

# מימשק למניעת תנגודת לכותנה מהונדסת עם Bt בעשי הכותנה העיקריים / רמי הורביץ

דו"ח מחקר לשנת 2004 מוגש להנהלת ענף כותנה

131-1154-04

רמי הורביץ, ודים חסדן, מריו ריפא, רפי מורי, סופיה קלייטמן

E-mail: hrami@volcani.agri.gov.il

המחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר גילת

מינהל המחקר החקלאי

## תקציר

מטרת המחקר היא לפתח מימשק נגד התפתחות תנגודת בעשי הכותנה החשובים לרעלן Cry1Ac (מחיידיק Bt) המבוטא בכותנה מהונדסת. בשלב הראשון של המחקר עבדנו על סיגול ושיפור של שיטות הגידול של הלקטית ורודה (ה"ו) וכן בצענו ניסויים לשם יצירת הקו הבסיסי לרגישות מזיק זה לרעלן. בשנה הראשונה והשנייה של המחקר נבחנה שיטת גידול של ה"ו על מצע מזון מלאכותי. עד עתה הצלחנו לבסס את שיטת הגידול בהצלחה ולהוכיח שהמזון מתאים גם לחרק זה. במקביל, נערכו ניסויי רגישות של זחלי ה"ו והליותיס לרעלן ה-Bt. תערובת הרעלן הוכנה מהתכשיר הביו-אינסקטיצידי - MVP-II קפסולרי שמקביל בתכונותיו לרעלן הטרנסגני. לפי הניסויים נראה שהגזע הסטנדרטי של ה"ו, שמקורו מגידול ממושך בעמק בית שאן, רגיש ביותר לרעלן ה-Bt בדומה לגזעים הרגשים שנמצאו בניסויים בארה"ב. לאחר מכן פותח גם קו בסיסי של רגישות לרעלן ה-Bt מאוכלוסיות מעבדה רגישות של ה"ו והליותיס. מספר איסופים של הלקטים נעשו בשדות בסוף עונות 2003 ו-2004 כדי לבדוק את הרגישות של עשי ה"ו מהשדות לרעלן ה-Bt. ניסוי לבדיקת המודלים השונים לדחיית תנגודת לגידול טרנסגני נעשה בסוף עונת 2003 וגם בעונת 2004 (בפעם השנייה) בחממה במרכז מחקר גילת. בניסוי זה נבדקים הנזקים להלקטי הכותנה ואפשרות היווצרות תנגודת בטיפולים הבאים: תערובת זרעים רגילים ומהונדסים, קטעים של צמחים רגילים בצמוד לחלקה המהונדסת לעומת חלקות ביקורת. הניסוי המתוכנן הוא רב שנתי ובכל חלקה פיזרנו אחת לשבועיים עשי הלקטית ורודה מהגידול. הנזק לצמחים, רמת התנגודת והקשר למודלים השונים – נבדקו בעונת 2003 ויבדקו גם בסוף עונת 2004. כמסקנת בנייים, נראה שלגבי ה"ו, גם תערובת זרעים וגם קטעים צמודים נותנים פיתרון למניעת נזק מה"ו ודחיית תנגודת למזיק זה.

## מבוא ורקע מדעי

תכשירי הדברה שמבוססים על החיידק בצילוס תורנינגיינזיס (Bt) מסוגלים להדביר ביעילות זחלי עשים שונים (Navon, 2000). תכשירים אלו הוכרו כטוחים וידידותיים לסביבה. הבעיה שאינם יציבים בתנאי שדה וזחלים חודרניים עשויים להתחמק מהם.

בכותנה הטרנסגנית הצליחו להחדיר בשיטות הנדסה גנטית את הגן של החיידק שמבטא את רעלן החיידק בכל אחד מתאי הצמח; באופן כזה הצמח עצמו מתגונן נגד המזיקים באמצעות הרעלן של החיידק. ההגנה וחסימה כנגד מזיקים על ידי הכותנה הטרנסגנית נחשבת כפריצת דרך טכנולוגית העשויה לשנות באופן משמעותי את כל ההתייחסות אל מימשק הדברה נגד מזיקי הכותנה. התועלת מיישום של גידול מהונדס עם Bt נגד מזיקים מפחית בהרבה את השימוש בתכשירי הדברה רעילים וכך מונע את זהום הסביבה והחשיפה של העובדים לתכשירים אלו. בנוסף, הוא אינו פוגע באויבים טבעיים, וכך יכול להשתלב בתוכניות להדברה משולבת. למרות כל אלו, ניצול ושימוש בצמחים טרנסגנים נגד מזיקים יש לו מגרעת בסיסית עיקרית והיא הסיכון הגבוה של התפתחות תנגודת במזיקי המטרה. זה נובע כתוצאה מחשיפה מתמדת של המזיק לצמחים המהונדסים (ולרעלן) במשך 5-7 חודשים של עונת הכותנה. כמו כן, ישנן כבר הוכחות שבחקרים שונים נמצאו גנים לפיתוח של עמידות לרעלן ה-Bt (Tabashnik et al., 1997; Gould et al., 1997; Gelernter, 1997). בכמה מיקרים נמצאה גם עמידות צולבת למספר רעלני Bt, ובמחקר שנעשה במעבדה נמצא שניתן לעשות סלקציה לעמידות של הלקטית ורודה לרעלן ה-Bt הנפוץ בכותנה הטרנסגנית, Cry1Ac (Bartlett, 1995).

מכל האמור לעיל, כדי לגדל מהונדס המסוגל להתגונן בפני מזיקי כותנה יש לפתח אסטרטגיות נגד תנגודת לגידול זה. לצורך זה פותחו מספר מודלים שכוללים בעיקרם: ביטוי גבוה של הרעלן באברי המטרה שיהיו מסוגלים לקטול זחלים עם אלל יחיד לתנגודת (כלומר פרטים הטרנזיגוטים, RS), חלקות צמודות של "צמחי מפלט" לא מהונדסים (refuge plants), ומעקב צמוד אחר התפתחות התנגודת לצמחים המהונדסים (למשל, Roush, 1997). ההנחה הבסיסית בהקצאת החלקה של צמחי מפלט היא שעשים רגישים המגיחים מחלקה זו יזדווגו עם עשים עמידים (שצפויים להיות נדירים) שמגיחים מהשטח הטרנסגני, וכך תדחה העמידות באופן משמעותי, כמו שהוראה בסימולציות שונות.

במחקרים שבצענו בעבר (1998-2000) נבדקה יעילות הכותנה המהונדסת עם Bt מתוצרת מונסנטו (Monsanto) נגד זחלי עשים מזיקים (הורביץ וחוב' 1999; דוחות מחקר למדען ראשי של משרד החקלאות ומועצת הכותנה – 1998, 1999, 2000) אולם לא ניתן היה לבחון את השינויים ברגישות הזחלים לרעלן (אם נגרמה עליה בעמידות) כתוצאה מחשיפה לכותנה המהונדסת.

בשלב הראשון של המחקר הנוכחי סיגלנו שיטות גידול חדשות לקבלת עשים של הלקטית ורודה, יצרנו קוים בסיסים של ה"ו לרגישות לרעלן ה-Bt, בחנו אוכלוסיות שדה שונות לרגישות לרעלן ובחנו מודלים שונים שהוצעו כדי לדחות היווצרות עמידות לרעלן ה-Bt בניסויי חממה.

## מטרות העבודה לשנים 2003-4

לבחון סלקציה מכוונת של הלקטית ורודה לרעלן Cry1Ac.  
לבדוק את רמת הביטוי של רעלן ה-Bt (ע"י בחנים ביולוגיים) בכותנה מהונדסת אשר גדלה שנה שנייה ושלישית ברציפות.  
לאסוף אוכלוסיות (גזעי שדה) של הלקטית ורודה באזורי הארץ השונים ולגדלן לשם מבחן רגישות ל-Bt ולכותנה מהונדסת עם רעלן ה-Bt.  
לתכנן ולבצע ניסוי חממה שיבחן את המודלים השונים שהוצעו לדחות פיתוח תגודת של עשים לצמחים מהונדסים (ניסוי רב שנתי).

## שיטות וחומרים

### שיטות גידול להלקטית ורודה

בשנים 2001-2003 נבחנה שיטה שנהוגה בארה"ב (אריזונה) שמאפשרת לבדוק את הרגישות של הזחל הורוד לרעלן. הגידול נעשה על מצע גידול מסחרי (Manduca-Heliothis Premix, Stonefly, TX, USA) שעליו מתפתחים הזחלים בתוך כלי מפוליאתילן מוקצף ("קלקר"). לפני ההתגלמות, הזחלים נוברים בדפנות הכלי ונופלים לכלי פלסטי נוסף - להתגלמות על ניירות מקופלים. גלמים או בוגרים מועברים לצנצנות הטלה עם מזון שמכיל סוכר ודבש.  
הבחינה למציאת שיטות גידול להלקטית ורודה הסתיימה בהצלחה. נכון להיום, אנחנו מגדלים אוכלוסיות שונות של הלקטית ורודה במצע מזון הנ"ל בכמויות נדרשות למחקר שלנו ומספקים ביצים או גלמים של ה"ו לפי הדרישות למחקרים ארציים שמבצעת מועצת הכותנה.

### שיטות גידול להליות וזיפית

בשנה אחרונה נבחנה שיטה לגידול הליות מהשדה שנהוגה בבית דגן. השיטה דומה לזאת לגידול ה"ו עם הבדלים קטנים. מכניסים זחל אחד או שניים לאחר הבקיעה לתוך בארות של פלטת ELISA (50 בארות, כ"א 3 מ"ל) עם מצע מזון. אחרי החיטוי מכניסים גלמים לצנצנות הטלה (~50 גלמים לצנצנת עם נפח כ-5 ליטר) עם פתחים למבחניות האכלה עם מי דבש לבוגרים. גידול של זיפית נעשה בצורה דומה לגידול ההליות. מציאת קו סטנדרטי

בניסויים נבחנה אוכלוסיית מעבדה שלא נחשפה לתכשירי Bt מגידול מעבדתי שמקורו מבית שאן. נאונטים (זחלים לאחר בקיעה) של הלקטית ורודה הועברו בעזרת מכחול דק למצע מזון מלאכותי על בסיס נבטי חיטה וסויה (כנ"ל). לתוך תמיסת המזון הוכנס הרעלן, Cry1Ac בריכוזים שונים, והתמותה נקבעה לאחר 14 יום. תערובת הרעלן מורכבת מהתכשיר הביו-אינסקטיצידי - MVP-II 20% קפסולרי (Mycogen) שמקביל בתכונותיו לרעלן הטרנסגני והמשמש בארצות הברית כבסיס למבחני רגישות לצמחים מהונדסים עם Bt. הרעלן נבדק בתמיסת המזון כדי ליצור רצף ריכוזים מ-0.1 עד 10 מיקרוגרם לגרם של מצע מזון. עשר חזרות של 10 זחלים כ"א נבחנו בכל ריכוז. לאחר מספר ניסויים עם נאונטים שבהם נראה שהעברה שלהם היא מאוד

בעייתית ועלולה לגרום לתמותת הזחלים הזעירים, התחלנו לבצע ניסויים ע"י העברה של תטולות צעירות של עד יומיים בנות 10 ביצים לכוסות של 30 מ"ל עם מכסים. נייר ההטלה סומן מתחת לבינוקולר וחולק לקטעים קטנים עם מספר הביצים הדרוש. הקטעים נגזרו לפיסות נייר עם הביצים והונחו בכוסות על גבי פיסות נייר כסף ונאטמו בפלסטיק להצמדת מזון. במכסים של הכוסות נעשו חורים לצורך אוורור והוכנסו טיפים צהובים למניעת בריחת זחלים. הכוסות הוכנסו לתבניות ביצים והועברו לחדר גידול עם טמפרטורה קבועה של  $27 \pm 2$  מ"צ.

המבחנים הביולוגיים עם הליות נעשו באופן דומה אבל עם שינויים קלים להתאמה לזחלים אלו. בכל חזרה הועברו שני נאנטים של הליות בעזרת מכחול לכוסות ה- 30 מ"ל עם מצע מזון בריכוזים שונים של רעלן Cry1Ac. הרעלן נבדק בתמיסות המזון כדי ליצור רצף ריכוזים גבוהים יותר מאשר ה"ו (0.1 עד 32 מיקרוגרם לגרם של מצע המזון).

#### איסוף אוכלוסיות למבחני רגישות של זחלים משדות הכותנה

דגימות מאוכלוסיות של הלקטית ורודה משדות כותנה בארץ בוצעו בסוף עונות 2003 ו-2004. איסוף של הלקטים נעשה באזור חוף כרמל וברבדים (נגב מערבי) - משדות שנחשדו בנגיעות גבוהה של זחל ורוד. אלפי ההלקטים שנאספו הונחו בתוך רשתות מאווררות שהוכנסו לקעריות של 10 ליטר כ"א ובתוכן ניירות מקופלים להתגלמות. לאחר מספר דורות של גידול על מזון מלאכותי, בססנו את הגידול מאוכלוסיות השדה והוא התפתח בחדר הגידול עד שהגיע לרמה שבה ניתן היה לערוך בו ניסויי רגישות.

#### איסוף אוכלוסיות למבחני רגישות של זחלים משדות הכותנה

מספר איסופים של הלקטית ורודה בוצע בסוף עונת 2003. איסוף של הלקטים נעשה באזור חוף כרמל וברבדים (נגב מערבי) - משדות שנחשדו בנגיעות גבוהה של זחל ורוד. הלקטים הונחו בתוך רשתות מאווררות שהוכנסו לקעריות של 10 ליטר כ"א ובתוכן ניירות מקופלים להתגלמות. לאחר מכן בססנו את הגידול מאוכלוסיות השדה והוא התפתח בחדר הגידול עד שהגיע לרמה שבה ניתן היה לערוך בו ניסויי רגישות.

#### סלקציה מכוונת של הלקטית ורודה לרעלן Cry1Ac

כדי לעשות סלקציה מכוונת של ה"ו לרעלן ה-Bt, נבחנו שלוש אוכלוסיות: גזע מעבדתי מבית שאן וגזעים משדות כפר מסריק ובארי. פרטים של ה"ו שגילו סבילות לריכוזים יותר גבוהים של רעלן מ-0.2 מיקרוגרם לגרם מצע מזון (בערך LC30) נבחרו לסלקציה מכוונת. פרטים של ה"ו גודלו בתנאי מעבדה מוגדרים על מצע מזון המכיל ריכוז 0.2 מיקרוגרם של הרעלן Cry1Ac לגרם מצע מזון ונבחנו מדי שלושה דורות לרגישות ביחס לקו הסטנדרט הרגיש. היום אוכלוסיה שמקורה מגזע מעבדתי מבית שאן (GDR – Gilat development resistant) גדלה במצע מזון המכיל ריכוז 2 מיקרוגרם של הרעלן Cry1Ac לגרם מצע מזון ואנחנו ממשיכים לבחון את האוכלוסייה הזאת מדי שלושה דורות לרגישות לרעלן ביחס לקו הסטנדרט הרגיש.

בדיקת ביטוי הרעלן Cry1Ac ע"י בחנים ביולוגיים בכותנה מהונדסת שגדלה שנה שנייה ושלישית ברציפות בניסויים נבדקה רמת הביטוי של הרעלן Cry1Ac בכותנה מהונדסת עם Bt, בשנת הגידול השנייה ושלישית (בנוסף על הממצא המדעי, כותנה מהונדסת משנה שנייה תוכל להיות מגודלת בשנת שמיטה במשקים דתיים והיא תמנע טיפולים רבים בקוטלי חרקים רעילים). בסוף הקיץ של 2002 וכדומה בסוף הקיץ של 2003 גזמו את הצמחים הנ"ל לאחר שנה ראשונה ושנייה של גידול וניסויים. במשך האביב וקיץ של 2003 ו-2004 ועד סוף העונה אנו בודקים בעזרת מבחנים ביולוגיים את יעילות הכותנה הטרנסגנית הנ"ל (הלקטים, כפתורים ועלים) כנגד זחלי ה"ו והליותים.

### ניסויי חממה

ב- 2004 חזרנו על ניסויי החממה באותה מתכונת כמו בעונה הקודמת. בניסויים בחממה בחנו את המודלים השונים שהוצעו לדחות פיתוח תנגודת של עשים לצמחים מהונדסים (ניסוי רב שנתי). הניסוי נערך בבלוקים באקראי עם ארבעה טיפולים ושלוש חזרות במרכז מחקר גילת (תרשים 1). סה"כ היו בניסוי 252 צמחים. בניסוי נזרעה כותנה טרנסגנית Bollgard (Bt. Monsanto, USA) ולא טרנסגנית (DP, Delta Pine 5415) כהיקש – לפי הטיפולים הבאים:

;100% Bt (B-33)

"שורות מיפלט" Internal refuges (2 שורות- כותנה טרנסגנית: שורה 1 - לא טרנסגנית);

תערובת זרעים - Seed mixtures (16 זרעים טרנסגנים ו-4 לא טרנסגנים, ז"א -80% ו-20%, בהתאם); היקש (100% לא טרנסגנית).

בניסויים בשנת 2004, הכותנה נזרעה ב- 4 למאי לתוך עציצים בתוך תערובת של חול וכבול. כל חזרה בודדה באמצעות רשת עדינה תוצרת AgriL - על מנת למנוע מעבר עשים בין הטיפולים. האילוח נעשה באמצעות מספר פיזורים של 250 גלמים/לחזרה של ה"ו מתוך הזן המעבדתי שמגודל בגילת ושלא נחשף לתכשירי הדברה. האילוח נעשה אחרי פריחת הכותנה כל 15 יום; סה"כ 5 פעמים - עד אמצע אוקטובר.

תרשים 1. תוכנית הטיפולים בחממה

תערובת זרעים Seed Mixture	היקש (Non-Bt)	Bt
Bt	תערובת זרעים Seed Mixture	היקש (Non-Bt)
"שורות מיפלט" Internal Refuges	Bt	"שורות מיפלט" Internal Refuges
היקש (Non-Bt)	"שורות מיפלט" Internal Refuges	תערובת זרעים Seed Mixture

הערכת הנזק נעשתה בסוף העונה ע"י אסוף הלקטים פתוחים ובדיקתם. הזחלים המועטים שנמצאו בהלקטים טרנסגנים נשמרו ב- 80 Ethanol על מנת לבדקם בסמני DNA לעמידות ל-Bt.

**תוצאות ודיון**

בחינת שיטות גידול להלקטית ורודה

הגידול הסטנדרטי בארץ שהחל בשנות ה-70 סיגל שיטות מארה"ב והתאים אותם לגידול המוני לצורכי מחקר ובדיקת רגישות לתכשירי הדברה קונבנציונאליים (Beckman et al., 1953; Ouye, 1962).

כמו שנמסר בדוח הקודם, לא התאימה שיטה זו לבחינה של ה"ו לרגישות לרעלן ה-Bt שמשפיע על הזחל דרך מערכת העיכול, ולצורך זה צריך ליישמו בקרקע המזון. במעבדה לעמידות מזיקי כותנה לתכשירי הדברה בעיר טוסון (Tucson) באריזונה הוקם מערך לבדיקות רגישות של ה"ו לרעלן ה-Bt על מזון מלאכותי על בסיס נבטי חיטה (מידע אישי – Maria Sims). כדי לחסוך בכוח אדם החלטנו לאחר בחינה מוקדמת להשתמש במצע מזון מלאכותי אוניברסלי המיועד לגידול של זחלי מזיקים שונים תוצרת ארה"ב, גם הוא על בסיס נבטי חיטה (ראה שיטות וחומרים). במקביל לגידול הסטנדרטי במעבדה הוקם גידול באינקובטור (Stock). התוצאות של גידול זה מצביעות על כך שהזחלים יכולים לגדול על מצע זה באופן סביר - ובמידה שצריך, ניתן להגביר את כמות הזחלים דרושים לניסויים. תנאי האקלים:  $27 \pm 2$  מ"צ, 50% לחות יחסית שנשמרים ע"י מערכת מיזוג אויר

ומחולל אדים מבוקרים ע"י בקר; ואורך יום של 14 שעות שנקבע ע"י תאורה פלוארוסנטית שנשלטת ע"י שעון חשמלי.

200-300 עשי ה"ו זכרים ונקבות מוכנסים לצנצנת הטלה של ליטר עשויות מפלסטיק שקוף שבצידה חריר, לתוכו מוכנסת מבחנת מזון לבוגרים (מי סוכר עם דבש). מכסה הפלסטיק חורר ועליו הולחמה רשת חלון ממתכת עם חרירים עדינים. על הרשת מונח נייר מגבת שעליו מטילות הנקבות דרך הרשת, ולצורך הידוק הנייר לרשת (הבוגרים מטילים טוב יותר אם הנייר מהודק) הנחנו משקולת של שקית עם חול. את הנייר עם הביצים אוספים פעמיים בשבוע. הביצים מועברות לתוך מכל פוליאתיילן מוקצף ("קלקר") של 0.5 ליטר מלא בחציו מצע מזון טרי. כדי להימנע מלחות עודפת לביצים, מוצמד נייר ההטלה לדופן המכל. הביצים בוקעות בתנאים הנ"ל לאחר יומיים-שלושה. הזחלים הראשונים (נאוטטים) צונחים למצע המזון ומתפתחים במשך של כ- 10-14 יום לדרגת טרום גולם (חמישית). בדרגה זו הם מחפשים מצע יבש יותר להתגלמות ורובם מחררים את תחתית כלי הקלקר וצונחים לתוך מיכל נוסף עם פתחי אוורור שמוצמד לתחתית הקלקר, שם מונחים ניירות מקופלים. לאחר כ-7 ימים נשלם תהליך ההתגלמות והגלמים המוכנים מועברים לצנצנות הטלה כנ"ל.

במשך הטיפול השגרתי בגידול נתקלנו במספר בעיות כגון וירוסים הפוגעים בזחלים. פתרנו בעיה זו באמצעות חיטוי גלמים וביצים של ה"ו בתמיסת פורמלין 1% במשך דקה ויבוש. כמו כן בדקנו את התאמת כמות המזון לכמות הביצים ומצאנו שכמות 100-150 ביצים ל"קלקר" מאפשרת לנצל מצע מזון בצורה האופטימאלית. לעומת זאת, הכפלה כמות עלולה לגרום להתפתחות עובש וכתוצאה מכך למנוע התפתחות זחלים. נמצא שמספר אופטימאלי של בוגרים לצנצנת הטלה הוא 250-300. עדיין נוצרו מספר שאלות ובעיות שצריך להתגבר עליהן כגון: מניעת לחות גבוהה בשלבים שונים של הגידול, העברת גלמים או בוגרים לצנצנות ההטלה ללא פגיעה, האם המזון המלאכותי פוגע בפוריות הנקבות לעומת המזון הסטנדרטי בארץ ובחו"ל? או רק נפגעת המשיכה בין הזוויגים (כמו שנמצא במחקרים שונים), האם ניתן לגדל את המזיק ברציפות - ללא ניוון של הדורות המתפתחים.

מכיוון שישנם בד"כ קשיים לגדל במעבדה אוכלוסייה שנאספה מהשדה, נבדקה אפשרות לגדל זחלים מהשדה על הלקטי כותנה מזן סיבאון שנאספו מגידול בחממה. פיסות נייר עם ביצים של ה"ו הונחו על פני הלקטים אשר הוצבו בתוך כוסות עם שכבת אגר. בעונה הבאה אפשר להיעזר בשיטה הזו לצורך גידול מספר דורות של זחלים מהשדה עד שהאוכלוסייה תגיע לגודל המתאים.

גידול של הליותיס סטנדרטי ממושך קיים כבר מספר שנים במעבדתו של ד"ר עמוס נבון במרכז וולקני, בית דגן, והוא משמש לניסויים בהמשך המחקר שמטרתם למצוא את רגישותו של מזיק זה לתכשיר ה-Bt.

#### איסוף אוכלוסיות למבחני רגישות של זחלים משדות הכותנה

בעונת 2003 נמצאו זחלים בהלקטים שנאספו בשדות שנחשדו כנגועים יחסית בצורה דומה לשנה קודמת. בעין כרמל אספנו סה"כ 3375 הלקטים עם אחוז הנגיעות גבוה (25.81%) ומתוכם יצאו להתגלם 186 זחלים, לעומת זאת, מהשדה של אפק עם נגיעות 2.48% מתוך 3507 הלקטים יצאו סה"כ רק 38 זחלים ומהשדה של עין צורים עם נגיעות 8.54% מתוך 2296 הלקטים יצאו סה"כ 266 זחלים. באסוף שנעשה לאחר קטיף הכותנה בשדה של רבדים שנחשב נגוע יחסית בה"ו נאספו כ- 3000 הלקטים עם נגיעות של כ- 90% במזיק זה. עקב

בעיות עם אחוזי נגיעות גבוה בווירוס של זחלים מהאוכלוסיות (בעיה הזו פתרנו באמצעות חיטוי כנ"ל) הצלחנו לגדל רק את שתי האוכלוסיות האחרונות.

כמסקנות מהעונות קודמות בשנה הזו: התרכזנו באיסוף של הלקטים בשדה נגועה יחסית - לקראת סוף העונה (ספטמבר). בסוף עונת 2004 קטפנו הלקטי כותנה משדות נגועים בה"ו מאזור רבדים ולאחר התבססותה של האוכלוסייה בתנאי מעבדה נבדוק אותה לרגישות לרעלן.

השפעת רעלן Cry1Ac לעיכוב בגידול ותמותה של זחלי הלקטית ררודה לאחר ביסוסה של שיטת הגידול פיתחנו את שיטת המבחן למציאת הרגישות של זחלי ה"ו לרעלן ה- (Cry1Ac) Bt. נמצא שבניסויים בהם הביצים של ה"ו הועברו למצע המזון בתוך כוסות פלסטיק (כפי שצוין בשיטות וחומרים) היו יותר אמינים; מפני שמספר הזחלים שנמצאו בביקורות ובטיפולים היה גדול יותר מאשר בשיטה הקודמת בהם השתמשנו בפלטות גידול. עקב כך, עברנו לשיטה זו בלבד (גם דו"ח קודם). בניסויים שבהם נבדקו אוכלוסיות מהשדה נמצא כי הם רגישים ביותר לרעלן ה- (Cry1Ac) Bt. האוכלוסיות השונות נבחנו לרגישות (תמותה) לרעלן ה- Bt ונבנו עקומי תמותה בסיסיים לקו הסטנדרט ולקווי השדה מעונת 2002 - 2004 (טבלה 1, איור 2). אחרי שהצלחנו לייצב את הגידולים שמוצאם מהשדות מאיסוף מעונת 2003, נמשכת הבדיקה שלהם גם כיום. במבחנים נוספים שנעשו עם אוכלוסיית בית שאן כתגובה להלקטים טרנסגנים (המבטאים בתוכם את רעלן ה- Bt), נמצא בדומה לניסויים קודמים (דו"ח קודם) שהיא רגישה ביותר לכותנה מהונדסת עם Bt (33) לעומת הביקורות.

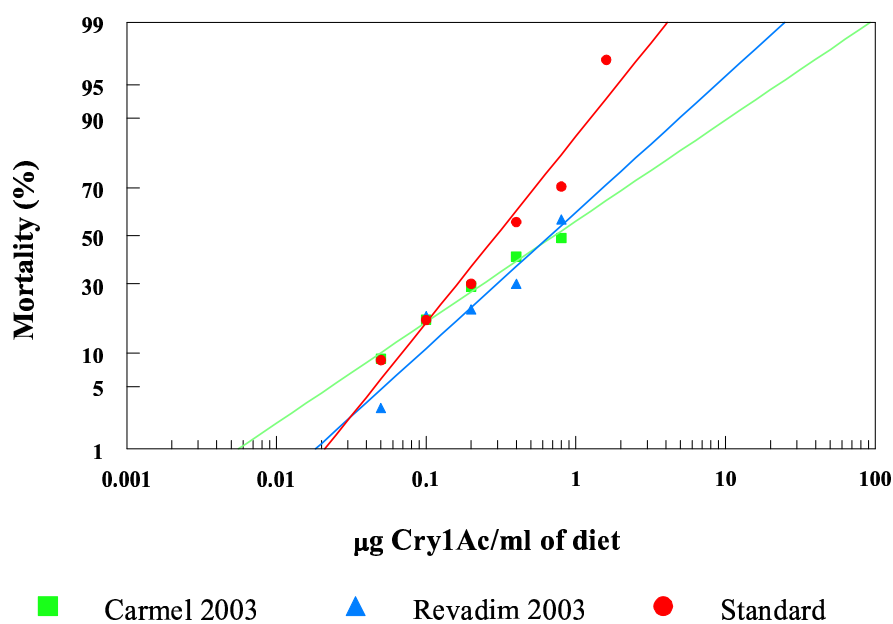
בניסויים התקבלה תמותה מלאה בריכוז רעלן יותר גבוה מ-1.6 מיקרוגרם לגרם מצע מזון לעומת ביקורת בלתי מטופלת. בהתייחסות למחקרים אחרים שנעשו באריזונה (Liu et al., 2001) נמצא כי הגזע שמוצאו מגידול בית שאן רגיש ביותר לרעלן ה- Bt. ה- LC50 (ריכוז דרוש לקטילה 50% מהאוכלוסייה מטופלת) הוא 0.32 מיקרוגרם רעלן לגרם מצע מזון. הגזע הרגיש מאריזונה נקטל גם הוא באופן מלא מ-10 מיקרוגרם רעלן לגרם מצע מזון, ורק כ- 3% שרדו בריכוז של 1 מיקרוגרם (כ- 50% שרדו מריכוז של 0.1 מיקרוגרם רעלן).



טבלה 1. טבלה מסכמת את רגישות זחלי הלקטית ורודה מהשדות (זנים שמקורם מחוף כרמל ורבדים בשנת 2003) ל-Cry1Ac (מיקרוגרם\גרם מצע מזון)

Strain	n	Slope $\pm$ SEM	LC50 (F.L.)	LC90 (F.L.)
Carmel 03	1800	1.08 $\pm$ 0.151	0.73 (0.52-1.23)	11.36 (4.8-50.55)
Revadim 03	600	1.37 $\pm$ 0.272	0.70 (0.38-4.57)	5.99 (1.66-131)

### Susceptibility of PBW field populations to Cry1Ac

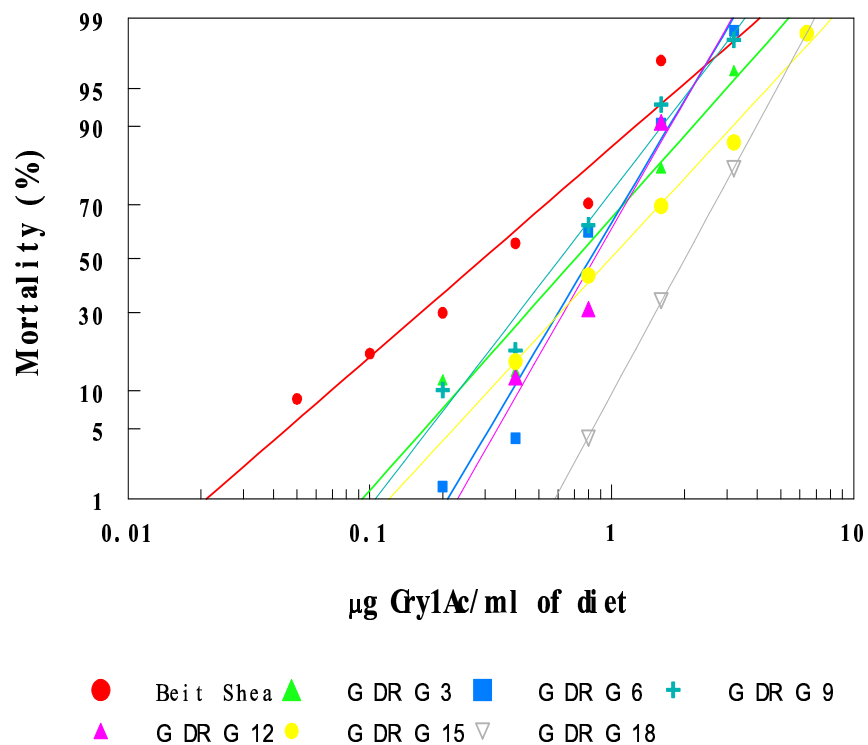


תרשים 2. הרגישות של אוכלוסיות הלקטית ורודה מאזור חוף הכרמל ורבדים (שנאספו בסוף עונת 2003 וגודלו בתנאי מעבדה על מזון מלאכותי) לרעלן ה-Bt לעומת גזע הסטנדרט.

סלקציה מכוונת של הלקטית ורודה לרעלן Cry1Ac הפרטים של ה"ו אשר נבחרו לסלקציה מכוונת גודלו בתנאי מעבדה מוגדרים על מצע מזון המכיל ריכוז של 0.2 מיקרוגרם של הרעלן Cry1Ac לגרם מצע מזון (ראה שיטות וחומרים). אחרי 3 דורות נבדקה אוכלוסיית של ה"ו להתפתחות עמידות (GDR) ונמצא שהם הפכו עמידים יותר לרעלן (יותר מפי 2 לעומת האוכלוסייה

מבית שאן לפי LC50 הוא 0.32 ו-0.72 מיקרוגרם של הרעלן Cry1Ac לגרם מצע מזון, בהתאם; יחס העמידות (RR50) עלה ל-2.25 (תרשים 3, טבלה 2). אף על פי שתוצאות הצביעו על כך שיש מגמה להתפתחות עמידות לרעלן Cry1Ac, בשלב הזה עדין היה קשה להגיד אם התהליך הוא אמיתי והאם הוא מצביע על מוטציה שקיימת בשדה. מצב דומה נצפה אחרי 3 דורות להתפתחות עמידות עם אוכלוסייה שנייה מכפר מסריק ובארי- KMBDR (דו"ח 3-2002). בהתאם לתוצאות האלה החלטנו להמשיך ניסוי רק עם אוכלוסייה אחת (GDR). כמו כן, במשך 15 דורות הרגישות לרעלן באוכלוסייה הזאת לא השתנתה. בבדיקות האחרונות נמצא שהאוכלוסייה (דור 18) הפכה לעמידה יותר לרעלן שאן (LC50) הוא 2.02 מיקרוגרם של הרעלן Cry1Ac לגרם מצע מזון, יחס העמידות (RR50) עלה ל-6.31. אנחנו ממשיכים לגדל את האוכלוסייה הזאת על ריכוזים יותר גבוהים של רעלן כדי לראות האם התנגדות לרעלן תעלה באופן עקבי.

### Susceptibility of PBW to Cry 1 Ac



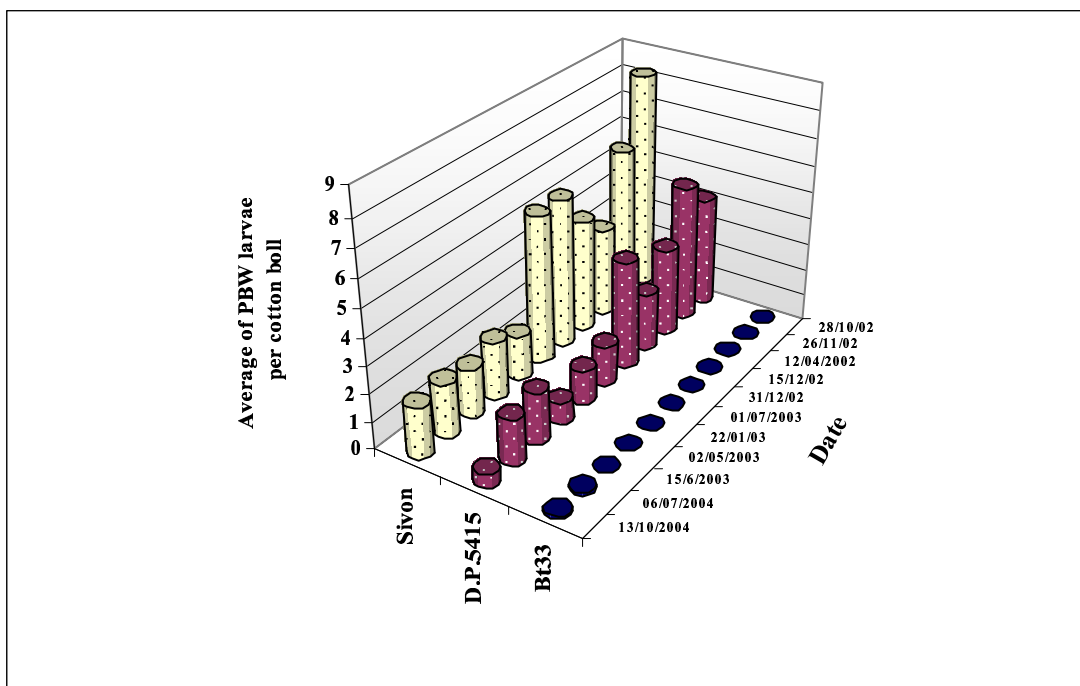
תרשים 3. הרגישות של זחלי הלקטית ורודה מאוכלוסיית הסלקציה (GDR) שנחשפה לריכוזים מ-0.2 עד 2 מיקרוגרם רעלן לגרם מצע מזון לעומת הסטנדרט (בית שאן).

מבחנים עם כותנה דו שנתית ועם כותנה משנה שלישית

הלקטים שנאספו במועדים שונים משלושת הזנים [כותנה טרנסגנית (Bt 33) וביקורות לא טרנסגניות (D.P. 5415 וסיבאון)] של כותנה דו-שנתית נחשפו לזחלי ה"ו כנ"ל. בכל המבחנים התקבלה תמותה מלאה של זחלי ה"ו צעירים בהשוואה לביקורות לא מהונדסות שבהם התקבל נזק ניכר ממזיק זה (תרשים 4). כמסקנה, רמת הרעלן בשנה שנייה ושלישית עדיין קוטלת באופן מלא את זחלי ה"ו לעומת הביקורות.

טבלה 2. טבלה מסכמת את רגישות זחלי הלקטית ורודה במשך הסלקציה המכוונת לרעלן Cry1Ac (כל 3 דורות) (מיקרוגרם\גרם מצע מזון)

Strain/ Generation	Slope $\pm$ SEM	LC50 (F.L.)	LC90 (F.L.)	RR50	RR90
Beit Shean סטנדרט	1.9 $\pm$ 0.25	0.32 (0.25-0.42)	1.52 (1.02-2.82)	1.0	1.0
GDR*G3 סלקציה	2.65 $\pm$ 0.39	0.72 (0.46-1.09)	2.19 (1.36-6.4)	2.25	1.44
GDR*G6 סלקציה	4.46 $\pm$ 0.61	0.79 (0.6-1.04)	1.52 (1.13-2.8)	2.25	1.0
GDR*G9 סלקציה	3.12 $\pm$ 0.38	0.64 (0.4-0.9)	1.63 (1.14-3.2)	2.0	1.07
GDR*G12 סלקציה	3.84 $\pm$ 0.72	0.91 (0.36-1.9)	1.96 (1.17-5.4)	2.84	1.28
GDR*G15 סלקציה	2.36 $\pm$ 0.19	1.0 (0.87-1.14)	3.5 (2.9-4.4)	3.12	2.3
GDR*G18 סלקציה	4.27 $\pm$ 0.42	2.02 (1.84-2.23)	4.02 (3.4-4.9)	6.31	2.65



תרשים 4. השפעת הלקטים של כותנה טרנסגנית (דו- ותלת שנתית) על זחלי הלקטית ורודה שנאספו במועדים שונים מחממה בתחנת גילת בהשוואה לביקורות לא טרנסגניות (D.P. 5415 וסיבאון)

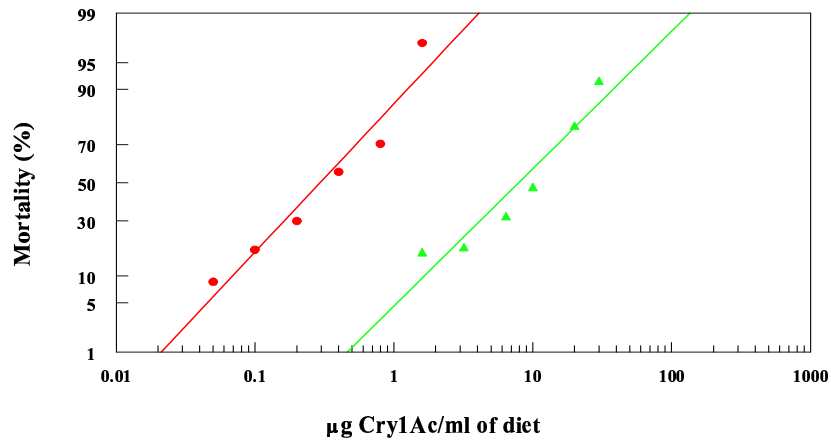
#### מבחני רגישות עם הליותים

התוצאות של הניסויים עם הליותים מצביעות על כך שהוא פחות רגיש לרעלן Cry1Ac (תרשים 5, 6); ה- LC50 הוא 8.37 מיקרוגרם רעלן לגרם מצע מזון (טבלה 3). גם הרגישות של זחלי ההליותים לאברים שונים (עלים וניצני פרחים) של הכותנה הטרנסגנית פחותה מזו של ה"ו ולא התקבלה תמותה מלאה למרות שהזחלים שנחשפו לכותנה הטרנסגנית היו מאוד קטנים ויתכן שלא מסוגלים להתפתח.

טבלה 3. טבלה מסכמת את רגישות זחלי הליותים (זן מעבדתי שמקורו מבית דגן) ל- Cry1Ac (מיקרוגרם/גרם מצע מזון)

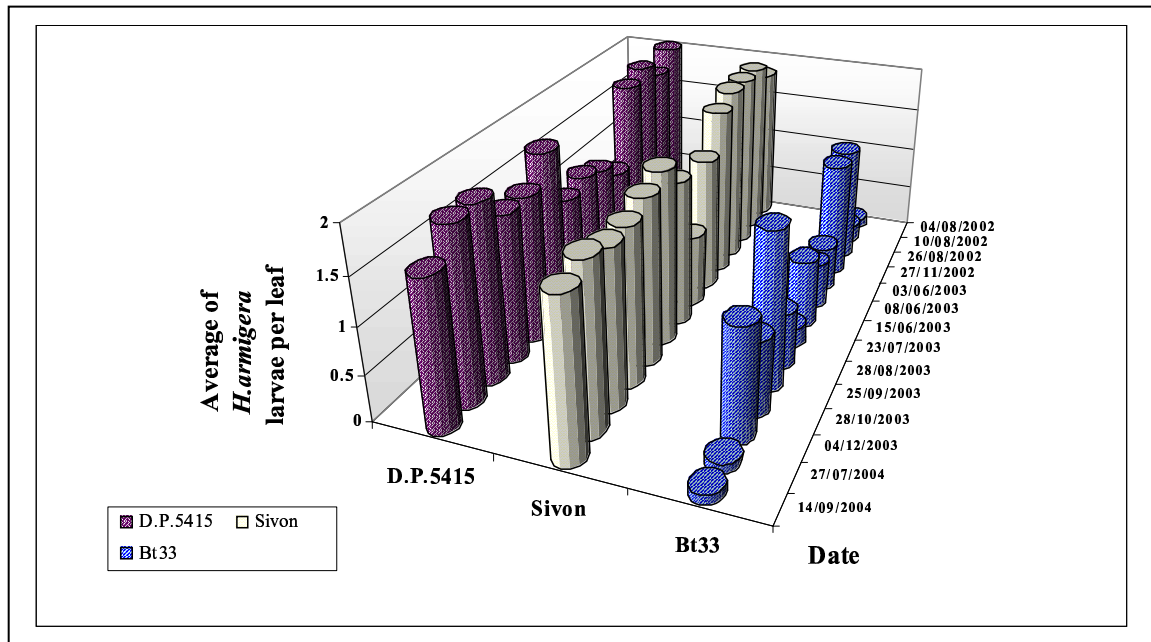
Strain	n	Slope ± SEM	LC50 (F.L.)	LC90 (F.L.)
Beit Dagan	420	1.87 ± 0.31	8.37 (5.24-13.56)	40.71 (21.88-182.57)

### Susceptibility of PBW and *Heliothis* to Cry1Ac

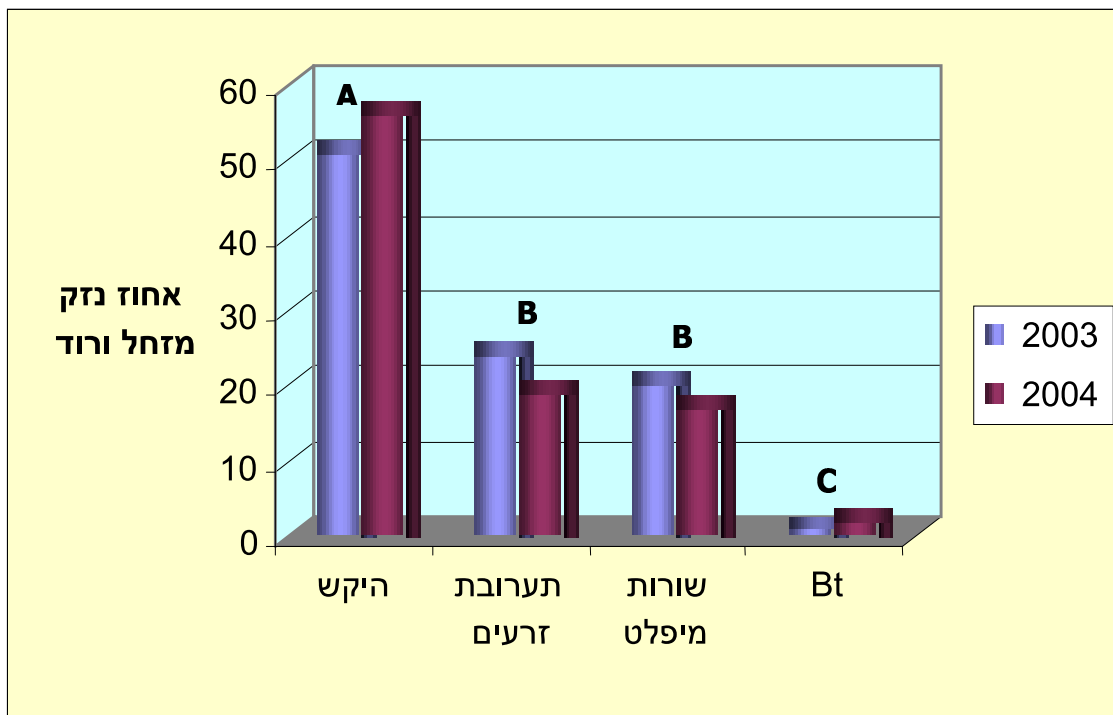


● PBWstandard (Gilat)      ▲ *Heliothis* standard (Beit-Dagan)

תרשים 5. הרגישות של זחלי הליותיס מגידול בית דגן (סטנדרט) לרעלן ה-Bt (Cry1Ac) בהשוואה לקו הרגיש של הלקטית ורודה.



תרשים 6. השפעת עלי כותנה טרנסגנית (Bt 33) על נאונטים של הליותיס בהשוואה לביקורות לא טרנסגניות (D.P. 5415 וסיבאון). מבחני רגישות נעשו בעונות 2002-2004 בעלים של כותנה מהונדסת שגודלה בחממה בגילת.



תרשים 7. התפלגות הנזק להלקטים לפי הטיפולים בחממה, עונות 2003-2004

#### ניסויים לבחינת מודלים לדחיית תנגודת לצמחים טרנסגנים

(העמדת הניסוי הראשון הייתה ביוני 2003 והוא התבצע עד נובמבר 2003. העמדת הניסוי השני החל ביוני 2004 והסתיים בסוף 2004).

מטרת הניסויים לבחון מודלים שהוצעו לדחיית תנגודת לצמחים טרנסגנים עם Bt. כמו כן נעשתה הערכת הנזק בסוגי המודלים ובביקורות.

בדיקת הביטוי של רעלן ה-Bt בצמחי הכותנה שגודלו בחממה, באמצעות מבחן ביולוגי, מצביעה על כך שהייתה בצמחים רמה גבוהה של ביטוי של הרעלן, אשר התבטאה ב-100% תמותה של זחלי ה"ו לעומת הביקורת (DP).

בניסויים נמצא מעט מאוד נזק להלקטים מה"ו: בחלקות ה-Bt נדגם נזק של 2.2 אחוזים (בעונת 2003 - 0.7%) לעומת יותר מ-50% בביקורת (DP 5415) בדומה לעונת 2003 (תרשים 7). לא היו הבדלים מובהקים בין הטיפולים "שורות מיפלט" (Internal refuge) ותערובת זרעים (Seed mixture), למרות שבשתי עונות הניסוי היה מעט פחות נזק במודל שורות המפלט. לפי התוצאות של ניסויים אלו ניתן להשתמש בארץ בשני המודלים בגידול כותנה מהונדסת עם Bt: "שורות מיפלט" שבו מגדלים פסים של כותנה לא מהונדסת לצד כותנת Bt, ומודל "תערובת הזרעים" שבו מערבבים

זרעים בשיעור של 20% (לפי ההמלצות בכל ארץ) עם כותנת Bt. המודל האחרון נפסל בזמנו כנגד הליותים מכיוון שחששו ממעבר זחלים מצמח לצמח, אך אין הוא מהווה חסרון כלפי הלקטית ורודה.

### מסקנות וסיכום

כדי לגדל גידול מהונדס המסוגל להתגונן בפני מזיקי כותנה (או כל מזיק-גידול לצמח מהונדס) יש לפתח אסטרטגיות נגד תנגודת לגידול זה. לצורך זה פותחו מספר מודלים שכוללים בעיקרם: ביטוי גבוה של הרעלן באברי המטרה שיהיו מסוגלים לקטול זחלים עם אלל יחיד לתנגודת, חלקות צמודות של 'צמחי מיפלט' לא טרנסגנים ומעקב צמוד אחר התפתחות התנגודת לצמחים המהונדסים. במחקר הקודם שבצענו נבדקה יעילות כותנה מהונדסת עם Bt מתוצרת מונסנטו (Monsanto) נגד זחלי עשים מזיקים, אולם לא ניתן היה לבחון את השינויים ברגישות הזחלים לרעלן (אם נגרמה עליה בעמידות) כתוצאה מחשיפה לכותנה המהונדסת. מטרת המחקר העיקרית היא לפתח אסטרטגיה למימשק נגד תנגודת של כותנה מהונדסת עם Bt במזיקי הכותנה העיקריים. השלב הראשון של המחקר חייב אותנו לסגל ולשפר שיטות גידול של מספר מזיקים ובמיוחד הלקטית ורודה (זחל ורוד), והליותים כדי ליצור קו בסיסי לרגישות מזיקים חשובים אלה לרעלן ה-Bt (Cry1Ac).

בשנה הראשונה של המחקר נבחנה שיטת גידול של ה"ו שמקובלת באוניברסיטת טוסון באריזונה. מצע מזון מלאכותי על בסיס נבטי חיטה וסויה נרכש בארה"ב ונוסה פעם ראשונה לגדול ה"ו. עד עתה הצלחנו לבסס את שיטת הגידול הזאת. אנחנו מגדלים בהצלחה היום במעבדה לא רק אוכלוסיות ממעבדה, כגון האוכלוסייה אשר קיבלנו מבית שאן לפני כשלוש שנים, אלא גם האוכלוסיות משדות שונים שנאספו בארץ. לסיכום ראוי לציין שהמזון אכן מתאים לחרק זה. במקביל, אנחנו משתמשים בהצלחה במצע מזון הזה לגידול הליותים לצורך ניסויים וגם בודקים אפשרות לגדל בצורה דומה זיפית שנאספה משדות כותנה שונים.

במקביל לשיפור שיטות הגידול, ערכנו ניסויי רגישות של זחלי ה"ו לרעלן ה-Bt. תערובת הרעלן הוכנה מהתכשיר הביו-אינסקטיציד - MVP-II 20% קפסולרי (Mycogen) שהוא היחיד שמקביל בתכונותיו לרעלן הטרנסגני. לפי הניסויים נראה שהגזע סטנדרטי של הלקטית ורודה, שמקורו מגידול ממושך בעמק בית שאן, רגיש ביותר לרעלן ה-Bt, בדומה לגזעים הרגילים שמשמשים כקווים רגילים בניסויים בארה"ב. אנחנו ממשיכים בניטור הרגישות בשדה של זחלי הלקטית ורודה לרעלן ה-Bt באזורי הארץ השונים. נאספו הלקטים ממספר שדות כותנה בעונות 2002-2004 ונעשו מבחני רגישות של גזעי ה"ו שמקורם מהשדה. גם הקווים מ-2002 ו-2003 נמצאו רגילים לרעלן ה-Bt ולכותנה טרנסגנית הגדלה בחממות גילת. כדי ללמוד האם נמצאים בשדה אללים לתנגודת נלקחו חלק מאוכלוסיות הנ"ל לניסויי סלקציה מכוונת במעבדה. אנחנו מנסים בימים האלה להעמיד גידול של ה"ו מהאיסופים האחרונים (רבדים מעונת 2004).

כיום אנו בוחנים בשנה השנייה (בתנאי חממה) חלק מהמודלים שהוצעו לדחיית תנגודת לצמחים טרנסגנים. בסיום הניסוי ננתח את התוצאות בהשוואה לתוצאות מהשנה הקודמת על מנת להסיג תוצאות ברורות. כתוצאה ממחקר זה נוכל למצוא את הקווים הבסיסיים (Baselines) של רגישות זחלי הלקטית ורודה והליותים לרעלן Cry1Ac, ועם התפתחות והתרחבות הגידול של הכותנה המהונדסת (או כל גידול טרנסגני העמיד למזיקים) נוכל לנטר את העמידות בשדה ולהשוות את גזע הסטנדרט המעבדתי (או מהשדה) לרגישות של גזעים

בשדות ובאזורים השונים. מחקר זה הוא הכרחי לכל יישום של צמחים טרנסגנים, ורק כך נוכל לעקוב וללמוד האם מתפתחת עמידות לצמחים אלו (Simmons et al., 1998). בסיומו של המחקר הנוכחי, אנו מצפים שנוכל להמליץ על המודל המתאים (בתנאי הארץ) לדחיית תנגודת של עשים מזיקים לכותנה מהונדסת.

#### רשימת ספרות:

- הורביץ, ר., נבון, ע., לבסקי, ש., ויבלונסקי, ש. 1999. היעילות של צמחי כותנה מהונדסים (טרנסגנים) עם בצילוס תורינגיינזיס נגד עשי כותנה מזיקים בישראל. גן שדה ומשק, אוקטובר 1999: 23-26.
- Bartlett, A.C. 1995. Resistance of the pink bollworm to Bt transgenic cotton. In Proceedings Beltwide Cotton Conferences. pp. 766-768.
- Beckman H.F., Bruckart S.M., Reiser R. 1953: Laboratory Culture of the Pink Bollworm of Chemically Media. J. Econ. Entomol. 46. 627-630
- Gelernter, W. D. 1997. Resistance to microbial insecticides: the scale of the problem and how to manage it. In: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity. The British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 86, Surrey, UK, pp.201-212.
- Gould, F., A. Anderson, A. Jones, D.G. Heckel, J. Lopez, S. Micinski, R. Leonard, and M. Laster. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to Bacillus thuringiensis toxins in field populations of Heliothis virescens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3519-3523.
- Liu, Y., Tabashnik, B. E., Meyer, S. K., Carriere, Y. and Bartlett, A. C. (2001). Genetics of pink bollworm resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac. J. Econ. Entomol. 94: 248-252.
- Navon, A. 2000. Bacillus thuringiensis insecticides in crop protection - reality and prospects. Crop. Prot. 19: 669-676.
- Ouye M.T. 1962: Effects of Anti-microbial Agent on Microorganisms and Pink Bollworm Development. J. Econ. Entomol. 55. 854-857.
- Roush, R. T. 1997. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? Pestic, Sci. 51: 328-334.
- Simmons, A.L., T.J. Dennehy, B.E. Tabashnik, L. Antilla, A. Bartlett, D. Gouge, and R. Staten. 1998. Evaluation of Bt cotton deployment strategies and efficacy against pink bollworm in Arizona. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. Pp1025-1030.
- Sims, M. A., Dennehy, T. J., Patin, A., Carrière, Y., Liu, Y., Tabashnik, B., Antilla L. and Whitlow, M. 2001. Arizona's multi-agency resistance management program for Bt cotton: sustaining the susceptibility of pink bollworm. Proceedings Beltwide Cotton Conferences 2001, pp. 1173-1179.



Tabashnik, B.E., N. Finson, D.G. Heckel, Y.B. Liu, and L. Masson. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1-5.