

ספריית מוטנטים כמקור לאיתור צמחי מלון עמידים לוירוסים החשובים בארץ

Melon mutation library as a source for resistance to important viruses in Israel

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות מוצרים ליצוא ירקות ע"י:

עמית גל-און, דיאנה ליבמן מחלקה לפתולוגיה, מכון להגנת הצומח מינהל המחקר החקלאי מכון וולקני
משה לפידות – מחלקה לגנטיקה, המכון הצמחי מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני
יעקב תדמור, יוסי בורגר ועוזי סער- היחידה לדלועיים, נווה יער

Amit Gal-On, Diana Leibman, Institute of plant protection, Dep. of Plant Pathology A.R.O
50-250 E-mail amitag@agri.gov.i

Moshe Lapidot, Department of Plant Genetics Institute of Field and Garden Crops P.O.B 6
A.R.O 50-250 E-mail lapidot@agri.gov.il

Tadmor Yaakov, Burger Joseph, Sa'ar Uz Newe Ya'ar Newe Ya'ar Research Center
A.R.O , P.O.Box 1021, Ramat Yishay 30095, tadmory@volcani.agri.gov.il

יוני 2010

סיון תש"ע

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

חתימת החוקר _____

הצגת הבעיה. מלון הוא גידול חשוב בחקלאות ישראל לשוק המקומי וליצוא. כל זני המלונים הם מאד רגישים להדבקה של מספר רב של וירוסים. גידול המלון בארץ נפגע בכל שנה מנגיעות של מספר וירוסים. קווי הטיפול של מלונים אינם מכילים עמידויות יציבות למרבית הוירוסים החשובים בארץ. הוירוסים החשובים המנגעים מלון בארץ ובעולם בשטחים פתוחים הם וירוסים של RNA השיכים למשפחת ה-Potyviridae: ZYMV, PRSV-W ו-CVYV, בשל מחסור במקורות עמידות נגרמים נזקים כלכליים כבדים לחקלאים. השריית עמידות ע"י טיפול בחומר מוטגני EMS- כנגד וירוסים מקבוצת ה-potyvirus אופיינה בעבר במספר גידולים. המחקר התבסס על ספריית מוטנטים המכילה כ- 2,000 משפחות M2 שונות של זרעי "נוי יזרעאל" שטופלו טופלו ב-EMS ליצירת זרעי M1. חשיבות המחקר היא במציאת מקורות עמידות למלונים מסחריים בדרך מהירה.

מטרות המחקר : א. איתור משפחות מוטנטים המתפצלות לעמידות לוירוסים הנבדקים. ב. ייצוב קווים עמידים לוירוסים הנבדקים. ג. אפיון ראשוני של העמידות ברמת הוירוס וברמה הגנטית.

שיטות עבודה. צמחי קישוא ומלפפון נגועים בוירוסים ZYMV ו-CVYV אשר שימשו מקור הדבקה גודלו בחממה לאורך כל שנות הניסוי. השתילים של המשפחות השונות גודלו במשתלה מסחרית בכדי לקבל צמחים אחידים המותאמים להדבקה. צוות המחקר בבית דגן העמידו מערכות הדבקה יעילות להדבקה של הוירוס CVYV ע"י כנימות עש ושל הוירוס ZYMV באופן מכאני.

תוצאות עיקריות. כבר במהלך השנה הראשונה שונתה התוכנית המקורית ובמקום להדביק את הקווים בארבעה וירוסים בו זמנית הוחלט לסרוק את המשפחות רק לשני הוירוסים ZYMV ו-CVYV. כאשר שני הוירוסים הנוספים יבחנו בשלב מאוחר יותר רק למשפחות עמידות נבחרות. הודבקו כ- 11,200 צמחים כ-1400 משפחות של מוטנטים בוירוסים ZYMV ו-CVYV. ראוי לציין, שמחזור הדבקה נמשכו כחודשיים מיום ההנבטה עד גמר הסריקה בשל הצורך להדביק את הצמחים שלא הראו תסמינים פעם שנייה וגם שלישית. כל הצמחים שהודבקו הראו רגישות לוירוסים CVYV ו-ZYMV. במהלך המחקר אותרו שתי משפחות שהראו עמידות לאחר הדבקה ראשונה אך בהדבקות חוזרות של דור הצאצאים הסתבר שהם אינם עמידים לוירוסים.

מסקנות והמלצות. לפרויקט אין המשכיות, כיוון שמעבודה זו למדנו שהסיכוי לאתר משפחה מתפצלת עמידה הוא נמוך מאד.

2. דיווח מדעי

ב. מבוא רקע מדעי ומטרות המחקר לתקופת הדו"ח

המלון, Cucumis melo, הוא מין דיפלואידי שפריו מהווה מרכיב חשוב בדיאטה של תרבויות רבות ברחבי העולם. גידול מלוניס בארץ ובעולם מבוסס על חקלאות מודרנית עתירת ידע והשקעה, בחממות, במנהרות גידול ובשדה פתוח. מחלות ויראליות בגידולי מלוניס גורמות לנזקים כבדים, ובמקרים רבים הינן גורם המסכן את הגידול. מלון הוא גידול רגיש במיוחד לנגיעות בוירוסים שונים בכל חלקי הארץ, מהגולן דרך השפלה ועד הערבה. בארץ קימת נגיעות מוערכת של 10-40% בוירוסים שונים, הפוגעת ברווחיות הגידול בשטחי גידול פתוחים וסגורים. בשנים בהן הנגיעות גבוהה מ-30% הנזק מסכן את רווחיות הגידול. כיום משקיעות חברות זרעים, כסף רב בניסיונות להחדרת עמידות לוירוסים במלוניס, באמצעות גנטיקה קלאסית. בארץ ובעולם לא קיימים מקורות לעמידות גנטית יציבה למרבית הוירוסים במלוניס. כשבעה וירוסים חשובים לחקלאות ישראל קיימים במלוניס. ההתמודדות כנגד וירוסים אלו מבוססת בעיקרה על שילוב של אמצעים אגרוטכניים והדברה כימית. ראוי לציין, שהדברה כימית היא בעיתית בשל יעילותה המוגבלת בהדברת הווקטור, פגיעה באיכות הסביבה והשפעה מצטברת על בריאות הצרכן. משום כך, קיים צורך חקלאי למציאת מקורות עמידות חדשים. בנוסף להחדרת מקורות עמידות טבעיים קיימות דרכים נוספות להקניית עמידות לוירוסים, כמו, עמידות טרנסגנית והשריה כימית ופיזיקאלית של מוטציות. שימוש במוטגנזה כימית או פיזיקאלית לשיפור גידולי תרבות היא טכנולוגיה מוכרת שנים רבות, וקיימות דוגמאות רבות להצלחה של טיפוח בטכנולוגיה. החומר המוטגני Ethyl Methanesulfonate (EMS), גורם בעיקר למוטציות transition, שינוי של GC ל-AT. בעבר הצליחו בדרך בנוכחות EMS להשרות עמידות בדור (M2) למספר וירוסים בגידולים שונים.

בעבודה זו התמקדנו בשלב הראשון באיתור עמידות לשני וירוסים חשובים של RNA השייכים למשפחת ה- Potyviridae, ZYMV, CVYV. בשלב השני, התוכנית הייתה לבחון את העמידות לשני וירוסים נוספים PRSV-W ו-WmCSV רק במשפחות שהראו עמידות בשלב הראשון. בחינת העמידות נעשתה על ספריית מוטנטים כימיים (EMS) המבוססת על קו העילית "נוי יזרעאל" ממשפחות שונות שעברו הכלאות עצמאיות (M2). בסריקה פנוטיפית של האוכלוסיה נמצא כי כ-10% מהמשפחות הראו שינוי פנוטיפ. חלק משינויים אלו נבחן ונמצא כנשלט על ידי גן יחיד. ראוי להזכיר כי הקו נוי יזרעאל, קו הטיפוח המייסד של ספריית המוטנטים, מהווה נדבך מרכזי בתכניות המחקר והפיתוח של יחידת הדלועיים בנוה יער ולפיכך הדרך לפיתוח זנים, לאחר איתור מוטציות מועילות, עשויה להיות קצרה ומהירה מאוד.

המחקר הציג, פיתרון יישומי לאיתור עמידות למלוניס למחלות וירוס הגורמות נזק כלכלי רב, בארץ ובעולם.

מטרות המחקר: למחקר היו מטרות קצרות טווח וארוכות טווח. בטווח הקצר, איתור צמחי מלון "מספרית מוטנטים" עמידים לוירוסים ZYMV, CVYV, PRSV-W ו-WmCSV. בטווח הארוך מטרתנו הייתה לפתח זנים נושאי עמידות לוירוסים הגורמים נזקים קשים לחקלאי ישראל.

ג. פרוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

הוכן מערך הדבקה מאורגן היטב להדבקה יעילה (מעל 95%) של המשפחות הנבדקות. לשם כך, גודלו בחממות מבוקרות ובבידוד צמחי מקור (אינוקולום) להדבקת משפחות המוטנטים. צמחי קישוא מודבקים בוירוסים ZYMV שימשו מקור אינוקולום להדבקה מכאנית של הווירוס. צמחי מלפפונים מודבקים בוירוסים CVYV שימשו כמקור להזנת כנימות עש לצורך הדבקה בוירוס זה. ראוי לציין, שבמעבדותינו היה קיים מערך הדבקה יעיל להדבקה בוירוסים אלו, אם בדרך מכאנית, ואם ע"י כנימות עש. אלא, שלצורך הדבקות בהיקפים גדולים של מאות צמחים בו זמנית, הגדלנו את: א. מערך ההדבקה של צמחי מקור (אינוקולום), ב. אוכלוסיית כנימות העש, ג. תשתיות של חדרי הגידול. משפחות המוטנטים שהונבטו במגשי חישתיל (128 שתילים במגש) הודבקו בוירוסים השונים בשלב של עלה אמיתי ראשון (כשבועיים לאחר זריעה). בכל מגש הדבקה נבחנו 8 משפחות, כאשר מכל משפחה הודבקו שמונה צמחים. לצורך השוואת הסימפטומים והערכת יעילות ההדבקה הודבקו בכל מגש שמונה צמחי בוחן רגישים מהגנוטיפ "נוי יזרעאל". הדבקת המשפחות נעשתה בהיקף של 64 משפחות למחזור. בדרך זו סרקנו כ- 1400 משפחות מוטנטים שהם כ-11,200 צמחים לעמידות לשני הווירוסים. הצמחים המודבקים גודלו במשך כחודש במגשים, לצורך מעקב אחר הופעת תסמיני המחלה. גידול הצמחים לתקופה של חודש במגשים, נעשה עם מערכת דישון והשקיה מתאימה בחממות מבודדות.

לאחר סריקה של כ- 1400 משפחות לעמידות לוירוסים CVYV ו- ZYMV אופיינו 2 משפחות המראות עמידות לוירוס ZYMV. שני צמחים מתוך שמונה של המשפחה הראו עמידות לוירוס ZYMV גם לאחר מספר הדבקות בוירוס. העמידות אופיינה בשיטות סרולוגיות של ELISA ומולקולאריות של RT-PCR. שני הצמחים העמידים מכל משפחה גודלו בתנאי חממה, נעשתה הפריה עצמית מבוקרת לקבלת פירות. נאספו זרעים M3 שגודלו למבחני עמידות. נערך ניסוי בו נבחנו צאצאי הפרות (M3) לעמידות לוירוס ZYMV, נמצא שכל השתילים צאצאי הקווים העמידים היו רגישים לוירוס ZYMV בדומה לצמחי הביקורת. לא ברור לנו כיצד צמחי ההורים המוטנטים M2 היו עמידים בעוד הצאצאים M3 הראו רגישות. אנו מניחים שהסיבה לכך היא התחמקות מהדבקה של המשפחות הללו בדור M2.

ראוי לציין, שאומנם ניסויי ההדבקה הם פשוטים יחסית, אבל זיהוי הצמחים הנגועים במגש חישתיל דורש מיומנות גבוהה בייחוד במועדי השנה השונים. לצורך זיהוי מהימן של הדבקה, הצלחנו לכייל תנאים של תאורה וטמפרטורה אופטימאליים להתפתחות סימנים של ZYMV שיאפשרו לנו לסרוק מספר רב יותר של צמחים בו זמנית. כמו כן, בעונות החורף בשל הקושי בגידול כנימות עש בהיקפים גדולים הקטנו את היקף ההדבקות בוירוס CVYV.

ברשות צוות המחקר יש קלון מוחלט של הווירוס ZYMV המבטא GFP. לצורך סריקה יעילה ומהירה יותר של הצמחים המודבקים החלטנו לבטא את הגן GFP גם בגזע אלם של הווירוס, ולהשתמש בגזע זה לצורך סריקה לעמידות של המוטנטים. הנחנו שחשיפת הצמחים לאור פלורוסנטי יקצר את זמן הסריקה של הצמחים המודבקים בוירוס ZYMV ל-5 ימים מהדבקה. ואכן נבנה קלון

של ZYMV-GFP אך הוא לא שולב בסריקת המוטנטים בשנה השלישית היות שהאמינות של השיטה לא הייתה גבוהה מזו של זיהוי תסמינים באופן ויזואלי. ראוי לציין, שצוות המחקר בנווה יער המשיך את עבודת ייצוב המשפחות ע"י הכלאות עצמיות ותצפיות על התפתחות הצמחים המוטנטים לכל אורך המחקר. לסכום: המחקר שהתבצע היה בעיקרו סריקה של משפחות של מוטנטים של מלונים לעמידות לוירוסים שונים. היות שלא הצלחנו לאתר משפחות עמידות אין למחקר המשכיות בשלב זה. חשוב לדעת, שקבוצות שונות של חוקרים בעולם ביצעו עבודות דומות בגידולים שונים, חלקם הצליחו לאתר משפחות של מוטנטים עמידות וחלקם לא הצליחו בדומה לתוצאות שלנו. היות שלא ניתן לחזות את ההצלחה מצד אחד, ומצד השני קימת חשיבות חקלאית לאיתור קווים עמידים של מלונים הרי להשקעה של כספי המדען בפרויקט היה הגיון רב.

(a) (b)



תמונה 1: משפחות מוטנטים (EMS) של מלון לפני הדבקה בוירוס (a) ושבעיים לאחר הדבקה בוירוס ZYMV (b).

ד. דיון, מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר או סיומו

המחקר עמד בהיקף הדרישות של הדבקה משפחות של מוטנטים וירוסים. לא נמצאו משפחות עם עמידות. יתכן שהגישה של סריקת מוטנטים בהיקף של אלפים בודדים הייתה בעייתית ברמה הסטטיסטית, כלומר, סיכויי מאוד נמוך לאתר משפחות עמידות. יחד אם זאת, ראוי לציין, שבמשך עשרות שנים מוסדות מחקר וחברות משקיעות כסף רב ללא הצלחה במציאת קווי מלונים עמידים לוירוסים. העובדה שמשפחות המוטנטים של מלון פותחו מכסף ציבורי היה הבסיס להצעת המחקר. היות שלא נמצאו משפחות עמידות אין למחקר המשכיות. יתכן שצריך לבחון אסטרטגיה שונה, שבה יבחנו רק משפחות של מוטנטים בהם נעשה מיפוי של המוטציה בגנים המעורבים בהתרבות הוירוס בצמח. לדוגמא אם ידוע שפגיעה בגן eIF4 משרה עמידות נגד וירוסים אולי היה צריך לסרוק נוכחות מוטציות בגן זה ורק לאחר מכן לבחון את העמידות.

ה. פרוט של הפרסומים המדעיים

לא יהיו פרסומים מדעים היות שלא הצלחנו לאתר משפחות עמידות.

3. סכום עם שאלות מנחות:

- 1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.**
מטרת המחקר הייתה לאתר קווים מוטנטים של מלון עמידים לוירוסים ע"י הדבקות של שתילים בוירוסים הנ"ל. המחקר עמד בהיקף הדרישות של הדבקה משפחות של מוטנטים וירוסים. לא נמצאו משפחות עם עמידות.
- 2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.** התבצעו הדבקות של כ- 11,000 שתיליים המיצגים כ-1400 משפחות של מוטנטים. בשלב זה לא נמצאו משפחות עמידות לוירוסים. פותח וקטור ויראלי אלם המבטא את הגן GFP לצורך סריקה יעילה יותר לעמידות של המשפחות. נמצא שהוקטור אינו מכנה יתרון לבחינה חזותית .
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשנו: הסיכוי לאתר משפחות עמידות הוא נמוך משציפינו. יתכן שהגישה של סריקת מוטנטים בהיקף של אלפים בודדים היא בעלת סיכוי מאד נמוך לאתר משפחות עמידות. היות שלא נמצאו משפחות עמידות אין למחקר המשכיות. יתכן שצריך לבחון אסטרטגיה שונה, שבה יבחנו רק משפחות של מוטנטים בהם נעשה מיפוי של המוטציה בגנים המעורבים בהתרבות הווירוס בצמח. לדוגמא אם ידוע שפגיעה בגן eIF4 משרה עמידות נגד וירוסים אולי היה צריך לסרוק נוכחות מוטציות בגן זה ורק לאחר מכן לבחון את העמידות.
- 3. בעיות שנוצרו במהלך המחקר.** מחזור הדבקה הוא ארוך מהצפוי בשל יעילות ההדבקה לא אופטימאלית מה שמחייב לחזור על ההדבקה פעמיים ולפעמים שלוש. בשל חורף קר הוקטן היקף הגידול של כנימות העש ובכך צומצם היקף ההדבקה.
- 4. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח.** אין ידע שאפשר להפיצו.
- 5. פרסום הדו"ח:** אפשר לפרסם.