



2000-2002

תקופת המחקר:

136-0409-02

קוד מחקר:

Subject: DEVELOPMENT OF TRANSGENIC RESISTANCE TO CUCUMBER GREEN MOTTLE MOSAIC VIRUS (CFMMV) IN CUCUMBER WITH THE USE OF A NOVEL PROMOTER.

Principal investigator: AMIT GAL-ON

Cooperative investigator: VICTOR GABA, AARON ZELCER, ANTIGNUS YECHZKEL, WOLF DALIA

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: פיתוח עמידות טרנסגנית לוירוס CFMMV במלפפון תוך שימוש בפרומטר יחודי

חוקר ראשי: עמית גלאון

חוקרים שותפים: ויקטור גאבה, אהרון זלצר, יחזקאל אנטיגנוס, דליה וולף

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

תקציר

הצגת הבעיה: בשנים האחרונות אופיין בארץ וירוס חדש ווירוס הנימור של פרי המלפפון (CFMMV) ruit mottle mosaic virus cucumbers (CFMMV) מקבוצת ה- ,tobamovirus הגורם נזקים קשים בארץ לגידול מלפפונים בחממות. הוירוס אופיין לראשונה במעבדתנו, ברמה הביולוגית והמולקולרית. בסקירת זני מלפפון בארץ לא נמצאו עד כה קווי מלפפון עמידים או סבילים כנגד וירוס זה.

מטרת המחקר הייתה לפתח קווי מלפפון עמידים לוירוס CFMMV ולגזעיו השונים בדרך של התמרה גנטית תוך שימוש בפרומטר חדש אשר אופיין גם הוא במעבדתנו. חשיבות המחקר היא בפיתוח עמידות למחלה ויראלית קשה, שאין בידי החקלאים אמצעים יעילים להתמודד עמה. **מהלך ושיטות עבודה:** נערכה טרנספורמציה לטבק ומלפפון בשיטת Agrobacterium Mediated Transformation עם פלסמידים בינאריים שנשאו גן המקדד לחלבון המעטפת CP או לחלק מגן הרפליקאז (KD54) של הוירוס CFMMV. הגנים שובטו תחת פרומטר קונסטיטוטבי חדש SV ורצף הגברה של הוירוס ZYMV. נבטים טרנסגניים מדור T1 שנבררו על מצע סלקציה (עמידות לקנמיצין) נבחנו לעמידות כנגד הוירוס CFMMV במספר דרכים: בשיטות וירולוגיות קלאסיות של הדבקה וזיהוי סימני מחלה, ובשיטות אימונולוגיות ומולקולריות של RT-PCR ו-ELISA. **תוצאות עיקריות:** פותחה מערכת טרנספורמציה יעילה במלפפונים. בסריקה לעמידות של קווי מלפפון טרנסגניים מדור T1 המכילים את גן הרפליקאז 54K נמצאו שמונה קווים מתוך 14 כבעלי עמידות מוחלטת לוירוס CFMMV בעוד שבקווים המכילים את גן המעטפת נמצאו רק שלשה קווים מתוך תשעה כבעלי עמידות לוירוס. לצורך המשך המחקר היישומי נבחר קו אחד- I44 שהראה עמידות מוחלטת בכל שיטות ההדבקה בוירוס למטרות לימוד ומסחר. בקו זה יוצרו זרעים הומוזיגוטים מדור T2 ללימוד איכות ומנגנון העמידות. הקו I44 הראה עמידות מוחלטת רק לוירוס ההומולוגי CFMMV לעומת עיכוב חלקי של הופעת סימני מחלה בהדבקה בוירוסים אחרים מאותה קבוצת ה- tobamovirus. בניסויי הרכבה בהם שימש הקו I44 ככנה, הראנו לראשונה בעולם שקו זה מקנה הגנה לרוכב (זן מסחרי) שאינו טרנסגני מפני הדבקה של הוירוס מהקרקע.

מסקנות: המחקר הגיע להישגים מרשימים ברמה עולמית ועמד בכל המטרות שהוגדרו למחקר. פותחה שיטה יעילה לטרנספורמציה של מלפפונים שאפשרה פיתוח קוים טרנסגניים עמידים לוירוס CFMMV.

המלצות: לצורך מימוש מסחרי חובה לתקצב את המחקר לתקופה נוספת בכדי לבצע ניסויי שדה בתנאים מסחריים. חשוב מאד למסחר את מוצרי המחקר לחברות זרעים בארץ ובעולם. הכרחי להגן על תוצאות המחקר ברישום פטנט באופן מידי.

א. דו"ח מסכם: לתכנית מחקר מספר 01-0409-136

1. נושא המחקר: פיתוח עמידות טרנסגנית לוירוס CFMMV במלפפון תוך שמוש בפרומוטר של וירוס צמחי יחודי

Development of transgenic resistance to cucumber fruit mottle mosaic virus (CFMMV) in cucumber with the use of novel plant virus promoter

עמית גל-און, יחזקאל אנטיגנוס, ויקטור גאבה- מחלקה לוירולוגיה, מכון להגנת הצומח מינהל המחקר החקלאי מכון וולקני ת.ד-6 בית דגן 50-250, דאר אלקטרוני amitag@agri.gov.il

דליה וולף, לריסה פטליס ואהרון זלצר מחלקה לגנטיקה, מכון לגידולי שדה מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני
Amit Gal-On, Yechzcel Antignus and Victor Gaba: Institute of plant protection, Dep. of Virology P.O.B 6 A.R.O 50-250 E-mail amitag@agri.gov.i
Aaron Zelcer, Dalia Wlff and Larisa Petlis Department of Plant Genetics Institute of Field and Garden Crops P.O.B 6 A.R.O 50-250 E-mail zelcer@agri.gov.il

2. הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר

שבט תשס"ב

אפריל, 2003

ב. מבוא:

מבוא ותאור הבעיה:

בשנים האחרונות מתפשטת מחלה ויראלית בארץ התוקפת באופן הרסני גידול מלפפונים איכותיים בחממות. עיקר הנזק של המחלה הוא בפגיעה קשה בפרי שלא ניתן לשיווק. הנזק לחקלאים הינו רב מפני שסימני המחלה עשויים להופיע על הפרי בשלב מאוחר, לאחר הוצאות גידול גבוהות ואובדן מרבית היבול. גורם המחלה אופייני כוירוס השיך לקבוצת ה- tobamovirus והוא שונה בחלק מתכונותיו מהוירוס cucumber green mosaic virus (CGMMV) שתואר בעבר בארץ ובעולם. הוירוס החדש אופייני במעבדותינו ברמה מולקולרית וביולוגית ושמו החדש וירוס הנימור של פרי המלפפון cucumber fruit mottle mosaic virus (CFMMV) (Antignus et al., 2001). הוירוס CFMMV עובר מצמח אחד לשני במגע מכני דרך העלווה והשורשים ולאחר תמותת הצמח הוא נשאר יציב בקרקע. מצע ואמצעי גידול מאולחים מהווים מקורות מידבק אפשריים שקשה לחטאם כאשר הגידול נעשה בחממות לאורך כל עונות השנה. הנזק העיקרי שגרם ע"י הוירוס הוא בפרי, בהופעת כתמים צהובים ובעיוות הפרי כך שלא ניתן לשווקו. כיום אין בנמצא מקורות עמידות טבעיים לוירוס לצורך פיתוח עמידות גנטית. כמו כן, מקור הפצתו הראשוני של הוירוס אינו ידוע, יתכן שהוא הופץ ע"י מכירת זרעים מאולחים מאירופה או המזרח הרחוק בהן המחלה נפוצה. ראוי לציין, שהפצתו של הוירוס בחממות עלולה להמית את ענף המלפפונים בחממות. הפיתרון היחידי המסתמן היום הינו החדרת עמידות טרנסגנית בשיטות ביוטכנולוגיות קימות.

מטרות המחקר היו:

- פיתוח צמחי מלפפון עמידים לוירוס CFMMV וגזעיו השונים. כאשר העמידות מבוססת על התמרה טרנסגנית של הגנים המקודדים לחלבון המעטפת ומקטע מחלבון הרפליקציה של הוירוס CFMMV.
- הערה באשר למטרות:** היות והוירוס CGMMV-W אינו מהווה את מקור המחלה החשוב בארץ, עיקר המאמץ במחקר הושקע בהקניית עמידות טרנסגנית כנגד הוירוס החדש CFMMV שבהצעת המחקר הופיע בשם CGMMV-Is (Antignus et al., 2001).

ג. פרוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

בשנה הראשונה פיתחנו מערכת של טרנספורמציה בזנים מסחריים של מלפפונים ובמקביל נבנו פלסמידים בינאריים המכילים את הגנים המתאימים CP ו- 54K של הוירוס CFMMV (תמונה 1). נעשה שימוש בפרומוטר יחודי SVBV (Wang et al., 2000) שאופייני במעבדתנו ואינו מוגבל מבחינת פטנטית.

בשנה השניה התקבלו 23 קווים טרנסגניים מדור T1 מהם 14 קווים המכילים את גן הרפליקאז ו-9 המכילים את גן המעטפת. כל קו טרנסגני נבחן בתכונות הבאות: א. תכונות הורטיקולטורית - ע"י תצפית לאורך כל שלבי הגידול כולל יצירת זרעים של הצמח הטרנסגני בהשוואה לצמחים שאינם טרנסגניים. ב. רמת העמידות לוירוס - כל קו הודבק בוירוס CFMMV ונערך מעקב אחר הופעת סימני מחלה אופייניים לוירוס עד לשלב הפרי (טבלה 1).

אופיינו 11 קווים עמידים לוירוס על פי כל המבחנים שתוארו, 8 מכילים את גן הרפליקאז ו-3 את גן המעטפת. בכל הקווים האלו נמצאה התפתחות תקינה ברמה הורטיקולטורית וניתן היה לגדלם לשלב של פרי ולקבל זרעים חיוניים ראה טבלה 1. הקו I44 המכיל את גן הרפליקאז שהראה עמידות מוחלטת לוירוס (תמונה 1) נבחר להמשך המחקר הבסיסי והיישומי. הקו I44 גודל לזר 2R ולאחר סריקה של זרעי T2 על

מצע סלקטיבי הצלחנו לאתר צאצאים הומוזיגוטים עמידים לוירוס CFMMV. צמחי I44 הומוזיגוטיים הראו עמידות מוחלטת (immune) לוירוס CFMMV הן בהדבקה של העלה בתכשיר מנוקה של וירוס בריכוז של $100 \mu\text{g/ml}$ והן בהדבקה דרך מערכת השורשים (טבלה 2). יתר על כן, בהרכבה של צמחי I44 על צמח נגוע בוירוס CFMMV נמצא, שהתפשטות הוירוס היתה מוגבלת רק לכנה הרגישה בעוד שהרכב (I44) נשאר עמיד לוירוס (טבלה 2). הקו I44 הוא אחד ממספר רב של קווים שנמצאו עמידים לוירוס. בכדי להגדיל את מבחר הקווים ההומוזיגוטים העמידים גודלו קווים עמידים נוספים לשלב של פרי עם זרעים בתנאים מבוקרים באמצעות ריסוסים הורמונאליים לקבלת דור T2. ברשות צוות המחקר שני קווים הומוזיגוטים נוספים שהראו עמידות מוחלטת (immune) להדבקה בוירוס CFMMV.

בשנה השלישית אופיינה העמידות לוירוס של הקו I44 ברמה ביולוגית ומולקולרית. נמצא שקו זה עמיד באופן מוחלט רק לוירוס CFMMV, אך הוא עמיד חלקית לוירוסים אחרים מאותה קבוצה: KGMMV, ZGMMV ו-CGMMV (טבלה 3). בשלשת הוירוסים האלה נצפתה דחיה של הופעת סימני המחלה, כאשר בהדבקה בוירוס CGMMV נצפו סימני מחלה מוחלשים על צמחי I44 בהשוואה לסימני מחלה אלימים בצמחי הביקורת (קו ההורה לא טרנסגני) (טבלה 3).

הממצא החשוב ביותר בהקשר לעמידות של הקו I44 בהיבט מסחרי הוא: ניתן להרכיב על צמחי I44 זנים שונים של מלפפון מסחרי, בצמחים מורכבים אלה הכנה I44 מונעת מעבר של הוירוס מקרקע מאולחת ובכך מגינה על הרכב שאינו טרנסגני מהדבקה בוירוס CFMMV (תמונה 3 טבלה 3). בדרך חדשנית זו ניתן למנוע או להפחית את מקור האינקולום הראשוני המצוי בקרקע ובכך לתת פיתרון חלקי לאפידמיה של הוירוס מבלי לשווק מלפפונים טרנסגנים לשוק.

ראוי לציין, שהקו I44 מראה עמידות טובה להדבקה בוירוס ZYMV. הסיבה לכך נובעת מהחדרת קטע של גנום הוירוס ZYMV (5' non-coding region NCR) לפלסמיד הביטארי. המקטע של ה-NCR (תמונה 1) הוכנס לפלסמיד הביטארי לפני גן המטרה, בכדי להגביר את התרגום של הגן CP ו-54K בצמח הטרנסגני. בפועל נראה שקטע זה לא הגביר את רמת התרגום, אלא שימש בסיס לפיתוח עמידות לוירוס ZYMV על בסיס RNA mediated resistance.

בעבודות קודמות הראו שעמידות על בסיס של השתקה עשויה להשבר ע"י הדבקה בוירוסים מקבוצת ה-potyvirus. וירוסים אלה מבטאים את גן ההלפר HC-Pro שמדכא את מערכת ההשתקה. הדבקה מוקדמת של הקו העמיד I44 בוירוסים שונים (CVYV, ZYFV, ZYMV, CMV) לא שברה את העמידות לוירוס CFMMV (טבלה 4). ברמה המולקולרית אופין עותק אחד של הגן בקו I44 עפ"י סגרציה על מצע סלקטיבי. כמו כן ביטוי של תעתיק הגן הטרנסגני לא הושפע מניסיונות ההדבקה בוירוס (תמונה 3). בניית התוצאות ברמה ביולוגית ומולקולרית ניתן להעריך שמנגנון ההגנה אינו מבוסס על השתקה באופן הקלאסי, אך העמידות החלקית שהתקבלה כנגד הדבקה בוירוס ZYMV עשויה לרמוז על מנגנון של השתקה בדרך שונה שעדין לא אופיין במלואו.

ד. מסקנות והשלכתייהן על המחקר:

כל מטרות המחקר שהוצבו יושמו באופן הטוב ביותר להלן פרוט המטרות:

- במחקר הנוכחי פותחה לראשונה בארץ מערכת טרנספורמציה יעילה להתמרה של גנים.
- פותחו קווים של מלפפון פרטנוקרפי עמיד לוירוס CFMMV.
- העמידות אופיינה ברמות השונות.
- המסקנות היישומיות ממחקר זה:
- חובה להמשיך את תיקצוב המחקר לניסויים בתנאים מסחריים טרם מיסחור המוצר.
- יש לגייס כסף כדי להגן על יישום התוצאות בפטנט.
- להתחיל ברישוי המוצר הטרנסגני הראשון שפותח בארץ.
- יש לחפש חברות בעלות עניין לקנות ולמסחר את המוצר.

ה. פירסומים

Antignus, Y., Wang, Y., Pearlsman, M., Lachman, O., Lavy, N. and Gal-on, A. (2001).
Biological and Molecular Characterization of a New Cucurbit-Infecting Tobamovirus .
Phytopathology 91: 565-571.

Gal-On, A., Antignus, Y., Wolf, D., Pearlsman, M., Lachman, O., Patlis, L., Wang, Y. and
Zelcer, A. (2002). Outstanding transgenic resistance to Cucumber fruit mottle mosaic
tobamovirus in cucumbers carrying a viral coat protein or replicase gene.
VIII International Plant Virus Epidemiology Symposium, May 12-17, 2002.
Aschersleben, Germany. Abstract pp 11.

Wolf, D., Zelcer, A., Antignus, Y., Patlis, L., Lachman, O., Pearlsman, M., Wang, Y., and
Gal-On, A. (2002). Development of a genetic transformation protocol for cucumber and
it's use in the generation of transgenic resistance to the CFMMV virus. The 24th
Congress Of The Israeli Phytopathology Society, February 11-12, Phytoparasitica 30:3
page 11 (Abstract).

Gal-On, A. Wolf, D., Ryu K. H., Min B.E., Antignus, Y., Pearlsman, M., Lachman, O., Patlis,
L., Wang, Y. Yang, J. and Zelcer, A. 2003. Transgenic cucumber expressing the 54k
gene of Cucumber Fruit Mottle Mosaic tobamovirus are highly resistance and protected
non-transgenic scions from soil infection. In preparation.

3. סיכום עם שאלות מנחות לדו"ח המחקר:

- 1) מטרת המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה:
כל מטרת המחקר (א, ב) הושגו בהצלחה בהתאם לתוכנית המחקר, וכמו כן יושמו מטרת נוספות. (ג).
- א. פיתוח מערכת טרנספורמציה יעילה במלפפונים לצורך הקניית עמידות לוירוסים.
- ב. פיתוח צמחים טרנסגניים עמידים לוירוס CFMMV.
- ג. שימוש בכנה עמידה טרנסגנית להקניית עמידות לרוכב שאינו טרנסגני.
- 2) עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:
א. בשיטות מולקולריות נבנה פלסמיד בינארי להחדרת עמידות לוירוס CFMMV.
- ב. פותחה ושוכללה שיטה לרגרציה וטרנספורמציה יעילה של מלפפונים.
- ג. פותחו קווים מסחריים עמידים לוירוס CFMMV בכל השיטות הקיימות.
- ד. אופיינה העמידות לוירוס ברמה ביולוגית וברמה מולקולרית.
- ה. פותחו צמחים מורכבים בהם הכנה הטרנסגנית מגנה על הרוכב מפני הדבקה מהקרקע.
- 3) המסקנות המדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר:
צוות המחקר הוכיח פעם נוספת שניתן להחדיר עמידות לוירוסים ביעילות גבוהה ע"י שמוש בטכנולוגיה טרנסגנית. כמו כן העמידות היא ספציפית לוירוס הומולוגי לרצף שהוחדר. רצוי לתקצב את המחקר בכסף רב יותר כך שניתן יהיה להחדיר עמידות למספר וירוסים בו זמנית.
- 4) הבעיות שנתקו לפתרון ואו השינויים שחלו במהלך העבודה:
לא נותרו כל בעיות במהלך המחקר וכל המטרות יושמו. ראוי לציין, שתיקצוב להמשך המחקר לא אושר בהצעות מחקר חדשות כך שהמחקר הנוכחי הופסק למרות הצלחתו המרשימה.
- 5) האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:
חלק מהידע פורסם בכנסים מדעיים ראה סעיף ה'. אם לא יגויס כסף לרישום פטנט בזמן הקרוב לא ניתן יהיה להגן על הטכנולוגיה של הגנת הרוכב מפני הדבקה מהקרקע באמצעות כנה טרנסגנית.
- הערה חשובה: צוות המחקר בראשותם של דר. גל-און ודר. זלצור הצליח במחקר הנוכחי ובעבר (פיתוח עמידות טרנסגנית של עגבניה לוירוס CMV) לפתח מוצרים טרנסגניים ברי מסחר. לצערנו, לא נראה שבמערכת הקיימת ישנו גוף שיכול ומעוניין למסחר פרויקטים ביוטכנולוגיים אלה. ראוי לציין, שכל המוסדות נחשפו לתוצאות המחקר כבר בשנתו השניה של המחקר (שר החקלאות ומנכ"ל, המדען הראשי של משרד החקלאות, ההנהלה של מנהל המחקר החקלאי כולל מנהלי מכונים ומחלקות). חבל שבמערכת ציבורית לא יודעים להביא את פירות המחקר גם לכיוונים מסחריים "החוקרים הצליחו המערכת נכשלה".

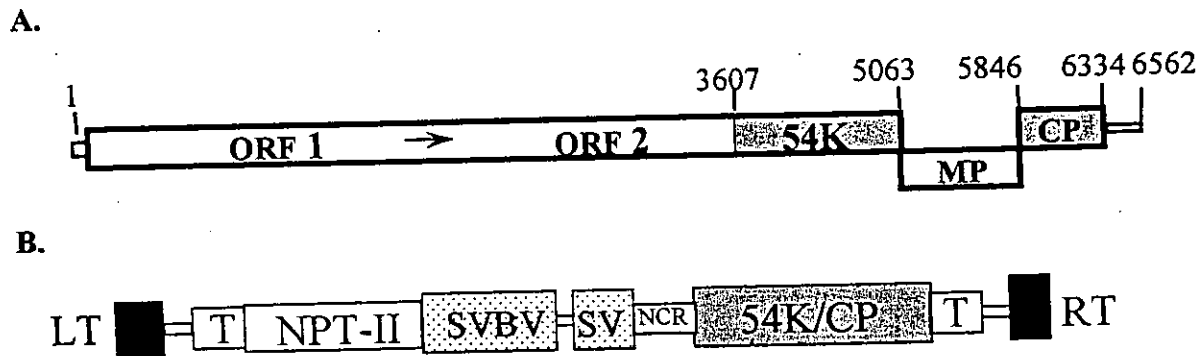


Fig. 1. Schematic presentation of the genome organization of cucumber fruit mottle mosaic virus (CFMMV). The numbers above refer to the position of the genes. The putative 54K and coat protein (CP) genes are marked (gray boxes). (B). the construct between the left (LT) and the right (RT) borders (black). The 54K gene or the coat protein (CP) of CFMMV was fused to the ZYMV 5' non-coding region (NCR) between the short SVBV (SV) promoter and the Nos poly-A terminator (T). The selective NPTII gene was inserted under the intact SVBV promoter.

Table 1: Screening of R1 transgenic cucumber lines containing 54K or CP genes for resistance to CFMMV

Original line [~]	Response to viral inoculation [^]	Response to back inoculation#
R44*	0/64	-
R45*	0/7	-
R84*	0/5	-
R187*	0/3	n.t
R169*	0/9	-
R175*	0/17	-
R179*	0/10	-
R205*	0/8	
R149	2/5	
R170	9/9	
R181	7/10	
R28	9/9	
R189	9/12	
R146	6/6	
CP86	0/25	+
CP112	0/18	-
CP195	6/6	
CP197	4/9	
CP201	5/5	
CP202	0/8	+
CP228	8/8	
CP235	8/8	
CP238	2/8	
Non-transformed cucumber	50/50	+

[~] Each numbered R1 seeds were germinated in the presence of kanamycin. R1 lines with R or CP refer to constructs contain the putative 54K gene (replicase) or the coat protein (CP) gene.

[^] The number of susceptible seedlings of the total inoculated is shown. Fully resistant lines are indicated in bold.

CFMMV-resistant seedlings were evaluated for low level of CFMMV accumulation by back inoculation of *N. benthamiana*. Systemic symptoms (+) and no symptoms (-) on *N. benthamiana* were observed three weeks post inoculation. n.t. – not tested

Fig 2: Response of transgenic line I44 (A. and C.) and non-transformed (B. and D) cucumber to CFMMV inoculation. Symptoms documented from leaves and fruit three (leaves) and seven weeks (fruit) after inoculation.



Table 2. Resistance of line I44 to CFMMV infected by mechanical, soil and graft inoculation.

^Inoculation methods	Lines	Infectivity*	ELISA	# Back inoculation
Mechanical inoculation	I44	0/65	-	-
	Control	30/30	++++	++++
Soil inoculation	I44	0/10	-	-
	Control	8/10	++++	N.T
Grafting inoculation	I44	0/16	-	-
	Control	12/16	++++	N.T

*Infectivity rate of transform (I44) and non-transformed (parental control) plants were determined as infected plants out of total plants inoculated by visual symptoms 4 weeks post infection.

Back inoculation was evaluated by mechanical inoculation of *N.benthamiana* with sap extracted from inoculated cucumber 4-weeks post inoculation.

Table 3. Resistance of the I44 transgenic plants to infection with different tobamovirus, CGMMV, KGMMV, ZGMMV and CFMMV.

Date (dpi)	CFMMV-54K Transgenic cucumber (I44)				Non-transgenic cucumber			
	CFMMV	CGMMV	KGMMV	ZGMMV	CFMMV	CGMMV	KGMMV	ZGMMV
8	-	-	-	-	-	-	++++	++++
10	-	-	-	-	+++	+++	+++++	+++++
14	-	+	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++
18	-	+	-	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
20	-	+	++	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
24	-	+	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
26	-	+	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
30	-	+	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

Cucumber plants were inoculated at the cotyledon stage and symptoms (+) were determined for resistance (-) every four days. The severity of symptoms is sum of mosaic spread and stunting, were evaluated from 1 to 5 (+) for a period of 30 days post inoculation (dpi). The data is summarized two independent experiments with ten plants for each treatment.

Fig. 3. Transgene RNA accumulation in transform cucumber plants (I44). Total RNAs were extracted from the second and third true leaves of transform (I44) and non-transform plants (NT) at 14 days post inoculation with CFMMV (cf) or with ZYMV (I44z). RNAs were analyzed by denaturing agarose gel electrophoresis and northern blot hybridization.

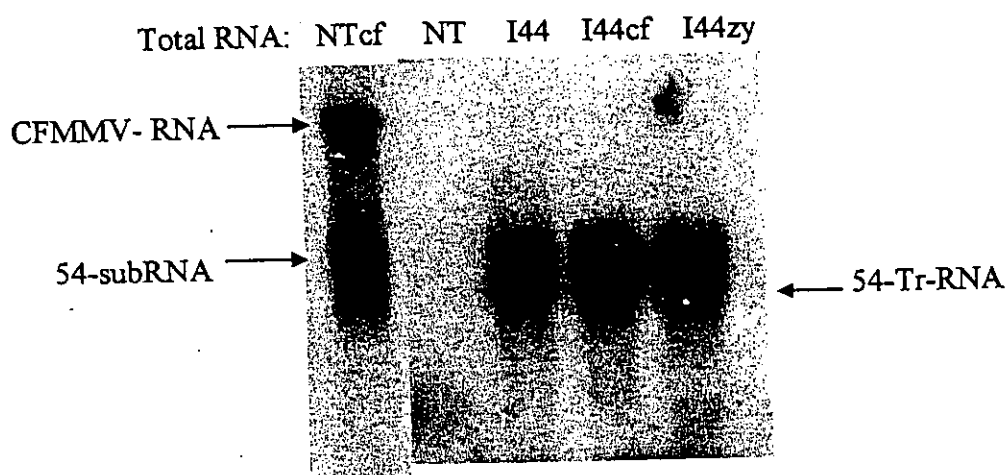


Table 4. Evaluation of I44 transgenic line for resistance to CFMMV infection following inoculation with viruses belong to potyviridae family and cucumber mosaic virus (CMV).

	ZYMV+ CFMMV	ZYFV+ CFMMV	CVYV+ CFMMV	CMV+ CFMMV	CFMMV+ CFMMV
I44	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
NT	4/4	6/6	6/6	4/4	6/6

Transgenic homozygote I44 line and non-transform cucumber seedling were inoculated by the potyviruses ZYMV, Zucchini yellow fleck potyvirus (ZYFV), cucumber vein yellowing virus (CVYV) and CMV week after germination. Ten days post inoculation the plants were challenge inoculated by CFMMV. Systemic infectivity of CFMMV was evaluated by symptoms and ELISA month after inoculation.

Table 5. Protection of scion seedling from soil infection by grafting on transgenic resistant I44 line.

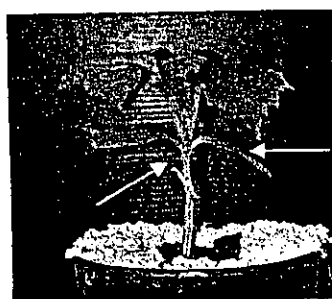
	Symptoms of scion	ELISA	Back inoculation
Grafted on I44	0/16	—	—
Not grafted	12/16	+++	n.t

Infectivity rate of scion non-transformed (parental control) plants were determined as infected plants out of total plants inoculated by visual symptoms 4 weeks post infection.

Back inoculation was evaluated by mechanical inoculation of *N.benthamiana* with sap extracted from inoculated cucumber 4 weeks post inoculation.

Fig. 4. Cucumber seedling grafted with I44 as a rootstock and non-transform as a scion. Top grafting was made with seedling at the cotyledon stage, while the lower non-transform. Grafted seedlings were planted in soil contained CFMMV virus (B).

A.



B.

