

דו"ח סופי לתוכנית מחקר מספר 16-1674-132

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

פיתוח אוכלוסיות מוטנטים של חמנית לקבלת עמידות לעלקת ולקוטלי עשבים היעילים בהדברת עלקת

Development of chemically induced sunflower mutant population for producing resistance to ALS inhibiting herbicides and sunflower broomrape

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

יוסי הרשנהורן – מחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער
יבגניה דור – מחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער
חנה בדני – גידולי שדה ומשאבי טבע, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
שמואל גלילי – גידולי שדה ומשאבי טבע, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Joseph Hershenhorn, Phytopathology and Weed Research, Newe Ya'ar Research Center, ARO,
P.O.B. 1021 Ramat Yishay 30095. E-mail: josephhe@volcani.agri.gov.il

Evgenia Dor, Phytopathology and Weed Research, Newe Ya'ar Research Center, ARO,
P.O.B. 1021 Ramat Yishay 30095. E-mail: evgeniad@volcani.agri.gov.il

Hana Badani, field crops and natural resources, Plant Sciences institute, ARO, P.O.B 5 Bet
Dagan. E-mail: badanih@volcani.agri.gov.il

Shmuel Galili, field crops and natural resources, Plant Sciences institute, ARO, P.O.B 5 Bet
Dagan. E-mail: galilis@volcani.agri.gov.il

תקציר

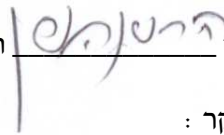
מטרת תוכנית זו היתה הקמת אוכלוסית מוטנטים של חמנית מזן ד.י.3, זן החמניות המוביל בארץ. אוכלוסיית המוטנטים שהוקמה, היתה אמורה להסרק לעמידות לעלקת חמנית. בגלל קשיים בייצור האוכלוסיה המוטנטית המפורטים בהמשך, לא הספקנו לסרוק אותה לעמידות לעלקת שהיא משימה הדורשת זמן רב ושדה נגוע מאד ולכן האוכלוסיה נסרקה רק לעמידות לקוטלי עשבים הקוטלים היטב עלקת. מטרת התוכנית לשנה א היתה יצירת זרעי דור M_2 . בשלב ראשון כיילנו את טיפול המוטגנזה באמצעות EMS) Ethan metham Sulfonate (קבלת קטילה של 80% מהזרעים. לאחר קבלת הריכוז המתאים בוצעו במקביל שתי פרוצדורות שונות: א. ביצוע מוטגנזה על 35,000 זרעים מקולפים והעברתם למשתלות חישתיל ליצירת שתילים לשתילה בשדה ב. ביצוע מוטגנזה על 35,000 זרעים וזריעה ידנית ישירה בשדה (10 זרעים בכל גומת זריעה). שתי השיטות נכשלו. בראשונה לא התפתחו השתילים היטב בשדה ולא יצרו זרעים. בשיטה השניה לא נבטו הזרעים המוטנטים בשדה. לאחר הפקת הלקחים החלטנו השנה לחזור ולבצע את שיטה א. קולפו כ- 50,000 זרעי חמנית שעברו כיול מחודש ב- EMS. הזרעים עברו מוטגנזה והועברו לחישתיל לזריעה.

השתילים שהתקבלו נשתלו הפעם מוקדם הרבה יותר מאשר בשנה הקודמת כדי להמנע מתקופת החמסינים ששיבשה את הניסוי בשנה הראשונה. השתילים נשתלו בחוות עכו. בתום העונה נקטפו הראשים, כל צמח בנפרד, שעברו דייש נפרד ואחר כך גם ניפוי וניקוי הזרעים הריקים. עמדו לרשותנו כ- 7500 שקיות (משפחות) רובם עם כמות קטנה של זרעים (3-1 זרעים). בשנה השלישית ליכדנו את הזרעים של משפחות שמחן היו לנו מעט זרעים כך התקבלו כ- 4000 משפחות שבכל אחת היו 5 זרעים או יותר. הזרעים נזרעו בשדה וגודלו עד לקבלת זרעים רובם לא הציצו או, כך, שבסך הכל התקבלו רק כ- 1000 ראשי חמנית שעברו דייש. במאי 2016 נזרעו הזרעים בשדה וכאשר הצמחים הגיעו לשלב של 6-2 עלים הם רוססו בפולסאר, קוטל עשבים ממשפחת מעכבי ה- ALS (Aceto lactate synthase) הידועים ביכולתם הגבוהה לקטול עלקת, במינון כפול מהמינון המקובל להדברת עשבים בקטניות ועדיין אין תוצאות ברורות. למרות שמשך התוכנית היה שלוש שנים אנו ממשיך במעקב ובריבוי הצמחים שישדרו את הטיפול הכימי לקראת יצירת זן חמנית עמיד לפולסאר.

.....
הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר:  תאריך: 24/5/16

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

Daklo-Keren, M., Cohen, O., Abo-Aklin, W., Berger, V., Sidan, G., Karni, L., Halperin, A.,
Osdechy, M. and Galili, S. (2015). The influence of seed coat removal on water absorption
of sunflower seeds. Nir Vatelem, 60 July 2015:12-15.

3. 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.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

- א. הקמת אוכלוסיית מוטנטים של חמנית.
- ב. סריקה של אוכלוסיית המוטנטים לעמידות לקוטלי עשבים מקבוצת מעכבי האנזים ALS.
- ג. סריקה של אוכלוסיית המוטנטים לעמידות לעלקת החמנית.

עיקרי התוצאות.

כדי להוריד את נפח תמיסת המוטגנזה, בדקנו את השפעת הקילוף על קצב ואחידות ספיחת המים ועל אחוז הנביטה. מצאנו שגרעינים מקולפים סופחים מים בקצב גבוה יותר ואחיד יותר מאשר גרעינים שאינם מקולפים. כמו כן, גרעינים מקולפים נובטים מהר יותר מאשר גרעינים שאינם מקולפים. לאחר שני ניסיונות כושלים הצלחנו לבסוף לקבל אוכלוסיית מוטנטים של חמניות לפצוח המונה כ-1000 משפחות. אוכלוסייה זו נזרעה באביב 2016 בשדה ורוססה במאי 2016 בפולסאר בריכוז כפול מזה המשמש להדברת עשבים בקטניות מספוא. אנחנו מחכים היום לראות האם יתקבלו צמחים עמידים.

מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
ניתן להשתמש בזרעי חמניות מקולפים ליצירת אוכלוסיית מוטנטים בחמניות לפצוח. צמחי החמניות לאחר המוטגנזה התפתחו בקצב איטי יותר וכמעט לא יצרו זרעים, וגם אלה שנוצרו היו ברובם ריקים. אנו מניחים שיכול להיות שהמוטגנזה הייתה חזקה מידי. שתילה של אוכלוסיית המוטנטים עדיפה על זריעה ישירה בשדה, בתנאי שהיא מתבצעת מוקדם יחסית בעונה. השפעת המוטגנזה על צמחי החמניות נפתרה רק חלקית גם בדור M_3 היו לנו בעיות קשות של הצצה ומילוי זרעים. אנחנו מניחים שמוטגנזה מתונה יותר יכולה לפטור את הבעיה.

בעיות שנתנו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר

הבעיה היחידה שנתקלנו בה הייתה התפתחות לקויה של שתילי החמנית. מאחר וצברנו נסיון נראה שהסיבה העיקרית לכך היא שתהליך המוטגנזה גורם לעקה רצינית על כל הצמחים ששורדים את הטיפול. כתוצאה מזה הצמחים מגיבים בצורה האופיינית של התפצלות גבעולים והופעת ראשים רבים וקטנים מה שפוגע במספר הזרעים המלאים לקרקפת. במידה ויתקבלו השנה צמחים עמידים אנחנו נאפיין את העמידות ע"י בידוד וריצוף של הגנים המקודדים לחלבון המטרה (ALS). הצמחים העמידים ירובו לזרעים וייבחנו שוב לעמידות בתנאי שדה.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;

Daklo-Keren, M., Cohen, O., Abo-Aklin, W., Berger, V., Sidan, G., Karni, L., Halperin, A.,

Osdechy, M. and Galili, S. (2015). The influence of seed coat removal on water absorption of sunflower seeds. Nir Vatelem, 60 July 2015:12-15.

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)

x ניתן לפרסם ללא הגבלה

מבוא ותאור הבעיה

חמנית לפצוח, (*Helianthus annuus* L.) מהווה גידול חשוב ורווחי במחזור הזרעים בארץ בהיקף של כ- 100,000 דונם המיועדים בעיקר ליצוא. זן החמנית הנפוץ הוא ד.י.3. בעל גרעין ארוך וכתפים רחבות והוא מהווה כ- 70-80% ממזרע החמנית בארץ. זן זה, כמו רוב זני החמנית המגודלים בארץ, רגיש מאוד לעלקת חמנית (*Orobancha cumana* Wallr.) ובמידה פחותה יותר לעלקת מצרית (*Phelipanche aegyptiaca*) (syn. *O. aegyptiaca*). שדה חמניות מאולח בזרעי עלקת חמנית יניב פחות ויהיה רגיש יותר למחלות ומזיקים מאשר שדה שלא נפגע. ברמת אילוח בינונית וגבוהה פחיתת היבול מגיעה עד לאובדן מלא של היבול. רמת האילוח של קרקעות בארץ המשמשות לגידול חמנית הלכה ועלתה עם השנים. החקלאים ששדותיהם נפגעו מעלקת חמנית זנחו את האדמות הנגועות למרות פוריותן ופנו לאדמות שוליות שיכולן מועט אך אינן מאולחות. (Hershenthorn et al. 2009).

במהלך השנים נעשו ניסיונות חוזרים ונשנים להדביר עלקת חמנית בחמנית באמצעות קוטלי עשבים. קוטלי העשבים המסוגלים לקטול עלקת שייכים כולם למעבכי האנזים Aceto lactate synthase (ALS). זהו אנזים מפתח בסינתזת חומצות האמינו המסועפות ואלין, לאוצין ואיזולאוצין. קוטלי עשבים מעבכי ה- ALS מחולקים לחמש תת קבוצות כימיות. החמנית מגלה סבילות מסוימת רק לתת קבוצת האימידזולינונים ובמיוחד לקוטל העשבים קדרה (Imazapic). בניסויי השדה הרבים שנעשו התברר כי למרות הסבילות של החמנית לקוטל עשבים זה בגיל צעיר, היא רגישה מאוד לחומר בשלב יצירת כפתור הפריחה ולאחריו. ריסוס החומר על כפתורי הפריחה מונע את פתיחתם. ריסוס בשלב מאוחר יותר גורם להופעת קרקפת קטנה ומעוותת ולאחוז גבוה של גרעינים ריקים. יישום קדרה בשלבים מוקדמים של עד 8 עלים אמיתיים אמנם מקטין במקצת את רמת הנגיעות בעלקת, אך מאחר ולא ניתן לחזור על טיפול זה בשלבי גידול מאוחרים יותר, בגלל נזק ליבול, השפעתו של ריסוס ראשון זה זניחה (Ali et al. 2001; Buxbaum et al. 1998; Goldwasser et al. 1999). יישום קוטל עשבים זה דרך הטפטוף נבדק לאחרונה גם הוא אך כנראה שלא יגיע לכלל רישוי בגלל מגבלות בטיחות חמורות לגידול וחוסר הדירות ביכולת ההדברה. בשנים האחרונות הצליחו בעולם לטפח זני חמנית לשמן עמידים לקוטל העשבים פולסאר (Imazamox) שגם הוא שייך לקבוצת ה- Imidazolinons. זנים אלה נמכרים תחת השם Clearfield® ומגודלים בטורקיה בהיקף נרחב עם הדברה כימית יעילה של עלקת החמנית (Süzer and Büyük 2010). גם ברוסיה וסרביה נכנסו זנים אלה לשימוש נרחב וגם שם מושגת הדברה יעילה של העלקת עם קוטל עשבים זה (גלי שי, ידע אישי). בניסויים שערכנו בשנים האחרונות התברר כי זני החמנית לפיצוח רגישים במיוחד לקוטל עשבים זה ולכן לא ניתן להשתמש בו בגידול זה. קיימת הסכמה כללית כי הגישה האופטימאלית לפתרון בעיית עלקת החמנית לאורך זמן הוא שילוב של זנים עמידים לעלקת (Alonso, 1999; Cubero and Moreno, 1999; Goldwasser et al. 1997). לפני כ- 10 שנים הופיעו בשוק המקומי מספר זני חמנית לפיצוח עמידים לעלקת חמנית (שמש, עמר, גיתית ועוד). זנים אלו הראו עמידות סבירה ברוב אזורי גידול החמנית בארץ למעט אזור הגליל העליון, שם רמת העמידות הייתה נמוכה (Eizenberg et al. 2003, 2004; Shay et al. 2003). במהלך השנים, כתוצאה

מהופעת תת אוכלוסיות חדשות של עלקת החמנית, הלכה ודעכה רמת העמידות של הזנים העמידים עד שנשברה כליל ורגישותם לעלקת החמנית חזרה להיות כשל הזנים הרגישים (Joel & Hershenhorn 2008). התהליכים המשולבים של העליה ברמות האילוח של הקרקעות והעלמות העמידות בזנים העמידים הביאה לכך ששטחים נרחבים ששימשו בעבר לגידול חמנית אינם בשימוש יותר בשל נגע זה. לדוגמה, מאז 2010 לא מגדלים יותר חמניות במושבי הנגב בשל התעצמות נגע העלקת. יש לזכור כי בחבל ארץ זה גידלו בעבר למעלה מ-10,000 דונם חמניות מדי שנה.

תופעה דומה התקבלה גם בזני חמנית לשמן עמידים לעלקת חמנית. זני החמנית העמידים הראשונים שפותחו כבר בשנות ה-20 של המאה הקודמת, נשברו על ידי אוכלוסיות עלקת אגרסיביות יותר. תהליך זה של פיתוח זני חמניות שמן עמידות לאוכלוסיות החדשות של העלקת שנוצרו והתפתחות אוכלוסיות שונות של עלקת חמנית שהצליחו לשבור את הזנים העמידים שפותחו נגדם חזר על עצמו עד היום שבע פעמים (Melero-Vara

et al. 2000; Fernández-Martínez et al. 2000, 2004, 2005). לכן, שימוש בזנים עמידים דורש פיתוח מתמיד של זנים עמידים חדשים. משך חייהם של זנים אלה קצר יחסית (7-15 שנים) בגלל יכולתה של העלקת להתגבר על מנגנוני העמידות בהם כפי שקרה במזרח אירופה, טורקיה, ספרד וגם בארץ בשנים האחרונות. אחת האפשרויות לשמירה על העמידות לעלקת בזני חמנית היא פיתוח זנים בעלי עמידות כפולה כנגד עלקת וכנגד קוטל עשבים היעיל בקטילת עלקת תוך שמירה על התכונות של גודל גרעין ויבול. הדרך להחדרת שתי תכונות אלו לזני העילית בארץ בטיפול קלאסי היא ארוכה וקשה במיוחד כאשר המנגנונים הגנטיים לעמידות אינם קיימים או לא ידועים. אחד הפתרונות לקבלת עמידות כפולה בזני העילית בארץ, היא יצירת אוכלוסיות מוטנטים, תוך השריית שונות גנטית ע"י מוטגנזה כימית, וסריקתם לתכונות הרצויות. בהשריית מוטציות ניתן לקבל כל מוטציה שהתקבלה באופן ספונטני, ומוטציות נוספות לאותה תכונה רצויה או תכונות אחרות, שלא התקבלו באופן ספונטני או שהלכו לאיבוד במהלך האבולוציה. בד"כ התכונות הרצויות שמתקבלות כתוצאה מהשריית המוטציות מקודדות ע"י גן רצסיבי בודד, בעוד שתכונות המתקבלות באופן ספונטני במהלך האבולוציה יכולות להיות גם פוליגניות, מצב אידיאלי לשילובן בתוכניות טיפוח (Menda et al. 2004).

סריקה של אוכלוסיית מוטנטים בעגבנייה הניבה קווים עמידים לעלקת (Dor et al. 2010a, 2010b) ולקוטלי עשבים מקבוצת מעכבי ה-ALS (ידע שלא פורסם עדיין). נוסף על כך, לפני שנתיים הקמנו גם אוכלוסיית מוטנטים בחימצה אותה סרקנו לעמידות לפולסאר ויש בידנו מספר מוטנטים פוטנציאליים עמידים. לכן, שימוש בטכניקה זו יכול לתת פתרון לענף בטווח הקצר ללא צורך בהבנה של המנגנון הגנטי העשוי להביא לעמידות. נוסף על כך, כיוון שלהקמת אוכלוסיית המוטנטים בחמניות נשתמש בזן המוביל בארץ מבחינה חקלאית (ד.י. 3), כל התכונות שייסרקו ימצאו באותו רקע גנטי מוצלח מבחינה חקלאית שיאפשר יישום מהיר של התכונות שייסרקו. כמו כן, ניתן ע"י הכלאות בין מוטנטים שונים מאותה אוכלוסיה, באופן קל יחסית, לשלב מספר רב של תכונות רצויות באותו קו (Shah et al. 2009). בטווח הארוך, יצירת מוטנטים עמידים יכולה להוות גם כלי חשוב להבנה של מנגנון העמידות כפי שנמצא במוטנט עגבנייה עמיד לעלקת מצרית (Dor et al. 2010b).

בעבודה זו אנו מציעים לתת פתרון מהיר לבעיית העלקת בחמניות ע"י יצירת אוכלוסית מוטנטים בזן ד.י. 3. אשר תסרק באופן בלתי תלוי לעמידות לקוטלי עשבים מקבוצת מעכבי ALS הידועים ביכולתם הגבוהה

להדביר כימית את העלקת ולעמידות לעלקת החמנית. קוים שימצאו עמידים לקוטלי העשבים יוכלאו (בתוכנית המשך) עם הקוים שימצאו עמידים לעלקת לקבלת זן מסחרי עתיר יבול ועמיד לשתי התכונות גם יחד. בטווח הארוך יותר ניתן יהיה לסרוק את אוכלוסית המוטנטים גם לעמידות לקימחון, רקבון הקרקפת, שבירת מנגנון אי ההתאם להפריה עצמית ותכונות נוספות בעלות חשיבות חקלאית .

מטרות המחקר:

- א. הקמת אוכלוסיית מוטנטים של חמניות.
- ב. סריקה של אוכלוסיית המוטנטים לעמידות לקוטלי עשבים מקבוצת מעכבי ה. ALS -
- ג. סריקה של אוכלוסיית המוטנטים לעמידות לעלקת.

תוצאות

השפעת קילוף הזרעים ואחסונם על אחוז הנביטה וההבדל בדרגת המיום של זרעים מקולפים ושלמים בהשריה במים

תהליך המוטגנזה הינו ארוך מאוד ונמשך למעלה מ- 24 שעות רצופות. דרישת קדם ברורה היא שכל הזרעים המשתתפים בתהליך יחשפו בצורה דומה לחומר המוטגני. במידה ודרישה זו מתקיימת, תהיה התוצאה דומה בכל פעם שנחזור על הטיפול וכמות המוטציות שתצטבר בכל זרע תהיה דומה. בניגוד לחמניות שמן, אחת הבעיות ביצירה של אוכלוסיית מוטנטים בחמניות לפיצוח היא גודל הגרעין, הגורם לכך שמוטגנזה מבוצעת בנפחים גבוהים. פתרון אפשרי לבעיה יכול להיות שימוש בגרעינים מקולפים. לזרעים מקולפים יכול להיות יתרון נוסף בכך שקצב ספיחת המים והחשיפה למוטגן אחיד יותר ומהיר יותר. זרעים מקולפים מתאמים יותר לזריעה ממוכנת במשתלה שתוריד את במידה ניכרת את הוצאות ייצור השתילים. לזרעים מקולפים יכולה להיות בעיה של ירידה ב % הנביטה. לכן, בשלב ראשון בדקנו את השפעת הקילוף על קצב ואחידות ספיחת המים ועל אחוז הנביטה. מצב זה יכול לנבוע מפגיעה פיסית בזרעים, כושר הנביטה של הזרעים יורד כתוצאה מאחסון ממושך או שהזרעים המקולפים רגישים יותר לפגיעה של פתוגניים בקרקע. לכן, כדי למנוע פגיעה פיסית בזרעים במהלך הפיצוח פתחנו טכניקה של פיצוח זרעים מהירה ויעילה שבה אין כמעט פגיעה פיסית בזרעים.

השפעת הקילוף על אחוז הנביטה

השפעת הקילוף על אחוז הנביטה של זרעי חמניות יבשים מובאת בטבלה 1.

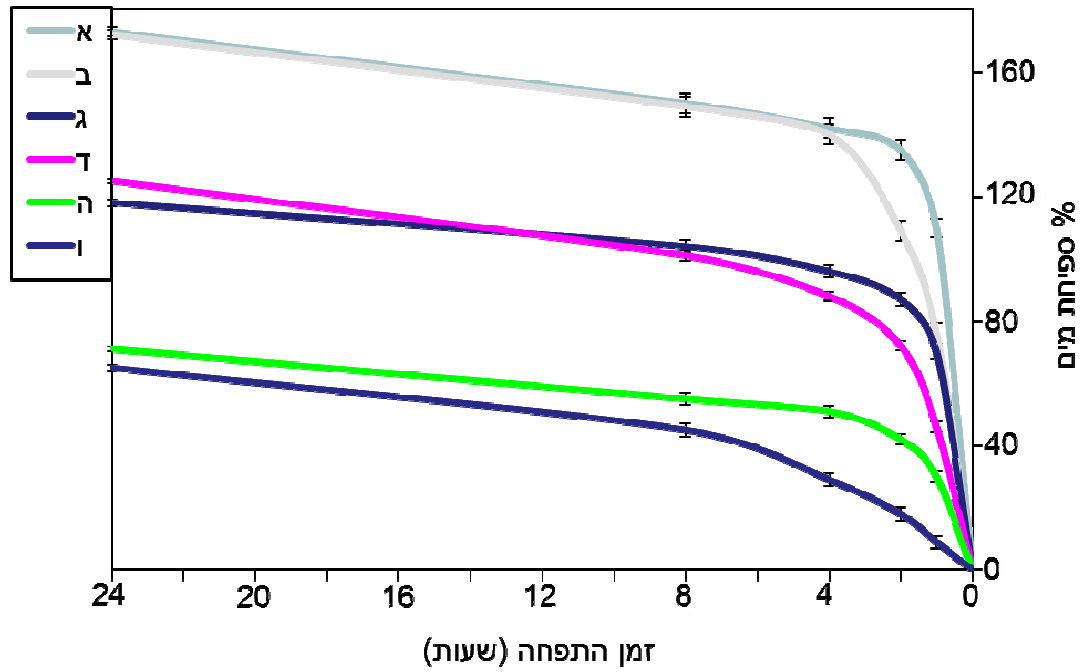
טבלה 1. אחוז נביטה של זרעי חמניות.

א	% נביטה אחרי 5 ימים
שלם	60±2b
מקולף	78±3a
ב	% נביטה אחרי 8 ימים
שלם	91±1.7a
מקולף	90±2.4a

אחרי 5 ימים אחוז הנביטה היה גבוה יותר באופן מובהק בגרעינים מקולפים (78%) מאשר בגרעינים שלמים (60%) (טבלה 1א). לעומת זאת, לא נמצאו הבדלים מובהקים באחוז הנביטה בין גרעינים שלמים (90%) למקולפים (91%) אחרי 8 ימים (טבלה 1ב). נתונים אלה מצביעים על כך שהקילוף לא רק שלא גרם לפגיעה באיכות הנביטה של הגרעינים, אלא גם הגביר את קצב הנביטה שלהם. תופעה דומה התקבלה גם בחמניות פיצוח בעבודות אחרות (Kaya, 2009), בהן נטען שההבדל במהירות הנביטה בין גרעינים שלמים ומקולפים יכול לנבוע מהבדל בקצב ספיחת המים. הנתונים שלנו תומכים במסקנה זו למרות שבגרעינים השלמים ההבדלים בקצב ספיחת המים נמצאו רק בארבע שעות הראשונות, כמות המים שנספחה בזרעים הייתה גבוהה יותר בגרעינים מקולפים לאורך כל זמן הבחינה (איור 1). לעומת זאת, Saranga et al., (1998) מצאו שאחוז הנביטה של זרעי חמניות לפיצוח שלמים מהזן ד.י. 3 היה נמוך יותר מהערכים שהתקבלו בעבודה זו ועמד על 64-68%, בעוד שהערכים של אותם גרעינים מקולפים עמד על 100%. גם כאן נטען שהבדלים אלה בין גרעינים שלמים למקולפים נבעו מכך שקצב צבירת המים גבוה יותר בגרעינים מקולפים מאשר בגרעינים שלמים, כיון שאחוז הנביטה של גרעינים סדוקים היה זהה לזה של גרעינים מקולפים. ניתן להסביר שאחוז הנביטה של גרעינים שלמים שנמצא בעבודה זו, שהיה גבוה ממה שנמצא ע"י Saranga et al., 1998, יכול לנבוע משיפור באיכות הגרעינים של הזן ד.י. 3 המסחרי.

השפעת קילוף של זרעי חמניות פיצוח על נביטה וספיחת המים

השפעת קילוף של זרעי חמניות פיצוח על ספיחת המים מובאת באיור 1.



איור 1. השפעת קילוף של זרעי חמניות על אחוז ספיחת מים בקליפה של גרעין מקולף (א), קליפה של גרעין שלם (ב), גרעין מקולף (ג), גרעין שלם (ד), זרע של גרעין מקולף (ה), זרע של גרעין שלם (ו). הערכים בכל נקודה מציינים ממוצע $\pm$ שגיאת תקן מ-75 חזרות בזמנים 1-8 שעות ו-225 חזרות לאחר 24 שעות. ספיחת המים בזמן 0 קיבלה ערכים של 0.0%.

ניתן לראות מאיור 1. ששני הטיפולים (שלמים ומקולפים) ספחו מים לאורך כל משך הניסוי. בשעתיים הראשונות גרעינים מקולפים ספחו יותר מים באופן מובהק מאשר גרעינים שלא קולפו, ולאחר מכן לא נמצאו הבדלים מובהקים באחוז ספיחת המים בין שני הטיפולים. כאשר בוחנים את ספיחת המים בחלקי הזרע השונים ניתן לראות, שלאורך כל משך הניסוי הקליפה סופחת כמות גבוהה יותר באופן מובהק של מים מאשר הזרע. בסוף הניסוי כמות המים בקליפה הייתה גבוהה פי כ-2.5 מאשר כמות המים בזרע. נוסף על כך, זרעים מקולפים ספחו, לאורך כל הניסוי, באופן מובהק יותר מים מאשר זרעים שלא קולפו, זאת בניגוד למה שהתקבל בזרעי אפונה בה קליפת הזרע ספחה רק כחצי מכמות המים שספחו גרעינים שלמים או מקולפים (Larson, 1967). מצב זה עשוי לנבוע מהבדלים בהרכב הכימי של קליפת הזרע והמסה הכוללת שלהם לעומת המסה של הזרע.

השפעת ההתפחה על אחוז הנביטה מובאת בטבלה 2.

טבלה 2. אחוז נביטה של זרעי חמניות לאחר התפחה.

טיפול	זמן ייבוש	אחרי 5 ימים	אחרי 8 ימים
שלם	0	67±3b	93±2a
	24	67±3b	90±2a
מקולף	0	87±3a	87±2a
	24	94±3a	94±2a

ניתן לראות מטבלה 2 שהגרעינים המקולפים נבטו מהר יותר מאשר גרעינים שלמים גם ישירות לאחר ההתפחה וגם לאחר ייבוש אוויר. ייבוש הגרעינים באוויר למשך 24 שעות לא השפיע על אחוז הנביטה. תוצאה דומה הקבלה גם בזרעי חמניות לשמן (Bailly et al., 2000). צבירת המוטציות תלוי במשך החשיפה של הגרעינים למוטגן. כיוון שהמוטגן חודר לתוך הגרעינים דרך המים ישנה חשיבות למידת האחידות של ספיחת המים ע"י הגרעינים.

השפעת הקילוף על אחידות ספיחת המים

אחד המדדים למדידת האחידות היא חישוב סטיות התקן. ככל שהערך של סטיית התקן יהיה נמוך יותר האחידות תהיה גבוהה יותר. טבלה 3 מראה את ערכי סטיות התקן של חלקי הזרע השונים בשני הטיפולים. כמעט בכל המקרים, למעט גרעינים שלמים אחרי 24 שעות וזרעים לאחר 1-2 שעות, ערכי סטיות התקן היו נמוכות יותר בגרעינים המקולפים מאשר בגרעינים השלמים.

טבלה 3. השפעת הקילוף וזמן ההתפחה על ערכי סטיות התקן.

קליפה		זרע		שלם		זמן (שעות)
מקולף	שלם	מקולף	שלם	מקולף	שלם	
15.1	19.5	14.8	15	8.9	12.4	1
21	23.4	14	11.2	9.3	11.1	2
24.7	34.5	11	15.3	15.7	16.8	4
19.8	27.4	11.4	16	15.3	16	8
28.7	34	14.6	28	15.4	15.4	24

סיכום

גרעיני חמניות מקולפים סופחים מים בקצב גבוה יותר ואחיד יותר מאשר גרעינים שאינם מקולפים. כמו כן, גרעינים מקולפים נובטים מהר יותר מאשר גרעינים שאינם מקולפים, אבל לא נמצאו הבדלים בין שני הטיפולים באחוז הנביטה הסופי. מכאן ניתן לקבוע שלצורך ביצוע מוטגנזה ויצור של אוכלוסיית מוטנטים של חמניות פיצוח יש יתרון בשימוש בגרעינים מקולפים, דבר שיוריד את נפח תמיסת המוטגן ויביא ליעול התהליך לחיסכון בעלויות. למרות השיפור בנביטה אין כאן מקום לשימוש בזרעים מקולפים לזריעות מסחריות.

יצור אוכלוסיית מוטנטים בחמניות

כיוול תהליך המוטגנזה לקבלת אחוז תמותה של 80%

תהליך כיוול המוטגנזה לקבלת אחוז תמותה של 80% בוצע פעמיים. התהליך כלל קילוף הזרעים והשרייתם במים למשך 8 שעות. בתום זמן זה הוספה למים כמות EMS ליצירת הריכוזים הנדרשים של 0.4, 0.7, 1.0, 1.3, 1.6 ו-1.9%. בנוסף הוכנה ביקורת מים שהכילה זרעים ששהו במים במהלך כל התהליך ובנוסף ביקורת יבשה שכללה זרעים מקולפים שלא הושרו כלל. הכלים ובהם הזרעים טולטלו במטלטלת מעגלית במהירות של 100 rpm במשך 12 שעות. בתום תקופה זו הוסרו המכסים של הכלים בהם שהו הזרעים. הכלים כוסו בגוזה והודקו לכלי באמצעות גומייה וצינורית טפטפת הוחדרה דרך הגוזה לכל כלי והכלים נשטפו בזרם חזק של מי ברז במשך 30 דקות. לאחר השטיפה נזרעו כל הזרעים במגשי חישתיל באדמת שתילה והוחזקו בבית רשת במשך חודש לקבלת אחוז הנביטה. התוצאות ניתנות בטבלה 4. לאחר קבלת התוצאות של הניסוי הראשון נערך ניסוי שני באותם תנאים אלא שהפעם שינינו את ריכוז ה-EMS לתחום צר שתאם את תחום הריכוז שגרם לכ- 80% תמותה בניסוי הראשון. תוצאות ניסוי זה ניתנות בטבלה 5.

טבלה 4: אחוז הנביטה של זרעי חמנית מקולפים ששהו בטווח רחב של ריכוזי EMS

ריכוז EMS (%)	נביטה (%) מביקורת)
ביקורת יבשה	90.35±4.73
0 ביקורת רטובה	100 (=76%)
0.4	84.21±4.97
0.7	40.35±7.12
1.0	18.42±1.88
1.3	7.89±3.26

0.0±0.0	1.6
0.88±1.00	1.9

טבלה 5: כיול תהליך המוטגנזה לקבלת 80% תמותה בתחום צר של ריכוזי EMS

ריכוז EMS (%)	נביטה (%) מביקורת רטובה)
ביקורת יבשה	90.35±4.73
0 ביקורת רטובה	100 (=61%)
0.5	26.6±4.97
0.6	40.2±7.12
0.7	34.8±1.88
0.8	63.1±3.26
0.9	23.9±0.0
1.0	22.8±1.00

טבלה 6: תוצאות המוטגנזה שבוצעה להכנת שתילי חמנית

ריכוז EMS (%)	נביטה (%) מביקורת רטובה)	תמותה (%) מביקורת רטובה)
ביקורת יבשה	73.3	
ביקורת רטובה	68.0	
1%	17.6	83.4

טבלה 7: תוצאות המוטגנזה שבוצעה לזריעת הזרעים בשדה

טיפול	נביטה (%) מביקורת רטובה)	תמותה (%) מביקורת רטובה)
ביקורת יבשה	43.16.2	-
ביקורת רטובה	25±10.7	-
טיפול מוטגנזה	4.2±0.0	83.3

הכנת הצמחים המוטגניים

כדי שלא לאבד עונה, החלטנו לבצע במקביל את המוטגנזה והכנת הצמחים בשתי שיטות שונות. בשתי השיטות טיפלנו בכ- 40,000 (8.8 ק"ג) זרעים מקולפים של חמנית מזן ד.י.3. בשתי השיטות תהליך המוטגנזה היה דומה. בשלב הבא היה שוני בין שתי השיטות: 1. הזרעים הובאו למשתלת חישתיל ושם נזרעו 3 זרעים לתא באמצעות מכונה אוטומטית. כאשר הצמחים הגיעו לגובה של כ- 15 ס"מ, הם הובאו לשדה בחוות עכו ונשתלו ידנית בשורה אחת לערוגה ובמרחק של 40 ס"מ בין השתילים. 2. הזרעים שעברו מוטגנזה הובאו בתום התהליך לחוות עכו ושם נזרעו ידנית 11 זרעים לבור זריעה בשורה אחת ובמרווחים של 40 ס"מ בין הבורות. בשתי השיטות, לאחר סיום ביצוע המוטגנזה נלקחו דוגמאות זרעים לבחינת אחוז התמותה בעקבות הטיפול וכן הוכנו ביקורת רטובה (זרעים שהושרו במים במהלך כל תהליך המוטגנזה) וזרעים יבשים (טבלה 6 ו-7). בשני ניסויי הכיול, תחום ריכוזים רחב ותחום צר התקבלה תוצאה דומה (טבלה 4 ו-5). ריכוז EMS של 1% גרם לתמותה בשיעור 80%. טווח התמותה אותו הגדרנו כמטרת המוטגנזה. בשני הניסויים בהם הכנו את הזרעים לשדה או למשתלה התקבלה תוצאה דומה של כ- 80% תמותה (טבלה 6 ו-7).

הכנת שתילים מוטגניים בחישתיל – תהליך הנביטה והכנת השתילים התנהל כשורה (תמונה 2). הצמחים שעברו "הלם" מטיפול המוטגנזה התפתחו באיטיות רבה והיו מוכנים לשתילה בשדה רק בסוף חודש מאי. ביום השתילה בשדה שררה טמפ' גבוהה מאד (חמסין) והצמחים נפגעו קשה מהחום והקרינה. התפתחותם נפגעה והם החלו מיד להתפצל למספר ראשים ונשארו ננסיים. הראשים נבדקו מספר פעמים ונמצא כי הזרעים שיצרו ריקים (תמונה 3). בעקבות התוצאות הושמדו הצמחים.

זריעת זרעים ישירות בשדה – הזריעה התבצעה בתנאים מיטביים. אך גם לאחר תקופה ארוכה, לא החלה נביטה בשדה. בבדיקות חוזרות ונישנות נמצאו זרעים מרקיבים בחורי הזריעה. הסיבה לכך היא כנראה שאחוז הנביטה הנמוך מאד של הזרעים שעברו את טיפול המוטגנזה. בדוגמאות הזרעים שהוצאנו והביקורות המתאימות שהוצבו מראות כי אחוז הנביטה של הביקורת הרטובה הגיע ל- 25%. המוטגנזה היתה אמורה לגרום לתמותה של 80% מהזרעים ואמנם כך היה. רק 4% מהזרעים המטופלים נבטו. תוצאות אלה התקבלו בבתי הרשת של נוה יער, בתנאים אופטימליים. בשדה, רק 4% מהזרעים היו אמורים לנבט. אך בשדה התנאים אינם אופטימליים ולכן אחוז הנביטה האמיתי היה עוד הרבה יותר נמוך וכך לא התקבלו גם בשיטה זו נביטות בשדה.



תמונה 2. בביטת זרעי חמניות מהזן ד.י. 3 לאחר מוטגנזה כימית שגעשתה על זרעים מקולפים.



תמונה 3. אוכלוסיית ראשונה של מוטנטים של חמניות מהזן ד.י. בחוות עכו לאחר השתילה.



תמונה 4. זריעה של אוכלוסיית המוטנטים השנייה של חמניות מהזן ד.י. בחוות עכו לאחר השתילה.
א. זרעים לאחר מוטגנזה, ב. זריעה בשדה, ג. זרעי חמניות בקן הזריעה.

בגלל הכישלון של שתי האוכלוסיות הראשונות החלטנו לחזור שוב על הכיולים ולהכין אוכלוסייה נוספת שתישתל במועד מוקדם יותר מאשר האוכלוסייה הראשונה כך שהתנאים בשדה יהיו יותר מתאימים. תהליך הנביטה והכנת השתילים התנהל כשורה כמו בהכנת האוכלוסייה הקודמת. הצמחים נזרעו מוקדם במשתלה והיו מוכנים לשתילה בשדה בחודש מרץ (כחודשיים מוקדם יותר מאשר באוכלוסייה הראשונה). הצמחים נקלטו יפה (תמונה 5). למרות הקליטה הטובה ההתפתחות שלהם הייתה מוגבלת בגלל הטיפול והם יצרו ראשים קטנים מפוצלים ואחז הזרעים המלאים היה מאוד נמוך וברוב המקרים כ-1-0.5%. כל ראש עבר דיש נפרד

ועזרת מכונה מיוחדת הצלחנו לנקות מכל שקית את הזרעים הריקים. בסה"כ נשארנו עם כ-7000 משפחות, כאשר ברוב המשפחות נשארו 1-3 זרעים. כל בזרעים נזרעו ידנית בשדה לריבוי. גם בזריעה הזו היו עדין בעיות הצצה וחנוטה של הצמחים, כך שחלק גדול מהם לא נבטו וגם באלה שנבטו כמות הזרעים המלאים הייתה נמוכה. בסופו של דבר נשארנו עם כ-1000 משפחות שנזרעו בשדה בשנת 2016 ורוססו במאי 2016 בפולסאר לאיתר צמחים עמידים. אנו מצפים לראות בשבועות הקרובים האם התקבלו צמחים עמידים. במידה ויתקבלו צמחים עמידים בתוכנית המשך אנחנו נרבה אותם ונאפיין אותם מולקולארית לראות האם המוטציה שמקנה את העמידות נמצאת כגן המקודד לאנזים ALS.



תמונה 5. אוכלוסיית המוטנטים של חמניות מהזן ד.י. בחוות עכו.

מקורות

Alonso, L. C. 1999. Resistance to *Orobanche* in sunflower: mechanisms of resistance in the host plant/*Orobanche* system. In: Cubero, J. I., Monero, M. T., Rubiales, D and Sillero, J. eds., Resistance to *Orobanche*, The State of Art, Cordoba, Spain. Pp. 124-137.

Aly, R., Goldwasser, Y., Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Golan, S. and Kleifeld, Y. 2001. Sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) control in sunflower (*Helianthus annuus*) with imazapic. *Weed Technol.* 15: 306-309.

Buxbaum, H., Blumenfeld, T., Golan, S., Chilf, T., Hershenhorn, J., Ali, R. and Kleifeld, Y. 1998. Broomrape control in sunflower, Alonim, 1998. *Gan Sadeh Va Meshek* 12: 43-45 (in Hebrew).

Cubero, J. L. and Moreno, M. T. 1999. Studies on resistance to *Orobanche crenata* in *Vicia faba* : In: Cubero, J. I., Monero, M. T., Rubiales, D and Sillero, J. eds., Resistance to *Orobanche*, The State of Art, Cordoba, Spain. Pp. 124-137.

Dor, E., Alperin, B., Wininger, S., Ben-Dor, B., Somvanshi, V. S., Koltai, H., Kapulnik, Y. and Hershenhorn, J. 2010a. Characterization of a novel tomato mutant resistant to the weedy parasites *Orobanch*e and *Phelipanche* spp. *Euphytica* 171: 371-380.

Dor, E., Yoneama, K., Wininger, S., Kapulnik, Y., Dor, E., Yoneama, K., Koltai, H., Xie, X., and Hershenhorn, J. 2010b. Strigolactone deficiency confers resistance in tomato line *SL-ORT1* to the parasitic weeds *Phelipanche* spp. and *Orobanch*e spp. *Phytopathology* 101: 213-222.

Eizenberg, H., Hershenhorn, J. and Ephrath, J. E. 2009. Factors affecting the efficacy of *Orobanch*e *cumana* control in sunflower. *Weed Res.* 49: 308-315.

Eizenberg, H., Plakhine, D., Hershenhorn, J., Kleifeld, Y. and Rubin, B. 2003. Resistance to broomrape (*Orobanch*e spp.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is temperature dependent. *J. Exp. Botany* 54: 1305-1311.

Eizenberg, H., Plakhine, D., Hershenhorn, J., Kleifeld, Y. and Rubin, B. 2004. variation in responses of sunflower cultivars to the parasitic weed broomrape. *Plant dis.* 88: 479-484.

Fernández-Martínez, J. M., Melero Vara, J. Muñoz Ruz, J. Ruso, J. and Domínguez J. 2000. Selection of wild and cultivated sunflowers for resistance to a new race of broomrape which overcomes resistance of the *Or5* gene. *Crop Sci.* 40:550–555.

Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B. Akhtouch, L. Velasco, L. Muñoz-Ruz, and

J. M. Melero-Vara J. M. 2004. Registration of four sunflower germplasms resistant to race F of broomrape. *Crop Sci.* 44:1.

Fernández-Martínez, J. M., Velasco, L. and Pérez-Vich B. 2005. Resistance to new virulent *O. cumana* races. p. 27–28. p. 17–18. In: A. Murdoch (ed.), *Abstr. COST849 Meeting on Broomrape Biology, Control and Management*, Univ. Reading, Dept. Agri., UK, 15–17 Sept. 2005. <http://cost849.ba.cnr.it/Abstracts%20Reading%202005.pdf>

Goldwasser, Y., Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Ali, R., Plakhine, D., Blumenfeld, T., Buxbaum, H., Golan, S., Chilf, T. and Kleifeld, Y. 1999. Broomrape control in sunflower. *Gan Sadeh Va Meshek* 8: 17-19 (in Hebrew).

Goldwasser, Y., Kleifeld, Y., Plakhine, D. and Rubin, B. 1997. Variations in vetch (*Vicia* spp.) response to *Orobanch*e *egyptiaca*. *Weed Sci.* 45: 756-762.

Gontcharov, S. V., Antonova, T. S. and Araslanova, N. M. 2004. Sunflower breeding for resistance to the new broomrape race. *Helia* 27: 193-198.

Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Dor, E., Kapulnik, Y. and Goldwasser, Y. 2009.

Phelipanche aegyptiaca management in tomato. *Weed Res.* 49: 34-47.

Joel, M. D. and Hershenhorn, J. 2008. Characterization of sunflower broomrape races in Israel. *Mashov Haklout* 230: 65-66 (in Hebrew).

Joel, M. D., Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Aly, R., Ejeta, G., Rich, P. J., Ransom, J. K., Sauerborn, J. and D. Rubiales 2007. Biology and Management of Weedy Root Parasites. Hort. Rev. 33: 267-349.

Menda, N., Semel, Y., Peled, D., Eshed, E. and Zamir, D. 2004. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. Plant J. 38: 861–872.

Melero-Vara, J. M., Domínguez, J. and Fernández-Martínez J, M. 2000. Update on sunflower broomrape situation in Spain: racial status and sunflower breeding for resistance. Helia 23:45–56.

Shah, T. M., Hassan, M. U., Haq, M. A., Atta, B. M., Alam, S. S. and Hina Ali, H. 2009. Evaluation of cicer species for resistance to ascochyta blight. Pak. J. Bot. 41: 1945-1955.

Shay, G., Lande, T., Achdary, G. and Hershenhorn, J. 2003. Resistance of Israeli sunflower varieties to sunflower broomrape. *Gan Sadeh Va Meshek* 4: 11-12 (in Hebrew).

Süzer, S, and Büyük, H. 2010. Residual effects of spraying imidazolinone-family herbicides on Clearfield® sunflower production from the point of view of crop rotation. Helia 33:25- 36.