

## ניקוי גפנים מוירוסים על ידי הקפאה וגידול מחדש של אמירי צמיחה ופיתוח שיטות יעילות לאבחון נגיעות בוירוסים

מגיש: מוניר מוואסי

המחלקה לוירולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן

**ניקוי מוירוסים:** בתוכנית המחקר בחרנו לנקות מוירוסים את הזן מאכל 125. זן זה נבדק ונמצא כי הוא נגוע בלפחות ב-GVA (וירוס הקשור למחלת הניקרונות). שתילים נגועות עברו חיטוי חיצוני בפני חיידקים ופטריית וגודלו בתרבית תחת תנאים סטריליים ומבוקרים. אמירי צמיחה עברו תהליך של הקפאה וצימוח מחדש ע"י שיטה אשר פותחה במעבדתנו במיוחד לשימוש בגפן. השתילים שהתקבלו נבדקו לנוכחות הנגיף ע"י אנליזות dsRNA, Western blot, ו-RT-PCR, תוך כדי השימוש ב-RNA כליי אשר הופק מהרקמה הצמחית. הבדיקות בוצענה מס' פעמים בשלבי צמיחה בתרבית. שתילונים אשר עברו ניקוי בשיטת ההקפאה נבדקו כחופשיים מנגיף ה-GVA. שתילונים אלה הם כעת בשלבי הקשחה לצורך קבלת צמחים בוגרים.

**אבחון וירוסים:** בתוכנית העבודה הצענו לפתח שיטות רגישות ויעילות לאבחון וירוסים בגפנים.

1. בין השיטות לגילוי נוכחות של וירוסים בצמחים ידועה שיטה המבוססת על זיהוי מולקולות dsRNA. מולקולות אלו נוצרות בצמח הנגוע במהלך ההתרבות של וירוסים רבים, יציבות ביותר וניתנות להפקה, בקלות יחסית. המעלה העיקרית בשיטה נובעת מהעובדה כי dsRNA ניתן לגילוי במהלך הדבקה ע"י מספר גדול של וירוסים השייכים למרבית הקבוצות המוכרות. השיטה אינה דורשת כל מידע מוקדם על הוירוס ולכן משמשת בעיקר בשלבים הראשונים של תהליך האבחון במקרים בהם לא ידוע הוירוס הספציפי אותו מבקשים לגלות. לצורך זיהוי גפנים נגועות בוירוס, זהו יתרון חשוב ביותר עקב ריבוי הוירוסים השונים והידע המועט בנושא האתיולוגיה של מחלות הגפן השונות. עד כה, 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 המשפרים את תהליך ההפקה באופן ניכר וחשוב יותר והתגברנו על הבעיות הספציפיות הקשורות בגפן. השינויים העיקריים בתהליך כללו מיצוי וניקוי ה-dsRNA מהגפן ע"י

השימוש בגרנולות צילולוז בעלות כושר ספיחה גדול יותר, CC-41 במקום CF-11, והימנעות ממיצוי בפנול. השיטה משמשת לנו כעת לזיהוי נגיעות של וירוסים בגפן. מאידך, מצאנו כי אבחון נגיעות מזערית של וירוסים ע"י שיטה זו הוא בעייתית.

על מנת לזהות באופן ספציפי את הוירוסים המנגעים, שימש ה- dsRNA המופק כתבנית לסינתזת cDNA ו- PCR תוך כדי השימוש בפרימרים סגוליים. פרימרים סגוליים לוירוסים הקשורים במחלות הניקרונות (GVA) והתקפלות עלים (GLRaV-1, GLRaV-3) נבחרו לפי רצפי הגנים בעלי רמת הביטוי הגבוהה ביותר בצמח. בדיקות של Northern blot והיברידיזציה שביצענו הראו כי הגן של חלבון התנועה של נגיף ה- GVA נוכח בצמח הנגוע ברמה הגבוהה ביותר בהשוואה לשאר הגנים של הוירוס. אנליזות דומות בוצעו לנגיפים הקשורים במחלת התקפלות העלים GLRaV-1 ו- GLRaV-3.

2. השיטה השנייה אשר פותחה לאיבחון וירוסים מבוססת על השימוש ב- RNA כללי אשר הופק מרקמה צמחית. רקמה עשירה בשיפה הוכנה מזמורות של גפנים נגועות בוירוסים ונכתשה באמצעות חנקן נוזלי לצורך הפקת RNA כללי. ההפקה של ה- RNA התבססה על השימוש בראגנט CTAB ושיקוע עם ליתיום כלוריד, הידוע כי בריכוז 2M הוא משקע חומצות גרעין מסוג RNA חד-גדילי. טיב ההפקה הבדק בגיל אגרוז. על מנת לזהות באופן ספציפי את הוירוסים המנגעים, שימש ה- RNA הכללי המופק כתבנית לסינתזת cDNA ו- PCR תוך כדי השימוש בפרימרים סגוליים לוירוסים הקשורים במחלות הניקרונות (GVA) והתקפלות עלים (GLRaV-1, GLRaV-3).