

דוח מסכם לתוכנית מחקר 12-1538-132

אפיון תופעת הניוון של עצי הדר תפוזים הנגרמת ע"י מחלה זמוית גריינינג

**Etiology of the carrot yellows disease and the involvement of the phloem limited *Candidatus Liberobacter solanacearum* bacteria in the disease**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מוניר מוואסי, ניר כרמי

מוניר מוואסי (email: mawassi@volcani.agri.gov.il): המחלקה לפתולוגיה של צמחים-  
היחידה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי.

ניר כרמי: המחלקה למדעי עצי פרי, המכון למדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי.

Munir Mawassi: The Plant Pathology Department, the Virology Unit, ARO, The Volcani Center.

Nir Carmi: Plant Sciences, Fruit Tree Sciences, ARO, The Volcani Center.

יוני  
2013

תמוז  
תשע"ג

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים**

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**



**חתימת החוקר:**

**\* רשימת פרסומים (אין)**

**תוכן עניינים**

3	תקציר .....
4	מבוא ותאור הבעיה .....
7	מטרות המחקר .....
7	פירוט עיקרי הניסויים .....
12	סיכום ודיון .....
14	ביבליוגרפיה .....
15	סיכום עם שאלות מנחות .....

## תקציר

**הצגת הבעיה:** בשנים האחרונות אנחנו עדים להתפרצות תופעה, או מחלה, של התנוונות עצי הדר של תפוזים טבורי דוגמת הזנים סמי וניו-הול. העצים הנגועים נראים עם תסמינים קשים המזכירים את אלו הנגרמים בשל מחלת הגרינינג, הנחשבת לאחת ממחלות ההדרים ההרסניות ביותר. בעצים הנגועים העלים מצהיבים ומראים סימנים הדומים למחסור באבץ. בשלבים הראשוניים, התסמינים נראים רק בחלק מהענפים אך בשלבים מתקדמים יותר, ניכרת תמותת ענפים, העץ מתנוון ובעל מראה שדוף. הפירות קטנים מהרגיל, מעוותים ואינם מבשילים מצד הפיטם. הפירות של העצים הנגועים במחלת ההתמוטטות אינם ראויים לשיווק. הנזקים הכלכליים של המחלה עלולים לנוע בין 20 עד 50% ויותר במחזורי נטיעה מסוימים. מטרת המחקר היא לאפיין את הפתוגן הגורם למחלה.

**מהלך העבודה:** בתוכנית המחקר בדקנו נוכחות וירוסים בעצים סימפטומטיים כמו וירוס הטריסטזה של ההדר. בנוסף, לצורך בחינת נוכחות חיידקים בעצים הנגועים בצענו PCR היכול להגביר מקטעי רצף של טווח רחב של חיידקים שוכני שיפה בצמחים, תוך כדי השימוש בפריימרים המסוגלים להתקשר לרצף הגן 16S Ribosomal RNA. במחקר בחנו את נוכחות החיידקים: פיטופלסמה, ספירופלסמה וליברובקטר בצמחים סימפטומטיים באמצעות PCR תוך כדי ע"י השימוש בפריימרים סגוליים.

**תוצאות:** תוצאות העבודה שנעשתה הראו כי בחלק, אך לא בכל, העצים המראים תסמיני מחלה אופייניים הייתה נגיעות של הספירופלסמה *Spiroplasma citri*- חיידק, חסר דופן, שוכן שיפה המוכר כגורם למחלת העלעלת בהדרים המבטאת תסמיני מחלה דומים לאלו של מחלת הגרינינג הנגרמת ע"י הליברובקטר. באמצעות שיטת ה-PCR שפיתחנו יכולנו במסגרת המחקר לגלות נגיעות בחיידק הליברובקטר בצמחי ההדר קפיר-ליים אשר הוכנסו לארץ ע"י פועלים מתאילנד ללא אישור. צמחים אלה אותרו והושמדו באופן מיידי ע"י השירותים להגנת הצומח. בנוסף פותח פרוטוקול לגילוי החיידק ברקמת הפלואם ע"י סימון פלורוסנטי FISH

## מבוא ותאור הבעיה

בשנים האחרונות אנחנו עדים להתפרצות תופעה, או מחלה, של התנוונות עצי הדר של תפוזים טבורי דוגמת הזנים סמי, וניו-הול. העצים הנגועים נראים עם תסמינים קשים (תמונה 1) המזכירים את אלו הנגרמים בשל מחלת הגריינינג והעלעלת. מחלת הגריינינג נחשבת לאחת ממחלות ההדרים ההרסניות ביותר, ובשנים הארוכות התפשטה בפלורידה לממדים שמעמידים את תעשיית ההדרים בסכנה קיומית. בעצים הנגועים, העלים מצהיבים ומראים סימנים הדומים למחסור באבץ. בשלבים הראשוניים, התסמינים נראים רק בחלק מהענפים אך בשלבים מתקדמים יותר, ניכרת תמותת ענפים, העץ מתנוון ובעל מראה שדוף. הפירות קטנים מהרגיל, מעוותים ואינם מבשילים מצד הפיטם (תמונה 1).

כאמור התסמינים של המחלה מזכירים את אלו הנגרמים ע"י מחלת הגריינינג. מחלת הגריינינג, או הנקראת גם "הואנגלונגבינג" Huanglongbing (מחלת הדרקון בסינית) (3) היא מחלה בקטריאלית הפוגעת קשה בגידול ההדרים באסיה (ובכלל זה בערב הסעודית), בהודו, באפריקה, בברזיל ובפלורידה (2,6,8,14). מאידך, המחלה טרם הגיעה לאגן הים התיכון (כולל ישראל) ואוסטרליה. המחלה גורמת לנזקים אדרים ונכללת ברשימת המחלות שיש חשש שגורמיהן ישמשו לטרור ביולוגי. בעצים נגועים, העלים מצהיבים, הענפים מתחילים להתייבש והפירות קטנים מהרגיל, אינם מבשילים מצד הפיטם וטעמם מר. הזרעים אינם פוריים. בשלבים מתקדמים, העץ כולו מת. גורם המחלה הוא החיידק *Candidatus Liberibacter*, חיידק שיפה שנוכח ליום זה אי-אפשר לגדלו במעבדה במצעים מנותקים. לפי השוואות מקטעי רצף של החיידק, נמצא כי לחיידק נמנים שלוש קבוצות: אסייתית, אפריקאית ואמריקאית. חיידקי ה- *Ca Liberibacter* מועברים במהירות מעץ לעץ ע"י שתי פסילות *Diaphorina citri* ו- *Trioza erytreae* (9).

חשוב לציין שבעצי התפוזים המתנוונים בארץ אף אחד משלושת הסוגים המוכרים של הגורם החיידקי של מחלת הגריינינג (האפריקאי, האמריקאי, האסיאתי) לא התגלה עד כה. מאידך, קיים חשש כי שיטות הדיאגנוסטיקה הקיימות אינן מתאימות לגילוי סוג החיידק הקיים בארץ, באם נמצא. אפשרות נוספת, שתופעת ההתנוונות של עצי התפוזים נגרמת בשל גורם בקטריאלי אחר, שטרם אופיין ושונה מהגורם של מחלת הגריינינג. בעבודה הקדמית אשר נעשתה בנושא, מצאנו כי בחלק, אך לא בכל, העצים המראים תסמיני מחלה אופייניים הייתה נגיעות של הספירופלסמה *Spiroplasma citri* - חיידק, חסר דופן, שוכן שיפה המוכר כגורם למחלת העלעלת בהדרים המבטאת תסמיני מחלה דומים לאלו של מחלת הגריינינג (1).

מחלת העלעלת תוארה לראשונה בארץ בשנת 1930 ע"י רייכרט ופרלברגר. הניסיונות שנעשו בכדי להתמודד עם התופעה, שנחשבה אז לפגם גנטי בחומר הריבוי, ע"י הרכבות חוזרות ברכב מעצים בריאים לא שיפרו את מצב העצים ובעקבות זה כונתה התופעה בשם STUBBORN (עקשן) (1,4,11). נזקי העלעלת בולטים בעצים צעירים, החל מגיל שנתיים. זנים שונים נפגעים במידה שונה. רגישים במיוחד תפוזים (ולנסיה זוני טבורי) ואילו בקליפים ולימונים אין מבחינים בסימני נזק בולטים. ישנה וריאציה אזורית רבה במידת הופעת העלעלת. פגיעת העלעלת תלויה בתפוצת העצים הנגועים ובגיל הפרדס. בפרדסים אשר בהם שיעורי התפוצה גבוהים יש עיכוב חמור בכניסת הפרדס לניבה מסחרית.

מידת הפגיעה ביבול תלויה במידת האלימות והביטוי של תסמיני המחלה הנגרמים בגלל מחלת העלעלת (7). עצים עם תסמיני מחלה אלימים מניבים פחות פרי והפירות שלהם יותר קטנים בהשוואה לעצים נגועים אך מבטאים תסמיני מחלה בינוניים (1,5,13). הסיבה להופעת תסמיני מחלה בעוצמות שונות בפרדסים אינה ברורה דיה, אך קיימת השערה שואריאציה זו תלויה בריכוז חלקיקי החיידק בתוך הרקמה הצמחית (4,5,12). אפשרות שנייה היא שהגנום הקטן במיוחד של חיידק ה- *S. citri* גורם להתרחשות של שינויים גנטיים בגנום ולהופעת גזעים אחרים של החיידק השונים במידת האלימות שלהם (10). אפשרות נוספת היא שהדבקה של העצים בשלב מוקדם ובריכוזי חיידק גבוהים גורמת לטווח רחב של פיזור והתרבות החיידק ברקמות הצמח ולבסוף ביטוי תסמיני מחלה אלימים.



**תמונה 1:** צילומים לתסמיני מחלה של ניוון של עצי הדר תפוזים הנגרמת ע"י ספירופלסמה/פתוגנים דמויי ספירופלסמה

## מטרות המחקר

מטרת המחקר העיקרית היא אפיון הגורם, או הגורמים המעורבים במחלה; ואפיון הנגיעות בצמחים חולים המציגים תסמיני מחלה שונים, כולל לימוד הפיזור של הגורם בחלקי צמח שונים.

## פירוט עיקרי הניסויים

אפיון גורם המחלה והתפוצה בארץ: במטרה לאפיין את הגורם של מחלת ההתנוונות של עצי תפוזים, נעשו בדיקות לגילוי שלושת סוגי החיידקים הפוטנציאליים היכולים לחולל מחלה עם תסמינים של צהבון או התנוונות:

1. חיידק הליברובקטר

2. חיידק הפיטופלסמה

3. חיידק הספירופלסמה

בנוסף עצים חולים המראים תסמיני מחלה נבדקו לנוכחות וירוסים ע"י PCR.

הבדיקות נעשו לעצים מזן התפוזים סמי מפרדסים במרכז הארץ ומפרדסים בדרום באזור עלומים וכפר מימון. נציין כי הדיגום של העצים והסיורים בפרדסים נעשו בשיתוף מדריכי שה"מ יאיר אורן ושוקי קונוניץ. במהלך המחקר נדגמו עצים המראים תסמיני מחלה של הצהבה בעלים ופרות קטנים, מעוותים ואינם מבשילים מצד הפיטם, נדגמו גם עצים ללא תסמיני מחלה שנמצאים במקום מרוחק מעצים סימפטומטיים. בתור ביקורת לבדיקת חיידק הפיטופלסמה, נדגמו 6 גפנים מכרמים מרמת הגולן אשר מראים תסמיני מחלה אופייניים למחלת הצהבון הנגרמת ע"י הפיטופלסמה סטולבור.

הדוגמאות (בסך הכול 47) נבדקו לנוכחות נגיף הטריסטזה של ההדר *Citrus tristeza virus* (CTV) ע"י PCR תוך כדי השימוש בפריימרים ספציפיים לגן חלבון המעטפת- התוצאות שהתקבלו הראו כי הצמחים לא הכילו את נגיף ה- CTV.

לאחרונה התפרסמה עבודה המתארת נוכחות של וירוס בעל חומצת גרעין DNA הנקרא Citrus chlorotic dwarf virus (CCDaV) השייך למשפחת הגיימיניוירוסים ואשר יכול לחולל בעצי הדר תסמינים של הצהבה ונינוס. על מנת לבדוק באם הוירוס הזה נוכח בעצים סימפטומטיים בפרדסי הארץ, הופק DNA מחלק מהעצים החשודים (16 דוגמאות) ונבדק ב- PCR לנוכחות הוירוס CCDaV ע"י השימוש בפריימרים סגוליים. התוצאות שהתקבלו הראו כי הצמחים לא הכילו את הנגיף הזה.

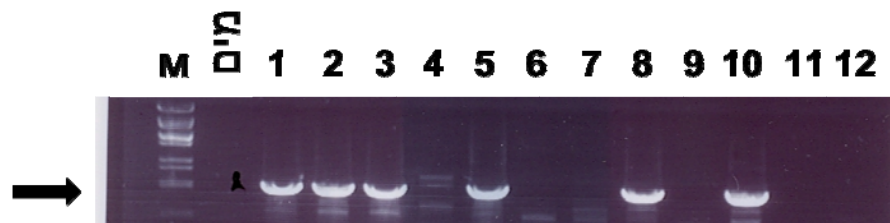
על מנת לבדוק נוכחות וירוסים באופן כללי בצמחים הסימפטומטיים, נעשה מיצוי של RNA דו-גדילי (dsRNA) אשר נוכחותו בצמח מעידה על נגיעות בוירוסים בעלי חומצת גרעין RNA. גם כאן התוצאות שהתקבלו הראו כי הצמחים הסימפטומטיים לא הכילו dsRNA ויראלי.

לבדיקת נוכחות חיידקים נעשו הפקות DNA מעורקים של עלים. בדיקות החיידקים ליברובקטר, פיטופלסמה וספירופלסמה נעשו ע"י הגברת מקטעי רצף מהגן 16S Ribosomal RNA באמצעות nested-PCR, תוך כדי השימוש בפריימרים ספציפיים לחיידקים הנ"ל. תוצרי ה-PCR נבדקו בגיל אגרוז.

התוצאות שהתקבלו (טבלה 1) הראו כי כול העצים הסימפטומטיים וגם הלא סימפטומטיים היו חופשיים מהחיידקים של פיטופלסמה וליברובקטר. מאידך, 18 מתוך ה-28 עצים הסימפטומטיים הכילו את חיידק הספירופלסמה. 10 עצים עם תסמיני מחלה וגם 19 העצים ללא סימפטומים לא הכילו את חיידק הספירופלסמה. נציין כי מבין ה-18 העצים הסימפטומטיים אשר היו חיוביים בבדיקות ה-PCR לחיידק הספירופלסמה 13 נדגמו מפרדסים מזרוע הארץ כמו עלומים וכפר מימון והשאר נדגמו מפרדסים במרכז הארץ. על מנת לאמת כי ה-DNA תוצר ה-PCR שהתקבל מעצים הסימפטומטיים מקורו בחיידק הספירופלסמה, נשלח ה-DNA לקביעת רצף ע"י מעבדות חי בע"מ ברחובות. התוצאות שהתקבלו הראו כי רצף ה-DNA היה תואם ב-100% לרצף החיידק ספירופלסמה הקיים ב-GenBank.

**טבלה 1:** סיכום בדיקות של עצי הדר תפוזים לחיידקים שוכני שיפה.

ליברובקטר (גריינינג)	ספירופלסמה	פיטופלסמה	ס"ה	
0	18	0	28	עצים סימפטומטיים
0	0	0	19	עצים לא סימפטומטיים
לא נבדק	0	6	6	גפנים עם צהבון

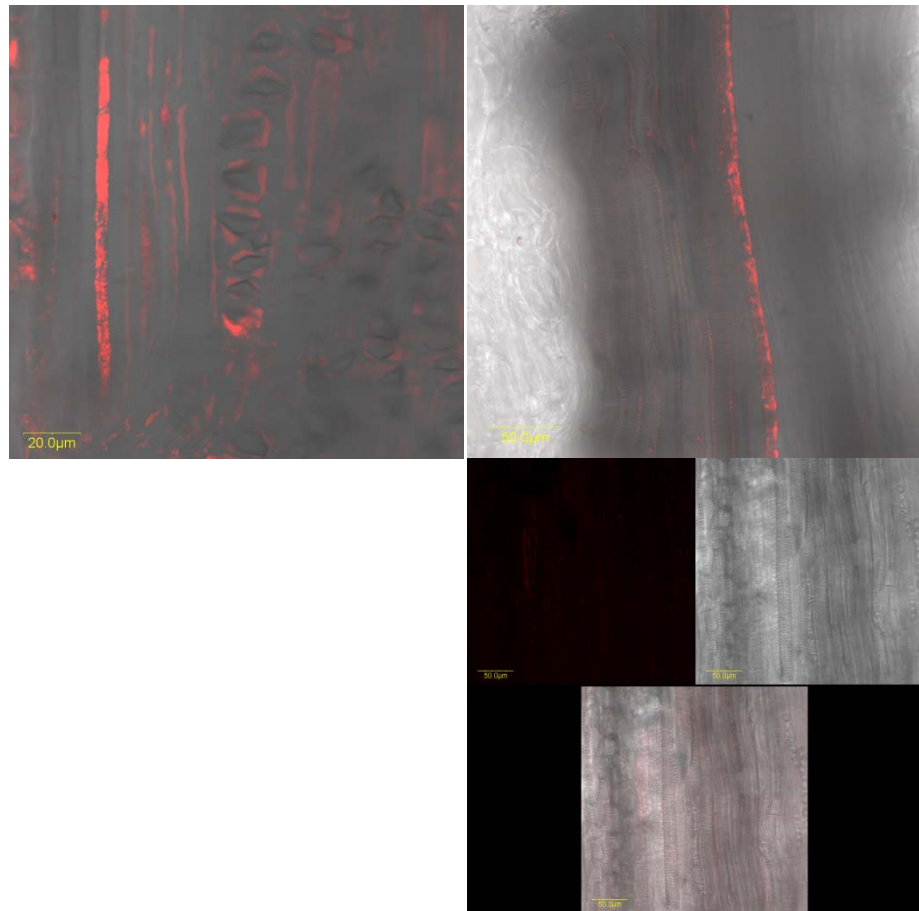


**תמונה 2:** גיל אגרוז המראה הפרדה של ה-DNA תוצר ה-PCR שנעשה לבדיקת ספירופלסמה בעצי הדר תפוזים זן סמי המראים תסמינים של מחלת ההתנוונות (דוגמאות 1-10) ובעצי הדר ללא תסמיני מחלה (דוגמאות 11, 12). דוגמא של מים שימשה כביקורת שלילית ל-PCR. M: סמן לגודל מולקולארי.



פיזור החיידק בחלקי הצמח השונים: על מנת לבדוק פיזור החיידק בחלקים שונים בצמח, בדקנו את נוכחות חיידק הספירופלסמה בקליפות של ענפים צעירים- רקמה עשירה בשיפה, בעורקים ובעלים. להבדיל מעורקים של עלים, לא יכולנו לגלות נוכחות של החיידק בקליפות של הענפים וגם לא בעלים. בבדיקות אשר נעשו על עורקים של עלים התקבלה תוצאה חיובית אשר חזרה על עצמה בשלוש חזרות של הניסוי. לפי תוצאה זו, הבדיקות הנוספות אשר נעשו במעבדה, השתמשנו באופן רוטיני בעורקים של עלים לצורך גילוי חיידק הספירופלסמה.

חיידקי הספירופלסמה נמצאים בצמחים הנגועים בריכוז נמוך ברקמות השיפה, דבר שמקשה את הליך הדיאגנוסטיקה וחקר הפתוגן. לגילוי חלקיקי ספירופלסמה נדרש לרוב ביצוע PCR נוסף (nested-PCR) להגברה נוספת של תוצר ה-PCR הראשוני. על אף היותן רגישות, שיטת הגילוי באמצעות PCR יכולה להיות מסובכת ומתסכלת בשל זיהומים עם DNA העלולים להתרחש במהלך האבחון במיוחד במעבדות העוסקות באופן רוטיני בדיאגנוסטיקה של פתוגנים אלה. במטרה לגלות חיידקי ספירופלסמה ברקמות צמחים נגועים פיתחנו שיטה של Fluorescent in situ hybridization (FISH) המבוססת על השימוש בפריימר מסומן במולקולה פלורוסנטית (Cy3). השיטה נוסתה על חתכי אורך מעורקים ראשיים של עלים של הדרים בעובי של כ-1 מ"מ ובאורך כ-1.5 ס"מ. נמצא כי ניתן היה להבחין בסימון פלורוצנטי ברקמה אשר מקורה בעצי הדר נגועים בספירופלסמה אך לא בערוקי עלים אשר מקורם מעצי הדר בריאים (תמונה 3).



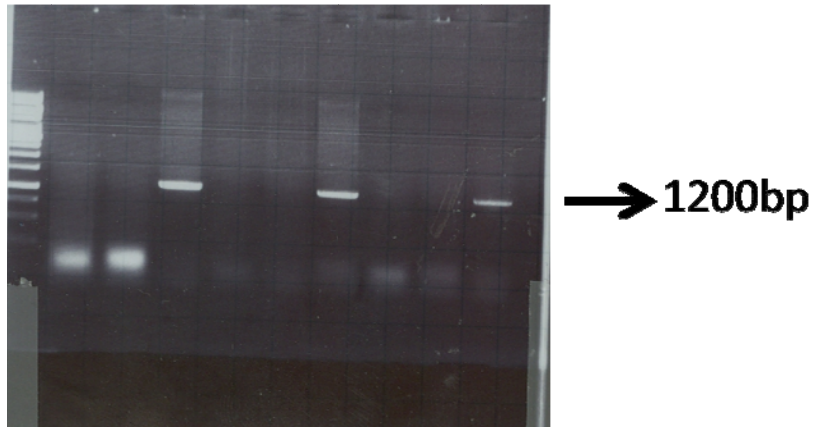
**תמונה 3 :** צילומים במיקרוסקופ קונפוקאלי של חתכי אורך של עורקים אשר מקורם מעלים של עצי הדר טבורי נגועים בספירופלסמה (תמונות למעלה) ומעלים של עצים בריאים (צילום למטה). בניסוי השתמשנו בפריימר משלים לרצף הספירופלסמה מסומן במולקולה פלורוצנטית (Cy3).

#### בדיקות נוכחות חיידק הליברובקטר- הגורם למחלת הגרינינג בהדרים :

כאמור מחלת הגרינינג היא מחלה בקטריאלית הפוגעת קשה בגידול ההדרים באסיה, בהודו, באפריקה, בברזיל ובפלורידה. המחלה גורמת לנזקים אדרים ונכללת ברשימת המחלות שיש חשש שגורמיהן ישמשו לטרור ביולוגי. גורם המחלה הוא החיידק *Ca. Liberibacter*, חיידק שיפה שנכון ליום זה אי-אפשר לגדלו במעבדה במצעים מנותקים. חיידקי ה- *Ca Liberibacter* מועברים במהירות מעץ לעץ שתי פסילות *D. citri* ו- *T. erytrae*.

על מנת שנהיה מוכנים באמצעי הגילוי של החיידק, פיתחנו במעבדה אצלנו מערכת של PCR היכולה לגלות את החיידק במיצויי DNA המופק מרקמות צמח עשירות בשיפה (כמו קליפת ענפים ועורקים של עלים). כאשר בדקנו עצי הדר סימפטומטיים חשודים לנוכחות חיידק הליברובקטר, התוצאות היו שליליות ולא נמצאה נגיעות. בשיתוף פעולה עם מדריכים חקלאיים של שה"מ והשירותים להגנת הצומח, נעשו עבודות של סריקת צמחי הדר מהסוג קפיר-ליים אשר מוכנס לארץ ללא היתר

ע"י פועלים מתאילנד. צמחי קפיר-ליים אותרו באזורים שונים בארץ כמו כפר ידידיה, בית שאן, גני יוחנן, עין וירד ובית הלל. הופק DNA כללי מעורקים של עלים וקליפות ענפים צעירים של צמחי הקפיר-ליים ונבדקו לנוכחות חיידק הליברובקטר באמצעות PCR. לצערנו הבדיקות העלו כי הייתה נגיעות בחלק מהצמחים האלה. תוצרי ה-PCR שהתקבלו אומתו ע"י קביעת רצף ונמצאו שאכן מקורם בחיידק הליברובקטר מהגזע האסייתי. עם קבלת התוצאות האלה, האחראים מהשירותים להגנת הצומח דאגו באופן מיידי להשמדת כול עצי הקפיר כולל אלה שהיו שליליים בבדיקה. בנוסף האחראים בשירותים להגנת הצומח, בשיתוף עם הפרדסנים ואנשי ההדרכה משה"מ, הקימו מערך לאיתור צמחי קפיר-ליים במגורי הפועלים התאילנדים לצורך השמדתם באופן מיידי.



תמונה 4: גיל אגרוז המראה הפרדה של ה-DNA תוצר ה-PCR שנעשה לבדיקת ליברובקטר-הגורם למחלת הגרינינג בעצי הדר צמחי קפיר-ליים אשר אותרו באזורים שונים בארץ. מבין 9 עצים אשר נבדקו בניסוי זה, 3 עצים היו חיוביים. תוצר ה-PCR בגודל 1200 בסיסים מצוין בצד.

## סיכום ודין

מחלת התנוונות של עצי הדר של תפוזים טבורי דוגמת הזנים סמי, וניו-הול גורמת להופעת תסמינים קשים המזכירים את אלו הנגרמים בשל מחלת הגרינינג והעלעתל. כאמור מחלת הגרינינג נחשבת לאחת ממחלות ההדרים ההרסניות ביותר, ובשנים הארוכות התפשטה בפלורידה לממדים שמעמידים את תעשיית ההדרים בסכנה קיומית. בשלבים הראשוניים, התסמינים נראים רק בחלק מהענפים אך בשלבים מתקדמים יותר, ניכרת תמותת ענפים, העץ מתנוון ובעל מראה שדוף. הפירות קטנים מהרגיל, מעוותים ואינם מבשילים מצד הפיטם.

הפתוגן הפוטנציאלי היכול להיות מעורב במחלה עם תסמינים כאלה הם אלו השייכים לקבוצת ה-*Mollicutes* כמו חיידקי הפיטופלסמה, ספירופלסמה או ליברובקטר.

המטרה הראשונה של המחקר הזה הייתה לקבוע איזה מבין שלושת החיידקים האלה ניתן לגלות בעצי הדר סימפטומטיים. במעבדה שלנו קיימים פרוטוקולים המשמשים אותנו לגלוי רוטיני של החיידקים פיטופלסמה וספירופלסמה בגידולים אחרים כמו גזר. מאידך, הפרוטוקול לגילוי חיידק הליברובקטר של ההדרים פותח במסגרת המחקר הזה. ע"י השימוש בפרוטוקולים אלה ניתן היה להסיק מהמחקר הזה כי:

- העצים הסימפטומטיים לא הכילו וירוסים מוכרים כמו CTV או CCDaV.
- הפיטופלסמה אינו החיידק המעורב במחלת הניוון של עצי ההדר תפוזים.
- החיידק ליברובקטר התוקף הדרים אינו מעורב במחלת הניוון של עצי ההדר תפוזים.
- הספירופלסמה התגלה במרבית העצים הסימפטומטיים ולכן הוא כנראה החיידק המעורב במחלת הניוון של עצי ההדר תפוזים. לאימות מסקנה זו דרוש כמובן המשך מחקר ומבחן קוד.
- לא תמיד ניתן לגלות את חיידק הספירופלסמה בעצים סימפטומטיים, כנראה בגלל ריכוז נמוך של החיידק ופיזור בלתי אחיד בצמח.
- עצים סימפטומטיים עם חיידק הספירופלסמה נמצאו בפרדסים הן באזור המרכז והן באזור הדרום.

היות והתסמינים של המחלה מזכירים את אלו הנגרמים ע"י מחלת הגרינינג שהיא המחלה בקטריאלית הפוגעת קשה בגידול ההדרים באסיה, בהודו, באפריקה, בברזיל ובפלורידה. המחלה טרם הגיעה לאגן הים התיכון (כולל ישראל) ואוסטרליה. המחלה גורמת לנזקים אדרים ונכללת ברשימת המחלות שיש חשש שגורמיהן ישמשו לטרור ביולוגי. גורם המחלה הוא חיידק הליברובקטר הנחשב לחיידק שיפה שנכון ליום זה אי-אפשר לגדלו במעבדה במצעים מנותקים. החיידק מועברים במהירות מעץ לעץ ע"י שתי פסילות *D. citri* ו-*T. erytrae* שאינן נמצאות בארץ. במסגרת המחקר הזה פותח פרוטוקול לגילוי החיידק. באמצעות פרוטוקול זה נמצאו כמה שתילי קפיר-ליים אשר הוברחו לארץ על ידי פועלים תאילנדים בצורה בלתי חוקית. גילוי העצים האלו הביא את היחידה לשירותים להגנת הצומח לטפל בבעיה זו באופן מיידי ונכון על ידי העברת הוראה לפרדסנים להשמדה מיידיית של עצי קפיר-ליים אשר ניטעו על ידי הפועלים אם זה בפרדסים או

במקומות שההייה של הפועלים. נכון להיום חיידק הליברובקטר של ההדרים טרם התגלה בפרדס כלשהו של הדרים בארץ.

במחקר זה עסקנו גם בבדיקת פיזור החיידק (ספירופלסמה) בחלקים שונים בצמח, בדקנו את נוכחות החיידק בקליפות של ענפים צעירים- רקמה עשירה בשיפה, בעורקים ובעלים. לפי התוצאות שהתקבלו לא יכולנו לגלות נוכחות של החיידק בקליפות של הענפים וגם לא בעלים. לעומת זאת ניתן היה לגלות אותו בעורקים של עלים. בהסתמך על תוצאות המחקר, הבדיקות הנוספות אשר נעשו במחקר זה השתמשנו באופן רוטיני בעורקים של עלים לצורך גילוי חיידק הספירופלסמה.

במטרה לגלות חיידקי ספירופלסמה ברקמות צמחים נגועים פיתחנו שיטה של FISH המבוססת על השימוש בפריימר מסומן במולקולה פלורוסנטית (Cy3). השיטה נוסתה על חתכי אורך מעורקים ראשיים של עלים של הדרים בעובי של כ-1 מ"מ ובאורך כ-1.5 ס"מ. נמצא כי ניתן היה להבחין בסימון פלורוצנטי ברקמה אשר מקורה בעצי הדר נגועים בספירופלסמה אך לא בערוקי עלים אשר מקורם מעצי הדר בריאים. בנוסף, לפי תוצאות ה-FISH ניתן היה להסיק כי החיידק אינו נמצא בפיזור אחיד ברקמת הפלואם. נציין גם כי מבין כול 10 חתכים אשר נבדקו היו בממוצע 4 חתכים אשר ניתן היה לגלות בהם צביעה פלורוסנטית. תוצאות אלו מעידות כי חיידקי הספירופלסמה נמצאים בצמחים הנגועים בריכוז נמוך ובפיזור בלתי אחיד ברקמות השיפה, דבר שמקשה את הליך הדיאגנוסטיקה וחקר הפתוגן. תוצאות אלו יכולות להסביר את העובדה כי לגילוי חלקיקי ספירופלסמה נדרש לרוב ביצוע PCR נוסף (nested-PCR) להגברה נוספת של תוצר ה-PCR הראשוני.

לסיכום המחקר הזה הביא לגילוי חיידק הספירופלסמה בעצים של תפוזים המראים תסמינים של מחלת ההתנוונות ולפיתוח כלים לגילוי גורם מחלת הגרינינג. בעתיד המחקר צפוי להביא לצמצום ההפצה של המחלה בפרדסים, להקטנת הנזקים הנגרמים מהמחלה ובהתאם לכך לשיפור איכות ורמת היבול של התפוזים.

## ביבליוגרפיה

1. Andre, A., Maucourt, M., Moing, A., Rolin, D., and Renaudin, J. 2005. Sugar import and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*: glucose and fructose play distinct roles. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:33-42.
2. Aubert, B. 1992. Citrus greening disease: A serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. *Proc. Int. Soc. Citricul.* 2:817-820.
3. Bove, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88:7-37.
4. Calavan, E. C., and Bové, J. M. 1989. Ecology of *Spiroplasma citri*. Pages 425-485 in: *The Mycoplasmas*. R. F. Whitcomb and J. G. Tully, eds. Academic Press, Inc., New York. 8.
5. Calavan, E. C., and Oldfield, G. N. 1979. Symptomatology of spiroplasmal plant diseases. Pages 37-64 in: *The Mycoplasmas*. R. F. Whitcomb and J. G. Tully, eds. Academic Press Inc., New York.
6. Coletta-Filho, H. D., Takita, M. A., Targon, M. L. P. N., and Machado, M. A. 2005. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus huanglongbing bacteria reveal a different "Ca. Liberibacter" strain associated with citrus disease in Sao Paulo. *Plant Dis.* 89:848.
7. Gaurivaud, P., Danet, J.-L., Laigret, F., Garnier, M., and Bové, J. M. 2000. Fructose utilization and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1145-1155.
8. Halbert, S. E. 2005. The discovery of huanglongbing in Florida. Pages H-3 in: *Proc. of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop*. Florida Citrus Mutual. Orlando, FL.
9. McLean, A. P. D., and Oberholzer, P. C. J. 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 8:297-298.
10. Melcher, U., and Fletcher, J. 1999. Genetic variation in *Spiroplasma citri*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:519-533.
11. Mello, A. F. S., Yokomi, R. K., and Fletcher, J. Assessment of citrus stubborn disease incidence in citrus. In: *Proc. 17th Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* In press.
12. Mello, A. F. S., Yokomi, R. K., Melcher, U., Chen, J. C., Wayadande, A. C., and Fletcher, J. 2008. Genetic diversity of *Spiroplasma citri* strains from different regions, hosts, and isolation dates. *Phytopathology* 98:960-968.
13. Mello, A. F. S., Fletcher, J., and Yokomi, R. K. 2007. *Spiroplasma citri* infection affects yield and fruit quality in commercial citrus grove in California. (Abstr.) *Phytopathology* 97:S74.
14. Teixeira, D. D. C., Danet, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., De Jesus, W. C., Jr., Yamamoto, P. T., Lopes, S. A., Bassanezi, R. B., Ayres, A. J., Saillard, C., and Bove, J. M. 2005. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes* 19:173.

## סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).  
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.  
**הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. מטרת המחקר העיקרית היא אפיון הגורם למחלת הניוון והצהבה של תפוזים, או הגורמים המעורבים במחלה; ולימוד הפיזור של הגורם בחלקי צמח שונים.</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• העצים הסימפטומטיים לא הכילו וירוסים מוכרים כמו CTV או CCDaV.</li> <li>• הפיטופלסמה אינו החיידק המעורב במחלת הניוון של עצי ההדר תפוזים.</li> <li>• החיידק ליברובקטר התוקף הדריס אינו מעורב במחלת הניוון של עצי ההדר תפוזים.</li> <li>• הספירופלסמה התגלה במרבית העצים הסימפטומטיים ולכן הוא כנראה החיידק המעורב במחלת הניוון של עצי ההדר תפוזים. לאימות מסקנה זו דרוש כמובן המשך מחקר ומבחן קוד.</li> <li>• לא תמיד ניתן לגלות את חיידק הספירופלסמה בעצים סימפטומטיים, כנראה בגלל ריכוז נמוך של החיידק ופיזור בלתי אחיד בצמח.</li> <li>• עצים סימפטומטיים עם חיידק הספירופלסמה נמצאו בפרדסים הן באזור המרכז והן באזור הדרום.</li> <li>• פותח פרוטוקול לגילוי חיידק הליברובקטר של ההדרים. החיידק נמצא במספר שתילים של קפיר-ליים הגדלים אצל פועלים תאילנדים אשר הבריחו אותם ארצה באופן בלתי חוקי. עצים אלו הושמדו ע"י השירותים להגנת הצומח.</li> <li>• פותח פרוטוקול לגילוי החיידק ברקמת הפלואם ע"י סימון פלורוסנטי FISH</li> </ul>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח? המחקר הזה הביא לגילוי חיידק הספירופלסמה בעצים של תפוזים המראים תסמינים של מחלת ההתנוונות ולפיתוח כלים לגילוי גורם מחלת הגרינינג. בעתיד המחקר צפוי להביא לצמצום ההפצה של המחלה בפרדסים, להקטנת הנזקים הנגרמים מהמחלה ובהתאם לכך לשיפור איכות ורמת היבול של התפוזים.</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר? אין</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: <b>פרסומים בכתב</b> - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; <b>פנטטים</b> - יש לציין שם ומס' פטנט; <b>הרצאות וימי עיון</b> - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי. אין</p>
<p>פרסום הדוח: ניתן לפרסם את הדוח.</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא</p>

\*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שנייה במחקר שאושר לשלוש שנים