

האבקה והפריה בשזיף – דו"ח לשנת 2002

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

מבוא ותאור הבעיה

השזיף היפני מהווה מקור הכנסה חשוב לחקלאים רבים. עם זאת רווחיותו 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: על ידי העלאת שיעורי ההאבקה וההפריה ומציאת מפרה מתאים. המחקר המוצע כאן אמור לבחון את האפשרות של העלאת היבולים ע"י איפיון הזנים המאביקים המתאימים ביותר לזנים העיקריים.

מטרות המחקר

בכוונתנו למצוא קשר בין מבחן ההתאמה הגנטי שבין הזן המפרה לזן המופרה לבין רמות היבול השונות. כמודל משמש הזן (RB) Red Beaut והזנים המפרים (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 המפרים W ו-RZ ובחינתם במטע ע"י האבקה טבעית(פתוחה) וידנית.

חומרים ושיטות

א. בחינת יעילות מפרים לאחר האבקה טבעית במטע

בשלב הראשון של המחקר בחנו זן מסחרי חשוב בעל אי התאם עצמי מלא: RB ושני מפרים סטנדרטיים שלו: W ו-RZ. עקבנו אחר פוריות עצי RB הסמוכים למפרים 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 עד כה. על פי עבודות בורדיים אחרים וסולניים צפוי 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. במהלך המחקר ניקבע רצף המקטעים, ועל פיו ייצרנו תחלים יחודיים לכל אלל ואלל. תחלים ייחודיים אלה שמשו 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 תערך בדיקת אבהות של הצאצאים שיונבטו מזן השזיף האמהי RB. הזרעים הוכנסו מיד לאחר הקטיף להכמנה ב-0°C למשך 6 חודשים. לאחר ההכמנה הונבטו הזרעים ב-25°C ומהעלים הראשונים הופק DNA. על גבי ה-DNA התבצעה 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, שתערך במהלך השנה הקרובה.

ד. אפיון פוטנציאל ההאבקה של ההורה המאביק

כאמור גם כאשר מתרחשת האבקה הצלחתה 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 זו עלולה להתבטא גם בפחיתה בחנטה וביבול.

ה. פעילות דבורים (נושא נוסף שהוכנס במהלך העבודה)

כוורות דבורי-דבש (*Apis mellifera*) שמקורן מהוואי, ארה"ב הוצבו ע"י מכוורת נאות מרדכי במטע, בצפיפות של כוורת אחת לכל 4 דונם, כמקובל במטעים מסחריים. פעילות הדבורים נבדקה בעצים אחידים מבחינת גיל הפרחים, שלבי הפריחה ועוצמתה.

1. קביעת האטרקטיביות לדבורים לאורך עונת הפריחה

הבדיקה נערכה בעץ אקראי בכל זן. ספירת ביקורי הדבורים בפרחי העץ בפרק זמן של דקה בוצעה ע"י בודק יחיד הנמצא במרחק מעץ בו ניתן להבחין בכל ביקורי הדבורים. לכל זן בוצעו 3 חזרות לסירוגין. הבדיקה בוצעה מידי יום בשעה קבועה (10:00) לכל אורך עונת הפריחה.

2. אפיון פעילות הדבורים

הבדיקה נערכה תוך כדי הליכה לאורך שורת הזן הנבדק. נספרו דבורים אוספות צוף ואוספות אבקה. הבדיקה הסתיימה כאשר נספרו 50 דבורים אוספות צוף או אבקה, או כאשר זמן הבדיקה התארך מעל 15 דקות. הבדיקה נערכה ב 3 חזרות לכל זן. מתוך ממצאי הבדיקה חושב אחוז הדבורים אוספות הצוף ו/או האבקה מכלל הדבורים.

3. מעבר הדבורים במטע

נבדקו שלושה סוגי מעברים של דבורים: מעבר בין שני עצים סמוכים בשורה (אותו זן), מעבר בין שתי שורות עצים סמוכות מאותו זן (בזן 'Red-Beaut'), מעבר בין שתי שורות עצים סמוכות מזנים שונים (מעבר בין מאביק למואבק ולהפך). בכל סוג מעבר נספרו מספר הדבורים שנצפו עוברות במשך דקה מעץ אחד לעץ אחר.

4. בדיקת הרכב סוכרים בצוף

לפרחים שכויסו 24 שעות קודם לבדיקה, הוחזרה קפילרה של ($1 \mu\text{l}$) לאזור הצופנים בבסיס הפרח ודגימה של $3 \mu\text{l}$ צוף נאספה מבלי לנתק את הפרח מהעץ. הדגימות נשמרו עד לבדיקה ב- $300 \mu\text{l}$ מים מזוקקים ב- 20°C . הרכב הסוכרים בצוף נקבע בשיטת HPLC עם אינדיקטור RI וקולונת (Bio-Rad) HPX-87H Aminex ($300 \times 7.6\text{mm}$). אלוזיה של דוגמא בנפח $20 \mu\text{l}$, התבצעה בעזרת $0.005 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ בקצב של $0.8 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. זיהוי הסוכרים נעשה לפי Retention time של סטנדרטים של סוכרים ידועים.

5. בדיקת חיוניות האבקה

שעור הנביטה

אבקנים מחמישה פרחים הועברו ל- 1 ml תמיסת הנבטה, שהכילה: 10% סוכרוז, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ חומצה בורית (H_3BO_3) ו- $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ סידן חנקתי [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]. התערובת עורבבה היטב ודוגמאות של $200 \mu\text{l}$ ממנה (שהכילו רק תמיסת הנבטה וגרגרי אבקה, ללא שאריות מאבקים) הועברו לבאריות בצלחת אלייזה, והודגרו במשך שעה בטמפרטורת החדר. באמצעות מיקרוסקופ אור זוהו

גרגרי אבקה שנבטו ואשר להם הנחשון ארוך מגרגר האבקה. שיעור הנביטה נקבע על פי מספר גרגרי אבקה שנבטו מכלל גרגרי האבקה.

צורת גרגרי האבקה

גרגרי אבקה קובעו בתמיסת (FAA) Formalin+ Acetic Acid ויובשו בעזרת סדרת תמיסות בריכוזים עולים של אתנול. גרגרי האבקה צופו בשכבה דקה של זהב, ונסרקו במיקרוסקופ אלקטרוניים סורק מסוג GEOL 840L (Rabinowitch et al., 1993).

תוצאות

א. פריחה וחנטה

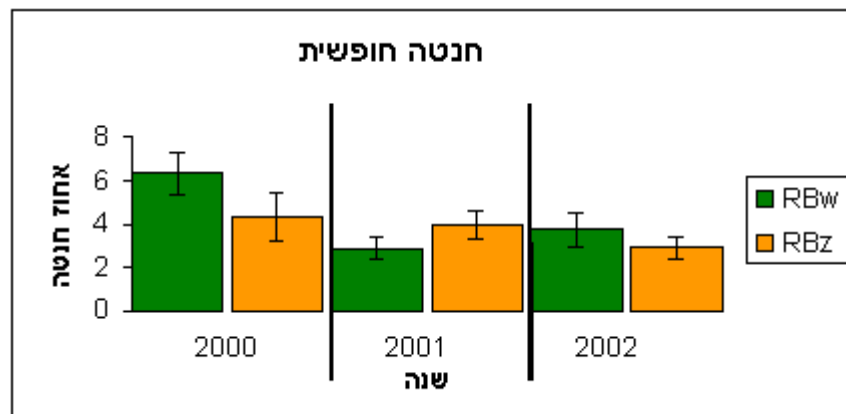
1. חפיפת פריחה

נתאי מקדים והכרחי להפריה הינו פריחה חופפת בין הזנים, חפיפה המייצגת את בשלותם של הגמטות הנקביות (בביצית) בצמח המופרה והגמטות הזכריות (בגרגר אבקה) בצמח המפרה. התמונה המתקבלת מחפיפת הפריחה (גרפים לא מוצגים) מצביעה על חפיפה מלאה בשתי העונות (2001+2002) בין 'Royal Zee' ל'Red Beaut', בעוד הפריחה של הזן 'Wickson' התאחרה וחפפה חלקית בלבד את פריחת 'Red Beaut'. הפער בין שיאי הפריחה היה גדול יותר ב 2001 מאשר ב 2002.

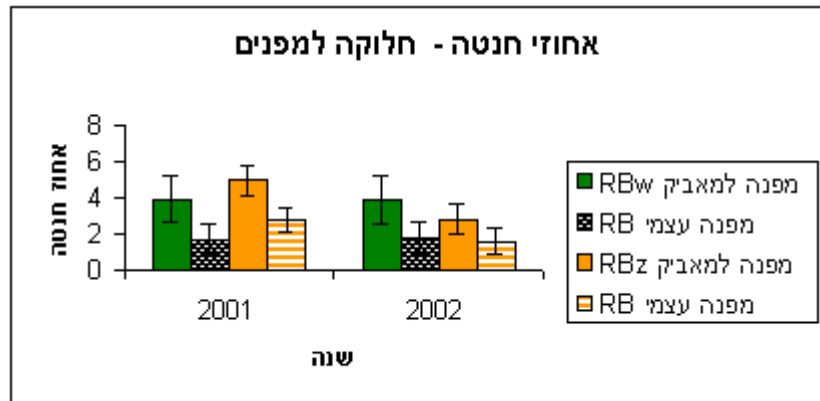
יש לציין כי החפיפה החלקית של 'Wickson' עם 'Red Beaut' הינה בעיה שעלתה כבר בשנים קודמות, ומשום כך, מטופל 'Wickson' בחומרים מקדימי פריחה (אלזודף + שמן חורפי).

2. חנטה כתוצאה מהאבקה חופשית

אחוזי החנטה בהאבקה פתוחה נבחנו ע"י מדידת החנטה בשורה הסמוכה לכל מפרה. נתוני החנטה והייבול המובאים בעבודה הינם של הזן 'Red Beaut', וסומנו בגרפים כ - RBz לשורות הסמוכות ל'Royal Zee' ו RBw לשורות הסמוכות ל'Wickson' (איור 1 א'). חלוקה למפנים הינה חלוקת השורה לצד הפונה למפרה לעומת הצד הנגדי לו (כל שורת 'Red Beaut' סמוכה למפרה מחד ולשורה נוספת של 'Red Beaut' מאידך) (איור 1 ב').



איור 1 א' – אחוזי החנטה (\pm שגיאת התקן) בשורות ה RB לפי סמיכות המפרה.



איור 1 ב' – אחוזי החנטה ($SE \pm$) בשני חצאי שורות הזן 'Red Beaut' הסמוכות למפרים שונים (RB או W, RZ בשורה סמוכה). שנים 2001 ו 2002.

ניתוח תוצאות החנטה מצביע על העובדה כי אחוזי החנטה בשורות הסמוכות ל'Wickson' גבוהים יותר מאלו הסמוכות ל'Royal Zee'. לעומת האחידות באחוזי החנטה בשורות הסמוכות ל'Royal Zee' בשתי העונות (בדומה לנתונים ההקדמיים), אחוזי החנטה בשורות 'Red Beaut' הסמוכות ל'Wickson' היו בד"כ גבוהים יותר אך נפגעו בשנת 2001 כתוצאה מחפיפת הפריחה הגרועה בין הזנים.

חלוקת אחוזי החנטה על פי המפנה מצביעה על תופעה האופיינית מאוד לפעילות דבורים נמוכה – הגורמת להבדלים בין אחוזי החנטה בצד הפונה למפרה לעומת הצד הנגדי. נתונים אלו תואמים את האטרקטיביות הנמוכה של 'Red Beaut' לדבורים (איור 2).

3. חנטה כתוצאה מהאבקות ידניות

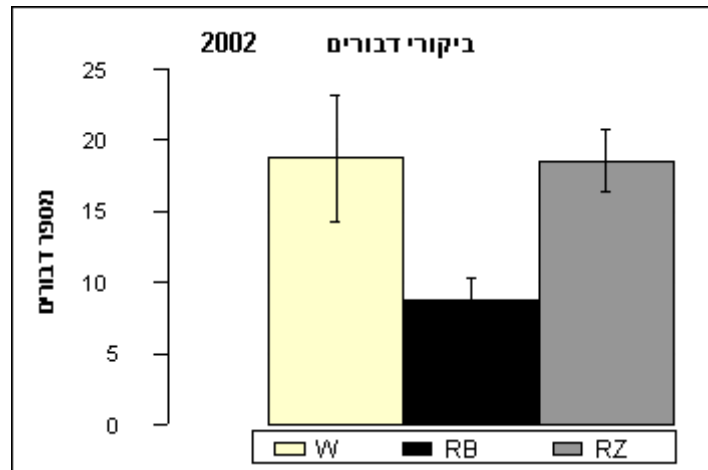
האבקות ידניות נעשו במטרה לבדוק את מידת אי ההתאם העצמי של 'Red Beaut' ואת יעילות ההפריה של הזנים המפרים. הניסוי בוצע ע"י כיוס ענפים ברשתות למניעת כניסה של חרקים. בשיא פריחה הוסרו זמנית השקיות והצלקות הואבכו בעודף ע"י אבקת הזן הנבדק. תוצאות ניסוי זה מצביעות על עקרות עצמית מוחלטת של 'Red Beaut'. מבחינת ההאבקה הזרה ל'Red Beaut', עולה כי שעורי החנטה לאחר האבקה ידנית עם 'Royal Zee' היו גבוהים בהשוואה להאבקה עם 'Wickson' (2.73% ו 0.55% בהתאמה). מכאן שהחיסרון של RZ בהאבקה טבעית במטע (למרות חפיפת הפריחה הטובה יחסית בהשוואה ל-W) נובע ככל הנראה מאופי פעילות הדבורים ולא מחיוניות אבקה.

ב. פעילות דבורים

פעילות הדבורים במטע נבחנה בשנתיים עוקבות (2001 + 2002). בשנת 2001 כתוצאה ממוזג אויר בעייתי בימי התצפית שלא אפשר פעילות דבורים תקינה, נערכו תצפיות ביום אחד בלבד ונתונים אלו אינם מובאים. נתוני שנת 2002 נאספו במהלך כל עונת הפריחה והם מוצגים להלן.

1. אטרקטיביות הזנים לדבורים

אטרקטיביות הדבורים לעץ מתבטאת במספר ביקורי הדבורים בכל זן. הבדיקה נערכה מידי יום לכל אורך עונת הפריחה של שלושת הזנים בשעה קבועה (איור 2).



איור 2 – מספר ביקורי הדבורים (ממוצע לדקה \pm SE) לאורך עונת הפריחה – שנת 2002.

נתוני משיכת הדבורים לזנים השונים מצביעים על אטרקטיביות דומה לשני הזנים המפריים 'Wickson' ו'Royal Zee' (כ - 19 ביקורים לדקה). לעומת זאת, ביקורי הדבורים ב' Red Beaut' פחותים בהרבה (כ - 9 ביקורים לדקה).

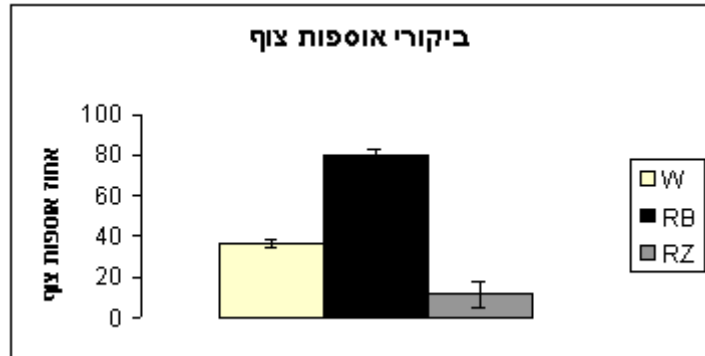
2. מעבר דבורים

האבקה זרה תלויה במעבר הדבורים בין הזנים המפריים לזן המופרה. מאחר והדבורים נוהגות ב"חסכנות" אנרגטית, מעבר הדבורים בין השורות הינו בשיעור קטן ביותר. יחד עם זאת, ניתן למצוא הבדלים בשיעור המעברים בין שורות של זנים שונים המובילים לשיעורי האבקה שונים ביניהם. מספר המעברים נמדד ע"י בחינת מספר מעברים בדקה בין עץ משורה אחת לשורה המקבילה.

שיעור מעברי הדבורים בין שורות המפריים 'Wickson' או 'Royal Zee' ל-RB הינו נמוך ודומה (בסביבות דבורה אחת/עץ/דקה), כך שניתן להניח כי קיימת רמה דומה של העברת אבקה מהם אל 'Red Beaut'.

3. אפיון פעילות הדבורים

דבורת הדבש אוספת צוף ואבקת פרחים כמרכיבי אנרגיה. תכונת ה"נאמנות" (Constancy) מתבטאת באיסוף סוג אחד של תגמול בכל שיחור, כאשר האפקטיביות להאבקה משתנה. אוספות אבקה נחשבות למאביקות טובות יותר עקב הימשכותן לפרחים צעירים בעלי אבקה חיונית. מתצפית אחר התנהגות הדבורה על הפרח, ניתן ללמוד אם היא אוספת צוף או אבקה, ומתוך כך לקבל אינדיקציה לגבי יעילות ההאבקה של הדבורים בזנים השונים. באיור 3 מתואר היחס בין אוספות הצוף לאוספות האבקה בכל אחד מהזנים בשנת 2002.



איור 3 – אחוז אוספות הצוף מכלל הדבורים אשר ביקרו בזנים השונים שנת 2002.

ניתן לראות כי שיעור אוספות הצוף ב' Red Beaut' הינו גבוה ביותר. מהתצפית גם עלה כי מעט הדבורים אוספות האבקה בזן זה ללא צמידות (ניסו לאסוף אבקה ולא הצליחו), כלומר אבקת 'Red Beaut', לא משכה את הדבורים או שמשכה אותן אך לא ניתן היה לאוספה כצמידות. ממצא זה מחזק ומסביר את שיעור אוספות הצוף הגבוה ב' Red Beaut'. בזן 'Wickson' נצפו יותר מפי 3 אוספות צוף מאשר ב' 'Royal Zee' (36 מול 11, בהתאמה).

4. הרכב הצוף

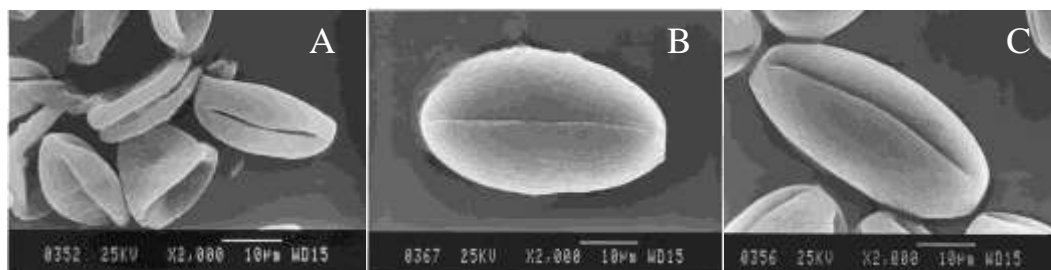
הרכב הסוכרים בצוף, המורכב בעיקר משלושת הסוכרים סוכרוז, פרוקטוז וגלוקוז, מהוה פקטור חשוב במשיכת הדבורים. הבדלים בהרכב הסוכרים עשויים להסביר הבדלים במשיכת הדבורים לפרח.

הנתון הבולט מתוך ניסוי זה הוא החוסר בסוכרוז בצוף של שלושת הזנים. מעבר לחוסר זה, אין הבדלים מובהקים בריכוזי הסוכרים פרוקטוז וגלוקוז (בכל הזנים היה ריכוזם בין 20 ל-25 אחוז).

5. איכות האבקה

מאחר ואוספות האבקה נמשכות לפרחים בעלי אבקה חיונית בלבד, הן נחשבות גם כמאביקות טובות יותר. במטרה להבין את הפער הגדול באיסוף האבקה בין 'Red Beaut' למפריי, נבחנה חיוניות האבקה של כל זן ע"י הנבטת האבקה בתמיסת הנבטה 10% סוכרוז. תוצאות ניסוי זה מראות כי אחוזי הנביטה של אבקת 'Wickson' ו' Royal Zee' גבוהים מאוד (כ- 80% בכל אחד), ואילו אבקת הזן 'Red Beaut' לא נבטה כלל. בנסיון לאתר הבדלים מורפולוגיים

אפשריים בין גרגרי האבקה של שלושת הזנים ביצענו צילום של האבקה במיקרוסקופ אלקטרוני סורק (תמונה 1).

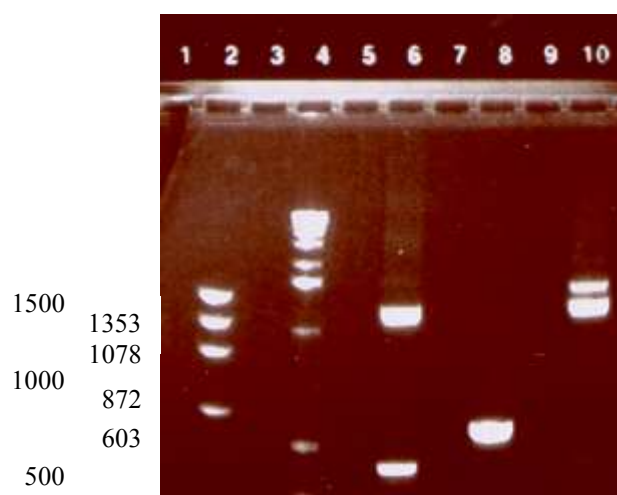


תמונה 1 – תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק של גרגרי אבקה (A) 'Red Beaut', (B) 'Royal Zee', (C) 'Wickson'.

תמונות הצילום המיקרוסקופ האלקטרוני מראות באופן ברור את ההבדלים בין האבקה של 'Royal Zee' ו'Wickson' לעומת האבקה של 'Red Beaut'. בעוד גרגרי האבקה של המפרים הינם עגולים ותפוחים נראים גרגרי האבקה של 'Red Beaut' קטנים יותר ומצומקים. הבדלים אלו משפיעים באופן ישיר על התנהגות הדבורים על כל אחד מהזנים.

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 Φ X174/Hae III (Roche).

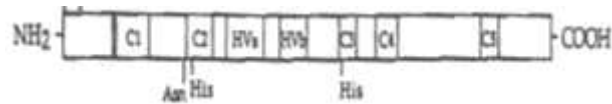
ערוץ 4 – סמן גודל 1Kbp (Roche).

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 רני"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: AF432417-8). האללים שזוהו הם S₅, S₄ מהזן רויאל זי, S₃, S₆ מהזן ויקסון, ו-S₁ מהזן רד-ביוט. מכאן שאין בעיה של חוסר התאמה גנטי בין שני המפריים הנ"ל לזן רד-ביוט.

מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

נמצא בוודאות שהסיבה להבדלים בין המפריים איננו נובע מאי התאם גנטי, אלא ככל הנראה (צריך עוד לבסס) מהתנהגות שונה של דבורים על פרחי שלושת הזנים. הפעילות השונה של הדבורים כמאביקות מושפעת כנראה מן האבקה הבלתי חיונית של פרחי ה-RB (שכתוצאה ממנה מתבצעת ההאבקה רק ע"י אוספות צוף) ומכוסר משיכה גבוה של דבורים אוספות צוף לפרחי ה-W בהשוואה לפרחי ה-RZ.