

717

2003-2004

תקופת המחקר:

136-0483-04

קוד מחקר:

Subject: GENETIC TRANSFORMATION OF TOMATO PLANT RESISTANT TO TWO STRAINS OF TOMATO YELLOW LEAF ROLL VIRUS (TYLCV) AS A SOURCE FOR THE INTRODUCTION OF THE VIRUS RESISTANCE TO COMMERCIAL TOMATO CULTIVARS

Principal investigator: ANTIGNUS YECHZKEL

Cooperative investigator: ARIE ROSNER

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

שם המחקר: פיתוח צמח עגבניה טרנסגני בעל חסינות לשני גזעים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה (TYLCV) (כמקור להחדרת העמידות לזני עגבניה מסחריים).

חוקר ראשי: יחזקאל אנטיגנוס

חוקרים שותפים: אריה רוזנר

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

תקציר

הצגת הבעיה : וירוס צהבון האמיר של העגבניה הוא גורם מגביל בגידול עגבניות בשטח הפתוח ובבתי צמיחה בארץ ובעולם. תכניות הטיפול הקונבנציונאלי לא הצליחו עד כה ליצור זנים בעלי איכות גבוהה שיחליפו את הזנים המסורתיים. יתכן שהגורם לכך היא תאחיזה של העמידות עם תכונות הורטיקולטוריות שליליות. מטרת עבודה זו הקניית עמידות טרנסגנית לצמחי עגבניה כנגד הגזע הישראלי האלים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה. צמחים אלו יוכלו לשמש כמקור ממנו ניתן יהיה להעביר עמידות לזנים מסחריים ללא פגיעה באיכותם.

מהלך ושיטות עבודה : חלקו ה-N-terminal של גן רפליקאז בודד מתכשיר DNA אשר הופק מצמחי עגבניה שהיו נגועים בגזע האלים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה (TYLCV-Is) בידודו של הגן הקטוע (T-Rep) נעשה בעזרת הגברה מולקולארית ע"י PCR תוך שימוש בתחלים ספציפיים שיוצרו על בסיס מעקב הבסיסים של הוירוס. הוכנו שני מבנים של ה-T-Rep בגודל של 348 בסיסים. אחד המבנים נושא קודון טרמינציה המאפשר תרגום של 113 ח.אמינו של הגן בעוד שהמבנה השני נושא קודון טרמינציה הצמוד לקודון ההתחלה של התרגום כך שלא מתאפשר תרגומו של הגן. שני המבנים שובטו לתוך קסטת ביטוי צמחית בין S35 CaMV פרומוטר לבין Nos terminator. קסטה זו הועברה לפלסמיד בינארי אשר הוחדר לאגרובקטריום אשר שימש להתמרה של צמחי עגבניה. שימוש ב-PCR ותחלים מתאימים אפשרו לזהות את המחדרים בצמחים המותמרים. הצמחים המותמרים נסקרו לעמידות ע"י הדבקתם עם פרטים של כנימת עש הטבק שרכשו את הוירוס מצמחי מקור נגועים בוירוס.

תוצאות עיקריות :

הצמחים המותמרים התפתחו באופן נורמלי ולא הראו סימני פיטוטוקסיות העשויים להופיע בצמחים המבטאים את גן ה-Rep או מקטעים ממנו. הכלאה עצמית של צמחי דור R0 הניבה צמחים הנושאים את הטרנסגן שחלקם הראה עמידות מוגבלת לגזע הישראלי האלים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה. הצמחים בעלי העמידות החלקית היו פוריים וסימני המחלה שהראו היו מתונים באופן מובהק בהשוואה לצמחי הביקורת הבלתי

טרנסגניים. צמחים אלו סבלו פחות מקיפול עלים והצהבות וקודקוד הצמיחה שלהם לא התנוון בדומה לזה של צמחי הביקורת.

מסקנות והמלצות :

משך הזמן המקוצץ שהוקצב לביצוע הפרויקט (שנתיים) לא אפשר לנו לייצב שושלות הומוזיגוטיות של הטרנסגן ובדיקת כשר העמידות שלהן בתנאי שדה ולבצע את התכנית עפ"י המיתוה המקורי.

רמת המידבק המופעלת על הצמחים לצורך סלקציה בתנאי מעבדה וגם חשיפתם להדבקה בגיל מוקדם יחסית מציבה בד"כ תנאים חמורים מאלו הקיימים בשדה ועל כן היה רצוי לבחון את רמת העמידות בתנאי השטח. במידה וניתן היה להקצות לפרויקט משאבים נוספים ניתן היה לבצע הכלאות בין קוים הומוזיגוטיים בהם ממוקם הטרנסגן באתרים שונים של הגנום וליצור צמחים הנושאים את הטרנסגן במספר עותקים ואולי באופן זה לשפר את רמת עמידותם.

דו"ח סופי מסכם לתכנית מחקר 136-0483-03

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

**פיתוח צמח עגבניה טרנסגני בעל חסינות לשני גזעים של וירוס צהבון
האמיר של העגבניה (TYLCV) כמקור להחדרת העמידות לזני עגבניה**

מסחריים

ע"י

י. אנטיגנוס, המחלקה לוירולוגיה מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 6, 50250

א. רוזנר, המחלקה לוירולוגיה מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 6, 50250

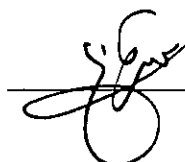
16-05-05

**Engineering of a tomato plant resistant to two strains of tomato
yellow leaf curl virus as a source for the its introduction into
commercial tomato varieties**

**Y. Antignus, Virology Department, ARO, The Volcani Center, P. O. ,
Box 6, Bet-Dagan, e-mail : antignus@agri.gov.il**

**A. Rosner, Virology Department, ARO, The Volcani Center, P. O. Box
6, Bet-Dagan, e-mail : rosnera@agri.gov.il**

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

חתימת החוקר : 

1. הצגת הבעיה חשיבות המחקר ומטרותיו

וירוס צהבון האמיר של העגבניה (וצ"א) התגלה בישראל בשנות השישים באזור עמק הירדן ומעט באזור תל-מונד אך במהלך השנים עקב התרחבות שטחי הגידול והעליה הדרמטית באוכלוסיית כנימת עש הטבק *Bemisia tabaci*, המפיצה את הוירוס, התפשטה המחלה לכל אזורי הארץ והיא מצויה גם באזורים גאוגרפיים נרחבים בעולם. כיום מהווה המחלה גורם מגביל בגידול עגבניות בשטח הפתוח והגידול כולו העבר לחממות ובתי רשת מחופים ברשתות 50 מ"ש.

הפתרון האופטימלי במצב זה הוא פיתוח זני עגבניה עמידים לוירוס. ואכן במהלך ארבעים השנה האחרונות נעשה מאמץ גדול ע"י קבוצות מחקר וחברות זרעים בעולם לטפח זני עגבניה עמידים, ע"י שימוש במקורות עמידות ממיני בר של הסוג *Lycopersicon*. כתוצאה מכך קימים היום זני עגבניה בעלי עמידות גבוהה לוירוס צהבון האמיר של העגבניה (וצ"א) אלא שאיכות הפרי אינה מגיעה לזו שהושגה בזנים המסחריים הרגילים ועל כן הם לא נקלטים ע"י החקלאים. ההסבר לחוסר היכולת ליצר זנים איכותיים עשוי להיות קשור לגנטיקה המסובכת של הורשת העמידות ולתאחיזה של גנים שליליים מבחינה הורטיקולטורית, לבין הגנים המקנים עמידות.

מטרת המחקר :

יצירת צמחי עגבניה טרנסגניים בעלי עמידות ל-וצ"א ע"י התמרתם עם קטע של גן הרפליקאז (Rep) שיבודד מכ"א משני גזעי וצ"א אשר אופינו בישראל. קטעי גן הרפליקאז יבודדו מהזן המתון והזן האלים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה ושניהם יוחדרו לצמחי עגבניה במטרה לקבל צמח בעל גנוטיפ שיקנה לצמחים עמידות כנגד שני זני הוירוס.

2. מהלך ושיטות עבודה

א. Subcloning של הקצה ה-N terminal של גן ה-Rep מגנים הגזע האלים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה (TYLCV-Is[severe]):

כלל ה-DNA הופק מצמחים גנועים בגזע האלים של הוירוס. תכשיר זה שימש כתבנית ליצירת קטע הגן (T-Rep) ע"י הגברה מולקולרית בעזרת PCR. ההגברה נעשתה בעזרת התחלים הבאים :

Forward primers :

(I) 5'-GTCGACATGCCTCGTTTATTTAAAATATATGCC-3' (TYLCV sequence number: 2787-2761) containing the AUG translation initiation codon of the gene (bold letters) and an added *Sal I* site (underlined).

לתחל נוסף באותה אוריינטציה הוחדר קודון סיום מיד לאחר קודון התחלת התרגום (ATG) האמור למנוע את תרגום קטע הגן של חלבון ה-T-Rep בצמחים הטרנסגניים בהם הוא ישובט.

(II) 5'-GTCGACATGTAACGTTTATTTAAAATATATGCC-3'

A reverse complement primer :

5'-GAGCTCTTAAACTCCAAAATCAATGAAG-3' (TYLCV sequence number: 2448-2467), contained a TAA-termination codon (bold letters) and a Sac I restriction endonuclease site (underlined).

פרוטוקול ראקציית ה-PCR :

The amplification reaction consisted of an initial 4 min at 94°C, 2 min at 54°C, 3 min at 72°C, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final step at 72°C for 5 min.

תוצר ה-PCR הכיל 348 בסיסים כדלקמן :

```

1      ATGCCTCGTT TATTTAAAAT ATATGCCAAA AATTATTTCC TAACATATCC
51     CAATTGTTCT CTCTCTAAAG AGGAAGCACT TTCCCAATTA AAAAACCTAG
101    AAACCCCAAC AAATAAAAAA TACATCAAAG TTTGCAGAGA ACTCCACGAT
151    AATGGGGAAC CACATCTCCA TGTGCTTATC CAATTCGAAG GCAAATACCA
201    ATGTAAAAAC CAACGGTTCT TCGACCTGGT ATCCCCAAC AGGTCAGCAC
251    ATTTCCATCC GAACATTGAG GCAGCTAAAA GCTCAACAGA TGTCAGAGCC
301    TACGTGGAGA AAGACGGAGA CTTCATTGAT TTTGGAGTTT AAGAGCTC

```

The primers sequences are underlined and the translation initiation and termination codons are indicated in bold.

קטע גן זה (T-Rep) אמור לקוד פפטיד בעל 113 חומצות אמינו :

```

1  MPRLFKIYAK NYFLTYPNCS LSKEEALSQL KNLETPTNKK YIKVCRELHD
   NGEPHLHVLI QFEGKYQCKN QRFFDLVSPN RSAHFHPNIQ AAKSSTDVKT
101 YVEKDGDFID FGV

```

שיבוט תוצרי ה-PCR (קטע גן ה-T-Rep) לפלסמיד : pGEM-TEasy :

תוצרי ה-PCR שובטו בין אתרי *Sal I* / *Sac I* של הפלסמיד :

pGEM-TEasy plasmid (Promega, Madison, USA).

שיבוט T-Rep לקסטת ביטוי צמחית בפלסמיד pJD 330 :

פרגמנט *Sal I* / *Sac I* המכיל את קטע גן הרפליקז שובט באתרים המתאימים בקסטת הביטוי בצמחים תחת בקרת הפרומוטר 35S (35s-rep-NOS cassette) של הפלסמיד pJD 330 (Shalev *et al.*, 1999) בין הפרומוטר CaMV 35S וה-Nopaline synthase terminator). נוכחות הגן באתר המתאים אומתה ע"י קביעת מעקב הנוקלאוטידים של הקטע הרקומביננטי בעזרת תחל שנגזר ממעקב הבסיסים של CaMV 35S.

העברת קסטת הביטוי לוקטור הבינארי pGA 492 של אגרובקטריום:
הפרגמנט המכיל את ה-T-Rep בתוך קסטת הביטוי הוצא בעזרת אנזימי חיתוך *Hind* III/*Bgl* II ושובט
בין אתרים אלו בפולימקור של הפלסמיד הבינארי pGA 492. נוכחות הקסטה בפלסמיד אומתה ע"י
PCR וע"י קביעת מעקב הבסיסים של גן הרפליקון. הפלסמיד הבינארי המהונדס הוכנס ל-
(*Gynheung et al.*, 1988) *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA 105 בשיטת "הקפאה והפשרה".

טרנספורמציה ורגנרציה של צמחי עגבניה
צמחי העגבניה אשר שמשו להתמרה הם מהזן VF36. תהליך ההתמרה התבצע בשיטה אשר שמשה
אותנו בעבר (Nitsch, 1969).

Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19, 389-404.

Gynheung A N, Ebert P R, Mitra A, Sam B H A. 1988. Binary vectors In *Plant Molecular Biology Manual* A3: pp. 1-19. Eds. S B Gelvin, R A Schilperoort, and D S Verma.

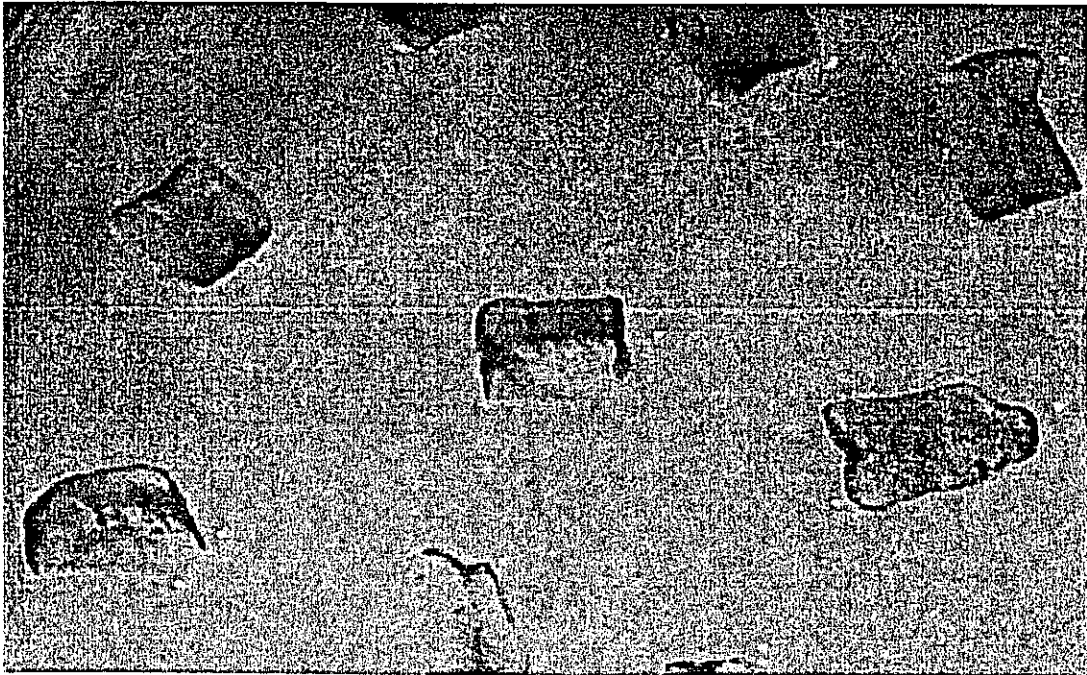
Shalev G, Sitrit Y, Avivi-Ragolski N, Lichtenstein C, Levy A A. 1999. Stimulation of homologous recombination in plants by expression of the bacterial resolvase

Ruv C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 7398-7402.

3.. תוצאות עיקריות :

בשלב זה של העבודה אנו מצפים לרגנרציה מלאה של רקמת העגבניה המותמרת. בתמונות להלן נראים השלבים השונים של תהליך הרגנרציה

תמונה 1 : אקספלט של פסיגי עגבניה אשר טופלה באגרובקטריום לצורך ההתמרה.



תמונה 2: רגנרציה של רקמת עגבניה מותמרת עם מבנה ה-T-Rep :

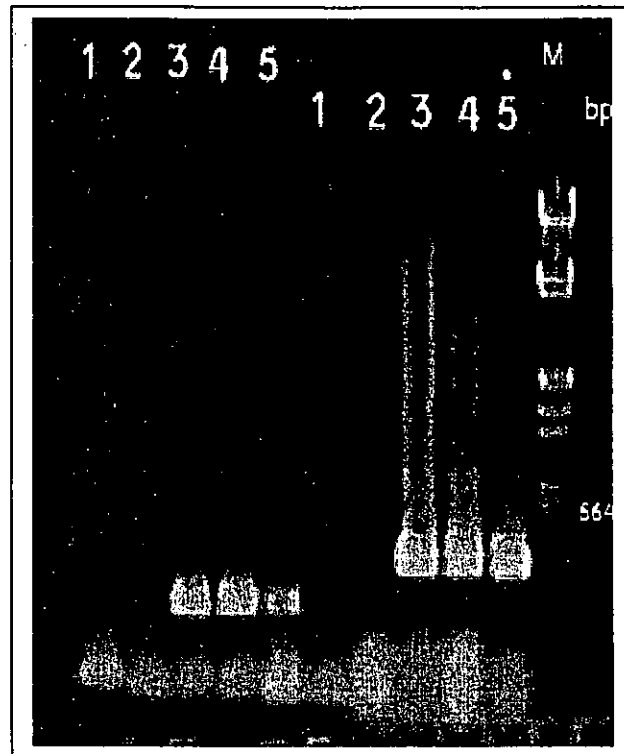


אפיון צמחי R0

צמחי העגבניה המותמרים היו משני טיפוסים :

1. צמחים הנושאים קטע מגן ה-Rep ב'מורד הזרם' מקודון ההתחלה (ATG)
 2. צמחים עם אותו המבנה אך בעלי קודון סיום מיד לאחר קודון ההתחלה .
- כביקורות לצמחים המותמרים שמשו צמחים בלתי מותמרים מהזן VF36 .
- נוכחות המחדרים בגנום הצמחים המותמרים נבחן ע"י אנליזה ב-PCR עם שלושה סוגי תחלים :
1. תחלים לזהוי גן הקנאמיצין
 2. תחלים לזהוי גן ה-Rep
 3. תחלים בעלי מעקב בסיסים המאפשר זיהוי קטע במחדר הנמצא בין 35S פרומוטר לבין הקצה ה-3' של ה-Rep.
- ראקציות ה-PCR נערכו על תכשירי כלל DNA שהופק מצמחי RO .
- תמונות 1, 2, 3 מצביעות על נוכחות המחדרים בצמחים המותמרים .
- במקביל שובטו בפלסמיד מקטעי ה-DNA שהתקבלו ע"י ההגברה ב-PCR ושימשו לקביעת רצף הבסיסים . נמצא כי המחדרים מכילים את רצף הבסיסים המקורי של מבנה הרפליקו כמתוכנן .

איור 3 : זהוי מחדר ה-Rep בצמחי עג' R0



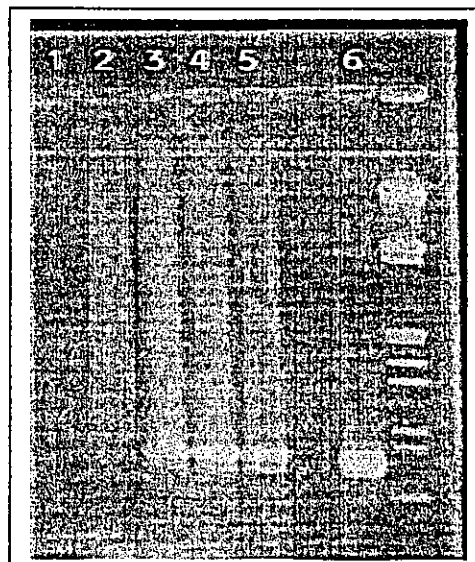
שמאל : תחלים בתוך גן ה-Rep

1. ראקציה ללא תבנית DNA 2. צמח לא טרנסגני 3-5. צמחים טרנסגניים

ימין : תחלים מאזור ה-35S ו ה-Rep.

1. ראקציה ללא תבנית DNA 2. צמח לא טרנסגני 3-5. צמחים טרנסגניים

איור 4 : זהוי גן הקאנאמיצין בצמחים הטרנסגניים R0



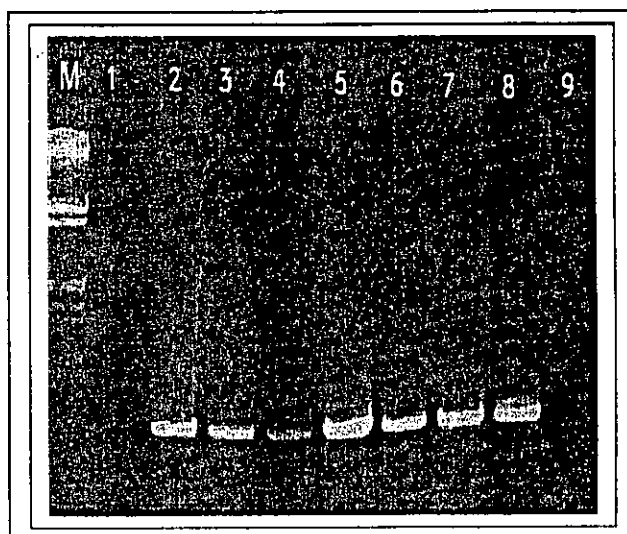
1. ראקציה ללא תבנית DNA 2. צמח לא טרנסגני 3-5. צמחים טרנסגניים 6. ראקציה ביקורת עם פלסמיד המכיל מבנה עם גן הקאנאמיצין.
- מתוך אוכלוסיית הצמחים של R0 נבחרו הצמחים הבאים שנמצאו מכילים את המחדרים שנבנו לצורך קבלת העמידות :
- א. צמחים הנושאים מחדר Rep שבקצהו ה-3' קודון 'עצירה'. צמחים אלו קיבלו את הסימון F17, F14, F10, F13, F15, F12
- ב. צמחים הנושאים מחדר Rep הנושא קודון עצירה מיד לאחר קודון ההתחלה. צמחים אלו סומנו : ST8, ST2, ST5, ST7, ST6 בשתי סדרות הצמחים אשר התקבלו מארועי טרנספורמציה בלתי תלויים בוצעה האבקה עצמית לצורך קבלת צמחי RI .

אפיון צמחי RI

זהוי הטרנסגן בצמחים

צמחי RI אשר התקבלו בדרך המתוארת לעיל גודלו בחממה מוגנת בפני חרקים. בשלב הראשון נבדקו צמחי השושלת לנוכחות הטרנסגן לצורך בחינת יכולת המעבר שלו בתורשה. נוכחות הטרנסגן נעשתה ע"י שימוש ב-PCR להגברת הטרנסגן מכלל ה-DNA שהופק מהצמחים הנבחרים.

איור 5 : זהוי הטרנסגן בצמחי RI



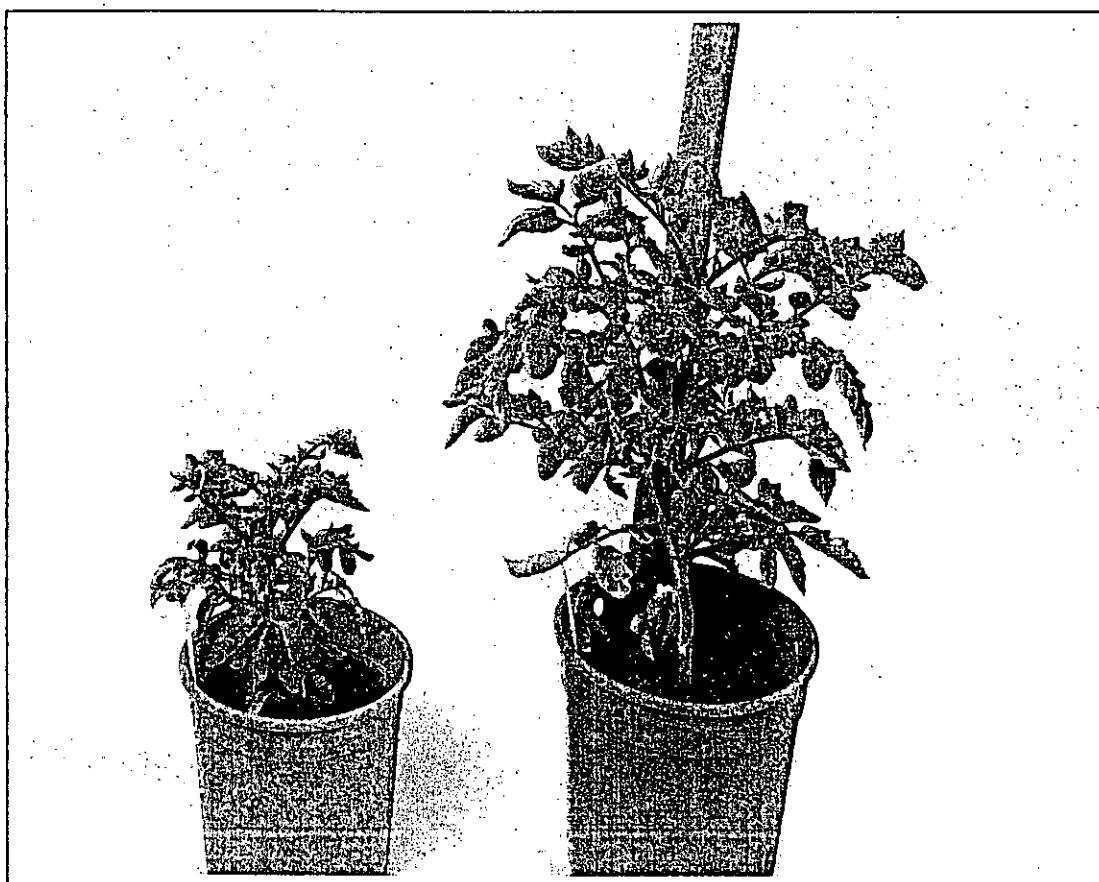
1. צמח לא טרנסגני 2. צמח טרנסגני ST2 3. צמח טרנסגני ST4 4. צמח טרנסגני F10 5. צמח טרנסגני F13 6. צמח טרנסגני F15 7. צמח טרנסגני F17 8. DNA מפלסמיד המכיל את הטרנסגן 9. ראקציה ללא תבנית DNA.

סלקציה לעמידות באוכלוסיות צמחי RI :

צמחים משושלות RI נחשפו להדבקה בעזרת כנימת עש הטבק אשר רכשה את הוירוס מצמחי עגבניה נגועים.

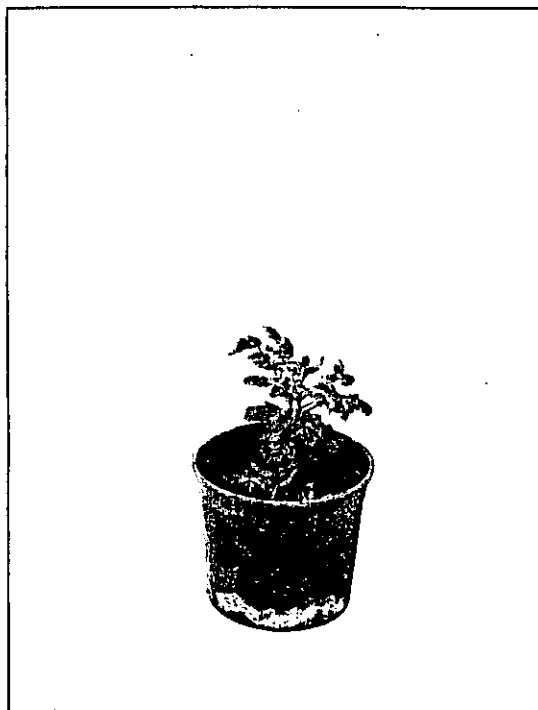
כל הצמחים שהודבקו הראו סימני מחלה אך צמחים השיכים לשושלות ST4, F10, F15, F17, F13 הראו סימני מחלה מתונים יותר באופן מובהק לעומת צמחי הביקורת הבלתי טרנסגניים (איור 6).

איור 6 : צמח RI טרנסגני מקו F10 (ימין) המראה סימני מחלה מתונים בהשוואה לתגובת צמח ביקורת בלתי מותמר (שמאל).



איור 7 : צמח טרנסגני RI מקו F13 (ימין) המראה סימני מחלה מתונים בהשוואה לצמח ביקורת

בלתי טרנסגני



איור 8 : : צמח טרנסגני RI מקו F13 המראה סימני מחלה מתונים יחסית והמסוגל להגיב פירות



הערכת כמות ת. הגרעין הויראלית בצמחים טרנסגניים בעלי פנוטיפ סובלני ל-TYLCV

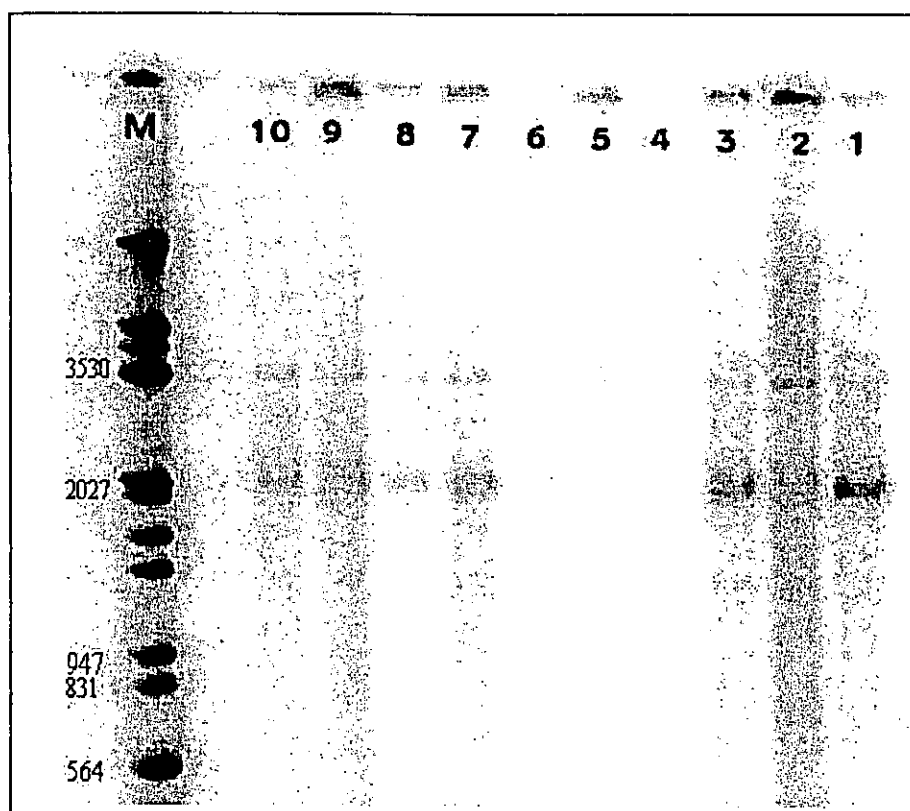
לצורך הערכת רמת העמידות בצמחים הטרנסגניים בהשוואה לביקורות הבלתי טרנסגניות מוצה כלל ה-DNA מהצמחים. כמויות זהות של ה-DNA הופרדו על ג'ל אגרוז, נערך Southern blot למברנת נילון שעברה היברידיזציה עם גלאי מולקולרי ספציפי לוירוס צהבון האמיר של העגבניה.

הבנדים המופיעים על הג'ל מיצגים את הצורה החד גדילית של ה-DNA הויראלי (בנד בעל

מובילות גבוהה) ואת הצורה הדו גדילית (Replicative form).

איור 9 : הערכת כמות ת. הגרעין הויראלית בצמחים טרנסגניים בעלי פנוטיפ סובלני ל-

TYLCV



מקרא :

1-3 צמחי ביקורת לא טרנסגניים 4. ללא דוגמה 5. צמח בריא 6. ללא דוגמה 7. צמח טרנסגני F10 8. צמח טרנסגני F13 9. צמח טרנסגני F15 10. צמח טרנסגני F17 11. ללא דוגמה 12. DNA מרקר

דיון

המבנים אשר הוחדרו לצמחי עגבניה היו משני סוגים : 1. מבנה בעל יכולת לקודד לחלבון בגודל של 113 ח. אמינו השיכות לקצה ה-N-terminal של גן ה-Rep הויראלי. 2. מבנה זהו לו במעקב הבסיסים אך

נושא קודון סיום בצמוד לקודון ההתחלה של הגן באופן שלא מאפשר את תרגומו. הצמחים המותמרים מדור R0 נראו נורמליים, אך חלקם לא היה פורה למרות שהתפתחותם הוגטיבית היתה תקינה. נאספו זרעי RI מעשרים וארבעה צמחים השיכים לדור R0. נוכחותם של המבנים שהוחדרו לצמחים המותמרים מדור R0 ו-RI הוכחה ע"י שימוש ב-PCR בעזרת תחלים ספציפיים המיצגים מעקבי בסיסים בגן ה-Rep, גן העמידות לקאנאמיצין וה-35S פרומוטר (איורים 3-5). תוצאות אלו מצביעות על יכלתם של המבנים המוחדרים לעבור בתורשה. צמחי RI אשר נחשפו להדבקה עם כנימת עש הטבק הראו כולם סימני מחלה אפניים לוירוס צהבון האמיר של העגבניה אך למרות זאת נמצאו מספר צמחים (F10, F13, F15, F17) בהם סימני המחלה היו מתונים באופן משמעותי לעומת צמחי הביקורת הבלתי טרנסגניים. צמחים אלו היו בעלי קצב גידול נמרץ יותר, עליהם היו פחות מקופלים וקודקודי הצמיחה שלהם לא התנוונו בדומה לצמחי הביקורת. צמחים אלו הניבו פירות שהכילו זרעים (איורים 6-8).

צמחים מקימים אלו צברו כמויות נמוכות יותר של DNA ויראלי (איור 9) ובמיוחד הקו F13 אשר הראה את סימני המחלה המתונים ביותר. ממצא זה מתאים לממצאים שקיבלנו בעבר המצביעים על מתאם שלילי בין רמת העמידות לבין רמת חומצת הגרעין הויראלית המצטברת ברקמה (Rom et al., 1993). רמת העמידות החלקית שאובחנה בצמחים הטרנסגניים שקיבלנו היתה טובה יותר בצמחים שהכילו מבנה היכול לבטא חלבון פגום (סדרת צמחי F) לעומת צמחים שאינם מבטאים את גן הרפליקציה ושבהם ממוקם קודון הסיום מיד לאחר קודון ההתחלה.

בעבודה שבצענו בעבר הוחדר מבנה דומה המכיל את מעקב הבסיסים של הקצה ה-N-terminal של גן ה-Rep של הגזע המתון של TYLCV לצמחי עגבניה מהזן VF36 ששימש בעבודה הנוכחית. הצמחים הטרנסגניים שהתקבלו במקרה זה היו בעלי חסינות לגזע המתון של הוירוס ולא לגזע האלים (Antignus et al., 2004). התוצאות בעבודה הנוכחית מצביעות על מצב שונה, בו מושגת עמידות חלקית בלבד, ע"י ביטוי הגן המבטא Rep קטוע של הוירוס האלים. עפ"י המשוער מנגנון הפעולה של העמידות כנגד הוירוס בצמחים הנושאים מחדר הכולל את מקטע ה-N-terminal של גן ה-Rep, נובע מתחרות בין המקטע החלבוני הבלתי פונקציונאלי המקודד ע"י הטרנסגן לבין החלבון המסונטז ע"י הוירוס החדר, מצב המונע שעתוק יעיל של C1 (Brunetti et al., 2001). יתרה מזו, תוצאות קודמות בעבודה שנערכה במעבדתנו מראות כי ניתן לשבור את החסינות הטרנסגנית כנגד הגזע המתון ע"י הדבקת הצמחים ע"י הדבקת הצמחים בשיטת האגרואינוקולציה. פרוצדורה זו בה נחשף הצמח לרמות מדבק גבוהות ומתמשכות, בהשוואה להדבקה הטבעית הנעשית ע"י כנימת עש הטבק מביאה בהרבה מקרים לשבירה מוחלטת או חלקית של החסינות (Antignus et al., 2004). יתכן איפוא כי קצב הריבוי המהיר של הגזע האלים של TYLCV אינו מאפשר תחרות מספיק יעילה של החלבון הטרנסגני הפגום עם החלבון הויראלי הפונקציונאלי, מצב המשפיע על רמת העמידות ומאפשר עמידות חלקית בלבד. התרבות מואצת של הוירוס האלים עשויה גם לגרום לבלימת ביטוי החלבון הויראלי הפגום המיוצר ע"י הצמחים הטרנסגניים דרך מנגנון של Post-transcriptional homology dependent gene silencing (Lucioli et al., 2003) mechanism.

מסקנות והמלצות

בעבודה הנוכחית הראנו כי הצמחים הטרנסגניים שהתקבלו ע"י התמרת זן העגבניה VF36 במקטע ה-N-terminal של גן ה-Rep הויראלי של הגזע הישראלי האלים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה היו בעלי פנוטיפ נורמלי ללא סימני פיטוטוקסיות העשויים להגרם ע"י ביטוי הטרנסגן בצמח. ע"י הכלאה עצמית של צמחי דור R0 התקבלו צמחים הנושאים את הטרנסגן וחלקם הראו עמידות מוגבלת לגזע הישראלי האלים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה. הצמחים בעלי העמידות החלקית היו פוריים וסימני המחלה שהראו היו מתונים באופן מובהק בהשוואה לצמחי הביקורת הבלתי טרנסגניים. צמחים אלו סבלו פחות מקיפול עלים והצהבות וקודקוד הצמיחה שלהם לא התנוון בדומה לזה של צמחי הביקורת. העמידות החלקית יכולה להיות מוסברת בכשר הריבוי המוגבר של גזע הוירוס האלים המוריד את כושר התחרות של חלבון ה-Rep הפגום המיוצר ע"י הצמח הטרנסגני עם חלבון ה-Rep הפונקציונאלי על אתר הקישור של C1.

משך הזמן המקוצץ שהוקצב לביצוע הפרויקט (שנתיים) לא אפשר לנו לייצב שושלות הומוזיגוטיות של הטרנסגן ובדיקת כשר העמידות שלהן בתנאי שדה. רמת המידבק המופעלת על הצמחים לצורך סלקציה בתנאי מעבדה וגם חשיפתם להדבקה בגיל מוקדם יחסית מציבה בד"כ תנאים חמורים מאלו הקיימים בשדה ועל כן היה רצוי לבחון את רמת העמידות בתנאי השטח. במידה ומבחנים כאלו יניבו תוצאות מספקות יהיה מקום לשקול שימוש בצמחים המותמרים כמקור לשיפור עמידות של זנים מסחריים. במקביל מומלץ לבצע הכלאות בין צמחי העגבניה הטרנסגניים שיוצרו במעבדתנו בעבר ונמצאו חסונים לגזע המתון של TYLCV לבין הצמחים בעלי סבילות למחלה הנגרמת ע"י הגזע האלים שהתקבלו במהלך הפרויקט הנוכחי. ע"י כך יתקבלו צמחים בעלי עמידות לשני הגזעים אשר זוהו בארץ וגם יתכן ששילוב של שני הטרנסגנים באותו הצמח ישפר את רמת העמידות של הצמח כנגד הגזע האלים של הוירוס.