



2002-2002

תקופת המחקר:

136-0478-02

קוד מחקר:

Subject:

שם המחקר: מחלות שנגרמות על ידי
פיטופלסמה - אפידמיולוגיה והדברה

Principal investigator: ABED GERA

חוקר ראשי: עבד גרה

Cooperative investigator:

חוקרים שותפים:

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן
50250

תקציר

מבוא: מחלת הצהבון נפוצה מאוד בארץ ובעולם. המחלה מתפשטת לאחרונה בארץ וגורמות נזק רב למגדלי גפן, גזר, פרחים וצמחי נוי. חיידקי הפיטופלסמה מוגבלים בתנועתם בצמח למערכת צינורות השיפה ומועברים על-ידי מיני ציקדות. הם מופיעים בריכוז נמוך מאוד ופיזורם בצמח אינו אחיד. עובדות אלו מקשים מאוד על זיהוי המחלה ועל בדיקת חומר הריבוי. כיום אין פתרון אגרוטכני יעיל למחלות הנגרמות ע"י פיטופלסמה. השימוש באנטיביוטיקה או איתור והדברת וקטורים בעזרת ריסוס הם פתרונות שעלולים להשפיע בצורה שלילית על הסביבה.

מטרת התכנית: בניית תשתית של שיטות, וידע לצורך זיהוי ואפיון מיני פיטופלסמה ואוכלוסיות הווקטור המעבירות את גורם המחלה, בניית תשתית ומתקנים לריבוי מיני הציקדות החשובים ללימוד האפידמיולוגיה של המחלה ופיתוח שיטות מניעה והדברה ע"מ להגביל את התפשטות והתבטאות המחלה.

מהלך ושיטות העבודה: אפיון וזיהוי הפיטופלסמה נעשה בשיטה מיקרוסקופית ע"י הסתכלות בחתכים דקים באמצעות מיקרוסקופיה אלקטרונית, ואמפליפיקציה באמצעות PCR. נעשה ניטור של ציקדות פעילות ונפוצות בשטחים נגועים באמצעות מלכודות דבק צהובות ושאובה בוואקום. בוצע מעקב בזמן ובמרחב אחר הופעת הפיטופלסמה והווקטור.

תוצאות עיקריות: בבדיקת חתכים דקים שבוצעה במיקרוסקופ אלקטרוני נצפו גופיפים דמויי פיטופלסמה בתאי שיפה של צמחי נוי עם סימנים. גופיפים אלו לא נצפו בתאים של צמחים בריאים. בבדיקות PCR שנערכו עם תחלים אוניברסליים ולאחריהם בריאקציה עוקבת עם תחלים ספציפיים התקבל מקטע DNA ספציפיים בכל המקרים בהם השתמשנו ב-DNA שהופק מצמח נגוע. לא התקבלו תוצרי אמפליפיקציה כאשר השתמשנו ב-DNA שהופק מצמחים בריאים. אותרו מספר צמחי בר ותרבות שמשמשים פונדקאי לפיטופלסמה. נמצאו שישה מינים של ציקדות הידועות כווקטורים של פיטופלסמה. האוכלוסייה הגדולה ביותר הייתה של *O. orientalis*. ששת המינים של ציקדות שנלכדו בשטחי לימוניום נגועים העבירו את הפיטופלסמה ביעילות גבוהה. נמצא שציקדות חודרות למנהרות דרך חלונות האוורור (Ventilation) בגבוה מתחת ל 1.5 מ'. נעשה ניסיון לחיזוק גפנים ע"י שיפור מצע הגידול. הוחל בניסיון להגן על גפנים בכרס צעיר ע"י שימוש בחגורה של צמחי מלכודת.

מסקנות והמלצות: הוכח שגורם המחלה בצמחי נוי, גזר וגפן הוא פיטופלסמה מסוגים שונים. זוהו הציקדות המעבירות את גורם המחלה. נבדק הגובה המקסימלי ממנו הציקדות נכנסות למנהרות. מומלץ לסגור את הכניסות למנהרות עם רשת כדי למנוע את כניסת הציקדות. כמו כן כדאי לחתוך את חלונות האוורור בגבוה של 1.5 מ'.

דו"ח לתכנית מחקר 02-0478-136

א. שם הנושא:

מחלות שנגרמות ע"י פיטופלסמה: אפידמיולוגיה והדברה

דו"ח שנתי מוגש לקרן המנהל

ב. שמות החוקרים:

המכון להגנת הצומח, המחלקה לוירולוגיה	מרכז הפרויקט: עבד גרה
המכון להגנת הצומח, המחלקה לוירולוגיה	חוקר: חזי אנסיגנוס
המכון להגנת הצומח, המחלקה לאנטומולוגיה	חוקר: פיליס ויינטראוב
המכון להגנת הצומח, המחלקה לוירולוגיה	חוקר: אריה רוזנר
מו"פ צפון	חוקר: תרצה זהבי
מו"פ הערבה	חוקר: גבי צוברי
קיבוץ שלוחות	חוקר: יוסי קנר
מו"פ בית שאן	חוקר: יעקב נקש
קיבוץ סעד	חוקר: אלי שליון
שה"מ	חוקר: ציון דר
שה"מ	חוקר: סמדר צוראל
שה"מ	חוקר: יונת השאם

Abed Gera, Department of Virology, ARO, The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; E-mail:

Weintraub Phyllis, Department of Entomology, Gilat Research Center, D.N. Negev 85280; Israel.

Zubiri Gabi, Navon Amnon, Oco Orna, Northern Arava Research and Development, Sapir Center, D.N. Arava, Israel, 86825; Israel.

Arieh Rosner, Department of Virology, ARO, The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; E-mail:

יוני 2003

סיון תשס"ג

האם הנך מאשר את ציון המסקה הבאה בדף הפתיחה לדו"ח כן/לא
הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר

3. תקציר

מבוא: מחלת הצהובון נפוצה מאוד בארץ ובעולם. המחלה מתפשטת לאחרונה בארץ וגורמות נזק רב למגדלי גפן, גזר, פרחים וצמחי נוי. חיידקי הפיטופלסמה מוגבלים בתנועתם בצמח למערכת צינורות השיפה ומועברים על-ידי מיני ציקדות. הם מופיעים בריכוז נמוך מאוד. ופיזורם בצמח אינו אחיד. עובדות אלו מקשים מאוד על זיהוי המחלה ועל בדיקת חומר הריבוי. כיום אין פתרון אגרוטכני יעיל למחלות הנגרמות ע"י פיטופלסמה. השימוש באנטיביוטיקה או איתור והדברת וקטורים בעזרת ריסוס הם פתרונות שעלולים להשפיע בצורה שלילית על הסביבה.

מטרת התכנית: בניית תשתית של שיטות, וידע לצורך זיהוי ואפיון מיני פיטופלסמה ואוכלוסיות הווקטור המעבירות את גורם המחלה, בניית תשתית ומתקנים לריבוי מיני הציקדות החשובים ללימוד האפידמיולוגיה של המחלה ופיתוח שיטות מניעה והדברה ע"מ להגביל את התפשטות והתבטאות המחלה.

מהלך ושיטות העבודה: אפיון וזיהוי הפיטופלסמה נעשה בשיטה מיקרוסקופית ע"י הסתכלות בחתכים דקים באמצעות מיקרוסקופיה אלקטרונית, ואמפליפיקציה באמצעות PCR. נעשה ניסוי של ציקדות פעילות ונפוצות בשטחים נגועים באמצעות מלכודות דבק צהובות ושאיבה בוואקום. בוצע מעקב בזמן ובמרחב אחר הופעת הפיטופלסמה והווקטור.

תוצאות עיקריות: בבדיקת חתכים דקים שבוצעה במיקרוסקופ אלקטרוני נצפו גופיפים דמויי פיטופלסמה בתאי שיפה של צמחי נוי עם סימנים. גופיפים אלו לא נצפו בתאים של צמחים בריאים. בבדיקות PCR שנערכו עם תחלים אוניברסליים ולאחריהם בריאקציה עוקבת עם תחלים ספציפיים התקבל מקטע DNA ספציפיים בכל המקרים בהם השתמשנו ב-DNA שהופק מצמח נגוע. לא התקבלו תוצרי אמפליפיקציה כאשר השתמשנו ב-DNA שהופק מצמחים בריאים. אותרו מספר צמחי בר ותרבות שמשמשים פונדקאי לפיטופלסמה. נמצאו שישה מינים של ציקדות הידועות כווקטורים של פיטופלסמה. האוכלוסייה הגדולה ביותר הייתה של *O. orientalis*. ששת המינים של ציקדות שנלכדו בשטחי לימוניום נגועים העבירו את הפיטופלסמה ביעילות גבוהה. נמצא שציקדות חודרות למנהרות דרך חלונות האוורור (Ventilation) בגובה מתחת ל 1.5 מ'. נעשה ניסיון לחיזוק נפנים ע"י שיפור מצע הגידול. הוחל בנסיון לחגן על גפנים בכרם צעיר ע"י שימוש בתגורה של צמחי מלכודת.

מסקנות והמלצות: הוכח שגורם המחלה בצמחי נוי, גזר וגפן הוא פיטופלסמה מסוגים שונים. זוהו הציקדות המעבירות את גורם המחלה. נבדק הגובה המקסימלי ממנו הציקדות נכנסות למנהרות. מומלץ לסגור את הכניסות למנהרות עם רשת כדי למנוע את כניסת הציקדות. כמו כן כדאי לחתוך את חלונות האוורור בגובה של 1.5 מ'.

4. רשימת פרסומים:

גרה, ע., ס. אלקסנדרוב, ל. מסלינין, א. רוזנר, י. אנטיוגוס, מ. למפל, י. מסיקה, פ. ויינטראוב, ומ. זיידאן (2003). מחלה חדשה ברקפת שגורמת ע"י פיטופלסמה, עולם פורח (בהדפסה)

Weintraub, P.G., Kleitman, S., Pivonia, S., Gera A. 2002. New Phytoplasma Disease in *Limonium* and Probable Leafhopper Vector, *Orosius orientalis* (=albicinctus)(Matsumura) (Hemiptera: Cicadellidae). 11th Meeting of the International Auchenorrhyncha Congress, Potsdam, Germany. P 52.

Gera, A., Rosner, A. and Weintraub, G. P. (2003). Molecular identification of a phytoplasma associated with a new disease of *Limonium* hybrids and the leafhopper vector(s). The International Congress of Plant Protection, Christchurch, New Zealand.

Gera, A. Maslenin, L., Rosner A., Zeidan M., Pivonia, S and Weintraub, P.G. 2003. A New Disease in *Limonium* hybrids. I. Molecular Identification. (Submitted)

Weintraub, P.G., Pivonia, S., Rosner, A. and Gera A. 2003. A New Disease in *Limonium* Hybrids. II: Insect Vectors. (Submitted)

ג. פירוט הניסויים והתוצאות

1. זיהוי ואפיון גורם המחלה:

שיטות וחומרים:

זיהוי מיקרוסקופי:

קטעי רקמה נאספו, קובעו ונחתכו באולטרה מיקרוטום. החתכים נצבעו ונבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני לנוכחות חלקיקים דמויי פיטופלסמה.

זיהוי מולקולרי:

במסגרת תכנית העבודה הנ"ל הותאמו שיטות לאיבחון פיטופלסמה בגפן, גזר, פרחים וחרקים. סוג הרקמה הצמחית הנלקחת לבדיקת הפתוגן ניבחר ונמצא כי תוצאות טובות ביותר התקבלו כאשר נילקחו לבדיקה עורקי העלים של הצמח ולא את רקמת העלה כולה. כתישת רקמה רכה (בוינקת למשל) נעשתה עם בופר כאשר חומר מעוצה (מגפן) ניכתש באויר נוזלי.

תאור כללי של שיטות מיצוי חומצת הגרעין מצמחים:

1. השיטה הראשונה שניבחרה היתה של Fulton et al., (1995) Plant Mol. Biol. Reporter

207, 13: ע"פ שיטה זו ניכתשה הרקמה הצימחית במבחנת אפנדורף בבופר (RT) שהכיל: NaCl/CTAB, Sorbitol, Sarkosyl, bisulfite. המיצוי כלל חימום של 65 C למשך של רבע שעה ועד שעתיים. השקעת החלבונים ע"י כלורופורום והשקעת חומצת גרעין (ח"ג) ע"י איזופרופנול. ניתן להוסיף טיפול ב-RNase בסופו של התהליך כדי לנקות את ה-DNA מ-RNA. שיטה זו הוכחה כמקובלת ביותר על ידנו, והיא יושמה במערכות צימחיות שונות: וינקה, לימוניות, גזר, גפן, פרחים, גיפסנית, מנטור.

2. שיטת Hot CTAB DNA Extraction (Zhang et al., 1998. J. Virol. Methods,

71:45-50): בופר כתישה (CTAB/NaCl/EDTA/Tris/mercaptoethanol), טחינה באויר נוזלי, חימום 65 C, מיצוי כלורופורום והשקעה ע"י איזופרופנול. השיטה יושמה בהצלחה לאבחון פיטופלסמה בלימוניות ובאסטר.

3. ניבדקו גם שיטה להעשרה של פיטופלסמה לפני מיצוי ח"ג בעזרת בופר מיצוי מיוחד

המכיל פוטסיום פוספט ו-sucrose, BSA, PVP, ascorbic acid (Ahrens and Seemuller 1992., Phytopathol. 82:828) שני שלבי צנטריפוגציה דיפרנציאלית לניקוי חלקי של הפתוגן. גם שיטה זו כללה טיפול של CTAB/NaCl, חימום 60 C, מיצוי כלורופורום והשקעה באיזופרופנול. בעזרת שיטה זו אובחנה פיטופלסמה בלימוניות, וינקה וציפורן.

4. שיטת Bertaccini (Italy) (השיטה מתבססת על פרוטוקול של שיטת Lee) כוללת בופר

מיצוי כני"ל בתוספת שלב טיפול של Proteinase K ו-Sarkosyl וכן מיצוי של כלורופורום ופנול. השיטה ארוכה ומורכבת, לוקחת זמן רב יותר ולכן לא הוכנסה לשימוש.

5. נוסו גם שיטות שבהן היה 2%-3% CTAB.

6. פרוטוקול פשוט למיצוי ח"ג שנוסה ע"י סיגלית (Orenstein et al., 2001. Vitis 40,

219-223) גם כן שימש אותנו במיצוי ח"ג מגפן וכן מוינקה. כתישת הרקמה הצמחית

נעשית ללא אויר נוזלי ובופר הכתישה כלל 3% CTAB, מיצוי כלורופורום והשקעת ח"ג באיזופרופנול. במערכת שלנו הוכחה שיטה זו כמתאימה לזיהוי פיטופלסמה בגפן וברקפת.

7. כמו כן הנו מתכוונים לנסות בעתיד גם קיט מסחרי לניקוי ח"ג מצמחים (גפן): DNeasy Plant Mini Kit המבוסס על ניקוי ח"ג בקולונה.

שטות מיצוי חומצת הגרעין ומציקדות:

1. לניקוי ח"ג מציקדות נוסתה תחילה שיטה פשוטה המבוססת על טיפול ב-NaOH. שיטה זו נמצאה כבלתי אמינה ולכן נוסתה שיטה אחרת (Maixner et al., 1995. Eur. J. Plant Pathol. 101;241-250). החרק נכתש בבופר: Tris, NaCl/CTAB, EDTA, mercapto. ולמיצוי נעשתה הדגרה ב-60 C, מיצוי כלורופורום והשקעה באיזופרופנול. לתוצרי ההגברה ב-PCR נעשה שיבוט מולקולרי וקביעת רצף הבסיסים שבו ובאופן זה זוהתה הפיטופלסמה בחרק.

2. שיטת Delaporte: שיטה כללית למיצוי ח"ג בופר המיצוי מכיל: Tris/EDTA/NaCl וכתישה בחנקן נוזלי, הוספת SDS וחימום ב-65 C ולאחר מכן השקעת החלבונים ע"י K-Acetate וח"ג ע"י איזופרופנול. שיטה זו עדיין לא ניבדקה לגבי ציקדות.

אמפליפקציה ב-PCR:

DNA כללי הופק מרקמות של צמחים נועים ובריאים נמהול לריכוז של 5-25 ng/ml, לפני בדיקת ה-PCR. ריכוז גבוהה יותר מכיל מעכבים צמחיים המפריעים לריאקציה ההגברה המולקולרית. DNA זה שימש כתבנית להגברה ב-PCR תוך שימוש בשני זוגות תחלים אוניברסליים המתבססים על מעקובת ייחודית בגן המקודד ל-16S rRNA לכלל הפיטופלסמה. בניסוי זה הדניא הכללי יחד עם ביקורת חיובית שמקורה מפלסמיד וביקורת שלילית. ללא דניא נכללו בריאקציות ה-PCR. בריאקציה הראשונה היה שימוש בזוג תחלים P1 ו-P7. תוצרי הריאקציה הראשונה נמהלו 1:40 ונכללו בריאקציה עוקבת שניה באותם תנאים אך תוך שימוש בזוגות תחלים שונים הממוקמים פנימה לזוג התחלים הראשון, דבר המאפשר שכפול בשיטת Nested-PCR. התוצרים אשר התקבלו בסיום מהלך השכפול השני הופרדו לפי גודל בגיל אגרוז 1%. לאחר צביעה באתידיום ברומיד הגיל נבדק בצילום תחת מנורת U.V. מקטע ה-DNA עבר שיבוט לפלסמיד ואנליזת קצף.

התחלים ששמשו להגברה המולקולרית ונמצאו מתאימים לאבחון הפיטופלסמה הם:

P1: 5'-AAGAATTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'
P7: 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'
R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'
F2: 5'-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3'
U3: 5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3'
U5: 5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3'

התחלים P1/P7 שימשו להגברה מולקולרית כפולה בשיטה של nested PCR כאשר השלב השני של ההגברה נעשה ע"י אחד משני זוגות התחלים: (1) U3/U5, (2) R2/F2 אשר תוצרי ההגברה שלהם היו 1200 ו-850 בהתאמה. שני זוגות תחלים אלו יכולים גם לשמש להגברה מולקולרית ישירה בשלב אחד במקרים שריכוז הפיטופלסמה גבוהה (בוינקה).

פרוטוקול ה-PCR היה כלהלן:

לגבי תחלים P1/P7:

92°, 30"
58°, 30"
72°, 90"

לגבי תחלים U3/U5 או R2/F2:

92°, 30"
55°, 30"
72°, 45"

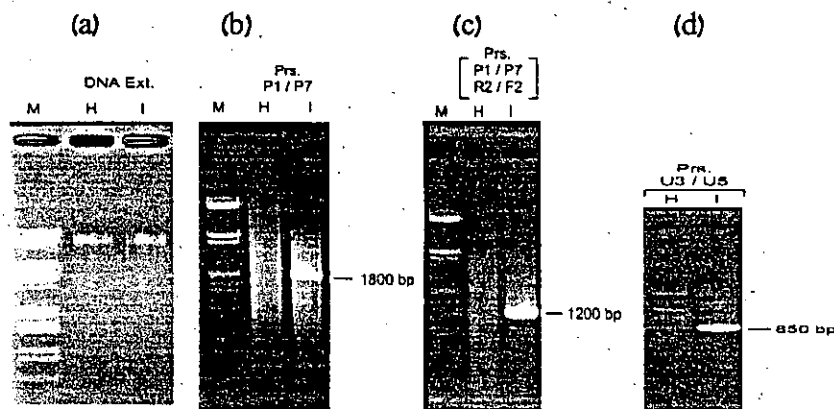
אבחון הפיטופלסמה נעשה במערכות הביולוגיות הבאות: פרחים, גזר, גפן וחרקים (ציקדות).

איבחון פיטופלסמה בפרחים:

איבחון פיטופלסמה בוינקה

צמח סטנדרטי ששימש כביקורת חיובית לאיבחון של פיטופלסמה הינו וינקה. תמונה מס (1) מראה חומצת גרעין שמוצתה מרקמת הצמח (a). הגברה מולקולרית בשיטת ה-nested ע"י זוג התחלים P1/P7 נתן תוצר הגברה בגודל מצופה של 1800 בסיסים (b). לתוצר זה נעשה מיהול של 1:40 וזה שימש כתבנית להגברה מולקולרית שניה בעזרת תחלים R2/F2 לקבלת תוצר של כ-1200 בסיסים (c), ותחלים U3/U5 שנתן תוצר שגודלו 850 בסיסים (d).

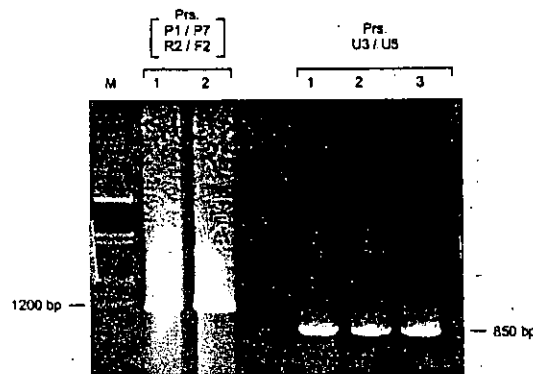
תמונה מס' 1: זיהוי פיטופלסמה בוינקה



איבחון פיטופלסמה בלימוניום

בבדיקות מולקולריות (PCR) שנערכו עם תחלים אוניברסליים ולאחריהם בריאקציה עוקבת שניה עם תחלים שונים. חלק מזוגות התחלים נתנו תוצאות לא אמינות. זוגות התחלים U3/U5 ו- R2/F2 נתנו תוצאות אמינות. מקטעים בגודל 1200 ו- 850 בסיסים, בהתאמה, התקבלו בכל המקרים בהם השתמשנו ב- DNA שהופק מצמח נגוע (תמונה 2). לא התקבלו תוצרי אמפליפיקציה כאשר השתמשנו ב- DNA שהופק מצמחים בריאים.

תמונה 2 – אנליזת PCR של לימוניום עם תחלים אוניברסליים (P1/P7) וריאקציה עוקבת שניה עם זוגות התחלים U3/U5 ו- R2/F2.

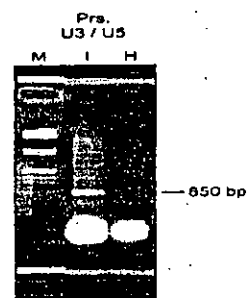


בבדיקת רצף הנוקלאוטידים של ה- DNA, נמצא שרצף הנוקלאוטידים דומה לרצף DNA של פיטופלסמה. זהות כמעט מוחלטת (99.3%) נמצאה עם ה- Elm Yellows Phytoplasma.

איבחון פיטופלסמה ברקפת

DNA הופק מרקמת עלים של רקפת ולדוגמאות נעשה PCR. התקבל תוצר של כ- 850 בסיסים תוך שימוש בתחלים U3/U5 בהגברה מולקולרית (תמונה 3). תוצר זה נוקה ושובט לפלסמיד של חיידקים לצורך קביעת רצף הבסיסים וזיהוי סוג הפיטופלסמה.

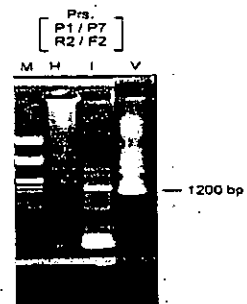
תמונה 3 : זיהוי פיטופלסמה ברקפת.



איבחון פיטופלסמה בגזר

מיצוי חומצת הגרעין נעשה מעלי גזר שהראו תסמינים אופייניים לפיטופלסמה. לזיהוי הפתוגן נעשתה הגברה מולקולרית כפולה: בתחילה בעזרת תחלים P1/P7 ולאחר מכן עם תחלים R2/F2 והתקבל תוצר בגודל של 1200 בסיסים (תמונה מס' 4) ובכך זוהה גורם המחלה כפיטופלסמה.

תמונה מס' 4: זיהוי פיטופלסמה בגזר.



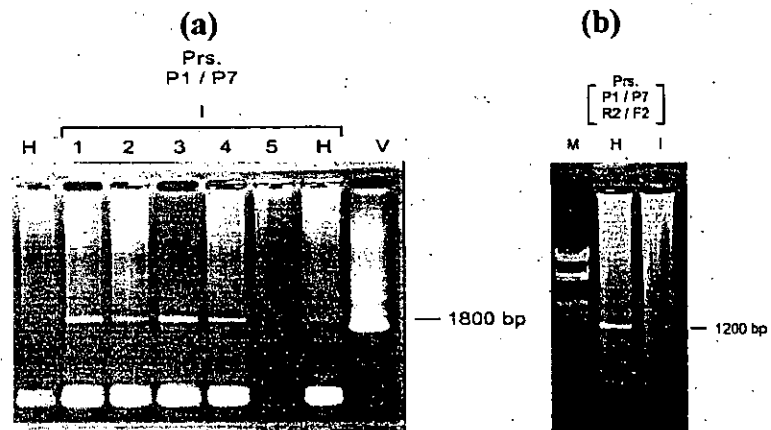
אבחון פיטופלסמה בגפן

אבחון הפיטופלסמה בגפן הינה בעייתית ביותר במהותה- הצמח מעוצה ורקמות העלים קשים למיצוי ח"ג. לכן השתמשנו בכתישת הרקמה תוך שימוש בהקפאה בקרח יבש וכן היה צורך בהגברה מולקולרית כפולה של P1/P7 ו-R2/F2.

דגימות גפן נאספו משני אזורים בארץ: ערד בדרום ורמת הגולן בצפון. בבדיקת דגימות גפן מערד התקבל תוצר הגברה בגודל המצופה של 1200 בסיסים (תמונה מס' 5a)

שנעשה לו קביעת רצף שעל פיו נקבע סוג הפיטופלסמה המדבקת כ- Aster Yellows. גם בבדיקות פיטופלסמה מבדיקות גפן מרמת הגולן התקבל תוצר דומה בהגברה מולקולרית (תמונה מס' 5b) וכן נעשתה הגברה כפולה בעזרת תחלים U3/U5 והתקבל תוצר התואם תחלים אלו בגודל של 850 בסיסים. גם לחומר זה נעשתה אנאליזה של רצף הבסיסים שהראו על הדבקה בסוג דומה של פיטופלסמה Aster Yellows.

תמונה מס' 5: זיהוי פיטופלסמה בגזר.

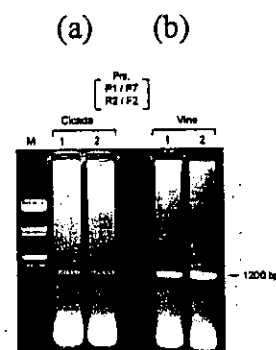


איבחון פיטופלסמה בציקדות

מיצוי חומצת הגרעין מציקדות (Orosius, Arava) נעשה באותה שיטת הפקה המשמשת לצמחים ונעשתה הגברה מולקולרית כפולה עם תחלים של P1/P7 ו-R2/F2. התקבל תוצר מצופה של 1200 בסיסים. לתוצר זה נעשה שיבוט לפלסמיד של חידקים (תמונה מס' 6). למקטע המשובט

נעשתה אנאליזה רצף של הבסיסים ונמצא שסוג הפיטופלסמה המדבק הוא גם כן ממשפחת Aster Yellows (טבלה 1).

תמונה מס' 6: זיהוי פיטופלסמה בציקדות (a) וגפן מערד (b).



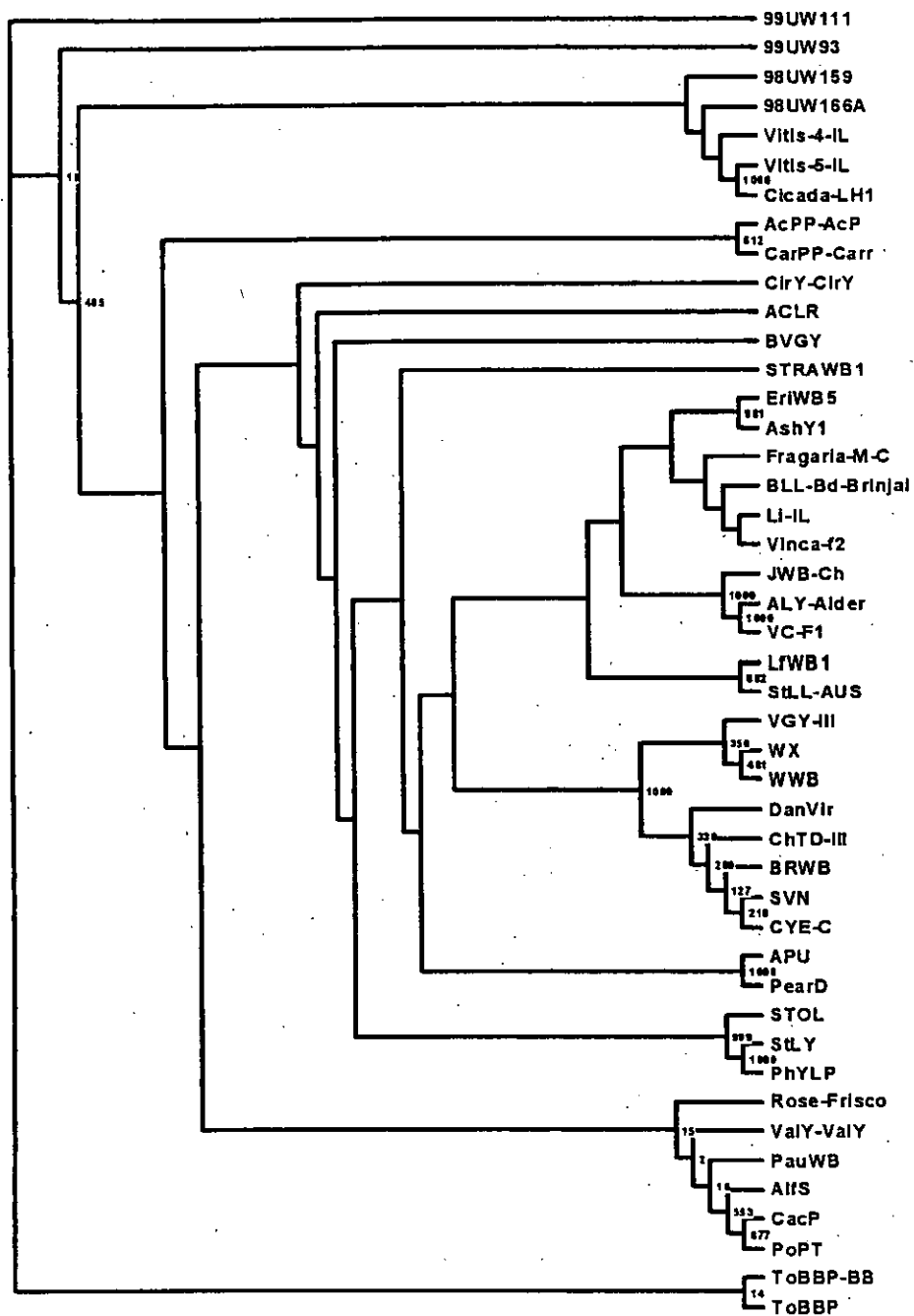
טבלה 1: שיעור הזהות של רצף ה-DNA מפיטופלסמה מלימוניום ופיטופלסמות אחרות.

Name	% identity
EY-Arl	99.29
EY-IL-1	98.95
EY-IL-2	98.78
PLL-Bd-Bri	98.95
FM-C	98.60
FM-C-MC9	98.69
FM-FRA9083	98.52
EY-CP-P	98.55
EriWB5	97.29
AshY1	96.94
StLL-AUS	96.77
LfWB	95.81
VC-F1	96.59
AL-Y-L	96.68
FD70	96.68
RuS-IT	96.42
FD-HD1	96.25
EY-NY	96.86

שיוך פילוגנטי:

בהתאם לרצפי ה-DNA שהתקבל, נבנה עץ פילוגנטי שמראה את השיוך של פיטופלסמות לקבוצות השונות (תמונה מס' 7).

תמונה 7: עץ פילוגנטי של פיטופלסמות שבחדו מהגידולים השונים.



2. איתור צמחי בר ותרבות שמשמשים פונדקאי לפיטופלסמה באזורים שונים:

צמחי מנתור, וינקה רפואית וענבי שועל שהראו סימני נינוס והצהבה, סימפטומים אופייניים למחלת הצהבון, נאספו בערבה, בסמוך לחלקה מסחרית של לימוניום בה נתגלתה נגיעות בפיטופלסמה. הצמחים נבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני ובבדיקה מולקולרית לנוכחות פיטופלסמה. תוצאות הבדיקה מוכיחות שבכל הצמחים עם סימני ההצהבה והנינוס היתה נגיעות בפיטופלסמה.

תוצאות הבדיקות של צמחי גבסנית ולויקדנדרון שהראו סימני נינוס ועיוותי עלים ונאספו בחצבה ורמת הגולן, בהתאמה היו שליליות.

במהלך השנה, נבדקו דוגמאות של לימוניום וצילוזה שנאספו מאזור השרון לנוכחות פיטופלסמה ונמצאו חיוביות. מדריכי שה"מ מדווחים על נגיעות בשיעור של 10-30 אחוז בחלקות מסחריות.

3. ניטור פעילותם של ציקדות עלים

לניטור הפעילות של החרקים הפוטנציאליים בחלקות לימוניום, נעשה שימוש במלכודות דבק צהובות ודיגום בואקום.

א. מלכודות דבק צהובות

א. במהלך השנה פוזרו מלכודות דביקות במספר חלקות בערבה, על-מנת להגדיר את האוכלוסיות הנפוצות בעונת הגידול. מלכודות צהובות עם דבק הונחו במנהרות לימוניום של ארבעה חקלאים במקומות שונים בערבה הצפונית. כמות תכשירי ההדברה הייתה שונה מחקלאי לחקלאי. אחד החקלאים לא השתמש בתכשירים כלל, כי רוב הצמחים היו נועים. המלכודות הונחו בשטח למשך שבוע, הציקדות זוהו, נוקו עם הקסאן (Hexane) והושמו בכוהל לאנליזת PCR.

תוצאות:

במהלך ניטור הפעילות של החרקים הפוטנציאליים בחלקות לימוניום נמצאו שישה מינים של ציקדות הידועות כוקטורים של פיטופלסמה במלכודות (טבלה 2) העיקריים היו: *O. orientalis*, *E. capicola*, *C. tenellus*, *C. haematoceps*, *O. orientalis* בכל מקום. 73% מכלל ה- *O. orientalis* היו חיוביים ב- PCR ו- 50% מכלל ה- *Circulifer* spp. נמצאו חיוביים אף הם. במשך הקיץ בגלל החום נלכדו מעט ציקדות.

טבלה 2: מספר הציקדות שנתפסו במלכודות דבק שהונחו במנהרות לימוניום במהלך שנה.

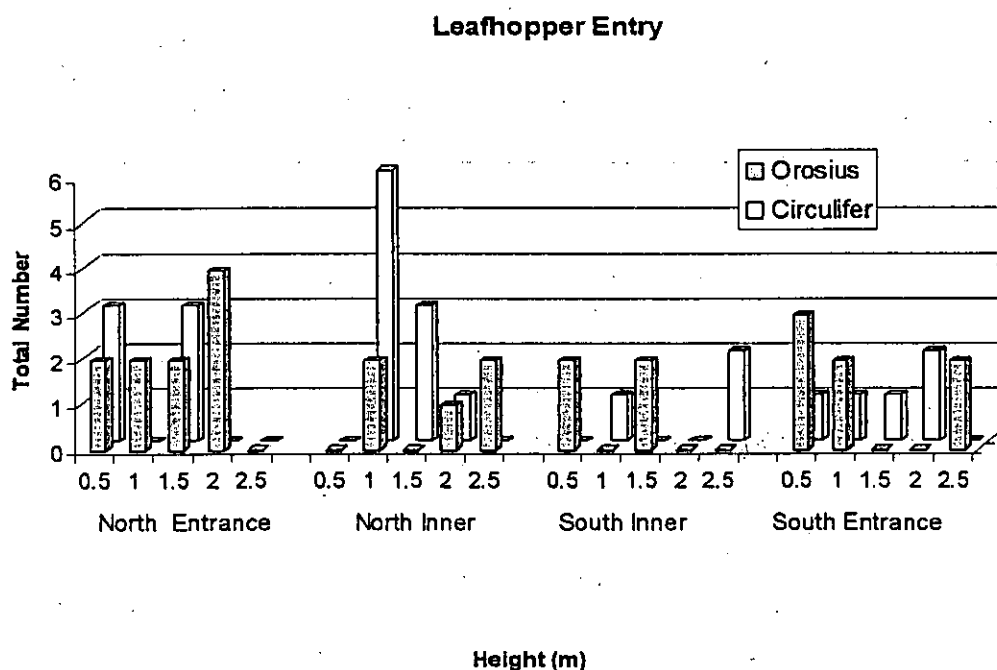
Species	Total # Caught
<i>Orosius orientalis</i>	8279
<i>Circulifer haematoceps</i>	825
<i>Circulifer tenellus</i>	832
<i>Exitianus capicola</i>	883
<i>Austroagallia sinuata</i>	94
<i>Psammotettix</i> spp.	32

ב. הניסוי כלל שלוש מנהרות, צמודות אחת לשניה, שבתוכן הונחו מלכודות דבק צהובות. כדי למדוד את הגובה שהציקדות נכנסות למנהרות, המלכודות הונחו בגבהים: 0.5 מ', 1 מ', 1.5 מ', 2 מ', 2.5 מ', ו-3 מ'. סידרה אחת בכניסה לכל מנהרה, ואחת 10 מ' בתוך כל מנהרה. כיוון המנהרות היה מצפון לדרום, כאשר הרוח באה בעיקר מהצפון. המלכודות הוחלפו כל שבועיים.

תוצאות:

באיור 1 אפשר לראות את המספר הממוצע של *O. orientalis* ו-*Circulifer* שנתפס במלכודות בגבהים השונים. מתוצאות אלה נראה שאפשר לשים גדר בכניסות למנהרות כדי למנוע את כניסת הציקדות. כמו כן כדאי לחתוך את חלונות האוורור (Ventillation) יותר גבוה במנהרות.

איור 1: המספר הממוצע של ציקדות שנתפס במלכודות דבק צהובות שהוצבו בגבהים השונים במנהרת לימונים.



ג. פלסטיק בולע קרינת UV:

ניסויי מעבדה:

בניסויים אלו נבחנה ההשפעה של פלסטיק בולע קרינת UV על התנהגות ציקדות בשתי שפופרות זכוכית באורך של 25 ס"מ שנצבעו בשחור. קצה אחד של השפופרת כוסה בפלסטיק בולע קרינת UV והקצה השני בפלסטיק רגיל וצופו בחומר דביק. קבוצות של 10 ציקדות, *O. orientalis* בחמש חזרות הוכנסו לשפופרות בתא חשוך. מנורת UV שהוצבה 75 ס"מ מהכיסוי הפלסטי הופעלה למשך 15 דקות. הציקדות שנמשכו למקור ה-UV ונלכדו נספרו. בניסויי אין ברירה (non-choice experiments) בהם הקצוות כוסו בפלסטיק בולע קרינת UV, מספר הציקדות

שנמשך למקור ה-UV היה קטן באופן מובהק בהשוואה לפלסטיק רגיל. לאחר 10 ניסויים 97 ציקדות נמשכו למקור ה-UV כאשר השפופרות כוסו בפלסטיק רגיל ורק 7 כאשר כוסו בפלסטיק בולע קרינת UV.

שני כלובים בגודל 60X55 X100 ס"מ נבנו מעץ כוסו משלשה כיוונים, וחופו עם יריעות בולעות UV או יריעות רגילות. להורדת החום בתאים, הצד האחורי של התאים חופה ברשת 50 מ"ש לגובה של 30 ס"מ. שני התאים חוברו בשפופרת באורך של 20 ס"מ דרך שני פתחים בקוטר 15 ס"מ בצדדים של כל כלוב. עציץ סומסום הונח בכל כלוב 100 ציקדות *O. orientalis* הוכנסו לכל כלוב. הכלובים הונחו מול קרני השמש למשך 3 שעות בבוקר ו-3 שעות אחר הצהריים. הניסוי נערך בשתי חזרות. כאשר ניתנה הברירה לציקות לעבור לכלוב המחופה עם יריעות בולעות UV בהשוואה לכלוב המחופה עם פלסטיק רגיל, לאחר ארבעה ניסויים, 385 ציקדות עברו לכלוב המחופה עם פלסטיק רגיל ורק 7 לכלוב המחופה עם יריעות בולעות UV.

4. ניטור פעילותם של ציקדות עלים בחלקות גזר בית שאן:

לניטור הפעילות של ציקדות בחלקות גזר, נעשה שימוש במלכודות דבק צהובות, דיגום בואקום ומלכודות אור. מלכודות דבק צהובות הוחלפו פעם בשבוע. דגימות ואקום ומלכודות אור נאספו בפרקי זמן קבועים.

תוצאות:

סתיו 2002:

במהלך ניטור הפעילות של החרקים הפוטנציאליים בחלקות גזר נרשמו מינים של ציקדות הידועות כוקטורים של פיטופלסמה או ספירופלסמה. במלכודות דבק צהובות נמצו האוכלוסייה הגדולה ביותר הייתה של *B. glaber* שבד"כ נפוצה בקיץ, הופיעה גם בסתיו (איור 2). בדיגום ואקום נלכדו מעט מאוד ציקדות (טבלה 3).

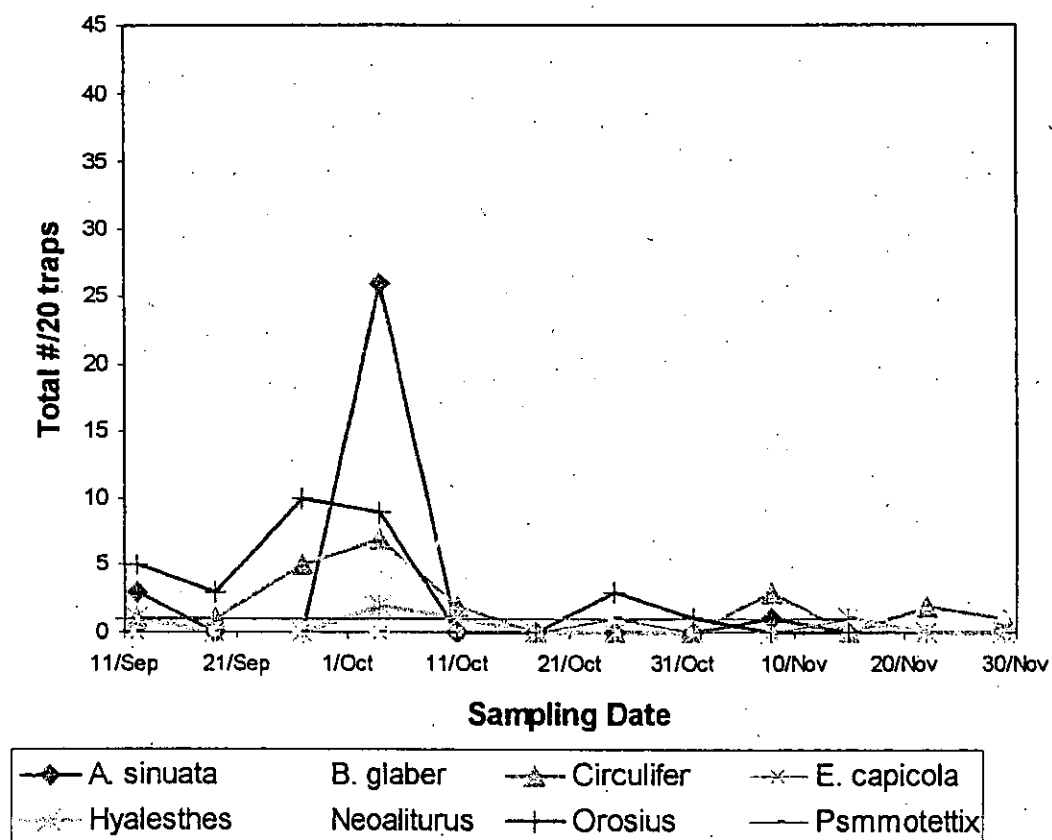
מספר הציקות המקסימלי שנלכדו במלכודות אור היה 3 פריטים (איור 3).

טבלה 3: מספר הציקדות שנתפסו במלכודת ואקום שהונחו בשדות גזר בבבית שאן (2002).

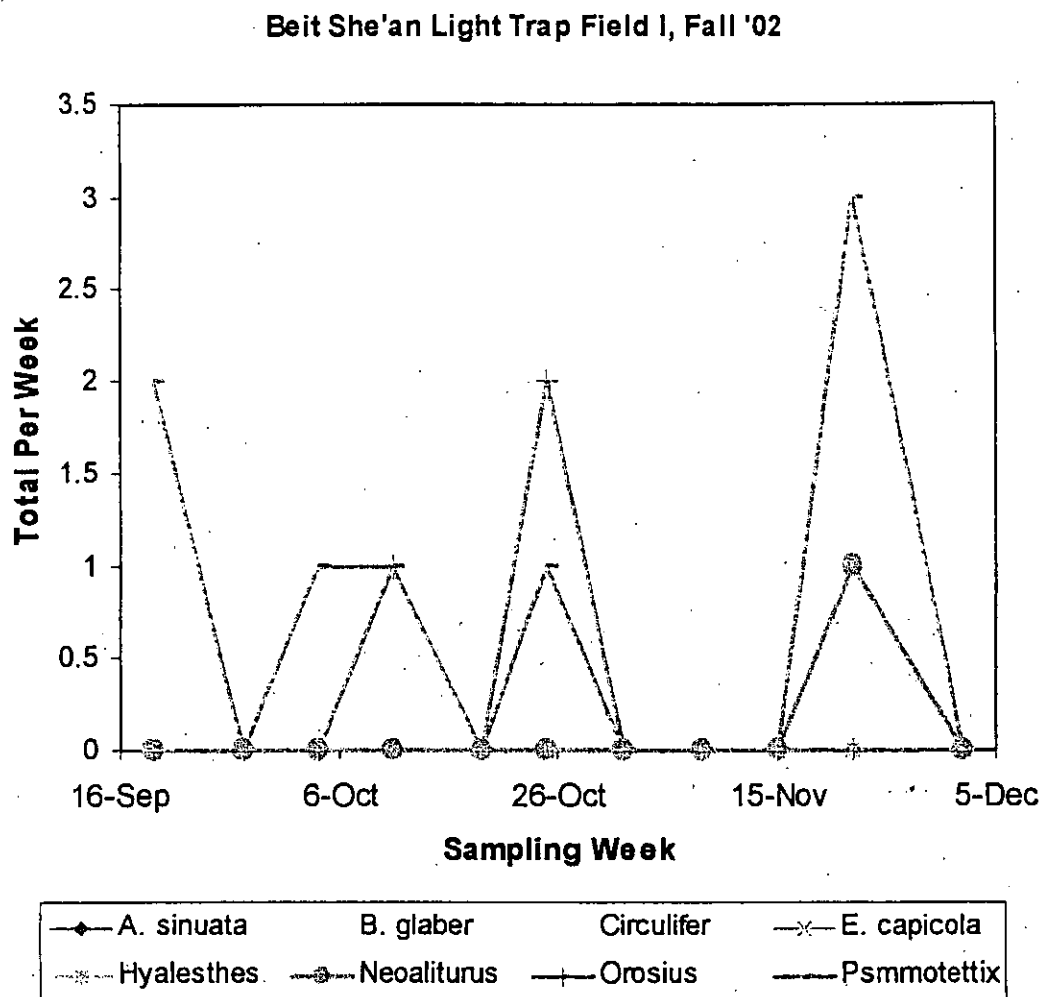
Vacuuming 25-Oct - 26 Jan	
<i>A. sinuata</i>	1
<i>B. glaber</i>	0
<i>Circulifer</i>	0
<i>E. capicola</i>	0
<i>Hyalesthes</i>	0
<i>N. fenestratus</i>	0
<i>O. orientalis</i>	1
<i>Psammotettix</i>	0

איור 2: המספר הממוצע של ציקדות שנתפסו במלכודות צהובות שהונחו בשדות גזר בבבית שאן (2002).

Beit Sh'ean Field I, Fall 02



איור 3: המספר הממוצע של ציקדות שנתפס במלכודות אור שהונחו בשדות גזר בבבית שאן (2002).



חורף 2002/3:

עונת החורף היתה גשומה ולכן המלכודות לא נאספו על בסיס שבועי. לא נלכדו ציקדות במהלך העונה בכל סוגי המלכודות. יתכן והציקדות נשטפו כתוצאה מהגשם העז.

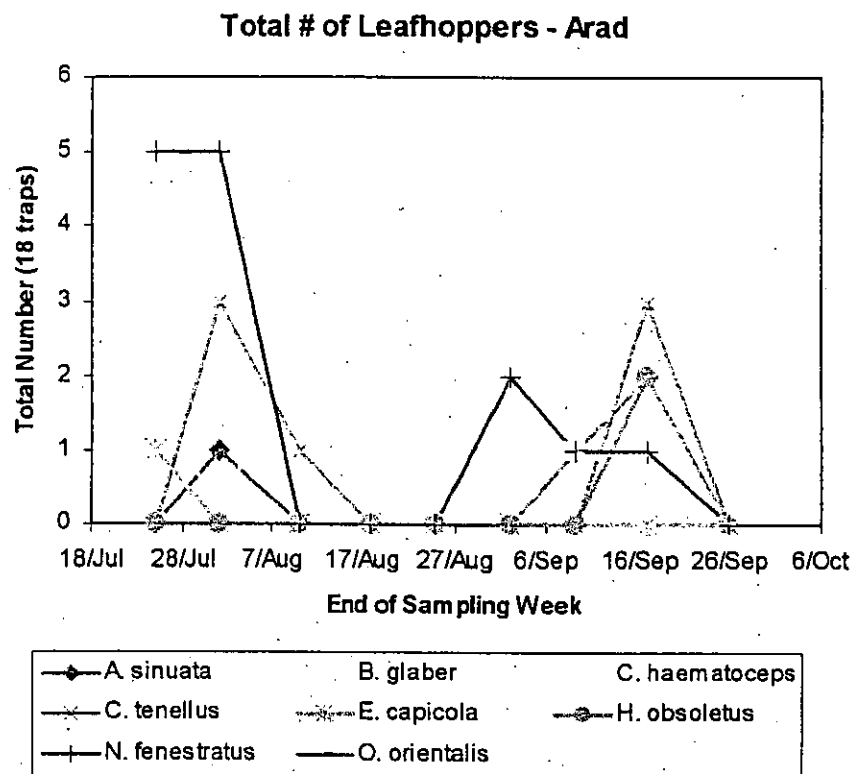
גפן-ערד:

ציקדות נלכדו בכרמים תוך שימוש במלכודות דבק צהובות שפוזרו סביב כרמים ובתוך הכרם. המלכודות הוחלפו אחת לשבוע מתחילת הפרויקט עד השלכת, ושוב מתחילת הבלבול ונמשך עד היום. כתוצאה מנגיעות קשה בון שורדנה, החלקה הושמדה במהלך החורף.

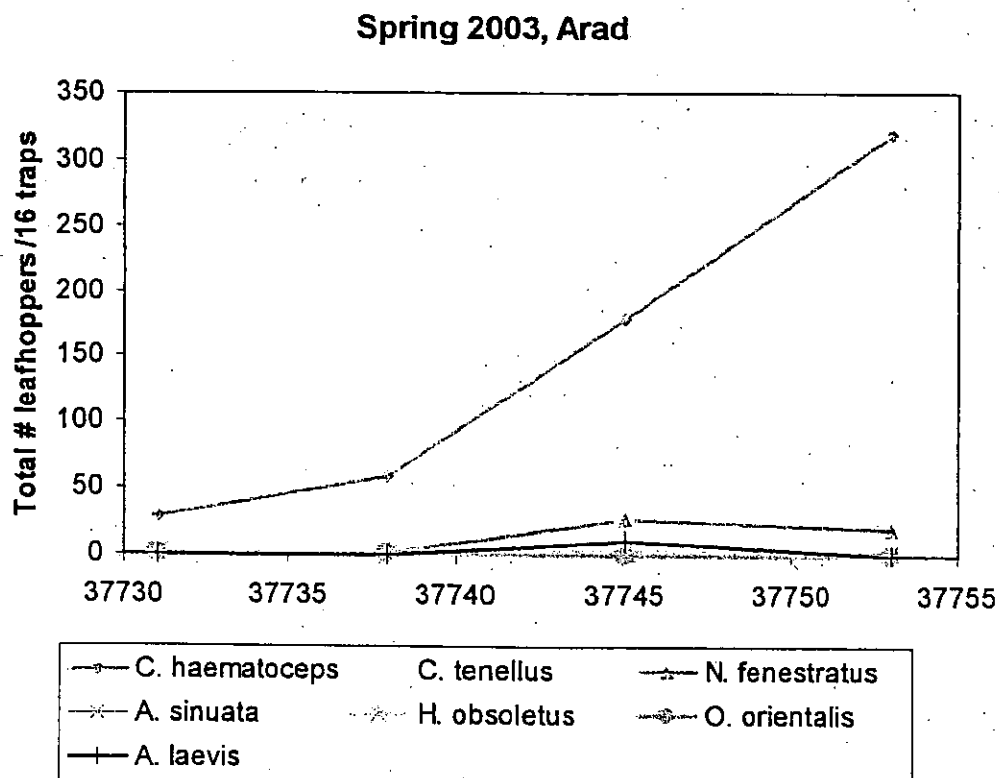
קיץ 2002:

תוצאות לכידות הקיץ והחורף מסוכמות באיורים 4 ו-5. מספר הפרטים של *C. haematoceps* היה הגבוה ביותר.

איור 4: המספר הממוצע של ציקדות שנתפס במלכודות דבק שהונחו בחרם במהלך קיץ 2002.



איור 5: המספר הממוצע של ציקדות שנתפס במלכודות דבק שהונחו בחרם במהלך 2003.



מסקנות: מספר הציקדות שנלכדו במהלך הקיץ היה נמוך, דבר שהיה צפוי. מספרים נמוכים של ציקדות נרשמו גם בגולן בעונה זו. לקראת סוף הקיץ מספר הציקדות *C. haematocephs* עלה. ציקדה זו ידועה כוקטור של פיטופלסמה בגידולים אחרים. יתכן שהיא משמשת כוקטור של פיטופלסמה של בגפן.

סיכום העבודה בנושא פיטופלסמות בגפני יין - גולן.

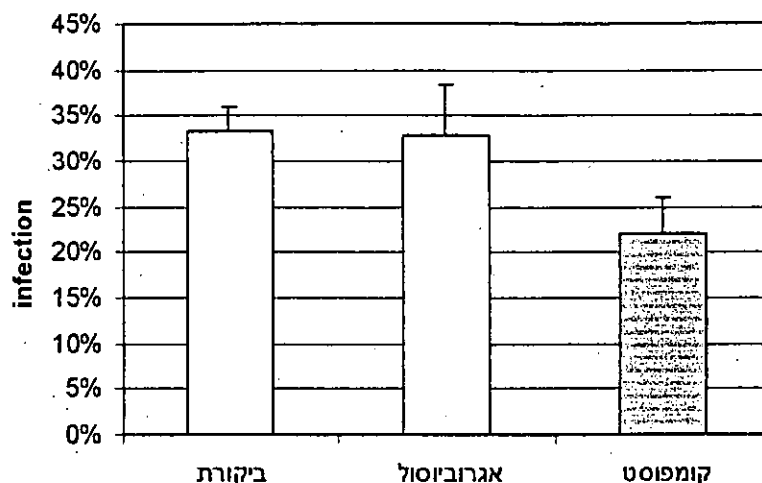
תרצה זהבי	שה"מ
רקפת שרון	מו"פ צפון
יוני גל	שה"מ
פיליס ווינטראוב	מינהל המחקר החקלאי, חוות גילת

5. שיפור מצע הגידול לצורך חיזוק הגפנים.

הניסוי נערך בכרם של מושב אלוני הבשן בון מרלו שניטע בשנת 1995 (16 אחוז נגיעות בשנת 2000). ניבחנו שני סוגי מצע לעומת גפני ביקורת. הטיפולים שניבחנו:

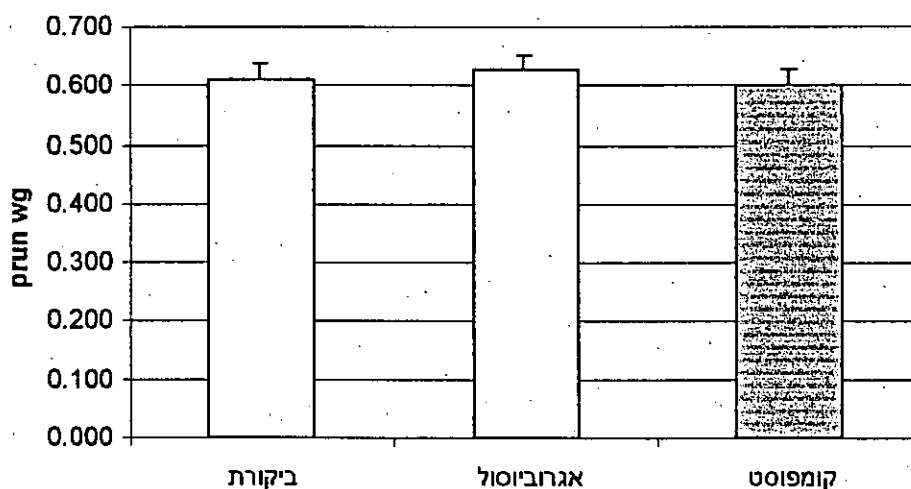
1. אגרוביוסול במינון של 300 ק"ג/ד' בהצנעה באביב.
 2. קומפוסט, במינון של 4 מ"ק/ד', ג"כ בהצנעה באביב.
 3. ביקורת לא מטופלת (חפירה וסגירה של תעלה ללא יישום של תוספים).
- מבנה הניסוי: שלושה טיפולים בשש חזרות (שורות) שבכ"א מהן 170 גפנים, כל חלקת ניסוי כוללת 50 עד 75 גפנים. בין כל שתי שורות נבדקות נמצאת שורת גבול אחת, בלתי מטופלת. יישום קומפוסט ואגרוביוסול נעשה באפריל 2002, אחרי תחילת הצימוח של הגפנים, על ידי חפירת תעלה ברוחב 20 ובעומק 15 ס"מ מצד אחד של השורה. קומפוסט או אגרוביוסול יושמו בתעלה בהתאם לטיפולים השונים ואילו בטיפול הביקורת, כדי לשלול את האפשרות שלעצם החפירה היתה השפעה על הגפנים, נערכה חפירה וסגירה של התעלה ללא כל יישום של חומר. מעקב ויזואלי אחר התפתחות הגפנים לא הראה השפעה בולטת של הטיפולים. בחינה של שעור הגפנים המראות סימני מחלה נעשתה לקראת הבציר בסוף אוגוסט מועד בו התבטאות המחלה בשיאה. כגפנים נגועות צוינו כאלה שהראו לפחות שניים מהסימנים הבאים: האדמה אופינית של העלים, התנוונות אשכולות, חוסר התעצות של השריגים. נערכה השוואה של שעור הנגיעות בין הטיפולים השונים לביקורת. ההשוואה נערכה אחרי טרנספורמציה לארקסיוס וניתוח GLM במבחן דנקן. התוצאות וסטיות התקן מוצגות באיור 6.

איור 6: השוואה של שעור הנגיעות בפיטופלסמה בין הטיפולים השונים לביקורת.



לאגרוביוסול לא היתה כל השפעה על שעור הנגיעות, לעומת זאת השוואה של שעור הנגיעות בגפנים שקיבלו קומפוסט לשעורן בטיפול הביקורת הראתה השפעה מובהקת של הטיפול. משקל הגזם, המהווה מדד מקובל לעוצמת הצימוח בגפן, ניקבע ע"י זמירה ושקילה של עשרים גפנים בכל חזרה. לא נימצא כל הבדל במשקל הגזם בין הטיפולים השונים (איור 7).

איור 7: השוואה של משקל הגזם בין הטיפולים השונים לביקורת.



ההשפעה המהירה של טיפול הקומפוסט (שיפור ניראה אחרי פחות מחצי שנה) מעודדת. בעונה הקרובה (2003) נחזור על הטיפולים בצד השני של השורה תוך הגדלת כמות האגרוביוסול ל- 500 ק"ג לדונם.

6. הגנה על ידי חגורה של צמחי מלכודת.

בחגורה, סביב כרם צעיר, נישתלו שיחים של הדס (*Myrtus sp.*) ושיח אברהם (*Vitex agnus-castus*) ושלושה זנים של חבלבל תרבותי. בנוסף גדלים בר בחגורה מספר זנים של חבלבל בר (*Convolvulus sp.*) וירבוזים (*Amaranthus sp.*). כל המינים האלה מוזכרים כפונדקאים אפשריים של מספר מיני ציקדות.

הצמחים בחגורה טופלו בקונפידור, חומר קוטל מוצצים במטרה להקטין את אוכלוסית המוצצים בקירבת הכרם.

בסתיו 2002 ובאביב 2003 נערך סקר של ציקדות בכרם המוקף בחגורה והאוכלוסיה הושוותה לאוכלוסיית החרקים בכרם סמוך מאותו זמן, שלא מוקף בחגורה כזו. ההשוואה נעשתה עם מלכודות דבק צהובות שניתלו בגבהים שונים מעל הקרקע. במקביל הושמו בהיקף של שני הכרמים עציצים עם צמחי וינקה, צמחים הנוטים לבטא במהירות רבה יחסית נגיעות בצהובון העציצים הוחזקו בכרם במשך שבועיים והועברו לבית רשת באבני איתן בהמתנה להתבטאות סימפטומים. בנוסף נאספה בתחילת מאי אוכלוסית חרקים בשאיבה ממרכז כל כרם.

טבלה 4: כמות הפרטים (בעיקר *Hyalesthes obsoletus*) שנילכדו במלכודות דבק צהובות במשך הסתיו בשני הכרמים (חזרה אחת בכל כרם):

תאריך	כיוון	דרום		מערב		צפון		מזרח	
	גובה (מ')	חגורה	ללא	חגורה	ללא	חגורה	ללא	חגורה	ללא
ספטמבר 3-18	1	1	18	0	1	2	1	0	2
	2	2	5	0	2	1	1	7	3
	3	1	0	0	0	1	2	1	2
	4	1	0	0	1	0	0	1	2
ספטמבר 18-30	1	2	2	12	90	3	6	8	6
	2	1	2	0	26	1	9	3	6
	3	1	2	0	2	1	3	1	0
		0	1	0	3	0	2	1	1

טבלה 5: כמות הפרטים (בעיקר *M. scabripines* (113) אך גם *Circulifer* (20) ומעט

laevis (1)) שנילכדו באפריל בשתי החלקות (5 חזרות בכל כרם):

תאריך	כיוון	דרום		מערב		צפון		מזרח		מרכז
	גובה (מ')	חגורה	ללא	חגורה	ללא	חגורה	ללא	חגורה	ללא	ללא
2-16 לאפריל	1	2	3	3	7	5	1	13	7	12
	2	3	3	1	1	1	0	7	4	2
	3	2	5	0	5	2	2	0	3	2
	4	1	5	0	3	2	0	3	3	2
סה"כ		8	16	4	16	10	3	23	17	18

בשני מועדי הלכידה ניראה הבדל ברור בכמות הפרטים שנלכדה במלכדות הנמוכות (2-1 מטר) לעומת כמותם במלכדות שחוצבו בגובה של 3-4 מטר. עובדה זו תוכל להקל על נסיונות לחסום פיזית את הגעת החרקים.

חשוב לציין שבעוד בסתיו הצמחיה בסביבת הכרם יבשה והכרם והתגורה המושקית סביבו מהווים כתם יחיד בחדד הרר באפריל הצמחיה מסביב ירוקה ולמעשה אין ייחוד ולכן כנראה גם לא נראה הבדל באוכלוסיות החרקים סביב שני הכרמים.

סיכום חדש לדיווחות מחקר 2000

1. מסרות המחקר לתקופת הדו"ח

מטרותיה של תכנית בית תשתית של שיטות, וידע לצורך זיהוי ואפיון מיני פטופלסמה ואוכלוסיות הווקטור המעבירות את גורם המחלה, בניית תשתית ומתקנים לריבוי מיני הציקדות החשובים ללימוד האפידמיולוגיה של המחלה ופיתוח שיטות מניעה והדברה ע"מ להגביל את התפשטות והתבטאות המחלה.

2. עיקרי הניסויים

זיהוי מיקרוסקופי: סטעי רקמה מצמחים נועים נאספו, קובעו ונחתכו באולטרה מיקרוטום. החתכים נצבעו ונבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני. גופיפים דמויי פטופלסמה נצפו במיקרוסקופ אלקטרוני בתאי שיפה של צמחי לימונים עם סימנים. גופפים אלה לא נצפו בחתכי רקם מצמחים בריאים.

זיהוי מולקולרי: בדיקות PCR שנערכו עם תחלים אוניברסליים ולאחריהם בריאקציה עוקבת עם תחלים ספציפיים התקבל מקטע DNA בגודל 1150 בסיסים, בכל המקרים בהם השתמשנו ב-DNA שהופק מצמח נוע. לא התקבלו תוצרי אמפליפיקציה כאשר השתמשנו ב-DNA שהופק מצמחים בריאים.

לימוד האפידמיולוגיה של המחלה: במעקב בזמן ובמרחב אחר הופעת גורם המחלה והווקטור, נמצאו שישה מינים של ציקדות הידועות כווקטורים של פטופלסמה. האוכלוסייה הגדולה ביותר הייתה של *O. orientalis*. ששת המינים של ציקדות שנלכדו בשטחי לימונים נועים העבירו את הפטופלסמה בעילות גבוהה. נמצא שציקדות חודרות למנהרות דרך חלונות האוורור (Ventilation) בגובה מתחת ל 1.5 מ'. נעשה נסיון לחיזוק גפנים ע"י שיפור מצע הגידול. הוחל בנסיון להגן על גפנים בכרם צעיר ע"י שימוש בחגורה של צמחי מלכדות.

חיזוק צמחים: נעשה נסיון לחיזוק גפנים ע"י שיפור מצע הגידול. הוחל בנסיון להגן על גפנים בכרם צעיר ע"י שימוש בחגורה של צמחי מלכדות.

3. המסקנות המדעיות

הוכח שגורם המחלה בצמחי נוי, גזר וגפן הוא פטופלסמה מסוגים שונים. זוהו הציקדות המעבירות את גורם המחלה. נבדק הגובה המקסימלי ממנו הציקדות נכנסות למנהרות. מומלץ לסגור את המניסות למנהרות עם רשת כדי למנוע את כניסת הציקדות. כמו כן כדאי לחתוך את חלונות האוורור בגובה של 1.5 מ'.

4. בעיות לפתרון

יש להמשיך ולעקוב אחר התפשטות המחלה והווקטורים בגזר, גפן וצמחי נוי. להמשיך ולבדוק דרכים למניעת הפצתה.

5. הפצת ידע

תוצאות העבודה הוצגו ביום עיון לחקלאים בערבה ובכינוסים בינלאומיים מקצועיים שהתקיימו בארה"ב, גרמניה וניז'לנד. פורס מאמר בירחון מגדלי הפרחים "פרחים". שני מאמרים הוגשו לפרסום.