

**דו"ח לתכנית מחקר מספר 203-1108-15**

שנת המחקר: 2015

Virus free deciduous orchards

**ניקוי עצי פרי נשירים מווירוס****מוגש למועצת הצמחים****ע"י**

בנימין אבידן	עצי פרי, מינהל המחקר החקלאי, וולקני
שמואל זילכה	עצי פרי, מינהל המחקר החקלאי, וולקני
אריה רוטבם	אחסון, מינהל המחקר החקלאי
עדי אורן	עצי פרי, מינהל המחקר החקלאי, וולקני
אליקים סלומון	השירותים לבקרה והגנת הצומח

Benjamin Avidan, Fruit Trees, ARO, vhavidan@volcani.agri.gov.il

Shmuel Zilkah, Fruit Trees, ARO

E-mail: [zilka@volcani.agri.gov.il](mailto:zilka@volcani.agri.gov.il);

Arie Rotbaum, Fruit Trees, ARO

Adi Oren, Fruit Trees, ARO

Eliakim Solomon

**תקציר**

זנים מצטיינים של עצי פרי גרעיניים וגלעיניים נמצאו נגועים בווירוס, חלקם במטעי הארץ וחלקם בתהליך של ייבוא ואינטרדוקציה. הגורמים האחראיים בשולחנות המגדלים החליטו על אותם זנים שהענפים היו מעוניינים בנקיונם. התכנית תוקצבה על ידי שולחנות מגדלים מענף הנשירים. הזנים עברו תהליך של הכנסה לתרבית ושל ניקוי בתרבית רקמה. הם עברו אבחון חוזר בשירותים להגנת הצומח. כל זני הגרעיניים, מלבד תפוח טופרד, נמצאו נקיים. זני הגלעיניים נבדקו על אינדיקטורים לטווח קצר ולטווח ארוך ונמצאו נקיים. זני הגלעיניים עברו בדיקה מהירה של PCR כנגד וירוס השרקה ונמצאו נקיים. הזנים הנקיים קיבלו אישור לשחרור והפצה. בפברואר 2016 הם הועברו לענף הנשירים, לצורך ריבוי, שימור בבית גרעין והפצה למשתלות.

**הצהרת החוקר הראשי:**

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים.

**חתימת חוקר:**

פרסומים והרצאות- פורסם מאמר בעלון הנוטע (2013), ראה רשימת ספרות.

## ב. גוף דו"ח המחקר

### מבוא

המטרה של מיזם רב שנתי זה הוא לנקות מווירוס חומר צמחי נגוע שנמצא במיני עצי פרי נשירים שמקורו בארץ (3,5,8), או שהגיע בתהליך היבוא והאקלום מחו"ל (4, 7). חומר הנגוע בווירוסים שנמצא בארץ עלול לתפקד במטעים באופן שאיננו ממצא את מלוא תכונות הזן שבו, כגון רגישות לתנאי אקלים וסביבה, שינוי בצורה ובצבע המקורי של הפרי (8). במקרה זה הניקוי מווירוס אמור לשפר את ביטוי הזן במטע (8). חומר צמחי שהגיע בתהליך האינטרודוקציה מחו"ל ונמצא נגוע בווירוסים בתהליך הבקרה וההסגר יכול להיות מושמד. מאידך, לעיתים, בגלל חשיבותו לענף הוא עובר תהליך של ניקוי מווירוסים. בתהליך הניקוי בתרבות רקמה החומר הצמחי עלול לעבור שינויים גנטיים, לכן הוא אמור לעבור בדיקת נאמנות למקור בבית גרעין ומשם להפצה למשתלות להכנת שתילים נקיים מווירוס עם אישור.

שיטת הניקוי כוללת מספר שלבים, כאשר כל שלב מצריך התאמה מיוחדת למין ולזן (1, 2, 4, 6): הכנסה של החומר המעוצה לתרבות רקמה, ריבוי צמחונים בתרבות, חיזוק וגדילה של נצרון בודד וריפוי בחום (טרמותרפיה). תהליך הריפוי בחום אמור לפגוע בהתרבות הווירוסים ולהשאיר את התאים האמיריים חופשיים מווירוס. התהליך כולל חשיפה של תרביות הרקמה לטמפרטורת בגובה ובפרקי זמן שונים, בהתאם לזן המטופל. השלב הבא הוא שחזור צמחון מלא על כל רקמותיו (רגנרציה), מתוך קדקודי הצמיחה של תרביות הרקמה שאמורים להיות חופשיים מווירוס לאחר שעברו את הטיפול בחום. הצמחון עובר אקלום והקשחה ליצירת צמח מעוצה, הגדל בכלי בתנאים בבית רשת. חומר מצמחים אלה נשלח לשירותים לבקרה והגנת הצומח בית דגן, לאבחון בשלב הראשון בשיטת PCR שאמורה לגלות ולזהות ווירוסים ידועים מראש. הצמחים שנמצאו נגועים – מושמדים או עוברים לניקוי חוזר. הצמחים שנמצאו חופשיים מווירוס עוברים לאבחון לטווח קצר או ארוך על אינדיקטורים צמחיים, אינדיקטורים בתרבות רקמה (6, 9). במערך המתואר ניקינו למשל את זן האפרסק הרמוזה שנמצא בארץ נגוע ב-PNRSV, ונוקה במעבדתנו. העצים הנקיים הראו יתרון ביבול ובאיכות הפרי בהשוואה לעצים הנגועים בווירוס (8), בדומה לממצאים שפורסמו בחו"ל לגבי היתרונות של הזנים החופשיים מווירוס בהשוואה לאלה הנגועים. באופן דומה זני גודגדן שנמצאו נגועים בתהליך האינטרודוקציה נוקו ונבדקו לגבי אקלומם בתנאי הארץ. ממצאים אלה אשרו ממצאים דומים בעולם המצביעים על יתרונו הכלכלי של עץ נקי ממחלה וירלית בהשוואה לעצים הנגועים.

### תוצאות המחקר

חלק בלתי נפרד מתוצאות המחקר הוא פיתוח השיטה. כיון שהמינים והזנים היו שונים זה מזה היה צורך להתאים את השיטה היעילה ביותר לכל אחד מהשלבים בתהליך פיתוח תרבות הרקמה לכל אחד מהזנים. שלבים אלה כללו את בחירת הרקמה להכנסה ראשונית לתרבות (אקספלטנט), התאמה של מצע בסיסי ושל ההרכב ההורמונלי לריבוי, להתארכות, להשרשה והתנאים להקשחה של הצמחון בתרבות. כמו-כן היה צורך בהתאמה של

השיטה היעילה לריפוי בחום, לחילוץ קדקוד הצמיחה מאותם צמחונים ששרדו את הטיפול ולשחזור צמח שלם. תוצאות אלה, שהם כאמור, מרכיבי השיטה לניקוי, לא מדווחות בדו"ח זה.

העבודה ב-2015/16 מהווה המשך רצף העבודה בנושא בשנים האחרונות ואשר סוכמו בדוח 2014. הננו מציינים את המשך ההתפתחות בשנת המחקר.

סיכום סקירה לפי זנים:

### גרעיניים

**ספדונה-** ספדונה קלון שנמצא נקי בבדיקות מהירות (dsRNA), נמצא נגוע בבדיקות לטווח ארוך על גבי אינדיקטורים בשירותים להגנת הצומח. עבר טרמוטרפיה. 15 קלונים מתוך 36 שרדו. ארבעה קלונים אוקלמו לצמחים בוגרים והועברו לבדיקה נוספת (2.3.2010). ב-18.11.2013 התקבלה תשובה לפיה קלון 3 נבדק על אינדיקטורים לטווח ארוך (Lord lambourne, Golden delicious , Verginia crab) ונמצא נקי. ב-28.11.2013 נלקח רכב לבדיקה על אינדיקטורים לטווח קצר להשלמת כלל הבדיקות. נמצא נקי (טבלה 1).

**אגס קוסצטיה-** הוכנס לתרבות, עבר טרמוטרפיה ושחזור מקצות צימוח בתרבות. העבודה בזן זה הופסקה מאחר שנמצא עץ חופשי מוירוס. עץ זה אמור להיות מקור לריבוי חומר נקי.

**תפוח טופרד –** ב-3.3.2010 התקבל כשתיל מורכב על חשבי 13/4. הובא לארץ כנקי. יש סימנים בעצים שאמורים להעיד על מחלה וירלית, כמו עיוותים בענפים ובפרי, ודהייה של צבע הפרי. הוכנס לתרבות, עבר ריבוי, והתארכות נצרים בודדים. אלה עברו ריפוי בחום. שרדו 3 קלונים. זן זה נמצא כקשה השרשה באופן קיצוני. למרות זאת, הצלחנו להשריש אותו ולמסור אותו לבדיקה (3.7.2012). הרכב מקלון 1 הורכב על כנה אצל השירותים להגנה"צ ונקלט. ב-28.11.2013 חומר מזן זה נלקח לבדיקה נוספת ונמצא נגוע בוירוס.

**כנת חשבי 10-1 -** הוכנסה לתרבות. 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 לטרמוטרפיה חוזרת (40/28 מ"צ). שני קלונים אוקלמו ונשלחו לאבחון חוזר על גבי אינדיקטורים בשירותים להגנת הצומח (1.3.11). ב-18.11.2013 התקבלה תשובה לפיה קלונים H-2, H-7 נבדקו על אינדיקטורים לטווח ארוך (Lord lambourne, Golden delicious , Verginia crab) ונמצאו נקיים. ב-28.11.2013 נלקח רכב לבדיקה על אינדיקטורים לטווח קצר ונמצא נקי.

**כנת חשבי 13-4 -** נמצאה נקייה בבדיקה ב-PCR. שני קלונים עברו שחזור לצמח השלם ונשלחו לבדיקה על גבי אינדיקטורים בשירותים להגנת הצומח (1.3.11). ב-18.11.2013 התקבלה תשובה לפיה קלון 3 נבדק על אינדיקטורים לטווח ארוך (Lord lambourne, Golden delicious , Verginia crab) ונמצא נקי. ב-28.11.2013 נלקח רכב לבדיקה על אינדיקטורים לטווח קצר ונמצא נקי.

**תפוח אווה.** נמצא באינטרודוקציה כנגוע. עבר ריבוי וניקוי. שוחרר כנקי.

### גלעיניים

**אפרסק 'סמר סנו'** - נמצא נגוע באינטרודוקציה. הוכנס לתרבית. עבר מספר מחזורים של טרמוטרפיה. 2 קלונים נמצאו נקיים באבחון ב-PCR. קלון אחד אוקלם, נבדק על צמח הבוחן שירופיג'ן ונמצא נקי (תשובה בכתב, 18.11.2013). קלון זה ניבדק על אינדיקטורים לטווח ארוך ונמצא נקי. נבדק לאבחון המחלה הויראלית-שרקה ונמצא נקי.

**נקטרינה קווין ג'וינט** - נמצא נגוע באינטרודוקציה. הוכנס לתרבית. מקדם הריבוי היה איטי (1.3) ולקח זמן רב עד לצבירת מאסה של תרביות שהספיקה לביצוע תהליך הריפוי בחום (מחזוריות של 36/18 מ"צ). ההישרדות היתה נמוכה (2.7%, קלון 1 מ-36). קלון אחד אוקלם, גודל בהצלחה, נשלח לבדיקה (11.8.2010), נבדק על צמח בוחן לטווח קצר (שירופיג'ן) ונמצא נקי (ההודעה נמסרה בע"פ ב- 11.1.2011). ב- 6.6.2012 נשלח שוב לבדיקה על אינדיקטורים ונמצא נקי. נבדק לאבחון המחלה הויראלית- שרקה ונמצא נקי.

**Citation שקד-אפרסק** - נמצאה נגועה באינטרודוקציה. הוכנסה לתרבית, עברה תהליך ניקוי, השרשה והקשחה. נמצאה נקיה מוירוס ב-PCR ובבדיקה לטווח קצר (שירופיג'ן, ההודעה נמסרה בע"פ). ב- 6.6.2012 נשלחה שוב לבדיקה ונמצאה נקיה. נבדקה לאבחון המחלה הויראלית- שרקה ונמצאה נקיה.

**שזיף מטלי** - נמצא נגוע במטעים בארץ. הוכנס לתרבית, 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 מ"מ וממנו שוחזר הצמח ע"ג מצע 3. בבדיקת PCR החומר נמצא נקי ל- PDV ונגוע ל- 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 נקי. אוקלמו 2 קלונים, נשלחו (11.8.2010), נבדקו על אינדיקטורים לטווח קצר ונמצאו נקיים. ההודעה נמסרה בע"פ (11.1.2011). ב- 6.6.2012 נשלח שוב לבדיקה ונמצא נקי. נבדק לאבחון המחלה הויראלית- שרקה ונמצא נקי.

**כנת גודגדן SL-64 (מהלב מובחר)** - זאת כנת אינטרודוקציה שהגיעה מ- CTIFL צרפת, ונמצאה 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 (2.0) 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 שנייה ושלישית. שני

קלונים נמצאו נקיים ב-PCR. אחד מהקלונים נשלח (11.8.2011) ונבדק על אינדיקטורים לטווח קצר (שירופיג'ן) ונמצא נקי. ההודעה נמסרה בע"פ (11.1.2011). תשובה בכתב התקבלה ב- 18.11.2013. קלון זה נבדק על אינדיקטורים לטווח ארוך ונמצא נקי. ברשותנו נשאר שתיל אחד בלבד אשר נמסר לענף הנשירים (מרים זילברשטיין). ב-2016 נמסר לנו כי השתיל הבודד מת. הוא הורכב בהגנת הצומח על גבי כנות נקיות. לאחרונה נבדק לאבחון המחלה הויראלית- שרקה ונמצא נקי. עותק נקי של כנה זאת המורכבת על כנת גודגדן נמצא בהגנת הצומח. רכב של 64/SL יילקח מצמח האם בפברואר 2017 ויורכב על כנת מהלב נקיה.

**טבלה 1: עצי פרי שעברו ניקוי מווירוס. 21/6/15**

גרעיניים			
מספר שתילים	קלון	זן	מין
8	10/1	חשבי	תפוח
6	13/4	חשבי	תפוח
1	3	טופרד	תפוח
1	2	טופרד	תפוח
1	1	טופרד	תפוח
1	8	ספדונה	אגס
1	14	ספדונה	אגס
גלעיניים			
1	SL 64		דובדבן
2	10	מטלי	שזיף
2	1	קוין גוינט	נקטרינה
5	10	סיטישיין	שקד אפרסק
2	10	סמר סנו	אפרסק

**טבלה 2: סיכום תוצאות אבחון- 10/2015**

בהסגר מתאריך	תוצאה סופית	צמחי בוחן					גרעיניים		
		APH-6	APH-2	APH-19	APH-7	APH-1	מספר שתילים	זן	מין
1.3.11	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	12	חשבי 10/1	תפוח
1.3.11	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	7	חשבי 13/4	תפוח
3.7.12	כל הקלונים נגועים	נבדק	נגוע	לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	3	טופרד אינטרודוקציה	תפוח
25.3.14	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	1	אווה <sup>1</sup> אינטרודוקציה	תפוח
2.10.10	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	נקי	2	ספדונה	אגס
בהסגר מתאריך	תוצאה סופית	צמחי בוחן					גלעיניים		
	שרקה-RT-PCR	CH1	PRH17	PH1	טומנטוזה	שירופיין גן	מספר שתילים	זן	מין
11.8.10	נקי 2016	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	1	SL-64 אינטרודוקציה	דובדבן
11.8.10	נקי 2016	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	3	מטלי	שזיף

11.8.10	נקי 2016	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	2	קוין גוינט אינטרודוקציה	נקטרינה
6.6.12	נקי 2016	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	6	סיטישן אינטרודוקציה	כנה שזיף- אפרסק
11.8.10	נקי 2016	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	נקי 2015	2	סמר סנו אינטרודוקציה	אפרסק

טבלה 3: שתילי נשירים (גרעיניים/גלעיניים) ניקיים מוירוס שעברו מוולקני- שמואל זילכה, לידי מרים זילברשטיין- ענף הנשירים 15.2.2016

מספר שתילים	מין/זן
-------------	--------

#### גרעיניים

2	אגס ספדונה
8	תפוח חשבי כנה 10/1
6	תפוח חשבי כנה 13/4

#### גלעיניים

1	דובדבן כנה SL 64
1	אפרסק Summer snow
3	שזיף מטלי
1	נקטרינה Queen joint
4	כנה סיטישן

**פרסום:** זילכה, ש., רוטבם, א., דוד, י., פיינגרש, י. שפיגל, ש. 2013. מטע חופשי מוירוס: ניקוי עצי נשירים בתרבות רקמה. עלון הנוטע, שנה סז', דצמבר 2013, 30-33.

**תודה:** נתונה למועצת הצמחים, אגף עצי פרי, שלחנות ענפי הנשירים, על תמיכתם במחקר.

#### ספרות

1. זילכה, ש., רוטבם, א., דוד, י., פיינגרש, י., שפיגל, ש. (2013). מטע חופשי מוירוס: ניקוי עצי נשירים בתרבות רקמה. עלון הנוטע, שנה סז', דצמבר 2013, 30-33.

2. Epstein, E., Zilkah, S., Faingersh, E. and Rotbaum, A. (1993). Transport and metabolism of indole-3-butyric acid in sterile easy- and difficult-to root cuttings of sweet cherry (*Prunus avium* L.). Acta Hort., 329: 292-295.

3. Spiegel, S., Rosner, A., Tam, Y., Zilkah, S., Faingersh, E., Rotbaum, R. and Krizbai, L. (1998).  
Detection of prune dwarf virus in sweet cherry in Israel. *Acta Hort.*, 472: 249-255
4. Zilkah, S., Faingersh E. and Rotbaum, A. (1992). In vitro, propagation of three MxM cherry rootstocks. *Acta Hort.*, 314: 93-97.
5. Zilkah, S., Faingersh, G., Rotbaum, A., Malca, N., Tam, Y. and Spiegel, S., (2002). In vitro production of virus-free pear plants. *Acta Hort.*, 596: 477-479
6. Zilkah, S., Faingersh, E., Rotbaum, A. and Stein, A. (1993). In vitro micropropagation of indicator plants for indexing *Prunus* necrotic ring spot virus. *Acta Hort.*, 336: 121-125.
7. Zilkah S., Faingersh E., Rotbaum A., Stein A. (1994): Rapid introduction of early season sweet cherry through in vitro micropropagation and virus elimination. In: *Progress in Temperate Fruit Breeding* (H. Schmidt and M. Kellerhals, Eds.): 385-389. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherland.
8. Zilkah, S., Spiegel, S., Faingersh, G., Rotbaum, A., David, I., Tam, Y. and Rieger-Stein, A. (2001).  
Field performance of in vitro propagated virus – free ‘Hermosa’ peach. *Acta Hort.*, 560: 551-554.
9. Zilkah, S., Spiegel, S., Stein, A., Faingersh, E. and Rotbaum, A. (1995). Symptoms of *Prunus* necrotic ring spot virus on micro-grafted *Prunus serrulata* cv. Shirofugen shoot cultures. *Acta Hort.*, 386: 183-186.
10. Zilkah, S., Zamiri, N. and Ziv, A. (2006). Putrescine and hydrogen peroxide improve the rooting of GF-677 rootstock in cuttings and tissue culture shoots. *Acta Hort.*, 713:331-334.

## סיכום עם שאלות מנחות 2015

### מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה

לנקות עצים נשירים מנגיעות ויראלית ולייצר צמחי אם חופשיים ממחלות וירוס.

### עיקר הפעילות והניסויים בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

הכנסה לתרבית, ריבוי, טרמוטרפיה, שחזור תרביות מקדקודי צמיחה של הנצרונים ששרדו את טיפולי הריפוי בחום, אקלום וקשחה של הצמחים, הכנה ושליחה של מדגמים מהחומר הצמחי לאבחון נגיעות ב RT-PCR, אינדיקטורים לטווח קצר, אינדיקטורים לטווח ארוך בשירותים להגנת הצומח. טיפול בשתילים הנקיים ומסירתם לענף הנשירים.

### התוצאות שהושגו, המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו

כל זני הגרעיניים, מלבד תפוח טופרד, נמצאו נקיים. זני הגלעיניים נבדקו על אינדיקטורים לטווח קצר ולטווח ארוך ונמצאו נקיים. השנה זני הגלעיניים עברו בדיקה מהירה של PCR כנגד וירוס השרקה ונמצאו נקיים. בפברואר 2006 נמסרו הזנים הנקיים להמשך ריבוי והפצה בענף הנשירים.

### האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח

נמצאים בקשר עם אנשי המערכת האחראים להכנסת השתילים לבתי גרעין והפצה לשתלנים. פורסם מאמר בעלון הנוטע.