

דוח מסכם לתוכנית היתכנות מספר 12-1662-132

**מניעת מחלות הנגרמות בירקות ע"י חיידקים מהסוג קסנטומונס - גישה חדשנית לפתרון  
הבעיה**

A novel approach for controlling disease caused by Xanthomonas spp. in vegetables

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות  
ע"י

**שולמית מנוליס ולאורה צ'לופוביץ**  
המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

E-mail: [shulam@volcani.agri.gov.il](mailto:shulam@volcani.agri.gov.il)

דצמבר 2013

כסלו תשע"ד

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

**הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.**

חתימת החוקר \_\_\_\_\_ תאריך 5.12.13

## תקציר

1. הצגת הבעיה: מכיוון שאמצעי ההתמודדות כנגד חיידקים גורמי מחלות מצומצמים מאוד מוצע בתוכנית היתכנות זו דרך חדשה להתמודדות עם חיידקים מהסוג קסנטומונס באמצעות שיבוש מערכת החישה הקבוצתית. בפתורים שונים של קסנטומונס קמפסטריס, התוקפים כרוביים, סולניים, דלועיים ועוד, נמצא כי הסיגנל לחישה קבוצתית היא תרכובת המכונה DSF. ההשערה שלנו היא שעייכוב מערכת החישה הקבוצתית ע"י מתן ריכוז גבוה של הסיגנל ימנע הפעלת גורמי וירולנטיות שונים בחיידק ובכך את המחלה. בתוכנית נבדוק אפשרות זו בתנאי משתלה מכיוון שלדעתנו הן המקור העיקרי להפצת החיידקים לחממות ולשדות.
2. מטרת המחקר: בדיקת עייכוב המחלות הנגרמות ע"י פתורים שונים של קסנטומונס ע"י מתן עודף של הסיגנל לחישה קבוצתית.
3. שיטות העבודה: השפעת הוספת עודף של הסיגנל DSF על התפשטות המחלה בכרוב ובעגבניה נבדקה ע"י אילוח הזרעים בתבדידים המתאימים לכל גידול. האילוח נעשה בריכוזים שונים של החיידקים ולאחר מכן הזרעים הוטבלו ב-DSF או במים לביקורת. שכיחות המחלה בטיפולים השונים וריכוז החיידקים נבדקו לאחר 8 ימים מהזריעה. השפעת הוספת DSF על ההפצה המישינית בתנאי משתלה נבדקה ע"י ריסוס העלווה של נבטים בני 5-6 ימים ב-DSF ואח"כ ריסוס בריכוזים שונים של החיידק.
4. תוצאות עיקריות: שכיחות המחלה הכללית ודרגת הנגיעות בנבטי כרוב שמקורם מזרעים מאולחים היתה נמוכה משמעותית לאחר טיפול של הזרעים ב-DSF. בריכוז של  $10^8$  חיידקים למ"ל שכיחות המחלה היתה 83%, כאשר מרבית הצמחים (78%) הראו תסמיני מחלה בדרגה קשה. לעומת זאת שכיחות המחלה הכללית בצמחים שטופלו ב-DSF היתה 42% אך מרביתם (88%) היו בדרגת מחלה נמוכה. אותה מגמה התקבלה בריכוזים של  $10^7$  ו- $10^6$  חיידקים למ"ל. כאשר החומר ניתן בריסוס של העלווה שכיחות המחלה הכללית לאחר ריסוס ב- $10^7$  חיידקים למ"ל הייתה 50% בביקורת ו-19% בטיפול ב-DSF. שכיחות המחלה בדרגת נגיעות גבוהה היתה בביקורת 32% לעומת 5% בטיפול ב-DSF. תוצאות טיפול בזרעי עגבניה הראו מגמה דומה אולם רמת המחלה בניסויים השונים היתה נמוכה בסביבות ה-20% בטיפול הביקורת לעומת 5% בטיפול ב-DSF.
5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: תוצאות מחקר היתכנות זה מראות כי שיבוש מערכת החישה הקבוצתית היא דרך אפשרית להתמודד עם מחלות חיידקים בתנאי משתלה. כמו כן ניתן להרחיב את הנושא גם לחיידקים מקבוצות אחרות בהן הסיגנל לחישה קבוצתית הוא הומוסטרין לקטון כמו חיידקים מקבוצת הפסודומונס הגורמים נזקים כלכליים ניכרים בגידולים שונים. הוגשה תוכנית לקרן קמ"ח שבה אנו בוחנים דרכים נוספות לשיבוש מערכת החישה הקבוצתית בחיידקי קסנטומונס ופסודומונס.

## מבוא

בשנים האחרונות יש בארץ עליה ניכרת במחלות הנגרמות ע"י חיידקים במשתלות, בחממות ובשדות. חיידקים מהסוג *Xanthomonas* (קסנטומונס) תוקפים צמחים ממשפחות שונות וגורמים נזקים כלכליים ניכרים בגידולי ירקות. הסוג קסנטומונס מונה מינים שונים בהתאם לטווח הפונדקאים, אולם רובם שייכים למין *Xanthomonas campestris* הכולל פתוורים שונים. מרבית החיידקים ממין זה חודרים לארץ עם הזרעים ואח"כ בתנאי משתלה, לחות, טמפרטורה וצפיפות מופצים לשתילים הנקיים. במקרים רבים צמחים נגועים שעדיין לא פיתחו תסמיני מחלה מועברים לחממות או לשדה ושם גורמים לנזקים ניכרים.

ככלל אמצעי ההתמודדות כנגד חיידקים גורמי מחלות מצומצמים וכוללים הימנעות באמצעים אגרוטכניים, הכנת חומר ריבוי נקי, צמחים עמידים ושימוש בחומרי הדברה בעיקר אנטיביוטיקה. אמצעים אלו לרוב לא יעילים ולא תמיד קיימים כמו במקרה של צמחים עמידים. בתוכנית זו אנו מציעים דרך חדשה להתמודדות עם חיידקים מהסוג קסנטומונס באמצעות שיבוש מערכת החישה הקבוצתית (Quorum Sensing). מערכת זו, של תקשורת בין חיידקים, מובילה לשינויים בביטוי גנים כאשר אוכלוסיית החיידקים מגיעה לצפיפות קריטית. נמצא כי התופעה מתרחשת באמצעות מולקולות סיגנל קטנות המיוצרות ע"י החיידקים והנקשרות לרצפטורים חלבוניים כתלות בגודל אוכלוסיית החיידקים. החיידקים המתרבים מפרישים את הסיגנל לתקשורת וכאשר אוכלוסיית החיידקים גדלה עולה ריכוז החומר עד שמגיע לריכוז הדרוש להפעלת גנים שונים ובעיקר הפעלה של גנים הדרושים לפתוגניות, הישרדות ויצירת ביופילם. בחיידק קסנטומונס התוקף כרוביים הסיגנל לחישה קבוצתית זוהה והוא מכונה DSF (diffusible signal factor).

החישה הקבוצתית באמצעות DSF נמצאה בפתוורים שונים של קסנטומונס קמפסטריס ביניהם אלו התוקפים כרוביים, סולניים, דלועיים, אורז, הדרים וקטניות. ההשערה שלנו היא ששיבוש מערכת זו לפני שהאוכלוסיה מגיעה לרמה שבה מופעלים גורמי וירולנטיות ימנע את תהליך המחלה. שיבוש מערכת החישה הקבוצתית יכול להיעשות ע"י מתן ריכוזים גבוהים של הסיגנל. עודף בסיגנל יגרום לביטוי מוקדם של גורמי וירולנטיות לפני שהאוכלוסיה מגיעה לרמה גבוהה היכולה להתגבר על מנגנוני ההגנה הטבעיים של הצמח ובכך למנוע את התפתחות המחלה. שיבוש מערכת החישה הקבוצתית בעודף ימנע את הפתוגניות אך לא יביא לתמותה של החיידקים. באופן כזה אין לחץ סלקציה על אוכלוסיית הפתוגן לפתח עמידות כפי שקורה במקרה של מתן אנטיביוטיקות. בכוונתנו לבדוק אפשרות זו ברמה של משתלות מכיוון שלדעתנו הן המקור העיקרי להפצת החיידקים לחממות ולשדות. זרעים נגועים ממקורות עצמיים או מחו"ל מהווים מקור ראשוני להפצת מחלות. לרוב, חברות הזרעים בודקות נוכחות פתוגנים שונים באצוות זרעים, אולם למרות זאת זרעים נגועים בודדים מגיעים למשתלות. זרעים אלו מהווים מקור להפצה מישנית של החיידקים לצמחים הבריאים בסביבה, בתנאים האופטימליים השוררים במשתלות. בצמחים אלו, שאולחו באופן מישני, תסמיני המחלה אינם מספיקים להתפתח עד ליציאה מהמשתלה וההעברה לחממות או לשדות. ההשערה שלנו היא שעיקוב מערכת החישה הקבוצתית בתנאי משתלה יכול לצמצם את הנזקים הנגרמים ע"י מחלות שמקורן בחיידקים.

## מטרות המחקר

בדיקת עיכוב המחלות הנגרמות ע"י פתוורים שונים של קסנטומונס ע"י מתן עודף של הסיגנל לחישה קבוצתית.

## פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות

א. השפעת שימוש בתרכובת DSF על התפשטות המחלה בכרוב

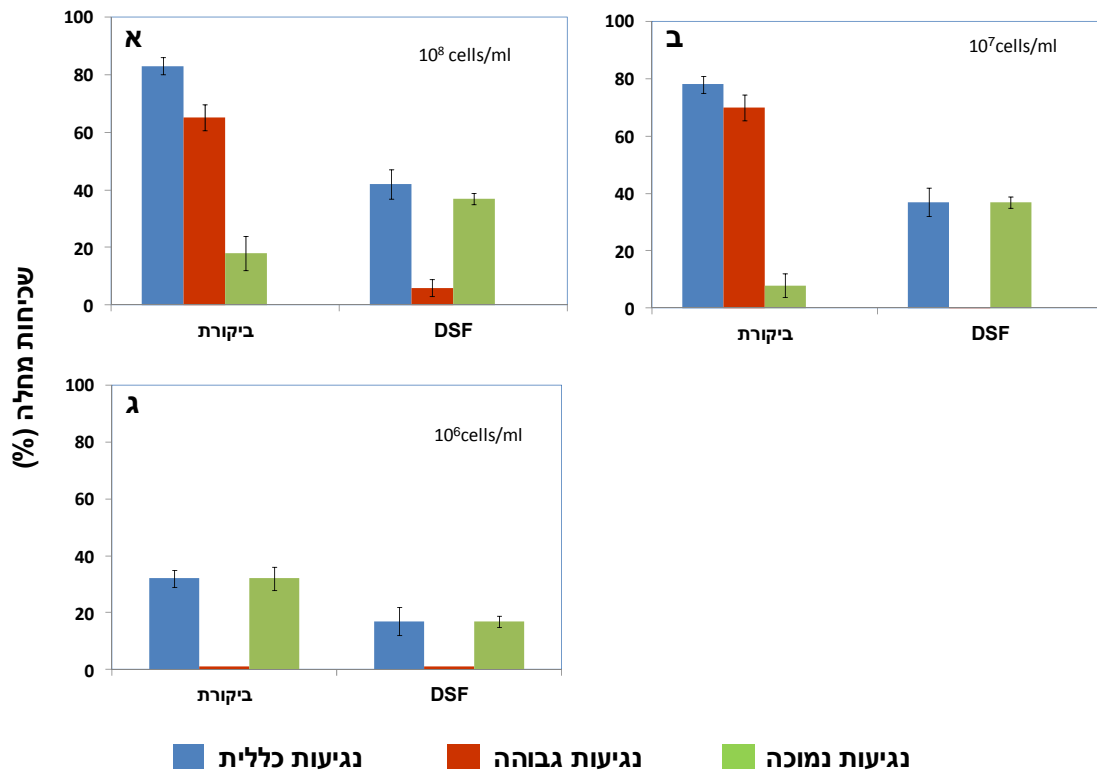
### 1) טיפול עם DSF בזרעים המודבקים

מהלך הניסוי: זרעי כרוב מהזן (*Brassica oleracea* cv. Brunnschwig) עברו שטיפה במים במשך לילה ולאחר מכן, אינפילטרציה בואקום כשעה עם תרחיף חיידקים של התבדיל XccCR-5 התוקף כרוביים. האינפילטרציה נעשתה בריכוזים שונים של החיידק;  $10^6$ ,  $10^7$  ו-  $10^8$  חיידקים למ"ל ולאחר מכן הזרעים יובשו באוויר למשך מספר שעות. מכל ריכוז נלקחו 50 זרעים מאולחים ואלו הוטבלו בתמיסה של DSF בריכוז של  $10\mu\text{M}$  במשך כחצי שעה. לאחר מכן הזרעים נזרעו במגשי חישתיל והוחזקו בתא גידול עם השקיה עילית. לאחר כ- 8 ימים מהזריעה (מצב של שני פסיגים ונצרון של עלה ראשון) נעשתה הערכת הנגיעות ונקבעה שכיחות המחלה (%) בטיפולים השונים. בנוסף נקבעה רמת איכלוס הצמחים בחיידקים. הביקורות בניסוי היו: 1. טיפול כפי שתואר לעיל אך במקום DSF הזרעים הוטבלו במים. 2. מתן DSF לזרעים ללא אילוח כדי לוודא שהחומר אינו פיטוטוקסי. הנגיעות נקבעה לפי הדרגות הבאות: 1) ללא תסמיני מחלה; 2) נגיעות נמוכה עד בינונית (כתמים על הפסיגים); 3) נגיעות קשה מאוד או צמח מת. איכלוס נקבע ע"י ריסוק הנבט ב- 2 מ"ל מים מעוקרים וזריעה של מיהולים עשרוניים על מצע LB. לכל טיפול נלקחו 10 נבטים. הניסויים בוצעו 3 פעמים.

תוצאות: נמצא כי לאחר 8 ימים מהזריעה, שכיחות המחלה הכללית בנבטי כרוב שמקורם מזרעים מאולחים בריכוז  $10^8$  חיידקים למ"ל היתה 83%, כאשר מרבית הצמחים (78%) הראו תסמיני מחלה בדרגה קשה (איור 1 א). לעומת זאת שכיחות המחלה הכללית בצמחים שטופלו ב- DSF היתה 42% אך מרביתם (88%) היו בדרגת מחלה נמוכה-בינונית. בשתילי כרוב שמקורם מזרעים מאולחים עם  $10^7$  חיידקים למ"ל שכיחות המחלה הכללית הגיעה ל-78% כאשר 90% מהם היו בדרגה נגיעות גבוהה. טיפול ב- DSF של אותם זרעים הביא לירידה משמעותית בשכיחות המחלה הכללית ל- 37% וכולם היו בדרגת נגיעות נמוכה (איור 1 ב). כאשר האילוח נעשה בריכוז של  $10^6$  חיידקים למ"ל שכיחות המחלה הכללית ירדה ל- 32% ובטיפול עם DSF רק 17% של הצמחים הראו תסמיני מחלה עם דרגה קלה של נגיעות (איור 1 ג).

בכל טיפול נבדק האיכלוס בצמחים עם או בלי תסמיני מחלה. נמצאה רמת חיידקים של  $10^9$  תאים לגרם צמח בהדבקות של  $10^8$  ו-  $10^7$ . רמת אוכלוסיית החיידקים בטיפולים עם הוספת ה-DSF הייתה דומה לביקורת. אומנם לא צפוי שטיפול ב-DSF יוריד את רמת החיידקים באופן ניכר, אולם יש לחזור על ניסויים אלו. לצורך כך בודדנו חיידק הנושא עמידות לאנטיביוטיקה ריפאמפיצין ואיתו נשתמש בניסויים הבאים.

בטיפול הביקורת של DSF ללא אילוח לא נמצא אפקט פיטוטוקסי של DSF.

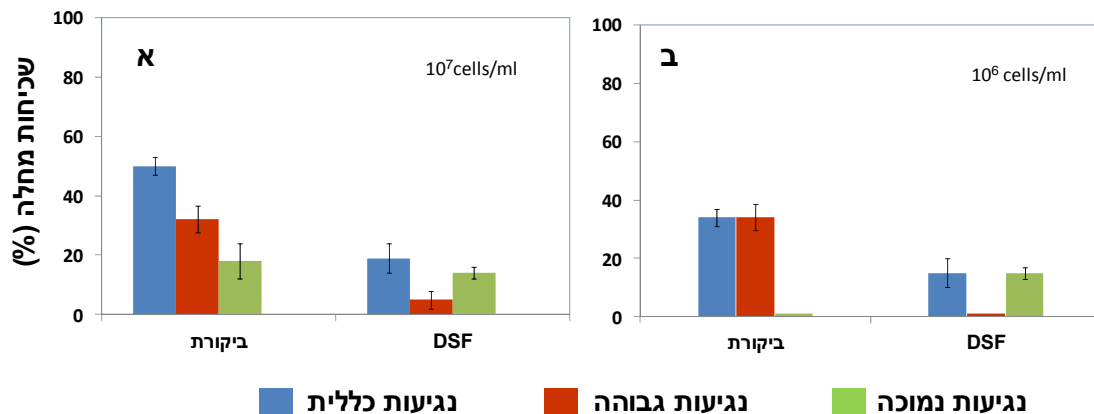


**איור 1:** השפעת טיפול זרעים ב-DSF על שכיחות המחלה בנבטי כרוב. הזרעים אולחו בריכוזים שונים של קסנטומונס וטופלו לאחר מכן ב-DSF. תוצאות נקבעו לאחר 8 ימים מהזריעה.

## (2) ריסוס עלווה עם DSF להקטנת ההפצה המישנית

**מהלך הניסוי:** שני מגשים של נבטי כרוב בריאים בני 5-6 ימים (הזמן בו מופיעים שני הפסיגים), רוססו בעלווה עם 100 מ"ל של תרכובת DSF בריכוז  $10 \mu\text{M}$ . שני מגשים נוספים רוססו עם מים כביקורת. לאחר ייבוש העלווה, שני מגשים (אחד רוסס ב-DSF והשני במים) רוססו עם 100 מ"ל תרחיף חיידקים

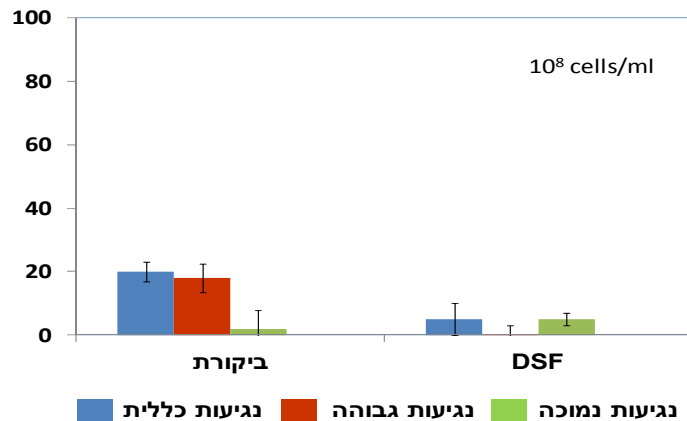
בריכוז  $10^7$  ושני המגשים הנותרים רוססו בריכוז  $10^6$  חיידקים למ"ל. המגשים כוסו ליצירת תא לח למשך 16 שעות. לניסוי נעשו שתי חזרות. תוצאות נקבעו לאחר 5 ימים מהריסוס. **תוצאות:** שכיחות המחלה הכללית לאחר ריסוס ב- $10^7$  חיידקים למ"ל הייתה 50% בביקורת ו- 19% בטיפול ב-DSF (איור 2 א). שכיחות המחלה בדרגת נגיעות גבוהה הייתה בביקורת 32% לעומת 5% בטיפול ב-DSF. בצמחים שרוססו בריכוז  $10^6$  חיידקים למ"ל שכיחות המחלה הכללית הייתה 34% ו-15% בטיפול הביקורת וה-DSF, בהתאמה (איור 2 ב). בשני טיפולים אלו דרגת הנגיעות הייתה נמוכה. בביקורת לא נמצא אפקט פיטוטוקסי של ריסוס DSF על הפסיגים.



**איור 2:** השפעת ריסוס DSF על שכיחות המחלה הנגרמת ע"י קסנטומונס בנבטי כרוב. החיידק רוסס בשני ריכוזים שונים מייד לאחר ריסוס DSF על נבטים בני 5-6 ימים. תוצאות נקבעו לאחר 5 ימים.

ב. השפעת שימוש בתרכובת DSF על התפשטות המחלה בעגבניה

הניסויים נעשו כפי שתואר לעיל אך עם התבדיל Xcv592 שבודד מעגבניות בארץ. התוצאות הטיפולים עם DSF הראו מגמה דומה אולם רמת המחלה בניסויים השונים הייתה נמוכה בסביבות ה- 20% בטיפול הביקורת לעומת 5% בטיפול ה-DSF (איור 3). אנו ממשיכים לעבוד על שיטות נוספות לאילוח זרעי או צמחי עגבניה עם תבדילים נוספים שהשגנו בשנה האחרונה.



**איור 3:** השפעת טיפול זרעים ב- DSF על שכיחות המחלה בנבטי עגבניה. הזרעים אולחו בריכוז של  $10^8$  חיידקים למ"ל וטופלו לאחר מכן ב- DSF. תוצאות נקבעו לאחר 14 ימים מהזריעה.

#### דיון והמשך עבודה

התוצאות שהושגו בשנת מחקר זו הראו כי טיפול זרעים ב- DSF אכן מוריד את רמת המחלה. גם טיפול שניתן בריסוס הוריד את רמת המחלה בהדבקה מישנית. יש להדגיש כי רמת האינקולום בניסויים אלה היתה גבוהה. בזרעים שאולחו בריכוז של  $10^7$  חיידקים למ"ל זרע נגוע נושא כ-  $2 \times 10^3$  ולמרות זאת הטיפול ב- DSF הקטין את רמת המחלה. בזרעים הנגועים טבעית לאחר שעברו ביקורת ע"י חברות הזרעים צפוי שהנגיעות תהיה נמוכה יותר. מכיוון שקשה לקבל מחברות הזרעים זרעים נגועים, ננסה לאלח צמחים ולקבל זרעים הנגועים באופן טבעי.

תוצאות מחקר היתכנות זה מראות לדעתנו כי שיבוש מערכת החישה הקבוצתית היא דרך אפשרית להתמודד עם מחלות חיידקים בתנאי משתלה. ניתן להרחיב את הנושא גם לחיידקים מקבוצות אחרות בהן הסיגנל לחישה קבוצתית הוא הומוסרין לקטון כמו חיידקים מקבוצת הפסודומונס הגורמים נזקים כלכליים ניכרים בגידולים שונים. הוגשה תוכנית לקרן קמ"ח שבה אנו בוחנים דרכים נוספות לשיבוש מערכת החישה הקבוצתית בחיידקי קסנטומונס ופסודומונס.

## סיכום

מטרות המחקר: בדיקת עיכוב המחלות הנגרמות ע"י פתוורים שונים של קסנטומונס ע"י מתן עודף של הסינגל לחישה קבוצתית.

עיקרי תוצאות: שכיחות המחלה הכללית ודרגת הנגיעות בנבטי כרוב שמקורם מזרעים מאולחים היתה נמוכה משמעותית לאחר טיפול של הזרעים ב- DSF בשלושת ריכוזי המדבק שנבדקו. כאשר החומר ניתן בריסוס של העלווה שכיחות המחלה הכללית היתה נמוכה משמעותית מזו שבביקורת. תוצאות טיפול בזרעי עגבניה הראו מגמה דומה אולם רמת המחלה בניסויים השונים היתה נמוכה.

מסקנות מדעיות: תוצאות מחקר היתכנות זה מראות כי שיבוש מערכת החישה הקבוצתית היא דרך אפשרית להתמודד עם מחלות חיידקים בתנאי משתלה. כמו כן ניתן להרחיב את הנושא גם לחיידקים מקבוצות אחרות בהן הסינגל לחישה קבוצתית הוא הומוסרין לקטון כמו חיידקים מקבוצת הפסודומונס הגורמים נזקים כלכליים ניכרים בגידולים שונים.

בעיות שנתרו לפתרון: המשך המחקר בנושא זה יעשה במסגרת תוכניות אחרות. הוגשה תוכנית לקרן קמ"ח שבה אנו בוחנים דרכים נוספות לשיבוש מערכת החישה הקבוצתית בחיידקי קסנטומונס ופסודומונס.

הפצת הידע: עדיין לא פורסם.

פרסום הדוח: ללא הגבלה.