

דוח שנתי לתוכנית מחקר 132-1540-12

**אטיולוגיה של מחלת "הצהבון בגזר" ואפיון גורמים ביוטיים אפשריים
בגרימת המחלה**

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

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

מוניר מוואסי, פיליס ויינטראוב, עבד גרה

מוניר מוואסי (email: mawassi@volcani.agri.gov.il), & עבד גרה: המחלקה לפתולוגיה
של צמחים-היחידה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי.
פיליס ויינטראוב, המחלקה לאנטומולוגיה, גילת.

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

Phyllis Weintraub: The Entomology Department, Gilat,

יוני
2013

תמוז
תשע"ג

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**



חתימת החוקר:

*** רשימת פרסומים (המידע של הדוח הוא חסוי ולא להפצה)**

תוכן עניינים

3	תקציר
4	מבוא ותאור הבעיה
5	מטרות המחקר
5	פירוט עיקרי הניסויים
12	סיכום ודיון
16	ביבליוגרפיה
17	סיכום עם שאלות מנחות

תקציר

הצגת הבעיה: בבדיקות מעבדה שנערכו לפני כשנתיים נתגלתה הבקטריה 'Candidatus Liberibacter solanacearum' (Lso) בקרב צמחי גזר מדרום הארץ שהראו תסמיני מחלה הידועה כמחלת מטאטא המכשפה. התופעה של מטאטא מכשפה בצמחי גזר יוחסה בעבר בעיקר לנגיפות צמחי גזר בפיטופלסמה וספירופלסמה, שהעברתם הטבעית מוגבלת בעיקר לציקדות. מאידך בבדיקות שערכנו לא נמצאה התאמה בין תסמיני המחלה הקשים לבין גורמי מחלה אלה. דיווחים על עליה בולטת בשיעורי התפוצה של פסילות בחלקות הגזר הנגועות עוררו את החשש כי פסילת הגזר היא הווקטור של המחלה בהעבירה גורם פתוגני מסוג ליברובקטר. לאימות ההשערה הזו, ערכנו בדיקות מולקולאריות לצמחי גזר ולפסילות מחלקות נגועות. בבדיקות אלה נמצא החיידק ה-Lso, אותו החיידק אשר דווח עליו בשנה האחרונה כגורם למחלת הזברה ציפס בתפוחי אדמה בטקסס, קליפורניה וניוזלנד. חיידק ה-Lso שוכן שיפה ומופץ על ידי חרקים מוצצים מהסוג פסילה. פרסומים מניוזלנד התברר כי החיידק הוא בעל טווח פונדקאים הכולל, מלבד תפוחי אדמה, גם גידולי סולניים חשובים אחרים כולל עגבניות ופלפל. בבדיקות ה-PCR שביצענו נמצא כי גם צמחי הגזר הנגועים וגם הפסילות שנאספו משדה גזר נגוע הכילו את החיידק Lso.

מהלך העבודה: במחקר בחנו את נוכחות שלושת הפתוגנים בצמחי גזר עם תסמיני מחלה, תוך כדי השימוש באמצעים של PCR וקביעת רצף תוצרי ה-PCR המתקבלים. בנוסף בדקנו באם זרעי גזר יכולים לשמש כמקור להפצת חיידקי הליברובקטר. נעשתה בדיקה לנוכחות החיידק בפסילות אשר נאספו מחלקות גזר במקומות שונים בארץ.

תוצאות מצופות: במסגרת המחקר מצאנו כי קיימת קורלציה ברורה בין המחלה לבין נוכחות החיידק ליברובקטר אך לא לבין החיידקים פיטופלסמה וספירופלסמה. פותחו שיטות PCR אמינות לגילוי החיידק בצמח ובפסילות המעבירות את החיידק. נמצאו זרעים היכולים להיות מאולחים בחיידק, אך הנבטים הגדלים מזרעים אלה היו חופשיים מהחיידק. בנוסף פותחו פרוטוקולים לגילוי החיידק ברקמת הפלואם ע"י סימון פלורוסנטי FISH וע"י PCR כמותי-qPCR.

מבוא ותאור הבעיה

בשנים האחרונות דווח על מחלה קשה הפוגעת בגידול הגזר בדרום הארץ, בשרון ובעמקים. המחלה התבטאה בצהבון העלים ובפריצות צימוח רבות שהזכירו מחלות שגורמיהן פיטופלסמה או ספירופלסמה המופצות לרוב ע"י ציקדות. בבדיקות מיקרוסקופיות של צמחי גזר נגועים בצהבון נצפו כבר בשנת 1995 תאי שיפה עמוסים בחלקיקי פיטופלסמה. אף על פי זאת, הבדיקות שנעשו לאחרונה במעבדותינו בשיטות של PCR בקרב צמחי גזר נגועים, התברר כי גורמי מחלה מסוג הפיטופלסמה או הספירופלסמה נמצאו רק בחלק מהצמחים שהראו תסמיני מחלה. מסוירים שערכנו בשטח, יכולנו להבחין כי בחלקות הגזר הנגועות בצהבון בדרום (עלומים) נמצאו פסילות רבות ומעט מאוד ציקדות. בעקבות כך, הוצע לבדוק את האפשרות של מעורבות חיידק הליברובקטר במחלת הגזר. בדיקות ראשוניות, באמצעות פרימרים סגוליים לחיידק הזה, של מיצויי DNA מצמחי גזר נגועים לא העלו דבר אך ממידע שהצטבר בעבר לגבי ריכוזי חיידק גבוהים בווקטור בכמה מערכות אחרות חזרנו ובדקנו את נוכחות החיידק במיצויי פסילות מחלקות נגועות. ואומנם נמצא כי הפסילות נשאו ריכוזי ליברובקטר גבוהים מצב שאישר את ההשערה שהועלתה כי גורם המחלה אינו פיטופלסמה או ספירופלסמה אלא החיידק ליברובקטר, מין חיידק קרוב לחיידקי הליברובקטר המוכרים בהדרים ובתפוחי אדמה.

לאחרונה התגלה כי גם מחלת תפוחי אדמה, המוכרת בשמות שונים כולל צהבון וכן גם מחלת הזברה ציפס, אף היא נגרמת על ידי מין קרוב של ליברובקטר המועבר על ידי פסילה, הדומה במאפיינים רבים לחיידק הגורם למחלת הגרינינג בהדרים. גורם המחלה החדש התגלה בטקסס וניוילנד. בניוילנד גרמה המחלה לנזקים בעגבניות ופלפל ובעקבות זאת הוטל מיד הסגר ונחסם היצוא משם של כל הגידולים הסולניים הרגישים לאוסטרליה, פיגי ויפאן.

במחקר זה, התקבלו ממצאים ראשוניים המראים כי מחלת צהבון הגזר, נגרמת על ידי גורם מחלה מסוג הליברובקטר המתרבה ונפוץ בפסילת הגזר. מהבדיקות שערכנו התברר כי הן הפסילות אשר נאספו משדה גזר נגוע והן צמחי גזר שהראו סימפטומים ברורים של צהבון הגזר נשאו חיידקי ליברובקטר. מאידך, ברוב הצמחים הללו לא נמצאו קטעי גנום מתאימים של גורמי מחלה מסוג הפיטופלסמה או ספירופלסמה, מצב הקושר את מחלת צהבון הגזר לנגיעות בליברובקטר.

הבדיקות המולקולאריות שעשינו הראו כי חיידק הליברובקטר בגזר היה זהה ברצף לרצף של החיידק שוכן-שיפה הידוע בשם '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Lso), הגורם למחלת הזברה ציפס בתפוחי אדמה בטקסס, קליפורניה וניוילנד. יצוין כי הופעת המחלה בניוילנד גרמה לחסימת יצוא תפוחי האדמה וירקות סולניים כולל עגבניות ופלפל בגלל החשש להפצת הליברובקטר בארצות אליהם יועדה התוצרת הזו.

מטרות המחקר

המחקר אושר לתקופה של שנתיים, אשר במהלכן ברצוננו ללמוד על מעורבות החיידק ליברובקטר במחלת הצהבון בגזר. המידע אשר יתקבל במחקר זה בסיס חיוני לשלב הבא לצורך פיתוח גישות להתמודדות עם המחלה ועם גורם המחלה. המטרות הספציפיות של המחקר הן:

- לימוד האטיולוגיה של מחלת "צהבון הגזר" ומעורבות החיידק ליברובקטר במחלה.
- בחינת העברת החיידק בזרעים אמיתיים של גזר.
- פיתוח אמצעי זיהוי רגישים וספציפיים למחלה.

פירוט עיקרי הניסויים

לימוד האטיולוגיה של מחלת "צהבון הגזר" ומעורבות החיידק ליברובקטר במחלה:

מחלקות גזר נגועות במחלת הצהבון ואשר הצמחים היו מראים תסמיני מחלה בשלב מתקדם של מטאטא מכשפה (תמונה 1), נלקחו דוגמאות לצורך בדיקתם במעבדה לשלושת הפתוגנים הפוטנציאליים: פיטופלסמה, ספירופלסמה וליברובקטר. במהלך השנתיים של המחקר הזה נבדקו יותר מ 500 של צמחי גזר סימפטומטיים ויותר מ 70 צמחי גזר לא סימפטומטיים. בתור ביקורת לבדיקת חיידקי הפיטופלסמה והספירופלסמה, נדגמו 5 גפנים מכרמים מרמת הגולן אשר מראים תסמיני מחלה אופייניים למחלת הצהבון הנגרמת ע"י הפיטופלסמה סטולבור וארבעה עצי הדר מעלומים כפר מימון עם תסמינים של מחלת העלעלת הנגרמת ע"י חיידק הספירופלסמה.

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



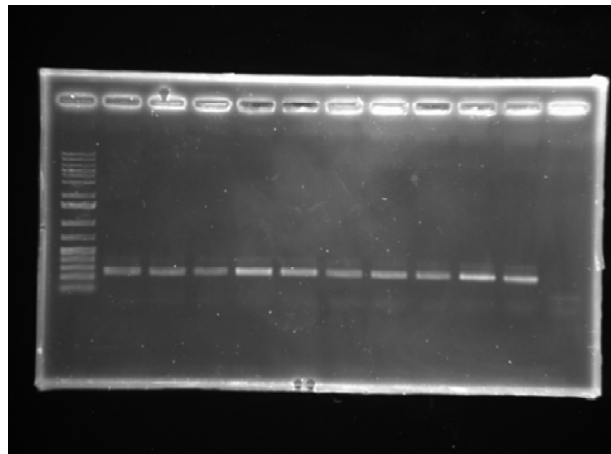
תמונה 1: צמחי גזר נגועים במחלת הצהבון עם תסמיני מחלה של איבוד שלטון קודקודי שלב מתקדם הידוע במטאטא מכשפה.

התוצאות שהתקבלו (טבלה 1) הראו כי כול מרבית (87%) הצמחים הסימפטומטיים וגם חלק (18%) מהצמחים הלא סימפטומטיים היו נגועים בחיידק הליברובקטר. רק שני צמחים סימפטומטיים הכילו את חיידק הספירופלסמה. אף לא צמח אחד הכיל את חיידק הפיטופלסמה. הביקורות של הגפן עם מחלת הצהבון וההדרים עם מחלת העלעלת הכילו את החיידקים פיטופלסמה וספירופלסמה, בהתאמה. נציין כי צמחי הגזר אשר נבדקו במהלך המחקר היו בעיקר משני מקומות בארץ: סעד בדרום, ושלוחות בצפון.

תוצר ה-PCR אשר התקבל בבדיקת הליברובקטר מהגזר הסימפטומטי נשלח מדי פעם לקביעת רצף ע"י מעבדות חי בע"מ ברחובות וזאת על מנת לאמת כי ה-DNA תוצר ה-PCR שהתקבל מקורו בחיידק הליברובקטר. התוצאות שהתקבלו הראו כי רצף ה-DNA היה תואם ב-100% לרצף החיידק הליברובקטר הקיים ב-GenBank ואשר מקורו מחיידק הליברובקטר של תפוחי האדמה.

טבלה 1: סיכום בדיקות של צמחי גזר לחיידקים פוטנציאליים למחלת הצהבון.

אחוז נגיעות (החיידק הדומיננטי)	ליברובקטר (גרינינג)	ספירופלסמה	פיטופלסמה	ס"ה	
87	451	2	0	516	גזר סימפטומטי
18	14	0	0	78	עצים לא סימפטומטי
100	לא נבדק	לא נבדק	5	5	גפנים עם צהבון
75	לא נבדק	3	לא נבדק	4	הדרים עם עלעלת



תמונה 2: בדיקת PCR לצמחי גזר נגועים במחלת הצהבון עם תסמיני מחלה של איבוד שלטון קודקודי שלב מתקדם-מטאטא מכשפה. דוגמא ראשונה מצד ימין בגיל: בדיקת PCR לצמח גזר ללא תסמיני מחלה.

בחינת העברת החיידק בזרעים אמיתיים של גזר:

בעבר היה מקובל כי חיידקים שוכני שיפה אינם עוברים בזרעים, לאחרונה הייתה טענה כי חיידקי ליברובקטר התוקף הדרים מועברים בזרעים, וזאת מאחר ונמצא שחלק מהשתילים שצמחו מזרעים שנאספו מפרות נגועים נשאו את הגורם.

במחקר שלנו בדקנו באם זרעי גזר יכולים גם הם לשמש כמקור להפצת חיידקי הליברובקטר. נבדקו זרעים של 10 זני גזר שונים באמצעות PCR. הזרעים של זן אחד הנקרא מאיסטרו (מקורו ביבוא מארצות אירופה) התקבל תוצר PCR ספציפי לחיידק הליברובקטר, הזרעים של שאר הזנים היו נקיים. תוצאה זו יכולה להעיד כי הזרעים של הזן מאיסטרו הם מאולחים בחיידק. לתוצאה זו יש משמעות מדעית חשובה, כי היא יכולה להעיד כי החיידק נמצא בגידול הגזר בארצות אירופה.

על מנת לבדוק באם זרעים מאולחים בחיידק עלולים להנביט צמחים נגועים בחיידק, אנחנו הנבטנו את הזרעים (תמונה 3) והצמחים שנבטו נבדקו באמצעות PCR לנוכחות החיידק ליברובקטר. התוצאות שהתקבלו הראו כי הצמחים היו חופשיים מהחיידק, כלומר החיידק אינו מאלח את הנבטים.



תמונה 3: נבטים של גזר מקורם מזרעים מאולחים בחיידק הליברובקטר. הנבטים נבדקו לנוכחות חיידק הליברובקטר ונמצאו חופשיים מהחיידק.

בחינת הפצת החיידק באמצעות פסילות:

להבדיל מפיטופלסמה וספירופלסמה המועברות ע"י ציקדות, חיידק הליברובקטר מועבר באמצעות פסילות. לפיכך, במחקר שלנו הצענו לעסוק בעיקר בניסויי העברה באמצעות פסילות.

מחלקות גזר נגועות במחלת הצהבון אספנו פסילות בוגרות. איסוף פסילות בוצע בעזרת רשת לכידת מזיקים מחלקות הגזר מחוות עדן וסעד. הפסילות שימשו להפקת DNA ולבדיקת החיידק ליברובקטר בעזרת PCR. התוצאות של ה-PCR שהתקבלו (תמונה 4) וגם תוצאות קביעת הרצף של תוצר ה-PCR הראו חד משמעית שהפסילות הכילו את החיידק ליברובקטר. בשנה השנייה של

המחקר הצטרף למיזם מחלת הצהבון בגזר (פרויקט שרץ במקביל למחקר זה) חוקר מהמחלקה לאנטומולוגיה, דר' מוראד גאנס, ובמסגרת המיזם הוא התכוון לבצע את הניסויים של ההעברה של החיידק על ידי פסילות. לכן במחקר הזה לא המשכנו בניסויים של ההעברה על ידי פסילות ובמקומם ביצענו ניסיונות ראשוניים להעברת החיידק על ידי כשות כפי שיתואר בהמשך.

תמונה 4: בדיקת PCR לפסילות אשר נאספו מחלקת גזר נגועה במחלת הצהבון.

העברה ע"י כשות:

הטפיל כשות (*Cuscuta*) הוא צמח טפיל שמאפשר העברת גורמי מחלה שוכני שיפה ע"י יצירת גשר פלסמטי בין צמחים. במחקר זה בוצעו ניסויים ראשוניים להעברת גורם המחלה מגזר נגוע לווינקת בריא וצמחי עגבנייה ופלפל (סולניים). המטרה היא לבדוק באם החיידק הליברובקטר הנמצא בגזר נגוע עלול לעבור לגידולים חקלאיים אחרים. בחרנו בסולניים כי ידוע מהספרות המקצועית שחיידק הליברובקטר התגלה לראשונה בגידולים סולניים כמו תפוחי אדמה. הניסויים בוצעו בבתי גידול מבוקרים במחלקה לפתולוגיה של צמחים. נאספה כשות משדות בר והונחה על עציצים בהם נבטו גזר נגוע בצהבון, וינקת בריאה, פלפל בריא ועגבנייה בריא. כעבור שלושה שבועות, ולאחר שווידאנו כי הכשות נבטה על הצמחים האלה (תמונה 5), נעשו בדיקות PCR לצורך גילוי חיידק הליברובקטר התוצאות הראשוניות שהתקבלו הראו כי חיידק הליברובקטר התגלה בצמחי הגזר, הכשות, הווינקת והעגבנייה. נציין כי הניסיונות האלה החלו בתום תקופת המחקר אך יימשכו גם לאחר סיום המחקר.

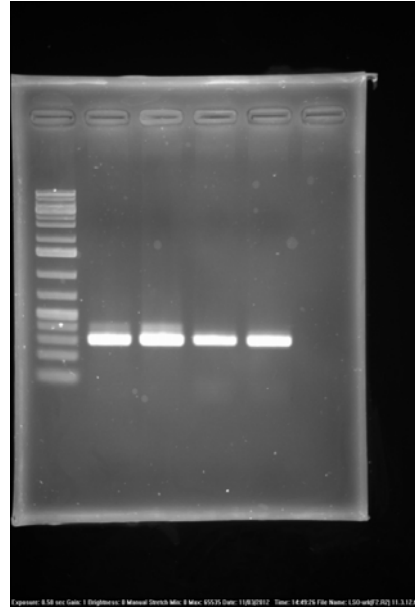


תמונה 5: כשות גדל על שתילים של גזר נגוע בצהבון, וינקה, פלפל ועגבנייה.

פיתוח אמצעי זיהוי רגישים וספציפיים למחלה:

גילוי החיידק באמצעות PCR:

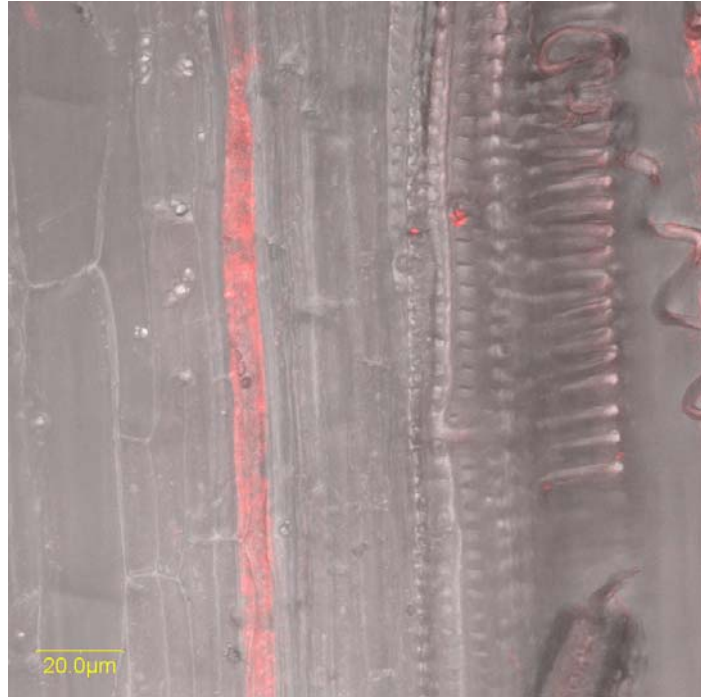
בדרך כלל, במהלך זיהוי החיידק הפתוגני באמצעות PCR, במיוחד nested-PCR, ע"י פריימרים המגבירים מקטעי רצף של RNA ריבוזומלי, קיים חשש של קבלת תוצרי PCR לא ספציפיים שמקורם מחיידקים מזהמים. לכן חשוב כי האמצעים אשר ישמשו לדיאגנוסטיקה יהיו רגישים וספציפיים במידה מקסימאלית. במחקר שלנו עסקנו בפיתוח מערכות הגברה המבוססות על מקטעי רצף סגוליים לחיידקים אלה. נכון להיום יש בידינו רצפים של פריימרים אשר הוכחו כיעילים במתן תוצאות אמינות של PCR היכולות לשמש לגילוי חיידק הליברובקטר (תמונה 6). על מנת לבצע בדיקות PCR למספר רב של דוגמאות, כויל פרוטוקול בו ניתן לבצע את ריאקציות ה-PCR ישירות על הרקמה הצמחית ללא צורך בהפקות של DNA כללי של הצמחים הנבדקים. ה-PCR הישיר בוצע תוך כדי השימוש בערכה Phire Plant Direct PCR Kit של חברת Finnzymes.



תמונה 6: בדיקת PCR לצמחי גזר נגועים במחלת הצהובן תוך כדי השימוש בפריימרים אשר סונתזו לפי רצף חיידק הליברובקטר הקיים במאגר הגנים העולמי והמדביק תפוחי-אדמה.

In situ hybridization פלורוסנטית

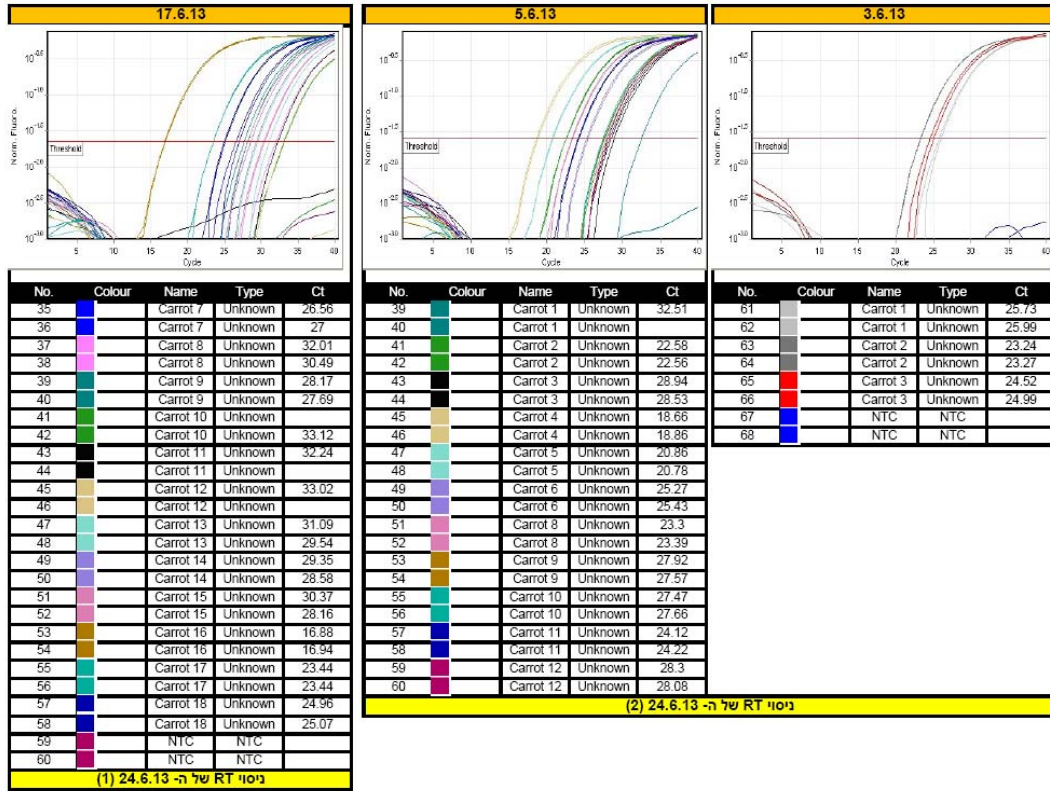
חיידק הליברובקטר נמצא בצמחים הנגועים בריכוז נמוך ברקמות השיפה, דבר שמקשה את הליך הדיאגנוסטיקה וחקר הפתוגן. לגילוי חלקיקי ספירופלסמה נדרש לפעמים ביצוע PCR נוסף (nested-PCR) להגברה נוספת של תוצר ה-PCR הראשוני. על אף היותן רגישות, שיטת הגילוי באמצעות PCR יכולה להיות מסובכת ומתסכלת בשל זיהומים עם DNA העלולים להתרחש במהלך האבחון במיוחד במעבדות העוסקות באופן רוטיני בדיאגנוסטיקה של פתוגנים אלה. במטרה לגלות חיידק הליברובקטר ברקמות צמחים נגועים פיתחנו שיטה של *Fluorescent in situ hybridization* (FISH) המבוססת על השימוש בפריימר מסומן במולקולה פלורוסנטית (Cy3). השיטה נוסתה על חתכי אורך של גבעולים או פטוטרות עלים בעובי של כ-1 מ"מ ובאורך כ-1.5 ס"מ. נמצא כי ניתן היה להבחין בסימון פלורוצנטי ברקמה אשר מקורה בגזר עם תסמיני מחלה (תמונה 7) אך לא בגבעולים או פטוטרות עלים אשר מקורם מצמחים לא סימפטומטיים.



תמונה 7: צילומים במיקרוסקופ קונפוקאלי של חתכי אורך של פטוטרט עלה של שתיל גזר נגוע במחלת הצהבון. בניסוי השתמשנו בפריימר משלים לרצף הליברובקטר מסומן במולקולה פלורוצנטית (Cy3).

פיתוח מערכת Real Time PCR לגילוי החיידק:

בחודשיים האחרונים של המחקר התחלנו בפיתוח של מערכת Real-Time PCR (נקראת גם qPCR) לצורך גילוי החיידק בצמחים סימפטומטיים. במסגרת התקופה הזו נעשו ניסויים ראשוניים אשר מטרתם הייתה לכייל את המערכת המבוססת על Cyber green PCR. לאחר הכיול נבחר הגן של Tubulin כגן צמחי אנדוגני המשמש לצורך ביקורת. בנוסף כוילה מערכת לגילוי החיידק בצמחים של גזר אשר ערכי ה-CT בה נעו בעיקר בין 19 ל-26 אם כי ישנם דוגמאות שרכי ה-CT שלהם היו יותר או פחות מערכים אלה (תמונה 8). כאמור כיול המערכת נעשה בתום תקופת המחקר הזה ומשך הפיתוח והשימוש במערכת זו ייעשה במסגרת פרויקט מיזם הגזר הנעשה במקביל למחקר זה.



תמונה 8: תוצאות של שלושה ניסויים של Real-Time PCR אשר נעשו במטרה לגלות חיידק ליברובקטר מצמחי גזר אשר נאספו מהשדה.

סיכום ודין

בשנים האחרונות דווח על מחלה קשה הפוגעת בגידול הגזר בדרום הארץ, בשרון ובעמקים. המחלה התבטאה בצהבון העלים ובפריצות צימוח רבות שהזכירו מחלות שגורמיהן פיטופלסמה או ספירופלסמה המופצות לרוב ע"י ציקדות (Lee *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2009). ראוי לציין כי בבדיקות מיקרוסקופיות של צמחי גזר נגועים בצהבון שהתקבלו במעבדת טולקובסקי מבית שאן נצפו כבר בשנת 1995 על ידי מר אנדרי פרנק ומשה בר-יוסף (מידע אישי) תאי שיפה עמוסים בחלקיקי פיטופלסמה. מאידך, הבדיקות שנעשו בשיטות של PCR בקרב צמחי גזר נגועים במסגרת המחקר הזה התברר כי גורמי מחלה מסוג הפיטופלסמה או הספירופלסמה כמעט ולא נמצאו בצמחים שהראו תסמיני מחלה. מסוירים שערכנו בשטח, יכולנו להבחין כי בחלקות הגזר הנגועות בצהבון בדרום (עלומים) ובצפון (שלוחות) נמצאו פסילות רבות ומעט מאוד ציקדות. המידע הזה עורר את החשד כי צהבון הגזר אינו נגרם על ידי פיטופלסמות או ספירופלסמות המועברות ע"י ציקדות, אלא כנראה על ידי מיקרואורגניזם המועבר ע"י פסילות, דוגמת חיידקי הליברובקטר. הממצאים של המחקר הזה אימתו את ההשערה הזו. במחקר זה מוצגים ממצאים המראים קורלציה ברורה בין הופעת התסמינים של מחלת צהבון הגזר ובין נוכחות החיידק מסוג הליברובקטר המתרבה ונפוץ בפסילת הגזר. מהבדיקות שערכנו בתקופת המחקר הזה (שנתיים) התברר כי צמחי גזר שהראו סימפטומים ברורים של צהבון נשאו חיידקי ליברובקטר אך לא פיטופלסמה ולא ספירופלסמה. נציין גם כי בחלק קטן מהצמחים שאינם מראים תסמיני מחלה הכילו חיידק הליברובקטר, אולי בשל הדבקה מאוחרת של הצמחים בחיידק שטרם גרמה לביטוי התסמינים. הבדיקות המולקולאריות שנעשו הראו כי חיידק הליברובקטר בגזר היה זהה ברצף לרצף שדווח בשנתיים האחרונות לגבי חיידק שוכן-שיפה הידוע בשם *(Lso) Ca. L. solanacearum* הגורם למחלה הקשה זברה צ'יפס בתפוחי אדמה שדווחה בתקופה האחרונה מטקסס, קליפורניה וניוזילנד (Munyanza *et al.*, 2007; Secor *et al.*, 2009). יצוין כי הופעת המחלה בניוזילנד גרמה לחסימת יצוא תפוחי האדמה וירקות סולניים כולל עגבניות ופלפל בגלל החשש להפצת הליברובקטר בארצות אליהם יועדה התוצרת הזו. הניסויים הראשוניים אשר ערכנו במטרה להעביר את גורם המחלה באמצעות כשות נמצא כי החיידק הנמצא בגזר יכול לעבור לצמחי עגבנייה במידה ויימצא ווקטור מתאים.

במחקר עסקנו בפיתוח שיטות PCR רגילות לגילוי החיידק בצמחים סימפטומטיים, פותחה גם מערכת של qPCR אשר נחשבת ליותר רגישה לגילוי החיידק הקיים באופן טבעי בריכוזים נמוכים ובפיזור בלתי אחיד בצמח הנגוע. על אף העובדה שפיתוח המערכת היה בסוף התקופה הקצרה של המחקר (שנתיים), אנחנו נמשיך בפיתוח וביישום המערכת במסגרת המיזם של צהבון הגזר.

על מנת לגלות חיידק הליברובקטר ברקמות צמחים נגועים פיתחנו שיטה של FISH המבוססת על השימוש בפריימר מסומן במולקולה פלורוסנטית (Cy3). השיטה נוסתה על חתכי אורך מפטוטרות עלים או גבעולים דקים בעובי של כ-1 מ"מ ובאורך כ-1.5 ס"מ. נמצא כי ניתן היה להבחין בסימון פלורוצנטי ברקמה אשר מקורה בצמחי גזר עם תסמינים של מחלת הצהבון אך לא בצמחים ללא תסמינים. בנוסף, לפי תוצאות ה-FISH ניתן היה להסיק כי החיידק אינו נמצא בפיזור אחיד

ברקמת הפלואם. נציין גם כי מבין כול 30 חתכים אשר נבדקו היו בממוצע 2 חתכים אשר ניתן היה לגלות בהם צביעה פלורוסנטית. תוצאות אלו מעידות כי חיידק הליברובקטר נמצא בצמחים הנגועים בריכוז נמוך ובפיזור בלתי אחיד ברקמות השיפה, דבר שמקשה את הליך הדיאגנוסטיקה וחקר הפתוגן.

בסך הכול היצוא של גזר ישראלי לאירופה הגיע לאחרונה ל-40 אלף טון ולסכום של כ-55 מיליון שקל. מחלת הצהבון היא מחלה המאיימת לחלוטין על היצוא של גזר. מדובר בגידול אשר התנופה שלו גדלה עם הזמן הן בהיקף השטחים והן בהיקף היבול ליצוא. מחלת הצהבון עלולה להביא לנזקים היכולים להגיע עד כדי 50% פגיעה באיכות ובכמות היבול. המחקר הזה הביא לגילוי חיידק הליברובקטר בצמחי גזר נגועים במחלת הצהבון. בעתיד המחקר צפוי להביא לצמצום ההפצה של המחלה בשדה, להקטנת הנזקים הנגרמים מהמחלה ובהתאם לכך לשיפור איכות ורמת היבול של הגידול.

ביבליוגרפיה

1. Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R, Paine TD. 2008. A new Huanglongbing Species, "Candidatus *Liberibacter psyllaurous*," found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5862-5865.
2. Lee IM, Martini M, Bottner KD, Dane RA, Black MC, Troxclair N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93:1368-1377.
3. Li W, Abad JA, French-Monar RD, Rascoe J, Wen A, Gudmestad NC, Secor GA, Lee IM, Duan Y, Levy L. 2009a. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' in potato plants with zebra chip. *J. Microbiol. Methods* 78:59-65.
4. Liefting LW, Weir BS, Pennycook SR, Clover GR. 2009. 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family Solanaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2274-2276.
5. Munyaneza JE, Crosslin J, Upton JE. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with 'Zebra Chip', a New Potato Disease in Southwestern United States and Mexico. *J. Econ. Entomol.* 100:656-663.
6. Secor GA, Rivera VV, Abad JA, Lee I-M, Clover GRG, Liefting XL, Li W, De Boer SH. 2009. Association of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' with Zebra Chip Disease of Potato Established by Graft and Psyllid Transmission, Electron Microscopy, and PCR. *Plant Dis.* 93:574-583

סיכום עם שאלות מנחות

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

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <ul style="list-style-type: none"> • לימוד האטיולוגיה של מחלת "צהבון הגזר" ומעורבות החיידק ליברובקטר במחלה. • בחינת העברת החיידק בזרעים אמיתיים של גזר. • פיתוח אמצעי זיהוי רגישים וספציפיים למחלה
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות.</p> <p>מחלקות גזר נגועות במחלת הצהבון ואשר הצמחים היו מראים תסמיני מחלה בשלב מתקדם של מטאטא מכשפה, נבדקו לשלושת הפתוגנים הפוטנציאליים: פיטופלסמה, ספירופלסמה וליברובקטר. הצמחים הסימפטומטיים מרביתם היו נגועים בליברובקטר ורק במקרים בודדים נמצאה נגיעות בספירופלסמה. פותחו שיטות PCR ו-qPCR אמינות לגילוי החיידק בצמחים. נבדקה האפשרות של העברת החיידק ע"י זרעים של גזר. פותחו פרוטוקולים לגילוי החיידק ברקמת הפלואם ע"י סימון פלורוסנטי FISH וע"י PCR כמותי- qPCR.</p>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p> <p>קיימת קורלציה ברורה בין המחלה לבין נוכחות החיידק ליברובקטר אך לא לבין החיידקים פיטופלסמה וספירופלסמה. פותחו שיטות PCR ו-qPCR אמינות לגילוי החיידק בצמח. נמצאו זרעים היכולים להיות מאולחים בחיידק, אך הנבטים הגדלים מזרעים אלה היו חופשיים מהחיידק. בעתיד המחקר צפוי להביא לצמצום ההפצה של המחלה בשדה, להקטנת הנזקים הנגרמים מהמחלה ובהתאם לכך לשיפור איכות ורמת היבול של הגידול.</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון /או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר?</p> <p>להמשיך בביצוע ניסויים של העברת החיידק בין צמחים של גזר וסולניים באמצעות כשות. להמשיך בפיתוח ויישום שיטת ה-qPCR על מנת לבדוק פיזור החיידק בחלקי צמח שונים.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p> <p>אין</p>
<p>פרסום הדוח:</p> <p>אני מבקש לא לפרסם את הדוח: הממצאים הם חסויים ופרסום שלהם עלול להזיק לייצוא של גזר ותוצרת חקלאית של גידולים סולניים כמו תפוחי אדמה, פלפל ועגבנייה.</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא</p>

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