



קוד זיהוי : 204-0370-00

נושא המחקר: התמרה של גפן בגנים בעלי פעילות אנטי פטריתית בנסיון להקנות עמידות למחלות פטריות

סוג דו"ח : דו"ח מדעי שנת

חוקר ראשי : פרל אביחי

חוקרים משניים: ראובני משה

סהר נחמן

פרחי שרון

שחם זהר

אבן סילבי

מקורות מימון עבורם מועד הדו"ח:

המועצה לפירות  
המועצה לגפן היין

תקציר הדו"ח:

הצגת הבעיה: מטרת המחקר היא יצירת זני גפן מאכל מהונדסים גנטית בעלי עמידות משופרת למחלות ורקבונות הנגרמות ע"י פטריות. מחלות פטריות בגפן מאכל ויין, ובמיוחד הקמחון מהווים את גורם הנזק הכלכלי הראשון במעלה בענף הגפן בעולם כולו. מהלך ושטות העבודה: יצירת צמחי גפן טרנסגניים עמידים לפטריות כגון בוטריטיס וקמחון ע"י ביטוי של אחד או יותר מהגנים שהוכחו בעלי פעילות אנטי-פטריתית. תוצאות עיקריות: כוססה מערכת של התמינות צמחי גפן מקאלוס אמבריוגני של גפן בתרבות. פותחה שיטת טרנספורמציה שבה תהליך ההדבקה ע"י חיידק האגרובקטריום מתבצע בנוכחות פרוטאז כמצע הגדול. התהליך מונע את ההשחרה ושיפר את יעילות הטרנספורמציה. שובטו מספר גנים אנטי פונגליים על אותו וקטור לטרנספורמציה. בוצעו טרנספורמציות עם מספר קונסטרוקטים והתקבלו מצחים מהונדסים. הצמחים נמצאים בחממה לקראת בדיקתם. מסקנות והמלצות: צמחים טרנסגניים שיפותחו בתוכנית זו יהיו בעלי סבילות משופרת כנגד פטריות - תכונה החסרה באופן כולט בכל הגפן האירופאית המגודלת מסחרית בארץ. מוצרי פרויקט זה יאפשרו הפחתה בשימוש בחומרי הדברה מחד וקבלת יבולים וביצועים משופרים מאידך.

חתימות ואישורים:

חוקר ראשי  
מנהל המחלקה  
מנהל המכון  
אמרכלות  
תאריך

# התמרה של גפן בגנים בעלי פעילות אנטי-פטריתית בנסיון להקנות עמידות למחלות פטריות.

אביחי פרל, רחל גולופ, משה ראובני.  
המחלקה להשבחת מטעים, מכון וולקני, מנהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן, 50250,  
והמכון לחקר הגולן, קצרין.

**דוח מחקר לשנה ראשונה לתוכנית 204-0370-00**

**מוגש למועצת הפירות**

**"הממצאים המובאים לעיל אינם בגדר המלצות,"**

## תקציר

**הצגת הבעיה:** מטרת המחקר היא יצירת זני גפן מאכל מהונדסים גנטית בעלי עמידות משופרת למחלות ורקבונות הנגרמות ע"י פטריות. מחלות פטריות בגפן מאכל ויין, ובמיוחד הקמחון מהווים את גורם הנזק הכלכלי הראשון במעלה בענף הגפן בעולם כולו.

**מהלך ושטות העבודה:** יצירת צמחי גפן טרנסגניים עמידים לפטריות כגון בוטריטיס וקמחון ע"י ביטוי של אחד או יותר מהגנים שהוכחו בעלי פעילות אנטי-פטריתית. **תוצאות עיקריות:** בוססה מערכת של התמינות צמחי גפן מקאלוס אמבריוגני של גפן בתרבות. פותחה שיטת טרנספורמציה שבה תהליך ההדבקה ע"י חיידק האגרובקטריום מתבצע בנוכחות פרוטאז במצע הגדול. התהליך מונע את ההשחרה ושיפר את יעילות הטרנספורמציה. שובטו מספר גנים אנטי פונגליים על אותו וקטור לטרנספורמציה. בוצעו טרנספורמציות עם מספר קונסטרוקטים והתקבלו מצחים מהונדסים. הצמחים נמצאים בחממה לקראת בדיקתם.

**מסקנות והמלצות:** צמחים טרנסגניים שיפותחו בתוכנית זו יהיו בעלי סבילות משופרת כנגד פטריות - תכונה החסרה באופן בולט בכל הגפן האירופאית המגודלת מסחרית בארץ. מוצרי פרויקט זה יאפשרו הפחתה בשימוש בחומרי הדברה מחד וקבלת יבולים וביצועים משופרים מאידך.

## מבוא - רקע מדעי ומטרות המחקר:

מחלות פטריות בגפן מאכל ויין ובמיוחד הקמחון מהווים את גורם הנזק הכלכלי מספר אחד בענף הגפן בעולם כולו. גם בארץ הם מהווים כיום את אחת מהבעיות החמורות ביותר אתם מתמודד ענף הגפן בשנים האחרונות. קמחון בשלב הראשון וקומפלקס הרקבונות התוקף אחריו מהווים את אחד מגורמי הפחתת החרifiים ביותר בהם נתקל הענף כיום. הבעיה חמורה עד כדי כך, שבאיזורי גפן שמבשילים מאוחר ואפילו באזורי לכיש, הפרי נרקב רובו ככולו על

העץ ללא פתרון נראה לעין. מרבית חומרי הרסוס כנגד רקבונות האשכול נמצאו כבילתי יעילים להורדת רמת הנגיעות בשטח. הסולטנינה שמהווה מרכיב חשוב בסל הזנים של אמצע-סוף העונה, סובלת מכך במיוחד. לצערנו, מחקרים בהגנת הצומח שבוצעו במרוצת 15 השנה האחרונות, לא תרמו לפתרון הבעיה ועם ירידת יעילות חומרי ההדברה, היא מתגברת מעונה לעונה. עם זאת, הצטברה האינפורמציה המוכיחה כי טפול יעיל להורדת רמת הנגיעות בקמחון בשלב המוקדם של העונה, יקטין בצורה משמעותית גם את יכולת ההתבססות של גורמי הרקבון בפרי: הריזופוס, הבוטריטיס והעובשים למיניהם. עמידות לקמחון כשותית ובוטריטיס היא תכונה פוליגנית באופיה וניתן למצאה בגפני בר אמריקאיות. העברת העמידות מהן לזני *Vinifera* המסחריים כיום, בהשבה קונונציונלית, הוא פרויקט חסר סכוי שימשך עשרות שנים רבות ויעביר במקביל גם תכונות שליליות שיפגמו האיכות הזן.

לאחרונה פותחו מספר רב של צמחים טרנסגניים שהראו עמידות כלפי פתוגנים פטריתיים. פתוגנים אילו כוללים עמידות כלפי: *Botritis*, *Rhizoctonia*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Powdery mildew*, *Unicola necator* או יותר משלושת הגנים הבאים: *Endocitinase*,  $\beta$  1-3 *Glucanase* ו *Ribosome inactivating protein*. שני הראשונים הם אנזימים הידרוליטיים שביכולתם לפגוע בקורי הפטרי במהלך נסיונות התבססותה בחללים הבין תאיים ברקמה הצמחית. דופן תא הפטריה מורכב בדרך כלל מכיטין ו  $\beta$  1,3 גלוקן, מרכיב שאינו נמצא בדופן התא הצמחי. פרוק דופן התא הפטריתי בעקבות פעילות של  $\beta$  1-3 *Glucanase* או *Endocitinase*, ימנע התפתחות תקינה של הקורים ויביאו לעכוב בצמחות הפטריה. *Ribosome inactivating protein* (RIP) הוא חלבון שמשמש כמין "אנטיביוטיקה" כנגד פיטריות. ביכולתו לשבש תרגום חלבונים ועייכ למנוע רבוי של הפטריה. גם בשימוש בו התקבלו לאחרונה צמחים טרנסגניים עמידים למחלות פיטריות. לא נמצאה כל רעילות של אנזימים אילו לצמחים עילאיים, בני אדם או חיות.

אחד הממצאים החשובים ביותר בעבודות המחקר שצוטטו לעיל הוא הנתון כי שמוש בגן אנטי-פונגלי בודד, יספק לצמח המהונדס הגנה חלקית בלבד. בטוי שני גנים שונים בו זמנית יצר אפקט סנרגיסטי ביניהם וספק הגנה כמעט מלאה לצמחים הטרנסגניים. יש חשיבות גם לבחור גנים בעלי פעילות אנטי-פטריתית ממקורות לא צמחיים על מנת להמנע מבעיות של השתקה *co-suppression*. כמוכן יש חשיבות עליונה להכוונה של החלבונים תוצרי הגן אל החללים בין-תאיים בהם מתרחשת ההדברה והתבססות הפטריה.

## מטרת המחקר:

מטרת העבודה היא לפתח צמחי גפן טרנסגניים עמידים לפטריות ע"י בטוי של אחד או יותר מהגנים המקודדים ל: Glucanase  $\beta$  1-3, Endocitinase, Stilbene synthase, pCAE (ESF12), Ribosome inactivating protein.

## פרוט המחקרים והתוצאות:

1. בוססה מערכת של התמינות צמחי גפן מקאלוס אמבריוגני של גפן בתרבות. פותחו קוים בעלי יכולת התמינות לצמחים מהזנים שרדונה, גמאי, סופריור סידלס, רד גלוב, נובומוסקט סידלס וכן מהכנה 41B.
2. פותחו שיטות המאפשרות קבלת צמחים בוגרים ומוקשים של גפן ביעילות גבוהה תוך פיתוח חדשני של מצע גדול המבוסס על שמוש במצע בסיסי של Gamborg B5 בצרוף של שני ציטוקינינים שלהם הוכחה פעילות סנרגיסטית: BAP ו Zeatin.
3. שופרה מערכת הטרנספורמציה לגפן תוך המשך הבנת המגוונים המעורבים בהשחרת תאי הגפן במהלך הטרנספורמציה. הנתונים הבאים נמצאו במהלך העבודה:
4. התברר כי נוכחות חיידק האגרובקטריום הינה הגורם הישיר שמביא להשחרה ומוות תאים בתרבות במהלך הטרנספורמציה.
5. בצוע פרוטוקול טרנספורמציה לכאורה עם חיידקים מומתים לאחר אוטוקלב גרם בדיוק לאותה ההשחרה.
6. שמוש במספר רב של מוטנטים של אגרובקטריום, חסרי יכולת טרנספורמציה גרם גם הוא להשחרה ומוות של תאי הגפן בתרבות.
7. נמצא כי חלבון המיוצר ע"י חיידק האגרובקטריום, ויציב בחום, הוא הגורם לתאי הגפן בתרבות להגיב בהשחרה שתוארה.
8. הוספת החלבון המנוקה לגדול תרבות התאים (ללא טרנספורמציה) גרמה ישירות להחמת התרבות.
9. טפול בחלבון משרה ההשחרה בפרוטאז מסוים לפני הוספתו לתרבות התאים מנעה את ההשחרות.
10. פותחה שיטת טרנספורמציה שבה תהליך ההדבקה ע"י חיידק האגרובקטריום מתבצע בנוכחות פרוטאז במצע הגדול. התהליך מונע את ההשחרה ושיפר את יעילות הטרנספורמציה.
11. נמצא כי רק זני אגרובקטריום המתבססים על Biovar 1 גורמים להשחרה. זני אגרובקטריום מטיפוס Biovar 3 שהם ידועים כמחוללי מחלות בקטראליות בגפן, לא גרמו להשחרה.
12. שובטו מספר גנים אנטי פונגליים על אותו וקטור לטרנספורמציה.

13. מתוך כל הצמחים הטרנסגניים שנוצרו נבדקו אותם צמחים שהכילו את הגן pCAE שהוא גן סינטטי שמקדד לפפטיד אנטי-מיקרוביאלי. מיצויים מעלים טרנסגניים הוספו למצעי גידול שהכילו את הבקטריות הבאות:

*E. Coli*

*V. cholera*,

*P. aeruginosa*,

*M. luteus*,

*Erwinia amilovera*,

*Xyllela*

נמצאה כושר עיכוב גידול חזק מאד של מיצויים מצמחים טרנסגניים כנגד קולי, חולרה, ובמיוחד *Erwinia*. האחרון ידוע כאחראי למחלת החרכון באגס ותפוח ויש סיכוי שביטוי גן זה בגידולים אילו יתרום לעמידות לחירכון. כמוכן מצנאה עמידות כנגד *Xyllela* חיידק האחראי למחלה במכה קשות בגידולי הדריס וגפן בעולם כולו המכונה *Pierce disease*. עמידות כנגד PD יכולה להיות בעלת חשיבות עולמית. ניתן לשער כי אותו גן יתן עמידות גם כנגד פיטופלסמה אם כי הדבר לא נבדק עדין.