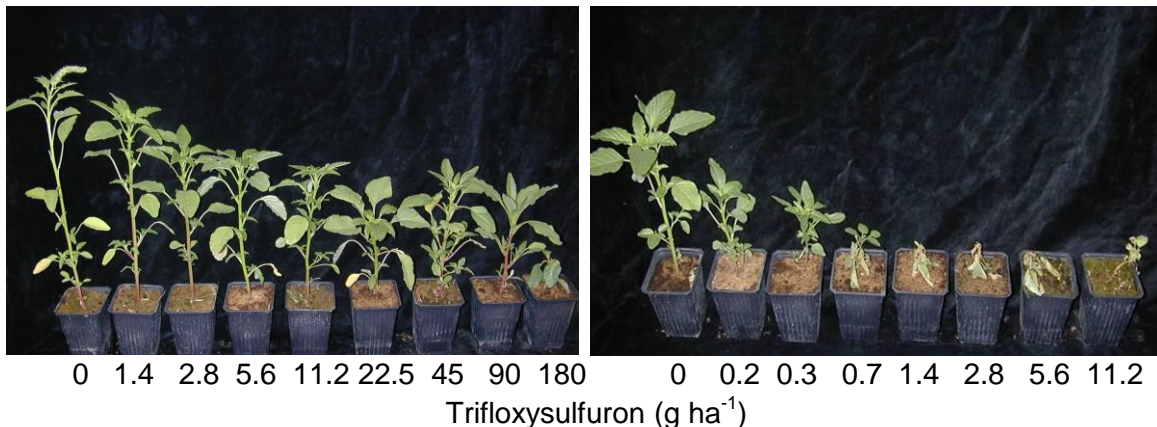


דו"ח מחקר מוגש להנהלת ענף כותנה
סיכום הניסויים בכותנה תשס"ט (2009)

גל דבורקין, מור מנור, משה סיבוני וברוך חבין
המכון למדעי הצמח והגנטיקה בחקלאות ע"ש רוברט ה. סמית
הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, האוניברסיטה העברית, רחובות

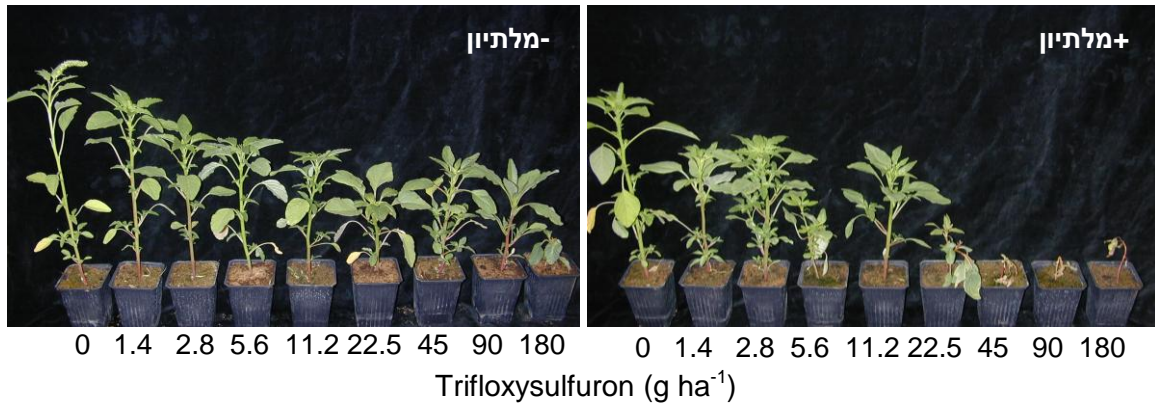
1. עמידות ירבוז פלמרי מנען לקוטל העשבים טריפלוקסיסולפורון (אנווק) - מעכב ALS ברירני לכותנה

במהלך השנה, נבדק החשד לעמידות של הירבוז הפלמרי מנען לקוטל העשבים טריפלוקסיסולפורון (אנווק). תגובת הירבוז הפלמרי נבדקה גם בניסוי שדה וגם בתנאי מעבדה. בשני המקרים, הוכח מעל לכל ספק שהצמחים עמידים לקוטל העשבים אנווק (תמונה 1).

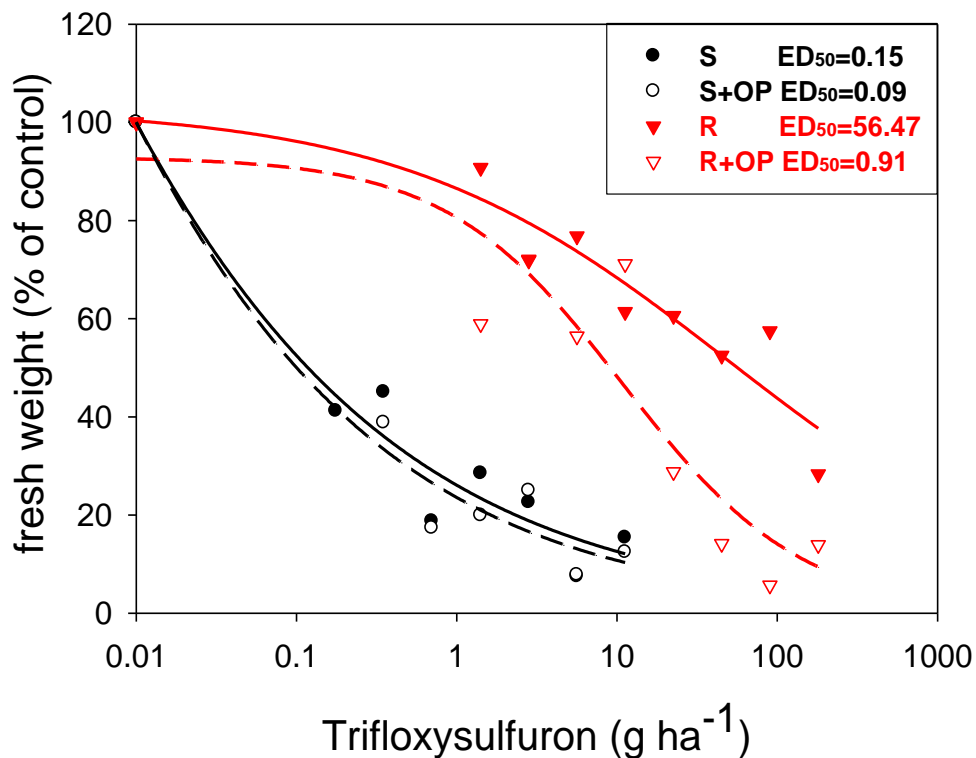


תמונה 1. תגובת צמחי הירבוז הפלמרי מנען (משמאל) לעומת תגובת אוכלוסיית "חוזה" הרגישה (מימין) למינונים הולכים ועולים של טריפלוקסיסולפורון.

השלב הבא, היה לנסות ולהתחקות אחר מנגנוני העמידות. בשלב הראשון, נבדקה תגובת הצמחים לקוטלי העשבים לאחר טיפול מקדים במלתיון. מלתיון הוא קוטל חרקים ממשפחת הזרחנים האורגניים, אשר מלבד השפעותיו העצביות על חרקים, ידוע כמעכב אנזימים מקבוצת ה-P₄₅₀ בצמחים. אנזימים אילו, מהווים את השלב הראשון והעיקרי במנגנון נטרול הרעילות של מולקולות זרות בצמח. לפיכך, טיפול במלתיון, אמור להעלות את רמת הרגישות של הצמח לקוטל העשבים, במידה ומנגנון העמידות הוא מטאבולי, דהיינו ניטרול הרעילות של ההרביציד על ידי פירוק או קונויגציה.



תמונה 2. תגובת צמחי הירבוז הפלמרי מנען למינונים שונים של טריפלוקסיסולפורון (אנוק) לאחר טיפול מקדים במלתיון. צמחים שלא טופלו במלתיון- משמאל וצמחים שטופלו- מימין

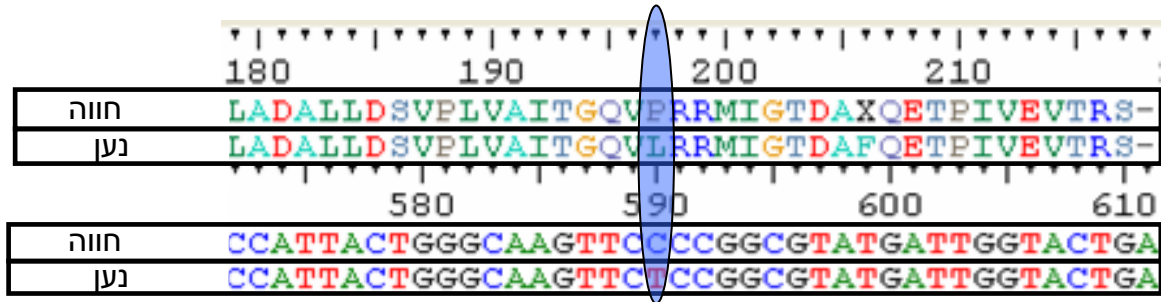


איור 1. השפעת טיפול מקדים במלתיון (קו מרוסק) על תגובת אוכלוסיות נען (אדום) וחווה (שחור) לאנוק. ניתן לראות שרגישות צמחי אוכלוסיית נען, עלתה פי שישים בתגובה לטיפול מקדים במלתיון.

השפעת הטיפול המקדים במלתיון להעלאת רמת הרגישות של צמחי הירבוז הפלמרי מנען, ניכרת, אולם אין בה די להסברת עמידות הצמחים (שעמדו במינון המומלץ, גם בטיפולים שכללו ריסוס מוקדם במלתיון). יתכן ויעילות העיכוב של המלתיון אינה מושלמת, או שמעורבים מנגנונים נוספים כגון עמידות באתר המטרה (תמונה 2, איור 1).

לבדיקת סברה זו, בודד DNA מצמחי ירבוז פלמרי משתי האוכלוסיות ורוצפו מקטעים ספציפיים בגן ALS משתי האוכלוסיות. ידוע שמוטציות במיקום מסוים על הגן, מולידות צמחים עמידים לקוטלי

עשבים ממשפחת ה- ALS. שני מקטעים של הגן הוגברו באמצעות פריימרים ייעודיים, ונשלחו לריצוף. תוצאות הריצוף, הוכיחו מעל לכל ספק, שכל הפרטים מאוכלוסיית נען שנבדקו הם מוטנטים. בצמחים אלו התרחשה החלפה של בסיס ציטוזין בבסיס טימין, מה שהוליד שינוי של חומצה אמינית מספר 197 (בגן, לפי המיספור בארבידופסיס) מפרולין לליאוצין (תמונה 3). מוטציה זו מקנה לצמחי הירבז מנען עמידות למעכבי ALS שונים וביניהם הטרילוקסיסולפורון.



תמונה 3. רצף הבסיסים (למטה) וחומצות האמינו (למעלה) של פריטים מאוכלוסיית חוזה הרגישה ונען העמידה.

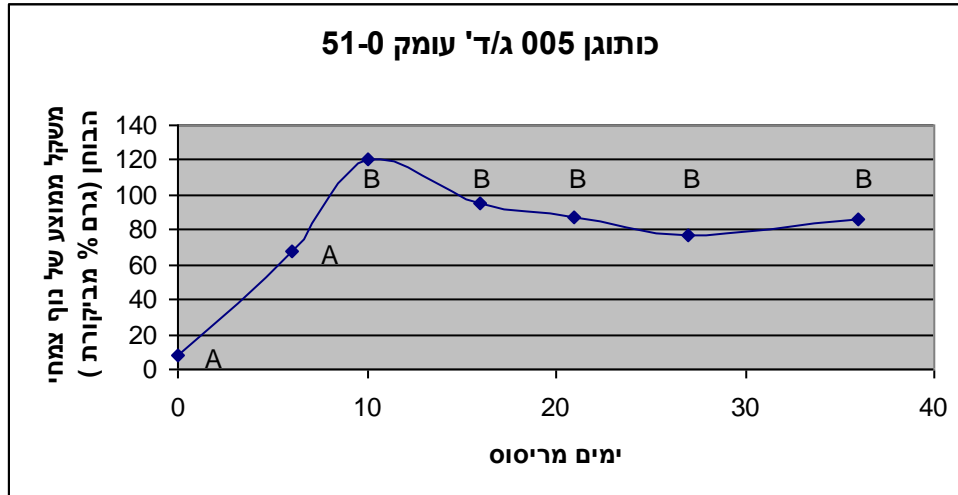
לבסוף, נבדק האם העמידות של צמחי הירבז הפלמרי מאוכלוסיית נען, מלווה בירידה בכשירות האקולוגית. בניסוי התחרו צמחים מאוכלוסיית נען בצמחים מאוכלוסיית חוזה על משאבי הגדילה וניכר היה שאין לאף אחת מהאוכלוסיות יתרון על רעותה. מכאן שהעמידות באוכלוסיית חוזה, אינה מלווה בפחיתה בכשירות.

לסיכום: צמחי הירבז הפלמרי מאוכלוסיית נען, עמידים לקוטל העשבים טריפלוקסיסולפורון (אנווק). העמידות מבוססת ככל הנראה, על שני מנגנונים; מטבוליזם מוגבר של קוטל העשבים ועמידות כתוצאה ממוטציה באנזים המטרה המונעת (או מצמצמת בהרבה) את התקשרות ההרביציד לאנזים ועיכובו. אין ספק שהדברה סלקטיבית של צמחי ירבז פלמרי מאוכלוסיית נען בטיפול אחר הצצה, הינה מסובכת ומחייבת למצוא תחליף הולם, גם בגידול כותנה, וגם בגידולים אחרים.

2. התנהגות קוטל העשבים פלואומטורון (כותוגן) תחת השקיה בקולחים

בעונה החולפת, נבחנו כמה זוויות של התנהגות קוטל העשבים פלואומטורון (להלן: כותוגן), תחת השקיה בקולחים. במהלך העונה, נערך ניסוי שדה בחלקת הקו-נוע בנען על מנת לנסות ולקבוע את קצב פירוק הכותוגן תחת השקיה בקולחים בתנאי שדה. הטיפולים כללו: טיפול במינון המומלץ- 250 ג' תכשיר/ד', טיפול במינון כפול (500 ג'/ד') והיקש לא מטופל (ביקורת). מבנה הניסוי היה טיפולים באקראי (כחלק מניסוי אחר שהועמד בשדה). מיום הריסוס נלקחו דגימות קרקע באמצעות מקדח הולנדי, במרווחים של ארבעה ימים. בטיפול ה- 250 ג'/ד' נלקחו דגימות מעומק 0-15 ס"מ ואילו בביקורת ובטיפול ה- 500 ג'/ד' נלקחו דגימות גם מעומק 15-30 ס"מ.

הקרקע שנאספה בדגימות הוכנסה לעציצים בהם נזרע מילון (רגיש מאד לכותוגן). מכל דגימה הושאר מדגם קטן של קרקע לאנליזה כימית. תוצאות המבחן הביולוגי המובאות באיור 2 מצביעות בברור שפעילות הכותוגן נעל מ כבר לאחר עשרה ימים ממועד היישום.



איור 2. משקל טרי של נוף צמחי המלון (מוצג כאחוז מביקורת) כפונקציה של מועד הדגימה. מועדים 0 ו-6 ימים נבדלים באופן מובהק משאר המועדים. בטיפול ה-250 ג'ד', המגמה זהה ואילו בעומק 15-30 לא נתקבלו הבדלים מובהקים במועדים השונים.

בנוסף, נבחנת תנועת וספיחת הכותוגן בחתך הקרקע תחת השקיה בקולחים לעומת מים שפירים ופירוק הכותוגן בקרקע בנוכחות מי קולחים ומים שפירים. תוצאות סופיות לניסויים אלו, יתקבלו בזמן הקרוב ויכללו לספק תשובה לסיבת היעלמותו של הכותוגן תחת השקיה בקולחים.

3. היעלמות מואצת של טריפלוקסיסולפורון מהקרקע – נען 2009 במדינה סמי-ארידית כמו ישראל, מים הם משאב הנמצא תמיד בחסר ולכן, בשנים האחרונות השתלטה מגמה של השקיית גידולי-שדה (כגון תירס וכותנה) במי קולחין בדרגות טיהור שונות על מנת לחסוך במים שפירים. מי הקולחין מכילים כמויות לא מבוטלות של מלחים, שאריות סבונים, חומר אורגני מסיס ומיקרואורגניזמים שונים העלולים להשפיע על פעילות של קוטלי עשבים בקרקע. ב-2005 ו-2006 נצפו בשדה כותנה של קיבוץ נען באזור המושב מצליח כישלונות בהדברת עשבים בחלקות המושקות בקו-נוע. על אף השימוש האינטנסיבי בקוטלי עשבים, השיבוש בחלקות אלה בירבז פלמרי גרם לנזק חמור בגידול וביבולי. הועלה חשד שיש לתופעות אלה קשר לפעילות/חוסר פעילות של הרב יצידיים בקרקע. הקרקע הנידונה מושקית במי-קולחין משנת 1991 (סקר קולחים ארצי).

התופעות שניצפו:

- בשנת 2005 בכותנה שיבוש ניכר בעשבים רעים בעיקר - ירבז פלמרי.
- בשנת 2006, בחלקות הכותנה (דו גידול לאחר חיטה) היה שיבוש חזק בירבז פלמרי (*Amaranthus palmeri*) לאחר יישום טריפלוקסיסולפורון (להלן: אנווק) 1.5 ג'ד' ו- 3 ג'ד' (המינון המומלץ ומינון כפול, בהתאמה). שיבוש זה גרם לפחיתה ניכרת ביבול, הן בגלל צמחים שלא נקטפו או בגלל סיבים שנשארו על הקרקע.
- בחורף 2007 במחזור חיטה לאחר כותנה שטופלה באנווק (סה"כ 4.5 ג'ד') במהלך עונת הגידול לא נצפו כלל פגיעות בחיטה משאריות התכשיר.
- בניסויי שדה שנערכו בקיץ 2007 ובקיץ 2008, מבין כל קוטלי העשבים שנבחנו, השיבוש הגדול ביותר בעשביה היה בקוטל העשבים אנווק בטיפול קדם ואחר הצצה.
- במבחן הביולוגי שנערך מקרקעות שנלקחו מחלקות ניסוי השדה שטופלו באנווק, התגלה שזמן הפעילות שלו הוא כחודש ימים בעומקים 0-15 ו-15-30 ס"מ מפני הקרקע.
- בניסוי שנערך במעבדה בחורף 2008, התגלה שיש הבדל משמעותי בפעילות האנווק בקרקעות עם היסטוריית השקיה של מי קולחין או מים שפירים.

השערת המחקר: ההשקיה במי קולחין עודדה פירוק מואץ של קוטלי עשבים ממשפחת הסולפוניל-אוריאה בקרקע, ולכן פעילות קוטלי העשבים בקרקע דעכה במהירות. כדי לבחון השערה זו נערכו שני ניסויים בקיץ 2009 (לאחר החיטה). מאחר והגידול העוקב היה תירס, נאלצנו ליישם גם את תכשירים החשודים שפגעו קשה בתירס.

חומרים ושיטות:

הניסוי נערך בשדה תירס לתחמיץ, שנזרע ב- 28.4.09, הושקה בקו-נוע במהלך כל העונה. התירס נקצר בתאריך 27.8.07.

טיפול קדם הצצה- מיד לאחר זריעת התירס נבחרה חלקה בשטח הבעייתי המוזכר לעיל. גודל החלקה: 12X2 מ', ב- 5 חזרות שסודרו באקראי. בניסוי נכללו 3 טיפולים שונים (כולל ביקורת) (ראה

טבלה 1), החומרים רוססו במרסס גב, המצויד בבום ברוחב 2 מ', נפח תרסיס- 25 ל"ד'. הריסוס בוצע ב- 28.4.09. מייד לאחר זריעת התירס, ולאחריה השקיית הנבטה בקו-נוע (50 ממ"ק/ד' ב-2 מנות). הטיפול הסטנדרטי בשדה היה אטרזין (200 סמ"ק/ד') + דואל גולד (200 סמ"ק/ד').

טבלה 1. טיפולי קדם הצצה שניתנו בחלקה בשדה תירס ב- 28.4.09:

שם מסחרי	שם גנרי	המינון (ג' או סמ"ק תכשיר/ד')
אנוק	Trifloxysulfuron	1.5
אנוק	Trifloxysulfuron	4.0
ביקורת	--	0

טיפול אחר הצצה - מדרום לחלקת קדם- הצצה, נבחרה חלקה בגודל זהה, שחולקה בצורה זהה, שתשמש לטיפולים שניתנו אחר- הצצה. ב- 22.5.09 (כשהתירס היה בגיל 5-6 עלים), רוססו החומרים הבאים (החומרים רוססו במרסס גב, עם בום ברוחב 2 מ') ונפח תרסיס של 27 ליטר/דונם:

טבלה 2. טיפולי אחר הצצה שניתנו בחלקה בשדה תירס ב- 22.5.09:

שם מסחרי	שם גנרי*	המינון (ג' או סמ"ק תכשיר/ד')
אטלנטיס	Mesosulfuron+Iodosulfuron	120
הוסאר	Iodosulfuron	15
הוסאר	Iodosulfuron	45
אנוק	Trifloxysulfuron	1.5
אנוק	Trifloxysulfuron	4
אקיפ	Foramsulfuron	200
אקיפ	Foramsulfuron	600
ביקורת	היקש לא מטופל	0

* כל התכשירים מכילים גם סייפנר

מדי מספר ימים נלקחו דגימות קרקע מה-15 ס"מ העליונים של הקרקע מהטיפולים במינונים הנמוכים ודגימות מעומקים 15-30 ס"מ מפני הקרקע בטיפולים במינונים הגבוהים. הדגימות הושמו בתוך שקיות ניילון, ובמידה והיה פרק זמן כלשהוא בין הדגימה ל- bioassay הדגימות אוכסנו במקרר בטמפ' של 4 מ"צ.

מהלך ה-bioassay: ע"מ לבדוק את שאריתיות קוטלי העשבים בקרקע, הקרקע שבשקיות עורבב היטב (ע"מ לשבור את השיכוב של ההרבציד בקרקע), ומכל שקית נלקחו 4 עציצים בגודל 7*7*6

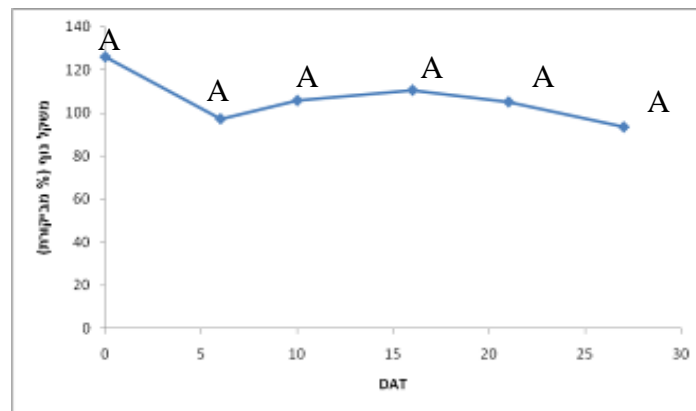
ס"מ. יש לציין, שהייתה הקפדה על- כך שהדגימות יילקחו באופן עקבי יומיים לאחר השקיה, בזמן שהקרקע במצב של קיבול-שדה. כל עציץ נזרע ב-5 זרעי סורגום (*Sorghum bicolor*) ששימש כצמח הבוחן בניסוי. לאחר 21 יום נשקל ונמדד נוף צמחי הבוחן והשווה ל נוף צמחי הבוחן שגדלו בעציצי הביקורת.

תוצאות:

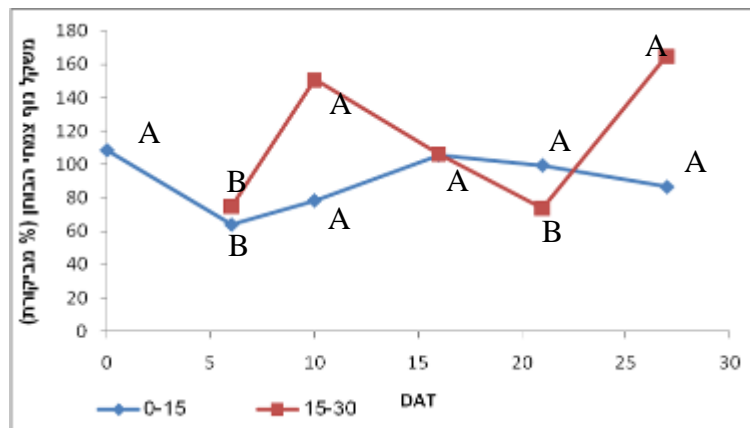
הפעילות השאריתית של קוטלי העשבים

תוצאות ה- bioassay מוצגות באיורים 3 עד 9 כאחוז משקל הנוף (ביחס לביקורת). נצפה לראות עליה במשקל הנוף ככל שהחומר דועך. האותיות מציינות הבדל מובהק לפי מבחן טוקי- קרמר ברמת מובהקות של 0.05.

טיפול קדם הצצה:

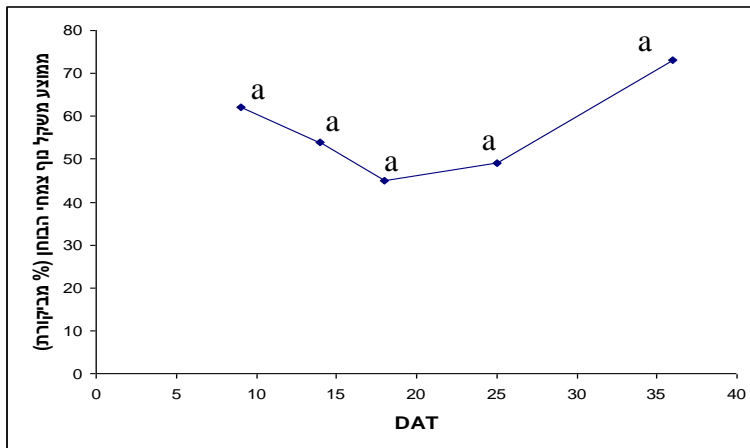


איור 3. השפעת זמן שעבר מריסוס אנוק 1.5 ג'ד' על משקל נוף צמחי הבוחן. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מבחן, $p = 0.05$, Tukey HSD.



איור 4. השפעת זמן שעבר מריסוס אנוק 4 ג'ד' על משקל נוף צמחי הבוחן, בשני עומקי קרקע שונים. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מבחן, $p = 0.05$, Tukey HSD.

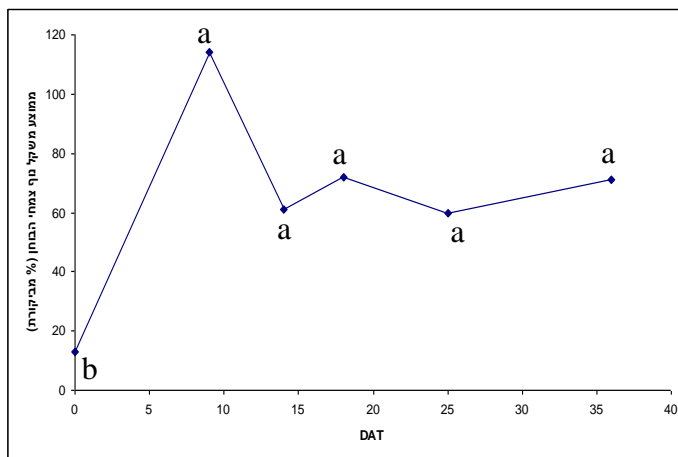
טיפול אחר הצצה:



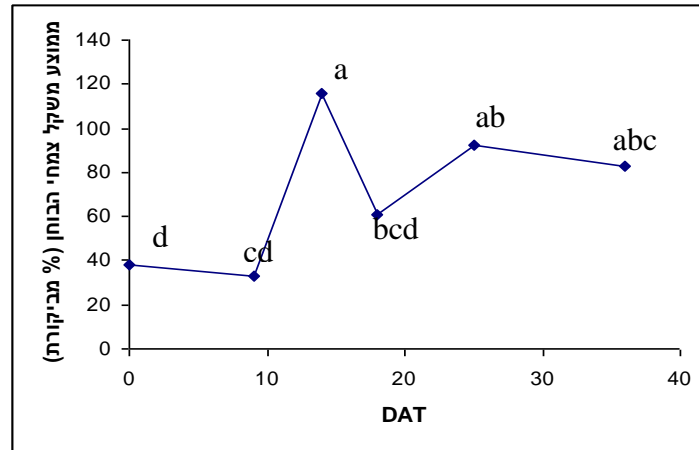
איור 5. השפעת זמן שעבר מריסוס אנווק 4 ג'ד' על משקל נוף צמחי הבוחן, בשני עומקי קרקע שונים. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מבחן $p = 0.05$, Tukey HSD, אין הבדל בין המועדים מיום 9 ומעלה.

טבלה 3. השפעת עומק הדגימה על ממוצע משקל נוף צמחי הבוחן (% מביקורת) בריסוס אנווק 4 ג'ד':

הבדלים במבחן טוקי-קרמר $p=0.05$	ממוצע משקל נוף צמחי הבוחן (% מביקורת)	עומק (%)
b	41%	0-15
a	70%	15-30

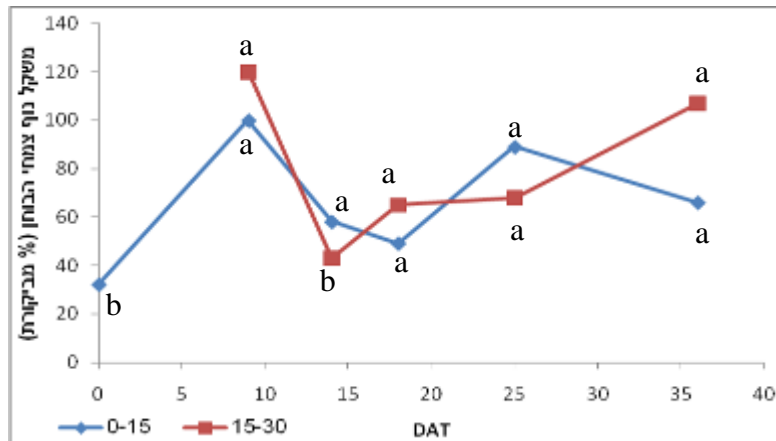


איור 6. השפעת זמן שעבר מריסוס אנווק 1.5 ג'ד' על משקל נוף צמחי הבוחן, בעומק 0-15 ס"מ מפני הקרקע. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מבחן $p = 0.05$, Tukey HSD.

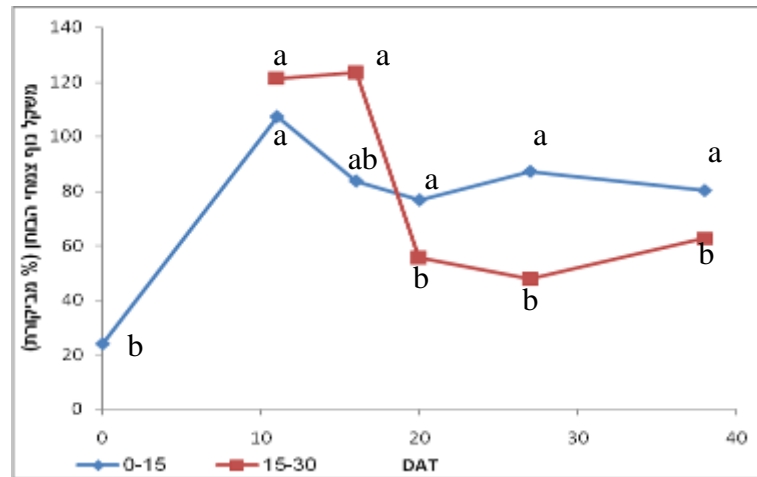


איור 7. השפעת זמן שעבר מריסוס הוסאר 15 ג'ד' על משקל נוף צמחי הבוחן, בעומק 0-15 ס"מ מפני הקרקע. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מבחן Tukey $p=0.05$, HSD.

בדיקות אנליטיות של מיצוי trifloxysulfuron מהקרקע - דגימות שנלקחו בניסוי שדה שנערך בקיץ 2009, מוצו ופותח פרוטוקול עבודה לזיהוי והפרדת trifloxysulfuron מהקרקע. העבודה בעיצומה, והתוצאות המובאות כאן הן תוצאות פרלימינאריות. מהתוצאות המובאות באיור 10 ניתן לראות שיש מתאם גבוה ($R^2=0.982$) לקו המגמה המעריכי המתאר את היחס בין ימים שעברו מיישום החומר לריכוזו בקרקע.



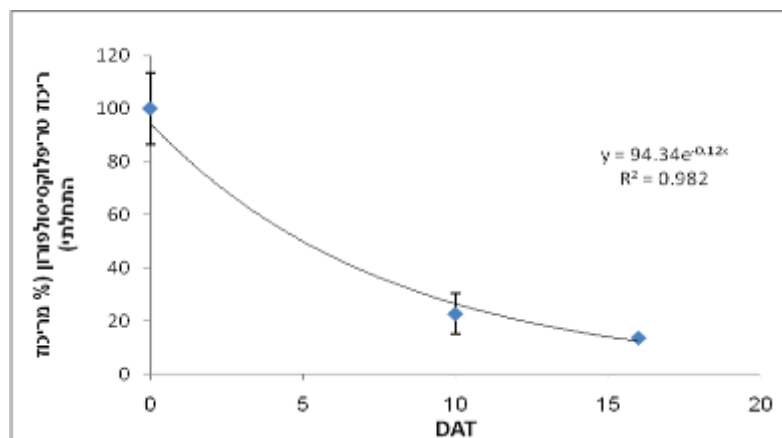
איור 8. השפעת זמן שעבר מריסוס הוסאר 45 ג'ד' על משקל נוף צמחי הבוחן, בעומק 0-15 ו-15-30 ס"מ מפני הקרקע. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מבחן Tukey $p=0.05$, HSD.



איור 9. השפעת הזמן שעבר מריסוס אטלנטיס 120 סמ"ק/ד' על משקל נוף צמחי הבוחן בדגימות שנאספו מעומק 0-15 ו-15-30 ס"מ מפני הקרקע. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מבחן Tukey HSD, $p < 0.05$.

דין ומסקנות:

אנווק- נראה שהשנה, בניגוד לשנתיים שעברו האנווק לא היה פעיל במבחן הביולוגי כשניתן קדם הצצה ב-2 המינוים שנבדקו (איורים 3 ו-4). באנווק שניתן אחר הצצה, נראה שהאנווק שניתן במינון 1.5 ג'ד' איבד את פעילותו בעומק 0-15 ס"מ מפני הקרקע כבר לאחר 9 ימים מיישום (איור 6). פעילות האנווק שניתן במינון 4 ג'ד' נבדקה בעומק 0-15 ו-15-30 ס"מ מפני הקרקע. מהתוצאות עולה שאין הבדל בפעילות האנווק במועדים השונים, אבל יש הבדל בפעילותו בעומקים השונים כשבדקים את ממוצע סך המועדים, והוא יותר פעיל במקטע העליון של 0-15 ס"מ מפני הקרקע (איור 5, טבלה 3). לאחר 30 יום רואים עליה במשקל נוף הצמח ל-70% מביקורת (איור 5). בסה"כ ניתן להגיד שהאנווק מאבד את פעילותו מהר מהצפוי גם במינון פי 4 מהמומלץ (4 ג'ד'). כשנבדקה נוכחות החומר הפעיל באנווק בבדיקות אנליטיות (LC/MS), נראתה ירידה חדה בנוכחותו בדוגמאות בימים הראשונים לאחר יישומו. יש לציין, שהתוצאות המובאות כאן מתייחסות לעומק 0-15 ס"מ בלבד, אבל תוצאות הבדיקה של הקרקע בעומק 15-30 ס"מ מצביעות על אותה המגמה.



איור 8. השפעת משך הזמן שעבר מיישום ק"ע על ריכוז trifloxysulfuron בקרקע בעומק 0-15 ס"מ.

הוסאר- הוסאר הוא חומר המורשה בארץ לחיטה בלבד , אבל מכיוון שמבחינה כימית ומנגנון פעולה הוא קרוב מאוד לאנווק , החלטנו לבדוק את פעילותו בניסוי השדה בשנת 2009. הוסאר ניתן ב-2 מינונים 15 ו-45 ג'ד'. הוסאר 15 ג'ד' לא פגע בתירס , מה שאימת את התוצאות שנצפו בשנה שעברה. הוסאר שניתן במינון של 45 ג'ד' כן פגע בתירס קשות , אבל לא הרג אותו לגמרי . מבחינת פעילות בקרקע , אנחנו רואים שהוסאר 15 מאבד את פעילותו בעומק 0-15 ס"מ מפני הקרקע לאחר כ-27 יום. למרות שאין הבדל מובהק בין יום 36 ויום 9 לאחר יישום , לאחר 27 יום יש עלייה גבוהה במשקל נוף צמחי הבוחן והם מגיעים למשקל של כ-80% מביקורת (איור 5).

פעילותו של הוסאר שניתן במינון 45 ג'ד' לא שונה בשני העומקים שנבדקו. משקל נוף צמחי הבוחן לאחר 25 יום מיישום נע בין 65%-80% מביקורת בעומק 0-15 ס"מ ו-65%-100% מביקורת בעומק 15-30 ס"מ (איור 6). להוסאר שניתן במינון נמוך מהמומלץ (15 ג'ד') לא הייתה פעילות שאריתית בקרקע לאחר כחודש. ההוסאר שניתן במינון יותר מפי 2 מהמומלץ איבד מפעילותו ב-2 העומקים , אך לא באופן מובהק.

אטלנטיס- האטלנטיס הוא חומר חדש שנכנס לשימוש בארץ בחיטה בלבד , ולפי היצרן הוא בעל שאריתיות גדולה בקרקעות . הקרקע שבה נערך ניסוי השדה מעולם לא "ראתה" אטלנטיס, אבל החומרים הפעילים בו הם מאותה משפחה כימית ומנגנון פעולה של האנווק . מהתוצאות נראה שאטלנטיס מחלחל לעומק הקרקע שנבדק (עד 30 ס"מ מפני הקרקע). האטלנטיס איבד את פעילותו בעומק 0-15 ס"מ מפני הקרקע לאחר 27 יום באופן מובהק (משקל נוף צמחי הבוחן 80% מביקורת) (איור 7). לעומת זאת , פעילותו עולה בעומק 15-30 ס"מ מפני הקרקע ככל שמתקדמת העונה , ומגיעה ל-40% עיכוב (משקל נוף צמחי הבוחן 60% מביקורת) לאחר 36 יום מיישום (איור 7) . מכיוון שנראית מגמה של עלייה במשקל נוף צמחי הבוחן לקראת סוף העונה בעומק 15-30 ס"מ מפני הקרקע , יש צורך להמשיך לבדוק את הנושא ולקחת דוגמאות מעומקי קרקע עמוקים יותר ע"מ לבדוק את פעילות האטלנטיס גם בעומקים אלו.

אקיפ- לפי היצרן , האקיפ אינו שאריתי כלל בקרקע , טענה שעמדה בעינה גם בניסוי השדה שערכנו אנחנו. התוצאות היו כצפוי , ולכן אינן מובאות בדו"ח זה.

הבעת תודה:

אנו מודים לגידי ולכל עובדי הגד "ש בנען על עזרתם הרבה ונכונותם לסייע ולמועצת הכותנה על תמיכתה במחקר.



תמונה 1. אנוק 4 ג'ד', 27 יום מריסוס.



תמונה 2. ביקורת, 27 יום מריסוס.



תמונה 3. הוסאר 15 ג"ד', 27 יום מריסוס.



תמונה 4. אקיפ 200 סמ"קד', 27 יום מריסוס.



תמונה 5. אנוק 15. ג'ד', 27 יום מריסוס.



תמונה 6. הוסאר 5 ג'ד', 27 יום מריסוס.



תמונה 7. אטלנטיס 120 סמ"ק/ד', 27 יום מריסוס.



תמונה 8. אקיפ 500 סמ"ק/ד', 27 יום מריסוס.