

דוח מסכם לתכנית מחקר מס' 07-0717-256

הפחתת נזקי מחלת הריקבון הרך הנגרמת ע"י החיידק *Pectobacterium carotovorum* בקאלה
וגיאופיטי נוי אחרים באמצעות שמוש במשרני עמידות כימיים

Reduction of soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* in Calla lily (*Zandetechia* spp.)
and other ornamental geophytes by the use of chemical defense inducers

מוגש לקרו המדען הראשי במשרד החקלאות

שמות החוקרים : איריס ידידיה-מינהל המחקר החקלאי iris@volcani.agri.gov.il
גדעון לוריא-שה"מ משרד החקלאות giluria@shaham.moag.gov.il
שאול בורדמן-הפקולטה לחקלאות saulb@agri.huji.ac.il
שולה מנוליס-מינהל המחקר החקלאי shulam@volcani.agri.gov.il
האורל יון-מינהל המחקר החקלאי aurel@volcani.agri.gov.il
אלכס ליפסקי-מינהל המחקר החקלאי lipsky@volcani.agri.gov.il

הממצאים הכתובים בד"ח זה אינם בגדר המלצות גידול

חתימת החוקר: _____

תקציר :

מטרת המחקר : להפחית נגיעות *Pectobacterium carotovorum* בקאלה לבנה ובנץ חלב, ע"י שפעול מערכת ההתגוננות הטבעית של הצמח באמצעות משרני עמידות כימיים.

חשיבות : הפחתה ולו חלקית ברמת נגיעות *Pc* בקאלה עשויה לתרום לרווחיות הענף בארץ ולהחזיר לסל הגידולים את המינים הצבעוניים האטרקטיביים מבחינה מסחרית. גישה זו חיונית במקרים בהם לא קיימת מערכת הדברה אפקטיבית כנגד הפתוגן, כמו במחלת הריקבון הרך.

שיטות : בידוד וזיהוי חיידקי פקטובקטריום מפונדקאים שונים באמצעות מצע סלקטיבי ושיטות מולקוריות לקבלת טביעת אצבע גנטית של החיידק. ביצוע מבחני הדבקה לפונקאים חד ודו - פסיגיים. השראת עמידות באמצעות ריסוס עלותי או הגמעה בצמחי קאלה וצמחוני נץ-חלב. כימות תגובת העמידות באמצעים שונים ביניהם יצירת חיידקים מותמרים המבטאים עמידות לאנטיביוטיקה ו-GFP. ספירות חיידקים ע"י Flow cytometry.

תוצאות : התקבלה הפחתת מחלה משמעותית ע"י שימוש במשרני עמידות. הפחתה מתמשכת התקבלה ע"י שפעול מסלול החומצה הג'יסמונית באמצעות מתיל ג'יסמונט. תוצאות ראשוניות מצביעות על עלייה בפוליפנולים כחלק ממנגנון העמידות.

מסקנות : הפחתת נגיעות בחיידק הפקטובקטריום באמצעות משרני עמידות ניתנת לביצוע במערכת מודל בצמחוני נץ-חלב בתרבית ובעלי קאלה בוגרים. יש לבחון את פוטנציאל המשרנים גם בצמחים שלמים. קיימים משרנים נוספים הפועלים במנגנון ח' גסמונית שלא נבדקו בעבודה זו והם בעלי יתרונות יישומיים. יש לבחון את האפשרות ליישום המשרנים בעציצים ובשטח פתוח.

רקע

מחלת הרקבון הרך הנגרמת על ידי החיידק ארויניה קרוטובורה (*Erwinia carotovora*), גורמת מידי שנה לנזק כלכלי במגוון גידולים כולל צמחים בעלי חשיבות לחקלאי ישראל. בעקבות שימוש בשיטות מולקולריות לזיהוי וסווג חיידקים הוחלט לאחרונה להעביר את חיידק הארויניה לסוג פקטובקטריום ושמו שונה בהתאמה ל- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc). בין פונדקאי המחלה ניתן למנות גידולי מזון מובילים כמו תפוז"א, עגבניה, פילפל וכרוב וכן גיאופיטי נוי כגון קאלה, נץ חלב, יקינתון, איריס ועוד (13). הקאלה הלבנה (*Zantedeschia aethiopica*) נמנית על משפחת הלופיים (*Araceae*), ומוצאה באזור הדרומי של אפריקה. בדומה לגיאופיטים חד-פסיגיים אחרים שמקורם טרופי, הקאלה עשבונית, בעלת איבר אגירה תת-קרקעי (קנה שורש מעובה או פקעת) ועיקר חשיבותה במסחר העולמי הינה כפרח קטיפי. היקף הגידול בארץ לשוק מקומי וליצוא הינו כ- 400 דונם. רגישותה הגבוהה למחלת הריקבון הרך מהווה גורם מגביל במיוחד במינים הצבעוניים. מינים אלה המאופיינים במגוון צבעים רחב, נכשלו בארץ במרוצת השנים בשל רגישותם הגבוהה לחיידק Pc, למרות התאמתם הפיסיולוגית והפוטנציאל הכלכלי הגבוה שלהם בשוק העולמי. נכון להיום אין בנמצא חומרים יעילים להדברת החיידק פרט לתכשירי נחושת המוגבלים בהשפעתם ובמקרים רבים בעלי אפקט פיטוטוקסי. תכשירים המתבססים על אנטיביוטיקה כגון סטרפטומיצין, עלותם גבוהה והשימוש בהם עלול לגרום התפתחות עמידות בחיידקים. לאחרונה פורסמו עבודות המסווגות את מיני הקאלה עפ"י רגישותם ל-Pc. במחקרים אלה נמצא כי קאלה לבנה (אתיופיקה) עמידה יותר מן הזנים הצבעוניים להדבקה בחיידק (11). הסבילות הגבוהה שקאלה אתיופיקה מגלה לחיידק לא ניתנת להעברה גנטית בהכלאה עם המינים הצבעוניים בשל חוסר התאם פלסטום גנום, המונע הכלאות בין מיניות בסוג *Zantedeschia*.

יישום חומרים כימיים משרי עמידות, לצורך הפעלת מנגנון ההתגוננות הטבעית מוכר ממערכות צמחיות שונות הכוללות מספר צמחים דו-פסיגיים ומיעוט מערכות מודל בצמחים חד-פסיגיים בעיקר ממשפחת הדגניים. עמידות זו יכולה להיות מקומית או סיסטמית ונמצאה יעילה כנגד טווח רחב של פתוגנים. בניסויי שדה נרחבים בארה"ב נמצא כי שפעול עמידות ע"י המשרן הכימי Bion® (תירס, אורז) נמצא יעיל כנגד פתוגנים פטרייתיים וחיידקיים, ובדו-פסיגיים (עגבניה, פלפל) נמצא אפקטיבי, אף יותר מהדברה כימית, כנגד פתוגנים ממקור חיידקי (2, 3, 5-7, 9, 10).

עמידות מושרית בחד-פסיגיים מקבוצת הדגניים נמצאה בעלת אפקט מתמשך בהשוואה לזו המתפתחת בצמחים דו-פסיגיים בהם האפקט הנו קצר טווח. הידע הנוגע להקניית עמידות בקבוצת גיאופיטי-הנוי עליהם נמנית הקאלה, הינו מוגבל ביותר. כך גם לגבי גיאופיטים נוספים הרגישים ל-Pc כמו נץ חלב, יקינתון ואיריס ואחרים (8).

שיטות

אינדוקציה לעמידות בצמחים: הצמחים גדלו במשך שתי עונות בעציצים בחממה (10-25°C), אור טבעי). העלים הצעירים ביותר שהגיעו לפריסה מלאה נקטפו והוגמנו למשך 24 שעות בתמיסה מימית של המשרנים Benzothiadiazole (BTH - Bion®), β -aminobutyric acid (BABA),

בריקוזים 0, 1, 5, 10, 25 ppm, ובריסוס עלוטי עבור Methyl jasmonate (MeJA) בריכוזים 0, 1, 10, 50 mM. השפעת החומרים נבחנה במערכת מודל שפותחה במעבדתנו המתבססת על דסקיות עלי קאלה ולימוד ההפחתה בתסמיני המחלה במערכת אספטית בצלחות על גבי מצע גידול (MS) המשמש לתרביות ללא סוכר.

החומר BTH מיוצר ע"י Syngenta וזמין באירופה (Bion®) ובארה"ב (Actigard®) כמוצר משלים למניעת מחלות בדגניים, עגבניות, טבק ובננות ונפוץ בשימוש בחקלאות האורגנית. החומרים האחרים המופיעים בעבודה זו אינם מיוצרים מסחרית.

בידוד Pc: רקמה נגועה נלקחה מצמח המראה תסמיני מחלה באיזור הגבול בין הרקמה הנגועה לבריאה. הרקמה נשטפה פעמיים במים מזוקקים (DW) וסטריליים, נשקלה והועברה לשקית פלסטיק אטומה לריסוק באמצעות עלי. למחית הוספו כ-1 מ"ל DW סטריליים והשקית הועברה לטילטול בטמפרטורת החדר במשך שעה. מן הדוגמא נזרעו 100 מיקרוליטר על גבי מצע סלקטיבי לפקטובקטריום (CVP) Crystal Violet Pectate, הצלחות הודגרו ב-28°C למשך 48-72 שעות עד להתפתחות מושבות. מושבות שיצרו שקע המעיד על פירוק המצע, בודדו, נוקו ונלקחו לאנליזה של חומצות שומן ו-PCR. לתבדידים שנבחרו לניסויי ההדבקה הוחדר פלסמיד המכיל גן עמידות לאמפיצילין המקנה לחיידק עמידות לאנטיביוטיקה וכן גן לחלבון פלואורסצנטי ירוק (GFP), לצורך מעקב ויזואלי אחר התפתחות החיידקים כפונקציה של עמידות הצמח, סלקציה וכימות.

מבחני פתוגניות: כל אחד מתבדידי ה-Pc שבודדו ממקורות צמחיים שונים, גודל למשך לילה במצע LB ממושבה בודדת. מבחני פתוגנה נערכו בדיסקיות עלי קאלה ונץ חלב כמודל לצמחים חד-פסיגיים ובעלי כרוב ופקעות תפוז"א כמודל לצמחים דו-פסיגיים. הדיסקיות בקוטר 20 מ"מ קורצו בעלים צעירים שעברו חיטוי חיצוני בסודיום היפוכלורית 0.7%, נפצעו נקודתית באמצעות טיפ סטרילי ואולחו ב-10 מיקרוליטר תרחיף חיידקים במים סטריליים בריכוז של 10^7 חיידקים למיליליטר. כל בדיקה נערכה בעשרים דיסקיות עלים בשלושה ניסויים שונים. שלושה משתנים שמשו כמדד למידת הפותגניות: קוטר השטח הנקרטי על גבי העלה, מספר הדיסקיות הכולל בהם התפתחו סימפטומים באחוזים מכלל הדיסקיות וספירת תאי החיידקים כמדד לשגשוג החיידקים ברקמה.

כימות חיידקים: דיסקיות עלי קאלה (1 גרם) לאחר אינדוקציה של 24 שעות והדבקה למשך 24 שעות נוספות, נטחנו והורחפו ב-10 מיליליטר מים סטריליים. כמות החיידקים נמדדה באמצעות ספירת מושבות לאחר מיהולים עשרוניים וזריעת החיידקים לצלחות LB אגר המכילות אמפיצילין. דרך נוספת לכימות החיידקים התבצעה ע"י ספירתם במכשיר - Fluorescent activated cell sorter (FACS). שיטה זו דורשת כיוול ביחס לכמות ידועה של בידים המשמשים כסטנדרט.

תוצאות ודיון

לצורך הקמת מערכת הבוחנת את פוטנציאל העמידות, בצמחי גיאופיטים חד פסיגיים, כנגד החיידק Pc, בודדנו חיידקים מפונדקאים המציגים תסמיני מחלת רקבון רך (תמונות 1, 2). את תבדידי החיידקים זיהינו במספר שיטות מקובלות: 1. ע"י זריעת בידוד למצע סלקטיבי, 2. ע"י אנליזה של חומצות שומן בשירותי הגנת הצומח בבית דגן 3. ע"י הגברת מקטעי DNA ייחודיים

לחיידיק באמצעות ראקציית PCR. לצורך הקמת מערכת אמינה ומכוילת בחנו את רמת האלימות של התבדידים השונים כלפי צמח המודל קאלה, בעזרת מערכת שפתחנו במעבדה הכוללת הדבקה בדיסקיות עלים לאחר חיטוי (תמונה 3A), ובריכוזי חיידקים משתנים. התבדידים שבודדו מפונדקאים שונים הציגו רמות אלימות שונות לקאלה. תבדיד מס' 1 אשר מקורו מבצל של נץ חלב הציג את האלימות הגבוהה ביותר, המתבטאת בכך שלאחר 24 שעות דיסקיות העלים היו רקובות לחלוטין. אחריו בסדר האלימות נמצא תבדיד 13 שמקורו בקאלה ותבדידים נוספים ממקור חד-פסיגי. באופן כללי תבדידים שבודדו מצמחים חד-פסיגיים הציגו אלימות גבוהה יותר לקבוצת הגיאופיטים החד פסיגיים מתבדידים שמקורם בצמחים דו-פסיגיים (תמונה C3). הבדלים אלה ברמת האלימות שנבחנו במספר רב של תבדידים מצביעים על ייחודיות במנגנון ההדבקה בצמחים החד פסיגיים. בהמשך בחרנו לעבוד עם התבדידים 13 (קאלה) ו-3 (תפו"א), המייצגים תבדיד שמקורו בצמח חד פסיגי ובצמח דו פסיגי. בנוסף לקאלה התבדידים נבחנו גם על גבי הפונדקאים נץ-חלב, כרוב ותפו"א. תבדידים שהראו אלימות גבוהה כלפי הקאלה היצגו דגם דומה בנץ החלב, אך לא בכרוב. תבדידים שהיו אלימים בכרוב נכשלו בדרך כלל במבחני ההדבקה של קאלה ונץ חלב. ניתן לומר שההתמחות של תבדידים שמקורם בצמחים חד-פסיגיים כפי שהיא משתקפת במידת האלימות לפונדקאים חד-פסיגיים נצפתה בשני הפונדקאים למרות שהם אינם נמנים על משפחות בוטניות קרובות (תמונה C3). תבדידים מסויימים שגילו אלימות רבה כלפי פונדקאי מהקבוצה ממנה בודדו (חד-דו פסיגי), לא גילו כל אלימות כלפי פונדקאי מהקבוצה השנייה ולהיפך (תמונה B3). בבדיקת טביעת האצבע הגנטית של התבדידים השונים באמצעות מבחן AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ניתן להצביע על מאפיינים ייחודיים בדגם הפסים של הטיפוסים שבודדו מפונדקאים חד-פסיגיים ועל פס ייחודי המאפיין את כל התבדידים הנמנים על קבוצה זו (תמונה 4).

מדד ויזואלי להקניית העמידות בקאלה ע"י השימוש במשרנים, הינו יכולת שגשוג והתרבות החיידק ברקמה, עם וללא אינדוקציה לעמידות ובהתאמה לריכוז המשרן. מתאם זה ניתן להמחשה באמצעות חיידקי פקטובקטריום המבטאים את החלבון הפלואורסצנטי GFP (תמונה 5). ניתן לראות הפחתה משמעותית בריכוז החיידקים בריקמה לאחר הקניית עמידות באמצעות המשרן Bion. ההפחתה ניכרת גם במידת הנזק הנגרם לריקמה ע"י החיידקים. לשם השוואה מספרית ביצענו כימות של החיידקים בטיפולים השונים, ואכן התקבלה הפחתה בכמות החיידקים של עד כארבעה סידרי גודל (פי 10,000) בין הצמחים המטופלים בריכוז מיטבי, לעומת צמחי הביקורת. כימות תגובת העמידות בוצע באותה מערכת, לאחר אינדוקציה של העלים למשך 24 שעות באמצעות משרני עמידות שונים מוכרים בספרות (Bion®-BTH, BABA, MeJA) והדבקת אתגר בחיידק. הפחתת המחלה נמדדה 24 שעות לאחר ההדבקה. טיפול במשרן Bion® הניב הפחתת מחלה ב- 50%, בהגמעה בריכוזים 10, 25 ppm, אך בריכוז 25 ppm כבר החלה השפעה פיטוטוקסית, הנכרת באחוזי הדיסקיות המודבקות ובהזדקנותן המוקדמת. טיפול דומה במשרן BABA הניב הפחתת מחלה דרמטית יותר (70%) ובריכוזים נמוכים יותר, אך הראה השפעה פיטוטוקסית גדולה יותר בריכוזים הגבוהים. השימוש בשני המשרנים האלה בלם את המחלה למשך 24 השעות הראשונות, אך לאחר 48 שעות הרקמה כולה נרקבה. הטיפול במשרן

MeJA, הניב הפחתת מחלה של 90% לאורך 120 שעות ויותר ע"י יישום בריסוס עלוותי ובריכוז 10 mM. גם במשך MeJA נצפה אפקט פיטוטוקסי ברכוז הגבוה 50 mM שהתבטא בהזדקנות מואצת של העלים (תמונה 6). ההבדל בין המשרנים השונים במשך הזמן בו נשמרה הפעילות המעקבת על התפתחות המחלה, מצביע על הבדל במנגנון הפעולה שלהם.

על פי הספרות ידוע כי החומרים BTH, BABA, פועלים, במסלול הגנה של הצמח התלוי בחומצה סליצילית (Salicylic acid -SA) ומקנה עמידות רחבת טווח, בעיקר כנגד פתוגנים ביוטרופים הגדלים על רקמה חיה (1, 12, 14). החומר מתיל ג'יסמונאט (MeJA) פועל במסלול הגנה התלוי בחומצה ג'יסמונית (Jasmonic acid - JA) ואתילן, אשר מקנה עמידות רחבת טווח בעיקר כנגד אוכלי צמחים (Herbivores) ופתוגנים נקרופיים הגדלים על רקמה מתה (4). פקטובקטריום קרוטובורה הינה חיידק נקרופי הממית את הרקמה כחלק ממנגנון גרימת המחלה. הגנה המבוססת על מוות מתוכנן של התא (אפופטוזיס), המאפיינת עמידות המושרית דרך מסלול החומצה הסליצילית, מסוגלת לעכב בטווח הקצר את שגשוג החיידקים בריקמה, אך אינה יעילה לאורך זמן. בניגוד לחיידקים ביוטרופיים, חיידק הפקטובקטריום אינו זקוק לריקמה חיונית לפיכך הרקמה המתה מספקת לו מקור מעולה לנוטריינטים. לעומת זאת, עמידות המושרית במסלול החומצה הג'יסמונית, הציגה הגנה מלאה משמעותית מבחינה סטטיסטית ולאורך זמן. הגנה זו יעילה יותר כנגד חיידק הארוניה ופועלת במנגנון שעדיין לא נחקר בקבוצת הגידולים בה אנו עוסקים – קבוצת גיאופיטי הנוי החד-פסיגיים.

כדי להבין מעט יותר את מנגנון הפעולה בחרנו לבחון את השפעת הטיפולים על הצטברות תרכובות פוליפנוליות בעלים ואת פעילותן הביולוגית על החיידק. הבחירה בכיוון זה קשורה לעובדה ששיפעול מסלול החומצה הג'יסמונית בצמחים מזוהה במידה רבה עם סינטזה של מטבוליטים משניים (9). ניתן לראות כי אינדוקציה עם מתיל ג'יסמונאט אך לא עם Bion הפעילה את מסלול סינתזת הפוליפנולים, אך זו התבטאה במידה משמעותית רק לאחר הדבקת אתגר בחיידק (תמונה 8). פעילות פוליפנולים כנגד החיידק נמצאה יעילה יותר בטיפול זה (תמונה 9A,B).

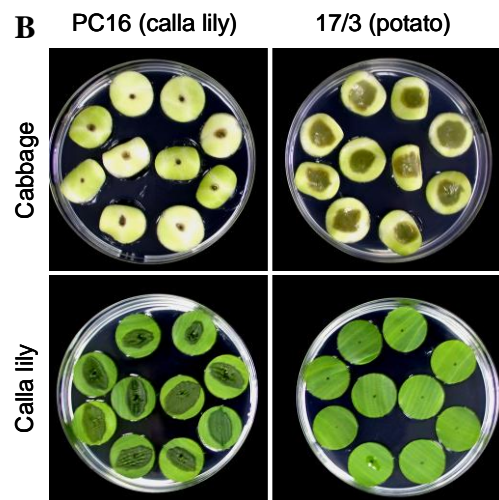
הקניית עמידות באמצעות הפעלה של מנגנוני הצמח "המולדים", באמצעות משרנים ידידותיים לסביבה, כגישה מניעתית ומשלימה למלחמה במיקרואורגניזמים פתוגניים לצמחים תופסת תאוצה במחקר ובחקלאות ומאפשרת להפחית נגיעות בפתוגנים כחלק ממערך הדברה משולבת. ממחקרנו מסתמן פוטנציאל להפחתת מחלה בקאלה, כנגד מחלת הרקבון הרך הנגרמת ע"י הפתוגן פקטובקטריום קרוטובורוס. מערכת המודל שפיתחנו מצביעה על כך שהמשרנים השונים אכן מקנים עמידות לגיאופיטים חד פסיגיים. עוד ניתן ללמוד מן המערכת כי התגובה תלויה במינון המשרן (Dose dependent), וכי נדרשת עבודת כיוול בדומה לחומרי הדברה מקובלים, למניעת השפעה פיטוטוקסית הנובעת משימוש במינון יתר. תוצאות דומות התקבלו גם עבור נץ חלב דבר המצביע על פוטנציאל המערכת לשמש כמודל עבור גיאופיטים נוספים.



תמונה 1: A, צמח קאלה המציג תסמיני מחלת הרקבון הרך בחממה (כפר בילו, 2006), ניתן לראות איבוד צבע עד הצהבה מלאה של העלים; **B**, תקריב רקבון פטוטר העלים; **C**, רקבון בסיס העלים ופקעת.

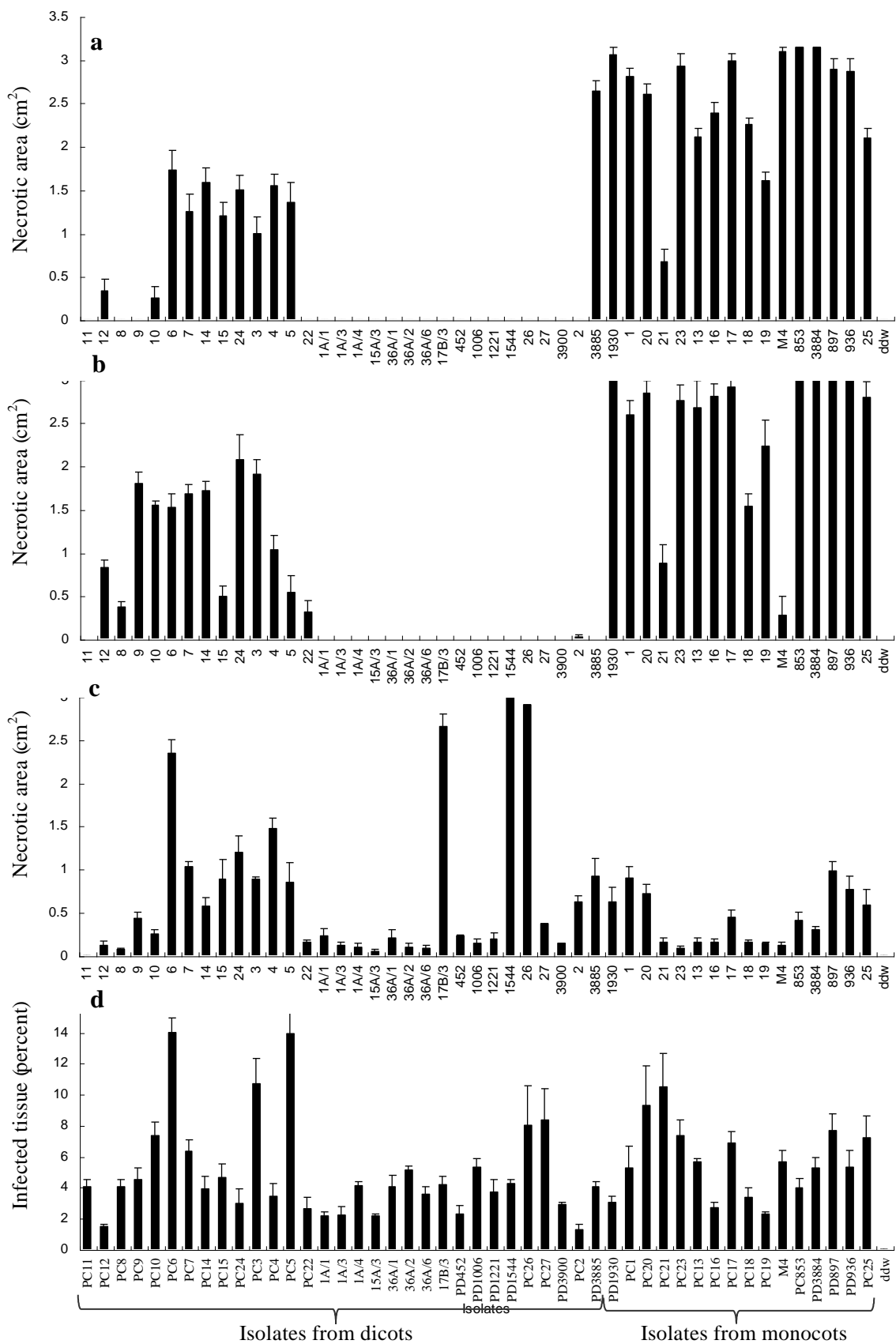


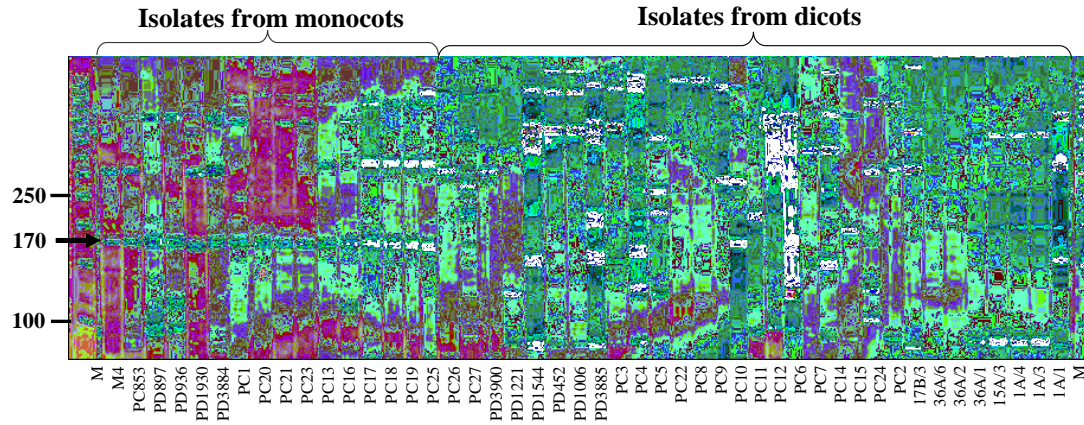
תמונה 2: A, צמחי נץ חלב (*Ornithogalum dubium*) המציגים תסמיני מחלת הרקבון הרך במנבטה בחממה (וולקני, 2006), ניתן להבחין בכתמים מצהיבים המתפשטים במנבטה; **B**, תקריב מאפשר להבחין בכתמים מימיים וברקבון בסיס העלים.



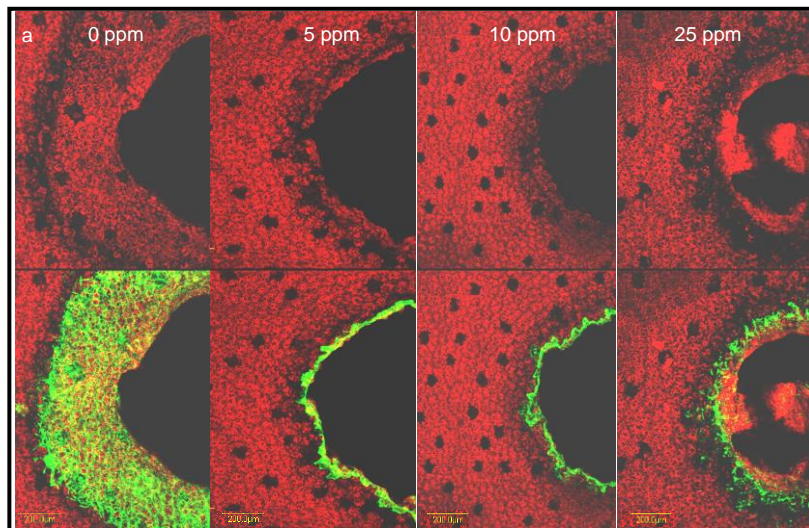
תמונה 3: A, דיסקיות עלי קאלה מאולחות בחמישה תבדידי פקטובקטריום ממקורות צמחיים שונים המראות הבדלים בקוטר האזור הנקרטי. אזור זה הנראה ככתם כהה על גבי הריקמה מבטא הבדלים ברמת האלימות בין התבדידים; **B**, דיסקיות עלי קאלה (פנל תחתון) וכרוב (פנל עליון) המבטאות הבדלים בהתפתחות תסמיני ריקבון רך לאחר הדבקה בפקטובקטריום שבודד מקאלה (שמאל) או תפוי"א (ימין); **C**, הבדלים ברמת האלימות של תבדידי ארויניה ממקורות שונים לדיסקיות עלי קאלה, A; נץ-חלב, B; כרוב, C; תפוי"א, D. העמודות מייצגות הבדלים בשטח האזור הנקרטי המתפתח על פני הדיסקית בתוספת סטיות תקן. בגרף מוצגים 47 תבדידים שבודדו או התקבלו ממקורות שונים ומאזורים גיאוגרפיים מרוחקים (ראה טבלה מצורפת-נספח 1).

C



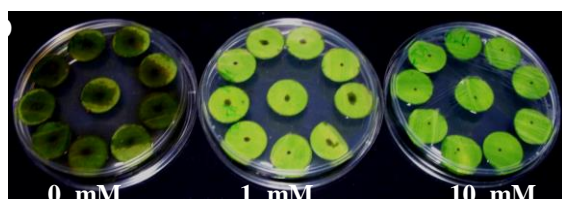
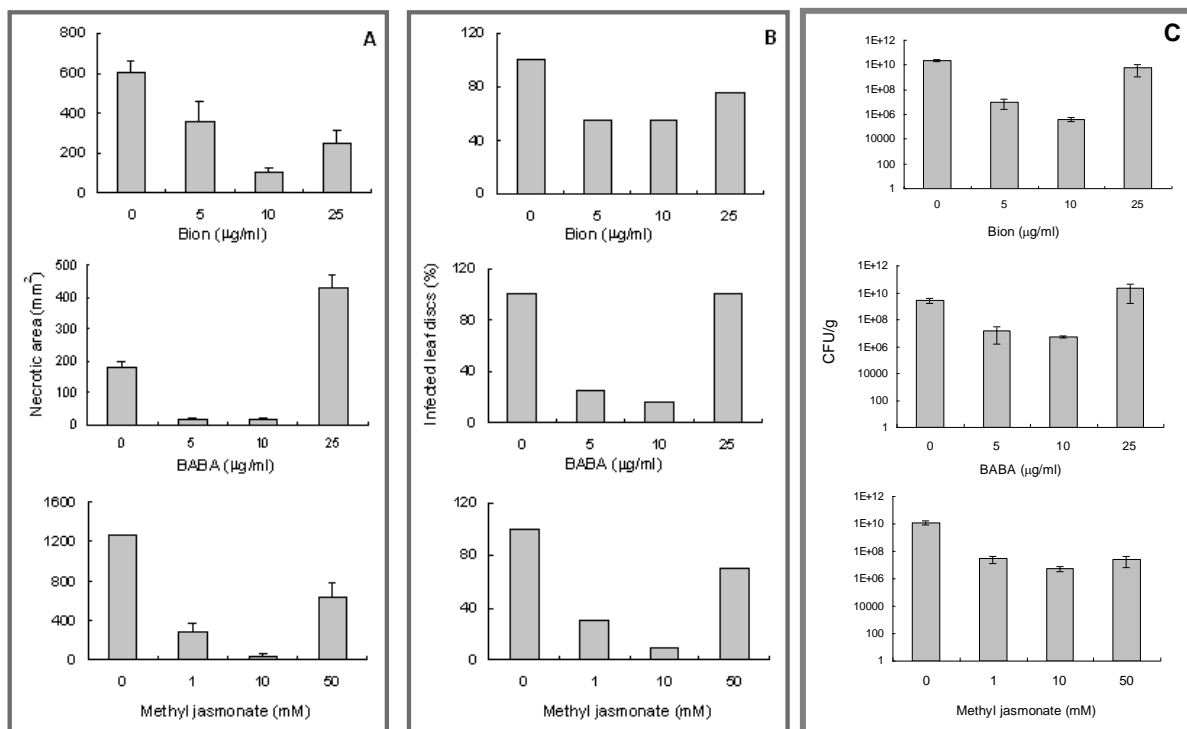


תמונה 4: תבדידי ארויניה ממקור חד או דו-פסיגי, המציגים הבדלים בדגם הפסים הגנטי שלהם כפי שהתקבל מאנליזת AFLP. בנוסף ניתן להבחין בסמן אופייני בגודל 170 בסיסים המאפיין רק את התבדידים שמקורם בצמחים חד-פסיגיים.



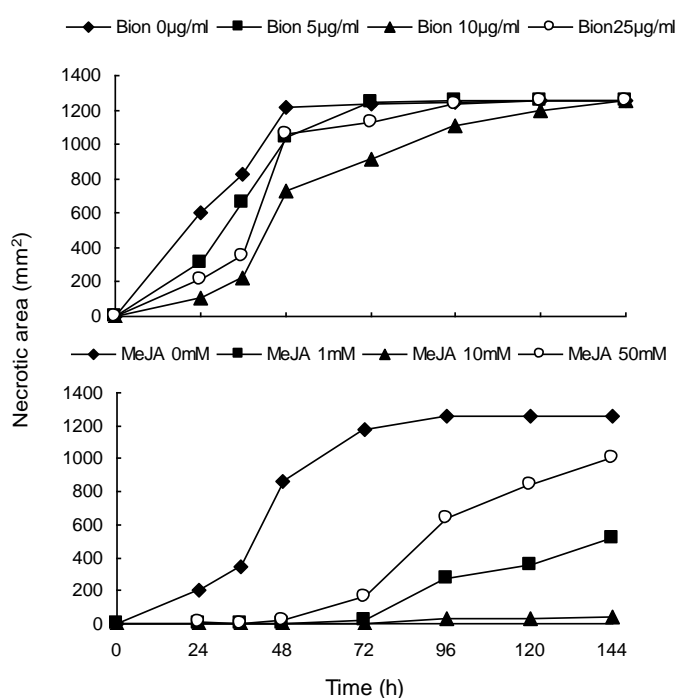
תמונה 5: דסקיות עלי קאלה המודבקות בחיידקי פקטובקטריום (10⁷ cfu/ml) חלבון פלואורסצנטי ירוק (GFP) לאחר אינדוקציה עם ריכוזים שונים (0-25 ppm) של המשך Bion® - BTH. האינדוקציה ניתנה בהגמעה למשך 24 שעות. בפנל העליון ניתן להבחין בריקמה צמחית פגועה המתבטאת בהרס הכלורופיל המסתמן

כצל כהה על רקע הפלואורסנציה האדומה של הכלורופיל בריקמה הבריאה. בפנל התחתון ניתן לראות את התפשטות החיידקים בריקמה, 24 שעות לאחר ההדבקה בחיידק. מידת הזהירה של החלבון הפלואורסצנטי (GFP) מהווה מדד להתפשטות ושגשוג החיידקים בריקמה.

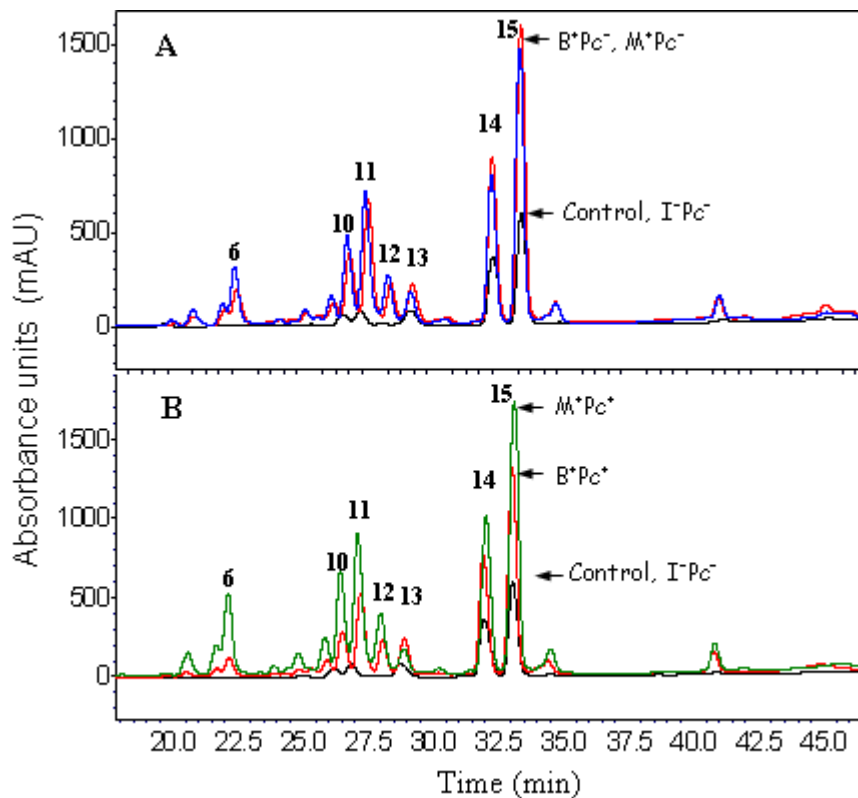


תמונה 6: A, הפחתת מחלה בדיסקיות על קאלה לאחר טיפול במשרנים BTH, BABA, MeJA והדבקת אתגר עם תרחיף חיידקים; **B**, הפחתה באחוז דיסקיות העלים המודבקים כתוצאה מהשראת העמידות. **C**, הפחתת אוכלוסיית החיידקים בדיסקיות על קאלה לאחר אינדוקציה בריכוזים שונים של המשרנים.

הקריאות נערכו 24 שעות לאחר הדבקה, פרט למתיל ג'יסמונאט שם נערכה מדידה לאחר 120 שעות. **D**, דיסקיות על קאלה לאחר אינדוקציה עם המשרן MeJA ו-120 שעות לאחר הדבקת אתגר עם תבדוד פקטובקטריום מס' 13 (בודד מקאלה).

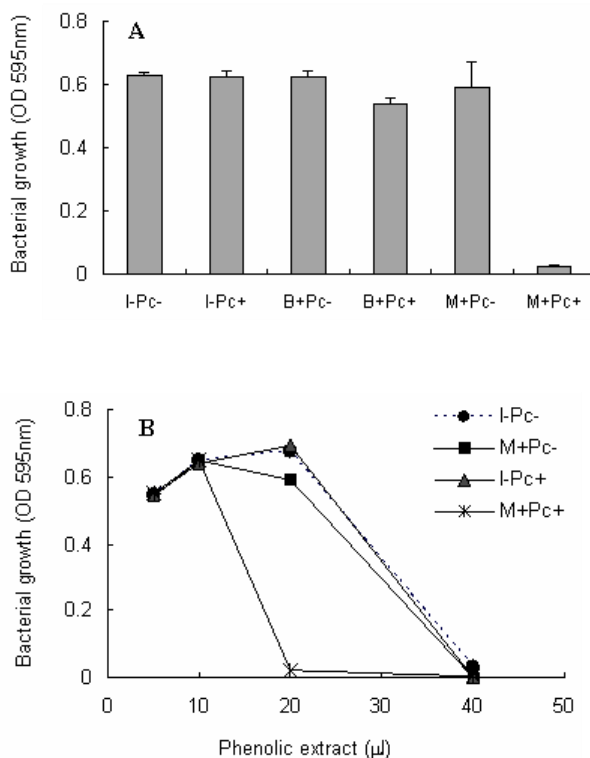


תמונה 7: התפשטות תסמיני מחלה בדיסקיות על קאלה כפונקציה של הזמן, בריכוזים שונים של משרני העמידות Bion או MeJA. המשרנים ניתנו 24 שעות לפני הדבקת אתגר בחיידק.



תמונה 8 :
פרופיל
תרכובות

פוליפנוליות בעלי קאלה כתוצאה מהשראת עמידות עם המשרנים Bion או MeJA. בפאנל העליון ניתן לראות פרופיל התרכובות לאחר ההשראה. בפנל התחתון ניתן לראות את פרופי התרכובות לאחר השראה והדבקת אתגר בחיידק. המספרים מייצגים את מספרי הפיקים והטיפולים השונים מיוצגים באותיות: B- Bion, Pc- *Pectobacterium carotovorum*, I- MeJA, M- I-MeJA, M- MeJA.



תמונה 9 : A, פעילות אנטימיקרוביאלית של מיצוי פוליפנולים מעלי קאלה לאחר אינדוקציה במשרנים והדבקה בפקטובקטריום. המקטע היחיד המראה פעילות הוא זה שעבר אינדוקציה במתיל גאסמונט והדבקת אתגר ביידק; B, קביעת ריכוז מינימלי של מיצוי פוליפנולי המראה פעילות מהטיפולים השונים במתיל גאסמונט כולל מתיל גאסמונט בלבד, חיידק בלבד ומים כבקורת. המיצוי הפעיל מראה רמת פעילות כפולה בהשוואה לבקורת.

1. **Cohen, Y.** 2001. The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica* **29**:375-378.
2. **Conrath, U., C. M. Pieterse, and B. Mauch-Mani.** 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **7**:210-6.
3. **Durrant, W. E., and X. Dong.** 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Reviews Phytopathology* **42**:185-209.
4. **Glazebrook, J.** 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Reviews Phytopathology* **43**:205-27.
5. **Gozzo, F.** 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:4487-503.
6. **Heil, M., and R. M. Bostock.** 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany (Lond)* **89**:503-12.
7. **Kothari, I. L., and M. Patel.** 2004. Plant immunization. *Indian Journal of Experimental Biology* **42**:244-52.
8. **Le Nard, M., and A. A. De Hertogh.** 2002. Research need for flower bulbs (geophytes). *Acta Horticulture* **570**:121-127.
9. **Oostendorp, M., W. Kunz, B. Dietrich, and T. Staub.** 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal Plant Pathology* **107**:19–28.
10. **Sakamoto, K., Y. Tada, Y. Yokozeki, H. Akagi, N. Hayashi, T. Fujimura, and N. Ichikawa.** 1999. Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. *Plant Molecular Biology* **40**:847-55.
11. **Snijder, R. C., and J. M. van Tuyl.** 2002. Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp. Araceae to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *European Journal Plant Pathology* **108**:565–571.
12. **Ton, J., and B. Mauch-Mani.** 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* **38**:119-30.
13. **Wright, P. J.** 1998. A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science* **26**:331-334.
14. **Zimmerli, L., G. Jakab, J. P. Metraux, and B. Mauch-Mani.** 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* **97**:12920-5.

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום 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.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
במהלך תקופת המחקר שנמשכה שנתיים העמדנו מערכת המיועדת לבחון את הפוטנציאל של משרני עמידות שונים כנגד החיידק פקטובקטריום בדיסקיות עלי קאלה וצמחוני נץ חלב. לצורך קביעת טווח העמידות ומידת יעילותה נבחנה במקביל מידת האלימות של תבדידים שונים של החיידק כלפי צמחי המודל. יוצרו חיידקים מותמרים המבטאים חלבון פלואורסנטי ועמידות לאנטיביוטיקה כדי לאפשר כימות ויזואלי ומספרי של תגובת העמידות.
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. נמצא כי תבדידי פקטובקטריום שמקורם בגידולים חד-פסיגיים אלימים משמעותית מתבדידים שמקורם בצמחים דו-פסיגיים לצמחי המודל קאלה ונץ-חלב. לתוצאה זו משמעות בקביעת מחזורי גידול, סניטציה בשטח וקירבה לגידולים שונים. בנוסף לכך תופעת העמידות המושגת חייבת להבחן כנגד תבדידים אלימים ממקור חד-פסיגי כדי לקבל תוצאה רלוונטית לגידול. נמצא כי משרנים שונים יכולים להשרות תגובת עמידות, אך המשרן הפועל במסלול ח' ג'סמונית נתן הגנה משמעותית ומתמשכת יותר. תופעה זו נמדדה על פי מספר פרמטרים כמו שטח הריקמה הסימפטומטית, % הדסקיות הנדבקות, ספירות חיידקים בריקמה וויזואליזציה של התגובה. נמצא כי מנגנון הפעילות מערב אינדוקציה של תרכובות פוליפנווליות המראות פעילות מוגברת רק לאח הדבקת אתגר בחיידק.
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח. מטרות המחקר לתקופה זו הושגו במלואן. פותחה מערכת המאפשרת השוואה בין יעילות תכשירים משרי עמידות שונים בשני צמחי המודל. המערכת מאפשרת בחינת פוטנציאל של משרנים נוספים במטרה להגיע עמם בסופו של התהליך לשדה.
הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר. עיקר המטרה בשלב השני של המחקר הינה לבחון את פוטנציאל המשרנים האלה ונוספים בתנאי שדה.
האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט : פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
הוחל בהפצת הידע.
פורסם מאמר בעיתון Plant pathology. התפרסם מאמר בעיתון עולם פורח. פורסם מאמר בעיתון Agricultural and food chemistry. התקבל מאמר לעיתון Environmental Microbiology. נשלחו והתקבלו שני מאמרים ל- Acta Horticulture.
1. Polyphenols induction in the defense response of calla lily towards <i>Pectobacterium carotovorum</i> . 2008. Iris Yedidia, Alex Lipsky, Avner Golan, Moran Yishay, Aurel Ion, and Tal Luzzatto. 2. A story of an old battle: <i>Pectobacterium carotovorum</i> and ornamental monocots. 2008. <u>Iris Yedidia</u> , Ron Ophir, Moran Yishay, Aurel Ion, Tal Luzzatto, Avner Golan, and Saul Burdman.
Publications in peer reviewed journals: 1. Luzzatto T, Yishay M, Lipsky A, Ion A, Belausov E, Yedidia I . 2007. Efficient, long-lasting resistance against the soft rot bacterium <i>Pectobacterium carotovorum</i> in calla lily

provided by the plant activator methyl jasmonate. *Plant Pathology*. 56: 692-701.

2. Luzzatto T, Golan A, Yishay M, Bilkis I, and **Yedidia I**. 2007. Priming of antimicrobial phenolics during induced resistance response towards *Pectobacterium carotovorum* in the ornamental monocot calla lily. *Agricultural and Food Chemistry*. 55: 10315-10322.

3. Moran Yishay, Saul Burdman, Angel Valverde, Tal Luzzatto, Ron Ophir and **Iris Yedidia**. Differential pathogenicity and genetic diversity among *Pectobacterium carotovorum* isolates from monocot and dicot hosts support early genomic divergence within this taxon. In press. *Environmental Microbiology*.

פרסומים בעברית

1. טל לוצאטו, מורן ישי, האורל יון, אלכס ליפסקי, שרה'ילה גוטמן, גדעון לוריא ואיריס ידידיה. 2006. הקניית עמידות מושרית לצמחי קלה כאמצעי להפחתת נגיעות בחיידק הארוויניה. עולם הפרח, ספטמבר-אוקטובר, ע'מ 46-49.
2. איריס ידידיה, מורן ישי, טל לוצאטו, אלכס ליפסקי, האורל יון, גדעון לוריא. 2006. חיידק הארוויניה בגיאופיטי נוי חד-פסיגיים. חוברת סיכום עונה- נץ חלב. עמודים 14-19.

3. הרצאות : סכום עונה מגדלי נץ חלב, 2006. בית אריזה השרון.
 סכום עונה מגדלי קאלה, 2007. אולם הרצאות מו"פ לכיש.
 סכום עונה מגדלי נץ חלב, 2007. בית אריזה השרון.
 יום אגף מדריכי שה"מ 2007. משרד החקלאות.
 המחלקה לפיטופתולוגיה אוניברסיטת ויסקונסין, 2008. מדיסון.
 כנסים : הכנס הבינלאומי לבצלים ופקעות, 2008. ליסה, הולנד.

פרסום הדו"ח : אני ממליץ לפרסם את הדו"ח : (סמן אחת מהאופציות)

ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) ←

מאגר תבדידי Pectobacterium carotovorum

מספר תבדיד	מס"ד מקורי	מקור צמחי	תאריך	מקור גיאוגרפי	אוסף	מקור צמחי: חד / דו פסיגי
Pc1	EC3 106	נץ חלב בצל O.dubium	17.6.04	ישראל, אורית	שולה מנוליס	חד פסיגי
Pc2	EC2 105	נץ חלב גבעול	17.6.04	ישראל, אורית	שולה מנוליס	חד פסיגי
Pc3	R9 87	תפוח אדמה פקעות תפוח אדמה	8.6.98	ישראל	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc4	R55 93		1.7.98	ישראל, רבקה הדס	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc5	R6 65	תפוח אדמה כרוב Brassica oleracea	20.5.98	ישראל, רבקה הדס	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc6	R53 91		1.7.98		שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc7	EC4K 52	כרוב	29.1.98	אלמטה, קזחסטן ישראל	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc8	ECCSP2 46	פלפל Capsicum annum	10.3.97	ישראל	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc9	R33 88	פלפל זרעים	8.6.98	ישראל, רבקה הדס	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc10	R34 78	פלפל זרעים עגבניה Lycopersicon esculentum	20.5.98	ישראל, רבקה הדס	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc11	R26 76		20.5.98		שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc12	R35 89	עגבניה זרעים	8.6.98	ישראל, רבקה הדס	שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc13	R13 69	קאלה	20.5.98	ישראל	שולה מנוליס	חד פסיגי
Pc14	EC4BK 94	כרוב	24.12.98	אלמטה, קזחסטן	קזחסטן, שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc15	EC9BK 95	כרוב	24.12.98	אלמטה, קזחסטן	קזחסטן, שולה מנוליס	דו פסיגי
Pc16		קאלה פקעת	2006	ישראל	מעבדה	חד פסיגי
Pc17		קאלה גבעול	2006	ישראל	מעבדה	חד פסיגי
Pc18		קאלה גבעול	2006	ישראל	מעבדה	חד פסיגי
Pc19		קאלה גבעול	2006	ישראל	מעבדה	חד פסיגי
Pc20		נץ חלב	2006	ישראל	מעבדה	חד פסיגי
Pc21		נץ חלב עלה	2006	ישראל	מעבדה (אלה)	חד פסיגי
Pc22		תפוח אדמה	2006	ישראל	הגנ"צ	דו פסיגי
Pc23		נץ חלב עלה	2006	ישראל	מעבדה (הילה)	חד פסיגי
Pc24	8590-1	מלון Cucumis melo	26.2.06	ישראל	הגנ"צ, וולקני	דו פסיגי
Pc25	8563-2	פלפל	9.3.06	ישראל	הגנ"צ, וולקני	דו פסיגי
Pc26		Hosta	23.6.06	הולנד		חד פסיגי
Pc27		Galthonia	23.6.06	הולנד		חד פסיגי
Pc28	M4	קאלה	אוגוסט 2006	פולין		חד פסיגי
Pc29	853	קאלה	אוגוסט 2006	פולין		חד פסיגי
Pc30	1A/1	תפו"א	ספטמבר 2006	פולין		דו פסיגי
Pc31	1A/3	תפו"א	ספטמבר 2006	פולין		דו פסיגי
Pc32	1A/4	תפו"א	ספטמבר 2006	פולין		דו פסיגי
Pc33	15A/3	תפו"א	ספטמבר 2006	פולין		דו פסיגי
Pc34	36A/1	תפו"א	ספטמבר	פולין		דו פסיגי

דו פסיגי		פולין	2006 ספטמבר	תפו"א	36A/2	Pc35
דו פסיגי		פולין	2006 ספטמבר	תפו"א	36A/6	Pc36
דו פסיגי		פולין	2006 ספטמבר	תפו"א	17B/3	Pc37
חד פסיגי	J.D. Janse	הולנד	2006 אוקטובר	Lilium sp.	PD 897	Pc38
חד פסיגי	J.D. Janse	הולנד	1987 פברואר	Schismatoglottis sp.	PD 936	Pc39
דו פסיגי	J.D. Janse	הולנד	1988 נובמבר	Cyclamen sp.	PD 1221	Pc40
דו פסיגי	J.D. Janse	הולנד	1989 נובמבר	Aconitum sp.	PD 1544	Pc41
חד פסיגי	J.D. Janse	הולנד	1992 מרץ	Spathiphyllum sp.	PD 1930	Pc42
חד פסיגי	J.D. Janse	הולנד	2000 יוני	Zantedeschia aestivae	PD 3884	Pc43
חד פסיגי	J.D. Janse	הולנד	2000 יוני	Zantedeschia aetiopica	PD 3885	Pc44
חד פסיגי	J.D. Janse	הולנד	2000 יולי	Curcuma	PD 3900	Pc45
דו פסיגי	J.D. Janse	הולנד	1984 מאי	Solanum tuberosum "Bintje"	PD 452	Pc46
דו פסיגי	J.D. Janse	הולנד	1987 דצמבר	Solanum tuberosum "Colmo"	PD 1006	Pc47
תבדידים שלא נכללו בניסויים:						
חד פסיגי		פולין	2006 דצמבר	Iris	(1+2) 52M	Pc48
חד פסיגי	מעבדה	ישראל/ הולנד	2007 אפריל	קאלה צבעונית עלה	16-18 RENOIL	Pc49
חד פסיגי	מעבדה	ישראל/ הולנד	2007 אפריל	קאלה צבעונית פקעת	ELEGANT SNAN 14-16	Pc50

תבדידי ייחוס שאינם Pc

אוסף	מקור גיאוגרפי	תאריך	מין/סוג החיידק	מקור צמחי	מס"ד מקורי	מספר תבדיד
	הולנד	23.6.06	Moraxella	Zantedeschia	Z-36	26 (הוחלף)
	הולנד	23.6.06	Klebsiella	Hyacint	H-5	28 (הוחלף)
	הולנד	23.6.06	pseudomonas	Iris		30
	הולנד	23.6.06	Citrobacter	Ornithogalum		31
שולה מנוליס	ישראל		E. Herbicola			
שולה מנוליס	ישראל		E. Amylovora			
שולה מנוליס	ישראל		Pseudomonas			
שולה מנוליס	ישראל		Agrobacterium			
	פולין	אוגוסט 2006	P.Atrosepticum	Zantedeschia	M2	
	פולין	אוגוסט 2006	P.Atrosepticum	Zantedeschia	M9	
מעבדה	ישראל	6.9.06	E.Chrysanthemii	Ornithogalum Saundarsi	O.Sa	