

הרחבת התשתית הגנטית לפתרון של צווארי בקבוק בטיפוח כותנת פימה בישראל

מוגש למועצת הכותנה

רן חובב, מנהל המחקר החקלאי

1. מבוא

במהלך העשורים האחרונים עבר ענף הכותנה בישראל מהפכים רבים בהיקפים ובאופי הייצור. אחד השינויים הוא המעבר מגידול עיקרי של כותנת אקלה לגידול של כותנת פימה ארוכת הסיבים, המהווה כיום חלק נכבד משטחי גידול בישראל. בשאר חלקי העולם מהווה כותנת אקלה מעל ל- 90% מהיקפי הגידול, בעוד שהפימה מהווה רק כ- 3-4%. לפיכך, המקורות לשונות הגנטית שעומדים לרשות המטפחים בכותנת הפימה הם פחות זמינים מאשר אלו שפותחו בעולם לאקלה (כגון מפות גנטיות, קווי אינטרוגרסיה, אוכלוסיות מוטנטים, וקווי טראנסגנים). מכיוון שעיקרון בסיסי בטיפוח הוא יצירת שונות מספקת כבסיס לברירה של תכונות, יש צורך להגדיל את המאגר הגנטי של כותנת הפימה בכדי למצוא פתרונות לטווח הרחוק של בעיות המהוות צוואר בקבוק בענף, בעיקר כנגד עקות ביוטיות ואביוטיות.

2. מטרות המחקר

מטרת המחקר היא להקים תשתית של שונות גנטית חדשה של כותנת פימה שתעמוד ברשות המטפחים והחוקרים בישראל. התכנית מכילה שלושה רכיבים:

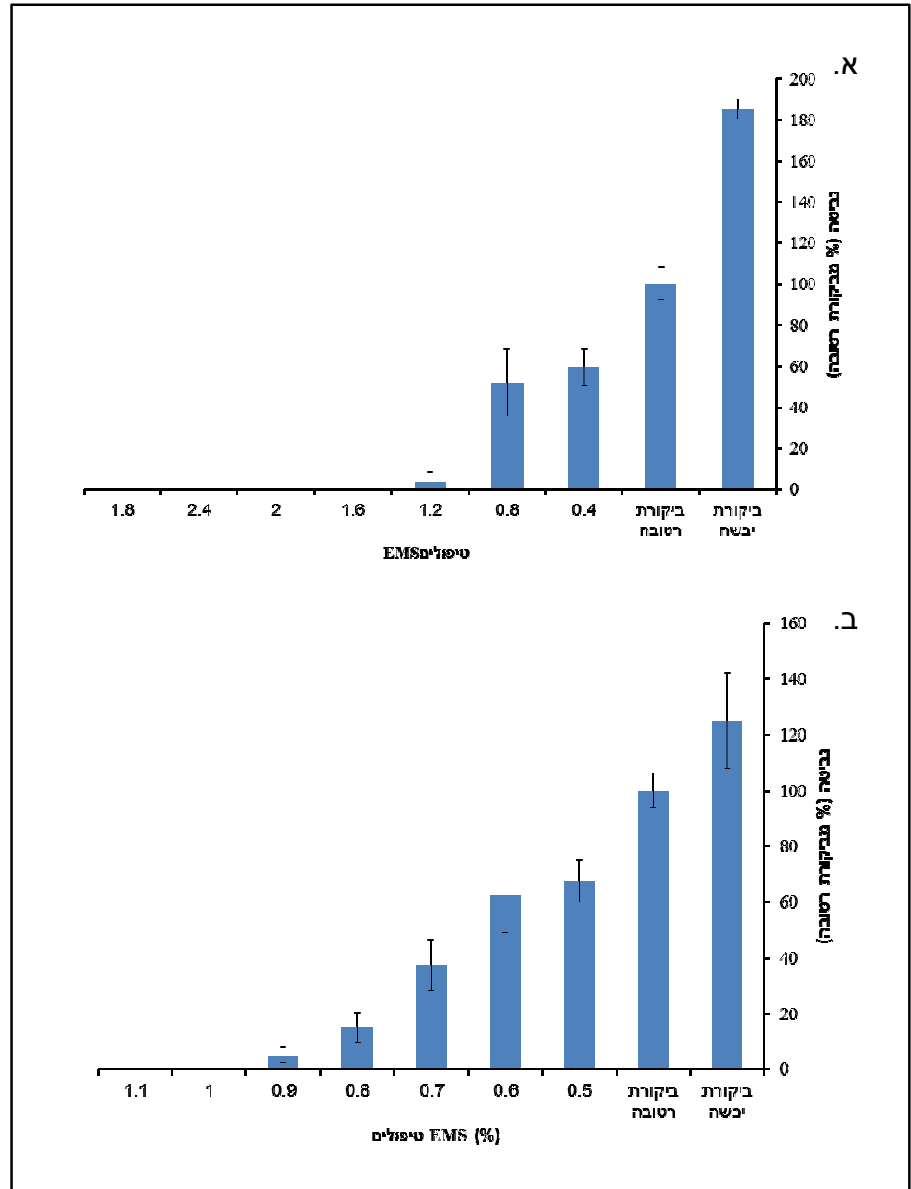
- א. הגדלת השונות הגנטית של זנים קיימים באמצעות פיתוח של אוכלוסיית מוטנטים כימיים.
- ב. הגדלת השונות האפיגנטית באמצעות השימוש בחומרים שמעכבים פעילות מתילציה של DNA.
- ג. ייבוא אוסף של מיני בר ותרבות מהמין *Gossypium barbadense* ומהמין הקרוב *Gossypium darwinii*.

3. תוצאות

א. פיתוח של אוכלוסיית מוטנטים גנטיים בכותנה

השריית מוטציות באופן כימי בתוך זני העלית הקיימים מהווה אלטרנטיבה ידועה לקבלת שונות גנטית בגידולים חקלאיים. אחת הדרכים להשריית מוטציות היא באמצעות המוטגן הכימי Ethylemethane Sulfonate (EMS). חומר זה משרה מוטציות נקודתיות בגנום ותדירות המוטציה נקבעת על ידי ריכוז תמיסת המוטגן ומשך ההשריה של הזרעים בו. בשנה זו ערכנו את הכיולים הדרושים על מנת לפתח את אוכלוסיית המוטנטים. נערכה בדיקה מקדימה לקביעת ריכוז ה-EMS ומשך זמן הטיפול באמצעות עקומת כיול (איור 1). לשם כך, 100 זרעי כותנה (10.66 גרם) שמקורם מהזן גוליית 7 של "זרעי ישראל" הושרו במים במשך 10 שעות והועברו לתמיסת EMS ל-12 שעות בריכוזים של 0 (ביקורת רטובה), 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, ו- 2.8%. בסוף הטיפול שפכנו את ה-EMS, הזרעים נשטפו תחת מים זורמים במשך 30 דקות, ונזרעו במגשי חישתיל. בנוסף נזרעה גם "ביקורת יבשה" של זרעים שלא עברו השרייה

מוקדמת במים. הניסוי נערך בשלוש חזרות. נביטה בביקורת התחילה אחרי 4 ימים. תוצאות הכיול הראשוני מובאות באיור 1א.



איור 1: השפעת ריכוזי EMS על נביטת זרעי כותנה. א. כיול ראשון בטווח ריכוזים גדול. ב. כיול שני בטווח ריכוזים צר.

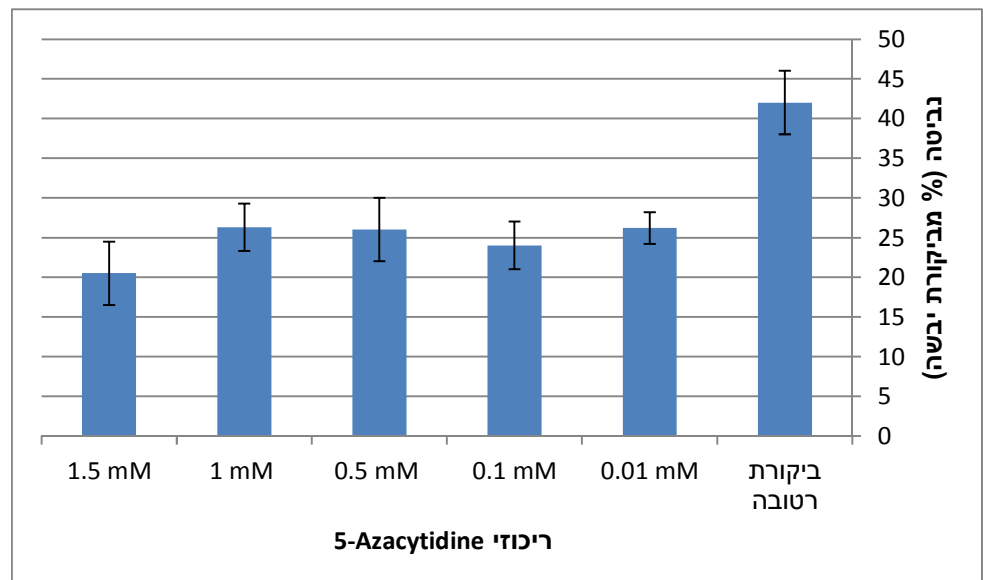
נמצא כי טווח הריכוזים האופטימלי למוטגנזה שמביא לאחוזי תמותה של מעל 80% הוא בין 0.8-1.2. ולכן, בשלב השני נערך סיבוב נוסף של כיול בטווח צר יותר של ריכוזי EMS (איור 1ב). לפי עקומת כיול זו נמצא כי ריכוזי המוטגן האופטימאליים הם בין 0.8-0.9% המביא בתנאי חממה לתמותה של 80-90% מהצמחים ולכן מעיד על השריית

מוטציות יעילה בצמחים ששרדו את הטיפול. בשלב זה אנו מפעילים את פרוטוקול הכיול הנ"ל על אוכלוסייה גדולה של 15,000 זרעי "גוליית 7". לאחר הטיפול הצמחים ששרדו יועברו לגידול בחוות עכו. ההערכה היא כי ניצר כ- 3,000 צמחי M1 מוטנטים. בסוף העונה נאסוף את הזרעים על בסיס צמח בודד, והם יהוו את הבסיס לאוכלוסיות M2.

ב. פיתוח של אוכלוסייה בעלת שונות אפיגנטית בכותנה

כאמור לעיל, השריית שונות חדשה בגידולים חקלאיים היא בעלת פוטנציאל רב להגדלת יבולים ולפתרון של צווארי בקבוק בטיפול. ישנן עדויות הולכות וגוברות כי השימוש בשונות אפיגנטית עשוי להיות מקור חדשני שלא נוצל עד כה. מטרת החלק הזה בפרויקט הייתה לייצר אוכלוסיות כותנה בעלות שונות אפיגנטיות באמצעות היפו-מתילציה כימית ולבדוק את מידת השונות האפיגנטית ואת היציבות שלה למשך כמה דורות. ולכן, ניסינו בשנה א להשרות היפומתילציה באמצעות המוטגן הכימי 5-Azacytidine (5-AzaC) כפי שתואר במערכות אחרות כמו בקנולה.

לשם כך, 100 זרעי כותנה (10.66 גרם) שמקורם מהזן גוליית 7 הושרו במים במשך 10 שעות והועברו לתמיסת 5-AzaC ל- 12 שעות בריכוזים של 0 (ביקורת רטובה), 0.01mM, 0.1mM, 0.5mM, 1mM ו- 1.5mM. בסוף הטיפול שפכנו את ה- 5-AzaC, הזרעים נשטפו תחת מים זורמים במשך 30 דקות, ונערכה זריעה במגשי חישתיל. לצערנו, בניגוד להשריית מוטציות גנטיות ב- EMS, לא נצפו אחוזי תמותה משמעותיים גם בריכוזים גבוהים של החומר (איור 2), ריכוזים שבהם הוא אפילו מסוכן בריאותית לשימוש. כמו כן לא הייתה השפעה לינארית על תמותת צמחים, והצמחים שגדלו לא הראו שום סימנים של השפעת הטיפול. ולכן, ייתכן כי כותנה עמידה בפני החומר והחלטנו בשלב זה לא להמשיך בשנה ב עם החלק הזה של התכנית.



איור 2: השפעת ריכוזי 5-Azacytidine על נביטת זרעי כותנה.

ג. ייבוא אוסף של מיני בר ומיני תרבות של פימה ושל מיני כותנה קרובים

בחלק זה אנו פועלים לייבוא של אוסף טיפוסי פימה שמקורם מהבר והתרבות. האוסף יתקבל משני מקורות: אוסף של כעשרים טיפוסים תרבותיים יובא מאריזונה, כולל טיפוסים בעלי סבילות גבוהה לחום. בשנה א' עברנו את תהליכי הוצאת רישיון ייבוא. בשל מצוקת כוח אדם ביחידה להגנת הצומח ושירותי ביקורת צמחים של ממשרד החקלאות, תקופת ההמתנה להוצאת הרישיון הייתה ארוכה מהצפוי, והזרעים הגיעו אלינו רק בדצמבר 2014. זרעים אלה עברו בדיקות מעבדה לשלוש מחלות (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Colletotrichum gossypii*) ונזרעו בחממת הסגר במכון וולקני בתחילת אביב 2015.

כמו כן, אוסף של 50 accessions של מיני בר של פימה מיובא בימים אלה מאוניברסיטת איווה. בנוסף אוסף של כ- 20 accessions של מין הבר *Gossypium darwinii* שהוא מין קרוב המכליא בקלות יחסית עם *Gossypium barbadense* מיובא גם כן מאוניברסיטת איווה. לצערנו, בשל אותם עיכובים במתן רישיון הייבוא מהיחידה להגנת הצומח, לא הספקנו לגדל בשנה הראשונה את הקווים בתנאי קרנטינה. ולכן, הגידול יתקיים מאוחר יותר בשנה השנייה של המחקר. במקביל נתחיל בהכלאות בין מיניות ליצירת תשתית גנטית במבנה של אוכלוסיות גנטיות בר X תרבות, למטרות מחקר בסיסי וטיפוח עתידי.