194

קוד מחקר:	*261-0284-98*
נושא:	**פיתוח כותנה טרנסגנית עמידה לחרקים וקוטלי עשבים**
חוקר ראשי:	ד"ר ידידיה גפני
מוסד:	מינהל המחקר החקלאי
חוקרים שותפים:	4
תקופת מחקר:	1997-1998
מאמרים:	

תקציר

מטרות המחקר: גידול הכותנה בישראל שידע ויודע תנודות בהיקף המזרע וברווחים, מתייצב עדיין כגידול השלחין הגדול ביותר בישראל ושטחי המזרע הצפויים בשנים הבאות ינועו סביב לרבע מיליון דונם. עם כל זאת הדברת חרקים, עמידות לקוטלי עשבים, תכונות אגרונומיות ואיכות סיב ידרשו בעתיד התערבות מסיבית של ההנדסה הגנטית כפי שכבר החל בעולם כולו. כדי ליצור זנים מהונדסים גנטית יש לפרוץ תחילה את בעיית הטרנספורמציה והרגנרציה של הזנים הישראליים וכן לאתר גנים חשובים להחדרה בשיטות ההנדסה הגנטית לזנים אלו.

מהלך ושיטות העבודה: במהלך השנה האחרונה הושקע מאמץ בשני כיוונים - רתימת הגנים כנגד חרקים (B.t. וטוקסינים מעקרב) לשימוש בצמחים, וניסיון להתגבר על מכשולי הטרנספורמציה והרגנרציה בזן כותנה ישראלי: סיב און.

השיטות המולקולריות ששימשו היו כמקובל ופורטו בדו"ח. לטרנספורמציה ורגנרציה פיתחנו פרוטוקול העושה שימוש בחיידקי אגרובקטריום ובחצאי אמירים של נבטי כותנה בהם נחשפות רקמות מריסטמיות להתמרה ורגנרציה לאחר מכן.

תוצאות עיקריות: עד כה יצרנו קונסטרקטים עם הגנים השונים שנועדו להקנות עמידות לחרקים. לשם בדיקתם הכינונו גם צמחי טבק שכבר מבטאים גנים אלו ואשר נועדו כבר עתה לניסויי האכלה. בנושא הטרנספורמציה הוכחנו שניתן לקבל רגנרציה מחצאי אמירים וכן הוכחנו שחצאי אמירים אלו ניתנים לטרנספורמציה.

מסקנות והמלצות: אנו נמצאים בנקודה קריטית בפרויקט כאשר עלינו לחבר את יכולת הטרנספורמציה עם יכולת הרגנרציה של חצאי האמירים, החיבור הזה יביא אותנו ליכולת יצירת כותנה ישראלית טרנסגנית שאליה נרתום בהתמרה את הגנים שהינדסנו במהלך הפרויקט - הן את הגן בהבצילוס והן את אלו מהעקרב, ופעילותם ביחד תיבחן בצמחי כותנה מותמרים.

יצירת צמחי כותנה טרנסגניים עמידים לחרקים

Development of transgenic Israeli cotton resistant to Lepidoptera insects

ידידיה גפני - חוקר ראשי

Yedidya Gafni (P.I.)
vcgafni@netvision.net.il

בנימין שטייניץ, אהרון זלצר
המחלקה לגנטיקה של צמחים,

Beni Steinitz, Aaron Zelcer
Department of Plant Genetics

עמוס נבון
המחלקה לאנטומולוגיה
מכון וולקני בית דגן 50250

Amos Navon
Department of Entomology
A.R.O., The Volcani Center, Bet Dagan

מספר תוכנית 261-0284-98

תקציר מדעי

הצגת הבעיה: גידול הכותנה בישראל שידע ויודע תנודות בהיקף המזרע וברווחים, מתייצב עדיין כגידול השלחין הגדול ביותר בישראל ושטחי מזרע צפויים בשנים הבאות ינועו סביב לרבע מיליון דונם. עם כל זאת הדברת חרקים, עמידות לקוטלי עשבים ותכונות אגרונומיות ואיכות סיב יידרשו בעתיד התערבות מסיבית של ההנדסה הגנטית כפי שכבר החל בעולם כולו. לייצור זנים מהונדסים גנטית יש לפרוץ תחילה את בעיית הטרנספורמציה והרגנרציה של הזנים הישראליים וכן לאת גנים חשובים להחדרה בשיטות ההנדסה הגנטית לזנים אלו.

מהלך ושיטות: במהלך השנה האחרונה הושקע מאמץ בשני ערוצים - רתימת הגנים כנגד חרקים (B.t. וטוקסינים מעקרב) לשימוש בצמחים, וניסיון להתגבר על מכשולי הטרנספורמציה והרגנרציה בזן כותנה ישראלי: סיב און.

השיטות המולקולריות ששימשו היו כמקובל ויפורטו בדו"ח, לטרנספורמציה ורגנרציה פיתחנו פרוטוקול העושה שימוש בחיידקי אגרובקטריום ובחצאי אמירים של נבטי כותנה בהם נחשפות רקמות מריסטמיות להתמרה ורגנרציה לאחר מכן.

תוצאות עיקריות: עד כה יצרנו קונסטרקטים עם הגנים השונים שנועדו להקנות עמידות לחרקים. לשם בדיקתם הכינונו גם צמחי טבק שכבר מבטאים גנים אלו ואשר נועדו כבר עתה לניסויי האכלה. בנושא הטרנספורמציה הוכחנו השנה שניתן לקבל רגנרציה מחצאי אמירים וכן הוכחנו שחצאי אמירים אלו ניתנים לטרנספורמציה.

מסקנות והמלצות: אנו נמצאים בנקודה קריטית בפרויקט כאשר עלינו לחבר את יכולת הטרנספורמציה עם יכולת הרגנרציה של חצאי האמירים. החיבור הזה יביא אותנו ליכולת יצירת כותנה ישראלית טרנסגנית שאליה נרתום בהתמרה את הגנים שהינדסנו במהלך הפרויקט - הן הגן בהבצילוס והן אלו מהעקרב ופעילותם ביחד תבחן בצמחי כותנה מותמרים.

מבוא - תאור הבעיה והגישה הניסויית לפתרונה:

בשנים האחרונות החל גידול רחב היקף של כותנה טרנסגנית בעולם כולו ובארה"ב בלבד מדובר על עשרות מיליוני דונם של כותנה נושאת גן לעמידות לחרקים מחיידקי הבצילוס. גם עמידות לקולטי עשבים הוחדרה לכותנה ונמצאת כבר בשימוש מסחרי. כותנה טרנסגנית גדלה כיום גם באוסטרליה בסין בארגנטינה ובקרוב גם בהודו ובפקיסטן. גם בארץ נעשתה השנה בחינה של כותנה טרנסגנית של חברת Delta & Pine והדבר מחזק את הצורך להביא להשבחת כותנה בישראל באמצעות הנדסה גנטית.

הדברת מזיקי מפתח מקבוצת העשים בכותנה באמצעים כימיים מהווה נטל כלכלי מרכזי במערך ההדברה. בנוסף, פיזור קוטלי החרקים בשדה כרוך בנזק בריאותי לאדם ובנזק. מצטבר עם הזמן לסביבה. התוכנית הנוכחית נועדה להתמודד עם הבעיות המוזכרות, ומציעה פיתוח אמצעי הגנה מפני מזיקים, אמצעים חלופיים או משלימים לאמצעים הקיימים, שיש בהם פוטנציאל ברור של צימצום הפיזור הבזבזני בשטח של אמצעי ההדברה הכימית. העמדת פרוטוקול מסודר להתמרה גנטית של כותנה וביסוס קבוצת מחקר קבועה בארץ לבצוע טרנספורמציות עם גנים קיימים כרגע ועם כאלה שיהיו זמינים בעתיד, הוא יעד הכרחי להבטחת יכולת טיפוח טרנסגני בארץ תוך שילוב עם טיפוח קונבנציונלי.

מטרות המחקר:

בתוכנית הנוכחית הצבנו כמטרה ליצור כותנה הנושאת גן זר, שיוחדר בהנדסה גנטית, לזנים המגודלים בישראל. הרעיון הינו השבחה מולקולרית של הזן סיב און על ידי הפיכתו לעמיד כנגד זחלי עשים. הדבר יבוצע על ידי החדרה של גן לרעלן הבצילוס טורינגינזיס. גן זה CryIA(c) שימש עד כה בהצלחה רבה בכותנה ובירקות בארצות הברית ובאוסטרליה נמצא בידנו בהסכם ובכוונתנו לעשות בו שימוש במסגרת התוכנית הנוכחית.

ניסויים ותוצאות:

כדי להגיע לצמחי כותנה טרנסגניים יש צורך למילוי מספר תנאים הקדמיים.

א - יש להשיג או לשבט את הגן לרעלן הבצילוס.

ב - יש להעמיד מערכת טובה של טרנספורמציה של תאי כותנה.

ג - יש להעמיד מערכת רגנרציה טובה שתאפשר קבלת צמחים מותמרים.

במהלך השנה שקדמה לזו שעליה אנו מדווחים (1997) ניסינו ליצור קאלוסים אמבריוגניים מפסיגים של נבטי כותנה משלשה זנים: בית דגן 11, COKER 312 ו- COKER 315. מכל הניסויים שנעשו עד כה, לא ניתן היה לקבל קאלוסים אלו בעיקר עקב השחמות קשות מאד שמנעו התפתחות קאלוסים תקינים ועבודה שהושקעה במעבדתנו לא הניבה קאלוסים אמבריוגניים. גם ניסיון להסתייע בפרופ' פיינר (John Finer) מאוהיו לא צלח ועבודה

שהושקעה במעבדתו לא הניבה קאלוסים אמבריוגניים. בהעדר הצלחה ליצור קאלוס אמבריוגני השהנו זמנית את המחקר המיועד ליצור מרשם רגנרציה תחילה. במקום זאת פנינו לחקר דרכים להחדרת הגן המבוקש לתאים הממוקמים במריסטמה קיימת, כדוגמת המריסטמה באמיר הנבט, שממנה מתפתח הצמח הבוגר. בדקנו שתי דרכי החדרת גן, האחת פיסיקלית והשניה ביולוגית. הדרך הפיסיקלית, שנוסתה במהלך 1997 ועד תחילת 1998, התבססה על החדרת DNA "ערום" לתאים באמצעות אלקטרופורציה. הדרך הביולוגית, שהתחלנו לנסותה במהלך 1998, מבוססת על התמרה גנטית של תאי מריסטמה באמצעות אגרובקטריום. בד בבד עם ניסויי ההתמרה של המריסטמה האמירית למדנו כיצד ליצור צמח בתרבית מתוך קטע צמח-אם (explant) שמקורו מאמיר נבט צעיר.

ניסיון נוסף שנעשה בשנה הקודמת להחדרת DNA למריסטמות קודקודיות באמצעות אלקטרופורציה, (פירוט בהמשך).

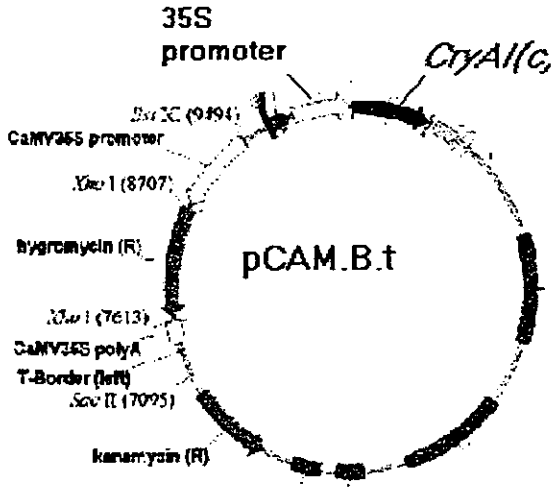
השנה (1998) פנינו לכן להחדרת DNA למריסטמות בסיוע חיידקי אגרובקטריום.

הגנים ששימשו בניסויים אלו היו הגנים המדווחים הבאים:

GUS - גן זה מקנה לרקמה המותמרת צבע כחול בעת שסובסטרט חסר צבע מוחדר לרקמה. רקמות שלא הותמרו לא יפרקו את הסובסטרט וצבען לא יכחיל.

GFP - חלבון הזוהר באור ירוק פלואורסצנטי כאשר התאים המותמרים מוארים באור כחול.

בשנה זו גם נסתיימה בניית הפלסמיד הבינארי pCAM.B.t (ראה תמונה) הנושא את הגן *CryIA(c)* תחת הפרומוטור 35S של וירוס מוזאיקת הכרובית. פלסמיד בינארי זה שימש להתמרת תאי עלי כותנה מהזן המסחרי "סיב און" וקבלת קאלוסים מותמרים בצורה יציבה עם הגן *CryIA(c)* .



1- **בנית פלסמידים.**

קבלנו בהסכם עם אוניברסיטת ניו מקסיקו בארה"ב את הגן הסינטטי לרעלן הבצילוס *CryIA(c)*, גן זה ניתן לנו בפלסמיד ללא פרומוטור ויחידות בקרה אחרות שיאפשרו ביטויו בצמחים. לשם הפיכתו לישים בצמחים הרכבנו אותו על פלסמיד בינארי שקנינו מחברת CAMBIA שבאוסטרליה. בחיבור זה הוקנו לגן גם יחידות הבקרה לאפשר ביטויו בצמחים וגם אתרי הכרות של אגרובקטריום (גבולות ה T-DNA). הפלסמיד שהתקבל pCAM.B.t הוחדר לחיידקי אגרו ובאמצעותם לדיסקיות עלי כותנה ליצירת קאלוסים.

2 - **התמרת דיסקיות פסיגים של כותנה עם pCAM.B.t.**

דיסקיות של פסיגים של נבטי סיב-און הודגרו עם חיידקי אגרובקטריום הנושאים את הפלסמיד pCAM.B.t בתוכם. קאלוסים שהופיעו נבררו על גבי האנטיביוטיקה היגרומיצין וגודלו במצעים ונבדקו לאחר כמה דורות של העברה לעמידות לאנטיביוטיקה. המימצאים מעידים על נוכחות יציבה של המחדר גם לאחר ההעברות.

3 – **התמרת מריסטמות באמצעות אלקטרופורציה**

הניסיון להחדיר DNA למריסטמות בשיטה זו נערך על אמירים של נבטים שלמים. יתרונה המרכזי של הטכנולוגיה, במידה והיא פועלת, הוא שההתמרה מתבצעת בצמחים שלמים הגדלים בקרקע, כלומר נמנעים מכל הקשיים והסיבוכים הכרוכים ברגנרציה של צמחים בתרבית רקמה. ההצלחה בניסויים הייתה במידה שמצדיקה המשכיות. עם זאת למדנו שמכשור האלקטרופורציה שהועמד לרשותנו באופן זמני באדיבות מעבדה שאינה עוסקת בצמחים, אינו מתאים לצרכים הספציפיים של עבודה בכותנה. להערכתנו ראוי לשוב ולשקול כוון זה בעתיד- במידה וניתן יהיה לרכוש ציוד יקר ומתאים לקבוצת המחקר שלנו.

4 - **רגנרציה ממריסטמות אמיריות**

התמרת מריסטמות באמצעות אגרובקטריום (ראה סעיף 5) מתבצעת בתרבית רקמה. לכן, לפני שניגשים לניסויי התמרה יש לפתח שיטה לרגנרציה של צמח ממריסטמה בתרבית. בנושא זה עסקנו בשנת 1998.

מנבטים צעירים שהונבטו בתרבית בודדנו קטע אמירי של ההיפוקוטיל הכולל את המריסטמה האמירית (הקודקודית). בשלב ראשון, למדנו ליצור צמח ממריסטמה שלמה, וכאן הגענו לשיעורי הצלחה גבוהים: יש בידינו האפשרות ליצור צמח ב 90-100% מהקטעים הנשתלים בתרבית. בשלב שני, בדקנו את האפשרות לחצות קטע אמירי של היפוקוטיל לאורך ציר האורך, ובכלל זה חציה של המריסטמה הקודקודית. מצאנו דרך לשחזור (רגנרציה) בתרבית של צמח שלם מקטעי חצי-אמיר. כיום אנו במצב שמרבית חצאי-האמיר מניבים צמח שלם, ומתוך 100 מריסטמות קדקודיות אנו קוצרים כ 150 צמחים.

המריסטמה חבויה ומוסתרת מהעולם החיצון על-ידי פרימורדיות עלים. פירושו של דבר, גישה ישירה וחופשית של חיידקי אגרובקטריום למריסטמה חסומה באופן פיזי. אבל, בקטע חצי-אמיר, תאים המצויים בחתך המריסטמה החצויה חשופים להדבקה באגרובקטריום. הדרך לשחזר צמחים שלמים מחצאי-אמיר פתחה צוהר לגישה ישירה של החיידקים אל תאי מריסטמה שממנה מתפתח צמח שלם.

5 - התמרת מריסטמות באמצעות אגרובקטריום

בחודשים האחרונים של 1998 התחלנו במערכת ניסויים שנועדה לבחון דרכים יעילות להדבקת מריסטמות באגרובקטריום. קטעי אמיר וחצאי-אמיר אולחו, בתנאי סביבת תרבית שונים, באגרובקטריום הנושא את הגן GUS. בדיקת ביטוי חולף של הגן מלמדת כי ההדבקה מתקבלת בעיקר באזורים פצועים שבחתכי הקטעים, אולם לפי שעה אין ביטוי של הגן בתאי מריסטמה. קיימים לפחות שני הסברים להעדר הדבקה של תאי מריסטמה: (א) עדיין לא מצאנו תנאי הדגרה של חיידק-רקמת פונדקאי המאפשרים באופן ספציפי הדבקה של תאי מריסטמה. (ב) באופן עקרוני, וללא תלות בתנאי הדגרה של חיידק-רקמת פונדקאי, אגרובקטריום אינו מסוגל להתמיר תאי מריסטמה. היות ובספרות המדעית יש דיווחים על יצירת צמחים טרנסגניים בעקבות טרנספורמציה של מריסטמות באמצעות אגרובקטריום, אנו לעת עתה דוחים את ההסבר השני הנ"ל. יש בדעתנו צורך להמשיך ולנסות לברור תנאי הדגרה אשר בסופו של דבר יאפשרו לאגרובקטריום להתמיר בהצלחה גם תאי מריסטמה.

<u>מסקנות</u>: החדרה יציבה של גנים לתאי כותנה הוכחה בעבודה שנעשתה עד כה כאפשרית, וקאלוסים נושאי הגנים הזרים מרובים עתה ללא בעיה מיוחדת. יצירת קאלוסים אמבריוגניים נראית עתה כפחות אטרקטיבית ולכן כיוון זה איננו בעדיפות להמשך. מאידך, חשיבותם של הקאלוסים המותמרים בגן לרעלן הבצילוס, למרות שאין לנו דרך לקבל רגנרציה מהם, היא בהיותם חומר גלם לניסויי ההאכלה של זחלי הליוטיס.

כיוון מבטיח יותר בקבלת רגנרציה הוא זה שפותח בעבודתנו לאחרונה ובו אנו מקבלים רגנרציה מחצאי אמיר של נבטי כותנה. טרנספורמציות של חצאי אמיר נתנו תוצאות טובות ויש עתה לשלב את יכולת הטרנספורמציה עם יכולת הרגנרציה ולבחון האם ניתן עתה לקבל צמחים מותמרים מחצאי אמיר מותמרים. שיטות החדרת ה DNA לרקמה שנבחנו עד כה היו שלש: אלקטרופורציה, אגרובקטריום והפצצה. להוציא השימוש בחיידקי האגרובקטריום, שתי השיטות האחרות לא נוסו עדיין בהיקף שניתן ללמוד ממנו על יעילותם ויש להמשיך ולבחון את יעילותן. במיוחד נכונים הדברים כלפי שיטת ההפצצה שנוסתה רק פעם אחת בלבד.

לסיכום, טרנספורמציה של כותנה טרנסגנית היא שאלה של זמן ולא של ייתכנות. הגן לרעלן נגד חרקים זמין ומצוי כבר בתאי כותנה. המשך המחקר לכן הוא הכרחי כדי שנוכל להגיע ליעד המוגדר במחקר זה: יצירת צמחי כותנה טרנסגנית עמידה כנגד חרקים.

3. סיכום עם שאלות מנחות לדו"ח מחקר 1998

1. <u>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה</u>

א. פיתוח פרוטוקולים לרגנרציה של צמחים בתרבית רקמה.

ב. פיתוח פרוטוקול לטרנספורמציה גנטית.

ג. החדרת הגן לרעלן CryA(I) מהחיידק בצילוס טורינגנסיס לתוך תאי כותנה לשם ביטויים.

2. <u>עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח</u>

א. ניסויי רגנרציה בתרבית מתוך רקמת קאלוס ומתוך מריסטמות. הצלחה של רגנרציה ויצירת צמחים מושרשים ממריסטמות אמיריות.

ב. הצלחה בהתמרה של תאים באמצעות אגרובקטריום. יצירת קאלוסים טרנסגניים של כותנה המבטאים כבר את הגן CryA(I) לשם ניסויי האכלה.

ג. טרנספורמציה מוצלחת לחצאי אמירי כותנה עם גנים מדווחים.

3. <u>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו</u>

א. השיטה של יצירת צמחים מחצאי אמירים מותמרים תאפשר לנו רגנרציה מכל זן ישראלי שנרצה להתמיר גנטית.

ב. הצלחת ההתמרה בגן CryA(I) וסלקציה של קאלוסים מותמרים מלמדת שניתן בקרוב לבחון את רעילות הטוקסין בניסויי האכלה של כותנה טרנסגנית.

4. <u>הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן</u>

א. מתבקשת בחינה והוכחה של יכולת רגנרציה של צמחים ממריסטמות מותמרות **בזנים שונים** המשמים לגידול בארץ.

ב. מיקוד ההצלחה בהתמרה עם אגרובקטריום בתאים של מריסטמות אמיריות.

חשובה מאד ההצלחה שקיבלנו השנה עם גנים מדווחים, יש להחדיר עתה למריסטמות רגנרטיביות את הגן CryA(I) .

ג. בדיקת ביטוי הגן CryA(I) באמצעות מבחן ביולוגי של האכלת זחלי מזיקים בקאלוס. בעיקר חשובה בדיקה לגבי פרודניה שאיינה מזיקה ברה"ב ולכן לא נבדקה פעילותו של הגן כלפיה.

5. <u>הפצת יידע בתקופת הדו"ח</u> התוצאות לא פורסמו בצורה של דוחו"ת/מאמרים מקצועיים/מדעיים. דיווח בעלפה נמסר בפורום של חוקרים, מדריכים ומגדלים של מועצת הכותנה.