

דוח מסכם לתוכנית מחקר מספר 136-0535-07

**גישה חדשה לדיכוי מחלת הצהבון בגפן ע"י ביטוי נוגדנים ספציפיים
לפיטופלסמה**

**A new approach for controlling of phytoplasmal diseases in
grapevine using viral vectors expressing specific antibodies**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות, ולמועצה לגפן היין

ע"י

המחלקה לפתולוגיה וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי

מוניר מואסי

המחלקה לפתולוגיה וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי

עבד גרה

שה"מ

תרצה זהבי

Munir Mawassi, The Department of Plant Pathology and Weed Control, Bet-Dagan.

P.O.B. 6 Bet-Dagan. Email: mawassi@volcani.agri.gov.il

Abed Gera, The Department of Plant Pathology and Weed Control, Bet-Dagan.

P.O.B. 6 Bet-Dagan. Email: abedgera@volcani.agri.gov.il

Tirtza Zahavi Ministry of Agriculture & Rural Development. Email: tirtzaz@yahoo.com

אפריל 2008

ניסן תשס"ח

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

*** חתימת החוקר**

רשימת פרסומים:

תומר גרשון, עבד גרה, תירצה זהבי, עירן הרכבי, **מוניר מוואסי**. פיתוח מערכת PCR לגילוי ספיציפי של פיטופלסמה מקבוצת ה-Stolbur. עלון הנוטע, 2007 יוני, 15-18.

תומר גרשון, עבד גרה, שרה שפיגל, **מוניר מוואסי**. פיטופלסמה בצמחי וינקה : I- שימוש בשיטת Real-Time PCR לכימות הפתוגן ואפיון הנגיעות. עולם הפרח, 2007 אפריל-מאי 54-56.

תומר גרשון, עבד גרה, שרה שפיגל, **מוניר מוואסי**. פיטופלסמה בצמחי וינקה : II- אפיון פיזור חלקיקי פיטופלסמה בצמחי וינקה בעזרת שיטת Real-Time PCR. עולם הפרח, 2007 יולי-אוגוסט 48-50.

תומר גרשון, עבד גרה, שרה שפיגל, **מוניר מוואסי**. פיטופלסמה בצמחי וינקה : III- השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות הפיטופלסמה בצמח. עולם הפרח, 2008 דצמבר-ינואר, 46-49.

תקציר

הצגת הבעיה

פיטופלסמות הם חיידקים חסרי דופן הגורמים למחלות הצהבון ולנזקים כלכליים כבדים במינים רבים של עצי פרי, ירקות ופרחים. כיום אין פתרון יעיל למחלות פיטופלסמה אך ברור כי הפתרון מחייב גישה בלתי שגרתית. מטרת המחקר שלנו היא ללמוד על פיזור חלקיקי הפיטופלסמה בצמח המודבק, על השפעת הטמפרטורה על התרבות חלקיקי הפיטופלסמה בצמח המודבק ולפתח גישה למלחמה בפיטופלסמות של גפן על יד ביטוי נוגדנים רקומבננטים (scFv) סגוליים בצמחים.

מהלך ושיטות העבודה

המחקר כלל עבודה של פיתוח שיטות של Real-Time PCR לאפיון פיטופלסמה בחלקים שונים בצמח, שיטות לבידוד גן של הפיטופלסמה המקדד לחלבון אנטיגני, הכנת נוגדנים פוליקלונליים נגד החלבון ונגד תעשיר של פיטופלסמה, בדיקת ספציפיות של הנוגדנים, בידוד cDNA של ה-scFv, ושיבוטו בגנום ווקטור ה-GVA Grapevine virus A.

תוצאות עיקריות

הוכן נוגדן פוליקלונאלי נגד חומר צמחי חופשי מפיטופלסמה. הנוגדנים שימשו לצורך סילוק החומר הצמחי ממיצוי אשר נעשה מצמח מודבק והכנת תכשיר מועשר בפיטופלסמה. הצלחנו לבודד גן ממברנאלי של פיטופלסמה ולבטא אותו בחיידקי E. coli. פיתחנו נוגדנים פוליקלונאליים ספציפיים כנגד התכשיר המועשר והחלבון הממברנאלי. בנוסף השתמשנו בתאים אשר מייצרים נוגדנים מונוקלונליים לפיטופלסמה של ה-aster yellows לצורך בידוד cDNA של ה-scFv. שיבטנו את ה-cDNA בגנום הווקטור הויראלי הבנוי על בסיס הגנום של ה-GVA. מצאנו כי הוירוס-ווקטור יכול להביא לביטוי הנוגדן המונוקלונלי בצמחים אך בריכוז קטן אשר אינו מאפשר בדיקות ביולוגיות.

פיתחנו מערכת של Real-Time PCR בה עסקנו באפיון חלקיקי פיטופלסמה בחלקים שונים בצמח, ואפיון הדבקות בפתוגן בתנאי טמפרטורה שונים. מצאנו כי האזורים העיקריים לאכלוס פיטופלסמה שנמצאו הם איברי מבלע הכוללים: שורשים ואיברים בעלי צימוח לא נורמאלי. בעבודה זו הצגנו לראשונה אפיון של משרעת הטמפרטורות המתאימה להתפשטות פיטופלסמה AWb. בנוסף, פיתחנו מערכת nested-PCR המספקת מבחן ספציפי, מהימן, מהיר, זול ובעל רגישות גבוהה לזיהוי הפיטופלסמה Stolbur. בשיטה זו משתמשים בתחל ייחודי הקרוי fSt1600 בשילוב עם התחל rtP7.

מסקנות והמלצות

מקטע ה-cDNA של ה-scFv אשר בוטא בחיידקים ובצמחים (ע"י הווקטור GVA) הוא פעיל ביולוגית. להמשך המחקר, צריך לפתוח נוגדנים מונוקלונליים נגד פיטופלסמת הגפן מסוג Stolbur וכנגד האנטיגנים אשר בודדו (החלבון הממברנאלי והתעשיר). בנוסף יש להביא לאופטימיזציה של המערכת לצורך קבלת ביטוי חזק יותר של הנוגדנים המונוקלונלי בצמח ע"י הווקטור הויראלי.

דו"ח מפורט

מבוא

פיטופלסמות הם חיידקים חסרי דופן הנחשבים לפתוגנים צמחיים אשר גורמים למחלות הצהבון ולנזקים כלכליים כבדים במינים רבים של עצי פרי, ירקות ופרחים. פיטופלסמות, הנחשבות לפתוגנים של שיפה, יכולות להיות מועברות מצמחים נגועים לצמחים בריאים ע"י הרכבה, ריבוי וגטיבי, וע"י מינים ספציפיים של ציקדות. הגפן הנה אחד הגידולים החשובים בארץ ובמדינות רבות בעולם אשר נפגעת קשה ע"י מחלות הצהבון. הפיטופלסמות גורמות בגפן בעיקר לחוסר התעצות של השריגים והתנוונות של האשכולות, והנזקים מתבטאים בירידה בכמות, באיכות היבול ובהפסדים כלכליים הנאמדים במאות מיליוני דולרים. בישראל, הזן שרדונה ידוע לרגיש ביותר למחלות הצהבון, אם כי רוב הזנים של גפני היין רגישים גם כן. בארץ נמצא כי הפיטופלסמות מקבוצות ה- stolbur ו- aster yellows הן גורמות הנזק העיקריות בגידול הגפן. כיום אין פתרון יעיל למחלות הנגרמות ע"י פיטופלסמה וברור כי הפתרון לבעיות הקשות בתחום זה מחייב גישה בלתי שגרתית.

אחד המנגנונים למלחמה בגורמי מחלה ובגורמים זרים אחרים בבעלי חיים היא המערכת החיסונית המבוססת על תנועתם ופעילותם של נוגדנים המסוגלים להתקשר באופן סגולי ולנטרל פולשים תאיים ואחרים. הנוגדנים מורכבים מ-4 שרשראות פוליפפטידיות, שתי שרשראות קלות (light chains) בנות כ-220 חומצות אמיניות ושתיים כבדות (heavy chains) בנות כ-440 חומצות אמיניות. השרשראות מתקפלות בצורת (Y) ויוצרות מבנה תלת מרחבי בעל מתחמים בני כ-110 חומצות אמיניות (מכל שרשרת). האזורים היוצרים את החלק המשתנה בנוגדן (variable region (Fv) הנקשר לאנטיגן, נמצאים בקצה האמיני של החלבון, מהווים את המתחם הראשון ונוצרים מאינטראקציות בין החלק המשתנה של השרשרת הקלה ((variable light (VL) לבין החלק המשתנה מהשרשרת הכבדה (variable heavy (VH)). שאר המתחמים מהווים את האזור השמור והוא אחראי לפעילות אפקטורית של הנוגדן כגון קישור לרצפטורים.

צמחים חסרים נוגדנים, ומערכי ההגנה שהם פיתחו שונים. מאידך, מחקרים רבים הראו כי ניתן לייצר בצמחים נוגדנים שלמים, או חלקי נוגדנים השומרים על פעילותם ולהגיע לצמחים המוגנים ספציפית בפני פתוגן מסוים. בספרות דווח על יצירת נוגדנים מונוקלונליים סגוליים לפיטופלסמות מקבוצות ה- stolbur ו- aster yellows המעורבות במחלת הצהבון בגפן ובגידולים נוספים. בנוסף נמצא כי צמחי מודל, טבק, אשר ביטאו נוגדן scFv ספציפי לפיטופלסמה מקבוצת ה- stolbur לא הראו סימני הדבקה בפתוגן. תוצאות אלה מראות כי ביטוי נוגדנים ספציפיים לפיטופלסמה בצמחים היא גישה ביוטכנולוגית היכולה לשמש למטרת "חיסון" צמחים בפני פתוגנים אלו. במחקר המוצע פה, ברצוננו ליישם גישה זו ולבטא בגפן גנים של נוגדים ספציפיים לפיטופלסמה.

לצורך החדרת וביטוי גנים בגפן, פותח לאחרונה במעבדתנו ווקטור ויראלי המבוסס על גנום נגיף הגפן *Grapevine virus A* (GVA). ה- GVA שייך לסוג *Vitivirus* ובעל גנום של RNA חד-גדילי, חיובי בגודל של כ- 7.5kb המכיל חמש מסגרות קריאה (ORFs) (open reading frames) אשר מקודדות חלבונים כגון הפולימראז (ORF1), חלבון התנועה (ORF3), חלבון המעטפת (ORF4), וחלבונים נוספים (ORF2 ו- ORF5) שתפקידם טרם נקבע. הגנום של ה- GVA הונדס לווקטור המכיל שני עותקים של הפרומוטור המבקרים יצירת חלבון התנועה, בתוספת אתרי רסטרקציה אשר ישמשו לצורך החדרת הגן

הזר. על מנת לשמור על יציבות הגן הזר בגנום הוירוס במשך תקופת הרפלקציה של ה-RNA הויראלי בצמח, הוחלף עותק אחד משני הפרומוטורים האלה של חלבון התנועה בפרומוטור הטרוולוגי אשר בודד מגזע אחר של GVA. היעילות של הווקטור המהונדס לביטוי גנים זרים נוסתה בהצלחה באמצעות ביטוי גן ה-GUS וגן ה-GFP. במסגרת המחקר המוצע ברצוננו לנצל את ווקטור ה-GVA לצורך ביטוי נוגדנים scFv ספציפיים לפיטופלסמות מקבוצות ה-stolbur ו-aster yellows למטרת דיכוי מחלת הצהבון בגפן.

מטרות המחקר

במחקר עסקנו במספר נושאים אשר כולם ביחד יקדמו אותנו לקראת השגת המטרה הסופית של הפרויקט: דיכוי פתוגן הפיטופלסמה הגורם למחלת הצהבון בגפנים. בשל טבעו של הגידול והזמן הארוך הדרוש לקבלת צמחים בוגרים עסקנו בפרויקט בצמחי מודל וינקה הידועים כצמחי בוחן למגוון רחב של פיטופלסמות כולל אלה המדביקים גפנים. בפרויקט הפיטופלסמה עסקנו כאמור במספר נושאים המובאים להלן ואשר תוצאותיהם מפורטות בהמשך:

1. שיבוט גן ממברנאלי של פיטופלסמה והכנת נוגדנים.
2. הכנת נוגדנים נגד תעשיר של פיטופלסמה.
3. אפיון הפיזור והכמות של פיטופלסמה באיברים שונים של צמחי וינקה.
4. אפיון השתנות ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה (AYWB) בוינקה לאורך זמן.
5. השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות הפיטופלסמה.
6. פיתוח תחל ייחודי לפיטופלסמה מקבוצת ה-Stolbur.
7. ביטוי נוגדנים של פיטופלסמה בצמחים באמצעות מערכת וירוס-ויקטור.

עיקר הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

דר' מוואסי בשיתוף עם פרופ' גרה ודר' תירצה זהבי מובילים את המחקר הזה לצורך בניית בסיס למחקר עתידי למלחמה במחלות פיטופלסמה בצמחים שונים. על הפרויקט הזה הועסק סטודנט לתואר שני (תומר גרשון) אשר סיים את עבודתו בהצטיינות יתרה.

1. שיבוט גן ממברנאלי אנטיגני מהפיטופלסמה A-WB

במטרה לבדוד גן המקודד לחלבון ממברנאלי אנטיגני (A-SPWP) מפיטופלסמה נעשו ריאקציות PCR, תוך כדי השימוש בתחלים F_SPWB ו-R_SPWB, על שמונה דוגמאות שונות של מיצויי חומצות גרעין מצמחים שונים, שהראו נוכחות של פיטופלסמה. התקבלה הגברה של מקטע בגודל הצפוי של כ-520 bp באחת הדוגמאות שתבנית ההגברה הכילה את הפיטופלסמה A-WB. תוצר ה-PCR אשר התקבל שובט בפלסמיד pGEM_T easy (קלון 366), והרצף של המחדר נקבע. השוואת רצף המחדר לרצפי חומצות הגרעין הקיימות במאגר הגנים (NCBI) הראתה זהות של 85% לרצף הגן לחלבון מפיטופלסמה SPWB. בחינת הרצף של קלון 366 הראתה שהוא מכיל מסגרת קריאה אחת באורך 169 חומצות אמינו. לרצף החלבון הייתה זהות של 86% לחלבון הפיטופלסמה SPWB (איור 1).

```

A-WB      MNHKENFLQTKNGKITVGVLASAGIALVVYFITAKLLHWAPFTIKTLTAK 50
SPWB      MNHKENFLQTKNGKITVGVLASAGIALVVYLITAKLLHWAPFTIKTLTTK 50
          *****:*****:
          *****:*****:

A-WB      DIDNLKVEIKDFTGKSTKDQLSLDDAKQESQKVVDAMKKIVDASAENKKA 100
SPWB      DIDNLKVEIKDFTGLNTKDKLSSDDAKQESQKAFDAINKIVDAFAENKKA 100
          *****_***:** *****_**::***** *****
          *****_***:** *****_**::***** *****

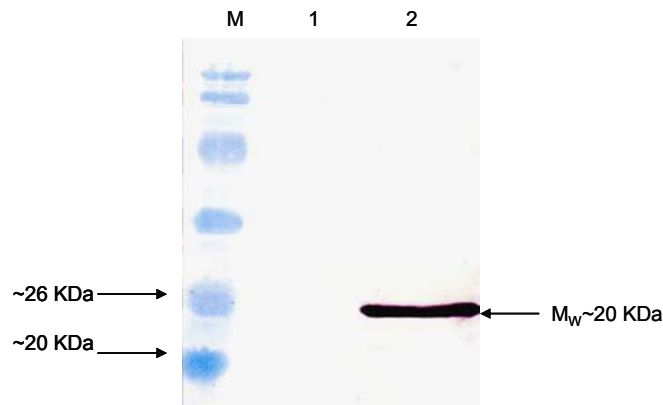
A-WB      DIKDKKISDSTITAANNLKTKADEALKFVNDNAS--NWIDDRVKDFVP-K 147
SPWB      DIKDKKISDSTIAAANNLKTKADNALKFVNENASVTINWTDDEVQDFVNNK 150
          *****:*****:*****:*** ** *****:*** *
          *****:*****:*****:*** ** *****:*** *

A-WB      MVKTSINDLLGLAKTDLKVQS 169
SPWB      VVKTKINDLLSQAKTDLKVQS 172
          :***_*****_*****

```

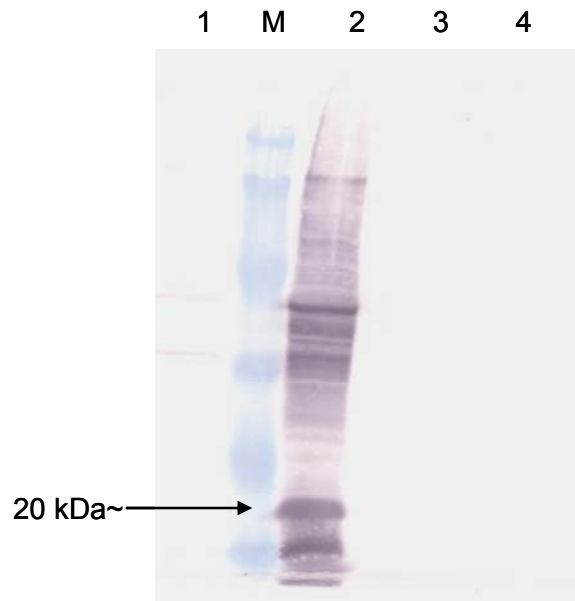
איור 1: תוצאות השוואת רצף חומצות האמינו של הגן שבודד החלבון ההומולוגי מפיטופלסמה SPWB בעזרת תוכנת CLUSTAL W. A-WB, רצף חומצות האמינו של חלבון שבודד. SPWB, רצף חומצות האמינו של החלבון ההומולוגי מפיטופלסמה SPWB. "*" חומצה אמינית זהה. ":" החלפה בחומצה אמינית משמרת מאותו טיפוס. "." החלפה של חומצה אמינית משמרת למחצה. " " החלפה בחומצה אמינית שאינה משמרת או העדר של חומצה אמינית.

לצורך ביטוי חלבון A-SPWB בחיידקים, שובט הגן A-SPWB בפלסמיד pET28a (שבט 367). שבט 367 הוכנס בטרנספורמציה לחיידקי *E. Coli* מהקו BL21. לאחר אינדוקציה של החיידקים עם 0.1mM IPTG קיבלנו ביטוי מוגבר של החלבון האנטיגני A-SPWB בגודל של 20 kDa. הספציפיות של החלבון המבוטא נקבעה באנליזת Western blot עם נוגדן חד-שבטי כנגד רצף ה-His-Tag (איור 2).



איור 2: Western blot עם נוגדן ראשוני חד שבטי כנגד His-Tag. 1, בקורת שלילית, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a ללא מחדר, עם אינדוקציה של 0.1mM IPTG. 2, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a עם מחדר לגן A-SPWB ועברו אינדוקציה של 0.1mM IPTG.

החלבון המבוטא בחיידקים בודד מגיל ושימש להכנת נוגדנים מארנבת. יכולת הקישור של הנוגדן שהתקבל נבדקה ב-Western blot. הנוגדן שהוכן זיהה בצורה טובה את החלבון המנוקה A-SPWB, מאידך, הנוגדן לא זיהה חלבון כלשהו בצמחים נגועים בפיטופלסמה מסוג A-WB (איור 3).

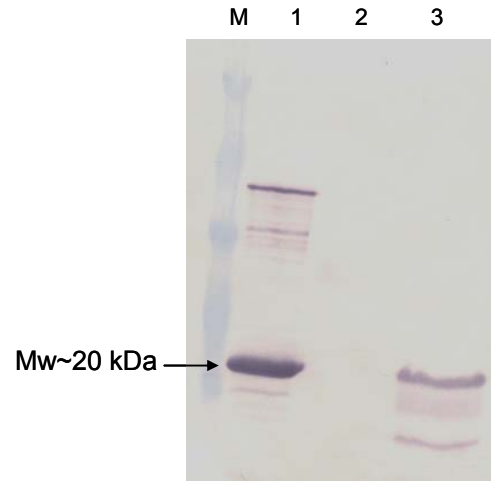


איור 3: Western blot עם נוגדן כנגד החלבון הרקומביננטי A-SPWB. 1, בקורת שלילית, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a ללא מחדר, עם אינדוקציה של 0.1mM IPTG. 2, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a עם מחדר לגן A-SPWB ועברו אינדוקציה של 0.1mM IPTG. 3, מיצוי חלבונים מצמח וינקה בריא ללא פיטופלסמה. 4, מיצוי חלבונים מצמח וינקה נגוע בפיטופלסמה A-WB.

2 הכנת תעשיר של פיטופלסמה ופיתוח נוגדנים נגד הפתוגן

15 גרם עורקים של צמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה נכתשו בעזרת מכתש ועלי בחנקן נוזלי עד לקבלת אבקה. האבקה שהתקבלה הוספה ל- 60 מיליליטר בופר GM (0.2 M - 0.3 M glycine-NaOH, pH 8.0) ו- 0.2 M $MgCl_2$ שהוסף לו 0.2% sodium mercaptoacetate. התמיסה הועברה דרך שתי שכבות של פד גזה וסורכזה במהירות התחלתית של 2000 g למשך חמש דקות ולאחר מכן במהירות של 8000 g למשך 20 דקות. תרחיף הדוגמא עברו שיקוע בעזרת הוספת PEG 6000. המשקע נאסף בעזרת סרכוז והורחף ב- 6 ml בופר A (0.05 M boric acid, 4 M NaCl, pH 9.0). התמיסה הועברה דרך קולונת Sepharose CL-4B (חברת Sigma-aldrich). התרחיף נאסף מהקולונה בפרקציות בנפח 0.5 ml. ריכוז החלבון בפרקציות נמדד בעזרת קריאת הבליעה באורך גל 280 nm. הפרקציות שהכילו חלבונים אוחדו והתמיסה עברה ניקוי בעזרת סרכוז במהירות 2000 g למשך 5 דקות. התרחיף שהתקבל עבר השקעה אימונית של אנטיגנים צמחיים (בעזרת אינקובציה עם 500 μ l אנטי-סרום, שהוכן כנגד צמח בריא). בהמשך נוקה התרחיף בקולונת rProtein A Sepharose-Fast flow וסרכוז באולטרה-צנטריפוגה במהירות 27,000 rpm. לאחר הסרכוז הזה נלקח המשקע והורחף ב- 1 ml בופר PBS. התעשיר של הפיטופלסמה שהוכן שימש לנו להכנת נוגדנים מארנבת. יכולת הקישור של הנוגדן נבדקה בעזרת Western blot. באנליזה זו נבדקו מיצויי חלבונים מצמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה מסוג A-WB בהשוואה למיצויי חלבונים מצמחי וינקה בריאים. נמצא כי הנוגדן שהכנו מזהה 2-3 חלבונים בטווח גודל

של 15-20 kDa במיצוי הצמחים מודבקים בפיטופלסמה שאינם מזוהים במיצויי הצמחים הבריאים. שיפור משמעותי בספציפיות של הנוגדן שהוכן התקבל לאחר הפחתת בתקשותו לחלבונים לא רצויים של הצמח (איור 4).


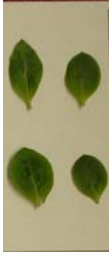








איור 4: Western blot עם נוגדן כנגד תעשיר של פיטופלסמה לאחר הדגרה עם כתש צמחי. 1, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a עם מחדר לגן A-SPWB ועברו אינדוקציה של 0.1mM IPTG. 2, מיצוי חלבונים מצמח וינקה בריא ללא פיטופלסמה. 3, מיצוי חלבונים מצמח וינקה נגוע בפיטופלסמה A-WB.

3. אפיון הפיזור והכמות של פיטופלסמה מסוג באיברים שונים של צמחי וינקה.

צמחי וינקה הנגועים בפיטופלסמה מסוג AYWB מציגים תסמינים שונים באיברי הצמח השונים. תסמינים אלו משתנים לאורך עם התגברות הנגיעות בצמחים. במחקר זה נבחנה הקורלציה בין ריכוז הפיטופלסמה לתסמיני המחלה הנראים באיברים השונים. בנוסף לכך נבחנה ההשפעה של טמפרטורת סביבה שונה על פיזור הפיטופלסמה באיברים השונים של הצמח.

ריכוז הפיטופלסמה באיברים השונים אופיינו בשמונה צמחי וינקה. שמונת הצמחים כללו שתי קבוצות של ארבעה צמחים. קבוצות הצמחים נבדלו במשטר הטמפרטורה בה גודלו. משטרי הטמפרטורה של 22/17°C (22) ו-27/22°C (27) במשך לילה/יום בהתאמה שימשו לגידול הצמחים בניסוי זה. צמחי וינקה בני חודשיים עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג A-WB והוחזקו במשך יומיים באותה חממה. לאחר מכן לכל חדר גידול הועברו ארבעה צמחי וינקה מורכבים. צמחים אלה גודלו בחדרי הגידול במשך יום. בתום תקופה זו נלקחו מכל צמח דוגמאות צמחיות לצורך הפקת דנ"א. דוגמאות אלו נלקחו משלושה איברים שונים של הצמחים וכללו: עורקים ראשיים של עלים, עלי כותרת של הפרחים ושורשים. דוגמאות העלים והפרחים נחלקו למספר דוגמאות נפרדות בהתאם לתפקידם הפיסיולוגי והתסמינים המוצגים בהם (איור 5). דוגמאות הדנ"א שהופקו מדוגמאות הצמחים שימשו כתבנית לכימות הפיטופלסמה ברקמה בעזרת Real-Time PCR.

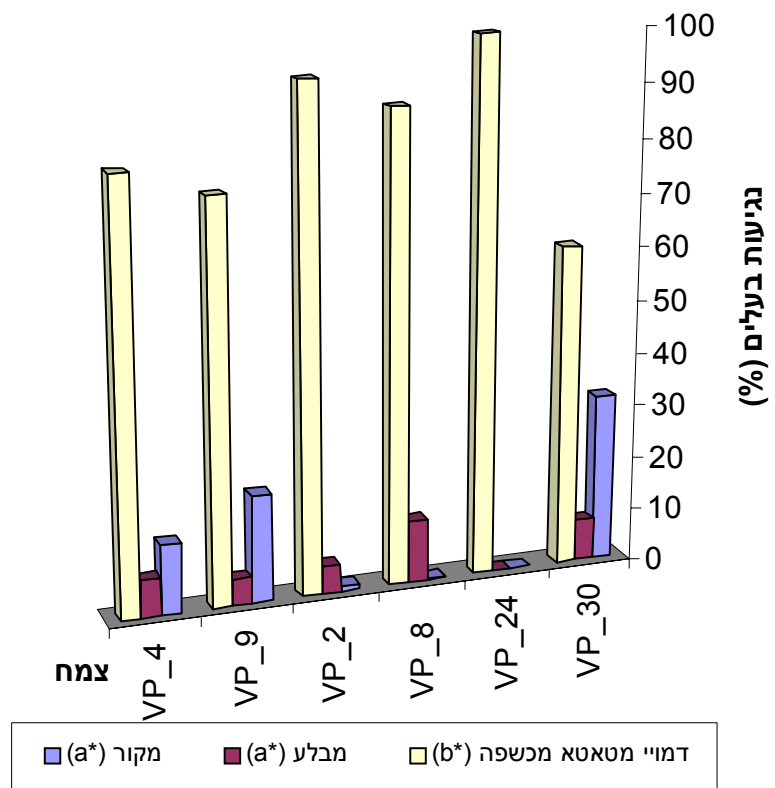
עורקים ראשיים מעלי:			פרחים בעלי תסמינים:				שורשים
מקור	מבלע	דמויי מטאטא מכשפה	ללא	חלשים	מתונים	חמורים	
							

איור 5 : כלל סוגי הדוגמאות הצמחיות ששימשו להפקת דנ"א.

ערכי הכימות שהתקבלו בעזרת Real-Time PCR נורמלו כחלק היחסי באחוזים מסכם ערכי הכימות של כלל הדוגמאות שהושוו בצמח (טבלא 1).

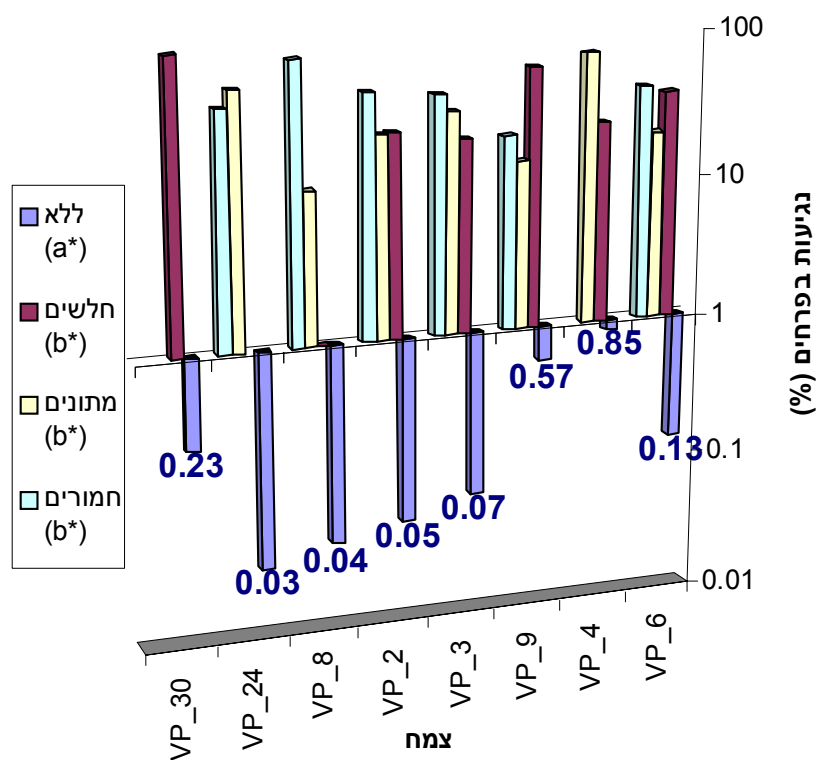
שורשים	פרחים בעלי תסמינים:				עורקים ראשיים מעלי:			משטר טמפרטורה	צמח
	חמורים	מתונים	חלשים	ללא	דמויי מטאטא מכשפה	מבלע	מקור		
14.18	23.81	11.31	21.27	0.07	-----	27.68	1.67	18/22°C	VP_6
26.18	-----	5.10	1.69	0.06	53.41	4.71	8.85	18/22°C	VP_4
6.20	9.82	6.51	28.12	0.25	36.73	2.43	9.94	18/22°C	VP_9
53.29	14.70	11.11	7.15	0.02	-----	9.14	4.59	18/22°C	VP_3
27.40	28.31	14.85	15.04	0.03	13.46	0.76	0.15	21/29°C	VP_2
-----	44.76	5.88	0.51	0.02	41.84	5.59	0.11	21/29°C	VP_8
51.93	10.71	14.10	-----	0.01	23.22	0.02	0.02	21/29°C	VP_24
57.02	-----	-----	7.36	0.02	21.54	1.31	11.25	21/29°C	VP_30
33.74	22.02	9.84	11.59	0.06	31.70	6.46	4.57		ממוצע
20.39	13.34	4.01	10.31	0.08	14.88	9.09	4.79		סטיית תקן (SD)

בהשוואה בין אחוזי הנגיעות בקבוצות העלים השונות (איור 6) נמצאה נגיעות גבוהה יותר בטווח של פי 2 עד 1400 באופן מובהק ($P < 0.01$) בקבוצת העלים בעלי מופע דמויי "מטאטא מכשפה" לעומת הנגיעות בקבוצת עלי המקור או המבלע. לעומת זאת לא נמצא הבדל מובהק ברמת הנגיעות בין קבוצת עלי המקור לקבוצת עלי המבלע.



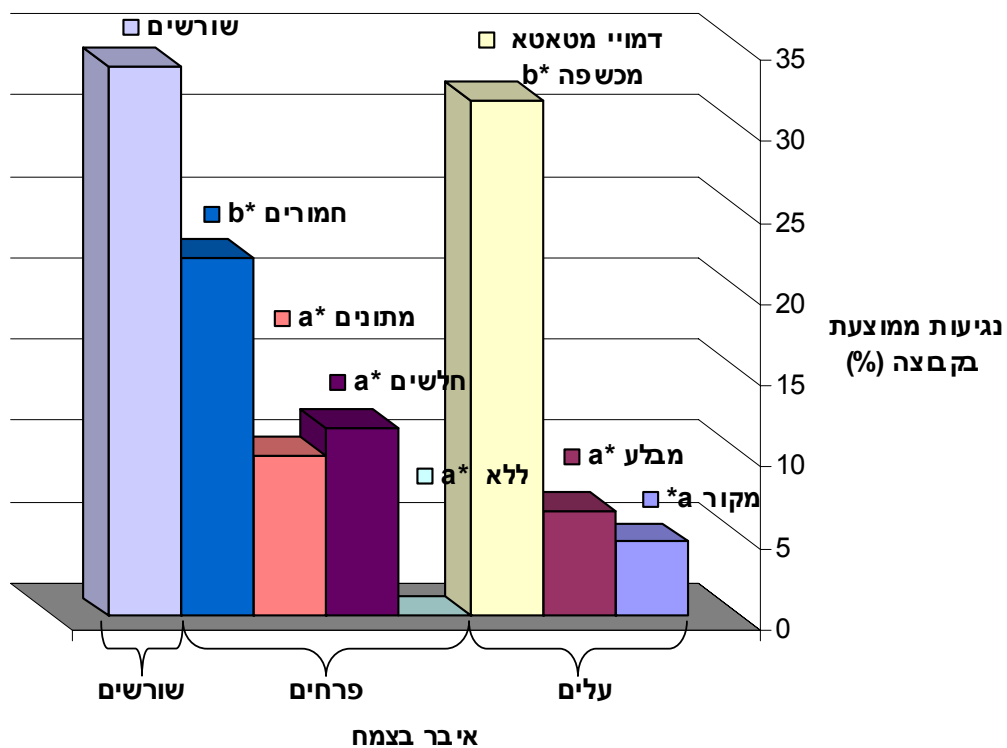
איור 6: אחוזי הנגיעות היחסיים של דוגמאות העלים מסך דוגמאות העלים שנבדקו באותו צמח. קבוצות בעלי שונות מובהקת מסומנות באותיות לטיניות שונות: *a/ *b.

בהשוואה בין אחוזי הנגיעות בקבוצות הפרחים השונות נמצאה נגיעות גבוהה יותר בטווח של אחד עד שלושה סדרי גודל באופן מובהק ($P < 0.05$) בכל קבוצות הפרחים בעלי תסמינים לעומת הנגיעות בקבוצת הפרחים ללא תסמינים (איור 7). לעומת זאת לא נמצא הבדל מובהק ברמת הנגיעות בין שלושת קבוצות הפרחים בעלי התסמינים.



איור 7: אחוזי הנגיעות היחסיים של דוגמאות הפרחים מסך דוגמאות הפרחים שנבדקו באותו צמח. קבוצות בעלי שונות מובהקת מסומנות באותיות לטיניות שונות: *a/ *b.

בנוסף לכך בהשוואה של רמת הנגיעות בשורשים לשאר הקבוצות שנבדקו, נמצאה נגיעות גבוהה יותר משמעותית ($P < 0.05$) בקבוצת השורשים לעומת שאר הקבוצות שנבדקו, למעט קבוצת העלים דמויי "מטאטא מכשפה" והפרחים בעלי תסמינים חמורים (איור 8). בהשוואה של כל אחת מהקבוצות: העלים דמויי מטאטא מכשפה והפרחים בעלי תסמינים חמורים לקבוצת השורשים, לא נמצא הבדל מובהק ברמת הנגיעות. בנוסף לכך לא נמצאו בניסוי זה מאפיינים שונים להתפלגות הנגיעות בפיטופלסמה בצמחים השונים שגודלו במשטרי טמפרטורה שונים.

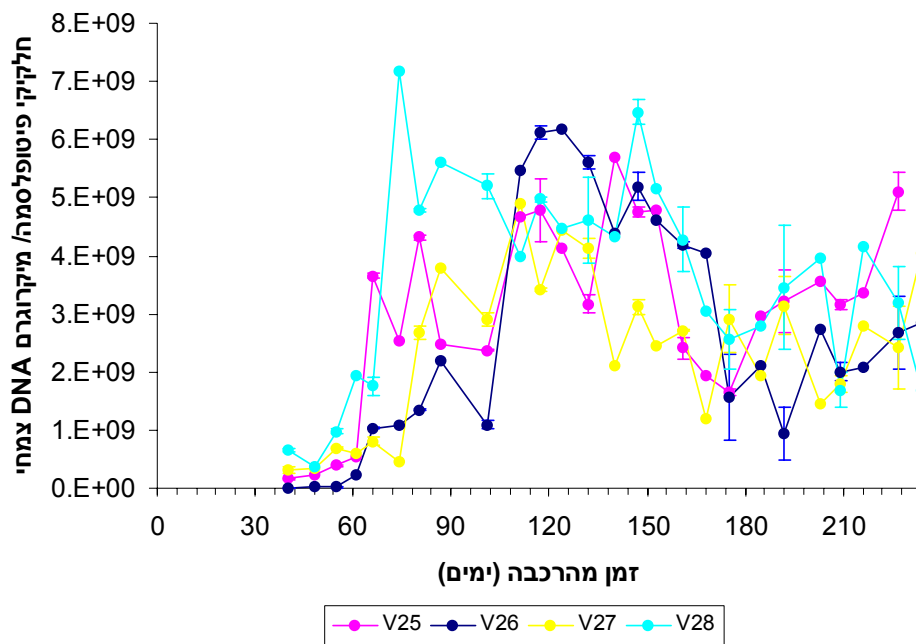


איור 8: ערכי הנגיעות הממוצעת בקבוצות האיברים השונים בצמח שנבדקו. קבוצות בעלי שונות מובהקת בהשוואה לקבוצת השורשים מסומנות באותיות לטיניות שונות: *a/ *b.

4. אפיון השתנות ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה (AYWB) בוינקה לאורך זמן

השתנות ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה בארבעה צמחי וינקה נבחנה במשך 234 יום. צמחי וינקה בני חודשיים עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג A-WB וגודלו במשך כל מהלך הניסוי בחממה בה טמפרטורת הסביבה ווסתה ל-25°C. צמח וינקה שלא עבר הרכבה שימש כבקרה שלילית לבחינת האפשרות של נוכחות חרקים נשאים בעלי יכולת להעביר את הפיטופלסמה בין צמחים שונים בחממה. דוגמאות DNA גנומי הופקו מעורקים ראשיים של שני עלי מבלע, בקודקוד של כל צמח שהורכב. דוגמאות הצמחים להפקת הדנ"א נלקחו במרווחים של 6-8 ימים במשך 234 ימים לאחר ההרכבה. דוגמאות DNA אלה שימשו לזיהוי מולקולארי של נוכחות פיטופלסמה בצמחים, בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3. דוגמאות DNA שנמצאו חיוביות לפיטופלסמה נלקחו לכימות בעזרת Real-Time PCR.

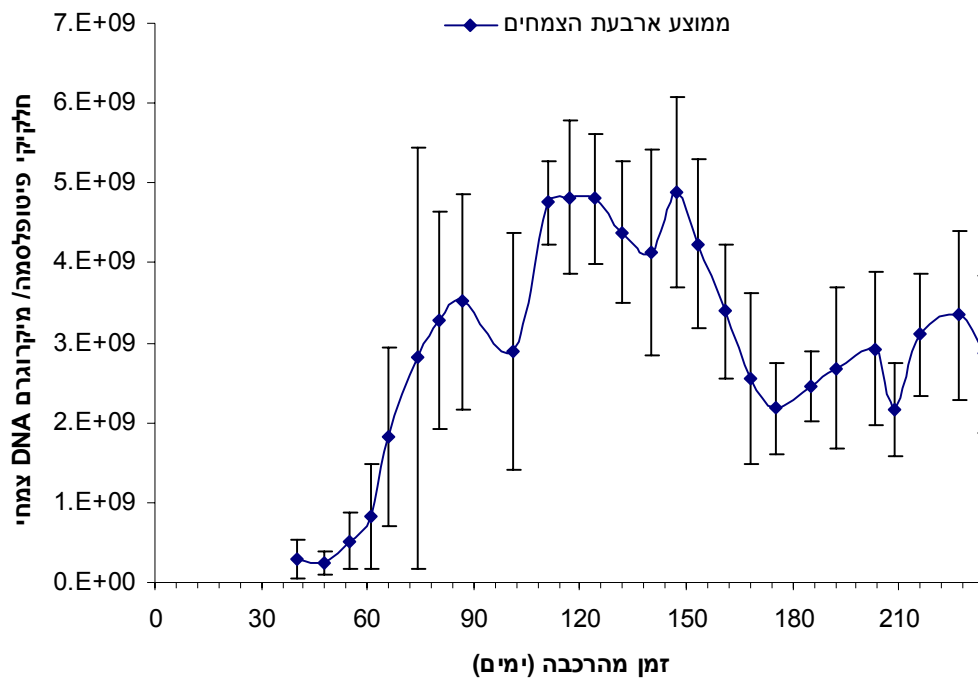
כלל ערכי הכימות עבור ארבעת הצמחים (VP25, VP26, VP27, VP28) המייצגים את מספר חלקיקי הפיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי שורטטו בגרף כפונקציה של הזמן שעבר מההרכבה (איור 9).



איור 9: ערכי ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי כפונקציה של הזמן מההרכבה בארבעת צמחי וינקה, שנחקלו בעזרת Real-Time PCR.

לשם זיהוי מאפיינים כלליים של השתנות ריכוז הפיטופלסמה בצמחי וינקה בעלי מבלע, חושבו ממוצעי ערכי הכימות של ארבעת הצמחים בכל פרק זמן. ממוצעים אלה שורטטו בגרף כפונקציה של משך הזמן מההרכבה (איור 10). מאיור זה ניתן לראות שטווח ריכוזים של הפיטופלסמה בעורקים של עלי מבלע בצמחי וינקה נע סביב $2.12 \cdot 10^8 - 5.99 \cdot 10^9$ חלקיקי פיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי. מגמה נוספת

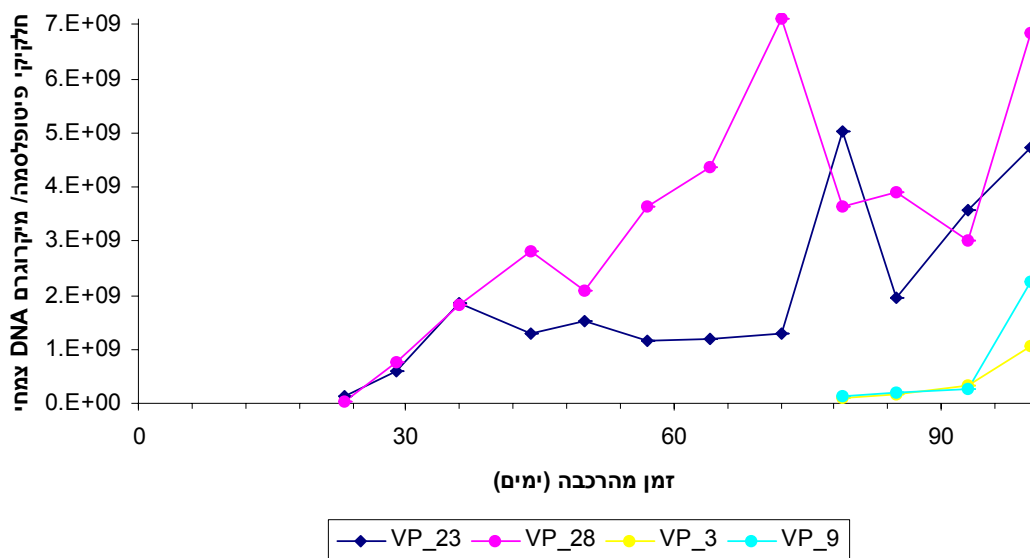
שניתן להבחין בה, הם שריכוזים נמוכים יחסית מתחת לערך של $1 \cdot 10^9$ חלקיקי פיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי נמדדו בארבעת הצמחים בפרק זמן של 55 יום לאחר ההרכבה. לעומת זאת מפרק זמן של 80 יום ומעלה כלל ריכוזי הפתוגן שנמדדו נעו בטווח הריכוזים של $1 \cdot 10^9$ - $7 \cdot 10^9$ חלקיקי פיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי. ריכוזי חלקיקי פיטופלסמה מרביים התקבלו בארבעת הצמחים בפרק הזמן בין ארבעה לחמישה חודשים לאחר ההרכבה.



איור 10: ממוצעי הערכים בארבעה צמחי וינקה של ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי כפונקציה של הזמן מההרכבה.

על מנת לאמת את תוצאות האפיון של השתנות ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה בארבעת צמחי וינקה, בוצע ניסוי נוסף שחזר על הניסוי הקודם. בדומה לניסוי הקודם ריכוזי חלקיקי הפיטופלסמה נבדקו בארבעה צמחי וינקה בני חודשיים שעברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג A-WB. אך בשונה מהניסוי הקודם כל זוג צמחי וינקה גודלו במשטר טמפרטורות שונה של $22/18^{\circ}\text{C}$ ו- $29/21^{\circ}\text{C}$ במשך לילה/יום בהתאמה. דוגמאות DNA גנומי הופקו מעורקים ראשיים של ארבעה עלי מבלע, בקודקוד של כל צמח שהורכב. דוגמאות הצמחים להפקת הדנ"א נלקחו במרווחים של 6-8 ימים במשך 100 ימים לאחר ההרכבה. דוגמאות DNA אלה שימשו לזיהוי מולקולארי של נוכחות פיטופלסמה בצמחים, בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3. דוגמאות DNA שנמצאו חיוביות לפיטופלסמה נלקחו לכימות בעזרת Real-Time PCR.

כלל ערכי הכימות עבור זוג הצמחים (VP_3, VP_9) וזוג הצמחים (VP_23, VP_28) שגדלו במשטר טמפרטורות של $22/18^{\circ}\text{C}$ ו- $29/21^{\circ}\text{C}$ בהתאמה שורטטו בגרף כפונקציה של הזמן שעבר מההרכבה (איור 11).



איור 11 הערכים בארבעה צמחי וינקה של ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי כפונקציה של הזמן מההרכבה

ניסוי זה מראה שטווח ריכוזים של הפיטופלסמה בעורקים של עלי מבלע בצמחי וינקה שגדלו במשטר טמפרטורות של $29/21^{\circ}\text{C}$ נע סביב $2.46 \cdot 10^7$ - $7.11 \cdot 10^9$ חלקיקי פיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי. בהשוואת טווח הריכוזים של זוג צמחים אלה עם ארבעת הצמחים מהניסוי הקודם ניתן לראות כי בפרק הזמן של 14-21 יום לאחר זיהוי הפיטופלסמה ריכוזי הפיטופלסמה שנמצאו היו נמוכים מסף $1 \cdot 10^9$ חלקיקי פיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי. מנגד נמצא כי קיים ריכוז מרבי של חלקיקי פיטופלסמה בעורקים של עלי מבלע בצמחי וינקה שמשוערך ל- $1 \cdot 10^7$ חלקיקי פיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי. בהשוואה בין שני זוגות הצמחים שגדלו במשטר טמפרטורות שונה נמצא הבדל בזמן הדרוש למעבר ריכוז

הסף של 1×10^9 חלקיקי פיטופלסמה למיקרו-גרם DNA צמחי מרגע זיהוי הפיטופלסמה בראש הכנה. זמן זה שנדרש למעבר ריכוז סף זה עמד על 14 יום בלבד בזוג הצמחים (VP_23, VP_28) שגדלו במשטר טמפרטורות של $29/21^\circ\text{C}$ בעוד שזמן זה התארך ל-21 יום בזוג הצמחים (VP_3, VP_9) שגדלו במשטר טמפרטורות נמוך יותר של $22/18^\circ\text{C}$.

5. השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות הפיטופלסמה

השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות הפתוגן בצמחי וינקה נבחנה בארבעה חדרי גידול בפיטורון בעלי משטר טמפרטורה שונה: $17/10^\circ\text{C}$ (17), $22/18^\circ\text{C}$ (22), $29/21^\circ\text{C}$ (29), $34/28^\circ\text{C}$ (34) לילה/יום בהתאמה. כ-40 צמחי וינקה בני חודשיים עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג A-WB והוחזקו במשך יומיים באותה חממה. לאחר מכן לכל חדר גידול הועברו עשרה צמחי וינקה מורכבים. בכל חדרי הגידול היה צמח וינקה שלא עבר הרכבה שימש כבקרה שלילית. דוגמאות דני"א גנומי הופקו מעורקים ראשיים של ארבעה עלי מבלע, בקודקוד של כל צמח שהורכב. דוגמאות הצמחים להפקת הדני"א נלקחו במרווחים של 6-8 ימים במשך 100 ימים לאחר ההרכבה. במקביל לאיסוף דוגמאות הצמחים נרשמה הופעת סימפטומים האופייניים להימצאות פיטופלסמה הכוללת הופעת פרחים ירוקים בצמחים המורכבים. דוגמאות דני"א אלה שימשו לזיהוי מולקולארי של התפשטות הפיטופלסמה בצמחים, בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3.

התפשטות הפיטופלסמה בצמחים זוהתה לראשונה בעזרת PCR כ-18 יום לאחר ההרכבה בחדר גידול 34. התפשטות פיטופלסמה בכלל אוכלוסיית הצמחים בחדר הגידול 34 אובחנה בעזרת PCR ותסמינים אופייניים לפיטופלסמה הכוללים הופעת פרחים ירוקים בכנה המורכבת כ-35 יום לאחר ההרכבה. בשני צמחים (VP23, VP28) בחדר הגידול 29, זוהתה הפיטופלסמה לראשונה בצמחים לראשונה בעזרת PCR כ-23 יום לאחר ההרכבה. בזוג הצמחים הנ"ל (VP23, VP28) נצפו תסמינים אופייניים לפיטופלסמה הכוללים הופעת פרחים ירוקים כשבוע לאחר הזיהוי הראשוני. התפשטות פיטופלסמה בכלל אוכלוסיית הצמחים בחדר הגידול 29 אובחנה בעזרת PCR ותסמינים אופייניים כ-57 יום לאחר ההרכבה. בניגוד לצמחים המורכבים בחדר הגידול 29, לא אובחנה כלל התפשטות של הפיטופלסמה בכל הצמחים המורכבים בחדרי הגידול 22 ו-17 כ-50 יום לאחר ההרכבה. בפרק זמן זה מכל אחד מחדרי הגידול: 17 ו-22 הועברו שלושה צמחים מורכבים לחדר הגידול 29. לאחר 22 ימים אובחנה התפשטות הפיטופלסמה בצמח אחד (VP19) מהצמחים המורכבים שהועברו מחדר הגידול 17 ובצמח אחד (VP8) מהצמחים המורכבים שהועברו מחדר 22. התפשטות פיטופלסמה בכל הצמחים שהועברו מחדרי הגידול 17 ו-22 לחדר הגידול 29 אובחנה בעזרת PCR ותסמינים כ-28 יום לאחר ההעברה.

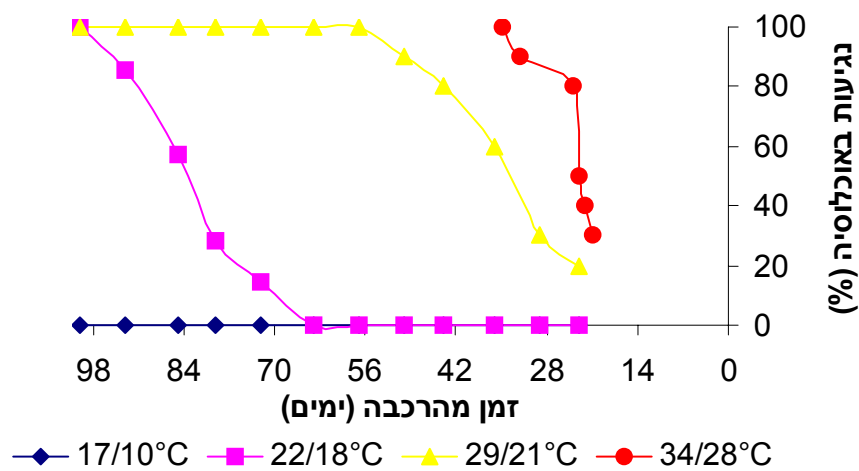
התפשטות הפיטופלסמה בצמחים בחדר הגידול 22 זוהתה לראשונה בעזרת PCR וסימפטומים כ-72 יום לאחר ההרכבה בצמח אחד (VP3). התפשטות פיטופלסמה בכלל אוכלוסיית הצמחים בחדר הגידול 22 אובחנה בעזרת PCR ותסמינים אופייניים כ-100 יום לאחר ההרכבה. השינוי בהתפלגות הנגיעות לאורך זמן בכלל אוכלוסיית הצמחים בחדר הגידול 22 מפורטת באיור 12 (עקום סגול). לעומת זאת בצמחים

המורכבים בחדר גידול 17 לא זוהתה התפשטות פיטופלסמה במשך 100 ימים לאחר ההרכבה (איור 12, עקום כחול). כלל ערכי משך הזמן עד לזיהוי הראשוני (ב-PCR או ע"י תסמינים לפי המוקדם מבניהם) של פיטופלסמה בכנה בכלל הצמחים המורכבים נרשם בטבלא 2. חישובים סטטיסטיים הכוללים ממוצעים, סטיות תקן

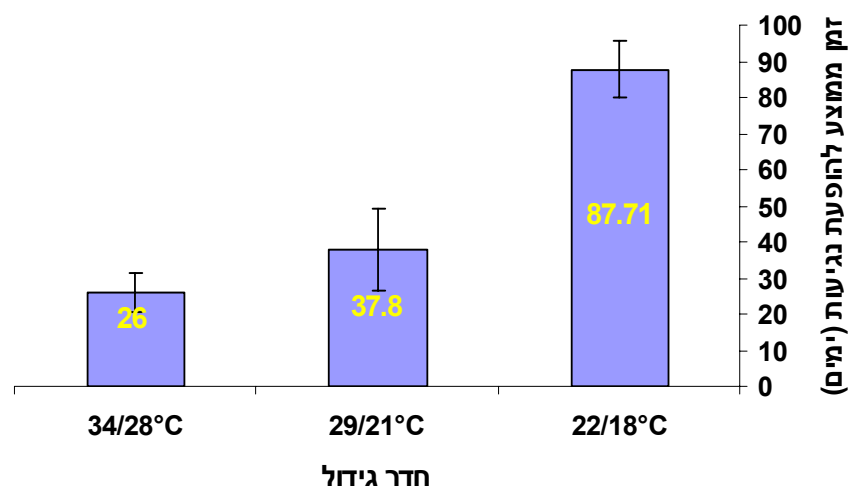
מספר תקן	ממוצע	משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בעשרת הצמחים המורכבים											מספר טור ה	
		N	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	17/10°C
7.89	87.71	--	85	79	«	93	10 0	«	85	79	«	93	22/18°C	
11.15	37.8	--	29	44	23	36	50	36	57	23	44	36	29/21°C	
5.56	26	--	29	21	32	29	29	24	22	18	21	35	34/28°C	

טבלא 2: משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בעשרת הצמחים המורכבים בארבעת חדרי גידול בעלי משטרי טמפרטורה שונים. --, לא נצפו תסמינים אופייניים לפיטופלסמה או תוצרי הגברה ב-PCR במשך כל הניסוי. «, צמח הועבר לחדר גידול 29/21°C כ-50 יום לאחר ההרכבה לפני הופעת התסמינים או קבלה של תוצרי הגברה ב-PCR.

התפלגות הנגיעות בפיטופלסמה בכנות המורכבות חושבה באחוזים מכלל אוכלוסיית הצמחים המורכבים בכל חדר גידול (איור 12). בנוסף לכך חושבו ממוצעי הזמן להופעת הנגיעות וסטיות התקן בכל אוכלוסייה של צמחים מורכבים בכל חדר גידול (טבלא 2, איור 13). בניסוי זה נמצא כי קיימת שונות מובהקת (מבחן HSD Tukey $p < 0.05$) בין הערכים למשך הזמן לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בקבוצות הצמחים השונות. בנוסף לכך נמצאה התאמה בין עלייה ברמת הטמפרטורות של חדר הגידול לקיצור משך הזמן הממוצע להופעת נגיעות בצמחים (איור 13).



איור 12: משך הזמן הממוצע מההרכבה להופעת נגיעות בפיטופלסמה בכנות בכלל אוכלוסיית הצמחים המורכבים בכל אחד משלושת חדרי הגידול: 22/18°C, 29/21°C, 34/28°C.



איור 13: משך הזמן הממוצע מההרכבה להופעת נגיעות בפיטופלסמה בחדרי גידול שונים.

נגיעות בכנות המורכבות בחדר גידול $17/10^{\circ}\text{C}$ לא זוהתה במשך 100 יום לאחר ההרכבה. לכן בוצע ניסוי נוסף על מנת ללמוד על השפעת טמפרטורות נמוכות על הימצאות ויכולת החיות של הפיטופלסמה ברוכב הנגוע ובכנה של צמחי וינקה. בניסוי זה השתמשנו בעשרה צמחי וינקה בני חודשיים אשר עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג A-WB והוחזקו במשך יומיים באותה חממה. לאחר מכן הועברו צמחים אלה לחדר גידול בעל משטר טמפרטורה של $17/10^{\circ}\text{C}$ במשך לילה/ יום בהתאמה לתקופה של 70 יום. בחדר גידול זה צמח וינקה שלא עבר הרכבה שימש כבקרה שלילית. בתום תקופה זו נלקחו דוגמאות מכלל הכנות לשם הפקת DNA. דוגמאות DNA אלה שימשו לזיהוי מולקולארי של נוכחות פיטופלסמה, בעזרת nested-PCR עם התחלים fU5/rU3. חומר צמחי מהכנות והרוכבים של שישה צמחים מורכבים שגדלו בחדר גידול $17/10^{\circ}\text{C}$ הורכב כרוכבים על גבי צמחי וינקה בריאים בני חודשיים. לשם בחינת נוכחות ויכולת ההדבקה של פיטופלסמה ברוכבים, הועברו הצמחים המורכבים החדשים לחדר גידול $34/28^{\circ}\text{C}$.

הופעת תסמינים אופייניים להימצאות פיטופלסמה הכוללים: הופעת פרחים ירוקים בכנות של הצמחים המורכבים נרשמה מדי יום. אימות נוכחות או העדר פיטופלסמה ברקמות הצמח בוצעה בעזרת ביצוע PCR עם התחלים fU5/rU3 על DNA, שהופק מרקמות הצמחיות הנבדקות.

בהתאמה לניסוי הקודם לא זוהתה בעזרת תסמינים ו-nested-PCR כלל התפשטות פיטופלסמה בכנות של צמחי הוינקה המורכבים שגודלו בחדר גידול $17/10^{\circ}\text{C}$ כ-72 יום לאחר ההרכבה. בצמחים המורכבים החדשים שגודלו בחדר גידול $34/28^{\circ}\text{C}$ נראו תסמינים אופייניים לפיטופלסמה של פרחים ירוקים בכנות רק בצמחים שהורכבו עם רוכבים נגועים (טבלא 3). לעומת זאת לא נצפו כלל תסמינים אופייניים לפיטופלסמה בכנות של צמחי הוינקה שהורכבו עם הכנות מצמחים מורכבים שגדלו בחדר $17/10^{\circ}\text{C}$ או בצמח ששימש כבקרה שלילית לנוכחות חרקים נשאים בחדר הגידול.

סטיית תקן	ממוצע	משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בעשרת הצמחים המורכבים							משטר טמפרטורה בגידול	סוג רוכב מצמחי וינקה שגודלו ב- $17/10^{\circ}\text{C}$
		NC	6	5	4	3	2	1		
		--	--	--	--	--	--	--	$34/28^{\circ}\text{C}$	כנה
2.8	20.67	--	26	18	20	19	20	21	$34/28^{\circ}\text{C}$	רוכב נגוע

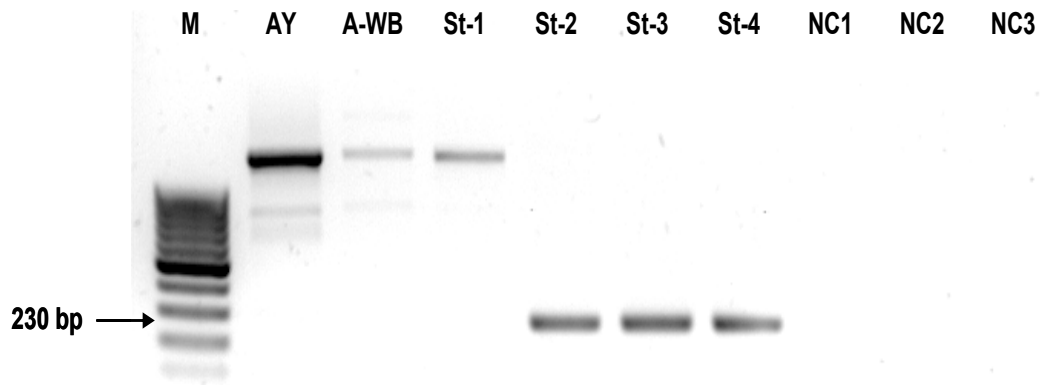
טבלא 3: משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בששת הצמחים המורכבים בחדר גידול $34/28^{\circ}\text{C}$. --, לא נצפו תסמינים אופייניים לפיטופלסמה או תוצרי הגברה ב-PCR במשך כל הניסוי.

6. פיתוח תחל ייחודי לפיטופלסמה מקבוצת ה- Stolbur

הניסוי נעשה על גפנים מהזן קריניאן בכרם השייך לעירא לוויין במזכרת-בתיה. גפנים אלה הציגו נגיעות במחלת הצהבון והציגו תסמינים אופייניים למחלה בזני ענבים אדומים הכוללים: האדמה לא עונתית וקיפול עלים. דוגמאות חומר צמחי של זמורות עם עלים נלקחו מגפנים אלה לצורך הפקת DNA. דוגמאות ה-DNA שימשו כתבניות להגברה בעזרת PCR. המטרה היא שיבוט, קביעת רצף (מעקובת) ואפיון הפתוגן.

תחלי ה- PCR rtF3/P7 שימשו להגברת קטע דנ"א בגודל 950 bp הכוללים חלקים מהגנים: 16S rRNA ו- 23S rRNA וכלול spacer region 16S-23S. תוצר ה- PCR נוקה מגיל ושובט בפלסמיד pGEM_T easy. הרצף של המחדר נקבע והשווה לרצפי פיטופלסמה במאגר מידע (NCBI) באמצעות תוכנת Blast. השוואת הרצפים העלתה הומולוגיה של 98% לרצף הגנים: 16S rRNA ו- 23S rRNA וכלול 16S-23S spacer region של הפתוגן *Candidatus Phytoplasma solani* השייך לקבוצת הפיטופלסמה Stolbur 16SrXII. על סמך רצף ה- 16S-23S spacer region במחדר שהתקבל והשוואה לרצפים הומולוגיים משמונה קבוצות פיטופלסמה שונות תוכן תחל ספציפי לגזע הפיטופלסמה *Candidatus Phytoplasma solani* מקבוצת ה- Stolbur (16SrXII). בהשוואת מעקובת התחל שתוכן (fSt_1600) עם רצפים של גזעים שונים מקבוצת ה- Stolbur התקבלה הומולוגיה מלאה לרצף התחל רק עם פיטופלסמה מגזע *Candidatus Phytoplasma solani*, מאידך לא התקבלה הומולוגיה מלאה עם רצפים משבעה קבוצות פיטופלסמה שונות. בהשוואה זו נמצא שמעקובת התחל שמורה בקצה 5' אך שונה בקצה 3'.

בדיקת יעילות וספציפיות ההגברה של התחל fSt_1600 שתוכן נבדקה בעזרת nested-PCR עם התחלים fSt_1600/rtP7. בנוכחות תבנית DNA מתאימה של פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה- Stolbur תחלים אלה הניבו תוצר הגברה ספציפי בגודל 230 bp, לעומת זאת לא זוהו תוצרי הגברה בגודל הצפוי בדוגמות של פיטופלסמה השייכות לקבוצות: *Candidatus phytoplasma asteris* ו- 16SrII ובמיצוי DNA מצמחי וינקה וגפן בריאים שאינם נגועים בפיטופלסמה (איור 14).



איור 14: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fSt_1600/rtP7, סמן גודל GeneRuler™ 100 bp DNA, M; Ladder (Fermentas); באריות: AY, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה-*Candidatus phytoplasma asteris*, A-WB, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה-16SrII, St-1, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה-Stolbur (16SrXII) שבודדה מגפן ברמת הגולן. St-2, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה-Stolbur (16SrXII) שבודדה מויניקה ברמת הגולן. St-3 ו-St-4, פיטופלסמה לקבוצת ה-Stolbur (16SrXII) שבודדה מגפנים שונות מסוג קריניאן במזכרת בתיה. NC1, גפן בריאה ללא תסמינים. NC2, ויניקה בריאה ללא תסמינים. NC3, ביקורת שלילית לראקציה ה-PCR, בה הוספו מים במקום DNA.

7. הכנת נוגדנים של פיטופלסמה וביטויים בצמחים באמצעות מערכת וירוס-ויקטור.

הכנת תכשיר מועשר של פיטופלסמה.

חומר המוצא שלנו היה שתילים של וינקה אשר נמצאו ע"י בדיקות PCR מודבקים בפיטופלסמה. שתילים אלה שימשו לצורך איסוף רקמת שיפה עשירה בפיטופלסמה (עורקים ופטוטרות של עלים). רקמה כזאת (10 גרם) נאספה מצמחים מודבקים בפיטופלסמה, ושימשה להכנת הומוגנט ע"י טיפול באנזימים של צילולאז ומאציראז. במקביל ייצרנו הומוגנט מצמחים בריאים אשר משמשים להכנת נוגדנים לחלבונים הצמחיים. השלבים בעבודה אשר בוצעו בשנה הראשונה היו:

- הכנת נוגדנים פוליקלונליים כנגד חלבונים צמחיים, ע"י הזרקת הומוגנט מוכן מצמח וינקה בריא.
- הנוגדנים של מיצוי הצמח הבריא שימשו להשקעת החלבונים הצמחיים (cross-adsorption) ע"י הדגרתם של נוגדנים אלה עם מיצוי של צמח וינקה נגוע בפיטופלסמה. כתוצאה מכך תחול התקשרות בין הנוגדנים לבין החלבונים הצמחיים ואלה ישקעו ויוצאו מהמערכת ובכך נשאר עם חלבונים פיטופלסמתיים.
- החלבונים הצמחיים סולקו ע"י צנטריפוגה, והמשפה (הנוזל) המכיל את הפיטופלסמה ישלח למעבדת שירות במכון וויצמן להזרקה לעכברים והכנת נוגדנים מונוקלונליים ספציפיים.

הכנת mRNA ושיבוט scFv:

במסגרת שיתוף עם קבוצתו של דר' Hei-Ti Hsu מ-Beltsville MD, USA קבלנו תאי היבריודומה המייצרים נוגדנים ספציפיים לפיטופלסמה מקבוצת ה- aster yellows. התאים של ההיבריודומות אשר שימשו לצורך הפקת mRNA ע"י השימוש בקיטים מסחריים בהם ניתן לבודד poly A mRNA. ה-RNA המופק שימש לצורך הכנת cDNA של החלק הוריאבילי של השרשרת הכבדה ושל השרשרת הקלה של הנוגדנים המונוקלונליים (scFv) תוך כדי השימוש בפריימרים ספציפיים לאזורים שמורים בשרשראות אלה. שתי השרשראות חוברו ביניהן ע"י רצף DNA המקדד לפפטיד קצר $(Ser-(Gly)_4)_3x$ אשר יגשר בין האזור המשתנה של השרשראות הכבדה והקלה. תפקידו של הפפטיד המגשר הוא לאפשר קיפול שתי השרשראות ויצירת מבנה מרחבי פעיל. בקצה הקרבוקסילי של המבנה הנוצר חובר פפטיד c-myc ופפטיד המורכב משרשרת היסטידינים. פפטידים אלה יישמשו למטרות זיהוי, הפקה וניקוי של החלבון תוצר הביטוי של ה-cDNA. שיבוט ה-cDNA בפלסמידים לצורך ביטוי תוצר ה-scFv באמצעות פלסמידים של ביטוי (pET28a) בחיידקים ובניית קונסטרוקטים לצורך טרנספורמציה של גפן נעשה ע"י השימוש בפרוטוקולים סטנדרטיים. מבנה ה-cDNA של שתי השרשראות הנוגדן בתוספת הפפטיד המגשר, פפטיד ה-c-myc ופפטיד ההיסטידינים שובט בפלסמיד לביטוי חלבונים pET28a, ולאחר מכן הוחדר הפלסמיד אשר יכול את המחדר לחיידקים BL21. בדיקת ביטוי המחדר נעשתה ע"י גידול החיידקים בנוכחות IPTG, הפקת החלבונים מהחיידקים ואנליזת Western blot תוך כדי השימוש בנוגדנים ספציפיים לפפטיד ההיסטידינים או לפפטיד ה-c-myc (איור 15).

בדיקת פעילות:

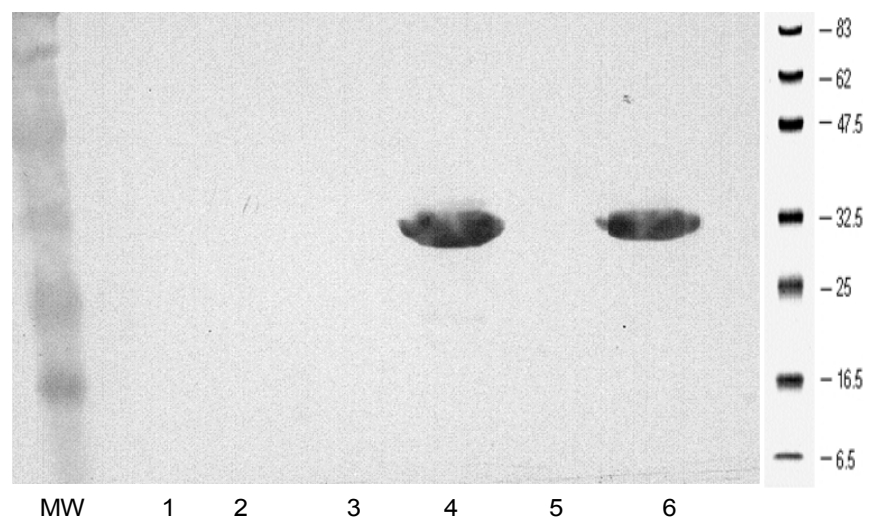
בדיקת הפעילות של scFv מבוצעת ע"י בדיקות DAS-ELISA. מיצוי מצמחים (וינקה) נגועים בפיטופלסמה קובעו על גבי ממבראנה. אחרי שטיפתה, הוגבה הממבראנה עם חלבון ה-scFv המבוטא בחיידק. לאחר מכן הוגבה הממבראנה עם נוגדן מונוקלונאלי סגולי לנוגדנים של הארנבת מסומן ב-

alkaline phosphatase. פעילות ה-alkaline phosphatase נעשתה עם הוספת סובסטרט *p*-nitrophenyl phosphate.

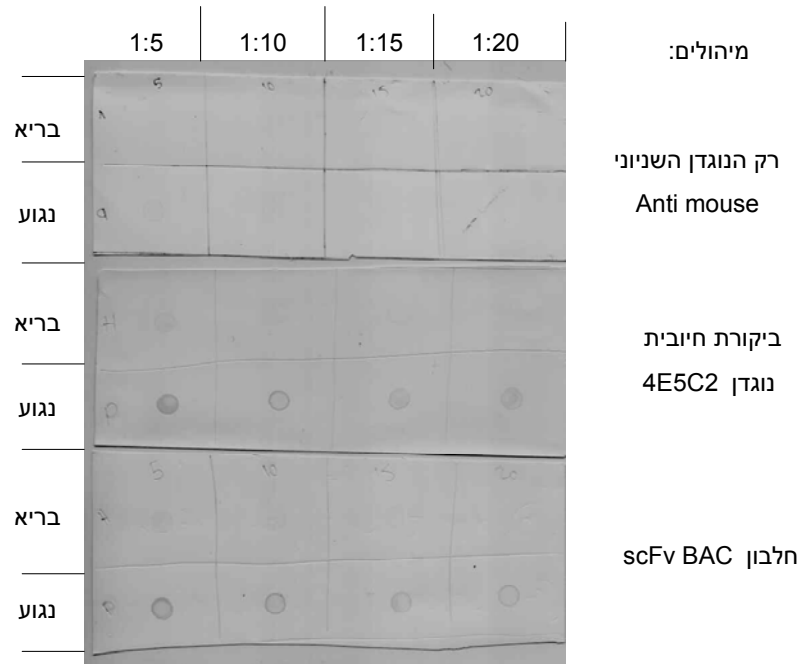
בבדיקות ראשוניות אשר נעשו אובחנה פעילות ביולוגית ל- scFv המבוטא בחיידקים (איור 16).

ביטוי scFv בצמחים:

לצורך החדרה וביטוי הגנים של scFv בצמחים התחלנו את הניסויים דרך השימוש במערכת וירוס-ווקטור. המערכת מבוססת על השימוש בוירוס ה- GVA כווקטור להחדרת וביטוי גנים זרים לתא הצמחי. מבין יתרונותיה הבולטים של מערכת זו: (א) ביטול הצורך בשתילת הגנים לתוך הגנום הצמחי (טרנספורמציה); (ב) הרמות הגבוהות של הריבוי של הוירוס מביאות לביטוי כמויות גדולות של תוצר הגן; (ג) בשל טבעה של ההדבקה המכאנית בוירוסים, הרמה המקסימאלית של ביטוי הגנים הזרים מהגנום הוויראלי, צפויה להתרחש בתוך זמן קצר, בדרך-כלל שבוע עד שבועיים מיום ההדבקה; (ד) היות יח- GVA הוא וירוס של רקמת השיפה, ניתן להסיק כי ווקטור ה- GVA עשוי להוות לנו כלי יעיל לביטוי מקסימאלי של גנים לעמידות ברקמה בה חיה גם הפיטופלסמה. במעבדתו של ד"ר מוניר מוואסי פותח ווקטור ויראלי המבוסס על גנום נגיף הגפן GVA. אשר הוכח כי היה יעיל למטרת ביטוי הגנים GFP ו- GUS בצמחי בנטמינה וגפן. ה- cDNA של הנוגדנים scFv שובט לתוך הגנום של ווקטור ה- GVA תחת בקרת הפרומוטור של חלבון התנועה המביא את ביטוי הנוגדנים לרקמת השיפה המאוכסנת בפיטופלסמה. לאחר שיבוט הגנים של scFv הספציפיים לפיטופלסמה לתוך הגנום של ווקטור ה- GVA (המשובט בפלסמיד בינארי) נעשתה הדבקה של הווקטור לצמחי בוחן בנטמינה ע"י אגרואינפקציה. בבדיקות ראשוניות מעידות על ביטוי של ה- scFv בצמחי בנטמינה. השלב הבא הוא לבחון את ביטוי ה- scFv במערכת של גפן.



איור 15: בדיקת Western blot של חלבונים המבוטאים בחיידקים כנגד ה- scFv. תגובה חיובית רואים בחלבונים אשר הופקו מחיידקים המבטאים את הגן (4, 6) אך לא בביקורות השליליות.



איור 16 : בדיקת פעילות ביולוגית של הנוגדן הרקומבנטי אשר הוכן נגד ה-scFv.

<p align="center">מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>להכין נוגדנים נגד חלבון ממברנאלי אנטיגני של פיטופלסמה, להכין נוגדנים נגד תכשיר מועשר בפיטופלסמה, לבטא scFv סגולי לפיטופלסמה בחיידקים ובצמחים ע"י ווקטור ויראלי, אפיון חלקיקי פיטופלסמה בחלקים שונים בצמח נגוע ע"י אמצעי Real-Time PCR, ללמוד על השפעת הטמפרטורה על התפשטות פיטופלסמה בצמח.</p>
<p align="center">עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</p> <p>הוכנו נוגדנים נגד חלבון ממברנאלי אנטיגני של פיטופלסמה. הוכנו נוגדנים נגד תכשיר מועשר בפיטופלסמה. שובט נוגדן רקומבננטי scFv ספציפי לפיטופלסמה קבוצת aster yellow ובוטא בחיידקים ובצמחי מודל. התוצאות הראו פעילות ביולוגית לנוגדן הרקומבננטי scFv הספציפי לפיטופלסמה קבוצת aster yellow. פותח פרוטוקול לאפיון פיטופלסמה באמצעי Real-Time PCR. עסקנו באפיון חלקיקי פיטופלסמה בחלקים שונים של הצמח הנגוע עסקנו בלימוד השפעת הטמפרטורה על פיזור והתפשטות פיטופלסמה בצמח הנגוע</p>
<p align="center">המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.</p> <p>הנוגדן אשר הוכן נגד תכשיר מועשר היה שימושי לזיהוי נגיעות בפיטופלסמה בצמחים, לעומת זאת הנוגדן כנגד החלבון הממברנאלי לא היה יעיל למטרת זיהוי הפתוגן בצמחים. מקטע ה-cDNA של ה-scFv אשר בוטא בחיידקים ובצמחים (ע"י הווקטור GVA) הוא פעיל ביולוגית. ביטוי הנוגדן בצמח היה חלש ומחייב אופטימיזציה של השיטה לצורך קבלת ביטוי יותר חזק. נמצא כי בטמפרטורה של 28-34 חלקיקי הפיטופלסמה מתפשטים במהירות בחלקי הצמח השונים. בטמפרטורה של 17 ופחות התנועה שלהם בצמח היא מוגבלת אך הפתוגן נשמר.</p>
<p align="center">הבעיות שונתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שונתרה לביצוע תוכנית המחקר.</p> <p>המחקר מתבצע כפי שהוצע אם כי הכנת נוגדנים מונוקלונליים וטרנספורמציה של גפנים במעבדת שירות במכון ויצמן ובקליפורניה בהתאמה, לא בוצעו בגלל עלויות אשר תקציב המחקר לא יכול לספק.</p>
<p align="center">האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.</p> <p align="right">פרסומים:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. תומר גרשון, עבד גרה, תירצה זהבי, עירן הרכבי, מוניר מוואסי. פיתוח מערכת PCR לגילוי ספיציפי של פיטופלסמה מקבוצת ה-Stolbur. עלון הנוטע, 2007 יוני, 15-18. 2. תומר גרשון, עבד גרה, שרה שפיגל, מוניר מוואסי. פיטופלסמה בצמחי וינקה: I- שימוש בשיטת Real-Time PCR לכימות הפתוגן ואפיון הנגיעות. עולם הפרח, 2007 אפריל-מאי 54-56. 3. תומר גרשון, עבד גרה, שרה שפיגל, מוניר מוואסי. פיטופלסמה בצמחי וינקה: II- אפיון פיזור חלקיקי פיטופלסמה בצמחי וינקה בעזרת שיטת Real-Time PCR. עולם הפרח, 2007 יולי-אוגוסט 48-50. 4. תומר גרשון, עבד גרה, שרה שפיגל, מוניר מוואסי. פיטופלסמה בצמחי וינקה: III- השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות הפיטופלסמה בצמח. עולם הפרח, 2008 דצמבר-ינואר, 46-49. <p align="right">פטנטים: אין</p>
<p align="center">פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</p>
<p align="right">רק בספריות <</p>
<p align="right">ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) (X) <</p>
<p align="right">חסוי – לא לפרסם <</p>
<p> </p>