

מחלת וירוס צהבון האמיר של העגבניה בשעועית

משה לפידות, לידיה כהן, רחל בן-יוסף, שלמה כהן.

המחלקה לזרולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ת. ד. 6, בית דגן, 50250

תקציר

זנים מסחריים שונים של שעועית הגינה (*Phaseolus vulgaris*) נבחנו לתגובתם להדבקה בוירוס צהבון האמיר של העגבניה (וצאייע, TYLCV). צמחי שעועית בני 14 יום הודבקו בוצאייע על ידי שימוש בכנימות עש. לאחר ההדבקה, הצמחים רוטטו בקוטל חרקים לסילוק כנימות העש, וגודלו במשך 4 שבועות נוספים בחממה. במהלך גידול הצמחים בוצע מעקב אחר התפתחות סימפטומים של מחלת צהבון האמיר, ונוכחות חומצת גרעין ויראלית בצמח הנגוע נבדקה בשיטות מולקולריות. מתוך 42 זנים שונים של שעועית אשר נבדקו, 24 נמצאו כרגישים לוירוס - הצמחים פיתחו סימפטומים חמורים של המחלה, וצברו כמויות גבוהות של חומצת גרעין ויראלית. לעומת זאת, 18 זנים נמצאו עמידים לוירוס - זן אחד הראה סימפטומים מתונים ואילו 17 הזנים האחרים לא הראו אף סימפטום של המחלה. מתוך 17 הזנים אשר לא הראו סימפטומים של המחלה, שלושה הכילו חומצת גרעין ויראלית, היינו נדבקו במחלה למרות שלא הראו סימפטומים, ואילו ב- 14 הזנים הנותרים לא נמצאה חומצת גרעין ויראלית. כאשר נבדקה השפעת גיל צמח השעועית על ההדבקה בוירוס ע"י כנימות עש הטבק, נמצא שיעילות ההדבקה תלויה בגיל הצמחים בזמן ההדבקה. כאשר הודבקו צמחים בני 14 יום התקבלה יעילות הדבקה של 92%. אולם, כאשר צמחים בני 12 או 26 יום הודבקו, יעילות ההדבקה ירדה ל- 34% עד 40% בהתאמה.

מבוא

וירוס צהבון האמיר של העגבניה (וצאייע, TYLCV) הינו כיום הוירוס ההרסני ביותר בגידול עגבניה באזורים טרופיים וסבטרופיים. הוירוס השייך למשפחת וירוסי הבגומו, מכיל מולקולת דנ"א מעגלית אחת, והוא מועבר בצורה מתמדת ע"י כנימת עש הטבק. עליות עונתיות ברמת אוכלוסיית כנימת עש הטבק כמעט תמיד מלוות בהתפשטות של וירוס צהבון האמיר של העגבניה (Lapidot & Friedmann 2002).

פותחו מספר שיטות להתמודדות עם התפשטות מחלת צהבון האמיר, אשר רובן ככולן מבוססות על הפחתת אוכלוסיית הוקטור המעביר את הוירוס הגורם למחלה - כנימת עש הטבק. קוטלי חרקים הם בעלי יעילות חלקית בלבד, שכן במקרים רבים הזמן שעובר מרגע חשיפת החרק לתכשיר ההדברה ועד שהתכשיר מבצע את פעולתו

הינו מספיק להדבקת הצמח בוירוס. יתרה מזאת, עקב השימוש הנרחב והלא מבוקר בתכשירי הדברה, החלו להיווצר תנגודות באוכלוסיות כנימת עש הטבק לתכשירי הדברה, ויש לזכור כי לרוב תכשירי ההדברה אפקט שלילי על הסביבה.

השימוש באמצעי הפרדה פיזיקליים, כמו רשתות 50 מש, מאד מקובל בארץ וברחבי המיזרח התיכון. לאחרונה הודגם כי השימוש ביריעות וברשתות בולעות קרינה אולטרה סגולה מעכב חדירה של כנימת עש הטבק למבנים המחופים ביריעות אלה (Antignus et al., 2001). אולם השימוש ביריעות וברשתות גורם לבעיות של חימום יתר בתוך המבנים, והשימוש בהם הינו יקר יחסית.

אמצעי נוסף המיושם בצמחים הגדלים בשטח הפתוח הוא חיפוי הקרקע ביריעות פלסטיק צהובות אשר מושכות אליהן את כנימת עש הטבק, מונעות את נחיתתה על הצמח והדבקתו בוירוס, וגורמות לקטילת החרק עקב החום הגבוה אשר נפלט מהחיפוי (Cohen et al., 1974). אולם שיטה זאת יעילה רק כאשר הצמחים צעירים, היינו לתקופה של שניים עד שלושה שבועות, שכן כאשר הצמח גדל ומכסה את פני היריעה נעלם אפקט ההגנה. היינו השיטה האופטימלית להתמודדות עם מחלות וירוס בכלל ועם וירוס צהבון האמיר של העגבניה בפרט היא ע"י טיפוח זנים לעמידות או סבילות לוירוס.

מזה זמן ידוע כי שעועית הגינה (*Phaseolus vulgaris*) רגישה להדבקה בוירוס צהבון האמיר של העגבניה. לאחרונה דווח על התפרצות קשה של מחלה ויראלית חדשה בשעועית בדרום ספרד, ונמצא כי הוירוס האחראי למחלה הינו צהבון האמיר של העגבניה (Navas-Castillo et al., 1999). יתרה מזאת, נמצא כי בספרד משמשת השעועית כמקור מידבק להיצטברות הוירוס, וכתוצאה מכך נגרמת החרפה במחלת צהבון האמיר בצמחי עגבניה (Sanchez-Campos et al., 1999). אולם בארץ, למרות שנמצאו צמחי שעועית הנגועים בוירוס, לא היה כל דיווח על אפידמיה של מחלת צהבון האמיר בשעועית, למרות ששעועית מגודלת בארץ והוירוס וכנימות העש המעבירות אותו נפוצים בכל אזורי הגידול בישראל.

מטרת עבודה זו היא סריקת זנים מסחריים של שעועית לעמידות לוירוס צהבון האמיר של העגבניה. כמו כן, כדי לזהות את גיל השעועית האופטימלי להדבקה בוירוס, נבדקה השפעת גיל הצמח על יעילות ההדבקה בוירוס.

שיטות וחומרים

וירוס. מקורו של וירוס צהבון האמיר של העגבניה בו השתמשנו הוא בתרבית המקורית אשר נאספה בשדה מצמחי עגבניה נגועים לפני כ- 40 שנה (Cohen & Nitzany, 1966). תרבית זו היא למעשה תערובת של שני תבדידי וירוס צהבון האמיר של העגבניה - TYLCV-IL ו- TYLCV-M אשר תוארו זה מכבר (Antignus and Cohen, 1994; Navot et al., 1991). הוירוס נשמר בחממה מוגנת מחרקים על צמחי עגבניה נגועים.

הדבקת צמחי שעועית בוירוס צהבון האמיר של העגבניה. אוכלוסיית כנימת עש הטבק גודלה על צמחי כותנה בכלובי חרקים בחממה. רכישת הוירוס נעשתה ע"י הושבת כנימות עש על צמחי עגבניה נגועים בוירוס להזנת רכישה למשך 48 שעות. בסיום הרכישה הועברו כנימות העש לצמחי שעועית בני 14 יום להזנת הדבקה במשך 48 שעות, וכך הועבר הוירוס לצמחי השעועית. בסיום ההעברה רוטטו צמחי השעועית בקונפידור, וגודלו במשך חודש בחממה המוגנת מפני חרקים. במהלך תקופה זו נבחנו הצמחים ויזואלית להופעת תסמיני המחלה, ובסוף התקופה נלקחו דוגמאות מהצמחים להפקת DNA מכל צמח. בכל ניסוי נבדקו לפחות 7 צמחים מכל זן. כל זן נבדק לפחות בשלושה ניסויים ניפרדים. זני השעועית אשר נבדקו לעמידות לוירוס מפורטים בטבלה מספר אחת.

השפעת גיל הצמח על יעילות ההדבקה. זרעים של זן שעועית (גולדי) הרגיש לוירוס נזרעו במועדים שונים. הצמחים מכל מועדי הזריעה השונים הודבקו באותו מועד כמתואר לעיל. בסיום ההדבקה הצמחים רוטטו בקונפידור ונשמרו בחממה למשך חודש נוסף. בסיום החודש נספרו הצמחים המראים תסמיני מחלה ונקבע אחוז הצמחים הנגועים.

זיהוי חומצת גרעין ויראלית בצמחים המודבקים. נוכחות חומצת גרעין ויראלית בצמחים המודבקים נקבעה

בשתי שיטות: היברידיזציה של Dot-blot, וע"י הגברה באמצעות מכשיר ה-PCR.

היברידיזציה: חודש לאחר הדבקת הצמחים נלקחו מכל עלה קודקודי 0.1 גרם רקמה אשר רוסקה בחצי מ"ל 0.4 M NaOH. 10 מיקרוליטר טופטפו על ממברנת ניילון אשר הוגבה עם סמן רדיואקטיבי יחודי לוירוס צהבון האמיר של העגבניה. לאחר ההגבה עם הסמן הממברנות נשטפו, ונחשפו למסך מיוחד אשר נקרא במכשיר פוספואימג'ר. PCR: חודש לאחר הדבקת הצמחים נלקחו דוגמאות מהעלה הקודקודי והופק ממנו Total DNA בשיטת דהלפורטה (Dellaporta et al., 1983). ה-DNA הצמחי עבר הגברה עם תחלים יחודיים לוירוס צהבון האמיר של העגבניה אשר נותנים תוצר הגברה בגודל של 850 נוקלאוטידים. הופעת תוצר ההגברה נבדקה ע"י הרצת תוצרי ה-PCR בגיל אלקטרופורזה.

תוצאות

השפעת גיל צמחי שעועית על יעילות הדבקתם בוירוס צהבון האמיר של העגבניה נבדקה על ידי הדבקת צמחי שעועית בגילאים שונים (תמונה מס. 1). כאשר צמחים בני 14 יום הודבקו בוירוס, התקבלה יעילות הדבקה של 92%. צמחי שעועית רגישים לוירוס מפתחים תסמיני מחלה חמורים כשבועיים לאחר ההדבקה. תסמיני המחלה כוללים קיפול עלים כלפי מטה, העלים מתארכים מאד, הופכים צרים ועבים יותר (תמונה 2). כמו כן הוירוס גורם לעיכוב חזק בצימוח, וכאשר נשמרו צמחים נגועים בחממה במשך חודשיים - שלושה היבול היה נמוך מאד. אולם

יעילות ההדבקה ירדה בחדות ל - 34% כאשר צמחים בני 12 יום הודבקו בוירוס, וכאשר צמחים מבוגרים יותר - בני 17 או 26 יום - הודבקו בוירוס יעילות ההדבקה היתה 50% - 40% בהתאמה (תמונה 1). יתרה מזאת, היה עיכוב של מספר ימים בהופעת תסמיני המחלה לאחר הדבקת צמחים בני 26 יום בהשוואה לצמחים בני 14 יום.

לאחר הדבקת צמחי שעועית בני 14 יום בצהבון האמיר, נסרקו זני שעועית שונים ותגובתם להדבקה בוירוס נבדקה על בסיס של הופעת או אי הופעת תסמיני מחלה (טבלה מס. 1). עשרים וארבעה זנים שונים נמצאו כרגישים מאד לוירוס - צמחים מהזנים הללו פיתחו תסמיני מחלה חמורים, לרוב תוך שבועיים ממועד ההדבקה. כאשר נבדק האם יש הצטברות חומצת גרעין ויראלית בצמחים המודבקים, נמצא כי בכל הצמחים הרגישים יש הצטברות של DNA ויראלי כפי שנקבע בשיטת ההיברידיזציה.

לעומת זאת, 18 זנים נמצאו עמידים לוירוס - צמחים מזנים אלו לא פתחו כלל תסמיני מחלה לאחר ההדבקה בוירוס, להוציא צמחים מהזן Scylla, אשר אומנם פיתחו תסמיני מחלה אולם התסמינים היו מאד מתונים. חומצת גרעין ויראלית התגלתה בארבעה מהזנים העמידים, כולל בזן Scylla אשר הראה תסמיני מחלה. בשאר 14 הזנים העמידים לא נתגלתה חומצת גרעין ויראלית הן כאשר הזיהוי נעשה ע"י ההיברידיזציה והן כאשר השתמשנו בהגברה ע"י PCR שהיא שיטה מאד רגישה (טבלה מס. 1).

דיון

זנים מסחריים שונים של שעועית הגינה נבחנו לתגובתם למחלת צהבון האמיר של העגבניה. הצמחים הודבקו בוירוס צהבון האמיר של העגבניה ע"י חשיפתם לכנימות עש אשר רכשו את הוירוס. בהתבסס על הופעת תסמיני מחלה ונוכחות חומצת גרעין ויראלית בצמחים הנגועים, 24 זנים נמצאו כרגישים לוירוס. צמחים מזנים אלו פיתחו תסמיני מחלה חמורים בעקבות ההדבקה בוירוס, ורמות גבוהות של חומצת גרעין ויראלית נמצאה בצמחים. לעומת זאת, 18 זנים נמצאו עמידים לוירוס. רק זן עמיד אחד הראה תסמיני מחלה מתונים, שאר 17 הזנים העמידים לא הראו כל תסמיני מחלה. חומצת גרעין ויראלית התגלתה בארבעה מהזנים העמידים, ולאור זאת נקבע כי זנים אלו הם סבילים למחלת צהבון האמיר של העגבניה (Cooper, and Jones, 1983). בשאר 14 הזנים העמידים לא נתגלתה חומצת גרעין ויראלית גם כאשר השתמשנו בהגברה ע"י PCR שהיא שיטה מאד רגישה. ולכן נראה כי הצמחים מארבעה עשר זנים אלו הם חסינים לוירוס.

תוצאות עבודה זו מראות בברור כי יעילות ההדבקה בוירוס צהבון האמיר של העגבניה ע"י כנימות עש תלויה בגיל הצמחים המודבקים. יעילות הדבקה גבוהה התקבלה כאשר הודבקו צמחים בני 14 יום, ויעילות ההדבקה ירדה כאשר הצמחים היו או צעירים יותר או מבוגרים יותר מבני 14 יום. יש לציין כי תלות דומה של יעילות ההדבקה

בגיל הצמח המודבק נמצאה גם במחקר אחר כאשר הודבקו צמחי שעועית בוירוס המוזאיקה המוזהבת של השעועית (BGMV), השייך אף הוא למשפחת וירוסי הבגומו - אותה משפחה של וירוס צהבון האמיר של העגבניה (Morales and Niessen, 1988).

למרות ששעועית מגודלת בארץ והן וירוס צהבון האמיר של העגבניה והן כנימות העש המעבירות אותו נפוצים בכל אזורי הגידול בישראל, לא ידוע על אפידמיה של וירוס צהבון האמיר של העגבניה בשעועית בישראל. יש להניח שהעדר האפידמיה נובע משתי סיבות עיקריות: עונת השעועית העיקרית בישראל היא באביב המוקדם, היינו גידול צמחי השעועית והקטיף מתרחשים לפני שיש בניה של אוכלוסיות גדולות של כנימת עש הטבק. יתרה מזאת, לפי חברות המשווקות זרעי שעועית שניים מזני השעועית היותר נפוצים בארץ הם ונטור (Venture) וקנטרה (Cantara) אשר לפי תוצאות עבודה זו הם חסינים לוירוס.

תודות

המחברים אסירי תודה לדר. רבקה הדס (המחלקה לזרעים, מינהל המחקר החקלאי), למיירה מנוח (בנק הגנים הישראלי) וליצחק רותם (שוק חקלאי) על עזרתם בהשגת זרעי שעועית מזנים שונים.

רשימת ספרות

Antignus, Y., and Cohen, S. 1994. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Phytopathology* 84:707-712.

Antignus, Y., Nestel, D., Cohen, S., and Lapidot, M. 2001. Ultraviolet-deficient greenhouse environment affects whiteflies attraction and flight-behavior. *Environmental Entomology* 30:394-399.

Cohen, S., and Nitzany, F. E. 1966. Transmission and host range of tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56:1127-1131.

Cohen, S., Melamed-Kadjar, V., and Hameiri, J. 1974. Prevention of the spread of tomato yellow leaf curl virus transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera, Aleyrodidae) in Israel. *Bull. Entomol. Res.* 64:193-197.

Cooper, J. I., and Jones, A. T. 1983. Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73:127-128.

Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.

Lapidot, M. and Friedmann, M. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 140:109-127.

Lapidot, M., Goldray, O., Ben-Joseph, R., Cohen, S., Friedmann, M., Shlomo, A., Nahon, S., Chen, L. and Pilowsky, M. 2000. Breeding tomatoes for resistance to tomato yellow leaf curl virus begomovirus. *EPPA Bulletin* 30: 317-321.

Morales, F. J., and Niessen, A. I. 1988. Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germ plasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. *Plant Dis.* 72:1020-1023.

Navas-Castillo, J., Sanchez-Campos, S., and Diaz, J. A. 1999. Tomato yellow leaf virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Dis.* 83:29-32.

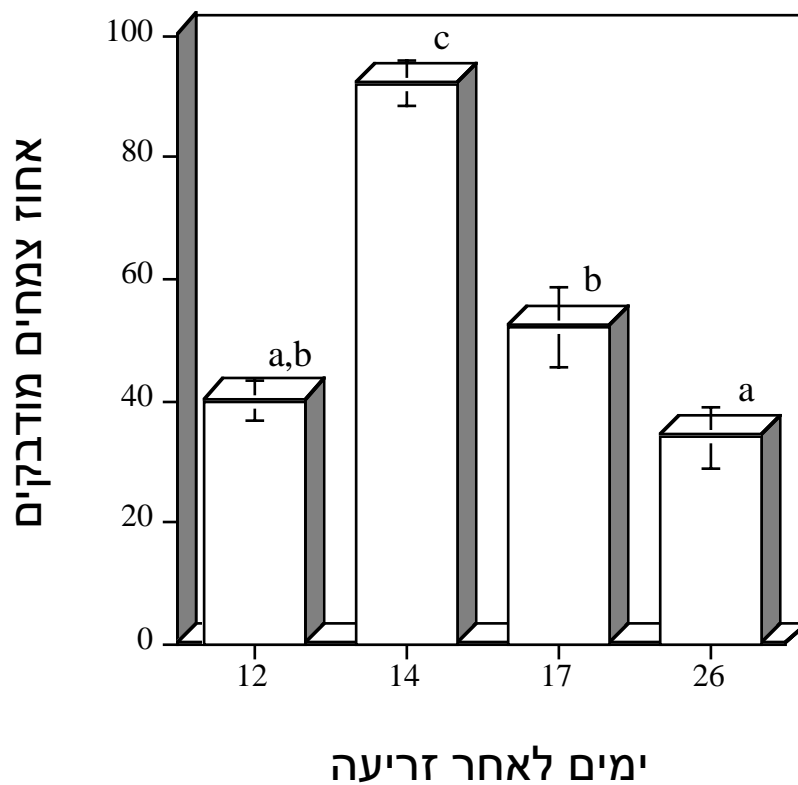
Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D., and Czosnek, H. 1991. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185:131-161.

Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Diaz, J. A., and Moriones, E. 1999. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89:1038-1043.

טבלה מס. 1. תגובת זני שעועית שונים להדבקה בירוס צהבון האמיר של העגבניה

| זיהוי DNA ויראלי | | | | זני שעועית |
|------------------|----------|-------------|--|--------------------|
| PCR | Dot Blot | תסמיני מחלה | | רגיש |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Astro |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Aphrodite |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Barbounia |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Benton |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Blue Crop |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Bonanza |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Bonvert |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Burpee's Richgreen |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Bush Romano |
| חיובי | חיובי | חמורים | | DGV |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Echo |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Gina |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Goldie |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Hialea |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Marona |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Maxidor |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Olympia |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Phoenix Claudia |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Provider |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Pure Gold Wax |
| חיובי | חיובי | חמורים | | Wax 216 |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | Zeus |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | 148 |
| לא בוצע | חיובי | חמורים | | RS 1409 |
| | | | | סביל |
| חיובי | חיובי | אין | | Maestro |
| חיובי | חיובי | אין | | Paloma |
| חיובי | חיובי | אין | | Scala |
| חיובי | חיובי | מתונים | | Scylla |
| | | | | עמיד |
| שלילי | שלילי | אין | | Alubia Blanca |
| שלילי | שלילי | אין | | Cantara |
| שלילי | שלילי | אין | | Celtic |
| שלילי | שלילי | אין | | Colana |
| שלילי | שלילי | אין | | Contender |
| שלילי | שלילי | אין | | Cyprus |
| שלילי | שלילי | אין | | Nirda |
| שלילי | שלילי | אין | | Pinto Amber |
| שלילי | שלילי | אין | | Speedy |
| שלילי | שלילי | אין | | Tema |
| שלילי | שלילי | אין | | Venture |
| שלילי | שלילי | אין | | Wonder Bush |
| שלילי | שלילי | אין | | 4087 |
| שלילי | שלילי | אין | | 4095 |

זני שעועית שונים הודבקו בוצא"ע, ונשמרו בחממה למשך חודש לאחר ההדבקה. במהלך החודש הצמחים נבדקו ויזואלית להופעת תסמיני המחלה, ונבדקה נוכחות DNA ויראלי בצמחים המודבקים.



תמונה מס. 1. השפעת גיל צמח שעועית על יעילות ההדבקה בוירוס צהבון האמיר של העגבניה. צמחי שעועית רגישים (זן גולדי) הודבקו בגילאים שונים בוירוס צהבון האמיר של העגבניה. בכל נקודת זמן הודבקו עשרה צמחים. בוצעו חמש חזרות ניפרדות. של הניסוי. הגרף מראה ממוצע של חמשת החזרות כולל סטיית תקן. אותיות שונות מבטאות הבדל סטטיסטי מובהק ($P < 0.05$).



תמונה מס. 2. צמח שעועית המבטא תסמיני מחלה בעקבות הדבקה בוירוס צהבון האמיר של העגבניה.
צמחי שעועית רגישים (זן גולדי) בני 14 יום הודבקו בוירוס צהבון האמיר של העגבניה. התמונה צולמה 3 שבועות
לאחר ההדבקה. א, צמח בריא. ב, צמח נגוע המבטא תסמיני מחלה טיפוסיים.