

נגיף ומחלת הטריסטזה בנטיעות עצי הדר "אור" בארץ

Tristeza and Citrus tristeza virus in "Or" citrus trees

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מינהל המחקר החקלאי

מוניר מוואסי,

מינהל המחקר החקלאי

לודמילה מסלינין,

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

Ludmila Meslinin Agricultural Research Organization

תקציר

הצגת הבעיה: בשנים האחרונות אנחנו עדים להתפרצות מחלה טריסטזה בעצים של הזן "אור"/חושש. לרוב, העצים הנגועים בשלב מתקדם מתנוונים ומתמוטטים. בעצים הנראים בריאים, ניתן למצוא שני טיפוסים: עצים לא נגועים ועצים נגועים עם תבדיד לא אלים של הווירוס. מטרות המחקר: המחקר כלל שלוש מטרות (1) בחינת התנהגות התבדיד האלים והתבדיד הבלתי אלים של טריסטזה על הזן "אור" מורכב על כנות שונות של הדורים; (2) בחינת השימוש בתבדיד הבלתי אלים להגנה הדדית בפני התבדיד האלים, (3) בניית קלון אינפקטיבי של התבדיד הבלתי אלים.

שיטות העבודה:

בתור אינוקולום לתבדיד אלים או בלתי אלים של נגיף הטריסטזה שימשו לנו עץ "אור"/חושש מתמוטט ועץ לא סימפטומטי בהתאמה מפרדס בעין החורש, לאחר קביעת ואימות הרצף של התבדידים. ההדבקות נעשו בהרכבות צד.

נעשה כיוול למערכת אשר כלל אופטימיזציה של: הפקת RNA מעצים נגועים, סינתזת cDNA ארוך, הגברת מקטעי PCR ארוכים (10-20kbp), ושיבוט תוצרי PCR ארוכים לתוך הפלסמיד pCAMBIA לצורך קבלת קלונים המכילים את הגנום השלם של וירוס הטריסטזה.

תוצאות עיקריות לתקופת הדוח: נעשה ניסוי שמטרתו ללמוד על ביטוי המחלה בצירופים שונים של "אור"/כנה. למטרה זו בדקנו חמשת כנות: חושש, טרוייר, תלת עלה, C35 ומקרופילה. התוצאות של הניסוי הראו כי התבדיד הבלתי אלים לא גרם לסימפטומים או התמוטטות בשתילים המודבקים למעט בשתיל אחד של הצירוף "אור"/מקרופילה שלדעתנו ההתמוטטות נגרמה בגלל סיבה אחרת שונה מהווירוס. לעומת זאת, השתילים המודבקים בתבדיד האלים נראתה התמוטטות בצירופים

של "אור" על הכנות הרגישות לטריסטזה חושש ומקרופילה. בצירופים עם טרוויר, C35 ותלת עלה השתילים לא התמוטטו.

נעשו ניסויים לבחון השימוש בתבדיד הבלתי אלים ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלים, קרי הגנה הדדית (cross protection). בניסוי שדה בעין ורד, כול העצים נראו כבריאים ללא תסמיני מחלה, למעט 7-8 עצים אשר הראו סימני כלורוזה. העצים האלו נבדקו והתבדיד שהתגלה בהם היה הבלתי אלים חלקת הניסוי הזו הניבה יכול יפה בכול השנים שהגיע לפעמים ל- 7 טון לדונם. במכון וולקני, העמדנו ניסוי שכלל שתילים של הצירופים: "אור"/חושש, "אור"/טרוויר, ו-"אור"/C35. השתילים הודבקו בתבדיד הבלתי אלים (protecting isolate) ע"י הרכבות צד. בוצעו בדיקות של PCR ו-ELISA וריצוף מקטעי גנום שאימתו את ההדבקות בתבדיד הווירוס המקורי. נעשו הדבקות הצמחים האלו בתבדיד האלים (challenge isolate). נעשו בדיקות PCR וריצוף לאימות ההדבקה ב challenge isolate. לפי התוצאות מרבית הצמחים אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלים (מתון) והדבקה שנייה בתבדיד האלים נתנו רצף דומה לרצף התבדיד הבלתי אלים. כול הצמחים האלו לא הראו תסמיני מחלה או התמוטטות. ניתן היה להסיק כי התבדיד הבלתי אלים לא אפשר לתבדיד האלים להתרבות בצמח. מסקנה זו היא נכונה בשלושת הצירופים של זן/כנה שנבדקו.

בניית קלון אינפקטיבי: המשכנו בבניית ושיבוט הגנום השלם של התבדיד האלים ושל התבדיד הבלתי אלים בתוך pCAMBIA תחת בקרת הפרומוטור CaMV 35S. לפי התוצאות ברשותינו קלון אינפקטיבי של התבדיד האלים, אם כי יעילות ההדבקה שלו היא עדיין נמוכה ומחייבת המשך מחקר ושיפור.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: מסקנות עיקריות: יש לנו עדויות המראות כי התבדיד הבלתי אלים יכול לשמש ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלים. ניתן להסיק כי התבדיד הבלתי אלים אינו גורם להתפתחות סימפטומים של התמוטטות של אור/חושש או אור/כנה אחרת. אין להסיק כי ניתן לעבור לשלב יישום בשדה מכיוון שדרוש ניסויי שדה לאימות הממצא..

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. פרופ' בני רקח
2. דר שרה שפיגל
3. פרופ' יוסי ריזב

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.



גוף דו"ח

מבוא והצגת הבעיה:

בשנים האחרונות חלה עלייה דרסטית בנטיעות פרדסים בארץ. היום, נטועים כ- 200,000 דונם מכל הסוגים והמינים. לאחרונה ניטע מגוון גדול של זנים, 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 החושחש, המצטיינת ככנה המקנה עמידות בפני מחלות קריפטוגניות ומותאמת לתנאי קרקע קשים. מאידך, כנת החושחש ידועה להיותה רגישה בפני נגיף הטריסטזה, וזנים המורכבים על כנה זו עלולים להיפגע קשה בגלל המחלה (Bar-Joseph et al., 1979). ובכן, לאחרונה אנחנו עדים להתפרצות מחלה, הפוגעת בעצים של הזן "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.

בדיקות מעבדתיות שעשינו, הראו שבעצים הסימפטומטיים ניתן לגלות את וירוס הטריסטזה של ההדר *Citrus tristeza virus* (CTV), וירוס המוכר מזה שנים רבות בפרדסנות בעולם כולל בארץ (Bar-Joseph & Dawson, 2008, Moreno et al., 2008). וירוס ה- CTV מעורב בכמה סוגי מחלות הדרים 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 החושחש ועל כנת המקרופילה (Bar-Joseph et al., 1979; Brilansky et al., 2002). הנגיף, המועבר בין עצים ע"י כנימות עלה, שייך למשפחת ה- *Closteroviridae* ונחשב לבעל הגנום הגדול ביותר מבין הווירוסים הצמחיים המוכרים (Bar-Joseph et al., 1979; Dolja et al., 2006).

לעומת הגילוי של נגיף ה- CTV בעצי "אור" סימפטומטיים, העצים הנראים בריאים היו שני טיפוסים: עצים "בריאים" שלא התגלה בהם וירוס ה- CTV ועצים "בריאים" שכן התגלה בהם וירוס ה- CTV. לאחר אפיון מקטעי רצף של הווירוס מצאנו כי התבדיל הנמצא בעצים הסימפטומטיים (להלן נקרא לו תבדיל אלום) היה שונה במעט מהתבדיל הנמצא בעצים "הבריאים" (להלן נקרא לו התבדיל המתון או הבלתי אלום). הממצא החשוב שלנו היה שבהשוואות הרצפים בתוצר הגן 33p המעורב בתופעת ההגנה ההדדית *cross protection* (Folimonova 2013), מצאנו כי התבדיל הבלתי אלום היה ניבדל בשתי חומצות אמינו מזה של התבדיל האלום. למרות שטרם הוכחנו ששתי חומצות האמינו האלו אומנם מעורבות בהגנה הדדית, היה ברור לנו כי בעצי "אור" קיימים שני תבדידים של וירוס ה- CTV: אחד אלום ואחר מתון השונים בינם אפילו במעט ברצף הגנום. במסגרת המחקר הזה הצענו לעסוק באפיון התבדיל המתון והתבדיל האלום. הצענו לבחון את השימוש בתבדיל המתון לצורך הגנה הדדית (*cross protection*) של "אור" על כנות הדרים שונות. בנוסף, ולאחר שבעבודה הקדמית אנחנו הצלחנו לקבוע את הרצף השלם של התבדיל הבלתי אלום ולשבט את

מלוא הגנום שלו בארבעה פלסמידים, במחקר הזה הצענו להתחיל בבניית קלון אינפקטיבי של תבדיד ה-CTV הבלתי אליים.

הנחת היסוד שלנו היא שתבדיד מתון או בלתי אליים של וירוס ה-CTV יכול להקנות הגנה הדדית של עצי "אור" בפני הדבקה בתבדידים אלימים, והדבר תלוי בשילוב זן/כנה. הנושא של הגנה הדדית, במיוחד נגד וירוס ה-CTV בהדרים, מוכר היטב בעולם (Costa & Broadbent et al., 1991; Muller, 1980; de Graca & van Vuuren, 2010). בעולם ישנן מדינות, למשל בדרום אפריקה, אשר בהן יישום הגנה הדדית בהדרים הוא חובה ונעשה במשתלות טרם נטיעת השתילים בפרדסים. חשוב לציין שהתבדידים הנבחרים לצורך הגנה הדדית מתאימים רק למקומות ספציפיים ואינם מתאימים לכלל הארצות המגדלות הדרים (Broadbent et al., 1991; Costa & Muller, 1980;).

מטרות המחקר:

המחקר שלנו כלל שלוש מטרות עיקריות:

1) בחינת התנהגות התבדיד האליים והתבדיד הבלתי אליים של CTV על הזן "אור" מורכב על כנות שונות של הדרים;

2) בחינת השימוש בתבדיד הבלתי אליים להגנה הדדית בפני התבדיד האליים;

3) בניית קלון אינפקטיבי של התבדיד הבלתי אליים.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

להלן סיכום הממצאים שהושגו בכול שנות המחקר:

בחינת התנהגות התבדיד האליים והתבדיד הבלתי אליים של CTV על הזן "אור" מורכב על כנות שונות של הדרים:

בחלק זה, הצענו לבצע ניסויים אשר מטרתם ללמוד על ביטוי המחלה בצירופים שונים של "אור"/כנה. למטרה זו בדקנו חמשת כנות: חושש, טרוייר, תלת עלה, C35 ומקרופילה. ממשלת מוטשן נרכשו שתילים של "אור" מורכב על הכנות האלה. מכל צירוף נרכשו 50 שתילים (ס"ה 250 שתילים). השתילים הודבקו בתבדיד האליים או התבדיד הלא אליים של ה-CTV ע"י הרכבות צד. כול שתיל הודבק ע"י שתי הרכבות צד כאלה. מכול צירוף: 20 שתילים הודבקו בגזע האליים, 20 שתילים יודבקו בגזע הבלתי אליים. 10 שתילים השארנו ללא הדבקה ושימשו כביקורת. הניסויים התבצעו בבתי רשת הנמצאים במחלקה לפתולוגיה-במינהל המחקר החקלאי. בזמן הניסוי, טופלו השתילים בריסוסים נגד כנימות עלה, וקונפידור נגד קמחיות.

אימות ההדבקה של הצמחים המורכבים נעשה ע"י בדיקות ELISA ו-PCR.

בדיקות ה-ELISA נעשו תוך כדי השימוש בנוגדנים פוליקלונליים ספציפיים לנגיף הטריסטזה אשר נרכשו מחברת BIOREBA. הצמחים המודבקים נדגמו חודשיים לאחר ההדבקה ועלים צעירים מגידול טרי נלקחו לבדיקה לאחר כתישה בבופר PBS. הנוגדן נמהל לריגוז סופי של 1:1000 והמשך האיבחון נעשה לפי הפרוטוקול וההוראות של היצרן.

בנוסף לבדיקת ה-ELISA, אומתה ההדבקה של הצמחים בנגיף הטריסטזה על ידי PCR. ראציות ה-RT וה-PCR נעשו לפי הוראות היצרן של האנזימים (). הפריימרים אשר שימשו ל-PCR היו ספציפיים למקטע מגן חלבון המעטפת של הנגיף:

CPVTF2 5'-GGA AAC GAA AGA AGG CGA C-3'

CPVTR2 5'-TGG TAA CTA CGA CTT CAT C-3'

אימות הרצף של התבדוד (אליים/בלתי אליים) אומתה ע"י ריצוף מקטע בגודל כ 300 בסיסים מהגן p33 של הווירוס. הפריימרים אשר שימשו ל-PCR היו:

VT_P33_poly_F 5'- TTA GTG GTG ACG TCG CTA-3'

VT_p33_poly_R 5'- CTT CAA TCG TGC GAC TTT G-3'

במהלך המחקר עקבנו אחר הביטוי של תסמיני המחלה בצמחים המורכבים.

צירוף (אור/כנה)	מודבק בתבדוד אליים		מודבק בתבדוד לא אליים		ביקורת לא מודבק
	סימפטומטי	לא סימפטומטי	סימפטומטי	לא סימפטומטי	לא סימפטומטי
שתילים לכול צירוף	20		20		10
חושחש	19	1	0	20	10
טרוייר	0	20	0	20	10
תלת עלה	0	20	0	20	10
C35	3	17	0	20	10
מקרופילה	18	2	1	19	9

התוצאות של הניסוי המוצגות בטבלה למעלה הראו בבירור כי התבדוד הבלתי אליים לא גרם לסימפטומים או התמוטטות בשתילים המודבקים למעט בשתיל אחד של הצירוף "אור"/מקרופילה שלדעתנו ההתמוטטות נגרמה בגלל סיבה אחרת שונה מהווירוס. נציין כי בביקורות היה לנו שתיל שהתמוטט למרות שלא הודבק בווירוס. לעומת זאת, השתילים המודבקים בתבדוד האליים נראתה התמוטטות בצירופים של "אור" על הכנות הרגישות לטריסטזה חושחש ומקרופילה. הטרוייר, C35 ותלת עלה הן כנות עמידות/סבילות והשתילים שהתמוטטו היו מעט. נציין כי בשטח אנחנו היינו עדים כול הזמן בפרדסים עם חלקות טרוייר/חושחש לעצים הנראים יפים בריאים אף על פי זאת כאשר בדקנו אותם מצאנו כי עצים אלו היו נגועים בטריסטזה הגסע האליים.



צילום של שתיל של אור/חושחש המראה תסמינים של התמוטטות (התייבשות ענפים). השתיל נבדק ב- ELISA וגם ב- PCR לגן P33 ונמצא נגוע בטריסטזה גזע אלים.



צילום של שתיל של אור/חושחש שאינו מראה תסמינים של מחלה. אף על פי זאת השתיל נבדק ב- ELISA וגם ב- PCR לגן P33 ונמצא נגוע בטריסטזה גזע לא אלים.

בחינת השימוש בתבדיד הבלתי אלים להגנה הדדית בפני התבדיד האלים:

למטרה זו העמדנו שני ניסויים: אחד בשטח בניסוי שדה בפרדס של כ 5 דונם בו ניטעו עצי אור/חושחש. הפרדס והנטיעות נעשו ע"י משתלת אורי מוטשן בעין ורד. הניסוי השני נעשה בתנאי מעבדה בבית רשת במינהל המחקר החקלאי.

בניסוי בשטח בעין ורד, בתור מקור לתבדיד הווירוס הבלתי אלים, נבחר עץ של אור/חושחש מפרדס בעין החורש נטיעות 2005. העץ נבדק לנוכחות הווירוס והדבקה בתבדיד בלתי אלים של הווירוס אומתה ע"י קביעת רצף של הגן p33 המעורב כנראה בהגנה הדדית.

בחלקת הניסוי נעשו הדבקות של העצים אור/חושחש בתבדיד הבלתי אלים ע"י הדבקות צד. נעשה מעקב אחר הצלחות בקליטת ההרכבות. העצים אשר בהם לא נקלטה ההרכבה, לא נכללו בניסוי. במהלך כול שנות המחקר נאסף חומר צמחי מהעצים המורכבים לצורך בדיקת הדבקה בווירוס הטריסטזה. אימות ההדבקה נעשתה ב ELISA ו- PCR עם הנוגדנים והפריימרים אשר ציינו בחלק המחקר למעלה.

החומר הצמחי שימש להפקות RNA כללי. נעשתה סינתזה של cDNA באמצעות קיטים מסחריים תוך כדי השימוש בתחלים ספציפיים לוורוס. לאחר מכן בוצעו ראקציות הגברה PCR של מקטע מתוך הגן p33 של הווירוס. תוצרי ה- PCR בודדו והרצף שלהם נקבע ע"י חברה מסחרית. האנליזה של הרצף נעשתה בתוכנת BioEdit.

התוצאות שהתקבלו הראו כי ההרכבות נקלטו במעל 80% מהעצים.

כול העצים אשר בהם ההרכבה נקלטה היו נגועים בווירוס הטריסטזה.

האנליזה של רצף תוצרי ה PCR הראו כי רצף הגן p33 של התבדיד הנמצא בעצים המודבקים בהרכבה היה זהה לזה של התבדיד המקור הבלתי אלים. היות והניסוי מבוצע בחלקה בפרדס השייכת למשתלת מוטשין, התבקשנו לא לבצע הדבקות מכווניות בגזע הטריסטזה האלים. ההנחה שלנו היא שהדבקה בגזע האלים, באם תתרחש, היא תבוצע באמצעות כנימות העלה המעבירות את הווירוס בפרדסים.

במעקב אחר הופעת תסמיני התמוטטות בחלקת הניסוי, כול העצים נראו כבריאים ללא תסמיני מחלה, למעט 7-8 עצים אשר הראו סימני כלורזה. העצים האלו נבדקו והתבדיד שהתגלה בהם היה הבלתי אלים וסביר להניח כי סיבת הכלורזה אולי בגורם ביוטי או אביוטי לא ידוע. חשוב לציין כי חלקת הניסוי הזו הניבה יכול יפה בכול השנים שהגיע לפעמים ל- 7 טון לדונם.



צילום של חלקת הניסוי בשטח בעין ורד. עצים של אור/חושש אשר הודבקו במכוון בתבדיל טריסטזה לא אלים. העצים נבדקו ב ELISA וגם ב- PCR לגן P33 ונמצא נגוע בטריסטזה גזע בלתי אלים.

בניסוי השני אשר נעשה בתנאי מעבדה בבית רשת במינהל המחקר החקלאי נבחרו שלושה עצים נגועים ב- CTV ומתמוטטים כמקור לאינוקולום של גזע אלים (אינוקולום 1-3), ושלושה עצים נגועים ב- CTV אך ללא סימפטומים של מחלה אשר שימשו לנו כמקור אינוקולום לגזע מתון/בלתי אלים (אינוקולום 4-6). עצים כאלה קיימים בפרדס בעין החורש וסומנו בהתאם לאחר שכבר ביצענו בהם אנליזה ואימתנו שהם מודבקים רק בנגיף ה- CTV ווידאנו שאינם מודבקים בוורוסים נוספים של הדורים. בנוסף עשינו אנליזת רצף ווידאנו את ההבדלים בגן p33 בין הגזע האלים והגזע המתון. כול אינוקולום (להלן יקרא protecting virus) הודבק ע"י הרכבת צד ל- 60 שתילים של הדורים: 20 שתיל של צירוף "אור"/חושש, 20 שתיל של צירוף "אור"/טרוויר, ו- 20 שתיל של צירוף "אור"/C35. הניסויים בוצעו בבתי רשת ובחדרי הגידול הנמצאים במחלקה לפתולוגיה-במינהל המחקר החקלאי. אימות ההדבקה של הצמחים המורכבים ואימות הפיזור של protecting virus בכול חלקי השתיל בוצעו באמצעים של ELISA ו/או PCR. במהלך המחקר, עקבנו אחר הביטוי של תסמיני המחלה בצמחים המורכבים. כעבור 6-8 חודשים מההדבקה, נעשו בדיקות PCR וקביעת רצף ואימתנו את ההדבקה ב- protecting virus. נציין כי לא נראו תסמיני מחלה בצמחים המודבקים וגם לא בצמחי הביקורת הלא מודבקים.

כעבור בערך שנה מההדבקה ב- protecting virus, נעשו ההדבקות בגזע אלים (challenge virus) על 15 שתילים מכול צירוף של "אור"/כנה; חמשה שתילים לא הודבקו ב- challenge virus

ושימשו לצורך ביקורת. במהלך המחקר נעשו בדיקות PCR וקביעת רצף לאימות ההדבקה ב-challenge virus. נעשה מעקב אחר הביטוי של תסמיני המחלה בצמחים המודבקים.

כעבור 6-8 חודשים מההדבקות, בוצעו בדיקות של PCR וקביעות רצף של תוצרי ה-PCR בכדי לקבוע ת סוג התבדיד העיקרי הקיים בצמח. סיכום התוצאות מובא בטבלה:

צירוף		מספר הצמחים עם הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלי	דמיון רצף תוצר ה-PCR
"אור"/חושש	challenging בתבדיד אלי	15	12 בלתי אלי 3 אלי
	ללא challenging	5	5 בלתי אלי
"אור"/טרור	challenging בתבדיד אלי	15	11 בלתי אלי 4 אלי
	ללא challenging	5	5 בלתי אלי
"אור"/35C	challenging בתבדיד אלי	15	12 בלתי אלי 3 אלי
	ללא challenging	5	5 בלתי אלי

לפי התוצאות המוצגות בטבלה רואים כי מרבית הצמחים (12-11 צמחים מתוך 15) אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלי (מתון) והדבקה שנייה בתבדיד האלי נתנו רצף של תוצר PCR דומה לרצף התבדיד הבלתי אלי. הצמחים שלא הודבקו הדבקה שנייה (challenging) נמצא בהם רצף של התבדיד המתון. כול הצמחים האלו לא הראו תסמיני מחלה או התמוטטות. מכאן ניתן

היה להסיק כי התבדיד הבלתי אלים לא אפשר לתבדיד האלים להתרבות בצמח. מסקנה זו היא נכונה בשלושת הצירופים של זן/כנה שנבדקו.



צילום של שתיל אור/חושחש שעבר הדבקה ראשונה בתבדיד בלתי אלים והדבקה שניה בתבדיד אלים. השתיל נראה ללא תסמיני מחלה למרות שבדיקות ה-PCR הראו שהוא נגוע בתבדיד הבלתי אלים.

בהמשך נעשה ניסוי שמטרתו לבדוק באם הגזע המתון/הבלתי אלים יהיה אלים בזנים אחרים של הדורים. בשנת המחקר השנייה ביצענו הדבקות צד עם הגזע המתון/הבלתי אלים לצירופים של וולנסיה/חושחש ואשכולית לבנה/חושחש. הכנו 20 שתילים מכול צירוף אשר הודבקו הדבקות צד עם הגזע המתון. נעשו בדיקות ELISA ו-PCR לאימות ההדבקה. כול 40 הצמחים היו חיביים ב-ELISA עם רכים יותר מ-1.5 והיו חיביים גם ב-PCR כאשר נבדקו עם הפריימרים לחלבון המעטפת של הוירוס. בהמשך, נעשה גם PCR לגן P33 וקביעת רצף לאימות ההדבקה בגזע הבלתי אלים. במהלך כול תקופת המחקר עקבנו אחר הביטוי של תסמיני המחלה בצמחים המודבקים אך לא נצפו כול תסמינים אלימים המעידים על התמוטטות. מאידך היו בין 5-7 שתילים של וולנסיה/חושחש אשר בראו כלורזה שלדעתנו נגרמה בשל סיבה פיסיולוגיה לא ידועה.



צילום של שתילי אשכולית לבנה/חושחש אשר הודבקו במכוון בתבדיד טריסטזה לא אלים. העצים נבדקו ב ELISA וגם ב- PCR לגן P33 ונמצא נגוע בטריסטזה גזע בלתי אלים.

בניית קלון אינפקטיבי של התבדיד הבלתי אלים:

פלסמיד המייצר וירוס סינטטי מדבק נקרא קלון אינפקטיבי. 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- CTV 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; 2000). היום, בפלורידה ובברזיל עוסקים בפיתוח הקלון האינפקטיבי של CTV-T36 ככלי העשוי לשמש למטרת דיכוי הגורם של מחלת הגרינינג בהדרים. לאור זה, ראינו כי מן החשוב, שהתבדיד הקיים אצלנו בארץ ישובט גם הוא כקלון אינפקטיבי.

במהלך השנה הראשונה של המחקר עסקנו ברצוף הגנום השלם של שני התבדידים האלים והמתון של נגיף הטריסטזה אשר בודדו מעצים סימפטומטיים ולא סימפטומטיים בהתאמה. לאחר קביעת הרצף השלם (יותר מ- 19200 בסיסים) עשינו השוואות רצפים עם רצפים של גזעים הקיימים במאגר הגנים GENBANK. 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. המסקנה היא שבעצי "אור" קיימים תבדידים שונים של אותו הגזע VT ולא גזעים שונים של הווירוס.

על מנת לשבט את הגנום השלם של הווירוס ולבנות אותו בתור קלון אינפקטיבי היה צורך בכיול 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 לצורך קבלת קלונים המכילים את הגנום השלם של וירוס הטריסטזה. נכון להיום, הצלחנו לבנות קלונים על בסיס פלסמיד ה-pCambia המכילים את הגנום השלם של שני התבדידים האלים והמתון. בשנת המחקר השנייה התחלנו לבצע ניסויים שמטרתם לבחון באם הקלונים שנבנו הם אינפקטיביים. בעזרת הבדיקות המולקולריות והסירולוגיות נמצאו רק שלושה צמחים חיוביים, כך שהמסקנה שלנו הייתה כי הקלונים הם אינפקטיביים אם כי יעילות ההדבקה שלהם היא מאוד נמוכה.

אחת הסיבות האפשריות ליעילות הדבקה נמוכה היא שרצף הווירוס המשובט בקלון שנבנה מכיל תוספת של כ-20 בסיסים בקצה ה-3' של הגנום. לאור זה בשנת המחקר השלישית נעשו הרבה עבודות על מנת להוריד את תוספת הבסיסים מקצה ה-3' של הגנום ולשבט במקומם רצף של Ribozyme וטרימינטור היכולים להביא לחיתוך ה-RNA לאחר הטרינסקריפציה בצמח ולקבלת האורך השלם המדויק של גנום הווירוס ללא כול תוספות של בסיסים. השינויים במבנה הקלון נעשו הן לגבי הקלון האינפקטיבי של תבדיד הווירוס האלים והן של התבדיד הבלתי אלים. ביצוע השינויים האלו צרך הרבה עבודה ונמשך זמן ממושך. במהלך השנה השלישית הצלחנו לקבל קלונים של התבדיד האלים והבלתי אלים המבטאים את גנום הווירוס ללא כול תוספת בסיסים בקצה ה-3'.

על מנת לבדוק את האינפקטיביות של הקלונים המשופרים, נעשו ניסויים של הדבקות שתילי מקרופילה בחיידקי אגרובקטריום המכילים פלסמיד ה-pCambia המבטא את גנום הווירוס השלם. בסך הכול הודבקו 70 שתילי מקרופילה בקלון שמקורו בתבדיד האלים ועוד 70 בקלון שמקורו בתבדיד הבלתי אלים. לאחר חודשיים מההדבקות 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 נכון להיום, יש לנו קלון אינפקטיבי של התבדיד האלים, אם כי יעילות ההדבקה שלו היא עדיין נמוכה ומחייבת המשך מחקר ושיפור.

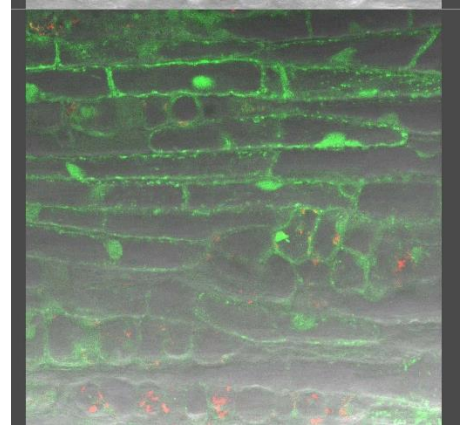
דין:

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. במסגרת המחקר שלנו הוצע ללמוד על התופעה ולבודד תבדידים או לפתח כלים אשר יכולים לשמש לחיסון צמחים בפני הדבקות בווירוס האלים. התבדיד אשר בודד מעץ נגוע אך לא סימפטומטי מאזור עין חורש נכון להיום עשוי להיות מבטיח כי העצים המודבקים טרם פיתחו תסמיני מחלה ולא זוהה עם כלשהו מתמוטט עם התבדיד האלים. חשוב כאן לציין כי הגזע הבלתי אלים אשר בודד מהעץ אור/חושש מעין החורש נבדק על הצירוף אשכולית לבנה/חושש ונמצא בלתי אלים לצירוף זה. זה להבדיל מהגזעים הבלתי אלימים אשר בודדו בעבודות קודמות בארץ ואשר מאוחר יותר התברר שהיו אלימים לצירוף של אשכולית לבנה/חושש.

חשוב לציין כי במעבדות שונות בעולם עובדים כול הזמן אחרי חיפוש ואיפיון גזעים או תבדידים בלתי אלימים של נגיף הטריסטזה במטרה להשתמש בהם לחיסון צמחים נגד גזעים אלימים, קרי הגנה הדדית. גזעים בלתי אלימים דווחו לאחרונה בעבודות בקליפורניה, איטליה ודרום אפריקה. אפיון הגזעים האלו נעשה לרוב לפי תגובת הגזע או התבדיד לנוגדן MCA13 (לפי עבודות קודמות של פרופ' משה בר יוסף נוגדן זה אינו מזהה גזעים ישאליים בלתי אלימים). למרות אפיונם של גזעים בלתי אלימים שונים בעולם, טרם פורסמו תוצאות של ניסויים או עבודות של הגנה הדדית.

במחקר שלנו הצלחנו לשבט את הגנום השלם של התבדיד האלים ושל התבדיד הבלתי אלים לתוך פלסמיד בינארי. הקלון של התבדיד האלים היה אינפקטיביים אם כי ביעילות נמוכה (3%). הוכנסו שינויים גנטיים בגנום הווירוס המשובט, האמורים לייצר גנום וירוס שלם ללא תוספות של בסיסים בקצה ה'3'. אך גם קלונים אלו הראו אינפקטיביות נמוכה. למרות היעילות הנמוכה של הקלון האינפקטיבי, למעבדה שלנו יש ברשותה קלון אינפקטיבי של הגזע VT. קלון זה נחשב לכלי ביוטכנולוגי בעלי פוטנציאל אדיר לחקר ביטוי מחלת הטריסטזה לרבות תופעת ההגנה ההדדית.

אחת הסיבות שאנחנו מייחסים לאחוז הדבקה נמוך הוא אולי שיטת הטרנספורמציה. עד כה השתמשנו בשיטה המבוססת על השימוש בחיידקי אגרובקטריום אשר הכילו את הפלסמיד הרקומבננטי. לפי שיטה זו, טבלנו שורשים חשופים של שתחלי ההדרים בתמיסה אשר הכילה את החיידק האגרובקטריום למשך לילה שלם. ולאחר מכן נעשו שטיפות של השורשים והעברת השתילים לעציצים עם אדמת טוף. בוסף אותם שתילים הודבקו 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. המכשיר נרכש לקראת סוף המחקר ותוכנית המחקר שהוגשה לא כללה שימוש במכשיר זה. אף על פי זאת אנחנו התחלנו לכייל את מכשיר האקדח גנים ולפתח פרוטוקול יעיל לטרנספורמציה של הדרים עם פלסמידים רקומבננים. בנוסויים ראשוניים השתמשנו בפלסמיד רקומבננטי המכיל את הגן המדווח GFP. לאחר כמה ניסויות הצלחנו לכייל פרוטוקול המביא לביטוי מאו יעיל ברקמת השיפה של ה GFP. למרות שמחקר זה תם, אנחנו נמשיך עם הניסיונות שלנו, תוך כדי השימוש באקדח הגנים החדש, על מנת לבצע טרנספורמציה של שתילי הדרים בקלונים האינפקטיביים של הטריסטזה אשר בנינו.



צילום במיקרוסקופ קונפוקאלי של רקמת שיפה של גבעול הדורים (אור/חושש) שעבר טרנספורמציה עם פלסמיד רקומבננטי המכיל את הגן ל GFP בעזרת אקדח גנים.

ביבליוגרפיה:

1. 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. van Regenmortel (Amsterdam: Elsevier Ltd), 161–184.
2. 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.
3. Brulansky, 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.
4. 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. Brulansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (Riverside, CA: IOCV), 64–70.
5. Costa, A.S., and Müller, G.W. (1980). Tristeza control by cross-protection; a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis.* 64, 538–541.
6. da Graça, J.V., and van Vuuren, S. P. (2010). "Managing Citrus tristeza virus losses using cross protection," in Citrus Tristeza Virus Complex and Tristeza Diseases, eds A.V. Karasev, and M.E. Hilf (Eagan: APS Press), 247–260.
7. Dolja, V.V., Kreuze, J.F., and Valkonen, J.P. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* 117, 38–51.
8. 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.
9. Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, 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.
10. Satyanarayana, T., Gowda, S., Boyko, V. P., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., et al. (1999). An engineered closterovirus RNA replicons and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7433–7438.
11. Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, M. A., Robertson, C., et al. (2000). Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in

addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. Virology 278, 253–265.

סיכום עם שאלות מנחות

אנא פרט מהם הניסויים שנעשו תוך השוואה לתכנית העבודה המתוכננת והתאמתם למטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעה המקיפה 1. בחינת התנהגות הגזע האלים והגזע הבלתי אלים של CTV על הזן "אור" מורכב על כנות שונות של הדורים 2. בחינת ביטוי המחלה בשילובים שונים של הזן אור וכנות הדורים שונות. 3. בניית קלון אינפקטיבי של וירוס הטריסטזה	מהם עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח? עיקרי הניסויים והתוצאות לכול תקופת המחקר: נעשה ניסוי שמטרתו ללמוד על ביטוי המחלה בצירופים שונים של "אור"/כנה. למטרה זו בדקנו חמשת כנות: חושש, טרויר, תלת עלה, C35 ומקרופילה. התוצאות של הניסוי הראו כי התבדיד הבלתי אלים לא גרם לסימפטומים או התמוטטות בשתילים המודבקים למעט בשתיל אחד של הצירוף "אור"/מקרופילה שלדעתנו ההתמוטטות נגרמה בגלל סיבה אחרת שונה מהווירוס. לעומת זאת, השתילים המודבקים בתבדיד האלים נראתה התמוטטות בצירופים של "אור" הכנות הרגישות לטריסטזה חושש ומקרופילה. בצירופים עם טרויר, C35 ותלת עלה השתילים לא התמוטטו. נעשו ניסויים לבחון השימוש בתבדיד הבלתי אלים ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלים, קרי הגנה הדדית (protection). בניסוי שדה בעין ורד, כול העצים נראו כבריאים ללא תסמיני מחלה, למעט 7-8 עצים אשר הראו סימני כלורזה. העצים האלו נבדקו והתבדיד שהתגלה בהם היה הבלתי אלים חלקת הניסוי הזו הניבה יכול יפה בכול השנים שהגיע לפעמים ל- 7 לדונם. במכון וולקני, העמדנו ניסוי שכלל שתילים של הצירופים: "אור"/חושש, "אור"/טרויר, ו- "אור"/C35. השתילים הודב בתבדיד הבלתי אלים (protecting isolate) ע"י הרכבות צד. בוצעו בדיקות של PCR ו- ELISA וריצוף מקטעי גנום שאימתו את ההדבקות בתבדיד הווירוס המקורי. נעשו הדבקות הצמחים האלו בתבדיד האלים (challenge isolate). נעשו בדיקות PCR וריצוף לאימות ההדבקה ב challenge isolate. לפי התוצאות מרבית הצמחים אשר הודבקו הדבקה ראשונה בתבדיד הבלתי אלים (מת והדבקה שנייה בתבדיד האלים נתנו רצף דומה לרצף התבדיד הבלתי אלים. כול הצמחים האלו לא הראו תסמיני מחלה התמוטטות. ניתן היה להסיק כי התבדיד הבלתי אלים לא אפשר לתבדיד האלים להתרבות בצמח. מסקנה זו היא נכונה בשליל הצירופים של זן/כנה שנבדקו. בניית קלון אינפקטיבי: המשכנו בבניית ושיבוט הגנום השלם של התבדיד האלים ושל התבדיד הבלתי אלים בתוך pCambia תוך בקרת הפרומוטור CaMV 35S. לפי התוצאות ברשותינו קלון אינפקטיבי של התבדיד האלים, אם כי יעילות ההדבקה שלו היא עד נמוכה ומחייבת המשך מחקר ושיפור.
בעקבות הניסויים שנעשו, אנא פרט והסבר כיצד הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח או חלק מהן המחקר עסק בשלוש מטרות: (1) בחינת התנהגות הגזע האלים והגזע הבלתי אלים של CTV על הזן "אור" מורכב על כנות שונות (הדורים; 2) בחינת השימוש בגזע הבלתי אלים להגנה הדדית בפני הגזע האלים, (3) בניית קלון אינפקטיבי של הגזע הבלתי אלים כול המטרות של המחקר הושגו.	בהתאם להצעה המקיפה, ציין מה התבצע מתוך טבלת המשימות ואבני דרך, כולל אבני דרך כמותיות (סעיפים IV-VI ומהם הקריטריונים שפורטו בהצעה המקיפה כבוחן להצלחת המחקר אכן הושגו מטרות המחקר הושגו כולם, המחקר הושלם אם כי ממשיכים בניסויים לשפר את הטרנספורמציה בעזרת האקדח גנים שנרכש לאחרונה.
מהן המסקנות המדעיות ומהן ההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו בעתיד?	

מסקנות עיקריות: יש לנו עדויות המראות כי התבדיד הבלתי אלים יכול לשמש ל"חיסון" צמחים בריאים בפני הדבקה בתבדיד האלי ניתן להסיק כי התבדיד הבלתי אלים אינו גורם להתפתחות סימפטומים של התמוטטות של אור/חושש או אור/כנה אחרת. להסיק כי ניתן לעבור לשלב יישום בשדה מכיוון שדרוש ניסויי שדה לאימות הממצא.
מהן הבעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ומה אמורה להיות ההתייחסות בהמשך שיפור שיטת הטרנספורמציה. האקדח גנים שנרכש למעבדה יש פוטנציאל עצום וצפוי לתת תשובה לבעיה.
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. אין
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

