

דוח מסכם לתוכנית מחקר מספר 05-0476-203

בעיות בפרתנוקרפיה של תמר

Analysis of parthenocarpic issues in date palms

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות ולמועצת הפירות

יובל כהן – המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
רעיה קוריציניסקי - המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
*וצ'סלב גורביץ - המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
*מאור שוחט - המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
*סקאר מאקש - המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
טריפּלר אפי – מו"פ ערבה דרומית
גדעון זיו – קיבוץ יטבתה

Yuval Cohen, Department of Fruit-Tree Sciences, ARO, P.O.B 6, Bet-Dagan 50250.

E-mail: vhyuvalc@volcani.agri.gov.il

Raia Korchinsky, Department of Fruit-Tree Sciences, ARO, P.O.B 6, Bet-Dagan 50250.

E-mail: rayakor@volcani.agri.gov.il

Vyacheslav Gurevich, Department of Fruit-Tree Sciences, ARO, P.O.B 6, Bet-Dagan 50250.

E-mail: vgurevich@hotmail.com

Maor Shochat, Department of Fruit-Tree Sciences, ARO, P.O.B 6, Bet-Dagan 50250.

E-mail: Maors@volcani.agri.gov.il

Sekar Makesh, Department of Fruit-Tree Sciences, ARO, P.O.B 6, Bet-Dagan 50250.

E-mail: sekarmakesh@gmail.com

Effi Tripler, Southern Arava Research Station, M. P. Hevel Eilat 88820, Israel.

E-mail: tripler@agri.huji.ac.il

Gideon Ziv, Kibbutz Yotvata, M. P. Hevel Eilat 88820, Israel.

* - סטודנטים ומשתלמים שהשתתפו בביצוע העבודה

מאי 2006

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים אינם מהווים המלצות למגדלים.

חתימת החוקר הראשי:

תקציר

הצורך בהרחבת מטעי התמרים הביא לפיתוח טכניקות לריבוי התמר בתרבית רקמה. כיום נטועים בארץ כ-30,000 עצי תרבית רקמה, המהווים את מרבית העצים הצעירים וכ-10% מכלל העצים הנטועים. אולם, בין שתילי תמר שמקורם מתרבית רקמה מתגלים עצים לא טיפוסיים רבים (כשליש מעצי התרבית הנטועים בארץ אובחנו עד היום כחריגים). שני פנוטיפים בולטים ונפוצים מאוד שהתגלו הינם חנטה לקויה (בזנים 'ברהי' ו'חלאס') ועיכוב צימוח (בזן 'מג'הול'). שכיחותם הרבה של העצים החריגים בין שתילי תרבית הרקמה מהווה מכשול להתפתחות הענף, ומגדלים רבים נמנעים מנטיעות חדשות של שתילים מתרביות רקמה. בעצים בהם החנטה לקויה, מרבית הפירות המתקבלים הינם פירות פרתנוקרפיים משולשים חסרי זרע. לפירות אלה אין כל ערך כלכלי. בחינה של פרחים וחנטים בעצים אלה גילתה שינויים מבניים בחלק מהפרחים והחנטים. בעצים צעירים נוצרו פרחים וחנטים מעוותים המכילים מספר רב (4-6) של אברים דמויי שחלות. בפרחי העצים החריגים נמצאו גם עיוותים מיקרוסקופים במבנה הצלקות. לאחר האבקת פרחים אלה באבקה תקינה הייתה צמיחתם של נחשוני גרגרי האבקה מהצלקת לשחלה ובתוך השחלה לקויים. נמצא שבמהלך התבגרות העצים חל שיפור מתמיד בחנטתם, ועצים רבים (למעלה מ-50% מהעצים) בני כ-11 שנים הניבו כמו עצים נורמאליים שמקורם בחוטרים. אפיון מולקולארי של שני הפנוטיפים העיקריים, זיהה שונות גנטית נמוכה מאוד בין עצים מחוטרים, עצים חריגים או עצים נורמאליים שמקורם במעבדות שונות ליצור שתילי תרבית רקמה. באנליזה שערכנו, לא מצאנו סמנים ייחודיים המאפיינים עצים ממקורות יצור מסוימים, או עצים מהפנוטיפים החריגים הנפוצים. לעומת זאת, התגלתה שונות רבה יחסית בדגמי מתילצית ה-DNA של העצים החריגים מתרבית הרקמה. תוצאות אלה מצביעות על אפשרות שהשונות הסומקלונלית נובעת משינויים אפיגנטיים בדפוסי המתילציה שחלו במהלך יצירת הצמחונים בתרבית. במהלך המחקר נקטנו גישה נוספת לאפיון הפנוטיפים החריגים באמצעות "גנים מועמדים" הקשורים לפנוטיפ חוסר החנטה: גנים הקשורים למבנה הפרח, שמוטציות בהם במינים אחרים הביאה לחוסר חנטה ולהתפתחות איברים דמויי שחלות, זוהו ושובטו בתמר. אנליזה של רצף הבסיסים, דפוסי המתילציה של ה-DNA ודגמי הביטוי של גנים אלו בפרחים מעצים נורמאליים לעומת פרחים מעצים חריגים בעלי בעיות חנטה נבחנת בימים אלה.

רשימת פרסומים

פרסומים בכתב:

כהן י., קורצ'ינסקי ר., טריפלר א., זיו ג., כהן ר. (2003) בעיות חנטה בעצי תמר מזן 'ברהי' שמקורם בתרבית רקמה. עלון הנוטע 57, 275-279.

כהן י., גורביץ ו., לביא א. (2004) הערכת השונות הגנטית בעצי תמר. עלון הנוטע 58, 278-281.

כהן י., קורצ'ינסקי ר., גורביץ ו., לביא א., טריפלר א. (2004, 2005, 2006) בעיות חנטה בעצי ברהי שמקורם בתרבית רקמה - ואריאציה גנטית או זכרון פיזיולוגי. שולחן תמר, סיכום תקצירי מחקרים בתמרים.

Cohen, Y., Korchinsky, R., Tripler E. (2004) Flower abnormalities cause abnormal fruit setting in tissue culture - propagated date palms (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Hort. Sci. & Biotech.*, 79, 1007-1013.

Gurevich, V., Lavi, U. and Cohen, Y. (2005) Genetic variation in date palms from offshoots and tissue culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130, 46-53.

Cohen, Y., Gurevich, V., Korchinsky, R., Tripler, E., Lavi, U. (2005) Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types. The international Workshop on True-To-Typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants, Marrakesh, Morocco.

Cohen, Y., Gurevich, V., Korchinsky, R., Shochat, M., Sekar, M., Lavi, U. (2006) Molecular and phenotypic characterization of somaclonal variation in date palm off-types originated from tissue culture. *Acta Horticulturae*, In Press.

הרצאות בע"פ:

בעיות חנטה בעצי תמר שמקורם בתרבית רקמה. (יוני 2003). סמינר משותף למכון למטעים ולמכון לגידולי שדה במרכז וולקני.

תוצאות ראשוניות מבדיקות ביו מולקולריות של ברהי ומגיהול (יולי 2003) סקירה בפני חברי ועדה מקצועית תמר.

בעיות חנטה בעצי 'ברהי' מתרבית רקמה (דצמבר 2003) סיכום מחקרי 2003 מו"פ ערבה דרומית, יטבתה. בעיות פרתנקורפיה בברהי (ינואר 2004) יום עיון למגדלי תמרים בעמקים הצפוניים, צמת.

שיטות מולקולריות לאפיון שונות גנטית בתמרים (פברואר 2004) הכנס השנתי של מגדלי התמרים, עין גדי. בעיות חנטה בעצי תמר שמקורם בתרבית רקמה (פברואר 2005) מו"פ ערבה דרומית - המרכז לחקר התמר. יום עיון למסירת דו"חות מחקרים.

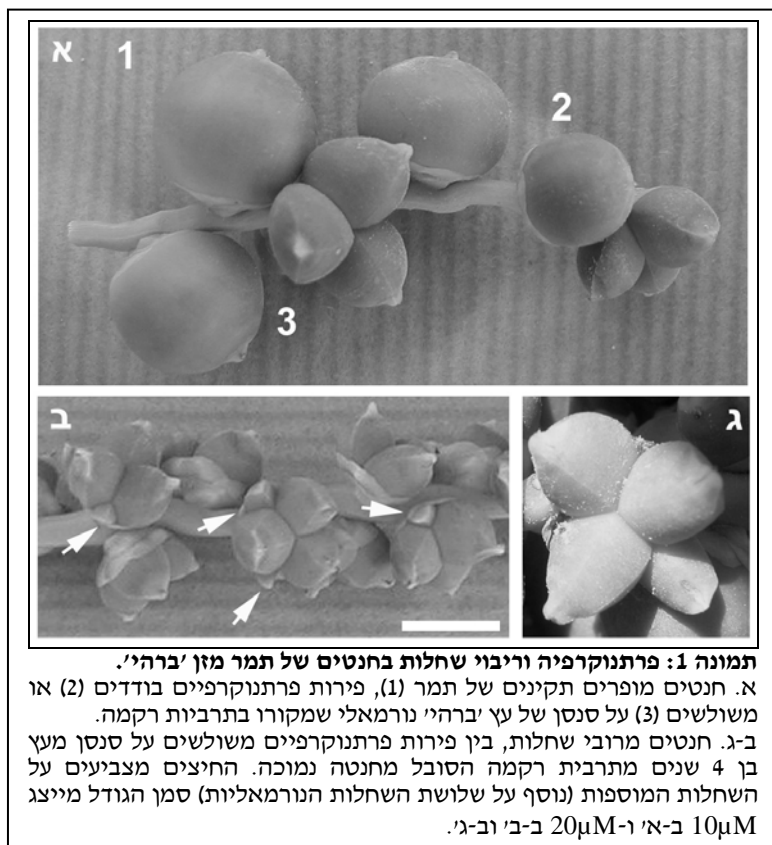
Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types (May, 2005). The International Workshop on True-To-Typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants, Marrakesh, Morocco.

Somaclonal variation in tissue culture originated date palm off-types - molecular characterization of the most common off-types (October 2005). The ISHS Symposium on Biotechnology of Temperate and Tropical Fruit Crops. Daytona Beach, Florida, USA.

Somaclonal variation in tissue culture originated date palms (February 2006). MARD (Multinational Agricultural Research and Development) Symposium on Biotechnology in Agriculture, Al-Salt, Jordan.

Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types (May 2006) Date Palm Integrated Crop Management. Agritech Exhibition, Tel Aviv, Israel.

ריבוי של התמר המצוי (*Phoenix Dactylifera L.*) נעשה באופן מסורתי על ידי חוטרים. שיטה זו מוגבלת לחוטרים בודדים הצומחים בשנים הראשונות מסביב לכל עץ (20-1 חוטרים לעץ בהתאם לזן). הצורך בהרחבת מטעי התמרים הביא לפיתוח טכניקות לריבוי התמר בתרבית רקמה. לשיטת ריבוי זו יתרונות רבים. כיום נטועים בארץ כ-30,000 עצי תרבית רקמה, המהווים את מרבית העצים הצעירים וכ-10% מכלל העצים הנטועים. אולם, בין שתילי תמר שמקורם מתרבית רקמה מתגלים עצים לא טיפוסיים. שני פנוטיפים בולטים ונפוצים מאוד התגלו בשנים האחרונות בין שתילי תרבית הרקמה: חנטה לקויה ועיכוב צימוח.



תמונה 1: פרטנוקרפיה וריבוי שחלות בחנטים של תמר מזן 'ברה'.
 א. חנטים מופרים תקינים של תמר (1), פירות פרטנוקרפיים בודדים (2) או משולשים (3) על סנשן של עץ 'ברה' נורמאלי שמקורו בתרביות רקמה.
 ב-ג. חנטים מרובי שחלות, בין פירות פרטנוקרפיים משולשים על סנשן מעץ בן 4 שנים מתרבית רקמה הסובל מחנטה נמוכה. החיצים מצביעים על השחלות המוספות (נוסף על שלושת השחלות הנורמאליות) סמן הגודל מייצג 10µM ב-א' ו-20µM ב-ב' וב-ג'.

חנטה לקויה: בארץ ניטעו למעלה מ-3,500 עצים מזן 'ברה' שמקורם ממספר מעבדות ליצור שתילי תרבית רקמה. לפחות 1,500 מהם מתאפיינים בבעיות חנטה. למאות עצים מהזן 'חלאס' שניטעו קיימת בעיה דומה. התופעה מקיפה אלפים רבים של עצים בעולם. בערב הסעודית לבדה ניטעו כ-100,000 עצים דומים. בעצים אלה מרבית הפירות המתקבלים הינם פירות פרטנוקרפיים משולשים חסרי זרע. לפירות אלה אין כל ערך כלכלי. בעצים צעירים רבים נצפית תופעה של יצירת פרחים וחנטים מעוותים המכילים מספר רב (4-6) של אברים דמויי שחלות (ראה תמונה 1). עצים רבים בעלי פנוטיפ זה נעקרו בשנים האחרונות ממטעי הארץ.

עיכוב צימוח: עצי 'מג'הול' רבים ממקור מסחרי מסוים, שרובו בתרבית רקמה בשיטת האמבריוגונה, נמצאו בעלי מופע ננסי אופייני. עצים אלה אינם מתפתחים כצפוי ונותרים קטנים מאוד גם לאחר 3-4 שנים של גידול. הם אינם פורחים בשלב בו עצים נורמאליים חונטים אשכולות ראשונים. בשנתיים האחרונות נצפו בחלק קטן מעצים אלה תפרחות ראשונות, ובהן, כפי שתואר בפנוטיפ חוסר החנטה בעצי הזן 'ברה', נמצאו חנטים פרטנוקרפיים מרובי שחלות. ההערכה היא שבארץ קיימים כ-10,000 עצי 'מג'הול' המאופיינים בעיכוב צמיחה. חלק ניכר מעצים אלה נעקר במהלך השנה האחרונה.

שני פנוטיפים אלו, שהיקפם בארץ מגיע לכשליש מכלל שתילי תרבית הרקמה שניטעו, אופייניים למעבדות תרבית רקמה מסוימות, ואינם נפוצים בשתילים שיוצרו במקורות אחרים. העצים משני פנוטיפים אלה מתגלים כפגומים רק מספר שנים לאחר נטיעתם בשדה או עם התבגרותם. בגלל החשיבות הרבה בפנוטיפ עיכוב הצימוח, ובעקבות זיהוי חנטים מרובי שחלות גם בעצים אלה, התחלנו בשנתיים האחרונות לעקוב ולאפיין גם את פנוטיפ עיכוב הצימוח בעצי הזן 'מג'הול'.

שכיחותם הרבה של העצים החריגים בין שתילי תרבית הרקמה מהווה מכשול להתפתחות הענף. למרות היתרונות הברורים בריבוי התמרים בתרביות רקמה, פחתה מאוד הנטיעה של שתילי תרבית רקמה בארץ,

הבדלים בין צמחים שיוצרו בתרבית רקמה וצמחי המקור מהם נוצרו התגלו במספר רב של מיני צמחים. תופעה זו, הנקראת שונות סומקלונלית (somaclonal variation), יכולה לנבוע משינויים גנטיים (מוטציות) או אפי-גנטיים (שאינם ברצף הבסיסים אך מביאים לדגם התבטאות גנים שונה). עבודה זו מאפיינת את מופע חוסר החנטה (ובמידה מסוימת גם את מופע הננסות) של עצי התמר החריגים, ברמות שונות: ברמה החקלאית של חנטת הפירות, ברמות המורפולוגית באפיון עיוותים בפרח ובפרי, ברמה הפיסיולוגית בבחינה מיקרוסקופית של תהליכי ההפריה, וברמה המולקולרית באפיון השונות הגנטית והאפי גנטית של העצים החריגים.

הניסויים והתוצאות בתקופת הדוח

1. סקר חנטה בחלקות נבחרות של עצי 'ברה' שמקורם בתרבית רקמה או בחוטרים ברחבי הארץ
 בשנת 2003 נבחנו נתוני החנטה במספר חלקות תרבית רקמה, ממקורות יצור שונים (בעבודה זו מוגדרים מקורות התרבית השונים כ- D-A), מגילאים שונים במספר משקים בארץ (טבלה I). כביקורת נבחנה החנטה גם בעצים שמקורם מחוטרים בגילאים דומים. נבחנו 3-6 סנסנים ב-3-6 אשכולות מייצגים (2 אשכולות בכל אחד משלושת דורי הפריחה) במספר עצים מייצג בכל חלקה. אחוז הפרחים שנשרו, החנטה, אחוז הפירות הפרתנוקרפיים הבודדים, המשולשים וחנטים מרובי השחלות נמדדו. התוצאות מסוכמות בטבלה I. נמצאו חלקות רבות בהן העצים אינם חונטים בעילות. בעצים אלה התקבלה תופעה של ריבוי פירות פרטנוקרפיים משולשים, הנשארים על הסנסנים. תופעה זו מתרחשת בחלק מהעצים מתרבית רקמה,

מטע	מקור וגיל העצים	מספר העצים שנבחנו	פירות רגילים	פירות פרטנוקרפיים בודדים	פירות תאומים	שלשות	פירות מרובי שחלות	נשירות
יטבתה	חוטר 1992	9	^B 59.29	3.14	0.29	^{DE} 1.91	^B 0.00	^{ABC} 35.37
יטבתה	חוטר 1998	10	^{AB} 66.73	0.23	0.23	^{CDE} 5.18	^B 0.00	^{ABC} 27.63
בית זרע	חוטר 1992	4	^A 84.23	0.00	0.67	^E 0.00	^B 0.00	^{CD} 15.23
יטבתה	מקור A 1993	36	^{CD} 34.69	3.18	0.97	^{CDE} 18.64	^B 0.10	^A 42.41
מעגן	מקור A 1993	10	^{BC} 53.21	0.00	0.68	^{CDE} 14.99	^B 0.00	^{ABC} 31.13
יטבתה	מקור A 1998	40	^E 7.37	2.51	0.48	^{BC} 34.81	^A 31.17	^{ABCD} 23.67
יטבתה	חוטר מעצי מקור A 1993	59	^{DE} 18.05	4.61	0.23	^{BCD} 31.80	^B 3.27	^A 42.03
יטבתה	מקור B 1998	39	^{CD} 35.41	4.60	0.47	^{CDE} 23.40	^B 3.62	^{ABC} 32.51
מעגן	מקור B 1997	10	^B 62.35	0.00	0.37	^{CDE} 11.40	^B 0.00	^{ABCD} 25.88
בית זרע	מקור B 1997	6	^{BC} 55.06	0.00	0.18	^{CDE} 22.42	^B 0.22	^{BCD} 22.12
בית זרע	מקור B 1999	8	^{DE} 26.02	2.16	1.00	^{AB} 54.08	^B 0.91	^{CD} 15.84
בית זרע	מקור D 2000	9	^E 11.58	0.78	1.06	^A 78.66	^B 0.19	^D 7.74
יבניאל	מקור C 1999	12	^{BC} 50.05	0.00	1.04	^{BCDE} 26.66	^B 0.31	^{BCD} 21.94

(A), אולם, במידה מסוימת, היא זוהתה גם בשתילי תרבית רקמה מכל מקורות היצור האחרים שניטעו בארץ. ככלל, רמות החנטה של עצי 'ברהי' בעצים צעירים שמקורם בתרבויות רקמה היו נמוכות יחסית לחנטת עצים מקבילים שמקורם מחוטרים.

2. השוואת נתוני חנטת עצי 'ברהי' מתרבית רקמה בחלקות נבחרות לאורך מספר שנים

מידת החנטה של העצים השונים נבחנה באופן מקיף במטע יטבתה, בו קיימות חלקות 'ברהי' ותיקות וצעירות מתרבית רקמה (ממקור יצור A) הסובלות כבר מספר שנים מבעיות חנטה, וכן חלקות 'ברהי' ממקורות יצור אחרים או מחוטרים. במטע יטבתה הוערכה בשנים 2000-2001 מידת החנטה, ובשנים 2002, 2003 ו-2004 נבחנה החנטה באופן מקיף. בחלקה נוספת, בבית זרע שניטעה בשנת 1994 נספרו בשנים 2000-2002 (בהמשך המחקר נעקרה חלקה זו) מספר התפרחות שחנטו ליצירת אשכולות מסחריים מתוך סך כל התפרחות שפרחו על העץ. בשתי החלקות התקבלו מפות חנטה של כל עצי החלקה. בשתי החלקות נתוני החנטה מצביעים על שונות רבה מאוד בין העצים. קיימים עצים בעלי חנטה טובה יותר בכל השנים, ועצים אחרים שנוטים לחנוט גרוע. באופן כללי, נמצא שבמהלך השנים 2000-2003 חל בשתי החלקות שיפור מתמיד בחנטת העצים. נתונים אלה מייצגים את המתרחש במטעים נוספים בארץ.

טבלה II (א) מציגה סיכום רב שנתי של כלל נתוני החנטה בחלקות השונות ביטבתה. לעומת 2002 ו-2004, בשנת 2003 הייתה רמת החנטה הכללית במטע יטבתה נמוכה יותר, תופעה שנבעה כנראה מתנאי מזג האוויר, והתבטאה בחלקות השונות שנבחנו. בחלקת עצי ה'ברהי' הותיקה (מקור A, נטיעת 1993) שסבלה במשך שנים מבעיות חנטה, נמצאה גם בשנת 2004 עלייה כללית ברמת החנטה. באופן כללי, נמצא שבמהלך השנים 2000-2004 חל שיפור בחנטת העצים. רמת היבול של עצים רבים (למעלה מ-50% מהעצים) בני כ-11 שנים ושל עצים נורמאליים שמקורם בחוטרים הייתה דומה. יחד עם זאת, הייתה שונות רבה מאוד בין העצים. נמצא מתאם בין עצים בעלי חנטה טובה יותר במהלך השנים, ועצים אחרים שנוטים לחנוט גרועה.

א. רמת החנטה של פירות תקינים בעצי 'ברהי' ממקורות שונים				
מקור העצים	שנת נטיעה	2002	2003	2004
מקור יצור A	1993	44.93	34.69	51.97
מקור יצור A	1998	13.20	7.37	9.18
חוטרי של עצים מ מקור יצור A	2000		18.05	26.24
מקור יצור B	1998	46.09	35.41	48.98
חוטרים	1990-92	71.99	59.29	68.73
חוטרים	1998		66.73	60.43
ב. הופעת חנטים מרובי שחלות בעצי 'ברהי' ממקורות שונים				
מקור העצים	שנת נטיעה	2002	2003	2004
מקור יצור A	1993	0.00	0.10	0.00
מקור יצור A	1998	22.44	29.53	19.20
חוטרי של עצים מ מקור יצור A	2000	-	3.27	0.95
מקור יצור B	1999	0.32	3.62	0.00
חוטרים	1990-92	0	0	0
חוטרים	1998	0	0	0

טבלה II: השוואת נתוני החנטה (א) ורמת החנטים מרובי השחלות (ב) בחלקות שונות במטע יטבתה בשנים 2002-2004. הנתונים מוצגים באחוזים מכלל החנטים שנבדקו בעצים השונים בחלקה. הנתונים משנת 2002 הינם מסקר מצומצם בחלק מהחלקות הנבדקות, ומשנים 2003-2004 מסקר מקיף של עצים רבים בכל חלקה וחלקה.

A, שניטעה בשנת 1998), השיפור ברמת החנטה היה

קטן, וגם בשנת 2004 לא התקבל כמעט יבול. בחלקה בגיל דומה ממקור ייצור אחר (מקור B, נטיעת 1998), הייתה רמת החנטה טובה בהרבה, אם כי היא עדיין הייתה נמוכה יותר מהחנטה מעצים בגיל דומה שמקורם בחוטרים. גם בחלקה זו התגלו מספר עצים שסבלו מרמות חנטה נמוכות מאוד. באופן ספציפי, בעצים אלו נמצאה פעמים רבות גם תופעה של חנטים מרובי שחלות.

3. אפיון תופעת ריבוי שחלות בפרחים וחנטים של עצי 'ברהי' מתרבית רקמה

בעיות חנטה יכולות לנבוע מליקויים מבניים בפרח. בחינה של פרחים וחנטים בעצים לקויי חנטה גלתה שינויים מבניים בחלק מהפרחים. בחלק מהעצים ממקור תרבית רקמה, נוצרו פרחים וחנטים מעוותים המכילים מספר רב (4-6) של אברים דמויי שחלות (במקום שלוש שחלות בפרח התקין). פירות מרובי שחלות אלה מתפתחים בדומה לפירות הפרתנוקרפיים המשולשים. תופעה זו נפוצה מאוד בחלק מעצי התרבית הצעירים (טבלות I ו-II). במטע צעיר ביטבתה (נטיעת 1998 ממקור A) נמצאה התופעה בשנת 2003 בכ-30% מכלל הפרחים ובשנת 2004 בכ-19% מכלל הפרחים. בעצים בוגרים יותר (נטיעת 1993), מאותו המקור, לא התגלתה כמעט תופעת ריבוי השחלות. אולם, מתברר שגם בעצים אלה נצפתה תופעה זו בצעירותם.

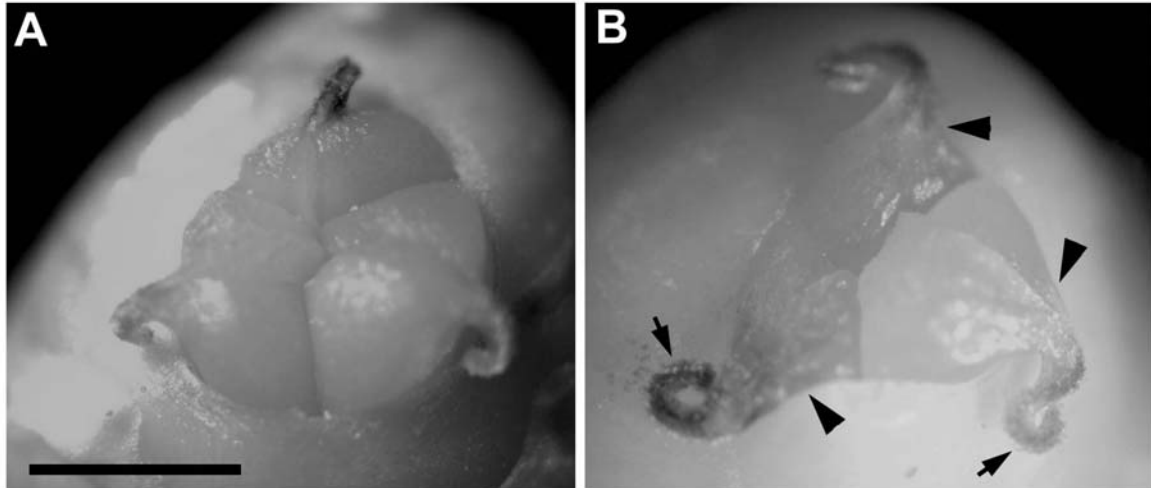
תופעה ריבוי השחלות התגלתה במידה מסוימת גם בעצי תרבית רקמה מכל מקורות הייצור האחרים בארץ, בעצים בעלי בעיות חנטה וברמה של עד כ-5% מהחנטים. תופעת ריבוי השחלות התגלתה גם בעצי תמר מזן אחר, 'חלאס', שיוצרו בתרבית (מקור A, נטיעת בית-זרע 1994 ובמשקים אחרים), אך בעוד בזן 'ברהי' אברים אלה נראים כ"שיניים" או שחלות מנוונות, בחנטי ה'חלאס' הם דומים בגודל ובצורה לשלוש השחלות שבדור הפנימי.

4. אפיון החנטה וריבוי השחלות בחוטרים של עצים חריגים שמקורם בתרבית רקמה

בשנים 2003-2004 עקבנו אחרי החנטה וריבוי השחלות בחוטרים (שניטעו בשנת 2000) של עצים מחלקת תרבית הרקמה הוותיקה עם היסטוריית בעיות החנטה (מקור A, נטיעת 1993, ראה לעיל). למרות שב"עצי האם" לא נמצאו בשנים האחרונות חנטים מרובי שחלות, מרבית החוטרים של עצים אלה סובלים מחנטה נמוכה ומריבוי שחלות. גם בחלקה זו, כמו בחלקות הבעייתיות האחרות, הייתה שונות רבה מאוד ברמת חנטת העצים ובשכיחות תופעת ריבוי השחלות. חוטרי עצים אלה סומנו בנטיעתם, כך שיש בידנו מידע על "עץ האם" הספציפי ממנו נלקח כל חוטר. באופן מפתיע, נמצא יחס ישיר בין רמות חנטת "עצי האם" הספציפיים וחנטת החוטרים שהוטררו מעצים אלה, ויחס הפוך בין רמת ריבוי השחלות בעצי ה"בת" ובין רמת החנטה בעצי ה"אם". בעצים אלה, כמו בעצי התרבית החריגים עצמם, נמצא שיפור ברמת החנטה, וירידה ברמת ריבוי השחלות, במהלך שתי שנות המעקב (טבלות I ו-II).

5. בחינה מיקרוסקופית לזיהוי עיוותים מבניים בפרחי ברהי מתרבית רקמה בהם לא נראה ריבוי השחלות

תופעת ריבוי השחלות מרמזת על בעיות מבניות בפרח הגורמות לחוסר חנטה. כדי להבין את בעיות החנטה באותם פרחים שאינם מרובי שחלות ערכנו בחינה מיקרוסקופית של פרחי תרבית. תפרחות שלמות וסגורות של עצי 'ברהי' מתרבית (נטיעת יטבתה 1993 ו-1998, מקור יצור A) או עצי חוטרים בגיל דומה הועברו למעבדה. מבנה הפרחים נבדק במיקרוסקופ סטריאוסקופי. נבחנו עיוותים בולטים במבנה השחלה. בנוסף, בעצי התרבית זוהתה התעבות של איזור בסיס הצלקת וחיבורה לשחלה (תמונה 2). בצענו בחינה כמותית של העיוותים בפרחים של עצי תרבית בעלי בעיות חנטה לעומת עצי חוטרים. צלקות נורמאליות, מסובבות במידה קלה, או צלקות מעוותות ומפותלות לכיוונים שונים, נספרו בנפרד. רמה גבוהה של עיוותים בצלקות התגלתה במרבית הפרחים בעצי התרבית, בעוד בפרחי עצי החוטרים מבנה כל הצלקות היה



תמונה 2: עיוותים בצלקות פרחי ברהי מתרבית רקמה. - פרח נורמאלי מחוטרים; B - פרח בעל צלקות מעוותות (ללא ריבוי שחלות) ממקור A, נטיעת 1993). חצים מצביעים על עיוותים ופיתולים של הצלקות. ראשי החץ מצביעים על מעבר ההדרגתי בין בסיס הצלקת והשחלה. סרגל הגודל מסמך 1 מ"מ.

אחוז העיוותים המבניים בצלקות			סה"כ הצלקות שנבדקו	מספר עצים שנדגמו בחלקה	אחוז חנטה בעצי החלקה בשנת 2003	חלקת עצים
צלקות מעוותות	צלקות מסובבות במקצת	צלקות תקינות				
94.9	0	5.1	99	7	34.7	מקור A 1993
94.6	0	5.4	93	4	7.4	מקור A 1998
0	55.0	45.0	60	2	59.3	חוטרים 1992
0	83.3	16.7	12	2	66.7	חוטרים 1998

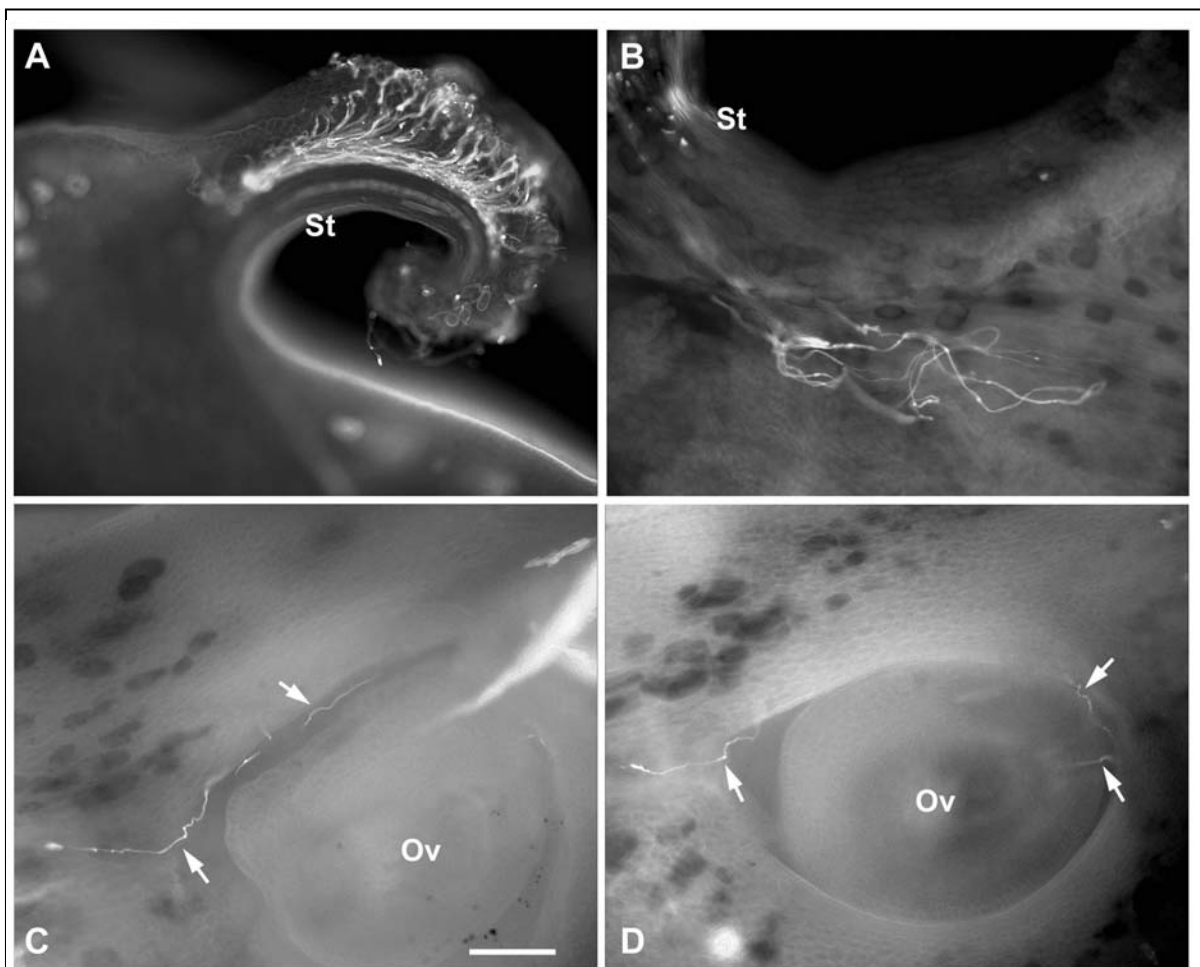
טבלה III: עיוותים מבניים בצלקות בעצי ברהי ממקור A לעומת עצי חוטרים במטע יטבתה בשנת 2003: פרחים נדגמו מעצים שונים במטע יטבתה. הצלקות נבחנו לפי רמת העיוותים המבניים שהובחנו בהן (צלקות נורמאליות, מסובבות במידה קלה, או מעוותות ומפותלות לכיוונים שונים).

III. בבחינה איכותית של עצמת העיוות והפיתול

של הצלקות, רמת העיוותים בעצי התרבית הצעירים יותר להם היו גם שחלות מוספות היתה גבוהה יותר יחסית לעצים הבוגרים בהם לא נצפו איברים דומים מרובי שחלות (תוצאות לא מוצגות).

6. צמיחת הנחשון בצלקת ובשחלה לאחר האבקה של פרחי ברהי מבודדים

מציאת הבדלים מבניים בפרחי תרבית הרקמה מרמזים על תקלות בתהליך ההפריה. כדי להבין את מנגנון חוסר החנטה דרוש לבחון את יכולתו של גרגר האבקה לנבוט ולהפרות את הביציות בפרחים אלה. לצורך זה פיתחנו מערכת לבחינת תהליכי צמיחת הנחשון בתוך השחלה, בתנאים מבוקרים. תפרחות טריות וסגורות של עצי 'ברהי' מתרבית רקמה (נטיעת יטבתה 1993 ו-1998, מקור יצור A), או עצים מחוטרים בגיל דומה, נפתחו במעבדה. סנסנים שלמים הועברו למבחנה המכילה מים בבסיסה. הפרחים הואבקו באבקת תמרים בעזרת מכחול והושארו להדגרה לפרקי זמן משתנים (0-48 שעות) בטמפרטורה של 28 מעלות צלסיוס. לאחר הבהרה של רקמת הפרחים בתמיסה של 10N NaOH, השחלות הופרדו תחת בינוקולר, ונחתכו לאורכן. הן נצבעו ב-0.2% Anillin Blue הצובע באופן ייחודי את הנחשונים, ונבחנו מיקרוסקופית תחת תאורת UV (תמונה 3). בחינה כמותית של צמיחת נחשוני גרגרי האבקה בוצעה על מספר רב של שחלות (בעצים ממקור A נטיעת יטבתה 1993 ו-1998 ובשחלות מעצי חוטרים בגודל דומה) כמפורט בטבלה IV. בעצים מתרבית רקמה בעלי בעיות חנטה הייתה רמה גבוהה של נחשונים (כ-50%) שצמיחתם נפסקה



תמונה 3: צמיחת הנחשון בהאבקה פרחי ברהי מבודדים במעבדה. נבדקה יכולתו של גרגר האבקה לנבוט ולצמוח לתוך הצלקת ולשחלה של הפרח. A - נביטה נורמאלית של גרגרי האבקה על צלקת של פרח ממקור חוטרים; B - נחשוני גרגרי האבקה יוצרים כעין פקק של נחשוניים בבסיס הצלקת או בחלקה העליון של השחלה. לעומתם, בפרחים מעצי חוטרים גרגרי האבקה נובטים עמוק לתוך השחלה (C) וחודרים לביצית (D). St - צלקת; Ov - ביצית, ראשי החץ מדגישים את מעבר הנחשון. סמן הגודל מייצג $100 \mu\text{m}$.

(B). לעומת זאת, באחוז גבוה של שחלות מעצי חוטרים נצפתה

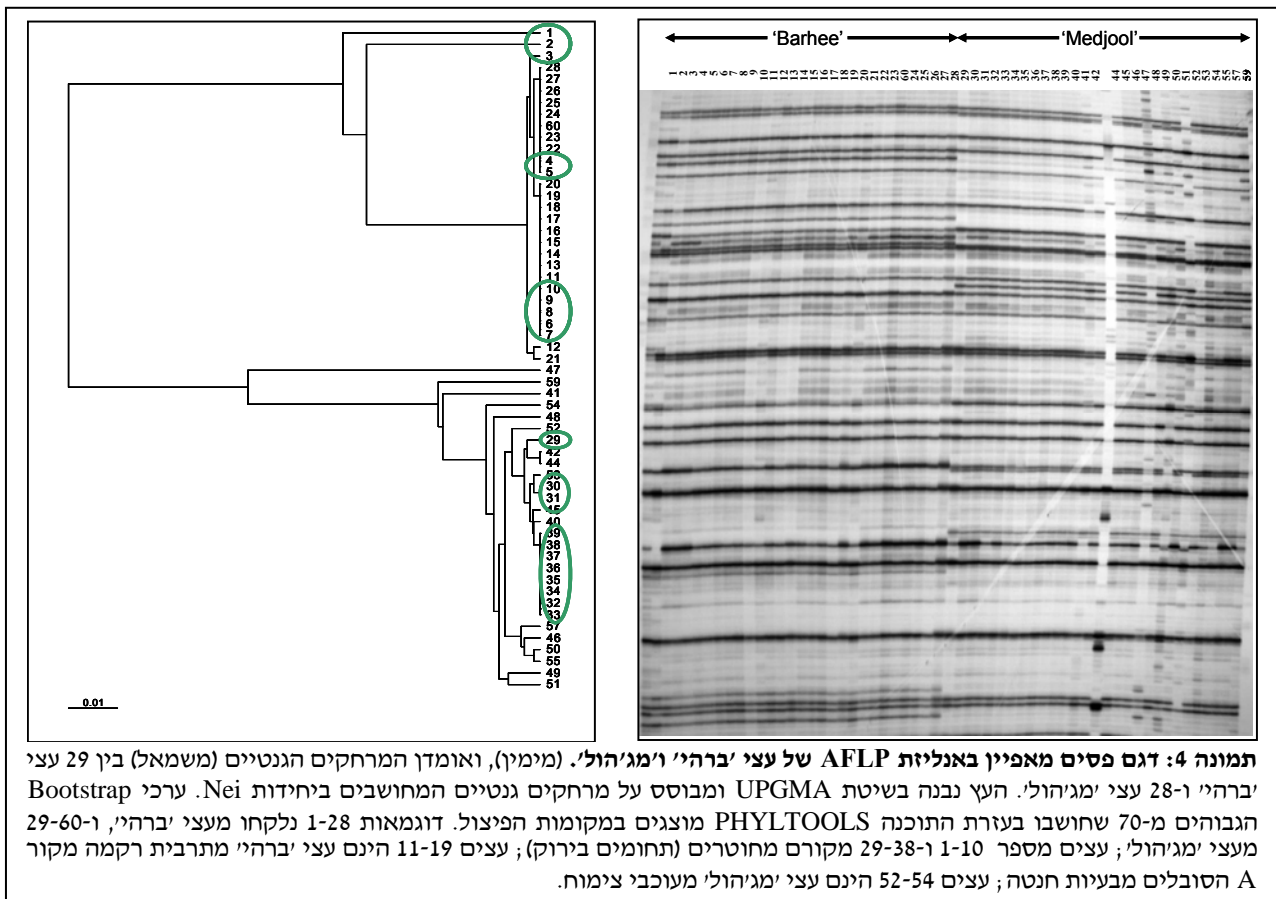
צמיחה של הנחשוניים עמוק לתוך השחלה, וחלק ניכר מהם אף צמח עד לאיזור הביצית (תמונה 3, D-C). תוצאות אלה הינן בהתאמה לרמות העיוותים שנמצאו בפרחי העצים מהחלקות השונות (טבלה II), ולנתוני החנטה הממוצעים של חלקות אלה. התוצאות מצביעות על כך שהעיוותים בבסיס הצלקת מהווים מכשול

אחוז צמיחת הנחשוניים בצלקת ובשחלה				סה"כ הצלקות שנבדקו	מספר עצים שנבדקו	אחוז חנטה בעצי החלקה בשנת 2003	חלקת עצים
באיזור הביצית	לתוך השחלה	"פקק" בבסיס הצלקת	מוגבלת לצלקת				
24.1	27.8	7.4	40.7	54	7	34.7	מקור A 1993
35.3	17.6	0	47.1	17	4	7.4	מקור A 1998
54.5	36.4	0	9.1	33	2	59.3	חוטרים 1992
0	100	0	0	4	2	66.7	חוטרים 1998

טבלה IV: צמיחת נחשון גרגרי האבקה בצלקות ושחלות מעצי ברהי מתרבותית רקמה בעלי בעיות חנטה ומחוטרים. פרחי 'ברהי' מעצי תרבות ומחוטרים ממטע יטבתה הואבכו בעזרת מכחול. לאחר הדגרה של 24-48 שעות הפרחים קובעו בתמיסת קיבוע. השחלות הופרדו תחת בינוקולר, ונחתכו לאורכן. הן נצבעו ב-Anillin Blue וצמיחת נחשוני גרגרי האבקה נבחנה תחת מיקרוסקופ פלואורסנטי. מידת צמיחת הנחשוניים לתוך הצלקת ולכיוון הביצית הוערכה בכל אחת מהשחלות.

7. איפיון השונות הגנטית בעצי תרבית הרקמה

במהלך העבודה בחננו את השונות הגנטית של עצי תמר ממקורות יצור שונים בשיטה של AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism). נבחנו כ-30 עצי תמר מזן 'ברהי' וכ-30 עצי 'מגיהול', שמקורם בחוטרים או בתרביות רקמה ממקורות יצור שונים. מדגם זה כלל עצי 'ברהי' שסבלו בעיות חנטה (ממקור יצור A) ועצי 'מגיהול' מעוכבי צימוח (ממקור יצור F). גיל מאפיין של אנליזה השונות הגנטית בין עצי ה'ברהי' וה'מגיהול' שנבדקו מוצג בתמונה 4 (מימין). נבחנו למעלה משלוש מאות בנדים ובאמצעותם נבנה עץ פילוגנטי (דנדרוגרם) (תמונה 4, משמאל). טבלה V מסכמת את תוצאות האנליזה הגנטית שהתקבלו בעצי התמר מהזנים 'ברהי' ו'מגיהול' ממקורות הייצור השונים. השונות הגנטית שהתקבלה בין עצי הזן 'ברהי' הייתה נמוכה ביותר, פרט לשני עצים צעירים שמקורם בחוטרים, בהם נמצאה שונות גנטית רבה (עצים מספר 1 ו-2 בתמונה 4), והינם כנראה זריעים שנלקחו בטעות בחוטרים. פרט לעצים אלה נמצאה שונות גנטית נמוכה מאוד בין העצים האחרים שמקורם מחוטרים והעצים שמקורם במעבדות שונות ליצור שתילי תרבית רקמה. גם בין עצי הזן 'מגיהול' שנבחנו היה עץ אחד חריג מאוד בדפוס הפסים שלו (עץ מספר 47 איור 5). עץ זה היה גם חריג פנוטיפית וניכר בעלים בצבע ובצורה לא אופייניים לזן. לעומת רמת השונות הגנטית הנמוכה מאוד ב'ברהי', נמצאה שונות גנטית רבה יותר בזן 'מגיהול' בין עצי תרבית הרקמה מכל מקורות הייצור שנבחנו. שונות מוגברת זו הופיעה במידה שונה בין עצים מכל מקורות הייצור בתרבית רקמה. אולם, באנליזה המוגבלת שערכנו, לא מצאנו סמנים ייחודיים המאפיינים עצים ממקורות יצור מסוימים, או עצים בעלי פנוטיפים חריגים של בעיות חנטה וריבוי שחלות ב'ברהי' או עיכוב צימוח



זן	מקור ריבוי	מספר העצים שנבדקו	מספר פולימורפיים שנמצאו	אחוז הפסים הפולימורפיים מכלל הפסים	ערכי AGD**
'ברה'	OS	10 (*8)	50 (*2)	15.77 (*0.63)	11.88(*0.78)
'ברה'	TC (A)	7	2	0.63	0.57
'ברה'	TC (B)	4	1	0.31	0.50
'ברה'	TC (C)	3	0	0	0.00
'ברה'	TC (D)	5	0	0	0.00
כללי' ברה'		29 (*27)	50 (*4)	15.77 (*1.26)	4.69 (*0.79)
'מגהול'	OS	10	3	0.94	0.75
'מגהול'	TC (E)	4	15	4.73	7.83
'מגהול'	TC (B)	9 (*8)	68 (*27)	21.45 (*8.52)	18.66 (*9.32)
'מגהול'	TC (F)	3	11	3.47	7.33
'מגהול'	TC (G)	2	3	0.94	3.00
כללי' מגהול'		28 (*27)	84 (*43)	26.49 (*13.56)	9.21 (*5.97)

טבלה V : אפיון דגם הפסים של עצי 'ברה' ו'מגהול' על בסיס אנליזה ה-AFLP. הערכים השונים בטבלה מהווים סיכום התוצאות שהתקבלו ע"י שימוש בחמישה צירופים של תחלים סלקטיביים. הדוגמאות חולקו לקבוצות לפי הזן ומקור הריבוי. (OS-חוטרים; TC – תרבית רקמה).

* אנליזה ללא הפרטים החריגים (דוגמאות מס' 1, 2 בזן 'ברה', ו-47 בזן 'מגהול'). ערכים אלה מופעים בסוגריים.

** הערך AGD (Average Gene Diversity) מתאר את ממוצע הפסים הפולימורפיים בין כל זוג פרטים בכל אוכלוסייה נבדקת.

אנליזה גנטית נוספת בוצעה בשיטת RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). נבחנו שני עצים נורמאליים שרובו מחוטרים וחמישה עצים בעלי פנוטיפ חריג שרובו בתרבית רקמה מכל אחד מהזנים 'ברה' ו'מגהול'. השתמשנו ב-59 תחלים בני 10 בסיסים והתקבלו כ-300 פסים שונים. בשני הזנים הפולימורפיזם בתוך הזן הנובע בעיקר מהעצים החריגים, ולעומת זאת השונות בין החוטרים הייתה קטנה מאוד. נמצאה רמה נמוכה יותר של פולימורפיזם בין עצי 'ברה' שרובו בתרביות רקמה לעומת עצי 'מגהול' שרובו בתרביות רקמה. כמו באנליזה ה-AFLP, באף אחד משני הזנים והפנוטיפים שנבדקו לא נמצא פס המאפיין ומבדיל את כל העצים החריגים מהחוטרים.

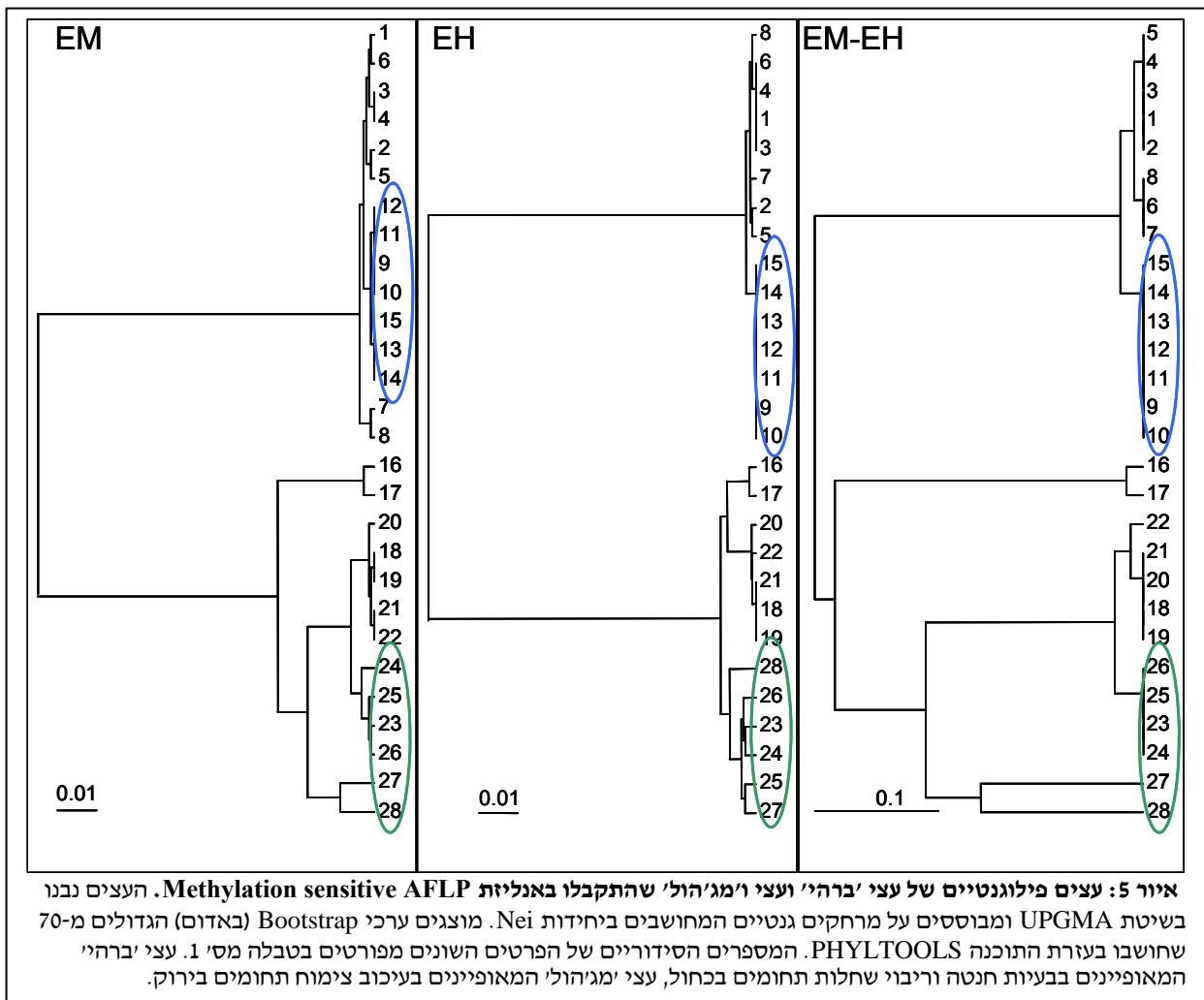
8. אפיון הבדלים בדפוסי המתילציה של ה-DNA בעצים החריגים

בעבודה זו בחננו, פרט לשונות הגנטית גם שונות אפי-אנטית הנובעת מהבדלים בדפוסי המתילציה של ה-DNA. אפיון דגמי המתילציה ב-DNA נעשה בשיטת Methylation Sensitive AFLP: דוגמאות DNA הופקו מעלים של 15 עצים מהזן 'ברה' אשר כללו עצים נורמליים שמקורם בחוטרים או בתרבית רקמה ועצים מתרבית רקמה המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות, ו-13 עצים מהזן 'מגהול' שכללו עצים נורמאליים מחוטרים ומתרבית ועצים מעוכבי צימוח מתרבית רקמה. לכל דוגמא נעשו שתי ריאקציות חיתוך-ליגציה נפרדות, אחת באמצעות האנזימים EcoRI ו-HpaI והשניה באמצעות EcoRI ו-MspI. שתי הריאקציות שימשו לאנליזות מקבילות של AFLP. האנזימים HpaI ו-MspI מזהים את אותו רצף בסיסים אך בעלי ספציפיות שונה למתילציה של אתר החיתוך. דגם הפסים שהתקבל באמצעות שבעה צירופים של תחלים סלקטיביים, תורגם למטריצה בינארית. נתונים אלה נבחנו בשלוש אנליזות שונות: EM, EH, ו-(EM-EH). אנליזות EM ו-EH מבוססות על דגמי פסים שנוצרו באמצעות השימוש באנזימי HpaI+MspI ו-EcoRI+HpaI בהתאמה ואנליזת (EM-EH) מבוססת על הפרשים בין פסי EM ופסי EH לכל דוגמא בכל אתר. סך כל הפסים באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH) היה 359, 331 ו-58 בהתאמה. סיכום התוצאות מפורט בטבלה VI.

זן	מקור ריבוי	פנוטיפ	מספר העצים שנבדקו	מספר פולימורפיים			פסים			אחוז פולימורפיים			ערכי AGD		
				EM	EH	EM-EH	EM	EH	EM-EH	EM	EH	EM-EH	EM	EH	EM-EH
'ברה'	OS	חנטה טובה	6	4	2	1	1.11	0.60	1.72	1.73	0.86	0.33			
'ברה'	(B)TC	חנטה טובה	2	1	1	0	0.28	0.30	0.00	1	1	0			
'ברה'	TC (A)	חנטה לקויה וריבוי שחלות	7	1	0	0	0.28	0.00	0.00	0	0	0			
'כלי ברה'			15	7	5	3	1.95	1.51	5.17	2.66	1.79	1.4			
'מג'הול'	OS	נורמלי	2	3	2	1	0.84	0.60	1.72	3	2	1			
'מג'הול'	TC (B)	נורמלי	5	2	2	1	0.56	0.60	1.72	1	0.8	0.4			
'מג'הול'	TC (F)	עיכוב צימוח	6	25	12	19	6.96	3.63	32.76	10.73	5	8.13			
'כלי מגהול'			13	47	24	35	13.1	7.25	60.34	14.56	7.46	10.1			

טבלה VI: סיכום דגם הפסים של אנליזת Methylation Sensitive AFLP בעצי 'ברה' ו'מג'הול'. הדוגמאות חולקו לקבוצות לפי הזן ומקור הריבוי. (OS-חוטרים; TC – תרבית רקמה (בסוגרים מקור תרבית הרקמה)). EM - אנליזה של דגם הפסים המתקבל אחרי חיתוך ב-EcoRI ו-HpaI; EH - אנליזה של דגם הפסים המתקבל אחרי חיתוך ב-EcoRI ו-MspI; (EM-EH) - אנליזה של דגם ההפרשים בין פסי EM ו-EH. AGD - מתאר את ממוצע הפסים הפולימורפיים בין כל זוג פרטים בכל אוכלוסייה נבדקת.

בתוך עצי 'ברה' נמצא שעור נמוך יחסית של פסים פולימורפיים באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH) (1.95%, 1.51% ו-5.17% בהתאמה). רוב הפסים הפולימורפיים נמצאו בחוטרים (1.11%, 0.6% ו-1.72% של פסים פולימורפיים בשלושת האנליזות הני"ל). בתוך שאר עצי 'ברה', אחוז הפסים הפולימורפיים בכל האנליזות היה לכל היותר מחצית מזה שנמצא בחוטרים. ערכי ה-AGD שנמצאו בחוטרים באנליזה EH היו: 0.86; 1; 0 בקבוצות OS; TC (A) ו-TC (B) בהתאמה. בשאר האנליזות, ערכי ה-AGD הגבוהים ביותר נמצאו בחוטרים. בתוך עצי 'מג'הול' נמצא אחוז גבוה יחסית של פסים פולימורפיים באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH) (13.1%, 7.25% ו-60.34% בהתאמה). רוב הפסים הפולימורפיים נמצאו בעצים מעוכבי הצימוח (TC (F)) (6.96%, 3.63% ו-32.76% בשלושת האנליזות בהתאמה). בתוך קבוצות החוטרים (OS) ותרבויות הרקמה התקינות (TC (B)) של 'מג'הול' נמצא אחוז נמוך יחסית של פסים פולימורפיים (לכל היתר 1.7%). העצים הפילוגנטיים של 15 דוגמאות 'ברה' ו-13 דוגמאות 'מג'הול' באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH) מוצגים באיור 5. בכל האנליזות המרחק בין הזנים היה גדול מאוד ביחס למרחקים בין העצים השייכים לאותו זן. כמו כן ההבדלים בתוך עצי 'מג'הול' היו גדולים ביחס להבדלים בתוך עצי 'ברה'. ההבדל בולט במיוחד באנליזות EM ו-(EM-EH). בזן 'ברה' ישנה הפרדה בין העצים הנורמלים לעצים המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות, אך הפרדה זו אינה מובהקת באנליזות EM (Bootstrap נמוך מ-70). בזן 'מג'הול' בכל האנליזות הייתה הפרדה בין העצים שמקורם מחוטרים (מס' 16, 17) לבין העצים שמקורם מתרבויות, אך הפרדה זאת לא הייתה מובהקת באנליזות EH (Bootstrap נמוך מ-70). הפרדה בין העצים



רק באנליזה EH. בשאר האנליזות, (Bootstrap=100)

לא נראית ההפרדה ברורה של פנוטיפים אלו.

אנליזה (EM-EH) מאפשרת זיהוי של אתרים ממותלים והמי-ממותלים בגנום שמזוהים באופן יחודי על ידי האנזימים *MspI/HpaII*. האחוזה הממוצע של אתרים ממותלים ב'ברהי' ובי'מג'הול' הוא 12.18% ו-8.37% בהתאמה. יחד עם זאת, בעצי 'ברהי' בעלי פנוטיפ נורמלי, האחוזה הממוצע של אתרים ממותלים גדול ב-0.9% מזה של העצים המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות (12.58%-ו-11.72% בהתאמה). בי'מג'הול' האחוזה הממוצע של אתרים ממותלים בעצים נורמליים ועצים מעוכבי צימוח היה 8.59%-ו-8.11% בהתאמה. יתכן שלירידה זו ברמות המתילציה של ה-DNA, יש משמעות ביצירת הפנוטיפים הנפוצים.

9. שיבוט גנים מועמדים הקשורים לפנוטיפים החריגים הנפוצים

שיטות ה-AFLP וה-Methylation sensitive AFLP משמשות לבחינת השונות הגנטית והאפי גנטית. שיטות אלו דוגמות את כלל הגנום ומאפשרות מציאת סמנים מבדילים. ניסיונותינו להעלות סמנים ספציפיים המבדילים בין עצי תמר נורמאליים ועצים חריגים מתרבית רקמה לא הצליחו. לגישות אלו חסרון ביכולת לזיהוי של שינויים נקודתיים שהתרחשו בגנום. גישה אחרת לאפיון הפנוטיפים היא חיפוש של שינויים (גנטיים או אפי-גנטיים) בגנים ספציפיים הקשורים לתהליך מסויים, המאפיין את הפנוטיפ. מכיוון שאנו מצפים לשינויים בגנים כאלו, הסיכויים גבוהים יותר לזיהוי הבדלים בין הפרטים הנורמאליים לחריגים.

במהלך השנה התחלנו בשיבוט של גנים מתמרים שמוטציות או שינויים בהתבטאותם יכולים להביא לפנוטיפים הנפוצים המתקבלים בעצי התרבות החרויגים. התרכזנו בגנים מתמרים הקשורים למסלול התהוות הפרח. מוטציות בגנים אלו בצמחי מודל (כמו צמחי ארבידופסיס) או במיני דגנים חד פסיגיים (אורז, חיטה ותיירס), הביאו לירידה בחנטת הפירות ולהתפתחות שחלות מוספות - פנוטיפים המתאימים בדיוק לפנוטיפ חוסר החנטה בעצי 'ברהי' מתרבות רקמה (סדרה של גנים אחרים אותם אנו מנסים לאפיין בעבודה מקבילה, קשורים למסלול הביוסינתזה, או החישה של ההורמונים ג'יברלינים, שמוטציות בהם במינים אחרים מביאה ליצירת צמחים ננסיים).

בשלב ראשון, על ידי השוואה של גנים הומולוגיים ממינים אחרים (בעיקר דגניים שונים), אופיינו אזורים שמורים בגנים אלו, ששימשו ליצירת תחלים (פריימרים, רצפי DNA קצרים). בעזרת תחלים אלו הצלחנו "לדוג" מקטעים של הגנים מתוך הגנום של התמר, בשיטה של PCR. עד עתה הצלחנו לשבט מקטעים משישה גנים הקשורים לתהליכי יצירת הפרח, ומהם שלושה גנים קשורים במיוחד להתהוות השחלות בפרח (כמו כן, אופיינו 4 גנים הקשורים לביוסינתזה של הג'יברלינים ולננסות). אנו ממשיכים לנסות ולשבט גנים נוספים הקשורים למסלולים חשובים אלה בתמרים.

בחינה ראשונית של רצף הבסיסים ב-DNA של מקטעים אלה, לא איתרה מוטציות ספציפיות הקשורות לפנוטיפים החרויגים. אנו עוסקים עתה באפיון הבדלים בדפוסי המתילציה בגנים אלה, ובבחינת הבדלים ברמות הביטוי שלהם ברקמות השונות של העץ (פרחים במקרה של בעיות בחנטה לעומת עלים צעירים בעצים המנונסים). אנו מקווים שגישה זו תשפר את הבנתנו את תהליכי היצירה של הפנוטיפים החרויגים.

מסקנות והשלכותיהן על המשך המחקר

במחקר הנוכחי נמצאו עיוותים מבניים בחלק ניכר מפרחי וחנטי התמר שנבדקו. לעיתים, הבדלים אלה מתבטאים בתוספת של איברים שלמים, דמויי שחלות, ובמקרים אחרים ההבדלים מסתכמים בעיוותים של השחלות הקיימות. תופעות חוסר החנטה וריבוי השחלות מאפיינת בעיקר שתילים שמקורם במעבדת תרבות רקמה בודדת, אולם, במידה מסוימת וברמה נמוכה הרבה יותר, היא זוהתה גם בשתילי תרבות רקמה מהזן 'ברהי' (וכן מהזן 'חלאס') מכל מקורות היצור האחרים שניטעו בארץ. ככלל, רמות החנטה של עצי 'ברהי' צעירים שמקורם בתרבות רקמה היו נמוכות יחסית לחנטה של עצים בגיל דומה שמקורם מחוטרים. במהלך השנים, רמת העיוותים יורדת, והפרחים הופכים יותר ויותר להיות נורמאליים. במקביל לשיפור במבנה הפרח עולה גם רמת החנטה של העצים. מעניין לציין שבחוטרים של העצים החרויגים, יש החרפה של הפנוטיפ יחסית לעצי האם שמרביתם חזרו לפנוטיפ הנורמאלי (ובחוטרים, כמו בעצי האם בהיותם צעירים, מזהים שוב חנטה נמוכה וריבוי שחלות). מכלול התוצאות מצביע על הקשר בין חומרת הפנוטיפ ובין יובנליות של העצים, ומרמז על אפשרות שהעצים החרויגים נותרים בשלב היובנלי שנים ארוכות יותר. הזן 'ברהי' ידוע כזן "קשה חנטה". מהתוצאות נראה ששינויים קטנים במאזן ההורמונאלי בפרח ובחנטה המתפתח, שנובעים כנראה מתהליכי היצירה בתרבות הרקמה, מביאים לעיוותים מבניים בפרח, לירידה בחנטה ולתופעת ריבוי השחלות.

במסגרת המחקר הרחבנו בשנות העבודה האחרונות את האנליזה גם לפנוטיפ חריג נוסף של עצי תמר שמקורו בתרבות ריקמה – מהזן 'מג'הול'; פנוטיפ המתבטא בעיכוב חמור של הצימוח. למרות אופי הצימוח השונה מאוד מזה המתגלה בפנוטיפ חוסר החנטה וריבוי השחלות ב'ברהי', מופיעים גם בעצי 'מג'הול' החרויגים חנטים מרובי שחלות, דומים לאלו המתגלים ב'ברהי'. דמיון זה יכול להצביע על מנגנון דומה שגרם לתופעות החרויגות בשני המקרים.

הבדלים בין צמחים שיוצרו בתרבית רקמה וצמחי המקור מהם נוצרו התגלו במספר רב של מיני צמחים. תופעה זו, הנקראת שונות סומקלונלית (somaclonal variation), יכולה לנבוע משינויים גנטיים (מוטציות) או אפיגנטיים (שאינם מתבטאים בשינויים ברצף הבסיסים עצמו). שכיחות תופעות חוסר החנטה וריבוי השחלות בעצי זן ה'ברהי' וה'חלאס' שמקורם בתרבית רקמה, התאוששות העצים במהלך השנים, והעובדה שלא זוהו סמנים מולקולריים (באנליזה המוגבלת שערכנו) ייחודיים לפנוטיפים אלה, מחזקות את ההשערה שהבעיה נובעת משונות אפיגנטית. השונות בדגמי המתילציה שזוהתה בעצי התרבית משני הפנוטיפים החריגים, והירידה הכללית ברמת המתילציה של ה-DNA (לפחות בזן 'ברהי' הסובל מבעיות חנטה) מצביעה על האפשרות, ששונות אפיגנטית זו נובעת משינויים בדפוסי המתילציה שהתרחשו בתרבית הרקמה. עבודות אחרות, בדקל שמן, זיהו פנוטיפ דומה מאוד לפנוטיפ חוסר החנטה וריבוי השחלות בתמר (פנוטיפ הנקרא 'Mantled'). נמצא שיצירת פנוטיפ זה קשורה לשינויים בדפוסי המתילציה של ה-DNA, המתרחשים בתרבית הרקמה. בדקל השמן תופעה זו מתרחשת בשבטים רבים ונוצרת במעבדות יצור שונות, וכמו בתמר, מהווה מחסום ובעיה קריטית בשיטת הריבוי של צמח זה בתרביות ריקמה.

התוצאות הרב שנתיות מהמחקר הנוכחי מראות התאוששות של מרבית עצי ה'ברהי' החריגים ושיפור במידת החנטה. גם העובדה שבחלקות התרבית שנבחנו (ממקור A) פנוטיפ ריבוי השחלות קיים בעיקר בעצים צעירים והולך ונעלם מעצים בוגרים יותר, מצביעה על מצב של העלמות התופעה וחזרה לפנוטיפ של עץ טיפוסי. בעצים הבוגרים יותר הסובלים מבעיות חנטה ניתן להעריך שתוך כ-10 שנים מנטיעתם התקבלה חנטה ברמה הנורמאלית במחציתם, ובאחרים חל שיפור ניכר. התופעה של התאוששות העצים בולטת לעין במספר מטעים נוספים בארץ. החקלאים השוקלים לעקור את עצי תרבית הרקמה בעלי בעיות חנטה צריכים לכלול מידע זה במכלול שיקוליהם. לגבי פנוטיפ עיכוב הצימוח, עדיין לא ברור לנו האם העצים מסוגלים להתאושש גם מפנוטיפ זה, ולהפוך לעצים נורמאליים.

השימוש בעצי תרבית הרקמה הינו חיוני להמשך התפתחות ענף התמר בארץ ובעולם, אולם מניעת יצירתם של עצים חריגים וזיהויים המוקדם הינם הכרחיים להמשך נטיעות של שתילים מתרבית ריקמה. הבחינה הגנטית שערכנו לא הביאה עד כה למציאת סמנים ייחודיים המאפיינים את הפנוטיפים החריגים. אנו מקווים שבגישה החדשה בה אנו נוקטים כעת, של אפיון גנים "מועמדים" והשוואתם ברמות שונות (ברצף, בדפוסי ביטוי ובדפוסי מתילציה DNA) בין עצים נורמאליים וחריגים, נוכל להבין טוב יותר את התופעות החריגות, ואת דרכי יצירתם של השתילים החריגים בתרביות הריקמה. אולי נוכל בגישה זו לפתח בעתיד סמנים לזיהוי מוקדם של העצים החריגים, הרבה לפני שתילתם במטעים.

פירוט מלא של הפרסומים המדעיים

פרסומים בכתב:

כהן י., קורצ'ינסקי ר., טריפּלר א., זיו ג., כהן ר. (2003) בעיות חנטה בעצי תמר מזן 'ברהי' שמקורם בתרבית רקמה. עלון הנוטע 57, 275-279.

כהן י., גורביץ ו., לביא א. (2004) הערכת השונות הגנטית בעצי תמר. עלון הנוטע 58, 278-281.

כהן י., קורצ'ינסקי ר., גורביץ ו., לביא א., טריפּלר א. (2004, 2005, 2006) בעיות חנטה בעצי ברהי שמקורם בתרבית רקמה - ואריאציה גנטית או זכרון פיזיולוגי. שולחן תמר, סיכום תקצירי מחקרים בתמרים.

Cohen, Y., Korchinsky, R., Tripler E. (2004) Flower abnormalities cause abnormal fruit setting in tissue culture - propagated date palms (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Hort. Sci. & Biotech.*, 79, 1007-1013.

Gurevich, V., Lavi, U. and Cohen, Y. (2005) Genetic variation in date palms from offshoots and tissue culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130, 46-53.

Cohen, Y., Gurevich, V, Korchinsky, R, Tripler, E., Lavi, U. (2005) Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types. The international Workshop on True-To-Typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants, Marrakesh, Morocco.

Cohen, Y., Gurevich, V., Korchinsky, R., Shochat, M., Sekar, M., Lavi, U. (2006) Molecular and phenotypic characterization of somaclonal variation in date palm off-types originated from tissue culture. *Acta Horticulturae*, In Press.

הרצאות בע"פ:

בעיות חנטה בעצי תמר שמקורם בתרבית רקמה. (יוני 2003). סמינר משותף למכון למטעים ולמכון לגידולי שדה במרכז וולקני.

תוצאות ראשוניות מבדיקות ביו מולקולריות של ברהי ומגיהול (יולי 2003) סקירה בפני חברי ועדה מקצועית תמר.

בעיות חנטה בעצי 'ברהי' מתרבית רקמה (דצמבר 2003) סיכום מחקרי 2003 מו"פ ערבה דרומית, יטבתה.
בעיות פרתנקורפיה בברהי (ינואר 2004) יום עיון למגדלי תמרים בעמקים הצפוניים, צמח.
שיטות מולקולריות לאפיון שונות גנטית בתמרים (פברואר 2004) הכנס השנתי של מגדלי התמרים, עין גדי.
בעיות חנטה בעצי תמר שמקורם בתרבית רקמה (פברואר 2005) מו"פ ערבה דרומית - המרכז לחקר התמר.
יום עיון למסירת דו"חות מחקרים.

Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types (May, 2005). The International Workshop on True-To-Typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants, Marrakesh, Morocco.

Somaclonal variation in tissue culture originated date palm off-types - molecular characterization of the most common off-types (October 2005). The ISHS Symposium on Biotechnology of Temperate and Tropical Fruit Crops. Daytona Beach, Florida, USA.

Somaclonal variation in tissue culture originated date palms (February 2006). MARD (Multinational Agricultural Research and Development) Symposium on Biotechnology in Agriculture, Al-Salt, Jordan.

Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types (May 2006) Date Palm Integrated Crop Management, Agritech Exhibition. Tel Aviv, Israel.

הנחיות למילוי סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3- עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה
איפיון פנוטיפ חוסר החנטה וריבוי השחלות בתמר. אפיון ראשוני של פנוטיפ עיכוב הצימוח ב'מגיהול'
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח
סקר חנטה מקיף בחלקות במטע יטבתה, בחינת השונות הגנטית בין עצי תמר מזן 'ברהי' ומזן 'מגיהול'. איפיון שונות גנטית בעצים החריגים, אפיון שונות בדפוסי המתילציה של ה-DNA בשיטה של Methylation sensitive AFLP, בעצי שני הזנים ובעצים החריגים. שיבוט גנים הקשורים למבנה הפרח בתמרים.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו
נמצאו עיוותים מבניים בחלק ניכר מפרחי וחנטי העצים בעלי בעיות החנטה שנבדקו. במהלך השנים, רמת העיוותים יורדת, והפרחים הופכים יותר ויותר להיות נורמאליים. במקביל לשיפור במבנה הפרח עולה גם רמת החנטה של העצים. נמצאה שונות גנטית נמוכה מאוד בין עצי התמר מהזן 'ברהי' מהמקורות השונים. התקבלה שונות גנטית גבוהה יותר בן עצי 'מגיהול' מתרבית רקמה ממקורות יצור שונים. אולם, שונות זו אינה מסבירה את הפנוטיפים שהתקבלו. נמצאה שונות בדפוסי המתילציה של ה-DNA בעצים מתרבית רקמה. יתכן ששינויים בדפוסי המתילציה במהלך התרבית הם המביאים ליצירת הפנוטיפים החריגים.
4. הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן
המשך איפיון השונות האפיגנטית של העצים, ופיתוח כלים לזיהוי העצים החריגים בשלב מוקדם. איפיון פנוטיפים לא נורמאליים אחרים בתמרים הנוצרים בתרבית רקמה. המשך אפיון הבדלים ברמות הביטי של גנים מועמדים הקשורים לפנוטיפים החריגים הנפוצים בתמרים.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
פרסומים בכתב: כהן י., קורציינסקי ר., טריפלר א., זיו ג., כהן ר. (2003) בעיות חנטה בעצי תמר מזן 'ברהי' שמקורם בתרבית רקמה. עלון הנוטע 57, 275-279. כהן י., גורביץ ו., לביא א. (2004) הערכת השונות הגנטית בעצי תמר. עלון הנוטע 58, 278-281. כהן י., קורציינסקי ר., גורביץ ו., לביא א., טריפלר א. (2004, 2005, 2006) בעיות חנטה בעצי ברהי שמקורם בתרבית רקמה - ואריאציה גנטית או זכרון פיזיולוגי. שולחן תמר, סיכום תקצירי מחקרים בתמרים. Cohen, Y., Korchinsky, R., Tripler E. (2004) Flower abnormalities cause abnormal fruit setting in tissue culture - propagated date palms (<i>Phoenix dactylifera</i> L.). <i>J. Hort. Sci. & Biotech.</i> , 79, 1007-1013. Gurevich, V., Lavi, U. and Cohen, Y. (2005) Genetic variation in date palms from offshoots and tissue culture. <i>J. Amer. Soc. Hort. Sci.</i> , 130, 46-53. Cohen, Y., Gurevich, V., Korchinsky, R., Tripler, E., Lavi, U. (2005) Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types. The international Workshop on True- To-Typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants, Marrakesh, Morocco. Cohen, Y., Gurevich, V., Korchinsky, R., Shochat, M., Sekar, M., Lavi, U. (2006) Molecular and phenotypic characterization of somaclonal variation in date palm off- types originated from tissue culture. <i>Acta Horticulturae</i> , In Press.
הרצאות בע"פ: בעיות חנטה בעצי תמר שמקורם בתרבית רקמה. (יוני 2003). סמינר משותף למכון למטעים ולמכון לגידולי שדה במרכז וולקני.

תוצאות ראשוניות מבידיקות ביו מולקולריות של ברהי ומגיהול (יולי 2003) סקירה בפני חברי ועדה מקצועית תמר.
בעיות חנטה בעצי 'ברהי' מתרבית רקמה (דצמבר 2003) סיכום מחקרי 2003 מו"פ ערבה דרומית, יטבתה.

בעיות פרתנקורפיה בברהי (ינואר 2004) יום עיון למגדלי תמרים בעמקים הצפוניים, צמח.
שיטות מולקולריות לאפיון שונות גנטית בתמרים (פברואר 2004) הכנס השנתי של מגדלי התמרים, עין גדי.

בעיות חנטה בעצי תמר שמקורם בתרבית רקמה (פברואר 2005) מו"פ ערבה דרומית - המרכז לחקר התמר. יום עיון למסירת דו"חות מחקרים.

Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types (May, 2005). The International Workshop on True-To-Type-ness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants, Marrakesh, Morocco.

Somaclonal variation in tissue culture originated date palm off-types - molecular characterization of the most common off-types (October 2005). The ISHS Symposium on Biotechnology of Temperate and Tropical Fruit Crops. Daytona Beach, Florida, USA.

Somaclonal variation in tissue culture originated date palms (February 2006). MARD (Multinational Agricultural Research and Development) Symposium on Biotechnology in Agriculture, Al-Salt, Jordan.

Phenotypic and molecular characterization of date palm off-types (May 2006) Date Palm Integrated Crop Management. Agritech Exhibition. Tel Aviv, Israel.

פרסום הדו"ח אני ממליץ לפרסם את הדו"ח
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)