109

קוד מחקר:	*135-0129-98*
נושא:	**הקניית עמידות למספר וירוסים חשובים של עגבניה על ידי התמרה עם חלבון תנועה פגום של וירוס המוזאיקה של הטבק**
חוקר ראשי:	ד"ר משה לפידות
מוסד:	מינהל המחקר החקלאי
חוקרים שותפים:	3
תקופת מחקר:	1996-1998
מאמרים:	

תקציר

מחלות ויראליות גורמות לנזקים כלכליים קשים בגידולי ירקות בכלל, ובעגבניה בפרט, כאשר העגבניה הינה גידול הירקות המרכזי בישראל ובארצות רבות אחרות. הוירוס המרכזי אשר גורם לנזקים קשים בצמחי עגבניה הינו צהבון האמיר של העגבניה (Tomato yellow leaf curl virus; TYLCV). וירוסים נוספים הפוגעים בגידול עגבניה הם וירוס כיתמי הנבילה של העגבניה (TSWV), וירוס המוזאיקה של הטבק (TMV), ווירוס המוזאיקה של המלפפון (CMV).

לאחרונה מצאנו שביטוי חלבון תנועה פגום של וירוס המוזאיקה של הטבק (Tobacco mosaic virus; TMV) בצמחי טבק מותמרים משרה עמידות נגד טווח רחב של וירוסים התוקפים צמחים אלו (1,2). ולכן הצענו לבטא את חלבון התנועה הפגום בצמחי עגבניה מותמרים וכך להקנות לצמחים עמידות מולטי-ויראלית . מאחר וצהבון האמיר הינו הוירוס בעל פוטנציאל הרס גבוה ביותר בעגבניה, נשתמש בקוי עגבניה בעלי סבילות לוירוס (3,4), ונבטא בהם את חלבון התנועה הפגום. היינו, אנו מציעים לשלב טיפוח קלאסי לעמידות לצהבון האמיר עם התמרה של חלבון ויראלי פגום ובצורה כזו לקבל צמחי עגבניה מותמרים בעלי עמידות נגד טווח וירוסים רחב.

הקניית עמידות למספר וירוסים חשובים על ידי התמרה עם חלבון תנועה פגום של וירוס המוזאיקה של הטבק. מטרה זו תושג בשני שלבים:

- ביטוי הגן המקודד לחלבון תנועה פגום של TMV בצמחי עגבניה מותמרים.
- איפיון הצמחים המותמרים ובדיקת רמת העמידות נגד וירוסי העגבניה המרכזיים.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

1. הגן המקודד לחלבון התנועה המוטנטי שובט לוקטור בינארי.
2. צמחי עגבניה עברו התמרה עם הוקטור הנ"ל.
3. צמחי העגבניה המותמרים נבדקו לעמידות לוירוס צהבון האמיר, לא נמצאה עמידות לוירוס.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

1. מתוצאות ראשוניות נראה שחלבון התנועה הפגום של TMV אינו מעכב את וירוס צהבון האמיר.
2. מתוצאות ראשוניות נמצא שהחלבון המוטנטי מעכב תנועת חלבון תנועה פעיל של TMV.

דו"ח מסכם – מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

מספר תוכנית 135-0129-96

נושא: הקניית עמידות למספר וירוסים חשובים של עגבניה על ידי התמרה עם חלבון תנועה פגום של וירוס המוזאיקה של הטבק

Induction of multi-viral resistance in transgenic tomato plants by expressing a dysfunctional movement protein of TMV.

חוקר ראשי: משה לפידות

חוקרים משניים: אהרון זלצר*, דליה וולף*, שלמה כהן ומאיר פילובסקי*

המחלקה לוירולוגיה, * המחלקה לגנטיקה, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ת.ד. 6 בית דגן 50250

Moshe Lapidot, Aharon Zelcer*, Dalia Wolf*, Shlomo Cohen and Meir Pilowsky*.

Dep. of Virology, * Dep. of Plant Genetics, The Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250

E-mail: lapidotm@netvision.net.il

מבוא

מחלות ויראליות גורמות לנזקים כלכליים קשים בגידולי ירקות בכלל, ובעגבניה בפרט, כאשר העגבניה הינה גידול הירקות המרכזי בישראל ובארצות רבות אחרות. הוירוס המרכזי אשר גורם לנזקים קשים בצמחי עגבניה הינו צהבון האמיר של העגבניה (Tomato yellow leaf curl virus; TYLCV). וירוסים נוספים הפוגעים בגידול עגבניה הם וירוס כיתמי הנבילה של העגבניה (TSWV), וירוס המוזאיקה של הטבק (TMV), ווירוס המוזאיקה של המלפפון (CMV).

לאחרונה מצאנו שביטוי חלבון תנועה פגום של וירוס המוזאיקה של הטבק (Tobacco mosaic virus; TMV) בצמחי טבק מותמרים משרה עמידות נגד טווח רחב של וירוסים התוקפים צמחים אלו (1,2). ולכן הצענו לבטא את חלבון התנועה הפגום בצמחי עגבניה מותמרים וכך להקנות לצמחים עמידות מולטי-ויראלית. מאחר וצהבון האמיר הינו הוירוס בעל פוטנציאל הרס גבוה ביותר בעגבניה, נשתמש בקוי עגבניה בעלי סבילות לוירוס (3,4), ונבטא בהם את חלבון התנועה הפגום. היינו, אנו מציעים לשלב טיפוח קלאסי לעמידות לצהבון האמיר עם התמרה של חלבון ויראלי פגום ובצורה כזו לקבל צמחי עגבניה מותמרים בעלי עמידות נגד טווח וירוסים רחב.

מטרות המחקר

הקניית עמידות למספר וירוסים חשובים על ידי התמרה עם חלבון תנועה פגום של וירוס המוזאיקה של הטבק.

מטרה זו תושג בשני שלבים:

1. ביטוי הגן המקודד לחלבון תנועה פגום של TMV בצמחי עגבניה מותמרים.
2. איפיון הצמחים המותמרים ובדיקת רמת העמידות נגד וירוסי העגבניה המרכזיים.

תוצאות

1. **שיבוט הגן המקודד לחלבון תנועה פגום של TMV.**

השלב הראשון בפרוייקט היה שיבוט הגן המקודד למוטנט לא פעיל של חלבון התנועה של TMV. מוטנט זה חסר שלוש חומצות אמינו - חומצות אמינו 3, 4 ו - 5 מהקצה ה - N טרמינלי. הגן הנ"ל שובט מתוך צמחי טבק מותמרים (N. tabaccum cv. Xanthi) המבטאים אותו. הופק DNA מצמחי הטבק המותמרים (Total plant DNA) ובעזרת תחלים יחודיים לגן המוטנטי בוצעה הגברה לגן ע"י PCR. רצף התחלים הוא:

I: 5'-TTT/TTA/GAA/TTC/TGT/TTA/TAG/ATG/GCT/AAA/GGA/AAA

II: 5'-TAG/TGA/TAC/TGG/ATC/CCA/TAT/TTA/AAA/CGA/ATC/CGA

התחלים היחודיים הכילו אתרים לאינזימי חיתוך ECO RI ו - BAM HI וכך נחתך תוצר ראקצית ה - PCR ע"י שני האינזימים הללו ושובט לפלסמיד pBluescript. תקינות הגן אומתה ע"י קביעת רצף הבסיסים ואזי הגן שובט לפלסמיד הבינארי pMON977 ליצירת הפלסמיד pMON977-dMP. הוקטור הבינארי pMON977-dMP שימש להתמרת צמחי עגבניה.

צמחי העגבניה אשר שמשו להתמרה הם הזנים MP-1 (4), זן בעל סבילות לוירוס צהבון האמיר, והזן מונימייקר (MM) אשר רגיש לוירוס. כביקורת בוצעה התמרת צמחי טבק סמסון ובנטמיאנה (Nicotiana benthamiana) ע"י אותו וקטור בינארי. כביקורת נוספת בוצעה התמרה עם הוקטור בלבד ללא נוכחות הגן dMP.

זרעים חוטאו ונזרעו על מצע MS המכיל 2% סוכרוז. בגיל 11 יום, הפסיגים נחתכו והותמרו כמתואר ע"י (5) McCormick 1991. צמחי Ro הועברו לחממה מוגנת להפריה עצמית לקבלת זרעי R1. הזרעים (R1) הונבטו על מצע בנוכחות האנטיביוטיקה קנמיצין (100 mg/ml), על מנת לברור את הצאצאים הנושאים את הגן המוחדר. במקביל נבדקו הצמחים לנוכחות הגן המקודד ל - dMP.

להלן התפלגות זרעי R1 לעמידות לקנמיצין במספר קוים מובחרים.

הזן	מס. הקו	PCR ל - dMP	התפלגות העמידות לקנמיצין (סה"כ/עמידים)
MP-1	67	+	31/39
MP-1	72	+	31/72
MP-1	117	+	0/50
MP-1	16A	+	59/72
MM	91	+	45/57

בדיקת נוכחות הגן: נוכחות הגן המקודד ל - dMP נעשתה בעזרת ה - PCR. מהצמחים המותמרים אשר הגיעו מתרבית התאים (דור R0) הופק DNA אשר שימש לראקצית ה - PCR יחד עם תחלים הספציפיים לגן. כביקורת

בוצעו ראקציות PCR עם תחלים הספציפיים לגן המשרה עמידות לקנימיצין. אחת הבעיות המתעוררות בבדיקה ע"י ה - PCR היא שכאשר אין תוצר הגברה, היינו הצמח שלילי לגן הנבדק, יתכן וה - DNA שהופק מהצמח היה באיכות כזו שפגעה בראקצית ה - PCR. היינו יתכן שחוסר נוכחות תוצרי הגברה נובעת מבעיה בראקצית ה - PCR ולא רק כי הגן איננו. כדי לפתור בעיה זו במקביל להגברה עם תחלים יחודיים ל - dMP בצענו הגברה עם תחלים אשר פותחו לזיהוי עמידות לנמטודות בעגבניה ונותנים תוצר הגברה בגודל 750 נוקליאוטידים בכל צמחי העגבניה (6). כך בדקנו את תקינות ה - DNA מחד ואת נוכחות הגן המקודד ל - dMP מאידך.

מכלל הצמחים אשר יצאו מתרבית הרקמה התקבלו הצמחים החיוביים, אשר מבטאים את הגן המקודד ל - dMP הבאים:

צמח	מספר
עגבניה:	
MP-1	16A
"	17B
"	29
"	32
"	37
"	66
"	67
"	69
"	70
"	72
"	75
"	86
MM	89
MM	91
MM	112
MP-1	117
MM	118
MM	119
טבק - סמסון	15-1
	79
טבק-בנטמיאנה	5B
	98
	99
"	105A
"	105B

2. **בדיקת עמידות**

בניסויים הקדמיים, כאשר הדבקנו צמחי טבק מותמרים המבטאים את חלבון התנועה הפגום עם וירוס צהבון האמיר, לא מצאנו כל שינוי בקצב התפשטות הוירוס בעלים הסיסטמיים. אולם וירוס צהבון האמיר אינו משרה סימפטומים בצמחי טבק כתוצאה מהדבקה, היינו יש הבדל יסודי בהתנהגות הוירוס בצמחי טבק לעומת עגבניה. ולכן, בדיקת העמידות בצמחי עגבניה מותמרים בוצעה בראש ובראשונה לוירוס צהבון האמיר של העגבניה. צמחי עגבניה מותמרים (קו 16A) גודלו על מצע המכיל קנמיצין, וכך מתפתחים רק הצמחים המבטאים את הגן המותמר. הצמחים הועברו לחממה והודבקו ע"י כנימות עש בוירוס צהבון האמיר. כביקורת גודלו על מצע ללא קנמיצין צמחי MP-1 לא מותמרים, ואף הם הועברו לחממה והודבקו בוירוס.

הדבקה: כנימות עש הטבק הוכנסו לכלובי צמחים לרכישת הוירוס במשך 48 שעות מצמחי דטורה המודבקים בוירוס. בסיום הרכישה הועברו הכנימות נושאות הוירוס לצמחי העגבניה והעבירו את הוירוס במשך 48 שעות נוספות. בסיום ההעברה הצמחים רוססו בקונפידור, והועברו לחממה להמשך גידול. בכל ניסוי נבדקו לפחות עשרה צמחים מכל קו.

במעקב אחר התפתחות סימפטומים בצמחים המודבקים, לא נמצא כל הבדל בן הקו המותמר 16A לבין צמחי הביקורת אשר אינם מותמרים. קצב התפתחות הסימפטומים וחומרתם, היו זהים. כדי לבדוק כמותית את רמת הוירוס בצמחים המודבקים, נלקחו דוגמאות עלים מקודקוד הצמחים המודבקים בזמנים שונים. רמת הוירוס נבדקה בשיטת ההיבריديזציה של נקודות - Dot-blot hybridization.

בקצרה: 0.1 גרם רקמת עלה קודקודי נכתשה בנוכחות 500 מיקרוליטר 0.4N NaOH, ו - 10 מיקרוליטר מכל דוגמא טופטפו על ממברנת ניילון (Hybond N+), וקובעו לממברנה ע"י יבוש בתנור. פלסמיד המכיל DNA של הוירוס שימש כטמפלייט להכנת גלאי (ריבופרוב) רדיואקטיבי לפי הרצף הויראלי, כך שהגלאי יקשר לרצפי ה - DNA הויראלי. הממברנה המכילה דוגמאות מהעלים הוגבה עם הגלאי הרדיואקטיבי, ונשטפה. הממברנה הרדיואקטיבית נחשפה למכשיר פוספואימג'ר, אשר מודד את רמת הפליטה הרדיואקטיבית מהנקודות השונות על הממברנה. וכך ניתן לכמת את רמת הוירוס בכל דוגמא ודוגמא. התוצאות מתקבלות ב - PSL (Photostimulated luminescence) פר יחידת שטח נמדד. ע"י עקום כיול בצורת כמויות מדודות מראש של DNA ויראלי אשר מטופטף אף הוא על גבי הממברנה, ניתן לקבל את כמות ה - DNA הויראלי בכל דוגמא.

זמן לאחר הדבקה:	28 יום	42 יום
	PSL/(mm)2	
קו מודבק:		
MP-1	175	198
16A	240	296

מבחינה סטטיסטית (T-test), ההבדל בין שני הקוים לא היה מובהק, ב - 28 יום P=0.3, ואילו אחרי 42 יום P=0.2. היינו, לא היה הבדל מובהק מבחינה סטטיסטית בכמות הוירוס אשר נמצאה בצמח מודבק מותמר ולא מותמר. למרות שההבדל לא היה מובהק, יש לציין שרמת הוירוס היתה גבוהה יותר בצמחים המותמרים, בניגוד לצפי. מן הראוי לחזור על הניסוי עם מספר קוים מותמרים, ועם מספר צמחים גבוה יותר, כדי לבדוק האם זו תופעה מובהקת.

3. **תנועה:** בניסויים הקדמיים, אשר בוצעו בשיתוף פעולה עם פרופ' ברוך אפל מאוניברסיטת תל-אביב, בדקנו את השפעת חלבון התנועה המוטנט על חלבון תנועה ויראלי פעיל. חלבון תנועה פעיל של TMV עבר ביטוי זמני

(Transient expression) בצמחי בנטמיאנה ע"י ירי באקדח חלקיקים. חלבון התנועה עבר איחוי עם חלבון פלואורסנטי, GFP, וכך ניתן לעקוב אחר מיקום חלבון התנועה בצמח. חלבון התנועה הפעיל בוטא בצמחי בנטמיאנה המבטאים את חלבון התנועה המוטנטי, קו 105. מיקום ותנועת חלבון התנועה נבדקו בשלוש נקודות זמן לאחר הירי: 6, 24, ו48- שעות לאחר הירי. 6 שעות לאחר הירי כבר ניתן לזהות את הפלורסנציה של GFP המאוחה עם חלבון התנועה. בזמן זה, לאחר 6 שעות, לא היה הבדל בביטוי בין צמחים מותמרים ללא מותמרים. אולם לאחר 24 שעות, ובצורה בולטת יותר לאחר 48 שעות, נע חלבון התנועה מתא לתא בצמח רגיל, אולם בצמח המותמר היה עיכוב ניכר בתנועת החלבון מתא לתא.

מסקנות-

נושא עבודה זו היה התמרת צמחי עגבניה בחלבון תנועה לא פעיל של וירוס המוזאיקה של הטבק, לקבלת צמחים מותמרים בעלי עמידות מולטי-ויראלית. השלבים הראשונים של העבודה בוצעו בהצלחה, החלבון שובט לתוך וקטור בינארי ושימש להתמרת צמחי עגבניה מהזן MP-1.

לצערינו, עקב קוצר הזמן הצמחים המותמרים נבדקו לעמידות רק עם וירוס צהבון האמיר. נמצא שהצמח המותמר לא עיכב את התפתחות וחומרת הסימפטומים. יתרה מזאת, כאשר נבדקה רמת הוירוס בצמח המודבק, נמצא שיש יותר וירוס בצמח המותמר, אולם התוצאה היתה לא מובהקת מבחינה סטטיסטית.

צמחי בנטמיאנה מותמרים, אשר הוכנו במסגרת עבודה זו, שמשו לבדיקת מנגנון העיכוב. בניסויים ראשוניים נמצא שאכן ביטוי החלבון המוטנטי גורם לעיכוב תנועתו של חלבון תנועה ויראלי פעיל.

רשימת סיפרות

1. Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W.J. and Beachy, R.N. 1993. A Dysfunctional Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus That Partially Modifies The Plasmodesmata and Limits Virus Spread in Transgenic Plants. The Plant J. 4; 959-970.
2. Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J.A., Dodds J.A. and Beachy, R.N. 1995. A Defective Movement Protein Of Tmv In Transgenic Plants Confers Resistance To Multiple Viruses Whereas The Functional Analog Increases Susceptability. Virology 206: 307-313.
3. Pilowsky, M., and Cohen, S. 1990. Tolerance to tomato yellow leaf curl virus derived from Lycopersicon peruvianum. Plant Dis. 74:248-250.
4. Barg, R., Pilowsky, M., Shabtai, S., Carmi, N., Szechtman, A.D., Dedicova, B., and Salts, Y. 1997. The TYLCV-tolerant tomato line MP-1 is charecterized by superior transformation competence. J. Exp. Bot. 48:1919-1923.
5. McCormick, S. 1991. Transformation of tomato with Agrobacterium tumefaciens. Plant Tissue Cult. Manual, B6:1-9, Kluwer Ac. Publishers.
6. Williamson, V.M., Ho, J.Y., Wu, F.F., Miller, N., and Kaloshian, I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. TAG, 87:757-763.

סיכום עם שאלות מנחות לדוחות מחקר

1. מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

הקניית עמידות למספר וירוסים חשובים על ידי התמרה עם חלבון תנועה פגום של וירוס המוזאיקה של הטבק. מטרה זו תושג בשני שלבים:

1. ביטוי הגן המקודד לחלבון תנועה פגום של TMV בצמחי עגבניה מותמרים.
2. איפיון הצמחים המותמרים ובדיקת רמת העמידות נגד וירוסי העגבניה המרכזיים.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

1. הגן המקודד לחלבון התנועה המוטנטי שובט לוקטור בינארי.
2. צמחי עגבניה עברו התמרה עם הוקטור המ"ל.
3. צמחי העגבניה המותמרים נבדקו לעמידות לוירוס צהבון האמיר, לא נמצאה עמידות לוירוס.

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

1. מתוצאות ראשוניות נראה שחלבון התנועה הפגום של TMV אינו מעכב את וירוס צהבון האמיר.
2. מתוצאות ראשוניות נמצא שהחלבון המוטנטי מעכב תנועת חלבון תנועה פעיל של TMV.

4. הבעיות שנותרו לפיתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה, התייחסות המשך המחקר לגביהן.

1. יש לסיים את איפיון הצמחים המוטנטים.
2. יש לבדוק עמידות נגד וירוסי עגבניה אחרים בנוסף לצהבון, ולסיים את בדיקת העמידות לצהבון.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח.

לא.