

## תקציר הדו"ח:

## 1. הצגת הבעיה (חשיבות, מטרות):

מטרת עבודה זו היתה לתרום לקיצור תהליך האינטרודוקציה של מיני עצי פרי נשירים בארץ. כיום נמשך תהליך זה מספר שנים, בין השאר, עקב בדיקות וירולוגיות המתבצעות בשדה הפתוח ומוגבלות למספר שבועות בשנה.

## 2. מהלך ושיטות עבודה:

הוצבו שני יעדים מידיים בתחום איבחון לוירוסים ובתרפיה של חומר צמחי נגוע: א. פיתוח מערך ריבוי Micropropagation עבור צמחי בוחן מעוצים מתאימים לעבודה בחממה, בלתי מוכרים בארץ ברובם ולמוד אבחון מהיר של וירוסים בנשירים במשך כל עונות השנה בתנאים מבוקרים. ב. פיתוח פרוטוקול תרפיה *in vitro* שיהיה יעיל וישים עבור נשירים נבחרים בעלי חשיבות לענף המטעים בארץ. העבודה התמקדה בשני קווי מחקר אלה במקביל.

## 3. תוצאות עיקריות:

פיתוח מערך ריבוי *in vitro* של צמחי בוחן ואיבחון מהיר של וירוסים - ייבאנו ארצה צמחי בוחן חדשים הכוללים את האינדיקטור העיקרי עבור גלעיניים ושניים עבור גרעיניים. שלשתם מגיבים בסמני עלים ספציפיים לוירוס על הרכבה עם חומר נגוע בתנאי חממה מבוקרת. הצלחנו בהתאמת מצעים לריבוי *in vitro*, השרשה, הקשיה, אקלום ואופטימיזציה של האיבחון בתנאי הארץ.

ולימוד הסמנים האופייניים למספר וירוסים כולל וירוס הגמדון של הגלעיניים (דווח ראשון בארץ) נמצא בעצומו. נותרו מספר נקודות הדורשות שפור נוסף לצורך יעול הבדיקות.

פתוח פרוטוקול תרפיה *in vitro* - העבודה חולקה לשתי קבוצות צמחים נגועים - נשירים נגועים בוירוסים מאופיינים עבורם קיימות בדיקות מהירות (ELISA ו-PCR) ובלתי מאופיינים הניתנים לאיתור בבדיקה ביולוגית בלבד. החומר הנגוע כלל תפוח (2 זנים וכנה) נגועים ב-CLSV, שיזף (2 זנים), שקד (2 זנים) נגועים ב-PNRSV גודגדן, אגס אדום (3 זנים), הניסויים כללו טרמותרפיה, כמותרפיה וטיפול משולב שנתנו כולם לצמחונים בגידול *in vitro*. יעילות הטיפול הוערכה על פי שני פרמטרים - אחוז הישרדות ונקיון מוירוס כפי שנמדד במשך מספר חודשים ב-ELISA ו-PCR עבור וירוסים מאופיינים ועל ידי בדיקה ביולוגית עבור בלתי מאופיינים. מהתוצאות שנאספו הסתבר שניתן להעלות את טמפי הטיפול ב-2-3 מ"צ בטרמותרפיה *in vitro* לעומת טפול כמותרפי בעוד שבשיזף יש צורך בטיפול משולב. מסוימים (תפוח) ניתן להסתפק בטפול כמותרפי בעוד שבשיזף יש צורך בטיפול משולב. הטפולים השונים הניבו צמחונים חפשיים מוירוס הנבדקים עדיין לאפשרות של נגיעות

## פיתוח טכניקות *in vitro* לאינטרדוקציה מהירה של מיני עצי פרי נשירים

מוגש על-ידי

ש. שפיגלי, ש. זילכה<sup>2</sup>, י. פיינגרשי, י. תסי, א. רוטבאום<sup>3</sup>, מ. וייסי

המחלקה לזירולוגיה - מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

<sup>2</sup>המכון למטעים - מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

<sup>3</sup>השרותים להגנת הצומח - משרד החקלאות, בית דגן

<sup>1</sup>Dept. of Virology - Agricultural Research Organization, Bet Dagan

<sup>2</sup>The Institute for Horticulture - Agricultural Research Organization, Bet Dagan

<sup>3</sup>The Plant Protection Services, Bet Dagan

e-mail: <sup>1</sup> vpsarasp@volcani.agri.gov.

### תקציר

מטרת עבודה זו הייתה לתרום לקיצור תהליך האינטרדוקציה של מיני עצי פרי נשירים בארץ. כיום נמשך תהליך זה מספר שנים, בין השאר, עקב בדיקות וירולוגיות המתבצעות בשדה הפתוח ומוגבלות למספר שבועות בשנה. לשם השגת מטרה זו הוצבו שני יעדים מיידיים בתחום איבחון לזירוסים ובתרפיה של חומר צמחי נגוע: (1) פיתוח מערך ריבוי *micropropagation* עבור צמחי בוחן מעוצים ספציפיים, מתאימים לעבודה בחממה, בלתי מוכרים בארץ ברובם ולמדד אבחון מהיר של זירוסים בנשירים במשך כל עונת השנה בתנאים מבוקרים, (2) פיתוח פרוטוקול תרפיה *in vitro* שיהיה יעיל וישים עבור מיני נשירים נבחרים בעלי חשיבות לענף המטעים בארץ. לפי התכנון המקורי התמקדה העבודה בשני קווי מחקר אלה במקביל. פיתוח מערך ריבוי *in vitro* של צמחי בוחן ואיבחון מהיר של זירוסים - יבאנו ארצה צמחי בוחן חדשים הכוללים את האינדיקטור העיקרי עבור גלעיניים ושיניים אחרים עבור גרעיניים. שלשתם מגיבים בסמני עלים ספציפיים לזירוס על הרכבה עם חומר נגוע בתנאי חממה מבוקרת. הצלחנו בהתאמת מצעים לריבוי *in vitro* השרשה, הקשיה, אקלום ואופטימיזציה של האיבחון בתנאי הארץ. לאחרונה התקבלה תגובה להרכבת חומר נגוע ולימדד הסמנים האופייניים למספר זירוסים כולל זירוס הגמדון של הגלעיניים (דווח ראשון בארץ) נמצא בעצמו. נותרו מספר נקודות הדורשות שפור נוסף לצורך יעול הבדיקות.

פיתוח פרוטוקול תרפיה *in vitro* עבור מיני נשירים נגועים בזירוסים - העבודה חולקה לשתי קבוצות צמחים נגועים - זנים נגועים בזירוסים מאופיינים עבורם קיימת בדיקות מהירות (ELISA ו-PCR) ובלתי מאופיינים הניתנים לאיתור בבדיקה ביולוגית בלבד. החומר הנגוע כלל תפוח (2 זנים וכנה) נגועים ב-CLSV, שזיף (זן אחד), שקד (2 זנים) נגועים ב-PNRSV, וכן גודגון (זן אחד), אגס אחד (3 זנים) ושזיף (זן אחד) נגועים בזירוס בלתי מאופיין. הניסויים כללו טרמותרפיה, כמותרפיה וטיפול משולב שנתנו כולם לצמחים בגידול *in vitro*. יעילות הטיפול הוערכה על פי שני פרמטרים - אחוז הישרדות ונקיון מוירוס כפי שנמדד במשך מספר חודשים ב-ELISA ו-PCR עבור זירוסים מאופיינים ועל ידי בדיקה ביולוגית עבור בלתי מאופיינים. מהתוצאות שנאספו הסתבר שניתן להעלות את טפול הטיפול ב-2 - 3 מ"צ בטרמותרפיה *in vitro* לעומת טפול בצמחים מעוצים מבלי לפגוע בהישרדות. בגדולים מסוימים (תפוח) ניתן להסתפק בטיפול כמותרפי בעוד שבשזיף יש צורך בטיפול משולב הטיפולים השונים הניבו צמחים חפשיים מוירוס הנבדקים עדיין לאפשרות של נגיעות בזירוס.

חלק מתוצאות מחקר זה (בדיקות ביולוגיות קצרות מועד) ניתנת לישום מיידי במערך ההסגר לאחר תקופת השוואה עם שיטות קיימות. מספר נקודות דורשות השלמות ברמת המחקר ולאחר מכן יוכלו להיכלל במערך הכנת חומר ריבוי נקי של נשירים. תכנית זו הייתה בת שלוש שנים ולא אושר המשך. הענקת מימון יאפשר המשך העבודה הוירולוגית ויעזור בקידום ענף המטעים.

## מבוא ומטרת המחקר

פיתוח והתאמת טכניקות לאיבחון וירוסים והכנת חומר ריבוי נקי בשיטות העדכניות הנקוטות בארצות בעלות ענפי מטע מפותחים הינה רב שלבית ומתמשכת על פני מספר שנים. איבחון וירוסים כולל בדיקות סרולוגיות ומולקולריות עבור וירוסים מאופיינים ובדיקות ביולוגיות, בעיקר הרכבות על צמחי בוחן מעוצים (אימקסינג). תהליך האימקסינג בשדה הפתוח הינו ארוך ביותר (חדשים עד שנים), בצועו מוגבל לתקופה מסוימת בשנה אך במקרים רבים מחוץ למיטת הכנסת פתוגנים. קצור תהליך זה נעשה במספר מדינות על ידי רענון ערכת האימקטורים והכנסת האימקסינג לחממה מבוקרת וקבלת סמים אחרי מספר שבועות. תהליך מקוצר זה תורם לקצור תהליך האינטרודוקציה בצורה משמעותית במקרים רבים. מרכיב אחר של האינטרודוקציה הוא שחרור חומר נגוע מוירוסים באמצעות טכניקות טרמו וכמותרפיה.

מטרת מחקר זה לתרום לקיצור תהליך האינטרודוקציה של מיני עצי פרי נשירים בארץ. לשם השגת מטרה זו הוצבו שני יעדים מדיים:

1. פיתוח מערך ריבוי *in vitro* (micropropagation) של צמחי בוחן רב-שנתיים ספציפיים ולמוד איבחון מהיר של וירוסים בנשירים במשך כל עונת השנה בתנאי חממה מבוקרים.
  2. פיתוח פרוטוקול תרפיה *in vitro* שיהיה יעיל וישם עבור מיני נשירים נבחרים בעלי חשיבות לענף המטעים בארץ.
- לפי התכנון המקורי התמקדה העבודה בשני קווי מחקר אלה במקביל. למען הסדר והנוחיות מוגש דוח זה לפי היעדים 1 ו-2.

## תוצאות

1. איבחון וירוסים בתנאים מבוקרים בחממה
- איבחון וירוסים בשיטת ההרכבה על צמחי בוחן ספציפיים בתנאי חממה מבוקרת במשך רוב עונת השנה מחייב אספקה שוטפת של צמחי אימקטור צעירים עליהם מתבצעות ההרכבות. במחקר זה בחרנו לאמץ את שיטת הריבוי והשרשה בתנאי *in vitro* המקובלת במעבדות בצרפת, קמדה ועוד.
- לשם הפעלה מלאה של פרוטוקול זה בארץ היה צורך ב: (א) עדכון מערך צמחי הבוחן על ידי יבוא אימקטורים מומלצים חדשים, לימוד דרך ריבוי, השרשה והקשיה מהירים; (ב) ריבוי והכנת צמחים צעירים של אימקטורים שהיו עד כה בשימוש בשטח הפתוח; (ג) התאמת שיטת אימקסינג בחממה עם אימקטורים מ- (א) ו- (ב) בתנאי הארץ.
- יש להדגיש שאימוץ פרוטוקולים לאיבחון וירוסים איננו ענין טכני גרידא, אלא דורש לימוד והתאמה של כל שלב לתנאי הארץ והמעבדה.

· צמחי בוחן חדשים עבור וירוסים התוקפים עצי פרי גלעיניים וגרעיניים - מזה מספר שנים מהווה *Prunus persica seedling GF305* צמח הבוחן העיקרי בעולם עבור בדיקה ביולוגית בתנאי

חממה לזירוסים של גלעיניים. אינדקטור זה מגיב בסימני עלים אופייניים להדבקה בזירוסים שונים כולל וירוס ה- plum pox. בארץ, לא נכלל אינדקטור זה בערכת הבדיקה השגורה ולכן רוכז מאמץ במסגרת תכנית מחקר זו ללמוד את השלבים השונים עד להכנסתו לשימוש.

זרעי GF305 הובאו על ידינו מצרפת, הונבטו ולאחר הגיעם לגודל מתאים הוכנס צימוח צעיר משתל"י GF305 לגידול *in vitro*. במשך השנה האחרונה נלמדו טכניקות *in vitro* הכוללות ריבוי, השרשה וכן הקשיה ואקלום בחממה של צמח בוחן זה. לאחר קשיים רבים בשלב ההשרשה וההקשיה הצלחנו להתאים שיטות מתאימות עבור שלבים אלה. התחלנו בלימוד אינדקסינג בחממה עם צמחי GF305 ובעקבות קשר עם מעבדת אינדקסינג בצרפת הצלחנו לבצע הרכבות עם חומר נגוע בחממה ולצפות בסימנים אופייניים למספר וירוסים. עד כה קבלנו תוצאות עם וירוס הנקרזה של הגלעיניים (PNRSV), וירוס הגמדון של הגלעיניים (PDV) - apple chlorotic leafspot (CLSV). לפני מתן המלצה לגורמים המתאימים לגבי יישום טכניקת אינדקסינג זו, יש עדיין לבצע בדיקות חוזרות במשך כל עונות השנה וללמוד את קריאת סמני המחלה הספציפיים בתנאי המקום.

צמחי הבוחן העדכניים ברוב המדינות בעלות מעבדות הסגר לאיבחון, בתנאי חממה מבוקרת, וירוסים התוקפים גרעיניים עבור הינם *Pyronia veitchi*, *Malus pumila* cv. Charden. מבין שני צמחי הבוחן *Pyronia* הינו העקרי והחשוב ביותר, מגיב תוך מספר שבועות בסמני עלים אופייניים למספר וירוסים עקריים בגרעיניים. במסגרת תוכנית מחקר זו הובאו ארצה מצרפת (ממעבדתו של Desvignes) צמחונים במצב *in vitro* של *Pyronia* -1 Charden. לשם ריבוי *in vitro* של צמחי הבוחן נבדקו 5 מצעי ריבוי המבוססים על Murashige and Skoog או על (Almehdi and Parfitt). לאחר התאמת מצע ריבוי בו התקבלו צמחונים מפותחים בפקטור ריבוי בין 4-5 הותאם מצע מעודד השרשה ונלמדו תנאי ההשרשה האופטימליים. לגבי Charden, נמצא לאחר ניסויים רבים שהחזקת הצמחונים בחושך במשך 8 ימים (בהם הם נעשה אמיוולנטיים) והעברתם לאור במצע המכין IBA גרמה להשרשת 85% מהצמחונים. לאחר אקלום שרדו בסה"כ 50% מהצמחונים. צמחוני *Pyronia* נמצאו קלים יותר לריבוי והשרשה ולגבי *Pyronia* ניתן לדווח שאחוז הצמחים השורדים לאחר האיקלום גבוה יחסית. בימים אלה התחלנו ללמוד את שיטת האינדקסינג ועדיין אין בידינו תוצאות.

ריבוי *in vitro* של צמחי בוחן המשמשים לאינדקסינג בשדה הפתוח והערכתם בתנאי חממה מבוקרת - הצמח *P. serrulate* cv. Shirofugen - הינו אינדקטור משמש לאבחון 3 וירוסים חשובים בעצי פרי גלעיניים. ריבוי, השרשה והקשיה של אינדקטור זה דווחו בעבר. במסגרת עבודה זו נבדקה אפשרות שימור במקרר של צמחונים מושרשים והוצאתם לחממה לפי הצורך. צמחים שעברו תקופות קרור שונות (עד 4 חודשים) בשלב המבחנה, הורכבו עם חומר נגוע ולאחר מספר שבועות הראו סימנים אופייניים. שיטה זו מאפשרת להכין מאגר צמחי בוחן שיועברו לחממה לפי תכנון מראש ותוך ניצול מירבי של כח אדם ושטח חממה. כמו כן נבדקה אפשרות הרכבת חלקי גבעול של צמחוני אפרסק ושקד, ישירות מהמבחנה, נגועים ב-PNRSV וגודגדן נגוע

ב-PDV על אינדקטור זה. נמצאה תגובה חיובית טיפוסית ב-90% מהמקרים. אמינות בדיקת חומר הגדל בתנאי תרבות רקמה פותח אפשרות איבחון וירוסים גם עבור אינטרוזקציות *in vitro*, דבר הנהוג כבר עתה בעולם בגידולים שונים (תפוא"ד, בטטה ועוד) ונעשה מקובל גם עבור חומר מעוצה.

M. pumila cv. virginia crab - הינו אינדקטור המשמש בעיקר לאבחון הוירוס (ASGV) stem grooving בגרעיניים. אבחון ASGV בתנאי שדה נמשך כשנתיים ואילו בתנאי חממה כחודשיים-שלושה. צמחונים של אינדקטור זה בגידול *in vitro* התקבלו מפולין (מעבדתה של החוקרת ב. זבוקה) ב-1995. נוסו מספר מצעי ריבוי והשרשה המבוססים על (MS) Murashige and Skoog - AP) Almejdi and Parfitt (בתוספת הרכבי הורמונים מתאימים לכל שלב. הוכנו צמחים של אינדקטור זה אשר הועברו לחממה מבוקרת לאחר הקשיה. במשך 1996 נעשו מספר ניסויי הרכבה עם דגימות קליפה מעצי תפוח נגועים ב-ASGV. כחודשיים לאחר ההרכבה וגידול האינדקטורים בחממה מבוקרת נמצאה נקרוזה מקומית טיפוסית באזור ההרכבה של חומר נגוע, המאשרת נגיעות בוירוס זה. לא נמצאה תגובה נקרוטית בהרכבות שנעשו עם חומר בריא.

2. פיתוח פרוטוקול תרפיה *in vitro* עבור מיני נשירים בעלי חשיבות לענף המטעים בארץ במסגרת מחקר זה התמקדנו בלימוד טכניקות טרמו- וכמותרפיה *in vitro* לשם ניקוי מיני נשירים גלעיניים וגרעיניים מוירוסים וקבלת חומר צמחי בריא היכול לשמש מקור לריבוי וגטיבי. הפעלת טיפולים אלה על צמחונים אפשרה התאמת מצע המעודד הישרדות מינים רגישים לחום כגון *Prunus*, טפול בו-זמני של עשרות צמחונים, הכללת כימיקל כמוטרפיותי במצע הגידול בתנאי מבחנה סגורה, ריבוי מהיר של חומר הנמצא נקי לאחר הטפול.

הצלחת טפול תרפיה של חומר צמחי נמדדת על פי שני מדדים (1) הישרדות ורגנרציה (2) ניקיון תוצר הרגנרציה מוירוס כפי שנמדד על ידי בדיקות מקובלות ומהימנות. עבור חלק מהוירוסים התוקפים נשירים אין עדיין בנמצא בדיקות מהירות ואבחונם נעשה באמצעות בדיקה ביולוגית על צמחי בוחן - תהליך ממושך הדורש המתנה בת מספר חודשים/ שנים. על סמך נתונים אלה ועל מנת להפיק את מלוא התועלת מתוכנית זו חולק החומר הצמחי לשתי קבוצות בהן נלמדו טכניקות תרפיה כדלקמן:

א. נשירים נגועים בוירוס מזוהה עבורו קיימת שיטת בדיקה סרולוגית מהירה ונוחה להפעלה על מספר דגימות גדול (ELISA) ולאחרונה בבדיקה מולקולרית (PCR) polymerase chain reaction. ב. נשירים נגועים בוירוסים בלתי מוגדרים עבורם בדיקת חומר המקור והתוצר לאחר טיפול הריפוי ורגנרציה של צמחונים חדשים נעשית עדיין בשיטה ביולוגית (indexing) על צמחי בוחן. תנאי הכרחי להכללת חומר צמחי נגוע לנסוי תרפיה היה הצלחת הכנסתו לגדול *in vitro* וריבוי. עם אתור והגדרת חומר המוצא, הוחל בהכנת תרבויות *in vitro* של כל מועמד. לאחר ניסויים בהם

נבדקו מצעים שונים נבחרו המצעים המתאימים לריבוי והתארכות של מיני נשירים אלה. המצעים מבוססים על AP-1 Ms עם שינויים מתבקשים בהרכב ורמת הורמונים לפי המין והזן. מבין כל המועמדים לניסוי התרפיה לא הצלחנו לקבל גידול טוב של מישמש (זן ED40) בתרבות ונאלצנו לוותר עליו בניסויים. לאחר התבססות הזנים השונים במצעים שהותאמו להם ולאחר ריבוי על בסיס קלונלי ומספר העברות למצע חדש (subculture) נערכו בדיקות ELISA לוירוסים PNRSV ו-CLSV עבור צמחים השייכים לקבוצה א' (לעיל). בכל המקרים נמצאו הצמחונים נגועים בוירוס עבורו נערכה הבדיקה פרט לשזיף (זן Sungold). במקרה זה, צמחוני השזיף (6 קלונים שונים) נמצאו נגועים ב-PNRSV לאחר ביסוסם במבחנה ולאחר 3 העברות עוקבות למצע חדש נמצאו 6 הקלונים חופשיים מוירוס כפי שנמדד ב-ELISA. בבדיקת PCR שנעשתה לקלונים אלה נמצא שהם חופשיים מוירוס ולכן לא נכללו בניסויים. יש לציין שתופעה זו היא חריגה אך מוכרת מניסויים של אחרים וגם מניסוינו עם וירוס אחר מקבוצת ה-ilarviruses. שזיף (זן Ogden) שהוכנס לתרבות בהצלחה ולא הראה את תופעת העלמות הוירוס נכלל בניסויים במקום Sungold.

יקוי מיני נשירים נגועים בוירוס מזוהה - במסגרת פרק זה נכללו זני תפוח (ענה, וסטרינג 24) וכנת מלוס 70 נגועים ב-ACLSV), זני שקד (סמיש וחזנוב) ושזיף (זן אוגדן) נגועים בוירוס הנקראה של הגלעיניים (PNRSV).

טיפול התרפיה שנבחרו לשם קבלת חומר צמחי נקי מוירוס היו:

- טיפולי חום ממושכים (עד 50 יום) המבוססים על טמפרטורות יום ולילה משתנות (40-38 מ"צ במשך 18 שעות אור ו-30 מ"צ במשך 6 שעות חושך),
- כימותרפיה בטמפרטורת החדר (וירחול בריכוז 20 מ"ג לליטר מצע),
- טיפול משולב של טרמו-כימותרפיה.
- צמחוני בקורת נגועים הוחזקו בחדר גידול ב 25 מ"צ.
- הישרדות הצמחונים במשך הטיפול הוערכה חזותית מידי מספר ימים ובתום הטיפול. עם סיום הטפולים השונים מחתכו קצוות הצימח הצעיר (כ-5 מ"מ) והועברו למצע חדש לשם רגרנציה והתארכות.

בדיקות ELISA נעשו מספר פעמים החל מארבעה - ששה שבועות לאחר הרגרנציה מידי כחודשיים במשך כשנה. צמחונים שנמצאו חיוביים בבדיקות אלה סולקו והמשך הריבוי נעשה עם צמחונים שליליים ב-ELISA בלבד. כך ניתן היה בשלב מוקדם יחסית להתמקד בחומר שסיכוי להיות נקיים מוירוס גדולים. בדיקת PCR הופעלה עבור צמחונים גבוליים מבחינת בבדיקת ה-ELISA.

מהתוצאות שקיבלנו עד כה ניתן להסיק את המסקנות הכלליות הבאות:

- בבדיקת השרדות לחום ממושך של הצמחונים נמצא שבתפוח, מבין שני הזנים והכנה, הזן סטרינג 24 הינו רגיש לחום (40 מ"צ) והשרדותו היתה נמוכה ביותר, שזיף ושקד טופלו בחום (38 מ"צ) בהצלחה די טובה. לאחר שינויים במצע הצלחנו לגרום לעליה בהשרדות צמחוני זנים אלה.

- בכל המקרים טמפרטורת הטיפול גבוהה ב 2 - 3 מ"צ מטמותרפיה המתבצעת עם עצים מעוצצים מאותם זנים. ממצאים אלה ייושמו בעתיד עבור זנים וכמות אחרים בעלי רגישות גבוהה לחום.
- ניתן להעלות את יעילות הטמותרפיה על ידי העברת הצמחונים בשלמותם למצע חדש באמצע הטיפול (אחרי כ-25 יום). פעולה זו מאפשרת להתגבר בצורה פשוטה על התיבשות המצע והעקה הנגרמת על ידי כך לצמחונים, בנוסף לעקת החום.
- בכל הניסויים שנעשו עד כה, הן בגלעיניים והן בגרעיניים, נמצא שניצנים צדדיים המתפתחים במהלך הטיפול על הגבעול המרכזי, הינם במקרים רבים חופשיים מוירוס אפילו אם קצה הצמח של הגבעול המרכזי נגוע. תנאי העקה המבוקרים (טמפרטורה גבוהה) הגורמים לעתים להתיבשות הגבעול המרכזי מעודדים גם פיצול מוגבר של ניצנים צדדיים, בחלקם הגדול נקיים מוירוס. יש להדגיש שנקיונם חייב להבדק. אין בידינו עדיין הסבר לתופעה זו, אולם אין ספק שהיא עשויה לתת יתרון משמעותי לתרפיה *in vitro*.
- בדיקות ELISA שנעשו במשך מספר חודשים בצמחונים שהתפתחו מקצוות צימוח צעיר לאחר סיום טיפול הריפוי הראו שניתן לאתר את מרבית הנגועים במשך 3-4 חודשים לאחר סיום הטיפול. בבדיקות שנעשו לצמחונים נקיים - 5 חודשים ויותר לאחר סיום הטיפול, כולל בצמחים שהושרשו והועברו לחממה, לא נמצאו נגועים חדשים בין הנקיים. ממצא זה מדגיש שניתן בקלות יחסית לאתר ולסלק נגועים ולהתמקד בריבוי חומר נקי.
- יעילות ויתרון בבדיקות PCR לצורך איתור מוקדם של נגועים (שליליים ב-ELISA) עדיין לא הושלמה וקיימות בידינו תוצאות חלקיות בלבד שיסוכמו בשלב מאוחר יותר.
- שילוב של טרמו- וכמותרפיה נתן יתרון מסוים לעומת כל טפול בנפרד ובמיוחד בהשוואה לטיפול כמותרפיה בטמפרטורת החדר. בון ענה ניתן לקבל צמחונים נקיים מ-CLSV על ידי טיפול כימותרפי בלבד. לגבי הזן סטרקינג 24 והכנה אין עדיין מספיק נתונים.

## ניקוי זנים גלעיניים מוירוסים בלתי ידועים

מטרת חלק זה של העבודה היתה להשתמש בשיטות של תרביות רקמה על מנת לנקות זנים מצטיינים של מינים גלעיניים מגיעות של וירוסים בלתי ידועים. בשיטות האבחון שפותחו במסגרת העבודה הנוכחית יעשה נסיון לזהות את הנגיעות בחומר הצמחי המקורי ביחס לחומר הצמחי הנקי.

לצורך נקוי מוירוס היה צורך להכניס חומר צמחי מעוצה לתרביות רקמה. לגבי כל אחד מהמינים פותחו שיטות אופטימליות לחיטוי, להכנסתו הראשונית לתרבית, לקביעת סוג המצע הבסיסי (basal medium), לקביעת הרכב ההורמונלי המתאים לשלב של ריבוי הצמחונים ולשלב של התארכותם, וכן התנאים היעילים להשרשה והקשחה.

לאחר הכנסה של הזנים השונים לתרבית הם נוקו מוירוס באמצעות שילוב בין שתי שיטות משלימות: 1. גידול של קצות גידול (shoot-tip culture) של הצימחונים. 2. ריפוי התרביות באמצעות חום (thermotherapy).

היה צורך בהכנה מתאימה של החומר הצמחי בתרבית. מצד אחד שיוכל לשרוד כתוצאה מהעברה של יחידות ריבוי בגודל מינימלי מקצות הגידול; ומצד שני שהתרביות יוכלו לשרוד בשיעור גבוה לאחר טיפולי החום האמורים לחסל את התפתחות הוירוסים. במסגרת זאת ההתקדמות בהכנה של קוים נקיים מוירוס בזנים השונים היתה כדלהלן:

### 1. גודגון מזן 91LA432

זן זה יובא מחברת השבחה פרטית (זייגר) בקליפורניה כזן מבכיר ביותר. ייחורים מורכבים מזן זה על כנת מהלב הוכנסו במהלך הסתיו ל-4 מ"צ עד להתעבות הפקעים. בשיטות החיטוי המקובלות לא הצלחנו להתגבר על זיהום בקטריאלי פנימי ("החידק הצהוב") אשר הרג את מריסטמות הגידול של פקעים שהועברו מהיחורים אל מצעי המזון. עיניים מהזן הורכבו על כנת מהלב וגודלו בחדר מבודד תחת תאורה וטמפרטורה מבוקרת. השתילים המורכבים הוכנסו ל-5 מ"צ למשך חדשיים לשם השראה של התעוררות פקעים. פקעים תפוחים הוכנסו לתרבית. נעשתה אופטימיזציה של הרכב ההורמונלי של המצע לצורך ריבוי. תרביות לאחר שלב התארכות עברו טיפולי טרמוטרפיה שונים. קצות הגידול של התרביות ששרדו עברו תהליכי השרשה, הקשחה ואקלום. שתילים מעוצים משני קוים בלבד הועברו לאגף הגנת הצומח לצורך בדיקת נקיונם באמצעות הרכבה על האינדיקטורים התיקניים הנוהגים באגף. האינדיקטורים שהורכבו ב-1997: Shirofugen, Tilton, Alberta, Bing, Lambert, Kerassa severe (הגיב כבר באופן שלילי). תהליך הבדיקה לא הסתיים והתוצאות לגבי יעילות שיטות הניקוי שהוזכרו יתקבלו רק מאוחר יותר.

### 2. זני אגס אדום: Sansation, Bone Rouge, Cascade



זנים אלה הינם אטרקטיביים ויובאו ארצה על-מנת לגוון את ההרכב המצומצם של זני האגס המקומיים. פותחו השיטות להכנסת זן **Cascade** לתרבות. את שני הזנים הנוותרים היה קשה לחטא. שתילים מזנים אלה הוכנסו ל-5 מ"צ למשך חדשיים והועברו לגידול בחדר מבודד בתנאי אור וטמפרטורה מבוקרים (16 ש' אור, 8 ש' חושך בטמפרטורה 25 מ"צ, לחות יחסית 60-70%, עצמת אור 2500 לוקס). מהצמיחות הצעירות שפרצו בתנאים אלה נלקחו אקספלנטים לצורך גידול בתנאי תרבות. זן **Cascade** עבר מספר טיפולי טרמותרפיה. הצמחונים ששרדו מטיפולים אלה (כ-7%) עברו שלבי ריבוי, השרשה ואקלום. כיום יש בידינו מספר קלונים הראויים לבדיקה על אינדיקטורים ובשיטות אחרות לבדיקת מידת נקיונם. שתילים מעוצים מזן זה ילקחו בימים אלה לבדיקה לאגף הגנת הצומח.

הזן **Bone Rouge** עבר שני מחזורי טרמותרפיה בשיעור השרדות של 11-13%. גם צמחונים של זן זה עברו שלבי ריבוי, השרשה ואקלום. כיום יש בידינו שתילים ממספר קלונים המוכנים לבדיקת רמת נקיונם. שני קלונים מזן זה הועברו ב-2.97 לאגף הגנת הצומח לצורך בדיקתם על גבי אינדיקטורים תיקניים לאגסים.

הזן **Sansation** עבר גם הוא טיפולי טרמותרפיה בשיעור השרדות נמוך של 2%. ישנה כיום בעיה בריבוי הצמחונים ששרדו. כיום נבדקים מצעים והרכבי הורמונים שונים במטרה להתגבר על בעית הריבוי.

### 3. זן שיזף: **Autumn Beaute**

זן זה הורכב על כנת מריאנה והוחזק בגידול בחדר מבודד ("קרנטינה") בתנאים מבוקרים (16 ש' אור, 8 ש' חושך בטמפרטורה 25 מ"צ, לחות יחסית 60-70%, עצמת אור 2500 לוקס). חלקים מהצמיחות הצעירות הוכנסו לתרבות. הותאמו הרכבים של מצעים לצורך ריבוי ולצורך הקניית יכולת השרדות בתנאי הטיפול בחום. התרבויות עברו 3 מחזורי טרמותרפיה בטמפרטורות ואורכי זמן שונים. פותחו בזן זה שיטות מיוחדות של הכנת הצמחונים לצורך שיפור שיעור ההשרדות בתנאי טיפולי הטרמותרפיה וכן לצורך שיפור יכולת הריבוי בשלבים שלאחר טיפולי החם. הצמחונים עברו ריבוי לפי קלונים. שתילים מעוצים משני קלונים נלקחו לפני כשנה לצורך הרכבתם על אינדיקטורים תיקניים באגף הגנת הצומח. האינדיקטורים שהורכבו: **Tilton**, **Alberta**, **Bing**, **Pozegace** ו- **Shirofugen** (הגיב כבר באופן שלילי).

### 4. זן משמש: **DE 40**

זן זה התקבל למעבדה כיחור מורכב על זריע משמש. הוא הוכנס לתרבות ועבר את שלבי הביסוס, הריבוי וההתארכות. במשך ההעברות זן זה התמוטט ולא נעשה נסיון חדש לשקמו.

### 5. אבחון של נגיעות וירלית מתוך מאגר הזנים המוחזקים כ"בנק" גנטי בתרבויות רקמה.

מינים וזנים של עצי פרי נשירים ופירות קטנים שפותחו לגביהם שיטות של מערכת תרבויות הרקמה במעבדתנו, מוחזקים אצלנו כבנק גנטי בתנאים תזונתיים, הורמונליים וסביבתיים.

שהותאמו לצורך שימור ממושך. מאגר גנטי זה משמש לשחזור של קוים חופשיים מפתוגנים וכן כפונציאל לביצוע מחקרים גנטיים ופיסיולוגיים ברמת התרבית. במאגר הגנטי נמצאים זנים של גודגדן, אגס, תפוח, שקד, שזיף, משמש, אפרסק ואוכמניות (כ-15 זנים). קוים שונים ממאגר זה שוחזרו ורובו ומידת נגיעותם בוירוסים נבדקה בשיטות המהירות שפותחו במסגרת תוכנית המחקר הנוכחית.

### סכום ומסקנות

הידע הנמצא בידינו לגבי האימיקטורים שנכללו במחקר זה מאפשר לכלול Shirofugen I-1 virginia crab במערך בדיקות בתנאים מבוקרים בחממה במסגרת ההסגר ואו בהכנת חומר רבוי חופשי מוירוסים. לגבי Pyronia I-1 Charden נשארו מספר נקודות הדורשות עבודה נוספת, כגון אקלום האימיקטורים לאחר הוצאתם מהמבחנה והכרת סמנים ספציפיים לוירוס המופיעים על האימיקטורים לאחר הרכבה.

טיפול תרפיה שונים הופעלו בהצלחה במערכות הניסויים שבצענו עם מספר גלעיניים וגרעיניים. לאחר סכום סופי של הנתונים ניתן יהיה לפתח פרוטוקולים עבור החומר שנכלל בעבודה. סכום זה יעשה לאחר סיום מעקב וירולוגי אחר חומר הנמצא עדיין בתרבית ואו לאחר איקלום בחממה. נשארו עדיין כמה שאלות משמעותיות כגון: מה פרק הזמן לאחר הרגנציה בו יש לחזור ולבדוק לצורך איתור נגועים? האם יש צורך בבדיקת PCR ואם כן עבור איזה וירוסים. האם תופעת הניצנים הצדדיים הנקיים שתוארה לעיל כללית ועוד. עם סיום השלמות אלה ניתן יהיה להפעיל מערך איבחון עדכני לוירוסים, טפולי תרפיה אפקטיביים ולקצר משמעותית את תהליך ההסגר.

### פרסומים מדעיים

1. שרה שפיגל, יהודית תם, אריה רחנר, לדמילה מסלין, שמואל זילכה, גניה פיינגרש, אריה רוטבאום, דב אופנהיים. (1998) נגיעות גודגדן בוירוס הגמדון של הגלעיניים (prune dwarf virus) - איבחון ראשון בארץ. עלון הנוטע (בדפוס).
2. S. Spiegel, Y. Tam, A. Rosner, M. Brison, B. Helliot, M.T. de Boucaud. In vitro elimination of prunus necrotic ringspot virus in a plum cultivar. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. 1998.

# סיכום חדש לדו"חות מחקר 1997

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

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. תודה.  
הערה: נא לציין הפניה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p><b>1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה</b></p> <p>מטרת עבודה זו היתה לתרום לקיצור תהליך האינטרודוקציה של מיני עצי פרי נשירים בארץ. לשם השגת מטרה זו הוצבו שני יעדים מיידיים בתחום אבחון לוורוסים ובתרפיה של חומר צמחי נגוע: (א) פיתוח מערך ריבוי micropropagation עבור צמחי בוחן מעוצים, מתאימים לעבודה בחממה, בלתי מוכרים בארץ ברובם ולימוד אבחון מהיר של וירוסים בנשירים במשך כל עונות השנה; (ב) פיתוח פרוטוקול תרפיה <i>in vitro</i> יעיל וישם עבור מיני נשירים נבחרים בעלי חשיבות לענף המטעים בארץ</p>
<p><b>2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח</b></p> <p><u>פיתוח מערך ריבוי <i>in vitro</i> של צמחי בוחן ואבחון מהיר של וירוסים</u> - הצלחנו בהתאמת מצעים לריבוי <i>in vitro</i>, השרשה, הקשיה, אקלום ואופטימיזציה של האבחון בתנאי הארץ עבור צמחי בוחן חדשים שייבאנו. לימוד הסמנים האופייניים למספר וירוסים כולל וירוס הגמדון של הגלעיניים (דווח ראשון בארץ) נמצא בעיצומו.</p> <p><u>פיתוח פרוטוקול תרפיה <i>in vitro</i> עבור מיני נשירים נגועים בוורוסים</u> - הניסויים כללו טרמותרפיה, כימותרפיה וטיפול משולב שינתנו כולם לצמחונים בגידול <i>in vitro</i>. יעילות הטיפול הוערכה על פי אחוז השרדות ונקיון מוורוס. נמצא שניתן להעלות את טמפרטורת הטיפול ב-2-3 מ"צ בטרמותרפיה <i>in vitro</i> לעומת טיפול בצמחים מעוצים מבלי לפגוע בהשרדות. בגידולים מסויימים (תפוח) ניתן להסתפק בטיפול כימותרפי בעוד שבשזיף יש צורך בטיפול משולב. הטיפולים השונים הניבו צמחונים חופשיים מוורוס הנבדקים עדיין לאפשרות של נגיעות בוורוס.</p>
<p><b>3. המסקנות המדעיות וההשלמות לגבי יישום המחקר והמשכו</b></p> <p>ניתן לקצר משמעותית תהליך אבחון וירוסים מסויימים על ידי העברת הבדיקה מהשדה הפתוח לחממה מבוקרת ושימוש באינדיקטורים צעירים מריבוי <i>in vitro</i> או זריעים. כך ניתן יהיה לפסול במהירות חומר נגוע.</p> <p>פעלת טיפולי תרפיה <i>in vitro</i> נעשתה בהצלחה במספר מינים. מהידע שצברנו לא ניתן עדיין להסיק על פרוטוקול כללי למין או סוג. לשיטה זו יש יתרון ברור על השיטה הקלאסית.</p>
<p><b>4. הבעיות שנתקו לפתרון ואם השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן</b></p> <p>מספר בעיות במעבר בין השלב המחקרי ליישומי דורשות לימוד נוסף הן בפרק צמחי הבוחן והן בפרק התרפיה. לשם כך יש לדאוג להמשך העבודה ולמימון נוסף.</p>
<p><b>5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל ביבליוגרפיה, פסנטים - יש לציין מס' פסנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך</b></p> <p>מאחר "נגיעות גודגן בוורוס הגמדון של הגלעיניים - אבחון ראשון בארץ, עלון הנוטע (בדפוס). <i>In vitro</i> elimination of prunus necrotic ringspot virus in a plum cultivar IX Int. Congress of Plant Pathology June 98.</p>