



משרד החקלאות
מינהל המחקר החקלאי

המכון לטכנולוגיה ואחסון של תוצרת חקלאית
המחלקה לאחסון פירות וירקות

מחלת הגומה השחורה ומחוללה (*Pseudomonas syringae*) בפרי-הדד

מ א ת

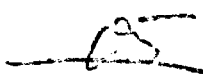
ש' כהן, א' כהן, מינה שיפמן-נדל, צפרירה וולקני

בולטין מס' 160

המחלקה לפרסומים מדעיים
מרכז וולקני, בית-דגן

1976

תשל"ז


134

05/634.3 : 589.95 : 632.3

20.06.87

<u>עמוד</u>	<u>ת ק צ י ר</u>
3	מ ב ו א
5	<u>סקירה ספרותית</u>
5	1. סיסטמטיקה
5	2. תפוצת המחלה וגורמי אקלים
6	3. תנאי ודרכי הדבקה
7	4. המלחמה בחידק
7	(א) הדברה כימית
7	(ב) טיפול מונע
8	מטרת המחקר
9	שיטות וחומרים
9	1. קרקעות-מזון סינתטיים מקובלים
9	2. קרקעות-מזון שהוכנו מהפרי
10	3. בידוד האורגניזם
10	4. מבחנים ביוכימיים להגדרת מחולל המחלה
10	5. שיטות לבדיקת התפתחות החידק
13	6. בדיקות מיקרוסקופיות
15	7. בדיקות פיסיולוגיות של פרי מודבק
16	8. בדיקת רגישות החידק לחומרי הדברה
17	תוצאות ודיון
18	(א) <u>בדיקות in vitro</u>
18	(1) התכונות המורפולוגיות והקשר למאטוגניות של החידק
20	(2) תכונות פיסיולוגיות של החידק
20	(א) פירוק תרכובות פחמן
20	(ב) מבחנים ביוכימיים
21	(3) השפעת הטמפרטורה על צמיחת החידק
21	(4) השפעת קרקע-מזון מפירות-הדר על צמיחת החידק
21	(ב) <u>בדיקות in vivo</u>
23	(1) תאור המחלה ובידוד האורגניזם
25	(2) תנאים להתפתחות המחלה בפרי
25	(א) השפעת הטמפרטורה על התפתחות המחלה
27	(ב) השפעת הלחות על כושר החידק לגרום למחלה
27	(ג) בדיקות מיקרוסקופיות של הגומה
28	(3) חיוניות החידק בתוך הגומה

ג) גורמים המשפיעים על הדבקה

28

1) הפצת והזמן הדרוש להדבקה

28

2) הקשר בין התפתחות הפרי לבין גודל הגומה

29

3) התפתחות הגומה בפרי על העץ ובפרי קטוף

30

ד) שינויים פיסיולוגיים בפרי המודבק ב- P. syringae

31

1) עוצמת הנשימה

31

2) פליטת אתילן

31

ה) השפעת טיפול באתילן על גודל הגומה

34

1) טיפול אתילן בפרי מודבק

34

2) הקשר בין מסך הטיפול באתילן לבין גודל הגומה

34

ו) הדברת החירק בחומרים כימיים

35

1) חומרי הדברה

35

2) d- limonene

36

מסקנות

37

רשימת ספרות

39

חקציר באנגליה

I

מחלת הגומה השחורה ומחוללה (*Pseudomonas syringae*)

בפרי-הדר

מאת

ש' כהן, א' כהן, מינה שיפמן-נדל, צפרירה וולקני

תקציר

מחולל מחלת הגומה השחורה (*P. syringae*) בודד מפרי לימון בארץ ונבדקו תכונותיו הפאתוגניות, הביוכימיות והפיסיולוגיות. בבדיקות הביוכימיות והפיסיולוגיות נמצא שהחידק אשר בודד בארץ זהה לזה שתואר בספרות ומכונה בשם "הגזע ההולנדי". במחקר שיתואר בדוח זה נכללו הנושאים הבאים: צמיחת החידק בקרקעות-מזון סינתטיות שונות ובפרי לימון; חיוניות החידק בתנאים שונים; הדבקת פירות; השפעת גודל הפרי על רגישותו להדבקה; עוצמת הנשימה והפליטה של אתילן על-ידי פרי מודבק, השפעת הטיפול באתילן על התפתחות המחלה; בדיקות היסטולוגיות, אנאטומיות והיסטוכימיות של רקמת פרי מודבקת בהשוואה לפרי בריא; ורגישות החידק לחומרי הדברה.

בבדיקות של צמיחת החידק בשלוש קרקעות-מזון שונות נמצא כי הטמפרטורה המיטבית (האופטימאלית) לגידול החידק *in vitro* היא 25-31 °C. לעומת זאת, הטמפרטורה הפיטבית להתפתחות המחלה בפרי היתה 14-17 °C; כאשר עלו הטמפרטורות חלה ירידה בקצב ההתפתחות של החידק.

תוצאות הניסויים מצביעות על כך שהחידק הוא בעל יכולת קיום גבוהה *in vitro*, גם ברסיבות וגם ביובש; תנאים קיצוניים אלה לא פגעו בכושר הפאתוגניות שלו בחקופה שנבדקה (במשך שישה חודשים). תכונות אלו מאפשרות, כנראה, לחידק לעבור את העונות הקשות של האקלים הישראלי (קיץ יבש וחורף גשום) עד להופעת תנאי הדבקה מתאימים.

גודל הגומה מושפע בין היתר גם מגודל הפרי: הגומה גדולה יותר ככל שהפרי גדול יותר. יש לציין כי בפירות לימון צהובים היתה התפתחות הגומה טובה יותר מאשר בפירות ירוקים.

נמצא שלפני הופעת הגומה מתרכזים החידקים בחללים הבין-תאיים של הפרי מבלי לחדור לתאים ולצינורות ההובלה של קליפת הפרי. בשלב מתקדם יותר של התפתחות המחלה נוכחו חידקים בתוך תאים קרובים לדופן בלבד.

בבדיקות ההיסטוכימיות של חתכים שנלקחו מקליפות פרי נגוע ומקליפות פרי בריא, לא נמצאו הבדלים בולטים בין הפירות מבחינת ריכוזי החומרים שנבדקו: עמילן, צלולוז, ליגנין, דונג וקוטיין.

בפרי מודבק התקבלה עליה גבוהה מאוד בעוצמת הנשימה והפליטה של אתילן, לעומת פירות פצועים ולא מודבקים ופירות בריאים ששימשו כביקורת. שיא הנשימה התקבל ביום השביעי לאחר ההדבקה והוא

הגיע ל-57.5 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה, לעומת כ-12 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה בפרי בריא, ואילו שיא הפליטה
החקבל ביום הרביעי והגיע ל-4.8 C_2H_4 /ק"ג/שעה, לעומת 0.07 C_2H_4 /ק"ג/שעה, בפרי הבריא.

בניסויים המתוארים נבדקה ההשפעה של טיפול אקסוגני באתילן, ונמצא שהוא עשוי להשפיע על
גודל הגומה. במבחנים שנועדו לבדוק את השפעתם של חומרים כימיים על התפתחות החידק נמצא שסודיום
אורתו-פניל-פנאט (סאופ"פ) וגופרת-נחושת בריכוז של 0.1%, וכלור בריכוז של 0.0125% מעכבים את
צמיחת החידק. לעומת זאת, בנומיל, תב"ז ו-FN-44 לא השפיעו כלל על התפתחות החידק. ניסויים שנעשו
בלימונן (עד לריכוז של 1%) לא נתנו תוצאות חיוביות בקטילת החידק.

מבוא

מחלת הגומה השחורה (Black pit) נגרמת על-ידי חיידק הידוע בשם Pseudomonas syringae (Van Hall). הגומה השחורה היא המחלה הבקטריאלית היחידה של פירות הדר (בעיקר לימונים) שתוארה בישראל, והיא מתבטאת בפגעים שחורים או חומים, יבשים, שקועים וקונצנטרים, הפוגמים במראה הפרי ופוסלים אותו לשיווק.

החיידק מצוי בפרדס גם על ענפים יבשים ועלים והם מהווים מקור הדבקה במשך כל השנה. לעיתים מתפתחת הגומה השחורה בפרי הארוז, בעת המשלוח והאחסון ואז נגרם לפרי נזק שקשה למנוע אותו בעת הטיפול בבית-האריזה.

בשנתיים האחרונות הולך וגדל היקף הנזק הנגרם לפירות-הדר כתוצאה מהגומה השחורה ויש חשש שהוא עלול להגיע למימדים ניכרים יותר. עד כה טרם נעשה מחקר יסודי על מחלה זו.

סקירה ספרותית

הסקירה הספרותית הוקדשה להיבטים שונים של החידק, כגון: גורמי אקלים, תפוצת המחלה, דרכי ההדבקה ותנאיה והמלחמה בחידק.

1. סיסטמטיקה

מחלת הגומה השחורה (black pit) בפרי-הדר נגרמת על-ידי חיידק גרם שלילי שחוגדר ב-1902 בשם Bacterium syringae (Van Hall); חיידק זה פוגע גם בענפים ועלי הדורים וגורם את מחלת הצרבון (Citrus blast).

מחולל הגומה השחורה הידוע כיום בשם Pseudomonas syringae, היה מוכר בספרות עד שנת 1928 בשלושה שמות שונים, שניתנו על-ידי חוקרים בארצות שונות:

(1) Bacterium syringae (Van Hall) (29) שתואר בקשר למחלת Lilac blight.

(2) Bacterium citripituae (Smith) (54) שתואר בקשר למחלת הצרבון בהדרים.

(3) Bacterium citrarefaciens (Lee) (39) שתואר בקשר למחלת הצרבון בהדרים.

B. syringae על לילך דווח לראשונה על-ידי Ritzema Bos (7) בהולנד ב-1889, ואחר כך - על-ידי Sorauer (57) בגרמניה ב-1891, ועל-ידי Gussow (27) באנגליה ב-1908. המחלה תוארה לראשונה בשנת 1902 על-ידי C.J.J. Van Hall (29). Smith (54) דיווח על הימצאות המחלה

באילינוי ב-1926 ושנחיים לאחר מכן היא נמצאה גם על-ידי Bryan (9).

B. citriputuale ב. דווח לראשונה על-ידי Smith (54) ב-1913 כגורם כחמים שקועים בלימונים. בשנים 1916 ו-1917 תיאר Coit (11) ו-Hodgson (30) מחלה חדשה בענפי תפוזים, ומאחר שלא מצאו תיאור של מחלה דומה בספרות כינו אותה בשם Citrus blast.

בשנת 1917 כינה Lee בשם B. citrarefaciens (39) את גורם מחלת ה-Citrus blast, מאוחר יותר (1921) מצאו Fawcett ו-Camp (22) שגורם המחלה שתואר על-ידי Lee זהה לזה של

B. citriputuale

בהשוואות שנעשו על-ידי Bryan (9), בשנת 1928, בין B. syringae שבודד מליך הולנדי באילינוי לבין בידוד טרי של B. citriputuale בקליפורניה, נמצא אורגניסם זהה בכל הבידורים. בהדבק לימונים בשני הגזעים נתקבלו גומות האופייניות למחלה זו.

בשנת 1926 היסח Smith (55) בין B. citriputuale מחולל הגומה השחורה וצרובן בהדרים, לבין B. syringae שבודד מ-Lilac blight ו-B. cerasi המופיע במטעים נשירים. שלושת האורגניסמים הושוו מבחינה מורפולוגית ותכונות אחרות ומהתוצאות הוא הסיק כי שלושתם הם למעשה קבוצה בעלת תכונות קרובות מאוד וכי יש להניח שהם מאותו הסוג; לכן הוא הציע לכנותם בשם B. syringae. בארץ דווחה המחלה לראשונה בשנת 1928 על-ידי Reichert ו-Perlberger (46).

2. תפוצת המחלה וגורמי אקלים

המחלה נפוצה באיזורים שונים בעולם. היא מופיעה לרוב בארצות בעלות אקלים ממוזג ונפוצה באזור הים-התיכון. מטורקיה מוסרים שהמחלה נחשבת לאחת משבע המחלות החשובות של הדרים (33). ביוון (47) גרמה המחלה נזקים קשים בשנים 1954-1956. ב-1939 מצאו Tcheretale ו-Tchanturia בהדרים באחסון במדינת גורגיה שבברית-המועצות (59). Philippe (44) מדווח בשנת 1955 על המחלה כאחת המחלות העיקריות בקונגו הבלגית.

יש לציין ש-P. syringae מתפתח אך ורק בחלק החמים של האיזור הממוזג ולא באיזורים צפוניים הכוללים ארצות קרות, כמו קנדה או ארצות סקנדינביה. מצד שני, המחלה אינה מתפתחת ביושב קיצוני ובארצות חמות בעלות לחות קיצונית. המחלה אינה מופיעה באיזור הטרופי של צפון אוסטרליה, או בכל איזור טרופי אחר (21, 45).

עד שנת 1928 הצטמצמה מחלת הגומה השחורה באיזור קליפורניה בלבד ולכן היתה מקובלת הדעה ש-P. syringae דורש להתפתחותו טמפראטורות גבוהות. לעומת זאת, מצאה Bryan בהולנד (9) ש-P. citriputuale מסוגל להתקיים על לילך גם בטמפראטורות נמוכות ב-1 מ"צ.

Schneider (51) מצא שהאופטימום לצמיחת P. syringae הוא 15-25 מ"צ, אולם גידול החידק אפשרי גם בטמפרטורה קרובה ל-0 מ"צ; כמו כן הוא מצא שבטמפרטורה גבוהה מ-25 מ"צ אין התפתחות של החידק.

Fawcett וחבריו (22, 23) מצאו שבטמפרטורות נמוכות, 17 מ"צ, הן נוחות ליצירת שקעים גדולים של הגומה ו-Smith (56) מצא הופעת שקעים גדולים אפילו ב-13.1 מ"צ.

Fawcett (21) מגיע למסקנה כי שני תנאים אקולוגיים חשובים על מנת שהמחלה תתפתח בצורה קשה: הטמפרטורה חייבת להיות מחת ל-20 מ"צ וכמות הגשמים במשך שלושה חודשים מתחילת עונת הגשמים חייבת להיות לפחות 150 מ"מ בממוצע.

Reichert (45) מסכם במחקרו שהפאתוגן הוא אורגאניסם המותאם לאיזור גשום, ללא קיץ חם מדי, וחיזוק לעובדה זו הוא מוצא בכך שהפאתוגן תוקף מינים של Prunus, שהוא כידוע עץ של איזור ממוזג. כמו כן מצא כי בישראל, בדומה לקליפורניה, מופיעה המחלה בחודשים נובמבר-ינואר שבהם כמות הגשמים היא מתאימה והטמפרטורה אינה עולה על 20 מ"צ. לעומת זאת, מצא Knorr (36), שבפלורידה אין התפתחות המחלה מאחר שבחודשים ינואר עד מרץ כמות הגשם קטנה מ-85 מ"מ והטמפרטורה הממוצעת היא 16 מ"צ.

3. תנאי ודרכי הדבקה

מחולל המחלה - P. syringae מסוגל להשחמר בענפים מתים על העץ או על הגזם ועל עלים שנשרו החידק אינו עובר את העונה היבשה בתוך הקרקע (51). הזיהום תלוי בפצעים המתהווים על פני הפרי, כגון - דקירות קוצים שעל העץ, מכות ברד, מציצות חקרים וכו' - כל זה בתנאי שיש לחות על פני הפרי (25). רוחות זזקות מלוות בגשם, ולאחר מכן קור ואסמוספירה לחה, הם תנאים אידאליים להדבקה ולהתפתחות החידק. הרוח גורמת שפשוף הפרי בענפים ועל-ידי כך נקרעת הקליפה ונפצעת דבר המאפשר חדירת החידק לתוך הפרי. פצעים סריים ושפשופים הנגרמים לפרי בעודו רטוב בטמפרטורה נמוכה, מבטיחים זיהום. מכות ברד ולאחר מכן תקופה רטובה הם תנאי הדבקה מתאימים (10).

4. המלחמה בחידק

כספרות ידועות שתי גישות עיקריות למלחמה במחולל הגומה השחורה - הדברה כימית וטיפול מונע.

א. הדברה כימית

כבר בשנים קודמות נמצא במחקרים שונים שריסוסים בחומרי נחושת היו יעילים מאוד במניעת המחלה ובהדברתה. Carne (10) מצא שריסוס אחד בחומרי נחושת (bluestone fungicide) הניתן

בסתיו, היה יעיל מאוד בהדברת המחלה. Schneider (50) המליץ על כמה ריסוסים במרק-בורדו 1%: ריסוסים מוקדמים (בנובמבר-דצמבר) ומאוחרים (מאמצע פברואר עד תחילת מאי).

הוראות משרד החקלאות (1) בארץ, ממליצות על ריסוסים מונעים במרק-בורדו 1%, בפראנוכס, או בקופרנטול 0.3% לאחר הגשם הראשון. לפי המלצות אלה עשויים 2-3 ריסוסים, במרווח-זמן של חודש, להקטין את הנזק עד למינימום.

גם החומרים האנטיביוטיים היו יעילים בהדברת מחולל המחלה. Krasiljnikov (37) מצא בפירח לימון ומנדרינה כי חומרים אנטיביוטיים המופקים מהסוג *Actinomyces* הניתנים לאחר ההדבקה במחלה גרמו לעצירת התפתחות הגומות, ואילו ריסוסי עצים בחומרים אלה מנעו את התפתחות המחלה גם מהענפים ומהעלים, נוסף לפירית. Dewolfe וחבוריו (15), קיבלו תוצאות חיוביות בהדברת המחלה, כאשר הם השתמשו באגרומיצין 500 Dye (18) בדק ומצא שמבין החומרים האנטיביוטיים שניסה, היה הסטרפטומוצין-סולפט היעיל ביותר בהפחתת אחוז הפגמים וגודלם בצמחים הנגועים בחידק. Klotz וחבוריו (35) מצאו שהחידק רגיש מאוד גם לסטרפטומיצין סולפט. Lazar ו-Grigoriu (38) בדקו *in vitro* רגישותו של *P. syringae*, אשר בודד מהדרים, לכמה חומרים אנטיביוטיים והם מצאו כי הוא רגיש לכלורפניקול לטרא-ציקלין, לסטרפטומיצין, לפולימיצין B, לנאומיצין ולאריטרומיצין, אולם לא נמצאה רגישות לסוגי הפניצילין G ו-Y.

ב. סיפול מונע

ההדברה הכימית של *P. syringae* יעילה אמנם, אך היא אינה מספיקה ועל כן יש חשיבות רבה לאמצעי מניעה. Fawcett (21), ומאוחר יותר גם Klotz וחבוריו (35), כותבים שאמצעים המונעים פציעות של הפרי בחורף, כגון משברי רוחות, הם יעילים מאוד במניעת המחלה. בדרום קליפורניה, שבו היבול העיקרי הוא של חפוזים טבוריים, נעשה הקטיף מוקדם בעונה, כדי למנוע את האפשרות של הדבקה על-ידי החידק. Gogvadze (27) הראה שכ-10% מחוך 200,000 העצים שנפגעו על-ידי החידק, היו במקומות בלתי-מוגנים בפני רוחות. מכאן, שמשברי-רוחות הם אמצעי יעיל נגד התפשטות המחלה בפרדס.

מאחר שהחידק מתקיים על ענפים מתים על העץ או על הגזם, יש חשיבות לגיזום ולהשמדה של הענפים הנגועים בסתיו, נוסף לריסוסי קטילה הניתנים בפרדס (51)

מטרת המחקר

מטרת המחקר היתה לחקור את: הביולוגיה והפאתוגניות, *in vivo* ו- *in vitro* של החידק *P. syringae* המצוי בארץ, המכאניזם של יצירת הגומה השחורה בפרי והשינויים הפיסיולוגיים החלים בפרי עקב הדבקה. ידע זה עשוי לתרום למציאת דרכי מלחמה יעילים במחלת הגומה השחורה.

המחקר כלל בעיקר את בחינת הנושאים הבאים:

שיטות לזיהוי החידק על-ידי גידולו בקרקעות-מזון שוגות והעברתו בסדרת מבחנים שונים; השפעת הסמפראטורה והלחות על התפתחות החידק בקרקעות-מזון שונות ועל הפרי; רגישות הפרי בדרגת הבשלה שונה להדבקה ולהתפתחות המחלה; בדיקות אנאטומיות והיסטוכימיות של כתם הגומה-השחורה בפרי; התנהגות פיסיולוגית של פרי נגוע, כגון נשימה והפרשה של אתילן, בהשוואה לפרי הבריא; השפעת חומרים פונגיצידיים ובקטריוצידים על מחולל המחלה.

שיטות וחומרים

לבידוד החידק *P. syringae* מפירות נגועים ולגידולו שימשו הקרקעות האלה:

1. קרקעות-מזון סינתטיים מקובלים

Nutrient agar (Difco) + Glycerol 1% (NA + G)

(א)

הרכבו:

Meat extract	3 gr
Peptone	5 "
Agar	20 "
Glycerol	1%
Distilled water	1000 ml

pH 7.0-7.2

Sucrose

(ב)

הרכבו:

Nutrient agar (Difco)	23 gr
Sucrose	5%
Distilled water	1000 ml

pH 7.0 - 7.2

King Medium "B"

(ג)

לפי נוסחה של קינג וחובריו (34)

הרכבו:

Difco Protease peptone No. 3	2 %
Bacto agar	1.5%
Glycerol C.P.	1.0%
K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	0.15%
Mg SO ₄ .7 H ₂ O	0.15%

pH. 7.2

2. קרקעות-מזון שהוכנו מהפרי

קרקעות-מזון הוכנו מחלקי קליפה של פרי - פלדו ואלבדו בנפרד. 50 גר' אלבדו או פלדו הוכנסו לחוך 250 מ"ל מים מזוקקים (1:5) ורוסקו במרסק-חשמלי במשך 2 דקות. המיצוי סונן בוואקום והועבר לבקבוק ארלנמיייר. למיצוי הוספו 2% אגר. ה-pH תוקן ל-7.2 ועוקר בלחץ של 1.2 אטמוספירות במשך 20 דקות. הוכן גם קרקע-מזון מעורב מאלבדו ומפלדו, ביחס של 1:1. כל הנ"ל נעשה בנפרד מלימון ירוק ומלימון צהוב.

3. בידוד האורגאניסם

בידוד החידק מפרי נגוע נעשה כלהלן: לאחר חיטוי חיצוני של קליפת לימון במקום הפגס, מורידים את הפגס בעזרת איזמל (סקלפל) מעוקר (סטריילי) וחותכים אותו בתוך כלי מעוקר - מעבירים את החתיכות על פני קרקע-מזון יצוק בתוך צלחת פטרי, שם מחזיקים אותו עד להופעת הצמיחה, לאחר אינקובציה ב-25 מ"צ. לזיהוי האורגאניסם גודל החידק בשלוש קרקעות-מזון: NA + G, Sucrose, King B. מן התרבות שהתקבלה הועברה הצמיחה (בעזרת לולאה בקטריאלית) למשופע של קרקע-מזון. לאחר יומיים הוספו 5 מ"ל מים מזוקקים ואלה נוערו היטב עד שהתקבל תרחיף הומוגני ממנו נעשו תרביות בשיטת המיהולים. לניקוי התרביות השתמשנו בשיטת המיהול. כדי לדעם כמה זמן לאחר הפציעה יכול הפרי להידבק על-ידי החידק, נעשתה הבדיקה הבאה: פירות לימון בצבע אחיד, ירוק-צהוב, נדקרו במחט מעוקרת בכמה מקומות על פני הפרי ומיד לאחר מכן הם הוכנסו לתא לח בטמפרטורה של 20 מ"צ. לאחר פרקי-זמן שונים מהדקירה, הושמו טיפות של צמיחה צעירה של החידק על גבי המקומות הדקורים. הצלחת ההדבקה נבדקה בפירות המפועים לאחר פרקי-זמן שונים. כדי לדעת באיזו מידה תורמים שפשוטים מלאכותיים של הפרי להדבקה על-ידי הפאתוגן, שופשה קבוצת פירות לימון בצבע ירוק-צהוב בצורה קלה מבלי להגיע לאלבדו, בנייר-זכוכית מס' 1. בקבוצה אחרת של פירות הורד חלק מן האלבדו בסכין. מיד לאחר מכן הוכנסו הפירות לתא לח בטמפרטורה של 25 מ"צ. מדי יום, במשך שבוע ימים, הושמו טיפות מתרחיף של צמיחת חידקים צעירה, בת 48 שעות, ונבדקה מידת ההדבקה של הפירות.

4. מבחנים ביוכימיים להגדרת מחולל המחלה

יצירת חומצה ממקורות פחמן שונים

מקורות פחמן שונים הוספו לקרקע-מזון סינחטי (basal medium) (4) במינון של 1% כ"א. למצע זה הוספה 0.0016 חמיסה מסיסה של Bromocresol purple, המשמשת כאינדיקטור לנוכחות חומצה. החידקים גודלו במבחנות סירולוגיות בתוך צינורות דורהם (Durham tubes) המכילות את קרקע-המזון הנוזלי. הם הודגרו ב-30 מ"צ במשך 4 שבועות ונערך מעקב אחר שינויי הצבע החלים בקרקע-המזון. שינוי הצבע של האינדיקטור לצהוב, בחלק המצע, או בכולו, נחשב כריאקציה חיובית ליצירת חומצה.

מקורות הפחמן, שנבדקו לפי Misaghi and Grogan (43).

Pentoses:	Xylose
Hexoses :	Galactose, Glucose, Levulose, Mannose,
Disacharides:	Lactose, Maltose, Melibiose, Sucrose.
Trisacharides:	Raffinose, Trehalose, Melezitose.
Alcohols:	Adonitol, Glycerol, Inositol, Mannitol, Sorbitol.
Glucosides:	Salicin

יצירת אינדול מטריפטופן

יצירת אינדול ניתנת להבחנה על-ידי כך שמגדלים את החידק בקרקע-מזון המכילה חומצה אמינית טריפטופן. מכניסים את האורגאניסם לתוך מבחנות המכילות מצע עם 1% טריפטופן. רצועות של נייר-פילטר, אשר קודם לכן הוטבלו בתמיסה רוויה של חומצה אוקסלית, מוכנסות יחד עם פקקי צמר-גפן כך שיימצאו מעל פני המצע ומבלי שיגעו בו. בנוכחות אינדול מקבלות רצועות הנייר צבע ורוד (17).

יצירת H_2S הפטון

פעולת החידק על הפטון גורמת את פירוקו ויצירת תרכובות פשוטות, כתוצרים סופיים. H_2S הוא בין התוצרים השכיחים ביותר המתקבלים מפעולת החידק. זורעים את האורגאניסם לתוך מבחנות המכילות הפטון מימי. מכינים רצועות של נייר-פילטר בגודל של 5-50 מ"מ, טובלים אותן בתוך תמיסה רוויה של אצטט העופרת ומייבשים אותן בטמפרטורה של כ-120 מ"צ. משחילים את הרצועות יחד עם פקקי צמר-גפן, כך שהפקקים יימצאו צמודים לדופן המבחנה, מעל פני המצע, ומבלי שיגעו בו. את המבחנות מדגירים בטמפרטורה של 25 מ"צ. אם נוצר H_2S , הנפחת שפת הנייר לשחורה כתוך 3-7 ימים, דבר המצביע על ריאקציה חיובית של החידק על הפטון (12).

חיזור ניטראט

חיזור ניטראט (NO_3) לניטרים (NO_2) ניתן להבחנה איכותית על-ידי כך שמגדלים את החידק בקרקע-מזון המכיל ניטראט. הרכב קרקע-המזון הוא: Meat extract (Difco) - 3 gr, Peptone - 5 gr, KNO_3 - 1 gr, Distilled water 1000 ml, pH 7.2.

לבדיקת נוכחות ניטריט משמשים הריאגנטים האלה:

- A) sulfanilic acid
- B) α - Naphthylamine

זורעים תרבות חידקים בת 48 שעות לקרקע-מזון נוזלי, מדגירים כ-30 מ"צ למשך 5-10 ימים, מוסיפים 1 מ"ל מריאגנט A ו-1 מ"ל מריאגנט B ומערבבים היטב. הפיכת צבע התמיסה לאדום או חום מעידה על ריאקציה חיובית (43).

USCHINSKY SOLUTION

Glycerol - 30 ml, NaCl_2 - 0.5 gr, CaCl_2 - 0.1 gr, זהו מצע נוזלי בעל ההרכב הבא:
 Mg SO_4 - 0.3 gr, Dipotassium phosphate - 2.5 gr, Ammonium lactate - 6.5 gr,
Sodium asparaginate - 3.5 gr, Distilled water - 1000 ml

זורעים תרבות חידקים בת 48 שעות ועוקבים אחרי נוכחות, או העדר : עכירות, מישקע, קרום, התהוות פיגמנטאציה צהבהבה-ירקרקת ופלואורסצנציה (40).

פרוק ג'לטין

ג'לטין הוא חלבון מן החי, עשיר בחומצות אמיניות והוא משמש מצע נוח לבדיקת פעילות פרוטאוליטית של חידקים. זורעים את החידק במבחנות עם מצע ג'לטין, בתרבות צעירה בת 48 שעות ומדגירים במשך 48 שעות. לאחר מכן שמים את המבחנות במקרר, בטמפרטורה של 4-5 מ"צ במשך שעה ובודקים אם יש התמוססות המצביעה על פירוק הג'לטין (17).

LITMUS MILK- שינוי צבע ב-

כידוע המרכיבים העיקריים של החלב הם סוכרים (לקטוז וגלוקוז) וחלבונים (לקטואלבומין וקזאינוגן). פעילות החידקים על מרכיבי החלב גורמת שינויים בצבע התמיסה, התגבנות (קואגולציה) ונוכחות פפטוניזציה. השינויים בצבע נבדקים באמצעות הליטמוס, המשמש כאינדיקאטור. שינויים בצבע התמיסה נגרמים עקב פירוק גלוקוז - ואז משתנה צבע האינדיקאטור מכחול לוורוד ובחזרה לכחול, או עקב פירוק לקטוז - ואז נוצרת חומצה בשיעור רב, דבר שיחזר את האינדיקאטור ויחולל שינוי בצבע לאדום-וורוד. כתוצאה מירידת ה-pH עם פירוק הלקטוז, מופיע משקע של קזאין (קואגולציה). פעילות של אנזימים פרוטאוליטיים גורמת הידרוליזה של החלבון ושחרור חומצות אמיניות חופשיות ומשום כך מתקבל מדיום צלול (Peptonization). הליטמוס משמש לא רק כאינדיקאטור לשינוי ב-pH התמיסה, אלא גם כאינדיקאטור לריאקציות חמצון-חיזור. במצב מחומצן - הליטמוס הוא אדום או כחול, לפי pH המדיום, במצב מחוזר - הליטמוס הוא חסר צבע.

זורעים אינוקולום מצמיחה צעירה למבחנה המכילה 5 מ"ל של תמיסת חלב ומכניסים לאינוקובאציה במשך 4 שבועות, תוך כדי עיקוב אחר השינויים החלים בה (17).

התהוות אמוניה בקרקע-מזון (Nutrient broth)

מבחן זה נועד לגלות התהוות אמוניה על-ידי פעילות חידקים. זורעים מתרביה לתוך מבחנה עם 5 מ"ל קרקע-מזון ומדגירים במשך 4-5 ימים. בתום הדגירה, מכניסים את המבחנה לאמבט עם מים רותחים למשך מספר דקות; בודקים את שינוי הצבע של נייר ליטמוס מצהבהב לכחול. הפיכת צבע האינדיקאטור לכחול מעידה על ריאקציה חיובית (יצירת אמוניה) (17).

5. שיטות לבדיקת התפתחות החידק

התפתחות החידק בתרביה, בטמפרטורות שונות

נבדקה השפעתן של טמפרטורות קבועות של 5, 8, 14, 17, 20, 25, 30 מ"צ על התפתחות החידק בתרביה. בכל טמפרטורה נבחנו ארבע חזרות של התרביה ונמדד קוטר המושבות על גבי קרקע-המזון, ע"י מיקרומטר במיקרוסקופ, בהגדלה $\times 100$.

התפתחות הגומה בפרי המודבק בטמפרטורות שונות

להדבקת פרי הוכן תרחיף של החידק אשר גודל על משופע קרקע-מזון והודגר ב-25 מ"צ במשך 48 שעות. מים מזוקקים מעוקרים שנוערו היטב הוספו למבחנה של 5 מ"ל לשם קבלת תרחיף הומוגני של חידקים. הדבקות הפרי נעשו על-ידי דקירות עדינות בפרי דרך טיפות של תרחיף החידקים וספטוף חוזר של התרחיף על מקום הפציעה. כביקורת נדקרו פירות במחט מעוקרת דרך טיפות מים, במקום טיפות התרחיף. לאחר ההדבקה הוחזקו הפירות בתא לח, בטמפרטורה קבועה של 5, 9, 14, 17, 20, 25, 30 מ"צ. בכל טמפרטורה נבטו שלושה פירות, וכל פרי הודבק בארבעה מקומות שונים. קוטר הכתם שהתפתח בפרי נמדד במשך 10 ימים.

הדבקת פירות לימון בדרגות התפתחות שונות

על מנת לבחון אם יש קשר בין שלב ההתפתחות של הפרי לכין אפשרות הדבקות על-ידי החידק, נקטפו מאותו העץ פירות שהיו בשלבי התפתחות שונים, החל מפרי ירוק בקוטר של 4 ס"מ ועד לפרי צהוב בקוטר של 9 ס"מ; הפירות הודבקו והוכנסו לתא לח, בטמפרטורה של 20 מ"צ. במקביל, נדבקו פירות בהיותם על העץ: חלקם הושאר על העץ וחלקם האחר נקטף והונח בפרדס על הקרקע. כדי לשמור על הלחות הדרושה להצלחת ההדבקה, הוכנסו הפירות לשקיות פוליאתילן עם מים למשך מספר שעות. נקבעה דרגת התפתחות המחלה ונמדד הגודל של כתמי הגומה שהתפתחו על הפרי.

כושר ההתקיימות של החידק בתנאי יובש

האורגאניסם גודל על משופע של $NA + G$ והודגר ב-25 מ"צ, במשך 48 שעות. מן הצמיחה שצמחה על קרקע-המזון הועברו ממרחי צמיחה, בעזרת לולאה בקטריאלית, למבחנות סטיריליות, שפוקקו בצמר-גפן והושארו בתנאי טמפרטורת החדר במשך שישה חודשים. מדי חודש נבדק כושר ההתקיימות של החידק על-ידי שפיכת אגר, שצונן לטמפרטורה של 48-50 מ"צ, לתוך המבחנה ונערך מעקב אחר צמיחת החידק בקרקע-המזון.

כושר הפאתוגניות והחיות של החידק בתרחיף

האורגאניסם גודל מתרביית בת 48 שעות על שיפוע קרקע-מזון $NA + G$, והודגר ב-25 מ"צ, במשך 48 שעות. ממשופע זה הועברה צמיחת האורגאניסם, בעזרת לולאה בקטריאלית, למבחנה עם 20 מ"ל מים מעוקרים, עורבבה היטב והושארה בטמפרטורת החדר במשך שישה חודשים. החיות והפאתוגניות של החידק נקבעו מדי חודש על-ידי בדיקת כושר ההדבקה בפירות לימון וכן הצמיחה על קרקע-מזון מוצק.

6. בדיקות מיקרוסקופיות

בדיקות היסטולוגיות

לימונים הודבקו באופן מלאכותי בחידק הנדון על-ידי דקירות עדינות בפרי דרך סיפות של תרחיף-חידקים. 14 יום לאחר ההדבקה נלקחו פירות נגועים לבדיקות היסטולוגיות. לצביעת החידקים ברקמה צמחית שימשה שיטת קלאודיו (לפי 49). החתכים נעשו במיקרוסום-קרח, בעובי של 10-15 מיקרון. החתכים עברו קיבוע (פיקסציה) באלכוהול אבסולוטי, במשך 48 שעות. האלכוהול הישן הוחלף בטרי כעבור 24 שעות. החומרים ששימשו לצביעה בשיטה זו הם:

Methyl violet, Picric acid $1/2$ sat. aq. dist. Sol., Chloroform, Ethyl alcohol absolute.

אופן הצביעה של חתכים מיקרוסקופיים

בשיטת Methyl violet החידק נצבע בכחול. בשיטה זו מכסים את החתכים בתמיסה Methyl violet מהולה במים (1:100) במשך דקה אחת. סופגים את עודף הצבע ומעבירים את החתכים לדקולורציה בכלורופורם. מחליפים את התמיסה עד שהצבע נעשה סגול-בהיר ולבסוף משאירים את החתכים בתוך הכלורופורם במשך הלילה. לפני הכנת הפרפראט שוטפים שוב בכלורופורם וקובעים את החתכים בתוך Canada balsam.

בדיקות היסטוכימיות

כדי לעקוב אחר שינויים היסטוכימיים ברקמה מודבקה, לעומת בריאה, נבדקו מרכיבי הרקמה הבאים:

(32) Johansen	לפי	Ruthenium red	על-ידי	<u>Pectic substances</u>	(1)
(32) Johansen	לפי	IKI - H ₂ SO ₄	על-ידי	<u>Cellulose</u>	(2)
(53) Siegal	לפי	Phloro-glucinol	על-ידי	<u>Lignin</u>	(3)
(31) Jensen	לפי	Sudan dyes	על-ידי	Total lipids	(4)

7. בדיקות פיסיולוגיות של פרי מודבק

הדבקת פרי במיקרואורגאניסמים עלולה לגרום שינויים בתהליכים פיסיולוגיים רגילים, כגון עוצמת הנשימה והפליטה של אתילן, ולכן נבדקה השפעת החידק *P. syringae* על תהליכים אלה.

עוצמת הנשימה של הפרי

בדיקות של עוצמת הנשימה נעשו בפירות לימון שהיו ביום הקטיפה בגודל אחיד, (קוטר של 5-6 ס"מ) ובצבע ירקרק. חלק מן הפרי הודבק על-ידי החידק בשיטה של דקירות עדינות דרך סיפות של תרחיף חידקים, חלק שני נדקר דרך סיפות מים בלבד לבדיקת ההשפעה של הפציעה עצמה על הנשימה וחלק שלישי נשאר לא-מסופל, כביקורת. הפירות נשקלו, הוכנסו לצנצנות זכוכית, בתוך חדר עם טמפרטורה קבועה של 14 מ"צ. בדיקות הנשימה נעשו בשיטה של זרימת אוויר מתמדת לתוך הצנצנות. הצנצנות נסגרו למשך שעה לפני לקיחת דגימת האוויר באמצעות מזרק. עוצמת הנשימה של הפירות חושבה במ"ג פחמן דו-חמצני המופרש מק"ג פרי טרי במשך שעה (6,5). קביעת ה- CO_2 נעשתה במכשיר גז-כרומאטוגרף מתוצרת פיישר. הבדיקות נעשו בפרי נגוע, בהשוואה לפרי הבריא והפצוע בלבד (ללא הדבקה), במשך 10 ימים מיום ההדבקה. בכל סיפול היו שלוש חזרות ולניסוי כולו היו שתי חזרות.

פליטת אתילן מהפרי

במקביל לקביעת עוצמת הנשימה של הפרי הנ"ל, נקבעה כמות האתילן המופרשת מהפרי המודבק, הפצוע והבריא. החישוב נעשה במיקרוליטר (μl) אתילן המופרש מק"ג פרי טרי במשך שעה. הקביעה נעשתה בעזרת גז-כרומאטוגרף מתוצרת פאקארד.

השפעת סיפול אתילן (הבחלה) על התפתחות הגומה

על מנת לבדוק מה תהיה השפעת הטיפול באתילן על התפתחות הגומה השחורה בפרי שהודבק בחידק הנדון והוכנס להבחלה, או בפרי שהודבק לאחר שעבר את הטיפול - נערך הניסוי הבא: פירות לימון בגודל בינוני ובצבע ירוק אחיד (נקטפו מאותו הפרדס), הוכנסו לתוך צנצנות-זכוכית בלחות גבוהה מ-95% ובטמפרטורה של 25 מ"צ. תערובת אוויר עם אתילן בריכוזים שונים של 0, 5, 10 ו-20 ח"מ הוזרמה לפרי במשך שלושה ימים. בתום הטיפול הודבקו הפירות בחידק בשיטת הדקירות ונעשה מעקב אחר התפתחות הגומה.

קבוצה אחרת של פירות הודבקה קודם הכנסתה לתנאים שתוארו לעיל, ונערך מעקב אחר התפתחות הגומה בפרי.

8. בדיקת רגישות החידק לחומרי הדברה

הבדיקות נעשו בשתי שיטות:

1. חומר הדברה בתוך תרחיף מימי של החידקים.

2. חומר הדברה בתוך קרקע-מזון מוצקה.

1. עקרון השיטה מבוסס על הכנסת החידק לתוך התרחיף שבו מצוי החומר הנבדק, בריכוז המתאים.

לוקחים "לופה" של צמיחה שעל שיפוע קרקע-המזון ומכניסים אותה לתוך המצע המורעל, מנערים היטב וזורעים מיד לאחר מכן על קרקע-המזון המוצקה הרגילה.

2. עקרון השיטה מבוסס על הכנסת חומר הדברה לקרקע-מזון NA+G בריכוזים הרצויים וזריעת החידק (מתרבית בת 48 שעות). 5 מ"ל מים מעוקרים הוספו שיפוע קרקע-המזון ונוערו היטב לקבלת תרחיף הומוגני. מן התמיסה נלקחה "לופה" של התרחיף ונזרעה על פני קרקע-מזון מוצקה שבה נמצא חומר ההדברה הנבדק.

החומרים שנבדקו בשתי השיטות הנ"ל היו: בנומיל, תב"ז (חיו-בגלזל), פן - 44 גפרת-נחושת, כלור וסאופ"פ בריכוזים של 100, 250, 500, 1000, 2000, 10000 ח"מ. הרגישות לחומרי ההדברה בריכוזים השונים נקבעה על-פי מידת צמיחת החידק על קרקע-המזון (או העדרה).

השפעת הלימונן על החידק

כיוון שהלימונן מוקרן ידוע כבקטריוציד, לגבי חידקים מסויימים (62), והוא מצוי בכמות

גדולה בתוך בלוטות השמן האתרי שבקליפת הלימונן, נבחן גם השפעתו על צמיחת החידק *P. syringae* הנדון.

הלימונן הושג על-ידי זיקוק מיקטע של שמן-אתרי מתפוזים, שנחקבל מהמעבדה של בית-חרושת

"יפאורה" שברחובות. כמות מסוימת של החומר הוקרנה על-ידי הצבתה באור השמש והיא אוחסנה

עם כמות לא-מוקרנת ב-3-4 מ"צ. בדיקת ההשפעה של הלימונן על צמיחת החידק נעשתה על-ידי הכנסת ריכוזים שונים של החומר - עד 10,000 ח"מ (אשר הומס תחילה באלכוהול) - לתוך קרקע-המזון.

קרקע-מזון שהכילה את הלימונן נשפכה לתוך צלחת-פטרי שבתחתיתה הושמה, קודם לכן, סיפה מתרחיף

החידק. לאחר מכן נבדקה השפעת לימונן רגיל ולימונן מוקרן על התפתחות החידק בטמפרטורה של 25

תוצאות ודיון

א. בדיקות in vitro

1. התכונות המורפולוגיות והקשר לפאתוגניות של החידק *P. syringae*

לאחר 48 שעות דגירה בשלוש קרקעות-מזון ששימשו לזיהוי החידק *P. syringae*, צמחו מושבות אופייניות לחידק בכל אחת מקרקעות-המזון:

I. King B, התפתחה מושבה בצבע אפור-בהיר, שטוחה, עשויה שלוש טבעות קונצנטריות. במבט על צלחת הפוכה הטבעת המרכזית היא כהה ואילו הטבעות, הפנימית והחיצונית, הן בהירות. צורת המושבה היא לולינית (ספירלה) שבמרכזה כיפה עם נקודה באמצע. כעבור 2-3 ימים, קיבלה קרקע-המזון צבע ירוק-בהיר.

II. NA + G. התפתחה מושבה שטוחה בצבע אפור-בהיר עשויה שלוש טבעות קונצנטריות. עם הזמן נעשתה קרקע-המזון ירקרקת.

III. Sucrose. התפתחו מושבות עגולות, בצבע לבן, מקומרות, חלקות עם טבעות מבריקות (במבט על צלחת הפוכה).

גם בקרקע-מזון King B וגם בקרקע-מזון Sucrose הופיעו מושבות עומק קטנות, משני טיפוסים - טבעתיות ומאורכות.

בספרות ידוע על קיום מיתאם בין המורפולוגיה של מושבות *P. syringae* לבין הפאתוגניות שלהן. סמית (56) מצא שהטיפוס היוצר מושבה חלקה גורם פגמים אופייניים ללימון ואילו הטיפוס היוצר מושבה מחוספסת-מקומטת היה בעל פאתוגניות חלשה וגרם פגמים קטנים. לפי סמית גידול החידק במשך שנה או יותר ברציפות על קרקע-מזון גלוקוז-תפוחי-אדמה, יכול לשנות צמיחה אופיינית חלקה לצורה מקומטת ואז הווירולנסיות של האורגניזם הולכת ופוחתת. מימצא דומה נמצא על-ידי שארפ (52) ב- Bacterium phaseoli sojense והוא מדווח על interconvertibility בין שני הטיפוסים.

בריאן השוותה בין הגזע שנמצא בהולנד (*P. syringae* (Van Hall) לבין הגזע שהתגלה באילינוי כאשר גידלה את שניהם על peptone beef infusion agar. מהגזע ההולנדי נתקבלו לאחר 24-48 שעות, מושבות עגולות, לבנות, קמורות, חלקות, שקופות, ההופכות לשטוחות כעבור 7 ימים ואינן מתקמטות בשום שלב והמצע של הגידול הפך להיות ירוק. מהגזע האילינוי נתקבלו, לאחר 24-48 שעות, מושבות זהות לאלה של הגזע ההולנדי.

טבלה 1: יצירת חומצה מקרבוהידראטית בקרקע-מזון סינתטיים על ידי *B. subtilis* (30-2) (30-1)

ס'ת	ס'ת										ס'ת		ס'ת		ס'ת			
	ס'ת					ס'ת					ס'ת		ס'ת					
ס'ת	Adoni-	Manni-	Sorbi-	Inosi-	Glyce-	Treha-	Rafi-	Mele-	Melli-	Malto-	Lactose	Sucro	Mann-	Ga-	Levu-	Glu-	Xylose	
Salicin	tol	tol	tol	tol	tol	lose	nose	zitose	biose	se			ose	lac.	lose	cose		
-	++	++	++	+	++	++	++	+	++	+	-	++	++	++	++	++	++	A/1
-	-	+++	+++	+++	++	+	++	+	++	+	-	++	++	++	++	++	++	A/2
-	-	++	+	+	+	++	++	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++	R/1
-	-	+++	+++	+++	++	++	++	-	++	-	-	+++	++	++	++	++	++	R/2
-	-	+++	+++	++	++	++	++	-	++	-	-	+++	++	++	++	++	++	108
-	-	+++	+++	++	++	++	++	-	++	-	-	+++	++	++	++	++	++	222/*

פ'ת 3 ת'ת 3 פ'ת 3 ת'ת 3 פ'ת 3 ת'ת 3

פירוק מלא תוך 3 ימים ++
 פירוק מלא תוך 7 ימים ++
 פירוק מלא תוך 11 ימים +
 חלשה מאוד *
 חלילה -

מספר הפירוק של תרכובות פחמן על-ידי איזולאסים
 (ימים לאחר התחלת הניסוי)

מספר ימים עד לפירוק המיני	האיזולאס	הפרי שסמנו בדרך האיזולאס
7	A1	לימון
7	A2	לימון
7	R1	לימון
10	R2	לימון
11	108	לימון
7	222/א	מנגו

לאחר מכן שוקע מרכז המושבות האלה והן הופכות להיות מקומות מאור. הקמטים גדלים עם צמיחת המושבה, הקצוות נשארות תפוחות וחלקות ואילו המצע שעליו גדלות המושבות הופך להיות ירוק.

בתוצאות שקיבלנו בעבודה שלנו נראה שהבידוד שלנו מהלימון דומה יותר בתכונותיו המורפולוגיות לגזע ההולנדי. כאמור, המושבות שנחקבלו אצלנו היו חלקות, עגולות, שטוחות או קמורות, לאחר מכן הפכו להיות שטוחות משתפכות.

2. תכונות פיסיולוגיות של החיידק

נבחנו אפשרות שימוש בתרכובות פחמן על-ידי איזולטים *P. syringae* שבדדו ממוצא שונה.

(א) פירוק תרכובות פחמן

נמצא שהאורגאניזם מסוגל לפרק שורה ארוכה של תרכובות פחמן (טבלה 1). הריאקציה שנוצרה היתה חומצית, בלא יצירת גז, במשך כל תקופת הבדיקות (28 יום). לא נמצאו הבדלים משמעותיים בתוצאות, מבחינת פירוק תרכובות הפחמן, בין האיזולטים השונים שנבדקו. בדיקות אלה הראו שהחיידק אינו משתמש ב- *melezitose* (מבין האוליגוסכרידים), ב- *lactose* וב- *maltose* מבין הגליקוזידים. תוצאות אלה תואמות את התוצאות שקיבלו דוסון (17) ו-מיסאכי וגרוגן (43) לגבי אי-פירוק החומרים הנ"ל על-ידי האורגאניזם *P. syringae*. בניגוד לממצאיהם של מיסאכי וגרוגן כי החיידק אינו מפרק *trehalose*, הרי שבבדיקה שנעשתה בעבודה זו החיידק אמנם השתמש בו.

במעקב אחר השינויים בצבע של קרקע-המזון שנמצא בהן פירוק של תרכובות פחמן על-ידי החיידק הנדון, התברר שהפירוק החל שלושה ימים לאחר התחלת הניסוי להוציא את R_1 שבו התחיל הפירוק אחרי יומיים. ברוב האיזולטים היה שיא הפירוק כעבור שבוע ימים, חוץ מהאיזולטים R_2 ו-108 (טבלה 2).

(ב) מבחנים ביוכימיים

במבחנים השונים לא נמצאו הבדלים בין האיזולטים השונים מבחינת התכונות הביוכימיות של *P. syringae* (טבלה 3). מחברר שהאורגאניזם מסוגל לחזר ניטראט לניטריט בכמות רבה. חכושר לחזר ל- X_2 מאפשר לחיידק גדילה כתנאים אנארוביים במצע המכיל ניטראט (56).

טבלה 3: תגובות החיידק *P. syringae* למבחנים ביוכימיים

האיזולט	יצירת אינדול	יצירת H_2S	חיזור ניטראט	תמיסת אושניסקי	פירוק ג'לטין	לישמוס מילק	קרקע-מזון
A_1	חיובי	+++	+++	+++	++	תגובה אלקלית+ פסטוניזציה	יצירת אמוניה
A_2	"	+++	+++	++	++	"	"
R_1	"	+++	+++	+++	+++	"	"
R_2	"	+++	+++	++	++	"	"
108	"	++	+++	+++	+++	"	"
222/k	"	+	++	+	+	"	"

עוצמת התגובה של האיזולטים לעיסטים:

+ תגובה חלשה
++ תגובה בינונית
+++ תגובה ניכרת

נמצא שלאורגניזם יש כושר המסת ג'לטין הוא יוצר שכבה מומסת של ג'לטין בחלק העליון של קרקע-
המזון. בליטמוס מילק גרם החידק תחילה לשינוי צבע החלב לסגול חיוור, אולם הצבע השתנה שוב מסגול
לצבע החלב. שינוי הצבע מארגמן לכחול ושוב לארגמן מצביע על כך שהחידק השתמש בכמות הקטנה של
גלוקוז המצויה בתרכובת הנבדקת ולא בלקטוז (יצירת צבע סגול). עם זאת הוא פעל גם על לקטובומין ויצר
אמוניה. ואפינים ולכן השתנה הצבע שוב לארגמן. החידק גרם לפפטוניזאציה (עיכול על-ידי אנזימים
פרוטאוליטיים) של קסאינוגן ויצירת מדיום בסיסי. כתוצאה משחרור אמוניה אמינים, והחלב נעשה צלול
ושקוף יותר. כמו כן הכחיל הליטמוס בצורה קלה עקב חיזור ליטמוס. נמצא שהאורגניזם הנדון יצר אינדול
מטריפטופן וכי יצירת H_2S גרמה השחמת השפה של צייר הפילטר שהוטבל בתמיסה רוויה של אצטט העופרת.
תוצאות הבדיקות של איזולאטים שבודדו בארץ תואמות את תיאור תכונותיו של האורגניזם מגזע הולנדי,
כפי שתוארו על-ידי חוקרים אחרים (9, 17, 43, 56).

3. השפעת הטמפרטורה על צמיחת החידק

השפעת הטמפרטורה על צמיחת החידק נבחנה בשלוש קרקעות-מזון סינתטיות שונות: King B, Sucrose ו- Na+G (ציור 1). התוצאות מראות שיש הבדלים בגודל המושבות של האורגניזם שגדל
בקרקעות-המזון השונות. התפתחות החידק היתה טובה יותר על King B שהיא קרקע-מזון עשירה מן
האחרות. לרוב לא נמצאו הבדלים מהותיים בין התפתחות החידק על Sucrose לבין Na + G. האופטימום
להתפתחות החידק בשלוש קרקעות-המזון היה 25 מ"צ. גודל המושבות הלך ופחת מתחת לטמפרטורה זו
ומעליה. בולטת ההתפתחות המועטה של המושבה בטמפרטורה הנמוכה של 5 מ"צ.

וולקני (60) מצאה את הגודל המירבי של המושבות על קרקע-מזון NA בטמפרטורה של 27-28.5 מ"צ.
ירידה בגודל המושבה חלה מתחת לטמפרטורה זו ומעליה. לפי שניידר (51) הטמפרטורה המיטבית
(אופטימלית) לצמיחת *P. syringae* בתרבית הוא 15-25 מ"צ, אולם גידול מסויים אשרי גם קרוב ל-0 מ"צ
אך לא מעל 25 מ"צ. סמית (56) מצא גידול מירבי של המושבה בטמפרטורה של 21.7 מ"צ בקרקע-מזון של
צ'אפ. ההתפתחות המיטבית של החידק שבודד על-ידנו מלימון דומה לזו שנמצאה על-ידי בריאן (9) לגבי
ההתפתחות המיטבית של החידק שבודד מליך. היא מצאה שהחידק בטמפרטורה מירבית של 35 מ"צ ובטמפרטורה
מיזערית של 1- מ"צ. לי (39) קיבל את הצמיחה הטובה ביותר בטמפרטורה של 25-28 מ"צ ומצא את נקודת
התמותה של החידק ב-50 מ"צ.

4. השפעת קרקע-מזון מפירות-הדר על צמיחת החידק

מיצויים של קליפות לימון ירוק או צהוב, אלבדו ופלדו, בנפרד וביחד, שימשו כקרקע-מזון
שעליה גדל החידק, במטרה לבחון את השפעת מרכיבי קליפת הפרי על עוצמת הצמיחה של החידק מחולל
הגומה השחורה (טבלה 4).

טבלה 4. עוצמת הצמיחה של מושבות החידק בקרקעות-מזון טבעיים של קליפות לימון ירוק וצהוב (קוטר ממוצע, במ"מ).

ימים	פרי ירוק *		פרי צהוב	
	אלבדו	אלבדו + פלבדו	פלבדו	אלבדו
2	0.96	0.83	0.99	0.75
3	2.09	1.05	2.00	1.50
5	2.59	1.50	3.10	2.58
6	2.59	1.75	3.40	2.70
7	2.78	2.00	3.50	2.70
8	2.78	2.50	3.71	2.70
			אלבדו+פלבדו	
			1.23	
			2.32	
			3.45	
			3.68	
			4.00	
			4.50	

* בפלבדו לא היתה צמיחה כלל.

נמצא כי בקרקע-מזון שמקורה מפלבדו של פרי ירוק בלבד לא צמחו חידקים. על מנת לברר אם הסיבה להעדר צמיחה קשורה בחוסר מזון או במציאות חומרים רעילים, נוספו לקרקע-המזון גם 2% סוכרוז, ואז נתקבלו מושבות של החידק, תופעה זו מצביעה על כך שבפלבדו של קליפת פרי ירוק לא נמצאו חומרי מזון מספיקים להתפתחות החידק. לעומת זאת, בפלבדו של קליפת פרי צהוב היתה צמיחה (טבלה 4) וסביר להניח שפוליסכרידים המצויים בפלבדו של פרי ירוק עוברים בהבשלה פירוק לסוכרים עשויים יותר המשמשים מקור הזנה מתאים להתפתחות החידק.

קרקע מזון שהוכנה מאלבדו עם פלבדו של פרי ירוק, הקטינה את גודל המושבות בהשוואה לקרקע-מזון המורכבת אך ורק מאלבדו, וכנראה שהסיבה לכך היא שלרשות החידק עמדו מקורות המזון של האלבדו בלבד. בקליפות של הפרי הצהוב היתה התמונה שונה. בפלבדו בלבד התקבלו מושבות בקוטר גדול מאשר באלבדו בלבד; תערובת של אלבדו ופלבדו הגדילה גודל מושבות החידק ביחס לגודל המושבות בכל אחד ממרכיבי קליפת הפרי לחוד. מכאן, שפלבדו של פרי צהוב, בניגוד לזה של פרי ירוק, תורם חומר מזון להתפתחות החידק.

1. תאור המחלה ובידוד האורגאניזם

תאור המחלה: הפגמים של הגומה השחורה נפוצים בפירות לימון יותר מאשר בפירות הדר אחרים. הגומה היא פגם בצבע חום-כהה עד שחור בקליפת פרי הלימון ואילו בתפוז או במנדרינה הצבע הוא אפור-כהה עד אדמדם-חום. (תמונות 1, 2, 3, 4).

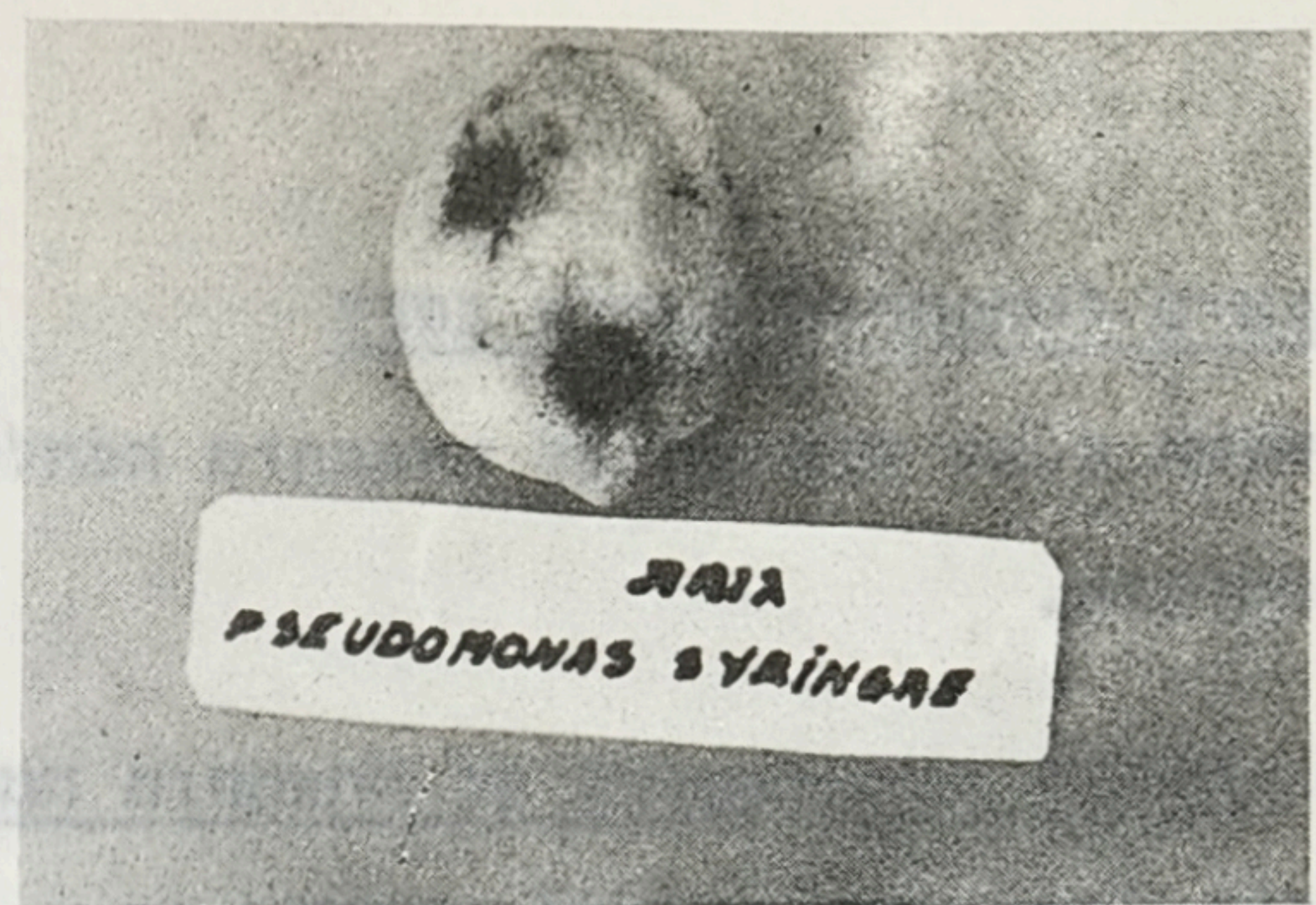
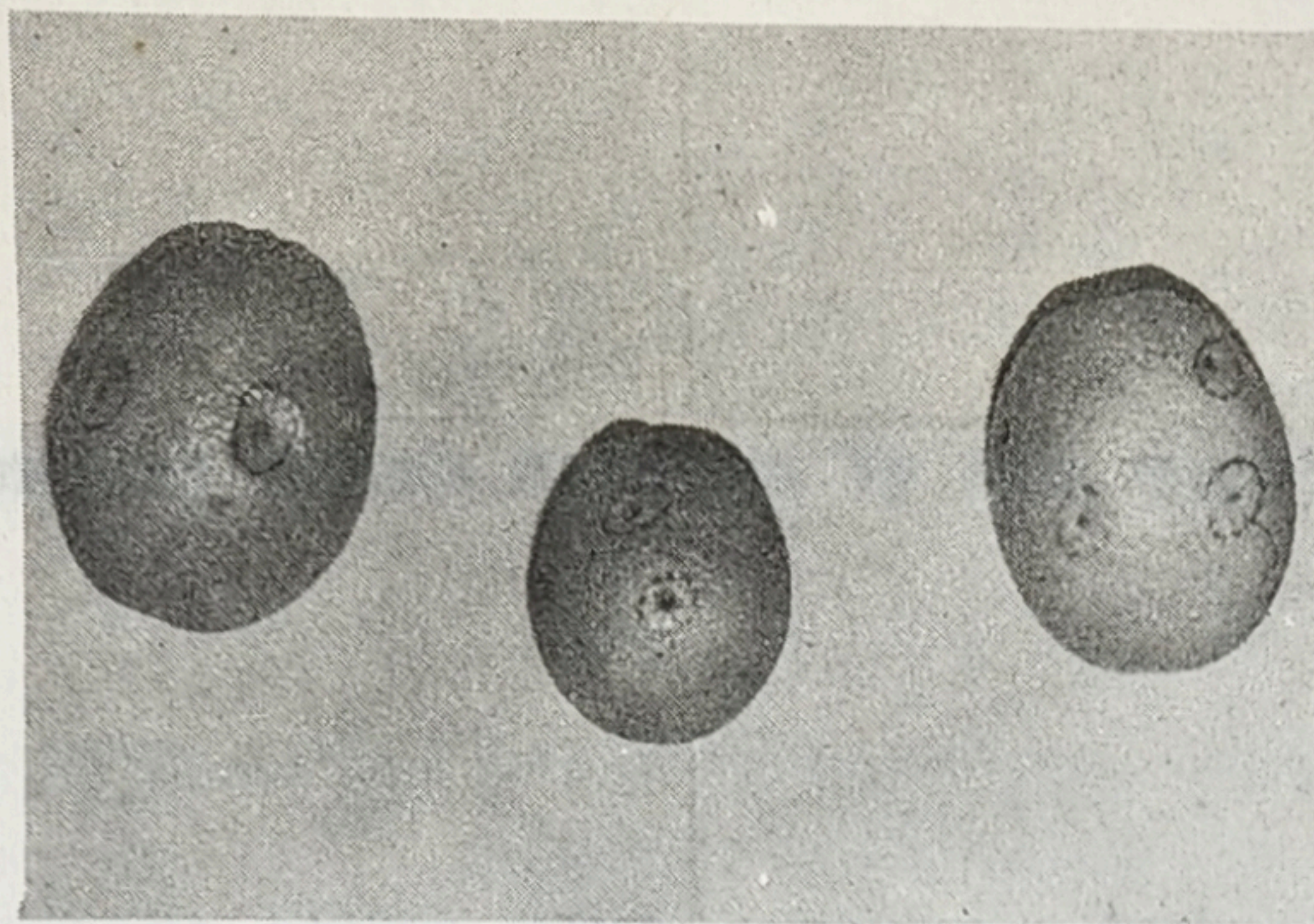
בהסתכלויות נמצא כי מחלת הגומה השחורה מתפתחת בחלק החיצוני של קליפת פרי-ההדר (פלדו) וכן בחלק הפנימי הלבן (אלבדו), אך אינה חודרת לחלק הבשרני של הפרי (ציפה). הפגמים עמוקים יותר בלימונים מאשר בפירות אחרים. הפגם הוא יבש, בדרך כלל קונצנטרי, ונוטה להתפשט. נמצא שגודל הכתם נקבע על-ידי הטמפרטורה ודרגת התפתחות הפרי. בניסוינו הופיעה המחלה גם בתנאי אחסון וסביר להניח שההדבקה ארעה עוד במסע.

Tcheretele ו-Tchanturia (59) מצאו כי החידק מחולל את הגומה השחורה בהדרים בתנאי אחסון של 4-5 מ"צ ולחות יחסית של 85%-88%. הגומה השחורה היא בדרך כלל קשה, אולם עלולים לחדור לתוכה גם מחוללי-מחלה משניים ולגרום רקבונות לחים.

להתפתחות המחלה יש שלושה שלבים: השלב הראשון הוא מהדגירה (Incubation) עד להופעת סימני המחלה הראשונים: שינויים קלים בצבע הקליפה ונקודות חומות סביב מקום ההדבקה כתוצאה מהשחרת בלוטות השמן; השלב השני הוא שקיעת הקליפה במקום המודבק ובשלב זה הולך הצבע ונעשה כהה יותר בעוד שהפגם עדיין לא מוגדר; השלב השלישי הוא הופעת הצבע השחור או הכהה והמשך גידולו והעמקתו של הפגם. לעיתים, קשה להבדיל בין פגמים ממוצא בקטריאלי לבין פגמים ממוצא אחר, כגון שפשופים וחומרי הדברה. הפגם הבקטריאלי הוא לרוב שקוע יותר, עמוק יותר, ומרכזו בולט בצבעו הכהה ומצביע על מקום חדירת הפאתוגן.

בידוד האורגאניזם: בשלב הראשון של המחקר בודד החידק מפרי הלימון שנאסף מפרדס ליד רחובות ומפרדס ליד אשקלון. (ראה הפרק על "שיטות וחומרים"). מושבות טיפוסיות התקבלו מהקליפות הנגועות כעבור 48 שעות דגירה.

לשם בדיקת הפאתוגניות של הבידודים שנתקבלו (A_1 , A_2 בפרדס אשקלון ו- R_1 , R_2 בפרדס רחובות), נערכה השוואה ביניהם לבין תרביות של *P. syringae* מלימונים וממנגו שנתקבלו מהמחלקה לפתולוגיה, מכון וולקני (טבלה 2). נבדקו תכונותיהם הפיסיולוגיות, המורפולוגיות והפאתוגניות ונמצא שבידוד A_1 הוא בעל וירולנטיות רבה יותר מאחרים (התוצאות ניתנות להלן). מסיבות אלה שימש בידוד זה לחלק ניכר של המחקר.



תמונה 2: פגמים של גומא שחורה בקליפת שמוטי כתוצאה מהדבקה מלאכותית של החידק P. syringae

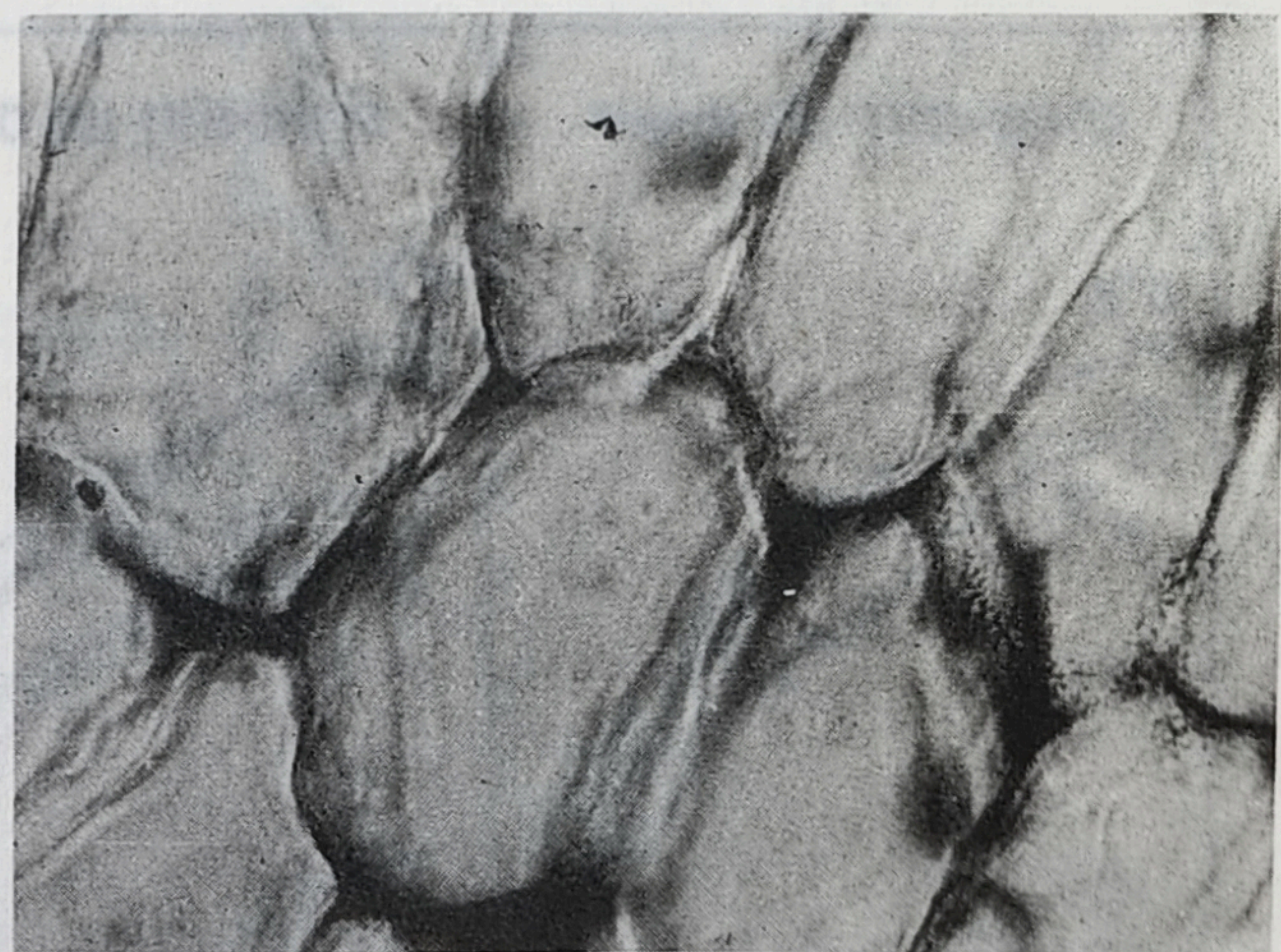
תמונה 1: פגמים של גומא שחורה על קליפת לימון כתוצאה מהדבקה מלאכותית של החידק P. syringae



תמונה 4: פגמים בשמוטי החשודים כגומא שחורה

תמונה 3: פגמים של גומא שחורה בקליפת לימונים, כתוצאה מהדבקה טבעית של החידק P. syringae

תמונה 5: הימצאות החידק P. syringae בתוך התא בתוך חללים בין-תאיים וסמוך לדופן התא של קליפת פרי לימון. (מיקרוסקופ פאזות, הגדלה 120x).



2. תנאים להתפתחות המחלה בפרי

השפעת תנאי הסביבה על התפתחות המחלה נבחנה במגמה ללמוד מכך על התפתחות המחלה ותפוצתה בתנאי הארץ השונים.

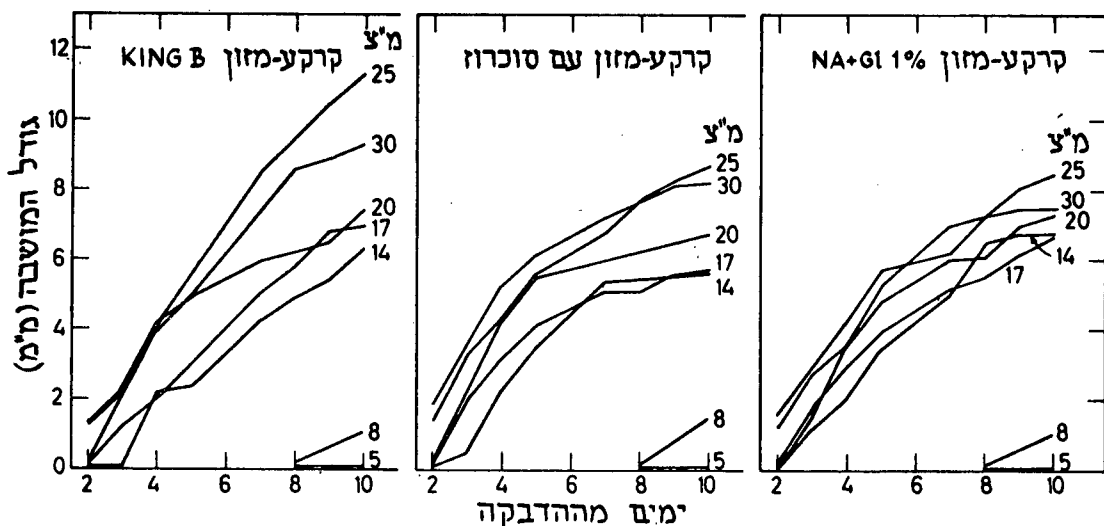
א. השפעת הטמפרטורה על התפתחות המחלה

נמצא (ציור 2) כי החל מהדבקת הפרי ועד הופעת הכתם השחור האופייני לשלב המחלה הסופי אפשר היה להבחין בשלושה שלבים של התפתחות הפגם: הופעת סימני המחלה (תקופת הדגירה), הופעת שקיעה, השחרת הכתם. כמו כן נמצא, כי עם עליית הטמפרטורה הולכת תקופת הדגירה ומתקצרת וחל זירוז בהתפתחות הגומה בפרי. קצב ההתפתחות המהיר ביותר של המחלה בלימון נמצא ב-25-30 מ"צ (ציור 3). התפתחות זו היתה בהתאמה מלאה עם תוצאות התפתחות החידק *in vitro* (ציור 1). האופטימום להתפתחות המחלה בלימון (25 מ"צ) דומה לאופטימום של צמיחת החידק *in vitro*. בטמפרטורות נמוכות היה קצב התפתחות המחלה איטי.

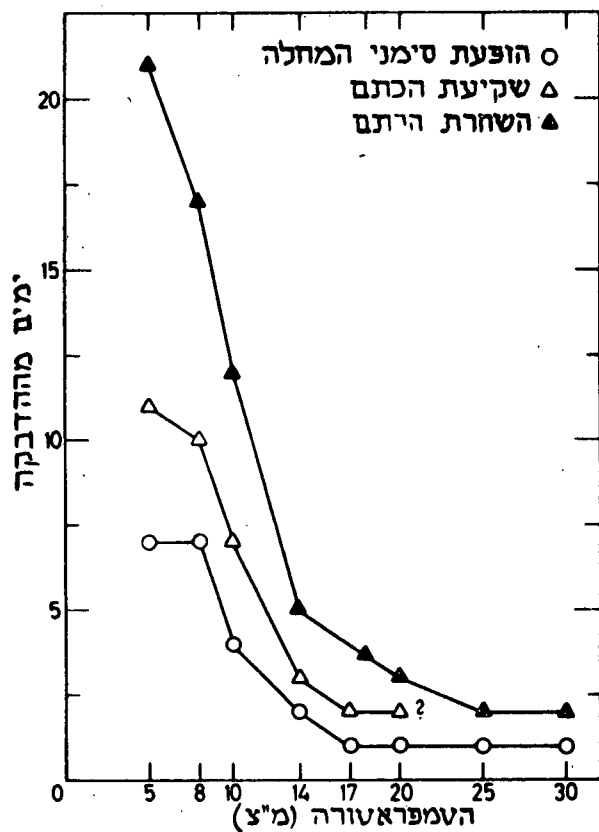
בפירות ירוקים של לימון ותפוז התקבלו הכתמים הגדולים ביותר בטמפרטורה של 14 מ"צ (ציור 3). בטמפרטורות נמוכות מ-14 מ"צ עלה גודל הכתם ומעל טמפרטורה זו הלך הכתם וקטן. בולטת העובדה שבטמפרטורה של 5 מ"צ היה הכתם גדול יותר מאשר בטמפרטורה של 30 מ"צ, דבר שמצביע אולי על העדפת טמפרטורות נמוכות על-ידי הפתוגן על פני טמפרטורות גבוהות המעכבות התפתחות המחלה, בניגוד לחידקי רבים אחרים. פאוסט (24) מצא שמתחת ל-20 מ"צ יש התפתחות טובה של המחלה. סמית (56) מצא שהטמפרטורה המיטבית ליצירת פגמים גדולים של גומה שחורה היא 13.1 מ"צ, ומעל לטמפרטורה זו היתה ירידה בגודל הכתם: בטמפרטורות של 13.1, 17.4 ו-31.5 מ"צ היה קוטר הכתם - 8.1, 5.6 ו-3.0 מ"מ, בהתאמה. וולקני (60) מצא את הכתמים הגדולים ביותר בטמפרטורה של 20 מ"צ.

תוצאות אלו מצביעות על הבדלים בין השפעת הטמפרטורה על גודל הגומה בפרי *in vivo* לבין השפעתה על התפתחות החידק *in vitro*. הטמפרטורה המיטבית שנמצאה בעבודה זו לגבי התפתחות המחלה בפרי היתה 14 מ"צ לעומת 25 מ"צ בקרקעות מזון סינתטיים.

יש לציין שגודל הכתם בתפוז היה קטן מזה שנמצא בלימון בכל הטמפרטורות שנבחנו (ציור 3).

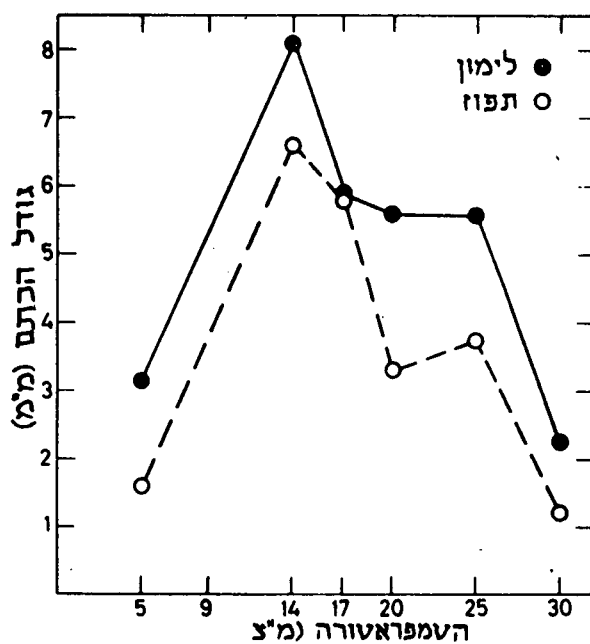


ציור 1: השפעת הטמפרטורה על גידול המושבות על קרקעות מזון שונים משך 10 ימים (קוטר ממוצע של מושבות)



ציור 2: קצב התפתחות המחלה בטמפרטורות שונות (ימים).

ציור 3: השפעת הטמפרטורה על גודל הגומה השחורה (קוטר הגומה לאחר 10 ימים).



ב. השפעת הלחות על כושר החידק לגרום למחלה

ובחנה השפעת תנאי לחות קיצוניים על מידת הפאתוגניות של החידק כגון - ייבוש המושבה והחזקת החידק במים כמשך שישה חודשים. הניסויים בוצעו בטמפרטורת החדר. נמצא כי שני התנאים הקיצוניים הנ"ל לא השפיעו על מידת הפאתוגניות של החידק. על סמך התוצאות האלה סביר להניח שהחידק מסוגל לעבור את העונות הקשות של האקלים הישראלי מבלי שכושר הפאתוגניות שלו ייפגע. עם הופעת תנאי הדבקה מתאימים, עלולה המחלה להופיע מחדש גם בעונת הקיץ, בתנאי שהחידק הצליח לחדור לקליפת הפרי במצבי רטיבות (פרדסים מושקים בהמטרה). עם זאת עשויים להיווצר אז כתמים קטנים בגלל הטמפרטורות הגבוהות השוררות בעונה זו. הנחה זו מבוססת על תוצאות ניסויים והסתכלויות שבהם נמצאה גומה קטנה בפרי ששהה בטמפרטורה גבוהה. המחלה אינה מתפתחת בייבוש קיצוני או בארצות בעלות לחות קיצונית (45), אך גורם המחלה מסוגל להישאר בחיים - גם בעצמים מתים, בעץ או בעלים שנשרו (51).

ג. בדיקות מיקרוסקופיות של הגומה

בדיקות היסטולוגיות

בדיקות היסטולוגיות נעשו בפגם אופייני של הגומה שהתפתח בקליפת לימון לאחר הדבקה מלאכותית ב- P. syringae. בחתכים היסטולוגיים של הגומה נמצאו דרגות שונות של חדירה של החידקים לתאים. עוד התברר מהם שהפאתוגן נמצא בשלב הראשון של ההדבקה בתוך החללים הבין-תאיים, ולאחר מכן הוא חדר לתוך התאים. הפאתוגן נמצא קרוב לדפנות התאים (תמונה 5). יש להניח שהפאתוגן שהיה מצוי בחללים הבין-תאיים גרם לפלאסמוליסה של התאים, דבר שאיפשר חדירה הדרגתית של החידקים לתוך התאים ולבסוף - את התמוטטותם. בחתכים היסטולוגיים של קליפת מנדרינה מצא פאוסט (21) חידקים של P. syringae בחללים הבין-תאיים בשלב המוקדם של ההדבקה. אריקסון (20) מצא חדירה דומה לתוך התאים של עוקץ שזיף מודבק ב- P. mors-prunorum. הוא מצא, שבעקבות הפלאסמוליסה של תוכן התאים חלה הפרדה בין דפנות התאים, ורק לאחר מכן חדר הפאתוגן. זומייר (61) חקר את הסיבות לחדירת החידק מסוג Bacterium מתא לתא בזרעי האפונה. על סמך העבודה שלו ושל רבים אחרים הוא הגיע למסקנה שעקב הצטברות חידקים בחללים הבין-תאיים יש שתי אפשרויות לחדירה לתוך התאים: האחת - על-ידי ספיגת נוזלים מהתאים שמסביב ובקיעת התאים בעקבות לחץ החידקים על התאים, והשנייה - המסה מוחלטת של דפנות התאים שבעקבותיה מתרחשת חדירת הפאתוגן. בחתכים שעשינו לא נמצא הפאתוגן בצינורות ההובלה של קליפת הלימון המודבק.

התאים של האלבדו והפלברו של הגומה שינו את צורתם ונעשו צרים ומאורכים עקב הפסדי מים, וכל רקמת הכתם היחה נקרוטית; עקב זה- גם החללים הבין-תאיים נעשו קטנים וצרים יותר. תופעה זו היחה בולטת במרכז הפגם יותר מאשר בהיקפו.

בדיקות היסטוכימיות

בבדיקות ההיסטוכימיות נבדקו שינויים היסטוכימיים ברקמות פרי נגוע שהודבק בחידק P. syringae בהשוואה לרקמת הפרי הבריאה. החומרים שנבדקו: פקטין, צלולוז, ליגנין, דונג וקוטיין. בחתכים אלה היה אפשר להבדיל הבדלה טובה בין החלק הבריא והבהיר, לבין החלק הנגוע, הנקרוטי והשחור. אולם, בתוך החלק השחור, היה קשה להבחין בשינוי צבע, ומשום כך לא נתקבלו הבדלים בולטים בין הטיפולים לגבי החומרים שנבדקו.

3. חיות החידק בתוך הגומה

נבחן משך החיות : של החידק בתוך רקמת הגומה. פירות לימון בצבע ירוק-צהבהב הודבקו ב- P. syringae והוחזקו בטמפרטורה של 14 מ"צ ובלחות גבוהה שמעל 95%. מבדודים שנעשו מכתמים במשך ארבעה חודשים התקבלה צמיחה אופיינית של החידק. לאחר תקופה זו לא נתקבלה יותר צמיחה בקטריאלית. נראה שכתנאי הניסוי הזה, נשתמרה חיות החידק במשך ארבעה חודשים. קרום (13) מצא כי תאי האצסים הנתקפים על-ידי P. syringae נוטים להפסיק את פעילותם בשלב מוקדם יותר מאשר אלה הנתקפים על-ידי P. mors-prunorum, והאורגאניזם שבתוכם מת במהרה עקב היווצרות פלוגן על-ידי הפאתוגן. קשה לשייך את תמותת החידק לחוסר בהספקה של חומרי-מזון, בהתחשב בכך שדרישותיו התזונתיות הן מועטות, כאמור בפרק של בדיקות ביוכימיות. יתכן, שגורמים פיסיקאליים או הצטברות תוצרים רעילים בעקבות ההזדקנות הם האחראים לכך.

2. גורמים המשפיעים על הדבקה

1. הפצע והזמן הדרוש להדבקה

בבדיקות שנעשו על מנת לברר כמה זמן מפציעת הפרי מסוגל החידק להדביק, התברר כי כשלושה ימים לאחר הפציעה לא התקבלו יותר הדבקות הפרי בחידק; יתכן שבעבור תקופה זו חלה התייבשות או הגלדת הפצע שמנעו מהפאתוגן את ההדבקה.

כדי לבדוק כיצד נעשית ההדבקה בסבב נעשה חיקוי של פציעה מלאכותית בתנאים הדומים למתרחש בסבב: שפשוף פירות, דקירות בעומקים שונים בפרי, דקירות פרי בין בלוטות השמן ובתוכן. ניסויי הדבקת פירות לאחר שפשופים שטחיים בנייר-זכוכית מס' 1 ושטיפת מקום השפשוף מיד לאחר מכן, לא נתנו תוצאות חיוביות; נדבקו רק פירות בודדים שהורד מהם גם חלק מן האלבדו בעזרת סכין. לעומת זאת, לא נמצאו הבדלים בהצלחת ההדבקה בין פירות שהודבקו בעומקי הפצע השונים. לא נמצאו הבדלים בהדבקה גם כאשר הדקירות נעשו בתוך בלוטות השמן וגם כאשר הדקירות נעשו בין הבלוטות; בכל המקרים היתה הצלחה מלאה של ההדבקה. פאוסט ו-לי (25) טוענים ששפשוף והכאת הפרי בענפים בגלל רוחות הם הדרכים העיקריות לחדירת החידק וליצירת זיהום. גם חוקרים אחרים (10, 27, 51) תומכים בדעה זו. כל התוצאות הללו מעידות על כך שחידק זה, כחידקים רבים אחרים, זקוק לפתח-כניסה על מנת לחדור לתוך הקליפה. החידק אינו מסוגל להדביק את הפרי בלי פצע. לכן, סביר להניח שהדבקה יעילה תתרחש בפצעים טבעיים הנגרמים מדקירות של קוצים שעל העץ, ממכות ברד, ממציצות חרקים או מזנקים אחרים הפותחים בפני החידק את נתיב הפלישה.

2. הקשר בין התפתחות הפרי לבין גודל הגומה

כדי לבדוק את הקשר בין דרגת ההתפתחות של הפרי לבין גודל הגומה הודבקו פירות בשלבי התפתחות שונים כשהם עדיין ירוקים. הניסוי נמשך 10 ימים בתנאים מבוקרים של לחות גבוהה מ-90% טמפרטורה של 20 מ"צ. נמדד גודל הכתם שעל הפרי, אולם מאחר שהסתכלויות הראו שהכתם מתרחב בתוך האלבדו, נמדד גם קוטר הפגם בתוך האלבדו לאחר 10 ימי הניסוי (טבלה 5).

טבלה 5: השפעת גודל הפרי על קוטר הגומה בפירות לימון (מ"מ) תקופות שונות לאחר ההדבקה

קוטר הפרי (ס"מ)	קוטר הגומה על פני הפרי לאחר (ימים):				קוטר הגומה בתוך האלבדו לאחר 10 ימים
	3	5	8	10	
עד 4	1.0	1.5	1.8	2.2	3.85
5.5	3.05	3.17	3.88	3.88	6.18
6.5	4.20	4.18	4.30	5.73	7.58
7	4.20	4.58	4.67	4.90	4.29
8	5.35	6.9	7.55	8.67	11.13
8.5-9	6.89	8.22	8.55	10.14	12.44

מטבלה 5 נראה מיתאם בין גודל הכתם שהתפתח על הפרי לבין גודל הפרי עצמו; גודל הכתם של הפגם הלך וגדל במקביל לגדילת הפרי המודבק. מהטבלה אפשר גם לראות שהכתם החיצוני אינו מבטא את מידת הנגע בתוך הפרי. בחתכים שנעשו בגומה לאחר 10 ימים נמצא שמתחת לחלק הנגוע יש התפשטות רחבה יותר וחדירה עמוקה לתוך האלבדו, שצבעה חום-בהיר, אולם הפגם אינו חודר לתוך ציפת הפרי. לעומת זאת נראה, שקוטר הפגם באלבדו גדול מזה שעל פני הפרי, פרט לפרי בקוטר של כ-7 ס"מ (ראה טבלה 5).

3. התפתחות הגומה בפרי על העץ ובפרי קטוף

בדצמבר 1972 נעשתה השוואה של התפתחות הגומה בין פרי על העץ בתנאי פרדס לבין פרי קטוף. פירות לימון בקוטר שונה (4 עד 8.5 ס"מ) הודבקו כשהם עדיין על העץ ונמדד גודל הכתם שהתפתח במשך 14 ימים. כביקורת הודבקה, באותו התאריך, קבוצת פירות אחרת אשר נקטפה מיד והונחה על הקרקע בפרדס. בניסויים לא נמצאו הבדלים כלשהם בין הפירות שהודבקו ונשארו על העץ לבין פירות הביקורת שהוחזקו על הקרקע. בשני המקרים התקבלו תוצאות כמעט זהות של התפתחות הגומה (טבלה 6).

טבלה 6 : גודל הגומה (מ"מ) בפרי על העץ בהשוואה לפרי קטוף - בשלבי התפתחות שונים של הפרי

הדבקת פרי קטוף ששהה בפרדס				הדבקה על העץ				
קוטר הגומה בתוך האלבדו לאחר 14 יום	ימים לאחר ההדבקה			קוטר הגומה בתוך האלבדו לאחר 14 יום	ימים לאחר ההדבקה			קוטר הפרי (ס"מ)
	14	7	5		14	7	5	
3.0	2.86	2.5	2.0	3.0	3.0	2.3	2.0	5-4
2.7	2.2	1.5	1.0	4.14	2.8	2.17	2.0	5.5
3.0	3.0	2.67	2.16	3.0	3.0	2.67	2.17	6
4.2	3.4	2.75	2.6	4.2	3.4	2.75	2.4	9-7
7.0	5.5	5.4	4.0	7.0	5.5	5.4	4.0	9-8 (צהוב)

בניסוי זה, כמו בניסוי הקודם (טבלה 5), בולטת העובדה שכלל שהפרי מודבק בדרגת התפתחות מתקדמת יותר-קוטר הגומה גדול יותר. בניסוי זה נמצא גם שבפרי צהוב גדול קוטר הגומה מאשר בפרי הירוק, דבר המצביע גם על השפעת דרגת ההבשלה של הפרי על גודל הגומה.

ד. שינויים פיסיולוגיים בפרי המודבק ב- *P. syringae*

ידוע, שהדבקה של אברים צמחיים על-ידי מיקרואורגניזמים מסויימים עלולה לגרום עליה בעוצמת הנשימה ובפליטת אטילן, ולכן נבדקה תגובת פירות לימון להדבקה בחידק הנדון.

1. עוצמת הנשימה

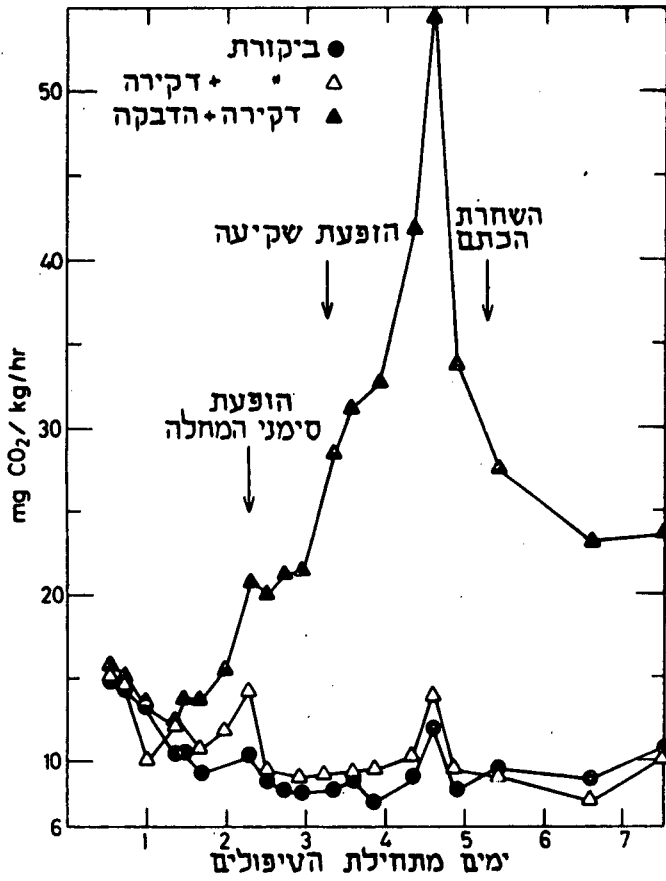
בפרי נגוע בשלוש גומות בודדות נמצאה עליה ניכרת בשיעור הנשימה, כבר יומיים לאחר ההדבקה והוא הגיע ל-20 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה עם הופעת השקיעה הראשונה. השיא בעוצמת הנשימה חל קרוב למועד השחרת הכתם והגיע ל-57.5 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה, ולאחר מכן חלה ירידה תלולה בעוצמת הנשימה. בפירות הביקורת הבריאים והפצועים (מדקירה), היתה עוצמת הנשימה נמוכה מאוד - 12 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה (ציורים 4 ו-6). העליה בעוצמת הנשימה שנגרמה על-ידי החידק היתה ניכרת ודמתה לעליה הנגרמת בפרי הדר המודבק על-ידי פטריות. בפירות לימון המודבקים ב- *P. citrophthora* נמצא (2) שעוצמת הנשימה של הפרי מתחילה לעלות כבר למחרת ההדבקה. עוצמת הנשימה בפירות המודבקים הגיעה לאחר היום החמישי ל-36.0 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה ולשיא של 60-70 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה - לאחר שישה ימים. בפירות לימון המודבקים ב- *P. digitatum* (19) נמצאה עוצמת נשימה גבוהה יותר לאחר התקופה הנ"ל - 150 מ"ג CO_2 /ק"ג/שעה.

מעניינת העובדה, כי הימצאות שלושה כתמים יחסית קטנים ומוגבלים בקליפת פרי בריא גררו עוצמת נשימה גבוהה מאוד, בדומה למצב בפירות לימון המודבקים בפטריות שונות הגורמות לריקבון מתפשט.

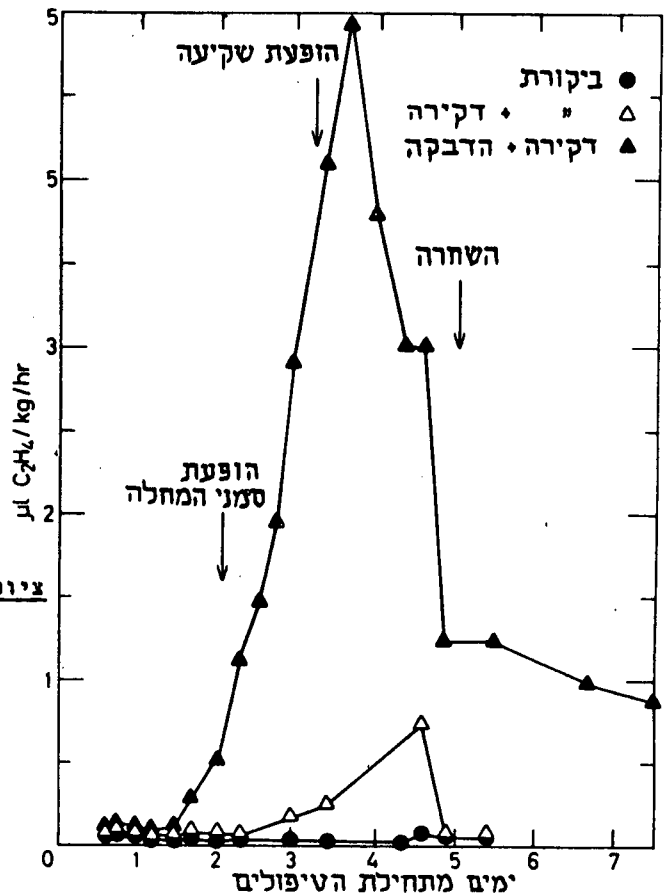
2. פליטת אטילן

בולטת כמות האטילן הגדולה המופרשת על-ידי פרי מודבק, לעומת הפרי שנדקר בלבד והפרי לבקורת שלא נדקר (ציורים 5 ו-6). בדומה לנשימה בפרי הנגוע בשלוש גומות בודדות, גדלה פליטת האטילן במהירות בפרי לימון לאחר היום השני לניסוי. בדרך כלל הקבילה העליה בפליטת האטילן בפרי הנגוע לעליה בעוצמת הנשימה, אך בפרי הנגוע הקדים שיא הפליטה את שיא הנשימה בפרי הביקורת.

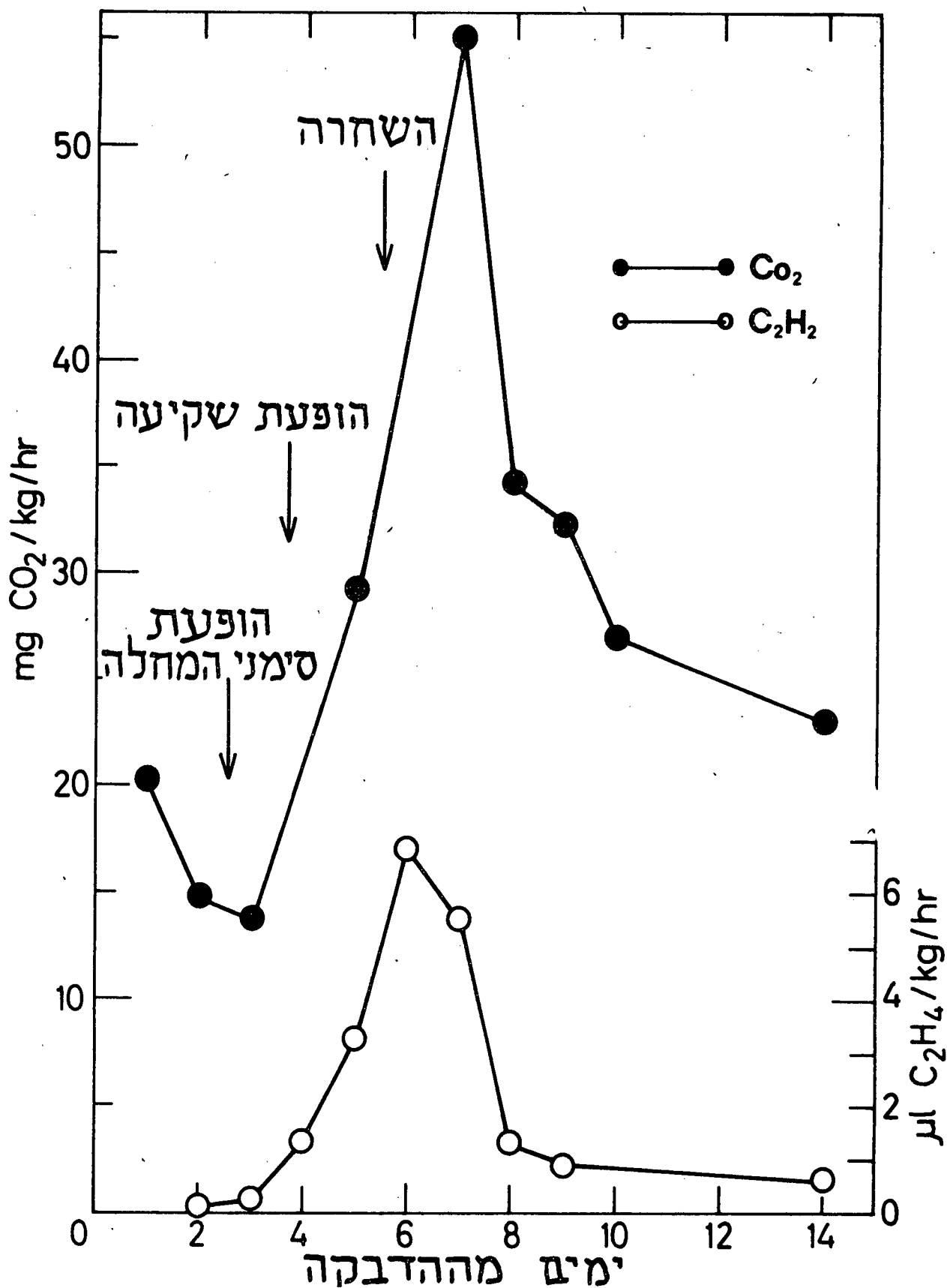
בפירות מודבקים ב- *P. syringae* נמצאה עוצמת פליטה של כ-0.5 $hr/Kg/\mu l C_2H_4$ עם הופעת השקיעה של הכתם וכ-1.25 $hr/Kg/\mu l C_2H_4$ - עם השחרת הכתם. עוצמת השיא של פליטת האטילן נרשמה ביום הרביעי לניסוי והיא הגיעה ל-4.8 $hr/Kg/\mu l C_2H_4$. ודנהייגן ו-פריבירן (26) הראשונים שדווחו על מעורבותם של חידקים בפליטת אטילן; הם מצאו שפירות בננה מודבקים ב- *Pseudomonas solanacearum* מייצרים יותר אטילן מאשר פירות לא-מודבקים. בפרי מודבק צהוב-למחצה נמצאו כ-20 ח"מ א"ל ואלו בפרי בלתי מודבק לא נרשמה פליטת אטילן כלל. בעבודה אחרת לונד ו-מפסון (11) מצאו שרקמות של פרחי כרובית המודבקים ב- *Erwinia carotovora* פולטים אטילן בעוצמה גבוהה לאחר דגירת החידק - כ-2.8 $\mu l C_2H_4$ רקמה במשך 65 שעות, בסמפראטורה של 20 מ"צ. לעומת זאת, בפרחים בלתי-מודבקים בחידק נמצאו עקבות אטילן בלבד. כמו כן מצאו שפרחי כרובית שהודבקו בחידק אחר, *Xanthomonas campestris* פלטו כמות אטילן יותר מאשר הביקורת.



צור 4: עוצמת הנשימה של פרי לימון מודבק ב-*P. syringae*. הפרי הודבק בשלושה מקומות 17.7.72.



צור 5: עוצמת פליטת אתילן של פרי מודבק ב-*P. syringae*. הפרי הודבק בשלושה מקומות 17.7.72.



ציור 16: עוצמת הנשימה ופליטת האתילן של פרי לימון
 מודבק ב- *Pseudomonas syringae*. הפרי
 הודבק בשלושה מקומות 1.4.73.

1. טיפול אחילון בפרי מודבק

בחחילת העונה של קסיף פרי-הדר נהוג להבחיל פרי בעודו ירוק, בחדר שבו הטמפרטורה היא 25 מ"צ, ריכוז האחילון - 10-20 ח"מ ובלחות היחסית גבוהה מאוד (90%-95%); ההבחלה נמשכת כשלושה ימים. פרי מודבק על-ידי החידק הנדון בפרדס עלול להגיע לחדר ההבחלה; כדי לבדוק אם הגומה תתפתח בפרי זה בתנאי הבחלה, נבחנה השפעת טיפול באחילון אקסוגני על פרי לימון המודבק על-ידי החידק הנדון. פירות ירוקים הודבקו בחידק והוחזקו בריכוזי אחילון שונים - מ-5 עד 20 ח"מ - בטמפרטורה של 25 מ"צ ובלחות גבוהה מ-95% במשך שלושה ימים. בריכוז הנמוך שנבחן (5 ח"מ) היה קוטר הגומה גדול מאשר בביקורת, ובריכוזים של 10 ו-20 ח"מ, היה הקוטר קטן מאשר בביקורת (טבלה 7). בפירות שטופלו בריכוז אחילון גבוה, 10 ו-20 ח"מ, הופיע הסימן הראשון לגומה מוקדם מאשר בפירות שקיבלו ריכוז נמוך (5 ח"מ).

טבלה 7: השפעת ריכוז אחילון אקסוגני בפרי מודבק על קוטר הגומה (ב-25 מ"צ)

קוטר גומה ממוצע (מ"מ)	ריכוז האחילון (ח"מ)
6.5	5
1.5	10
1.8	20
3.8	ביקורת

2. הקשר בין משר הטיפול באחילון לבין גודל הגומה

כדי לבחון אם משכי הטיפול באחילון, בפרי לפני הדבקה, ישפיע על גודל הגומה טופלו פירות ירוקים באחילון במשכי זמן שונים של 1, 2 ו-3 ימים ואחר כך הודבקו בחידק. לאחר הטיפול נמדד קוטר הגומה בפירות אלה ובפרי הביקורת שלא קיבל טיפול באחילון. מדידות גודל הגומה נעשו 12 ימים לאחר ההדבקה, כאשר הפרי שהה ב-25 מ"צ ובלחות מעל ל-95% (טבלה 8).

לא נמצאה השפעה ברורה למשך הבחלת הפרי על קוטר הגומה.

על פירות אשר קיבלו טיפול בגז בריכוז 5 ח"מ הופיעו כחמים קשים, כהים ומוגדרים. מאידך, פירות אשר קיבלו טיפול באחילון בריכוזים הגבוהים, 10 ו-20 ח"מ, הכחמים היו שקועים, בלתי מוגדרים עם נטיה להתפשטות.

טבלה 8: השפעת משך הטיפול באתילן על קוטר הגומה (מ"מ)

(לאחר 12 יום דגירה ב-25 מ"צ)

משך הטיפול (ימים):			ריכוז האתילן (ח"מ)
3	2	1	
4.0	4.3	5.8	5
5.3	4.2	4.1	10
6.0	5.5	5.0	20
		5.7	פרי ירוק כביקורת

1. הדברת החידק בחומרים כימיים

1. חומרי הדברה

כדי למנוע הדבקת הפרי על-ידי החידק בתוך מיכל החיסוי בבית-האריזה, נבדקה *in vitro* השפעתם של חומרי חיסוי שונים הנמצאים בשימוש בבית האריזה על קטילת החידק. כמו כן נבדקה השפעתם של חומרי נחושת הניתנים בפרדס כנגד הריקבון החום.

טבלה 9: השפעת חומרים בקטריוצידיים ופונגיצידיים על צמיחת החידק בקרקע-מזון

הריכוז %	בנומיל	תב"ז	FN-44	סאופ"ם	כלור	גפרת- נחושת
0.0025					+	
0.0050					+	
0.01					+	+
0.0125				+	-	+
0.048	+	+	+	+		+
0.06	+	+	+			
0.07	+	+	+			
0.08	+	+	+			
0.09	+	+	+			
0.1	+	+	+	-		-
1.0	+	+	+			

+ צמיחת חידקים
- עיכוב צמיחה מוחלט

הערה: רק במקומות המסומנים בטבלה נבדק ריכוז החומר.

מהתוצאות מתברר כי לשלושה חומרים - בנומיל, תב"ז ו-FN-44 - לא היתה כל השפעה על צמיחת החידק, אפילו בריכוז הגבוה ביותר - 1% גפרת-נחושת וסאופ"פ מנעו את התפתחות החידק בריכוז של 0.1% והכלור - ב-0.0125% (טבלה 9). לתוצאות אלה יש השלכות מעשיות בכל הקשור לטיפולם הניתנים לפרי בעיקר בבית האריזה. פירות המובאים לבתי-אריזה לשם אריזתם למשלוח עלולים להיות מודבקים ב-*P. syringae* עוד בהיותם בפרדס או עלולים לשאת אותו על פני קליפתם. בתחילת העונה מחוסה הפרי בדרנצ'ר (מקלה) לפני הכנסתו לחדר ההבחלה; מאחר שהתב"ז המצוי בתמיסת הדרנצ'ר אינו קוטל את החידק יש להשתמש בתוספת של סאופ"פ או כלור בריכוזים של 0.1% ו-0.0125%, בהתאמה, כחומר חיטוי נוסף לתב"ז. בעת חיטוי הפירות בבית האריזה יש איפוא חשיבות בשמירת ריכוזים נאותים של חומרים כמו כלור או סאופ"פ, כי ירידה בריכוזי החומרים האלה עשויה להיות הסיבה להדבקה בדרנצ'ר ולהתפתחות המחלה בפרי הארוז בזמן המשלוח.

בגמר ההבחלה, זמן קצר לאחר כניסתו לבית האריזה, עובר הפרי את מיכל החיטוי המכיל סאופ"פ בריכוז של 0.5%, כך שבתקופה זו אין סכנה של אילוח הפרי.

ידוע מספרות כי תרכובות נחושת הן חומרים יעילים נגד מחולל המחלה, בעיקר מרק-בורדו, והן משמשות לריסוסים-מניעה בפרדס (1, 10, 50).

2. d-limonene

בעבודתו על פעולת הלימוןן על חידקים, (המהווה יותר מ-90% מהשמן האתרי בפירות הדר) מצא Zuckerman (62) כי חומר זה אינו משפיע על מיקרואורגניסמים המצויים בפירות הדר בצורה טבעית במשך השלבים השונים של התפתחות הפרי והבשלתו. כאשר הלימוןן נחשף לאוויר הוא מגלה תכונה של מעכב צמיחה, המתפתחת עם הארכת משך החשיפה. הופעת התכונה המעכבת הנ"ל נובעת מחמצון החומר, דהיינו - מיצירת קשר פרוקסידי (peroxide bond).

בעבודות שונות נמצא (3, 8, 62) כי לימוןן מוקרן מעכב צמיחת מיקרואורגניסמים. משום כך נערך ניסוי במטרה לבדוק אם ובאיזו מידה פועל הלימוןן לעיכוב *P. syringae*, ועשוי לשמש חומר הדברה נגדו, מה עוד שבעבודתם של צוקרמן ומינה שיפמן-נדל (3) נמצאו מנות קטלניות של לימוןן מוקרן לגבי פטריות שונות שהן פאתוגניות לפרי-הדר. בניסוי נבחנה רגישות החידק ללימוןן מוקרן ובלתי-מוקרן בריכוזים של 0.01%-1%. בכל הריכוזים שנבחנו *in vitro* לא נתקבלה כל השפעה מעכבת על גידול החידק הנדון צוקרמן (62) מצא שהחומר המוקרן מאבד את התכונה המעכבת דבר הנובע מנוכחות 1-ascorbic acid במצע. אי לכך נבדקה מידת ההשפעה של הלימוןן *in vivo* על הפרי, בהנחה שהפרשת לימוןן כתוצאה מפגיעת קליפת-הפרי, מחשיפתו לאוויר ומחימצונו תביא לגילוי תכונות המעכבות צמיחת *P. syringae*, דבר העשוי לקרות גם בטבע.

כדי לבדוק את השפעת הלימוןן בעת הדבקת הפרי, הודבקו פירות לימון בחורף לוזי השמן ובין לוזי השמן של הקליפות, ונבדקה מידת התפתחות הגומה מהדבקות שנעשו. נמצא שהמחלה התפתחה בשני המקרים. תוצאות אלה מראות שגם בקליפת הפרי אין ל-d-limonene השפעה כל-שהיא על התפתחות המחלה.

מ ס ק ו ת

העבודה עסקה בהיבטים שונים של מחלת הגומה השחורה ומחולל המחלה בפרט. מתוצאות העבודה

אפשר להסיק את המסקנות הבאות:

1. הגומה השחורה היא בעיה כלכלית בארצות המגדלות הדריס שונים. עד לזמן האחרון היתה המחלה ידועה בארץ בלימונים בלבד. אולם, במעקב שערכנו אחר תפוצת המחלה בזני הדר שונים, התברר כי בשתיים-שלוש השנים האחרונות למחקר הנדון כאן הופיעו בתפוזים, פגמים דומים לגומה השחורה, בעיקר באיזור החוף החל מדרום לאזור רחובות ועד הגליל המערבי ובהיקף המהווה בעיה כלכלית. צבע הפגמים בשמוסי היה בהיר במקצת מצבע הגומות בלימון. מחלק של פגמי השמוסי בודד החידק *P. syringae*, ומכאן שהחידק מצוי בארץ בשיעור ניכר גם בתפוזים. יתכן שההתפשטות הרבה של החידק קשורה בריסוסים המרובים של בנזימידזולים הניתנים במטעים נגד פטריות שונות; הוכחה לכך אפשר למצוא בתוצאות המחקר הנדון כאן דהיינו - שהחידק *P. syringae* אינו רגיש לבנזימידזולים כמותב"ז ובנומיל. יש להניח, שהדברת פאתוגנים שונים על-ידי ריסוסים אלה מקטינה את התחרות בין החידק בנדון לבין פאתוגנים אחרים, ויתכן שתופעה זו קשורה בהתפשטות החידק בפרדסים בכלל ובהופעתו בשמוסי בפרט.
2. השיעור הרב של פגמי הגומה, שנמצא בעיקר בפרדסים הקרובים לים, עשוי להיות קשור בפציעת קליפת הפרי מחול הנישא על-ידי רוחות הים. נוסף לכך, הסרת משברי-רוחות המגינים מפני רוחות הגדילה את סכנת הפציעה. פציעת לוזי שמן (הגורמת כתמי שמן) אינה מכשול לחדירת החידק, כי הלימונן - שהוא המרכיב העיקרי של השמן האתרי וידוע בספרות כקוטל-מיקרואורגאניסמים שונים (3, 8, 62) - אינו קוטל את *P. syringae*.
3. קיים קושי מסויים בהערכה של מידת התפוצה של חידק זה בפרדסים. בניגוד למחלות הנגרמות על-ידי פטריות, מצריכה המחלה הנדונה עריכת מספר רב של מבחנים לשם זיהוי החידק הנדון בבירורים מהגומה, נוסף לתגובה המתקבלת מגידולו בקרקע-מזון King (34, 40, 43). כל אלה מקשים על זיהוי מהיר של הפאתוגן. יתר על כן, על מנת להבטיח כי החידק אמנם וירולנטי יש לבדוק מדי פעם את כושר הדבקתו (פאתוגניות) בפרי לימון. גם באותם המקרים שתוצאות המבחן של הדבקה לימון היו שליליות עדיין אפשרי שבתוך התרביית שבדודה - האוכלוסיה היא מעורבת ויש דיכוי של האוכלוסיה הפרזיטית על-ידי האוכלוסיה הספרופיטית, כתוצאה מיחס מספרי גדול יותר של האוכלוסיה הספרופיטית (12, 15). על-ידי תהליך הפרדה ממושך של האוכלוסיה המעורבת אפשר לבודד את החידק הפאתוגני. יתכן שאפשר להתגבר על הקשיים בזיהוי הפאתוגן ועל משך הזמן הדרוש לכך על-ידי פיתוח שיטה לגילוי החידק בעזרת פאגים או אנטיסרום ספציפי.

5. העליה בשיעור הנשימה והפליטה של האתילן שנמצאה בפרי עם גומה, מצביעה על ההשפעה הפיסיולוגית הרבה של הפגם הקטן על הפרי. תגובת הפרי להתפתחות הגומה הנגרמת על-ידי חידק, היא משמעותית, בעיקר לאור תגובות חלשות יותר (המתבטאות בנשימה ובפליטה של אתילן) של הפירות המודבקים על-ידי פטריות שונות הגורמות ריקבון המחפשט על הפרי כולו (48).
6. בחקופת ההבחלה נמצאה עליה נכרת בשיעורי הגומות בפרי המובחל. במחקר זה התברר שבפרי המודבק בחידק הנדון הקדים טיפול באתילן את הופעת הגומה. ראוי להזכיר שבעת ההבחלה, מסייעים להתפתחות הגומה הלחות הרבה והטמפרטורה הגבוהה נוסף להשפעות האתילן.
7. למימצא של עבודה זו שתב"ז ובנומיל אינם קוטלים את החידק, יש השלכה על דרכי הטיפול בבית-האריזה; שימוש בחומרים אלה להדברת פטריות שונות מחייב הוספת בקטריציד מתאים הקוטל את החידק הנדון.
8. במחקר זה נמצא שתרכובות נחושת קוטלות את החידק כבר בריכוזים נמוכים מאוד. מכאן, שהריסוסים בחומרי נחושת הניתנים מדי שנה (בנובמבר) כנגד גורם הריקבון החום (P. citrophthora) עשויים להקטין במידה מסוימת את אוכלוסית החידק, הרגיש לחומר זה. אולם, יש להניח שמתן ריסוסים נוספים בעת התפתחות הפרי בעיקר באזורים הידועים כנגועים בגומה, יצמצם את האוכלוסיה עוד יותר.

רשימת ספרות

1. אגף להגנת הצומח משרד החקלאות, (1961). "השדה" מ"ב: 169.
2. כהן א' (1970). השינויים החלים בפרי הדר נגוע ב-Phytophthora citrophthora (SM & SM) Leon - חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה. מוגש לסינאס האוניברסיטה העברית בירושלים, עמ' 30.
3. צוקרמן י', שיפמן-נדל מינה (1956). השפעת לימון מוקרן על פטריות הגירמות רקבונות פרי-הדר "כתבים" 6: 81-82.
4. Ayers, S.H., Rupp, P. and Johnson, W.T. (1919) A study of the alkali forming bacteria in milk. Bull. U.S. Dep. Agric. 782.
5. Biale, J.B. (1940) The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits. Adv. Fd Res. 10: 293-354.
6. Biale, J.B. (1940) Respiration of fruit. Handbk PflPhysiol. 12: 536-592.
7. Bos, R.J. (1899) Eene bacterienzicte der syringen. Tijdschr. PlZiekt. 5: 177-183.
8. Brodrick, H.T. (1971) Toxicity of limonene and citrus peel extracts to Guinardia citricarpa Kiely. Phytophylactica 3(2): 69-72.
9. Bryan, K.M. (1928) Lilac blight in the United States. J. agric. Res. 26: 225-235.
10. Carne, W.M. (1926) Citrus pit (Pseudomonas citriputuale C.O. Smith). J. Dep. Agric. W. Aust. 3: 378-381.
11. Coit, J.E. (1916) Citrus blast - A new disease in California. J. Agric. 3: 234-235.
12. Committee on Bacteriological Technic. (1957) Manual of Microbiological Methods. Soc. Am. Bacteriologists [Eds.]. McGraw-Hill, New York.
13. Crosse, J.E. (1966) Epidemiological relations of the Pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. Annu. Rev. Phytopathol. 4: 291-310.

14. Del Rivero, J.M. (1965) Citrus bacteriosis. Boln. Patol. veg. Ent. agric. 28: 119-123.
15. DeWolfe, T.A. et al. (1966) Control of citrus blast in northern California. Calif. Agric. 20(8): 12-13.
16. Dowler, W.M. (1971) Inhibition of P. syringae by saprophytic bacterial isolates in culture and in infected plant tissues. 3rd Int. Conf. on Plant Pathogenic Bacteria, Wageningen, 1971. pp. 307-315.
17. Dowson, W.J. (1949) Manual of Bacterial Plant Diseases. Adam and Charles Black, London.
18. Dye, D.W. (1953) Control of P. syringae with Streptomycin. Nature, Lond. 172: 184.
19. Eaks, I.L. (1955) Effects of biphenyl on respiration of oranges and lemons. Proc. Am. Soc. hort. Sci. 66: 135-140.
20. Erikson, D. (1945) Certain aspects of resistance of plum trees to bacterial canker. Part II. On the nature of the bacterial invasion of Prunus sp. by Pseudomonas morsprunorum Wormald. Ann. appl. Biol. 32: 112-116.
21. Fawcett, H.S. (1936) Citrus Diseases and their Control. McGraw-Hill Co., New York.
22. Fawcett, H.S. and Camp, A.F. (1921) Citrus blast and black pit. Calif. Citrogr. 6: 234.
23. Fawcett, H.S., Horne, W.T. and Camp, A.F. (1923) Citrus blast and black pit. Tech. Pap. Calif. agric. Exp. Stn 5.
24. Fawcett, H.S. and Klotz, L.J. (1936) Protection of citrus fruits and foliage from brown rot. Calif. Citrogr. 22: 64-65.
25. Fawcett, H.S. and Lee, H.A. (1926) Citrus Diseases and their Control. McGraw-Hill Co., New York. pp. 293-304, 443-450.
26. Freebairn, H.T. and Buddenhagen, I.W. (1964) Ethylene production by Pseudomonas solanacerum. Nature, Lond. 202: 213.
27. Gogvadze, I.I. (1940) [Windbreaks in the control of citrus blast.] Sovetsk. Subtrop. 9: 57. (in Russian)

28. Gussons, H.T. (1908) New lilac leaf disease in England (P. syringae).
Gard. Chron. 44(3): 404-405.
29. Hall, C.J.J. van (1902) Bijdragen Tot de Kennis der Bacteriale Plantezlekten.
Amsterdam.
30. Hodgson, R.W. (1917) Citrus blast - A new bacterial disease. Calif. St.
Commer. Hort. Mo. Bull. 6: 229-238.
31. Jensen, W.A. (1962) Botanical Histochemistry. Freeman & Co., San Francisco,
Calif.
32. Johansen, D.A. (1940) Plant Microtechnique. McGraw-Hill Co., New York.
33. Karel, G. (1956) A Preliminary List of Plant Diseases in Turkey. Ministry
of Agric., Ankara.
34. King, E.O., Wood, M.K. and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the
demonstration of pyolyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307
35. Klotz, L.J., DeWolfe, T.A. and Desjardins, P.R. (1955) Bacterial blast and
black pit of citrus. Calif. Citrogr. 40: 108-109.
36. Knorr, L.C. (1965) Serious diseases of citrus foreign to Florida. Bull. Fla
Dep. Agric. 5: 59.
37. Krasiljnikow, N.A., Mirzabexyan, R.O. and Askarova, S. (1951) [The applica-
tion of antibiotics to some plant diseases.] Dok. Akad. Nauk. S.S.S.R.
79: 1025-1027. (in Russian)
38. Lazar, I. and Grigoriu, A. (1972) Contributii la studiul speciilor de
Pseudomonas patogene pe sâmburoase in Rominia. Studii si Cercetari
de Biologie Botanica 24(3): 237-242.
39. Lee, H.A. (1917) A new bacterial disease of Citrus. J. agric. Res. 9: 1-8.
40. Lelliot, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C. (1966) A determinative scheme
for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. J. appl. Bact.
29(3): 470-489.
41. Lund, B.M. and Mapson, L.W. (1970) Stimulation by Erwinia caratovora of the
synthesis of ethylene in cauliflower tissues. Biochem. J. 119: 251-263.

42. Martelli, G.P. (1957) Bacteriosis or bacterial pitting of citrus. Inf. fitopat. 7: 283-285.
43. Misaghi, I. and Grogan, R.G. (1969) Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. Phytopathology 59: 1436-1450.
44. Philippe, J. (1955) Recognition and control of the principal diseases and pests of citrus in the Belgian Congo. Bull. Inf. Inst. nat. Etude Agron. 4: 13-25.
45. Reichert, I. (1964) A northern bacterial invader in Citrus plantings. A pathogeographical study. Ann. Inst. phytopath. Benaki, N.S. 56(1): 146-155.
46. Reichert, I. and Perlberger, J. (1928) The blast disease of citrus: A new citrus disease in Palestine. Palest. Citrogr. (Hadar) 1(4): 5-7.
47. Sarejanni, A.J., Démétriadès, S.D. et Papaioanou, A.J. (1955) Rapport sommaire sur les principales maladies des plantes cultivées observées en Grèce au cours de l'années 1953, 1954, 1955. Ann. Inst. phytopath. Benaki 7: 4.
48. Schiffmann-Nadel, M. (1974) Facteurs et regulation de la maturation des fruits. Coll. Int. Centre nat. Rech. scient. 238: 139-145.
49. Schneider, H.Z. and Zimmermann, A. (1922) Die Botanische Microtechnik. pp. 390-394. Gustav Fischer Verlag, Yena.
50. Schneider, Yu.I. (1950) [When to spray citrus to control bacterial necrosis.] Sad i Ogorod (Orchard and Garden) 11: 43-45. (in Russian)
51. Schneider, Yu.I. (1951) Results of studies on bacterial necrosis of citrus. Microbiology 20: 41-51.
52. Sharp, C.G. (1927) Correlation of virulence and acid agglutination of a smooth and a rough strain of Bacterium phaseoli sojense. Phytopathology 17: 49.
53. Siegal, S.M. (1953) On the biosynthesis of lignin. Physiologia Pl. 6: 134-139.
54. Smith, C.O. (1913) Black pit of lemon. Phytopathology 3: 277-281.

55. Smith, C.O. (1926) Similarity of bacterial diseases of avocado, lilac and citrus in California. Phytopathology 16: 235-236.
56. Smith, C.O. (1930) A comparative study of the citrus blast bacterium and some other allied organisms. J. agric. Res. 41: 233-245.
57. Sorauer, P. (1891) Neue Krankheitserscheinung bei Syringa. Z. PflKrankh. 1: 186-188.
58. Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. gen. Microbiol. 43: 159-271.
59. Tzeretele, L.Y. and Tchanturia, N.N. (1939) Diseases of citrus fruits in storage. Sovetsk. Bot. 18: 445 (abstr.).
60. Volcani-Elazari, Z. (1950) A comparative study of the pathogenicity of two isolates of Pseudomonas syringae. Ktavim 1: 211-231.
61. Zaumeyer, W.J. (1932) Comparative pathological histology of three bacterial diseases of bean. J. agric. Res. 44: 605-632.
62. Zukerman, I. (1951) The effect of oxidized d-limonene on microorganisms. Nature, Lond. 168: 517.

MINISTRY OF AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION

Institute of Technology and Storage
of Agricultural Products
Division of Fruit and Vegetable Storage

BLACK PIT DISEASE OF CITRUS FRUIT, AND ITS AGENT
PSEUDOMONAS SYRINGAE

By

S. Cohen, E. Cohen, Mina Schiffmann-Nadel and
Zafrira Volcani

Pamphlet No. 160

Division of Scientific Publications
The Volcani Center, Bet Dagan,

Israel

1976

BLACK PIT DISEASE OF CITRUS FRUIT, AND ITS AGENT PSEUDOMONAS SYRINGAE

S. Cohen, E. Cohen, Mina Schiffmann-Nadel and Zafrira Volcani

Summary

The pathogenic agent of the Black Pit disease was isolated from lemon fruit in Israel and its biochemical, pathogenic and physiological characteristics were studied. The different biochemical tests indicated that P. syringae isolated in Israel was identical to that described and named in the literature P. syringae Van Hall.

The work included studies of the influence of temperature and humidity factors on the fruit infection, the influence of the fruit size on its sensitivity to infection, the respiration rate and ethylene evolution from inoculated fruit, histological and histochemical changes occurring in the infected tissue in comparison with sound fruit, and the sensitivity of the bacteria to pesticides.

Tests on three different media showed that the optimal temperature for bacterial growth was 25-31°C. However, in vivo, the temperature favoring the maximum development of lesions was 14-17°C; at higher temperatures the rate of development decreased, and at 5°C the development of the lesions was very limited.

Results indicated that bacteria can survive for 6 months under extremely dry or extremely wet conditions. This feature explains how these bacteria are able to survive in the severe Israeli climate of a dry summer and rainy winter.

Spot size increased as the size of the fruit increased, and Black Pit developed best on yellow fruit. On the inoculated fruit, the bacteria concentrated first in the intercellular spaces and then penetrated to the cells near the cell wall, but did not penetrate to the vascular bundles on the fruit peel.

Histochemical tests showed no changes occurring in the infected tissue in comparison with sound tissue, in cellulose, lignin, pectic substances, and total lipid contents.

Respiration rate and ethylene evolution during the incubation period increased in pitted fruit in comparison with sound fruit. The maximum respiration rate was on the seventh day after infection: 57.5 mg CO₂/kg/h, in comparison with 12 mg

II

CO_2 /kg/h in the healthy fruit; the maximum ethylene evolution was on the fourth day: 4.8 ml C_2H_4 /kg/h, in comparison with 0.07 ml C_2H_4 /kg/h in the healthy fruit.

Treatment of infected fruit with exogenous ethylene showed that ethylene can influence the size of the disease spots.

Tests on the influence of pesticides on the growth of the bacteria showed that sodium ortho-phenylphenate and copper sulfate at 1000 ppm, and chlorine at 125 ppm, inhibited growth. However, benomyl, TBZ, FN-44, and limonene, at 1%, did not affect the bacteria.