

1999-2001

תקופת המחקר:

259-0106-01

קוד מחקר:

Subject: IDENTIFICATION OF RESISTANCE SOURCES
IN TOMATO FOR THE PLANT PARASITE
OROBANCHE AEGYPTIACA

Principal investigator: YORAM KAPULNIK

Cooperative investigator:

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: בידוד מקורות עמידות בצמחי
עגבניה לעלקת מצרית

חוקר ראשי: יורם קפולניק

חוקרים שותפים:

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן
50250

תקציר

מטרת הפרויקט הנוכחי היתה לזהות ולאפיין מוטנטים של צמחי עגבניה העמידים לצמח הטפיל – עלקת.

במהלך העבודה נעשו מאמצים ב-2 כוונים במקביל. האחד, לנצל ממצאים מוקדמים שהיו ברשותנו ולהמשיך לאפיין מוטנטים שנתקבלו בתנאי חממה של הזן מיקרוטום. והשני, להתחיל לבדוד מוטנטים חדשים בתנאי שדה מהזן M82. מתוך המהלך הראשון שהחל עם 40 מוטנטים בדור ראשון (אחרי מוטציה) כעמידים הסתבר כי כל הקוים שבודדו עדיין רגישים לעלקת ונדבקים בה, כאשר תנאי הגידול (בחממה) הינם סב-אופטימלים ובאיקר טמפרטורות נמוכות. המהלך המקביל של סלקציה בתנאי שדה נתן גם הוא קוים בעלי פוטנציאל עמידות לעלקת אך מאמץ זה לא הגיע לידי סיום. מתוך 14,000 מוטנטים שנבחנו במשך המחקר הנוכחי נמצאו כ-6 בעלי פוטנציאל עמידות בתנאי שדה ונבחנו שוב באביב 2002 בשדה. סקר נוסף שכלל אוכלוסית 18,000 מוטנטים של הזן M82 העלה כ-21 פרטים שהראו עמידות בתנאי חממה.

מסקנות מהממצאים עולה כי עמידות לעלקת באופן הגישה והטכנולוגיה שנעשה בהם שימוש אינה קלה להשגה והמוטנטים שהתגלו עד כה צריכים עדיין להבחן בתנאי שדה לפני המשך העבודה.

בידוד מקורות עמידות של צמחי עגבניה לעלקת מצרית

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מס' 259-106-00

מוגשת לקרן המדען משרד החקלאות

ע"י

ד"ר יורם קפולניק – גידולי שדה ומשאבי טבע, מינהל המחקר החקלאי

ד"ר אברהם לוי – גנטיקה של צמחים, מכון ויצמן למדע

ד"ר דני יואל – נווה יער, מינהל המחקר החקלאי

ד"ר ראובן יעקובסון – ירקות, מינהל המחקר החקלאי

Yoram Kapulnik, Dept. of Agronomy and Natural Resources, ARO, the Volcani Center, Bet Dagan 50250. Email kapulnik@agri.huji.ac.il

Avi. A. Levy, Dept. of Plant Sciences, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100. Email: avi.levy@weizmann.ac.il

Dani Yoal, Dept of weed Sciences, ARO, Newe Yawar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095

Jacob Yacovson, Vech Dept, ARO, the Volcani Center, Bet Dagan 50250.

מרץ 2002

ממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר



תקציר

מטרת הפרויקט הנוכחי היתה לזהות ולאפיין מוטנטים של צמחי עגבניה העמידים לצמח הטפיל – עלקת. במהלך העבודה נעשו מאמצים ב-2 כוונים במקביל. האחד, לנצל ממצאים מוקדמים שהיו ברשותנו ולהמשיך לאפיין מוטנטים שנתקבלו בתנאי חממה של הזן מיקרוטום. והשני, להתחיל לבדוד מוטנטים חדשים בתנאי שדה מהזן M82. מתוך המהלך הראשון שהחל עם 40 מוטנטים בדור ראשון (אחרי מוטציה) כעמידים הסתבר כי כל הקווים שבודדו עדיין רגישים לעלקת ונדבקים בה, כאשר תנאי הגידול (בחממה) הינם סב-אופטימלים ובאיקר טמפרטורות נמוכות. המהלך המקביל של סלקציה בתנאי שדה נתן גם הוא קווים בעלי פוטנציאל עמידות לעלקת אך מאמץ זה לא הגיע לידי סיום. מתוך 14,000 מוטנטים שנבחנו במשך המחקר הנוכחי נמצאו כ-6 בעלי פוטנציאל עמידות בתנאי שדה ונבחנו שוב באביב 2002 בשדה. סקר נוסף שכלל אוכלוסית 18,000 מוטנטים של הזן M82 העלה כ-21 פרטים שהראו עמידות בתנאי חממה. מהממצאים עולה כי עמידות לעלקת באופן הגישה והטכנולוגיה שנעשה בהם שימוש אינה קלה להשגה והמוטנטים שהתגלו עד כה צריכים עדיין להבחן בתנאי שדה לפני המשך העבודה.

מבוא

צמחים המשתייכים לסוג עלקת (*Orabanche*) הם טפילים מוחלטים ותלויים בצמח הפונדקאי להשלמת מחזור חייהם. תוך כך, קיימת פגיעה ברמת היבולים והתפתחות צמח הפונדקאי עד התמוטטות מוחלטת של צמח הפונדקאי. מידת הנזק תלויה ברמת האילוח, בעונת הגידול, אופי האגרוטכני ובעיקר טווח הפונדקאים. העלקת הפכה עם השנים לבעיה מרכזית בארץ ובעולם. זרעי העלקת נשמרים באופן יציב בקרקע למשך מספר רב של שנים ועד הופעת פונדקאי מתאים בכך מגבילה העלקת בקרקע את בחירת הגידולים המתאימים לקיום מחזור זרעים תקין בחקלאות. הדברת העלקת הינה משימה קשה והסיבות לכך תוארו בהצעתו המקורית. עיקר ההדברה מתבסס כיום על יישום הרבציידים בריכוזים נמוכים המשרים נזק רב יותר לטפיל מאשר לפונדקאי. גישה זו מצריכה ישומים כימיים מדויקים ומייקרת את עלות הגידול מסבה נזק מצטבר לסביבה ובחלק מהמיקרים גם נזק לפונדקאי וליבולו. על רקע זה ברור כי קיימים יתרונות רבים לחיפוש אחר מקורות עמידות גנטיים שיביאו להורדה באילוח הגידולים ובתפוצת זרעי עלקת בשדות חקלאיים. עד כה נמצאו עמידויות מעטות בלבד לעלקת בגידולים אחדים.

העגבניה הינו גידול הרגיש מאוד לעלקת מצרית (*O. aegyptiaca* Pers) ובתנאי טמפ' נמוכה בקרקע נדבקת גם בעלקת חרוקה (*O. crenata* Forsk). מעבודה מקדימה שנעשתה ע"י חלק מהמציעים עולה שמתוך 160 זני עגבניות שנבדקו בישראל לא נמצא אף זן אחד העמיד לעלקת מצרית. גם בעולם לא ידועה עמידות בעגבניות הן בזני הבר והן בזנים הנמצאים בשימוש חקלאי. על רקע נתונים אלה ניתן להבין מדוע יש חשיבות במציאת דרכי פעולה חדשים שיאפשרו זיהוי של מנגנוני עמידות בצמח זה לפיתוח זני עגבניה עמידים לעלקת מצרית.

מטרת המחקר

מטרת המחקר הנוכחי לאתר עמידות גנטית לעלקת כחומר מוצא ליצירת זני עגבניות עמידים לעלקת. לצורך השגת מטרה זו הוצעו הפעולות הבאות:

- א. לערוך סקר ובחירה של קווי צמחים שאינם נדבקים בעלקת מתוך שתי אוכלוסיות מוטנטיות שנוצרו במסגרת פרויקט הגנום הצמחי. אוכלוסיה אחת נוצרה ע"י קרינה Fast Neutron (FN) ואוכלוסיה השניה ע"י חדירה אקראית של טרנספוזונים.
- ב. פרטים שיזוהו כבעלי עמידות יוכלאו בהכלאות עצמיות והכלאות חוזרות (על זן המקור) במטרה לקבוע את תורשתיות התכונה ולאפיין את הבסיס הגנטי לעמידותם.
- ג. המוטנטים השונים יוכלאו בינם לבין עצמם על מנת למיין אותם לקבוצות האלליות השונות.
- ד. המוטנטים ימוינו על פי הפנוטיפ שלהם לאחר איפיון בוטני של שלבי ההדבקה.
- ה. איפיון הגנים המוטנטים ייעשה ע"י מיפוי באוכלוסיות ה-FN וע"י שיבוט ישיר באוכלוסיות הטרנספוזונים (במידה ואוכלוסיה זו תכיל מוטנטים בהדבקות עלקת). איפיון מעמיק של הגנים הינו חורג ממסגרת העבודה של הצעה זו.

שלא במסגרת ההצעה המקורי – נערכו ניסויי סלקציה בשדה תוך שימוש עם אוכלוסיות מוטנטים של הזן M82

מהלך העבודה

מאוכלוסיה שהוכנה ברקע של זן עגבניות מיקרוטום לצורך זיהוי מקורות גנטים לעמידות במין *Lycopersicon esculentum* שבה ניבדקו כ- 5,000 פרטים וזהו כ- 40 קוים שלא הצליחו להידבק בעלקת, וזאת למרות יישום מידבק כבד במצע הגידול ובתנאים בהם נידבק זן המקור (WT מיקרוטום) באופן מלא.

העבודה הנוכחית עשתה שימוש בשלוש אוכלוסיות מוטנטים:

1. אוכלוסיות מיקרו-טום שטופלו בקרינה של Fast Neutron.

אוכלוסיות M2 של עגבניות מהזן מיקרוטום שפותחו מזרעי יסוד שעברו טיפול בקרינה נבחנו וזהו כ- 40 פרטים שאינם נדבקים בעלקת ויחד עם זאת פוריים, דומים לזן המקור פנוטיפית. במשך העונה האחרונה נעשה מבחן הדבקה נוסף ובודדו 2 פרטים) שלא נדבקים בעלקת מיצרית. במפרטים אלו נעשתה הכלאה עצמית של הקווים והמשכנו לרבות את מספר הזרעים (הצאצאים) בגידול ללא חשיפה לעלקת וזאת כדי לאפשר מיבחן צאצאים באוכלוסיות גדולות. הקווים הוכלאו עם קו חבר. פרטים שלא נידבקו בעלקת הוכלאו (עצמית, וחוזרת) ויבוצעו בהם הכלאות לבדיקת קומפלימנטציה.

מתוך אוכלוסית המוטנטים של מיקרוטום שכללה 5,000 פרטים (M2) נמצאו כ-40 פרטים שהראו עמידות לעלקת. כל אחד מהפרטים שנמצאו נבדק בדור הבא (M3) לעמידות ונמצא כי מתוכם רק 16 פרטים הראו עמידות בניסויי חממה. מבחן עמידות נוסף נערך לצאצאי 16 הפרטים (M4) ונמצא כי רק שני פרטים עמידים לעלקת בתנאי הניסוי.

לאחר ריבוי של הזרעים של שני הקוים נערך מבחן עמידות לצאצאיהם (M5) ונמצא כי רק 60% מהצמחים היו עמידים בקו M386 ואילו בקו M6 90% מהצמחים הראו עמידות. בשלב זה אחת המסקנות האפשריות היא העובדה כי לא הצלחנו לקבל הומוזיגוטיות לתכונת העמידות ו/או העמידות אינה מוחלטת ונשלטת ע"י תנאי סביבה.

2. אוכלוסיות טרנספוזונים

במסגרת פרויקט הגנום הצמחי הוכנה מערכת מוטגנזה בעגבניה טרנספוזוני Ac/Ds של תירס. מוטגנזה בעזרת טרנספוזונים הינה פחות יעילה מאשר הקרנה, אך לעומת זאת החדרת הטרנספוזון לתוך גן משמש כתווית (TAG) ומאפשר זיהוי ובידוד ישיר של הגן המוטנטי. עד כה ניסרקו כ-1,500 קווי M3 מאוכלוסית הטרנספוזונים. קוים אלו נימצאו כולם רגישים לעלקת מיצרית

3. אוכלוסית מוטנטים בזן התעשייה M82

במסגרת פרויקט הגנום הצמחי הוכנה מוטגנזה נוספת בזן עגבניה לתעשייה M82. הצמחים רובו בתנאי שדה וזרעי M2 נשתלו בחלקת ניסוי שבקיבוץ אושה. בניסוי זה נבדקו 700 משפחות שאופיינו קודם לכן במעבדתו של פרופ' דני זמיר (הפקולטה לחקלאות) כמו כן, נשתלו 14,000 מוטנטים באקראי. רמת האילוח של הקרקע בשדה היתה גבוהה מאוד ובמהלך הגידול נראו נפילות של צמחים בעקבות הדבקה בעלקת. בתום הגידול נמצאו כ-100 צמחים שלא הודבקו בעלקת ומתוכם 31 צמחים נמצאו פוריים וראויים להמשך העבודה.

מתוך אוכלוסית מוטנטים של הזן M82 שנבחנו בתנאי שדה (אושה 200) נבדקו 700 משפחות (10 פרטים בכל משפחה) וכן 14,000 מוטנטים בודדים שלא במבנה משפחות. מתוך כל המוטנטים שנבדקו באותה עונה נמצאו כ-100 פרטים שהראו עמידות לעלקת בשדה. מתוך כל הצמחים העמידים רק 31 קוים היו פוריים והם נלקחו להמשך בדיקה בתנאי חממה. בקיץ 2001 נערך מבחן העמידות בתנאי חממה לצאצאי כל אחד מ-31 הקוים הנ"ל. נמצאו התוצאות המובאות בטבלה מס' 1. ניתן ללמוד כי מתוך כל הצמחים החיוניים (שנבטו בתנאי חממה) קיים קו אחד שלא נדבק כלל בעלקת. במקביל לבחינת 31 הקוים נבדקה אוכלוסיה של מוטנטים בודדים לזן M82 (18,000 צמחים) בתנאי חממה ומתוכם נמצאו 37 קוים עמידים אך רק 21 מהם הניבו פירות.

מסקנות כלליות

בפרויקט הנוכחי נעשה מאמץ מוגבר כדי לבחון את אפשרות של מציאת עמידות גנטית לעלקת בצמחי עגבניה וזאת ע"י שימוש במוטנטים של זנים המקובלים בעבודה. נעשה שימוש בשתי אוכלוסיות זנים בלתי תלויות (מיקרוטום ו-M82).

ניתן להסיק כי תדירות המוטציות לצמחים עמידים הינה נמוכה ומעבר לכך, יציבות המוטציה ו/או העמידות אינה גבוהה. זאת ועוד, נראה כי הצורך בביצוע סלקציות בתנאים מבוקרים גרם לכך שחלק מהצמחים – למרות שהיו עמידים בתנאי שדה – "איבדו" את עמידותם. אחת הסיבות האפשריות לתופעה זו עשויה להיות הטמפרטורה הנמוכה במצע הגידול הגורמת לשבירת העמידות גם בקוים שבברור היתה לגביהם נטיה לעמידות. נטיה זו התבטאה במספר עלקות נמוך בהרבה בהשוואה לצמחי המקור (1-2 עלקות לצמח לעומת 20, בהתאמה).

למרות המסקנה העומדת תלויה כצל מעל ממצאי המחקר הנוכחי החומר הביולוגי שברשותנו עדיין נבחן בתנאים מבוקרים. יש בדעתנו לבדוק ישירות את ההיפותזה הנל ורק במידה ויוכח כי אכן תנאי הטמפרטורה הם הגורם המגביל להמשך סלקציה בתנאים מבוקרים יערכו ניסויים בשדות מאולחים. הבעיה העיקרית במעבר לעבודה בשדה היא העובדה כי פוטנציאל ההדבקה בקרקע אינו אחיד ביחידת הבדיקה (החלקה) ועשוי להעמיד קשיים להמשך. בעיה זו תוכל לבוא על פתרונה עם המעבר לעבודה בתנאי חממה מבוקרים שיוגדרו בניסויי הפיטוטרון הנערכים באביב 2002.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר

לזהות ולאפיין מוטנטים של עגבניות עמידות לעלקת.

עיקרי הניסויים והתוצאות

במאמץ לאפיין מוטנטים שהיו קיימים בתחילת הפרויקט וכן לבדוד מוטנטים נוספים התברר כי רוב המוטנטים שקיימים אינם מראים עמידים מושלמת לעלקת והנותרים עמידותם מותנאת בתנאי הסביבה. מהמוטנטים שנמצאו במשך הפרויקט קיימים מספר טיפוסים מבטיחים להמשך עבודה בתנאי שדה.

המסקנות המדעיות

1. ניתן לקבל טיפוסים צמחים הנדבקים בשלב מאוחר של הגידול.
2. בטמפרטורות נמוכות בקרקע חלה "שבירה" של עמידות המוטנטים.
3. טיפוח לתכונת עמידות בעלקת ראוי להעשות בתנאי שדה ולא חממה.

הבעיות שנתרו לפתרון

בידנו מספר טיפוסים מוטנטים העמידים לעלקת רק בתנאים מסוימים. בטרם יושקע מאמץ ואמצעים אחרים רצוי להגדיר נכון את התנאים בהם קיימת עמידות ולבחון את התרומה הכלכלית העשויה לנבוע מהשימוש בהם.

הפצת הידע

עדין לא.