

התמודדות עם דורת ארם צובא (*Sorghum halepense*) וירבוז פלמרי (*Amaranthus palmeri*),

עשבים קשי הדברה בכותנה

דו"ח תוצאות ניסויים לשנת תשע"ח 2018

מוגש להנהלת ענף הכותנה על ידי

עפרי גרזון, ינון ידיד, צבי פלג, וברוך רובין

המכון למדעי הצמח והגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה, רחובות

האוניברסיטה העברית, ירושלים

תקציר

בשנת המחקר השלישית עסק המחקר באימות העמידות באוכלוסיות עשבים רעים בבתי גידול שונים. נתברר הבסיס המולקולרי של האוכלוסיות העמידות של דורת ארם צובא (דא"צ) למעכבי ACCase ומעכבי ALS ונבחנו ממשקי הדברה אלטרנטיביים. העמידות למעכבי ACCase נובעת ממוטציה בעמדה 2027 ואילו העמידות למעכבי ALS נבעה ממוטציה בעמדה 197 מפרולין לתריאונים. נמצא כי על אף העמידות ניתן עדיין להתמודד עם העשב הרב שנתי דא"צ באמצעות קוטלי העשבים הקיימים, אך נדרשת זהירות משנה נפני העליה בתפוצת האוכלוסיות העמידות. לגבי התפוצה של ירבוז הגדות, נתגלו ואופיינו שלשה מוקדי חדירה מהם החלה ככל הנראה התפוצה בתוך האזורים האלה: גליל עליון, אזור העמקים, והשפלה. כן נצפו מספר פרטים בודדים באזורים שונים בשרון. מרבית האוכלוסיות (85%) נאספו בשולי השדות ונחלים, ורק כ 15% בתוך שדות מעובדים (כותנה, חמניות, תירס). חלק מהאוכלוסיות נאספו בקרבת מקורות מזון כגון בריכות דגים, רפתות, מרכזי מזון והאתר להאכלת עגורים בגרגרי תירס מיובא באגמון. עובדה זו מרמזת לכאורה על הדרך בה הגיעו הזרעים לארץ. עד כה נסרקו 16 אוכלוסיות (מתוך 20 שנאספו) לק"ע השונים. מהסריקות השונות נמצאו שלוש אוכלוסיות (נווה יער-NY01, מגידו- ME01 וגניגר GA02) העמידות למעכבי ALS. בריצוף של הגן ALS באוכלוסיות מגידו ונווה יער נמצא כי בפרטים העמידים קיימת התמרה מח"א טריפטופן (Trp) בעמדה 574 לליאוצין (Leu), המקנה עמידות לכל קבוצות ק"ע מעכבי ALS. מאחר וצמחים אלה הם דו-ביתיים והפרייתם זרה, יש לצפות לתפוצה מהירה של העשב בדומה לזו של ירבוז פלמרי. תוצאות הניסויים מצביעים על בעיה אמיתית של התבססות ירבוז הגדות בשדות השלחין בישראל ומחייבת היערכות הענף להתמודדות איתו.

מבוא

בשנת המחקר הנוכחית עסק המחקר באימות העמידות באוכלוסיות עשבים רעים בבתי גידול שונים: דורת ארם צובא (*Sorghum halepense* – קוצ'אב) עשב רב שנתי; ירבוז פלמרי (*Amaranthus palmeri* - י"פ) המשבש בעיקר גידולי שלחין בקיץ; וירבוז הגדות (*A. rudis* - יה"ג), עשב חדש שחדר לגידולי שלחין שונים; אוכלוסיות העשבים נאספו בכל חלקי הארץ והניסויים לאיפיון התגובה ולברור מנגנון העמידות נערכו במעבדות הפקולטה לחקלאות. יש לציין שמקור המימון העיקרי לניסויים אלה היה של קרן המדען הראשי של משרד החקלאות במסגרת מיזם העמידות בו לקחנו חלק.

התמודדות עם דורת ארם צובא (דא"צ)

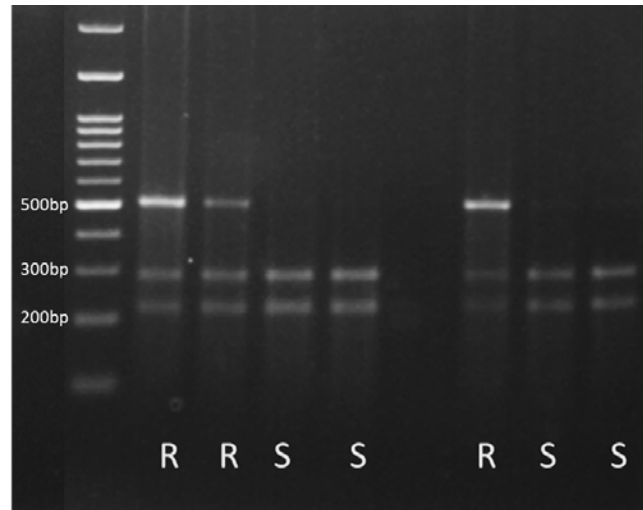
המטרה הכללית של המחקר היא לאמוד את היקף בעיית העמידות למעכבי ACCase בדא"צ, לברר את המנגנונים המולקולריים המקנים עמידות באוכלוסיות שונות, ולסייע בפיתוח ממשקי הדברה חליפיים שיצמצמו את התופעה.

בהתאם לתכנית שנה זו התמקדה העבודה בדא"צ בפיתוח כלי מהיר לניטור העמידות למעכבי ה ACCase שנמצאו בשנת 2017; לאיפיון מנגוני עמידות נוספים ולבחינת ממשקי הדברה חליפיים. כאמור, העמידות של דא"צ למעכבים אלה נבעה ממוטציה נקודתית בעמדה 2027 שהתגלתה לראשונה במחקר זה.

(1) **פיתוח סמנים גנטיים לאפיון מהיר של נוכחות SNP בעמדה 2027:** במטרה לפתח כלי אשר יאפשר זיהוי מהיר, נוח וכלכלי של ה-SNP בגן המטרה בעמדה 2027 שנמצא באוכלוסיות העמידות. פותחו סמנים המבוססים על שימוש באנזים רסטריקציה ובכך להבדיל בין פרט רגיש לעמיד על בסיס ההתמרה הקיימת בפרט העמיד. פותח סמן CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) ספציפי המבוסס על חיתוך תוצרי PCR עם אנזים הרסטריקציה *BsrI*, בעל אתר ההיכרות לרצף ACTGG. הרצף ACTGG במקטע המוגבר קיים רק בפרטים הרגישים עקב ה-SNP בקו העמיד (G→T). לאחר הדגרה של תוצרי ה-PCR עם האנזים, מתקבל הבדל בדפוס התוצרים באורך 217bp ו-287bp בפרטים רגישים כאשר בפרטים העמידים נראה גם תוצר באורך 502bp (איור 1).

אפיון עמידות ל ALS: מאחר ואחד התכשירים הנפוצים להדברת דא"צ משתייך למעכבי ALS (טיטוס, 25% רימסולפורון) נבדקה האפשרות שהתפתחה עמידות גם למעכבים אלה. בבדיקת תגובת האוכלוסיות השונות שנאספו נתגלו שתי אוכלוסיות עמידות ביותר למעכבי ALS, מתל-נוף וחולדה. בחינת זריעים מאוכלוסייה זו העלה שאוכלוסיות אלו מצויות בשלבי התבססות שונים – באוכלוסייה מתל נוף מרבית הפרטים שנבחנו היו עמידים בעוד שבאוכלוסיית חולדה רק חלק קטן מהצמחים עמידים (טבלה 1). יש להזכיר שהאוכלוסייה הרגישה בה השתמשנו בניסוי זה עמידה מאד למעכבי ACCase (כפי שדיווחנו בעבר. יש לזכור שבדא"צ ההפריה זרה וחלק מהזריעים הטרזיגוטים ואפילו הומוזיגוטים

רצסיבים לתכונת העמידות ועל אף זיהוי המוטציה בצמחים ששרדו רמת העמידות של הזרעים הנבדקים נמוכה.



איור 1. תוצרי PCR של מקטע מהגן ACCase של פרטים שונים, רגישים (S) ועמידים (R), אשר עברו אינקובציה עם האנזים *BsrI* בהשוואה לסמן גודל של 100bp.

טבלה 1. תגובת אוכלוסיות רגישות ועמידות של דא"צ לק"ע מעכב ALS - רימסולפורון ('טיטוס') שניתן אחר הצצה.

| תדירות הפרטים העמידים* | RI ^{\$} | ED ₅₀ [#] (g ai ha ⁻¹) | אוכלוסייה |
|---------------------------|------------------|--|-----------|
| 0±0% | | 0.2 | כפר בלום |
| 65±13.7% | 14.5 | 2.9 | תל נוף |
| 2.3±1.2% | 0.9 | .018 | חולדה |

ED₅₀[#] = מינון ק"ע (ג.ח.פ להקטר) הגורם לפחיתה של 50% במשקל הצמח מול צמחי הביקורת.
RI^{\$} - ערך המבטא את רמת העמידות של אוכלוסיית כפר בלום אל מול האוכלוסייה הנבחנת.

ריצוף פרטים עמידים ורגישים מאוכלוסיות עיינות (רגישה, משדה אורגני), תל נוף וחולדה חשף כי הבסיס לעמידות הינו התמרה בעמדה 197 של אנזים ה- ALS מפרולין לתריאוןין (איור 2).

(3) **פיתוח ממשקי הדברה חליפיים** - על מנת לשפר את ממשק ההדברה העומד לרשות החקלאים ובכדי להקשות על טיפוסים עמידים להתבסס הוחלט לבחון תכשירים השייכים למנגנוני פעולה נוספים, ביישום קדם ואחר הצצה. לשם בחינת יעילות הטיפולים החליפיים נבחרה האוכלוסייה העמידה למעכבי ACCase מכפר בלום.

| | 190 | 200 |
|-------------|---------------|-------------|
| S_halepense | LDSVPMVAITGQV | PRRMIGTDAFQ |
| AY1 | | P |
| AY2 | | P |
| HU (R) | | T |
| HU (S) | | P |
| TN (R) | | T |
| TN (S) | | P |

איור 2. השוואת רצפים באתר הגן ALS. רצף הגנום באתר מחומצת אמינו מס' 184 ועד 207, כאשר אותיות שונות מציגות את רצף ה. האמינו, מוצגת עמדה 197 בלבד בכל האוכלוסיות, (P- פרולין, T- תראונין). פרטים רגישים (S) ועמידים (R) מהאוכלוסיות חולדה (HU), תל נוף (TN) ופרטים רגישים מאוכלוסיית עיינות (AY) ולמקטע ידוע של פרט רגיש של דורת ארם צובא *S. halepense*; (LN898464.1).

קדם הצצה: עשרה זרעי דא"צ נזרעו בעציצים $7 \times 7 \times 6$ ס"מ המכילים חול רחובות בעומק 1 ס"מ. התכשירים יושמו קדם הצצה במרסס שולחני, במינונים עולים (0, 1/2X, X, 2X) כאשר X = המינון המומלץ (טבלה 2). בטיפול הסטומפ ה'מתוחח', פני השטח רוססו ולאחר מכן תכולת כל עציץ בנפרד הועברה לשקית ניילון עורבבה היטב ('תוחחה') והוחזרה לעציץ, אל תוך הקרקע המטופלת נזרעו הזרעים כפי שתואר. בטיפול 'קוראל', התוארית הגרגירית, המינון לכל עציץ נשקל בנפרד ופוזר באופן ידני על פני הקרקע. שלשה שבועות לאחר היישום נקצר נוף הצמחים ונשקל משקלם היבש. התוצאות (לא מוצגות) העלו שכל התכשירים מנעו כמעט לחלוטין הצצה של זריעי דא"צ כבר במחצית המינון ומעט הנבטים שהציצו פיגרו בהתפתחותם מאד, ללמדך שאת נבטי הזרעים קל להדביר ועיקר הבעיה היא ההתמודדות עם ההצצות של קני השורש.

אחר הצצה: בעקבות התוצאות המוקדמות (דווח 2017) שהראו כי קיים הבדל משמעותי באופן התגובה שלהם. נבחנו תכשירים שונים הידועים כקוטלי דגניים הן על צמחים שגדלו מקני שורש והן אלה הזרעים. התוצאות בטבלה 2 מצביעות בברור שקוטל הדגניים פרופיזאמיד (קרב) והקוטל הכללי סאפלופנציל (היט) אינם מסוגלים להתמודד עם דא"צ גם אם התחיל מזרעים, בעוד התכשירים האחרים פועלים היטב ופעילותם אף משתפרת כשמוסיפים להם גלייפוסט. נראה לנו שבהקפדה על ממשק הדברה נכון ללא הסתמכות יתר על מעכבי ACCASE ומעכבי ALS, ניתן להתמודד עם דא"צ. תוצאה מעניינת היא השפעת השילוב של טמבוטריון (לאודיס) עם אטרזין שאינם פוגעים בדרך כלל בדא"צ, מדברים באופן סינרגיסטי את העשב כשהם משולבים (טבלה 2).

טבלה 2. השפעת טיפולים נגד דא"צ ביישום אחר הצצה על צמחים שגדלו מקני שורש ומזרעים.

| תכשיר | חומר פעיל | קנה שורש | | זריע | |
|---------|--------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|
| | | התחדשות (%) | משקל יבש יחסי (%) | התחדשות (%) | משקל יבש יחסי (%) |
| סטרייק | Flumioxazin | 100 | 29.8±25** | 80 | 8.4±8.6*** |
| סטרייק+ | Flumioxazin+ | 80 | 9±14.8*** | 0 | 0.4±0*** |
| ראונדאפ | Glyphosate(900) | 25 | 3.5±2.7*** | 0 | 0.4±0*** |
| בסטה 20 | Glufosinate | 0 | 2.1±2.1*** | 0 | 0.4±0*** |
| ראונדאפ | Glyphosate (1080) | 40 | 5.2±4.4*** | 0 | 0.4±0*** |
| ראונדאפ | glyphosate (540) | 100 | 80±36.6 | 60 | 59.9±27 |
| מגלן | propyzamide | 60 | 65.8±46 | 100 | 67.5±38 |
| היט | Saflufenacil | 20 | 2.1±2.1*** | 0 | 0.4±0*** |
| היט+ | saflufenacil(105) | 80 | 5.2±4.3*** | 0 | 0.4±0*** |
| ראונדאפ | +glyphosate(900) | 20 | 1.1±0*** | 0 | 0.4±0*** |
| היט+ | saflufenacil(52.5) | 60 | 16.7±18*** | 0 | 0.7±0.7*** |
| ראונדאפ | +glyphosate(900) | | | | |
| מוניטור | Sulfosulfuron | | | | |
| לאודיס | Tembotrione+ | | | | |
| אטרנקס | Atrazine | | | | |

*כאשר תכשיר ניתן במינונים שונים, המינון מופיע בסוגריים בגרם חומר פעיל להקטר ; ** , *** מציין הבדל מובהק בתגובת הצמחים בהשוואה לטיפול הביקורת, ($P < 0.001$) ו ($P < 0.0001$) - בהתאמה, (לשם ניתוח השונות נבחר מבחן Dunnet).

עמידות מיני ירבוז לק"ע תוצאות - 2018

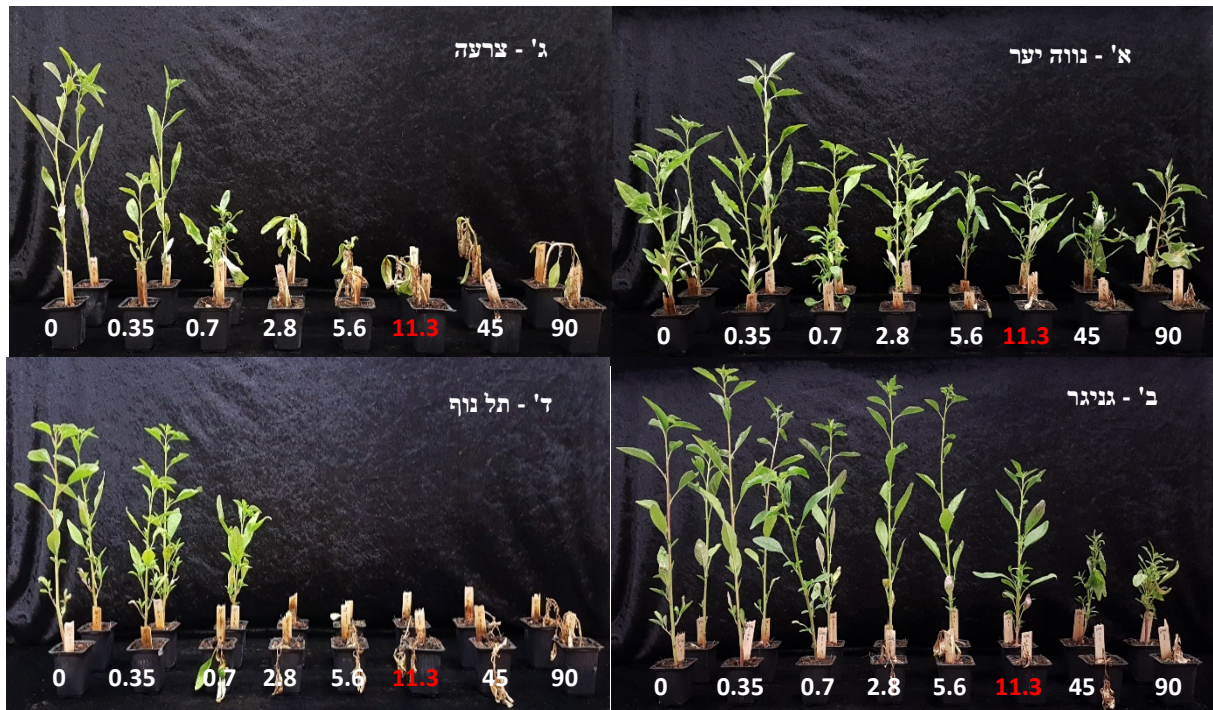
ירבוז הגדות (י.ג.) *Amaranthus tuberculatus rudis* וירבוז פלמרי (י.פ.) *Amaranthus palmeri*, ממשפחת הירבוזיים, הינם צמחים חד שנתיים דו ביתיים המאופיינים בקצב התפתחות מהיר מאוד (C4) בהשוואה לצמחי C3 שהם מרבית גידולי התרבות. צמחים אלו נחשבים לעשבים פולשים במדינת ישראל אשר מקורם ביבשת אמריקה. עשבים אלו בעלי תכונות המקנות להם יכולת להתחרות עם גידולים רבים על המשאבים השונים, לגרום להפחתה ביבול, להעשיר את בנק הזרעים בקרקע ועלולים לגרום נזק כלכלי לחקלאים.

י.ג. וי.פ. בעלי מספר רב של מאפיינים ביולוגיים בעלי פוטנציאל המאפשרים להם לפלוש, להתפשט ולשבש שדות חקלאיים במהירות, הבנת הביולוגיה, המורפולוגיה ומנגוני העמידות שעשבים אלה פיתחו לקוטלי עשבים, תתרום למציאת נקודת התרופה במחזור חייהם שם נמקד את אמצעי ההדברה ותאפשר שימוש מושכל בק"ע בשילוב אגרוטכניקה למניעת הפצת העשבים והפיכתם לאיום ממשי על השדות החקלאיים בארץ.

במטרה ללמוד על רמת השיבוש של ירבוז הגדות בשדות ישראל, נערך סקר מקיף בהסתמך על דיווחים של מדריכים חקלאיים, אנשי שדה ומגדלים. בשנה הראשונה נאספו 20 אוכלוסיות מאתרים שונים ברחבי ישראל. עד כה אופיינו שלשה מוקדי תפוצה עיקריים: צפון הארץ, אזור העמקים, והשפלה, עם זאת נצפו גם מספר פרטים בודדים באזורים שונים בשרון. מרבית האוכלוסיות (85%) נאספו מתוך או על גדות נחלים ומצידי שדות כותנה, תירס, שדות מקשה, חימצה וגזר. שלוש אוכלוסיות (15%) נאספו

מתוך שדות (שדה חמניות, כותנה ותירס). חלק מהאוכלוסיות נאספו בקרבת מקורות מזון כגון בריכות דגים, רפתות, מרכז האכלת עגורים ומרכזי מזון, דבר המרמז על הדרך בה הגיעו הזרעים מלכתחילה לאותם מקומות. בנוסף, חלק מהאוכלוסיות נמצאות בקרבת נחלים, מה שייתכן ועוזר לזרעים להתפשט ברחבי הארץ.

במטרה ללמוד על היקף הבעיה של עשבים עמידים לק"ע, מתבצעת בחינה של תגובת האוכלוסיות לק"ע ממשפחות שונות. עד כה נסרקו 16 אוכלוסיות (מתוך 20 שנאספו) לק"ע השונים. מהסריקות השונות נמצאו שלוש אוכלוסיות (נווה יער-NY01, מגידו-ME01 וגניגר GA02) העמידות למעכבי אנזים ה-ALS (אנבוק= טריפלוקסיסולפורון, סטייפל= פיריטיובאק-סודיום ו אקיפ= פורמסולפורון). שתי אוכלוסיות (גניגר ונווה יער) הראו עמידות או סבילות למעכבי אנזים ה-ALS (טריפלוקסיסולפורון, פיריטיובאק-סודיום) ולכן נבדקה התגובה של האוכלוסיות העמידות ואוכלוסיות רגישות למינונים עולים של התכשירים הנ"ל על מנת לקבוע עקומי תגובה לכל אחת מהאוכלוסיות (איורים 3-4). נמצא כי אוכלוסיית תל נוף וצרעה רגישות לטריפלוקסיסולפורון ונקטלות כבר ברבע מהמינון המומלץ. לעומתן, אוכלוסיות גניגר ונווה יער מתנהגות באופן שונה, כאשר ישנה התפצלות בתגובה לטריפלוקסיסולפורון במינונים השונים. נמצא כי מדד העמידות (טבלה 1) של אוכלוסיות גניגר ונווה יער גדול פי 22 ופי 16 בהתאמה לטריפלוקסיסולפורון ביחס לאוכלוסייה הרגישה (תל נוף).

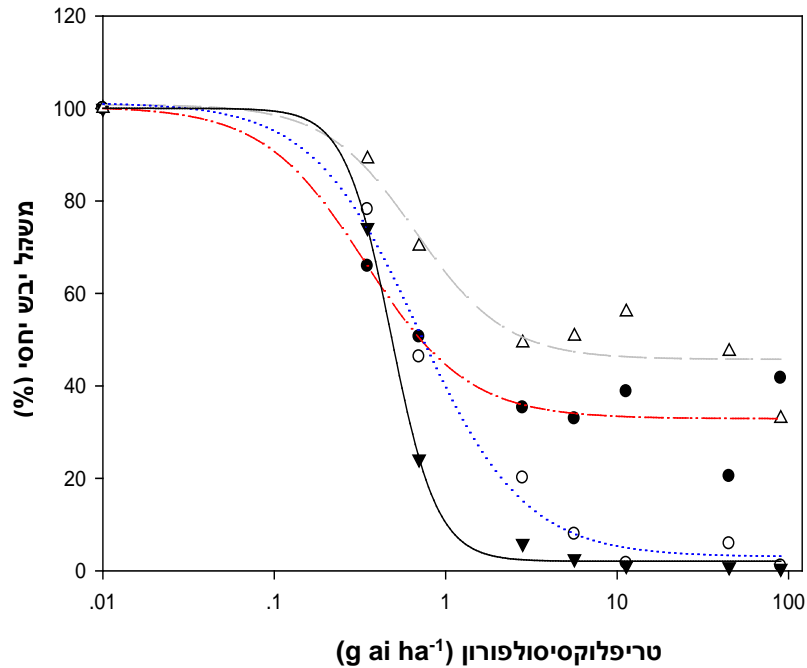


g a.i./ha

איור 3. תגובתם של אוכלוסיות רגישות (צרעה; ג' ותל נוף; ד') ואוכלוסיות עמידות (נווה יער; א' וגניגר; ב') למינונים עולים של קה"ע טריפלוקסיסולפורון=אנבוק. המינון המומלץ ליישום בשדה מודגש בצבע אדום. התמונה צולמה 21 ימים לאחר הריסוס.

טבלה 1. ערכי ED_{50} (g a.i./ha) ו-RI של אוכלוסיות רגישות צרעה ותל נוף ואוכלוסיות עמידות נווה יער וגניגר לק"ע טריפלוקסיסולפורון.

| ממד | תל נוף | צרעה | נווה יער | גניגר |
|-----------|--------|------|----------|-------|
| ED_{50} | 2.1 | 3.07 | 32.93 | 45.76 |
| RI | 1.0 | 1.46 | 15.68 | 21.79 |



איור 3. עקומי תגובה של ארבע אוכלוסיות ירבוז הגדות למינונים עולים של ק"ע טריפלוקסיסולפורון. תל נוף (\blacktriangledown), נווה יער (\bullet), צרעה (\circ), גניגר (Δ). הנתונים הם ממוצע כל טיפול ($n=5$). לכל אוכלוסייה הותאם מודל המתאר את הפחיתה במשקל בעקבות העלייה במינון.

על מנת לבחון את מנגנון העמידות נערך ריצוף של הגן ALS (איור 4) באוכלוסיות מגידו ונווה יער ונמצא כי בפרטים העמידים קיימת התמרה מחומצת האמינו טריפטופאן (Trp) בעמדה 574 לחומצת אמינו ליאוצין (Leu), המקנה עמידות לכל קבוצות ק"ע מעכבי ALS ובעקבות כך לכשל בהדברת העשב. מוטציה זו נמצאה על ידינו בעבר בארץ בירבוז שרוע.

יש לציין שמאחר ואוכלוסיות אלה **לא** נחשפו בארץ ללחץ סלקציה משמעותי של מעכבי ALS, יתכן שהגיעו ממקום מוצאם לארץ כפרטים עמידים. כאן המקום לציין שכל הנראה מדובר על כמה אירועי כניסה לארץ המתאימים לאופי הפיזור של האוכלוסיות שאספנו עד כה: האחד שהגיע לנחל שורק (צרעה ותל נוף) והוא רגיש למעכבי ALS, השני שהגיע לאזור העמקים (נווה יער וגניגר) ונשא איתו עמידויות לכמה קוטלי עשבים והשלישי שחדר לארץ דרך האגמון ואתר האכלת העגורים שתגובתו לקוטלי עשבים טרם נבדקה.