

שימור צמחי גפן *in vitro* לתקופה ממושכת

נ. שלמוביץ¹, פ. שפיגל-רואי²,
ע. תנאי

מבוא

גפן היא צמח רב-שנתי הנמנה עם צמחי התרבות העתיקים בעולם וריבויה הוא וגטטיבי. לתכונה זו יתרונות וחסרונות כאחד. גפן למאכל וליין היא מהגידולים החשובים בעולם, ומעמדה וערכה הכלכלי ממשיכים להתחזק בארצות רבות. מכאן החשיבות הגדולה של יצירת חומר ריבוי פטור ממחלות ושל שימור חומר גנטי (germplasm) לצורכי בנק גנים.

מחלות ומזיקים רבים פוגעים בגפן; חלקם

ניתנים להדברה על-ידי שימוש בחומרים כימיים או אחרים המונעים את פגיעת המזיק או מחולל המחלה, וחלקם, כגון מחלות הנגרמות על-ידי וירוסים, אינם ניתנים להדברה.

חשיבות השימור של החומר הגנטי הולכת ומתגברת בחקלאות העתיד. במאגר משמרים גנים מן הבר וכן גנים שמקורם בכנות ובזנים תרבותיים, המשמשים גם הם מקור חשוב להשבחה. מדובר בגנים כמקורות עמידות למחלות ולמזיקים, כמקור לתכונות הבכרה והאפלה, צבע, צורה ועוד. העובדה כי ריבוי הגפן הוא וגטטיבי מקשה על קיום Repository בתנאי מטע, שבהם נדרשים שטח גדול ועבודה רבה, וחומר הריבוי חשוף לפגיעת מזיקים ומחלות.

גידול הגפן בתרבית *in vitro* מאפשר לקדם אותה ולהתגבר על מספר בעיות שקשה לפתור בשדה או שכלל לא ניתן. הגידול נועד למלא מספר מטרות, שהחשובות בהן הן כלהלן.
* הקמת בנק גנים (germplasm) לשימור לטווח ארוך של זנים וכנות.
* יצירת חומר ריבוי פטור ממחלות, בעיקר

מחלות ויראליות.

* ריבוי מהיר של זנים וכנות בעלי חשיבות כלכלית.
* יצירת מכלואים חדשים ומניפולציות גנטיות לצורכי השבחה.

היתרונות של שימור גפן בתרבית *in vitro* לצורכי בנק גנים לעומת Repository בתנאי מטע הם כלהלן.

* דרישות שטח - לא ניתן לגדל כ-8,000 זני גפן במטע; לעומת זאת, ניתן לשומרם בתרבית.
* דרישות עבודה - גידול גפן במטע מחייב עבודה אגרנטית מרובה - עיבודים, ריסוסים, זמירה ועוד, לעומת דרישות העבודה של טכנאי מעבדה.

* ייצור ושימור של תרביות פטורות מוירוסים ופתוגנים אחרים מספק חומר בריא למדינה המעוניינת בו, ומאפשר סחר בינלאומי קל ונוח יחסית, בהתאם לסטנדרטים בינלאומיים.

* ריבוי מהיר - ניתן לרבות גפן שמקורה בתרבית רקמה ולקבל מצמחים בודדים מאות אלפי צמחים בשנה (Chen et al., 1990)
(Chee et al., 1984)

1. המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי
2. המחלקה להשבחת המטעים, מינהל המחקר החקלאי

טבלה 1. השפעת סורביטול (5%) על התפתחות צמחונים של שתי כנות - K5BB ו-RSG - בתרבות

8 שבועות		4 שבועות		מספר שבועות מתחילת הניסוי
RSG	K5BB	RSG	K5BB	כנה
15	14	15	15	מס' צמחונים
40	79	33	40	% צמחונים שהתארכו
1.1	0.9	0.55	1.1	תוספת אורך בס"מ*
4.5	2.6	2.8	3.2	תוספת פרקים

* ממוצע של הצמחים שהתארכו.

* העלות של השימור בתרבות היא נמוכה יחסית.

* קבלת צמחונים או חלקי צמח המתאימים לעבודת השבחה, או לחלופין להעברה מידית למטע (Galzy, 1985).

חסרונות השיטה הם:

* יש צורך בעבודה להתאמת מצעים ספציפיים לכנות ולזנים השונים.

* אפשרות לקבלת מוטציות. מספר המוטציות קטן, אך יש להביאו בחשבון. ככל שהאקספלנט גדול יותר כן קטן הסיכוי לקבלת שוני גנטי.

* קיימת תופעת היובנליות, אך ניתן להתגבר עליה.

שיטות מקובלות לגידול בתרבות דורשות טיפול מתמיד (העברות), ולכן עלות החזקתן גבוהה. האטת קצב הגידול תפחית את תדירות הטיפול בצמחי תרבות ותאפשר שימוש בשיטה זו כשיטה כלכלית.

Galzy (1969) ו-Barlass and Sene (1983) שימרו מספר זני יין, למשך מספר חודשים, בטמפרטורה של 12-7 מ"צ. ההתאוששות אחר השימור בקור תלויה בגנוטיפ. ניסויים מעטים

Chee et al. (1990) ו-Monette (1988) סוקרים שיטות שונות לשימור אוסף צמחי גפן בתרבות. ניתן לעכב את קצב הצמיחה על-ידי בקרת הרכב המצע או באמצעות טמפרטורת ההדגרה.

הכנת אקספלטנטים

שריגים ירוקים של הזנים השונים נלקחו מהשדה. השריגים נשטפו בסבון תחת מי ברז זורמים, במשך 15-30 דקות, וחוטאו ב-Sodium hypochlorite + טיפת Tween 20 למשך 10 דקות. לאחר 3 שטיפות במים מזוקקים הועברו מקטעים משריגים אלה למצע תרבית. בדרך כלל המקטעים גדלים במצע תרבית של Murashige and Skoog (1962), כאשר המינרלים הם בחצי מהריכוז המקורי בתוספת סוכרוז 3% ואגר 0.8%. מקטעים אלה גודלו במבחנות 150x25 מ"מ המכילות 10 סמ"ק מצע, בחדר גידול בטמפרטורה של 25 מ"צ, 15 שעות אור פלואורסצנטי לבן (S/M E/m²45).

כאמצעי נוסף לשימור צמחים בתרבית לטווח בינוני Bhojwani and Razadan, 1983; Kartha, 1984; Thorpe, 1990. מטרת עבודה זו היא לבחון את ההשפעות של עקות אוסמוטיות על עיכוב קצב ההתפתחות של צמחונים בתרבית.

חומרים ושיטות

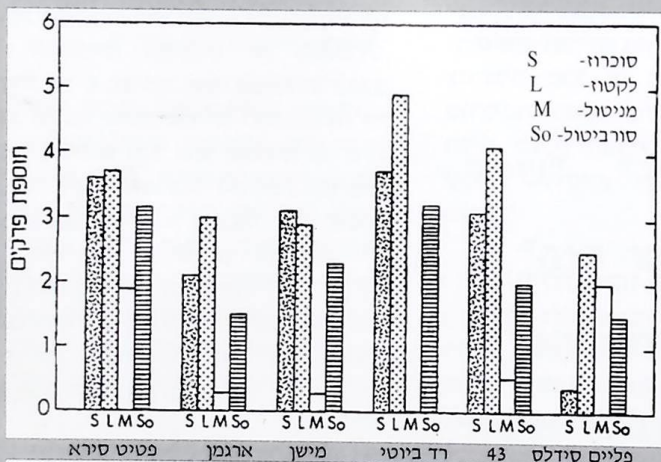
חומר צמחי

נבדקו זני היין (P.S.) Petite Sirah, ארגמן (A), Mission (M), וזני המאכל זן אדום חסר חרצנים - Black beauty (54), ברירה שחורה חסרת

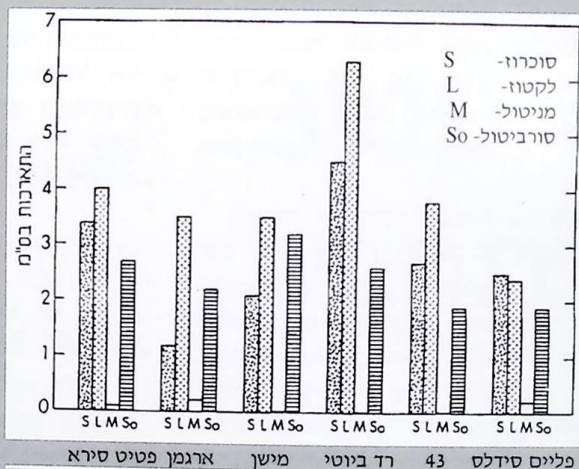
נערכו לבדיקת שיטה לשימור בהקפאה (Chen et al., 1990; Whithers, 1985).

טיפול כימי יכול להאט את קצב הצמיחה במספר דרכים: השפעה ישירה על תרדמת איברים, הפחתת המטבוליזם של תאים או מניעת החלוקה של התאים. השפעות כאלו ניתן להשיג על-ידי הפחתת ריכוז החמצן או על ידי מעכבי צמיחה. Galzy (1985) טוענת, שהסיכוי הגדול ביותר לשימור יציבות גנטית של גפן בתרבית הוא להשתמש במצע ללא חומרי צמיחה. לפי Bajaj (1990), הגורמים המעודדים חוסר יציבות גנטית בתרבית לזמן ממושך הם תנאי הסביבה ורמות גבוהות של

דיאגרמה 2. השפעת סוכרים שונים (ריכוז קטן) על תוספת פרקים בצמחוני גפן - זנים שונים הגדלים בתרבית 8 שבועות.



דיאגרמה 1. השפעת סוכרים שונים (ריכוז קטן) על התארכות צמחוני גפן - זנים שונים, הגדלים בתרבית 8 שבועות.



הפעלת תנאי עקה

מהצמחונים שהתקבלו נחתכו קטעים של 2-3 פרקים ונשתלו במצעים, שהכילו בנוסף למצע הבסיסי כפי שתואר לעיל 3% סוכרוז (דו-סוכר המורכב מיחידות גלוקוזה

חרצנים (43) (שניהם מברירות של פרופ' פי שפיגל) ו-Flame seedless (F.S.). בניסויים נוספים נבדקו זני גפן יין וזני מאכל שונים וכן כנות מתוך אוסף הזנים הקיים במעבדתנו.

חומרי צמיחה. Reuveni and Israeli (1993) הראו, כי הרכב המצע, קצב הריבוי ומשך הזמן בתרבית אינם מעודדים מוטציות בבגנות. הפחתת ריכוז החמצן בתרבית אינה פשוטה ליישום, והשימוש בחומרי צמיחה שנוי במחלוקת. ניתן להשתמש בעקה אוסמוטית



שניצקי מ.ס. (1990) בע"מ ציוד לעיבוד קרקע וקונועים

■ מכסחת מטעים ■ קונועים להשקיה אוטומטית
■ מגוב נגרר 10 שמשות ■ דיסקים נגררים

שניצקי מ.ס. (1990) בע"מ ת"ד 71 לוד 71100 טל: 08-9253866 פקס: 08-9253868



שבועות נראו רוב הצמחונים שרזיים בעקה. כעבור 8 שבועות נראה הבדל בין הזנים; רוב צמחוני K-5BB התאוששו, אך לא כן צמחוני RSG. לצמחונים שהתפתחו, הן RSG והן Kobber 5BB, פרקים קצרים מהרגיל ועלים קטנים שצבעם ירוק כהה.

דין

ניתן לשמר חומר צמחי בתרבות לזמן ארוך, כל עוד משגיחים עליו ומונעים בו התפתחות של זיהומים, וכל עוד ההעברות למצע טרי נעשות בפרקי-זמן מתאימים. קצב הצמיחה של הצמחונים תלוי בגנוטיפ, במצב צמחי האם, בטמפרטורת ההדגרה ובהרכב המצע.

ניתן לשמר צמחוני גפן במצע היוצר עקה אוסמוטית לפרקי-זמן ארוכים, בטמפרטורה של 25 מ"צ. העקה מאיטה את קצב הצמיחה, גורמת ליצירת פרקים קצרים רבים ומעלה על-ידי כך את האפשרות לריבוי מהיר. צמחונים של תפוא"ד, במצע תרבות שהכיל סורביטול 4% או מניטול 4%, גדלו בטמפרטורה של 25 מ"צ ונדרשה בהם העברה אחת לשנה (Lizarraga et al., 1989).

בעבודה זו נבדקה השפעת שני דו-סוכרים ושני סוכרים כוהליים על 6 זני גפן שונים. בתוצאות המוצגות בדיאגרמות 1, 2, 3 ו-4 בולטת השונות הרבה: שונות בין הזנים בתגובה לסוכר מסוים ושונות בין הזנים בתגובה לריכוזים שונים של אותו סוכר. נצפתה גם שונות בין שתי הזרות על אותו ניסוי

בסוכרוז (2%-ו-4%) ובלקטוז (5%-ו-20%) הצמחונים מתפתחים היטב. מניטול (2%-ו-4%) גרם לעיכוב חזק של הצמיחה. סורביטול 2% מעכב את הצמיחה בהשוואה לסוכרוז וללקטוז, והוא גורם להפחתה של 50% ויותר (פרט מאשר בון ארגמן) בהתארכות בהשוואה לסוכרוז.

העברה מסורביטול לסוכרוז

העברת צמחונים ממצע שימור המכיל סורביטול למצע רגיל של סוכרוז אינה פוגעת בדרך-כלל בצמחונים. צמחונים מהזנים Red beauty, Mission, Flame seedless, ארגמן ו-Red beauty שהו במצע שהכיל סורביטול 2%-ו-4% במשך 6-חודשים - ואחר הועברו לסוכרוז. כעבור 3-חודשי גידול בסוכרוז נבדקו הצמחונים, ונמצא כי רובם התפתחו באופן נורמלי.

התאמה לזנים רבים

שישה-עשר זני גפן יין וזני מאכל (לפחות 2 צמחונים מכל זן) גדלו במצע, שהכיל 4% סורביטול במשך כחצי שנה. רוב הצמחונים הגיעו לגובה המבחנה; הם היו בעלי עלים קטנים, ירוקים, כהים וגבעולים מעובים מהרגיל.

הגדלת ריכוז הסורביטול במצע

בניסוי ראשוני לבדיקת ההשפעה של הגדלת ריכוז הסורביטול במצע, נשתלו צמחונים מהכנות Kobber 5BB ו-Rupetstiris st. George במצע שהכיל 5% סורביטול (טבלה 1). כעבור 4

ופרוקטוז (דו-סוכר המורכב מיחידות גלוקוז וגלקטוז) בריכוז של 2% או 4%, סוכרים שונים כמו לקטוז (דו-סוכר המורכב מיחידות גלוקוז וגלקטוז) בריכוז של 5% או 10%, מניטול (חד-סוכר כהלי) בריכוז של 2% או 4%, וסורביטול (חד-סוכר כהלי) בריכוז של 2% או 4%. בכל ניסוי היו בממוצע 10 צמחונים, והוא נעשה בשתי הזרות.

מעקב אחר התפתחות הצמחונים (תוספת אורך ותוספת פרקים) נעשה כעבור 4, 8 ו-12 שבועות מתחילת הניסוי.

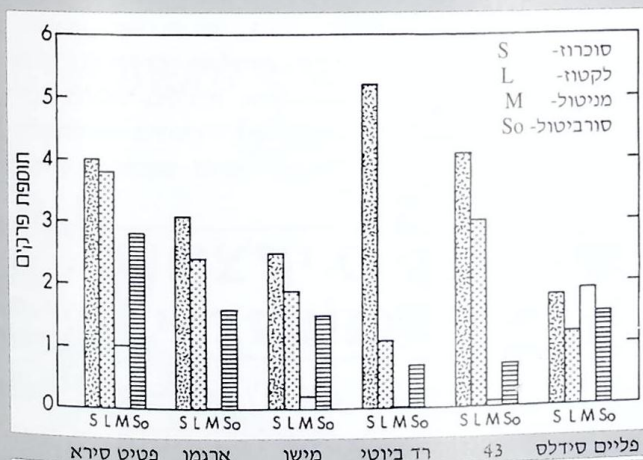
תוצאות

השפעת עקה אוסמוטית

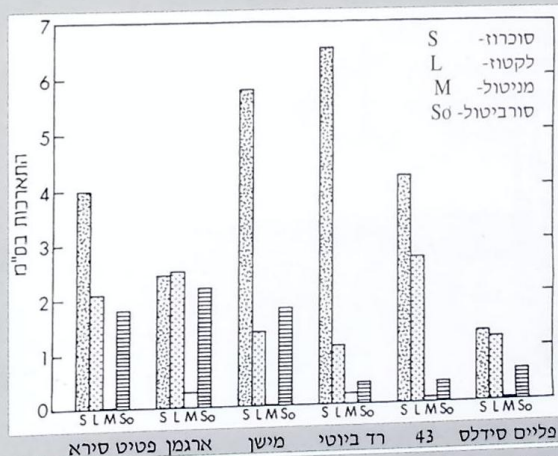
השפעת עקה אוסמוטית המושרית על-ידי סוכרים שונים מסוכמת בדיאגרמות 1-4. בדיאגרמות 1 ו-3 מסוכמת השפעה של סוכרים שונים על התארכות צמחונים מזנים שונים בתרבות. בדיאגרמות 2 ו-4 מסוכמת ההשפעה על תוספת פרקים. דיאגרמות 1 ו-2 מציגות את השפעת הריכוזים הקטנים של הסוכרים, ודיאגרמות 3 ו-4 מציגות את השפעת הריכוזים הגדולים. קיימת שונות במידת ההתפתחות של הצמחונים השונים בכל אחד מהסוכרים. לרוב יש התאמה בין ההתארכות לתוספת הפרקים, כלומר ההתארכות היא תוצאה של תוספת פרקים, וזאת הן בריכוזים הקטנים והן בריכוזים הגדולים של הסוכרים.

ההתפתחות בדרך-כלל רבה יותר בריכוזים הקטנים של הסוכרים, אך לגבי סוכרוז התמונה הפוכה (יוצא דופן F.S.).

דיאגרמה 4. השפעת סוכרים שונים (ריכוז גדול), על תוספת פרקים בצמחוני גפן - זנים שונים, הגדלים בתרבות 8 שבועות.



דיאגרמה 3. השפעת סוכרים שונים (ריכוז גדול) על התארכות צמחוני גפן - זנים שונים, הגדלים בתרבות 8 שבועות.



סיכום

נבדקה אפשרות לשמר כנות וזני גפן שונים לטווח ארוך לצורכי בנק גנים (germplasm), לשם שמירת חומר ריבוי פטור ממחלות (בעיקר ויראליות), לשם השבחה ולשם שמירת מלאי לריבוי מהיר. השוואת מצע גידול שהכיל סוכרים שונים בריכוזים שונים הראתה, ששימוש במצע המכיל 4% סורביטול מאפשר גידול גפן בתרבות in vitro למשך 6 חודשים לפחות, בטמפרטורה רגילה של חדר גידול (25 מ"צ). למרות השונות הרבה שבין הכנות וזני הגפן, ממצאים אלה מהווים בסיס לעבודה מעשית של שימור בתרבות לטווח ארוך.

יש לערוך ניסויים נוספים שמטרתם למצוא שיטה שתתאים למספר רב של זנים וכנות, ושתתן תוצאות אחידות יותר, שאולי אף יאפשרו שימור לזמן יותר ארוך.

*

רשימה מלאה של הספרות המקצועית אפשר לקבל במערכת "השדה".

לזה שבמצע רגיל של סוכרוז. בזה האחרון נדרשת העברת צמחונים אחת לחודשיים. ניסיונות ראשוניים מצביעים על כך שבמבחנות ארוכות יותר (20 ס"מ) ניתן לגדל צמחונים במשך יותר משנה - ללא צורך בחידוש המצע. הגדלת ריכוז הסורביטול במצע הגידול ל-5% נבדקה בשתי כנות (טבלה 1). בשבועות הראשונים סבלו הצמחים מעקה חזקה ולא נראתה כל צמיחה. לאחר כ-5-6 שבועות התאוששו חלקם (צמחי Kobber 5BB יותר מ-RSG). אלו שהתאוששו הצמיחו פרקים קצרים מהרגיל ועלים קטנים ירוקים כהים. אמנם שיעור ניכר מהצמחונים נפגעו ולא נראה כי יתאוששו, אך אלו שהתגברו על העקה התפתחו, אמנם לאט, ומראם היה טוב.

יש להמשיך ולערוך ניסויים בכיוונים שהוזכרו, לפיתוח שיטה שתתאים לגידול מספר רב של זני גפן, באותו מצע, ללא צורך בטיפול במשך תקופה ארוכה. במקביל יש לוודא, שלמצע הגידול אין כל השפעה על היציבות הגנטית.

(התוצאות אינן מוצגות בעבודה זו). עם זאת, ניתן להבחין בנטייה כללית משותפת. הצמחונים התפתחו היטב במצעים, שהכילו סוכרוז ולקטוז. מניטול בשני הריכוזים שנבדקו גרם לעקה קשה, שהתבטאה בעיכוב, לרוב מוחלט, של הצמיחה. סורביטול בריכוז 4% השרה עיכוב ניכר על רוב הזנים. עם זאת הוא עדיין איפשר צמיחה, ולכן נבחר להמשך הניסויים.

צמיחתם של צמחונים שגדלו 6 חודשים על סורביטול והועברו לאחר מכן לסוכרוז - לא נפגעה. השפעת העברות חוזרות ונשנות מסורביטול לסוכרוז צריכה להיבדק לפרקי זמן ממושכים.

שישה-עשר זני גפן גדלו במשך כ-6 חודשים במצע שהכיל סורביטול, ובדרך-כלל היתה התפתחותם תקינה. מכך ניתן ללמוד, ששימוש במצע המכיל סורביטול מתאים לטווח גדול של זנים בגידול במבחנות סטנדרטיות (15 ס"מ). זמן הצמיחה הממוצע לצמח בטרם יידרש חידוש המצע הוא לפחות פי-שלושה בהשוואה