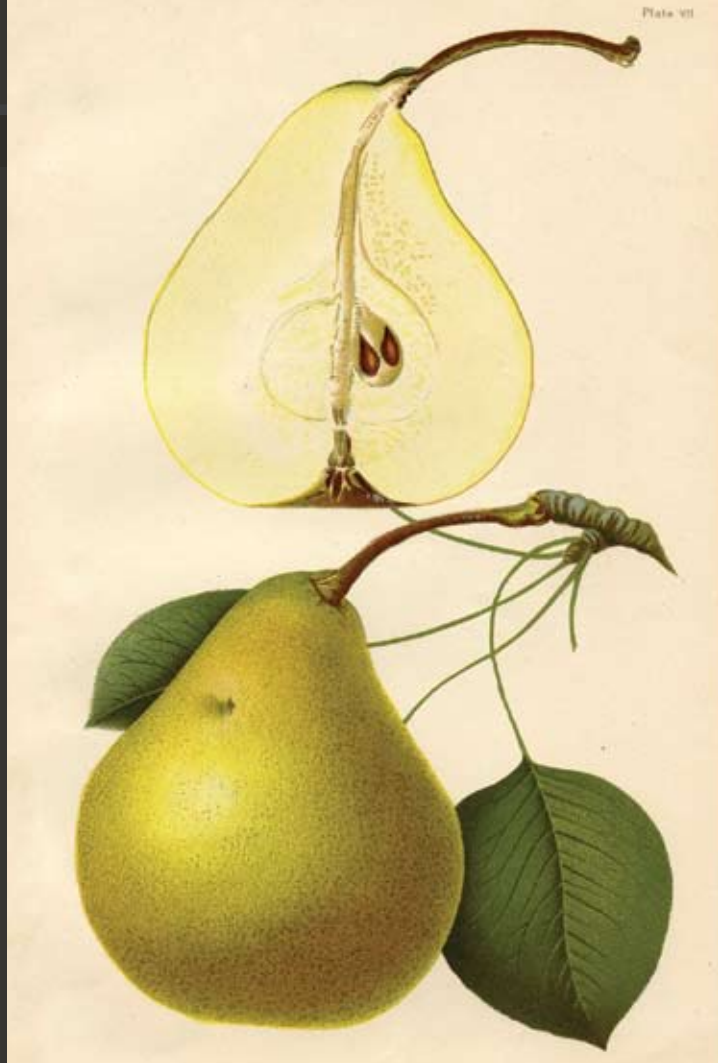




ד"ר משה פליישמן

חלבמה באגס: עמידות לחירכון תוך שימוש בסמנים גנטיים וזן חסר יובנליות

ירדנה דהן, אביעד פריימן, זאב יבלוביץ, רעות פאר, יובל כהן,
שרה גולובוביץ, משה פליישמן / המחלקה למדעי עצי הפרי,
המכון למדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני



www.williams-sonoma.com באדיבות

באירופה מגדלים למעלה מ-30 זני אגס מסחריים המצטיינים בגודל פרי ובצבעי ירוק, אדום וביקולור (ירוק עם לחי אדומה), צהוב וזנים חומים. הטעם של זנים אלה לרוב חמאתי, בהשוואה לטעם העסיסי והמתוק של ה'ספדונה'. כמו כן, הזנים באירופה פוריים מאד, בעלי כושר אחסון ממושך ומניבים מדי שנה יבולים גבוהים מ-4 טון/ד', בהשוואה לרמת יבולים נמוכה עד כדי 50% במטעי ישראל. הזנים הגדלים באירופה הם תוצרי השבחה המתבצעת בארצות בעלות אקלים ממוזג כמו צרפת, איטליה, קנדה וניו-זילנד. זנים אלה מאופיינים בדרישות קור גבוהות ועל כן אינם יכולים לגדול ולהניב פרי איכותי באזורי הגידול השונים ביש-ראל. במהלך השנים נעשו מספר ניסיונות לאינטרודוקציה של זני אגס מאירופה. בפועל, עד היום לא הצליחו לגדל בהצלחה זני אגס חדשים מלבד ה'ספדונה'. נראה של 'ספדונה', מלבד היותו זן ידוע ומקובל בקרב הצרכנים, יש התאמה פיזיולוגית גבוהה במיוחד לתנאי הארץ. מכאן, שתוכנית השבחה באגס לגידול בישראל צריכה להתבסס על ה'ספדונה'. לזן זה תכונות רצויות, כמו דרישות קור נמוכות (הזן נטוע מדביר בדרום ועד מטולה בצפון), טעם עסיסי וצבע ירוק. לעומת היתרונות הללו מצויות בו תכונות שרצוי לשפר, כמו גודל פרי, צבע, פוריות ורגישות למחלות (Manulis et al., 1998).

ה המאמר הנוכחי מסכם את תהליך ההשבחה באגס, שמטרתו לייצר זן דמוי 'ספדונה' עמיד למחלת החירכון. תמצאו כאן סקירה של מהלך תוכנית ההשבחה ותוצאות ראשונות המצויות בידינו

מבוא

בישראל מגדלים מוון מצומצם של זני אגס שמקורם באיטליה, והם משמשים בענף יותר מ-40 שנה. הזן העיקר הוא 'ספדונה' ('Spadona', di Salerno), שמתועד כבר ב-1699 כאחד מ-115 זני האגס באוסף של Cosimo III לבית מדיצי בטוסקנה, איטליה. בנוסף מגדלים את הזנים 'ג'וטיל', 'קוסטיה' ו'ספדוצינה', המשמשים במטע גם כמפרים של 'ספדונה'. כל אלה הם זנים ירוקים שהגדול ביניהם, ה'ספדונה', מוגיע בעקבות טיפולי ציטוקינים לקוטר של 60-65 מ"מ (Flaishman et al., 2001; Stern and Flaishman, 2003).

תוכנית ההשבחה

בשיתוף עם חקלאים ומדריכי שה"מ נבחרו התכונות הרצויות באגס העתידי שיתקבל במערכת ההשבחה בישראל: קוטר פרי 65-75 מ"מ, צורה עגולה או מאורכת, צבע ירוק או ביקולור, טעם עסיסי (בדומה ל"ספדונה") או חמאתי, זן פורה, דרישות קור ומוכות ומשך אחסון של כשישה חודשים לפחות. מלבד כל האמור לעיל התכונות החשובות ביותר לחקלאי בזנים החדשים שיפותחו הן עמידות למחלת החירכון ועמידות למוזיק פסילת האגס. ההתמודדות עם מחלת החירכון הושגה עד היום באמצעות תוכנית ריסוסי הדברה מבוססת אקלים שפותחה על ידי פרופ' **דני שטיינברג** וחוב' (2003). תוכנית זו איפשרה לחקלאי לצמצם את כמות הריסוסים בחומרי ההדברה. לאחרונה נמצא כי החידק *Amylovora Erwinia*, גורם מחלת החירכון באגס, פיתח עמידות ואנו ניצבים בפני מצב חדש שבו חומרי ההדברה המאושרים לשימוש אינם יעילים עוד (Manulis et al., 1998). אל מול מצב זה הוחלט להעמיד במרכז תוכנית ההשבחה באגס את יצירת העמידות כנגד מחלת החירכון, ובנוסף עמידות כנגד פסילת האגס.

תהליך ההשבחה

השבחת עצי פרי היא תהליך ארוך המושפע ממשך תקופת היוביליות - השנים הראשונות לאחר נביטת הזרעים, בהן העצים אינם יכולים לפרוח אף לא בתנאי גידול מיטביים. תקופה זו נמשכת באגס עד כעשר שנים (Pin and Nilsson, 2012). אחד היעדים במחקר בעצים הוא הקדמת הפריחה. בהתבסס על הידע הקיים בצמחי מודל, בודדו מספר גנים מבקרי פריחה ובאמצעות התמרידה גנטית ובדקה השפעתם על הקדמת פריחה בעצי פרי. הגן מבקר הפריחה, המקודד לחלבון דמוי *TFL1*, בודד בתפוח והראה כי השתקת הגנים הפארלי גיים ל-*MdTFL1* גרמה להתפתחות פרח כשמונה חודשים בלבד לאחר העברה לחממה. אברי הפרח מתפתחים באופן נורמלי והעץ המותמר יכול לשאת פרי המכיל זרעים (Kotoda et al., 2006). בהדרים הראו כי ביטוי מתמשך של הגן LFY גרם אף הוא לקיצור תקופת היוביליות בעץ (Peña et al., 2001). המאמר הנוכחי מסכם את תהליך השיפור באגס 'ספדונה', שהביא ליצירת זן עמיד למחלת החירכון. תמצאו כאן סקירה של מהלך תוכנית ההשבחה ותוצאות ראשונות המצויות בידיו.

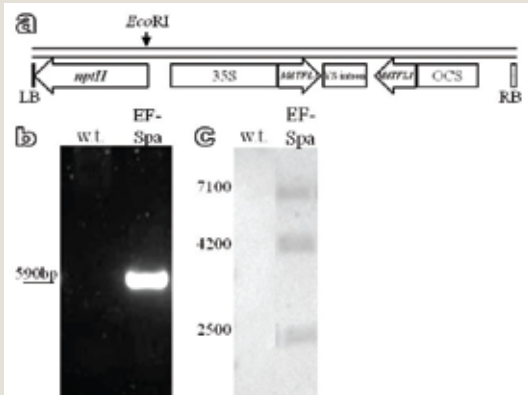
תוצאות

■ **יצירה ואיפיון של האגס חסר היוביליות (Juvenile):** באמצעות מערכת התמרידה גנטית לאגס 'ספדונה' (Yancheva et al., 2005) בוצעה השתקה של הגן מבקר הפריחה *TFL1*. מתהליך ההתמרידה התקבל קו עמיד לאנטיביוטיקה קנומיצין (Early Flowering Spadona - EF-Spa), שומצא חיובי להימצאות המחדר בגנום באמצעות PCR לגן *nptII* (איור 1b). באמצעות היברידיזציה Southern ופרח לגן *nptII* נמצאו שלושה מחדרים בגנום של הקו EF-Spa (איור 1c). רצף הגן *TFL1*, ששימש לבניית המחדר, גרם להשתקת שני הגנים האר דוגניים *PcTFL1-1* ו-*PcTFL1-2* בקו המותמר EF-Spa. הקו EF-Spa הראה התפתחות פריחה מוקדמת לעומת אגס לא מותמר (Freiman et al., 2012). הקו EF-Spa פיתח פרחים כבר בשלב תרבות הרקמה וכן בצמחים מושרשים שגדלו בחממה (איור 2a). עץ אגס בוגר מפתח תפוחת מעורבת המכילה מס' פרי עלים ופרחים (איור 2a), והמשך צימוח מתרחש מפקע צדי בבסיס אחד העלים שבתפוחת. בקו EF-Spa, בפקע הקודקודי מתפתח פרח בודד ללא עלים והמשך צימוח יתרחש מפקע צדי בבסיס עלה בעוף, כאשר מהפקעים

הצדדיים יכול להתפתח עוף שבסופו יתפתח פרח בודד נוסף. צורת הע' לה בקו המותמר אף היא דומה יותר לעלה מעץ בוגר מאשר לעלה מעץ יובילי - עלה עגול עם שוליים חלקים (איור 2c). בחניה של מבנה הפרח בקו EF-Spa הראתה שבדורים המיניים עמודי עלי זירי האבקה אין הב' דלים במספר ובצורה בין הצמח המותמר לפרחים מאגס בוגר. בדורים החיצוניים, בעלי גביע וכתרת נמצא כי לקו EF-Spa מתפתחים יותר עלי גביע ויש איברים מאוחרים, עלי גביע-כותרת.

■ **הכלאות והורשת קיצור היוביליות:** הכלאות בוצעו בין הקו המותמר EF-Spa לזן 'קוסציה' ולזן 'Red leaf'. הורעים נבטו וגדלו בחממה ונוכחות המחדרים בזרעים נבדקה ב-PCR על דנ"א גנומי. שלושה מתוך ארבעת הזרעים בזן 'קוסציה' נמצאו חיוביים וזרע אחד

איור 1: אוליזה מולקולרית לקו המותמר EF-Spa. תיאור סכימטי של הווקטור הבינארי בין הגבול הימני (RB) לגבול השמאלי (LB) עם המ' חדר *MdTFL1 RNAi* והגן לעמידות *nptII*. החץ מורה על אתר חיתוך של האנזים *EcoRI* (a) על מוצי דנ"א גנומי מהקו EF-Spa ואגס שאינו מותמר (*wt*). ששימש כביקורת שלילית. פריימרים משני צדי הגן *nptII* שימשו להגברת מקטע בגודל צפוי (590 bp). אוליזה Southern blot עם גלאי לגן *nptII* על מוצי דנ"א גנומי מהקו EF-Spa ואגס שאינו מותמר (*wt*). גודל כל מקטע מצוין מיומן (c)

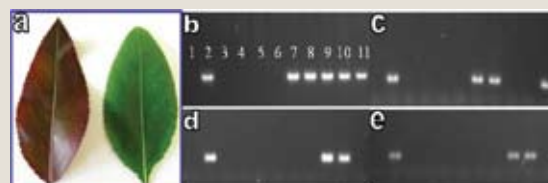


איור 2: ארכיטקטורת הצמח ומאפיינים מורפולוגיים של הקו המותמר EF-Spa בהשוואה לאגס שאינו מותמר. צמח EF-Spa מושרש הגדל בחממה עם שלושה עלים ופרח טרמולי (a). תפוחת של עץ אגס בוגר מו' 'ספדונה' (b). העלים מהקו EF-Spa דומים לעלים מעץ בוגר: צורה מעוגלת ושוליים חלקים (c)



נמצא שלילי. בון 'Red leaf' נמצאו חמישה זריעים חיוביים וארבעה שליליים. הזריעים CS1 ו-CS2 פרחו ארבעה ושישה חודשים מנביטה (בהתאמה), ואילו הזריע CS3 פרח לראשונה 33 חודשים מנביטה. הזריעים RF5 ו-RF7 פרחו חודשים בודדים לאחר העברה לחממה ושאר הזריעים פרחו לאחר יותר מ-20 חודשים. ריצוף האתרים הגנוי מיים אליהם חדר המחדר *MdF1 RNAi* איפשר מעקב פשוט אחר המחדרים באוכלוסיה באמצעות PCR ופריימרים ספציפיים. שלושה זריעים, RL5, RL6 ו-RL9, מכילים עותק אחד של המחדר בכרומוזום 2 ושני זריעים מכילים את שני העותקים של המחדר בכרומוזום 14 (איור 3c-e). באנליזה של אתרי המחדר בזריעים שאינם מותמרים לא נמצאו שינויים ברצף חומצות הגרעין. בהכלאה עם הזן 'Red leaf', המכיל את הגן הדומיננטי לעלה אדום, כל הצמחים שהתקבלו היו כצפוי בעלי עלים אדומים (תמונה + איור 3).

איור 3: הכלאת הקו המותמר *EF-Spa* עם זן אגס בעל עלים אדומים (*RL*). צבע עלים אדום בוריע דור ראשון בהשוואה לעלה מוריע אחר PCR (a) לכן *np11* על מוציאו ד"א גנומי של הקו המותמר *EF-Spa* ותשעת הזריעים דור ראשון. 1 - אגס שאינו מותמר, *EF-Spa*, 3-11 2 - תשעת הזריעים דור ראשון PCR (b) *RL1-RL9* למחדר בכרומוזום 2 PCR (c) לשני המחדרים בכרומוזום 14 (d, e)



■ **מהלך השבתה באמצעות קו האגס חסר היובניליות:** בקו המותמר *EF-Spa* יש ירידה חזקה בצימוח הווגטיבי. פיתחנו מערכת של צמחים קומפקטיים שבתנאי יום ארוך וטמפרטורה גבוהה ניתן היה לגדל אותם ולקבל פריחה לאורך כל השנה. הצמחים הקומפקטיים שהתקבלו מאפשרים גידול "מטע השבתה" בתוך החממה (איור 1). במערכת זו ניתן לבצע הכלאות לאורך כל השנה ולקבל חמישה עד שמונה פירות לעציץ. לאחר הפקת הזריעים ניתן לגדל את הנבטים ולקבל צמיחה ופריחה לאחר כשנה. משך קבלת דור במערכת זו, מזרע לזרע, הוא פחות משנתיים.

כאמור, המטרה העיקרית של תוכנית ההשבתה באגס היא ליצור זן דמוי 'ספדונה' בעל עמידות למחלת החירכון. תהליך השבתה ליצירת עמידות למחלות הוא ממושך ודורש הכלאות מחזוריות בין הזן העמיד וזן המקור. לנוכח תקופת היובניליות הארוכה באגס יש יתרון רב לשימוש בזן חסר היובניליות שפותח. באיור 5 מודגם מהלך השימוש באגס חסר היובניליות בתוכנית ההשבתה. לאחר קבלת דור F1 בין זן עמיד למחלת החירכון והזן *EF-Spa*, ניתן לבצע שלוש-ארבע הכלאות מחזוריות במשך כשש שנים, לעומת יותר מ-30 שנה (!) בשיטה המי קובלת. חשוב לציין, כי בדור האחרון של תוכנית ההכלאות נלקחים צאצאים לא מותמרים שאותם יש לקדם לפריחה מהירה בשיטות הורטיקולטוריות מקובלות.

המשך בעמוד הבא

למחלת החירכון. איור 6 מראה את תוצאות המבחן, מהן עולה כי זריע המכלוא 65 עמידות בדומה לזו של הון 'Harrow Sweet'. בוצע ריבוי של הזריע 65 משמש מקור להכלאות מחזירות ליצירת מכ' לוא עמיד דמוי 'ספדונה'.

■ **שימוש בסמונים גנטיים לברירה מהירה של קווים עמידים לחיר' כון בעלי דרישות קור נמוכות:** פיתוח סמונים גנטיים יאפשר ליעל את תהליך ההשבחה באגס. במסגרת העבודה הנוכחית אנו מפתחים סמ' נים לעמידות לחירכון ולדרישות קור נמוכות. בעבודות קודמות בוצעה אנליזה של הכלאות בין זן האגס 'Passe Crassane' הרגיש למחלת החירכון לבין הון 'Harrow sweet' העמיד למחלה, ובנתה מפת תא' חייה המכילה שלושה סמונים (Dondini et al., 2004; Le Roux PMF et al., 2012). מתוך אוכלוסיית זריעים מקדימי פריחה מההכלאה של 'Harrow sweet' עם EF-Spa נמצאו מספר זריעים הנושאים את הסמן העיקרי לעמידות למחלה. השוואה שנעשת בימים אלה בין הסמונים לאחר איפיון עמידות שהתקבל בניסוי האילוח מראה זהות חלקית בין הסמונים לעמידות למחלה. בימים אלה אנו מפתחים סמונים גנטיים לז' רישות קור נמוכות על בסיס אוכלוסיות זריעים של מכלואים בין זנים בעלי דרישות קור נמוכות לזן בעל דרישות קור גבוהות. האפיון הפוטנ' פי ייבחן מול סמונים לדרישות קור שפותחו לאחרונה בתפוח (Celton et al., 2011). פיתוח סמונים אלה יאפשר לנו בירור יעיל של מכלואים בבית הרשת ויפחית את כמות החומר שתועבר לשתילה בחלקות. אנו מתכננים בהמשך לפתח סמונים גם לעמידות לפסילת האגס ולתכונות איכות של הפרי, כגון צבע, גודל ואיכות פנימית.

סיכום

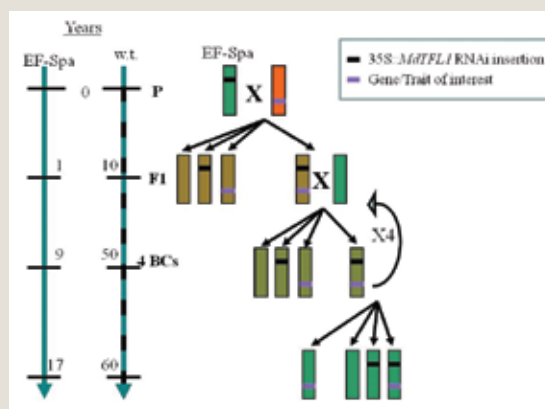
נכון להיום קיים בעולם מספר מצומצם של תוכניות להשבחת אגס, בעיקר בשל מגבלת תקופת היוביליות הארוכה, שמצריכה עשרות שנים עד לפיתוח זן מסחרי איכותי. במסגרת התוכנית הנוכחית פי' תחנו, לראשונה בעולם, טכנולוגיה לקיצור תקופת היוביליות ויחד עם פיתוח סמונים לעמידות למחלות, דרישות קור ואיכות פרי נוכל להערי' כתנו לקצר באופן משמעותי את תהליך ההשבחה. פרי איכותי עמיד למחלות העיקריות של האגס בישראל, שיהיה מסוגל לגדול באקלים החם של ארצנו, יקנה למגדלי האגס בארץ יתרון תחרותי שיתבטא ביכולת המכירה, קבלת מחיר גבוה בשוק המקומי ותחרותיות מול אגסים מיובאים. יצירת אגס איכותי עמיד למחלות ובעל דרישות קור נמוכות יאפשר לפתח ולגדל אגסים בארצות נוספות שבהם מגדלים אגסים באזורים חמים.

רשימת ספרות

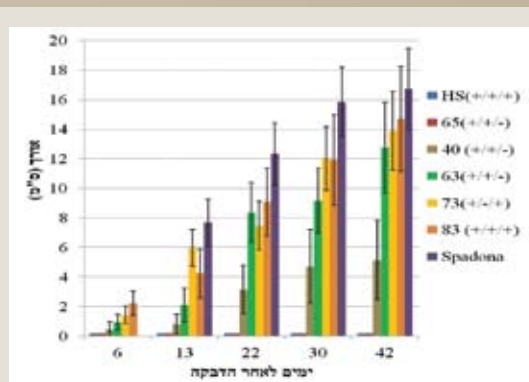
1. Celton et al. (2011): Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes. *New Phytologist* 192: 378-392.
2. Dondini et al. (2004): Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map. *Molecular Breeding* 14: 407-418.
3. Flaishman et al. (2001): The synthetic cytokinin CPPU



תמונה 1:
צמחים קומפקטיים
בקו המותמר EF-
Spa המאפשרים נז'
דול "מטע השבחה"
בתוך החממה



איור 4:
לוח הזמנים של
העברת תכונות
בהכלאות מחר
זירות באמצעות
הקן חסר היוב'
נליות בהשוואה
להשבחה
קונבנציונלית



איור 5:
התפתחות
מחלת החירכון
במבחן אילוח
בחיך *Erwinia*
amylovora על
מכלוא
'Harrow Sweet'
X EF-Spa

■ **שימוש בקו EF-Spa ליצירת זריעים מקדימי פריחה שעמידים למחלת החי' רכון:** ברשותנו אבקות של אגסים בעלי עמידות לחירכון. 'Harrow Sweet' היו זן אגס שמקורו בהכלאה שבוצעה בחוות המחקר Harrow בקנדה ב-1965 ובורר כעמיד למחלה ב-1980. ה-'Harrow Sweet' אינו יכול לשמש בארץ כון מסחרי כיוון שיש לו דרישות קור גבוהות במיוחד. אבקה של הון 'Harrow Sweet' שימ' שה להאבקת צמחי EF-Spa, ממונה התקבלה אוכלוסיית זריעים. באוכלוסיית F1 כ-80% מהזריעים נמצאו מותמרים, כאשר יותר מ-60% הראו הקדמת פריחה עד 20 חודשים מנביטה. נעשה מבחן אילוח בחידק *Erwinia* למציאת זריעים עמידים

9. Pin et al. (2012): The multifaceted roles of *FLOWERING LOCUS T* in plant development. *Plant Cell and Environment* 35: 1742-1755.
10. Shtienberg et al. (2003): New considerations for pruning in management of fire blight in pears. *Plant Disease* 87: 1083-1088.
11. Shtienberg et al. (2003): Evaluation of local and imported fire blight warning systems in Israel. *Phytopathology* 93: 356-363.
12. Stern R. et al. (2003): Benzyladenine effects on fruit size, fruit thinning and return yield of 'Spadona' and 'Costia' pear. *Scientia Horticulturae* 98: 499-504.
13. Sun et al. (2009): Construction of a genetic linkage map and QTL analysis for some leaf traits in pear (*Pyrus L.*). *Frontiers of Agriculture in China* 3: 67-74.
14. Yancheva et al. (2006): Green fluorescent protein as a tool for improving *Agrobacterium* - mediated transformation of 'Spadona' pear (*Pyrus communis L.*). *Plant Cell Reports* 25: 183-189. ■
4. Freiman et al. (2012): Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis L.*) genotype by RNAi silencing of PcTFL1-1 and PcTFL1-2. *Planta* 235: 1239-1251.
5. Kotoda et al. (2006): Antisense expression of MdTFL1, a TFL1-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 74-81.
6. Le Roux, et al., 2012. Redefinition of the map position and validation of a major quantitative trait locus for fire blight resistance of the pear cultivar 'Harrow Sweet' (*Pyrus communis L.*). *Plant Breeding* 131: 656-664.
7. Manulis et al. (2003): Changes in the sensitivity of *Erwinia amylovora* populations to streptomycin and oxolinic acid in Israel. *Plant Disease* 87: 650-654.
8. Peña et al. (2001): Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*. 19: 263-267.