

ממשק כולל להדברת מחלות וירוס בחסה

Comprehensive management program for the control of virus disease in Lettuce

שותפים:

משה אלבו (elbazmoshe@mopdarom.org.il), מייקל לופטהאוס, דב צהר, מירון סופר, חיים לינרס,

ליאנה גנות- מו"פ דרום, חוות הבשור.

לאה צרור, שרה מרדכי לביוש-מחלות צמחים, מינהל המחקר החקלאי, גילת.

אביב דומברובסקי, עודד לכמן - מחלות צמחים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

אברהם גמליאל- המכון להנדסה חקלאית, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

גדי צפרייר- ממ"ר גידולי עלים וכרוביים, שה"מ.

תקציר:

בשנה החולפת נבחנו מגוון שיטות לזיהוי מיני הפטרייה והוירוסים המעורבים במחלת העורקים המעובים של החסה. נעשתה אופטימיזציה של השיטה המולקולארית והסרולוגית להערכת הנגיעות בפטרייה בקרקע ובשורשי הצמחים והוירוס בצמחים. בדיגומי הקרקע והצמחים הנגועים מחלקות מסחריות בשדה ניצן ועין הבשור נמצא כי קיים הבדל בשכיחות מיני ה- *Olpidium* שמאכלסים את רקמת השורשים של צמחי חסה, כרוב וצמחי בר כתלות בצמח הפונדקאי ובעונה עם דומיננטיות של *O. virulentus* בצמחי חסה המראים סימני מחלה. הבדלים גדולים נמצאו גם בשכיחות הוירוסים המעורבים במחלה עם דומיננטיות של MiLBV. ניסויי הדבקה והדברה של הפטרייה בעציצים מראים כי ניתן בקלות יחסית לאלח קרקע נקייה ב-*Olpidium* וכי נוכחותם של חומרים משטחים בקרקע מפחיתה את סיכויי המעבר של הוירוס לצמחים. יש להמשיך ולבדוק את יעילותם של חומרים אלו בניסויי שדה. כמו כן הזמינות של חלקות נגועות יאפשר בהמשך לבצע ניסויי הדברה, חיטוי קרקע, טיפולי המתת שורשים ומבחני זנים בחלקות מסחריות.

תוכן עניינים:

<u>עמוד</u>	<u>כותרת</u>
4	1. מבוא
4	2. מטרת המחקר
4	2.1 מטרת ספציפיות
5	3. פרוט עקרי הניסויים והממצאים.
5	3.1 הגדרה, אפיון ובדיקת שכיחות הפטרייה <i>Olpidium</i> spp.
5	3.1.1 צביעה ספציפית וזיהוי הפטרייה בשורשי הצמח באמצעות מיקרוסקופ
5	3.1.2 זיהוי הפטרייה בשיטות מולקולאריות שונות
6	3.1.3 בדיקת שכיחות מיני הפטרייה בחבל הבשור
7	3.2 הגדרה, אפיון, ובדיקת שכיחות מיני הוירוסים
7	3.2.1 כיול מערכת לזיהוי הוירוסים באמצעות שיטות מולקולאריות וסרולוגיות
9	3.2.2 אפיון הוירוסים
9	3.2.3 שכיחות מיני הוירוסים בדגימות מחבל הבשור
10	3.3 ניסויי הדבקה במערכת מבוקרת
11	3.4 ניסויי הדברה ראשוני בדליים באמצעות חומרים משטחים
12	4. דיון
12	4.1 אפיון מיני הפטרייה ושכיחותם באזור הבשור
12	4.2 שיטות עבודה מועדפות לזיהוי הוירוסים ושכיחותם באזור הבשור
12	4.3 אפיון רצף הוירוסים בהשוואה למה שנמצא באזורים אחרים בעולם
13	4.4 המשך הפעילות בשנה הקרובה בהתאמה למה שנלמד ובהתאמה לתוכנית המחקר
14	5. מקורות.

1. מבוא:

מחלת העורקים המעובים של החסה נפוצה באזורים ממוזגים רבים בעולם. סימני המחלה בולטים בעיקר בחורף בטמפרטורות קרקע נמוכות מ-20 מ"צ ומתבטאים בהבהרה של הכלורופיל סביב העורקים בעלים, לסול העלים, נינוס של הצמחים וירידה באיכות הקולס לשיווק (Zink and Grogen 1954, Ryder). ידועים שני וירוסים המעורבים במחלה: האחד, *Lettuce big vein associated virus* (LBVaV) מהסוג *Varicosavirus* והשני, *Mirafiori lettuce big vein virus* (MiLBV) מהסוג *Ophiovirus* (Lot et al. 2002). הווקטור של שני מיני הוירוסים הינן פטריות מהסוג אולפידיום (*Olpidium*). טפיל אובליגטורי זה מעביר את הוירוסים לשורשים בריאים של הצמח הפונדקאי באמצעות זואוספורות ובהעדר פונדקאי מתאים גופי הקיימא מסוגלים לשרוד בקרקע ולשמר את יכולת ההדבקה במשך עשרות שנים. מחקרים שנעשו בשנים האחרונות מתארים לפחות שני מינים של פטריות (*Olpidium virulentus*, *Olpidium brassicae*, בעלי פוטנציאל העברה של לפחות אחד מהוירוסים הגורמים למחלה. הזיהוי של מיני הפטרייה והוירוסים נעשה באמצעות כלי זיהוי מורפולוגיים, מולקולאריים, וסרולוגיים. (Navarro et al. 2004, Herrera-Vasquez et al. 2009, Maccarone et al. 2010). בארץ, המחלה מתפשטת בשנים האחרונות ונפוצה מאוד אצל מגדלים רבים ובמיוחד בקרקעות שמעובדות בצורה אינטנסיבית בשל חוסר היכולת לקיים מחזור גידולים עקב מגבלות שטח. כל אלו דורשים פיתוח ממשק הכולל פתרונות קצרי וארוכי טווח להתמודדות עם התפשטות מחלת העורקים המעובים בחבל הבשור.

2. מטרת המחקר הכללית:

פיתוח ממשק להתמודדות עם מחלת וירוס העורקים המעובים של החסה.

2.1 מטרת ספציפיות:

1. זיהוי מיני הפטרייה המעורבת בהעברת המחלה ופיתוח שיטה להערכת האוכלוסייה בקרקע ובשורשי הצמחים.
2. אפיון התנאים הנדרשים להתפשטות פטריות *Olpidium* ובחינת כשר ההישרדות שלה ושל הוירוסים שהיא נושאת בתנאי אזור הבשור.
3. פיתוח גלאי מולקולארי ספציפי לאבחון מהיר של כל אחד מהוירוסים המעורבים ביצירת המחלה.
4. פיתוח שיטת אילוח בתנאי מעבדה שתאפשר יצירת מחלה לצורך סריקת עמידות וסריקה מהירה של קוטלי פטריות היעילים בצמצום המחלה.

3. פירוט עיקרי הניסויים והמצאים

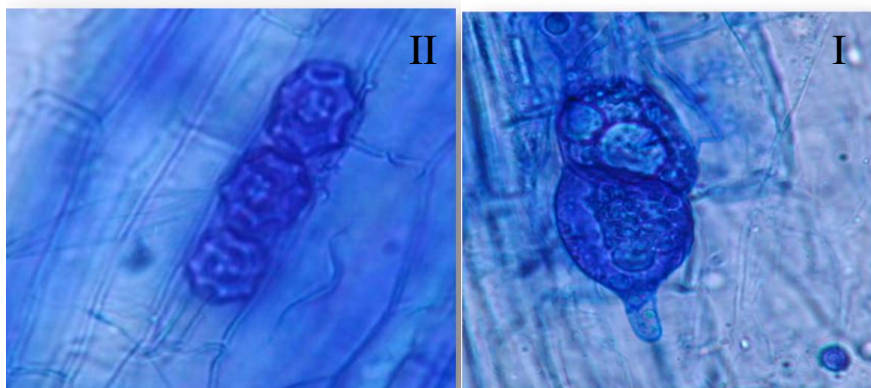
3.1 הגדרה, אפיון ובדיקת שכיחות הפטרייה *Olpidium* spp.

3.1.1 צביעה ספציפית וזיהוי הפטרייה בשורשי הצמח באמצעות מיקרוסקופ

שטיפת השורש במי ברז וחיתוך השורשים לסגמנטים באורך כ-10 מ"מ, הוספת KOH 10% 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. מכל דגימה נבדקו כ- 13-15 סגמנטים באורך של כ- 1 ס"מ. בשורשי צמחים נגועים בוירוס אשר נדגמו בחלקה מסחרית בשדה ניצן (2010) זוהתה הפטרייה *Olpidium* על פי המורפולוגיה שלה (תמונה 1).

(באנליזת PCR זוהה המין כ *O. virulentus*).

תמונה 1: גופי הפטרייה שזוהו בתוך תאי השורש של חסה (שדה ניצן): (I) Zoospore cysts, (II) Spores.



3.1.2 זיהוי הפטרייה בשיטות מולקולאריות שונות

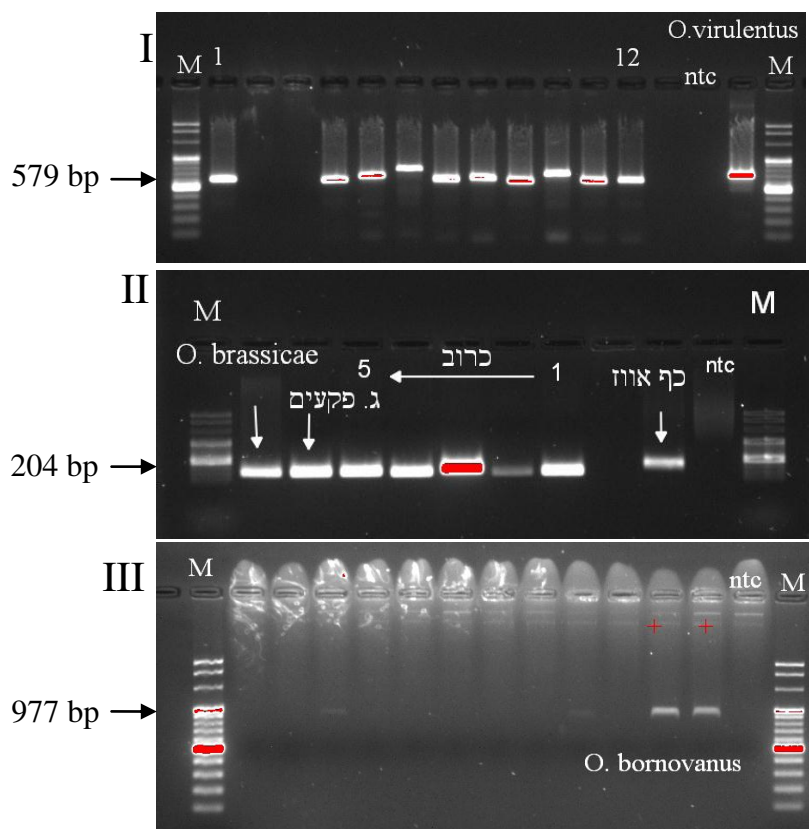
הפקת DNA מרקמה צמחית: יבוש בלאופיליזר של השורשים, כתישה בחנקן נוזלי והפקת DNA בקיט MaxWell Tissue תוצרת חברת Promega לפי הפרוטוקול של הקיט. הפקת DNA מקרקע: באמצעות קיט GenMATRIX Soil DNA Purification Kit תוצרת חברת EURx לפי הפרוטוקול של הקיט. מכל דגימת קרקע נבדקו 4 תת-דגימות.

אנליזת PCR ו-Multiplex PCR

השתמשנו בפריימרים ספציפיים לזיהוי שני מיני הפטרייה *O. brassicae* and *O. virulentus*: White et al. 1999 (ITS1 and ITS4); 2. (Ob1, Ob2, Ov1, and Ov2) Maccarone et al. 2010. תנאי ראקציית PCR: דנטורציה למשך דקה ב-94°C לאחר מכן 35 מחזורי דנטורציה ב-94°C למשך 30 שניות, התחברות התחלים נעשית בטמפרטורה של כ- 60°C למשך 30 שניות, התארכות בטמפרטורה של 72°C למשך 1 דקה, שלב התארכות ב 72°C למשך 10 דקות לפני סיום ב-14°C. בבדיקת כל צרופי הפריימרים הנ"ל משורשי 3 צמחים הנגועים בוירוס ומקרקע מאזור בית השורשים משדה ניצן ועין הבשור התקבלה הגברה רק של הפטרייה *O. virulentus* (500 bp).

לזיהוי 3 מיני הפטרייה: *O. brassicae*, *O. virulentus* and *O. bornovanus*: השתמשנו בפריימרים באמצעות Multiplex PCR (Herrera-Vásquez et al. 2009) (Species-specific forward primers: OLPborF, OLPvirF, OLPbraF and Common reverse primer OLPR). תנאי ראקציית Multiplex PCR: דנטורציה למשך 5 דקות ב-94°C לאחר מכן 35 מחזורים של דנטורציה ב-94°C למשך 45 שניות, התחברות התחלים נעשית בטמפרטורה של כ-55°C למשך דקה, ההתארכות בטמפרטורה של 72°C למשך 1 דקה. שלב התארכות ב-72°C למשך 10 דקות לפני סיום ב-10°C. בבדיקת הפריימרים הנ"ל מ-DNA שהופק משורשי צמחים נגועים בוירוס ומקרקע מאזור בית השורשים (שנדגמו בחלקות משדה ניצן ועין הבשור) התקבלה הגברה של שלושת מיני הפטרייה לאור תוצאות אלה, הוחלט להמשיך בכל האנליזות המולקולאריות בסט זה של 3 זוגות הפריימרים הנ"ל בכדי לאבחן את שלושת מיני הפטרייה (תמונה 2).

תמונה 2: גודל תוצרי PCR שהוגברו משלושת מיני הפטרייה: (I) *O. brassicae*, (II) *O. virulentus*, (III) *O. bornovanus* ונראים לאחר הרצתם בג'ל אגרוז.



3.1.3 בדיקת שכיחות מיני הפטרייה בחבל הבשור

כדי לקבוע את שכיחות מיני הפטרייה בקרקע ובצמחים בחבל הבשור נערך סקר בין התאריכים: דצמבר 2010 עד דצמבר 2011. מכל חלקה נדגמו בין 3 ל-12 צמחים. בדיגום הראשון שנערך בחורף 2010 בחלקות חסה נגועות בוירוס (שדה ניצן ועין הבשור) אובחן המין *O. virulentus* בלבד, הן בשורשי הצמחים והן בקרקע (טבלה 1).

בקיץ-סתיו 2011 נדגמו צמחי חסה וקרקע מחלקות מסחריות בשדה ניצן ועין הבשור. בדגימות הקרקע אובחנו *O. virulentus* ו-*O. brassicae* בשיעור נגיעות של 40% או 80%-100%, בהתאמה. המין השלישי *O. bornovanus* לא נמצא. בצמחי החסה אופיינו הפטריות *O. virulentus* ברמות נמוכות (כ- 3.0%), ו-*O. brassicae* ברמות גבוהות (20-30%). *O. bornovanus* לא נמצא. בצמחי כרוב אובחן רק *O. brassicae*. בשיעור של 100% נגיעות (טבלה 1).

בחורף 2011-2012 נדגמו צמחי חסה מחלקה בשדה ניצן. *O. virulentus* אובחן בשיעור נגיעות של 100%. שני המינים הנוספים, *O. brassicae* ו-*O. bornovanus* אובחנו בשיעור נמוך של 28% (טבלה 1). בנוסף, נדגמו ונבדקו צמחי בר שגדלו בחלקות. כף אווז *Chenopodium murale* עשב חד שנתי נפוץ מאוד, מחלקת חסה, וגומא הפקעים *Cyperus rotundus* עשב רב שנתי, מחלקת כרוב. בשני המקרים נמצאה נגיעות ב-*O. brassicae* (תמונה 2, II).

טבלה 1 : סקר לקביעת שכיחות מיני הפטרייה בקרקע ובצמחים בחבל הבשור בעונות שונות בשנים 2010-2012.

קרקע	2011 קיץ		קרקע	
	חסה	כרוב	שדה ניצן	עין הבשור
עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור
Big vein symptom	0/39 (0%)	0.0%		
<i>O. virulentus</i>	1/39 (2.6%)	0/5 (0.0%)	16/20(80%)	2/5 (40%)
<i>O. brassicae</i>	9/39 (23.1%)	5/5 (100%)	20/20 (100%)	5/5 (100%)
<i>O. bornovanus</i>	ל.ג	ל.ג	ל.ג	0/5 (0.0%)
קרקע	2011 סתיו		קרקע	
	חסה	כרוב	שדה ניצן	עין הבשור
עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור
Big vein symptom	0/26 (0.0%)	0/26 (0%)		
<i>O. virulentus</i>	0/26 (0.0%)	0/10 (0.0%)	27/30 (90.0%)	
<i>O. brassicae</i>	0/26 (0.0%)	3/10 (30.0%)	23/30 (76.7%)	
<i>O. bornovanus</i>	ל.ג	0/10 (0.0%)	0/10 (0.0%)	
קרקע	2010 חורף		קרקע	
	חסה	צמחי חסה	שדה ניצן	עין הבשור
עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור
Big vein symptom	חיובי	חיובי		
<i>O. virulentus</i>	חיובי	חיובי	חיובי	חיובי
<i>O. brassicae</i>	שלילי	שלילי	שלילי	שלילי
<i>O. bornovanus</i>	שלילי	שלילי	שלילי	שלילי
קרקע	2012-2011 חורף		קרקע	
	חסה	צמחי חסה	שדה ניצן	עין הבשור
עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור	שדה ניצן	עין הבשור
Big vein symptom	16/18 (88.9%)			
<i>O. virulentus</i>	18 /18 (100%)			
<i>O. brassicae</i>	5/18 (27.8%)			
<i>O. bornovanus</i>	5/18 (27.8%)			

3.2 הגדרה, אפיון, ובדיקת שכיחות מיני הוירוסים

3.2.1 כיול מערכת לזיהוי הוירוסים באמצעות שיטות מולקולאריות וסרולוגיות:

זיהוי סרולוגי באמצעות נוגדן ספציפי ל- **Mirafiori lettuce big-vein virus (MiLBVV)**

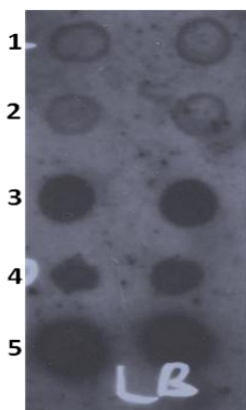
דוגמאות צמחים אשר נאספו מחלקות חסה בהם נצפו צמחים סימפטומטיים שימשו לכיול מערכת לזיהוי. נכון להיום, ישנו נוגדן מסחרי רק כנגד הוירוס MiLBVV מתוצרת חברת BioReba כנגד MiLBVV. במהלך העבודה נעשה שימוש נרחב בנוגדן זה לבדיקת נוכחות הוירוס בבדיקה סרולוגית בשיטה של (Double Antibody Sandwich -Linked Immunosorbent AssayEnzyme) DAS-ELISA בדוגמאות צמחים שנאספו מחלקות חסה ולבדיקת צמחים בניסויי העברה השונים.

זיהוי מולקולארי באמצעות ריאקציה הגברה RT-PCR

הפקת RNA מעלי חסה סימפטומטיים - 5 גר' של עלי חסה סימפטומטיים נכתשו ב 2.5ml בופר כתישה, BRB extraction buffer Grapevine (Bioreba, Switzerland). לאחר סרכוז הכתש (1 דקה, 13,000 rpm) נלקחו 400ul של הנוזל והועברו דרך קולונה יחודית לניקוי RNA ויראלי Viral extraction kit (Bioneer), (ע"פ הוראות היצרן). ה-RNA הויראלי שהתקבל נמדד (Nanodrop) ושימש כתבנית ליצירת cDNA בריאקציה של reverse transcription (RT) באמצעות האנזים reverse transcriptase מסוג Maxima מתוצרת חברת Fermentas ופריימר משלים Reverse (ספציפי לכל אחד מהוירוסים). ה-cDNA שהתקבל מכל אחד מהוירוסים, שימש כתבנית אשר הוגברה בריאקציה PCR באמצעות פריימרים ספציפיים לכל וירוס. תוצרי ה-PCR שהתקבלו הוחדרו לפלסמיד pGEM-T Easy (Promega) שובטו וגודלו בחיידקים ובהמשך ורוצפו לקבלת מקטעים מהגנום של כ"א משני הוירוסים.

זיהוי LBVaV באמצעות גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG

בשל העובדה כי אין בנמצא נוגדן מסחרי כנגד LBVaV זיהוי LBVaV נעשה גם באמצעות הכנת גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG, הספציפי לגנום הוירוס. הגלאי, מקטע מגן חלבון המעטפת של הוירוס, הוכן באמצעות הגברה (תהליך PCR) עם מיקס של נוקליאוטידים המסומנים ב-DIG ופריימרים ספציפיים המגבירים קטע של כ- 1000 בסיסים מחלבון המעטפת. כתבנית שימש פלסמיד המכיל מחדר הכולל את חלבון מעטפת הוירוס. לאחר הכנת הפרוב כייילנו את מערכת הזיהוי ע"י הפקות שונות של RNA מעלי חסה סימפטומטיים (תמונה מס' 3). ניתן לראות שהזיהוי המוצלח ביותר היה מהפקות של RNA ויראלי באמצעות הקיט של חברת Bioneer (Viral RNA Extraction Kit) או לחילופין, שילוב בין הפקת RNA ויראלי באמצעות ה-Viral RNA Extraction Kit לאחר הפקת total RNA באמצעות TRI Reagent של חברת MRC (תמונה מס' 3 שורה 3 ו 4).

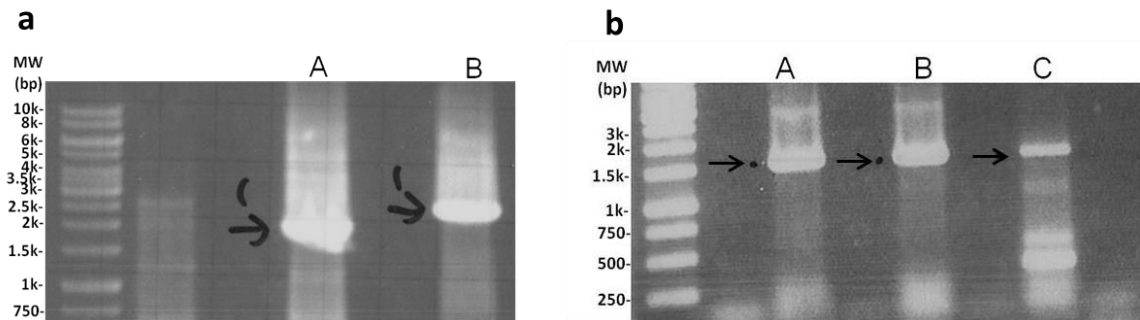


תמונה 3: כיול זיהוי LBVaV באמצעות גלאי מולקולארי מסומן ב-DIG. דוגמאות של הפקות RNA שונות מעלי חסה סימפטומטיים עברו היברידיזציה עם הגלאי ל-LBVaV המסומן ב-DIG. הדוגמאות שנבדקו: 1. הפקת RNA באמצעות קיט Direct-zol RNA MiniPrep של חברת Zymo. 2. הפקת RNA באמצעות TRI Reagent של חברת MRC. 3. הפקת RNA באמצעות Viral RNA Extraction Kit של חברת Bioneer. 4. שילוב של TRI Reagent של חברת MRC ו Viral RNA Extraction Kit של חברת Bioneer. 5. פלסמיד הנושא את הגן לחלבון מעטפת ה-LBVaV אשר שימש ליצירת הגלאי.

3.2.2 אפיון הוירוסים

בתמונה מס' 4, ניתן לראות דוגמא להגברת מקטעים מגנום הוירוסים LBVaV ו-MiLBVV. מורכב משני מקטעי RNA (S1 ו S2): S1 המורכב מ-6773nt ו S2 המורכב מ-6081nt. ההגברה נעשתה בעזרת פריימרים ספציפיים תוך שימוש ב cDNA שהתקבל (ראה לעיל) כתבנית לראקציית ה-PCR (1a). בעמודה A ניתן לראות מקטע של כ-1800 בסיסים שהתקבל תוך שימוש בפריימרים הספציפיים למקטע 1285nt-3097nt, השייך ל-S2. בעמודה B ניתן לראות מקטע של כ-2300 בסיסים שהתקבל תוך שימוש בפריימרים הספציפיים למקטע 4431nt-6773nt (קצה 3') של S1. מקטעים אלו נוקו מהג'ל, שובטו ורוצפו כמתואר לעיל.

MiLBVV מורכב מארבעה מקטעי RNA: S1, S2, S3, S4 הבנויים מ-1794nt, 1515nt, 1402nt בהתאמה. 3 רצפים שונים, באורך של כ-1500 בסיסים כ"א, ממקטע S1 הוגברו בתהליך ה-PCR ע"י פריימרים ספציפיים (1b עמודות A, B, C). גם במקרה זה המקטעים שהתקבלו נוקו מהג'ל, שובטו ורוצפו כמתואר לעיל.



תמונה 4: הגברה של מקטעים מגנום הוירוסים LBVaV ו MiLBVV באמצעות תהליך PCR. (a) מקטעים מגנום הוירוס LBVaV (S1 ו S2) הוגברו באמצעות זוגות הפריימרים 1285F/3097R (A) ו 4431F/6773R (B) כתבנית שימש ה-cDNA שסונתז מה-RNA הויראלי שהופק מעלי חסה סימפטומטיים. (b) מקטעים מסגנט S1 של MiLBVV הוגברו באמצעות זוגות הפריימרים 5416F/6968R (A), 4045F/5592R (B) ו 1272F/2827R (C), כתבנית שימש ה-cDNA שסונתז מה-RNA הויראלי שהופק מעלי חסה סימפטומטיים.

3.2.3 שכיחות מיני הוירוסים בדגימות מחבל הבשור.

בצמחים שנדגמו במהלך 2011 נמצאה נוכחות של וירוסים המעורבים במחלה רק בעונת החורף. כמו כן נמצאה שכיחות גבוהה של וירוס_MiLBVV (90%) לעומת וירוס_LBVaV שנמצא בשכיחות נמוכה (10%) (טבלה 3)

טבלה 3: שכיחות מיני הוירוסים המעורבים במחלת העורקים המעובים בעונות דיגום שונות.

קיץ 2011	צמחי חסה		
	שדה ניצן	עין הבשור	שכיחות (%)
Big vein symptom	0	0	0
<i>Mirafiori lettuce big vein virus</i>			0
<i>Lettuce big vein associated virus</i>			
חורף 2011	צמחי חסה		
	שדה ניצן	עין הבשור	שכיחות (%)
Big vein symptom	10/10		100%
<i>Mirafiori lettuce big vein virus</i>	10/10		100%
<i>Lettuce big vein associated virus</i>	1/10		10%

3.3 ניסויי הדבקה במערכת מבוקרת

בשלב ראשון נאספו קרקעות נגועות מסביבת בית השורשים של צמחי חסה סימפטומטים בחלקות גידול מסחריות ממושב שדה ניצן. דוגמאות הקרקע עורבבו וחולקו לעציצים של 0.5L בהם נשתלו שתילי חסה בריאים בהשוואה לקרקע חולית "סטרילית". העציצים הועברו לתאי גידול בטמפ' של $15^{\circ}\text{C} \pm 3$ להמשך גידול עד להופעת סימני מחלה אשר הופיעו לאחר כ- 14-21 יום. לאחר שלושה שבועות מהשתילה נלקחו דוגמאות עלים מהצמחים לזיהוי נוכחות הוירוס MiLBVV באמצעות בדיקה סרולוגית בשיטה של DAS-ELISA. לאחר מחזור ההדבקה הראשון נעקרו הצמחים הנגועים והקרקע המאולחת נאספה ועורבבה עם קרקע מסחרית סטרילית ביחס של 1:1. תערובת הקרקע חולקה שוב לעציצי גידול בהם נשתלו שוב צמחי חסה אשר גודלו עד הופעת סימני מחלה (כמתואר מעלה). תהליך זה בוצע בצורה דומה בניסוי 3 ו-4, (ראה טבלה מס' 2). ניתן לראות כי פרופורציית הצמחים שנדבקו לאחר כ- שלושה שבועות בתנאי מעבדה גבוהה.

טבלה 2: סיכום ניסויי העברה של מחלת עיבוי העורקים בחסה (Big vein disease) באמצעות קרקע מאולחת.

מס' צמחים נגועים/ צמחים נבדקים	מס' צמחים נגועים/ צמחים נבדקים	מס' צמחים נגועים/ צמחים נבדקים
0/8	8/8	ניסוי 1: קרקע עם נגיעות גבוהה במחלה
0/8	10/12	ניסוי 2: שתילה חוזרת בקרקע מניסוי 1
0/10	19/20	ניסוי 3: שתילה חוזרת בקרקע מניסוי 2
0/8	22/25	ניסוי 4: שתילה חוזרת בקרקע מניסוי 3

*ביקורת שלילית, שימוש בקרקע מסחרית (נקה) חופשייה מהפטרייה ומהוירוסים

3.4 ניסויי הדברה ראשוני בדליים באמצעות חומרים משטחים.

השימוש במשטחים אניוניים כנגד זואו ספורות של הפטריות מהסוג *Olpidium* כגון: *O. brassica*, *O. radicale* ו- *O. bornovanus* נבדקה בעבר ונמצאה ככזו שהפחיתה בצורה משמעותית את כמות הצמחים שסובלים ממחלות הנגרמות ע"י הפטריות ואף פוגעת בחינניות ופעילות הזואוספורות של הפטריות. (Tomlison et al. 1979; Stabghellibi and Tomlison 1987; Stabghellibi et al. 2010). בכדי לבצע ניסוי ראשוני לבדיקת יעילותם של שני חומרים משטחים: שטח 90 (Agral) ו- 2000 (Aquatrols®) (Aquatrols®). הועמד ניסוי בדליים בנפח 10 ליטר וכלל 5 טיפולים שונים, 5 דליים

בכל טיפול ובכל דלי נשתלו שלושה צמחי חסה עגולה (Iceberg). הצמחים גודלו במשך כ- 60 יום בתא גידול במשטר תאורה פוטוסינטטי (14D:10L) ובטמפרטורה (12-15C°) שמתאימים להתפתחות מחלת העורקים המעובים.

לפני השתילה הוכנו 5 תמיסות השקיה בהתאמה לטיפולי הניסוי: (I) קרקע נגועה ללא תוסף: *דישון בלבד. (II) קרקע נגועה + שטח 90: 1.2 cc + 1L H₂O חומר שטח 90 + *דישון. (III) קרקע נגועה + AquaGro2000: 1.2 cc + 1L H₂O + AquaGro2000 *דישון. (IV) קרקע לא נגועה ללא תוסף: *דישון בלבד. (V) קרקע לא נגועה עם AquaGro2000: 1.2 cc + 1L H₂O + AquaGro2000 *דישון.

*דישון: 5-2.5-5 דשן מור + מיקרו 3 ו 1% Ca + 1% Mg.

לפני השתילה כל הדליים מכל הטיפולים הוגמעו במים בלבד לקבלת רטיבות מספקת לשתילה ולאחר מיכן כל דלי הושקה ב- 150 ml מתמיסת ההזנה המתאימה כל יומיים מתחילת הניסוי ועד היום ה-40 בקרוב. מיום זה ועד היום ה-60 הוכפלה כמות ההשקיה.

תוצאות הניסוי: לאחר 60 ו 81 יום בוצעו שתי הערכות של צמחי הניסוי בכל הערכה נבדקו 2-3 צמחים מ- 2-5 דליים של הניסוי: (I) הערכה ויזואלית של צמחי הניסוי לסימני המחלה. (II) בדיקת נגיעות של הצמחים בוירוסים הגורמים למחלה באמצעות ELISA (ראה מעלה). עבור הבדיקות השונות חושבה שכיחות הצמחים הנגועים עבור כל אחת מקטגוריות הבדיקה (טבלה 4).

טבלה 4: שכיחות צמחים נגועים במחלת העורקים המעובים תחת טיפולי קרקע שונים.

שכיחות ממוצעת של צמחים בעלי סימני מחלה		שכיחות של צמחים הנגועים בוירוס		טיפול
בדיקה 1	בדיקה 2	בדיקה 1	בדיקה 2	
0%	ל.ג	0%	ל.ג	קרקע לא מאולחת + Aquagro 2000
6.6%	56%	50%	56%	קרקע מאולחת + Aquagro 2000
13.20%	38%	50%	65%	קרקע מאולחת + שטח 90
46%	100%	100%	100%	קרקע נגועה ללא תוסף
0%	0%	0%	0%	קרקע לא מאולחת ללא תוסף

3.4. הקשר בין שכיחות הוירוסים ומיני הפטריות באזור הבשור.

בדיגום צמחים בחורף 2011-2012 נמצא כי *O. virulentus* אובחן בשיעור נגיעות של 100% שני המינים *O. bornovanus* ו *O. brassicae* הובחנו בשיעור נגיעות נמוך של 28%. באותו דיגום נמצאה נגיעות של 100% של הוירוס *Mirafiori lettuce big-vein virus* שיהיה גם הוירוס היחיד שנמצא בצמחים (טבלה 5).

טבלה 5: שכיחות מיני הפטריות והוירוסים בצמחים חולים במחלת העורקים המעובים

שכיחות	צמחי חסה, שדה ניצן
88.9%	16/18
100.0%	18/18
0.0%	0/18
100.0%	18/18
27.8%	5/18
27.8%	5/18

4. דיון

4.1 אפיון מיני הפטרייה ושכיחותם באזור הבשור.

נבדקו שיטות (מיקרוסקופיות ומולקולאריות) לזיהוי הפטרייה ברקמת השורשים של צמחי חסה והכרוב. כמו כן נעשתה אופטימיזציה של השיטה המולקולארית להערכת הנגיעות בפטרייה בקרקע ובשורשי הצמחים. בדיגומי הקרקע והצמחים הנגועים מחלקות מסחריות בשדה ניצן ועין הבשור, אופיינה הפטרייה *O. virulentus*, *O. brassicae*. שנכחו בקרקע ובצמחים בקיץ ובחורף ו*O. bornovanus* אובחן רק בחורף ובשכיחות נמוכה. פטריית ה *Olpidium* אובחנה גם בצמחי בר כגון: כף אוז *Chenopodium murale*, וגומא הפקעים *Cyperus rotundus* שנאספו מחלקות חסה וכרוב בהתאמה. מאחר והפטרייה שורדת על גבי עשבים וצמחי ספיח יש חשיבות רבה לסניטציה של השדה לאחר הגידול המסחרי.

4.2 שיטות עבודה מועדפות לזיהוי הוירוסים ושכיחותם באזור הבשור.

זיהוי הוירוסים: לשיטות המולקולאריות כגון RT-PCR, Probe יתרון בולט ביכולת רגישותם הגבוהה, אך יחד עם זאת הן יקרות יותר (דבר המקבל משקל רב כאשר סורקים מספר רב של דוגמאות) ומחייבות כוח אדם מקצועי ומיומן. מצד שני, שימוש בשיטות סרולוגיות כגון ELISA מאפשרות סריקה של מספר רב של דוגמאות, ברמת אמינות גבוהה ביותר ובעלות פחותה בהרבה בהשוואה לשיטות המולקולאריות. לכן כאשר הדבר מתאפשר (מותנה בקיום נוגדן ספציפי כנגד הוירוס הנבדק) יש יתרון בולט לשימוש בנוגדנים לזיהוי הוירוס בעיקר בשיטה של ELISA. בדיקה של צמחים סימפטומטים למחלת עיבוי העורקים בחסה הראתה כי תסמיני המחלה מופיעים עם נוכחותו של הוירוס MiLBVV לבדו או בשילוב עם הוירוס LBVaV. בנוסף בדיקה של צמחים א-סימפטומטים (ללא סימני המחלה) איפשרה במספר מיקרים את זיהויו של הוירוס LBVaV, כך שלמעשה אין כל צורך בבדיקות לזיהויו היות והוא לבדו איננו מעורב בהשריית תסמיני המחלה, כך שעיקר הזיהוי בהמשך העבודה צריך להתמקד בזיהויו של הוירוס MiLBVV.

4.3 אפיון רצף הוירוסים בהשוואה למה שנמצא באזורים אחרים בעולם.

מתוצאות ריצוף מקטעים בגנום של הגזעים הישראליים של MiLBVV ו LBVAV והשוואתם אל רצפי הוירוסים המצויים בבנק הגנים GenBank אנו מזהים אחוזי זהות בתחום של 93-97% זהות של הוירוסים שזוהו בארץ לגזעים שונים של הוירוסים הנ"ל שזוהו במדינות שונות בעולם.

4.4 המשך הפעילות בשנה הקרובה בהתאמה למה שנלמד ובהתאמה לתוכנית המחקר.

בבדיקת הקשר בין מיני הפטרייה ושכיחות הוירוסים המעורבים במחלה נראה כי בהתאמה למתואר בספרות המין *O. virulentus* הוא הווקטור העיקרי של וירוסים שמעורבים במחלת העורקים המעובים. ומעביר בעיקר את MiLBVV באזור הבשור לפי הדיגומים שנעשו טבלה (5).

הנוכחות של פטריות מהמין *O. virulentus* ו- *O. brassicae* בשורשים של צמחי חסה וצמחי בר בעונה חמה לפני הופעת סימנים קשים של המחלה מצדיקה את הבדיקה של טיפולי המתה של שורשי הצמח באמצעות תכשירי מתאם סודיום במינון מופחת, בקיץ ובסתיו, לפני הגידול החורפי "הרגיש" וגם אחריו על מנת להפחית את רמת האינוקולום של הפטרייה בשורשי הצמחים. בנוסף, תוצאות השימוש בחומרים משטחים מראות כי קיים פוטנציאל לשימוש בחומרים אלו ומצדיק ניסוי מקיף יותר עם מספר חזרות גדול יותר ובגידול במיכלים ובחלקות מסחריות. בנוסף לאלה צפויים להיבדק תכשירי חיטוי קרקע שונים שחלקם בשימוש ע"י חקלאים ואחרים בתהליכי רישוי.

תודות:

ברצוני להודות למגדלים אסף פרחי (שדה ניצן) ואורי ארד (עין הבשור) על הזמן והמשאבים שהשקיעו בניסוי.

לאנשי "רימי" : שגיא גל ואסף רוזנברג – על השקעת הזמן והמשאבים בניסויים בכלורופיקרין.

"לאגן" : תרומת "אדיגן סופר"

לקרן המדען על התמיכה במחקר

1. Campbell, R.N., and Fry, P.R. 1966. The nature of associations between *Olpidium brassicae* and Lettuce big-vein and Tobacco necrosis viruses. *Virology* 29:222–33.
2. Herrera-Vásquez. J.A., Cebrian, M.C., Alfaro-Fernandez, A., Cordoba-Selles. M.C., and 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.
3. Lot, H., Campbell, R. N., Souche, S., Milne, R.G., and Roggero, P. 2002. Transmission by *Olpidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *lettuce big-vein virus* and their roles in lettuce big-vein etiology. *Phytopathology* 92:288-293.
4. 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 Disease* 94:563-569.
5. Mayo, M. A. 2000. Genus *Varicosavirus* In : MHV, Fauquet, C. M., Bishop D. H. L. Carstens, E. B. Estes, M. K. Lemon, S. M., Maniloff, J. , Mayo, M. A., MacGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (eds). *Virus Taxonomy*, seventh.
6. Navaro JA, Botella F, Maruhenda A, Sastre P, Amelia S'anchez – Pina and Vicente Pallas 2004. Comparative Infection Progress Analysis of Lettuce big-vein virus and Mirafiori lettuce virus in lettuce crops by developed Molecular Diagnosis Techbiques. *Phytopathology* 94:470-477.
7. Patterson, C.L., Grogan, R.G., Campbell, R.N. 1986. Economically important diseases of lettuce. *Plant Disease* 70:982-987.
8. Ryder, E.J., 1979. Effects of big vein resistance and temperature on disease incidence and percentage of plants harvested of crisphead lettuce. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 104:665-668.
9. Stanghellini, M. E., Mathews, D. M., and Misaghi I. J. 2010 Pathogenicity and Management of *Olpidium bornovanus*, a Root Pathogen of Melons. *Plant Disease* 94:163-166.
10. Stanghellini, M.E., and Tomlinson, J.A. 1987. Inhibitory and lytic effects of a nonionic surfactant on various asexual stages of life cycle of *Pythium* and *Phytophthora* species. *Phytopathology* 77: 112-114.
11. Tomilson, J.A., and Faithfull, E.M. 1980. Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Olpidium brassicae*. *Annals Applied Biology* 93:13-19.
12. 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. Innis, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, New York.
13. Zink, F. W., Grogan, R. G. 1954. The inter-related effects of big vein and market price on the yield of head lettuce. *Plant Disease Reporter* 38:844-846.