

דוח שנה שלישית תוכנית מחקר מס' 11-1483-131

נוכחות פתוגנים והמופע של המערכת החיסונית בדבורת הדבש

מוגש לקרן מדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

נור צ'חנובסקי<sup>1</sup>, ויקטוריה סורוקר<sup>1</sup>, ארנון דג<sup>1</sup>, בוריס יעקובסון<sup>2</sup>, חיים אפרת<sup>3</sup>, יוסי סלבצקי<sup>3</sup>, הדסה ריבקיין<sup>1</sup>, יוסי קמר<sup>1</sup>

<sup>1</sup> מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

<sup>2</sup> מכון ווטרינרי

<sup>3</sup> ש"ה"מ

Nor Chejanovsky: [ninar@volcani.agri.gov.il](mailto:ninar@volcani.agri.gov.il)

Victoria Soroker: [sorokerv@agri.gov.il](mailto:sorokerv@agri.gov.il)

Arnon Dag : [arnondag@agri.gov.il](mailto:arnondag@agri.gov.il)

Boris Yakobson: [dir-kimron@moag.gov.il](mailto:dir-kimron@moag.gov.il)

Haim Efrat: [haime@moag.gov.il](mailto:haime@moag.gov.il)

Yossi Slabezki: [yoslav@shaham.moag.gov.il](mailto:yoslav@shaham.moag.gov.il)

Hadassah Rivkin: [dassy@volcani.agri.gov.il](mailto:dassy@volcani.agri.gov.il)

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים.



חתימת החוקר

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

1. Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N. (2011). Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. Virology 417:106-12.
2. - Chejanovsky N (2010). Paralytic Viruses of the Honey Bee. Uludag Bee Journal, 10: 126-134.

|         |                               |
|---------|-------------------------------|
| 3.....  | תקציר                         |
| 4.....  | 1. מבוא                       |
| 4.....  | מטרת המחקר                    |
| 5.....  | 2. הפעלת המחקר. פירוט ניסויים |
| 9.....  | 3. דיון                       |
| 17..... | 4. פרסומים שנבעו מהמחקר       |
| 18..... | 5. רשימת ספרות                |
| 19..... | סיכום עם שאלות מנחות          |

## תקציר

הצגת הבעיה: פתוגנים וליקויי תפקוד במערכת החיסונית מהווים גורמים חשובים להפחתת הקשה באוכלוסיות דבורים בארץ ובעולם. כאן, אפיינו פתוגנים ויראליים ולראשונה בחנו פרמטרים של תפקוד המערכת החיסונית בכוורות בארץ.

### מטרת המחקר שבהצעת המחקר

מטרה כללית: אפיון תופעת קריסת הדבוריות ואובדן ברמה ארצית.

מטרות הספציפיות:

1. בחינת תפוצת הוירוסים ו-Nosema הפתוגניים לדבורת הדבש בכוורות מייצגות בארץ, בכוורות נגועות בוורואה ובהעדרו.
  2. בנית פרופיל של המערכת החיסונית של כוורות מודל בנוכחות ובהעדר פתוגנים, עם או בלי וורואה ובמצבי סטרס חברתי.
  3. בדיקת הקשר בין הפחת ובין הרקע הגנטי של קו דבורים.
- שיטות העבודה קביעה איכותית וכמותית של וירוסים ב-RT-PCR איכותי וכמותי במיקרוכווריות, ובכוורות מוטפלות בוורואה. בדיקת ביטוי גנים של המערכת החיסונית בעזרת real time RT-PCR.

### תוצאות מצאנו ש:

תדירות גבוהה של וורואה, נוסימה והוירוסים, (Deformed wing, IAPV (Israeli acute paralysis virus), (Chronic bee paralysis virus) CBPV ו-virus) DWV (Virus) ו-VDV-1 (Varroa destructor virus-1), והתפרצויות של ABPV (Acute bee paralysis virus) (Chronic bee paralysis virus) CBPV ו-virus).  
תפוצתם של DWV ו-VDV-1 מותאמת יותר לנוכחות הוורואה והעלייה ב-IAPV התאימה עונתית לעליית הנוסימה.  
- רק בראש דבורים מגיחות סימפטומטיות (מעוותות כנפיים) קיים וירוס ריקומביננטי והגנום שלו מורכב מאזור הקצה ה-5' של VDV-1 ובאזור הקצה ה-3' מרצפי DWV. -קיים הבדל של כארבעה סדרי גודל בכמות הוירוסים הנ"ל בין דבורים סימפטומטיות ואסימפטומטיות.

-במבחן להערכת המערכת החיסונית בקביעת רמת הביטוי של הגנים Defensin Abaecin, Hymenoptaecin ו-Defensin Abaecin ו-Glucose oxidase עמילות בוגרות הראו רמת ביטוי גבוהה של Abaecin ו-Defensin בתגובה מהירה (שש שעות) לריכוזים עולים של IAPV בגופם. Abaecin ו-Hymenoptaecin Defensin הראו מגמת ירידה בביטויים כתוצאה מהדבקה ממושכת בוירוס.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: 1- הרחבת המחקר לקביעת רמת הסמנים הללו במצבי עקה כחשיפת הדבורים לוורואה ולוירוסים נוספים במערכת מבוקרת. 2-חשיפה השוואתית של אוכלוסיות דבורים בעלי רקע גנטי שונה לאותו וירוס ובדיקת תגובתם.

אפיון תגובת המערכת החיסונית בתנאים אילו תאפשר לנצל בהמשך את הידע הזה ככלי לטיפול כוורות בריאות ועמידות מפני מחלות להקטנת פחת הדבורים בארץ.

## 1. מבוא

מאז 2005 ועד היום נרשמו במכוורות בארץ אירועים אחדים הדומים לסינדרום קריסת הכוורת "Colony collapse disorder- CCD (1-4) הכולל עליה בפחת הדבוריות שמגיע במכוורות גדולות אל מעל- 25% בחישוב שנתי. מבין הסיבות האפשריות שהוצעו להסברתם: פגעים כגון אקריות ופתוגנים, תכשירי הדברה, ליקויי תפקוד במערכת החיסונית (5,6). בשנה ראשונה של המחקר בדקנו כוורות במדגם ארצי לנוכחות פתוגנים על מנת לאפיין את הכוורות בארץ ואת תדירות הופעתם של פתוגנים שונים במהלך השנה. מצאנו תדירות גבוהה של וורואה, נוסימה והוירוסים הבולטים VDV-1 (Varroa destructor virus) ו-DWV (Deformed wing virus), IAPV (Israeli acute paralysis virus) ו-CBPV (Chronic bee paralysis virus). כמו כן נצפו התפרצויות ממוקדות של ABPV (Acute bee paralysis virus) ו- CBPV (Chronic bee paralysis virus). נמצאה התאמה עונתית בין העלייה ב-IAPV לבין הנוסימה והתאמה חלקית בין IAPV לבין נוכחות וורואה. לעומת זאת, תפוצתם של DWV ו-VDV-1 מותאמת יותר לנוכחות הוורואה המשמש להם כווקטור. ההערכות של הוירוסים בכוורות היו איכותיות בלבד ולכן בשנה השנייה ניגשנו לפתח גישות כמותיות להערכת הוירוסים. עבודה הזאת חשפה את השפעת ההטפלה בוורואה על השתנות הוירוסים DWV ו-VDV-1.

כמו כן, בשנה הראשונה פיתחנו מבחן כמותי להערכת המערכת החיסונית שכללה את המסלולים JAK/STAT, imd ו-JNK ואת הגן המקודד ל-PPO (Prophenol oxidase activating enzyme). הערכה ראשונית של שינוי ברמת הביטוי הגנים הללו בשתי כוורות מודל הייתה מעודדת ובעקבות זאת ביצענו הערכה מדגמית דומה של כוורות נגועות. בשנה השנייה, בעקבות להמלצות של שופט הדו"ח הראשון, התרכזנו בפיתוח מערכת המודל שלנו בתנאי כוורת מבוקרים על מנת לצמצם את מספר הפרמטרים שיכולים להשפיע על הקשר בין רמת ביטוי גנים מהמסלולים השונים של המערכת החיסונית (הרחבה על כך ניתנת בדיון), זה הביא אותנו למעקב אחרי גנים שהם תוצרי ההפעלה של מסלולי המערכת החיסונית (Glucose oxidase ו-Abaecin, defensin, Hymenoptaecin) ולא מווסתי המערכת שנבדקו בשנה הראשונה. בשנה השלישית הרחבנו את לימוד התגובה החיסונית של הדבורים להדבקה בוירוסים בעיקר IAPV, דבר שדרש פיתוח מבחן כמותי למעקב הדבקת דבורים בוירוס זה.

## מטרת המחקר

**מטרת המחקר הכללית** הינה אפיון תופעת קריסת הדבוריות ואובדן ברמה ארצית. כאשר מטרותינו הספציפיות בשנה זאת הייתה המשך בנית פרופיל של המערכת החיסונית של כוורות מודל בנוכחות ובהעדר פתוגנים.

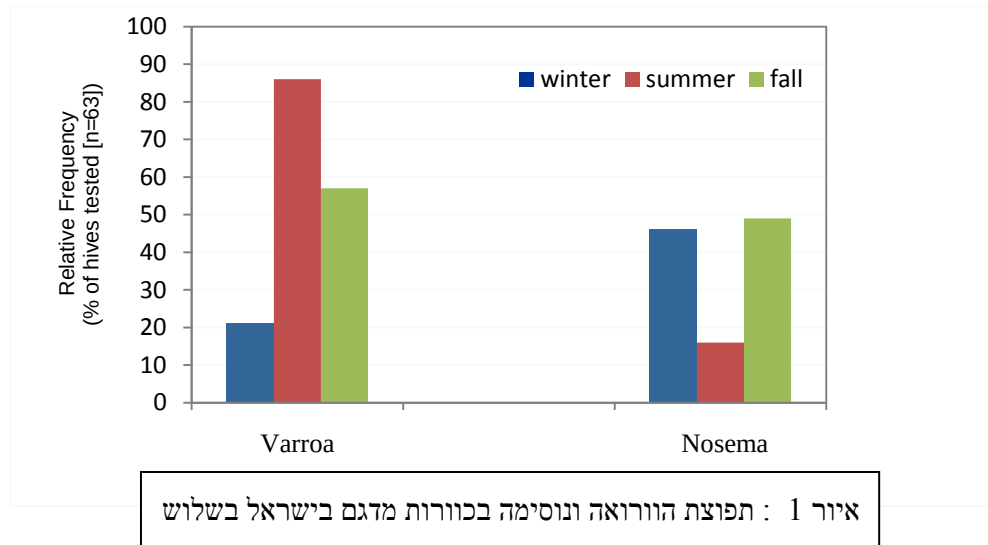
המטרות הספציפיות של המחקר הן:

1. בחינת תפוצת הוירוסים ומיקרופורידיה (Nosema), הפתוגניים לדבורת הדבש בכוורות מייצגות בארץ, בכוורות נגועות בוורואה ובהעדרו.
2. בנית פרופיל של המערכת החיסונית של כוורות מודל (קו דבורים מושבח) בנוכחות ובהעדר פתוגנים, עם או בלי וורואה ובמצבי סטרס חברתי.
3. בדיקת הקשר בין הפחת ובין הרקע הגנטי של קו דבורים.

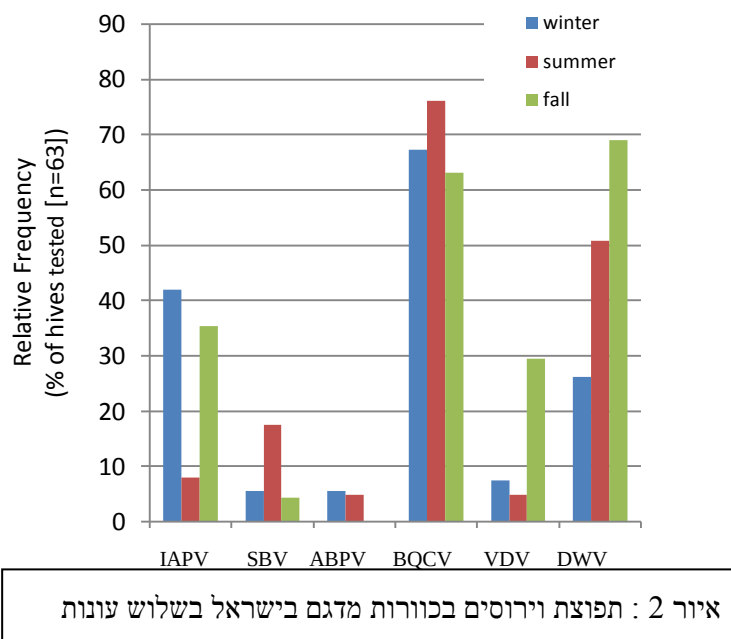
## 2. הפעלת המחקר. פירוט הניסויים.

### 2.1 אבחון פתוגנים –שנה ראשונה

א.נעשה אבחון פתוגנים ממדגם כוורות ארצי. באיור מספר 1 ניתן לראות את תפוצת הוורואה והנוסימה בארץ בשלושה מועדים שנקבעו.



ניתן לראות שאוכלוסיית אקרית הוורואה נפוצה מאד בכוורות (אם כי באחוזי נגיעות המשתנים באופן משמעותי ביניהם, לפירוט ראה [11]). הנגיעות בנוסימה נמוכה יותר במיוחד בקיץ. כמו כן, ניתן לראות באיור מס' 2 את אחוזי הנגיעות בוירוסים השונים (לפירוט נרחב של הפרימרים ראה [11]).



מכלל הוירוסים BQCV המופיע בתדירות גבוהה והוא אסימפטומטי לחלוטין, ובמידה והוא מתפרץ הוא תוקף את המלכה בשלב מוקדם של התפתחותה.

הוירוסים הבולטים יותר בתפוצתם בעלי יכולת פתוגנית לכוורת הינם ה-IAPV וה-DWV ו-VDV-1. בטבלה I ניתן לראות את אחוזי הכוורות נגועות בוירוסים הנ"ל כאשר נוכחים או נעדרים מהם וורואה או נוסימה.

| Virus (% in beehives) | (% of virus) Varroa |    | (% of virus) Nosema |     |
|-----------------------|---------------------|----|---------------------|-----|
|                       | +                   | -  | +                   | -   |
| IAPV                  |                     |    |                     |     |
| 25                    | 24                  | 76 | 36                  | 64  |
| 5                     | 60                  | 40 | 0                   | 100 |
| 20                    | 63                  | 37 | 53                  | 47  |
| VDV                   |                     |    |                     |     |
| 8                     | 13                  | 88 | 13                  | 88  |
| 3                     | 100                 | 0  | 33                  | 67  |
| 14                    | 77                  | 23 | 46                  | 54  |
| DWV                   |                     |    |                     |     |
| 16                    | 8                   | 92 | 25                  | 75  |
| 32                    | 90                  | 10 | 19                  | 81  |
| 41                    | 62                  | 38 | 45                  | 55  |

טבלה I - אחוז נגיעות הכוורות בוירוסים המצוינים לעיל בנוכחותם או היעדרותם של וורואה או נוסימה, בהתאמה.

נראה שיש התאמה בין עונות בהן מופיע IAPV לבין נוכחות הנוסימה (השווה איור 1 ו-2) והתאמה חלקית בין IAPV לבין נוכחות ורואה. לעומת זאת, תפוצתם של DWV ו-VDV יותר מותאמת לנוכחות הוורואה המשמש להם כווקטור.

## 2.2 המערכת החיסונית : בחינת תפקודו במערכת מודל (כוורות במכוורת).

על מנת לבחון את מופע המערכת החיסונית של הכוורת נבדק הביטוי הכמותי של קבוצות גנים המייצגים את המסלולים העיקריים של מערכת זאת, המסלולים JAK/STAT, toll, imd ו-JNK בעזרת Real-time PCR. נבחרו גנים מרכזיים שתוצרתם מעבירים את האות לתגובה של כל מסלול:

*hopsotch* GB12159 , *imd* GB18606 (*Imd*), *basket* GB16401 (*JNK*), *dorsal* GB19537 (*Toll*) (*JAK/STAT*) ושני גנים נוספים שתוצרתם מעורבים בהכרת הפתוגן ברמה הווראלית ובתאית שהובחנו בהשתנותם בדבורים בעקבות הדבקות בחיידקים ופטריות *PPOA* GB18767 ו-*DScam* GB11871, בהתאמה. שימשו כ- *RPL8* GB17629 and *RPS5* GB11132 house-keeping genes . הפרימרים ששימשו לזיהויים מובאים בטבלה II .

| Gene     | Accession number | Primer forward        | Primer reverse         |
|----------|------------------|-----------------------|------------------------|
| basket   | GB16401          | AGGAGAACGTGGACATTTGG  | AATCCGATGGAAACAGAACG   |
| dorsal-1 | GB19537          | AAATGGTTCGCTCGTAGCAC  | TCCATGATATGAGTGATGGAAA |
| Dscam    | GB11871          | TTCAGTTCACAGCCGAGATG  | ATCAGTGTCCCGCTAACCTG   |
| hopsotch | GB12159          | ATTTCATGGCATCGTGAACAA | CTGTGGTGGAGTTGTTGGTG   |
| Imd      | GB18606          | TGTTAACGACCGATGCAAAA  | CATCGCTCTTTTCGGATGTT   |
| PPOact   | GB18767          | GTTTGGTCGACGGAAGAAAA  | CCGTCGACTCGAAATCGTAT   |

מקבוצת הגנים שבטבלה הצלחנו להגביר את כולם ב-PCR-RT עם RNA שמוצה מכוורות נבחרות. בהמשך נעשה זיהוי של הגנים על ידי קביעת רצף שהראה התאמה מלאה לרצף שבבנק הגנים להוציא את *dorsal-1* ו-*Dscam*. וכן ההמשך נעשה בגנים שזיהינו בוודאות.

פיתוח מבחן Real-time PCR למסלולי המערכת החיסונית

קטעים מהגנים (PPO) (PPOact), Imd, hopscotch (Hsc), basket (bsk) הוגברו ונוקו, בעזרתן הוכנו עקומות כיול כמותיות בשיטת Real-time PCR (qRT-PCR) במכשיר (Corbett Rotor-gene 6000 research) בשימוש ב-SYBR Green [12]. העקומות שנתקבלו היו:

| R       | עקומה                                    | גן            |
|---------|------------------------------------------|---------------|
| 0.99757 | $Ct = -3.333(\log \text{conc}) + 26.414$ | bsk           |
| 0.99742 | $Ct = -3.075(\log \text{conc}) + 19.204$ | hpsc          |
| 0.99598 | $Ct = -3.096(\log \text{conc}) + 21.185$ | imd           |
| 0.99484 | $Ct = -3.100(\log \text{conc}) + 22.833$ | PPO           |
| 0.99299 | $Ct = -3.285(\log \text{conc}) + 19.431$ | House keeping |

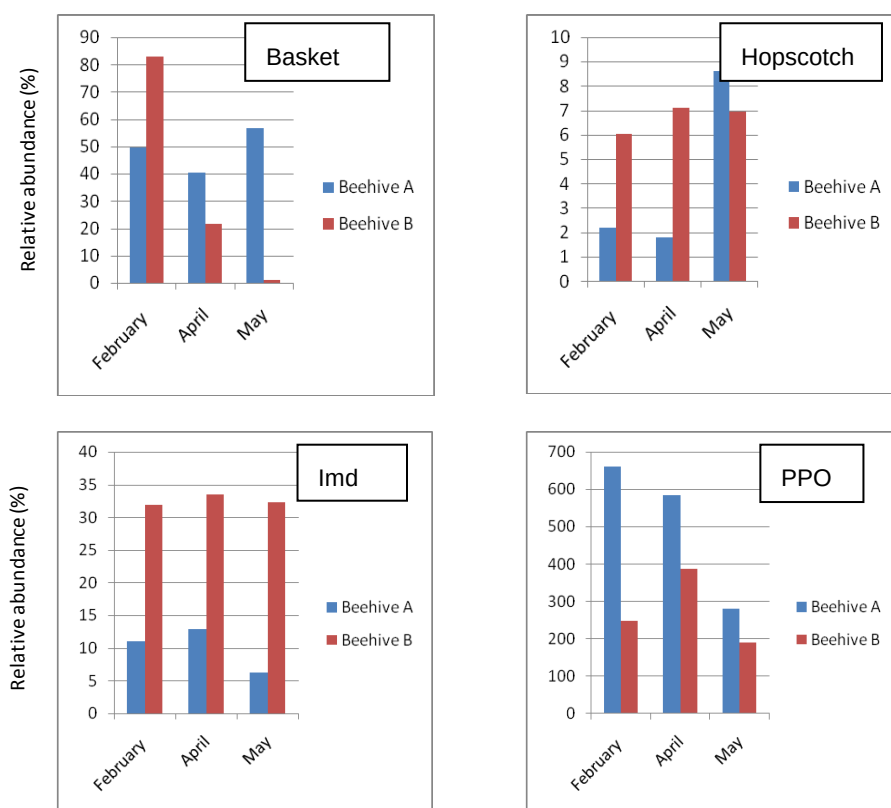
נתונים אלה שימשו לנו כבסיס להערכת ביטוי הגנים הללו בכוורות נבחרות.

בדיקת ביטוי הגנים בוצעה ב- 3 חזרות טכניות לבדיקה ו-3 חזרות ביולוגיות. ביטוי הגנים בקבוצת הדבורים מותפלים בוורואה, מודבקים בוירוס, הושווה לקבוצת ביקורת לא מותפלת על מנת לקבוע איזה גנים יתבטאו ביתר או בחסר או לא השתנו כלל.

### 2.3 מעכב אחרי פתוגנים בכוורת נגועה בוורואה ובדיקת ביטוי הגנים של מסלולי המערכת החיסונית.

עקבנו אחרי שתי כוורות בשלושה מועדים עוקבים על מנת לכייל את המערכת. במקביל בדקנו את נוכחותם של פתוגנים בכוורות אילו. כוורת A הינה מוטפלת בוורואה וללא טיפול וכוורת B לא מוטפלת ללא טיפול.

הנתונים מוצגים באיורים הבאים ובטבלה מס' 3:



איור 3 : רמת הביטוי של גנים ממסלולי המערכת החיסונית בכוורת מוטפלת בוורואה לעומת ביקורת מדגם, בשלוש עונות בשנה

ניתן לראות שבכוורת B אשר סבלה בפתוגניות גבוהה של הוירוסים המשתקים ABPV ו-CBPV הייתה ירידה בביטוי ושל bsk לעומת ירידה חלקית באפריל בכוורת A (יש לציין שבבדיקה זאת התגלה גם הוירוס ABPV באותה הכוורת). רמת Hpvc לעומתה כמעט לא השתנה בכוורת B למרות שעלתה באופן ניכר בכוורת A יחד עם הופעתם של DWV ו-VDV. לא הובחנו שינויים משמעותיים של-Imd בכוורת אילה. לבסוף, ביטוי של PPO ירד באופן משמעותי בכוורת A במקביל להופעתם של VDV ו-DWV ואותה ההתאמה נמצאה בכוורת B בחודשי פברואר ומאי בהן אותר DWV. BQCV נמצא בשתי הכוורות, כמו ברוב הכוורות בישראל בצורה אסימטרית.

| Beehive | Month    | IAPV2 | SBV | ABPV | CBPV | VDV | DWV |
|---------|----------|-------|-----|------|------|-----|-----|
| A       | February | +     |     |      |      |     |     |
| A       | April    | +     |     | +    |      |     | +   |
| A       | May      | +     |     |      |      | +   | +   |
| B       | February |       |     |      |      |     | +   |
| B       | April    | +     |     | +    | +    |     |     |
| B       | May      | +     | +   | +    | +    |     | +   |

טבלה III- אחוז נגיעות הכוורות בוירוסים המצוינים לעיל. BQCV נמצא בשתי הכוורות, וכמו כן ברוב הכוורות בישראל בצורה אסימטרית.

#### 2.4 הרחבת מעקב אחרי המערכת החיסונית בכוורות נגועות

בהמשך לעבודה עקבנו אחרי ביטוי הגנים הנ"ל במספר כוורות שנמצאו נגועות בפתוגנים ויראליים. חלקם הראו סימפטומי תמותה וחלקן לא. הסימפטומים מתוארים כדלהלן:

|                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| B2- כוורת טובה                                                                               |
| B3- גוססות מהפתחים                                                                           |
| N1 -איסוף דבורים מתות וגוססות במשטח לפני הכוורת.                                             |
| N2 - איסוף מתוך הכוורת – הדבורית נראית טוב.                                                  |
| O- גוססות מכוורת ספציפית בקבוצה.                                                             |
| D2-רועדות וגוססות בפתח.                                                                      |
| T2- מעט מתים בחוץ.                                                                           |
| F1 הכוורת ממנה נדגמו דבורים היא האחרונה ששרדה. הדבורים שנאספו היו במצב גסיסה לפני פתח הכוורת |
| C2- דבורים גוססות מהפתח                                                                      |
| D3- מתות טריות בפתח.                                                                         |

| Colony | Relative levels of expression |          |          |          | Virus detected |     |      |      |      |     |     |
|--------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------------|-----|------|------|------|-----|-----|
|        | BSK                           | HPSC     | IMD      | PPO      | IAPV           | SBV | ABPV | BQCV | CBPV | VDV | DWV |
| B2     | 22.93165                      | 1.667117 | 2.883809 | 179.9478 | 1              | 0   | 0    | 1    | 0    | 0   | 1   |
| B3     | 55.94661                      | 5.540299 | 10.88955 | 261.6351 | 1              | 0   | 0    | 0    | 1    | 0   | 0   |
| N1     | 114.9048                      |          |          | 54.68277 | 1              | 0   | 0    | 1    | 0    | 0   | 1   |
| N2     | 255.042                       |          |          | 225.8516 | 1              | 0   | 1    | 1    | 1    | 0   | 1   |
| O      | 145.2                         | 15       | 55       | 214.78   | 1              | 0   | 1    | 1    | 1    | 0   | 1   |
| D2     | 78.71655                      | 3.564593 | 11.28389 | 98.05301 | 0              | 0   | 1    | 1    | 1    | 0   | 1   |
| T2     | 132.1344                      | 6.680614 | 45.59275 | 214.2849 | 0              | 0   | 0    | 1    | 0    | 0   | 1   |
| F1     | 67.90651                      | 11.06725 | 49.13743 | 286.9722 | 0              | 0   | 0    | 1    | 0    | 0   | 0   |
| C2     | 74.46508                      | 16.8254  | 53.01587 | 92.12794 | 1              | 0   | 0    | 1    | 0    | 0   | 1   |
| D3     | 57.81671                      | 5.543478 | 8.913043 | 139.8161 | 1              | 0   | 1    | 1    | 1    | 0   | 1   |

טבלה IV- אחוז נגיעות הכוורות בוירוסים המצוינים לעיל וביטוי יחסי של גני המערכת החיסונית- שמות הכוורות וסימפטומים שנצפו בדבורים שנאספו מוצגות מעל הטבלה.

ניתן לראות שקשה מאוד, אם בכלל, היה למצוא התאמה בין ביטוי הגנים לבין נגיעות הכוורת. הדבר נבע ממספר סיבות: גיוון הוירוסים בכוורות, רקע גנטי שונה בין כוורות, ושינויים התפתחותיים המשפיעים על הגנים ששמשו מרקרים של המערכת החיסונית (הרחבה בדיון).

2.5 שנה שני ושלישית : 1) מכיוון שגם הובחנו הדבקויות ויראליות בכוורות בהעדר סימפטומים ועל מנת להבין יותר לעומק את פשר נוכחותם של וירוסים שונים בכוורת והקשר שלהם למופע של המערכת החיסונית פיתחנו מבחן כמותי לבחינת רמת



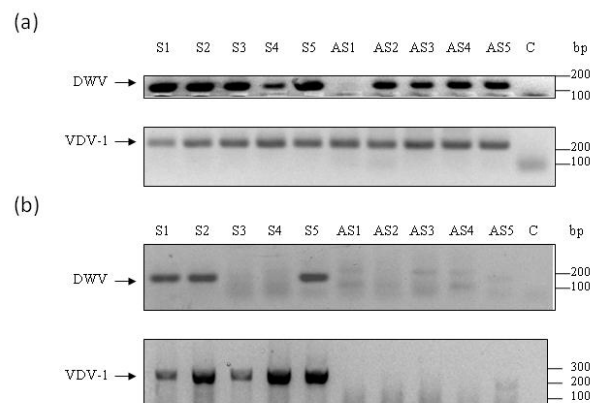
הווירוסים בכוורת. זה אפשר לנו לעקוב אחרי השפעת נוכחות הוורואה להדבקה בוירוסים DWV ו-VDV1 בכוורת מוטפלות בוורואה.

(2) על מנת לצמצם את מספר הגורמים המשפיעים על תפקודו של המערכת החיצונית ואת על ניטורה, התרכזנו בפיתוח מערכת מודל בתנאי כוורת מבוקרים.

## 2.6 אבחון פתוגנים

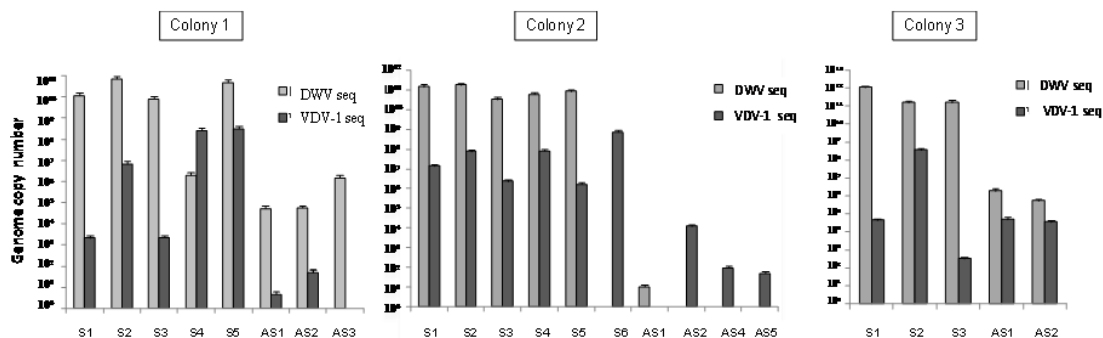
### 2.6.1 פיתוח מערכת להערכה כמותית של הווירוסים פתוגנים לדבורת הדבש: וירוסים הגורמים לעיוות כנפיים

לשם כך בחרנו תחילה בצמד ווירוסים המועברים על ידי אקרית הוורואה שנמצאו בכוורת בתדירות גבוהה: וירוס עיוות הכנפיים (DWV) ווירוס אקרית הוורואה (VDV-1). לאבחון ווירוסים הופק RNA מדבורים אינדיבידואליות. כל אחד מהווירוסים הועבר שיעתוק הפוך (reverse transcription, RT) עם תחלים ספציפיים לו ובהמשך נקבע נוכחותו על ידי הגברה כמותית בעזרת real-time PCR. התחלים שימשו ל-RT של DWV היו DWV RT reverse (5032) GCGGCCACCACTTGAAAAGA, GGCAAGTGCTTGGGTATCCA (7271) DWV RT forward (7212) VDV RT-reverse - GCAGAGGAGGCCAGTGCT (4997) VDV RT-forward- VDV-1 (7212) TTTAAATAGAAAGTCACGAATC, המספרים בסוגריים מציינים את מיקומם של התחלים בגנום הווירוס. הגברת PCR של DWV נעשתה בעזרת התחלים TGGCTAACCGTCGTAAGGCG (6141) DWVqPCRfor ו-VDVqPCRfor (6111) עם VDV-1 ו-TAACTGACGCACTAATTTCCG DWVqPCRrev (6326) VDVqPCRrev (6299) ACTAATCTCTGAGCCAACACGT ו-TGGCTAATCGACGTAAAGCA. לניסויים בחנו שלוש כוורות שונות מצריפין שהיו נגועות בוורואה ובדקנו באופן אינדיבידואלי דבורים שהראו סימפטומים (עיוות כנפיים) או אסימפטומטיות מאותן הכוורות. מצאנו שבנסויי RT-PCR איכותיים ניתן להבחין ברצפים מהווירוסים הללו בראשם של דבורים מגיחות סימפטומטיות וכמעט ולא בראשם של דבורים מגיחות אסימפטומטיות (תמונה I).



**תמונה 1.** זיהוי קיומם והכפלתם של רצפים של DWV ו-VDV-1 בראשם של דבורים מגיחות (S) ו-(AS), דבורים סימפטומטיות ואסימפטומטיות בהתאמה. PCR המזהה (+) סליל חיובי של הווירוסים ו-PCR (-) המזהה סליל שלילי המעיד על שכפולו של הווירוס.

ניסויים כמותיים הוכיחו שההבדל בין כמות הווירוסים הנ"ל בין דבורים סימפטומטיות לדבורים אסימפטומטיות הללו הינו של עד כארבעה סדרי גודל, כאשר דבורה סימפטומטית מכילה בראשה לא פחות מ- $10^7$  העתקים מאחד מהווירוסים הנ"ל (איור 4 וטבלה V).



**איור 4.** מטען רצפי הגנומים של DWV ו-VDV-1 הנמצא בראשיהם של דבורים מגיחים סימפטומטיות ואסימפטומטיות (S) ו-(AS), בהתאמה. מספר העתקים של הוירוסים נמדד בעזרת quantitative real-time PCR עם תחלים ספציפיים לכל וירוס. DWV seq ו-VDV seq מציינים רצפים של הוירוסים המתאימים.

|        |                        |                       |
|--------|------------------------|-----------------------|
| Sym1   | 1.12 x10 <sup>10</sup> | 2.15 x10 <sup>3</sup> |
| Sym2   | 6.91 x10 <sup>10</sup> | 6.73 x10 <sup>6</sup> |
| Sym3   | 7.83 x10 <sup>9</sup>  | 2.18 x10 <sup>3</sup> |
| Sym4   | 2.01 x10 <sup>6</sup>  | 2.49 x10 <sup>8</sup> |
| Sym5   | 4.81 x10 <sup>10</sup> | 3.10 x10 <sup>8</sup> |
| Sym6   | 1.56 x10 <sup>11</sup> | 1.39 x10 <sup>7</sup> |
| Sym7   | 1.79 x10 <sup>11</sup> | 7.56 x10 <sup>7</sup> |
| Sym8   | 3.56 x10 <sup>10</sup> | 2.34 x10 <sup>6</sup> |
| Sym9   | 6.10x10 <sup>10</sup>  | 8.21 x10 <sup>7</sup> |
| Sym10  | 8.53 x10 <sup>10</sup> | 1.69 x10 <sup>6</sup> |
| Sym11  | ND                     | 7.34 x10 <sup>8</sup> |
| Sym12  | 1.09 x10 <sup>12</sup> | 4.38 x10 <sup>4</sup> |
| Sym13  | 1.56 x10 <sup>11</sup> | 3.69 x10 <sup>8</sup> |
| Sym14  | 1.63 x10 <sup>11</sup> | 3.33 x10 <sup>2</sup> |
| Sym14  | 1.15 x10 <sup>11</sup> | 2.28 x10 <sup>8</sup> |
| Sym15  | 1.28 x10 <sup>7</sup>  | 2.40 x10 <sup>9</sup> |
| Sym16  | 8.93 x10 <sup>10</sup> | 2.60 x10 <sup>9</sup> |
| Sym17  | 1.03 x10 <sup>11</sup> | 3.22 x10 <sup>4</sup> |
| Sym18  | 1.78 x10 <sup>11</sup> | 8.30 x10 <sup>9</sup> |
| Sym19  | 1.94 x10 <sup>11</sup> | 3.10 x10 <sup>9</sup> |
| Asym1  | 5.15 x10 <sup>4</sup>  | ND                    |
| Asym2  | 5.50 x10 <sup>4</sup>  | 49                    |
| Asym3  | 1.47 x10 <sup>6</sup>  | ND                    |
| Asym5  | ND                     | ND                    |
| Asym4  | ND                     | 1.21 x10 <sup>4</sup> |
| Asym 5 | ND                     | 92                    |
| Asym6  | ND                     | 50                    |
| Asym7  | 2.05 x10 <sup>6</sup>  | 5.21 x10 <sup>4</sup> |
| Asym8  | 5.56 x10 <sup>5</sup>  | 3.56 x10 <sup>4</sup> |
| Asym9  | 1.41 x10 <sup>5</sup>  | 1.12 x10 <sup>4</sup> |
| Asym10 | 1.83 x10 <sup>5</sup>  | 1.36 x10 <sup>5</sup> |
| Asym11 | 2.28 x10 <sup>5</sup>  | 5.77 x10 <sup>3</sup> |
| Asym12 | 1.71 x10 <sup>5</sup>  | 1.79 x10 <sup>3</sup> |
| Asym13 | 3.26 x10 <sup>6</sup>  | 4.82 x10 <sup>4</sup> |

Student's t-test: DWV,  $P < 0.016$ , VDV-1,  $P = 0.051$ ,  $n = 32$ . ND: not detected.

**טבלה V.** הבדלים סטטיסטים בכמות הגנומים הנוכחיים בראשיהם של דבורים מגיחים סימפטומטיות ואסימפטומטיות (Sym) ו-(Asym).  $P$  הוערך ב-Student's t-test.

בנוסף הבחנו שבהרבה מקרים בראש הדבורה הסימפטומטית נוכח יותר מרצף של וירוס אחד. בהמשך גילינו שרצפי הוירוס ה-DWV שמצאנו בדבורים הנ"ל היו שייכים לוירוס ריקומביננטי שהגנום שלו היה מורכב באזור הקצה ה-5' מרצפי הוירוס VDV-1 ובאזור הקצה ה-3' מרצפי הוירוס DWV. רצפי ה-VDV-1 שנמצאו, מקודדים בעיקר לחלבונים המבניים של הוירוס ורצפי ה-DWV מקודדים לחלבונים הלא מבניים של הוירוס. ממצאים אילו גם מעלים את ההשערה שוירוס ריקומביננטי זה יכול להיות אחראי להופעת הסימפטומים של עיוות הכנפיים בכוורות שנבדקו ואולי גם במקומות אחרים בעולם ולא רק אצלנו. הממצאים שלנו פורסמו לאחרונה ב- (7) Virology.

## 2.6.2 פיתוח מערכת להערכה כמותית של הווירוסים פתוגנים לדבורת הדבש: וירוסים הגורמים לשיתוק כ- IAPV

### הקשור לתופעת סינדרום קריסת כוורות דבורים (CCD)

אבחון איכותי של נוכחותם של וירוסים בכוורת איננו מדד מדויק לבריאותה מכיוון שהווירוסים יכולים להיות נוכחים בה בצורה אסימפטומטית. לכן, בשנה זאת של המחקר ניגשנו לפתח מבחן PCR שיאפשר הערכה כמותית של הווירוס IAPV הקשור לתופעת קריסת כוורות דבורים.

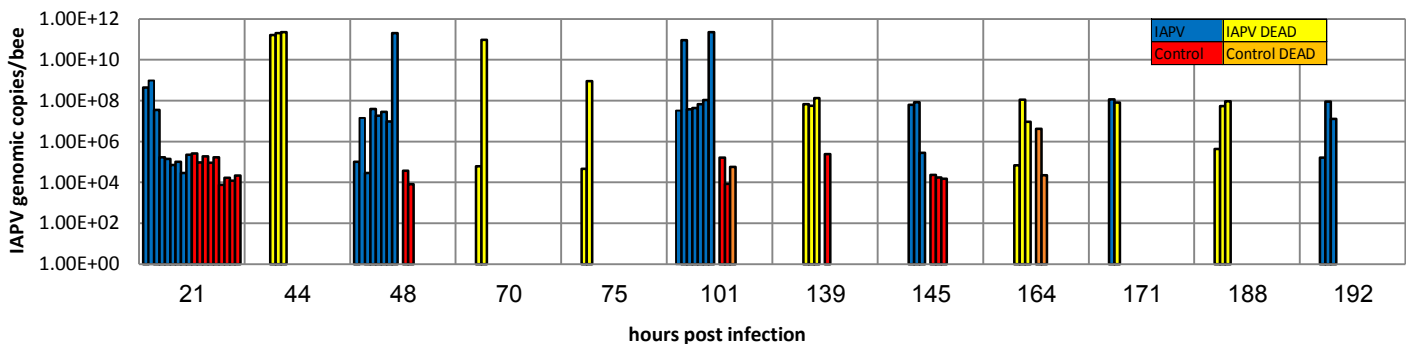
לאבחון הווירוס הופק RNA מדבורים אינדיווידואליות ובמידה והיה נוכח הווירוס בדבורה, הגנום שלו הועבר שיעתוק הפוך (reverse transcription, RT) עם תחלים ספציפיים לו ובהמשך נקבע נוכחותו על ידי הגברה כמותית בעזרת real-time PCR. RT נעשה בעזרת oligo-dT והתחלים ששימשו ל-PCR היו

5'-CCAGCCGTGAAACATGTTCTTACC IAPV ORF2f q7965- IAPV ORF2r q8191-1

5'-ACATAGTTGCACGCCAATACGAGAAC-3' המספרים מציינים את מיקומם של התחלים בגנום הווירוס.

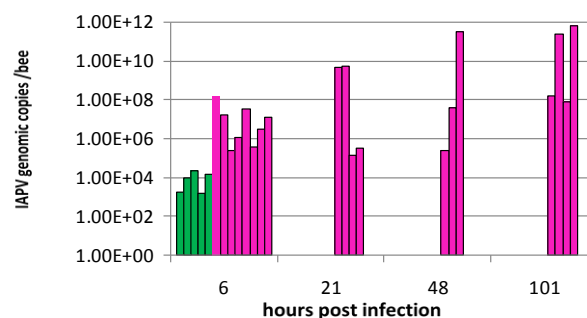
### הדבקת מיקרו-כווריות ב-IAPV

הניסויים בוצעו בהדבקת דבורים במיקרו-כווריות על ידי האכלתם בתמיסת סוכרוז שהכילה את וירוס ה-IAPV המנוקה כמתואר בדו"ח מספר 2 (20-24 דבורים לכוורית נחשפו לתמיסת סוכרוז שהכילה וירוס). באיור 5 ניתן לראות ניסוי טיפוסי כאשר במקביל נבדקו דבורים שלא הודבקו בוירוס (דבורים אילו הראו לפעמים רמה נמוכה של הווירוס, תופעה ידועה של נשיאת וירוסים בצורה אסימפטומטית על ידי הדבורים). הדבורים נבדקו באופן פרטני לביטוי הגנים הללו ולרמת ההכפלה של IAPV במבחן הכמותי המתואר מעלה.



איור 5- הדבקה אוראלית של דבורים מגיחים עם IAPV. מספר העתקי גנום IAPV במהלך ההדבקה

21 שעות לאחר ההדבקה נראה עליה משמעותית של כייל ה-IAPV בדבורים אינדיווידואליים שנחשפו לוירוס (עליה של כייל הווירוס של כ-4 log מגמה זאת המשיכה ב-44 שעות ולאחר מכן ואף הובחנו דבורים בכייל של וירוס של כ-10<sup>11</sup> העתקי גנום לדבורה. בנוסף מ-44 שעות והלאה נצפתה תמותת של דבורים מודבקים בכוורת (צהוב). ממצא הכפלת הווירוס כ-21 שעות לאחר ההדבקה רמז על כך שיתכן שהווירוס משתכפל מהר יותר בדבורה. דבר שאומת בניסוי המובא באיור 6, בו ניתן לראות עליה בכייל של הווירוס מעל ביקורת של עד כ-4 סדרי גודל.



איור 6- הדבקה אוראלית של דבורים מגיחים עם IAPV. מספר העתקי גנום IAPV במהלך ההדבקה- ורוד (מודבקים), ירוק (ביקורת).

## 2.7 בדיקת תפקוד סמני המערכת החיסונית בדבורים שנחשפו ל-IAPV : בחינת תפקודו במערכת מודל

בהתאם להמלצות של שופט הדו"ח הראשון התרכזנו בפיתוח מערכת המודל בתנאי כוורת מבוקרים ועל מנת לצמצם את מספר הפרמטרים שיכולים להשפיע על הקשר בין רמת ביטוי גנים מהמסלולים השונים של המערכת החיסונית. לשם כך הכנסנו את השינויים הבאים:

1. עבדנו במיקרו-כווריות שהכילו מ-20 עד 24 דבורים מכוורת נבחרת, שהובאו לכווריות בגיל 24 שעות לאחר הגחתם. הדבורים הללו נדבקו בוירוסים על ידי האכלת וירוס השיתוק החריף הישראלי IAPV.

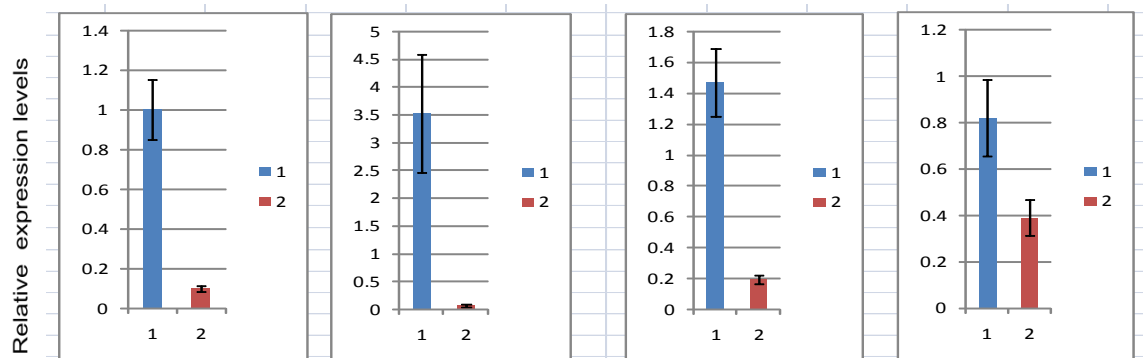
2. לבדיקת הגנים השונים שייצגו את המערכת החיסונית בחרנו בגנים שמקודדים לתוצרים הסופיים של המסלול ולא גנים רגולטורים בעלי רגישות לשינויים מינורים שנוסו בשנה הראשונה. כך, בדקנו את רמת הגנים המקודדים ל-Glucose oxidase (GOX), Defensin, Abaecin, Hymenoptaecin (antimicrobial peptides) - AMPs בעזרת תחלים סינטיטיים שהכנו בהתאם ל-Shen and Cox-Foster (8). ובעזרתם פיתחנו מבחן time RT- real PCR מתאים.

תחילה בדקנו את רמתם היחסית בדבורים שנחשפו ל-IAPV, בזמנים שונים לאחר ההדבקה בדגש על שעות מאוחרות לאחר ההדבקה כאשר אפשר היה להבחין בסימפטומים של שיתוק ותמותת דבורים. בדיקת ביטוי הגנים בוצעה ב-3 חזרות טכניות לבדיקה ו-3 חזרות ביולוגיות. ביטוי הגנים בקבוצת הדבורים מודבקות בוירוס, הושווה לקבוצת ביקורת לא מודבקות על מנת לקבוע איזה גנים יתבטאו ביתר או בחסר או לא השתנו כלל.

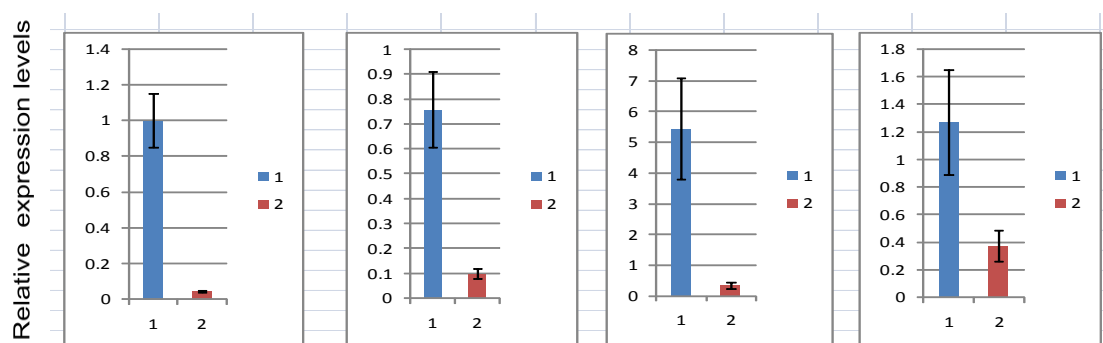
הדבורים נבדקו באופן פרטני לביטוי הגנים הללו ולרמת ההכפלה של IAPV.

רמת הביטוי של הגנים ל-Defensin, Abaecin, Hymenoptaecin AMPs, הראתה תנודתיות

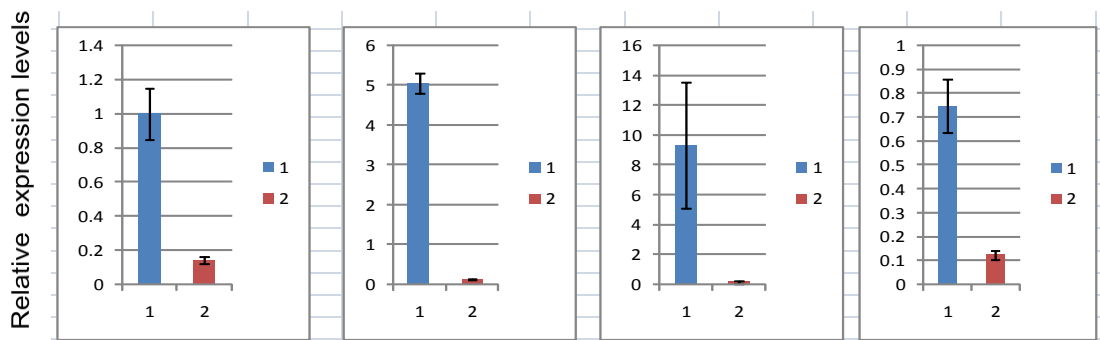
מסוימת אבל מגמה של ירידה בביטוי כתוצאה מההדבקה ב-IAPV (איורים 7-9). לעומתם GOX הראתה שינויים גדולים שהראו מגמות הפוכות (איור 10).



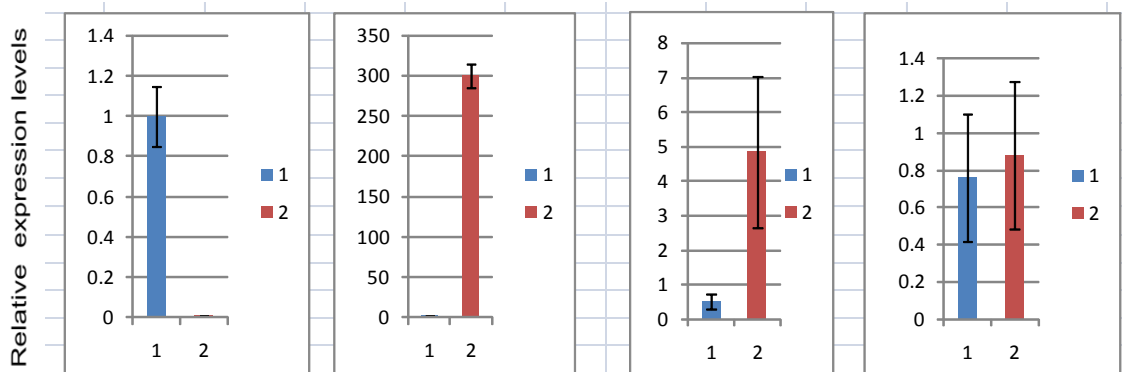
איור 7. ביטוי Abaecin בדבורים מודבקות ב-IAPV (2) ובקורת (1).



איור 8. ביטוי Defensin בדבורים מודבקות ב-IAPV (2) ובקורת (1).

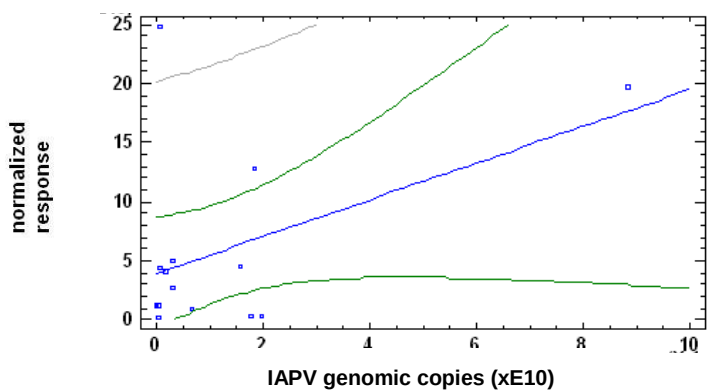


איור 9. ביטוי Hymenoptaecin בדבורים מודבקות ב-IAPV (2) ובקורת (1).

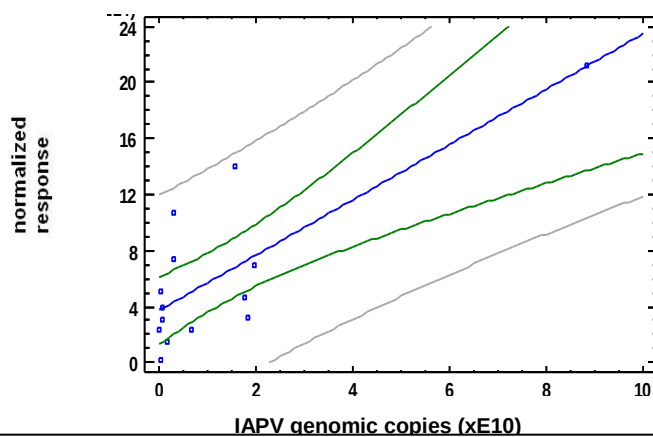


איור 10. ביטוי GOX בדבורים מודבקות ב-IAPV (2) ובקורת (1).

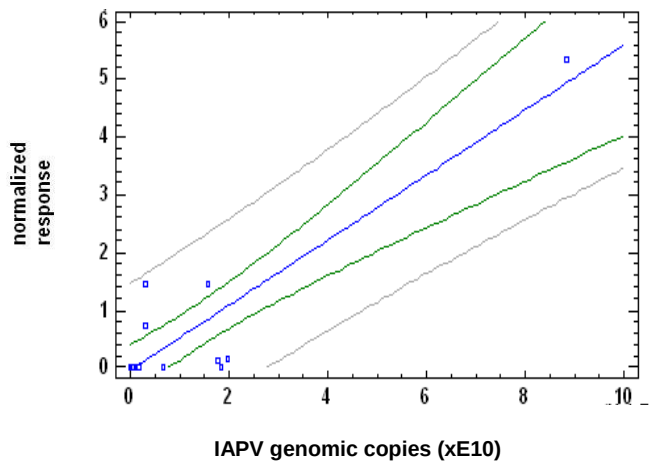
מאחר שראינו שקיימת עליה משמעותית בכמות הווירוס בדבורים המודבקים 6 שעות לאחר ההדבקה בדקנו את ביטוי הגנים הללו כפונקציה של ריכוז ה-IAPV בזמן הזה. התוצאות מובאות באיורים 11 עד 13.



איור 11. ביטוי Hymenoptaecin בדבורים מודבקות ב-IAPV כפונקציה של ריכוז הווירוס בדבורה.  $n=22$ , P-value 0.0940.



איור 12. ביטוי Abaecin בדבורים מודבקות ב-IAPV כפונקציה של ריכוז הווירוס בדבורה.  $n=22$ , P-value  $0.0000 < 0.05$ .



איור 13. ביטוי Defensin בדבורים מודבקות ב-IAPV כפונקציה של ריכוז הווירוס בדבורה  $n=22$ ,  $P\text{-value } 0.0007 < 0.05$

מכאן נראה שקיימת התאמה מובהקת בין עליה בכייל של הווירוס בדבורה לבין עליה בביטוי הגנים – Abaecin ו-Defensin.

### 3. דיון

בתחילת המחקר בדקנו כוורות במדגם ארצי לנוכחות פתוגנים על מנת לאפיין את הכוורות ואת תדירות הופעתם של פתוגנים שונים במהלך השנה. מצאנו תדירות גבוהה של וורואה, נוסימה והוירוסים הבולטים

( VDV-1 (Varroa destructor ו IAPV (Israeli acute paralysis virus), DWV (Deformed wing virus) )  
 (virus) CBPV (Chronic bee - ו Acute bee paralysis virus) ABPV. כמו כן נצפו התפרצויות ממוקדות של  
 (paralysis virus). נמצאה התאמה עונתית בין העלייה ב-IAPV לבין הנוסימה והתאמה חלקית בין IAPV לבין נוכחות  
 וורואה. לעומת זאת, תפוצתם של DWV ו VDV-1 מותאמת יותר לנוכחות הוורואה המשמש להם כווקטור.

אבחון איכותי של נוכחותם של וירוסים בכוורת איננו מדד מדויק לבריאותה מכיוון שרוב הוירוסים יכולים להיות  
 נוכחים בה בצורה אסימפטומטית. ובכל זאת המצאות בו זמנית של מספר וירוסים בכוורת מעידה על היחלשותה.

לאפיון כללי זה ניתן להוסיף את הנקודות הבאות בבדיקת דבורים בוגרות בכוורת:

- 1- במעבד אחר ה-IAPV השתמשנו בזוגות תחלים שונים וכאשר חלה התפרצות בהדבקה בווירוס זה שתי ריאקציות ה-RT-PCR בשתי זוגות התחלים הייתה חיובית.
- 2- הדבקה בוירוסים ABPV, CBPV ו-SBV הייתה נדירה יותר וכאשר מבחן ה-PCR איתר אותם זה היה סמך להדבקה פעילה המלווה במחלה.
- 3- נגיף ה-BQCV נוכח ברוב הכוורות בארץ כאשר בדבורים בוגרות לרוב ללא סימפטומים ומתקיים לכאורה מבלי לגרום למחלה בעלת אופי המסכן את הכוורת.
- 4- נגיפי DWV ו VDV-1 מופיעים בנפרד או ביחד. כאר ישנם ביחד, הסיכוי למחלת עיוות הכנפיים בכוורת גדל.

תפוצתם של DWV ו VDV-1 יותר מותאמת לנוכחות הוורואה המשמש להם כווקטור. ולכן פיתחנו מבחן כמותי של הוירוסים הנ"ל. הניסויים הללו הוכיחו שההבדל בין כמות הוירוסים הנ"ל בין דבורים סימפטומטיות לדבורים אסימפטומטיות הינו בערך של עד כארבעה סדרי גודל, כאשר דבורה סימפטומטית מכילה בראשה לא פחות מ- $10^7$  העתקים של הרצפים מאחד מ-DWV ו VDV-1. בנוסף, גילינו שרצפי הווירוס ה-DWV שמצאנו בדבורים הנ"ל היו שייכים לוירוס ריקומביננטי שהגנום שלו היה מורכב באזור הקצה ה-5' מרצפי הווירוס VDV-1 ובאזור הקצה ה-3'

מרצפי הווירוס DWV. ממצאים אילו גם מעלים את ההשערה שווירוס ריקומביננטי זה יכול להיות אחראי להופעת הסימפטומים של עיוות הכנפיים בכוורות ומעלים את ההיפותזה שהוא הינו זן אליים הגורם לעיוות הכנפיים, ויתכן שהיווצרותו נובעת מאינטראקציה בין הוורואה והדבורה, כי ידוע שגם DWV ו-VDV-1 נמצאו בכייל גבוהה בשני פונדקאים אלה (7).

כמו כן, על מנת להעריך באופן מדויק נזק שנגרם לכוורות על ידי וירוסים הגורמים לשיתוק כ-IAPV הקשור לתופעת סינדרום קריסת כוורות דבורים (CCD), פיתחנו מבחן כמותי לוורוס הזה. מבחן זה אפשר גם מעבד אחר ההדבקה במערכת של מיקרו-כוורות והשפעתו על המערכת החיסונית של הדבורה.

בנוגע למערכת החיסונית פיתחנו תחילה מבחן כמותי להערכתה שכללה את המסלולים JAK/STAT, imd ו-JNK ואת הגן המקודד ל-Prophenol oxidase activating enzyme (PPO). הערכה ראשונית של שינוי ברמת הביטוי הגנים הללו בשתי כוורות מודל הייתה מעודדת. אבל, הערכה מדגמית דומה של כוורות נגועות הראתה שפרמטרים שונים של הכוורות כגיל הדבורים שנאספו, מיקומם ותפקידם בכוורת, חשיפה ליותר מפתוגן אחד ורקע גנטי שונה הקשו על אפיון ברור של המצב. אי לכך, פיתחנו מערכת מיקרו לבדיקה מבוקרת של השפעת פתוגנים ויראליים על הדבורים בה יכולנו לעקוב על התפתחות המחלה של פרטים בעלי גיל התפתחותי אחיד יותר ובדבורים בעלי רקע גנטי יותר הומוגני מאשר בכוורת פתוחה. כמו כן, בעקבות התנודתיות הגבוהה של מדדי המערכת החיסונית בה עבדנו בשנה הראשונה, העדפנו להתרכז בבדיקת גנים המקודדים לאפקטורים שלה AMP, (antimicrobial peptides) וכן לגן הקשור למצב בריאותה של הכוורת ככלל כ-GOX. רמת הביטוי של הגנים ל-AMPs, Abaecin, Hymenoptaecin ו-Defensin הראתה מגמה של ירידה כתוצאה מהדבקה וחשיפה ממושכת ב-IAPV ו-GOX הראתה שינויים גדולים ומגמות הפוכות.

בדיקה מדוקדקת בתחילת ההדבקה (6 שעות) הראתה שיש התאמה מובהקת בעליה בביטוי הגנים Abaecin ו-Defensin עם עליה בכמות ה-IAPV. לעומתה Hymenoptaecin לא הראה עליה מובהקת ו-GOX הראה תנודתיות. מגוון האוכלוסיה בכוורת הכוללת דבורים בדרגות התפתחות שונות ותפקודים שונים משתקפת בפעילות המערכת החיסונית של האוכלוסיות הללו. כך, Evans וחבריו הראו שרמות הביטוי של Abaecin ו-Defensin משתנה במהלך ההתפתחות מזחל לגולם. זחלים בדרגה ראשונה הראו עליה בביטוי של 2.81 ו-2.61 של Abaecin, ו-Defensin בהתאמה, כתגובה לחשיפתם לחיידק *Paenibacillus larvae* (9) Guzman ו-Evans גם הראו שרמת הביטוי של שני הגנים הללו יורדת בחשיפתם של גלמים לכמות קטנה של אקריות וורואה (10).

עמילות בוגרות הראו רמת ביטוי גבוהה של Abaecin, Hymenoptaecin ו-Defensin בתגובה לחשיפתם ל-*E.coli* (11). עלייה ברמת הביטוי של Abaecin, הייתה בהתאמה לעליה בביטוי של Defensin ולא של

Hymenoptaecin (11) בדומה לתוצאות שקיבלנו בחשיפת דבורים מגיחות ל-IAPV. ממצאים אלה מרמזים על כך שיתכן שביטויים של שני הגנים הללו מווסתת על ידי אותו המסלול החיסוני. לעומת זאת, Azzani וחבריו לא מצאו התאמה בין רמת Abaecin ו-Defensin בתגובה להזרקת וירוס משתק כ-ABPV לדבורים מגיחות (12).

לאחרונה פורסם שקיים קשר בין ירידת הביטוי של הגן Dorsal בכוורות מוטפלות באקרית הוורואה לבין התרבות הווירוס DWV (13).

לסיכום, במחקר זה וזיהינו ובדקנו את נפיצותם של פתוגנים בכוורות בארץ בדגש על פתוגנים ויראליים. זיהויים ונפיצותם מאפשר הערכת כוורות בצורה מושכלת יותר ומהווה צעד ראשון לבניית מערכת לערכת הסיכון לכוורות בקבוצה בשל נוכחות וירוסים מדבקים.

הושקעה עבודה רבה לקביעת פרמטרים של המערכת החיסונית שניתן יהיה להשתמש עליהם בסמנים של בריאות הכוורת. כתוצאה מהמחקר נראה שסמנים המבוססים על גנים המקודדים לאפקטורים שלה (AMP, antimicrobial peptides) יותר מבטיחים לשימוש זה מאשר סמנים של גנים מווסתים. יש צורך להרחיב את מחקר למדידת תגובתם של סמנים אלה במצבי עקה נוספים כגון חשיפת הדבורים לוורואה ולוירוסים נוספים במערכת מבוקרת, וכן חשיפה השוואתית של אוכלוסיות דבורים בעלי רקע גנטי שונה לאותו וירוס ובדיקת תגובתם. מה ניסיון שנרכש במחקר זה יש צורך להקפיד על דרגת ההתפתחות של הדבורים הנדבקות (ומכך ההכרח להשתמש במערכת מבוקרת). התקדמות באפיון של תגובת המערכת החיסונית בתנאים אילו תאפשר לנצל בשלב הבא את הידע הזה ככלי לטיפול כוורות בריאות ועמידות מפני מחלות להקטנת פחת הדבורים בארץ.



-Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N. (2011). Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. Virology 417:106-12.

-Chejanovsky N. Significant virus changes in *Varroa destructor* -infested Honey bee colonies. MERC Symposium Dead Sea, Jordan. November 2011.

-Chejanovsky, N.; Zioni, N.; Soroker, V. Varroa destructor virus-1 and Deformed wing virus associations in honey bees with crippled wings. Apimondia September 2011, Argentina.

-Chejanovsky N (2011) Honey bee viruses, newcomers or permanent residents. ICPBR 2011 Symposium Honey bee health and worldwide colony losses. June 2011, Mexico.

- Chejanovsky N (2010). Paralytic Viruses of the Honey Bee. Uludag Bee Journal, 10: 126-134.

- Chejanovsky N.. Honey bee viruses: dormant and transmissible phantoms.COLOSS Workshop "Varroa and Viruses" Bern, Switzerland. November 2010

1. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briesse T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. (2007). *Science* 318:283-7.
2. Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiéry R, Faucon JP, Ribière M. (2008). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*. Jul 30. [Epub ahead of print]
3. Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, Bussetti AV, Conlan S, Evans J, Chen YP, vanEngelsdorp D, Efrat H, Pettis J, Cox-Foster D, Holmes EC, Briesse T, Lipkin WI. (2008). Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J Virol.*, 82:6209-17.
4. דבורים מתות בסתר: CCD (Colony collapse disorder). (2007). אפרת ח. וסלובצקי י.  
ילקוט המכורות 47, עמ' 22-24.
5. Hayes (2007). Colony collapse disorder- Research update. *American Bee Journal* 147: 1023-1025.
6. Kievits (2007) Bee gone: colony collapse disorder. *Pesticides News*, 3-5
- 7 - Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N. (2011). Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. *Virology* 417:106-12.
8. Shen M, Yang X Cox-Foster D, and Cui L (2005). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 342, 141-9.
- Evans, J.D., 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 85, 105-111.
10. Gregory, P.G., Evans, J.D., Rinderer, T., de Guzman, L., 2005. Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by Varroa mites. *J Insect Sci* 5, 7.
11. Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7470-7475.
12. Azzami, K., Ritter, W., Tautz, J., Beier, H., Infection of honey bees with acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. *Arch Virol* 157, 689-702.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>1. בחינת תפוצת הווירוסים הפתוגניים לדבורת הדבש בכוורות נגועות באקרית <i>Varroa destructor</i>.</p> <p>2. בנית פרופיל של המערכת החיסונית של כוורות מודל בנוכחות ובהעדר פתוגנים.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>עיקרי הניסויים והתוצאות.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <p>1- בחינה איכותית וכמותית של הווירוסים IAPV, DWV ו-VDV בדבורים סימפטומטיות ואסימפטומטיות מכוורות מותפלות בוורואה ובמיקרוכווריות. 2- פיתוח מודל להערכת המערכת החיסונית בדבורים מודבקים בוירוס IAPV ו- CBPV.</p> <p>3- בדיקת רמת הביטוי של הגנים המייצגים את המערכת החיסונית המקודדים ל- Abaecin, Hymenoptaecin, Defensin ול- (GOX) Glucose oxidase.</p> <p>נמצא: - תדירות גבוהה של הווירוסים IAPV, DWV ו-VDV, והתפרצויות של ABPV ו- CBPV. תפוצתם של DWV ו-VDV מותאמת יותר לנוכחות הוורואה והעלייה ב- IAPV התאימה עונתית לעליית הנוסיעה. - רק בראש דבורים מגיחות סימפטומטיות (מעוותות כנפיים) קיים וירוס ריקומביננטי והגנום שלו מורכב מאזור הקצה ה-5' של VDV-1 ובאזור הקצה ה-3' מרצפי DWV. - קיים הבדל של כארבעה סדרי גודל בכמות הווירוסים הנ"ל בין דבורים סימפטומטיות ואסימפטומטיות.</p> <p>- עמילות בוגרות הראו ביטוי גבוה של Abaecin ו- Defensin בתגובה מהירה (שש שעות) לריכוזים עולים של IAPV בגופם. Abaecin Hymenoptaecin ו- Defensin הראו מגמת ירידה בביטויים כתוצאה מהדבקה ממושכת בוירוס.</p> |
| <b>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <p>המטרות 1 ו-2 הושגו. הן מהוות הבסיס להמשך הבדיקה של כוורות נבחרות נגועות ולא נגועות בוירוסים ובוורואה. מטרה מספר 3 לא הושגה בשל הצורך להקדיש מאמץ ממושך ומרוכז למציאת הגנים שישקפו נאמנה את התפקוד של המערכת החיסונית.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <p>בדיקת המודל בכוורות בהן קווי דבורים נבחרים, ומציאת השפעה של סטרס חברתי על התגובה של המערכת החיסונית של דבורת הדבש (ראה שאלה קודמת).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <p>פרסום בעיתונות הבינלאומית Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N. (2011). Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. Virology 417:106-12.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <p>⏪ (ללא הגבלה) בספריות ובאינטרנט</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |