

מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

קרן מדען ראשי

תקציר הדו"ח:

1. הצגת תבעיה: מיני עלקת מהווים פתוגן חשוב במספר רב של גידולים חקלאיים. הגדרת המינים איננה ברורה, הידע הגנטי על מיני עלקת מוגבל ביותר, ועד כה לא נעשה ניסיון לברר האם קיימים יחסי גומלין כלשהם בין אוכלוסיות החקלאות לאוכלוסיות הבר של הטפיל. מטרת המחקר היו:
1. למצוא סמנים גנטיים לאיפיון זיהוי ואיבחון של מיני העלקת בשדות חקלאות.
2. לתרום להבנת הבסיס הגנטי לשונות בתוך אוכלוסיות עלקת בארץ וביניהן.
3. לברר את הקרבה הגנטית בין אוכלוסיות בר לאוכלוסיות "חקלאיות" של מיני עלקת.
4. לברר את מידת הקרבה בין עלקת מצרית ועלקת ענפה.
5. לברר את מידת הקרבה בין עלקת נטויה ועלקת החמנית.
2. מהלך ושיטות המחקר: נדגמו אוכלוסיות עלקת בשדות חקלאות ובשטחי בר. דיגום העלקת כלל חומר מוקפא לצורך הפקת DNA וחלבונים, זרעים, וחומר עשביה. נבדקו איזוזימים וסמנים גנטיים ברמת ה-DNA בשיטות RAPD ו-SCAR. נערכו הכלאות בין מינים שונים ובין צמחים מאוכלוסיות שונות של עלקת מצרית. נבדקו פרופילי ה-DNA של המכלואים שהתפתחו ונבחנו התנהגותם.
3. תוצאות עיקריות: נמצאו סמני RAPD ספציפים לכל מיני העלקת החשובים בחקלאות. הסימנים הוכחו ככלי דיאגנוסטי יעיל ומדויק לזיהוי המינים מישראל ומארצות אחרות. פותחה יכולת לזהוי מולקולארי של זרעים בודדים של עלקת מדוגמאות קרקע, למרות הכמות הזעירה של DNA שהם מכילים. פותחו פרוימרים ספציפים של PCR לאיבחון העלקות בשיטת SCAR. התקבלו היברידיים חיוניים בין מיני עלקת, ובין אוכלוסיות בר ותרבות של הטפיל. תוצאות ראשוניות מצביעות על האפשרות של הורשה אימהית של ההעדפת פונדקאים בעלקת נטויה. התגלתה הפרדה גנטית ברורה בין אוכלוסיות של עלקת מצרית, ותברר שהמרחק הגנטי גדול ככל שגדל המרחק הגאוגרפי.
4. מסקנות והמלצות: תוצאות המחקר מדגימות את הפוטנציאל בשימוש בשיטות מולקולריות לאיבחון עלקת. השיטה המולקולרית מאפשרת הבחנה חד משמעית בין מיני עלקת, שחשיבותה רבה בגלל ההבדל בהעדפות-פונדקאי על ידי המינים. פיתוח אמצעים מולקולריים פשוטים ומדויקים לאבחון עלקת הוא חדשני ובעל משמעות לחקלאות בארץ ובארצות אחרות בהן העלקת מהווה פגע קשה. ניתן להשתמש בשיטות שפותחו כשירות לחקלאי. יש להתור לשכלול השיטות, וכן למציאת סמנים לאוכלוסיות ספציפיות בתוך המינים, ששונות בהעדפת פונדקאים. יש להרחיב המחקר על הורשת הוירולנטיות שחשוב לשם פיתוח איסטרטגיות עמידות מתאימות בפונדקים.

נושא המחקר: המבנה הגנטי של אוכלוסיות עלקת בשדות החקלאות.

סוג דו"ח : מדעי סופי

חוקר ראשי : יואל דניאל

חוקרים משניים: הרשנהורן יוסף
קציר נורית
פורטנוי ויסלי

4/3

המבנה הגנטי של אוכלוסיות עלקת בשדות החקלאות

The genetic structure of broomrape populations in agricultural fields

1. רקע מדעי

11 מיני עלקת (*Orobancha* sp.) נפוצים בישראל (Feinbrun-Dothan 1978), חמישה מהם מהווים פתוגן חשוב במספר רב של גידולים חקלאיים (יואל ויעקובסון 1988). מיני העלקת גורמים נזק כבד עד כדי אובדן יכול לירקות, לחמניות, צמחי מספוא, פרחים וגידולים אחרים. באזורים נרחבים בארץ נגועים השדות קשה בזרעי מינים שונים של עלקת ולא ניתן לגדל בהם גידולים חשובים בשל היותם פונדקאים לטפילים אלה. מיני העלקת בארץ משתייכים לשתי קבוצות שנחשבות כשבטים נפרדים של הסוג עלקת: (א) *sect. Trionychon* Tzvel. לקבוצה זו שייכות ע. מצרית (*O. aegyptiaca* Pers.) וע. ענפה (*O. ramosa* L.). (ב) *sect. Orobanche* (= *sect. Osproleon* Wallr. ex Duby) לקבוצה זו משתייכות ע. חרוקה (*O. crenata* Forsk.), ע. נטויה (*O. cernua* Loefl.) וע. החמנית (*O. cumana* Wallr.). בהגדרת המינים קיימים חילוקי דעות בין החוקרים. עלקת ענפה שגדלה בארץ נחשבת ע"י פיינברון (Feinbrun 1978) ופיינברון ודנין (1991) כמין נפרד: עלקת מוטל (*O. mutelii* Schultz.) ואילו חוקרים אירופים ואמריקאים מחשיבים אותה תת מין של ע. ענפה שנפוץ במקומות רבים בעולם (לדוגמא: Chater and Webb 1972). ההבדלים העיקריים בין ע. ענפה וע. מצרית הם גודל הפרח ושעירות האבקנים. אך בתצפיות שערכנו בארץ בעשר השנים האחרונות מצאנו חוסר אחידות במופע העלקות ולעיתים קרובות לא הצלחנו לשיק אוכלוסיה מסוימת או פרטים בודדים באוכלוסיה למין זה או אחר. עלקת החמנית משויכת במגדירים בארץ (פיינברון ודנין 1991) כוריאנט של עלקת נטויה. במזרח אירופה מפרידים בין ע. נטויה (*O. cernua*) לע. החמנית (*O. cumana*) (Teryokhin 1991). בחינה מורפולוגית של עלקת נטויה ועלקת החמנית בארץ (Joel 1988) הציגה הבדלים משמעותיים ביניהם במבנה ובצורת הפרח, במורפולוגיה של הזרע, ובמבנה הנבט. הבחנה זו תואמת את השוני המשמעותי בטווח הפונדקאים: עלקת החמנית תוקפת חמניות

ואילו עלקת נטויה תוקפת גידולים סולניים ;

כל מיני העלקת המצויים בשדות החקלאות, למעט עלקת החמנית, גדלים גם בשדות הבר בארץ. עד כה לא נעשה נסיון לברר האם קיימים יחסי גומלין כלשהם בין אוכלוסיות החקלאות לאוכלוסיות הבר. הידע הגנטי על מיני עלקת מוגבל ביותר. על מנת שנוכל לתת מידע מהימן לחוקר ולחקלאי עלינו להתייחס לכמה שאלות בסיסיות שיבהירו את המבנה הגנטי של אוכלוסיות המינים החשובים של עלקת בשדות החקלאות: מה הבסיס הגנטי לשונות הגדולה בתוך האוכלוסיות של מיני עלקת בשדות החקלאיים בארץ. האם האוכלוסיות פנמיקטיות או מורכבות מתת קבוצות שכל אחת מבודדת יחסית מן האחרות. האם קיימים מחסומים התרבותיים בין אוכלוסיות עלקת ממינים שונים, והאם קיימים מחסומים התרבותיים בין אוכלוסיות "חקלאיות" ואוכלוסיות בר של המינים הנ"ל. מחקרנו עסק בשאלות אלה ובפיתוח אמצעים מדויקים לזיהוי העלקות ולאיבחון.

2. מטרת המחקר לתקופת הדו"ת:

1. למצוא סמנים גנטיים לאיפיון זיהוי ואיבחון של עלקת ממינים שונים.
2. לתרום להבנת הבסיס הגנטי לשונות הגדולה בתוך אוכלוסיות עלקת בארץ וביניהן.
3. לברר את הקרבה הגנטית בין אוכלוסיות בר לאוכלוסיות "חקלאיות" של מיני עלקת.
4. לברר את מידת הקרבה בין עלקת מצרית ועלקת ענפה.
5. לברר את מידת הקרבה בין עלקת נטויה ועלקת החמנית.

3. פירוט ניסויים

(1) דיגום אוכלוסיות עלקת בשדות חקלאות ובשטחי בר באיזורי ארץ שונים, בעונות הגידול שלהן. נסרקו חברות צומח רבות בכל רחבי הארץ, ונמצאו למעלה מ-30 אוכלוסיות בר של עלקת ממינים שונים (טבלה 1).

טבלה 1 : רשימת אוכלוסיות עלקת שנדגמו לצורך המחקר.

אזור	אתרי א עלקת בר
גולן	אל-על, עין זיון, מבוא חמה
גליל מערבי	גשר הזיו, נהריה
גליל תחתון	אלוני אבא, נחל ציפורי
גליל עליון	נחל קדש
עמק יזרעאל	מגידו, בלפוריה
כרמל	אליקים, דלית אל כרמל, יגור, פרק הכרמל
גלבוע	מורדות מזרחיים, הר ברקן
בקעת הירדן	ואדי אום סידרה - גשר דמיא
עמק ירדן עליון	תל רחוב, רכס רחוב, עין אור, עין מנתה, מרגלות הגלבוע, חמת גדר
מדבר שומרון	אום זוקא
יהודה	גבעות עדולם, תל שכה, גבעות מחסיה, נחל אילן, שדות מיכה
שרון	חולות קיסריה, נתניה דרום, בית ינאי
חוף דרומי	הרצליה, מבוא אשדוד
נגב צפוני	צומת משאבים, ניר עם, נחל עשן

מרבית האוכלוסיות היו קטנות ביותר, בני פרטים בודדים בלבד. מכל אלוסיה נאספו במידת האפשר לפחות חמישה צמחים, מהם נלקחו חלקי צמח להקפאה לצורך בדיקה מולקולארית של DNA ולבדיקת חלבונים. הצמחים יובשו ושומרו לבדיקה מורפולוגית.

דוגמאות העשביה עברו אנליזה מורפולוגית לזיהוי של המינים, ודוגמאות ה-DNA שבדדו מהן שמשו לאנליזה גנטית. האנליזה המורפולוגית בוצעה בהשוואה לעלקות מאוסף העשביה הלאומית בירושלים, שמבוסס על איסופים ברחבי הארץ במאה השנים האחרונות.

דיגום העלאת כלל:

א. חומר מוקפא לצורך הפקת DNA וחלבונים (תפרחות צעירות ל-DNA, וגבעולי תפרחת לאיזוזמים, שניהם הוקפאו ב -80°C עד לשימוש.

ב. זרעים הופקו מתפרחות שנאספו בשטח. התפרחות הועמדו בתנאי יובש עד הבשלת הזרעים.

ג. צמחים מיצגים נאספו בשטח והוכנסו לעשביה לאחר שנכבשו ויובשו.

(2) גידול עלקות: עלקות מאוכלוסיות שונות גודלו בעצבים בנוה יער בתנאים אחידים על פונדקאים שונים. נערך מעקב אחר עיתוי התפתחותם, העדפת פונדקאים והשפעתם על התפתחות הפונדקאים. כמו כן נדגמו רקמותיהם לבדיקה גנטית, ונאספו זרעיהם.

(3) בחינת פרטים באוכלוסיות (בבתי הגידול הטבעיים, בשדה ובעצבים) בעזרת הכלים הבאים:

א. מורפולוגיה של הזרע, הפרח (כולל צבעים של חלקי הפרח) והתפרחת.

ב. סמנים ברמת החלבון. נבדקו איזוזימים שונים: ADH, GDH, PGDH, SOD, GOT, Est, ME.

ג. סמנים גנטיים ברמת ה-DNA בשתי שיטות: DNA Random Amplified Polymorphic (RAPD)

ו-Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) (Paran & Michelmores, 1993) שמבוססת על קביעת הרצפים של בנדים דיאגנוסטיים ובחירת פריימרים ספציפיים עבורם.

(4) הכלאות בין עלקת מצרית ועלקת ענפה, בין עלקת נטויה ועלקת החמנית ובין צמחים מאוכלוסיות שונות של עלקת מצרית. נערכה השוואה של פרופילי ה-DNA של הזרעים שהתפתחו עם אלה של צמחי האם.

(5) ניתוח נתוני ה-RAPD עבור המינים השונים, בהתבסס על בנדים פולימורפים שהתקבלו בעזרת פריימרים נבחרים. הבנדים טופלו כנתונים בינאריים (קיים/חסר) בעזרת התוכנה PAUP 3.1.1 (Swofford 1993).

4. תוצאות המחקר:

בחינת שיטות:

על מנת לבחון את ההבדלים בין מיני עלקת ובין אוכלוסיות ופרטים בתוכם היה צורך בשלב הראשון לבחור בשיטה שתיתן מידע מתאים על פולימורפיזם שלהם. לכן הישונו בשלב הראשון את התוצאות המתקבלות מבחינת איזוזימים עם אלה המתקבלות ב-RAPD מאותם פרטים של אוכלוסיות עלקת מוגדרות. אנליזה אלקטרופורטית ראשונית של איזוזימים באוכלוסיות עלקת אמנם נתנה תמונה ראשונית על מידת הפולימורפיזם באוכלוסיות, אך מספר הלוקוסים הרלבנטיים בבדיקת זו היה קטן יחסית. מבין שבעה האנזימים שבדקנו התברר שרק MDH, PGDH ו-GDH נתנו פולימורפיזם המתאים לאנליזה גנטית בעלקת מצרית. כמות הפולימורפיזם שהתקבלה במקביל על ידי RAPD היתה גדולה בהרבה. ממשום כך החלטנו לבחור את ה-RAPD כשיטה המובילה במחקר.

מציאת סמנים מולקולארים ל-DNA של המינים החשובים לחקלאות:

לצורך חיפוש סמנים גנטיים לאוכלוסיות עלקת מצרית נבחנו תחילה תוצרי האמפליפיקציה של 165 פריימרים על תערובות DNA של 3-4 פרטים שנלקחו בהתאמה מכל אחת מ-7 אוכלוסיות שונות. מתוכם התגלו 65 פריימרים שהיו פולימורפים.

מבין 86 תוצרי האמפליפיקציה הפולימורפים שהתקבלו תוך שימוש בפריימרים הנבחרים התגלו שני בנדים : UBC300-600 ו- UBC212-300 כבנדים ייחודיים בהתאמה לשני השבטים העיקריים של עלקת (Osproleon ו- Trionychon). ששה תוצרים נוספים (UBC215-470, OPG6-660, OPG6-400, UBC250-750, UBC215-800, UBC215-1400) נתגלו כמתאימים לשמש כסמנים דיאגנוסטיים לזיהוי המינים השונים של הטפיל. המידע הדיאגנוסטי שהתקבל משמונה התוצרים הנל מסוכם בטבלה 2.

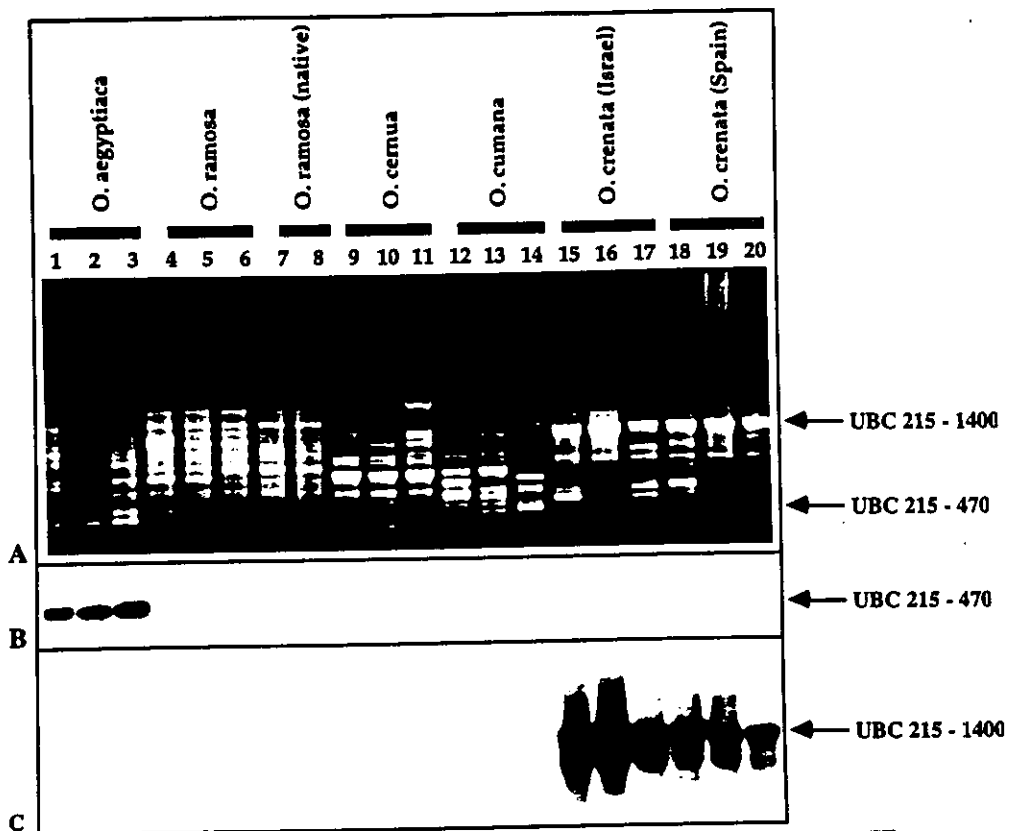
תמונה 1 מראה דוגמה לדגם RAPD שהתקבל על ידי אחד הפריימרים (UBC215) ששימש לבדיקת DNA של חמשת מיני העלקת, שלשה צמחים מכל מין שכל אחד מהם נאסף מאוכלוסיה נפרדת. פריימר זה נתן בנד אחד (UBC215-470) שאופייני רק לעלקת מצרית ובנד אחד (UBC215-1400) שאופייני רק לעלקת חרוקה. כדי לשפר את מובהקות התוצאה ולמנוע טעויות ביצענו בדיקת Southern לדגמי ה-RAPD על ידי היברידיזציה בעזרת גלאים מתאימים (UBC215-1400 או UBC215-470). על ידי כך וידאנו שבנדים מקבילים אינם זהים רק באורך המולקולה אלא גם ברצף הנוקלאוטידים שלה. הנתונים בטבלה 2 מבוססים על בדיקות כפולות כאלה.

טבלה 2 : ביטוי תוצרי אמפליפיקציה נבחרים במיני עלקת החשובים בחקלאות

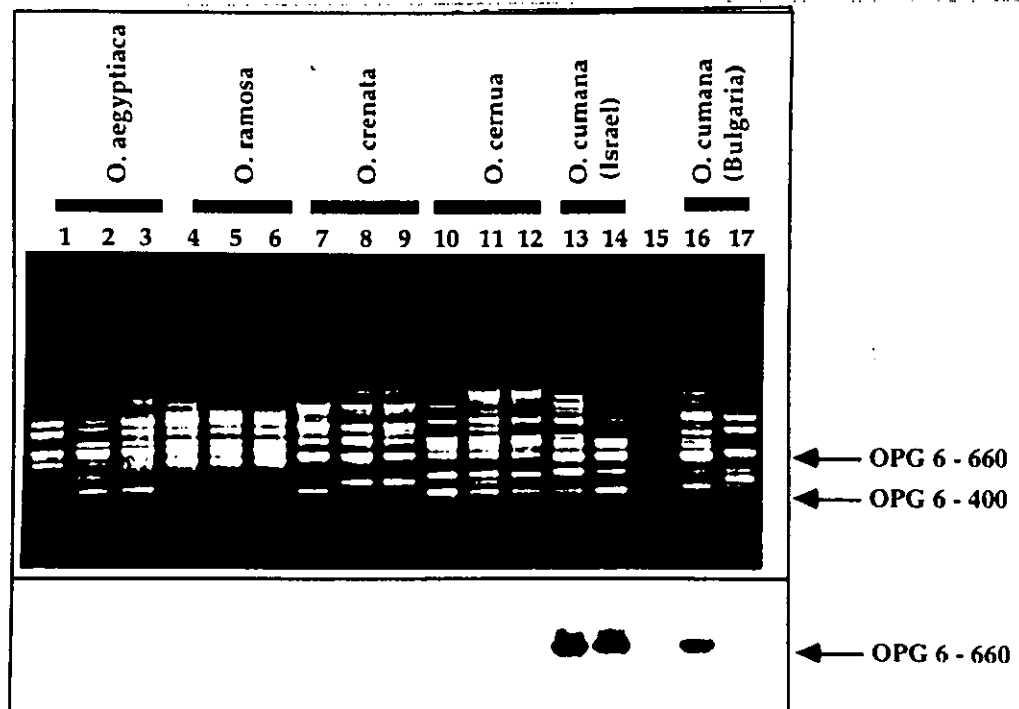
UBC300 600	UBC212 300	UBC250 750	OPG6 400	OPG6 660	UBC215 470	UBC215 1400	UBC215 800	
								sect. <i>Trionychon</i> Wallr.
-	+	-	+	-	+	-	-	עלקת מצרית
-	+	+	-	-	-	-	-	עלקת ענפה
								sect. <i>Osproleon</i> Wallr.
+	-	-	-	-	-	-	-	עלקת נטויה
+	-	-	-	+	-	-	+	עלקת החמנית
+	-	-	-	-	-	+	-	עלקת חרוקה

תמונה 2 מראה דוגמה דומה של RAPD שהתקבל על ידי הפריימר אחר (OPG6) ששימש לבדיקת DNA של חמשת מיני העלקת כנל. פריימר זה נתן בנד אחד (OPG6-400) שאופייני רק לעלקת מצרית ובנד אחד (OPG6-660) שאופייני רק לעלקת חמנית. גם פה בוצע Southern לדגמי ה-RAPD על ידי היברידיזציה בעזרת גלאים מתאימים.

עלקת ענפה שנאספה בשדות תפוחי אדמה בגולן דומה בפרופיל RAPD לפרטים של עלקת ענפה מאוכלוסיות בר שונות בגליל המערבי, בגליל התחתון ובעמק יזרעאל (תמונה 1). ניתן היה בקלות להבדיל בין פרטים אלה לעלקת מצרית בעזרת גלאי DNA שעוברים היברידיזציה בהתאמה עם כל אחד מן המינים (טבלה 2). בדרך דומה מצאנו כי דגמי RAPD של עלקת נטויה משדות חקלאות בגולן ובנגב דומים לאלה של פרטים מאותו מין שנאספו בשדות בר. הסמנים הגנטיים שנמצאו למיני העלקת החשובים נבדקו גם על דוגמאות DNA של עלקות מארצות אחרות, כדי



תמונה 1 : דגמי RAPD של מיני עלקת שונים עם הפריימר UBC215, ודגם Southern לדגמי
 לדגמי ה-RAPD שהתקבלו על ידי היברידיזציה בעזרת הגלאים UBC215-1400 ו-
 UBC215-470.



תמונה 2 : דגמי RAPD של מיני עלקת שונים עם הפריימר OPG6, ודגם Southern לדגמי
 ה-RAPD שהתקבלו על ידי היברידיזציה בעזרת הגלאי OPG6-660.

לבחון את תקפותם לזיהוי אמין של המינים החשובים. בדקנו אותם על אוכלוסיות שונות של עלקת משני מינים מספרד, המייצגים את אזור התפוצה המערבי ביותר שלהם, בצידו השני של הים התיכון, ועל עלקות ממזרח אירופה ומצפון אפריקה. שלש דוגמאות של עלקת חרוקה שנטפלו לפונדקאים שונים באזורים שונים בספרד מוצגות לדוגמה בתמונה 1, ושתי דוגמאות DNA של עלקת החמנית משני אזורים בבולגריה מוצגות בתמונה 2. הבנדים הדיאגנוסטיים שנמצאו מתאימים לזיהוי מיני העלקת בארץ נמצאו מתאימים גם לזיהוי עלקת חרוקה ממצרים ולעלקת החמנית מספרד וטורקיה.

אנליזת Parsimony של אוכלוסיות עלקת המבוססת על 86 בנדים פולימורפים הפרידה בבירור בין שני השבטים בסוג עלקת, הבחינה בין עלקת מצרית ועלקת ענפה, והראתה את עלקת החמנית כישות שונה מעלקת נטויה.

פיתוח יכולת לבדוד DNA מזרעי עלקת

זרעי העלקת זעירים, גודלם 0.2-0.4 מ"מ. זרעים אלה נשארים רדומים בקרקע עד קבלת גרוי כימי משרשי פונדקאי. עם קבלת גרוי כזה הם נובטים ותוקפים את הפונדקאי. מאחר וקיימים הבדלים בהעדפת הפונדקאים של מיני העלקת השונים פיתחנו שיטה שתאפשר זיהוי של זרעי העלקת המצויים בשדה. לצורך זהו זרעי עלקת שבודדו מן הקרקע נדרשה לכן שיטה שמאפשרת קבלת DNA באיכות מתאימה מזרע בודד. לאחר בדיקת שינויים שונים בפרוטוקול הפקת ה-DNA ולתוכנית ה-PCR (בעיקר תוספת פולימראז והגדלת מספר מחזורי הפעולה של המכשיר) הגענו ליכולת הפקה טובה של DNA מזרעים מן הקרקע וליכולת לבצע אנליזה של ה-DNA. התברר שלמרות שכמות ה-DNA שאנו מפיקים מזרע בודד היא קטנה ביותר (1-5ng), היא מספיקה לסדרה בת 20 בדיקות בעזרת PCR לאחר מיהול בעוד שלזיהוי מדויק של מין העלקת מספיקות כ-5 בדיקות כאלה בלבד.

לצורך זיהוי זרעים שנפו מדוגמאות קרקע מן השדה היה צורך בשינוי הפרוטוקולים כנראה בגלל איכות ירודה של ה-DNA בחלק מן הזרעים. הגדלנו את מספר מחזורי ה-PCR והוספנו יותר פולימראז כדי לקבל דגם בנדים הניתן לקריאה.

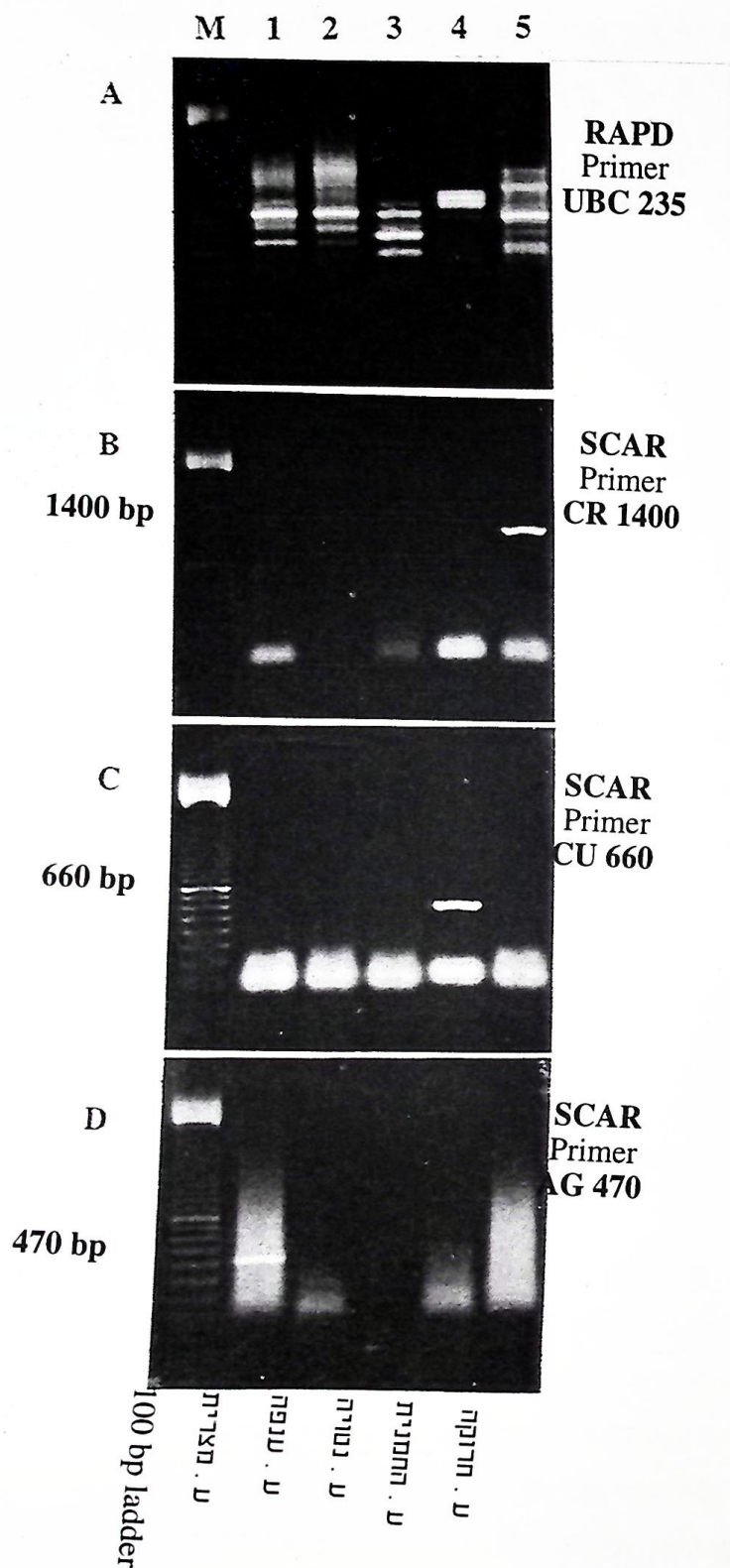
זרעים שאיבדו מחיוניותם ניתנים עדיין לבדיקה כל עוד הם מכילים רקמות עובר שלמות. ניתן להפיק DNA באיכות המתאימה לבדיקה גם מזרעים שאינם נצבעים ב-tetrazolium (צביעה מקובלת לבחינת חיותיות הזרעים). יכולת זו אינה מפתיעה, כי tetrazolium בוחן פעילות אנזימית חיונית במיטוכונדריות התאים, שדועכת עם הזדקנות הזרע, בעוד שה-DNA הוא מולקולה יציבה מאד שנשמרת שלמה גם בתאי ס מזדקנים של העובר והאנדוספרם כל עוד הזרע לא התפרק לחלוטין.

כאשר כמות ה-DNA בזרע קטנה מדי לקבלת פסים אופייניים בגל אגרוז עם צביעת אטידיום ברומיד, הרצה בגל אקריל-אמיד עם צביעת כסף איפשרו לנו להבחין בבנדים אופייניים ברגישות גבוהה ובקונטרסט מספיק. זוהי השיטה המדויקת ביותר שפותחה עד כה לאיבחון זרעים בקרקע בכלל ולבחינת נגיעות שדות בעלקת בפרט. בעזרתה ניתן לקבוע בודאות את מין העלקת ואת שיעור החיוניות של הזרעים בקרקע.

עם פיתוח שיטות אלה יש בידינו אפשרות לבדיקה בז-זמנית של ה-DNA של צמח בוגר שנאסף בשדה עם בדיקת DNA של הזרעים שהצמח הבוגר נושא, שמיצגים את אוכלוסית הצאצאים. בעזרת כלי זה יכולנו לבחון את תכונות הצאצאים של הכלאות עלקת בלי צורך לחכות להבשלת הזרעים ולנביטתם, שבטפילים אלה תלויה בנוכחות פונדקאי ונמשכת תקופה ארוכה יחסית.

פיתוח פריימרים ספציפיים לאיבחון עלקת

מאחר וזיהוי מדויק של עלקת בעזרת דגמי RAPD מצריך גם היברידיזציה כדי לזהות בנדים לא רק על פי גודלם



תמונה 3 : דגמי SCAR של DNA מזרעי עלקת מחמישה מינים (1-5), שהתקבלו מפריימרים ספציפיים (B-D), בהשוואה לדגמי RAPD (A).

אלא גם על פי הרצף שלהם, ראינו צורך בשיפור השיטה בדרך שתאפשר זיהוי חד משמעי בהרצה אחת ללא צורך בהיברידזציה שגוזלת זמן, דורשת שימוש בחומר רדיואקטיבי, יקרה יחסית ולכן לא מתאימה לדיאגנוסטיקה רוטינית. משום כך פיתחנו סמני SCAR (Sequence Characterised Amplified Regions) (Paran & Michelmore, 1993) על ידי בירור רצף הנוקלאוטידים בבנדים הספציפים של מיני העלוקת השונים ופיתוח פריימרים ספציפים שיאתרו את הרצפים הללו ב-DNA של צמחי עלוקת.

בתמונה 3 מוצגים דגמי SCAR של מיני עלוקת שונים. התמונה משווה דגמי RAPD ו-SCAR מ-DNA שמקורו בזרעי עלוקת בודדים מחמישה מינים שונים. תמונה 3A מציגה את דגמי ה-RAPD שהתקבלו בעזרת הפריימר UBC235 מן ה-DNA של כל חמשת הזרעים. תמונה זו מראה בנדים של RAPD האופייניים למינים הנבדקים ומהווה עדות לאיכות הטובה של ה-DNA. תמונות 3B-D מציגות את דגמי ה-SCAR של אותן דוגמאות DNA, כל אחת התקבלה בעזרת זוג פריימרים הספציפים למין אחד. משום כך מופיע בכל אחת מן התמונות רק בנד בודד: עלוקת חרוקה ב- 1400bp, עלוקת החמנית ב- 660bp ועלוקת מצרית ב- 470bp.

ההאבקה ומהלך התפתחות הפרח

ההאבקה בעלוקת מצרית ובעלוקת נטויה מבוצעת על ידי חרקים, בעיקר דבורים. עדות ישירה למעורבותם מצאנו בבחינת הרכב גרגרי האבקה על רגלי הדבורה ועל גחונה. דבורים שביקרו פרחי עלוקת היו עמוסות אבקת עלוקת שזוהתה בעזרת המיקרוסקופ.

מהלך הפריחה של פרח בודד נמשך כשבוע. לפרח פרוטוגיניה ברורה: הניצן נפתח כאשר הצלקת בשלה, האבקנים נפתחים כיום וחצי אחר-כך והם משחררים אבקה במהלך יום אחד. בשלב השני האבקנים נפתחים במרחק מה מהצלקת. בשלב זה יכול חרק להאביק את הפרח. יותר מאוחר עמוד העלי המתארך מביא את הצלקת למגע עם המאבקים הפתוחים ואז תתבצע האבקה עצמית. פרחים מכוייסים מפתחים פירות נורמלים המכילים 450-700 זרעים פוריים המעידים על יכולת הפרח לייצר זרעים גם ללא האבקה חזיתית.

הנבטה וגידול של עלקות בר

הנבטה וגידול של עלקות בר בתנאים מבוקרים מצביעות על הבדל מהותי ביניהן לבין עלקות משדות החקלאות. הבדל זה מתבטא ביכולת הריבוי וביכולת התקיפה של גידולים חקלאיים. נסיונות לגידול עלקות ענפה ועלוקת נטויה מן הבר על גידולי חקלאות לא צלחו. לעומת זאת טפילים אלה תוקפים צמחי נוי אחדים. עלוקת רכת-שער ששכיחה בהרי הגליל התחתון ובכרמל ואיננה ידועה משדות החקלאות תוקפת צמחי נוי בגינות.

יחסי גומלין בין אוכלוסיות חקלאות לאוכלוסיות בר של עלוקת

הקושי הטכסונומי העיקרי במיני העלוקת בחקלאות בארץ הוא בקביעה המדויקת של השייכות של אוכלוסיות עלוקת ענפה. עלוקת זו משתייכת באירופה למספר תת-מינים ולא היה ברור עד כה כיצד הם מתייחסים לפרטים הגדלים בארץ. בפלורה מופיעה רק תאור של *O. mutellii*, שהוא סינונים של *O. ramosa*. הישונו נטית את פרופיל ה-DNA של אוכלוסיות שונות בארץ עם דוגמאות DNA שקיבלנו מספרד ומבולגריה. כמו כן ערכנו בחינה מקפת של נתונים מורפולוגיים של עלקות אלה ועלוקות שנאספו בבר. התוצאות מצביעות על קיום לפחות שתי קבוצות מוגדרות בתוך הקומפלקס הזה בבר בארץ, חלקם קרובים מאד לעלוקת הענפה שבשדות. העלוקת הענפה ה"חקלאית" בארץ שונה משמעותית מזו הגדלה באירופה הן מורפולוגית והן על פי פרופיל ה-DNA. בגלל מיגבלות קרנטינה לא גידלנו עלקות מחו"ל ולא בוצעו הכלאות ביניהן לבין עלקות מן הארץ. על אוכלוסיות עלוקת הבר ראה להלן.

מרחק גנטי בין אוכלוסיות עלקת

סיכום הנתונים המולקולריים ב-cluster analysis מראה דגם ברור של אוכלוסיות מבודדות יחסית של עלקת בשדות החקלאות. לדוגמא, תמונה 4 מראה את הדמיון הגנטי בין אוכלוסיות עלקת מצרית בגליל המערבי. בתמונה זו קיימת הפרדה ברורה בין האוכלוסיות, והיא מראה כי המרחק ביניהן גדל ככל שהמרחק הגיאוגרפי ביניהן גדול יותר. נתון זה מצביע על כך שתנועת זרעי עלקת בין איזורים נגועים בעלקת איננה משמעותית. לעומת זאת מצאנו גיוון בדמיון של פרטים מאוכלוסיות עלקת חדשות יחסית. במקומות כאלה דמו פרטים שונים מאותה אוכלוסיה לאוכלוסיות שונות בארץ. דוגמה לכך ניתנת בתמונה 6' א' בה מוצגת רמת הדימיון של פרטים שנאספו בשדות מבוא חמה לאוכלוסיות עלקת מצרית מן הגליל המערבי.

כאשר הנתונים המולקולריים באוכלוסיות הבר של עלקת נבחנו באותה שיטה (תמונה 5) התברר שקיימות כמה קבוצות מוגדרות של עלקת ענפה ששונות זו מזו ומרוכזות בדרך כלל במוקדים גאוגרפים מוגדרים, וזאת בניגוד לדמיון הרב יחסית בין אוכלוסיות עלקת ענפה משדות החקלאות בגולן בנגב ובעמק יזרעאל. אוכלוסיית הבר של עלקת ענפה הדומה ביותר לאוכלוסיות החקלאיות היא זו שנדגמה במלכישוע. אוכלוסיה זו גדלה בשטח של צומח טבעי בשלטון שעורת התבור, שנתון לרעיה קבועה. יתכן שזרעי עלקת ממקור זה עברו לשטחים חקלאיים על ידי בעלי החיים.

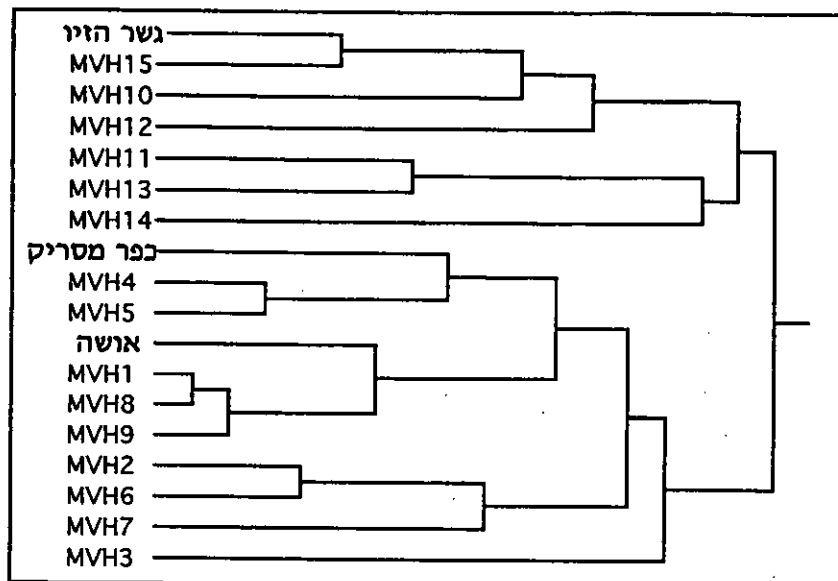
במקומות אחדים מצאנו יחד קבוצות שונות של עלקת ענפה. אוכלוסיית עלקת ענפה מאזור שדה תרומות למרגלות הגלבוע (אוכלוסיה 23) כללה שתי קבוצות מוגדרות שהמרחק ביניהן גדול יחסית, אחת נטפלה לחלמית והשנייה לאמיתה. אנו מניחים שאוכלוסיה פולימורפית זו היא היברידי בין עלקת ענפה למצרית. למרות שהמאפיינים המורפולוגיים של עלקות אלה מתאימים לעלקת ענפה, כמו אבקנים קרחים וממדים קטנים לצמח ולפרחים, הראו כמה פרטים את הבנדים הדיאגנוסטיים של עלקת מצרית, בדומה למצב בהיברידיים שיצרנו בנוה יער.

הכלאות בין מינים ואוכלוסיות של עלקת

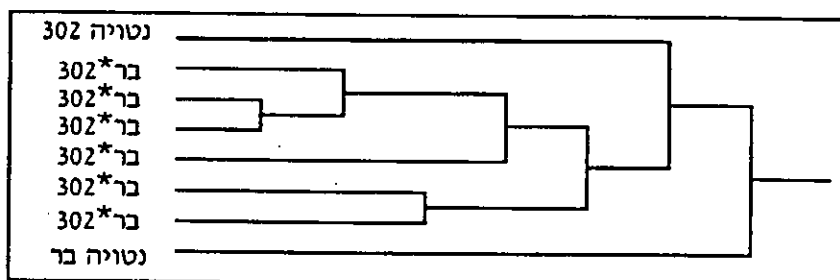
נערכו הכלאות רציפרוקליות של עלקת מצרית עם עלקת ענפה, של עלקת נטויה עם עלקת החמנית, ושל פרטים מאוכלוסיות שונות של עלקת מצרית הנבדלות ביניהן בהעדפת פונדקאים. האבקה ידנית של פרחים בוצעה בשלבי הבשלות המתאימים בכל מין. הפרחים כויסו עד הבשלת ההלקטים. זרעים בשלים נאספו והועברו לבדיקות הבאות:

(א) קביעת שיעור החיוניות על ידי מבחן נביטה בתנאים סטנדרטים (בנוכחות ארבעה ריכוזים שונים של GR24). שיעורי הנביטה של זרעי היברידיים בין אוכלוסיות של עלקת מצרית, ובין המינים עלקת מצרית ועלקת ענפה היו גבוהים (90%-100%). שיעור נביטת זרעי ההיברידיים של עלקת החמנית עם עלקת נטויה היה יחסית גבוה (מעל 80%), בעוד שיעור נביטת זרעי ע. החמנית, ששימשו כהורים זכריים ונקביים בהכלאות עם עלקת נטויה, היה נמוך יחסית (פחות מ-50%).

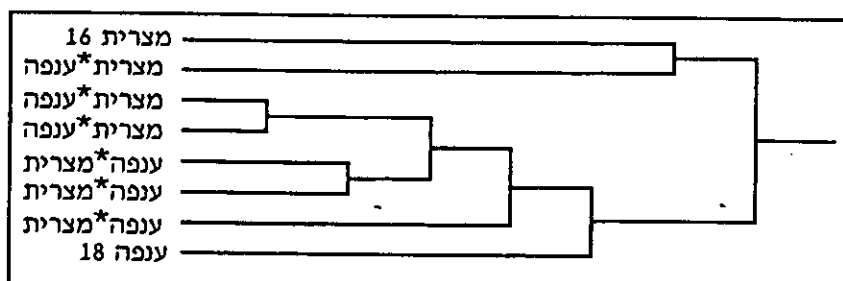
(ב) השוואת פרופילי RAPD של דוגמאות. לזרעים רבים פרופילי RAPD המהווים מצב ביניים בין דגמי ההורים. במקרים רבים הראו זרעים בנדים אופייניים של שני ההורים. פרטים אחרים נמצאו שונים משמעותית מהוריהם. בדרך כלל היו פרופילי ההיברידיים דומים יותר לצמח האם מאשר להורה הזכרי. סיכום הנתונים על ידי cluster analysis הראה כי כל זרע שהתפתח מפרח שהאבק הדדית באופן מלאכותי היה בדרך כלל יותר דומה לאחיו מאשר לכל אחד מהוריו (תמונה 6' ב-ד). מצב זה נכון לגבי הכלאות בין אוכלוסיות ובין מינים. לעיתים קרובות מצאנו דמיון רב בין זרעים מהכלאות רציפרוקליות, אם כי בהכלאות בין עלקת מצרית ועלקת ענפה בלט השלטון האימהי בהתבטאות המאפיינים המולקולריים שנבדקו.



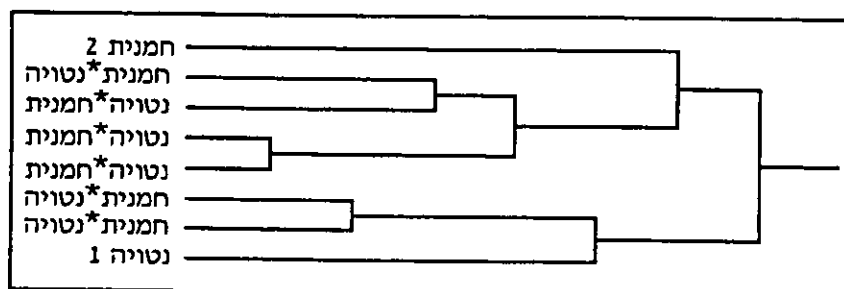
תמונה 6א: יחסי הדמיון בין פרטים באוכלוסיית עלקת מצרית ממבוא חמה לבין אוכלוסיות עלקת מצרית בגליל המערבי.



תמונה 6ב: יחסי הדמיון בין עלקת נטויה בר וחקלאית לבין ההיברידים ביניהם.



תמונה 6ג: יחסי הדמיון בין עלקת מצרית ועלקת ענפה לבין ההיברידים ביניהם.



תמונה 6ד: יחסי הדמיון בין עלקת נטויה ועלקת החמנית לבין ההיברידים ביניהם.

דנדרוגרמות המבטאות יחסי דמיון בין עלקות,
בוססות על בנדים פולימורפים של RAPD.

6/26

(ג) בדיקת העדפת פונדקאים. נערך מבחן הדבקה (ללא גרוי נביטה מלאכותי) על שרשי פונדקאים במערכת גידול שקופה בה ניתן לעקוב אחר התפתחות השרשים. תוצאות ראשוניות הראו שנבטי ההיברידיים של עלקת חמנית עם ע. נטויה מתו מיד לאחר הדבקה על שרשי חמנית, בעוד שהרציפרוקלים שלהם המשיכו להתפתח על שרשים אלה. תוצאות אלה מצביעות על האפשרות שבקבוצה זו של עלקות קיימת הורשה אימהית (ציטופלסמטית) של וירולנטיות לחמנית.

5. מסקנות והשלכות על המשך המחקר

תוצאות מחקר זה מדגימות את הפוטנציאל הטמון בשימוש בשיטות אנליזה של DNA בחקר הגנטיקה ובדיאגנוסטיקה של עלקת. בידינו גלאי RAPD ספציפים לכל אחד ממני העלקת החשובים בחקלאות, ופריימרים ספציפים של SCAR לכל מין, הניתנים לשימוש גם על DNA שמקורו בזרעים שמבודדים מדוגמאות קרקע משדות חקלאות. בתכניתנו להמשיך ולפתח ערכת זיהוי לעלקת עבור מעבדות שרות.

ההבחנה בין עלקת מצרית לעלקת ענפה היתה עד כה קשה בשל חוסר בהירות בסימנים המורפולוגיים המבדילים ביניהן. בעיה זו קשה במיוחד בגלל ההבדלים במורפולוגיה של כל אחד מהם כאשר הם נטפלים לפונדקאים שונים. לדוגמא: עלקת מצרית מפתחת תפרחות קטנות ופרחים קטנים, בדומה לעלקת ענפה, כאשר היא נטפלת לפונדקאים מסוימים. בעזרת סמני RAPD ו-SCAR לא מתעורר קושי זה בזיהוי.

בדרך דומה מאפשרת השיטה המולקולרית הבחנה חד משמעית בין עלקת החמנית לעלקת נטויה, שחשיבותה רבה בגלל ההבדל בהעדפות פונדקאי על ידי שני המינים.

פיתוח אמצעים מולקולריים פשוטים ומדויקים לאבחון של עלקת בשדות החקלאות הוא חדשני ובעל משמעות לחקלאות בארץ ובארצות רבות אחרות בהן העלקת מהווה פגע קשה בחקלאות. מציאת סמנים מולקולריים למיני העלקת נותנת כלי לאיבחון עלקת בשדה. הצורך בכלי זה נובע מן ההבדלים הגדולים בהעדפות הפונדקאים על ידי מיני העלקת השונים. שיטות האיבחון שפותחו במחקר זה יאפשרו תכנון נכון של מחזור-גידולים בהתחשב בזהוי המדויק של אוכלוסיות העלקת. על בסיס הישגנו במחקר זה יש לחתור עתה למציאת סמנים לאוכלוסיות ספציפיות בתוך המינים, שהראו שונות בהעדפת פונדקאים.

מחקר זה מציג לראשונה את האפשרות כי אוכלוסיות בר של עלקת מעורבות במאגר הגנים של אוכלוסיות עלקת בשדות. התברר כי הכלאה של עלקת נטויה ושל עלקת ענפה מן הבר עם פרטים מאוכלוסיות מינים אלה בהתאמה משדות חקלאות נותנת זרעים פוריים. מן הנתונים דלעיל ברור גם כי הכלאה טבעית בין עלקת מצרית ועלקת ענפה אפשרית בשדות. נראה לנו גם כי אוכלוסיות בר הסמוכות לשדות חקלאות עשויות לשמש מקור לפולימורפיזם בשדות, אם כי במידה מצומצמת בגלל ההבדלים בגודל הפרחים שעשויים לשמש מחסום התרבותי חלקי.

עד כה לא נעשתה שום עבודה להבהרת הבסיס הגנטי של העדפת פונדקאים על ידי פרטים או אוכלוסיות של עשבים טפילים. מחקר מקיף זה מביא תוצאות ראשוניות המצביעות על האפשרות כי העדפת פונדקאים מורשת אימהית. אם יתקבל אישור לתוצאות אלה, יתכן שהעברת אבקת עלקת מאוכלוסיות בר לאוכלוסיות חקלאיות לא תהווה גורם שישפיע משמעותית על הוירולנטיות של עלקת לגידולים חקלאיים. מאחר והיקף המחקר בתחום זה היה ראשוני בלבד איננו יודעים אם התופעה מוגבלת לעלקת נטויה או שהיא כללית למיני העלקת השונים. יש להרחיב את המחקר בנקודה זו על מנת לאפשר פיתוח אסטרטגיות עמידות מתאימות בגידולים פונדקאים.

6. הצעות ליישום תוצאות המחקר

הכלים המולקולריים שפותחו במחקר זה המאפשרים זיהוי מדויק של זרעי עלקת מדוגמאות קרקע נותנים מענה מדויק לצרכים הדיאגנוסטיים הקיימים בשדות חקלאיים. זיהוי זרעים אפשרי היום כשרות לחקלאים וככלי ולמטפחים, והוא יכול להכנס לשימוש מידי כיוון שהבדיקה המולקולרית איננה יקרה משמעותית מהבדיקות הקיימות. אנו מקווים שיהיה גורם מעוניין שיסייע ברישום פטנט על רצפי הפריימרים שפיתחנו, ויממן פיתוח שישלב את כל הפריימרים בערכת זיהוי אחת שתצמצם את מספר הרצות ה-PCR הדרושות לכל דוגמה.

7. הבעת תודה: תודתנו לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות על תמיכתה בפרויקט זה.