534

קוד מחקר: 136-0405-02	**תקופת המחקר:** 2000-2002
שם המחקר: וירוס הכתמים הצהובים של האיריס בבצל, והעברתו ע"י תריפסים .	*Subject:* IRIS YELLOW SPOT VIRUS IN ONION AND ITS TRANSMISSION BY THRIPS.
חוקר ראשי: עבד גרה	*Principal investigator:* ABED GERA
חוקרים שותפים: הישאם יונס, בנימין רקח, ענת קריצמן	*Cooperative investigator:* HISHAM YUNES, BENJAMIN RACCAH,
מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250	*Institute:* Agricultural Research Organization (A.R.O.)

תקציר

הצגת הבעיה: וירוס הכתמים הצהובים של האיריס (IYSV), נתגלה לראשונה בארץ בסוף 1997 בבצל הגינה, באזור בית-שאן. ההדבקה בווירוס גרמה לירידה של כ- 30-50% ביבול. הווירוס התפשט באזורים שונים בארץ ובמספר גידולים. כנראה, שהתפרצות וירוס זה והתפשטותו, קשורה לקיום אוכלוסיות גדולות של תריפס.

מטרותיה של תכנית זו איפיון ביולוגי וסרולוגי של תבדידי IYSV מבצל, היפאסטרום וליזיאנטוס , זיהוי פונדקאים המשמשים כמקור הפצה, זיהוי הווקטורים המפיצים את הווירוס, ואת מידת יעילותם בהפצה ובדיקת דרכים למניעת ההפצה.

מהלך ושיטות העבודה: זיהוי ואפיון הוירוס מליזיאנתוס נעשה באמצעות הדבקה על צמחי בחן, Western blot ו- ELISA. הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד שובט ועבר ריצוף. נעשה ניטור ואיסוף תריפסים ונבדקה ההעברה של הווירוס באמצעות תריפסים שנאספו בשדה או שגודלו במעבדה. נבדקה יעילותם של מספר תכשירי הדברה סיסטמיים נגד תריפסים.

תוצאות עיקריות: תבדידי IYSV מבצל, היפאסטרום וליזיאנתוס זוהו ואופיינו. הווירוס נוקה והוכן נוגדן פוליקלונלי. נבדק פיזור הווירוס בצמח והעברתו בבצלים וזרעים. בודד הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד של תבדידי הוירוס מבצל, היפאסטרום וליזיאנתוס ונקבע רצף הנוקלאוטידים. תריפס הבצל (*Thrips tabaci*) זוהה כוקטור עיקרי להפצת הוירוס. נמצאה קורלאציה בין מספר התריפסים לשיעור הנגיעות בוירוס בשדות מסחריים של בצל. כל הטיפולים להדברת תריפסים הקטינו את הפצת המחלה וגרמו לעליה ביבולים.

מסקנות והמלצות: התפרצות הווירוס בבצל קשורה באוכלוסיות הגדולות של תריפס הבצל. הנגיעות בליזיאנתוס קשורה, כנראה, ביבוא של שתילים נגועים מהולנד ו/או באוכלוסיות הגדולות של תריפס הבצל. גילוי וזיהוי הווירוס בליזיאנתוס מחייב לפקוח עין ולדווח על הופעת סימנים מחשידים בצמחי תרבות. יש לדאוג ולשמור על רמה נמוכה של תריפס כדי להקטין את הנזק.

דו"ח סופי לתכנית מחקר 136-0405-00

וירוס הכתמים הצהובים של האיריס בבצל, והעברתו ע"י תריפסים.

Iris yellow spot virus in onion and its transmission by thrips

דו"ח שנתי מוגש לקרן מדען ראשי

ע"י:

עבד גרה המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

הישאם יונס שה"מ, משרד החקלאות.

בני רקח המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

ענת קריצמן המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

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

Hisham Yunis, Extension Service, Ministry of Agriculture, P.O.B. 6, Bet Dagan 50250, Israel;

Benny Raccah, Department of Virology, ARO, The Volcani Center, P.O. B. 6, Bet Dagan 50250, Israel; E-mail: braccah@volcani.agri.gov.il

Anat Kritzman, Department of Virology, ARO, The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; E-mail: anatkr@ volcani.agri.gov.il

טבת תשס"ג דצמבר 2002

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: וירוס הכתמים הצהובים של האיריס (IYSV), נתגלה לראשונה בארץ בסוף 1997 בבצל הגינה, באזור בית-שאן. ההדבקה בווירוס גרמה לירידה של כ- 30-50% ביבול. הוירוס התפשט באזורים שונים בארץ ובמספר גידולים. כנראה, שהתפרצות וירוס זה והתפשטותו, קשורה לקיום אוכלוסיות גדולות של תריפס.

מטרותיה של תכנית זו איפיון ביולוגי וסרולוגי של תבדידי IYSV מבצל, היפאסטרום ולזיאנטוס, זיהוי פונדקאים המשמשים כמקור הפצה, זיהוי הווקטורים המפיצים את הווירוס, ואת מידת יעילותם בהפצה ובדיקת דרכים למניעת ההפצה.

מהלך ושיטות העבודה: זיהוי ואפיון הוירוס מליזיאנתוס נעשה באמצעות הדבקה על צמחי בחן, Western blot ו- ELISA. הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד שובט ועבר ריצוף. נעשה ניטור ואיסוף תריפסים ונבדקה ההעברה של הווירוס באמצעות תריפסים שנאספו בשדה או שגודלו במעבדה. נבדקה יעילותם של מספר תכשירי הדברה סיסטמיים נגד תריפסים.

תוצאות עיקריות: תבדידי IYSV מבצל, היפאסטרום וליזיאנתוס זוהו ואופיינו. הווירוס נוקה והוכן נוגדן פוליקלונלי. נבדק פיזור הווירוס בצמח והעברתו בבצלים וזרעים. בודד הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד של תבדידי הוירוס מבצל, היפאסטרום וליזיאנתוס ונקבע רצף הנוקלאוטידים. תריפס הבצל (*Thrips tabaci*) זוהה כוקטור עיקרי להפצת הוירוס. נמצאה קורלציה בין מספר התריפסים לשיעור הנגיעות בוירוס בשדות מסחריים של בצל. כל הטיפולים להדברת תריפסים הקטינו את הפצת המחלה וגרמו לעליה ביבולים.

מסקנות והמלצות: התפרצות הווירוס בבצל קשורה באוכלוסיות הגדולות של תריפס הבצל. הנגיעות בליזיאנתוס קשורה, כנראה, ביבוא של שתילים נגועים מהולנד ו/או באוכלוסיות הגדולות של תריפס הבצל. גילוי וזיהוי הווירוס בליזיאנתוס מחייב לפקוח עין ולדווח על הופעת סימנים מחשידים בצמחי תרבות. יש לדאוג ולשמור על רמה נמוכה של תריפס כדי להקטין את הנזק.

4. רשימת פרסומים:

1. ע. קריצמן, ה. בקלמן, ס. אלקסנדרוב, י. כהן, מ. למפל וע. גרה (2000). גילוי וזיהוי וירוס וירוס הכתמים הצהובים של האיריס (IYSV) מקבוצת ה-Tospo בליזיאנתוס, *"דפי מידע"* 11, 57-60.
2. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Zeidan, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2000). Lisianthus leaf necrosis a new disease of lisianthus caused by iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 84, 1185-1189.
3. **Gera, A.**, Kritzman, A., Cohen, J., Raccah, B. and Y. Antignus (2000). Tospoviruses infecting vegetable crops In Israel. *OEPP/EPPO Bulletin*. 30, 289-292.
4. Kritzman, A., Lampel, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2001). Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 85 838-842.
5. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S. Cohen, J., Lampel, M., Siti, E., Raccah, B. and **Gera, A.** (2001). Detection of Iris yellow spot virus in Lisianthus. Phytoparasitica 29, 256-257.
6. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2002). Detection of Iris Yellow Spot Virus in Lisianthus. Acta Horticulturae 568, 43-49.
7. Kritzman, A., Lampel, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2002). Characterization and spread of iris yellow spot virus in Israel. The 7th International Working Groups on Legume Viruses (16th meeting of IWGLV) and Vegetable Viruses (10th meeting of IWGVV) Bonn, Germany.
8. Kritzman, A., Beckelman, H., Raccah, B. and **Gera, A.**, (2002). Spread of iris yellow spot virus in cultivated crops in Israe. IVIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aschersleben, Germany.
9. Kritzman, A., Yunis, H., Omari, N., Raccah, B.and **Gera, A.** (2003). Distribution and impact of iris yellow spot tospovirus and *Thrips tabaci* on onion. International Congress of Plant Protection, Christchurch, New Zealand.

ב. מבוא

וירוס הכתמים הצהובים של האיריס Iris yellow spot virus (IYSV), נתגלה לראשונה בסוף 1997, בבצל הגינה, באזור בית-שאן והמשולש. הנגיעות בווירוס גרמה לירידה של כ- 30-50% ביבול. בעבר הוגדר הווירוס בהיפאסטרום שיובא מהולנד. קיימים בארץ מספר מיני תריפסים. שניים מהם ידועים בעולם ובארץ כווקטורים של וירוסים מקבוצת הטוספו, והם: תריפס הפרחים המערבי *Frankliniella occidentalis* , ותריפס הבצל *Thrips tabaci* ממשפחת Thripidae. כנראה, שהתפרצות הווירוס בבצל קשורה לקיום אוכלוסיות גדולות של תריפס הבצל *Thrips tabaci*, בגידול זה. הווירוס הנרכש ע"י זחלי התריפס, מועבר ע"י התריפסים בדרגת הבוגר הניזונים על צמחים, במשך כל תקופת חייהם. אופי ההעברה המיוחד של הווירוס, ויכולתו של התריפס להתקיים בארץ במשך כל עונות השנה, עלולים לגרום מגפות נרחבות ונזקים רבים.

חדירת הווירוס לישראל, והתפשטותו בבצל, בהיפאסטרום ובלזיאנטוס במקומות שונים בארץ, מחייבת המשך המחקר לצורך אפיונו הביולוגי, הסרולוגי, יעילות העברתו ע"י אוכלוסיות מקומיות של מיני תריפסים שונים ולצורך הבנת הקשר שבין הווירוס, לווקטור שמעביר אותו. צבירת מידע זה, והבנת המחלה והאפידמיולוגיה שלה, בעלי חשיבות רבה לצורך פיתוח אמצעים לצמצום התפשטות המחלה ולצמצום נזקיה.

מטרת המחקר

1. איפיון ביולוגי וסרולוגי של תבדידי IYSV מבצל והיפאסטרום.
2. זיהוי פונדקאים המשמשים כמקור הפצה.
3. זיהוי הווקטורים המפיצים את הווירוס, ואת מידת יעילותם בהפצה.
4. בדיקת דרכים למניעת ההפצה.

מטרות ספציפיות

1. הכנת מערך לזיהוי הווירוס (הדבקות מכניות, מיקרוסקופיה וסרולוגיה).
2. השוואת התבדידים מבצל, היפאסטרום וליזיאנתוס. (ביולוגית, סרולוגיות ומולקולריות).
3. בדיקת פיזור הווירוס בצמח הנגוע בעלים, גבעול הפריחה, גלדים, שורשים ובצלצלים.
4. זיהוי התריפסים המפיצים את הווירוס ובחינת יעילות ההעברה של מיני תריפסים שונים.
5. בדיקת יעילותם של תכשירי הדברה נגד תריפסים ומניעת ההפצה של הווירוס.

ג. פירוט הניסויים והתוצאות:

1. גילוי וזיהוי IYSV בליזיאנתוס:

עם הפעלת התכנית התגלתה בצמחי ליזיאנתוס תופעה חדשה המתבטאת בהופעת כתמים נקרוטיים סיסטמיים והתיבשות עלים. התסמינים הופיעו במספר רב של צמחים בחלקות מסחריות ונגרם נזק לא מבוטל. בבדיקת מיצוי עלים עם תסמינים במיקרוסקופ אלקטרוני נצפו חלקיקי וירוס עגולים, עטופים בממברנה כפולה בקוטר 90-110 ננומטר - צורה אופיינית לחלקיקי וירוס מקבוצת ה-Tospo. בבדיקות סרולוגית, הווירוס הגיב עם נוגדנים כנגד ה- IYSV אבל לא עם נוגדנים כנגד וירוס כתמי הנבילה של העגבניה (TSWV) מקבוצת ה-Tospo. תבדיד הווירוס החדש

דומה בתכונותיו הסרולוגיות והמולקולריות לתבדידי וירוס הכתמים הצהובים של האיריס (IYSV) שנמצא בבצל הגינה והיפאסטרום.

חומרים ושיטות:

הדבקה מכנית: עלי ליזיאנתוס עם סימני מחלה נכתשו ב-0.05M בופר סודיום פוספט pH 7.0 שהכיל 0.1% סודיום סולפיט באמצעות מכתש ועלי, צמחי הבוחן אובקו בקרבורנדום, והרסק הצמחי נמרח על העלים בעזרת גזה סטרילית.

בחינת טווח פונדקאים: לקביעת טווח הפונדקאים של הווירוס הודבקו סדרות של צמחי בחן. הערכת התוצאות היתה חזותית למשך חודש, על פי הופעת סימנים על הצמח המודבק ובאמצעות בדיקה סרולוגית ב- ELISA.

מיקרוסקופיה אלקטרונית: הכנת חתכים דקים למיקרוסקופ אלקטרוני נעשתה על ידי חיתוך פיסות עלי ליזיאנתוס עם כתמים נקרוטיים ועלי *N. benthamiana* עם כתמים כלורוטיים. נדגמו קטעי עלים בגודל 3×1מ״מ. הפיסות עברו פיקסציה והטבעה. הרשתיות עברו צביעה כפולה ונבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני חודר.

תוצאות:

סימני המחלה והפצת הווירוס - סימני המחלה הופיעו בשלבים מתקדמים של הגידול. בעלים הופיעו כתמים נקרוטיים סיסטמיים או כלורוטיים מוקפים ברקמה נקרוטית.

העברה מכנית - הווירוס הועבר מכנית ל– *C. quinoa, N. benthamiana* ו- *G. globosa*. סימני המחלה בבנטמיאנה הופיעו כחמישה ימים לאחר ההדבקה (**טבלה 1**). עיגולים כלורוטיים בקוטר 2-4 מ״מ הופיעו על העלים המודבקים. הווירוס התפשט סיסטמית וכ- 10-12 יום לאחר ההדבקה הופיעו נקפים בעלי האמיר שבהמשך הגידול גרמו להתמוטטות העלים ומות הצמח. נקפים הופיעו גם לאורך הגבעול. ההדבקה בקינואה ובגומפרנה היתה מקומית, נקפים מקומיים הופיעו על העלים המודבקים 3-5 ימים לאחר ההדבקה. בהדבקה חוזרת ממיצוי עלי בנטמיאנה, התקבלו בליזיאנתוס סימנים דומים לאלה שהיו בצמחים נגועים, שנאספו בשדה.

טבלה 1 - תוצאות טווח הפונדקאים של הווירוס IYSV

	תגובת צמחי הבוחן	
צמח בוחן	מקומי	סיסטמי
Chenopodium quinoa	+	-
Datura stramonium	±	-
Gomphrena globosa	+	-
Nicotiana benthamiana	+	+
Petunia hybrida	+	-

תגובת צמחי הבוחן להדבקה בווירוסי IYSV שבודד מבצל.
מקרא לסימפטומים: + = נקפים מקומיים; - = אין סימפטומים; ± = לעתים

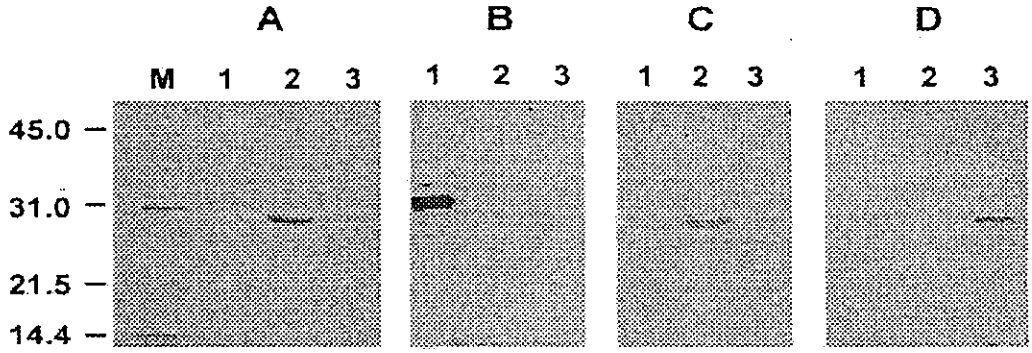
מיקרוסקופיה אלקטרונית - חלקיקי וירוס בודדים בקוטר 90-110 ננומטר נמצאו בתכשיר שהוכן מרסק צמחי ליזיאנתוס או בנטמיאנה נגועים בווירוס.

בבדיקות חתכי רקמת ליזיאנתוס ובנטמיאנה נמצאו בתאי הפרנכימה חלקיקי וירוס בקבוצות, כאשר ממברנה עוטפת את הקבוצה.

ניקוי הווירוס, הפרדת חלבוני הנוקלאוקפסיד וזיהויים על ידי נוגדנים: בפרפרטים שהוכנו מניקוי חלקי של הווירוס מעלי בנטמיינה נמצאו חלקיקים עגולים בקוטר 90-110 ננומטר עטופים בממברנה כפולה. הווירוס המנוקה שימש להכנת נוגדנים פוליקלונליים.

בהפרדת חלבוני הווירוס מתכשיר וירוס נקי על ג'ל, נתקבל בנד עיקרי בגודל של 32.5 kD. זיהוי סופי של בנד זה כחלבון הנוקלאוקפסיד נעשה באמצעות נוגדן ספציפי ב-Western blot. לא התקבלה כל תגובה עם נוגדנים ל-TSWV ו -INSV (**תמונה 1**).

תמונה 1 - הפרדת חלבוני הנוקלאוקפסיד של הווירוסים IYSV, TSWV ו- INSV באמצעות SDS-PAGE (A) ו-Western blot עם נוגדן ספציפי ל- IYSV (B), TSWV (C), ו-INSV (D).



ELISA: הנוכחות של IYSV בצמחים נקבעה ב- ELISA על ידי שימוש בנוגדן ספציפי לווירוס שהוכן במעבדתנו. דוגמאות מצמחי ליזיאנתוס, בצל והיפאסטרום שנאספו מהשדה וצמחי בנטמיינה שהודבקו במעבדה הגיבו חיובית ב- ELISA. ערכי ה-ELISA (O.D405) שהתקבלו היו גבוהים במיצויים הן מצמחים שנאספו בשדה והן מצמחי הבוחן (**טבלה 2**). לא התקבלה כל תגובה עם נוגדנים ל-TSWV ו-INSV.

<u>טבלה 2</u> : קריאות ELISA (O.D. $_{405}$ nm) המראות את תכולת ה-IYSV בצמחים שונים

צמח נבדק	O.D. $_{405}$ nm
N. benthamiana	1.875±0.250
Lisianthus	1.450±0.350
A. cepa	1.215±0.280
Hippeastrum	0.650±0.150

2. העברה ע"י תריפסים:

בדיקת הקורלציה בין נגיעות בווירוס (IYSV) לאוכלוסיית התריפסים

נערכו ניסויים מקיפים במטרה למצוא קורלציה בין ספירות התריפסים לבין שיעור הצמחים הנגועים בווירוס בשדה מסחרי של בצל. נסויים אלה הראו שאוכלוסיית תריפס הטבק (*T. tabaci*) היא השלטת ושקיימת קורלציה בין מספר התריפסים לשיעור הנגיעות בוירוס (**טבלה 3**).

טבלה 3: מספר תריפסים ושיעור הנגיעות ב-IYSV בשדה בצל בעמק בית שאן.

Date of count	Mean no. thrips per 10 plants (±SD)	Virus incidence[a]	(%)
17.4.00	130±53	nt	nt
1.5.00	642±195	20/35	57
15.5.00	476±51	nt	nt
29.5.00	212±26	nt	nt
12.6. 00	162±30	12/20	60

[a]Virus incidence is the number of infected plants out of total plants tested.
nt=not tested.

במטרה לבדוק את יכולתו של IYSV לעבור מליזיאנתוס נגוע לבריא באמצעות תריפס, נבחנה יעילות העברתו ע"י אוכלוסיה מעבדתית של תריפס הבצל. זחלים של תריפס שרכשו את הווירוס מצמח נגוע העבירו אותו לחמשה צמחים מתוך שמנה שנבדקו.

תריפסים בוגרים שנאספו מצמחי בצל, שהראו סימני נגיעות ב-IYSV והונחו להזנת הדבקה על גבי שתילי ליזיאנתוס בריאים, שגודלו מזרעים, העבירו את הווירוס לשבעה צמחים מתוך עשרה. הצמחים הראו סימנים והגיבו חיובית ל- IYSV ב-ELISA.

העברה ע"י תריפסים, שנאספו בחלקות בצל נגועות בווירוס

במבחנים לצורך הבנת האפידמיולוגיה של המחלה ותרומתם היחסית של תריפסים בהפצת הווירוס, נבחנה יעילות העברת IYSV ע"י אוכלוסיות של תריפס הבצל, שנאספו בשדות בצל ושום נגועים. בוגרים של תריפס הבצל נאספו מצמחי בצל או שום, שהראו סימני נגיעות ב-IYSV, בחלקות גידול שונות באזור בית שאן והמשולש. הם הונחו להזנת הדבקה על גבי דיסקיות עלי דטורה, פטוניה או בנטמיינה בקוטר 1.3cm, או על גבי חתיכות עלי בצל, שגודל מזרעים, באורך של כ- 2cm, או על גבי צמחי בצל שלמים ובריאים, שגודלו מזרעים, בעציצים. הזנת ההדבקה ערכה שישה ימים. לאחר מכן, הדיסקיות או צמחי הבצל נכתשו בבופר כתישה, ביחס 1:10 משקל עלה לנפח בופר ונבדקו ב-ELISA **(טבלאות 4 ו- 5).**

<u>טבלה 4</u>: מספר חתיכות עלי הבצל, שנמצאו נגועות ב- IYSV בבדיקת ELISA, לאחר הזנת הדבקה ע"י פרטים של תריפס הבצל, שנאספו בחלקות בצל ושום נגועות בווירוס.

חתיכות עלי הבצל, שנמצאו נגועות בווירוס מכלל החתיכות שנבדקו		
	מספר	אחוז
העברה ראשונה		
חלקת בצל	8/26	30.8%
חלקת שום	9/21	42.9%
העברה שניה		
חלקת בצל	3/12	25.0%
חלקת שום	4/11	36.4%

טבלה 5: יחס פרטי תריפס הבצל האינפקטיביים, שנאספו בחלקות בצל נגועות ב- IYSV.

מיקום החלקה	חתיכות עלי הבצל, שנמצאו נגועות בווירוס מכלל החתיכות שנבדקו	
	יחס	אחוז
עין חרוד	16/37	49.2%
מיצפה	10/24	47.9%
יגור	4/12	33.3%

נמצא, שיעילות העברת הווירוס מבצל לבצל הייתה מאוד גבוהה, ושכ- 45% מכלל האוכלוסייה הם וקטורים. עובדות אלו מראות, שהקורלציה בין התריפס למחלה אינו מיקרי, ושהתפשטות המחלה בבצל, נעשית ע"י התריפסים בשדות.

בניסיון להעביר את הווירוס במעבדה, באמצעות שתי אוכלוסיות שונות של תריפס הפרחים המערבי, לא נתקבלה העברה כלל. ממצאים אלו מעידים על כך, שתריפס הפרחים המערבי אינו מהווה וקטור של IYSV.

3. בחינת פיזור הווירוס והעברתו באברי צמח הבצל :

למידע זה יש חשיבות הן בהבנת האפידמיולוגיה של הווירוס, והן באופן דגימת הבצל לבדיקת נוכחות הווירוס בצמחים חשודים, במעבדה. נבדקה נוכחות הווירוס באברים השונים של הבצל (גלדים, זרעים, ואזורים שונים לאורך העלים). הבדיקות נעשו בשיטת ה-ELISA.

לצורך בדיקת נוכחות הווירוס וריכוזו בצמח, העלה נחתך לחמש חתיכות רצופות, וכל חתיכה נבדקה בשיטת ELISA, עם נוגדנים נגד IYSV (ראה תוצאות **בטבלה 6**).

טבלה 6: תוצאות בדיקת ELISA לנוכחות הווירוס IYSV וריכוזו באזורים שונים לאורך עלי הבצל.

Slice position[a]	ELISA values (E_{405})[b]				
	Leaf[c] # I	Leaf # II	Leaf # III	Leaf # IV	Leaf # V
A	0.299±0.298	0.412±0.429	0.914±0.833	0.593±0.676	0.518±0.635
B	0.228±0.227	0.689±0.649	1.218±0.987	0.730±0.435	0.656±0.835
C	0.566±0.494	1.038±0.749	1.836±0.902	1.703±0.624	0.861±0.707
D	1.860±0.673	2.069±0.902	2.706±0.156	2.326±0.556	1.895±0.772

[a]Slice A is the tip of the leaf, and slice D is closest to the bulb.
[b]Mean values of eight different onion leaves.
[c]Leaves I and V are the external and leaf III is the internal one

בבדיקות גלדים לנוכחות הווירוס, לא היה ניתן לזהות את הווירוס בגלדים מצמחים שהראו סימני מחלה בעלים, ונמצאו נגועים בבדיקת ה- ELISA.

בבחינת העברת הווירוס בזרעים שנאספו מצמחים נגועים, לא נמצאה כל נגיעות בצמחי בצל שהתפתחו מזרעים כנ"ל (0/550) ומכאן שהווירוס אינו עובר בזרעים.

4. בידוד ושיבוט הגן המקודד לחלבון המעטפת של הווירוס:

RNA ויראלי שהופק מויריונים של IYSV מבצל ולזיאנתוס שימש כתבנית להכנת cDNA. ה-cDNA עבר אמפליפקציה ב- PCR, תוך שימוש בפריימרים ספציפיים לגן המקודד הנוקלאוקפסיד של הווירוס. תוצר האמפליפיקציה שובט בפלסמיד (pGEM) ושימש להתמרת חיידקי *E. coli*. קלונים רקומביננטיים בודדו ושימשו לאנליזת רצף. נמצא שהגן מכיל 825 נוקלאוטידים ומקודד לחלבון בגודל של 273 חומצות אמינו, במשקל מולקולרי של 32,000 דלטון. השוואת הרצף עם רצפים של sRNA של וירוסים מקבוצת ה-Tospo הראתה זהות גבוהה (96%) עם התבדיד ההולנדי ו- 91% עם התדיד הברזילאי (**תמונה 2**).

תמונה 2. השואת רצף חומצות האמינו של הגן המקודד לנוקלאוקפסיד של התבדיד הישראלי IYSV מלזיאנתוס (LIS) עם התבדידים מהולנד (NL) וברזיל (Br).

```
IYSV-LIS   MATVRVKPSEIEKLLSGGDVDVVIESDETEGFNFKNFVLA   40
    -NL    -s--------------------------------------   40
    -Br    -------a-----------a---------------s--v-   40

IYSV-LIS   NEGVQMTFNNGYTILRNRAGIYKTIKSGKFTFQGKTIVIP   80
    -NL    --------------------------t-------------   80
    -Br    ---ir-----------------------------n-p-i--   80

IYSV-LIS   SANVSPNQDDWTFRRLEGFIRARMLVELLETKDEKEKQKM  120
    -NL    ----------------------------i-----------  120
    -Br    ------s--------------------------n-------  120

IYSV-LIS   YEKICGLPLVSAYGLKLSSKFDATTARIMLALGGPLTLLA  160
    -NL    ----------------p----h--------t-------m--  160
    -Br    ----------------p-d-----------t------i---  160

IYSV-LIS   SLDIFAAAVLPLAYFQNVKKEALGISRFSTYEQLCKVARV  200
    -NL    --------a-------------------------------  200
    -Br    ---s----a-------------------------------  200

IYSV-LIS   MAAKEYKFTEKYKKIFDETVKILTDCTPGTSGAASLIKFN  240
    -NL    -----f-------------i--------------------  240
    -Br    -----f---dr-------------k-----------v---  240

IYSV-LIS   EQYKILEGAFGKIVEDIGESSKPKNPSKKDRYN         273
    -NL    --i----------------------t--------        273
    -Br    --iq-----------------------------         273
```

5. בחינת השפעת תכשירי הדברה שונים נגד תריפסים על נגיעות חלקות בצל בתריפסים ובווירוס IYSV, והשפעת הטיפולים על כמות היבולים:

נערכו ניסויים מקיפים באזורים שונים, להשוואת יעילות טיפולים שונים א. בהדברת תריפסים, ב. בצמצום נגיעות הצמחים בווירוס, ג. בצמצום הלבנת הקש בבצל. סיכום חלקי של תוצאות הניסויים מובא בטבלאות 6-7.

טבלה 6: תוצאות חלקיות של ניסוי למניעת הלבנת קש בבצל (זן איתן) במבוא חמה, קיץ 1999, (בשיתוף עם שאול גרף):

הטיפול (6 ריסוסים במהלך העונה)	ממוצע מספר תריפסים לצמח בתאריך 15.6.99		הערכת חומרת הלבנת קש 15.6.99 (0=אין, 5=חמור)	נגיעות ב- IYSV (בדיקה סרולוגית) בתאריך 9.6.99
	בוגרים	זחלים		
מסורול 200 + רדומיל	2.2 בג	21.2 אבג	1.6	לא נבדק
מסורול 200 + עמיסטר	2.7 בג	21.2 אבג	1.1	לא נבדק
מסורול 300 + רדומיל	4.8 א	28.5 א	1.6	**47.6% =10/21**
מסורול 300 + עמיסטר	4.1 אב	23.0 א	1.1	לא נבדק
מרשל 250 + **טוקתיון 100** + רדומיל	1.3 ג	4.5 ה	1.0	**36.4% =8/22**
מרשל 250 + **טוקתיון 100** + עמיסטר	1.3 ג	13.2 בגדה	0.6	לא נבדק
היקש	0.9 ג	7.3 דה	3.5	**87.5% =21/24**

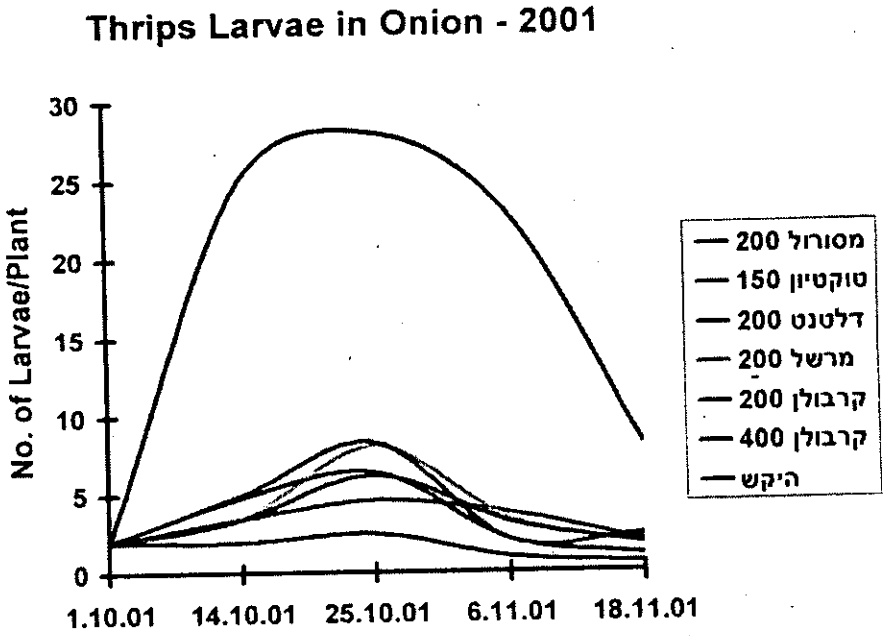
*3 ריסוסים ראשונים גם רדומיל או עמיסטר.

טבלה 7: תוצאות חלקיות של ניסוי (I) למניעת הלבנת קש בבצל ביגור, קיץ 1999, (בשיתוף עם הישאם יוניס, עלי עומרי):

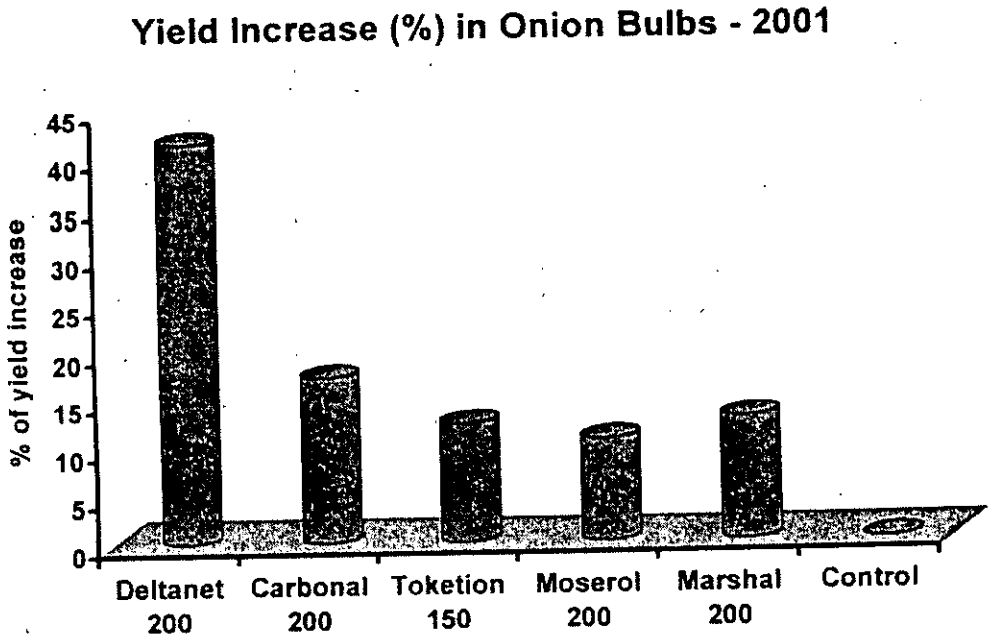
הטיפול (כל כ- 10 ימים ריסוס במהלך העונה)	יעילות הדברה (%) (מעקב לאורך כל העונה)		נגיעות ב- IYSV (בדיקה סרולוגית)	
	תריפסים בוגרים	תריפסים זחלים	בתאריך 12.5.99	בתאריך 14.6.99
***מסורול 300**	63.4	54.3	=14/20 70%	75% =30/40
מסורול 300	71.8	74.1	לא נבדק	
אלטרנציה	64.3	69.5	לא נבדק	86% =37/43
מסורול 200	71.1	70.2	לא נבדק	
היקש	-	-	=16/20 80%	59% =24/41

*כל כ- 21 ימים ריסוס במהלך העונה.

תמונה 3: תוצאות של ניסוי להדברת זחלים של תריפס בעמק בית שאן, קיץ 2001, (בשיתוף עם נביל עומרי והישאם יונס).



תמונה 4: תוצאות של ניסוי להדברת תריפס על יבול של בצל בעמק בית שאן, קיץ 2001, (בשיתוף עם נביל עומרי והישאם יונס).



ניתן לראות,

א. שבכל הניסויים נראתה קורלציה טובה בין ספירות התריפסים לבין חומרת הלבנת הקש.

ב. כל הטיפולים להדברת תריפסים הקטינו את אוכלוסיות התריפס וגרמו לעליה ביבולי הבצל.

ג. קיימת חשיבות ליישום יעיל של התכשירים, שכן: עלוות הבצלים חלקה, הזחלים חבויים בחיק העלים, הגלמים חבויים בקרקע, והבוגרים מתחמקים בקפיצות ובמעוף ברוח.

ד. המסקנות המדעיות - הושלם האפיון הביולוגי, המיקרוסקופי והסרולוגי של הווירוס מבצל היפאסטרום, וליזיאנתוס. הווירוס נוקה והוכן נוגדן פוליקלונלי נגד חלבון הנוקלאוקפסיד שמשמשים לזיהוי הווירוס. נבדק פיזור הווירוס בצמח והעברתו בבצלים וזרעים. בודד הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד של תבדידי הוירוס מבצל, היפאסטרום וליזיאנתוס ונקבע רצף הנוקלאוטידים. תריפס הבצל (*Thrips tabaci*) זוהה כוקטור עיקרי להפצת הוירוס. נמצאה קורלציה בין מספר התריפסים לשיעור הנגיעות בוירוס בשדות מסחריים של בצל. כל הטיפולים להדברת תריפסים הקטינו את רמת התריפס וגרמו לעליה ביבולים. הוכנו נוגדנים פוליקלונליים ספציפיים. יש להמשיך במעקב אחר התפשטות וירוסים בצמחי תרבות.

ה. פרסומים מדעיים מביצוע העבודה (כולל עבודת שהוצגו בכנסים):

1. ע. קריצמן, ה. בקלמן, ס. אלקסנדרוב, י. כהן, מ. למפל וע. גרה (2000). גילוי וזיהוי וירוס וירוס הכתמים הצהובים של האיריס (IYSV) מקבוצת ה-Tospo בליזיאנתוס, *"דפי מידע"* 11, 57-60.
2. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Zeidan, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2000). Lisianthus leaf necrosis a new disease of lisianthus caused by iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 84, 1185-1189.
3. **Gera, A.,** Kritzman, A., Cohen, J., Raccah, B. and Y. Antignus (2000). Tospoviruses infecting vegetable crops In Israel. *OEPP/EPPO Bulletin.* 30, 289-292.
4. Kritzman, A., Lampel, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2001). Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 85 838-842.
5. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S. Cohen, J., Lampel, M., Siti, E., Raccah, B. and **Gera, A.** (2001). Detection of Iris yellow spot virus in Lisianthus. Phytoparasitica 29, 256-257.
6. Kritzman, A., Beckelman, H., Alexandrov, S., Cohen, J., Lampel, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2002). Detection of Iris Yellow Spot Virus in Lisianthus. Acta Horticulturae 568, 43-49.
7. Kritzman, A., Lampel, M., Raccah, B. and **Gera, A.** (2002). Characterization and spread of iris yellow spot virus in Israel. The 7th International Working Groups on Legume Viruses (16th meeting of IWGLV) and Vegetable Viruses (10th meeting of IWGVV) Bonn, Germany.
8. Kritzman, A., Beckelman, H., Raccah, B. and **Gera, A.,** (2002). Spread of iris yellow spot virus in cultivated crops in Israe. IVIII th International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aschersleben, Germany.
9. Kritzman, A., Yunis, H., Omari, N., Raccah, B.and **Gera, A.** (2003). Distribution and impact of iris yellow spot tospovirus and *Thrips tabaci* on onion. International Congress of Plant Protection, Christchurch, New Zealand.

סיכום חדש לדו"חות מחקר 2000

1. מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

מטרותיה של תכנית זו איפיון ביולוגי, סרולוגי ומולקולרי של תבדידי IYSV מבצל, היפאסטרום וליזיאנתוס , זיהוי פונדקאים המשמשים כמקור הפצה, זיהוי הווקטורים המפיצים את הווירוס, את מידת יעילותם ובדיקת דרכים לצמצום ההפצה.

2. עיקרי הניסויים

אפיון ביולוגי - הווירוס מליזיאנתוס הועבר בהדבקה מכנית לצמחי הבוחן. IYSV הדביק מספר קטן של צמחים שכלל -*C. quinoa, N. benthamiana* ו- *G. globosa*. תבדיד הווירוס מבצל הדביק ליזיאנתוס הן בהעברה מכנית והן בהדבקה באמצעות תריפס.

מיקרוסקופיה אלקטרונית - בבדיקות חתכי רקמה, נמצאו בתאי הפרנכימה של ליזיאנתוס ובנטמיאנה קריסטלים של חלקיקי וירוס עטופים בממברנה.

ניקוי חלבוני הווירוס וזיהוי סרולוגי: חלבון הנוקלאוקפסיד של הווירוס נוקה מעלי בנטמיינה ושימש להכנת נוגדנים פוליקלונליים. הנוגדים שימשו לבדיקת הנוכחות של IYSV בצמחי בצל ובפונדקאים אחרים. הווירוס זוהה ב- Western blot ו- ELISA.

בחינת פיזור הווירוס והעברתו באברי צמח הבצל : נבדקה נוכחות הווירוס באברים השונים של הבצל (גלדים, זרעים, ואזורים שונים לאורך העלים). הבדיקות נעשו ב- ELISA.

במקביל נבחנה העברת הווירוס בזרעים ובבצלים שנאספו מצמחים נגועים.

העברה ע"י תריפסים - נבחנה יעילות העברת IYSV ע"י אוכלוסיה מעבדתית של תריפס הבצל, ותריפסים שנאספו בשדות בצל נגועים. בוגרים של תריפס הבצל הונחו להזנת הדבקה על גבי שתילי ליזיאנתוס בריאים להזנת הדבקה הצמחים נבדקו ויזואלית להתפתחות סימנים. התוצאות אומתו ב-ELISA.

בידוד הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד - ה- RNA שמקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד של הוירוס בודד באמצעות RT-PCR. תוצר האמפליפקציה בגודל של 850 נוקלאוטידים, עבר בדיקת רצף.

3. המסקנות המדעיות

הושלם האפיון הביולוגי, הסרולוגי והמולקולרי של תבדיד הווירוס מבצל ולזיאנתוס. הוכן נוגדן פוליקלונלי שמגיב ספציפית עם הווירוס ויכול לשמש למטרות דיאגנוסטיקה. בודד הגן המקודד לחלבון הנוקלאוקפסיד של תבדידי הוירוס ונקבע רצף הנוקלאוטידים. נמצאה קורלציה טובה בין ספירות התריפסים לבין שיעור המחלה בבצל. מבחינת יבולים- כל טיפול להדברת התריפסים היה יעיל מהבקורת.

4. בעיות לפתרון

יש להמשיך ולעקוב אחר התפשטות הוירוס בצמחי תרבות ולבדוק דרכים למניעת הפצתו.

5. הפצת ידע

תוצאות העבודה הוצגו בכינוס השנתי של החברה הפיטופתלוגית הישראלית, בימי עיון לחקלאים, מדריכי שה"ם ועובדי האגף להגנת הצומח ובקורת ובשלשה כינוסים בינלאומיים. פורסמו שלשה מאמרים מבוקרים בעיתונות המקצועית בחו"ל ומאמר בירחון מגדלי הפרחים "דפי מידע".