



מגלים עמידות

מחקר מקיף לזיהוי והשבחה של זני שקד עמידים למחלת ALS הנגרמת על ידי החיידק קסיללה, ושימוש בכלים גנטיים לפיתוח זנים מותאמים לתנאים בישראל

הילל ברוקנטל, מירי ונונו, רותם הראל-בז'ה, טלי טריינין, עירית בר-יעקוב, כאמל חטיב, דורון הולנד, אופיר בהר ותמר אזולאי-שמר/ מנהל המחקר החקלאי-מכון וולקני

אפיון רב שנתי של האפידמיולוגיה של החיידק בארץ העלה שהמחלה בשקד מבוססת בעמק החולה וגבולה הדרומי הוא עמק יזרעאל. לא נמצאו עצים נגועים במרכז הארץ ובדרומה. בנוסף, המיזם העלה שכונ לשנים אלו, התפשטות המחלה נמוכה מאוד ולא נמצא וקטור הידוע מהספרות. למרות שהפרקטיקה הנהוגה באירופה לטיפול במחלה נעשה על ידי השמדת חלקות נגועות, בארץ, נכון להיום מטפלים בעצים נגועים בצורה נקודתית ומונעים מהשמדה של חלקות שלמות (Zecharia et al., 2022). כחלק מפיתוח ממשק להתמודדות עם המחלה בארץ, נעשו ניסיונות לזיהוי והשבחה של זני שקד מסחריים בעלי סבילות/ עמידות לקסיללה. במרכז המחקר נווה-יער קיימים אוספים של עצי פרי נשירים המהווים מקור לתכונות חשובות בתוכניות ההשבחה השונות (Holland et al. 2006).

מכלל האוספים הגנטיים החיים של עצי פרי נשירים בנווה-יער, אוסף עצי השקד כולל בתוכו כ-150 זני ומיני שקד שונים. זנים מסחריים, זני מסורת ומיני בר מישראל ומרחבי העולם. במסגרת תוכנית השבחת השקד, נעשה שימוש באוסף להטמעת תכונות שונות בעלות ייתרון בפיתוח זני השקד המסחריים העתידיים. לדוגמא, תכונת הפוריות העצמית בשקד, אשר הוטמעה בפרויקט ההשבחה הקודם בנווה-יער והובילה לפיתוח שני זנים מסחריים בעלי הפריה עצמית, הזן 'מתן' (Holland et al., 2016) והזן 'ב.יפת' (בנימין).

זני שקד מסחריים אלו אינם נדרשים לנטיעה בסמוך לזנים מפריים, כפי שדרשו הזנים השכיחים שגודלו עד כה בישראל ('אום-אל-פאחם', 'שפע', '53' ו-'54'). הטמעת תכונות הפוריות העצמית

סיללה (*Xylella fastidiosa*) הינו חיידק גראם שלילי, גורם מחלה בטווח רחב של גידולים ביניהם זיתים, גפנים ושקד. מחקרים ברחבי העולם מצאו שהחיידק מועבר על ידי חרקים מוצצי עצה ממשפחת הציקדתיים. בשקד, לאחר ההדבקה החיידק מתבסס ומפתח ביופילמים בציוורות העצה. תופעה זו מתבטאת בהתייבשות עלים (Almond leaf scorch-ALS), ענפים, ויכולה אף להוביל לתמותת העץ. מחלת ה-ALS נתגלתה ונחקרה ראשית בארה"ב, ובעשורים האחרונים התגלו מוקדים רבים באיטליה וספרד (Zecharia et al., 2022). מחלת ה-ALS גרמה לתמותת עצים רבה באירופה, ולמקור דאגה מרכזי בקרב החקלאים. מעבר לתמותת העצים הנגועים עצמם, התפשטות המחלה הובילה לעקירות נרחבות של חלקות שקד זזית, היות והמענה היחיד לעצים נגועים הוא סניטציה והשמדת עצים שזוהו כמאולחים ועצים בסביבתם.

עמידות למחלת ה-ALS

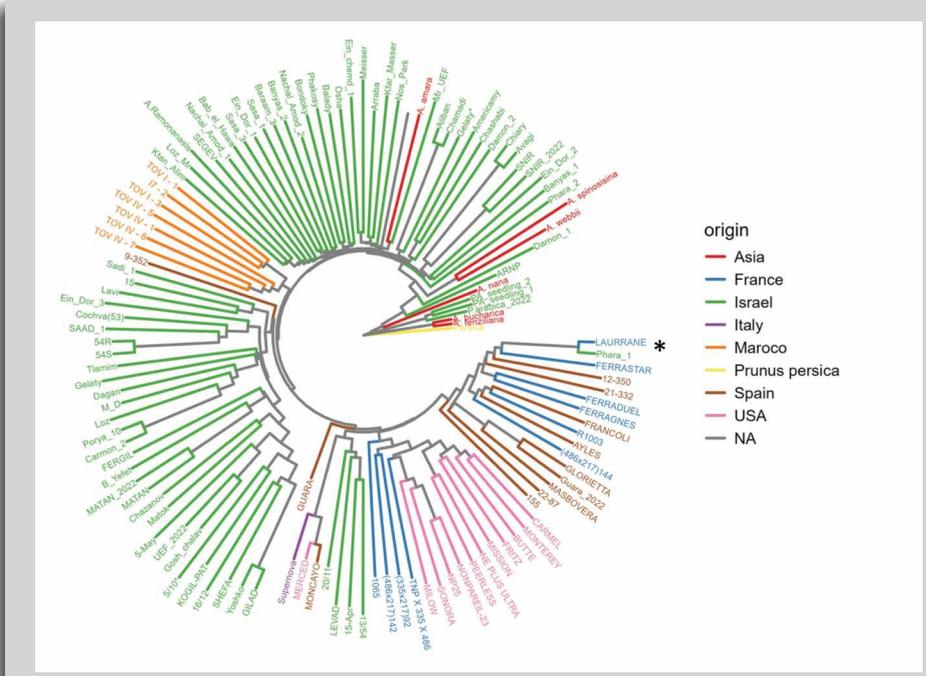
לאור ממצאים אלו וכפעולת מנע החלו סקרי מחלות לזיהוי החיידק קסיללה בישראל. בשנת 2016 החלו להגיע דיווחים על המצאות החיידק במטעי שקד בצפון הארץ. עקב דיווחים אלו הוחלט להקים מיזם שמטרתו הן מיפוי התפשטות המחלה, אפיון החיידק, אפיון הווקטור המעביר את המחלה ופיתוח ממשק להתמודדות עם המחלה (דו"ח סיכום שנה ראשונה, מיזם קסיללה 2019, מועצת הצמחים).

בתמונה למעלה: מטע שקד פורח. צילום מיכל אקרמן לברט

סריקה ראשונית בה נבחרו 7 זנים מאוסף השקד בנווה-יער. מכיוון שלא היו זנים כלשהם בעולם בעלי עמידות לחיידק, המוטיב המוביל היה לייצר רשימה מגוונת של זנים ממקורות שונים שתכלול כמה שיותר אזורי גידול בעולם. בחירת הזנים אשר נכללו בסריקה זו נעשתה על פי מקורות מידע בספרות ועל פי אפיון גנטי של האוסף (ג'נוטיפינג, איור 1). רשימת הזנים שנבחרה על בסיס נתונים אלו כללה זנים אמריקאים, אירופאים, ישראלים מקומיים, ומין בר מקומי.

במהלך חודש פברואר של חורף 2020 נלקח רכב מהזנים השונים והורכב על עצים בוגרים וגועים בשדה נחמיה. לבחינה סטטיסטית הורכבו מכל זן כ-30 רוכבים על עשרה עצים שונים כך שעל כל עץ נגוע הורכבו בין 4-5 זנים שונים ומכל זן בין 2-4 חזרות.

הניסוי נערך במשך שנתיים. במהלך הניסוי, לאורך האביב והקיץ, כמתו סימפטומים חזותיים ונלקחו דגימות עלים לבחינת נוכחות כמותית של החיידק בחומר המורכב. תוצאות הניסוי הראו שהזנים המרכזיים בארץ: 'אום-אל-פחם' ו'מתן' בעלי רגישות גבוהה למחלה (Highly susceptible). החיידק קסיללה



איור 1. עץ פילוגנטי של אוסף השקד בנווה יער. עץ זה משקף את המרחק הגנטי בין זני ומוני השקד באוסף השקד בנווה-יער. העץ נבנה על פי האפיון הגנטי (Genotyping) של האוסף. מאחר ולא היה קיים ידע על זנים בעלי עמידות לקסיללה, ניתוח זה שימש כבסיס לבחירת הזנים אשר יסרקו בניסויים ומייצגים שונות גנטית רחבה ככל הניתן. הון העמיד 'לורן' ('Lauranne') מסומן בכוכבית. זני ומוני השקד צבועים לפי המקור הגאוגרפי שלהם (Origin).



איור 2. ניסוי סריקת זנים בשדה נחמיה. תמונות מייצגות לניסוי סריקת זני שקד שונים אשר הרכבו (רכב צמחי נקי ממחלה) על עצים בוגרים וגועים במחלת ALS. מוכיח ויתן לראות זן שקד המראה סימפטומים של רגישות למחלה (A). משמאל זן המראה עמידות מלאה ללא סימפטומים (B). (שדה נחמיה, אוגוסט 2020)

בזני השקד 'מתן' ו-'ב'פת' שחררה זנים אלו מתלות בזנים מפריים, העלתה את אחוזי ההפריה, ואת התלות האובליגטורית בדבורים לנשיאת פרי. במאמר זה אנו מדווחים על ממצאים ראשוניים של מחקרנו, בו זיהינו ואפיינו לראשונה זנים ומוני שקד שונים בעלי עמידות למחלת ה-ALS. זנים ומונים אלו משמשים אותנו בימים אלו כמקור לתכונת העמידות/סבילות למחלת ה-ALS בתוכנית השבחת השקד. בנוסף, המגוון הגנטי ושימוש בכלים מולקולריים ופיזיולוגיים יאפשרו מחקר מעמיק לגילוי והבנת המוגוונים הגנטיים והתאיים המקנים את הסבילות/עמידות למחלה בשקד.

תוצאות ודין

ניסוי 1: סריקת זנים מאוסף השקד לאפיון רמת רגישות/ עמידות לחיידק קסיללה.
במטרה לבסס מערכת מחקרית אשר תאפשר מדידה ואפיון רמת הרגישות/עמידות של זני שקד שונים לקסיללה, בוצעה

המחלה. הרחבה זו תאפשר לנו, בעזרת השוואת רצפים גנטיים ובחינה של הבדלים ברמות ביטוי של גנים בפרטים השונים, לנסות ולאתר אזורים בגנום המבקרים את העמידות לחיידק. ניסוי מס' 2 בוצע בשתילים צעירים ונקיים מהחיידק, והאילוח נעשה בצורה מכוונת וידינית. בניסוי זה הצלחנו לפתח פרוטוקול ידני אמין לאילוח של החיידק ולביצוע ניסוי בתנאים מבוקרים יותר של אפיון לעמידות (Zecharia et al., 2022). אולם, בהשוואה לשיטת הסריקה בניסוי 1, צורת סריקה זו דורשת תשומות גבוהות יותר ותנאי הסגר לניסוי (היות שהחיידק נחשב למזיק הסגר בישראל). בנוסף, הניסוי מבוצע בעציצים וקיימת רגישות יותר לעקות אביוטיות.

ניסוי 3: אפיון ומיפוי הגורמים הגנטיים המקנים את העמידות למחלת ALS באמצעות אוכלוסיות מכלוא.

במטרה לזהות ולאפיין את המרכיב הגנטי האחראי לעמידות לקסיללה בזן 'לורן' וכדי לייצר סמונים אשר ישמשו לסריקה וזיהוי מכלואים אשר נושאים את תכונת העמידות. בתוכנית ההשבחה, נסרקו כ-150 צאצאים של הזן. אוכלוסייה זו נסרקה לעמידות לקסיללה במערכת השתילים הצעירים בחממה בהסגר בבית דגן. תוצאות הניסוי הראו כי האוכלוסייה מגוונת מן ההיבט של רמת הרגישות לקסיללה. הסקירה מראה שונות ברמת העמידות לקסיללה, מפרטים עם רגישות לפרטים בעלי עמידות מלאה לסימפטומים ולנוכחות חיידק. דוגמאות עלים נלקחו להפקת DNA וישמשו למיפוי גנטי של התכונה ולפיתוח סמונים.

סיכום

הודות לשיתוף הפעולה בין השירותים להגנת הצומח וצוות המחקר של מיזם קסיללה, אשר אפיין התפשטות המחלה במטעי השקד בארץ, נחסכה עקירה ורחבת של מטעי שקד בישראל ונמצא זן עמיד למחלה. על אף שלא נמצא ממשק כלשהו למוינעה או טיפול בעצים נוגעים, נכון להיום לא ידועה התפשטות מסיבית של המחלה במטעי שקד בישראל. היקף המחלה הנגרמת על ידי קסיללה משתנה משנה לשנה והגורמים לכך אינם ידועים. אולם, טווח הפונדקאים הרחב של החיידק ופוטנציאל הנזק העצום שלו מחייבים אותנו לפתח מראש זנים עמידים ולהבין את מנגוני המחלה והשפעתם על העצים. מחקר זה מדגיש את החשיבות בשימור אוסף מיני שקד מגוון ורחב ככל האפשר על מנת לתת מענה לאתגרים הקיימים והצפויים לחקלאות הישראלית והעולמית. אוסף השקד כמו גם אוספים אחרים היוו ומהווים מקור וחלק אינטגרלי בתהליך המחקר וההשבחה. מחקר זה מניח את התשתית להבנת המנגונים הגנטיים המקנים עמידות למחלת

הועבר מהעץ הנוגע לרכב של זנים אלה וכתוצאה פיתחו תסמיני מחלה בולטים.

אחת התוצאות המעניינות והבולטות ביותר הייתה זיהוי עמידותו הגבוהה של הזן 'לורן' למחלה (Highly resistant). בבחינת רכב של זן זה אשר הורכב על העצים הנוגעים נמצא כי ישנה התבססות פחותה, משמעותית סטטיסטית, של החיידק וסימפטומים פחותים של מחלת ה-ALS לעומת הזנים האחרים (איור מס' 2). הזן 'לורן' הינו זן מסחרי צרפתי, אך בבחינת גידול באזורים שונים בישראל, נמצא בעל פרי קטן עם קליפה קשה, לעיתים מריה, ויבולים לא יציבים שאינו מותאם לגידול בארץ. היותו של הזן 'לורן' זן מסחרי ותוצאות מחקר זה, המצביעות על עמידותו בפני קסיללה, הובילו אותנו לשימוש בזן זה כמקור להעברת תכונה זו בהכלאות להשבחה לזנים שיתאימו לגידול בישראל. כמו כן, שיטת הסריקה, הרכבת חומר צעיר על עצים בוגרים מאולחים הוכחה כיעילה מאוד ויכולה להוות תשתית לסריקה רחבה של מאות פרטים.

ניסוי 2: סריקה רחבה של זנים ואוכלוסיות מכלוא לאפיון רמת התגובה שלהם לחיידק קסיללה

לאחר שזוהה הזן 'לורן' בהצלחה כזן עמיד לקסיללה הוחלט להרחיב את הסריקה באוסף לזנים מסחריים, מיני בר ומכלואי שקד שונים. כל זאת כדי להרחיב את הבסיס הגנטי של מקורות העמידות לקסיללה. לאור זאת נבחרו כ-45 פרטים שונים. בשונה מהניסוי הקודם, לניסוי זה נלקחו רכב מהפרטים השונים אשר הורכב בחזרות על כנת GF.677 ובוצע אילוח של השתילים הצעירים עם החיידק קסיללה בצורה מכנית (איור 3). הרחבת הניסוי הוכחה כחשובה וחשפה רמות תגובה שונות של הזנים השונים לגורם



איור 3. סריקה רחבה של זנים ואוכלוסיות מכלוא לאפיון רמת התגובה שלהם לחיידק קסיללה במערכת שתילים צעירים. שתילים צעירים של זני שקד שונים בעציצים בחממת הסגר מבוקרת (בית דגן, 2023)



שקד מלבלב במטע

'Matan', a New Self-compatible Almond Cultivar with High-quality Kernel and Good Yield. *HortScience*, 51(3), 302-304.

Zecharia, N., Krasnov, H., Vanunu, M., Siri, A. C., Haberman, A., Dror, O., ... & Bahar, O. (2022). *Xylella fastidiosa* outbreak in Israel: Population genetics, host range, and temporal and spatial distribution analysis. *Phytopathology*®, 112(11), 2296-2309. 

ALS, ולפיתוח זני שקד מסחריים המותאמים לתנאי האקלים הישראליים בעלי עמידות לחיידק קסיללה.

תודות

ברצוננו להודות לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות, ענף הפירות ולענף השקד על התמיכה במחקר לאורך השנים. כמו כן תודה לקרן Beyond Xylella, Integrated Management Strategies for Mitigating Xylella fastidiosa Impact in Europe; grant 101060593, from European Union's Horizon Europe "Food, Bioeconomy Natural Resources, Agriculture and Environment" Programme לקיבוץ שדה נחמיה ולמגדל ירון פינטו על העמדת מטע השקדים של הקיבוץ לרשותנו לטובת הניסוי והתמיכה לאורך הדרך. תודה לשותפים מהשירותים להגנת הצומח על הבנת חשיבות הניסוי, אישורו ואישור מתקן ההסגר במכון וולקני. תודה נוספת למנחם בורנשטיין על הקמת מתקן ההסגר במכון וולקני.

מקורות

Holland, D., Bar-Yaakov, I., Trainin, T., & Hatib, K. (2006). Old deciduous fruit trees of the Rosaceae in Israel and their utilization in modern agriculture and breeding. *Israel Journal of Plant Sciences*, 54(3), 169-177.
Holland, D., Bar-Ya'akov, I., Hatib, K., & Birger, R. (2016).