

009 - ✓

48

הופק בתאריך: 09.02.99

דו"ח דיווח מדעי



77

קוד זיהוי: 204-0370-98

נושא המחקר: התמרה של גפן בגנים בעלי פעילות אנטי פטרייתית בנסיון להקנות עמידות למחלות פטרייתיות

סוג דו"ח: מדעי שנתי

חוקר ראשי: פרל אביחי

חוקרים משניים: גולופ רחל  
ראובני משה  
סהר נחמן



מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

המועצה לפירות  
קרן מדען ראשי

תקציר הדו"ח:

הצגת הבעיה: מטרת המחקר היא יצירת זני גפן מאכל מהונדסים גנטית בעלי עמידות משופרת למחלות ורקבונות הנגרמות ע"י פטריות. מחלות פטרייתיות בגפן מאכל ויין, ובמיוחד הקמחון מהווים את גורם הנזק הכלכלי הראשון במעלה בענף הגפן בעולם כולו. מהלך ושיטות העבודה: יצירת צמחי גפן טרנסגניים עמידים לפטריות כגון בוטריטיס וקמחון ע"י ביטוי של אחד או יותר מהגנים שהוכחו בעלי פעילות אנטי-פטרייתית. תוצאות עיקריות: בוססה מערכת של התמינות צמחי גפן מקאלוס אמבריוגני של גפן בתרבות. פותחה שיטת טרנספורמציה שבה תהליך ההזדקה ע"י חייזק האגרובקטיריום מתבצע בנוכחות פרוטאז במצע הגידול. התהליך מונע את ההשחרה ושיפר את יעילות הטרנספורמציה. שובטו מספר גנים אנטי פונגליים על אותו וקטור לטרנספורמציה. בוצעו טרנספורמציות עם מספר קונסטרוקטים והתקבלו צמחים מהונדסים. 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 בתומרי הדברה מחד וקבלת יכולים וביצועים משופרים מאידך.

חתימות ואישורים:

17.2.99 תאריך  
חוקר ראשי  
מנהל המחלקה  
מנהל המכון  
אמרכלות

## דווח שנתי לשנת 1998

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.

Transformation of grape with antifungal constructs.

Perl A, Gollop R and Reuveni M.

Department of Fruit Tree Breeding and Molecular genetics, The Volcani Center, ARO, P.O.Box 6 Bet-Dagan, 50250, Israel

email: vhlperl@volcani.agri.gov.il

### מבוא:

מטרת המחקר היא יצירת זני גפן מאכל מהונדסים גנטית בעלי עמידות משופרת למחלות ורקבונות הנגרמות ע"י פטריות. הצמחים המהונדסים יבטאו מספר גנים שהוכחו כבעלי פעילות אנטי-פטריתית ולאחרונה שמוש בהם הקנה לצמחים טרנסגניים שונים עמידות או סבילות משופרת למגוון מחלות פטריות. מחלות פטריות בגפן מאכל ויין, ובמיוחד הקמחון מהווים את גורם הנזק הכלכלי הראשון במעלה בענף הגפן בעולם כולו. גם בארץ מחלות אילו המוות את אחת מהבעיות החמורות ביותר אתם מתמודד הענף בשנים האחרונות. הקמחון בשלב מוקדם וקומפלקס הרקבונות התוקף אחריו מהווים את אחד מגורמי הפחת החריפים ביותר בהם נתקל הענף היום ומחייבים משטר רסוסים מורכב, יקר ומזיק לאדם ולסביבה. בשנים של נגיעות קשה, קים חשש שזנים רבים, במיוחד האפילים שביניהם ירקיבו עוד בכרסומשטר הרסוסים נמצא כבילתי יעיל מספיק להורדת הנגיעות בשטח. במרוצת בשנים האחרונות הצטברה אינפורמציה כי טפול יעיל בקמחון בשלב המוקדם של העונה, יקטין בצורה משמעותית גם את הנגיעות בקומפלקס הרקבונות: הריזופוס, הבוטריטיס ועובשים אחרים התוקפים בשלבים מתקדמים יותר ומזיקים בעיקר בפרי. קיימת אומנם בטבע עמידות טיבעית לקמחון כשותית ובוטריטיס. מקור העמידות הוא בזני בר של גפן הטיפוס אמריקאי וידוע כי היא פוליגנית באופייה. לכן, העברת העמידות מזני גפן

אמריקאית לזנים המסחריים כיום בישראל בהשבחה קונוונציונלית הוא פרויקט בעל סיכויי הצלחה קלושים שימשך עשרות שנים ויעביר במקביל גם תכונות שליליות שיפגמו באיכותם המסחרית של הזנים המקובלים כיום.

### מטרת המחקר:

מטרת המחקר היא לפתח צמחי גפן טרנסגניים עמידים לפטריות כגון בוטריטיס וקמחון ע"י ביטוי של אחד או יותר מהגנים בהוכחו בעלי פעילות אנטי-פטריתית מהקבוצות הבאות:

Endochitinase

Glucanase  $\beta$  1-3

Ribosome inactivating protein (RIP)

S tilben synthase

Chitobiase

Nagase

### פרוט המחקרים והתוצאות:

1. בוססה מערכת של התמינות צמחי גפן מקאלוס אמבריוגני של גפן בתרבית. פותחו קוים בעלי יכולת התמינות לצמחים מהזנים שרדונה, גמאי, סופריור סידלס, רד גלוב, נובומוסקט סידלס וכן מהכנה B41.

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:

1. התברר כי נוכחות חיידק האגרובקטריום הינה הגורם הישיר שמביא להשחרה ומוות תאים בתרבית במהלך הטרנספורמציה.

2. בצוע פרוטוקול טרנספורמציה לכאורה עם חיידקים מומתים לאחר אוטוקלב גרם בדיוק לאותה ההשחרה.
3. שמוש במספר רב של מוטנטים של אגרובקטריום, חסרי יכולת טרנספורמציה גרם גם הוא להשחרה ומוות של תאי הגפן בתרבית.
4. נמצא כי חלבון המיוצר ע"י חיידק האגרובקטריום, ויציב בחום, הוא הגורם לתאי הגפן בתרבית להגיב בהשחרה שתוארה.
5. הוספת החלבון המנוקה לגדול תרבית התאים (ללא טרנספורמציה) גרמה ישירות להחמת התרבית.
6. טפול בחלבון משרה ההשחרה בפרוטאז מסוים לפני הוספתו לתרבית התאים מנעה את ההשחרות.
7. פותחה שיטת טרנספורמציה שבה תהליך ההדבקה ע"י חיידק האגרובקטריום מתבצע בנוכחות פרוטאז במצע הגדול. התהליך מונע את ההשחרה ושיפר את יעילות הטרנספורמציה.
8. 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.
9. שובטו מספר גנים אנטי פונגליים על אותו וקטור לטרנספורמציה. המפורטים בטבלה הבאה:

1. 35S-CaMV- Endochitinase; 35S-CaMV- Glucanase; 35S-CaMV - Ribosome Inactivating Protein (RIP).

2. 35S-CaMV - Antimicrobial protein CAE; 35S-CaMV- Glucanase; 35S-CaMV - Ribosome Inactivating Protein (RIP).

3. 35S-CaMV - El301.

4. PR-Promoter - stilbene synthase.

5. 35S-CaMV - Antimicrobial protein CAE.

10. בוצעו טרנספורמציות עם מספר קונסטרוקטים ומצב הטרנספורמציה לגבי כל זן מרוכז בטבלה הבאה:

מזב הניסוי	הסלקציה	הקונסטרוקט	זן הגפן
צמחים מתמינים	Paromomycin	pCAE	Superior
צמחים מתמינים	Paromomycin	pCAE+Glu+RIP	Superior
צמחים ממוינים	Hygromycin	Glu+RIP	41B
צמחים ממוינים	Paromomycin	Stilbene synthase	41B
צמחים ממוינים	Paromomycin	EL 301	Chardonnay
קאלוס מתמין	Paromomycin Hygromycin	Stilbene synthase +Glu+RIP	Chardonnay

**מסקנות והשלכותיהן:** ענף הגפן נמצא בשגשוג מתמשך מבחינת רווחיותו. צמחים טרנסגניים נעשו לאחרונה מקובלים בעולם כולו ותהליכי אשורם למסחור נעשו קלים יחסית. קרוב למחצית מגידול הסויה בארצות הברית הינו מתבסס על זנים טרנסגניים שונים ושליש מנפח התירס מקורו מצמחים מהונדסים גנטית. הצרכן מתחיל לקבל בברכה מוצרים מהונדסים גנטית כי ברור לו היתרון על צריכת מוצרים עתירי ריסוסים כימיים בחומרים המסוכנים לו ולסביבה. חשיבות העמידות לקמחון ולמחלות פטריות בגפן כלל אינה ניתנת להערכה. במקומות בהם מקובל לרסס בפונגיצידיים שונים יש חובה לרסס בתדירות גבוהה של לפחות אחת לשבוע וגם אז לא מושגת הדברה ביעילות גבוהה. רסוסים תכופים בפונגיצידיים הם פעולות הגוזלות זמן יקר, ימי עבודה רבים, עלותם גבוהה ויוצרים נזק בלתי הפיך לאדם ולסביבה. צמחים טרנסגניים שיפותחו בתוכנית זו יהיו בעלי סבילות משופרת כנגד פטריות - תכונה החסרה באופן בולט בכל הגפן באירופאית המגודלת מסחרית בארץ. אין כל סבירות הגיונית להעביר עמידות זו ממינים אחרים בסוג זה ולכן הנדסה גנטית היא האופציה ההגיונית היחידה שניתן לחשוב עליה. מוצרי פרויקט זה יאפשרו הפחתה בשימוש בחומרי הדברה מחד וקבלת יבולים ובצועים משופרים של הצמח מאידך.

Perl, A. and Eshdat, Y (1998) DNA transfer and gene expression in transgenic grapes.  
In: Tombs (ed), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Intercept Publishers  
UK, Vol 15, pp. 365-386.

Perl, A., Coutos-Tevenot, P., Boulay, M. (1998)  
Proteases in plant cell culture and transformations.  
European Appl. (under registration).

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.  
פתוח זני גפן חדשים עמידים למחלות פטריות, בעיקר קמחון כשותית ובוטריטיס.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.  
שפור יעילות טרנספורמציה בגפן, הגדלת מספר הקווים האמבריוניים במעבדה, בניית קונסטרקטים המכילים מספר גנים בעלי פעילות אנטיפונגאלית, החדרה של חלק מהם לצמחי גפן בטרנספורמציה גנטית, התמינות צמחים וריבויים.

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר.  
פרויקט בעל יכולת הצלחה בטווח הבינוני. ניתן להחדיר גנים לגפן כצמח מודל עיצי ביעילות סבירה.

4. הבעיות שנתקו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים);  
התייחסות המשך המחקר לגביהן.  
המשך בניית קונסטרקטים המכילים 2-3 גנים אנטיפונגאלים שונים על אותו וקטור. הרחבת מעגל הטרנספורמציות לזנים נוספים.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל  
בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לצין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.

1. Perl, A. and Eshdat, Y (1998) DNA transfer and gene expression in transgenic grapes.  
In: Tombs (ed), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Intercept Publishers  
UK, Vol 15, pp. 365-386.

2. Perl, A., Coutos-Tevenot, P., Boulay, M. (1988) Proteases in plant cell culture and  
transformations. European Appl. (under registration).