

מדינת ישראל, משרד החקלאות והכפר
מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני
המכון למטעים וצמחי נוי
המחלקה לעצי פרי
ת.ד. 6 בית דגן, 50250
טל: 03-9683828, פקס: 03-9669583
zilka@agri.gov.il

מטע נקי מוירוס – נשירים

תכנית מס': 203-0416-08

דו"ח לשנת 2008

מוגש למועצת הצמחים – ענף הפירות

שמואל זילכה, אריה רוטבם, גניה פיינגרש, דוד ישראל

Virus free orchards – Deciduous orchards

Zilkah, S., Faingersh, E., Rotbaum, A. and David, I.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים והם **לא** מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר:

תקציר

1. **אגס ספדונה** - קלון שנמצא נקי בבדיקות מהירות (dsRNA) בהגנת הצומח, נמצא נגוע בבדיקות לטווח ארוך על גבי אינדיקטורים. עבר טרמוטרפיה. 15 קלונים מתוך 36 שרדו. קלונים אלה עוברים הקשחה לצורך אבחון ע"ג אינדיקטורים.
2. **אגס קוסצטיה** - הוכנס לתרבית, עבר טרמוטרפיה ושחזור מקצות צימוח בתרבית. בודדו כ- 40 קלונים. אלה עברו תהליכי ריבוי והשרשה בתרבית. אוקלמו שתילים שנבדקו על גבי אינדיקטורים לטווח ארוך ונמצאו נגועים. החומר עובר טרמוטרפיה נוספת.
3. **כנת חשבי 1-10** - הוכנסה לתרבית. עברה מספר מחזורים של טרמוטרפיה. צמחים המאוקלמים נמצאו נגועים באבחון ע"ג אינדיקטורים צמחיים. עברו ריבוי נוסף והוכנסו לטרמוטרפיה נוספת (40/28 מ"צ).
4. **כנת חשבי 4-13** - נמצאה נקייה בבדיקה ב-PCR. נמצאת בשלב של שחזור לצמח שלם לצורך בדיקה על גבי אינדיקטורים צמחיים.
5. **אפרסק 'סמר סנו'** - הוכנס לתרבית. עבר מספר מחזורים של טרמוטרפיה. 2 קלונים נמצאו נקיים באבחון ב-PCR. נמצא בתהליכים של ריבוי, השרשה והקשחה לצורך בדיקה על אינדיקטורים צמחיים.
6. **נקטרינה קווי ג'וינט** - הוכנס לתרבית. מקדם הריבוי היה איטי. עבר טרמוטרפיה. ההישרדות לאחר הטרמוטרפיה הייתה נמוכה. הזן נמצא במצב של ריבוי לקראת אבחון ב-PCR.
7. **כנת Citation שקד-אפרסק** - הוכנס לתרבית כמו סמר סנו. בוצעה בו טרמוטרפיה, ריבוי (פקטור ריבוי 2.5), השרשה והקשחה. נמצא נקי מוירוס ב-PCR ובבדיקה לטווח קצר על גבי צמחי בוחן בהגנת הצומח.
8. **שזיף מטלי** - הוכנס לתרבית. בבדיקת PCR החומר נמצא נקי ל-PDV ונגוע לוירוס PNRSV. החומר הוכנס לטיפול חום נוסף. בבדיקה חוזרת ב-PCR נמצא בשלב זה נקי.
9. **כנת גודגדן SL-64** - הוכנס לתרבית. החומר עבר מספר מחזורים של טרמוטרפיה. שני קלונים נמצאו נקיים ב-PCR. החומר נמצא בשלב של פיתוח שיטה להשרשה והקשחה.

1. מבוא

שיטת ניקוי עצי פרי בתרבית רקמה פותחה בשיתוף עם דר' שרה שפיגל וצוותה מהמחלקה לוירולוגיה. השיטה מתבססת על הכנסה לתרבית רקמה של החומר המעוצה, ריבוי התרבית, הכנת תרבית רקמה הכוללת נצרון בודד וחזק וטיפול בחום (טרמותרפיה) בנצרונים. החום אמור לפגוע בתאים הנגועים בוורוס, בעוד שהתאים האמיריים אמורים להיות חופשיים מוורוס. השלב הבא הוא לשחזר (רגנרציה) צמחון בתרבית מהתאים האמיריים ולרבות אותו כתרבית. התרבי עוברת אבחון לא ספציפי לגבי נקיותה מוורוס בשיטת dsRNA ואבחון לנגיעות בוורוס ספציפי בשיטת PCR-RT אצל פרופ. מוחמד זיידן משירותים לבקרה והגנת הצומח, בית דגן. אותן שנמצאו נקיות עוברות השרשה, אקלום והקשחה לצמח מעוצה. השתיל המוקשח עובר בדיקת נגיעות נוספת באמצעות PCR ו/או אינדיקטורים צמחיים ע"י ניסים מלכה ומשה וייס מהשירותים לבקרה והגנת הצומח, בית דגן. אלה שנמצאו נקיים עוברים לריבוי במשתלה מסחרית ועוברים לבית גרעין לבדיקת נאמנות למקור הזן והפצה לשתלנים מורשים. במערך המתואר ניקינו למשל את זן האפרסק הרמוזה שנמצא נגוע ב-PNRSV, ונוקה במעבדתנו. השתילים נבחנו בתנאי מטע מסחרי מול הביקורות המתאימות. העצים הנקיים הראו יתרון ביבול ובאיכות הפרי בהשוואה לעצים הנגועים בוורוס. ממצאים אלה אשרו ממצאים דומים בעולם המצביעים על יתרונו הכלכלי של עץ נקי ממחלה וירלית בהשוואה לעצים הנגועים.

במסגרת מערך תרביות הרקמה ניהלנו בנק גנטי של כל הזנים מהמינים השונים שעברו ריבוי וניקוי מוורוס במעבדתנו. בנק זה שימש לא פעם לשחזור של חומר צמחי שנדרש למטרות מסחריות או מחקריות. עיקר הבנק הכיל בעיקר חומר צמחי מעצי פרי נשירים. הצמחים בבנק הגנטי הועברו בהפרשי זמן גדולים בהרכבים מיוחדים של מצעי גדילה וטמפרטורות נמוכות הגורמים לצמיחה איטית ביותר של התרביות. לצערנו בגלל תקלה טכנית חמורה הבנק ניזוק קשה, ואנו משתדלים לשחזר ולשקם מה שאפשר.

תוצאות

ניקוי מוירוס של זני אגס וכנות תפוח

זני האגס הנפוצים בארץ ספדונה וקוסטציה וכנות התפוח חשבי 1-10 וחשבי 13-4 הועברו אלינו באביב 03. כנות החשבי ידועות כקשות ריבוי בתרביות רקמה, ואכן היו קשיים בהכנסת כנות החשבי לתרבית.

ספדונה: יש לנו קו שנמצא נקי בבדיקות מהירות (dsRNA) בהגנת הצומח. בבדיקות לטווח ארוך על גבי אינדיקטורים נמצא נגוע. עבר טרמוטרפיה 36/28 מ"צ ועלינו בהדרגה ל- 40/30 מ"צ למשך 11 שבועות. 15 קלונים מתוך 36 שרדו. קלונים אלה עוברים הקשחה לצורך אבחון ע"ג אינדיקטורים.

קוסצטיה: הוכנס לתרבית, עבר טרמוטרפיה ושחזור מקצות צימוח בתרבית. בודדו כ- 40 קלונים. אלה עברו תהליכי ריבוי והשרשה בתרבית. אוקלמו שתילים שנבדקו על גבי אינדיקטורים לטווח ארוך ונמצאו נגועים. החומר עובר טרמוטרפיה נוספת.

חשבי 1-10. הוכנסה לתרבית. עברה מספר מחזורים של טרמוטרפיה (42 מ"צ ל- 16 ש' אור, 28 מ"צ ל- 8 ש' חושך). צמחים המאוקלמים נמצאו נגועים באבחון ע"ג אינדיקטורים צמחיים.

עברו ריבוי נוסף והוכנסו לטיפול טרמוטרפיה נוספת (40/28 מ"צ).

חשבי 4-13: נמצאה נקייה בבדיקה ב-PCR (ד"ר זיידן בהגנת הצומח). נמצא בשלב של שחזור לצמח שלם לצורך בדיקה על גבי אינדיקטורים צמחיים.

ניקוי מוירוס של זנים וכנות אפרסק - נקטרינה

לפי דרישת הענף עסקנו בניקוי מוירוס של זן האפרסק סמר סנו, נקטרינה קוויג'וינט, כנת סיטשין (מכלוא שקד X אפרסק) מקור זן האפרסק סמר סנו, נקטרינה 'קוויג'וינט' וכנת סיטשין הוא משתלת זוהר חנני, בית לחם הגלילית. השתילים היו בשלב תרדמה בתוך שקיות ניילון שחורות בנפח של 2 ל'. השתילים הגיעו למעבדתנו ב- 26.11.06. ב- 29.11.06 הם הוכנסו ל- 5 מ"צ למשך 6 שבועות. ב- 14.1.07 השתילים הוצאו לאינקובטור (25 מ"צ, 70% לחות, פוטופריודה 16/8, עוצמת אור 6000-7000 לוקס).

'סמר סנו'.

חיטוי: ב- 25.2.07, גוזרים את הטרפים של העלים ומשאירים על הגבעול את הפטוטרות בלבד. מחלקים את הגבעול למקטעים של פרקים. מקטעים אלה מוכנסים לתוך יריעות בד גזה (6 שכבות) ונסגרים כשקיות. כל שקית מוכנסת לכוס כימית ונשטפת במשך 3 שעות במי-ברז זורמים. טבילה באתנול 70% ל- 2-3 שניות, מעבירים לתמיסת- 0.3% NaOCl עם המשטח Tween 20 0.5% למשך 20 דקות תוך ערבוב באמצעות מגנט מסתובב, שטיפות במים סטריליים (5X) עד העלמות ריח הכלור. מוציאים את מקטעים ומחדשים את החתכים של הפטוטרות וקצות הגבעול.

מעבירים למבחנות (2.5X10 מ"מ), שמכילות 10 מ"ל מצע התחלתי (מצע 1) AP (Almehdi and Parfit, 1986 עם IBA 0.01 mg/l + BA 0.2mg/l) המוקשח ב- 3.5 g/l בקטו אגר+ 1 g/l פיטגיל או ג'ל רייט. הנעיצה במצע נעשית באופן שהפקע התחתון יהיה טבול כולו במצע והשני מעל פני המצע. הפריצות האקסיאליות מחיק העלים מועברות, כל אחד בנפרד למצע ריבוי (מצע 2) שמבוסס על מצע 1 בהרכב הורמונים שונה (IBA 0.01 mg/l + BA 1.0 mg/l). פקטור הריבוי 2.8. ב- 29.7.07 הוכנסו לטיפול טירמוטרפי. ריפוי בחום בוצע על תרביות לא מושרשות ששהו במצע גדילה התחלתי הנ"ל במשטר טמפרטורה של 36 מ"צ למשך 16 שעות אור ו- 28 מ"צ למשך 8 שעות חושך, למשך 6 שבועות. בתרביות ששרדו את הטיפול בחום (16%, 6 קלונים), הועברו הקודקודים (10-5 מ"מ) למצע התחלתי ואחר כך למצע ריבוי. 5 קלונים נבדקו ב- RT-PCR ע"י פרופ. מוחמד זיידן, השירותים לבקרה והגנת הצומח, ונמצאו כנקיים ל- PDV וחשודים כנגועים ב- PNRSV. הזן הוכנס למחזור טרמוטרפיה נוסף באותם תנאים למשך 7 שבועות. התרביות ששרדו (5%, 2 קלונים) ועברו ריבוי. 2 קלונים נמצאו נקיים ואחד נמצא נגוע ב- PNRSV. הקלונים הנקיים יעברו תהליכי ריבוי, השרשה והקשחה לצורך בדיקה על אינדיקטורים צמחיים.

נקטרינה קווין ג'וינט

הכנסה לתרבית כמו השיטות שתוארו לסמר סנו. מקדם הריבוי היה איטי (1.3) עד שצברנו מאסה של תרביות שהספיקו לביצוע ריפוי בחום. הטרמוטרפיה בוצעה במחזוריות של 36/18 מ"צ. ההישרדות היתה נמוכה (2.7%, קלון 1 מ-36). הזן נמצא במצב של ריבוי לקראת בדיקת PCR.

כנת Citation שקד-אפרסק

הוכנס לתרבית כמו סמר סנו. בוצעה בו טרמוטרפיה, ריבוי (פקטור ריבוי 2.5),
השרשה והקשחה. נמצא נקי מוירוס ב- PCR ובבדיקה לטווח קצר על גבי צמחי
בוּחן בהגנת הצומח.

שזיף מטלי

הוכנס לתרבית כמו סמר סנו. ההבדל הוא במצע ריבוי (מצע 3) : מצע בסיס
מורכב מ- AP ו- 0.25 מצע MS. ההורמונים : IBA 0.01 mg/l + BA 0.5 mg/l.
בתנאים אלה פקטור ריבוי היה גבוה (4.5). טרמוטרפיה בתנאי טמפרטורה כמו
בעבר (38/28) אלה שהצמחונים היו עמידים מאד והיה ניתן למשוך את הטיפול
למשך 11 שבועות. ההישרדות הייתה 28% (10 מתוך 36 קלונים). לאחר טרמוטרפיה
חולץ הקדקוד בגודל 1-3 וממנו הצמח שוחזר ע"ג מצע 3. בבדיקת PCR החומר
נמצא בקי ל- PDV ונגועים לוירוס PNRSV. החומר הוכנס לטיפול חום נוסף
בתנאים של 38 מ"צ באור ו- 28 מ"צ לילה, למשך 6 שבועות. ההישרדות 39% (14
קלונים מתוך 36). עברו ריבוי, בדיקה חוזרת ב- PCR ונמצא בשלב זה נקי.

כנת גודגדן SL-64 (מהלב מובחר).

זאת כנת יבוא שהגיעה מ- CTIFL צרפת, שנמצאה נגועה בשירותי הגנת הצומח.
חלקי הצמח הופרדו כמו סמר סנו. החיטוי בוצע בשיטה שתוארה. נוסו הרכבים
שונים של מצעים ביסוס ראשוני של התרבית וריבוי והתוצאות לא היו משביעות
רצון. פקטור הריבוי היה סביר (2) אבל איכות התרבית הייתה ירודה. הגבעול דק,
עלים קטנים, נוף מוגבל. בתנאים אלה ביצענו טרמוטרפיה (36/28 מ"צ, 6 שבועות).
שרידות 16% (6 קלונים מתוך 36 מבחנות). החומר עבר טרמוטרפיה שניה ושלישית.
שני קלונים נמצאו נקיים ב-PCR. החומר נמצא בשלב של פיתוח שיטה להשרשה
והקשחה.