דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 20-15-0044

פיתוח כלים חדשניים לגילוי גורמי מחלות בזרעים ובחומר ריבוי וגטטיבי

Development of new tools for detection of pathogens in seeds and vegetative propagation material

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

שולמית מנוליס, אביב דומברובסקי, ויקטור גאבה, לאורה צ'לופוביץ, נועה סלע ונטע לוריא

המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

E-mail: shulam@volcani.agri.gov.il

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר שולה מנוליס תאריך 14.5.19

תוכן העניינים

תקציר	2
מבוא ותאור הבעיה	3
מטרת המחקר	4
פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר	5
א. פיתוח שיטה לזיהוי נגיפים בזרעי עגבנייה באמצעות ריצוף רנ"א	5
ב. בניית אתר לזיהוי רצפי וירוסים באמצעות רצפי sRNA, RNA-seq ו- Nanopore	8
ג. זיהוי חיידקים ופטריות בזרעי עגבנייה	11
דיון ומסקנות	18
ספרות מצוטטת	20
פרסומים מדעיים	21

תקציר

1. הצגת הבעיה: בשנים האחרונות זוהו מספר רב של גורמי מחלות בחומר ריבוי המיוצא והמיובא לישראל. כתוצאה מכך יש פגיעה בייצוא וכן חדירה של פתוגניים חדשים כולל הסגר. מטרת המחקר היא לפתח כלי חדשני לגילוי רגיש ובו זמנית של פתוגניים בזרעים ובחומר ריבוי וגטטיבי.

2. שיטות העבודה: זיהוי נגיפים/וירואידים בזרעי עגבנייה נעשה באמצעות ריצוף sRNA ו- RNA ויראלי ואנליזה ביואינפורמטית של הרצפים. זיהוי חיידקים ופטריות בזרעים נעשה בשיטת הריצוף החדשה של Nanopore ואנליזה ביואינפורמטית בתוכנות המסופקות ע"י החברה.

3. תוצאות עיקריות: ריצוף בפלטפורמה של Illumina Hi-seq איפשר זיהוי של הוירוסים ToBRFV ו- PepMV, הרכבת רצף גנום חלקי (בתערובות המכילות זרעים בנגיעות של 0.16%) והרכבת גנום מלא בתערובות המכילות 0.3% זרעים נגועים. נבנה אתר לזיהוי וירוסים הפתוח כעת למשתמשים נוספים. הוקמה התשתית לריצוף דנ"א ורנ"א בשיטת ריצוף חדשה Nanopore. הפקת דנ"א כללי מזרעי עגבנייה וריצוף בשיטה זו איפשר זיהוי של 2 חיידקים (*Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*) ופטריה (*Fusarium oxysporium*) ברמת נגיעות של 0.5%. שימוש בשיטת ריצוף זו כדרך כללית לאיבחון פתוגנים בצמחים נבדק עם דגימות צמחים שונים הנגועים בגורמי מחלה ידועים ולא ידועים ונמצא שהשיטה מהירה ויעילה.

4. מסקנות והמלצות: השימוש בטכנולוגית ריצוף מתקדמת מאפשר זיהוי מוצלח של טובמווירוסים ופפינווירוסים בזרעי עגבנייה ברמת נגיעות של 0.16%. המעבר לספריות המבוססות על הפחתת הרנ"א הצמחי (RNA depletion) העלה את כמות הקריאות שמופו לנגיפים הנחקרים ביותר מפי 10 לעומת אלו שהתקבלו מספריות המבוססות על קשירה של Poly A. זיהוי פתוגנים בזרעי עגבנייה התאפשר לאחר שימוש בטכנולוגיית ריצוף חדשה מהדור השלישי שלהערכתנו הוכיחה את יעילותה בהשוואה לשיטות ריצוף אחרות. באמצעות שימוש בטכנולוגית זו ניתן לאבחן גורמי מחלה בצמחים המראים סימני מחלה לא ברורים ובכך לחסוך את הצורך בביצוע בדיקות שונות לכל גורם מחלה אפשרי. השיטה יכולה להתאים לגילוי גורמי מחלות הסגר. מחקר זה הינו חדשני בתחום של איבחון מחלות בצמחים.

<u>מבוא ותאור הבעיה</u>

בשנים האחרונות אנו עדים לעליה דרסטית בהופעתם של גורמי מחלה בצמחים שמקורם בחומר ריבוי נגוע בפתוגנים שונים. זוהו מספר רב של גורמי מחלות (נגיפים, חיידקים, פטריות) בחומר ריבוי המיוצא מישראל, דבר שפגע בתדמית הייצוא ופוגע ביצוא המסחרי לשווקים שונים באירופה, ארה"ב, יפן וסין. גם בחומר ריבוי המיובא לישראל ושלכאורה קיבל את כל אישורי הבריאות הדרושים נמצאו פתוגניים שונים כולל אלו המוגדרים כפתוגנים של הסגר. למרות שחומר הריבוי מגיע עם תעודת בריאות נעשית בדיקה נוספת לפתוגנים של הסגר במעבדות הרשמיות והפרטיות לפי פרוטוקולים בינלאומיים. המצב כיום בפועל בו חברות הזרעים ומעבדות האבחון עושות כל שביכולתן על מנת לאתר ולפסול מכסות זרעים נגועות איננו משביע רצון ולמעשה אנו עדים לחדירה והתבססות של פתוגנים חדשים בארץ בגידולים שונים. כך לדוגמא, אין כיום מערכת יעילה לזיהוי וירואידים בזרעי עגבנייה ואנו עדים לחדירה מתמדת של וירואידים מסוג פוספיוירואיד (*Pospiviroid*) הגורמים לפגיעה קשה הן למגדלי עגבניות מאכל בארץ והן למגדלי עגבניות לזרעים. נגיפים מהסוג Tobamovirus משתמרים במגוון זרעים. לאחרונה זוהה טובמווירוס חדש בעגבנייה (ToBRFV) *Tomato brown rugose fruit virus* השובר את העמידות של כל הזנים המסחריים. בשנים האחרונות (CGMMV) *Cucumber green mottle mosaic virus* מהווה בעיה קשה במגוון זרעי דלועיים כגון אבטיח, מלון, מלפפון, ומיני דלעות שונים המשמשים ככנות לצמחים מורכבים.

<u>הופעה של נגיף חדש בארץ:</u> החל משנת 2017 זוהה נגיף חדש בתוצרת מיובאת (פירות עגבנייה ללא עוקץ), הנמכרת בשווקים השונים בארץ. לאחר מכן, בדוגמאות צמחים ופירות של עגבנייה שהתקבלו ממגדלים באזור הבשור (החל מחודש נובמבר 2018) ושנבדקו במעבדה בבדיקות סרולוגיות ומולקולאריות, התקבל זיהוי של ToBRFV ונגיף נוסף מסוג פוטקס – *Potexvirus* (PepMV) *Pepino mosaic virus* אשר הנו נגיף חדש בארץ. ב- 40 דוגמאות של צמחי עגבנייה שהתקבלו ממגדלים מאזורים שונים בארץ זוהה PePMV. נכון לחודש אפריל 2019, PepMV מצוי בחממות לגידול עגבניות באזורים: לכיש, הבשור ורמת נגב בהדבקה משולבת עם הטובמווירוס ToBRFV.

מבין המחלות החשובות הנגרמות ע"י חיידקים בזרעי עגבניה ניתן למנות את החיידק *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, החיידק *Pseudomonas corrugate* (*mediterranea*) והחיידק *Xanthomonas euvesicatoria*. חיידקים אלה מהווים בעיה לגידול ויצוא עגבניות ויצור זרעי עגבניות.

באבחון פטריות גורמות מחלות, המעבדות המוסמכות מבצעות את הבדיקות בשיטות מקובלות, על בסיס זיהוי מורפולוגי, מולקולארי או סרולוגי שחלקן מיושנות ויעילותן מוגבלת. בהרבה מקרים חומר ריבוי הנבחן להימצאותן של פטריות פתוגניות, נמצא נקי בשל רמת גילוי נמוכה של השיטות המשמשות כיום. לעיתים פטריות אלה נמצאות במצב לטנטי, ביחידות ריבוי בודדות או בשלב לא פתוגני. במקרים כאלה חומר הריבוי אינו מראה סימני מחלה אך עם היווצרות התנאים המתאימים הפטריות מתפתחות וגורמות למחלה בצמח הגדל. ביצוע בדיקה כוללנית רחבת טווח לבחינת רמת הניקיון של חומר הריבוי הינו קשה וכמעט שאינו מבוצע. נכון להיום, מלבד

בחינת חומר לגורמי מחלות הסגר ידועות, אבחון וזיהוי גורמי מחלות חדשים שאינם נכללים במסגרת זו טרם נעשה. בדיקה סטנדרטית של זרעי עגבניות ודלועיים מחייבת בדיקה ל- *Fusarium oxysporum* עד לרמת הגזע (הן ביבוא והן ביצור מקומי).

ישנן שיטות רבות לזיהוי וגילוי גורמי מחלות בזרעים ובחומר ריבוי המבוססות על עקרונות שונים. בשיטות המקובלות ניתן לגלות את גורמי המחלה לעיתים אף בספציפיות וברגישות רבה. אולם ישנם מקרים לא מעטים בהם שיטות האבחון הקיימות אינן מצליחות לגלות ריכוזים נמוכים של הפתוגנים ברקמות הצמחיות ובזרעים הנבדקים. הסיבות לכך יכולות להיות שונות, החל מכך שקשה לעיתים לבודד את הפתוגנים על מצעי מזון וכלה בכך ששיטות ה- PCR רגישות למעכבים הנמצאים בזרעים וברקמות הצמחיות. בכל מקרה התוצאה היא ירידה ברמת הגילוי. בנוסף, גם כאשר שיטות האבחון הקיימות משביעות רצון יש צורך לבצע בדיקה נפרדת לכל אחד מהפתוגניים החשובים של אותו הגידול. מכיוון שבמקרה כזה עלות הבדיקות גבוהה, חברות הזרעים אינן בודקות את כל הפתוגניים האפשריים.

בשנים האחרונות פותחו שיטות מולקולריות מתקדמות המבוססות על הטכנולוגיות של ריצוף מתקדם כגון Illumina אשר יאפשרו זיהוי יעיל וספציפי למספר רב של פתוגניים בו זמנית. בתוכנית אנו מציעים דרך אחרת לאבחון גורמי מחלות שונים המבוססת על ריצוף דנ"א או רנ"א, ניתוח תוצאות הריצופים והקמת תשתית מחשובית שתשרת מעבדות אבחון. התוכנית עונה על הצורך בפיתוח גישות חדשות ויעילות יותר, שיאפשרו זיהוי מדויק ורגיש בעלויות מתחרות לשיטות הקיימות. הצלחת התוכנית תתרום לשימוש בחומר ריבוי נקי בחקלאות ישראל ובנוסף תסייע להגדלת מרחב היצוא של זרעים ביחד עם הקטנת עלויות של הבדיקות הנדרשות. בשונה מטכניקות המבוססות על PCR או microarray, כאשר אנחנו משתמשים בטכניקות הריצוף החדשניות (NGS) Next Generation Sequencing אין לנו שום צורך בידע מוקדם על רצפי הפתוגנים הנבדקים.

<u>היפותזת העבודה</u>: שימוש בטכנולוגיות מבוססות ריצוף עמוק (NGS) יאפשר גילוי וזיהוי של פתוגניים בחומר ריבוי וגטטיבי וזרעים ברגישות, דיוק, הדירות ומהירות גבוהים בהשוואה לשיטות הקיימות כיום.

הייחודיות של שיטות הריצוף השונות הן שניתן בעזרתן לגלות בו זמנית ובאופן ספציפי נוכחות של רצפי רנ"א או דנ"א של פתוגניים שונים בדוגמא הנבחנת כולל פתוגניים שאינם קיימים בארץ. האפשרות לגלות פתוגניים של הסגר תתרום לקיצור הזמן לאינטרודוקציה של חומר צמחי חדש כמו גפנים. בנוסף, ישנם מקרים לא מעטים שבהם לא מצליחים לגלות את גורמי המחלה. הצמחים החולים נשלחים למעבדות שונות לבדיקת נוכחות נגיפים, פטריות וחיידקים אולם למרות זאת אין תשובה ברורה לגבי גורם המחלה. הכלי שיפותח בתוכנית יתאים במיוחד למקרים כאלה מכיוון שבדיקה אחת תאפשר למצוא את גורם המחלה כולל פתוגנים לא ידועים בארץ או כאלה שלא ניתנים לריבוי על מצעי מזון. להערכתנו עלות הבדיקה בכלי החדש שנפתח תהיה כדאית לעומת הבדיקות הנעשות כיום וזאת בנוסף ליתרונות האחרים של רגישות וספציפיות גבוהים.

מטרת המחקר: פיתוח כלי חדשני לגילוי רגיש ובו זמנית של פתוגניים בזרעים ובחומר ריבוי וגטטיבי.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

א. פיתוח שיטה לזיהוי נגיפים בזרעי עגבנייה באמצעות ריצוף רנ"א

מהלך הניסוי:

א. הכנת חומר ריבוי נגוע: שבועיים משתילה הודבקו מכאנית צמחי עגבנייה במוהל צמחים נגועים ב-ToBRFV או ב-PepMV. הצמחים גודלו בחממה עד קבלת פירות בשלים. במהלך גידול הצמחים התפתחו תסמיני מחלה אופייניים ל-ToBRFV ו-PepMV (לאחר כשבועיים), בהמשך לאחר כ- 8-10 שבועות נעשה אימות ב-RT-PCR לזיהוי נוכחותם של הפתוגנים. החל מהשבוע ה-12 התבצע איסוף פירות מהצמחים הנגועים לצורך הפקת הזרעים הנגועים.

ב. זרעים נגועים ב-ToBRFV וזרעים נגועים ב- PepMV עורבבו עם זרעי עגבנייה החופשיים מהנגיפים הללו (להלן זרעים "בריאים"), ביחסים שונים, כמתואר בטבלה 1. מכל תערובת כזאת הופק רנ"א נגיפי באמצעות קיט מסחרי (Accuprep viral RNA Extraction kit, Bioneer).

ג. בנוסף נערך ניסוי ביקורת בו הופק רנ"א נגיפי (כמתואר בסעיף ב'), מ- 100 זרעי עגבנייה חופשיים מ-ToBRFV- ו-PePMV.

ד. מכל דוגמאות הרנ"א הנגיפי (טבלה 1) הוכנו ספריות (Seed Script-Seq Complete sample prep), המבוססות על הפחתה של ה-RNA הריבוזומלי הצמחי. הספריות רוצפו בריצוף מתקדם בפלטפורמה של Illumina Hi-seq ביחידת הריצוף בטכניון. ניתוח ביואינפורמטי של התוצאות: מהרצפים שהתקבלו לאחר הריצוף המתקדם הוסרו רצפי האדפטורים ורצפים שאיכותם נמוכה באמצעות שימוש בתוכנת TRIMMOMATIC גרסא 0.35. לאחר מכן התבצע מיפוי של הרצפים על תבנית של רצף נגיף ידוע בעזרת תוכנת BOWTIE. בזרעים מודבקים התקבל כיסוי מלא של גנום הנגיף. בעזרת התוכנה ניתן היה לקבוע את אחוז הרצפים המשוייכים לוירוס הידוע ואת אחוזי הכיסוי.

טבלה 1: תערובות זרעים מודבקים שנשלחו לריצוף

סה"כ זרעים בתערובת	מספר זרעים נגועים ב- PepMV	מספר זרעים נגועים ב- ToBRFV	מספר זרעים "בריאים" (לא נגועים)	אחוז זרעים נגועים ב- ToBRFV ו- PepMV בתערובת הזרעים	חזרות
100	2	2	96	2%	**3**
200	2	2	196	1%	**3**
400	2	2	396	0.5%	**3**
600	2	2	596	0.3%	**3**
1200	2	2	1196	0.16%	**2**
100	0	0	100	0%	**2**

תוצאות:

תוצאות הריצוף העמוק שהתקבלו נותחו וסוכמו ועיקר התוצאות מוצג בטבלה מספר 2 ובאיור 1. ע"פ התוצאות שהתקבלו מריצופי הספריות נמצא:

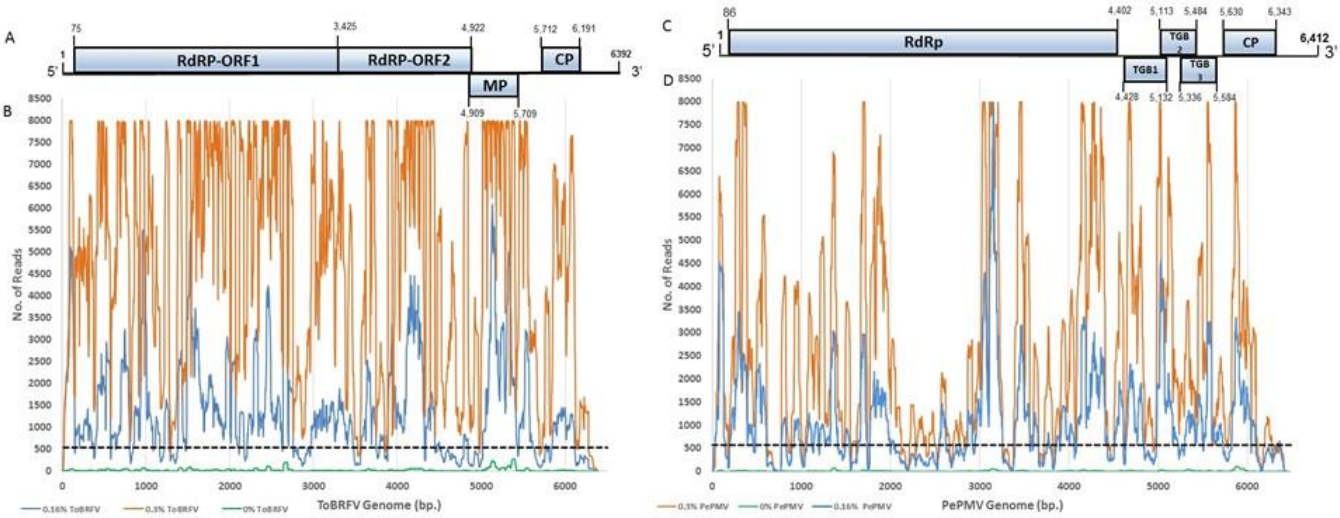
1. זיהוי ToBRFV – התקבל זיהוי של הנגיף בכל אחת מתערובת הזרעים (נגיעות 0.16%-2%) באופן הבא: בתערובות זרעים בנגיעות של 2% זוהה הנגיף ב- 27.2% בממוצע מסך הקריאות (reads) לאחר ניקוי (פילטר); בתערובות זרעים בנגיעות של 1% זוהה הנגיף ב- 19.1% בממוצע מסך הקריאות; בתערובות זרעים בנגיעות של 0.5% זוהה הנגיף ב- 7.6% בממוצע מסך הקריאות; בתערובות זרעים בנגיעות של 0.3% זוהה הנגיף ב- 3.0% בממוצע מסך הקריאות ובתערובות זרעים בנגיעות של 0.16% זוהה הנגיף ב- 2.25% בממוצע מסך הקריאות. בזרעים הבריאים זוהה הנגיף ב-0.015% בממוצע מסך הקריאות, זיהוי זה הוא זניח וכל הנראה נובע מזיהום שנגרם בזמן ההרצה במכשיר האילומינה.

2. זיהוי PepMV - התקבל זיהוי של הנגיף בכל אחת מתערובת הזרעים (נגיעות 0.16%-2%) באופן הבא: בתערובות זרעים בנגיעות של 2% זוהה הנגיף ב- 7.5% בממוצע מסך הקריאות (reads) לאחר ניקוי (פילטר); בתערובות זרעים בנגיעות של 1% זוהה הנגיף ב- 6.7% בממוצע מסך הקריאות; בתערובות זרעים בנגיעות של 0.5% זוהה הנגיף ב- 3.4% בממוצע מסך הקריאות; בתערובות זרעים בנגיעות של 0.3% זוהה הנגיף ב- 1.26% בממוצע מסך הקריאות ובתערובות זרעים בנגיעות של 0.16% זוהה הנגיף ב- 1.3% בממוצע מסך הקריאות. בזרעים הבריאים זוהה הנגיף ב- 0.005% בממוצע מסך הקריאות, זיהוי זה הוא זניח.

טבלה 2: תוצאות הריצוף המתקדם לזיהוי של הנגיפים בזרעים הנגועים

מספר קריאות שמופו ל- ToBRFV	מספר קריאות שמופו ל- PepMV	מס' קריאות שהתקבלו אחרי ניקוי (פילטר)	סה"כ מספר הקריאות שהתקבלו	נוכחות ToBRFV/ PepMV	הרכב תערובת זרעים (בריאים/נגועים)	מספר דוגמא
10639362 (40.45%)	2094493 (7.96%)	26299784 (87.58%)	30029024	2%	2/98	1
8555035 (29.85%)	2469727 (8.62%)	28656450 (95.11%)	30129933	2%	2/98	2
3569399 (11.27%)	1865652 (5.89%)	31659809 (93.46%)	33876683	2%	2/98	3
4192133 (14.16%)	1070352 (3.62%)	29607450 (89.38%)	33125528	1%	2/198	4
5302740 (21.24%)	1590504 (6.37%)	24971033 (94.41%)	26449021	1%	2/198	5
5168260 (22.01%)	891389 (3.80%)	23477991 (93.73%)	25047602	1%	2/198	6
1525789 (5.76%)	1057220 (3.99%)	26485585 (82.16%)	32237481	0.5%	2/398	7
2210856 (8.63%)	854587 (3.34%)	25614684 (87.38%)	29314096	0.5%	2/398	8
2562726 (8.38%)	886005 (2.90%)	30595666 (94.94%)	32225817	0.5%	2/398	9
1174473 (3.82%)	384000 (1.25%)	30770641 (85.78%)	35872580	0.3%	2/598	10

11	2/598	0.3%	32267251	29147378 (90.33%)	149991 (0.51%)	309637 (1.06%)
12	2/598	0.3%	27409425	25108335 (91.60%)	507481 (2.02%)	1055609 (4.20%)
13	2/1198	0.16%	29450056	25260983 (85.78%)	133884 (0.53%)	178584 (0.71%)
14	2/1198	0.16%	25288632	22194682 (87.77%)	460752 (2.08%)	840447 (3.79%)
15	0/100	0%	21244011	18785439 (88.43%)	1474 (0.01%)	3755 (0.02%)
16	0/100	0%	25394857	23121578 (91.05%)	794 (0.00%)	2276 (0.01%)

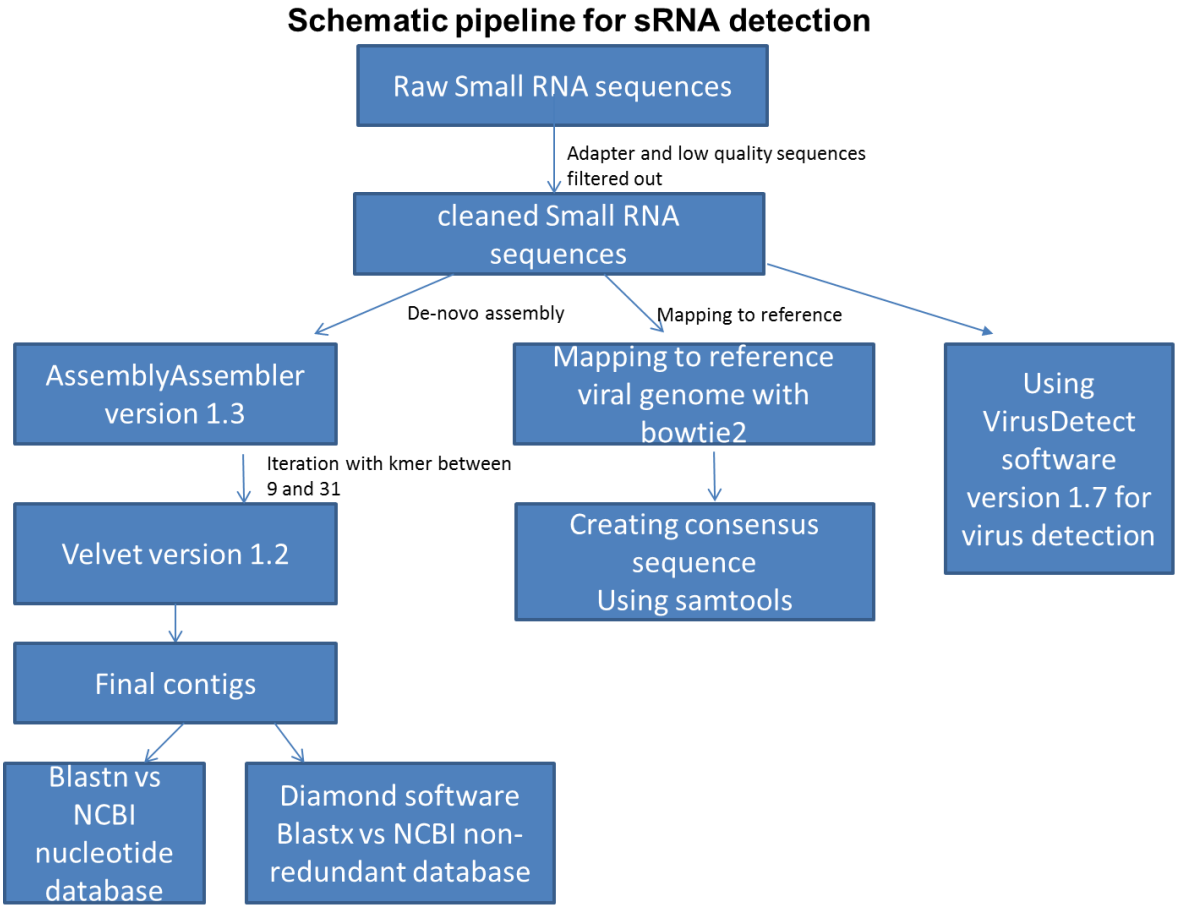


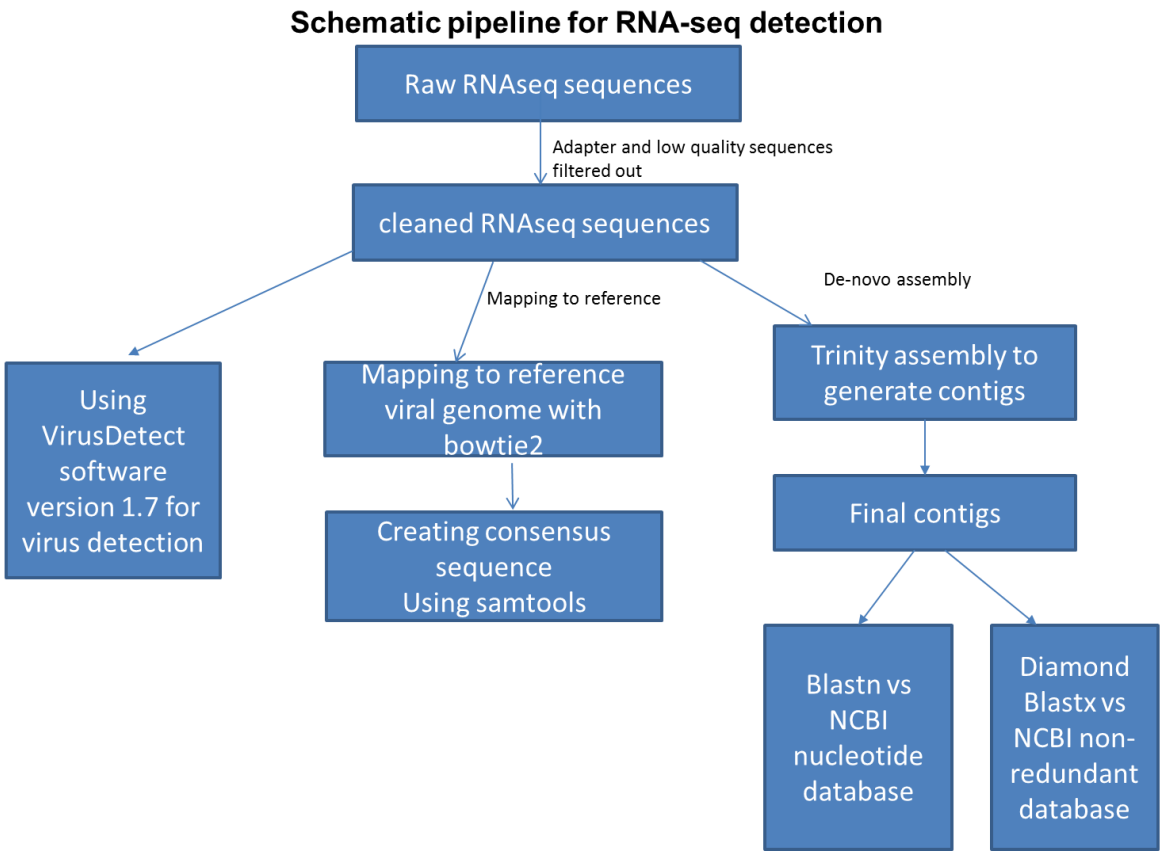
איור 1: סכמות נבחרות המדגימות את פיזור הקריאות שהתקבלו בריצוף מתקדם לאורך הגנום של ToBRFV ו- PepMV. A. ארגון סכמתי של הגנום של ToBRFV. B. פיזור הקריאות לאורך גנום ToBRFV כפי שהתקבלו בניתוח ביואינפורמטי של דוגמא 10 (זרעים בעלי נגיעות של 0.3%) ושל דוגמא 13 (זרעים בעלי נגיעות של 0.16%). תוצאות הריצוף אשר מופו ל-ToBRFV מהווים 3.82% מסך הקריאות שהתקבלו בהרצת דוגמא 10 ו- 0.71% מסך הקריאות שהתקבלו בהרצת דוגמא 13. C. ארגון סכמתי של גנום PepMV. D. פיזור הקריאות לאורך גנום PepMV כפי שהתקבלו בניתוח ביואינפורמטי של דוגמא 10 (זרעים בעלי נגיעות של 0.3%) ושל דוגמא 13 (זרעים בעלי נגיעות של 0.16%). תוצאות הריצוף שמופו ל- PepMV מהווים 1.25% מסך הקריאות שהתקבלו בהרצת דוגמא 10 ו- 0.53% מסך הקריאות שהתקבלו בהרצת דוגמא 13. דוגמא 15 מייצגת זרעים החופשיים מנגיפים אלו (0% נגיעות ל- ToBRFV ו- PepMV). בצבע

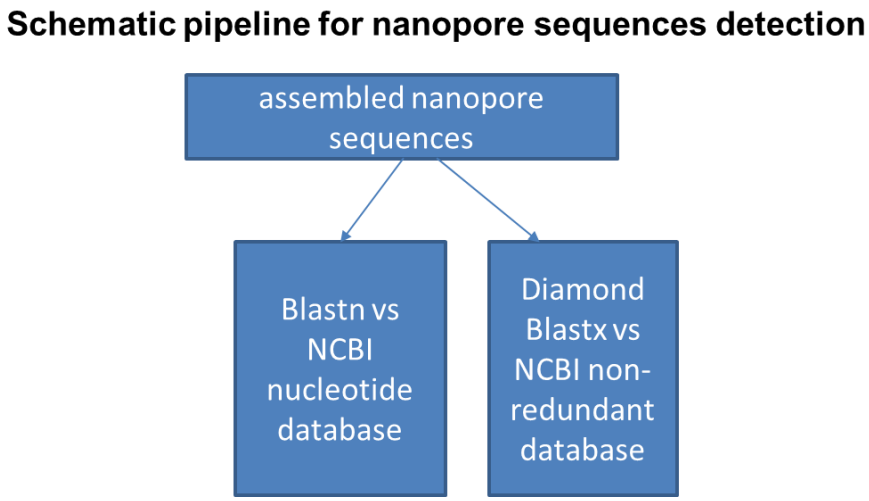
כתום - קריאות שהתקבלו לדוגמא 10, בצבע כחול - קריאות שהתקבלו לדוגמא 13 ובצבע ירוק - קריאות שהתקבלו לדוגמא 15.

ב. בניית אתר לזיהוי וירוסים באמצעות רצפי sRNA, RNA-seq ו- Nanopore

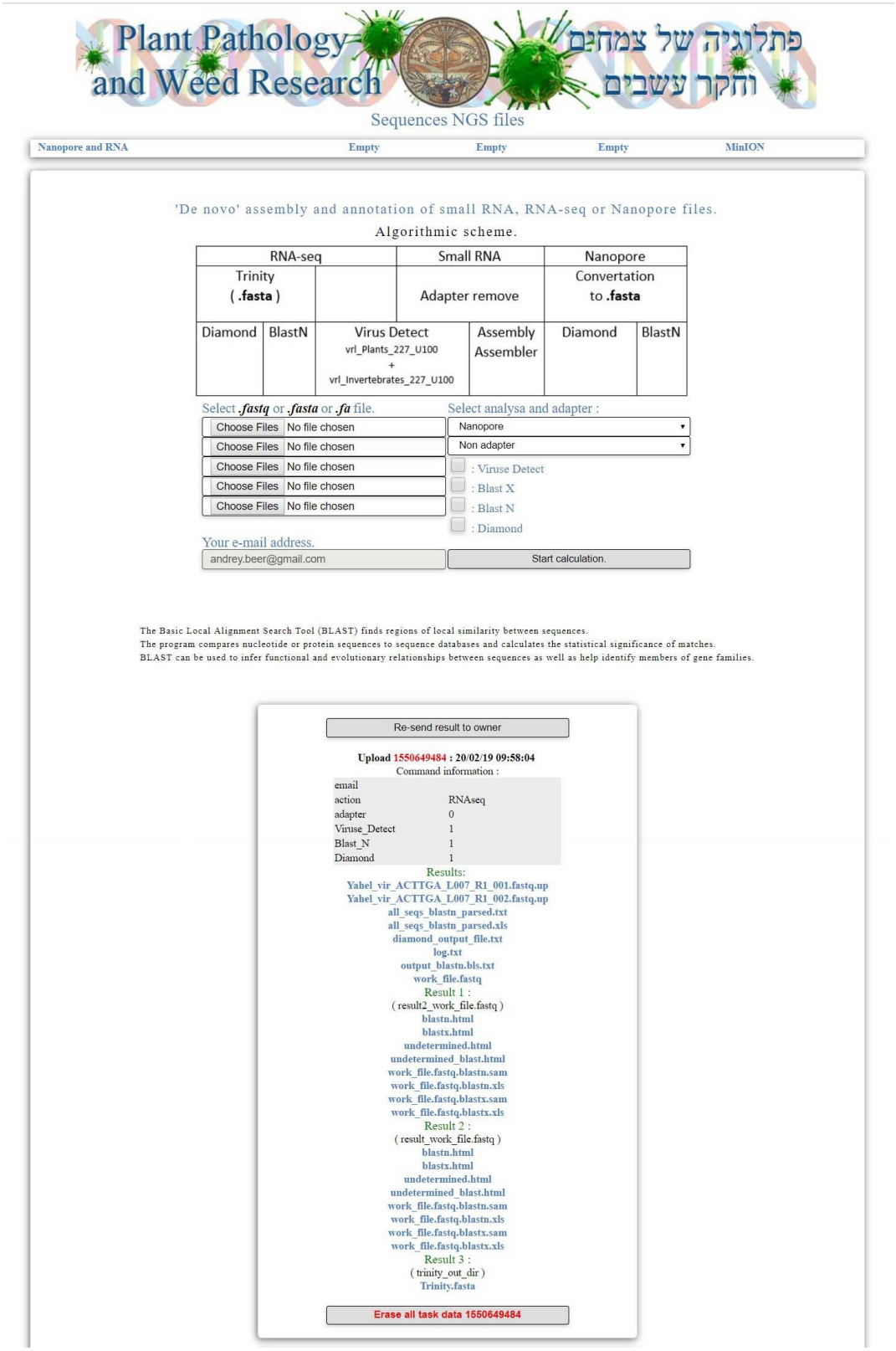
הוקם אתר המבוסס על ה-PIPELINE הנמצא תחת הכתובת http://10.26.6.57/ (איורים 2 ו- 3). האתר יכול לעשות אנליזת de-novo אסמבלי של מיפוי רצפי sRNA לגנומים ויראליים ידועים. ה-PIPELINE מבוסס על עבודה שפורסמה בעיתון BIOINFORMATICS (Isakov et al., 2011) עם התאמות שלנו. בשנה השלישית הרחבנו את האנליזה כך שהאתר יכול לעשות אסמבלי וזיהוי של רצפי וירוסים גם עבור רצפים של RNA-seq וגם עבור רצפי Nanopore. האתר נבנה בעזרת תוכניתן שהועסק על ידינו במסגרת תוכנית זו. הוא משמש אותנו לזיהוי וירוסים והוא פתוח כעת למשתמשים נוספים.







איור 2: תיאור של אפשרויות האנליזה אותן ניתן לבצע באתר.



איור 3: צילום עמוד הכניסה של האתר.

ג. <u>זיהוי חיידקים ופטריות בזרעי עגבנייה</u>

תוצאות ריצוף דנ"א כללי מזרעי עגבנייה לא נתנו תוצאות טובות לזיהוי פוזריום ושני החיידקים. כפי שציינו בדו"ח שנה א', יתכן שהסיבה לכך היא שמרבית הרצפים שהתקבלו הם מגנום העגבנייה (גנום העגבנייה 950Mb לעומת פוזריום 60Mb או קלויבקטר 2.6 Mb). גם אורך הרצפים שמתקבל בשיטת האילומינה (100-200 בסיסים) מקשה לאתר את הרצפים של הפתוגנים במאגרי המידע ואת האנליזה הביואינפורמטית. ניסויים במטרה להעשיר את רצפי הפתוגנים בדוגמאות בשיטות שונות לא היו יעילים מכיוון שכמות הדנ"א הייתה קטנה ולא מספיקה לריצוף בשיטת האילומינה. כדי להתגבר על בעיה זו בדקנו את אפשרות הריצוף בשיטה חדשה, מהדור השלישי, שפותחה לאחרונה והנקראת Nanopore sequencing. בטכנולוגיה זו הריצוף נעשה על מולקולה בודדת של דנ"א המועברת דרך נקבובית (nanopore) במכשיר הריצוף. מעבר המולקולה מייצר שינויים בזרם חשמלי הספציפיים לכל בסיס. טכנולוגית ריצוף זו מאפשרת קבלת תוצאות מהירה מכיוון שהריצוף מתבצע בזמן אמת. השיטה מאפשרת ריצוף של מקטעי דנ"א ארוכים, ניתנת לביצוע במעבדה והיא זולה באופן יחסי. גם הניתוח הביואינפורמטי הראשוני פשוט יחסית מכיוון שהחברה מספקת מספר תוכנות לאנליזה של הרצפים ולביצוע de novo assembly. כדי להשתלם בטכנולוגיה זו נסעה ד"ר לאורה צ'לופוביץ (לא במימון של המדען) לסדנה באנגליה ללימוד אפשרויות השימוש בשיטה ובשנה האחרונה נסעה לגרמניה (אוניברסיטת בילפלד) להשתלם בתוכנות הביואינפורמטיות הקשורות לטכנולוגיה זו. במהלך השנתיים האחרונות מרבית מזמנה הוקדש לביסוס המערכת והתאמתה למטרות איבחון פתוגנים בזרעים ובצמחים נגועים. יש לציין שזו המערכת היחידה במינהל ועד כמה שידוע לנו אין מערכת דומה בארץ בשלב מתקדם יותר. ד"ר צ'לופוביץ ביחד עם תוכניתן שמועסק על ידינו הקימו את התשתית לביצוע הריצוף בשיטה זו, כולל התקשורת בין מכשיר ההרצה, מעבד המידע ומאגר הנתונים. כדי לאפשר הרצה של מספר דוגמאות בו זמנית בדקנו בשנה זו את האפשרות של הרצה עם ברקודים שונים.

בשיטת ריצוף זו השתמשנו לשתי מטרות: האחת זיהוי רצפי פתוגניים בזרעי עגבניה והשנייה זיהוי פתוגניים בצמחים נגועים המראים סימפטומים לא ברורים. תוצאות מחקר זה פורסמו במאמר Chalupowicz et al. 2019 המצורף לדוח זה ויוצגו בקצרה בהמשך הדוח.

ג.1. <u>זיהוי פתוגנים בזרעי עגבנייה</u>

<u>מהלך הניסוי</u>: הכנת זרעים נגועים בפתוגנים נעשתה ע"י אינפילטרציה בואקום של זרעים עם תרחיף של החיידקים *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata* בריכוז של כ- 10^8 תאים למ"ל. זרעים המודבקים בפטריה *Fusarium oxysporium f.sp lycopersici* הוכנו ע"י אינפילטרציה של הזרעים בתרחיף בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל. האינפילטרציה ארכה 16 שעות והזרעים המאולחים יובשו במשך 4 שעות ונשמרו בתנאי יובש עד לשימוש. לניסויים הוכנו דגימות זרעים המכילות זרע

נגוע אחד מכל אחד מהפתוגנים השונים בתוך 100 ו- 200 זרעי עגבניה לא נגועים שעברו התפחה במשך 16 שעות.

נבדקו מספר פרוטוקולים להפקת דנ"א מזרעי עגבנייה. מבין הפרוטוקולים נבחר הקיט MasterPure™ Complete DNA & RNA (Epicentre). בפרוטוקול זה משתמשים בתחילה באנזים lyzozyme המסייע לפירוק תאי החיידקים ומיצוי התמיסה עובר טיפול סופי בפנול/כלורופורם (1:1), המסייע לניקוי הדנ"א. בשיטת ריצוף של ננופור יש חשיבות רבה לקבלת דנ"א נקי וגבה מולקולרי, ולכן רמת הניקיון, ריכוז ושלמות הדנ"א נבדקו באמצעות המכשירים: NanoDrop (Thermofisher), Qubit 3.0 (Invitrogen) ו- TapeStation 2200 (Agilent Technologies).

הכנת ספרית הדנ"א להטענה במכשיר הריצוף Nanopore נעשתה עם קיט Ligation Sequencing Kit 1D (Nanopore Technologies) עם ריכוז דנ"א התחלתי של 1µg ולפי הפרוטוקולים המומלצים עיי' החברה.

<u>תוצאות:</u>

באיור 4 מוצגת סידרת הפעולות הנדרשת לריצוף בשיטת הננופור ואנליזת הרצפים. ההרצה נעשית במכשיר MinION flow cell המחובר למחשב ואנליזת התוצאות נעשית בזמן אמת בתוכנה של החברה הנמצאת בענן וירטואלי, (WIMP) "What's in my Pot?", והמיועדת להשוואת הנתונים למאגרי מידע (NCBI).

איור 4: סכמה המתארת את סדר הפעולות הנדרשות בתהליך הריצוף בשיטת הננופור.

תוצאות הריצוף של 3 דגימות זרעי עגבנייה המכילות זרע נגוע אחד בכל אחד מהפתוגנים מובאות בטבלה 3. ניתן לראות כי בשלושת הדגימות הפתוגנים זוהו ומוקמו (rank) במקומות הראשונים של טבלת התוצאות המתקבלת תוך כדי הריצוף. בדוגמא **a** פסודומונס קורוגטה ופוזריום הופיעו במקומות 1 ו- 2 בהתאמה. החיידק קלויבקטר הופיע במקום רביעי אך לפניו במקום 3 התקבל מין אפיפיטי (*Dikarya*). בדוגמא **b** הוספו זרע נגוע אחד בקלויבקטר וזרע נגוע אחד בפסודומונס ושניהם נמצאו במקום 1 ו-2 בהתאמה. דוגמא **c** כללה זרע נגוע בפוזריום וזרע נגוע בפסודומונס ושניהם התגלו ע"י התוכנה לאחר הריצוף. התוצאות המוצגות בטבלה 3 מייצגות את הדגימות עם 200 זרעים. דגימות של 100 זרעים נתנו תוצאות דומות ואינן מובאות כאן.

טבלה 3: תוצאות הריצוף של דגימות זרעי עגבנייה כפי שהתקבלו בתוכנת WIMP

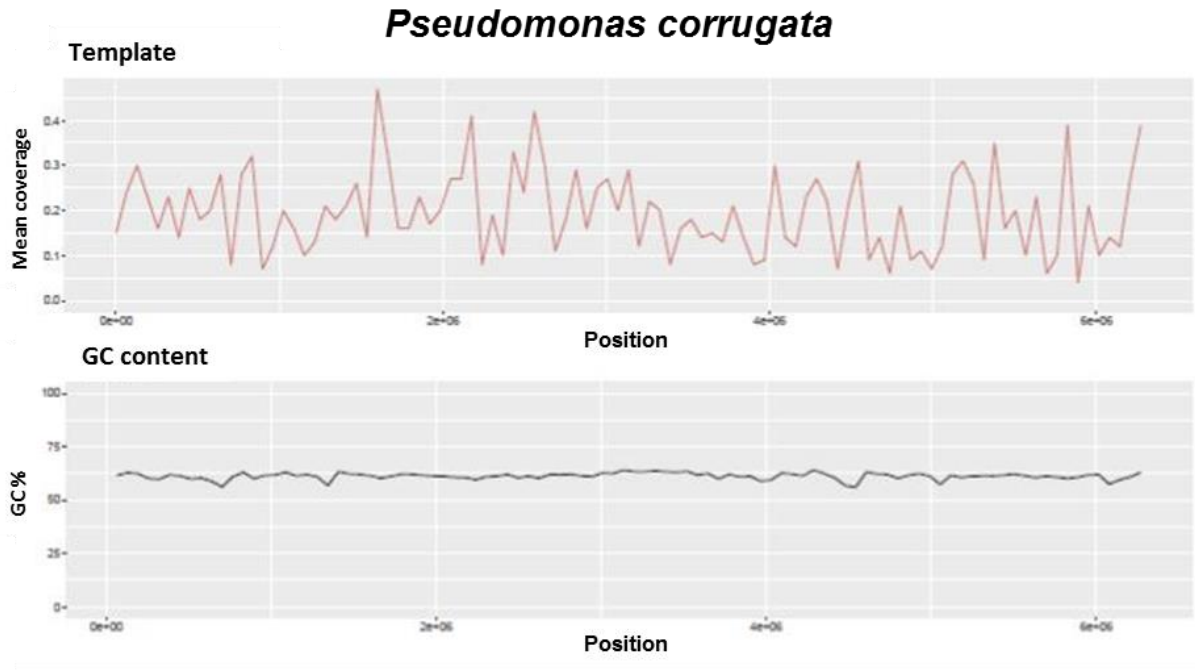
Sample No.	Pathogen identified /rank	Reads analyzed	Read classified	Cumulative reads
a	P. corrugata /1	23,493	4,542	2,634
	F.o. lycopersici /2	23,493	4,542	408
	C. m. michiganensis/4	23,493	4,542	50
b	C. m. michiganensis/1	59,878	6,899	1,769
	P. corrugata /2	59,878	6,899	402
C	F.o. lycopersici /1	8,059	857	188
	P. corrugata /2	8,059	857	37

Cumulative reads: total number of reads classified to a specific organism.

כדי לאמת את התוצאות שהתקבלו בתוכנת WIMP הרצפים עברו אנליזה ביואינפורמטית נוספת בתוכנה הנקראת NanoOK, המסופקת ע"י החברה והמופעלת ע"י מערכת הפעלה Linux. התוכנה מאפשרת לבצע השוואה ואנליזה של רצפים המתקבלים ע"י מכשיר ה- Nanopore לגנומים של מיקרואורגניזמים ידועים הנמצאים במאגרי מידע. תוצאות המובאות בטבלה 4 מסכמות מספר פרמטרים שהתקבלו. ניתן לראות כי האורך הממוצע של הרצפים שהתקבלו היה גבוה, בין 2,400 ל- 3,600 בסיסים. הכיסוי הממוצע של הגנומים היה נמוך, אולם בשל אורך הרצפים המתקבל הוא מכסה את כל האזורים לאורך הגנום של שני החיידקים והפטריה. דוגמא לכך אפשר לראות באיור 5 לגבי החיידק פסודומונס קרוגטה שבו הקריאות מפוזרות לאורך הגנום. ה- Kmer – מדד המייצג את הרצף הארוך ביותר התואם באופן מדוייק את רצף הרפרנס, היה מעל 100 בשלושת המקרים (טבלה 4).

טבלה 4: תוצאות המתקבלות לאחר אנליזה של רצפים והשוואתם לגנומים ידועים באמצעות התוכנה NanoOK.

Reference pathogen	Genome Size (Mb)	No. of reads with alignments	Mean read length (bases)	Mean coverage	Longest perfect Kmer (bases)
P. corrugata NZ CP014262.1	6.15	5,954	3,600	1.22	160
C. m. michiganensis NC 009480	3.3	1,991	2,752	1.23	120
F.o. lycopersici AAXH00000000.1	60	3,305	2,412	0.04	134



איור 5: דוגמא לכיסוי הגנום של פסודומונס קורוגטה כפי שהתקבל בתוכנת NanoOK

ג.2. <u>זיהוי כלל הפתוגנים בצמחים נגועים המראים סימפטומים לא ברורים</u>

תוצאות זיהוי הפתוגנים באמצעות ריצוף בשיטת הננופור היו מעודדות והביאו אותנו למחשבה שניתן להשתמש בשיטה זו לאיבחון גורמי מחלות בצמחים עם סימני מחלה לא ברורים. צמחים כאלה בדרך כלל נשלחים למעבדות שונות לאיבחון וירוסים, חיידקים או פטריות ולא תמיד מתקבלות תשובות ברורות. ההשערה שלנו היתה שבבדיקה אחת אפשר יהיה למצוא את גורם המחלה מבלי לבצע בדיקות שונות לכל גורם מחלה אפשרי. מכיוון שבשיטת הננופור ניתן לרצף בנוסף לדנ"א גם מולקולות של רנ"א <u>באופן ישיר</u> מבלי הצורך לעבור שלב של RT-PCR, המכניס שגיאות, אפשר היה לאבחן גם נוכחות וירוסים של רנ"א בשיטה זו.

<u>מהלך הניסוי:</u>

כדי לבדוק שניתן להשתמש בשיטת ריצוף זו לאיבחון פתוגנים רוצפו 11 דגימות של צמחים נגועים אותם אילחנו בגורמי מחלה ידועים (חיידקים, פיטופלסמה, וירוסים של דנ"א, וירוסים של רנ"א ופטריות) ו- 4 דגימות של צמחים עם סימני מחלה שהתקבלו מהשדה או מבתי צמיחה ושבהם גורם המחלה לא היה ידוע.

בטבלה 5 מובאות דגימות הצמחים המאולחים עם גורמי מחלה ידועים ושאינם ידועים ואשר נלקחו לריצוף. הצמחים עברו חיטוי חיצוני והפקת הדנ"א או רנ"א נעשתה מ- 200-400 מ"ג רקמה. קטעי רקמת עלים רוסקו עם פטיש לאחר הוספת חנקן נוזלי. הדגימות המרוסקות הועברו לקולונות לצורך הפקת הדנ"א באמצעות הקיט NucleoSpin Plant II Midi isolation kit (Mo Bio) בהתאם להוראות היצרן. הקיט נמצא יעיל לקבלת דנ"א ברמת שלמות ואיכות יחסית גבוהים. הפקת דנ"א מרקמה מעוצה ומפירות נעשתה בקיט MasterPure™ Complete DNA & RNA (Epicentre). הפקת רנ"א נעשתה לפי Accuprep (Bioneer) בהתאם להוראות היצרן. בניית הספריות לריצוף ווהטענתן במכשיר MinION נעשתה כפי שתואר לעיל. כדי לרצף מספר צמחים יחד לחלק מהדגימות נעשה Barcoding לפי הוראות היצרן ואח"כ בוצע הריצוף.

טבלה 5 : דגימות הצמחים שנלקחו לריצוף

Sample	**Host / infecting pathogen**
Bacteria	
	Tomato (*Solanum lycopersicum*) / *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
	Tomato (*Solanum lycopersicum*) / *Pseudomonas corrugata*
	Melon (*Cucumis melo*) / *Acidovorax citrulli*
	Gypsophila (*Gypsophila paniculata*) / *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*
Phytoplasma	
	Vinca (*Catharanthus roseus*) / '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' - group 16SrII-D
Fungi	
	Strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) / *Colletotrichum acutatum*
	Lemon (*Citrus limon*) / *Penicillium digitatum*
	Pepper (*Capsicum annuum*) / *Verticillium dahliae*
DNA Viruses	

	Tomato (*Solanum lycopersicum*) / *Tomato yellow leaf curl virus*
	Watermelon (*Cucumis sativus*) / *Watermelon chlorotic stunt virus*
RNA Virus	
	Tomato (*Solanum lycopersicum*) / *Tomato brown rugose fruit virus*
Unknown samples	**Symptomatic plants with unknown disease agents**
	Tomato (*Solanum lycopersicum*) with leaf spots
	Cucumber (*Cucumis sativus*) with leaf spots
	Watermelon (*Citrullus lanatus*) with leaf yellowing and mottling symptoms
	Butternut squash (*Cucurbita moschata*) rootstock with severe mosaic symptoms on leaves

תוצאות:

בטבלה 6 מובאות תוצאות ריצוף דנ"א או רנ"א מדגימות צמחים שאולחו בפתוגנים ידועים. כל הפתוגנים זוהו ברמת המין או הסוג. במרבית הדגימות הפתוגנים הופיעו במקום ראשון ובמקרים שלא, הופיעו לפניהם מינים אפיפיטיים או אנדופיטיים. דוגמא לתוצאות המתקבלות בתוכנת WIMP מובאת באיור 6. ניתן לראות שלמרות נוכחות אנדופיטים ומיקרואורגניזמים לא פתוגניים רבים הם אינם מפריעים לזיהוי הפתוגנים.

טבלה 6: תוצאות הריצוף של דגימות צמחים נגועים בפתוגנים ידועים כפי שהתקבלו בתוכנת WIMP

Pathogen identified /rank	Reads analyzed	Read classified	Cumulative reads
C. m. michiganensis /1	93,824	15,072	6,380
P. corrugata /1	3,081	1,121	430
A. citrulli /1	7,352	3,089	2,447
P. agglomerans /1	4,229	929	100
'Candidatus Phytoplasma' /1	91,589	6,069	672
Colletotrichum sp. /1	1,523	400	216
Colletotrichum sp. /1	42	14	10
Penicillium digitatum/1	39,304	36,150	30,579
V. dahliae /2	30,643	1,851	81
TYLCV/1	1,953	85	10
WmCSV/5	13,093	386	7
ToBRFV/3	65,125	5,829	312

1

Taxa at Rank: Species

Filter...

Taxon	Cumulative Reads
Clavibacter michiganensis	**6,916**
Phycomyces blakesleeanus	573
Verticillium dahliae	405
Marssonina brunnea	198
Ascoidea rubescens	113
Lodderomyces elongisporus	99
Sphaerulina musiva	98
Verruconis gallopava	95
Paracoccidioides lutzii	92
[Candida] auris	87
Blastomyces gilchristii	85
Paracoccidioides brasiliensis	80

2

Taxa at Rank: Species

Filter...

Taxon	Cumulative Reads
Wallemia ichthyophaga	861
Saccharomyces cerevisiae	757
Tomato brown rugose fruit virus	**312**
Blastomyces gilchristii	141
Acetomicrobium mobile	92
Histoplasma capsulatum	91
Puccinia graminis	90
Thielavia terrestris	87
Trichophyton rubrum	85
Neurospora tetrasperma	80
Paracoccidioides lutzii	65
[Candida] auris	65

איור 6: דוגמאות לתוצאות המתקבלות בתוכנת WIMP לאחר ריצוף בשיטת הננופור. דוגמא מספר 1 מייצגת ריצוף דנ"א שנעשה מצמחי עגבניה שאולחו בחיידק קלויבקטר. דוגמא מספר 2 מייצגת ריצוף רנ"א מצמחי עגבניה שאולחו בוירוס ToBRFV. בדוגמא האחרונה ניתן לראות כי במקומות 1 ו-2 מופיעים מיקרואורגניזמים לא פתוגניים.

תוצאות דגימות של צמחים נגועים בהם גורם המחלה לא ידוע מובאות בטבלה 7. בצמחי עגבנייה עם נקודות על העלים נמצא לאחר הריצוף החיידק *Xanthomonas euvesicatoria* בשתי חזרות. בצמחי מלפפון עם סימני מחלה בעלים נמצא בריצוף החיידק *Pseudomans syringae*. כדי לאשר את התוצאות, מושבות בודדות של החיידקים נאספו ועברו PCR עם פריימרים ספציפיים לכל פתוגן. כמו כן נעשו מבחני פתוגניות על עגבנייה ומלפפון בהתאמה, ונעשתה אנליזה בתוכנת NanoOK כנגד רפרנסים ידועים של חיידקים אלו (תוצאות לא מובאות). בכל המקרים התקבלו תוצאות שהתאימו לתוצאות הריצוף בננופור והצביעו על חיידקים אלו כגורמי המחלה.

תוצאות ריצוף דנ"א של דוגמאות אבטיח ודלעת עם סימני מחלה (טבלה 5) ואנליזת WIMP לא הצביעו על פתוגנים אפשריים ולכן החלטנו לעבור לריצוף של רנ"א. תוצאות בטבלה 7 מראות כי באבטיח נמצא הוירוס CGMMV ובדלעת ZYMV בשתי חזרות. התוצאות עברו ולידציה בשיטות שונות: אליזה, RT-PCR ואילוח של

צמחי ביקורת. אנליזה ב- NanoOK מראה שלמרות שמספר הקריאות לגבי ZYMV נמוך היה כיסוי טוב של הוירוס (תוצאות לא מובאות).

טבלה 7: תוצאות הריצוף של דגימות צמחים נגועים בפתוגנים לא ידועים כפי שהתקבלו בתוכנת WIMP

Sample No.	Pathogen identified /rank	Reads analyzed	Read classified	Cumulative reads
a	*Xanthomonas euvesicatoria*/1	19,978	2,780	1,082
b	*Xanthomonas euvesicatoria*/1	20,188	1,012	254
	Pseudomonas syringae /1	20,225	6,852	4,247
RNA	CGMMV/1	12,000	4,674	132
a RNA	ZYMV/22	40,489	29,919	26
b RNA	ZYMV/15	1,404	1,166	2

<u>דיון ומסקנות</u>

<u>נגיפים:</u> בשנת המחקר הראשונה נעשה שימוש מוצלח בפלטפורמת Illumina Mi-seq לזיהוי small RNA של ToBRFV ו- PSTVd מזרעים מאולחים בלבד. כמו כן התקבלה תרומה משמעותית לפעולת ההתפחה של הזרעים כשלב מקדים להכנת הדוגמא. בשנת המחקר השנייה, נעשה שימוש בפלטפורמה החזקה יותר של Illumina Hi-seq לזיהוי RNA של ToBRFV ו- PSTVd בתערובת זרעי עגבנייה נקיים אשר אליהם הוספו זרעים נגועים לרמה של 2%. התקבל זיהוי של רצפים נגיפיים אשר אפשרו הרכבה של רצף הגנום המלא של ToBRFV. מתוצאות אלו קבענו סף זיהוי של 500 קריאות (הוסף קו המדגים את סף הזיהוי באיור 1) בעיקר באזור בגנום המקודד לחלבון המעטפת וחלבון התנועה MP-CP אשר עשוי לספק זיהוי ודאי של גורם המחלה. בשנת המחקר השלישית נשלחו תערובות של זרעי עגבנייה בנגיעות של 0.16%-2% לריצוף מתקדם. התערובות הכילו זרעים הנגועים ב-ToBRFV וב- PepMV וזרעים "בריאים" (חופשיים מנגיפים אלו בהרכבים שונים לקבלת הנגיעות הרצויה) (טבלה 1). מתוצאות הריצוף המתקדם התקבל זיהוי של כל אחד מהנגיפים הנבחנים בכל אחת מהתערובות השונות כולל בתערובות הנגועות ברמה של 0.16% (טבלה 2). הרצפים הנגיפיים שהתקבלו אפשרו כיסוי מלא של גנום שני הנגיפים (בזרעים הנגועים ברמה של 0.3%-2%), ואילו בזרעים הנגועים בשני הנגיפים ברמת נגיעות של 0.16% התקבל כיסוי חלקי של הגנום הנגיפי (איור מס' 1). יש לציין כי סף הזיהוי שנקבע ע"פ

התוצאות שהתקבלו בשנת המחקר השניה נשמר גם בשנת המחקר השלישית עם הגדלת המיהול של הנגיעות הנגיפית בתערובת הזרעים. מהתוצאות שהתקבלו ניתן לקבוע סף זיהוי מעל 500 קריאות שממופות לכל אחד מהנגיפים ToBRFV ו-PepMV. בנוסף יש לציין שהמעבר לספרייה לאחר הפחתת מקטעי ה- RNA הריבוזומלי מצמחים בניסויים בשנת המחקר השלישית, אפשר קבלת קריאות רבות יותר הספציפיות לנגיפים הנחקרים לעומת כמות הקריאות שהתקבלו בשנת המחקר השנייה בתערובות זרעים מהן הוכנו ספריות המבוססות על קשירה של Poly A. לדוגמא, בתערובת זרעים עם נגיעות של 2% בספריות המבוססות על קשירה של Poly A. התקבלו בממוצע 2.62% קריאות שמופו לנגיף ה-ToBRFV לעומת 27.2% של קריאות הממופות לנגיף זה שהתקבלו מספריות שהוכנו בשיטת הפחתת ה-RNA הריבוזומלי (יותר מפי 10 קריאות).

בשנת המחקר האחרונה זוהתה לראשונה נגיעות בנגיף הפפינו PepMV בגידול עגבניות בארץ. נגיף הפפינו נחשב למזיק קשה בגידול עגבניות בעולם. כמו כן בשנת 2018 ToBRFV זוהה במדינות רבות: באירופה (גרמניה, הולנד, איטליה) מקסיקו וארה"ב (Panno *et al*., 2019; Ling *et al*., 2019). שני הנגיפים ToBRFV ו-PepMV מועברים בזרעים ולפי הערכות ראשוניות נראה כי מתקיים אפקט סינרגיסטי בהחמרת תסמיני המחלה בשילוב של שני הנגיפים ToBRFV ו- PepMV . בשל החשיבות העולמית וכמובן לגידול עגבנייה בישראל בחרנו להתמקד בשנה השלישית בשני הנגיפים הללו.

<u>חיידקים ופטריות:</u> ההחלטה לעבור לשיטת הריצוף החדשה של Nanopore החל מהשנה השניה היתה נכונה. ניתן למנות מספר יתרונות לשיטה זו: הרצפים המתקבלים ארוכים, דרושה כמות דנ"א או רנ"א קטנה, זמן ההרצה מהיר, התוצאות מתקבלות בזמן אמת, ניידות של המכשיר בשל גודלו הקטן כך שניתן לבצע את הריצוף בכל מעבדה, עלות נמוכה יחסית וע"י שימוש בברקודים ניתן לבצע הרצה של מספר דוגמאות באותה פלטה וכן להשתמש בה מספר פעמים. ניתן לבצע ריצוף ישיר של רנ"א ללא צורך ב- RT-PCR וגם הניתוח הביואינפורמטי הראשוני פשוט יחסית. בשיטת הננופור השתמשנו לשתי מטרות, זיהוי רצפי פתוגניים בזרעי עגבניה וזיהוי פתוגניים בצמחים נגועים המראים סימפטומים לא ברורים. זיהוי הפתוגנים (שני חיידקים ופטריה) בזרעי עגבניה התאפשר בדגימות של 200 זרעים המכילות זרע נגוע אחד בכל אחד מהפתוגנים (איור 4). בכל המקרים הפתוגנים מוקמו ראשונים בטבלת התוצאות המתקבלת בתוכנת WIMP. כאשר בדקנו דגימות של 400 זרעים מצאנו שאיכות הדנ"א שהופק לא היתה טובה; הכילה עמילן ומעכבים אחרים שהפריעו לתהליך הריצוף. ולכן צריך למצוא דרכים טובות יותר להפקת דנ"א מזרעים אם רוצים להגדיל את גודל הדגימה.

שיטת הריצוף של ננופור נבדקה כדרך אפשרית לאיבחון גורמי מחלות בצמחים בהם הסימפטומים לא מצביעים בברור על גורם מחלה מסויים. השיטה נבדקה תחילה עם צמחים נגועים בגורמי מחלה ידועים ונמצא כי כל הפתוגנים שנבדקו זוהו בארבעת המקומות הראשונים (טבלה 6). מכיוון שהאנליזה של WIMP מבוסס על רצפים שלמים (RefSeq) זיהוי הפתוגנים לרמת המין או הסוג תלוי ברצפים הקיימים במאגרי המידע. בפטריות, לעומת וירוסים וחיידקים, יש יחסית מעט גנומים שלמים (240) ולכן הזיהוי מתקבל לעיתים רק ברמת הסוג. כך לדוגמא, במקרה של *Colletotrichum* בתות שדה התקבל זיהוי של *Colletotrichum* sp. למרות שהאילוח

נעשה עם *Colletotrichum acutatum*. במקרה כזה אנליזה ביואינפורמטית נוספת (NanoOK) כנגד רצפים של מין זה הקיימים במאגרי המידע אך אינם שלמים, מאפשרת זיהוי לרמת המין. מכיוון שכמות הרצפים במאגרי המידע גדלה כל הזמן צפוי שבעיה זו תיפתר בעתיד הקרוב.

כפי שאפשר לראות באיור 6 השיטה מגלה את כלל המיקרואורגניזמים המצויים באופן טבעי בדגימה הצמחית כולל אנדופיטים ומיקרואורגניזמים לא פתוגניים. אולם למרות זאת אין הפרעה בגילוי הפתוגנים. יתכן והסיבה לכך היא שברקמה הנגועה רמת הפתוגן גבוהה לעומת מיקרואורגניזמים אחרים. בכל מקרה רצוי שאת תוצאות האנליזה יבחן אדם הבקי במחלות צמחים כדי לשלול או לאשר את האורגניזמים העשויים להיות גורמי המחלה.

שיטת ריצוף זו נבדקה עם 4 דגימות של צמחים בהם הסימפטומים לא היו ברורים ולא הצביעו על גורם ידוע. התוצאות שהתקבלו (טבלה 7) היו מבטיחות. ביצוע בדיקות שונות לזיהוי פתוגנים כמו אליזה, PCR או מבחני פתוגניות אישר את תוצאות הריצוף בכל ארבעת הדגימות. גם במקרה של הוירוס ZYMV שלא התקבל במקומות הראשונים ברשימת התוצאות של WIMP נמצא כי זהו הוירוס הראשון שזוהה ברשימה.

המגבלות של שיטת הריצוף של ננופור שיש צורך בכוח אדם מיומן, תמיכה של איש מחשבים ושרתים גדולים לאיחסון הרצפים. אולם למרות זאת יש לשיטה יתרונות רבים לאיבחון גורמי מחלות היכולים לסייע בזיהוי מחלות הסגר, במקרים שבהם קשה לזהות את גורם המחלה וכן לזיהוי מספר פתוגנים בו זמנית. להערכתנו השיטה תיתן כלי נוסף למעבדות איבחון של פתוגנים בצמחים אם על ידי החלפת שיטות האיבחון הקיימות או כדרך נוספת לאישור תוצאות. מחקר זה הוא חדשני בתחום של איבחון מחלות צמחים. למיטב ידיעתנו לא נעשה שימוש בשיטת הננופור לאיבחון מחלות צמחים בארצות אחרות או בארץ.

<u>הערה כללית</u>: במחקר נעשה שימוש בשיטות ריצוף מתקדמות לאבחון פתוגנים שונים (נגיפים, פטריות וחיידקים) ומכאן מורכבותו הן בפיתוח פרוטוקולים מתאימים עבור כ"א מהפתוגנים והן בטכנולוגיות שחלקן אינן מצויות במנהל המחקר החקלאי ומתבצעות כשירות בתשלום במוסדות אחרים. היה גם צורך להעסיק עובד בתחום המחשוב והביואינפורמטיקה לבניית האתר לזיהוי וירוסים וכן לעזרה בתוכנות הקשורות לריצוף עם ננופור ולכן, באופן כללי עלות המחקר היתה גבוהה.

כפי שציינו בדוח שנה א לא הצלחנו בשיטה המקורית של NGS לגלות חיידקים ופטריות ולכן עברנו לשיטת הריצוף החדשה של ננופור. המעבר דרש מאיתנו השקעה וזמן בלימוד השיטה וביישומה ולכן לא כגענו לשלב של בדיקת השיטה במעבדות אחרות. פנינו לשרותים להגנת הצומח ואף הצגנו את השיטה בהרצאה שניתנה שם מכיוון שלדעתנו היא מתאימה ביותר ליישום בארף בעיקר לגבי פתוגנים של הסגר. היתה התעניינות רבה בשיטה אולם לדעתם ייקח זמן ליישמה.

<u>ספרות מצוטטת</u>

Ofer, I., Modai, S. and Shomron, N. (2011). Pathogen detection using short-RNA deep sequencing subtraction and assembly. Bioinformatics 27.15: 2027-2030.

Ling, K.S., Tian, T., Gurung, S., Salati, R. and Gilliard, A., 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the US. Plant Disease.

Panno, S., Caruso, A.G. and Davino, S., 2019. First report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on tomato crops in Italy. Plant Disease.

<u>פרסומים מדעיים</u>

תוצאות העבודה הוצגו במספר כנסים: שתי הרצאות בכנס של העמותה הישראלית למחלות צמחים שהתקיים בפברואר 2018 במכון וולקני, כנס בינלאומי של ICPP שהתקיים ביולי 2018 בבוסטון, הרצאה במסגרת יום עיון בנושא של התמודדות עם נגיפי טובמו בחקלאות ישראל שהתקיים במינהל המחקר החקלאי בנובמבר 2018 וכן ניתנה הרצאה בשירותים להגנת הצומח להצגת אפשרויות האיבחון באמצעות ריצוף.

פורסם מאמר אחד בנושא איבחון גורמי מחלות בצמחים באמצעות ריצוף בשיטת הננופור.

Chalupowicz, L., Dombrovsky, A., Gaba, V., Luria, N., Reuven, M., Beerman, A., Lachman, O., Dror, O., Nissan, G. and Manulis-Sasson S. (2019). Diagnosis of plant diseases using Nanopore sequencing platform. *Plant Pathology* 68:229-238.

מאמר נוסף בנושא של איבחון וירוסים בזרעים נמצא בשלבי הכנה.