

תוכן עניינים

1.....תקציר מדעי

2.....דף פותח לדו"ח

3.....מבוא

3.....מטרות

3.....עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

14.....דיון

17.....נספחים

1. תקציר מדעי

מחלת צהבון הגזר משויכת עם החיידק ליבריבקטר, המועבר על ידי פסילת הגזר, גורמת לשינויים התפתחותיים בגזר הפוגעים קשות באיכות וכמות היבול המסחרי. הממשק הטיפולי הקיים כולל ריסוסים מרובים של חומרים רעילים כנגד פסילת הגזר, ויעילותו מוטלת בספק, במיוחד במזרעים מאוחרים. בתכנית זו בחנו את השינויים ההורמונליים המתרחשים בצמח בעקבות ההדבקה בחיידק ובעזרת שימוש במוסטי צמיחה שונים ניסינו להפחית את הופעת תסמיני המחלה ו/או את חומרתם. בניסויים שבוצעו הראנו שהדבקה בחיידק ליבריבקטר מובילה לשינוי הן בביטוי גנים המעורבים בביוסינתזה וחישה של הורמונים צמחיים והן בשינוי ברמת ההורמונים עצמם בצמח, כגון ציטוקינין חומצה סליצילית וחומצה ג'סמונית. תוצאות אלו תומכות בהיפותזה המרכזית של הצעת המחקר ומספקות הסבר חלקי להופעתם של תסמיני המחלה היחודיים. ניסויי חממה ושדה בהם בחנו יישום של מווסטי צמיחה שונים, בריכוזים שונים ובדרכי יישום שונות לא הובילו להפחתה הדירה ומשמעותית של תסמיני המחלה. יחד עם זאת, כן נראה שניתן להשפיע על מסלול ההתפתחות הטבעי של הגזר על ידי יישום של מווסטי צמיחה בריסוס. שינויים התפתחותיים מיקרוסקופיים המושרים על ידי החיידק נבחנו תחת מיקרוסקופ במטרה לזהות את התפתחות המחלה בשלב מוקדם. זהו מספר תופעות המאפיינות הדבקה בליבריבקטר כגון, פריצה של מריסטמות חיקיות, ריבוי עלים, עלים "תאומים" והאטת התפתחות האשרוש. מבין אלו, הופעת עלים "תאומים" היה התסמין הברור והמוקדם ביותר שניתן היה לזהות. תסמין זה נבחן גם בניסוי שדה בו האילוח התבצע בתנאים טבעיים ונמצא כי על אף ביטוי תסמין עלים "תאומים", הוא איננו נמצא באסוציאציה הדוקה דיה עם נוכחות גורם המחלה ולכן אינו מתאים לשמש כסמן דיאגנוסטי. לסיכום, שימוש במווסטי צמיחה יכול להשפיע על הופעת תסמיני המחלה והתפתחות הגזר, יחד עם זאת, לא על בידינו לפתח פרוטוקל יישום הדיר להתמודדות עם המחלה, לכך ידרש המשך מחקר.

דו"ח לתכנית מחקר מספר 20-02-0117

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

יישום מווסתי צמיחה להתמודדות עם מחלת צהבון הגזר

Using plant growth regulators to manage carrot yellows disease symptoms

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

אופיר בהר	המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ראשון לציון
מיה בר	המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ראשון לציון
יהושע קליין	המחלקה למשאבי טבע, מינהל המחקר החקלאי, ראשון לציון

Ofir Bahar, Plant Pathology and Weed Research, ARO, Volcani Center, Rishon LeZion 5025001.

E-mail: ofirb@agri.gov.il

Maya Bar, Plant Pathology and Weed Research, ARO, Volcani Center, Rishon LeZion 5025001.

E-mail: mayabar@agri.gov.il

Josh Klein, Natural Resources, ARO, Volcani Center, Rishon LeZion, 5025001.

E-mail: vcjosh@agri.gov.il

3. גוף דוח המחקר

א. מבוא

תסמיני צהבון הגזר הכוללים איבוד שלטון קודקודי (אש"ק) וצימוח עלוותי מוגבר מזכירים שינויים פנוטיפיים המושפעים מהורמונים צמחיים. על מנת ללמוד טוב יותר על הקשר שבין תסמיני המחלה והשינויים ההורמונליים המתחוללים בצמח המודבק נאפיין במחקר זה את השינוי ההורמונלי שמתרחש עם ההדבקה בגורם המחלה ליבריבקטר ועל בסיס ידע זה, ננסה להשתמש במוסתי גדילה שונים על מנת לסתור את השינוי ההורמונלי המושרה על ידי גורם המחלה, בכדי להפחית את עוצמת תסמיניה.

ב. מטרות ויעדים

להלן המטרות העיקריות ומטרות המשנה של המחקר כולו כפי שהופיעו בתכנית המחקר המקורית:

1. אפיון השינוי ההורמונלי בצמחי גזר בעקבות הדבקה בחיידק ליבריבקטר

- 1.1. השפעת ההדבקה בליבריבקטר על ביטוי גנים המעורבים ביצירה וחישה של הורמונים
- 1.2. בחינת השתנות רמות ההורמונים בצמח בעקבות הדבקה בליבריבקטר

2. יישום מווסתי צמיחה והשפעתם על צהבון בגזר

- 2.1. בחינת השפעתם של מווסתי צמיחה על תסמיני צהבון בתנאים מבוקרים
- 2.2. הספגת זרעים במווסתי צמיחה נבחרים ובחינת השפעתם על המחלה
- 2.3. התאמת פרוטוקול יישום של מווסתי צמיחה נבחרים
- 2.4. בחינת השפעתם של מווסתי צמיחה נבחרים על ריכוז ליבריבקטר בצמח
- 2.5. יישום מווסתי צמיחה נבחרים להפחתת תסמיני צהבון הגזר בשדה

3. אפיון התפתחותי של צמחי גזר נגועים בחיידק ליבריבקטר ושטופלו במווסתי צמיחה

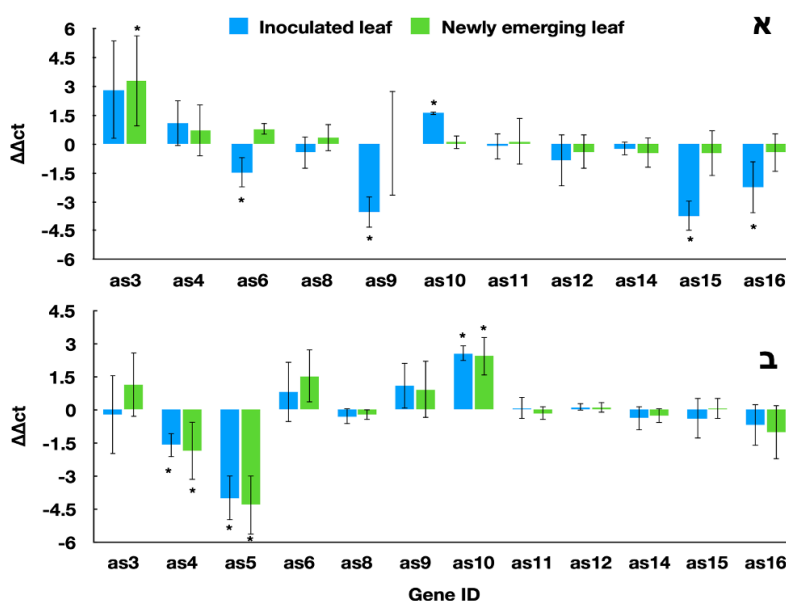
- 3.1. קביעת הפנוטיפ ההתפתחותי של צמחי גזר שהודבקו בחיידק ליבריבקטר
- 3.2. קביעת השפעתם של מווסתי צמיחה על מדדי איכות של הגזר
- 3.3. בחינת יעילות השימוש באבחון מיקרוסקופי התפתחותי לזיהוי מוקדם של צהבון הגזר
 - 3.3.1. אבחון מיקרוסקופי התפתחותי בתנאים מבוקרים
 - 3.3.2. אבחון מיקרוסקופי התפתחותי בשדה

ג. עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

1. אפיון השינוי ההורמונלי בצמחי גזר בעקבות הדבקה בחיידק ליבריבקטר.

1.1. השפעת ההדבקה בליבריבקטר על ביטוי גנים המעורבים ביצירה וחישה של הורמונים. בניסוי זה בחנו את רמת הביטוי של מספר גנים המעורבים בביוסינתזה וחישה של הורמונים שונים. בקצרה, 5 צמחי גזר אולחו באמצעות שקיות אילוח שהוצמדו לעלה אחד בכל צמח, ובתוכן 10 פסילות נגועות בליבריבקטר למשך 5 ימים, כמתואר (Keshet-Sitton et al., 2021). לאחר מכן, הפסילות הוסרו

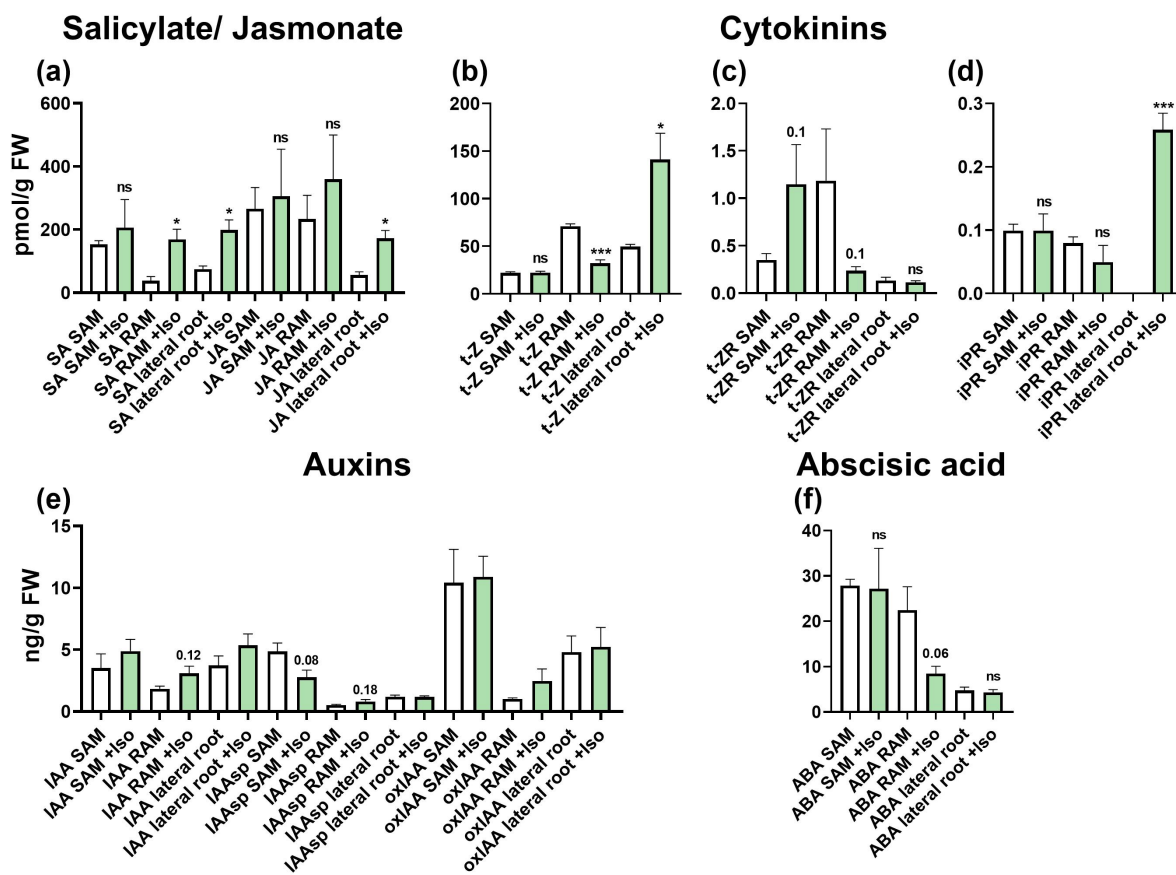
מהעלה והעלה שאולח ועלה צעיר ממנו נדגמו, הופק מהם רנ"א ונבדק ביטויים של 12 גנים המשתייכים למסלולים הבייוסינתטיים של אוקסין, גיברלין וציטוקינין, וגנים המעורבים באקטיבציה ותגובה לציטוקינין (ראה רשימת גנים וקיצורים בנספח, פרק ה). הבדיקה נערכה 10 ו- 20 ימים לאחר האילוח. חמישה צמחי גזר שלא אולחו בליבריבקטר שימשו כביקורת. רמת ביטוי הגן חושבה באמצעות שיטת $\Delta\Delta Ct$ בהשוואה לאקטין כגן מנרמל ולאחר מכן לרמת הביטוי בצמחי הביקורת. בגנים הקשורים לבייוסינתזה של אוקסין, לא התקבלה כל הגברה. לעומת זאת, בגנים המעורבים בבייוסינתזה של גיברלין וציטוקינין נראו הבדלים מובהקים ברמות הביטוי, 10 ו- 20 ימים לאחר האילוח. מבין שלושת הגנים הקשורים בבייוסינתזה של גיברלין, רמת הביטוי של גן אחד (as3) עלה 10 ימים לאחר ההדבקה (איור 1א), ואילו ביטויים של שני גנים אחרים (as4, as5) ירדו 20 יום לאחר האילוח (איור 1ב). בגנים המעורבים בבייוסינתזה ותגובה לציטוקינין, הגן as10 עלה בשתי נקודות הזמן ביחס לביקורת ולעומת זאת, רמת הביטוי של הגנים as6, as9, as15, as16, ירדה 10 ימים לאחר האילוח ולא הייתה שונה במובהק מהביקורת 20 יום לאחר האילוח (איור 1). ברב המקרים לא נראה הבדלים מובהקים ברמת ביטוי הגנים בין העלה המאולח לבין עלה צעיר ממנו שלא נחשף באופן ישיר לאילוח. עם זאת במקרים בודדים רמת ביטוי הייתה שונה באופן מובהק בין שני העלים (as6, 10 ימים לאחר האילוח).



איור 1 אילוח בליבריבקטר מוביל לשינוי ברמת הביטוי של גנים המעורבים בבייוסינתזה של הורמונים צמחיים. צמחי גזר אולחו על ידי פסילות נושאות ליבריבקטר, באופן ממוקד בעלה אחד לכל צמח. עשרה (א) ועשרים (ב) יום לאחר האילוח נבחנה רמת ביטוי גנים המעורבים בבייוסינתזה של הורמונים צמחיים שונים בעלה המאולח ובעלה הסמוך אליו. העמודות מייצגות את ממוצע הביטוי היחסי ($\Delta\Delta Ct$) של כל גן נבדק (as) בהשוואה לגן מנרמל (actin) ובהשוואה לצמחים לא מאולחים. כל ממוצע הוא של 4-5 צמחים והבר מציינ את סטיית התקן. בכוכבית מסומנות עמודות בהן רמת הביטוי הייתה שונה באופן מובהק מהביקורת הלא מטופלת, באמצעות t-test ורמת מובהקות של $p < 0.05$ (*) או $p < 0.01$ (**).

1.2. בחינת השתנות רמות ההורמונים בצמח בעקבות הדבקה בליבריבקטר. כניסוי משלים לניסוי ביטוי הגנים שתואר לעיל, בחנו את השתנות רמת הורמונים מרכזיים בתגובה להדבקה בליבריבקטר. שמונה עשר צמחי גזר אולחו בליבריבקטר כמתואר לעיל, ולאחר מכן רוטטו בחומר קוטל חרקים. עם הופעת תסמיני המחלה (כשישה שבועות לאחר האילוח) נאספו דוגמאות מהמריסטמה קודקודית, מריסטמה של השורש ושורשים צדדיים מצמחים מאולחים ומצמחי ביקורת לא מאולחים והופקו מהם הורמונים. הניסוי כלל שלוש חזרות ביולוגיות לכל טיפול וכל חזרה נאספה משישה צמחים כדי לקבל כמות מספקת של חומר צמחי להפקה. מבין הרקמות השונות שנבדקו, במריסטמה הקודקודית לא נמצא הבדל מובהק בכמות הנגזרות השונות באף אחד מההורמונים הנבדקים לעומת קבוצת הביקורת (איור 2). עליה מובהקת (t -test, $p < 0.05$).

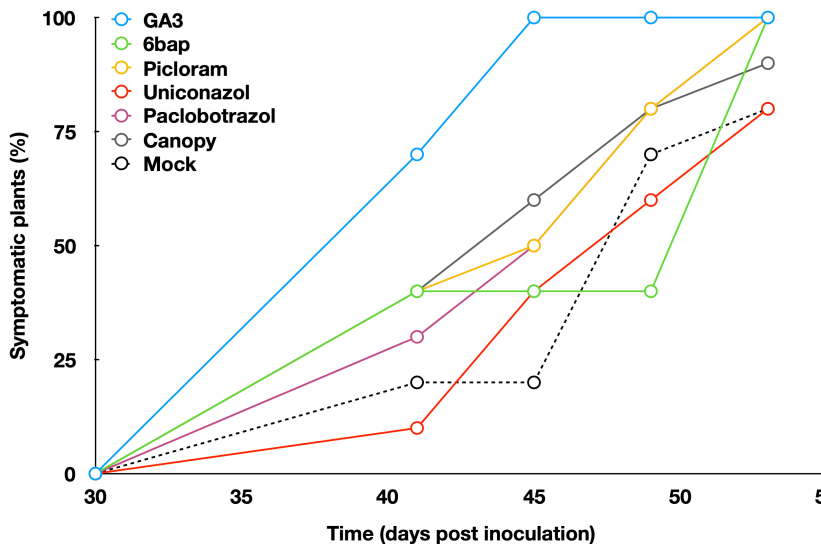
(test) בכמות החומצה הסליצילית במריסטמה של השורש ובשורשים הצדדים ובחומצה הג'סמונית בשורשים הצדדים נראתה בצמחים מודבקים בליבריבוקטר לעומת צמחי הביקורת (איור 2a). מבין שלוש הנגזרות של ציטוקינין שנבדקו, בנגזרות iPR, t-Z, נראתה כמות גבוהה יותר בצמחים הנגועים בליבריבוקטר לעומת צמחי הביקורת בשורשים הצדדים (איור 2b, 2d). לעומת זאת, הנגזרת t-Z הייתה נמוכה יותר במריסטמה של השורש בצמחים המודבקים (איור 2b). בניסוי נבדקו שש נגזרות של אוקסין, שלוש מהן (IBA, IAGlu ו-IBGlu) לא אותרו כלל באף אחת מהרקמות הנבדקות (תוצאות לא מוצגות) ובשלוש הנגזרות האחרות לא התקבל הבדל מובהק בכמותם בהשוואה לביקורת בכל הרקמות (איור 2e). כמות החומצה אבציסית גם כן נבדקה ולא נמצא הבדל מובהק ברקמות השונות בין צמחים מודבקים לצמחי הביקורת (איור 2f).



איור 2. אילוח בליבריבוקטר מוביל לשינוי ברמת ההורמונים הצמחיים בגזר. צמחי גזר אולחו על ידי פסילות נגועות בליבריבוקטר באופן ממוקד על ידי הצמדתם לעלה אחד בכל צמח. לאחר הופעת תסמיני המחלה (כשישה שבועות מרגע האילוח) נבחנה רמתם של נגזרות שונות של ההורמונים הצמחיים הבאים: (a) חומצה סליצילית וחומצה ג'סמונית; (b-d) ציטוקינין; (e) אוקסין; (f) חומצה אבסיצית. כל אחד מההורמונים נבדק בשלוש רקמות שונות: מריסטמה קודקודית (SAM); מריסטמת השורש (RAM); ובשורשים צדדיים (lateral root). העמודות מייצגות את ממוצע רמת נגזרות ההורמונים וסטיית התקן. כל חזרה נאספה משישה צמחים והממוצע מורכב משלוש חזרות ביולוגיות. בכוכבית מסומנת עמודות בהן רמת ההורמון בצמח המאולח (Lso+) הייתה שונה באופן מובהק מהביקורת הלא מטופלת באמצעות t-test ורמת מובהקות של $p < 0.05$. אינו מובהק, ns; מספרים מעל סטיות התקן מציינים את ערך σ במקרים בהם התוצאה הייתה על סף ערך המובהקות שנקבע.

2. יישום מווסתי צמיחה והשפעתם על צהבון בגזר

2.1. בחינת השפעתם של מווסתי צמיחה על תסמיני צהבון בתנאים מבוקרים. בניסוי הראשון שבוצע בתנאים מבוקרים השתמשנו במווסתי הצמיחה הבאים: גיברלין (GA3), ציטוקינין (6bap), אוקסין (picloram), uniconazol (מעכב ביוסינתזה של גיברלין), פקלובוטראזול (מעכב ביוסינתזה של גיברלין) ו- Canopy (מעכב ביוסינתזה של גיברלין). הצמחים טופלו במווסתי הצמיחה 5 ימים לפני האילוח, ופעמיים מדי שבוע לאחר האילוח ועד לסוף הניסוי. כל צמח אולח בנפרד באמצעות כמתואר לעיל והערכת הופעת תסמיני המחלה (איבוד שלטון קודקודי, אש"ק) בוצעה לאורך זמן עד כ- חודשיים ממועד האילוח. בתום תקופת הערכת התסמינים, הוצאו הצמחים ונעשתה הערכה פנוטיפית לטיפול במווסתי הצמיחה השונים.

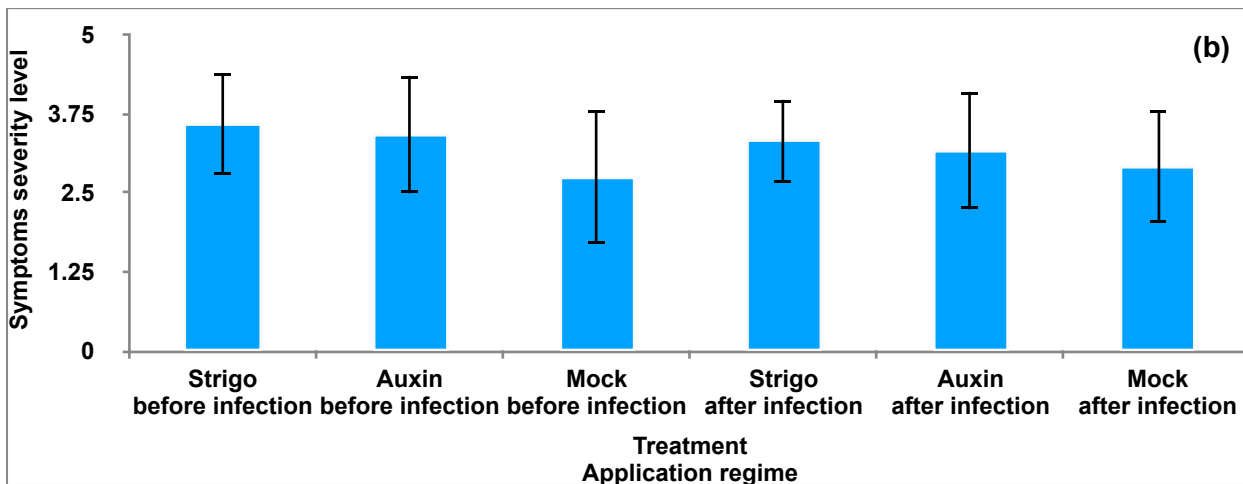
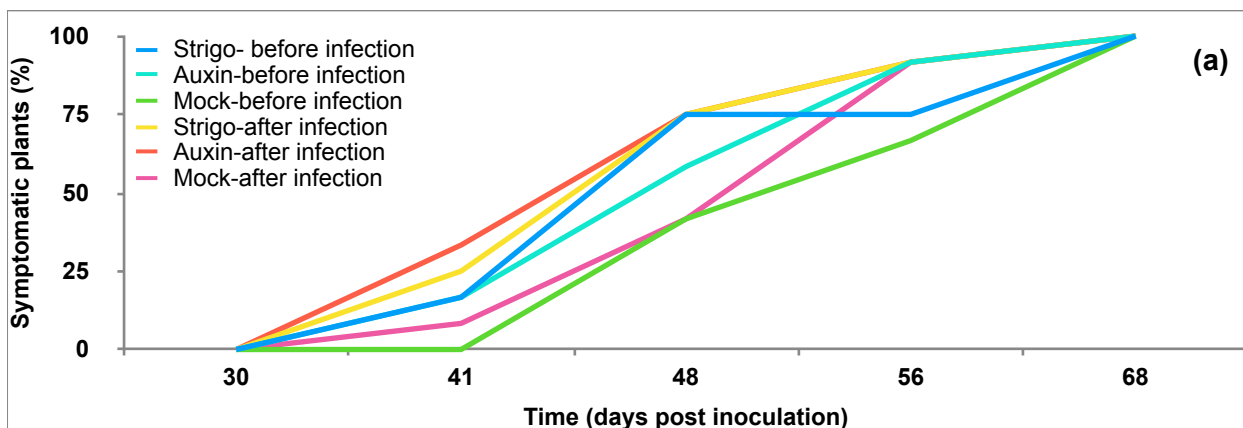


תוצאות הניסוי מראות כי מווסתי צמיחה השפיעו מאוד על אופן הגדילה של הגזר, כאשר גיברלין לדוגמא, גורם להתארכות רבה מאוד של הנוף ואילו גידול האשרוש מעוכב מאוד (תוצאות לא מוצגות). מצד שני, טיפול במעכבי גיברלין, כמו פקלובוטראזול, הובילו למופע מנונס של הנוף. מבחינת הופעת תסמיני אש"ק, מווסתי צמיחה מסוימים, כדוגמת GA3 פקלובוטראזול, ו-

canopy עודדו את תסמיני אש"ק איור 3. טיפול בווסתי צמיחה משפיעה על הופעת תסמיני איבוד שלטון קודקודי בגזר. צמחי גזר טופלו במווסתי צמיחה כמתואר לעיל, ואולחו על ידי פסילות נושאות ליבריבקטר. מעקב אחר הופעת תסמיני איבוד שלטון קודקודי (אש"ק) נערך החל מ- 30 יום לאחר האילוח ועד תום הניסוי. הגרף מתאר את אחוז הצמחים הסימפטומטיים בכל טיפול לאורך הניסוי. טיפול הביקורת (mock) בשחור. באופן ברור (איור 3).

לאור התוצאות מהניסוי הראשון בו לא נראתה הפחתה בחומרת תסמיני המחלה ובטיפולים מסוימים אף נראתה פגיעה משמעותית במופע הגזר והחרפה של התסמינים, חזרנו על הניסוי עם שני מווסתי צמיחה בעלי הפוטנציאל הגבוה ביותר להבנתנו להפחתת המחלה: אוקסין, וסטריגולקטון, כאשר כל אחד מהחומרים הללו יושם בשני משטרי ריסוס שונים. במשטר היישום הראשון הריסוס נעשה חמישה ימים לפני האילוח וכל שבועיים לאחר מכן, ואילו במשטר השני הטיפולים ניתנו שלושה שבועות לאחר אילוח (לפני הופעת תסמינים) וכל שבוע לאחר מכן, עד תום הניסוי. כל טיפול (מווסת צמיחה/משטר יישום) יושם על 12 צמחים. אילוח הצמחים נעשה כפי שמפורט בניסויים קודמים. במעקב אחר קצב הופעת תסמיני המחלה לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים השונים לבין טיפול הביקורת (איור 4a). בתום הניסוי הוערכה רמת התסמינים בצמחים השונים על פי סקלת חומרת מחלה (0, ללא תסמינים - 4, תסמינים קשים מאוד). גם בהערכה זו לא נמצאו הבדלים מובהקים בין טיפולי הביקורת ומווסתי הצמיחה במשטרי היישום השונים (איור 4b).

2.2. הספגת זרעים במווסתי צמיחה נבחרים ובחינת השפעתם על המחלה. במטרה לנסות דרכי יישום שונות בחרנו גם לבחון יישום דרך הספגת זרעים, באופן ספצפי עם מווסת הצמיחה 4-BR אשר הינו

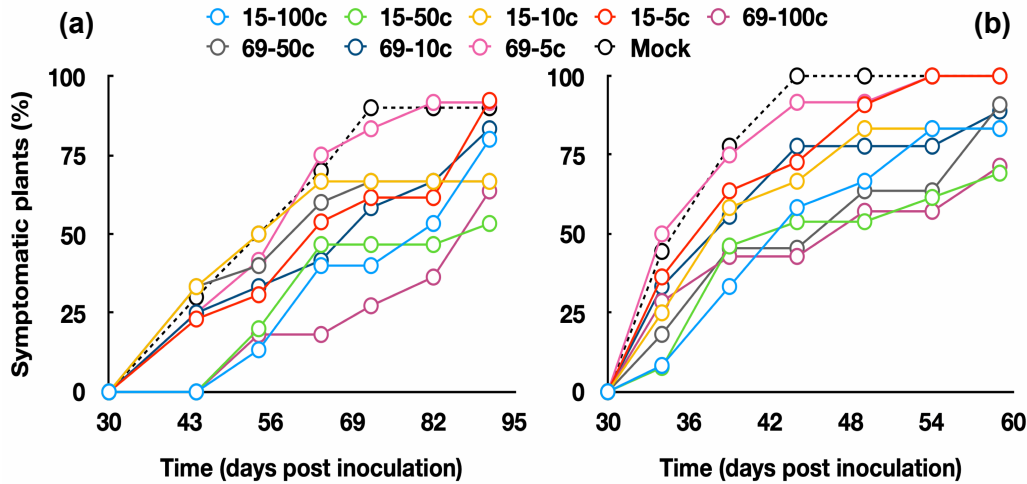


איור 4: בחינת השפעתם של אוקסין וסטריגולקטון על הופעת תסמיני צהבון בשני משטרי יישום. אוקסין (auxin) וסטריגולקטון (strigo) יושמו על צמחי גזר בשני משטרי ריסוס שונים; באחד היישום החל לפני האילוח (before infection) ובשני לאחר האילוח (after infection). צמחי ביקורת רוססו במים (mock). אחוז הצמחים הסימפטומטיים נקבע לאורך זמן (a) ובתום הניסוי בוצעה הערכת חומרת תסמיני המחלה (b). בשני הפרמטרים הנבדקים לא נמצאו הבדלים מובהקים סטטיסטית בין הטיפולים לביקורת (Tukey-Kramer HSD test, $p < 0.05$).

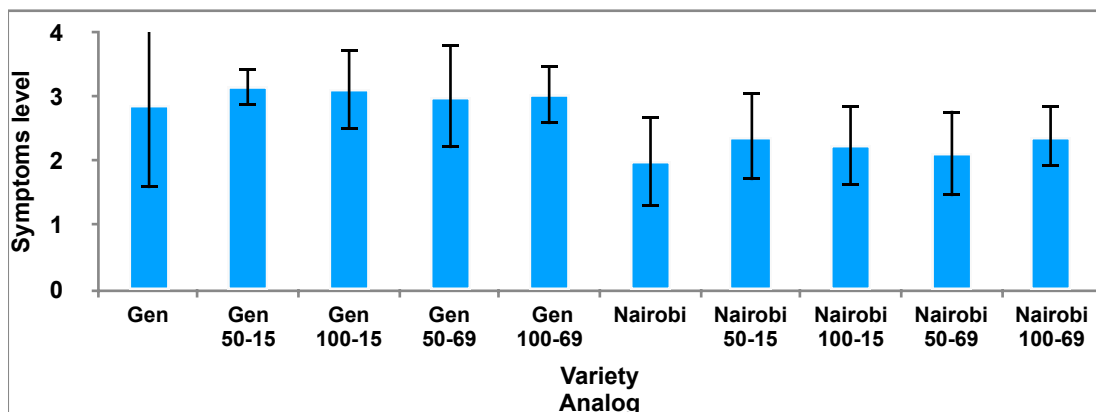
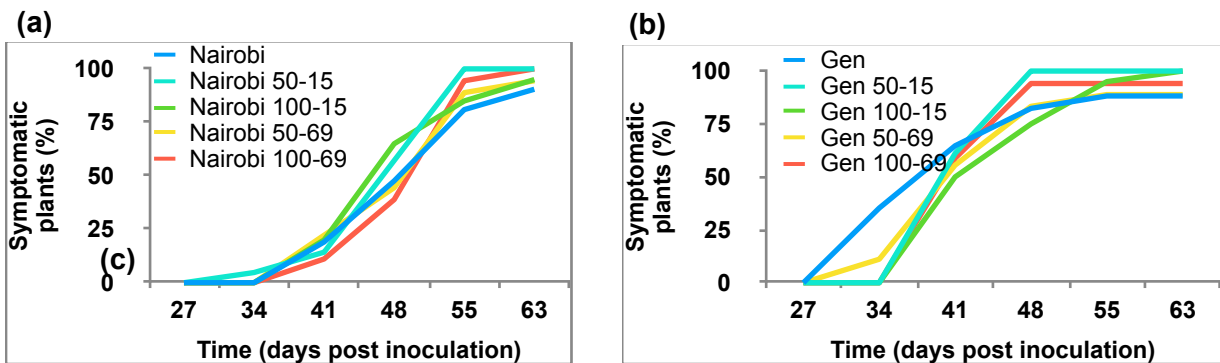
סטריגולקטון שמעכב פריצות צדדיות של עלים ומקובל ליישמו בזרעים. בניסוי זה השתמשנו בשני אנלוגים של סטריגולקטון (להלן יקראו 15 ו-69), בארבעה ריכוזים שונים (5, 10, 50, 100 ננומולר) בהם הספגנו זרעים מהזנים ניירובי (Nairobi) וזר (Zer). כביקורת בוצע לזרעים טיפול של הספגה במים. לאחר ההספגה, נזרעו הזרעים בעציצים, ואלו הועברו לכלובי רשת (50 מ"ש). כאשר הגיעו הצמחים לגיל של 4-5 עלים אמיתיים, הוכנסו לתוך כל כלוב כ-300 פסילות נגועות בליבריבקטר לאילוח הצמחים. תקופת האילוח נמשכה שבועיים ולאחריה, הוצאו הצמחים מכלובי הרשת ורוססו בקוטלי חרקים לסילוק הפסילות. הטיפול בשני האנלוגים של סטריגולקטון בריכוזים של 50 ו-100 ננומולר הפחית את מספר הצמחים הסימפטומטיים באופן מובהק בהשוואה לטיפול הביקורת (27-40% לעומת 100% צמחים סימפטומטיים בתום הניסוי, Chi-square test, $p < 0.05$) (איור 5). זרעים שטופלו בריכוז גבוה מ-100 ננומולר סבלו מאחוזי נביטה נמוכים מאוד ולכן ריכוז זה נזנח (תוצאות לא מוצגות).

לאור תוצאות חיוביות אלו, חזרנו על הניסוי גם בשנה ב'. בדומה לשנה א', גם בניסוי זה הספגנו זרעי גזר מהזן המסחרי (Nairobi) וזן בר (Gen) בשני אנלוגים של סטריגולקטון (15, 69) בשני ריכוזים שונים (50 μM ו-100 μM). בניגוד לשנה א', הפעם לא נראתה השפעה ליישום סטריגולקטון על קצב

הופעת התסמינים ולא על חומרת המחלה באף אחד מהריכוזים שנבדקו בשני מהאנלוגים השונים ובשני הזנים (איור 6).



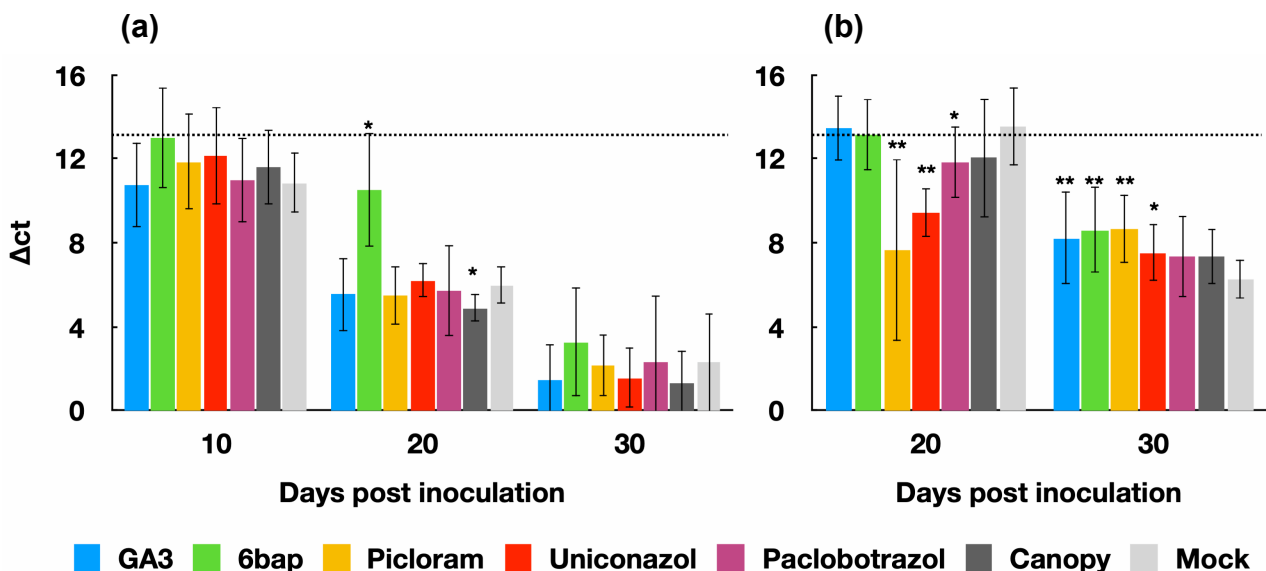
איור 5. טיפול זרעים באנלוגים של סטריגולקטון השפיע על הופעת תסמיני איבוד שלטון קודקודי בגזר. זרעי גזר הוספגו בריכוזים שונים (5, 10, 50 ו-100 ננומולר) של שני אנלוגים של סטריגולקטון (15 ו-69). לאחר מכן הצמחים גודלו בעציצים ואולחו על ידי פסילות נושאות ליבריבקטר בתוך כלובי רשת. מעקב אחר הופעת תסמיני איבוד שלטון קודקודי (אש"ק) נערך החל מ-30 יום לאחר האילוח ועד תום הניסוי. הגרף מתאר את אחוז הצמחים הסימפטומטיים בכל טיפול לאורך הניסוי. בזן זר (a) וניירובי (b).



איור 6. קצב הופעת תסמיני מחלה וחומרתם בטיפול הספגת זרעים בסטריגולקטון. זרעי גזר הוספגו בשני ריכוזים (50 ו-100 ננומולר) של שני אנלוגים של סטריגולקטון (15 ו-69) לאחר מכן נזרעו בעציצים. זרעי ביקורת הוספגו במים. הצמחים אולחו בליבריבקטר כמתואר לעיל בהגיעם לגיל של 4-5 עלים אמיתיים. לאחר אילוח נערך מעקב אחר הופעת תסמיני איבוד שלטון קודקודי ובתום הניסוי בוצעה הערכה של חומרת התסמינים. (a) הגרף מתאר את אחוז הצמחים הסימפטומטיים בכל טיפול לאורך הניסוי בזן Nairobi ו- (b) בזן Gen. (c) גרף מתאר את חומרת התסמינים בנקודת הדיגום הסופית. העמודות מציינות את ממוצע חומרת המחלה וסטיית התקן. לא נמצא הבדל מובהק על פי ANOVA ברמת מובהקות של $p < 0.05$.

2.3. התאמת פרוטוקול יישום של מווסתי צמיחה נבחרים. יעד זה מגולם בתוך הניסויים שתוארו לעיל למציאת מווסתי צמיחה בפרוטוקול יישום מתאים להפחתת תסמיני אש"ק.

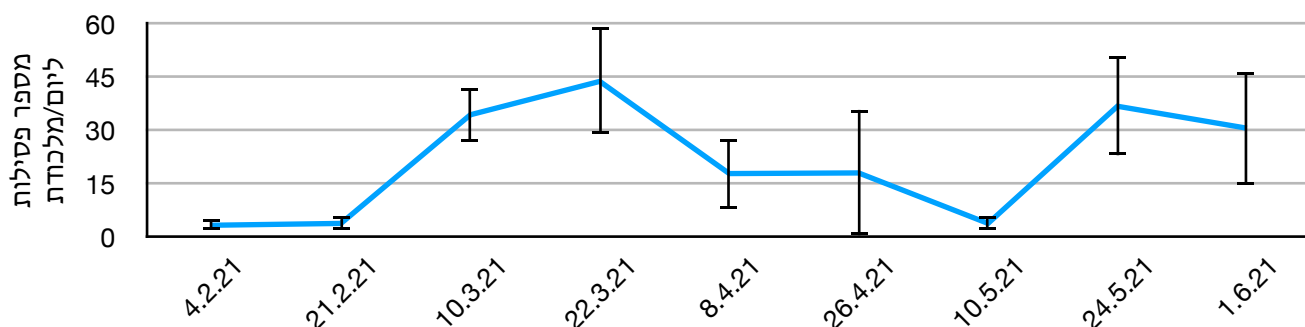
2.4. בחירת השפעתם של מווסתי צמיחה נבחרים על ריכוז ליבריבקטר בצמח. בנוסף להערכת התסמינים, ביצענו גם כימות של ריכוז גורם המחלה, ליבריבקטר, הן בעלה המאולח והן בעלה הצעיר, בטיפולים השונים באמצעות qPCR. עשרים יום לאחר האילוח ריכוז החיידק בעלה המאולח בצמחים שטופלו ב 6bap (אנלוג של ציטוקינין) היה נמוך באופן מובהק לעומת צמחי הביקורת שאולחו בחיידק. יחד עם זאת, 30 יום לאחר האילוח, ריכוז החיידק בכל הטיפולים לא נבדל באופן מובהק מטיפול הביקורת. בעלה הצעיר, שלא נחשף ישירות לאילוח באמצעות הפסילות, נראו הבדלים מובהקים בין מספר טיפולים לעומת הביקורת, הן ב- 20 והן ב- 30 יום לאחר האילוח. אך בעוד ב- 20 יום לאחר האילוח ריכוז החיידק בטיפולים אלו היה גבוה מזה שבביקורת, ב- 30 יום לאחר האילוח, ריכוז החיידק היה נמוך יותר בארבע טיפולים (GA3, 6bap, picloram, uniconazole) (איור 7).



איור 7. טיפול בווסתי צמיחה משפיע על ריכוז ליבריבקטר בצמחים. צמחי גזר טופלו במווסתי צמיחה כמתואר לעיל, ואולחו על ידי פסילות נושאיות ליבריבקטר. ריכוז החיידק ליבריבקטר נבדק באמצעות qPCR 10, 20 ו- 30 יום לאחר האילוח הן בעלה הצעיר (a) והן בעלה המאולח (b) תוך השוואה לגן מנרמל (actin). כל עמודה מייצגת ממוצע של 10 צמחים והבר מציינ את סטיית התקן. ככל שהערך נמוך יותר כך ריכוז החיידק גבוה יותר. הקו המקווקו מסמן את סף הזיהוי של השיטה. מובהקות נבדקה באמצעות Dunnett's test בהשוואה לביקורת. עמודות מסומנות בכוכבית שונות באופן מובהק מהביקורת הלא מטופלת, ברמת מובהקות של $p < 0.05$ (*), או $p < 0.01$ (**).

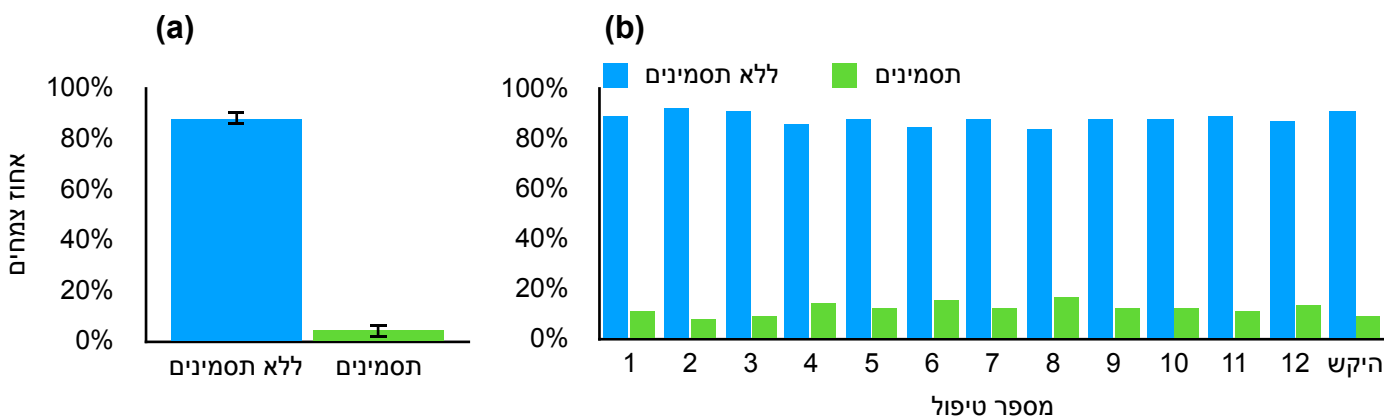
2.5. יישום מווסתי צמיחה נבחרים להפחתת תסמיני צהבון הגזר בשדה. במסגרת ניסוי שדה בחנו את היישום של אוקסין וציטוקינין במספר ריכוזים ומספר משטרי יישום והשפעתם על התפתחות תסמיני המחלה ומדדי צימוח של גזר. הניסוי בוצע בשדה גזר מסחרי בלב הנגב, בחודשים דצמבר עד תחילת יוני. מווסתי הצמיחה שנבחרו לשימוש הן אוקסין (Picloram) וציטוקינין (6bap) כאשר כל אחד מהן ניתן בשני ריכוזים. מווסתי הצמיחה יושמו בשלושה משטרי יישום שנבדלו ביניהם במועד התחלתם: חודש וחצי, חודשיים וחצי, או שלושה מזריעה. מן היישום הראשון, מווסתי הצמיחה יושמו אחת לשבועיים עד לאסוף בכל הטיפולים. סה"כ ישנם 12 טיפולים שונים של מווסתי צמיחה, וטיפול ביקורת היקש (13 טיפולים

סה"כ). כל טיפול רוסי על 2 מטר שורה אמצעית בכל ערוגה, ובין טיפול לטיפול ישנו אזור חיץ של כמטר אחד לא מטופל. הניסוי הוצב במתכונת של שמונה בלוקים באקראי כאשר בכל בלוק ייצוג לכלל הטיפולים שהוצבו באופן אקראי. היות והניסוי התבסס על אילוח טבעי בשדה, הוצבו מלכודות דבק צהובות בחלקה אשר הוחלפו אחת לשבועיים להערכת גודל אוכלוסיית פסילת הגזר, ומידת נגיעותו בליבריבקטר. לאורך הניסוי ביצענו הערכות לקביעת השפעת הטיפולים השונים על צבירת ייבול, תסמיני מחלה, ואכלוס על ידי גורם המחלה ליבריבקטר. אוכלוסיית פסילת הגזר הגיעה לשיא של כ- 50 פסילות ליום/מלכודת, שהוא נמוך מהמצופה. כמו כן, באמצע הגידול נראתה ירידה לא צפויה בגודל האוכלוסייה שחזרה ועלתה בחודש האחרון לניסוי (איור 8). סה"כ, כמות הפסילות שנלכדה הייתה נמוכה מהמצופה מאזור זה בארץ ובחודשים הללו.

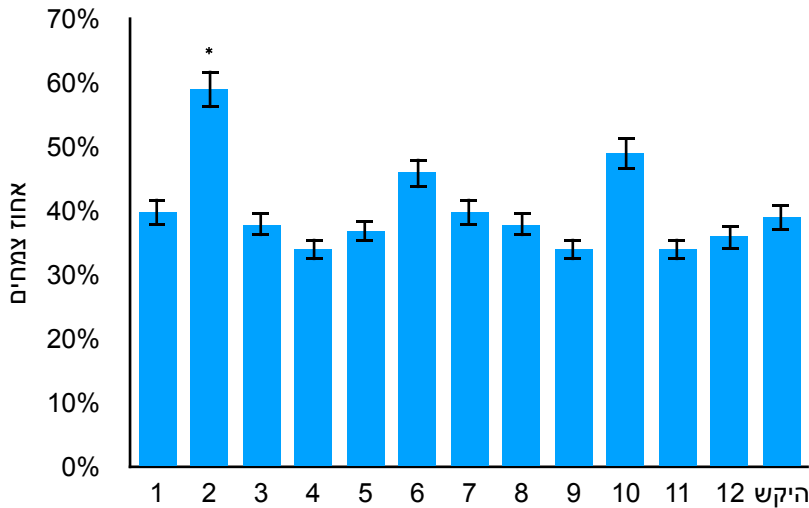


איור 8. הערכת גודל אוכלוסיית פסילת הגזר בשדה הניסוי לאורך זמן. בשדה הוצבו 8 מלכודות דבק צהובות אשר הוחלפו אחת לשבועיים ומספר הפסילות נספר. הגרף מתאר את ממוצע הפסילות שנלכדו ביום במלכודת אחת, בכל אחת מנקודות הזמן הנבדקות, ואת סטיית התקן של הממוצע.

בדיקות מולקולריות של הפסילות הראו שאחוז הפסילות הנגועות הלך ועלה עם התקדמות הגידול והגיע ל- 100% מהפסילות הנבדקות ביום האסיף (תוצאות לא מוצגות). יחד עם זאת, אחוז הצמחים עם תסמיני אש"ק בניסוי כולו במועד האסיף היה נמוך מהצפוי ועמד על כ- 10% (איור 9a). כאשר בחנו את השפעת הטיפולים השונים על הופעת תסמיני המחלה לא נמצאו הבדלים מובהקים לעומת טיפול הביקורת באף אחד מהטיפולים (איור 9b). מעבר לבחינת הופעת התסמינים, נבחנה גם חומרתם. גם כאן לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים השונים וטיפול ההיקש (תוצאות לא מוצגות).



איור 9. אחוז הצמחים המראים תסמיני אש"ק בחלקת הניסוי. (a) אחוז הצמחים המראים תסמיני אש"ק בחלקת הניסוי כולה ביום האסיף. (b) אחוז הצמחים עם תסמיני אש"ק בכל אחד מהטיפולים בנפרד ובהיקש. השוואה בין כל אחד מהטיפולים לטיפול ההיקש בוצעה באמצעות המבחן הסטטיסטי Dunnett's test, ולא נמצאו הבדלים מובהקים סטטיסטיים ($p=0.05$).

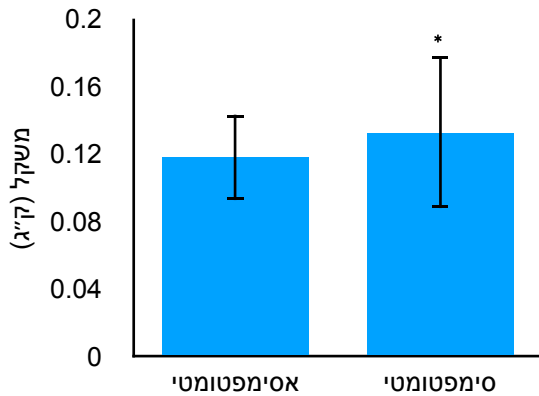


איור 10. השפעת הטיפולים השונים על היווצרות שורשים צדדיים באשרוש. מופע שורשים צדדיים הוערך בטיפולים השונים על ידי קביעת אחוז הצמיחה בכל טיפול עם שורשים צדדיים מרובים. העמודות הם ממוצע של שמונה החזרות בכל טיפול והברים מייצגים את סטיית התקן. כוכבית מסמנת הבדל מובהק (p<0.05) בהשוואה לטיפול ההיקש (ריסוס מים) על פי Dunnett's test.

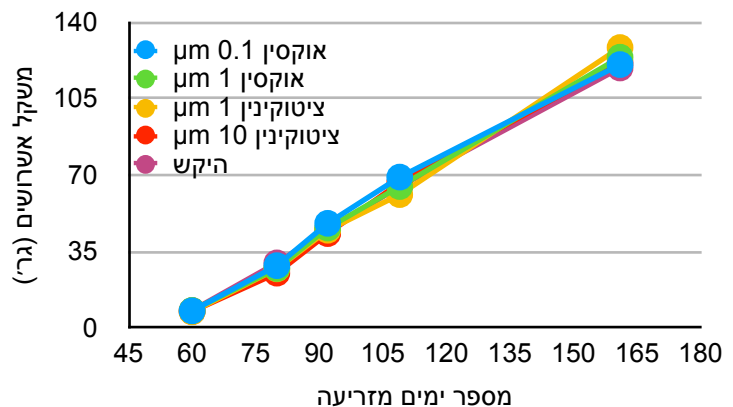
בנוסף לתסמיני אש"ק הערכנו גם את היווצרותם של שורשים צדדיים מרובים, המהווה גם תסמין אופייני למחלה, וגם מדד חשוב לאיכות הגזר (משימה 3.2). במדד זה טיפול אחד (אוקסין בריכוז 1 מיקורמולר ובמשטר ריסוס מוקדם) נבדל באופן מובהק מההיקש (Dunnett test, p<0.05) והראה כמות רבה יותר של גזרים עם תסמיני שורשים צדדיים (איור 10).

במקביל להערכת השפעת מווסתי הצמיחה על תסמיני אש"ק והופעה של שורשים צדדיים מרובים, הערכנו את השפעת הטיפולים על צבירת היבול (משימה 3.2). הערכה זו בוצעה לאורך עונת הגידול עד

למועד האסיף. באף אחת מנקודות הדיגום לא נמצאו הבדלים מובהקים (ANOVA, p<0.05) בין הטיפולים השונים וההיקש (איור 11). יחד עם זאת בדומה לתצפיות קודמות, משקל הגזרים הסימפטומטיים היה גבוה באופן מובהק (t-test, p<0.05) מגזרים אסימפטומטיים (איור 12).



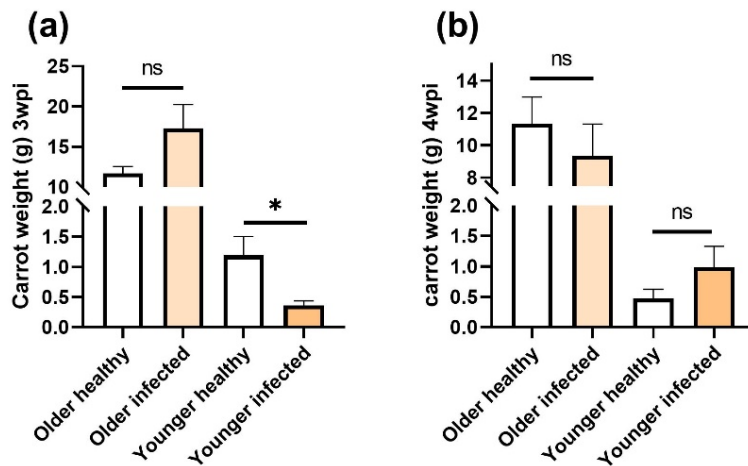
איור 12. משקל גזרים סימפטומטיים לעומת גזרים אסימפטומטיים. גזרים סימפטומטיים ואסימפטומטיים מכלל הטיפולים נשקלו בנפרד והשוו. העמודות מיצגות ממוצע של שמונה חזרות והבר את סטיות התקן. כוכבית מציינת הבדל מובהק (t-test, p<0.05).



איור 11. צבירת יבול כתלות בטיפול במווסתי צמיחה. בכל נקודת זמן נאספו 20 גזרים מכל חזרה (8 חזרות לטיפול) ונשקלו. הגרף מראה את ממוצע משקל האשורשים בכל טיפול בכל נקודת זמן. מווסתי הצמיחה יושמו לראשונה כ-70 יום מזריעה ולאחר מכן אחת לשבועיים עד לאסיף. בנקודת הזמן האחרונה ביום האסיף נלקחה הדגימה האחרונה. מבחן ANOVA הראה שאין הבדלים מובהקים במשקל האשורש בין הטיפולים באף אחת מנקודות הזמן הנבדקות.

3. קביעת הפנוטיפ ההתפתחותי של צמחי גזר שהודבקו בחיידק ליבריבקטר.

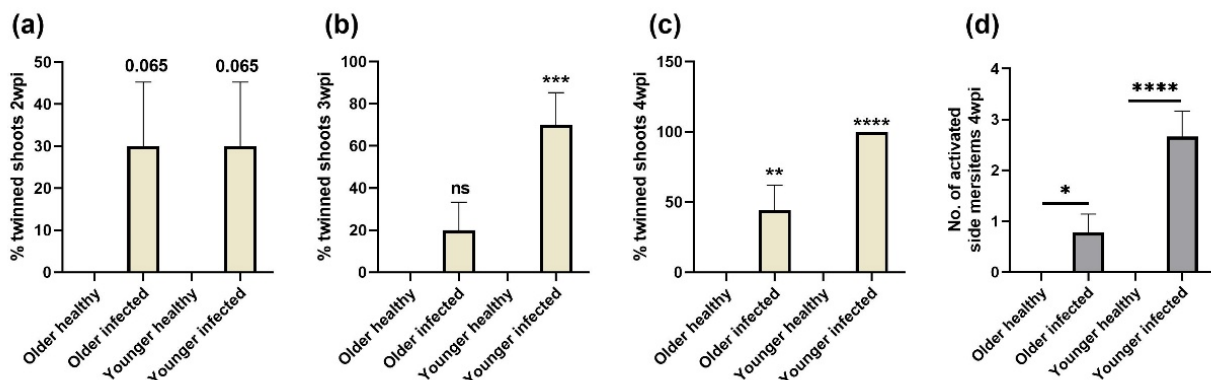
בפרק זה בחנו האם ניתן להבחין בשינויים התפתחותיים המתרחשים בגזר מאוכלס בליבריבקטר, עוד בטרם אלו נראים בעין בלתי-מזויינת, על ידי הסתכלות מיקרוסקופית, והאם אלו יכולים לשמש לדיאגנוסטיקה של גורם המחלה. בניסויים הראשוניים שבוצעו, הבחנו בשתי תופעות התפתחותיות אשר



איור 12: השפעת הדבקה בליבריבקטר על משקל הארוש. צמחים בני חודש (להלן צעירים) ובני חודשיים (להלן מבוגרים) אולחו באמצעות פסילות נגועות בליבריבקטר והארושים נשקלו שלושה (a) וארבעה (b) שבועות לאחר ההדבקה, בהשוואה לגזרים לא מאולחים. התוצאות מוצגות כממוצע פלוס טעות התקן, n=10. המובהקות של ההבדלים נבחנה במבחן t-test בין צמחי הביקורת לצמחים המודבקים (*, $p < 0.05$).

איפיינו צמחים מודבקים וניתן היה להבחין בהן בטרם נראו תסמינים בעין בלתי מזוינת. התופעה הראשונה נקראה עלים "תאומים", שהם שכפול של שלב התפתחותי, שבדרך כלל לא מתקיים בגזר, ותופעה שנייה היא משקלו של הגזר המתפתח, אשר היה נמוך יותר בצמחים המאולחים. לאישוש התוצאות ביצענו ניסוי נוסף בו אילחנו צמחים בשני גילאים שונים (בני חודש ובני חודשיים, 30 צמחים בכל קבוצת גיל) באמצעות שקית רשת ובה עשר פסילות אשר הוצמדו לעלה אחד בכל צמח (כמתואר לעיל). הפסילות אופשרו להיזון מהצמח

למשך חמישה ימים ולאחר מכן הוסרו. הצמחים נדגמו שבועיים, שלושה וארבע שבועות לאחר האילוח, כאשר בכל נקודת זמן נדגמו עשרה צמחים מאולחים ועשרה צמחי ביקורת בכל קבוצות גיל. מועד זה נבחר היות ובניסויים קודמים זיהינו כי זהו המועד המוקדם ביותר שבו ניתן להבחין בשינויים התפתחותיים בצמח כתוצאה מההדבקה בחיידק. שלושת הפרמטרים שנבחנו היו מספר עלים, עלים "תאומים", ומשקל הגזר. במקביל לאנליזה ההתפתחותית, הצמחים נדגמו לבדיקות מולקולריות לאיתור גורם המחלה. התוצאות באיור 12a מדגימות כי כשלושה שבועות לאחר מועד ההדבקה, הארושים של הצמחים המודבקים התפתחו פחות ושקלו פחות מהגזרים של צמחי הביקורת, בקבוצת הצמחים שאולחה בשלב צעיר יותר. עם זאת, הפרמטר של משקל הגזר לא היה הדיר מספיק, ובצמחים שנדגמו שבוע לאחר מכן, לא נצפו הבדלים מובהקים (איור 12b).

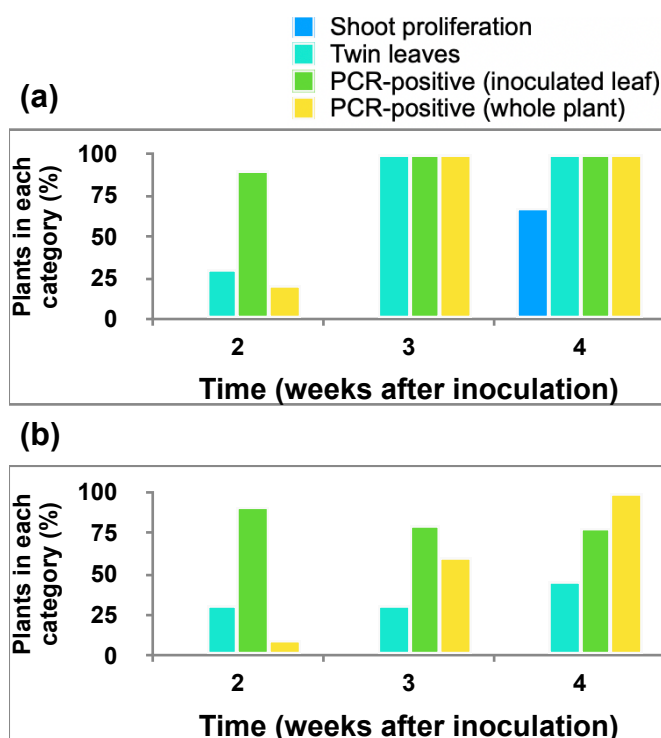


איור 13: השפעת הדבקה בליבריבקטר על הופעת עלים "תאומים" ומספר עלים בצמחי גזר. צמחים בני חודש ובני חודשיים אולחו בליבריבקטר כמתואר לעיל. לאחר כשבועיים, עוד בטרם נצפו תסמינים משמעותיים בצמחים, נוצרו שני עלים באותו פלסטוכרון בו זמנית, עלים "תאומים". (a) כימות תופעות ה"תאומים" שבועיים לאחר ההדבקה. (b) כימות תופעת ה"תאומים" שלושה שבועות לאחר ההדבקה. (c) כימות תופעות ה"תאומים" ארבעה שבועות לאחר ההדבקה. (d) כימות שפעול מריסטמות חיקיות ארבעה שבועות לאחר ההדבקה. התוצאות מוצגות כממוצע פלוס טעות התקן, n=10. המובהקות של ההבדלים נבחנה במבחן t-test בין צמחי הביקורת לצמחים המודבקים (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

לגזר פילוטקסיס (דגם יצירת עלים) ספירלי: יש עלה אחד בלבד שיוצא מהמריסטמה הקודקודית בכל זמן נתון, ובדרך כלל אין שני עלים באותו גיל היוצאים מאותו מקום. בשנת הפרויקט הראשונה זיהינו כי לאחר ההדבקה בליבריבקטר, דגם הפילוטקסיס משתנה, ואנו רואים שני עלים באותו גיל היוצאים מאותו מקום-עלים "תאומים". בניסוי המשך, שבועיים לאחר האילוח נצפו עלים "תאומים" בכשליש מהקודקודים המאולחים, בשתי קבוצות הגיל (איור 13a). לאחר שלושה שבועות, כמות הקודקודים עם עלים "תאומים" הייתה מובהקת בצמחים הצעירים (איור 13b), ולאחר ארבעה שבועות, נצפתה מובהקות בשתי קבוצות הגיל, אם כי, התופעה הייתה נרחבת יותר בצמחים הצעירים, בדומה לנצפה בשנת הפרויקט הראשונה (איור 13c). בנוסף לעלים ה"תאומים", הבחנו כי ישנו גם שפעול של מריסטמות חיקיות, וחלק מהתסמינים המאוחרים יותר שנצפים בגזר מודבק בליבריבקטר, של ריבוי עלים, נובעים כנראה הן מיציאה של עלים מרובים יותר מהקודקוד הראשי, וכן משפעול של קודקודים חיקיים. שפעול קודקוד חיקי כך שיוצאים ממנו עלים הוא דבר שיכול להתרחש גם בצמחים בריאים באופן פיזיולוגי, אולם, ארבעה שבועות לאחר ההדבקה- תופעה זו נצפתה רק בצמחים המודבקים, ולא בצמחי הביקורת (איור 13d). בנוסף בדקנו גם את

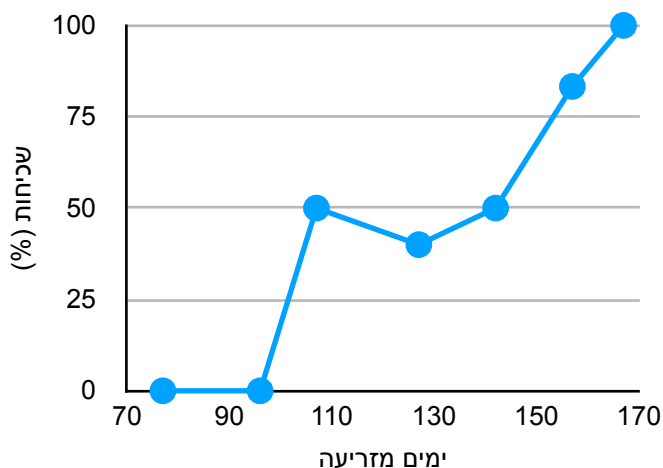
מספר העלים הכולל שייצרו צמחי הגזר. גם כאן ראינו שיש עלייה מובהקת במספר העלים שהוציאו הצמחים המודבקים בשתי קבוצות הגיל- אך רק ארבעה שבועות לאחר ההדבקה (תוצאות לא מוצגות). ראינו אפוא כי העלים ה"תאומים" הם הפרמטר המובהק, ההדיר, והמוקדם ביותר של הדבקת גזר בליבריבקטר. מספר העלים מושפע רק בשלב מאוחר יותר לאחר ההדבקה, ומשקל הגזר מושפע מוקדם אך לא בכל הצמחים, ולכן אינו מספיק הדיר לשימוש כפרמטר דיאגנוסטי.

בבדיקות מולקולריות מצאנו שכאשר מפיקים דנ"א מכלל הצמח, אבחון גורם המחלה בשיטה המולקולרית תאם בזמן ובעילות הזיהוי את האבחון ההתפתחותי על פי עלים "תאומים" (איור 14a). בצמחים בני החודשיים נראו אחוזים גבוהים יותר של צמחים עם עלים "תאומים" שבועיים לאחר הדבקה מאשר צמחים חיוביים ב-PCR, אך שלושה וארבע שבועות לאחר האילוח, הבדיקה המולקולרית הייתה יעילה יותר (איור 14b). בכדי לבחון את יעילות והדירות השיטה בתנאי שדה. אחת לשבועיים-שלושה נאספו

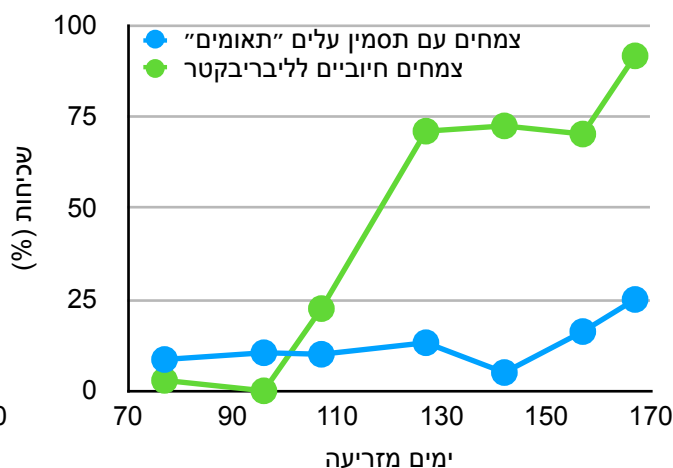


איור 14. אבחון מולקולרי של ליבריבקטר בהשוואה לאבחון על פי תופעות התפתחותיות המשוייכות עם הדבקה בליבריבקטר. צמחי גזר מאולחים בליבריבקטר נבדקו מולקולרית באמצעות qPCR לנוכחות של ליבריבקטר בעלה המאולח, ובצמח כולו. הניסוי כלל שתי קבוצות צמחים אחת אולחה בגיל חודש (a) והשניה בגיל חודשיים (b). אחוז הצמחים המראים את התסמינים ההתפתחותיים המאפיינים הדבקה בליבריבקטר (shoot proliferation, twin leaves) מתואר בגרף במספר נקודות זמן לאחר האילוח ובשתי קבוצות הגילאים. במקבלים מופיע אחוז הצמחים בהם הבדיקה המולקולרית של ליבריבקטר יצאה חיובית כאשר דנ"א הופק מהעלה המאולח (PCR-positive inoculate leaf) או מהצמח כולו (PCR-positive, whole plant).

באופן אקראי מהשדה 35-40 צמחים אשר נבדקו הן לנוכחות עלים "תאומים", והן לנוכחות ליבריבקטר ב-qPCR. נמצא כי בעוד אחוז הצמחים עם עלים "תאומים" השתנה מעט לאורך הזמן, אחוז הצמחים החיוביים לליבריבקטר עלה באופן משמעותי עם התקדמות הגידול (איור 15). יחד עם זאת, נמצא כי אחוז הצמחים עם עלים "תאומים" בהם נמצא גם החיידק הלך ועלה עם התקדמות הגידול (איור 16).



איור 16. שכיחות הצמחים בעלי תסמין עלים "תאומים" וחיוביים לליבריבקטר. הגרף מתאר את אחוז הצמחים החיוביים לליבריבקטר מבין אלו שהראו תסמין של עלים "תאומים". מספר הצמחים בכל נקודת דיגום עם תסמין עלים "תאומים" נע בין שלושה לתשעה.



איור 15. שכיחות צמחים חיוביים לליבריבקטר, או עם תסמין עלים "תאומים". בכל נקודת דיגום נאספו 35-40 צמחים באופן אקראי מהשדה ונבחנו לנוכחות ליבריבקטר באמצעות qPCR, ובמקביל נבחנו לנוכחות תסמין עלים "תאומים". הגרף מתאר את אחוז הצמחים בכל קטגוריה לאורך הגידול.

ד. דיון

ההיפותזה שעמדה בבסיס מחקר זה היא כי התבססות החיידק ליבריבקטר בצמחי גזר מובילה להפרת האיזון ההורמונלי בצמח, דבר המקבל ביטוי בצמיחה לא נורמלית של הצמח והופעת תסמינים אופייניים כגון איבוד שלטון קודקודי (אש"ק). מטרת העל של התכנית היא לאפיין ולהבין את השינוי ההורמונלי המושרה בעקבות הדבקה בליבריבקטר, ולנסות, באמצעות טיפול במוסתי צמיחה שונים, לנגוד את השינוי המושרה על ידי החיידק ובכך להפחית את תסמיני המחלה.

התוצאות שהושגו במהלך המחקר מצביעות על כך שאכן מתרחש בצמח שינוי במאזן ההורמונים עם ההדבקה בליבריבקטר. השינוי בא לידי ביטוי הן ברמת ה mRNA של גנים הקשורים בביוסינתזה וחישה של הורמונים צמחים והן בשינוי בפועל ברמת הורמונים צמחיים כגון ציטוקינין, להם תפקיד התפתחותי חשוב. ציטוקינין ידוע כמעודד חלוקת תאים והתעוררות של מריסטמות רדומות, ולאוקסין תפקיד חשוב בשימור השלטון הקודקודי בצמח (Müller and Leyser 2011). לאור תסמיני המחלה המתבטאים בהתעוררות של מריסטמות חיקיות וכתוצאה מכך איבוד השלטון הקודקודי בצמח וריבוי עלים, ניתן היה לשער כי הדבקה בליבריבקטר מובילה לשינוי מאזן ההורמונים המועדף מצב זה. אי לכך, ציפנו לראות ירידה בריכוז האוקסין בצמח ועליה בריכוז הציטוקינין. יחד עם זאת, ברקמות ובזמנים שנבדקו לא מצאנו שינוי ברמת נגזרות האוקסין השונות שנבדקו. בציטוקינין לעומת זאת, כן נמצא שינוי בצמחים המודבקים,

כאשר בשורשים הצדדיים הייתה כמות גבוה יותר של ציטוקינין בצמחים המודבקים ואילו במריסטמת השורש המצב היה הפוך. נקודה מעניינת היא שדווקא במריסטמה הקודקודית, לא מצאנו כל הבדל בריכוזי ההורמונים השונים שנבדקו. מצד אחד, התוצאות מחזקות את ההיפותזה המרכזית של המחקר, אך יחד עם זאת ממחישות את הקושי שבאפיון השינוי ההרמונלי שחל בצמח עם האילוח.

תהליך ההדבקה הינו תהליך מתמשך אשר ראשיתו בהחדרת תאי חיידק ספורים על ידי הפסילה אל העלה ולאחר מכן מתרבה החיידק ומתפשט לאזורים נוספים בצמח. מתי אם כך הזמן הנכון "לתפוס" את השינוי ההרמונלי המתרחש בצמח? ככל הנראה אין לכך תשובה ברורה, וסביר שגם תהליך התגובה הצמחית (כולל ברמה ההורמונלית) הינו תהליך דינמי שאינו עוקב בהכרח אחר קו ברור וצפוי. נוסף על כך, השינוי ההרמונלי אינו אחיד בצמח כולו וסביר שברקמות שונות נראה מצב שונה, לדוגמא, בעלה מאולח לעומת עלה מרוחק שלא נחשף ישירות לאילוח, במריסטמה הקודקודית, בעלה צעיר מול עלה חדש, באשרוש, במריסטמה של השורש, בשורשים הצדדיים ועוד. לאור כל זאת, אנחנו מכירים בעובדה שלא נוכל לבצע אפיון מושלם של השינוי במאזן ההורמונים בצמח בתגובה להדבקה בליבריבקטר. עם זאת, השימוש במוסתי צמיחה הראה שניתן להסית את מסלול ההתפתחות הטבעי של הגזר לכיוונים אחרים.

על אף שבחלק מהניסויים שביצענו נראתה הפחתה בתסמיני המחלה בתגובה למוסתי צמיחה, לצערנו, לא הצלחנו לשחזר הצלחות אלו באופן הדיר. יתרה מכך, בניסוי השדה שביצענו לא הצלחנו להשיג הפחתה בתסמיני המחלה על ידי שימוש במוסתי צמיחה. בניסוי השדה, התבססנו על אילוח טבעי המתרחש בשדה ולכן בחרנו במזרע מאוחר שעל פי תצפיות קודמות הנחנו שתהיה בו שכיחות גבוהה של המחלה. בפעול, לא כך היה, ושכיחות המחלה בשדה בתום הניסוי עמדה על כ- 10%. יתכן והודות ליישום יעיל ומשמעותי של חומרי הדברה הצליח המגדל להפחית את כמות הווקטור בחלקה, כפי שגם בה לידי ביטוי בספירות המלכודות שביצענו, ולכן שכיחות המחלה בחלקה נמוכה. כאשר שכיחות המחלה היא נמוכה קשה יותר לראות הבדלים מובהקים בין הטיפולים, ויתכן שלכך חלק בכך שלא נראו הבדלים שכאלו. לסיכום, על אף אישוש ההיפותזה הכללית הנוגעת לשינוי ההרמונלי החל בצמח בעקבות ההדבקה בליבריבקטר, לא הצלחנו לפתח פרוטוקול הדיר לשימוש במוסתי צמיחה להפחתת תסמיני צהבון הגזר בשדה.

בניסויים למעקב אחר השינויים ההתפתחותיים שנראים בצמחי גזר בעקבות הדבקה בליבריבקטר שנעשו נראו מספר תופעות חשובות ומעניינות. התופעות הבולטות ביותר בהן הבחנו הן ריבוי עלים כתוצאה מהתעוררות של מריסטמות חיקיות, הופעה של עלים "תאומים", ועיכוב התפתחות האשרוש. מבין תופעות אלו, תופעת העלים ה"תאומים" נראתה בשלב המוקדם ביותר (2-3 שבועות לאחר אילוח) עוד בטרם נראו תסמיני מחלה ברורים ולכן הייתה המעניינת יותר לבחינת הפוטנציאל הדיאגנוסטי שלה. מעניין לראות שתופעה זו בולטת יותר כאשר האילוח נעשה בגיל צעיר יותר (צמחים בני חודש לעומת צמחים בני חודשיים). בניסוי השדה ראינו שבשתי נקודת הדיגום הראשונות תסמין עלים "תאומים" הופיע עוד בטרם אובחן החיידק, ובהמשך, אחוז הצמחים עם עלים "תאומים" שהיה חיובי לחיידק הלך ועלה. יחד עם זאת, הפער בין אחוז הצמחים החיוביים בתום הגידול (90%) לבין צמחים עם עלים "תאומים" (25%) מעיד על כך שישנו מספר משמעותי של צמחים נגועים שאינם מבטאים את תסמין העלים "תאומים". יתכן והיות שבשדה האילוח נעשה בשלבים מאוחרים יותר, כפי שלמדנו מבדיקות מולקולריות, תופעת עלים "תאומים"

איננה הדירה וברורה כפי שהייתה בניסויים שביצענו בתנאים מבוקרים. לאור זאת, נראה כי על אף הייחוד של תסמין זה, הוא אינו מתאים כמדד דיאגנוסטי לאבחון צמחים נגועים בליבריבקטר. תופעה מעניינת שהבחנו בה היא פחיתה בגודל ומשקל האשרוש כאשר הצמחים מאולחים בגיל צעיר. זוהי נקודות מעניינת מאוד היות וידוע כי בשדה, גזרים סימפטומטיים הם לרב גדולים יותר באופן משמעותי מגזרים שאינם סימפטומטיים (Mawassi et al. 2018; Weintraub and Orenstein 2004). ניסוי השדה שביצענו חיזק תוצאות אלו והראה שאכן גזרים סימפטומטיים גדולים יותר מאילו שאינם. חוסר ההלימה בין שתי תוצאות אלו הוביל אותנו לשער כי יתכן שאילוח הגזר בשלבים פיסיוולוגים שונים משרה תגובה התפתחותית אחרת, כך שלדוגמא, צמח שאולח בשלב מאוחר, דווקא יאיץ את גידול האשרוש, ואילו צמח שאולח בשלב מוקדם יחסית התפתחותו תעוכב. התוצאות שנראות כאן יכולות לתמוך בהיפותזה זו, אך כמובן שיש לחזק אותה עם ניסויים נוספים אשר יתוכננו לבחינת שאלה זו באופן ספציפי. ראוי לציין כי השינויים ההתפתחותיים שנראו כגון האטה בהתפתחות האשרוש, ריבוי עלים ויצירת עלים מחוץ לפילוטקסיס הרגיל, הם כולם פנוטיפים המקושרים עם ריבוי ציטוקונינים ו/או עליה ברגישות הצמח לציטוקינין, דבר המתיישב עם שאר תוצאות המחקר ועם ההיפותזה שבבסיסו (Müller and Leyser 2011). מכאן שיש מקום להמשיך ולנסות להתאים טיפול במוסתי צמיחה שיעכבו ציטוקינין (כגון אוקסין) ולבחון את הפעילות התרפויטית שלו.

לסיכום, תוצאות המחקר מראות כי אילוח בחיידק ליבריבקטר, מוביל לשינוי בביטוי גנים שונים המעורבים בביוסינתזה ותגובה של הורמונים צמחיים, לשינוי ברמת ההורמונים בצמח ומשרה גם ביטוי של פנוטיפים התפתחותיים. שימוש במוסתי צמיחה השפיעה על הופעת תסמיני מחלה בגזר, אך לא באופן הדיר ויעיל דיו, ולכן לא עלה בידינו לפתח פרוטוקול יישום של חומרים אלו להפחתת תסמיני המחלה. יחד עם זאת, יש לדעתנו מקום לבחון את הנושא יותר לעומק ולנסות להגיע לפתח פרוטוקול יעיל וישים. על אף שהנושא אינו בתכנית המחקר המקורית, אנו גם מציעים לבחון יותר לעומק את הקשר בין הגיל הפיסיוולוגי של הצמח בעת האילוח והשפעתו על התפחות האשרוש היות והבנה של נושא זה תסייע רבות בהבנת מנגנון הנזק שהמחלה גורמת בשדה, נקודת שעד היום טרם הובהרה.

ה. נספחים

רשימת הגנים הנבדקים בתת-פרק 1.1, איור 1

GA biosynthetic pathway

DcGA20ox2-as3

DcGA2ox2-as4

DcGA2ox1-as5

Involved in cytokinin biosynthesis

DcIPT3-as6

CK biosynthesis and inactivation

DcIPT9-as8

DcCYX1-as9

DcCYX7-as10

CK response

DcRR-B1-AS11

DcRR-B2-AS12

DcRR-B4-AS14

DcRR-A1-AS15

DcRR-A2-AS16

ו. רשימת פרסומים והרצאות שנבעו מהמחקר

1. א. בהר. גישה מולטידיספלינרית ללימוד והתמודדות עם מחלת צהבון הגזר. (מרץ 2019). סמינר המכון להגנת הצומח, ראשון לציון, ישראל
2. א. בהר. תוצאות מחקרים בצהבון הגזר וכיווני המשך. (יוני 2019). יום דיווח מחקרים בגזר, ראשון לציון, ישראל.
3. א. בהר. תוצאות מחקרים בצהבון הגזר וכיווני המשך. (נובמבר 2019). יום עיון גזר, יח"מ, מגן, ישראל.

ז. ביבליוגרפיה

- Fukui, K., Ito, S., Ueno, K., Yamaguchi, S., Kyojuka, J., and Asami, T. 2011. New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 21:4905–4908.
- Mawassi, M., Dror, O., Bar-Joseph, M., Piasetzky, A., Sjölund, J., Levitzky, N., et al. 2018. "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" is tightly associated with carrot yellows symptoms

in Israel and transmitted by the prevalent psyllid vector *Bactericera trigonica*.
Phytopathology. 108:1056–1066.

Müller, D., and Leyser, O. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. Ann.
Bot. 107:1203–1212.

Weintraub, P., and Orenstein, S. 2004. Potential leafhopper vectors of phytoplasma in
carrots. Int. J. Trop. Insect Sci. 24:228–235.