

“פיתוח גישה חדשה להדברה ביולוגית של מזיקי צמחים באמצעות וירוסים פתוגנים לחרקים

השייכים לסוג Densovirus ו- Picorna-like viruses”

Developing a new approach for biological controls against insect pests using pathogenic viruses belonging to the genus Densoviruses and Picorna like viruses

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים, מכון וולקני, בית דגן
מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות הדברה ידידותית לסביבה
אביב דומברובסקי, יחזקאל אנטיוגנוס, עודד לכמן
המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים, מכון וולקני, בית דגן.

Aviv Dombrovsky, Plant Pathology and Weed Research, ARO. The Volcani Center, P. O. Box 6, Bet Dagan. E-mail: aviv@volcani.agri.gov.il

July 2013

יולי 2013

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר : _____ תאריך : _____

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

- Dombrovsky Aviv and Luria Neta. (2013). The *Nerium oleander* aphid *Aphis nerii* is tolerant to a local isolate of *Aphid lethal paralysis virus* (ALPV). *Virus Genes*. 46: 354-361.

תקציר

מטרה: מציאת חלופות להדברה הכימית אשר ישולבו במערך ההדברה הביולוגית העתידית.

הצגת הבעיה: בהדברה הביולוגית מוחדרים אל שטח הגידול בצורה יזומה אוכלוסיות אויבים טבעיים של החרקים המזיקים ובכך נבלמת התפשטותם של חרקים אלו. בעבודה זו, אנו מציעים לפתח אמצעים נוספים אשר ייתוספו בעתיד אל מערך ההדברה הביולוגית הנמצא בשימוש כיום ובכך יוכלו לסייע בהתמודדות כנגד החרקים המזיקים.

מהלך ושיטות עבודה: איסוף דוגמאות של כנימות עלה מצמחיית הבר והתרבות. דוגמאות אלו שימשו כמאגר ממנו נסרקו ואותרו נגיפים פתוגניים לחרקים. בהמשך התבצע אפיון של כ"א מתבדידי הנגיפים השונים הכולל: ריצוף של הגנום הנגיפי, זיהוי של החלבונים הנגיפיים, טווח פונדקאים ובחלק מהנגיפים שזוהו התבצעה גם בחינה ראשונית של יעילותם כמדבירים ביולוגיים של חרקים ובחינת השפעתם על חרקים מועילים.

תוצאות עיקריות: לאחר שנדגמו למעלה מ- 300 דוגמאות שונות המכילות מינים שונים של כנימות עלה זוהו לראשונה בארץ ארבעה נגיפים פתוגניים לכנימות עלה:

1. זוהה נגיף פתוגני לכנימות עלה *Myzus persicae Densovirus* (MpDENV). תבדיד אחד של הנגיף נבחר לגידול במעבדה על כנימות מהמין *Myzus persicae* הגדלות על צמחי חרדל לביצוע הניסויים השונים ולאפיון הנגיף.
2. זוהה לראשונה הנגיף *Aphid lethal paralysis virus* (ALPV) בכנימות עלה ההרדוף הגדלות על צמח הרדוף הנחלים *Aphis nerii*. בספרות המדעית, מתואר נגיף זה כפתוגני ביותר לכנימת עלה האפרסק *Myzus persicae* ולמינים נוספים של כנימות עלה הגדלות על דגניים. תבדיד אחד של ALPV נבחר לגידול קבוע במעבדה על כנימות מהמין *A. nerii* (אינן נפגעות בצורה משמעותית מהנגיף) על צמחי הרדוף, לביצוע הניסויים השונים ולאפיון הנגיף.
3. זוהה תבדיד ישראלי של הנגיף *Brevicoryne brassicae picorna-like virus* (BrBV) מאוכלוסייה של כנימת עלה הכרוב *B. brassicae* שנאספה מצמחי כרוב.
4. זוהה נגיף חדש ממשפחת ה- *Dicistroviridae* אותו כינו בשם *Aphis gossypii virus* (AgV) מאוכלוסייה של כנימת עלה הדלועים *A. gossypii* שנאספה מצמח ההיביסקוס.

מסקנות והמלצות:

1. יעילותו של MpDENV כמדביר ביולוגי היא גבולית משום שהוא איננו מדביר את כנימת העלה. כנימות נגועות ב-MpDENV הן קטנות יותר ובעלות יכולת תנועה פחותה אך לא מתקיימת תמותה של הכנימות בעקבות הדבקה בנגיף. יש לבחון את השפעתו של MpDENV על דבורים (דבש, בומבוס) המשמשים להאבקה.
2. לעומת זאת, יעילותו של ALPV כמדביר ביולוגי היא גבוהה. נגיף זה נמצא אלים לכנימות עלה האפרסק אשר נושרות מהצמח כתוצאה מההדבקה בנגיף בטווח של בין 48 שעות עד שבוע לאחר ההדבקה. יש להמשיך את המחקר על מנת לברר כיצד ניתן ליישם בשטח את השימוש ב-ALPV כמדביר ביולוגי כנגד כנימות עלה.
3. ו- 4. היות ש-BrBV ו-AgV הנם נגיפים חדשים יש לבצע מחקר נוסף ללימוד יעילותם כמדבירים ביולוגיים עתידיים.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

מציאת חלופות להדברה הכימית אשר ישולבו במערך ההדברה הביולוגית העתידית.

שלבים עיקריים בהפעלת המחקר:

I. איסוף דוגמאות של חרקים (כנימות עלה) מצמחי תרבות ומצמחיית הבר.

II. סריקה של הדוגמאות לאיתור נגיפים פתוגניים לחרקים.

אפיון של תבדידי הנגיפים השונים ובחינת יעילותם כמדבירים ביולוגיים של חרקים מזיקים.

פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו וכלל התוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

I. סקר של כנימות עלה לאיתור נגיפים הפתוגניים לכנימות עלה בארץ.

מטרתה העיקרית של עבודה זו הייתה איתור ואפיון נגיפים פתוגניים לכנימות עלה, תוך איתור הכנימות בעלות הפוטנציאל המרבי כמדבירים ביולוגיים ואשר תוכלנה לשמש במערך ההגנה העתידי מפני חרקים מזיקים. לשם כך במהלך תקופת המחקר נערך סקר בו נאספו מינים של כנימות עלה מאזורים שונים בארץ מצמחיית בר ותרבות. בסה"כ נדגמו ונסרקו כ-300 דוגמאות של כנימות עלה (תמונה מס' 1) אשר שימשו כמאגר לאיתור ובידוד נגיפים פתוגניים לחרקים.



תמונה מס' 1. המגוון העשיר של מיני כנימות עלה בארץ. קולקציה חלקית של מיני כנימות עלה הגדלות על צמחי בר ותרבות בארץ אשר נאספו במהלך הסקר לאיתור הנגיפים הפתוגניים לכנימות עלה.

II. סריקה של הדוגמאות לאיתור נגיפים פתוגניים לחרקים

בחינה של הדוגמאות שנאספו במהלך הסקר הניבה זיהוי ואפיון של ארבעה נגיפים פתוגניים לכנימות המשתייכים ל-3 משפחות טקסונומיות שונות: *Densovirus*, *Picornalike virus* ו-*Dicistroviridae*, שלושה מבין ארבעת הנגיפים שזוהו הנם תבדידים מקומיים (ישראלים) של נגיפים שזוהו בעבר בעולם ואילו הרביעי הנו נגיף חדש שלא דווח בספרות. לשלושת הנגיפים המוכרים נקבע רצף הגנום המלא במהלך עבודה זו בעוד שהנגיף הרביעי מצוי בשלבי ריצוף. להלן תיאור של הנגיפים הפתוגניים שזוהו ונחקרו במהלך תוכנית מחקר זו:

1. ***Myzus persicae Densovirus (MpDNV)*** זוהה בכנימות עלה האפרסק (*M. persicae*) אשר גדלו על צמחי חרדל בר במספר אזורים בארץ. תבדיד אחד של הנגיף נבחר לגידול במעבדה על כנימות מהמין *M. persicae* על צמחי חרדל לאפיון הנגיף וביצוע ניסויי מעבדה.

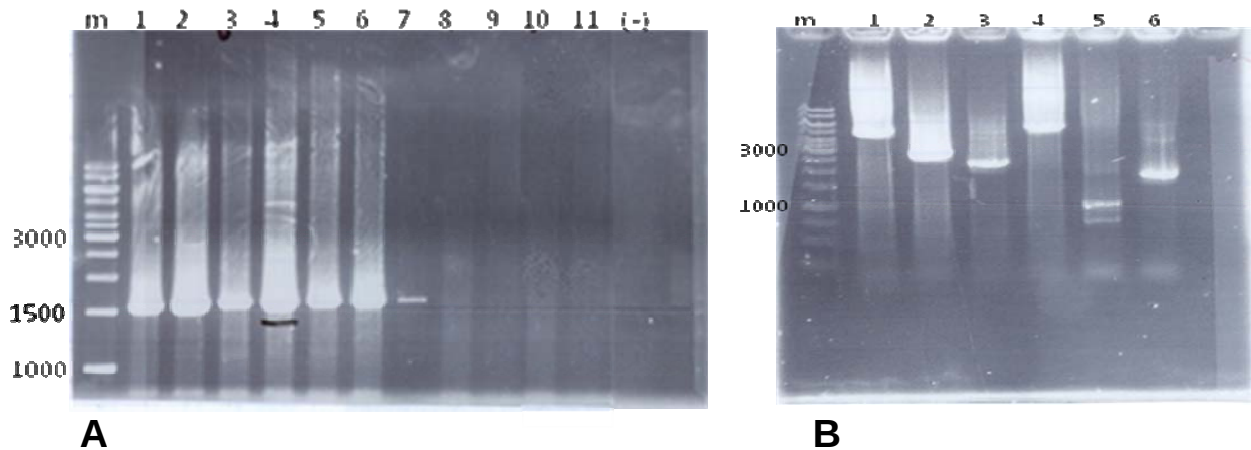
2. ***Aphid lethal paralysis virus (ALPV)*** זוהה על כנימות עלה ההרדוף (*A. nerii*) שגדלו על צמחי הרדוף הנחלים במספר מוקדים בארץ. בספרות המדעית מתואר נגיף זה כפתוגני ביותר לכנימת עלה האפרסק (*M. persicae*) ולמינים נוספים של כנימות עלה הגדלות על דגניים. תבדיד אחד של ALPV נבחר לגידול קבוע במעבדה על כנימות מהמין *A. nerii* (אשר אינן נפגעות בצורה משמעותית מהנגיף) על צמחי הרדוף, לאפיון הנגיף וביצוע ניסויי מעבדה.

3. ***Brevicoryne brassicae picorna-like virus (BrBV)*** זוהה באוכלוסייה של כנימות עלה הכרוב (*B. brassicae*) שנאספה מצמחי כרוב באזור של חוף הכרמל.

4. ***Aphis gossypii virus (AgV)*** נגיף חדש ממשפחת ה-*Dicistroviridae* זוהה באוכלוסייה של כנימות עלה הדלועים (*A. gossypii*) שנאספה מצמח ההיביסקוס.

II. 1. נגיף ה- *Myzus persicae Densovirus (MpDNV)* הישראלי

הנגיף MpDNV זוהה בישראל בכנימות עלה האפרסק (*M. persicae*) אשר גדלו על צמחי חרדל בר וצמחי פלפל בגידולים מסחריים במספר אזורים בארץ. בשונה מנגיפים פתוגניים אחרים לכנימות עלה, ל-MpDNV המשותף לנגיפים מהסוג Denso גנום של DNA על כן זיהויו נעשה תוך הפקת DNA כללי מדוגמאות של כנימות עלה שנדגמו במהלך הסקר. תוצרי ההפקה שימשו כתבנית להגברה באמצעות PCR תוך שימוש בתחלים ייחודיים שתוכננו תחילה על פי הרצף של התבדיד הצרפתי של MpDMV (שמקורו בדרום אפריקה, תמונה מס' 2-A). תוצרי ה-PCR הופרדו בג'ל אגרוז, המקטע המוגבר חולץ ושובט לתוך פלסמיד pGEM-T easy. הפלסמיד שובט לחיידקי *E. coli* ורוצף. בהמשך, פלסמיד זה שימש להכנת גלאי מולקולארי ספציפי כנגד MpDNV. לאחר הזיהוי הראשוני של הנגיף רוצף גנום המלא באמצעות הגברה של מקטעים חופפים של הגנום הנגיפי אשר שובטו לפלסמידים, הותמרו בחיידקים ורוצפו (תמונה 2-B). סכימה כללית המתארת את ארגון הגנום של ALPV והחלבונים אליהם הוא מקדם מוצגת בתמונה מס' 3-A.

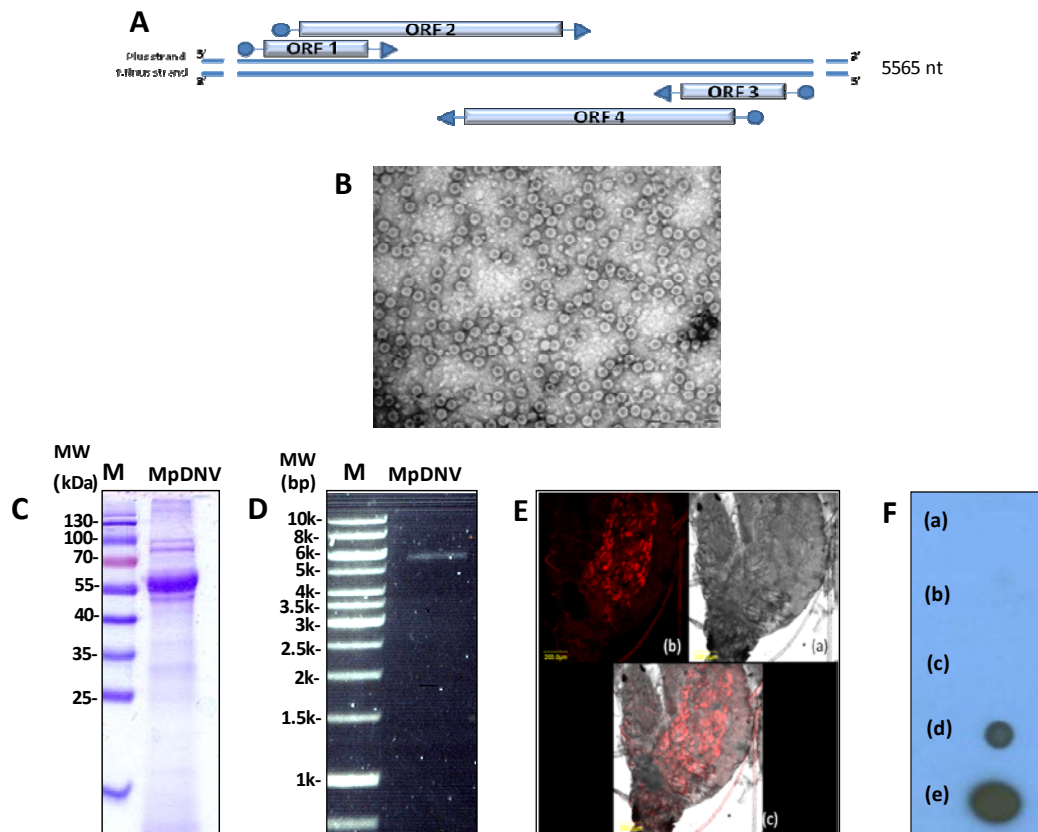


תמונה מספר 2. זיהוי MpDNV בדוגמאות של כנימות עלה בשיטת PCR. A. הפרדה בג'ל אגרוז 1% של תוצרי הגברה ספציפית ל-MpDNV מדוגמאות של DNA כללי מ-0.02 גר' כנימות חשודות. סדר הרצה: m : סמן גודל 1. כנימות עלה מהמין M.p מצנון בר. 2. M.p מחרדל בר. 3. M.p מפלפל. 4. ביקורת חיובית- M.p אשר יובא מצרפת. 5. R.m מחיטה. 6. M.e מחציל. 7. כנימות שנאספו מפרחי כתימה. 8. M.r מורד. 9. A. g מפלפל. 10. כנימת עש הטבק *B. tabaci* מחרדל. 11. כנימת *B.b* מחרדל (-) ביקורת שלילית. **B. הגברת מקטעי הגנום של MpDNV באמצעות PCR.** הפרדה בג'ל אגרוז 1% של מקטעים מוגברים מגנום הנגיף תוך שימוש בכנימות עלה האפרסק הנגועות בנגיף ותחלים ספציפיים. סדר הרצה: m : סמן גודל 1. מקטע 1-5002 bp. 2. מקטע 1-990 bp. 3. 2557 bp. 4. 3335-5490 bp. 5. 512-5490 bp. 6. 990-1645 bp.

אפיון מורפולוגי של חלקיקי נגיף ה-MpDNV: הכנת תכשיר נגיף מנוקה נעשתה בהתאם לפרוטוקול הפקה של נגיפים מאבטיח בעלי צורה מורפולוגית דומה (1). בקצרה, 100 גר' רקמת טרף בין עורקית מצמחי חרדל המכילים כנימות עלה נגועות בנגיף ה-MpDNV, הוספו ל-200ml בופר כתישה (הרכב: 0.067M בופר פוספט pH 7.2 ו-50ml של 0.1M חומצה אסקורבית). התערובת נכתשה בהומוגניזר חשמלי במהירות איטית עד לכתישת כל העלים. המשך כתישה נעשתה במהירות גבוהה עד לקבלת עיסה אחידה. עיסה זו סוננה דרך נייר Miracloth והתסנין עבר סרכוז במהירות נמוכה (10,000g) למשך 10 דקות בטמפ' של 4°C. הנוזל העליון נאסף ואליו הוסף 10% כלורופורום מהנפח שהתקבל. הדוגמא עורבבה באיטיות למשך כעשר דקות בטמפ' של 4°C. לאחר הבאת הדוגמא ל-pH 5.3 נעשה סרכוז במהירות נמוכה בתנאים אלה. הנוזל העליון סרכוז במהירות גבוהה (30,000g) למשך 120 דק' ברוטור Ti-35 בטמפ' של 4°C. המשקע המכיל את חלקיקי הנגיף הורחף למשך הלילה ב-0.2-0.3ml של 0.01M בופר פוספט pH 7.0. בהמשך נבחנה איכות הניקוי וריכוז הנגיף המתקבל באופנים הבאים:

- א.** דוגמא המכילה חלקיקי MpDNV מנוקים הונחה ע"ג רשתית נחושת, נצבעה באורניל אצטט ונבחנה במיקרוסקופ אלקטרוניים חודר. ניתן לזהות חלקיקי נגיף איזומטרי בקוטר של 28nm (תמונה 3-B).
- ב.** זיהוי של ארבעת החלבונים המבניים של הנגיף התאפשר לאחר הפרדה של תכשיר המכיל ויריונים מנוקים ע"ג ג'ל של פולי-אקריל-אמידוצביעה בצבע קומאסי כחול (תמונה 3-C).
- ג.** דוגמת חלקיקי ה-MpDNV שימשה כחומר מוצא להפקת DNA נגיפי. הפרדה של ה-DNA הכללי בג'ל אגרוז 1% מאפשרת זיהוי של המקטע השלם של הגנום הנגיפי בגודל של כ-6000 bp (תמונה 3-D).

פיתוח גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG לזיהוי MpDNA אימות נוסף של התוצאות שהתקבלו בניסויי ההגברה ב-PCR, נעשה באמצעות הכנה של גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG הספציפי לגנום הנגיף. נבחנו מספר דוגמאות באופן זה: (a) צרעה טפילית (*Aphidius colemani*) אשר גודלה על כנימות עלה האפרסק נגועות ב-MpDNV; (b) כנימות עלה הדלועיים (*Aphis gossypii*); (c) כנימות שאינן נגועות בנגיף כביקורת שלילית (d) תכשיר המכיל חלקיקי נגיף מנוקים כביקורת חיובית ו-(e) כנימות עלה האפרסק נגועות ב-MpDNV. (תמונה 3-F).



תמונה מס 3. אפיון נגיף ה-MpDNV שבודד בארץ. A. סכמה המתארת את ארגון הגנום הנגיפי של התבדיל הישראלי של MpDNV. **B.** בחינה במיקרוסקופ אלקטרוני חודר של חלקיקי נגיף שהופקו מאוכלוסיית כנימות *M. persicae* נגועות. לאחר צביעה באורניל אצטט. **C.** הפרדת חלבונים מבניים של MpDNV ע"י גיל אקרילאמיד. **D.** הפרדת בגיל אגרוז 1% של DNA נגיפי שהופק מחלקיקי נגיף מנוקים. **E.** בחינה במיקרוסקופ קונפוקאלי של כנימות *M. persicae* הנגועות בנגיף לאחר הגבה עם גלאי DNA מסומן פלואורסנטית. (a) כנימה נגועה בשדה אור רגיל (Bright field). (b) הכנימה כפי שנצפתה עם הגלאי הפלואורסנטי (c) שילוב של השדה הפלואורסנטי ושדה אור רגיל. **F.** זיהוי MpDNV באמצעות גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG. דוגמאות של DNA כללי (מלבד דוגמא d) בסדר הבא: (a). צרעה טפילית *Aphidius colemani*, לאחר שהתפתחה על כנימות עלה נגועות (b). כנימות *A. gossypii*. (c). כנימות *M. persicae* בריאות (d). ויריונים מנוקים של MpDNV, (e). כנימות *M. persicae* נגועות ב-MpDNV.

II. 2 נגיף השיתוק הקטלני של כנימות עלה (ALPV) *Aphid leathal paralysis virus*

אפיון של חלקיקי ALPV - אוכלוסיה של כנימות עלה ההרדוף שנאספו מצמחי הרדוף הנחלים (*Nerium oleander*) (תמונה מס' 4) אפשרו את זיהויו ובידודו של התבדיל הישראלי של נגיף השיתוק הקטלני של כנימות עלה, נבחר השם ALPV-An לייצוג התבדיל. הכנת תכשיר נגיף מנוקה נעשתה בהתאם לפרוטוקול להפקה של נגיפים מאבטיח בעלי צורה מורפולוגית דומה (1) וכפי שפורט בסעיף II.1.

בתום הכנת התכשיר נלקחה דגימה לקביעת איכות הניקוי וריכוז הנגיף המתקבל:

א. דוגמא המכילה חלקיקי ALPV מנוקים הונחה ע"ג רשתית נחושת, נצבעה באורניל אצטט ונבחנה במיקרוסקופ אלקטרוני חודר. ניתן לזהות חלקיקי נגיף איזומטרי בקוטר של 32nm (תמונה 4-C).

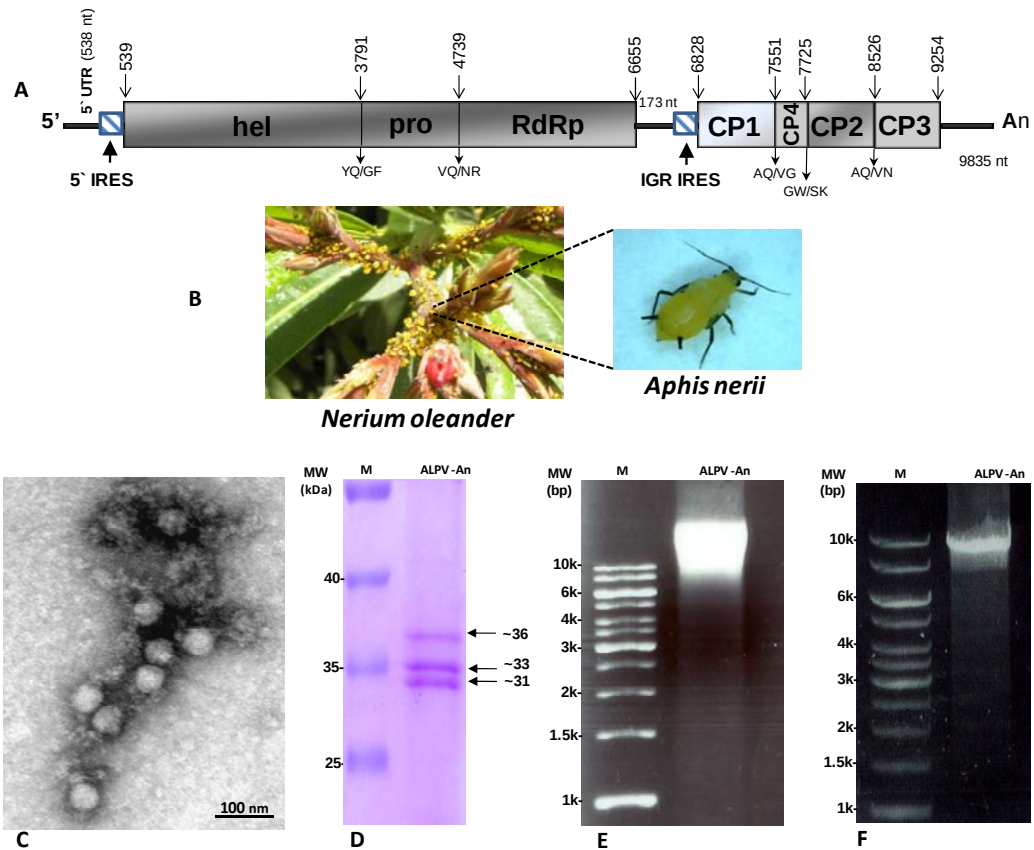
ב. זיהוי החלבונים המבניים של ALPV התאפשר באמצעות הפרדה ע"ג ג'ל אקרילאמיד של תכשיר המכיל חלקיקי נגיף מנוקים (תמונה 4-D).

ג. בנוסף, חלקיקי הנגיף ALPV המנוקים שימשו להפקת RNA נגיפי (הפרדתו בג'ל אגרוז, תמונה 4-E) אשר שימש כתבנית ל-RT-PCR לצורך הגברת הגנום הנגיפי (4-F).

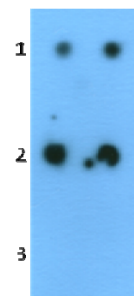
זיהוי מולקולארי של ALPV וריצוף מלא של הגנום הנגיפי - RNA נגיפי הופק מתכשיר המכיל חלקיקי נגיף מנוקים מאוכלוסיה של כנימות עלה ההרדוף נגועות ב-ALPV. ה-RNA הנגיפי שהתקבל שימש כתבנית לסינתזה של הגדיל הראשון ss-cDNA ועליו התבצעה סינתזה של הגדיל המשלים ds-cDNA. התקבלו מקטעי רצף בגדלים שונים אשר שובטו לפלסמיד pUC19 חתוך באנזים *SmaI*. לאחר התמרה לחיידקי *E. coli* נסרקו מושבות בעלות מחדר ונשלחו לקביעת רצף. חפיפת כלל המחדרים אשר רוצפו אפשרו את קביעת הרצף המלא של הגנום הנגיפי של הגזע הישראלי, ALPV-An המכיל 9635 נוקלאוטידים (תמונה מס' 4-A), הרצף הופקד בבנק הגנים (Accession number JX480861).

פיתוח גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG לזיהוי ALPV אימות נוסף לזיהוי ALPV-An נעשה באמצעות הכנת גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG, ספציפי לגנום הנגיף. הגלאי, מקטע מגן המקדד לחלבון המעטפת הנגיפי, הוכן באמצעות הגברת המקטע תוך שימוש בנוקליאוטידים מסומנים ב-DIG. הדוגמאות שנבדקו היו ניקויי חלקיקים מכנימות הרדוף (*A. nerii*) וכנימות עלה האפרסק (*M. persicae*). הגלאי אפשר זיהוי של הנגיף מתכשיר חלקיקי נגיף שהופק מכנימות עלה ההרדוף בלבד ולא זיהה את הנגיף מהפקה מכנימות עלה האפרסק (תמונה 5).

ניסוי הדבקה של כנימות עלה האפרסק (*M. persicae*) בנגיף ALPV-An. בניסויי הדבקה ראשוניים רוססו בתכשיר של חלקיקי נגיף מנוקים מושבות של כנימות עלה האפרסק (כ-700 כנימות לכל מושבה) שגודלו על צמח חרדל (*B. perviridis*). כעבור 48 מרגע הריסוס נשרו כ-70% מכלל הכנימות, כעבור 72 שעות נותרו כ-5% מהכנימות על צמחי החרדל ולאחר שבוע מהריסוס לא נותרו כנימות ע"ג הצמחים.



תמונה מס' 4. אפיון נגיף ה-ALPV הישראלי (ALPV-An). A. סכמה של ארגון הגנום הנגיפי של ALPV-An. B. אוכלוסיה של כנימות עלה ההרדוף (*Aphis nerii*) אשר גדלו על צמחי הרדוף (*Nerium oleander*). C. שימשו לניקוי הנגיף (צד שמאל), הגדלה של כנימת עלה ההרדוף נגועה בנגיף (צד ימין). D. הפרדת חלבונים ב-SDS-PAGE. E. RNA נגיפי (כ-10000nt), שהופק מתכשיר נגיף מנוקה הופרד ע"ג ג'ל אגרוז 1%. F. הפרדה בג'ל אגרוז 1% של תוצר הגברת הגנום השלם של הנגיף (כ-10000bp).



תמונה מס' 5. זיהוי ALPV באמצעות גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG. A. דוגמאות של ויריונים חלקיקי נגיף מנוקים הוגבו עם הגלאי ספציפי ל-ALPV מסומן ב-DIG. B. סדר הדוגמאות: (1) פלסמיד הנושא את הגן לחלבון המעטפת של ALPV (שימש להכנת הגלאי) כביקורת חיובית (2) הפקת חלקיקי נגיף מכנימות הרדוף (*A. nerii*) נגועות (3) הפקת חלקיקי נגיף מכנימות עלה האפרסק (*M. persicae*).

II. 3. זיהוי ואפיון נגיף *Brevicoryne brassicae picorna-like virus* (BrBV) בארץ

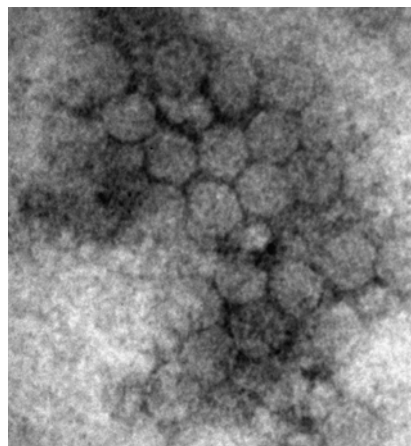
נגיף ה-BrBV, זוהה ואופיין בבריטניה בשנת 2007 בכנימות עלה הכרובים (*Brevicoryne brassicae*) נכון להיום זהו הגזע היחידי של הנגיף בעולם. זיהוי של BrBV בארץ נקבע כמטרה ע"מ לאתר נגיף בעל פוטנציאל יישומי כמדביר ביולוגי. לשם כך נסרקו דוגמאות של כנימות עלה הכרובים מאזורים שונים בארץ (אזור הצפון, אזור הדרום ואזור המרכז) (תמונה מס' 6).



תמונה מס' 6. איסוף אוכלוסיות של כנימות עלה הכרוב מצמחיית הבר והתרבות. אוכלוסיות גדולות של כנימות עלה הכרוב נאספו מצמחי חרדל וכרוב ממקומות שונים בארץ לשם איתור הנגיף BrBV. בתמונה מימין פרטים רבים מהאוכלוסייה נפגעו ע"י צרעות טפיליות (מומיות).

אפיון מורפולוגי של חלקיקי נגיף BrBV

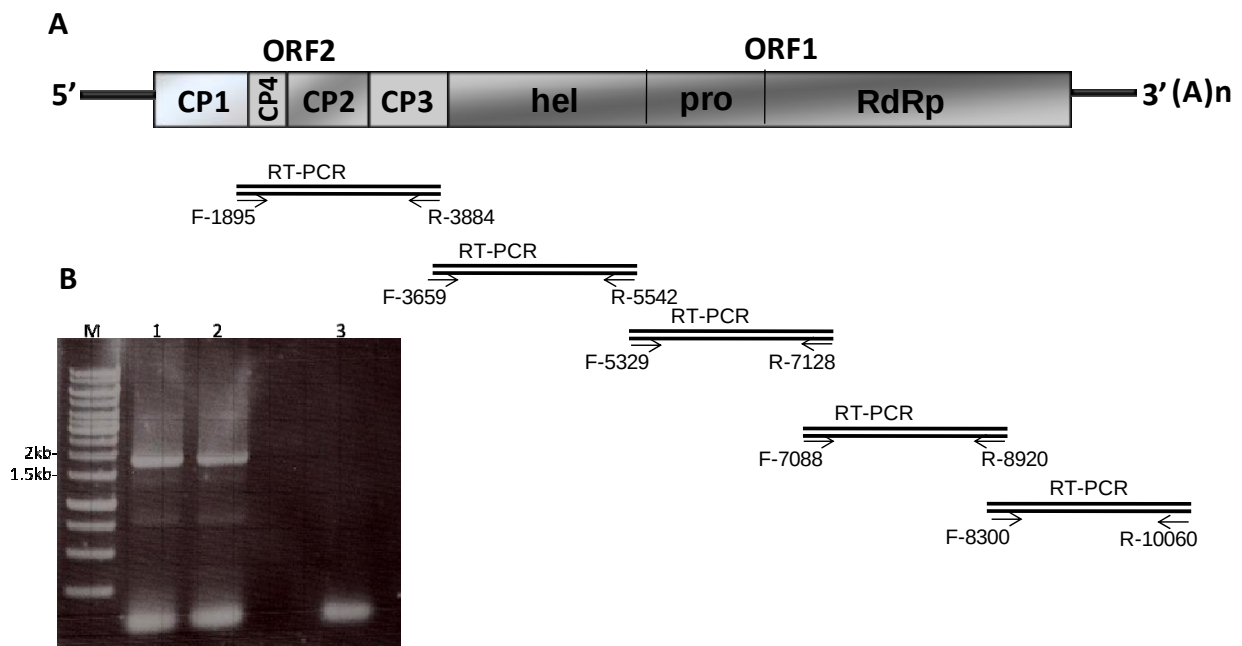
על מנת לאתר את BrBV בדוגמאות של כנימות עלה הכרוב שנאספו מאזורים שונים בארץ הוכנו תכשירי נגיף מנוקים מכל אחת מאוכלוסיות הכנימות. הפקת התכשירים נעשתה בהתאם לפרוטוקול המפורט ב- 1.II. הדוגמאות הונחו ע"ג רשתית נחושת, נצבעו באורניל אצטט ונבחנו במיקרוסקופ אלקטרוני חודר. חלקיקי נגיף איזומטריים בקוטר של כ- 26 nm זוהו במס' דוגמאות (תמונה 7).



תמונה מס' 7. מורפולוגיה של חלקיקי נגיף BrBV. תכשיר של חלקיקי נגיף מנוקים לאחר צביעה באורניל אצטט בבחינה במיקרוסקופ אלקטרוני חודר.

זיהוי מולקולארי וריצוף הגנום של BrBV.

מתכשיר מנוקה של חלקיקי נגיף הופק Total RNA ששימש כתבנית להפקת ss-cDNA באמצעות תחל מסוג Oligo-dT. לאחר מכן הגנום הוגבר ע"י RT-PCR תוך שימוש בתחלים שתוכננו ע"פ רצף BrBV המצוי ב-GeneBank (Accession no. EF517277). תוצרי ההגברה שובטו בפלסמיד pGEM-T Easy ונשלחו לקביעת רצף הבסיסים (תמונה מס' 8). רמת זהות גבוהה של 94% נמצאה בין רצף התבדיד הישראלי לזה המצוי ב-GeneBank עבור המקטע המצוי בין 1895-3884 bp (תחל קדמי **1895F**: 5'- ccgttccatccgatctctta-3 ותחל משלים **3884R**: 3- ccgaataagtttaacccgtgtg-3) בגנום של BrBV (תמונה 9).



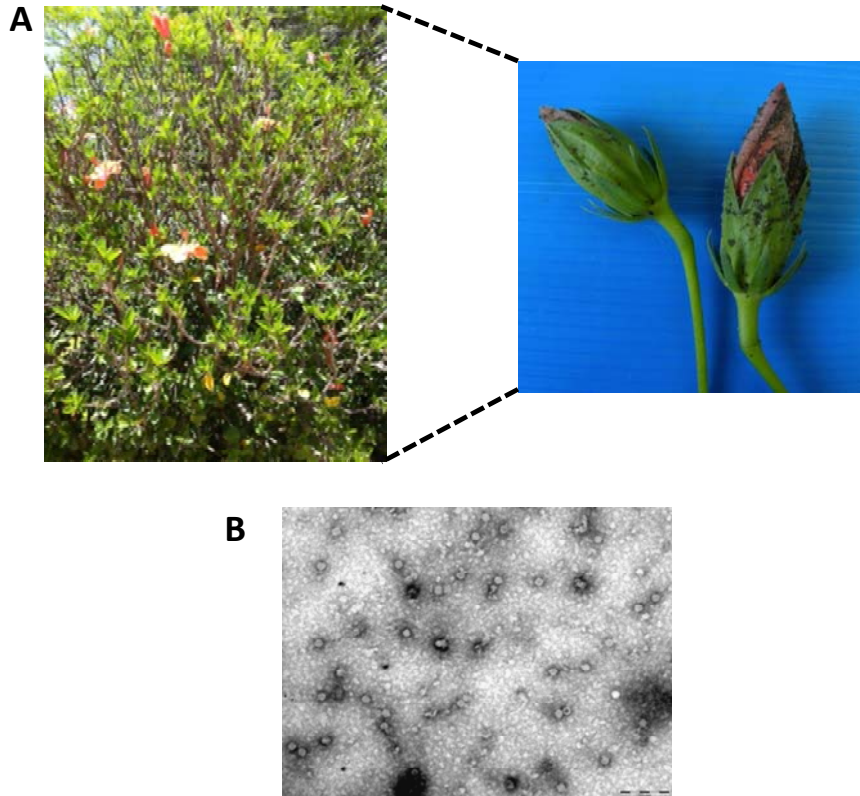
תמונה מס' 8. הגברה של מקטעים בגנום של BrBV מהתבדיד הישראלי. A. תרשים המדגים את ארגון הגנום של התבדיד הישראלי של BrBV ואופן ריצוף הגנום. הגברה באמצעות RT-PCR תוך שימוש בתחלים ספציפיים אפשרה קבלת מקטעים שונים לאורכו של הגנום. **B.** הפרדת תוצרי RT-PCR של האזור שבין 1895-3884bp. סדר הרצה: M—סמן גודל; בארית 1 ו-2 כנימות עלה שנאספו מצמחי כרוב; בארית 3 ביקורת שלילית (ללא תבנית).

	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	2731	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	2861	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	2991	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	3121	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	3251	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	3381	3390	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	3511	3520	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600	3610	3620	3630	3640
Br-BV	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Israel	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													

תמונה מס' 9. השוואה בין רצפי הגנומים של שני תבדירי BrBV הידועים כיום בעולם האנגלי BrBV הישראלי. השוואה בין רצף הגנום של התבדיר הישראלי והאנגלי באזור שבין 2600-3640 bp. ההשוואה נעשתה באמצעות תוכנת multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>)

II. 4. זיהוי נגיף חדש במשפחת ה- *Dicistroviridae*

(AgV) *Aphis gossypii* virus שם טנטיבי שאנו מציעים לנגיף הרביעי שזוהה ואופיין חלקית במסגרת עבודה זו. נגיף ה-AgV זוהה בדוגמא שנאספה מאוכלוסיה של כנימות עלה הדלועיים (*Aphis gossypii*) אשר גדלו במרכז הארץ על צמחי היביסקוס מתורבתים. אוכלוסיות הכנימות (תמונה מס' 10-A) הנוגעות ב-AgV נראו קטנות בגודלן מכנימות עלי דלועים אופייניות הגדלות על היביסקוס ללא נגיעות בנגיף.



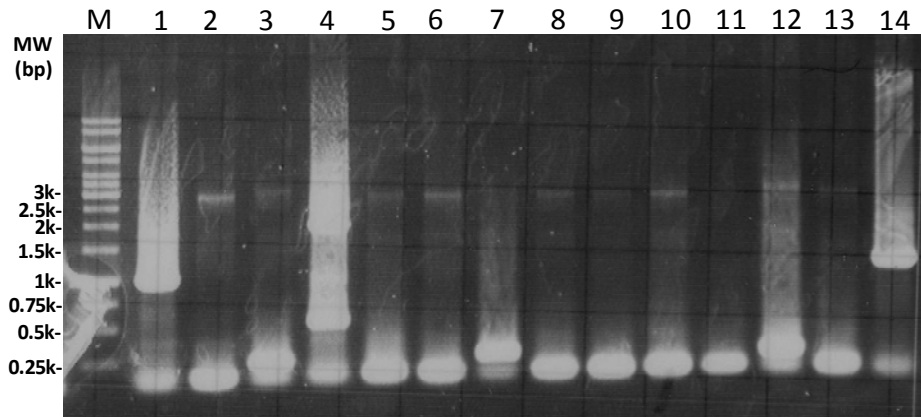
תמונה מס' 10. כנימות עלה הדלועיים שגדלו על צמחי היבסקוס. A. צמח היבסקוס במרכז הארץ (צד שמאל). הגדלה של פרח היבסקוס עליו גדלו אוכלוסיות של כנימות עלה הדלועיים (צד ימין). **B.** חלקיקי נגיף שהופקו מאוכלוסיית כנימות עלה הדלועיים, לאחר צביעה באורניל אצטט כפי שנצפו במיקרוסקופ אלקטרוני חודר.

הפקת נגיף מדוגמאות כנימות עלה הדלועיים.

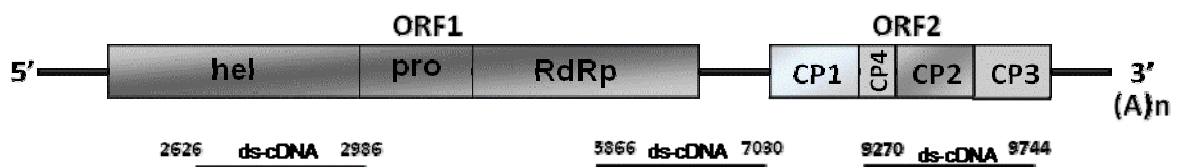
ההפקה של חלקיקי הנגיף נעשתה בדומה למתואר בסעיף II.1. תכשיר נגיף מנוקה נבחן במיקרוסקופ אלקטרוני חודר והתאפשר זיהוי של חלקיקים איזומטריים בקוטר של כ-31nm (תמונה B-10).

זיהוי מולקולארי וריצוף הגנום של AgV.

לראשונה זוהה נגיף הפוגע בכנימות עלה הדלועיים (*A. gossypii*). ריצוף הגנום הנגיפי נעשה באמצעות הפקת Total RNA מתכשיר מנוקה של חלקיקי הנגיף. הפקה זו שימשה כתבנית ליצירת גדיל ה-ss-cDNA וגדיל משלים ds-cDNA. בהמשך, מקטעי ה-ds-cDNA שובטו לפלסמיד pUC19 החתוך באנזים *SmaI*. הפלסמידים עם המקטעים השונים הותמרו לחיידקי *E. coli* ומושובות בעלות מחדר ברור (תמונה 11) נשלחו לקביעת רצף. השוואת הרצפים שהתקבלו אל רצפים המצויים ב-GeneBank (באמצעות BLAST-n) הראתה כי מקטעי הגנום בעלי הומולוגיה נמוכה (אך הגבוהה ביותר שנמצאה) היא נעה בטווח שבין 71%-74% לנגיף *Rhopalosiphum padi virus* (RhPV), ממשפחת ה-*Dicistroviridae*. מכיוון שאחוז הזהות שהתקבל הנו מתחת לסף ה- demarcation index העומד על 90% נראה כי מדובר בנגיף חדש ממשפחת ה-*Dicistroviridae* הפוגע בכנימות עלה והוענק לנגיף השם הזמני *Aphis gossypii virus* (AgV) על שם הפונדקאי בו הוא מתאכסן.



תמונה מס' 11. מקטעים בגנום של *Aphis gossypii* virus (AgV) הגברה של מקטעי הגנום הנגיפי אשר הוחדרו לפלסמיד pUC19. בערוצים 1,4,7,12,14 נראים מחדרים ברורים שהתקבלו ואלו נשלחו לריצוף, בשאר הערוצים הפלסמידים לא רכשו מחדר.



תמונה מס' 12. סכימה כללית המתארת את ארגון הגנום של *Aphis gossypii* virus (AgV). סכימה של ארגון הגנום של נגיפים ממשפחת ה-*Dicistroviridae*, שלושת המקטעים המצויים תחת הסכימה מייצגים את האזורים בגנום אשר רוצפו באמצעות יצירה של ds-cDNA. רצף הגנום באזורים המצויים בין שלושת מקטעי ה- ds-cDNA התקבל באמצעות שימוש בתחלים ספציפיים בריאקציה של RT-PCR.

סיכום עם שאלות מנחות

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה.

עבודה זו הנה חלוצית בתחומה ותוצאותיה מספקות את התשתית הראשונית לתחום חדש העושה שימוש בנגיפים פתוגניים לחרקים מזיקים. במהלך תקופת המחקר זוהו לראשונה 4 נגיפים פתוגניים לכנימות עלה בארץ. הנגיפים שבודדו שייכים למשפחות טקסונומיות שונות ונבדלים זה מזה ברמת הפתוגניות שלהם ובטווח הפונדקאים אותם הם תוקפים. כמובן שנדרש עוד מחקר רב לאפיון כל אחד מארבעת הנגיפים שזוהו וכן הבנה של האופן בו ניתן לעשות בהם שימוש מועיל לחקלאות ולמחקר.

2. עיקרי התוצאות:

הנגיף הראשון MpDNV: כנימות הנגועות ב- MpDNV נפגעות פיסיולוגית: הן קטנות יותר, בעלי יכולת תנועה פחותה אך הן אינן מתות בעקבות נגיעות בנגיף. נגיף זה בעל גנום DNA דו גדילי מעגלי המשתייך למשפחה *Densovirinae*. הגנום הנגיפי של הגזע הישראלי רוצף במלואו ונמצא מכיל 5565 נוקלאוטידים וארבע מסגרות קריאה המקדדות לחלבונים (תמונה מס' 3-A). בבדיקה של טווח הפונדקאים נמצא כי MpDNV אינו מנגע את

הצרעה הטפילית (*A. colemani*) המשמשת כמדביר ביולוגי של כנימות עלה אלו, גם כאשר הצרעה גדלה וניזונה על כנימות עלה נגועות, נמצא כי הנגיף אינו מדביק את כנימת עלה הדלועיים (*A. gossipii*) (תמונה מס' 3-F).
על סמך התוצאות ניתן להניח כי יעילותו של MpDNV כמדביר ביולוגי מוגבלת ולכן כדאי לעשות בו שימוש ככלי למחקרים תשתיתיים ופחות כמדביר ביולוגי.

בבדיקה שערכנו נמצא כי נגיף ה-MpDNV עובר אינטגרציה לגנום הכנימה. ממצא זה יכול להסביר את העובדה שהכנימה מעבירה את הנגיף בצורה אנכית וכן לתת הסבר לקיום ITR בקצוות הנגיף הידועים כמבנים נגיפיים (טרנספוזומים) היוצרים אינטגרציות בגנום הפונדקאי. יעילותו של MpDNV כמדביר ביולוגי היא מוגבלת בעיקר בשל העובדה כי איננו פתוגני לכנימה אותה הוא מדביק. מנגד, לעובדה כי MpDNV עובר אינטגרציה אל גנום הכנימה ישנה חשיבות מחקרית גדולה ביותר ויתכן כי לראשונה תתאפשר יצירה של קלון אינפקטיבי של MpDNV שימש בעתיד ליצירה של כנימות עלה טרנסגניות, דבר שעדיין לא נעשה בעולם. בכנימות הטרנסגניות ניתן יהיה לבטא חלבונים שונים או לחילופין להשתיק גנים חיוניים לכנימה לצורך לימוד תפקודם של גנים בכנימה בעבודות מחקר בעלות אופי של גנומיקה תפקודית.

הנגיף השני ALPV: זוהי לראשונה בארץ מדוגמאות של כנימות עלה שנאספו מן הבר. תבדיל אחד של הנגיף נבחר לגידול רציף במעבדה על כנימות עלה מהמין *A. nerii* הגדלות על צמחי הרדוף הנחלים לביצוע הניסויים השונים ולאפיון מעמיק של הנגיף. התבצע אפיון של התבדיל הישראלי של ALPV כולל ריצוף מלא של הגנום הנגיפי והשוואתו לזה של הגזע הדרום אפריקאי, הכנת תכשירי נגיף מנוקה, לימוד של דפוס החלבונים המבניים ופיתוח שיטות לזיהוי רגיש ואמין של הנגיף מדוגמאות של כנימות עלה. בהמשך החל תהליך של לימוד יכולת הנגיף כמדביר ביולוגי של כנימות עלה. נמצא כי התבדיל המקומי של ALPV פתוגני לכנימות עלה האפרסק (*M. persicae*) אשר נושרות מהצמח עליו הן ניזונות עד כשבוע מרגע הריסוס בחלקיקי נגיף מנוקים של ALPV. יעילותו של ALPV כמדביר ביולוגי היא גבוהה במיוחד כנגד כנימת עלה האפרסק, אך יש לבחון את השפעתו של ALPV על חרקים מועילים כגון דבורים (דבש, בומבוס) המשמשים להאבקה. מתוצאות החלק בעבודה אשר עסק בחקר נגיף ה-ALPV עולות שאלות מדעיות שונות אותן יש לבחון בעבודות המשך נוספות:
מה מקנה לכנימת עלה ההרדוף יכולת עמידות כנגד ALPV?
האם נגיף ה-ALPV פתוגני גם למינים אחרים של כנימות עלה?

3. מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו המטרות לתקופת הדו"ח?

כן בהחלט, הושגו כל מטרות המחקר לתקופת הדוח ובנוסף הושגו גם מטרות נוספות שלא הוגדרו בתוכנית המחקר המקורית. להלן מספר נקודות עיקריות הדורשות המשך מחקר עתידי:

1. קיום תרבית חיה של ALPV בכנימות *Aphis nerii* לשם ביצוע ניסויים נוספים לבחינת יעילותו של הנגיף כמדביר ביולוגי. כמו כן יש לבצע ניסויים נוספים על מנת לבחון האם הנגיף פוגע בחרקים מועילים כגון דבורת דבש (בומבוס).
2. יש לבדוק האם צרעה טפילית (לדוגמא אפידיוס) המתפתחת על כנימות עלה הרדוף נגועות ב-ALPV תוכלנה לשמש כמעין "ווקטור" להדבקה של מיני כנימות עלה אחרות כגון כנימת עלה האפרסק או הדלועיים ב-ALPV.
3. הכנה של קלון אינפקטיבי של ALPV ובחינת יכולתו לשמש כמדביר ביולוגי עתידי. יתרון השיטה היא שאיננה מחייבת החזקה שוטפת של הנגיף בתרבית חיה במעבדה. יישום השיטה היא ע"י ריסוס הקלון האינפקטיבי על מוקדי הכנימות בחלקות נגועות.

הנגיף השלישי BrBV: זיהוי בארץ של BrBV היה אחד ממטרות העבודה. נגיף זה משתייך לקבוצה חדשה של נגיפים התוקפים חרקים *Iflaviruses*, זהו הנגיף הראשון מקבוצה זו התוקף כנימות עלה. עד היום פורסמה רק עבודה אחת בנושא זה, בה הנגיף זוהה ובודד מאוכלוסיות של כנימות עלה הכרוב התוקפות צמחים ממשפחת המצליבים ונקבע הרצף המלא של הגנום הנגיפי אולם עדין לא נקבע טווח הפונדקאים (1). הנגיף זוהה על אוכלוסיות של כנימות עלה הכרוב שנדגמו ממספר מקומות ברחבי הארץ. גנום הנגיף רוצף כמעט במלואו (כ-95%) ובמקביל אופיינו חלבוני הנגיף ונבחן טווח הפונדקאים. החשיבות של מציאת נגיף זה בארץ הנה רבה מכיוון שנכון להיום BrBV הנו הנגיף היחידי מקבוצת ה- *Iflaviruses* התוקף כנימות עלה. כמו כן, מלבד מאמר אחד שהתפרסם על זיהוי הנגיף באנגליה אין כל מידע נוסף על נגיף זה וחסר מידע רב על יכולתו הפתוגנית וטווח הפונדקאים.

הנגיף הרביעי (AgV): להפתעתנו, במהלך עבודת מחקר זו זוהה לראשונה נגיף חדש הפתוגני לכנימות עלה הדלועיים (*A. gossypii*) אשר גדלו על צמחי היבסקוס מתורבתים במרכז הארץ. בשלב זה רוצפו מספר מקטעים בגנום הנגיף. השוואה של רצפי הגנום שהתקבלו אל רצפי נגיפים אחרים ב-GeneBank מצאה כי נגיף זה הנו נגיף חדש המשתייך למשפחת ה- *Dicistroviridae* אליה משתייך גם הנגיף ALPV. השם הזמני שנבחר לנגיף חדש זה הנו *Aphis gossypii virus (AgV)*. ככל הידוע לנו, *AgV* הנו הנגיף הראשון שזוהה כפוגע בכנימות עלה הדלועיים, המהוות נזק כלכלי רב בארץ ועל כן חשיבותו רבה במיוחד. ריצוף הגנום של נגיף זה עדיין לא הושלם (כ-80% רוצף עד היום), כמו כן גם חלבוני הנגיף בשלבי לימוד. יש להמשיך ולבחון את השפעתו על כנימות עלה הדלועיים בפרט ועל מיני כנימות עלה אחרות ככלל ולבצע טווח פונדקאים.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע בתקופת הדו"ח:

- כן, מאמר על ALPV פורסם בעיתונות העולמית:
- Dombrovsky Aviv and Luria Neta. (2013). The *Nerium oleander* aphid *Aphis nerii* is tolerant to a local isolate of *Aphid lethal paralysis virus (ALPV)*. *Virus Genes*. 46: 354-361.
- רצפי הגנומים המלאים של הנגיפים אשר רוצפו בעבודה זו הוכנסו למאגר המידע של GeneBank.
- כמו כן, חלקים מהעבודה הוצגו בכנס ה- 34 (2013) של העמותה הישראלית למחלות צמחים שהתקיים במינהל המחקר החקלאי ע"י דר' נטע לוריא פוסט דוקטורנטית במעבדתו של דר' אביב דומברובסקי.
- מאמרים נוספים בעברית ובאנגלית עתידים להתפרסם בתקופה הקרובה.

פרסום הדו"ח

אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי.

כן

1. Ryabov, E. V. (2007). A novel virus isolated from the aphid *Brevicoryne brassicae* with similarity to Hymenoptera picorna-like viruses. *Journal of General Virology* 88: 2590-2595.
2. van Munster, M., Dullemans, A. M., Verbeek, M., van den Heuvel, J. F. J. M., Clérivet, A. & van der Wilk, F. (2002). Sequence analysis and genomic organization of *Aphid lethal paralysis virus*: a new member of the family *Dicistroviridae*. *J Gen Virol* 83, 3131–3138.
3. van Munster M., Dullemans A.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Reinbold C., Brault V., Cle'rivet A. and van der Wilka F., (2003). Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84:6
4. van Munster M., Dullemans A. M., Verbeek M., van den Heuvel J. F. J. M., Reinbold C., Brault V., Cle' rivet A. and van der Wilk F., (2003). A new virus infecting *Myzus persicae* has a genome organization similar to the species of the genus Densovirus. *Journal of General Virology* , 84:165
5. van Munster M., Janssen A., Clerivet A. and van den Heuvel J., (2005). Can plants use an entomopathogenic virus as a defense against herbivores?. *Oecologia* 143: 396–401
6. Williamson, C., Rybicki, E. P., Kasdorf, G. G. F. & Von Wechmar, M. B. (1988). Characterization of a new picorna-like virus isolated from aphids. *Journal of General Virology* 69, 787-795.