

דו"ח שנתי לתכנית מחקר - 132-1353-08

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

**אפיון פרמטרים אפידמיולוגיים ומולקולאריים הקשורים לעליה בהתפשטות וירוס**

**כתמי הנבילה של העגבניה (TSWV) בשטחי פלפל ושבירת העמידות של זנים**

**עמידים למחלה**

ע. גרה<sup>1</sup>, י. אנטיגנוס<sup>1</sup>, פ. ויינטראוב<sup>2</sup>, א. דומברובסקי<sup>1</sup>, ש. שפיגל<sup>1</sup>, ס. דוברינין<sup>3</sup>, ע. לכמן<sup>1</sup>,

מ. פרלסמן<sup>1</sup>

<sup>1</sup>היחידה לוירולוגיה, מכון וולקני, בית דגן; <sup>2</sup>המח' לאנטומולוגיה, תחנת הניסיונות, גילת; <sup>3</sup>שה"מ, משרד

החקלאות

By

**A. Gera, Y. Antignus, P. Weintraub, A. Dombrovsky, S. Spiegel, S.**

**Dobrinin, O. Lachman, M. Pearlsman**

**A. Gera**, Virology Department, ARO, The Volcani Center, P. O. Box 6, Bet-Dagan,

e-mail : [abedgera@agri.gov.il](mailto:abedgera@agri.gov.il)

April 2011

אפריל 2011

**הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים**

חתימת החוקר : \_\_\_\_\_

## תקציר

**הצגת הבעיה :** בשנים האחרונות הופיעו דיווחים מספרד, מאיטליה ואוסטרליה על הופעת גזעים של TSWV השוברים את עמידות המוקנית לצמחי פלפל ע"י הגן *Tsw*. במהלך השנתיים האחרונות נצפתה עליה מדאיגה בהתפשטות וירוס זה בשטחי הפלפל הגדלים באזור הבשור והערבה ועלה החשש להופעת גזעים שוברי עמידות גם בישראל. כ"כ התגלו בבשור ובערבה אוכלוסיות של תריפס הקיקיון החשוד כוקטור של TSWV ובניגוד לתריפס הפרחים המערבי הנחשב לוקטור העקרי של הוירוס, יכול ליצור אוכלוסיות גדולות בקיץ. הופעה של וקטור פוטנציאלי נוסף בזירה יוצרת מצב חדש המגדיל את הסיכויים ליצירת מגפה משמעותית של TSWV.

### מהלך ושיטות עבודה :

נערך איפיון מולקולרי של תבדידי וירוס שוברי עמידות לעומת הגזע הרגיל. שיבוט הגנים נעשה בשיטות המולקולאריות המקובלות ואנליזת התוצאות נעשה בעזרת תכנות ייעודיות למטרה זו.

**תוצאות עיקריות :** אפיונם הגנטי של התבדידים נעשה ע"י שיבוט הגנים הויראליים NC, NSm, NSs וכן האזור הבין-גני ( SIGR ) של קומפוננט ה-RNA הגנומי S-RNA. מידת הזהות ברצף הבסיסים של התבדידים שוברי העמידות לעומת התבדיד הרגיל הגיעה ל-99%. לא נמצאו הבדלים ברצף חומצות האמינו של הגן NC של שלושת התבדידים הישראליים אך הוא היה שונה ב-5 חומצות אמינו מהתבדיד הברזילאי. רצף ה. האמינו של הגן NSm בתבדידים WT ו-RB3 היה זהה ושניהם נבדלו בח. אמינו אחת מהתבדיד RB1. גן ה-NSm של שלושת התבדידים הישראליים נבדל גם הוא בחמש ח. אמינו מהגזע הברזילאי. רצף ה. האמינו של הגן NSs בתבדיד הרגיל נמצא שונה מרצף שני הגזעים שוברי העמידות בח. אמינו בעמדה 393. תבדיד RB1 שונה מ-WT ו-RB3 בעמדה 290. RB3 שונה מ-WT ו-RB1 בעמדה 139. פותחה שיטה מולקולארית לזיהוי התבדידים שוברי העמידות.

**מסקנות והמלצות :** מחקר זה מצביע לראשונה על קיומם של גזעי TSWV בישראל השוברים את עמידותם של צמחי פלפל הנושאים את הגן *Tsw* לעמידות כנגד הוירוס. השוואת רצף הבסיסים של שלושה גנים ויראליים בתבדידים שנבחנו, מצביע על כך שהתבדידים שוברי העמידות אינם בעלי זהות גנטית והם נוצרים באופן מקומי. ההבדלים במעקב ח. האמינו של הגן NSs תומכת באפשרות שגן ויראלי זה הוא ה-elicitor המפעיל את הגן הצמחי לעמידות. בשלב זה אין לתבדידים שוברי העמידות יתרונות על פני הגזע הרגיל מלבד יכולתם להדביק את צמחי הפלפל העמידים ולכן הם אינם יוצרים בשלב זה איום אפידמיולוגי על ענף הפלפל אך מגמת ההתפשטות של הגזעים העמידים ברורה ולעיתים מתקבלת אף פגיעה כלכלית לא מבוטלת. במידה ומגמה זו תימשך גם בשנים הבאות יתכן והגזעים שוברי העמידות יתבססו בשטח ולפיכך לא ניתן יהיה להשתמש בצמחים בעלי עמידות HR המוקנית ע"י הגן *Tsw*. יש לפיכך חשיבות רבה לאיתור מקורות עמידות נוספים ל-TSWV.

### מבוא ותאור הבעיה :

וירוס כתמי הנבילה של העגבניה (TSWV) מופץ ע"י מינים שונים של תריפס ויוצר מגפות נרחבות באזורים שונים של אגן הים התיכון בהם קיים גידול אינטנסיבי של ירקות חסויים. הנזקים הכלכליים הכבדים שנגרמו ע"י הוירוס הניעו את חברות הזרעים להחדיר עמידות כנגד הוירוס בעגבניות ובפלפל. בשנים האחרונות קיימים דיווחים מספרד, מאיטליה ואוסטרליה על הופעת גזעים של TSWV השוברים את עמידות בגידולים אלו. במהלך השנתיים האחרונות נצפתה עליה מדאיגה בהתפשטות וירוס זה בשטחי הפלפל הגדלים באזור הבשור והערבה ועלה החשש להופעת גזעים שוברי עמידות גם בישראל. תריפס הפרחים המערבי (*Frankliniella occidentalis*) הוא אחד הוקטורים היעילים של הוירוס. לאחרונה התגלתה נגיעות בשטחי פלפל שנשתלו בקיץ המאוחר ובסתיו באזור הערבה התיכונה ובבשור.

ההופעה המוקדמת של תריפס הקיקיון (*Scirtothrips dorsalis*) והשתלבותו עם אוכלוסיות תריפס הפרחים המערבי המופיעות מאוחר יותר יוצרת מצב חדש המגדיל את הסיכויים ליצירת מגפה משמעותית של TSWV.

## **מטרות המחקר :**

1. סקר לאיסוף תבדידים של TSWV השוברים את העמידות של הזנים המסחרים.
2. בחינת כושרם של גזעי הוירוס המקומיים לשבור את העמידות המוקנית לזני פלפל מסחריים ע"י הגן *Tsw*, לימוד הגורמים הגנטיים והסביבתיים המשפיעים על יעילות העמידות ויציבותה ופיתוח שיטה לזיהוי מהיר של הגזעים שוברי העמידות. בחינת השונות הגנטית והביולוגית של אוכלוסיות הוירוס.
3. בחינת כושר ההעברה של TSWV ע"י תריפס הקיקיון, מידת יעילותה והשפעתה על פוטנציאל ההתפשטות של המחלה בפלפל.

## **שיטות וחמרים:**

### **1. סקר לאיסוף דוגמאות**

נאספו 50 דגימות מצמחים חשודים לנגיעות ב-TSWV (טבלה 1). הדגימות נלקחו בעיקר מאזורי הבשור, הערבה והבקעה, שהם אזורי הגידול המרכזיים של פלפל. מקור הדגימות היה בעיקר מצמחי פלפל, ובנוסף מעגבנייה וצמחי נוי (*Anemone Pittosporium spp.*). הנגיעות ב-TSWV אושרה ע"י בדיקה ביולוגית וסרולוגית במעבדה.

### **1.1. אפיון ביולוגי ובדיקת טווח מאכסנים**

כל דגימה שהתקבלה הודבקה מכאנית לסדרת צמחי בוחן. הדגימות נכתשו עם בופר 0.05M Na-Phosphate pH 7.0, המכיל 0.1% Sodium Sulfite, בתוספת Carborundum 320 GRIT Powder (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) לפציעת העלים, ע"י איבוק הצמחים, או הכנסת החומר לבופר. האילוח התבצע ע"י שפשוף עלים עם תכשיר המידבק, ושטיפה עוקבת במים. סימני מחלה נבדקו בזמנים שונים לאחר ההדבקה.

### **1.2. בדיקה סרולוגית**

נוכחות הוירוס בצמחים אושרה בבדיקת ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) כמתואר ע"י Clark & Adams (1977) תוך שימוש בנוגדן רב שבטי מארנבת שהוכן במעבדה (Gera et al., 1999). הבדיקה נערכה בד"כ כ-14 יום לאחר ההדבקה. כל דגימה נבדקה בשתי חזרות לאישור התוצאה.

### **1.3. הפקת תבדידי וירוס טהורים**

כל תבדיד הוירוס אולה מכאנית על-*Nicotiana tabacum* Samsun. 4 ימים לאחר האילוח (4dpi) נלקח נקף נקרוטי בודד, וממנו התבצע אילוח מכאנית לצמח טבק חדש. כדי להבטיח את טוהר התבדיד, התבצעו באופן זה עוד 2 העברות עוקבות. מידבק שהופק לאחר שלושה מחזורי הדבקה, שימש להדבקת צמחי *N. benthamiana*, ששימשו כמקור להפקת תבדידי הוירוס.

## 2. שיבוט וריצוף גנים ויראליים

### 2.1. הפקת RNA כללי מצמחים נגועים

הפקת RNA כללי מהצמח התבצעה לפי (Hughes & Glenn, 1988), כאשר הדגימה נלקחה מעלים עליונים של צמחי *N. benthamiana*, שהודבק ב-TSWV 2-4 שבועות קודם לכן. דוגמאות ה-RNA נשמרו בהקפאה ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) ושימשו אח"כ כתבנית ליצירת c-DNA.

### 2.2. בידוד גנים

בידוד הגנים הויראליים (NC, NSm, NSs) והאזור הבין-גני (SIGH) נעשה ע"י שימוש ב-RT-PCR עם התחלים הספציפיים (primers) הבאים:

NC:

Complementary 5' GATCATCATGTCTAAGGTTAAGC 3' (nucleotides location 2770-2748)

Forward 5' CAGCTGCTTTCAAGCAAGTTC 3' (nucleotides location 1978-1998)

NSs:

Complementary 5' CAAGATTATTTTGATCCTGAAGC 3' (nucleotides location 1488-1466)

Forward 5' CCAATAACCATAATGTCTTCAAG 3' (nucleotides location 77-99)

SIGH:

Complementary 5' GAACTTGCTTGAAAGCAGCTG 3' (nucleotides location 99-77)

Forward 5' GCTTCAGGATCAAAATAATCTTG 3' (nucleotides location 1466-1488)

רצפי התחלים הנ"ל סונתזו עפ"י רצף הגזע הברזילאי BR-01 (De Haan *et al.*, 1990; 1989) (NCBI GenBank Accession No. NC\_002051, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

NSm:

Complementary 5' GCTTAAATAAGTGATATTAAAGAAC 3' (nucleotides location 1034-1009)

Forward 5' ATGTTGACTCTTTTCGGTAAC 3' (nucleotides location 101-121)

רצפי התחלים הנ"ל סונתזו עפ"י רצף הגזע הברזילאי BR-01 (Kormelink *et al.*, 1992) (NCBI GenBank Accession No. NC\_002050).

### 2.3. Reverse Transcription (RT)

RNA יבש שמקורו בצמחים נגועים בתבדידים השונים, הורחף ב-  $30\ \mu\text{l}$  מים מעוקרים, הודגר ב-  $80^{\circ}\text{C}$  למשך 10 דקות ולאחר מכן הועבר לכלי עם קרח. ל-  $5\ \mu\text{l}$  מה-RNA המורחף, הוספו  $1\ \mu\text{l}$

(30 pmol) מכל תחל ו- $3 \mu\text{l}$  של מים מעוקרים, לנפח סופי של  $10 \mu\text{l}$ , והדגרה נוספת ב- $80^\circ\text{C}$  למשך 10 דקות ואח"כ הועבר לקרח לדקה. לאחר מכן הוספו:

$2 \mu\text{l}$  10x Taq Buffer with 15 mM  $\text{MgCl}_2$  (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)

$0.25 \mu\text{l}$  10mM NTP (each)

$0.1 \mu\text{l}$  RNAsin 40 u/ $\mu\text{l}$ , 1000u (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)

$0.5 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}$  25 mM

$0.1 \mu\text{l}$  M-MuLV 200 u/ $\mu\text{l}$  (USB, Cleveland, Ohio, USA)

$7.05 \mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (מים מעוקרים)

לנפח כולל של  $10 \mu\text{l}$  והודגרו ב- $37^\circ\text{C}$  למשך 80 דקות.

דוגמאות ה-c-DNA נשמרו בהקפאה ( $-20^\circ\text{C}$ ).

## 2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ה-PCR בוצע בנפח כללי של  $30 \mu\text{l}$ : ל- $1 \mu\text{l}$  מתוצר ה-c-DNA הוספו  $1 \mu\text{l}$  (30 pmol) מכל תחל,  $12 \mu\text{l}$  של מים מעוקרים, ו- $15 \mu\text{l}$  של 2.0xMaster Mix RED ( $100, 1.5 \text{ mM } \text{MgCl}_2$ ) (Ampliqon, Genetech, Jerusalem, Israel). כביקורת שלילית הוכנה מבחנה עם כל חומרי התגובה, ללא c-DNA.

ראקציות ה-PCR בוצעו במכשיר PCR מסוג MJ Research PTR-200 Peltier Thermal Cycler (Waltham, MA, USA).

תוצרי ה-PCR הורצו בג'ל אגרוז לאישור גודל הגן, מוצו ונוקו בעזרת הערכה: BiONEER PCR washing kit (AccuPrep BiONEER, Daejeon, Korea) עפ"י הוראות היצרן.

## 2.5 ריצוף גנים ויראליים של תבדידי וירוס והשוואתם

כדי להבטיח את מהימנות התוצאות, נערך ריצוף של כל אחד משלושת הגנים, שמקורם בתבדידי הוירוס הנחקרים (NC, NSm ו-NSs), בשני כיוונים של ה-DNA הויראלי, מארבע מושבות שונות (מאותה הפקת RNA). הריצוף נערך בחברת Hy Laboratories (Rehovot, Israel) ע"י שימוש בתחלים האוניברסאליים המייצגים את הפרומוטרים SP6 ו-T7 הגובלים בשני צידי המחדר.

השוואת הרצפים נערכה בתוכנת Blast 2 sequences (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). נערכה השוואה בין רצפי הגנים של

התבדידים הישראליים, לבין רצף הגזע הברזילאי BR-01 (De Haan *et al.*, 1989; Kormelink *et al.*, 1992). במקרה של אי התאמה ברצפים שהתקבלו מאותו פלסמיד בכיוונים שונים, נבחר

הבסיס שזהה לתבדיד הברזילאי. השוואה של רצפים מרובים (multiple alignment) נערכה בתוכנת ClustalX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) בפורמט NEXUS. במקרה של אי התאמה

בין הרצפים של פלסמידים שונים, נבחר הבסיס שהופיע ברוב הפלסמידים. תרגום רצף הבסיסים לחומצות אמינו נעשה בתוכנת Translate tool של חברת ExPASy

(<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). רצפי חומצות האמינו של התבדידים הושוו זה לזה בתוכנת ClustalX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) בפורמט NEXUS.

רצף הבסיסים באזור הבין-גני הבלתי מקודד (Untranslated Intergenic region) של מקטע ה-S RNA (SIGH), נקבע לפי 4-5 רצפים שהתקבלו ממושבות שונות, ונשלחו לריצוף בחברת Hy Laboratories (Rehovot, Israel). במקרה של אי התאמה נבחר הבסיס שהופיע ברוב הפלסמידים. השוואת האזור הבין-גני של התבדידים הישראליים נעשתה מול מקטע זה בגזע הספרדי SPAIN-2 (NCBI GenBank Accession No. AY744480), שנמצא בעל זהות גבוהה לרצף התבדידים הישראליים (Tsompana *et al.*, 2005). ההשוואה התבצעה בתוכנת BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall, 1999).

## 2.6. אנליזה פילוגנטית

הקרבה הפילוגנטית של התבדידים הישראליים למספר גזעי וירוס מרחבי העולם נערכה על בסיס רצף חומצות האמינו של חלבון הנוקלאוקפסיד הויראלי (NC). ההשוואה נערכה באמצעות התוכנה MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

## 2.7. ריצוף מתקדם של הגנום המלא של TSWV

חלק זה של העבודה איננו כלול בתוכנית המחקר ועדין לא הושלם, אך בשל ההתקדמות הטכנולוגית הרבה שחלה בשנים האחרונות בשיטות הריצוף הוחלט לבחון האם בשיטות המתקדמות ניתן יהיה לקבל תמונה מלאה יותר של רצף הגנום המלא של גזעים נבחרים של TSWV כולל מפת ה-SNP (Single-nucleotide polymorphism) אשר יכולה ללמד אותנו על מידת השונות בגנום הויראלי הקיימת בכ"א מהתבדידים הנבדקים. לשם כך, כ-20 צמחי טבק הודבקו בגזע הבר או לחילופין בכ"א משני הגזעים שוברי העמידות של TSWV שימשו כצמחי מקור לניקוי חלקיקי וירוס. שלושת מקטעי ה-RNA הויראלי של כ"א משלושת הדוגמאות: תבדיד הבר (WT) ושני תבדידים שוברי עמידות הופקו מתוך חלקיקי הוירוס ונשלחו לבדיקת רצף מתקדם Deep sequencing בשיטה של Solid. בתהליך זה נחתך ה-RNA הויראלי למקטעים קצרים אליהם יחברו אדפטורים אשר יישמשו להגברת המקטעים בתהליך הכנת הספרייה של כ"א מהדוגמאות. כתוצאה מתהליך ההגברה כ"א מהספריות מתוכננת לכסות את כל הגנום הויראלי אלפי פעמים. בהמשך כ"א מהספריות מורצת ע"ג מכשיר ה-Solid.

## 3. בחינת מעורבותו של תריפס הקיקיון בהפצת TSWV

### 3.1. הקמת תרבית של תריפס הקיקיון.

נערכו מספר ניסויים בהם נבחן גידול התריפס בכלובים מחופים ברשת 50 מש או בבד כותנה אשר הוחזקו בחממה. נבחנו כלובים בגודל שונה. הכלובים אוכלסו עם פונדקאים שונים כגון פלפל, ליזיאנתוס, וורדים. כל הניסויים בהם נוסה הגידול בכלובים נכשלו. בשיחות עם אנטומולוגיה מפלורידה התברר כי גם שם ניכשל גידול התריפס במעבדה וזאת מסיבות בלתי ידועות. כמו כן כשלו ניסויים לגידול בבית רשת (חיפוי 50 מש) של צמחי פלפל בגיל שבעה עלים אשר אולחו עם תריפס קיקיון שנאסף מחלקת ליזיאנתוס שהייתה נגועה קשה. קודקודי הצמחים שהיו מעוותים ונשאו אוכלוסיה של התריפס נקטמו והועברו לבית הרשת. קודקודי הליזיאנתוס הונחו

בעציצי הפלפל וכתוצאה מהתייבשותם עברו פרטים של התריפס אל צמחי הפלפל וגרמו שם לעיוותים קשים אך תרבית תריפס הקיקיון לא שרדה לאחר מספר ימים.

**בשל העובדה כי לא עלה בידינו לקיים במעבדה תרבית של תריפס הקיקיון לביצוע ניסויי העברה של TSWV נאלצנו לחפש דרכים חלופיות בהם ניתן יהיה לעקוף את המכשול בגידול התריפס ולקיים ניסויי העברה מסודרים.**

**3.2. איסוף בוגרים של תריפס קיקיון מצמחי פלפל נגועים ב-TSWV**  
במנהרה עבירה במו"פ דרום נשתלו כ- 40 צמחי פלפל נגועים ב-TSWV מגזע הבר ומגזע שובר עמידות. הצמחים הראו סימני הדבקה ב-TSWV ונבדקו סרולוגית לאימות הימצאותו של TSWV. ניתור של הצמחים בצורה שוטפת ואיסוף של כלל אוכלוסיית התריפסים. במעבדה התבצע זיהוי של התריפסים ופרטים של תריפס הקיקיון נאספו אל כלובי עלים (כ-50 פרטים בכל כלוב אשר הונח ע"ג העלה של צמח הבוחן) צמחי פלפל (ראה תמונה ) או ליזיאנטוס בריאים למשך שלושה ימים. עם תום ניסוי העברה נאספו כלובי העלים והצמחים הועברו להמשך גידול בחממה להתפתחות סימני מחלה ולבדיקות סרולוגיות. לאחר כשלושה שבועות נלקחו דוגמאות מקודקודי הצמיחה לבדיקה סרולוגית בשיטה של ELISA.

**3.3. חשיפה של שתילי פלפל בריאים לצמחים נגועים ב-TSWV ומאוכלסים ב- תריפס הקיקיון**  
צמחי פלפל נגועים ב-TSWV אשר גודלו במנהרה העבירה במו"פ דרום ונתקפו בתריפס הקיקיון בצורה טבעית שימשו כמקור מידבק ופונדקאים לגידול תריפס קיקיון. אחת ל 3-4 ימים הונחו ארבעה מגשים המכילים שתילי פלפל (גידול אורגני) לא מרוססים או מטופלים (בתוך אדניות עם מים) בצמוד לשתילי המקור הנגועים בוירוס. תהליך זה נמשך במשך שלושה שבועות תוך כדי ניתור קפדני של אוכלוסיית התריפסים בתקופה בה זוהה אך ורק תריפס הקיקיון לפני הגעת תריפס הפרחים המערבי. עם תום ימי החשיפה למקור המדבק ותריפס הקיקיון נאספו הצמחים רוססו כנגד התריפס והועברו להמשך גידול בחממה להתפתחות סימני מחלה ולבדיקות סרולוגיות. לאחר שלושה שבועות מתקופת החשיפה נלקחו דוגמאות מקודקודי הצמיחה לבדיקה סרולוגית בשיטה של ELISA.

**3.4. שתילה של צמחי פלפל בצמוד לצמחי פלפל נגועים ב-TSWV ומאוכלסים בתריפס הקיקיון**  
כפי שתואר בסעיף הקודם, צמחי פלפל נגועים ב-TSWV אשר גודלו במנהרה העבירה במו"פ דרום ונתקפו בתריפס הקיקיון בצורה טבעית שימשו כמקור מידבק ופונדקאים לגידול תריפס קיקיון. בצמוד לצמחי המקור נשתלו צמחי פלפל (מגידול אורגני) על מנת לראות האם תריפס הקיקיון יוכל להעביר את TSWV אל צמחי הפלפל הצעירים. לאחר כחודש ממועד השתילה נלקחו דוגמאות עלים מהצמחים לבדיקה סרולוגית ל-TSWV.

## תוצאות:

### 1. סקר תפוצת TSWV בישראל

דגימות מצמחים חשודים, שנאספו מרחבי הארץ, נבדקו לנוכחות TSWV ע"י הדבקות לצמחי בוחן ובדיקות ELISA. ניתן לראות כי הוירוס נפוץ בכל רחבי הארץ (תמונה 1).

תמונה 1: תפוצת TSWV בישראל, כפי שנמצאה בסקר שנערך בשנים 2006-8. מסומן באדום - תבדידים שהצליחו לשבור עמידות בזני פלפל עמידים, הנושאים את הגן *Tsw*.



ע"פ תוצאות הסקר שנערך נמצא כי TSWV נפוץ בכל רחבי ישראל, והתפרצויות אקראיות שלו מתרחשות בגידולי פלפל בכל חלקי הארץ.

### 1.1 אפיון ביולוגי ובדיקת טווח מאכסנים של תבדידי TSWV

התוצאות שנצפו לגבי רוב התבדידים הראו, כי ניתן היה להדביקם מכאנית לרוב צמחי הבוחן. צמחי הבוחן השונים הגיבו באופן דומה להדבקה בתבדידים השונים (טבלה 1). חלק מצמחי הבוחן הראו סימנים מקומיים: טבעות קונצנטריות ב-*D. stramonium* ולעיתים ב-*C. annum*, נקפים נקרוטיים ב-*G.*



*N. glutinosa*, *globosa*, *P. hybrida* ולעיתים גם ב-*N. benthamiana*. חלק מצמחי הבוחן הראו סימני מחלה סיסטמיים: הצהבה ועיוות בעלים עליונים ב-*D. stramonium*, *C. annuum* ו-*N. benthamiana*, הצהבה בעלים עליונים ב-*E. sonchifolia*, הצהבה וברוזה בעלים ובעורקים ב-*L. esculentum*. לעיתים נצפתה נקרוזה סיסטמית גם ב-*N. glutinosa*.

**טבלה 1:** סימני מחלה אופייניים שנגרמו בהדבקה מכאנית עם תבדידי של TSWV. סימנים שכיחים מודגשים.

| Host plant            | Disease symptoms         |
|-----------------------|--------------------------|
| <i>C. annuum</i>      | SW, SN, SY, W, N, RS     |
| <i>L. esculentum</i>  | B, SY, N                 |
| <i>N. benthamiana</i> | SW, W, SY, N, LL, SN     |
| <i>N. glutinosa</i>   | LL, N, W, SN             |
| <i>E. sonchifolia</i> | SY, SW, W                |
| <i>G. globosa</i>     | LL, SW, N, W, SY, SN     |
| <i>D. stramonium</i>  | RS, W, SN, SW, LL, N, SY |
| <i>P. hybrida</i>     | LL                       |

**מקרא:**

B – Bronzing; SN – Systemic Necrosis; LL – Local lesions; SW – Systemic Warp;  
N – Necrosis; SY – Systemic Yellow; RS – Ringspots; W – Wilting

## 1.2. סריקה לזיהוי גזעי וירוס שוברי עמידות באמצעות הדבקת זני פלפל עמידים

כל תבדיד אולח מכאנית ל-6 זני פלפל עמידים (צמח אחד מכל זן), הנושאים את הגן *Tsw*. כביקורת אולח פלפל רגיש וצמח הבוחן *N. glutinosa*. האילוח התבצע עם הופעת 4-6 עלים אמיתיים ראשונים בצמח. הניסוי נערך בתא גידול כמתואר בשיטות וחומרים. סימני מחלה נבדקו במועדים שונים לאחר ההדבקה (2dpi, 7dpi, 14dpi, 28dpi). נוכחות הוירוס אושרה בבדיקת ELISA של עלים מודבקים ועלים עליונים (לא-מודבקים) במועדים 14dpi, 30dpi. הדבקת תבדידים רגילים על צמחי פלפל עמידים, הנושאים את הגן לעמידות *Tsw*, הובילה כמצופה לקבלת תגובה היפרסנסטיבית (HR) על העלים המודבקים, שהתבטאה בנקפים נקרוטיים מקומיים (local lesions) ולרוב לוותה בנשירת אותם עלים. לעומת זאת, בצמח פלפל רגיש התפשט הוירוס באופן סיסטמי ועבר מהעלים המודבקים אל חלקי הצמח העליונים, שם הוא גרם לעיוות והצהבה (תמונה 2). מבין התבדידים שנבדקו, נמצאו מספר תבדידים שגרמו לשבירת עמידות בחלק מהזנים העמידים (טבלה 2). הדבקה בתבדידים אלו נתנה תגובה מקומית של נקפים נקרוטיים מקומיים, בחלק מהמקרים נקפים אלו היו דיפוזיים. לאחר מספר שבועות (2-4 שבועות) הופיעה נקרוזה סיסטמית בקודקוד הצמח ובגבעול, שלעיתים גרמה להתמוטטות כללית של הצמח (תמונה 2). התבדידים

שהצליחו להתגבר על העמידות בצמחי הפלפל שנבדקו, הראו כושר שבירה שונה. תבדידים מספר 4 ו-21 הצליחו לשבור עמידות בכל הזנים שנבדקו, תבדיד מספר 20 הצליח לשבור עמידות ברוב הזנים (6/7). לעומת זאת, שאר התבדידים הצליחו להתגבר על העמידות, המוקנית ע"י הגן Tsw, רק בחלק קטן מהזנים טבלה 2.

תמונה 2: צמח עמיד שנשברה בו עמידות. נראית נקרוזה סיסטמית המתפשטת מהעלים המודבקים אל קודקוד הצמח.



טבלה 2: זיהוי תבדידי TSWV בעלי כושר שבירת עמידות בזני פלפל עמידים הנושאים את הגן Tsw.

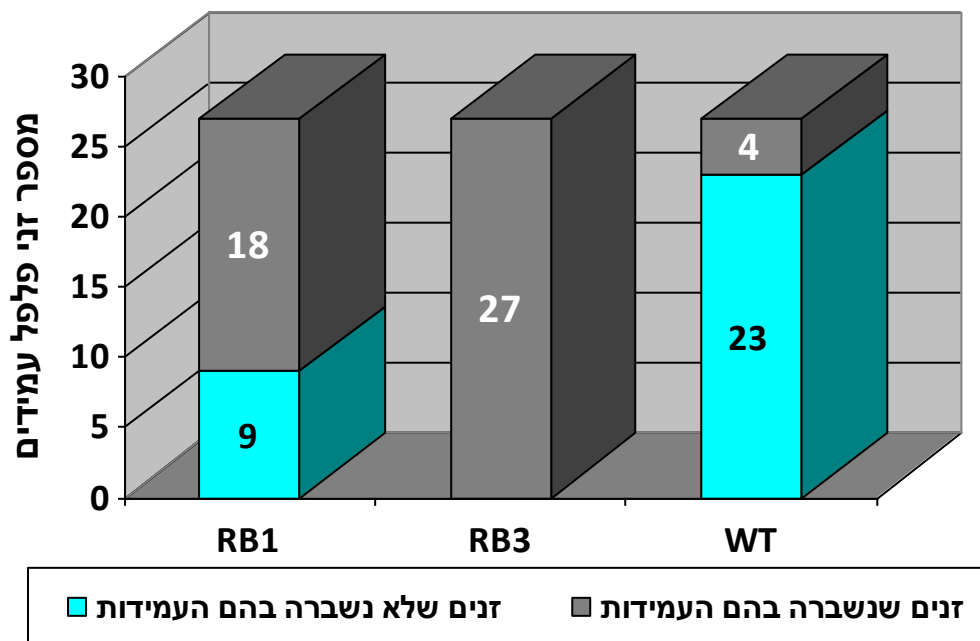
| מספר התבדיד |    |    |    |    |    |   | זן עמיד                 |
|-------------|----|----|----|----|----|---|-------------------------|
| 46          | 23 | 21 | 20 | 18 | 16 | 4 |                         |
| -           | -  | +  | +  | -  | +  | + | <b>Fiona</b>            |
| -           | -  | +  | +  | -  | -  | + | <b>Inbar</b>            |
| -           | -  | +  | +  | -  | +  | + | <b>Bravo</b>            |
| -           | +  | +  | +  | -  | -  | + | <b>Shipon</b>           |
| -           | -  | +  | +  | -  | -  | + | <b>Alegria</b>          |
| -           | -  | +  | +  | -  | -  | + | <b>Romans</b>           |
| -           | -  | +  | -  | -  | -  | + | <b>6525</b>             |
| +           |    | +  |    | -  |    | + | <b>307</b>              |
| +           | +  | +  | +  | +  | +  | + | <b>Maor – sensitive</b> |

[+] נגוע סיסטמית [-] לא נגוע סיסטמית [ ] לא נבדק

על בסיס תוצאות הסריקה המתוארת לעיל נבחרו שלושה תבדידים להמשך העבודה (מהם שניים שוברי עמידות). תבדיד מס' 4, שמקורו מזן פלפל רגיש מרעננה, כונה RB1 והתקבל לאחר מספר הדבקות חוזרות על זני פלפל עמידים בתנאי מעבדה. תבדיד מס' 21 כונה RB3, ובודד מצמח פלפל עמיד מהזן Inbar שנדבק באופן טבעי בבית גידול במושב תדהר. תבדיד מס' 18 בודד מזן פלפל רגיש, שנדבק באופן טבעי בבית גידול במושב עין יהב, וכונה WT. תבדיד זה לא שבר עמידות בסריקה הראשונית, אך נמצא מאוחר יותר כבעל כושר שבירה במספר זנים קטן.

בכדי לשלול את האפשרות שהייתה תערובת של תבדידי TSWV בעלי אופי שבירה שונה בדוגמת המקור, והיא זו שגרמה להבדלים בשבירת העמידות בניסויים השונים, בודדו תבדידים טהורים מכל אחת מתרביות המקור כמתואר בשיטות וחמרים. שלושה תבדידים מייצגים נבחרו להמשך האפיון (RB1, RB3 ו-WT). תבדידים אלו לא נמצאו שונים ביולוגית, בטווח צמחי הבוחן שהצליחו להדביק, ובאופי סימני המחלה אך הם היו שונים ביכולתם לשבור את עמידות 27 הזנים אשר שמשו בדיקה (תמונה 3)

תמונה 3: השוואת כושר שבירת העמידות של שלושת התבדידים שנבדקו על סדרת זנים עמידים, לפי מספר זנים.



### 1.3. השפעת טמפרטורה גבוהה על יכולת TSWV לשבור עמידות בזני פלפל עמידים

בדיקה של שבירת עמידות ע"י שלושת התבדידים בשני משטרי טמפרטורה ( $25^{\circ}\text{C}$  ו- $35^{\circ}\text{C}$ ), התבצעה פעמיים, בשני ניסויים בלתי תלויים. בשני הניסויים, נצפה הבדל ברור באופי סימני המחלה שהופיעו בצמחים מודבקים בטמפרטורות השונות: הצהבה סיסטמית ועיוות בעלים הקודקודיים ב- $35^{\circ}\text{C}$ , לעומת נקרוזה סיסטמית בעלים עליונים ובגבעול, ולעיתים גם התמוטטות ב- $25^{\circ}\text{C}$ . בנוסף לכך נמצא כי צמחים ששהו ב- $35^{\circ}\text{C}$  כחודשיים ולאחר מכן הועברו ל- $25^{\circ}\text{C}$ , החלו לפתח נקרוזה בעלים עליונים כשבוע לאחר

ההעברה. תוצאות אלו מראות, כי לטמפרטורה יש השפעה ברורה על תגובת העמידות ואופי סימני המחלה הנגרמים ע"י הוירוס. במחקרים קודמים שנעשו (Moury *et al.*, 1998; Roggero *et al.*, 1996), לא נצפו שינויים באופי סימני המחלה בטמפרטורות השונות, שם דווח על הופעת נקרוזה גם בטמפרטורה של 32°C בצמחי פלפל עמידים (*C. chinense*).

מבחינת טווח שבירת העמידות של התבדילים השונים, נראה כי טמפרטורה גבוהה (35°C) הגדילה מעט את טווח שבירת העמידות של תבדיל ה-WT בשני הניסויים, ובניסוי השני נמצא אפקט זה גם בתבדיל RB1. השפעת התוצאות שהתקבלו אינן מצביעות על השפעה דרמטית של הטמפרטורה על יציבות העמידות, זאת בניגוד לתוצאות במחקר שהתבצע ע"י Moury *et al.* (1998) נראה באופן ברור, כי שהייה של הצמחים בטמפרטורה מתמשכת של 32°C הגדילה את טווח שבירת העמידות של התבדילים.

## 2. אפיון מולקולארי של תבדילי הוירוס

כדי לאפיין הבדלים אפשריים בין התבדילים (RB1, RB3 ו-WT) ברמה המולקולארית, שובטו 3 גנים ויראליים: הגן המבני NC המקודד לחלבון המעטפת (Nucleocapsid), בגודל 777nt, והגנים הבלתי מבניים NSm המקודד לחלבון התנועה, בגודל 768nt, ו-NSs המקודד לחלבון בגודל 1395nt. בנוסף, שובט האזור הבלתי מקודד (SIGR) שבין הגנים במקטע ה-S RNA, שיתכן ומשפיע על ביטוי הגנים בצמח (Qiu *et al.*, 1998). השוואת הרצפים נעשתה ברמת הבסיסים וגם ברמת חומצות האמינו. בנוסף, מופו אתרי החיתוך בגן ה-NSs, ונערכה אנליזה פילוגנטית של חלבון המעטפת הויראלי, בהשוואה לגזעים שונים של הוירוס ממקומות שונים בעולם.

### 2.1. השוואת רצף הבסיסים

נצפו אחוזי זהות גבוהים (99%) בין רצפי הגנים (NC, NSm, NSs) של שלושת התבדילים הישראליים, ואחוזי זהות נמוכים יותר בין הגנים של תבדילים אלו לבין הגנים של הגזע הברזילאי BR-01. באזור שבין הגנים (SIGR) במקטע ה-S RNA, נצפו אחוזי זהות גבוהים (97-99%) בין שלושת התבדילים הישראליים לעצמם, ואחוזי זהות משתנים (96-98%) בין תבדילים אלו לגזע הספרדי SPAIN-2 (Accession No. AY744480; Tsompana *et al.*, 2005) התבדיל RB3 שונה משמעותית משאר התבדילים הישראליים בבסיסים מס' 194-202, וגם מהתבדיל הספרדי. לא נמצאו הבדלים ברצף חומצות האמינו של גן ה-NC של שלושת התבדילים הישראליים, אך רצף חומצות האמינו שלהם היה שונה ב-5 חומצות אמינו, מרצף חומצות האמינו של התבדיל הברזילאי (לא מוצג).

רצף חומצות האמינו של הגן NSm בתבדילים WT ו-RB3 היה זהה, ושניהם נבדלו בחומצת אמינו אחת מהתבדיל RB1 (החלפה של Isoleucine (I) ב-Valine (V) בעמדה מספר 86, (שתיהן אליפטיות) (לא מוצג). רצף חומצות האמינו של גן ה-NSm בשלושת התבדילים הישראליים היה שונה ב-5 חומצות אמינו, בהשוואה לרצף חומצות האמינו של התבדיל הברזילאי.

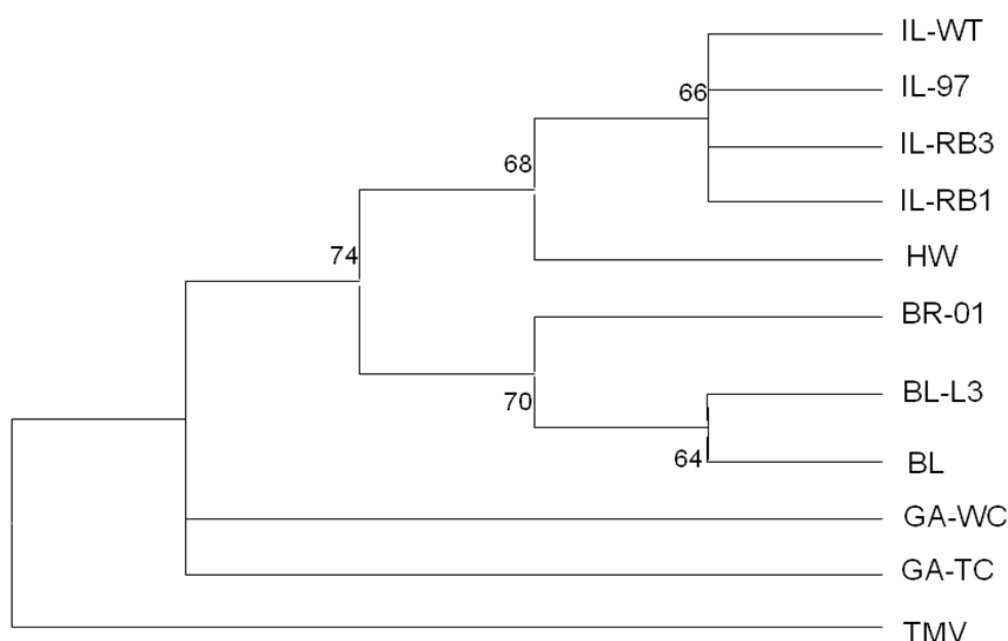
רצף חומצות האמינו של חלבון ה-NSs של תבדיל ה-WT נמצא שונה מ-RB1 ו-RB3 בעמדה מספר 393, שם חומצת האמינו R (Arginine), הוחלפה ב-K (Lysine) בתבדיל ה-WT, שתיהן בסיסיות. התבדיל RB1 נמצא שונה מ-WT ו-RB3 בעמדה מספר 290, שם חומצת האמינו V (Valine) הוחלפה

ב-I (Isoleucine) ב-RB1, שתיהן אליפטיות. התבדיל RB3 נמצא שונה מ-WT ו-RB1 בעמדה מספר 139, שם חומצת האמינו R (Arginine) הוחלפה ב-Q (Glutamine) ב-RB3, החלפה של חומצת אמינו בסיסית בכזו עם שייר אמידי. בנוסף נמצאו שינויים משמעותיים ברצף חומצות האמינו של גם ה-NSs בתבדילים הישראליים לעומת שה של התבדיל הברזילאי. שינויים אלו התרכזו בארבעה מוקדים, בעמדות מספר 54-72, 235-238, 336-343 ו-350-356 (לא מוצג).

## 2.2. אנליזה פילוגנטית

בתמונה 4, ניתן לראות כי עפ"י רמת הקרבה הפילוגנטית יוצרים התבדילים המשווים שלוש קבוצות. האחת כוללת את התבדילים הישראליים, שקרובים ביותר לתבדיל מהוואי. השניה כוללת את התבדילים הבולגריים והברזילאים, ובשלישית שני התבדילים הגיאורגיים (Georgia).

**תמונה 4:** אנליזה פילוגנטית המראה מרחקים גנטיים בין תבדילים שונים של TSWV, עפ"י רצף חומצות האמינו של חלבון המעטפת הויראלי (NC).



**מקרא:** IL-Israel, HW-Hawaii, BR-Brazil, BL-Bulgaria, GA-Georgia

## 2.3. פיתוח שיטה מולקולארית לזיהוי מהיר של תבדילי וירוס שוברי עמידות בפלפל, באמצעות אנזימי הגבלה (RFLP analysis)

לצורך פיתוח השיטה, נבחנו מפות החיתוך של רצפי ה-DNA של גן ה-NSs משלושת התבדילים, כדי לנסות לאפיין אנזים הגבלה, שיאפשר זיהוי מולקולארי של תבדילים שוברי עמידות. נערך מיפוי של אנזימים המכילים אתר חיתוך יחיד בגן (1 cutters). מיפוי אתרי החיתוך הראה הבדלים בדגם החיתוך

של הגנים NSs ו-NSm. מכיוון שהגן NSs "חשוד" כגורם העמידות המשתתף בהשראת מנגנון העמידות (Margaria *et al.*, 2007), ניסינו להשתמש בו לצורך האבחון.

טבלה 3: אנזימי הגבלה החותכים באופן שונה את רצף הנוקלאוטידים של הגנים הלא-מבניים NSs ו-NSs בשלושת התבדדים (RB1, RB2, WT).

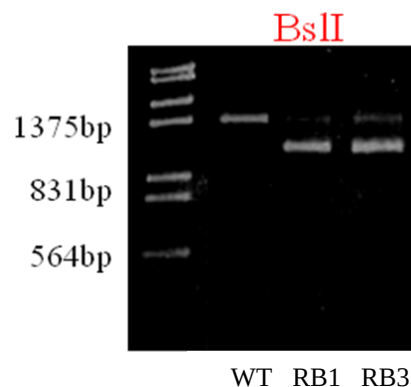
| שם הגן      |      | שם התבדד |
|-------------|------|----------|
| NSs         | NSm  |          |
| -           | BsII | WT       |
| EcoNI, BsII | MmeI | RB1      |
| EcoNI, BsII | MmeI | RB3      |

מיפוי אתרי החיתוך של ה-cDNA המייצג את הגן NSs של שלושת התבדדים הראה כי אנזימי ההגבלה BsII ו-EcoNI חותכים את רצף הגן של התבדדים שוברי העמידות (RB1, RB3), ולא את רצף הגן של תבדד ה-WT. לעומת זאת, נמצא כי אנזים ההגבלה TaqII חותך את רצף הגן של תבדד ה-WT ולא את רצף הגן של התבדדים שוברי העמידות RB1 ו-RB3 (לא מוצג).

#### 2.4 שימוש ב-RT-PCR לזיהוי תבדדים שוברי עמידות בצמח

הגן NSs (משלושת התבדדים) התקבל בעזרת RT-PCR על תבנית RNA ויראלי, שמקורו ב-RNA כללי, שהופק מצמחים נגועים. תוצרי התגובה עברו ניקוי מג'ל אגרוז, ונחתכו עם אנזים ההגבלה BsII (תמונה 5). תוצאות ניסוי זה מאשרות את התוצאות המוצגות לעיל, שהתקבלו מחיתוך של גנים משובטים. בנוסף לשלושת התבדדים הנ"ל, נבדק תבדד שובר עמידות נוסף (מס' 46), ונצפה דגם חיתוך זהה לזה של התבדדים שוברי העמידות RB1 ו-RB3.

תמונה 5: הרצת תוצרי חיתוך עם האנזים BsII של RT-PCR של גן NSs משלושת התבדדים (RB1, RB3, WT).



### 3. בחינת מעורבותו של תריפס הקיקיון בהפצת TSWV

למרות שלא עלה בידינו לקיים במעבדה תרבית של תריפס הקיקיון לביצוע ניסויי העברה של TSWV נערכו מספר ניסויים בהם נאספו בוגרים של תריפס הקיקיון מצמחי פלפל נגועים ב-TSWV ושימשו לאילוח שתילי פלפל או ליזאינתוס צעירים בעזרת כלובי עלים לצורך הזנת ההדבקה (ראה סעיף 3.2 בשיטות וחומרים).

- תוצאות ניסויי החשיפה של שתילי פלפל בריאים לצמחים נגועים ב-TSWV ומאוכלסים ב- תריפס הקיקיון (ראה סעיף 3.3 בשיטות וחומרים) (תמונה 6) היו שליליות.
- צמחי פלפל בריאים שנשתלו בצמוד לצמחי פלפל נגועים ב-TSWV ומאוכלסים בתריפס הקיקיון לא נדבקו ב-TSWV. (ראה סעיף 3.4 בשיטות וחומרים) (תמונה 7)

**בסיכום של כל ניסיונות העברה השונים של TSWV באמצעות תריפס הקיקיון אשר במהלכם נבדקו סרולוגית כ- 600 צמחים לא זוהה צמח אפילו אחד אשר נדבק ב-TSWV כאשר תריפס הקיקיון שימש כוקטור.**

תמונה 6: חשיפה של מגשים עם שתילי פלפל לצמחי מקור נגועים ב-TSWV ומאוכלסים בתריפס הקיקיון



תמונה 7: שתילה של צמחי פלפל בצמוד לצמחי מקור נגועים ב-TSWV ומאוכלסים בתריפס הקיקיון





## דיון

אנליזה פילוגנטית של התבדידים הישראליים מראה זהות ברצף חומצות האמינו בחלבון המעטפת הויראלי של תבדידים אלו והרצף של תבדיד TSWV שאופיין בישראל ב-1997. בנוסף, ניתן לראות כי התבדידים הישראליים קרובים יותר לתבדיד שמקורו בהוואי, ופחות לתבדידים שמקורם באירופה, מה שיכול להצביע על מקור הוירוס שהגיע לישראל.

רמת הזהות ברצף הבסיסים של הגנים NC, NSm, NSs בשלושת התבדידים הישראליים הייתה גבוהה מאוד (99%). הבדלים אלו כללו שינוי של חומצת אמינו אחת בחלבון התנועה (NSm), ו-3 שינויים בחלבון ה-NSs בין שלושת התבדידים.

ע"פ מנגנון ה-gene-for-gene, ישנה אינטראקציה ישירה או עקיפה בין תוצרי הגן לעמידות בצמח (R) לגן לא-וירולנטיות שמקורו בפתוגן (Avr) המובילה לשרשרת סיגנלים המפעילים את התגובה לעמידות בצמח (Kiraly *et al.*, 2007). התפקיד המשוער של חלבון ה-NSs, הוא בתהליכי השתקת הגנים (gene silencing) בצמחים נגועים ב-TSWV (Whitfield *et al.*, 2005), והוא "נחשד" כגן הא-וירולנטי המשרה את תגובת העמידות בצמחי פלפל עמידים, הנושאים את הגן *Tsw* (Margaria *et al.*, 2007). נמצאה חומצת אמינו אחת בלבד שמבדילה בין התבדידים RB1 ו-RB3 שוברי העמידות לתבדיד ה-WT (החלפה של ארגינין בליזין). התבדיד RB3 נבדל בחומצת אמינו אחת מ-RB1 ומ-WT (החלפה של חומצת אמינו בסיסית בכזו עם שייר אמידי), מה שיכול להיות קשור ליכולת שבירת העמידות הגבוהה שלו. למרות שהשוני קטן הרי שבמערכות אחרות שנחקרו נמצא שגם שינוי בחומצת אמינו אחת עשוי לגרום לשינוי מבני בחלבון, ולהשפיע על יכולת הקישור בין תוצר הגן לעמידות (*Tsw*) לבין תוצר



הגן הא-וירולנטי (NSs) (כנראה NSs), מה שיכול להסביר את ההבדל ביכולת התבדידים לשבור את העמידות. ממצאינו מראים כי ברצף הבין-גני במקטע ה-RNA S, שכנראה קשור בבקרה על ביטוי הגנים NC ו-NSs, ישנו שינוי ב-9 חומצות אמינו בין התבדיד RB3 לשני התבדידים האחרים. התבדיד RB3 נלקח מפלפל עמיד בשטח, והיה האגרסיבי ביותר באופן עקבי לאורך כל הניסויים, הן במספר הזנים שאת עמידותם שבר, והן בחומרת סימני המחלה. התבדידים שוברי העמידות RB1 ו-RB3 נבדלים זה מזה ב-16 בסיסים, לעומת זאת, תבדיד ה-WT נבדל מהתבדיד RB1 רק ב-5 בסיסים. יתכן והשינויים באזור הבקרה בעלי משמעות ביכולת הוירוס לשבור עמידות בזני פלפל עמידים, אך ע"פ הממצאים לא נראה שינוי עקבי המבדיל את שני התבדידים שוברי העמידות מתבדיד ה-WT. (Margaria et al. (2007 בדקו את האזור הבין-גני במקטע זה, והשוו בין תבדידים שוברים עמידות לתבדיד ה-WT. ממצאיהם לא הראו הבדל עקבי בין תבדידים שוברי עמידות לתבדיד ה-WT, ולכן הסיקו כי מוטציות במקטע זה לא קשורות לשבירת העמידות.

דגם החיתוך שהתקבל משלושת התבדידים מראה כי מספר אנזימי הגבלה חותכים את רצף הבסיסים של הגנים הלא-מבניים NSm ו-NSs, ומאפשרים להבחין תיאורטית בין שני התבדידים שוברי העמידות לבין תבדיד ה-WT. בדיקה בפועל נעשתה ע"י שימוש באנזים BslI החותך את גן ה-NSs של התבדידים שוברי העמידות (RB1 ו-RB3), אך לא של תבדיד ה-WT. על פניו נראה כי אנזים זה מאפשר להבדיל מולקולארית בין תבדידים שוברי עמידות לתבדיד ה-WT, אך יש צורך בחיתוך של תבדידים נוספים, שוברי עמידות ו-WT, בכדי לבסס את הטענה. שיטה זו יכולה לשמש ככלי עזר לבחינת יכולת שבירת העמידות של תבדיד חדש, במקביל לבדיקה ביולוגית על זני פלפל עמידים.

חלק נוסף אשר יעשה שלא במסגרת התוכנית (ראה סעיף 2.7) אשר יוכל לסייע לנו בהמשך המחקר לקבל תמונה רחבה יותר של כלל הגנום הויראלי כולל יכולת ההשתנות שלו SNP במטרה ללמוד על השונות בין תבדיד הבר (WT) לתבדידים שוברי עמידות ויכולת ההשתנות הגבוהה של TSWV. בשלב הזה בהיסמך על תוצאות ניסויי העברה של TSWV באמצעות תריפס הקיקיון ובניגוד לפרסום קודם המופיע בספרות לא נמצאה הוכחה לאפשרות שתריפס הקיקיון מאפשר העברה TSWV. אך על מנת להסיר כל ספק בנושא זה, אנחנו מתכוונים לבצע חזרות נוספות לניסויי העברה גם בשנה הבאה מחוץ למסגרת התוכנית הנוכחית.

השפעת טמפרטורה גבוהה על יכולת TSWV לשבור עמידות בזני פלפל עמידים: נצפה הבדל ברור באופי סימני המחלה שהופיעו בצמחים מודבקים בטמפרטורות השונות: הצהבה סיסטמית ועיוות בעלים הקודקודיים ב-35°C, לעומת נקרוזה סיסטמית בעלים עליונים ובגבעול, ולעיתים גם התמוטטות ב-25°C. נמצא כי לטמפרטורה יש השפעה ברורה על תגובת העמידות ואופי סימני המחלה הנגרמים ע"י הוירוס. כמו כן, נראה כי טמפרטורה גבוהה (35°C) הגדילה מעט את טווח שבירת העמידות של תבדיד ה-WT. נראה באופן ברור, כי שהייה של הצמחים בטמפרטורה מתמשכת של 32°C הגדילה את טווח שבירת העמידות של התבדידים.

נקודה מעניינת נוספת היא העובדה היא כי זני עגבנייה הנושאים עמידות המוקנית ע"י הגן SW5 עדין מצליחים לעמוד בהדבקה של TSWV. יתכן והדבר נעוץ בעובדה כי עדין אין שימוש רחב בזני עגבנייה

עמידים ולכן עדין לא נוצרו גזעים בעלי יכולת לשבור את העמידות בעגבנייה. יתכן וכאשר יעשה שימוש נרחב יותר בזני עגבנייה העמידים תיוצר סלקציה של גזעים בעגבנייה כפי שהדבר מתרחש כיום בפלפל. יש להתייחס לתוצאות הסקר (תפוצה בכל רחבי הארץ).

## **סיכום עם שאלות מנחות**

### **מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה**

1. סקר תפוצת המחלה באזורים החקלאיים של ישראל 2. אפיון ביולוגי של תבדידי וירוס מאזורים שונים 3. איתור תבדידים שוברי עמידות ואיפיונם 4. בחינת מעורבותו של תריפס הקיקיון בתפוצת TSWV.

### **עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה שאליה מתייחס הדו"ח**

נערך אפיון מולקולרי של תבדידי וירוס שוברי עמידות והגזע הרגיל. לצורך האפיון שובטו הגנים NC, NSs, NSm, וכן האזור הבינגני (SIGR) של קומפוננט ה-RNA הגנומי S-RNA. מידת הזהות ברצף הבסיסים של התבדידים שוברי העמידות לתבדיד הרגיל הגיעה ל-99%. לא נמצאו הבדלים ברצף חומצות האמינו של הגן NC של שלושת התבדידים הישראליים אך הוא היה שונה ב-5 חומצות אמינו מהתבדיד הברזילאי. רצף ח. האמינו של הגן NSm בתבדידים WT ו-RB3 היה זהה ושניהם נבדלו בח' אמינו אחת מהתבדיד RB1. גן ה-NSm של שלושת התבדידים הישראליים נבדל גם הוא בחמש ח' אמינו מהגזע הברזילאי. רצף ח' האמינו של הגן NSs בתבדיד הרגיל נמצא שונה מרצף שני הגזעים שוברי העמידות בח' אמינו בעמדה 393. תבדיד RB1 שונה מ-WT ו-RB3 בעמדה 290. RB3 שונה מ-WT ו-RB1 בעמדה 139. פותחה שיטה מולקולארית לזיהוי התבדידים שוברי העמידות.

### **המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי ישום המחקר והמשכו**

מחקר זה מצביע לראשונה על קיומם של גזעי TSWV בישראל השוברים את עמידותם של צמחי פלפל הנושאים את הגן Tsw לעמידות כנגד הוירוס. עד כה טרם התרחשו מגפות נרחבות כתוצאה מהופעתם של גזעים אלו. השוואת רצף הבסיסים של שלושה גנים ויראליים בתבדידים שנבחנו מצביע על כך שהתבדידים שוברי העמידות אינם בעלי זהות גנטית והם נוצרים באופן מקומי. ההבדלים במעקב ח' האמינו של הגן NSs תומכת באפשרות שגן ויראלי זה הוא ה-elicitor המפעיל את הגן הצמחי לעמידות. בשלב זה אין לתבדידים שוברי העמידות יתרונות על פני הגזע הרגיל ולכן הם אינם יוצרים בשלב זה איום אפידמיולוגי על ענף הפלפל. אך מגמת ההתפשטות של הגזעים העמידים ברורה ולעיתים מתקבלת אף פגיעה כלכלית לא מבוטלת. במידה ומגמה זו תימשך גם בשנים הבאות יתכן והגזעים שוברי העמידות יתבססו בטבע כך שלמעשה לא ניתן יהיה להשתמש בצמחים עמידים בעלי עמידות HR המוקנית ע"י הגן Tsw. יש לפיכך חשיבות רבה באיתור מקורות עמידות חלופיים כנגד TSWV.

### **הבעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים שיווקיים ואחרים);**

#### **התייחסות המחקר אליהם**

בשלב הזה בהיסמך על תוצאות ניסויי העברה של TSWV באמצעות תריפס הקיקיון ובניגוד למצוין בספרות לא נמצאה הוכחה ליכולתו כשרו של תריפס הקיקיון לשמש וקטור ל-TSWV. על מנת להסיר כל ספק בנושא זה, אנו מתכוונים לבצע ניסויי העברה נוספים, גם בשנה הבאה שלא במסגרת התוכנית הנוכחית.

כמו כן אנו ממליצים על בניית תכנית מחקר חדשה המכוונת לזיהוי מקורות עמידות חדשים כנגד TSWV שאינם מבוססים על עמידות מטיפוס HR.

### **האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח**

Kobo, H., Gera, A., Epel, B., Spiegel, S., Lachman, O., Pearlsman, M., Beckelman, E., Sobolev, I., and Antignus, Y. 2008. Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in commercial pepper cultivars carrying the *Tsw* gene. *abstracts of the 28th Meeting of the Israeli Phytopathological Society*.

Kobo, H., Gera, A., Epel, B., Spiegel, S., Lachman, O., Pearlsman, M., Beckelman, E., Sobolev, I., and Antignus, Y. 2008. Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in commercial pepper cultivars carrying the *Tsw* gene. Abstracts of the 3<sup>rd</sup> Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV). August 20<sup>th</sup>-23<sup>th</sup>, Lubljana, Slovenia.

Antignus, Y., Kobo, H., Lachman, O., Pearlsman, M., Bekelman, L., Apel, B., Gera, A. (2009). The emergence of TSWV resistance breaking isolates in pepper crops. Is it a reason for concern? *Sade Va'Yerek*, Issue 12, September, October 2009, P45-49. (in Hebrew).

כמו כן הופצו הממצאים בכנסים עם חקלאים ומדריכים והומלץ על דרכים לצמצום התופעה של הופעת גזעים שוברי עמידות.