

דוח מסכם לתוכנית מחקר מספר 132-1314-09

**פיתוח שיטות לאיבחון החיידק *Erwinia chrysanthemi* בפקעות תפוחי אדמה ובדיקת**

**הישרדות הפתוגן בקרקע**

**Development of detection methods for *Erwinia chrysanthemi* in potato seeds and determining  
the survival of the pathogen in soil**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

שולמית מנוליס, לאה צרור, גיורא קריצמן, אורית דרור, בני קירשנר, שרה לביוש, אורלי ארליך, המחלקה  
למחלות צמחים, מכון וולקני ומרכז מחקר גילת;  
ציון דר, ממ"ר תפוחי אדמה, שה"מ

Shulamit Manulis, Leah Tsrer, Giora Kritzman, Orit Dror, Benny Kirshner, Sara Lebiush, Orly  
Erlich, Dept, of Plant Pathology, ARO, The Volcani Center Bet Dagan 50250, and Gilat  
Experiment Station, M.P. Negev 85280.

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

Zion Dar, Shaham, Ministry of Agriculture.

מאי 2010

סיוון תש"ע

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

**הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.**

חתימת החוקר

**תוכן העניינים**

2	תקציר
3	מבוא
3	מטרות המחקר
4	פירוט עיקרי הניסויים
4	א. פיתוח הפרוטוקול לגילוי הפתוגן
8	דיון ומסקנות
9	ב. איפיון אוכלוסיית הפתוגן בארץ
12	ג. הישרדות החיידק בקרקע
18	מסקנות
19	רשימת ספרות
20	סיכום

## תקציר

1. הצגת הבעיה: אחד הפתוגנים החשובים הגורמים לנזקים ניכרים בגידול תפוחי-אדמה הוא החיידק *Erwinia chrysanthemi* הגורם למחלת הנבילה הבקטריאלית. זהו חיידק הסגר ובעבר היו כישלונות בגילוי נגיעות סמויה בחיידק במכסות זרעים מיובאים. כמו כן לא ידוע אם וכמה זמן החיידק שורד בקרקעות נגועות והאם האינקולום בקרקע מהווה גורם משמעותי בהפצת המחלה.
2. מטרות המחקר: א. פיתוח פרוטוקול רגיש לגילוי החיידק במכסות של פקעות תפוחי אדמה לזריעה. ב. בדיקת הישרדות החיידק בקרקע.
3. שיטות ומהלך העבודה: פותח פרוטוקול לגילוי ארוויניה כריזנטמי בפקעות תפוחי-אדמה המבוסס על העשרה במצע המכיל פקטין ובדיקות בשיטת ה-ELISA וה-PCR. הפרוטוקול נבדק בשלוש שנות המחקר עם 155 אצוות מסחריות ו-80 אצוות לתצפית. הוכן אוסף של 121 תבדידי הפתוגן שעבר אנליזה באמצעות שיטת ה-PFGE עם שני אנזימי רסטריקציה. פותח פרוטוקול לבידוד הפתוגן מהקרקע המבוסס על העשרה במצע מוצק. הישרדות הפתוגן בקרקע נקבעה בניסויים ובסקרים שנעשו בוולקני, בבשור ובגילת ולאחר יישום פורמלין ואמוניה. נבדקה האפשרות של גידול אגוזי אדמה למחזור גידולים.
4. תוצאות עיקריות: בדיקת הקשר בין גילוי נגיעות במעבדה להופעת המחלה בשדה באצוות מסחריות ובאצוות לתצפית הראתה כי בשיטה המולקולארית ההתאמה טובה יותר וכן הרגישות גבוהה יותר בהשוואה לשיטה הסרולוגית. אחוז ה- false negative היה נמוך יותר בשני סוגי האצוות שנבדקו. אנליזה באמצעות שיטת ה-PFGE שנעשתה לאוסף תבדידי הפתוגן הראתה 7 טיפוסים שונים כאשר מרבית התבדידים הם מטיפוס A, תוצאה המצביעה על כך שאוכלוסיית החיידק כנראה הומוגנית. בדיקת הישרדות הפתוגן בקרקע הראתה שהחיידק שורד לפחות שנה ויכול לעבור לפקעות הבת מצמח האם. טיפולי קרקע בתכשירי אמוניה או פורמלין הדבירו לחלוטין את הפתוגן. החיידק מאכלס ויוצר סימני מחלה על אגוזי אדמה.
5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: על פי ממצאי העבודה ניתן ליישם את הפרוטוקול שפותח על מנת לבדוק את פוטנציאל הנגיעות בארוויניה כריזנטמי באצוות היבוא. ההחלטה מה לעשות במקרה של תשובות חיוביות נתונה בידי השירותים להגנת הצומח מכיוון שזהו חיידק הסגר. יתכן שיהיה צורך בעתיד לקבוע מהו סף הנגיעות הגורם להתבטאות מחלה בשדה. במקרה זה כדאי יהיה לפתח את הבדיקה באמצעות Real-time PCR המאפשרת קבלת מדד כמותי לריכוז החיידקים בדוגמא. כדי להשתמש במידע לגבי טיפוס הפתוגן בארץ לצרכים אפידמיולוגיים יש לנסות ולבדוק שונות בקבוצה A באמצעות שיטות אחרות כמו rep-PCR. החיידק ארוויניה כריזנטמי מדביק אגוזי אדמה ולכן צמח זה אינו יכול לשמש במחזור גידולים בקרקעות שבהן נמצא אינקולום של הפתוגן.

**מבוא**

אחד החיידקים החשובים הגורמים לנזקים ניכרים בגידול תפוחי-אדמה הוא החיידק ארוויניה כריזנטמי (*Erwinia chrysanthemi*) או בשמו החדש *Dickeya*. זהו פתוגן בעל טווח פונדקאים רחב התוקף מינים ממשפחות שונות וגורם למחלת הנבילה הבקטריאלית המתבטאת בהחמה של צינורות ההובלה, נבילה של הצמח ורקבון רך של הפקעות. החיידק מוגדר בישראל כפתוגן הסגר. בתפוחי אדמה, במקרים רבים, הוא יכול להימצא בצורה סמויה בפקעות ובצמח ולגרום לתסמיני המחלה כאשר תנאי הסביבה מתאימים (טמפרטורה גבוהה 30-39 מ"צ ולחות מרובה). הסימנים הראשוניים של המחלה הם נבילה של העלים העליונים אשר מאוחר יותר מתייבשים. התסמינים מתפשטים בהדרגה לכיוון העלים התחתונים ולבסוף הצמח כולו מתייבש ומת. החמה חזקה מופיעה תחילה בצנורות ההובלה של הצמח ולאחר מכן בסיס הגבעול משחיר. כמו כן עלול להופיע רקבון רך בפקעות הזריעה ומאוחר יותר גם בפקעות הבת. זהו חיידק וסקולארי המתבסס בצנורות ההובלה ולכן מתפשט בצמח באופן סיסטמי.

המחלה גורמת לנזקים חמורים ביבול עקב תמותת צמחים וכן עקב רקבונות בפקעות הממשיכים להתפתח לאחר האסיף, באחסנה. המחלה נפוצה במרבית אזורי גידול תפוחי אדמה בעולם, אך גורמת לנזקים כלכליים בעיקר בתנאי גידול מתאימים. החיידק יכול לשרוד בקרקע, בשיירי צמחים ומופץ במים. משך ההישרדות בקרקע לא ידוע. אין אמצעי כימי יעיל להדברת המחלה ולכן שימוש בחומר ריבוי נקי הינו האמצעי העיקרי העשוי למנוע את ההפצה וההתבססות של החיידק. הופעת המחלה בישראל דווחה פעם אחת בשנת 1980. בשנת 2001 אובחן החיידק בשדה נגוע בשרון, אולם ב-2004 התגלתה נגיעות במספר שדות בנגב ובשרון בזנים דזירה ומונדיאל כשמקור הזרעים היה מהולנד. ב-2005 ו-2006 נצפתה התפרצות חמורה של המחלה בהיקף רחב במספר זנים. בתחילת העונה תופעת הנגיעות התאפיינה בסימני המחלה הטיפוסיים: נבילה, החמה בצנורות ההובלה ולעיתים רקבון בבסיס הגבעול. במועד מאוחר יותר בעונת הגידול נמצאו כבר פקעות בת רקובות. מדינת ישראל מייבאת כל שנה לעונת האביב קרוב ל-25,000 טון זרעים מאירופה (הולנד, סקוטלנד, צרפת, וגרמניה). מכיוון שהחיידק נחשב כחיידק הסגר נעשו בעבר בדיקות במדגמים ממכסות זרעים מיובאים מהולנד, אולם אף לא אחד מהמדגמים (מעל 1000 דגימות בכל שנה) נמצא כנגוע. הסיבה לכך נובעת כנראה מפרוטוקול שגוי לאיבחון. בבדיקות של אצוות זרעים מיבוא שנעשו בדרך זו לא נתגלתה נגיעות אך למרות זאת התפתחה מחלה בשדה. ממצאים אלו העלו את הסברה ששיטת הבדיקה אינה מתאימה לזיהוי אוכלוסיה סמויה בפקעות הזריעה, ולפיכך יש לפתח שיטות מתאימות יותר. ידועות מספר שיטות לאיבחון החיידק המתבססות על מצעים סלקטיביים, נוגדנים ספציפיים ושיטות מולקולריות. אולם אין פרוטוקולים מתאימים לבדיקת נוכחות החיידקים במכסות זרעים כאשר ריכוזי החיידק נמוכים. כמו כן לא ידוע כמה זמן החיידק שורד בקרקעות נגועות והאם המידבק בקרקע מהווה גורם משמעותי בהפצה והתבססות המחלה.

**מטרות המחקר**

1. פיתוח פרוטוקול רגיש לגילוי הפתוגן במכסות של פקעות תפוחי אדמה לזריעה.
2. בדיקת הישרדות החיידק בקרקע.

## פירוט עיקרי הניסויים

### 1. פיתוח פרוטוקול רגיש לגילוי הפתוגן במכסות של פקעות תפוחי אדמה לזריעה

בשנה הראשונה של המחקר פותח הפרוטוקול לגילוי החיידק ארוויניה כריזנטמי בפקעות תפוחי אדמה. פרוטוקול זה נבחן גם בשנה השניה והשלישית בבדיקת אצוות של זרעי יבוא. בנוסף כחלק ממטרה 1 נבחנה השוונות באוכלוסיית הפתוגן בארץ.

#### 1.א. פיתוח הפרוטוקול

##### שיטות ומהלך העבודה

גידול החיידקים נעשה על מצע כללי nutrient agar ועל מצע סלקטיבי המכיל פקטין CVP (5). הפקת דני"א מתרבית נקיה של החיידקים וממיצוי של רסק קליפת פקעות תפוחי אדמה באמצעות קיט מסחרי Epicenter מחברת סיגמא. ראקציות PCR נעשו עם פריימרים ספציפיים המבוססים על הגן לביוסינתזה של פקטאט ליאז (4). הפריימרים נמצאו ספציפיים לארוויניה כריזנטמי ולא הגיבו עם החיידק *Erwinia carotovora* התוקף תפוחי אדמה ומראה סימני מחלה הדומים בחלקם לאלו הנוצרים ע"י ארוויניה כריזנטמי. השיטה הסרולוגית ELISA נעשתה באמצעות קיט מסחרי נעשה עם נוגדנים מסחריים ספציפיים לחיידק (ADGEN Phytodiagnosics) בהתאם לפרוטוקול שדווח בספרות (1). גם בשיטה זו נמצאה ספציפיות לארוויניה כריזנטמי.

##### אופטימיזציה של הכנת החומר הצמחי לבדיקה המולקולרית או הסרולוגית

הגברת רגישות שיטות האיבחון באמצעות מצע העשרה נבדקה ע"י השוואה של מיצוי צמחי מקליפות תפוחי אדמה עם וללא העשרה מקדימה במצע המכיל פקטין. נמצא יתרון ברור להדגרה מקדימה במצע העשרה קודם לאנליזת PCR או ELISA. השוואה בין הרקמות הצמחיות הנבדקות: נבדקו צרורות הובלה בצד הסטולון בפקעת, וקליפת הפקעת (בדומה לבדיקת ארוויניות אחרות), שילוב של רקמת הובלה עם קליפה, עדשתיות, שילוב של עדשתיות עם רקמת צרורות הובלה. נמצא יתרון לדיגום של מקטע הסטולון. ניסוי 1: פקעות נגועות (זן ספיר, משדה נגוע בנייר יצחק – 30% נגיעות ויזואלית). הטיפולים כללו: קליפת הפקעת, קטעים מצרורות הובלה, ללא מצע העשרה. נעשו 3 חזרות בכל טיפול, 40 פקעות לחזרה. באנליזת PCR נמצא פס חלש בקליפה ופס חזק וברור יותר בקטעים מצרורות הובלה. ניסוי 2: פקעות נגועות (זן דזירה, נחל עוז). הטיפולים כללו: קליפה עם וללא מצע העשרה, עדשתיות (10 לפקעת) עם מצע העשרה, ומיצוי מצרורות הובלה. באנליזת PCR נמצא כי דגימות העדשתיות היו חיוביות, וחיידקים שבודדו מקליפה (עם ובלי העשרה) היו חיוביים. ניסוי 3: פקעות נגועות (זן דזירה, נחל עוז). טיפולים עם מצע העשרה ל-72 שעות: קליפה, רקמה מאיזור הסטולון (כולל הקליפה), קטעים מצרורות הובלה + קליפה. באנליזת PCR נמצא כי דוגמאות קליפה היו שליליות, הטיפולים האחרים היו חיוביים. חיידקים שבודדו בכל הטיפולים היו חיוביים. ניסוי 4: זן מונדיאל. הטיפולים: 1. קליפה, 2. צרורות הובלה, 3. קליפה+צרורות הובלה, 4. עדשתיות, 5. קצה הסטולון, 6. עדשתיות+צרורות הובלה, 7. עדשתיות+צרורות הובלה ללא העשרה, 8. פקעות נקיות. באנליזת PCR נמצאה תגובה חיובית בטיפולים 6-2 בכל החזרות. בטיפולים 1 ו-7 תגובה חיובית רק בשתיים מהחזרות, בטיפול 8 - תגובה שלילית בכל ארבע החזרות.

מהלך הפרוטוקול המוצע לגילוי ארוויניה כריזנטמי בפקעות

- מדגם של 200 פקעות – למכסה.
- חיטוי חיצוני בהיפוכלורית 0.5% לדקה
- חיתוך רקמת הסטולון (הכוללת צרורות הובלה + קליפה) והעברה למבחנה עם מצע העשרה. ארבע חזרות של 50 פקעות.
- הדגרה ל- 48 שעות
- בדיקת ELISA
- בדיקה ב-PCR (לאחר מיצוי DNA) עם פריימרים ספציפיים.
- בידוד חיידקים – על מצע CVP וגידול בטמפרטורה של 33.5 מ"צ.

**1.1. בחינת הפרוטוקול לגילוי ארוויניה כריזנטמי באצוות של זרעי יבוא**

הפרוטוקול נבדק בשלוש שנות המחקר.

בשנת 2007 נבדקו 72 אצוות זרעי יבוא (47 אצוות לתצפית ו- 25 אצוות מסחריות) לפי הפרוטוקול שתואר לעיל. במקביל לבדיקות המעבדה, מדגמים מהאצוות (100 פקעות מכל אצווה בכל חלקה) נזרעו בעונה האביבית בשתי חלקות (גילת וחלוצה) ובהן נערך מעקב אחר הופעת נגיעות בחיידק בחלקות. הצבת חלקות ניסוי אלה אפשרה את בדיקת הקשר בין תוצאות המעבדה לבין הופעת המחלה בשדה.

תוצאות

הקשר בין בדיקות מעבדה (ב- ELISA ו-PCR) להופעת המחלה בשדה מובא בטבלה 1.

א. על פי אנליזת ELISA 9% מהמדגמים היו שליליים במעבדה אבל חיוביים בשדה (עם סימני מחלה ברמה נמוכה). באנליזת PCR רק 2% מהמדגמים היו שליליים במעבדה וחיוביים בשדה. עובדה זו מצביעה על רגישות גבוהה יותר של שיטת ה-PCR.

ב. בחלקות המסחריות אובחנה נגיעות בפתוגן במהלך הגידול ב- 5 אצוות. בשלוש אצוות שנמצאו חיוביות בבדיקת המעבדה לא נצפתה כל נגיעות בשדה. לא נמצא אף מקרה של תשובה שלילית במעבדה ונגיעות בשדה.

**טבלה 1:** הקשר בין בדיקות מעבדה להופעת המחלה בשדה - סיכום תוצאות 2007

מספר האצוות	-Lab + Field	+ Lab - Field	- Lab - Field	+Lab + Field	השיטה	האצווה
47	9%	6 13%	19 40%	18 38%	ELISA	תצפית
47	1 2%	14 30%	11 23%	21 45%	PCR	תצפית
25	0 0	3 12%	17 68%	5 20%	ELISA	מסחרית

+ תוצאה חיובית, - תוצאה שלילית

בשנת 2008 נבדקו 115 אצוות זרעי יבוא (33 אצוות לתצפית ו- 82 אצוות מסחריות). פרוט האצוות המסחריות שנבדקו לפי מקור: 57 לוטים מהולנד, 19 מסקוטלנד, 5 מצרפת ו-1 מגרמניה.

במקביל לבדיקות המעבדה, מדגמים מ- 33 אצוות הניסוי (100 פקעות מכל אצווה בכל חלקה, שתי ערוגות באורך 10 מטר) נזרעו בעונה האביבית בשתי חלקות (גילת וחלוצה) ובהן נערך מעקב אחר הופעת נגיעות בארווינה כריזנטמי. המעקב והערכת הנגיעות בחלקות המסחריות נעשו ע"י השירותים להגנת הצומח והביקורת.

### תוצאות

א. הקשר בין גילוי נגיעות במעבדה להופעת מחלה בשדה - באצוות המסחריות  
מתוך 82 האצוות שנבדקו (כל מדגם בן 200 פקעות זריעה) 10 בלבד היו חיוביות בשיטת ה- ELISA ו- 22 בשיטת ה- PCR (טבלה 2). תוצאה זו מצביעה על רגישות גבוהה יותר של השיטה המולקולארית. שיעור האצוות שלא נתגלו חיוביות בבדיקת המעבדה אך נמצאו סימני מחלה בשדה היה 11% (9 מ- 82) בשיטה הסרולוגית, לעומת 4% (3 מ- 82) בלבד בשיטה המולקולארית. שלוש אצוות (רודאו וסנטנה מהולנד, ורוזנה מצרפת) שנבדקו במעבדה נמצאו כשליליים, אולם בשדות מסחריים נראו סימני מחלה אם כי ברמות נמוכות מאד. יש להדגיש כי דגימות מהשדות נלקחו רק ממקומות שמגדלים דווחו על בעיות. ייתכן מאד כי המחלה הופיעה בחלקות נוספות (לפי טבלה 2) אך ברמה נמוכה מאד, כך שהמגדל לא הזעיק את אנשי השרותים להגה"צ ולביקורת. בנוסף לכך, לא כל המגדלים שמרו על זהות האצוות בשדות – דהיינו, מספרי מגדל, ולכן לא ניתן תמיד לקשור באופן ישיר את הנגיעות בשדה למקור הזרעים. יש לשים לב לגילוי הנגיעות בחיידק לראשונה גם בזן צרפתי (רוזנה), המעיד על שכיחות החיידק במדינות נוספות בצפון אירופה, כפי שגם דווח בכינוסים שונים.

ב. הקשר בין נגיעות בבדיקות מעבדה להופעת מחלה בשדה – באצוות לתצפית.  
בבדיקות מעבדה שנעשו בישראל בשיטת ה- ELISA רק 12% מ- 33 מדגמים נמצאו חיוביים ואילו בשיטת ה- PCR - 42% מהמדגמים היו חיוביים (טבלה 3). שיעור האצוות שנמצאו שליליות במעבדה אך נצפו סימני מחלה בשדה היה 45% לפי שיטת ה- ELISA ורק 21% בשיטת ה- PCR.

בבדיקות מעבדה שנעשו במקביל בהולנד (תוצאות לא מוצגות) בשיטת ה- ELISA 89% מ- 29 מדגמים נמצאו חיוביים. רק 7% נמצאו שליליים במעבדה, וחיוביים בשדה. בשיטת ה- PCR 52% בלבד היו חיוביים. 24% נמצאו שליליים במעבדה, וחיוביים בשדה. יתכן שההבדלים בתוצאות בבדיקות ה- ELISA שבוצעו בישראל לבין אלה שבוצעו בהולנד נובעים ממספר החזרות; בישראל – 4 חזרות של 50 פקעות בכל אחת, ואילו בהולנד – 8 חזרות של 25 פקעות כל אחת. בנוסף, הנוגדן בבדיקה לא היה זהה, וייתכן כי רגישותו של הנוגדן "ההולנדי" הינה גבוהה מהנוגדן "הישראלי".

**טבלה 2:** הקשר בין בדיקות המעבדה לבין הופעת המחלה בשדה – אצוות מסחריות  
עפ"י ממוצע סימני מחלה בשדה

מספר האצוות	-Lab + Field	+Lab - Field	-Lab - Field	+Lab + Field	
82	9 11%	6 7%	63 77%	4 5%	ELISA
82	3	12	57	10	PCR

	4%	15%	70%	12%	
--	----	-----	-----	-----	--

+ תוצאה חיובית, - תוצאה שלילית

**טבלה 3 :** הקשר בין בדיקות המעבדה לבין הופעת המחלה בשדה - אצוות לתצפית  
עפ"י תוצאות בדיקת מעבדה לצמחים שנדגמו מהשדה בגילת

מספר האצוות	-Lab + Field	+Lab - Field	-Lab - Field	+Lab + Field	
33	15 45%	1 3%	14 42%	3 9%	ELISA
33	7 21%	3 9%	12 36%	11 33%	PCR

+ תוצאה חיובית, - תוצאה שלילית

בשנת 2009 נבחן שוב הפרוטוקול בבדיקת 74 אצוות זרעי יבוא מסחריות. כולם נבדקו בשיטת PCR ו-48 מהם נבדקו גם בשיטת ELISA. פרוט האצוות שנבדקו לפי מקור: 43 מהולנד, 16 מסקוטלנד, 12 מצרפת ו-3 מגרמניה.

מעקב אחר האצוות המסחריות והערכת הנגיעות בחלקות שונות בנגב נעשה ע"י אנשי השירותים להגנת הצומח ולביקורת באחריות ראול קליינרמן.

במקביל לבדיקות המעבדה והמעקב בשדות, בוצעה בעונה האביבית תצפית בגילת, ובה נזרעו כ-100 פקעות זריעה מ-9 אצוות מסחריות שזוהו כנגועות (שתי ערוגות באורך 10 מטר), ונערך בה מעקב אחר הופעת נגיעות בארוויניה כריזנטמי.

תוצאות

א. הקשר בין גילוי נגיעות במעבדה להופעת מחלה בשדה – באצוות מסחריות  
מתוך 48 הלוטים המסחריים שנבדקו (כל מדגם בן 200 פקעות זריעה) 14 בלבד היו חיוביים בשיטת ה-ELISA. מתוך 74 הלוטים המסחריים, 27 היו חיוביים בשיטת ה-PCR (טבלה 4). תוצאה זו מצביעה על רגישות גבוהה יותר של השיטה המולקולארית, כפי שנמצא גם בשנים הקודמות. שיעור האצוות שהיו שליליות לחיידק בבדיקת המעבדה אך נמצאו סימני מחלה בשדה היה 2.1% (אצווה יחידה מ-48) בשיטה הסרולוגית, לעומת 1.4% (אצווה יחידה מ-74) בלבד בשיטה המולקולארית.  
גם כאן יש להדגיש כי דגימות מהשדות נלקחו רק ממקומות שמגדלים דווחו על בעיות ויתכן כי המחלה הופיעה בחלקות נוספות אך ברמה נמוכה מאד, כך שהמגדל לא הזעיק את אנשי השרותים להגה"צ ולביקורת. יש לשים לב לגילוי הנגיעות בחיידק לראשונה גם בזן גרמני (גילי) וגם בזן נוסף (מונדיאל) שמקורו בצרפת, עובדה המעידה על שכיחות החיידק במדינות נוספות בצפון אירופה, מלבד הולנד, כפי שגם דווח בכינוסים שונים.

ב. הקשר בין נגיעות בבדיקות מעבדה להופעת מחלה בשדה – באצוות לתצפית.  
לתצפית נבחרו רק אצוות שזוהו כנגועות בבדיקת מעבדה בשיטת ה-PCR. בארבעה מהם (44%) נצפו סימני מחלה בשדה ובחמישה (56%) לא נראו סימנים (טבלה 5).

**טבלה 4 :** הקשר בין בדיקות המעבדה לבין הופעת המחלה בשדה – אצוות מסחריות  
עפ"י ממוצע סימני מחלה בשדה



מספר האצוות	-Lab + Field	+Lab - Field	-Lab - Field	+Lab + Field	
48	1 2.1%	6 12.5%	33 68.8%	8 16.6%	ELISA
74	1 1.4%	15 20.3%	46 62.1%	12 16.2%	PCR

+ תוצאה חיובית, - תוצאה שלילית

**טבלה 5:** הקשר בין בדיקות המעבדה לבין הופעת המחלה בשדה – **אצוות לתצפית**  
עפ"י תוצאות בדיקת מעבדה לצמחים שנדגמו מהשדה בגילת

#	-Lab + Field	+Lab - Field	-Lab - Field	+Lab + Field	
9	0	5 55.5%	0	4 44.4%	PCR

**טבלה 6:** הקשר בין בדיקות המעבדה לבין הופעת המחלה בשדה באצוות לתצפית ואצוות מסחריות – סיכום משלוש שנות מחקר

מספר האצוות	-Lab + Field	+Lab - Field	-Lab - Field	+Lab + Field	אצוות לתצפית
80	19 23.7%	7 8.7%	33 41.3%	21 26.3%	ELISA
89	8 9%	22 24.7%	23 25.8%	36 40.5%	PCR

מספר האצוות	-Lab + Field	+Lab - Field	-Lab - Field	+Lab + Field	אצוות מסחריות
155	10 6.4%	15 9.6%	113 73%	17 11%	ELISA
156	4 2.6%	27 17.4%	103 66%	22 14%	PCR

#### דיון ומסקנות

הפרוטוקול שפותח לגילוי ארווינייה כריזנטמי בפקעות תפ"א נבדק במהלך שלוש שנות המחקר באצוות מסחריות ובאצוות לתצפית. סיכום התוצאות מובא בטבלה 6. נמצא כי רגישות השיטה המולקולארית גבוהה מזו של השיטה הסרולוגית. בבדיקות מעבדה של אצוות מסחריות 31.4% מהאצוות נמצאו חיוביות ב-PCR ורק 20.6% ב-ELISA. באצוות לתצפית 65.2% נמצאו חיוביות ב-PCR ורק 35% ב-ELISA. כאשר בוחנים את ההתאמה בין תוצאות המעבדה לאלו שהתקבלו בשדה גם כאן היתה התאמה טובה יותר בשיטת ה-PCR לעומת שיטת ה-ELISA. אחוז ה- false negative (תוצאה שלילית במעבדה אך חיובית בשדה) היה 2.6% ב-PCR לעומת 6.4% ב-ELISA באצוות המסחריות ו-9% לעומת 23.7% באצוות לתצפית. הקטנת אחוז התוצאות שהן false negative חשוב ביותר למניעת הפצת חומר נגוע לשדה. לעומת זאת אחוז התוצאות שהן false positive (חיובי במעבדה אך שלילי בשדה) היה גבוה יותר בשיטת ה-PCR לעומת שיטת ה-ELISA; 17.4 לעומת 9.6 באצוות מסחריות ו-24.7 לעומת 8.7 באצוות לתצפית, בהתאמה (טבלה 6). כאן יש להדגיש כי יתכן

ותוצאות שהתקבלו כ- false positive אינן בהכרח כאלה. יתכנו מקרים בהם המחלה לא מתבטאת בשדה בגלל תנאי סביבה לא מתאימים למרות שהפקעות נושאות את חיידי ארוויניה כריזנטמי. בנוסף מכיוון ששיטת ה-PCR רגישה יתכן והיא מגלה ריכוזים נמוכים של החיידק מתחת לסף הנדרש לגרימת מחלה. כאשר משווים בין התוצאות שהתקבלו באצוות התצפית לאלו שהתקבלו באצוות המסחריות נמצא כי אחוז הבדיקות שנמצאו חיוביות במעבדה היה גבוה יותר בתצפית לעומת המסחריות. הסיבה יכולה לנבוע מכך שהמדגם באצוות התצפית היה קטן יותר; רק 100 פקעות מכל אצווה נזרעו. בנוסף הפקעות לתצפית לא נבחרו באקראי אלא לפי זנים ולפי אצוות מסוימות עליהן התקבלו דיווחים מאירופה שיש חשש גבוה יותר לנגיעות. אולם למרות זאת המגמה דומה; שיטת ה-PCR היתה הטובה יותר. על פי הממצאים עד כה, ניתן ליישם את הפרוטוקול שפותח על מנת לבדוק את פוטנציאל הנגיעות בארוויניה כריזנטמי באצוות היבוא. מכיוון ששיטת ה-PCR היתה טובה יותר מוצע לא להשתמש בשיטת ה-ELISA. ההחלטה מה לעשות במקרה של תשובות חיוביות נתונה בידי השירותים להגנת הצומח מכיוון שזהו חיידק הסגר. יתכן שיהיה צורך בעתיד לקבוע מהו סף הנגיעות הגורם ליצירת מחלה בשדה ובמקרה זה כדאי יהיה לפתח את הבדיקה באמצעות Real-time PCR. בשיטה זו ניתן לקבל מדד כמותי לריכוז החיידקים בדוגמא ואז ההחלטה אם להשמיד את החומר המיובא או לא תהיה תלויה בסף הגורם לנגיעות בשדה.

### 1.ג. איפיון אוכלוסיית ארוויניה כריזנטמי בארץ

כחלק ממטרה 1 במחקר נעשתה אנליזה לבדיקת השונות באוכלוסיית הפתוגן בארץ. אנליזה כזו יכולה לאפשר מעקב אחר מקורות המידבק בארץ וחדירת הפתוגן באמצעות זרעי היבוא.

#### שיטות ומהלך העבודה

הוכן אוסף של תבדידי הפתוגן שנאספו ונוקו מזרעי יבוא, צמחים חולים משדות שונים ומפקעות בת והכולל 121 תבדידים (טבלה 7). איפיון התבדידים השונים נעשה באמצעות מספר שיטות: מבחני פתוגניות על פרוסות תפוחי אדמה, הגברת הדנ"א בשיטת ה-PCR עם פריימרים לגן פקטאט ליאז ובאמצעות מבחנים ביוכימיים שונים. כל התבדידים הגיבו חיוביות במבחנים אלו. איפיון טיפוסי החיידקים השונים נעשה באמצעות פרופיל הדנ"א הכללי של התבדידים כפי שמתקבל בשיטת ה-PFGE (pulsed field gel electrophoresis) (3). נבדקו מספר אנזימי רסטריקציה ונמצא שהאנזימים XbaI ו-I-CeuI הם המתאימים ביותר לקבלת פרופיל דנ"א של תבדידי ארוויניה כריזנטמי.

#### תוצאות ודיון

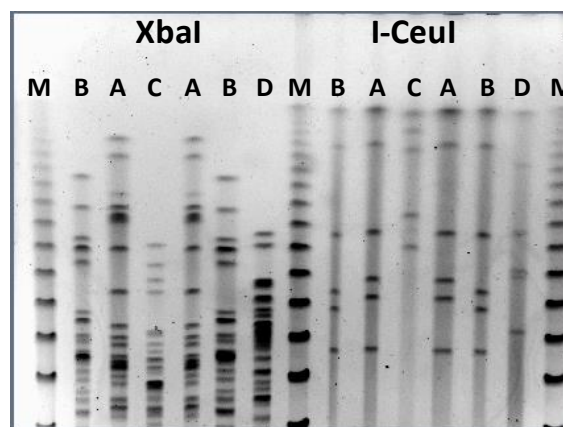
אנליזה באמצעות שיטת ה-PFGE הראתה 7 טיפוסים שונים כפי שהתקבלו עם שני אנזימים שונים; 104 תבדידים מטיפוס A, שני תבדידים מטיפוס B וחמשה תבדידים נוספים הראו כל אחד פרופיל שונה C, D, E, F, G. תבדידי הביקורת (135 עד 141) היו שונים מהתבדידים שבודדו בארץ. פרופיל של מספר תבדידים מוצג באיור 1. העובדה שמרבית התבדידים הם מטיפוס A מצביעה על כך שאוכלוסיית החיידק כנראה הומוגנית. כדי להשתמש במידע זה לצרכים אפידמיולוגיים יש לנסות ולבדוק שונות בקבוצה זו באמצעות שיטות אחרות כמו rep-PCR.

## טבלה 7 : אוסף תבדידי ארווייניה כריזנטמי שעברו אנליזה של PFGE

Strain number	Strain designation	Origin	Isolation date	Host/cultivar	Source	PFGE group
1	6453				E. Levi	B
4	G-87	Israel	2/2006	potato plant	L. Tsrer	A
5	G-120	"	5/2006	"	"	A
6	G-169	"	4/2007	progeny tubers	"	A
7	P.C3	Holland	"	seeds	"	A
8	P.C26.4	"	"	"	"	A
9	P.C36.1	"	"	"	"	A
10	P.C41.1	"	"	"	"	A
11	H1991	Holland	2006	positive control	"	A
12	Imp1	Holland	5/2007	seeds	"	A
13	Imp23.1	"	"	"	"	A
14	Imp24	"	"	"	"	A
15	G-118	Israel	4/2006	potato plant	"	A
17	G-197	"	11/2007	"	"	A
18	G-198	"	"	"	"	A
19	G-199	"	"	"	"	A
20	G-201	"	"	"	"	A
21	G-202	"	"	"	"	A
22	G-203	"	12/2007	"	"	A
23	G-216	"	"	"	"	A
24	G-212.1	"	5/2008	"	"	A
25	G-220.1	France	"	"	"	A
26	G-220.2	"	"	"	"	A
27	G-223	"	4/2008	"	"	A
28	G-224	"	"	"	"	A
29	G-225	"	"	"	"	A
43	G-236	Israel	"	"	"	A
44	G-237	"	"	"	"	A
45	G-238	"	"	"	"	A
46	G-240	"	"	"	"	A
47	G-242	"	4/2008	"	"	A
48	G-245	"	"	"	"	A
49	G-254	"	"	"	"	A
50	G-255	"	"	"	"	A
51	G-256	"	"	"	"	A
52	G-257	"	"	"	"	A
53	P.C29	Holland	"	seeds	"	A
54	P.C36	"	"	"	"	A
55	P.C41	"	"	"	"	A
57	G-275	Israel	5/2008	Mozart	"	A
58	G-281	"	"	Mondial	"	A
59	G-282	"	"	Voyager	"	A
60	G-284	Israel	"	Mondial	L. Tsrer	C
61	G-287	"	"	"	"	A
62	G-289	"	"	"	"	A
63	G-291	"	"	Quincy	"	A
64	G-p11	"	"	Mondial	"	A
66	G-p17	"	9/2008	"	"	A
67	G-p18	"	"	Voyager	"	A
68	G-p23	"	"	Mondial	"	A
69	G-p29	"	"	"	"	A
70	G-p31	"	"	Carrena	"	A
71	G-p32	"	"	Quincy	"	A

72	G-p35	“	“	Mondial	“	A
73	ImpM8	Holland	11/2008	“	“	A
74	ImpM15	Holland	“	Mondial	L. Tsrer	B
75	E.ch9	Israel	12/2008	Soil, Gilat	K. Kritzman	D
77	G-298	Israel	4/2009	Plants, Gilat	L. Tsrer	A
78	G-304	“	“	“	“	A
79	G-306	“	“	“	“	E
80	G-308	“	“	“	“	A
81	G-309	“	“	“	“	A
82	G-310	“	“	“	“	A
83	G-312	“	“	“	“	A
84	G-313	“	“	“	“	A
85	G-314	“	“	“	“	A
86	G-315	“	“	“	“	A
87	G-316	“	“	“	“	A
89	Pc-b-7		“	Imported seeds	“	A
90	Imp-s-1551		“	“	“	A
91	Imp-M-1218		“	“	“	A
92	Imp-M-20		“	“	“	A
93	Imp-M-1208		“	“	“	A
94	Imp-N-109		“	“	“	A
95	Imp-J-52		“	“	“	A
96	E.ch 1/B	Israel	5/2009	Tuber, Gilat	G. Kritzman	
97	E.ch 1/C	“	“	“	“	
98	G-331	“	6/2009		L. Tsrer	A
99	G-332	“	“		“	A
100	G-333	“	“		“	A
101	G-335	“	“		“	A
102	G-338	“	“		“	A
103	G-340	“	“		“	A
104	G-342	“	“		“	A
105	G-345	Israel	6/2009		L. Tsrer	A
106	G-346	“	“		“	A
107	G-347	“	“		“	A
108	G-348	“	“		“	A
109	G-349	“	“		“	A
110	G-351	“	“		“	A
111	G-352	“	“		“	A
112	G-358	“	“		“	A
113	G-360	“	“		“	A
114	G-Q8-7	“	“	Quarantine	“	F
115	G-Q15.1-7	“	“	“	“	A
116	G-Q3-3	“	“	“	“	A
117	G-Q4.1-3	“	“	“	“	A
118	Q8-7	Holland	7/2009	Imported seeds	“	G
119	Q3-3	“	“	“	“	A
120	G388	Germany	“	Progeny tubers	“	A
121	G389	Holland	“	“	“	A
122	G390	“	“	“	“	A
123	G-Cr124	Israel	“	“	“	A
124	G-Q16pt-7	Holland	“	“	“	A
125	PC-1	Israel	9/2009	Nicola, P. t.	“	A
126	PC-2	“	“	“	“	A
127	PC-3	“	“	“	“	A
128	PC-5	“	“	“	“	A
129	G-402	Israel	2/2010	Plant	“	
130	G-410	“	“	“	“	A
131	G-413	“	“	“	“	A

132	G-416	"	"	"	"	A
133	Imp39	Holland	"	Imported seeds	"	A
134	Imp43	Germany	"	"	"	A
135	2114	Holland	"	Tester strains	"	Different
136	2116	"	"	"	"	"
137	2117	"	"	"	"	"
138	2118	"	"	"	"	"
139	2120	"	"	"	"	"
140	2124	"	"	"	"	"
141	2129	"	"	"	"	"



**איור 1:** פרופיל חיתוך דנ"א עם 2 אנזימי רסטריקציה. M- סמני גודל, A, B, C, D קבוצות עם פרופיל שונה.

## 2. בדיקת הישרדות החיידק בקרקע

### 2.A. פיתוח פרוטוקול לבידוד החיידק מהקרקע

הפרוטוקול מתבסס על העשרה במצעים המכילים פקטין. בשלב ראשון נעשו ניסויים להעשרת הפתוגן במצע נוזלי המכיל את המרכיבים הבאים:

NaNO<sub>3</sub> 1.5 g/100 ml, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g, Sodium taurocholate (Difco) 0.2 g, NaCl 2.3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, L-Asparagine monohydrate 0.5 g, Sodium Polypectate 1.0 g.

הגידול נעשה בתנאים של לחץ חמצן נמוך. מבחנות מולאו ב- 10 מ"ל מצע העשרה ולאחר הזריעה ממקורות שונים הוספה מעל המצע שכבת שמן מינרלי, 1 מ"ל למבחנה. שכבה זו מונעת שיחלוף גזים עם האטמוספירה. התוצאות הראו שלאחר הדגרה בטמפרטורה של 37 מ"צ מקדם ההעשרה היה נמוך. תרבית נקייה של הפתוגן שנמהלה עד לרמה של חיידק אחד או 10 חיידקים למ"ל ועברה הדגרה של 24 שעות התרבתה לרמה של פי 3 מהמקורית. הדגרה נוספת של 48 שעות נתנה העשרה של פי 10 חיידקים לעומת המקור. כאשר מקור המדבק היה קרקע לא ניתן היה לגלות רמה שווה ערך ל- CFU אחד לגרם קרקע וכך בשילוב עם רקמות תפוחי אדמה. תוצאות אלו לא מספקות מבחינת הרגישות ולכן חיפשנו דרך העשרה חלופית שתאפשר לגלות חיידק בודד תוך 24 עד 48 שעות.

נבדקה דרך העשרה אחרת באמצעות מצע מוצק. להלן הפרוטוקול להערכה כמותית של החיידק ממקורות שבהם הריכוז הוא בין 10 ל-1 CFU לגרם דוגמה (קרקע, קליפת פקעות תפוחי אדמה ורקמת הסטולון).

### 1. הכנת הדגימות

א. דגימת קרקע הורחפה בתמיסת 0.1% אגר מים, טולטלה למשך 2 שעות בשקית סטומכר חתומה ועברה כתישה של דקה בסטומכר.

ב. דגימת קליפות פקעות שקולפו במכונה או רקמת פקעת מאזור החיבור לסטולון - בתוספת 0.05% חומצה אסקורבית נמהלו 10:1 במים מעוקרים, טולטלו 2 שעות ועברו סטומכר למשך דקה.

ג. בניסוי הוספו מלאכותית חיידקי ארוויניה כריזנטמי ברמות הבאות CFU לגרם: 100; 10; 1. החיידקים הוספו לפני הטלול ישירות לשקיות הסטומכר, או נעשה שימוש בקרקע מאולחת בריכוז גבוה ידוע ( $3.76 \times 10^6$ ) שנמהלה בקרקע ללא פתוגן לריכוז מחושב של כ-3,300,300 CFU לגרם קרקע.

## 2. העשרה

א. העשרה נעשתה על ידי זריעה ישירה של 10 נקודות על פני צלחת CVP בכל נקודה 20 מיקרוליטר. סה"כ לצלחת 200 מיקרוליטר מהדגימות על פי סעיף ג1.

ב. הדגרה למשך 24 או 48 בטמפרטורה של 37 מ"צ.

## 3. בדיקת מקדם העשרה

א. פני כל צלחת נשטפו בעדינות עם 2.5 מ"ל מים מעוקרים.

ב. 1.75 מ"ל מהתרחיף הועבר למבחנת אפנדורף וסורכו. המשקע הורחף ב-100 מיקרוליטר.

ג. הדגימות נמהלו במיהולים עשרוניים ונזרעו בחזרה למצע CVP בשיטת ה-MPN (2) ל-10 חזרות.

## טבלה 8: תוצאות העשרה חיידקי ארוויניה כריזנטמי במצע מוצק

סטיית תקן	CFU (ממוצע של 5 חזרות)	הטיפול
3	60	קרקע +100 תאים
503	5340	קרקע+100 תאים לאחר 24 שעות העשרה
34339	326480	קרקע+100 תאים לאחר 48 שעות העשרה
1	6	קרקע+10 תאים
55	57	קרקע+10 תאים לאחר 24 שעות העשרה
5663	2406	קרקע+10 תאים לאחר 48 שעות העשרה
0	0	קרקע+1 תא
20	33	קרקע+1 תא לאחר 24 שעות העשרה
442	127	קרקע+1 תא לאחר 48 שעות העשרה
13	57	קליפה +100 תאים
1050	4408	קליפה+100 תאים לאחר 24 שעות העשרה
13873	27320	קליפה+100 תאים לאחר 48 שעות העשרה
0	0	קליפה+10 תאים
21	10	קליפה+10 תאים לאחר 24 שעות העשרה
797	386	קליפה+10 תאים לאחר 48 שעות העשרה
0	0	קליפה+1 תא
54	8	קליפה+1 תא לאחר 24 שעות העשרה
254	369	קליפה+1 תא לאחר 48 שעות העשרה
0	0	סטולון+1 תא
33	13	סטולון+1 תא לאחר 24 שעות העשרה
437	728	סטולון+1 תא לאחר 48 שעות העשרה

התוצאות מראות כי לפי פרוטוקול זה העשרה בדגימות קרקע נותנת הגברה של פי 89 לאחר 24 שעות ופי 5441 לאחר 48 שעות כאשר ריכוז החיידקים היה 100 CFU לגרם קרקע. בריכוז של חיידק אחד לגרם קרקע ניתן לאחר הדגרה של 24 שעות או 48 שעות לקבל העשרה של פי 10 או פי 100 בהתאמה. רמות העשרה דומות נמצאו בקליפה ובסטולון לאחר 24 ו-48 שעות גידול.

## 2.ב. בדיקת הישרדות החיידק ארוויניה כריזנטמי בקרקע באמצעות שתילה של פקעות תפוחי אדמה מאולחות

### ברמה נמוכה

### שיטות ומהלך העבודה

פקעות תפוחי אדמה מהזן דזירה אולחו ע"י השריית הפקעות בתרחיף של החיידק ארוויניה כריזנטמי (תבדיד מהארץ) בריכוז  $10^8$  חיידקים למ"ל תחת ואקום למשך 20 דקות. רמת המדבק שהתקבלה הייתה בין 60 ל-140 יחידות יוצרות מושבות לגרם קליפה. כהיקש השתמשנו בפקעות שעברו את אותו התהליך אך עם מים בלבד. הניסויים נעשו בחלקת החלקות הזעירות בבית דגן שכללה 30 ערוגות שקועות במידות (מטר)  $0.6 \times 2 \times 1$ . מחצית מהחלקות מכילות קרקע שמקורה מצאלים והמחצית האחרת קרקע ממקור ניר עוז. במרכז של כל חלקה נזרעה פקעת אחת. בדיקות הקרקע נעשו לפני הזריעה (זמן אפס) ולאחר 80 ימים ע"י הוצאת מדגם ממרכז כל חלקה מפני השטח עד עומק 30 ס"מ. הבדיקות נעשו לפי הפרוטוקול שתואר לעיל הכולל העשרה וזריעה על מצע CVP והדגרה בטמפרטורה של 37 מ"צ למשך 5 ימים. ב-25 חלקות נזרעו פקעות נגועות וב-5 חלקות פקעות שלא אולחו.

### תוצאות ודין

בזמן אפס לא נמצאו חיידקי ארוויניה כריזנטמי באף אחת מהחלקות. לאחר 80 ימים מהזריעה ממוצע חיידקי ארוויניה כריזנטמי לגרם קרקע היה 0 בחלקות ההיקש ו-  $40.7 \pm 9.27$ ,  $P=0.005$  בחלקות הטיפול. כל הפקעות כולל המאולחות נבטו ויצרו צמחים. בהמשך הניסוי נבדקו פקעות הבת לנוכחות הפתוגן ונערך מעקב אחר הישרדות הפתוגן בחלקות עם הפקעות הנגועות. התוצאות מובאות בטבלה 9. נמצא כי פקעות הבת היו מאולחות בפתוגן ללא קשר למקור הקרקע. בבדיקות הקרקע לאחר האסיף נמצאו אוכלוסיות של 320 ו-110 חיידקים לגרם קרקע ממקור צאלים לעומת ניר עוז, בהתאמה. אולם לאחר 6 חודשים מהאסיף אוכלוסיית הפתוגן בקרקעות פחתה באופן משמעותי; פי 8 ו- פי 5.5 בקרקע ממקור צאלים לעומת ניר עוז. יתכן וההבדלים נובעים מכך שאחת הקרקעות קלה ואילו השניה כבדה, אולם התופעה החשובה היא שאוכלוסיית הפתוגן פחתה משמעותית לאחר מספר חודשים בשתי הקרקעות. השאלה אם רמה נמוכה כזו יכולה לגרום לאילוח פקעות ולגרימת מחלה אינה ידועה בשלב זה.

**טבלה 9:** הישרדות החיידק ארוויניה כריזנטמי בקרקע ובפקעות הבת בניסוי בחלקת החלקות הזעירות בבית דגן. התוצאות ב-CFU לגרם קרקע ובבדיקה איכותית על מצע CVP בפקעות הבת.

ממוצע חלקות קרקע ממקור ניר עוז	ממוצע חלקות קרקע ממקור צאלים	
חיובי	חיובי	<b>בדיקות פקעות הבת *</b>
$110.667 \pm 26.7$	$320.400 \pm 81.8$	<b>בדיקות קרקע לאחר האסיף **</b>
$20.967 \pm 4.9$	$38.933 \pm 5.7$	<b>בדיקות קרקע 6 חודשים מהאסיף</b>

\* פקעות שנאספו מהחלקות הזעירות נבדקו לנוכחות הפתוגן. מבחן T המראה כי אין הבדל בין שתי החלקות ובשתייהן חל אילוח פקעות ( $P = 0.056$ ).  
\*\* ההבדלים בתוצאות האוכלוסיות של הקרקעות השונות ובתאריכי הבדיקה השונים נמצאו מובהקות במבחן תחום. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

## 2.ג. השפעת טיפולי פורמלין ואמוניה על הישרדות ארוויניה כריזנטמי בקרקעות מנוגעות באופן טבעי בפתוגן.

### שיטות ומהלך העבודה

הניסוי נעשה בסוף חודש אוקטובר באזור הבשור בשטח שבו גודלו תפוחי אדמה שנה וחצי לפני העמדת הניסוי ולאחר מכן חיטה.

הטיפולים היו:

היקש – 6 חלקות באורך 24 מטר וברוחב 3 ערוגות.

פורמלין – 6 חלקות באורך 24 מטר וברוחב 3 ערוגות - 225 ליטר לדונם, אפליקציה בעזרת סיכות.

אמוניה – 6 חלקות באורך 24 מטר וברוחב 3 ערוגות – 180 ק"ג לדונם + בוצה 9.2 קוב לדונם + סיד 500 ק"ג לדונם.

בדיקת נוכחות החיידק בקרקע נעשתה על פי שיטת העשרה. חתך הקרקע הנבדק היה 5 עד 30 ס"מ והקרקעות נבדקו לפני הטיפולים (זמן "0") ולאחר 21 ימים.

#### תוצאות ודין

תוצאות הערכה איכותית מובאות בטבלה 10. הערכה איכותית נעשתה על פי יצירת שקעים במצע העשרה כאשר (+) מציין חיובי ו- (-) שלילי לנוכחות ארוויניה. בדיקה זו נעשתה על מנת להחליט אם לעשות הערכה כמותית. בזמן אפס ארבע מחלקות ההיקש היו חיוביות לנוכחות ארוויניה כריזנטמי ונשארו חיוביות לאחר 21 יום. לעומת זאת ארבע מחלקות הטיפול בפורמלין שנמצאו חיוביות בזמן אפס היו שליליות לאחר 21 יום. בחלקות הטיפול בפורמלין שלוש היו חיוביות בזמן אפס ושליליות לאחר הטיפול.

הערכה כמותית של חיידקים לגרם קרקע נעשתה לאחר העשרה כפי שתואר לעיל והתוצאות מובאות בטבלה 11. נמצא כי בכל החלקות בזמן אפס ממוצע החיידקים נע בין 700 ל-900 חיידקים לגרם קרקע. לעומת זאת לאחר הטיפול בפורמלין ובאמוניה לא נמצאו חיידקים בקרקע לאחר 21 ימים לעומת חלקות ההיקש. מפקעות שנאספו מחלקות הניסוי השונות נבדקה נוכחות הפתוגן. נלקח מדגם מייצג של 60 פקעות שנאספו באקראי. התוצאות המובאות בטבלה 12 מראות כי הפתוגן נמצא רק בפקעות שנאספו מחלקות ההיקש ולא מאלו שטופלו בפורמלין או אמוניה.

**טבלה 10:** הערכה איכותית לנוכחות ארוויניה כריזנטמי בחלקות השונות לפני ולאחר 21 ימים מהטיפולים השונים

היקש זמן "0"	היקש 21 יום	פורמלין זמן "0"	פורמלין 21 יום	אמוניה זמן "0"	אמוניה 21 יום
+	+	+	-	-	-
+	+	+	-	-	-
-	-	+	-	+	-
+	+	-	-	+	-
+	+	-	-	-	-
-	-	+	-	+	-

**טבלה 11:** הערכה כמותית של חיידקים (CFU) לגרם קרקע לאחר העשרה. בשורה אחרונה מובא ממוצע של התוצאות מ-6 החלקות השונות

היקש זמן "0"	היקש 21 יום	פורמלין זמן "0"	פורמלין 21 יום	אמוניה זמן "0"	אמוניה 21 יום
980	1000	1100	0	0	0
1200	1420	900	0	0	0
00	0	2340	0	1700	0
2000	2200	0	0	1520	0



0	0	0	0	930	756
0	1000	0	1200	0	0
0	703±328	0	923±356	925±345	823±311

**טבלה 12 :** נוכחות ארוויניה כריזנטמי (CFU לגרם קליפה) בפקעות שנאספו מחלקות הניסוי בבשור

היקש	פורמלין	אמוניה
130	0	0
75	0	0
0	0	0
1240	0	0
80	0	0
0	0	0

## 2.ד. בדיקת מדגמי קרקע מחלקות במרכז מחקר גילת וביח"מ

### שיטות ומהלך העבודה

בחלקת ניסוי בגילת נזרעו זרעי יבוא שנבדקו במעבדה לנוכחות החיידק (ובחלקם אכן אובחנה נגיעות) ונצפו סימני מחלה במהלך הגידול, דהיינו החלקה היתה נגועה באופן טבעי בארוויניה כריזנטמי. כחודשיים לאחר האסיף נלקחו מדגמי קרקע לאורך החלקה. המרחקים בין מדגם למשנהו היו 10 מטר (אלכסונים בזווית 45° בין פאות החלקה). המדגמים נלקחו בעזרת דוגם קרקע בחתך שבין 5 ס"מ ל- 30 ס"מ. בנוסף נאספו בסמוך לנקודות הדגימה "מומיות" של פקעות בת שנותרו בשדה לאחר האסיף. בדיקת נוכחות החיידק נעשה בשיטת ההעשרה כפי שהוזכר לעיל.

בחלקות הניסויים יח"מ (שכן 1442) נלקחו דגימות קרקע לפני ואחרי פיזור פורמלין ואמוניה והבדיקות נעשו כפי שתואר לעיל.

### תוצאות ודיון

מתוך 30 דגימות שנלקחו מהקרקע בגילת 18 מהן היו חיוביות לנוכחות ארוויניה כריזנטמי (טבלה 13). פיזור הדגימות בשדה היה אקראי (איור 2). בדיקת נוכחות החיידק בפקעות שנותרו בשדה נעשתה ל- 18 פקעות שמתוכן 10 היו חיוביות.

בקרקע ביח"מ רמת החיידקים בהיקש ובחלקות הטיפוליים בזמן אפס היתה בין 117 ל- 127 חיידקים לגרם קרקע (טבלה 14). לאחר הטיפולים בפורמלין או אמוניה לא בודדו חיידקי הפתוגן מחלקות הניסוי לעומת ההיקש. רמת החיידקים בפקעות שנותרו בשדה לאחר הניסוי היתה 32 חיידקים לגרם קליפה בהיקש ואילו בחלקות הטיפולים בפורמלין ואמוניה לא בודדו חיידקים מהפקעות.

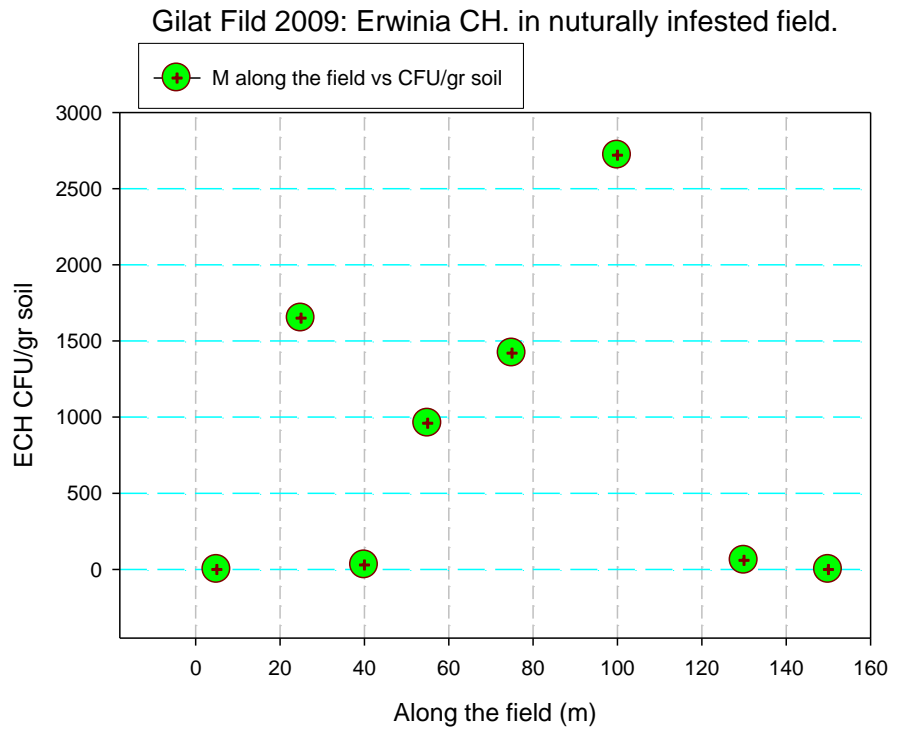
## טבלה 13 : גילוי ארוויניה כריזנטמי בקרקע בגילת

נקודות דגימה לאורך השדה (10 מ' בין נקודה לנקודה)	גילוי ארוויניה כריזנטמי בדגימה	הערכה כמותית/ CFU לגרם אדמה	גילוי ארוויניה כריזנטמי בפקעות שנותרו בשדה
1	-		
2	-	0.0	-
3	-		-
4	-		-
5	+		+
6	+	1650.0	+
7	+		

-		-	8
-	30.0	+	9
+		-	10
		+	11
-	960.0	+	12
-		-	13
+		+	14
+		+	15
+	1420.0	+	16
		+	17
		-	18
		+	19
		-	20
	2720.0	+	21
		+	22
-		+	23
+		-	24
+		+	25
+	60.0	+	26
+*		+	27
		-	28
		+	29
	0.0	-	30

• בדיקת PCR של #27 נמצאה חיובית

איור 2 :



**טבלה 14:** בדיקת נוכחות ארוויניה כריזנטמי בקרקע ביח"מ לאחר טיפולי פורמלין ואמוניה

הטיפול	CFU לגרם קרקע לפני הטיפול	CFU לגרם קרקע לאחר הטיפול או השקיה	CFU לגרם קליפה בפקעות שנאספו מהחלקות
היקש לא מטופל	23	40	0
היקש לא מטופל	140	200	30
היקש לא מטופל	115	312	46
היקש לא מטופל	200	355	55
היקש לא מטופל	40	50	0
היקש לא מטופל	34	45	0
היקש לא מטופל	250	320	50
היקש לא מטופל	85	100	10
היקש לא מטופל	200	333	64
היקש לא מטופל	97	130	112
היקש לא מטופל	200	300	59
היקש לא מטופל	64	80	0
היקש לא מטופל	53	66	0
היקש לא מטופל	140	220	20
<b>ממוצע היקש</b>	<b>117±73</b>	<b>182±122</b>	<b>32±33</b>
אמוניה	83	0	0
אמוניה	64	0	0
אמוניה	200	0	0
אמוניה	150	0	0
אמוניה	140	0	0
<b>ממוצע אמוניה</b>	<b>127±54</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
פורמלין	133	0	0
פורמלין	160	0	0
פורמלין	74	0	0
פורמלין	66	0	0
פורמלין	200	0	0
<b>ממוצע פורמלין</b>	<b>126±57</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

## 2.ה. בחינת טווח הפונדקאים של ארוויניה כריזנטמי

מטרת הניסוי היתה לבדוק האם בקרקע נגועה ניתן לגדל אגוזי אדמה כמחזור גידולים. הניסוי נעשה במכון וולקני בעמודות בטון בקוטר 65 ס"מ המכילות קרקע קלה. אילוח הקרקע נעשה עם חיידק שבודד מקרקעות בבשור ע"י עירוב הקרקע בגרגרי פרלייט שעליהם גודל החיידק. רמת האילוח של הקרקע הייתה בסביבות  $10^6$  חיידקים לגרם קרקע. בכל עמודה נזרעו 6 זרעים מהם נבטו וגודלו 5 צמחים. סה"כ 22 עמודות מהן 3 כביקורת לא מאולחת.

לקראת האסיף נעקרו הצמחים ונבדקו החלקים הבאים: גבעול – לכתמים או משטחים שחורים/חומרים, תרמילים עם סימנים ברורים של כתמים כהים שחורים או חומים ורקבונות של גבעולים ותרמילים.

### תוצאות ודיון

בכל העמודות פרט לשלוש עמודות ההיקש נמצאו צמחים עם הסימנים שתוארו לעיל. בבדיקות מעבדה כל החלקים החשודים נמצאו מאוכלסים ע"י החיידק ארוויניה כריזנטמי. לא נעשתה הערכה כמותית אלא רק

איכותית. אין דיווחים בספרות על כך שהחיידק גורם לסימני מחלה באגוזי אדמה. אולם גם אם לא נגרם נזק לגידול זה העובדה שהצמחים היו מאוכלסים בפתוגן מונעת את האפשרות לגדל אגוזי אדמה כמחזור גידולים לתפוחי אדמה.

#### מסקנות מהניסויים על מטרה 2 :

1. במהלך עבודה זו פותחה שיטה להערכה כמותית של ארוויניה כריזנטמי בקרקע באמצעות העשרה על מצע מוצק. השיטה מאפשרת גילוי חיידק אחד לגרם קרקע לאחר 24 או 48 שעות גידול. פיתוח השיטה מאפשר מעקב אחר הישרדות הפתוגן בקרקע לאורך זמן ולאחר טיפולי קרקע שונים.
2. החיידק נמצא במספר רב של מדגמי קרקע חקלאית מאזור הבשור. הוא עלול להדביק צמחים דרך הקרקע ולהיות מועבר הפקעות שצמחו בחלקות אלו.
3. החיידק שורד בקרקע לפחות שנה ויכול להיות מועבר לפקעות הבת. פקעות מאולחות בחיידק משאירות אחריהן קרקע מאולחת.
4. טיפולי קרקע בתשירים המשחררים אמוניה או בפורמלין מדבירים לחלוטין את הפתוגן.
5. החיידק ארוויניה כריזנטמי מדביק אגוזי אדמה ולכן צמח זה אינו יכול לשמש במחזור גידולים בקרקעות שבהן נמצא אינוקולום של הפתוגן.

#### **רשימת ספרות:**

1. Frechon, D., Exbrayat, P., Helias, V., Hyman, L.J., Llop, P., Lopez, M.M. Payet, N., Perombelon, M.C.M., Toth, I.K., Van Beckhoven, J.R., van der Wolf, J.M. and Bertheau, Y. 1998. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Res.* 41:163-173.
2. Kritzman G. 1989. Detection quantification and classification of soft rot *Erwinia* associated with potato tubers. *Phytoparasitica* 17:205-219.
3. Lee, Y.-A., Chen, K.-P. and Hsu, Y.-W. 2006. Characterization of *Erwinia chrysanthemi*, the soft-rot pathogen of white-flowered calla lily, based on pathogenicity and PCR-RFLP and PFGE analyses. *Plant Pathol.* 55:530-536.
4. Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., and Bertheau, Y. (1996). Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2228-2235
5. Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. Eds. 2001. Laboratory guide for plant pathogenic bacteria. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press.

### סיכום

מטרות המחקר: 1. פיתוח פרוטוקול רגיש לגילוי החיידק ארוויניה כריזנטמי במכסות של פקעות תפוחי אדמה לזריעה. 2. בדיקת הישרדות החיידק בקרקע.

עיקרי הניסויים ותוצאות: פותח פרוטוקול לגילוי ארוויניה כריזנטמי בפקעות תפוחי אדמה המבוסס על העשרה במצע המכיל פקטין ובדיקות בשיטת ה-ELISA וה-PCR. הפרוטוקול נבדק בשלוש שנות המחקר עם 155 אצוות מסחריות ו-80 אצוות לתצפית. בדיקת הקשר בין גילוי נגיעות במעבדה להופעת המחלה בשדה באצוות מסחריות ובאצוות לתצפית הראתה התאמה טובה יותר עם השיטה המולקולארית וכן רגישות גבוהה יותר בהשוואה לשיטה הסרולוגית. אנליזה באמצעות שיטת ה-PFGE שנעשתה לאוסף תבדידי הפתוגן הראתה 7 טיפוסים שונים כאשר מרבית התבדידים הם מטיפוס A, תוצאה המצביעה על כך שאוכלוסיית החיידק כנראה הומוגנית. פותח פרוטוקול לבידוד הפתוגן מהקרקע המבוסס על העשרה במצע מוצק. הישרדות הפתוגן בקרקע נקבעה בניסויים ובסקרים שנעשו בוולקני, בבשור ובגילת והראתה שהחיידק שורד לפחות שנה ויכול לעבור לפקעות הבת. טיפולי קרקע בתכשירי אמוניה או פורמלין הדבירו לחלוטין את הפתוגן. נבדקה האפשרות של גידול אגוזי אדמה למחזור גידולים ונמצא כי הפתוגן מאכלס ויוצר סימני מחלה על גידול זה.

מסקנות מדעיות: על פי ממצאי העבודה ניתן ליישם את הפרוטוקול שפותח על מנת לבדוק את פוטנציאל הנגיעות בארוויניה כריזנטמי באצוות היבוא. הפרוטוקול יתבסס על שיטת ה-PCR. מכיוון ששיטה זו רגישה יתכן והיא מגלה ריכוזים נמוכים של החיידק מתחת לסף הדרוש לגרימת מחלה. במקרה של תשובות חיוביות ההחלטה מה לעשות עם זרעי היבוא נתונה בידי השירותים להגנת הצומח מכיוון שזהו חיידק הסגר. החיידק ארוויניה כריזנטמי שורד לפחות שנה בקרקע ובפקעות הנותרות בשדה ולכן כדאי לטפל במקורות אינוקולום אלה. מכיוון שהחיידק מדביק ומאכלס אגוזי אדמה צמח זה אינו יכול לשמש במחזור גידולים בקרקעות שבהן נמצא אינוקולום של הפתוגן.

בעיות שנתרו לפתרון: דרוש לקבוע את סף הנגיעות הגורם ליצירת מחלה בשדה על מנת להקל על ההחלטה אם להשמיד את זרעי היבוא כאשר מתקבלות תשובות חיוביות. במקרה זה כדאי יהיה לפתח את הבדיקה באמצעות Real-time PCR המאפשרת קבלת מדד כמותי לריכוז החיידקים בדוגמא. כדי להשתמש במידע לגבי טיפוס הפתוגן בארץ לצרכים אפידמיולוגיים יש לנסות ולבדוק שונות בקבוצה זו באמצעות שיטות אחרות כמו rep-PCR.

הפצת הידע: ניתנו הרצאות ב-2008 ו-2009 לפרומים של מגדלי תפוא"ד (ימי עיון ארציים בבית דגן, ביח"מ).

פרסום הדוח: מאחר וטרם פורסמו חלק מהנתונים במאמרים מדעיים, נבקש לצמצם את הפרסום לספריות בלבד.