

Subject: CROSS PROTECTION OF ORNITHOGALUM PLANTS WITH A RECOMBINANT, ATTENUATED ORNITHOGALUM MOSAIC VIRUS (OMV)

Principal investigator: TZAHY ARAZI

Cooperative investigator: AVNER COHEN, GIDON LURIE, RAN STAV, ABED GERA

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

שם המחקר: הגנה הדדית על צמחי נץ חלב בעזרת וירוס מוזאיקה של נץ חלב רקומביננטי מוחלש

חוקר ראשי: צחי ארזי

חוקרים שותפים: אבנר כהן, גדעון לוריא, רן סתו, עבד גרה

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

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 (OMV). נכון להיום לא ידועה עמידות טבעית לוירוס בנץ החלב.

מטרת המחקר הינה להגן על צמחי נץ חלב מפני וירוס ה-OMV ע"י הדבקה מוקדמת עם OMV מוחלש שישובט ויהונדס במעבדה.

מהלך העבודה והתוצאות - בשנה הראשונה הצלחנו לרצף במלואו את הגנום של ה-OMV הישראלי. בשנה השנייה היה צורך לחבר את מקטעי הוירוס ששובטו לקלון שלם על מנת לקבל קלון אינפקטיבי של OMV. למרות רעילותו של הרצף הויראלי המלא המונעת ריבוי ה-cDNA שלו בחיידקים, הצלחנו לשבטו במלואו תחת פרומוטר המאפשר שעתוק במבתנה או שעתוק בצמח. נסיונות הדבקה של צמחי נץ חלב בקלונים המלאים לא צלחו כנראה עקב יעילות הדבקה נמוכה, בעיה אוביקטיבית בטכניקות ההדבקה של נץ חלב או מוטאציות בקלון האינפקטיבי שבידנו. בשנה השלישית על מנת לשלול חלקית נוכחות מוטאציות בקלון החלפנו כמחצית מגנום הווירוס בקלונים שבידנו וביצענו ניסויי הדבקה נוספים כולל הדבקת פרוטופלסטים ונץ חלב בתרבית. למרות מאמצנו לא הצלחנו להוכיח כי הקלון המלא שבידנו אינפקטיבי.

לסיכום, הצלחנו לרצף במלואו לראשונה את הגנום של הגזע הישראלי של OMV. אנליזה של הרצף מוכיחה כי ה-OMV משתייך לקבוצת הפוטיווירוסים התוקפים בצלים ושחלבון ה-HC-Pro שלו מכיל מוטיבים שמורים בעלי פוטנציאל להחלשת הוירוס. פענוח הרצף המלא של OMV יקל על לימוד הביולוגיה של פתוגן זה וזיהויו ביתר קלות. למרות רעילותו של הרצף הויראלי המלא המונעת ריבוי ה-cDNA שלו בחיידקים, הצלחנו לשבטו במלואו אך לא הצלחנו לייצר קלון אינפקטיבי שניתן לאחר מכן להחלישו במטרה שישמש להגנה הדדית על צמחי נץ חלב. לאור חוסר יכולתנו לקבל קלון אינפקטיבי לא יכולנו לבחון האם החלשה של OMV על ידי מוטגינה של חלבון ה-HC-Pro שלו תגן על צמחי נץ חלב מהזן הבר האלים ולכן לא השגנו את מטרות המחקר במלואן.

רשימת פרסומים

רינת יסעור, עבד גרה, אבנר כהן, רן סתו, עמית גל-און וצחי ארזי. בדרך להתמודד עם מחלת המוזאיקה של נץ החלב: ריצוף ושיבוט הגזע הישראלי של הוירוס. עולם הפרח דצמבר-ינואר 2007 49-47

הגנה הדדית 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	ויכולוגיה, 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

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

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

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

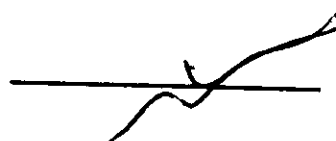
Gideon Luria, Dep. of Floriculture, Extension Service, Ministry of Agriculture, P.O.B. 6, Bet Dagan. E-mail: giluria@shaham.moag.gov.il

אפריל 2007

אדר ב'- תשס"ה

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

 **חתימת החוקר**

רשימת פרסומים

רינת יסעור, עבד גרה, אבנר כהן, רן סתיו, עמית גל-און וצחי ארזי. בדרך להתמודד עם מחלת המוזאיקה של נץ החלב: ריצוף ושיבוט הגזע הישראלי של הוירוס. עולם הפרח דצמבר-ינואר 2007, 46-49.

תקציר

נץ חלב זרביס הינו גיאופיט חד-פסיגי אטרקטיבי בשוק הפרחים העולמי, אך כמו מרבית המינים של נץ החלב רגיש מאד לוירוס המוזאיקה של נץ החלב (OMV). נכון להיום לא ידועה עמידות טבעית לוירוס בנץ החלב. מטרת המחקר הינה להגן על צמחי נץ חלב מפני וירוס ה-OMV ע"י הדבקה מוקדמת עם OMV מוחלש שישבט ויהונדס במעבדה. בשנה הראשונה הצלחנו לרצף במלואו את הגנום של ה-OMV הישראלי. בשנה השנייה היה צורך לחבר את מקטעי הוירוס ששובטו לקלון שלם על מנת לקבל קלון אינפסטיבי של OMV. למרות רעילותו של הרצף הויראלי המלא המונעת ריבוי ה- cDNA שלו בחיידקים, הצלחנו לשבט במלואו תחת פרמטור המאפשר שעתוק במבחנה או שעתוק בצמח. נסיונות הדבקה של צמחי נץ חלב בקלונים המלאים לא צלחו כנראה עקב יעילות הדבקה נמוכה, בעיה אוביקטיבית בטכניקות ההדבקה של נץ חלב או מוטאציות בקלון האינפסטיבי שבידנו. בשנה השלישית על מנת לשלול חלקית נוכחות מוטאציות בקלון שבידנו החלפנו כמחצית מגנום הוירוס בקלונים שבידנו וביצענו ניסויי הדבקה נוספים כולל הדבקת פרטופלסטים ונץ חלב בתרבות. למרות מאמצנו לא הצלחנו להוכיח כי הקלון המלא שבידנו אינפסטיבי. לסיכום, הצלחנו לרצף במלואו לראשונה את הגנום של הגזע הישראלי של OMV. אנליזה של הרצף מוכיחה כי ה-OMV משתייך לקבוצת הפטיווירוסים התוקפים בצלים ושחלבון ה-HC-Pro שלו מכיל מוטיבים שמורים בעלי פוטנציאל להחלשת הוירוס. פענוח הרצף המלא של OMV יקל על לימוד הביולוגיה של פתוגן זה וזיהוי ביתר קלות. למרות רעילותו של הרצף הויראלי המלא המונעת ריבוי ה- cDNA שלו בחיידקים, הצלחנו לשבט במלואו אך לא הצלחנו לייצר קלון אינפסטיבי שניתן לאחר מכן להחלישו במטרה שישמש להגנה הדדית על צמחי נץ חלב. לאור חוסר יכולתנו לקבל קלון אינפסטיבי לא יכולנו לבחון האם החלשה של OMV על ידי מוטגיזזה של חלבון ה- HC-Pro שלו תגן על צמחי נץ חלב מהזן הבר האלים ולכן לא השגנו את כל מטרות המחקר.

מבוא, הבעיה ומטרות המחקר

נץ החלב הינו צמח בצל חד פסיגי ממשפחת היקינטוניים (*Hycinthaceae*), על-משפחת השושניים (*Liliaceae*), ידועים כ- 150 מינים, הנפוצים באירופה, אסיה ודרום אפריקה. המין הנחקר ביותר הינו *Ornithogalum arabicum* (De Hertogh and Le Nard, 1993). החל משנת 1993 הוחדר בהצלחה לשוק הפרחים, על ידי מגדלים ישראליים, המין *Ornithogalum dubium* (*O. dubium*, נץ חלב כתום) או בשמו הנפוץ: Yellow Chink, שמקורו הבוטני בדרום אפריקה. גובהו בטבע 15-30 ס"מ. בתנאי טמפרטורה מתונה של כ-22°C ביום יש לו נטייה להישאר ירוק כל השנה. הוא פורח בתחילת האביב, בחודשים מרץ-מאי. הפריחה בעלת צורת אשכול, ולכל פרח שישה עלי כותרת (איור 1A). פרחיו צהובים כתומים ולעיתים בעלי מרכז כהה. הפריחה תלויה בגודל הבצל, כאשר גודל בצל מינימאלי המאפשר פריחה הינו 4 ופריחה מלאה חלה כאשר הבצל בגודל 6 ויותר. כלומר הבצל נשמר ומשתבח משנה לשנה. הריבוי בארץ נעשה בחצב מבצלים שמקורם בזרעים שהתקבלו מהכלאות של הורים מסומנים.

O. dubium נמכר הן כפרח קטוף והן כעציץ פורח. הפרחים ממין זה התקבלו בצורה חיובית ע"י השוק ופזו 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. המחלה, הנגרמת על ידי וירוס המוזאיקה של נץ החלב (OMV, תמונה 1B) מקבוצת הפטיווירוסים, גורמת להופעת סימפטומים בצורת כתמים בהירים על העלים (תמונה 1C-D), כתמים ירוקים כהים או בהירים על הגבעול ולעיוות ונזק הפרחים (Burger and Von-Wechmar, 1989; Zeidan et al., 1998).

בסיום הגידול השנתי נותר הוירוס בבצל (Burger and Von Wechmar, 1988) וגורם לניוונו. בגלל הירידה הדרסטית באיכות הפרחים המתפתחים מבצלים מנוונים נאלצים המגדלים להחליף את חומר הריבוי כמעט כל שנתיים. נכון להיום לא קיים פתרון לבעיה זו וזאת מכיוון שלא ידועה עמידות טבעית לוירוס בגן החלב (Voeelar, 1992) וכן ששיטות קונבנציונאליות כדוגמת תרמות ריבוי ליצירת חומר ריבוי נקי מוירוסים לא צלחו. אחת האלטרכטיבות להקניית עמידות לוירוס שלא ע"י טרנספרמציה הינה הגנה הדדית (cross-protection). הגנה הדדית 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 (Lecoq et al., 2001; Pennazio et al., 2001). למרות אי הבהירות לגבי המנגנון של ההגנה ההדדית (Urban et al., 1990; Valkonen et al., 2002) ישמה ומיושמת השיטה במספר גידולים (עגבניות, טבק, הדורים, דלועיים, גן, סויה, פפאיה ועוד (et al., 1999; Rezende et al., 1999; Tsipouridis and Karayiannis, 1999; Vuuren et al., 1999; Reddy and Vidhyasekaran, 1990; Matsumoto et al., 1998; Rezende and Pacheco, 1998; Sheen et al., 1998; Powell et al., 1999). בחלקם כדי להגן מפני פוטוירוסים (Lecoq et al., 1991; Wang et al., 1991; Gonsalves, 1998; Yarden et al., 2000). בישראל, שיטת ההגנה הדדית מאושרת ומיושמת כדי להגן על יבולי דלועיים (Yarden et al., 2000). בעבר התגלה במרכז וולקני שניתן להחליש את וירוס המוזאיקה של הקישוא (ZYMV) על ידי שינוי יחיד במוטיב שמור ביותר בחלבון HC-Pro הויראלי (Gal-On, 2000). הוירוס המוחלש מתרבה בצמח אך לא גורם לנזק משמעותי ליבול ולכן מגן ביעילות מפני הוירוס האלים (Gal-On, 2000). ממצא זה הוגש כפטנט כללי להחלשת פוטוירוסים (Gal-On, 1998) ועומד בהתאמה עם ממצאים עדכניים המציעים שפעילות דיכוי מנגנון ההגנה האנטי ויראלי של הצמח הנגוע על ידי החלבון הפוטויראלי HC-Pro גורמת לפגיעה בהתפתחותו הנורמאלית ולהופעת סימפטומי מחלה (Kasschau and Carrington, 1998; Kasschau et al., 2003; Xie et al., 2003). מכיוון שהוירוס היחיד, עד כה, הגורם לנזק בגן חלב (OMV) שייך לקבוצת הפוטוירוסים (Burger and Von-Wechmar, 1989; Burger et al., 1990; Zeidan et al., 1998), סביר להניח שניתן יהיה גם כן להחלישו לאחר שיבוטו על ידי החדרת מוטאציות שיפגעו חלקית ביכולת זיכוי PTGS של חלבון HC-Pro ולאחר מכן להשתמש בוירוס המוחלש כדי להקנות הגנה הדדית מפני וירוס הבר האלים. אנו משערים שצמצום המחלה הויראלית בצמחי נץ החלב תקטין או תמנע את הניוונו הנגרם על ידי הוירוס ואת הצורך להחליף את חומר הריבוי לעתים קרובות, תקטין משמעותית את העלויות למגדלים, תשפר את איכות הפרחים והעציצים ולכן תגדיל את כדאיות הגידול. בנוסף, בניגוד להקניית עמידות על ידי החדרת עמידות טרנסגנית שטובה רק לזן שבו היא הוחדרה, בוירוס המוחלש ניתן יהיה להגן על כל זני נץ החלב הקיימים ללא כל פיתוח נוסף. יש לציין שהוירוס המוחלש אינו משנה את גנום הצמח ולכן אינו מעורר בעיות סביבתיות הקשורות לשימוש בצמחים טרנסגנים, והכי חשוב שהשימוש בשיטת ההגנה ההדדית מקובל בעולם. נכון לתחילת פרויקט זה לא היה ידוע הרצף השלם של וירוס ה-OMV ורצפו רק אזורים קצרים של הקצה ה-3' של הגזע הישראלי (Zeidan et al., 1998) והגזע הדרום אפריקאי (Burger et al., 1990).

לאור זאת מטרת המחקר היו:

1. שיבוט קלון אינפסטיבי של וירוס ה-OMV ואפיונו.
2. החלשת הוירוס הקלונלי בעזרת מוטגניזה של האזור המרכזי בחלבון הויראלי HC-Pro, בדגש על המוטציה (FRNK->FINK), איור 1, (Gal-On, 2000) ואפיון הוירוסים המוטנטים.
3. מבחני הגנה הדדית למוטנטים המוחלשים שנבחרו במעבדה ובחממה והערכת אפקטיביות.

עיקרי הניסויים

ניקוי וירוס ה-OMV והפקת ה-RNA הויראלי

כדי לקבוע את רצף הנוקלאוטידים השלם של וירוס ה-OMV היה צורך בשלב ראשון להפיק את הרנ"א הויראלי המהווה את גנום הוירוס. לשם כך ניקינו את וירוס ה-OMV מצמחי *C. quinoa*, שהודבקו בהדבקה מכאנית בכתש שהופק מצמחי נץ חלב כתום נגועים ב-OMV, על פי השיטה שפותחה במעבדתו של עבד גרה (Zeidan et al., 1998). בקיצור: עלי נץ חלב נגוע ב-OMV רוסקו בבופר הדבקה ליצירת אינוקולום. אינוקולום זה נמרח בעזרת גזה על עלים שאובקו קודם לכן באבקת קרבוונזום. כ-10-14 ימים לאחר הדבקה, עם הופעת סימני מחלה בצורת נגעים מקומיים על העלים (תמונה 2A+B), נאספו כ-30 גרם עלים ונוקה מהם הוירוס כפי שמתואר ב-(Zeidan et al., 1998). דרגת הניקיון של הוירוס נקבעה על ידי הסתכלות במיקרוסקופ אלקטרוני וגם על ידי הרצת דגימה באלקטרופורזה בגיל SDS-PAGE וצביעת חלבונים. ניתן לראות בתמונה 2C שהוירוס שהתקבל נקי מכיוון שחלבון המעטפת שלו מחווה את הפס העיקרי בגיל. ריכוז הוירוס הנקי שהתקבל היה בסביבות 19.5 mg/kg , $A_{260}/A_{280}=1.45$. וירוס זה שימש אותנו לאחר מכן להפקת הרנ"א הויראלי. בקצרה: נפח זהה של וירוס נקי ובופר מיצוי עורבבו עם נפח זהה של פנול. הפאזות הופרדו ע"י סירכוז ב- 20000 g למשך 10 דקות. הפאזה העליונה עורבבה עם נפח זהה של פנול כלורופורם איזואמיל-אלכוהול (25:24:1) והופרדה שוב. ה-RNA הויראלי הושקע מהפאזה העליונה בעזרת סודיום אצטאט ואתאנול ולאחר מכן הורחף במים. איכות הרנ"א נבדקה על ידי הרצה בגיל אגרוז 1% בנוכחות 50% פורמאמיד (איור 3).

שיבוט וריצוף ה-cDNA הויראלי

כדי לפענח את רצף הגנום הויראלי יש צורך לשעתק את הרנ"א הויראלי ל-cDNA ולאחר מכן לרצפו. כפוטיוירוס, הרנ"א של ה-OMV כולל בקצה ה'3' זנב פולי A (Shukla, 1994) ולכן בשלב הראשון ה-cDNA הויראלי סונטז ותוך שימוש בתחל oligo-dT המחובר לרצף ידוע. בעבר נקבע קטע קצר של הקצה ה'3' של הגזע הישראלי של (Zeidan et al., 1998). בהסתמך על רצף זה סונטז תחל משלים (תמונה 3, תחל 11) ששימש יחד עם תחל ה-oligo-dT להגברת הקצה ה'3' של ה-RNA הויראלי על ידי RT-PCR. שאר גנום הוירוס הוגבר על ידי "הליכה" לאורך ה-cDNA בסידורת ראקציות RT-PCR, תוך שימוש כל פעם בתחל משלים מהקצה הידוע ותחל מנוון מאזור במעלה הזרם המשותף לפוטיוירוסים רבים (איור 3 וטבלה 3). בכל פעם תוצר ה-PCR שהוגבר שובט ורוצף. רצף זה שימש לנו לתכנן את הצעד הבא. תוך שימוש בגישה זו הצלחנו ליצור רצף של כשישה שבטים שיחד מייצגים את הגנום השלם של וירוס ה-OMV (איור 3). שבטים אלו אפשרו לנו בפעם הראשונה לקבוע את רצף הגנום השלם של וירוס ה-OMV הישראלי, שהינו באורך כולל של 9503 בסיסים.

שיבוט ה-OMV במלואו בפלסמיד יחיד

תנאי הכרחי ליצירת וירוס OMV מוחלש הוא הינדוסו כשבט אינפקטיבי שלם, שיאפשר את ריבוי הוירוס המוחלש בצמחי המטרה, ובכך להגן עליהם מפני וירוס ה-OMV מטיפוס הבר. כדי לקבל שבט OMV שלם, הצלחנו לאחר מספר נסיונות להגביר בעזרת RT-PCR שני פרגמנטים באורך 5103 ו-4400 בסיסים המייצגים יחדיו את הגנום השלם של הוירוס (איור 5). אולם, לאחר ליגציה של שני חלקים הנ"ל לפלסמיד הביטארי pGreenII וטרנספורמציה של הפלסמיד לחיידקים מהזן DH5 α וגידולם ב- 37°C למשך לילה, התקבל שבט בעל חסר של כ-2000 בסיסים לעומת גודלו של וירוס הבר (תוצאות לא מוצגות). אנליזת PCR של השבטים

החסרים הראו כי האזור החסר הוא האזור המקודד לחלבון P3 ולקצה האמיתי של חלבון CI שנמצאו בעבר בוירוסים צמחיים כגורם רעילות בחיידקי *E. coli* (Johansen, 1996; Jakab *et al.*, 1997). רעילות זו נובעת כנראה מהמצאות פרומוטורים נסתרים על ה-cDNA הויראלי המשופעלים באופן אקראי בחיידק (Johansen, 1996). על מנת לפתור בעיה זו נערכו טרנספורמציות בתנאים שונים של השבט לאחר ליגציה:

1. טרנספורמציה לחיידקי DH5 α , גידול 37 °C למשך 24 שעות.
2. טרנספורמציה לחיידקי DH5 α , 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 (pGreenII-OrMV) התקבל לבסוף רק בתנאים המצוינים בסעיף 4 לעיל (איור 6), כלומר הפלסמיד המכיל את הרצף המלא התקבל לאחר טרנספורמציה לחיידקי Ecos9, שגודלו בטמפי של 26°C. ויזואל של נוכחות ונכונות רצף המחדר נעשה על ידי PCR וריצוף חוזר שהוכיח כי מצוי בידנו השבט המלא של OMV.

שיבוטו ה- OMV 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 (Mori *et al.*, 1991) ושל הקלון הויראלי הצמחי של PPV (Maiss *et al.*, 1992) 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 השלם של OMV. הדנ"א המקודד ל-35S הוגבר על ידי PCR מהפלסמיד pCambia-1302 כך שישלול 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 pGreenII-OrMV (איור 7) נחתך ב-*NotI* + *SwaI* המצויים מיד במעלה הזרם לרצף ה-OMV, ועבר ליגציה ל-35S החתוך. לאחר טרנספורמציה לחיידקי ECOS9, בדיקה של המחדר המצוי ב-pGr-OMV 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 7).

בחינת השיטה המיטבית להדבקת צמחי נץ חלב ב- OMV

צמח נץ החלב הינו צמח בשרני בעל קוטיקולה עבה, ולכן צפוי שיהיה קושי בהדבקתו בדנ"א ויראלי לעומת צמחים בעלי עלים רכים יותר. כיוון שהמטרה העיקרית של המחקר היתה להנדס שבט ויראלי אינפקטיבי מוחלש של OMV בפלסמיד כדי שישמש להדבקת צמחי נץ חלב והגנה עליהם, חשוב היה לקבוע איזו שיטה, ממגוון השיטות הקיימות לאילוח צמחים בוירוסים, היתה השיטה היעילה ביותר לאילוח צמחי *O. dubium* ב-OMV. ערכנו ניסיונות הדבקה בשלוש שיטות מקובלות: הדבקה מכאנית ואו ירי של כתש מצמח נגוע,

והדבקה עם כנימות שהינה הדרך הטיבעית שבה מועבר ה-OMV. לאחר כל ניסוי הדבקה נבחנו בעין הסימפטומים להדבקה בירוס: צמחי נץ חלב שהודבקו בירוס OMV מראים סימני מחלה קשים הכוללים מוזאיקה והצהבה 20-30 ימים לאחר ההדבקה. בנוסף, נבחנה ההדבקה בבדיקת ELISA עם נוגדן ספציפי נגד חלבון המעטפת של OMV. רק 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 גם היא הביאה להדבקת רק כמחצית הצמחים בירוס OMV (טבלה 1).

בחינת אינפקטיביות הקלונים pGr-35S-OMV-B ו-pGreenII-OMV בצמחי נץ חלב

השיטה הישירה לבחינת אינפקטיביות שבט ויראלי הינה יצירת תעתיקי RNA *in vitro* על סמך השבט השלם (Ahlquist and Janda, 1984). על מנת לקבל RNA ויראלי, הוסף פרומוטור T7, במעלה הזרם לקצה 5' של OMV על ידי PCR לקלון השלם pGreenII-OrMV 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 פרומוטור 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 (Gal-On et al., 1995; Jakab et al., 1997) כמשפר באופן ניכר את יעילות ההדבקה של קלון אינפקטיבי המצוי בפלסמיד לעומת שפשוף מיכני. הצמחים ששימשו בניסיונות ההדבקה היו צמחי *O. dubium* צעירים שגודלו בחממה 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 µg של דנ"א פלסמדי לעלה וכן הודבקו כ-86 צמחים בירי, כשליש נורו פעם אחת, כשליש פעמיים, וכשליש משני צידי העלה – בכל ירייה נורה 0.35 µg של דנ"א ממרחק של כ-1 ס"מ. גם במקרה הנ"ל אנליזה של הצמחים הראתה כי לא נתקבלה הדבקה.

החלפת מקטע 3'-5000 בקלון השלם

במקרים בהם מתקבל קלון ויראלי שאינו מדביק, אחד הפתרונות האפשריים הוא החלפת קטע מהשבט המקורי, בקטע שסונתז בראקציית RT-PCR עבור אותו האזור, זאת בהנחה שאותו קטע נושא מוטאציות אשר מונעות את אינפקטיביות הוירוס. ייתכן כי הפולימראז שבו השתמשנו להגברת גנום הוירוס במהלך שיבוטו גרם לשגיאות לאורך הרצף, שיתוקנו באמפליקון החדש. במהלך הניסיונות להקניית אינפקטיביות לשבט של OMV לאחר שלא נצפתה הדבקה, ערכנו החלפה של הקלון 3'-5000 ששימש בבניית הקלון המלא, כמפורט לעיל. הקלון החדש סונתז בראקציית RT-PCR עם תחלים ספציפים תוך שימוש ב-Taq פולימראז בעל יכולת תיקון גבוהה במיוחד. הפרגמנט שהוגבר נחתך ושובט לתוך pGreenII-OrMV ו-pGr-35S-OrMV במקום

הפרגמנט המקורי pGreenII-OrMV החדש היווה תבנית לעריכת PCR על רצף הוירוס המלא ויצירת תעתיקי RNA *in vitro* של OMV כמתואר לעיל. תעתיקי ה-RNA שימשו להדבקת צמחי בותן בצורה מכאנית וצמחי מקור הן מכאנית והן בירי חלקיקי Tungsten מצופים RNA, 12 צמחים הודבקו עבור כל שיטה. גם במקרה זה לא נתקבלה תוצאה חיובית לפי הופעת סימפטומים על העלים, הסתכלות במיקרוסקופ אלקטרוני ובדיקות ELISA עם נוגדן ספציפי.

ניסיון הדבקת פרוטופלסטים שמקורם ב-*Nicotiana benthamiana* בתעתיקי RNA

דרך מקובלת לבחינת יכולת ההתרבות של שבת ויראלי, הינה טרנספורמציה של תעתיקי RNA ויראלי לפרוטופלסטים. ייתכן מצב בו השבת הויראלי חסר יכולת הדבקה בצמח שלם, אך בעל יכולת שכפול במערכת פרוטופלסטים (Gera, 1995). אנו החדרנו בשיטת אלקטרופורציה תעתיקי RNA של שבת pGREENII-OMV לפרוטופלסטים שמקורם ב-*N. benthamiana* (Navas-Castillo *et al.*, 1997). בעזרת אנליזות Western blot 3 ימים ו-5 ימים לאחר הדבקה לא אובחנה נוכחות RNA ויראלי.

בחינת אינפסטיביות הקלון pGr-35S-OMV-B החדש בצמחי נץ חלב שגודלו בתרבות

לאור יעילות ההדבקה הנמוכה של צמחי נץ חלב מחממה או מהשדה בירוס עצמו ובקלונים שבידנו ערכנו ניסיונות הדבקה של צמחי נץ חלב בתרבות תוך שימוש בקלון האינפסטיבי pGr-35S-OMV-B החדש. נץ חלב מתרבות הינו בעל עלים רכים יותר מצמח שגדל בחממה או בשדה ומכיוון שצמח נץ החלב הינו צמח בשרני בעל קוטיקולה עבה, שיתכן ומונעת את מעבר חלקיקי הטוגסטון המצופים בדג"א, חשבנו כי צמחי תרבות יכולים להוות מערכת מתאימה לניסויי הדבקה. כמה עשרות צמחים נורו בחלקיקי טוגסטון מצופים בפלסמיד pGr-35S-OMV-B. לצערנו גם במקרה זה לא נתקבלה תוצאה חיובית לפי הופעת סימפטומים על העלים ובדיקות ELISA עם נוגדן ספציפי.

דיון

מטרת מחקר זה הינה להגן על צמחי נץ חלב נועים מפני וירוס ה-OMV האלים תוך שימוש בהגנה הדדית על ידי וירוס OMV מוחלש שיהונדס במעבדה. כצעד ראשון להשגת מטרה זו היה צורך לשבט את ה-cDNA של הגזע הישראלי של וירוס ה-OMV, לרצף אותו במלואו ולאחר מכן לשבטו כקלון שלם אינפסטיבי. רצף וירוס ה-OMV המלא לא היה ידוע ממחקרים קודמים. בשנה הראשונה של המחקר הצלחנו לרצף את ה-OMV הישראלי במלואו ולשבט שני קלונים חלקיים המייצגים יחדיו את הקלון מלא של הוירוס. יש לציין כי זהו אחד הרצפים המלאים הבודדים של פוטיווירוס התוקף בצלים.

קביעת הרצף המלא של ה-OMV, אפשרה לנו לנתח אספקטים שונים הקשורים לרצף הוירוס, במיוחד אלו הקשורים לחלבון ה-HC-Pro שהינו המפתח ליצירת וירוס מוחלש. תחילה השונו בין רצפי חומצות אמינו של חלבון המעטפת בעזרת תוכנת ClustalW, ומהנתונים שהתקבלו ערכנו עצים פילוגנטיים בעזרת תוכנת Phylip לפי שיטת חישוב מרחקים Distance. ניתן לראות כי OMV קרוב גנטית לוירוס הנימור של השושן (LMoV) ולוירוס הפסים הצהובים של הכרישה (LYSV), שניהם פוטיווירוסים התוקפים גם בצלים (איור 7).

בעבר אופיינו מספר שינויים באזורים שמורים על חלבון ה-HC-Pro של הפוטיווירוס Tobacco etch virus (TEV), שגרמו לשימור יכולת התנועה והשכפול של הוירוס אך ללא הופעת סימני מחלה (Kasschau and Carrington, 2001) קרי, החלישו את ההשפעה של הוירוס על הצמח הפונדקאי. כמו כן, התגלה שניתן להחליש

את ה-ZYMV על ידי שינוי יחיד במוטיב שמור ביותר בחלבון HC-Pro הויראלי (Gal-On and Raccach, 2000). הוירוס המוחלש מתרבה בצמח אך לא גורם לנוזק משמעותי ליבול. שינויים אלו חנים בעלי פוטנציאל ליצור וירוס מגן מוחלש המתאים להתנהגות הדדית. השוואה של רצף חלבון ה-HC-Pro של OMV לרצפי HC-Pro של TEV ו-ZYMV מראה שרוב השינויים המחלישים שמורים גם ב-OMV (איור 8) ומכאן קיימת סבירות טובה שניתן יהיה להחלישו בעתיד על ידי החדרת שינויים אלו בחלבון ה-HC-Pro שלו.

בסוף שנת המחקר הראשונה היה בידנו הרצף המלא של גנום ה-OMV שניקבע על בסיס שבטים חלקיים של הוירוס. לאור זאת היה צורך לשבט את הוירוס השלם לפלסמיד על מנת שניתן יהיה לשעתקו במלואו ולבחון את האינפסטיביות שלו, תכונה הכרחית לוירוס "מגן" שאמור לשמש להדבקת צמחי נץ חלב. בתחילה נתקלנו בבעיות של רעילות הדניא הויראלי בחיידקים. עבודות רבות שכללו ניסיונות גידול של פלסמיד המכיל שבט ויראלי מלא בחיידקים, נתקלו בתופעה דומה של רעילות המחדר הויראלי לחיידק (Boyer and Haenni, 1994). רעילות זאת נגרמת על ידי פרמוטורים נסתרים על הרצף הויראלי, הגורמים לביטוי אקראי של חלבונים טוקסיים לחיידק (Fakhfakh et al., 1996). כתגובה החיידק "זורק" חלק מהשבט, או גורם לשינויים ברצף על מנת שיוכל להתרבות. נסקרו מקרים רבים בנושא והוצעו פתרונות שונים: הכנסת אינטרון לרצף (Johansen, 1996; Yang et al., 1998), החלפת קו החיידקים *E. Coli* או סוג הפלסמיד, קבלת תעתיקי RNA ישירות מתוצר הליגציה ללא ריבוי בחיידקים (Rice et al., 1989), חלוקת הקלון לשני סב-זקטורים והדבקת הצמח בתוצר הליגציה של שניהם לקבלת וירוס שלם בצמח (Jakab et al., 1997). RT-PCR מלא על כל הוירוס ותעתיק של האמפליקון ישירות (Tellier et al., 1996). במקרה שלנו מצאנו כי שימוש בקו החיידקים *Ecos9* שגדלו בטמפרטורה של 26°C מנע את ביטוי החלבונים הרעילים לחיידק ואיפשר קבלת שבט ויראלי מלא של OMV, שנמצא דומה מאוד לרצף המקורי (pGreenII-OrMV). עם זאת, לא נוכל לשלול את העובדה שיתכן ורצף זה מכיל מוטציות נקודתיות שעלולות להשפיע על אינפסטיביות הוירוס. מצב כזה נמצא עבור Potato virus Y (PVY) שרוצף במלואו בשנת 1989 (Robaglia et al., 1989), אולם רק בשנת 1997 פורסם כי הצליחו לשבט שבט מלא לפלסמיד, ולהדביק צמחים באמצעותו (Jakab et al., 1997). הסיבה לקושי שבקבלת שבט מדביק בפלסמיד של PVY היתה המצאות פרמוטורים נסתרים על הרצף הויראלי באזור חלבון CP שגרמו לשינויים ברצף הגנום ולהחסרות של מקטעים מהגנום (Fakhfakh et al., 1996). לאור פתרון בעיית הרעילות הצלחנו גם להנדס שבט של הוירוס השלם המצוי תחת בקרת פרמוטר צמחי (pGr-35S-OrMV-B) דבר החיוני בדרך ליצירת שבט אינפסטיבי יעיל.

צמח נץ החלב הינו צמח בשרני בעל קוטיקולה עבה, ולכן צפוי היה שיהיה קושי בהדבקתו בדניא 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 אינפסטיביות השבטים pGreen-OrMV ו-pGr-35S-OrMV-B באמצעות הדבקה מכאנית. בנוסף, ערכנו גם ניסיונות הדבקה בשיטת ירי, אשר על פי (Gal-On et al., 1997; Jakab et al., 1997), הצליחה להדביק גם במקרים בהם הדבקה מיכנית נכשלה (Jakab et al., 1997). ואולם לא קיבלנו הדבקה באף אחד מן השבטים.

בשנה השלישית על מנת לקבל קלון אינפסטיבי, שניתן יהיה לערוך עליו מוטציות לשם החלשה, החלפנו בקלונים הקיימים מקטע בן 5500 בסיסים ברצף ה-OMV, שסונתז על ידי Taq high fidelity, באזור

שזיהינו שמקנה רעילות לחיידקים ולכן ייתכן שעבר שניויים בחיידקים. ביצענו נסיונות הדבקה בפרוטופלסטים ובצמחי נץ חלב שגודלו בתרבית וטרם התעבתה הקוטיקולה שלהם אך גם בנסיונות אלו לא התקבלה הדבקה.

ישנן מספר סיבות אפשריות לכך שלא נצפתה הדבקה בעזרת הקלון המהונדס: (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 דגינרטיבי 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.

לסיכום, הצלחנו לרצף במלואו לראשונה את הגנום של הגזע הישראלי של OMV. אנליזה של הרצף מוכיחה כי ה-OMV משתייך לקבוצת הפטיווירוסים התוקפים בצלים ושחלבון ה-HC-Pro מכיל מוטיבים שמורים בעלי פוטנציאל להחלשת הזירוס. פענוח הרצף המלא של OMV יקל על לימוד הביולוגיה של פתוגן זה וזיהוי ביתר קלות. למרות רעילותו של הרצף הויראלי המלא המונעת ריבוי ה-cDNA שלו בחיידקים, הצלחנו לשבטו במלואו אך לא הצלחנו לייצר קלון אינפקטיבי שניתן לאחר מכן להחלישו במטרה שישמש להגנה הדדית על צמחי נץ חלב. לאור חוסר יכולתנו לקבל קלון אינפקטיבי לא יכולנו לבחון האם החלשה של OMV על ידי מוטגיזה של חלבון ה-HC-Pro שלו תגן על צמחי נץ חלב מהזן הבר האלים ולכן לא השגנו את כל מטרת המחקר.

רשימת ספרות

- Ahlquist, P. and Janda, M. (1984) cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol Cell Biol*, **4**, 2876-2882.
- Boyer, J.C. and Haenni, A.L. (1994) Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, **198**, 41-5426.
- Burger, J.T. and Von Wechmar, M.B. (1988) Rapid diagnosis of Ornithogalum and Lachenalia viruses in propagation stock. *Acta Horticulturae*, **234**, 31-38.
- 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.
- 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**, 2253-2527.
- De Hertogh, A.A. and Le Nard, M. (1993) *General Chapter on Summer Flowering Bulbs*. Amsterdam, London, New York, Tokyo.: ELSEVIER.
- 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), 519-523.
- 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), 3223-3227.
- 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**, 103-110.
- Gal-On, A. (1998) Recombinant potyvirus construct and use thereof, PCT/IL.
- 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.
- Gal-On, A. and Raccach, B. (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.
- Gera, A. (1995) *Protoplast culture: Viruses and Viroids*. In *Advanced Methods In Plant Pathology*. Ed. by R.P. Singh & U.S. Singh, CRC press, pp. 313-328.
- Gonsalves, D. (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 415-437.
- Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baucombe, 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), 3141-3145.
- 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**, 12412-12405-00.

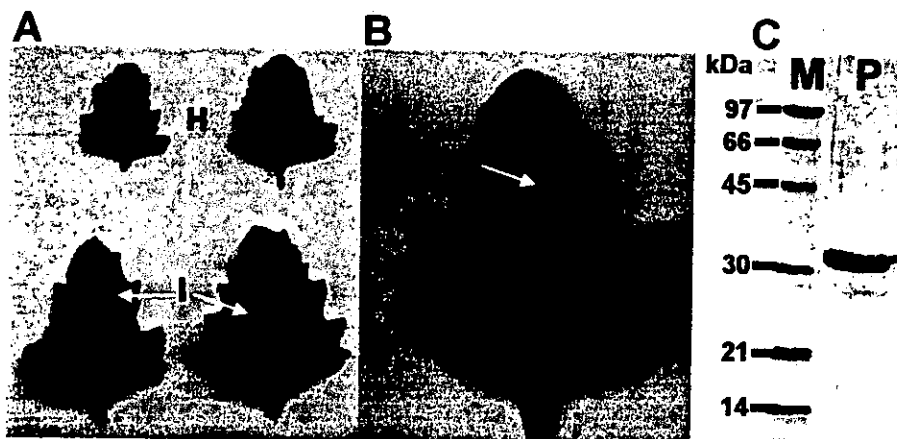
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **95**, 461-470.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology*, **285**, 71-81.
- 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 function. *Dev Cell*, **4**, 205-217.
- Lecoq, H., Lemaire, J.M. and Wipfscheibel, C. (1991) Control of Zucchini Yellow Mosaic-Virus in Squash by Cross Protection. *Plant Disease*, **75**, 208-211.
- 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*. Wallingford; UK: CABI Publishing, pp. 177-192; 149 ref.
- 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), 709-713.
- Matsumoto, T., Furuya, H., Tairako, K. and Yamamoto, H. (1998) Cross protection of spontaneous mutants derived from an attenuated tomato strain of tobacco mosaic virus TMV-L11A. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **64**, 213-216.
- 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), 243-246.
- Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Gowda, S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. (1997) Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs. *Virology*, **228**, 92-97.
- Pennazio, S., Roggero, P. and Conti, M. (2001) A history of plant virology. Cross protection. *New Microbiol*, **24**, 99-114.
- Powell, C.A., Pelosi, R.R., Rundell, P.A., Stover, E. and Cohen, H. (1999) Cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of citrus tristeza virus. [St, American Phytopathological Society.]
- Reddy, H.R. and Vidhyasekaran, P. (1990) Cross protection in the management of virus diseases. *Basic research for crop disease management*. 1990, 176-182; 32 ref., New Delhi; India: Daya Publishing House.
- Rezende, J.A.M. and Pacheco, D.A. (1998) Control of papaya ringspot virus-type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. [St, American Phytopathological Society.]
- Rezende, J.A.M., Pacheco, D.A. and Iemma, A.F. (1999) Effects of cross protection with mild strains of PRSV-W on 'Menina Brasileira' squash. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **34**, 1481-1489.
- 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**, 285-296.
- 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), 935-947.
- Sheen, T.F., Wang, H.L., Wang, D.N., Iwahori, S., Kano Murakami, Y., Shinkai, S., Sugiyama, N. and Sakiyama, R. (1998) Control of papaya ringspot virus by cross protection and cultivation techniques. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **67**, 1232-1235.

- Shukla, D.D., C. W. Ward, and A. A. Brunt** (1994) *The Potyviridae*. Wallingford: CAB International.
- 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**, 437.4373-0
- Tsipouridis, C.G. and Karayiannis, I.** (1999) Apricot-nectarine graft compatibility and possible cross protection effects against PPV. *Acta Horticulturae*, 561-563.
- Urban, L.A., Sherwood, J.L., Rezende, J.A.M. and Melcher, U.** (1990) Examination of mechanisms of cross protection with non-transgenic plants. *NATO ASI Ser Ser H Cell Biol, W. Ger.*, Springer-Verlag.
- Valkonen, J.P., Rajamaki, M.L. and Kekaramen, T.** (2002) Mapping of viral genomic regions important in cross-protection between strains of a potyvirus. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 683-692.
- Vcelar, B.M., D.L. Ferreira, J.G. Niederwiser** (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.
- Vuuren, F.v., Vyver, J.v.d., van Vuuren, F. and van der Vyver, J.** (1999) Citrus tristeza virus cross protection in South Africa. *Neltropika Bulletin*, 24-25.
- Wang, H.L., Gonsalves, D., Provvidenti, R. and Lecoq, H.L.** (1991) Effectiveness of Cross Protection by a Mild Strain of Zucchini Yellow Mosaic-Virus in Cucumber, Melon, and Squash. *Plant Disease*, **75**, 203-207.
- 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**, 784-789.
- 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**, 2443-2451.
- 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.
- 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



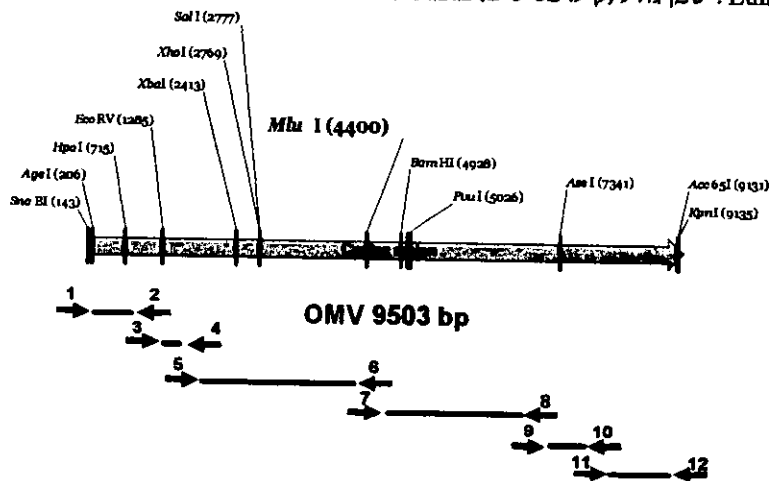
איור 1: נץ חלב כתום, וירוס המוזאיקה של נץ חלב ומחלת המוזאיקה של נץ חלב. A. צמח נץ חלב כתום בריא פורח. B. צילום במיקרוסקופ אלקטרוני של חלקיקי וירוס ה-OMV. C. עלה של צמח נץ חלב נטוע עם סימני מוזאיקה (מסומנים בחץ). D. השוואה בין נץ חלב בריא (מימין) לנץ חלב נטוע בוירוס OMV (משמאל).



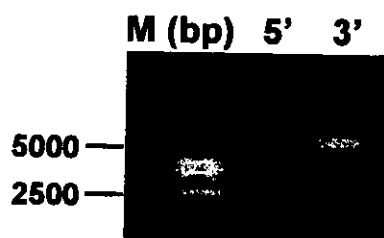
איור 2. ניקוי וירוס OMV. (A+B) צמחי *C. quinoa* הודבקו במיצוי מצמחי נץ חלב נטועים (I) או מים (H). בתצנים מסומנים חגעים שנוצרים כ-14 יום מרגע ההדבקה כתוצאה מהדבקה מקומית. (C) אנליזה של הוירוס המנוקה בגיל SDS-PAGE (P). לאחר ההרצה הגיל נצבע בצביעת חלבון. סמני גודל מוצגים במסלול M.



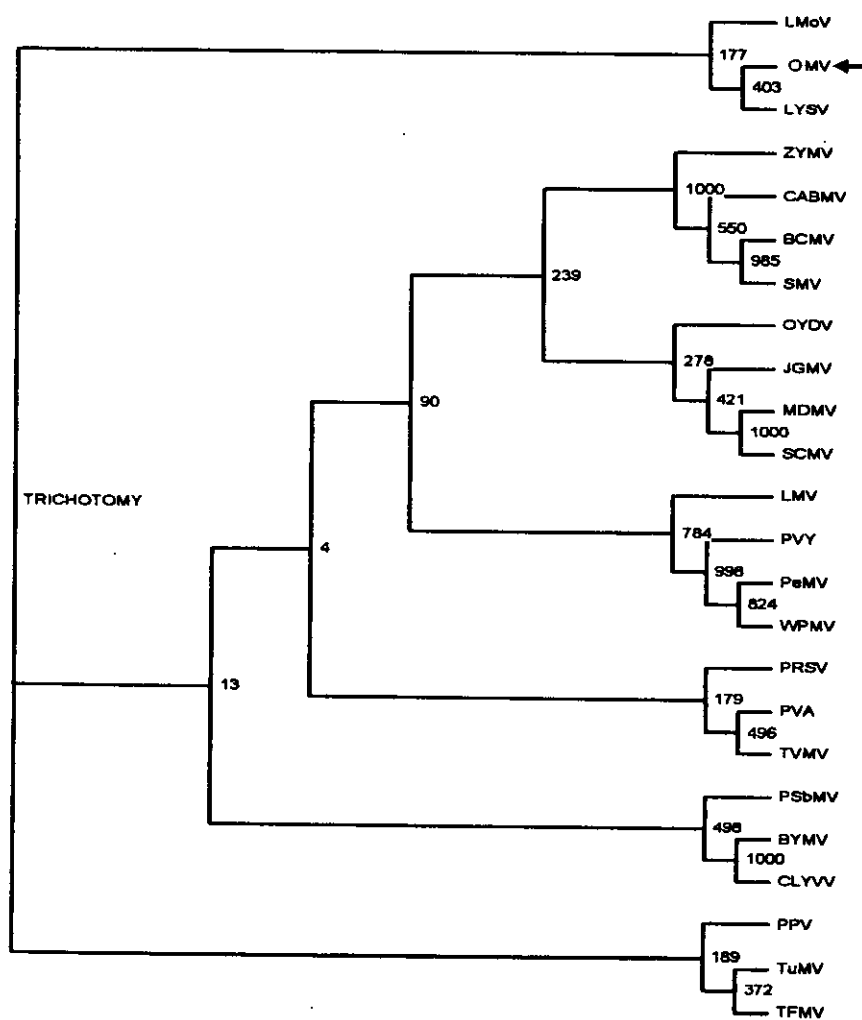
איור 3. אנליזה של רנ"א ויראלי בגיל אגרוז 1%. הרנ"א הורחף ב-50% פורמאמיד למניעת קיפול לפני ההרצה. לאחר ההרצה הגיל נצבע ב- Ethidium Bromide. סמן גודל (קילו בסיסים) מוצג במסלול M.



איור 4. סכימה המתארת את תהליך שיבוט הקלון המלא של OMV. בחלק העליון מפת הריסטריקציה של חרצף המלא לאחר פענוח. בחלק התחתון התחלים (מסומנים בחיצים) בחיצים ממוספרים ע"פ טבלה 1) ששימשו בראקציות ה-RT-PCR להגברת האזורים השונים של חירוס. תחל 1 – קצה 5', תחל 12 – קצה 3'.



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



איור 8: עץ פילוגנטי שמגדיר על פי רצף חלבון המעטפת של פוטיווירוסים שונים כלל ה-OMV (מסומן בחץ).

	10	20	30	40	50	60	70	80
ZYMV	-----	SSQPEVQFFQ	WRRMFDKLRPS-	PDHVCKVDYNNEECGELAATFCOALFPVVKLS	SCOTCREKLSRVSFEEFKDS			
TuMV	-----	HKIVHESAAGANF	WKGEORCLAYRSDNREHTCYSGLDVTECGEVAALMCLAMFPCGKITCPDCVTDSELSQGOASGPS					
PVY	-----	MDSMVQFSSAES-	FWEGLDGNWQ	MRYP-TDHTCVAGIPVEDCGRVAAIMTHSILPCYKITCPPTCAQQYANLPASDLLKI				
TEV	-----	SDKSISEA-	FFIPYSKKFLELRPDGISHECTRGVSVEROGEVAAILTOALSPCGKITCKRCMVETPDIVEGESGES					
OMV	-----	HYSLGTQYFEA	ESTEFLKHRVVTHEGPCERDISLTDIAKVAQLHQLFFGCGKITCLCKMQEIVTRNGHNLKLP					
	90	100	110	120	130	140	150	160
ZYMV	-----	FTIHKDEWDNFKEGSQYDNI	FKLIKVAT----	QATONLKLSEVMKLVQNHSTSTMKQIQDINKALMKGSLV				
TuMV	-----	LTQLRDVIKSSYP	PRFKHAVQILDRYEQS----	LSSANENYQDFAEIQSISDGVKEA	AFPHVKNKLNAILIKGATA			
PVY	-----	ASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTI	LEHL--TEPVDLSLEIFNEVFKSIGEKQ	QSPFKNINILNFFLKGN				
TEV	-----	VTNQG----	KLLAMLKEQYPDFMAEKLLTRFLOQ--	KSLVNTNLTACSVKQIIGDRKQAPFTHVLAVSEILFKGNKL				
OMV	-----	ILNE----	VTTLESELQEVSLPHIAALMKFITVERE--	KNIDINLHADVLKLTNGKEGEIFKMSRLNDALSKSGFG				
	170	180	190	200	210	220	230	240
ZYMV	-----	TQDELDLALKQLLEMTQ	WERNHMLTGEELKFRN	RRSSKAMINPSLLCDNQLDKNGNFVWGERGYHSKRLFKNFFEEV				
TuMV	-----	TGEEFSQATKHLLE	LARYLKNRTENIEKGSLSFRNKESQAHINPTLMCDNQLDRNGNFVWGERGYHAKRFFSNYFEII					
PVY	-----	TAREWQVAQSLLEL	AREFKNRTDNIKKGDISEFRNK	SAKANWNLVLSNCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNYFEII				
TEV	-----	TGADLEEASTHMLE	IARFLNNRTENMRIGHLSFRNKESKARVNNALMCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNYFEII					
OMV	-----	VPOALRTAHVELLO	LARFKNRTDNVNSGSLQFRN	ISGAHINTALMCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNYFEII				
	250	260	270	280	290	300	310	320
ZYMV	-----	IPSEGYTKYVVRNFPNGTRKLAIGSLIVPLNLDARTALLG-	ESIEKKPLTSACVSKONGNYIHSCCVTDDEGTPMYSE					
TuMV	-----	DPKQGYTQYETRVVPNGSRKLAIGSLIVPTNFEVLRDQMG-	EPVEPYPTIVECVSKLQGEVHACCVTDESDPVLSE					
PVY	-----	DPKQGYTQYETRVVPNGSRKLAIGSLIVPLDLAEFRKMKG-	DYKRQPGVSKKCTSSKDNVYVPCCVTDESDPVLSE					
TEV	-----	DPKQGYTQYETRVVPNGSRKLAIGSLIVPLDLAEFRKMKG-	DYKRQPGVSKKCTSSKDNVYVPCCVTDESDPVLSE					
OMV	-----	NPKGDAQHLRLKNPNNGARELAIGNLIMSTNFEVLRQQLKGPRLFESVGI	TEACVSRLLNNFLSCCCATDVGKPVLSQ					
	330	340	350	360	370	380	390	400
ZYMV	-----	LKSPTKRHLVIGASGDPKYIDLPASEAERMYIAKEGYCYLNI	FLAMLVNVNNEAKDFTK-MIRVDLIPMLGOWP	SIMDV				
TuMV	-----	IKMPTKHHLVIGNSGDPKYIDLPEIEENKMYIAKEGYCYLNI	FLAMLVNVNNEAKDFTK-MIRVDLIPMLGOWP	SIMDV				
PVY	-----	FYPPTKKHLVIGNSGDPKYIDLPASEAERMYIAKEGYCYLNI	FLAMLVNVNNEAKDFTK-MIRVDLIPMLGOWP	SIMDV				
TEV	-----	LKHPTKRHLVIGNSGDPKYIDLPASEAERMYIAKEGYCYLNI	FLAMLVNVNNEAKDFTK-MIRVDLIPMLGOWP	SIMDV				
OMV	-----	LKIPTKNHLVIGNTGDAKYVDLPTNDDEHLYIAKEGYCYLNI	FLAMLVNVNNEAKDFTK-MIRVDLIPMLGOWP	SIMDV				
	410	420	430	440	450	460	470	480
ZYMV	-----	ATAAYILGVFHPETRC	AEPRILVDHRTQTMHVDSYGS	LTGVGYHVLKAGTVNH	LIQFASNDLQSEMKHYRVG			
TuMV	-----	ATACYFLKVFFYPDV	HAELPRMLVDHRTQTMHVDSYGS	LTGVGYHVLKAGTVNH	LIQFASNDLQSEMKHYRVG			
PVY	-----	ATTCAQMKIFYPDV	HAELPRMLVDHRTQTMHVDSYGS	LTGVGYHVLKAGTVNH	LIQFASNDLQSEMKHYRVG			
TEV	-----	ATACYLLSILYPDV	HAELPRILVDHRTQTMHVDSYGS	LTGVGYHVLKAGTVNH	LIQFASNDLQSEMKHYRVG			
OMV	-----	AAACHLLSVFFEPD	TRNAELPRILVDHRTQTMHVDSYGS	LTGVGYHVLKAGTVNH	LIQFASNDLQSEMKHYRVG			
	490							
ZYMV	-----							
TuMV	-----	HGASNIDDPQL						
PVY	-----	PDYA-----						
TEV	-----							
OMV	-----							

איור 9. השוואה של רצף חומצות האמינו של חלבון HC-PRO מ-OMV ופוטיווירוסים אחרים. מיקומן של חומצות זהות או שמורות מסומן בצמוד ואפור בהתאמה. חומצות אמינו ב-TEV שמוטגניזם שלהם ל-Ala פועה ביכולת עקוב ההשתקה לאחר שנתקן של HC-PRO אך לא ביטלה לגמרי את פעילותו מוקפת בעיגול.

טבלה 1. פריימרים ספציפיים ודגנרטיבים ששימשו להגברת גנום ה-OMV, (C או A=M, T או A=W, G או C=V, A או C=Y, T או A=H, G או C=N, A או A=R, G או A=I, inosine=I, G או K=T).

מספר	רצף	מיקום בגנום השלם	אורך הפרגמנט
1	ATGACCAATCAGATGGCACAAAATWWMAMVAC	1	9511
2	CTCTCCAAGGTTACCT	1190	
3	GCGGTCGACTTYATHGTNAGRGGNA	1180	1000
4	CACAACATGCATCGTCTTATTCC	2180	
5	GCIGARYTICCMGIATWYTRGTKGAYCA	2160	2310
6	CATCTATGTCCAAGGTTACTCCG	4470	
7	GCMACIAAYATIATIGARAAAYGG	4470	2000
8	CCTCGTTTGCAGGAGCTCGAAATCG	6470	
9	CGATTTCGAGCTCCTGCAAACGAGG	6460	1770
10	GGACTTGACGACGTCTCTAATCT	8230	
11	CCTGAACTGCTGCAGGAGATTAGA	8230	3721
12	ATGACCAATCAGATGGCAC	5039	
13	ATGACCAATCAGATGGCACTTTTTTTTTTTTTTTT	Oligo-dt	

טבלה 2. סיכום תוצאות הדבקת צמחי נץ חלב בוירוס בר.

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

סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
1. שיבוט קלון אינפקטיבי של וירוס ה- OMV ואפיונו.
2. החלשת הוירוס הקלונלי בעזרת מוטגניזה של האזור המרכזי בחלבון הויראלי HC-Pro, בדגש על המוטציה (FRNK->FINK, איור 1, (Gal-On, 2000)) ואפיון הוירוסים המוטנטים.
3. מבחני דגנה הדדית למוטנטים המוחלשים שנבחרו במעבדה ובחממה והערכת אפקטיביות.
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
1. שובט ורצף במלואו הקלון הויראלי בפלסמיד יחיד תחת פרומוטר של T7 המאפשר שעתוק רנ"א ויראלי שלם במבחנה
2. שובט במלואו הקלון הויראלי המשופר בפלסמיד יחיד תחת פרומוטר וטרמינאטור צמחיים המאפשר שעתוק הוירוס בצמח
3. כמחצית מהקלון הויראלי על מנת לשפר את אינפקטיביות הקלון.
4. נבחנה האינפקטיביות של הקלונים הויראליים בנץ חלב, נץ חלב מתרבות, פרוטופלסטים וצמחי בוחן אך לא נתקבלה הדבקה.
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.
הצלחנו לשבט ולרצף את הוירוס OMV במלואו לפלסמיד תחת פרומוטר המאפשר יצור רנ"א ויראלי במבחנה או שעתוק בצמח. שבט ויראלי זה הינו הבסיס ללימוד הביולוגיה של OMV ולקבלת שבט אינפקטיבי של OMV בעתיד. כמו כן בחנו את האינפקטיביות של קלון זה בנץ חלב מחממה ומתרבות וכן בפרוטופלסטים ובצמח בוחן. למרות ניסיונות חוזרים ונשנים לא הצלחנו להוכיח שבידנו קלון אינפקטיבי ולכן לא השגנו את מטרות המחקר במלואן קרי החלשת הוירוס וכן בחינת יעילותו כוירוס "מגן" בשדה.
הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.
הבעיה העיקרית שעומדת בפני יישום תוצאות המחקר הינה החדרה יעילה של דנ"א לצמחי נץ חלב. ללא טכניקה יעילה להדבקה של נץ חלב בדנ"א לא נוכל לדעת האם בידינו קלון אינפקטיבי או לא ולא נוכל לישם את תוצאות המחקר.
האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט : פרסומים - כמקובל בביולוגיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
רינת יסעור, עבד גרה, אבנר כהן, רן סתיו, עמית גל-און וצחי ארזי. בדרך להתמודד עם מחלת המוזאיקה של נץ החלב: ריצוף ושיבוט הגזע הישראלי של הוירוס. עולם הפרח דצמבר-ינואר 2007, 46-49.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) <
חסוי - לא לפרסם <