דו״ח מסכם לתכנית מחקר:

בחינת טיפולים הורמונליים בשלבים שונים של התפתחות פקע הפריחה, לעיכוב נשירת הפקעים בזן שינשו ולעידוד נשירה בזן יוהו.

שנת המחקר: 2016

מוגש למועצת הצמחים, ענף הפירות, שולחן האפרסמון

צוות המחקר:

ענת יצחקי (חוקרת ראשית), ישראל דוד, פליקס שייע /המכון למדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

מבוא ומטרות המחקר

הזנים טריומף ושינשו מאופיינים בנשירה גבוהה של פקעי פריחה אשר גורמת לפחיתה ביבול. טיפולים בחומרי צמיחה לעיכוב הנשירה נבחנו בעבר בזנים שונים של אפרסמון וקיים שפע של דיווחים בסיפרות על הורמונים שונים העשויים לתרום לצימצום הנשירה, אולם עדין לא ברור מהו הטיפול המיטבי. מטרת תוכנית מחקר זאת היתה לבחון טיפולים בחומרי צמיחה שונים לעיכוב נשירת פקעי פריחה וחנטים בזנים טריומף, שינשו ויוהו כתלות בשלב ההתפתחותי של הפקעים. הטיפולים נבחרו על סמך עבודות שנעשו בארץ ובעולם וכן על סמך תוצאות ראשוניות מניסויים שנעשו בחלקת הנסיונות בבית דגן. כל הטיפולים אשר נבדקו במחקר זה ניתנו בארבעה שלבים שונים של התפתחות הפרח: פקע סגור, בלון, פרח פתוח וחנט צעיר. בנוסף נבחנה גם תגובת הזן יוהו, זן אשר מאופיין בנשירה נמוכה, לצימצום הנשירה בעקבות הטיפולים השונים וכן לעידוד הנשירה בעיקבות טיפולי אתילן. המטרה המקורית של העבודה עם זן זה היתה לכייל מערכת in vitro, באמצעותה נוכל ללמוד ולאפיין את תהליך ניתוק ונשירת הפקעים. במקביל ערכנו אנליזות היסטולוגיות לאפיון רקמת הניתוק – הרקמה בה מתרחשים תהליכי הניתוק והנשירה, ונערכו ניסויים פרלמינרים לקביעת רמות הורמונים אנדוגניות באזור זה, במהלך התפתחות הפקע.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

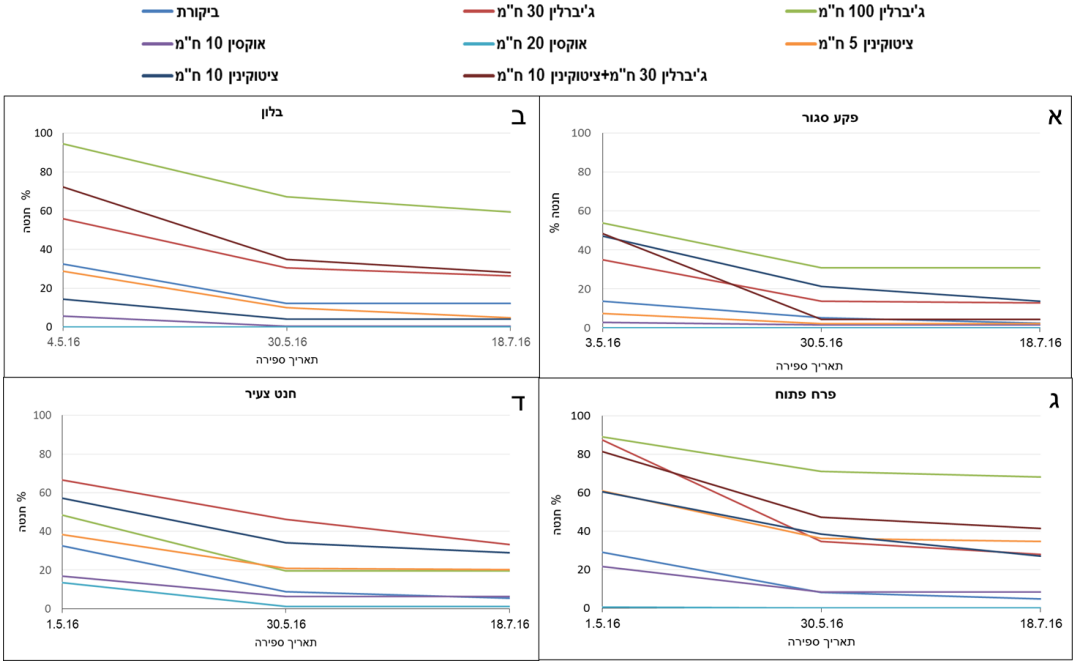
<u>1. עיכוב נשירה בזנים טריומף, שינשו ויוהו באמצעות טיפולים בחומרי צמיחה בשלבים שונים של התפתחות הפקע</u>

על מנת לבחון את השפעת חומרי צמיחה שונים על צימצום נשירת פרחים רוססו ענפים בודדים עבור כל אחד מהזנים, טריומף, שינשו ויוהו, בוצעו הטיפולים המפורטים להלן, בכל אחד מארבעת שלבי התפתחות הפקע: פקע סגור, בלון, פרח פתוח וחנט צעיר. כל טיפול (8 טיפולים) בוצע על ענף בודד בעץ, עבור כל אחד משלבי ההתפתחות (4 שלבים), בחמש חזרות (5 עצים מכל זן). סה״כ 40 ענפים לעץ.

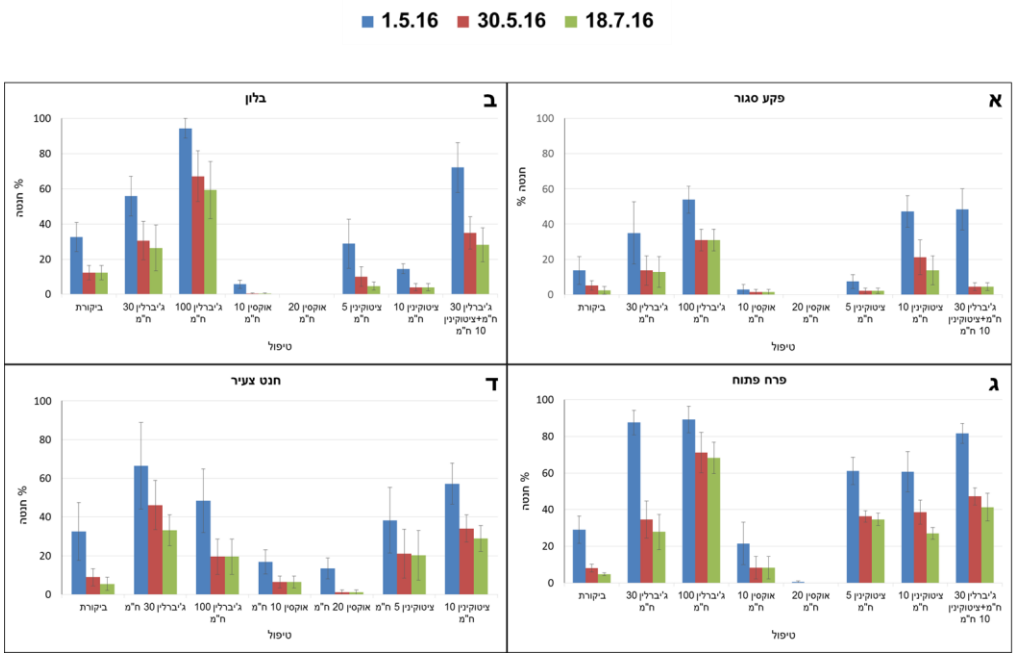
הטיפולים שנבחנו:

1) ביקורת - 0.025% טריטון x100 2) ג׳יברלין (ג׳יברלון) 30 ח״מ 3) ג׳יברלין (ג׳יברלון) 100 ח״מ 4) אוקסין (הדרנול) – 10 ח״מ 5) אוקסין (הדרנול) – 20 ח״מ 6) ציטוקינין (CPPU) – 5 ח״מ 7) ציטוקינין (CPPU) – 10 ח״מ 8) ג׳יברלין (ג׳יברלון) 30 ח״מ + ציטוקינין (CPPU) 10 ח״מ. כל אחד מהטיפולים (2-8) כלל גם את המשטח טריטון x100 בריכוז 0.025%

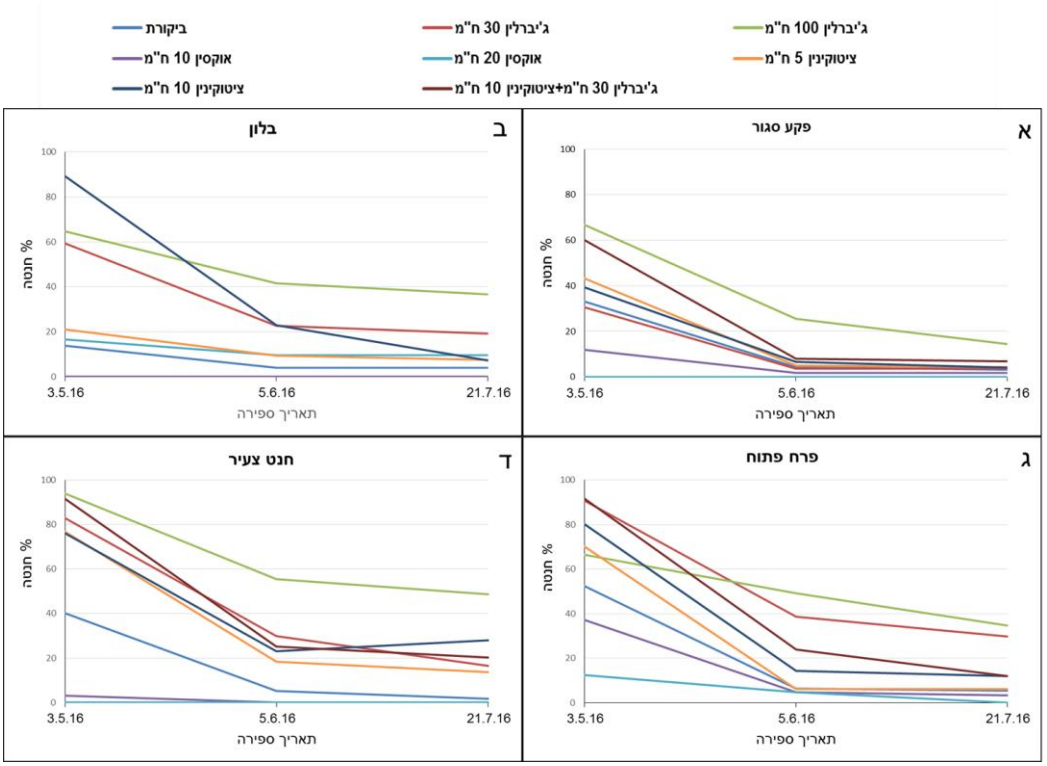
מספר הפקעים לענף נספר לפני הריסוס ובשלושה מועדים עוקבים לאחר הריסוס ואחוז החנטים ששרדו חושב עבור כל אחד ממועדי הספירה. מתוצאות הניסויים עולה כי אחוז החנטה הגבוה ביותר בכל שלושת הזנים, טריומף, שינשו ויוהו התקבל בטיפול הג׳יברלין בריכוז 100 ח״מ. בזן טריומף הטיפול בג׳יברלין 100 ח״מ היה יעיל ביותר כאשר ניתן בשלבים של פקע סגור, בלון ופרח פתוח, בעוד שהטיפול בג׳יברלין 30 ח״מ היה אפקטיבי יותר בשלב החנט הצעיר (איורים 2-1). בזן שינשו לעומת זאת ריסוס ג׳יברלין 100 ח״מ בשלבי ההתפתחות בלון, פרח פתוח וחנט צעיר הביא לעיכוב הנשירה הגבוה ביותר (איורים 4-3). הטיפול המוקדם בג׳ברלין 100 ח״מ, בשלב הפקע הסגור, עיכב את הנשירה ברמה מועטה בלבד. תוצאות דומות התקבלו גם עבור הזן יוהו, כאשר בזן זה הטיפול בג׳יברלין 100 ח״מ היה האפקטיבי ביותר כאשר ניתן בשלב הבלון והפרח הפתוח (איורים 5-4).



<u>איור 1 : השפעת טיפולים בחומרי צמיחה בשלבים שונים של התפתחות הפקע על % החנטה בזן טריומף.</u> כל טיפול (ביקורת, ג׳יברלין 30 ח״מ, ג׳יברלין 100 ח״מ, אוקסין 10 ח״מ, אוקסין 20 ח״מ, ציטוקינין 5 ח״מ, ציטוקינין 10 ח״מ, ג׳יברלין 30 ח״מ+ציטוקינין 10 ח״מ) בוצע על ענף בודד בעץ, עבור כל אחד משלבי ההתפתחות : פקע סגור (א), בלון (ב), פרח פתוח (ג) וחנט צעיר(ד), בחמש חזרות (5 עצים מכל זן). סה״כ 40 ענפים לעץ. שגיאות התקן לא נכללו בגרף זה על מנת להקל על הבנת התוצאות. לגרפים בתוספת שגיאות התקן, ראה איור 2.

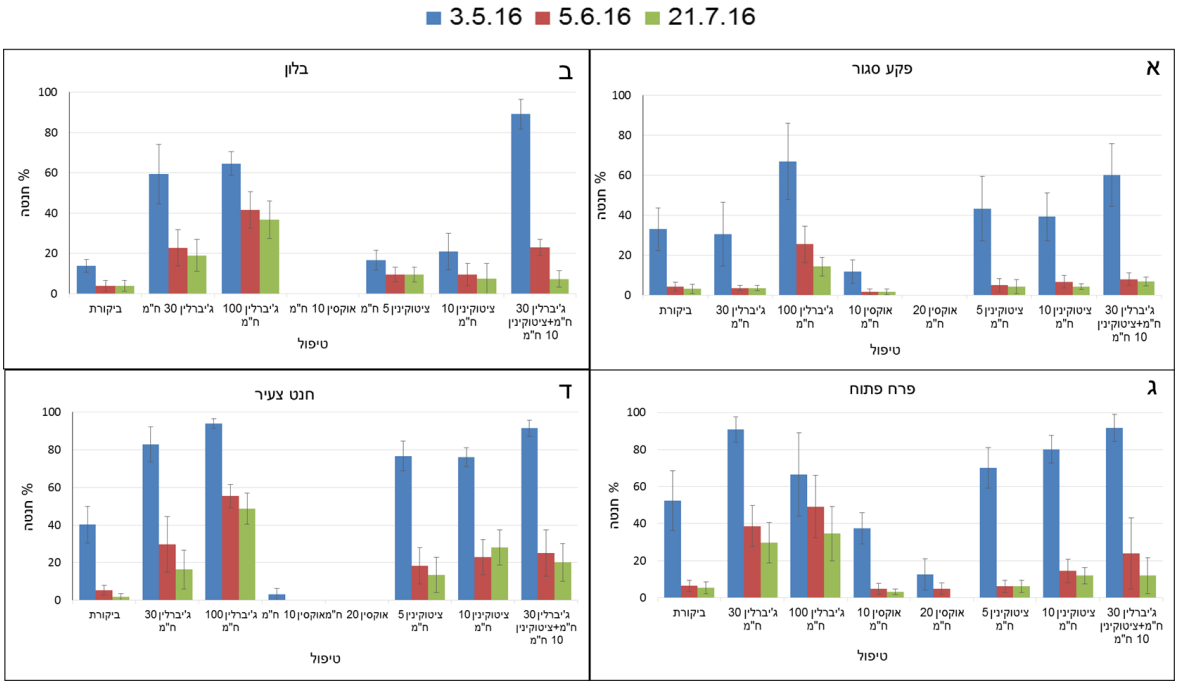


<u>איור 2 : השפעת טיפולים בחומרי צמיחה בשלבים שונים של התפתחות הפקע על % החנטה בזן טריומף</u>. כל טיפול (ביקורת, ג'יברלין 30 ח"מ, ג'יברלין 100 ח"מ, אוקסין 10 ח"מ, אוקסין 20 ח"מ, ציטוקינין 5 ח"מ, ציטוקינין 10 ח"מ, ג'יברלין 30 ח"מ+ציטוקינין 10 ח"מ) בוצע על ענף בודד בעץ, עבור כל אחד משלבי ההתפתחות : פקע סגור (א), בלון (ב), פרח פתוח (ג) וחנט צעיר(ד), בחמש חזרות (5 עצים מכל זן). סה"כ 40 ענפים לעץ. איור זה הינו כולל את שגיאות התקן אשר לא נכללו באיור 1.

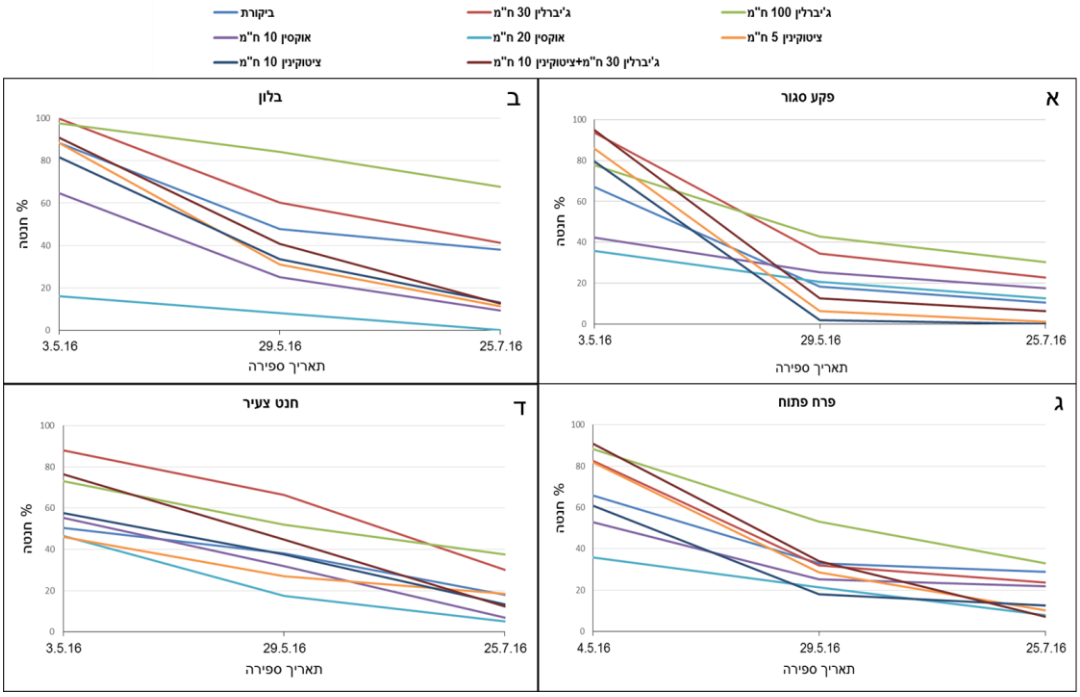


<u>איור 3 : השפעת טיפולים בחומרי צמיחה בשלבים שונים של התפתחות הפקע על % החנטה בזן שינשו</u>. כל טיפול (ביקורת, ג'יברלין 30 ח"מ, ג'יברלין 100 ח"מ, אוקסין 10 ח"מ, אוקסין 20 ח"מ, ציטוקינין 5 ח"מ, ציטוקינין 10 ח"מ, ג'יברלין 30 ח"מ+ציטוקינין 10 ח"מ) בוצע על ענף בודד בעץ, עבור כל אחד משלבי

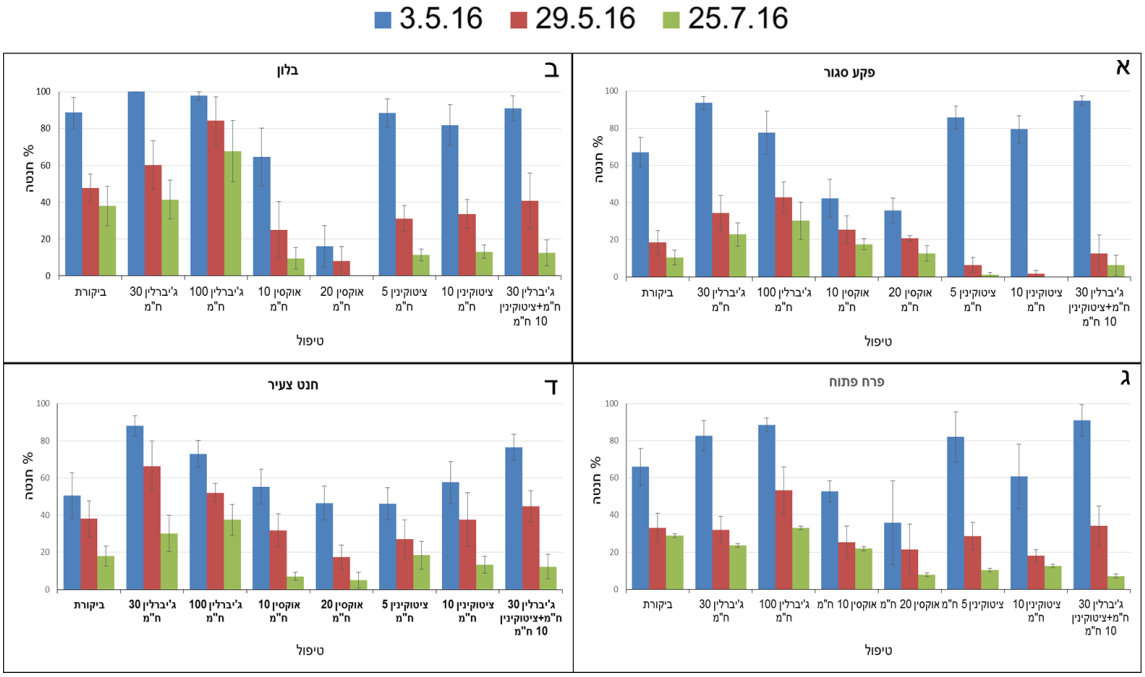
ההתפתחות: פקע סגור (א), בלון (ב), פרח פתוח (ג) וחנט צעיר(ד), בחמש חזרות (5 עצים מכל זן). סה״כ 40 ענפים לעץ. שגיאוות התקן לא נכללו בגרף זה על מנת להקל על הבנת התוצאות. לגרפים בתוספת שגיאות התקן, ראה איור 4.



<u>איור 4: השפעת טיפולים בחומרי צמיחה בשלבים שונים של התפתחות הפקע על % החנטה בזן שינשו.</u> כל טיפול (ביקורת, ג׳יברלין 30 ח״מ, ג׳יברלין 100 ח״מ, אוקסין 10 ח״מ, אוקסין 20 ח״מ, ציטוקינין 5 ח״מ, ציטוקינין 10 ח״מ, ג׳יברלין 30 ח״מ+ציטוקינין 10 ח״מ) בוצע על ענף בודד בעץ, עבור כל אחד משלבי ההתפתחות: פקע סגור (א), בלון (ב), פרח פתוח (ג) וחנט צעיר(ד), בחמש חזרות (5 עצים מכל זן). סה״כ 40 ענפים לעץ. איור זה הינו כולל את שגיאות התקן אשר לא נכללו באיור 3.



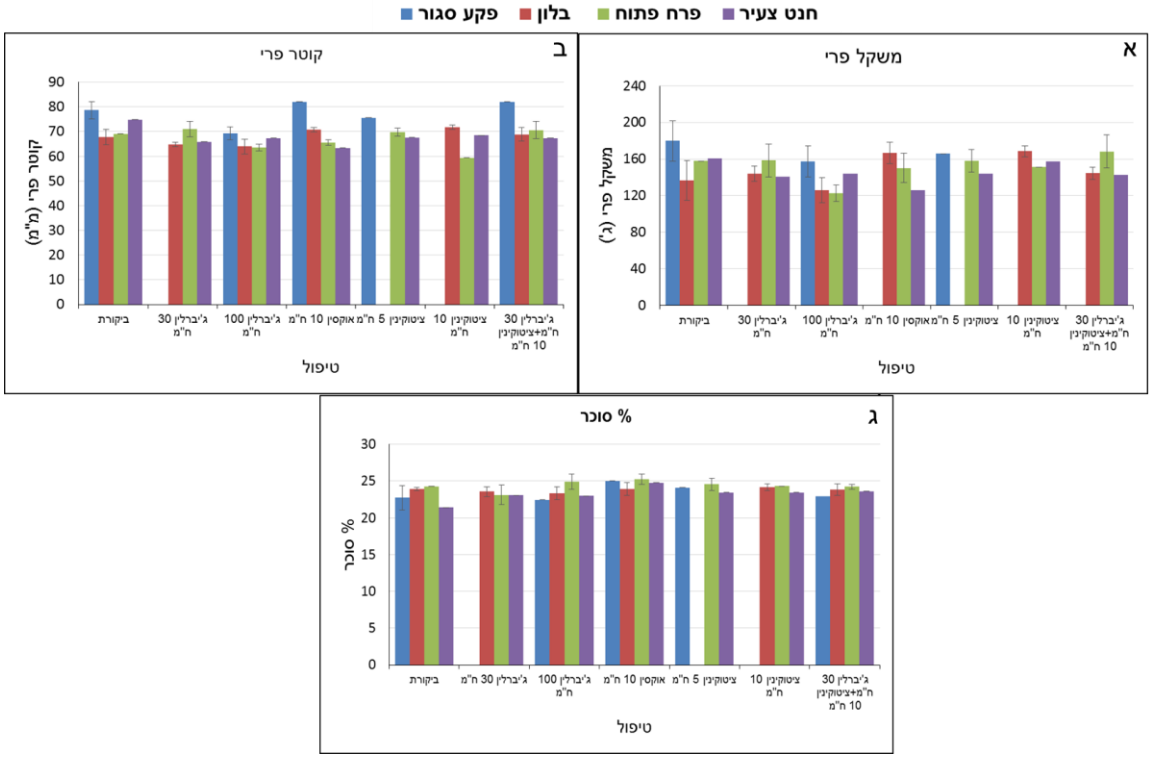
<u>איור 5: השפעת טיפולים בחומרי צמיחה בשלבים שונים של התפתחות הפקע על % החנטה בזן יוהו.</u> כל טיפול (ביקורת, ג'יברלין 30 ח"מ, ג'יברלין 100 ח"מ, אוקסין 10 ח"מ, אוקסין 20 ח"מ, ציטוקינין 5 ח"מ, ציטוקינין 10 ח"מ, ג'יברלין 30 ח"מ+ציטוקינין 10 ח"מ) בוצע על ענף בודד בעץ, עבור כל אחד משלבי ההתפתחות: פקע סגור (א), בלון (ב), פרח פתוח (ג) וחנט צעיר(ד), בחמש חזרות (5 עצים מכל זן). סה"כ 40 ענפים לעץ. שגיאות התקן לא נכללו בגרף זה על מנת להקל על הבנת התוצאות. לגרפים בתוספת שגיאות התקן, ראה איור 6.



<u>איור 6: השפעת טיפולים בחומרי צמיחה בשלבים שונים של התפתחות הפקע על % החנטה בזן יוהו.</u> כל טיפול (ביקורת, ג'יברלין 30 ח"מ, ג'יברלין 100 ח"מ, אוקסין 10 ח"מ, אוקסין 20 ח"מ, ציטוקינין 5 ח"מ, ציטוקינין 10 ח"מ, ג'יברלין 30 ח"מ+ציטוקינין 10 ח"מ) בוצע על ענף בודד בעץ, עבור כל אחד משלבי ההתפתחות: פקע סגור (א), בלון (ב), פרח פתוח (ג) וחנט צעיר(ד), בחמש חזרות (5 עצים מכל זן). סה"כ 40 ענפים לעץ. איור זה הינו כולל את שגיאות התקן אשר לא נכללו באיור 5.

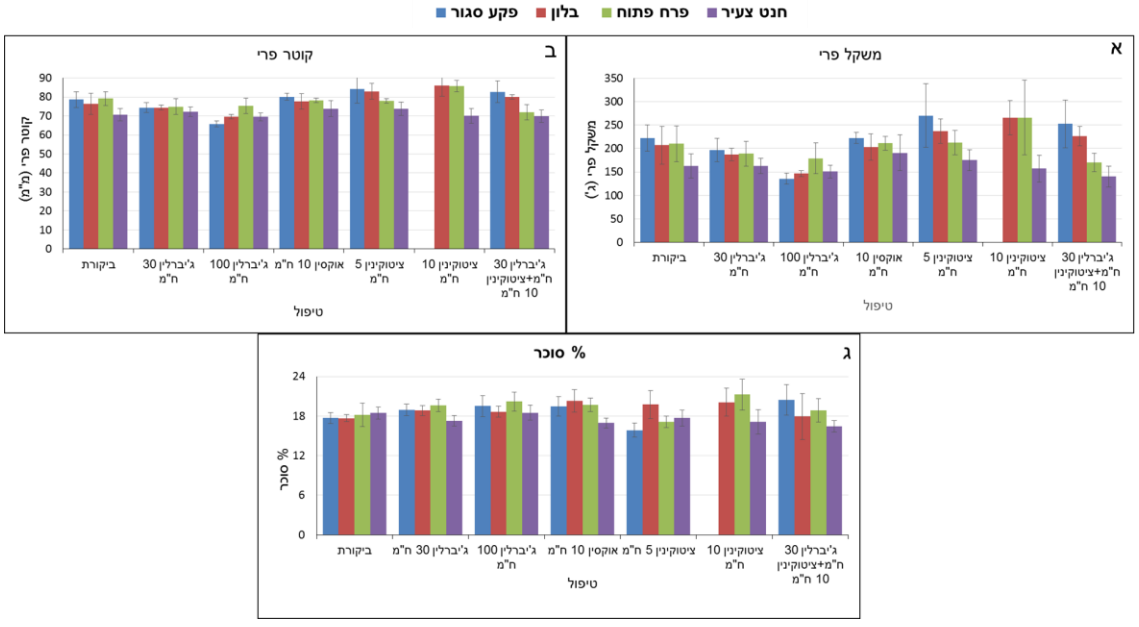
<u>2. בחינת השפעת הטיפולים לעיכוב נשירה על מדדי יבול</u>

על מנת לבחון את השפעת הטיפולים על התפתחות הפרי, נאספו הפירות וחושבו משקל וקוטר פרי ממוצע וכן % הסוכר בפרי עבור כל אחד מהטיפולים בזנים טריומף ושינשו. לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים השונים עבור כל אחד מהזנים (איורים 7-8). חשוב לציין כי מאחר והטיפולים נעשו על ענפים בודדים מספר הפירות לטיפול היה נמוך, עובדה הפוגמת במהימנות התוצאות. יש לחזור על ניסוי זה בהיקף גדול יותר על מנת שנוכל להגיע למסקנות כלשהן.



איור 7 : השפעת הטיפולים על משקל פרי, קוטר פרי ו-% סוכר בפירות טריומף לאחר הקטיף.

הפירות מכל טיפול (ביקורת, ג'יברלין 30 ח"מ, ג'יברלין 100 ח"מ, אוקסין 10 ח"מ, אוקסין 20 ח"מ, ציטוקינין 5 ח"מ, ציטוקינין 10 ח"מ, ג'יברלין 30 ח"מ+ציטוקינין 10 ח"מ) ומכל שלב התפתחותי : פקע סגור, בלון, פרח פתוח וחנט צעיר נקטפו, וחושב משקל הפרי הממוצע (א), קוטר הפרי הממוצע (ב) ו-% הסוכרים בפרי (ג).

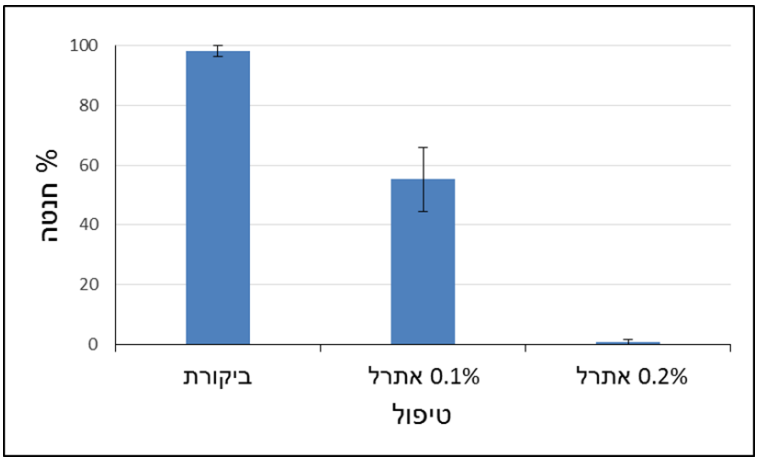


איור 8 : השפעת הטיפולים על משקל פרי, קוטר פרי ו-% סוכר בפירות שינשו לאחר הקטיף.

הפירות מכל טיפול (ביקורת, ג'יברלין 30 ח"מ, ג'יברלין 100 ח"מ, אוקסין 10 ח"מ, אוקסין 20 ח"מ, ציטוקינין 5 ח"מ, ציטוקינין 10 ח"מ, ג'יברלין 30 ח"מ+ציטוקינין 10 ח"מ) ומכל שלב התפתחותי : פקע סגור, בלון, פרח פתוח וחנט צעיר נקטפו, וחושב משקל הפרי הממוצע (א), קוטר הפרי הממוצע (ב) ו-% הסוכרים בפרי (ג).

3. השריית ניתוק בזן יוהו באמצעות אתרל

אתילן ידוע כהורמון המרכזי המבקר ומעודד את תהליך הניתוק בצמחים ובעצים רבים. על מנת ללמוד את הגורמים המעודדים את תהליך הנשירה והניתוק של הפקעים, ריססנו באתרל (חומר נוזלי המשחרר אתילן כאשר חודר לתאים) ענפים בודדים (5 ענפים לטיפול) מעצים מהזן יוהו, זן המאופיין ברמת נשירה נמוכה, לפי הטיפולים הבאים: 1) ביקורת - 0.025% טריטון x100 2) 0.1% אתרל 3) 0.2% אתרל. כל אחד מהטיפולים (1-2) כלל גם את המשטח טריטון x100 בריכוז 0.025%. מספר הפקעים לענף נספר לפני ואחרי הריסוס ואחוז החנטים ששרדו חושב עבור כל אחד מהטיפולים. ההורמון אתילן אכן עודד את ניתוק פקעי הפריחה ובריכוז הגבוהה אף גרם לנשירת מרבית הפקעים על הענף (איור 9). מניסוי זה ניתן להסיק כי הנשירה באפרסמון אכן מבוקרת ע"י אתילן, בדומה למערכות צמחיות נוספות, וכי טיפולים אשר מעכבים את פעולת האתילן עשויים למנוע את הניתוק. במקביל לריסוס ענפים על גבי עצי יוהו במטע, ניסינו להעמיד מערכת in vitro של ענפי יוהו מנותקים, מתוך כוונה לפתח מערכת אשר תאפשר לנו להעמיק וללמוד את הגורמים ההורמונלים המבקרים את תהליך ניתוק הפקעים. לא הצלחנו בהעמדת המערכת מאחר וניתוק הענפים מהעץ גרם לנשירת פקעי הפריחה והחנטים.

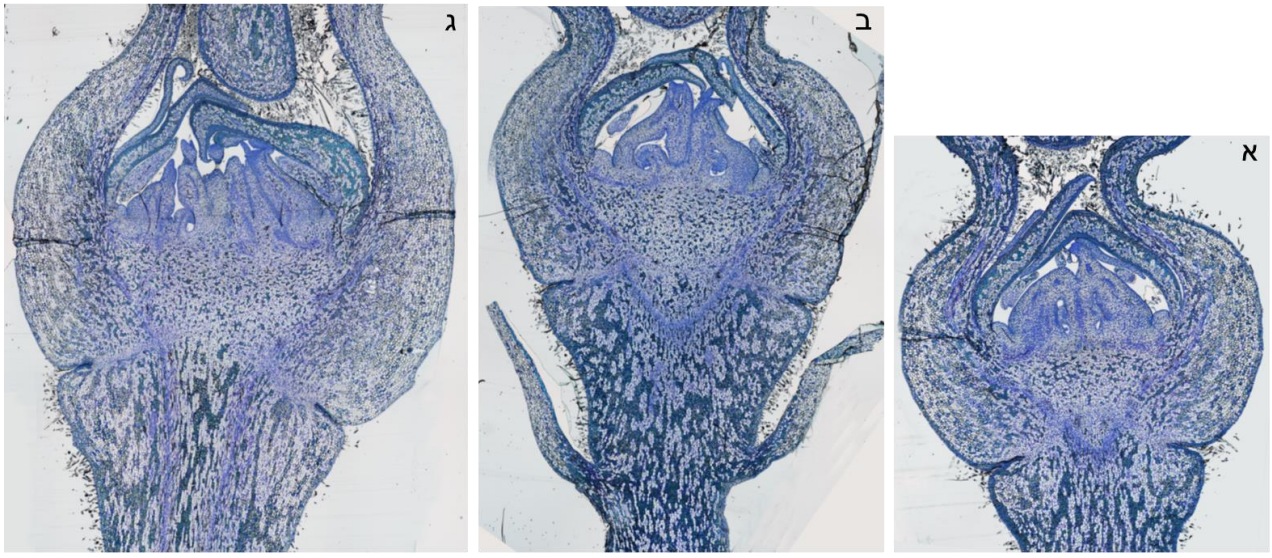


איור 9: השריית ניתוק בזן יוהו באמצעות אתילן. 5 ענפים בודדים רוססו בטיפולים הבאים: 1) ביקורת - 0.025% טריטון x100 2) 0.1% אתרל 3) 0.2% אתרל. מספר הפקעים לענף נספר לפני ואחרי הריסוס ואחוז החנטים ששרדו חושב עבור כל אחד מהטיפולים.

4. אפיון אנטומי-היסטולוגי של אזור הניתוק בפקעי טריומף

לאור חוסר ההצלחה בהעמדת מערכת של ענפים מנותקים ללימוד תהליך הנשירה, החלטנו להתרכז בעץ השלם וללמוד את הגורמים המבקרים את הניתוק in vivo באמצעות אנליזות אנדוגניות של רמות ההורמונים באזור הניתוק. בכדי לברר איזו רקמה יש לקחת לאנליזות ההורמונליות ובאיזה שלב התפתחותי, ביצענו אפיון אנטומי של אזור הניתוק בפקעי טריומף בשלושה שלבי התפתחות מוקדמים – שלבים מוקדמים יותר משלב הפקע הסגור בו ניתנו הטיפולים בחומרי הצמיחה. ניתן לראות בחתכים ההיסטולוגים כי רקמת הניתוק הממוקמת בבסיס הפרח, בנקודת החיבור בין העוקץ לעלי הגביע ומתמיינת בשלבים מוקדמים של התפתחות הפקע (איור 10 א-ג). כבר בפקע הצעיר מבין השלושה ניתן לראות את רקמת הניתוק, אשר מאופיינת בתאים קטנים המסודרים בשורות מקבילות (איור 10 א). בהינתן הסיגנלים ההורמונלים המתאימים, התאים ברקמה זו

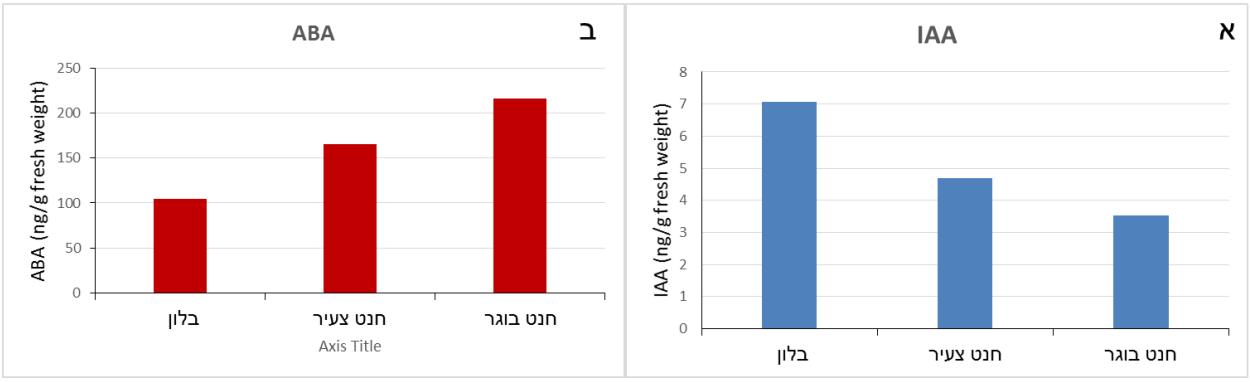
יתנתקו זה מזה ויביאו לנשירת הפקע. התמיינות הרקמה מתחילה מהחלק החיצוני של הפקע (עלי הגביע) וממשיכה כלפי פנים הפקע (השחלה).



איור 10 : אפיון אנטומי-היסטולוגי של אזור הניתוק בפקעי טריומף. חתכים בפקעי פריחה סגורים משלושה שלבי התפתחות מוקדמים, כאשר עלי הגביע הינם סגורים לחלוטין ועלי הכותרת אינם נראים לעין. א- השלב הצעיר ביותר. ב- השלב האמצעי. ג- השלב הבוגר מבין השלושה. ניתן לראות כי רקמת הניתוק אשר ממוקמת בבסיס הפקע החלה להתמיין מן החוץ (עלי הגביע) אל הפנים (שחלה). התמיינות רקמת הניתוק כמעט מושלמת בשלב הבוגר מבין השלושה (ג).

5. אנליזות הורמונליות למדידת רמות הורמונים באזור הניתוק בפקע

הבקרה ההורמונלית על תהליך הניתוק הינה מורכבת ויש להניח כי מדובר באינטראקציה בין מספר הורמונים. לפיכך ידיעת רמות ההורמונים באזור הניתוק והנשירה במהלך התפתחות הפקע עשויה לתל לנו כלים להתמודד ואף למנוע את התופעה. בשנתיים האחרונות פיתחנו שיטות לכימות אנדוגני של הורמונים צמחיים באמצעות מכשיר LC-MS. על מנת לבחון האם אכן יש ביכולתנו להפיק ולכמת הורמונים צמחיים מאזור הניתוק בפקעי אפרסמון, ביצענו ניסוי מקדים בו ערכנו אנליזות להורמונים אוקסין (IAA) וחומצה אבסיצית (ABA), בפקעי שינשו משלושה שלבים התפתחותיים. ההורמון אוקסין ידוע כמעכב את תהליך הנשירה, בעוד שחומצה אבסיצית ידועה כמעודדת את התהליך. כפי שניתן באיור 11, עם התפתחות פקע הפריחה משלב הבלון לשלב החנט, רמת האוקסין בפקע יורדת, בעוד שרמת החומצה האבסיצית עולה. תוצאות העולות בקנה אחד עם הידוע מהסיפרות ומעידות על כך שאנליזות הורמונליות לקביעת פרופיל ההורמונים באזור הניתוק במהלך התפתחות הפקעים, אכן יכולות לתרום להבנת הבקרה על מנגנון הנשירה ולעזור במציאת פתרון אגרוטכני מתאים לעיכוב התהליך.



<u>איור 11 : אנליזות הורמונליות למדידת הרמות האנדוגניות של ההורמונים אוקסין (IAA) וחומצה אבסיצית (ABA).</u> פקעי פריחה משלושה שלבי התפתחות בלון, חנט צעיר וחנט בוגר מהזן שינשו נלקחו לאנליזות של ההורמונים IAA ו- ABA באמצעות מכשיר LC-MS.

סיכום

מהניסויים שערכנו במהלך שנת 2016 עולה כי טיפול הג׳יברלין הוא הטיפול המיטבי למניעת נשירת פקעים וחנטים בזנים טריומף ושינשו. תוצאה זו אינה חדשנית ועולה בקנה אחד עם תוצאות קודמות מהספרות וכן עם ההמלצות למגדלי הטריומף בארץ. התרומה של מחקר זה לידע הקיים היא, כי ייתכן וריכוזים גבוהים יותר של ג׳יברלין (100 ח״מ) עשויים להיות אפקטיביים יותר. מתוצאות הניסויים עולה כי יש לבצע התאמה בין השלב ההתפתחותי בו מומלץ לרסס לבין הזן מאחר ושלב זה עשוי להיות שונה בין זנים שונים. ניסויי 2016 היו ניסויים פרלימינריים בלבד, ועל מנת לבסס תוצאות אלה יש לחזור ולבצען בהיקף גדול יותר ברמת העץ השלם, ואף לבחון את השפעתם על היבול של אותה שנה וכן של השנה העוקבת. שפע של ניסויים ועבודות שנערכו באפרסמון ובעצי פרי רבים נוספים הביאו למסקנות שונות באשר להורמונים העשויים לעכב את תהליך הניתוק, אך למרות זאת עדין לא נמצא הטיפול האגרוטכני היעיל למניעתו. ייתכן והדבר נובע ממורכבות הבקרה על התהליך. מורכבות זו יכולה להתבטא באינטראקציה בין מספר הורמונים ושילובים שונים שלהם בשלבי התפתחות שונים של הפקע. על מנת להתמודד בצורה יעילה ומושכלת עם תופעת הנשירה, יש להעמיק את רמת הידע שלנו באשר לתהליך.