

# הגנה צולבת על צמחי נץ חלב בעזרת וירוס מוזאיקה של נץ חלב רקומביננטי

## מוחלש

### Cross protection of *Ornithogalum* plants with a recombinant, attenuated *Ornithogalum* mosaic virus

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף פרחים

ע"י

צחי ארזי	צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי
סתו רן	צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי
אבנר כהן	צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי
עבד גרה	וירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי
גדעון לוריא	ממ"ר גאופיטים, האגף לפרחים, שרות ההדרכה והמקצוע

Tzahi Arazi, Ornamental Horticulture, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: [tarazi@agri.gov.il](mailto:tarazi@agri.gov.il)

Ran Stav, Ornamental Horticulture, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: [stavred15@yahoo.com](mailto:stavred15@yahoo.com)

Avner Cohen, Ornamental Horticulture, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: [vhacohen@volcani.agri.gov.il](mailto:vhacohen@volcani.agri.gov.il)

Abed Gera, Virology, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: [abedgera@volcani.agri.gov.il](mailto:abedgera@volcani.agri.gov.il)

Gideon Luria, Dep. of Floriculture, Extension Service, Ministry of Agriculture, P.O.B. 6, Bet Dagan. E-mail: [giluria@shaham.moag.gov.il](mailto:giluria@shaham.moag.gov.il)

אפריל 2006

ניסן תשס"ו

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.**

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**

**חתימת החוקר**

\*

רשימת פרסומים

## תקציר

נץ חלב דוביום הינו גיאופיט חד-פסיגי אטרקטיבי בשוק הפרחים העולמי, אך כמו מרבית המינים של נץ החלב רגיש מאד לוירוס המוזאיקה של נץ החלב (OrMV). נכון להיום לא ידועה עמידות טבעית לוירוס בנץ החלב. מטרת המחקר הינה להגן על צמחי נץ חלב מפני וירוס ה-OrMV ע"י הדבקה מוקדמת עם OrMV מוחלש שישובט ויהונדס במעבדה. בשנה הראשונה הצלחנו לרצף במלואו את הגנום של ה-OrMV הישראלי. בשנה השנייה היה צורך לחבר את מקטעי הוירוס ששובטו לקלון שלם על מנת לקבל קלון אינפקטיבי של OrMV. למרות רעילותו של הרצף הויראלי המלא המונעת ריבוי ה-cDNA שלו בחיידקים, הצלחנו לשבטו במלואו תחת פרומוטר המאפשר שעתוק במבחנה או שעתוק בצמח. נסיונות הדבקה של צמחי נץ חלב בקלונים המלאים לא צלחו כנראה עקב בעיה בטכניקת ההדבקה בצמחים אלו. בשנה השלישית אנו מקווים לשפר את טכניקת ההדבקה ולהוכיח את אינפקטיביות הקלון שבידנו, ולאחר מכן להחלישו במטרה שישמש להגנה הדדית על צמחי נץ חלב.

## מבוא, הבעיה ומטרות המחקר

נץ חלב (*Ornithogalum*) הינו צמח בצל חד פסיגי שהפך בשנים האחרונות למרכיב חשוב בסל פרחי הבצל והפקעת בשוק העולמי. החל משנת 1993 הוכנס לשוק ע"י מגדלים ישראליים מין חדש של נץ החלב *O. dubium*, בעל צבעי פרח צהובים-כתומים. הפרחים ממין זה שמקורו הבוטני בדרום אפריקה, התקבלו בצורה חיובית ע"י השוק ופדו מחירים גבוהים. בשנים האחרונות חלה ירידה הדרגתית בכמות ובאיכות הפרחים ששווקה. הסיבה המרכזית לכך הינה ניוון חומר הריבוי היקר כתוצאה ממחלת המוזאיקה של נץ החלב לה רגישים ביותר הזנים המסחריים הקיימים של נץ החלב. המחלה הנגרמת על ידי וירוס המוזאיקה של נץ החלב (OrMV) מקבוצת הפוטיווירוסים [20] הגורמת להופעת סימפטומים בצורת כתמים בהירים על העלים, כתמים ירוקים כהים או בהירים על הגבעול ולעיוות וניסוס הפרחים [5, 26]. בסיום הגידול השנתי נותר הוירוס בבצל [4], גורם לניוונו ועקב כך נאלצים המגדלים להחליף את חומר הריבוי כמעט כל שנתיים בגלל הירידה הדרסטית באיכות הפרחים המתפתחים מבצלים נגועים. נכון להיום לא קיים פתרון לבעיה זו וזאת מכיוון שלא ידועה עמידות טבעית לוירוס בנץ החלב וכן ששיטות קונבנציונאליות כדוגמת תרמותרפיה ליצירת חומר ריבוי נקי מוירוסים לא צלחו [22]. בנוסף, יצירת צמחי נץ חלב טרנסגנים עמידים לוירוס הינו תהליך איטי במיוחד ועדיין בעייתי מבחינה מסחרית. וירוס ה-OrMV בודד ואופיין לראשונה בדרום אפריקה [3, 5]. הגזע הישראלי של OrMV זוהה, בודד ונוקה במעבדתנו [26].

אחת האטרנטיבות להקניית עמידות לוירוס שלא ע"י טרנספורמציה הינה הגנה צולבת (cross-protection). הגנה צולבת הינה הגנה מושרית המתפתחת בצמחים כנגד וירוסים כתוצאה מהדבקה מוקדמת של צמח עם וירוס "מגן" מוחלש שמונעת הדבקה נוספת על ידי וירוס "מאתגר" אלים מגזע זהה או קרוב [14, 17]. בישראל, שיטת ההגנה צולבת מאושרת ומיושמת כדי להגן על יבולי דלועיים [25]. בעבר התגלה שניתן להחליש את פוטיווירוס המוזאיקה של הקישוא (ZYMV) על ידי שינוי יחיד במוטיב שמור ביותר בחלבון HC-Pro הויראלי (FRNK->FINK, [7]). הוירוס המוחלש מתרבה בצמח אך לא גורם לנזק משמעותי ליבול [7]. ממצא זה עומד בהתאמה עם ממצאים עדכניים המציעים שמנגנון ה-PTGS

(השתקה לאחר שעתוק) האנטי ויראלי של הצמח מדוכא על ידי החלבון הפוטיויראלי HC-Pro דבר הפוגע בהתפתחותו הנורמאלית ולהופעת סימפטומי מחלה [12, 13, 23]. מכיוון שהוירוס היחיד, עד כה, הגורם לנזק בנץ חלב (OrMV) שייך לקבוצת הפוטיווירוסים [3, 5, 26], סביר להניח שניתן יהיה גם כן להחלישו על ידי החדרת מוטאציות בגן המקודד לחלבון HC-Pro שיפגעו חלקית ביכולת דיכוי מנגנון ההגנה האנטי ויראלי ויגרמו להחלשת הוירוס. לאחר מכן ניתן יהיה להשתמש בוירוס המוחלש כדי להקנות הגנה צולבת מפני וירוס הבר האלים. בשנה הראשונה הצלחנו לשבט ולרצף במלואו את הגנום של ה-OrMV הישראלי. לאור זאת **מטרות המחקר בשנה השניה היו:**

1. שיבוט ה-OrMV במלואו בפלסמיד יחיד.
2. הינדוס הקלון המלא של OrMV תחת בקרה של הפרומוטור T7, על מנת לאפשר הדבקה ב-RNA ויראלי, ותחת הבקרה של הפרומוטור 35S, על מנת לאפשר הדבקה צמחים ב-cDNA ויראלי.
3. בחינת השיטה המיטבית להדבקה צמחי נץ חלב ב-OrMV.
4. בחינת אינפקטיביות הקלונים המלאים בצמחי נץ חלב.

## עיקרי הניסויים

### שיבוט ה-OrMV במלואו בפלסמיד יחיד

על מנת להנדס שבט אינפקטיבי של OrMV, יש להרכיב שבט מלא בפלסמיד המצוי תחת פרומוטור שיאפשר את שיעתוקו ל-רנ"א ויראלי שיתרבה בצמחים. בשנה הראשונה קבענו את רצף ה-OrMV המלא על בסיס מספר שבטים חלקיים של הוירוס באורכים שנעו בין 1000-2200 bp. על מנת לקבל שבט מלא ניסינו בתחילה להגביר את גנום הוירוס השלם מרנ"א ויראלי בעזרת RT-PCR. ניסיונות אלו לא צלחו. לשמחתנו, הצלחנו להגביר את גנום הוירוס השלם בשני חלקים (איור 1):

1. החצי ה-5' של הוירוס - שבט באורך 4440 bp, המכיל אתר *NotI* בקצה ה-5' ו-*MluI* בקצה ה-3'.

2. החצי ה-3' של הוירוס - שבט באורך 5000 bp, המכיל אתר *Apal* בקצה ה-3' ו-*MluI* בקצה ה-5'.

ואולם לאחר ליגציה של שני חלקים הנ"ל לפלסמיד הבינארי pGreen וטרנספורמציה של הפלסמיד לחיידקים מהזן DH5 $\alpha$  וגידולם ב-37 °C למשך לילה, התקבל שבט בעל חסר של כ-2000 bp לעומת גודלו של וירוס הבר (תוצאות לא מוצגות). אנליזת PCR של השבטים החסרים הראו כי האזור החסר הוא האזור המקודד לחלבון P3 ולקצה האמיני של חלבון CI שנמצאו בעבר בוירוסים צמחיים כגורם רעילות בחיידקי *E. coli* [10, 11]. רעילות זו נובעת כנראה מהמצאות פרומוטורים נסתרים על ה-cDNA הויראלי המשופעלים באופן אקראי בחיידק [11]. על מנת לפתור בעיה זו נערכו טרנספורמציות בתנאים שונים של השבט לאחר ליגציה:

1. טרנספורמציה לחיידקי DH5 $\alpha$ , גידול 37 °C למשך 24 שעות.
2. טרנספורמציה לחיידקי DH5 $\alpha$ , גידול 26 °C למשך 48 שעות.
3. טרנספורמציה לחיידקי Ecos9, גידול 37 °C למשך 24 שעות.
4. טרנספורמציה לחיידקי Ecos9, גידול 26 °C למשך 48 שעות.

קלון מלא בגודל צפוי של 9500 bp (pGr-OrMV) התקבל לבסוף רק בתנאים המצוינים בסעיף 4 לעיל (איור 2), כלומר הפלסמיד המכיל את הרצף המלא התקבל לאחר טרנספורמציה לחיידקי Ecos9, שגודלו בטמפ' של 26°C. וידוא של נוכחות ונכונות רצף המחדר נעשה על ידי PCR וריצוף חוזר שהוכיח כי מצוי בידנו השבט המלא של OrMV.

### **שיבוטו ה- OrMV תחת פרומוטור וטרמינטור כדי לאפשר את שיעתוקו במבחנה ובצמח**

בתחילת שנות ה-90, נמצא כי הוספת הפרומוטור 35S של CaMV המקנה ביטוי רציף בצמח במעלה הזרם של הקלון הויראלי הצמחי של BMV [16] ושל הקלון הויראלי הצמחי של PPV [15] משפר בהרבה את יעילותה של הדבקה מכאנית. בנוסף, ניתן להדביק את הצמח בפלסמיד שלם שהינו במצב של דנ"א יציב, ללא צורך בעבודה עם תעתיקי RNA שאינם יציבים. על מנת לשבט את הפרומוטור 35S במעלה הזרם ל-cDNA הויראלי השלם. הדנ"א המקודד ל- 35S הוגבר על ידי PCR מהפלסמיד pCambia-1302 כך שיכלול את אתרי ריסטרקציה *NotI* ו-*SwaI* בקצה ה-5' וה-3' בהתאמה. התוצר המוגבר שובט לפלסמיד pGEM-T easy ונחתך עם אנזימי ההגבלה *SwaI*+*NotI*. במקביל, הפלסמיד pGr-OrMV (איור 2) נחתך ב- *NotI* + *SwaI* המצויים מיד במעלה הזרם לרצף ה-OrMV, ועבר ליגציה ל-35S החתוך. לאחר טרנספורמציה לחיידקי ECOS9, בדיקה של המחדר המצוי ב- pGr-OrMV על ידי PCR ואנזימי הגבלה איששה את הימצאות הרצף המושלם של הוירוס + פרומוטור 35S מיד במעלה הזרם כך שנתקבל השבט pGr-35S-OrMV-B (איור 3).

### **בחינת השיטה המיטבית להדבקת צמחי נץ חלב ב- OrMV**

כיוון שהמטרה העיקרית של המחקר הינה להנדס שבט ויראלי אינפקטיבי מוחלש בפלסמיד כדי שישמש להדבקת צמחי נץ חלב והגנה עליהם, חשוב היה לקבוע איזו שיטה, ממגוון השיטות הקיימות לאילוח צמחים בוירוסים, הינה השיטה היעילה ביותר לאילוח צמחי *O. dubium* ב- OrMV. ערכנו ניסיונות הדבקה בשלוש שיטות: הדבקה מכאנית ואו ירי של כתש מצמח נגוע, והדבקה עם כנימות שהינה הדרך הטיבעית שבה מועבר ה- OrMV. לאחר כל ניסוי הדבקה נבחנו בעין הסימפטומים להדבקה בוירוס: צמחי נץ חלב שהודבקו בוירוס OrMV מראים סימני מחלה קשים הכוללים מוזאיקה והצהבה 20-30 ימים לאחר ההדבקה בנוסף, נבחנה ההדבקה בבדיקת ELISA עם נוגדן ספציפי נגד חלבון המעטפת של OrMV. כמחצית מצמחי *O. dubium* הבריאים שהודבקו מכאנית מצמחי *O. dubium* נגועים, הראו סימפטומים של מוזאיקה על עלים חדשים לאחר שלושה עד ארבעה שבועות. לעומת זאת אף צמח של *O. dubium* לא הודבק לאחר ירי של חלקיקי וירוס. הדבקה של צמחי נץ חלב בריאים בצורה טבעית על ידי כנימות שרכשו את הוירוס מצמחי נץ חלב נגועים הביאה להדבקת כמחצית הצמחים בוירוס OrMV (טבלה 1).

### **בחינת אינפקטיביות הקלוניום pGr-35S-OrMV-B ו-pGr-OrMV בצמחי נץ חלב**

השיטה הישירה לבחינת אינפקטיביות שבט ויראלי הינה יצירת תעתיקי *in vitro* RNA על סמך השבט השלם [1]. על מנת לקבל RNA ויראלי, הוסף פרומוטור T7, במעלה הזרם לקצה 5' של OrMV על ידי PCR על הקלון השלם pG-rOrMV תוך שימוש בתחל המכיל את רצף הפרומוטור. תוצר ה- PCR שהתקבל היווה את התבנית ליצירת תעתיקי RNA ויראלי במבחנה. התעתיקים שהתקבלו הודבקו על

צמחי *O. dubium* הן בהדבקה מכאנית והן בירי של חלקיקי Tungstan מצופים RNA. נוכחות הוירוס בצמחים המודבקים נבחנה על ידי בחינת סימפטומים, חיפוש ויריונים במיקרוסקופ אלקטרוני וזיהוי חלבון המעטפת באמצעות שיטות סרולוגיות ELISA ו-western immunoblotting. סה"כ הודבקו 12 צמחים באופן מכאני ו-12 בירי. אנליזה של הצמחים הראתה שהצמחים לא הודבקו. בשלב הבא בחנו את האינפקטיביות של השבט המלא pGr-35S-OrMV-B שבו גנום הוירוס נמצא תחת בקרת פרומוטר צמחי 35S. גם כאן בצענו נסיונות הדבקה באופן מיכני ובשיטת הירי ללא ואקום של חלקיקי Tungstan מצופים בדנ"א ויראלי. ירי דנ"א נמצא בעבר [9, 10] כמשפר באופן ניכר את יעילות ההדבקה של קלון אינפקטיבי המצוי בפלסמיד לעומת שפשוף מיכני. הצמחים ששימשו בניסיונות ההדבקה היו צמחי *O. dubium* צעירים בעלי עלים ברוחב של כ-2 מ"מ וצמחים מבוגרים יותר, בעלי רוחב עלים של כ-1 ס"מ. הודבקו כ-15 צמחים מכאנית בכ-  $27.2 \mu\text{g}$  של דנ"א פלסמידי לעלה וכן הודבקו כ-86 צמחים בירי, כשליש נורו פעם אחת, כשליש פעמיים, וכשליש משני צידי העלה – בכל ירייה נורה  $0.35 \mu\text{g}$  של דנ"א ממרחק של כ-1 ס"מ. גם במקרה הנ"ל אנליזה של הצמחים הראתה כי לא נתקבלה הדבקה.

## דיון

מטרת מחקר זה הינה להגן על צמחי נץ חלב נגועים מפני וירוס ה-OrMV האלים תוך שימוש בהגנה צולבת על ידי שבט OrMV אינפקטיבי מוחלש שיהונדס במעבדה. בסוף שנת המחקר הראשונה היה בידנו הרצף המלא של גנום ה-OrMV שניקבע על בסיס שבטים חלקיים של הוירוס. לאור זאת היה צורך לשבט את הוירוס השלם לפלסמיד על מנת שניתן יהיה לשעתקו במלואו ולבחון את האינפקטיביות שלו, תכונה הכרחית לוירוס "מגן" שאמור לשמש להדבקת צמחי נץ חלב. בתחילה נתקלנו בבעיות של רעילות הדנ"א הויראלי בחיידקים. עבודות רבות שכללו ניסיונות גידול של פלסמיד המכיל שבט ויראלי מלא בחיידקים, נתקלו בתופעה דומה של רעילות המחדר הויראלי לחיידק [2]. רעילות זאת נגרמת על ידי פרומוטורים נסתרים על הרצף הויראלי, הגורמים לביטוי אקראי של חלבונים טוקסים לחיידק [6]. כתגובה החיידק "זורק" חלק מהשבט, או גורם לשינויים ברצף על מנת שיוכל להתרבות. נסקרו מקרים רבים בנושא והוצעו פתרונות שונים: הכנסת אינטרון לרצף [11, 24], החלפת קו החיידקים *E. Coli* או סוג הפלסמיד, קבלת תעתיקי RNA ישירות מתוצר הליגציה ללא ריבוי בחיידקים [18], חלוקת הקלון לשני סב-וקטורים והדבקת הצמח בתוצר הליגציה של שניהם לקבלת וירוס שלם בצמח [10], RT-PCR מלא על כל הוירוס ותעתיק של האמפליקון ישירות [21]. במקרה שלנו מצאנו כי שימוש בקו החיידקים *Ecos9* שגדלו בטמפ' של  $26^{\circ}\text{C}$  מנע את ביטוי החלבונים הרעילים לחיידק ואיפשר קבלת שבט ויראלי מלא של OrMV, שנמצא דומה מאוד לרצף המקורי (pGr-OrMV). עם זאת, לא נוכל לשלול את העובדה שיתכן ורצף זה מכיל מוטציות נקודתיות שעלולות להשפיע על אינפקטיביות הוירוס. מצב כזה נמצא עבור Potato virus Y (PVY) שרוצף במלואו בשנת 1989 [19], אולם רק בשנת 1997 פורסם כי הצליחו לשבט שבט מלא לפלסמיד, ולהדביק צמחים באמצעותו [10]. הסיבה לקושי שבקבלת שבט מדביק בפלסמיד של PVY היתה המצאות פרומוטורים נסתרים על הרצף הויראלי באזור חלבון CP שגרמו לשינויים ברצף הגנום ולהחסרות של מקטעים מהגנום [6]. לאור פתרון בעיית הרעילות הצלחנו

גם להנדס שבט של הוירוס השלם המצוי תחת בקרת פרומוטר צמחי (pGr-35S-OrMV-B) דבר החיוני בדרך ליצירת שבט אינפקטיבי יעיל.

צמח נץ החלב הינו צמח בשרני בעל קוטיקולה עבה, ולכן צפוי שיהיה קושי בהדבקתו בדנ"א ויראלי לעומת צמחים בעלי עלים רכים יותר. לשם כך ערכנו ניסיונות הדבקה בשיטות שונות כדי לוודא מהי השיטה היעילה ביותר בה ניתן להדביק צמחי *O. dubium*. מתוך השוואה בין שתי שיטות הדבקה מקובלות: מכאנית וירי נמצא כי הדבקה מכאנית היא השיטה היעילה ביותר להדבקת צמחי *O. dubium* לפחות שמדובר בחלקיקי וירוס הבר. על סמך הממצאים הללו בחרנו לבחון את אינפקטיביות השבטים pGr-OrMV ו-pGr-35S-OrMV-B באמצעות הדבקה מכאנית. בנוסף, ערכנו גם ניסיונות הדבקה בשיטת ירי, אשר על פי [8, 10], הצליחה להדביק גם במקרים בהם הדבקה מיכנית נכשלה (Jakab et al., 1997). ואולם נכון לדיווח זה לא קיבלנו הדבקה באף אחד מן השבטים.

ישנן מספר סיבות אפשריות לכך שלא נצפתה הדבקה: (1) ייתכן כי יעילות ההדבקה נמוכה מאוד ולא נצפתה במהלך הניסויים שנערכו עד עתה גם בגלל מבנה העלה הבשרני בעל קוטיקולה העבה של נץ חלב; (2) מכיוון שקצה '5 נקבע על סמך תחל דג'נרטיבי קיימת אפשרות כי באזור זה קיימים חסרים. חסרים כאלו יכולים להשפיע על אינפקטיביות שבט ויראלי (Boyer and Haenni, 1994); (3) עקב הרעילות שנתקלנו בה, ייתכן כי הרצף המשובט אינו הומולוגי ב- 100% לרצף הבר וכולל מוטציות המונעות את אינפקטיביות השבט שבידנו.

על מנת לקבל קלון אינפקטיבי, שניתן יהיה לערוך עליו מוטציות לשם החלשה, ישנם מספר מהלכים להמשך המחקר:

1. ניסיונות הדבקה מסיבים יותר על מנת לשלול את האפשרות שלא נצפתה הדבקה עקב יעילות הדבקה נמוכה במהלך הניסויים שנערכו עד כה. בניסיונות אלו נשתמש בצמחים צעירים שטרם התעבו וגודלו בתרבית ריקמה מה שצפוי להקל את חדירת הקוטיקולה באופן מכני או בירי.
2. מציאת הרצף המלא של הקצה ה-5' הלא מקודד בעזרת תהליך RACE, לשם קבלת הומולוגיה מלאה של כל הרצף הויראלי לשבט המהונדס. השלמת נוקלאוטידים חסרים באזור זה יכולה להוות את הפתרון לחוסר יכולת ההדבקה.
3. החלפת מקטעים לאורך הרצף הויראלי, שיתקבלו על ידי עבודה עם אנזימים בעלי יכולת גבוהה של פולימריזציה ללא טעויות במטרה לתקן מוטציות אם קיימות.

אנו מקווים שנצליח לייצר קלון אינפקטיבי בשנה הקרובה. הצלחה כזו תאפשר לנו להשיג במהירות גם את שאר מטרות המחקר

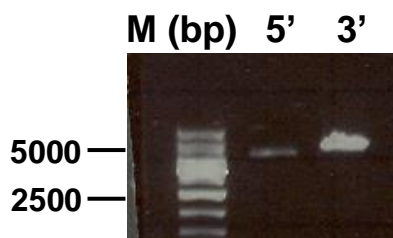
## רשימת ספרות

1. Ahlquist, P. and Janda, M. (1984). cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol Cell Biol* **4**, 2876-82.
2. Boyer, J. C. and Haenni, A. L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **19**, 415-26, 8.
3. Burger, J. T., Brand, R. J. and Rybicki, E. P. (1990). The molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal region of ornithogalum mosaic virus. *Journal of General Virology* **71**, 2527-2534.

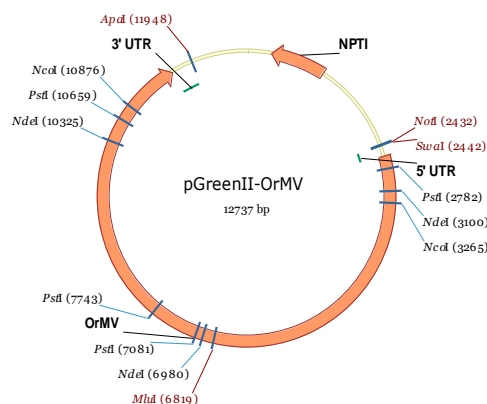
- .4 **Burger, J. T. and Von-Wechmar, M. B.** (1988) .Rapid diagnosis of Ornithogalum and Lachenalia viruses in propagation stock. *Acta Horticulturae*, 31-38.
- .5 **Burger, J. T. and Von-Wechmar, M. B.** (1989). Purification and some properties of South African isolates of Ornithogalum mosaic virus. *Phytopathology* **79**, 385-391.
- .6 **Fakhfakh, H., Vilaine, F., Makni, M. and Robaglia, C.** (1996). Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *J Gen Virol* **77 (Pt 3)**, 519-23.
- .7 **Gal-On, A.** (2000). A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. *Phytopathology* **90**, 467-473.
- .8 **Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D. J. and Gaba, V.** (1997). Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. *J Virol Methods* **64**, 103-10.
- .9 **Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W. J., Raccach, B. and Gaba, V.** (1995). Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *J Gen Virol* **76 (Pt 12)**, 3223-7.
- .10 **Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D. and Malnoe, P.** (1997). Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *J Gen Virol* **78 (Pt 12)**, 3141-5.
- .11 **Johansen, I. E.** (1996). Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in Escherichia coli while biological activity is reestablished after transcription in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12400-5.
- .12 **Kasschau, K. D. and Carrington, J. C.** (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461-70.
- .13 **Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. and Carrington, J. C.** (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev Cell* **4**, 205-17.
- .14 **Lecoq, H., Raccach, B., Jeger, M. J. and Spence, N. J.** (2001). Cross-protection: interactions between strains exploited to control plant virus diseases. In *Biotic interactions in plant pathogen associations*, pp. 177-192; 49 ref. Wallingford; UK: CABI Publishing.
- .15 **Maiss, E., Timpe, U., Briske-Rode, A., Lesemann, D. E. and Casper, R.** (1992). Infectious in vivo transcripts of a plum pox potyvirus full-length cDNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *J Gen Virol* **73 (Pt 3)**, 709-13.
- .16 **Mori, M., Mise, K., Kobayashi, K., Okuno, T. and Furusawa, I.** (1991). Infectivity of plasmids containing brome mosaic virus cDNA linked to the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *J Gen Virol* **72 (Pt 2)**, 243-6.
- .17 **Pennazio, S., Roggero, P. and Conti, M.** (2001). A history of plant virology. Cross protection. *New Microbiol* **24**, 99-114.
- .18 **Rice, C. M., Grakoui, A., Galler, R. and Chambers, T. J.** (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol* **1**, 285-96.
- .19 **Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S. and Casse-Delbart, F.** (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *J Gen Virol* **70 (Pt 4)**, 935-47.
- .20 **Smith, F. F. and Brierley, P.** (1944). Ornithogalum mosaic. *Phytopathology* **34**, 497-503.
- .21 **Tellier, R., Bukh, J., Emerson, S. U. and Purcell, R. H.** (1996). Amplification of the full-length hepatitis A virus genome by long reverse transcription-PCR and transcription of infectious RNA directly from the amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4370-3.
- .22 **Vcelar, B. M., Ferreira, D. I. and Niederwieser, J. G.** (1992). Elimination of ornithogalum mosaic virus in the Ornithogalum cv. Rojel through meristem tip culture and chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**, 51-55.
- .23 **Xie, Z., Kasschau, K. D. and Carrington, J. C.** (2003). Negative Feedback Regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-Guided mRNA Degradation. *Curr Biol* **13**, 784-9.
- .24 **Yang, S. J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. and Dunez, J.** (1998). Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in Escherichia coli and on their infectivity to plants. *Arch Virol* **143**, 2443-51.
- .25 **Yarden, G., Hemo, R., Livne, H., Maoz, E., Lev, E., Lecoq, H. and Raccach, B.** (2000). Cross-protection of Cucurbitaceae from zucchini yellow mosaic potyvirus. *Acta Horticulturae*, 349-356.

26 Zeidan, M., Cohen, J., Watad, A. and Gera, A. (1998). Improved purification and molecular properties of ornithogalum mosaic virus in Israel. *Annals of Applied Biology* **133**, 167-176.

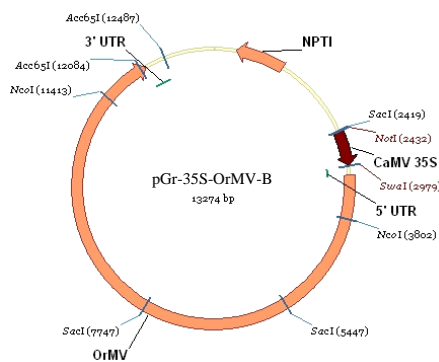
## איורים וטבלאות



איור 1. תוצרי הגברת ה- cDNA של וירוס ה-OrMV. הגודל הצפוי לתוצרים ה-5' וה-3' הינו 4440 ו-5000 בסיסים בהתאמה.



איור 2. הצגה סכמטית של השבט המלא pGr-OrMV. ה- cDNA הויראלי צבוע כתום. אתר הליגציה *MluI* בין שני חלקי הוירוס, אתרי הליגציה לפלסמיד *NotI*, *Apal*, ואתרי החיתוך באנזימי הגבלה, שבהם נעשה שימוש לשם וידוא נכונות הרצף ושלמותו, מצויינים.



איור 3. הצגה סכמטית של השבט המלא pGr-35S-OrMV-B. השבט נוצר על ידי ליגציה של דנ"א המקודד לפרומוטור 35S לפלסמיד pGr-OrMV באתרים *NotI*, *Swal*. מצוינים גם אתרי החיתוך של אנזימי הגבלה בהם נעשה שימוש לשם וידוא נכונות הרצף ושלמותו.

טבלה 1. סיכום תוצאות הדבקת צמחי נץ חלב בוירוס בר.

שטת ההדבקה	מס' צמחים בניסוי	מס' צמחים שהודבקו	אחוזי הדבקה
הדבקה מכאנית	9	5	55%
הדבקה עם כנימות	25	12	48%
ירי	15	0	0