

**פיתוח עמידות טרנסגנית למחלות וירוסים של גפן המבוססת על
השתקת RNA**

**Development of RNA silencing-mediated resistance for
grapevine viruses**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מינהל המחקר החקלאי
מינהל המחקר החקלאי
מינהל המחקר החקלאי

מוניר מוואסי,
לודמילה מסלינין,
אתי אור,

Munir Mawassi
Ludmila Meslinin
Etti Or

Agricultural Research Organization (mawassi@agri.gov.il)
Agricultural Research Organization
Agricultural Research Organization

תקציר

הצגת הבעיה:

מחלות וירוסים בגפנים מתפשטות בכרמים בארץ ובעולם, ככול אזורי הגידול בעיקר של ענבי יין, ופוגעות קשה באיכות היין. עד כה, השיטות המוצעות למלחמה בוורוסים מוגבלות בעיקר בהדברה כימית של הווקטור המפיץ קמחיות ובשימוש בחומר ריבוי חופשי מוורוסים. הצמחים אימצו מנגנון הגנה טבעי המביא לנטרול התרבות וירוסים בתאיהם, המבוסס על עיכול ספציפי של RNA ויראלי. מצד שני, וירוסים מייצרים חלבונים אשר גורמים לדיכוי מנגנון RNA silencing (חלבוני RSS). במחקר הנוכחי הוצע לפתח צמחים המייצרים dsRNA ויראלי אשר ביכולתו לעורר את מנגנון ההגנה הצמחי RNA silencing בצורה חזקה שתנטרל בו זמנית את חלבוני ה-RSS של שלושה וירוסים עיקריים המנגעים גפנים.

מטרות המחקר: המחקר כלל שלוש מטרות עיקריות:

- א. בניית קונסטרוקטים על בסיס המינירפליקון של ה-GVA המבטאים מקטעי רצף של הוורוסים GLRaV-3 ו-GVB בעלי פוטנציאל גבוה לנטרול וירוסים (מקורם מגנים האחראיים על דיכוי השתקת RNA בצמח - Suppressors of RNA silencing).
- ב. פיתוח גפנים טרנסגניות, המבטאות את הקונסטרוקטים.
- ג. בדיקת העמידות של הגפנים הטרנסגניות, אשר התקבלו מהמחקר אשר הסתיים, לגבי הדבקה בפני GVA, GVB, ו-GLRaV-3.

שיטות העבודה:

השיטות שעסקנו בהן כללו בין היתר הפקת RNA מגפנים, סינתזת cDNA, הגברת מקטעי PCR ושיבוט תוצרי PCR לתוך פלסמידים, הדבקות שתילונים של גפן בתרבות דרך השורשים.

תוצאות עיקריות לתקופת הדוח:

במהלך השנה הראשונה של המחקר הצלחנו לבנות מיני-ריפליקון של GVA אשר הכיל בתוכו מקטעים קצרים (עד 300 בסיסים) של ה-GVB ו-GLRaV-3 המקודדים לחלבוני ה-RSS (ORF5 של GVB, ו-ORF10 של GLRaV-3). קונסטרוקטים על בסיס המיני-ריפליקון של ה-GVA המבטאים מקטעי רצף כאלה הם בעלי פוטנציאל גבוה לנטרול הוורוסים GVA, GVB, ו-GLRaV-3. הקמנו מאגר של צמחונים אשר גודלו בתרבות שמקורם בצמח גפן ריכטר אשר נבדק ואומתה בו הטרנספורמציה. אימות הטרנספורמציה בצמחונים נעשה ע"י הגברת מקטע מגן ה-GFP הנמצא בגנום המינירפליקון. לצורך בחינת העמידות של הצמחים המותמרים, השתמשנו בצמחונים הגדלים בתרבות. הצמחונים אולחו בנגיף ה-GVA או GVB המשובטים בתור קלונים אינפקטיביים. לאחר שבוע מההדבקה, הצמחונים הועברו למצע מוצק בעצצים וגידול הצמחים נמשך בבתי גידול מבוקרים ובחדרים מאושרים ע"י השירותים להגנת הצומח וביקורת. להדבקת צמחים בנגיף GLRaV3 השתמשנו בהרכבת צד של חומר צמחי נגוע בוירוס היות וטרם התקבל קלון אינפקטיבי לוירוס זה. כעבור 2-6 חודשים הצמחים נבדקו ב-PCR לנוכחות GVA, GVB או GLRaV3 תוך כדי הגברה של מקטעי גנום שאינם נמצאים בגנום המינירפליקון.

התוצאות של המחקר בשנת המחקר הראו שהצמחים שנבדקו הראו עמידות בפני GVA. מחציתם הראו עמידות בפני GVB. מאידך לא התקבלה עמידות בפני הנגיף GLRaV3. המסקנה מהבדיקות הראשוניות היא מעודדת ומעידה על האפשרות שהצמחים המותמרים הם עמידים בפני נגיף ה-GVA.

בשנות המחקר השנייה והשלישית נעשו מספר נסיונות ומאמצים לבצע טרנספורמציה של הזן קברנה סובנין אך כול הניסיונות לא צלחו. לאור זה קיבלנו מלשכת המדען אישור להארכת המחקר לשנה רביעית ללא תקציב על מנת לנסות לבצע טרנספורמציה בזן גפן אחר סופריר. הטרנספורמציה הייתה אמורה להצבצב במעבדתה של דר אתי אור מהמכון למטעים, אך בשל בעיות טכניות ומחסור בצוות מחקר במעבדתה לא הצלחנו לבצע טרנספורמציה בזן סופריר.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות:

הניסויים שלנו הראו על האפשרות שהכנה ריכטר הטרנסגנית שקיבלנו היא עמידה בפני וירוס ה-GVA אך לא לגבי GVB או GLRaV3.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. אמנון ליכטר.
2. בני רקח.
3. שאול בורדמן.

הצהרת החוקר הראשי:

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.**



גוף דו"ח

מבוא:

מחלות וירוסים בגפנים גורמות לנזקים והפסדים כלכליים כבדים לענף בעולם לרבות בארץ, עד כדי איום על המשכיות הגידול (Jackson, 1994; Safran et al., 1996). בין המחלות הקשות נמנות מחלת קיפול העלים Leafroll disease ומחלת הניקרון Rugose wood disease הגורמות לנזקים קשים בענבי יין וענבי מאכל, בהתאמה (Martelli, 1993). הגורם העיקרי למחלת קיפול העלים הוא הנגיף *Grapevine leafroll associated virus-3* (GLRaV-3). במחלת הניקרון מעורבים בעיקר שני הווירוסים *Grapevine virus A* (GVA) ו- *GVB*. שלושת הנגיפים GLRaV-3, GVA ו- *GVB* נפוצים בזנים החשובים הגדלים בארץ והתפוצה הטבעית שלהם מתרחשת ע"י כנימות קמחיות.

בשנים האחרונות, מחלת התקפלות העלים מתפשטת בכרמים בארץ בכול אזורי הגידול בעיקר של ענבי יין, ופוגעת קשה באיכות היין. לאחרונה הוחלט להפסיק נטיעת זנים של ענבי יין מחומר ריבוי אשר מקורו מצמחי האם הקיימים בארץ בשל גילוי מחלות וירוסים בהם. באזור לכיש נפוצה מחלת הניקרון המשועם בסולטנינה. בבקעת הירדן קיימת נגיעות קשה בניקרון בזן סופיריור. שיעור הנגיעות של מחלות אלה מתקרב ל- 100% והמחלה גורמת לאובדן יבול רב.

עד כה, השיטות המוצעות למלחמה בווירוסים מוגבלות בעיקר בהדברה כימית של הווקטור המפיץ קמחיות ובשימוש בחומר ריבוי חופשי מווירוסים. אף על פי כן, בשל היותן רב שנתיים, גפנים תמיד חשופות להדבקה בווירוסים באמצעים שונים כמו הרכבות. זנים שונים של גפן נבדלים ברגישות למחלות וירוסים, אך עד היום לא דווח על עמידות או על גן לעמידות למחלות וירוסים.

הצמחים אימצו מנגנון הגנה טבעי המביא לנטרול התרבות וירוסים בתאיהם, המבוסס על עיכול ספציפי של RNA ויראלי (השתקת RNA או RNA silencing) (Baulcombe 1996;) (RNA silencing או RNA silencing) (Hammond et al., 2001). במשך הרפלקציה של הווירוס בתא הצמחי, נוצר RNA דו-גדילי (dsRNA) double-stranded RNA (Hammond et al., 2001). בנוסף, הקיפול המשני של גנום הווירוס החיובי (+ssRNA) מביא גם הוא ליצירת מבנים של dsRNA. כתוצאה מכך מעכל האנזים DICER את ה- dsRNA למולקולות קטנות באורך של 21-24 בסיסים, small interfering RNA (siRNA) (Hammond et al., 2001). ה- siRNA עובר אינטראקציה עם קומפלקס RNA-induced silencing complex (RISC) ומכוון אותו למטרת עיכול ספציפי של RNA ויראלי זהה. וירוסים רבים, לעומת זאת, נמצאו מייצרים חלבונים אשר גורמים לדיכוי מנגנון RNA silencing המוכרים כ- "מדכאי השתקת גנים" (RNA Silencing Suppressor).

או RSS) (Roth *et al.*, 2004; Silhavy & Burgyan 2004; Guo *et al.*, 2002). במחקר הנוכחי הוצע לפתח צמחים המייצרים dsRNA ויראלי אשר ביכולתו לעורר את מנגנון ההגנה הצמחי RNA silencing בצורה חזקה שתנטרל בו זמנית את חלבוני ה-RSS של שלושה וירוסים עיקריים המנגעים גפנים. הוצע לפתח גפנים טרנסגניות של הכנה ריכטר המבטאת מיני ריפליקון של וירוס, כלומר RNA ויראלי המגביר את עצמו, מייצר dsRNA בכמות גדולה, ומעורר בו זמנית את מנגנון ההגנה הצמחי gene silencing כנגד שלושת הנגיפים GLRaV-3, GVA ו-GVB. היתרון בפיתוח עמידות מכוונת בו זמנית כנגד מספר וירוסים הוא בהיותה עמידות יציבה שאינה נשברת כאשר מתרחשת הדבקה ויראלית.

הגישה לפיתוח צמחים טרנסגניים עמידים לוורוסים באמצעות RNA ויראלי המגביר את עצמו היא גישה חדשה, פותחה במעבדתנו והוכיחה את עצמה במערכת מודל (ראה Brumin *et al.*, 2009). ה-RNA הוויראלי המגביר את עצמו, אשר להלן נקרא מיני-ריפליקון, מכיל את האלמנטים המינימליים הדרושים לרפלקציה ולכן הוא מתרבה בתוך התא המאכלס, מייצר מולקולות RNA דו-גדילי (dsRNA) אך לא חלקיקי וירוס וכמובן איננו מבטא חלבוני פתוגנזה. ה-dsRNA שנוצר תוך כדי הרפלקציה של המינירפליקון עובר עיכול בתא הצמחי למולקולות siRNA אשר יכולות לנוע בין התאים ובין רקמות הצמח ולהשרות ע"י כך את מנגנון העמידות בצמח הידוע בשם השתקת RNA או RNA silencing.

מטרות המחקר:

היעד לטווח הרחוק של המחקר, הוא קבלת גפנים עם עמידות בו-זמנית, בפני שלושת הווירוסים GVA, GVB ו-GLRaV-3.

המחקר כלל במקור שלוש מטרות עיקריות:

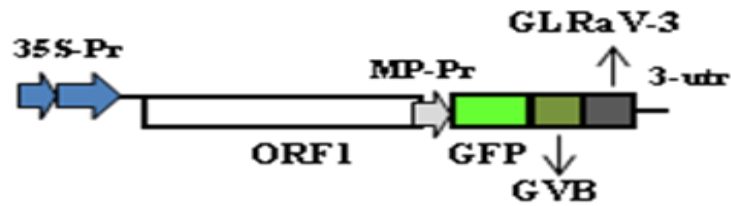
- א. בניית קונסטרוקטים על בסיס המינירפליקון של ה-GVA המבטאים מקטעי רצף נוספים של הווירוסים GLRaV-3 ו-GVB בעלי פוטנציאל גבוה לנטרול וירוסים (מקורם מגנים האחראיים על דיכוי השתקת RNA בצמח - Suppressors of RNA silencing).
- ב. פיתוח גפנים טרנסגניות, המבטאות את הקונסטרוקטים.
- ג. בדיקת העמידות של הגפנים הטרנסגניות, אשר התקבלו מהמחקר אשר הסתיים, לגבי הדבקה בפני GVA, GVB ו-GLRaV-3, וביצוע אנליזה לבדיקת מנגנון העמידות.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

פיתוח קונסטרוקטים של מיני-ריפליקון עם פוטנציאל להשריית RNA silencing נגד הוירוסים GLRaV-3 ו-GVB, GVA.

בתוכנית המחקר הצענו להתמודד בו זמנית בפני שלושת הוירוסים GVA, ו- GLRaV-3 הנפוצים ביותר בכרמים בארץ, ו- GVB אשר לפי הממצאים שלנו עלול לשבור את העמידות ל- GVA. חשוב לציין כי לצורך פיתוח צמחים טרנסגניים עמידים בפני שלושת הוירוסים הנ"ל תכננו להשתמש בקונסטרוקט אחד המכיל רצפים נבחרים משלושת הוירוסים, וזאת במקום השימוש בשלושה קונסטרוקטים שונים. במעבדתנו פותחו קלונים אינפקטיביים של GVA ו- GVB, והם משובטים בווקטורים בינאריים (pCambia) (Moskovitz et al., 2008). שניהם משמשים אותנו למטרת הדבקת צמחי בוחן בנטמינה באמצעים של אגרו-אינפקציה, ולהדבקת גפנים דרך השורשים ע"י השיטה שפיתחנו.

בנינו מיני-ריפליקון של GVA אשר מכיל בתוכו מקטעים קצרים שמקורם מהגן של חלבון המעטפת של ה- GVB ו- GLRaV-3. הקונסטרוקט שימש לטרנספורמציה של כנת הגפן ריכטר. במחקר הנוכחי הוצע לבנות קונסטרוקטים נוספים על בסיס המיני-ריפליקון של ה- GVA המבטאים מקטעי רצף נוספים של GLRaV-3 ו- GVB ובעלי פוטנציאל גבוה לנטרול וירוסים אלה (מקורם מגנים האחראיים על דיכוי השתקת RNA בצמח- Suppressors of RNA silencing). הקונסטרוקט אשר שימש אותנו במחקר קודם הכיל מקטעים מהגנים של חלבון המעטפת ושל חלבון ה- Hsp70h של הוירוסים GVB ו- GLRaV-3 בהתאמה. לפי דיווחים מהספרות מסתבר כי עמידות נגד וירוסים המכוונת נגד הגנים המקדדים לחלבונים המדכאים השתקת RNA (חלבוני RSS) היא חזקה יותר מאשר זאת המכוונת נגד גנים ויראליים אחרים. בהתאם לכך במהלך השנה הראשונה של המחקר הצלחנו לבנות מיני-ריפליקון של GVA אשר הכיל בתוכו מקטעים קצרים (עד 300 בסיסים) של ה- GVB ו- GLRaV-3 המקדדים לחלבוני ה- RSS (ORF5 של GVB, ו- ORF10 של GLRaV-3, בהתאמה). קונסטרוקטים על בסיס המיני-ריפליקון של ה- GVA המבטאים מקטעי רצף כאלה הם בעלי פוטנציאל גבוה לנטרול הוירוסים GVA, GVB, ו- GLRaV-3. נציין כי הקונסטרוקט שנבנה נושא בתוכו את הגן המדווח המבטא GFP המשמש בתור סמן לאפיון ביטוי המיני-ריפליקון, והוא בנוי על בסיס pCambia.



תמונה 1: ציור סכמתי של הקונסטרוקט המיני-ריפליקון של ה- GVA אשר נבנה וישמש לנו למטרת טרנספורמציה של צמחים. המיני-ריפליקון מכיל בתוכו מקטעים קצרים (עד 300 בסיסים) של ה- ORF5 של GVB, ו- ORF10 של GLRaV-3 שהם מקטעים מהגנים של חלבוני ה- RSS.

הקונסטרוקט שנבנה שימש אותנו בהמשך לצורך התחלת טרנספורמציה לכנת הגפן ריכטר במעבדתה של דר אתי אור.

פיתוח גפנים טרנסגניים, המבטאות את הקונסטרוקטים:

הקונסטרוקט שימש בהמשך לטרנספורמציה של כנת הגפן ריכטר. הליך הטרנספורמציה בוצע ע"י הצוות של דר' אתי אור ובמעבדתה. בתום ההליך הצמחים של ריכטר שעברו התמרה הועברו למעבדתנו להמשך מחקר.

הצמחים נבדקו ב- PCR ואלו שהיו חיוביים הועברו להמשך גידול בשתי צורות:

1. בעציצים באדמה

2. בתרבית בתנאים סטריליים.

הצמחים נבדקו מדי חודשיים ב- PCR לאימות קיום המחדר ע"י הגברת מקטע מגנום המינירפליקון ולנוכחות גן ה- GFP.

לצורך בחינת העמידות של הצמחים המותמרים, השתמשנו בצמחונים הגדלים בתרבית.

צמחונים אלו אולחו בנגיף ה- GVA המשובט בתור קלון אינפקטיבי. שיטת האילוח בקלון האינפקטיבי של ה- GVA נעשתה לפי הפרוטוקול שלנו ואשר פורסם ב- Muruganantham et al., 2009.

הניסוי כלל 80 צמחונים אשר הודבקו בקלון האינפקטיבי של ה- GVA. לאחר שבוע מההדבקה, הצמחונים הועברו למצע מוצק בעציצים (כול 5 צמחים בעציץ אחד) וגידול הצמחים נמשך בבתי גידול מבוקרים ובחדרים מאושרים ע"י השירותים להגנת הצומח וביקורת. כעבור חודשיים הצמחים נבדקו ב- PCR לנוכחות ה- GVA תוך כדי הגברה של מקטעי גנום שאינם נמצאים הגנום המינירפליקון (כול חמשה צמחים בעציץ נבדקו כדוגמא אחת). התוצאות היו שליליות, לעומת הביקורות של צמחים שאינם מותמרים שהיו חיוביים. המסקנה מהבדיקות הראשוניות היא מעודדת ומעידה על האפשרות שהצמחים המותמרים הם עמידים בפני נגיף ה- GVA.

במחקר הצענו לפתח גפנים טרנסגניות של הכנה ריכטר ושל זן ענבי יין קברנה סובניון המבטאות את הקונסטרקט של המינירפליקון של ה-GVA המבטאים מקטעי רצף נוספים של הווירוסים GLRaV-3 ו-GVB. בשנה השנייה והשלישית נעשו הרבה מאמצים וניסיונות במעבדתה של דר' אתי אור לפתח גפנים טרנסגניות מתרביות עוברים של הכנה ריכטר ושל הזן קברנה סובניון. להבדיל מהכנה ריכטר, כול המאמצים שהושקעו לטרנספורמציה של הזן קברנה לא הניבו הצלחה. לאור זאת הגשנו בקשה למדען הראשי למתן אישור לתוספת שנה רביעית של מחקר ללא תוספת תקציב על מנת לבצע טרנספורמציה בזן ענבי מאכן סופרירור. מלשכת המדען הראשי אישרו לנו את השינוי. לצערנו בשל בעיות טכניות במעבדתה של דר אור שקרו בשנת המחקר הרביעית ובשל מחסור בכוח אתם מיומן, מעבדתה של דר אור לא הצליחה לבצע טרנספורמציה לזן סופרירור. חשוב לציין כי טרנספורמציה לזן הסופרירור לא היתה מטרה בתוכנית המחקר המאושרת, אלא תוספת שהוצעה לביצוע ללא תוספת מיומן.

בדיקת העמידות של הגפנים הטרנסגניות של הכנה ריכטר לגבי הדבקה בפני GVA, GVB ו-GLRaV-3.

בשנות המחקר השנייה והשלישית עסקנו בבדיקת העמידות של הכנה ריכטר הטרנסגנית אשר פיתחנו. במחקר הוצע להתמודד בו זמנית בפני שלושת הווירוסים GVA, GVB ו-GLRaV-3 הנפוצים ביותר בכרמים בארץ. חשוב לציין כי לצורך פיתוח צמחים טרנסגניים עמידים בפני שלושת הווירוסים הנ"ל תכננו להשתמש בקונסטרקט אחד המכיל רצפים נבחרים משלושת הווירוסים, וזאת במקום השימוש בשלושה קונסטקטים שונים. במעבדתנו פותחו קלונים אינפקטיביים של GVA ו-GVB, והם משובטים בווקטורים בינאריים (pCAMBIA) (Moskovitz et al., 2008). שניהם משמשים אותנו למטרת הדבקת צמחי בוחן בנטמינה באמצעים של אגרו-אינפקציה, ולהדבקת גפנים דרך השורשים ע"י השיטה שפיתחנו.

הצמחים נבדקו ב-PCR ואלו שהיו חיוביים הועברו להמשך גידול בשתי צורות:

1. בעצצים באדמה
2. בתרבות בתנאים סטריליים.



תמונה 2: צמחוני גפן טרנסגניים של הכנה ריכטר בגידול בתרבות רקמה במגנטות לאחר הדבקה בקלון אינפקטיבי של GVA או GVB.

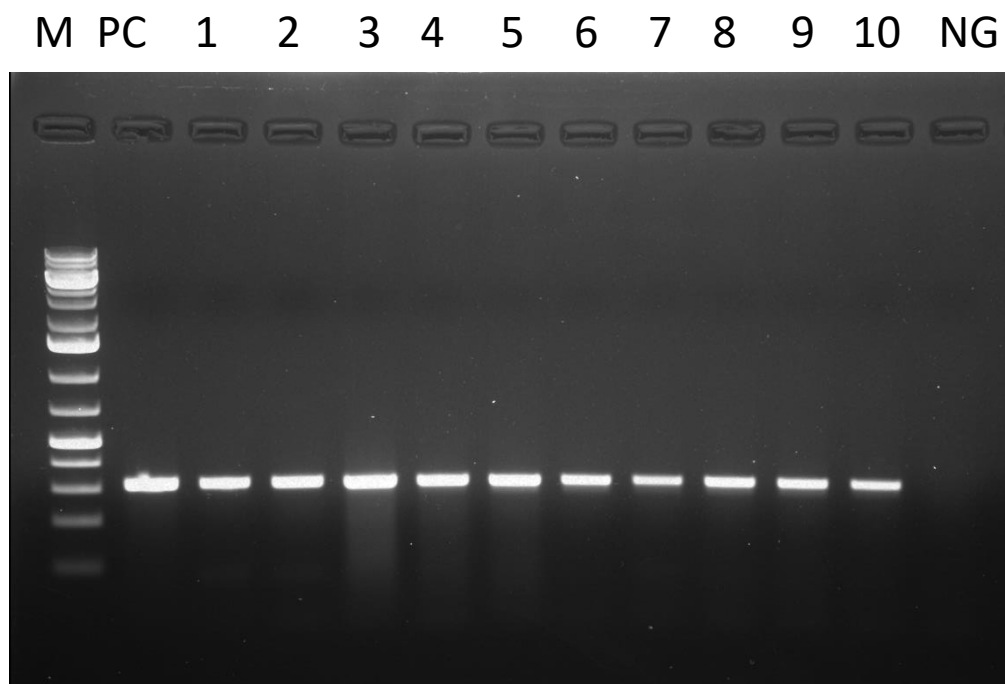


תמונה 3: צמחוני גפן טרנסגניים של הכנה ריכטר בגידול בעציצים בחממה לאחר הדבקה בקלון אינפקטיבי של GVA או GVB או הרכבת צד עם חומר נגוע ב GLRaV3.

הצמחים נבדקו מדי חודשיים ב- PCR לאימות קיום המחדר ע"י הגברת מקטע מגנום המינירפליקון ולנוכחות גן ה- GFP.

חשוב להזכיר כי כול הצמחים אשר שימשו לבדיקות העמידות מקורם בצמח אחד של ריכטר טרנסגני הנקרא T-49 אשר התקבל מהליך הטרנספורמציה במעבדתה של דר' אתי אור. הצמח הזה שימש כצמח אם לריבוי והכנת צמחים נוספים הן בעצבים והן בתרבויות.

תמונה 4 מציגה בדיקת PCR לאימות נוכחות הטרנסגן בצמחים הטרנסגניים ע"י הגברת מקטע בגודל כ 300 בסיסים מגן ה- GFP הנמצא במינירפליקון. לפי התמונה רואים כי כול הצאצאים של הצמח T49 הן טרנסגנים.

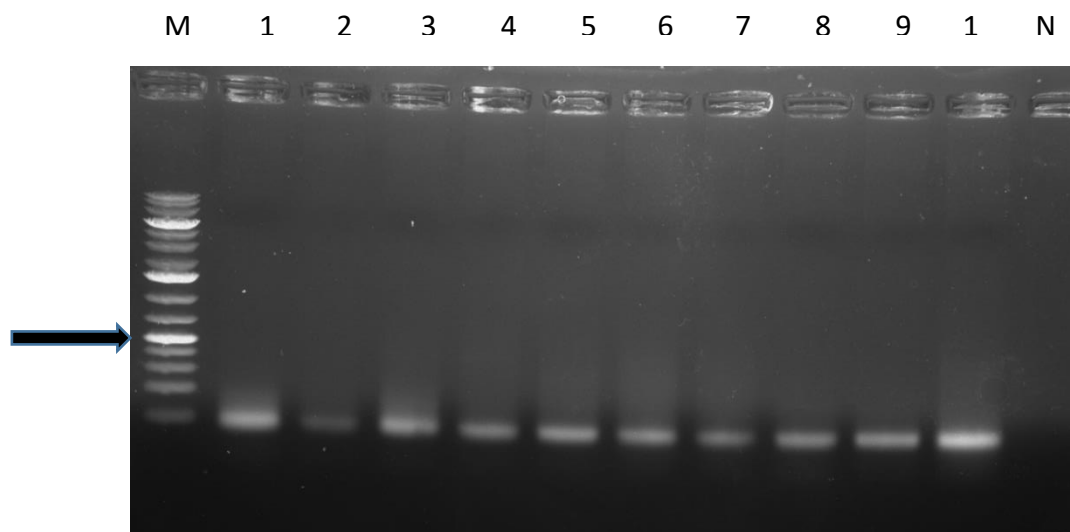


תמונה 4: בדיקת 10 צמחונים של הכנה ריכטר הטרנסגנית (לאחר ריבוי מאותו צמח אם טרנסגני): הרצת ג'ל לתוצר PCR אשר הוגבר מתוך מקטע ה GFP הנמצא בגנום המינירפליקון. PC ביקורת חיובית, NC ביקורת שלילית. גודל המקטע המוגבר כ 300 בסיסים.

לצורך בחינת העמידות של הצמחים המותמרים, השתמשנו בצמחונים הגדלים בתרבות. צמחונים אלו אולחו בנגיף ה- GVA או GVB המשובטים בתור קלונים אינפקטיביים. שיטת האילוח בקלון האינפקטיבי נעשתה לפי הפרוטוקול שלנו ואשר פורסם ב- Muruganantham et al., 2009.

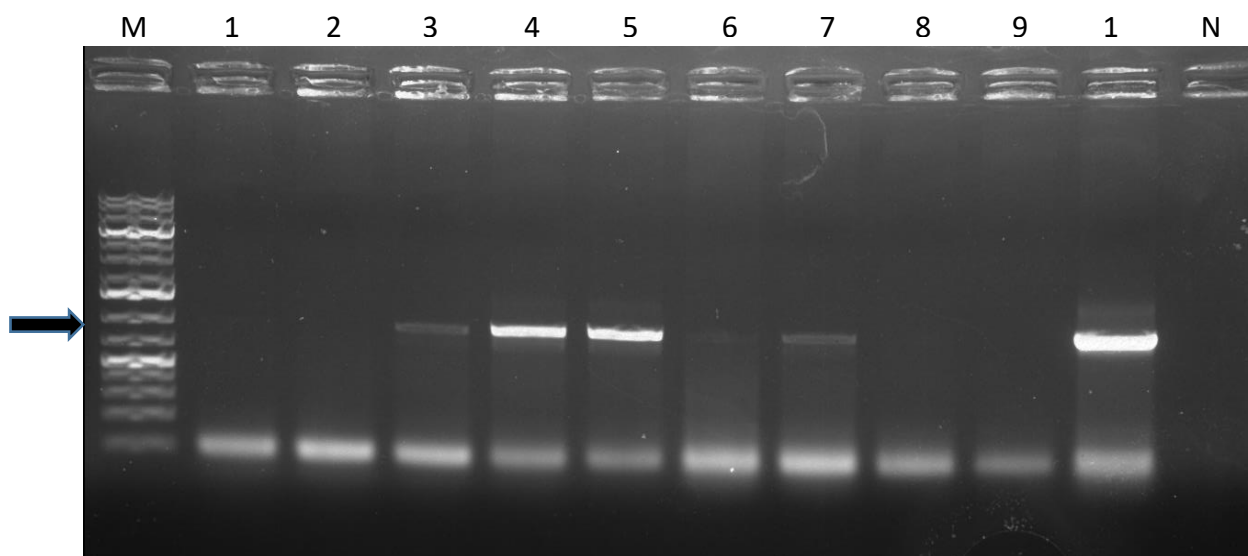
לאחר שבוע מההדבקה, הצמחונים שגודלו במבחנות הועברו למגלנדות. לאחר שהצמחונים גדלו מספיק ונראו יותר חזקים הם הוערו למצע מוצק בעציצים. לבדיקת עמידות בפני הנגיף GLRaV3 צמחים טרנסגניים בוגרים של הכנה ריכטר ההגדלים בעציצים הודבקו ע"י הרכבת צד בחומר צמחי שמקורו מגפן נגועה בנגיף GLRaV3. גידול הצמחים נמשך בבתי גידול מבוקרים ובחדרים מאושרים ע"י השירותים להגנת הצומח וביקורת. כעבור חודשיים הצמחים נבדקו ב- PCR לנוכחות ה- GVA, GVB או GLRaV3 תוך כדי הגברה של מקטעי גנום שאינם נמצאים הגנום המינירפליקון.

לצורך בדיקת העמידות של הצמחים הטרנסגניים בפני נגיף ה- GVA נעשה PCR להגברת מקטע כ 500 בסיסים מהגן של חלבון המעטפת CP של הוירוס שנמצא בגנום הוירוס אך לא במינירפליקון. לפי התוצאות המוצגות בתמונה 5, לא התקבל תוצר PCR, תוצאה זו היא מעודדת ומעידה על האפשרות שהצמחים המותמרים הם עמידים בפני נגיף ה- GVA.



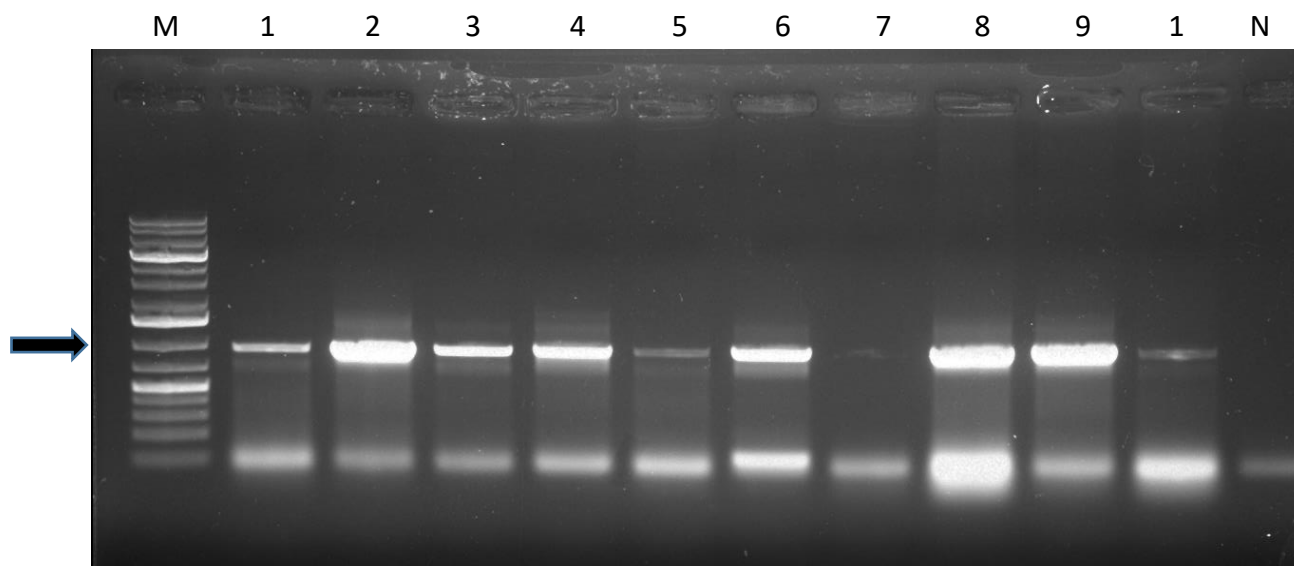
תמונה 5: בדיקת צמחונים של הכנה ריכטר הטרנסגנית להדבקה בנגיף ה- GVA: הרצת ג'ל לתוצר PCR אשר הוגבר מגנום ה- GVA שאינו קיים במינירפליקון (גן ה- CP). החץ מצביע על גודל המקטע המוגבר (כ 500 בסיסים). N ביקורת שלילית.

לצורך בדיקת העמידות של הצמחים הטרנסגניים בפני נגיף ה- GVB נעשה PCR להגברת מקטע כ 750 בסיסים מגן הרפליקאז מגנום הנגיף שאינו נמצא במינירפליקון. לפי התוצאות המוצגות בתמונה 6, התקבל תוצר PCR בגודל הצפוי בלפחות במחצית הצמחים שניבדקו, תוצאה זו היא מראה כי 50% מהצמחים הראו עמידות ל GVB והשאר לא היו עמידים בפני אותו הוירוס.



תמונה 6: בדיקת צמחונים של הכנה ריכטר הטרנסגנית להדבקה בנגיף ה-GVB: הרצת ג'ל לתוצר PCR אשר הוגבר מגנום ה-GVB שאינו קיים במינירפליקון (מתוך גן הרפליקאז). החץ מצביע על גודל המקטע המוגבר (כ 750 בסיסים). N ביקורת שלילית.

לצורך בדיקת העמידות של הצמחים הטרנסגניים בפני נגיף ה-GLRaV3 נעשה PCR להגברת מקטע כ 800 בסיסים מגן הרפליקאז מגנום הנגיף שאינו נמצא במינירפליקון. לפי התוצאות המוצגות בתמונה 7, התקבל תוצר PCR בגודל הצפוי בכול הצמחים שניבדקו, תוצאה זו מראה כי הצמחים לא היו עמידים בפני וירוס ה-GLRaV3.



תמונה 7: בדיקת צמחונים של הכנה ריכטר הטרנסגנית להדבקה בנגיף ה-GLRaV3: הרצת ג'ל לתוצר PCR אשר הוגבר מגנום ה-GLRaV3 שאינו קיים במינירפליקון (מתוך גן הרפליקאז). החץ מצביע על גודל המקטע המוגבר (כ 800 בסיסים). N ביקורת שלילית.

דיון:

בסגרת המחקר בנינו מיני-ריפליקון של GVA אשר הכיל בתוכו מקטעים קצרים שמקורם מהגן של חלבון המעטפת של ה-GVB ו-GLRaV-3. הקונסטרוקט שימש בהמשך לטרנספורמציה של כנת הגפן ריכטר. במהלך המחקר עסקנו בבניית מאגר של צמחונים אשר גודלו בתרבות שמקורם בצמח גפן ריכטר אשר נבדק ואומתה בו הטרנספורמציה. בשנות המחקר השנייה והשלישית בדקנו את מידת העמידות של הצמחים המותמרים להדבקה ב-GVA, GVB ו-GLRaV-3. הצמחים שנבדקו הראו עמידות בפני GVA. מחציתם הראו עמידות בפני GVB. מאידך לא התקבלה עמידות בפני הנגיף GLRaV3.

טרנספורמציה של צמחים בכלל מחשבת היא גישה מקובלת ולרוב יעילה בפיתוח צמחים עמידים בפני מחלות בכלל ובפני וירוסים בפרט. לגבי גפן, פיתוח מערכות טרנספורמציה על בסיס תרביות עוברים נחשבת לשיטה לא קלה בגלל הזמן הרב להקמתה וליעילות הרגנרציה לאחר הליך הטרנספורמציה. אף על פי זאת יעילות ההצלחה בפיתוח מערכות טרנספורמציה של תרביות עוברים תלויה גפ בזן או בכנה של הגפן. כנת הריכטר נמצאה במחקר שלנו וגם במחקרים אחרים במעבדתה של ד"ר אתי אור כיעילה הן לטרנספורמציה והן לרגנרציה. מאידך הזן קברנה סובניון לא היה מוצלח. עבודות אחרות בהן השתמשו בטרנספורמציה של תרביות עוברים, דווח על קושי דומה והצלחה במעט זנים בעיקר בענבי מאכל כמו הזן טומפסון (Wang X. et al. 2018). להבדיל מטרנספורמציה של תרביות עוברים, בשנים באחרונות עובדים על פיתוח מערכות טרנספורמציה יותר יעילות ומוצלחות המבוססות על השימוש בקאלוסים שמקורם מפטוטרות עלים (Zhao et al. 2017). שיטה זו נוסתה בהצלחה (20% יעילות

רגנרציה וטרנספורמציה) על הגפן *V. amurensis*, לביטוי גנים מדווחים כמו GFP ובכוננתו לנסות אותה על הגפן *V. vinifera*.

הספרות המדעית דלה בעבודות העוסקות בפיתוח עמידות טרנסגנית של גפנים, מהמין *V. vinifera*, בפני פתוגנים לרבות וירוסים וזאת בשל המחסור בגנים פוטנציאליים היכולים לעורר עמידות בצמחים המהונדסים גנטית. בהקשר לוירוסים, רוב העמודיות שפותחו בצמחים כולל גפנים היו מבוססות על ביטוי גנים ויראליים המקודדים לחלבוני המעטפת, התנועה והרפלקציה של הוירוס או על החדרת מקעי גנים של הוירוסים בצורת sense או antisense לדוגמא עבודתם של Valat & Burrus (2006). בדומה למחקר שלנו כאן, נעשו עבודות המתארות ניסיונות לפיתוח גפנים טרנסגניים עם עמידות בפני וירוסים המבוססת על הפעלת מנגנון ההשתקת RNA בצמח אם כי תוך כדי השימוש בקונסטרוקטים המבטאים מבנה של RNA המייצר מבנה stem-loop המשרה את הפעלת המנגנון. דוגמא לכך עבודתם של Gambino et al., 2010. אשר נעשו לגבי וירוס עלה המניפה GFLV. מאידך לא ידוע בספרות על עבודות אשר מתארות פיתוח עמידות בגפנים המבוססת על ביטוי RNA וירואלי המתרבה בצמח הטרנסגני והמפעיל באופן מתמיד את מנגנון השתקת RNA המסוגל לנטרל בו זמנית יותר מוירוס אחד בדומה למחקר שלנו כאן.

1. Baulcombe, D.C. (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant cell*, 8:1833-1844.
2. Brumin, M., Stukalov, S., Haviv, S., Muruganantham, M., Moskovitz, Y., Batuman, O., Fingstein, A., and Mawassi, M. (2009). Post-transcriptional gene silencing and virus resistance in *Nicotiana benthamiana* expressing a Grapevine virus A minireplicon. *Trans. Res.* 18, 331-345.
3. Gambino, G., Perrone, I., Carra, A., Chitarra, W., Boccacci, P., Torello Marinoni, D., et al. (2010). Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: Analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation. *Transgenic Research*, 19, 17–27.
4. Guo, H.S., and Ding, S.W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.* 21: 398-407.
5. Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
6. Hammond, S.M., Caudy, A.A., and Hannon, G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* 2: 110-119.
7. Jackson, R.S. (1994) Viticulture. In Arentzen, C.J. (ed.) *Encyclopedia of Agricultural Science*. Academic Press, vol. 4, pp 443-53.
8. Martelli, G.P. (1993) Rugose wood complex. In Martelli, G.P. (ed.) *Graft-Transmissible Diseases of Grapevine*. FAO, Rome, pp 45-53.
9. Moskovitz, Y., Goszczynski, D.E., Bir, L., Fingstein, A., Czosnek, H., Mawassi, M. (2008). Sequencing and assembly of a full-length infectious clone of Grapevine virus B and its infectivity on herbaceous plants. *Arch. Virol.* 153, 323-328
10. Muruganantham, M., Moskovitz, Y., Haviv, S., Horesh, T., Fenigstein, A., du Preez, J., Stephan, D., Burger, J.T., and Mawassi, M. (2009). Grapevine virus A-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. *Journal of Virological Methods*. 155, 167-174
11. Roth, B.M., Pruss, G.J., and Vance, V.B. (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* 102: 97-108.
12. Safran, B., Kimelman, R., and Bazak, H. (1996) The Development of viticulture in Israel. *Alon Hanotea*, 50:26-34.
13. Silhavy, D. and Burgyan, J. (2004). Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci.* 9: 76-83.
14. Valat, L., Fuchs, M., & Burrus, M. (2006). Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of Grapevine fanleaf virus: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. *Plant Science*, 170, 739–747.
15. Wang, X., Tu, M., Wang, D., Liu, J., Li, Y., Li, Z., Wang, Y., Wang, X. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnol. J.* 16: 844–855.
16. Waterhouse, P., Gramham, M., and Wang, M-B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13959-13964.
17. Zhao T, Wang Z, Su L, Sun X, Cheng J, Zhang L, Karungo SK, Han Y, Li S, Xin H. (2017). An efficient method for transgenic callus induction from *Vitis amurensis* petiole. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0179730.

סיכום עם שאלות מנחות

אנא פרט מהם הניסויים שנעשו תוך השוואה לתכנית העבודה המתוכננת והתאמתם למטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעה המקיפה להלן מטרות המחקר: 1. בניית קונסטרוקטים על בסיס המינירפליקון של ה-GVA המבטאים מקטעי רצף של הווירוסים GLRaV-3 ו-GVB בעלי פוטנציאל גבוה לנטרול וירוסים (מקורם מגנים האחראיים על דיכוי השתקת RNA בצמח- Suppressors of RNA silencing). 2. פיתוח גפנים טרנסגניות, המבטאות את הקונסטרוקטים. 3. בדיקת העמידות של הגפנים הטרנסגניות, לגבי הדבקה בפני GVA, GVB, ו-GLRaV-3, וביצוע אנליזה לבדיקת מנגנון העמידות.	מהם עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח? במהלך השנה הראשונה של המחקר הצלחנו לבנות מיני-ריפליקון של GVA אשר הכיל בתוכו מקטעים קצרים (עד 300 בסיסים) של ה-GVB ו-GLRaV-3 המקדדים לחלבונים ה-RSS (ORF5 של GVB, ו-ORF10 של GLRaV-3). קונסטרוקטים על בסיס המיני-ריפליקון של ה-GVA המבטאים מקטעי רצף כאלה הם בעלי פוטנציאל גבוה לנטרול הווירוסים GVA, GVB, ו-GLRaV-3. הקמנו מאגר של צמחונים אשר גודלו בתרבות שמקורם בצמח גפן ריכטר אשר נבדק ואומתה בו הטרנספורמציה. אימות הטרנספורמציה בצמחונים נעשה ע"י הגברת מקטע מגן ה-GFP הנמצא בגנום המינירפליקון. לצורך בחינת העמידות של הצמחים המותמרים, השתמשנו בצמחונים הגדלים בתרבות. הצמחונים אולחו בנגיף ה-GVA או GVB המשובטים בתור קלונים אינפקטיביים. לאחר שבוע מהדבקה, הצמחונים הועברו למצע מוצק בעצצים וגידול הצמחים נמשך בבתי גידול מבוקרים ובחדרים מאושרים ע"י השירותים להגנת הצומח וביקורת. להדבקה צמחים בנגיף GLRaV3 השתמשנו בהרכבת צד של חומר צמחי נגוע בוירוס היות וטרם התקבל קלון אינפקטיבי לוירוס זה. כעבור 2-6 חודשים הצמחים נבדקו ב-PCR לנוכחות GVA, GVB, או GLRaV3 תוך כדי הגברה של מקטעי גנום שאינם נמצאים בגנום המינירפליקון. התוצאות של המחקר בשנת המחקר הראו שהצמחים שנבדקו הראו עמידות בפני GVA. מחציתם הראו עמידות בפני GVB. מאידך לא התקבלה עמידות בפני הנגיף GLRaV3. המסקנה מהבדיקות הראשוניות היא מעודדת ומעידה על האפשרות שהצמחים המותמרים הם עמידים בפני נגיף ה-GVA. בשנות המחקר השנייה והשלישית נעשו מספר נסיונות ומאמצים לבצע טרנספורמציה של הזן קברנה סובנין אך כול הניסיונות לא צלחו. לאור זה קיבלנו מלשכת המדען אישור להארכת המחקר לשנה רביעית ללא תקציב על מנת לנסות לבצע טרנספורמציה בזן גפן אחר סופריר. הטרנספורמציה הייתה אמורה להצבצב במעבדתה של דר אתי אור מהמכון למטעים, אך בשל בעיות טכניות ומחסור בצוות מחקר במעבדתה לא הצלחנו לבצע טרנספורמציה בזן סופריר.
בעקבות הניסויים שנעשו, אנא פרט והסבר כיצד הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח או חלק מהן מטרה 1 של המחקר הושלמה בשנת המחקר. מטרה 2 הושגה לגבי כנת הריכטר אך למרות המאמצים שנעשו לא הצלחנו לקבל טרנספורמציה לזו קברנה סובנין. מטרה 3 בוצעה והושלמה בשנה המחקר 3.	בהתאם להצעה המקיפה, ציין מה התבצע מתוך טבלת המשימות ואבני דרך, כולל אבני דרך כמותיות (סעיפים IV-VI) ומהם הקריטריונים שפורטו בהצעה המקיפה כבוחן להצלחת המחקר אכן הושגו מטרות 1 הושגה במלואה בשנה א' של המחקר מטרה 2 הושגה והושלמה לגבי הכנה ריכטר. מאידך לגבי הזן קברנה סובנין לא הצלחנו לקבל תרבויות עוברים לצורך טרנספורמציה. מטרה 3 בוצעה והושלמה בשנה המחקר 3.
מהן המסקנות המדעיות ומהן ההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו בעתיד?	

הניסויים שלנו הראו על האפשרות שהכנה ריכטר הטרנסגנית שקיבלנו היא עמידה בפני וירוס ה-GVA אך לא לגבי GVB או GLRaV3. בעתיד ניתן להשתמש הכנת ריכטר הטרנסגנית אשר פותחה בתור כנה עמידה בפני נגיף ה-GVA.
מהן הבעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ומה אמורה להיות ההתייחסות בהמשך? נמשיך וננסה בהמשך לבצע טרנספורמציה בזן גפן קברנה סובניון.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי. אין.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח (סמן אחת מהאופציות) ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט).
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי ? לא*

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים