

דו"ח לתכנית מחקר מספר 131-1675-13

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

הגנה על צמחי עגבנייה מפני מזיקים באמצעות הגברת רמת חומצת השומן הלינולנית

Protecting tomatoes from insect pests by over-expressing the linolenic fatty acid

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף פרחים
ע"י

מוראד גאנם, סבטלנה קונצידלוב וגלינה לבדב המחלקה לאנטומולוגיה, מכון וולקני, בית דגן
רבקה ברג, יחיעם זלץ המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, בית דגן

Murad Ghanim, Entomology Department, ARO, Bet Dagan. E-mail:
ghanim@agri.gov.il

Rivka Barg and Yehiam Zalts. Plant Sciences, ARO, Bet Dagan. E-mails:
rivkab@agri.gov.il; ysalts@agri.gov.il

תקציר

הצגת הבעיה

חרקים מזיקים בכלל וזחלי עשי לילה בפרט גורמים לבעיות רבות בהרבה גידולי חקלאיים בארץ ובעולם. הדברת זחלי עשים מתבססת בעיקר על שימוש בתכשירי הדברה כימיים המהווים סכנה לאדם, לסביבה ולאורגניזמים מועילים, ולכן ישנו צורך גובר בפיתוח שיטות הדברה ידידותיות.

המטרה של המחקר

מטרתו העיקרית של המחקר היא בחינת היעילות של צמחי עגבנייה טרנסגניים המייצרים ביתר חומצת השומן הלינולנית (A-18) בהפחתת הנזק של זחלי עשים, על סמך תוצאות הקדמיות שקיבלנו בהם קיבלנו הפחתה מובהקת של נזקם של מספר זחלי עשים כגון פרודניה והליוטיס בנוסף לתריפס, לאחר ביטוי ביתר של הגן FAD3 המביא לעליה ברמת חומצת השומן הלינולנית. מטרה נוספת היא בחינת השפעת ההזנה על צמחים טרנסגניים על מערכת העיכול של זחלי עשים.

שיטות העבודה

הניסויים נעשו במגוון שיטות שכללו שימוש במבחנים ביולוגיים שונים להאכלת חרקים על צמחים מנותקים וצמחים שלמים בעציצים. בנוסף נעשו ניסיונות להאכלת חרקים במצע מזון מלאכותי

לאספקת חומצות השומן. הערכת רמת הנזק לענפים וצמחים בעציצים נעשתה על ידי שקילת הצמחים לפני ואחרי אכילה והערכת הייבול לצמחים בעציצים. ההשפעות על התפתחות החרקים כללו מדידות של מדדי התפתחות שונים בגוף החרק, וניתוח של מערכת העיכול וצביעתה בצבענים שונים לאפיון השפעות על התפתחות מערכת העיכול.

תוצאות עיקריות

בניסויים בכל שלושת שנות המחקר חקרנו את השפעת ההזנה על צמחים טרנסגניים שמבטאים ביתר את חומת השומן הלינולנית לעומת צמחים מטיפוס הבר על הגנה מפני חרקים, וההשפעה של העלאת חומצת שומן זו על פרמטרים התפתחותיים של החרקים החרקים. התוצאות הראו שהעלאת רמת חומצת השומן נתנה הגנה מובהקת הן ברמת העלים, הענפים או הצמחים השלמים בעציצים. בנוסף, העלאת רמת חומצת השומן הלינולנית גרמה להשפיעת מובהקות על נתונים התפתחותיים שונים של זחלי פרודנייה מה שמלמד על כך שהירידה ביכולת האכילה של הזחלים על צמחים קשורה בהשפעות השליליות על התפתחות המזיק.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. פרופ' חנוך זוסנק, הפקולטה לחקלאות
2. פרופ' מוחמד זיידאן, השירותים להגנת הצומח, משרד החקלאות
3. ד"ר יצחק ישעיה, המחלקה לאנטומולוגיה, מכון וולקני

.....
הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

***במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)**

חתימת החוקר  תאריך: 9.3.2016

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

אין

מבוא

חרקים מזיקים בחקלאות מהווים כיום איום רציני בהרבה גידולים חקלאיים וגורמים לנזקים הנמנים בעשרות אחוזים, ובמקרים קיצוניים מאיימים על ענפים חקלאיים שלמים, משום שהם גורמים לנזקים שיכולים להביא לאובדן מוחלט של היבול. אחת הקבוצות החשובות בקרב מזיקים בארץ ובעולם הינה פרפרי לילה כגון פרודניה (*Spodoptera littoralis*), הליוטיס (*Helicoverpa armigera*) שתוקפת מגוון גידולי ירקות, גידולי שדה, צמחי נוי, פרחים, תבלינים, מטעים ועוד. זחלים של מזיקים אלה תוקפים את כל דרגות ההתפתחות של הצמח, ובעיקר אמירי צימוח מה שמעכב באופן משמעותי את התפתחות הצמח. בנוסף אכילה על חלקי צמח לפעמים פוסלת לחלוטין את התוצרת כמו במקרה של גידולי עלים. הדברת זחלי פרפראים מתבססת בעיקר על שימוש בתכשירי הדברה כימיים, הגובים מחיר כלכלי, סביבתי ובריאותי רב. מגוון רחב של קבוצות כימיות משמשות את החקלאים וכוללת חומרים לא סלקטיביים כגון קרבמטים ופרתרואידים, ותכשירים יותר חדשים כמו מווסתי גדילת ירקים שונים. בגלל היקפי הנזק וכמויות תכשירי ההדברה שמשמשים, דרושות היום דרכי התמודדות אחרות ידידותיות עם זחלי עשים אלה. אחת הגישות המבטיחות הינה פיתוח צמחים טרנסגניים המבטאים תוצרים שונים כגון חלבונים או חומרים אחרים שיכולים לקטול או לעכב את ההתפתחות של הזחלים. אכן, כבר הרבה שנים שקיימים גידולים כגון כותנה וסויה המבטאים טוקסינים נגד עשים. במסגרת מחקר קודם יוצרו צמחי עגבנייה טרנסגניים המאופיינים ברמה מוגברת של חומצת השומן הלינולנית הבלתי בלתי רוויה (18:3) באמצעות ביטוי ביתר של הגן *BnFAD3* המקדד לאנזים *fatty acid desaturase3*. אנזים זה מחמצן את חומצת השומן הלינולאית המכילה שני קשרים לא-רוויים (18:2) והופך אותה לחומצה לינולנית בעלת שלושה קשרים כפולים (18:3). בנוסף לערך התזונתי המוכר של החומצה הלינולנית (הידועה כתוסף המזון אומגה-3), מצאנו בסידרת ניסויים שנערכו על עלים מנותקים, שהעלאת רמת ה-18:3 משפרת באופן מובהק את סבילות הצמחים לחרקים לועסים מכרסמים כגון פרודניה, הליוטיס, וכן לתריפס. תוצאות אלה ואחרות הצביעו על קשר ברור וחיובי בין רמת ה-18:3 לבין יכולת הצמחים להתמודד עם חרקים לועסים מכרסמים. אחד ההסברים הסבירים ביותר (אם כי לא היחיד) למתאם זה הוא, שחומצת השומן 18:3 היא סובסטרט המוצא שתוך מספר שלבים הופך להורמון חומצה ג'סמונית, כך שרמה גבוהה יותר של ה-18:3 עשויה להאיץ את קצב הסינטזה של ההורמון, שידוע כמעורב בהפעלת מגנוני התמודדות עם עקות ביוטיות וא-ביוטיות בצמחים, כולל בתגובה לפגיעה הנגרמת על ידי חרקים לועסים מכרסמים דוגמת זחלי פרפראים (Wang et al 2000). אחת הסברות שקיימות היום גם שהרוק המופרש על ידי חרקים בזמן ההזנה על הצמח הוא שמעורר

את תגובת ההגנה של הצמח כולל עירור מסלולי ההגנה של החומצה הג'סמונית והסליצילית (Eichenseer et al., 2010; Howe & Jander, 2008 Hogenhout & Bos, 2001).

במחקר זה ניסו לברר את ההשפעה של חומצת השומן הלינולנית שמקורה בצמחי עגבניה טרנסגנים על הגנה בפני חרקים מזיקים בעיקר פרודניה שהינו מזיק לועס-מכרסם קשה בארץ ובעולם. מצאנו בסדרה של ניסויים בשנות המחקר שחומצת השומן משפיעה באופן מובהק הן על יכולת החרקים להיזון על הצמחים, כאשר בצמחים הטרנסגנים הייתה הגנה מובהקת בהשוואה לצמחי טיפוס הבר שלא ביטאו ביתר את החומצה. בנוסף, לחומצת השומן הלינולנית הייתה השפעה מובהקת על פרמטרים התפתחותיים ומורפולגיים שונים.

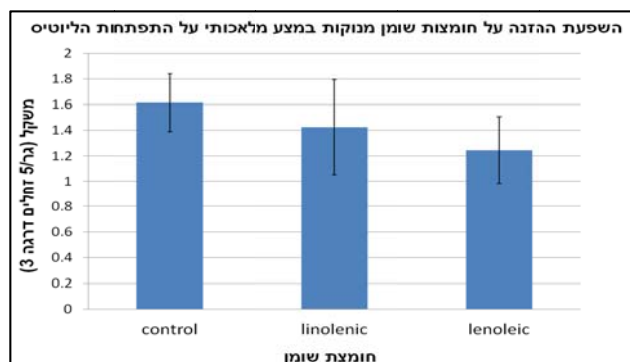
מטרות המחקר

(1) לבחון ברמת הצמח השלם את יעילות העלאת רמת חומצת השומן 18:3 כאמצעי לשיפור הסבילות לנזקי חרקים לועסים ומכרסמים חשובים כולל: פרודניה, הליוטיס, טוטה אבסולוטה ותריפס הפרחים המערבי. (2) לברר את השפעת העלאת רמת ה- 18:3 על המורפולוגיה של מערכת העיכול של פרודניה, הליוטיס, טוטה אבסולוטה ותריפס הפרחים המערבי, בשיטות מיקרוסקופיית אור, מיקרוסקופיה קונפוקאלית ומיקרוסקופיה אלקטרונית חודרת, דבר שיכול לתמוך בהשערה שה- 18:3 גורם לעיכוב באכילה עקב עליה ברמת חלבונים המגינים על הצמח. (3) לחקור את התפקיד של הרוק של פרודניה, הליוטיס וטוטה אבסולוטה בתגובה להזנה על צמחי עגבנייה בהם הועלתה רמת חומצת השומן 18:3 בהשוואה לצמחי ביקורת, ולברר אם פרופיל הביטוי של גנים שמתבטא בבלוטות הרוק של פרודניה בעת ההזנה על צמחים אלה. (4) לחקור את הבסיס המולקולארי לקשר שבין העלאת רמות ה-18:3 לבין ההפעלה המהירה של סינטוז מעכבי הפרוטאזות בתגובה לפציעה.

פירוט עיקרי הניסויים

1. השפעת ההזנה על חומצות שומן במצע מלאכותי

איור 1. משקל של זחלי הליוטיס לאחר חשיפה לחומצת השומן הלינולנית, הלינולאית וללא חשיפה לחומצות שומן במצע המזון המלאכותי למשך 8 ימים לפני שקילתם. לפי התוצאות אין הבדלים מובהקים סטטיסטית בין הטיפולים השונים.



בסט ראשון של ניסויים התחלנו לבדוק אם הוספה של חומצות השומן הנחקרות למצע המזון המלאכותי שמשמש אותנו לגידול של זחלי פרודניה יכול לגרום לשינוי בדפוס ההתפתחות הרגיל של הזחלים על ידי מדידת משקלם בתום הניסוי. באיור 1 ניתן לראות שהוספה של חומצות השומן הלינולנית או הלינולאית איננו משפיע באופן מובהק על משקל הזחלים בהשוואה לביקורת שבה השתמשנו במצע ללא שום תוספת. תוצאה זו מצביעה על כך שכנראה חומצות שומן נקיות לבד אינן גורמות להפרעות מובהקות כלשהן בהתפתחות הזחלים וכי כנראה שמכלול של חומרים, שבהם חומצת השומן הלינולנית כמרכיב עיקרי בצמחים הטרוסגניים בהם הועלתה רמת חומצת שומן זו יכולים לגרום להפרעה בהתפתחות הזחלים.

2. בחינת השפעת ההזנה על טבק בהשוואה לעגבנייה

כיוון שצמח הטבק נחשב לצמח שהרבה יותר קל לעבוד איתו הן מבחינת הגידול הרגיל והן מבחינת יצירת צמחים טרוסגניים, בדקנו אם ההזנה על צמחי טבק על ידי פרודניה תביא לתמותה נמוכה ברת השוואה עם צמח העגבנייה, או שניתן לראות תמותה גבוהה רק מעצם ההזנה על טבק שנחשב גם לצמח טוקסי בגלל תכולת הניקוטין הגבוהה שיש בו. המטרה של ניסויים אלה הייתה להשתמש בצמחי טבק במקום עגבנייה לניסויים השונים במטרה להתקדם יותר מהר במחקר.

טבלה 1. השפעת ההזנה על צמחי עגבנייה מטיפוס הבר (MP-1), עגבנייה עם ביטוי ביתר של חומצת השומן הלינולנית (A-18) וצמחי טבק על התמותה וצבירת המשקל בזחלי פרודניה דרגה 3.

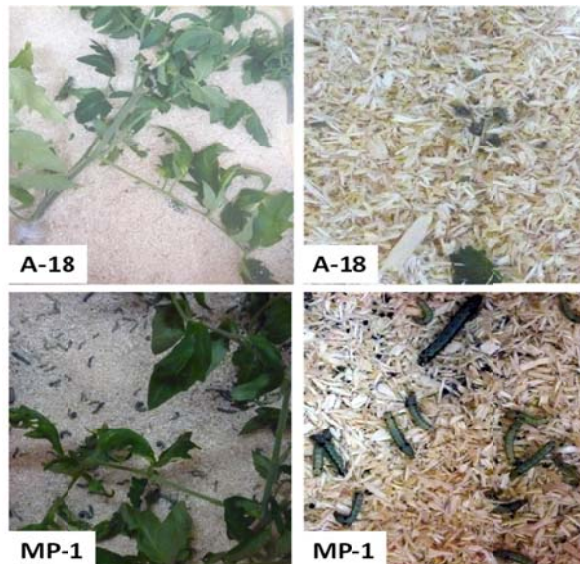
	מספר זחלים דרגה 3	SEM±%, תמותת זחלים		צבירת משקל יחסית לביקורת	
		4 ימים	8 ימים	4 ימים	8 ימים
MP-1	50	20±5a	46±4a	100a	100a
A-18	50	18±6a	38±6a	65±6b	98±5a
טבק	50	30±7b	52±4ab	46±4c	43±4b

כפי שרואים מהתוצאות בטבלה 1, הזנה על טבק גרמה הן לתמותה מובהקת בהשוואה לביקורת, והן לירידה מובהקת בצבירת המשקל. המסקנה היא ששימוש בצמחי טבק טרוסגניים בהם הועלתה או הורדה רמת חומצת השומן הלינולנית איננה אפשרית והניסויים שלנו המשיכו להיות כמתוכנן עם צמחי עגבנייה טרוסגניים בנוסף לטיפוס הבר. מעניין לראות בטבלה 1 שבקו שבו הועלתה רמת חומצת השומן הלינולנית לא הייתה תמותה מובהקת של הזחלים בהשוואה לביקורת של צמחי MP-1, אולם צבירת המשקל הייתה נמוכה באופן מובהק בהשוואה לביקורת

לאחר 4 ימים, אולם נצפתה "התאוששות" וצבירת המשקל לא הייתה שונה באופן מובהק מהביקורת.

3. בחינה ברמת הצמח השלם את יעילות העלאת רמת חומצת השומן 18:3 כאמצעי לשיפור הסבילות לנזקי פרודניה והליוטיס.

בסט זה של הניסויים התחלנו לבדוק את ההתפתחות של זחלי פרודניה החל מהדרגה הראשונה על ענפים גדולים שנותקו מצמחים טרנסגניים המבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית (A-18), בהשוואה לזחלים שהתפתחו על ענפים מצמחי טיפוס הבר (MP-1). המטרה הייתה לבדוק אם במסה של זחלים, הצמח יוכל לעמוד במתקפה כזו או לא, מצב המדמה תנאי שדה. כפי שניתן לראות באיור 2, הזחלים שעומתו עם ענף גדול מצמח שלם טרנסגני (פנל עליון בצד שמאל) בקושי התפתחו ועל מצע הנשורת הם בקושי נראו מה שמעיד על גודלם הקטן (פנל עליון בצד ימין). בביקורת, שבה זחלים מדרגה ראשונה עומתו עם ענפים גדולים מצמחים מטיפוס הבר ניתן לראות שמספר רב של זחלים התפתח לזחלים גדולים (פנל תחתון בצד שמאל) וניתן לראות שהזחלים התפתחו לגדלים גדולים מאוד כפי שניתן לראות על מצע הנשורת (פנל תחתון בצד ימין). שקילות וספירת מספר הזחלים בשני המצבים הראו בבירור תמותה הרבה יותר גבוהה של זחלים שעומתו עם צמחים טרנסגניים לעומת זחלים שגדלו על צמחי ביקורת. בנוסף משקל הזחלים שגדלו על צמחים מטיפוס הבר, כפי שניתן להתרשם גם באיור 2, היה הרבה יותר גבוה ומובהק בהשוואה לזחלים שגדלו על צמחים טרנסגניים.



איור 2. התפתחות זחלי פרודניה מדרגה ראשונה עד דרגה שלישית על צמחים טרנסגניים שמבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית (A-18) בהשוואה לזחלים שהתפתחו על צמחים מטיפוס הבר (MP-1). (1)

4. הזנת זחלים על צמחים טרנסגניים וצמחי ביקורת ומדידת פרמטרים שונים של התפתחות זחלים, גודל, משקל, תמותה ומשקל טרי ויבש של צמחים לפני ואחרי ההזנה של הזחלים.

בניסוי הראשון להלן נבדק האורך והיקף קופסית הראש של זחלים שהועברו לענפים מנותקים מצמחי A-18 המבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית בהשוואה לצמחי ביקורת MP-1. הזחלים הועברו בדרגה ראשונה והמדידות נעשו לאחר יום או שלושה ימים מההגעה לדרגה השלישית. אספקת הענפים לזחלים נעשתה בכל פעם שהזחלים גמרו לאכול את הענפים שנוספו עד שהגיעו לדרגה השלישית, המועד בו נעשו המדידות.

טבלה 2. השפעת ההזנה על ענפי עגבנייה מטיפוס הבר (MP-1) ועגבנייה עם ביטוי ביתר של חומצת השומן הלינולנית (A-18) על אורך הזחל וקוטר קופסית הראש בזחלי פרודניה דרגה 3.

	מספר זחלים דרגה 3	±SEM, אורך הזחלים (מ"מ)		היקף קופסית הראש (מ"מ)	
		1 ימים	3 ימים	1 ימים	3 ימים
MP-1	105	3.2±0.4a	3.8±0.3a	8.3±4a	8.9±2a
A-18	107	1.7±0.5b	1.67±0.3b	3.2±2b	4.1±1b

ניתן לראות מהתוצאות המוצגות בטבלה 2 שאכילה על צמחים המבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית גרמה להתפתחות לקויה של הזחלים שהתפתחות על צמחים אלה בהשוואה לביקורת, וזה מתבטא באורך זחלים ובהיקף קופסית ראש כמעט כפול בזחלים שגדלו על צמחי טיפוס הבר מה שמעיד בוודאות על השפעה שלילית מובהקת על הזחלים.

בניסוי השני שתוצאותיו מוצגות בטבלה 3 נבחן אורך הזמן שעובר עד שזחלים מדרגה ראשונה או מדרגה שלישית מתגלמים, כאשר הזחלים גדלים על ענפים מצמחי A-18 או MP-1.

טבלה 3. אורך הזמן עד להתגלמות של זחלים פרודניה מדרגה ראשונה או דרגה שלישית לאחר הזנה על ענפי עגבנייה מטיפוס הבר (MP-1) ועגבנייה עם ביטוי ביתר של חומצת השומן הלינולנית (A-18).

	מספר זחלים	זמן עד התגלמות (ימים) ±SEM	
		דרגה 1	דרגה 3
MP-1	100	18±1a	10±1a
A-18	103	31±4b	29±5b

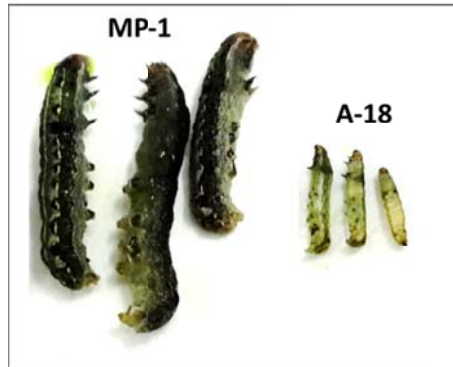
ניתן לראות מהתוצאות המוצגות בטבלה 3 שאורך הזמן עד ההתגלמות של זחלי פרודניה מדרגה ראשונה או זחלים מדרגה שלישית שגדלו על צמחי A-18 היה הרבה יותר ארוך באופן מובהק מזחלים שגדלו על צמחי טיפוס הבר MP-1 דבר המעיד על כך שחומצת השומן הלינולית מעכבת באופן משמעותי את התפתחותם של זחלים אלה.

בניסוי השלישי שתוצאותיו מוצגות בטבלה 4, נבחן המשקל הטרי והיבש של שתילי עגבנייה עם ארבעה עלים או שמונה עלים אמיתיים, ששימשו להזנת זחלי פרודניה מדרגה שלישית למשך שבוע בתנאי מעבדה. הניסוי התבצע בחדרי גידול מבוקרים והזחלים שוחררו על כל עציץ בנפרד כאשר 5 זחלים שימשו להזנה על שתילים עם 4 עלים ו-10 זחלים שימשו להזנה על שתילים עם 8 עלים אמיתיים למשך שבוע. בניסוי זה נבחן גם משקלם של הזחלים ששימשו להזנה, כאשר הם נאספו בתום הניסוי ונשקלו.

טבלה 4. משקל טרי ויבש של שתילי עגבנייה מטיפוס הבר (MP-1) ועגבנייה עם ביטוי ביתר של חומצת השומן הלינולית (A-18) בגיל 4 או 8 עלים אמיתיים ששימשו להזנת זחלי פרודניה דרגה 3 למשך שבוע. גם הזחלים נשקלו בניסוי זה.

	מספר זחלים דרגה 3	משקל טרי (גרם) \pm SEM		משקל יבש (גרם) \pm SEM		משקל זחלים (מ"ג) \pm SEM	
		8 עלים	4 עלים	8 עלים	4 עלים	8 עלים	4 עלים
MP-1	107	15.7 \pm 4a	9.7 \pm 1.6a	7.4 \pm 4a	4.9 \pm 1a	12.3 \pm 3a	5.3 \pm 1a
A-18	103	24 \pm 0.5b	14.6 \pm 0.3 b	11.1 \pm 2b	9.1 \pm 1b	6.9 \pm 1.4a	2.9 \pm 0.7a

ניתן לראות מהתוצאות שלעומת הזנה על צמחים מטיפוס הבר בגילאים שונים בהם הייתה הזנה רגילה וצריכה רבה של העלים שהתבטאו במשקלים הטריים והיבשים, בהזנת הזחלים מצמחים טרנסגניים המבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולית ניתן לראות שהמשקלים הטריים והיבשים של הצמחים היו יותר גבוהים בצורה מובהקת דבר המלמד על כך שצמחים אלה מורידים באופן משמעותי את יכולת הזחלים להיזון מצמחים וזה מתבטא במשקלים הטריים והיבשים של הצמחים. ההזנה המועטה על צמחים טרנסגניים אלה התבטאה גם במשקל של הזחלים שניזונו על צמחים אלה כאשר משקלם היה נמוך באופן משמעותי מזחלים שניזונו על צמחים מטיפוס הבר, ולפעמים המשקל הגיע לכחצי ממשקל הזחלים על הצמחים מטיפוס הבר. באיור 3 ניתן לראות זחלים מייצגים, כאלה שניזונו על צמחי MP-1 ועל צמחי A-18.



איור 3. זחלים מייצגים שניזונו מצמחים טרנגניים A-18 או צמחים מטיפוס הבר MP-1

5. השפעה של הזנת הזחלים על צמחי עגבנייה המבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית על מערכת העיכול של פרודניה בעזרת שיטות מיקרוסקופיה ונבחנה ההשפעה בעזרת צביעות ציטוסקיליטון וצביעות גרעינים ונמדדו מימדי מערכת העיכול תחת הטיפולים השונים.

בניסוי הראשון נמדד היקף מערכת העיכול של זחלי פרודניה דרגה רביעית וחמישית לאחר הזנה על צמחי עגבנייה מטיפוס הבר MP-1 או צמחים טרנסגניים המבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית A-18. על סמך התוצאות של הניסויים הקודמים הסקנו שיכולת ההזנה של זחלים על צמחים טרנסגניים כאלה נפגעת ולכן צפוי שתהיה פגיעה כלשהיא במערכת העיכול. פגיעה כזו יכולה להיות פגיעה מבנית שתבטא במימדי המערכ ובהרכב שלה.

טבלה 5. היקף מערכת העיכול של זחלי פרודניה דרגה רביעית וחמישית שניזונו על צמחי עגבנייה טרנסגניים המבטאים ביתר חומצת השומן הלינולנית החל מהדרגה הראשונה, בהשוואה לזחלים שניזונו על צמחים מטיפו הבר.

	מספר זחלים דרגה 4 או 5	היקף המעי (מ"מ) \pm SEM	
		דרגה רביעית	דרגה חמישית
MP-1	25	$3.7 \pm 1.1a$	$3.1 \pm 1.6a$
A-18	25	$1.4 \pm 0.5b$	$1.3 \pm 0.3b$

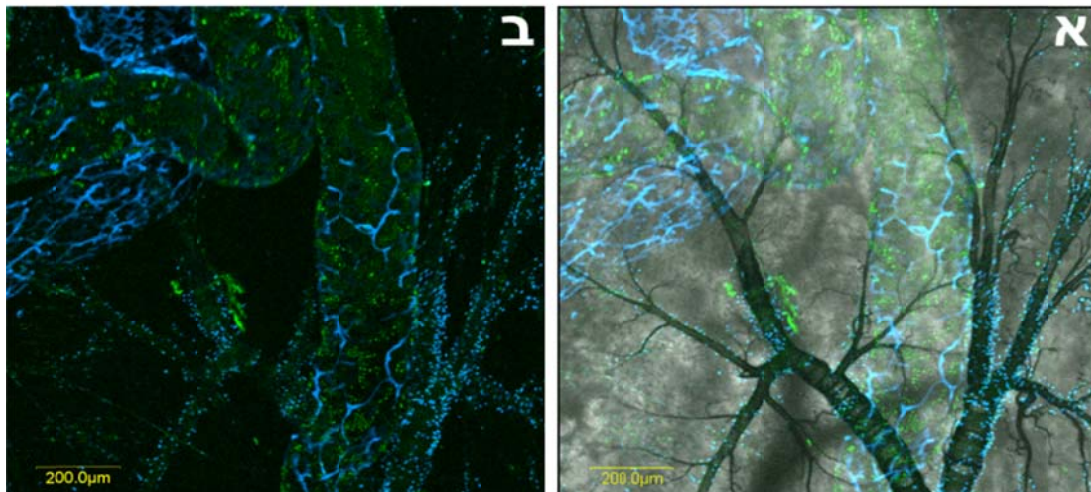
ניתן לראות מהתוצאות בטבלה 5 שאכן חוסר ההתפתחות וההזנה של זחלים מדרגה 4 או 5 על צמחים טרנסגניים A-18 המבטאים את חומצת השומן הלינולנית מלווה גם בהתפתחות לקויה

של מערכת העיכול שהיקפה קטן באופן מובהק מהיקף מערכת העיכול אצל זחלים מאותן דרגות שניזונו על צמחים מטיפוס הבר. באיור 4 ניתן לראות תמונות מייצגות של מעיים שהוצאו מזחלים שניזונו על צמחים טרנסגניים A-18 או צמחים מטיפוס הבר MP-1



איור 4. מעיים שנתחו מזחלים דרגה חמישית שניזונו מצמחים טרנסגניים A-18 או צמחים מטיפוס הבר MP-1

מעיים שנתחו מזחלים שניזונו על צמחים טרנסגניים או צמחים מטיפוס הבר נצבעו בעזרת מרקר ספיציפי הצובע סיבי אקטין phalloidin וצבע DAPI הצובע גרעינים. באיור 5 מובאים מעיים של פרודניה שנתחו ונצבעו בפלואידין וב- DAPI וניתן לראות את הגרעינים וסיבי האקטין.



איור 5. צביעת מעיים של זחל פרודניה דרגה 4 עם פלואידין שצובע סיבי אקטין ועם DAPI שצובע רגעינים. א. תמונה ברקע בהיר. ב. תמונה ברקע שחור.

טבלה 6. כימות של עוצמת הפלורוסנציה של סמן פלואידין הצובע אקטין ו- DAPI שצובע גרעינים במערכת העיכול של זחלי פרודניה דרגה רביעית שניזונו על צמחי עגבנייה טרנסגניים המבטאים ביתר חומצת השומן הלינולנית בהשוואה לזחלים שניזונו על צמחים מטיפו הבר.

	מספר זחלים דרגה 4 שנותחו	עוצמת הפלורוסנציה בהשוואה לביקורת	
		פלואידין	DAPI
MP-1	25	9.1 ±1a	7.7±1.0a
A-18	25	2.1±0.3b	3.7±0.9b

מטבלה 6 ניתן לראות שעוצמת הצביעה בשני הצבענים שהשתמשנו לסיבי אקטין ולגרעינים היא נמוכה באופן מובהק במעיים שנותחו ונצבעו מזחלים שניזונו מצמחים טרנסגניים המבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית, לעומת זחלים שניזונו מצמחים מטיפוס הבר. יתכן והבדל זה נובע מכך שהמעיים מזחלים שניזונו מהצמחים הטרנסגניים הם יותר קטנים כפי שראינו בניסויים הקודמים בהם היקף המעי של זחלים אלה הוא יותר נמוך בהשוואה לביקורת.

השלב הבא של הניסויים נעשה בחדרים מבוקרים במכון וולקני על מנת להעריך את פוטנציאל ההגנה על צמחי עגבנייה שמבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית מהזנה של פרודניה, בהשוואה להזנה על צמחים מטיפוס הבר. הניסוי נעשה בעצמים בחדרים מבוקרים ובגלל המקום המוגבל ומספר הזרעים המוגבל, בכל ניסוי השתמשנו בשישה עצמים, בשלוש חזרות לטיפול ולביקורת (סך הכל 18 עצמים לכל טיפול, צמחים טרנסגניים וצמחים מטיפוס הבר). בכל עציץ גודל צמחי עגבנייה עד לשלב של הפריחה ולאחר מכן שוחררו לכל צמח 20 זחלים של פרודניה בדרגה הראשונה. הערכת הנזק נעשתה כל שבוע למשך חודשיים והתוצאות מוצגות כסיכום של המדדים בחודשיים האלה. רמת הנזק מבוטאת כ- 1 כאשר היא הרמה הכי גבוהה שעל הצמחים כמעט ולא נשארו עלים ו- 5 אמה שבה לא נצפה שום נזק. שקילת הצמחים לאחר תום הניסוי נעשתה על מנת להעריך את פוטנציאל האכילה של הפרודניה. בסוף הניסוי נעשתה הערכה למשקל הפרי שנוצר.

טבלה 6. פרמטרים של התפתחות ויבול של צמחים טרנסגניים שמבטאים ביתר את חומצת השומן הלינולנית בהשוואה לצמחים מטיפוס הבר לאחר הזנה של זחלי פרודנייה

MP-1 ניסוי 3	MP-1 ניסוי 2	MP-1 ניסוי 1	ניסוי A-18 3	A-18 ניסוי 2	A-18 ניסוי 1	
4	4	4	1	1	1	הערכת רמת הנזק בתום הניסוי
1.2±0.2b	1.5±0.2b	1.1±0.7b	3.3±0.9a	3.1±0.1a	3.4±0.4a	משקל טרי ממוצע של כל הצמחים בתום הניסוי (ק"ג)
0.4±0.1b	0.7±0.1b	0.5±0.1b	1.4±0.1a	1.7±0.1a	1.5±0.2a	משקל יבש ממוצע של כל הצמחים בתום הניסוי (ק"ג)
13.3±3b	12.7±2b	10.5±3b	27.5±4a	33.4±5a	27.2±7a	משקל פרי בתום הניסוי (ק"ג)

דיון

מהניסויים שבוצעו במחקר זה ניתן ללמוד בבירור שלחומצת השומן הלינולנית ישנה השפעה מובהקת על התפתחות זחלי פרודנייה, ולפעמים ישנה אפילו גרימת תמותה בקרב הזחלים, מה שמביא גם להגנה על צמחי עגבנייה המתבטא במשקלם ובכמות הפרי שהם מייצרים ונושאים. לפי ההנחה המקורית שלנו, חומצת השומן הלינולנית מהווה שלב ראשון בשפעול מערכות הגנה בצמח נגד פולשים ומזיקים למיניהם. הזנה של חומצות שומן כאלה לבד במצע מלאכותי לא הביאה לאותן השפעות שרואים בצמח השלם, דבר המעיד על כך שיש צורך במערכות צמחיות אחרות המשתתפות בתגובות אלה. הניסיון שלנו להשתמש בצמחי טבק במקום עגבנייה במטרה להקל על הניסויים הראו שטבק לבדו הינו צמח טוקסי ולכן איננו מתאים לניסויים שביצענו. בניסויים אחרים שביצענו, התמקדנו בלימוד ההשפעות שיכולות להיגרם למערכת העיכול של זחלי עשים כתוצאה מהזנה על צמחים טרנסגניים ששימשו אותנו עד כה, וגם בבחינת ההשפעה של זחלים על צמחים טרנסגניים ברמת החממה והצמח השלם. מהניסויים שבוצעו בשנה השנייה והשלישית ניתן ללמוד בבירור שלחומצת השומן הלינולנית ישנה השפעה מובהקת על התפתחות זחלי פרודנייה לא רק ברמת הענפים המנותקים, אלא גם ברמת השתילים והצמחים השלמים. ראינו שאפילו הזנה ברמת הצמח השלם לפעמים נותנת תוצאות הגנה יותר טובות בהשוואה לענפים מנותקים ויתכן שזה נובע מכך שניתוק הענפים גורם לשיבוש או עצירה בייצור חומצת השומן, ולכן השפעתה על הזחלים נפגעת. כל המדדים שנבחנו כולל אורך הזחלים, היקף קופסית הראש, משקל הזחלים והמשקל הרטוב והיבש של הצמחים עליהם ניזונו הזחלים, וגם

כמות הפרי שיוצרה על ידי צמחים אלה הראו שלחומצת השומן ישנה השפעה מאוד מובהקת ונוכחותה גורמת להגנה על הצמח שהיא מובהקת בהשוואה לצמחי ביקורת שלא מבטאים ביתר חומת שומן זו.

בניסויים בהם נבחנה מערכת העיכול מצאנו שיש להזנה על הצמחים הטרנסגניים עם ביטוי יתר לחומצת השומן הלינולנית, יש השפעה שלילית ומובהקת על גודל מערכת העיכול ועל כמות הפלורוסנציה הנמדדת מגרעינים וסיבי אקטין במערכת העיכול.

לסיכום, תוצאות המחקר מראות בבירור שלביטוי ביתר של חומצת השומן הלינולנית בצמחים יש השפעות מובהקות על פרודניה, מזיק חשוב בהרבה מאוד גידולים חקלאיים, כולל עגבנייה. ההשפעות ניצפו בפרמטרים שונים של התפתחות המזיק וגם ברמת הנזק על צמחים, ובסוף כמות הייבול שנמדדה בטיפולים עם ובלי חומצת שומן זה. מכל זה ניתן להסיק ששימוש בחומצת שומן זו על ידי יצירת צמחים טרנסגניים יכולה בהחלט להשתלב עם גישות אחרות להגנה מפני מזיקים, בעיקר פרפראיים.

פירוט מלא של הפרסומים המדעיים

אין עדיין פרסומים

בבליוגרפיה

- Wang C, Zien CA, Afitlhile M, Welti R, Hildebrand DF, Wang X. (2000) Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in arabidopsis. *Plant Cell*. 12:2237-2246.
- Howe GA, Jander G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*. 59:41-66.
- Eichenseer H, Mathews MC, Powell JS, Felton GW. (2010). Survey of a salivary effector in caterpillars: Glucose oxidase variation and correlation with host range. *J. Chem. Ecol*. 36:885–897.
- Hogenhout SA, Bos JIB. (2011). Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr. Opin. Pla. Biol*. 14:422–428.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס ל כל השאלות בקצרה ולעניין , ב- 3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת). (שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. **הערה** : נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

1. מטרת המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

מטרת המחקר כפי שהוצגו בתחילת המחקר היו: (1) ברמת הצמח השלם את יעילות העלאת רמת חומצת השומן 18:3 כאמצעי לשיפור הסבילות לנזקי חרקים לועסים. (2) בירור השפעת העלאת רמת ה- 18:3 על המורפולוגיה של מערכת העיכול של פרודניה, בשיטות מיקרוסקופייה, דבר שיכול לתמוך בהשערה שה- 18:3 גורם לעיכוב באכילה עקב עליה ברמת חלבונים המגינים על הצמח. לגבי שתי המטרות האחרות שהוצגו בהתחלה הומלץ לנו על ידי ועדת השיפוט לא לעסוק בהן אלא אם נשאר זמן ותקציב לקראת סוף המחקר

2. עיקרי הניסויים והתוצאות.

בוצעו ניסויים הקשורים להתפתחות זחלים על צמחים טרנסגניים עם חומצת השומן הלינולנית בהשוואה לצמחי ביקורת וביצענו מדידות שונות כגון אורך הזחלים, היקף קופסת הראש, משקל הזחלים, המשקל הטרי והיבש של צמחים משני הסוגים עליהם ניזונו זחלים, וגם הייבול בכל ניסוי. בנוסף חקרנו את השפעת ההזנה על צמחים טרנסגניים בהשוואה לביקורת על גודל והתפתחות מערכת העיכול אצל זחלי פרודניה על ידי מדידות ישירות ועל ידי צביעות בצבענים לסיבי האקטין ולגרעינים במערכת העיכול.

3. מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו . האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?

מטרות המחקר הושגו והמחקר התקדם כצפוי. מסקנה מדעית חשובה היא שלחומצת השומן הלינולנית יש כנראה השפעה חשובה על התפתחות מערכת העיכול דבר המביא לאכילה מועטה של זחלים על צמחים המבטאים ביתר חומצת שומן זו. כנראה שזו הסיבה לכך שצמחים טרנסגניים עם חומצה זו אינם נפגעים כמו צמחי טיפוס הבר. בסוף זה מתבטא במשקל הצמחים ובכמות הייבול שהם נותנים.

4. בעיות שנתרו לפתרון / או שינויים (טכנולוגיים , שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ;התייחסות המשך המחקר לגבי הן , האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?

מטרות המחקר כפי שהוצבו מההתחלה הושגו בתום תקופת המחקר.

5. הפצת הידע שנוצר בתקופת הדוח : פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי.

עד כה אין פרסומים בכתב

6. פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט ;הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום , תאריך , ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי

עד כה העבודה לא הוצגה בכינוסים מדעיים.

7. פרסום הדוח :אני ממליץ לפרסם את הדוח: סמן אחת מהאופציות ללא הגבלה, בספריות ובאינטרנט

האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי ? לא רלוונטי