

# העלאת יבול השזיף היפני בישראל ע"י אפיון ההתאמה הגנטית בין מפרים למופרים באמצעות כלים מולקולריים

רפי שטרן, מרטין גולדווי, דן איזיקוביץ, יעל גרינבלט, גל ספיר

## תקציר

השזיף היפני שייך למשפחת הוורדניים וקיימת בו, כמו בהרבה וורדניים אחרים, תופעת אי התאם עצמי. חלק ניכר מזני השזיף היפני ובמיוחד האיכותיים שבהם, סובל מבעיה חמורה של פוריות לקויה. כתוצאה מכך, העצים אינם מממשים את מלוא פוטנציאל היבול ולכן הכנסת החקלאים בענף זה נמוכה. מבין הגורמים הרבים בעלי ההשפעה על יבולי מטעים, התאמה גנטית היא תנאי הכרחי להפריה טובה אבל פרמטרים נוספים כמו: התאמה במועדי פריחה, חיוניות אבקה ורצפטיביות של הצלקת צריכים גם הם להמצא מתאימים. מתוך הנסיון שצברנו בהבנת מערכת ההאבקה וההפריה בתפוחי עץ, אנו מציעים לשפר תהליכים אלו ע"י אפיון התבנית הגנטית של אללי S ממנגנון אי ההתאם העצמי בשלושה זני שזיף שונים. על ידי כך נוכל להמליץ על התאמה טובה יותר בין זנים מופרים לזנים מפרים. מתוך עבודתנו במטעי תפוח עולה כי ההתאמה של זנים מפרים ומופרים במטעי הארץ, אינה אופטימלית. נתונים אלה נתגלו על ידי השוואת יבול של זן מופרה אחד על ידי שני מפרים שונים ואוששו בעבודת מעבדה שבה זוהו אללי S של כל אחד מהזנים. נמצא כי ניתן להסביר את היבולים הנמוכים באי התאמה אללית חלקית בין המפרה למופרה. לעומת זאת בשזיפים, מנגנון ההפריה ברמה המולקולרית טרם נבחן. יחד עם זאת, כיוון שקיים מידע רב לגבי וורדניים אחרים, יש לצפות כי ניתן לקדם את המחקר בנושא זה בשזיף, בקצב מהיר.

## המחקר מתבצע בשני שלבים במקביל:

1. עבודה גנטית ברמה מולקולרית (בידוד ואיפיון אללי S של כל אחד מהזנים, קביעת רצף ה-DNA של המקטעים, בניית "פריימרים ספציפיים" לכל אחד מהאללים ובחינתם מול כל אחד מהזנים).
2. עבודת שדה שבוחנת את מועדי הפריחה ועוצמתה, הפרשת הצוף, מועד פיזור האבקה וחיוניותה, רצפטיביות הצלקות, וכן שיעורי החנטה וגובה היבול בזנים הנבחנים (Red Beaut שנחשב כזן איכותי אך לא פורה ושני המפרים הסטנדרטיים שלו Wickson ו-Royal Zee). מתוצאות שנת המחקר הראשונה עולה כי יש הבדל משמעותי בין שני הזנים המפרים, וככל הנראה יש לכך אף הסבר גנטי, אך כדי לאשר זאת יש להמשיך בניסויים ובבדיקות.

## מבוא ותאור הבעיה

השזיף היפני מהווה מקור הכנסה חשוב לחקלאים רבים. עם זאת ריווחיותו בשנים האחרונות, נמצאת בירידה מתמדת עקב פוריות לקויה. אחד הגורמים לפוריות הנמוכה קשור ככל הנראה לשעורי האבקה נמוכים, או לתקלות שונות בתהליכי ההפריה. ממצאים הקדמיים שלנו בענף התפוח, שסובל אף הוא מבעיה דומה, הראו כי ניתן להעלות את רמת היבולים בעשרות אחוזים בשיטה פשוטה וזולה על ידי העלאת שיעורי ההאבקה וההפריה ומציאת מפרה מתאים. המחקר המוצע כאן אמור לבחון את האפשרות של העלאת היבולים ע"י איפיון הזנים המאביקים הטובים ביותר לזנים העיקריים.

## מטרות המחקר

בכוונתנו למצוא קשר בין מבחן ההתאמה הגנטי שבין הזן המפרה לזן המופרה לבין רמות היבול השונות. כמודל ישמש הזן (RB) Red Beaut והזנים המפריים (W) Wickson ו-(RZ) Royal Zee.

### מטרות המשנה להשגת יעד זה הן:

1. אפיון אללי S של זני השזיף השונים ברמה מולקולרית.
2. פיתוח טכניקת עבודה לאנליזה של אללי S באמצעות PCR.
3. קביעת פוטנציאל ההפריה של הזנים המפריים W ו-RZ ובחינתם במטע.

## חומרים ושיטות

### א. בחינת יעילות מפריים לאחר האבקה טבעית במטע

בשלב הראשון של המחקר בחנו זן מסחרי חשוב בעל אי התאם עצמי מלא: RB ושני מפריים סטנדרטיים שלו: W ו-RZ. עקבנו אחר פוריות עצי RB הסמוכים למפריים השונים. בחינת הפוריות במטע נעשתה על ידי מעקב אחר החנטה וגובה היבול. מעקב החנטה בוצע על ידי סימון 4000 פרחים לטיפול (100 פרחים לענף 4 X ענפים לעץ 10 X עצים), במטע של חוות המטעים בעמק החולה.

### המדדים שנבדקו:

- א. רישום סדרי הפריחה של כל זן.
- ב. אחוז החנטה בענפים מסומנים (סוף אפריל).
- ג. יבול לעץ - כל אחד מ-10 העצים לטיפול נקטף ונשקל בנפרד.

### ב. בידוד אללי S

אפיון אללי S באמצעות PCR מתבסס על הכרת רצף ה DNA של כל אלל ואלל. על בסיס ההבדלים בין רצפי האללים השונים ניתן לייצר עבורם תחלים יחודיים. באמצעות תחלים אלה ניתן לערוך אנליזה לאפיון האללים בזנים השונים. אללי ה-S של שזיפים טרם בודדו. צפוי על פי עבודות בורדניים וסולניים שימצא דימיון בין אללי S של שזיף ואללי S שכבר אופיינו. על פי המידע הקיים ניתן לזהות בקרב אללי S שונים רצפים שמורים ורצפים משתנים. הרצפים השמורים יכולים לשמש כאזור שעבורו נסנטז תחלים ל-PCR שבאמצעותם נבודד מיקטעים פנימיים מתוך רצפי אללי S של שזיפים. רצף המקטעים יקבע, ועל פיו ייוצרו תחלים יחודיים לכל אלל ואלל. תחלים ייחודיים אלה שישמשו לאנליזה ולאפיון ספציפי של זני השזיף.

### **ג. אפיון ההורה המאביק**

באמצעות אנליזה של אללי S ניתן גם לקבוע מי מבין הזנים במטע הפרה את הפרה. לשם כך תעשה בדיקת אבהות של הצאצאים שיונבטו מזן השזיף האמהי RB. הזרעים הוכנסו מיד לאחר הקטיף לאכמנה ב-0°C למשך 6 חודשים. בשלב זה מונבטים הזרעים ב-25°C ומהעלים הראשונים יופק DNA. על גבי ה-DNA תתבצע אנליזה של אללי S. צפוי כי מבין שני אללי S המצויים בנבט, אחד יהיה ממקור אמהי של הזן המופרה (RB), והאחר יהיה ממקור אבהי של הזן המפרה (W או RZ). יחד עם זאת יתכן כי ההאבקה תתבצע גם ע"י מאביקים רחוקים פיזית מה-RB (שונים מה-W וה-RZ) ואת שיעורי ההאבקה הזו נוכל לאתר באמצעות אנליזת ה-PCR.

### **ד. אפיון פוטנציאל ההאבקה של ההורה המאביק**

כאמור גם כאשר מתרחשת האבקה היא עשויה להיות מלאה או חלקית. ניתן לאתר את אופי ההפריה על ידי זיהוי התפלגות אללי S בקרב הצאצאים מחד ועל ידי אפיון רמות החנטה והיבול מאידך. כך למשל בהפריה מלאה שמקורה בהתאם מלא ימצאו אללי ה-S האבהיים בהתפלגות שווה של 50% כל אחד בקרב הצאצאים. לעומת זאת בהפריה של התאם חלקי שבו נדחה אלל אחד ורק השני מפרה ימצא בקרב הצאצאים רק אלל אבהי אחד (100% מכלל הצאצאים). במקרה בו נדחים האללים באופן חלקי הדבר יתבטא בשעורים שונים: פחות מ-50% מופע של האלל הדחוי חלקית ועליה של מעבר ל-50% של האלל הבלתי דחוי. הפריה חלקית עשויה להתבטא גם בפחיתה בחנטה וביבול.

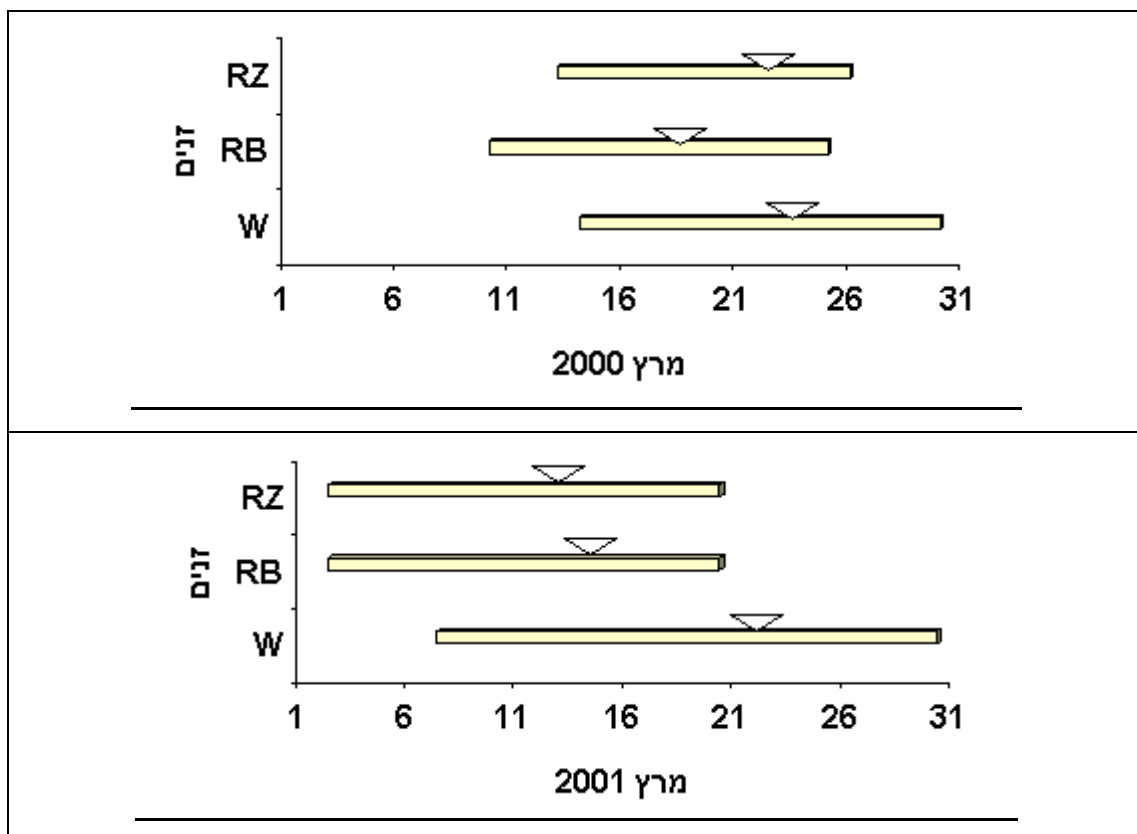
## תוצאות

### יעילות מפריס לאחר האבקה טבעית במטע

#### 1. פנולוגיה (סדרי הפריחה)

השוואת הפנולוגיה משנת 2000 (שנת מחקר הקדמית) ל-2001 (שנת מחקר ראשונה) מצביעה על הבדל ניכר במועדי הפריחה של שלושת הזנים, אך בעיקר בחפיפת הזנים המפריס עם ה-RB. בשנת 2000 החלה פריחת כל הזנים בעשרת השניה של מרץ, והגיעה לשיאה בסביבות ה-20/3 (איור 1). זוהי אגב תקופת הפריחה המקובלת של זני השזיף השונים בעמק החולה. בשנת 2001 הוקדמה פריחת השזיף, כמו יתר מיני הנשירים והסובטרופיים בארץ, והחלה כבר בראשית מרץ. הבדל נוסף ומשמעותי הרבה יותר בין השנים היה בחפיפת הזנים. בשנת 2000 היתה חפיפת פריחה מושלמת של כל 3 הזנים, מלווה בעוצמת פריחה גבוהה ואחידה. לעומת זאת ב-2001 היתה חפיפה מצוינת של RB עם RZ, אך גרועה עם W.

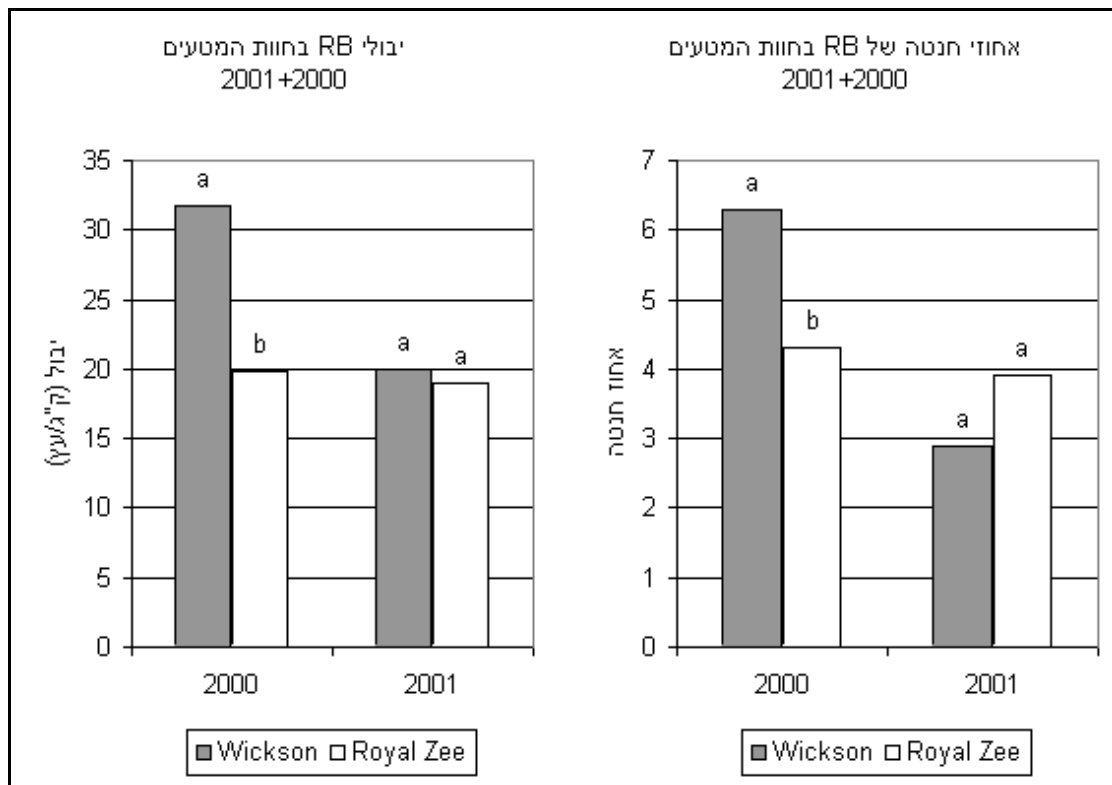
איור 1: פנולוגיה של שלושת הזנים בחוות המטעים, בשנים 2000 ו-2001 ( $\nabla$  = שיא פריחה).



#### 2. חנטה ויבול

בשנת 2000, בה היתה כאמור חפיפת פריחה מושלמת של כל 3 הזנים, היו שיעורי החנטה וגובה היבול של עצי RB הסמוכים ל-W גבוהים באופן משמעותי ומובהק בהשוואה לעצים הסמוכים ל-RZ: אחוזי חנטה של 6.3 ו-4.3 בהתאמה, ויבולים של 32 ק"ג/עץ ו-20 ק"ג/עץ בהתאמה. (איור 2).

**איור 2:** אחוז חנטה הממוצע של RB (משני צידי השורה) וסה"כ היבול של RB בסמיכות למפרים השונים (W או RZ).

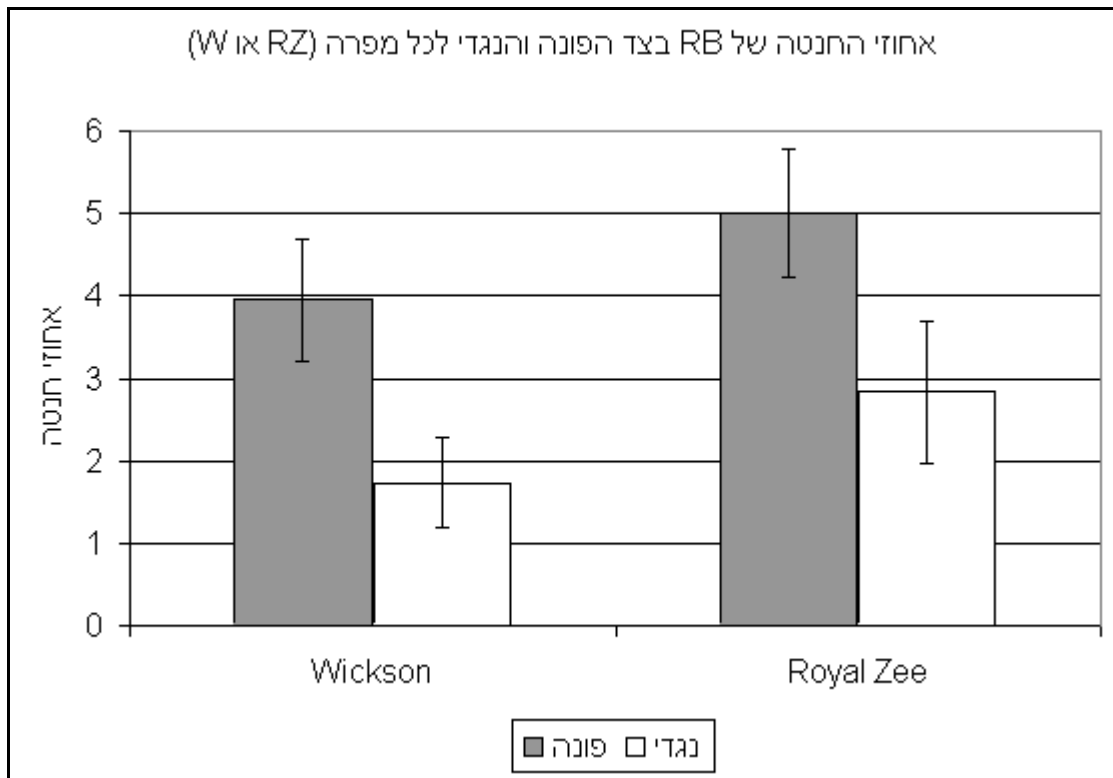


לעומת זאת ב-2001, בה היתה חפיפת פריחת מעטה מאוד של RB עם W וחפיפה מצוינת עם RZ, התקבלו אחוזי חנטה ויבול דומים. מכאן, שה-W הוא ככל הנראה מפרה עם פוטנציאל הרבה יותר גבוה בהשוואה ל-RZ. עם מעט מאוד פריחה חופפת הצליח ה-W להעניק חנטה ויבול גבוהים יחסית. מנגד ניתן לאות כי ל-RZ יכולת הפריה מוגבלת: בשתי שנות הבדיקה, עם חפיפת פריחה מצוינת, הביא לשיעורי חנטה ויבול נמוכים יחסית (כ-4% חנטה וכ-20 ק"ג/עץ), לעומת ה-W שבחפיפת פריחה טובה (2000) הביא לשיעורי חנטה ויבול גבוהים הרבה יותר (6.3% חנטה ו-32 ק"ג/עץ).

השוואת אחוזי חנטת RB בצד שפונה למפרה לעומת הצד הנגדי למפרה (איור 3) מראה כי בשני הזנים המפרים היתה תופעה דומה: בצד הפונה למפרה (לכיוון W או לכיוון RZ) התקבלו שיעורי חנטה גבוהים באופן משמעותי ואף מובהק (W) בהשוואה לצד הנגדי למפרה. תוצאה זו מרמזת על שני דברים:

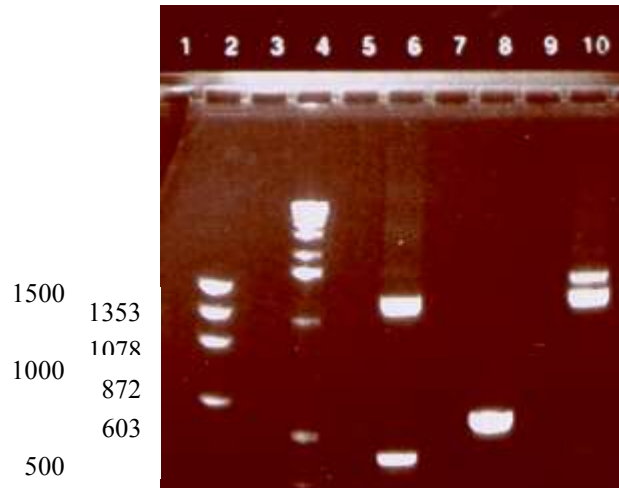
1. החשיבות הגדולה של המפרה לזן RB.
2. החשיבות הגדולה של הדבורים כווקטור להעברת אבקה.

איור 3: אחוזי החנטה של RB בצד הפונה והנגדי לכל מפרה (W או RZ).



### 3. אפיון אללי S

DNA של חמישה אללי S שונים הוגבר מתוך הגנום ע"י ריאקציית PCR לאחר שתוכננו תחלים אוניברסליים. מקטעי ה-DNA שובטו לפלסמיד pGEM-T והועברו בטרנספורמציה לחיידקי E. coli DH10. לאחר מכן נקבע רצף הנוקלאוטידים של כל מקטע.



ערוץ 2 – סמן גודל ΦX174/Hae III (Roche).

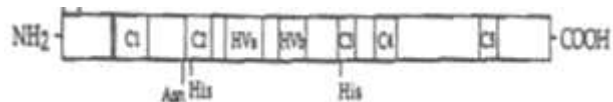
ערוץ 4 – סמן גודל 1Kbp (Roche).

ערוץ 6 – הזן וויקסון.

ערוץ 8 – הזן רד ביוט.

ערוץ 10 – הזן רויאל זי.

ריאקציית ה-PCR בוצעה ע"י תחלים אשר תוכננו לאזורים השמורים C2 ו C4. באזור המשתנה Hva מצוי אינטרון בכל אללי ה-S רנ"אזות. אינטרון זה גורם לשוני בגדלי תוצרי ה-PCR המתקבלים בעבודה עם DNA גנומי.



מאנליזה של תוצאות הריצוף הגענו למסקנה כי הצלחנו לאפיין חמישה אללים, אשר מתוכם ארבעה אללים חדשים ואלל אחד שכבר ידוע וקיים בבנק הגנים, אך אנו הוספנו לרצף זה את רצף האינטרון הייחודי לו. חמשת האללים הופקדו בבנק הגנים ( מספרי הפקדה: AF433647-9: AF432417-8AF).

בהשוואת רצפי ה-DNA של האללים ששובטו התגלה כי ברמת החלבון האללים דומים בסביבות 80%. נתון שהינו אופייני להבדלים בין אללים שונים.

rz-Se LWPSNYSNPT MPSNCNGSKF EDRKVSPQLR SKLKRSWPDV ESGNDTKFWE  
w-Sc LWPSNYSNPT KPSNCNGSQF DDRKVYPQLR TKLKRSWPDV EDGNDTKFWE  
rz-Sd LWPSNYSNPK IPSNCKGALF GARKVYPQLQ LNLKISWPDV KSGNETNFWQ  
RB-Sa LWPSNYSNPR MPSNCTGSQF KKQNLYPYMQ SKLKISWPDV ESGNDTKFWE  
W-Sf LWPSNYSNPR MPSNCRGSLF ETRKLSPELQ SKLKRAWPNV ETDNDTKLWE

rz-Se GEWNKHGTCS EQTLNQMQYF ERSMSWYSF NITEILRNAS IVPHP  
w-Sc REWNKHGTCS EGRLNQMQYF ERSNMWMSY NITEILKNAS IVPHP  
rz-Sd SEWNKHGTCS ERTLNQMQYF ERSDEMWSY NITEILKNAS IVPHP  
RB-Sa GEWNKHGTCS ERTLNLMOYF QRSHAMWWSH NITEILKNAS IVPHP  
W-Sf HEWNKHGRCS EGTLNQTQYF QRSYSMWRSH NITEILRNAS IVPHP

הבדל נוסף בין האללים מצוי, כאמור בגודל האינטרון. גדלי אינטרונים :

292bp – Sa

183bp – Sc

999bp – Sd

1269bp – Se

928bp – Sf

כתוצאה מהבדל זה מתקבלים הבדלים בין המקטעים כאשר משתמשים באותם תחלים עבור האללים השונים.

### מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

אנחנו עדיין בשלב ראשוני של המחקר (שנה ראשונה מתוך השלוש), אך כבר עתה ניתן לומר שאחת מבעיות הפוריות של השזיף היפני נובעת ממחסור באבקה (הבדלים משמעותיים בין צד פונה למפרה ובין צד נגדי לו) וממפרים שהם לא בהכרח מתאימים גנטית.