

**פיתוח גישות להתמודדות עם מחלת הכתם הבקטריאלי הנגרמת ע"י  
*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* בדלועיים**

Developing means for preventing and managing Bacterial Fruit Blotch of cucurbits

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות  
ע"י

שולמית מנוליס<sup>1</sup>, לאורה צ'לופוביץ<sup>1</sup>, שאול בורדמן<sup>2</sup>, גיורא קריצמן<sup>1</sup> ולאה מזור<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן;  
<sup>2</sup> המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה, פקולטה לחקלאות, רחובות;  
<sup>3</sup> המעבדה הרשמית לבדיקת זרעים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

E-mail: shulam@volcani.agri.gov.il

יולי 2013

אב תשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר \_\_\_\_\_ תאריך \_\_\_\_\_

**תוכן העניינים**

2	תקציר
3	מבוא
3	מטרות המחקר
3	פירוט עיקרי הניסויים
16	דיון
18	ביבליוגרפיה
19	סיכום

## תקציר

1. הצגת הבעיה: מחלת הכתם הבקטריאלי הנגרמת ע"י החיידק אצידוורקס, היא מחלה הרסנית בגידולי דלועיים בעיקר אבטיח ומלון. בשנים האחרונות המחלה התפשטה לאזורים רבים בעולם, כולל ישראל שבה הפתוגן נחשב כחיידק הסגר. אין אמצעים כימיים יעילים להדברת החיידק ואין כיום זני מלון או אבטיח מסחריים בעלי עמידות לחיידק.
2. מטרות המחקר: א. איתור מקורות המידבק הראשוני של הפתוגן בשדה ובבתי צמיחה. ב. קביעת הגורמים המשפיעים על התפתחות והתפשטות המחלה. ג. פיתוח פרוטוקול לבדיקה רגישה ואמינה לגילוי הפתוגן בזרעים ובשתילים.
3. שיטות העבודה: אילוח זרעי מלון ושתילי מלון בטבילה או ריסוס נעשה עם התבדיל M6. בידוד הפתוגן מדגימות של צמחי אבטיח ומלון נעשה על מצע סלקטיבי. הניסויים באתר וולקני בוצעו בתא הסגר.
4. תוצאות עיקריות: בתנאי משתלה השקיה עילית במתזים גורמת להפצת המחלה לצמחים השכנים בעוד שבהשקיה בהצפה לא נמצאו צמחים שכנים נגועים או מאוכלסים בחיידקים. הפסיגים היו האברים המאוכלסים ביותר בחיידקים לעומת עלה ראשון או שאר הצמח. טיפול בנחושת בזמן ההפצה המישנית הוריד באופן משמעותי את שכיחות המחלה ואת עוצמתה. לראשונה הצלחנו בעבודה זו לסמן חיידק אצידוורקס בחלבון הפלואורוסנטי GFP והראנו כי הפתוגן מתרבה בעיקר בחלל צינורות ההובלה. מצע MTM בתוספת האנטיביוטיקה נובוביוצין היה המתאים ביותר לבידוד הפתוגן מהצמחים והזרעים. נבחרו שני זוגות פריימרים שבעזרתם ניתן להגביר ב-PCR את הפתוגן ולא ספרופיטים אחרים. עם פריימרים אלו פותחה שיטה Real time PCR לאיבחון הפתוגן בזרעים. במהלך שלוש שנות המחקר לא בודדו חיידקים מדגימות של חלקי צמחים וקרקע החשודים כנגועים בפתוגן.
5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: יתכן והמחלה בארץ היא בעיקר בעיה של משתלות וצמחים נגועים שמתגלים בשדות מקורם משתילים מאולחים. לדעתנו יש להתרכז בעיקר במשתלות כדרך היעילה להתמודדות עם המחלה. ניתן לעשות זאת ע"י העלאת רמת הרגישות של שיטות האיבחון בזרעים ובכך להקטין את מקור האינקולום הראשוני, ומצד שני למנוע את ההפצה המשנית במשתלות ע"י השקיה תחתית, ריסוס בנחושת או תכשירים אחרים בשלב של הפסיגים שהם האברים העיקריים האחראים להפצה המישנית.

**מבוא**

מחלת הכתם הבקטריאלי (bacterial fruit blotch, BFB) הנגרמת ע"י החיידק *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (שם חדש *Acidovorax citrulli*) (Schaad *et al.* 2008) היא מחלה הרסנית הגורמת להפסדים כלכליים ניכרים בגידולי דלועיים בעיקר אבטיח ומלון. בשנים האחרונות המחלה התפשטה לאזורים רבים בעולם, כולל ישראל שבה הפתוגן נחשב כחיידק הסגר (Burdman *et al.*, 2005; Schaad *et al.*, 2003). המחלה מתבטאת בפגיעה הרסנית בנבטים וצמחים צעירים או בצמחים מניבים, תוך פגיעה ישירה בפרי הגורמת לריקבון והפוסלת אותו לשיווק. בין השנים 2000-2003 ובשנים 2007-2008, המחלה גרמה להפסדים כלכליים בשדות מלון ואבטיח באזורים שונים בארץ. אין אמצעים כימיים יעילים להדברת החיידק ואין כיום זני מלון או אבטיח מסחריים בעלי עמידות ל-BFB. הדברת המחלה מתבססת בעיקר על שימוש בחומר ריבוי נקי ופיטוסינטיציה בשטחים בהם מתגלית המחלה. אין כיום שיטת חיטוי זרעים ולא קיימים פרוטוקולים מתאימים לגילוי החיידקים במכסות זרעים או בשתילים כאשר ריכוזי החיידק נמוכים (Bahar *et al.* 2009).

למרות חשיבות המחלה שאלות רבות הקשורות למקורות המידבק הראשוני, להפצת המחלה והישרדות הפתוגן עדיין לא נפתרו. ההנחה היא שהפתוגן חדר לארץ באמצעות זרעים נגועים וזאת למרות הבדיקות הנעשות ע"י חברות הזרעים. לפיתוח שיטת איבחון רגישה ואמינה יש חשיבות רבה במניעת חדירה של המחלה דרך הזרעים. המחלה בארץ מוגבלת לאבטיחים ומלונים ועדיין לא פגעה בגידולים אחרים כמו מלפפונים כפי שקרה במקומות אחרים בעולם. אולם אי טיפול בבעיה בשלבים אלה יגרום לביסוס האינזוקולום בארץ, להפצת המחלה לגידולים אחרים וליצירת אפידמיה שתהיה קשה לשליטה. המטרה הכללית של המחקר היא לפתח גישות להתמודדות עם מחלת הכתם הבקטריאלי במלון ואבטיח שיאפשרו להתמודד מעשית עם סכנת ההתפשטות של פתוגן זה בארץ.

**מטרות המחקר**

- א. איתור מקורות המידבק הראשוני של הפתוגן בשדה ובבתי צמיחה.
- ב. קביעת הגורמים המשפיעים על התפתחות והתפשטות המחלה.
- ג. פיתוח פרוטוקול לבדיקה רגישה ואמינה לגילוי הפתוגן בזרעים ובשתילים.

**פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות****א. איתור מקורות המידבק הראשוני של הפתוגן****א.1. בידוד הפתוגן מצמחים החשודים כנגועים**

בכל שנות המחקר נערכו ביקורים, ביחד עם מדריכי הגידולים, בשדות בהם מגדלים אבטיחים ומלונים ללקיחת דגימות של צמחים החשודים כנגועים באצידוורקס. חלקי הצמחים שנדגמו היו עלים, גבעולים שורשים ופירות. עלים צעירים של אבטיח היו בעלי כתמים קטנים כלורוטיים המפוזרים על כל שטח העלה.

פירות חשודים כנגועים היו בעלי כתמים כלורוטיים בקליפת הפרי. בחלקם הציפה היתה ספוגית וחסרת צבע. בפירות מלון נראו נקודות נקרוטיות ובולטות (גרב) בקליפת הפרי. בנוסף נלקחו דגימות קרקע שנאספו ממקומות סמוכים לצמחים הנגועים בעומק של 10 ס"מ. דגימות הצמחים הועברו למעבדה במכון וולקני לבידוד וזיהוי הפתוגנים. הבידוד נעשה באמצעות זריעה על צלחות המכילות מצע סלקטיבי MTM (יתואר בסעיף ג' בהמשך). מושבות אופייניות לאצידוורקס, בעלות צבע אפור-ירוק כהה והילה שקופה מסביב, מתקבלות לאחר 5 ימי הדגרה. לאישרור התוצאות למושבות החשודות נעשית ריאקציה PCR עם פריימרים ספציפיים שפותחו על ידינו (יתואר בהמשך). בנוסף מספר דגימות נבדקו בקיט מסחרי של חברת Agdia. תאריכי האיסוף, המקום וסוג הדגימה מתוארים בטבלה 1. בכל 188 הדגימות של חלקי צמחים וקרקע לא התגלה הפתוגן. מדגימה של צמחי עגבנייה שהראו תסמיני מחלה של השחרת עלים בודדנו חיידקים האופייניים לאצידוורקס. למרות שתבדידי אצידוורקס ידועים כספציפיים לדלועיים התבדד שבודד מעגבניות תוקף אבטיחים.

**טבלה 1:** דגימות של צמחים וקרקע שנאספו ממקומות שונים בארץ לבידוד אצידוורקס

תאריך	מקום	סוג הדגימה	מספר הדגימות
8.7.10	קיבוץ כנרת	פירות, גבעולים, צוואר השורש, עלים וקרקע (אבטיח)	15
10.7.10	כפר יונה	פירות ועלים (אבטיח)	10
15.7.10	כפר יונה	עלים נקרוטיים (אבטיח)	5
18.7.10	כפר יונה	עלים של זן 313 (אבטיח)	5
18.7.10	רמת יוחנן	עלים של זן 913 (אבטיח)	7
18.7.10	בית ליד	עלים של זן מקסימה (אבטיח)	8
26.7.10	הכפר הירוק	עלים וגבעולים (אבטיח)	9
18.8.10	הכפר הירוק	פירות (אבטיח)	4
17.7.11	יבניאל	פירות ועלים (אבטיח)	10
17.7.11	מולדת	פירות ועלים (אבטיח)	15
21.7.11	מי עמי	עלים נקרוטיים (אבטיח)	25
21.7.11	פוריה	עלים וגבעולים (אבטיח)	12
21.7.11	החותרים	עלים (אבטיח)	8
27.7.11	קיבוץ כנרת	גבעולים, צוואר השורש ועלים (אבטיח)	10
3.1.12	עין יהב	פירות (מלון)	25
22.3.12	בית ליד	עלים נקרוטיים (מלון)	6
22.3.12	קיבוץ החותרים	עלים נקרוטיים (מלון)	4
18.4.12	מי עמי	עלים נקרוטיים (מלפפון)	3
14.2.12	עין יהב	פירות עם כתמים צהובים (מלון)	7

#### א.2. בדיקת הישרדות הפתוגן בקרקע

א.2.1. בדיקות קרקע נעשו רק בשנה הראשונה ומכיוון שהמחלה לא התגלתה בצמחים לא ביצענו בהמשך בדיקות לגילוי החיידק בקרקעות שבהן נמצאו צמחים חשודים. בשנה השלישית אילחנו קרקע בפתוגן ובדקנו הישרדות החיידק לאורך זמן וכן הופעת המחלה בצמחים שנשתלו בקרקע מנוגעת. מהלך הניסוי: הכנת המדבק נעשתה מתבדיד M6 שבודד ממלון בארץ. גידול התבדיד נעשה על צלחות נוטריינט אגר המכילות 100 מיקרוגרם למ"ל אמפיצילין, למשך 48 שעות ב-28 מ"צ. התרבית נאספה בעזרת מים מעוקרים וממנה הוכן תרחיף המכיל  $10^9$  חיידקים למ"ל.

לתערובת קרקע המשמשת כמצע גידול לשתילים (כבול וורמיקוליט 50: 50) הוספו 50 מ"ל של תרחיף החיידקים לכל 500 גרם קרקע וזו הועברה לעציצים. לכל ניסוי נלקחו 30 עציצים שהוחזקו בתא הסגר ומהם נלקחו דגימות קרקע לבדיקת הישרדות לאחר 15 ו- 30 ימים. דגימות של 2 גרם מהקרקע המאולחת הורחפו ב- 12 מ"ל מים מעוקרים והתרחיף טולטל במשך 10 דקות במטלטלת. לאחר מכן נעשו מיהולים עשרוניים שנזרעו על צלחות עם מצע סלקטיבי MTM.

במקביל, 15 עציצים עם קרקע מאולחת שימשו לזריעת מלון מהזן Cantaloupe Imperial (זרעים בן שחר). נערך מעקב אחר הופעת הסימפטומים וכן נלקחו חלקי צמח לבדיקת נוכחות הפתוגן לאחר 15 ימים ממועד הזריעה. מכל צמח נלקחו דגימות של פסיגים, עלה ראשון וגבעול במשקל של כ- 200 מיליגרם שלהם הוספו 1 מ"ל מים מעוקרים. הדוגמאות רוסקו וטולטלו במשך כמה דקות ולאחר מכן נזרעה דגימה של 100 מיקרוליטר על צלחות עם מצע סלקטיבי MTM.

תוצאות: בדיקת רמת החיידקים בקרקע הראתה כי בזמן אפס (מועד האילוח) היו  $10^5$  חיידקים לגרם קרקע. לאחר 15 ימים מספר המושבות שזוהו בצלחות הסלקטיביות ירד והגיע לרמה של  $10^2$  חיידקים לגרם. בבדיקה נוספת לאחר 30 יום, לא התקבלו מושבות אופייניות לאציידוורקס בצלחות עם המצע הסלקטיבי. תוצאות אלו מצביעות על כך שהפתוגן אינו שורד בתערובת הקרקע המשתמשת כמצע לגידול שתילי מלון.

בבדיקה של שתילי המלון (בני 15 ימים) שגודלו בעציצים עם קרקע מאולחת, רק ב- 20% מהם התפתחו תסמיני מחלה בפסיגים בלבד. רמת האכלוס בפסיגים ובעלים עם תסמיני מחלה היתה בין  $10^7$ - $10^8$  תאים לגרם צמח. האיכלוס נבדק גם בשאר הצמחים שלא פיתחו תסמיני מחלה. לשם כך נלקחו דגימות של קטעי רקמה מפסיגים, עלים ראשוניים, גבעול ושורשים. מתוך 24 צמחים ללא סימפטומים שנבדקו רק בדגימות של פסיגים מ- 4 צמחים בודדו חיידקים. דגימות מעלים ראשוניים וגבעולים יצאו חיוביות לאציידוורקס רק ב- שני צמחים וצמח אחד, בהתאמה.

#### א.2.2 קביעת סף הדבקה במים הגורם להתפתחות המחלה

מהלך הניסוי: קביעת הכמות המינימאלית של חיידקים במים הגורמת להתפתחות מחלה נעשתה ע"י אילוח שתילי מלון בריכוזים שונים של החיידק. שורשים של שתילי מלון בני 15 ימים נטבלו בתרחיף החיידק בריכוזים של  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$  חיידקים למ"ל במשך 30 דקות ולאחר מכן הועברו לעציצים. לכל ריכוז נלקחו 16 שתילי מלון והניסוי התבצע פעמיים. הצמחים הוחזקו בתא הסגר עם טמפרטורה ממוצעת של כ- 25 מ"צ. לאחר 15 ימים התבצעה הערכת נגיעות ונבדקה רמת האוכלוסיה בצמחים. דגימות של פסיגים עלה ראשון, ושורשים (לאחר חיטוי עם אקונומיקה 1%, למשך דקה אחת) נלקחו לקביעת רמת האכלוס בצמחים עם ובלי תסמיני מחלה. מיצויי הצמחים נזרעו על מצע סלקטיבי.

תוצאות: נמצא כי הצמחים שאולחו בריכוזים של  $10^9$  ו-  $10^7$  חיידקים למ"ל פיתחו תסמיני מחלה ב- 70% ו- 40% מהצמחים, בהתאמה. לעומת זאת, בריכוז הנמוך  $10^5$  חיידקים למ"ל לא התפתחו תסמיני מחלה באף אחד מהצמחים.

בצמחים המראים סימפטומים (הודבקו בשורשים בריכוזים של  $10^9$  ו-  $10^7$ ), נמצא כי החיידקים מאכלסים את השורשים, הפסיגים ועלה ראשון בריכוזים בין  $10^5$ - $10^7$  חיידקים לגרם רקמה. לעומת זאת, בצמחים

ללא סימפטומים רמת החיידקים היתה נמוכה יותר  $10^4$  -  $10^2$  חיידקים לגרם רקמה ונמצאה רק בשורשים ובפסיגים. מהעלה הראשון לא בודדו החיידקים. בצמחים שהודבקו בשורשים בריכוז של  $10^5$  חיידקים למ"ל, נמצאה מגמה דומה של אכלוס השורשים והפסיגים בלבד אך בריכוזים נמוכים יותר שבין  $10^1$  -  $10^2$  חיידקים לגרם רקמה.

### **ב. קביעת הגורמים המשפיעים על התפתחות והתפשטות המחלה**

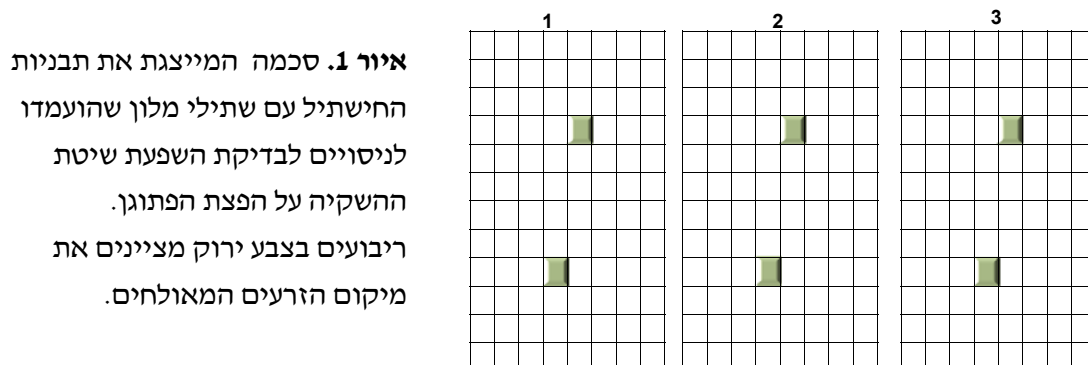
1. השפעת שיטת ההשקיה על התפשטות הפתוגן

מהלך הניסוי: כל הניסויים בוצעו בתא הסגר של המחלקה למחלות צמחים.

הכנת המדבק נעשתה מתבדיל M6 כפי שתואר לעיל. מתרחיף החיידקים הוכנו מיהולים עשורניים של  $10^6$  ו-  $10^4$  חיידקים למ"ל. אילוח זרעי המלון מהזן Cantaloupe imperial נעשה ע"י הרחפה במצע מזון עשיר (המכיל מיצוי שמרים, גליצרול ובנלט) אליו הוסף החיידק בריכוזים שהוזכרו לעיל. הזרעים עברו אינפילטריציה בואקום כשעתיים ולאחריה יובשו באוויר במשך מספר שעות. העמדת הניסוי: שני זרעים מאולחים הונחו בשני מוקדים בכל מגש חישתיל ומסביבם הונחו זרעים בריאים (איור 1). השקיה עילית נעשתה באמצעות מתזים (גודל טיפה קטן, 25 ליטר לשעה, Danpal) לעומת השקיה תחתית שנעשתה בהצפה של המגש. ההשקיה ניתנה במשך 2 דקות 3 פעמים ביום. כל טיפול נלקחו 3 מגשים. לכל ריכוז של חיידקים נעשו 2 ניסויים.

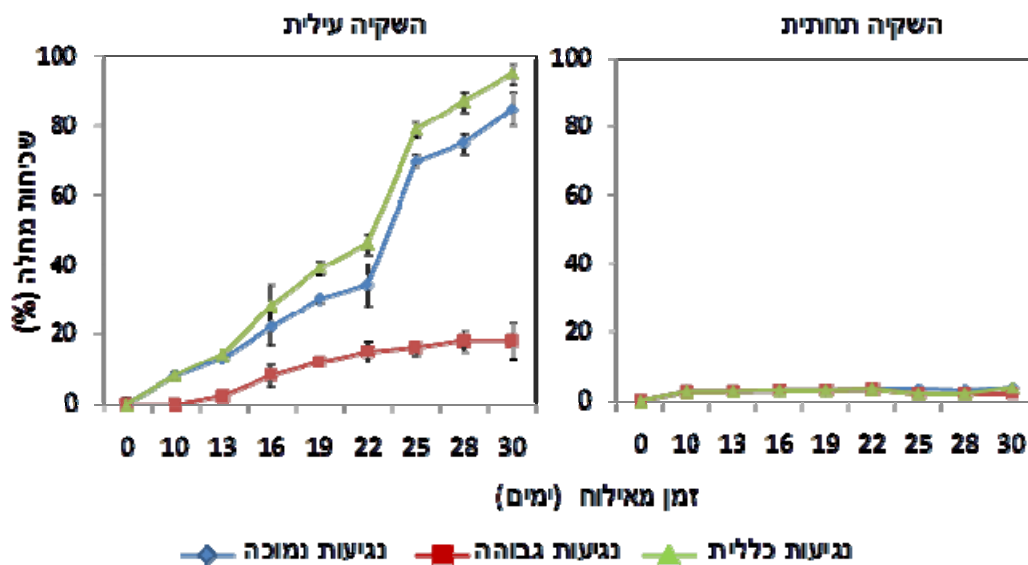
מעקב אחר הופעת התסמינים החל כאשר שתילי המלון היו בני עשרה ימים (בזמן זה לשתיל שני פסיגים ושני עלים ראשונים) וכל 3 ימים עד חודש מהעמדת הניסוי. הערכת רמת הנגיעות בכל מגש נקבעה על פי סולם שכלל 6 דרגות:

דרגה 0: צמח ללא סימני מחלה. דרגה 1: נגיעות נמוכה; כתם אופייני קטן אחד בפסיג או בעלה.  
דרגה 2: נגיעות בינונית; לפחות שני כתמים בפסיגים ו/או בעלים. דרגה 3: נגיעות גבוהה; כתמים אופייניים המתפשטים בפסיגים ובעלים עם שילוב של תסמיני נבילה בעלים ובגבעול. דרגה 4: נגיעות קשה מאד; צמחים עם נבילה. דרגה 5: צמח מת.



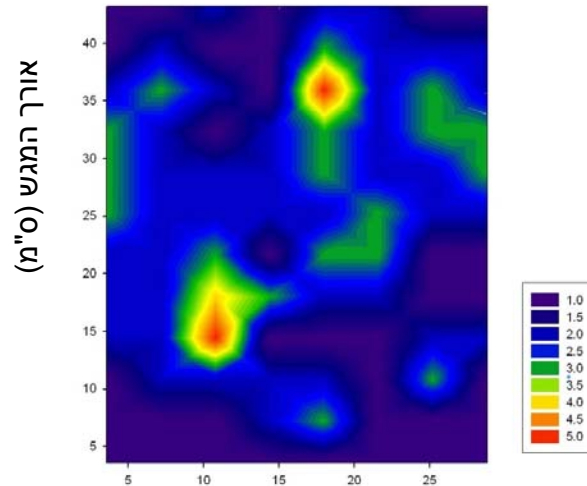
**תוצאות:** באיורים 2 ו-3 ניתן לראות כי שיטת ההשקיה במתזים עליונים משפיעה בברור על הפצת המחלה בשתילי מלון בני 10-14 יום (תנאי משתלה). שכיחות המחלה הכללית עלתה וגדלה במשך תקופת המבחן והגיעה לרמה של כ- 95% חודש לאחר האילוח. שכיחות המחלה בצמחים עם נגיעות נמוכה הגיעה ל- 80% לאחר חודש לעומת 20% בצמחים עם נגיעות גבוהה. לרוב, תסמיני המחלה הופיעו תחילה על הפסיגים ככתמים קטנים צהובים ונקרוטיים. עם הזמן תסמיני המחלה התפשטו בכל הפסיג והופיעו גם בעלים הראשונים. בדרך כלל לא נראו תסמיני מחלה בעלים מספר 3 ו-4.

בניגוד להפצת המחלה ע"י ההשקיה העילית, לא נצפתה התפתחות והתפשטות המחלה בשתילי מלון שהושקו באמצעות השקיה תחתית. שתילי המלון (שמקורם בזרעים המאולחים) ושהונחו במוקדים פתחו מחלה עם רמות נגיעות בין 3 ל-5 ואילו השתילים הסמוכים לא הראו כלל תסמיני מחלה. לאימות התוצאות בוצעה בדיקת נוכחות החיידקים בשתילים הסמוכים לשתילי המקור הנגועים. מכל צמח שמסביב למוקד, נלקחו 2 דגימות של עלה 1 ו-2 במשקל 200 מיליגרם שלהן הוספו 1 מ"ל מים מעוקרים. הדוגמאות רוסקו וטולטלו במשך כמה דקות ולאחר מכן נלקחו 100 מיקרוליטר לזריעה על צלחות עם מצע סלקטיבי MTM. לאחר 4 ימי הדגרה ב- 28 מ"צ, מושבות בעלות מראה אופייני לאצידורקס הועברו לבדיקת PCR עם פריימרים ספציפיים. בנוסף, דגימות הצמחים נבחנו בריאקצית PCR ישירה לאחר סדרת מיהולים עשרוניים. התוצאות השליליות שהתקבלו ב-PCR מצביעות על כך ששתילי מלון השכנים לאלו הנגועים היו נקיים מהפתוגן.



**איור 2.** השפעת שיטת ההשקיה על התפשטות המחלה בשתילי מלון. זרעים מאולחים ( $10^6$  חיידקים למ"ל) של מלון הונחו בשני מוקדים בכל מגש ומסביבם נזרעו זרעים בריאים. בדיקת שכיחות המחלה (%) נעשתה בזמנים שונים לאחר הזריעה. התוצאות הן ממוצע משני ניסויים.





**איור 3.** תיאור ויזואלי להצגת התפשטות המחלה במרחב במגש של שתילי מלון שהושקו עם מתזים עליונים חודש לאחר הזריעה. הנתונים נותחו מרחבית באמצעות תוכנת ContourPlot (Sigmaplot). סולם הצבעים מסמן את חומרת הנגיעות של שתילי מלון: מאדום לצהוב, נגיעות קשה; ירוק, נגיעות גבוהה; כחול, נגיעות בינונית וסגול, נגיעות נמוכה.

## ב.2. שימוש בתכשיר נחושת להדברת המחלה

ב.2.1. בדיקת רגישות של תבדידי אצידוורקס לתכשיר נחושת

אחד מהתכשירים בהם נעשה שימוש במשתלות למניעת מחלות, הוא תכשיר הנחושת הידרוקסיד-

Kocide. מכיוון שרגישות אוכלוסיית הפתוגן בארץ לתכשירי נחושת לא ידועה, נבדקו בשלב הראשון אוסף

התבדידים הקיים במעבדה, ובשלב שני נקבע הריכוז המינימאלי לעיכוב גידול החיידקים.

מהלך הניסוי: כ-17 תבדידים (13 בודדו ממלון או אבטיח ו-4 תבדידים משתילי עגבניה) נבדקו על צלחות

נוטריאנט אגר המכילות ריכוזים שונים של התכשיר: 0.05%, 0.1%, 0.25%. הוכנו תרחיפים בריכוז של

$10^3$  חיידקים למ"ל מכל אחד מהתבדידים ומהם נזרעו 50 מיקרוליטר על הצלחות עם ריכוזי הנחושת

השונים. הצלחות הודגרו ב-28 מ"צ למשך 5 ימים.

תוצאות: נמצא שריכוז נחושת של 0.05% עיכב באופן מוחלט את גידול תבדידי אצידוורקס שבודדו מצמחי

אבטיח ועגבניות. לעומת זאת, תבדידים שמקורם ממלון היו עמידים יותר בריכוז זה ועכבו רק ב-50%

בהשוואה לצלחות ללא תוספת נחושת. ריכוז נחושת של 0.1% עיכב את הגידול של כל תבדידי אצידוורקס

שנבדקו במבחן זה. המסקנה מהתוצאות הנ"ל הוא שריכוז נחושת של 0.1% הוא הריכוז המינימאלי

לעיכוב גידול הפתוגן.

## ב.2.2. השפעת ריסוס בתכשיר נחושת על התפשטות הפתוגן במשתלה

על מנת לענות על השאלה האם תכשיר נחושת מונע או מקטין את עוצמת המחלה וההפצה המישנית במשתלה, נערכו שני סוגים של ניסויים. האחד שבו הונחו זרעים מודבקים במוקדים וניסוי שני ע"י ריסוס העלוח עם תרחיף של הפתוגן.

מהלך הניסוי עם זרעים מודבקים: הניסויים נעשו במגשי חישתיל והשקיה עילית. אילוח של זרעי מלון מהזן Cantaloupe Imperial נעשה ע"י אינפילטרציה עם שני תרחיפים בריכוזים של  $10^8$  ו-  $10^7$  חיידקים למ"ל למשך כשעתיים ויבוש באוויר במשך מספר שעות כפי שתואר קודם. שתי קבוצות של 9 זרעים מאולחים בכל אחד מהריכוזים, הונחו בשני מוקדים בכל מגש חישתיל ומסביבם הונחו זרעים בריאים. טיפול אחד שימש כביקורת (רוסס במים) וטיפול שני רוסס בנחושת בריכוז 0.15%. כאשר שתילי המלון היו בני 10 ימים (הזמן בו מופיעים שני הפסיגים). ריסוס נוסף בנחושת ניתן לאחר 3 ימים מהריסוס הראשון. מעקב אחר הופעת התסמינים החל יומיים אחרי הטיפול השני בנחושת ובכל 3 ימים עד חודש מתחילת הניסוי.

מהלך ניסוי עם ריסוס עלווה: זרעי מלון בריאים נזרעו במגשי החישתיל והוחזקו בתא גידול עם השקיה עילית. כאשר השתילים היו בני 10 ימים ניתן ריסוס בתכשיר הנחושת 0.15% ואילו טיפול הביקורת רוסס במים. לאחר יבוש הטיפות נעשה ריסוס ב- 100 מ"ל למגש של תרחיף חיידקים בריכוז של  $10^6$  למ"ל. מעקב אחר הופעת התסמינים החל יומיים אחרי הריסוס עם תרחיף החיידקים ובכל 3 ימים עד חודש מתחילת הניסוי.

בשני סוגי הניסויים, הערכת רמת הנגיעות בכל מגש נקבעה על פי שלוש דרגות:

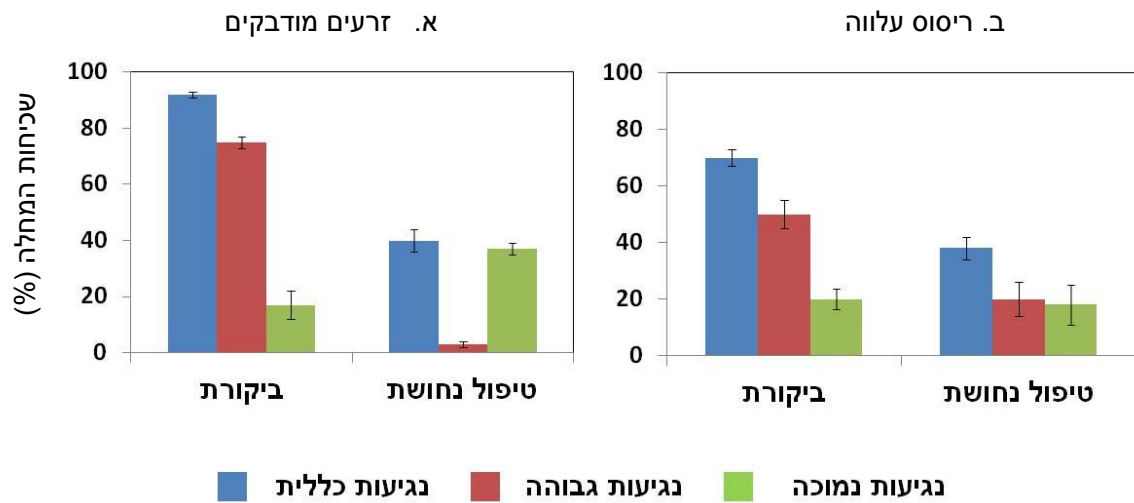
דרגה 0: צמח ללא תסמיני מחלה.

דרגה 1: נגיעות נמוכה; כתם אופייני קטן אחד בפסיג.

דרגה 2: נגיעות קשה מאד או צמח מת.

תוצאות: בניסוי עם מוקדים של זרעים מודבקים (איור 4א), שכיחות המחלה הכללית הגיעה ל-92% לאחר שלושים ימים. מרבית הצמחים הנגועים (75%) הראו תסמיני מחלה חמורים שהתבטאו ככתמים נקרוטיים בפסיגים ובעלה הראשון או תמותה של הצמחים. לעומת זאת רק 17% מהנגועים היו בדרגת נגיעות נמוכה. טיפול בנחושת הוריד את שכיחות המחלה הכללית ל-40% בהשוואה לביקורת כאשר מרבית הצמחים הנגועים (37%) הראו תסמיני מחלה בדרגת נגיעות נמוכה ורק 3% היו בדרגת נגיעות קשה (איור 5א).

מגמה דומה התקבלה בניסוי של ריסוס עלווה (איור 4ב). שכיחות המחלה הכללית לאחר ריסוס בפתוגן היתה 70% בביקורת ו-38% בטיפול בנחושת. בטיפול הביקורת התקבלה 50% נגיעות גבוהה לעומת 20% בטיפול הנחושת. יש להדגיש שרמת החיידקים בריסוס היתה גבוהה ולמרות זאת טיפול בנחושת הוריד את רמת המחלה.



**איור 4.** השפעת הטיפול בתכשיר נחושת על שכיחות המחלה בשתילי מלון. מגשים של שתילי מלון הוחזקו בתאים עם השקיה עילית במתזים ובטמפרטורה של 25-28 מ"צ. בדיקת שכיחות המחלה (%) נעשתה לאחר 30 ימים מהעמדת ניסויים א ו-ב.

### 3. ב. מעבר החיידק בצמח ורגישות אברי הצמח להפצה המישנית

תוצאות שהוצגו לעיל הראו כי השקיה עילית במתזים גורמת להפצת המחלה לצמחים השכנים. כדי להבין את התופעה בניסויים הבאים בדקנו מהם האברים בצמח שבהם מתרכזים החיידקים והיכולים להוות מקור להפצה מישנית ומהם האברים הרגישים להפצה המישנית של המחלה בתנאי משתלה.

#### 3. ב. 1. מעבר הפתוגן בצמח

מהלך הניסוי: מאה זרעי מלון מאולחים בריכוז של  $10^7$  חיידקים למ"ל נזרעו במגש חישתיל והוחזקו בתא לח בו קיימים תנאים שמעודדים נביטה. לאחר הופעת הפסיגים, הועברו הנבטים לעציצים ונערך מעקב אחר הופעת תסמיני המחלה ונוכחות החיידק בחלקים שונים של הצמח.

תוצאות: נמצא כי הפסיגים של 70% מהצמחים הראו תסמיני מחלה האופייניים לאסידוורקס. לאחר התפתחות צמחים אלו נראו כתמים נקרוטיים בעלה ראשון ושני רק ב- 30% ו- 2%, בהתאמה. לא התפתחו תסמיני מחלה בשלבים התפתחותיים מאוחרים יותר כגון, עלה שלישי, רביעי ופריחה. לאימות התוצאות, נלקחו במקביל קטעי רקמה מאיברים נגועים (פסיג, עלה ראשון ושני ושורשים) וגם באלו הלא נגועים (עלים עליונים ופריחים). דגימות הצמח נשקלו, רוסקו והורחפו במים לצורך זריעה על צלחות נוטריאנט אגר בתוספת האנטיביוטיקה אמפיצילין. נמצא כי רמת החיידקים הגיעה ל- $10^2$  תאים לגרם צמח בדגימות שנלקחו מהפסיגים, ול-  $2.5 \times 10^8$  בעלה ראשון ושני. בשורשים הריכוז היה כ-  $10^3$  חיידקים ואילו בעלים עליונים יותר ובפריחים לא בודדו חיידקים. התוצאות מראות כי ייתכן והחיידק אינו עובר באופן סיסטמי לחלקים עליונים של הצמח ולפריחים. הפתוגן מתרכז וגורם לתסמיני מחלה בעיקר בפסיגים ובמידה נמוכה יותר בעלה הראשון והשני.

### ב.3.2 רגישות להפצה המישנית של הפתוגן

מהלך הניסוי: מאה זרעי מלון נזרעו במגש חישתיל והוחזקו בתא המתאים להנבטה. בשלב הופעת הפסיגים, הועברו השתילים הצעירים לעציצים המכילים כבול וטוף (M08) ביחס של 30:70 והוחזקו בתא ההסגר. בשלבי התפתחות שונים של הצמח, פסיגים, עלה ראשון ועלה שני, רוססה קבוצה של 20 צמחים עם 100 מ"ל תרחיף של החיידק בריכוז של  $10^6$  תאים למ"ל באמצעות מרסס עדין. נערך מעקב אחר הופעת הסימפטומים ובמקביל נלקחו דגימות רקמה לאחר עשרה ימים מהריסוס לבדיקת איכלוס. במקרה של צמחים שרוססו בשלב הפסיגים, נאספו דגימות של עלה ראשון. במקרה של ריסוס עלה ראשון ושני, שאר הצמח מעל לעלה המודבק נלקח לבדיקה. האיכלוס נבדק על צלחות המכילות מצע נוטריאנט אגר המכיל אמפיצילין.

תוצאות: נמצא כי לאחר 10 ימים מהאילוח 65% מהצמחים שרוססו בשלב הפסיגים הראו תסמיני מחלה בפסיגים, אך רק חצי מצמחים אלו היו בעלי סימפטומים (כתמים קטנים נקרוטיים) בעלה הראשון. בזריעה של כל רקמת העלה הראשון התקבלה אוכלוסיה של  $10^{10}$ - $10^9$  חיידקים לגרם צמח. במקרה של ריסוס תרחיף חיידקים בשלב העלה הראשון, 30% מהצמחים פיתחו תסמיני מחלה בעלים המודבקים אך רק 10% מהצמחים הללו הראו נוכחות החיידקים בשאר חלקי הצמח ברמות של  $10^3$ - $10^2$  חיידקים לגרם צמח. ריסוס עם תרחיף החיידקים בשלב הופעת העלה השני, הראה כי 10% בלבד מהצמחים המודבקים, פיתחו תסמיני מחלה ברמות של  $10^2$  חיידקים לגרם צמח. תוצאות אלו מראות פעם נוספת שהפסיגים הם הרגישים ביותר להתפתחות מחלה ולהפצה המשנית בתנאי משתלה.

### ב.3.3 נוכחות החיידקים על פני הפסיגים ובמי הדמיעה (הידטודות)

מהלך הניסוי: נבדקה האפשרות שחיידקים הנמצאים על פני הפסיגים, ומופצים בטיפות המים בזמן ההשקיה העילית במתזים, הם האחראיים להפצת הפתוגן לשתילים השכנים. עשרים שתילי מלון (בני 12 ימים) עם פסיגים נגועים (שמקורם בזרעים המאולחים) הושקו ע"י מתזים במשך כ-10 דקות. לאחר מכן הטיפות שנמצאו על פסיגים הנגועים נאספו בעזרת פיפטור והועברו למבחנה אפנדורף. הנוזל (1 מ"ל) סורכוז, הורחף ב-100 מיקרוליטר מים ונזרע על צלחות עם מצע סלקטיבי. במקביל נעשתה מהתרחיף ריאקציה PCR ישירה עם פריימרים ספציפיים.

האפשרות שהחיידקים מופרשים במי הדמיעה נבדקה בניסוי הבא. זרעי מלון מאולחים בריכוז של  $10^6$  חיידקים למ"ל נזרעו בעציצים. לאחר 15 ימים מהזריעה, הצמחים המאולחים (אך בלי תסמיני מחלה) הוכנסו לתא מיוחד בו שוררים תנאים המעודדים הפרשת טיפות מי דמיעה (איור 5). למחרת, טיפות מי הדמיעה מהעלים הראשונים נאספו, רוכזו (בצנטריפוגה) ונזרעו על צלחות עם מצע סלקטיבי ובמקביל בוצעה ריאקציה PCR ישירה.

תוצאות: באיסוף טיפות המים מפני הפסיגים התקבלו תוצאות חיוביות הן ב-PCR והן בגידול על מצע המזון. לעומת זאת לא נתגלה הפתוגן במי הדמיעה בשתי שיטות הבדיקה. התוצאות מראות שהפצת המחלה לצמחים השכנים, נעשית כנראה ע"י הפסיגים הנגועים ובמידה מועטה יותר ע"י העלים הראשונים הנגועים.

**איור 5.** עלה מלון מראה הפרשת טיפות מי דמיעה לאחר הכנסת הצמח לתא לח במשך 16 שעות.



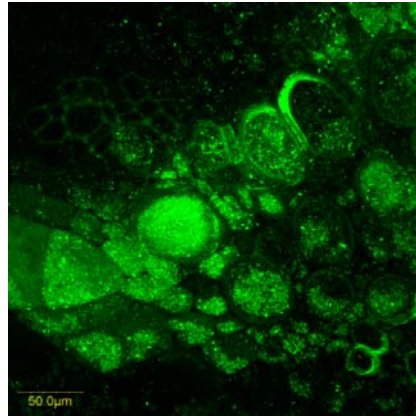
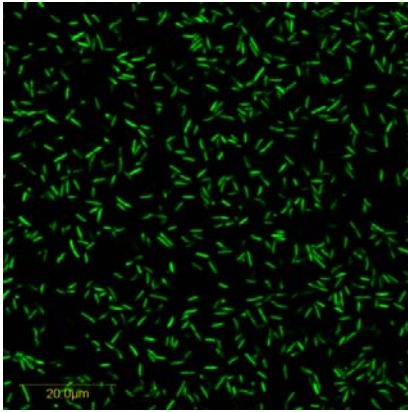
#### ב. 4. בדיקת מעבר הפתוגן לזרעים

מטרת ניסוי זה היא לענות על השאלה האם הפתוגן עובר באופן סיסטמי מהצמח לפרי ומנגע את הזרעים ו/או כתוצאה מהדבקה מישנית בשלב הפריחה. בניסוי שתואר לעיל לא מצאנו איכלוס של הפרחים בחיידקים כאשר האילוח נעשה בזרעים. כדי לענות על שאלה זו פיתחנו חיידק אצידוורקס המבטא את החלבון הפלורוסנטי GFP.

מהלך הניסוי: כדי ליצור חיידק המסומן ב-GFP בדקנו טרנספורמציה של מספר וקטורים הנושאים את הגן המדווח. כמו כן בדקנו את עוצמת הביטוי של הגן המדווח ואת יציבות הפלסמיד בחיידק לאורך זמן. הניסויים נעשו עם צמחי מלון בני עשרה ימים (שתיל עם שני פסיגים ושני עלים ראשונים) שאולחו בגבעול ע"י דקירה והנחת 10 מיקרוליטר של תרחיף המכיל  $10^8$  חיידק מסומן למ"ל.

תוצאות: טרנספורמציה של התבדיד M6 עם הפלסמיד pKT-Km אפשרה לראשונה לקבל חיידק אצידוורקס המבטא את החלבון הפלואורוסנטי GFP (איור 6א). הפלואורוסנציה נמצאה יציבה עד חודש. בצמחים המאולחים נמצא כי לאחר שבוע מההדבקה הפתוגן מתרבה בעיקר בחלל צינורות ההובלה (איור 6ב).

הועמד ניסוי על מנת לבדוק מעבר החיידקים לאחר אילוח פרחים וחנטים עם החיידק המסומן. האילוח נעשה ע"י ריסוס כל פרח בנפרד עם תרחיף של חיידקים ( $10^8$ - $10^9$ ), וכן באמצעות טפטוף של 40 מיקרוליטר מתרחיף החיידקים לכל פרח. בשל בעיות טכניות הניסוי לא הצליח. בהמשך העבודה נחזור על ניסויים אלו שלא במסגרת תוכנית המחקר הנוכחית.



**איור 6.** א. תרבית של החיידק אצידוורקס M6 המבטא את החלבון ה-GFP כפי שניתן לראות במיקרוסקופ פלאורוסנטי. ב. חתך אורך של גבעול צמח מלון מראה שהחיידק המסומן ממלא את צינורות ההובלה כפי שניתן לראות במיקרוסקופ קונפוקלי.

### ג. פיתוח פרוטוקול רגיש ואמין לגילוי הפתוגן בזרעים ובשתילים

#### 1. פיתוח מצע סלקטיבי לזיהוי החיידק

המחקר לפיתוח פרוטוקול לגילוי הפתוגן בזרעים ובשתילים, מתבסס על שתי גישות: בקטריולוגית ומולקולארית. שילובם עשוי לספק את הרגישות והאמינות לבדיקת החומר הצמחי. מהלך הניסוי: בשלב ראשון של פיתוח מצע סלקטיבי נבדקה רגישות של 12 תבדידי אצידוורקס למעכבים שונים. מצעי מזון – TSA (tryptic soy agar) ו-MTM (modified tween medium) הידועים כמתאימים לגידול של תבדידי הפתוגן (Grondeau et al., 2007; Walcott and Gitaitis, 2000) נבחרו כמצעי בסיס. בדיקת רגישות למעכבים, שמונעים גידול של חיידקים ופטריית ספרופיטים, נעשתה ע"י הוספתם למצעי הבסיס. נבחנו מספר אנטיביוטיקות: cephalothin, 5-fluorouracyl, ו-novobiocin. נגד פטריות נבדק התכשיר cycloheximide. הריכוזים שנבדקו היו בטווח של 10 עד 100 מיקרוגרם למ"ל. תהליך בדיקת הרגישות נעשה על פי השלבים הבאים:

1. הוכן תרחיף מהחיידק M6 שנזרע על צלחות NA (Nutrient Agar) המכילות אמפיצילין והודגר ב-28 מ"צ למשך 48 שעות.
  2. מהתרחיף המרוכז נזרעו 100 מיקרוליטר על צלחות TSA ו-MTM לקבלת גידול אחיד על פני הצלחות.
  3. על צלחות אלו הונחו דיסקיות נייר (1 ס"מ קוטר) שנטבלו בריכוזים שונים של תמיסת המעכב הנבחר.
  4. לאחר הדגרה בטמפרטורה של 28 מ"צ למשך 5 ימים, נבדקה ההילה שנוצרה מסביב לדיסקיות.
- תוצאות: לא נוצרה הילה מסביב לדיסקיות המכילות את האנטיביוטיקות Novobiocin ו-5-fluorouracyl – 5 בריכוזים של 10 ו-20 מיקרוגרם למ"ל. כלומר אנטיביוטיקות אלו לא מעכבות את החיידק. לעומת זאת

נוצרה הילה מסביב לדסקיות עם cephalixin בכל הריכוזים שנבחנו. תוצאה המעידה על רגישות אצידוורקס לאנטיביוטיקה זו.

במהלך הכנת המצעים התגלה קושי בהתמוססות של האנטיביוטיקה 5-fluorouracyl ולכן החלטנו לא להשתמש בה בהמשך העבודה.

לבדיקת יעילות המצעים הוכנו בשלב הבא צלחות MTM המכילות novobiocin בריכוזים של 10 ו-20

מיקרוגרם למ"ל וציקלוהקסימיד 50 מ"ג למ"ל, ועליהם נזרע התבדיל הנבחן בריכוז של  $10^2$  חיידקים לצלחת. במצע זה מתקבלות מושבות בעלות צבע אפור-ירוק כהה והילה שקופה מסביב (איור 7). נמצא כי במצע זה בשני הריכוזים של האנטיביוטיקה לא היה עיכוב בגידול החיידקים.

מצעי מזון TSA ו-MTM בתוספת האנטיביוטיקה novobiocin נבחנו בהמשך ליעילותם בגילוי הפתוגן

ברקמה צמחית ויכולתם לעכב את גידול המיקרואורגניזמים הספרופיטיים. הניסויים נעשו ע"י הוספת

ריכוזים שונים של החיידק ( $10^7$  ו- $10^8$ ) לרקמה צמחית מרוסקת של מלון או מיצוי של זרעי מלון. נמצא

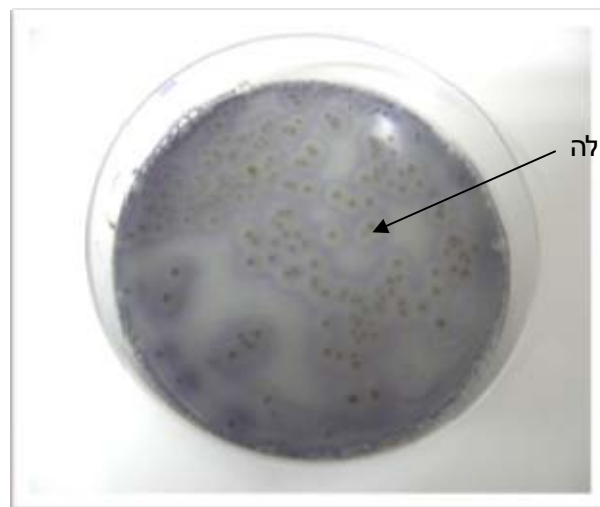
שמצע מזון MTM בתוספת novobiocin בריכוז של 50 מיליגרם למ"ל היה היעיל ביותר לגילוי החיידק

וכמעט שלא התפתחו עליו ספרופיטים. לעומת זאת, הוספת אותו ריכוז של אנטיביוטיקה למצע TSA גרמה

לעיכוב משמעותי בגידול החיידק אצידוורקס. מסקנתנו היא שמצע MTM בתוספת האנטיביוטיקה מתאים

לבדיוד הפתוגן מרקמות צמחיות שונות המגיעות למעבדה לבדיקת נוכחות אצידוורקס.

**איור 7.** גידול מושבות אופייניות של החיידק אצידוורקס על גבי צלחת עם המצע הסלקטיבי MTM ובנוכחות אנטיביוטיקה Novobiocin (20 מיקרוגרם למ"ל). תוצאות לאחר גידול של 5 ימים.



מושבות עם הילה

ג.2. פיתוח שיטה מולקולארית רגישה וספציפית לגילוי אצידוורקס בזרעים וחלקי הצמח השונים

מהלך העבודה: בעבודה זו נבחנו מספר פריימרים לשימוש בשיטת ה-PCR כשהכוונה היא למצוא את זוגות

הפריימרים שיראו את הרגישות וספציפיות הגבוהים הדרושים לפיתוח שיטה יעילה ואמינה לגילוי

הפתוגן. בטבלה 2 מובא הרצף והמקור של הפריימרים שנבחנו. ארבעת הזוגות הראשונים ידועים

ומשמים לזיהוי החיידק. שני זוגות נוספים (LAU, RIBOT) תוכננו על ידינו ונבחנו לראשונה בעבודה זו. בניית הפריימרים LAU ו-RIBOT נעשתה בעזרת התוכנה (Primer Express 3.0, Applied Biosystems) תוך השוואת הרצף למאגרי מידע באמצעות BLAST. ראקציית ה-PCR נעשתה עם קיט 5X Hot FirePol Blend Master Mix שנמצא היעיל ביותר להגברת מקטעי DNA של אצידוורקס ע"י הפקתו באופן ישיר ממושבות וחלקי צמח נגועים. ספציפיות ורגישות הפריימרים נבחנו באמצעות ראקציית PCR עם דנ"א כמקור להגברה. מיצוי הדנ"א נעשה ממושבות שגדלו על צלחות סלקטיביות, מחלקי צמחים נגועים, ממיצוי זרעים ומחיידקים אחרים קרובים מבחינה אבולוציונית לאצידוורקס כמו *Pseudomonas fluorescens* A450 ו-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

**תוצאות:** שני זוגות הפריימרים שסונתזו בעבודה זו הצטיינו ביכולתם להגביר באופן רגיש וספציפי את הפתוגן לעומת זוגות הפריימרים האחרים שנבחנו. הספציפיות נבחנה עם תרחיפי חיידקים שהוכנו מאוסף תבדידי אצידוורקס שבודדו ממלון ואבטיח וכן מחיידקים אחרים הקרובים מבחינה אבולוציונית לאצידוורקס. תוצאות חיוביות התקבלו עם כל תבדידי אצידוורקס שנבחנו. לעומת זאת עם תרחיפי חיידקים אחרים כמו *Pseudomonas fluorescens* A450 ו-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* התוצאות היו שליליות. פריימרים אלו שימשו אותנו בהמשך לגילוי הפתוגן בזרעים באמצעות Real time PCR.

## טבלה 2. תיאור זוגות של פריימרים שנבחנו בעבודה הנוכחית.

מקור	**ספציפיות	*רגישות	מיקום הרצפים בגנום	הרצפים (3-5)	הפריימרים
Bahar et al 2008	+/-	+	אזורים חוזרניים בגנום	GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA CAGCTGGGAGCGATCTTCAT	BX-S
Bahar et al 2008	+/-	+	אזורים חוזרניים בגנום	CGGTCTTCGACCTGAACGCT CAGCTTCTTTCCAGCAAA	ERC
Seminis	+	-	האזורים הפנימיים של גנים לרנ"א ריבוזומלי	CCTCCACCAACCAATACGCT TCGTCATTACTGAATTTCAAC	SEQID
Syngenta	-	+	תת יחידה של דיקארבוקילאט טראנספורטר (DetM)	CGCGCCGACCGAGACCTG GGGGCACGCCAACATCCT	SEM
בעבודה הנוכחית	+	+	תת יחידה של דיקארבוקילאט טראנספורטר (DetM)	CGCGTAGATGATCATGATGATCGA TGAGCCGACAGGATGTTGGCGT	LAU
בעבודה הנוכחית	+	+	האזור המקודד של RNA <sub>t</sub>	TTGAATATTCGTTTTGACGCAATC CGGTTCGATCCCGTCATC	RIBOT

\* מתקבל תוצר PCR עם ריכוזים נמוכים של הפתוגן (100, 10 חיידקים למ"ל).  
\*\* מניעת הגברה מקטעים של חיידקים אחרים.  
+ או - תוצאה חיובית או שלילית בהתאמה. +/- תוצאות לא הדירות.



### ג.3. אימות השיטה לגילוי הפתוגן באצוות זרעים

מהלך העבודה: פיתוח שיטת ה-RT-PCR לגילוי הפתוגן באצוות זרעי מלון. לצורך כך סונטזו פריימרים

ספציפיים על בסיס רצף מקטע דנ"א של אותו גן שבחרנו בעבר (זוג הפריימרים LAU) ובעזרת התוכנה

Primer Express 3.0 (Applied Biosystems).

לאצווה של 1000 זרעי מלון בריאים הוספו שני זרעי מלון שאולחו בריכוז של  $10^6$  תאים למ"ל כפי שתואר

לעיל. הזרעים נכתשו ב-40 מ"ל של מים מזוקקים במשך כ-30 דקות, הרסק סונן דרך גזה והמיצוי רוכז

בצנטריפוגה כ-6 דקות ב-8000 rpm. המשקע הורחף במ"ל של מים ומיצוי הדנ"א נעשה בקיט מסחרי של

PrepMan Ultra sample Preparation reagent (Applied Biosystems). לראקציה ה-RT-PCR נלקחו 2

מיקרוליטר של מיצוי הדנ"א ותערובת הראקציה נעשתה עם הסמן פלורוסנטי SYBRgreen, SYBR Premix

Ex Taq II (Takara).

תוצאות: בשיטה זו התגלה הפתוגן במיצוי זרעים עם רמת גילוי גבוהה של מחזור  $C_t$  19.6. כעת אנו עורכים

ניסויים עם אצוות זרעים גדולות יותר של 5000 ו-10,000 שיכילו זרע אחד נגוע.

### דיון

השקיה תחתית בהצפה לעומת השקיה עילית במתזים הראתה בבירור כי בהצפה לא נמצאו צמחים שכנים

נגועים והצמחים לא היו מאוכלסים בחיידקים. כדי להבין תופעה זו בדקנו מהם חלקי הצמח היכולים

להוות מקור להפצה מישנית ומהם האברים הרגישים להפצה המשנית של המחלה בתנאי משתלה. אילוח

בשורשים בריכוזים גבוהים של החיידק ( $10^7$ - $10^9$ ) הראה כי החיידק חודר דרך השורשים, גורם לתסמיני

מחלה ומאכלס ברמה גבוהה את הפסיגים והעלה הראשון, בעוד שבריכוז הנמוך ( $10^5$ ) לא התפתחו תסמיני

מחלה באף אחד מהצמחים והחיידקים בודדו רק מהפסיגים. תוצאה זו מצביעה על כך כי יתכן ובהשקיה

תחתית רמת החיידקים הנמצאת במים נמוכה כך שאין אילוח של שורשי צמחים שכנים הבריאים. סימוכין

לכך מצאנו כאשר בדקנו בשורשים של צמחים שהתפתחו מזרעים נגועים את רמת החיידקים ונמצא כי

הרמה נמוכה ( $10^3$ ). יתכן שגם אם יש זרע נגוע במגש חישתיל רמת החיידקים המשתחררת למים אינה

מספיקה לאילוח שורשי צמחים שכנים. לעומת זאת בהשקיה עילית יש הפצה ניכרת של החיידקים

לצמחים השכנים הבריאים. בניסויי אילוח מזרע נגוע בפתוגן הראנו כי הפסיגים היו תמיד האברים

המאוכלסים ביותר בחיידקים לעומת עלה ראשון, שני או שאר הצמח. רמת החיידקים על פני הפסיגים

שהתפתחו מזרע נגוע היתה גבוהה בעוד שבטיפות מי הדמיעה שהתפתחו בעלה ראשון לא בודדו חיידקים.

כאשר נעשה ריסוס של הפתוגן בשלב הפסיגים, עלה הראשון, או השני נמצא כי מרבית הצמחים פיתחו

סימני מחלה כאשר הריסוס נעשה בשלב הפסיגים. יתכן ויכולת החדירה של החיידק לרקמת העלים

האמיתיים, דרך פתחים טבעיים כמו פיוניות וטרכומות, היא נמוכה. תוצאות אלו מצביעות על כך

שהפסיגים הם הרגישים ביותר להתפתחות מחלה ושהם כנראה המקור העיקרי להפצה המישנית של

הפתוגן בתנאי משתלה.

טיפול בנחושת בזמן ההפצה המישנית במשתלות הוריד באופן משמעותי את שכיחות המחלה הכללית וכן

את עוצמת המחלה, כך שמרבית הצמחים שכן הראו תסמיני מחלה היו בדרגת נגיעות נמוכה. גם כאשר

ניתן ריסוס אחד בנחישות לאחר ריסוס העלווה בפתוגן ברמה גבוהה נמצאה ירידה בשכיחות המחלה וברמתה. תוצאות אלו מצביעות על כך שניתן בריסוס של נחישות או בקטריוציידים אחרים למנוע את ההפצה המישנית במשתלות.

לראשונה הצלחנו בעבודה זו לקבל חיידק אצידוורקס המבטא את החלבון הפלואורוסנטי GFP והראנו כי בצמחים המאולחים לאחר שבוע מההדבקה הפתוגן מתרבה בעיקר בחלל צינורות ההובלה. החיידק המסומן יאפשר לנו בהמשך העבודה לענות על מספר שאלות מחקר חשובות כמו: כיצד החיידק חודר לזרעים, כיצד מתקדם בצמח והיכן מתרכז ברקמות הצמחיות.

במחקר הנוכחי עבדנו על פיתוח ושיפור שיטות האיבחון של הפתוגן בזרעים ובשתילים. מצע המזון MTM בתוספת novobiocin בריכוז של 50 מיליגרם למ"ל היה היעיל ביותר לגילוי החיידק וכמעט שלא התפתחו עליו ספרופיטים. מצאנו שני זוגות פריימרים שבעזרתם ניתן להגביר ב-PCR באופן רגיש וספציפי את הפתוגן ולא ספרופיטים אחרים הקרובים מבחינה אבולוציונית לאצידוורקס. פריימרים אלו שימשו אותנו בהמשך לגילוי הפתוגן בזרעים באמצעות Real time PCR. הזרעים מהווים מקור ראשוני למחלה כך שאיבחון רגיש של הפתוגן באצוות זרעים יקטין באופן משמעותי את מוקדי המחלה במשתלות, אך מניעת ההפצה המשנית חשובה לא פחות.

במהלך שלוש שנות המחקר לא בודדו חיידקים מדגימות של חלקי צמחים וקרקע החשודים כנגועים באצידוורקס. יתכן שבשנים אלו רמת המחלה היתה נמוכה והצמחים שאובחנו כחשודים לא היו נגועים. תתכן גם האפשרות שהתנאים בארץ אינם מתאימים להתפתחות המחלה בשדה. בארה"ב לדוגמה ידוע כי גשמי קיץ יכולים לגרום לאילוח הצמחים והפירות. בארץ יתכן והמחלה היא בעיקר בעיה של משתלות וצמחים נגועים שמתגלים בשדות מקורם משתילים שאולחו ברמה גבוהה במשתלות. לפיכך לדעתנו יש להתרכז בעיקר במשתלות כדרך היעילה להתמודדות עם המחלה. ניתן לעשות זאת ע"י העלאת רמת הרגישות של שיטות האיבחון בזרעים ובכך להקטין את מקור האינקולום הראשוני, ומצד שני למנוע את ההפצה המשנית במשתלות ע"י השקיה תחתית, ריסוס בנחישות או תכשירים אחרים בשלב של הפסיגים שהם האברים העיקריים האחראים להפצה המישנית.

### **פרסומים מהמחקר**

עדיין אין פרסומים מעבודה זו. אנו מתכננים לסיים את המחקר עם החיידק המסומן ב- GFP ואז נסכם את העבודה במאמר שישלח לפרסום בעיתונות בינלאומית. כמו כן תוצאות העבודה יוצגו בוועידה של החברה הישראלית לפיטופתולוגיה שיתקיים בשנה הבאה.

### **הבעת תודה**

אנו מודים לאמנון קורן ממשתלת חישתיל על העצות והצמחים שסיפק. לאורית דרור ומיכל ראובן על השתתפותן בביצוע חלק מהניסויים.

**ביבליוגרפיה**

- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R.R. and Burdman, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Pathology **57**: 754-763.
- Bahar, O., Kritzman, G. and Burdman, S. 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of transmission in pathogenicity. European J. Plant Pathology **123**: 71-83.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G. and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. Plant Disease **89**: 1339-1347.
- Grondeau, C., Manceau, C. and Samson, R. 2007. A semiselective medium for the isolation of *Acidovorax valerianellae* from soil and plant debris. Plant Pathology **56**:302-310.
- Schaad, N.W., Postnikova, E. and Randhawa, P.S. 2003. Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a crop threatening disease of watermelon and melon. In: *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens. Jacobelis, N. S. *et al.* (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 573-581.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L.E., Vidaver, A.K, Jones, J.B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B.A. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavario, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Systemic and Applied Microbiology **31**:434-446.
- Walcott, R.R. and Gitaitis, R.D. (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Disease **84**:470-474.

## סיכום

מטרות המחקר: א. איתור מקורות המידבק הראשוני של הפתוגן בשדה ובבתי צמיחה. ב. קביעת הגורמים המשפיעים על התפתחות והתפשטות המחלה. ג. פיתוח פרוטוקול לבדיקה רגישה ואמינה לגילוי הפתוגן בזרעים ובשתילים.

עיקרי תוצאות: בתנאי משתלה השקיה עילית במתזים גורמת להפצת המחלה לצמחים השכנים בעוד שבהשקיה בהצפה לא נמצאו צמחים שכנים נגועים או מאוכלסים בחיידקים. הפסיגים היו האברים המאוכלסים ביותר בחיידקים לעומת עלה ראשון או שאר הצמח. טיפול בנחושת בזמן ההפצה המישנית הוריד באופן משמעותי את שכיחות המחלה ואת עוצמתה. לראשונה הצלחנו בעבודה זו לסמן חיידק אצידורקס בחלבון הפלואורוסנטי GFP והראנו כי הפתוגן מתרבה בעיקר בחלל צינורות ההובלה. מצע MTM בתוספת האנטיביוטיקה נובוביוצין היה המתאים ביותר לבידוד הפתוגן מהצמחים והזרעים. נבחרו שני זוגות פריימרים שבעזרתם ניתן להגביר ב-PCR את הפתוגן ולא ספרופיטים אחרים. עם פריימרים אלו פותחה שיטת Real time PCR לאיבחון הפתוגן בזרעים. במהלך שלוש שנות המחקר לא בודדו חיידקים מדגימות של חלקי צמחים וקרקע החשודים כנגועים בפתוגן.

מסקנות מדעיות: יתכן והמחלה בארץ היא בעיקר בעיה של משתלות וצמחים נגועים שמתגלים בשדות מקורם משתילים מאולחים. לדעתנו יש להתרכז בעיקר במשתלות כדרך היעילה להתמודדות עם המחלה. ניתן לעשות זאת ע"י העלאת רמת הרגישות של שיטות האיבחון בזרעים ובכך להקטין את מקור האינוקולום הראשוני, ומצד שני למנוע את ההפצה המשנית במשתלות ע"י השקיה תחתית, ריסוס בנחושת או תכשירים אחרים בעיקר בשלב של הפסיגים שהם האברים העיקריים האחראים להפצה המישנית. בעיות שנתרו לפתרון: המשך בדיקת מקור אילוח הזרעים באמצעות חיידק מסומן ב-GFP.

הפצת הידע: טרם נעשה, יעשה בעתיד הקרוב.

פרסום הדוח: ללא הגבלה.