

869

2004-2006

תקופת המחקר:

136-0461-06

קוד מחקר:

Subject: DEVELOPMENT OF ROOTSTOCKS RESISTANT TO ZYMV AS AN INNOVATIVE SYSTEM FOR IMPROVEMENT OF CUCURBITS.

Principal investigator: AMIT GAL-ON

Cooperative investigator: MENAHEM EDELSTEIN, VICTOR GABA, AMIT GAL-ON, SIMA ZINGER

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

שם המחקר: פיתוח ושפור כנה לדלועים עמידה ל-ZYMV - כדרך חדשנית להחדרת תכונות לדלועים.

חוקר ראשי: עמית גלאון

חוקרים שותפים: מנחם אדלשטיין, ויקטור גאבה, עמית גלאון, סימה זינגר

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

תקציר

הצגת הבעיה: וירוס המוזאיקה הצהובה של הקישוא ZYMV, גורם לפחיתה ניכרת ביבולי דלועיים בכל אזורי הארץ. לוירוס זה לא נמצאו מקורות עמידות גנטיים יציבים באבטיחים. בשנים האחרונות הרכבה של אבטיחים על כנות חסונות ועמידות למחלות קרקע ורמת מליחות יחסית גבוהה היא טכנולוגיה מסחרית בארץ ובעולם. מספר שתילי האבטיח המורכבים בארץ מוערך ביותר משלוש מיליון, כ-70% משטח אבטיחי המאכל. הכנה הנפוצה בהרכבות דלועיים היא של דלעת *Cucurbita X Cucurbita maxima*. הבסיס למחקר בנוי על יצירת כנה טרנסגני המבטא מקטע של dsRNA לוירוס המטרה ZYMV, כאשר ביטוי ה-dsRNA בצמח משרה עמידות בדרך של השתקה לרוכב.

מטרות המחקר לבחון השרית עמידות לוירוס ע"י ביטוי חולף של dsRNA באמצעות Agro-infiltration של תבנית ההשתקה. ולהמשיך בפיתוח שיטת טרנספורמציה יעילה לדלעת עם גן המשרה השתקה לוירוס ZYMV.

מהלך ושיטות עבודה: בשיטות של ביולוגיה מולקולארית נעשה שיבוט של גן ההלפר HC-Pro של הוירוס ZYMV הגן הרפליקז של PVY ונבנתה תבנית גנית במבנה של inverted repeat ייחודית להשריית השתקה. בשיטות של אגרו-אינפילטרציה נבנתה תבנית ההשתקה בצמח המודל *Nicotiana Benthiana*. נעשו מספר רב של ניסויי טרנספורמציה בשיטה הקלאסית של הדבקה עם אגרובקטריום של תת פסיג ונבנתה טרנספורמציה ברמת הצמח השלם בשיטה של Flamingo-bill.

תוצאות עיקריות: נבנו שתי תבניות ההשתקה האחת עם הגן HC-Pro של הוירוס ZYMV והשנייה עם גן הרפליקאז של PVY. תבנית ההשתקה של ZYMV הוכחה כפעילה בדרך של אגרו-אינפילטרציה ביכולתה להשתיק את פעילותו של גן ה-HC-Pro כ-suppressor. מאוסף זני הדלעת הקיים בנווה יער נסרקו 9 גנוטיפים שונים לבחינת כושר רגנרציה. נבחרו שני גנוטיפים בעלי רגנרציה טובה לניסויי טרנספורמציה. נעשו מספר רב של ניסויי טרנספורמציה בשיטה הקלאסית של הדבקה עם אגרובקטריום של תת פסיג. לא הצלחנו לקבל טרנספורמציה בשיטה זו אם הגנוטיפים השונים. בהמשך נבנתה טרנספורמציה ברמת הצמח השלם בשיטה של Flamingo-bill.

bill. גם בשיטה זו לא הצלחנו להגיעה לצמח טרנסגני המבטא את תבנית ההשתקה. במקביל למחקר בדלעת ניסינו לבדוק את מודל העמידות המושרת מכנה לרוכב בצמחי טבק כנגד הווירוס PVY. יצרנו צמחי טבק עמידים immune לוירוס, ובמבחני הרכבה לא התקבלה השריה של עמידות מכנה טרנסגנית עמידה לרוכב רגיש. היות שלא הצלחנו לזהות siRNA בצמחי הטבק אנו מניחים שהכמות המצטברת של ה-siRNA לא הייתה מספקת למעבר מכנה לרוכב להשתקת הווירוס ברוכב.

מסקנות והמלצות: בשל בעיות טכנולוגיות של טרנספורמציה של דלעת לא הצלחנו לבחון את המטרה העיקרית של המחקר בדלועיים של הקנית עמידות מושרית ל-ZYMV. הצלחנו לאפיין רגנרציה של קווי דלעת איכותיים. יש להשקיעה מאמץ נוסף בפיתוח שיטות חדשות של טרנספורמציה של דלעות. ויש לבחון תבניות גניות שיבטאו כמות גדולה של siRNA בשביל להוכיח את המודל.

פיתוח כנה לדלועים עמידה לוירוס ZYMV כדרך חדשנית להחדרת תכונות לדלועים

Development of rootstocks resistance to ZYMV as new system for
improvement of cucurbits

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

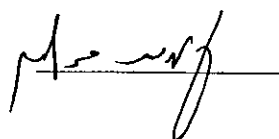
עמית גל-און, ויקטור גאבה, וסימה זינגר - מחלקה לוירולוגיה, מכון להגנת הצומח מינהל המחקר החקלאי מכון
וולקני ת.ד-6 בית דגן 50-250, דאר אלקטרוני amitag@agri.gov.il
מנחם אדלשטיין, מחלקה לירקות נווה יער, מינהל המחקר החקלאי.

Amit Gal-On, Sima Singer and Victor Gaba: Institute of plant protection, Dep. of Virology

P.O.B 6 A.R.O 50-250 E-mail amitag@agri.gov.il

Menahem Edelstein Department of Vegetable Crops Newe Ya'ar Research Center

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

חתימת החוקר 

פיתוח ושיפור כנה לדלועים עמידה ל-ZYMV כדרך חדשנית להחדרת תכונות לדלועים

תקציר:

הצגת הבעיה: וירוס המוזאיקה הצהובה של הקישוא ZYMV, גורם לפחיתה ניכרת ביבולי דלועיים בכל אזורי הארץ. לוירוס זה לא נמצאו מקורות עמידות גנטיים יציבים באבטיחים. בשנים האחרונות הרכבה של אבטיחים על כנות חסונות ועמידות למחלות קרקע ורמת מליחות יחסית גבוהה היא טכנולוגיה מסחרית בארץ ובעולם. מספר שתילי האבטיח המורכבים בארץ מוערך ביותר משלוש מיליון, כ-70% משטח אבטיחי המאכל. הכנה הנפוצה בהרכבות דלועיים היא של דלעת *Cucurbita X Cucurbita maxima*. הבסיס למחקר בנוי על יצירת כנה טרנסגני המבטא מקטע של dsRNA לוירוס המטרה ZYMV, כאשר ביטוי ה-dsRNA בצמח משרה עמידות בדרך של השתקה לרוכב.

מטרות המחקר לבחון השרית עמידות לוירוס ע"י ביטוי חולף של dsRNA באמצעות Agro-infiltration של תבנית ההשתקה. ולהמשיך בפיתוח שיטת טרנספורמציה יעילה לדלעת עם גן המשרה השתקה לוירוס ZYMV. **מהלך ושיטות עבודה:** בשיטות של ביולוגיה מולקולארית נעשה שיבוט של גן ההלפר HC-Pro של הוירוס ZYMV הגן הרפליקז של PVY ונבנתה תבנית גנית במבנה של inverted repeat ייחודית להשריית השתקה. בשיטות של אגרו-אינפילטרציה נבחנה תבנית ההשתקה בצמח המודל *Nicotiana Benthiana*. נעשו מספר רב של ניסויי טרנספורמציה בשיטה הקלאסית של הדבקה עם אגרובקטריום של תת פסיג ונבחנה טרנספורמציה ברמת הצמח השלם בשיטה של Flamingo-bill.

תוצאות עיקריות: נבנו שתי תבניות ההשתקה האחת עם הגן HC-Pro של הוירוס ZYMV והשנייה עם גן הרפליקז של PVY. תבנית ההשתקה של ZYMV הוכחה כפעילה בדרך של אגרו-אינפילטרציה ביכולתה להשתיק את פעילותו של גן ה-HC-Pro כ-suppressor. מאוסף זני הדלעת הקיים בנווה יער נסרקו 9 גנוטיפים שונים לבחינת כושר רגנרציה. נבחרו שני גנוטיפים בעלי רגנרציה טובה לניסויי טרנספורמציה. נעשו מספר רב של ניסויי טרנספורמציה בשיטה הקלאסית של הדבקה עם אגרובקטריום של תת פסיג. לא הצלחנו לקבל טרנספורמציה בשיטה זו אם הגנוטיפים השונים. בהמשך נבחנה טרנספורמציה ברמת הצמח השלם בשיטה של Flamingo-bill. גם בשיטה זו לא הצלחנו להגיעה לצמח טרנסגני המבטא את תבנית ההשתקה. במקביל למחקר בדלעת ניסינו לבדוק את מודל העמידות המושרת מכנה לרוכב בצמחי טבק כנגד הוירוס PVY. יצרנו צמחי טבק עמידים לוירוס, ובמבחני הרכבה לא התקבלה השריה של עמידות מכנה טרנסגנית עמידה לרוכב רגיש. היות שלא הצלחנו לזהות siRNA בצמחי הטבק אנו מניחים שהכמות המצטברת של ה-siRNA לא הייתה מספקת למעבר מכנה לרוכב להשתקת הוירוס ברוכב.

מסקנות והמלצות: בשל בעיות טכנולוגיות של טרנספורמציה של דלעת לא הצלחנו לבחון את המטרה העיקרית של המחקר בדלועיים של הקנית עמידות מושרית ל-ZYMV. הצלחנו לאפיין רגנרציה של קווי דלעת איכותיים. יש להשקיע מאמץ נוסף בפיתוח שיטות חדשות של טרנספורמציה של דלעות. יש לבחון תבניות גניות שיבטאו כמות גדולה של siRNA בשביל להוכיח את המודל.

ב. מבוא רקע מדעי ומטרות המחקר לתקופת הדו"ח

מחלות ויראליות בגידולי דלועיים גורמות לנזקים כבדים, ובמקרים רבים הינן גורם המסכן את הענף כולו. מבין הוירוסים השונים, וירוס המוזאיקה הצהובה של הקישוא - Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) הינו ההרסני ביותר וגורם לאפידמיות קשות באבטיח, מלון וקישוא, בארץ וברחבי העולם. מניעת התפשטותו של הוירוס ZYMV היא מוגבלת כיוון שהופעתו אינה ניתנת לחיזוי וטיפול מניעה שונים יעילותם מוגבלת והם מייקרים מאד את עלויות הגידול. כיום נעשים עשרות ניסויי שדה בעיקר בארה"ב בהם נבחנים דלועיים טרנסגניים לעמידות לוירוסים שונים כאשר עמידות זו מוגדרת כ-pathogen derived resistance עיקר הבעייתיות של מסחור מוצרים אלו מקורו בגישה השלילית של הציבור ליישום ומסחור הטכנולוגיה הטרנסגנית. המחקר הנוכחי מציע דרך ביוטכנולוגית חדישה של השרית עמידות לוירוסים מכנה טרנסגנית לרוכב שאינו טרנסגני. בדרך זו יהיה ניתן להשתמש בכנה אוניברסלית עמידה למספר וירוסים ובאמצעותה להשרות עמידות בזנים שונים שיורכבו על גביה. גישה זו עשויה להפיג את התנגדות הציבור לשימוש בתוצרת חקלאית מהונדסת ולמזער את הסיכון הפוטנציאלי לסביבה בהעברה בלתי מבוקרת של גנים לעמידות לפונדקאים אחרים. חשוב לציין שבטכנולוגיה זו המוצר העתידי המשווק למאכל אינו מהונדס ולכן לא צפויים קשיים בהליכי הרישוי ובשיווק התוצרת החקלאית.

א. מטרות המחקר: 1. לבנות תבנית גנית בפלסמיד בינארי המיועדת להשרות השתקה. 2. לבחון השרית עמידות לוירוס ע"י ביטוי חולף של dsRNA באמצעות אגרובקטריום. 3. לפתח שיטת טרנספורמציה יעילה לדלעת, 4. סריקה של קווי כנה עמידים ל-ZYMV ומעקב אחר ביטוי של RNA קצר (21-25nt) בקווים אלו.

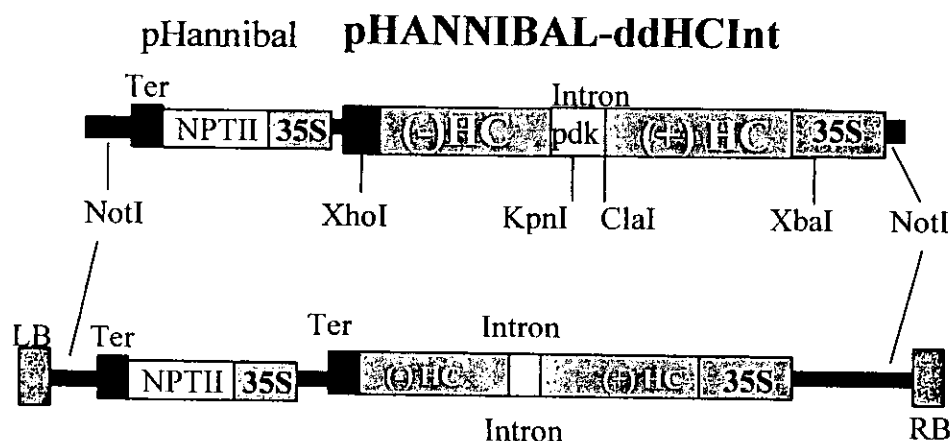
ג. פרוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

1. בניית תבנית גנית בפלסמיד בינארי המיועדת להשרות השתקה בדלועיים.

נבנו שתי תבניות גניות של השתקה, האחת כנגד הוירוס ZYMV המכילה מקטע (600bp) של הגן ה-HC-Pro והשנייה כנגד הוירוס PVY המכילה מקטע של הרפליקאז (600bp Nib). תבנית גנית משרת השתקה שנבנתה בפלסמיד הבינארי pCambia בשנה א' הייתה לא יעילה בטרנספורמציה של צמחי בוחן בנטמיאנה וצמחי מטרה דלעת. לא ברור לנו מדוע הטרנספורמציה של תבנית גנית זו הייתה לא יעילה. משום כך, הוחלט להשתמש באותם מקטעים של הגן ה-HC-Pro אשר שובט בשתי אוריינטציות לפלסמיד pHANNIBAL כאשר בין הקטעים הויראליים שובט רצף של אינטרון Pdk. בשלב שני הועבר המקטע באמצעות חיתוך באנזים *NotI* לפלסמיד בינארי אחר pART27. תבנית גנית זו pART-Hannibal-ddHC בנויה משני רצפים זהים המקודדים לגן ה-HC-Pro המשובטים באוריינטציה הפוכה, כאשר הם מבוטאים תחת פרומוטר אחד 35S (ראה איור). בדרך זו נוצר תעתיק אחד של RNA שלאחר חיתוך האינטרון מתוכו בתהליך של ספליסינג בגרעין נוצרים שני קטעי RNA בפולאריות הפוכה שעוברים איחוי בציטופלסמה ל-dsRNA. הפלסמיד הבינארי עבר חיתוכים מתאימים בכדי לאפיין את הסדר הנכון של המקטעים, כמו כן נקודות החיבור של המקטעים השונים רוצפו והוכחו כמתאימות לרצף הצפוי. תבנית גנית דומה נבנתה עם גן הרפליקאז של PVY.

2. ביטוי חולף של תבנית הגנית pART-Hannibal-ddHC .

בכדי לבחון האם תבנית זו פעילה בנינו שלוש מערכות של ביטוי חולף -transient בפלסמיד בינארי שהועברו לחידקי אגרובקטריום: א. תבנית גנית של ביוטי GFP בפלסמיד בינארי pBIN19 ב. תבנית גנית של ביטוי הגן HC-Pro (suppressor) בפלסמיד בינארי pBIN19. ג. תבנית הגנית החדשה לביטוי המשתיק של פעולתו של ה-pART-Hannibal-ddHC HC-Pro suppressor. כאשר ביטנו את הגן המדועד GFP בעלי בנטמיאנה באמצעות אגרו-אינפילטרציה, נצפתה זהירה 48 שעות לאחר ההזרקה. זהירה זו מגיעה לשיא אחרי יומיים שלושה, שדועכת כעבור ארבע ימים, כתוצאה מהשתקת ה-ע"י מערכת ה-PTGS המושרת כתוצאה מביטוי גבוהה של תעתיק המקטע הטרנסגני. לעומת זאת כאשר ביצענו פעולה זו ביחד עם הגן HC-Pro זהירה ה-GFP נמשכה יותר משבוע, מה שמעיד שהסופרסור של מערכת ההשתקה (HC-Pro) מנע את השתקת ה-mRNA של הגן המדועד GFP. אנחנו רצינו לבחון את פעולתה של התבנית הגנית pART-Hannibal-ddHC כמשתיקה את פעילותו של suppressor. לכן ביצענו אגרו-אינפילטרציה עם שלושת התבניות הנ"ל בו זמנית. ואכן ראינו שהתבנית החדשה שבנינו מבטלת את פעילות הסופרסור, כך שהזהירה נמשכה כיומים בדומה לזהירה שהתקבלה בהזרקה של תבנית הגנית של GFP. מכאן אנו למדים שהתבנית החדשה pART-Hannibal-ddHC היא פעילה ולכן צפוי שהיא תשתיק את הוירוס ZYMV המכיל את הגן HC-Pro. לאחר שהוכחנו את פעילותה של התבנית pART-Hannibal-ddHC התחלנו את ניסויי הטרנספורמציה.



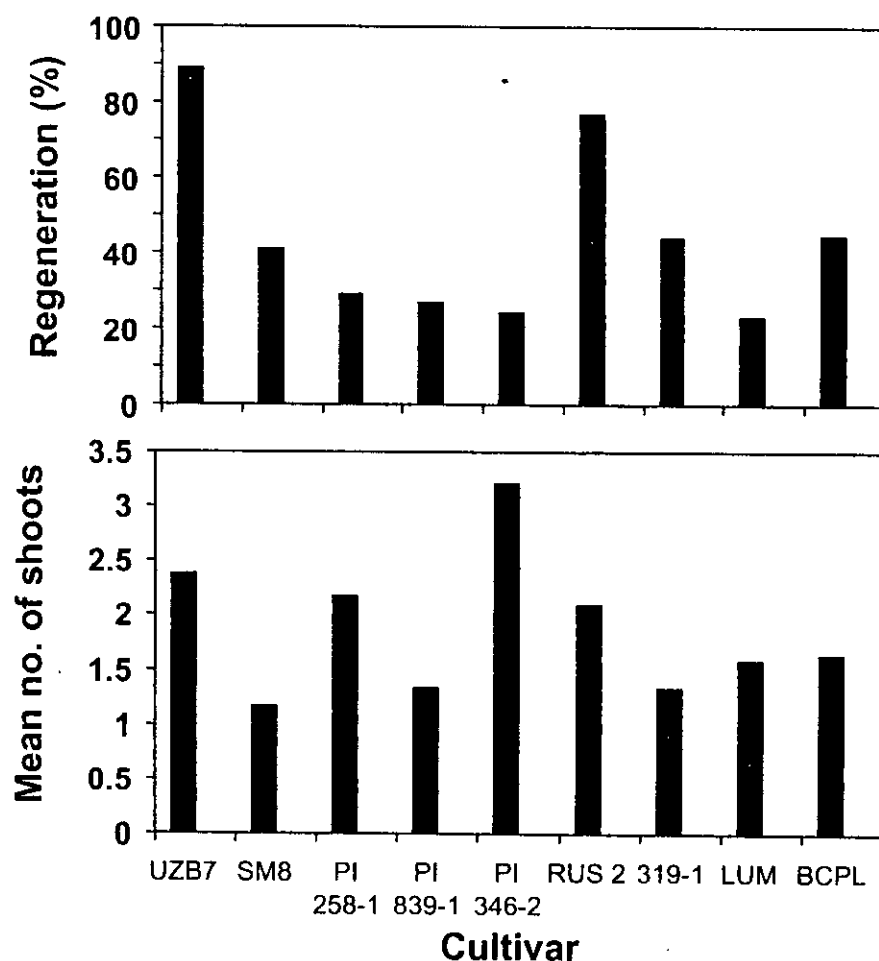
Binary vector pART

5. המשך פיתוח פרוטוקול יעיל טרנספורמציה של כנות דלעת:

בשנה א' אפיינו מספר קווי דלעת בהם קימת רגנרציה יעילה של צמחי דלעת שהתפתחו לצמחונים. באיור 2. ניתן לראות את רמה השוואתית של רגנרציה בגנוטיפים שונים של דלעת. חלק מהגנוטיפים נבחרו ע"י מנחם אדלשטיין

כמתאימים להרכבת של אבטיחים. נבחנו הפרמטרים של מספר הצמחונים לתת פסיג ואחוז הרגנרציה. לדוגמא שגנוטיפים UZB7 ו RUS2 אופיינה רמת רגנרציה גבוהה, ובגנוטיפים UZB7 ו-PI-346-2 התקבלה רגנרציה של יותר משני צמחונים לתת פסיג. ניסויי טרנספורמציה נבחנו במספר גנוטיפים כאשר מאמץ רב הושקע עם הגנוטיפ UZB7 שאופיין כטוב מכולם ברגנרציה.

איור 2. יעילות רגנרציה של כנות דלעת נבחרות.

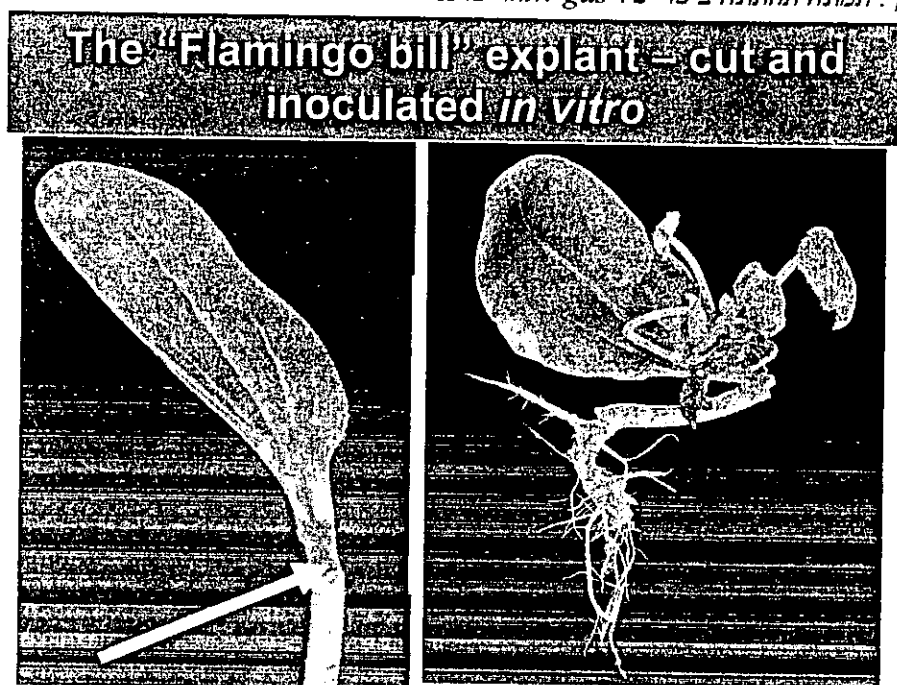


בניסויי טרנספורמציה עם אגרובקטריום שערכנו לא הצלחנו לקבל צמחונים טרנסגניים. בניסויים אלו נבחנו פרמטרים שונים, כמו טכניקות שונות של הדבקה עם אגרובקטריום, מועדי הדבקה, ריכוזי הדבקה שונים עם אגרובקטריום, ותנאים שונים לעורר את האלימות של חיידקי האגרובקטריום. עיקר הבעיה בטרנספורמציה מחוסר נובעת מכך שאזורי הרגנרציה הם אינם יעילים בטרנספורמציה.

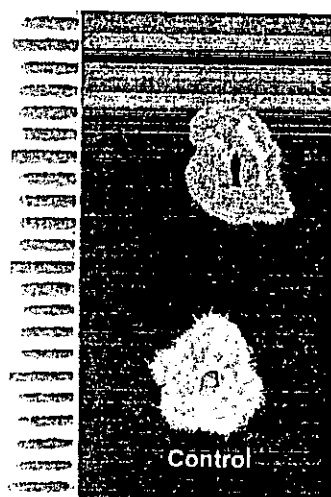
לאור התוצאות השליליות של הטרנספורמציה החלטנו לבחון מערכת חדשה של טרנספורמציה של הצמח השלם בתנאים סטריליים של תרבית. השיטה תוארה בעבר בהצלחה בטרנספורמציה של עגבניות וקרויה Flamingo bill. בשיטה זו חותכים חלק מהצמח מדביקים עם אגרובקטריום בנקודת הפצע כאשר התמינון של צמחונים חדשים מתפתחת בנקודת הפציעה. בחיתוך של אזור הפסיגים והדבקה עם אגרובקטריום התקבלו מספר צמחים טרנספורמנטים כימריים שמעידים שרק חלק מהצמח הוא טרנסגני. נעשה מעקב אחר התאים המבטאים את

הגן המדווח *gus* היות שרק תאים ספציפיים בגבעול עשויים לעבור דיפרנציאציה לתאים עובריים (ראה איור 3). השיטה מחיבת מיומנות מאד גבוהה ולמרות שזיהינו מספר צמחים המבטאים את הגן-*gus* עדיין לא הצלחנו לבודד צמחים מתאימים בהם ביטוי ה-*gus* ימצא ברקמות שמתמיינות לעברי המין. העמדנו מספר רב של ניסויים לקבל צמחונים טרנסגניים כאשר הטרנספורמציה בשיטת ה-*Flamingo bill* נעשתה עם שתי תבניות גניות האחת עם הגן המדווח *gus* בכדי לעקוב אחר אזורים שעברו טרנספורמציה והשנייה מכילה את מבנה המטרה להשתקת הוירוס *pART-Hannibal-ddHC*. אזור ההדבקה עם אגרובקטריום מסומן בחץ. לאחר מחקר מאד אינטנסיבי לא הצלחנו להגיע לצמחים טרנסגניים המכילים את תבנית ההשתקה. הסיבה העיקרית היא יעילות נמוכה של טרנספורמציה וקושי לאתר ולהרכות את התאים שעברו טרנספורמציה ברמת הצמח השלם.

איור 3: טרנספורמציה בשיטת ה-*Flamingo bill* אזור ההדבקה באגרו מסומן בחץ. מימין התפתחות צימחון מאזור החתך. תמונה תחתונה ביטוי של *gus* לאחר טרנספורמציה בשיטה זו.

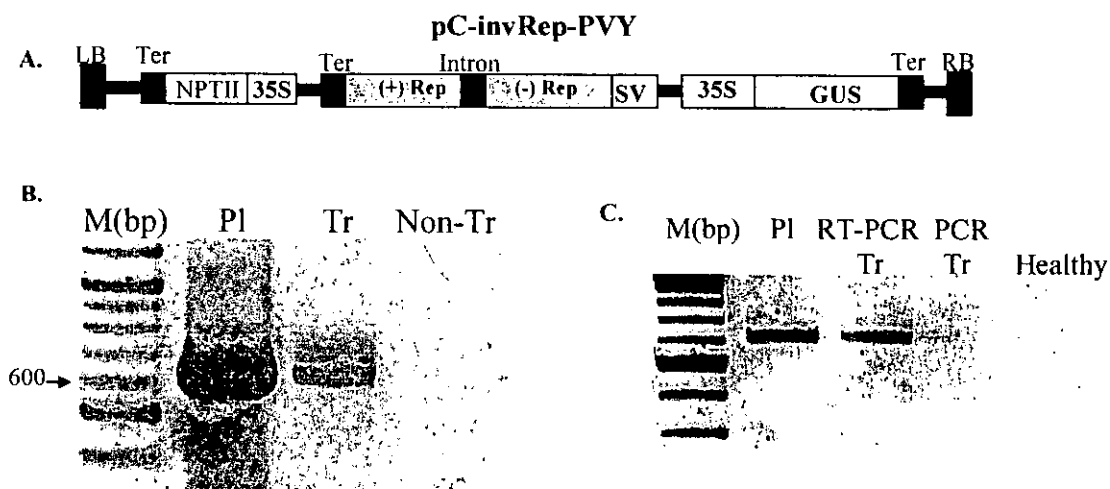


Chimeric shoots 1-5%



בכדי לבחון את השארת המחקר ברמת המודל ביצענו במקביל לניסויים בדלעות ניסויים בטבק. ביצענו טרנספורמציה לטבק עם תבנית ההשתקה המכילה את גן הרפליקאז של הוירוס PVY (איור 4). סרקנו מספר קווים לעמידות ואפינו קוו אחד שהראה עמידות מוחלטת להדבקה מכאנית של הוירוס.

איור 4: A איור סכמתי של תבנית ההשתקה בפלסמיד בינארי. B אנליזה של PCR לזיהוי המקטע הטרנסגני. C ביטוי התעתיק הטרנסגני באנליזה של RT-PCR.



התקבלה עמידות מוחלטת לחמישה גזעים של הוירוס PVY שנגעים תפוז"א (WP,N,H,O,52). שני גזעים המנגעים פלפל ועגבנייה שברו את העמידות לאחר 16 יום מהדבקה (טבלה 2).

טבלה 2: איפיון העמידות ל-PVY של הצמח הטרנסגני.

PVY Strains	ELISA 10dpi		RT-PCR		Symptoms (dpi)		Back inoculation to tobacco (14 dpi)	
	TR	Non-TR	Tr	Non-TR	Tr	Control	Tr	
WP	-	+	-	+	none	6	-	
N	-	+	-	n.t	none	6	-	
H	-	+	-	n.t	none	6	-	
O	-	+	-	n.t	none	6	-	
52	-	+	-	n.t	none	6	-	
Tomato	+	+	n.t	n.t	16	6	+	
Pepper	+	+	n.t	n.t	16	6	+	

כאשר נבחנה ההומולוגיה של כל הגזעים השונים לעומת הטרנסגן, נמצא ששני הקווים ששברו את העמידות הם בעלי הומולוגיה נמוכה יחסית של כ-86% (טבלה 4). עמידות שהיא קורלטיבית לרמת ההומולוגיה של הטרנסגן היא בדרך כלל על בסיס RNA silencing. ואכן, ידוע שעמידות על בסיס של השתקה מבוססת על רמת הומולוגיה גבוהה.

טבלה 3: רמת ההומולוגיה של הגזעים השונים של PVY עם הרצף של המקטע הטרנסגני המשובט.

Strains	% homology with the transgene from the N1b replicase			Resistant/ Susceptible
	Nucleotide	Amino acid		
		Identity	Similarity	
WP	99.5	98	98	R
PVY -N	95.3	97	99	R
PVY - H	94.6	97	99	R
PVY - O	88.6	97	98	R
52	88.1	95	97	R
Tomato	86.3	97	98	S
Pepper	85.9	95	97	S

לאחר אפיון העמידות ניסינו לזהות הצטברות של siRNA של הטרנסגן בצמח הטרנסגני. תבנית ההשתקה שנבנתה יוצרת dsRNA שנחתך ע"י ה-Dicer למקטעים של 22 בסיסים ובכך להצטברות של מקטעים שונים של siRNA. בניסויים שעשינו לזיהוי הצטברות siRNA לא הצלחנו לזהותו בצמח טרנסגני מודבק בוירוס ושאינו מודבק בוירוס. היות שמערכת זיהוי siRNA בצמח היא טכנולוגיה שכחיה במעבדה ונעשית בהצלחה בצמחים טרנסגניים אחרים, אנו מעריכים שהרמה המצטברת הייתה מתחת לסף הזיהוי של השיטה.

כמו כן, בחנו האם העמידות כנגד PVY בטבק עוברת מכנה לרוכב בצמח מורכב. לצורך זה ערכנו סלקציה לצמחים הומוזיגוטיים עמידים. על צמחים טרנסגניים הומוזיגוטיים הרכבנו טבק שאינו טרנסגני. בהדבקה של הכנה הטרנסגנית בלבד לא היה מעבר של וירוס לרוכב מה שמעיד על עמידות גבוהה. שאינה מאפשרת לוירוס להתרבות ולנוע. בהדבקה של הרוכב בלבד לא התקבלה עמידות של הרוכב כחודש לאחר הרכבה מה שמעיד שהסיגנאל ההשתקה לא עבר מהכנה לרוכב. יתכן שעבר סיגנאל (שלא הצלחנו לזהותו ב-N blot) אבל הוא היה חלש ולא מספיק חזק להשתיק את הוירוס PVY.

ד. מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

עיקר הבעיה הוא בפיתוח מערכת לטרנספורמציה יעילה של דלעת. נעשה מאמץ רב ליצור צמחי דלעת טרנסגניים בשתי שיטות שונות של טרנספורמציה. צוות המחקר לא הצליח לתת מענה לבעיה, יתכן שצריך לחפש טכנולוגיות חדשות לטרנספורמציה כמו דרך אבקה *pollen transformation* או ירי *bombardment*. בגלל חשיבות הנושא והפוטנציאל של כנת דלעת עמידה למחלות ומזיקים חשוב להשקיע מאמץ נוסף בפיתרון הבעיה. ראוי לציין שאין פרסומים בספרות המדעית על הצלחה של טרנספורמציה בדלעות.

ה. פרוט של הפרסומים המדעיים. רשימת פרסומים שנשלחו וישלחו מצורפת.

3. סכום עם שאלות מנחות:

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה. מטרת המחקר העיקרית הייתה לפתח כנת דלעת טרנסגנית עמידה לוירוס ZYMV שתשרה עמידות לרוכב שאינו טרנסגני. מטרה זו לא הושגה בשל בעיות של טרנספורמציה. בשל כך נבחן המודל בטבק עם הוירוס PVY. קיבלנו קוו טרנסגני עמיד לגזעים שונים של הוירוס PVY, אלא שקוו זה לא השרה עמידות לרוכב בשל רמה נמוכה של ביטוי של siRNA.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. נבנתה תבנית גנית עם מבנה של השתקה לטרנספורמציה לשני וירוסים ZYMV ו-PVY. תבנית הגנית נבדקה לפעילות באמצעות אגרו-אינפילטרציה. אופיינה עמידות בטבק לוירוס PVY. נעשה מחקר מקיף של אפיון הרגנרציה של גנוטיפים שונים של דלעות. נבחרו שני גנוטיפים יעילים יחסית בהרגנרציה לניסויי טרנספורמציה. נעשו עשרות ניסויי טרנספורמציה בשתי שיטות שונות, ולא הצלחנו ליצר צמחים טרנסגניים.

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

תוצאות המחקר לא הביאו להוכחת היתכנות של הגנה של רוכב בפני הדבקה ויראלית באמצעות הרכבה על כנה עמידה לוירוס. אנו חושבים שמערכת זו היא אפשרית אלא היא תלויה ברמת הביטוי של ה-siRNA (כנגד הוירוס) הנוצר בצמח. בצמח המודל טבק לא הצלחנו להראות הצלחה בשל רמה מצטברת נמוכה של siRNA. ולכן צריך לסרוק קווים טרנסגניים איכותיים המבטאים רמה גבוהה של siRNA ואיתם להמשיך לניסויי הרכבה.

4. בעיות שונות/או השינויים שחלו במהלך העבודה. עיקר הבעיה הוא בפיתוח מערכת לטרנספורמציה יעילה של דלעת. נעשה מאמץ רב ליצור צמחי דלעת טרנסגניים בשתי שיטות שונות של טרנספורמציה. צוות המחקר לא הצליח לתת מענה לבעיה, יתכן שצריך לחפש טכנולוגיות חדשות לטרנספורמציה כמו דרך אבקה *pollen transformation* או ירי *bombardment*. בגלל חשיבות הנושא והפוטנציאל של כנת דלעת עמידה למחלות ומזיקים חשוב להשקיע מאמץ נוסף בפיתרון הבעיה. ראוי לציין שאין פרסומים בספרות המדעית על הצלחה של טרנספורמציה בדלעות.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח. כן, ראה רשימת פרסומים.

6. פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח.

Publications from this work:

1. Amutha S, Kathiravan K, Singer S, Jashi L, Shomer I, Steinitz B and Gaba V (2007) Seedling recovery from decapitation. Submitted for publication.
2. Kathiravan K, Edelstein M, Cohen R, Berger Y, Yablonsky S, Gal-On A, Steinitz B, and Gaba V. Adventitious shoot production in several *Cucurbita* species in vitro. (In preparation)
3. Gaba V, Amutha S., Kathiravan K., Singer S., Jashi L., Shomer I. and Steinitz B. Recovery from gross apical damage in dicotyledonous seedlings. Society for In Vitro Biology Congress 2006. In Vitro Biology Meeting Abstract Issue, 42: 38A, abstract number P-2016.
4. Gaba V, Amutha S, Kathiravan K, Singer S, Jashi L, Shomer I and Steinitz B. Seedling recovery from decapitation. Poster and abstract at meeting of Israel Society for Plant Biology, Faculty of Agriculture, Hebrew University, Rehovot, 15 February, 2007. Book of abstracts.