

דו"ח לתכנית מחקר מספר 1214-132

אבחון מוקדם ומניעה של *Colletotrichum gloeosporioides*, הגורם

למחלת ההתמוטטות בלימוניות

Diagnosis and prevention of *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of
Limonium wilt disease

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

סטנלי פרימן, איידה צויבל (מנהל המחקר החקלאי)

יעל בר לבן, רחל לויטה, שמעון פיבוניה (תחנת יאיר, מו"פ ערבה)

Stanley Freeman, Dept. of Plant Pathology and Weed Science, ARO, The Volcani Center, Bet
Dagan 50250. E-mail: freeman@volcani.agri.gov.il

Shimon Pivonia, Arava R&D, Sapir, M.P. Arava. E-mail: ShimonP@arava.co.il

אפריל, 2008

ניסן תשס"ח

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר

תקציר

1. הצגת הבעיה: הלימוניום הוא גידול חשוב באזור הערבה, וגדל גם בבקעת הירדן, בשרון ובנגב בקיבוץ נירים. תופעת ההתמוטטות בלימוניום נגרמת ע"י הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides*.

2. מטרת המחקר

א. מציאת דרכים להבטחת ניקיונו של חומר הריבוי או השתיל מגורם המחלה, באמצעים מולקולריים. ב. אפיון מחזור החיים המיני של הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides*. ג. מציאת טיפולי הדברה/מניעה יעילים (כימיים וביולוגיים), להפחתת שיעור המחלה במשתלה ובשדה.

3. שיטות ומהלך העבודה: אוסף התבדידים נסרק לוירולנטיות בצמחים. נבחרו מספר תבדידים פתוגנים ונקבע ריכוז מדבק לקבלת סימפטומים. הוחל בחיפוש מחזור החיים המיני של הפתוגן. נבדקה תגובת שני זנים מקומיים של לימוניום, סופרים וספורה, לפטרייה על-ידי הערכה ויזואלית של חומרת המחלה ובידוד הפתוגן על מצע חצי ברני. DNA הופק מצמחים חולים ונבדק לנוכחות הפתוגן בשיטת PCR כמותי (QRT-PCR), באמצעות תחלים ספציפיים לפטרייה. הועמדו שני ניסויי שדה להדברת הגורם ולזיהוי הפטרייה בשיטה מולקולרית.

4. תוצאות עיקריות: שני תבדידי הפתוגן נבחרו וכוילה מערכת הדבקה בריכוזי מדבק שונים. לא זוהה השלב המיני של הפתוגן בתנאי הדבקה מלאכותיים. קיים מתאם בין ריכוז המידבק לחומרת המחלה. נמצא שהזן ספורה סביל יותר למחלה בהשוואה לזן סופרים. בתנאים מסוימים, טיפול הדברה בפרוכלורז הפחית את חומרת המחלה. כוילה שיטת אבחון מולקולרית ע"ס real-time PCR לאחר סינטוז תחלים ספציפיים לגנים של הפטרייה ושל הצמח.

5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: ככל הנראה, השלב המיני אינו גורם חשוב בהפצה והישרדות הגורם בחממה ובשדה. השימוש בזן ספורה שסביל יותר לפתוגן בהשוואה לזן סופרים יכול לשמש כפתרון למחלה מאחר וקשה להדביר את הגורם בשדה. בניסוי שדה להדברת הגורם לא ניתן היה לגלות את הפטרייה כחודש לאחר השתילה, מה שמעיד על הקושי שבזיהוי באמצעים קלאסיים בצמח ומדגיש את החשיבות שבפיתוח כלי דיאגנוסטי מתקדם. ריאקציות QRT-PCR אפשרו זיהוי איכותי של הפתוגן ב-DNA בצמחים מניסויי החממה והשדה, בשלבי הדבקה מוקדמים. זיהוי הפטרייה בצמח בשיטת QRT-PCR יכול לשמש בעתיד ככלי חשוב לאבחון מוקדם יותר של המחלה במשתלה.

מבוא

צמח הלימוניום הוא גידול מרכזי באזור הערבה, וגדל גם בבקעת הירדן, בשרון ובנגב בקיבוץ נירים. תופעת ההתמוטטות בלימוניום נגרמת ע"י הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides*. כמוכך, חלה תמותת שתילים במשתלות שונות, טרם הגעת השתילים לשדות החקלאים. בכל אזורי הגידול בהם נמצאו צמחים חולים ומתים, בודד הגורם מצוואר השורש. לעיתים מופיע גם בשתילות קיציות חדשות שיעור נמוך מאוד של תמותה כתוצאה מאילוח בפטרייה. תמותה זו יכולה להוות סימן ראשוני לבעיה שתתגלה בשדה רק בקיץ הבא. החומר פרוכלורז נמצא יעיל להדברת מיני קולטוטריכום בשתילי תות שדה ובכלנית נגועים, וחומר זה נמצא יעיל מאד בעיכוב גידול תפטיר (פונגיטוקסי) הפתוגן מלימוניום.

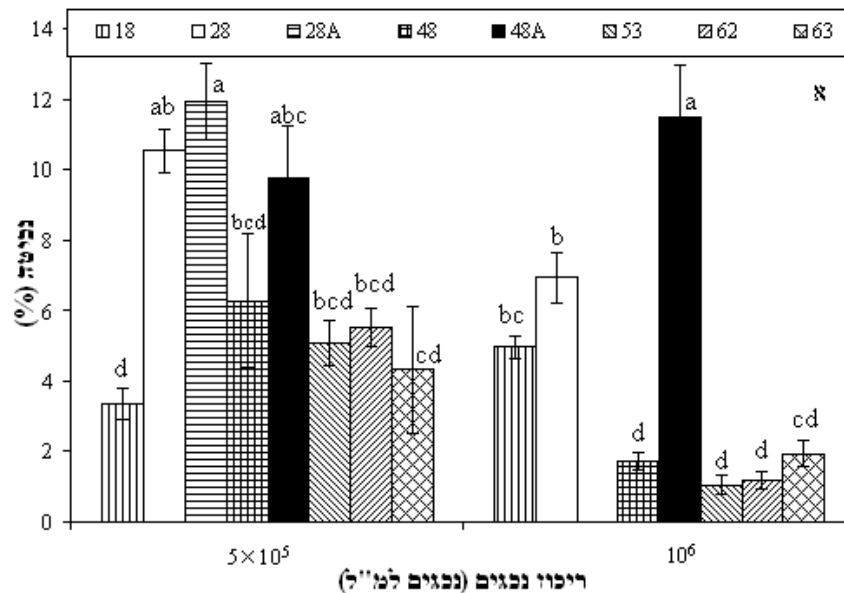
מטרות המחקר

א. מציאת דרכים להבטחת ניקיונו של חומר הריבוי או השתיל מגורם המחלה, באמצעים מולקולריים. ב. אפיון מחזור החיים המיני של הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides*. ג. מציאת טיפולי הדברה/מניעה יעילים (כימיים וביולוגיים), להפחתת שיעור המחלה במשתלה ובשדה.

עקרי הניסויים שבוצעו ותוצאות שהתקבלו

השוואה בין תבדידים שונים של *Colletotrichum gloeosporioides* (C.g.)

השוואת אחוז הנביטה של תבדידי הפטרייה השונים העלתה כי בריכוז של 5×10^5 נבגים למ"ל, נבגים של תבדידים מספר 28, מספר 28A ומספר 48A נובטים בשיעור גבוה יותר מאלו של התבדידים האחרים, אם כי ההבדל בינם לבין שאר התבדידים אינו תמיד מובהק (איור 1). עבור מרבית התבדידים נראה כי בריכוז המידבק הגבוה יותר (10^6 נבגים למ"ל), אחוז הנביטה נמוך יותר מאשר בריכוז המידבק הנמוך יותר (5×10^5 נבגים למ"ל).



איור 1: א. ממוצע אחוז נביטת נבגים של תבדידי C.g. שונים. נקבע עבור תרחיף נבגים בשני ריכוזים שונים באמצעות ספירת נבגים לאחר גידול של 20 שעות בתאי ספירה מפלסטיק. LSD (רמת מובהקות $P < 0.0001$) – עבור ריכוז של 5×10^5 נבגים למ"ל – 5.5087, עבור ריכוז של 10^6 נבגים למ"ל – 3.0048 (אין נתונים לגבי אחוז הנביטה של תבדיד מספר 28A).

בחירת תבדידי פטרייה ושיטת האילוח אשר שימשו לעבודה

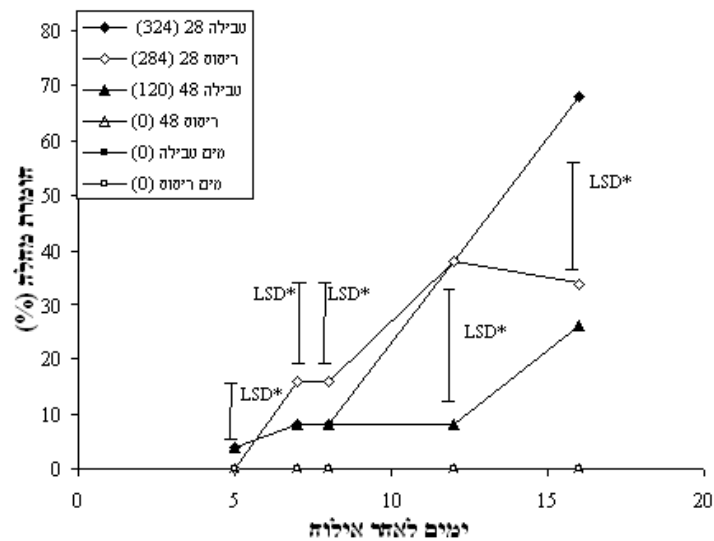
על מנת לבחור את תבדידי C.g. ששימשו להמשך העבודה ואיזו שיטת אילוח צמחים עדיפה, נעשו ניסויים מקדימים של אילוח צמחים מזן סופרים, שאולחו בטבילה, ונקבעה חומרת המחלה בצמחים בשיטה הויזואלית:

מקרא עבור סימפטומי המחלה:

0	אין סימני מחלה או שהם קלושים	0%
1	התחלת סימני מחלה, נגיעות	20% עלים נגועים
2	סימני מחלה ברמה בינונית	50% עלים נגועים
3	סימני מחלה חמורים	80% עלים נגועים
4	צמח מתמוטט	100%

באיור 2 ניתן לראות תוצאות של הערכת חומרת המחלה במועדי הבדיקה השונים, אשר על פיהן ועל פי תוצאות ניסויי תאי הספירה, נקבע כי התבדידים אשר שימשו להמשך העבודה הם מספר 28 ומספר 48. שני

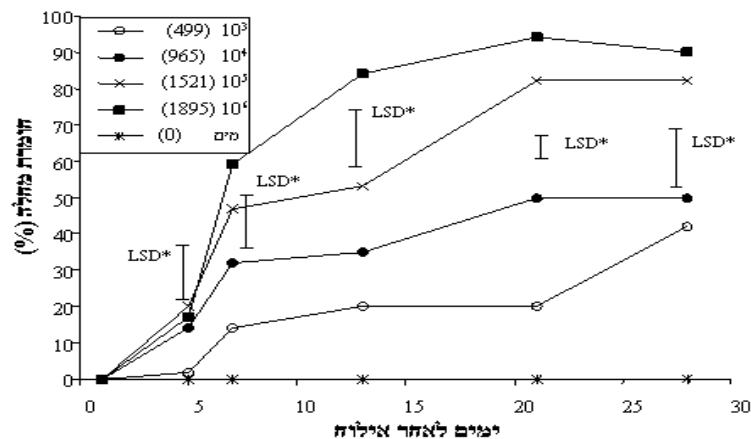
תבדידים אלו גרמו למחלה בעוצמה חזקה יותר מאשר שאר התבדידים שנבדקו (מספר 18, 53, 62, 63 ו-72) לפי ערכי ה-AUDPC. ניתן לראות כי שיטת הטבילה הוכיחה את עצמה כיעילה יותר (70% נגיעות בסוף הניסוי בשיטת הטבילה לעומת 35% נגיעות בשיטת הריסוס, עבור תבדיד מספר 28) ואילוח הצמחים בכל הניסויים שיוצגו נעשה בה.



איור 2: חומרת המחלה בצמחים שאולחו בתבדידי C.g. מספר 28 ומספר 48 בשתי שיטות. ריכוז המידבק אשר שימש לאילוח הוא 5×10^6 נבגים למ"ל, בנוסף לביקורת המים. האילוח נעשה בטבילה או בריסוס. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 5 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. LSD* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 5 – 10.098, יום 7 ויום 8 – 14.281, יום 12 – 20.51, יום 16 – 19.717. במקרא בסוגריים: ערכי AUDPC של הגרפים השונים, LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות $P < 0.0001$): 140.1.

השוואת ריכוזי אילוח שונים

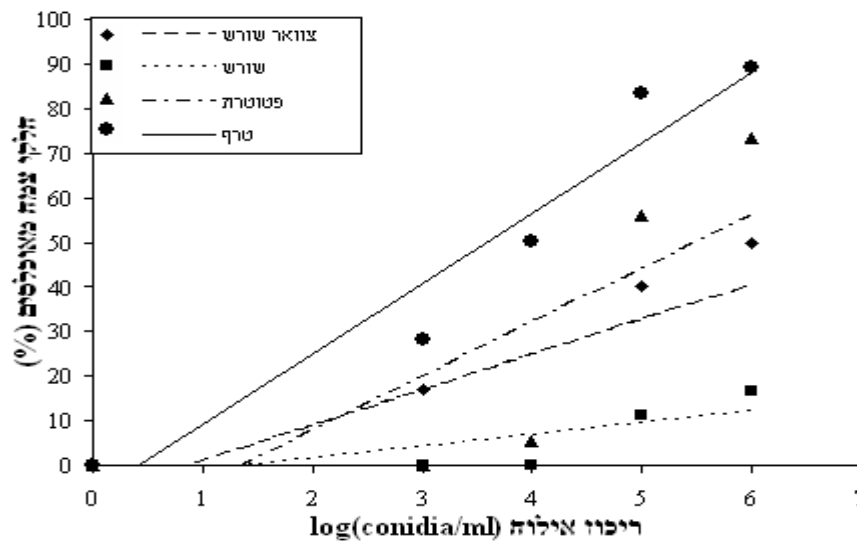
בכל מועד בדיקה חומרת המחלה הייתה גבוהה ככל שריכוז המידבק ששימש לאילוח היה גבוה יותר, אם כי לא תמיד ההבדלים בין ריכוזי המידבק השונים היו מובהקים. עם זאת, ערך ה-AUDPC שמייצג את מהלך התפתחות המחלה לאורך הזמן, שונה במובהק בין כל הטיפולים השונים (איור 3). בתום תקופת הניסוי, חומרת המחלה של צמחים שאולחו ב- 10^5 נבגים למ"ל הייתה גבוהה משמעותית משל צמחים שאולחו ב- 10^4 נבגים למ"ל: כ-80% נגיעות לעומת 50% בהתאמה. לעומת זאת ההבדל בין חומרת המחלה של צמחים שאולחו בריכוז של 10^3 נבגים למ"ל לצמחים שאולחו ב- 10^4 נבגים למ"ל, או בין צמחים שאולחו ב- 10^5 נבגים למ"ל לכאלה שאולחו ב- 10^6 נבגים למ"ל, היה פחות משמעותי: כ-40% לעומת 50%, או 80% לעומת 90%, בהתאמה. יחס דומה קיים גם בערכי ה-AUDPC של הטיפולים השונים. הניסוי נערך פעמיים עם תוצאות דומות. כמוכן, תוצאות דומות התקבלו עם תבדיד 48 A.



איור 3: חומרת מחלה בצמחים שאולחו בתבדיד C.g. מספר 28. ריכוזי המידבק אשר שימשו לאילוח היו $0, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 10 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. *LSD (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 1 – 0, יום 5 – 14.28, יום 7 – 14.302, יום 13 – 15.506, יום 21 – 6.562, יום 28 – 15.984. במקרא בסוגריים: ערכי AUDPC של הגרפים השונים, LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות $P < 0.0001$): 198.8.

אכלוס איברים שונים בצמח על-ידי תבדיד מספר 28

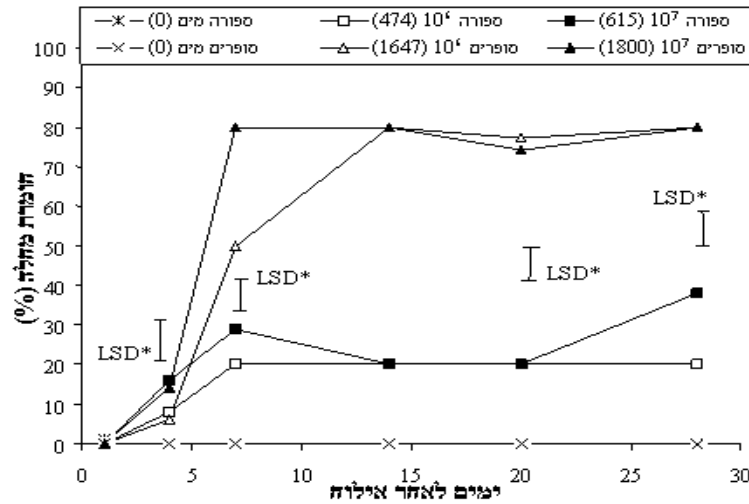
ככל שריכוז האילוח גבוה יותר, כך גם אחוז חלקי הצמח המאוכלסים (איור 4). ניתן לראות כי חלקי הטרפים הם המאוכלסים ביותר (בריכוז האילוח הגבוה ביותר עד 90% מהחלקים שנבדקו מאוכלסים), ולאחר מכן, בסדר יורד, חלקי הפטוטרת (עד 75%), צוואר השורש (עד 50%), ולבסוף חלקי השורש (עד 15%), שמראים רמת אכלוס נמוכה מאוד. ערך ה- R^2 של חלקי הטרפים הוא גבוה במיוחד. בנוסף, שיפועי הקווים הליניאריים אינם מובהקים, מלבד עבור הטרפים. חזרה נוספת לניסוי זה הראתה תוצאות דומות (אינן מוצגות). כמוכן, תוצאות דומות התקבלו עם תבדיד 48 A.



איור 4: אכלוס חלקי צמחים שאולחו בתבדיד מספר 28. ריכוזי המידבק אשר שימשו לאילוח היו $0, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 3 חלקים שנזרעו על מצע חצי ברגני) עבור כל איבר ב-6 מועדי בדיקה שונים המשמשים כחזרות, וממוצע בין החזרות. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 ומובהקות שיפוע הקו עבור כל איבר: צוואר שורש $y = 7.8573x - 6.8473$, $R^2 = 0.6181$, $P = 0.1148$; שורש $y = 2.6313x - 3.8843$, $R^2 = 0.5901$, $P = 0.1292$; פטוטרת $y = 12.131x - 16.643$, $R^2 = 0.6332$, $P = 0.1074$; טרף $y = 15.773x - 6.5852$, $R^2 = 0.9341$, $P = 0.0073$.

השוואת זני לימוניום שונים למחלה

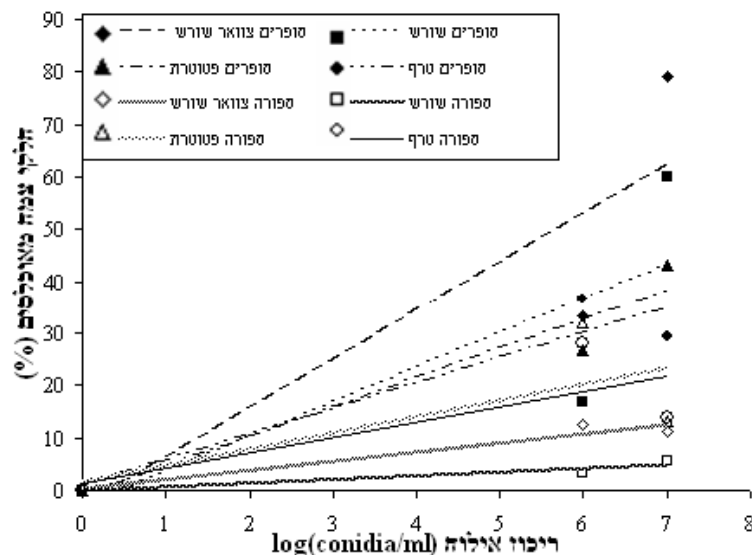
נערכה השוואת חומרת המחלה של אילוח שני זני לימוניום, ספורה וסופרים, בתבדיד 48A. זן הסופרים הראה רגישות רבה יותר למחלה – רמת נגיעות של כ-80% לקראת סיום הניסוי, לעומת 20%-40% עבור זן הספורה (איור 5). בוצעו שתי חזרות נוספות של ניסוי זה (תוצאות אינן מוצגות), בשתייהן זן הסופרים הגיב בצורה קשה יותר לאילוח המלאכותי מאשר זן הספורה, עד כדי רמת הנגיעות של 80%. רמת הנגיעות של צמחים מזן הספורה נותרה נמוכה יותר משל צמחים מזן הסופרים, עד 60% (איור 5). כאשר מתייחסים לערכי ה-AUDPC של החזרה המוצגת, ניתן לראות הבדל מובהק בהתפתחות המחלה לאורך זמן בתוך כל זן והבדל גדול יותר בין הזנים השונים. בשתי החזרות האחרות, ההבדל המובהק הגדול בין הזנים חזר על עצמו.



איור 5: חומרת מחלה בצמחים משני זני לימוניים, שאולחו בתבדוד מספר 48A. הריכוזים אשר שימשו לאילוח היו 0, 10³ ו-10⁶ נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 10 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. LSD* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 0-1, יום 4-10, יום 7-7,817, יום 14-0, יום 22-8,529, יום 28-8,537. במקרא בסוגריים: ערכי AUDPC של הגרפים השונים, LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות $P < 0.0001$): 93.6.

השוואת אכלוס תבדוד 48A באיברי צמח שונים בשני זני הלימוניים

ניתן לראות כי זן הסופרים רגיש יותר למחלה – כל חלקי הצמח שנדגמו מזן זה מראים רמת אכלוס גבוהה יותר מאשר חלקי צמח שנדגמו מזן הספורה, ללא קשר לאיבר ממנו הם נדגמו בצמח (איור 6). האיבר המאוכלס ביותר היה צוואר השורש (בריכוז האילוח הגבוה ביותר עד 80% מהחלקים שנבדקו מאוכלסים), ולאחריו בסדר יורד היו חלקי השורש (עד 60%), הפטוטרת (עד כ-45%) ולבסוף הטרפים (עד כ-30%), שהיו בניסוי זה בעלי רמת האכלוס הנמוכה ביותר עבור זן סופרים - בניגוד לניסויים הקודמים, בהם הם היו האיברים בעלי רמת האכלוס הגבוהה ביותר. לעומת זאת, רמת אכלוס האיברים בתוך הזן ספורה הייתה דומה יותר לתוצאות הניסויים הקודמים: פטוטרת וטרפים (בריכוז האילוח הגבוה ביותר עד כ-14% מהחלקים שנבדקו מאוכלסים), צוואר השורש (עד כ-11%) ולבסוף חלקי השורש (עד כ-6%).



איור 6: אכלוס חלקי צמחים משני זני לימוניים שאולחו בתבדוד מספר 48A. ריכוזי המידבק אשר שימשו לאילוח היו 0, 10⁶ ו-10⁷ נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 3-6 חלקים שנורעו על מצע חצי בררני) עבור כל איבר ב-6 מועדי בדיקה שונים המשמשים כחזרות, וממוצע בין החזרות. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה-R² ומובהקות שיפוע הקו עבור כל איבר: סופרים: צוואר שורש $y = 9.3023x - 2.8101$, $R^2 = 0.7851$, $P = 0.3069$; שורש $y = 6.5504x - 2.8295$, $R^2 = 0.9014$, $P = 0.4089$; פטוטרת $y = 5.5814x - 0.8527$, $R^2 = 0.9346$, $P = 0.1646$; טרף $y = 4.8708x + 0.9302$, $R^2 = 0.6411$.

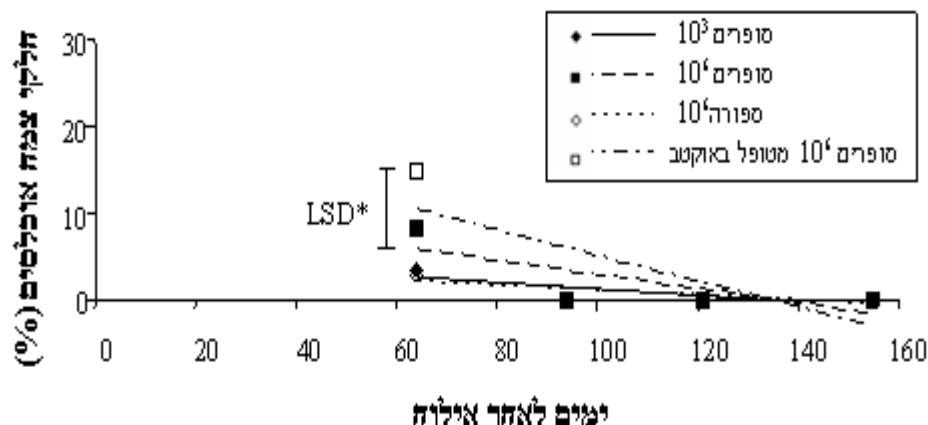
$R^2=0.9257$ $y=0.7105x-0.1162$ שורש; $P=0.1490$ $R^2=0.9463$ $y=1.7604x+0.2422$ צוואר שורש; $P=0.2035$
 $P=0.4205$ $R^2=0.6235$ $y=2.9199x+1.3101$ טרף; $P=0.4788$ $R^2=0.5334$ $y=3.1008x+1.6744$ פטוטרט; $P=0.1766$

ניסויי שדה: השוואת ריכוזי אילוח שונים, זני לימוניום שונים וקיום טיפולי הדברה

א. אכלוס חלקי צמחים בפתוגן בניסוי שדה

על מנת לקבוע את תגובת הזנים השונים לפתוגן לאורך זמן ומחוץ לחממה, בוצעו שני ניסויי שדה לאורך מספר חודשים, בהם צמחים אולחו בחממה ולאחר חודש הועברו לגידול בשדה. הניסוי הראשון החל בעונת הסתיו ונמשך עשרה חודשים (נובמבר 2006 – ספטמבר 2007), ואילו הניסוי השני החל בעונת הקיץ ונמשך שבעה חודשים (יוני - נובמבר 2007). הניסויים ייקראו ניסוי סתיו וניסוי קיץ, בהתאמה. בניסויי השדה נבדקו השפעות הפרמטרים הבאים: זן הצמח (סופרים או ספורה), ריכוז המידבק ששימש לאילוח (10^3 נבגים למ"ל - רק בניסוי הסתיו, 10^6 נבגים למ"ל וביקורת מים) והשפעת טיפול הדברה באוקטב על הישרדות הפתוגן (הדברה או ללא הדברה). הצמחים אולחו בחממה בגיל 2-4 שבועות, וגודלו בה במשך ארבעה שבועות לאחר האילוח, במהלכם מחצית מהצמחים טופלו באוקטב שבוע לאחר האילוח, שבועיים לאחריו וארבעה שבועות לאחריו. ההדברה נעשתה על-ידי טבילת צמחים למשך 4 דקות בתמיסת 0.2% prochloraz. בשלב זה הצמחים נשתלו בשדה בתחנת יאיר בערבה, כל טיפול בארבע חזרות שבכל אחת 10 צמחים בניסוי הסתיו, או בשלוש חזרות שבכל אחת 6 צמחים בניסוי הקיץ, והחזרות הוצבו במתכונת ניסוי של בלוקים באקראי. מניסויי השדה נלקחו דגימות צמחים בשלב החממה (שתי חזרות בכל עונת ניסוי) ובשלב השדה (ארבע חזרות בעונה הראשונה, שלוש חזרות בעונה השנייה) לצורך זיהוי נוכחות הפתוגן בשיטת האכלוס ובשיטה המולקולארית. בנוסף, נבדקה תמותת הצמחים בשדה.

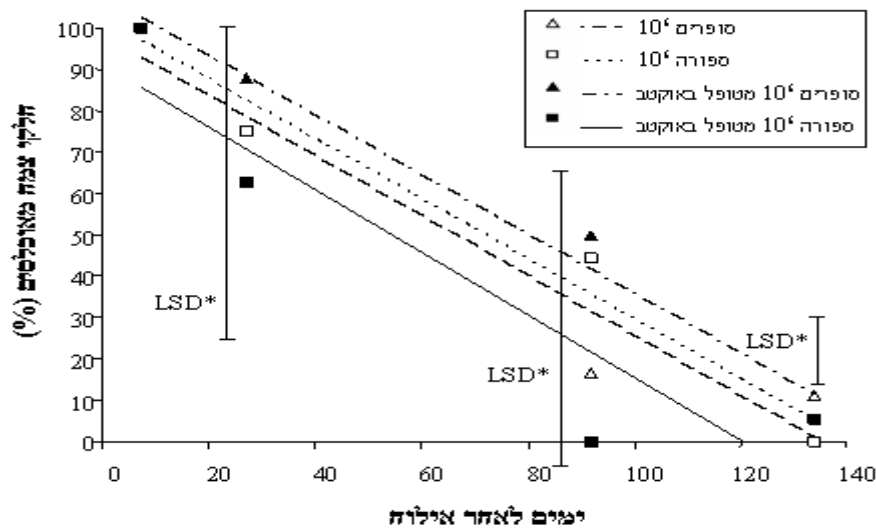
בניסוי הסתיו ההערכות והדגימות נערכו בחמישה מועדים, החל משלב שתילת הצמחים בשדה: כחודשיים (64 ימים), שלושה חודשים (96 ימים), ארבעה חודשים (124 ימים), חמישה חודשים (157 ימים) ועשרה חודשים (311 ימים), לאחר האילוח. רק במועד הראשון ניתן היה לזהות את הפתוגן בחלקי הצמח הנבדקים, שכללו חלקי צוואר שורש ופטוטרות, אך גם אז אחוז החלקים המאוכלסים היה נמוך מאוד (איור 7). בצמחים שאולחו בריכוז הנמוך של הנבגים (10^3 נבגים למ"ל) הפתוגן מופיע רק ב-4% מחלקי צמחים מזן סופרים שלא טופלו באוקטב. בצמחים שאולחו בריכוז הגבוה של הנבגים (10^6 נבגים למ"ל) הפתוגן מופיע בכל הטיפולים מלבד צמחי ספורה שטופלו באוקטב: 15% מחלקי צמחי סופרים שטופלו באוקטב מאוכלסים, 8% מחלקי סופרים שלא טופלו באוקטב, ו-2% מחלקי צמחי ספורה שלא טופלו באוקטב. באופן כללי רמת האכלוס של צמחי ספורה נמוכה יותר מרמת האכלוס של צמחי סופרים, ללא תלות בטיפול באוקטב או בריכוז המידבק אשר שימש לאילוח.



איור 7: אכלוס חלקי צמחים בפתוגן בניסוי שדה שנערך בסתיו (נובמבר 2006 – ספטמבר 2007). נבדקו שני זני לימוניום שאולחו בתבנית מספר 48A בריכוזים 0, 10^3 , ו- 10^6 נבגים למ"ל. במהלך החודש לאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם עברו הדברה באוקטב. כל הנתונים נלקחו מאותו מועד בדיקה (חודשיים לאחר האילוח וחודש לאחר השתילה בשדה) והם מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 8-10 חלקי צוואר שורש ופטוטרות שנרעו על מצע חצי ברנני) עבור 2-4

צמחים המשמשים כחזרות, וממוצע בין החזרות. LSD* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) 64 ימים לאחר האילוח: 8.9858. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 ומובהקות שיפוע הקו עבור הטיפולים המוצגים בגרף: סופרים 10^3 $y = -0.0352x + 4.7153$; $P = 0.2348$ $R^2 = 0.5856$ $y = -0.0274x + 3.6718$; סופרים 10^6 $y = -0.0806x + 10.791$; $P = 0.2348$ $R^2 = 0.5856$; סופרים 10^6 מטופל באוקטב $y = -0.1473x + 19.72$; $P = 0.2348$ $R^2 = 0.5856$.

בניסוי הקיץ הבדיקות נערכו בארבעה מועדים, שניים מהם בשלב החממה ושניים לאחר השתילה בשדה: שבוע (7 ימים), כחודש (27 ימים), כשלושה חודשים (92 ימים) וכארבעה וחצי חודשים (134 ימים) לאחר האילוח (איור 8). ניתן לראות כי בכל ארבעת המועדים הפתוגן מזוהה בצמחים המאולחים, אך עם זאת, אין הבדל מובהק בין הטיפולים השונים בכל נקודת זמן. מספר החלקים מהם בודד הפתוגן על גבי צלחת הולך ויורד ככל שהזמן עובר לאחר מועד האילוח, כאשר במועד הדגימה הראשונה 100% מהחלקים שנבדקו היו מאוכלסים בכל טיפולי האילוח, ובמועד הדגימה האחרונה ערך האכלוס הגבוה ביותר נמדד בצמחים מזן סופרים שלא עברו טיפול הדברה – כ-10%.

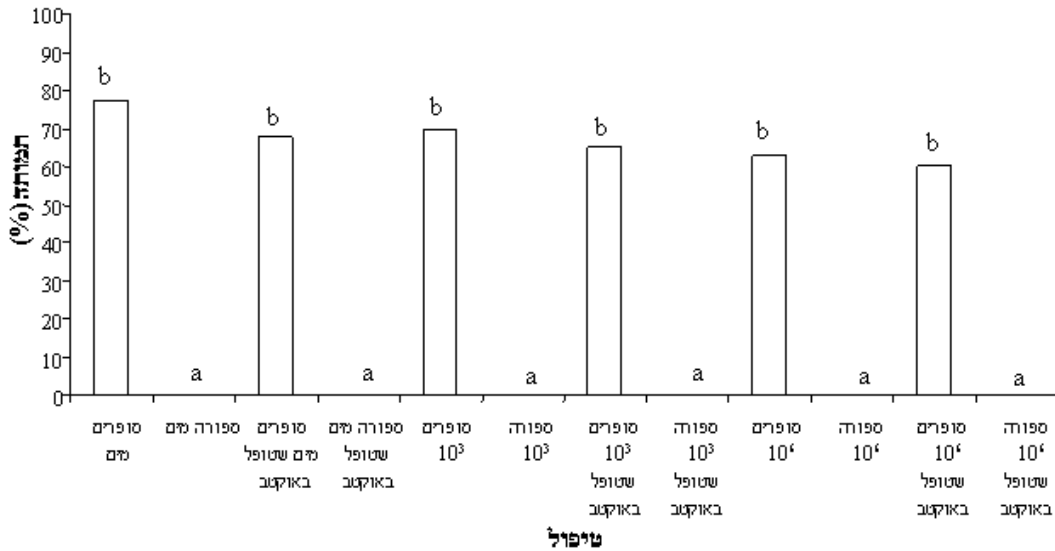


איור 8: אכלוס חלקי צמחים בפתוגן בניסוי שדה שנערך בקיץ (יוני-נובמבר 2007). נבדקו שני זני לימוניום שאולחו בתבדיד מספר 48A בריכוזים 0 ו- 10^6 נבגים למ"ל. במהלך החודש לאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם עברו הדברה באוקטב. הנתונים מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 4-6 חלקי צוואר שורש ופטוטרת שנורעו על מצע חצי בררני) עבור 2-3 צמחים לכל טיפול בכל מועד בדיקה וממוצע בין חזרות אלה. LSD* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 0 – 7, יום 27 – 78.201, יום 92 – 73.241, יום 134 – 16.66. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 ומובהקות שיפוע הקו עבור הטיפולים המוצגים בגרף: סופרים 10^6 $y = -0.7218x + 97.613$; $P = 0.0337$ $R^2 = 0.9337$; ספורה 10^6 $y = -0.7234x + 101.88$; $P = 0.0104$ $R^2 = 0.9792$; ספורה 10^6 מטופל באוקטב $y = -0.7178x + 107.42$; $P = 0.0156$ $R^2 = 0.9691$; ספורה 10^6 מטופל באוקטב $y = -0.7566x + 91.194$; $P = 0.0741$ $R^2 = 0.8573$.

ב. תמותת צמחים בניסויי השדה

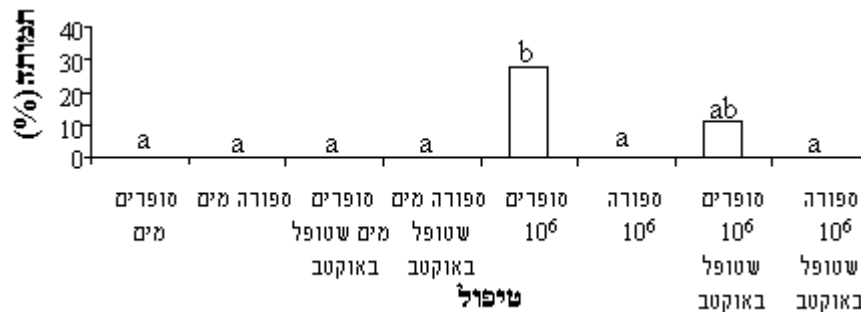
נבדקה תמותת הצמחים משני הזנים בניסויי הסתיו והקיץ.

בניסוי הסתיו: חמישה חודשים לאחר האילוח, לא נצפתה תמותה כלל בצמחי הסופרים (אפריל 2007, תוצאות לא מוצגות). ביולי 2007, שמונה חודשים לאחר האילוח, הייתה תמותה גדולה בצמחי הסופרים, כולל הצמחים מקבוצת ביקורת המים (באיור 9). הטיפול בו נפגעו הכי מעט צמחים (60% תמותה) היה צמחי סופרים שאולחו בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל וטופלו באוקטב. עשרה חודשים לאחר האילוח (ספטמבר 2007), לא נותרו כלל צמחי סופרים בחיים, כולל הצמחים מקבוצת ביקורת המים.



איור 9: תמותת צמחים בניסוי שדה שנערך בסתיו (נובמבר 2006-ספטמבר 2007), שמונה חודשים לאחר האילוח (יולי 2007). נבדקו שני זני לימוניים, שמונה חודשים לאחר שאולחו בתבדיד מספר 48A בריכוזים 0, 10^3 ו- 10^6 נבגים למ"ל. במהלך החודש לאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם טופלו באוקטב. הנתונים מבוססים על קביעת אחוז התמותה בכל אחת מארבע החזרות לכל טיפול, וחישוב הממוצע. LSD^* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) - 37.078.

בניסוי הקיץ: חמישה חודשים לאחר האילוח, בנובמבר 2007, חלק מצמחי הסופרים מתו (איור 10) ואחרים היו בשלבי קמילה שונים. אילוח בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל פגע בזן הסופרים בצורה הקשה ביותר (כ-25% תמותה). בקרב צמחי סופרים שאולחו בריכוז זה אך טופלו באוקטב, הייתה תמותה נמוכה יותר (כ-11%), שלא הייתה שונה במובהק משאר הטיפולים. אין נתונים נוספים לגבי התמותה בניסוי הקיץ מאחר שהצמחים סולקו מהשדה.



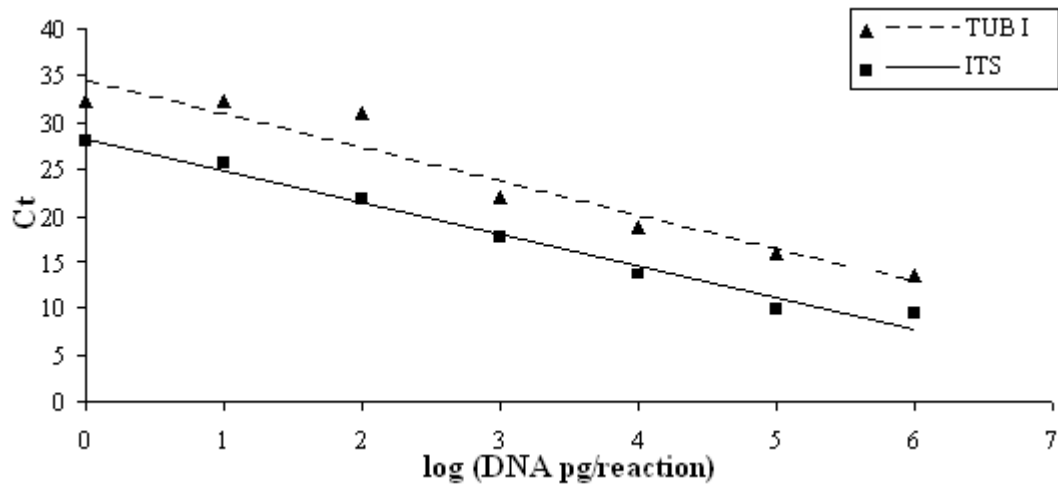
איור 10: תמותת צמחים בניסוי שדה שנערך בקיץ (יוני-נובמבר 2007), חמישה חודשים לאחר האילוח (נובמבר 2007). נבדקו שני זני לימוניים, חמישה חודשים לאחר שאולחו בתבדיד מספר 48A בריכוזים 0 ו- 10^6 נבגים למ"ל. במהלך החודש שלאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם טופלו באוקטב. הנתונים מבוססים על קביעת אחוז התמותה בכל אחת משלוש החזרות לכל טיפול, וחישוב הממוצע. LSD^* (רמת מובהקות $P = 0.003$) - 21.501.

חיפוש שלב מיני של הפטרייה

בעבודה שנעשתה בעבר נמצא כי קיים שלב מיני של C.g. לאחר בידודים במצע בתנאים מלאכותיים. מכל הצמחים שאולחו בתבדידים השונים בחממה ובשדה, לא נצפתה הופעה של פריטציה, גופי ריבוי המיניים של הפטרייה. לכן, ככל הנראה, השלב המיני אינו גורם חשוב בהפצה והישרדות הגורם בחממה ובשדה.

זיהוי C.g. באמצעות PCR כמותי, QRT-PCR

הגנים ITS ו-TUB I זוהו באמצעות פריימרים ITS RT (R-ו F) ו-RT TUB I (R-ו F) בהתאמה. ה-DNA הגנומי של הפטרייה נמהל במיהולים עשורניים בתחום 10^6 - 10^2 pg/reaction (2. $\times 10^5$ -0.2 pg/ μ l). איור 12 מציג את עקומת הכיול של הפריימרים המזהים את הגנים ITS ו-TUB I ב-DNA הגנומי של הפטרייה ואת משוואת הקו הישר, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות השיפוע עבור כל זוג פריימרים. בדגימות ה-DNA שנבדקו, גן ITS מזוהה בין מחזורים 7-27, מוקדם יותר מאשר גן TUB I, המזוהה בין מחזורים 14-32 באותם ריכוזי DNA. בנוסף, מידת ההתאמה של הנתונים לקו הליניארי ויעילות הריאקציה גבוהות יותר עבור גן ITS. עם זאת, הפריימרים המזהים גן זה יוצרים דימר, ולא נמצאו פריימרים ללא דימר, ולכן היה צורך לבדוק גן נוסף (TUB I).



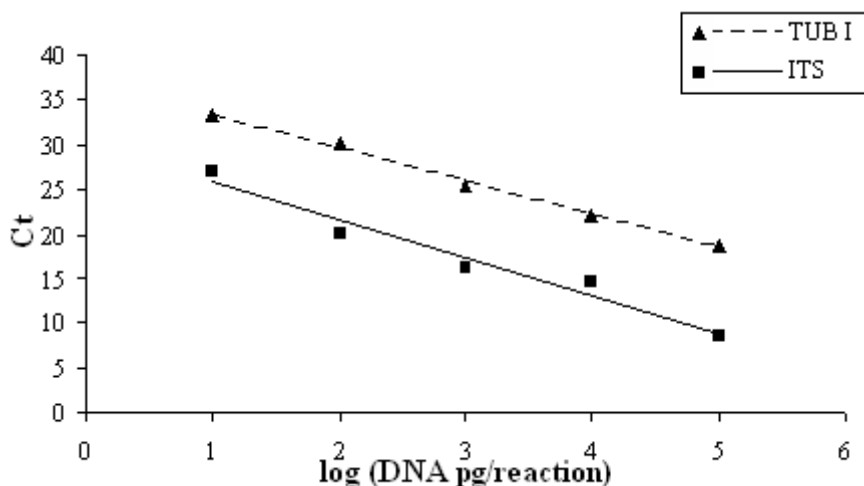
איור 12: ערכי ה-Ct שהתקבלו בריאקציות QRT-PCR עבור ריכוזי DNA גנומי שונים של תבדוד מספר 48 של C.g. הריאקציות בוצעו בעזרת פריימרים ITS RT (R-ו F) עבור גן ITS ופריימרים TUB I RT (R-ו F) עבור גן TUB I. ערך ה-Ct המוצג הינו ממוצע עבור שתי חזרות טכניות לכל ריכוז DNA, שנע בין 10^6 -1 pg/reaction. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות שיפוע הקו עבור כל גן: ITS: $y = -3.41823x + 28.239$, $R^2 = 0.9811$, $efficiency = 0.95$, $P < 0.0001$; TUB I: $y = -3.5966x + 34.466$, $R^2 = 0.9342$, $efficiency = 0.87$, $P = 0.0004$.

DNA גנומי של הפטרייה מהול ב-DNA צמחי

למטרת זיהוי הפתוגן בצמחים מאולחים בוצעו מיהולים של ה-DNA הגנומי של הפטרייה בתוך תמיסה של DNA צמחי בריכוז קבוע. ה-DNA הגנומי של הפטרייה נמהל במיהולים עשורניים בתחום 10^5 - 10^1 pg/reaction (2. $\times 10^4$ -2 pg/ μ l). ה-DNA הצמחי אשר שימש למהילה הופק מצמחי סופרים בריאים שונים עבור הכיולים השונים. נבדקה רגישות זיהוי הגנים של הפטרייה ב-QRT-PCR בנוכחות ריכוזים שונים של ה-DNA הצמחי: גן ITS זוהה בריכוזים שונים בנוכחות DNA צמחי בריכוז קבוע של 90,10,9,1 ng/reaction, 900,500,90 pg/reaction. גן TUB I זוהה בריכוזים שונים בנוכחות DNA צמחי בריכוז קבוע של 900,90 pg/reaction, 9 ng/reaction, ולא זוהה בריכוז של 90 ng/reaction (לא נבדקו ריכוזים נוספים עבור זיהוי גן זה). איור 13 מציג את עקומת הכיול של הפריימרים המזהים את הגנים ITS ו-TUB I ב-DNA הגנומי של הפטרייה, המהול ב-DNA צמחי של אותו צמח, בריכוז קבוע של 9000 pg/reaction, ואת משוואת הקו הישר, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות השיפוע עבור כל זוג פריימרים.

בדגימות ה-DNA שנבדקו, גן ITS מזוהה בין מחזורים 9-27, מוקדם יותר מאשר גן TUB I, המזוהה בין מחזורים 19-33 באותם ריכוזי DNA פטרייה וצמח. לעומת זאת, מידת ההתאמה של הנתונים לקו הליניארי

ויעילות הריאקציה גבוהות יותר עבור גן TUB I. זאת, בנוסף לעובדה כי כל הפריימרים המזהים את גן ITS שנמצאו יוצרים דימר שגורם לקריאה שגויה של הפלורסנציה, גרם להעדפת זיהוי גן TUB I במרבית הניסויים.



איור 13: ערכי Ct שהתקבלו בריאקציות QRT-PCR עבור ריכוזי DNA גנומי שונים של תבדיד מספר 48 של C.g., מהול ב-DNA צמחי בריכוז קבוע. הריאקציות בוצעו בעזרת פריימרים ITS RT (R-ו F) עבור גן ITS ופריימרים TUB I RT (R-ו F) עבור גן TUB I. ערך ה-Ct המוצג הינו ממוצע עבור שתיים או שלוש חזרות טכניות לכל ריכוז DNA, שנע בין 10^5 - 10^3 pg/reaction. ריכוז ה-DNA הצמחי הקבוע בו נמהל DNA הפטרייה 9000 pg/reaction עבור כיוול כל גן. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות שיפוע הקו עבור כל גן: ITS $R^2=0.9638$ $y=-4.2577x+30.092$ efficiency $P<0.0001$ TUB I $R^2=0.9964$ $y=-3.7163x+37.083$ efficiency $P=0.0041$.

זיהוי גן הפטרייה ב-QRT-PCR בתבדידי C.g. שונים

כל תוצאות ריאקציות ה-QRT-PCR שתתוארנה בפרק זה בחנו DNA שנלקח מתבדידים מספר 48A או 48 או DNA של צמחים שאולחו באמצעות תבדיד 48A. עם זאת, הפריימרים ITS RT (R-ו F) והפריימרים TUB I RT (R-ו F) המשמשים לזיהוי גנים ITS ו-TUB I בהתאמה בתבדידים אלו מזהים גם תבדידים נוספים של C.g. (תוצאות לא מוצגות): תבדידים מספר 18, 28, 53, 62 ו-63 נבדקו בשתי ריאקציות נפרדות (שתי חזרות טכניות לכל תבדיד). עבור כל התבדידים שנבדקו, גן ה-ITS מזהה במחזור מוקדם יותר מאשר גן ה-TUB I כאשר נבדקת אותה דגימת DNA.

יישום הכלי שפותח על צמחים מאולחים

טבלה 1 מתארת זיהוי גן TUB I של C.g. על-ידי QRT-PCR בדגימות עלים של צמחים מזן סופרים שנלקחו מניסוי השוואת ריכוזי אילוח שונים. דגימות הצמחים להפקת ה-DNA נלקחו באותם מועדים שבהם נבדקו הצמחים בשיטה הויזואלית ובשיטת האכלוס. בריכוז האילוח הנמוך ביותר (10^3 נבגים למ"ל) לא מזהה הפטרייה כלל, גם זמן רב לאחר האילוח (61 ימים). בריכוזי האילוח האמצעיים (10^4 ו- 10^5 נבגים למ"ל) הפטרייה מזהה רק לאחר זמן רב מהאילוח, ואילו בריכוז האילוח הגבוה ביותר (10^6 נבגים למ"ל), ניתן לזהות את הפטרייה כבר ארבעה ימים לאחר האילוח.

טבלה 1: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR בדגימות DNA מעלים של צמחי סופרים שאולחו בריכוזים שונים

ריכוז מידבק ↓ ימים לאחר אילוח	10 ²	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
1	X	X	X	V
4	X	X	X	V
7	V	X	X	V
61	X	V	V	V

הפריימרים TUB I RT (F ו-R) שימשו לזיהוי. X לא מזוהה. V מזוהה.

זיהוי הפטרייה ב-QRT-PCR בזני לימוניום שונים

טבלה 2 מתארת זיהוי גן TUB I של C.g. על-ידי QRT-PCR בדגימות צמחים מזן סופרים ומזן ספורה, שנלקחו מניסוי השוואת זני לימוניום שונים. דגימות הצמחים להפקת ה-DNA נלקחו באותם מועדים שבהם נבדקו הצמחים בשיטה הויזואלית ובשיטת האכלוס. הפטרייה לא מזוהה בדגימות ה-DNA שנלקחו מצמחי ביקורת המים במועדים השונים ובזני הצמחים השונים. בצמחי הסופרים ניתן לזהות את הפטרייה בדוגמאות רבות יותר מאשר בצמחי הספורה, כאשר בריכוז האילוח הגבוה, 10⁷ נבגים למ"ל, יותר דוגמאות מכילות את הפטרייה מאשר בריכוז האילוח הנמוך, 10⁶ נבגים למ"ל, עבור שני זני הצמחים. כמו כן, ככל שמועד לקיחת הדגימות מתרחק ממועד האילוח יותר דגימות מזוהות כחיוביות להמצאות הפטרייה. ישנו הבדל בין יכולת זיהוי הפטרייה בדגימות העלים ובדגימות צוואר השורש והפטוטרות: בצמחים שאולחו בריכוז הגבוה של נבגים הפטרייה לא תמיד מזוהה בצוואר השורש, גם בצמחים בהן היא מזוהה בחלקי העלים.

טבלה 2: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR בדגימות DNA מאיברי צמח שאולחו בריכוזים שונים

ריכוז מידבק ↓ ימים לאחר אילוח	דגימות מעלים						דגימות מצוואר השורש+פטוטרות					
	סופרים			ספורה			סופרים			ספורה		
	0	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁶	10 ⁷
1	X	X	V	X	X	V	X	X	V	X	X	X
4	X	X	V	X	X	X	X	X	X	X	X	V
8	X	V	V	X	V	V	X	V	V	X	V	X
15	X	V	V	V	V	V	X	X	X	X	X	V
22	X	V	V	X	V	V	X	V	V	X	X	V
29	X	V	V	X	V	V	X	X	V	X	V	X

הפריימרים TUB I RT (F ו-R) שימשו לזיהוי. X לא מזוהה. V מזוהה.

זיהוי הפטרייה ב-QRT-PCR בניסויי השדה

בדגימות משני המועדים הראשונים (שבוע וארבעה שבועות לאחר האילוח) אין חלוקה לעלים ולצוואר שורש, כי ה-DNA הופק מכלל הצמח. התוצאות המוצגות בטבלה מספר 3 ומספר 4 הן של דגימות צמחים מניסוי השדה שלא טופלו באוקטב כלל. ניתן לראות כי בשני הניסויים, זיהוי הפתוגן בעייתי, ולמעשה ישנם מספר מועט של צמחים שזוהו כמכילים את הפתוגן. במספר מקרים היו דגימות שזוהו כחיוביות, אך רק בחזרה אחת מתוך שתיים או שלוש שבועות עבור אותה דגימת DNA (טבלה מספר 3, מסומנים ב-*).

טבלה 3: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR עבור ניסוי שדה שנערך בסתיו

	דגימות מעלים						דגימות מצוואר השורש+פטטורות					
	סופרים			ספורה			סופרים			ספורה		
	0	10 ³	10 ⁶	0	10 ³	10 ⁶	0	10 ³	10 ⁶	0	10 ³	10 ⁶
ריכוז מידבק ימים לאחר אילוח ↓												
7	-	X**	**V	-	X**	X**	*	*	*	**	**	**
27	X**	X**	**V	X**	X**	X**	**	**	**	**	**	**
64	X	X	X	X	X	X	X	X	*V	X	X	X
94	X	X	X	*V	X	X	X	X	X	X	X	X
121	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	V*	X
155	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
198	X	X	X	X	X	X	V*	X	X	X	X	X

נבדקו דגימות DNA מעלים ומחלקי צוואר שורש ופטטורות של צמחים משני זני לימוניום שאולחו בתבדיל מספר 48A. X לא מזוהה. V מזוהה. - לא נבדק. * רק באחת החזרות מבין 2-3 חזרות היה זיהוי. ** אין הפרדה בין צוואר שורש ועלים.

טבלה 4: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR עבור ניסוי שדה שנערך בקיץ

	דגימות מעלים				דגימות מצוואר השורש+פטטורת			
	סופרים		ספורה		סופרים		ספורה	
	0	10 ⁶	0	10 ⁶	0	10 ⁶	0	10 ⁶
ריכוז מידבק ימים לאחר אילוח ↓								
7	X**	**V	X**	X**	**	**	**	**
27	X**	X**	X**	X**	**	**	**	**
92	X	X	X	X	X	X	-	-
134	X	X	X	X	X	X	-	-

נבדקו דגימות DNA מעלים ומחלקי צוואר שורש ופטטורות של צמחים משני זני לימוניום שאולחו בתבדיל מספר 48A. X לא מזוהה. V מזוהה. ** אין הפרדה בין צוואר שורש ועלים. - לא נבדק.

דיון

1. צמח הלימוניום הוא גידול חשוב באזור הערבה, בבקעת הירדן, בשרון ובנגב. תופעת ההתמוטטות בלימוניום נגרמת ע"י הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides*. כמוכך, חלה תמותת שתילים במשתלות שונות, טרם הגעת השתילים לשדות החקלאים ועל כן חובה לפתח שיטת אבחון אמין ומהיר (בשיטות מולקולריות) לגילוי הפתוגן לפני הפצת החומר הצמחי לשטח.
2. הערכת הנגיעות באילוח בריכוז של 10^6 נבגים/מ"ל הייתה גבוהה מזו של אילוח בריכוז של 10^5 ו- 10^3 נבגים למ"ל, התואם את התלות בריכוז המידבק בחומרת המחלה.
3. בבחינת רגישות סבילות זני לימוניום למחלה, ניתן להבחין בחממה וניסויי שדה שזן הספורה סביל יותר למחלה בהשוואה לזן סופרים. בעוד שהערכת הנגיעות עבור הזן ספורה הייתה כ- 20%, הנגיעות בסופרים הייתה 75%-80%. הדבר מחזק את הסברה כי הזן סופרים רגיש יותר לפטרייה בהשוואה לזן ספורה.
4. לטיפול הדברה בפרוכלורז יש חשיבות במניעת התפתחות המחלה עבור שני הזנים שנבדקו. בנוסף, ככל שריכוז הנבגים גבוה יותר, הנגיעות גבוהה יותר. לא ניתן היה לגלות נוכחות הפטרייה באף אחד מהטיפולים כחודש לאחר השתילה בשדה. הדבר מעיד על הקושי שבזיהוי הפטרייה בצמח באמצעים קלאסיים מתוך דגימות בשדה ומדגיש את החשיבות שבפיתוח כלי דיאגנוסטי מתקדם לגילוי הפתוגן בשלב המשתלה.
5. בצמחים שאולחו בחממה ולאחר חודש נשתלו בשדה, הסימפטומים שהופיעו על העלים בשלבים המוקדמים נעלמו עם הזמן והיה קושי לבדוד את הפתוגן מהצמחים. תמותה התרחשה גם בצמחי הסופרים מקבוצת ביקורת המים, דבר שיכול להעיד על אילוחם דרך השורשים או מערכת ההשקיה, לאחר השתילה.
6. בניסוי השדה שנערך בסתיו, (נובמבר 2006), שמונה חודשים לאחר האילוח, הייתה תמותה גדולה בצמחי הסופרים, כאשר הטיפול בו נפגעו הכי מעט צמחים (60% תמותה) היה צמחי סופרים שאולחו בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל וטופלו באוקטב. עשרה חודשים לאחר האילוח, לא נותרו כלל צמחי סופרים בחיים, כולל הצמחים מקבוצת ביקורת המים, כאשר צמחי הספורה לא נפגעו. בניסוי שדה שנערך בקיץ (יולי 2007), צמחי הזן סופרים שוב נפגעו בצורה הקשה ביותר (כ-25% תמותה) אך בקרב הצמחים שטופלו באוקטב, הייתה תמותה נמוכה יותר (כ-11%), שלא הייתה שונה במובהק מהביקורת הלא מטופלת. לא נצפתה תמותה של שתילי הספורה, המצביע שוב על תגובת עמידות הזן לאנתרקנוז.
7. שיטת ה- quantitative real-time PCR (QRT-PCR) היא רגישה אף יותר מ-PCR רגיל ומבוססת על זיהוי האמפליפיקציה לכל אורך הריאקציה, גם בשלבים המוקדמים, ומדידת הקינטיקה שלה. השיטה מאפשרת זיהוי הפתוגן בצמח בשלבי הדבקה מוקדמים ע"ס פריימרים ספציפיים לפטרייה.
8. השתמשנו ב-Quantitative Real Time-PCR לזיהוי וכימות DNA של הפטרייה בתוך DNA צמחי לכימות הפטרייה נבחרו הגן ל- DNA ריבוזומלי (ITS) וגן ל- β -tubulin (Tub1) ונוצרו גרפי כיול ל-DNA פטרייתי בתוך DNA צמחי.
9. ריאקציות QRT-PCR אפשרו זיהוי איכותי של הפתוגן ב-DNA בצמחים מניסויי החממה והשדה, בשלבי הדבקה מוקדמים – כבר יום אחד לאחר האילוח. זיהוי הפטרייה בצמח בשיטת QRT-PCR יכול לשמש בעתיד כלי חשוב לאבחון מוקדם יותר של המחלה במשתלה.

פרסומים מדעים מהמחקר

1. נמסר דווח בע"פ ב- 24.04.06 במסגרת יום דיווח "דחיקת השימוש בחומרי הדברה" המאורגן ע"י המדען הראשי של משרד החקלאות.
2. נמסר דווח בע"פ ב- 25.12.07 במסגרת יום עיון "פרחי קטיף – גידולים חדשים" המאורגן ע"י שירות ההדרכה והמקצוע, אגף הפרחים, משרד החקלאות.

3. ניתן הרצאה בע"פ ב- 04.02.08 במסגרת הועידה ה-29 של החברה הישראלית לפיטופתולוגיה.
4. נמסר דווח בע"פ ב- 05.05.08 במסגרת יום דיווח "פרחים וגידולים חדשים" המאורגן ע"י המדען הראשי של משרד החקלאות.

Abraham, I., Jurkevitch, E., Pivonia, S., Levita, R., Bar Lavan, Y., and **Freeman, S.** (2008). Response of different cultivars of *Limonium* to *Colletotrichum gloeosporioides* and identification of the pathogen in infected plants by quantitative real time PCR *Phytoparasitica* 36:118.

אנו מודים למדען הראשי של משרד החקלאות והנהלת ענף המטעים עבור מימון מחקר זה. כמוכן, תודות למשתלת דנציגר על הספקת השתילים.

1. מטרת המחקר

א. מציאת דרכים להבטחת ניקיונו של חומר הריבוי או השתיל מגורם המחלה, באמצעים מולקולריים. ב. אפיון מחזור החיים המיני של הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides*. ג. מציאת טיפולי הדברה/מניעה יעילים (כימיים וביולוגיים), להפחתת שיעור המחלה במשתלה ובשדה.

עיקרי הניסויים ותוצאות

שני תבדידי הפתוגן נבחרו וכילה מערכת הדבקה בריכוזי מדבק שונים. לא זוהה השלב המיני של הפתוגן בתנאי הדבקה מלאכותיים ובשדה. קיים מתאם בין ריכוז המידבק לחומרת המחלה. נמצא שהזן ספורה סביל יותר למחלה מאשר הזן סופרים. בתנאים מסוימים, טיפול הדברה בפרוכלורז הפחית את חומרת המחלה. כוילה שיטת אבחון מולקולרית ע"ס real-time PCR לזיהוי הפטרייה בצמח לפי תחלים ספציפיים של הפחוגן.

מסקנות מדעיות והשלכות

השימוש בזן ספורה שסביל יותר לפתוגן בהשוואה לזן סופרים יכול לשמש כפתרון לבעיה מאחר וקשה להדביר את הגורם בשדה. ככל הנראה, השלב המיני אינו גורם חשוב בהפצה והישרדות הגורם בחממה ובשדה. בניסוי שדה לא ניתן היה לגלות את הפטרייה כחודש לאחר השתילה, דבר המעיד על הקושי שבזיהוי באמצעים קלאסיים בצמח ומדגיש את החשיבות שבפיתוח כלי דיאגנוסטי מתקדם. ריאקציות QRT-PCR אפשרו זיהוי איכותי של הפתוגן ב-DNA בצמחים מניסויי החממה והשדה, בשלבי הדבקה מוקדמים.

הבעיות שנותרו לפתרון

החומר אוקטב צריך להיבחן לאורך זמן ביישומים בשדה כדי לקבוע את יעילותו. זיהוי הפטרייה בצמח בשיטת QRT-PCR יוכל לשמש בעתיד ככלי חשוב לאבחון מוקדם יותר של המחלה במשתלה אך צריך לבחון את השיטה הזו בצמחים המתקבלים במשתלות השונות.

הפצת ידע

1. נמסר דווח בע"פ ב- 24.04.06 במסגרת יום דיווח "דחיקת השימוש בחומרי הדברה" המאורגן ע"י המדען הראשי של משרד החקלאות.
2. נמסר דווח בע"פ ב- 25.12.07 במסגרת יום עיון "פרחי קטיף – גידולים חדשים" המאורגן ע"י שירות ההדרכה והמקצוע, אגף הפרחים, משרד החקלאות.
3. ניתן הרצאה בע"פ ב- 04.02.08 במסגרת הועידה ה-29 של החברה הישראלית לפיטופתולוגיה.
4. נמסר דווח בע"פ ב- 05.05.08 במסגרת יום דיווח "פרחים וגידולים חדשים" המאורגן ע"י המדען הראשי של משרד החקלאות.

פירסום הדו"ח: אנו ממליצים לפרסם את הדו"ח רק בספריות.