

הופעתם של נגיפי צמחים חדשים וויראליים באגן הים התיכון

Emergent viruses and virus vectors in Mediterranean Basin crops

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

משה לפידות, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, lapidotm@volcani.agri.gov.i
אביב דומברובסקי, הגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, aviv@volcani.agri.gov.il

תקציר

1. הצגת הבעיה: החקלאות באזור הים התיכון התפתחה בצורה משמעותית במהלך העשורים האחרונים. הקרבה בין הגידולים השונים מאפשרת הפצה מתמדת של מחלות נגיפיות בין צמחיית הבר, צמחי הנוי וגידולי הירקות השונים שבאזור. ישנה חשיבות רבה לזיהוי מחלות נגיפיות חדשות באזור וסריקה אחר מקורות עמידות גנטית כנגד הנגיפים השונים על מנת לבלום את הפצתם. תוכנית מחקר זו היא חלק ממאמץ כולל של מדינות השוכנות לחופי הים התיכון במסגרת תוכנית ARIMNET. שיתוף פעולה עם יורלוגים ממדינות שכנות יסייע בהתמודדות עם מחלות נגיפיות.

2. מטרות המחקר:

- א. מעקב ואפיון אחר הופעתם של נגיפים חדשים בארץ המועברים ע"י חרקים
- ב. לימוד הסינרגיזם בהדבקות מעורבות של נגיפי צמחים בגידולי ירקות עיקריים
- ג. סריקה אחר מקורות עמידות לנגיפי צמחים תוך התמקדות בוורוסים בגומו
3. שיטות העבודה: איסוף דגימות מגידול מסחרי של עגבניה ואבטיח, הפקות דנ"א, רנ"א, זיהוי ע"י PCR, בדיקת ריצוף מתקדם (NGS), הדבקת צמחי ביקורת בעזרת כנימות עש.
4. תוצאות עיקריות:

- א. זיהינו בארץ לראשונה לווין דנ"א בטא באסוסיאציה למחלת צהבון האמיר בעגבניה.
- ב. נמצא כי לווין דנ"א בטא ממשיך להתפשט בארץ ונמצא כמעט בכל אזורי גידול העגבניה.
- ג. נמצא כי הנוכחות של לווין בטא באסוסיאציה לוורוס צהבון האמיר של העגבניה גורמת לשבירת עמידות גנטית לוורוס בעגבניה.
- ד. בוצעה ולידציה הורטיקולטורלית ללוקוס נוסף לעמידות לוורוס צהבון האמיר של העגבניה. נמצא כי השילוב של שני לוקוסים עמידים נתן את רמת העמידות הטובה ביותר, ובברור יותר טובה מכל לוקוס עמיד בנפרד.
- ה. בעזרת שימוש בשיטות ריצוף מתקדמות של דגימות מפרות אבטיח בשדה זיהינו את הווירוסים התוקפים אבטיח – "ווירוס" האבטיח. כמו כן מצאנו כי הווירוס *Cucurbit chlorotic yellows virus* נמצא בארץ באבטיחים נגועים.

ו. נמצא כי השילוב של מספר נגיפים התוקפים בו זמנית את צמחי האבטיח מוביל לפגיעה משמעותית בכמות ובאיכות התוצרת.

5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: השילוב של לוויין בטא עם מחלת צהבון האמיר גורם לשבירת העמידות הגנטית בעגבניה המושרית על ידי הלוקוס *Ty-1/Ty-3*. אי לכך יש להמשיך ולהקפיד על הרחקת כנימות עש מהגידול גם כאשר משתמשים בצמחי עגבניה בעלי עמידות לוורוס.

יש לשקול הפעלת שיטות להרחקת כנימות עש מגידול אבטיח בשטח הפתוח, במיוחד יש לשקול העברת הגידול מהשטח הפתוח לגידול במנהרות, שכן הדבקת צמחי האבטיח על ידי מספר נגיפים בו זמנית גורמת לפגיעה משמעותית הן בכמות והן באיכות התוצרת.

פרסומים והרצאות שנבעו מביצוע המחקר

פרסומים בעיתונות בינלאומית:

- Luria N, Smith E, Sela N, Lachman O, Koren A, Dombrovsky A. 2019. Insights into a watermelon virome contribute to monitoring distribution of whitefly-borne viruses. *Phytobiomes Journal* 3:61-70.
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PBIOMES-07-18-0034-R>
- Gelbart D, Chen L, Alon T, Dobrinin D, Levin I, Lapidot M. 2020. The recent association of DNA betasatellite with *Tomato yellow leaf curl virus* in Israel – A new threat to tomato production. *Plant Protection* 128. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104995>

פרסומים בעיתונות מקומית:

- גלברט ד., מחבש צ., חן ל., אלון ת., דוברינין ס., לוין א., לפידות מ. 2017. אורח לא רצוי בארצנו – הופעת לוויין בטא השובר עמידות גנטית לוורוס צהבון האמיר בעגבניה. מבזק ירקות – שדה וירק, דצמבר 2017, כרך 311, עמודים 47-50

הרצאות:

- 7.11.2017 הרצאה למגדלים ולמדריכים: "הופעת לוויין בטא בארץ והשפעתו על עמידות גנטית לוורוס צהבון האמיר של העגבניה", חוות יאיר.
- 11.12.2017 הרצאה למדריכי שה"ם: "הופעת לוויין בטא בארץ והשפעתו על עמידות גנטית לוורוס צהבון האמיר של העגבניה", מו"פ דרום.
- 30.1.2018 הרצאה במסגרת הכנס השנתי לסיכום העונה לירקות תעשייה: "וירוסים בשעועית המועברים על ידי כנימת עש הטבק", עין חרוד.
- 29.11.2018 שולחן מגדלי דלועיים: "וירוס האבטיח".
- Lapidot M. 2019. New insights into genetic resistance to TYLCV. 8th International Geminivirus Symposium, Davis, CA, USA.
- Gelbart, D., Chen, L., Alon, T., Dobrinin, S., Levin, I., Lapidot, M. 2019. Association of DNA betasatellite with *Tomato yellow leaf curl virus* overcomes *Ty-1* resistance in tomato plants. *International Advances in Plant Virology, Rome, Italy*.

תוכן עניינים

נושא	עמוד
דף שער	1
תוכן עניינים	3
מבוא	3
מטרות המחקר	5
פירוט עקרי הניסויים	6
רשימת ספרות מצוטטת	28

מבוא

תאור הבעיה: החקלאות באזור הים התיכון, בקעת הירדן והערבה התפתחה בצורה משמעותית במהלך העשורים האחרונים. בתקופה זו גידולים חקלאיים שונים נמצאו רגישים למחלות נגיפיות שונות. זוהו מחלות ויראליות חדשות בגידולי ירקות בארץ ואף בעולם. הקרבה בין הגידולים השונים מאפשרת הפצה מתמדת של מחלות נגיפיות בין צמחיית הבר, צמחי הנוי-פרחים וגידולי הירקות השונים שבאזור.

התופעה של הדבקות מעורבות (מספר נגיפים) המועברים ע"י אותו החרק התוקפים ומאכלסים צמח פונדקאי אחד הפכה לעניין שבשגרה, הבנת יחסי הגומלין בין הנגיפים השונים בפונדקאים השונים בעיקר אלו הגדלים בצורה אינטנסיבית בשדות פתוחים תוכל לסייע באיתור מוקדם והתמודדות עם המחלות הנגיפיות השונות. לכן ישנה חשיבות רבה לזיהוי מחלות נגיפיות חדשות באזור וסריקה אחר מקורות עמידות גנטית כנגד הנגיפים השונים על מנת לבלום את הפצתם לגידולים שכנים ולאתרי גידול נוספים הן ברמת שטחי גידול סמוכים, וברמה המקומית-ארצית ומדינות האזור. שיתוף פעולה עם וירולוגים בעלי שם עולמי ממדינות שכנות על מנת לשלב ידע, אמצעים ויכולות יסייע ביצור פתרונות מעשיים בהתמודדות עם מחלות נגיפיות. תוכנית מחקר זו כוללת שיתוף פעולה של 12 קבוצות מחקר מאגן הים התיכון, מהארצות הבאות: ישראל, טורקיה, יוון, ספרד, סלובניה, מצרים, מרוקו, צרפת ואיטליה. מטבע הדברים דו"ח זה כולל רק את הפעילות של הקבוצה הישראלית.

נגיפים חדשים מועברי ווקטור בארץ: בשנים האחרונות זוהו בארץ מספר נגיפים חדשים ממשפחות ומקבוצות שונות המועברים באמצעות וקטורים חרקים, כנימות עש וכנימות עלה.

בשנת 2002 זוהו בארץ שני נגיפים חדשים ממשפחת הבגומו אשר גרמו לנזקים משמעותיים ביותר בגידול קישוא ואבטיח *Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV)* and *Squash leaf curl virus (SLCV)*. כמו שאר נגיפי הבגומו, גם שני הנגיפים הללו מועברים בצורה מתמדת באמצעות כנימת עש הטבק (Abudy et al., 2010). במסגרת מחקר בשיתוף ארצות האזור נמצא כי שני הנגיפים החדשים התבססו גם ברשות הפלסטינאית, מצריים, לבנון וירדן (Lapidot et al., 2014). כמו כן נמצא כי SLCV גורם לנזק לקישוא ואלו WmCSV גורם לנזקים כבדים בגידול אבטיח ומלון. סינרגיזם בין שני הנגיפים

בגידול מלון ואבטיח מחריף את עוצמת הנזק לרמה של עד כ- 90% פחת מהתוצרת (Sufrin-Ringwald and Lapidot, 2011).

בשנת 2005 זוהתה מחלה נגיפית בגידולי פלפל, לימוד המחלה הראה כי הגורם הנו נגיף חדש מסוג *Pepper yellow leaf curl virus* (PYLCV) *Polyerovirus* המועבר בצורה מתמדת באמצעות שני מינים של כנימות עלה. הנגיף אשר זוהה באזור בקעת הירדן והערבה פוגע בצורה קשה בגידולי פלפל (Dombrovsky et al., 2010). ריצוף ולימוד רצף הגנום של PYLCV הראה כי הנגיף נוצר כתוצאה מרקומבינציה של לפחות שני נגיפים (שמקורם בנגיפי טבק ודלועיים) אשר איכלסו במשותף צמח פונדקאי לא ידוע וכתוצאה מכך נוצר נגיף חדש התוקף פלפל (Dombrovsky et al., 2013).

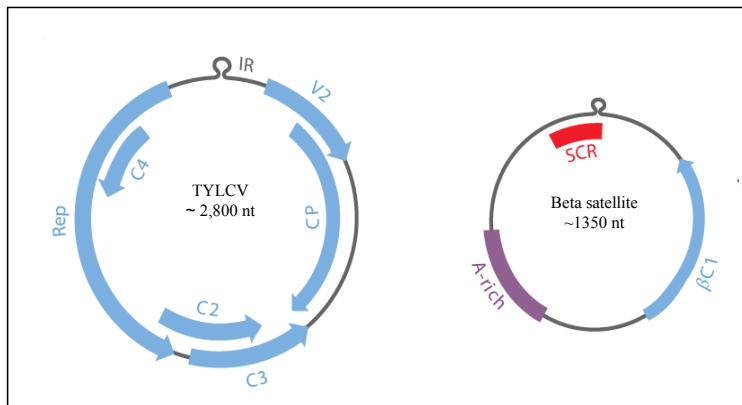
משנת 2005 ואילך זוהתה מחלה נגיפית בגידול חציל במבנים ובשטח פתוח הגורמת לעיוות משמעותי בפירות. תוצאות מחקר הראו כי המחלה נגרמת כתוצאה מהדבקה בנגיף חדש מסוג *Ipomovirus* *Eggplant mild leaf mottle virus* (EMLMV) המועבר בצורה חצי מתמדת באמצעות כנימת עש הטבק. נמצא גם כי EMLMV הוא למעשה גזע מקומי של נגיף, *Tomato mild mottle virus* (TomMMoV-IL), (Dombrovsky et al., 2012; 2013).

בעונת הגידול האחרונה 2014 של האבטיח זוהתה מחלה ויראלית חדשה אשר גרמה להפסד מוחלט של היבול והשמדת החלקות בכ- 4,000 דונם. נמצא כי גורם המחלה הנו נגיף חדש בארץ מסוג *Ipomovirus* *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) המועבר בצורה חצי מתמדת באמצעות כנימת עש הטבק (Reingold et al., 2016).

דניאל לוין בטא שובר עמידות: להדבקת צמחים בוורוס נילווים לעיתים גורמים אינפקטיביים נוספים, שאינם שייכים לוורוס התוקף את הצמח. גורמים אלה נספחים במהלך ההדבקה לוורוס התוקף אשר מאפשר את שיכפולם ומשמש עבורם כוורוס מסייע. אחד מהגורמים הללו נקרא לוין (Satellite), כאשר הלוין אינו מסוגל להשתכפל בעצמו והוא נסמך על הוורוס המסייע לשיכפול, מתעטף בחלבון המעטפת של הנגיף, ומועבר מצמח לצמח כמו הנגיף. בשנת 1997 זוהה לראשונה לוין שחומצת הגרעין שלו היא דניאל, אשר היה באסוסיאציה לוורוס ממשפחת הבגומו בשם וירוס קיפול העלים של העגבניה (*Tomato leaf curl virus*), ונקרא לוין בטא (Betasatellite). מאוחר יותר נמצא כי לוויני בטא נפוצים מאד באזור דרום מזרח אסיה, תמיד באסוסיאציה עם וירוסים בעלי גנום אחד ממשפחת וירוסים הבגומו – כמו וירוס צהבון האמיר של העגבניה (Zhou, 2013). כמעט בכל המקרים בהם נמצא לוין בטא הוא גרם להחרפת תסמיני המחלה של הצמח הנגוע. גנום הלוין מורכב מדניאל מעגלי בגודל של כ-1350 נוקלאוטידים, המקודד לחלבון אחד בלבד (איור 1), כאשר חלבון זה הוא מדכא של מנגנון ההשתקה הצמחי. כיום מניחים שדיכוי מערכת ההשתקה ע"י לוין הבטא הוא הגורם להחרפת תסמיני המחלה כאשר הצמח מודבק בוורוס ובלוין גם יחד.

הפעם הראשונה בה דווח על צמחי עגבניה הנגועים במחלת צהבון האמיר ובלוין בטא היתה בעומאן בשנת 2008. בנסיון להבין את הסיבה להתפרצות מגפת צהבון קשה נמצא כי הצמחים הודבקו בוורוס צהבון האמיר מאירן ביחד עם לוין בטא (Khan et al., 2008). בשנת 2013 נערך ניסוי שדה בירדן אשר בחן את רמת העמידות של קווים וזנים שונים של עגבניה לוורוס צהבון האמיר. קו טיפוחי, המכיל את הלוקוס

העמיד Ty-3, הראה באופן מפתיע סימפטומים חריפים של מחלת צהבון האמיר. נמצא כי הצמחים היו נגועים גם בוורוס וגם בלוויין בטא, אשר כפי הנראה גרם לשבירת העמידות ולהחרפת תסמיני המחלה (Anfoka et al., 2014). מאחר ולוויין בטא זוהה בירדן, הנחנו שהופעתו בארץ היא רק עניין של זמן.



איור 1. ארגון גנום לווין בטא (מימין) וגנום וירוס צהבון האמיר (משמאל). הווירוס מקודד לשישה חלבונים, החצים מתארים את כיוון הגנים. בנוסף גנום הווירוס מכיל אזור IR (Intergenic region). גנום הלוויין מקודד לחלבון אחד, מכיל אזור עשיר באדנין (A-rich) ואזור בקרה שמור (satellite conserved region) SCR. השירטוט הוא לפי קנה מידה.

מחלת צהבון האמיר של העגבניה: מחלת צהבון האמיר של העגבניה נגרמת ע"י כעשרה ווירוסים שונים השייכים לסוג *Begomovirus* ממשפחת *Geminiviridae*. אחד הווירוסים החמורים שבניהם הינו ווירוס צהבון האמיר [*Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)*]. ווירוס זה מועבר ע"י כנימת עש הטבק, ומביא לפגיעה קשה ביבול עד כדי השמדתו המוחלטת. עיקר ההתמודדות עם המחלה נעשית באמצעים אגרוטכניים וכימיים (רשתות וריסוסים) המכוונים לעצירת הווקטור הווירלי (Lapidot et al., 2014). הגישה הרווחת בשנים האחרונות היא גישה גנטית באמצעות פיתוח זנים עמידים (Lapidot & Levin, 2017). הקו TY172, אשר פותח במכון וולקני, אינו מציג בד"כ סימפטומים בעת הדבקה עם הווירוס. קו זה נושא אתר רצפי עיקרי על כרומוזום 4, המכונה *ty-5*, אשר על פי עבודות קודמות מסביר 39.7-46.6% מהשונות הנצפית בחומרת הסימפטומים באוכלוסיות מתפצלות (Anbinder et al., 2009). מיפוי מפורט של הלוקוס *ty-5* הביא לזיהוי גן בודד - המקודד לחלבון Pelota (Pelota) - כאחראי לעמידות בלוקוס זה (Lapidot et al., 2015). במהלך עבודה זו נמצא כי ביטוי ביתר של האלל הרגיש של הגן *Pelo* בקו העמיד TY172 לא גרם לשבירה מוחלטת של העמידות, והצמחים הטרוסגניים שהתקבלו התאפיינו ברמת סימפטומים בינוניים לאחר הדבקה בוורוס (~2). ערכים אלה גבוהים אמנם מהערך של הקו העמיד (~0), אך אינם מגיעים לערך של הקו הרגיש (~4). תוצאות אלו הביאו להשערה כי בקו TY172 ישנו גן נוסף התורם לעמידות וכי שילוב של גן זה יחד עם *Pelo* מביא את ערכי חומרת הסימפטומים לאפס בקו העמיד TY172. בדיקה זו הובילה לזיהוי לוקוס נוסף המבקר עמידות, אותו כינינו *Ty-1^V*, אשר מתמפה לכרומוזום 6, לאזור בו מופו בעבר שני האללים מבקרי עמידות: *Ty-1* ו-*Ty-3*.

מטרות המחקר

1. מעקב ואפיון אחר הופעתם של נגיפים חדשים בארץ המועברים ע"י חרקים
2. לימוד הסינרגיזם בהדבקות מעורבות של נגיפי צמחים בגידולי ירקות
3. סריקה אחר מקורות עמידות לנגיפי צמחים התמקדות בנגיפי בגומו

פירוט עיקרי הניסויים

1. מעקב ואפיון אחר הופעתם של נגיפים חדשים בארץ המועברים ע"י חרקים.

שימוש בשיטות ריצוף מתקדמות (Next generation sequencing (NGS) לזיהוי נגיפים בפירות סימפטומטיים של אבטיח: נגיפי צמחים מהווים חלק ניכר מהפתוגניים התוקפים צמחים ומביאים לפגיעה משמעותית באיכות היבול וכמותו. נגיפים אלו מועברים לרוב באמצעות וקטור חרקי (כגון כנימות עלה, כנימות עש) המאפשר את הדבקתם של צמחים פונדקאים חדשים בנגיף. בשנים האחרונות אנו עדים להופעה של מחלות ויראליות שונות הפוגעות בצורה קשה במקשות אבטיחים. כדי להרחיב את המעקב והאפיון של נגיפים חדשים בארץ, הצענו לדגום צמחים בשדה החשודים כנגועים במחלות ויראליות, ואפיון כל הווירוסים בצמחים אלו ע"י שימוש בשיטות ריצוף מתקדמות – Next generation sequencing; NGS. בשיטה זו דגמנו פירות בשלים מצמחים אשר הראו תסמיני מחלה קשים (חשודים כנגועים בווירוסים). הדגימות שמשו להפקת כל מולקולות הרנ"א הקטנות (Total Small RNA) מהצמח, אשר מהן הוכנו ספריות של מולקולות siRNA. הספרייה של מולקולות הרנ"א הקטנות עברה ריצוף במכשיר אילומינה, וע"י אנליזה ביואינפורמטית של תוצאות הריצוף ניתן לזהות איזה נגיפים הדביקו את הצמח, ואף לקבל ריצוף של גנום הווירוס. יש לציין כי שיטה זו מאד יקרה, דורשת הרבה עבודה מולקולרית, וכדי לקבל תוצאות אמינות יש לדגום כל פרי פעמיים.

במהלך שנות הפרוייקט התבצע מעקב אחר תפוצת מחלות נגיפיות באזורי הגידול של אבטיח. בכל שנה, בחודשים אפריל-מאי נדגמו פירות אבטיח לביצוע בדיקות מעבדה ונמצא כי בפועל מתקיימות הדבקות משולבות של שלושה נגיפים מסוגים שונים המועברים בצורה חצי מתמדת באמצעות כנימות עש הטבק:

Cucumber vein yellowing virus (CVYV) איפומוורוס; Ipomovirus

Squash vein yellowing virus (SqVYV) איפומוורוס; Ipomovirus

Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) קריניוורוס; Crinivirus

השילוב של מספר נגיפים התוקפים את צמחי האבטיח מוביל לפגיעה משמעותית בכמות ובאיכות התוצרת. באזור מרכז הארץ וצפון הארץ זוהה בעיקר הבגמווירוס נגיף הגימדון והחיוורון של האבטיח *Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV)* המועבר בצורה מתמדת באמצעות כנימות עש הטבק וגורם לנזקים כבדים לצמחים הנגועים. כמו כן נצפו גם שילובים של WmCSV עם SqVYV הפוגעים בצורה קשה באיכות הפירות המתקבלת.

שיטות וחומרים

שיטות סרולוגיות: DAS-ELISA או Direct ELISA ושימוש בנוגדנים ספציפיים כנגד ToBRFV לזיהוי

של חלבון המעטפת הנגיפי.

זיהוי נגיפים באמצעות הגברה ב- RT-PCR או PCR: בהתבסס על רצפי כל אחד מהנגיפים שזוהו

בשיטות הריצוף המתקדמות וכאלו הידועים כנגיפים המנגעים אבטיח, תוכננו תחלים ספציפיים לזיהוי של כ"א מהנגיפים בדוגמאות הנבדקות. זיהוי של נגיפי רנ"א נעשה באמצעות הפקה של רנ"א נגיפי אשר שימש כתבנית להגברה באמצעות RT-PCR תוך שימוש בתחלים ספציפיים לכל אחד מהנגיפים. זיהוי של נגיפי

דנ"א נעשה באמצעות הפקה של דנ"א גנומי צמחי (Total DNA) בפרוצדורה של דהלפורטה (Delaporta et al., 1983) ולאחר מכן הגברה באמצעות PCR. התחלים בהם נעשה שימוש מוצגים בטבלה 1.

ריצוף בשיטות מתקדמות:

siRNA-Seq: דוגמאות פירות אבטיח סימפטומטים שימשו להפקה של Small RNA (siRNA) באמצעות שימוש בקיט מסחרי של חברת Ambion. לאחר הוכנו ספריות של siRNA (שימוש בקיט מסחרי של חברת Illumina) אשר הורצו במכשיר ריצוף ה-MiSeq-Illumina שבמנהל המחקר החקלאי.

RNA-Seq: דוגמאות של פירות אבטיח סימפטומטים שימשו להפקה של רנ"א ויראלי (באמצעות קיט מסחרי של חברת Bioneer), לאחר מכן, הרנ"א הנגיפי שימש כבסיס להכנת ספריות של TruSeq RNA (קיט מסחרי של חברת Illumina) הספריות הורצו במכשיר HiSeq 2500 של הטכניון.

ביואינפורמטיקה: ניתוח ביואינפורמטי של תוצאות הריצוף המתקדם נעשו ע"י דר' נועה סלע, מנהל המחקר החקלאי לזיהוי של רצפי הגנומים הנגיפיים בכ"א מהדוגמאות. נעשה שימוש בתוכנה VirusDetect לניתוח ביואינפורמטי של התוצאות <http://virusdetect.feilab.net/cgi-bin/virusdetect/index.cgi>.

טבלה 1. תחלים לזיהוי וירוסים באבטיח בעזרת PCR או RT-PCR.

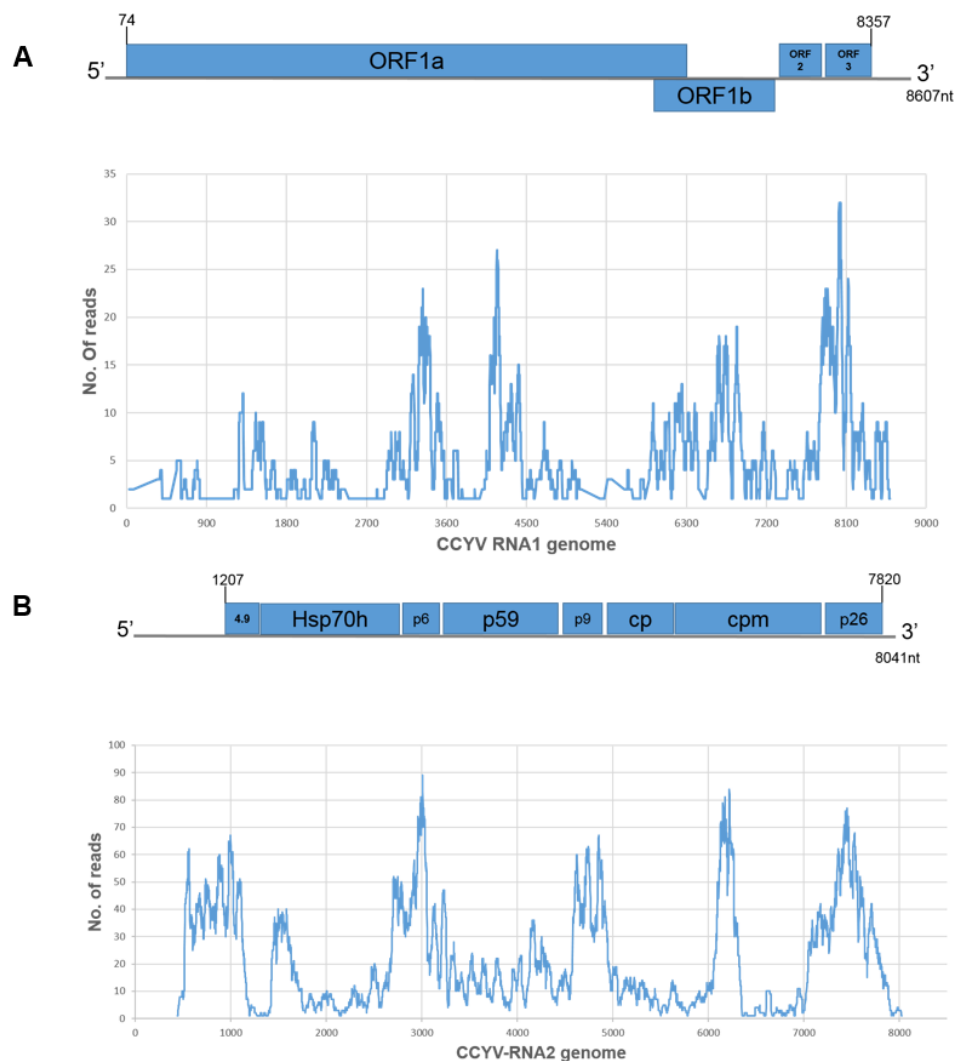
Primer	Sequence (5'-3')	Virus
RNA viruses – amplification by RT-PCR		
Sq-F-1-IL	ACATGAAAATTCAACACAACGAC	SqVYV-IL
Sq-R-435-IL	CACCGCATTACAGTATGTCT	SqVYV-IL
CCYV-F-6215-CPM	GGTGAGGACTTCCAACCAAA	CCYV
CCYV-R-6730-CPM	TACAAAACGACACCCCCATT	CCYV
CVYV-F-CP	GCTTCTGGTTCTCAAGTGGA	CVYV
CVYV-R-CP	GATGCATCAGTTGTCAGATG	CVYV
CYS-HSP-IN-F	TCAGCAGTTATGTTAACGGTGTT	CYSDV
CYS-HSP-IN-R	GGAATCCATAGAGAATATTTCTA	CYSDV
DNA viruses - amplification by PCR		
SL-F-CP	GGCAAGATATGGATGGACG	SLCV
SL-R-CP	CAGACTTAACACAAAAGCGC	SLCV
Wm-F-rep	CCGCACTTTAGATCAACGCG	WmCSV
Wm-R-rep	ATGAGGCCTCCCCGCTTTAG	WmCSV

תוצאות

1.1. ריצוף והרכבת נגיף *Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV)*

מתוצאות הריצופים המתקדמים התקבל הרצף של הנגיף (CCYV) *Cucurbit chlorotic yellows virus* שכלל הידוע, זאת הפעם הראשונה שזוהה בארץ. זיהוי נגיף זה התקבל בשתי הדוגמאות (קליה 2016 ומצפה שלם 2017). היות והנגיף זוהה לראשונה בארץ, התבצע ריצוף והרכבה של רצף הגנום המלא. נגיף זה בעל גנום רנ"א חד גדילי חיובי, שייך לסוג *Crinivirus* ומכיל שני סגמנטים של RNA (RNA1 ו-RNA2). RNA1 מכיל כ-8600 בסיסים ומקודד לחלבונים הקשורים לרפליקציה ואילו RNA2 מכיל כ-8040 בסיסים ומקודד למספר חלבונים ביניהם חלבוני המעטפת Coat protein (CP) ו-minor CP (CPM).

רצפי הגנום של התבדיד הישראלי הופקדו בבנק הגנים (MH477611 ו-MH477612, בהתאמה). עומק הריצוף שהתקבל מהדוגמא של האבטיחים וארגון הגנום של CCYV מוצגים באיור 2. שני הסגמנטים של גנום הנגיף, מקודדים למסגרות הקריאה השונות לחלבונים הנגיפיים. סגמנט 1 כולל 8607 נוקלאוטידים המקודדים לארבעה חלבונים (ORF1b, ORF1, ORF3 ו-ORF4). 5'UTR מתחיל בעמדה 1 ומסתיים בעמדה 74 של הסגמנט הראשון, 3'UTR מתחיל בעמדה 8358 ומסתיים בעמדה מספר 8607 של סגמנט זה. סגמנט 2 כולל 8041 נוקלאוטידים המקודדים לשמונה חלבונים נגיפיים (Hsp70h, 4.9, p6, p59, p9, cp, cpm, p26). 5'UTR מתחיל בעמדה 1 ומסתיים בעמדה 1207 של הסגמנט השני, 3'UTR מתחיל בעמדה 7821 ומסתיים בעמדה מספר 8041 של סגמנט זה. ניתן לראות שהקריאות שהתקבלו בריצוף המתקדם מספקים כיסוי של מרבית הגנום.



איור 2. פיזור הקריאות ועומק הריצוף לאורך שני מקטעי הגנום של התבדיד הישראלי של CCYV כפי שהתקבל מתוצאות הריצוף המתקדם. A. סכמה המתארת את ארגון הגנום של סגמנט 1 (RNA1) של CCYV-IL. B. סכמה המתארת את ארגון הגנום של סגמנט 2 (RNA2) של CCYV-IL ופיזור הקריאות שהתקבלו לאורכו.

1.2. זיהוי נגיפים בפירות אבטיח ע"י NGS

בחודש מאי 2016 בוצע דיגום ממקשה מסחרית של פירות אבטיח בקיבוץ קליה (איור 3) אשר הראו תסמיני מחלה קשים (חשודים כנגועים בנגיפים) במהלך הקטיפה. מהפירות הופקו רנ"א קטנים אשר עברו

אנליזת ריצוף זיהוי רצפים ויראליים בדגימות (טבלה 2) ע"י ריצוף small RNA במכשיר Illumina-Miseq. בחודש אפריל 2017 בוצע דיגום ממקשת אבטיחים במצפה שלם (איור 3). מהפירות הנגועים הופק Total RNA אשר עבר אנליזת ריצוף זיהוי רצפים ויראליים בדגימות במכשיר Illumina-Hiseq (טבלה 3).



A



B

איור 3. תסמיני המחלה הקשים הנגרמים כתוצאה מהדבקות מעורבות של נגיפים המועברים באמצעות כנימות עש הטבק. (A) מקשת אבטיחים קיבוץ קליה מאי 2016. (B) מצפה שלם אפריל 2017.

טבלה 2. תוצאות ריצוף מתקדם של דגימות רנ"א שנלקחו מפירות אבטיח נגועים

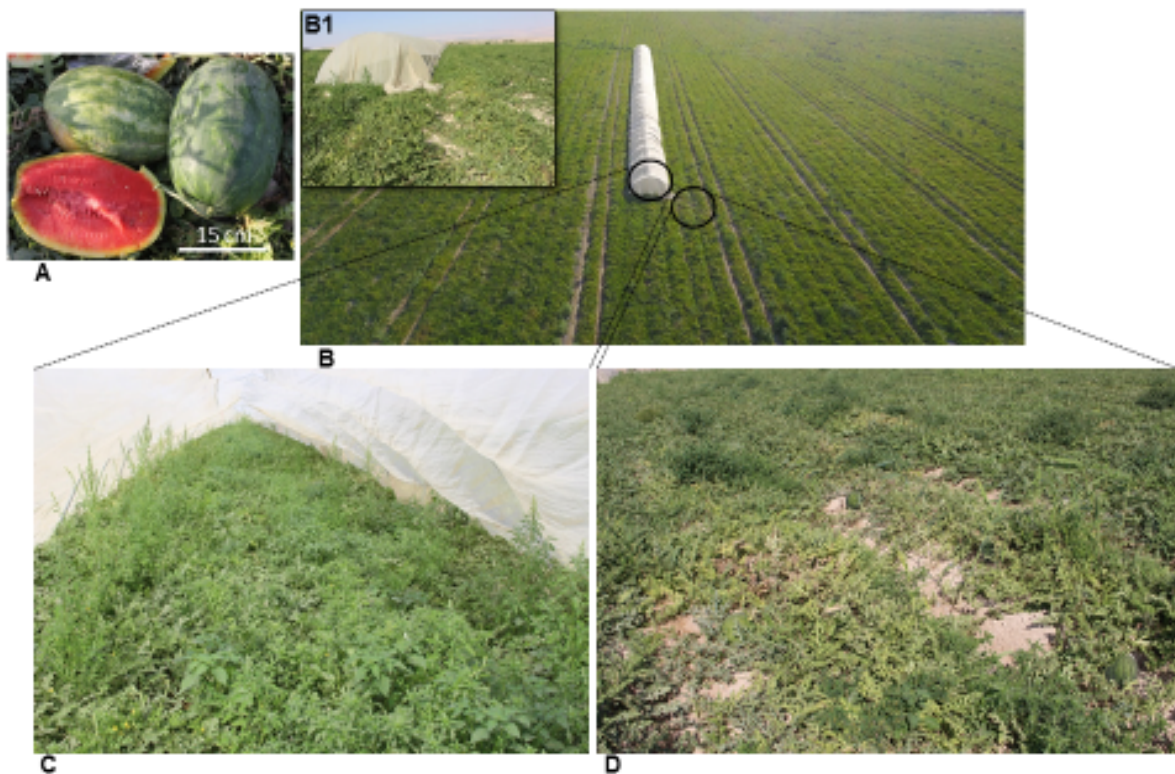
Description	Genus	Genome (nt)	Kalia 2016		Mitzpe-Shalem 2017	
			Coverage (%)	Identity (%)	Coverage (%)	Identity (%)
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i> , RNA 1 (CCYV)	Crinivirus	8,607	6,904 (80.2)	99.6	6,283 (79.3)	99.8
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i> , RNA 2 (CCYV)	Crinivirus	8,041	4,466 (55.5)	99.5	7,503 (93)	99.8
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> , RNA 1 (CYSDV)	Crinivirus	9,127	8,710 (95.4)	99.3	ND	ND
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> , RNA 2 (CYSDV)	Crinivirus	7,976	7,676 (96.2)	99.7	ND	ND
<i>Cucumber vein yellowing virus</i> (CVYV)	Ipomovirus	9,751	ND	ND	7,417 (76.1)	95.4
<i>Squash vein yellowing virus</i> (SqVYV)	Ipomovirus	9,831	9,798 (99.7)	99.5	6,369 (64.8)	99.6
<i>Squash leaf curl virus</i> , DNA-A (SLCV)	Begomovirus	2,667	2,664 (99.9)	97.5	ND	ND
<i>Squash leaf curl virus</i> , DNA-B (SLCV)	Begomovirus	2,624	2,579 (98.3)	96.5	ND	ND

תוצאות הריצוף המתקדם של פירות אבטיח סימפטומים בשתי הפרוצדורות: small RNA ו- Total RNA וריצוף בשתי הטכנולוגיות Illumina-HiSeq ו- Illumina Mi-Seq אפשרו זיהוי של פרופיל הנגיפים בדוגמאות. תוצאות אלו סיפקו הבנה מעמיקה על נוכחותם של נגיפים משפחות ומסוגים שונים (בגומו, קריני

ואיפואם) כאשר המשותף לכולם הוא הווקטור החרקי (כנימות עש הטבק) המשמש להעברה של נגיפים אלו. תוצאות אלו סייעו לתכנון תחלים (פרימרים) לאבחון באמצעות הגברה ספציפית ב- RT-PCR.

1.3. השפעת וירוסים מועברי כנימת עש הטבק על גידול אבטיח

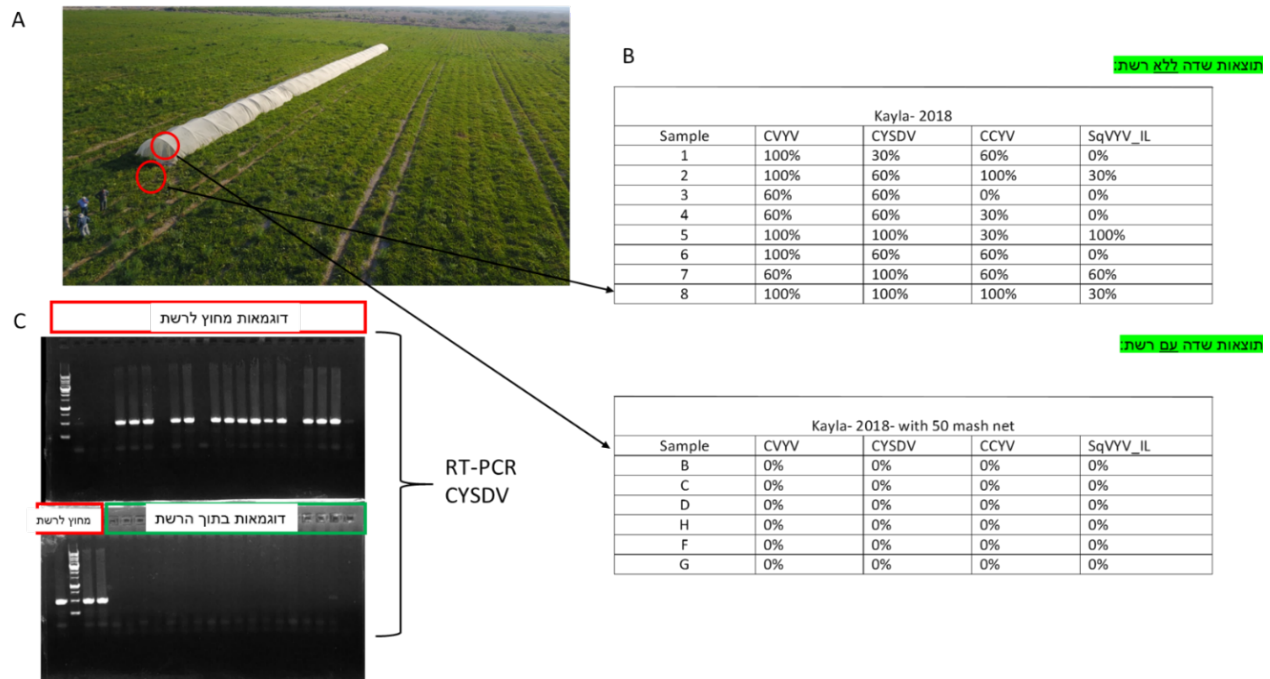
על מנת לראות האם מניעת החדירה של כנימות עש הטבק (הווקטור החרקי) לצמחי אבטיחים יסייע בהפחתת הנגיעות בנגיפים המועברים באמצעותם, נערכו תצפיות במקשת אבטיחים בקיבוץ קליה. בתצפית הוקמה מנהרה עבירה מחופה ברשת 50 מש במרכז המקשה (איורים 4 ו-5). נערכה הערכת נגיעות ויזואלית של הצמחים (במקשה ובמנהרה) ובוצעו בדיקות מעבדה לקביעת הרכב הנגיפים בפירות הבשלים (אחרי האיסוף) השוואה בין הפירות במקשה לאלו שגדלו במנהרה המחופה ברשת. הצמחים נבדקו לנוכחות הנגיפים (SqVYV, CCYV, CYSDV, CVYV) ו- (WmCSV, SLCV) המועברים ע"י כע"ט באמצעות RT-PCR ו- PCR. מתוצאות הבדיקות (איור 3 B, C) לא התקבל זיהוי של הנגיפים בצמחים המצויים בתוך הרשת לעומת זיהוי של הנגיפים SqVYV, CCYV, CYSDV, CVYV ו- SLCV בתערובות שונות מהדיגומים שנעשו מחוץ לבית הרשת.



איור 4. השפעת רשת 50 מש על חדירת כנימות עש הטבק והעברת נגיפים במקשת אבטיחים בקיבוץ קליה 2018. A. אבטיחים במקשה בהם ניתן לזהות נקודות ריקבון על ציפת הפרי. B. מנהרה עבירה מכוסה ברשת-50 מש (100 מ' X 6 מ') הממוקמת במרכז מקשת האבטיחים. B1. הגדלה של התמונה באזור הפתח בצד המערבי. C. צמחים הגדלים בתוך המנהרה. D. צמחים נגועים הגדלים במקשה, מחוץ למנהרה.

נערכה השוואה של התוצאות של הריצופים המתקדמים שנעשו לשלושה סוגים של ספריות לאותה דוגמא. לשם כך נבחרה דוגמת אבטיחים מקליה 2016 ונעשו ספריות של sRNA, Total RNA, Viral RNA. תוצאות ההשוואה מובאות בטבלה 3. כפי שניתן לראות התקבל זיהוי של אותו הרכב הנגיפים (וירוס) בכל אחת משיטות ההכנה של הספריות עם יתרון מסוים להכנת ספרייה המבוססת על הפקה של viral RNA,

ספרייה זו ספקה את עומק הריצוף ואחוז הכיסוי הגבוה ביותר בהשוואה לספריית האחרות (sRNA ו- Total RNA).



איור 5. בחינת הרכב הנגיפים המועברים ע"י כע"ט באבטיחים הגדלים תחת רשת 50 מ"מ ומחוצה לה, קליה 2018. **A.** שדה פתוח של גידול אבטיחים שבמרכזו מנהרה העשויה רשת 50 מ"מ. **B.** תוצאות RT-PCR לזיהוי נגיפים המועברים באמצעות כע"ט, שנעשו על אבטיחים המצויים סמוך למנהרה (ללא רשת) וכאלה שגדלו בתוך המנהרה (עם רשת). הנגיפים שנבחנו הם: CVYV, CYSDV, CCYV, SqVYV. סה"כ נדגמו 3 אבטיחים ב-8 טיפולים של שילובי כנה רוכב (בוצעו במסגרת המיזם של אבטיח מורכב בהובלת פרופ' אלי פאליק). **C,** ג'ל מייצג מתוצאות הבדיקה לנוכחות של CYSDV בדוגמאות האבטיחים השונות באמצעות RT-PCR עם פריימרים ספציפיים לנגיף. ערוצים המסומנים בצבע אדום- מיצגים דיגומי אבטיחים מחוץ למנהרת הרשת. ערוצים המסומנים בצבע ירוק- מיצגים דיגומי אבטיחים בתוך מנהרת הרשת.

טבלה 3. השוואה בין שלוש שיטות להכנת ספריית לריצוף מתקדם (NGS) מפירות אבטיחים סימפטומטיים שנדגמו מקליה 2016.

Reference genome ^b	sRNA			Total RNA			Viral RNA		
	Coverage ^c (%)	Depth ^d	Identity ^e (%)	Coverage (%)	Depth	Identity (%)	Coverage (%)	Depth	Identity (%)
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i> (CCYV), RNA1	6,904 (80.2)	5.0	99.55	4,527 (52.6)	1.6	99.6	8,029 (93.28)	4.5	99.63
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i> (CCYV), RNA 2	4,466 (55.5)	3.3	99.54	4,173 (51.9)	1.5	99.7	7,503 (93)	6.6	99.79
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> (CYSDV), RNA1	8,710 (95.4)	9.9	99.34	8,588 (94.1)	27.6	99.43	9,054 (99.2)	35.7	99.45
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> (CYSDV), RNA2	7,676 (96.2)	12.1	99.73	7,303 (91.6)	17.1	99.73	7,898 (99)	28	99.84
<i>Squash vein yellowing virus</i> (SqVYV)	9,798 (99.7)	64.2	99.49	9,723 (98.9)	448.3	99.59	9,779 (99.5)	513	99.46
<i>Squash leaf curl virus</i> (SLCV), DNA-A	2,664 (99.9)	48.1	97.53	2,667 (100)	94.7	99.7	2,204 (82.67)	3.2	98.41
<i>Squash leaf curl virus</i> (SLCV), DNA-B	2,579 (98.3)	42.8	96.52	2,624 (100)	80.05	99.31	2,039 (76.45)	3.6	98.81

בדיאגנוסטיקה של מחלות נגיפיות בצמחים, ע"פ רוב האבחון הראשוני נעשה בהתאם לתסמיני המחלה המהווים חלק חשוב בהחלטה על סוג בדיקות האבחון כנגד "משפחה", "סוג" או "מין" ספציפי של נגיף לבדיקות מולקולריות סרולוגיות ומבחני הדבקה על צמחי בוחן. במרבית המקרים בבדיקות דיאגנוסטיקה שגרתיות מתקבל זיהוי של נגיף אחד או שניים, כאשר ברוב המקרים אנו מנסים לאתר את הנגיף הגורם לתסמיני המחלקה הקשים ביותר או לפגיעה הקשה באיכות היבול כמקור הבעיה. גישה זו יעילה לאבחון גורמי מחלה ומתן תשובות למגדלים ולמדריכים החקלאים, אך מותירה שאלות אליהם יש להתייחס:

1. אלו נגיפים אנחנו לא מזהים ולא מודעים אליהם בדוגמאות צמחים סימפטומטיים.

2. האם שילוב של מספר נגיפים מוביל לאפקט סינרגסטי ונזק מוגבר.

לכן בעבודה זו בחנו את השימוש בשיטות הריצוף המתקדמות לקבלת פרופיל מעמיק של הרכב הנגיפים בדוגמא הנבדקת - "Viroome". שיטות הריצוף המתקדמות שונות זו מזו בהכנה ובהרכב של הדוגמא הנבדקת, בפלטפורמה המשמשת לריצוף ובתוכנות המשמשות לניתוח ביואינפורמטי של התוצאות. ריצוף של siRNA מאפשר לנו לעקוב אחר מערכת ההגנה הצמחית אשר מעידה על התמודדות הצמח עם הפתוגנים השונים אשר תקפו אותו במהלך תקופת הגידול. מאידך, ריצוף של כלל ה-RNA מספק מידע על הפתוגנים המצויים בדוגמא ברגע הנתון. היות והחלמה מנגיפי צמחים היא אירוע נדיר מאוד (מתקיים בבטטה, קאסווה) ריצוף כלל ה-RNA מספק לנו מידע אמין על הנגיפים שתקפו את הגידול עד מועד לקיחת הדוגמא.

מלימוד של תוצאות הריצוף, בשתי שיטות הריצוף המתקדמות והרכבת פרופיל הווירוס של הדוגמאות, נמצא כי אכן מתקיים פער מידע גדול בין תסמיני המחלה והרכב הנגיפים. יתכן והגישה של זיהוי הנגיף הפתוגני המעורב ביצירת המחלה היא נכונה חלקית ובפועל קיימים נגיפים נוספים אשר יתכן והם מעורבים בהשראת תסמיני המחלה.

בשנים האחרונות מ-2016-2018 התבצע מעקב מעמיק אחר נוכחות הווירוסים בפירות האבטיח. מתוצאות הבדיקות עולה כי בכל מקשת אבטיחים בעונות הגידול השונות קיים הרכב נגיפים שונה (ווירוס). מתוצאות הבדיקות של הווירומים השונים נמצא כי בשנים האחרונות עיקר הנזק לגידול האבטיח נגרם כתוצאה מהדבקה של נגיפים המועברים באמצעות הווקטור כנימת עש הטבק. תצפית השדה בה נעשה שימוש במנהרה עבירה בלב מקשת האבטיחים (עונת גידול 2018) בקיבוץ קליה סייעה להוכיח כי הפחתת החדירה של כנימות עש הטבק תורמת למניעה מוחלטת של הנגיפים בדוגמאות הצמחים. אין ספק כי איכות פרי האבטיח משקפת את ההיסטוריה הווירומית של הצמח. או במילים אחרות הידבקות צמחי האבטיח בנגיפים השונים מובילה לפירות אבטיח עם תסמיני מחלה קשים אשר פוגעים במרקם ובאיכות התוצרת. כמו כן, זוהי לראשונה בארץ הנגיף CCYV השייך לסוג של ווירוס קריני המועבר בצורה חצי מתמדת באמצעות כנימות עש הטבק ותוקף בעיקר צמחים ממשפחת הדלועיים. זאת כחלק מאנליזת הווירוס, שכן אם היינו מפעילים כלי זיהוי ספציפיים לכל וירוס כלל לא היינו בודקים האם וירוס זה נוכח בדגימות.

היות וזה לא מעשי לבצע דיאגנוסטיקה המבוססת על ריצוף מתקדם NGS לכל דוגמא צמחית המגיעה למעבדה, הן בהיבט של עלות הבדיקה הגבוהה והן בהיבט של פרק הזמן הארוך של כמספר שבועות עד

קבלת תוצאות הריצוף וניתוח ביואינפורמטי לזיהוי הנגיפים. לכן, בהתבסס על הידע שהתקבל מפרופיל הנגיפים שזוהה בדוגמאות אבטיחים, תוכננו תחלים ספציפיים לביצוע הגברה ספציפית של נגיפים שזוהו בפרופילים של שני הווירומים לבדיקה רחבה יותר של הרכב הנגיפים מדוגמאות של פירות אבטיח שנאספו ממקשות אבטיח ובכך התאפשר לבצע פרופילים וירומים ממוקדים יותר בעלות בדיקה סבירה תוך פרק זמן קצר ביותר של 2-3 ימים.

1.3. הופעת לוויין דנ"א בטא בארץ באסוסיאציה למחלת צהבון האמיר בעגבניה

במהלך השנה הראשונה למחקר גילינו את נוכחות לוויין בטא בארץ, באסוסיאציה עם מחלת צהבון האמיר של העגבניה. במהלך השנה השניה והשלישית למחקר המשכנו באיסוף הדגימות מצמחי עגבניה וזאת כדי לאפיין את תפוצת הלוויין בארץ.

חומרים ושיטות

איסוף דוגמאות מצמחי עגבניה מסחריים: התבצע איסוף של דגימות מצמחי עגבניה מגידול מסחרי, אשר הראו סימפטומים "לא צפויים" של צהבון האמיר. אספנו דגימות מצמחים עמידים אשר הראו סימפטומים, ומצמחים שהראו סימפטומים לא אופייניים לוירוס צהבון האמיר של העגבניה. ההגיון היה שהופעת לוויין בטא תגרום לסימפטומים לא אופייניים של מחלת צהבון האמיר.

בדיקות מולקולאריות: הפקה של דנ"א גנומי צמחי (total DNA) מקודקוד צמח העגבניה נעשתה בשיטת דהלפורטה (Delaporta et al., 1983). הדנ"א הגנומי שימש כבסיס להגברה באמצעות ריאקצית PCR כאשר השתמשנו בתחלים יחודיים המסוגלים לזהות גזעים שונים של וירוס צהבון האמיר וגם את לוויין בטא (טבלה 4).

זיהוי נוכחות Ty-1: נעשה ע"י PCR בעזרת הסמן המולקולרי P19 לפי Verlaan et al., 2013.

טבלה 4. תחלים יחודיים לזיהוי גזעים שונים של וירוס צהבון האמיר של העגבניה ושל לוויין בטא.

Primer	Sequence (5'-3')	TYLCV isolate, recombinant or bettasatellite	Product size (bp)	Ref.
TYAlmv 2516 TYAlmc115	TTTTATTTGTTGGTGTGTTAGTTGAAG ATATTGATGGTTTTTCAAACTTAGAAG	TYLCSV	433	Anfoka et al., 2005.
TYv2337 TYc138	ACGTAGGTCTTGACATCTGTTGAGCTC AAGTGGGTCCCACATATTGCAAGAC	TYLCV	634	
TYv2664 TYc138	ATTGACCAAGATTTTACACTTATCCC AAGTGGGTCCCACATATTGCAAGAC	TYLCV-Mld	316	
Sar-43R IL-2629F Mld-2277F	TGCGTAGGDCCYACTWCTTTATCGG GGTGTCCCTCAAAGCTCTAWG CTSWCCCCARTCGABGGTG	R-TYLCV/TYLCSV R-TYLCV-Mld/TYLCSV	187 548	Belabess et al., 2015
TY-78R IL-2629F Mld-2277F	GCAATTTGATTGGTTGAYAGTSACR GGTGTCCCTCAAAGCTCTAWG CTSWCCCCARTCGABGGTG	TYLCV TYLCV-Mld	230 592	
Beta01 Beta02	GGTAACCACTACGCTACGCAGCAGCAGCC CACATGGGGACCCTCCCATCCATFF	Betasatellite	~1350	Briddon 2002

תוצאות

זיהוי לוויין בטא בארץ: בסביבות ספטמבר 2016, נראו תסמיני מחלת צהבון האמיר יוצאי דופן בחריפותם בזן העגבניות דיאגרמה (חברת נונמס) (איור 6), זן בלתי מסיים בעל עמידות לוורוס צהבון האמיר, בחממות במושב רוויה (דרום עמק המעינות). הצמחים נדגמו בחודש נובמבר, ולאחר אנליזה מולקולרית בעזרת PCR נמצא כי הצמחים נגועים בוורוס צהבון האמיר ובלוויין בטא. כאשר בדקנו את הצמחים לנוכחות הגן Ty-1 אשר משרה עמידות לוורוס צהבון האמיר נמצא כי כולם אכן נושאים את הגן (טבלה 5).

איור 6. שני צמחים מהזן דיאגרמה העמיד לוורוס צהבון האמיר של העגבניה המראים תסמינים חריפים של מחלת צהבון האמיר. התמונות צולמו בחממה במושב רוויה, נובמבר 2016.



איפיון לוויין בטא המופיע עם מחלת צהבון האמיר בעגבניה: מאחר ולוויין בטא הוא מולקולה קטנה יחסית, תוצר ההגברה ב-PCR שובט בפלסמיד מסחרי (pGEM-T Easy), ונשלח לריצוף. השיבוט והריצוף בוצע על מספר דגימות שונות, אולם רצף הלוויין היה זהה בכל הדוגמאות ששלחנו. נמצא כי הלוויין אשר זוהה בארץ הוא בגודל של 1329 נוקלאוטידים (איור 7), הרצף הופקד בבנק הגנים, מס. הפקדה MK456609. כאשר בצענו השוואה של רצף הלוויין אשר התגלה בארץ לרצפי לווייני בטא השמורים ב-GeneBank (טבלה 5) נמצא כי ההומולוגיה הגבוהה ביותר – 96% זהות - היתה עם לוויין בטא שזוהה בכותנה בג'זירה, מצרים - Cotton leaf curl Gezira betasatellite. היינו, לוויין הבטא אשר נתגלה בארץ הוא תבדיד (איזולט) של הלוויין אשר מקורו בכותנה ממצרים, ועל כן צריך להקרא - *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* [Israel:tomato:2016]. שלא במפתיע, נמצאה הומולוגיה גבוהה של 93% עם לוויין הבטא אשר זוהה בירדן.

איור 7. רצף הנוקלאוטידים של לווין הבטא אשר זוהה בארץ באסוסיאציה למחלת צהבון האמיר בעגבניה.

1	ACCGTGGGCGAGCGGTGCCGTGGACTGAATTTGGTGGGTCCCATCTATTGGGAATGAATGA	60
61	AGTCTTGGGAAATTGGGCTAGATCCAATCCATTTGTTATATATATTTAATTTATGATTAA	120
121	ATTAAATAATTCTATAAATGATATTATAAAACAAATAATTTAAATATTATTTATTATA	180
181	TATAATTTCAAACATTACACGGACGATTTATTTATGATGCGGTAATGATTTATGAGTTCC	240
241	ATGCCATAAACGTTACGTTCTCAGCCATCACCATATCCACCACGTCGACTAGTTCCCTCC	300
301	GTCTTGATCATCTGGTGAGTGGATTCTTTGTACATATTCTTAACCCATGCATTATTTCT	360
361	TCCCTCAGAGCCGTTAAAGTCAATGGGATGAAGACATCAGCGAAGTGATATGGTATGATA	420
421	AACGTTGATTTCTCAGATATGATTCTTTTGTGCGGTACCTCTATCTTGCAGTCTATA	480
481	TGATCGTCTTTGAGGAAGACATCGACTCTGAAGTGGACTCCCTTGGTGTCTTAAATGTG	540
541	ATAGTCATTTTTTAATATGTTTCGTGTTGATCATCAACAGGAAATATATAGATGATTCAT	600
601	AAAAAATATCTTCTGAGTATATGGATTTAAATGGAACACGTATATCCTGTATTATCCATA	660
661	CATATTTCTGTCATCCATTACGTCATACAGGCTCATACGATGTAAAGCATCGTAAGAGATA	720
721	AACATTAAATAAAAAGGAAAAAATAAAATAAGAAATAATTAGAAGTTAGAAAGAAACAAG	780
781	GGAGCGCAGCAAGAAACAAGGGGGGGGAGGGGAAAAAAAAACCCGAACAGAGAAAGAA	840
841	AAATAAATAGAAAAAAAAACCGTACAAGTTCTTTTCAGAAGGACTTGGTTGATAAAAAAAAA	900
901	AACACATTACTTCCGTACTATCATACTATGTCGTTTTTGTGAAGTCCGTACTCAAATCAC	960
961	TATTTAAACGGTAGACTCAATTTTCATCAGCAATCCCGTTCCGTTATTTTTGTATCCGTTT	1020
1021	CGTTATTTATCACCATTCCGTTATTTGAGTACCGATATATCGGTGCCTATCGGTGCCTAT	1080
1081	TGGTACTCATTTAAGTTGCCTTTTTACCAAATTACCCTCAAAAAGCTGAGATAAGAGGCGC	1140
1141	GTGCAATGCGCCTAAAAAGTTAACATTCTCTATCCTATTTCCGGTGAACTATCATTTTC	1200
1201	CGGTGGTTGCCGGCGTCAATTACGACACGCGCGGGGTGTATACCCCTGGGAGGGTAGG	1260
1261	TACCGGTACCACACGCTACGCAGCAGCCTTAGCTACGCCGGAGCTTAGCTCGCCACGT	1320
1321	TCTGATATT	1329

טבלה 5. השוואת רצף הנוקלאוטידים של לווין הבטא אשר זוהה בארץ באסוסיאציה למחלת צהבון האמיר עם רצפי לווני בטא מבנק הגנים – בטבלה מרוכזים הרצפים בהומולוגיה של 89% ומעלה.

Description	Cover (%)	Identities (%)	GenBank Accession No.
Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate IsSq-C112	99	96	KT099177.1
OkLCV satDNA 10*	99	95	AF397215.1
Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate IsSq1	99	94	KU095847.1
OkLCV satDNA 10 isolate Homra*	99	93	KJ396939.1
OkLCV satDNA 10 isolate Amman*	99	92	JX649952.1
OkLCV satDNA 3*	99	90	AF397217.1
Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate IsSq-C9	99	90	KT099178.1
Cotton leaf curl Gezira virus-associated DNA beta -CLC32-S	96	90	AY0777981.1
Cotton leaf curl Gezira virus satellite DNA beta	98	89	FJ868829.1
Okra leaf curl virus-[Mali] satellite DNA beta*	98	89	EU024121.1
Cotton leaf curl Gezira virus satellite DNA beta - Datura	97	89	DQ644564.1
Cotton leaf curl Gezira beta - [Sudan:Okra 44-2:96]	96	89	AY044142.1

*Originally termed OkLC betasatellite, but later recognized as Cotton leaf curl Gezira betasatellite (Briddon et al., 2008).

טבלה 6 מראה את כל האתרים בארץ בהן זוהה לווין הבטא באסוסיאציה עם מחלת צהבון האמיר בעגבניה. כל הדגימות היו מצמחי עגבניה מסחריים אשר הראו תסמיני מחלה מאד חריפים או לא אופייניים. כל הגנוטיפים של עגבניות החממה שנדגמו נמצאו חיוביים לנוכחות הגן *Ty-1* המשרה עמידות לוורוס צהבון האמיר. היינו צמחים אלו הראו תסמיני מחלה מאד חריפים למרות שהם למעשה עמידים לוורוס. אנו מניחים

כי לנוכחות הלווין יש השפעה שלילית על העמידות הגנטית בצמחים אלו. כמו כן ניתן לראות שהלווין התפשט ונפוץ בכל חלקי הארץ.

טבלה 6. זיהוי לווין בטא בדגימות מגידול מסחרי של עגבנייה ברחבי הארץ מאוקטובר 2016 ועד אוקטובר 2018.

אתר	תאריך (חודש-שנה)	גנוטיפ	Ty-1*	מס. צמחים חיוביים		
				TYLCV-Is	TYLCV-Mid	לווין בטא
א. עגבניות חממה						
רוויה	10-2016	דיאגרמה	+/-	11	7	10
אליפז	2-2017	אשכול	+/-	0	3	3
נתיב העשרה	5-2017	אשכול	+/-	1	1	2
בית חנן	9-2017	3951	+/-	7	1	7
ישע	10-2017	אשכול	+/-	5	1	6
עידן	10-2017	אשכול	+/-	2	2	4
מיבטחים	10-2017	אולימפיקוס	+/-	1	1	2
עין ירב	10-2017	אשכול	+/-	2	2	2
רנן	7-2018	ברונז	+/-	1	5	6
שדה דוד	10-2018	טוני	+/-	1	3	3
נחלה	10-2018	גילה	+/-	1	4	4
ב. שטח פתוח						
תומר	3-2017	לא ידוע	-/-	2	2	4
מו"פ דרום	10-2017	לא ידוע	-/-	2	4	3
גבעת יואב	8-2018	שביט	+/-	4	7	6
אפיק	8-2018	שנטי	+/-	2	4	4

* הסימון +/- פירושו נוכחות הגן Ty-1 במצב הטרוזיגוטי, -/- פירושו צמחים רגישים ללא נוכחות Ty-1.

דיון

כאמור, בסביבות ספטמבר 2016, נראו תסמיני מחלת צהבון האמיר יוצאי דופן בחריפותם בזן העגבניות דיאגרמה (איור 6), מיכלוא מסחרי בלתי מסיים בעל עמידות לוורוס צהבון האמיר, בחממות במושב רוויה (דרום עמק המעינות). בבדיקות מולקולריות נמצא כי הצמחים אכן נגועים בוורוס צהבון האמיר של העגבניה, אבל במקביל זוהתה נוכחות לווין בטא בצמחים אלו. זה הזיהוי הראשון של לווין בטא בארץ. במהלך המחקר התקבלו דוגמאות נוספות ממגדלים חקלאים של מיכלואי עגבניה מסחריים אשר הראו תסמיני מחלה לא טיפוסיים של מחלת צהבון האמיר. יתרה מזו, רוב המיכלואים היו בעלי עמידות גנטית לוורוס צהבון האמיר. נמצא כי הצמחים בעלי הסימפטומים הלא טיפוסיים מכילים לווין בטא, והוא באסוסיאציה עם מחלת צהבון האמיר של העגבניה. במהלך המחקר נמצא גם כי הלווין התפשט למעשה בכל חלקי הארץ, מאליפז בדרום ועד גבעת יואב בצפון. הלווין שובט ורוצף, ובהשוואה לרצפי לווין בטא אשר בבנק הגנים נמצא כתבדיד של לווין בטא אשר זוהה בצמחי כותנה במצרים. כמו כן נמצא כי הוא בעל הומולוגיה גבוהה ללווין בטא אשר זוהה בירדן.

לפי הסיפורות כמעט בכל המקרים בהם נמצא לווין בטא הוא גרם להחרפת תסמיני המחלה של הצמח הנגוע. גנום הלווין מורכב מדנ"א מעגלי בגודל של כ-1350 נוקלאוטידים, המקודד לחלבון אחד בלבד (איור 1), כאשר חלבון זה הוא מדכא של מנגנון ההשתקה הצמחי. כיום מניחים שדיכוי מערכת ההשתקה ע"י לווין הבטא הוא הגורם להחרפת תסמיני המחלה כאשר הצמח מודבק בוורוס ובלווין גם יחד.

הלוויין אשר זוהה בארץ הוא בעל 1329 נוקלאוטידים, ומקודד לחלבון אחד שכמו בשאר הלוויינים שזוהו עד כה הוא מדכא של מנגנון ההשתקה הצימחי. אנו מניחים כי נוכחות הלוויין היא הגורם להחמרה הלא טיפוסית בתסמיני המחלה אשר נגרמים על ידי ווירוס צהבון האמיר של העגבניה. כמו כן אנו מניחים כי הלוויין גורם לשבירת העמידות הגנטית נגד הווירוס, לפחות בלוקוסים העמידים *Ty-1/Ty-3*. היפותזות אלו נבדקו בסעיף 2 של המחקר.

2. לימוד הסינרגיזם בהדבקות מעורבות של נגיפי צמחים בגידולי ירקות עיקריים.

במהלך השנה השניה והשלישית של המחקר החלנו בבדיקת האינטראקציה של לוויין הבטא שהתגלה בארץ עם ווירוס צהבון האמיר של העגבניה, ואת השפעתו על עמידות גנטית למחלה. בקשנו לברר את השאלות הבאות:

1. האם הלוויין אכן גורם להחמרת תסמיני המחלה המושרים על ידי הווירוס.
2. האם הלוויין גורם לשבירת עמידות גנטית בצמחי העגבניה המסחריים, ואם כן איזו עמידות.
3. מה השפעת הלוויין על לוקוסים שונים לעמידות לוורוס צהבון האמיר.

שיטות וחומרים

הדבקת הצמחים בוורוס צהבון האמיר: כנימות עש הטבק (*B. tabaci*) גודלו על צמחי כותנה בכלובים המכוסים ברשת 50 מ"ש. הכלובים הוחזקו בחדר גידול בטמפרטורה של $23-30^{\circ}\text{C}$. תרבויות של ווירוס צהבון האמיר נשמרו בקו העגבניות הרגיש R13 בחממות חסינות לחרקים. לצורך רכישת הווירוס הכנימות הועברו להזנה על צמחי העגבניה הנגועים במשך 48 שעות. לאחר מכן הועברו הכנימות לצמחי הניסוי בשלב עלה אמיתי ראשון למשך 48 שעות (כ-50 כנימות לצמח). לאחר פרק זמן זה הכנימות רוססו והצמחים הוחזקו בחממות חסינות לחרקים בטמפרטורה של $26-32^{\circ}\text{C}$.

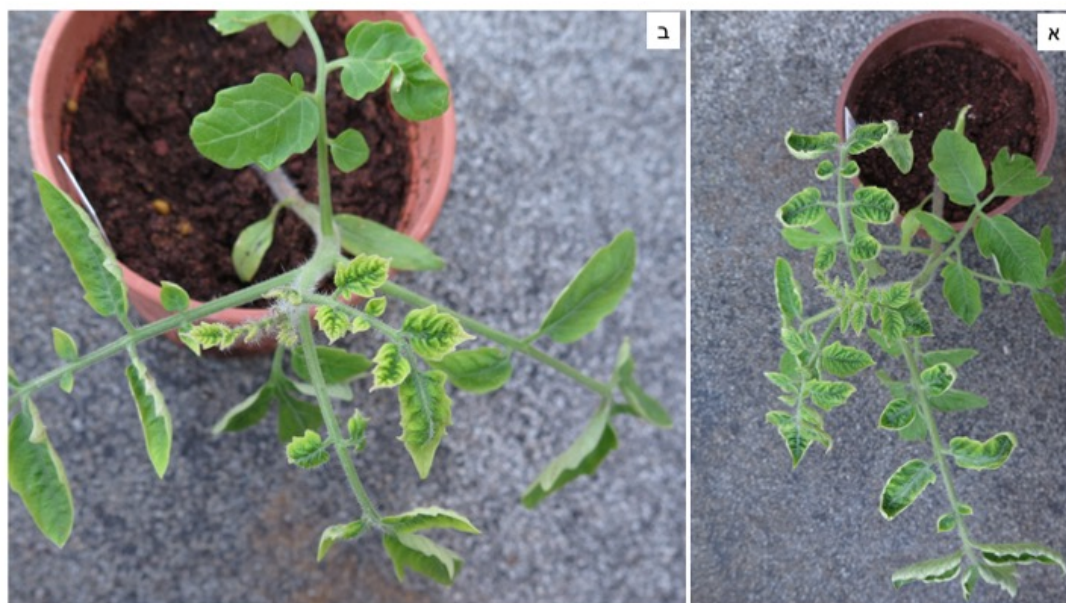
הדבקת צמחים בלוויין בטא ובוורוס צהבון האמיר: ההדבקה בוצעה על ידי כנימות עש הטבק כמפורט לעיל, כאשר צמחי מקור הכילו הן לוויין בטא והן וורוס צהבון האמיר.

הערכת חומרת הסימפטומים: הערכת חומרת הסימפטומים בצמחים שהודבקו בוורוס צהבון האמיר עם או בלי הלוויין נעשתה במהלך שלושה מועדים, 15, 21 ו-28 יום לאחר ההדבקה. חומרת הסימפטומים נקבעה לפי סולם אינדקס חומרת המחלה, הכולל 5 דרגות, כפי שתואר בעבר (Friedmann, et al., 1998; Lapidot and Friedmann, 2002). דרגה 0- צמח ללא סימפטומים; דרגה 1- סימפטומים קלים מאוד, הכוללים הצהבה בשולי העלים; דרגה 2- סימפטומים בדרגת ביניים, כוללים הצהבה וגלגול עלים; דרגה 3- סימפטומים חמורים, כוללים גלגול והצהבת עלים, עיכוב או עצירת הצימוח; דרגה 4- סימפטומים חמורים מאוד, כוללים גלגול והצהבת עלים, צריבת קודקוד הצמיחה ועצירת הצימוח.

זיהוי מולקולרי של וורוס צהבון האמיר ולוויין בטא: נוכחות הווירוס או הלוויין בוצעה על ידי זיהוי מולקולרי בעזרת PCR, כמתואר בסעיף 1.3.

תוצאות

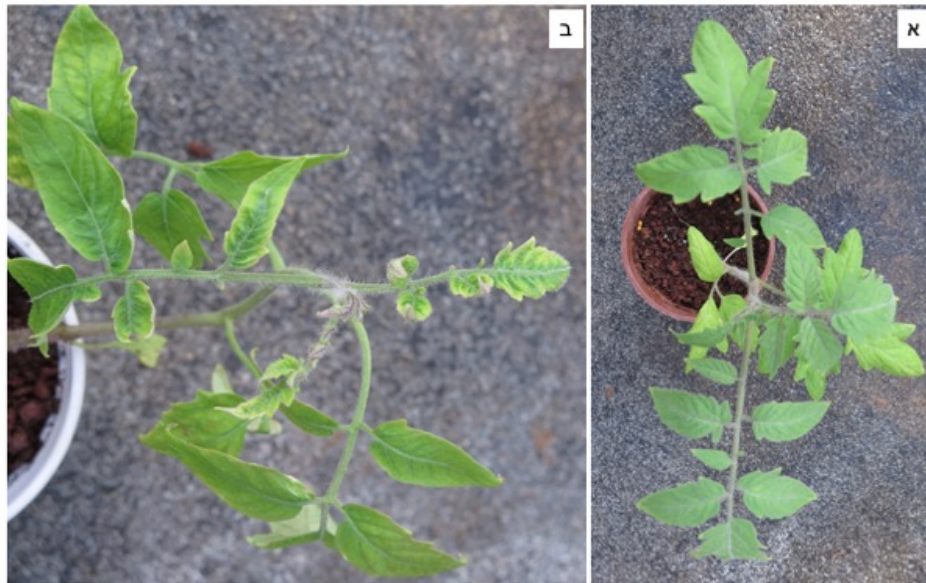
השפעת לווין בטא על חומרת תסמיני מחלת צהבון האמיר: כדי לבדוק את השפעת הלווין על חומרת מחלת צהבון האמיר הדבקנו צמחים עם וירוס צהבון האמיר או עם וירוס צהבון האמיר ועם לווין בטא. כאשר הדבקנו צמחי עגבניה רגישים לוורוס הצמחים פיתחו כצפוי תסמיני מחלה חמורים אחרי הדבקה עם הווירוס, אולם תסמיני המחלה היו חמורים יותר כאשר לוורוס נלווה לווין בטא (איור 8).



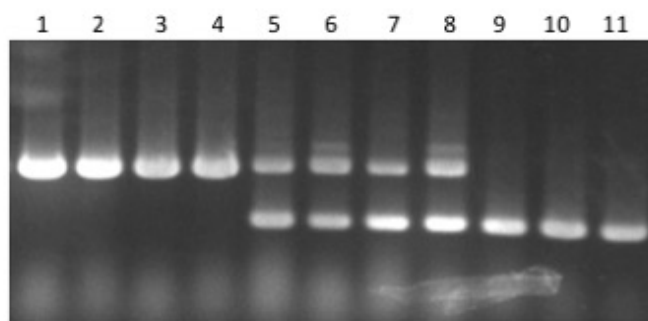
איור 8. הדבקת צמחי עגבניה רגישים לוורוס צהבון האמיר בוורוס בנוכחות לווין בטא. צמחי עגבניה רגישים לוורוס, הקו רחובות 13, הודבקו בוורוס צהבון האמיר (א), או בוורוס צהבון האמיר בנוכחות לווין בטא (ב). התמונות צולמו 28 יום לאחר ההדבקה.

בקשנו לבדוק האם צמחי הזן דיאגרמה, הזן המסחרי עליו נתגלה הלווין בפעם הראשונה בארץ, אכן עמידים לוורוס ומה השפעת הלווין על תסמיני המחלה. כפי שניתן לראות באיור 9, 28 יום לאחר ההדבקה, לא נראו תסמיני מחלה בצמחים שהודבקו רק בוורוס צהבון האמיר, והם אכן עמידים לוורוס. לעומת זאת, הצמחים אשר הודבקו גם בוורוס וגם בלווין הראו תסמינים חריפים של מחלת צהבון האמיר. שימוש בסמנים ללוקוס העמידות *Ty-1* הראה כי צמחי דיאגרמה אכן מכילים את הלוקוס הזה במצב הטרוזיגוטי (איור 10). כאשר הדבקנו צמחים עמידים לוורוס צהבון האמיר, הנושאים את האלל העמיד *Ty-3* במצב הומוזיגוטי, התקבלה תוצאה דומה - הצמחים אשר הודבקו רק בוורוס הראו תסמיני מחלה מתונים, בעוד שהצמחים אשר הודבקו הן בוורוס והן בלווין הראו תסמיני מחלה חריפים, המעידים על שבירת העמידות על-ידי הלווין (איור 11).

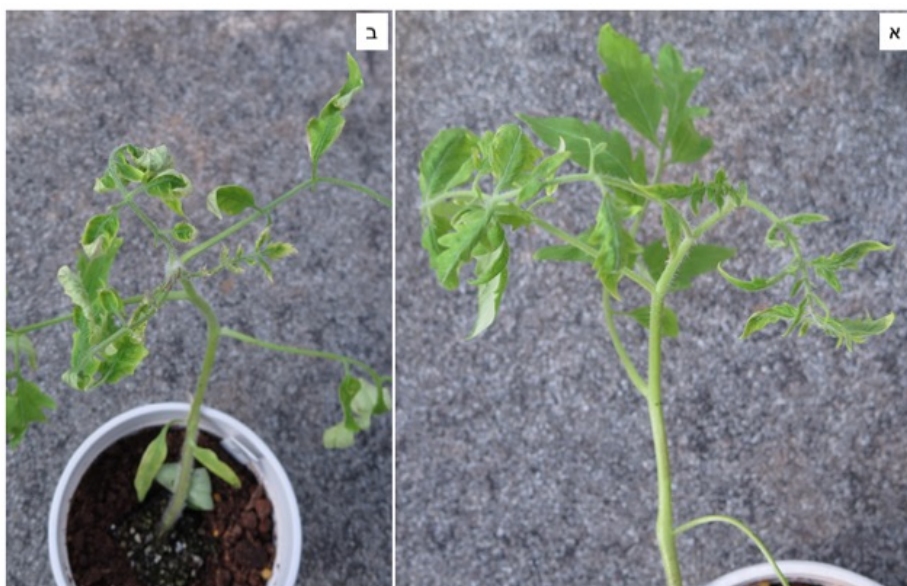
טבלה 7 מראה את השפעת הדבקה בוורוס או בוורוס עם הלווין על גנוטיפים עמידים שונים אשר מכילים לוקוסים שונים לעמידות. השתדלנו לעבוד עם גנוטיפים עמידים שחוברו על אותו הרקע הגנטי, במקרה הנוכחי קו רגיש שנקרא FLA7776, אשר שימש אותנו במחקר אחר. כאשר כל גנוטיפ מכיל רק לוקוס עמיד אחד, ניתן לראות שהלווין בברור שובר את העמידות המושרית על ידי כל הלוקוסים העמידים, החל מ-*Ty-1* וכלה ב-*Ty-5*. לעומת זאת נראה שע"י חיבור לוקוסים עמידים, כמו בקוים TY172, TY199, ו-0788 ניתן להתמודד עם לווין בטא.



איור 9. הדבקת צמחי עגבניה מהזן דיאגרמה בווירוס צהבון האמיר בלבד (א) או בווירוס ביחד עם לוויין בטא (ב).



איור 10. הזן דיאגרמה מכיל את הלוקוס העמיד *Ty-1* במצב הטרוזיגוטי. דנ"א הופק מצמחי עגבניה עמידים המכילים את הלוקוס העמיד *Ty-1* במצב הומוזיגוטי (ערוצים 1-4), מצמחי דיאגרמה (ערוצים 5-8) ומצמחים הרגישים לווירוס (ערוצים 9-11), והופעל סמן מולקולרי המזהה את הלוקוס העמיד *Ty-1*.



איור 11. הדבקת צמחי עגבניה המכילים את הלוקוס העמיד *Ty-3* בווירוס צהבון האמיר בלבד (א) או בווירוס יחד עם לוויין בטא (ב).

טבלה 7. הדבקת צמחי עגבניה בעלי לוקוסים עמידים שונים לוורוס צהבון האמיר בוורוס בנוכחות לוויין בטא.

Line	Type	Average DSI*					
		15 DAI**		22 DAI**		28 DAI**	
		TY	+B	TY	+B	TY	+B
422	Susceptible-FLA 7776	1.9	3.0	3.5	4.0	4.0	4.0
TY172	<i>ty-5/ty-5 Ty-1^V/Ty-1^V</i>	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	1.1
TY199	<i>ty-5/ty-5 Ty-1^V/Ty-1^V</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
H-24	<i>Ty-2/Ty-2</i>	2.0	2.5	1.8	3.3	1.6	4.0
Diagramma	TYLCV resistant hybrid	0.0	1.0	0.2	2.5	0.5	3.1
0853	<i>Ty-1</i> in FLA7781 background	0.0	0.9	0.0	1.9	0.0	2.8
0788	<i>Ty-3/Ty-3 Ty-4/Ty-4 ty-5/ty-5</i> in FLA 7776	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0	1.1
0789	<i>ty-5/ty-5</i> in FLA 7776	1.0	1.7	0.7	2.7	0.0	2.4
0790	<i>Ty-3/Ty-3</i> in FLA 7776	0.8	2.6	0.6	2.4	0.1	3.1
0791	<i>Ty-4/Ty-4</i> in FLA 7776	1.9	2.6	3.4	3.5	0.03	4.0
0792	<i>Ty-3/Ty-3 ty-5/ty-5</i> in FLA 7776	0.0	0.1	0.0	1.6	0.0	2.8
0793	<i>Ty-4/Ty-4 ty-5/ty-5</i> in FLA 7776	0.3	1.9	0.0	1.9	0.0	2.3
0794	<i>Ty-3/Ty-3 Ty-4/Ty-4</i> in FLA 7776	0.1	1.8	0.3	3.0	0.0	2.8

*ממוצע חומרת סימפטומים, מכל קו הודבקו 8 צמחים, **ימים אחרי הדבקה.

דין

לאור הופעת לוויין בטא בארץ, בקשנו לברר את השאלות הבאות:

1. האם הלוויין אכן גורם להחמרת תסמיני המחלה המושרים על ידי הוורוס – מהתוצאות של מחקר זה עולה בברור כי אכן נוכחות הלוויין גורמת להחמרה ברורה בתסמיני המחלה המושרים על ידי וירוס צהבון האמיר של העגבניה. אלו הן חדשות לא טובות למגדלי העגבניה בארץ, בהתחשב בעובדה שהלוויין התפשט בהצלחה בכל חלקי הארץ.

2. האם הלוויין גורם לשבירת עמידות גנטית בצמחי העגבניה המסחריים, ואם כן איזו עמידות – לאור התוצאות ניתן לומר בברור כי הלוויין אכן גרם לשבירת העמידות הגנטית בזני עגבניה מסחריים. כמעט כל הזנים המסחריים שבדקנו הכילו את הלוקוס העמיד *TY-1/TY-3*.

3. מה השפעת הלוויין על לוקוסים שונים לעמידות לוורוס צהבון האמיר - נראה שהלוויין גורם לשבירת רוב הלוקוסים העמידים לוורוס, אולם לא את כולם. יתרה מזו, ניתן לראות כי חיבורים של עמידויות שונות מצליחים להתמודד עם הלוויין. התוצאות הטובות ביותר התקבלו מחיבורים המכילים את *ty-5* – החיבור *ty-5* עם *TY-1^V* בקו העמיד 172 נתן את התוצאה המצוינת של חומרת סימפטומים של 1.2, בעוד שאותו חיבור ברקע קצת שונה – הקו 199 היה עמיד לחלוטין גם בנוכחות הלוויין עם חומרת סימפטומים של אפס. אלה תוצאות מצוינות אולם יש לזכור שהגנוטיפים העמידים *TY172* ו-*TY199* הם בעלי רקע גנטי שונה משאר הגנוטיפים העמידים, ולרקע הגנטי יש השפעה ברורה על רמת העמידות של הגנוטיפ הניבדק. החיבור *TY-3+TY-4+ty-5* (הקו 0788) אף הוא נתן תוצאה טובה של חומרת סימפטומים 1.5. גם החיבור של *TY-4+ty-5* הראה תוצאות טובות באופן יחסי בהתמודדות עם הלוויין, עם חומרת סימפטומים של 2.3, אולם פחות טובה משני החיבורים הראשונים.

לאחרונה התפרסם זיהוי של אתר עמידות חדש לוורוס צהבון האמיר, *Ty-6*, אשר מופה לכרומוזום 10. יתרה מזו, בעבודה זו הראו יעילות גבוהה של *Ty-6* לאחר חיבורו ל-*ty-5* (Gill 2019). מן הראוי לבדוק את השפעת הלוויין על אתר עמידות חדש זה.

3. סריקה אחר מקורות עמידות לנגיפי צמחים תוך התמקדות בוורוסי בגומו.

לאחר המפגש של קבוצת המחקר אשר התקיים במאי 2016 סוכם כי הקבוצה הישראלית תתמקד בנגיפים התוקפים צמחי עגבניה ומועברים על ידי כנימת עש הטבק, היינו קבוצת הוורוסים האחראית למחלת צהבון האמיר בעגבניה. במסגרת המחקר בדקנו את ההשפעה של הלוקוס הנוסף לעמידות אשר זיהינו ונקרא $Ty-1^V$. במסגרת מחקר זה בצענו ניסוי יבול לבדוק את השפעת הלוקוס הנ"ל על העמידות, אם בכלל.

שיטות וחומרים

חומר גנטי: במהלך העבודה השתמשנו בקווים הבאים: TY172 - קו עמיד לוורוס צהבון האמיר; R13 ו-M82 - קווים רגישים לוורוס; ארבעה קווים קרובים לאיזוגניות מדור BC_2F_4 , אשר פותחו ע"י הכלאות חוזרות בין הקו העמיד TY172 לקו רגיש M82, כהורה מחזיר: PRT-855, הנושא את הלוקוס $Ty-1^V$ במצב הומוזיגוטי ($Ty-1^V/Ty-1^V$); PRT-856, הנושא את הלוקוס $ty-5$ במצב הומוזיגוטי ($ty-5/ty-5$); PRT-854, הנושא את שני הלוקוסים $Ty-1^V$ ו- $ty-5$ במצב הומוזיגוטי ($Ty-1^V/Ty-1^V$ $ty-5/ty-5$); ו-PRT-857, אשר נושא אף לא אחד משני הגנים ($+/+$ $+/+$). הסלקציה ללוקוסים $Ty-1^V$ ו- $ty-5$ הייתה באמצעות סמני דנ"א המבוססים על רצפי הגנים $RDRP$, ו- $Pelo$, בהתאמה.

הדבקת הצמחים בוורוס צהבון האמיר: צמחי עגבניה הודבקו בוורוס כמתואר בסעיף 2. בסיום ההדבקה הצמחים הוחזקו בחממה במשך שבועיים נוספים, ואז הועתקו לדליים של 15 ליטר וגודלו בבית רשת המכוסה ברשת 50 מ"מ.

הערכת חומרת הסימפטומים: הערכת חומרת הסימפטומים נעשתה כמתואר בסעיף 2.

השפעת הלוקוס $Ty-1^V$: על מנת לאמוד את השפעת הלוקוס $Ty-1^V$ ויחסי הגומלין שלו עם הלוקוס $ty-5$ על עמידות לוורוס צהבון האמיר, השתמשנו בארבעה קווים, קרובים לאיזוגניות, מדור BC_2F_4 , הנבדלים בלוקוסים $ty-5$ ו- $Ty-1^V$. ארבעת הקווים נזרעו, הודבקו, נשתלו ונבחנו פעמיים בבית רשת בבית דגן, פעם באביב המוקדם ופעם באביב המאוחר. הניסוי נערך בתבנית ניסוי של חמישה בלוקים באקראי: חמישה צמחים מודבקים וחמישה צמחים לא-מודבקים לכל גנוטיפ בכל בלוק. במהלך הגידול אופיינו הצמחים לחומרת הסימפטומים, כמות הוורוס בצמח, יבול לצמח, משקל צמח, מסה כללית של הצמח ומדד קציר.

כימות דנ"א וויראלי: כימות הדנ"א הויראלי התבצע באמצעות PCR כמותי (Quantitative PCR) לפי (Mason et al., 2008). לצורך כימות הדנ"א הויראלי נעשה שימוש בתחלים TYRT2R ו-TYRT2F (טבלה 9). דנ"א שהופק מצמחים שלא עברו הדבקה שימש כביקורת שלילית. לצורך יצירת עקומת כיוול תוצר ה-PCR שובט לתוך פלסמיד pGEM-T Easy ועבר ולידציה ע"י ריצוף. הפלסמידים הופקו ממושבות נבחרות ועברו לינאריזציה ע"י האנזים $PstI$. פרגמנטים שנוקו מג'ל נבדקו באמצעות NanoDrop לצורך קביעת ריכוז ושימשו לשם בניית עקומת כיוול. סדרת המיהולים נעשתה עפ"י מספר עותקים בהתאם לשיטה שפותחה ע"י Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

בניית קונסטרוקט לטרנספורמציה: על מנת ליצור ווקטור השתקה של הגן $RDRP$ נעשה בתחילה שימוש בפלסמיד pHANNIBAL, לתוכו שובטו שני מקטעים באורך 487bp שהוגברו מהגן. מקטע אחד שובט באוריינטציית sense והמקטע השני שובט באוריינטציית anti-sense. על מנת ליצור ווקטור בינארי,

פלסמיד ה- pHANNIBAL שנוצר נחתך באנזים רסטרקציה *NotI* והמקטע הנמצא בין הפרומוטור לטרמינטור שובט לתוך ווקטור pBin.

טרנספורמציה: טרנספורמציה בוצעה על פיסות פסיגים שנלקחו מצמחי TY172 באמצעות *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 עפ"י Azari et al., 2010.

זיהוי צמחים טרנסגניים: זיהוי הצמחים הטרנסגנים התבצע באמצעות ריאקצית PCR על דנ"א שהופק מצמחים בודדים תוך שימוש בתחלים:

35SF=5'- CAAGACCCTTCCTCTATATAAG-3'

Intron-260-R=5-CTAGTATATCATCTTACATGTTTCG-3'

כאשר התחל הקדמי משלים לפרומוטור 35S והתחל האחורי משלים לגן.

צמחים טרנסגניים מושתקים לגן *Ty-1^V*: צמחי T_0 אשר הכילו את הטרנסגן גודלו בחממה ונאספו זרעי T_1 . אוכלוסיות טרנסגניות אלו נזרעו, הודבקו בוורוס ונערכה בדיקה למדדי חומרת הסימפטומים שלהם. צמחי T_1 אשר נמצאו טרנסגנים גודלו ונאספו זרעי T_2 . בנוסף למדד חומרת הסימפטומים נבדקה רמת ההשתקה של הצמחים הטרנסגנים לעומת הקו הלא טרנסגני TY172 באמצעות PCR כמותי.

בדיקת רמת התעתיקים של הגנים שנבחנו בניסוי: רמת התעתיקים של הגן *RDRP* נבדקה באמצעות PCR כמותי. התחלים בהם השתמשנו מופיעים בטבלה מספר 9. הריאקציה התבצעה בנפח של $12 \mu\text{L}$ והכילה: $3 \mu\text{L}$ של דנ"א, $6 \mu\text{L}$ של SYBER (Kapa Biosystems, Boston, USA), ו- $0.125 \mu\text{M}$ של כל אחד מהתחלים. הריאקציה נעשתה במכשיר Corbett Rotor-Gene 600 כאשר שלבי הריאקציה היו כדלקמן: שלב 1: 95°C במשך 10 דקות; שלב 2: 95°C במשך 15 שניות; שלב 3: 58°C במשך 30 שניות שלב 4: 72°C במשך 15 שניות; שלב 5: חזרה על שלבים 2 עד 4, 40 פעמים.

טבלה מספר 9. התחלים אשר השתמשנו בהם ל-PCR כמותי.

Gene	Primer	Primer sequence (5'-3')	Product size (nt)
RDRP	RDRRTF	GGCAAAATATGCAGCCAG GCTTTCC	220
	RDRRTR	TCAGTATGTATACGAGGTTCGCCGT	
Pelota	PELOTARTF	GTCTCCGGAGAACAATTGAATC	104
	PELOTARTR	GAACGATCATTTTCATCCATCAC	
18S	18SF	GCGACGCATCATTCAAATTTC	101
	18SR	TCCGGAATCGAACCCTAATTC	
TY-C1	TYRT2F	GCT GAT CTG CCA TCG ATT TG	147
	TYRT2R	GGT TCT TCG ACC TGG TAT C	

הגן הריבוזומלי 18S שימש כגן ביקורת/האנליזה של התוצאות נעשתה בעזרת התוכנה Rotor-Gene 6000 גרסת 1.7.28 (Qiagen Corbett) Life Science, Duesseldorf, Germany. רמת התעתיקים היחסית של הגן הנבחן, חושבה לפי הנוסחה: $(CT_X - CT_{18S}) \cdot 2$, כאשר CT מייצג את המחזור בו רמת הפלואורסנציה חוצה את ערך הסף (בד"כ 0.05).

תוצאות

חומרת סימפטומים: הערכת חומרת הסימפטומים בצמחים שהודבקו בוורוס צהבון האמיר נעשתה בשני מועדים: 30 יום ו- 44 יום לאחר ההדבקה. התוצאות המוצגות בטבלה 10 מראות כי קיימים הבדלים מובהקים בחומרת הסימפטומים בין הקווים שנבחנו בשני המועדים. הקו PRT-854, הנושא את שני הלוקוסים לעמידות במצב הומוזיגוטי, הציג את רמת הסימפטומים הממוצעת הנמוכה ביותר ואילו הקו PRT-857, אשר נושא אף לא אחד מלוקוסים אלה, הראה את רמת הסימפטומים הגבוהה ביותר. שני הקווים האחרים PRT-855 ו-PRT-856 אשר נושאים, כל אחד, לוקוס בודד במצב הומוזיגוטי הציגו ערכי ביניים של המחלה.

טבלה 10. השוואת חומרת הסימפטומים בין קווים קרובים לאיזוגניות הנבדלים בלוקוסים $Ty-I^V$ ו- $ty-5$ בממוצע של שתי העונות לאחר תיקון לאפקט השנה (אותיות שונות בכתב עילי מציינות הבדלים מובהקים בין הממוצעים ברמת מובהקות המופיעה בתחתית הטבלה).

ימים לאחר ההדבקה				
קו	גנוטיפ	30	44	ממוצע
PRT-857	+/+ +/+	$3.5^A \pm 0.1$	$3.7^A \pm 0.1$	$3.6^A \pm 0.1$
PRT-855	$Ty-I^V/Ty-I^V$ +/+	$2.0^B \pm 0.0$	$3.0^B \pm 0.1$	$2.5^B \pm 0.0$
PRT-856	+/+ $ty-5/ty-5$	$1.4^C \pm 0.1$	$2.2^C \pm 0.1$	$1.8^C \pm 0.1$
PRT-854	$Ty-I^V/Ty-I^V$ $ty-5/ty-5$	$0.2^D \pm 0.1$	$0.7^D \pm 0.1$	$0.5^D \pm 0.1$
$P(F)$		2.8×10^{-80}	2.6×10^{-59}	6.0×10^{-80}

כמות הווירוס: כימות הדנ"א הוויראלי היחסי בצמחים התבצע בשלושה מועדים באביב המאוחר ובשני מועדים באביב המוקדם. מניתוח הנתונים ניתן לראות כי הקו PRT-854, הנושא את שני הלוקוסים לעמידות, התאפיין בכמויות הווירוס הנמוכות ביותר בהשוואה לשאר הקווים בשתי העונות ובכל המועדים בכל עונה (טבלה 11). רמת הווירוס בקו זה נבדלה תמיד באורח מובהק מקו הביקורת הרגיש PRT-857. שני הקווים האחרים PRT-855 ו-PRT-856 אשר נושאים, כל אחד, לוקוס בודד במצב הומוזיגוטי הציגו תמיד ערכי ביניים של וירוס. מהממוצע הגלובאלי של שתי העונות, לאחר תיקון לאפקט העונה, ניתן ללמוד כי שילוב של כ"א מהלוקוסים בקו רגיש מוריד את הכמות היחסית של הווירוס במידה דומה בהשוואה לקו הרגיש -41 50%, ואילו שילוב של שניהם מוריד את כמות הווירוס בקרוב ל- 90% (טבלה 11).

טבלה 11. השוואת כמות הווירוס היחסית בין קווים קרובים לאיזוגניות הנבדלים בלוקוסים $Ty-I^V$ ו- $ty-5$ בממוצע של שתי העונות לאחר תיקון לאפקט השנה (בכל מועד נלקחו חמש דוגמאות לכל גנוטיפ, כל דוגמא מורכבת משלושה צמחים; אותיות שונות בכתב עילי מציינות הבדלים מובהקים בין הממוצעים ברמת מובהקות המופיעה בתחתית הטבלה).

ימים לאחר ההדבקה				
קו	גנוטיפ	19	30	*44
PRT-857	+/+ +/+	$156^A \pm 0.041$	$98^A \pm 18$	$38^A \pm 11$
PRT-855	$Ty-I^V/Ty-I^V$ +/+	$81^A \pm 0.024$	$41^A \pm 8$	$24^{AB} \pm 5$
PRT-856	+/+ $ty-5/ty-5$	$77^A \pm 0.024$	$63^A \pm 32$	$14^B \pm 2$
PRT-854	$Ty-I^V/Ty-I^V$ $ty-5/ty-5$	$16^B \pm 6$	$13^B \pm 4$	$10^B \pm 2$
$P(F)$		3.9×10^{-8}	5.6×10^{-5}	6.7×10^{-3}
				9.4×10^{-12}

* התוצאות בדיגום זה מבוססות על עונת האביב המאוחר בלבד

יבול לצמח: היבול לצמח נבדק לאורך שתי עונות הגידול, כאשר עגבניות שהבשילו נקטפו ונשקלו לאורך כל עונה. מניתוח התוצאות, המוצגות בטבלה 12, ניתן לראות כי בצמחים לא מודבקים קו הביקורת PRT-857 היה בעל היבול הגבוה ביותר בשתי השנים. יבול קו זה נבדל בצורה מובהקת מיבול הקו PRT-854, אשר נושא את שני הלוקוסים לעמידות במצב הומוזיגוטי. אולם, בצמחים מודבקים המגמה השתנתה: הקו PRT-854 הניב יבול גבוה יותר מקו הביקורת PRT-857. הבדל זה היה מובהק סטטיסטית בממוצע שתי עונות הגידול. ממוצע היבול של הקו PRT-855, הנושא את הלוקוס $Ty-1^V$ לא נבדל סטטיסטית מממוצע היבול של הקו PRT-856, הנושא את הלוקוס $ty-5$, בשתי שנות הגידול הן ללא הדבקה והן לאחר הדבקה בוורוס. הקו PRT-854, הנושא שני לוקוסים לעמידות, לא הצטיין ביבולו כאשר לא הודבק בוורוס בהשוואה לשני הקווים האחרים, הנושאים לוקוס בודד לעמידות.

גולת הכותרת של ניסוי זה הוא בשינוי ביבול שנרשם בקווים השונים בעקבות ההדבקה. בעוד שבקו הביקורת ובקווים הנושאים לוקוס אחד לעמידות ההדבקה בנגיף גרמה לירידה מובהקת ביבול, השינוי ביבול של הקו PRT-854 המכיל את שני הלוקוסים העמידים בעקבות ההדבקה היה נמוך ולא מובהק סטטיסטית.

טבלה מס 12. השוואת יבול לצמח בק"ג בין קווים קרובים לאיזוגניות הנבדלים בלוקוסים $Ty-1^V$ ו- $ty-5$ בממוצע של שתי העונות לאחר תיקון לאפקט העונה (אותיות שונות בכתב עילי מציינות הבדלים מובהקים בין הממוצעים ברמת מובהקות המופיעה בתחתית הטבלה; רמת המובהקות לשינוי ביבול מצוינת בכתב עילי לכל גנוטיפ בנפרד והיא ע"פ: NS - לא מובהק; * $0.01 < P(F) < 0.05$; ** $0.01 < P(F) < 0.01$; *** $P(F) < 0.001$).

קו	גנוטיפ	לא מודבק	מודבק	שינוי ביבול (%)
PRT-854	$ty-5/ty-5 \quad Ty-1^V/Ty-1^V$	$1.3^C \pm 0.10$	$1.2^A \pm 0.11$	-4 ^{NS}
PRT-855	$+/+ \quad Ty-1^V/Ty-1^V$	$1.6^B \pm 0.10$	$1.1^A \pm 0.08$	-31 ^{***}
PRT-856	$ty-5/ty-5 \quad +/+$	$1.5^{BC} \pm 0.12$	$1.1^{AB} \pm 0.11$	-26 ^{***}
PRT-857	$+/+ \quad +/+$	$1.9^A \pm 0.12$	$0.9^B \pm 0.10$	-54 ^{***}
	P(F)	5.1×10^{-7}	2.8×10^{-3}	

השוואת רמת תעתיקים של הגן RDRP: על מנת לבדוק את ההשערה כי העמידות לוורוס מבוקרת תיעתוקית באמצעות השינויים שנמצאו באזור הפרומוטור, בחנו את רמת התעתיקים של הגן RDRP בקווים קרובים לאיזוגניות, המכילים את האלל מהקו העמיד TY172 ברקע M82, לעומת קווים המכילים את האלל מהקו הרגיש M82. גידלנו ארבעה קווים קרובים לאיזוגניות כמתואר בטבלה 13 ובדקנו את רמת הביטוי של הגנים השונים על ידי PCR כמותי (qPCR), בדגימות רנ"א שנלקחו מצמחים מודבקים ולא מודבקים בשלושה מועדים שונים לאחר ההדבקה בוורוס. כיוון שלא נמצאו הבדלים מובהקים בין הצמחים מודבקים לבין צמחים לא מודבקים, בצענו את הניתוח על כלל הדגימות בניסוי.

השתקת הגן RDRP: על מנת לבדוק האם אכן הגן RDRP היא הגורם לעמידות בקו העמיד TY172 (בנוסף כמובן ל- $ty-5$), פיתחנו קווים טרנסגניים בהם הגן RDRP הושתק. התקבלו 8 קווים טרנסגניים בלתי תלויים אשר נבדקו ב-PCR ונמצאו טרנסגניים. הקווים הטרנסגניים נזרעו, הודבקו בוורוס ו-30 יום לאחר הדבקה נלקחו המדדים של חומרת הסימפטומים (DSI), כמות וורוס ורמת התעתיקים היחסית. מניתוח הנתונים המוצגים בטבלה 14, ניתן לראות כי כל הקווים הטרנסגניים הציגו ירידה ברמת התעתיקים היחסית לעומת קו הביקורת הלא-טרנסגני. אולם רק בשני קווים, TYV-5 ו-TYV-6, הירידה הזו הייתה מובהקת סטטיסטית בהשוואה לביקורת הלא-טרנסגנית. מדד חומרת הסימפטומים היה מובהק בשישה מהקווים

הטרנסגניים (TYV1-TYV6) ובשני הקווים, TYV-5 ו- TYV-6, מדד חומרת הסימפטומים היה הגבוה ביותר לעומת קו הביקורת. חומרת הסימפטומים המצופה מצמחים בהם הגן הושתק היא באזור DSI~2, שכן בצמחים המושתקים הגן הראשי לעמידות, *ty-5*, עדיין פעיל. מדד כמות הווירוס נמצא מובהק רק בשלושה קווים טרנסגניים TYV-1, TYV-5 ו- TYV-6 לעומת הקו TY172. כאשר בוחנים את כל המדדים שני קווים TYV-5 ו- TYV-6 נמצאו מובהקים בכל הפרמטרים לעומת קו הביקורת הלא-טרנסגני.

טבלה מספר 13. השוואת רמת התעתיקים של הגן *RDRP* בין קווים קרובים לאיזוגניות הנבדלים בלוקוסים *Ty-1^V* ו- *ty-5* (בכל מועד נלקחו חמש דוגמאות לכל גנוטיפ, כל דוגמא מורכבת משלושה צמחים; אותיות שונות בכתב עילי מציינות הבדלים מובהקים בין הממוצעים ברמת מובהקות המופיעה בתחתית הטבלה).

ימים לאחר הדבקה				
קו	גנוטיפ	0	15	30
PRT-854	<i>Ty-1^V/Ty-1^V ty-5/ty-5</i>	374 ^A ±132	2708 ^A ±409	17078 ^A ±2822
PRT-855	<i>Ty-1^V/Ty-1^V +/+</i>	85 ^{AB} ±24	1343 ^B ±353	17843 ^A ±1604
PRT-856	<i>+/+ ty-5/ty-5</i>	48 ^B ±11	656 ^{BC} ±113	11439 ^{AB} ±1357
PRT-857	<i>+/+ +/+</i>	76 ^B ±22	444 ^C ±75	9453 ^B ±1308
	<i>P(F)</i>	6.6 X 10 ⁻³	2 X 10 ⁻⁶	9.2 X 10 ⁻³

דין

השוואת רמת העמידות בקווים הקרובים לאיזוגניות: מרכיבי יבול ההורטיקולרים כגון יבול פרי ומשקל צמח הינם תכונות אשר עשויות להיות מושפעות בצורה דרמטית מרקעים גנטיים שונים. ולכן ההנחה כי שימוש באוכלוסיות כמעט איזוגניות בעלי רקע גנטי דומה יכול לאמוד את מרכיבי היבול בצורה טובה יותר מאשר בקווים לא איזוגניים. אולם למרות השימוש בקווים כמעט איזוגניים עדיין יתכן ויש שמירה על גנים מההכלאה הראשונית של הקו העמיד אשר נמצאים בסמיכות ללוקוסים לעמידות, ויתכן ולגנים אלו יש אפקט על מרכיבי היבול. כדי לנטרל ככול האפשר אפקטים של הקווים השונים, בחנו את השינוי בין צמחים מודבקים לצמחים לא מודבקים בתוך כל קו. פרמטר זה בוחן את השינוי במרכיבי היבול ונותן אומדן אובייקטיבי טוב יותר. בצורה כזו אנו מנטרלים ככול האפשר את השפעת הקווים השונים על מרכיבי היבול. כאשר בוחנים את התוצאות ניתן לראות כי שני הלוקוסים שנבחנו *Ty-1^V* ו- *ty-5* תורמים רבות למידת השינוי במרכיבי היבול בין צמחים שאינם מודבקים לצמחים מודבקים בקווים שנבדקו. כל לוקוס לבדו יכול להפחית את אובדן מרכיבי היבול וכאשר משלבים את שני הגנים נצפית ירידה מעטה בכל אחד ממרכיבי היבול שנבחנו לעומת הקו שלא הכיל לוקוסים אלו. היינו הקו אשר הכיל את שני הלוקוסים היה בעל העמידות הטובה ביותר לוויורוס צהוב האמיר.

עם זאת חשוב לציין כי ההדבקה המכוונת בניסויים חמורה יותר מההדבקה שמתרחשת בשטח פתוח או בבתי רשת. מועד ההדבקה של הווירוס בתנאי גידול חקלאי מתרחש על צמחים שנשתלים לאחר כ- 30 יום לאחר זריעה בגודל בוגר (עלה אמיתי חמישי) ולכן ההשפעות יהיו פחות חמורות מאשר הדבקה שמתבצעת על צמחים קטנים (עלה אמיתי ראשון) כפי שמתרחש בביצוע הניסויים (Levy and Lapidot, 2008). כמו כן, כמות הכנימות בהדבקה המכוונת עצומה וגורמת להדבקה קשה יותר מההדבקה שמתרחשת בשדה,

ולכן השינויים שמתרחשים בפועל בין צמחים מודבקים לצמחים לא מודבקים קטנים יותר וגן בודד יכול להקנות עמידות טובה לוורוס ללא ירידה דרמטית במרכיבי היבול.

טבלה 14. אפקט ההשתקה של הגן *RDRP* על חומרת הסימפטומים (DSI) ורמת התעתיקים היחסית. (אותיות שונות בכתב עילי מציינות הבדלים מובהקים בין הממוצעים ברמת מובהקות המופיעה בתחתית הטבלה לכל גנוטיפ בנפרד).

קו	טרנסגני (T) לא טרנסגני (NT)	מדד חומרת הסימפטומים	כמות וורוס יחסית	רמת תעתיקים יחסית של הגן <i>RDRP</i>
TYV-1	T	$0.8^A \pm 0.1$	$238.1^A \pm 108.7$	$40.7^A \pm 6.6$
	NT	$0.1^B \pm 0.0$	$80.4^A \pm 44.5$	$95.0^A \pm 46.4$
		2×10^{-8}	1.8×10^{-1}	4.0×10^{-1}
<i>P(F)</i>				
TYV-2	T	$0.6^A \pm 0.1$	$325.8^A \pm 60.5$	$21.5^A \pm 3.2$
	NT	$0.1^B \pm 0.0$	$80.4^B \pm 44.5$	$95.0^A \pm 46.4$
		6.0×10^{-6}	8.8×10^{-3}	4.6×10^{-1}
<i>P(F)</i>				
TYV-3	T	$0.3^A \pm 0.0$	$59.2^A \pm 10.0$	$20.8^A \pm 2.8$
	NT	$0.1^B \pm 0.0$	$80.4^A \pm 44.5$	$95.0^A \pm 46.4$
		8.0×10^{-3}	6.5×10^{-1}	4.8×10^{-1}
<i>P(F)</i>				
TYV-4	T	$0.4^A \pm 0.1$	$38.9^A \pm 20.9$	$22.3^A \pm 3.1$
	NT	$0.1^B \pm 0.0$	$80.4^A \pm 44.5$	$95.0^A \pm 46.4$
		1.0×10^{-3}	5.4×10^{-1}	5.3×10^{-1}
<i>P(F)</i>				
TYV-5	T	$1.9^A \pm 0.1$	$167.8^A \pm 30.1$	$5.5^B \pm 0.8$
	NT	$0.1^B \pm 0.0$	$59.6^B \pm 30.1$	$95.0^A \pm 46.4$
		4.0×10^{-18}	3.5×10^{-2}	2.0×10^{-4}
<i>P(F)</i>				
TYV-6	T	$1.6^A \pm 0.1$	$179.4^A \pm 30.8$	$7.1^B \pm 3.9$
	NT	$0.1^B \pm 0.0$	$59.6^B \pm 30.1$	$95.0^A \pm 46.4$
		3.0×10^{-16}	2.1×10^{-2}	2.0×10^{-4}
<i>P(F)</i>				
TYV-7	T	$0.1^A \pm 0.1$	$43.5^A \pm 9.1$	$23.5^A \pm 8.8$
	NT	$0.1^A \pm 0.0$	$59.6^A \pm 30.1$	$95.0^A \pm 46.4$
		9.1×10^{-1}	8.1×10^{-1}	9.2×10^{-2}
<i>P(F)</i>				
TYV-8	T	$0.1^A \pm 0.1$	$43.6^A \pm 5.0$	$23.2^A \pm 9.2$
	NT	$0.1^A \pm 0.0$	$57.7^A \pm 12.4$	$32.4^A \pm 7.1$
		8.6×10^{-1}	5.2×10^{-1}	2.5×10^{-1}
<i>P(F)</i>				

הגורם המקובל לאפיון עמידות באוכלוסיות צמחים בכלל ובניסוי זה בפרט, הינו אומדן רמת חומרת הסימפטומים, וזאת למרות שאינו נמדד באופן אובייקטיבי לחלוטין. בהתחשב בבעייתיות העשויה לנבוע מחוסר האובייקטיביות של מדד זה, אומדן רמת חומרת הסימפטומים של הצמחים נעשה בד"כ במספר קריאות במועדים שונים ובנוכחות של צמחי ביקורת. ואכן, לאחר ההדבקה בוורוס האוכלוסיות הכמעט איזוגניות הציגו מופע סימפטומים ברור. קו שהכיל שילוב של שני הלוקוסים לעמידות $Ty-1^V$ ו- $ty-5$, הציג רמת סימפטומים ממוצעת נמוכה (~ 0.5). שני הקווים שהכילו לוקס בודד לעמידות הציגו ערכי ביניים (~ 2), והקו שלא הכיל לוקוסים לעמידות כלל הציג ערכי חומרת סימפטומים גבוהים מאוד (~ 3.5).

איפיון רמת התיעתוק של הגן *RDRP*: הגן המבקר עמידות לוורוס בלוקוסים *Ty-1/Ty-3* זוהה, והוא *RNA-dependent RNA polymerase (RDRP)* (Verlaan et al., 2013). כאשר מיפנו את *TY-1^V* נמצא שהוא בעצם אלל נוסף של העמידות בלוקוסים *Ty-1/Ty-3*. כאשר רצפנו את הגן מצאנו כי רצף הנוקלאוטידים של הקו *TY172* בגן *RDRP* מכיל שמונה שינויים נוקלאוטידיים לעומת המין התרבותי. רצף הגן *RDRP* רוצף בספרות במספר רב של קווים ממיני בר ומינים תרבותיים (Caro, 2015). השוואת רצף חומצות האמינו של קווים אלו עם רצף הגן של הקו העמיד *TY172* מראה כי גם לקווים רגישים לוורוס יש שינויים נוקלאוטידיים אשר מובילים לשינויים בחומצות אמינו, ולא ניתן להסביר את העמידות בשינויים ברצף הגן. לעומת זאת, מצאנו כי קיימים שינויים רבים באזור הפרומוטור של הגן *Ty-1^V* לעומת המקור התרבותי. ממצאים אלו הובילו להשערה כי בקרה תיעתוקית הנובעת מהבדלים באזור הפרומוטור של הגן יכולה להיות הגורם לעמידות. על מנת לבדוק השערה זו, בחנו את רמת התעתיקים של הגן *RDRP* בארבעה קווים קרובים לאיזוגניות, על ידי PCR כמותי (qPCR), בדגימות רנ"א שנלקחו מצמחים מודבקים ולא מודבקים בשלושה מועדים שונים לאחר ההדבקה בוורוס.

ניתן לראות כי נמצאו הבדלים מובהקים ברמת התעתיקים של הגן הנבחן בין קווים השונים בכל המועדים שנבחנו. במועדים הראשון והשני (0 ו- 15 ימים לאחר הדבקה) נמצא הבדל מובהק בין הקו *PRT-854* שמכיל את שילוב שני הגנים לבין שני הקווים שמכילים את האלל הרגיש *PRT-856* ו- *PRT-857*. כמו כן, במועד שלישי (30 ימים לאחר הדבקה) ניתן לראות כי שני הקווים שהכילו את האלל העמיד *PRT-854* ו- *PRT-855* נמצאו גבוהים בצורה מובהקת מהקו הרגיש *PRT-857*. היינו, ניתן להסביר את העמידות לוורוס המושרית על ידי *TY-1^V* על ידי רמת הביטוי השונה של האלל העמיד לעומת האלל הרגיש. מצד שני, להוציא מועד אחד לא נראה שלנוכחות *ty-5* יש השפעה ברורה על ביטוי *TY-1^V*.

השתקת הגן *RDRP*: יש לציין כי כדי לטעון במפורש שאכן הגן *RDRP* הוא אחראי לעמידות לוורוס בלוקוס *TY-1^V* ובעצם מדובר על אלל נוסף של *TY-1/TY-3*, והעמידות של אלל זה היא תוצאה של רמת הביטוי השונה של הגן, יש לבדוק בעזרת צמחים טרנסגניים האם השתקת *TY-1^V* בקו העמיד *TY172* אכן תשפיע על רמת העמידות של הקו. לאור זאת תכננו קונסטרקט להשתקת הגן, פתחנו צמחים טרנסגניים שבהם הגן הושתק, ובחנו את רמת העמידות שלהם לוורוס צהבון האמיר של העגבניה. כל שמונת הקווים המושתקים ללא יוצא מן הכלל הציגו ירידה מסוימת ברמת התעתיקים של הגן *RDRP* לעומת הקו העמיד *TY172*, אך רק שני קווים הציגו ירידה מובהקת: *TYV5* ו- *TYV6*. חומרת הסימפטומים המצופה מצמחים בהם הגן הושתק היא באזור *DSI-2*, שכן בצמחים המושתקים הגן הראשי לעמידות, *ty-5*, עדיין פעיל. מתוך שמונת הקווים הטרנסגניים רק שני קווים *TYV-5* ו- *TYV-6* הציגו את ערכי חומרת סימפטומים המצופים, ואשר נמצאו מובהקים לעומת הקו העמיד *TY172*. הקו *TYV-5* הציג חומרת סימפטומים של 1.9 ± 0.1 והקו *TYV-6* הציג חומרת סימפטומים של 1.6 ± 0.1 (טבלה 14). כמו כן, ניתן לראות כי שני קווים טרנסגניים הנ"ל הציגו עליה מובהקת ברמת כמות הוורוס היחסית לעומת הקו העמיד *TY172*. כל המדדים שנבחנו בניסוי על הצמחים הטרנסגניים נבדקו על אוכלוסיית T_1 . אוכלוסיות אלו אינן מיוצבות לטרנסגן ומתפצלות באוכלוסייה. יש לציין כי צמחים שנמצאו טרנסגניים באוכלוסיות אלה המצב הגנוטיפי שלהם אינו ידוע, הסמן לצמחים אלו הינו סמן דומיננטי ואי אפשר לדעת האם הצמח הומוזיגוט או הטרוזיגוט לטרנסגן

ללא קידום דור נוסף לצמחים ספציפיים ומבחן צאצאים לצמחים אלו. בנוסף, מידת ההשתקה יכולה להשתנות בין קו לקו בשל הבדלים בשינוי מיקום מחדר לגנום וביטוי שונה בין רקמות שונות בשל סיבות אפיגנטיות.

רשימת ספרות מצוטטת

- Abudy, A., Sufrin-Ringwald, T., Dayan-Glick, C., Guenoune-Gelbart, D., Livneh, O., Zaccari, M., Lapidot, M. 2010. *Watermelon Chlorotic Stunt and Squash Leaf Curl* Begomoviruses – New Threats to Cucurbit Crops in the Middle East. *Israel J. of Plant Sciences* 58:33-42.
- Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M, Levin I. 2000). Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor Appl Genet* 119:519-530.
- Anfoka, GH, Abhary M, Nakhla MK. 2005. Molecular identification of species of tomato yellow leaf curl virus complex in Jordan. *J. Plant Pathology* 87:61-66.
- Anfoka, G., Haj Ahmad, F., Altaieb, M., Abadi, M. 2014. Detection of satellite DNA beta in tomato plants with tomato yellow leaf curl disease in Jordan. *Plant Disease* 98:1017.
- Azari, R., Reuveni, M., Evenor, D., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L. and Levin, I. 2010. Overexpression of UV-DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 links plant development and phytonutrient accumulation in high pigment-1 tomato. *J Exp Bot* 61(13): 3627-3637.
- Belabess, Z., Dallot, S., El-Montaser, S., Granier, M., Majde, M., Tahiri, A., Blenzar, A., Urbino, C., Peterschmitt, M. 2015. Monitoring the dynamics of emergence of a non-canonical recombinant of Tomato yellow leafcurl virus and displacement of its parental viruses in tomato. *Virology* 486:291-306.
- Bridson, R.W., Bull, S.E., Mansoor, S., Amin, I., Markham, P.G. 2002. Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA-β: a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Mol. Biotechnol.* 20:315– 318.
- Caro, M., Verlaan, MG., Julián, O., Finkers, R., Wolters, AM., Hutton, SF., Scott, JW., Kormelink, R., Visser, RG., Díez, MJ., Pérez-de-Castro, A., Bai, Y. 2015. Assessing the genetic variation of Ty-1 and Ty-3 alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. 35:132 DOI 10.1007/s11032-015-0329-y
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. 1983. Maize DNA miniprep. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Dombrovsky, A., Glanz, E., Pearlsman, M., Lachman, O., Antignus, Y. 2010. Characterization of Pepper yellow leaf curl virus a tentative new *Polerovirus* species causing a yellowing disease of pepper. *Plant Pathology*, 62: 750–759.
- Dombrovsky, A., Sapkota, R., Lachman, O., Antignus, Y. 2013. *Eggplant mild leaf mottle virus* (EMLMV), a new putative member of the genus *Ipomovirus* that harbors an HC-Pro gene. *Virus Genes*. 44: 329–337.
- Dombrovsky, A., Sapkota, R., Lachman, O., Pearlsman, M., Antignus, Y. 2012. A new aubergine disease caused by a whitefly-borne strain of tomato mild mottle virus (TomMMoV). *Plant Pathology*, 62: 750–759.
- Dombrovsky, A., Glanz, E., Lachman, O., Sela N., Doron-Faigenboim, A., Antignus, Y. 2013. The complete genome sequence of PYLCV and its implications on the understanding of evolution dynamics in the genus *Polerovirus*. *PLoS ONE* 8(7).
- Friedmann, M., Lapidot, M., Cohen, S., Pilowsky, M. 1998. A novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 1004-1007.

- Gill U., Scott JW., Shekasteband R., Ogundiwin, E., Schuit C., David M. Francis DM, Sim S-C., H., Hutton SF. 2019. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle Virus. *Theoretical & Applied Genetics*, <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03298-0>
- Khan AJ, Idris AM, Al-Saady NA, Al-Mahraki MS, Al-Subhi AM, Brown JK. 2008. A divergent isolate of Tomato yellow leaf curl virus from Oman with and associated DNA β satellite: an evolutionary link between Asian and the middle eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes* 36:169-176.
- Lapidot M, Friedmann M. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 140:109-127.
- Lapidot, M., Gelbart, D., Gal-On, A., Sela, N., Anfoka, G., Haj Ahmed, F., Abou-Jawada, F., Sobh, H., Mazaya, H., Aboul-Ata E., El-Attar, A., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Polston, J.E., Duffy, S. 2014. Frequent migration of introduced cucurbit-infecting begomoviruses among Middle Eastern countries. *Virology Journal* 11:181.
- Lapidot M, Karniel U, Gelbart D, Fogel D, Evenor D, Makhbash Z, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Reuveni M, Levin I. 2015. A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor Pelota. *PLOS Genetics*, DOI:10.1371/journal.pgen.1005538.
- Lapidot, M., Legg, J.P., Wintermantel, W.M. Polston, J.E. 2014. Management of Whitefly-transmitted viruses in open-field production systems. In: *Control of Plant Viruses* in the series "Advances in Virus Research" (G. Loebenstein and I. Katis, Eds), Vol. 90, Burlington: Academic Press, pp. 147-206.
- Lapidot, M. Levin, I. 2017. Genetic resistance to viruses in tomato. In Achieving sustainable cultivation of tomatoes (Autar Mattoo and Avtar Handa, Eds.), Burleigh Dodds Science Publishing, pp. 381-400.
- Levy D., Lapidot M. 2008. Effect of Plant Age at Inoculation on Expression of Genetic Resistance to *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. *Archives of Virology* 153:171-179.
- Reingold, V., Lachman, O., Sela, N., Luria, N., Dombrovsky, A. 2016. Watermelon Fruit Rot Disease in Israel is Caused by a Distinct *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) Strain. *Plant Disease* 100:1176-1183.
- Sufrin-Ringwald, T., Lapidot, M. 2011. Characterization of a Synergistic Interaction Between Two Cucurbit-Infecting Begomoviruses: *Squash Leaf Curl Virus* and *Watermelon Chlorotic Stunt Virus*. *Phytopathology* 101:281-289
- Verlaan MG, Hutton S.F, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RG, Scott JW, Edwards JD, Bai Y. 2013. The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics*, e1003399.
- Zhou, X. 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. *Ann. Rev. Phytopathol.* 51:357-381.