



בחינת התגובה של אוכלוסיית ירבוז פלמרי לקוטל העשבים אנווק ובירור מנגנון העמידות

75%. קוטל זה מייצג מעבד ALS שנמצא בשימוש רב ולכן נבחר לשימוש במחקר זה. בנוסף, עבור תת-קבוצה של אוכלוסיות שהראו תגובה מופחתת לקוטל העשבים בבדיקה הראשונית, רמות העמידות נבדקו בעקומי תגובה. נחקר גם מנגנון העמידות הקשור בשינוי באתר המטרה של הגן המקודד לאנזים ALS באוכלוסיות אלו.



(תמונה שמאלית) (צילום: מאור מצרפי).

שיטות וחומרים

איסוף זרעים מהאוכלוסיות השונות

איסוף זרעים מהשדות השונים כלל קציר אקראי של 4-6 תפרחות מכל צמח עבור כ-40 צמחי נקבה המרוחקים לפחות 10 מ' זה מזה, שנאספו באופן אקראי בכל שדה. המרחק בין מיקומים מהם נאספו זרעים, אוכלוסיות, היה לפחות 5 ק"מ. התפרחות נדושו ואוחסנו בקופסאות ב-4 מעלות צלזיוס עד לשימוש.

סקירה ראשונית לבחינת יעילות קוטל העשבים אנווק

זרעים מכל 22 האוכלוסיות נזרעו במגשים מלאים בתערובת גידול מסחרית (טוף מרום-גולן®). כל מגש הכיל 98 באריות, כאשר בכל בארית נזרעו 5-8 זרעים. עם ההצצה, דוללו הצמחים לקבלת שתיל אחד לכל באר. כאשר רוב הצמחים בכל מגש הגיעו לשלב צמיחה בגובה 5-7 ס"מ (שלב 4-6 עלים), חולקו המגשים לשלושה

ז'קלין אבו-נסאר¹, עמית וולך^{1,2}, אילון וינקלר^{1,3}, חנן איזנברג¹, מאור מצרפי¹

¹המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער, החוג לביולוגיה אבולוציונית סביבתית, אוניברסיטת חיפה ³הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, האוניברסיטה העברית

מבוא

ירבוז פלמרי הוא מין פולש, עשב קיץ, דו ביתי קשה הדברה. הוא תחרותי מאוד מול גידולי שדה קיץ נמרצים בעלי קמה מפותחת; גם בצפיפות נמוכה, נוכחותו בשטח עלולה לגרום לאובדן יכול משמעותי. על פי סקר לאומי של האגודה האמריקאית למדע העשבים הרעים (Van Wyche et al., 2017), ירבוז פלמרי הוא אחד ממיני העשבים הקשים ביותר להדברה בשדות תירס וסורגום בארה"ב. מכיוון שמין זה הוא יצרן זרעים פורה, נוכחותם של צמחי נקבה בודדים בלבד בשדה עלולה להוביל לשיבוש משמעותי במהלך עונות הגידול הבאות (Norsworthy et al., 2014). בנוסף לכך, בשל השונות הגנטית הגבוהה במין זה, הופעת העמידות לקוטלי עשבים די שכיחה בשדות השונים (Yannicari et al., 2022). לראיה, מין זה הוא בין מיני העשבים הידועים לשמצה ביותר לפיתוח דפוסי עמידות לקוטלי עשבים נגד מנגנוני פעולה רבים ושונים (Heap, 2024).

עשב זה נפוץ במספר אזורים ברחבי הארץ, מעמק החולה בצפון ועד השפלה הדרומית בדרום. תפוצתו התרחבה במהירות בשנים האחרונות, כאשר חקלאים מדווחים על כשל בהדברת העשב באמצעות מעכבי האנזים אצטולקטאט סינתאז (ALS). בעבודה זו ערכנו סקר על מנת להבין את תפוצת הצמח הפולש בשדות חקלאיים ולחקור את תופעת העמידות לקוטלי עשבים המעכבים את האנזים ALS. ההשערה המחקר הייתה כי עמידות למעכבי ALS עשויה להופיע בכמה אוכלוסיות ובמקומות שונים ברחבי הארץ. לפיכך, לצורך מחקר זה, אספנו זרעים מ-22 אוכלוסיות משדות חקלאיים שונים ברחבי ישראל בהם דווח על שיבוש נרחב בעשב זה. זרעים אלה הונבטו, וצמחים נבדקו בעזרת מינונים שונים של קוטל העשבים אנווק® (טריפלוקסיסולפורון,

ניתוח סטטיסטי

המינון היעיל שגורם לעיכוב של 50% בצימוח (ED_{50}) והמינון שהביא לשרידות של 50% (LD_{50}) מהפרטים נבחן עבור כל אוכלוסייה בעזרת עקומי התגובה. הנתונים נותחו על ידי התאמת מודל לוגיסטי של שלושה פרמטרים, ואחוז ההישרדות נותח באמצעות מודל ליניארי כללי (חבילת 'drc'). הניתוח הסטטיסטי בוצע באמצעות RStudio גרסה 4.2.3 (R core Team, 2016). על מנת לבדוק אם ניתן לשלב את התוצאות של שתי הרצות ניסוי, השתמשנו ב-ANOVA דו-כיווני ואחריו ב-Tuckey post-hoc test.

תוצאות

סריקה לבחינת העמידות לקוטל העשבים אנוק בשימוש בחצי ובמינון המלא המומלץ בתווית

כפי שמוצג על ידי המפה באיור 1, ניתן לקבץ אוכלוסיות לארבעה אזורים מרכזיים ברחבי הארץ: הגליל, הגליל התחתון ומישור החוף-צפון ודרום. אף על פי שניתן למצוא גידולי שדה גם באזור הערבה, לא דווח על אוכלוסיות ירכוז פלמרי באזור זה (מצרפי, תצפיות אישיות). צמחים מ-22 האוכלוסיות שנאספו נבחנו בתגובה לשני מינונים של אנוק אל מול ביקורת לא מטופלת. באופן כללי, היעילות של אנוק הייתה נמוכה ואוכלוסיות עמידות נרשמו בכל ארבעת האזורים (איור 1). עם זאת, לצמחים של אוכלוסיות שמקורן באזור מישור החוף הדרומי היו שיעורי הישרדות גבוהים יותר בהשוואה לאזורים האחרים עבור חצי או מהמינון המומלץ של אנוק.

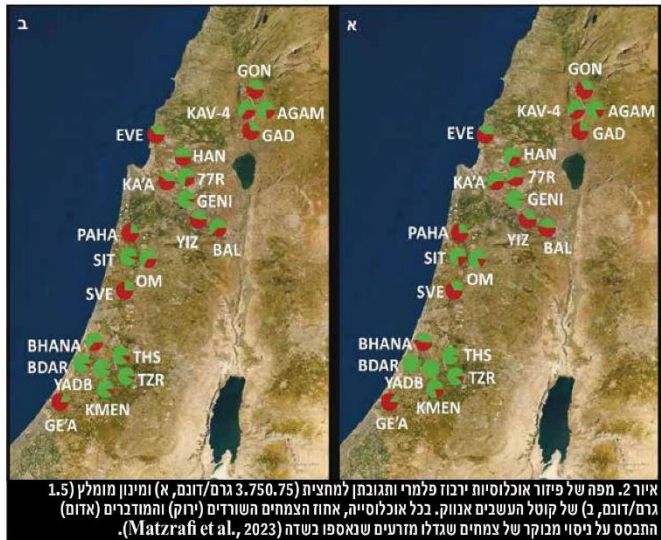
חלקים: הראשון שימש כביקורת לא מטופלת, השני רוסס בחצי מינון והשלישי במינון מלא כפי המומלץ בתווית. המינון המומלץ בתווית 1.5 גרם לדונם בתוספת שטח 90 בריכוז 0.1% סה"כ רוססו כ-28 צמחים לכל טיפול. יישום התכשירים בוצע באמצעות מרסס שולחני מצויד בפומית 8001E, בנפח תרסיס של 20 ליטר לדונם. הניסויים נערכו במרכז המחקר נווה יער בבית רשת במהלך העונה הטבעית (יוני-ספטמבר 2022) לגידול ירכוז פלמרי בטמפרטורה ממוצעת של $33/22\pm 3$ מעלות (לילה/יום). אחוז השרידות, צמחים בעלי עלה חדש, תועד 21 ימים לאחר הטיפול. המפות ששימשו לתיאור אחוז השרידות עבור כל אוכלוסייה נוצרו באמצעות ArcGIS Pro. 2.8.0. (ESRI)

בחינת רמת העמידות ע"י עקומי תגובה

רמת העמידות נבחנה עבור תת-קבוצה של אוכלוסיות שהראו רגישות מופחתת לקוטל העשבים אנוק בסקירה הראשונית, הצמחים באותם אוכלוסיות שרדו טיפול במינון המומלץ. כל האוכלוסיות החשודות כעמידות לקוטל העשבים הושאו לאוכלוסייה רגישה שנבחרה אף היא מבדיקת התגובה הראשונית לקוטל עשבים. הצמחים טופלו בגובה של 5-7 ס"מ, עם שמונה מינונים: ביקורת לא מטופלת, שמינית, רבע, חצי, מינון מלא, פי שתיים ופי ארבעה מהמינון המומלץ כמפורט לעיל. כל הטיפולים הוצבו במבנה אקראי לחלוטין, עם 10 חזרות לכל טיפול. הניסויים בוצעו פעמיים. משקל טרי ואחוז הישרדות נבחנו 21 יום לאחר יישום קוטל העשבים.

ריצוף הגן המקודד לאנזים ALS

זרעים מאוכלוסיות GENI, TZR, BDAR, YADB (עמידות ל-ALS) ו-GEA (רגישה ל-ALS), נזרעו במגשי פלסטיק מלאים בתערובת גידול מסחרית (טוף מרום-גולן®). בשלב שלושה-ארבעה עלים, המגשים רוססו באנוק במינון הגבוה פי ארבעה מהמינון המומלץ כמתואר לעיל. עבור כל אחת מהאוכלוסיות העמידות נלקחה דגימה של רקמת עלה מכל צמח ששרד את הטיפול. מיצוי DNA בוצע באמצעות אותם הליכים המתוארים ב-Matzrafi et al. (2017). תחלים ששימשו לרצף הגן ALS והליך PCR מתוארים ב-Reinhardt et al. (2022). ניתוח הרצפים בוצע באמצעות תוכנת BioEdit (Hall, 1999). הרצפים שהושגו הושאו לרצפים ידועים של הגן ALS מירכוז פלמרי (KY781923.1) ממאגר (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) שרוצף בעבר.



טבלה 1. אחוזי השרידות של צמחים מ-22 אוכלוסיות של ירבוז פלמרי שנאספו וטופלו בחצי והמינון המלא של קוטל העשבים אנווק.

מינון מלא 1.5 גרם/דונם				חצי מינון 0.75 גרם/דונם				אוכלוסייה /אזור בארץ
אחוז השרידים לאזור	אחוז השרידים	מספר צמחים ששרדו	מספר צמחים שטופלו	אחוז השרידים לאזור	אחוז השרידים	מספר צמחים ששרדו	מספר צמחים שטופלו	
אצבע הגליל								
0.53	0.43	12	28	0.51	0.33	9	27	GON
	0.3	8	27		0.25	7	28	GAD
	0.64	18	28		0.61	17	28	KAV-4
	0.77	20	26		0.82	23	28	AGAM
הגליל התחתון								
0.57	0.36	10	28	0.58	0.39	11	28	EVE
	0.44	12	27		0.37	10	27	YIZ
	0.63	17	27		0.46	13	28	BAL
	0.93	26	28		0.96	27	28	GENI
	0.5	14	28		0.68	19	28	HAN
	0.39	11	28		0.61	17	28	KA'A
	0.71	20	28		0.57	16	28	77R
מישור החוף הצפוני								
0.52	0.22	6	27	0.54	0.26	7	27	PAHA
	0.67	18	27		0.82	23	28	OM
	0.93	26	28		0.77	20	26	SIT
	0.26	7	27		0.32	9	28	SVE
מישור החוף הדרומי								
0.77	0.89	24	27	0.75	0.96	26	27	TSH
	0.64	18	28		0.46	13	28	BHANA
	0.93	26	28		0.88	23	26	TZR
	0.89	25	28		0.79	22	28	KMEN
	0.93	26	28		1	28	28	BDAR
	0.96	27	28		1	28	28	YADB
	0.18	5	28		0.14	4	28	GE'A

אחוז השרידים חושב כפרופורציה מסך הצמחים שטופלו.

BDAR (93%) ו-YADB (96%). שתי אוכלוסיות אחרות, אחת מכל אזור (למשל, הגליל התחתון - GENI, מישור החוף הצפוני - SIT), הראו גם הן אחוז גבוה של שרידות עם ערך של 93% עבור צמחים שטופלו בשיעור השדה המומלץ של אנווק.

עקומי תגובה
ארבע אוכלוסיות החשודות כעמידות לאנווק הושאו לאוכלוסייה רגישה בשימוש בעקומי תגובה (איור 2). רמה גבוהה יחסית של עמידות נרשמה עבור כל האוכלוסיות

אחוז הפרטים ששרדו היה דומה מאוד בקרב צמחים שטופלו במחצית או במינון מלא של אנווק בכל אוכלוסייה (איור 1). כמו כן, רמת העמידות האזורית הייתה דומה עבור שני המינונים, חצי ומלא, כפי שניתן לראות באחוז ההישרדות לאזור; באצבע הגליל - 51% לעומת 53%, גליל תחתון - 58% מול 57%, מישור החוף הצפוני - 54% מול 52%, ומישור החוף הדרומי 75% מול 77% (טבלה 1). אוכלוסיות שנמצא בהן אחוז שרידות גבוה בטיפול במינון המלא, היו ברוכן באזור מישור החוף הדרומי, (TZR (93%



האוכלוסיות שתועדו בהן פרטים עמידים לקוטל העשבים אנוק (איור 3). מספר הפרטים בעלי מוטציה היה גבוה יותר עבור אוכלוסיות BDAR ו-YADB, עם זאת, יש צורך בנתונים נוספים על מנת להבין את התדירות של מוטציה זו ברמת האוכלוסייה.

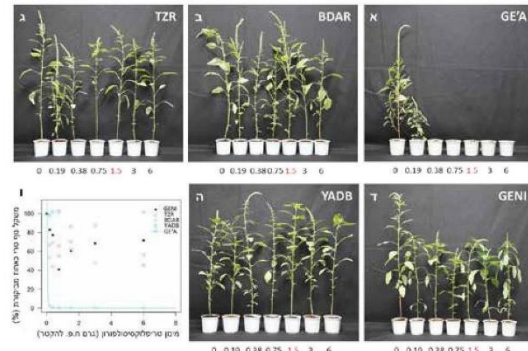
דין ומסקנות

על פי הנתונים שלנו, מיקומי אוכלוסיית ירבוז פלמרי מקבילים לשטחים החקלאיים העיקריים המשמשים לגידולי שדה בקיץ, לרבות עמק החולה, עמק יזרעאל ומישור החוף הדרומי. לגבי התגובה לקוטל העשבים אנוק, אחוז השרידות היה גבוה מאוד, במיוחד באזור קו החוף הדרומי (77%). ארבע אוכלוסיות ששימשו למחקר המשיך בעקומי תגובה הראו עמידות גבוהה, ושרדו בשיעור של פי ארבעה מהמיון המומלץ בתווית התכשיר (30 גרם/דונם). בריצוף של הגן המקודד לאנזים ALS נמצאה מוטציה בעמדה 574 שגרמה לשינוי מחומצת האמינו טריפטופן לליאוצין בחלק מהפרטים בהם הופיעה העמידות. חשוב לציין כי השינוי תועד בכל האוכלוסיות העמידות. רמת העמידות הגבוהה שנצפתה במחקר זה, לצד המוטציה באתר המטרה שנמצאה באוכלוסיות של ירבוז פלמרי, מסכנת את השימוש העתידי במעכבי ALS בתירס, כותנה וגידולי קיץ אחרים הגדלים בישראל. תוצאות מאמר זה הן ראשוניות ובימים אלו אנו עמלים בכדי לבצע מספר ניסויים לבחינת הטיפול השונים בתנאי שדה.

הממצאים במחקר זה הם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצה לשימוש. אין באכזר התכשירים משום המלצה לשימוש, או העדפה על פני תכשירים אחרים המכילים את אותם החומרים הפעילים שלא נבחנו.

רשימת ספרות

- Abu-Nasar, J., Wllach, A., Winkler, E., Eizenberg, H. & Matzrafi, M. (2024) Occurrence of *Amaranthus palmeri* in Israeli agriculture. Status of spread and response to glyphosate and trifloxysulfuron. *Weed Research*. <https://doi.org/10.1111/wre.12616>
- Heap, I. (2024). The international survey of herbicide resistant weeds. <http://weedsociety.org>
- Matzrafi, M., Herrmann, I., Nansen, C., Kliper, T., Zait, Y., Ignat, T., Siso, D., Rubin, B., Karnieli, A., & Eizenberg, H. (2017). Hyperspectral technologies for assessing seed germination and trifloxysulfuron-methyl response in *Amaranthus palmeri* (Palmer amaranth). *Frontiers in Plant Science*, 8, 474
- Norsworthy, J. K., Griffith, G., Griffin, T., Bagavathiannan, M., & Gbur, E. E. (2014). In-field movement of glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and its impact on cotton lint yield: Evidence supporting a zero-threshold strategy. *Weed Science*, 62, 237–249
- Reinhardt, C., Vorster, J., Küpper, A., Peter, F., Simelane, A., Friis, S., Magson, J., & Aradhya, C. (2022). A nonnative Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) population in the Republic of South Africa is resistant to herbicides with different sites of action. *Weed Science*, 70, 183–197
- R Core Team. 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Van Wyche, L. (2017). Survey of the most common and troublesome weeds in grass crops, pasture and turf in the United States and Canada. *Weed Science Society of America*, 2017. <http://wssa.net/wp-content/uploads/2017-Weed-Survey>
- Yannicari, M., Gaines, T., Scursoni, J., de Prado, R., & Vila-Aiub, M. (2022). Global patterns of herbicide resistance evolution in *Amaranthus* spp.: an analysis comparing species, cropping regions and herbicides. *Advances in Weed Science*, 40, e0202200037



איור 2. תמונות מייצגות של צמחי ירבוז פלמרי שטופלו באנוק מחמש אוכלוסיות, הרגיש (GE'A) והעמידות (א-ה: BDAR, TZR, GENI, YADB). המיון המומלץ ליישום אנוק = 1.5 גרם/דונם מסומן באדום. משקל נוף טרי בתגובה למינונים עולים של קוטל העשבים אנוק (טריפטופוסילטורון, (Matzrafi et al., 2023).

	570	580
AP_KY781923.1	GMVVQWEDRFYKAN	
GENI	GMVXXWEDRFYKAN	
GENI	GMVXXLEDRFYKAN	
GENI	GMVXXWEDRFYKAN	
TZR	GMVXXWEDRFYKAN	
TZR	GMVXXWEDRFYKAN	
BDAR	GMVXXLEDRFYKAN	
BDAR	GMVXXLEDRFYKAN	
BDAR	GMVXXLEDRFYKAN	
YADB	GMVXXLEDRFYKAN	
YADB	GMVXXLEDRFYKAN	
YADB	GMVXXWEDRFYKAN	

איור 3. רצף חלקי של הגן המקודד לאנזים ALS של צמחים מאוכלוסיות עמידות של ירבוז פלמרי. עמדה 574 מסומנת בחץ כחול. העמדות מתייחסות לרצף הגן הידוע של ALS מירבוז פלמרי כפי שתואר במאגר ה-NCBI (KY781923.1) (Matzrafi et al., 2023).

שנבדקו, TZR, BDAR, YADB ו-GENI. מכיוון שלא נצפה מתאם בין משקל הצמחים הטרי למינון קוטל העשבים, מודלים של תגובה לקוטל עשבים לא הצליחו לתאר את תגובת אנוק באף אחת מהאוכלוסיות העמידות (איור 2). בנוסף, למרות שנצפתה ירידה במשקל הטרי, כל הצמחים המטופלים שרדו את הטיפול אף במינון של פי ארבעה מהמיון המומלץ בתווית התכשיר. ניתן לראות את התגובה של האוכלוסייה הרגיש (ההגשה שהודברה אף ברבע מהמינון המומלץ).

על מנת לזהות את החלפות הבסיסים המובילות למוטציות נקודתיות, רצף הגן ALS הוגבר באמצעות שני זוגות של תחלים (Reinhardt et al., 2022). עבור החלק הראשוני של הגן ALS, לא נמצאו החלפות בעמדות Pro197 ו-Ala205 (לא מוצגים נתונים). החלפה בעמדה 574 מחומצת האמינו טריפטופן לליאוצין, נמצאה בכל