

**בחינת תבדידים מתונים של נגיף הטריסטזה לצורכי שימוש להגנה הדדית
בנטיעות "אור" וקליפים בארץ**

The use of mild isolates of citrus tristeza virus for cross protection
on "Or" and other mandarin varieties

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מינהל המחקר החקלאי
מינהל המחקר החקלאי
מינהל המחקר החקלאי

מוניר מוואסי,
לודמילה מסלנין,
סברנה חביב,

Munir Mawassi
Ludmila Meslinin
Sabrina Haviv

Agricultural Research Organization (mawassi@agri.gov.il)
Agricultural Research Organization
Agricultural Research Organization

תקציר

בשנים האחרונות אנחנו עדים להתפרצות מחלה, של וירוסים, הפוגעת בעצים של הזן "אור" בפרדסים בארץ. בדיקות מעבדתיות, הראו שברוב העצים הסימפטומטיים ניתן לגלות את וירוס הטריסטזה של ההדר *Citrus tristeza virus* (CTV), במעבדה שלנו יכולנו לגלות כי בעצים הלא-סימפטומטיים קיים תבדיד של CTV מתון או בלתי אלים שונה מזה הנמצא בעצים המתמוטטים (תבדיד אלים). קבענו את הרצף השלם של שני התבדידים ולראשונה הצלחנו לבנות קלונים אינפקטיביים של שני התבדידים האלים והמתון.

במחקר הזה עסקנו בחקר תופעת ההגנה ההדדית. מטרות המחקר היו: (1) בחינת האינפקטיביות של שני התבדידים האלים והמתון בכנות וזנים של צמחי הדר (2) בחינת השימוש בתבדיד המתון לצורך הגנה הדדית של "אור"; (3) בחינת התפקיד הביולוגי של הגן p33 בתופעת ההגנה ההדדית וחשיבות חומצות האמינו המבדילות בין שני התבדידים בתופעה ע"י מוטגנזה בגן של הקלונים האינפקטיביים.

נעשו ניסויים לבחון השימוש בתבדיד הבלתי אלים ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלים, קרי הגנה הדדית (cross protection). הניסוי שהעמדנו החל בחודש אפריל 2016, וכלל שתילים של הצירופים: "אור"/חושחש, "אור"/טרור, "אור"/מקרופילה, "אור"/812 ו-"אור"/35C. השתילים אולחו בתבדיד הבלתי אלים (protecting isolate) או התבדיד האלים לקראת סוף חודש אפריל 2016 ע"י הרכבות צד. במשך חודש אוקטובר ונובמבר בוצעו בדיקות של PCR ו-ELISA וריצוף מקטעי גנום שאימתו את ההדבקות בתבדיד הווירוס המקורי. בשנה ב של המחקר נעשה אילוח של הצמחים האלו בתבדיד האלים (challenge isolate). נעשו בדיקות PCR וריצוף לאימות ההדבקה ב challenge isolate. מרבית צמחים אשר קיבלו אילוח ראשוני בתבדיד הבלתי אלים ואילוח שני בתבדיד האלים נמצא בהם וירוס עם רצף דומה לרצף התבדיד הבלתי אלים. מכאן ניתן היה להסיק כי התבדיד הבלתי אלים לא אפשר לתבדיד האלים להתרבות הצמח.

נבנו קלונים אינפקטיביים של שני התבדידים האלים והבלתי אלים. באילוח צמחים של אור/חושחש בקלונים אלו, אחוז ההדבקה היה נמוך עד 4%, הצמחים לא הראו תסמיני התמוטטות או תסמיני מחלה.

בנוסף, נבנו קלונים מוטנטיים בגן p33 המעורב כנראה בתופעת ההגנה ההדדית. באילוח צמחים של אור/חושחש במוטנטיים אלו, אחוז ההדבקה היה 2-5%, הצמחים לא הראו תסמיני התמוטטות או תסמיני מחלה.

המחקר המוצע יביא לצמצום ההפצה של המחלה בפרדסים, להקטנת הנזקים הנגרמים מהמחלה ובהתאם לכך לשיפור איכות וכמות היבול של הזן הקליף אור.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. דר' עירן רוזה
2. דר שרה שפיגל
3. דר' ניר כרמי

הצהרת החוקר הראשי:
הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים :לא.



גוף דו"ח

מבוא:

בארץ אנחנו עדים בשנים האחרונות לעלייה דרסטית בנטיעות מגוון גדול של זני קליפים, בעיקר הזן הקליף "אור", המבוקש במידה רבה במדינות אירופה בגלל טעמו המשובח וחיי המדף הארוכים שלו. הטעם המשובח של "אור" נובע כנראה בגלל היותו זן מורכב לרוב על כנת החושש, המצטיינת ככנה מותאמת לתנאי קרקע קשים. מאידך, כנת החושש ידועה להיותה רגישה למחלת הטריסטזה, וזנים המורכבים על כנה זו עלולים להיפגע קשה בגלל המחלה (Bar-Joseph et al., 1979; Bar-Joseph & Dawson, 2008). ובכן, לאחרונה אנחנו עדים להתפרצות המחלה בקליפים שונים לרבות בזן "אור". בהשוואה לעצים בריאים, העצים הנגועים נראים חלשים וננסיים, עם עלים בדרך כלל כלורוטיים. בגלל היותם בעלי נוף קטן, העצים הנגועים מניבים מוקדם. בשלבים הראשוניים, התסמינים נראים רק בחלק מהענפים אך בשלבים מתקדמים, התסמינים נראים בכל העץ. לרוב, העצים הנגועים בשלב מתקדם מתמוטטים.

מבדיקות מעבדתיות אשר נעשו במעבדתנו, נמצא כי עצים סימפטומטיים היו מאוכלסים בוורוס הטריסטזה של ההדר *Citrus tristeza virus* (CTV). מנגד, העצים אשר נראים בריאים היו שני טיפוסים: עצים "בריאים" שלא התגלה בהם וירוס ה-CTV ועצים "בריאים" שכן היו נגועים ומאוכלסים בתבדיד מתון של וירוס ה-CTV. במסגרת מחקר אחר המסתיים בעוד שנה אנחנו סרקנו תבדידים שונים של נגיף הטריסטזה והעמדנו ניסויי שדה לבחינת השימוש בתבדידים בלתי אלימים לצורך הגנה הדדית וחסיון עצי "אור" בפני תבדידים אלימים. במסגרת אותו המחקר המבוצע במעבדתנו הצלחנו לקבוע את הרצף המלא הן של גנום תבדיד אלים הנמצא בעצים סימפטומטיים והן של תבדיד מתון או בלתי אלים הנמצא בעצים נגועים אך לא סימפטומטיים.

וירוס הטריסטזה של ההדר (CTV). הוא וירוס המוכר מזה שנים רבות בפרדסנות בעולם כולל בארץ (Bar-Joseph & Dawson, 2008, Moreno et al., 2008). וירוס ה-CTV מעורב בכמה סוגי מחלות הדורים הגורמות לנזקים כלכליים קשים, בעקבות פגיעתם הקשה ברמת היבולים ובאיכות הפרות של זני הדר רגישים, ובעיקר בגלל הניוון המהיר של עצי הדר המורכבים על כנת החושש ועל כנת המקרופילה (Bar-Joseph et al., 1979; Bransky et al., 2002). הנגיף, המועבר בין עצים ע"י כנימות עלה, שייך למשפחת ה-*Closteroviridae* ונחשב לבעל הגנום הגדול ביותר מבין הוורוסים הצמחיים המוכרים (Bar-Joseph et al., 1979, 1989; Dolja et al., 2006).

במעבדה שלנו מצאנו כי התבדיד האלים היה שונה במעט מהתבדיד המתון וזאת על אף ששניהם נמנים תחת אותו הגזע VT הנפוץ והמוכר מלפני כן בארץ בזני הדר אחרים

(Mawassi et al., 1996). אך, הממצא החשוב שלנו היה שהגן או התוצר של הגן p33 אשר כנראה מעורב בתופעת ההגנה ההדדית (Folimonova 2013; Sun & Folimonova, 2019) היה שונה בשתי חומצות אמינו. מצאנו כי השוני הזה היה קבוע והתקבל מבדיקת 20 עצים לא סימפטומטיים ו 20 עצים סימפטומטיים. על מנת להוכיח את מעורבות שני הנוקליאוטידים או שתי חומצות האמינו האלו בתופעת ההגנה ההדדית יש צורך בביצוע מוטציות ברצף הגן בוורוס סינטטי, קרי קלון אינפקטיבי. ובכן לאחרונה הצלחנו לשבט את הגנום השלם של שני התבדידים האלים והמתון לתוך פלסמידים בינאריים מתחת לפרומוטור הצמחי 35S CaMV. הבדיקות הראשונים שלנו באמצעות PCR הראו כי הקלון עם הגנום של התבדיד האלים היה אינפקטיבי ויכול להדביק צמחי הדר מקרופילה ולהתפשט סיסטמית בצמח בדומה לוורוס המקור, אם כי אחוז ההדבקה היה נמוך (3-4%). חשוב לציין כי קלונים המכילים את הגנום השלם של שני תבדידים: אלים ומתון מאותו הגזע (VT) של טריסטזה נמצאים, נכון להיום, רק במעבדה שלנו. המחקר המוצע כאן הוא מבוסס על השימוש בקלונים של שני התבדידים האלו והמשך פיתוחם לכלים ביוטכנולוגיים לחקר ביטוי מחלת הטריסטזה לרבות תופעת ההגנה ההדדית ובחינת הסיבות מאחורי השוני במידת האלימות של המחלה בכנות שונות.

מטרות המחקר:

- המחקר הזה עסק בחקר תופעת ההגנה ההדדית. למחקר היו שלוש מטרות עיקריות:
- (1) בחינת האינפקטיביות של שני התבדידים האלים והמתון המשובטים בפלסמיד בינארי על צירופים של כנות וזנים שונים של צמחי הדר.
 - (2) בחינת השימוש בתבדיד המתון לצורך הגנה הדדית של "אור".
 - (3) בחינת התפקיד הביולוגי של הגן p33 בתופעת ההגנה ההדדית וחשיבות חומצות האמינו המבדילות בין שני התבדידים בתופעה ע"י מוטגנזה בגן p33.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

שיבוט הגנום השלם של נגיף הטריסטזה הוא מאתגר בשל כמה סיבות:

- הגודל של הגנום (20kb) שנחשב לוירוס הצמחי הארוך ביותר שמכים עד כה.
- הטוקסיות של המחדר (ה- cDNA) לחיידקי E. coli. מסתבר שקיים מקטע ברצף הנמצא בתוך ORF1, המקדד לחלבוני הרפלקציה, שהוא טוקסי לחיידקים, מעכת את גידולם וגורם לקבלת מושבות חיידקים רקומבננטיים קטנות במיוחד.
- מדי פעם אנו עדים להתרחשויות מוטציות ברצף של המחדר המשובט בחיידקי E. coli.

אף על פי זאת במעבדתנו פותחו וכוילו פרוטוקולים של שעזרו לנו להתגבר על המגבלות הנ"ל ולביצוע הניסויים כפי שהוצע בתוכנית המחקר:

- פיתחנו פרוטוקול לסינתזת cDNA גדול באורך של כ 20,000 בסיסים באמצעות הערכה Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit של היצרן Thermo Scientific.
 - הצלחנו לפתח מערכת להגברת מקטעי cDNA ארוכים, של יותר מ- 10,000 בסיסים, באמצעות PCR ואיחוי מקטעים אלו באמצעות overlapped PCR למקטע אחד גדול (20,000 בסיסים). ההגברה נעשית עם האנזים Herculase II Fusion DNA Polymerase של היצרן Agilent technologies.
 - הקמנו מערכת לשיבוט מקטעי ה PCR ארוכים לתוך פלסמידים ע"י רקומבינציה בעזרת הערכה In-Fusion HD Cloning Kit של היצרן Clontech Laboratories, Inc.
 - על מנת להתגבר על בעיית הטוקסיות לחיידקי E. coli ולבעיית המוטציות שעלולות להתרחש בחיידקים אלו, פיתחנו מערכת המבוססת על השימוש בחיידקי Agrobacterium.
- בזכותם של טכניקות אלו הגענו למצב שברשותנו היום קלונים עם הגנום השלם של התבדיד האלים והתבדיד הבלתי אלים של נגיף הטריסטזה. הפלסמיד אשר שימש אותנו הוא pCAMBIA המכיל פרומוטור וטרמינאטור של 35S CaMV. קלונים אלו ישמשו אותנו להדבקות צמחים כפי שיפורט בהמשך.

להלן סיכום ההתקדמות והממצאים שהושגו בשלושת השנים של המחקר.

בחינת האינפקטיביות של התבדידים המשובטים:

ע"י שיטות של הנדסה גנטית, ניתן לשבט גנום של וירוס צמחי לתוך פלסמיד, להרבות את הפלסמיד בתוך חיידק, ובכך ניתן לייצר תעתיקים של וירוס סינטטי במבחנה היכול להדביק צמחים. קלון אינפקטיבי נחשב לכלי ביוטכנולוגי בעל חשיבות רבה לחקר מחלות וירוסים ועשוי לשמש גם ככלי שבעזרתו ניתן להתמודד בפני פתוגנים אחרים של שיפה. וירוס ה-CMV נחשב לוורוס הצמחי הארוך ביותר, אף על פי זאת, נבנה עבורו (של הגזע האלים T36 הקיים בפלורידה) קלון אינפקטיבי. בניית הקלון האינפקטיבי של גזע ה-T36 ארכה יותר מ-5 שנים ע"י צוות המונה יותר מ-10 אנשים (Satyanarayana et al., 1999).

במהלך השנה הראשונה של המחקר הנוכחי השקענו מאמצים רבים ברצוף הגנום השלם של שני התבדידים האלים והמתון של נגיף הטריסטזה אשר בודדו מעצים סימפטומטיים ולא סימפטומטיים בהתאמה. מצאנו דמיון של 99% בין שני התבדידים האלים והמתון. בנוסף היה דמיון של יותר מ-96% בין שני התבדידים לבין הגזע ה-VT הנפוץ והמוכר מלפני כן בארץ בזני הדר אחרים.

לאחר כיוול פרוטוקולים שונים אשר כללו אופטימיזציה של הפקת RNA מעצים נגועים, סינתזת cDNA ארוך, הגברת מקטעי PCR ארוכים (10-20kbp), ושיבוט תוצרי PCR ארוכים לתוך הפלסמיד pCambia בנינו קלונים המכילים את הגנום השלם של שני התבדידים האלים והמתון.

במסגרת המחקר הנוכחי נבנו קלונים עם הגנום השלם של הוורוס שהכילו בקצהו ה-3' של הגנום מקטע של Ribozyme וטרימינטור היכולים להביא לחיתוך ה-RNA לאחר הטרינסקריפציה בצמח ולקבלת האורך השלם המדויק של גנום הוורוס ללא כול תוספות של בסיסים. קלונים כאלה נעשו הן לגבי התבדיד האלים והן לגבי התבדיד הבלתי אלים. ביצוע השנויים האלו צרך הרבה עבודה ונמשך זמן ממושך.

לצורך בדיקת האינפקטיביות של הקלונים, נעשו ניסויים של אילוח שתילי מקרופילה בחיידקי אגרובקטריום המכילים פלסמיד ה-pCambia המבטא את גנום הוורוס השלם.

במחקרים שלנו אנחנו משתמשים בשתילי הדר (מקרופילה, טרור, חושש, אור), בגודל של 15-25 ס"מ, קנויים ממשתלות מסחריות. השתילים נבדקים לנוכחות וירוס הטריסטזה באמצעות ELISA ומבחני PCR. מהניסיון שלנו, אנחנו מוצאים כי השתילים שאנחנו רוכשים ממשתלת מוטשן בעין ורד, תמיד היו חופשיים מהוורוס, לכן מרבית הצמחים בניסויים שלנו מקורם ממשתלת מוטשין.

להכנת השתילים לאילוח בקלונים האינפקטיביים, אנחנו מוציאים אותם מהאדמה ושוטפים את השורשים שלהם במים בצורה יסודית. גוזרים את קצוות השורשים הצדדיים והשורש המרכזי במספרים לצורך פציעתם, וזאת על מנת להקל הדבקתם בחיידקי האגרובקטריום.

חיידקי האגרובקטריום המכילים את הפלסמיד הריקומביננטי (pCambia) המכיל את הגנום השלם של הווירוס) גודלו בחצי ליטר מצע עם אנטיביוטיקה מתאימה (Kan&Ref) ל- OD 0.6. החיידקים שוקעו בצנטריפוגות והורחפו בחצי ליטר בופר MES עם Acetosyringone. לצורך אילוח, טבלנו את השורשים החשופים והפצועים של שתילי ההדרים לתוך תרחיף החיידקים למשך לילה שלם. למחרת, שתלנו את השתילים המודבקים באדמה בעציצים. השתילים הוחזקו בחדר לגידול צמחים עם תנאים מבוקרים ומורשה לעבודה עם צמחים מהונדסים.

צמחי ההדר המאולחים נבדקו לנוכחות הווירוס כחודשיים לאחר ההדבקה. הופק RNA כללי מקליפה של ענפים של גידול צעיר מהשתילים המודבקים באמצעות ערכה מסחרית Viral RNA Extraction Kit ולפי הוראות היצרן Bioneer. ה-RNA הכללי שימש אותנו לסינתזת cDNA בעזרת פריימר אקראי (Random Hexamer Primer) ופריימרים סגוליים לווירוס הטריסטזה. מקטעי רצף מגנום הווירוס הוגברו מה-cDNA באמצעות PCR ופריימרים ספציפיים. תוצרי ה-PCR נשלחו לקביעת רצף ע"י חברות מסחריות לאימות הבדיקה (בעיקר Hy-Labs ברחובות ו-Macrogen בדרום קוריא). לבדיקות היברידיזציה (Northern blot), ה-RNA הכללי של הצמחים המודבקים הופרד בג'ל אגרוז והועבר למברנת ניילון. ההיברידיזציות בוצעו עם גלאים מסומנים ב-DIG, ספציפיים למקטעי רצף שונים של וירוס הטריסטזה (בעיקר של קצוות ה-5' ו-3' של גנום הווירוס ושל גן חלבון המעטפת). מהלך ההיברידיזציה וההגבה עם הגלאי מתואר ב-Mawassi et al., 2000.

לצורך בדיקות ELISA, נעשה מיצוי של צמחי הדר מאולחים שנבדק בערכת ELISA המכילה נוגדנים סגוליים לווירוס הטריסטזה של ההדר ולפי הוראות היצרן BIOREBA AG.

בסך הכול אולחו 70 שתילי מקרופילה בקלון שמקורו בתבדיד האלים ועוד 70 בקלון שמקורו בתבדיד הבלתי אלים. לאחר חודשיים מהאילוח נעשו בדיקות ELISA ו-PCR על מנת לאמת הדבקות בווירוס. נמצאו ארבעה צמחים חיוביים באלה המודבקים בקלון של התבדיד האלים אך לא אף צמח אחד הודבק בקלון שמקורו בתבדיד הבלתי אלים. לכן יכלנו להסיק כי יש לנו קלון אינפקטיבי של התבדיד האלים, אם כי יעילות ההדבקה שלו היא עדיין נמוכה ומחייבת המשך מחקר ושיפור.

יעילות ההדבקה נמוכה (3-5%) של הקלון של התבדיד האלים התקבלה בשתי חזרות של הניסוי, ההדבקה של הצמחים אומתה הן בבדיקות PCR והן ב-ELISA ע"י השימוש בנוגדנים מסחריים סגוליים לנגיף הטריסטזה. מאידך תוצאות ההדבקה של הקלון של התבדיד הבלתי אלים היו בסימן שאלה, מכיוון שרק שני צמחים בחזרה ראשונה של הניסוי מתוך 70 הצמחים היו חיוביים בבדיקות ה-PCR אך שליליים בבדיקות ה-ELISA, לכן המסקנה שלנו שהקלון של התבדיד הבלתי אלים טרם נמנה לאינפקטיבי.

על מנת לוודא שהרצף של הגנום המשובט של התבדיד הבלתי אלים לא מכיל מוטציות, נעשה ריצוף מלא של כול ה-19200 בסיסים של ה-cDNA המשובט בקלון. להפתעתנו נמצאה מוטציה אחת שגרמה להחלפת חומצת אמינו אחת ברצף התוצר של החלבון p27 המשמש לוורוס כחלבון מעטפת משני (לוורוס ישנם שני חלבונים מעטפה: עיקרי p25 ומשני p27). על סמך תוצאות אלו, החלטנו בהליך של תיקון המוטציה ע"י שיחלוף הגן p27 בקלון הדפקטיבי.

מאמצע שנת המחקר השנייה העמדנו ניסויים במטרה לתקן את המוטציה שהתגלתה בקלון של התבדיד הלא אלים. לצורך זה נעשו שחלופים של מחצית הגנום בקצהו ה-3' שכלל את הגנים p27, p25, p18, p13, p20, p23 וה-3'-UTR.

נסרקו מאות קלונים והחיוביים נשלחו לחברת Hy-Labs לצורך אימות הרצף.

לאחר הסריקות והריצוף היו לנו 7 קלונים עם רצף תקין. הקלונים שובטו לתוך חיידקי אגרובקטריה ואולחו לצמחי מקרופילה כפי שתואר למעלה.

בסך הכול אולחו 120 שתילי מקרופילה בקלון שמקורו בתבדיד הבלתי אלים. לאחר חודשיים מההדבקות נעשו בדיקות ELISA ו-PCR על מנת לאמת הדבקות בוורוס. נמצאו רק שלושה צמחים חיוביים שאומתו כמודבקים בקלון של התבדיד הבלתי אלים.

המסקנה שקיבלנו בחלק זה של המחקר היא שהצלחנו לבנות קלונים של התבדיד האלים והבלתי אלים אשר הראו הדבקה על מקרופילה אם כי יעילות ההדבקה היא נמוכה.

בחינת השימוש בתבדיד המתון לצורך הגנה הדדית של "אור":

הנחת היסוד שלנו היא שגזע מתון או בלתי אלים של וירוס ה-CTV יכול להקנות הגנה הדדית של עצי "אור" בפני הדבקה בגזעים אלימים. הנושא של הגנה הדדית, במיוחד נגד וירוס ה-CTV בהדרים, מוכר היטב בעולם (Broadbent et al., 1991; Costa & Muller, 1980). בעולם ישנן מדינות, למשל בדרום אפריקה, אשר בהן יישום הגנה הדדית בהדרים הוא חובה ונעשה במשתלות טרם נטיעת השתילים בפרדסים. חשוב לציין שהגזעים הנבחרים לצורך הגנה הדדית מתאימים רק למקומות ספציפיים ואינם מתאימים לכלל הארצות המגדלות הדרים (Broadbent et al., 1991; Costa & Muller, 1980).

בחלק זה, הצענו לבצע ניסוי מעבדה מבוקרים אשר מטרתם לבחון השימוש בתבדיד הבלתי אלים ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלים, קרי הגנה הדדית (cross protection). על מנת לסייע בהפחתת נזקי המחלה העלולים להיגרם ע"י גזעים אלימים. כאמור הניסויים של חלק זה של המחקר החלו בשנת המחקר הראשונה והמשכנו בהם בשנת המחקר השנייה.

כמקור להדבקה, ראינו כי לא ניתן להסתמך על השימוש בקלונים האינפיקטיביים של התבדיד האלים והבלתי אלים שהכנו במחקר זה, וזה בשל היעילות הנמוכה שלהם להדבקת צמחים.

האלטרנטיבה שבחרנו בה היא להשתמש בתבדיד בלתי אלים שמקורו בעץ 19 בפרדס בעין החורש ותבדיד אלים שמקורו בעץ 4 מאותו הפרדס (התבדידים אופיינו מלפני כן ע"י ריצוף שלם של כול הגנום שלהם ומשמשים אותנו כמקור לתבדיד הבלתי אלים והאלים בהתאמה בתוכנית מחקר מקבילה).

הניסוי שהעמדנו החל בחודש אפריל 2016, וכלל שתילים של הצירופים: "אור"/חושחש, "אור"/טרויר, "אור"/מקרופילה, "אור"/812 ו-"אור"/35C. כול צירוף כלל 50 שתילים (טבלה 1). כול השתילים נרכשו ממשלת מוטשן ונבדקו ע"י PCR ו-ELISA ואומתו כנקיים מנגיף הטריסטזה.

טבלה 1:

צירוף	מספר הצמחים שאולחו בתבדיד הבלתי אלים	מספר הצמחים שאולחו בתבדיד האלים	מספר הצמחים שלא אולחו (ביקורת)
"אור"/חושחש	20	20	10
"אור"/טרויר	20	20	10
"אור"/מקרופילה	20	20	10
"אור"/812	20	20	10
"אור"/35C	20	20	10

השתילים אולחו בתבדיד הבלתי אלים (protecting isolate) או התבדיד האלים לקראת סוף חודש אפריל 2016 ע"י הרכבות צד. כול שתיל כלל שתי הרכבות. לאחר האילוח, השתילים הוחזקו בבית רשת במינהל המחקר החקלאי. הבית רשת טופל מדי פעם בריסוסים נגד כנימות עלה, קונפידור נגד קמחיות וכלל מדבקות צהובות.

כעבור 6 חודשים מהאילוח, בוצעו בדיקות של PCR ו-ELISA לכול הצמחים על מנת לאמת הדבקות בוורוס הטריסטזה. מתוך הצמחים המודבקים נבחרו באקראי להמשך אנליזה חמשה צמחים שהודבקו בתבדיד הבלתי אלים ועוד חמשה צמחים שהודבקו בתבדיד האלים. צמחים אלו שימשו לאמפליקציות של מקטעי גנום של הוורוס ע"י PCR. תוצרי ה-PCR נשלחו לריצוף על ידי חברת Macrogen בדרום קוריאה. הרצף שהתקבל תאם את הרצף של התבדידים המקור אשר שימשו באילוח.

בשנת המחקר השנייה נעשה אילוח של הצמחים האלו בתבדיד האלים (challenge isolate). השלב הזה החל בחודשים מרץ ואפריל 2017, בהם הסיכוי להצלחת ההרכבות וההדבקות הוא גדול. אציין כי עד סוף 2016 לא נצפו תסמיני התמוטטות בצמחים אשר הודבקו בתבדיד הבלתי אלים. מאידך, גם בצמחים אשר הודבקו בתבדיד האלים היו רק שני צמחים אשר הראו התחלה של תסמיני התמוטטות (כלורזה של עלים והתייבשות ענפים).

בשלב ה-challenging, מתוך 20 הצמחים של כול צירוף אשר היו מודבקים בתבדיד הבלתי אלים, אולחו 15 בתבדיד האלים (challenge isolate) ועוד 5 שתילים הושארו ללא הדבקת

challenging. הקבוצה השנייה של השתילים אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד האלים, 15 צמחים מכול צירוף קיבלו איתגור בתבדיד הבלתי האלים, ויתר ה 5 הושארו ללא איתגור. כול ההדבקות נעשו על ידי הדבקות צד.

כעבור 6-8 חודשים מהאילוח, במשך חודשים ספטמבר עד נובמבר בוצעו בדיקות של PCR וקביעות רצף של תוצרי ה-PCR בכדי לקבוע את סוג התבדיד העיקרי הקיים בצמח. סיכום התוצאות מובא בטבלאות 2א ו-2ב.

טבלה 2א: סיכום ניסוי הגנה הדדית בקבוצת הצמחים אשר שקיבלו הדבקה ראשונה בתבדיד

לא אלים והדבקת challenge עם תבדיד אלים

צירוף	מספר הצמחים עם הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלים	Challenging עם	דמיון רצף תוצר ה-PCR	מובהקות סטטיסטית של התוצאה במבחן contingency עפ"י Fisher's exact (two-sided)
"אור"/"חושש"	15	תבדיד אלים	11 בלתי אלים 4 אלים	****p<0.0001
	5	ללא	5 בלתי אלים	
"אור"/"טרויר"	15	תבדיד אלים	10 בלתי אלים 5 אלים	***p<0.0002
	5	ללא	5 בלתי אלים	
"אור"/"מקרופילה"	15	תבדיד אלים	11 בלתי אלים 4 אלים	****p<0.0001
	5	ללא	5 בלתי אלים	
"אור"/"812"	15	תבדיד אלים	10 בלתי אלים 5 אלים	***p<0.0002
	5	ללא	5 בלתי אלים	
"אור"/"35C"	15	תבדיד אלים	11 בלתי אלים 4 אלים	****p<0.0001
	5	ללא	5 בלתי אלים	

בנוסף למבחן Fisher's exact contingency test שנערך על כל ניסוי וניסוי, חמשת הניסויים הבלתי תלויים שנערכו עברו אנליזה סטטיסטית למובהקות הבדלים בין הקבוצה שהציגה הגנה הדדית לבין הקבוצה שלא. N ניסוי = 20, N כללי = 100. במבחן two-tailed t-test נמצא כי ההבדל בין הקבוצות מובהק, ****p<0.0002.

טבלה 2: סיכום ניסוי הגנה הדדית בקבוצת הצמחים אשר קיבלו הדבקה ראשונה בתבדיד אלים ואיתגור בתבדיד הבלתי אלים.

צירוף	מספר הצמחים עם הדבקה ראשונה בתבדיד האלים	Challenging עם	דמיון רצף תוצר ה-PCR
"אור"/"חושש"	15	תבדיד מתון	15 אלים
		ללא	5 אלים
"אור"/"טרור"	15	תבדיד מתון	15 אלים
		ללא	5 אלים
"אור"/"מקרופילה"	15	תבדיד מתון	15 אלים
		ללא	5 אלים
"אור"/"812"	15	תבדיד מתון	15 אלים
		ללא	5 אלים
"אור"/"35C"	15	תבדיד מתון	15 אלים
		ללא	5 אלים

חמשת הניסויים הבלתי תלויים שנערכו עברו אנליזה סטטיסטית למובהקות הבדלים בין הקבוצה שהציגה הגנה הדדית לבין הקבוצה שלא. $N = 20$ ניסוי, $N = 100$ כללי. במבחן two-tailed t-test נמצא כי ההבדל בין הקבוצות מובהק, $p < 0.0002$.***

לפי התוצאות המוצגות בטבלה 2 ארואים כי מרבית הצמחים (11-10 צמחים מתוך 15) אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלים (מתון) והדבקה שנייה בתבדיד האלים נתנו רצף של תוצר PCR דומה לרצף התבדיד הבלתי אלים. הצמחים שלא קיבלו challenging נמצא בהם רצף של התבדיד המתון. כול הצמחים האלו לא הראו תסמיני מחלה או התמוטטות (תמונה 1). מצד שני, הצמחים אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד האלים ו-challenging עם תבדיד בלתי אלים נתנו רצף של התבדיד האלים (טבלה 2). אציין כי בצמחים אלו היו שני צמחים של אור/חושש אשר הראו תסמיני התמוטטות (כלורזה של עלים והתייבשות ענפים) (תמונה 2). מכאן ניתן היה להסיק כי התבדיד הבלתי אלים לא אפשר לתבדיד האלים להתרבות בצמח. מסקנה זו היא נכונה בחמשת הצירופים של זן/כנה שנבדקו.

עד תום המחקר הזה נעשה מעקב אחר ביטוי תסמיני המחלה בצמחים המודבקים.

נמצא כי השתילים אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלים (מתון) והדבקה שנייה challenging בתבדיד האלים לא הראו תסמיני מחלה בולטים ובוודאי לא התמוטטות והם נראו דומים לחלוטין לצמחי ביקורת לא מודבקים.

התוצאה המעניינת שהתקבלה הייתה עם הצמחים אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד האלים ו- challenging עם תבדיד אלים. בקבוצה זו היו שני צמחים של אור/חושש אשר התמוטטו ומתו ואילו שאר הצמחים לא הראו תסמיני מחלה ולא התמוטטות על אף היותם מודבקים בתבדיד האלים.



תמונה 1: שתיל אור/חושש שעבר הדבקה ראשונה בתבדיד מתון (בלתי אלים) והדבקה שניה בתבדיד אלים. השתיל נראה ללא תסמיני מחלה למרות שבדיקות ה-PCR הראו שהוא נגוע בתבדיד הבלתי אלים.



תמונה 2: שתיל אור/חושש שעבר הדבקה ראשונה בתבדיד אלים והדבקה שניה בתבדיד אלים. השתיל נראה עם תסמיני מחלה של התמוטטות שמתבטאים בנשירת עלים והתיבשות ענפים. בדיקות ה-PCR הראו שהוא נגוע בתבדיד האלים.

בניסוי שדה אשר החל בשנת 2011, העמדנו ניסוי בפרדס בשטח של כ 5 דונם בו ניטעו עצי אור/חושש. הפרדס והנטיעות נעשו ע"י משתלת אורי מוטשן בעין ורד. בחלקה היו 12 שורות של עצים וכול שורה הכילה 48-50 עצים. בתור מקור לתבדיד הווירוס הבלתי אלים, נבחר עץ של 19 של אור/חושש מפרדס בעין החורש. כאמור, העץ נבדק לנוכחות הווירוס וההדבקה בתבדיד בלתי אלים של הווירוס אומתה ע"י קביעת רצף של הגן 33p המעורב כנראה בהגנה הדדית. בחלקת הניסוי נעשה אילוח של העצים אור/חושש בתבדיד הבלתי אלים ע"י הדבקות צד. בחלקה אולחו שורות 1-11 ואילו שורה 12 לא אולחה ושימשה מעין ביקורת לניסוי. נעשה מעקב אחר הצלחות בקליטת ההרכבות. העצים אשר בהם ההרכבה לא נקלטה לא נכללו בניסוי. במהלך כול שנה נאסף חומר צמחי מהעצים המאולחים לצורך בדיקת הדבקה בווירוס הטריסטזה. התוצאות שהתקבלו הראו כי כול העצים אשר בהם ההרכבה נקלטה התרחשה הדבקה והיו נגועים בווירוס הטריסטזה. האנליזה של רצף תוצרי ה-PCR הראו כי רצף הגן 33p של התבדיד הנמצא בעצים המודבקים בהרכבה היה זהה לזה של התבדיד המקור הבלתי אלים. העצים בשורה 12 היו שליליים ל-CTV בבדיקות ה-PCR.

במעקב אחר הופעת תסמיני התמוטטות בחלקת הניסוי, כול העצים נראו כבריאים ללא תסמיני מחלה, למעט 7 עצים המראים סימני כלורזה. חשוב לציין כי הבדיקות שנעשו הראו כי עצים אלו היו מודבקים בתבדיד הלא אלים של CTV לפי רצף הגן p33. אנחנו סבורים כי סיבת הכלורזה היא בגורם ביוטי או אביוטי לא ידוע.

התפקיד הביולוגי של הגן p33 בתופעת ההגנה ההדדית:

קלון אינפקטיבי נחשב לכלי ביוטכנולוגי בעל חשיבות רבה לחקר מחלות וירוסים ועשוי לשמש גם ככלי שבעזרתו ניתן להתמודד בפני פתוגנים אחרים של שיפה. נכון להיום, המעבדה שלנו היא היחידה בעולם אשר שיבטה את הגנום השלם של שני תבדידים של אותו הגזע של הווירוס VT, אחד אלים ואחד מתון.

היות ושני התבדידים גורמים לביטוי תסמינים שונים בצמחים המודבקים הצענו לחקור את המעורבות הביולוגית של הגנים של הווירוס בביטוי המחלה. לפי הממצאים והפרסומים של המעבדה של Bill Dawson ב-CREC פלורידה הגן החשוב במעורבות הווירוס בתופעת ההגנה ההדדית הוא כנראה הגן p33. לפי התוצאות שלנו הגן הזה היה שונה בשתי חומצות אמינו בין שני התבדידים האלים (CTV4) והמתון (VT10) (תמונה 3).

על מנת לאמת ולוודא את המעורבות של הגן p33 בתופעת ההגנה ההדדית עסקנו במהלך השנה השנייה של המחקר בבניית מוטנטים של הווירוס בגן p33. בהתחלה בנינו את הקלונים המבוססים על התבדיד האלים מכיוון שהיה זמין לנו. הקלונים המבוססים על התבדיד הבלתי אלים נבנו מאוחר יותר לאחר קבלת הקלון אינפקטיבי שלו וזאת לקראת סוף שנת המחקר השנייה.



תמונה 3: השוואת רצף חומצות האמינו של הגן P33 של התבדיד אלים (CTV4) והתבדיד המתון (VT19). העיגולים האדומים מצביעים על שתי חומצות האמינו שהבדילו תמיד בין שני הטיפוסים של התבדידים.

בסך הכול נבנו ארבעה קלונים של הוירוס:

1. קלון של התבדיד האלים אשר בגנום שלו הוחלף הגן p33 עם זה של התבדיד הבלתי האלים.
2. קלון של התבדיד הבלתי האלים אשר בגנום שלו הוחלף הגן p33 עם זה של התבדיד האלים.
3. קלון של התבדיד האלים אשר בגן p33 שלו הוחלפו שתי חומצות האמינו שיהיו דומות לאלו של התבדיד הבלתי האלים.
4. קלון של התבדיד הבלתי האלים אשר בגן p33 שלו הוחלפו שתי חומצות האמינו שיהיו דומות לאלו של התבדיד האלים.

בניית המוטנטים הייתה מאוד מאתגרת וקשה אשר התאפשרה בעזרת השימוש בפרוטוקולים אשר פיתחנו לסינתזת והגברת מקטעי cDNA ארוכים (20kb), overlapped PCR, ושיבוט לתוך פלסמידים באמצעות רקומבינציה בעזרת הקיטים מסחריים שונים. ראוי לציין כי לצורך השחלופים של הגן p33 בין הקלונים של שני התבדידים ולצורך החדרת המוטציות היה צורך בשחלוף תוצרי PCR ארוכים (כ- 10kbp) וזאת בגלל המחסור בנוכחות אתרי חיתוך סגוליים לאנזימי רסטקציה. כול קלון שהתקבל היה נבדק ע"י ריצוף כול המקטע שהוחלף (10kbp) ולא רק הגן p33.

לאחר קבלת ארבעת טיפוסים הקלונים המתוארים למעלה (הליך שהושלם בערך עד אמצע שנת המחקר השלישית), בצענו אילוח של שתילי אור/חושחש תוך כדי השימוש בהדבקת אגרובקטריום דרך השורשים כפי שתואר קודם. כול אחד מארבעת הקלונים הנ"ל אולח ל- 60 שתילים של אור/חושחש. בתור ביקורות, אולחו במקביל 40 שתילים של אור/חושחש בקלון המקורי של התבדיד האלים ו- 40 שתילים בקלון המקורי של התבדיד הבלתי אלים.

כעבור חודשיים מהאילוח, ביצענו בדיקות ELISA ו- RT-PCR לאימות הדבקת השתילים בנגיף הטריסטזה.

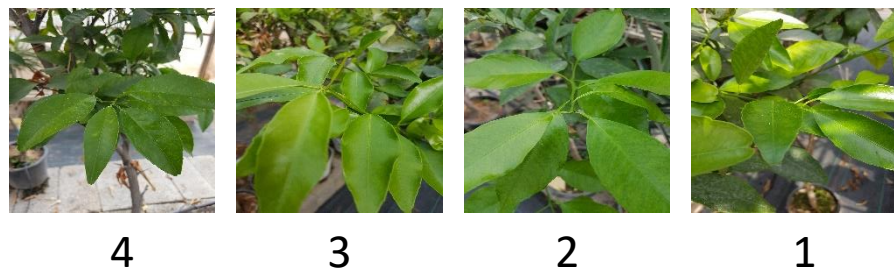
טבלה 3:

תבדיד הוירוס	מספר שתילים בניסוי	מודבקים ב- ELISA	מודבקים ב- RT-PCR	סימפטומים בשתילים מודבקים
אלים	40	3	3	ללא סימפטומים
בלתי אלים	40	2	1	ללא סימפטומים
1	60	5	3	ללא סימפטומים
2	60	4	3	ללא סימפטומים
3	60	4	3	ללא סימפטומים
4	60	5	2	ללא סימפטומים

התבדידים 1: קלון של התבדיד האלים אשר בגנום שלו הוחלף הגן p33 עם זה של התבדיד הבלתי האלים; 2. קלון של התבדיד הבלתי האלים אשר בגנום שלו הוחלף הגן p33 עם זה של התבדיד האלים; 3. קלון של התבדיד האלים אשר בגן p33 שלו הוחלפו שתי חומצות האמינו שיהיו דומות לאלו של התבדיד הבלתי האלים; 4. קלון של התבדיד הבלתי האלים אשר בגן p33 שלו הוחלפו שתי חומצות האמינו שיהיו דומות לאלו של התבדיד האלים.

בכול הטיפולים מספר הצמחים המקסימלי שנמצאו מודבקים ב- RT-PCR היה 3 (לעומת 5 ב- ELISA הנחשבת לפחות אמינה מאשר RT-PCR). תוצרי ה- RT-PCR נשלחו לחברת Hy-labs לצורך קביעת הרצף. תוצאות הריצוף הראו שהגנים המשוחלפים והמוטציות שהוכנסו נשמרו בוירוס הקיים בשתילים המודבקים.

במהלך השנה השלישית ועד כתיבת הדוח הנוכחי, אנחנו עקבנו אחר ביטוי תסמיני המחלה בשתילים המודבקים. בתצפיות שלנו לא יכולנו להבחין בתסמין מחלה אופייני ובהחלט לא התמוטטות באף שתיל מודבק בכול הטיפולים (תמונה 4). כול השתילים היו נראים לנו דומים לשתילי ביקורת שלו אולחו בוירוס.



תמונה 4: צמחי אור/חושש מודבקים ב-1 קלון של התבדיל האלים אשר בגנום שלו הוחלף בגן 33 עם זה של התבדיל הבלתי האלים; 2 קלון של התבדיל הבלתי האלים אשר בגנום שלו הוחלף בגן 33 עם זה של התבדיל האלים; 3 קלון של התבדיל האלים אשר בגן 33 שלו הוחלפו שתי חומצות האמינו שיהיו דומות לאלו של התבדיל הבלתי האלים; 4 קלון של התבדיל הבלתי האלים אשר בגן 33 שלו הוחלפו שתי חומצות האמינו שיהיו דומות לאלו של התבדיל האלים.

לקראת סוף שנת המחקר השלישית האחרונה, השתמשנו בשתילים המודבקים מכול הטיפולים המתוארים בטבלה 3 כמקור אינוקולום לאילוח סדרה רחבה של שתילי אור/חושש. נכון ליום כתיבת דוח מסכם זה (8 חודשיים לאחר ההדבקה) טרם אבחנו בתסמיני מחלה בולטים או קשים, וגם לא בתסמיני התמוטטות באף אחד מהטיפולים.

דיון:

נגיף הטריסטזה מונה עשרות גזעים היכולים להיות שונים במידת האלימות שלהם ודרגת ביטוי התסמינים בצמחים. עוצמת המחלה או התסמינים תלויה בגזע הוירוס, וגם בצירוף זן/כנה. בארץ שכיח יותר הגזע VT שנמצא גם הפרדסים שונים במדינות אחרות כולל בארצות הברית וארצות אירופה. אף על פי זאת, הגזע VT מונה תחתיו מספר רב של תבדידים היכולים להיות שונים במידת האלימות. במחקר זה עסקנו בשני תבדידים של גזע ה- VT שנמצאים בארץ ושונים במידת האלימות שלהם למרות הדמיון הרב שלהם ברצף. בדומה לעבודה שלנו,

התפרסם לאחרונה מאמר המתאר אוכלוסיות של תבדידים של גזע ה-VT הנמצא בקליפורניה (Yokomi et al., 2018), חלקם של תבדידים אלו הם אלימים וחלקם בלתי אלימים. מאידך, טרם התפרסמה עבודה כלשהי המתארת שיבוט התבדידים המתון והאליים של הגזע VT. למיטב ידיעתנו, המעבדה שלנו היא הראשונה אשר הצליחה לשבט קלונים אינפקטיביים של שני תבדידים האליים והמתון של אותו הגזע VT. במעבדתו של פרופ' דאווסון בפלורידה עוסקים כול הזמן בפיתוח קלונים אינפקטיביים של גזעים שונים של נגיף הטריסאזה אך לא של תבדידים שונים ביולוגית של אותו הגזע.

בהדבקות צמחים בתנאי מעבדה השתמשנו בשני מקורות מדבק של הוירוס:

1. וירוס טבעי מהשטח: ע"י הדבקת צד של שתילי הדריים ברכב שמקורו בעץ נגוע מהשטח (עין החורש).

2. וירוס סינטטי משובט-קרי קלונים אינפקטיביים.

צמחים אשר הודבקו ע"י הרכבת צד בתבדיד וירוס אליים שמקורו מפרדס מעין החורש (VT4) הראו תסמיני מחלה ואפילו התמוטטות. מאידך מעט הצמחים אשר נמצאו מודבקים בוירוס הסינטטי, קרי הקלון האינפקטיבי, של התבדיד האליים לא הראו תסמיני מחלה.

ההבדל בין שני מקורות המדבק האלו הוא שהוירוס הסינטטי הוא בעצם אוכלוסיית וירוס אחידה הומולוגית ונקייה מוירוסים אחרים, לעומת זאת תכשיר של וירוס מהשטח יכול להכיל תבדידים או אפילו וירוסים אחרים שבבדיקות שלנו לא מצליחים לגלות. אחוז ההדבקה של הצמחים בוירוס מהשטח הוא הרבה יותר גבוה מהוירוס הסינטטי. סיבה אפשרית לכך היא בעצם העובדה שציינו כי תכשיר וירוס מהשטח יכול להכיל מרכיבים המסייעים להדבקת צמחים. אפשרות נוספת היא שהוירוס הסינטטי מכיל מוטציה מסוימת ברצף הנוקליאוטידים שלו שמשפיעה לרעה על ההדבקה. וירוס הטריסטזה של ההדר הוא גדול במיוחד ותמיד קיים סיכוי להתחשות מוטציה/יות במהלך ה-RT-PCR או השיבוט בפלסמידים.

בספרות ישנם דיווחים המתארים תופעה דומה למקרה שלנו בה הדבקה בוירוס טיפוס טבעי היא יעילה יותר מאשר בוירוס סינטטי שהוכן במעבדה. בעבודתם של Folimonov et al., 2007 נמצא כי הדבקה יעילה בקלון אינפקטיבי של גזע פלורידאי של וירוס הטריסטזה הייתה מתקבלת רק לאחר הדבקת הוירוס הסינטטי תחילה לפרוטופסטים או לצמחים של בנטמינה ולאחר מכן הפקת ויריונים מהפרוטופסטים או צמחי הבנטמינה המודבקים והשימוש בויריונים בתור אינוקולום להדבקת הדריים. במעבדתנו לא הצלחנו לקבל הדבקה של הגזע הישראלי של הטריסטזה לצמחי בנטמינה.

אחת הסיבות שאנחנו מייחסים לאחוז הדבקה נמוך יכולה להיות שיטת הטרנספורמציה. במחקר שלנו השתמשנו בשיטה המבוססת על השימוש בחיידקי אגרובקטריום אשר הכילו את הפלסמיד הרקומבננטי. לפי שיטה זו, טבלנו שורשים חשופים של שתילי ההדרים בתמיסה

אשר הכילה את החיידק האגרובקטריום למשך לילה שלם. ולאחר מכן נעשו שטיפות של השורשים והעברת השתילים לעציצים עם אדמת טוף. בנוסף אותם שתילים אולחו בעוד שיטה אחרת ע"י פצעים שנעשו בעזרת סקלפל לגבעולים של אותם השתילים ולפצעים אלו הוחדרה תמיסת אגרובקטריום. כאמור בשיטות אלו התקבלה הדבקה ביעילות נמוכה (3%). לאחרונה רכשנו מכשיר טרנספורמציה –אקדח גנים במטרה לשפר את יעילות ההדבקה. אנחנו התחלנו לכייל את מכשיר האקדח גנים ולפתח פרוטוקול יעיל לטרנספורמציה של הדורים עם פלסמידים רקומבננים. בניסויים ראשוניים השתמשנו בפלסמיד רקומבנטי המכיל את הגן המדווח GFP. לאחר כמה ניסיונות הצלחנו לכייל פרוטוקול המביא לביטוי מאו יעיל ברקמת השיפה של ה GFP. חשוב לציין כי התפרסמה עבודה המתארת את השימוש באקדח גנים זה להדבקת קלון אינפקטיבי של גזע T36 של וירוס הטריסטזה הקיים בפלורידה (Acanda et al., 2019).

הגנה הדדית היא תופעה המוכרת במיוחד בהדרים נגד מחלת הטריסטזה. גזעים מתונים או חלשים כאשר הם מדביקים עצים הם יכולים להקנות עמידות בפני הדבקה בגזעים או תבדידים אלימים של אותו הווירוס. בעולם השימוש בגזעים מתונים של נגיף טריסטזה לצורך הגנה על עצי הדר בפני גזעים אלימים רשם הצלחה בדרום אפריקה, אוסטרליה ועוד. אך חשוב לציין כי ההצלחה הייתה מוגבלת לגזעים אלימים המדביקים עצי הדר מורכבים על כנות סבילות אך לא על כנת החושחש הרגישה. בנוסף הניסויים המתוארים בספרות מבוססים של השימוש בגזעים אלימים ומתונים של נגיף הטריסטזה ולא על תבדידים אלימים ומתונים של אותו הגזע.

המנגנון בו פועלת הגנה הדדית נגד וירוסים בכלל ונגד CTV בפרט טרם נקבע. ישנם כמה פרשנויות אשר ניתן למצוא בספרות המדעית אשר תוארו וסוכמו במאמרה של החוקרת מפלורידה Folimonova 2013. מבין המנגנונים אשר תוארו ניתן למנות כאלה המפריעים להתבססות הווירוס האלים בהדבקה השנייה (challenged virus) כמו הפרעות בחדירת חלקיקי הווירוס לתא המאוכלס לפני כן בגזע המתון, תחרות ביו שני הטיפוסים על מרכיבים צמחיים חיוניים לרפרלקציה של הווירוס, הפרעות בהפרדת מעטפת החלבון של חלקיקי וירוס (disassembly), ותחרות על אתרי הרפלקציה בתא. בנוסף ישנם המשערים כי בתופעת ההגנה ההדית מעורב מנגנון הצמח השתקת RNA (RNA Silencing). מאידך במחקר אשר נעשה ע"י Folimonova 2012 דווח כי במנגנון ההגנה הדדית של וירוס הטריסטזה, מעורב חלבון ויראלי p33 ברמת החלבון. בניסויים של Folimonova 2012 השתמשו בקלונים אינפקטיבי של גזע אלים T36 הקיים בפלורידה. נמצא כי מוטנטים אשר לא ביטאו את חלבון ה-p33 לא יכלו להגן על הצמח בדומה לאלה המבטאים את חלבון p33. מכול זה עולה כי הגנה ההדדית הוא מנגנון מורכב היכולים להיות מעורבים בו יותר ממרכיב אחד היכול להתרחש ברמת ה-RNA או/ו החלבון וכי דרוש עוד מחקרים רבים על מנת להבין אותו.

במחקר שלנו הוצע ללמוד על תופעת ההגנה ההדדית ולבודד תבדידים מתונים או לפתח כלים אשר יכולים לשמש לחיסון צמחים בפני הדבקות בתבדידים אלימים של הווירוס בדגש על כנת

החושש. התבדיד אשר בודד מעץ נגוע של אור/חושש מאזור עין חורש נכון ואשר אינו מראה סימפטומים של מחלה או התמוטטות, עשוי להיות מבטיח כי העצים של אור/חושש אשר הדבקנו במחקר זה בתנאי מעבדה טרם פיתחו תסמיני מחלה ולא זוהה עץ כלשהו מתמוטט. אף על פי זאת, יש להמשיך ולעקוב אחר הצמחים בניסוי המעבדה והניסוי בשדה. בהדבקות בתנאי מעבדה, מרבית הצמחים של אור/חושש אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלים והדבקה שנייה בתבדיד האלים נתנו רצף של תוצר PCR דומה לרצף התבדיד הבלתי אלים. מכאן ניתן היה להסיק כי התבדיד הבלתי אלים לא אפשר לתבדיד האלים להתרבות בצמח על אף היותו מורכב על כנת חושש. חשוב לציין כי בחנו את התבדיד המתון על צירופים שונים של זן/כנה ונמצא שהוא בלתי אלים לרבות לצירוף של אשכולית לבנה/חושש. תוצאה זו חשובה בגלל דיווחים על גזעים מתונים של CTV שהיו לכרואה מועמדים לשימוש לצורכי הגנה הדדית, אך התגלו מאוחר יותר שהם אלימים לצירוף אשכולית/חושש.

בפרדס בו בוצע ניסוי השדה בעין ורד, בו הדבקנו עצי הדר בתבדיד המתון, טרם נראו עצים מתמוטטים והפרדס ממשיך לתת יבול מצויין בכול שנה (מעל 4 טון לדונם). היות והניסוי הועמד לפני מספר שנים והעצים נכון להיום עדיין נראים בריאים, על אף היותם מודבקים בתבדיד המתון, ניתן לכן להסיק כי התבדיד המתון הוא יציב בעצים השטח ואינו עובר שינוי גנטי כלשהו שהופך אותו לאלים.

בבדיקות והשוואת רצפים של הגנום של התבדיד האלים והתבדיד המתון מצאנו כי קיים שוני אשר חוזר על עצמו והוא נמצא בגן p33. מבדיקות של עשרות עצים סימפטומטיים ולא סימפטומטיים נמצא כי הגן או התוצר של הגן p33 (אשר כנראה מעורב בתופעת ההגנה הדדית וזאת לפי Folimonova 2013, ו-Sun & Folimonova, 2019) היה שונה בשתי חומצות אמינו (תמונה 3). מצאנו כי השוני הזה היה קבוע והתקבל מבדיקת 20 עצים לא סימפטומטיים ו 20 עצים סימפטומטיים. במחקר זה עשינו ניסויים במטרה להוכיח את מעורבות שני הנוקליאוטידים או שתי חומצות האמינו האלו בתופעת ההגנה ההדדית. לצורך זה עשינו מוטציות ברצף הגן בקלון האינפקטיבי של התבדיד האלים והתבדיד המתון כפי שתואר למעלה.

לפי התוצאות שהתקבלו, מעט הצמחים שנמצאו מודבקים (3-5%, טבלה 3) לא הראו תסמינים של התמוטטות או תסמיני מחלה אחרים, גם באלו המודבקים בקלון האינפקטיבי של התבדיד האלים. ההסבר לכך הוא כפי שהוזכר למעלה הוא שהוירוס הסינטטי אולי הכיל מוטציה מסוימת ברצף הנוקליאוטידים בזמן ההתרבות שלו בצמח אשר שמשפיעה לרעה על ההדבקה או בשל מחסור במרכיב ביולוגי אחר אשר מסייע להתבוססות והתרבות הוירוס בצמח. כאן חשוב לציין תופעה ידועה בעצי הדר המודבקים בו-זמנית בתבדידים או בגזעים אלימים ומתונים של וירוס הטריסטזה בה חלה לפעמים השתלטות של אוכלוסיית התבדיד או

הגזע המתון על אוכלוסיית התבדיד או הגזע האלים. כאשר דבר כזה מתרחש, אז נדובר בתופעה שנקראת recovery של עצים מגזעים או תבדידים אלימים. תופעת ה recovery מוכרת בפרדסים במיוחד אלו המקבלים טיפול אגרוטכני טוב, ותנאים טובים של השקייה ודישון. היות והשתילים שלנו במחקר זה היו מוחזקים בבית רשת תחת תנאים "מפנקים", יכול להיות שזו הייתה סיבה שצמחים אשר הודבקו בקלונים אינפקטיביים נראו ללא תסמיני מחלה.

1. Acanda Y, Wang C, Levy A. (2019). Gene Expression in Citrus Plant Cells Using Helios® Gene Gun System for Particle Bombardment. *Methods Mol Biol.* 2019;2015:219-228.
2. Bar-Joseph, M., and Dawson, W.O. (2008). "Citrus tristeza virus," in *Encyclopedia of Virology, Third Edition Evolutionary Biology of Viruses*, Vol. 1, eds B.W.J. Mahy and M.H.V. vanRegenmortel (Amsterdam:ElsevierLtd), 161–184.
3. Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., and Gonsalves, D. (1979). The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* 25, 93–168.
4. Bar-Joseph, M., Marcus, R., and Lee, R. F. (1989). The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 291–316.
5. Brlansky, R.H., Howd, D.S., Broadbent, P., and Damsteegt, D.V. (2002). Histology of sweet orange stem pitting caused by an Australian isolate of Citrus tristeza virus. *Plant Dis.* 86, 1169–1174.
6. Broadbent, P., Bevington, K.B., and Coote, B.G. (1991). "Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection," in *Proceedings Conference of the International Organization of Citrus Virology*, 11th. Eds R.H. Brlansky, R.F.Lee, and L.W. Timmer (Riverside, CA: IOCV), 64–70.
7. Costa, A.S., and Müller, G.W. (1980). Tristeza control by cross-protection; a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis.* 64, 538–541.
8. Dolja, V.V., Kreuze, J.F., and Valkonen, J.P. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* 117, 38–51.
9. Folimonova, S. Y. (2012). Superinfection exclusion is an active virus–controlled function that requires a specific viral protection. *J. Virol.* 86, 5554–5561.
10. Folimonova, S.Y. (2013). Developing an understanding of cross-protection by Citrus tristeza virus. *Front Microbiol.* 2013;4:76. doi: 10.3389/fmicb.2013.00076. Epub 2013.
11. Folimonova, A.S. , Folimonova SY, Bar-Joseph M, Dawson WO. (2007). A stable RNA virus-based vector for citrus trees. *Virology.* 2007, 368, 205-216.
12. Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., and Bar-Joseph, M. (1996). Unusual sequence relationships between two isolates of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 77, 2359–2364.
13. Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., and Pena, L. (2008). Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.* 9, 251–268.
14. Sun, Y.D., Folimonova, S.Y. (2019). The p33 protein of Citrus tristeza virus affects viral pathogenicity by modulating a host immune response. *New Phytol.* 221, 2039-2053.
15. Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Chiumenti, M., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Weng, Z., Xiong, Z., Hajeri, S. (2018). Molecular and biological characterization of a novel mild strain of citrus tristeza virus in California. *Arch. Virol.* 163, 1795-1804.

סיכום עם שאלות מנחות

אנא פרט מהם הניסויים שנעשו תוך השוואה לתכנית העבודה המתוכננת והתאמתם למטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעה המקיפה בניית ובחינת אינפקטיביות של קלונים של התבדיד האלים והתבדיד המתון של נגיף טריסטזה שמקורו מפרדס בעין החורש. בחינת השימוש בתבדיד המתון לצורך הגנה הדדית של "אור"/חושחש. בחינת התפקיד הביולוגי של הגן p33 ומעורבותו בפתוגנזה.	מהם עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח? נבנו קלונים עם הגנום השלם של הווירוס שהכילו בקצהו ה-3' של הגנום מקטע של Ribozyme וטרימינטור היכולים להביא לחיתוך ה-RNA לאחר הטרינסקריפציה בצמח ולקבלת האורך השלם המדויק של גנום הווירוס. קלונים כלאה נעשו הן לגבי התבדיד האלים והן לגבי התבדיד הבלתי אלים של נגיף הטריסטזה. נעשו ניסויים לבחון השימוש בתבדיד הבלתי אלים ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלים, קרי הגנה הדדית (cross protection). הניסוי כלל שתילים של הצירופים: "אור"/חושחש, "אור"/טרויר, "אור"/מקרופילה, "אור"/812 ו-"אור"/35C. השתילים הודבקו בתבדיד הבלתי אלים (protecting isolate) או התבדיד האלים. בזמן ביצוע הניסוי, טרם היו לנו קלונים אינפקטיביים, לכן כמקור לאינוקולום השתמשנו בעץ סימפטומטי ועץ לא סימפטומטי מפרדס מעין החורש. ההדבקות נעשו ע"י הרכבות צד. בהמשך נעשו הדבקות צמחים בתבדיד האלים (challenge isolate). נעשו בדיקות PCR וריצוף לאימות ההדבקה ב challenge isolate. נבנו קלונים מוטנטים בגן p33 המעורב כנראה בתופעת ההגנה ההדדית. בחנו את יעילות ההדבקה וביטוי תסמיני המחלה בשתילי אור/חושחש מודבקים במוטנטים אלו.
בעקבות הניסויים שנעשו, אנא פרט והסבר כיצד הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח או חלק מהן במחקר זה הושלמו שלושת המטרות שלו: התקבלו קלונים אינפקטיביים של התבדיד האלים והתבדיד הבלתי אלים אם כי אחוז ההדבקה שלהם לשתילי מקרופילה ואור/חושחש היה נמוך (עד 4%). נעשו ניסויים של challenging של צמחים מודבקים בתבדיד בלתי אלים. מרבית הצמחים אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלים והדבקה שנייה בתבדיד אלים נמצא בהם ירוס עם רצף דומה לרצף התבדיד הבלתי אלים. מכאן ניתן היה להסיק כי התבדיד הבלתי אלים לא אפשר לתבדיד האלים להתרבות הצמח. נבנו קלונים עם מוטציות או שחלופים בגן p33 אשר הוצע כמעורב בתופעת ההגנה ההדדית. בהדבקת צמחים של אור/חושחש במוטנטים אלו, אחוז ההדבקה היה נמוך 2-5%, הצמחים לא הראו תסמיני התמוטטות או תסמיני מחלה.	בהתאם להצעה המקיפה, ציין מה התבצע מתוך טבלת המשימות ואבני דרך, כולל אבני דרך כמותיות (סעיפים IV-VI) ומהם הקריטריונים שפורטו בהצעה המקיפה כבחון להצלחת המחקר אכן הושגו בתוכנית המחקר המקיפה היו שלוש מטרות, כול המטרות הושלמו, והניסויים בוצעו כפי שצויין בתוכנית המחקר.
מהן המסקנות המדעיות ומהן ההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו בעתיד? יש לנו עדויות המראות כי: הקלונים של התבדידים האלים והמתון שבנינו הם אינפקטיביים אם כי יעילות ההדבקה נמוכה במיוחד (2-4%). התבדיד הבלתי אלים, שמקורו מעץ ללא תסמינים הפרדס בעין החורש, יכול לשמש ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלים. לפי ניסוי השדה ניתן להסיק כי התבדיד המתון הוא יציב בעצים ולא עובר שינוי לתבדיד אלים. המוטציות שהוכנסו לגן p33 בקלונים האינפקטיביים לא השפיעו על ביטוי התסמינים, תוצאה המעידה כי פקטורים נוספים יכולים להיות מעורבים בפתוגנזה.	מהן הבעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ומה אמורה להיות ההתייחסות בהמשך יש להמשיך ולחקור שינויים גנטיים בגנום הווירוס המשובט (הקלונים האינפקטיביים) שאולי מתרחשים ומביאים לאחוז הדבקה נמוך של צמחים.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי . Mawassi M, Haviv S, Maslenin L. (2019). Amplification and Cloning of Large cDNA Fragments of the Citrus tristeza virus Genome. Methods Mol Biol. 2019;2015:151-161. doi: 10.1007/978-1-4939-9558-5_11.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח (סמן אחת מהאופציות) ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט).
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי ? כן *

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים