



1999-2001

תקופת המחקר:

556-0052-01

קוד מחקר:

**Subject:** DEVELOPMENT OF A PROTOCOL TO OBTAIN PEONY PLANTLETS VIA TISSUE CULTURE.

**Principal investigator:** MOSHE REUVENI

**Cooperative investigator:** ABRAHAM HALEVI, ABED WATAD, MENASHE COHEN, ORA BAR-CHAY

**Institute:** Northern R&D

**שם המחקר:** פתוח מערך לרביי מהיר של צמחוני אדמונית בתרבות רקמה

**חוקר ראשי:** משה ראובני

**חוקרים שותפים:** אברהם הלוי, עבד ותד, מנשה כהן, אורה ברחי

**מוסד:** מו"פ צפון, ת.ד. 90000, ראש פינה 12100

### תקציר

בשנים האחרונות מתקדם שיווקם של פרחי האדמונית המיוצרים ברמת הגולן לפני עונת השיווק ההולנדית. עובדה זו הביאה לביקוש ניכר של פקעות אדמונית וחומר ריבוי. יצור פקעות באופן קונבנציונלי הנו תהליך איטי.

**מטרת העבודה** היא לפתח מערך ליצור של צמחוני אדמונית בתרבות רקמה על מנת לקבל חומר ריבוי החופשי מגורמי מחלות וכן ריבוי מהיר שיאפשר הפחתת עלויות של יבוא ויצור פקעות באופן איטי וכן יאפשר את ריבויים של זנים נבחרים ומבוקשים.

**ביצוע המחקר** התמקדנו בשיפור פרוטוקול להכנסת חומר צמחי לתרבות וביסוס בנק של החומר הצמחי על מצע מוצק בתרבות (סעיף 1 בתוכנית המחקר) וכן בפיתוח שיטות לריבוי צמחונים והגדלת הבנק בתרבות (סעיף 2 בתוכנית המחקר) וקבלת צמחונים מושרשים בתרבות (סעיף 3).

**תוצאות העבודה** מראות כי הכנסת ניצנים חיקיים של אדמונית וביסוסם בתרבות מתאפשרת ביעילות גבוהה, תוך התגברות על בעיית הזיהום האנדוגני וההשחמה של הרקמה. פותחו שלוש שיטות לריבוי צמחונים בתרבות: חלוקה לאורך של צמחים מפותחים דמויי "שיח", ריבוי ממקטעי רקמה דמויית קאלוס המתפתחת בבסיס הצמחונים (כהמשך לשיטה קודמת ובכך מגדילה את מקדם הריבוי), וקבלת צמחונים מיחידות ריבוי שנוצרו בקור (בעיקר עם טיפול באנצמידול). שיטה זו הנה מעודדת ביותר ונראית לנו כמבטיחה ביותר. כמו כן הצלחנו בניסויים ראשוניים לקבל צמחונים מושרשים בתרבות באחוזים משמעותיים.

**מסקנות** יש לשפר את הנושא של השרשת צמחונים על מנת לקבל כאלו הראויים לשיווק ולהקשחה וכן ללמוד את נושא הקשחתם של צמחונים אלו בתנאי מעבדה/חממה-בית רשת.

**פיתוח מערך לריבוי מהיר של צמחוני אדמונית בתרבות רקמה**

**Development of a protocol to obtain Peony plantlets via tissue culture**

דו"ח סיכום מוגש ע"י: משה ראובני<sup>1</sup>, עבד ותאד ז"ל<sup>2</sup>, אורה בר-חי<sup>3</sup>, מאירה זיו<sup>4</sup> ואברהם הלוי<sup>5</sup>

Submitted by: Reuveni, M<sup>1</sup>, Watad, A<sup>2</sup>, Bar-Hai, O<sup>3</sup>, Ziv, M.<sup>4</sup> and Halevi, A<sup>5</sup>  
 המכון לחקר הגולן, קצרין, מו"פ צפון קרית שמונה<sup>2</sup> מינהל המחקר החקלאי-המחלקה לפרחים,  
 מו"פ צפון, קרית שמונה, המחלקה לפרחים<sup>4</sup>, בוטניקה חקלאית- הפקולטה לחקלאות,  
 רחובות

<sup>1</sup>Golan Research Institute, Kazrin, <sup>2</sup>Dept of Hortic, ARS, Volcani Center, Bet-Dagan,

<sup>3</sup>Northern R&D, Kazrin, <sup>4</sup>Dept. of Agricultural Botany, Faculty of Agriculture,

Rehovot, <sup>5</sup>Dept. of Hortic. Faculty of Agriculture, Rehovot.

Email: mreuveni@research.haifa.ac.il

**תקציר**

**מבוא.** בשנים האחרונות מתקדם שיווקם של פרחי האדמונית המיוצרים ברמת הגולן לפני עונת השיווק ההולנדית. עובדה זו הביאה לביקוש ניכר של פקעות אדמונית וחומר ריבוי. יצור פקעות באופן קונבנציונלי הינו תהליך איטי. מטרת העבודה היא לפתח מערך ליצור של צמחוני אדמונית בתרבות רקמה על מנת לקבל חומר ריבוי החופשי מגורמי מחלות וכן ריבוי מהיר שיאפשר הפחתת עלויות של יבוא ויצור פקעות באופן איטי וכן יאפשר את ריבויים של זנים נבחרים ומבוקשים. **בביצוע המחקר בשלוש השנים** התמקדנו בשיפור פרוטוקול להכנסת חומר צמחי לתרבות וביסוס בנק של החומר הצמחי על מצע מוצק בתרבות (סעיף 1 בתוכנית המחקר) וכן בפיתוח שיטות לריבוי צמחונים והגדלת הבנק בתרבות (סעיף 2 בתוכנית המחקר) וקבלת צמחונים מושרשים בתרבות (סעיף 3). **תוצאות העבודה** מראות כי הכנסת ניצנים חיקיים של אדמונית וביסוסם בתרבות מתאפשרת ביעילות גבוהה, תוך התגברות על בעיית הזיהום האנדוגני וההשחמה של הרקמה. פותחו שלוש שיטות לריבוי צמחונים בתרבות: חלוקה לאורך של צמחים מפותחים דמויי "שיח", ריבוי ממקטעי רקמה דמויי קאלוס המתפתחת בבסיס הצמחונים (כהמשך לשיטה קודמת ובכך מגדילה את מקדם הריבוי), וקבלת צמחונים מיחידות ריבוי שנוצרו בקור (בעיקר עם טיפול באנצמידול). שיטה זו הינה מעודדת ביותר ונראית לנו כמבטיחה ביותר. כמו כן הצלחנו בניסויים ראשוניים לקבל צמחונים מושרשים בתרבות באחוזים משמעותיים. יש לשפר את הנושא של השרשת צמחונים על מנת לקבל כאלו הראויים לשיווק ולהקשחה וכן ללמוד את נושא הקשחתם של צמחונים אלו בתנאי מעבדה/חממה-בית רשת.

**ביצוע תוכנית המחקר**

**פירוט הניסויים שבוצעו ותוצאותיהן**

**א. הגדלת היעילות בהכנסת חומר צמחי לתרבות וביסוס בנקים במצע מוצק.**

**חומר צמחי:** העבודה בוצעה על צמחי אדמונית עשבונית משני הזנים הגדלים ברמת-הגולן: הזן (Sara Bernhardt) SB והזן (Douchess de Namour) DN, על פי הפרוטוקול שתואר בדו"ח קודם.

קטעי הכתרים בעלי ניצנים הורדו בחודש פברואר 2001 מצמחים שגודלו בתחנת הנסיונות באבנה איתן ונשמרו במקרר בתוך פרלייט בקופסאות סגורות. חלקם הועברו לקירור בטמפ. 1- מעלות למשך חודשיים או יותר והוחזרו לקירור רגיל.

שיטת החיטוי והכנסה התבססה על הפיתוח של השנה הקודמת:

שטיפה של הניצנים תחת מי ברז עם סבון למשך 20 דקות, טלטול בתמיסת מרפאן 1% ובנלאט 0.5%, טלטול בתמיסת נתרן תת כלורי 1% למשך 20 דקות, ושתי שטיפות במים סטריליים. לאחר שלבי חיטוי אלה נשמרו הניצנים בכלי סטרילי יבש למשך 24 שעות בקרור. למחרת, הופרדו הניצנים המחוטאים לשני סוגי ניצנים להכנסה: ניצנים מסוג 3 שהוא הניצן המרכזי בגובה ממוצע של כ-7-8 מ"מ וניצנים מסוג 5 שהם הניצנים החיקיים של ניצן 3 וגובהם הממוצע כ-5 מ"מ. לאחר ההפרדה עברו הניצנים הזעירים חיטוי נוסף בתמיסת נתרן תת כלורי (0.75%): ניצנים מס' 5 למשך 30 שניות וניצנים מס' 3 למשך 5 דקות. לאחר שתי שטיפות במים סטריליים וספיגת עודף המים, הונחו הניצנים על מצע ביסוס (A) בתאורה נמוכה למשך שבוע ולאחריו הועברו למצע B למשך 5-6 שבועות לתאורה מלאה (תמונה 1). בשנה זו התמקדנו בזן DN המבוקש יותר ע"י המגדלים (טבלה 1).

**טבלה 1: סכום מס' הניצנים ששימשו להכנסה מזן SB ו-DN בשנת 2001**

זן	מס' הכנסה	ניצן מס' 3	ניצן מס' 5
DN	1	28	34
	2	28	32
	3	56	12
	4	66	53
	6	94	---
SB	5	33	53

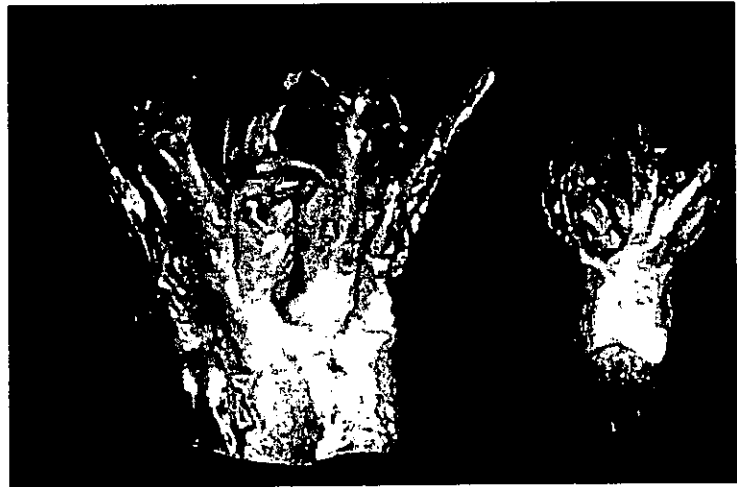
**טבלה 2: יעילות ההכנסה לאחר העברה ממצע ביסוס למצע ריבוי לפי ניסויי 1999-2000**

% השרדות של הניצנים בתום השלב הראשון בתרבות

זן	ניצן מרכזי	ניצן חיקי
SB	58.2±10.1	77.6±9.0
DN	49.1±6.6	86.8±4.4

בשלב הראשון הצלחנו להגיע לרמה נמוכה ביותר של זיהומים ורמה כמעט אפסית של בעיות השחמה ע"י אנדוטוקסינים.

בהעברה שניה למצע ריבוי טרי פוחת אחוז השרדות אפילו עד כ- 30% נוספים במיוחד בניצן המרכזי, כתוצאה מאנדוטוקסינים ובעיקר זיהומים בקטריאליים פנימיים.



**תמונה 1.** ניצן מרכזי (מס 3 הגדול משמאל) וניצן חיקי (מס 5 הקטן מימין) לאחר שבוע ימים במצע ביסוס בתרבות רקמה.

ניסויי ההכנסות של שנת 2001 מראים כי:

כמות החומר להכנסות בשנה זו היתה פחותה יותר בהשוואה לשנה קודמת. יתכן וזה קשור לסיבות פיסולוגיות לא ברורות או לזיהום אנדוגני של החומר.

הניסויים מראים כי ניתן לשמור חומר צמחי למשך מספר חודשים (עד ששה) גם בטמפרטורה נמוכה יותר. עוד התברר בניסויים כי גם לאחר הורדה של ניצנים ניתן לחדש את תערובת איחסון הכתרים (פרלייט עם קוטלי פטריות מרפאן 1% ובנלאט 0.5%) למשך 3 חודשים נוספים והם יצמיחו סביב הגדם ניצנים חדשים להכנסה לתרבות. חומר כזה הוכנס בהכנסה מספר 6 (טבלה 1).

### **ב. ריבוי צמחוני אדמונית במצע מוצק**

כפי שתואר בדוח קודם פותחו שלושה נתיבים לריבוי אדמונית. במהלך שנת 2001 בוצעו ניסויים על מנת לשפרם ו/או לבחון את הפוטנציאל הטמון בכל אחד מהם.

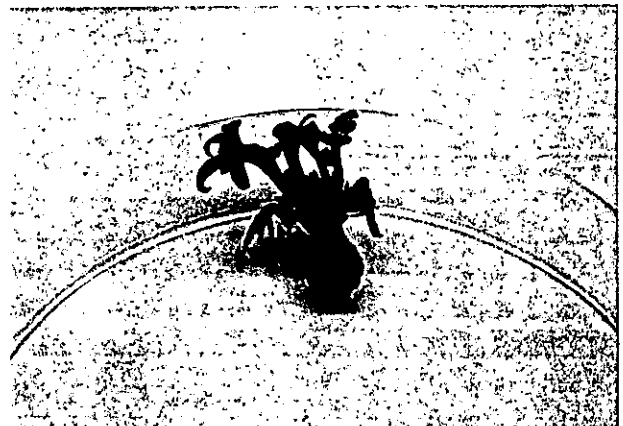
#### **1. ריבוי ע"י חלוקה לאורך של צמחונים מפותחים.**

צמחונים מרובי גבעולים ניתנים לחלוקה לאחר כ-3-4 חודשים במצע ריבוי (תמונה 2).

לאחר החלוקה הועברו הצמחונים למצע ביניים (זהה בהרכבו למצע הריבוי אלא שאינו מכיל הורמונים) למשך כ-10 ימים ורק אח"כ הועברו למצע גידול טרי (תמונה 3).



**תמונה 3.** צמחונים של אדמונית דמויי "שיח" לאחר חלוקה וריבוי במצע.



**תמונה 2.** צמחון של אדמונית דמוי "שיח" במצע המתאים לחלוקה.

במהלך הניסויים בשנה זו שיפרנו את יעילות תהליך הריבוי בכך שחסכנו את שלב הביניים בהעברה למצע ללא הורמונים למשך 10 ימים. שלב זה היה עד כה הכרחי, שנועד למנוע החממה של הרקמה בחינה מקרוב של צמחונים שהוצאו מהקופסא (תמונה 14) מראה כי השורשים יוצאים מבסיס הצמחון ולא מן הרקמה שמתחתיו. עובדה זו מעידה על כל כך שיתכן והרקמה דמוית הקאלוס בבסיס הצמחון רק מפריעה להשתרשות הצמחונים.

נמצא כי את שלב ביניים זה ניתן להחליף בטבילה של הצמחונים לאחר החיתוך באחת משתי התמיסות:

א. תערובת של חומצה ציטרית וחומצה אסקורבית 1% כל אחת למשך 15 דקות. או:

ב. תמיסה של DTT (Dithiothreitol) בריכוז של 50 מג לליטר למשך 20 דקות.

התברר כי ביצוע אחד מהטיפולים האלו מנע את סימני ההחממה הנ"ל וחסך את שלב הביניים. שיטת החלוקה לכשעצמה עדיין משמשת אותנו במעבדה ומקדמי הריבוי שהתקבלו היו דומים לאלו שהתקבלו בעבר (טבלה 3).

**טבלה 3: מקדמי הריבוי של צמחוני אדמונית לאחר חלוקתם לאורכם (לפי ניסויי 1999-2000)**

זן	חלוקת ניצן מרכזי (3)	ניצנים חיקיים (5)
SB	$3.3 \pm 0.4$	$4.2 \pm 0.3$
DN	$5.3 \pm 0.6$	$3.9 \pm 0.3$

התוצאות עבור הזן SB הן משתי הכנסות שלו לתרבית ושל הזן DN מארבע הכנסות.

הממוצע ב-SB התקבל מ-20 צמחונים מניצן 3

ו-100 צמחונים מניצן 5

הממוצע ב-DN התקבל מ-50 צמחונים מניצן 3

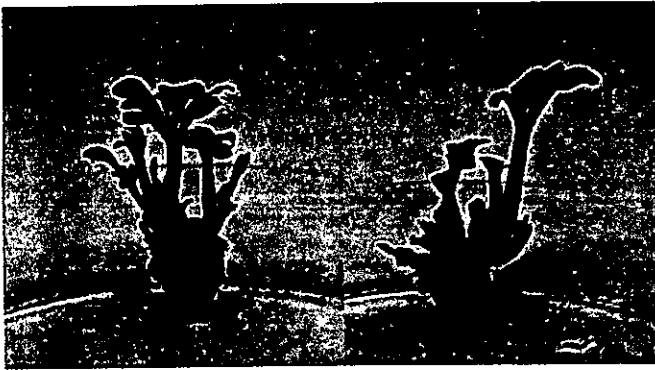
ו-131 צמחונים מניצן 5

**2. ריבוי צמחונים ממקטעי רקמה דמוית "קאלוס" בבסיס הצמחון.**

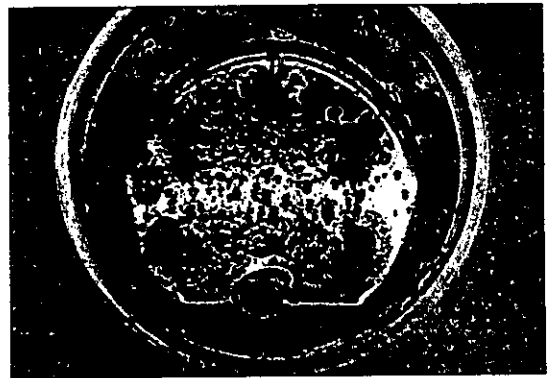
א. **ריבוי על מצע מוצק.** צמחונים מפותחים יצרו במקרים רבים רקמה דמוית "קאלוס" בבסיס הצמחון, כפי שניתן לראות בצמחון המתואר בתמונה 2. רקמה עגולה ירוקה. הצמחונים הוצאו מתוך הקלוס והועתקו למצע ריבוי. מקטעי הרקמה דמוית הקאלוס הועברו למצע למצע ריבוי רגיל לאחר טיפול כמתואר בסעיף קודם. (תמונה מס' 4). התפתחות צמחונים נצפתה לראשונה כעבור 3-4 שבועות.

בתמונה מס' 5 ניתן לראות יצירת צמחונים בדרך זו.

ניתן לראות בשיטת ריבוי זו כחלק נוסף לשיטת הריבוי הקודמת ובכך להגדלת מקדמי הריבוי.



תמונה 5. צמחונים בודדים שהתפתחו ממקטעי רקמה דמויית קאלוס (כעבור 5 שבועות במצע).



תמונה 4. התפתחות צמחונים ממקטעי רקמה דמויית קאלוס (כעבור 5 שבועות).

### ב. ריבוי מקטעי רקמה דמוית קאלוס במצע נוזלי.

במהלך שנת 2001 נבדקה האפשרות של ריבוי מקטעים אלו בנוזל. מקטעי רקמה הוסרו מבסיס הצמחונים כפי שתואר לעיל והוכנסו לארלנמייירים מכילים מצע נוזלי לריבוי. בכל ארלנמיייר הוכנסו מספר יחידות זהה ובכל חזרה שימשו ששה בקבוקים לפחות. הארלנמייירים הונחו על מטלטלת (אורביטלית) בחדר גידול. לשם השוואה הונחו מקטעי רקמה על מצע ריבוי מוצק בתוך קופסאות ריבוי.

תוצאות ניסויים אלו הראו כי לא נצפה שיפור בריבוי בנוזל, בהשוואה למוצק ולעיתים אף היה נמוך ממנו. שיטת הריבוי בנוזל לא תשמש בעתיד. יחד עם זאת, יש להמשיך לנצל את הרקמה דמוית הקאלוס בבסיס הצמחון לאחר הורדת הצמחונים ולמצוא מצע משופר לניצנים קטנים (גודל 1-2 מ"מ) המתפתחים בבסיס הצמחון כדי לנצל את מלוא הפוטנציאל של רקמה זו.

### 3. ריבוי אדמונית ע"י יצירת יחידות ריבוי בקור.

צמחוני אדמונית משני הזנים שימשו לעבודה זו. הצמחונים נשמרו בקירור ( $4^{\circ}\text{C}$  חושך) וכאלה שהיו ב-  $13^{\circ}\text{C}$  עם תאורה. צמחונים בודדים וכן הנצות ללא מבנה של צמחון הועברו למצע B ובהשוואה למצע E הזהה ל-B בתוספת אנצימידול 0.5 מ"ג לליטר. הצמחונים הושארו בתנאים אלו למשך 3 חודשים. כעבור תקופה זו נוצרו יחידות ריבוי עם פריצות אטיולנטיות (גוון לבן ורוד). בתמונה מס' 6 ניתן לראות את הפריצות כעבור מספר (5) חודשים בקירור.



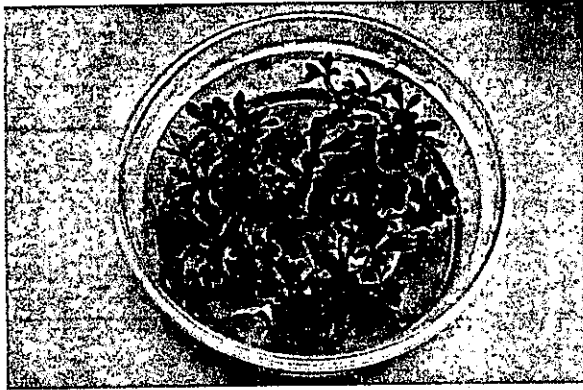
תמונה 6. יצירת יחידות ריבוי בקור (4 מעלות) על מצע רגיל ללא אנצימידול (מימין) ועל מצע עם אנצימידול (משמאל), זן DN.

כפי שניתן לראות נוצרות יחידות רבות מצמחון בשני סוגי המצע אלא שמספרן רב יותר במצע עם אנצימידול (23 לעומת 13) כאשר, על מצע ללא אנצימידול יש גבעולים אטיולנטים מוארכים המעידים על שלטון קודקודי המדוכא אולי באמצעות אנצימידול (בתמונה משמאל) וכך הוא מאפשר ריבוי יתר של פריצות.

לא נראה קשר בין הזן לכושר זה וכן לא נראה קשר בין מצבו הראשוני של הצמחון אם היה רק צמחון נמוך- לא מוגדר עדיין, ללא גבעול ועלים, או צמחון רגיל או צמחון מפותח בעל מס גבעולים, התופעה נצפתה רק ב-  $4^{\circ}\text{C}$  ולא ב-  $13^{\circ}\text{C}$ .

הפריצות נראו כיחידות ריבוי. לפיכך הן הופרדו והועתקו למצע גידול (B).

**בתמונה מס' 7** ניתן לראות התפתחות צמחונים מיחידות הריבוי שנוצרו בקור. צמחונים אלו דומים לחלוטין לצמחונים שנוצרו על ידי שיטת החלוקה לאורך.



תמונה 7. צמחונים שנוצרו מיחידות ריבוי בקור

יעילות הריבוי בשיטה זו מוצגת בטבלה 4.

טבלה 4: יצירת צמחונים מיחידות הריבוי שנוצרו בקור.

זן	מס' יחידות ריבוי לצמחון	מס' צמחונים שנוצרו מצמחון	% יחידות ריבוי שפיתחו צמחון
SB	$7.0 \pm 2.5$	3.66	$46.3 \pm 17.0$
DN	$8.3 \pm 1.6$	2.52	$31 \pm 6.8$

התוצאות המעודדות שהתקבלו משיטת ריבוי זו הביאו אותנו לביצוע ניסויים נוספים בשנה זו על מנת להציעה כפרוטוקול לריבוי.

בניסויים אלו נבחנו טיפולים נוספים על מנת לוודא את השפעת הקור ו/או החושך בנוסף לאנצימידול על ידי הוספת שני טיפולים: צמחונים על מצע E ב 12 מעלות וכן צמחונים ב 12 מעלות בתנאי חושך. עדיין לא הצלחנו לקבל תשובות ברורות מניסויים אלו בגלל משך הניסוי. שיטה זו נראית לנו כמבטיחה מאוד ואנו מקוים לבססה כפרוטוקול לריבוי לאחר בירור הנקודות שצוינו לעיל.

### ג. השרשה של צמחונים בתרבית

צמחונים ששהו כבר 3 חדשים בקורר הועברו למצע השרשה המכיל אוקסינים: NAA בריכוז 0.1 מ"ג לליטר, IBA בריכוז 1 מ"ג לליטר ו-IAA בריכוז 1 מ"ג לליטר. הצמחונים הודגרו ב-  $4^{\circ}\text{C}$  ו-  $13^{\circ}\text{C}$ . לאחר חדשיים היתה התחלת השרשה בצמחונים שהודגרו בטמפרטורה של  $13^{\circ}\text{C}$  מעלות בלבד, אך נוצרו שורשים קצרים מאד (טבלה 5).

**בטבלה 5.** השפעת הוספת אוקסנים למצע וטמפרטורת הדגרה על השתרשות של צמחוני אדמונית בתרבית.

<b>ניסוי 2</b>			<b>ניסוי 1</b>		
טמפ'	מס' צמחונים	מס' צמחונים	מס' צמחונים	מס' צמחונים	מס' צמחונים
עם שרשים	עם שרשים	עם שרשים	עם שרשים	עם שרשים	עם שרשים
ממוצע, מ"מ	ממוצע, מ"מ	ממוצע, מ"מ	ממוצע, מ"מ	ממוצע, מ"מ	ממוצע, מ"מ
4° C	30	0	2.7	15	5
13° C	30	0	0	15	0

תוצאות הניסויים משנים קודמות מלמדות על אינדוקציה להשרשה בקור ועל כך שהשרשה תהיה בטמפ' הגידול ולא בקור. התוצאות מעידות כי השרשה של צמחונים בתרבית היא אכן אפשרית, אך נדרשת עבודה נוספת לקבלת שורשים בכמות ואורך המתאימים להוצאה והקשחה.

#### **ניסויי השרשה בשנת 2001**

בהתאם לתוכנית העבודה רוכז עיקר המאמץ בשנה זו בניסיון לקבל צמחוני אדמונית מושרשים. במהלך השנה בוצעו ניסויים בשני נתיבים:

א. השרשה ex-vitro של צמחוני אדמונית

ב. השרשה In vitro של צמחונים.

א. לשם ביצוע סעיף זה נבדקה האפשרות להשריש צמחוני אדמונית שנוצרו מחדש מכתרי אדמונית כפי שדווחו בעבר (דוח סיכום שנת 1999). מקטעי קני שורש נשמרו בקירור למשך חודשיים ולאחר הורדת הניצנים הושרו בתמיסה המכילה מרפאן 1% ובנלאט 0.5% ומוסתי צמיחה גיברלין ו בנזיל אדנין בריכוז של 100 מג לליטר כל אחד למשך 30 דקות. מקטעים אלו נשתלו בפרלייט ונשמרו בחדר גידול (23 מעלות). לאחר 2-3 שבועות התפתחו ניצנים ויחורים חדשים ששימשו לניסויי השרשה. צמחונים אלו (לפני הסרתם מהכתר) מוצגים בתמונה מס' 8.

תמונה 1B וגם תמונה 1 RROT



**תמונה 8.** כתר מונבט בתוך פרלייט בקופסא (ימין) וכתר עם צמחונים מחוץ לקופסא (שמאל).

קבוצות הטיפולים בניסויים אלו כללו יחורים שנוצרו על ידי טיפול מוקדם בגיברלין ובנזיל אדנין או יחורים שנוצרו על ידי השראה מוקדמת בבנזיל אדנין בלבד (על מנת למנוע השפעה אפשרית של הגיברלין ביצירת שורשים). היחורים נטבלו בחלקם התחתון למשך דקה בתמיסות של אוקסינים שונים לצורך אינדוקציה להשרשה. בניסוי ראשון נכללו 10 טיפולים ובשני שבעה טיפולים. הטיפולים כללו יחורים שלא נטבלו כלל באוקסין (בקורת) וכאלו שנטבלו בתמיסות IBA בריכוזים 1000, 2000, 5000 ו-10,000 מג לליטר, אבקת IBA, אבקת IBA + NAA וכן שני טיפולים של יחורים



שנוצרו מהשראה מוקדמת בבנזיל אדנין בלבד: טבילה בתמיסת IBA 5000 מג לליטר וטבילה באבקת IBA. בניסוי השני חזרנו במקביל על טיפולים 1-7. לאחר הטבילה באוקסינים נשתלו הצמחונים בתוך קופסאות המכילות תערובת מעוקרת של פרלייט עם 25% כבול. הקופסאות הונחו על מגש עם מים וכוסו ביריעת פלסטיק לשמירה על לחות גבוהה בחדר גידול 24 מעלות עם 16 שעות אור.

בכל הניסויים האלו לא התפתחו שורשים ביחורים (צמחונים) שמקורם מכתרים. הצמחונים גם לא עברו תהליך הקשחה ולא שרדו לתקופות ממושכות.

במקביל לניסויים אלו ניסינו להשריש ולהקשיח צמחוני אדמונית לא מושרשים מתרבית רקמה בתנאים לא סטריליים בתחנת הנסיונות באבני איתן. הצמחונים (45 מכל זן) נטבלו בבסיסם בתמיסת IBA בריכוז 4000 מג לליטר או באבקת השרשה של IBA + NAA ונשתלו בתערובת של כבול, פרלייט, ורמקוליט וקלקר בתנאי לחות וערפול. גם כאן הצמחים לא שמרו על חיוניותם לא פיתחו שורשים וכעבור 6 שבועות רובם לא שרדו.

## ב. השרשה In vitro של צמחוני אדמונית בתרבית.

### 1. השרשה במערכת מאווררת על פרלייט.

בסדרה של ארבעה ניסויים נבדקו השפעות של פרמטרים שונים על אינדוקציה להשרשה.

**בניסוי 1** – נבדקה השפעת הקור, IBA ופוטרסין על ההשרשה.

צמחוני אדמונית משני הזנים שמשו בניסוי שהכיל שמונה טיפולים עם שמונה חזרות (צמחונים)

לכל אחד מהטיפולים. בסך הכל שמשו 128 צמחונים ( $128 = 2 \times 8 \times 8$ ). הצמחונים "נשתלו"

בקופסאות גבוהות (500 מל) בתוך תערובת של פרלייט כאשר כ- 10% מנפחה מכיל מצע נוזלי.

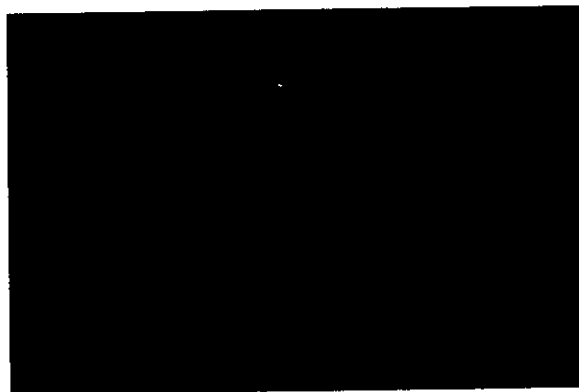
הקופסאות נסגרו במכסה צלולוז לאפשר איוורור ותחלופת גזים (תמונה 9).

הטיפולים בניסוי: חדר גידול מואר (12 מעלות) בהשוואה לחדר קור ( $1^{\circ}$ ).

טבילה או אי טבילה של הצמחונים לפני השתילה בהורמון IBA בריכוז של 5000 מג לליטר.

לכל אחד מהטיפולים הוספה או אי הוספה של פוטרסין (פוליאמין הידוע כמשרה השרשה) בריכוז

של 1 מג לליטר למצע ו IBA בריכוז של 1 מג לליטר.



**תמונה 9.** קופסאות גידול עם מכסה מאוורר מכילה צמחוני אדמונית בתוך תערובת מאווררת של פרלייט ומצע נוזלי.

**ניסוי 2.** בוצע ניסוי דומה בו נבדקה השפעת הקור, ההורמון IAA (במקום IBA), ופוטרסין על ההשרשה.

בניסוי שמשו 12 טיפולים עם שמונה צמחים לטיפול משני הזנים (סך הכל 192 צמחים).

הטיפולים, בנוסף לנייל כללו גם ריכוזים שונים של IAA במצע הנוזלי: 2, 5, ו-10 מג לליטר.

**ניסוי 3.** נבדקה אינדוקציה מוקדמת להשרשה על ידי הכללת פוטרסין בריכוז של 1 מג לליטר במצע מוצק (B) למשך 20 ימים. לאחר מכן הוצאו הצמחונים מהאגר (8 צמחונים לטיפול), נטבלו ב IBA בריכוז של 5000 מג לליטר למשך דקה ונשתלו במערכת דומה כמתואר בשני ניסויים קודמים. המצע הנוזלי במערכת לא הכיל הורמונים. כבקורת שמשו צמחונים שלא נטבלו ב IBA.

**ניסוי 4.** בוצע ניסוי דומה לניסוי 3, אך המצע הנוזלי שהוסף לפרלייט הכיל IAA בריכוזים 0, 2, 5, ו-10 מג לליטר. בניסוי שמשו 8 צמחונים לטיפול (בסך הכל 36 צמחונים).

**תוצאות:** בכל הניסויים נראו הצמחים חיוניים ובריאים במשך חמשת השבועות הראשונים. בתקופה זו לא נצפו עדיין שורשים בצמחים. ברם, כנראה מאחזקתם בפרלייט שלא איפשר במהלך תקופה כה ממושכת מגע טוב עם המצע הנוזלי, או מהשפעה שלילית של הפרלייט עצמו, החלו צמחונים להתמוטט כעבור 6-7 שבועות מבלי שנצפו עדיין שורשים באף לא אחד מהטיפולים. על מנת למנוע את תמותת כל הצמחים, הועברו הצמחונים ששרדו טיפול בתערובת של רוטלי פטריות מרפאן ובנלאט עם אמפוטריצין ובמידת הצורך גם הורחקה רקמה דמוית קאלוס בבסיס הצמחון. לאחר החיתוך נטבלו בסיסי הצמחונים בתערובת של חומצה ציטרית ואסקורבית (1% כ"א) למשך 15 דקות כמתואר לעיל. הצמחונים הועתקו לקופסאות המכילות מצע מוצק (אגר) המכיל חצי MS, 3% סוכרוז ו- IBA בריכוז של 1 מג לליטר (ללא ציטוקינינים) ונשמרו בחדר גידול (16 מעלות).

כעבור כחודשיים נצפתה השתרשות בצמחונים משני הזנים בשעור של 20-50% בקבוצות הטיפול השונות (תמונה 10).



**תמונה 10.** השתרשות של צמחוני אדמונית במצע מוצק כעבור חודשיים מיום העברתם מהפרלייט.

ראוי לציין כי עקב מספר נמוך של צמחונים ששרדו מהשהות הממושכת בפרלייט לא נערך ניתוח סטטיסטי של התוצאות. אולם בחינת הממצאים מראה כי אחוז השתרשות גבוה (עד 50% מהצמחונים) נמצא בקבוצות הטיפול הבאות: 1. צמחונים מזן SB שעברו תקופת קירור ב- $1^{\circ}$ , טבילה ב IBA ואחר כך גודלו על פרלייט מכיל מצע נוזלי המכיל פוטרסין ו IBA (ניסוי 1). 2. צמחונים שעברו קירור מוקדם כמו ב-1 ואחר כך גודלו על פרלייט עם מצע נוזלי המכיל IAA בריכוז של 10 מג לליטר (ניסוי 2). בכל יתר הטיפולים רמת ההשרשה היתה פחותה מזו.

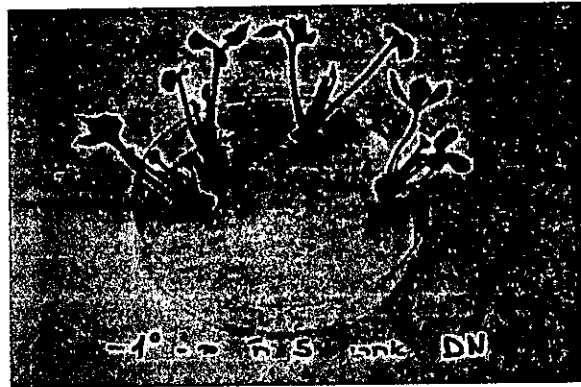
השלמת הניסויים על אגר לאחר אינדוקציה מוקדמת עם מצע נוזלי כפי שתוארה לעיל הראתה כי ניתן להשריש צמחוני אדמונית משני הזנים בתרבית רקמה.

המסקנות מניסויים אלו מעידות כי יש כנראה חשיבות לאינדוקציה בקור ואו פוטרסין וכן יש לשחררם מציטוקינינים. על אף שבניסויים שתוארו לעיל נבחנו פרמטרים רבים, הבעיה שהתעוררה מגידולם בפרלייט מחייבת בחינה של אפשרות נוספות לקבלת פרוטוקול להשרשה.

## 2. השרשה של צמחוני אדמונית במצע אגר מוצק ובזרמקוליט

לשם ביצוע ניסויים אלו השתמשנו בצמחונים משני הזנים משלוש קבוצות שגודלו קודם בתנאים שונים. הצמחונים טופלו באופן דומה: טבילה בקוטלי פטריות, חיתוך רקמה דמוית קאלוס בבסיס המצחון וטיפול למניעת החמה כמתואר לעיל. קבוצות הצמחונים ששמשו היו:

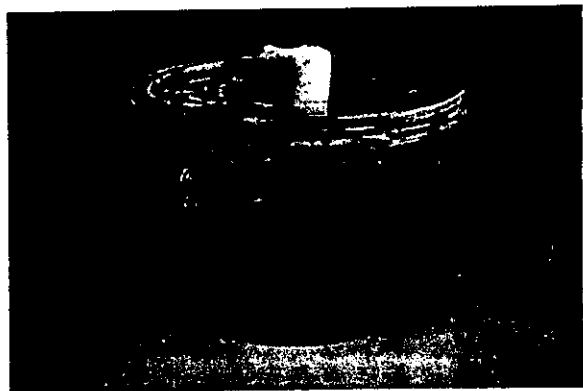
1. מזן SB שגודלו על מצע B בקירור של  $1^{\circ}$  מעלות למשך חודשיים.
2. מזן DN שגודלו על מצע B ושהו בחדר קור בטמפרטורה של  $1^{\circ}$  למשך 5 חודשים בחושך (תמונה 11).
3. מזן DN שגודלו על מצע מוצק בנוכחות אנזימידול ונשמרו במקרר ( $4-5^{\circ}$ ) למשך שלושה וחצי חודשים.



תמונה 11. צמחוני אדמונית (זן DN) ששהו חמשה חודשים בתרבות בקור ( $1^{\circ}$ ).

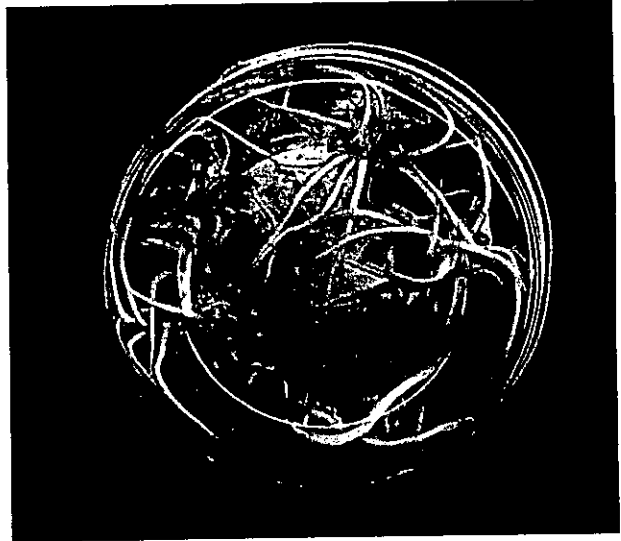
הצמחונים בתמונה 11 מראים כי ניתן לשמור את צמחוני אדמונית חיוניים ובריאים לתקופה ממושכת בטמפרטורה כה נמוכה וזאת בנוסף לעובדה כי הקירור המוקדם גורם לאינדוקציה להשרשה.

מחצית הצמחונים מכל אחת מהקבוצות הועתקו לקופסאות בנפח של 500 מל מאווררות ומכילות מצע מוצק עם חומרי צמיחה (תמונה 12) ואילו המחצית האחרת של הצמחונים הועתקו למבחנות המכילות ורמקוליט עם מצע נוזלי דומה. כעבור שבועיים הועתקו הצמחונים למצע חדש: ממוצק אגר למצע גיל רייט (שקוף) או ממבחנות עם ורמקוליט למצע נוזלי חדש במבחנות עם ורמקוליט ללא חומרי צמיחה (פרופ' מאירה זיו – מידע אישי).



תמונה 12. מערכת השרשה של צמחוני אדמונית במצע מוצק.

**תוצאות:** שורשים ראשוניים נצפו כעבור שבועיים מההעברה למצע החדש על מצע מוצק בלבד. לא נצפתה השתרשות במערכת של מצע נוזלי עם ורמקוליט. יתכן ובדומה לפרלייט לא היה מגע טוב בין המצע הנוזלי והצמחונים. תמונה 13 וטבלה 6 מראות את יעילות ההשתרשות של צמחוני אדמונית בשיטה זו על מצע המכיל ג'ל רייט כעבור 5 שבועות.

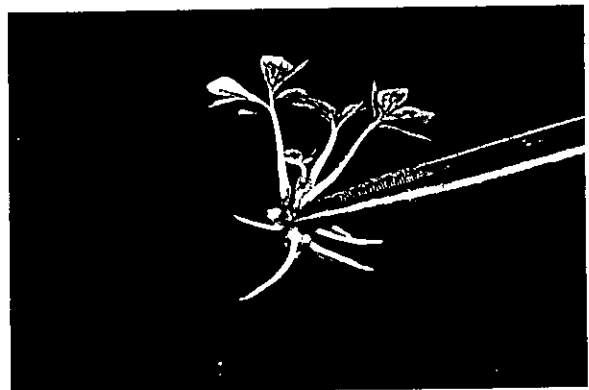


תמונה 13. התפתחות שורשים בצמחוני אדמונית בתרבית במצע מוצק על ג'ל רייט שקוף.

טבלה 6. יעילות השרשה של צמחוני אדמונית במצע מוצק כעבור חודש בתרבית

מקור קבוצת הצמחונים	זן	צמחונים מושרשים (%)	מס' שורשים לצמחון	אורך שורשים (ממ)
1	SB	93.0	5.8	12.3
2	DN	43.2	6.3	21.2
3	DN	73.3	6.4	18.6

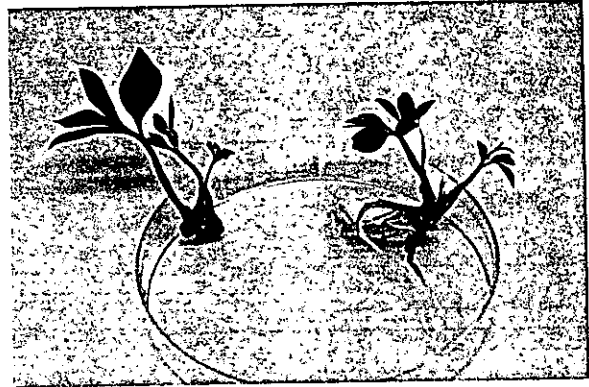
התוצאות מראות כי צמחונים מכל שלוש הקבוצות היו בעלי יכולת השתרשות. ההשתרשות של צמחונים שנשמרו בקור למשך חודשיים (קבוצה 1) היתה הגבוהה ביותר ואף מזו של אלו שנשמרו לתקופה ממושכת יותר. לא נמצאו הבדלים במספר השורשים שנוצרו לצמחון (5.8-6.4) שהיה גבוה באופן יחסי (טבלה 6).



תמונה 14. צמחון של אדמונית שהשתרש בתרבית על מצע מוצק בג'ל רייט (כעבור 5 שבועות במצע).

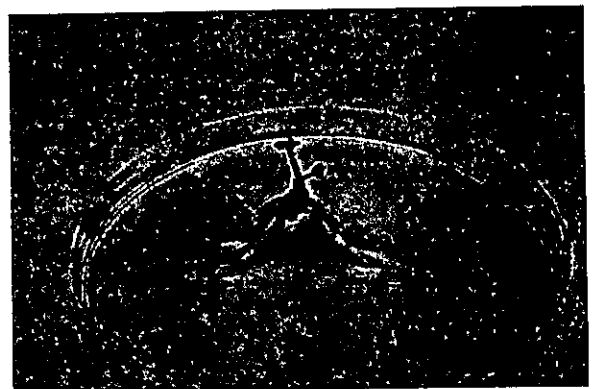
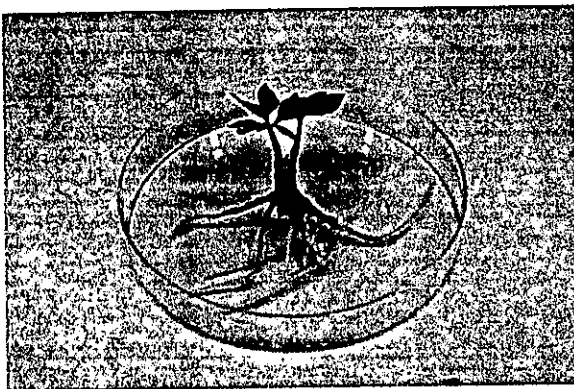
בחינה מקרוב של צמחונים שהוצאו מהקופסא (תמונה 14) מראה כי השורשים יוצאים מבסיס הצמחון ולא מן הרקמה שמתחתיו. עובדה זו מעידה על כל כך שיתכן והרקמה דמוית הקאלוס בבסיס הצמחון רק מפריעה להשתרשות הצמחונים.

בהשוואה שנערכה בין צמחונים מזן DN בעלי רקמה דמוית קאלוס עגול בבסיס הצמחון לבין צמחונים שרקמה זו הוסרה מהם לפני הנחתם על המצע להשרשה במערכת זו, נמצא כי אכן נוכחות רקמה זו בבסיס הצמחון מעכבת כנראה את התפתחות השורשים (תמונה 15). תוצאה זו היתה עקבית ונצפתה בכל המקרים.



תמונה 15. צמחון של אדמונית עם רקמה דמוית קאלוס בבסיסו וללא שורשים (שמאל), בהשוואה לצמחון שרקמה זו הוסרה ממנו והשתרש כעבור 5 שבועות בתרבית.

במערכת ניסויים זו נמצא עוד כי גם צמחונים קטנים בעלי נצר מינימלי ועלים זעירים הם בעלי יכולת השתרשות גבוהה ומערכת שורשים מפותחת מאוד (תמונה 16). יש לפעול למנוע התפתחות יתר של השורשים על חשבון התפתחות הנצר על מנת לקבל צמחונים עם מערכת שורשים ונצר הראויים לשיווק והקשחה.



תמונה 16. התפתחות מערכת שורשים על צמחון מזן SB עם נצר זעיר (מימין) וצמחון מזן SB עם נצר ועלים מפותחים (שמאל) כעבור חמשה שבועות בתרבית.

### סיכום ומסקנות העבודה:

1. פותח פרוטוקול יחודי להכנסתם של ניצנים מרכזיים וחיקיים עם אחוזי התבססות בתרבות גבוהים מאד. שיטה זו אף איפשרה הגדלה משמעותית של מספר יחידות הריבוי, בהשוואה לשיטה קודמת, שנמצאה כלא יעילה.
2. פותחו שלוש שיטות לריבוי צמחונים בתרבות: חלוקה לאורך של צמחים מפותחים דמויי "שיח", שמוש במקטעי רקמה דמויית קאלוס המתפתחת בבסיס הצמחונים לקבלת צמחונים (כהמשך לשיטה קודמת ובכך מגדילה את מקדם הריבוי), וקבלת צמחונים מיחידות ריבוי שנוצרו בקור (בעיקר עם טיפול באנצימידול). שיטה זו הינה מעודדת ביותר ונראית לנו כמבטיחה ביותר.
3. פותחה שיטה למניעת החמה ותמותת צמחונים במהלך הריבוי כתוצאה מהפרשת פנולים ואנדוטוקסינים לאחר חיתוך הרקמה.
4. בניסויי השרשה התברר כי ניתן לקבל צמחוני אדמונית מושרשים משני הזנים באחוזים משמעותיים. יש לשפר את הנושא של השרשת צמחונים על מנת לקבל כאלו הראויים לשיווק.
5. עדיין אין בידינו שיטה להקשחתם של צמחונים אלו בתנאי מעבדה/חממה-בית רשת ויש עוד ללמוד נושא זה.

### פרסומים מדעיים: אין עדיין פרסומים מדעיים מעבודה זו.

### תכנית העבודה לשנה הבאה (שנה רביעית) תכלול את הסעיפים הבאים:

1. שיפור הריבוי בקור עם אנצימידול באור ובחושך (השלמת פיתוח פרוטוקול הריבוי).
2. שיפור הפרוטוקול להשרשה:
  - א. אימות תוצאות הניסויים האחרונים וקבלת אחוזי השרשה גבוהים יותר.
  - ב. לבחון שוב השרשה במצע כמו ורמקוליט בנוזל (עשוי לאפשר הקשחה מהירה וקלה יותר).
  - ג. לפעול לויסות מערכת שורשים על מנת לקבל צמחון עם מערכת שורשים המתאימה לשיווק ולהקשחה. יש לנתב את התפתחות מערכת השורשים לעומק ולא לרוחב כפי שקיבלנו עד כה.
  - ד. לפעול למניעת התפתחות יתר של שורשים על חשבון התפתחות הנצר, כפי שצפינו בחלק מהמקרים (תמונה 16 בדוח).
3. לימוד נושא הקשחתם של צמחונים מושרשים בתרבות בתנאי מעבדה או חממה-בית רשת ואחר כך ללמוד את תנאי ההקשחה ברמה חצי מסחרית.
4. בסיום העבודה יכתב פרוטוקול לקבלת צמחוני אדמונית מושרשים בתרבות ואופן הקשחתם.