

אפיון שני ג'מיניוירוסים חדשים המאיימים על ענף הדלועים בישראל ופיתוח ממשק הדברה משולבת לצמצום הנזקים.

חוקרים שותפים :

יחזקאל אנטיגנוס, עודד לכמן, מלי פרלסמן, המחלקה לוירולוגיה, מנהל המחקר החקלאי. שמשון עומר, יונס הישאם, יואל מסיקה, אורנה אוקו, שה"מ, משרד החקלאות. חנה יחזקאל, מו"פ דרום.

הצגת הבעיה : התפשטות דרמטית של שני ג'מיניוירוסים (SLCV ו-WmCSV) המופצים ע"י כנימת עש הטבק והתוקפים דלועים בכל רחבי ישראל, גרמה נזקים קשים בגידולי אבטיח, דלעת וקישוא. מטרת המחקר היא אפיון הוירוסים ברמה הביולוגית והמולקולרית ועל בסיס הידע שיופק תפותח מערכת הדברה משולבת שתאפשר התמודדות עם שתי מחלות ויראליות חשובות התוקפות גידולי שטח פתוח.

מהלך ושיטות עבודה : אפיון מולקולרי של תבדידי הוירוס WmCSV אשר נאספו באזורי גידול שונים נעשה ע"י שיבוט גן ה- Rep וגן ה-CP של כ"א מהתבדידים באמצעות PCR וע"י שימוש בתחלים ספציפיים. נקבע מעקב הבסיסים של שני הגנים ב-19 תבדידים שונים אשר נאספו בכל רחבי הארץ מהערבה בדרום ועד הגולן. ניסויי השדה נערכו באזור הבשור שם קימות אוכלוסיות גדולות של כנימת עש הטבק, הפעילות מהמחצית השנייה של הקיץ ולאורך הסתיו. ניתוחים סטטיסטיים נערכו בתמיכת המחלקה לסטטיסטיקה במכון וולקני. נבחנה יכולת הקליטה של הוירוסים ע"י כנימת עש הטבק מצמחי הפונדקאי.

תוצאות עיקריות : פותחה מערכת IPM המבוססת על חיפוי קרקע עם יריעות פוליאאתילן, שימוש בזנים סובלניים והדברה כימית המכוונת למנוע נזקים ישירים של כנימת עש הטבק. על בסיס מעקבי הבסיסים של גן ה-Rep וגן ה-CP נבנה עץ פילוגנטי המתאר את הקרבה הגנטית של התבדידים השונים ביחס לתבדידי וירוס אשר אופינו באזורים אחרים של העולם.

מסקנות והמלצות : SLCV נמצא בעל זהות גבוהה ביותר לתבדיד האמריקאי של הוירוס גם ברמת מעקב הבסיסים וגם עפ"י טוח הפונדקאים. לעומת זאת התבדיד הישראלי של WmCSV בעל גנום עם הומולוגיה נמוכה יותר לגנום התבדיד אשר זוהה בתימן. גם טוח הפונדקאים אשר פורסם לגבי התבדיד התימני צר יותר בהשוואה לזה של התבדיד הישראלי. השימוש בהדברה כימית אינו מונע התפשטות שני הוירוסים בגידולי אבטיח וקישוא ולכן יש להשתמש בה אך ורק כדי למנוע נזק ישיר לגידול. ניתן להגן על קישוא בשטח פתוח מפני SLCV באופן יעיל ע"י שימוש בחיפוי קרקע צהוב ושימוש בזנים בעלי סבילות כגון הזן צוק. בשלב זה לא נמצאו פתרונות אגרוטכניים יעילים כנגד WmCSV.

מבוא:

בסתיו 2002 התגלתה במקשות קישואים תופעה של קיפול עלים חריף בקדקדי הצמיחה של הצמחים, גידולם הוגטטיבי עוכב באופן משמעותי ופירות שהניבו צמחים אלו היו בעלי איכות ירודה. בחלק מהזנים היו הפירות מעוותים ועל פניהם הופיעו בליטות ושקעים ירוקים אשר פסלו אותם כליל לשיווק. ממדי המגפה היו נרחבים ביותר והיא פגעה קשות במרבית שטחי הקישוא בישראל. רמת הנגיעות בשטחים שנתקפו במחלה היתה גבוהה והגיעה במקרים רבים לרמה של 100%, למרות השימוש המסיבי בקוטלי חרקים. בבדיקות ראשוניות אשר נערכו על ידנו נימצא כי המחלה מועברת ע"י כנימת עש הטבק וגורם המחלה הוא ג'מיניוירוס הנותן תגובה סרולוגית צולבת עם Squash leaf curl virus (SLCV) השייך לקומפלכס וירוסים התוקף צמחים ממשפחת הדלועים בחצי הכדור המערבי. גורם המחלה לא היה ידוע בעבר בישראל או מדינות אחרות של ה'עולם הישן' ונראה כי בישראל הוא הופך לגורם מגביל בגידול קישואים שהוא בעיקרו גידול של שטח פתוח ואולי גם בגידולי מיקשה אחרים. מחלה ויראלית נוספת נמצאה באותה השנה במוקד בודד באזור הערבה הדרומית וגרמה שם למגפה נרחבת. עפ"י ממצאים ראשוניים גורם המחלה הוא Watermelon chlorotic stunt (WmCSV) שאף הוא מופץ ע"י כנימת עש הטבק ונימנה עם משפחת הג'מיניוירוסים. הוירוס ידוע ביכולתו לגרום נזק רב לאבטיחים כפי שדווח מאזורים גאוגרפיים אחרים (תימן, סודן, אירן). תכנית המחקר שנקבעה לשנה השניה כללה: בחינת השונות הגנטית של WmCSV, ניסוי שדה לבחינת עמידות זני קישוא כנגד SLCV ופיתוח מערך IPM כנגד המחלה בקישואים.

שיטות וזמרים:

1. השוואת יעילות ההגנה של חיפוי נוף בעזרת אגריל לעומת השימוש בחיפוי קרקע

שתילי קישוא מהזן ארליקה נשתלו בתאריך 04-08-04. נבחנו החיפויים הבאים: צהוב-חום, כסף-שחור, מתוצרת גניגר מפעלי פלסטיקה בע"מ. כל היריעות היו ברוחב של 1.60 מ'. היריעה בצבע צהוב-חום היתה בעבי של 30 מקרון בעוד שהיריעה הכסופה היתה בעבי 25 מקרון. חלקות הביקורת היו חשופות ללא חיפוי כלשהוא. בנוסף לכך נבחנו הטיפולים הבאים: חיפוי אגריל, חיפוי אגריל + חיפוי קרקע עם יריעה צהובה. כל טיפול הופיע בחמש חזרות, בהצבה של בלוקים באקראי. כל חזרה כללה ערוגה אחת באורך 7 מ' והמרוח בין השתילים היה 40 ס"מ. חיפוי האגריל הונח על גבי קשתות מתכת המקובלות בשימוש ליצירת מנהרות נמוכות. השתילים חופו מיד לאחר שתילתם. השתילים הוגמנו בקונפידור לפני העתקתם מהמשתלה לשטח הניסוי. הסרת החיפויים התבצעה בתאריך 04-08-18 כדי לאפשר האבקה ע"י דבורים. ממועד הסרת הכיסויים טופלו צמחי הקישוא כנגד כנימת עש הטבק עפ"י משטר הריסוסים שכלל: פגוסוס, מוספילן, תיונקס + סמש ואויסקט. בנוסף לקוטלי החרקים הנ"ל רוססו גם קוטלי פטריות עפ"י הצורך. קטיף ראשון נערך בתאריך 08-23-04 והאחרון בתאריך 04-09-21. שקילת הפרי בכל אחת מהחזרות נעשתה בערוגה המרכזית בלבד. השפעת הטיפולים על היבול המצטבר נבחנה עפ"י אותם פרמטרים ובאותו האופן כמתואר בסעיף 1.

2. ניטור כנימת עש הטבק

ניטור הכנימות נעשה ע"י שימוש במלכודות דבק צהובות (20X15 ס"מ) אשר נתלו באוריינטציה אפקית על מעמדי מתכת כ-70 ס"מ מעל לפני הקרקע. סה"כ הוצבו 14 מלכודות בהיקפה של חלקת הניסוי ושלוש במרכז. המלכודות הוחלפו מדי שבוע לאחר מניית הכנימות שנלכדו. ניטור הכנימות נעשה לכל אורך תקופת הניסוי.

3. קביעת קצב התפשטות המחלה בטיפולים

האחוז המצטבר של הנגיעות ב-SLCV נקבע ע"י ספירה של הצמחים המראים סימני מחלה אפייניים. הספירה נערכה אחת לשבוע בארבעה מועדים לאחר השתילה במרווח של שבוע בין ספירה לספירה.

4. בחינת מכניזם ההגנה של יריעות פוליאיתילן צבעוניות :

השפעת חיפויי קרקע על האילוח בכנימת עש הטבק נבדק כדלקמן : תשעה ימים לאחר השתילה נספרו הפרטים של כנימת עש הטבק ששהו על צדו התחתון של העלה המפותח ביותר (שלב 5-6 עלים) בכל אחד מהצמחים ב-כ"א מהטיפולים. אנליזה ספקטרלית של החזר האור מהיריעות, מקרקע חשופה והצמחים נעשתה בעזרת ספקטרופוטומטר באדיבות מפעל הפלסטיק של גניגר.

5. ניתוח סטטיסטי : הניתוח הסטטיסטי בניסויי השדה נערך בעזרת Student-Neman-Keuls test (בתמיכת המחלקה לסטטיסטיקה, מכון וולקני).

6. בחינת השונות הגנטית של תבדידי WmCSV

תבדידי הוירוס נאספו מאזורי גידול שונים ברחבי הארץ וגם מגידולי תרבות או צמחי בר (אבטיח, מלון, דלורית, ירוקת החמור). כלל DNA הופק מהחומר הצמחי אשר הובא מהשדה בשיטת דלפורטה. ה-DNA שהופק בדרך זו שימש כתבנית להגברת שני גנים ויראליים (CP- ו Rep) בשלמותם באמצעות PCR. התחלים אשר שימשו להגברה סונתזו עפ"י מעקב הבסיסים של הוירוס אשר נקבע על ידנו בעבר (ראה דו"ח שנה קודמת).

תחלים אשר שימשו לבידוד גן ה-CP :

פרימר WmCPF מעמדה 313-331 במעקב הבסיסים הכללי :

5'ATGGCGAAGCGAACAGGAG 3'

פרימר WmCPNC מעמדה 1069-1091 במעקב הבסיסים הכללי :

5' CTTTATTAACGTAAGTGGAGTC 3'

תחלים אשר שימשו לבידוד גן ה-Rep :

פרימר WmrepF :

5' ATGAGGCCTCCCCGCTTTAG 3'

פרימר WmrepC :

5' CCGCACTTTAGATCAACGCG 3'

תוצרי ההגברה של ה-PCR שובטו בפלסמיד pGemT Easy ואח"כ שימשו לקביעת מעקב הבסיסים.

7. אנליזה פילוגנטית של תבדידי WmCSV

האנליזה על חלבוני ה-Rep וחלבון המעטפת של הוירוס נעשתה בעזרת תכנת Clustal 1.83 on line. התכנה הופעלה עפ"י קביעות ברירת המחל של גן Rep וגן חלבון המעטפת של התבדיד התימני והתבדיד הסודני של WmCSV נלקחו ממאגר GenBank Accession No AJ012081 ו- Accession No AJ245650 בהתאמה. מעקב הבסיסים של שני הגנים הנ"ל בוירוס SLCV נילקח מ- GenBank Accession No M38183 והוא שימש כביקורת יחוס לוירוס בעל ריחוק גנטי ניכר.

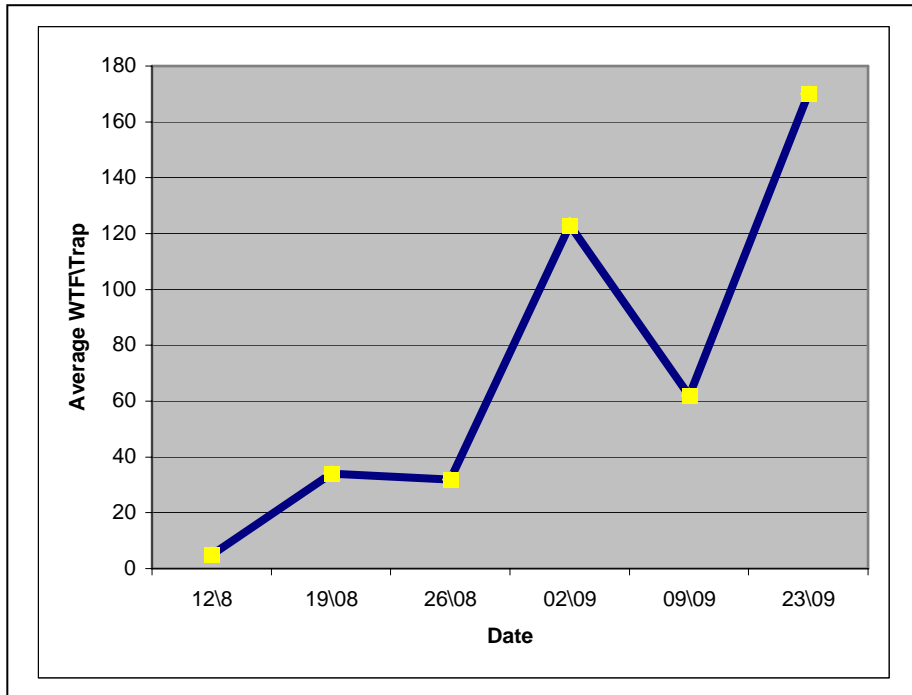
תוצאות:

א. פיתוח מערכת IPM כנגד SLCV בקישוא

א 1. ניטור אוכלוסיית כנימת עש הטבק בניסוי.

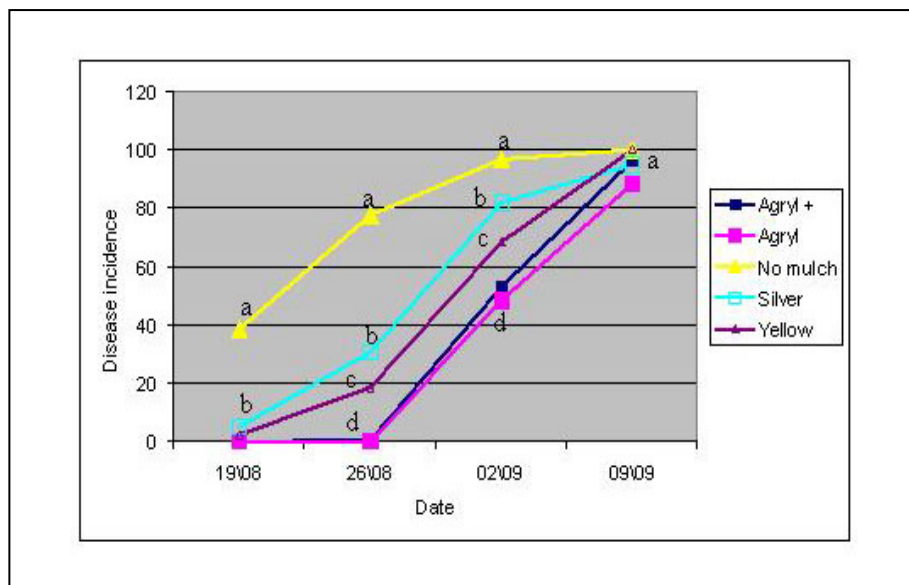
גודל אוכלוסיית כנימת עש הטבק הוא גורם דומיננטי בקביעת קצב התפשטות SLCV לו היא משמשת כוקטור בלעדי.

איור 1 : ניטור אוכלוסיית עש הטבק במהלך הניסויים



באיור 1 ניתן לראות כי במהלך השבוע הראשון לאחר השתילה היתה רמת האוכלוסייה של הכנימות נמוכה יחסית אך היא הלכה והתעצמה לאורך הניסוי והגיע לשיא עם סיומו.

א 2 . השפעת חיפוי נוף לעומת חיפוי קרקע על קצב התפשטות SLCV בקישוא
איור 2: השפעת חיפוי קרקע שונים וכיסוי באגריל על הנגיעות המצטברת של SLCV בצמחי קישוא



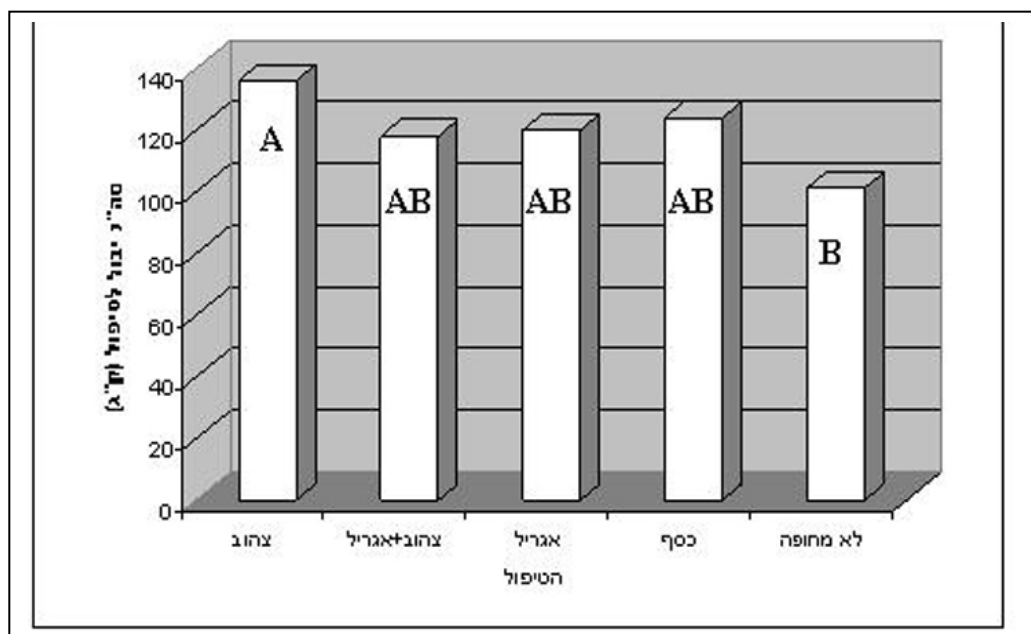
במהלך שלושת השבועות בהם היו צמחי הקישוא מחופים לא התפתחה כל נגיעות עקב יעילותו של חומר כיסוי זה במניעת חדירה של כנימות העש. עם הסרת הכיסוי התפתחה המחלה במהירות ותוך שבועיים מיום הסרת הכיסוי הגיעה רמת הנגיעות ל- 100% (איור 2). חיפוי הקרקע הצהוב והחיפוי הכסוף הצליחו לשמור על רמת נגיעות נמוכה במהלך שלושה שבועות ממועד השתילה ורק בשלב מאוחר יותר התפתחה נגיעות גבוהה שוות ערך לזו שהתפתחה בטיפול ללא חיפוי (איור 2).

א 3. השפעת חיפוי נוף לעומת חיפויי קרקע על היבול בקישואים

בדומה לתוצאות שהתקבלו בשנה קודמת גם בניסוי זה התקבלו יבולים גבוהים יותר על חיפוי פוליאאתילן צהוב ועל חיפוי כסוף לעומת היבולים אשר התקבלו על קרקע חשופה או חלקות אשר חופו באגריל (עם חיפוי קרקע או בלעדיו) (איור 3).

הבדלים בעלי מובהקות סטטיסטית נמצאו רק בין חיפוי הקרקע הצהוב לבין קרקע חשופה (איור 3).

איור 3: השפעת חיפויי נוף וקרקע על היבול



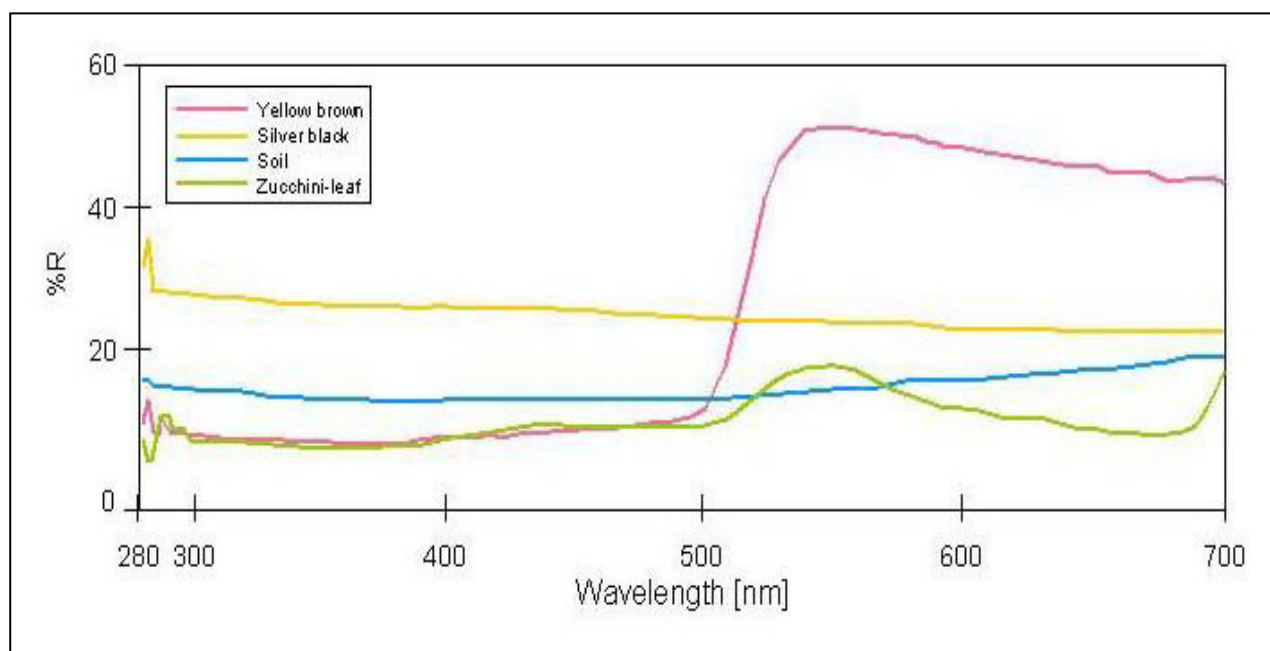
א. 4. בחינת מכניזם הפעולה של חיפויי קרקע במניעת אילוח צמחי קישוא עם כנימת עש הטבק

מתוך טבלה 1 ניתן לראות כי המספר הגדול ביותר של פרטי כנימת עש הטבק (כ-10 פרטים לעלה) נמצא על צמחים אשר גדלו על קרקע חשופה בעוד שעלים שנדגמו מצמחים אשר גדלו על חיפוי נשאו במוצע כ- 1.5-1.7 כנימות לעלה. לא נמצא הבדל בין רמת האילוח של הזנים ארליקה וצוק וכן לא נמצא הבדל סטטיסטי מובהק בין חיפוי צהוב לחיפוי עם פוליאאתילן כסוף.

טבלה 1 : רמת האילוח של צמחי קישוא בכנימת עש הטבק על חיפויי קרקע שונים

Cultivar	No of WTF \ 85 sampled plants		
	Yellow mulch	Silver mulch	No Mulch
Zuk	163A	180A	925B
Erlika	123A	87A	764B

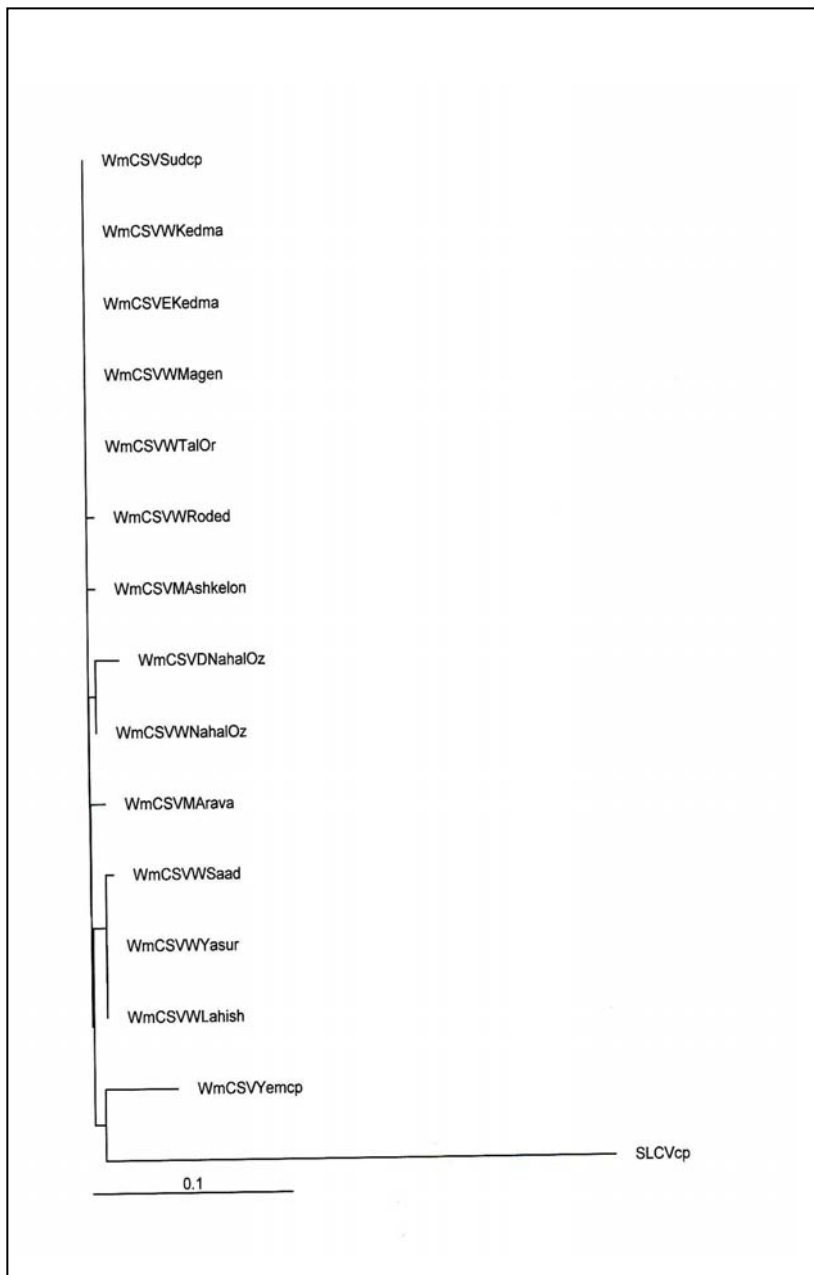
איור 4 : ספקטרום החזר האור מיריעות שונות של פוליאטילן אשר שימשו לחיפוי הקרקע



אנליזה ספקטרלית של החזר האור מהקרקע, עלי הקישוא, ויריעות הפוליאאתילן אשר השתתפו בניסוי (איור 4), הראתה כי אין הבדלים איכותיים בין הקרינות המוחזרות מהאלמנטים השונים שנבדקו. לעומת זאת נמצאו הבדלים כמותיים בין רמות החזרי הקרינה באורך גל של 550nm בין האלמנטים שנבדקו.

א. 5 אנליזה פילוגנטית לחלבונים ויראליים של תבדידי WmCSV אשר נאספו מאזורי גידול שונים ומפונדקאים שונים בישראל

איור 5 : אנליזה פילוגנטית לחלבון המעטפת של תבדידי WmCSV



מקרא- מוט הקנ"מ בתחתית התמונה מיצג שונות של 10%.
 מעקב הבסיסים של חלבון המעטפת של SLCV (SLCVcp) שימש כביקורת התיחסות לירוס שונה השייך לאותו סוג (*Begomovirus*).

עפ"י האנליזה המוצגת באיור 5 רמת השונות בין חלבון המעטפת של התבדידים הישראליים השונים אינה גבוהה. כללית ניתן לזהות שני צברים של תבדידים : צבר אחד של תבדידים (קדמה, מגן, וטל אור) בעלי קירבה גבוהה יחסית לתבדיד הסודני (WmCSVSudCP) בעוד שיתרת התבדידים אשר נבחנו, קרובים יותר לתבדיד התימני (WmCSVYemcp). באנליזה מאותו הסוג אשר נערכה על חלבון ה-Rep הויראלי של התבדידים (לא מוצג), התגלתה שונות גנטית מועטה בין התבדידים הישראליים לתבדידים שמקורם בתימן ובסודן.

דיון:

פיתוח מערכת IPM כנגד SLCV

הניסויים המתוארים לעיל נועדו לבסס תוצאות ניסויים אשר נערכו בשנה קודמת ותוארו בדו"ח הקודם. כמודגם באיור 2 ועפ"י הנתונים אשר הוצגו בדו"ח הקודם, חיפוי הקרקע ביריעות פוליאטילן אינו מונע מחלה אלא דוחה את מועד ההדבקה ומאט התפשטותה כך שמרבית הצמחים נדבקים בגיל מאוחר יותר ובאופן זה קטנה רמת הנזק. אוכלוסיות כנימת עש הטבק בשנה בה נערך הניסוי היו נמוכות יותר בזמן השתילה לעומת גודלן בשנה הקודמת (ראה דו"ח קודם). מצב זה עשוי להסביר את ההבדל המתון יחסית שהתקבל בניסוי הנוכחי בין רמות היבול של צמחים שגדלו על חיפויי הקרקע לבין אלו שגדלו על קרקע חשופה. יש להניח כי אוכלוסיית וקטור נמוכה יחסית בשלבי הגידול הראשוניים אפשרה את דחיית ההדבקה גם בטיפול הביקורת בו גדלו הצמחים על קרקע חשופה ובאופן זה קטנו ההבדלים בינה לבין טיפולי החיפוי (איור 3).

חיפוי הצמחים ביום השתילה עם אגרייל נתן לצמחים הגנה טובה בפני הדבקה במהלך 23 ימים שבין מועד השתילה למועד הסרת הכיסויים ובמהלך תקופה זו לא התגלתה נגיעות בטיפול זה (איור 2). למראית עין הכיסוי באגרייל לא פגע בהתפתחות הצמחים למרות הטמפרטורות הגבוהות בתקופת הניסוי. מאיור 2 ניתן לראות כי במהלך התקופה שבין השתילה להסרת כיסוי האגרייל היתה רמת הנגיעות בטיפולים של חיפוי הקרקע הצהוב והכסוף (ללא אגרייל) נמוכה והיא לא עלתה על 20%-ו-30% בהתאמה, לעומת 80% נגיעות בקבוצת הצמחים שגדלה על קרקע חשופה. מיד עם הסרת כיסוי האגרייל התפוגג אפקט ההגנה ותוך שבועיים הגיעה רמת הנגיעות ל-100% כמו בטיפולים האחרים (איור 2). רמת היבול של צמחים שהיו מחופים באגרייל בלבד ושל אלו אשר היו מוגנים ע"י שילוב של אגרייל וחיפוי צהוב היתה זהה, עובדה המראה כי חיפוי הקרקע הצהוב אינו מעניק יתרון הורטיקולטורי ואינו משפיע לכשעצמו על רמת היבול אלא פועל בדחיית מועד ההדבקה. בדומה לניסוי שנערך בשנה קודמת, רמות היבול שהתקבלו על חיפוי הקרקע הצהוב והכסוף היו גבוהות מרמת היבול שהתקבלה מצמחים שהיו מחופים באגרייל וכמובן גבוהה גם מזו שהניבו צמחים שגדלו על קרקע חשופה (איור 3). על בסיס תוצאות הניסוי הנוכחי וזה שנערך בשנה הקודמת ניתן לסכם כי חיפוי קרקע בפוליאטילן צהוב נמצא עדיף על כיסוי באגרייל. יתרונותיו של הראשון לעומת האגרייל בצמצום ההתפשטות של מחלות נוף, מניעת עקת גידול ממנה סובלים הצמחים לאחר הסרת חיפוי האגרייל והשקעה כספית נמוכה יחסית לזו הכרוכה בישום האגרייל והסרתו.

מכניזם הפעולה של יריעות הפוליאטילן

לא מצאנו סימוכין להיפותזה המקובלת הקושרת את מכניזם הפעולה של היריעה הצהובה, במשיכה החזקה של הכנימות לצבע זה המונעת מהן להגיע אל הצמח. דחיית היפותזה זו מבוססת על שלוש עובדות :

1. לא ניתן לזהות כנימות חיות או מתות על החיפוי הצהוב במהלך הניסויים 2. לא נמצאו הבדלים איכותיים בפרופיל החזר האור של היריעות שנבדקו (איור 4) 3. אפקט ההגנה של יריעה כסופה וצהובה נמצאו דומים (איור 2, איור 4, טבלה 1).

איור 4 מראה כי עצמת החזר האור מיריעות צהובות ויריעות כסופות בתחום אורכי הגל 500-600 nm גבוהה מעצמת האור המוחזר בתחום זה של הספקטרום מעלי הצמח ומקרקע חשופה. אנו מניחים כי התולדה של מצב זה הוא הורדת רמת הניגודיות בין צמח המטרה לרקע עליו הוא גדל מצב הגורם לפגיעה ביכולת הראיה של החרק וזיהוי הצמח לצורך נחיתה. לעומת זאת צמחים הגדלים על קרקע חשופה מהווים מטרה נוחה לזיהוי, כתוצאה מרמת הניגודיות הגבוהה בין הצמח לרקע שעליו הוא גדל.

אפיון השונות הגנטית של תבדידי WmCSV בישראל

השונות הגנטית אשר נמצאה בחלבון המעטפת של התבדידים הישראליים ואלה שאופינו בתימן ובסודן היתה גבוהה יחסית מזו שנמצאה במעקב חומצות האמינו של חלבון ה-Rep. תוצאה זו מוסברת בקיומם של אזורים בעלי רמת שימור גבוהה בגן ה-Rep המשתתף בשיכפול הגנום הויראלי.