

עמידות ליובש בקווי אינטרוגרסיה איזוגניים של כותנה

דו"ח מחקר לשנת 2007
מוגש להנהלת ענף הכותנה

על ידי

אבישג לוי ויהושע סרנגה

המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, רחובות

מבוא

מים הם הגורם העיקרי המגביל התפתחות צמחים ויבולי גידולים חקלאיים בעולם כולו. בעיה זו אף צפויה להחריף בשל הדרישה הגוברת למים לשימוש ביתי ותעשייתי והשינוי האקלימי הגלובלי. אחת הדרכים המבטיחות להתמודדות עם המחסור במים בחקלאות היא שיפור פיסילוגי-גנטי של התאמת הצמחים לתנאי עקת מים.

כותנה (*Gossypium Spp.*) היא גידול קיץ של אזורים צחיחים וצחיחים-למחצה, ולכן נחשף הצמח במקרים רבים במהלך גידולו, גם בתנאי השקיה, לעקות מים הפוגעות ביבול ובאיכות. מקור הכותנה הוא מצמחי בר הגדלים באזורים סוב-טרופיים צחיחים-למחצה ומותאמים לתנאי מחסור במים, אלא שבמהלך התרבות והטיפוח המודרני איבדה הכותנה את יכולת ההתאמה ליובש המצויה במיני הבר. בזני כותנה מודרניים הגדלים בתנאי שדה מוליכות פיוניות גבוהה מן הנדרש לאספקת CO₂ לתהליך הפוטוסינתזה וכמעט שאינה מגבילה את קצב הטרנספירציה (Radin, 1994).

טיפוח הכותנה שהתבסס בעבר על שיטות "קלאסיות" תרם רבות לגידול הכותנה בארץ ובעולם, אולם נראה כי פריצת דרך משמעותית בהתאמת זני כותנה לאזורים צחיחים דורשת שימוש בשיטות טיפוח חדישות. מיפוי גנטי מהווה כלי רב עוצמה המאפשר זיהוי אתרי תכונות כמותיות (Quantitative Trait Loci, QTLs) ויישומם בטיפוח (Paterson, 1997). טיפוח "קלאסי" מבוסס על סלקציה בהתאם לביצועי הצמח (פנוטיפ) המושפעים מגורמי סביבה (קרקע, אקלים, השקיה, דישון וכד'), לעומת זאת, המיפוי הגנטי מאפשר ביצוע סלקציה ישירה לגנים הרצויים על פי סמנים גנטיים (Tanksley et al., 1989).

במחקר שנערך במעבדתנו על אוכלוסיה בין-מינית של צמחי כותנה (F177 X H23) מופו 83 QTLs המשפיעים על כושר הייצור (חומר יבש, כותן גולמי, ורכיבי יבול) ותכונות פיסילוגיות נלוות (יעילות ניצול מים, פוטנציאל אוסמוטי, טמפרטורת הנוף וריכוז כלורופיל), (Saranga et al., 2004). צמחי הכותנה נבחנו בהשקיה מלאה (100%) ומופחתת (50%) בתנאי שדה בישראל, ולכן תוצאות המחקר רלוונטיות במיוחד לתנאי הארץ. מחקר זה הראה כי אין תאחיזה שלילית בין QTLs הקשורים בעמידות ליובש לבין איכות הסיבים. חלק מן ה-QTLs התבטאו רק בתנאי מחסור במים (ולא בתנאי השקיה מלאה), דבר המעיד על חשיבותם כחלק ממנגנון התגובה של הצמחים ליובש. בחלק מן ה-QTLs תרם האלל של שמקורו במין *G. hirsutum* לשיפור העמידות ליובש, ואילו ב-

QTLs אחרים היה יתרון לאלל של המין *G. barbadense*. תוצאות אלו מעידות שבמהלך האבולוציה נותרו בכל אחד ממיני הכותנה גנים שונים (שמקורם במיני הבר) המקנים התאמה לתנאי מחסור במים, לכן ניתן לשפר כל מין על ידי החדרה (אינטרוגרסיה) של גנים שמקורם במין השני.

מטרות המחקר

- מטרת מחקר זה היא להעמיק את הידע בנושא התאמת צמחי כותנה לעקת מים ובכך ליצור את הבסיס לטיפוח של זנים שיותאנו לתנאים אלה. להצעת מחקר זו נקבעו מטרות משנה כלהלן:
1. אפיון העמידות ליובש בקווי אינטרוגרסיה איזוגניים של שני מיני הכותנה, בהשוואה לקוי ההורים שלהם.
 2. אפיון המנגנונים הפיסיולוגיים התורמים לעמידות ליובש בקווי האינטרוגרסיה האיזוגניים.
 3. פיתוח קווים המכילים "אינטרוגרסיה כפולה" של שני אזורי מטרה על מנת להוסיף ולשפר את עמידותם ליובש.

שיטות וחומרים

על פי תוצאות המיפוי הגנטי נבחרו חמישה אזורים בגנום (להלן: "אזורי מטרה") בהם מצויים QTLs עיקריים המשפיעים על יבול, יעילות ניצול מים ריכוז כלורופיל והתאמה אוסמוטית. אזורי המטרה הוחדרו באמצעות הכלאות מחזירות תוך שימוש בסמנים גנטיים אל כל אחד משני ההורים (זן אקלה H-23 ו זן פימה F-177) ליצירת קוי אינטרוגרסיה איזוגניים (קווים דומים לקוי ההורים למעט אזור מטרה שהוחדר מן ההורה השני).

קוי האינטרוגרסיה וקוי ההורים (ביקורות) נבחנו במהלך עונת 2006 ועונת 2007. בקיץ 2006 נבחנו 28 קווים איזוגניים (דור BC3F4) שפותחו עבור 7 אזורי מטרה (3-5 קווים לאזור מטרה). הניסוי בוצע בחוות הפקולטה לחקלאות בחלקות קטנות (בשל מגבלת זרעים) בקרקע חולית. בקיץ 2007 נבחנו 18 קווים נבחרים המכילים שישה אזורי מטרה (3 קווים לכל אזור) בחלקת שדה של מושב בני-דרום, בקרקע חרסיתית. בכל ניסוי נכללו שני משטרי השקיה, השקיה משקית מקובלת (בקורת, להלן טיפול "רטוב") והשקיה מופחתת (כ-50% מהשקיה משקית, להלן טיפול "יבש"). הניסויים בוצעו במתכונת של חלקות מפוצלות (השקיה בחלקות ראשיות וזנים בחלקות משנה) בבלוקים באקראי ובשש חזרות.

במהלך שתי העונות בוצעו מדידות של פוטנציאל אוסמוטי (פ"א), תכולת כלורופיל, ויחס איזוטופים של פחמן שהוא מדד עקיף ומקובל ליעילות ניצול המים (ינ"מ). התאמה אוסמוטית (ה"א) חושבה כהפרש שבין פ"א בטיפול הרטוב לבין הפ"א בטיפול היבש. בנוסף, בעונת 2006 נמדדה מוליכות הפיוניות של הצמחים בשדה, וצפיפות הפיוניות, ובעונת 2007 נבדק גודל עלה מרבי. בסוף העונה בוצע קטיף ידני של מטר שורה (2006) או שני מטר (2007) על מנת לאמוד את פוטנציאל היבול של קוי האינטרוגרסיה. כל קו הושווה סטטיסטית (מבחן t) להורה המחזיר שלו, שהוגדר בניסוי כקו ביקורת.

תוצאות

בדו"ח זה נתמקד בחמישה אזורי מטרה (המסומנים כ- 1,2,3,8,9) תוך הצגת תוצאות של קו מייצג אחד מכל אזור (טבלאות 1, 2).

המיפוי הגנטי ובהמשכו גם עבודה זו עוסקים בכושר היצור של הצמח בתנאי עקה ובתכונות פיסיוולוגיות הקשורות בו. כללית ניתן לומר כי אף אחד מאזורי המטרה שנלמדו לא תרם לשיפור ביבול הסיבים (או כותן), להוציא את יבול הסיבים הגבוה והמובהק של קו 1 בעונה 2006 בטיפול הרטוב (170 גר/מ"ר) יחסית ל- F177 (140 גר/מ"ר) (טבלאות 1, 2). יתכן כי את הבדלים אלה ניתן ליחס לתרומת אזור המטרה לעליה ביבול בתנאי סביבה ספציפיים, או לרגישות של קו הביקורת F177 בסביבה זו. התבוננות בתוצאות היבול בעונה 2007 מלמדת כי הטיפול המשקי לא היה מיטבי ולמעשה נתנה השקיה בעודף. כך למשל לא נמצא שיפור ביבולי F177 בין הטיפול היבש לרטוב, ואף ישנם קוים בהם נמצאה פחיתה ביבול בתגובה לתוספת המים בעונת 2007.

שלוש תכונות פיסיוולוגיות שקשורות להתאמה ליובש נלמדו במהלך המיפוי הגנטי: פ"א, תכולת כלורופיל ויחס איזוטופים של פחמן (ינ"מ). קוי אנטרוגרסיה 1, 2, 3 הכילו אזורים שתרמו לעליה ביבול הכותן וירידה בפ"א (שלילי יותר) (טבלאות 1, 2). בשתי עונות המחקר הפ"א של כל אחד מקוי אינטרוגרסיה אלה נמצא נמוך לעומת ההורה המחזיר (קו בקורת בניסוי), להוציא קו 3 בעונה 2007. הפ"א הנמוך התבטא בהתאמה אסומוטית גבוהה ומובהקת מקו הביקורת (מלבד קו 3 עונה 2007). קוי האינטרוגרסיה 8, 9, 1 הכילו אזורים שתרמו לעליה בתכולת כלורופיל (אזור 1) או ירידה (אזורים 8, 9). קוים 8 ו-9 לא בטאו רמות כלורופיל נמוכות מאלה של קוי הביקורת, אך בקו 1 אכן נמצאה השפעה של אזור המטרה על עליה בתכולת הכלורופיל. השפעה זו אומנם לא נמצאה מובהקת, אך ניתן היה לראות כי באופן עקבי תכולת הכלורופיל בקו זה נמצאה גבוהה יותר בשני משטרי ההשקיה מופחתי המים. תכונה נוספת שנמצאה קשורה לאזורי מטרה 8 ו-9 היא יחס איזוטופים של פחמן (ינ"מ). מן התוצאות ניתן ללמוד על השפעה מובהקת של שני אזורי מטרה אלה על עליה בינ"מ, אשר נמצאה גבוהה ומובהקת לעומת שני קוי הביקורת בעונה 2006 (דוגמאות מ-2007 נמצאות בבדיקה).

במטרה להבין את השפעות האינטרוגרסיה של האזורים בגנום שנמצאו קשורים להתאמה ליובש, קוי האינטרוגרסיה וקוי הביקורת נבחנו לתכונות פיסיוולוגיות נוספות שלא נכללו במיפוי הגנטי: מוליכות פיוניות, צפיפות פיוניות וגודל עלה. קוי האינטרוגרסיה נמצאו שונים מקווי הביקורת גם בתכונות אלה (טבלאות 1, 2). בקוים 2 ו-9 נמצאה מוליכות פיוניות נמוכה יחסית לביקורת בטיפול הרטוב. מוליכות נמוכה זו התבטאה בינ"מ גבוהה (קו 9), אך לא לוותה בפחיתה ביבול (קוים 2 ו-9). תוצאה זו מלמדת כי מוליכות הפיוניות בקו הביקורת F177 גבוהה מן הנדרש, וכי ניתן להפחית מכמויות המים המקובלות בכותנה ללא הפסד ביבול. צפיפות פיוניות הינה תכונה חשובה העשוי להשפיע על ינ"מ של הצמח. ירידה מובהקת בצפיפות הפיוניות נמצאה בקו 1, ועליה מובהקת נמצאה בקו 3. ראוי לציין כי לא נמצא קשר ישיר בין מוליכות הפיוניות לצפיפותן. גודל העלה המרבי נמצא שונה יחסית לביקורת בכל הקוים שנלמדו. השפעה מאוד מובהקת בכיוון הקטנת העלה

נמצאה בקו 1. לצמצום גודל העלה עשויה להיות חשיבות מיוחדת ביכולת התאמת הצמח לסביבות מחסור במים וביבולו (Blum, 2005).

דין ומסקנות

התוצאות בעבודה זו מלמדות כי ניתן לשפר את ההתאמה של צמחי כותנה לתנאי יובש בתכונות פיזיולוגיות חשובות באמצעות מיפוי גנטי וסלקציה עם סמנים. בעבודה זו נמצא שיפור בקווי האנטרוגרסיה בתכונות פיזיולוגיות הקשורות בהתאמת הצמח לתנאי יובש כמו התאמה אוסמוטית וינ"מ. למרות זאת ההצלחה היא חלקית וקשורה בעיקר במורכבות התכונות בהן עסק המחקר. יבול ותכונות פיזיולוגיות הקשורות להתאמה ליובש הינן תכונות בעלות אינטראקציה חזקה מאוד עם הסביבה אשר מושפעות מעשרות גנים. בעבודה זו ניסינו ללמוד על השפעת אזורי המטרה בצירוף עם חדש של גנים (אינטרוגרסיה מהורה א' להורה ב') ובסביבות חדשות. אזורי המטרה המכילים גנים שתורמים לתכונה הנלמדת עשויים אומנם לשפר את הביצועים של ההורה אליו הועברו, אך לא בהכרח. לעיתים אינטרקציות חדשות (סביבה או בין גנים) עשויות להתבטא בחוסר השפעה או אפילו בנחיתות של קו האינטרוגרסיה. מאחר והתכונות שנלמדו מושפעות מהרבה מאוד גנים העברה של אזור גנומי אחד (גן אחד או גנים בודדים) לא בהכרח תשפר את ביצועי הצמח. המסקנה המתבקשת היא כי עלינו להמשיך ולשפר את ביצועי קווי האינטרוגרסיה באמצעות אנטרוגרסיות כפולות, ודחיקת אזורים לא רצויים בגנום, על מנת שתכונות פיזיולוגיות חשובות כמו פ"א, ינ"מ, תכולת כלורופיל וגודל עלה שקשורות בעמידות הצמח לתנאי יובש תוכלנה לבוא לידי ביטוי במופע הצמח בסביבות יבשות, ולאפשר פיתוח קווים עם יבולים משביעי רצון.

לסיכום, בחלק מקווי האינטרוגרסיה נמצא שיפור בתכונות פיזיולוגיות חשובות הקשורות לעמידות ליובש, אך לא ביבול. על מנת שנוכל ליצור קווים מותאמים ליובש המשלבים תכונות פיזיולוגיות של התאמה ליובש ויבול יש להמשיך ולפתח קווים נקיים מהשפעות גניות לא רצויות המכילים מספר אזורי מטרה.

ביבליוגרפיה נבחרת:

- Blum A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential-are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aus. J. Agr. Res.* 56 1159-1168.
- Paterson A.H., 1997. *Molecular Dissection of Complex Traits*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Radin JW. 1994. Genetic variability for stomatal conductance in Pima cotton and its relation to improvement of heat adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7217-7221.
- Saranga, Y., C. Jiang, R. Wright, D. Yakir, A. H. Paterson, 2004. Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity. *Plant Cell & Environ.* 27:263-277.
- Tasnkley, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Bonierbale, 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tool for an old science. *Biotechnology* 7:257-264.

טבלה 1: יבול כותן ותכונות פיסילוגיות בקוי אינטרוגרסיה איזוגניים נבחרים של כותנה, רחובות 2006. †, *, ** ו- *** מציינים הבדל מובהק מן ההורה המחזיר ברמות של 0.01, 0.05, 0.1 ו- 0.001 בהתאמה.

קו	יבול סיבים (גר/מ"ר)		פ. אוסמוטי (Mpa)		ה"א (Mpa)	יחס איזוטופים של פחמן (%o)		תכולת כלורופיל (spad value)		מוליכות פיוניות (mol/m ² /sec)		צפיפות פיוניות (#/mm ²)
	יבש	רטוב	יבש	רטוב		יבש	רטוב	יבש	רטוב	יבש	רטוב	רטוב
קוי פימה (הורה מחזיר F177)												
1	100	171*	-1.8**	-1.1	0.6*	-27.7	-27.9	46	41	0.7	1.7	223*
2	97	158	-1.6	-1.0	0.6*	-26.5**	-27.9	45	37*	0.7	1.0***	337
9	69**	132	-1.4	-1.0	0.3	-25.7***	-26.7***	44	38	0.3	0.7***	307
F177	108	140	-1.5	-1.0	0.4	-27.4	-27.8	44	40	0.6	1.9	319
קוי אקלה (הורה מחזיר H23)												
3	141*	223	-1.5*	-1.0	0.5**	-27.1	-27.9	47**	42	0.79	1.27	343*
8	103***	87***	-1.5**	-1.1	0.5*	-26.3±	-26.6*	56**	45±	0.70	0.94*	289
H23	181	216	-1.3	-1.0	0.4	-26.7	-27.2	51	42	0.90	1.57	271

טבלה 2: יבול כותן ותכונות פיסילוגיות בקוי אינטרוגרסיה איזוגניים נבחרים של כותנה, בני דרום 2007. †, *, ** ו- *** מציינים הבדל מובהק מן ההורה המחזיר ברמות של 0.01, 0.05, 0.1 ו- 0.001 בהתאמה.

קו	יבול סיבים (גר/מ"ר)		פ. אוסמוטי (Mpa)		ה"א (Mpa)	תכולת כלורופיל (spad value)		גודל עלה מרבי (cm ²)
	יבש	רטוב	יבש	רטוב		יבש	רטוב	רטוב
קוי פימה (הורה מחזיר F177)								
1	395	261***	-1.5**	-0.9	0.6*	48±	37	66***
2	177***	88***	-1.4±	-0.9	0.5*	44	36*	114
9	273***	306*	-1.2	-0.9	0.2	44	38	93±
F177	383	380	-1.2	-0.9	0.3	45	39	108
קוי אקלה (הורה מחזיר H23)								
3	328**	372**	-1.0	-0.9	0.1**	47±	38	98
8	214***	248***	-1.1	-0.9	0.2±	55***	43***	-
H23	414	469	-1.3	-0.9	0.4	50	35	82