



קוד זיהוי : 132-1085-00

נושא המחקר: בדיקת רגישות של כנת אלנם לאגרובקטריום.

סוג דו"ח : דו"ח מדעי שנתי

חוקר ראשי : מנוליס שולמית

חוקרים משניים: צ'לופוביץ לאורה
אנטמן שמעון

מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

המועצה לפירות

תקציר הדו"ח:

כנות שקד מר מהסוג אלנם ולכיש משמשות לגידול זני אפרסקים ושזיפים מוקדמים בשל תכונות הורטיקולטוריות שונות ועמידותם לנמטודה יוצרת עפצים. הכנות רגישות לחיידק *Agrobacterium umefaciens* הגורם למחלת העפצים. מטרת העבודה היתה לברר האם קיים שוני ברגישות הכנות להדבקה בחיידק אגרובקטריום והאם ניתן לאתר כנה שהיא רגישה פחות. הניסויים נעשו בשתילי שקד מר בני שנה מהכנות אלנם-88, אלנם-1 ולכיש עליהם מורכבים שתילי אפרסק מהזן סוולינג. השתילים אולחו בשורשים ובצואר השורש, בחיידק פתוגני הנושא עמידות לאנטיביוטיקה סטרפטומיצין. כאשר ההדבקה נעשתה בצואר השורש בחלק העל קרקעי אחוז ההדבקות המוצלחות היה בכנה לכיש 90 לעומת 57 ו-52 בקווים אלנם-88 ואלנם-1 בהתאמה. כאשר ההדבקות נעשו בצואר השורש בחלק התת קרקעי נמצא שאחוז העפצים שנוצרו לאחר חודשיים מההדבקה בלכיש היה 100 לעומת 38 ו-9.5 בקווים האחרים בהתאמה. מדידת גודל העפצים הראתה שלא היה הבדל משמעותי בגודל העפצים שנוצרו בשלושת הכנות. בהדבקה שנעשתה בשורשים לאחר פציעתם לא נמצאו כלל עפצים. בבדיקה לאחר 8 חודשים של השורשים של כל העצים שבניסוי נמצאו בכנה לכיש 50% עצים עם עפצים לעומת 3% בכנה אלנם-1 ו-16% בכנה אלנם-88. גם מספר העפצים שנמצא בלכיש היה גבוה מזה שבשתי הכנות האחרות. בדיקה של החיידקים בעפצים אלו הראתה שהם לא נשאו עמידות לסטרפטומיצין. כלומר ההדבקה נעשתה אצל המגדל ממקור אילוח שהיה בקרקע. תוצאה זו מצביעה על כך שיתכן והשורשים בשתילים בני שנה אינם רגישים למחלה. בדיקת התפשטות החיידקים לחלקים על קרקעיים בצמח מראה כי ניתן לגלותם רק במרחקים שאינם עולים על 10 ס"מ ממקום ההדבקה. תוצאות המחקר שהתקבלו בשיטות ההדבקה השונות מראות שהכנה לכיש רגישה יותר משתי הכנות האחרות לחיידק אגרובקטריום.

חתימות ואישורים:

3.1.01

תאריך

רש

אמרכלות

מנהל המכון

מנהל המחלקה

חוקר ראשי

בדיקת רגישות של כנות אלנס לאגרובקטריום

מוגש ע"י: שולמית מנוליס ולאורה צ'לופוביץ, המחלקה למחלות צמחים, מרכז וולקני, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן, שמעון אנטמן, שה"מ, משרד החקלאות

תקציר

כנות שקד מר מהסוג אלנס ולכיש משמשות לגידול זני אפרסקים ושיזיפים מוקדמים בשל תכונות הורטיקולטוריות שונות ועמידותם לנמטודה יוצרת עפצים. הכנות רגישות לחיידק *Agrobacterium tumefaciens* הגורם למחלת העפצים. מטרת העבודה היתה לברר האם קיים שוני ברגישות הכנות להדבקה בחיידק אגרובקטריום והאם ניתן לאתר כנה שהיא רגישה פחות. הניסויים נעשו בשתילי שקד מר בני שנה מהכנות אלנס-88, אלנס-1 ולכיש עליהם מורכבים שתילי אפרסק מהזן סוולינג. השתילים אולחו בשורשים ובצואר השורש, בחיידק פתוגני הנושא עמידות לאנטיביוטיקה סטרפטומיצין. כאשר ההדבקה נעשתה בצואר השורש בחלק העל קרקעי אחוז ההדבקות המוצלחות היה בכנה לכיש 90 לעומת 57 ו-52 בקווים אלנס-88 ואלנס-1 בהתאמה. כאשר ההדבקות נעשו בצואר השורש בחלק התת קרקעי נמצא שאחוז העפצים שנוצרו לאחר חודשיים מההדבקה בלכיש היה 100 לעומת 38 ו-9.5 בקווים האחרים בהתאמה. מדידת גודל העפצים הראתה שלא היה הבדל משמעותי בגודל העפצים שנוצרו בשלושת הכנות. בהדבקה שנעשתה בשורשים לאחר פציעתם לא נמצאו כלל עפצים. בבדיקה לאחר 8 חודשים של השורשים של כל העצים שבניסוי נמצאו בכנה לכיש 50% עצים עם עפצים לעומת 3% בכנה אלנס-1 ו-16% בכנה אלנס-88. גם מספר העפצים שנמצאו בלכיש היה גבוה מזה שבשתי הכנות האחרות. בדיקה של החיידקים בעפצים אלו הראתה שהם לא נשאו עמידות לסטרפטומיצין. כלומר ההדבקה נעשתה אצל המגדל ממקור אילוח שהיה בקרקע. תוצאה זו מצביעה על כך שיתכן והשורשים בשתילים בני שנה אינם רגישים למחלה. בדיקת התפשטות החיידקים לחלקים על קרקעיים בצמח מראה כי ניתן לגלותם רק במרחקים שאינם עולים על 10 ס"מ ממקום ההדבקה. תוצאות המחקר שהתקבלו בשיטות ההדבקה השונות מראות שהכנה לכיש רגישה יותר משתי הכנות האחרות לחיידק אגרובקטריום.

הקדמה

כנות שקד מר מהסוג אלנס ולכיש משמשות לגידול זני אפרסקים ושיזיפים מוקדמים בשל תכונות הורטיקולטוריות שונות. כנות אלנס התקבלו מבירורים שנעשו בין זריעי שקד מר שנוותרו בחיים

במשתלות נגועות קשה בנמטודות יוצרות עפצים [1]. הכנות מצטינות בעוצמת גדילה ובגדילה זקופה ובגלל עמידותם לנמטודה יוצרת עפצים וכשרם הטוב ביצירת זרעים הדומים להורים הן מתאימות לשמש ככנות [1]. הכנה לכיש מוצאה מאיסוף זרעי אלנם לא מזוהים בחוות לכיש. כל הכנות רגישות לחיידק *Agrobacterium tumefaciens* הגורם למחלת העפצים. אגרובקטריום הוא חיידק שוכן קרקע הגורם למחלת עפצים בגידולים שונים כגון, עצי פרי גלעניים, גפן, ורדים וצמחי נוי אחרים [2]. המחלה מתבטאת בגידול יתר של תאי הפרנכימה ויצירת גידולים (עפצים) על השורשים, צואר השורש, בסיסי יחורים ואף על החלקים העל קרקעיים של הצמח [2]. החיידק חודר לצמח דרך פצעים כגון אלה הנגרמים ע"י הצמיחה עצמה, פצעי גזיוס או נזקי קור. הנזק של המחלה בצמח מתבטא בהגבלת תנועת המים מהשורשים לשאר חלקי הצמח והגבלת תנועת מוטמעים. במקרים רבים משמשים העפצים גם פתח לחדירת מיקרואורגניזמים מישניים המתישים את הצמח ועלולים לגרום להתנוונותו ולמותו [2].

מטרת העבודה היתה לברר האם קיים שוני ברגישות כנות שקד מר מהסוג אלנם ולכיש להדבקה בחיידק אגרובקטריום והאם ניתן לאתר כנה שהיא רגישה פחות.

שיטות וחומרים

שתילים: הניסויים נעשו עם שתילים בני כשנה שהתקבלו מזריעים של הכנות לכיש ואלנם. מהכנה אלנם נבדקו 2 קווים 1 ו-88. על הכנות הורכבו שתילי אפרסק מהזן סוולינג (Sweetling). כל השתילים גודלו באותו שטח אצל המגדל רפי שוטן מיד נתן. מכל כנה נלקחו 40 עצים לניסוי. העצים גודלו בבית רשת בדליים המכילים תערובת של טוף וכבול ביחס של 2:1.

אילוח העצים: נעשה בתבדיד פתוגני של אגרובקטריום הנושא עמידות לאנטיביוטיקה סטרפטומיצין. נבדקו הדבקות בשורש בריכוזים של 10^7 ו- 10^8 חיידקים לסמ"ק. לפני השתילה נעשו בשורשים החשופים פצעים והשורשים הוטבלו בתמיסת החיידק למשך חצי שעה. לאחר מכן הועברו לדליים וכוסו בתערובת הגידול. הדבקה בצואר השורש בחלק העל קרקעי נעשתה ע"י יצירת חתכים בגוץ והנחת טיפה של 20 מיקרוליטר לכל חתך מריכוזים של 10^6 , 10^7 , ו- 10^8 חיידקים לסמ"ק. החתכים כוסו בנייר פרפילס לשמירת לחות למשך 3 ימים ולאחר מכן הוסרו.

באופן דומה נעשו חתכים בצואר השורש אך בחלק התת קרקעי של הכנות. הריכוזים שנבדקו היו 10^7 ו- 10^6 חיידקים לסמ"ק. החתכים כוסו בנייר פרפילס למשך יומיים. בכל עץ נעשו 3 חתכים במרחק של 1 ס"מ אחד מהשני להדבקה החיידק, ולכל ריכוז נלקחו 7-8 עצים.

מעקב אחרי יצירת העפצים: הופעת עפצים נבדקה כל שבועים. במקרה והופיעו עפצים נמדד גודלם. במקביל נלקחו דוגמאות רקמה מהעפצים ובמרחקים שונים מהם לבדיקת נוכחות החיידקים. הבדיקה נעשתה ע"י לקיחת 0.25 גרם מהרקמה, שטיפה במים מזוקקים וריסוק בתוך 1 סמ"ק מים מזוקקים מעוקרים. מהרסק נעשו מיהולים עשרוניים שנורעו על צלחות המכילות מצע סלקטיבי – RSM, המתאים לבידוד החיידק אגרובקטריום [3]. הבידוד נעשה על צלחות המכילות 250 מיקרוגרם לסמ"ק סטרפטומיצין וכן צלחות שאינן מכילות אנטיביוטיקה. על מנת לוודא שאכן מדובר בחיידק הפתוגני נעשתה ראקצית PCR לאיבחון החיידק כפי שפורסם בעבר [4]. לאחר 8 חודשים כל העצים

הוצאו מהדליים ונבדקו להופעת עפצים בשורשים ובחלקים אחרים שהודבקו וכן לנוכחות החיידקים בחלקים המרוחקים מהשורשים.

תוצאות

א. אילוח השורשים. לאחר חודשיים ושלושה חודשים מההדבקה הוצאו מהדליים 2 עצים מכל זן והשורשים נבדקו לנוכחות עפצים. נבדקו עצים שאולחו בריכוז הגבוה של 10^9 חיידקים לסמ"ק. באף אחד מהעצים לא נראו עפצים. מכיוון שהוצאת העצים מהדליים גרמה להתייבשותם לא הוצאו עצים נוספים. לאחר 8 חודשים כל העצים הוצאו מהדליים ונבדקו לנוכחות עפצים. אחוז העצים שנמצא בהם עפצים מסוכם בטבלה 1. האחוז מחושב מתוך כל העצים של הניסוי גם אלה שלא הודבקו בשורשים. בכנה לכיש ב- 50% מהעצים נמצאו עפצים שמספרם נע בין 2-6. במרבית העצים נמצא עפץ גדול אחד במקום התפצלות השורשים. בכנות אלנס-88 ואלנס-1 אחוז העצים עם עפצים היה קטן יותר (טבלה 1). בידוד החיידקים מהעפצים על מצע סלקטיבי עם ובלי סטרפטומיצין הראה שעל צלחות המכילות סטרפטומיצין לא גדלו כלל חיידקים. לעומת זאת במצע ללא אנטיביוטיקה נמצאו חיידקים שהגיבו חיובית במבחן PCR. תוצאה זו מצביעה על כך שהעפצים שנוצרו על השורשים מקורם מאילוח שנעשה אצל המגדל בקרקע ולא באילוח שנעשה על ידינו. לא נמצא אף עפץ שממנו ניתן היה לבודד חיידקים עמידים לסטרפטומיצין.

טבלה 1: הופעת עפצים בשורשים של העצים ששימשו לניסוי

הכנה	אחוז העצים עם עפצים*	מספר עפצים לעץ	עמידות לסטרפטומיצין**
אלנס-88	16	1	-
אלנס-1	3	1	-
לכיש	50	2-6	-

* בכנות אלנס-88 ואלנס-1 היו סה"כ 30 עצים מכל כנה ובלכיש 36 עצים.

** עמידות נבדקה על ידי בידוד חיידקים על מצע סלקטיבי המכיל 250 מיקרוגרם לסמ"ק סטרפטומיצין.

ב. אילוח צואר השורש בחלק העל קרקעי. אחוז העפצים שנוצרו מתוך כלל ההדבקות שנעשו בשלושת הכנות נמדד במהלך הניסוי. בריכוז 10^6 חיידקים לסמ"ק לא נמצאו עפצים באף אחד מהעצים. אחוז העפצים שנוצרו בריכוזים 10^8 ו- 10^7 מתואר באיור 1. לאחר חודשיים נמצאו עפצים בכנה לכיש ב- 90% מההדבקות לעומת 57% ו- 52% בקווים אלנס-88 ו- אלנס-1 בהתאמה. אחוז העפצים שהתקבלו בכנות אלנס גדל לאחר שלושה וארבעה חודשים ומתקרב לזה המתקבל בכנה לכיש. הגודל הממוצע של העפצים מתואר באיור 2. לא היה הבדל משמעותי בגודל העפצים שנוצרו בשלושת הזנים.

ג. אילוח צואר השורש בחלק התת קרקעי. התוצאות באיור 3 מצביעות על כך שהכנה לכיש היא הרגישה ביותר. אחוז ההדבקות המוצלחות היה לאחר 40 ימים 71 בלכיש, 9.5 באלנס-88 ו- 5

באלנס-1. לאחר 60 ימים הגיע אחוז העפצים בלכיש ל-100 בעוד שבשני הקווים האחרים הגיע רק ל-38 ו-9.5 בהתאמה. בנוסף אחוז העפצים שהתקבל בכנה אלנס-1 היה שונה באופן מובהק מזה שהתקבל בכנה אלנס-88. מכל העפצים שנוצרו נלקחו דוגמאות לבדיקת נוכחות החיידקים ונמצא כי החיידקים היו עמידים לסטרפטומיציין כלומר העפצים היו ממקור ההדבקה שנעשתה על ידינו.

ד. בדיקת נוכחות החיידקים בחלקי צמח הרחוקים ממקום ההדבקה. על מנת לבדוק אם יש נדידה של החיידקים מהאזורים הנגועים לאזורים אחרים נלקחו דגימות ממרחקים שונים ונבדקו על צלחות המכילות מצע סלקטיבי. בדיקה נוספת נעשתה על ידי פציעה של אזורים הרחוקים ממקום ההדבקה מתוך הנחה שהחיידק זקוק לשם התפתחותו ליצירת פצעים וכי הפציעה במידה וישנם חיידקים תגרום ליצירת עפצים. בעצים משלושת הכנות שאולחו בשורשים נלקחו דגימות רקמה לבדיקת נוכחות החיידקים. נמצאו חיידקים שאינם נושאים עמידות לאנטיביוטיקה, כלומר מקורם מהשטח ולא מההדבקה שנעשתה על ידינו. מצמחים בהם נעשו הדבקות בצואר השורש נלקחו דגימות במרחקים שונים ממקום ההדבקה ורק במקרים בודדים נתגלו חיידקים. בחלקים הרחוקים ממקום ההדבקה מעל 10 ס"מ לא נתגלו כלל חיידקים.

דיון ומסקנות

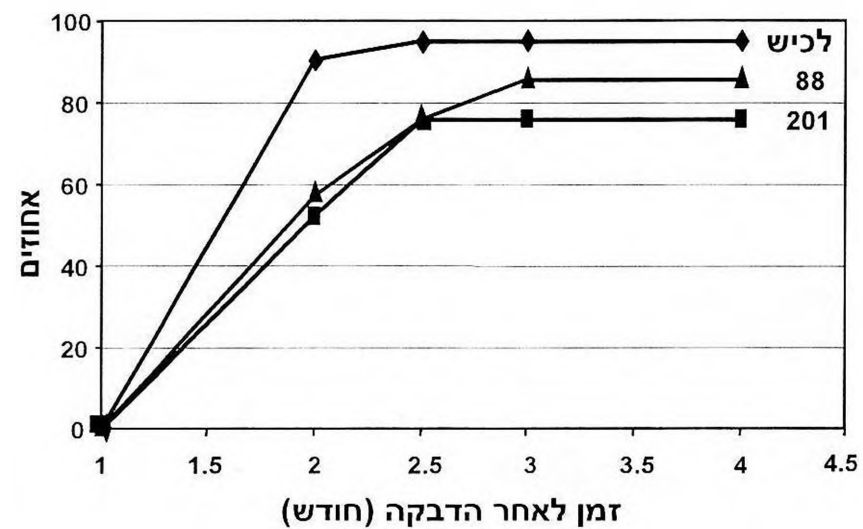
התוצאות שהוצגו בהדבקות צואר השורש בחלק העל קרקעי מצביעות על כך שהכנה מ לכיש רגישה לחיידק אגרובקטריום יותר משני הקווים של כנת אלנס. ההדבקה התת קרקעית חיזקה תוצאה זו ונתנה תוצאות משמעותיות יותר. יתכן והעובדה שהחיידק נמצא בתנאי לחות במשך תקופה ארוכה יותר שומרת על חיוניותו וגורמת לאי איבוד הפתוגניות. תוצאה זו אינה מפתיעה מכיוון שזהו חיידק קרקע היכול לשרוד בקרקע לתקופות ארוכות.

תוצאות הדבקות השורשים היו מפתיעות מכיוון שלא התפתחו כלל עפצים באף אחד מהעצים וזאת למרות שנעשו פציעות בשורשים. לעומת זאת העצים כן פיתחו עפצים בשורשים כשמקור האילוח היה מהקרקע. האפשרות שתרבית החיידקים שבה השתמשנו לאילוח השורשים היתה לא פתוגנית נשללת מכיוון שאותה תרבית שימשה להדבקות בצואר השורש שכן הצליחו. הסבר לתופעה זו יכול לנבוע מגיל העצים. יתכן ושורשים של עצים בני כשנה אינם רגישים להדבקה על ידי החיידק, כך שגם כאשר נעשים פצעים, הרקמה אינה מתאימה להתרבות החיידק. לעומת זאת, בתהליך הכנת השתילים, המתחיל מהנבטת הזרעים וההעברה לגידול בשטח, הצמח הצעיר רגיש יותר להדבקה בשורשים. אם תופעה זו אכן נכונה יש לה השלכות לגבי האפשרות להימנע מהמחלה באמצעות גידול השתילים הצעירים במצע מנותק שעבר חיטוי.

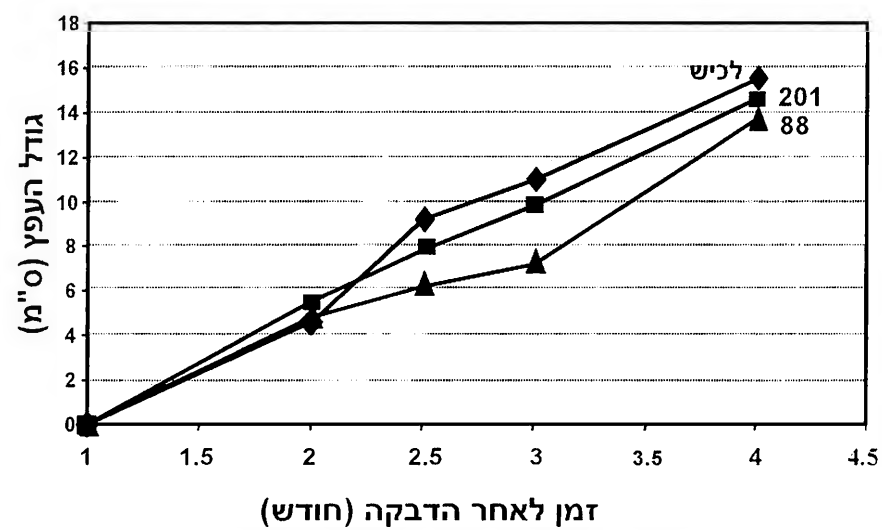
התוצאות שהתקבלו מאילוח צואר השורש בחלק התת קרקעי מצביעה על האפשרות שכנה אלנס-1 רגישה פחות מאלנס-88. חיזוק לתוצאה זו ניתן למצוא באחוז העפצים שנוצרו בשורש אצל המגדל. גם במקרה זה כנת אלנס-1 היתה רגישה פחות מאלנס-88. יש כמובן לחזור על הנסוי בשתי כנות אלו ואם אכן ימצא שאלנס-1 רגישה פחות ניתן יהיה לרבות מקור זה ולהכין רק ממנו שתילים לגידול וני אפרסקים שונים.

ספרות מצוטטת

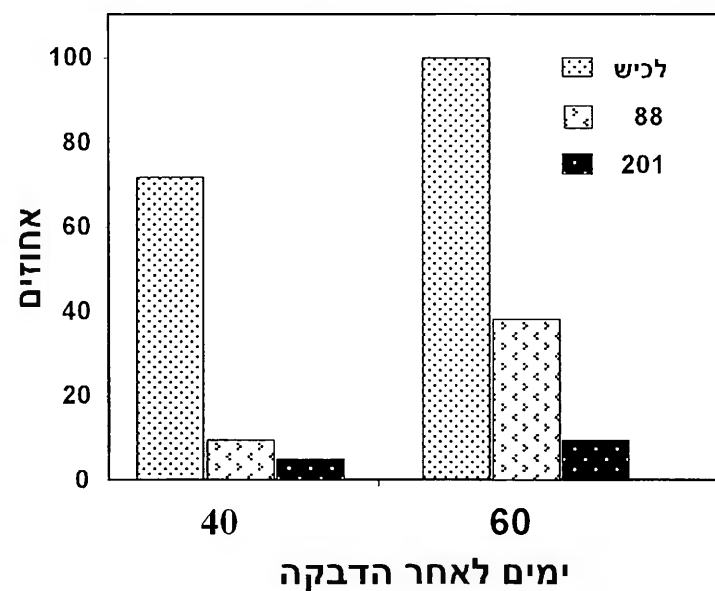
1. כוכבא, י., שפיגל-רואי, פ., ברון, י., אלנס: כנות שקד מר עמידות לנמטודות יוצרות עפצים. עלון הנוטע, 1977. **12**: p. 797-798.
2. צפריה, ו.נ., מחלות חיידיקים בצמחים בישראל. 1985, בית דגן: מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני. 388.
3. Moore, L. W., C.I. Kado, and H. Bouzar, *Agrobacterium*, in *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, N.W. Schaad, Editor. 1988, APS Press: St. Paul, MN. p. 16-33.
4. Hass, J.H., et al., *Universal PCR primers for detection of phytopathogenic Agrobacterium starins*. Appl. Environ. Microbiol., 1995. **61**: p. 2879-2884.



איור 1: אחוז העפצים שנוצרו בכנות שקד מר לאחר הדבקה באגרובקטריום. ההדבקות נעשו בצואר השורש בחלק העל-קרקעי בריכוז של 10^7 ו- 10^8 חיידקים לסמ"ק. התוצאות שהתקבלו לאחר חודשיים בכנות אלנם-88 ואלנם-1 שונות באופן מובהק ($p < 0.05$) מאלו של הכנה לכיש.



איור 2: גודל העפצים שנוצרו בכנות שקד מר בזמנים שונים לאחר הדבקה באגרובקטריום. ההדבקות נעשו בצואר השורש בחלק העל-קרקעי בריכוז חיידקים של 10^8 לסמ"ק.



איור 3: אחוז העפצים שנוצרו בכנות שקד מר לאחר 40 ו- 60 ימים מההדבקה באגרובקטריום. ההדבקות נעשו בצואר השורש בחלק התת-קרעי בריכוז חיידקים של 10^6 - 10^7 לסמ"ק. התוצאות שהתקבלו בכנות אלנם-88 ואלנם-1 שונות באופן מובהק ($p < 0.05$) מאלו שהתקבלו בשני הזמנים בכנה לכיש. התוצאות שהתקבלו לאחר 60 ימים בכנה אלנם-1 שונות באופן מובהק ($p < 0.05$) מאלו שהתקבלו בכנה אלנם-88.