

דו"ח לתוכנית מחקר מספר 203-0947-12

לשנת 2014 (שנה שלישית מתוך שלוש, דו"ח מסכם)

בידוד ואיפיון של גנים הקשורים בקליטה של מנות צינור ובהפעלת המנגנון לשחרור מתרדמה של פקעי עצים ורדניים וגפן

Isolation and characterization of genes related to sensing of chilling and to activation of dormancy release in deciduous trees and vine

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י:

טל איזיקסון, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער דורון הולנד, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער עירית בר-יעקב, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער טלי טריינין, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער אתי אור, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני משה פליישמן, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

Tal Isaacson, Fruit Tree Sciences, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. vhhollan@agri.gov.il

Doron Holland, Fruit Tree Sciences, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. vhhollan@agri.gov.il

Irit Bar-Ya'akov, Fruit Tree Sciences, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. iritby@agri.gov.il

Taly Trainin, Fruit Tree Sciences, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095.taly@agri.gov.il

Etti Or, Fruit Tree Sciences, A.R.O. The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250. vhattior@volcani.agri.gov.il

Moshe Flaishman, Fruit Tree Sciences, A.R.O. The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250. vhmoshea@volcani.agri.gov.il

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר _____

תקופת החשיפה הנדרשת לצמחים רב-שנתיים ליציאה מתרדמת החורף באביב משתנה בין מינים וזנים ונמדדת במדד "מנות צינון". באזורי גידול בעלי חורף חם, מוגבלות מנות הצינון אליהן יכולים הצמחים להיחשף והדבר מגביל גידול נשירים. עם זאת, ישנם זני נשירים המסוגלים לשגשג באיזורים חמים כדוגמת זן התפוח 'ענה'. המטרה העיקרית של עבודה זו היא למצוא גנים האחראים לקביעת עיתוי ההתעוררות מהתרדמה החורפית של עצי פרי נשירים. במסגרת התוכנית נמצא כי הפעלה של גן המקודד לאנזים מפרק ABA גרם לקצב התעוררות גבוהה מזה שבצמחי הביקורת בגפן. כמו כן, במסגרת המחקר רוצף הגנום של זן התפוח 'ענה', נמצאו סמנים גנטיים פולימורפיים ובוצע אפיון גנוטיפי ופנוטיפי לאוסף הגנטי של תפוחים בנווה יער שמראה שונות פנוטיפית נרחבת לתכונת דרישות הקור. בעזרת אפיון זה מצאנו שני סמנים גנטיים שבעזרתם ניתן יהיה לבצע בירור מוקדם לצאצאים בעלי דרישות קור נמוכות במסגרת תוכניות השבחה: הראשון, בכרומוזום 9, באזור שהוגדר כ QTL בעל השפעה גנטית גדולה על קביעת תכונת דרישות הקור, בו נמצא הפלוטיפ ייחודי האופייני לכל הזנים בעלי דרישות קור נמוכות באוסף הזנים בנווה יער ולא קיים באף זן אחר שנבדק. הסמן השני, בגן *MdSOC1*, שנחשד במשמש, תות וקיווי כבקר של עיתוי התעוררות מתרדמה, בו נמצא אלל ייחודי המופיע רק בזנים המוקדמים ביותר מקרב אוסף הזנים. ניסיונות לבצע התמרה גנטית לקבלת צמחי תפוח שבהם הגן *MdSOC1* מושתק לא צלחו ונראה שפעילות הגן חיונית לצמח. אפיון גנוטיפי רחב שבוצע לזנים בעלי דרישות קור נמוכות ע"י שמונה סמנים אוניברסאליים, יוכל לשמש להבנת המקור הגנטי של התכונה. אוכלוסיות F1 של 'ענה' עם זנים בעלי דרישות קור גבוהות שכבר ניטעו, יוכלו לשמש לאישוש הסמנים ואף לצמצומם.

תוכן העניינים

מבוא.....	3
מטרות המחקר.....	5
פירוט עקרי הניסויים והתוצאות.....	6
דיון וסיכום.....	16
בביליוגרפיה.....	19
סיכום עם שאלות מנחות.....	20

מבוא (מבוא מפורט קיים בהצעת המחקר)

במחזור החיים השנתי של עצים נשירים, במהלך הסתיו, נקלטים ע"י הצמח אותות של התקצרות אורך היום וירידה בטמפרטורה והוא מגיב בכניסה לתרדמה. לאחר חשיפה לתקופת קור, עם האותות המבשרים את בוא האביב, הצמח מתעורר וישנה התפתחות מואצת של ניצנים וגטטיביים ורפרודקטיביים. צמחים שונים התפתחו כך שדרישות הקור שלהם הותאמו לתנאי הסביבה שבה הם חיים, וזאת בכדי למנוע מצד אחד התעוררות מוקדמת שתגרום לחשיפת הפקעים המתעוררים לתנאי קרה, ומצד שני להבטיח שהפקעים יתעוררו מוקדם ככל האפשר בכדי שהעץ יוכל לנצל את מירב ימי האביב והקיץ לצמיחתו. משך החשיפה לקור הנדרש לצמח בכדי לצאת מהתרדמה משתנה בין מינים ובין זנים שונים של אותו מין, ונמדד במדד הנקרא 'מנות קור'. קיימים מספר מודלים לחישוב הצטברות 'מנות קור' במהלך החורף, ורובם מסתמכים בעיקר על משך הזמן שבו שהה הצמח בתנאי טמפרטורה מוגדרים. לא ברור מהם הגורמים הצמחיים המגדירים וקובעים את דרישות הקור של צמחים נשירים שונים, או מהו המנגנון הצמחי ש'מונה' את מנות הקור ומאותת לצמח שתקופת הקור הנדרשת לו התקיימה. חשיפת הצמח לכמות 'מנות קור' נמוכה משדרוש לו תוביל להתעוררות איטית ולא אחידה.

באזורי גידול בעלי חורף חם, דוגמת ישראל, מוגבלות מנות הצינון אליהן יכולים הצמחים להיחשף ולכן לא ניתן לגדל מיני זני נשירים (כגון ורדניים וגפן) בעלי איכות גבוהה שהם בעלי דרישות קור גבוהות. יתרה מזו, יש גם קושי לחזות את התנהגותם של זנים בעלי מכסות צינון נמוכות יותר שמהווים את שלד הייצור של גידול הנשירים בארץ. מחסור במנות צינון ניתן לתיקון על ידי שימוש בחומרים שוברי תרדמה אך אלו מובילים לפרקים לנזקים כלכליים עקב השפעה פיטוטוקסית וברמה נמוכה של מנות קור יעילותם מוגבלת ואינה מאפשרת החלפה של הדרישה לצינון. במציאות של התחממות גלובלית יש להיערך לקראת תרחיש שבו מידת ההתאמה של זני הנשירים הנטועים כיום לאקלים המשתנה תלך ותפחת, ויהיה צורך בזנים מותאמים לדרישות קור נמוכות, בעלי פרי באיכות גבוהה. למרות המגבלות חשוב להדגיש כי בתנאי האקלים הישראלי, ההולך ומתחמם, אין כיום תחליף לשימוש בחומרים שוברי תרדמה והם מצויים בשימוש נרחב ברוב זני ומיני הורדניים, בגפן ובעצי פרי נשירים אחרים. בשנים האחרונות נגרמו נזקים רבים למטעי נשירים בישראל כתוצאה מחוסר השלמה של דרישות הצינון שהתבטא בהתעוררות חלקית ולא אחידה של הפקעים הוגטטיביים והרפרודוקטיביים, דבר שגרם לפריחה לא אחידה וכיסוי עלוותי מוגבל והוביל לירידה ברמת היבול. במציאות של התחממות גלובלית, צפוי כי כמות מנות הצינון אף תלך ותרד ויש חשש לפגיעה קשה בענף גידול הנשירים בארץ.

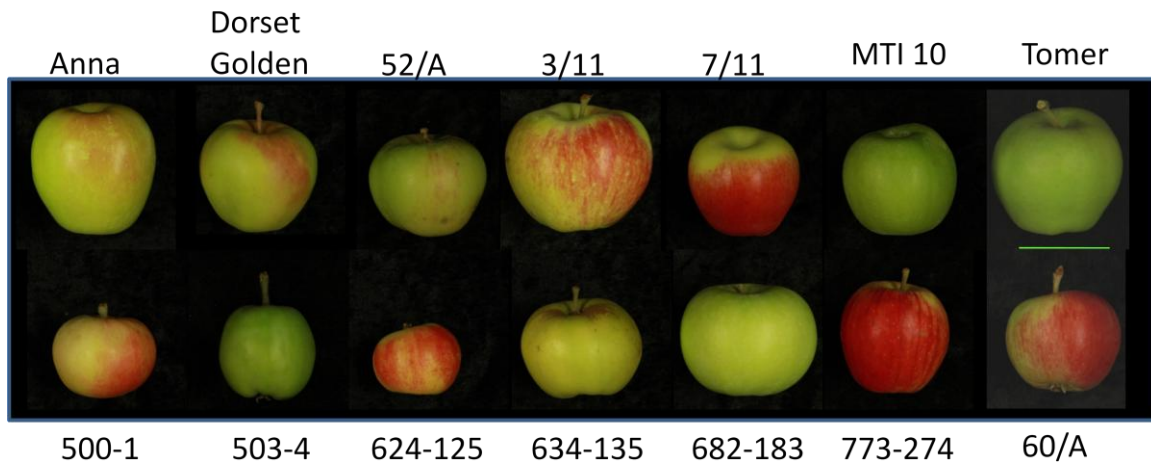
בשיתוף פעולה בין דורון הולנד לקבוצה באוניברסיטת צפון קרוליינה, נבחנו דרישות קור בהכלאות בין זנים שונים במישמש (Olukolu et al., 2009) ואפרסק (Fan et al., 2010), אופיינו דרישות הצינון ומהלך ההתעוררות של אוכלוסיות מכלוא ואוספי זנים במישמש ואפרסק, ואותרו QTLs (Quantitative Trait Loci) המעורבים בבקרה של התעוררות. בנוסף לכך, נחשף במשמש גן קנדיט שקיבל את השם *ParSOC1* (נקרא *Paagl* בהצעת המחקר שהוגשה למדען) הממוקם מחוץ ל-QTLs העיקריים. גן זה שייך למשפחת ה-MADS-box ודומה מאוד לגן *AGL20/SOC1* מארבידופסיס. לגן פולימורפיזם גדול בין זני משמש. שימוש ראשוני

בסמנים לגן זה באוסף זני המשמש של נווה יער מראה כי אלל מסויים שלו קיים ביותר מחמישים אחוז מהטיפוסים בעלי דרישות קור נמוכות (Trainin et al., 2013). בתות בר (*Fragaria vesca*) נמצא כי *FvSOC1* הוא בעל פעילות מעכבת פריחה ומעודדת צימוח וגטטיבי (Mouhu et al., 2013). בנוסף, מחקר שבוצע לאחרונה חקר תשעה גנים דמויי *SOC1* בקיווי, וממצאיו מצביעים על כך שלאחד הגנים תפקיד בקביעת משך תקופת התרדמה מכיוון שביטוי ביתר שלו גרם לקיצור משך תקופת התרדמה בצמחים הטרנסגניים (Voogd et al., 2015).

בצפפה נמצא כי במקביל לעצירת הצימוח, ולפני יצירת פקע טרמינלי, יש ירידה ברמת הביסנינתיזה של ג'יברלין, ירידה זמנית ברמת הסוכרים ועליה ברמת האתילן. מאוחר יותר, במקביל להשראת תרדמה, תועדה עלייה בביטוי מרכיבי סינתזה וחישה של חומצה אבסיסית (ABA) ועלייה ברמת ABA (Ruttink et al., 2007). בהתאמה, נמצאה בגפן בתגובה לשוברי תרדמה ירידה ברמת ABA שהייתה מלווה בירידה בביטויים של בקרים מרכזיים של סינתזה ועלייה בביטויים של בקרי פירוק של ABA. במקביל נמצאה עלייה ברמת אתילן שהייתה מלווה בעלייה בביטויים של מרכיבי סינתזה וחישה אתילן והוצע כי אתילן מבקר ירידה ברמת ABA (Ophir et al., 2009) (Or et al., unpublished). ההנחה היא כי קיים עיכוב של התעוררות הפקעים שמתווך ע"י ABA. הנחה זו מבוססת על תצפיות שמראות שטיפולים שוברי תרדמה גורמים לביטוי מופחת של גנים הקשורים ביצירת ABA, כגון *VvNCED1* ולעלייה בביטוי של גנים הקשורים בפירוק של ABA, כגון *VvA8H-CYP707A4*, כמו גם עליה בתוצרי פירוק של ABA (Zheng et al., 2015).

רוב זני התפוח המערביים השולטים בשוק הם בעלי דרישות קור גבוהות-בינוניות. בישראל, בה החורף הוא חם יחסית, נמצאים רוב מטעי התפוחים בצפון הארץ, באזורים הקרים, והם מטופלים בחומרים שוברי תרדמה כדי להבטיח התעוררות מלאה ואחידה של העצים. כיום, קיימים בעולם זנים בעלי דרישות קור נמוכות אך רובם בעלי פרי איכות שאינה מספקת. מבין הזנים בולט הזן 'ענה', שמסוגל לשגשג באזורים חמים מאוד, בעל איכות פרי סבירה, אך פירותיו אינם עמידים באחסון ארוך. הזן 'ענה' שולט בעולם באזורים רבים שבהם לא ניתן לגדל זני תפוח בעלי דרישות קור בינוניות או גבוהות כגון צפון-אפריקה, הודו, מקסיקו ואזורים נרחבים בדרום אמריקה. בארץ, הוא מגודל באזורי השרון והעמקים ויתרונו בכך שהוא זן המקדים את כל שאר זני התפוח. הזן טופח ע"י אבא שטיין בקיבוץ עין שמר, בורר בשנת 1954, והיה חלק מתוכנית השבחה שבה הכליא שטיין בין זנים מערביים בעלי איכות פרי גבוהה וזנים מקומיים בעלי התאמה טובה לתנאי האקלים המקומיים. במסגרת התוכנית, ברר אבא שטיין זנים נוספים, אך אף אחד מהם לא זכה להצלחה דומה לזו של 'ענה'. הזן היחיד שעדיין נמצא בשימוש הוא 'עין-שמר' המשמש כמפרה ל'ענה' בחלק מהחלקות. בשנים האחרונות נעשה מאמץ מחקרי לאפיין את הגורמים הגנטיים המקנים ל'ענה' ולזני תפוחים אחרים דרישות קור נמוכות (van Dyk et al., 2010; Celton et al., 2011). בכל העבודות נמצא QTL משמעותי בחלקו העליון של כרומוזום 9. במחקר נוסף שבדק ביטוי גנים במהלך התפתחות הפקעים הצביעו החוקרים על גן שהם הגדירו כדומה לגן *FLOWERING LOCUS C (FLC)* מארבידופסיס כגן מועמד להשפיע על תכונת דרישות הקור ומועד התעוררות בתפוח. גן זה נמצא בתוך איזור ה-QTL בכרומוזום של התפוח, אך הגדרתו כדמוי *FLC* היא בעייתית (Porto et al., 2015). מלבד הזן 'ענה', טיפח אבא שטיין זני תפוח נוספים בעלי דרישות קור נמוכות ושבעה מהם שומרו והם גדלים באוסף התפוחים בנווה יער. בנוסף

להם קיימים באוסף עוד כ- 13 זנים מקומיים שנאספו בארץ ולחלקם דרישות קור נמוכות, שישה קוים של תפוח חשאבי המשמשים ככנות וגם להם דרישות קור נמוכות, וכן כ 60 זנים מרחבי העולם, רובם בעלי דרישות קור בינוניות או גבוהות. איור 1, שבו תמונות פרי של זנים מקומיים ושל זנים שפותחו ע"י אבא שטיין ממחיש את השונות הפנוטיפית בין הזנים.



איור 1: תמונות פרי בשל של זנים וקווים שונים מהאוסף הגנטי בנווה יער. 'Dorset Golden' הינו זן בעל דרישות קור נמוכות שיובא לארץ. הזנים 52/A, 3/11, 7/11, 60/A, ו'תומר' פותחו ע"י אבא שטיין. הקווים 500-1, 503-4, 624-125, 634-135, 682-183, 773-274 הם קווים מקומיים.

מטרות המחקר

המטרה העיקרית של עבודה זו היא לאתר מרכיבים מרכזים במנגנון הביוכימי האחראי לבקרה על התעוררות בתגובה למנות צינון במהלך תקופת התרדמה החורפית של עצי פרי נשירים, ומשפיע על שונות בין מינית ובין זנית במכסות הצינון הנדרשות, באמצעות זיהוי ובחינה פונקציונאלית של גנים המשמשים בתפקידי מפתח בחינת מנות הקור ובהפעלת מנגנון ההתעוררות.

מטרות ספציפיות

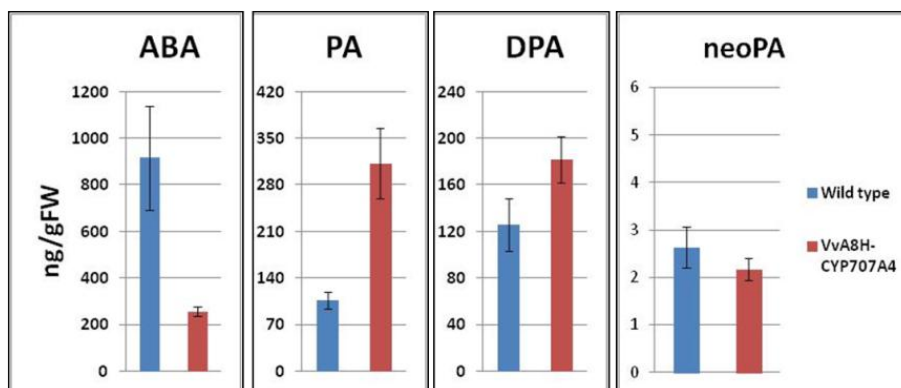
- א. איתור גנים המבקרים דרישות צינון בגרעיניים על ידי שילוב של כמה מערכות אפיון:
 1. אפיון הביטוי של גנים מועמדים התחומים ב-QTL האמור בכרומוסום 9 בתפוח, וכן גנים מועמדים אחרים, במהלך כניסה לתרדמה ויציאה מתרדמה, בזני התפוח 'ענה' ו'גולדן-דלישס', הנבדלים בדרישות למכסות צינון.
 2. השוואת רצפי הגנים המוזכרים בין הזנים 'ענה' ל'גולדן-דלישס' למציאת הבדלים שעשויים להסביר את השונות בין הזנים.
 3. שימוש באוסף זני התפוח של נווה יער למבחני map association לגנים מועמדים.
- ב. בידוד, שיבוט ומבחן פונקציונאלי של גנים קנדידטים בתפוח על בסיס עבודות מוקדמות במשמש וגפן ועל בסיס זיהוי גנים בעלי ביטוי ורצף דיפרנציאליים בהשוואה בין ענה לגולדן-דלישס כאמור לעיל.

פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות שהתקבלו:

1. התמרה גנטית של גנים מועמדים בגפן ובתפוח

1.1. גנים המשפיעים על רמת ABA בצמח.

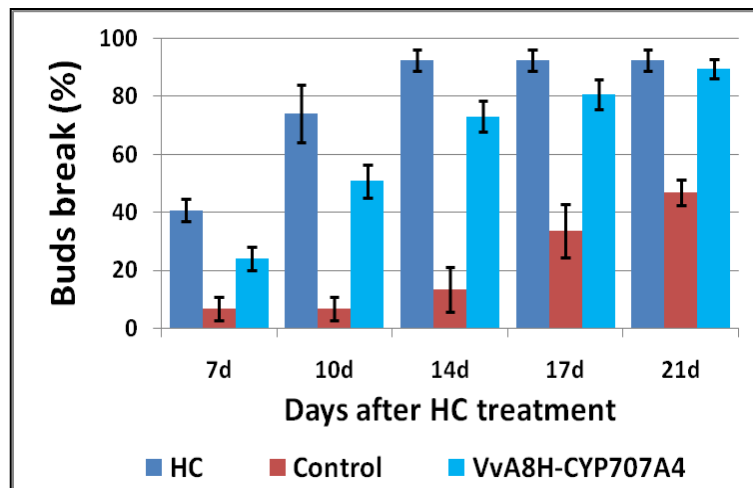
בכדי לבחון את השפעת ייצור ABA על התעוררות הפקעים שובטו שני גנים בעלי תפקידי מפתח מגפן. גן אחד הוא *VvNCED1* (9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase), המקודד לאנזים הראשון במסלול הביוסנטזה של ABA מקרטנואידים, וצפוי שביטוי ביתר שלו יוביל להגברה בייצור ABA ברקמה. הגן השני הוא *VvA8H-CYP707A4*, גן המקודד לאנזים המעורב בפירוק ההורמון ABA, ולכן אנו צופים כי ביטוי שלו ביתר יגרום לירידה בכמות ה-ABA ברקמת הפקע. ביטוי שני הגנים שנבחרו משתנה בפקעי גפן בתגובה לגירוי שבירת תרדמה. שני הגנים שובטו בפלסמידים מבוססי GATEWAY (destination vector) (pK7FWG2) תחת בקרה של פרומטר 35S. הגנים שובטו כך שקצה שלוש שלהם אוחה לגן GFP. תאים אמבריוגנים מגפן שהוחדר להם הקונסטרוקט המכיל את *NCED1* בטאו GFP והייתה בהם רמת ABA גבוהה יותר, כלומר נראה שהקונסטרוקט תקין והאנזים *NCED1* פעיל, אך הם לא הצליחו להתמין לצמחונים בתנאים שנבדקו. תאים אמבריוגנים המבטאים את *VvA8H-CYP707A4* התפתחו לצמחים טרנסגניים (אשר ברמת ה-PCR). נבחרו 16 צמחים טרנסגניים המבטאים את *VvA8H-CYP707A4* וחמישה צמחים ששימשו כביקורת. עלים צעירים של הפקעים נאספו ומוצו מהם ABA, ותוצרי פירוק של ABA: חומצה נאופסאית (Neophaseic acid; neoPA), חומצה פסאית (Phaseic acid; PA), ודיהידרו-חומצה פסאית (dihydrophaseic acid; DPA). בעלים של הצמחים הטרנסגניים נצפתה רמה נמוכה פי 4 מהרמה שנצפתה בעלי הביקורת, בהתאם נצפו בעלים הטרנסגניים רמות גבוהות יותר של תוצרי הפירוק של ABA: PA (פי 3 יותר) ו DPA (פי 1.45 יותר) (איור 2).



איור 2: רמות ממוצעות של ABA ותוצרי פירוק שלו (ng/gFW) בעלים צעירים של 16 צמחי גפן טרנסגניים ל *VvA8H-CYP707A4* (כחול) ובעלים של חמישה צמחי ביקורת (אדום). חומצה נאופסאית (Neophaseic acid; neoPA), חומצה פסאית (Phaseic acid; PA), ודיהידרו-חומצה פסאית (dihydrophaseic acid; DPA).

ענפי הצמחים, הטרנסגניים והביקורת, נגזמו לייחורים בעלי פקע יחיד. קבוצות של שמונה ייחורים של כל קו, טרנסגני או ביקורת, שימשו לבחינת התעוררות. ארבע קבוצות ייחורים מצמחי הביקורת רוסו ב'דורמקס' 3% (בתמיסת 0.02% טריטון) כטיפול שובר תרדמה של הידרוג'ן ציאנימיד (HC), ארבע קבוצות של ייחורים מצמחי הביקורת, וארבע קבוצות של ייחורים מהצמחים הטרנסגניים, טופלו בריסוס ביקורת

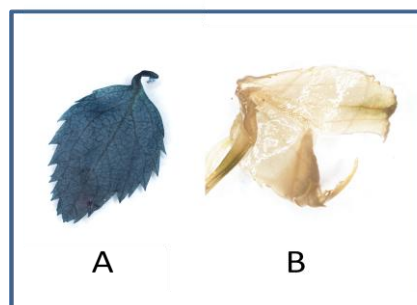
בתמיסת 0.02% טריטון בלבד. הפקעים הועברו לתנאים של השריית התעוררות (22°C, תחת משטר הארה של 14 שעות אור ו-10 שעות חושך) למשך 21 ימים. תצפיות להתעוררות הפקעים נערכו 7, 10, 14, 17, 21 ימים לאחר הטיפול HC. ניתן היה לראות שאחוזי ההתעוררות של הפקעים הטרנסגניים המבטאים ביתר את הגן *VvA8H-CYP707A4*, ולכן בעלי רמה נמוכה של ABA, הייתה גבוהה בהרבה מאחוזי ההתעוררות בקרב פקעי הביקורת כבר שבעה ימים לאחר הטיפול והעברה לתנאים משרי התעוררות. ככל שעבר הזמן, עלו אחוזי ההתעוררות של הפקעים הטרנסגניים, וב-21 ימים לאחר הטיפול כבר היו שווים לאחוזי ההתעוררות של פקעי הביקורת שטופלו ב HC (איור 3).



איור 3: שיעור התעוררות פקעים שמקורם מצמחים טרנסגניים לגן *VvA8H-CYP707A4*, צמחי ביקורת שרוסו ב'דורמקס' 3% כטיפול שובר תרדמה (HC), ומצמחי ביקורת שרוסו בתמיסת 0.02% טריטון בלבד. הפקעים הועברו לתנאים המשרים התעוררות ונבחן שיעור ההתעוררות שלהם 7, 10, 14, ו-21 ימים לאחר הטיפול והמעבר.

1.2. הגן *MdSOC1*

פרוטוקול התמרה בזן התפוח 'גלאקסי' (בעל דרישות קור גבוהות) כבר פותח ע"י מעבדת פליישמן ובמסגרת תוכנית המחקר פותח פרוטוקול להתמרה ורגנרציה של חומר צמחי מהזן 'ענה' (בעל דרישות קור נמוכות) ע"י התמרה עם הפלסמיד pME504 המבטא את הגן המדווח GUS. (איור 4).



איור 4: עלים לאחר צביעת GUS: מצמח שנוצר כתוצאה מהתמרה של חומר צמחי מזן התפוח 'ענה' בעזרת הפלסמיד pME504 המבטא את הגן המדווח GUS (A), ומצמח הביקורת (B).

לאור הממצאים הקושרים את הגן *ParSOC1* לבקרה של דרישות קור במשמש (Trainin et al., 2013), ולאחרונה גם ממצאים הקושרים גנים ממשפחת ה-*SOC1* מקיווי עם קביעת משך זמן התרדמה (Voogd et al., 2015), הנחת העבודה היא ששינוי הביטוי של הגן בתפוח עשויה להשפיע על דרישות הקור שלו. על בסיס הומולוגיה בגנום התפוח אותרו שני גנים הנראים כאורתולוגים של *ParSOC1* (להלן *MdSOC1*) ושובט רצף, שאמור לצור השתקה של שני הגנים בו זמנית, בווקטור RNAi. הפלסמיד הוחדר לאגרובקטריום ונערכו ניסיונות התמרה הן בזן 'גלאקסי' והן בזן 'ענה'. הרגנרציה עבדה ביעילות נמוכה, וגם הרגנרנטים שהתקבלו לא הצליחו להתפתח לצמח למעט במקרה בודד בזן 'גלאקסי' (טבלה 1).

טבלה 1: תיאור ניסיונות התמרה ורגנרציה של וקטור להשתקת הגן *MdSOC1* בזני התפוח 'גלאקסי' וענה'.

תאריך	מס' עלים	מס' רגנרנטים-ביקורת	מס' רגנרנטים בניסוי	צמחים מותמרים	איפיון
זן 'גלאקסי'					
25.3.13	250	30/30	11/250	0	נעצרה התפתחות ונבילה בהמשך
20.1.14	200	30/30	1/200	0	הלבנה
5.5.14	200	30/30	13/200	1	המשך ריבוי לשדה
12.6.14	200	30/30	6/200	0	נעצרה התפתחות ונבילה בהמשך
זן 'ענה'					
20.5.14	200	25/30	1/200	0	נעצרה התפתחות ונבילה בהמשך
2.6.14	200	26/30	1/200	0	נעצרה התפתחות ונבילה בהמשך

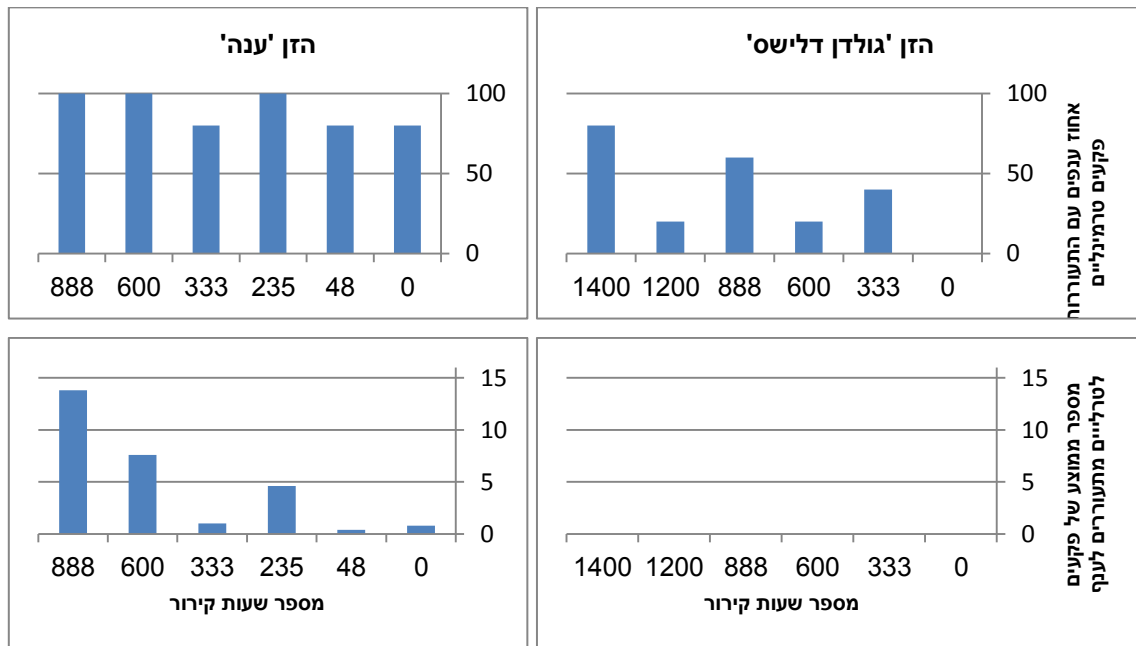
ייתכן כי עיכוב בביטוי הגן *MdSOC1* בשלבי התפתחות ראשוניים של הצמח גורם לדיכוי בהתפתחות הצמחונים. ייתכן שהגן חיוני בשלבי התפתחות אלו. DNA מהצמח המותמר נבדק PCR ונמצא מכיל את הגן לעמידות לקנמיצין (תוצאות לא מוצגות)

2. אפיון פנוטיפי של אוסף זני התפוח בנווה יער

2.1. מעקב אחר התעוררות ענפים גזומים שנחשפו למנות מבוקרות של צינון

בסוף חודש דצמבר 2012 נקטפו ענפים (בני שנה, באורך של כ 50 ס"מ, קוטר של כ 1 ס"מ) מהזן 'ענה' ומהזן 'גולדן דלישס'. הענפים הועברו לאיחסון בחושך ב 4°C לפרקי זמן משתנים (0, 50, 235, 333, 600 ו 888 שעות חשיפה לענפי 'ענה'. ואילו ענפים של 'גולדן דלישס' נחשפו ל 0, 333, 600, 888, 1200, 1400 שעות). לפי השירות המטרולוגי, נחשפו העצים לארבעה שעות קור בלבד לפני קטיף הענפים (לפי מודל שסופר מספר שעות שבהן הייתה הטמפרטורה הממוצעת נמוכה מ 7°C). חמישה ענפים מכל זן הוצאו בתום כל תקופת חשיפה. והועברו לחדר צמיחה שבו תנאים מבוקרים (24°C, יום ארוך) להתעוררות. נערך מעקב אחר התעוררות של פקעים טרמינליים ולטרליים ואחר הופעת פרחים בענפים. 14 ימים לאחר העברת הענפים לתנאים מעודדי התעוררות, ניתן לראות שבזן 'ענה' היתה התעוררות של 80-100% מהפקעים הטרמינליים בכל הטיפולים, כולל טיפול ללא חשיפה לקירור (איור 5). ב'גולדן דלישס' לעומת זאת, היתה התעוררות חלקית בלבד ונראה שלחשיפה לקור הייתה השפעה חיובית מסוימת על ההתעוררות. בזן 'ענה'

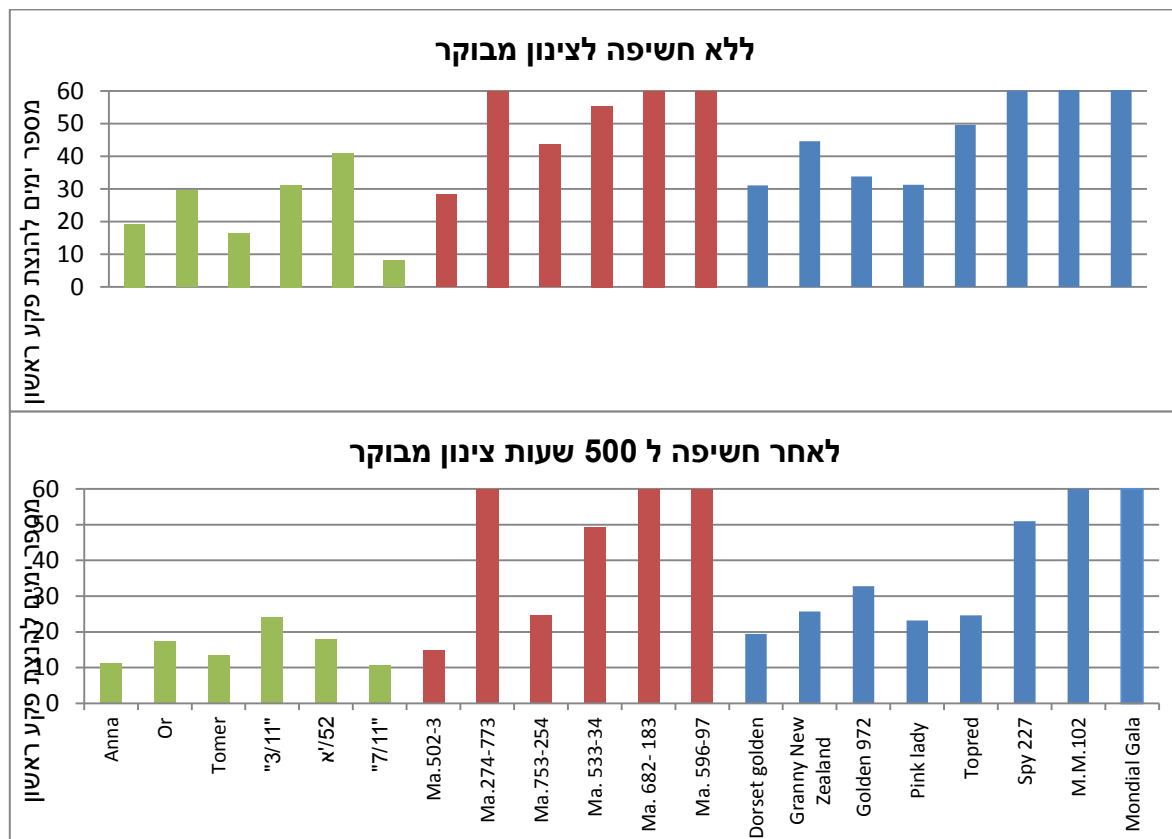
ניתן לראות שהתעוררות הפקעים הלטרליים הושפעה מאוד מזמן החשיפה של הענפים לקור. בזן 'גולדן דלישס', שבועיים לאחר העברת הענפים ל-24°C, לא נצפתה התעוררות לטרלית באף אחד מהטיפולים (איור 5). שלושה שבועות לאחר העברה נצפה פקע לטרלי מתעורר בודד באחד הענפים שנחשפו ל 1200 שעות קירור, ארבעה שבועות לאחר העברה נצפו שלושה פקעים לטרליים מתעוררים גם בטיפול של 333 שעות קירור ושישה שבועות לאחר העברה נצפו פקעים ספורים מתעוררים גם בטיפול של 1400 שעות קור (הנתונים אינם מוצגים).



איור 5: תוצאות התעוררות פקעים טרמינליים ולטרליים בענפי תפוח קטופים שנחשפו למספר שונה של שעות קירור, 14 יום לאחר העברתם לתנאים מעודדי התעוררות.

מהתוצאות נראה שבתנאים שבדקנו, הפקעים הטרמינליים בזן 'ענה' אינם זקוקים למנות צינור כלל בכדי להתעורר, ואילו התעוררות הפקעים הליטרליים משתפרת ככל שעולה זמן החשיפה לקור. בזן 'גולדן דלישס' לעומת זאת, נראה שיש השפעה מסויימת לחשיפה לקור על התעוררות פקעים טרמינליים ונראה שהפקעים הליטרליים מעוכבים מאוד במערכת שבדקנו, גם לאחר קירור ממושך. בסוף חודש דצמבר 2013 נקטפו שוב ענפים מעצים של עשרים זני תפוח: שישה זנים שטופחו ע"י אבא שטיין ('ענה', 'אור', 'תומר', '3/11', '7/11', '52/א'), שישה זנים מקומיים (Ma. 502-3, Ma. 753-254, Ma. 274-773, Ma. 533-34, Golden delicious 972, Pink Lady, Granny) ושמונה זנים 'מערביים' (Ma. 682-183, Ma 596-97 New Zealand, Topred, Spy 227, M.M. 102, Mondial Gala, Dorset Golden). הענפים הועברו לאיחסון בחושך ב 4°C לפרקי זמן קצובים (0, 50, 200, 500, 1000, 1500 שעות חשיפה לענפי של זנים של אבא שטיין וזנים מקומיים ואילו ענפים של זנים מערביים נחשפו ל 0, 500, 600, 1000, 1500, 2000 שעות). לפי השירות המטרולוגי, נחשפו העצים ל 136 שעות קור לפני קטיף הענפים. חמישה ענפים מכל זן הוצאו בתום כל תקופת חשיפה והועברו לתנאים מעודדי התעוררות כפי שנעשה בשנת 2013. נערך מעקב אחר מספר הימים שעברו מהמעבר לתנאים מעודדי התעוררות ועד להתעוררות של פקעים טרמינליים

ולטראיים וכן אחר הופעת ניצני פריחה ופרחים בענפים. התצפית נמשכה כ 50 ימים מכיוון שאחרי תקופה זו הפקעים בדו"כ התייבשו והענפים לא התעוררו. חלק ניכר מהענפים לא הראו סימני התעוררות גם לאחר תקופה זו, ולצורך חישוב ממוצעי זמן ההתעוררות נבחר ערך של 70 ימים כערך מייצג עבורם (כך שיהיה ערך מספיק גדול בכדי להצביע על שונות, אך לא גדול מידי כך שתרומתם של ענפים שכן התעוררו לממוצע תהיה משמעותית). למרות שהזמן שנדרש לזנים שפותחו ע"י אבא שטיין להתעורר היה קצר יחסית, כמצופה על פי ההתעוררות המוקדמת של זנים אלו במטע, הזנים המקומיים והזנים המערביים לא התנהגו תמיד בהתאם לתצפיות במטע (איור 6). לדוגמא, ענפים של הזן Ma 274-773 שהראה התעוררות מוקדמת במטע, התקשו להתעורר, גם לאחר 500 שעות צינון (איור 6) וגם לאחר 1000 שעות צינון (נתונים לא מוצגים). לעומת זאת, ענפים של זנים מערביים שהתקשו להתעורר במטע: גרני ניו-זילנד, גולדן דלישס 972 ופינק לידי, התעוררו יחסית מהר, גם אם לא נחשפו לצינון מבוקר.



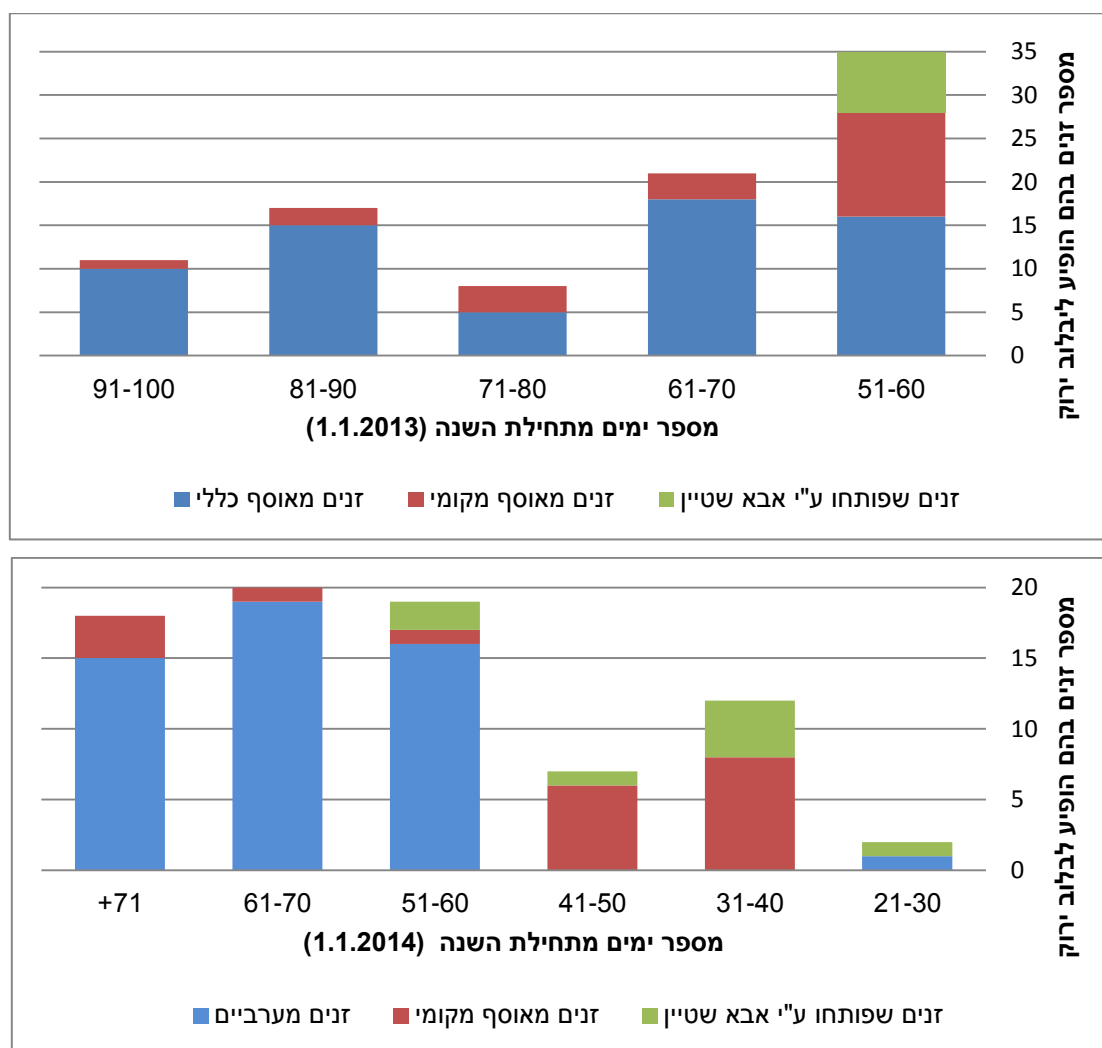
איור 6: התעוררות פקעים בענפי תפוח קטופים שנחשפו למספר שונה של שעות קירור. מוצג משך הזמן המומצע (בימים) מהעברת הענפים לתנאים מעודדי התעוררות, ועד להתעוררות פקע ראשון. בירוק, זנים שפותחו ע"י אבא שטיין, באדום זנים מקומיים (מתוכם Ma. 502-3 ו Ma. 753-254 הם בעלי דרישות קור נמוכות והשאר בעלי דרישות קור בינוניות-גבוהות), בכחול זנים מערביים.

במערכת זו בלט כי ברוב הענפים שהראו סימני התעוררות התפתח הפקע הטרמינלי ורק בחלק הייתה התפתחות של פקעים לטראליים. נסיון לשבור את השלטון הקודקודי ע"י קטימה של הפקע הטרמינלי גרם לכך שהפקע הבא בתור בהיררכיה התעורר ואילו הפקעים הלאטראליים מיעטו להתעורר. בעיה נוספת הייתה

שלאחר משך זמן של כשבועיים שלושה בתנאים מעוררים אצל חלק מהזנים התייבשו או התנוונו הפקעים. לאור התוצאות שלא תמיד תאמו את התצפיות מהעצים במטע, ואת שתועד בספרות, הוחלט ששיטת העבודה עם ענפים חתוכים אינה מתאימה לאפיון דרישות הקור של קווי התפוחים.

2.2. מעקב אחר התעוררות עצים באוסף זני התפוח בנווה יער

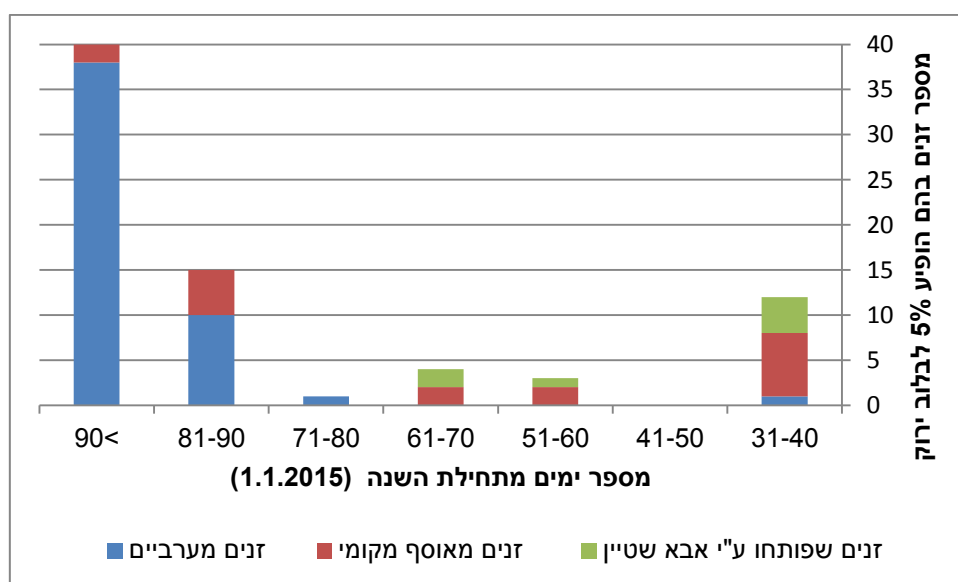
במהלך עונת חורף-אביב 2013, 2014, ו 2015 נערכו תצפיות למעקב אחר מועד התעוררות וגטטבית (עלים) ורפרודוקטיבית (פרחים) של העצים באוסף הגנטי בנווה יער. בעונות 2013 ו 2014 נערך מעקב אחר העצים ותועדו זמני הופעת עלה ירוק ראשון, פרח ראשון, 10% פריחה ושיא פריחה (90%). באיור 7 מוצגות תוצאות מועד הופעת עלה ירוק ראשון בזנים השונים לפי ציר הזמן (מספר ימים מתחילת השנה) (איור 7).



איור 7: התפלגות הזנים באוסף זני התפוח בנווה יער לפי המועד בו הופיע עלה ירוק ראשון בעונות חורף-אביב 2013, 2014.

חורף 2012-13 התאפיין בטמפרטורות גבוהות יחסית ונראה שהדבר התבטא בהתעוררות מוקדמת ולא אחידה. על פי נתונים של השרות המטאורולוגי, הצטברו בנווה יער סך של 70 'שעות קור' בלבד (לפי מודל הסופר מספר שעות שבהן הייתה הטמפרטורה הממוצעת נמוכה מ 7°C) עד תחילת הפריחה של הזן

המקדים ביותר (21.2.2013). בתחילת חודש מרץ נוספו עוד עשר שעות קור. במהלך חורף 2013-2014 הצטברו 226 'שעות קור' אך פיזורן לא היה אחיד, ו 142 מהן הצטברו כבר במהלך חודש דצמבר. מהתצפיות ניתן לראות שרוב הזנים שפותחו ע"י אבא שטיין (ביניהם הזן 'ענה') וכן חלק מהזנים שנאספו בכפרים ברחבי הארץ ('מקומיים') הם בעלי נטייה להתעורר מוקדם (איור 7). זן נוסף שהתעורר מוקדם הוא הזן Dorset Golden שנחשב לזן שיובא מא"י הבהמאס (Miller and Sherman, 1980). תוצאות התצפיות כפי שנלקחו לא משקפות היטב את התפתחות העצים. סיבה אחת לכך היא שברבים מהעצים המערביים הייתה הופעה של עלה ירוק ראשון אך התעוררות של פקעים נוספים התעכבה בשבועות רבים. סיבה נוספת היא הקושי להגדיר מהו מופע של 10% או 90% פריחה ברוב הזנים בעלי דרישות הקור הבינוניות- גבוהות. זנים אלו הוציאו ניצני פריחה בודדים לאורך תקופה שנמשכה זמן רב, ולכן יהיה זה לא נכון להשוות אותם לעצים בעלי דרישות קור נמוכות שהם בעלי פריחה מלאה ואחידה יותר. בעונת חורף-אביב 2015, שבה הצטברו כ 150 שעות קור באזור המטע בנווה יער, קיימנו מערך תצפית מדוקדק יותר שבו סומנו שמונה ענפים רנדומליים מכל זן/קו באוסף הזנים ונערך מעקב אחר התעוררות הפקעים. איור 8 מראה את התפלגות הזנים באוסף בנווה יער לפי המועד שבו 5% מהפקעים כבר הוריקו.



איור 8: התפלגות הזנים באוסף בנווה יער לפי המועד שבו 5% מהפקעים כבר הוריקו בעונת חורף-אביב 2015.

גרף המציג את ההתפלגות לפי המועד בו 5% מהפרחים כבר פרחו הוא דומה, אם כי הוא בעייתי מכיוון שהיו קווים שעבורם לא תועדה כל פריחה על הענפים שנבחרו לתצפית (תוצאות לא מוצגות). הגרף תואם את קצב ההתעוררות של הקווים (אחוז הפקעים שהתעוררו לאורך זמן, מהופעה של לבלוב ירוק) כך שלקווים שהתעוררו מוקדם היה קצב התעוררות מהיר ואילו לקווים שהתעוררו מאוחר היה קצב הורקה איטי. הגרף מייצג תמונה טובה יותר של מצב העצים בשטח, ולכן בחרנו בו בכדי להגדיר את הפנוטיפ של הקווים השונים: קווים שהגיעו ל 5% לבלוב לפני היום 70 הקלנדרי הוגדרו כקווים מוקדמים (בעלי דרישות קור נמוכות), וקווים שהגיעו לכך אחרי יותר מ 70 יום מתחילת השנה הוגדרו כקווים מאוחרים (בעלי דרישות קור בינוניות-גבוהות).

3. אפיון גנטי של זנים שטופחו ע"י אבא שטיין, זנים מקומיים וזנים מערביים

רצף גנום התפוח, שנעשה על הזן 'גולדן דלישס' פורסם (Velasco et al., 2010), ומאפשר שימוש בו כגנום-סמך (Reference Genome) לריצוף של גנומים של זנים נוספים בשיטת Re-sequencing. בשנה הראשונה לתוכנית המחקר ביצענו ריצוף לגנום של הזן 'ענה', ובעזרת השוואה בינו לבין גנום התפוח הנגיש לציבור (http://www.rosaceae.org/species/malus/malus_x_domestica/genome_v1.0) נמצאו אתרים פולימורפיים בשלושה אזורים ענייני: איזור QTL לדרישות קור נמוכות שנמצא במחקר גנטי קודם בכרומוסום 9 (van Dyk et al., 2010; Celton et al., 2011), והאזורים המכילים את שני העותקים של הגן *MdSOC1*, על כרומוזומים 2 ו 7. על סמך סמנים ידועים ועל סמך סמנים חדשים שתוכננו על ידנו, בוצע אפיון גנטי לזנים וקווים שונים באוסף זני התפוח בנווה יער:

3.1. איזור ה QTL לדרישות קור נמוכות בכרומוזום 9:

נעשה שימוש בסמנים ידועים: ארבעה סמני SSR ושני SNP באזור המדובר, וכן תוכננו ונבדקו עשרה סמני SNP ו 14 סמני SSR נוספים בגנים קנדידטים או לידם, על סמך השוואה בין הגנום של הזן 'ענה' לגנום הסמך של הזן Golden Delicious. הסמנים נבדקו על 79 קווים וזנים של תפוח: שמונה קווים שטיפח אבא שטיין (כולם בעלי דרישות קור נמוכות), 18 קווים מקומיים (מתוכם 12 בעלי דרישות קור נמוכות ו 6 בעלי דרישות קור בינוניות-גבוהות) ו 53 קווים מערביים (רק אחד מהם, 'דורסט גולדן', הוא בעל דרישות קור נמוכות).

טבלה 2: אפיון גנטי של אוסף זני התפוח בנווה יער בעזרת סמנים באיזור QTL לתכונת דרישות קור נמוכות על כרומוזום 9. המספרים מייצגים את מספר הפרטים הנושאים כל אלל מתוך כלל הפרטים בקבוצה. מודגשים בירוק סמנים היוצרים הפלוטיפ המשותף לכל הזנים בעלי דרישות הקור הנמוכות. בכיתוב אדום מודגשים סמנים שבהם אללים ייחודיים לכל הזנים בעלי דרישות קור נמוכות שאינם מופיעים באף אחד מהזנים בעלי דרישות קור בינוניות-גבוהות שנבדקו.

סמן	SNP-A4	SSR-N	SNP-A6-2	SNP 01189	SSR-E	snp01891	SSR-D	SSR-A
אלל	T	208	T	G	250	C	361	311
קווים בעלי דרישות קור נמוכות	18/21	21/21	20/20	13/13	19/19	19/19	9/18	9/19
קווים בעלי דרישות קור גבוהות	0/51	0/58	0/54	15/22	11/21	23/27	11/18	6/24

בעזרת האנליזה הגנוטיפית ניתן היה להגדיר הפלוטיפ של חמישה סמנים, שלושה SNPs ושני סמני SSR, שמוגדר בתוך איזור של כ 500 Kb וקיים בכל הקווים בעלי דרישות הקור הנמוכות שבדקנו (טבלה 2, איזור מודגש בירוק). שני סמנים, SNP-A6-2 ו SSR-N, נמצאו בתאחיזה מלאה לתכונה, כך שאללים ייחודיים שלהם הופיעו בכל הקווים בעלי דרישות קור נמוכות ולא הופיעו כלל בקווים בעלי דרישות קור בינוניות-גבוהות (טבלה 2, כיתוב אדום). סמנים אלו יוכלו לשמש לזיהוי מוקדם של תכונת דרישות קור נמוכות בכל מאמץ של טיפוח והשבחה של קווים כאלו. יש לציין כי הזן 'דורסט גולדן', בעל דרישות קור נמוכות שהובא לארץ כמפרה ל'ענה', סווג על ידינו כזן 'מערבי' מכיוון שתואר בספרות כצאצא של הזן 'גולדן דלישס' שהתגלה

באיי הבהאמה (Brooks and Olmo, 1972). עם זאת, הוא נחשד בעבר כצאצא של 'ענה' או זן אחר שטופח ע"י אבא שטיין, 'עין-שמר' (Miller and Sherman, 1980), למרות שלפי התיעוד שבידנו הוא בודד ב 1953, בעוד שההכלאה שיצרה את 'ענה' התרחשה ב 1959 (Brooks and Olmo, 1972). כך או כך, מתוך האנליזה הגנטית שבוצעה הסתבר כי הוא קרוב של הזנים בעלי דרישות הקור הנמוכות שנבדקו (נושא את האללים האופייניים ל'ענה' ודומיה) ונשללה האפשרות שהוא זריע ישיר של 'גולדן דלישס'.

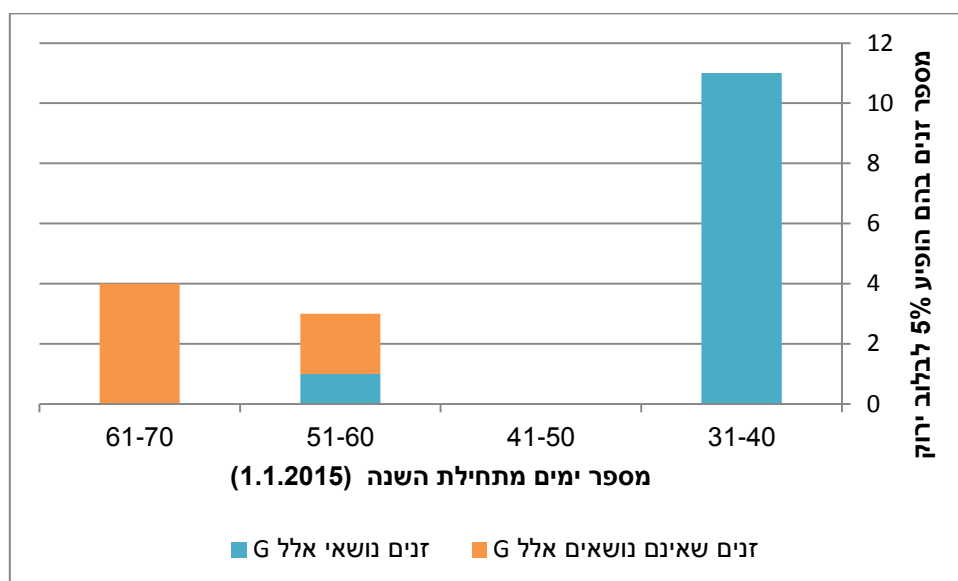
3.2 הגן MdSOC1

נמצאו סמני SSR בתוך הגנים בכרומוסומים 2 ו 7 ונעשה בהם שימוש בכדי לאפיין את אוסף הזנים בנווה יער. בקרב הפרטים שנבדקו עבור סמן ה SSR בכרומוזום 2 נמצאו שניים-עשר אללים שונים (L-A בטבלה 3). נמצא כי הזן 'ענה' נושא אלל ייחודי של הסמן, אלל G, שמופיע רק בזנים בעלי דרישות קור נמוכות ולא מופיע באף זן בעל דרישות קור בינוניות או גבוהות. עם זאת, האלל לא מופיע בכל הזנים והקווים בעלי דרישות הקור הנמוכות (טבלה 3).

טבלה 3: אפיין גנוטיפי (אללים L-A) לזנים וקווים מאוסף זני התפוח בנווה יער לסמן SSR באיזור הגן MdSOC1 בכרומוזום 2. האלל G שמופיע בזן 'ענה' מודגש בצבע אדום.

פנוטיפ	הזן	MdSOC1 genotype	פנוטיפ	הזן	MdSOC1 genotype
זנים מערביים בעלי דרישות קור בינוניות או גבוהות	Baujade	DK	בעל דרישות קור נמוכות	Dorset Golden	GH
	Gala I3	HL	זנים שטופחו ע"י אבא שטיין	Anna	BG
	Granny New Zealand	CD		Or	EG
	Jonathan selection No.6	CH		Tomer	DG
	Mondial Gala	HL		3/11	EG
	Orleans	BE		52 /א'	DE
	Royal Gala	HL		60/A	BE
	Summered	DH		7/11	EG
	Bronzee	HK		Ein shemer	DK
	Fuji New Zealand	CD		זנים מקומיים בעלי דרישות קור נמוכות	Ma.500-1
	Golden 972	HK	Ma.502-3		AD
	Golden Delicious B-L	HK	Ma.624-125		AD
	Golden S	DH	Ma.634-135		GI
	Lysgolden	HK	Ma.274-773		DE
	Nagafu No. 6	DE	MH 10-1		GJ
	Ozark Gold	CK	MH 13-4		GJ
	Smoothee	HK	MH 14-5		GJ
	Double Red S. No. 6	DE	MH 15-6	GJ	
	Grand selection No. 4	CK	MH 16-7	GJ	
	Early Red Mutant	DE	זנים מקומיים בעלי דרישות קור בינוניות או גבוהות	Ma.503-4	EF
	Early Stripe	DE		Ma.533-34	DK
	M.M.102	CD		Ma.596-97	DK
	M.M.104	DD		Ma.682-183	BC
	Oregon Mutant	DE		Ma.684-185	EK
	Oregon Spur	DE		Ma.753-254	DE
	Pink Lady V.F.	BK			
	Red Chief	DE			
	Red Prince	DE			
	Scarlet Spur	DE			
	Spy 227	CD			
	Topred	DE			

מעניין לציין שכאשר בוחנים את הקווים שהוגדרו כבעלי דרישות קור נמוכות ניתן לראות שביניהם קיימים זנים מקדימים יותר ומאוחרים יותר. נראה שאלל G נמצא בכל הזנים המקדימים התעוררות ואינו נמצא ברובם של הזנים המאוחרים (איור 9).



איור 9: התפלגות הזנים שהוגדרו כבעלי דרישות קור נמוכות (מוקדמים) באוסף בנווה יער לפי הגנוטיפ שלהם בסמן SSR בגן MdSOC1 על כרומוזום 2, והמועד שבו 5% מהפקעים כבר הוריקו בעונת חורף-אביב 2015.

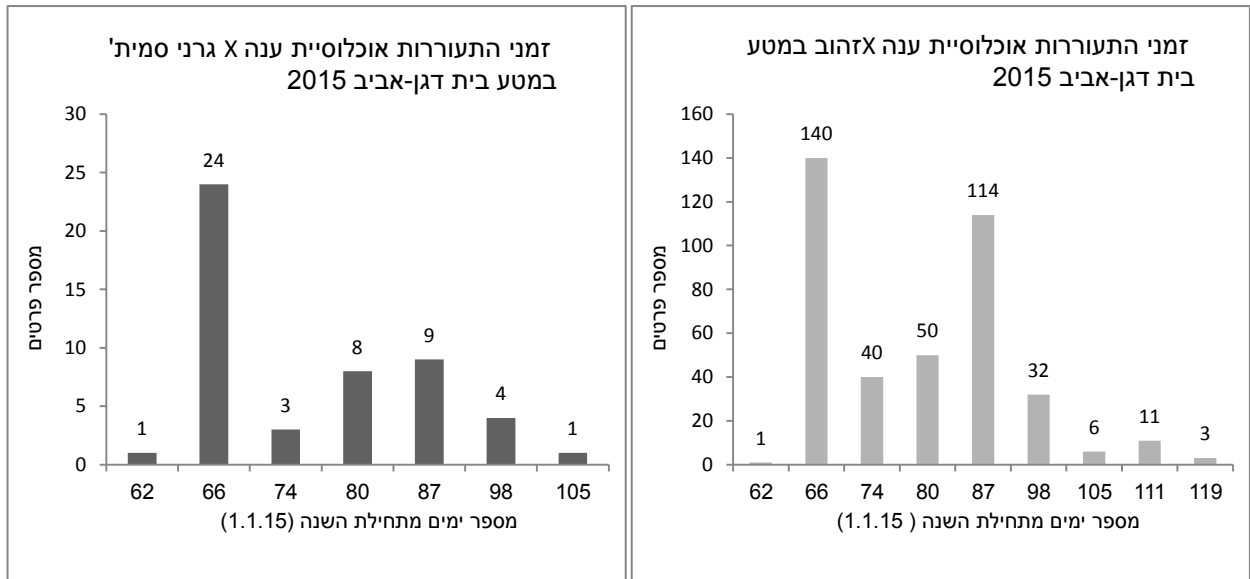
בסמן ה-SSR שנמצא בגן MdSOC1 בכרומוזום 7 נמצאו עשרה אללים שונים אך אף אחד מהם לא היה ייחודי לזנים בעלי דרישות הקור הנמוכות (תוצאות לא מוצגות). אלל D הופיע בשמונה מתוך 18 הקווים בעלי דרישות קור נמוכות שנבדקו (44%), אך אלל זה הופיע גם ב-13 מתוך 22 הקווים בעלי דרישות קור בינוניות-גבוהות שנבדקו (59%), כך שלא ניתן לומר שהוא באסוציאציה עם התכונה.

3.3 אפיון גנוטיפי בעזרת סמני SSR אוניברסלים בגנום התפוח

אפיון גנוטיפי מקיף של אוספים גנטיים של תפוחים באיזורים שונים בעולם התבצע בשנים האחרונות והוגדר סט אוניברסלי של 16 סמני SSR שבעזרתם ניתן לאפיין את מוצאם של העצים ואת מיקומם הפילוגנטי (Durel et al., 2014). לצורך אפיון השונות בין הפרטים השונים שהוגדרו כבעלי דרישות קור נמוכות השתמשנו בשמונה סמני SSR מתוך הסט (מידע על הסמנים והפעלתם ניתן באדיבות דר' שארל-אריק דורל, INRA, צרפת, תוצאות לא מוצגות). מתוך התוצאות של אפיון זה וכן מתוך תוצאות הסמנים על כרומוזומים 2, 7, ו-9, נראה כי בקרב הקווים המקומיים קיימות שתי קבוצות שבכל אחת מהן דמיון גנטי רב שעשוי להצביע על כך שמדובר במוצא גנטי משותף (הקווים אינם זהים לחלוטין מבחינה גנטית אך נבדלים זה מזה רק בגנוטיפ של סמן יחיד או פחות, מתוך הסמנים שנבדקו ב-11 איזורים שונים בגנום). קבוצה אחת מכילה חמישה מבין ששת קווי החשאבי וכן את קו 135-634, הקבוצה השנייה כוללת את הקווים 1-500, 3-502, 125-624. יתר הפרטים שהוגדרו כבעלי דרישות קור נמוכות (שלושה קווים מקומיים, שמונה הקווים של אבא שטיין ו'דורסט גולדן' שיובא לארץ) הם שונים מאוד מבחינה גנטית.

4. יצירת אוכלוסיית ע"י הכלאות בין 'ענה' לזני תפוח אחרים

צאצאי הכלאה שבוצעה ב 2012 בין הזן 'ענה' ל'גולדן דלישס' (כ 290 פרטים) ובין 'ענה' ל'גרני סמית' (כ 60 פרטים) הורכבו ב2013 על כנת M-109 וב2014 נטעו בחלקת השבחה בבית דגן. נתונים פנוטיפים של התעוררות נאספו בחורף-אביב 2015 כאשר התעוררות הוגדרה כהתעוררות פקעים וגטטיביים והתפתחות עלים. בשתי הכלאות רואים התפלגות פנוטיפית דומה שבה כמחצית מהצאצאים התעוררו בדומה ל'ענה' (66 ימים מתחילת השנה 1.1.2015) והשאר התעוררו מאוחר יותר (איור 10).



איור 10: התפלגות צאצאי הכלאות 'ענה' X 'זהוב' (ימין) ו'ענה' X 'גרני סמית' (שמאל) לפי מועד התעוררות וגטטיבית בחורף-אביב 2015.

דין וסיכום

במסגרת תוכנית המחקר נעשה ניסיון להגיע להבנה טובה יותר של הגורמים הגנטיים המבקרים את התכונות הקשורות בקביעת דרישות הקור, וקביעת עיתוי התעוררות מתרדמה בתפוח ובגפן. לצורך כך השתמשנו באוסף הגנטי של זני וקווי תפוחים בנווה יער, אוסף שמייצג שונות פנוטיפית גדולה לתכונות הנזכרות. כמו כן נעשה שימוש במערכות התמרה גנטית בתפוח ובגפן.

תפקידם של גנים המבקרים את רמת ההורמון הצמחי ABA בבקרה על תהליך ההתעוררות מתרדמה נבדקה בגפן ע"י ביטוי ביתר של גן מפתח בייצור ABA (*VvNCED1*) ומצד שני ביטוי ביתר של גן מפתח בתהליך פירוק ABA (*VvA8H-CYP707A4*), בכדי לצור צמחים בעלי רמות גבוהות ונמוכות של ABA בהתאמה. בתאים המותמרים לגן *VvNCED1* נצפתה רמה גבוהה של ABA אך הם לא הצליחו להתפתח לצמחונים, ייתכן שהרמות הגבוהות של ABA גרמו לכך. בצמחים המותמרים לגן *VvA8H-CYP707A4* נצפו רמות נמוכות של ABA ורמות גבוהות של תוצרי פירוק של ABA. פקעים של צמחים אלו התעוררו מתרדמה בקצב גבוהה מקצב ההתעוררות של צמחי הביקורת. התוצאות מחזקות ממצאים קודמים

שהצביעו על תפקידו של ABA בעיכוב תהליך ההתעוררות מתרדמה, ומצביעות על האפשרות למעורבות של גנים הקשורים בייצור ופירוק של ABA בתהליך.

לצורך חקר גורמים גנטיים המשפיעים על עיתוי ההתעוררות מתרדמה בתפוח השתמשנו באוסף הגנטי של זני וקווי תפוח בנווה יער. האוסף כולל כשמונים זנים המראים שונות גדולה בדרישות הקור שלהם ובמועד ההתעוררות שלהם מתרדמה. אחד האתגרים שעמד בפנינו הוא מציאת שיטה לאפיון פנוטיפי של תכונת דרישות הקור ותכונת מועד ההתעוררות. תצפיות מניסיונות להשתמש בענפים חתוכים שנחשפו למנות קור מבוקרות והועברו לתנאים מעודדי התעוררות לא תאמו את התצפיות במטע והיו בעיתיות בשל שונות גדולה במידת היכולת של פקעים לטראליים להתעורר, ולכן נזנחו. תצפיות על העצים המתעוררים במטע אומנם סבלו מכך שבכל שנה תנאי הסביבה של העצים משתנים, אך נראה היה ששינויים אלו משפיעים בעיקר על מועדי ההתעוררות אך לא כל כך על סדר ההתעוררות בין הפרטים השונים. תצפיות שכללו הופעת עלה ראשון והופעת פרח ראשון לא התאימו מכיוון שבזנים רבים, בחלק מהשנים, הייתה התעוררות של פקעים בודדים אך זו נעצרה והתקדמה בקצב איטי מאוד או התחדשה רק לאחר פרק זמן ארוך. גם מדדים של 10% פריחה ושיא פריחה היו בעייתיים מכיוון שאצל רוב הזנים פרחו פרחים בודדים בלבד והפריחה נמשכה תקופה ארוכה. בשנה האחרונה ביצענו תצפיות מדוקדקות שעקבו אחר התעוררות הפקעים בענפים שנבחרו רנדומלית בכל קו. תצפית כזו אפשרה לנו לעקוב אחר מועד ההתעוררות של כל פקע, אחר קצב ההתעוררות, ואחר מידת ההתעוררות והרגטטיות והרפרודוקטיבית מתוך פוטנציאל הפקעים שעל הענפים. התוצאות אומנם לא נותנות מדד מדויק לדרישות הקור של הזנים, אך הן נותנות מושג על מידת ההתאמה של הזנים לתנאי האקלים של נווה יער, קרי תנאים בהם כמות מנות הקור נמוכה יחסית, לפי מועד ההתעוררות, שיעור ההתעוררות וקצבה. על סמך תוצאות אלו יכולנו לחלק את הזנים לשתי קבוצות מאוד ברורות: זנים שהתעוררו מוקדם וההתעוררות שלהם הייתה יחסית מלאה ואחידה, וזנים שהתעוררו מאוחר והתהליך היה ארוך וחלקי, כלומר, נראה היה שדרישות הקור שלהם לא מולאו. התצפית המפורטת בוצעה במשך שנה אחת ויש צורך לחזור עליה בשנים נוספות בכדי לוודא שהפנוטיפ הנצפה יציב.

בעזרת רצף הגנום של זן התפוח 'ענה', שריצפנו בתחילת תוכנית המחקר, תוכנן סט של 30 סמנים גנטיים באזור של כארבעה מיליון בסיסים על כרומוזום 9 בתפוח, איזור שהוגדר במחקרים קודמים כבעל השפעה מכרעת בקביעת דרישות הקור ומועד ההתעוררות (van Dyk et al., 2010; Celton et al., 2011). בעזרת הסמנים הגנטיים ניתן היה להבחין בהפלוטיפ ייחודי שמופיע בכל הזנים שהוגדרו כבעלי דרישות קור נמוכות (מוקדמים) ולא מופיע באף זן שהוגדר כבעל דרישות קור בינוניות-גבוהות. הפלוטיפ זה תחום באזור של כ 500 kb וניתן להשתמש בו כסמן גנטי לצורך ברירת צאצאים הנושאים את תכונת דרישות הקור הנמוכות בשלב מוקדם במהלך תוכנית השבחה וטיפוח. האזור מכיל כ 50 גנים. ביניהם בולטים שני גנים המקודדים לפקטורי תעתוק ממשפחת ה MADS box genes. אחד מהם נחקר לאחרונה ונחשד כבעל תפקיד בקביעת עיתוי התעוררות מתרדמה (Porto et al., 2015), אך יהיה צורך במחקר נוסף בכדי להוכיח שהוא האחראי להבדלים בעיתוי ההתעוררות מתרדמה.

הגן *SOC1* נחשד כמשתתף בקביעת תכונת דרישות הקור ועיתוי ההתעוררות מתרדמה במשמש (Trainin et al., 2013), בתות (Mouhu et al., 2013) ובקיווי (Voogd et al., 2015). בתפוח נמצאו שני

אורתולוגים לגן, אחד על כרומוזום 2 ואחד על כרומוזום 7. בסמוך לשני הגנים נמצאו סמני SSR ונעשה בהם שימוש בכדי לאפפין גנטית את הפרטים באוסף הזנים בנווה יער. מהתוצאות נראה שבגן *MdSOC1* שנמצא על כרומוזום 7 אין אלל מסויים שנמצא בתאחיזה לתכונת דרישות הקור הנמוכות. לעומת זאת, בגן *MdSOC1* שנמצא על כרומוזום 2 נצפה אלל ייחודי שהופיע ב 12 מהזנים/קווים שהוגדרו כבעלי דרישות קור נמוכות. אלל זה לא הופיע באף אחד מהזנים שהוגדרו כבעלי דרישות קור בינוניות-גבוהות. בנוסף ניתן היה לראות שבקרב הזנים בעלי דרישות קור נמוכות, האלל הייחודי מופיע בזנים המקדימים ביניהם ואינו מופיע בזנים המאוחרים יותר. הממצאים מחזקים את ההשערה כי לגן *MdSOC1* יש תפקיד בבקרה על התעוררות מתרדמה ומצביע על האפשרות שניתן יהיה להשתמש באלל הייחודי שמופיע בזנים בעלי דרישות הקור הנמוכות כסמן גנטי לצורך ברירת צאצאים הנושאים את תכונת דרישות הקור הנמוכות בשלב מוקדם במהלך תוכנית השבחה וטיפוח. בניסיונות לבצע התמרה גנטית ולהשתיק את הגן *MdSOC1* בזן התפוח 'גלקסי', בעל דרישות קור נמוכות, ובזן 'ענה' התקבלו רגנרנטים, אך הם לא שרדו, למעט צמח אחד, ונראה שהמניפולציה פוגעת בפונקציות חיוניות לצמח.

הופעה של אללים ייחודיים בזנים בעלי דרישות קור נמוכות, שלא מופיעים בזנים האחרים (הן בכרומוזום 9 והן בכרומוזום 2) עשויה להעיד על כך שמקור גנטי אחד, ייחודי, תרם את תכונת דרישות הקור הנמוכות לכל אותם זנים. אין לנו מידע גנטי לגבי ההורים של 'ענה', שכן הזן 'אדום מהדסיה' שתועד על ידי אבא שטיין כהורה הנקבי (שטיין 1988) לא נגיש לנו כיום, וגילינו בשנת המחקר הראשונה, שההורה הזכרי אינו 'זהוב' כפי שחשב שטיין. עם זאת, מעניין לציין שכבר הודגם שחלק מהמטען הגנטי של 'ענה' מקורו ייחודי ושונה מזה של התפוח המערבי בעבודה שאפיינה ב'ענה' את הרכיב הגנטי שאחראי לתכונת אי-ההתאם העצמי בתפוח. אפיון גנוטיפי של גן ה-S-RNase ב'ענה' גילה אלל ייחודי השונה מאוד מכל אלל אחר שנמצא בתפוחים מערביים (Matityahu et al., 2005). השוואה של רצף החלבון למאגר הגנים מעלה שהוא דומה ביותר לרצפים של S-RNase מתפוח נוי (*Malus spectabilis*) ואגס מסוג נאשי (*Pyrus x bretschneideri*). ייתכן שבעזרת האפיון הגנוטיפי הנרחב שביצענו בעזרת שמונה סמני SSR אוניברסאליים, והשוואתו לאפיונים שנעשו בעזרת אותם סמנים לפרטים באוספים גנטיים ברחבי העולם ניתן יהיה לאתר את המקור הגנטי לזנים בעלי דרישות קור נמוכות שבאוסף הזנים בנווה יער וניתן יהיה להבין עד כמה הוא ייחודי. אם אכן המקור הוא ייחודי, ייתכן שהסמנים הגנטיים שמצאנו לתכונה הם אוניברסאליים ולא, כפי שקורה בסמנים רבים לתכונות אחרות, תלויים בהורים של אוכלוסיות השבחה.

אוכלוסיות F1 שנוצרו ע"י הכלאה של 'ענה' עם 'זהוב' ועם 'גרני סמית' כבר גדלות במטע בבית דגן, והשנה ניתן היה לבצע אפיון פנוטיפי ראשוני. אוכלוסיות אלו יוכלו לשמש לאישרור של הסמנים שנמצאו בכרומוזום 9 ובכרומוזום 2 (*MdSOC1*) כסמנים גנטיים שניתן יהיה להשתמש בהם לבירור מוקדם של פרטים בעלי דרישות קור נמוכות בתהליך השבחה וטיפוח של תפוח.

- Brooks RM, Olmo HP** (1972) Register of new fruit and nut varieties: Second edition, Ed 2nd edition. Univ of California Press, Berkeley, CA
- Celton JM, Martinez S, Jammes MJ, Bechti A, Salvi S, Legave JM, Costes E** (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
- Durel CE et al.**, (2014) Genetic diversity, structure and parentage analysis within several European apple germplasm collections assessed by microsatellite markers. In 7th International Rosaceae Genomics Conference, Seattle, Washington, USA.
- Fan S, Bielenberg DG, Zhebentyayeva TN, Reighard GL, Okie WR, Holland D, Abbott AG** (2010) Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytologist* **185**: 917-930
- Matityahu A, Stern RA, Schneider D, Goldway M** (2005) Molecular Identification of a New Apple S-RNase—S29—Cloned from 'Anna', a Low-chilling-requirement Cultivar. *HortScience* **40**: 850-851
- Miller E, Sherman W** (1980) Origin and description of 'Dorsett Golden' apple. *In* Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Vol 93, pp 108-109
- Mouhu K, Kurokura T, Koskela EA, Albert VA, Elomaa P, Hytönen T** (2013) The *Fragaria vesca* Homolog of SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 Represses Flowering and Promotes Vegetative Growth. *The Plant Cell* **25**: 3296-3310
- Olukolu BA, Trainin T, Fan S, Kole C, Bielenberg DG, Reighard GL, Abbott AG, Holland D** (2009) Genetic linkage mapping for molecular dissection of chilling requirement and budbreak in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Genome* **52**: 819-828
- Ophir R, Pang X, Halaly T, Venkateswari J, Lavee S, Galbraith D, Or E** (2009) Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Molecular Biology* **71**: 403-423
- Porto DD, Bruneau M, Perini P, Anzanello R, Renou J-P, Santos HPd, Fialho FB, Revers LF** (2015) Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for FLC-like genes. *Journal of Experimental Botany*
- Ruttink T, Arend M, Morreel K, Storme V, Rombauts S, Fromm J, Bhalerao RP, Boerjan W, Rohde A** (2007) A Molecular Timetable for Apical Bud Formation and Dormancy Induction in Poplar. *The Plant Cell* **19**: 2370-2390
- Trainin T, Bar-Ya'akov I, Holland D** (2013) ParSOC1, a MADS-box gene closely related to Arabidopsis AGL20/SOC1, is expressed in apricot leaves in a diurnal manner and is linked with chilling requirements for dormancy break. *Tree Genetics & Genomes* **9**: 753-766
- van Dyk MM, Soeker MK, Labuschagne IF, Rees DJG** (2010) Identification of a major QTL for time of initial vegetative budbreak in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Tree Genetics & Genomes* **6**: 489-502
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troglio M, Pruss D** (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus [times] domestica* Borkh.). *Nature genetics* **42**: 833-839
- Voogd C, Wang T, Varkonyi-Gasic E** (2015) Functional and expression analyses of kiwifruit SOC1-like genes suggest that they may not have a role in the transition to flowering but may affect the duration of dormancy. *Journal of Experimental Botany*
- Zheng C, Halaly T, Acheampong AK, Takebayashi Y, Jikumaru Y, Kamiya Y, Or E** (2015) Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1527-1542

