

לימוד השונות הגנטית בצבע הפרח ותגמול הצוף באוכלוסיות של **בן-חרדל מצוי** ומידת
השפעתה על התנהגות מאביקים בתנאי תחרות בין ותוך מינית

דו"ח מחקר לתוכנית 14-0924-261

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף אקולוגיה חקלאית

על ידי:

ד"ר עוז ברזני	חוקר ראשי, המכון למדעי הצמח, בנק הגנים לצמחי א", מרכז וולקני
פרופ' שרונה שפיר	המחלקה לאנטומולוגיה, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה, האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות
ד"ר ארנון דג	המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, תחנת ניסיונות גילת
ד"ר אפרים לווינסון	מכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, נווה יער
ניר חנין	מהנדס מחקר, המכון למדעי הצמח, בנק הגנים לצמחי א", מרכז וולקני
עינת בר	מהנדסת מחקר, מכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, נווה יער
טל ארז	תלמידה לתואר שני, המחלקה לאנטומולוגיה, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה, האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות

Dr. Oz Barazani, Institute of Plant Sciences, Dept. of Vegetable Research, Israel Plant Gene Bank, Volcani Center. E-mail: barazani@agri.gov.il

Prof. Sharoni Shafir- B. Triwaks Bee Research Center, Department of Entomology, Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food, and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot

Dr. Arnon Dag, Institute of Plant Sciences, Agricultural Research Organization, Gilat Research Station

Dr. Efraim Lewinsohn, Institute of Plant Sciences, Dept. of Vegetable Research, Agricultural Research Organization, Neve Yaar Research Station

Nir Hanin, Institute of Plant Sciences, Dept. of Vegetable Research, Israel Plant Gene Bank, Volcani Center

Einat Bar, Institute of Plant Sciences, Dept. of Vegetable Research, Agricultural Research Organization, Neve Yaar Research Station

Tal Erez, M.Sc. student, Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food, and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot

אוגוסט 2015

אב תשע"ה

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר הראשי: 

1. תקציר: אוכלוסיות של *בן-חרדל מצוי* (מצליבים) לאורך אזור התפוצה של המין בארץ נבדלות במופע צבע עלי הכותרת, כשמופע/אקוטיפ הבהיר אופייני לבתי גידול יובשניים ומופע צהוב לבתי גידול ים-תיכוניים. בשנת המחקר הראשונה התמקדה העבודה בבחינה של הבסיס הגנטי של צבע עלי הכותרת באוכלוסיות של *בן-חרדל מצוי*. בשנה השנייה נבחנו ההבדלים הפנוטיפיים בין מופע הפרח הצהוב והבהיר: נקבע גודל הפרח ונמדדה כמות הצוף הזמינה בשני מופעי הפרחים (תגמול). כמו כן מצאנו שתי שטות להערכת צבע עלי הכותרת, האחת באמצעות סריקה וקביעת רמת הרוויה (סטורציה) והשנייה באמצעות ספקטרופוטומטר. בשנת המחקר הנוכחית בוצעו מערכי ניסוי שבהם נבחנו יכולת דבורי דבש להבחין בין מופע הפרח הצהוב והבהיר בניסויים בתחרות תוך ובין מינית; כל הניסויים לוו בבחינת צבע הפרחים. במערכות ניסוי נוספות נבחנה יכולת ההבחנה של דבורי הדבש לריחות המשתחררים מהפרחים של שני המופעים באמצעות ניסויי העדפה ומבחן של התניית שלפית לשון. דו"ח זה מסכם את התוצאות שהתקבלו במערכות ניסוי אלו ובהתייחס לתוצאות שדווחו בשנתיים הראשונות של המחקר.

2. מבוא: מינים השייכים למשפחת המצליבים הם מרכיב דומיננטי באוכלוסיות צמחים בשטחים פתוחים בישראל, ובעונת הפריחה מהווים מקור צוף ואבקה חשוב לדבורי דבש. למרות זאת, עדיין לא ברורים לעומקם הקשרים שבין מיני מצליבים למאבקהם וכיצד אלו תורמים להצלחתם הרבייתית של צמחים בבתי גידול שונים. בצמחים המואבקים על ידי בעלי חיים יש למורפולוגיה של הפרח תפקיד חשוב בהתנהגות מאבקים פוטנציאליים ובהצלחה הרבייתית וכשירות הצמח (fitness). לכן, בצמחים בהם יש תלות בהאבקה על ידי בעלי חיים, התנהגותם של המאבקים מהווה לחץ סלקציה על תכונותיו של פרח [1]. מלבד תכונות מורפולוגיות של מבנה וצבע הפרח, לחומרים נדיפים (Volatile Organic Compounds, VOCs) וחומרים משניים בצוף הפרח השפעה על התנהגותם של מאבקים [4-7]. במיני צמחים ממשפחת המצליבים, כמו *בצנון מצוי* [2], קיימת שונות גנטית המתבטאת בצבע עלי הכותרת בין ובתוך אוכלוסיות. מכיוון שצבע הפרח מהווה גורם משיכה וזיהוי עבור חרקים מקבוצות שונות, הרי שלתכונה זו קיימת השלכה על ההצלחה הרבייתית של צמחים הן בבתי גידול טבעיים והן באקוסיסטמות חקלאיות.

לאורך גבול התפוצה של *בן-חרדל מצוי* (מצליבים) בבקעת הירדן, קיימת שונות בצבע עלי הכותרת (איור 1). שכיחותם של פרטים צהובים גבוהה יותר באוכלוסיות הצפוניות, בהם מהווים צמחי *בן-חרדל מצוי* אחוז נמוך מכלל כיסוי הצמחייה וחשופים לתחרות בין-מינית. באוכלוסיות שבגבול התפוצה הדרומי, שכיחים יותר צמחים בעלי מופע (morph) בהיר (קרם), בבתי גידול בהם *בן-חרדל מצוי* מהווה את המין השליט. לפיכך, אנו משערים כי מקסימיזציה של כשירות מבוקרת באמצעות גורמי משיכה/דחייה והתגמול של הצמח, שלהם תפקיד חשוב בהצלחתם של גנוטיפים בבתי גידול שונים ובהתאם לכך למידת השפעתם על ביקורי מאבקים. *בן-חרדל מצוי* הוא צמח בעל אי-התאם עצמי והאבקה שלו מתבצעת על ידי חרקים. בתצפיות שערכנו בטבע ראינו כי הוא מבוקר בעיקר על ידי דבורי דבש, דבורי בר, פרפרי לבנין וחיפושיות הניזונות על אבקה.



איור 1. צמחים של *בן-חרדל מצוי* בבית גידולם הטבעי. צמח בעל מופע פרח בהיר בדורם בקעת הירדן (ימין) וצמח בעל מופע פרח צהוב בסביבה תחרותית בצפון אזור התפוצה (שמאל).

בשנת המחקר הראשונה הוכח הבסיס הגנטי לצבע בפרחים מאוכלוסיות של *בן-חרדל מצוי* (דו"ח מחקר 2014). בשנה השנייה נבחנו ההבדלים הפנוטיפיים בין מופע הפרח הצהוב והבהיר: נקבע גודל הפרח ונמדדה כמות הצוף הזמינה בשני מופעי הפרחים (תגמול). בשנת מחקר זו התמקד המחקר באפיון ההבדלים הפנוטיפיים שבין מופע הפרח הבהיר והצהוב ובמערכות ניסוי שונות נבחנה העדפה של דבורי דבש לכל אחד מהמופעים. לצורך הניסויים השתמשנו בשתי קבוצות זרעים:

א. זרעים שמייצגים את האוכלוסייה המדברית והים-תיכונית הנבדלות בצבע עלי הכותרת (איור 1). מאגר זרעים זה נבנה תחת תנאים אחידים במרכז וולקני [8].

ב. זרעים שמייצגים קווים מיוצבים של מופע פרח בהיר וצהוב. מאגר זרעים זה נבנה במהלך שלוש שנות המחקר בתהליך של ברירה של ארבעה דורות, בהם נבררו צמחים בעלי מופע פרח בהיר ומופע פרח צהוב. בכל דור הוכלאו צמחים מכל קבוצת צבע לייצור של קווים מיוצבים למופע הצבע (איור 2).



איור 2. גבעולי תפוחת של *בן-חרדל מצוי* משני קווים מיוצבים המייצגים פרחים בעלי צבע בהיר וצהוב, תוצרי ברירה של שלושה דורות.

בשנת המחקר השנייה חיזקנו את הבנתנו על ההבדלים הפנוטיפיים שבין פרחים של שני המופעים באמצעות מדדים שכללו את גודל הפרח וכמות הצוף (תגמול); בנוסף נבנתה מערכת לקליטת נדיפים אשר שימשה אותנו לבחינת הרכב הנדיפים המשתחררים מפרחים ובמהלך השנה השנייה למחקר נבחנה גם ההעדפה של דבורי דבש למופע הפרח של *בן-חרדל מצוי* בשתי מערכות ניסוי: א) בצמחים המייצגים את שתי אוכלוסיות הצמחים, המדברית והים-תיכונית; ו- ב) עם צמחים של שני הקווים המיוצבים, המייצגים את מופע הפרח הבהיר והצהוב (לעיל). תוצאות מערכת הניסוי לימדו אותנו על העדפה ברורה של הדבורים למופע הפרח הצהוב על פני הבהיר (ראה/י דו"ח מחקר 2014). בשנת המחקר הנוכחית נבחנו צמחים המייצגים את שתי אוכלוסיות הצמחים, המדברית והים-תיכונית,

וצמחים של שני הקווים המיוצבים (לעיל) במערכות הניסוי שבחנו את ההעדפה של דבורי דבש בתנאי תחרות תוך ובין-מינית. תוצאות הניסויים אלו נבחנו בהתייחס למופע הפרח ונבחנה השערת המחקר כי קיים יתרון יחסי לצמחים בעלי מופע פרח צהוב בסביבה תחרותית. בנוסף למדנו על תפקיד ריח הפרח על ידי בחינת התגובה של דבורי דבש בשתי מערכות ניסוי:

- א. מבחן למידה של התניית שלילית לשון (PER) Proboscis extension response
- ב. יכולת העדפה לריחות המשתחררים מפרחים המייצגים את שני הקווים המיוצבים

3. פירוט עיקר הניסויים ומסקנותיהם:

3.1 ניסוי העדפה של דבורי דבש לצמחים משני המופעים בתנאי תחרות תוך-מינית

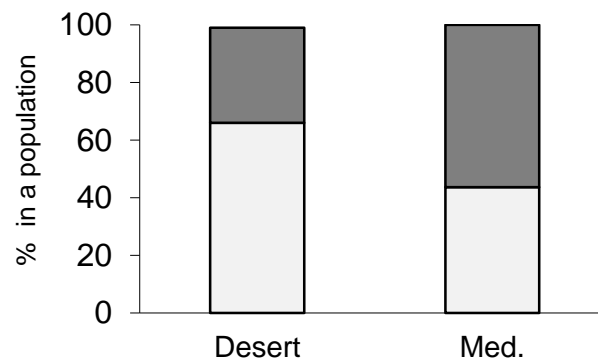
במערכת ניסוי זו נבדקה יכולת ההבחנה של דבורי דבש למופע פרח צהוב או בהיר, כשהוא נמצא בכתם של פרחים שמקורם מצמחים בעלי מופע פרח בהיר (איור 3). שני מערכי ניסוי בוצעו בנפרד, האחד בשימוש בצמחים מהאוכלוסייה הטבעית והשני עם הקווים המיוצבים (לעיל). הצמחים גודלו בפיטוטרון של הפקולטה לחקלאות, בחדר צמיחה של 8 שעות יום ו-16 שעות חושך, בטמפרטורה של $22/16^{\circ}\text{C}$, בהתאמה. לאחר הפריחה נקטפו גבעולי פריחה מצמחים מכל אחת מהאוכלוסיות הבר או מהקווים המיוצבים, אלו הושמו בכלי עם מי ברז, גבעול אחד מכל צמח; בכל גבעול היו ארבעה פרחים. עשרה גבעולי פריחה עם פרחים בהירים (המייצגים את האוכלוסייה המדברית או הקווים המיוצבים), סודרו בהיקף צלחת מסתובבת, ובמרכז הונח גבעולי פריחה מצמח בעל מופע פרח צהוב או בהיר המייצג את אחת האוכלוסיות או אחד מהקווים המיוצבים בהתאמה. כל דבורה שהגיעה ובחרה לשחר בפרח במרכז, הוצאה מהניסוי, ובשלב זה הוחלף גם הפרח במרכז בכזה מהקבוצה השנייה; סה"כ נבחנו 44 פרחי מרכז בהירים ו-40 פרחי מרכז צהובים, כשהמדדים שנבחנו היו: מספר הביקורים בפרחי ההיקף עד לבחירה בפרח המרכזי, והזמן בשניות עד לבחירה בו.



איור 3. מערך הניסוי שבו נבחנה העדפה של דבורי דבש לצמחים משני מופעי הפרח בניסוי תחרות תוך מינית.

כאמור, מערך ניסוי זה בוצע עם שתי קבוצות הצמחים לעיל, המייצגים את אוכלוסיית הבר ואת הקווים המיוצבים. מכיוון שהצמחים בניסוי נבחרו באופן אקראי והזמן הארוך שלקח בין חזרה לחזרה, נאלצנו לאחד בין תוצאות של שתי האוכלוסיות. מכיוון שקיימת שונות בין צמחים בצבע הפרח בכל

אחת מאוכלוסיות הבר (איור 4), בוצעה חלוקה של צמחי אוכלוסיות הבר לשתי קבוצות צבע, על פי מדד הרוויה, ותוצאות אלו אוחדו עם התוצאות שבוצעו עם הקווים המיצבים.

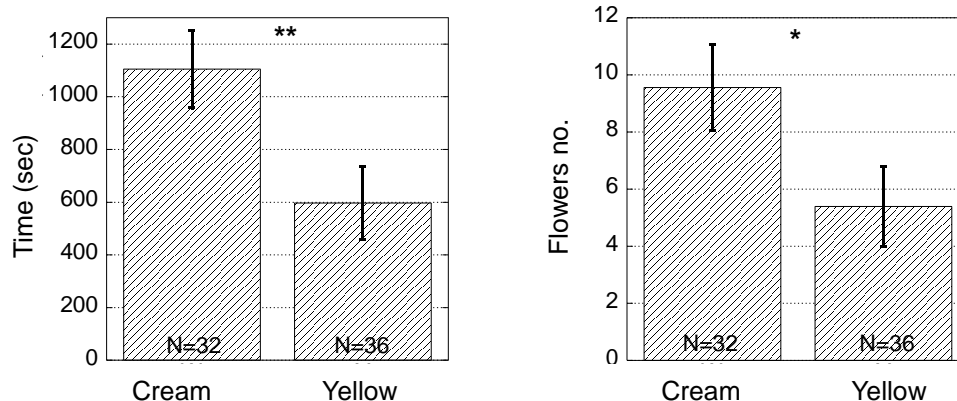


איור 4. רמת הצבע בפרחים בצמחים שונים המייצגים את האוכלוסייה המדברית (Desert) והים תיכונית (Med.), מפרחים בעלי מופע פרח צהוב (עמודות כהות) ובהיר (עמודות בהירות). קביעת הצבע נקבע על פי הערכה ויזואלית איכותית של צבע הפרח.

התוצאות מלמדות כי בממוצע ביקרו דבורי דבש ב- 9.6 ± 1.5 פרחי היקף בעלי מופע בהיר עד אשר בחרו לשחר בפרח המרכזי, כאשר זה היה שייך לאותה קבוצת הצבע. לעומת זאת, כאשר הפרח המרכזי הוחלף בזה מהמופע הצהוב ירד מספר הביקורים בפרחי ההיקף באופן מובהק ל- 5.4 ± 1.4 (One-way ANOVA, $F_{1,66}=4.14$, $P=0.046$) (איור 5א). בנוסף, הזמן הממוצע שעבר מתחילת התצפית עד לביקור הדבורה בפרח המרכזי היה קצר באופן מובהק (One-way ANOVA, $F_{1,66}=6.31$, $P=0.015$) כשזה היה שייך למופע פרח צהוב מאשר בזה בעל מופע פרח בהיר, לעומת 18.0 ± 2.0 דקות בממוצע, בהתאמה (איור 5ב).

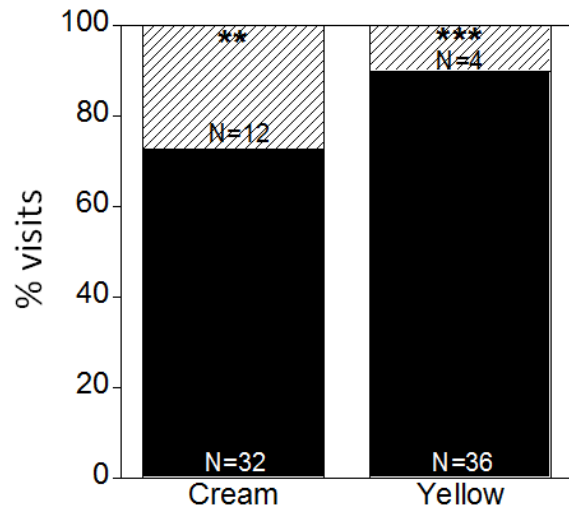
ב

א



איור 5. העדפה של דבורי דבש לפרחים מהמופע הצהוב (yellow) או הבהיר (cream) בתנאי תחרות תוך-מינית. התוצאות מתארות את הערכים הממוצעים ושגיאות התקן של מספר הביקורים בפרחי ההיקף הבהירים השייכים לאוכלוסייה המדברית (א) והזמן שלקח מתחילת התצפית ועד לביקור דבורת הדבש בפרח המרכזי (ב), שייצג לחילופין את המופע הבהיר או הצהוב. N מייצג את מספר הדבורים שביקרו בפרח המרכזי; כוכבית אחת או שתיים מייצגות הבדלים מובהקים ברמה של $P \leq 0.05$ ו- $P \leq 0.01$, בהתאמה (One-way ANOVA).

מהתצפיות למדנו גם כי מתוך כלל הדבורים שהשתתפו בניסוי יותר דבורים ביקרו בפרח המרכזי כשזה ייצג את מופע הפרח הצהוב מאשר כשזה היה שייך לקבוצת הפרחים הבהירה, 90.0% - 72.3%, בהתאמה ($\chi^2=98.27$, $P=0.0001$) (likelihood ratio) (איור 6). במבחן סטטיסטי נוסף בו נבדקה כל קבוצה בנפרד, נמצא הבדל מובהק בין הבחירה של דבורי דבש בפרחי ההיקף (בעלי מופע פרח בהיר) בהשוואה לפרח במרכז, כשזה היה צהוב ($\chi^2=29.45$, $P=0.0001$) (likelihood ratio) או כשזה הוחלף בבהיר ($\chi^2=9.43$, $P=0.0021$) (likelihood ratio).



איור 6. אחוז הביקורים בפרח המרכזי (עמודות כהות) ובפרחי ההיקף בלבד (עמודות בהירות) מכלל הדבורים ששחררו, כאשר הפרח המרכזי היה שייך למופע פרח בהיר (cream) או צהוב (yellow). כוכביות מייצגות הבדלים סטטיסטיים מובהקים ברמה של $P \leq 0.01$ ** או $P \leq 0.001$ ***. N מייצג את מספר הדבורים שביקרו בפרחי המרכז או בפרחי ההיקף בלבד.

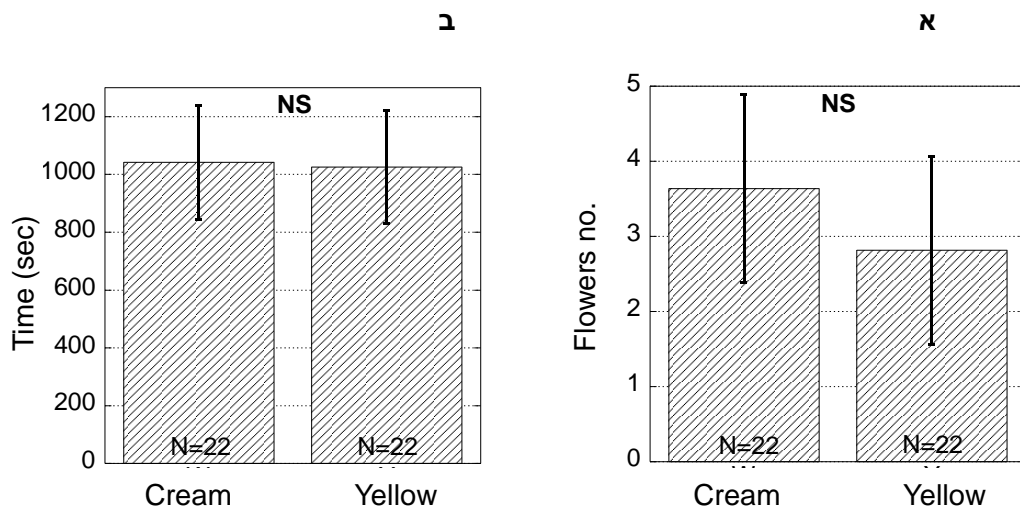
3.2 ניסוי העדפה של דבורי דבש לצמחים משני המופעים בתנאי תחרות בין-מינית

מערך ניסוי זה בוצע בדומה למערך הניסוי הקודם (3.1) כשבאחרון הוחלפו צמחי ההיקף בשישה פרחים של חרצית עטורה (מורכבים, *Chrysanthemum coronarium*), אחד המינים השליטים באוכלוסיות הים-תיכוניות שבאזור עין גב והמורדות המערביים של הרי הגולן (איור 7; לתיאור האוכלוסיות ראה/י דו"ח מחקר 2013).

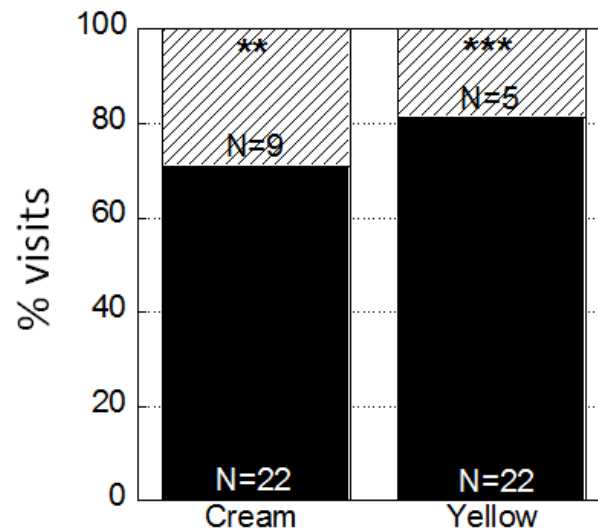


איור 7. צמחי חרצית עטורה ליד צמחי בן-חרדל מצוי בבית גידול אופייני לאוכלוסיות הים-תיכוניות, לאורך חופה המזרחי של הכנרת.

התוצאות המוצגות להלן מתארות איחוד תצפיות של שני מערכי ניסויים שבוצעו עם צמחים מאוכלוסיות הבר והקווים המיוצבים; התוצאות אוחדו מאותן סיבות המתוארות לעיל (3.1) ומתארות 27 תצפיות עם פרח מרכזי צהוב, ו-31 עם פרח מרכזי בהיר. התוצאות המסוכמות באיור 8, מתארות תצפיות של 44 דבורים אשר בחרו לשחר על הפרחים שהוצעו להם מתוך כלל 69 הדבורים שהשתתפו בניסוי. מהתוצאות אנו לומדים כי מספר הביקורים הממוצע בפרחי ההיקף, לפני השיחור על הפרח המרכזי, היה נמוך יותר כאשר הפרח המרכזי היה צהוב מאשר כשזה היה בהיר (2.8 ו-3.7, בהתאמה). אולם, הבדל זה לא נמצא מובהק סטטיסטית (איור 8א'). בדומה, נמדד זמן ממוצע זהה של כ- 17.0 ± 3.0 דקות מתחילת התצפית עד לביקור הדבורים בפרח המרכזי הצהוב או הבהיר (איור 8ב'). אולם, מכלל מספר התצפיות, היה מספר המקרים שבהם הדבורים בחרו לשחר על פרח מרכזי צהוב גבוה באופן מובהק ממספר המקרים שבהם הם ביקרו פרח מרכזי בהיר, 81.5% ו-70.8%, בהתאמה (likelihood ratio, $\chi^2=80.13$, $P=0.0001$) (איור 9).



איור 8. העדפה של דבורי דבש לפרחים מהמופע הצהוב (yellow) או הבהיר (cream) בתנאי תחרות בין-מינית. התוצאות מתארות את הערכים הממוצעים וסטיות התקן של מספר הביקורים בפרחי ההיקף השייכים לחרצית עטורה (א) והזמן שלקח מתחילת התצפית עד לביקור דבורת הדבש בפרח המרכזי שייצג לחילופין את מופע הפרח הבהיר או הצהוב. N מייצג את מספר הדבורים שביקרו בפרח המרכזי.



איור 9. אחוז הביקורים בפרח המרכזי (עמודות כהות) ובפרחי ההיקף בלבד (עמודות בהירות) מכלל הדבורים ששחררו, כאשר הפרח המרכזי היה שייך לבן-חרדל מצוי בעלי מופע פרח בהיר (cream) או צהוב (yellow) ופרחי ההיקף של חרצית עטורה. כוכביות מייצגות הבדלים סטטיסטיים מובהקים ברמה של $P \leq 0.01$ ** ו- $P \leq 0.001$ ***, N מייצג את מספר הדבורים שביקרו בפרחי המרכז או בפרחי ההיקף בלבד.

3.3 ניסוי הבחנה בין ריח של מופע הפרח הצהוב והבהיר

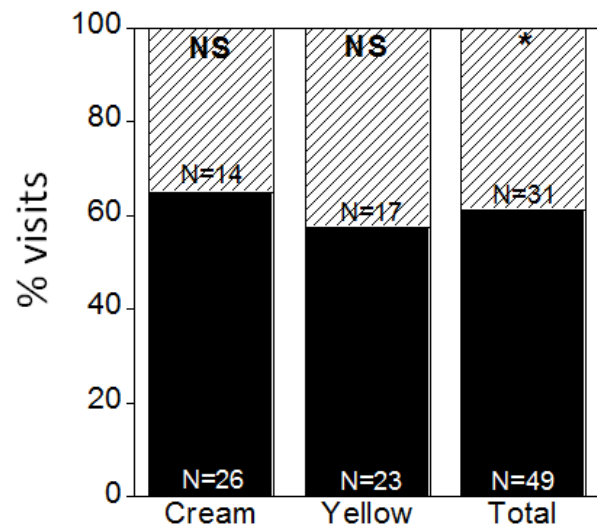
בניסוי זה נבחנה הנחת העבודה כי להבדל בריכוזי הנדיפים המשתחררים משני מופעי הפרח, צהוב ובהיר (ראה/י תוצאות דו"ח מחקר 2014), יש תפקיד בהבחנה של דבורי דבש במופע הפרח. לצורך כך בחנו אם קיימת העדפה לריח של פרחים מכל אחד מהמופעים על פני אוויר נטול ריח כשהגורם הוויזואלי אינו גלוי (איור 10). סה"כ בוצעו תצפיות של 40 חזרות לכל מופע פרח.



איור 10. מערכת הניסוי בה הוזרם אוויר נקי דרך שני מסנני פחם (א) אל שני ארלנמיירים- האחד ריק והשני שהכיל גבעול תפרחת אחד עם כארבעה פרחים של בן-חרדל מצוי מאחד משני מופעי הפרח, צהוב או בהיר (ב); פתח שחרור אוויר מהארלנמייר הונח בתוך מתקן שלא אפשר לדבורים לראות את הפרחים (ג). בכל בדיקה נבחן מופע פרח אחד.

איור 11 מתאר את אחוז הפעמים בהם בחרו הדבורים ריח פרחים או אויר בכל אחת מהתצפיות לכל אחד ממופעי הפרחים, בהיר (Cream), צהוב (Yellow) ואיחוד שתי התצפיות של שני מופעי הפרח יחד (Total). כאשר מסתכלים על כל תצפית בנפרד לא נמצא יתרון לריח שהשתחרר מפרחים צהובים או בהירים, על פני אוויר נטול ריח. עם זאת, באיחוד התצפיות נמצא כי אחוז הדבורים שבחרו

בריה שהשתחרר מארלנמייר עם פרחים (61.25%), ללא תלות במופע, גבוה באופן מובהק מזה שהשתחרר מהארלנמייר הריק (38.75%) (likelihood ratio, $\chi^2=4.08$, $P=0.043$).



איור 11. אחוז הביקורים של דבורי דבש לריח המשתחרר מכל אחד ממופעי הפרח של בן-חרדל מצוי (עמודות כהות), צהוב (yellow) או בהיר (cream), ובשילוב של כל התצפיות יחד (total), ובהשוואה לאוויר נקי (עמודות בהירות).

3.4 ניסוי הבחנה בין ריחות המופעים על ידי מבחן למידה התניית שלילית לשון- Proboscis

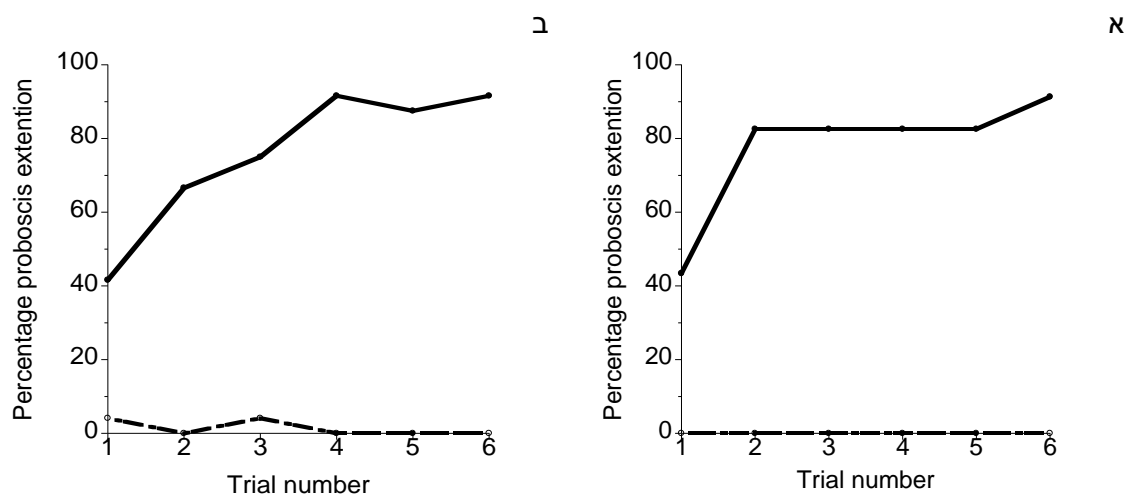
Extension Response

במבחני למידה של דבורי דבש נבחנת תגובתן המותנית בשליפת הלשון, וזאת באמצעות יצירת קישור אסוציאטיבי בין גירוי מותנה, כדוגמת ריח או מגע, לבין גירוי בלתי-מותנה, כדוגמת תמיסת סוכר. בניסוי זה שימש שחרור ריח מצמחים משני המופעים של אוכלוסיות הבר או אוויר נטול ריח כגירוי מותנה, ותמיסת סוכרוז בריכוז 40% או גירוי שלילי של תמיסת מלח בריכוז 2M שימשו כגירוי הבלתי מותנה. שחרור הריחות מפרחים (כארבעה פרחים לגבעול) נעשה מכלי סגור, בדומה למערך הניסוי הקודם. הדבורים הנבחנות קובעו על גבי קשיות ואלו הונחו בתאים מופרדים על גבי מסילה. תנועה על גבי המסילה אפשרה חשיפה לריח למשך 5 שניות לכל אחד מהתאים בנפרד (איור 12). כעבור 4 שניות מהחשיפה הראשונית לריח ניתן לכל דבורה הגירוי הבלתי מותנה החיובי או השלילי, בהתאם לריח הניתן. באופן זה יכלו הדבורים לקשר בין ריח לגמול, חיובי או שלילי. במהלך הניסוי בוצעו תצפיות של שליפת הלשון בחשיפה חוזרת לריחות: דבורה אשר שלפה לשון כתגובה למשב האוויר, עם או ללא ריח, עוד לפני הגשת הגירוי הבלתי מותנה, סומנה כתגובה חיובית, ואילו דבורה אשר לא שלפה לשון כלל בזמן הזרמת הריח סומנה כתגובה שלילית. שליפת הלשון למשב האוויר מייצגת את הקישור שעושה הדבורה הנבחנת בין הגירוי הבלתי מותנה (ריח), לבין הגירוי המותנה (גמול), המשמש כמדד הלמידה. כל דבורה נבחנה סה"כ 12 פעמים, כאשר בשש פעמים מתוכן הוצמד ריח מסוים לגמול חיובי ובשש צומד הריח הנגדי לגמול שלילי. סדר הופעת הריחות היה אקראי.



איור 12. מערכת לבדיקת התניית לשון בדבורי דבש.

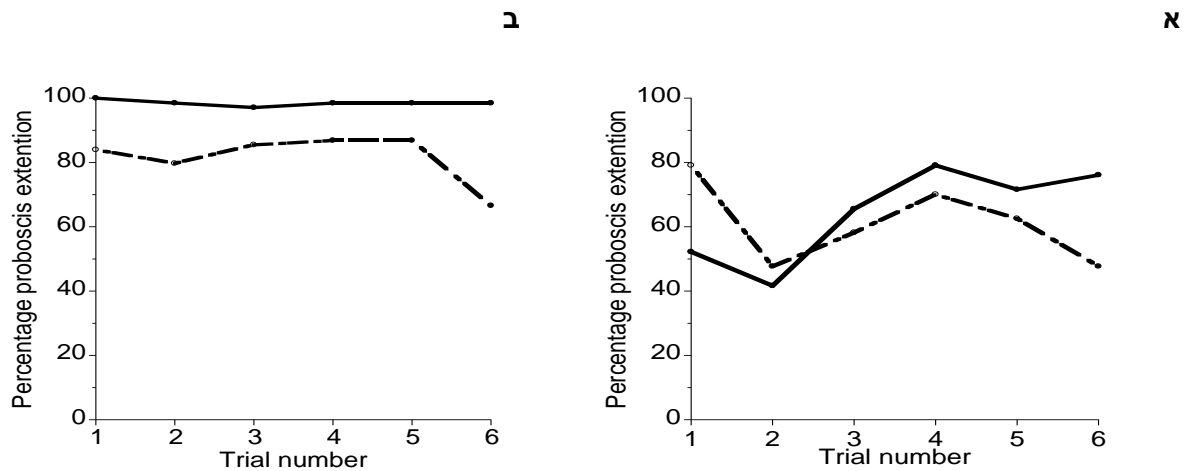
עקומות הלמידה של 48 דבורים (איור 13) מראות כי הדבורים למדו להבחין בין ריחות הפרחים המקושרים לגמול החיובי לבין אוויר נקי שמקושר לגמול שלילי. כלומר, הבחינו באופן משמעותי ומובהק בין ריח פרחים המייצגים את האוכלוסייה המדברית (פרחים בהירים) לבין אוויר נקי (t -test, $P=0.0001$) (איור 13א'), ובין ריח של פרחים מהאוכלוסייה הים-תיכונית (צהובים) לבין אוויר נקי (t -test, $P=0.0001$) (איור 13ב').



איור 13. אחוז הדבורים אשר שלפו לשון בהתניית ריח מפרחים בהירים (א') וצהובים (ב') במהלך שש חזרות. קו מלא מציג חשיפה לריח פרחים עם גמול חיובי ומקווקו חשיפה לאוויר נקי עם גמול שלילי.

בשלב השני בדקנו אם יש לדבורי דבש הבחנה ברורה בין ריח המשתחרר מפרחים משני המופעים. בניסוי זה נבחנה התניה של שליפת לשון ב-130 דבורים שנחשפו בצורה אקראית לסילון אוויר עם ריח שהשתחרר מפרחים מאחד המופעים (בהיר או צהוב) שלאחריו הם קיבלו גמול חיובי, ולחילופין לסילון אוויר עם ריח שהשתחרר ממופע הפרח השני שמיד לאחריו ניתן לדבורה גמול שלילי. לדוגמה, חשיפה לריח מפרח צהוב עם גמול חיובי ולאחריו חשיפה לריח מפרח בהיר עם גמול שלילי. תוצאות הניסוי (איור 14) מלמדות כי אחוזי שליפת לשון היו גבוהים יותר לריחות אשר צומדו לגמול חיובי מאשר לריחות שצומדו לגמול השלילי. מגמה זו נראתה כאשר המופע הצהוב קושר לגמול חיובי

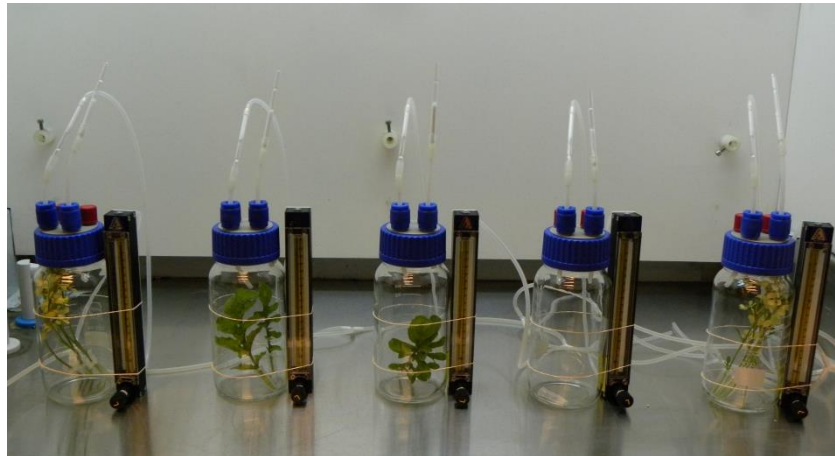
וגם כאשר המופע הבהיר צומד לגמול חיובי (t -test, $P=0.0001$) מתוצאות (t -test, $P=0.0018$). מתוצאות ניסוי זה למדנו כי לדבורי דבש יש את היכולת להבחין בין ריחות המשתחררים משני מופעי הפרחים.



איור 14. אחוז הדבורים אשר שלפו לשון במהלך ניסויי ההתניה: (א) ריח מפרחים בהירים עם גמול חיובי וריח מפרחים צהובים עם גמול שלילי; (ב) ריח מפרחים צהובים עם גמול חיובי וריח מפרחים בהירים עם גמול שלילי. קו מלא ומקווקו מציגים את אחוז שליפות הלשון כתוצאה מהתניה לגמול חיובי או שלילי, בהתאמה.

3.5 פרופיל הנדיפים המשתחרר מפרחים משני המופעים

מערכת לקליטת נדיפים שנבנתה במסגרת פרויקט זה (איור 15) שימשה אותנו לבחון אם קיימים הבדלים בשחרור נדיפים בין שתי קבוצות הצמחים: צמחים המייצגים את שתי אוכלוסיות הבר, ושני הקווים המיוצבים (לעיל).



איור 15. מערכת לקליטת נדיפים (headspace) שנבנתה לצורך בחינה של נדיפים המשתחררים מפרחים ועלים של בן-חרדל מצוי.

מערכת הבדיקה כללה הזרמה של אוויר באמצעות משאבה אל תוך בקבוק שאליו הוכנסו עמודי התפחת. כל בקבוק כלל שתי קולונות סופחות, אחת בכניסה, כדי לאפשר כניסה של אוויר נקי והשנייה ביציאה, לקליטה וספיחה של הנדיפים המשתחררים מהפרחים. שטיפה של הקולונה נעשתה באמצעות ממס אורגני, האנליזה של הנדיפים התבצעה באמצעות הרצה ב-GC-MS ובהשוואה

לסטנדרט פנימי (Isobutylbenzene). כל בקבוק כלל בין שלושה לארבעה עמודי תפרכת מצמח אחד, בהתאם למספר הפרחים. חישוב התוצאות נעשה ביחס למספר הפרחים בבקבוק וביחס לסטנדרט הפנימי.

זוהו 12 חומרים נדיפים בפרחים של צמחי בן-חרדל מצוי ביניהם בנזואידים, אלדהידים, ססקוויטרפן וכהלים (טבלה 1). הבדלים בין צמחים משתי אוכלוסיות הבר כמו בין צמחים מהקווים המיוצבים נמצאו בריכוז של הבנזואיד Methyl benzoate שהיה גבוה בפרחים מהמופע הצהוב מאשר הבהיר. לעומת זאת, veratrole השתחרר מפרחים ממופע הפרח הבהיר בריכוז גבוה יותר מאשר מפרחים בעלי מופע צהוב. חשוב לציין כי לשני החומרים תפקיד חשוב במשיכת מאביקים [9,10], אך לא ברור לנו עדיין אם לשונות פנוטיפית זו יש חשיבות אקולוגית.

טבלה 1. ריכוז מרכיבי הריח בפרחים של צמחים שונים המייצגים את אוכלוסיות הבר המדברית (Desert) והים תיכונית (Med.) וצמחים של שני הקווים המיוצבים, בעלי פרחים בהירים (cream) וצהובים (yellow). התוצאות מציגות ממוצע ושגיאת תקן של ריכוז הנדיפים המשתחררים מעשרה פרחים בארבעה צמחים שונים.

	אוכלוסיות בר		קווים מיוצבים	
	Desert	Med	Cream	Yellow
Benzaldehyde	0.33±0.07	0.51±0.05	0.32±0.01	0.49±0.02
Benzeneacetaldehyde	1.30±0.83	0.26±0.06	0.15±0.02	0.44±0.10
Acetophenone	0.17±0.06	0.17±0.03	0.16±0.03	0.21±0.02
Guaiacol	0.19±0.03	0.33±0.13	0.11±0.04	0.25±0.06
Methyl benzoate	0.00	0.45±0.27	0.05±0.01	0.23±0.07
Phenyl ethyl alcohol	0.40±0.10	0.11±0.06	0.15±0.09	0.19±0.03
Veratrole	0.08±0.03	0.00	0.16±0.10	0.00
Anis aldehyde	0.07±0.06	0.27±0.14	0.00	0.02±0.02
Ethyl acetophenone	0.18±0.01	0.21±0.03	0.18±0.01	0.23±0.02
Cedrene	0.00	0.15±0.10	0.00	0.01±0.03
Pentanoic acid	0.02±0.01	0.16±0.11	0.00	0.05±0.03
Methyl eudesmate	1.22±0.38	0.57±0.49	1.80±0.41	2.38±0.94

4. ספרות

1. Whittall, J.B., Strauss, S. 2006. Non-pollinator agents of selection on floral traits. In: Ecology and Evolution of Flowers (Eds. L. Harder and S. Barrett) Oxford Uni. Press, pp.120-138.
2. Stanton, M.L., Snow, A.A., Handel S.N. 1986. Floral evolution: attractiveness to pollinators increases male fitness. Science 232: 1625-1627
3. Kay Q.O.N. 1976. Preferential pollination of yellow-flowered morphs of *Raphanus rttphanistrum* by *Pieris* and *Eristalis* spp. Nature 261: 230-232.
4. Kessler, D., Gase, K., Baldwin, I.T. 2008. Field experiments with transformed plants reveal the sense of floral scents. Science 321: 1200-1202
5. Afik, O., Dag, A. and Shafir, S. 2008. Honey bee (*Apis mellifera*) round dance is influenced by trace components of floral nectar. Anim. Behav. 75: 371-377
6. Omura, H., Honda, K., Hayashi, N., 1999. Chemical and chromatic bases for preferential visiting by the cabbage butterfly, *Pieris rapae*, to rape flowers. Journal of Chemical Ecology 25, 1895-1906.
7. Omura, H., Honda, K., Hayashi, N., 2000. Floral scent of *Osmanthus fragrans* discourages foraging behavior of cabbage butterfly, *Pieris rapae*. Journal of Chemical Ecology 26, 655-666.
8. Barazani, O., M. Quaye, S. Ohali, M. Barzilai, and J. Kigel. 2012. Photo-thermal regulation of seed germination in natural populations of *Eruca sativa* Miller (Brassicaceae). Journal of Arid Environments, 85:93-96
9. Negre, F., Kish, C.M., Boatright, J., Underwood, B., Shibuya, K., Clark, D.G., Dudareva, N. 2003. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. The Plant Cell, 15: 2992–3006.
10. Gupta, A.K., Akhtar, T.A., Widmer, A., Pichersky, E., Schiestl, F.P. 2012. Identification of white campion (*Silene latifolia*) guaiacol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of veratrole, a key volatile for pollinator attraction. BMC Plant Biology, doi: 10.1186/1471-2229-12-158.

5. סכום עם שאלות מנחות:

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה
על פי המוצע בתוכנית המחקר, בשנה זו חיזקנו את הבנתנו על ההבדלים הפנוטיפיים בין אקוטיפים של <i>בן-חרדל מצוי</i> הנבדלים במופע צבע הפרח. ניסויי העדפה עם דבורי דבש בוצעו כדי לבחון את השערת המחקר, כי למופע הצבע הצהוב יש יתרון במשיכת מאביקים.
עיקרי הניסויים והתוצאות
תוצאות מבחני ההעדפה מלמדים על העדפה של דבורי הדבש למופע פרח צהוב על פני הבהיר. במבחני התניית לשון מצאנו גם כי לדבורי הדבש יכולת הבחנה של ריח הפרחים. אנליזה של נדיפים הראתה על הבדלים בין פרחים בעלי מופע פרח צהוב ובהיר בשני נדיפים שלהם תפקיד במשיכה של מאביקים.
מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
הושגו כל מטרות המחקר לשנת המחקר הנוכחית ולכלל הפרויקט, בהתאם למוצע בתוכנית המחקר.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
הושגו כל מטרות הפרויקט אך נפתחו כיווני מחקר חדשים הקשורים בגורמי סלקציה שפעלו לטובת התבססות שונות גנטית, ועד כמה יש לתכנן אלו קשר ליחסי הצמח אם סביבתו הביוטית.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטוט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטונים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
1. הוצג פוסטר במסגרת יום הסטודנט בפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה. יוני 2014: T. Erez, S. Shafir, O. Barazani. The role of flower morphology in attracting bees to <i>Eruca sativa</i>
2. הוצג פוסטר במסגרת הכנס השנתי של החברה האנטומולוגית הישראלית, אוקטובר 2014, מרכז וולקני (הפוסטר זכה במקום ראשון במסגרת התחרות): טל ארז, שרון שפיר ועוז ברזני. תפקיד מופע הפרח באוכלוסיות של <i>בן-חרדל מצוי</i> (מצליבים) במשיכה של דבורת הדבש <i>Apis mellifera</i> .
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
← יוני - נבקש לא לפרסם את הדו"ח עד לפרסום תוצאות המחקר במאמרים מדעיים