ממשק כולל להדברת מחלות וירוס בחסה

לאה צרור, שרה לביוש, אורלי ארליך

מחלת העורקים המעובים בחסה (Lettuce Big Vein Disease) נגרמת על ידי קומפלקס של שני וירוסים המועברים בקרקע ע״י הפטריה *Olpidium*. תסמיני המחלה כוללים הבהרת והגדלה בולטת של ״העורקים״ בעלים, עיוות העלים, כלורוזה ונינוס של הצמחים. איכות השיווק של צמחים הנגועים היא ירודה ביותר, ובנגיעות קשה הקולסים אינם ראויים לשיווק. המחלה מתפשטת וכיום מופיעה במרבית החלקות בהם מגדלים חסה במושבי אזור הבשור ומסבה נזקים כלכליים כבדים. בעבר בוצעו חיטויי קרקע באמצעות מתיל ברומיד שאסור כיום בשימוש. על כן חיטוי הקרקע כיום מבוצע בעיקר באמצעות תכשירי מתאם סודיום שיעילותם פחותה. בנוסף, התופעה של פירוק מואץ של התכשיר בקרקעות מסוימות (בעיקר בכאלו שבוצע בהן בעבר חיטוי במתאם סודיום) הולכת ומתגברת, ובחלקות בהן קיימת אינדיקציה לתופעה, לא ניתן להשתמש בתכשיר לחיטוי קרקע. מתחייב משום כל אלה עולה הצורך המיידי בפיתוח ממשק הדברה להתמודדות עם מחולל מחלת העורקים המעובים בחסה.

מטרת המחקר הכללית הינה פיתוח ממשק להתמודדות עם מחלת וירוס העורקים המעובים של החסה.

אחת מהמטרות הספציפיות שהוגדרה בעדיפות ראשונה היתה לזהות את הפתוגנים המעורבים.

דהיינו את הפטריה המשמשת כנשאית הוירוסים ואת הוירוסים המעורבים.

כמו כן התחלנו בפיתוח שיטה להערכת אוכלוסית הפטריה בקרקע ובשורשי הצמחים.

<u>שיטות וחמרים</u>

בתאריך 21.12.10 נדגמו צמחי חסה מזנים שונים עם סימפטומים של המחלה בחלקות מסחריות. בשדה ניצן נלקחו שתי דגימות של חסה ערבית, ובעין הבשור דגימה אחת של חסה אייסברג. כמו כן נלקחה דגימה של 1 ק״ג קרקע מאזור בית השורשים של הצמחים. הדגימות נלקחו למעבדה לוירולוגיה בוולקני ולמעבדה למחלות צמחים בגילת.

<u>צביעה ספציפית וזיהוי הפטרייה בשורשי הצמח באמצעות מיקרוסקופ</u>

שטיפת השורש במי ברז וחיתוך השורשים לסגמנטים באורך כ-10 מ״מ, הוספת 10% KOH ובישול באמבט בטמפרטורה של 80°C למשך שעתיים. שטיפה במי ברז וצביעה ב- Trypan Blue 0.05% בלקטוגליצרול (ח. לקטית, גליצרול ו- מים ביחס 1:1:1). לאחר 24 שעות בוצעה הסתכלות במיקרוסקופ.

<u>זיהוי בפטריה בשיטות מולקולאריות</u>

הפקת DNA מרקמה צמחית: יבוש בלאופילייזר של השורשים, כתישה בחנקן נוזלי והפקת DNA בקיט MaxWell Tissue תוצרת חברת Promega לפי הפרוטוקול של הקיט.

הפקת DNA מקרקע: באמצעות קיט GenMATRIX Soil DNA Purification Kit תוצרת חברת EURx לפי הפרוטוקול של הקיט. נבדקו 4 תת-דגימות מכל דגימת קרקע.

<u>פריימרים</u>

פריימרים בהם השתמשנו לזיהוי 2 מיני הפטריה *O. virulentu* and *O. brassicae* ב- PCR:

(ITS1 and ITS4) White et al. 1999; 2. (Ob1, Ob2, Ov1, and Ov2) Maccarone et al. 2010

(נבחנו כל שילובי הפריימרים הנ"ל).

פריימרים לזיהוי 3 מיני הפטריה: *O. brassicae*, *O. virulentus* and *O. bornovanu* ב:

Multiplex PCR (Herrera-Vásquez et al. 2009): (Species-specific forward primers:

OLPborF, OLPvirF, OLPbraF and Common reverse primer OLPR).

<u>תנאי ראקציית PCR (2): *O. brassicae* and *O. virulentus*</u>

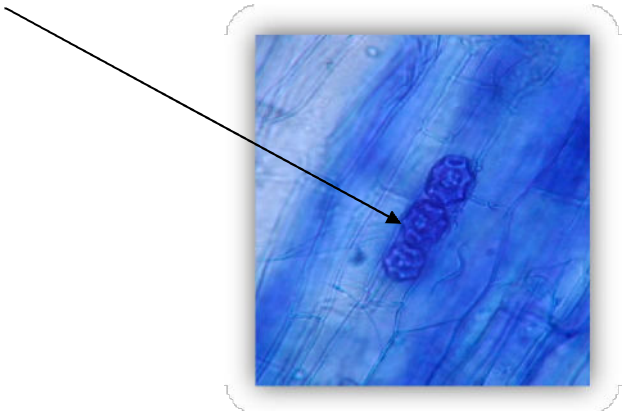
דנטורציה למשך 1 דקה נעשית ב94°C לאחר מכן 35 מחזורים של דנטורציה ב94°C למשך 30 שניות, התחברות התחלים נעשית בטמפרטורה של כ- 60°C למשך 30 שניות וההתארכות - בטמפרטורה של 72°C למשך 1 דקה. ושלב התארכות ב 72°C למשך 10 דקות לפני סיום ב14°C.

<u>תנאי ראקציית Multiplex PCR (1): *O. brassicae*, *O. virulentus* and *O. bornovanus*</u>

דנטורציה למשך 5 דקות נעשית ב94°C לאחר מכן 35 מחזורים של דנטורציה ב94°C למשך 45 שניות, התחברות התחלים נעשית בטמפרטורה של כ- 55°C למשך 1 דקה וההתארכות - בטמפרטורה של 72°C למשך 1 דקה. ושלב התארכות ב 72°C למשך 10 דקות לפני סיום ב10°C.

<u>תוצאות</u>

הפטריה הנראית מורפולוגית דומה לפטריה *Olpidium* – אובחנה בשורשי הצמחים הנגועים, לאחר צביעת שורשים (שדה ניצן). בצילום ניתן לראות את גופי הפטריה (spores).



אבחון בשיטות מולקולאריות

ממצאי PCR לדגימת הקרקע: בכל דגימות הקרקע התקבל הגברה ל *O. virulentus* בלבד (איור 1).

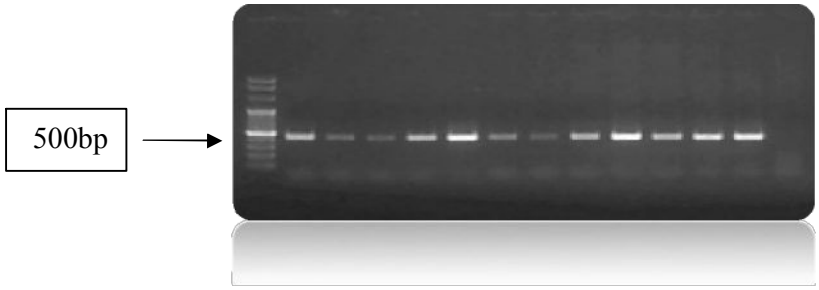


Fig 1- PCR amplified DNA from soil. Lanes 1- Negative control (sterile water), 2–5, soil from sample 1, 6–9 soil from sample 2, 10-13 soil from sample 3, 14- 100 bp DNA Ladder

- בכל דגימות הצמחים התקבל ה הגברה ל *O. virulentus* בלבד (איור 2).

Fig 2- PCR amplified DNA from plant. Lanes 1-100 bp DNA Ladder, 2-3 plant 1*, 4-5 plant 2, 6-7 plant 3, 8- no sample, 9- Negative control, 10 – soil 1 (Positive control) 10-100 bp DNA Ladder

*Plant 1 – בראקציה נוספת לאחר מיהול הDNA לריכוז 1.5 ng /reaction התקבל ה הגברה ל O. virulentus (לא מוצג, ראה גם איור 3 II lane 1)

בכל שילובי הפריימרים שנבדקו, התקבלה הגברה רק בשילוב הפריימרים של *O. virulentus* (ITS1 עם Ov2) , בנד בגודל כ- 500bp הן מהקרקע והן מהצמחים.

ממצאי Multiplex PCR : בריאקציה זו התקבלה הגברה של מקטעי DNA בגודל 579bp התואם ל *O. virulentus* בלבד, מהקרקע והצמחים (איור 3).
לא התקבלה הגברה של *O. bornovanus* או *O. brassicae* גם לא בריאקציה עם סט יחיד של הפריימרים הנ"ל .

I - קרקע II - צמחים

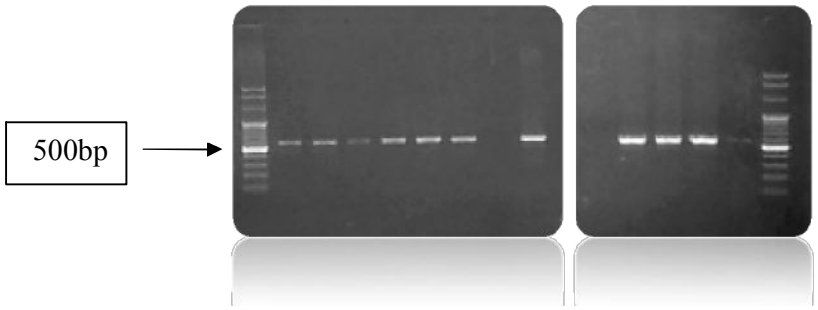
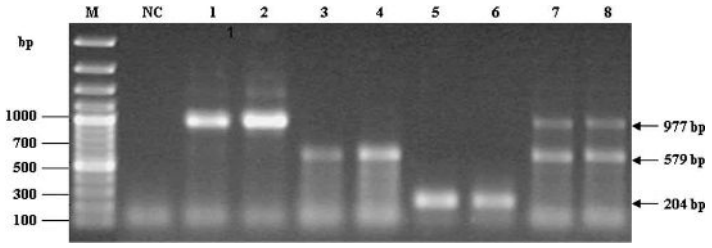


Fig 3 – Multiplex PCR amplified DNA from soil and root.
I) Lanes 1–100 bp DNA Ladder, 2- Negative control (sterile water), 2–4, soil from 3 sample
II) Lanes 1 plant 1 (DNA 1.5ng/rec.), 2- Negative control 3-4 plant 1, 5-6 plant 2, 7-8 plant 3, 9- 100 bp DNA Ladder.

מאחר ואין במעבדתנו ביקורות חיוביות של מיני האולפידיום השונים, להלן איור מהמאמר שעל פיו נעשתה העבודה (1).

זיהוי 3 מיני *Olpidium* בMultiplex PCR



Multiplex PCR amplified DNA of three Olpidium spp. from root bait plants.
Lanes 1–2, O. bornovanus; 3–4, O. virulentus; 5–6, O. brassicae; 7–8, O. bornovanus-dual infection detection with O. virulentus; NC, Negative control (sterile water); M, Gene Ruler_ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)

טבלה 1: סיכום ממצאים לזיהוי ואפיון הפטריה *Olpidium* בדגימות צמחים וקרקע שנערכו ב-3 שדות מסחריים בשדה ניצן ובעין הבשור (12.2010).

		O. virulentus		*O. bornovanus*		*O. brassicae*	
זן	אתר	קרקע	צמח	קרקע	צמח	קרקע	צמח
ערבית	שדה ניצן	חיובי	חיובי	שלילי	שלילי	שלילי	שלילי
ערבית	שדה ניצן	חיובי	חיובי	שלילי	שלילי	שלילי	שלילי
אייסברג	עין הבשור	חיובי	חיובי	שלילי	שלילי	שלילי	שלילי

<u>סיכום</u>

בדיגומי הקרקע והצמחים הנגועים מחלקות מסחריות בשדה ניצן ועין הבשור, אופיינה הפטריה *O. virulentus*.

נבדקו שיטות (מיקרוסקופית ומולקולאריות) לזיהוי הפטרייה ברקמת השורשים של צמחי חסה הנגועים בווירוס. כמו כן נעשתה אופטימיזציה של השיטה המולקולרית להערכת הנגיעות בפטריה בקרקע ובשורשי הצמחים.

<u>ספרות</u>

1. Herrera-Vásquez, JA, Cebrian MC, Alfaro-Fernandez A, Cordoba-Selles MC, Jorda C. 2009. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. Mycological Research 113:602– 610.

2. Maccarone, L. D., Barbetti, M. J., Sivasithamparam, K., and Jones, R. A. C. 2010. Molecular genetics characterization of *Olpidium virulentus* isolates associated with big-vein diseased lettuce plants. Plant Dis. 94:563-569.

3. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for polygenetics.Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Inns, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, New York.