

144-0034-98

קוד מחקר:

נושא: הפקת נוגדנים לצורך אבחון מחלות ויראליות בגפן

מוסד: מינהל המחקר החקלאי

ד"ר רוני גפני

חוקר ראשי:

חוקרים שותפים:

1

תקופת מחקר:

1996-1998

מאמרים:

3

תקציר

הצגת הבעיה. מרבית הוירוסים הקשורים במחלות התקפלות העלים וקומפלקס הניקרונוז מופיעים בגפן בריכוז נמוך והנם בעלי אימונווגניות נמוכה. כמו כן יש קושי רב בניקוי מרבית הוירוסים הגורמים למחלות בגפן. עובדות אלו מקשות על הפקת נוגדנים באיכות טובה. מטרת המחקר ליצר בחיידקי *E. coli* את חלבון המעטפת של שלושה וירוסים. החיידקים ישמשו כמקור לכמות בלתי מוגבלת של חלבון לשם יצור נוגדנים. מחלך ושיטות עבודה. dsRNA שהופק מצמחים נגועים שמש לשיבוט הגנים ב- RT-PCR. ביטוי החלבונים נעשה בעזרת expression vector (pET3a). המערכת הדיאגנוסטית מבוססת על Immunoblotting. תוצאות עיקריות. חלבון התנועה נמצא כחלבון מתאים ביותר לזיהוי סרולוגי של GVA. נקבעו התנאים המתאימים לזיהוי הוירוס בגפן (כגון הרקמה המתאימה ומועד הדגימה). במקביל פותחה שיטה להפקת dsRNA מגפן. השיטה נמצאה מתאימה לאבחון נגיעות בנגיפים בגפן. מסקנות והמלצות. חלבון התנועה הוא החלבון המועדף כאנטיגן לזיהוי GVA בהשוואה לחלבון המעטפת המשמש כאנטיגן במערכות הדיאגנוסטיות המקובלות כיום. רצוי להשתמש באנליזה של dsRNA על מנת לזהות גפנים נגועות ולחסוך את הכנסתן למסלול בדיקות ארוך הנמשך למעלה מ- 3 שנים לבחירתן כמקור לחומר ריבוי.

הפקת נוגדנים לצורך אבחון מחלות ויראליות בגפן

דו"ח מסכם

Production of Antisera for Diagnosis of Viral Diseases of Grapevine

רון גפני ועדנה תנא המחלקה לוירולוגיה מנהל המחקר החקלאי מכון וולקני ת.ד. 6 בית דגן

50250

Ron Gafny and Edna Tanne, Department of Virology, Agricultural Research Organization. P.O.Box 6

Bet Dagan 50250. (e-mail vprg@netvision.net.il)

מבוא

הגפן הנו אחד מגדולי הפרי הנפוצים בעולם והחשובים ביותר מבחינה כלכלית. מחלות הנגרמות על ידי וירוסים גורמות לפגיעה ניכרת ברווחיות הגידול. המחלות הנפוצות העיקריות מתחלקות לשלוש קבוצות: א - grapevine fanleaf ומחלות נוספות הנגרמות על ידי וירוסים מקבוצת ה-nepo. ב- מחלות התקפלות העלים (grapevine leafroll complex) ג- קומפלקס הניקרונוט (rugose wood). מחלות משלושת הקבוצות נפוצות בכל אזורי גדול הגפן בעולם כולל ישראל^{1,2}.

גורמי המחלות מועברים על ידי חומר הריבוי הוגסטיבי. שימוש בחומר ריבוי הפטור מוירוסים הנו האמצעי היעיל ביותר ליצירת כרמים חופשיים ממחלות וירוסים. זיהוי אמין ומהיר של הוירוסים גורמי המחלות מהווה בסיס הכרחי ליצור חומר ריבוי בריא, לאינטרדוקציה של זנים חדשים מחו"ל ומטיפול מקומי, ולזיהוי של המחלות השונות בשדה. השיטה העיקרית המקובלת כיום לאבחון מחלות וירוס בגפן היא אינדקסינג ביולוגי - הרכבה על גבי צמחי בוחן גפניים. משך הזמן הנדרש לאבחון בשיטה זו מגיע עד 3 שנים^{1,2}. בשנים האחרונות הושקע מאמץ רב בפיתוח שיטות אבחון אלטרנטיביות^{3,4}. באופן כללי שיטות הדיאגנוסטיקה הסרולוגיות הן האמינות, המהירות והזולות ביותר לזיהוי וירוסים בצמחים ומהוות כיום את אמצעי האבחון העיקרי למחלות ויראליות בצמחים. מרבית הוירוסים הקשורים במחלות התקפלות העלים וקומפלקס הניקרונוט מופיעים בגפן בריכוז נמוך והנם בעלי אימונוגניות נמוכה. כמו כן יש קושי רב בניקוי מרבית הוירוסים הגורמים למחלות בגפן. עובדות אלו מקשות על הפקת נוגדנים באיכות טובה ובבניית מערכת דיאגנוסטית טובה.

מטרות המחקר לשבט ולבטא בחיידקי *E. coli* את חלבון המעטפת של שלושה וירוסים המעורבים במחלת ניקרון ובמחלת התקפלות העלים בגפן. החיידקים ישמשו כמקור לכמות בלתי מוגבלת של חלבון מעטפת לשם יצור נוגדנים. הוירוסים שנגדם ייוצרו נוגדנים הנם: grapevine

virus A (GVA), grapevine virus B (GVB), grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV 3).

פרוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

1. שיבוט וביטוי הגן לחלבון המעטפת של GVA ויצירת נוגדנים

dsRNA בודד מצמחי *Nicotiana benthamiana* נגועים ב-GVA. הגן המקודד לחלבון המעטפת שובט בטכניקת ה-RT-PCR. רצף הבסיסים של הגן נקבע כדי לוודא כי אכן התקבל הגן המבוקש. נמצאה הומוולוגיה של 89% לרצף של חלבון המעטפת של תבדיל ה-GVA אשר פורסם בעבר⁶ (תמונה 1).

הגן הועבר לפלסמיד pET3a לצורך ביטוי הגן ויצירת החלבון בחיידקי *E. coli*. תמונה 2 A מראה את יצור חלבון המעטפת בחיידקים. חלבוני החיידק הופרדו בעזרת PAGE וחלבון המעטפת בודד מהגיל. החלבון הוזרק לארנבות ולתרנגולות, 3 הזרקות במרווחים של 4 שבועות בין זריקה לזריקה.

לצורך בדיקה של הופעת נוגדנים כנגד GVA נאסף סרום מהארנבות וחלבון מביצי התרנגולות. הסרום והחלבון נבדקו ב-Western blot כנגד מיצוי מ-*N. benthamiana* נגוע ב-GVA (או בריא כביקורת). נימצא כי מהארנבות התקבל אנטיסרום אשר נתן תגובה ספציפית ברורה כנגד GVA. החומר מהתרנגולות נתן רקע גבוה ותגובה בלתי ספציפית.

לא ניתן היה לזהות את הוירוס בעזרת ELISA בשיטת ה-double sandwich עקב חוסר ההצלחה בקבלת נוגדנים מתרנגולות. בדקנו את האפשרות לזהות את הוירוס בצמחים מודבקים ע"י ספיחה ישירה של המיצוי הצמחי לפלטה (antigen capture ELISA). השיטה עבדה אך בהשוואה ל-Western blot הרגישות בבדיקות ה-ELISA הייתה נמוכה יותר והרקע גבוה יותר.

2. שיבוט וביטוי הגן לחלבון התנועה של GVA ויצירת נוגדנים

במקביל לעבודה עם חלבון המעטפת עסקנו בשיבוט וביטוי בחיידקים של הגן המקודד לחלבון התנועה של GVA וביצירת נוגדנים כנגד החלבון. הגישה ושיטות העבודה היו זהים לאלו שתוארו לגבי חלבון המעטפת. תמונה 1 B מראה את רצף חומצות האמינו של חלבון התנועה בהשוואה לרצף מהתבדיל IS 151 שפורסם בעבר⁶. תמונה 2 B מראה את יצור חלבון התנועה בחיידקים.

הנוגדנים שהתקבלו אפשרו זיהוי של חלבון התנועה בצמחי *N. benthamiana* נגועים ב-GVA. בעזרת Western blot (תמונה 3).

A Coat protein

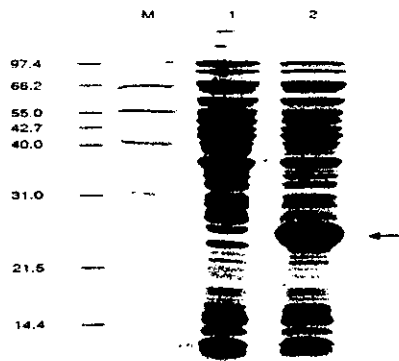
MAHYAKRVEIRAIIEELVLAKATPTEDASESGYDRNMYLNTLFGYIALVG
 -----Q--D-----
 TSKKAVHYGEVDIVGPKASKKTGIDPRGKMVSELVGRMRTLSVAVSEGP
 -----I-----
 VKGATLRQMCEPFAQNAYDFLVLMAEMGTYSQLATKMTRSGFKEPQVMFD
 -----V-----
 FASGLDLKALTQEATVIQAMHSRLFRTEGAKGVFNAQPSVGEQAVEI
 -----S-I-----

B Movement protein

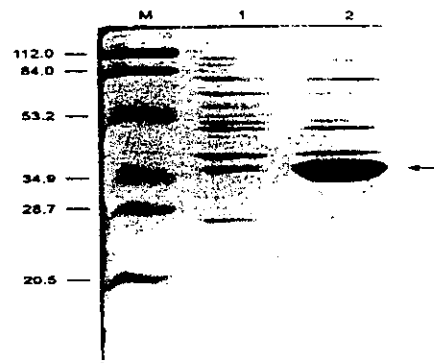
MSQEDSQATKGSPSDPKEIKIFNVTRNTKDLETLNKSLHRGDVYDTIELIE
 ----G-LG--A-SFE-QD--V-H-K-S-R-----N-----
 RVFPRRTKKCVVHKELVVQDGRVDCELDLMDGGLDDIDETEPYLYHVGC
 K-----I----I-K-----D--I--E-----N-E-F-----
 VVALMPHGKNLQGGKVVVEVIDTRLQGWVRAGSLG.AVMDMSKPLSACADF
 -----S---L---VD..G-SRISRTL-----
 PGYFISTSDLNGYTLHLSITTTDLQFVDGVHPFSVQLMNIGRLCGDDMK
 -----S---F--E---
 TRYAVGEASKILHQNILNSQGDGEMIPRGVQVQKVPDTLVMPEVYETIKR
 ----IT-T--M-----TE----L-----F----R
 LGLKTNGTLRQEGGDKGDRGTGAGESHAN
 F-----R---N-RV-V---PT-

תמונה מס' 1. מעקובת חומצות האמינו של חלבון המעטפת (A) וחלבון התנועה (B) של GVA
 תבדיד PA3 כפי שנקבע בעבודה זו (רצף עליון), בהשוואה לרצפי החלבונים של תבדיד IS 151,⁶
 רצף תחתון. קוים מסמנים ח. אמינו זהות.

A



B



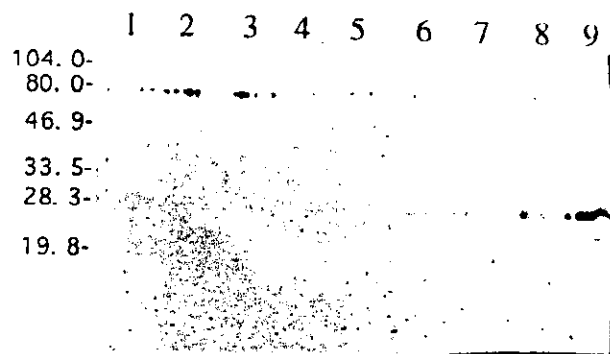
תמונה מס' 2. ביטוי חלבון המעטפת (A) וחלבון התנועה (B) של GVA ב-*E. coli* M-סמנים למשקל מולקולרי (kDa). 1 - מיצוי חלבונים מחיידקים המכילים את הפלסמיד pET3a - 2 - מיצוי חלבונים מחיידקים המכילים את הפלסמיד pET3a הנושא מחדר המקודד לחלבון המעטפת (A) או לחלבון התנועה (B).

3. מערכת דיאגנוסטית ל-GVA וזיהוי הוירוס בגפנים נגועות

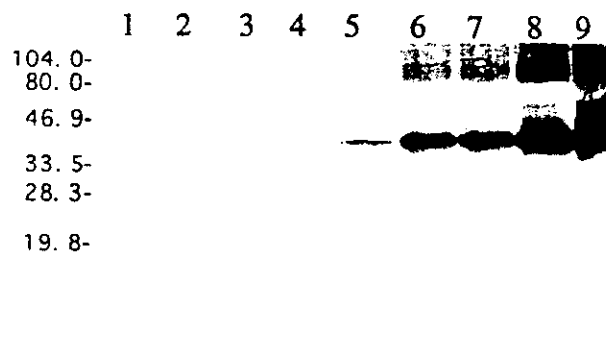
במטרה לבדוק האם הנוגדנים שהתקבלו מאפשרים לזהות GVA בגפנים נגועות נאספו דגימות מגפנים מבקעת חירדן המראות סמני ניקרון. מיצויים מגפנים אלו נבדקו בשיטת ה-Western blotting. הדגימות שיבדקו בעזרת נוגדנים כנגד חלבון המעטפת וחלבון התנועה. הוירוס באופן נתגלה באופן יעיל יותר בעזרת נוגדנים כנגד חלבון התנועה. התגובה חזקה יותר ובמספר מיקרים אף ניתן היה לזהות את חלבון התנועה בגפנים בהם לא נמצאה תגובה בעזרת אנטיסרום לחלבון המעטפת. תמונה מס' 4 מראה את זיהוי הוירוס בגפנים נגועות בעזרת שני הסרומים.

אנליזה של חלקים ורקמות שונים של גפן נגוע, בעזרת הסרום כנגד חלבון התנועה, הראתה כי קליפת הגזע הפנימית (phloem scrapings) או פטוטרות ועורקים מעלים מבוגרים מהווים את המקור הטוב ביותר לזיהוי הוירוס (תמונה 5).

A



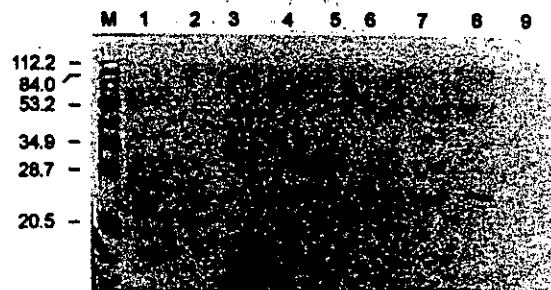
B



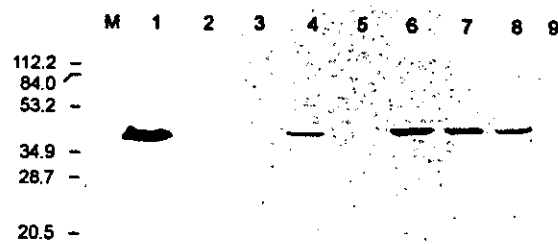
תמונה מס' 3. הצטברות חלבון המעטפת וחלבון התנועה בצמחי *Nicotiana benthamiana*

מודבקים ב-GVA. מיצוי חלבונים כללי עבר הפרדה בגיל SDS-PAGE ו-immunoblotting. בעזרת נוגדנים כנגד חלבון המעטפת (A) או כנגד חלבון התנועה (B). 1 - מיצוי מצמחים בריאים, 2 - מצוי 1/2 יום לאחר ההדבקה, 3 - מיצוי יום לאחר ההדבקה, 4 - יומיים, 5 - 3 ימים, 6 - 4 ימים, 7 - 5 ימים, 8 - 7 ימים, 9 - 11 ימים לאחר ההדבקה.

A



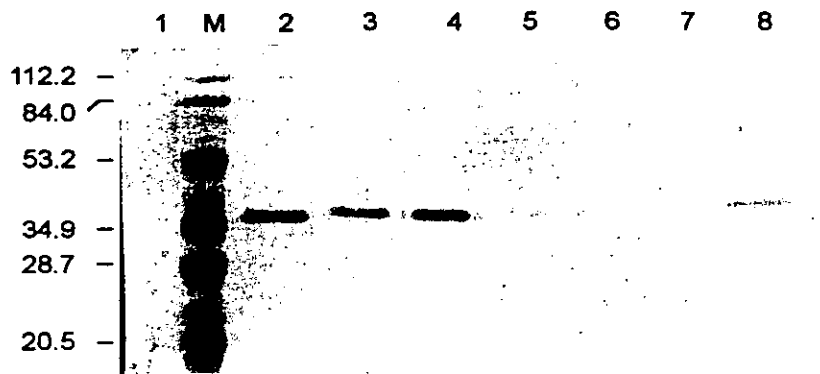
B



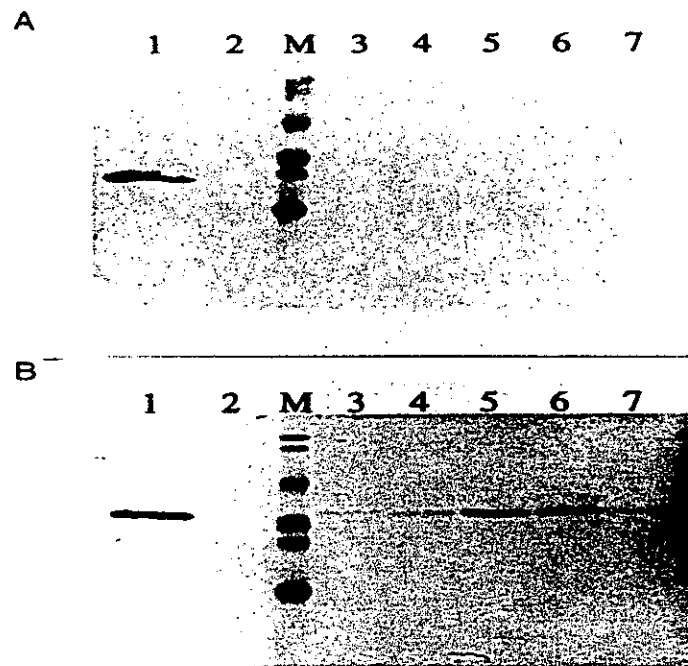
תמונה מס. 4. זיהוי GVA בגפנים (סופיריור) המראות סימנים של נקרין העצה. A - תגובה עם נוגדן כנגד חלבון המעטפת, B - תגובה עם נוגדן כנגד חלבון התנועה. ערוצים 1-8 - מיצוי חלבונים מצרורות ההובלה של גפנים המראות סימני מחלה, 9 - מיצוי חלבונים מגפן בריאה, M - סמנים למשקל מולקולרי (kDa).

4. אפיון הנוגדנים ומערכת לגלוי GVA

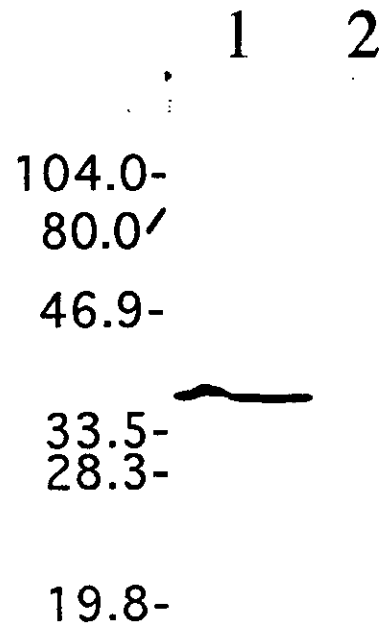
בבדיקות נוספות בהן השונו את הנוגדנים כנגד חלבון המעטפת לנוגדנים כנגד חלבון התנועה נמצא יתרון ברור לשימוש באחרונים. בתמונה 6 מתואר ניסיון לזיהוי GVA בגפנים נגועות שנאספו בשדה. מיצוי החלבונים הוגב ב-Western blot עם אנטיסרום כנגד חלבון המעטפת או חלבון התנועה. בכל 5 הגפנים נתן היה לזחות את הוירוס רק בעזרת הנוגדן כנגד חלבון המעטפת. דגימות מאותן גפנים נבדקו במקביל בעזרת קיט מסחרי לזיהוי GVA (תוצרת חברת Bioreba). קיט זה מבוסס על נוגדנים כנגד חלבון המעטפת של GVA (הוירוס השלם). בכל המקרים לא התגלה הוירוס בעזרת הקיט המסחרי.



תמונה מס' 5. זיהוי MP-GVA באיברים שונים בגפנים נגועות ע"י immunoblotting בעזרת אנטיסרום כנגד חלבון התנועה. 1 - פטוטרת של גפן בריאה. ערוצים 2-7 - דגימות מגפנים (סופירור) נגועות בנקרון עצה מבקעת הירדן. 2 - קילופי שיפה מגבעולים, 3 - פטוטרת, 4 - עורקים מגבעולים בוגרים, 5 - עלים צעירים, 6 - עוקצים מהאשכול, 7 - פירות מתפתחים, ערוץ 8 - פטוטרת גפן נגועה מחממת גידול, שימשו לביקורת חיובית, M - סמנים למשקלים מולקולריים.



תמונה מס' 6. זיהוי GVA בגפנים (סולטנינה) נגועות בניקרון משועם. אנליזה ב-immunoblot בעזרת נוגדן כנגד חלבון המעטפת (A) וכנגד חלבון התנועה (B). 1 - מיצוי חלבונים מצמחי *N. benthamiana* נגועים ב-GVA, משמש כביקורת חיובית, 2 - מיצוי חלבונים מצמחי *N. benthamiana* בריאים, משמש כביקורת שלילית, M - סמנים לגודל מולקולרי (kDa), ערוצים 3-7 - מיצוי חלבונים מצרורות הובלה של גפנים נגועות המראות סימפטומים של נקרון משועם.



תמונה מס' 7. ספציפיות של הנוגדן כנגד חלבון התנועה של GVA. ערוץ 1 - מיצוי מגפן

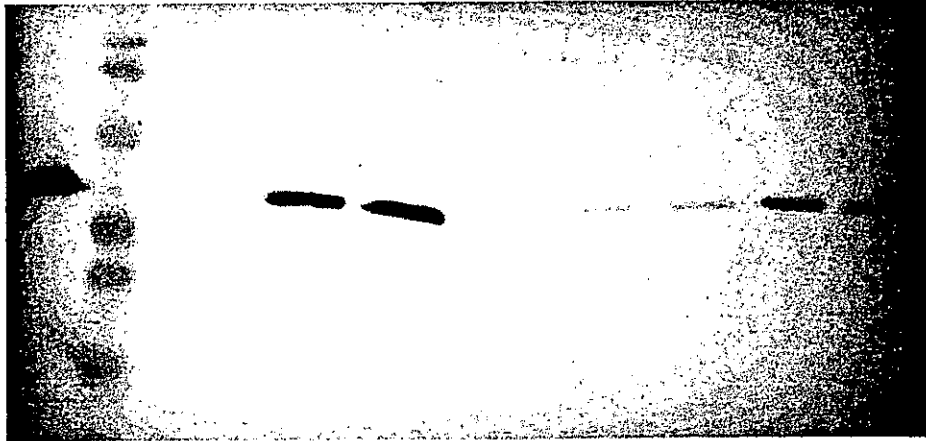
נגועה ב-GVA, ערוץ 2 - מיצוי מגפן נגועה ב-GVB. מיצוי חלבונים מגפנים נגועות. הורץ ב- SDS-PAGE, החלבונים הועברו לממברנת ניטרצולוז והוגבו עם נוגדן כנגד חלבון המעטפת של GVA. המספרים מצינים את מיקומם של סמנים למשקל מולקולרי (kDa).

לאחרונה פורסם כי נמצאה תגובה צולבת בין נוגדנים כנגד GVA ונוגדנים כנגד ו-GVB. תגובה זו נתגלתה בנוגדנים שנוצרו כנגד הוירוס השלם ונמצאה רק ב-Western blot ולא ב-ELISA. עקב כך בדקנו האם הנוגדן שהכנו כנגד חלבון התנועה של GVA מגיב עם GVB. לצורך כך נבדקה, ב-PCR נוכחותם של שני הוירוסים בגפנים משני זנים: ארגמן (זן ישראלי חדש) והזן Maressane. נמצא כי ארגמן מכיל GVA ו-Maressane מכיל GVB. ב-Western blot עם נוגדנים כנגד חלבון התנועה של GVA נמצאה תגובה רק כנגד מיצוי חלבונים מארגמן. לא התקבלה תגובה כנגד מיצוי מ-Maressane (תמונה 7). מכאן עולה יתרון נוסף לשימוש בחלבון התנועה לגלוי GVA: העדר תגובה צולבת (cross reaction) עם GVB.

5. חיפוש מקור לחומר ריבוי נקי

הזן סופיריור הנו זן ענבי המאכל החשוב בבקעת הירדן. כיום זן זה תופס כמחצית מהשטח הנטוע ומתוכנן להמשיך ולהגדיל את חלקו. עקב בעיית הניקרון החמורה כמעט ונפסקו הנטיעות של זן זה בבקעת הירדן. לאור התוצאות שתוארו לעיל, החלטנו לנסות ולזהות גפנים מהזן סופיריור הנקיות מ-GVA. הנוגדן כנגד חלבון התנועה שיוצר במסגרת תוכנית המחקר נתן בידנו

C M H 1 2 3 4 5 6 7



תמונה מס' 8. זיהוי GVA בגפנים מחלקת ריבוי מאושרת של סופיריור. מיצוי חלבונים ניבדק ב- immunoblotting עם נוגדן כנגד חלבון התנועה של GVA. C - ביקורת חיובית, N. benthamiana נגוע ב- GVA. M - סמנים למשקל מולקולרי. H - ביקורת שלילית, N. benthamiana בריא. 1-7 - מיצויים מגפנים (סופיריור) שנידגמו מחלקת חומר ריבוי מאושר.

כלי חשוב לביצוע בדיקות אלו. מאידך, הייתה זו הזדמנות לבדוק את יעילות מערכת האבחון. נבדקו גפנים (מזן סופיריור) משתי חלקות אשר אושרו כחלקות אם לחומר ריבוי. בכל בגפנים שנבדקו נמצא GVA, למרות שמרביתן היו חסרות סמני ניקרון (תמונה 8). בחלקה אחת נמצאו 3 גפנים סימפטומטיות ובשניה לא נמצאו גפנים כאלו.

במקביל לבדיקות אלו נערכו בדיקות של חומר הריבוי לזן סופיריור שנמצא בחוות יזרעם. ביזרעם נשמרים שתלי האם וחלקות הריבוי של זני וכנות הגפן, חומר זה אמור להיות פטור ונקי ממחלות ויראליות ולשמר, על פי תקנות הגנת הצומח, כמקור בלעדי לחומר ריבוי. בשנה זו הוכנו ביזרעם כ- 1,000 שתלי סופיריור שעמדו לפני נטיעה בחווה. בדקנו זגימות משתילים אלו ורובם נמצאו נגועים ב- GVA. (בחלק מהשתילים לא זוהה הנגיף, אך סביר להניח שזה בגלל גילם הצעיר של השתילים, פחות משנה). בעקבות ממצאים אלו הוחלט להשמיד את השתילים.

בדקנו מקור אפשרי אחר לחומר ריבוי נקי. מדובר במספר קטן של גפנים מהזן סופיריור אשר נטעו באזור לכיש ב- 1981. שתילים אלו הוכנו מחומר ריבוי שהובא לארץ בצורה בלתי חוקית, באותה תקופה. גפנים ותיקות אלו אינן מראות סמני ניקרון, מצבן הכללי טוב והן נותנות יבול גבוה ולכן הוחלט לבדוק אותן. בבדיקה שנעשתה על 8 גפנים בעזרת הנוגדן כנגד חלבון התנועה, לא נמצא GVA. הוחלט להמשיך בבדיקות לנוכחות וירוסים ומחלות אחרות כדי לאפשר שימוש בגפנים אלו כמקור לחומר ריבוי נקי. בבדיקה סרולוגית סטנדרטית למספר נגיפים נמצא grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV 3) ב- 7 מתוך 8 גפנים שנבדקו. בגפן בה לא נימצא נגיף זה נמצא dsRNA של נגיף אחר אשר לא זוהה ספציפית (תמונה 9 וראה בהמשך לגבי הפקת dsRNA).

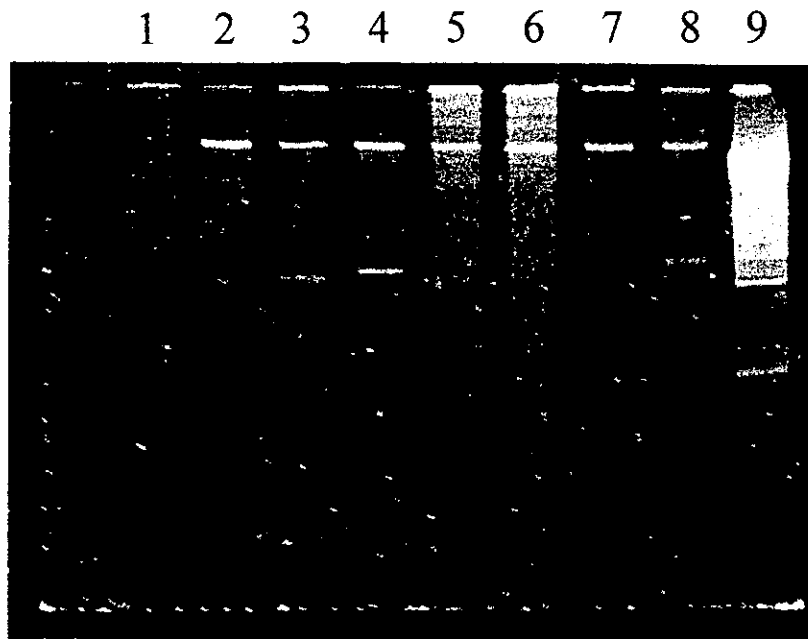
בדיקות אלו הוכיחו את יעילות הגישה החדשה שפותחה לזיהוי הנגיף. עם זאת ברור כי מערכת ה-Western blot אינה מתאימה לבדיקות בהיקף נרחב ויש צורך בהתאמת המערכת לבדיקה באמצעות ELISA או dot-blot.

6. פיתוח שיטה מהירה להפקת dsRNA מגפן

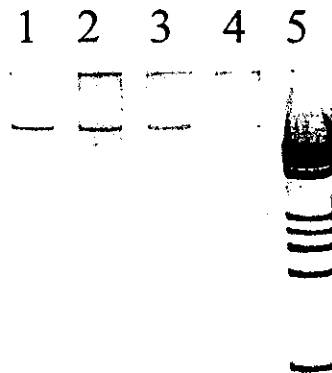
בין השיטות לגילוי נוכחות של וירוסים בצמחים ידועה שיטה המבוססת על זיהוי מולקולות RNA דו גדילי (dsRNA)^{7,8}. מולקולות אלו נוצרות בצמח הנגוע כחלק מתהליך ההתרבות של וירוסים רבים⁹. מולקולות ה-dsRNA יציבות ביותר וניתנות להפקה, בקלות יחסית, מצמחים נגועים. החיסרון העיקרי של השיטה הנו במורכבות היחסית ובכמות העבודה הנדרשת (יחסית לשיטות הסרולוגיות). עקב כך מספר הבדיקות המצומצם הניתן לבצוע בהשוואה לשיטות הסרולוגיות השגרתיות^{7,8}.

המעלה העיקרית בשיטה נובעת מהעובדה כי dsRNA ניתן לגילוי במהלך הדבקה על ידי מספר גדול מאוד של וירוסים השייכים למרבית הקבוצות המוכרות⁹. השיטה אינה דורשת כל אינפורמציה מוקדמת על הוירוס ולכן משמשת בעיקר בשלבים הראשונים של תהליך האבחון במיקרים בהם לא ידוע הוירוס הספציפי אותו מבקשים לגלות⁷. לצורך זיהוי גפנים נגועות בוירוס זהו יתרון חשוב ביותר עקב ריבוי הוירוסים השונים והידע המועט בנושא האתילוגיה של מחלות הגפן השונות. עובדות אלה הביאו לפני מספר שנים לביצוע מחקר שהדגים כי ניתן להשתמש באנליזה של dsRNA כשיטה לזיהוי גפנים נגועות במחלות התקפלות העלים¹⁰. במספר עבודות אחרות השתמשו באנליזה של dsRNA לצורך אפיון וירוסים חדשים בגפן¹¹⁻¹⁵. למרות זאת, השיטה לא זכתה לשימוש מעשי בתוכניות האבחון של חומר ריבוי בגפן עקב קשיים טכניים ספציפיים הקשורים בביצוע הבדיקה בגפן. התברר כי ריבוי חומרים פנוליים ופוליסכרידים גורם לבעיות במיצוי וניקוי מולקולות ה-dsRNA. במסגרת המחקר הכנסנו מספר שינויים חשובים המקצרים את תהליך ההפקה באופן ניכר וחשוב יותר מתגברים על הבעיות הספציפיות הקשורות בגפן. השינויים העיקריים בתהליך מיצוי וניקוי ה-dsRNA מהגפן הנם שימוש בגרנולות צלולוז בעלות כושר ספיחה גדול יותר, CC-41 במקום CF-11, והימנעות ממיצוי בפנול (מוניר מוואסי, רוני גפני ומשה בר-יוסף). תוצאות שלא פורסמו). היתרון החשוב לגבי הגפן נובע מכך שבתהליך החדש אין שימוש בפנול. בשלב הראשון של העבודה נעשתה אופטימיזציה של תהליך הפקת ה-dsRNA מגפן. בתמונה 9 מוצגות תוצאות בדיקת dsRNA מגפני סופיריור מאזור לכיש אשר נמצאו נקיות מ-GVA. ניתן לראות כי כל הגפנים מכילות dsRNA במשקל מולקולרי גבוה. גפנים 2-7 נמצאו נגועות ב- GLRaV 3. גפן 1 כנראה נגועה בנגיף אחר מקבוצת ה-closteroviruses.

מדגימות גפנים בבקעת הירדן נוקה dsRNA. נבדקו גפנים מהזן סופיריור, המראות סימני ניקרון, וגפנים מהזן פרלט מחלקה סמוכה אשר אינן מראות סימני ניקרון. נימצאו מולקולות dsRNA בגודל המתאים ל-GVA (גפנים משני הזנים (תמונה 10). בבדיקה סרולוגית שנערכה



תמונה מס' 9. DsRNA מגפנים (סופיריור) אשר נמצאו חופשיות מ- GVA. גפנים 2-8 נמצאו בבדיקה סרולוגית נגועות ב- GLRaV 3. ערוץ 9 - סמני משקל מולקולרי DNA λ חתוך ב- Hind III.

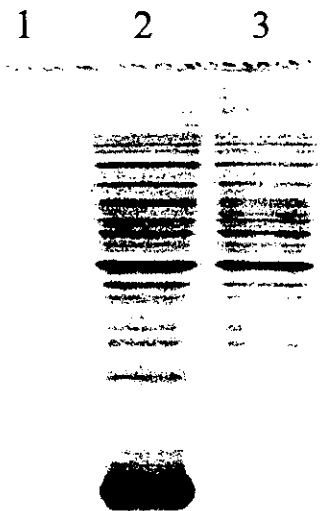


תמונה מס' 10. אנליזה של dsRNA מגפנים בבקעת הירדן. 1 ו- 2, סופיריור המראה סמני ניקרון, 3 ו- 4 פרלט שאינו מראה סמני ניקרון מחלקה סמוכה לחלקת הסופיריור, 5 - סמנים למשקל מולקולרי (DNA λ חתוך ב- BstE II).

בפרלט מאותו כרם נימצא GVA. ממצאים אלו מעלים את האפשרות כי יש התפשטות טבעית של הנגיף (מהסופיריור לפרלט). הזנים פרלט וסופיריור מהווים כל אחד כמחצית משטחי הכרם בבקעה. בעוד שהסופיריור נגוע ברובו בניקרון, אין דיווחים על סימני המחלה בפרלט. יתכן כי הפרלט אינו מראה סימנים למרות הנגיעות הסמויה. ממצאים ראשוניים אלו דורשים בחינה יסודית ומקיפה יותר.

4. שיבוט וביטוי גנים נוספים של GVA

שובטו שני גנים נוספים המקודדים בגנום של GVA. הגן המקודד ל- ORF 2 והגן המקודד ל- ORF 5. תפקידם של שני הגנים במחזור החיים של הנגיף אינו ידוע. החלבון המקודד על ידי - ORF2 אינו דומה לשום חלבון אחר במאגר הרצפים (GenBank). החלבון המקודד על ידי ORF 5 דומה למספר חלבונים קטנים קושרי RNA המופיעים ברובם בוירוסים מקבוצת ה- carlaviruses. שני החלבונים שובטו בפלסמיד pCR2.1 (Invitrogene) אחרי אמפליפיקציה ב- RT-PCR. ORF 5 בוטא ב- *E. coli*. (תמונה מס' 11) החלבון בודד מגיל SDS-PAGE והוזרק לשתי ארנבות. הנוגדן שהתקבל הגיב עם החלבון המיוצר על ידי *E. coli* אך לא הצלחנו לזהות את החלבון המצטבר בצמחים מודבקים.



תמונה מס' 11. ביטוי הגן המקודד ל- ORF 5 ב- *E. coli*. מיצוי חלבונים כללי הופרד ב- SDS-PAGE וניצבע ב- coomassie blue. 1 - סמנים לגודל מולקולרי (kDa), 2 - מיצוי חלבונים מחיידקים המכילים את הפלסמיד pET3a הנושא מחדר המקודד ל- ORF 5, 3 - מיצוי חלבונים מחיידקים המכילים את הפלסמיד pET3a.

ארבעת החלבונים (חלבון המעטפת, חלבון התנועה, והחלבונים המקודדים ע"י ORF 5 ו- ORF 2) במערכת ביטוי נוספת ב- *E. coli*. הביטוי נעשה כחלבון המאוחד לרצף של שישה שירי היסטידין. הוספת שירי ההיסטידין מאפשרת לבדוד את החלבון בעזרת קולונת Ni-NTA. החלבונים הנקיים ישמשו להכנת נוגדנים משופרים. תמונה 12 מתארת את ביטוי החלבונים בחיידקים ואת החלבונים לאחר ניקוי.

5. שיבוט הגן לחלבון המעטפת של GVB וקביעת רצף הבסיסים

נעשו מספר ניסיונות לשיבוט הגנים לחלבון המעטפת וחלבון התנועה של GVB. השיבוט נעשה ע"י שימוש בפרמרים אשר סונטזו על פי הרצף שפורסם⁶, בראקצית RT-PCR. בניסויים הראשונים השתמשנו ב-dsRNA אשר בודד מגפן נגועה ב-GVB. לא הצלחנו לשבט את הגנים המבוקשים. בהמשך השתמשנו ב-RNA אשר בודד מצמחי *N. benthamiana* נגועים ב-GVB. בניסיונות אלו הצלחנו לשבט את הגן לחלבון המעטפת של הוירוס. רצף הבסיסים של הגן נקבע. לא הצלחנו לשבט את הגן לחלבון התנועה של הוירוס.

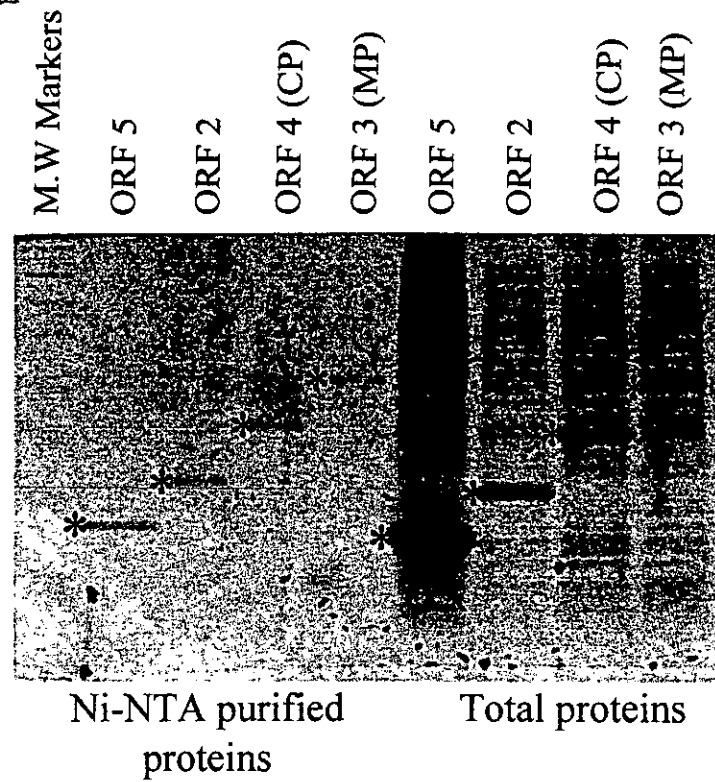
6. השפעת תנאי הגדול על התבטאות מחלת הניקרון ועל הצטברות חלבונים של GVA

אחת התופעות שנצפו במהלך המחקר הנה החומרה יוצאת הדופן של סמני מחלת הניקרון וההופעה המוקדמת של סמני המחלה בבקעת הירדן. השנה נצפה כרם סופיריור שהראה סמני ניקרון חריפים, במרבית הצמחים כבר שנתיים לאחר הנטיעה. לעומת זאת כרם האם ממנו נלקח חומר הריבוי ממוקם באזור השפלה, הנו בן למעלה מ-10 שנים ממנו ואין בו סימני מחלה (כאמור לעיל בכל הגפנים שנדגמו בכרם האם נתגלה GVA). עקב כך, ברצוננו לבחון את השפעת התנאים הסביבתיים על התפתחות המחלה על "התנהגות" הוירוס:

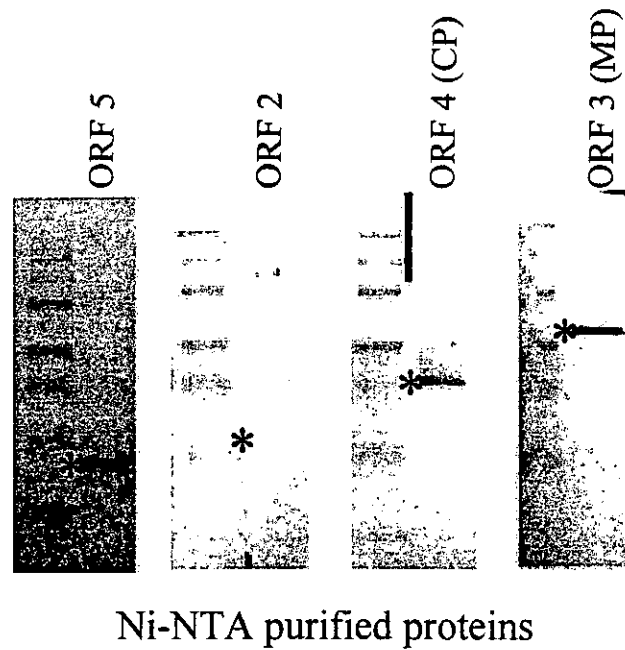
1 - במהלך השנה השניה לתוכנית הוכנו שתילי גפן מחומר נגוע שנאסף בבקעת הירדן. כ-10 שתילים נשתלו בכרם מסחרי בבקעה. כ-10 שתילים נוספים נשתלו במנהל המחקר החקלאי בבית דגן. עד כה לא הופיעו סימני מחלה בשתי קבוצות השתילים. בשנים הקרובות יערך מעקב אחר הופעת סימני ניקרון בשני האתרים, ותיבדק נוכחות GVA בשתי קבוצות השתילים.

2 -נבדקה השפעת הטמפרטורה על הצטברות הוירוס, על ידי זיהוי חלבון התנועה וחלבון המעטפת. שתילי סופיריור בני שנה, נגועים ב-GVA, נשמרו למשך 3 חודשים ב 3 טמפרטורות שונות. טמפ' נמוכה - 20/12 בינונית - 26/18 גבוהה - 29/21 (טמפרטורת לילה/יום במעלות צלסיוס). לאחר שישה ו-12 שבועות בטמפרטורות הנ"ל נלקחו דוגמאות מהצמחים ורמת שני החלבונים בדגימות השונות נבדקו, חלבון המעטפת לא נימצא באף אחת מהבדיקות. חלבון התנועה ירד ברמתו לאורך כל תקופת הניסוי. בטמפרטורה הנמוכה לא ניתן היה לזהות את החלבון לאחר 3 חודשי גידול. בטמפרטורות הבינונית והגבוהה ירדה רמת החלבון אך הירידה הייתה קטנה יותר בטמפרטורה הגבוהה. תוצאות אלו מראות כי ישנה התאמה מסוימת של GVA לתנאי טמפרטורה גבוהה. תוצאות אלו אינן חד-משמעיות מכיוון שבכל משטרי הטמפרטורה חלה ירידה ברמת החלבון בהשוואה למועד תחילת הניסוי (לפני תחילת הניסוי הוחזקו הצמחים, מאז מועד השרשתם, כשלושה חודשים בבית רשת בחוות יזרעם).

Coomassie staining:



Immuno-blot:



Ni-NTA purified proteins

תמונה מס' 12. ביטוי הגנים המקודדים ל- ORF 2-5 ב- *E. coli*. מיצוי חלבונים כללי הופרד ב- SDS-PAGE וניצבע ב- coomassie blue (למעלה מימין). החלבונים בודדו בעזרת קולונות Ni-NTA (למעלה משמאל) והוגבו עם הנוגדנים ההומולוגיים (למטה).

7. שיבוט הגן לחלבון המעטפת של GLRaV3

במהלך השנה נבדקו מספר גפנים שהראו סמני מחלה (התקפלות עלים) בעזרת נוגדן מסחרי ל-GLRaV 3. זהו מספר גפנים נגועות ומגפנים אלו מוצא dsRNA. באנליזה על גיל נמצאו מולקולות dsRNA בגודל של כ-20 Kbps. לפני כמספר חודשים פורסם רצף הבסיסים של הגן לחלבון המעטפת של הוירוס (תבד"ד NY מארה"ב). ניסנו לשבט את הגן לחלבון המעטפת מהתבד"ד הישראלי אך בראקציות RT-PCR לא התקבלו תוצרי הגברה. ניסיונות נוספים יעשו תוך שינוי תנאי הראקציה ובדיקת פרימרים נוספים. עם זאת שובטו מגפנים נגועות מספר מולקולות cDNA המייצגות את הקצה ה-3' של GLRaV 3. קביעת הרצף של הקלונים אמתה את השתייכותם לנגיף זה. קלונים אלו יאפשרו התקדמות בשיבוט לכיוון הגן לחלבון המעטפת.

מסקנות

אנליזה בעזרת immunoblot הראתה כי גילוי סרולוגי של חלבון התנועה יכול לשמש כאמצעי יעיל לזיהוי GVA בגפנים נגועות. הנוגדנים כנגד חלבון זה מסוגלים לזהות את הנגיף ברגישות גבוהה יותר מאשר נוגדנים כנגד חלבון המעטפת או kit ELISA מסחרי המבוסס על נוגדנים כנגד הנגיף.

למיטב ידיעתנו, זהו הדיווח הראשון על כך שחלבון לא מבני מהווה מטרה מעודפת לזיהוי סרולוגי של וירוסים בצמחים. חלבון מעטפת של הנגיף נמצא בצמח נגוע, בכמות של מספר אלפי מולקולות לגנום, ואילו חלבונים לא מבניים, בד"כ נמצאים בכמויות קטנות יותר. יתכנו מספר סיבות לעובדה כי חלבון התנועה ניתן לגילוי יעיל יותר מאשר של חלבון המעטפת: יתכן שחלבון התנועה יציב יותר ומצטבר בתאים נגועים בזמן שריכוז של הנגיף בצמח. לחלופין יתכן כי חלבון התנועה אמונוגני יותר וגורם להוצרות נוגדנים טובים יותר בחיות מחוסנות.

לאחרונה דווח על קירבה סרולוגית מוגבלת בין GVA ל-GVB. נמצאה תגובה צולבת בין נוגדנים של שני הנגיפים ב-western-blot. עם זאת לא נמצאה תגובה כזו ב-immunosorbent electron microscopy או באמצעות ELISA. בעבודה הנוכחית מצאנו כי הנוגדן לחלבון התנועה של GVA אינו מגיב עם GVB. עובדה זו מהווה יתרון נוסף לשימוש בחלבון התנועה כאנטיגן לזיהוי GVA.

הנוגדנים כנגד חלבון המעטפת נמסרו לחברת Bioreba בשוויצריה. בבדיקה ראשונית שנעשתה בחברה הם נמצאו יעילים באופן דומה לנוגדן הנמכר על ידי החברה. נתבקשנו לשלוח כמות גדולה יותר של נוגדן וחומר זה נמצא כעת בבדיקה במעבדות החברה. הנוגדן נמסר גם לחברת בקטוכס בנס ציונה המשתמשת כיום בנוגדן זה לצורך בדיקות סרולוגיות של GVA בגפן. פותחה שיטה מהירה להפקת dsRNA מגפן. השיטה מאפשרת זיהוי גפנים נגועות במרבית הנגיפים המנגעים גפן.

פרסומים מדעיים

Gafny, R., Robinson, E., Galiakparov, N. and Tanne, E. and (1997) Serological detection of grapevine virus A using antiserum to a non-structural protein, the putative movement protein. Xth International Congress of Virology, Jerusalem, Israel, 11-16 August, 1996.

Rubinson, E., Galiakparov, N., Radian, S., Sela, I., Tanne, E. and Gafny, R. (1997) Serological detection of grapevine virus A using antiserum to nonstructural protein, the putative movement protein. *Phytopathology* 87:1041-1045.

Rubinson, E., Galiakparov, N., Radian, S., Sela, I., Tanne, E. and Gafny, R. (1997) Detection of Grapevine Virus A Using Antiserum to the Putative Movement Protein. Extended abstracts 12th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Lisbon, Portugal, 29 September-2 October 1997 pg.93-94.

רשימת ספרות

1. Martelli, G.P. (1993) Rugose wood complex. In: Martelli, G.P. (Ed.) *Graft-Transmissible Diseases of Grapevines*. FAO, Rome. pp. 45-53.
2. Martelli, G.P. (1993) Leafroll. In: Martelli, G.P. (Ed.) *Graft-Transmissible Diseases of Grapevines*. FAO, Rome. pp. 37-44.
3. Minafra, A. and Hadidi, A. (1994) Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods* 47:175-188.
4. Saldarelli, P., Minafra, A., Martelli, G.P. and Walter, B. (1994) Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus III by molecular hybridization. *Plant Pathology* 43:91-96.
5. Van Regenmortel, M.H.V. and Dubs, M.-C. (1994) Serological procedures. In: Matthews, R.E.F. (Ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton. pp.159-214.

6. Minafra, A., Saldarelli, P., Grieco, F. and Martelli, G.P. (1994) Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. *Archives of Virology*, 13:249-261.
7. Dodds, J. (1993): dsRNA in diagnosis. In: *Diagnosis of plant virus diseases*, edited by R.E.F. Matthews, pp. 273-294. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA
8. Valverde, R.A., Nemeth, M., and Jordan, R.L. (1990): Analysis of double-stranded RNA for virus diagnosis. *Plant Disease*, 74:255-258.
9. Matthews, R.E.F. (1991): *Plant Virology*. Academic Press, San Diego.
10. Habili, N., Krake, L.R., arlass, M., and Rezaian, M.A. (1992) Evaluation of biological indexing and dsRNA analysis in grapevine virus elimination. *Ann. Appl. Biol*, 121(2):277-283.
11. Rezaian, M.A., Krake, L.R., Cunying, Q., and Hazzalin, C.A. (1991): Detection of virus-associated dsRNA from leafroll infected grapevines. *J. Virol. Methods*, 31:325-334.
12. Namba, S., Boscia, D., Azzam, O., Maixner, M., Hu, J.S., Golino, D.A., and Gonsalves, D. (1991): Purification and properties of closterovirus-like particles associated with grapevine corky bark disease. *Phytopathology*, 81:964-970.
13. Habili, N., Fazeli, C.F., Ewart, A., Hamilton, R., Cirami, R., Saldarelli, P., Minafra, A., and Rezaian, M.A. (1995): Natural spread and molecular analysis of grapevine leafroll - associated virus 3 in Australia. *Phytopathology*, 85:1418-1422.
14. Choueiri, E., Boscia, D., Digiario, M., Castellano, M.A., and Martelli, G.P. (1996): Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis*, 35:91-93.
15. Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M.A., Gonsalves, D., and Martelli, G.P. (1993): Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Arch. virol.* 130:109-120.

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה. לשבט ולבטא בחיידקים את חלבון המעטפת של שלושה וירוסים המעורבים במחלת ניקרון ובמחלת התקפלות העלים בגפן. החיידקים ישמשו כמקור לכמות בלתי מוגבלת של חלבון מעטפת לשם יצור נוגדנים. הוירוסים שנגדם ייוצרו נוגדנים הנם: GVA, GVB, ו-GLRaV3.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. הוכנו נוגדנים כנגד חלבון המעטפת וחלבון התנועה של GVA. נבחנו יעילות הזיהוי של הוירוס ושיטות שונות לזיהוי הוירוס בעזרת הנוגדנים. נבחנו השפעת טמפרטורת הגידול על גילוי הוירוס. נעשו ניסיונות לשיבוט וביטוי
חלבוני המעטפת של שני הוירוסים הנוספים. פותחה שיטה מהירה ויעילה לזיהוי dsRNA בגפן. שובטו ובטאו בחיידקים 4 מתוך 5 הגנים הקיימים ב-GVA והוכנו נוגדנים כנגד ארבעת החלבונים.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. חלבון התנועה של GVA מהווה מטרה טובה יותר, מאשר חלבון המעטפת, לגילוי סרולוגי של הוירוס. רצוי להתמקד בחלבון המקביל של GVB כאנטיגן. הפקה וזיהוי של dsRNA יכולה לשמש שיטה מתאימה לזיהוי נגיעות של גפן במספר רב של נגיפים
4. הבעיות שנתרו לפתרון /או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים), התייחסות המשך המחקר לגביהן. לא הצלחנו בשיבוט חלבון התנועה של GVB וחלבון המעטפת של GLRaV3. תבחנו דרכים נוספות לשיבוט (כגון בניה וסריקה של ספריה, בחינת פרימרים שונים). הנוגדן כנגד חלבון שמופק מגל דנטורטיבי אינו יעיל ב-ELISA. תבחנו אפשרות לקבל נוגדן מתאים ע"י בוסט של חלבון נטיבי. לא הצלחנו לזהות את החלבונים המקודדים ע"י ORF 2 ו-ORF 5 בצמחים מודבקים. יעשו ניסיונות לקבל נוגדנים טובים יותר.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביליוגרפיה, פטנטים - יש לצין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך. הנוגדן כנגד חלבון התנועה נמסר לחברה מסחרית שוויצרית ונימצא בבדיקה. פורסם מאמר: Robinson et al.
Phytopathology 87:1041-104. (1997) al., העבודה הוצגה ב 3 כנסים בין לאומיים ובאופן ראשוני ביום עיון לסיכום עונות 1996 ו-1998 למגדלי הגפן. חברה ישראלית משתמשת בנוגדן שפותח לדיאגנוסטיקה רוטינית של GVA בגפן.