

# שיטה לבדיקת נוכחות וירוס התקפלות העלים בפקעות תפוא"ד לאחר איסופן

מאת שלמה מרקו, נורית הילל, מינהל המחקר החקלאי \*

בעיה קשה בזרעי תפוא"ד מקומיים שמגדלים ברמת-הגולן היא איתור נגיעות בוירוס התקפלות העלים (להלן וה"ע), נגיעות שאינה נראית בזרעים, אלא רק בצמחים המתפתחים לאחר זריעתם. שיטות אחדות הנהוגות בחו"ל לבדיקת נגיעות זרעי תפוא"ד בזה"ע נוסו ונמצאו לא מתאימות לתנאי הארץ. עבודה זו מדווחת על שיטה שפותחה לבדיקת נגיעות בזה"ע — בעיניים של פקעות תפוא"ד, באמצעות כנימות-עלה המעבירות את הווירוס לצמחי בוחן.

## מבוא

ב-1976 נתקל גידול תפוא"ד מזרעי גולן בבעיות קשות, בגלל נגיעות מרובה של הזרעים בוירוס התקפלות העלים (1). נגיעות מרובה היתה בגולן גם בגידול של 1977, והיא נמנעה בחלקות המסחריות — בזכות הטיפולים התכופים בקוטלי חרקים נגד אוכלוסיית הכנימות המפיצות וירוס זה (4). מכאן, שהתופעה ב-1976 לא היתה מקרית, ומדי פעם עלולה להתפרץ בגולן מגפה של זה"ע בתפוא"ד לזרעים, דבר העלול להיות הרה אסון, אם לא יתגלה בזמן. על כן נראה חיוני, שבנוסף לאמצעים הננקטים במשך עונת הגידול, למניעת ההדבקה בזה"ע (2) — יש לערוך בדיקות לגילוי הווירוס בפקעות המיועדות לזרעים, לאחר איסופן ולפני השיווק לחקלאי.

בדיקות כאלה נהוגות בארצות המייצרות זרעי תפוא"ד, ושיטות רבות פותחו לצורך זה. הבעיה המרכזית היא, שזה"ע אינו עובר מכנית, כי אם על-ידי כנימות-עלה והרכבה בלבד. השיטות הנפוצות לבדיקה — הן המעשיות והפשוטות יותר, והן שתיים:

א. שיטת איגל-לאנגה, המבוססת על צביעת הקלון (חומר פחמימתי) בפקעות המדגם, בהנחה שבפקעת גנועה יש הצטברות-יתר של קלון, ומכאן גם צביעה רבה יותר (6).

ב. בדיקת סימפטומים ויזואלית בצמחים המתפתחים מפקעות המדגם (5), באזורים חמים — בשדה הפתוח, ובאזורים קרים — בחממה (פלורידה טאסט) (5).

שיטות אלה, ומספר שיטות נוספות, הושו בדבר מידת התאמתן לבדיקת זה"ע בזרעי תפוא"ד בארץ. כן פותחה שיטה המבוססת על העברת הווירוס מעיני הפקעות לצמחי-בוחן באמצעות כנימות עלה.

## חמרים ושיטות

דגימת פקעות נעשתה לאחר שריפת הנוף. הצמחים לדגימה נבחרו באקראי, ומכל אחד מהם נלקחו פקעת אחת או שתיים, בגודל בינוני (10).

\* מפרסומי מינהל המחקר החקלאי, סדרה ה' 1979, מס' 2142.

הערכת הנגיעות בזה"ע. התוצאות שהתקבלו בשיטות השונות — הושו תמיד לתוצאות שהתקבלו מאותן פקעות (ואם אפשר — מאותו נבט) על-ידי העברת זה"ע באמצעות כנימות עלה לצמחי-בוחן — שיטה הנחשבת למהימנה ביותר. כנימות עלה פטורות מווירוס, מהמין *Myzus persicae* Sulz.

שגודלו על כרוב סיני (צמח שאינו נתקף בזה"ע), הושבו באמצעות כלובי עלים על עלי-הצמח הנבדק להזנת רכישת הווירוס במשך 48–72 שעות. אחרי-כן הועברו הכנימות, באמצעות אותו כלוב עלים, על צמח בוחן: דטורה — *Datura stramonium* L. או בוען — *Physalis floridana* Rydb. או על שניהם, למציצת העברת הווירוס, וגם זאת למשך 48–72 שעות. אחרי-כן הוסרו הכלובים, וצמחי הבוחן רוססו לשם קטילת הכנימות והוכנסו לחממה מוגנת מחרקים עד להתפתחות הסימפטומים.

בשיטת איגל-לאנגה נחתכו פקעות המדגם מצד הכוד, ופרוסות בעובי של 2–3 מ"מ, במרחק 3–5 ס"מ מהקצה, הוטבלו בתמיסה מימית של רזורצין כחול 1%, שהוכנה לפי דה-בוקס (6). לאחר כ-5 דקות הוצאו הפרוסות, יובשו ונלקחו להסתכלות תחת המיקרוסקופ.

בשיטת ההרכבה בפקעת (7) הוצאה העין הקדקודית, עם קטע של פקעת המדגם, באמצעות מנקב פקקים מחוטא. קטע מקביל, קטן במקצת, הוצא מפקעות פטורות מווירוס שהתקבל מחו"ל. הקטע של פקעת המדגם הוכנס במקום הקטע שהוצא מהפקעת הפטורה מווירוס, בכעין הרכבה, והפקעת כולה הוטבלה בפר-פין. שלושת הרכיבים — הקטע שהוצא מהפקעת הפטורה מווירוס, הפקעת המורכבת ופקעת המדגם — נזרעו לאחר שהייה של 4–5 ימים ב-20 מ"צ לשם הגלדת הפצעים.

שיטת ההרכבה לדטורה (9). נוסו מספר שיטות הרכבה, מבחינת אחוז הצלחה ומהירות ביצוע. לבסוף הורכבה העין הקדקודית עם קטע דק מפקעת המדגם — בצדו של גבעול דטורה בגודל מתאים, ונקשרה בסרט פלסטיק. שיטה זו נמצאה המהירה ביותר, ואם הצמחים, ללא כל טיפול נוסף, הוחזקו ב-20 מ"צ — ההצלחה בקליטת ההרכבה היתה קרוב ל-100%.



קים עד להתפתחות הסימפטומים (תמונה 1). לאחר הבדיקה הוטבלו הפקעות בפירימור, להמתת כנימות העלה, נזרעו בבית-רשת, ובשלב של צמחים צעירים נבדקו לנוכחות וה"ע על-ידי העברה עם כנימות-עלה. כך אפשר היה להשוות את התוצאות לגבי אותו נבט.

לשימוש שגרתי שונתה השיטה במקצת, לשם נוחות, ובמקום שלב ג — נחתכו הפקעות מתחת לכלובים, באופן שבכלוב נותר חלק הפקעת עם העין והכנימות שעליה. כלוב זה הוכנס לצנצנת המכסה צמח-בוחן כנ"ל. הכנימות עוברות בעצמן, תוך זמן-קצר, מהעין המתייבשת אל צמח הבוחן.

## תוצאות

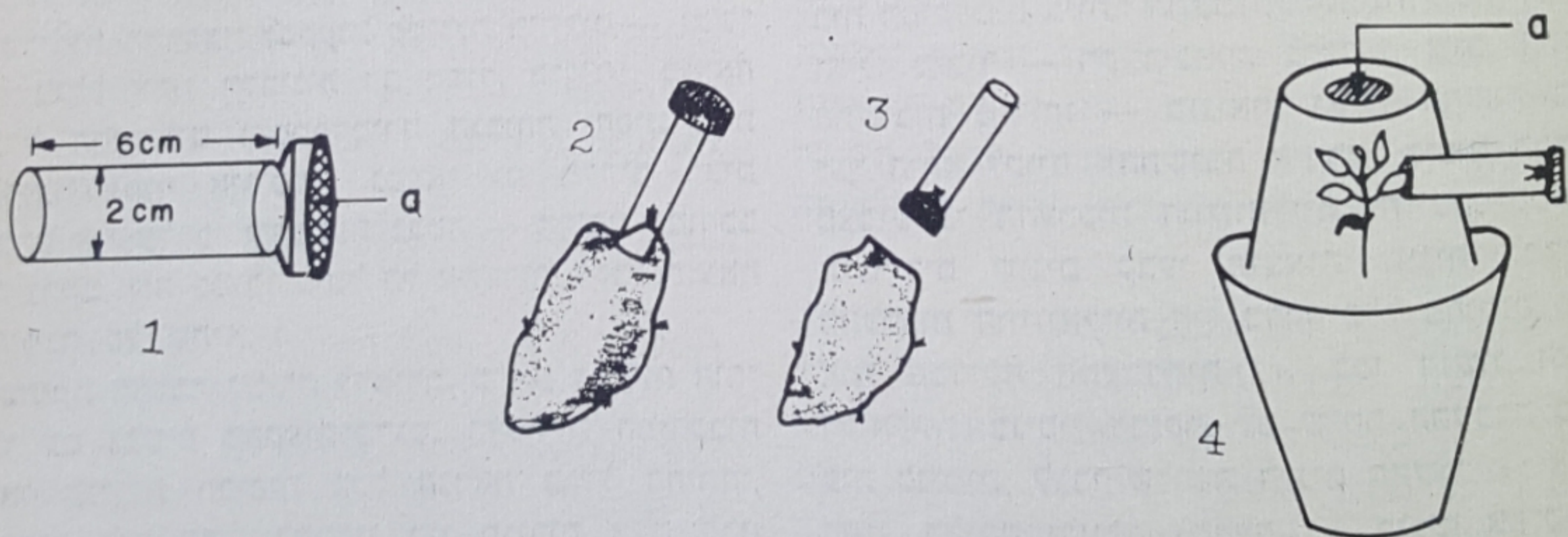
בדיקות בשיטת איגל-לאנגה. כ-100 פקעות שנאספו בבית-שן נבדקו מיד לאחר איסופן. הצביעה היתה, באופן כללי, חלשה מאוד, ולא נראו הבדלים ברורים בין הפקעות שהוכחו אחרי-כן כנגועות (העברה על-ידי כנימות) לבין הבריאות.

אחסנה בטמפרטורה כדי 20 מ"צ למשך 3 חדשים שיפרה את הצביעה; אך שוב, ההבדלים היו סובייקטיביים למדי. במקרה אחד הצלחנו לאבחן כ-70% מהנגועים, ובמקרה אחר היה מספר הנגועים שנמצאו יותר מכפליים מאשר בשיטת ההעברה בכנימות. השיטה נראית לא מהימנה, ומקדם המיתאם שלה

בדיקות "פלורידה טאפטי" (5). זרעי גולן של 1976 נבדקו ביטבתה וביבור, וזרעי 1977 נבדקו ביריחו ובנוה-יער. פקעות המדגם הונבטו בחלקן בצורה מלאכותית, באמצעות טיפול בחומר הכימי רינדייט (6), וחלקן הונבטו באופן טבעי (3). עם הופעת הנבטים נזרעו הפקעות בשדה באורח מסחרי. עם הנביטה נלקחו גבעולים לבדיקה מעבדתית — העברה באמצעות כנימות עלה (3), וכעבור כ-6 ו-8 שבועות נערכו שתי בדיקות ויזואליות של הצמחים המראים סימפטומים אפייניים בשטח.

בנוסף, נערך בבית-דגן ניסוי מבוקר, שבו הושו התוצאות של הערכת נגיעות ויזואלית עם תוצאות העברה בכנימות, בזנים אפ-טו-דייט, בלגקה ודזירה.

בדיקת עיניים. בדיקה זו פותחה במעבדתנו, וכו-ללת את השלבים הבאים: א) הנבטה מלאכותית של פקעות המדגם באמצעות רינדייט, שהייה בחושך עד שהעינים מגיעות לאורך של כ-0.5 ס"מ. ב) הושבת כנימות-עלה פטורות מווירוס בכלובי פלסטיק המוח-דרים לפקעת מעל לעין, לשם הזנת-רכישת-הווירוס, למשך כ-48 שעות. ג) הסרת יתר העיניים, הסרת הכנימות מהעין בחזרה לכלוב, והכנסת פתח הכלוב לתוך צנצנות פלסטיק המכסות צמחי-בוחן צעירים — דטורה או בוען. השהייה כאן, לשם מציצת-העברת-הווירוס, היא כ-3 ימים. אחרי-כן מוסרת הצנצנת, וצמחי הבוחן מרוססים ומוכנסים לחממה מוגנת מחר-



תמונה 1. שיטת בדיקת עיניים של פקעות תפוא"ד לגילוי נגיעות בווירוס התקפלות העלים.

שלב 1. לגליל פלסטיק (כלוב) עם מכסה המותאם לשני הצדדים והמכוסה רשת, מכניסים כ-10 כנימות אפרסק פטורות מווירוס.

שלב 2. את הכלוב עם הכנימות מחדירים לפקעת מעל לעין המונבטת באמצעות רינדייט (ברגיל — העין האפיקלית), לתקופת "רכישת הווירוס" של כ-48 שעות.

שלב 3. בגמר תקופת רכישת הווירוס — נחתכת הפקעת מתחת לכלוב, כשבכלוב נשארים קטע פקעת עם העין והכנימות שעליה. את המכסה מעבירים לצדו האחר של הכלוב, מאחורי פיסת הפקעת והעין.

שלב 4. הכלוב מוחדר לפתח מתאים בצנצנת פלסטיק (עם תקרת רשת), המכסה צמח בוחן בעציץ. פיסת הפקעת והעין הולכות ומתייבשות, ותוך 24 שעות עוברות הכנימות בעצמן לצמח הבוחן. כאן הן שוהות עוד 48 שעות, להזנת העברת הווירוס. אחרי-כן הצנצנת מוסרת, צמחי הבוחן מרוססים (לקטילת הכנימות) ומוכנסים לחממה עד להתפתחות הסימפטומים.



מספר פקעות	מספר נגזעים	מספר הפקעות שנמצאו נגזעות בשתי השיטות	מקדם הקורלציה	בוֹחַן
96	22	12	0.25	Igel-Lange
51	32	3	0.18	העברה בכנימות
98	14	9	0.63	Igel-Lange
42	6	12	0.89	העברה בכנימות
64	16	25	0.81	הרכבה לדטורה
38	11	3	0.85	העברה בכנימות
52	13	8	0.58	בדיקת עינים
76	13	14	0.67	העברה בכנימות
88	27	6	0.33	העברה בכנימות
	29			העברה בכנימות
	4			העברה בכנימות
	10			העברה בכנימות
	14			העברה בכנימות
	16			העברה בכנימות
	22			העברה בכנימות
	28			העברה בכנימות
	12			העברה בכנימות

**טבלה 1.** נגיעות בזה"ע בפקעת תפוא"ד כפי שנמצאה בשיטות שונות בהשוואה לתוצאות שהתקבלו בבדיקת צמחים שהתפתחו מאותן פקעות בשיטת ההעברה על-ידי כנימות עלה.

מספר פקעות (טור 2) — הכוונה: סה"כ פקעות בניסוי, לאחר הרחקת מקרים מפוקפקים או שבהם לא היתה אפשרות לערוך השוואה בין שתי השיטות (למשל, מות פקעות או צמחים).

בשורה הראשונה — פקעות מאסיף יולי, בית-שאן, לאחר אחסנה במשך 3 חדשים ב-20 מ"צ.

בשורה השנייה — פקעות מאסיף ספטמבר, רמת-הגולן, לאחר אחסנה במשך 3 חדשים ב-20 מ"צ.

עם ההעברה בכנימות הוא מועט (טבלה 1).

**בדיקות ההרכבה לפקעות פטורות מוירוס — נכש-** לו, בגלל אחוזי רקבונות רב מאוד, כ-50%, כנראה בגלל החיתוכים והטמפרטורה הגבוהה יחסית בעת הזריעה (סוף אוגוסט). נמצאו גם מקרים רבים שבהם אף על פי שהפקעת נבטה — הרוכב המורכב בה נרקב, וזה כמובן ביטל כל אפשרות לקבל תוצאה מהימנה כל שהיא.

**בדיקת הרכבה ישירה לדטורה.** כ-100 דטורות הור-כבו עם נבטים מפקעות-מדגם. בדטורות המורכבות נראו תגובות חריפות ככל הנראה בגלל החיתוך, ולעתים היה קשה להבחין בין תגובות אלה לבין סימפטומי הוירוס. אפשר היה לגזום את הדטורות, ואז הופיעו הסימפטומים בצורה ברורה יותר, על הצימות שהתפתחו אחרי-כן; אך תהליך זה נמשך יותר מחדשיים, ואפילו בשלב זה היו הדטורות זקנות מדי, והסימפטומים עדיין לא היו ברורים כד-רוש. לעובדה זו אנו מייחסים את האחוז הגדול של נגזעים, שנמצא לפי שיטה זו (טבלה 1), בהשוואה לשיטת ההעברה בכנימות.

**פלורידה טאסט.** כ-5000 פקעות, שנלקחו באקראי בחלקות תפוא"ד לזרעים מרמת-הגולן ב-1976, הונ-בטו באמצעות רינדייט (6) ונזרעו ביטבתה, וכ-5000 פקעות נזרעו ללא טיפול כימי — ביבור (3). גם ב-1977 נזרעו פקעות מזרעי גולן ביריחו ובנווה-יער. בצמחים שהתפתחו הוערכה הנגיעות במעבדה

(העברה בכנימות) ועל-פי הסימפטומים (3). התשו-בות המוקדמות ביותר התקבלו מיטבתה, בסוף דצמבר, ואילו מיבור — רק בינואר. ב-1977, שוב, התקבלו התשובות מיריחו — בינואר, ואילו ההצצה בנוה-יער היתה לקויה, והתשובה איחרה. סיכום הבדיקות מצביע כי ההערכות הוויזואליות הן סובייקטיביות, ומעריכים שונים קבעו תוצאות שונות למדי (3). ההערכות הוויזואליות היו בדרך-כלל פחותות מתוצ-אות הבדיקה המעבדתית (3). לכן הושוה הערכות ויזואליות, בניסוי מבוקר, עם שיטת ההעברה באמצ-עות כנימות, לגבי שלושת הזנים החשובים: אפיטו-דייט, בלנקה ודזירה (טבלה 1). בזנים אפיטו-דייט ובלנקה נמצאו בבדיקה הוויזואלית 71% ו-73% מה-פקעות הנגזעות, בהשוואה לאלה שנמצאו נגזעות ב-בדיקה עם כנימות. בדזירה, לעומת זאת, הובחנו בבדיקה הוויזואלית כמעט פי 3 צמחים נגזעים מה-עברה בכנימות, ככל הנראה מכיון שזן זה מגיב בהתקפלות פיסילוגית על תנאי-סביב מסוימים, תופ-עה שאפשר לראותה בטעות כתגובה לוירוס.

**בדיקת עיניים.** פקעות-מדגם הונבטו באמצעות רינדייט, וכעבור שהייה של 2-3 שבועות בתוך או באור דיפוזי — נבדקו העיניים שהתעוררו, באמצ-עות כנימות, כמתואר לעיל בסעיף חמרים ושיטות. אחרי-כן נזרעו הפקעות בבית-רשת מוגן באמצעות בצמחים נבדקה שוב הנגיעות בזה"ע, התוצאות העברת וה"ע לצמחי-בוֹחַן על-ידי כנימות.



ליבון והחלפת דעות חיוניות. כן אנו מודים לי. קרול ולי. יהושע — על עזרתם הטכנית היעילה.

# ספרות

1. מרקו ש. (1976): מעורבותן של מחלות וירוס בבעיות שהיו כרוכות בגידול תפוא"ד מ, "זרעי" הגולן. "השדה" ג"ז: 639—643.
2. מרקו ש., וייס מ., בן יהודה ר. (1977): גי-סויים לצמצום אוכלוסיית כנימות עלה בגולן לצורך גידול תפוחי-אדמה ל, "זרעים". "השדה" ג"ז: 1047—1054.
3. מרקו ש., נתב י., אופנהיימר י. (1977): וירוס התקפלות העלים בזרעי תפוא"ד מהגולן. "השדה" ג"ז: 1238—1239.
4. מרקו ש., בן-יהודה ר., הלל ג., זיו א. (1978): שימוש בקוטלי-חרקים גבשישיים להפחתת תפוצת וירוס התקפלות העלים בתפוא"ד לזרעים. "השדה" ג"ח: 1297—1300.
5. Bokx, J. A. de (1963). Methods of identification of potato virus diseases and the possibilities of standardization. Theoretical aspects, in: Report of the International Conference of Potato Virus Diagnosis. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris.
6. Bokx, J. A. de (1972). Histological, cytological and biochemical methods, in "Viruses of Potatoes and Seed — Potato Production". ed. J. A. de Bokx, Pudoc, Wageningen.
7. Bokx, J. A. de (1972). Graft and mechanical Transmission in "Viruses of Potatoes and Seed — Potato Production". ed. J. A. de Bokx, Pudoc, Wageningen.
8. Casper, R. (1977). *Phytopath. Z.* 90: 364—368.
9. Cupertino, F. P. and Costa, A. S. (1969). *Bragantia*, 28: 233—240.
10. Hiddema, J. (1972). Inspection and quality grading of seed potatoes, in "Viruses of Potatoes and Seed-potato Production". ed. J. A. de Bokx, Pudoc, Wageningen.
11. Zajac, Z. (1963). *Acta agrobot.* 14: 155—185.



המסוכמות בטבלה 1, מצביעות על התאמה טובה מאוד בין בדיקת הנבטים לבין בדיקות בצמחים על-ידי העברה עם כנימות. הבדיקה נמשכת 6—7 שבועות; התפתחות הנבט — כ-3 שבועות; התגובות על דטורה — כ-3 שבועות נוספים.

# דיון

אם נצא מההנחה, שבדיקת נגיעות זרעי תפוא"ד בזה"ע, לפני השיווק, הכרחית — הרי שבבדיקת הזרעים המקומיים יש מספר אילוצים. הקריטית ביותר היא מגבלת הזמן: ממצאי הבדיקות חייבים להתקבל עד דצמבר, התאריך האחרון שבו עדיין יש סיכוי לקבל זרעים מחו"ל במקרה שהמקומיים ייפסלו. מכיון שהאסיף בגולן חל בחודש ספטמבר, הרי שרק חדשיים נותרים לכל תהליכי הבדיקה. נראה, שהבדיקות המהירות, כגון איגל-לאנגה והרכ-בות ישירות לדטורה — אינן מתאימות. מסתבר, שבנוסף למהימנות המפוקפקת של שיטת איגל-לאנגה — הרי שבתנאי הארץ אין אפשרות לנקוט אותה מיד לאחר האיסוף, כנראה בגלל הטמפרטורות הגבוהות בזמן האסיף, המונעות הצטברות קלוז (11). שיטת הרכבות ישירות לדטורה (9) אינה נראית מוצלחת, מכיון שתגובות הצמח לחיתוך דומות לסימפ-טומים המתפתחים כתוצאה מנגיעות בזה"ע.

לפלורידה טאסט יש מספר יתרונות בלתי מבוט-לים: (א) זו שיטה פשוטה יחסית וזולה לביצוע; (ב) היא מאפשרת בדיקה והסתכלות במספר רב של פקעות-מדגם; (ג) היא מאפשרת הסתכלות מהיבטים נוספים וחשובים של טיב הפקעות, שאינם קשורים עם וירוסים דווקא. יחד עם זאת, הבעיה המרכזית שעל פלורידה טאסט אין אפשרות לקבל תשובה בזמן, וככל הנראה אין אפשרות לבדוק באמצעותה פקעות דוירה.

בדיקת העיניים היא אמנם יקרה יותר; אך היא כעת הבדיקה היחידה הבאה בחשבון לשם קבלת מידע מהימן בזמן. על כן, הצעתנו היא — לשלב שיטה זו עם מספר מועט יחסית של מדגמים, לשם קבלה מוקדמת של מידע הקדמי, והשלמת התמונה — עם פלורידה-טאסט, שיתן את מלוא המידע מאוחר יותר ותימנע תקלה קשה מבחינת מחלות-פטירות ותגובות פיסיוולוגיות לא רצויות.

ראוי לציין, שלגבי העתיד קיימת אפשרות עקרונית של בדיקת זה"ע בפקעות או בנבטים — בשיטה סרולוגית חדישה, ELISA (8). בשלב זה, בניסויים הקדמיים שנערכו במעבדתנו, היו מספר הצלחות; אך נראה שיעברו עוד מספר שנים עד שהשיטה תוכל לשמש באורח שגרתי.

# הבעת תודה

אנו מביעים את תודתנו לד"ר ש. כהן, לפרופ' ג. לובנשטיין ולפרופ' G. A. de Zoeten על שיחות