



2000-2002

תקופת המחקר:

256-0568-02

קוד מחקר:

Subject: OMV VIRAL RESISTANCE IN
ORNITHOGALUM DUBIUM SELECTIONS

Principal investigator: AVNER COHEN

Cooperative investigator: AVNER COHEN, RAN STAV,
ABED GERA, MUHAMAD ZAIDAN

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

שם המחקר: הקניית עמידות לוירוס המוזאיקה
של נץ חלב (OMV) בסלקציות של נץ חלב
דוביום

חוקר ראשי: אבנר כהן

חוקרים שותפים: אבנר כהן, רן סטן, עבד גרה,
מוחמד זיאדן

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

תקציר

הצגת הבעיה: נץ החלב הכתום (*Ornithogalum dubium*) כמו מרבית הטיפוסים המסחריים של נץ החלב, רגיש מאד לוירוס המוזאיקה של נץ החלב (OMV). קצב ההינגעות מהיר מאד וגורם לנוון של חומר השתילה ולירידה באיכות המוצר, מה שמאלץ את המגדלים להחליף את חומר הריבוי היקר לעתים קרובות. המעבר הטבעי לגידול של זנים אחידים מריבוי וגטיביי מחמיר את היקף הבעיה. לא ידוע על עמידות טבעית לוירוס בנץ החלב. הדרך היחידה לקיים קלוניים נקיים מוירוס, לאורך זמן, היא ע"י החדרה של גנים לעמידות לוירוס תוך שימוש בשיטות של הנדסה גנטית. ישנם דיווחים רבים שהתמרה של צמחים בגנים וירליים כמו הגן לחלבון המעטה (CP) והגן רפליקאז עשויה להקנות לצמחים המותמרים עמידות בפני אילוח באותו הוירוס. גנים אלה בודדו מתוך וירוס המוזאיקה של נץ החלב. השיטה המקובלת להתמרה של צמחים חד-פסיגיים, כמו נץ החלב, היא השימוש במאיץ חלקיקים לירי של גנים אל תוך הרקמה הצמחית.

מטרת המחקר: החדרה של גנים ממקור וירלי כמו הגן לחלבון המעטה או הגן רפליקאז אל הגנום הצמחי בנץ החלב על מנת להעניק עמידות לוירוס בקלוניים המותמרים. השגת מטרה זו מותנית בהתאמת השימוש ברובה החלקיקים להחדרת גנים לרקמת המטרה, בירור התנאים המיטיביים לטרנספורמציה של רקמות צמחיות בקלוניים הנבחרים וכיול מערכת הרגנרציה והסלקציה ברקמות הצמחיות.

מהלך העבודה: קוטל העשבים בסטה נמצא כלא מתאים לשמש כסמן לסלקציה לפיכך כוילה מערכת אלטרנטיבית המשתמשת בעמידות לקנמיצין. שוכללה השיטה לקבלת תרביות נוזלית של תאים אטיולנטים המתאימים להתבטאות הטרנסגן לאחר ירי ובהמשך, לרגנרציה או אמבריוגנזה לצמחונים ונבחנה התגובה שלהם לריכוזים עולים של קנמיצין. בנוסף לכך נבנו פלסמידים עם פרומוטרים שונים ונבחנה התאמתם להפעלת גנים ברקמה הצמחית. נבנו קונסטרוקטים עם שני גני המטרה ואלה נורו אל הרקמה הצמחית. לאחר הירי נבחן הביטוי החולף של הגן המדווח בתאי המטרה. צברי התאים הועברו למצע נוזלי לסלקציה ממושכת בנוכחות קנמיצין. לאחר סלקציה ממושכת הועברו התרביות למצע רגנרציה באור.

תוצאות עיקריות: תרביות תאים שגדלו במצעים שונים הגיבו בצורה שונה לירי. קאלוס שגדל במצע 206 נמצא מתאים יותר לביטוי חולף של הגנים לאחר ירי, אולם בהמשך הגידול נעצרה ההתפתחות וחלוקת התאים. מצע 101 נתן תוצאה פחות טובה בירי אולם אפשר המשך גידול

והתפתחות ארוך-טווח. יעילות הטרנספורמציה הייתה נמוכה יותר בתרבויות בנות שנה מאשר בתרבית צעירה. העברת צברי התאים, זמנית, למצע 206 טרי, החזירה את הרקמה מבחינת יעילות התגובה לירי, לרמה שנצפתה ברקמה צעירה. הרקמה הצמחית נורתה בארבעה קונסטרוקטים שכללו את שני הגנים הוירליים תחת בקרה של שני הפרומוטרים UBQ3 ו- Δ SVB והרקמה גודלה על מצע סלקציה נוזלי בחושך. לאחר ששה חודשי סלקציה הועברה הרקמה למצע רגנרציה באור שבעקבותיו התפתחו מאות צמחונים מותמרים שהראו תגובת GUS חיובית. סלקציה קצרה יותר הניבה צמחים בודדים בלבד.

מסקנות והמלצות: פתחנו שיטה לקבלת צמחים מותמרים בנץ חלב. הגידול האטי של תאי נץ החלב בתנאי הסלקציה עכב בצורה מהותית את שלבי הסיום של תוכנית המחקר. בשלב זה הצמחונים, שהם כפי הנראה מותמרים, צריכים לפתח מסה צמחית מינימאלית לפני שיהיה אפשר להפיק מהם DNA, לוודא סופית את נוכחותם של גני המטרה בצמחים ולחשוף אותם להדבקה בוורוס בכדי להגיע למימוש המטרה המוצהרת – קבלת צמחים עמידים לוורוס המוזאיקה של נץ החלב. ניתן ליישם את השיטה להתמרה של גנים נוספים בעלי השלכות כלכליות.

פרסומים

- Lipsky, A., A. Cohen, V. Gaba, A. Ion, D. Sandler-Ziv, A. Gera and A. Watad. 2002. Development of *Ornithogalum dubium* cell cultures of high competence for transformation by particle bombardment and of high embryogenic capacity. 10th IAPTC&B Congress, Orlando Fla.

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 02-0568-256
 הקניית עמידות לוירוס המוזאיקה של נץ חלב (OMV) בסלקציות של נץ חלב דוביום
 Transformation for virus resistance in Ornithogalum breeding lines

מוגש למו"פ בתי צמיחה של המדען הראשי
 ע"י

המחלקה לצמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	אבנר כהן
המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי	עבד גרה
המחלקה לצמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	אלכסנדר ליפסקי
המחלקה לצמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	צחי ארזי
המחלקה לצמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	דורית סנדלר-זיו
המחלקה לצמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	האורל יון
המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי	ויקטור גבה
האגף להגנת הצומח, משרד החקלאות	מוחמד זידאן
המחלקה לצמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	קורנליו פינטה
המחלקה לצמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	רן סתו

Avner Cohen, Dept. Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet

Dagan, 50250. E-mail: vhacohen@agri.gov.il"

Abed Gera, Dept. of Virology, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan, 50250.

E-mail: abedg@netvision.net.il

Alexander Lipsky, Dept. Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan,

50250. E-mail: lipsky@agri.gov.il"

Zahi Arazi, Dept. Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan, 50250.

E-mail: tarazi@volcani.agri.gov.il"

Dorit Sandler-Ziv, Dept. Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan

50250. E-mail: dorit@agri.gov.il"

Aurel Ion, Dept. Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan 50250

E-mail: aurel@agri.gov.il"

Victor Gaba, Dept. of Virology, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan, 50250.

E-mail: @netvision.net.il

Muhammad Zeidan, Plant Protection Services, Ministry of Agriculture, Bet Dagan

Korneliu Fintea, Dept. Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan

50250

Ran Stav, Dept. Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan, 50250.

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

.....חתימת החוקר

תקציר

הצגת הבעיה: נץ החלב הכתום (*Ornithogalum dubium*) כמו מרבית הטיפוסים המסחריים של נץ החלב, רגיש מאוד לוירוס המוזאיקה של נץ החלב (OMV). קצב ההינגעות מהיר מאוד וגורם לנוון של חומר השתילה ולירידה באיכות המוצר, מה שמאלץ את המגדלים להחליף את חומר הריבוי היקר לעתים קרובות. המעבר הטבעי לגידול של זנים אחידים מריבוי וגטיבי מחמיר את היקף הבעיה. לא ידוע על עמידות טבעית לוירוס בנץ החלב. הדרך היחידה לקיים קלוני נקיים מוירוס, לאורך זמן, היא ע"י החדרה של גנים לעמידות לוירוס תוך שימוש בשיטות של הנדסה גנטית. ישנם דיווחים רבים שהתמרה של צמחים בגנים וירליים כמו הגן לחלבון המעטה (CP) והגן רפליקאז עשויה להקנות לצמחים המותמרים עמידות בפני אילוח באותו הוירוס. גנים אלה בודדו מתוך וירוס המוזאיקה של נץ החלב. השיטה המקובלת להתמרה של צמחים חד-פסיגיים, כמו נץ החלב, היא השימוש במאיץ חלקיקים לירי של גנים אל תוך הרקמה הצמחית. **מטרת המחקר:** החדרה של גנים ממקור וירלי כמו הגן לחלבון המעטה או הגן רפליקאז אל הגנום הצמחי בנץ החלב על מנת להעניק עמידות לוירוס בקלוני המותמרים. השגת מטרה זו מותנית בהתאמת השימוש ברובה החלקיקים להחדרת גנים לרקמת המטרה, בירור התנאים המיטביים לטרנספורמציה של רקמות צמחיות בקלוני הנבחרים וכיול מערכת הרגנרציה והסלקציה ברקמות הצמחיות. **מהלך העבודה:** קוטל העשבים בסטה נמצא כלא מתאים לשמש כסמן לסלקציה לפיכך כוילה מערכת אלטרנטיבית המשתמשת בעמידות לקנמיצין. שוכללה השיטה לקבלת תרביות נוזלית של תאים אטיולנטיים המתאימים להתבטאות הטרנסגן לאחר ירי ובהמשך, לרגנרציה או אמבריוגנזה לצמחונים ונבחנה התגובה שלהם לריכוזים עולים של קנמיצין. בנוסף לכך נבנו פלסמידים עם פרומוטרים שונים ונבחנה התאמתם להפעלת גנים ברקמה הצמחית. נבנו קונסטרוקטים עם שני גני המטרה ואלה נורו אל הרקמה הצמחית. לאחר הירי נבחן הביטוי החולף של הגן המדווח בתאי המטרה. צברי התאים הועברו למצע נוזלי לסלקציה ממושכת בנוכחות קנמיצין. לאחר סלקציה ממושכת הועברו התרביות למצע רגנרציה באור. **תוצאות עיקריות:** תרביות תאים שגדלו במצעים שונים הגיבו בצורה שונה לירי. קאלוס שגדל במצע 206 נמצא מתאים יותר לביטוי חולף של הגנים לאחר ירי, אולם בהמשך הגידול נעצרה ההתפתחות וחלוקת התאים. מצע 101 נתן תוצאה פחות טובה בירי אולם אפשר המשך גידול והתפתחות ארוך-טווח. יעילות הטרנספורמציה הייתה נמוכה יותר בתרביות בנות שנה מאשר בתרבית צעירה. העברת צברי התאים, זמנית, למצע 206 טרי, החזירה את הרקמה מבחינת יעילות התגובה לירי, לרמה שנצפתה ברקמה צעירה. הרקמה הצמחית נורתה בארבעה קונסטרוקטים שכללו את שני הגנים הוירליים תחת בקרה של שני הפרומוטרים UBQ3 ו-ΔSVB- והרקמה גודלה על מצע סלקציה נוזלי בחושך. לאחר ששה חודשי סלקציה הועברה הרקמה למצע רגנרציה באור שבעקבותיו התפתחו מאות צמחונים מותמרים שהראו תגובת GUS חיובית. סלקציה קצרה יותר הניבה צמחים בודדים בלבד. **מסקנות והמלצות:** פתחנו שיטה לקבלת צמחים מותמרים בנץ חלב. הגידול האטי של תאי נץ החלב בתנאי הסלקציה עכב בצורה מהותית את שלבי הסיום של תוכנית המחקר. בשלב זה הצמחונים, שהם כפי הנראה מותמרים, צריכים לפתח מסה צמחית מינימאלית לפני שיהיה אפשר להפיק מהם DNA, לוודא סופית את נוכחותם של גני המטרה בצמחים ולחשוף אותם להדבקה בוירוס בכדי להגיע למימוש המטרה המוצהרת – קבלת צמחים עמידים לוירוס המוזאיקה של נץ החלב. ניתן ליישם את השיטה להתמרה של גנים נוספים בעלי השלכות כלכליות.

פרסומים

אבר כהן, דווח לתוכנית המחקר, יום עיון בתי צמיחה א' למחקרים במימון המדען הראשי, 1 בינואר 2002

Lipsky, A., A. Cohen, V. Gaba, A. Ion, D. Sandler-Ziv, A. Gera and A. Watad. 2002. Development of *Ornithogalum dubium* cell cultures of high competence for transformation by particle bombardment and of high embryogenic capacity. 10th IAPTC&B Congress, Orlando Fla.

ב. מבוא

הסוג נץ חלב (*Ornithogalum*) הפך בשנים האחרונות למרכיב חשוב בסל פרחי הבצל והפקעת

בשוק העולמי. בשנת 1993 נמכרו בבורסות בהולנד טיפוסים חדשים של נץ-החלב בעלי פרחים צהובים-כתומים מהמין *O. dubium* שנשלחו כמשלוח ניסיוני מהארץ (21 אלף פרח בסה"כ). הפרחים ממין זה שמקורו הבוטני בדרום אפריקה, התקבלו בצורה חיובית ע"י השוק ופדו מחירים גבוהים. משנת 1994 ואילך עלתה הכמות הנמכרת: 1.75 מיליון פרחים ב- 97/1996, למעלה מ- 7 מיליון ב- 97/1996, 10.43 מיליון ב- 98/1997 ו- 14.6 מיליון ב- 99/1998. בשלושת הבורסות ההולנדיות, בלבד, נרשמו בשנת 2002 מכירות של למעלה מ- 41 מיליון פרחי נץ חלב, 12.5 מיליון מהם של נץ החלב הכתום (דו"ח המחלקה לחקר שווקים, משרד החקלאות, דצמבר 2002). מלבדם נמכרים גם עציצים פורחים של נץ החלב הזה בבורסות וגם בעסקי מכירה ישירה לקניינים. מגדלי ישראל נהנים בשלב זה ממעמד של ספק כמעט בלעדי של נץ החלב הכתום לבורסות ההולנדיות. נץ החלב מהמינים בעלי הפרחים הלבנים המכונה גם "כוכב בית לחם" נמכר כפרחים קטופים בלבד מאחר ואין ביניהם זנים ננסיים המתאימים לגידול בעציץ.

כתוצאה ממאמציהם של המגדלים המסחריים של חומר הריבוי. הגיעו מגדלי ישראל להישגים יפים בשיפור איכות הפרח, הקדמת הפריחה ושיפור באחידות ובגובה התפרחות בנץ החלב הכתום. למרות זאת קיימת עדיין שונות רבה מאוד לגבי מרבית התכונות שהן בעלות ערך כלכלי שהיא פועל יוצא משיטת הריבוי של חומר השתילה. האחידות באופי הגידול ובתגובה לתנאי הסביבה היא הכרח בגידולים חקלאיים ובמיוחד בגידול פרחים. אחידות כזו מושגת אם ע"י טיפוח של זרעי מכלוא או ע"י ריבוי ווגטטיבי של קלונים נבחרים. כמעט כל זני הפרחים המיוצאים מהארץ מקורם בריבוי קלונלי. הדבר נכון גם בסוגים שבעבר גידלו מזרעים, כמו מיני עדעד, ליאטריס, אקוניטוס ועוד. גם ממינים אחרים של נץ חלב כל הזנים הקיימים בשוק הבינלאומי הם מריבוי ווגטטיבי. יש לצפות שגם העלייה בכמויות יגיע השוק לרוויה יחסית ותעלה הדרישה למוצר אחיד ואיכותי. פרחי קטיפ נמוכים מדי למשל, כמו גם משלוחים לא אחידים, לא יקלטו ע"י השוק או שיפדו מחירים נמוכים בהרבה. יש להיערך לכן למצב שבו השוק ידרוש פרחים בעלי תפרחת איכותית, אחידות בצבע ובמבנה, וגבעול גבוה ויציב מזנים המשווקים כפרחי קטיפ. במקביל יש לפתח קלונים אחידים המתאימים לשווק כעציצים פורחים. בשנתיים האחרונות כבר נכנסו לשוק הבינלאומי זני נץ-חלב כתום מריבוי ווגטטיבי הן ממקורות בארץ והן מחו"ל. יש להניח שגם בזנים של נץ החלב הכתום המגודל הן לקטיפ והן לעיצוץ, יוחלף בהדרגה חומר השתילה הווריאבילי בקלונים נבחרים בעלי תכונות ייחודיות מבוקשות.

נץ החלב הכתום, כמו גם מרבית הזנים המסחריים ממינים אחרים של נץ החלב, רגיש באופן בולט לוורוס. מדובר בוורוס ספציפי, וירוס המוזאיקה של נץ החלב (OMV) המשתייך לקבוצת ה-Potyvirus הוורוס המועבר ע"י כנימות, גורם לניוון מהיר ביותר של חומר השתילה כאשר הסימפטומים העיקריים להינגעות בוורוס כוללים כתמי מוזאיקה על העלים, הורקת פרחים, התייבשות עלים, דיכוי אורך הגבעול וגודל הפרחים, גבעולים מפותלים ופגיעה בפתיחת הפרחים. המגדלים נאלצים להחליף את חומר הריבוי היקר כמעט כל שנתיים בגלל הירידה הדרסטית באיכות הפרחים המתפתחים מבצלים נגועים. השתילה של חומר חדש בסמוך לבצלים "ותיקים" מאץ בצורה משמעותית את קצב האילוח ואת הניוון שבא בעקבותיו. הוורוס אותר בדרום אפריקה כגורם לסימפטומים של מוזאיקה בצמחי נץ חלב ולכליה המועברים בקלות בעזרת כנימות ובאמצעים מכאניים (Smith and Brierley, 1944; Klessner and Nell, 1976). בידוד ואיפיון מולקולארי שלו נעשה גם הוא בדרום אפריקה ע"י Burger et al, 1990. לאחרונה, נבדק, במעבדתו של עבד גרה, תבדיר מקומי של וירוס המוזאיקה של נץ החלב שנאסף מצמחים נגועים אצל מגדלי נץ החלב (כהן וחוברי, 1995). הוורוס נוקה אופיין ונקבע הרצף שלו. כמו כן פותחו גם נוגדנים פוליקלונליים לחלבון המעטה של הוורוס. התבדיר הישראלי של הוורוס הראה דמיון רב לתבדיר שבודד בדרום אפריקה אך הוא בהחלט אינו זהה. נמצאה זהות של 93.7% ברצף הנוקלאוטידים של הגן לחלבון המעטה ו- 95.8% ברצף חומצות האמינו בחלבון (Zeidan et al., 1998).

טיפול בדרכים קונבנציונליות הביא לשיפור רב ועצום של גידולים שונים בחקלאות אבל דרך זו הינה מוגבלת ע"י מספר התכונות הזמינות במאגר הגנטי של מינים או זנים קרובים מבחינה גנטית ושניתן לבצע ביניהם הכלאות פוריות. אחד מההישגים החשובים של הנדסה גנטית הוא השימוש בטכנולוגית הטרנספורמציה של גנים אל תוך הגנום של צמחים עילאיים. בדרך זו ניתן להעביר גנים שבודדו מאורגניזמים שונים לצמחים מזנים קיימים ולהעשירם בתכונות שאינם נמצאות במאגר הגנטי של המין, או כאשר מעוניינים להכניס תכונה בודדת לזן שהוא מעולה בד"כ אך חסרות בו תכונות יחידות חשובות. להתבטאות של גנים אלה בפנוטיפ של צמחים קיימת חשיבות גדולה במיוחד כאשר לגנים אלה יש משמעות כלכלית. בסוג נץ חלב לא ידוע על עמידות לוורוס המוזאיקה של נץ החלב. הדרך היחידה לקיים קלונים נקיים מוורוס, לאורך זמן, היא ע"י החדרה של גנים לעמידות לוורוס תוך שימוש בשיטות של הנדסה גנטית.

בשנים האחרונות ישנם דיווחים רבים שהתמרה של צמחים בגנים וירליים עשויה להקנות לצמחים המותמרים עמידות בפני אילוח באותו הוורוס. מבין הגנים שיעילותם הוכחה במספר מערכות שונות נמצאו הגנים לחלבון המעטה (coat protein) של וירוסים שונים (Beachy et al. 1990). צמחים שעברו התמרה ברצפים ויראליים של חלבון המעטה היו עמידים לוורוס כשהגנים הוחדרו לגנום הצמחי הן באוריינטציה ה-sense והן באוריינטציה ה-antisense (Dougherty et al., 1994). בנוסף לכך הראו מחקרים שונים שהתמרה בגן - replicase ממקור ויראלי השרתה גם היא עמידות לאותו וירוס (Anderson et al., 1992; Brederode et al., 1995).

מבין השיטות המקובלות ביותר להחדרה של גנים לרקמות צמחיות שתיים הם המקובלות ביותר. השיטה היעילה ביותר להתמרת צמחים דו-פסיגיים היא בעזרת אגרובקטריום המחדיר מקטעי DNA ישירות לתוך הגנום הצמחי. השימוש באגרובקטריום בצמחים חד-פסיגיים הוא מוגבל, יחסית, מאחר ומרביתם אינם רגישים להדבקה ע"י החידק. למרות זו ישנם מספר דיווחים

על הצלחות בהתמרה של צמחים חד-פסיגיים בעזרת אגרובקטריום. השיטה השנייה המקובלת היא החדרה גנים לרקמה תוך שימוש ברובה חלקיקים המאיץ חלקיקי מתכת, זהב או טונגסטן, מצופים בדניא, למהירות כזו שהם יכולים לחדור לתוך התאים דרך דופן התא. תאים שנפגעים מידי זה יבטאו את הגנים שהוחדרו להם, לפחות באופן זמני (ביטוי חולף), בחלק קטן מהם משתלב ה-DNA המוחדר לתוך הגנום התאי וכך הם הופכים לתאים מותמרים בצורה יציבה. בעיקרון, ניתן לברור תאים אלה בעזרת תהליך סלקציה אם מחזירים, יחד גן המטרה (target gene) הרצוי, גן נוסף לגורם סלקטיבי (כגון עמידות לאנטיביוטיקה או לקוטלי עשבים), שיאפשר רק לתאים שמכילים את הגן לגורם הסלקציה לשרוד ולהמשיך להתחלק. שיטת הירי ברובה חלקיקים ישנם מספר יתרונות בתהליך הטרינספורמציה: בעזרתה ניתן לעקוף את שאלת הספציפיות של האגרובקטריום לפונדקאים (מיני צמחים) שונים, וניתן להשתמש בסוגים שונים של רקמות ואברי צמח כיעד לטרינספורמציה. קבלת ביטוי קבוע של גן המטרה ואינטגרציה מלאה שלו אל תוך הגנום התאי היא תנאי הכרחי, אך לא מספיק אם לא ניתן לגרום להתחלקות התאים הטרינסגניים והמשך הרגרציה שלהם לצמחים. חשוב, לכן, שהרקמה המטופלת תהיה שהתאים בה יהיו בעלי יכולת ליצירת מוקדים מריסטמטיים פעילים ורגרציה.

נץ החלב הנו גיאופיט חד-פסיגי שאינו רגיש להדבקה באגרובקטריום. טבעי, לכן, להשתמש ברובה חלקיקים כאמצעי המועדף לטרינספורמציה בסוג זה. היכולת לקבל רגרנטים מרקמות שונות כמו מקטעי עלים, גבעולי התפרחות, קאלוסים וכו' מאפשרת בחינה של התאמתם של הרקמות השונות לשמש כרקמת היעד.

המטרה העיקרית בתוכנית מחקר זו היא הקניית עמידות לוירוס המוזאיקה בסלקציות של נץ החלב הכתום (*O. dubium*) על ידי התמרתן בגנים האנטי-ויראליים לוירוס המוזאיקה של נץ החלב (OMV).

השגת מטרה זו הייתה מותנית בקבלת תוצאות חיוביות בשלבים שעל פיהם נקבעו אבני הדרך בהפעלת המחקר: א. התאמת השימוש ברובה החלקיקים להחדרת גנים לרקמות המטרה. ב. התאמת מצעי הגידול האופטימאליים למין (או לזן) הנבחר וכיול מערכת הרגרציה לצמחונים. ג. בירור הרקמה המתאימה ביותר לטרינספורמציה, בחינה של פרומוטרים שונים המסוגלים להפעיל גנים ברקמת המטרה, בחינת התגובה של הרקמות הצמחיות לסמני סלקציה אלטרנטיביים, בחירת סמן הסלקציה המתאים ביותר וקביעת התנאים המיטביים התנאים המיטביים לגידול והתפתחות של רקמות צמחיות בתנאי סלקציה. ד. בניית קונסטרוקטים הכוללים גנים לסלקציה וגן מדווח יחד עם גן המטרה: חלבון המעטה של הוירוס וואו גן replicase, שניהם ממקור ויראלי, תחת הבקרה של פרומוטרים מתאימים. ה. ירי של החומר הצמחי בקונסטרוקטים עם גן המטרה, גידול והתפתחות בתנאי סלקציה ורגרציה של צמחים טרנסגניים. ו. בחינת צמחים החשודים כטרנסגנים לנוכחות הגן או הגנים המבוקשים ואישור על פעילותם (בחינה ויזואלית ומולקולרית). ז. מבחן של הצמחים המותמרים לפעילות גני המטרה – האם הצמחים המותמרים עמידים לוירוס המוזאיקה של נץ החלב?

ג. פירוט הניסויים והתוצאות, כולל מסקנות:

1. התאמת סמן הסלקציה וכיול גידול הרקמה הצמחית: שני סוגי הגנים הנפוצים ביותר כסמני סלקציה בניסיונות התמרה של צמחים הם גנים לעמידות לקוטלי עשבים וגנים לעמידות לאנטיביוטיקה. השימוש בגנים לעמידות לקוטלי עשבים מועדף במקרים רבים מאחר פעולת התמרה

אחת ניתן להשיג פעילות של גן המטרה יחד עם עמידות סלקטיבית לקוטל עשבים שהיא לכשעצמה בעלת חשיבות כלכלית בגידול. בנוסף לכך, רבים מהצמחים החד-פסיגיים מגלים עמידות גבוהה יחסית לאנטיביוטיקה. גם בניסויים בנץ החלב העדפנו בשלב הראשון את השימוש בעמידות לקוטל העשבים Basta על פני השימוש בעמידות לאנטיביוטיקה קנמיצין כסמן לסלקציה. בכל אחד מהסמנים, השאיפה הריכוז המתאים לסלקציה הוא להערכתנו, הריכוז המונע מצד אחד את הרגנרציה של תאים לא מותמרים אך אינו גורם למוות מיידי ונקרוזה של התאים הלא מותמרים. כך עשוי להינתן לתאים המותמרים פסק זמן המאפשר להם להמשיך ולהתחלק מבלי שתאים נקרוטיים הנמצאים מסביבם (ומוצרי הפירוק שלהם) יגרמו להרעלה של הרקמה ויחד איתה, למוות של התאים המותמרים. הרקמה המתאימה חייבת להיות כזו המסוגלת לעבור רגנרציה לצמחונים, אם בדרך יצירה של פקעים אדוונטיביים או דרך התפתחות של עוברים סומטיים. בצורה זו ניתן לאפשר לתאים מותמרים להתפתח לצמחים שלמים בתנאי סלקציה.

ג.1.1. כיול קוטל העשבים "בסטה" כסמן סלקציה: קטעי עלים (5X5 מ"מ) מצמחי נץ החלב

שגודלו בתרבות הושמו על מצע רגנרציה (מצע #206 = $MS + 2mg/l BA + 0,1 mg/l$ NAA+3% sucrose) שכלל ריכוזים עולים: 0 (היקש), 0.25, 0.5, 1, 2, 3 ו-5 מ"ג/ליטר של bialaphos, החומר הפעיל בקוטל העשבים "בסטה". התוצאות מוצגות באיור X ריכוזים של 3 מ"ג/ליטר ומעלה גרמו בשלב הראשון להצהבה של העלים ומאוחר יותר להחממה ומוות של הרקמה הצמחית. בריכוז של 1 מ"ג/ליטר הייתה מניעת כמעט מוחלטת של הרגנרציה אך לא התפתחו סימני נקרוזה. אולם, לעיתים קרובות מתפתחים בריכוז זה צמחונים המתחמקים מהשפעה ישירה של גורם הסלקציה ונשארים ירוקים במשך תקופה ארוכה יחסית. הריכוז שנראה בהתחלה כמתאים לסלקציה, לפחות במקרה של מקטעי עלים, הוא 2 מ"ג לליטר של בסטה. אולם, חשיפה ממושכת בסטה בריכוז 2 מ"ג לליטר גרמה להחממה של הרקמה. הטווח בין ריכוז הבסטה המאפשר התפתחות של צמחים "מתחמקים" לבין הריכוז הגורם להחממה ומוות הוא קטן מכדי לאפשר שימוש יעיל בקוטל העשבים כסמן סלקציה.

ג.2.1. הכוונת הירי ברובה חלקיקים לאזורים בהם צפויה רגנרציה: קבלת צמחים טרנסגנים

מותנית באינטגרציה מלאה של הגנים הייחודיים לתוך הגנום התאי אך גם בכך שתאים אלה יוכלו להמשיך ולהתחלק, להתפתח למרכזים מריסטמטיים פעילים ולעבור רגנרציה לצמחים. הרגנרציה מקטעי עלים של נץ חלב מרוכזת בעיקר בסמוך לחתך, בעיקר בחלק הבזאלי של מקטע העלה. הרגנרציה בחלקים אחרים של מקטעי העלים היא מועטה ביותר. חשוב, לכן, לרכז את ירי החלקיקים לאזור שבו הסיכויים לקבל התפתחות רגנרנטים הם הגדולים ביותר. לשם כך פותח ע"י אלכס ליפסקי מעמד המאפשר החזקה של קטעי העלה בכון החושף את אזור החתך לכוון ממנו נורים החלקיקים. קטעי עלים של נץ החלב הכתום נורו בחלקיקי זהב שנשארו את הפלסמיד pUBQ3genGUS שכלל את הגן המדווח uidA המקודד לאנזים β -glucuronidase (GUS) תחת בקרה של הפרומוטר ubiquitin3. התוצאות הראו בברור ריכוז של נקודות כחולות, סה"כ 116 נקודות בעשרה קטעי עלים, באזורי החתך הרגנרטיבים בעלים (ראה תוצאות המוצגות בדו"ח שנתי 256-0568-00). בשיטת הירי המכוון ניתן לכאורה, להעלות את הסיכוי לקבלת צמחים טרנסגנים. יחד עם זאת המספר הקטן יחסית של הנקודות המייצגות ביטוי חולף לא מותירות סיכוי גבוה לקבלת ביטוי קבוע במקטעי העלים וסיכוי נמוך מאוד לקבלת רגנרציה של צמחים מותמרים. ריאקציה ה GUS החזקה מוכיחה גם את התאמתו

של הפרומוטר UBQ3 לבקרת הפעלתם של גנים ברקמות של נץ החלב. פלסמיד זה שימש אותנו במשך כל תקופת המחקר, כסמן היקש, על מנת לבחון את היעילות של פרומוטרים וקונסטרוקטים אחרים וכן את מידת ההתאמה של הרקמות הצמחיות השונות לקליטה של גנים.

ג. 1. 3. ירי עם פלסמידים שונים וניסיונות סלקציה: תוצאות שתועדו בספרות הראו שניתן לקבל התמרה של 12 סמנים שונים הנמצאים על פלסמידים שונים את יורים תערובת של הפלסמידים אל הרקמה הצמחית (Hadi et al. 1996). לאור זאת נעשה ניסיון ירי נעשה עם תערובת של שלושה פלסמידים שונים pSAN45, הנושא גן רפליקאז פגום PAT+ המקודד לאנזים N-phosphinothricin-acetyltransferase והמקנה עמידות לבסטה, pSANZU הנושא גן לחלבון המעטה של וירוס המוזאיקה של המלפפון וכן pPG5 הנושא נושא את הגן uidA ואת הגן PAT. קטעי עלים של נץ החלב הכתום מקלון N1 נורו בחלקיקי זהב שנשארו תערובת של הפלסמידים הנ"ל ושכוונו אל אזורי החתך בקטעי העלים. לאחר הירי הועברו האקספלנטים למצע רגנרציה (מצע #206) שהכיל 1 מ"ג לליטר בסטה. רק באחד מתוך 79 קטעי עלים התפתחו צמחונים למרות נוכחות קוטל העשבים במצע (דו"ח שנתי לתוכנית מחקר 256-0568-00). הצמחונים הועברו למצע חדש שכלל 1 מ"ג בסטה והם המשיכו לגדול ולהתפתח. בחינה של ראקציה GUS בחתיכות של עלים מצמחים אלה לא נתנה תוצאה חיובית. יתכן צמחים אלה הם צמחים שהתחמקו מהשפעה ישירה של גורם הסלקציה ואינם צמחים טרנסגנים. נראה גם כאן שריכוז בסטה של 1 מ"ג לליטר יתכן ואינו מספיק לסלקציה. העלאה של ריכוז הבסטה במצע הסלקטיבי גרמה לנקרוזה, להרעלת הרקמה ולמוות של הצמחים שהתפתחו. שוב נוכחנו לדעת שהשימוש בבסטה כסמן סלקציה בנץ החלב הוא בעייתי.

ג. 2. 1. ביסוס בתרבות של תרביות תאים המתאימים להתמרה: בתחילת עבודת המחקר נשקל שימוש בשתי אלטרנטיבות של רקמות צמחיות להתמרה. עלים מצמחים שגודלו בתרבות סטרילית, או כאלה שגדלו בחממה ובנוסף לכך נבדקה גם התגובה של תרבית תאים שגודלה במצע נוזלי. בתחילה העדפנו את השימוש בעלים מאחר ולגביהם קיימת שיטה מבוססת לרגנרציה על גבי מצע 206 (MS + 2mg/l BA + 0,1 mg/l NAA + 3% sucrose) השימוש בתרבית צברי תאים במצע נוזלי נדחה מחשש לשונות סומקלוגית, ויטריפיקציה וירידה בפוטנציאל המורפוגנטי של התרביות. אולם לאור ההצלחה שנחלנו בהתמרה של תאים כאלה בשושן החלטנו לנסות ולכיל את השיטה גם בנץ החלב. כמקור לתרבית שמש קאלוס קומפקטי, מוצק, שהתפתח בבסיס הצמחים שהוחזקו בתרבית ארוכת טווח על מצע 206. גושי הקאלוס הועתקו בהתחלה למצע 206 מוצק טרי בחושך. במשך 48 יום הייתה התפתחות איטית מאוד ונטייה של הקאלוסים לעבור רגנרציה מוקדמת מדי לצמחונים. התרביות חולקו לשניים והועברו להמשך גידול בחושך לשני מצעים נוזליים: מצע 206 (כנ"ל) ומצע 101 (מצע 101 = MS + additional 0.4 mg/l Thiamine-HCL + 1 mg/l NAA + 0.1 mg/l BA + 3% sucrose). הקאלוס שגדל על מצע 206 התפתח לאט יותר לקאלוס מוצק יחסית. ואילו על מצע 101 התפתח קאלוס "רווח", אך לא פריך (עיין דו"ח שנתי לתוכנית מחקר 256-0568- לשנת 2001).

ג. 2. 2. התאמת תרביות תאים לירי ברובה חלקיקים: תרביות התאים שגדלו בשני מצעי הגידול נורו בחלקיקי זהב טעונים בפלסמיד pUBQ3uidA הנושא את הגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטר הקונסטיטוטיבי UBQ3 (אותו פלסמיד ששימש בעבר לירי במקטעי עלים). התוצאות

הראו שוני בין שני קווי הקאלוס בהתאמתם לירי שבאה לביטוי בתגובה שונה לביטוי חולף של הגן המדווח GUS. בשתי צלחות של תאים שגדלו במצע 206 נספרו כ-7000 נקודות כחולות, לעומת פחות מ-1500 נקודות שנספרו בתאים שגדלו במצע 101. קאלוס "קומפקטי" נמצא בעבודתנו כמתאים יותר לטרנספורמציה ע"י ירי ברובה חלקיקים (דו"ח שנתי לתוכנית המחקר -0568-256 לשנת 2001).

ג.2.3. רגנרציה וסלקציה בתרבית נוזלית: שני קווי התאים שגדלו בתחילה במצעים 206 ו-

101 בחושך הועברו להמשך גידול והתפתחות למצע 206 באור (ש' באור ו-8 ש' בחושך).

מהקו שהגיע במקור ממצע 206 התפתחו עוברים סומאטיים (אמבריוגנזה) ואילו מהקו שבמקור גדל על מצע 101 התפתחו צמחונים מעטים בלבד. לאור התוצאות האלה והעובדה התאים שהתפתחו במצע

206 נמצאו גם מתאימים יותר לירי (לעיל), הוחלט להמשיך בכול המערכת בתאים שגדלו על מצע

206. לאחר העתקה נוספת והמשך הגידול על מצע 206 למשך חודש נוסף, התברר שהגידול

והתפתחות הקאלוס בתרבית הואטה באופן משמעותי, כמעט עד לכדי עצירה מוחלטת. נוצר הכרח

להעביר את התרבית למצע חדש שיחזיר את התאים לחלוקה מחודשת ולהתפתחות. ניסינו שלושה

מצעים שונים שאתם היה לנו ניסיון חיובי גם במערכות אחרות: מצע $1/2 MS + 18g/l MG$

(maltose+4.6 g/l glycerol), מצע 101 שנוסה גם בעבר ומצע VB (MS+0.2 +2 mg/l Dicamba)

mg/l Kinetin. תרביות התאים התפתחו יפה בכל מהמצעים אולם התרבית שהתפתחה בצורה הטובה

ביותר הייתה זו שגודלה במצע 101 במשך 8 שבועות. התחלה של רגנרציה יעילה לעוברים

סומאטיים/צמחונים התקבלה לאחר העתקה של התרבית למצע ללא הורמונים למשך שלושה שבועות

נוספים.

ג.2.4. בחירת הרגישות לקנמיצין: הניסיון להשתמש בקוטל העשבים בסטה כסמן לסלקציה

לצמחים מותמרים בנץ החלב נכשל, כפי שנאמר לעיל. תוצאה דומה קיבלנו בעבר גם בניסיונו להתמיר

רקמות של שושן הפסחא. התמרת שושן יעילה התאפשרה רק לאחר שעברנו לשימוש בקונסטרקטים

שכללו גן לעמידות לקנמיצין כסמן סלקציה של צמחים מותמרים. הוחלט, לכן, לנסות גישה דומה גם בנץ

החלב. התגובה של נץ חלב לריכוזים עולים של קנמיצין מוצגת באיור 1. בתרבית שגודלה על המצע

המוצק עכב קנמיצין את התפתחות הקאלוס כבר בריכוזים של 10 מ"ג לליטר (איור a-1) עליה נוספת

בריכוזי הקנמיצין עד ל-150 מ"ג לליטר לא התבטאו בעיכוב משמעותי נוסף בגידול התאים. בשום מקרה

לא ראינו מוות של תאים אולם ההתמיינות נעצרה לחלוטין. השפעת קנמיצין בתרביות נוזלית הייתה

חזקה בהרבה (איור b-1), נצפתה ירידה דרסטית בהתרבות התאים ועצירה מוחלטת של הרגנרציה. גם

בריכוזים הגבוהים נשאר המצע צלול ללא סימני נקרוזה. עיכוב הרגנרציה ע"י קנמיצין נראה ברור גם

כאשר הוסף קנמיצין לתרביות בשלב מאוחר יותר כאשר התרביות החלו כבר בתהליך ההתמיינות. תאים

מקורם ממצע 206 שהועברו למשך 60 יום למצע 101 ולאחר מכן למצע נטול הורמונים למשך 25 יום

נוספים התחילו להתמייין. אולם העתקתם למצע שהכיל 50 מ"ג לליטר קנמיצין עצר לחלוטין את המשך

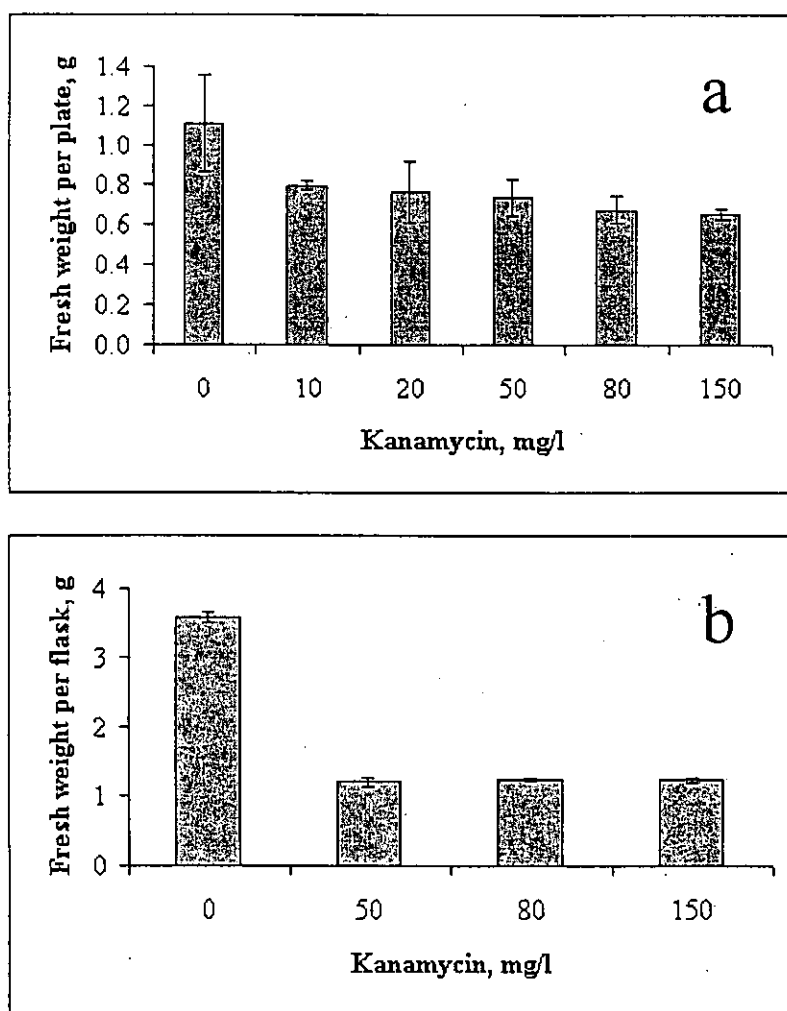
ההתמיינות הן ע"י מצע מוצק (לוח b-1) והן במצע נוזלי (לוח a-1). תרביות כאלה בנוכחות קנמיצין, גם

בריכוזים של 20 מ"ג לליטר אבדו בהדרגה את צבען הירוק ולמרות שלא ניכרו בהם סימני נקרוזה

ברורים, נפסקה בהם ההתפתחות לחלוטין והן נידונו למוות איטי. התרביות שגדלו במצע ללא קנמיצין

המשיכו בהתמיינות תקינה לצמחונים נורמאליים, רבים מהן השרישו זמן קצר לאחר העברתם למצע MS

ללא הורמונים (לוח c-1).



איור 1: ההשפעה של ריכוזים עולים של קנמיצין במצע הגידול על גידול והתפתחות של תרבית תאים של נץ החלב הכתום (*O. dubium*) על מצע 101 מוצק לאחר 30 יום (a), או במצע 101 נוזלי (b) לאחר 70 יום.

ג. 3. בניית קונסטרוקטים להתמרה של נץ החלב :

ג.1.3. בחינת התאמתם של פרומוטרים שונים : הבחינה של התאמת פרומוטרים

קונסטיטוטיביים לשמש כמבקרי הפעלת גנים ברקמות חד-פסיגיות נעשתה ע"י החדרתם לפלסמיד pGreenII לפני הגן GUS/nos terminator. החדרת הגנים נבחנה ע"י הפעלתם של אנזימי רסטריקציה המתאימים. בחינת פעילות הקונסטרוקטים נעשתה ע"י ירי של אפידרמיס של בצל המשתייך גם הוא לעל-משפחת השושניים שלה משתייך גם נץ החלב. התוצאות, על פי הספירה של נקודות ביטוי חולף של GUS 48 שעות לאחר הירי, מוצגות בטבלה 1.

טבלה 1: יעילותם של פרומוטרים שונים בהפעלת ביטוי חולף של GUS בתאי אפידרמיס של בצל

Promoter	No. of GUS-expressing cells/plate on	
	Water agar	MS medium
35S	42	92
Δ SVBV	16	44
Act 2	2	0
UBQ3	43	133
Act 1-35S	-	85

הפרומוטרים CaMV35S, Δ SVBV, UBQ3 ו-Act1-35S נתנו מספר נקודות כחולות (GUS)

(באותם סדרי גודל. רק הפרומוטר Act2 נתן תוצאה שלילית. תופעה מעניינת נצפתה כאשר בכל המקרים כשהושמו התאים, לאחר הירי על מצע אגר שהומס במים (ללא חומרי צמיחה), היה מספר הנקודות קטן בהרבה מאשר בטיפולים המקבילים שהושמו על מצע MS. הפרומוטר Δ SVBV בודד במינהל המחקר החקלאי (Wang et al., 2000) ואין לגביו מגבלות הקשורות בקניין רוחני. יעילותו של הפרומוטר UBQ3 הוכחה בבדיקות הקודמות ברקמות נץ החלב השונות. לפיכך, הוחלט להשתמש בשני הפרומוטרים הנ"ל לבקרת ההפעלה של גני המטרה בקונסטרוקטים שנבנו במטרה לקבל צמחים מותמרים עמידים לוורוס.

ג. 2.3. בניית קונסטרוקטים עם גן-מטרה: שני הגנים שנבחרו לשמש בעבודת המחקר היו, כאמור, התבדיל הישראלי של הגן לחלבון המעטה (CP) של וירוס המוזאיקה של נץ החלב (OMV) שבודד במחלקה לוורולוגיה והגן רפליקאז (Nib) של הווירוס שבודד בדרום אפריקה. כל אחד משני גנים אלה הונדס עם הפרומוטר Δ SV (Δ SBV) ועם UBQ3. לאור העובדה שקנמיצין נמצא מתאים יותר לשמש כסמן סלקציה הוחלט להשתמש בפלסמיד pCAMBIA2301 (איור 2) כווקטור הנושא את גן המטרה. פלסמיד זה נושא את הגן nptII לעמידות לקנמיצין ואת הגן המדווח GUS, שניהם תחת הבקרה של הפרומוטר הקונסטיטוטיבי 35S שהשימוש בו הוכתר בהצלחה גם בהתמרה של שושן הפסחא (Lipsky et al, 2002)

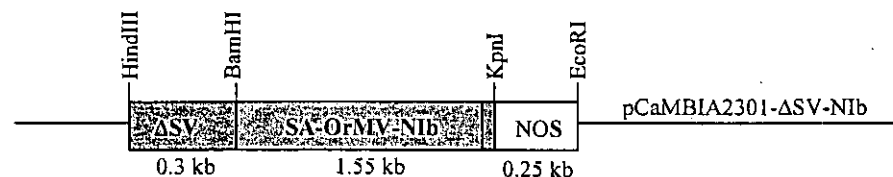
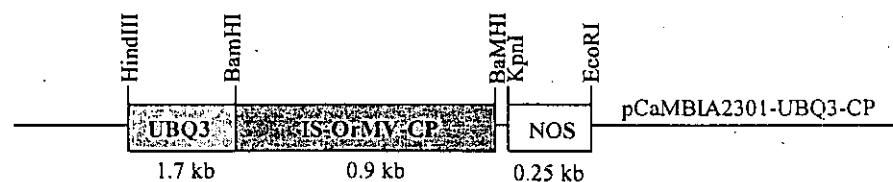
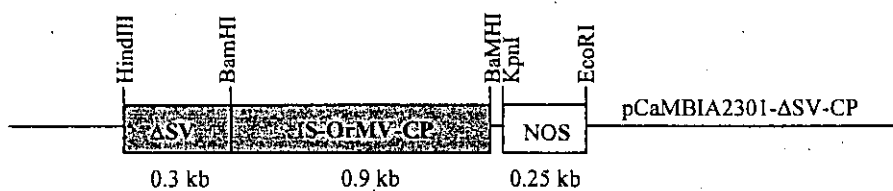
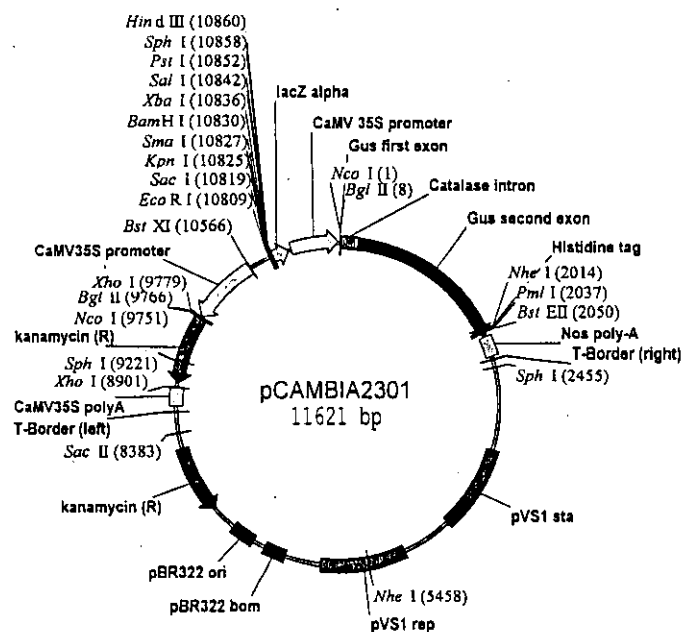
בבניית הקונסטרוקט השתמשנו בטכניקות המקובלות שכללו חתוך בעזרת אנזימי רסטריקציה, טרנספורמציה וריבוי ב- E.coli. בשלב הראשון שובט NOS-terminator אל בין אתרי הרסטריקציה KpnI-EcoRI של הפלסמיד pCaMBIA2301. לאחר מכן שובטו הפרומוטרים Δ SV (Δ SBV), ו-UBQ3 אל בין אתרי הרסטריקציה HindIII-BamHI. השלב הבא כלל שיבוט של הגן לחלבון המעטה (CP) או הגן לרפליקאז (Nib), שניהם מווירוס המוזאיקה של נץ החלב, אל תוך אתר הרסטריקציה BamHI או אל האתר BamHI-KpnI, בהתאמה, בשני הווקטורים. התוצאה של שיבוט זה היא ארבעת הקונסטרוקטים שהתרשים שלהם, הכולל את אתרי הרסטריקציה, מופיע באיור 2:

pCaMBIA2301- Δ SV-NOS-CP, pCaMBIA2301-UBQ3-NOS, pCaMBIA2301-UBQ3-NOS-CP, ו-Nib-sense. בכל הקונסטרוקטים שבהם קיים הגן CP הוא מופיע באוריינטציית sense.

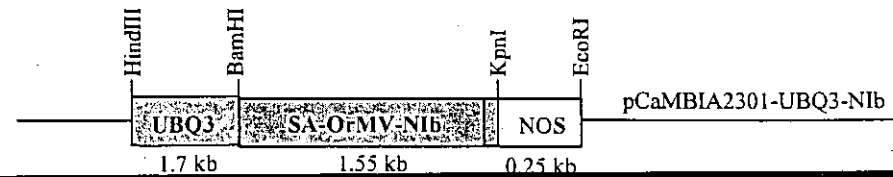
ג. 3. ירי צברי תאים בגני המטרה: תרבית ברת קיימא של צברי תאים אטיולנטים גודלו

בחושך על גבי מצע #101 נוזלי (1 + 0.4 mg/l thiamine-HCl) MS salt and vitamins with additional

שנה ונבחנו, תקופתית, בכדי להבטיח שהם ממשיכים לשמור על יכולתם לעבור רגנרציה לצמחונים לאחר העברתם לאור. צברי התאים האלה נורו בחלקיקי זהב שנשאו כל אחד מארבעת הפלסמידים עם גני המטרה. בכל אחד מהניסויים נורתה רקמה הצמחית בשתי צלחות נפרדות לכל קונסטרקט. כל צלחת נורתה 3 פעמים. לאחר 48 שעות נבדק ביטוי חולף של ריאקצית GUS. בכדי להעריך את יעילות הירי נורו צברי התאים מאותה תרבית גם עם הפלסמיד pUC-UBQ3genGUS שאיתו נעשה הכיול הראשוני



■ - HIS tag



* A Kozak sequence (CCA/GCCATGG) was inserted in the 5' of CP and Nib - CCACCATGG

איור 2. הפלסמיד pCaMBIA2301 בעל אתרי רסטריקציה מרובים וארבעת הקונסטרוקטים עם גני המטרה ששובטו לתוכו.

של הירי ושכלל את הגן *uidA* לאנזים בטא-גלוקורונידאז (GUS) תחת בקרה של הפרומוטר UBQ3. תוצאות נבחרות ממבחן הביטוי החולף מופיעות בטבלה 2.

טבלה 2. ביטוי חולף של GUS לאחר ירי עם פלסמידים שונים (פרטים בגוף הדו"ח)

Row #	Plasmid vector	Date of experiment (Number)	Medium	# foci per experiment	# foci per g FW	Relative efficiency (% of exp. I)	Relative efficiency within the same experiment
1	pUC UBQ3 gen GUS	17.04.2001 (I)	101S*	6500	1320	100	
2	pUC UBQ3 gen GUS	12.04.2002 (II)	101S	1280	660	50	100
3	pCAMBIA ΔSV-Nib-nos-35S-GUS	12.04.2002 (II)	101S	1040	510	38	77
4	pCAMBIA2301 -35S-GUS	12.04.2002 (II)	101S	500	360	27	55
5	pUC UBQ3 gen GUS	01.05.2002 (III)	101S	2500	500	38	100
6	pCAMBIA UBQ3-Nib-nos-35S-GUS	01.05.2002 (III)	101S	1600	370	28	75
7	pUC UBQ3 gen GUS	01.05.2002 (III)	101	2490	550	41	109
8	pUC UBQ3 gen GUS	26.05.2002 (IV)	206S**	4000	1180	89	
9	pUC UBQ3 gen GUS	23.06.2002 (V)	206S**	6350	1160	88	

*Medium #101: MS salt and vitamins with additional 0,4 mg/l thiamine-HCl + 1 mg/l NAA + 0.1 mg/l BA + 3% sucrose, #101S is the same medium but supplemented with 9% sucrose.

**Medium #206S : MS salts and vitamins with 2 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA +9% sucrose.

היעילות היחסית של כל קונסטרוקט נבחנה על פי מספר הנקודות הכחולות שהתקבלו בירי שלו בהשוואה למספר הנקודות שנצפו בירי של אותה רקמה, מאותה תרבית, כשנורתה בפלסמיד ההיקש (pUC-UBQ3genGUS). בחינת ההתאמה (competence) של הרקמה ה"מבוגרת" שקוימה בתרבית במשך שנה נעשתה ע"י השוואה עם התוצאות שהתקבלו שנה קודם לכן כשהרקמה הייתה "צעירה" (שורה 1 בטבלה). למרות שמספר הנקודות הכחולות שנצפו לאחר ירי עם הקונסטרוקטים השונים

המיוצגים בטבלה 2 ע"י pCAMBIA ΔSV-NIb-NOS-35S-GUS (שורה 3) ו-pCAMBIA UBQ3-NIb-NOS-35S-GUS (שורה 6), היה גבוה למדי, הוא היה נמוך בהרבה מהתוצאות שקבלנו ברקמה צעירה (ראה תוצאות המוצגות בשורה 1 לעומת אלה בשורה 2). נבחנו גם האפשרות שהבדלים בריכוז הסוכרוז במצע הגידול השפיע על מספר הנקודות הכחולות שנצפו. בפועל מספר הנקודות היו באותו סדר גודל כאשר ריכוז הסוכר במצע היה 9% (מצע 101S, שורה 5) או 3% (מצע 101, שורה 7).

בניסויים הקודמים שלנו מצאנו שתאים שגדלו על מצע #206 (MS salts and vitamins + 2) על $0.1 \text{ mg/l NAA} + 0.1 \text{ mg/l BA}$ הראו התאמה גבוהה יותר לטרנספורמציה מאשר התאים שגדלו על מצע #101. אולם, בטווח הארוך עכב מצע #206 בהדרגה את המשך הגדילה של צברי התאים. לפיכך הועדף השימוש במצע #101 לקיום מתמשך של תאים בתרבית. אולם, לאור ההצלחה בקבלת ביטוי חולף של GUS במצע #206, הוחלט לבחון את ההשפעה של העתקה של הרקמה, שגודלה קודם על מצע #101 למצע #206 טרי זמן קצר לפני הירי. ואמנם, צברי התאים שהועתקו למצע #206 שבועיים לפני הירי (שורה 8) הראו התאמה גבוהה בהרבה, שהתבטאה בעלייה במספר הנקודות הכחולות. התוצאות היו טובות עוד יותר כאשר החשיפה למצע #206 טרי נעשתה שבוע לפני הירי (שורה 9). ההעתקה הקצרה למצע #206 החזירה את הרקמה מבחינת יעילות התגובה לירי, לרמה שאותה ראינו ברקמה צעירה.

ג. 3. 4. ביטוי קבוע, סלקציה ורגרציה של צמחי נץ חלב טרנסגנים: לאחר הירי של צברי

התאים עם החלקיקים שנשאו את ארבעת גני המטרה ובחינת הביטוי החולף בריאקצית GUS הועברו התאים לגידול ממושך בחושך במצע #101 בתוספת 80 מ"ג לליטר קנמיצין (מצע סלקציה). התאים הועברו למצע טרי כל שבועיים. דוגמה מתאים אלה נלקחה לאחר מספר שבועות ונצבעה לנוכחות ביטוי קבוע של הגן המדווח כפי שמוצג בלוח 2. בשלב הראשון גודלה הרקמה על מצע סלקציה במשך חודשיים. בתקופה זו הוכפל נפחה של הרקמה שנורתה בקונסטרוקטים השונים. רקמת היקש שלא נורתה והושמה על מצע סלקציה נשארה במצבה ההתחלתי למרות שלא נראו בה סימנים של החמה או מוות. רקמת היקש שגדלה על מצע ללא קנמיצין הכפילה את נפחה פי 5-6 במשך אותה תקופה. תאי נץ חלב חייבים להגיע למסה קריטית מסוימת לפני שהם מסוגלים להתמייין לצמחים עם העברתם למצע נטול הורמוני צמיחה באור. תאי היקש שהועברו לאחר חודשיים לאור התמיינו בצורה טובה ויצרו "דשא" של צמחונים. לעומת זאת, ברקמה שנורתה עם הקונסטרוקטים השונים ושגדלה במצע סלקציה הופיעו סימני הורקה בודדים וגם אלה, רק כחודש לאחר ההעברה לאור. נראה כי לתאי נץ חלב בתנאי סלקציה לוקח הרבה יותר זמן מאשר לתאי שושן על מנת לפתח את אותה המסה קריטית הדרושה להמשך התמיינות לצמחים. הוחלט לכן להמשיך בתנאי הסלקציה בחושך למשך ארבעה חודשים נוספים (סה"כ 6 חודשי סלקציה במצע נוזלי, בחושך) ורק אח"כ להעביר את הרקמה לתנאים המעודדים התמיינות.

לאחר 6 חודשי על מצע #101 הועברו הצברי התאים למצע MS ללא חומרי צמיחה והמשיכו את גידולם באור (16 ש"א או ביממה). תאי היקש שגדלו על מצע ללא קנמיצין החלו בהתמיינות והורקה מיד לאחר ההעתקה לאור. תרביות שהועתקו, זמנית, למצע #206 שבוע לפני העברתם לאורת התמיינו מהר יותר מאשר תרביות הועתקו למצע כזה שבועיים לפני החשיפה לאור או כאלה שנשארו על מצע #101 בחושך ממש עד למועד העברתם למצע MS באור. תאי היקש בשלבים שונים של התמיינות

הועברו למצע מוצק להמשך התפתחותם. אלה שנחשפו בשלב זה לקנמיצין, גם אם ריכוזו לא עלה על 20 מ"ג לליטר, אבדו בהדרגה את הכלורופיל ומתן כעבור מספר שבועות.

התאים שנורו בכל ארבעת הקונסטרוקטים המשיכו להתפתח בתנאי סלקציה (80 מ"ג לליטר קנמיצין) לאחר ששה חודשי סלקציה הם הועברו למצע רגנרציה באור. הם התמיינו בתנאי סלקציה לעשרות צמחונים. הצמחים הועברו המשך גידול על מצע סלקציה מוצק. עלים וחלקי צמחים שהוסרו מצמחונים אלה הראו תגובה חזקת של הגן המדווח GUS. התהליך שבסופו התקבלו צמחים טרנסגנים של נץ חלב מוצג בלוח 2.

ד. מסקנות והשלכות לסיכום :

הגידול האטי של תאי נץ החלב בתנאי הסלקציה עכב בצורה מהותית את שלבי הסיום של תוכנית המחקר. בשלב זה הצמחונים, שהם כפי הנראה מותמרים (על סמך התבטאותו של הגן המדווח), צריכים לפתח מסה צמחית מינימאלית לפני שיהיה אפשר להפיק מהם DNA, לוודא סופית את נוכחותם של גני המטרה בצמחים ולחשוף אותם להדבקה מכוונת בוורוס. המחקר ימשך, לכן גם בשנת 2003 על מנת שנוכל להגיע למימוש המטרה המוצהרת – קבלת צמחים עמידים לוורוס המוזאיקה של נץ החלב. הצלחתו של המחקר בפיתוח השיטה להתמרה של צמחי נץ החלב פותחת פתח להכנסתם של גנים נוספים בעלי משמעות כלכלית היכולים לשפר את הגידול, לחסוך בהוצאות או אך לפתח יישומים או שווקים חדשים.

ה. פרסומים :

1. אבנר כהן וחוברין דו"חות שנתיים לתוכנית המחקר 256-0568 לשנים 2000 ו-2001, הקניית עמידות לוורוס המוזאיקה של נץ החלב בסלקציות של נץ החלב דוביום. המדען הראשי של משרד החקלאות.

2. אבנר כהן, דווח לתוכנית המחקר, יום עיון בתי צמיחה א' למחקרים במימון המדען הראשי, 1 בינואר 2002

3. Lipsky, A., A. Cohen, V. Gaba, A. Ion, D. Sandler-Ziv, A. Gera and A. Watad. 2002. Development of *Ornithogalum dubium* cell cultures of high competence for transformation by particle bombardment and of high embryogenic capacity. 10th IAPTC&B Congress, Orlando Fla.

ספרות מצוטטת

כהן, י., ע. גרה, ס. פינקלשטיין, א. כהן. 1995. וירוסים בנץ חלב. דפי מידע, גיליון 4 עמ' 67-68.

Anderson J.M., Palukitis P. and Ziatlin M. (1992) A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 8759-8763.

Beachy R.N., Loesch-Fries S. and Tumer N.E. (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 451-474.

Brederode F.T., Taschner P.E.M., Posthumus E. and Bol J.F. (1995) Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. *Virology* 207: 467-474.

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. *Jour. Gen. Virol.* 71:2527-2534.

Dougherty W.G., Lindbo J.A., Smith H.A., Parks T.D., Swaney A. and Proebsting W.M. (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Microbe Interac.* 7: 544-552.

Klessner, P.J., and Nell D.D.(1976). Virus diseases and tissue culture of some South African flower bulbs. *Acta Horticulturae* 59:71-76

Lipsky A, A. Cohen, R. Barg, S. Shabtai, Y. Salts, V. Gaba, K. Kamo, A. Gera and A. Watad (2002) Transformation by particle bombardment and of high embryogenic capacity. 10th IAPTC&B Congress, Orlando Fla.

Hadi, M.Z., McMullen, M.D., and Finer, J.J. (1996). Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 15:500-505.

Smith, F.F., and Brierley, P. (1944). Ornithogalum mosaic. *Phytopathology* 34:497-503.

Wang, Y-Z., Gaba, V., Wolf, D., Xia, X-D, Zelcer, A., and Gal-On, A. (2000). Identification of novel plant virus promoter using a potyvirus infectious clone. *Virus Genes* 20:11-17.

Zeidan, M., J. Cohen, A. Watad and A.Gera. (1998). Improved purification and molecular properties of Ornithogalum mosaic virus in Israel. *Ann. Appl. Biol.* 133:167-176.

3. סיכום לתוכנית המחקר

מטרות המחקר: א. החדרה של גנים ממקור וירלי כמו הגן לחלבון המעטה או הגן לרפליקאז לגנום על מנת להעניק עמידות לוירוס בקלונים (*Ornithogalum dubium*) הצמחי של נץ החלב הכתום המותמרים. השגת מטרה זו מותנית בבחירת הרקמה הצמחית המתאימה, בהתאמת השימוש ברובה החלקיקים להחדרת גנים לרקמת המטרה, בירור התנאים המיטביים לטרנספורמציה של רקמות צמחיות בקלונים הנבחרים וכיול מערכת הסלקציה והרגנרציה בתרבית.

עיקרי הניסויים והתוצאות בתקופה אליה מתייחס הדו"ח: תרבויות תאים שגדלו במצעים שונים הגיבו בצורה שונה לירי. קאלוס שגדל במצע 206 נמצא מתאים יותר לביטוי חולף של הגנים ואילו מצע 101 התאים לקיום ארוך טווח לפני הירי ולאחריו. נבנו ארבעה קונסטרוקטים שכללו שני גני מטרה: הגן לחלבון המעטה והגן לרפליקאז עם שני פרומוטרים שונים. צברי תאים שגדלו בקונסטרוקטים האלה וגדלו בתנאי סלקציה במצע נוזלי ובחושך, במשך ששה חודשים התמיינו לצמחונים רבים עם העברת לגידול באור. כמעט בכל הצמחים האלה אובחנה פעילות של הגן המדווח GUS.

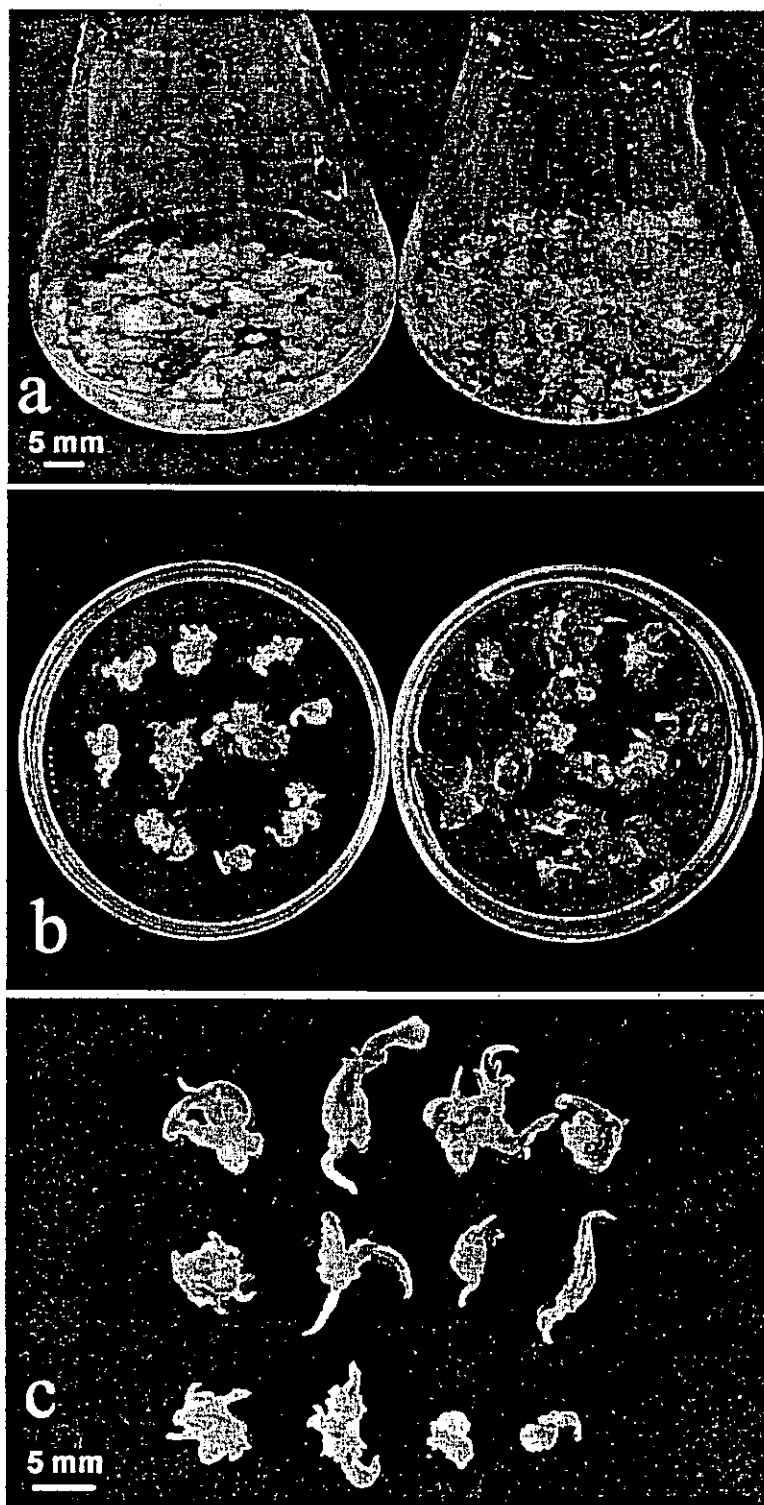
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום והמשך: הגידול של צברי תאים של נץ חלב בתרבית נוזלית התברר כאיטי מהצפוי עובדה שהאטה את ההתמיינות, עכבה את האישור המולקולארי לתהליך ההתמרה ודחתה את האפשרות לבחינת התגובה של הצמחים להדבקה בוירוס. קנמיצין נמצא מתאים לשמש כסמן סלקציה אולם יש לאפשר לתרבויות זמן מספיק לגדול בתנאי סלקציה. השיטה מתאימה להתמרת נץ חלב ויכולה להיות מיושמת להתמרה בגנים נוספים בעלי חשיבות כלכלית.

הבעיות שנותרו לפתרון: יש לאפשר לצמחים לגדול למסה מספקת להפקה של DNA על מנת לקבל אישור מולקולארי לנוכחות גני המטרה בצמחים שהתמיינו בתנאי סלקציה ונמצאה בהם פעילות חזקה של הגן המדווח GUS. במקביל יהיה צורך לחשוף את הצמחים להדבקה מכוונת בוירוס בדרך מכאנית או בעזרת כנימות בכדי לבחון אם הם אכן עמידים.

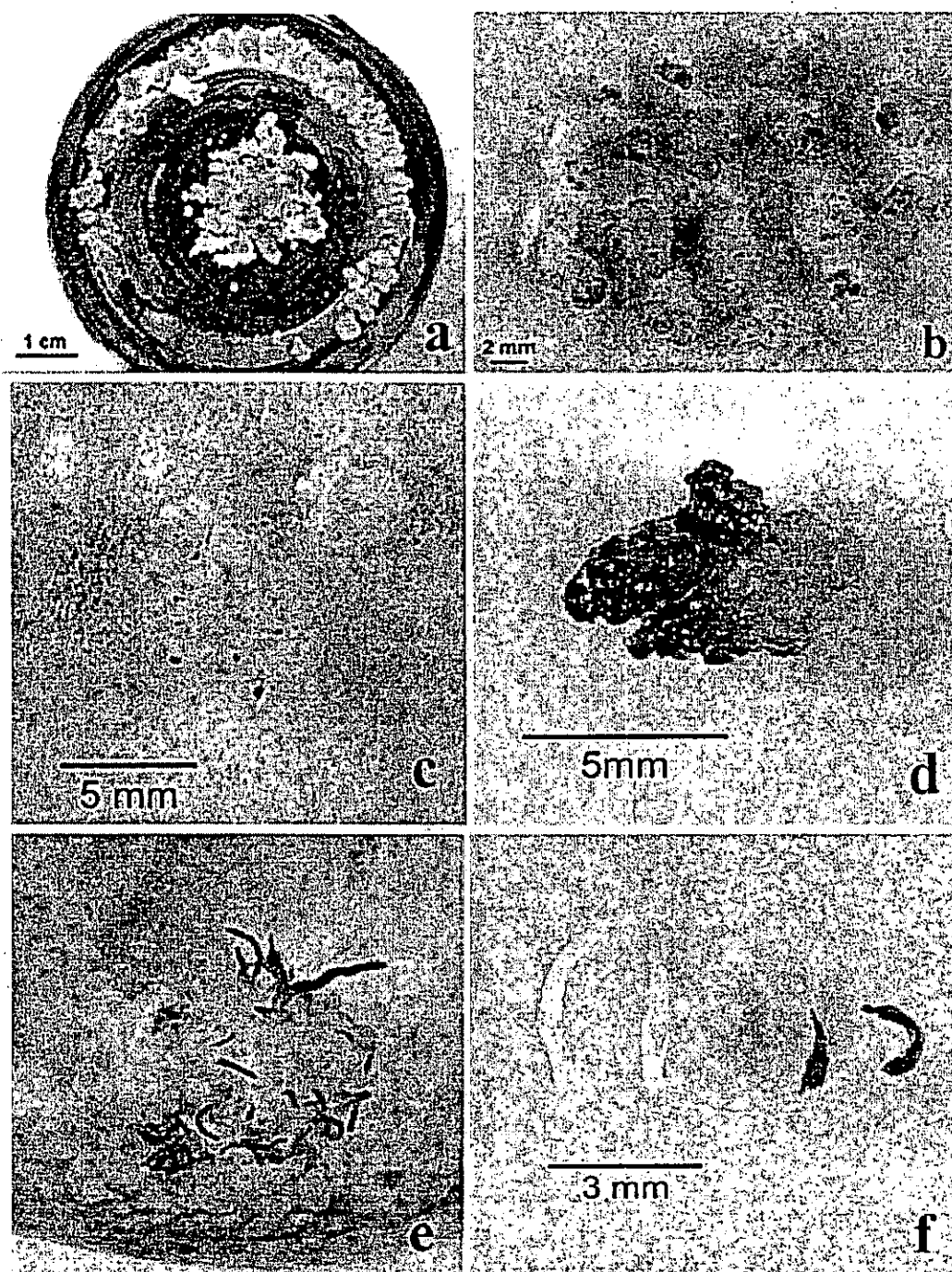
האם הוחל בהפצת הידע ?

1. חלק מהתוצאות המוצגות בדו"ח זה הוצגו ביום עיון לדווח על מחקרים במימון המדען הראשי, בתי צמיחה א', 1 בינואר 2002.
2. אבנר כהן וחובריו דו"חות שנתיים לתוכנית המחקר 0568-256 לשנים 2000 ו- 2001, הקניית עמידות לוירוס המוזאיקה של נץ החלב בסלקציות של נץ החלב דוביום. המדען הראשי של

3. Lipsky, A., A. Cohen, V. Gaba, A. Ion, D. Sandler-Ziv, A. Gera and A. Watad. 2002. Development of *Ornithogalum dubium* cell cultures of high competence for transformation by particle bombardment and of high embryogenic capacity. 10th IAPTC&B Congress, Orlando Fla.



לוח 1. השפעת קנמיצין על הגידול וההתמיינות בתרביות מתמיינות של נץ החלב הכתום (*O. dubium*) שגדלו באור. a. ריכוזים של 50 מ"ג לליטר קנמיצין (משמאל) עצרו לחלוטין את המשך ההתמיינות בהשוואה להתמיינות תקינה לצמחונים במצע ללא קנמיצין (מימין). b. עיכוב דומה בתגובה ל- 50 מ"ג לליטר קנמיצין, בגושי תאים שגדלו על מצע מוצק. c. התמיינות של צמחים נורמאליים מתרביות נוזליות.



לוח 2 . טרנספורמציה של נץ החלב הכתום (*Ornithogalum dubium*) : a : קאלוס של נץ החלב
 מתרבית נוזלית שגודל בחושך; b : ביטוי חולף של GUS בקאלוס לאחר ירי עם הפלסמיד
 pUBQ3genGUS (שכלל את הגן uidA תחת בקרה של הפרומוטר UBQ3) ; c : ביטוי יציב של
 GUS בקאלוס לאחר 35 יום במצע סלקציה שהכיל 80 מ"ג לליטר קנמיצין; d : התפתחות של רקמה
 טרנסגנית מאורגנת על מצע סלקציה לאחר תקופת גידול ממושכת בתרבית נוזלית בחושך; e : רגנרציה
 של צמחונים באור על מצע רגנרציה עם 80 מ"ג לליטר קנמיצין; f . התבטאות הגן המדווח GUS בקטעי
 עלים מהצמחונים שהתפתחו על מצע סלקציה; g : ביטוי של GUS בצמחונים מותמרים שהתפתחו
 בתמונה e בהשוואה לצמח היקש (משמאל).