

מיקום ואפיון כמותי של חלקיקי פיטופלסמה בצמחי וינקה (*Catharanthus roseus*)

**עבודת גמר
מוגשת הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה
העברית בירושלים
לשם קבלת
התואר
"מוסמך למדעי החקלאות"**

**מאת
תומר גרשון**

יוני 2007

רחובות

תמוז תשס"ז

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של

פרופ' עבד גרה

ודר' מוניר מאוסי

העבודה בוצעה במעבדה

ע"ש טולקובסקי

המחלקה לוירולוגיה

מנהל המחקר החקלאי

בית דגן.

מוקדש באהבה רבה

לנעמה מחדון על שטיפחה ונטעה בי את שורשי אהבתי ללימודי המדע

לאהובתי היקרה מפז אמירית

לכל בני משפחתי

הורי ישראל ושושנה

ואחיי היקרים שגיא טל ורותם

תודה רבה על האהבה, הסבלנות והתמיכה.

תודה מיוחדת למוניר על ההדרכה, העזרה, התמיכה הרבה לכל אורך תקופת עבודתי
והפתיחות לשמוע רעיונות והגיגים חדשים ולעיתים מטורפים לכל אורך מחקרי
במעבדתו

תודה לעבד על ההנחיה, הערות בונות ותמיכה לכל אורך המחקר

תודה לפרופ' משה בר-יוסף על הערותיו הבונות לאורך כל הדרך

לחברי למעבדה בהווה ובעבר על עזרתם ותמיכתם הרבה : אני פינגשטיין , לנה ביר,
אוזגור בטומן, יוני מוסקוביץ, סבריינה חביב, תמר חורש, אהרון בללו, הילה יחזקל,
מרינה ברומון , סבטלנה סטוקלוב, M. Muruganatham
שהפכו את התקופה הזו לחוויה

תודה ללודמילה מסלנין על ההדרכה והלימוד של נושא הפיטופלסמה בתחילת דרכי

תודה לאדי בלאוסוב על העזרה והצילום במיקרוסקופ הקונפוקלי

תודה לאביב דומברובסקי על העזרה והייעוץ באנליזות החלבונים

תודה לד"ר שרה שפיגל על לימוד ההרכבות ומתן צמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה

ותודה אחרונה לפסח קציר על גידול שתילי הוינקה

עבודה זו זכתה במלגה מטעם החברה הישראלית לפיטופתולוגיה,
מתרומה של חברת "זרעים" גדרה ותודתי להם.

תקציר

פיטופלסמה הם חיידקים פתוגניים חסרי דופן מקבוצת ה-Mollicutes. חיידקים אלה מאכלסים את רקמת השיפה בצמח וגורמים למחלות הצהבון ולנזקים לכללים כבדים במינים רבים של עצי פרי, ירקות ופרחים. פיטופלסמות מועברות מצמחים נגועים לצמחים בריאים ע"י הרכבה, ריבוי וגטיבי, צמחים טפיליים וע"י מינים ספציפיים של ציקדות. למרות הנזקים הכבדים שנגרמים כתוצאה ממחלות הצהבון בצמחים, הפתוגנים האלה טרם אופיינו דיים. אחד המאפיינים של הפיטופלסמה הוא שלא ניתן לגדלם בתרבית *in vitro* על מצעים מנותקים, דבר המקשה על חקר הפתוגן. צמח הוינקה מהווה צמח מודל לצורך מחקר ולימוד פיטופלסמות שונות בשל רגישותו לטווח רחב של פיטופלסמות וריכוזי החיידק הגבוהים ברקמות הנגועות.

מטרתה של עבודה זו לאפיין אוכלוסיית הפיטופלסמה Alfalfa witches'-broom (AWb) בצמחי וינקה בשלושה היבטים: בדיקת השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות הפיטופלסמה בצמח המודבק, מאפייני פיזור הפיטופלסמה באיברי הצמח השונים ומעקב אחר ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה בעלי מבלע לאורך זמן. בנוסף לכך, פותחו בעבודה זו שיטות לזיהוי וכימות פיטופלסמות בכלל, שאפשרו לאפיין אוכלוסיית הפיטופלסמה AWb בצמחי וינקה.

עבודה זו מציגה לראשונה אפיון של משרעת הטמפרטורות המתאימה להתפשטות פיטופלסמה AWb. השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות הפיטופלסמה נבחנה בצמחי וינקה מורכבים בחומר צמחי נגוע ב-AWb ואשר גודלו בחדרים מבוקרים בעלי משרעת טמפרטורות שונה בעזרת PCR ובדיקת תסמיני המחלה. בניסויים אלה נמצא כי הפיטופלסמה AWb מסוגלת להתפשט בצמחי וינקה במשרעת טמפרטורות רחבה של $22-34^{\circ}\text{C}$. המשרעת המיטבית ביותר להתפשטות שנמדדה בעבודה, נעה בין $28-34^{\circ}\text{C}$. מנגד, נמצא שהתפשטות הפיטופלסמה הנ"ל נעצרה במשרעת טמפרטורות של $17/10^{\circ}\text{C}$ לילה/יום בהתאמה.

בעבודה זו פותחה שיטת Real-Time PCR אשר שימשה ככלי יעיל לקביעת ריכוזי הפיטופלסמה AWb באיברי הצמח השונים ולשם מעקב אחר השתנות ריכוזי פיטופלסמה זו בעורקים של עלי מבלע בצמחי וינקה. האזורים העיקריים לאכלוס פיטופלסמה שנמצאו הם איברי מבלע הכוללים: שורשים ואיברים בעלי צימוח לא נורמאלי. צימוח לא נורמאלי כלל עלים בעלי מבנה דורי ופרחים בעלי תסמינים חמורים. אפיון השתנות ריכוז הפיטופלסמה בעלי מבלע חושף לראשונה כי במהלך המחלה הנגרמת ע"י פיטופלסמה AWb בצמחי וינקה מתרחשים שני שלבים עוקבים עיקריים. השלב הראשון הוא שלב התחלתי קצר הנמשך 14-21 יום ומאופיין בעלייה מהירה בריכוז החיידק מריכוז של 1×10^7 פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי עד לריכוז של 1×10^9 פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי. בנוסף לכך נמצא שמשכו של שלב זה מתקצר עם העלייה בטמפרטורות הסביבה. השלב השני הוא שלב המשכי תמידי המאופיין בריכוזי פיטופלסמה הנעים בטווח של $1-7 \times 10^9$ פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי ללא תלות במשרעת הטמפרטורות של הסביבה.

בעבודת המחקר זו יצרנו נוגדנים רב שבטיים בארנבת כנגד תעשיר הפיטופלסמה AWb. נוגדנים אלה זיהו לפחות שלושה פסי חלבונים בעזרת Western blot במיצויי חלבונים מצמחי וינקה, בצורה ספציפית ועקבית, רק בדוגמאות מצמחים נגועים בפיטופלסמה AWb ולא בצמחים בריאים. במקביל,

Sweet potato witches' broom לחלבון החלבון ההומולוגי לחלבון antigenic protein (SPWB-Ap) מהפיטופלסמה AWb. למרות שהנוגדנים הרב-שבטיים מארנבת שהוכנו כנגד החלבון הרקומביננטי AWb antigenic protein (AWb-Ap) הצליחו לזהות בצורה ספציפית את החלבון הרקומביננטי ממיצוי החיידקים, לא נמצא כל זיהוי של חלבון בגודל הרצוי, והתואם לחלבון AWb-Ap במיצויי חלבונים של צמחים נגועים בפיטופלסמה מסוג AWb בעזרת שיטת ה-Western blot.

בנוסף, פיתחנו מערכת nested-PCR המספקת מבחן ספציפי, מהימן, מהיר, זול ובעל רגישות גבוהה לזיהוי הפיטופלסמה *Candidatus Phytoplasma solani* (CPs). בשיטה זו משתמשים בתחל ייחודי המבוסס על איזור ה-16S-23S intergenic spacer region של הפיטופלסמה CPs, הקרוי fSt1600 בשילוב עם התחל rtP7 לצורך הגברה ייחודית של תבניות DNA מהפיטופלסמה CPs. לסיכום, זיהויים של חלבונים הנקשרים ע"י הנוגדנים הרב שבטיים שהוכנו נגד תעשיר הפיטופלסמה AWb יכול להיות בסיס למחקר עתידי שיאפיין יחסי הגומלין בין חלבונים של הפתוגן והצמח המאחסן. השלכה מעשית למציאת משרעת הטמפרטורה המיטבית להתפשטות פיטופלסמה AWb הוא קיצור משמעותי במשך הזמן עד להופעת תסמינים במבחני הרכבות של חומר צמחי חשוד בנגיעות בפיטופלסמה AWb על גבי כנה של צמח אינדקטור בריא. חזרה על ניסוי זה בעזרת הרכבות של חומר צמחי נגוע בפיטופלסמות מגזעים שונים תספק מידע פתולוגי חשוב ויאפשר את אפיון משרעת הטמפרטורות המיטבית להתרבותם והתפשטותם של פיטופלסמות נוספות. בנוסף לכך נדרשים ניסויים נוספים על מנת לקבוע האם מאפייני פיזור הפיטופלסמה AWb הינו אחיד בכל הצמחים המאחסנים או ייחודי לצמחי וינקה. למרות שעבודה זו התמקדה בבדיקת השתנות ריכוזי הפיטופלסמה AWb בעורקי עלי מבלע של צמחי וינקה, נדרשים ניסויים נוספים שיוכלו לקבוע את השתנות הריכוזים לאורך זמן באיברי צמח השונים ובצמחים נוספים. ניסויים אלה יוכלו להבהיר את אופיים של הגורמים לשינויים בטווח ריכוזי הפיטופלסמה בשלב התמידי. קביעת השתנות ריכוזי פיטופלסמות נוספות מלבד AWb, לאורך זמן, בצמחים שונים תוכל לאשר או לשלול את קיומם של מאפיינים אחידים לשינוי בריכוזי אוכלוסיית הפיטופלסמה במאחסנים הצמחיים.

תוכן עניינים

1		תקציר
4		רשימת קיצורים
5	1.1 פיטופלסמה- היסטוריה	1.1. מבוא
6	1.2 מאפייני מחלה	
7	1.3 מאפייני פתוגן	
9	1.4 מאחסנים צמחיים	
12	1.5 חרקים נשאים	
13	1.6 גילוי וזיהוי פיטופלסמה	
15	1.7 התפשטות וריכוז פיטופלסמה בחלקי הצמח	
15	1.8 פיטופלסמה Alfalfa witches'-broom	
16	רשימת מטרות	
17	2.1 מקור הפיטופלסמה	2. חומרים ושיטות
17	2.2 שיטות עבודה עם חיידקים	
18	2.3 שיטות עבודה עם חלבונים	
20	2.4 הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb	
23	2.5 שיטות עבודה עם DNA	
25	טבלא 1 : רשימת תחלים	
26	טבלא 2 : תנאי הגברה ב-PCR	
27	טבלא 3 : רשימת שבטים	
31	רשימת חומרים	
33	3.1 זיהוי פיטופלסמה AWb בצמחי וינקה	3. תוצאות
33	3.2 הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb	
39	3.3 פיתוח תחל ייחודי לפיטופלסמה CPs מקבוצת ה- Stolbur	
42	3.4 השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות פיטופלסמה	
48	3.5 פיתוח שיטת Real-Time PCR לכימות הפיטופלסמה	
51	3.6 פיזור חלקיקי פיטופלסמה בצמחי וינקה	
54	3.7 השתנות ריכוז חלקיקי פיטופלסמה בוינקה לאורך זמן	
57	4.1 הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb	4. דיון ומסקנות
58	4.2 פיתוח תחל ייחודי לפיטופלסמה CPs מקבוצת ה- Stolbur	
58	4.3 השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות פיטופלסמה	
60	4.4 פיזור חלקיקי פיטופלסמה בצמחי וינקה	
60	4.5 השתנות ריכוז חלקיקי פיטופלסמה בוינקה לאורך זמן	
62		רשימת ספרות
72		נספחים

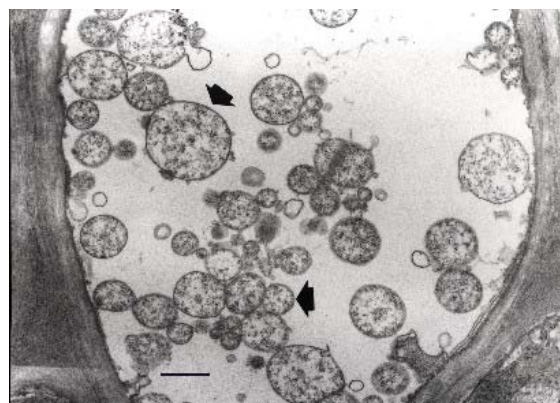
רשימת קיצורים

Amp= Antigenic membrane protein
AP= Apple proliferation
AY= Aster yellows
AYWB= Aster yellow witches' broom
AWb= Alfalfa witches'-broom
AWb-Ap= Alfalfa witches'-broom Antigenic protein
BI= Branch inducing
BN= Bois noir
CP= Clover proliferation
CPs= Candidatus Phytoplasma solani
CY= Chrysanthemum yellow
DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindole
DNA= Deoxyribonucleic acid
FD= Flavescence dorée
MLO's= Mycoplasma-Like Organisms
OY= Onion yellows
PBI= Poinsettia branch-inducing
PD= Papaya dieback
PDp= Pear decline phytoplasma
PCR= Polymerase Chain Reaction
PR-5= Pathogenesis-related type-5
PWb= Peanut Witches' broom
RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA= Ribonucleic acid
SR= 16S-23S intergenic spacer region
SPWB= Sweet potato witches' broom
SPWB-Ap= Sweet potato witches' broom Antigenic protein
rDNA= Ribosomal DNA
rRNA= Ribosomal RNA
WX= Western-X

1 מבוא

1.1 פיטופלסמה- היסטוריה

מחלת הצהבון זוהתה לראשונה ב-1902 בצמח נזרה סינית (*Callistephus chinensis*) (Kunkel, 1926). הסברה הרווחת במשך שנים רבות הייתה שמחלות הצהבון נגרמות ע"י וירוסים. הנחה זו התבססה על תסמיני המחלה בצמחים ויכולת העברת המחלה ע"י חרקים נשאים. בנוסף בדומה לוירוסים, גורם המחלה עבר בסינון בפילטר נגד חיידקים (Lee, 1992). עם זאת לא נראו חלקיקי וירוסים ברקמות נגועות או במיצוי מצמחים נגועים. חלקיקי גורם המחלה נצפו לראשונה ב-1967 ע"י Doi וחבריו בצינורות הכברה בשיפת צמחים נגועים במחלת הצהבון. חלקיקים אלה הראו דמיון מבני ותפקודי ל- *Mycoplasma* של בני אדם ובעלי חיים. דמיון זה כלל: מבנה חלקיקי רב-צורתני בטווח גודל זהה, העדר דופן תא ונוכחות של ממברנה יחידה. ממצאים אלה היו עקביים ביחס לטבעו של גורם המחלה כחיידק חסר דופן, מה שהוביל לשינוי דרמטי במאפייני האטיולוגיה של מחלות הצהבון. הודות לדמיונם המבני של מיקרואורגניזמים אלו ל- *Mycoplasma* הם נקראו בתחילה Mycoplasma-Like Organisms (MLOs). ה- MLOs הראו רגישות לאנטיביוטיקה מקבוצת ה- tetracycline כמו שאר חברי מחלקת ה- Mollicutes, אך לא לאנטיביוטיקה מקבוצת ה- penicillin. בניגוד ל- *Mycoplasma*, הגורמים למחלות רבות בבעלי חיים ובני אדם, ה- MLOs לא ניתנות לגידול בתרבית. הבדל עיקרי נוסף בין MLOs ו- *Mycoplasma* הוא ש- MLOs מועברות ומופצות בין צמחים ע"י חרקים הניזונים מרקמת השיפה. הכינוי MLOs הוחלף בשם המקובל כיום פיטופלסמה, בשנת 1994 בוועידה העשירית של הארגון הבינלאומי לטקסונומיה של *Mycoplasma*. צורת חלקיקי פיטופלסמה בחתכי רוחב של רקמה נראים כגופים רב-צורתיים מעוגלים בקוטר 200-800 nm (Lee and Gundersen-Rindal, 2000) (תמונה 1; Gera et al., 2001).

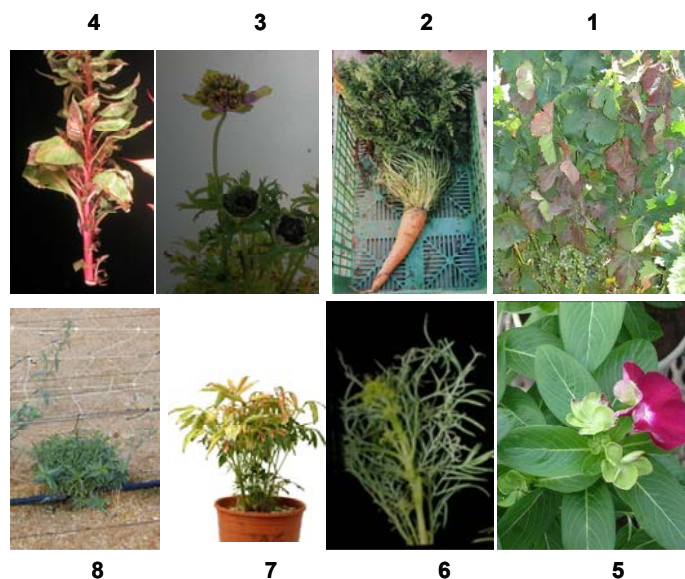


תמונה 1: צילום של חלקיקי פיטופלסמה בחתך רוחב של צמח וינקה נגוע שהתקבל בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר (Gera et al., 2001)

1.2 מאפייני מחלה

1.2.1 תסמיני מחלות פיטופלסמה

צמחים נגועים בפיטופלסמה מציגים מערך רחב של תסמינים המרמזים על הפרעה משמעותית במאזן ההורמונים ובקרי הגדילה בצמח (Chang, 1995; McCoy, 1989). תסמינים אלה כוללים: *virescence* - התפתחות של פרחים ירוקים והעדר פיגמנטים בפרח, *phyllody* - התפתחות של חלקי פרח במבנים של עלים, פרחים עקרים, ריבוי צימוח משני היכול ליצור מראה דמוי מטאטא מכשפה, התקצרות המרחק בין הפרקים בנצר, עצירת צימוח בכלל הצמח, כלורוזה בעלים ובנצרים, קיפול עלים, מראה גידול שיחי בקצוות הגבעולים ונבילה כללית הכוללת: נבילה של זלזלים והצהבה או האדמה לא עונתית של עלים. בנוסף לכך פיטופלסמה יכולה לגרום לנזקים במבנה השיפה הכוללים: נקרוזה ויצירת עודף רקמה. עם זאת הופעת צירוף מסוים של תסמיני מחלה בצמחים חולים תלויה בסוג הפיטופלסמה, מין הצמח המאחסן ובשלב ההדבקה (Lee and Gundersen-Rindal, 2000). תסמינים אלו המושרים על ידי נגיעות בפיטופלסמה גורמים בד"כ לנזקים משמעותיים לצמח, למעט מיני צמחים מסוימים בעלי סבילות או עמידות לפיטופלסמה. תסמינים אלו גורמים להפסדים כלכליים בשל אובדן חלקי או מלא באיכות וכמות היבול (תמונה 2). אולם קיים מקרה ייחודי אחד שבו נגיעות בפיטופלסמה יצרה תסמינים בעלי תועלת למגדלים (Lee et al., 1997). במקרה ייחודי זה צמחי חלבלוב הדור (*Euphorbia pulcherrima*) נגועים בפיטופלסמה הראו מאפייני גידול רצויים הכוללים: נינוס, מראה שיחי וריבוי פרחים. מאפייני גידול אלה יצרו צמח עציץ נוי ראוותני המתאים לשיווק.



תמונה 2: תסמיני מחלה בגידולים שונים נגועים בפיטופלסמה. 1. גפן (*Vitis vinifera*). 2. גזר (*Daucus carota*). 3. כלנית (*Anemone coronaria*). 4. צלוזיה (*Celosia cristata*). 5. וינקה (*Catharanthus roseus*). 6. רבזינה (*Verbesina encelioides*). 7. אדמונית (*Peony*). 8. גפסנית (*Gypsophila paniculata*).

פיטופלסמות גורמות למחלות במספר מאות מיני צמחים הכוללים צמחי תרבות, ירקות, פירות, צמחי נוי, עצים וצמחי בר. מחלות פיטופלסמה הן הגורם המגביל העיקרי לגידול של יבולים חשובים רבים ברחבי העולם (McCoy, 1989). לדוגמא, הפיטופלסמה מסוג Aster Yellow (AY) אחראית לאובדן

כלכלי עיקרי של ירקות כגון: חסה, גזר וסלרי וצמחי נוי שונים בצפון אמריקה וחלק מאירופה. בשל הנזקים הקשים הנגרמים מחיידקי הפיטופלסמה, התנועה של מינים רבים של צמחים נגועים מוגבלת בעזרת תקנות הסגר בינלאומיות (Lee and Gundersen-Rindal, 2000).

1.2.2 העברה והתפשטות מחלות פיטופלסמה

דרך ההעברה העיקרית של מחלות פיטופלסמה בטבע היא בעזרת חרקים נשאים מוצצי שיפה. חרקים אלה רוכשים פיטופלסמה על ידי הזנה ממוהל השיפה של צמחים נגועים ומעבירים אותה לצמחים בריאים. סימני פיטופלסמה יכולים להעלם בצמחים רב שנתיים נגועים, במהלך החורף. צמחים אלה משמשים כמאגר לתפוצה באמצעות ציקדות בעונת האביב העוקבת. דרך נוספת להתפשטות פיטופלסמה בין צמחים שונים היא בעזרת צמחים טפילים כדוגמת כשות (*Cuscuta campestris*), המאפשרים מעבר של פתוגנים צמחיים בנוזלי השיפה בין צמחים ממשפחות בוטניות שונות. בנוסף לכך פיטופלסמה יכולה להתפשט כתוצאה מריבוי צמחים מאחסנים ברבייה וגטטיבית הכוללת: חתכים, פקעות אגירה, קני-שורש ובצלים (Lee, 1992). ריבוי וגטטיבי משמש כדרך ההעברה העיקרית להתפשטות מחלות פיטופלסמה בצמחי נוי ועצי פרי. בנוסף, פיטופלסמה יכולה לעבור בהרכבה של רוכב נגוע על כנה בריאה ולהיפך. לעומת זאת, בניגוד לוורוסים, לא ניתן להעביר פיטופלסמה מכאנית בעזרת מוהל צמחי המכיל פיטופלסמה.

1.3 מאפייני הפתוגן- פיטופלסמה

1.3.1 מיון טקסונומי ומוצא פילוגנטי

קבוצת חיידקי הפיטופלסמה מוגדרת כסוג (genus) נפרד בשם *Candidatus phytoplasma* בתוך מחלקת (class) ה-Mollicutes. הסברה הרווחת על פי השוואת רצפי הגנים ל-16S rRNA, שמחלקת ה-Mollicutes התפתחה מאב בקטריאלי קדום דמוי *Clostridium* מסוג גראם חיובי הנמנה עם חיידקי ה-*Lactobacillus* (Weisburg and Woese, 1989). מחלקת ה-Mollicutes כוללת ארבעה סדרות נפרדות: Anaeroplasmatales, Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, ו-Acholeplasmatales. הסוג *Candidatus phytoplasma* מסווג תחת משפחת Acholeplasmataceae הכלולה בסדרה Acholeplasmatales. סיווג הפיטופלסמה במשפחת ה-Acholeplasmataceae נובע מהדמיון הרב יותר ברצפי הגנים ל-16S rRNA ולחלבונים ריבוזומליים של חיידקי הפיטופלסמה לחיידקי ה-Acholeplasma לעומת חיידקי ה-Mycoplasma (Lim, 1989). תכונה נוספת התומכת בסיווג שני סוגי החיידקים: *Candidatus phytoplasma* ו-Acholeplasma תחת אותה משפחה היא ששני סוגי החיידקים אלה שמרו על תפקוד הקודון U-G-A כקודון פסק וזאת בניגוד לשימוש שלו בחיידקי ה-Mycoplasma כקודון לטריפטופן. בסוג *Candidatus phytoplasma* מסווגות תתי קבוצות נפרדות ברמת המין (species) על פי הדמיון ברצפי הגנים ל-16S rRNA (Gundersen et al., 1994). המיון הראשוני לתתי קבוצות התבצע בתחילת שנות ה-90 תוך שימוש במאפייני אנליזת חיתוך באנזימי הגבלה (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)) על מקטעי 16S rRNA (Lee, 1993; Schneider, 1993). בהמשך

עם השיפור בשיטות הריצוף ובזמינות רצפי הגן 16S rRNA הורחבה החלוקה ל-20 תתי קבוצות שונות (Seemuller, 1998). בהמשך הורחב השימוש לסמנים פילוגנטיים נוספים מלבד 16S rRNA, הכוללים רצפי גנים שמורים אחרים כדוגמת: מרווח בין גני של 16S-23S rRNA, Replication, protein (rp) ו-elongation factor EF-Tu (*tuf*) (Lee, 1998b; Schneider et al., 1997; Smart et al., 1996).

הגדרה של מין חדש במחלקת ה-Mollicutes מצריכה תאור מאפייני המין בתרבות מבודדת. תאור מאפייני פיטופלסמה בתרבות מבודדת אינו אפשרי ולכן אומץ המינוח Candidatus המציין מעמד ארעי נבדל של פיטופלסמה ברמת המין והתת-מין. כיום מוגדרים כבר 28 תתי-מינים ומין אחד של פיטופלסמות שונות תחת המינוח Candidatus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=33926>). שיעור הזהות של רצפי הגן ל-16S rRNA משמשים סמן עיקרי לקטלוג פילוגנטי של גזעי פיטופלסמה. טווחי זהות גבוהים של 95%-99% בגן זה נמצאו כמצביעים על השתייכות לאותה קבוצת מין (קבוצת 16S rRNA) ואילו טווחי זהות נמוכים יותר של 88%-94% נמצאו כמצביעים על השתייכות לקבוצות מינים שונות (Lee, 1994). בהתאמה לכך בהשוואת רצפי הגן ל-16S rRNA של פיטופלסמה לקבוצת החיידקים הקרובה ביותר ה-Acholeplasma נמצאו טווחי זהות של 87%-88.5% (Seemuller, 1998).

1.3.2 מבנה ומאפיינים גנומיים

גנומי החיידק המרוצפים מכילים כרומוזום מעגלי אחד מסוג DNA דו-גדילי ומספר פלסמידים מסוג DNA מעגליים חוץ-כרומוזומליים. הכרומוזום בנוי מ-530 kbp או 1350 kbp ומקודד ל-671 או 754 גנים עבור Aster yellow witches' broom (AYWB) ו-Onion yellows (OY) בהתאמה (Oshima et al., 2004). גדילי הכרומוזום הגנומי של פיטופלסמה נמצאו זהים בקירוב בהשוואה לחיידקים הנכללים בסוג Mycoplasma (580-1300 kbp), אך הם קטנים יותר בהשוואה לחיידקים הקרובים ביותר מבחינה פילוגנטית אליהם, הנכללים בסוג Acholeplasma (~1600 kbp) (Razin et al., 1998). גנום הפיטופלסמה מאופיין בתכולה נמוכה של הבסיסים G+C (23%-29%), בדומה לשאר חברי מחלקת ה-Mollicutes (Kollar and Seemuller, 1998). בנוסף לכרומוזום נמצא כי הפיטופלסמות מכילות פלסמידים מעגליים קטנים חוץ כרומוזומליים (Kuboyama et al., 1998; Liefing et al., 2004; Tran-Nguyen and Gibb, 2006). מצוי בהעדר מספר גנים, הנחוצים למטבוליזם תקין בחיידקים אוטונומיים כדוגמת *Escherichia coli* (E. coli). הגנים החסרים כוללים גנים לייצור מחדש (*de novo*) של חומצות אמינו, חומצות שומן וחומצות גרעין. בשונה מ-Mollicutes אחרים הכוללים Mycoplasma ו-Spiroplasma, גנומי הפיטופלסמה אינם מכילים גנים למסלול חילופי (Salvage pathway) לייצור חומצות גרעין ו-ATP synthase מסוג F₁F₀. בניגוד לשאר הפרוקריוטים, גנומי הפיטופלסמה המרוצפים מכילים גנים

המקודדים ל-ATPase מסוג P_{2C} , האופייני לתאים אוקריוטים הכוללים בעלי חיים, פטריות וצמחים. בשל המחסור בגנים לייצור מטבוליטים הכרחיים בגנומי הפיטופלסמה המרוצפים, חיידקים אלה כנראה מחויבים להסתמך על קליטת מטבוליטים אלה ע"י תהליכי העברה בממברנת החיידק (Christensen et al., 2005). סימוכין לקיום תהליכי העברה ממברנליים מורכבים היא הימצאות של נשאים ממברנליים רבים שנשמרו בדומה לחיידקי גראם חיוביים (Van Wely et al., 2001). לאור העדר גנים המקודדים לאנזימים מפרקי סוכרוז והעדר מערכת זרחון על גבי נשאים (Phosphotransferase system (PTS)) עבור הקסוזות (סוכרים בעלי שישה פחמנים), הסברה היא שפיטופלסמה תלויים בקליטה של הקסוזות מזרחנות כמקור פחמני, שיכולות להיכנס למסלול הגליקוליזה. העדר מפתיע נוסף בגנומי הפיטופלסמה הוא של גן המקודד לחלבון דמוי tubulin בשם FtsZ, שנחשב כחיוני לחלוקה תאית (Christensen et al., 2005). קיום מאחסנים בשתי ממלכות שונות לפיטופלסמה מטיל אילוצים רבים על מהירות האבולוציה שלהם. חיפוי חלקי על אילוצים אלו יכול להתקבל ע"י קיום אבולוציה מהירה יותר הכוללת גנום המכיל רצפי DNA חוזרים רבים (Repeat-rich genome). רצפים חוזרים אלה מגבירים את שכיחות: אירועי שחלופי מקטעים (רקומבנציה) גנומיים, אירועי רקומבנציה בתוך הכרומוזום ובין הכרומוזום לפלסמידים והעברת גנים רוחבית (Horizontal gene transfer) (Nishigawa et al., 2002b). מניחות השוואתי של הגנומים המרוצפים של הפיטופלסמות OY ו-AYWB עולה שהרצפים החוזרים של DNA מאורגנים בקבוצות גדולות של יחידות ייחודיות לפיטופלסמה בעלות אפשרות לשינוי מקום הקרויות potential (PMUs) mobile units (Bai et al., 2006).

1.4 מאחסנים צמחיים

נגיעות בפיטופלסמה תועדה בלמעלה מ-100 מיני צמחים בעלי זרעים הכוללים: חשופי זרע, חד פסיגיים ודו-פסיגיים (Lee and Gundersen-Rindal, 2000). פיטופלסמות זוהו כמאכלסים את צינורות הכברה בשיפה ברוב האיברים של הצמחים הנגועים. למרות שנגיעות של רקמות התפרחת תועדה, הסברה היא שהעברה של הפיטופלסמה לזרעים אינה אפשרית בשל אי קיום קשר ישיר בין צינורות השיפה והזרע. למרות זאת העברה של פיטופלסמה לזרעים כנראה אפשרית בשל דווח של מציאת פיטופלסמה בעוברים מפירות של דקלי קוקוס (*Cocos nucifera* L.) (Cordova et al., 2003) ובזרעי אספספת (*Medicago sativa*) (Khan et al., 2002b).

1.4.1 מחלת פיטופלסמה בארץ

מחלות הנגרמות על ידי פיטופלסמה מתפשטות לאחרונה בארץ וגורמות נזק רב לגידולים רבים בחקלאות הכוללים מטעים, כרמים, פרחי קטיף וירקות. מחלות אלו זוהו לראשונה בגפנים (*Vitis vinifera*) בישראל באמצע שנות ה-80 (Orenstain et al., 2003). תסמיני המחלה בגפנים נגועות כוללים עיכוב הנצה, הצהבה או האדמה בעלים, התעגלות עלים, כנות לא מפותחות והבשלת פירות לקויה או הצטמקות גרגירים. סריקת נגיעות לפיטופלסמה בגפנים ברמת הגולן בוצעה במהלך השנים 1999 ו-2000 (Orenstain and Weintraub, 2001). בסריקה זו אופיינו גורמי המחלה בגפנים

נגועות כפיטופלסמות מקבוצות AY, Stolbur ו-WX Western-X). מחלות אלו נמצאו בעבר בפרחי הקטיפה נורית (*Ranunculus asiaticus*) וכלנית (*Anemone coronaria*) (Klein, 1995). בירקות, נתגלתה מחלת הפיטופלסמה בגזר (*Daucus carota*) לראשונה ב-1995. גורמי המחלה בחמישה זני גזר שונים נמצאו כפיטופלסמה AY ו-WX (Orenstain et al., 1999). מאוחר יותר הופעת מחלת הצהבון בגזר תועדה ביבולי סתיו, חורף וקיץ בדרגות נזק שונות באזור עמק בית שאן בצפון, איזור השרון במרכז ובקיבוץ סעד בנגב. תסמיני המחלה בגזר כוללים יצירת עלים מנוצים ומוקטנים בצבע צהוב או אדום, ריבוי צימוח משני של חלקי הנצר המתבטא במראה דמוי מטאטא מכשפה, צימוח רב של שורשים משניים המסודרים במבנה דורי וגזר דקיק בעל צורה לא נורמאלית. נוכחות המחלה הוכחה בבדיקות מולקולאריות, ובניסויים של כיסוי שטחים ברשת נגד חרקים וריסוסים במועדים שונים. בקיץ 1999 נמצאו המחלות בגידולי צלוזיה (*Celosia cristata*) בעמק חפר (Cohen et al., 1999a), קוסמוס (*Cosmos sulphureus*) בדרום השרון (Cohen et al., 1999b) וורבזינה זהובה (*Verbesina encelioides*) בעמק חפר (Cohen et al., 2000). באוקטובר 2000 נמצאה המחלה בחלקות מסחריות של לימוניום (*Limonium latifolium*) בצפון הערבה (Gera et al., 2001) ווינקה רפואית (גרה וחובריו, לא פורסם). סימני המחלה בצמחי לימוניום נגועים כללו הצהבה והתייבשות עלים, עיוות פרחים ונינוס. הנגיעות במחלה בחלקות אלו במהלך עונה זו גרמה לנזק רב שהגיע במקרים קשים עד לנגיעות של 60% מהצמחים בחלקה ולהשמדת כלל חלקת הגידול. מאוחר יותר אופיין גורם המחלה בצמחי הלימוניום הנגועים כפיטופלסמות השייכות לקבוצת Elm yellows ו- almond witches broom (Gera et al., 2004). באוקטובר 2002 נצפתה מחלת הפיטופלסמה בצמחי רקפת (*Cyclamen persicum*) במשתלה בבשור (Gera and Alexandrov, 2003). סימני המחלה ברקפות נגועות כללו הצהבה בעלים, עיוותים בעלים, גבעולי פריחה ופרחים ונינוס. גורם המחלה בצמחים אלו אופיין כשייד לפיטופלסמה מקבוצת ה-Stolbur. ב-2005 דווח על זיהוי פיטופלסמה מקבוצת ה-Stolbur בעצי פפאיה (*Carica papaya*) שהראו תסמינים של מחלת ניוון האמיר (Gera et al., 2005). בנוסף לכך נמצאו גפנים נגועות באותו גורם המחלה בכרם הנמצא בסמוך למטע הפפאיה. מציאה של אותו גורם מחלה בשני גידולים שונים הגדלים בסמוך יכול להצביע על אפשרות של נשא חרקי ומקור הדבקה משותפים. לאחר מכן באפריל 2006 נצפו במשתלות במרכז הארץ צמחי אזוביון דגול (*Lavandula stoechas*) בעלי מופע חריג של צהבון ועלים קטנים ומעוקלים (Spiegel, 2006b). גורם המחלה בצמחים אלה אופיין כפיטופלסמה השייכת לקבוצת ה-Clover proliferation (CP). באפריל של אותה השנה נמצאו במטע בצפון רמת הגולן עצי גודגן (*Prunus avium*) בעלי מראה גידול לא נורמאלי שכלל עלים שמוטים, התייבשות ענפים חלקית או מלאה, קיצור פרקים וגידול צפוף של ענפים צעירים, הצהבה והתקפלות עלים ומופע עלים בצבע ארגמן בתקופת הקיץ. בעצי מטע אלו אופיין גורם המחלה כפיטופלסמה השייכת לקבוצת ה-CP. הנזק שנגרם למטע הנגוע כלל תמותה של 220 עצים (18% מכלל חלקת המטע) ואובדן יכול עקב התייבשות חלקית של ענפים בעצים הנגועים (Spiegel, 2006a).

1.4.2 תפקיד תאי הלוואי להתפתחות פיטופלסמה

ריכוז אוכלוסיית הפיטופלסמה בצינורות הכברה מציע שחיידקי הפיטופלסמה משתמשים בתאי הכברה לשם התפשטות וחלוקה. הפיטופלסמה יכולה להגיע להיקף חלוקה גדול, המשפיע על החיות של תאי הכברה בצורת אובדן מפל היונים הממברנלי (Christensen et al., 2004). תאי הכברה הם חסרי גרעין ומכילים ציטופלסמה מופחתת, המקנה התנגדות מופחתת עבור הובלת מוטמעים והתפשטות פיטופלסמה. אולם נראה שתאי הכברה אינם מכילים הקסוזות מזורחנות ונוקלאוטידים החיוניים לפיטופלסמה. תאי הלוואי פעילים מטבולית בצורה גבוהה במיוחד. תאים אלה מספקים את כל התרכובות הדרושות לשמירה על חיות ותפקוד תקינים של תאי הכברה השכנים. התרכובות המסופקות מתאי הלוואי יכולות לשמש מקור מזון חשוב לפיטופלסמה (Christensen et al., 2005). מעבר של תרכובות בין תאי הלוואי לתאי הכברה נעשה דרך יחידות הפלסמודסמה. יחידות הפלסמודסמה מאפשרות שחלוף מבוקר של אוליגו-פפטידים, מולקולות חלבוניות עד לגודל של 67 kDa וליפידים מתאי הלוואי לתאי הכברה. בהנחה שבתאי הכברה הבלתי נגועים יש כמות מועטה של הקסוזות מזורחנות ונוקלאוטידים, הפיטופלסמה אולי משרה דליפה מבוקרת של תרכובות אלה מתאי הלוואי לתאי הכברה על ידי שינוי התפקוד של יחידות הפלסמודסמה (Christensen et al., 2005).

1.4.3 פגיעת הפיטופלסמה בצמחים

תסמינים הנגרמים על ידי פיטופלסמה מצביעים על שינויים במאזן ההורמונים, תפקוד השיפה ובתכולת מוהל השיפה. הדבקה מסיבית בפיטופלסמה כוללת שינויים היסטולוגיים הכוללים מיקום מחדש של Callose בפלטות הכברה, מוות תאי והתמוטטות של צינורות הכברה (Lee and Gundersen-Rindal, 2000). השפעות משניות שיכולות להיות קשורות לעיכוב העברה של מוטמעים בשיפת צמחים נגועים כוללות יכולת ההטמעה מופחתת, הצטברות פחמימות בעלים בוגרים (עלי מקור) וירידה בתכולת העמילן ברקמות מבלע כדוגמת שורשים (Choi et al., 2004; Junqueira et al., 2004). ההשפעה של שינוי מיקום הפחמימות בצמח נמצאה בתאחיזה לוירולנטיות של גזע הפיטופלסמה. הצטברות פחמימות בעלי מקור יכולה לגרום להיזון חוזר מעכב של פוטוסינטיזה, שתבטא באובדן הכלורופיל וכלורוזה (Tan and Whitlow, 2001). הפרעות אלה ביכולת ההעברה של מוטמעים בצינורות הכברה יכולות להיגרם מחלוקה מסיבית של הפיטופלסמה, שיכולה לסתום את צינורות הכברה. אולם העברת מוטמעים מופחתת נצפתה גם בצמחים בעלי ריכוז פיטופלסמה נמוך. תצפית זו יכולה להצביע על השפעה לא ישירה של הפיטופלסמה על חילוף החומרים ותפקוד השיפה, שאינה כוללת בהכרח סתימה של צינורות השיפה (Christensen et al., 2005).

1.4.4 גנים משוערים ביחסי הגומלין בין הפיטופלסמה לצמח

נגיעות בפיטופלסמה יכולה להביא להפעלה של מנגנוני הגנה בצמחים הנגועים. מנגנוני ההגנה אלה כוללים ייצור של נגזרות פנוליות ורדיקלים חופשיים של חמצן וחלבונים הקשורים לפתוגנה מסוג PR-5 (Junqueira et al., 2004; Zhong and Shen, 2004). בנוסף לכך נמצא כי פיטופלסמה המסווגת כ-Stolbur השרתה דיכוי בביטוי גן המעורב בשינוע סוכרים בשם transketolase. מוטנט

בגן זה בצמח ארבידופסיס (*Arabidopsis thaliana*) יצר פנוטיפ לבקן, הפגוע בביטוי מספר גנים המעורבים בפוטוסינטיזה ויצור פיגמנטים. מכך הסיקו שדיכוי גן זה בצמחי וינקה יכול להיות אחד הגורמים האחראים להופעת כלורוזה בצמחים נגועים בפיטופלסמה המסווגת כ- Stolbur (Jagoueix-Eveillard et al., 2001). בנוסף לכך בצמחי משמש (*Prunus armenica*) נגועים בפיטופלסמה *Candidatus prunorum* נמצאו שלושה גנים המבוקרים חיובית: גן מקודד ל- metallothionein, גן ל- heat shock protein והומולוג של EST 673. מחקרים סרולוגיים מראים כי קיימים מספר מועט של חלבונים ממברנליים אנטיגניים במיוחד הקרויים על כן חלבונים אימונודומיננטים (Berg et al., 1999; Blomquist et al., 2001). חלבונים ממברנליים אלה יכולים לשמש מועמדים אפשריים ליחסי גומלין בין הפיטופלסמה למאחסן. יחסי גומלין אלה יכולים לכלול את התאחיזה לתאי המאחסן, שיכולה לשמש תנאי מקדים לאכלוס והדבקה (Suzuki et al., 2006). נוגדנים לחלבונים ממברנליים אלה יכולים לשמש כפלטפורמה ליצירה של צמחים טרנסגנים עמידים. מעבר בין המאחסנים השונים, הכוללים נשאים חרקיים וצמחים, נמצא כהכרחי לשמירת הוירולנטיות של הפיטופלסמה. דוגמא לכך הוא המוטנט של פיטופלסמה מסוג OY בשם OY-NIM הגורם לתסמינים מתונים בצמחים ואינו מועבר ע"י נשאים חרקיים (Nishigawa et al., 2002a). מוטנט זה מכיל פלסמיד החסר שתי מסגרות קריאה ביחס לזן הבר. מסגרות קריאה אלו כוללות חלבון בעל הומולוגיה לחלבונים קושרי DNA חד-גדילי (single-strand binding protein) וחלבון בלתי מאופיין המשוער כחלבון ממברנלי.

1.5 חרקים נשאים

החרקים האחראים להעברת פיטופלסמה הם בעיקר ציקדות עלה מוצצות שיפה ממשפחת הציקדיתיים (Cicadellidae). בנוסף לכך הוכחו מספר כנימות ממשפחת הפסיליות (Psyllidae) וציקדות צמח המכונות planthoppers מעל משפחת העפרוניתיים (Fulgoroidea) המוצצות שיפה כנשאים של פיטופלסמה (Weintraub and Beanland, 2006). מספר פיטופלסמות מאופיינות בספציפיות נשא חרקי נמוכה ומועברים ע"י נשאים שונים רבים כדוגמת AY שמועבר ע"י לפחות 24 מיני ציקדות שונות. לעומת זאת לפיטופלסמות אחרות ספציפיות גבוהה במיוחד והן מועברות ע"י מספר מועט או יחיד של חרקים נשאים (Christensen et al., 2005).

1.5.1 רכישה והתפשטות פיטופלסמה בנשא החרקי

פיטופלסמה נמצאה ברוב האיברים של חרקים נשאים נגועים. רכישה של הפיטופלסמה מבוצעת ע"י מציצת נוזלי שיפה מצינורות הכברה של צמח נגוע ע"י חדק (stylet) החרק. מסלול ההעברה של החיידק כולל מעבר מחדק החרק למעינים וכניסה למערכת הסירקולרית של ההמולימפה. על מנת שהחרק הנשא יהיה מסוגל לבצע הדבקה של פיטופלסמה בצמח הבריא צריכה להתרחש הזנת הדבקה. הזנת הדבקה בחרק הנשא אפשרית רק לאחר שהפיטופלסמה מאכלסת את בלוטות הרוק של הנשא החרקי. אכלוס בלוטות הרוק כוללת חלוקה של החיידק בתוך נוזל הרוק עד לרמה בה ההזנה תכניס רמה אינפקטיבית לצמח הבריא (Webb et al., 1999). תקופת האכלוס בחרק נמשכת כשלושה

שבועות עד להגעה לריכוז פיטופלסמה אינפקטיבי. תקופת האכלוס בנשא החרקי קרויה תקופה לטנטית והיא יכולה להשתנות בין מיני חרקים שונים. בנוסף לכך נמצא שדרושה תקופת רכישה מינימאלית של 2-4 ימים עבור הפסילות (*Cacopsylla pruni* (Psyllids) על מנת להדביק את הנשא החרקי. לאחר תקופת הרכישה הנשא החרקי נשאר מודבק לכל ימי חייו כולל מעבר תקופת החורף (Carraro et al., 2001). בד"כ נשאים חרקים אלה אינם מעבירים פיטופלסמה לצאצאיהם. אולם מקרים של זיהוי פיטופלסמה בצאצאים דווחו בעבר וכוללים ביצים, נימפות ובוגרים בדור הצאצאים הראשון והשני (Alma et al., 1997; Hanboonsong et al., 2002).

1.5.2 יחסי הגומלין בין הפיטופלסמה לנשא החרקי

מאפייני ההשפעה של פיטופלסמה על כשירות הנשא החרקי אינם ברורים. למרות שתועדו חרקים נשאים נגועים עם כשירות (fitness) מופחתת (Bressan et al., 2005), תועדו אף חרקים נשאים שהפיקו תועלת מהנגיעות בפיטופלסמה הכוללת יכולת מוגברת של מעבר תרדמת חורף, פוריות מוגברת ואריכות ימים (Beanland et al., 2000). הסברה הרווחת היא שככל שמשך יחסי הגומלין בין הפיטופלסמה לנשא ארוכים יותר כך הווירולנטיות של הפיטופלסמה למאחסן החרקי נמוכה יותר. בנוסף לכך ההשפעה הישירה של הפיטופלסמה על החרק ועל הרכב נוזלי ההמולימפה אינם ידועים (Christensen et al., 2005). לאחרונה Suzuki וחבריו (2006) הראו על קיום יחסי גומלין בין פיטופלסמה מקו OY לסיבי קישור של דופן המעי החרקי. יחסי גומלין אלו כללו קישור של חלבון ממברנלי אימונודומיננטי מהחידק בשם (Amp) Antigenic membrane protein (לחלבונים חרקיים שכללו אקטין והשרשרת הקלה וכבדה של מיוזין. בנוסף לכך נמצאה התאמה חיובית בין יכולת העברת הפיטופלסמה ע"י ציקדות ליצירת התצמיד החלבוני בין Amp לסיבי הקישור בדופן המעי החרקי. התאמה זו מצביעה על כך שיכולת הנשא החרקי להעברת פיטופלסמה תלויה ביצירת תצמיד בין חלבון ממברנלי של הפיטופלסמה לסיבי הקישור במעי הנשא החרקי. בהתאמה לכך אנליזה השוואתית של 14 חלבוני Amp שונים שנעשתה ע"י Kakizawa וחבריו (2006) מצאה סלקציה חיובית משמרת חזקה לקבוצת חלבונים זו. מה שתומך בסברה שלחלבון ה-Amp תפקיד ביולוגי חשוב ביחסי הגומלין בין המחסן לפיטופלסמה.

1.6 גילוי זיהוי פיטופלסמה

חלקיקי פיטופלסמה התגלו לראשונה בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני בצינורות הכברה בשיפת צמחים נגועים במחלת הצהבון (Doi Y.M., 1967). בשל חוסר היכולת לקבל תרבית מבודדת של פיטופלסמה, הגילוי והזיהוי של פיטופלסמה לא היה מדויק ואמין במהלך העשור הראשון שלאחר גילוי לראשונה. במהלך עשור זה, הימצאות תסמינים אופייניים וחלקיקים דמויי Mycoplasma בחתכי רקמה של צמחים חולים היוו קנה מידה עיקרי לאבחון מחלות ממקור פיטופלסמי אפשרי (Haggis and Sinha, 1978). במקרים מסויימים היעלמות תסמינים לאחר טיפול באנטיביוטיקה מסוג טטראצקלין סיפקה תימוכין נוסף לאבחון הראשוני (Lee, 1992). בהמשך פותחו שיטות מיקרוסקופיות נוספות המבוססות על כך שהתאים המרכיבים את צינורות הכברה של השיפה הינם חסרי DNA. על בסיס עובדה זו פותחו שיטות מיקרוסקופיות לזיהוי DNA בצינורות הכברה.

בשיטות מיקרוסקופיות אלו משתמשים בצבע פלורוצנטי כגון: DAPI (DNA-specific 6- diamidino-2-phenylindol) ו-SYTO (green fluorescent nucleic acid stain) שיטות מיקרוסקופיות אלו מצריכות זמן ארוך להכנה, קיבוע וסריקה של חתכי רקמה רבים.

זיהוי והבחנה בין גזעי פיטופלסמה שונים התבסס על מאפיינים ביולוגיים כגון תסמינים בצמחים נגועים, טווח מאחסנים צמחיים ויחסי גומלין עם חרקים נשאים (Chiykowski and Sinha, 1989; Chiykowski, 1991). זיהוי זה על פי המאפיינים הביולוגיים לקה בחסרונות רבים שכללו משך זמן לקטלוג ארוך, תוצאות לא עקביות ואי ידיעת כלל החרקים הנשאים.

שיפור משמעותי ביכולת האבחנה של פיטופלסמה התקבל בתחילת שנות ה-80 עם פיתוח גלאים מולקולאריים הכוללים נוגדנים חד-ורב-שבטיים וקטעי DNA משובטים. השימוש בנוגדנים חד-שבטיים ייחודיים לפיטופלסמה אפשר ביצוע של מבחנים סרולוגיים לגילוי וזיהוי. מבחנים אלה סיפקו דרכים פשוטות בעלות רגישות וספציפיות גבוהה לגילוי וזיהוי מיני פיטופלסמה ייחודיים (Chen, 1992). בנוסף לכך גלאי DNA פיטופלסמי משובטים אפשרו את לימוד יחסי הגומלין הגנטיים וסיווג סוגי הפיטופלסמה לקבוצות נפרדות (Lee, 1998a). שימוש בגלאי DNA משובטים בשילוב עם אנליזת RFLP ביססה לראשונה קטלוג גנומי לאבחנה בין גזעים שונים בקבוצת ה-AY (Lee et al., 1992). מקטלוג גנומי זה נראה שגזעי פיטופלסמה קרובים גנטית יכולים לגרום לתסמינים שונים בצמחים חולים, ובנוסף לכך ששני גזעי פיטופלסמה שונים גנטית יכולים להשרות תסמינים זהים בצמחים. תוצאות אלה ממחישות את חוסר הדיוק מהשימוש הקודם בתסמינים ככלי להבחנה בין גזעי פיטופלסמה שונים.

שיפור משמעותי בסף גילוי הפיטופלסמה התקבל בתחילת שנות ה-90 בעזרת השימוש ב-PCR. בתחילה, תחלי PCR תוכננו על סמך מקטעי DNA פיטופלסמי משובטים (Deng, 1991b; Goodwin et al., 1994). לאחר מכן מספר קבוצות מחקר תכננו תחלים ייחודיים לקבוצת הפיטופלסמה המבוססים על רצפים מהגן השמור 16S rRNA (Ahrens and Seemuller, 1992; Davis, 1993; Deng, 1991a; Gundersen, 1996). תחלים אלה אפשרו הגברה של רצפי 16S rDNA מטווח רחב של גזעי פיטופלסמה ומגזעים ספציפיים השייכים לקבוצת פיטופלסמה נתונה. תחלים אלה אפשרו לראשונה את הזיהוי והלימוד של טווח רחב של גזעי פיטופלסמה בצמחים וחרקים נשאים. בהמשך פותחו גם תחלים אוניברסאליים וספציפיים לקבוצת פיטופלסמה מסוימת המתבססים על רצפי גנים שמורים אחרים כדוגמת מרווח בין גני של 16S-23S, Replication protein (rp), ו-elongation factor EF-Tu (*tuf*) (Lee, 1998b; Schneider et al., 1997; Smart et al., 1996).

בשנים האחרונות יושמה טכניקת אבחון בעלת רגישות גבוהה יותר מה-PCR לזיהוי פיטופלסמה הקרויה Real-Time PCR. שיטה זו יושמה בתחילה לשם זיהוי ייחודי של פיטופלסמות מקבוצת ה-AP בעצי תפוח (*Malus domestica*) (Baric and Dalla-Via, 2004). בהמשך פותחו שיטות נוספות המבוססות על Real-Time PCR לזיהוי ייחודי של הפיטופלסמות Flavescence Bois noir (BN), (Angelini et al., 2007; Galetto et al., 2005) AY ו-dore'e (FD). שיטת זיהוי זו אפשרה לראשונה את הכימות של חלקיקי פיטופלסמה ברקמה צמחית. שיטות לכימות שכאלה פותחו

הצליחו לכמת את מספר חלקיקי הפיטופלסמה לרקמה צמחית עבור פיטופלסמות Brunch Christensen et al.) Apple proliferation (AP) ו-inducing (BI), Chrysanthemum yellow (CY) (al., 2004; Marzachi and Bosco, 2005; Torres et al., 2005).

1.7 התפשטות וריכוז פיטופלסמה בחלקי הצמח

חיידקי הפיטופלסמה מועברים בנוזל הרוק של חרקים נשאים לתוך צינורות הכברה של הצמח. מצינורות אלה חיידקי הפיטופלסמה מתפשטים באופן סיסטמי לכלל איברי הצמח. מבנם הרב צורתו (Pleiomorphic) וגודלם הקטן של הפיטופלסמה מאפשר מעבר חופשי בין תאי כברה שכנים דרך חריצי משטחי הכברה (Christensen et al., 2004). מעבר חופשי זה מאפשר לחיידקי הפיטופלסמה להיסחף עם זרם המוטמעים מעלי מקור לאיברי מבלע צורכי מוטמעים. בהתאם לכך פיטופלסמה המקוטלגת כ-PD נמצאה ברקמות מבלע של צמחי פפאיה (*Carica papaya*) הכוללות עלים בלתי בוגרים ושורשים בעוד שעלי מקור נשארו בלתי נגועים (Siddique et al., 1998). מנגד ריכוזים גבוהים בעלי מקור ואכלוס נמוך של רקמות מבלע נמצאו בצמחי ורד (*Rosa multiflora*) וחלבוב הדור (*Euphorbia pulcherrima*) הנגועים בפיטופלסמה AY ו-Poinsettia branch-inducing (PBI) בהתאמה (Christensen et al., 2004; Kaminska et al., 2003). מחקרים העוסקים במעבר פיטופלסמה לאחר אילוח המוגבל למקום ספציפי בצמח (Wei et al., 2003) או אכלוס מחדש ב-Pear decline phytoplasma (PDp) התוקפת עצי אגס (*Pyrus Communis*) (Garcia-Chapa et al., 2003) מספקים עדויות לכך, שלא ניתן להסביר את התפשטות הפיטופלסמה בצמח רק ע"י תנועת זרם המוטמעים. תנועה פעילה של הפיטופלסמה נראית בלתי סבירה בהתחשב בהעדר גנים המקודדים לאלמנטים דמויי שלד תאי (Cytoskeleton) או שוטונים (Christensen et al., 2005). לעומת זאת אחיזה של פיטופלסמה לתאי המאחסן וחלוקה לאורך ממברנות התאים יכולה להסביר תנועה של הפיטופלסמה כנגד תנועת זרם המוטמעים. אחיזה של פיטופלסמה לתאי המאחסן החרקיים נראתה בעבר (Suzuki et al., 2006). אסטרטגיה זו של אחיזה לתאי המאחסן הוראתה בעבר גם ב-mollicutes אחרים כדוגמת: Spiroplasma ו-Mycoplasma (Berg et al., 2001; Razin, 1999). בעבר דווח שטמפרטורות סביבה הגבוהות מ-40°C יכולות לגרום להרס חלקיקי הפיטופלסמה בצמחים נגועים (Caudwell et al., 1997; Goodwin et al., 1994). בנוסף לכך נמצא שחלקיקי פיטופלסמה בתרביות רקמה אינם נפגעים לטמפרטורות נמוכות של עד 4°C (Kaminska et al., 2005). אולם לא נמצאו מחקרים המציגים אפיון של משרעת הטמפרטורות המתאימה להתפשטות אופטימלית של פיטופלסמה.

1.8 פיטופלסמה Alfalfa witches'-broom (AWb)

הפיטופלסמה AWb דווחה בעבר כגורם המחלה העיקרי בצמחי אספסת תרבותית (*Medicago sativa* L.) בסולטנות עומאן (Khan et al., 2002a). מחלה ה-witches'-broom בצמחי אספסת אופיינה בריבוי נצרים, הצהבה של עלים, ריבוי יחורים והפיכת היבול ללא פורה וכבלתי ראוי לשיווק. בסולטנות עומאן מחלה זו גרמה לאובדן יבול בהיקף של 30 מיליון דולר לשנה בממוצע בענף גידול

האספסת התרבותית למספוא. עיקר הנזק ממחלה זו נגרם עקב תמותה של צמחים נגועים, עיכוב יצור זרעים, הפחתה במחזור החיים של שדה נגוע והצורך לבצע זריעה מחדש בשדות נגועים. למרות הנזק הרב שנגרם מגורם מחלה זה, לא בוצעו עד כה מחקרים שעסקו באפיון פיטופלסמה זו, למעט מחקר שדיווח על ריצוף מקטע גנומי של הגן ל-RNA ריבוזומלי 16S-23S וניתוח מאפייני החיתוך עם אנזימי הגבלה על מקטע מוגבר של גנים ריבוזומלים (RFLP). בשל חוסר המידע העוסק באפיון פתוגן זה, נזקיו הקשים ונוכחותו בארץ (גרשון וחובריו, לא פורסם) גורם מחלה זה נבחר כנושא העיקרי לאפיון בעבודה זו.

מטרות המחקר

1. פיתוח שיטות לזיהוי וכימות פיטופלסמה הכוללות:
 - א. הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb באמצעות תעשיר פיטופלסמה.
 - ב. הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb באמצעות שימוש בחלבון ממברנלי של הפיטופלסמה שבוטא בחיידקי *E. coli*.
 - ג. פיתוח תחל ייחודי לפיטופלסמה *Candidatus Phytoplasma solani* (CPs) מקבוצת ה-Stolbur.
 - ד. פיתוח שיטה מסוג Real Time PCR שתאפשר מדידה של ריכוזי הפיטופלסמה AWb בצמחי וינקה.
2. אפיון אוכלוסיית הפיטופלסמה AWb בצמחי וינקה:
 - א. אפיון השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות פיטופלסמה.
 - ב. אפיון הפיזור והכמות של פיטופלסמה באיברי הצמח השונים.
 - ג. אפיון השתנות ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה בעלי מבלע לאורך זמן.

2 חומרים ושיטות

2.1 מקור הפיטופלסמה

צמח וינקה (*Catharanthus roseus*) מקיבוץ אילות שהראה סימני נגיעות בפיטופלסמה שימש כצמח מקור לפיטופלסמה. סימני נגיעות אלו כללו כלורוזה והקטנת עלים, ריבוי התפצלות עלים, היוצרים דור עלים ופרחים עקרים קטנים וירוקים. צמח וינקה זה אופיין כנגוע בפיטופלסמה Alfalfa witches'-broom (AWb) ושימש כצמח מקור להדבקה של צמחי וינקה בריאים בפיטופלסמה. הדבקה בפיטופלסמה נעשתה בעזרת הרכבות צד של רוכב נגוע מצמח המקור על גבי צמחי וינקה בריאים בני חודשיים. צמחי וינקה המורכבים נשמרו בחממה מבוקרת טמפרטורה (25°C). נוכחות פיטופלסמה בצמחי וינקה אושרה בעזרת צביעת DAPI.

2.1.1 חתכי רקמה לצביעת DAPI

חתכי אורך ברקמות הצמחיות הנבדקות בוצעו בעזרת סקלפל. חתכי הרקמה קובעו למשך לילה בתמיסת Carnoy's (chloroform: ethanol: acetic acid ביחסים של 6:3:1 בהתאמה). הדוגמאות עברו הבהרה בעזרת תמיסת 6% מי חמצן (H_2O_2) מהולים באתנול למשך שעתיים. דוגמאות הרקמה נשתפו במים סטריליים ונצבעו בתמיסת צבע הספציפי ל-DNA 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) בריכוז 5 µg/ml למשך 5 דקות. חתכי הרקמה נשתפו במים סטריליים וסודרו על גבי זכוכית נושאת להסתכלות וצילום במיקרוסקופ פלורוסנטי.

2.2 שיטות עבודה עם חיידקים

2.2.1 מצעים לגידול חיידקים

מצע LB (Luria - Bertami Medium) לגידול חיידקי *E. coli* 20 g LB broth של חבר'ת Pronadisa הומסו ב-1 L מים, pH הותאם ל-7 בעזרת NaOH. לשם הכנת מצע גידול מוצק הוסף לתמיסה 1.5% Bacto agar (Becton, Dickinson and Company). למצעי הגידול הוספה האנטיביוטיקה Ampicillin sodium (Duchefa Biochemie) לריכוז סופי של 100 µM.

2.2.2 הכנת תאים קומפטנטיים לטרנספורמציה

חיידקי *E. coli* מהגזע DH5α שימשו לטרנספורמציה. אחד מיליליטר של תרבית חיידקים גודלה למשך הלילה בתוך 100 ml מצע LB נוזלי ב 37°C ובטילטול עד OD 0.6. התרבית קוררה בקרח למשך 10 דקות וסורכה 5 דקות ב-6000g. משקע התאים הורחף בחצי נפח הגידול 50 mM CaCl₂. התרחיף סורכו שוב באותם התנאים, והורחף בעשירית מנפח הגידול המקורי של 50 mM CaCl₂. לתרחיף התאים הוסף גליצרול לריכוז סופי של 15%. התאים חולקו למנות של 100 µl, הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב-80°C.

2.2.3 טרנספורמציה

תאים קומפטנטיים (חיידקי *E. coli* מהזן DH5 α) שהוכנו לפי הסעיף הקודם, הופשרו במשך 30 דקות בקרח. אליהם הוספו $10 \mu\text{l}$ של תוצרי הליגציה לאינקובציה של 30 דקות בקרח. לאחר התאים עברו עקת חום למשך 90 שניות ב- 42°C , והוחזרו לקרח למשך 50 דקות. לאחר הוספת 1 ml של מצע גידול נוזלי LB, הודגרו התאים ב- 37°C למשך שעה בטלטול. מאתיים מיקרוליטר מהחיידקים נזרעו על מצע LB מוצק שהכיל אנטיביוטיקה (אמפצילין או קנמיצין) בריכוז $100 \mu\text{g/ml}$.

2.2.4 הפקת DNA פלסמידי מהחיידקים בשיטה אלקלית (Miniprep)

גידול מושבה בנפח 2 ml של מצע LB, המכיל אנטיביוטיקה בהתאם לסוג הפלסמיד, למשך לילה ב- 37°C . למחרת תרבית החיידקים עברה שיקוע בעזרת סרכוז במהירות $14,000 \text{ rpm}$ למשך 2 דקות במבחנות אפנדורף של 1.5 ml . משקע החיידקים הורחף ב- $200 \mu\text{l}$ בופר S1 (50 mM Tris) הוספת $200 \mu\text{l}$ בופר S2 (200 mM NaOH , $1\% \text{ SDS}$) ואינקובציה בטמפרטורת החדר למשך 5 דקות. סתירת בופר השבירה נעשתה בעזרת הוספת $200 \mu\text{l}$ בופר S3 (2.8 M KAC pH 5.1) ואינקובציה למשך 15 דקות בקרח. סילוק שברי תאי החיידקים נעשה בעזרת סרכוז במהירות $14,000 \text{ rpm}$ למשך 20 דקות בטמפרטורה של 4°C . הנוזל העליון עם הפלסמידים נאסף לאפנדורף חדש ועבר השקעה בעזרת הוספת $420 \mu\text{l}$ איזופרופנוול בטמפרטורה של -20°C למשך 20 דקות. הפלסידים נאספו בעזרת סירכוז במהירות $14,000 \text{ rpm}$ למשך 15 דקות בטמפרטורה של 4°C . שטיפת המלחים נעשתה בעזרת הרחפת המשקע ב- $500 \mu\text{l}$ תמיסת 75% אתנול. התרחיף סולק לאחר סרכוז במהירות $14,000 \text{ rpm}$ למשך 10 דקות. דגימות המשקע יובשו בואקום למשך 10 דקות והורחפו ב- $50 \mu\text{l}$ מים.

2.3 שיטות עבודה עם חלבונים

2.3.1 הפרדת חלבונים באלקטרופורזה בג'ל אקרילאמיד בנוכחות SDS (SDS-PAGE)

שימוש בשיטה זו של הפרדת חלבונים נעשה באופן סטנדרטי עפ"י (Laemmli (1970). שיטה זו מתבססת על הפרדת החלבונים השונים בשדה החשמלי ע"פ גודלם. החלבונים מוטענים ע"ג ג'ל פוליאקרילאמיד ומופרדים בשדה חשמלי לאחר שעברו דנטורציה עם SDS והרתחה. עוטף את החלבונים במטענים שליליים, כתוצאה מכך מתאפשרת תנועתם בתוך הג'ל בכוח השדה החשמלי לעבר האנודה. הפרדת החלבונים היא ע"פ גודלם בלבד, חלבונים קטנים ינועו מהר יותר בהשוואה לחלבונים גדולים. ההפרדה נעשתה במכשיר Mini-Protean של חברת Bio-Rad. נעשה שימוש בג'ל בריכוז של 12% אקרילאמיד המורכב משתי שכבות של ג'לים המפורטים ע"פ סדר הכנתם. ג'ל הפרדה (תחתון) Separating gel המכיל:

$1.05 \text{ ml Separating bufferX4}$: (0.123 M Tris-HCl pH 6.8, $0.4\% \text{ SDS}$), $1.7 \text{ ml ddH}_2\text{O}$, $1.35 \text{ ml } 30\% \text{ Acrylamide}$, $2.5 \mu\text{l TEMED}$, $61.5 \mu\text{l APS}$.

וגיל הטענה (עליון) Stacking gel המכיל:

0.49ml Stacking bufferX4: (0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS), 1.1 ml ddH₂O,
5.5 µl TEMED, 31 µl APS, 0.33 ml Acrylamide.

לתמיסות החלבונים הנבדקות הוסף (Laemmli Sample buffer x 4) בופר דוגמא ביחס של
1:3 (Laemmli, 1970). התערובת הורתחה למשך 5 דקות והוטענה על הגיל. ההרצה נעשתה

עם בופר הפרדה X1 Running buffer:

(Tris 15.132 g/liter, Glycine 71.31g/liter, SDS 5 g/liter pH 8.3) לתוכנית הבאה - 20

דקות ראשונות ב- 120 V, ו- 40 דקות אחרונות ב- 170 V.

2.3.2 צביעת חלבונים ע"י Coomassie Blue

עם סיום ההפרדה הגיל מועבר לצביעה למשך 30 דקות בטלטול איטי עם תמיסת Coomassie Brilliant blue (0.1% coomassie Brilliant Blue R-250, 45% Methanol, 10% acetic acid). צביעה זו צובעת את כל החלבונים באופן לא ספציפי. לאחר הצביעה תמיסת הצבע מסולקת ומוספת תמיסת מימית של destaining (45% Methanol, 10% acetic acid). הגיל המצוי בתמיסה טולטל באיטיות למשך מספר שעות עד לזיהוי ברור של החלבונים בגיל.

2.3.3 אנליזת Western blot

שימוש בשיטת ה- Western blot נעשה באופן סטנדרטי כמתואר ע"י Towbin וחובריו (1979). שיטה זו מאפשרת זיהוי של החלבון הנבדק באמצעות שימוש בנוגדן ספציפי כנגדו. העבודה בשיטה זו נעשתה בהתאם לשלבים הבאים:

1. הרצת גיל SDS-PAGE עם דוגמאות החלבון.

2. העברת החלבונים לממברנת ניטרולולוז (NC) בוצעה בבופר העברה
(38 mM Glycine, 48 mM Tris, 1.3 mM SDS, 20% methanol) בזרם של כ- 250 mA במשך

45 דקות ע"י מכשיר CSL Semi Dry Blotting Unit של חברת Cleaver Scientific.

3. חסימת האתרים הפנויים בממברנה (blocking) על ידי טלטול הממברנה למשך שתיים בטמפ' החדר בתמיסה המכילה 5% אבקת חלב בבופר 20 Tris-buffered saline-Tween (TBST).

(2 M Tris HCl pH 8, 5 M NaCl, Tween 20).

4. הגבת הממברנה עם הנוגדן הראשוני במיהול 1:500 בתמיסת TBST עם 5% אבקת חלב למשך הלילה בטמפרטורת החדר (רשימת נוגדנים מפורטת בהמשך). בחלק מהניסויים הוסף לתמיסה 1 גרם כתש צמחי לשם הורדת קישור נוגדנים לא ספציפיים לחלבונים צמחיים.

5. שלוש שטיפות של חמש דקות כל אחת והעברה של הממברנה אל תמיסת TBST עם 5% אבקת

חלב, אליה הוסף נוגדן שניוני anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphate Conjugate (Sigma) במיהול

1:10,000.

6. טלטול למשך שעה בטמפ' החדר ושטיפת הממברנה שלוש פעמים למשך חמש דקות לסילוק שאריות הנוגדנים שלא נקשרו. העברת הממברנה לתמיסה המכילה בופר סובסטרט (NBT) + סובסטרט (BCIP) (Promega) לאנזים אלקלין פוספטאז.
7. פיתוח הריאקציה נעשה בחושך תוך כדי טלטול איטי במשך 10-1 דקות, הריאקציה מופסקת ע"י שטיפה של הממברנה במים.

2.3.4 הפקת חלבונים מצמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה

חלבונים הופקו מצמחי וינקה בעלי תסמינים אופייניים לנגיעות בפיטופלסמה. עורקים ראשיים של עלים נכתשו בחנקן נוזלי בעזרת מכתש ועלי עד לקבלת אבקה אחידה. אבקה זו הועברה למבחנה אפנדורף של 1.5 ml, המכילה בופר ESB:
7.5% β -mercaptoethanol, 4.5% SDS, 9 M Urea, 75 mM Tris pH 6.8, ביחס של 1:1 למסת האבקה. הפרדת שברי התאים משאר החלבונים נעשתה ע"י סרכוז במהירות 13,000 rpm למשך 6 דקות. תרחיף הדוגמאות הועבר למבחנה חדשה, שהוסף לה 4 x Sample Buffer (0.25 M Tris pH 6.8, 40% Glycerol, 8% SDS, 20% β -mercaptoethanol, 0.05% Bromophenolblue ביחס של 3:1).

2.4 הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb

נוגדנים רב שבטיים בארנבת כנגד הפיטופלסמה AWb הוכנו בעזרת שימוש בשתי גישות הנבדלות בסוג האנטיגנים המשמשים ליצירת נוגדנים:
שימוש בתעשיר של הפיטופלסמה שהופק ממיצוי צמחים נגועים.
שימוש בחלבון ממברנלי של הפיטופלסמה שבוטא בחיידקי *E. coli*.

2.4.1 שימוש בתעשיר פיטופלסמה שהופק ממיצוי צמחים נגועים

2.4.1.1 הכנת תעשיר של פיטופלסמה AWb מצמחי וינקה

תעשיר פיטופלסמה AWb מצמחי וינקה הוכן לפי השיטה שפותחה ע"י Clark וחובריו (1989) תוך הכנסת מספר שינויים לפרוטוקול השיטה. חמישה עשר גרם עורקים של צמחי וינקה נגועים נשטפו למשך 60 דקות במים זורמים. עורקים אלו יובשו ונכתשו בעזרת מכתש ועלי בחנקן נוזלי עד לקבלת אבקה. האבקה שהתקבלה הוספה ל- 60 ml בופר GM (0.3 M glycine-NaOH, pH 8.0 ו- 0.2 M $MgCl_2$) שהוסף לו 0.2% sodium thioglycolate. לשם ניקוי התמיסה משברי תאים צמחיים התמיסה הועברה דרך שתי שכבות של פד גזה ועברה סרכוז במהירות התחלתית של 2000 g למשך חמש דקות ולאחר מכן מהירות של 8000 g לעוד 20 דקות. תרחיף הדוגמא נלקח למבחנת צנטריפוגה חדשה. במבחנה זו חלקיקי החיידק עברו שיקוע בעזרת הוספת PEG 6000 עד לריכוז סופי של 60 g/liter ואינקובציה למשך שעה בקרח. המשקע נאסף בעזרת סרכוז במהירות של 9000 g למשך 40 דקות והורחף ב- 6 ml בופר A (0.05 M boric acid, 4 M NaCl, pH 9.0). לשם ניקוי התרחיף משאריות PEG התמיסה הועברה דרך קולונת Sepharose CL-4B (ma-aldrich) בנפח של 15 ml (כדוריות

הספרוז במדיום הנייח עברו הרחפה עד להגעה לשיווי משקל עם בופר A לפני הרצת הדוגמא בקולונה). התרחיף נאסף לאחר יציאתו מהקולונה בפרקציות בנפח 0.5 ml כל אחת. ריכוז החלבון בפרקציות אלה נמדד בעזרת קריאת הבליעה באורך גל האופייני לחלבונים של 280 nm במכשיר NanoDrop. כלל הפרקציות שהכילו חלבונים אוחדו לתמיסה אחת בנפח 10 ml. תמיסה זו עברה ניקוי בעזרת סרכוז במהירות 2000 g למשך 5 דקות. התרחיף שהתקבל עבר השקעה אימונית של אנטיגנים השייכים לצמח בעזרת אינקובציה עם 500 µl אנטי-סרום, שהוכן בארנבת כנגד מיצוי של צמח בריא למשך שעה בטמפרטורה של 37°C. ניקוי צברי נוגדן-אנטיגן שנוצרו בוצע בעזרת סרכוז במהירות 2000 g למשך 5 דקות. תרחיף הדוגמא הועבר בקולונת rProtein A Sepharose-Fast flow (חברת GE Healthcare Bio-Sciences AB) בנפח 1 ml לשם סילוק שאריות נוגדני IgG הקשורים לאנטיגנים מהצמח ונוגדני IgG בלתי קשורים. תרחיף זה עבר סרכוז באולטרה-צנטריפוגה במהירות 27,000 rpm (רוטור TY-30) למשך שעה. מסרכוז זה נלקח המשקע והורחף ב-1 ml בופר PBS (136 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.14 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4).

2.4.1.2 הכנת נוגדן רב שבטי בארנבת כנגד פיטופלסמה AWb

בכל הזרקה הוזרקה תמיסה של 1 ml תעשיר או תמיסה של 1 mg מהחלבון הרקומביננטי AWb-Ap. דוגמא ראשונית של 2 ml דם הוקזה מאוזן הארנבת לפני ההזרקה הראשונה ושימשה כביקורת (Pre-immune serum) לנוגדן אותו נפיק.

1. הזרקה ראשונה לארנבת: תמיסת תעשיר/חלבון בנפח של 1 ml עורבבה עם נפח זהה של Complete Freund's adjuvant (Sigma) עד ליצירת אמולסיה אחידה. התמיסה המעורבת הוזרקה לשריר הירך בארנבת.
2. נערכו 3 הזרקות נוספות בהפרשים של שבועיים בין כל הזרקה. בכל הזרקה 500 µl תמיסת תעשיר עורבבה עם נפח זהה של Incomplete Freund's adjuvant (Sigma) עד ליצירת אמולסיה אחידה. התמיסה המעורבת הוזרקה לשריר הירך בארנבת (ההזרקות והקזות הדם בוצעו ע"י טכנאית המעבדה).
3. שבוע לאחר ההזרקה השלישית והרביעית הוקזו כ- 10 ml דם מהארנבת. הדם הוקז מאוזן הארנבת והועבר לטמפי של 4°C למשך הלילה. הנסיוב הופרד מן הקריש בסרכוז במהירות 10,000 g למשך 10 דקות בטמפי של 4°C. לנסיוב שהופק הוסף Azid בריכוז סופי של 0.02% כחומר משמר המונע גידול של חיידקי גראם שליליים. לנסיוב הוסף 20% גליצרול והוא נשמר בטמפרטורה של -20°C. איכות הנוגדנים נבחנה בשיטת Western-blot.

2.4.2 שימוש בחלבון ממברנלי של הפיטופלסמה שבוטא בחיידקי *E. coli*

2.4.2.1 שיבוט גן ממברנלי אנטיגני מהפיטופלסמה AWb

גן לחלבון ממברנלי אנטיגני של פיטופלסמה מסוג Sweet potato witches' broom (SPWB) בודד ושובט בעבר ע"י Yen-Ling וחובריו (1998). פיטופלסמה מסוג SPWB משתייכת לקבוצת

הפיטופלסמה 16SrII (Peanut WB group). בנוסף לכך Yen-Ling וחבריו הראו את נוכחותו של גן הומולוגי בפיטופלסמה Peanut Witches' broom (PWb) לחלבון הממברנלי האנטיגני בפיטופלסמה SPWB. הימצאותו של גן לחלבון ממברנלי אנטיגני בשני סוגי פיטופלסמה השייכות לקבוצת ה-16SrII מצביעה על פונקציה שמורה לחלבון זה. בהתבסס על רצף גן לחלבון זה מפיטופלסמה SPWB (Accession Number U15224) תוכנו התחלים F_SPWB ו-R_SPWB להגברת גן זה מפיטופלסמה AW. תוצרי ה-PCR נחתכו מגיל ונוקו בעזרת UltraClean 15 (MO BIO Laboratories). תוצר הראקציה המנוקה עבר איחוי (ליגציה) לפלסמיד pGEM_T easy (Promega). תוצר האיחוי שובט בעזרת טרנספורמציה לתאי *E. coli* מזן DH5- α . סלקציה של מושבות חיידקים שקיבלו את הפלסמיד pGEM_T easy נעשתה ע"י גידול המושבות על צלחת LB המכילה אמפצילין. סריקת המושבות בעלות סבירות להכלת המחדר (מושבות לבנות בצלחת כחול/לבן) נעשה בעזרת הפקת הפלסמידים בשיטה אלקלית וחיתוך ה-DNA הפלסמידי באנזים ההגבלה EcoRI. הפקת שבט הפלסמידים לצורך ריצוף נעשה בעזרת DNA-spin (חברת iNtRON). שבט הפלסמידים המנוקה נשלח לריצוף המחדר במעבדת שרות של חברת Hy-Labs. רצף המחדר הושווה לרצפי חומצות הגרעין הקיימים במאגר הגנים (NCBI) באמצעות תוכנת Blast.

2.4.2.2 שיבוט הגן לחלבון AWb-Ap בפלסמיד pET-28a לביטוי חלבונים

אתרי החיתוך לאנזימי הגבלה NdeI ו-XhoI הוספו לתוצר הגברת הגן AWb-Ap בקצוות 5' ו-3' בהתאמה בעזרת ביצוע תגובת הגברה ב-PCR עם תחלים F_SPWB ו-R_SPWB. אתרי החיתוך לאנזימי ההגבלה הני"ל נוספו לצורך התאמת מקטע הגן המוגבר לכניסה למקטע ה-polylinker של הפלסמיד pET-28a. בנוסף לכך התחלים תוכנו כך שתישמר מסגרת הקריאה של הגן המשועתק והנמצא תחת פרומוטור של T7 RNA polymerase. לחלבון הרקומביננטי אוחה קטע של 20 חומצות אמינו בקצה האמיני של החלבון (N-terminal) הכולל His-Tag המכיל שישה היסטדינים רצופים. מקטע הגן נחתך בעזרת אנזימי ההגבלה NdeI ו-XhoI משבט הפלסמידים שרוצף והכיל את מחדר הגן לחלבון AWb-Ap. במקביל בוצע חיתוך של הפלסמיד pET-28a באותם אנזימי הגבלה. תוצרי החיתוך הופרדו לפי גודלם בעזרת אלקטרופורוזה בג'ל 1% אגרוז בבופר TAE_{x0.5} (40 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA, 0.1142 % acetic acid). תוצרי החיתוך הרצויים נחתכו מהגיל ונוקו בעזרת UltraClean 15 (MO BIO Laboratories) ועברו איחוי (ליגציה) לפלסמיד pET-28a חתוך ומנוקה. לאחר טרנספורמציה לחיידקי *E. coli* קומפנטיים מהקו BL21 (Novagen) נעשתה סלקציה למושבות בעלות הפלסמיד הרצוי בעזרת זריעת החיידקים הטרנספורמנטים על צלחת LB המכילה אנטיביוטיקה Kanamycin. סריקת המושבות בעלות המחדר בוצעה בעזרת PCR עם התחלים F_SPWB ו-R_SPWB על המושבות הנסרקות. מושבות שנמצאו כמכילות את הגן שמקודד לחלבון AWb-Ap נלקחו לבדיקת ביטוי חלבונים.

2.4.2.3 ביטוי של חלבון AWb-Ap בחיידקים

חיידקי *E. coli* מהקו BL21 (Novagen) שהכילו את הפלסמיד הרקומביננטי pET-28a, המכיל את הגן AWb-Ap שימשו לביטוי של החלבון. החיידקים גודלו במצע LB בתוספת אנטיביוטיקה Kanamycin בריכוז 50 mg/l למשך 12 שעות בטמפי של 37°C. 100 µl של תרחיף חיידקים הועברו למצע LB טרי בנפח 10 ml וגודלו עד לבליעה של 0.2-0.3 O.D. הוסף להם IPTG בריכוז סופי של 1 mM לקבלת ביטוי מוגבר של חלבון. החיידקים גודלו 3-4 שעות נוספות ב-28°C ולאחר מכן סורכו במהירות 5000 g למשך 15 דקות ב-4°C. לצורך הפקת החלבון המבוטא, המשקע הורחף ב-1 ml בופר הרחפה: (6 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.6). החיידקים עברו שבירה ע"י שלוש חזרות של הקפאה בחנקן נוזלי והפשרה באמבט מים. לאחר מכן הוסף ליזוזים לריכוז סופי של 2 mM. הריאקציה הודגרה 10 דקות בטמפי החדר ואחרי כן הונחה בקרח למשך 15 דקות. הדוגמא עברה טיפול בגלי סוני (סוניקציה) על מנת לבצע פרוק נוסף של החיידקים ולצורך פרוק "גופיפי החסגר" (Inclusion-body) הנוצרים במצב של ביטוי יתר של חלבונים בחיידקים. המיצוי החיידקי סורכו במהירות של 5000 g למשך 10 דקות והנוזל העליון נאסף ונשמר בטמפי של 4°C. דוגמאות מיצוי חלבוני החיידקים הופרדו באלקטרופורזה בגיל 12% אקרילאמיד בנוכחות SDS (SDS-PAGE) ונצבעו בעזרת Coomassie Blue. נוכחות החלבון AWb-Ap במיצוי החלבוני אושרה בעזרת ביצוע אנליזת Western blot עם נוגדן ראשוני חד-שבטי כנגד רצף ה-His-Tag (Sigma). פס החלבון מוצה מהגיל בעזרת הקיט GeBAflex-tube (חברת GeBA). תמיסת החלבון עברה סילוק משאריות SDS ודיאליזה בבופר PBS בעזרת הקיט GeBAflex-tube (GeBA). הכנת נוגדן רב שבטי בארנבת כנגד החלבון הרקומביננטי AWb-Ap נעשתה על פי סעיף 2.4.1.2.

2.5 שיטות עבודה עם DNA

2.5.1 מיצוי DNA

כלל ה-DNA מצמחי וינקה נגועים ובריאים הופק מעורקים של עלי מבלע בקודקודי הצמיחה. מאתיים מיליגרם עורקים נכתשו בעזרת מכתש ועלי בחנקן נוזלי עד לקבלת אבקה. האבקה שהתקבלה הוספה ל-1.2 ml בופר CTAB: (20 mM EDTA pH 8, 100 mM Tris pH 8, 2M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP, 0.5% β-mercaptoethanol) לשם פירוק ממברנות התאים. דוגמאות הכתישה עברו אינקובציה באמבט מים בטמפרטורה 65°C למשך 30 דקות. השקעת שברי התאים בוצעה בעזרת סרכוז הדוגמאות במהירות 13,000 rpm למשך חמש דקות. התרחיף שהתקבל מכל דוגמא עבר ניקוי מחלבונים בעזרת הוספת נפח זהה של Chloroform:Isoamyl alcohol ביחס של 1:24 וערבוב במשך שתי דקות. הפרדת השכבות בוצעה בעזרת סרכוז במהירות 13,000 rpm למשך חמש דקות. השכבה העליונה נלקחה להשקעה של כלל חומצות הגרעין בעזרת הוספת 0.7 נפח של Isopropanol למשך לילה בטמפרטורה של 20°C-. המשקע נאסף בעזרת סרכוז במהירות 13,000 rpm למשך 20 דקות בטמפרטורה של 4°C, ועבר שטיפה ממלחים בעזרת 500 µl 70% אתנול וסרכוז

במהירות 13,000 rpm למשך 10 דקות בטמפרטורת החדר. המשקע עבר יבוש משאריות אתנול בעזרת וואקום והורחף לאחר מכן ב- 40µl מים סטריליים, שעברו ניקוי ב-HPLC.

2.5.2 זיהוי בשיטה מולקולארית (PCR)

שיטת Polymerase Chain Reaction (PCR) משמשת להגברת קטע חומצת גרעין דו גדילית (DNA) ספציפי בעזרת זוג תחלים (primers) ספציפיים ותבנית DNA מתאימה. ספציפיות ההגברה נקבעת על ידי הרצפים של זוג התחלים, התואמים לקצוות הקטע הרצוי להגברה. זוגות התחלים השונים, תנאי שלבי ההגברה של כל זוג ומיקומם באופרון הריבוזומאלי מפורטים בטבלא 1, 2 ותמונה 3 בהתאמה. ריאקציה ה-PCR בוצעה בעזרת מכשיר Thermocycler בשם PCT-100 Programable Thermal Controller (MJ Research). תערובת ריאקציה ה-PCR בנפח של 25 µl הכילה: R. Buffer 2.5 µl (Fermentas), 1 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1 mM Tris pH 6.8, 0.1142% acetic acid, 40 mM Tris pH 6.8, 1 mM Na₂EDTA, 0.1142% acetic acid) ונראו בעזרת צביעה באתידיום ברומיד וצילום תחת מנורת UV. סמני הגודל (BstEII) DNA/Eco9II (λ) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) שימשו להערכת גודל מקטעי ה-DNA בגיל. סמן λ מכיל מקטעים בגדלים: 2323, 3675, 4324, 4822, 5687, 6369, 7242, 8453, 702, 1264, 1371, 1929, 800, 900, 1031, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 80 זוגות בסיסים.

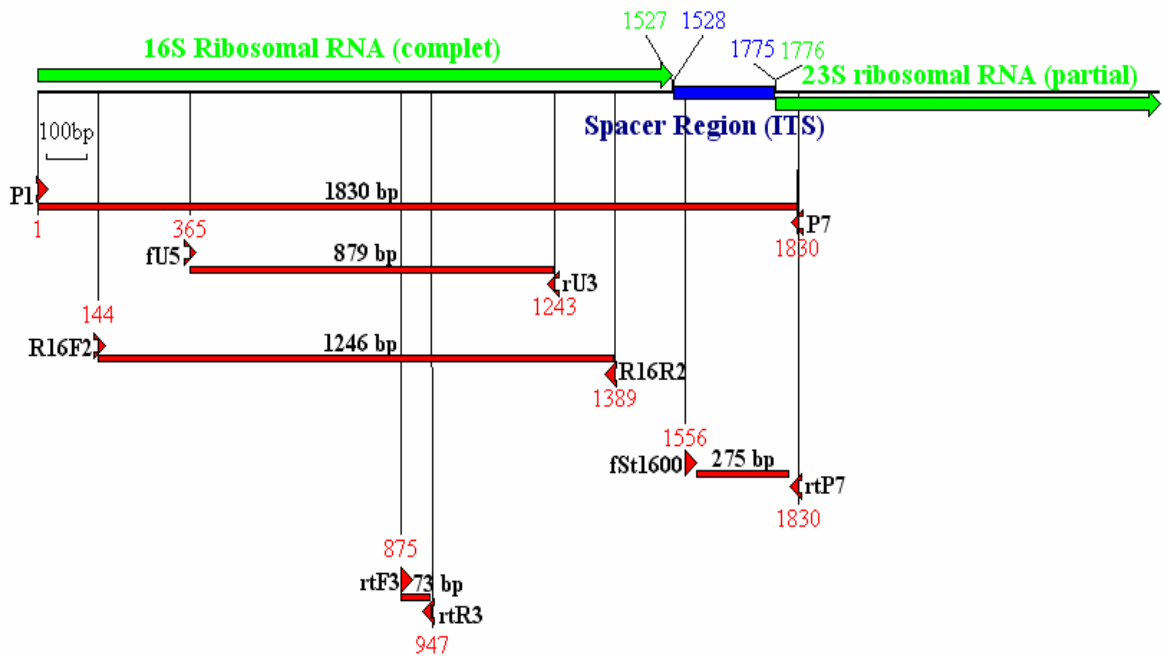
2.5.3 זיהוי בעזרת nested-PCR

שיטת ה-nested-PCR זהה באופן ביצועה ומהלכה לשיטת ה-PCR למעט תבנית ה-DNA שמשמשת להגברה. בשיטה זו בשונה מ-PCR משתמשים במיהול של תוצר הגברה ראשוני המכיל בתוכו אתרים הומולוגיים מתאימים לזוג התחלים ב-nested-PCR. בעבודה זו בוצעה הגברה ראשונית של קטע DNA בעזרת התחלים P1/P7 המניבים מקטע בגודל 1830 bp, המקודד לגן ל-16S rRNA, DNA spacer region tRNA-Ile, 16S/23S rDNA, ו-23S rRNA. תוצר ההגברה הראשוני במיהול של 1:30 שימש כתבנית לשם ביצוע nested-PCR בעזרת אחד מזוגות התחלים fU5/rU3, rtF3/P7, fSt_1600/rtP7 או R16F2/R16R2.

טבלא 1: רשימת תחלים

שם התחל	רצף	כיוון התחל	גן מוגבר	מקור ספרותי	נוכחות אתרי חיתוך
P1	5'-AAG AAT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T -3'	+	16S rRNA	(Deng, 1991a)	
P7	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'	-	23S rRNA	(Deng, 1991a)	
fU5	5'-CGG CAA TGG AGG AAA CT-3'	+	16S rRNA	(Lorenz et al., 1995)	
rU3	5'-TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA-3'	-	16S rRNA	(Lorenz et al., 1995)	
R16F2	5'-ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3'	+	16S rRNA	(Lee, 1993)	
R16R2	5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'	-	16S rRNA	(Lee, 1993)	
rtF3	5'-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3'	+	16S rRNA	*	
rtR3	5'-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3'	-	16S rRNA	*	
F18S	5'-GAC TAC GTC CCT GCC CTT TG-3'	+	18S rRNA	Christensen et) (al., 2004	
R18S	5'-AAC ACT TCA CCG GAC CAT TCA-3'	-	18S rRNA	Christensen et) (al., 2004	
F_SPWB	5'-AGC CAT ATG ATG AAT CAC AAA GAA AAT TTT TTA C-3'	+		*	NdeI
R_SPWB	5'-ACG CTC GAG TTA TGA TTG TAC TTT TAA GTC TGT TTT AG-3'	-		*	XhoI
fSt_1600	5'-GAG AGA CTT AAG AAA GTT TTT CAT TTT TTA-3'	+	16S-23S spacer region	*	
rtP7	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT AGT GC-3'	-	23S rRNA	*	

* , תחלים שתוכננו על ידי.



תמונה 3: תחלים ריבוזומליים- מיקום כלל התחלים ששימשו להגברת גנים באיזור האופרון הריבוזומלי של פיטופלסמה ותוצרי ההגברה שהתקבלו מכל זוג תחלים.

טבלא 2: תנאי הגברה ב-PCR

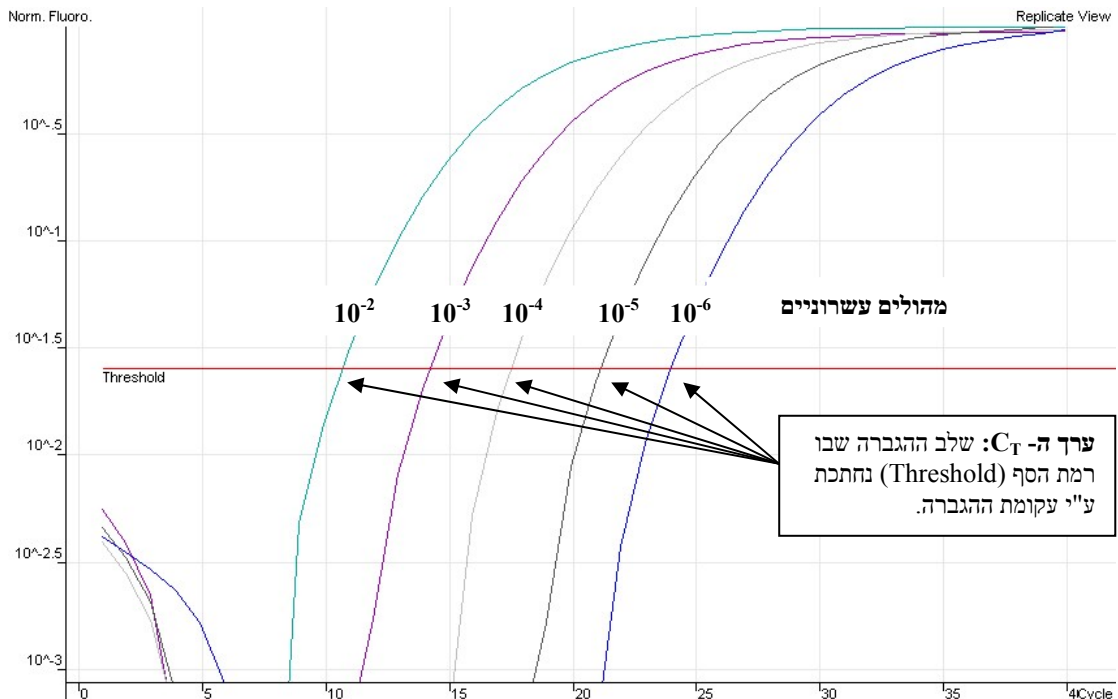
זוג תחלים						גודל [bp]	תוצרי הגברה
rtF3/P7	F_SPWB R_SPWB	fSt1600/rtP7	fU5/rU3	R16F2/ R16R2	P1/P7		
95						טמפרטורה (°C)	שילפי הגברה (שילפים 2-4 בוצעו 31 פעם)
5						זמן (דקות)	
94						טמפרטורה (°C)	
30						זמן (שניות)	
55	55	60	55	57	55	טמפרטורה (°C)	
30						זמן (שניות)	
72						טמפרטורה (°C)	
60	45	30	45	75	105	זמן (שניות)	
72						טמפרטורה (°C)	
5						זמן (דקות)	
950	528	230	879	1246	1830		
חלק ג- 23S rRNA וכל 16S rRNA spacer region	חלבון ממברנלי אימונו דומיננטי	חלק ג- 23S spacer region ו- 16S rRNA	חלק ג- 16S rRNA	חלק ג- 16S rRNA	16S rRNA ו- 23S rRNA וכל spacer region	תכולת גנים של פיטופלסמה	

טבלא 3: רשימת שבטים

שבת	גודל המחדר (bp)	מקור ומאפייני המחדר	אופן קבלת המחדר	אתרי איחוי לפלסמיד המקור
pGEM-T_AWb-Ap_366	528	רצף הגן לחלבון האימונודומיננטי AWb- Ap של פיטופלסמה מגזע AWb	תוצר PCR עם תחלים F_SPWB/R_SPWB	הבסיס (T) בשני קצוות הפלסמיד pGEM-T easy (Promega)
pET-28a_AWb-Ap_367	519	רצף הגן לחלבון האימונודומיננטי AWb- Ap של פיטופלסמה מגזע AWb	שבט pGEM-T_AWb- Ap_366 חתוך באנזימי NdeI ההגבלה XhoI ו-	NdeI בקצה 5' ו- XhoI בקצה 3' של המחדר
pGEM-T_CPs_370	950	קטע ריבוזומלי הכולל חלקים מהגנים 16S rRNA ו- 23S rRNA וכל 16S-23S spacer region של החיידק <i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	תוצר PCR עם תחלים rtF3 ו- p7	הבסיס (T) בשני קצוות הפלסמיד pGEM-T easy (Promega)
pGEM-T_AWb_249	1246	קטע ריבוזומלי הכולל חלק מהגן 16S rRNA של הפיטופלסמה מגזע AWb	תוצר PCR עם תחלים R16R16F2/R16R2	הבסיס (T) בשני קצוות הפלסמיד pGEM-T easy (Promega)

Real Time PCR 2.5.4

שיטת ה- Quantitative Real-Time PCR מסוג SYBR Green מאפשרת כימות של תבניות DNA רצויות בדוגמת מיצוי DNA צמחי. בדומה לריאקצית PCR שיטה זו משתמשת בזוג תחלים לשם הגברת קטע DNA ספציפי. בשיטה זו תערובת הריאקציה כוללת מולקולות צבע מסוג SYBR Green. עוצמת הפלורוסנציה הנפלטת נמצאת ביחס ישר לכמות תוצרי ההגברה. על כן כימות יחסי של תוצרי ההגברה בכל מחזור במהלך הריאקציה מתאפשר על ידי מדידת עוצמת הפלורוסנציה. ערכי הפלורוסנציה הנמדדים שורטטו בגרף חצי לוגריתמי כפונקציה של שלב ההגברה (תמונה 4). השוואה בין דוגמאות שונות נעשתה בעזרת קביעת ערך סף (Threshold) אחיד לפלורוסנציה. ערך הסף שנבחר צריך להימצא בשלב ההגברה האקספוננציאלי ומעל לערכי הפלורוסנציה של רעש הרקע. שלב ההגברה שבו רמת הסף נחתכת ע"י עקומות ההגברה הוגדר כערך ה- C_T . ערכי C_T המתקבלים נמצאים ביחס הפוך לריכוז תבניות ה-DNA המתאימות בדוגמא הנבדקת (תמונה 4). כימות מדויק של תבניות ה-DNA שעברו הגברה התאפשר על ידי השוואה לעקומת כיוול. עקומת כיוול זו התקבלה על ידי ביצוע ניסוי Real-Time PCR מקדים לסדרת מהולים של דוגמא בעלת מספר תבניות DNA ידועות. התאמה בין דוגמאות הניסוי לעקומת הכיוול בעזרת הרצה של דוגמת סטנדרט עם ריכוז ידוע של תבניות DNA מתאימות.



תמונה 4: ערכי פלורוסנציה בסקלה לוגריתמית כפונקציה של שלב ההגברה. לדוגמאות בעלות מהול גדול יותר מתאים ערך C_T גבוה יותר.

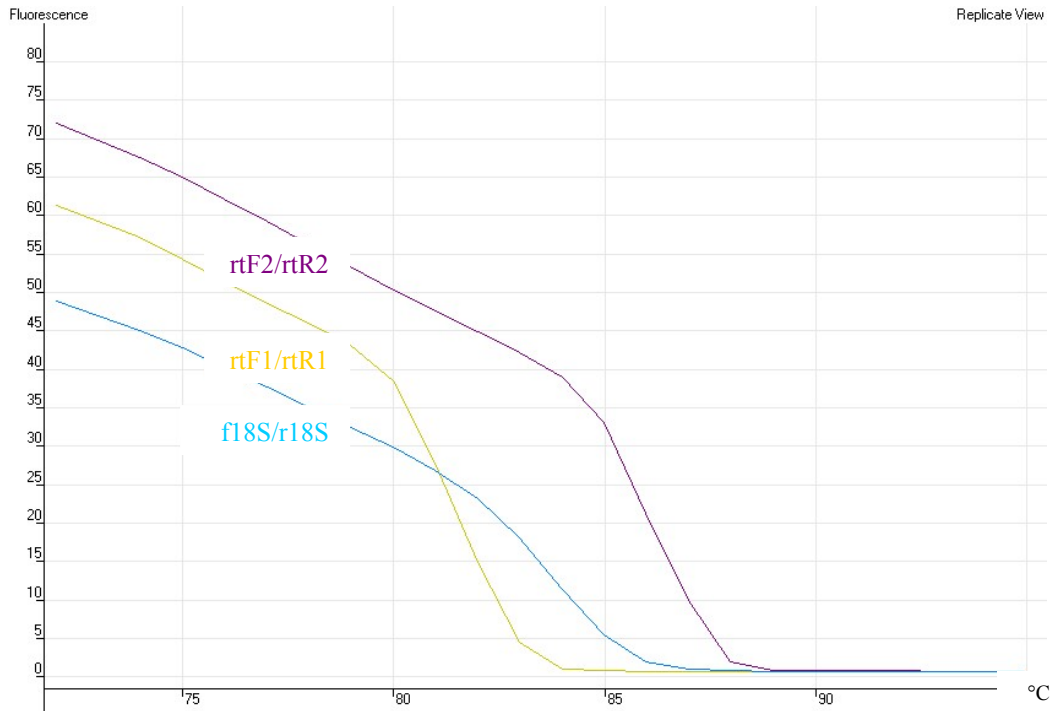
רצף הגנים ל-RNA הריבוזומלי מכיל מאפיינים שמורים במעקובת הרצף ובמבנה לכל קבוצת אורגניזמים. על כן כימות עותקי גנים אלו יכול לשמש לכימות מספר הגנומים בדוגמא. במחקר זה נעשתה הגברה לקטע של 88 bp מהגן הריבוזומלי 16S של הפיטופלסמה בעזרת התחלים rtF3 ו-rtR3. רצפי המעקובת של תחלים אלו נבחרו לאחר השוואה ומציאה של איזורים שמורים, המשותפים ל-32 רצפי גנים המקודדים ל-16S rDNA מגזעי פיטופלסמה שונים הכוללים את כלל קבוצות הפיטופלסמה.

בנוסף לכך לשם השוואה בין דוגמאות מיצוי DNA שונות נעשתה הגברה של גן ייחוס במקביל להגברת הגן הנבדק על כלל הדוגמאות. גן הייחוס ששימש בניסוי מקודד לגן הריבוזומלי 18S הצמחי. גן זה הוגבר בעזרת התחלים f18S ו-r18S ששימשו בעבר להגברת גן ייחוס לשם כימות פיטופלסמה (Christensen et al., 2004).

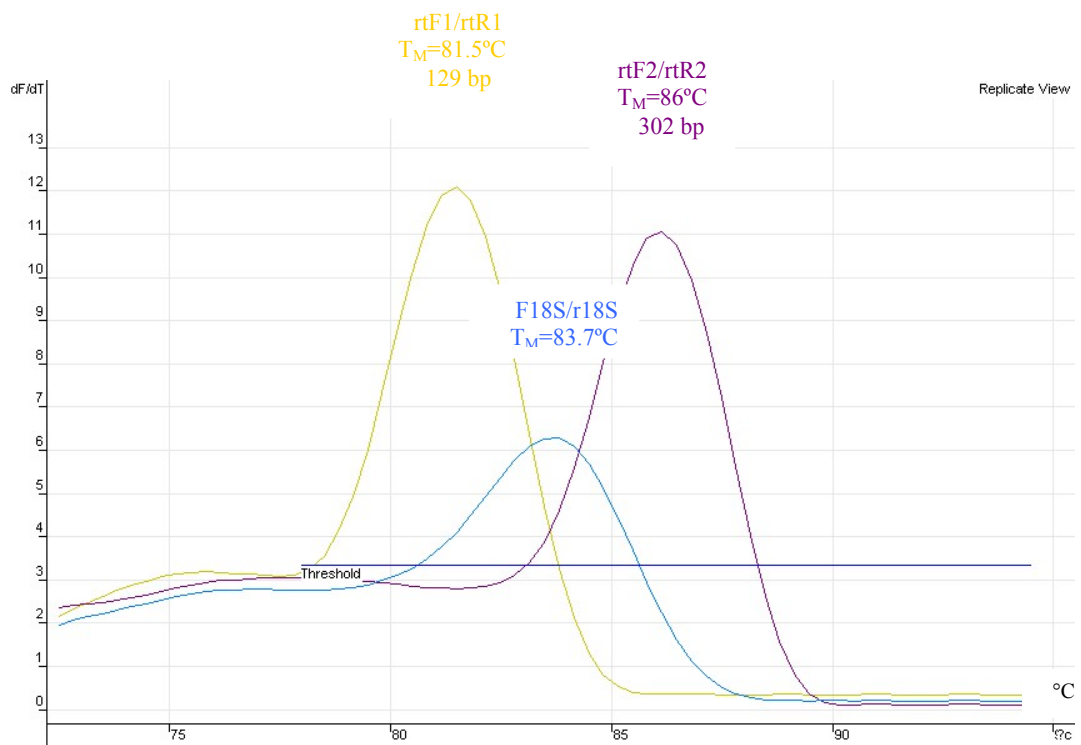
ריאקציה ה-Real-Time PCR בוצעה בעזרת המכשיר Rotor-Gene 6 (Corbett Research). תערובת הריאקציה הכילה 15 µl הכוללים: Absolute Sybr-Mix Rox (Tamar) 7.5 µl, 175 nM מתחל rtF3 או f18S, 250 nM מתחל rtR3 או r18S ו-1 µl מדוגמת מיצוי ה-DNA במיהול של 1:10. הריאקציה כללה 40 מחזורים הכוללים: הפרדת זוג הגדילים בטמפרטורה של 95°C למשך 10 שניות, צימוד התחלים לגדילי תבניות ה-DNA המתאימים בטמפרטורה של 60°C למשך 15 שניות, הארכת תוצרי הצימוד בטמפרטורה של 72°C למשך 20 שניות וקריאת הפלורוסנציה האופיינית למולקולות צבע SYBR-Green המשולבות בתוצרי ההגברה. בהתחלת הריאקציה נוסף שלב של הפרדה ראשונית של כלל זוגות ה-DNA בטמפרטורה של 95°C, שנמשך 15 דקות לשם הפעלה של Hot-Start Taq polymerase.

2.5.4.2 עקומת התכה (Melt)

לאחר סיום שלבי ריאקציה ההגברה הוסף שלב התכה לתוצרי ההגברה. שלב ההתכה הנוסף אפשר את ההתבוננות בקינטיקה של הפרדת גדילי תוצרי ההגברה. בשלב זה הטמפרטורה מועלת בקצב ליניארי והפלורוסנציה של כל דוגמא נמדדת (תמונה 5). העלאת הטמפרטורה גרמה לפתיחה של גדילי תוצרי ההגברה ושחירורן של מולקולות ה-SYBR-Green המשולבות. שחרור מולקולות הצבע תגרום לירידה בעוצמת הפלורוסנציה הנמדדת. הירידה בפלורוסנציה ליחידת זמן (שיפוע הגרף באיור 5) עולה עם ההתקרבות לערך ה- T_m (תמונה 6). ערך ה- T_m הינו הטמפרטורה בה מחצית מכלל אוכלוסיית תוצרי ההגברה עברו הפרדה למצב חד גדילי. לפיכך שיא הירידה בעוצמת הפלורוסנציה ליחידת זמן ימוקם בערך ה- T_m . ערכי ה- T_m מושפעים מאורך והרכב הבסיסים של תוצרי ההגברה. לכן תוצרי הגברה שונים יאופיינו בערכי T_m שונים. ההעלאה נעשתה במחזורים של חימום במעלה אחת ומדידת הפלורוסנציה. המחזורים השונים תוזמנו במרווחים של חמש שניות למעט המחזור הראשון שלפניו נלקח מרווח של 45 שניות.



תמונה 5: השתנות הפלורוסנציה עם עליה ליניארית בטמפרטורת ההתכה בשלושה תוצרי הגברה שונים: rtF1/rtR1, rtF2/rtR2 ו-f18S/r18S.



תמונה 6: שינוי הפלורוסנציה ליחידת זמן עם העלייה בטמפרטורת ההתכה בשלושה תוצרי הגברה שונים: rtF1/rtR1, rtF2/rtR2 ו-f18S/r18S. תוצרי הגברה בעלי אורך גדול יותר מתאים ערך T_M גבוה יותר.

רשימת חומרים

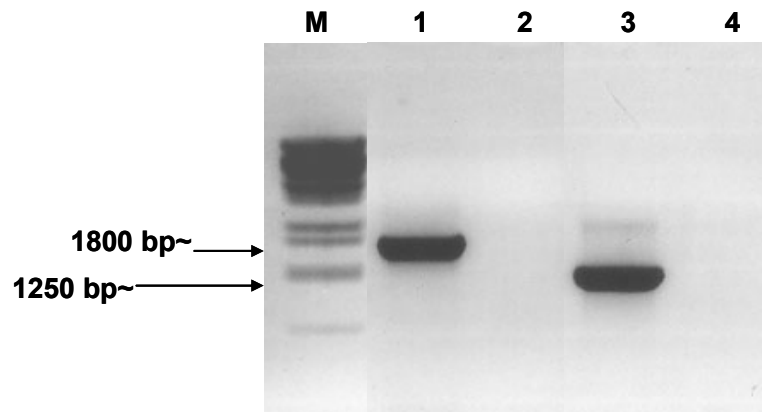
שם (ר"ת)	שם מלא	חברה	עיר	ארץ
Absolute Sybr-Mix Rox		תמר	מבשרת ציון	ישראל
acetic acid		Bio Lab	ירושלים	ישראל
Acrylamide		Sigma	סיינט לואיס	ארה"ב
Ampicillin	Ampicillin sodium	Duchefa Biochemie	הארלם	Netherlands
APS	Ammonium persulfate	Bio Lab	ירושלים	ישראל
Azid	Sodium azide (NaN ₃)	Sigma	סיינט לואיס	ארה"ב
Bacto agar		Becton, Dickinson and company	ניו-ג'רסי	ארה"ב
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	Promega	Madison	ארה"ב
boric acid		Merck	Darmstadt	גרמניה
Bromophenolblue		Bio Rad	Hercules	קנדה
CaCl ₂	Calcium chloride	Sigma	סיינט לואיס	ארה"ב
chloroform		גדות	נתניה	ישראל
Complete Freund's adjuvant		Sigma	סיינט לואיס	ארה"ב
Coomassie	coomassie Brilliant Blue R-250	Bio Rad	Hercules	קנדה
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide	Sigma	סיינט לואיס	ארה"ב
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	Sigma	סיינט לואיס	ארה"ב
dNTP ₃		Bio Lab	ירושלים	ישראל
DTT	Dithiothreitol			
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	Merck	Darmstadt	גרמניה
Ethanol		Bio lab	ירושלים	ישראל
Glycerol		Bio Lab	ירושלים	ישראל
Glycine		Bio Rad	Hercules	קנדה
HCl	Hydrogen chloride	Bio Lab	ירושלים	ישראל
IAA	Isoamyl alcohol	Bio Lab	ירושלים	ישראל
Incomplete Freund's adjuvant		Sigma	סיינט לואיס	ארה"ב
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside	Bio Lab	ירושלים	ישראל
Isopropanol		Bio Lab	ירושלים	ישראל
KAC	Potassium acetate	Merck	Darmstadt	גרמניה
Kanamycin	Kanamycin	Duchefa	Haarlem	Netherlands

		Biochemie	monosulfate	
גרמניה	Darmstadt	Merck	potassium chloride	KCl
גרמניה	Darmstadt	Merck	Potassium dihydrogenphosphate	KH ₂ PO ₄
דרום אפריקה	Conda	Pronadisa Labratorios		LB Broth
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma		Lysozyme
ישראל	ירושלים	Bio Lab		Methanol
גרמניה	Darmstadt	Merck	magnesium chloride	MgCl ₂
בריטניה	Cheshunt			Milk powder
גרמניה	Darmstadt	Merck	Sodium phosphate	Na ₂ HPO ₄
ישראל	נתניה	גדות	sodium chloride	NaCl
ישראל	נתניה	גדות	sodium hydroxide	NaOH
ארה"ב	מדיוסון	Promega	p-nitroblue tetrazolium chloride	NBT
גרמניה	Dassel	Whatman		Nitrocellulose membrane
גרמניה	Darmstadt	Merck	Polyethylene glycol	PEG 6000
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma	phenylmethylsulphonyl fluoride	PMSF
שבדיה	Uppsala	GE Healthcare Bio-Sciences AB	rProtein A Sepharose-Fast flow	Protein A-Sepharose
ארה"ב	Solon	Amreaco	Polyvinylpyrrolidone	PVP (40,000)
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma	Sodium dodecyl sulfate	SDS
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma		Sepharose CL-4B
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma		Sodium thioglycolate
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma	N,N,N,N -Tetramethyl-Ethylenediamine	TEMED
ישראל	ירושלים	Bio Lab	trishydroxymethylaminomethane	Tris
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate	Tween 20
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma	Diaminomethanal	Urea
ישראל	ירושלים	Bio Lab	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside	X-Gal
ארה"ב	סיינט לואיס	Sigma		β-mercaptoethanol

3 תוצאות

3.1 זיהוי פיטופלסמה AWb בצמחי וינקה

צמחי וינקה מקיבוץ אילות המראים סימני נגיעות נבדקו עבור הימצאות פיטופלסמה. סימני נגיעות אלו כללו כלורוזה והקטנת עלים, ריבוי התפצלות עלים, היוצרים דור עלים ופרחים עקרים קטנים וירוקים. דוגמאות מצמחי וינקה אלה נלקחו להפקת DNA. נוכחות פיטופלסמה בצמחי הוינקה הנגועים אושרה בעזרת nested-PCR תוך כדי השימוש בתחלים R16F2/R2 המשמשים להגברת מקטע DNA של הגן 16S rRNA בגודל של כ- 1250 bp (תמונה 7). תוצר ה-PCR בודד, שובט בפלסמיד pGEM_T easy (שבט pGEM-T_AWb_249) והרצף שלו נקבע ע"י חברת Hy-Labs (רחובות, ישראל). השוואת רצף המחדר לרצפי חומצות הגרעין הקיימים במאגר הגנים (NCBI) באמצעות תוכנת Blast הראתה זהות של 98% לרצף הגן 16S rRNA מפיטופלסמה AWb (Accession Number-EF193360).



תמונה 7: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים P1/P7 (באריות 1-2) ו-1 nested-PCR עם התחלים R16F2/R2 שהופרדו באלקטרופורזה בג'ל 1% אגרוז. באריות: M, סמן הגודל DNA/Eco91I (λ) Lambada. 1, דוגמת מיצוי DNA מוינקה החשודה בנגיעות בפיטופלסמה. 2, בקרה שלילית- מים. 3, תוצר PCR המופיע בבארית 1. 4, בקרה שלילית-מים.

3.2 הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb

נוגדנים רב שבטיים של ארנבת כנגד הפיטופלסמה AWb הוכנו בשתי גישות הנבדלות בסוג האנטיגנים:

שימוש בתעשיר של פיטופלסמה שהופק ממיצוי צמחים נגועים.

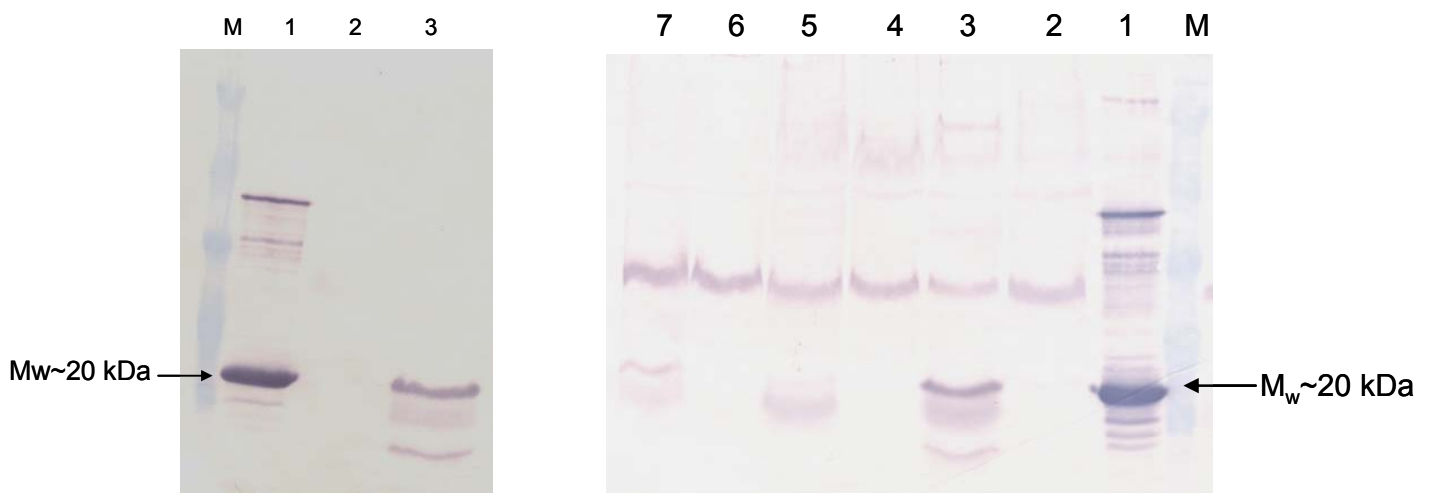
שימוש בחלבון ממברנלי של הפיטופלסמה המבוטא בחיידקי *E. coli*.

3.2.1 הכנת נוגדנים כנגד תעשיר של פיטופלסמה שהופק ממיצוי צמחים נגועים

תעשיר הפיטופלסמה הופק מ-15 גרם עורקים של צמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה AWb כפי שפורט קודם לכן (2.1.1.1 - שיטות וחומרים). לשם יצירת נוגדנים רב-שבטיים הוזרק התעשיר לארנבת כפי שפורט בשיטות וחומרים (סעיף 2.1.1.2).

3.2.1.1 בדיקת יכולת הקישור של הנוגדן הרב-שבטי כנגד תעשיר הפיטופלסמה

יכולת הקישור של הנוגדן הרב-שבטי שהוכן בארנבת כנגד תעשיר הפיטופלסמה נבדקה בעזרת אנליזת Western blot. באנליזה זו נבדקו מיצויי חלבונים מצמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה מהסוג AWb בהשוואה למיצויי חלבונים מצמחי וינקה בריאים. בנוסף לכך נבדקה יכולת הקישור של הנוגדן לחלבון AWb-Ap שבוטא בחיידקי *E. coli*. באנליזה זו הנוגדן זיהה מספר חלבונים בטווח גודל של 15-20 kDa במיצוי של צמחים המודבקים. חלבונים כאלה לא זוהו במיצויי של צמחים בריאים (תמונה 8). בנוסף לכך הנוגדן זיהה בכל הדוגמאות הצמחיות חלבונים נוספים ממקור צמחי. הנוגדן זיהה את החלבון AWb-Ap ממיצוי חיידקי *E. coli*, אם כי בנוסף לזה, הנוגדן זיהה באופן לא ספציפי חלבונים נוספים של חיידקי ה-*E. coli*. שיפור משמעותי בספציפיות הנוגדן התקבל לאחר הוספת 1 גרם כתש צמחי של וינקה בריאה לתמיסה שכללה את הנוגדן הראשוני במהלך אנליזת ה-Western blot (התמיסה מתוארת בשלב 4 בסעיף 2.1.2.2.6) (תמונה 9). שיפור הספציפיות התבטא בזיהוי של שלושה חלבונים בטווח גודל של 15-20 kDa במיצוי מצמח חולה ובהעדר זיהוי של חלבונים במיצוי מצמח בריא. בנוסף לכך הייתה הפחתה בקישור הלא ספציפי לחלבונים של חיידקי ה-*E. coli*.



תמונה 9: ממברנת ניטרולולוז ששימשה לאנליזת Western blot עם נוגדן ראשוני רב שבטי כנגד תעשיר של פיטופלסמה וכתש צמחי. 1, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a עם מחדר לגן AWb-Ap ועברו אינדוקציה עם 0.1mM IPTG. 2, מיצוי חלבונים מצמח וינקה בריא ללא פיטופלסמה. 3, מיצוי חלבונים מצמח וינקה נגוע בפיטופלסמה AWb. **M**, Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

תמונה 8: ממברנת ניטרולולוז ששימשה לאנליזת Western blot עם נוגדן ראשוני רב שבטי כנגד תעשיר של פיטופלסמה. 1, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a עם מחדר לגן AWb-Ap ועברו אינדוקציה עם 0.1mM IPTG. 2,4,6, מיצויי חלבונים משלושה צמחי וינקה בריאים ללא פיטופלסמה. 3,5,7, מיצויי חלבונים משלושה צמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה AWb. **M**, Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

3.2.2 הכנת נוגדנים כנגד חלבון ממברנלי של הפיטופלסמה שבוטא בחיידקי *E. coli*

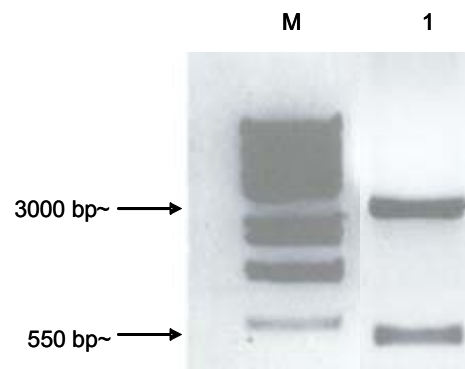
3.2.2.1 שיבוט גן ממברנלי אנטיגני מהפיטופלסמה AWb

גן המקדד לחלבון ממברנלי אנטיגני של פיטופלסמה המסווגת כ-SPWB והנכללת בקבוצת PWb (16SrII) בודד ושובט בעבר ע"י Yu וחבריו (1998). בנוסף לכך קבוצת החוקרים הזו הראתה את נוכחותו של גן הומולוגי בפיטופלסמה PWb. הימצאותו של גן לחלבון ממברנלי אנטיגני בשני סוגי פיטופלסמה השייכות לקבוצת ה-16SrII מצביעה על אפשרות של פונקציה שמורה לחלבון זה. בהתבסס על רצף גן לחלבון זה מפיטופלסמה SPWB (Accession Number U15224) תוכננו התחלים F_SPWB ו-R_SPWB להגברת גן זה מפיטופלסמה AWb. ניסיון הגברת הגן המקודד לחלבון ממברנלי אנטיגני מפיטופלסמה בוצע בעזרת תחלים אלה על שמונה דוגמאות שונות של מיצויי חומצות גרעין מצמחים שונים, שהראו תסמינים של נגיעות בפיטופלסמה (תמונה 10). בתגובת הגברה זו התקבלה הגברה של מקטע בגודל הצפוי (התואם לגודל הגן ההומולוגי בפיטופלסמה SPWB) של כ-530 bp בדוגמא אשר הכילה את הפיטופלסמה AWb. לעומת זאת לא נתקבלה הגברה של מקטע דומה בשאר הדוגמאות שהכילו פיטופלסמות מקבוצות שונות ולא בדוגמאות הביקורת השלילית.



תמונה 10: תוצרי הגברת רצף ה-DNA (PCR) של הגן לחלבון האנטיגני AWb-Ap מופרדים באלקטרופורזה בג'ל 1% אגרוז. תבניות ה-DNA ששימשו להגברת הגן כללו מיצויי DNA שהכילו סוגים שונים של פיטופלסמה. באריות: M, סמן הגודל DNA/Eco91I (λ); 1, St מגפן; 2, St מוינקה; 3, A-WB מוינקה; 4, CP מצלוזיה; 5, CP ממשמש; 6, CP מלימוניום; 7, AY מוינקה; 8, A-WB מוינקה; 9, צמח בריא; 10, בקרה שלילית-מים.

לצורך אפיון תוצר המקטע המוגבר, תוצר ה-PCR שובט בפלסמיד pGEM_T easy (שבט pGEM-T_AWb-Ap_366) (תמונה 11) והרצף שלו נקבע ע"י חברת Hy-Labs (רחובות, ישראל).



תמונה 11: הפרדה באלקטרופורזה בג'ל 1% אגרוז של שבט pGEM-T_AWb-Ap_366 חתוך באנזים ההגבלה EcoRI (בארית 1). M, סמן הגודל DNA/Eco91I (λ).

השוואת רצף המוחדר לרצפי חומצות הגרעין הקיימות במאגר הגנים (NCBI) באמצעות תוכנת Blast הראתה זהות של 85% לרצף הגן לחלבון מפיטופלסמה SPWB שלפיו תוכננו התחלים להגברה (Accession Number U15224). בחינת רצף המקטע אשר בודד בעזרת תוכנת DNAMAN הראתה שרצף זה מכיל מסגרת קריאה רצופה אחת באורך 169 חומצות אמינו. השוואת רצף החלבון שהתקבל באנליזה זו לרצף החלבון ההומולוגי מפיטופלסמה SPWB (Accession Number AAC46382) בעזרת תוכנת CLUSTAL W (גרסה 1.83) העלתה זהות של 86% ברמת חומצות האמינו של שני החלבונים (תמונה 12). התוצר הצפוי של הגן השייך לפיטופלסמה AWb אשר בודד בעבודה זו סומן בשם AWb-Ap.

```

AWb      MNHKENFLQTKNGKITVGVLASAGIALVVYFITAKLLHWAPFTIKTLTAK 50
SPWB     MNHKENFLQTKNGKITVGVLASAGIALVVYLITAKLLHWAPFTIKTLTTK 50
*****:*****:*

AWb      DIDNLKVEIKDFTGKSTKDQLSLDDAKQESQKVVDAMKKIVDASAENKA 100
SPWB     DIDNLKVEIKDFTGLNLTGDKLSSDDAKQESQKAFDAINKIVDAFAENKA 100
*****:*****:*

AWb      DIKDKKISDSTITAANNLTKADEALKFVNDNAS--NWIDDRVKDFVP-K 147
SPWB     DIKDKKISDSTIAAANNLTKADNALKFVNEASVTNWTDDRVDQDFVNNK 150
*****:*****:*

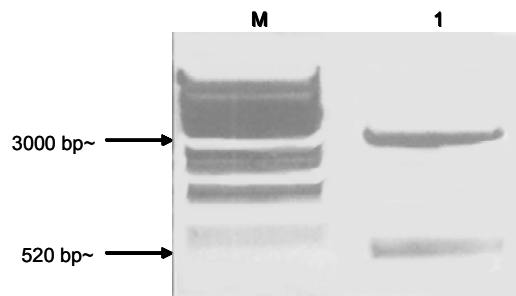
AWb      MVKTSINDLLGLAKTDLKVQS 169
SPWB     VVKTKIINDLLSQAKTDLKVQS 172
*****:*****:*

```

תמונה 12: תוצאות השוואת רצף חומצות האמינו של הגן שבודד לחלבון ההומולוגי מפיטופלסמה SPWB בעזרת תוכנת CLUSTAL W. AWb, רצף חומצות האמינו של חלבון שבודד מהפיטופלסמה AWb, SPWB, רצף חומצות האמינו של החלבון ההומולוגי מפיטופלסמה SPWB. ":", חומצה אמינית זהה. ":", החלפה בחומצה אמינית משמרת מאותו טיפוס. ":", החלפה של חומצה אמינית משמרת למחצה. ":", החלפה בחומצה אמינית שאינה משמרת או העדר של חומצה אמינית.

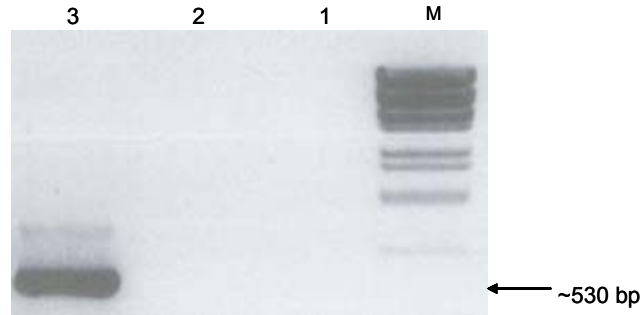
3.2.2.2 שיבוט הגן לחלבון AWb-Ap בפלסמיד pET-28a לביטוי חלבונים

לצורך ביטוי של חלבון AWb-Ap בחיידקים שובט הגן AWb-Ap לתוך פלסמיד הביטוי pET28a תחת הפרומוטור של T7 RNA polymerase ובין האתרים של אנזימי ההגבלה NdeI ו-XhoI (תמונה 13) (שבט pET-28a_AWb-Ap_367). ראוי לציין כי בשיבוט באתרים האלה הייתה מטרה לבטא את הגן המוחדר באיחוי, בקצהו ה-C-terminal, לפפטיד המכיל שישה חומצות אמינו רצופות של היסטדין (His-Tag).



תמונה 13: הפרדה באלקטרופורזה בג'ל 1% אגרוז של חיתוך באנזימי ההגבלה NdeI ו-XhoI של השבט pET-28a_AWb-Ap_367 (בארית 1), M, סמן הגודל (λ) DNA/Eco91I.

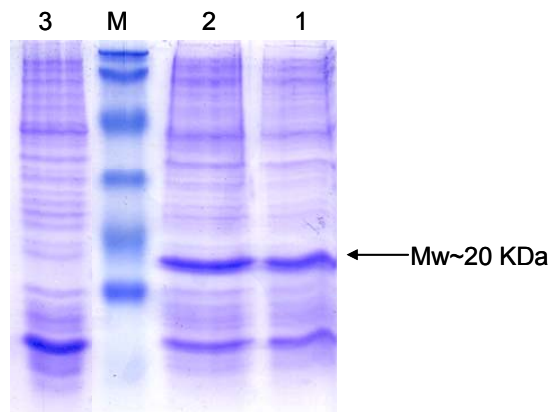
ה-DNA של השבט pET-28a_AWb-Ap_367 הוחדר ע"י טרנספורמציה לחיידקי *E. coli* קומפנטטיים מהקו BL21 (Novagen) המייצרים באופן קונסטיטויבי את האנזים T7 RNA polymerase. נוכחות המחדר בשבט החיידקים pET-28a_AWb-Ap_367 אושרה ב-PCR בעזרת התחלים F_SPWB ו-R_SPWB; בריאקציה הגברה זו התקבל תוצר הגברה של כ-550 bp התואם לגן AWb-Ap ולא נתקבלה הגברה של קטע דומה בדוגמאות הביקורת השלילית (תמונה 14).



תמונה 14: הפרדה באלקטרופורזה בג'ל 1% אגרוז של תוצרי הגברה (PCR) לגן החלבון האנטיגני AWb-Ap. 1, תערובת ראקציה PCR בתוספת מים. 2, שבט חיידקי BL-21 המכילים פלסמיד pET28a ללא מחדר. 3, חיידקי BL-21 עם השבט pET-28a_AWb-Ap_367.

3.2.2.3 ביטוי של חלבון AWb-Ap בחיידקים

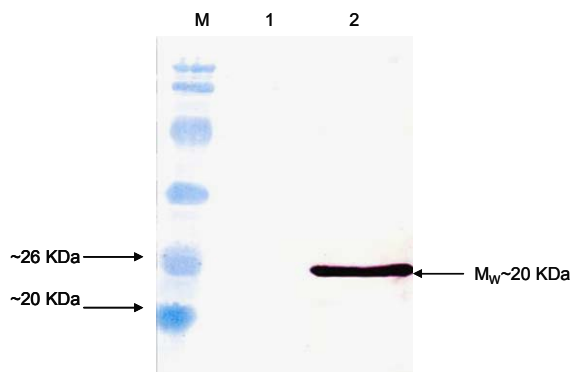
ביטוי מוגבר של החלבון האנטיגני AWb-Ap בגודל של כ-20 kDa התקבל בחיידקי BL21 שהכילו את השבט pET-28a_AWb-Ap_367. התוצאות הראו כי לא היה הבדל משמעותי ברמת ביטוי החלבון ע"י חיידקים אשר עברו אינדוקציה עם IPTG לאלה שלא קיבלו אינדוקציה (תמונה 15). בדוגמא של הביקורת השלשית אשר הכילה חלבונים מחיידקים המכילים פלסמיד ביטוי pET28a ללא מחדר לא נצפה חלבון דומה.



תמונה 15: הפרדה של מיצוי חלבונים מחיידקים מהגזע BL21 בג'ל SDS-PAGE 12.5% וצביעה ב-coomassie blue, לבדיקת ביטויי ה-AWb-Ap. באריות: 1, מושבה המכילה את הפלסמיד pET-28a_AWb-Ap_367 ללא אינדוקציה עם IPTG. 2, מושבה המכילה את הפלסמיד pET-28a_AWb-Ap_367 עם אינדוקציה של 0.1mM IPTG. M, Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). 3, בקורת שלילית, חיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a ללא מחדר, עם אינדוקציה של 0.1mM IPTG.

נוכחות החלבון הרקומביננטי AWb-Ap במיצוי החלבוני של חיידקי BL-21 שהכילו את שבט pET-28a_AWb-Ap_367 אושרה באנליזת Western blot תוך כדי השימוש בנוגדן חד-שבטי כנגד פפטיד

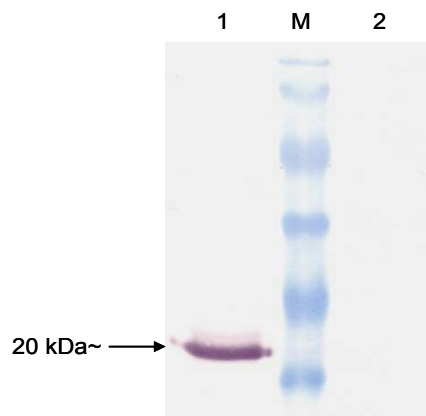
ה- His-Tag (Sigma). באנליזה זו נמצא כי הנוגדן מגיב עם חלבון יחיד התואם את גודל החלבון הרקומביננטי AWb-Ap המשוער (תמונה 16).



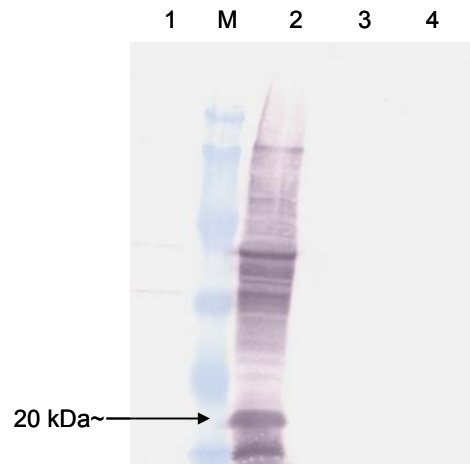
תמונה 16: ממברנת ניטרוצלולוז ששימשה לאנליזת Western blot עם נוגדן ראשוני חדש שבטי כנגד His-Tag. **1**, בקורת שלילית, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a ללא מחדר, עם אינדוקציה של 0.1mM IPTG. **2**, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a_AWb-Ap_367 ועברו אינדוקציה של 0.1mM IPTG. **M**, (Fermentas) Prestained Protein Molecular Weight Marker.

3.2.2.4 בדיקת קישור הנוגדן הרב-שבטי כנגד החלבון הרקומביננטי AWb-Ap

החלבון הרקומביננטי AWb-Ap בוטא בחיידקים והופרד משאר חלבוני המיצוי החיידקיים בעזרת אלקטרופורזה בגיל אקרילאמיד בנוכחות SDS (SDS-PAGE). פס החלבון הרקומביננטי מוצה מהגיל. החלבון הרקומביננטי עבר קיפול מחדש בעזרת סילוק שאריות SDS ודיאליזה בבופר PBS בעזרת הקיט GeBAflex-tube (חברת GeBA). תמיסת החלבון שהתקבלה שימשה להזרקה לארנבת לצורך הכנת נוגדנים רב-שבטיים (סעיף 2.1.2.1.2). יכולת הקישור של הנוגדן הרב-שבטי שהוכן בארנבת כנגד החלבון AWb-Ap נבדקה בעזרת אנליזת Western blot. נוגדן זה זיהה בצורה ברורה את החלבון המנוקה AWb-Ap אך לא זיהה כלל חלבונים ממיצוי חלבונים מחיידקי *E. coli*, שלא הכילו מחדר לביטוי הגן לחלבון AWb-Ap (תמונה 17). למרות הזיהוי החזק והספציפי של חלבון AWb-Ap הרקומביננטי, הנוגדן לא היה יעיל לזיהוי חלבון פיטופלסמה כלשהו במיצוי חלבונים של צמחים נוגעים בפיטופלסמה מסוג AWb (תמונה 18).



תמונה 17: ממברנת ניטרוצלולוז ששימשה לאנליזת Western blot עם נוגדן ראשוני רב שבטי במהול של 1:500 כנגד החלבון הרקומביננטי AWb-Ap. **1**, חלבון AWb-Ap מנוקה ממיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a_AWb-Ap_367 ועברו אינדוקציה עם 0.1mM IPTG. **2**, בקורת שלילית, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a ללא מחדר, בתוספת אינדוקציה עם 0.1mM IPTG. **M**, (Fermentas) Prestained Protein Molecular Weight Marker.



תמונה 18: ממברנת ניטרוצלולוז ששימשה לאנליזת Western blot עם נוגדן ראשוני רב שבטי כנגד החלבון הרקומביננטי AWb-Ap. 1, בקורת שלילית, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a ללא מחדר, עם אינדוקציה 0.1mM IPTG. 2, מיצוי חלבונים מחיידקים שהכילו את הפלסמיד pET-28a_AWb-Ap_367 ועברו אינדוקציה עם 0.1mM IPTG. 3, מיצוי חלבונים מצמח וינקה בריא ללא פיטופלסמה. 4, מיצוי חלבונים מצמח וינקה נגוע בפיטופלסמה AWb. M, (Fermentas) Prestained Protein Molecular Weight Marker.

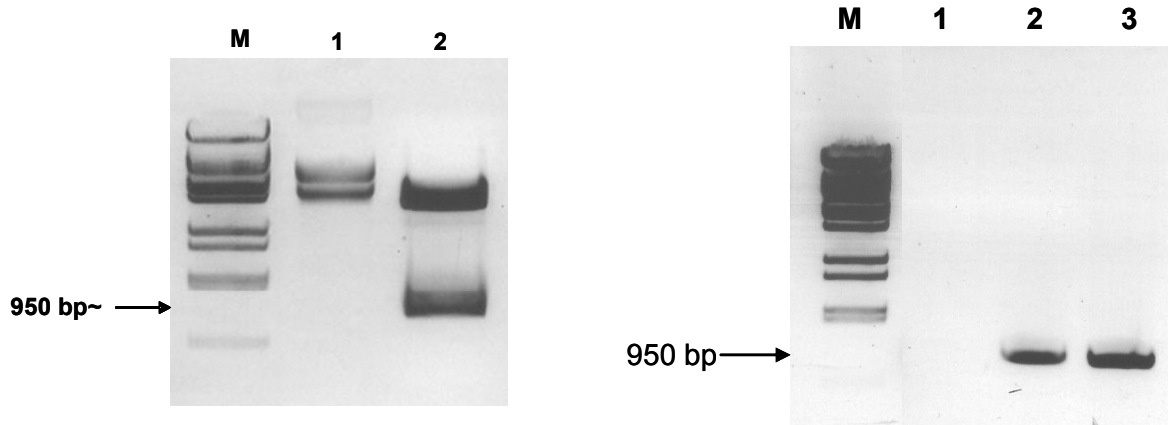
3.3 פיתוח תחל ייחודי לפיטופלסמה CPs מקבוצת ה- Stolbur

גפנים מסוג קריניאן (זן של ענבי יין אדום) בכרם השייך לעירא לוויין במזכרת-בתיה הציגו תסמינים המצביעים על אפשרות של נגיעות במחלת הצהבון אשר כללו האדמה לא עונתית וקיפול עלים (תמונה 19).



תמונה 19: גפן מסוג קריניאן (זן של ענבי יין אדום) בכרם השייך לעירא לוויין במזכרת-בתיה הציגה תסמינים של האדמה לא עונתית וקיפול עלים.

דוגמאות חומר צמחי של זמורות עם עלים נלקחו מגפנים אלה לצורך הפקת מיצוי DNA. דוגמאות ה-DNA שימשו כתבניות להגברה בעזרת PCR. בריאקצית PCR זו נעשה שימוש בזוג התחלים rtF3/P7 המניבים תוצר הגברה אופייני בגודל 950 bp מהאופרון הריבוזומלי של הפיטופלסמה הכולל חלקים מהגנים: 16S rRNA ו-23S rRNA ואת כלל 16S-23S spacer region (תמונה 20). תוצר ההגברה שובט בפלסמיד pGEM_T easy (שבט pGEM-T_CP3_370) (תמונה 21) ונשלח לריצוף במעבדת שירות של חברת Hy-Labs (רחובות, ישראל).



תמונה 21: תוצרי חיתוך באנזים ההגבלה EcoRI, M, סמן גודל (BstEII) DNA/Eco91I (λ). 1, שבת pGEM-T_CP370 לפני חיתוך. 2, שבת pGEM-T_CP370 לאחר החיתוך.

תמונה 20: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים rtF3/P7, M, סמן גודל DNA/Eco91I (λ) (BstEII); באריות: 1, ביקורת שלילית לראקציה ה-PCR, בה הוספו מים במקום DNA. 2-3, דוגמאות מגפנים נגועות שהציגו תסמינים אופייניים למחלת הצהובון.

השוואת רצף המחדר שהתקבל למאגר גנים ב-NCBI העלה הומולוגיה של 98% לרצף מהגנים: 16S rRNA ו-23S rRNA וכל 16S-23S spacer region של החיידק *Candidatus Phytoplasma solani* (CPs) השייך לקבוצת הפיטופלסמה Stolbur (16SrXII). על סמך רצף ה-16S-23S spacer region במחדר שהתקבל והשוואה לרצפים הומולוגיים משמונה קבוצות פיטופלסמה שונות תוכנן תחל ספציפי לגזע הפיטופלסמה CPs מקבוצת ה-16SrXII Stolbur (שבודד (תמונה 22)).

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment	homology score
fSt_1600 primer	GAGAGACTTAAGAAAAGTTTTTCATTTTTTTA 100
<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	GAGAGACTTAAGAAAAGTTTTTCATTTTTTTA 100
Buckland Valley grapevine yellows	GAGAGACTTAAACAAGTTTTTCATTTTTTTT 90
<i>Candidatus Phytoplasma australiense</i>	GAGAGACTTAAAAAAGTTTTTCGTTTTTTTTA 93
Strawberry virescence phytoplasma	GGAGGCCATAAAAAAGTTTTTTGGTTTTTTTTA 76
Consensus	* * * * * * * * * *

תמונה 22: הומולוגיה רב-רצפית לתחל fSt_1600 עם שני גזעי פיטופלסמה שונים מקבוצת ה-16SrXII Stolbur שהתקבלה בעזרת תוכנת (EBI) CLUSTAL W (1.83).

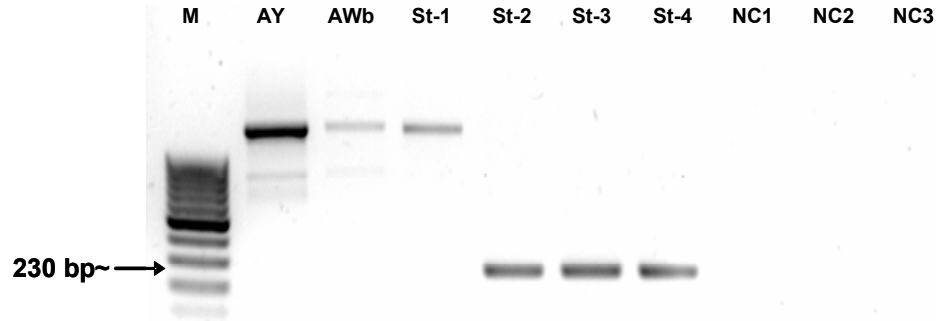
בהשוואת מעקובת התחל שתוכנן fSt1600 עם רצפים הומולוגיים של גזעים שונים מקבוצת ה-Stolbur התקבלה הומולוגיה מלאה לרצף התחל רק עם פיטופלסמה מגזע CPs. לעומת זאת לא התקבלה הומולוגיה מלאה בהשוואת מעקובת התחל שתוכנן fSt1600 עם רצפים הומולוגיים משבעה קבוצות פיטופלסמה שונות (תמונה 23). ההשוואות אשר נעשו הראו כי מעקובת התחל אשר תוכנן הייתה שמורה בקצה 5' אך שונה בקצה ה-3'.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment homology score

fSt_1600 primer	GAGAGACTTAAGAAAAGTTTTTCATTTT TTA	100
Candidatus_asteris	GAGAGACTTAAGAAAAGTTTTTCATTTT AAA	90
16SrX	GAAAGACTTAAAAAAGTTTTTTA TTTTT	86
16SrVII	GAAAGACTTAAATTGTTAAGTTTTTC TTTTT	73
16SrIX	GAAAGACTTAGTCAAGTTTTTC TGATTAT	70
16SrVI	GAAAGACTTAAGTAGAAAA TAA GTTTTT TCI	66
16SrII	GAAAGACTTAGGATAACTAGTTTTTC ITCG	66
16SrVIII	GAAAGACTTAGATTAAATAAGTTTTTC TTTT	50
Consensus	** *****	

תמונה 23: הומולוגיה רב-רצפית לתחל fSt_1600 עם שבע קבוצות פיטופלסמה השונות מקבוצת ה- (16SrXII) Stolbur. שהתקבלה בעזרת תוכנת (EBI) CLUSTAL W (1.83).

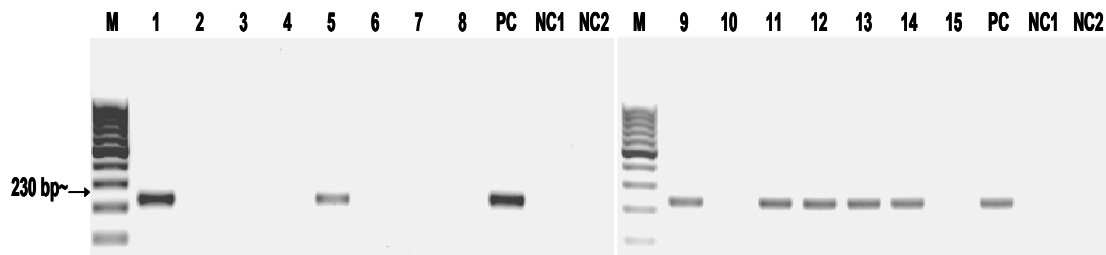
בדיקת יעילות וספציפיות ההגברה של התחל fSt1600 שתוכנן נבדקה בעזרת nested-PCR עם התחלים fSt1600/rtP7. בנוכחות תבנית DNA מתאימה של פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה- Stolbur תחלים אלה הניבו תוצר הגברה ספציפי בגודל של כ- 230 bp, הכולל חלקים מהגנים 16S-23S spacer region ו-23S rRNA (תמונה 24). לעומת זאת לא זוהו תוצרי הגברה בגודל דומה 230 bp בדוגמות DNA שהכילו פיטופלסמה השייכות לקבוצות: Candidatus phytoplasma asteris ו-16SrII ובמיצוי DNA מצמחי ויניקה וגפן שאינם נגועים בפיטופלסמה.



תמונה 24: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fSt_1600/rtP7, סמן גודל GeneRuler™ 100 bp DNA, M, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה- Candidatus phytoplasma asteris, AY, באריות; Ladder (Fermentas); פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה- 16SrII, St-1, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה- Stolbur (16SrXII) שבדדה מגפן ברמת הגולן. St-2, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה- Stolbur (16SrXII) שבדדה מויניקה ברמת הגולן. St-3 ו- St-4, פיטופלסמה השייכת לקבוצת ה- Stolbur (16SrXII) שבדדה מגפנים שונות מסוג קרייניאן במזכרת בתיה. NC1, גפן בריאה ללא תסמינים. NC2, ויניקה בריאה ללא תסמינים. NC3, ביקורת שלילית לראקציה ה-PCR, בה הוספו מים במקום DNA.

לאחר שזוג התחלים fSt1600/rtP7 הוכחו כיעילים להגברה ספציפית של DNA של הפיטופלסמה Stolbur, בוצע ניסוי לסריקת גפנים חשודות כנגועות בפיטופלסמה. תכשירים של DNA כללי הופקו מ-15 גפנים כאלה ונבחנו בעזרת nested-PCR לנוכחות הפתוגן פיטופלסמת ה- Stolbur מגזע CPs תוך כדי השימוש בתחלים fSt-1600/rtP7 (תמונה 25). התוצאות שהתקבלו הראו כי שמונה גפנים מכלל ה-15 היו נגועות בפיטופלסמת מגזע CPs. לצורך אימות התוצאות, נקבע הרצף של תוצרי

ההגברה של שלושה מהדוגמאות האלה. השוואת רצפי תוצרי ההגברה שהתקבלו עם מאגר הגנים (NCBI) העלתה הומומולוגיה של יותר מ-98% לרצף הפיטופלסמה CPs.

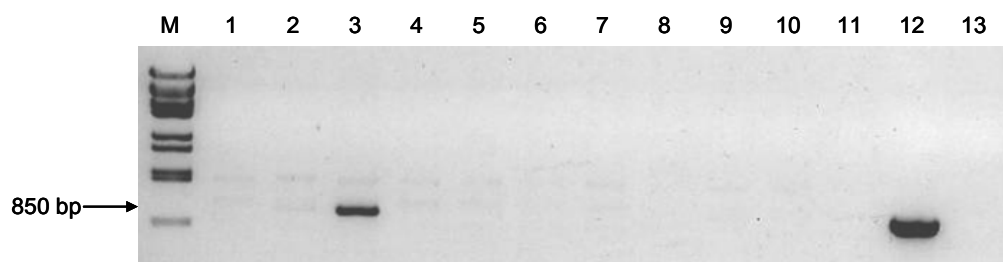


תמונה 25: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת nested-PCR עם התחלים fSt-1600/rtP7. M, סמן גודל; באריות: 1-15, גננים שונות החשודות כנגועות בפיטופלסמה. PC, ביקורת חיובית. NC1, ביקורת שלילית לריאקציה ה-PCR הראשונית, בה הוספו מים במקום DNA. NC2, ביקורת שלילית לריאקציה ה-nested-PCR, בה הוספו מים במקום DNA.

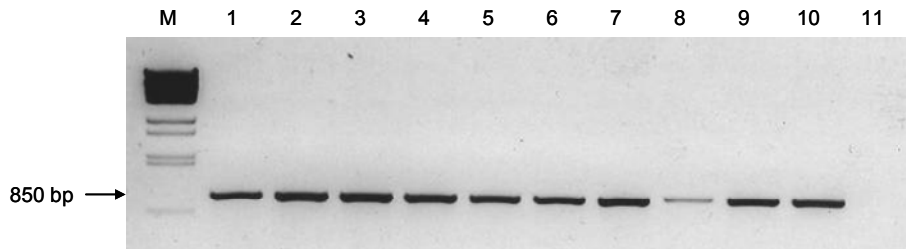
3.4 השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות פיטופלסמה

השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות פיטופלסמה AWb בצמחי וינקה נבחנה תוך כדי השימוש בארבעה חדרי גידול בפיטוטרום בעלי משטר טמפרטורה של: 29/21°C (29), 34/28°C (34), 22/18°C (22), 17/10°C (17) במשך לילה/יום בהתאמה. ארבעים צמחי וינקה בני חודשיים עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג AWb והוחזקו במשך יומיים באותה חממה (25°C) וזאת במטרה לאפשר הדבקה. לאחר מכן הועברו עשרה צמחי וינקה מורכבים לכל אחד מארבעת חדרי הגידול. בנוסף, לכל אחד מהחדרים הוכנס צמח וינקה בריא שלא עבר הרכבה אשר שימש לנו בתור בקרה שלילית. במשך כל הזמן של הניסוי עקבנו אחרי הופעת הסימפטומים האופייניים לנגיעות בפיטופלסמה הכוללים הופעת פרחים ירוקים בצמחים המורכבים. דוגמאות של DNA גנומי הופקו מעורקים ראשיים של ארבעה עלי מבלע, אשר נלקחו מקודקוד של כל צמח מורכב. דוגמאות הצמחים להפקת ה-DNA נלקחו במרווחים של 6-8 ימים במשך 100 ימים לאחר ההרכבה. דוגמאות DNA אלה שימשו לאפיון מולקולארי של התפשטות הפיטופלסמה בצמחים, בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3.

התפשטות הפיטופלסמה בצמחים זוהתה לראשונה בעזרת PCR כ-18 יום לאחר ההרכבה בחדר גידול 34 (תמונה 26). התפשטות פיטופלסמה בכלל אוכלוסיית הצמחים בחדר הגידול 34 אובחנה כ-35 יום לאחר ההרכבה הן בעזרת PCR (תמונה 27) והן ע"י הופעת תסמינים אופייניים לנגיעות בפיטופלסמה הכוללים הופעת פרחים ירוקים.

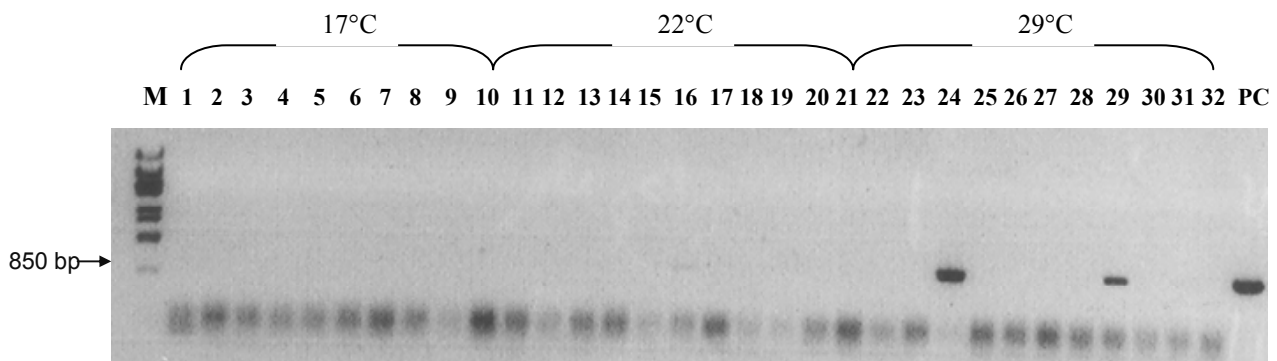


תמונה 26: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3. M, סמן גודל (λ) Lambada; באריות: 1-10, דוגמאות מצמחים מורכבים כ-18 יום לאחר ההרכבה שגודלו בחדר גידול 34. 11, דוגמא שהופקה מוינקה לא מורכבת ששימשה כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדר הגידול. 12, ביקורת חיובית. 13, ביקורת שלילית לריאקציה ה-PCR, בה הוספו מים במקום DNA.

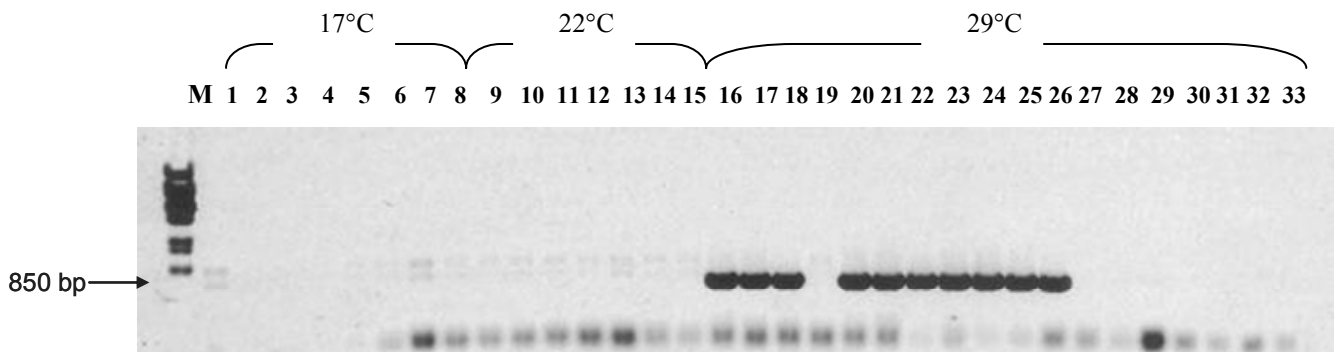


איור 27: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3, M, סמן גודל (λ) DNA/Eco91I (BstEII); באריות: 1-10, דוגמאות מצמחים מורכבים כ-35 יום לאחר ההרכבה שגודלו בחדר גידול 34, 11, דוגמא שהופקה מוינקת לא מורכבת ששימשה כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדר הגידול וזיהום בתערובת ה-PCR.

בחדר הגידול 29, התפשטות הפיטופלסמה בצמחים זוהתה לראשונה בעזרת PCR כ-23 יום לאחר ההרכבה בשני צמחים (VP23, VP28) (תמונה 28). בשני הצמחים האלה נצפו תסמינים אופייניים לנגיעות בפיטופלסמה הכוללים הופעת פרחים ירוקים כשבע לאחר הזיהוי הראשוני ב-PCR. התפשטות פיטופלסמה בכלל אוכלוסיית הצמחים בחדר הגידול 29 אובחנה כ-57 יום לאחר ההרכבה בעזרת PCR והופעת תסמינים אופייניים (תמונה 29).

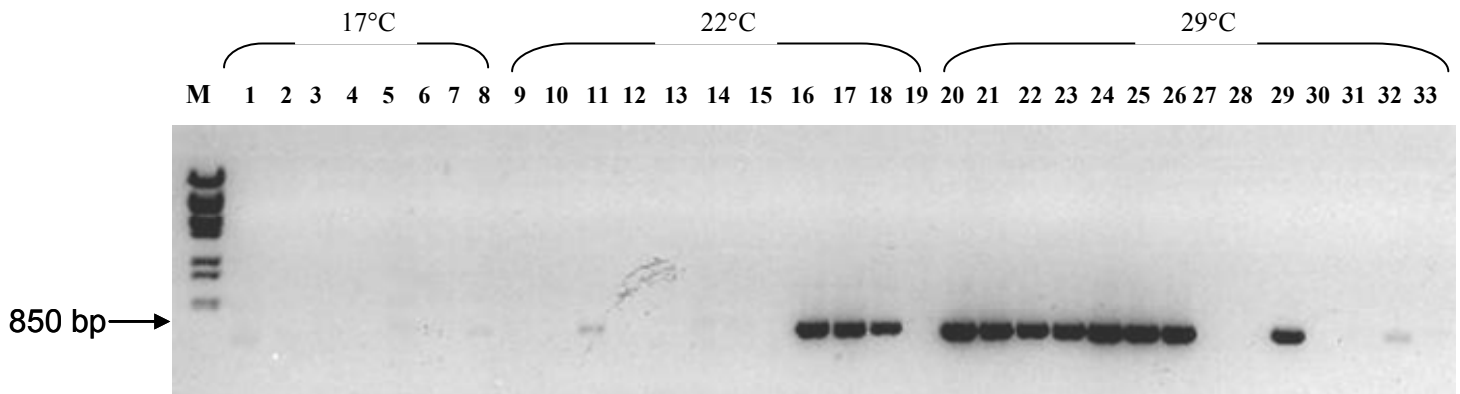


תמונה 28: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3, M, סמן גודל DNA/Eco91I (BstEII); באריות: 1-9, 11-20, 22-31, דוגמאות מצמחים מורכבים כ-23 יום לאחר ההרכבה שגודלו בחדרי גידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 10, 21 ו-32 דוגמאות שהופקו מוינקות לא מורכבות ששימשו כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדרי הגידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. PC, ביקורת חיובית.

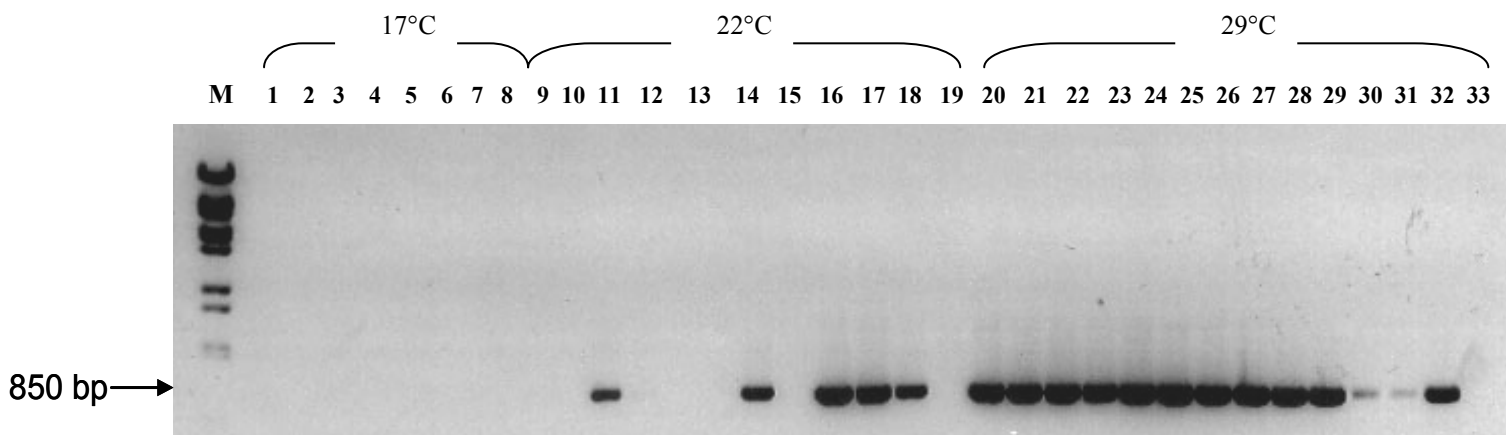


תמונה 29: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3 על דוגמאות מצמחים מורכבים כ-57 יום לאחר ההרכבה. M, סמן גודל DNA/Eco91I (BstEII); באריות: 1-7, 9-15, 20-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 8, 19 ו-33, דוגמאות שהופקו מוינקות לא מורכבות ששימשו כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדרי הגידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 16-18, 27-29, 30-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 29, 17 ו-22 בהתאמה במשך 50 יום לאחר ההרכבה ולאחר מכן הועברו לחדרי גידול 22, 29 ו-29 בהתאמה.

בניגוד לצמחים המורכבים בחדר הגידול 29 לא אובחנה כלל התפשטות של הפיטופלסמה כ- 50 יום לאחר ההרכבה בכל הצמחים המורכבים בחדרי הגידול 22 ו-17. בפרק זמן זה הועברו שלושה צמחים מורכבים מכל אחד מחדרי הגידול: 17 ו- 22 לחדר הגידול 29. לאחר 22 יום אובחנה התפשטות הפיטופלסמה בצמח אחד (VP19) שמקורו מחדר הגידול 17 ובצמח אחד (VP8) שמקורו מחדר 22 (תמונה 30). התפשטות פיטופלסמה בכל הצמחים שהועברו מחדרי הגידול 17 ו-22 לחדר הגידול 29 אובחנה בעזרת PCR ותסמינים כ-28 יום לאחר ההעברה (תמונה 31).



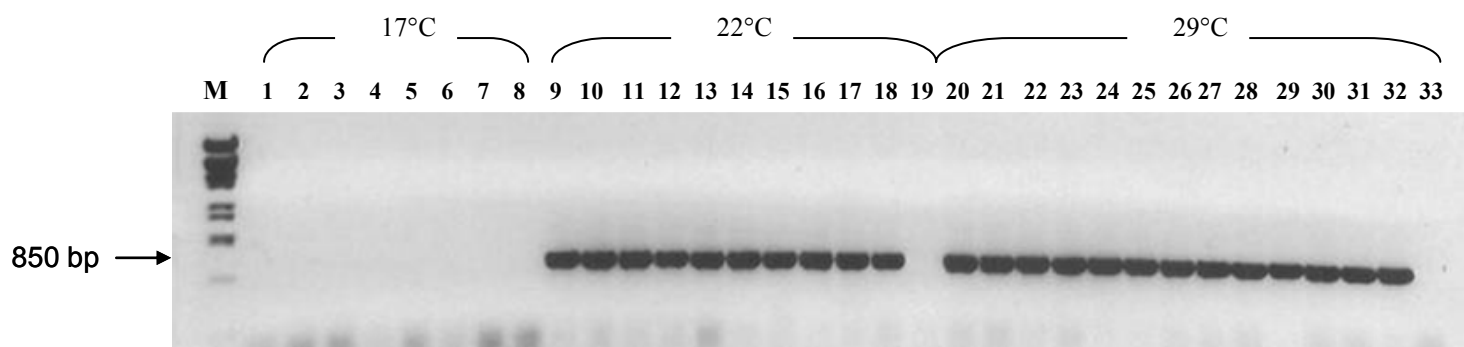
תמונה 30: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3 על דוגמאות מצמחים מורכבים כ-72 יום לאחר ההרכבה. M, סמן גודל DNA/Eco91I (BstEII) (λ); באריות: 1-7, 9-15 ו-20-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 17, 22 ו-27 בהתאמה. באריות: 8, 19 ו-33 דוגמאות שהופקו מוינקות לא מורכבות ששימשו כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדרי הגידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 16-18, 27-29, 30-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 29, 17 ו-22 בהתאמה במשך 50 יום לאחר ההרכבה ולאחר מכן הועברו לחדרי גידול 29, 29 ו-29 בהתאמה.



תמונה 31: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3 על דוגמאות מצמחים מורכבים כ-79 יום לאחר ההרכבה. M, סמן גודל DNA/Eco91I (BstEII) (λ); באריות: 1-7, 9-15 ו-20-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 8, 19 ו-33 דוגמאות שהופקו מוינקות לא מורכבות ששימשו כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדרי הגידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 16-18, 27-29, 30-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 29, 17 ו-22 בהתאמה במשך 50 יום לאחר ההרכבה ולאחר מכן הועברו לחדרי גידול 29, 29 ו-29 בהתאמה.

התפשטות הפיטופלסמה בצמחים בחדר הגידול 22 זוהתה לראשונה בעזרת PCR (תמונה 30) וסימפטומים כ- 72 יום לאחר ההרכבה בצמח אחד (VP3). התפשטות פיטופלסמה בכלל אוכלוסיית הצמחים בחדר הגידול 22 אובחנה בעזרת PCR (תמונה 32) ותסמינים אופייניים כ- 100 יום לאחר

ההרכבה. בצמחים המורכבים בחדר הגידול 17 לא זוהתה התפשטות פיטופלסמה במשך 100 ימים לאחר ההרכבה (תמונה 32).

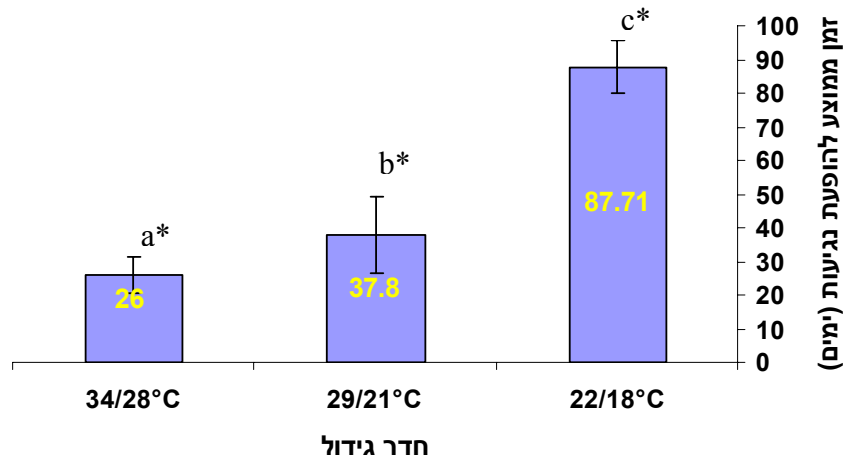


תמונה 32: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3 על דוגמאות מצמחים מורכבים כ-100 יום לאחר ההרכבה. M, סמן גודל DNA/Eco91I (BstEII) (λ) Lambada; באריות: 1-7, 9-15 ו-20-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 8, 19 ו-33 דוגמאות שהופקו מוינקות לא מורכבות ששימשו כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדרי הגידול 17, 22 ו-29 בהתאמה. באריות: 16-18, 27-29, 30-32, דוגמאות מצמחים שגודלו בחדרי גידול 29, 17 ו-22 בהתאמה במשך 50 יום לאחר ההרכבה ולאחר מכן הועברו לחדרי גידול 22, 29 ו-29 בהתאמה.

כלל ערכי משך הזמן עד לזיהוי הראשוני (ב-PCR או ע"י תסמינים לפי המוקדם מבניהם) של פיטופלסמה בכנה בכלל הצמחים המורכבים נרשם בטבלא 4. חישובים סטטיסטיים הכוללים ממוצעים, סטיות תקן ומבחנים לשונות בין הקבוצות השונות בוצעו בעזרת פונקצית ONE WAY ANOVA באתר VassarStats (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). ממוצעי הזמן להופעת הנגיעות וסטיות התקן בכל אוכלוסייה של צמחים מורכבים בכל חדר גידול חושבו ונרשמו בטבלה 4 (תמונה 33). בניסוי זה נמצא כי קיימת שונות מובהקת (מבחן Tukey HSD $p < 0.05$) בין הערכים למשך הזמן עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בקבוצות הצמחים השונות. בנוסף לכך נמצאה התאמה בין עלייה ברמת הטמפרטורות של חדר הגידול לקיצור משך הזמן הממוצע להופעת הנגיעות בפיטופלסמה (תמונה 33).

משתר טמפרטורה	משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה	בעשרת הצמחים המורכבים											
		NC	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
17/10°C	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
22/18°C	7.89	87.71	--	85	79	«	93	100	«	85	79	«	93
29/21°C	11.15	37.8	--	29	44	23	36	50	36	57	23	44	36
34/28°C	5.56	26	--	29	21	32	29	29	24	22	18	21	35

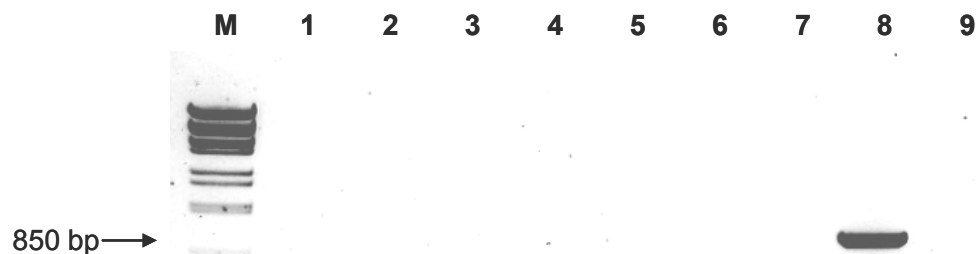
טבלא 4: משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בעשרת הצמחים המורכבים בארבעת חדרי גידול בעלי משטרי טמפרטורה שונים. --, לא נצפו תסמינים אופייניים לפיטופלסמה או תוצרי הגברה ב-PCR במשך כל הניסוי. «, צמח הועבר לחדר גידול 29/21°C כ-50 יום לאחר ההרכבה לפני הופעת התסמינים או קבלה של תוצרי הגברה ב-PCR. NC, ביקורת שלילית.



תמונה 33: משך הזמן הממוצע מההרכבה להופעת נגיעות בפיטופלסמה בכנות בכלל אוכלוסיית הצמחים המורכבים בכל אחד משלושת חדרי הגידול: 22/18°C, 29/21°C, 34/28°C. זמנים ממוצעים להופעת נגיעות בעלי שונות מובהקת סומנו באותיות לטיניות שונות (a*, b*, c*).

3.4.1 השפעת משטר טמפרטורות סביבה נמוכות על התפשטות הפיטופלסמה

נגיעות בכנות המורכבות בחדר גידול 17/10°C לא זוהתה במשך 100 יום לאחר ההרכבה (טבלא 4). לכן בוצע ניסוי נוסף על מנת ללמוד על השפעת טמפרטורות נמוכות על הימצאות ויכולת ההישרדות של חיידקי הפיטופלסמה ברוכב הנגוע ובכנה של צמחי וינקה. בניסוי זה, עשרה צמחי וינקה בני חודשיים עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג AWb והוחזקו במשך יומיים בחממה (טמפי 25) על מנת לאפשר הדבקה. לאחר מכן הועברו הצמחים לחדר גידול בעל משטר טמפרטורה של 17/10°C במשך לילה/ יום בהתאמה לתקופה של 72 יום. בניסוי זה השתמשנו בצמח וינקה שלא עבר הרכבה בתור בקרה שלילית. בתום תקופה זו נלקחו דוגמאות מכלל הכנות לשם הפקת DNA. דוגמאות DNA אלה שימשו לזיהוי מולקולארי של נוכחות פיטופלסמה, בעזרת nested-PCR עם התחלים fU5/rU3. בדומה לניסוי הקודם לא זוהתה כלל התפשטות פיטופלסמה בעזרת תסמינים ו-nested-PCR בכנות של צמחי וינקה המורכבים הגדלים בחדר גידול 17/10°C במשך ה-72 יום לאחר ההרכבה (תמונה 34).



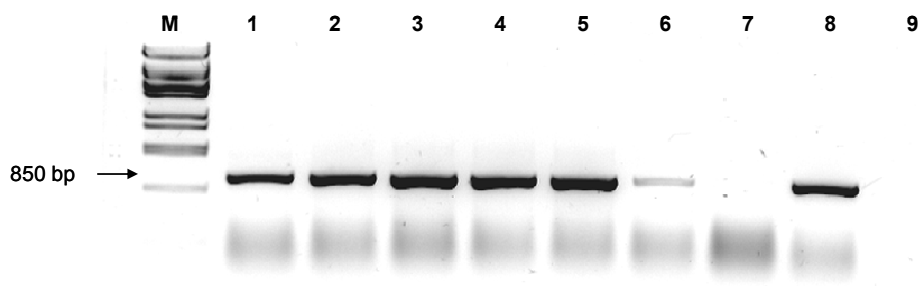
תמונה 34: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת nested-PCR עם התחלים fU5/rU3. M, סמן גודל (λ) Lambada DNA/Eco91I (BstEII); באריות: 1-6, דוגמאות מכנות של צמחי וינקה מורכבים שגודלו בחדר גידול 17/10°C - 72 יום לאחר ההרכבה. 7, דוגמא שהופקה מוינקה לא מורכבת ששימשה כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדר הגידול. 8, ביקורת חיובית. 9, ביקורת שלילית לראקציה ה-PCR, בה הוספו מים במקום DNA.

נוכחות פיטופלסמה בשישה צמחים מורכבים, שגדלו בחדר גידול $17/10^{\circ}\text{C}$ במשך 72 יום, נבדקה בחלקי הרוכב והכנה בכל צמח בעזרת הרכבות צד על גבי צמחי וינקה חדשים. צמחי וינקה בהם נעשו הרכבות חלקי הרוכב, (הנגוע בפיטופלסמה AWb) שימשו לצורך בחינת נוכחות והישרדות פיטופלסמה ברוכבים וכונו צמחי רוכב. ואילו צמחי וינקה בהם נעשו הרכבות של חלקי הכנה (לא ידועה הנגיעות) שימשו לצורך בחינת התפשטות הפיטופלסמה לכנה וכונו צמחי הכנה. על מנת לאפשר את התפשטות הפיטופלסמה והתפתחות תסמיני מחלה, הצמחים המורכבים החדשים הועברו לחדר גידול $34/28^{\circ}\text{C}$. הופעת תסמינים אופייניים לנגיעות בפיטופלסמה הכוללים הופעת פרחים ירוקים בכנות של הצמחים המורכבים נרשמה מדי יום. אימות נוכחות או העדר פיטופלסמה ברקמות הצמח בוצע בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3 על DNA אשר הופק מרקמות הצמחיות הנבדקות. תסמינים אופייניים לפיטופלסמה AWb של פרחים ירוקים זוהו כ-26 יום לאחר ההרכבה בכנות של צמחי הרוכב (טבלא 5).

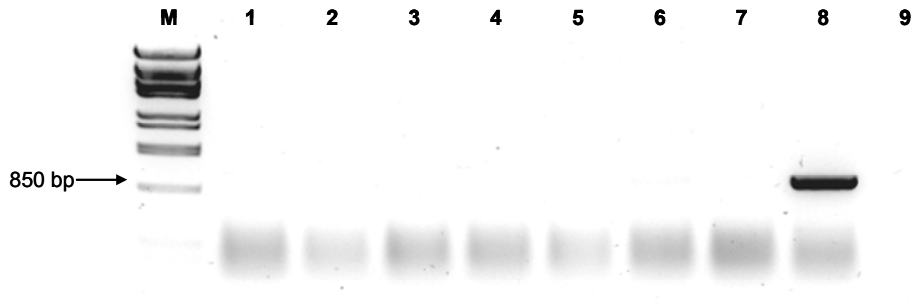
סטיית תקן	ממוצע	משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בעשרת הצמחים המורכבים							משטר טמפרטורה בגידול	סוג רוכב מצמחי וינקה שגודלו ב- $17/10^{\circ}\text{C}$
		NC	6	5	4	3	2	1		
		--	--	--	--	--	--	--	$34/28^{\circ}\text{C}$	כנה
2.8	20.67	--	26	18	20	19	20	21	$34/28^{\circ}\text{C}$	רוכב נגוע

טבלא 5: משך זמן (ימים) מהרכבה עד לזיהוי הראשוני של פיטופלסמה בכנה בששת הצמחים המורכבים בחדר גידול $34/28^{\circ}\text{C}$. --, לא נצפו תסמינים אופייניים לפיטופלסמה או תוצרי הגברה ב-PCR במשך כל הניסוי.

לעומת זאת לא נצפו כלל תסמינים אופייניים לפיטופלסמה בכנות של צמחי הכנה או בצמח ששימש כבקרה שלילית לנוכחות חרקים נשאים בחדר הגידול. במקביל לכך נוכחות הפיטופלסמה אושרה בכלל הכנות של צמחי הרוכב בעזרת PCR (תמונה 35). ואילו העדר פיטופלסמה אושר בכלל הכנות של צמחי הכנה בעזרת PCR (תמונה 36).



תמונה 35: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3. M, סמן גודל λ (Lambada) DNA/Eco91I (BstEII); באריות: 1-6, דוגמאות מכנות של צמחים שהורכבו עם רוכב נגוע, כ-26 יום לאחר ההרכבה שגודלו בחדר גידול $34/28^{\circ}\text{C}$. הרוכבים נלקחו מרוכבים של צמחים מורכבים שגודלו קודם לכן בחדר גידול $17/10^{\circ}\text{C}$ במשך 72 יום. 7, דוגמא שהופקה מוינקה לא מורכבת ששימשה כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדר הגידול. 8, ביקורת חיובית. 9, ביקורת שלילית לראקציה ה-PCR, בה הוספו מים במקום DNA.



תמונה 36: תוצרי הגברה שהתקבלו בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3, M, סמן גודל DNA/Eco91I (λ) (BstEII); באריות: 1-6, דוגמאות מכנות של צמחים שהורכבו עם רוכב שמקורו בכנה, כ-26 יום לאחר ההרכבה שגודלו בחדר גידול $34/28^{\circ}\text{C}$. הרוכבים נלקחו מכנות של צמחים מורכבים שגודלו קודם לכן בחדר גידול $17/10^{\circ}\text{C}$ במשך 72 יום. 7, דוגמא שהופקה מוינקה לא מורכבת ששימשה כביקורת שלילית להימצאות ווקטורים בחדר הגידול. 8, ביקורת חיובית. 9, ביקורת שלילית לראקציה ה-PCR, בה הוספו מים במקום DNA.

3.5 פיתוח שיטת Real-Time PCR לכימות הפיטופלסמה

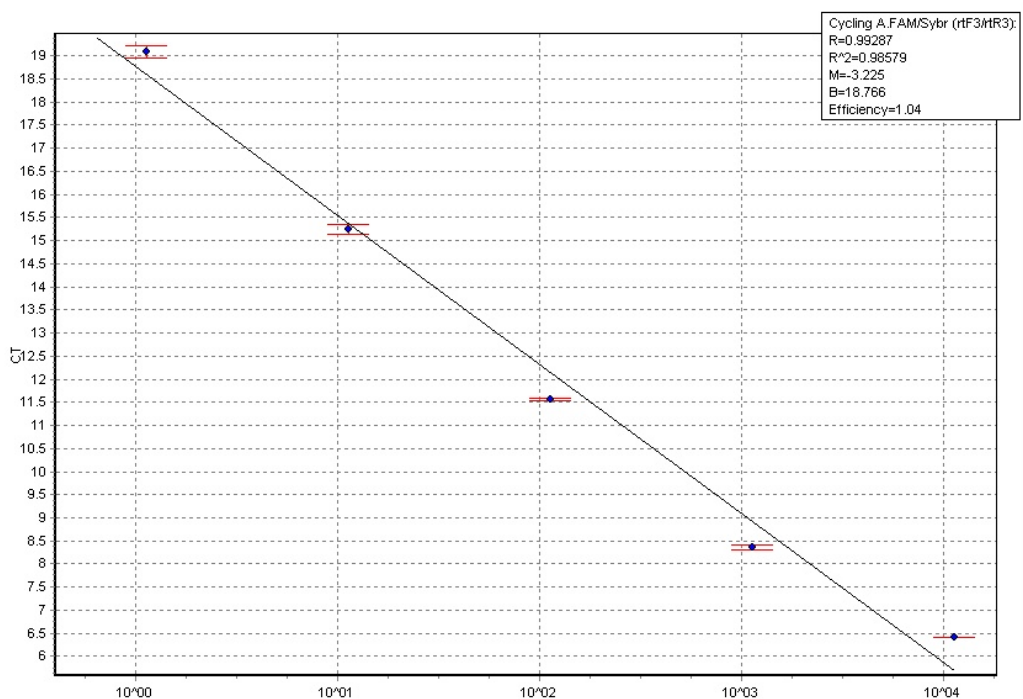
שיטת ה-Quantitative Real-Time PCR שנבחרה היא מסוג SYBR Green. שיטה זו איפשרה כימות של תבניות DNA של גנומי הפיטופלסמה בדוגמת מיצוי DNA צמחי.

3.5.1 כיוול ריכוזי התחלים

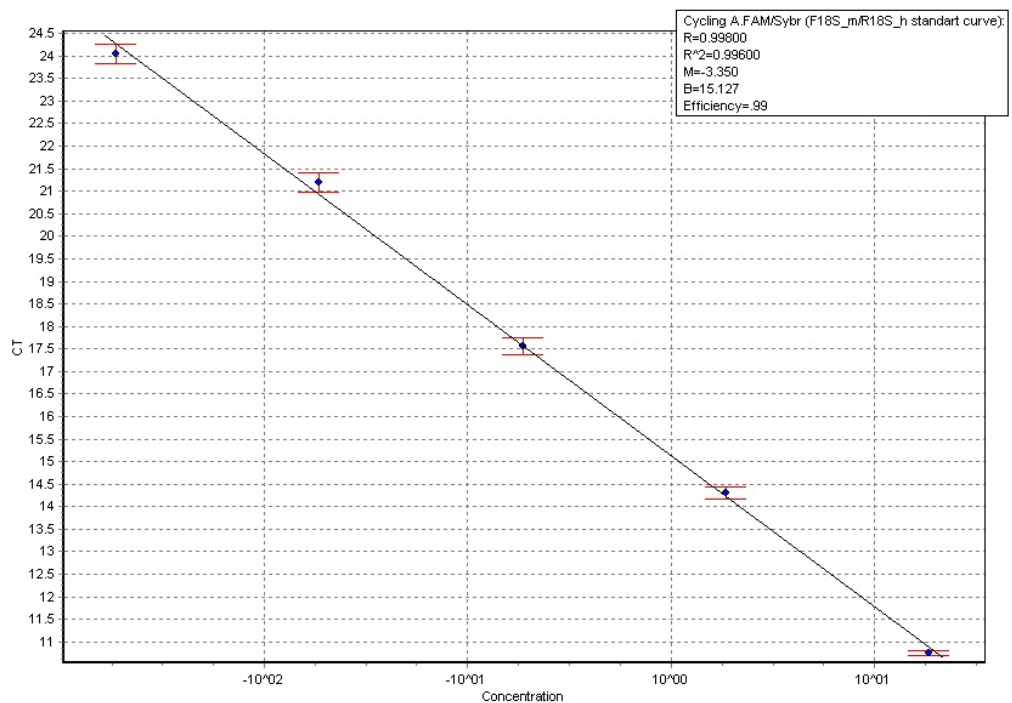
השילובים של שלושה ריכוזים שונים 100 nM, 175 nM ו-250 nM, נבחנו עבור כל תחל עבור זוגות התחלים rtF3/rtR3 ו-f18S/r18S. שילוב הריכוזים המיטביים שנבחר עבור זוגות התחלים: rtF3/rtR3 ו-f18S/r18S הוא 175 nM ו-250 nM, בהתאמה לשני זוגות התחלים. שילוב הריכוזים נבחר על סמך יעילות הגברה הטובה ביותר מכלל השילובים שנבחנו. יעילות הגברה טובה מאופיינת בערך C_T נמוך. לכן נבחרו שילובי הריכוזים בהם ערכי ה- C_T היו הנמוכים ביותר.

3.5.2 בניה של עקומות כיוול

לשם כימות חלקיקי הפיטופלסמה ביחס לכמות ה-DNA הצמחי בדוגמאות, נבנו שתי עקומות כיוול: האחת לכימות הפיטופלסמה (תמונה 37) והשנייה לכימות ה-DNA הצמחי (תמונה 38). שבת הפלסמידים מנוקה (pGEM-T_AWb_249) שימש כתבנית מלאכותית במהולים עשרוניים של 10^{-2} עד 10^{-6} לשם בניית עקומת כיוול לכימות הפיטופלסמה. כלל המהולים של שבת הפלסמידים המנוקה נעשה במיצוי DNA של צמח וינקה בריא. מיהול זה נעשה לשם התחשבות בהשפעה של מעכבי PCR במיצוי כלל ה-DNA מצמח על מאפייני הריאקציה. בנוסף לכך מהולים עשרוניים של 10^{-2} עד 10^{-6} מדוגמא של DNA, שהופקה מצמח בריא שימשו לבנייה של עקומת כיוול להערכת ריכוז ה-DNA הצמחי. כימות שבת הפלסמידים המנוקה (pGEM-T_AWb_249) ומיצוי ה-DNA מהצמח הבריא בוצעו בעזרת מכשיר NanoDrop. כלל הדוגמאות בניסויי הכיוול נעשו בשלושה חזרות. ערכי ה- C_T של כלל דוגמאות המהולים שורטטו כפונקציה של ריכוז תבניות ה-DNA בדוגמא לשם קבלת עקומות כיוול. עקומות כיוול אלה שימשו למציאת ריכוז תבניות ה-DNA בדוגמאות בהתבסס על ערכי ה- C_T , שהתקבלו עבור דוגמאות אלה.



תמונה 37: עקומת כיוול לכימות מספר תבניות DNA של הפיטופלזמה. גרף זה מציג את התלות הליניארית בין ערך ה- C_T למספר תבניות DNA של הגן 16S למיקרו ליטר דוגמא. גן זה הוגבר בעזרת התחלים rtF3/rtR3.



תמונה 38: עקומת כיוול לכימות ריכוז ה-DNA הצמחי. גרף זה מציג את התלות הליניארית בין ערך ה- C_T לריכוז ה-DNA הצמחי (ng/ μ l). ריכוז ה-DNA הצמחי נקבע בעזרת הגברה לגן הריבוזומלי הצמחי 18S בעזרת התחלים f18S ו-r18S.

3.5.3 חישוב מספר תבניות ה-DNA בשבט הפלסמידים

ריכוז ה-DNA בשבט הפלסמידים pGEM-T_AWb_249 נמצא כ- 4370 ng/μl. לשם מציאת מספר המולים למיקרו ליטר, משקל זה חולק במסה המולרית של שבט הפלסמידים pGEM-T_AWb_249 (2644.1 kDa). מסה מולרית זו חושבה בעזרת הרצת הרצף ה-DNA של שבט הפלסמידים pGEM-T_AWb_249 בתוכנת DNAMAN. שבט הפלסמידים pGEM-T_AWb_249 נמצא כמכיל 1.65×10^{12} מולים למיקרו ליטר. בעזרת הכפלת מספר המולים במספר אבוגדרו ($N_A = 6.023 \times 10^{23}$) נמצא שבט הפלסמידים pGEM-T_AWb_249 מכיל 9.95×10^{11} עותקים למיקרו ליטר. מכך ניתן להסיק שמספר עותקי הגן 16S בשבט הפלסמידים שווה ל- 9.95×10^{11} למיקרו ליטר וזאת בהנחה שכל עותקי הפלסמידים בשבט מכילים את המחזר מהגן 16S. מכיוון שלכל חיידק פיטופלזמה שני עותקים מהגן 16S rRNA (Schneider and Seemuller, 1994), מספר חיידקי הפיטופלזמה שווה למחצית מספר עותקי גן זה.

3.5.4 מגבלות שיטת ה-Real-Time PCR שפותחה

במקביל לבחינת ההגברה בשיטה זו על תבניות DNA שהופקו מצמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה נבחנה ההגברה על תבניות DNA שהופקו מצמחי וינקה בריאים. העדר נוכחות פיטופלסמה בדוגמאות הצמחים הבריאים אומתה בעזרת PCR. בניגוד לתכנון המקדים נצפתה הגברה של תבניות DNA בריכוזים של 1.7×10^4 - 6.5×10^4 למיקרו ליטר בעזרת שיטת ה-Real-Time PCR בחמש דוגמאות DNA שהופקו מצמחי וינקה בריאים. על מנת להבין את מקור תבנית ההגברה בדוגמאות הצמחים הבריאים בוצע שיבוט של שלושה תוצרי הגברה בגודל 75 bp שהתקבלו בשיטה זו. מקור תוצרי ההגברה היו שתי דוגמאות של צמחי וינקה בריאים ודוגמא של וינקה נגועה בפיטופלסמה AWb. אופן שיבוט תוצרי ההגברה וקבלת רצף חומצות הגרעין זהה לתהליך שתואר קודם לכן בסעיף 2.4.2.1. רצפי תוצרי ההגברה שהתקבלו מצמחי וינקה בריאים נמצאו זהים ברצף שאינו כולל את רצף התחלים (שכן ביצוע הגברה עם תחלים שאינם הומולוגים לתבנית ה-DNA המוגברת תכניס שינויים מקומיים באזורים שאינם הומולוגים בתחלים) לרצף 16S rRNA של חיידק קרקע שאינו ניתן לגידול בתרבית (NCBI Accession Number-EF455386). לעומת זאת תוצרי הגברה אלה נמצאו שונים בשני בסיסים מרצף החיידק הקרוב ביותר מבחינה פילוגנטית לפיטופלסמה מקבוצת ה-*Acholeplasma* (NCBI Accession Number-AY538170) ובשלושה בסיסים מרצף הפיטופלסמה AWB (תמונה 39).









SEQ_1	rtF3 -ATTGACGGG	GGCCCGCACAAAGCGG- RC	rtR3
SEQ_2	rtF3 -ATTGACGGG	GGCCCGCACAAAGCGG- RC	rtR3
AWB	rtF3 -ATTGACGGG	ACTCCGCACAAGCGG- RC	rtR3
<i>Acholeplasma parvum</i>	rtF3 -ATTGACGGG	ACCCCGCACAAAGCGG- RC	rtR3
Uncultured_soil_bacterium	rtF3 -ATTGACGGG	GGCCCGCACAAAGCGG- RC	rtR3
Consensus	*****	*****	

תמונה 39: תוצאות השוואת רצפי תוצרי ההגברה בעזרת תוכנת תוכנת (EBI) CLUSTAL W (1.83), שהתקבלו ע"י התחלים rtF3/rtR3 משתי דוגמאות וינקה בריאות (SEQ_1, SEQ_2) ווינקה נגועה בפיטופלסמה AWb שהושוו לרצפי החיידקים *Acholeplasma parvum* ו-Uncultured_soil_bacterium שנלקחו ממאגר הגנים ב-NCBI. רצף התחל rtF3, רצף התחל rtR3, רצף בכיווניות הפוכה ומשלים לרצף התחל rtR3.

בשל קבלת תוצר הגברה בדוגמאות DNA שהופקו מצמחי וינקה בריאים, שיטה זו של Real-Time PCR שפותחה אינה יכולה לשמש לזיהוי פיטופלסמה בדוגמאות DNA. אולם מכיוון שריכוז תבניות ה-DNA שנמדדו בעזרת שיטה זו בדוגמאות של צמחי וינקה בריאים לא עלה על 1×10^5 למיקרוליטר. לכן הסקנו שתוצאות הכימות של פיטופלסמה בשיטה זו אמינים אך ורק בריכוזי פיטופלסמה העולים על 1×10^5 למיקרוליטר דוגמא. בנוסף לכך דוגמאות ה-DNA שנלקחו לכימות עברו בדיקה מקדימה לנוכחות פיטופלסמה בעזרת PCR רגיל עם אחד מזוגות התחלים האוניברסליים לפיטופלסמה על מנת לאשש את נוכחות הפתוגן.

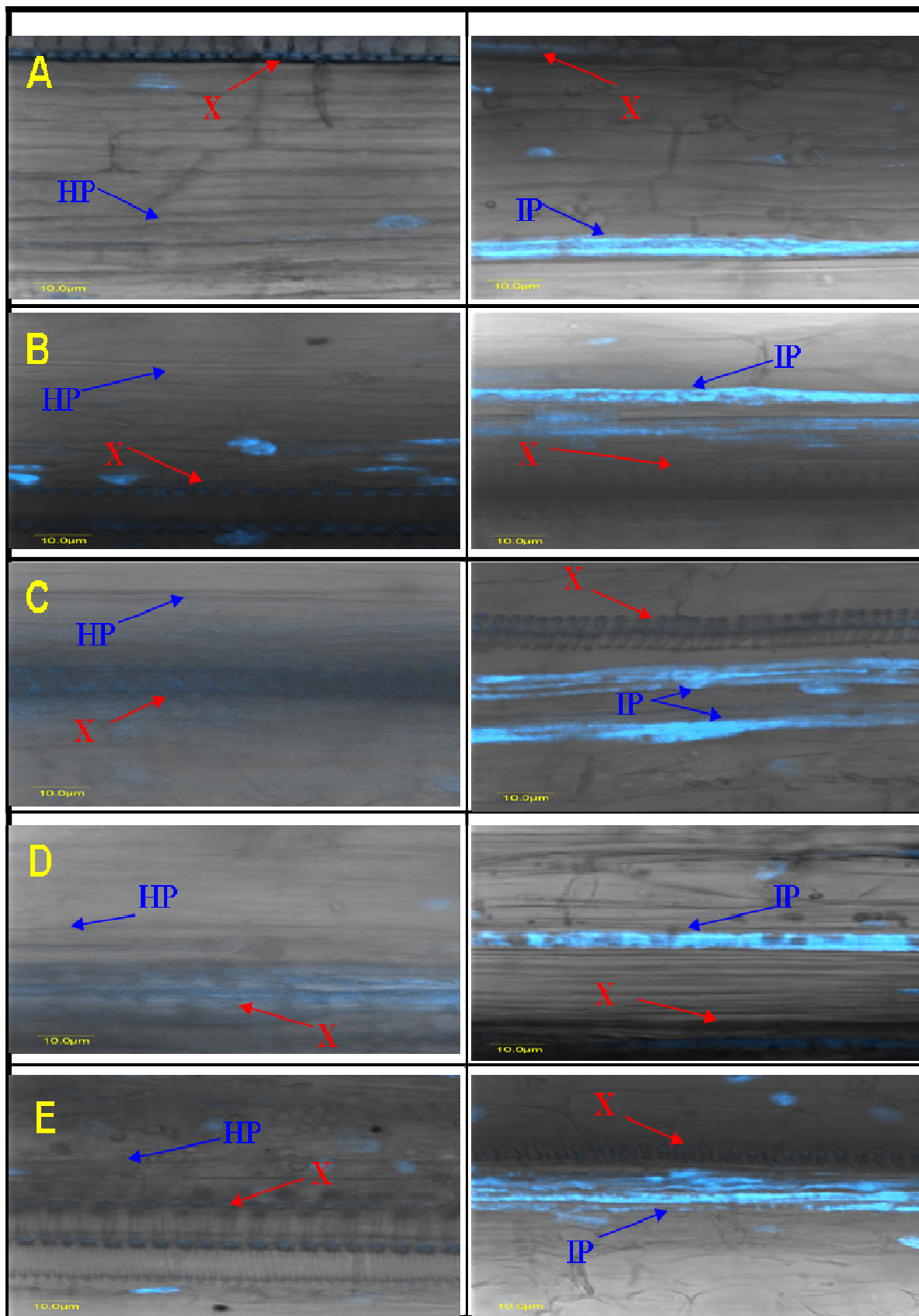
3.6 פיזור חלקיקי פיטופלסמה בצמחי וינקה

ריכוז הפיטופלסמה AWb באיברים השונים אופיינו בשמונה צמחי וינקה. שמונת הצמחים כללו שתי קבוצות של ארבעה צמחים. קבוצות הצמחים נבדלו במשטר הטמפרטורה בה גודלו. משטרי הטמפרטורה של $29/21^\circ\text{C}$ (29) ו- $22/18^\circ\text{C}$ (22) במשך לילה/יום בהתאמה שימשו לגידול הצמחים בניסוי זה. צמחי וינקה בני חודשיים עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג AWb והוחזקו במשך יומיים באותה חממה. לאחר מכן לכל חדר גידול הועברו ארבעה צמחי וינקה מורכבים. צמחים אלה גודלו בחדרי הגידול במשך 106 יום. בתום תקופה זו נלקחו מכל צמח דוגמאות צמחיות לצורך הפקת DNA. דוגמאות אלו נלקחו משלושה איברים שונים של הצמח וכללו: עורקים ראשיים של עלים, עלי כותרת של הפרחים ושורשים. דוגמאות העלים והפרחים מוינו למספר דוגמאות נפרדות בהתאם לשלב ההתפתחות והתסמינים המתבטאים בהם (תמונה 40).

עורקים ראשיים מעלי:			פרחים בעלי תסמינים:				שורשים
מקור	מבלע	מבנה דורי	ללא	חלשים	מתונים	חמורים	
							

תמונה 40: כלל סוגי הדוגמאות הצמחיות ששימשו להפקת DNA.

דוגמאות ה-DNA שימשו כתבנית לכימות הפיטופלסמה ברקמה בעזרת Real-Time PCR. ערכי הכימות שהתקבלו בעזרת Real-Time PCR (נספח 1) נורמלו כחלק היחסי באחוזים מסכם ערכי הכימות של כלל הדוגמאות שהושוו בצמח (טבלא 6). בנוסף לכך נוכחות פיטופלסמה נראתה בעזרת צביעת DAPI בחתכי אורך באיברי הוינקה השונים הנגועים ולא בצמחי הוינקה הלא נגועים ששימשו כביקורת שלילית (תמונה 41).

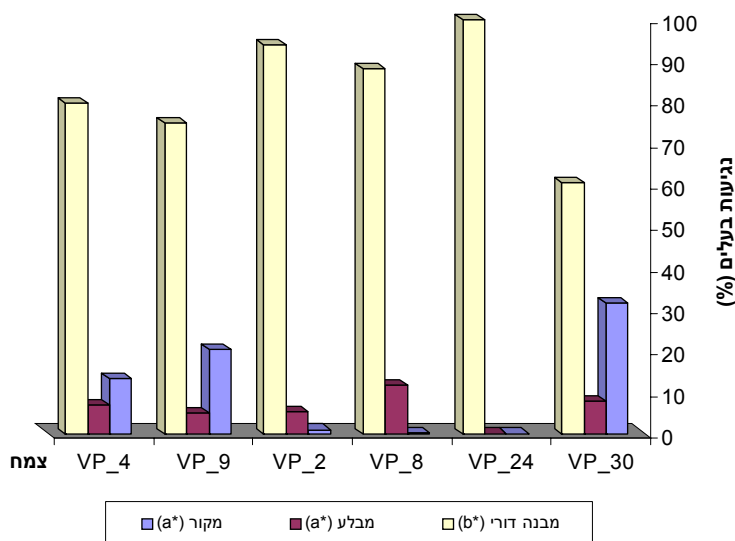


תמונה 41: חתכי אורך באיברי וינקה שונים: עלי מקור (A), עלי מבלע (B), עלי מבלע במבנה דורי (C), עלי כותרת של פרחים ושורשים (D) בצמח וינקה נגוע בפיטופלסמה AWb (טור ימני) בהשוואה לצמח וינקה בריא (טור שמאלי) שנצבעו ב- DAPI וצולמו בעזרת מיקרוסקופ קונפוקלי (עלי מבלע של צמח בריא שימשו כביקורת שלילית ב-C). X, צינורות עיצה. HP, צינורות כברה בשיפה בריאה. IP, צינורות כברה בשיפה נגועה בפיטופלסמה.

טבלא 6: תוצאות כימות הפיטופלסמה עבור שמונה צמחי וינקה, שהתקבלו בעזרת Real-Time PCR לאחר נרמול כחלק היחסי באחוזים מסכם ערכי הכימות של כלל הדוגמאות שהושושו בצמח. - , העדר נוכחות של איבר זה בצמח בזמן הדיגום.

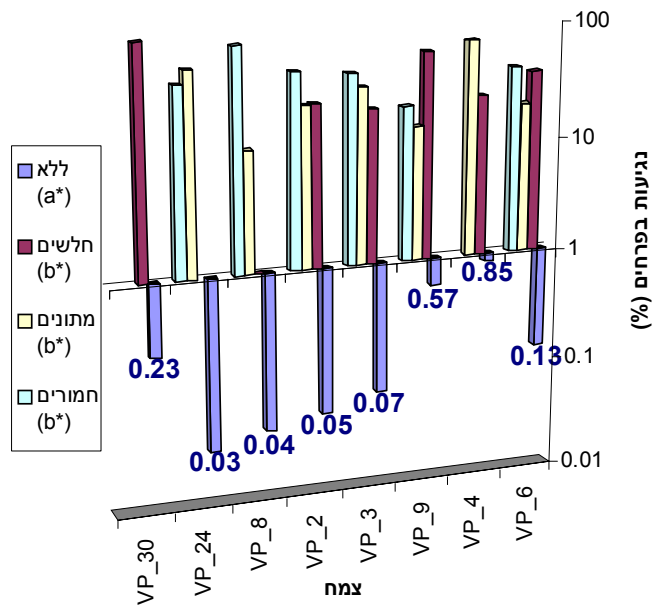
שורשים	פרחים בעלי תסמינים:				עורקים ראשיים מעלי:			משטר טמפרטורה	צמח
	חמורים	מתונים	חלשים	ללא	מבנה דורי	מבלע	מקור		
14.18	23.81	11.31	21.27	0.07	-----	27.68	1.67	18/22°C	VP 6
26.18	-----	5.10	1.69	0.06	53.41	4.71	8.85	18/22°C	VP 4
6.20	9.82	6.51	28.12	0.25	36.73	2.43	9.94	18/22°C	VP 9
53.29	14.70	11.11	7.15	0.02	-----	9.14	4.59	18/22°C	VP 3
27.40	28.31	14.85	15.04	0.03	13.46	0.76	0.15	21/29°C	VP 2
-----	44.76	5.88	0.51	0.02	41.84	5.59	0.11	21/29°C	VP 8
51.93	10.71	14.10	-----	0.01	23.22	0.02	0.02	21/29°C	VP 24
57.02	-----	-----	7.36	0.02	21.54	1.31	11.25	21/29°C	VP 30
33.74	22.02	9.84	11.59	0.06	31.70	6.46	4.57		ממוצע
20.39	13.34	4.01	10.31	0.08	14.88	9.09	4.79		סטיית תקן (SD)

בהשוואה בין אחוזי הנגיעות בקבוצות העלים השונות נמצאה נגיעות גבוהה יותר בטווח של עד פי 1400 בקבוצת העלים בעלי מופע של דור עלים לעומת הנגיעות בקבוצת עלי המקור או המבלע (תמונה 42). לעומת זאת לא נמצא הבדל מובהק ברמת הנגיעות בין קבוצת עלי המקור לקבוצת עלי המבלע.



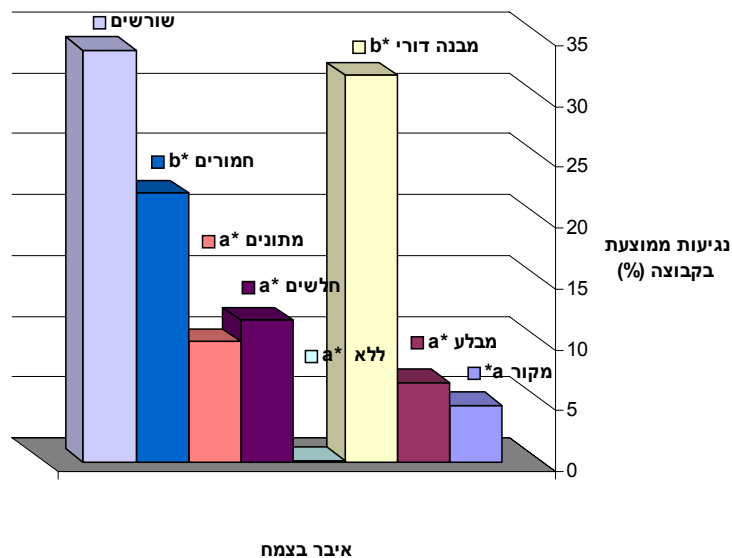
תמונה 42: אחוזי הנגיעות היחסיים של דוגמאות העלים מסך דוגמאות העלים שנבדקו באותו צמח. קבוצות בעלי שונות מובהקות מסומנות באותיות לטיניות שונות: *a/ *b.

בהשוואה בין אחוזי הנגיעות בקבוצות הפרחים השונות נמצאה נגיעות גבוהה יותר בטווח של אחד עד שלושה סדרי גודל באופן מובהק בכל קבוצות הפרחים בעלי תסמינים לעומת הנגיעות בקבוצת הפרחים ללא תסמינים (תמונה 43). לעומת זאת לא נמצא הבדל מובהק ברמת הנגיעות בין שלושת קבוצות הפרחים בעלי התסמינים.



תמונה 43: אחוזי הנגיעות היחסיים של דוגמאות הפרחים מסך דוגמאות הפרחים שנבדקו באותו צמח. קבוצות בעלי שונות מובהקת מסומנות באותיות לטיניות שונות: *a/ *b.

בהשוואה של רמת הנגיעות בשורשים לשאר האיברים האחרים של הצמח, נמצאה נגיעות גבוהה יותר משמעותית בשורשים לעומת שאר הקבוצות שנבדקו, למעט קבוצת העלים דמויי דור עלים והפרחים בעלי תסמינים חמורים (תמונה 44). בהשוואה של כל אחת מהקבוצות: עלים במבנה דורי והפרחים בעלי תסמינים חמורים לקבוצת השורשים, לא נמצא הבדל מובהק ברמת הנגיעות. בנוסף לכך לא נמצאו בניסוי זה מאפיינים שונים להתפלגות הנגיעות בפיטופלסמה בצמחים השונים שגודלו במשטרי טמפרטורה שונים (תמונות 42,43).

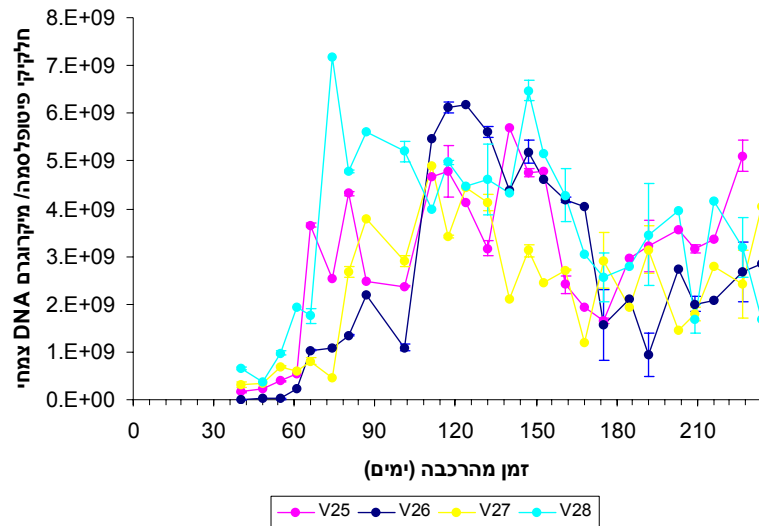


תמונה 44: ערכי הנגיעות הממוצעת בקבוצות האיברים השונים בכלל הצמחים שנבדקו. קבוצות בעלי שונות מובהקת בהשוואה לקבוצת השורשים סומנו ב- *a ואילו קבוצות שאינן בעלות שונות מובהקת בהשוואה לקבוצת השורשים סומנו ב- *b.

3.7 השתנות ריכוז חלקיקי פיטופלסמה בוינקה לאורך זמן

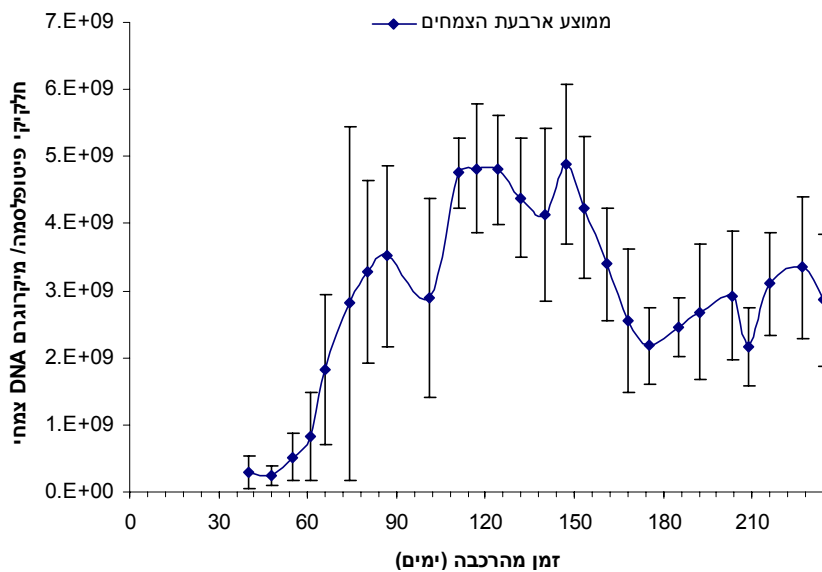
צמחי וינקה בני חודשיים עברו הרכבת צד עם חומר צמחי נגוע בפיטופלסמה מסוג AWb וגודלו במשך כל מהלך הניסוי בחממה בה טמפרטורת הסביבה ווסתה ל- 25°C. צמח וינקה שלא עבר הרכבה שימש כבקרה שלילית לנוכחות חרקים נשאים בעלי יכולת להעביר את הפיטופלסמה בין צמחים

שונים בחממה. ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה בצמחים נבחן במרווחים של 6-8 ימים במשך 234 יום מההדבקה. דוגמאות DNA גנומי הופקו מעורקים ראשיים של שני עלי מבלע, בקודקוד של כל צמח ושימשו לזיהוי מולקולארי של נוכחות פיטופלסמה בצמחים בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3. דוגמאות DNA שנמצאו חיוביות לפיטופלסמה נלקחו לכימות בעזרת Real-Time PCR. כלל ערכי הכימות עבור ארבעה צמחים (VP25, VP26, VP27, VP28) המייצגים את מספר חלקיקי הפיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי חושבו ושורטטו בגרף כפונקציה של הזמן שעבר מההדבקה (תמונה 45).



תמונה 45: ערכי ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי כפונקציה של הזמן מההרכבה בארבעת צמחי וינקה, שנתקבלו בעזרת Real-Time PCR.

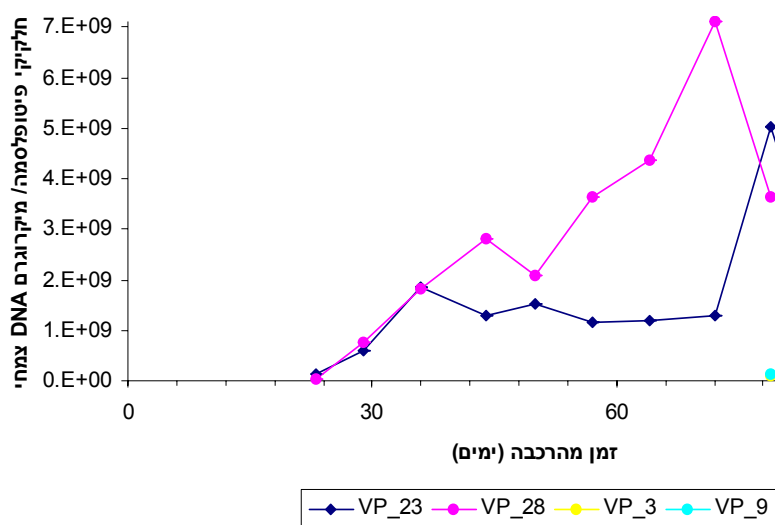
לשם זיהוי מאפיינים כלליים של השתנות ריכוז הפיטופלסמה בצמחי וינקה בעלי מבלע, חושבו ממוצעי ערכי הכימות של ארבעת הצמחים בכל פרק זמן ושורטטו בגרף כפונקציה של משך הזמן מההדבקה (תמונה 46).



תמונה 46: ממוצעי הערכים בארבעה צמחי וינקה של ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי כפונקציה של הזמן מההרכבה.

מהתוצאות שהתקבלו ניתן לראות שטווח ריכוזים של הפיטופלסמה בעורקים של עלי מבלע בצמחי וינקה נע סביב 2.12×10^8 - 5.99×10^9 חלקיקי פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי. מגמה נוספת שניתן להבחין בה, היא שריכוזים נמוכים יחסית מתחת לערך של 1×10^9 חלקיקי פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי נמדדו בארבעת הצמחים בפרק זמן של 55 יום לאחר ההרכבה. לעומת זאת מפרק זמן החל מ- 80 יום לאחר ההדבקה כלל ריכוזי החיידק שנמדדו נע בטווח של 1×10^9 - 7×10^9 חלקיקי פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי. ריכוזי חלקיקי פיטופלסמה מרביים התקבלו בארבעת הצמחים בפרק הזמן בין ארבעה לחמישה חודשים לאחר ההרכבה.

ההתחלה בה חלה עלייה משמעותית בריכוז חלקיקי הפיטופלסמה ואשר חלה, לפי תוצאות הניסויי הני"ל, 55 יום לאחר ההדבקה יכולה להיות מושפעת מהטמפרטורה של הגידול. על מנת לבחון את האפשרות הזו, בוצע ניסוי נוסף בארבעה צמחי וינקה בני חודשיים שהודבקו בפיטופלסמה AWB וגודלו לאחר מכן במשטר טמפרטורות של $22/18^\circ\text{C}$ ו- $29/21^\circ\text{C}$ במשך לילה/יום בהתאמה. דוגמאות DNA גנומי הופקו מעורקים ראשיים של ארבעה עלי מבלע במרווחים של 6-8 ימים במשך 100 ימים לאחר ההרכבה ושימשו לזיהוי מולקולארי של נוכחות פיטופלסמה בצמחים, בעזרת PCR עם התחלים fU5/rU3. דוגמאות DNA שנמצאו חיוביות לחיידק הפיטופלסמה נלקחו לכימות בעזרת Real-Time PCR. תמונה 47 מציגה את התוצאות של ערכי הכימות של הפיטופלסמה של צמחים אלה כפונקציה של הזמן שעבר מההדבקה.



תמונה 47: ריכוז חלקיקי הפיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי כפונקציה של הזמן מההרכבה בשני זוגות צמחי וינקה, שגדלו במשטרי טמפרטורה שונים של $22/18^\circ\text{C}$ (VP_3, VP_9) ו- $29/21^\circ\text{C}$ (VP_23, VP_28). ריכוזי הפיטופלסמה נמדדו בעזרת Real-Time PCR.

ניסוי זה הראה כי הזמן הראשוני לזיהוי פיטופלסמה בצמחים היה שונה. בצמחים שגדלו בחדר גידול $29/21^\circ\text{C}$ זיהוי ראשוני לפיטופלסמה התאפשר לאחר 23 יום מההדבקה, לעומת 79 יום בצמחים שגדלו בחדר הגידול $22/18^\circ\text{C}$. בזמנים אלה ריכוזי הפיטופלסמה חושב ל- $1-2 \times 10^7$ ו- 1×10^8 לצמחים הני"ל, בהתאמה. ממועד הזיהוי הראשוני, נמצא כי ריכוזי הפיטופלסמה עולה ומגיע ל- 1×10^9 כעבור שבועיים בצמחים שגדלו ב- $29/21^\circ\text{C}$ וכעבור שלושה שבועות בצמחים שגדלו $22/18^\circ\text{C}$.

4 דיון ומסקנות

4.1 הכנת נוגדנים רב-שבטיים כנגד פיטופלסמה AWb

שימוש בתעשיר פיטופלסמה שהופק מצמחים נגועים הוכח בעבר כשיטה מוצלחת להכנת נוגדנים חד רב שבטיים כנגד פיטופלסמה (Shen and Lin, 1993). בעבודה זו נעשה שימוש בשיטה שפותחה ע"י Clark וחבריו (1989) להכנת תעשיר פיטופלסמה, תוך הכנסת מספר שינויים המפורטים בסעיף 2.1.2.1.1 בעבודה. בעבודת המחקר שלנו הצלחנו ליצור נוגדנים רב שבטיים בארנבת כנגד תעשיר הפיטופלסמה AWb. נוגדנים אלה זיהו לפחות שלושה פסי חלבונים בעזרת Western blot במיצויי חלבונים מצמחי וינקה בצורה ספציפית ועקבית רק בדוגמאות מצמחים הנגועים בפיטופלסמה AWb ולא בצמחים הבריאים (תמונה 9). מכיוון שזוהו שלושה פסי חלבונים רק במיצויי-חלבונים מצמחי וינקה נגועים ניתן להשתמש בזיהויים של פסי חלבונים אלה בשיטת Western blot כסמן אמין לנוכחות פיטופלסמה AWb בצמחי וינקה.

שימוש אפשרי נוסף לנוגדנים הרב שבטיים שפותחו הוא בזיהוי פיטופלסמות השייכות לקבוצות השונות מקבוצת הפיטופלסמה שנגדה הוכנו הנוגדנים. תופעה זו נגרמת בשל קישור הנוגדנים לאתרים אנטיגנים דומים בחלבונים שונים וקרויה קישור צולב (cross reactivity). תופעה זו של יצירת קישור צולב שימשה בעבר בהצלחה לזיהוי פיטופלסמות מקבוצות שונות בעזרת שימוש בסרום המכיל נוגדנים רב-שבטיים כנגד החלבון הממברנלי SecA מפיטופלסמה OY (Wei and Namba, 2004).

חלבונים אלה שזוהו בשיטת ה-Western blot יכולים להיות חלבונים המשתייכים לפיטופלסמה AWb או חלבונים צמחיים הבאים לידי ביטוי גבוה בנוכחות פיטופלסמה זו בצמח. זיהוי אפשרי של חלבונים אלו הם כחלבונים ממברנליים אימונודומיננטים (חלבונים אנטיגנים השכיחים בממברנת הפתוגן ומשרים תגובה אימונית חזקה כנגדם). זיהוי שכזה בוצע בעבר בשיטה זו עבור פיטופלסמות שונות (Berg et al., 1999; Blomquist et al., 2001; Kakizawa et al., 2004). מיקומם ושכיחותם הרבה של חלבונים אלה בממברנת הפתוגן יכולה להצביע על מעורבותם ביחסי גומלין עם חלבוני המאחסן הצמחי או החרקי. יחסי גומלין שכאלה הוראו בעבר עבור חלבון ממברנלי אימונודומיננטי בשם Amp בפיטופלסמה OY עם חלבונים בסיבי הקישור בדופן המעי של המאחסן החרקי (Suzuki et al., 2006). לפיכך זיהויים של שלושת פסי חלבונים אלה יכול להוות בסיס למחקר עתידי שיאפיין יחסי גומלין בין החלבונים שזוהו בעזרת הנוגדנים לחלבוני המאחסן הצמחי והחרקי.

נוגדנים חד שבטיים נגד החלבון SPWB-Ap הוכנו בעבר וחלבון זה הוכח כחלבון ממברנלי אימונודומיננטי עיקרי בפיטופלסמה SPWB (Shen and Lin, 1993; Yu et al., 1998). בעבודה זו הצלחנו לשבט ולבטא בחיידקים את החלבון ההומולוגי לחלבון SPWB-Ap מהפיטופלסמה AWb. למרות שהנוגדנים שהוכנו כנגד החלבון הרקומביננטי AWb-Ap יכלו לזהות בצורה ספציפית את החלבון הרקומביננטי ממיצוי החיידקים, לא הצלחנו לזהות חלבון בגודל הצפוי, והתואם לחלבון AWb-Ap במיצויי חלבונים של צמחים נגועים בפיטופלסמה מסוג AWb בעזרת שיטת ה-Western blot (תמונה 18). מכך הסקנו כי למרות שהנוגדנים אכן יעילים בזיהוי החלבון AWb-Ap

הרקומביננטי המבוטא בחיידקים, הם אינם יעילים בזיהוי החלבון AWb-Ap במיצוי חלבונים מצמחים מודבקים בפיטופלסמה AWb. אחת הסיבות לכך יכולה להיות כי בבדיקות בעזרת Western blot, החלבונים במיצוי הצמח לאחר שעברו דנטורציה הם אינם מזוהים ע"י הנוגדנים אשר הוכנו כנגד חלבון נטיבי. חשוב לציין כי הנוגדנים אשר הוכנו כנגד תעשיר הפיטופלסמה זיהו באופן ספציפי את החלבון AWb-Ap המבוטא בחיידקים, דבר המראה כי אכן החלבון AWb-Ap הוא אנטיגן. הסבר נוסף לאי זיהוי פיטופלסמה AWb ע"י הנוגדנים אשר הוכנו כנגד החלבון הרקומביננטי הוא ריכוז נמוך של החלבון AWb-Ap בדוגמאות הנבדקות.

4.2 פיתוח תחל ייחודי לפיטופלסמה CPs מקבוצת ה- Stolbur

השוואה בין פיטופלסמות המקוטלגות בקבוצות שונות העלתה כי איזור ה-SR מכיל שונות רבה יותר מרצפי הגנים הריבוזומלים 16S rRNA ו-23S rRNA. לפיכך איזור זה שימש בעבר לתכנון תחלים ייחודיים לקבוצות פיטופלסמה שונות (Smart et al., 1996). אולם אף אחד מתחלים אלה שפותחו על בסיס איזור ה-SR היה ייחודי לקבוצת ה-Stolbur (16SrXII). זיהוי הפיטופלסמה CPs השייכת לקבוצת ה-Stolbur הצריך הגברה של קטעי גנים ריבוזומלים, קביעת רצף הבסיסים והשוואה למאגרי מידע. בעבודה זו הצלחנו לתכנן תחל ייחודי לפיטופלסמה CPs. שימוש בתחל זה הקרוי fSt1600 בשילוב עם התחל rtP7 בשיטת ה-nested-PCR (תמונות 24-25) נמצא כיעיל להגברה ייחודית של תבניות DNA מהפיטופלסמה CPs. מנגד לא זוהו תוצרי הגברה בגודל דומה בדוגמאות פיטופלסמה השייכות לקבוצות אחרות או במיצויי DNA מצמחים בריאים. לכן ניתן להסיק ששיטה זו של nested-PCR מספקת מבחן ספציפי, מהיר, זול ובעל רגישות גבוהה לזיהוי הפיטופלסמה CPs. בנוסף לכך שיטה זו מאפשרת זיהוי הפתוגן CPs ללא קביעת רצף חומצות הגרעין והשוואה למאגרי מידע שהיו דרושים לשם זיהוי הפתוגן לפני פיתוח השיטה.

4.3 השפעת טמפרטורת הסביבה על התפשטות פיטופלסמה

התפשטות פיטופלסמה נצפתה בשלושה חדרי גידול בפיטורון בעלי משטר טמפרטורה: 29/21°C, 22/18°C (22), 34/28°C (34) במשך לילה/יום בהתאמה. בעבר דווח שטמפרטורות סביבה הגבוהות מ-40°C יכולות לגרום להרס חלקיקי הפיטופלסמה בצמחים נגועים (Caudwell et al., 1994; Goodwin et al., 1997). מכיוון שזוהתה התפשטות פיטופלסמה בחדר הגידול החם ביותר של 34/28°C ניתן להסיק שהטמפרטורה הגבוהה של 34°C אינה מעכבת את התפשטות הפיטופלסמה AWb. מנגד נמצא שחלקיקי פיטופלסמה בתרביות רקמה אינם רגישים לטמפרטורות נמוכות של עד 4°C (Kaminska et al., 2005). מכיוון שהחדר הקר ביותר שבו נרשמה התפשטות פיטופלסמה AWb הוא 22/18°C ניתן להסיק כי הפיטופלסמה יכולה עדיין להתפשט בטמפרטורת סביבה של 22°C. אולם לא ניתן להסיק כי הפיטופלסמה הנ"ל מסוגלת להתפשט בטמפרטורה 18°C בשל אפשרות שהתפשטות הפיטופלסמה בחדר גידול זה התרחשה רק ביום. מניתוח הזמן הממוצע להופעת נגיעות, שמייצגת את התפשטות הפיטופלסמה עולה כי קצב התפשטות הפיטופלסמה עלה בצורה משמעותית

עם העלייה בטמפרטורת הסביבה. לפיכך ניתן להסיק שקצב ההתפשטות המהיר ביותר של הפיטופלסמה AWb הוא בטווח של משרעת טמפרטורות $28-34^{\circ}\text{C}$. מנגד הראנו בעבודה זו בתנאי סביבה של משרעת טמפרטורות $10-17^{\circ}\text{C}$ לא התרחשה כלל התפשטות של הפיטופלסמה AWb. לפיכך ניתן להסיק שבטמפרטורות נמוכות ושוות עד ל- 17°C פיטופלסמה זו אינה מתפשטת בצמחי וינקה. בנוסף לכך חלקיקי הפיטופלסמה ששהו במשטר טמפרטורות נמוך של $17/10^{\circ}\text{C}$ היו מסוגלים לחזור ולהתפשט בצמח לאחר העברה למשטר טמפרטורות גבוה יותר של $34/28^{\circ}\text{C}$. מכך ניתן להסיק כי החיוניות (viability) של חלקיקי פיטופלסמה AWb אינה נפגעת עקב השהיה במשטר טמפרטורות נמוך.

תהליך התפשטות הפיטופלסמה בצמח מלווה בעליה בריכוז חיידק בצמח (תמונות 43-45). לכן ניתן להסיק כי זיהוי התפשטות הפיטופלסמה בצמחים מורכבים מהווה סמן אמין לקיום תהליכי חלוקה של חלקיקי הפיטופלסמה בצמח. כמו כן ניתן להסיק כי התפשטות מהירה יותר בצמח מעידה על תהליכי חלוקה מהירים יותר של הפתוגן. מכל האמור לעיל ניתן להסיק כי הפיטופלסמה AWb מסוגלת לבצע חלוקה במשרעת טמפרטורות רחבה של $22-34^{\circ}\text{C}$ עם משרעת המיטבית ביותר לחלוקה שנמדדה בעבודה, הנעה בין $28-34^{\circ}\text{C}$, אולם אינה מסוגלת לבצע חלוקה בטמפרטורות נמוכות ושוות עד ל- 17°C . אולם סף הטמפרטורה המרבי שמאפשר עדיין חלוקה של הפיטופלסמה AWb אינו נקבע ומצריך ניסויי המשך בעתיד. סף זה לא נקבע על ידינו בשל העדר זמינות חדר גידול, המתאים לצרכי הניסוי הדרוש.

יכולת חלוקה דומה במשרעת טמפרטורות רחבה נרשמה עבור חיידקים אחרים ממחלקת ה-Mollicutes הנכללים בסוגים *Acholeplasma* ו-*Spiroplasma*. כאשר חיידקי ה-*Acholeplasma* וה-*Spiroplasma* יכולים לבצע חלוקה בטווחי טמפרטורות של: $18-37^{\circ}\text{C}$ ו- $10-41^{\circ}\text{C}$ בהתאמה (Bonnet et al., 1991; Hackett et al., 1996; Konai et al., 1996; Konai et al., 1997; Oduori et al., 2005; Tully et al., 1994). הסיבות לדמיון בטווח הטמפרטורות לחלוקה יכול לנבוע משני סיבות: האחת קרבה פילוגנטית בשל השייכות המשותפת למחלקת ה-Mollicutes, ששימרה גנים המאפשרים חלוקה בטווח טמפרטורות דומה והשנייה היא סביבת גידול זהה. במסגרת סביבת גידול משותפת לפיטופלסמה עם שני סוגי החיידקים הנ"ל נכללים נשאים חרקים. בנוסף לכך בדומה לפיטופלסמה חיידקי ה-*Spiroplasma* מאכלסים את צינורות הכברה של שיפת צמחים מאחסנים, ואילו חיידקי ה-*Acholeplasma* ממוקמים על פני משטחי הצמח החיצוניים. נוכחותם של חיידקים אלה בבתי גידול דומים או זהים יכולה להיות הגורם העיקרי לקו-אבולוציה משותפת, שהובילה להתאמה זהה לתנאי הסביבה בכלל ולמשרעת הטמפרטורות לגידול וחלוקה בפרט.

למציאת משרעת הטמפרטורה המיטבית להתפשטות פיטופלסמה AWb מספר השלכות תיאורטיות ומעשיות. ממצא זה ניתן להסיק כי משך הזמן עד להופעת הנזקים בצמחים שעברו הדבקה ע"י הפיטופלסמה AWb תלוי במשרעת הטמפרטורות של סביבת הגידול. בעוד שבעונה חמה עם טמפרטורות חמות המגיעות עד לטמפרטורה המיטבית לחלוקה ניתן יהיה לראות את הופעת הנזקים בצמחים המודבקים כבר לאחר 21 יום. מנגד בעונה קרה בה משרעת הטמפרטורות אינה עולה על

22°C הופעת הנזקים בצמחים יכולה להידחות עד ל-100 יום או יותר לאחר ההדבקה. אולם הופעת עונה חמה עם שיאי טמפרטורה מעל לטמפרטורה המיטבית לחלוקה יכולים לגרום לפגיעה בחלקיקי הפיטופלסמה עד להיעלמותם מהצמחים (Goodwin et al., 1999). השלכה מעשית לממצא זה הוא קיצור משמעותי במשך הזמן עד להופעת תסמינים במבחני הרכבות של חומר צמחי חשוד בנגיעות בפיטופלסמה AWb על גבי כנות בריאות. בנוסף לכך ניסוי זה מציג לראשונה אפיון של משרעת הטמפרטורות המתאימה להתפשטות פיטופלסמה AWb. חזרה על ניסוי זה בעזרת הרכבות של חומר צמחי נגוע בפיטופלסמות מגזעים שונים תאפשר את אפיון משרעת הטמפרטורות המאפשרת חלוקה והתפשטות של פיטופלסמות נוספות.

4.4 פיזור חלקיקי פיטופלסמה בצמחי וינקה

בעבודה זו אופיינו לראשונה ריכוזי הפיטופלסמה AWb באיברים השונים של צמחי וינקה. האזורים העיקריים לאכלוס פיטופלסמה שנמצאו הם איברי מבלע הכוללים שורשים ואיברים בעלי צימוח לא נורמאלי. צימוח לא נורמאלי כלל עלים בעלי מבנה דורי ופרחים בעלי תסמינים חמורים. אולם לא נמצאה שונות מובהקת (במבחן ANOVA, $p < 0.05$) בין כלל עלי המקור למבלע בעלי צמיחה נורמאלית. בהתאמה לתוצאות אלו דווח בעבר על מציאת הפיטופלסמה PD ברקמות מבלע בצמחי פפאיה (*Carica papaya*) שכללו עלי מבלע ושורשים, ואילו עלי מקור נשארו בלתי נגועים (Siddique et al., 1998). מנגד ממצאים הפוכים של ריכוזים גבוהים בעלי מקור ואכלוס נמוך של רקמות מבלע נמצאו בצמחי ורד (*Rosa multiflora*) וחלבוב הדור (*Euphorbia pulcherrima*) הנגועים בפיטופלסמה AY ו-PBI בהתאמה (Christensen et al., 2004; Kaminska et al., 2003). מכיוון שנבדקו זני פיטופלסמה שונים בכל אחד מהניסויים ניתן להניח כי לפיטופלסמות שונות יכולים להיות מאפייני פיזור שונים בצמחים שונים. אולם קיימים הסברים אפשריים נוספים למאפייני הפיזור השונים, היכולים לנבוע מתנאי ניסוי שונים כדוגמת משך פרק הזמן מההדבקה, סוג המאחסן הצמחי, חומרת המחלה בצמחים, זן הפיטופלסמה ושיטת המדידה של ריכוז הפיטופלסמה. מכיוון שבניסוי שבוצע על ידינו פרק הזמן מההדבקה היה זהה והצמחים הראו אותה חומרת מחלה. לפיכך יכול להיות שהיו מתקבלות תוצאות פיזור שונות עם שינוי פרק הזמן מההדבקה או שימוש בצמחים עם חומרת מחלה שונים. אולם בדיקת השפעת המאחסן הצמחי על פיזור אותו גזע פיטופלסמה בצמחים שונים בתנאי ניסוי זהים הוא נושא למחקר עתידי. מחקר שכזה יוכל לקבוע האם פיזור גזע פיטופלסמה מסוים הוא קבוע ללא תלות בסוג המאחסן הצמחי.

4.5 השתנות ריכוז חלקיקי פיטופלסמה בוינקה לאורך זמן

הערכה של ריכוזי הפיטופלסמה מהסוגים BI, CY ו-AP בוצעה בעבר תוך שימוש בשיטת ה-Real-Time PCR בצמחים שונים (Christensen et al., 2004; Marzachi and Bosco, 2005; Torres et al., 2005). במחקרים אלו נמדדו ריכוזי פיטופלסמה שונים בטווח נרחב של 1×10^3 - 1×10^7 חלקיקי פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי עבור פיטופלסמות שונות. במחקרנו נמצא שריכוזי הפיטופלסמה AWb בעורקים של עלי מבלע נעים בטווח של כ- 1×10^7 - 7×10^9 חלקיקי פיטופלסמה

למיקרוגרם DNA צמחי. לפיכך ניתן להסיק שפיטופלסמות שונות מאופיינות בריכוזים שונים. בנוסף לכך ניתן להסיק שריכוזי הפיטופלסמה AWb בעורקים של עלי מבלע הם הגבוהים ביותר שדווחו אי פעם עבור פיטופלסמה כלשהיא. אולם באף אחד מהמחקרים הקודמים לא בוצע מעקב אחר השתנות ריכוז הפיטופלסמה בצמחים לאורך זמן. לפיכך בעבודה זו אפיינו את השתנות ריכוז הפיטופלסמה AWb בעורקים של עלי מבלע בצמחי וינקה. מהתבוננות בתמונות 45-47, המציגות את ריכוזי הפיטופלסמה כפונקציה של פרק הזמן מההדבקה, ניתן לראות שמהלך המחלה בצמח מתחלק לשני שלבים עוקבים עיקריים. השלב הראשון הוא שלב התחלתי קצר הנמשך 14-21 יום ומאופיין בעלייה מהירה בריכוז החיידק מריכוז של 1×10^7 פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי עד לריכוז של 1×10^9 פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי. אולם מכיוון שתחילת התפשטות של הפיטופלסמה AWb תלויה בטמפרטורת הסביבה לכן גם תחילתו של שלב זה תלויה בטמפרטורת הסביבה. בנוסף לכך נמצא שמשכו של שלב זה מתקצר עם העלייה בטמפרטורת הסביבה.

השלב השני הוא שלב המשכי תמידי המאופיין בריכוזי פיטופלסמה הנעים בטווח של $1-7 \times 10^9$ פיטופלסמה למיקרוגרם DNA צמחי ללא תלות במשרעת הטמפרטורות של הסביבה. הימצאות טווח ריכוזי פיטופלסמה בצמחי וינקה שונים יכולה להיות תוצאה הנגרמת משיווי משקל דינאמי בין כמות הנוטריינטים הזמינים במאחסן הצמחי ואוכלוסיית הפיטופלסמה שצורכת אותם. אולם קיימת אפשרות שמגבלה זו בריכוזי הפיטופלסמה יכולה להיגרם מויסות פעיל של הפיטופלסמה על אוכלוסייתה, שהתפתחה אבולוציונית לשם שמירה על חיות המאחסן הצמחי. בנוסף לכך הקיצור במשך הזמן עד להגעה לשלב השני עם העלייה בטמפרטורות הסביבה יכול להיות מוסבר ע"י קיום חלוקה מהירה יותר של הפיטופלסמה הנ"ל במשרעת הטמפרטורות הגבוהה יותר. קביעת השתנות ריכוזי הפיטופלסמה AWb לאורך זמן בצמחים נוספים מלבד וינקה תוכל להבהיר את אופיים של הגורמים לטווח ריכוזי הפיטופלסמה בשלב התמידי. ואילו קביעת השתנות ריכוזי פיטופלסמות נוספות מלבד AWb לאורך זמן בצמחים שונים תוכל לאשר או לשלול את קיומם של מאפיינים אחידים לשינוי בריכוזי אוכלוסיית הפיטופלסמה במאחסנים הצמחיים.

רשימת ספרות

- Ahrens, U., Seemuller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*. 82, 828-832.
- Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Arzone, A., 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology*. 6(2), 115-121.
- Angelini, E., Luca Bianchi, G., Filippin, L., Morassutti, C., Borgo, M., 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*. 68(3), 613-622.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., Hogenhout, S. A., 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*. 188(10), 3682-3696.
- Baric, S., Dalla-Via, J., 2004. A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*. 57(1), 135-145.
- Beanland, L., Hoy, C. W., Miller, S. A., Nault, L. A., 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 93, 271-276.
- Berg, M., Davies, D. L., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C., Seemuller, E., 1999. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology*. 145(8), 1937-1943.
- Berg, M., Melcher, U., Fletcher, J., 2001. Characterization of *Spiroplasma citri* adhesion related protein SARP1, which contains a domain of a novel family designated sarpin. *Gene*. 275(1), 57-64.
- Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., Kirkpatrick, B. C., 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease

- phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology*. 147(3), 571-580.
- Bonnet, F., Saillard, C., Claude-Vignault, J., Garnier, M., Carle, P., Bove, J. M., Rose, D. L., Tully, J. G., Whitcomb, R. F., 1991. *Acholeplasma-Seiffertii* sp. nov., a mollicute from plant surfaces. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41(1), 45-49.
- Bressan, A., Clair, D., Semetey, O., Boudon-Padieu, E., 2005. Effect of two strains of Flavescence doree phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89(2), 144-149.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., 2001. Transmission characteristics of the european stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*. 107(7), 695-700.
- Caudwell, A., Larrue, J., Boudon-Padieu, E., and McLean, G. D., 1997. Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 3, 21-25.
- Chang, C. J., Lee, I-M. (1995). Pathogenesis of diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: Singh, U. S., Singh, R.P., Kohmoto, K., (Eds.), *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*, Vol. 1. Elsevier Press, New York, pp. 237-246.
- Chen, T.-A., Lei, J.D., Lin, C.P., 1992. Detection and identification of plant and insect mollicutes, In: Whitcomb, R. F., Tully, J.K., (Eds.), *Detection and identification of plant and insect mollicutes*, Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 393-424.
- Chiykowski, L. N., 1991. Vector-pathogen host plant relationships of clover phyllody mycoplasma-like organism and the vector leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 13, 11-18.
- Chiykowski, L. N., Sinha, R. C., 1989. Differentiation of MLO disease by means of symptomatology and vector transmission. *Zentralblatt für Bakteriologie, Suppl.* 20, 280-287.
- Choi, Y. H., Tapias, E. C., Kim, H. K., Lefeber, A. W., Erkelens, C., Verhoeven, J. T., Brzin, J., Zel, J., Verpoorte, R., 2004. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology*. 135(4), 2398-2410.
- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., Schulz, A., 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*. 10(11), 526-535.

- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schulz, A., 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 17(11), 1175-1184.
- Cohen, J., Gera, A., Zoraël, S., Ben-David, Z., Alexandrov, S. a. T., E., 1999a. The Celosia yellow disease. *Dapey Medaa*. 7, 56-57. (In Hebrew).
- Cohen, J., Ziedan, M., Alexandrov, S., Ben-David, Z., and Gera, A., 2000. *Verbesina encelioides*, a new host for the yellow disease in Israel. *Pracheem*. 2, 72-73. (In Hebrew).
- Cohen, J., Zeidan, M., Gotman, S., Zoraël, S., Alexandrov, S. and Gera, A., 1999b. The yellow disease in Cosmos in Israel. *Dapey Medaa*. 4, 77-78. (In Hebrew).
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. A., Oropeza, C., 2003. In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology*. 4(2), 99–108.
- Davis, R. E., Lee, I-M., 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*. 83, 1008-1011.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991a. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*. 14, 53-61.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991b. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 81, 1475-1479.
- Doi Y.M., Y., K., Asuyama, H., 1967. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 33, 259-266.
- Galetto, L., Bosco, D., and Marzachi, C., 2005. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescentia dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Annals of Applied Biology*. 147, 191-201.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M. A., Laviña, A., Batlle, A., 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*. 52, 513-520.

- Gera, A., Alexandrov, M., L., Rosner, A., Antignus, Y., Lampel, M., Masika, Y., Weintaub, P. and Ziedan, M., 2003. Cyclamen: A new disease caused by phytoplasma. *Pracheem*. 25, 58-60. (In Hebrew).
- Gera, A., Cohen, J., Alexandrov, S., Oku, O., Navon, A., Fiboniah, S., Zuberi, G., and Ziedan, M., 2001. Limonium: A new disease caused by phytoplasma. *Pracheem*. 5, 51-53. (In Hebrew).
- Gera, A., Maslenin, L., Rosner, A., Zeidan, M., Pivonia, S., Weintraub, P. G., 2004. A new disease in Limonium hybrids. I. Molecular identification. *Hortscience*. 39(5), 1056-1059.
- Gera, A., Mawassi, M., Zeidan, M., Spiegel, S., Bar-Joseph, M., 2005. An isolate of 'Candidatus Phytoplasma australiense' group associated with Nivun Haamir dieback disease of papaya in Israel. *Plant Pathology*. 54, 560.
- Goodwin, P. H., Mahuku, G. S., Liu, H., Xue, B. G., 1999. Monitoring phytoplasma in populations of aster leafhoppers from lettuce fields using the polymerase chain reaction. *Crop Protection*. 18(2), 91-99.
- Goodwin, P. H., Xue, B. G., Kuske, C. R., Sears, M. K., 1994. Amplification of plasmid DNA to detect plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Annals of Applied Biology*. 124, 27-36.
- Gundersen, D. E., Lee, I-M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*. 35, 114-151.
- Gundersen, D. E., Lee, I. M., Rehner, S. A., Davis, R. E., Kingsbury, D. T., 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis of their classification. *Journal of Bacteriology*. 176, 5244-5254.
- Hackett, K. J., Whitcomb, R. F., French, F. E., Tully, J. G., Gasparich, G. E., Rose, D. L., Carle, P., Bove, J. M., Henegar, R. B., Clark, T. B., Konai, M., Clark, E. A., Williamson, D. L., 1996. *Spiroplasma corruscae* sp nov, from a firefly beetle (Coleoptera: Lampyridae) and tabanid flies (Diptera: Tabanidae). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46(4), 947-950.
- Haggis, G. H., Sinha, R. C., 1978. Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology*. 68, 677-680.

- Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S., Damak, S., 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*. 11(1), 97-103.
- Jagoueix-Eveillard, S., Tarendeau, F., Guolter, K., Danet, J. L., Bové, J. M., Garnier, M., 2001. *Catharanthus roseus* Genes Regulated Differentially by Mollicute Infections. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 14(2), 225-233.
- Junqueira, A., Bedendo, I., Pascholati, S., 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65, 181-185.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 150(1), 135-142.
- Kaminska, M., Podwyszyska, M., Sliwa, H., 2005. Phytoplasma detection in rose shoots propagated in vitro. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 74(3), 181-186.
- Kaminska, M., Sliwa, H., Malinowski, T., Skrzypczak, C., 2003. The Association of Aster Yellows Phytoplasma with Rose Dieback Disease in Poland. *Jornal of Phytopathology*. 151, 469-476.
- Khan, A. J., Botti, S., Al-Subhi, A.M., Gundersen-Rindal, D. E., Bertaccini, A.F., 2002a. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches'-broom in Oman. *Phytopathology*. 92, 1038-1047.
- Khan, A. J., Botti, S., Paltrinieri, S., Al-Subhi, A.M., Bertaccini, A.F., 2002b. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? In: Abstracts, 14th International Organization of Mycoplasma Conference. Vienna, Austria, pp. 148.
- Klein, M., 1995. Mycoplasma-like organisms and spiroplasma in ornamentals, In: Loebenstein, G., Lawson, R. and Brunt, A. (Ed.), *Mycoplasma-like organisms and spiroplasma in ornamentals*, pp. 77-83.
- Kollar, A., Seemuller, E., 1989. Base composition of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Phytopathologische Zeitschrift*. 127, 177-186.

- Konai, M., Clark, E. A., Camp, M., Koeh, A. L., Whitcomb, R. F., 1996. Temperature ranges, growth optima, and growth rates of Spiroplasma (Spiroplasmataceae, class Mollicutes) species. *Current Microbiology*. 32(6), 314-319.
- Konai, M., Whitcomb, R. F., French, F. E., Tully, J. G., Rose, D. L., Carle, P., Bove, J. M., Hackett, K. J., Henegar, R. B., Clark, T. B., Williamson, D. L., 1997. *Spiroplasma litorale* sp nov, from tabanid flies (Tabanidae: Diptera) in the southeastern United States. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47(2), 359-362.
- Kuboyama, T., Huang, C. C., Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., Namba, S., 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 11(11), 1031-1037.
- Kunkel, L. O., 1926. Studies on aster yellows. *American Journal of Botany*. 13(10), 646-705.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Biotechnology*. 227, 680-685.
- Lee, I. M., Davis, R.E., 1992. Mycoplasmas which infect plants and insects, In: Maniloff, R. N. M. J., Finch L. R. and Baseman, J. B. (Eds.), *Mycoplasmas which infect plants and insects*, American Society for Microbiology Press, Washington, pp. 379-390.
- Lee, I. M., Davis, R. E., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Fletcher, J., 1992. A genomic-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology*. 82, 977-986.
- Lee, I. M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal, D. E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*. 54, 221-255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Bertaccini, A., 1998a. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*. 88, 1359-1366.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M., 1998b. Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1153-1169.

- Lee, I.-M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W., Davis, R.E., 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*. 84, 559-566.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., Gundersen, D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*. 83, 834-842.
- Lee, I. M., Klopmeier, M., Bartoszyk, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Chou, T. S., Thomson, K. L., Eisenreich, R., 1997. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nature Biotechnology*. 15(2), 178-182.
- Liefting, L. W., Shaw, M. E., Kirkpatrick, B. C., 2004. Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Microbiology*. 150(6), 1809-1817.
- Lim, P. O., Sears, B.B., 1989. 16S rRNA sequences indicated that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*. 171, 5901-5906.
- Lim, P. O., Sears, B.B., 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*. 174, 2606-2611.
- Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemuller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*. 85, 771-776.
- Marzachi, C., Bosco, D., 2005. Relative quantification of chrysanthemum yellows (16Sr I) phytoplasma in its plant and insect host using real-time polymerase chain reaction. *Molecular Biotechnology*. 30(2), 117-128.
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Cang, C.J., Chen, T. A., Chiykowski, L.N. (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: Whitcomb, R. F., Tully, J.K., (Eds.), *The Mycoplasmas*, Vol. 5. Academic Press, New York. pp. 545-560.
- Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H. Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2002a. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene*. 298(2), 195-201.
- Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H. Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2002b. Evidence of intermolecular recombination between

- extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology*. 148(5), 1389-1396.
- Oduori, M. A., Lipa, J. J., Gasparich, G. E., 2005. *Spiroplasma leucomae* sp nov., isolated in Poland from white satin moth (*Leucoma salicis* L.) larvae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 2447-2450.
- Orenstain, S., Frank, A., Kuznetzova, L., Sela, I., Tanne, E., 1999. Association of phytoplasmas with a yellows disease of carrot in Israel. *Journal of Plant Pathology*. 81(3), 193-199.
- Orenstain, S., Zahavi, T., Nestel, D., Sharon, R., Barkalifa, M. a. W., P. G., 2003. Spatial dispersion patterns of potential leafhopper and planthopper (Homoptera) vectors of phytoplasma in wine vineyards. *Annals of Applied Biology*. 142, 341-348.
- Orenstain, S., Zahavi, T., Weintraub, P., 2001. Distribution of phytoplasma in grapevines in the Golan Heights, Israel, and development of a new universal primer. *Vitis*. 40(4), 219-223.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*. 36(1), 27-29.
- Razin, S., 1999. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Bioscience Reports*. 19(5), 367-372.
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4), 1094-1156.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C., Seemuller, E., 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*. 139, 519-527.
- Schneider, B., Gibb, K. S., Seemuller, E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*. 143(10), 3381-3389.
- Schneider, B., Seemuller, E., 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic Mollicutes. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(9), 3409-3412.

- Seemuller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Goschl, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*. 80, 3-26.
- Shen, W. C., Lin, C. P., 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweet potato 'whiches' broom. *Phytopathology*. 83(6), 671-675.
- Siddique, A. B. M., Guthrie, J. N., Walsh, K. B., White, D. T., Scott, P. T., 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease*. 82(10), 1112-1120.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemuller, E., Kirkpatrick, B. C., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(8), 2988-2993.
- Spiegel, S., Gera, A., S, Sobolov, Weintaub, P. and Ziedan, M., 2006a. Phytoplasma in cherries in the Golan Heights: A new detection. *Alon Hanotea*. 60, 40-44. (In Hebrew).
- Spiegel, S., Maslenin, L., Zeidan, M., Gor, S., Holdengreber, V., and Gera, A., 2006b. Phytoplasma in *Lavendula*. *Olam Haperach*. April, 52-53. (In Hebrew).
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H. Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., Namba, S., 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(11), 4252-4257.
- Tan, P. Y., Whitlow, T., 2001. Physiological responses of *Catharanthus roseus* (periwinkle) to ash yellows phytoplasmal infection. *New Phytologist*. 150, 757-769.
- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Monton, C., Martin, M. P., 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*. 19(5), 334-340.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76, 4350-4354.

- Tran-Nguyen, L. T., Gibb, K. S., 2006. Extrachromosomal DNA isolated from tomato big bud and candidatus phytoplasma australiense phytoplasma strains. *Plasmid*. 56(3), 153-166.
- Tully, J. G., Whitcomb, R. F., Rose, D. L., Bove, J. M., Carle, P., Somerson, N. L., Williamson, D. L., Edengreen, S., 1994. *Acholeplasma-brassiccae* sp-Nov and *Acholeplasma-palmae* sp-Nov, 2 non-sterol-requiring mollicutes from plant-surfaces. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(4), 680-684.
- Van Wely, K. H., Swaving, J., Freudl, R., Driessen, A. J., 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 25(4), 437-454.
- Webb, D. R., Bonfiglioli, R. G., Carraro, L., Osler, R., Symons, R. H., 1999. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology*. 89, 894-901.
- Wei, W., Kakizawa, S., Jung, H. Y., Suzuki, S., Tanaka, M., Nishigawa, H., Miyata, S.I., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T., and Namba, S., 2004. An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. *Phytopathology*. 94(7), 683-686.
- Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H. Y., Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T., Namba, S., 2003. In planta dynamic analysis of Onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*. 94(3), 244-250.
- Weintraub, P. G., Beanland, L., 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*. 51, 91-111.
- Weisburg, W. G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., Van Etten, J., Maniloff, J., Woese, C. R., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis of their classification. *Journal of Bacteriology*. 171, 6455-6467.
- Yu, Y. L., Yeh, K. W., Lin, C. P., 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology*. 144(5), 1257-1262.
- Zhong, B. X., Shen, Y. W., 2004. Accumulation of pathogenesis-related type-5 like proteins in phytoplasma-infected garland chrysanthemum *Chrysanthemum coronarium*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 36(11), 773-779.

נספח 1: ערכי כימות הפיטופלסמה (חלקיקי פיטופלסמה/ מיליגרם DNA צמחי) של איברים שונים בשמונה צמחי וינקה שהתקבלו ע"י Real-Time PCR. ----, לא נלקחה דוגמא בשל העדר מציאת איבר מסוג זה בצמח הנבדק.

שורשים	פרחים בעלי תסמינים:				עורקים ראשיים מעלי:			משטר טמפר טורה	צמח
	חמורים	מתונים	חלשים	ללא	מבנה דורי	מבלע	מקור		
4.62E+0 8	6.53E+0 8	3.59E+0 8	6.40E+8 0	4.11E+6 0	-----	8.81E+8 0	7.46E+7 0	18/22° C	VP_6
8.68E+0 8	-----	1.95E+0 8	7.89E+0 7	4.27E+0 6	1.67E+0 9	2.03E+0 8	3.45E+0 8		VP_4
5.77E+0 8	8.08E+0 8	5.96E+0 8	2.18E+0 9	3.28E+0 7	2.69E+0 9	2.66E+0 8	9.52E+0 8		VP_9
2.64E+0 9	8.29E+0 8	6.45E+0 8	4.31E+0 8	2.88E+0 6	-----	5.62E+0 8	3.21E+0 8		VP_3
2.12E+0 9	2.15E+0 9	1.22E+0 9	1.24E+0 9	5.11E+0 6	1.19E+0 9	9.62E+0 7	2.20E+0 7	21/29° C	VP_2
3.46E+0 8	1.59E+1 0	9.42E+0 8	1.13E+0 8	6.82E+0 6	5.94E+0 9	1.00E+0 9	3.13E+0 7		VP_8
8.05E+0 9	1.85E+0 9	2.45E+0 9	-----	3.31E+0 6	3.95E+0 9	7.20E+0 6	7.99E+0 6		VP_24
4.27E+0 9	-----	-----	6.35E+0 8	3.58E+0 6	1.71E+0 9	3.11E+0 8	1.05E+0 9		VP_30

fSt1600, whose design was based on the sequence of a variable 16S-23S spacer region present in the CPs genome.

Vinca plants were infected with AWb phytoplasma via grafting and kept in different temperature controlled greenhouses. Phytoplasma infection was examined by monitoring symptom development and by PCR amplification. We found that AWb phytoplasma is capable of spreading in infected plants in environmental temperatures ranging between 22 and 34°C with optimal spread occurring between 28 and 34°C. No pathogen spread was detected in environmental temperatures 17°C or lower. Determining the optimal temperature range for AWb phytoplasma spread in infected plants is important and could have an application in reducing the period of time required for the appearance of symptoms in graft-inoculated indicator plants. To our knowledge, this work is the first to examine the effects of different environmental temperatures on AWb phytoplasma spread in vinca plants. Similar experiments for various phytoplasmas could elucidate important pathological information and reveal relevant temperature range for additional phytoplasma strains.

The real-time PCR strategy developed in this research enabled quantification of AWb phytoplasma titers in different organs of AWb-infected vinca plants and determination of phytoplasma concentrations in sink-leaf veins along different periods of infection. We found, in AWb-infected vinca plants, that roots, severe-symptomatic flowers and circular-leaf proliferation of immature leaves were the main organs populated with phytoplasma. Following plant graft-inoculation, phytoplasma infection was found to be characterized by two main phases. A short period 14 to 21 days post infection, was characterized by rapid increase of the pathogen titer and measured to range from 1×10^7 to 1×10^9 phytoplasma particles for one microgram of the plant DNA. However, the duration of this step was dependant upon the environmental temperature and decreased in high temperatures. Phase two was characterized by pathogen titers ranged from $1-7 \times 10^9$ phytoplasma particles for each microgram of plant DNA and was not dependent on the environmental temperature.

Additional experiments are required to establish whether the results described here for infection of vinca plants with AWb phytoplasma are common to other phytoplasmas and plant hosts.

Abstract

Phytoplasmas, minute wall-less bacteria, grouped in the class *Mollicutes*, inhabit plant phloem sieve elements and cause yellows diseases and enormous economic damage to grain crops, fruits, vegetables and flowers. The pathogen spreads through vegetative propagation, grafting, parasitic plants and certain species of insects. Unlike most mycoplasmas, phytoplasmas cannot be cultured *in vitro* in cell-free media. In spite of the huge damage to agriculture caused by phytoplasmas, these pathogens have not been yet sufficiently characterized. Development of specific molecular-based probes (antibodies and cloned DNA fragments) has made it possible to gain new knowledge about phytoplasmas and to study their interrelationships with infected plants.

In the present work, we use vinca (*Catharanthus roseus*) as a model plant to investigate phytoplasma infection. Vinca is susceptible to a broad range of phytoplasma species and can maintain high pathogen titers. The main purpose of the work was characterization of three primary aspects of the Alfalfa witches' broom (AWb) phytoplasma population: 1) examination of environmental temperature effects on phytoplasma spread in infected plants, 2) characterization of phytoplasmal dispersal through various plant organs, and 3) time course tracking of phytoplasma concentration in sink leaves. We also describe a new method for identification and quantification of phytoplasma by means of real-time PCR amplifications.

Rabbit polyclonal antibodies against AWb phytoplasma enriched extracts were prepared and, using Western blot analysis, these antibodies were found to specifically detect at least three different proteins prepared from AWb-infected plants. AWb phytoplasma gene, which encodes the antigenic protein homolog of the phytoplasma SPWB, was isolated and cloned. The gene was expressed in *E. coli* and the resultant protein used to immunize a rabbit for the preparation of polyclonal antibodies. The AWb-Ap antibodies were specifically able to detect the recombinant protein expressed in *E. coli* cells but not in extracts of AWb infected plants. The identification of three separate proteins, thought to be AWb phytoplasmal antigenic proteins, offers an intriguing topic for a future study of pathogen-plant-insect protein interaction.

We developed a nested-PCR strategy to specifically identify infection with the Candidatus Phytoplasma solani (CPs). This method relied on the use of a specific primer,

**This work was carried out under the supervision of
Prof. Abed Gera
And Dr. Munir Mawassi
At the S. Talkowsky Laboratory,
Department of Virology, ARO,
The Volcani Center,
Bet-Dagan.**

**Quantitative characterization and
localization of Phytoplasma particles in
Catharanthus roseus (L)**

**Thesis submitted to the
Faculty of Agriculture of
The Hebrew University of Jerusalem
For the degree of
Master of Science**

**by
Gershon Tomer**

June, 2006

Rehovot