

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 20-15-0033

דרכים להתמודדות עם מחלת הגרב בתפוחי אדמה הנגרמת ע"י *Streptomyces* spp.

Prevention of potato common scab caused by *Streptomyces* spp.

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

שולמית מנוליס, לאה צרור, לאורה צ'לופוביץ, מיכל ראובן, אורית דרור, מרינה חזנובסקי ואורלי ארליך
המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן וגילת

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

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר  תאריך 1.4.19

תוכן העניינים

2	תקציר
3	מבוא ותאור הבעיה
4	מטרות המחקר
5	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר
5	א. בידוד, הגדרת המינים ואיפיון אוכלוסיות החיידקים הגורמים למחלת הגרב בתפוז"א
9	ב. השפעת טיפולי הדברה על התעצמות המידבק בקרקע ועל כושר ההתבססות
11	ג. פיתוח פרוטוקול לחיזוי נגיעות הקרקע בגרב
19	דיון ומסקנות
20	ספרות מצוטטת
20	פרסומים מדעיים

תקציר

1. הצגת הבעיה: בשנים האחרונות עלתה בארץ שכיחות מחלת הגרב (סטרפטומיצטים) בתפוחי אדמה ובאגוזי אדמה. פקעות תפוז"א לזריעה הינן המקור העיקרי להפצת הפתוגן. אמצעי ההדברה כמו חיטוי קרקע אינם יעילים דיים, יקרים ופוגעים בסביבה. מטרת המחקר: לפתח אמצעים לצמצום נגיעות תפוז"א בגרב וזאת ע"י איפיון אוכלוסיות החיידקים הגורמים למחלה, בדיקת השפעת טיפולי ההדברה על התעצמות המידבק ופיתוח פרוטוקול לחיזוי נגיעות הקרקע בגרב.
2. שיטות העבודה: בידוד החיידקים מפקעות תפוז"א ממקורות שונים, איפיון בשיטות מולקולריות ומיקרוביולוגיות, ביצוע מבחני פתוגניות בתפוז"א (דיסקיות) ובצנונית (זרעים וצמחים) ופיתוח פרוטוקול לגילוי החיידקים באמצעות quantitative real-time PCR עם פריימרים המבוססים על הטוקסין טקסטומין.
3. תוצאות עיקריות: הוכן אוסף הכולל 152 תבדידי סטרפטומיצטים שמקורם מפקעות נגועות מגידול מקומי ומיבוא מאירופה וכן מגידולים אחרים כמו אגוזי אדמה. האוסף אופיין בשיטות מולקולריות שונות ובאמצעות שלושה מבחני פתוגניות. במבחן המבוסס על עיכוב נביטה של זרעי צנונית שיעור ההתאמה עם תוצאות ה-PCR היה הגבוה ביותר. נמצאו מספר מינים של סטרפטומיצטים כאשר ארבעה מהם נפוצים גם באירופה. לנציגים של מינים אלו נעשה בימים אלו ריצוף הגנום. בשני ניסויים שונים נבדקה מידת ההישרדות של 6 תבדידים שונים בקרקעות לס וחול. לא נמצא הבדל משמעותי בין התבדידים השונים אך שיעור תסמיני גרב בחול היה גבוה יותר בהשוואה ללס. פותח פרוטוקול לגילוי סטרפטומיצטים בקרקע באמצעות qPCR ונמצא כי ניתן לגלות בעזרתו מעל 10^3 חיידקים פתוגניים ל-2 גרם קרקע. מתוך 304 קרקעות החשודות כנגועות בגרב ברמות שונות, 137 נמצאו חיוביות, כאשר בכל הקרקעות בהן נאספו פקעות עם סימני גרב התקבלו תוצאות חיוביות.
4. מסקנות והמלצות: איפיון אוכלוסיית הסטרפטומיצטים הפתוגניים בקרקע בארץ מצביע על שונות גבוהה ועל נוכחות מינים שונים המצויים גם באירופה. נוכחות אוכלוסיות סטרפטומיצטים לא פתוגניים ברמה גבוהה בקרקעות מקשה על בידוד וזיהוי הפתוגנים ואיתור קרקעות נגועות. הפרוטוקול שפותח לבדיקת נגיעות בגרב נמצא יעיל ומהיר בהשוואה לשיטות אחרות. בדיקת קרקעות שונות מחלקות מסחריות בנגב מראה שניתן להשתמש בפרוטוקול זה לגילוי מוקדם של קרקעות נגועות בגרב וככלי תומך החלטה לגבי השימוש או הטיפול בקרקעות אלו.

מבוא ותאור הבעיה

חיידקים גרם חיוביים מהסוג *Streptomyces* (סטרפטומיצטים) נפוצים מאוד בקרקע כספרופיטים. בסוג זה מוכרים מינים רבים אולם רק מקצתם הינם פתוגניים לצמחים, הגורמים למחלות המסכות נזק כלכלי משמעותי. מחלת הגרב בתפוחי אדמה (common scab), הנפוצה בכל אזורי הגידול בעולם, נחשבת אחת מבין חמש המחלות החשובות ביותר בגידול תפוחי אדמה. המחלה גורמת לפגיעה באיכות הפקעות המיועדות לשווק כתוצרת טרייה או לתעשייה וזאת עקב היווצרות כיבים על פניהן. כיבים אלה יכולים להיות שטוחים, עמוקים (deep-pitted) או דמויי יבלות. נגיעות במחלה עלולה גם לגרום לירידה ביבול כתוצאה מעיכוב התפתחות הפקעות והגדלת מספר הפקעות. לסטרפטומיצטים מחוללי מחלת הגרב טווח פונדקאים רחב, הכולל בנוסף לתפוח"א גם סלק, גזר, צנוניות, אגוזי אדמה, בטטה ועוד גידולי שורש. מחוללי הגרב בתפוח"א מסוגלים לשרוד בקרקע מעל 12 שנים גם ללא נוכחות פונדקאי. החיידקים מועברים ומופצים ביעילות גבוהה במיוחד באמצעות פקעות תפוח"א לזריעה ובאמצעים נוספים כגון כלי עיבוד, רוחות וסופות חול.

גורם הפתוגניות היחיד המוכר במחלת הגרב הוא הטוקסין thaxtomin הדרוש ליצירת הסימפטומים האופייניים על גבי פקעות תפוח"א. נמצא קשר ישיר בין כמות הטוקסין המיוצר ע"י החיידקים לעוצמת הוירולנטיות על פקעות תפוח"א. כל המינים הפתוגניים הידועים כיום נושאים צבר גנים לביוסינתזה של הטוקסין הנמצא על אי-פתוגניות גדול (Pathogenicity island). דיווחים בספרות הראו כי אי-פתוגניות יכול לעבור מתבדידי סטרפטומיצטים פתוגניים לתבדידים ספרופיטיים, תופעה היכולה להסביר הופעת מינים פתוגניים חדשים.

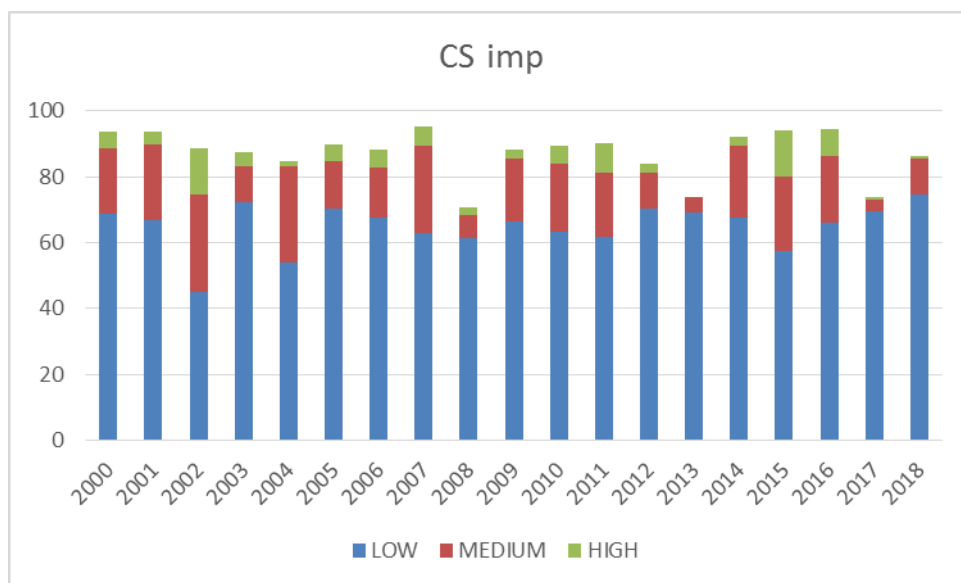
במהלך השנים הוצעו מספר אמצעי הדברה להתמודדות עם המחלה ביניהם: הגדלת רטיבות הקרקע בזמן יצירת הפקעות, הורדת pH הקרקע, מחזור גידולים, טיפולי קרקע בפורמלין, כלורופיקרין ותוספי קרקע אורגניים, הדברה ביולוגית וטיפול בזרעים עם כימיקלים שונים. אולם כל האמצעים הללו אינם יעילים דיים ותוצאות היישום אינן הדירות.

בארץ, מחלת הגרב דווחה לראשונה ב-1972 באזור חבל מעון במערב הנגב. בשנים האחרונות עלתה שכיחות המחלה בתפוח"א וגם באגוזי אדמה. נזקים חמורים במיוחד של המחלה מתרחשים באזור חבל מעון ממספר סיבות, ביניהן, גידולים רגישים נוספים במחזורי הרוטציה, קרקעות המעודדות את המחלה (קונדיוסיביות) והיעדר אמצעי הדברה יעילים. פקעות תפוח"א לזריעה הינן המקור העיקרי לנגיעות בפתוגן. ישראל מייבאת מדי שנה לעונת האביב כ-30,000 טון 'זרעים' מאירופה עם שיעור ניכר של אצוות נגועות בסטרפטומיצטים (ופתוגנים אחרים). זרעי היבוא מגיעים בעיקר מסקוטלנד, הולנד, צרפת וגרמניה. כנראה שהמינים הנפוצים באירופה הם אלה החודרים ומתבססים בארץ.

כפי שהוזכר לעיל מחוללי הגרב בתפוח"א מסוגלים לשרוד בקרקע שנים רבות ואכן קרקעות רבות בארץ מאולחות כבר בסטרפטומיצטים. הדברת המידבק הנישא בקרקעות מאולחות נסמכת בעיקר על חיטוי קרקע בפורמלין, שהוא התכשיר המקובל והנפוץ (בנפרד, או במשולב עם תכשירי חיטוי אחרים). לחיטוי בפורמלין עלויות גבוהות ומגבלות בשימוש בגלל רעילותו הגבוהה. בנוסף, בחלקות בהן נעשה שימוש חוזר בתכשיר, מתפתחת תופעה

של פירוק מואץ של החומר ע"י מיקרואורגניזמים אשר מפחיתה מאד את יעילותו של התכשיר. במקרים אלו אין פתרון חלופי וחלקות נגועות, המועדות לפירוק מואץ, נזנחות ולמעשה יוצאות ממאגר החלקות במחזור תפוא"א ואגוזי אדמה. פקעות הזריעה (ובעיקר אלה המיובאות לעונת האביב) מאולחות מאד במחוללי מחלת הגרב (איור 1). לכן, גם במקרים בהם אין בעיית פירוק מואץ יש חשש לאילוח מחדש ע"י פקעות זריעה נגועות. משום כך, ישנה חשיבות רבה לשימוש בחומר ריבוי חופשי ממחולל מחלת הגרב. עד כה לא נעשתה בארץ עבודה בסיסית מקיפה להגדרת אוכלוסיית הסטרפטומיצטים הגורמים למחלת הגרב בתפוא"א. המחקר המוצע יאפשר להגדיר את הטיפוסים השונים החודרים לישראל ולבדוק את יכולתם להתבסס בקרקעות בארץ. פיתוח פרוטוקול לבדיקת נוכחות גרב בקרקע יאפשר זיהוי מראש של קרקעות נגועות וייתן בידי המגדלים כלי תומך החלטה. לדוגמה, האם להשתמש בחלקה נתונה, להתאים זן רגיש לנגיעות הצפויה, האם לחטא או לא לחטא את הקרקע. כך תתייעל ההתמודדות עם המחלה ואף יצומצם השימוש בתכשירים לחיטוי קרקע ולטיפול בפקעות זריעה.

איור 1: איור המתאר את שיעור האצוות הנגועות בגרב מצוי - זרעי יבוא



נמוך=3 פצעים לפקעת, בינוני=4-7 פצעים לפקעת, גבוה= מעל 8 פצעים לפקעת

מטרות המחקר:

- בידוד, הגדרת המינים ואיפיון אוכלוסיות החיידקים הגורמים למחלת הגרב בתפוא"א.
- השפעת טיפולי הדברה על התעצמות המידבק בקרקע ועל כושר ההתבססות של טיפוסים חדשים.
- פיתוח פרוטוקול לחיזוי נגיעות הקרקע בגרב.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

א בידוד, הגדרת המינים ואיפיון אוכלוסיות החיידקים הגורמים למחלת הגרב בתפוז"א

מהלך הניסוי:

החיידקים בודדו מפקעות תפוזי אדמה נגועות עם תסמינים שונים האופייניים לגרב המצוי. הפקעות נאספו ממקורות שונים – פקעות זריעה מיבוא ממדינות שונות ופקעות מקומיות ממשקים שונים בנגב. הפקעות חוטאו בהיפוכלורית במשך 10 דקות ויובשו היטב. מקטעים מפצעי הגרב הוסרו באמצעות סקלפל מעוקר ונאספו למבחנה המכילה סליין מעוקר. לאחר ריסוק הרקמה הצמחית וביצוע מיהולים עשרוניים, נזרעו 0.1 סמ"ק על מצע אמרסון (Emerson). צלחות הפטרי הודגרו למשך 10 ימים בטמפ' של 25 מ"צ ומושבות טיפוסיות של סטרפטומיצטים הועברו לצלחות נקיות להמשך העבודה. בנוסף, באותה דרך, בודדו סטרפטומיצטים מפונדקאים נוספים כמו אגוזי אדמה, צנונית וחרדל בר.

גידול החיידקים להפקת דנ"א נעשה על מצע אמרסון בטמפרטורה של 28 מ"צ למשך 7 עד 10 ימים. החיידקים נאספו מהצלחות בעזרת מקל דרגלסקי והפקת הדנ"א נעשתה עם קיט של חברת Epicentre (MasterPure complete DNA&RNA kit). PCR לדנ"א של התבדילים נעשה עם שלושה זוגות פריימרים המבוססים על הגנים הבאים: 1. הטוקסין *thaxtomin*, המקודד ע"י האופרון *txtAB* והגורם ליצירת הסימפטומים האופייניים; 2. הגן *nec1* האחראי ליצירת הנקרזה (*necrogenic phenotype*) בפקעות תפוז אדמה; 3. הגן *toma* המקודד לגורם וירולנטיות ההומולוגי ל-*tomatinase*.

איפיון התבדילים נעשה בכמה דרכים: 1. PCR עם פריימרים המבוססים על 16S rRNA ו-ITS rDNA, ניקוי תוצרי הראקציה מהג'אל עם קיט של Zymoclean Gel DNA Recovery, שליחה לריצוף במעבדות חי והשוואת הרצפים לבנק הגנים. 2. חיתוך תוצרי PCR של ITS עם אנזים הרסטרקציה *Hpy99I*. 3. Rep-PCR נעשה עם הרצפים החוזרניים ERIC, Rep ו-BOX. 4. PFGE - נבדקו כמה פרוטוקולים לאחר גידול החיידקים על מצע מוצק או נוזלי ובתנאי הרצה שונים. נבדק גם הפרוטוקול של (Kieser et al. 1992), אולם עד כה לא הצלחנו להפריד את הדנ"א. 5. איפיון בעזרת הגן *atpD* וחיתוך התוצרים באנזימים *HaeIII*, *CfoI* כפי שתואר ע"י Correa et al. (2015) נעשה ל-24 תבדילים.

נבחנו מספר פרוטוקולים למבחני פתוגניות: מבחן פתוגניות בדסקיות תפוזי אדמה *tuber slice assay* לפי Correa et al. (2015). פקעות מהזן ווינסטון (רגיש לגרב מצוי) נשטפו וחוטאו בהיפוכלורית למשך 8 דקות, נשטפו במים מעוקרים ויובשו. פרוסות תפוזי האדמה (8-10) הונחו בצלחות פטרי על גבי נייר סופג לח. במרכז הפרוסה חורר חור בעומק 3 מ"מ בקוטר 1.8 ס"מ, לתוכו הוכנס פלאג אגר (0.3 מ"מ) המכיל את תבדיד החיידק הנבדק. הצלחות הודגרו בטמפ' של 28 מ"צ למשך כשבוע. הערכת הנקרזה נעשתה 6 ימים לאחר הדבקה.

מבחן פתוגניות בצנונית לפי Wanner (2004). צמחי צנונית גודלו בעציצונים בתערובת שתלנות וחול (5 בלוקים, 2 עציצים לבלוק, 5-6 זרעים בכל עציץ). הדבקה בחיידקים נעשתה ע"י הוספה של רסק תבדיד החיידק שגודל בצלחת על גבי מצע אמרסון (בריכוז של 3×10^8 CFU/0.5 gr). תוצאות המבחנים נקבעו כחודשיים מהזריעה.

מבחן פתוגניות עם זרעי צנונית נעשה לפי (Dees et al. 2013). זרעי צנונית עוברים חיטוי בהיפוכלורית 0.5% למשך דקה, נשטפים מספר פעמים במים מעוקרים ומונחים על צלחות פטרי בהן תרביות של החיידקים הנבדקים לאחר גידול של 8 ימים על מצע שבולת שועל. עיכוב נביטה או עיוות הנבטים מעיד על פתוגניות של התבדיד הנבדק. באיור 2 ניתן לראות דוגמאות לתוצאות מבחני הפתוגניות השונים.

איור 2: דוגמא למבחני פתוגניות שונים



עיכוב נביטת זרעי צנוניות

דסקיות תפוחי אדמה



1. ביקורת
2. חיידק פתוגני

הדבקת צנונית בקרקע מאולחת בחיידק

תוצאות:

במהלך המחקר הכנו אוסף הכולל 152 תבדידים; בודדנו חיידקי גרב מפקעות נגועות ממקורות מקומיים ומיבוא, מאגוזי אדמה, צנונית וחרדל בר. האוסף כולל גם 5 תבדידי רפרנס שהתקבלו מצרפת. בטבלה 1 מתוארים הפרמטרים השונים המאפיינים את האוסף.

טבלה 1: איפיון האוסף של תבדידי סטרפטומיצטים שברשותנו לפי פרמטרים שונים

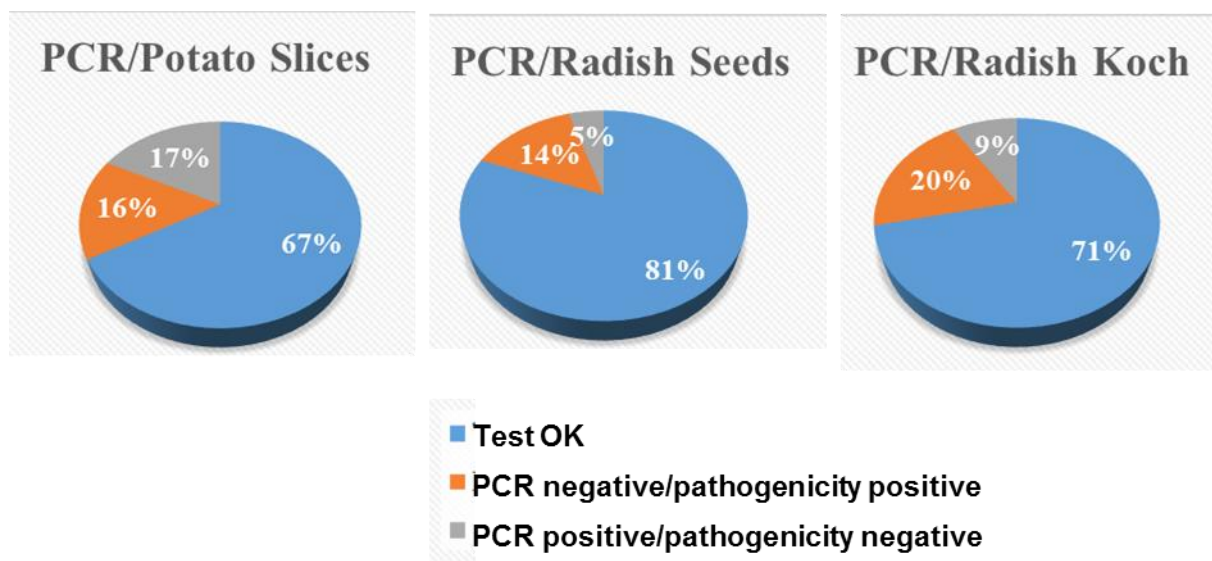
מספר התבדידים ותאור	הפרמטר
147	התבדידים שנאספו בארץ
5	תבדידי היחוס מצרפת
2015-2017, 2004-2007	שנות הבידוד
122	תבדידים מזני תפוחי אדמה: ניקולה, דזירה, מונדיאל,

	וינסטון, ויואלדי, סיפרה, ועוד
23	תבדידים מאגוזי אדמה
2	תבדידים מפונדקאים נוספים כמו צנונית, חרדל בר
צרפת, גרמניה, הולנד, סקוטלנד	מקור הפקעות לזריעה אביבית
יח"מ, נירים, גילת, עין השלושה, דורות, חלוצה, ניר יצחק ועוד	מקור הפקעות בארץ, פקעות בת לשיווק
51	התבדידים שהגיבו עם 3 זוגות הפריימרים
25	התבדידים שהגיבו עם 2 זוגות הפריימרים
31	התבדידים שהגיבו עם זוג פריימרים אחד
40	התבדידים שלא הגיבו ב-PCR
<i>S. scabiei</i> , <i>S. turgidiscabiei</i> , <i>S. europaeiscabiei</i> , <i>S. stelliscabiei</i> <i>S. griseus</i> , <i>S. sampsonii</i> , <i>S. venezuelae</i>	הגדרת המינים לפי ריצוף רנ"א ריבוזומלי 16S ו-ITS וחיתוך התוצר ITS באנזים הרסטריקציה Hpy99I

כל התבדידים נבדקו ב-PCR עם שלושת זוגות הפריימרים המבוססים על הגנים *tomA*, *nec1*, *txt*. מתוך 147 תבדידים שבודדו בארץ 51 הגיבו עם שלושת זוגות הפריימרים, 40 לא הגיבו ב-PCR ו-56 הגיבו עם 2 זוגות או זוג אחד. בסה"כ הגיבו 91 תבדידים עם הפריימרים לגן טקסטומין. מרבית התבדידים (122) בודדו מתפוחי אדמה והשאר מפונדקאים אחרים. חלק מהתבדידים אופיינו לפי ריצוף רנ"א ריבוזומלי 16S, ו-ITS וכן ע"י חיתוך תוצר ITS באנזים הרסטריקציה Hpy99I. החיתוך מאפשר להבחין בין המין *S. europaeiscabiei* (שאינו נחתך) לבין המינים *S. scabiei*, *S. turgidiscabiei*, *S. stelliscabiei* שבהם התוצר נחתך למקטעים שונים. ארבעת מיני הסטרפטומיצטים העיקריים שנמצאו עד כה בין התבדידים שבודדו על ידינו הם: *S. scabiei*, *S. turgidiscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*. אולם נמצאו גם מינים נוספים כמו *S. griseus* שבודד מאגוזי בשנים 2004-2007, *S. sampsonii* ו-*S. venezuelae* שבודדו מתפוזי א-ב-2016. איפיון של חלק מהתבדידים ב-rep-PCR נתן תוצאות עם הפריימרים של ERIC ו-BOX אולם לא נמצאה התאמה בין התבדידים כנראה בגלל השונות הרבה בין התבדידים השונים. ניסויים רבים נערכו לבדיקת האפשרות של איפיון תבדידי האוסף בשיטת ה-PFGE אולם עד כה לא הצלחנו לקבל הפרדה טובה של הדנ"א. יתכן ושיטות הליזיס לפירוק תאי חיידקי הסטרפטומיצטים, שהם גרם חיוביים, לא היו יעילות מספיק. בנוסף, בדקנו את האפשרות לאפיין את אוסף תבדידי סטרפטומיצטים בעזרת הגן *atpD*. אולם בבדיקה של 24 תבדידים לא נמצאה התאמה עם תבדידי הרפרנס ועם התוצאות שהתקבלו ברנ"א ריבוזומלי ולכן לא המשכנו לאפיין בשיטה זו את שאר תבדידי האוסף.

איפיון האוסף בשלושה מבחני פתוגניות (איור 2) נעשה עם 63 תבדידים מייצגים בהשוואה לתוצאות PCR שהתקבלו עם הפריימרים המבוססים על הגן המקודד לטקסטומין (איור 3). המבחן המבוסס על הופעת נקרוזה בפרוסות תפוז"א היה הפחות טוב מבין שלושת המבחנים. במבחן המבוסס על עיכוב נביטה או עיוות נבטים של זרעי צנונית אחוז ההתאמה עם תוצאות ה-PCR היה הגבוה ביותר (81%). בכל המבחנים היו תוצאות של false positive או false negative כאשר אחוזי אי ההתאמה היו הנמוכים ביותר במבחן עם זרעי צנונית. במבחן קוך המבוסס על הופעת כתמי גרב לאחר הדבקת צנוניות בקרקע מאולחת, אי ההתאמה הגיע ל-29%. מבחן זה אורך כחודשיים עד לקבלת התוצאות ולכן אינו מתאים לבדיקה רוטינית של פתוגניות התבדידים.

איור 3: ניתוח תוצאות שלושה מבחני פתוגניות בהשוואה לתוצאות ב-PCR



ריצוף תבדידי סטרפטומיצטים מייצגים. מכיוון שאוכלוסיית הסטרפטומיצטים מאוד מגוונת ואיפיון האוסף בשיטות שונות נותן תמונה חלקית בלבד החלטנו לרצף 4 טיפוסים מייצגים מהאוסף שבדדנו בארץ. הריצוף נעשה בשיטה החדשה שפותחה לאחרונה הנקראת Nanopore sequencing. בטכנולוגיה זו הריצוף נעשה על מולקולה בודדת של דנ"א המועברת דרך נקבובית (nanopore) במכשיר הריצוף. טכנולוגית ריצוף זו מאפשרת קבלת תוצאות מהירה מכיוון שהריצוף מתבצע בזמן אמת. השיטה מאפשרת ריצוף של מקטעי דנ"א ארוכים, ניתנת לביצוע במעבדה והיא זולה באופן יחסי. ריצוף חלקי של תבדיד Sc.Pe21 שבדד ב-2007 מאגוזי אדמה הראה הומולוגיה גבוהה ל-*S. stelliscabiei*. סיום הריצוף של תבדיד זה ושלושה תבדידים נוספים ימשך גם לאחר סיום הפרוייקט.

ב. השפעת טיפולי הדברה על התעצמות המידבק בקרקע ועל כושר ההתבססות של טיפוסים חדשים מהלך הניסוי:

הניסוי בוצע פעמיים, בשנה השניה והשלישית, עם שני סוגי קרקע (חול ולס) ועם שלושה תבדידי גרב שונים בכל ניסוי. בניסוי I נבדקו התבדידים: Sc.il.101, Sc.Pe.21, Sc.il.143, ובניסוי II התבדידים Sc.il.102, Sc.Imp165, Sc.Imp156. כל התבדידים הגיבו חיובית ב-PCR עם שלושת זוגות הפריימרים והם מייצגים מינים שונים לפי ההגדרה ברנ"א ריבזומלי. מכיוון שאין טיפולי הדברה מומלצים בשלב זה וכדי להימנע משימוש בפורמלין השתמשנו בעיקור הקרקעות כתחליף לטיפול הדברה. העיקור נעשה באוטוקלאב פעמיים במרווח של 48 שעות. הטיפולים בניסוי היו: קרקע חול או לס מעוקרת לעומת לא מעוקרת, מודבקת בכל אחד מתבדידי הגרב (ברכוז 10^6) לעומת קרקעות לא מודבקות בפתוגן. הקרקע בטיפולים השונים חולקה לעצמים (3 חזרות בכל טיפול) בהם נזרעו בכל עציץ מספר זרעי צנונית. לאחר 60 ימי גידול נבחנו הצנוניות לתסמיני גרב והקרקע נבדקה לרמת אוכלוסיית הגרב ע"י מיצוי במים, הכנת מיהולים עשורניים וזריעה על גבי מצע אמרסון. ספירת המושבות שהתפתחו בטיפולים השונים נעשתה לאחר 7 ימי הדגרה.

תוצאות:

בטבלה 2 מוצגות התוצאות של ניסוי I. בטיפולים בהם עוקרה הקרקע לפני אילוח בתבדידים Sc.Pe.21 ו- Sc.il.101 שיעור תסמיני גרב בצנוניות היה גבוה יותר בהשוואה לצנוניות בקרקע לא מעוקרת. ממצא זה מאשש דיווחים קודמים בהם בתנאי 'ואקום', לאחר חיטוי קרקע, אכלוס מחדש ע"י הפתוגן נעשה ביעילות רבה יותר בהשוואה לקרקע לא מטופלת, שבה יש אוכלוסיות מיקרואורגניזמים טבעיות אשר מתחרות עם הפתוגן. שיעור תסמיני גרב בקרקע חול היה גבוה יותר בהשוואה לקרקע לס, כפי שקורה בד"כ בחלקות המסחריות. עם תבדיד Sc.il.143 לא התקבלו כלל תסמיני גרב בצנוניות, רק נקודות שחורות שלא ניתן היה לבודד מהן סטרפטומיצטים. בהערכה כמותית של כלל הסטרפטומיצטים בקרקעות בסיום הניסוי נמצאו בכל הטיפולים חיידקים ברמה גבוהה (10^6 - 10^7 CFU/g). לא היו הבדלים משמעותיים באיכלוס הקרקע בין שלושת התבדידים. יש לציין כי ספירת החיידקים בקרקע היא ספירה כללית של סטרפטומיצטים ללא התייחסות לחיידקים הפתוגניים.

בניסוי II שיעור הנגיעות בצנוניות היה נמוך מאד (טבלה 3). הנגיעות התקבלה רק בטיפולים בהם עוקרה הקרקע לפני אילוח בתבדידים Sc.Imp156 ו- Sc.il.102 עם 10% ו- 2.3%, בהתאמה. בהערכה כמותית של כלל הסטרפטומיצטים בקרקעות בסיום הניסוי נמצאו בכל הטיפולים חיידקים ברמה גבוהה, ללא הבדלים משמעותיים באיכלוס הקרקע בין שלושת התבדידים.

תוצאות שני הניסויים שנערכו הראו שאין הבדל בהישרדות המינים השונים בקרקעות לס או חול. כמו כן, ניתן להבחין כי בקרקע מעוקרת המדמה קרקע שטופלה לפני זריעה היתה נגיעות גבוהה יותר בצנוניות המודבקות.

טבלה 2: ניסוי I - השפעת עיקור קרקע על התעצמות המידבק בקרקע

מספר התבדיל	הטיפול	סה"כ צנוניות	% צנוניות עם סימפטומים	רמת נגיעות 0-5	Log CFU
Control	לס מעוקר	18	0	0	8.362
	לס רגיל	17	0	0	6.477
	חול מעוקר	28	0	0	8.108
	חול רגיל	32	0	0	6.826
Sc.il.143	לס מעוקר	22	0	0	8.813
	לס רגיל	26	0	0	7.903
	חול מעוקר	23	0	0	8.097
	חול רגיל	31	0	0	7.826
Sc.Pe.21	לס מעוקר	12	41.7	2.8	7.079
	לס רגיל	16	25.0	2.6	5.716
	חול מעוקר	12	58.3	4.1	7.114
	חול רגיל	3	0.0	0	4.255
Sc.il.101	לס מעוקר	11	27.3	2.4	5.987
	לס רגיל	9	22.2	1.8	6.740
	חול מעוקר	12	66.7	2.6	6.919
	חול רגיל	15	53.3	4	6.255

טבלה 3: ניסוי II - השפעת עיקור קרקע על התעצמות המידבק בקרקע

מספר התבדיל	הטיפול	סה"כ צנוניות	% צנוניות עם סימפטומים	רמת נגיעות 0-5	Log CFU
Control	לס מעוקר	30	0	0	4.551
	לס רגיל	39	0	0	4.551
	חול מעוקר	41	0	0	4.485
	חול רגיל	46	0	0	4.494
Sc.il.102	לס מעוקר	26	0	0	4.630
	לס רגיל	31	0	0	3.835
	חול מעוקר	44	2.3	6.8	4.618
	חול רגיל	36	0	0	4.878
Sc.Imp165	לס מעוקר	17	0	0	4.375
	לס רגיל	14	0	0	4.040
	חול מעוקר	19	0	0	4.551
	חול רגיל	18	0	0	4.317
Sc.Imp156	לס מעוקר	10	10	0.1	3.592
	לס רגיל	11	0	0	4.536
	חול מעוקר	16	0	0	5.028
	חול רגיל	19	0	0	4.406

ג. פיתוח פרוטוקול לחיזוי נגיעות הקרקע בגרב

מהלך הניסוי:

הפרוטוקול מבוסס על שיטת ה- quantitative real-time PCR (qPCR) כאשר בשלב ראשון בדקנו מספר זוגות פריימרים שיראו רגישות וספציפיות גבוהה לסטרפטומיצים פתוגניים בקרקע. מכיוון שהטוקסין thaxtomin הוא גורם הפתוגניות היחיד הידוע במחלת הגרב, בחרנו להשתמש בו לגילוי תבדידים פתוגניים בקרקע. בנוסף, השתמשו בזוג של פריימרים המבוססים הגן *nec1* (טבלה 4).

טבלה 4: הרצף והמקור של הפריימרים שנבחנו לראקציית qPCR

מקור	גן מטרה	גודל קטע DNA (בסיסים)	הרצפים (5'-3')	פריימרים
Qu et al. (2008)	<i>txtAB</i>	71	GCAGGACGCTCACCAGGTAGT	strepF
			ACTTCGACACCGTTGTCCTCAA	strepR
Cullen and Lees (2007)	<i>nec1</i>	83	TCGCACTCTTGGAGATCTCATG	necF
			TCGTAAGAACGCGACGCTTT	necR

הבדיקה נעשתה עם דנ"א של מספר תבדידים שהגיבו ב- PCR עם שלושת זוגות הפריימרים, שתוארו לעיל, ועם תבדידים שלא הגיבו עם אף אחד מזוגות הפריימרים.

מכיוון ששני זוגות הפריימרים נתנו תוצאות טובות המשכנו לעבוד בעיקר עם הפריימרים *txtAB*. בידוד הדנ"א נעשה מ- 2 גרם קרקע בשתי חזרות. דגימות הקרקע הועברו למבחנות פלסטיק של 50 מ"ל והורחפו ב- 6 מ"ל של בופר TE. לתרחיף הוספו כדורי ברזל בקוטר של 3.5 מ"מ והמבחנות עברו טילטול בשכיבה במכשיר Vortex בעוצמה חזקה במשך כ- 10 דקות. לאחר מנוחה במשך כ- 5 דקות נאסף הנוזל העליון ורוכז בצנטריפוגה 2 דקות ב- 10000 rpm. המשקע הורחף ב- 200 מיקרוליטר של בופר TE. מיצוי הדנ"א מהקרקע נעשה בקיט של Epicentre. במקביל, נזרעו מהמיצוי מיהולים עשרוניים על צלחות עם מצע אמרסון. לאחר הדגרה בטמפרטורה של 28 מ"צ למשך 7 ימים, המושבות נאספו בעזרת מקל דרגלסקי ב- 5 מ"ל מים מזוקקים ונעשה מיצוי של הדנ"א מהתרחיף וביצוע Bio-PCR.

להכנת עקומת כיול לבדיקת רגישות שיטת ה- qPCR הוכנה תערובת של 5 קרקעות שונות שעברו עיקור בתנור בטמפרטורה של 250 מ"צ למשך 30 דקות. לדגימות של הקרקע המעוקרת הוספו ריכוזים עשרוניים של התבדיד Sc.imp.170 והפקת הדנ"א נעשתה כמתואר לעיל. הביקורות לבדיקת qPCR מהקרקעות השונות היו: דנ"א נקי, ודגימת קרקע אליה הוספו חיידקים בריכוז סופי של 10^5 כביקורות חיוביות, ומים לביקורת שלילית.

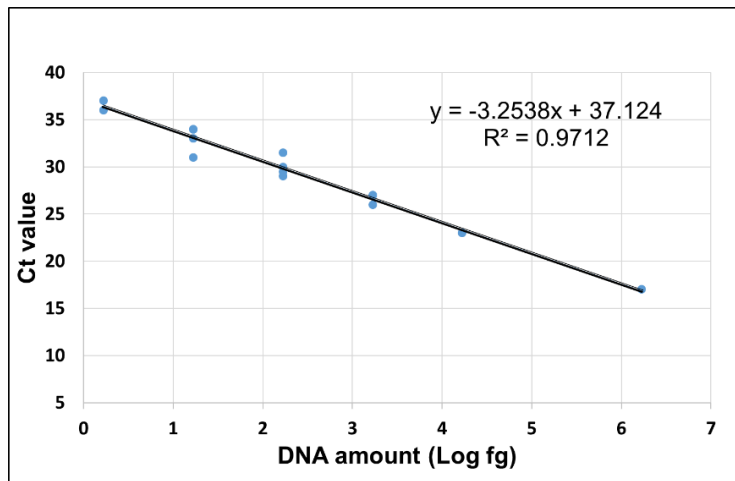
בנוסף, בחלק מדגימות הקרקעות שנבדקו נזרעו צנוניות לביצוע מבחן פתוגניות (10 עציצים עם 5 זרעים לכל קרקע). תוצאות מבחני הפתוגניות נקבעו לאחר כחודשיים.

תוצאות:

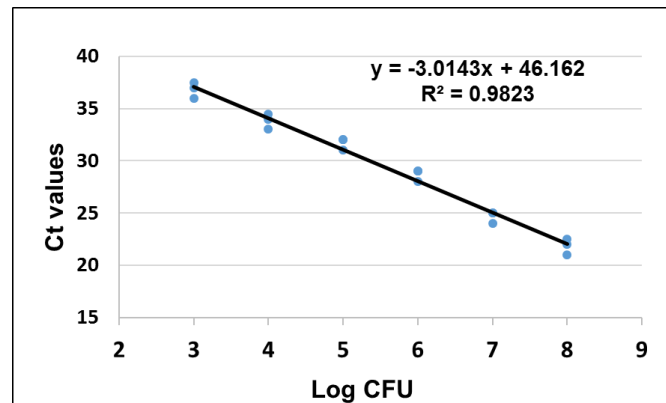
למיצוי הדנ"א מהקרקע נמצא כי הקיט של חברת Epicentre היה היעיל ביותר מבין הקיטים שנבחנו. בראקצית ה-qPCR שבה נבדקו ריכוזים מוגדרים של תרביות נקיות של תבדידי סטרפטומיצטים (10^2 - 10^8 תאים למ"ל), נמצא ששני זוגות הפריימרים שנבדקו (טבלה 4) היו יעילים והגבירו באופן רגיש וספציפי את התבדידים שהגיבו עם שלושת זוגות הפריימרים אך לא את אלו שלא הגיבו.

עקומת כיול לדנ"א נקי (Sc.imp.170) מתוארת באיור 4. ניתן לראות כי השיטה רגישה מאוד ויכולה לגלות 10 fg. עקומת כיול לחיידקים שהוספו לקרקע מעוקרת (איור 5) הראתה רגישות החל מ- 10^3 חיידקים ל-2 גרם קרקע.

איור 4: עקומת כיול של תוצאות qPCR עם סדרת מיהולים של דנ"א מחיידק *Streptomyces* תבדיד Sc.imp.170. C_t (threshold cycle) מייצג את מספר המחזורים בהם הקריאה עולה על הסף.



איור 5: עקומת כיול של תוצאות qPCR עם דנ"א שהופק מקרקע סטרילית לאחר הוספת ריכוזים שונים של החיידק הפתוגני. כל התוצאות הראו את טמפרטורת ההתכה הנכונה.



אימות הפרוטוקול:

לשם אימות הפרוטוקול נבחרו חלקות בהן היתה בעבר נגיעות גרב מצוי או תוך כדי עונת גידול תפוז"א עם תסמיני מחלה בפקעות הבת. נבדקו 304 קרקעות שונות שנאספו ממקומות שונים בהם היה חשד לנגיעות בגרב (טבלה 5). רמת הנגיעות בחלקות נקבעה על סמך האינפורמציה שניתנה ע"י המגדלים. בדיקת הקרקעות השונות

החשודות לנגיעות בסטרפטומיצטים נעשתה לפי הפרוטוקול שתואר לעיל. ניתן לראות כי מתוך 304 קרקעות שנבדקו, ב- 137 מהן התקבלו תגובות חיוביות ב- qPCR, כאשר בחלקות בהן רמת הנגיעות גבוהה מספר התוצאות החיוביות היה גבוה יותר. בכל הקרקעות בהן נמצאו פקעות תפוא"א עם תסמיני גרב התקבלו תוצאות חיוביות. ב- 55 קרקעות נעשו במקביל בדיקות גם ב- Bio-PCR ובמבחן פתוגניות עם צנוניות. אולם רק 3 דגימות מתוך 55 היו חיוביות ב- Bio-PCR ו- 8 מתוך 55 היו חיוביות במבחן פתוגניות עם צנוניות. גם בקרקעות שבהן נמצאו פקעות נגועות לא התקבלו תוצאות חיוביות בשני מבחנים אלו ולפיכך לא המשכנו לבצע בדיקות אלו בשאר הקרקעות הנבחרות.

ספירת מושבות סטרפטומיצטים לאחר בידוד וזריעת מיצויים מהקרקע בצלחות הראתה ריכוזים גבוהים בין 10^5 ל- 10^3 CFU של חיידקים בעלי מופע הדומה לזה של סטרפטומיצטים. אולם כאשר נאספו החיידקים, הופק דנ"א ונעשה PCR לא התקבלו תוצאות חיוביות לחיידקים פתוגניים. יתכן ונוכחות אוכלוסיות גבוהות של סטרפטומיצטים בקרקע מקשה על גילוי סטרפטומיצטים פתוגניים בשיטות אחרות ומדגישה את יעילותה של שיטת ה- qPCR.

טבלה 5: סיכום תוצאות בדיקת קרקעות לנוכחות סטרפטומיצטים פתוגניים

תוצאות חיוביות מכלל הדגימות**			רמת נגיעות בחלקה*	מקור הקרקע, מיקום החלקות והזנים
% צנוניות נגועות	Bio-PCR	qPCR		
3/10	0/10	3/10	5-30%	תפוא"א ישובי חבל מעון, חלוצה, גבולות, ניר עוז, מגן. הזנים: וינסטון, אליאס, מרקיז, סלטיאן
4/10	3/10	10/10	מעל 50%	חלקה אמיתי 1, ליד כרם שלום, מאריס פייפר
0/10	0/10	5/10	15%	שדה בוקר חלקה 414 (מדרשה), טייסון
1/10	0/10	2/10	2%	שדה בוקר חלקה 402 (קיבוץ), סיפרה
		6/10	10%	חלקה 117 ברור חיל, קיבוץ סעד
		8/10	50%	חלקה 117 ברור חיל, קיבוץ סעד
		10/10	50%	חלקה 117 ברור חיל, קיבוץ סעד
		10/10	50%	חלקה 33, ניר עוז
		3/10	20%	חלקה 33, ניר עוז
		1/10	5%	חלקה 33, ניר עוז
		5/10	8%	חלוצה, ווינסטון

		5/10	13%	חלוצה, ווינסטון
		5/10	6%	חלוצה, ווינסטון
		0/10	3%	נירים, ווינסטון
		0/10	10%	נירים, ווינסטון
		0/10	4%	מגן, ווינסטון
		0/10	7%	מגן, ווינסטון
		0/10	5%	נר עוז, ווינסטון
		0/10	3%	נר עוז, ווינסטון
		5/10	8%	עין השלושה, ליד מושבי הנגב, ווינסטון
		5/10	8%	עין השלושה, ווינסטון
		5/10	8%	עין השלושה, סלטיאן
		5/10	5%	עין השלושה, מאריס פייפר
		5/10	6%	נר עוז, מאריס פייפר
		10/10	12%	נירים, מאריס פייפר
		5/10	3%	נירים, נייטה
		0/5	7%	חלוצה, נייטה
		1/2	50%	כפר עזה, נייטה
		2/2	50%	עין השלושה, נייטה
		1/10	15%	עצמונה, שרלוט
		10/10	15%	עצמונה מאריס פייפר
0/5	0/5	2/5	25%	אגוזי אדמה טלאור, בארי, משאבי שדה, מגן, עין השלושה
0/8	0/8	8/8	25%	שכ"ן 1212, חלוצה, עין השלושה, טל אור
0/1	0/1	0/1	לא מאולחת	ניסוי קרקע ברחובות
0/1	0/1	1/1	מאולחת	ניסוי קרקע ברחובות

* רמת נגיעות הקרקע נקבעה על סמך האינפורמציה שניתנה ע"י המגדלים, על פי אחוז נגיעות הפקעות ביבול.

** עמודות ריקות – בדיקות לא בוצעו.

בחלק מהקרקעות החשודות כנגועות נלקחו דגימות על פי נקודות ציון ונעשתה בדיקת qPCR וזריעה על מצע סלקטיבי. התוצאות מתוארות בטבלה 6 ובאיורים 6, 7, 8, ו-9. בשדה בוקר חלקה 414 מתוך 10 נקודות ציון ב-חמש התקבלו תוצאות חיוביות ב-qPCR כאשר נקודות אלו מרוכזות בחלק אחד של השדה (איור 6). בשדה בוקר חלקה 402, רק שתי נקודות מתוך 10 נמצאו חיוביות ואולם אחת הנקודות היתה סמוכה למקום בו נמצאה פקעת נגועה בסטרפטומיצטים (איור 7). בברור חיל חלקה 117 נלקחו דגימות מ-30 נקודות ציון ברמת נגיעות שונה. בנקודות ציון שבהן נלקחו דגימות מקרקעות עם נגיעות של 50%, התקבלו תוצאות חיוביות ב-18 מתוך 20 הדגימות; בקרקעות עם 10% נגיעות, 6 מתוך 10 היו חיוביות (איור 8). בכל נקודות הציון בהן היו פקעות נגועות התקבלו תוצאות חיוביות ב-qPCR. בניר עוז חלקה 33 בקטע החלקה שהוגדר עם נגיעות של 50%, כל

10 הדגימות יצאו חיוביות לעומת 3 מתוך 10 בנגיעות של 20% או תוצאה חיובית אחת בנגיעות של 5% (איור 9). בכל הדגימות בודדו חיידקי סטרפטומיצטים בריכוזים של 10^3 עד 10^5 CFU/g אך ללא קשר לרמת הנגיעות בחלקה.

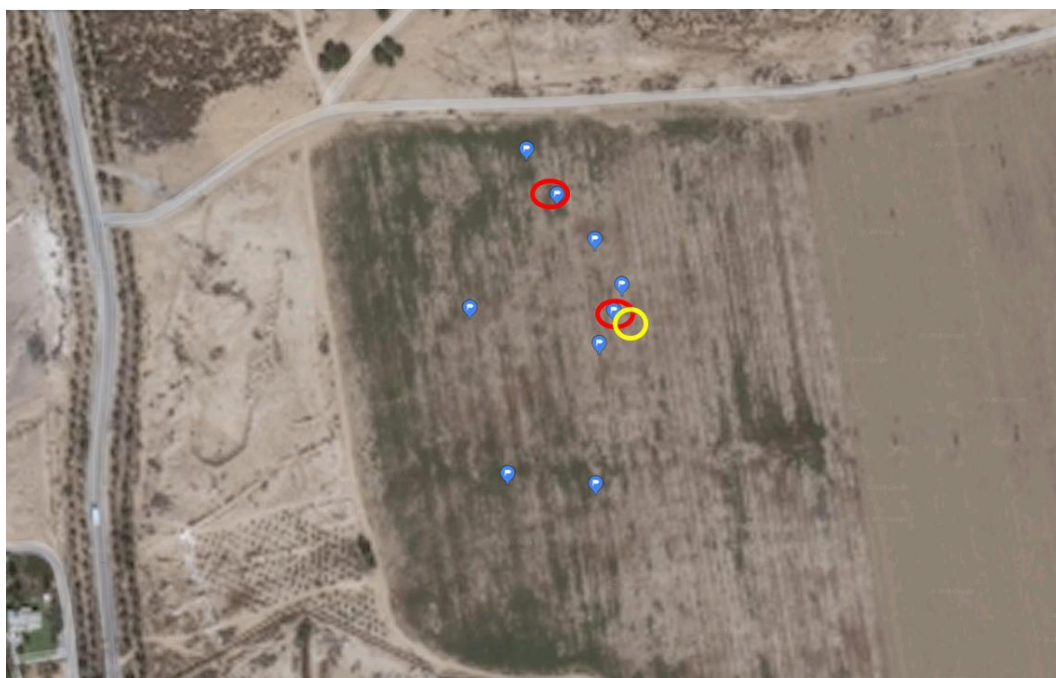
טבלה 6: בדיקת קרקעות בשדה בוקר, ברור חיל וניר עוז בחלקות עם נקודות ציון

מקור הקרקע, זן תפוז"א, רמת נגיעות	מיקום החלקה ומספר הדגימה	תוצאות qPCR	CFU/g על מצע סלקטיבי
שדה בוקר חלקה 414, הזן טייסון	מדרשה (1)	-	2.2×10^4
"	" (2)	-	4.6×10^4
"	" (3)	-	5.9×10^4
"	" (4)	-	1.8×10^4
"	" (5)	-	1.4×10^4
"	" (6)	+	2.2×10^4
"	" (7)	+	2×10^4
"	" (8)	+	2.7×10^4
"	" (9)	+	4×10^4
"	" (10)	+	1.8×10^4
שדה בוקר חלקה 402, הזן סיפרה	קיבוץ (1)	-	2.3×10^4
"	" (2)	+	6.7×10^3
"	" (3)	-	2.1×10^4
"	" (4)	-	3×10^4
"	" (5)	+	2×10^4
עם פקעות נגועות	" (6)	-	1.3×10^4
"	" (7)	-	1.3×10^4
"	" (8)	-	4.3×10^4
"	" (9)	-	2.1×10^4
"	" (10)	-	3.6×10^4
ברור חיל חלקה 117, 10% נגיעות	ק. סעד (1)	-	4.8×10^5
"	" (2)	+	3.5×10^5
"	" (3)	-	2.9×10^5
"	" (4)	-	3.5×10^5
"	" (5)	+	2.5×10^5
"	" (6)	+	3.5×10^5
"	" (7)	+	2.5×10^5
"	" (8)	+	3.5×10^5
"	" (9)	+	2.9×10^5
"	" (10)	-	2.9×10^5
ברור חיל חלקה 117, 50% נגיעות	ק. סעד (11)	-	1.9×10^5
" פקעות נגועות	" (12)	+	1.0×10^5
"	" (13)	-	1.9×10^5
" פקעות נגועות	" (14)	+	9.9×10^4
"	" (15)	+	9.9×10^4
" פקעות נגועות	" (16)	+	1.2×10^5

1.9×10^5	+	(17)	"	"
1.0×10^5	+	(18)	"	"
9.8×10^4	+	(19)	"	" פקעות נגועות
9.9×10^4	+	(20)	"	"
2.3×10^5	+	(21)	ק. סעד	ברור חיל חלקה 117, 50%
2.9×10^5	+	(22)	"	"
1.2×10^5	+	(23)	"	" פקעות נגועות
2.9×10^5	+	(24)	"	"
2.3×10^5	+	(25)	"	"
2.3×10^5	+	(26)	"	"
2.9×10^5	+	(27)	"	"
1.2×10^5	+	(28)	"	"
2.9×10^5	+	(29)	"	" פקעות נגועות
1.2×10^5	+	(30)	"	" פקעות נגועות
3×10^4	+	(1)		נר עוז חלקה 33, 50% נגיעות
2.9×10^4	+	(2)		"
3.2×10^4	+	(3)		"
3.4×10^4	+	(4)		"
2.9×10^4	+	(5)		"
3×10^4	+	(6)		"
3×10^4	+	(7)		"
3.8×10^4	+	(8)		"
3.3×10^4	+	(9)		"
2.9×10^4	+	(10)		"
3.6×10^4	-	(11)		נר עוז חלקה 33, 20% נגיעות
3.3×10^4	-	(12)		"
3.6×10^4	-	(13)		"
3.7×10^4	-	(14)		"
4.3×10^4	-	(15)		"
2.8×10^4	+	(16)		"
3.7×10^4	-	(17)		"
3.2×10^4	+	(18)		"
2.7×10^4	-	(19)		"
3.2×10^4	+	(20)		"
1.2×10^4	+	(21)		נר עוז חלקה 33, 5% נגיעות
2.5×10^4	-	(22)		"
2.5×10^4	-	(23)		"
2×10^4	-	(24)		"
1.2×10^4	-	(25)		"
2×10^4	-	(26)		"
1.2×10^4	-	(27)		"
3.2×10^4	-	(28)		"
1.3×10^4	-	(29)		"
2.8×10^4	-	(30)		"



איור 6: שדה בוקר חלקה 414, הזן טייסון. עיגול אדום תוצאה חיובית ב- qPCR בנקודות 6 עד 10.



איור 7: שדה בוקר חלקה 402, הזן סיפרה. עיגול אדום תוצאה חיובית ב- qPCR, בנקודות 2 ו-5. עיגול צהוב-פקעת נגועה.



איור 8: חלקה 117 ברור חיל. סימונים באדום תוצאה חיובית ב-PCR.



איור 9: חלקה 33 ניר עוז. סימונים באדום תוצאה חיובית ב-PCR.

דין ומסקנות

איפיון אוסף תבדידי הגרב בשיטות שונות הראה כי יש מספר מינים בארץ אולם מרבית התבדידים שבודדו בשנים האחרונות שייכים לארבעת המינים: *S. scabiei*, *S. turgidiscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*. הנפוצים באירופה שהיא המקור לזרעי היבוא. מבחני הפתוגניות שנעשו לחלק ניכר מתבדידי האוסף הראו כי מבחן עיכוב נביטת צנוניות היה במתאם הטוב ביותר עם תוצאות ה-PCR שהתקבלו עם הגן המקודד לטקסטומין. המקרים בהם התקבלו תוצאות חיוביות ב-PCR אך שליליות במבחן פתוגניות היו נמוכים. בכל המקרים בהם התקבלו תוצאות חיוביות ב-PCR התקבלה תוצאה חיובית לפחות באחד ממבחני הפתוגניות. מקרים בהם התקבלה תוצאה שלילית ב-PCR אך חיובית בפתוגניות מצביעים על אפשרות שלחלק מהתבדידים יש יכולת לגרום למחלה גם ללא נוכחות הטוקסין. באופן כללי איפיון אוכלוסיית הסטרפטומיצטים בארץ מצביע על שונות גבוהה בין התבדידים ומקשה על הגדרת המינים. גם העובדה שתוצאות מבחני הפתוגניות אינם אחידים מקשה על הגדרה מדויקת של המינים. לשם כך התחלנו לרצף את הגנום של מספר תבדידים באמצעות שיטת ה-Nanopore. הריצוף ימשך גם לאחר סיום הפרויקט.

במחקר על התבססות מינים נפוצים בקרקע לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין שלושת התבדידים שנבדקו. חלק מהבעיה נובע מכך שאוכלוסיית הסטרפטומיצטים הלא פתוגניים הנמצאת בקרקעות השונות מאוד גבוהה ומקשה על המעקב אחר אלו הפתוגניים. הניסיון לסמן תבדידים פתוגניים בעזרת עמידות לאנטיביוטיקה על מנת לעקוב אחרי האוכלוסייה בקרקע לא הצליח. נראה כי ההתבססות של תבדידי הגרב בקרקע מאד איטית ואכלוס הקרקע בתבדידים פתוגניים אורך מספר רב של מחזורי גידול. בעבודות קודמות שלנו, בדקנו את ההשפעה של טיפולי זרעים שונים על המחלה. פקעות זריעה נגועות מאד בגרב רגיל טופלו בתכשירים שונים ונזרעו בקרקע נקיה. למרות הנגיעות הגבוהה בזרעים, שיעור הנגיעות בפקעות הבת היה נמוך מאד, עובדה המעידה על כך שמקור המידבק העיקרי הוא נגיעות קרקע, ושהפתוגן מתבסס בקרקע לאט. תוצאות מבטיחות התקבלו בפיתוח הפרוטוקול לגילוי סטרפטומיצטים פתוגניים בקרקע ב-qPCR. הפרוטוקול רגיש ומאפשר לגלות אוכלוסייה של סטרפטומיצטים פתוגניים, ברמה של מעל 10^3 חיידקים ל-2 גרם קרקע תוך זמן קצר.

כדי לאמת את הפרוטוקול נבדקו 304 קרקעות שונות שנאספו ממקומות שונים בהם היה חשד לנגיעות ברמות שונות (טבלה 5). חלק מהקרקעות (55) נבדקו גם במבחני פתוגניות ע"י זריעת צנוניות בקרקע וב-Bio-PCR. בשני המבחנים האחרונים אחוז התוצאות החיוביות היה נמוך; 14.5% ו-9%, בהתאמה. גם במקרים בהם נבדקו קרקעות שהיו בהן בעת הדיגום פקעות נגועות לא התקבלה תשובה חיובית במבחנים אלו. במקרה של Bio-PCR תוצאות אלו יכולות לנבוע מנוכחות גבוהה של סטרפטומיצטים לא פתוגניים בקרקע הגדלים על הצלחות וממסכים את התבדידים הפתוגניים שרמתם נמוכה מזו של הלא פתוגניים. במקרה של מבחני פתוגניות עם צנוניות לא ברור מדוע אין התפתחות של סימני מחלה בכל המקרים.

המתאם הטוב ביותר התקבל בשיטת ה-qPCR, כאשר בחלקות בהן רמת הנגיעות גבוהה מ- 50% אחוז התוצאות החיוביות היה גבוהות (80%-100%). במקומות שבהן יש נקודות ציון בכל המקרים שבהם אובחנו פקעות נגועות התוצאות שהתקבלו ב-qPCR היו חיוביות (טבלה 6). תוצאות אלו מעודדות ומצביעות על אפשרות שימוש בפרוטוקול זה לגילוי קרקעות נגועות בגרב וקבלת החלטות לגבי המשך השימוש או הטיפול בהן.

יש לציין כי באופן כללי המחקר על מחלה זו לא היה קל: אוכלוסיית הסטרפטומיצטים הלא פתוגניים בקרקע מאוד גבוהה ומקשה על גילוי התבדילים הפתוגניים, גידול החיידקים נמשך זמן רב ומבחני פתוגניות אינם אחידים והדירים. יחד עם זאת פיתוח הפרוטוקול לחיזוי נגיעות גרב בקרקע מאפשר להשתמש בו ככלי תומך החלטה.

ספרות מצוטטת

- Correa, D.B.A., Salomao, D., Rodrigues-Neto, J., Harakava, R., Destefano, S.A.L. (2015). Application of PCR-RFLP technique to species identification and phylogenetic analysis of *Streptomyces* associated with potato scab in Brazil based on partial atpD gene sequences. *Euro. J. Plant Pathol.* 142:1-12.
- Cullen, D.W. and Lees A.K. (2007). Detection of the *nec1* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. *J. Applied Microbiology* 102:1082-1094.
- Dees, M. W., Sletten, A. and Hermansen, A. 2013. Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathology* **62**: 217-225
- Kieser, H. M., Kieser, T. and Hopwood, D. A. 1992. A Combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Journal of Bacteriology* **174**: 5496-5507
- Qu, X., Wanner, L. A. and Christ, B.J. (2008). Using the TxtAB operon to quantify pathogenic *Streptomyces* in potato tubers and soil. *Phytopathology* 98:405-412.
- Wanner, L. A. 2004. Field isolates of *Streptomyces* differ in pathogenicity and virulence on radish. *Plant Disease* 88:785-796.

פרסומים מדעיים

תוצאות העבודה הוצגו בכנס של העמותה הישראלית למחלות צמחים שהתקיים בפברואר 2018 במכון וולקני. מאמר בנושא איפיון אוכלוסיית הסטרפטומיצטים בישראל נמצא בשלבי כתיבה.