

2001-2003

תקופת המחקר:

136-0444-03

קוד מחקר:

**Subject:** VIRUS DISEASES IN NEW ORNAMENTAL AND FLOWER CROPS.

**Principal investigator:** ABED GERA

**Cooperative investigator:** YACOV COHEN, ARIE ROSNER

**Institute:** Agricultural Research Organization (A.R.O)

**שם המחקר:** מחלות וירוסים בגידולי פרחים וצמחי נוי חדשים.

**חוקר ראשי:** עבד גרה

**חוקרים שותפים:** יעקב כהן, אריה רוזנר

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

## תקציר

**הצגת הבעיה:** גידולי פרחים וצמחי נוי רגישים למחלות וירוס שפוגעים ופוסלים אותם לשיווק ומונעים שימוש בחומר הריבוי יותר מעונת גידול אחת. ריבוי הצמחים בתנאים לא מבוקרים הביא להינעוץ הסטוקים במחלות וירוס. בהעדר צמחים חופשיים מוירוס לא ניתן לחדש את הגידול. מטרת תכנית זו להתמקד בזיהוי ואפיון מחלות וירוס חדשות בגידולי פרחים וצמחי נוי חדשים, ליווי וירולוגי של גידולי פרחים חדשים, מתן פתרון מהיר לבעיות המתעוררות במהלך הגידול ובדיקת האפשרות לאספקה של חומר ריבוי פטור מוירוסים.

**מהלך ושיטות העבודה:** אפיון וזיהוי הוירוסים נעשה בשיטות ביולוגיות באמצעות הדבקה על צמחי בוחן, שימוש במיקרוסקופיה אלקטרונית, שיטות סרולוגיות: ELISA, ISEM ו-Western blot, ושיטות מולקולאריות, RT-PCR, שיבוט חומצות גרעין ובדיקת רצף. תכשירי וירוס מנוקה הוזרקו לארנבות ושימשו להכנת נוגדנים פוליקלונליים ספציפיים לוירוסים השונים.

**תוצאות עיקריות:** צמחי טברנמונטנה וצמחי קאלה שנבדקו ב-ELISA לנוכחות וירוס TMGMV ו-DsMV, בהתאמה, ונמצאו חופשיים מוירוסים, משמשים להקמת סטוק צמחי אם לריבוי.

תבדידי IYSV מליזיאנטוס זוהה ואופיין. בודד הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד ונקבע רצף הנוקלאוטידים.

וירוס חדש מקבוצת ה-Carla בודד ואופיין מוירבנה.

וירוס הנימור של קליבראכואה (CbMV), וירוס חדש מקבוצת ה-Carmo, נוקה ואופיין מקליבראכואה והוכנה שיטת בדיקה לזיהויו. הוחל בברירת צמחים מתאימים להכנת תרביות ממריסטמות במגמה ליצור סטוק צמחי-אם חופשיים מוירוס.

וירוס הפסים של הטבק (TSV) מקבוצת ה-Illarviruses, זוהה, נוקה ואופיין מפלוקס.

**מסקנות והמלצות:** בטברנמונטנה ובקאלה הוכנו צמחים חופשיים מוירוס. הצלחת הגידול מותנית בהדרכת המגדלים בשיטות סניטציה ומניעת הפצה.

בצמחי נוי חדשים, אקוניטום, פלוקס, וירבנה, קליבראכואה, ובקופה נתגלו וירוסים חדשים.

שימוש בשיטות וגטיביות לריבוי צמחי נוי ויבוא בלתי מבוקר של חומר ריבוי מביא להתפשטות מחלות וירוס. חומר ריבוי שמקורו בצמח נגוע הוא מקור להפצה על ידי מגע בזמן הגיזום והקטיף. מניעת נזקי מחלות וירוס תושג על ידי שימוש בחומר ריבוי חופשי מווירוס. מומלץ לבדוק בצורה יסודית חומר ריבוי של צמחי נוי שמגיע מחו"ל לנוכחות וירוסים.

#### 4. רשימת פרסומים:

1. Cohen, J., Rosner, A., Kagan, S., Gottleb, J., Zeidan, M. and Gera, A. (2001). Detection of Tobacco mild green mosaic virus in *Tabernaemontana*. *Phytoparasitica* 29, 257.
2. Cohen, J., Lapidot, M., Loebenstein, G. and A. Gera (2001). A new disease occurring in *Lisianthus* caused by *Sweet potato sunken vein virus*. *Pracheem* 8, 59-62.
3. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Raccach, B. and Gera, A. (2002). Detection of Iris Yellow Spot Virus in *Lisianthus*. *Acta Horticulturae* 568, 43-49.
4. Kritzman, A., Beckelman, H., Raccach, B. and Gera, A. (2002). Spread of iris yellow spot virus in cultivated crops in Israel. VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aschersleben, Germany.
5. Cohen, J., Zeidan, M., Feigelson, L., Maslenin, L., Rosner, A. and A. Gera, A. (2003). Characterization of a Distinct Carlavirus Isolated from *Verbena*. *Archives of Virology* 148, 1007-1015.
6. Gera, A., Lampel, and Fiegelson, L. (2003). Detection of a Carmovirus in *Calibrachoa*. *Pracheem* (in press).
7. Gera, A., Tamari, Y., Lampel, M., Maslenin, L., Rosner, A. and Zeidan, M., (2003). Detection of tobacco streak virus (TSV) in phlox. *Pracheem* (in press).

דו"ח לתכנית מחקר 00-0444-136  
מחלות וירוס בגידולי פרחים וצמחי נוי חדשים

Virus diseases of new ornamental crops

דו"ח סופי מוגש לקרן מדען ראשי

ע"י:

המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.	עבד גרה
המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.	מרים למפל
המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.	אריה רוזנר

Abed Gera, Department of Virology, ARO, The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; E-mail: [abedg@volcani.agri.gov.il](mailto:abedg@volcani.agri.gov.il).

Miriam Lampel, Department of Virology, ARO, The Volcani Center, P.O. B. 6, Bet Dagan 50250, Israel.

Arieh Rosner, Department of Virology, ARO, The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; E-mail: [rosnera@volcani.agri.gov.il](mailto:rosnera@volcani.agri.gov.il)

דצמבר 2003

טבת תשס"ד

האם הנך מאשר את ציון הפסקה הבאה בדף הפתיחה לדו"ח כן/לא  
הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר

### 3. תקציר

**הצגת הבעיה:** גידולי פרחים וצמחי נוי רגישים למחלות וירוס שפוגעים ופוסלים אותם לשיווק ומונע שימוש בחומר הריבוי יותר מעונת גידול אחת. ריבוי הצמחים בתנאים לא מבוקרים הביא להנגעות הסטוקים במחלות וירוס. בהעדר צמחים חופשיים מוירוס לא ניתן לחדש את הגידול. מטרת תכנית זו להתמקד בזיהוי ואפיון מחלות וירוס חדשות בגידולי פרחים וצמחי נוי חדשים, ליווי וירולוגי של גידולי פרחים חדשים, מתן פתרון מהיר לבעיות המתעוררות במהלך הגידול ובדיקת האפשרות לאספקה של חומר ריבוי פטור מוירוסים.

**מהלך ושיטות העבודה:** אפיון וזיהוי הוירוסים נעשה בשיטות ביולוגיות באמצעות הדבקה על צמחי בוחן, שימוש במיקרוסקופיה אלקטרונית, שיטות סרולוגיות: ELISA, ISEM ו-Western blot, ושיטות מולקולאריות, RT-PCR, שיבוט חומצות גרעין ובדיקת רצף. תכשירי וירוס מנוקה הוזרקו לארנבות ושימשו להכנת נוגדנים פוליקלונליים ספציפיים לוירוסים השונים.

**תוצאות עיקריות:** צמחי טברנמונטנה וצמחי קאלה שנבדקו ב- ELISA לנוכחות וירוס TMGMV ו-DsMV, בהתאמה, ונמצאו חופשיים מוירוסים, משמשים להקמת סטוק צמחי אם לריבוי.

תבדידי IYSV מליוזאנתוס זוהה ואופיין. בודד הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד ונקבע רצף הנוקלאוטידים.

וירוס חדש מקבוצת ה- Carla בודד ואופיין מוירבנה.

וירוס הנימור של קליבראכואה (CbMV), וירוס חדש מקבוצת ה- Carmo, נוקה ואופיין מקליבראכואה והוכנה שיטת בדיקה לזיהויו. הוחל בביררת צמחים מתאימים להכנת תרביות ממריסטמות במגמה ליצור סטוק צמחי-אם חופשיים מוירוס.

וירוס הפסים של הטבק (TSV) מקבוצת ה- *Ilarviruses*, זוהה, נוקה ואופיין מפלוקס. **מסקנות והמלצות:** בטברנמונטנה ובקאלה הוכנו צמחים חופשיים מוירוס. הצלחת הגידול מותנית בהדרכת המגדלים בשיטות סניטציה ומניעת הפצה.

בצמחי נוי חדשים, אקוניטוס, פלוקס, וירבנה, קליבראכואה, ובקופה נתגלו וירוסים חדשים. שימוש בשיטות וגטטיביות לריבוי צמחי נוי ויבוא בלתי מבוקר של חומר ריבוי מביא להתפשטות מחלות וירוס. חומר ריבוי שמקורו בצמח נגוע הוא מקור להפצה על ידי מגע בזמן הגיזום והקטיף. מניעת נזקי מחלות וירוס תושג על ידי שימוש בחומר ריבוי חופשי מוירוס. מומלץ לבדוק בצורה יסודית חומר ריבוי של צמחי נוי שמגיע מחו"ל לנוכחות וירוסים.

### 4. רשימת פרסומים:

1. Cohen, J., Rosner, A., Kagan, S., Gotlieb, J., Zeidan, M. and Gera, A. (2001). Detection of Tobacco mild green mosaic virus in Tabernaemontana. *Phytoparasitica* 29, 257.
2. Cohen, J., Lapidot, M., Loebenstein, G. and A. Gera (2001). A new disease occurring in *Lisianthus* caused by *Sweet potato sunken vein virus*. *Pracheem* 8, 59-62.
3. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Raccach, B. and Gera, A. (2002). Detection of Iris Yellow Spot Virus in *Lisianthus*. *Acta Horticulturae* 568, 43-49.
4. Kritzman, A., Beckelman, H., Raccach, B. and Gera, A. (2002). Spread of iris yellow spot virus in cultivated crops in Israel. VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aschersleben, Germany.
5. Cohen, J., Zeidan, M., Feigelson, L., Maslenin, L., Rosner, A. and A. Gera, A. (2003). Characterization of a Distinct Carlavirus Isolated from *Verbena*. *Archives of Virology* 148, 1007-1015.
6. Gera, A., Lampel, and Feigelson, L. (2003). Detection of a Carmovirus in *Calibrachoa*. *Pracheem* (in press).

7. Gera, A., Tamari, Y., Lampel, M., Maslenin, L., Rosner, A. and Zeidan, M., (2003). Detection of tobacco streak virus (TSV) in phlox. Pracheem (in press).

## **ב. מבוא:**

גידולי פרחים וצמחי נוי רגישים למחלות וירוס שפוגעים ופוסלים את הפרחים לשיווק ומונע שימוש בחומר הריבוי יותר מעונת גידול אחת. ריבוי הצמחים בתנאים לא מבוקרים הביא להינגעות הסטוקים במחלות וירוס. בהעדר צמחים חופשיים מווירוס לא ניתן לחדש את הגידול. מטרת תכנית זו להתמקד בזיהוי ואפיון מחלות וירוס חדשות בגידולי פרחים וצמחי נוי חדשים, ליווי וירולוגי של גידולי פרחים חדשים, מתן פתרון מהיר לבעיות המתעוררות במהלך הגידול ובדיקת האפשרות לאספקה של חומר ריבוי פטור מווירוסים. בעבודה זו התמקדנו במספר גידולים:

### **1. טברנמונטנה:**

הצמח **טברנמונטנה** עטורה הוא המוצר בלעדי לישראל וגובה מחיר גבוה באירופה. ב-1999 התגלתה במשתלה בגוש קטיף מחלה לא מוכרת שסימניה מופיעים בעלים כעגולים כלורוטיים, צורות דמויות נוצה, נקרוזה וחרור עלים. עצמת הפגיעה הביאה לחיסול הצמחים. המשך הגידול חייב זיהוי ואפיון המחלה ולימוד דרכי תפוצתה ומניעתה.

### **2. קאלה**

פרחי **קאלה** נגועים בווירוס אינס ראויים לשיווק. בישראל נעשה שימוש בחומר ריבוי מקומי או מיבוא שלא עבר בקרת. גידול בחממות או בשטחים פתוחים ללא הגנה מפני חרקים גורם להנגעות השטחים תוך עונת גידול אחת במחלות וירוס. יכול הפרחים נפגע וחומר הריבוי אינו ראוי לשימוש. בבדיקה הקדמית של כתש עלים נושאי תסמיני מחלה במיקרוסקופ אלקטרוני נמצא וירוס חוטי לא מזוהה. המשך הגידול והרחבתו מחייב זיהוי ואפיון המחלה והכנת חומר ריבוי חופשי מווירוס.

### **3. גידולים חדשים**

**הקליבראכואה** (*Calibrachoa*), ממשפחת ה-*Solanaceae*, הוא צמח נוי עשבוני חדש יחסית המשמש כצמח עציץ וגינה. בשנים האחרונות טופחו מספר זני קליבראכואה, שריבויים נעשה בצורה וגטטיבית על ידי ייחורים. במספר משקים הוחל בייצוא חומר ריבוי לאירופה ובעונת היצוא 2002/03 יוצאו מהארץ כ-5 מיליון ייחורים. בעבר, בגלל הריבוי מזרעים, שדרסם מרבית הווירוסים לא עוברים, לא היתה בעיית הווירוסים משמעותית בקליבראכואה. המעבר מזרעים לייחורים והסחר הבינלאומי בחומר ריבוי גרם להופעה והתפשטות מחלות וירוס חדשות. בתצפיות שנערכו במשתלות ובחומר ריבוי שהתקבל מחו"ל, נמצאו צמחים נושאי סימני מוזאיקה קלה. לא נגרם נזק משמעותי לגידול. גורם המחלה זוהה כ וירוס הנימור של קליבראכואה *Calibrachoa mottle virus* (CbMV) מקבוצת ה-*Carmoviridae*. הוחל בהכנת צמחי-אם פטורים מווירוס על ידי ניקוי דרך תרבית מריסטמטית ובשיתוף עם המשתלות.

## **פלוקס:**

**פלוקס** הוא צמח נוי המשמש כצמח גינה וכפרח קטיפי, והיקף גידולו מתרחב הן בארץ והן בהולנד. הצמח מהווה פונדקאי למספר וירוסים. ריבוי הווגטטיבי של הפלוקס על ידי ייחורים מחייב תשומת לב מיוחדת בבחירת הייחורים ממטעי אם חופשיים מוירוס. בתצפיות שנערכו בחלקות מסחריות של פלוקס בסוף שנת 2002, נמצאו צמחים נושאי סימני ניקרוזה סיסטמית והתייבשות עלים. צמחים נגועים לא פרחו ונגרם נזק משמעותי לגידול. גורם המחלה זוהה כוירוס הפסים של הטבק *(TSV) Tobacco streak virus* (מקבוצת ה- *Ilarviruses*).

## **ליזיאנתוס**

פרחי ה**ליזיאנתוס** פופולריים מאוד ביפן. בעשור האחרון, הצמח הוכנס לגידול מסחרי בארץ כפרח קטיפי המיועד לשוק המקומי ולייצוא והפך לאחד החשובים בסחר הפרחים באירופה וארה"ב. הריבוי נעשה בדרך כלל מזרעים במשתלות, ולאחרונה הוחל בייבוא שתילים מהולנד. הצמח רגיש מאוד לוירוסים ולמחלות קרקע. נגיעות בוירוס גורמת לנזקים קשים בהתפתחות הצמח ובאיכות הפרח. בסוף 1999 התגלתה, בחלקות ליזיאנתוס בדרום הארץ, תופעה לא מוכרת. הצמחים נראו מנונסים ועל העלים נראו כתמים נקרוטיים. התסמינים הופיעו במספר רב של צמחים בחלקה ונגרם נזק לא מבוטל. התסמינים שהופיעו בליזיאנתוס לא התאימו לסימני מחלות וירוס הידועים בליזיאנתוס, עלה החשד שמדובר בוירוס מקבוצת ה-Tospo, קבוצת וירוסים שמתפשטת במהירות בארץ ופוגעת במספר הולך וגדל של מיני תרבות ובר.

## **ג. פירוט הניסויים והתוצאות:**

### **1. טברנמונטנה**

#### **הכנת צמחי אם חופשיים מוירוס ה-TMG MV**

צמחי טברנמונטנה נאספו מחממות המחלקה לפרחים ומגינות נוי ונבדקו לנוכחות הוירוס TMGMV בשיטת ה-ELISA. צמחים שנמצאו חופשיים מוירוס שימשו להכנת סטוק צמחי אם. הצמחים נבדקו במהלך עונת הגידול ונמצאו נקיים וכיום עומדים לרשות המגדלים.

### **2. קאלה**

#### **הכנת צמחי אם חופשיים מוירוס ה-DsMV**

צמחי קלה שגדלים בעציצים ואינם מראים סימני מחלה נאספו מחממות ונבדקו לנוכחות וירוס המוזאיקה של הדשין (DsMV) בשיטת ה-ELISA. צמחים שנמצאו חופשיים מוירוס שימשו להכנת סטוק צמחי אם. הצמחים נבדקו במהלך שתי עונות גידול.

### **3. זיהוי וירוס הנימור בקליבראכואה**

בתצפיות שנערכו במשתלות ובחומר ריבוי שהתקבל מחו"ל, נמצאו צמחים נושאי סימני מוזאיקה קלה. לא נגרם נזק משמעותי לגידול. גורם המחלה זוהה כוירוס הנימור של

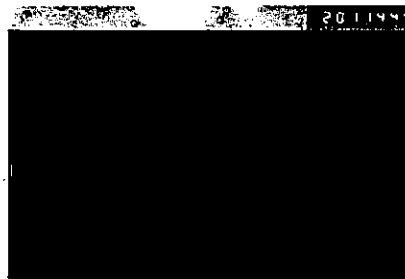
קליבראכואה - *(CbMV) Calibrochoa mottle virus*, מקבוצת ה-Carmo. במקביל לעבודתנו דווח על המצאות הווירוס בארה"ב ואירופה.

#### תיאור הווירוס

צמחי קליבראכואה נגועים בד"כ לא מראים סימני מחלה. לעתים רחוקות כאשר הצמח בעקה, סימני מוזאיקה קלה ונימור מופיעים בעלים. מוהל גס שהוכן מהצמחים הנגועים שימש להדבקת שורה של צמחי בוחן. סימנים סיסטמיים התקבלו ב- *Nicotiana benthamiana* ונקפים נקרוטיים התקבלו ב- *Chenopodium quinoa*. בבדיקת מיצוי מעלי קליבראכואה, קינואה ו/או בנטמינה נגועים במיקרוסקופיה אלקטרונית נצפו חלקיקי וירוס עגולים בקוטר של 29-31 ננומטר.

#### ניקוי הווירוס והכנת אנטי-סרום:

עלי קינואה טריים רוסקו בבופר פוספט pH-7.0 בתוספת Chloroform ו-thioglycolic acid. נעשה סירכוז נמוך והמשקע הורחק. הנוזל העליון נאסף והוטען על כרית 20% סוכרוז בבופר פוספט. לאחר סירכוז במשך 3 שעות במהירות 30000 RPM סולק הנוזל העליון והמשקע הורחק בבופר פוספט. הווירוס הוטען על גרדיאנט 10%-40% CsCl בבופר פוספט. לאחר סירכוז במשך 3 שעות במהירות 38,000. נאספו פרקציות בנפח 1 מ"ל ונבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני. הפרקציות שהכילו וירוס אוחדו, נאספו ורוכזו. שיטת הניקוי נמצאה יעילה ואפשרה קבלת יכול גבוה של חלקיקי וירוס (תמונה 1).



תמונה 1. תכשיר מנוקה של וירוס נימור הקליבראכואה (CbMV) כפי שנראה במיקרוסקופיה אלקטרונית.

ווירוס מנוקה הוזרק, לארנבת לקבלת נוגדנים. מהסרום הוכנה ערכת בדיקה סרולוגית בשיטת ה-ELISA. הסרום נמצא יעיל בזיהוי הווירוס. ערכת בדיקה שהוכנה במעבדה, משמשת היום לזיהוי הווירוס. בבדיקות ELISA עם הנוגדן התקבלה תגובה חיובית הן, בדוגמאות שהוכנו ישירות מצמחי קליבראכואה שהראו סימני נימור ו/או ללא סימנים והן מצמחי בתן מודבקים.

העברת הווירוס:

בהדבקות מכאניות על צמחי בוחן, הווירוס עבר בנקל לשני זני ניקוטיינה (בנטמינה וקליבלנדי) וקינפודיום אמרנטיקלור. הווירוס לא הדביק צמחי פטוניה מזנים שונים. בניסיונות ראשוניים, לא הצלחנו להעביר את הווירוס בהעברה חולפת באמצעות כנימות עלה. וירוסים מקבוצת ה-Carmo עוברים בנקל, בהעברה מכאנית ובשיעורים נמוכים בזרעים.

**לסיכום,** רשויות הגנת הצומח באירופה התייחסו בסלחנות לגבי חומר ריבוי נגוע בוירוס במהלך העונה הקודמת. ניקיון חומר הריבוי הוא הגורם שיקבע את המשך הגידול לייצוא. חומר ריבוי שמקורו בצמח נגוע מעביר בוודאות את הווירוס לצאצאיו, אשר יהוו בעתיד מקור להפצתו לצמחים בריאים. הוחל בברירת צמחים מתאימים להכנת תרביות ממירסטמות במגמה ליצור סטוק צמחי-אם חופשיים מווירוס. העבודה נעשית בשיתוף עם משתלות לחומר ריבוי.

#### **4. פלוקס:**

**פלוקס** מהווה פונדקאי למספר וירוסים, והחשובים ביניהם הם וירוס המוזאיקה של המלפפון (CMV) שהתגלה בארץ, ווירוס הטבעות השחורות של העגבניה (TBRV) שנתגלה באירופה. ריבוי פלוקס נעשה מייחורים שנלקחים ממטעי-אם או ייחורי שדה הנלקחים ממטעים לאחר עונת הגידול. ייצור שתילים מריבוי וגטטיבי באמצעות ייחורי שדה מצמחי אם נגועים בוירוס יעביר בוודאות את הווירוס לצאצאים, אשר יהוו מקור להפצה משנית לצמחים בריאים בשדה. רוב הזנים המובאים לארץ מקורם מטיפוח הולנדי.

בתצפיות שנערכו בסוף שנת 2002 בחלקות מסחריות, נמצאו צמחים נושאי סימני ניקרוזה סיסטמית והתייבשות עלים. צמחים נגועים לא פרחו ונגרם נזק משמעותי לגידול. גורם המחלה זוהה כווירוס הפסים של הטבק - *Tobacco streak virus* (TSV) מקבוצת ה-*Ilarviruses*.

#### **תיאור התופעה:**

סימני המחלה הופיעו בכל שלבי הגידול ובמיוחד בשלבים המתקדמים. הצמחים הנגועים נראו מנונסיים. בעלים ובגבעול הופיעו כתמים ניקרוטיים סיסטמיים או מוקפים ברקמה כלורוטית (תמונה 2). לעתים צמחים נגועים התייבשו והתנוונו. התסמינים הופיעו במספר רב של צמחים בחלקה ונגרם נזק לא מבוטל.





## תמונה 2: פלוקס עם סימני ניקרוזה, נגוע בוורוס הפסים של הטבק (TSV). העברה מכאנית:

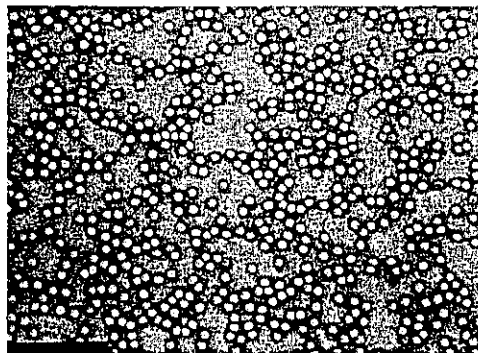
בהדבקה מיכנית על צמחי הבוחן השונים, במיצוי מעלי פלוקס עם תסמינים, הווירוס הדביק – *G. globosa*, *C. quinoa*, *N. benthamiana* – סימני מוזאיקה ונימור נצפו בבנטמינה כשמנה ימים לאחר ההדבקה. ההדבקה בקינואה ובגומפרנה היתה מקומית, נקפים מקומיים הופיעו על העלים המודבקים 5-8 ימים לאחר ההדבקה. בהדבקה חוזרת ממיצוי עלי בנטמינה, התקבלו בפלוקס סימנים דומים לאלה שהיו בצמחים נגועים, שנאספו בשדה. התסמינים שהופיעו לא תאמו לסימני מחלות וירוס הידועים בפלוקס, בארץ. תסמינים דומים הנגרמים על ידי TBRV תוארו בעבר בפלוקס, באירופה. בבדיקות סירולוגיות ראשוניות, דוגמאות מצמח נגוע לא הגיבו עם נוגדן מסחרי נגד- TBRV.

### מיקרוסקופיה אלקטרונית:

חלקיקי וירוס בודדים בקוטר של כ- 30 ננומטר נמצאו בתכשיר שהוכן מרסק צמחי פלוקס או בנטמינה נגועים בוורוס.

### ניקוי הוירוס:

עלי קינואה טריים רוסקו בבופר פוספט pH-7.0 בתוספת Chloroform ו-thioglycolic acid. נעשה סירכוז נמוך והמשקע הורחק. הנוזל העליון נאסף ועבר סירכוז במשך שתיים, במהירות 32000 RPM. הנוזל העליון סולק והמשקע הורחק בבופר פוספט. הווירוס הוטען על גרדיאנט סוכרוז 10%-40%, ולאחר סרכוז במשך 3 שעות במהירות 27,000, נאספו פרקציות בנפח 1 מ"ל ונבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני. הפרקציות שהכילו וירוס אוחדו, נאספו ורוכזו. שיטת הניקוי שתוארה לעיל, נמצאה יעילה ואפשרה קבלת יבול גבוה של וירוס (תמונה 3).



תמונה 2. תכשיר מנוקה של וירוס הפסים של הטבק (TSV) כפי שנראה במיקרוסקופיה אלקטרונית.

### הכנת אנטי-סרום:

תכשיר של וירוס מנוקה עורבב עם Incomplete Adjuvant והוזרק, אחת לשבוע לשתי השוקיים, של ארנבת בתדירות של שבוע. לאחר ההזרקה הרביעית הוקז דם והסרום הופרד. מהסרום הוכנה ערכת בדיקה סרולוגית בשיטת ה-ELISA.

#### ELISA:

הנוכחות של TSV בצמחים נקבעה גם ב-ELISA על ידי שימוש בנוגדן ספציפי לוורוס שהוכן במעבדתנו. דוגמאות מצמחי פלוקס שנאספו מהשדה וצמחי בוחן שהודבקו במעבדה הגיבו חיובית ב-ELISA. ערכי ה-ELISA ( $O.D_{405}$ ) שהתקבלו היו גבוהים במיצוי מצמחי הבוחן ונמוכים יחסית במיצוי מפלוקס (טבלה 1), דבר שמצביע על ריכוז נמוך של הווירוס בפלוקס. הסרום נמצא יעיל בזיהוי הווירוס. ערכת הבדיקה משמשת היום לזיהוי.

**טבלה 1 - קריאות ELISA ( $O.D_{405}$ ) המראות את תכולת ה-TSV בצמחי בוחן שונים שהודבקו מכנית בתבדיר מפלוקס**

צמחי בוחן	$O.D_{(405)}$
<i>N. benthamiana</i>	$1.360 \pm 0.150$
<i>G. globosa</i>	$1.050 \pm 0.103$
<i>C. quinoa</i>	$1.150 \pm 0.165$
<i>Phlox</i>	$0.653 \pm 0.062$

#### הפרדה בג'ל SDS-PAGE:

ווירוס מנוקה מקינואה הופרד על ג'ל פוליאקרילאמיד. התקבל בנד אחד שמשקלו המולקולארי נקבע ל-29 kD. זיהוי הבנד כחלבון המעטפת של הווירוס אושר ב-Western blot תוך שימוש בנוגדן מסחרי ספציפי לוורוס הפסים של הטבק (TSV).

#### שיבוט cDNA ובדיקת רצף:

בבדיקת רצף ראשונית של שני קלונים ששובטו בפלסמיד, נמצא שרצף הנוקלאוטידים של ה-RNA הוויראלי דומה לרצף הנוקלאוטידים של TSV מקבוצת ה-*Ilarviruses*. הקלון בגודל 2.2kb נמצא דומה (88%) לגן המקודד לחלבון הריפליקאז של TSV. הקלון בגודל 1.2kb נמצא דומה (88%) לרצף של 3' RNA של TSV.

**לסיכום**, בעבודה זו אנו מדווחים על ניקוי ואפיון וירוס הפסים של הטבק (TSV) מקבוצת ה-*Ilarviruses*, וירוס שזוהה בעבר (1992) בתות שדה, ועל הכנת שיטת בדיקה לזיהוי. הווירוס גורם לנזק משמעותי בגידול. שימוש בשיטות וגטיביות לריבוי פלוקס ויבוא בלתי מבוקר של

חומר ריבוי הביא להתפשטות מחלות וירוס. חומר ריבוי שמקורו בצמח נגוע הוא מקור להפצה על ידי מגע בזמן הגיזום והקטיף. מניעת נזקי מחלות וירוס תושג על ידי שימוש בחומר ריבוי חופשי מוירוס. הדבר מחייב יצירת צמחי גרעין (nuclear stock) דרך תרבית רקמה מריסטמטית והקמת מערך בתי יסוד וחלקות ריבוי הנמצאות בפיקוח. גידול בבית גידול מבודד ומוגן בפני חרקים (insect proof), בדיקות חזותיות, בדיקות סרולוגיות מדגמיות, סילוק והשמדת צמחים נגועים וחיטוי כלי עבודה - יבטיחו אספקת חומר ריבוי חופשי מוירוסים.

לא ניתן להוכיח בוודאות את מקור הווירוס. ייתכן שהווירוס חדר לארץ עם חומר הריבוי שמיובאו בשנים האחרונות מהולנד. ייתכן שהווירוס עבר לפלוקס על ידי תריפס מתות שדה נגוע. זיהוי הווירוס בפלוקס מחייב פיקוח ומעקב אחר התפשטות המחלה.

## 5. זיהוי ואפיון וירוס לטנטי בורבנה (*Verbena*):

הסוג ורבנה היא צמח עשובני שייך למשפחת הורבניים (*Verbenaceae*) שכוללת יותר מ- 250 זנים, מרביתם אנדמים לאגן הים התיכון. מינים שונים של ורבנה משמשים כצמחי נוי הגדלים בגינות לכיסוי שטחים חשופים, אדניות ועציצים. הזנים הנפוצים כיום הם זני מכלוא (*Verbena hybrida*) שריבויים נעשה בעיקר וגטיבית מיחורים.

במהלך שנות המחקר הראשונה והשנייה זוהה וירוס הנבילה של הפול (*Broad bean* (BBWV) *wilt virus*). בהמשך תוך כדי בדיקת צמחים ללא או עם סימני מחלה במיקרוסקופ אלקטרוני נצפו חלקיקי וירוס חוטיים. בחתכים דקים של צמחי ורבנה עם סימנים, לא נראו גופיפי הסגר האופייניים לוורוסים חוטיים מקבוצת ה-Potyvirus. לא נמצא קשר בין היאלחות משולבת בשני הוורוסים והופעת סימני מחלה. להלן תיאור הווירוס החדש שהצענו לקרוא לו *Verbena latent* *Carlavirus* (VeLV).

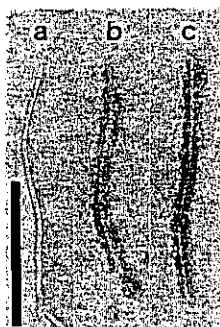
### ניקוי הווירוס והכנת נוגדן פוליקלונלי:

הווירוס נוקה מעלי ורבנה תוך שימוש בסירכוז דיפרנציאלי וגרדיאנט של CsCl. שיטה שנמצאה יעילה ואיפשרה קבלת יבול גבוה של וירוס ששימש להכנת נוגדן פוליקלונלי. מהסרום הוכנה ערכת בדיקה סרולוגית בשיטת ה-ELISA. הסרום נמצא יעיל בזיהוי החלקיק החוטי של הורבנה כפי שיתואר בהמשך.

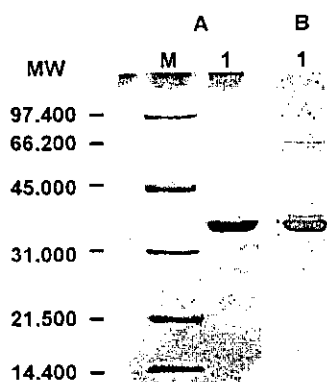
**מיקרוסקופיה אלקטרונית** – חלקיקי וירוס חוטיים באורך של כ- 650 ננומטר נמצאו בתכשיר שהוכן מרסק צמחי ורבנה נגועים בוירוס (תמונה 3a).

בבדיקה סרולוגית במיקרוסקופ אלקטרוני בשיטת IEM, נעשה שימוש בסרום ללכידה וקישוט החלקיקים. התקבל מספר גדול של חלקיקים חוטיים על רשתות הבדיקה וקישוט כבד: נמצא שהסרום יעיל לשימוש במיקרוסקופ אלקטרוני בשיטת IEM (תמונה 3b).

הרצה בג'ל SDS-PAGE - וירוס מנוקה מורבנה הורץ על ג'ל פוליאקרילאמיד. התקבל בנד אחד שמשקלו המולקולרי נקבע ל-38.9 kD. זיהוי הבנד כחלבון המעטפת של החלקיק החוטי אושר ב-Western blot (תמונה 4).



תמונה 3: תכשיר של הוירוס החוטי מורבנה (VeLV) בבדיקה במיקרוסקופ אלקטרוני (a), לכידה באמצעות נוגדן (b) וקישוט החלקיקים (c).



תמונה 4 - הפרדת חלבון הוירוס VeLV באמצעות SDS-PAGE (A) ו-Western blot עם נוגדן ספציפי ל-VeLV (B).

קביעת קבוצת ההשתייכות של החלקיק החוטי - העדר גופיפי הסגר ברקמה שולל אפשרות שהוירוס שייך לקבוצת ה-Pot. אורך חלקיק של 650 nm ומשקל מולקולרי של חלבון המעטפת 38.9 kD מצביעים על האפשרות שהוירוס שייך לקבוצת ה-Carla.

שיבוט cDNA - נעשה מיצוי של RNA מפרפרט של וירוס מנוקה והוכן ממנו cDNA על ידי שימוש בפריימרים אקראיים (Random primer) ובפריימר של Oligo dT. cDNA דו-גדילי שובט

לפלסמיד (Bluescript) אשר הוכנס לחיידקים. קלונים שמכילים את המחדר בודדו. זוהו קלונים בגדלים שונים ונעשה ניקוי של פלסמיד במטרה לקבוע את רצף הנוקלאוטידים שבקלון. בבדיקת רצף ראשונית, נמצא שרצף הנוקלאוטידים של ה-RNA הוויראלי דומה לרצף הנוקלאוטידים של וירוסים מקבוצת ה-Carla ובמיוחד לשני הווירוסים PVM ו-PVS. הצענו לקרוא לוויורוס (VeLV) *Verbena latent Carlavirus*.

#### ד. המסקנות המדעיות

##### טברנמונטנה וקאלה:

בודדו ואופיינו הווירוסים שמנגעים טברנמונטנה וקאלה; *Tobacco mild green (TMGMV)*; *mosaic virus* ווירוס המוזאיקה של הדשן (*DsMV*), בהתאמה. צמחים שנראו בריאים נאספו ונבדקו לנוכחות שני הווירוסים ב-ELISA. צמחים שנמצאו חופשיים מווירוס שימשו להכנת סטוק צמחי אם. הצמחים נבדקו במהלך עונת הגידול ונמצאו נקיים וכיום עומדים לרשות המגדלים. הצלחת הגידול מותנית בהדרכת המגדלים בשיטות סניטציה ומניעת הפצה.

##### גידולים חדשים:

בצמחי נוי חדשים, אקוניטום, פלוקס, וירבנה, קליבראכואה, ובקופה נתגלו וירוסים חדשים; וירוס הנימור של קליבראכואה (*CbMV*), וירוס הפסים של הטבק (*TSV*), והווירוס הלטנטי בורבנה (*VeLV*). שימוש בשיטות וגטיביות לריבוי צמחי נוי ויבוא בלתי מבוקר של חומר ריבוי מביא להתפשטות מחלות וירוס. חומר ריבוי שמקורו בצמח נגוע הוא מקור להפצה על ידי מגע בזמן הגיזום והקטיף. מניעת נזקי מחלות וירוס תושג על ידי שימוש בחומר ריבוי חופשי מווירוס. מומלץ לבדוק בצורה יסודית חומר ריבוי של צמחי נוי שמגיע מחו"ל לנוכחות וירוסים.

#### ה. רשימת פרסומים:

1. Cohen, J., Rosner, A., Kagan, S., Gotlieb, J., Zeidan, M. and Gera, A. (2001). Detection of Tobacco mild green mosaic virus in *Tabernaemontana*. *Phytoparasitica* 29, 257.
2. Cohen, J., Lapidot, M., Loebenstein, G. and A. Gera (2001). A new disease occurring in *Lisianthus* caused by *Sweet potato sunken vein virus*. *Pracheem* 8, 59-62.
3. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Raccach, B. and Gera, A. (2002). Detection of Iris Yellow Spot Virus in *Lisianthus*. *Acta Horticulturae* 568, 43-49.
4. Kritzman, A., Beckelman, H., Raccach, B. and Gera, A. (2002). Spread of iris yellow spot virus in cultivated crops in Israel. VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aschersleben, Germany.
5. Cohen, J., Zeidan, M., Feigelson, L., Maslenin, L., Rosner, A. and A. Gera, A. (2003). Characterization of a Distinct Carlavirus Isolated from *Verbena*. *Archives of Virology* 148, 1007-1015.

6. Gera, A., Lampel, and Fiegelson, L. (2003). Detection of a Carmovirus in Calibrachoa. Pracheem (in press).
7. Gera, A., Tamari, Y., Lampel, M., Maslenin, L., Rosner, A. and Zeidan, M., (2003). Detection of tobacco streak virus (TSV) in phlox. Pracheem (in press).

## סיכום חדש לדוחות מחקר 2002

### 1. מטרות המחקר

תוכנית זו מיועדת לשמש כתוכנית ליווי לגידולי פרחים חדשים מטרותיה: זיהוי ואפיון מחלות וירוס חדשות, דרכי הפצתן, דרכי מניעתן, וצמצום הנזק שהן גורמות והקמת סטוק צמחי אם חופשיים מוירוס שימש כמקור לחומר ריבוי למגדלים.

### 2. עיקרי הניסויים

הכנת סטוק צמחי אם של טברנמונטנה וקלה חופשיים מוירוס: צמחי טברנמונטנה וקלה ממקורות שונים שנמצאו חופשיים מוירוס, משמשים להכנת סטוק צמחי אם.

זיהוי וירוס חוטי בורבנה: וירוס חוטי ארוך בודד מצמחי ורבנה עם סימני מוזאיקה ועיוותי עלים. הווירוס נוקה ואופיין. נמצא שהווירוס חדש ומשתייך לקבוצת ה-Carla.

זיהוי וירוס הנימור בקליבראכואה: וירוס הנימור של קליבראכואה (CbMV), וירוס חדש מקבוצת ה-Carmo בודד וזוהה. הוכנה שיטת בדיקה לזיהויו. הוחל בביררת צמחים מתאימים להכנת תרביות ממריסטמות במגמה ליצור סטוק צמחי-אם חופשיים מוירוס.

זיהוי וירוס הפסים של הטבק בפלוקס: וירוס הפסים של הטבק (TSV) מקבוצת ה-Illarviruses, זוהה, נוקה ואופיין מפלוקס.

3. המסקנות המדעיות: בטברנמונטנה ובקאלה הוכנו צמחים חופשיים מוירוס. הצלחת הגידול מותנית בהדרכת המגדלים בשיטות סניטציה ומניעת הפצה.

בצמחי נוי חדשים, אקוניטום, פלוקס, וירבנה, קליבראכואה, ובקופה נתגלו וירוסים חדשים.

שימוש בשיטות וגטיביות לריבוי צמחי נוי ויבוא בלתי מבוקר של חומר ריבוי מביא להתפשטות מחלות וירוס. חומר ריבוי שמקורו בצמח נגוע הוא מקור להפצה על ידי מגע בזמן הגיזום והקטיף. מניעת נזקי מחלות וירוס תושג על ידי שימוש בחומר ריבוי חופשי מוירוס. מומלץ לבדוק בצורה יסודית חומר ריבוי של צמחי נוי שמגיע מחו"ל לנוכחות וירוסים.

4. הבעיות שנתרו לפתרון: המשך אפיון וירוסים וירוסים חדשים המנגעים צמחי נוי חדשים, פיתוח מערך בדיקה לוירוסים והכנת חומר ריבוי חופשי מוירוס.

5. הפצת מידע: תוצאות העבודה הוצגו בימי עיון וכנסים לחקלאים, מדריכי שה"ם ועובדי האגף להגנת הצומח, בכנס של החברה הישראלית לפיטופתולוגיה. ובכנסים מדעיים

בינלאומיים, בגרמניה, ארה"ב וניוזילנד. פורסמו מספר מאמרים בירחון מגדלי הפרחים  
ובעיתונות מקצועית מבוקרת בחו"ל.