

136-0412-99

קוד מחקר:

נושא: זיהוי ואפיון קשר אפשרי בין גורם ויראלי ותופעת ההצהבות והניווון של פלפל בערבה

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

חוקר ראשי: דר' יחזקאל אנטיגנוס

חוקרים שותפים:

1999-1999

תקופת מחקר:

מאמרים:

תקציר

במהלך עונת הגידול 1998/1999 התגלו בערבה שטחי פלפל נרחבים שהראו סימפטומים של הצהבה קשה, עצירת גידול ופגיעה בגודל הפרי וצבעו, סינדרום זה כונה בשם "תופעה". תופעה כזו לא נראתה בארץ בעבר ואינה מתועדת בספרות. הבינלאומית. מטרת המחקר: לבחון את האפשרות שהמחלה נגרמת ע"י פתוגן ויראלי. מהלך העבודה: בשלב הראשון נמצא כי ניתן להעביר את התופעה ע"י הרכבה, דבר המצביע לכאורה על קיומו של גורם פתוגני בעל יכולת התפשטות ברקמות. בניסויי מעבדה נבדקה האפשרות שהתופעה נגרמת ע"י גזע חדש של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה, אך אפשרות זו הופרכה ע"י שימוש בגלאים מולקולריים. ניסיונות להעביר את גורם המחלה במעבדה בעזרת כנימת עש הטבק (*Bemisia tabaci*) הניבו באופן חד משמעי תוצאות שליליות. במהלך השנה שחלפה ערכנו בערבה סקר שתכליתו הייתה לקבוע את חשיבותה הכלכלית של התופעה וסקר נוסף שבעזרתו זוהה קשר בין כנימות עלה לבין התפשטות התופעה. אשר תוארה לעיל. בתצפיות אשר נעשו ברחבי הארץ נמצאה התופעה גם באזור הבשור בניסויים מבוקרים אשר נערכו במעבדה הוכחנו באופן חד משמעי כי ניתן להעביר את גורם המחלה בעזרת כנימת עלה האפרסק (*Myzus persicae*) השכיחה באזור הערבה. בעזרת הכנימה ניתן להעביר את המחלה מפלפל לפלפל וכנראה גם לפונדקאים אחרים ממשפחת הסולניים. ממצאים אלו מוכיחים את מעורבותו של גורם ויראלי במחלה ומאפשרים לנקוט כבר בשלב זה אמצעים לצמצום התפשטותה. כמו כן נותנים ממצאים אלו תוקף להמשך המחקר שיתמקד עתה בבידוד גורם המחלה ולימוד האפידמיולוגיה שלו בזמן ובמרחב.

זיהוי ואיפיון קשר אפשרי בין גורם ויראלי לבין תופעת ההצהבות והניוון של פילפל בערבה

מוגש ע"י י. אנטיגנוס המחלקה לזרולוגיה מכון וולקני בית דגן

e-mail: antignus@ias.agri.gov.il; Tel. : 9683567

תקציר

הצגת הבעיה

במהלך עונת הגידול 1998\1999 התגלו בערבה שטחי פלפל נרחבים שהראו סימפטומים של הצהבה קשה, עצירת גידול ופגיעה בגודל הפרי וצבעו, סינדרום זה כונה בשם ה"תופעה". תופעה כזו לא נראתה בארץ בעבר ולמיטב ידיעתי אינה מתועדת בספרות הבינלאומית. התבקשנו על כן לבחון את האפשרות שהמחלה ניגרמת ע"י פתוגן ויראלי.

מהלך העבודה ותוצאות עיקריות

בשלב הראשון נימצא כי ניתן להעביר את התופעה ע"י הרכבה דבר המצביע לכאורה על קיומו של גורם פתוגני בעל יכולת התפשטות ברקמות. בניסוי מעבדה ניבדקה האפשרות שהתופעה ניגרמת ע"י גזע חדש של וירוס צהבון האמיר האמיר של העגבניה אך אפשרות זו הופרכה ע"י שימוש בגלאים מולקולריים. ניסיונות להעביר את גורם המחלה במעבדה בעזרת כנימת עש הטבק (*Bemisia tabaci*) הניבו באופן חד משמעי תוצאות שליליות.

במהלך השנה שחלפה ערכנו בערבה סקר שתכליתו היתה לקבוע את חשיבותה הכלכלית של התופעה וסקר נוסף שבעזרתו זוהה קשר בין כנימות עלה לבין התפשטות התופעה אשר תוארה לעיל. בתצפיות אשר נעשו ברחבי הארץ נימצאה התופעה גם באזור הבשור. בניסויים מבוקרים אשר נערכו במעבדה הוכחנו באופן חד משמעי כי ניתן להעביר את גורם המחלה בעזרת כנימת עלה האפרסק (*Myzus persicae*) השכיחה באזור הערבה. בעזרת הכנימה ניתן להעביר את המחלה מפלפל לפלפל וכניראה גם לפונדקאים אחרים ממשפחת הסולניים.

מסקנות

מימצאים אלו מוכיחים את מעורבותו של גורם ויראלי במחלה ומאפשרים לנקוט כבר בשלב זה אמצעים לצמצום התפשטותה. כמו כן נותנים ממצאים אלו תוקף להמשך המחקר שיתמקד עתה בבידוד גורם המחלה ולימוד האפידמיולוגיה שלו בזמן ובמרחב.

מבוא ומטרות המחקר

פרויקט "ערבה נקיה" ופתיחת השוק האמרקאי לפלפל ישראלי הביא לעליה תלולה בשטחי הפלפל באזור הערבה וכיכר סדום. סך שטחי הפלפל בבתי רשת מינהרות ובתי צמיחה מגיע באזורים אלו לכחמשת אלפים דונם. ענף זה הפך לענף המוביל באזור.

בסתיו 1998 התגלתה באזור שבין כיכר סדום למושב פארן תופעה שפגעה קשות בחלקות פלפל שגודלו תחת רשתות צל ובבתי צמיחה. בצמחים שניפגעו פסקה ההתפתחות הוגטטיבית, שולי העלים התקפלו כלפי מעלה ועל העלים הופיעה כלורוזה קשה. פרי שנישא על צמחים אלו לא האדים כראוי ועל כן ניפסל ליצוא. המראה הכללי של הצמחים הפגועים מזכיר סימני מחלה הניגרמים ע"י וירוס.

הרכבת ריקמה מצמחים שמראים את התופעה לצמחים בריאים גרמה להופעת סימפטומים הדומים לסימפטומים של הצמחים מהם נילקחה הריקמה. מימצא זה עשוי להצביע על כך כי אמנם התופעה ניגרמת ע"י גורם פתוגני המסוגל להתפשט בריקמה וניתן להעברה.

על בסיס סיורים שנערכו בשטח ניראה שהיקף השטחים הפגועים משמעותי ואם אכן גורם התופעה הוא פתוגן בעל יכולת התפשטות, הרי שיש בתופעה זו משום סיכון ענף הפלפל באזור הערבה וגם באזורים נוספים של המדינה אליהם היא עשויה להתפשט.

המטרה הבסיסית של מחקר זה היא זיהוי ואיפיון הגורם לתופעת ההצהבות וההתנוונות של הפלפל בהנחה שהגורם הוא ויראלי, זיהוי הוקטוראים האחראים לתפוצתו ולימוד האפידמיולוגיה של המחלה באזור הערבה.

פירוט התוצאות והניסויים.

עבודת שדה

העבודה בשדה היתה מכוונת לזהות את התפשטות המחלה בזמן ובמרחב. לצורך מעקב אחר הופעת המחלה לאורך זמן מעת שתילת הפלפל ואילך ניבחרו שלושה אתרים במושב עין יהב אשר בכל אחד מהם הוצבו מידי שבוע מגשי חישתיל שכל אחד הכיל עשרים צמחי פלפל. הצמחים נאספו מהשטח אחת לשבוע יחד עם קבוצת ביקורת אשר כללה צמחים שלא נחשפו בשטח. הצמחים הובאו לבית דגן רוססו והחזקו בבית צמיחה שלושה חדשים למעקב אחר הופעת הסימפטומים. חשיפת הצמחים נערכה בין 8-9-99 ועד 1-1-2000.

באף אחת מקבוצות הצמחים שנחשפו בשטח לא הופיעו צמחים נושאי סימפטומים. במקביל לעבודה זו נערך סקר שבו תועדה התפשטות התופעה בבתי צמיחה ובתי רשת בהם יושמה הדברה כימית והדברה משולבת שבמיסגרתה צומצם למינימום 'שום חמרי הדברה

רעילים והושם דגש על שימוש באויבים טבעיים. במיסגרת סקר זה התבהרו העובדות הבאות:

1. נימצאה חפיפה בין מוקדי נגיעות ב"תופעה" לבין מוקדי נגיעות עם כנימות עלה ועם מוקדים של CMV שהוא וירוס חולף המועבר גם כן ע"י כנימות עלה.
2. נימצאה שכיחות גבוהה של התופעה בחלקות הדברה משולבת לעומת חלקות של הדברה כימית.
3. מוקדי הנגיעות הופיעו בבתי צמיחה תחת גמלונים שלא היו מכוסים בפלסטיק לצורך איורור המיבנה בראשית העונה (אוגוסט).
4. מוקדי הנגיעות במיבני חממה ללא כיסוי גג היו בד"כ בסמיכות לקיר הדרומי של המיבנה מצב האפיוני למצבים בהם חרקים מונחתים ע"י זרימת אויר מעל שובר רוח.
5. ביטוי הסימפטומים היה חמור יותר באזורים בהם עצמת הקרינה במיבנה היתה גבוהה יותר.
6. המחלה לא התפשטה ממוקדי נגיעות שבהם הופיעה למרות נוכחות מסיבית של אוכלוסיות כנימת עש הטבק בתוך המיבנה.

עבודה במעבדה

1. נסיונות לזיהוי וירוס צהבון האמיר בצמחי פלפל נושאי סימפטומים מתוך דיווח שהופיע לאחרונה בספרות עולה כי וירוס צהבון האמיר של העגבניה (TYLCV) תקף פלפל בספרד (Reina, J. 1999. Plant Dis. 83, 1176). כדי לבדוק אפשרות זו נערכה הפקה של כלל ה-DNA (Dellaporta procedure) מצמחים שהובאו מהערבה והמראים סימפטומים אפיוניים של התופעה. התכשירים שהתקבלו הורצו על ג'ל הועברו לממברנה עליה נעשתה היברידיזציה עם גלאי מולקולרי ספציפי לזיהוי וירוס צהבון האמיר של העגבניה. מתוך התוצאות עולה כי לא נימצא DNA ויראלי בתכשירים שהופקו מצמחי פלפל נושאי סימפטומים מהערבה בעוד שהתקבלה תגובה ספציפית עם תכשיר שהופק מצמחי עגבניה שהיו נגועים ב-TYLCV (איור 1).
- בניסויים נוספים ניסינו לזהות TYLCV בצמחי פלפל נגועים בעזרת PCR ע"י שימוש בתחלים ספציפיים ל-TYLCV. האמפליפיקציה בוצעה על תכשירים שהופקו מצמחי פלפל נגועים בשיטת דלפורטה. גם בניסויים אלו לא זוהה בצמחי הפלפל תוצר אמפליפיקציה ממקור ויראלי בעוד שהוא הופיע בברור בתכשיר הביקורת שהופק מעגבניות נגועות ב-TYLCV (איור 2).
2. ניסויים לזיהוי RNA ויראלי דו-גדילי בצמחי פלפל נגועים ב"תופעה" RNA דו-גדילי אינו מופיע בריקמת צמחים בריאים והימצאותו עשויה להצביע על קיומה של אינפקציה בריקמה הניבדקת. כדי לברר אפשרות זו הופקו מרקמות נגועות של פלפל RNA דו-גדילי (Dodds and Bar Joseph, 1983. Phytopathol. 73, 419-422). התכשירים הורצו על גלים של

אקרילאמיד וניצבעו בצביעת כסף (איור 3) לא הצלחנו לזהות הבדלים בין דגם פסי ה-RNA של תכשיר מצמח פלפל נגוע לבין הפרופיל שהתקבל מצמח פלפל בריא.

3. ניסויים לבידוד חלקיקים ויראליים מרקמות נגועות.

הנחת העבודה הראשונית היתה מבוססת על האפשרות שהוירוס התוקף פלפל בערבה שייך למשפחת ה-Closteroviridae הנחה שהתבססה על האופן שבו מופיעים הסימפטומים על עלוות הצמח כשלראשונה הסימנים נראים על העלים היותר מבוגרים. ניסינו על כן להשתמש בפרוצדורות הפקה שפותחו בעבר לוירוסים מקבוצה זו

(Klassen, et al., J. Gen. Virol. 75, 1525-1533, Cohen et al., Ann. Appl. Biol. 121, 257-268).

לא הצלחנו עד כה לזהות חלקיקים באף אחת מהשיטות המתוארות לעיל.

נוסחה גם שיטה נוספת שנימצאה על ידנו בעבר יעילה לבידוד וירוסים מאורכים :

(Antignus et al., Ann. Appl. Biol. 126, 111-120). החומר אשר שימש להפקה נילקח מצמחים

מבוגרים שהובאו מהערבה ואשר נידבקו זמן רב לפני ששימשו כחומר גלם להפקה. כיום

לאחר שהצלחנו לזהות וקטור אשר בעזרתו ניתן לבצע העברה ניתן יהיה להכין חומר גלם

בשלב מתאים יותר לצורך הפקה.

4. ניסויים לזיהוי הוירוס באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני חודר.

עלים מקודקודי צמיחה של פלפל הנגוע בתופעה קובעו ונחתכו במיקרוטום. הנחת העבודה

שהתבססה על אופי הסימפטומים היתה שהוירוס הוא וירוס המוגבל לריקמת השיפה ולכן

כוונו החתכים לאזור זה. עד כה לא התגלו סימנים בריקמה לנוכחותו של וירוס למעט מיקרה

אחד בהן זהו סטרוקטורות (Vesicles) הקשורות לעיתים לאינפקציות ויראליות.

5. ניסויים להעברת המחלה ע"י הדבקה מכנית.

עלים מצמחים נגועים ניכתשו בבופר פוספט והדבקו לצמחי לפלפל ולצמחי בוחן ממשפחות

שונות המקובלים בזיהוי ביולוגי של וירוסים. הצמחים החזקו בבית צמיחה כחדשיים אך על

אף אחד מהם לא הופיעו סימפטומים. עובדה זו מאשרת את הנחתנו המבוססת על אופי

הסימפטומים כי הוירוס הוא וירוס המוגבל למערכת השיפה ואינו ניתן להעברה באופן מכני.

6. ניסויים להעברת המחלה ע"י כנימת עש הטבק (B. tabaci)

העונה בה מופיעה המחלה בפלפל באזור הערבה (סוף הקיץ \סתיו) היא עונת השיא

בפעילות כנימת עש הטבק ובתקופה זו מגיעות אוכלוסיות לשיא. מסיבה זו ומתוך טענות

החקלאים על הופעת כע"ט בחלקות שנוגעו בחרנו חרק זה כמועמד סביר לשמש וקטור

למחלה. נערכו ניסויים רבים בהם הוזנו כנימות עש על צמחי פלפל נגועים שהובאו מהערבה

למשך 48 ש' ויותר. לאחר מכן הועברו הכנימות להזנת הדבקה בת 48 ש' נוספות. הצמחים

רוססו והעברו לבית צמיחה למשך חדשיים לצורך מעקב אחר הופעת הסימפטומים.

באף אחד מהניסויים שנערכו (עשרה ניסויים) לא הופיעו סימפטומים על הצמחים שנחשפו

להדבקה עם כנימת עש הטבק.

בסידרת ניסויים נוספת נילכדו פרטים של כע"ט בעזרת מכשיר שאיבה מצמחי פלפל נושאי סימפטומים שגדלו בחממה אורגנית (עין יהב) שהיתה נגועה קשה בתופעה. הכנימות אשר נילכדו הושבו באופן מידי על שתילי פלפל שכוסו בכלובונים (כ- עשר כנימות לצמח). הפנימות שהו על הצמחים 48 ש' ואח"כ רוססו. הצמחים החזקו כחדשיים למעקב אחר הופעת סימפטומים. באף אחד מהמיקרים לא התקבלו סימפטומים על צמחים שהדבקו באופן זה.

6. ניסויים להעברת המחלה ע"י כנימות עלה (Myzus Persicae)

ממצאי הסקר שערכנו בשטחי הפלפל של מושב עין יהב ופאראן הראו באופן ברור מיתאם בין הופעת מוקדי נגיעות של המחלה ומוקדי נגיעות של כנימות עלה. פנינו על כן לבדוק את האפשרות שכנימות עלה גורמות לתפוצת המחלה.

פרטים של כנימת עלה האפרסק מתרבות מעבדה העברו להזנת רכישה של מספר ימים על צמחי פלפל נושאי סימפטומים אשר הובאו מהערבה. הכנימות העברו אח"כ לצמחי פלפל בריאים להזנת הדבקה של מספר ימים. לאחר מכן ניקטלו הכנימות והצמחים החזקו בתנאים של 25-30 מעלות עם הארה מתמדת. לאחר 2-3 שבועות החלו להופיע סימני הצהבה קלים על העלים המבוגרים והצמח הפסיק את גידולו. לאחר 40-45 ימים הופיעו הסימפטומים באופן ברור והם כללו הצהבות בין עורקיות, התקצרות פרקים חריפה והופעת עלים קטנים ובלתי מפותחים באמירי הצימוח. הצלחת ההעברה חזרה על עצמה בשיבעה סטים של צמחים אשר הדבקו כנ"ל (טבלה 1).

מסקנות

עיקר המאמץ הושקע בתחום האפידמיולוגי וזיהוי הוקטור הגורם לתפוצת המחלה כדי שנוכל לנקוט באמצעי התגוננות לצמצום הנזק מהר ככל שניתן. בשלב זה של המחקר ניתן לקבוע את המסקנות הבאות:

1. גורם המחלה בעל אופי ויראלי מובהק והוא עובר בהרכבה וע"י כנימת עלה האפרסק.
2. הפתוגן מוגבל כניראה למערכת השיפה של הצמח ומתוך הכרותנו עם פתוגנים מקטגוריה זו סביר להניח שהוא מטיפוס מתמיד או מתמיד למחצה מצב המאפשר שימוש בהדברה כימית לצמצום הנזק אך נקודה זו עדיין דורשת הוכחה.
3. בעונת הגידול הקרובה מומלץ לנקוט בכל האמצעים המכוונים למנוע פלישת כנימות עלה למיבני גידול הפלפל כגון שימוש ביריעות חוסמות UV ורשתות ביונט וכן שימוש ביריעות צהובות דביקות ללכידה המונית של כנימות עלה.

המשך המחקר יתרכז בנקודות הבאות:

1. זיהוי הפתוגן איפיונו הביולוגי והמולקולרי וקביעת יחסי הגומלין שלו עם כנימת עלה האפרסק.
2. לימוד האפידמיולוגיה של כנימות העלה בערבה בעונה הרלבנטית (סוף קיץ\ סתיו) וזיהוי מקורות האינקולום.

סיכום עם שאלות מנחות

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה בדיקת האפשרות כי תופעת ההצהבות וההתנוונות של הפלפל בערבה ניגרמת ע"י פתוגן יראלי. במידה ועובדה זו תאושר יאופין הוירוס ברמה הביולוגית והמולקולרית ויחקרו מאפייניו האפידמיולוגיים.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. נעשו ניסויים לבדוד חלקיקים ויראליים מריקמה נגועה וכן נעשו חתכים ברקמה נגועה לזיהוי סטרוקטורות ממקור יראלי אך ניסיונות אלו ניכשלו עד כה. נערכו ניסויים להעביר את גורם המחלה בעזרת חרקים שונים ונימצא כי כנימת עלה האפרסק מעבירה אותו ביעילות בתנאי מעבדה. ע"י ביצוע סקר נילמדה האטיולוגיה ואופן התפשטות המחלה בשטחי הפלפל בערבה.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי ישום המחקר והמשכו. מציאת הוקטור המסוגל להעביר את המחלה ומעקב אחר התפתחות הסימפטומים במעבדה מאוששות את הנחתנו כי תופעת ההצהבות וניוון הפלפל בערבה ניגרמת ע"י פתוגן יראלי. סימני המחלה והתפתחותם מאפשרת להניח כי הוירוס הגורם למחלה שייך לקבוצת ה-Luteoviruses או קבוצת ה-Closteroviruses וניסיונות הבידוד של החלקיקים יעשו עפ"י פרוצדורות אשר פותחו עבור בני קבוצות אלו. מימצאינו פותחים פתח לבדיקת רמת הספציפיות של הוקטור, יחסי הגומלין שלו עם הוירוס ולימוד האפידמיולוגיה שלו באזור הערבה.
4. הבעיות שנותרו לפיתרון ולאו השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים שיווקיים ואחרים), התייחסות המשך המחקר לגביהן. הנושאים שיש עדיין לטפל בהם : בידוד הוירוס ואיפיונו ברמה הביולוגית והמולקולרית, יחסי גומלין של הוירוס עם הוקטור, אפידמיולוגיית המחלה בערבה כולל איתור מקורות האינקולום וזיהוי גידולים היכולים לשמש כנשאים.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח הידע העבר באופן מידי לאנשי מו"פ ערבה ומדריכי שה"מ על מנת שידריכו חקלאים למנוע פלישת כנימות עלה לבתי הגידול. כמו כן אציג את הנושא והאמצעים שיש להפעיל בשטח במיסגרת הרצאה שאתן למגדלי הפלפל של הערבה בסוף חודש מרץ ש.ז.

תוצאות ניסויי העברה של תופעת הערבה בפלפל עם כנימת עלה האפרסק

(Myzus Persicae)

<u>הניסוי</u>	<u>תאריך</u>	<u>תאריך ריסוס</u>	<u>הזנת הדבקה (ימים)</u>	<u>הופעת סימפטומים</u>	<u>נגיעות</u>
I	19-12-99	27-12-99	8	35 יום	5/5
II	26-12-99	2-1-00	7	40 יום	4/4
III	29-12-99	2-1-99	4	40 יום	4/5
IV	2-1-99	8-1-99	6	32 (התחלה)	5/6
V	5-1-00	8-1-99	3	40	2/3
VI	12-1-99	16-1-99	4	40	5/5
VII	17-1-00	23-1-99	6	35	3/4
VIII	21-1-00	30-1-99	9		
IX	23-1-99	30-1-99	7		

Healthy pepper
Infected pepper
Infected pepper

MW
Ladder

No. 282

DINCO & RHEINUM



