

**בנושא: גישות חדשות למניעת מחלת הכיב הבקטריאלי והנבילה בעגבניות הנגרמת ע"י**

**החיידק *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

**New approaches for preventing bacterial canker of tomato caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

שולמית מנוליס, גיורא קריצמן ופרידה קלייטמן, המחלקה למחלות צמחים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן 50250.

רבקה הדס, המחלקה לזרעים, המכון לגידולי שדה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן  
יצחק ברש, המחלקה למדעי הצמח אוניברסיטת תל אביב, תל-אביב

Shulamit Manulis, Kritzman Giora, Frida Kletman, Dept. of Plant Pathology, ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan 50250. E-mail: [shulam@volcani.agri.gov.il](mailto:shulam@volcani.agri.gov.il)

Rivka Hadas, Official Seed Testing Laboratory, ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan,

Isaac Barash, Dept. of Plant Sciences, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, 69978

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.**

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**

חתימת החוקר \_\_\_\_\_

## תקציר

1. הצגת הבעיה : מחלת הכיב הבקטריאלי הנגרמת ע"י החיידק *Clavibacter michiganensis* היא אחת המחלות החשובות והמגבילות בגידול עגבניות. בארץ המחלה גורמת לנזקים בעיקר בחבל הבשור ובגוש קטיף ובשנים האחרונות חלה התפשטות של המחלה גם לאזורים אחרים. מטרת העבודה הן : לפתח שיטה לזיהוי ספציפי של תבדידים פתוגניים בזרעים ובצמחים, בדיקת כושר ההישרדות האנדופיטית של החיידק הפתוגני בצמחים ממשפחת הסולניים, במים ובקרע ובדיקת אפשרות השימוש בתבדיד בלתי פתוגני להדברת המחלה.
2. מהלך ושיטות עבודה : הוכן אוסף של תבדידי קלויבקטר ממקומות ומזנים שונים של עגבניות שהוגדר על פי גידול מושבות על 4 מצעי מזון שונים, מבחני פתוגניות, מבחן אליזה וראקצית PCR עם 2 זוגות פריימרים המבוססים על רצף הדנ"א של גנים לפתוגניות הנמצאים על פלסמידים. פותח פרוטוקול לגילוי הפתוגן בזרעי עגבניה ונקבע סף הרגישות של השיטה. נבדקה הישרדות הפתוגן במים, בצמחי פלפל וחציל ובקרע נגועה. נקבע פוטנציאל המחלה של קרע נגועה. תבדיד אנדופיטי בלתי פתוגני סומן בעמידות לאנטיביוטיקה ונבדק כושרו לאכלס צמחי עגבניה. הוחל בניסויים בהדבקה משותפת של תבדיד זה ותבדיד פתוגני.
3. תוצאות עיקריות : איפיון האוסף של כ- 120 תבדידים בשיטות שונות הראה התאמה טובה בין שיטת ה-PCR למבחני פתוגניות. שיטת מיצוי הפתוגן מהזרעים כוללת שלב של טחינת הזרעים כאשר הגודל הדגימה אינו עולה על 2000 זרעים. סף הרגישות של השיטה הוא זרע נגוע אחד בדגימה של 2000 זרעים ומעל 5 זרעים נגועים לדגימה בת 10,000 זרעים. בדיקת הישרדות הפתוגן במים הראתה כי ניתן למצוא את החיידק גם לאחר 100 ימים וכי קולונויות של חול או טוף מורידות את רמת האינקולום. בדיקת הישרדות החיידקים בצמחים אחרים ממשפחת הסולניים כמו פלפל וחציל הראתה כי החיידק שורד גם לאחר כ- 4 חודשים במקום ההדבקה ומעל ומתחת למקום זה. החיידק שורד בקרע תקופה ארוכה ופוטנציאל גרימת המחלה של קרע זו הוא כשנתיים. חיידק אנדופיטי בלתי פתוגני מתפתח ומתפשט בצמחי עגבניה ברמה הקרובה לזו של הפתוגן ובניסויים ראשוניים נמצאה ירידה במספר הצמחים החולים בהדבקה משותפת.
4. מסקנות : השיטה הטובה ביותר לאיבחון כיום היא ביצוע PCR ישיר ובמקביל בידוד החיידק על מצעי מזון וביצוע ראקצית PCR נוספת עם שני זוגות פריימרים. עם סיום פרויקט הגנום של קלויבקטר יבחנו פריימרים נוספים שיאפשרו להתגבר על בעיות של False positive. בדיקת סף הרגישות של גילוי החיידק בזרעים מראה כי על מנת לגלות זרע נגוע אחד גודל הדגימה לא יעלה על 5000 זרעים לחזרה. הסף שמתחתיו לא נגרמת מחלה בצמחים הגדלים בתנאי חממה הוא כ- 60 CFU לגרם זרעים. החיידק נמצא שורד בצמחים אחרים ממשפחת הסולניים, במים ובקרע ולכן בנוסף לזרעים המהווים את המקור העיקרי למחלה יש לטפל גם במקורות אינקולום נוספים. ניסויים ראשוניים של שימוש בתבדיד אנדופיטי לעיכוב המחלה מצביעים על כדאיות המשך בדיקת הנושא וחיפוש דרכים שונות לאפליקציה של האנדופיט או אנדופיטים אחרים.

## מבוא

הפתוגן *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) הוא חיידק גרם חיובי הגורם למחלת הכיב הבקטריאלי (bacterial canker) ומחלת הנבילה בעגבניות. זו מחלה סיסטמית בעיקרה ואחת החשובות והמגבילות בגידול עגבניות. היא גם נחשבת למחלת הסגר באירופה ובארץ. המחלה גורמת לנבילה, התנוונות כללית ותמותת הצמחים בכל שלבי הגידול. בשנים מסוימות המחלה יכולה לגרום לנזקים כלכליים ניכרים ולירידה ביבול של עד 60% במקומות שונים בעולם. המחלה התגלתה לראשונה בארץ בשנת 1963 ומאז הופיעה באופן ספורדי במקומות שונים. בשנת 2000 היתה אפידמיה של המחלה בבתי צמיחה בחבל הבשור ובגוש קטיף שהם האזורים העיקריים לגידול עגבניות חממה ועגבניות צ'רי. מאז המחלה התבססה באזור הבשור. מנתוני סקר שבוצע ב-2002 התגלתה נגיעות בכ-450 דונם בתי צמיחה (בעיקר בתי רשת) וסביר כי היקפי השטחים הנגועים אף גבוהים יותר. המחלה התפשטה גם לאזורי גידול של עגבניות תעשייה בצפון הארץ ונמצאה בחולה, בגולן ובעמק עכו. החיידק ידוע כמועבר בזרעים, בתוכס או על פני הקליפה. הוא יכול לשרוד בקרקע מספר שנים ועל שיירי צמחי עגבניה או סולניים אחרים. המחלה מופצת לצמחים בריאים באמצעות מי השקיה, גשמים, כלי עבודה מזוהמים או אפילו ריסוס חומרי הדברה. בחממות בהן משתמשים במים ממוחזרים יש חשש להפצת המחלה בכל החממה מצמחים נגועים בודדים. בנוסף לכך, לחיידק זה יש יכולת להתרבות כאנדופיט (ללא יצירת סימפטומים) על צמחים שונים ממשפחת הסולניים, כולל עגבניה.

הדברת המחלה באמצעות אנטיביוטיקה או תכשירי נחושת אינה יעילה ואינה רצויה לסביבה. זני עגבניות מסחריים העמידים לחיידק עדיין לא פותחו. מכיוון שהחיידק מועבר בעיקר בזרעים או שתילים צעירים אחת הדרכים היעילות להימנע מהמחלה היא באמצעות שימוש בזרעים נקיים ושמירה על תנאי סניטציה נכונים. קיימת שונות גבוהה מבחינה מורפולוגית, סרולוגית ועוצמת הוירולנטיות בין התבדידים שבודדו ממקומות שונים בעולם. השיטות לאיבחון הפתוגן שפותחו בעבר אינן יעילות להבחנה בין תבדידים פתוגניים לבלתי פתוגניים. שיטות מולקולריות לאיבחון הפתוגן מסתמכות על מחקרים שנעשו על מנגנון הפתוגניות של החיידק. נמצא כי חיידקים פתוגניים הכילו שני פלסמידים (pCM1, pCM2) הנושאים גנים לפתוגניות. תבדידים שאיבדו פלסמידים אלו הפכו בלתי פתוגניים אך עדיין איכלסו ביעילות צמחי עגבניות. הפלסמיד הראשון נושא את הגן לאנדוגלוקנאז (*celA*) ואילו בפלסמיד השני אותר גן נוסף הדרוש לפתוגניות (*pat-1*). פגיעה בכל גן בנפרד או בשניהם יחד גרמה לאיחור בהופעת הסימפטומים ולירידה בעוצמתם. מאחר והפלסמידים הנ"ל נבדקו במספר מועט של תבדידים דרוש מחקר יסודי על מנת לברר האם גנים אלו מצויים בכל התבדידים הפתוגניים וזאת כדי שניתן יהיה לבסס עליהם שיטה חדשה לאיבחון החיידקים בזרעים, ממקורות שונים. המחקר המוצע יאפשר לפתח שיטה רגישה לבדיקת נוכחות תבדידים פתוגניים בזרעים, בקרקע ובמים ממוחזרים ואת הישרדות הפתוגן בצמחים ממשפחת הסולניים.

## מטרות המחקר

- א. פתוח שיטה לזיהוי ספציפי של תבדידים פתוגניים. מטרה זו תושג באמצעות איפיון אוכלוסיית החיידק בארץ מבחינה ביוכימית ומולקולרית ופיתוח פריימרים המבוססים על גנים הדרושים לפתוגניות.
- ב. בדיקת כושר ההישרדות האנדופיטית של החיידק הפתוגני בעגבניות ובצמחים אחרים ממשפחת הסולניים, וכן בדיקת כושר ההישרדות בקרקע ובמים וזאת על מנת ללמוד על מקורות האינקולום ומציאת הדרכים לטיפול בהם.
- ג. בדיקת אפשרות השימוש בתבדיד אנדופיטי בלתי פתוגני להדברה ביולוגית של הפתוגן.

## שיטות

**בידוד החיידקים:** בידוד מצמחי עגבניה נעשה ע"י הסרת קטעי רקמה מפטוטרת העלים ומגבעולים. ל-1 גרם רקמה הוספו 5 סמ"ק מים מעוקרים והדוגמאות רוסקו בהומוגניזר. הרסק סונן דרך גוזה, לסילוק חלקי צמח גדולים, ולאחר מכן סורכו במשך 5 במהירות 14,000 rpm. הנוזל העליון סולק והמשקע הורחף ב-500 מיקרוליטר מים מעוקרים. מתרחיף זה נעשתה זריעת בידוד על 4 מצעי מזון שונים: C, CNS, SCM, D2ANX (Alvarez and Kaneshiro 1998). לאחר 4-5 ימים של הדגרה ב-28 מ"צ הצלחות נבדקו ומושבות חיידקים האופייניות ל-קלויבקטר נלקחו להמשך הבדיקות.

בחירת שיטת המיצוי מזרעים: נבדקו זרעים שלמים לעומת זרעים שנטחנו במטחנת Wiley mill. נבדקה השריה בבופר עם ובלי טילטול בסטומכר. השריה למשך הלילה בבופר PBS אגר ביחס של 1 גרם זרעים ל-5 מ"ל בופר. למחרת, התרחיף עובר מיצוי נוסף במשך 2 דקות בסטומכר ולאחר מכן נעשים מיהולים עשרוניים הנזרעים על מצעים בררנים כפי שצויין לעיל.

**בדיקה סרולוגית:** נעשתה בשיטת האליזה הישירה עם נוגדנים פוליקלונליים כנגד Cmm שנרכשו מחברת LOEWE (Cat. No. 07063).

**מבחני פתוגניות:** נבדקו מספר פרוטוקולים על מנת למצוא את השיטה שתתאים למטרות השונות של המחקר. התבדידים הנבדקים גודלו על מצע NA למשך הלילה ב-28 מ"צ. החיידקים הורחפו במים סטריליים ב-2 מ"ל והובאו לריכוז של  $10^8$  או  $10^9$  חיידקים למ"ל. שתילי עגבניות בני 3 שבועות מזן 5656 שימשו למבחנים השונים:

- הגבעול של שתיל העגבניה נחתך בין הפסיגים לעלים הראשונים, בחתך נעשה חריץ ועליו הונחו 20 מיקרוליטר מתרחיף של  $10^9$  חיידקים למ"ל.
- הזרקה לגבעול מתחת לעלה הראשון נעשתה בעזרת מזרק המכיל תמיסה של  $10^8$  חיידקים למ"ל.
- הדבקה בשורשים נעשתה לאחר שטיפת השורשים במים סטריליים וטבילה בתרחיף חיידקים בריכוז  $10^9$  למשך 4 שעות. השורשים נחתכו בעזרת מספריים על מנת ליצור פצעים. הצמחים הועברו למצע המכיל קוקוס (80%) וקלקר (20%).

לאחר מכן בדקנו אפשרויות נוספות: חתך של העלה הראשון האמיתי ומריחה של החיידק בעזרת קיסם ישר מהצלחת, או חתך בגבעול מתחת לעלה הראשון או שני בעזרת סקלפל טבול בתרחיף חיידקים בריכוז של  $10^9$  חיידקים למ"ל.

הצמחים הוחזקו בחממה בטמפרטורת 25 מ"צ. סימני נבילה והשחרה של העלים והגבעול נבדקו במהלך 4 שבועות.

**בדיקת הישרדות החיידק במים ובצמחים שונים:** בדיקת הישרדות החיידק במים נעשתה בחממה בעין גדי. ההדבקה נעשתה ע"י הכנסת מדבק לתוך מיכלי המים שהכילו את מי הנקז לפני הטיפול השונים. ריכוז המדבק היה ברמה של כ- $2 \times 10^3$  חיידקים למ"ל. צמחי עגבניה מטיפוס שרי הושקו במים ולאחר שלושה חודשים הצמחים נבדקו לסימני מחלה וכן נלקחו לבידוד החיידק מהגבעול. הבידוד נעשה כפי שתואר לעיל. כל חזרה כללה 100 צמחים.

בדיקת הישרדות החיידק בצמחי פלפל וחציל נעשתה על צמחים בני כחודש. הצמחים הודבקו בדקירה של הגבעול בריכוז של  $10^6$  חיידקים למ"ל. התבדידים לניסוי נשאו עמידות לריפאמפיצין או סטרפטומיצין.

בזמנים שונים נלקחו חלקי גבעול מאזור ההדבקה ו-5 ס"מ מעל מתחת, ונקבע ריכוז החיידקים ברקמה. לכל טיפול נלקחו 4 חזרות והניסוי נערך פעמיים.

בדיקת הישרדות החיידק בקרקע: הניסוי נעשה עם קרקע נגועה בקלויבקטר במערב הנגב. מקרקע זו נלקחו דגימות מ-5 מקומות שונים בעומק של 20 ס"מ. קביעת ריכוז קלויבקטר בקרקע הנגועה נעשה ב-5 חזרות לכל נקודת זמן במהלך 34 חודשים. הבדיקה נעשתה ע"י הרחפה של 10 גרם קרקע ב-90 מ"ל אגר מים בעזרת סטומכר. מהתרחיף נעשו מיהולים עשורניים שנזרעו על צלחות עם מצעים מתאימים כפי שתואר לעיל. הצלחות הועברו להדברה ב-28 מ"צ ולאחר אינקובציה של עד 5 ימים המושבות נספרו. מושבות חשודות כקלויבקטר עברו צביעת גראם.

בנוסף נבדק פוטנציאל המחלה של קרקע נגועה בקלויבקטר. הניסוי נעשה ע"י שתילה של צמחי עגבניות; חמש חזרות בנות 20 צמחים בכל נקודת זמן. נספרו הצמחים שהראו סימני מחלה מתוך כלל הצמחים. בדיקת השימוש בתבדיד אנדופיטי לעיכוב המחלה: התבדיד האנדופיטי *Cmm100* שהתקבל מגרמניה סומן במקביל באנטיביוטיקות ריפאמפיצין וסטרפטומיציין. שתילי עגבניה מזן חממה 870 אולחו ע"י דקירה במחט בצואר השורש ובמקום הדקירה הונחו 10 מיקרוליטר מהאנדופיט בריכוז של  $10^9$  חיידקים למ"ל. לאחר שבועיים אולחו הצמחים בפתוגן בדקירה בגבעול בריכוז של  $10^7$  חיידקים למ"ל. בדיקת ריכוזי האנדופיט והפתוגן נבדקו לאחר חודשיים וכן נקבע אחוז בצמחים עם סימני מחלה. נעשו 2 ניסויים כשבכל ניסוי שתי חזרות.

ראקצית PCR: נעשתה עם 2 זוגות פריימרים. זוג אחד מבוסס על הרצף של הגן לאנדוגלוקנאז (*celA*) המצוי בפלסמיד pCM1 ואילו הזוג השני מבוסס על הגן *pat-1* ההומולוגי לסריין-פרוטאז והמצוי בפלסמיד השני pCM2 (Jahr, et al. 2000). ראקציית Bio-PCR נעשתה ע"י גידול 100 מיקרוליטר מתרחיף צמחים או זרעים על מצע NBY. לאחר גידול של 48 שעות המושבות נאספו ע"י הרחפה ב-1 מ"ל מים. דוגמא בת 10 מיקרוליטר נלקחה לראקצית ה-PCR.

ניתוח התוצאות: נעשה לפי CATMOD (SAS). קביעת רגרסיה נעשתה בתוכנת Excel.

## תוצאות ודיון

א. איפיון אוכלוסיית הפתוגן בארץ.

במהלך שנות המחקר הכנו אוסף של תבדידי קלויבקטר ממקומות שונים בארץ, מזני עגבניות שונים ומחלקי צמח שונים; פטוטרות עלים, פירות וזרעים. האוסף מכיל תבדידים שנאספו בשנים שונות, החל מ-1994 ועד 2004 וכן לשם השוואה גם תבדידים שהתקבלו ממקומות אחרים בעולם כמו ארה"ב, צרפת והולנד. מספר התבדידים שיש לנו כיום באוסף הוא 120. טבלה 1 מראה מדגם אופייני של האוסף. כדי לבדוק את הפתוגניות של התבדידים השונים נבחנו מספר שיטות לאילוח הצמחים.

מבחני פתוגניות: תוצאות השוואה בין 3 מבחני פתוגניות שונים מובאות בטבלה 2. כפי שניתן לראות מהטבלה בחיתוך הגבעול התקבלו סימפטומים לאחר שבועיים בעוד שבטבילת שורשים רק לאחר 3 ו-4 שבועות. הזרקה לגבעול היתה טובה יותר מטבילת שורשים אך פחות טובה מחיתוך הגבעול. על סמך תוצאות אלו נעשו מבחנים חוזרים אלא שהפעם לא נחתך כל הגבעול אלא רק העלה הראשון ועליו נמרחו החיידקים. התוצאות שהתקבלו במבחן זה לאחר שבועיים היו ברורות יותר ומכיוון שזהו מבחן מהיר הוא שימש אותנו בהמשך לקביעת פתוגניות של התבדידים כשהתשובה הנחוצה היא כן/לא. ההזרקה לגבעול נעשתה במטרה למצוא מבחן פתוגניות שיאפשר למצוא הבדלים באלימות התבדידים. התוצאות לא היו

אחידות ולכן נבדקה שיטה אחרת של חיתוך הגבעול מתחת לעלה הראשון עם סקלפל טבול בתרחיף חיידקים בריכוז ידוע. שיטה זו תשמש בהמשך לקביעת הבדלים באלימות בין התבדילים השונים. טבילת השורשים למשך 4 שעות תשמש אותנו בהמשך לבדיקת הישרדות החיידקים ופעילות של תבדיל אנדופיטי בעיכוב המחלה ע"י התבדיל הפתוגני.

מתוך האוסף של תבדילי קלויבקטר נבדקו 60 תבדילים על 4 מצעי מזון בררניים לבדיקת מראה מושבה אופייני, במבחני פתוגניות (חיתוך הגבעול), במבחן אליזה עם נוגדנים מסחריים וב-PCR עם שני זוגות הפריימרים. בתמונה 1 מובאות תוצאות PCR שהתקבלו עם 5 תבדילים שונים. בצלחות הסלקטיביות רוב התבדילים היו בעלי מראה אופייני. אולם מספר תבדילים בעלי מראה אופייני לא היו פתוגניים במבחן הפתוגניות. במבחן אליזה כל התבדילים שנבדקו הגיבו חיובית גם אלה שלא היו פתוגניים. מכאן שמבחן זה אינו יעיל. איפיון האוסף מבחינת PCR הראה שהרוב התבדילים הגיבו עם 2 זוגות הפריימרים שמקורם משני פלסמידים שונים, כפי שמודגם בתמונה 1 עמודה 2. חלק הגיבו עם זוג אחד בלבד וחלק עם הזוג שני (עמודות 3 ו-4). כלומר חלק איבדו את אחד הפלסמידים. התופעה של איבוד הפלסמידים ידועה בעיקר כאשר החיידקים נמצאים בטמפרטורות גבוהות מעל 30 מ"צ. נמצאו 3 תבדילים שהגיבו עם הפריימרים אך לא היו פתוגניים (False negative). תבדילים אלו נשלחו לאיפיון נוסף בגרמניה אצל ד"ר רודי אייכלאוב מאוניברסיטת בילפלד. נמצא שהם נושאים את הפלסמידים לפתוגניות ולכן הגיבו חיוביות במבחן ה-PCR אולם בגנום נמצא חסר באזור בו מרוכזים גנים נוספים הדרושים לפתוגניות ("אי-פתוגניות"). ריצוף אזור זה גילה גנים עם הומולוגיה לגנים המצויים בפלסמידים (סרין פרוטאזות) וכן גנים נוספים המראים הומולוגיה לרצפים מהחיידק קסיללה.

יש לציין שעד עתה לא נמצאו תבדילים שהיו פתוגניים ולא הגיבו ב-PCR (False negative). תוצאה המצביעה על כך שהפלסמידים נחוצים לפתוגניות, ולכן השיטה הטובה לאיבחון כיום היא ביצוע PCR ישיר ובמקביל בידוד על מצעי מזון וביצוע לאחר מכן ראקציה PCR עם 2 זוגות הפריימרים. הבעיות של False positive (שהן הפחות חמורות) יפתרו בעתיד הקרוב (תוך מספר חודשים) עם סיום פרויקט הגנום של קלויבקטר שיאפשר לבחור פריימרים נוספים מהאזור של "אי הפתוגניות".

#### טבלה 1: טבלה מייצגת של תבדילי Cmm שבדודו בישראל

התבדיל	תאריך הבידוד	מקום הבידוד	מקור
Cmm-34	1994	גוש קטיף	זרעי עגבניה
Cmm-31	1994	גוש קטיף	צמח עגבניה
Cmm-43	1996	בקעת הירדן	צמח עגבניה
Cmm-602/8	1996	אחיטוב	פרי עגבניה
Z-1	1997	ציפורי	צמח עגבניה
4yathed	1998	מושב יתד	צמח עגבניה
CBM-3	2000	חבל הבשור	צמח עגבניה
Cmm-3699/2	2000	פיתחת רפיח	צמח עגבניה

Cmm3713/2	2000	מושב גן עוז	צמח עגבניה
Cmm-189/2-2	2001	מושב תלמי אליהו	צמח עגבניה זן 189
Cmm-189/6-1	2001	פריגן	צמח עגבניה זן 189
Cmm-1402/81	2001	עמי עוז	צמח עגבניה זן 1402
Cmm-1309/14	2001	גני טל	צירי זן 1309
Cmm19-8/1	2002	מושב ישע	פרי עגבניה זן 189
Cmm20-1	2002	עמיעוז	זרעים מפרי ירוק 189
Cmm22-3/1	2002	מושב מבטחים	זרעים מפרי ירוק זן 870
Cmm23-2/1	2002	פריגן	פטוטרות עלים זן 189
Cmm492-03	2003	עמיעוז	צירי זן 493

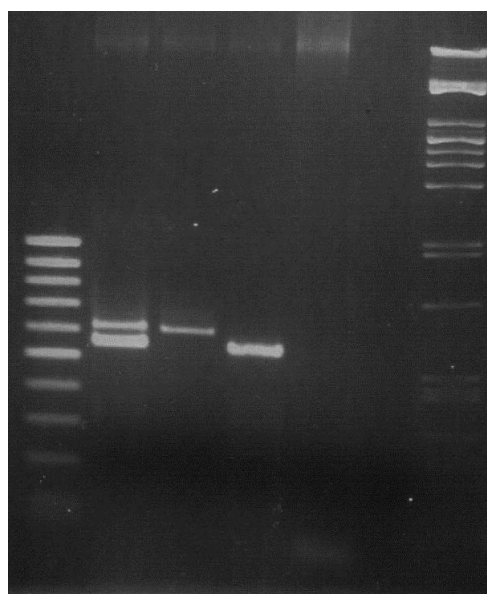
## טבלה 2: השוואה בין 3 מבחני פתוגניות שונים

שיטת הדבקה/ זמן הופעת סימפטומים	חיתוך גבעול	הזרקה לגבעול	טבילת שורשים
2 שבועות	21/21	13/21	0/21
3 שבועות	21/21	19/21	6/21
4 שבועות	21/21	21/21	11/21

נבדקו 7 תבדדים שונים, 3 צמחים לכל תבדד.

**איור 1: תוצאות PCR עם 2 זוגות פריימרים שונים.** בעמודה 2 תבדד פתוגני שהגיב עם 2 זוגות הפריימרים. בעמודה 3 ו- 4 תבדדים פתוגניים שהגיבו עם זוג פריימרים אחד. עמודות 5 ו- 6 תבדדים לא פתוגניים. עמודות 1 ו- 7 סמני גודל. הגן לאנדוגלוקנאז (*celA*) מצוי בפלסמיד ראשון ואילו הגן *pat-1* ההומולוגי לסרין-פרוטאז, מצוי בפלסמיד השני.

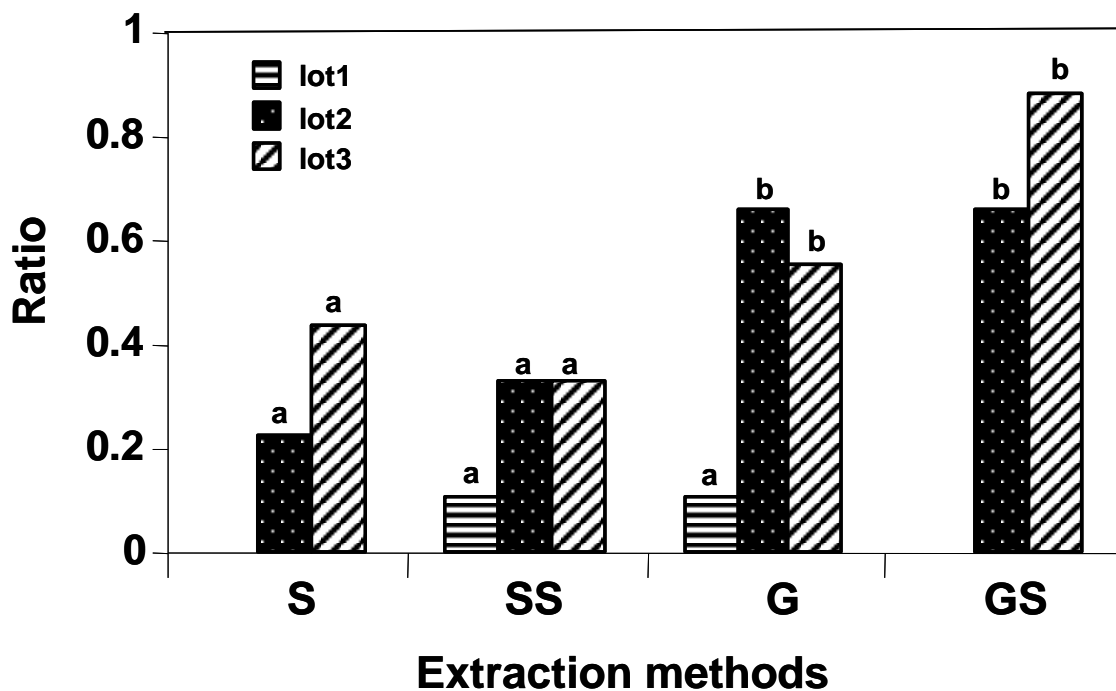
*pat-1*  
→  
*celA*



### ב. פיתוח פרוטוקול לזיהוי הפתוגן בזרעי עגבניות.

בדיקת סף הרגישות של השיטה נעשתה ע"י קביעת הכמות המינימאלית של זרעים נגועים הניתנת לגילוי בדגימות שונות. זרעים מאולחים נלקחו מפירות של צמחי עגבנייה נגועים. רמת האילוח נבדקה עם 55 זרעים. נמצא שמספר החיידקים לזרע נע בין 156 ל-3990, ובממוצע  $95+935$  CFU לזרע. נבדקו ארבע שיטות מיצוי שונות: 1. השריה בבופר למשך הלילה (S), 2. השריה בבופר ולאחר מכן ערבוב בסטומכר (SS), 3. טחינה במטחנת Wiley והשריה בבופר למשך הלילה (G), 4. טחינה, השריה בבופר וערבוב בסטומכר (GS). התוצאות המוצגות באיור 2 מראות כי שיטות המיצוי הכוללות טחינה של הזרעים היו באופן משמעותי טובות מאלו שכללו השריה בלבד בשני הלוטים המכילים זרעים נגועים. הוספת השלב של הסטומכר לא שיפר באופן משמעותי את מיצוי החיידקים מהצמח. לכן מוצע כי בדגימות של עד 2000 זרעים להשתמש בטחינה. לעומת זאת השיטה של השריית זרעים שלמים בבופר וטילטול בסטומכר מתאימה למספר גדול של זרעים.

**איור 2: מספר הדוגמאות שנמצאו חיוביות ביחס למספר הדוגמאות שנבדקו בשיטות המיצוי השונות.** נבדקו 3 לוטים שונים של זרעים שהכילו 0, 5 ו-10 זרעים נגועים טבעית בתוך 2000 זרעים. הניסוי בוצע 3 פעמים עם 3 חזרות לכל טיפול.



סף הגילוי של הפתוגן נקבע בדגימות בנות 2000, 5000 או 10,000 זרעים המכילות זרע אחד, 2, 3, 5 או 10 זרעים נגועים. הזרעים הנגועים הופקו מפירות של צמחים המראים סימני מחלה. זיהוי הפתוגן נעשה על שלושה מצעי מזון סלקטיביים, בראקצית PCR עם פריימרים ייחודיים ובשיטת ה-Bio-PCR. התוצאות (טבלה 3) מראות כי בדגימות בנות 2000 זרעים ניתן לגלות זרע נגוע אחד בכל השיטות ובכל החזרות. בדגימות בנות 5000 זרעים ניתן לגלות זרע נגוע אחד בכל החזרות רק בשיטות ה-PCR. על צלחות ניתן לגלות זרע נגוע אחד ב-4 חזרות מתוך 5. בדגימות בנות 10,000 זרעים ניתן לגלות זרע נגוע אחד רק ב-PCR



ובחזרה אחת. 5 זרעים נגועים ניתן לגלות רק ב- 3 חזרות ואילו 10 זרעים נגועים ניתן לגלות בכל החזרות ובכל השיטות.

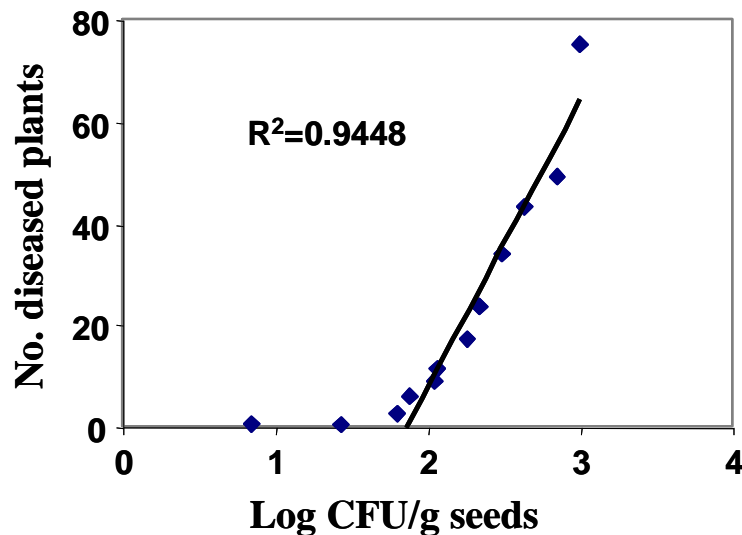
קביעת היחס בין רמת הנגיעות בזרעים להופעת המחלה נעשתה עם זרעים מנוגעים מלאכותית ברמות נגיעות של  $10^2$ - $10^5$  חיידקים למ"ל. התוצאות המוצגות באיור 3 מראות כי הסף שמתחתיו לא נגרמת מחלה בצמחים הגדלים בתנאי חממה הוא 58 CFU לגרם זרעים.

**טבלה 3: קביעת סף הגילוי של זרעי עגבניה נגועים בקלויבקטר**

Infested seed/sample	Detection Method		
	Plates	Direct PCR	Bio-PCR
0/2,000	0/1*	0/1	0/1
1/2,000	5/5	5/5	5/5
3/2,000	5/5	5/5	5/5
0/5000	0/5	0/5	0/5
1/5000	4/5	5/5	5/5
2/5000	5/5	5/5	5/5
5/5000	5/5	5/5	5/5
0/10,000	0/5	0/5	0/5
1/10,000	0/5	0/5	1/5
5/10,000	3/5	3/5	3/5
10/10,000	5/5	5/5	5/5
20/10,000	1/1	1/1	1/1

\* The number of replicates with positive results (plates or PCR) out of the total tested replicates.

**איור 3. פוטנציאל המחלה כתלות ברמת המידבק.** בכל רמה נבדקו 3-4 חזרות של 2000 זרעים לחזרה. בכל חזרה נספרו מספר הנבטים בהם הופיעו סימני מחלה. נבטים עם סמנים נבדקו לנוכחות הפתוגן. אחוז הנביטה בכל הטיפול היה מעל 90%.



ג. בדיקת כושר הישרדות החיידק במים בחממות בהן ממחזרים מי נקז.

לאחר הוספת החיידקים למים נקבע ריכוזם במשך 100 ימים. במקביל צמחי עגבניה שהושקו במים אלו נבדקו להופעת סימני המחלה ונקבע אחוז הצמחים המתים. תוצאות מובאות בטבלה 4 ובאיור 4.

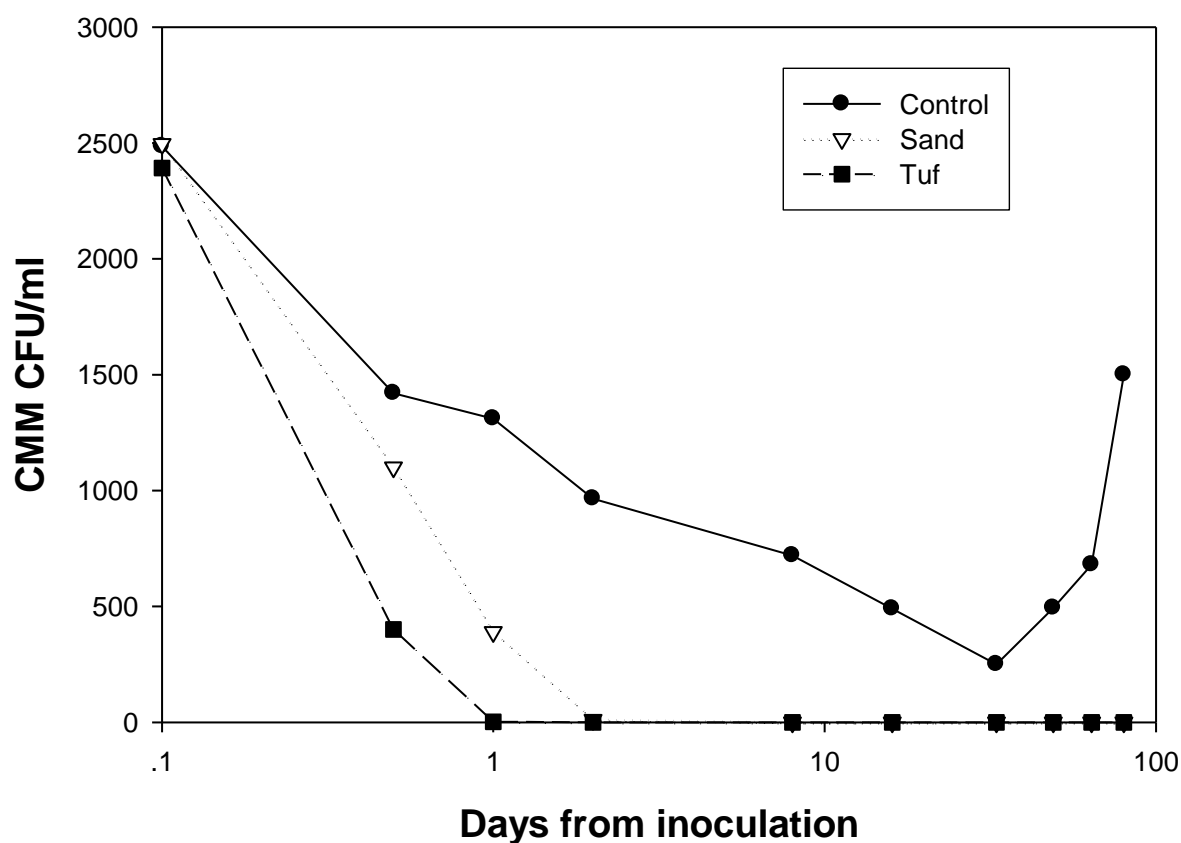
**טבלה 4: סיכום מספר צמחי עגבניה עם סימני מחלת הכיב הבקטריאלי לאחר השקיה עם מים המכילים קלויבקטר.**

Water treatment	Bacterial Inoculation*	Diseased plants (%)**
Control	-	2
Control	+	98
Sand column	+	26
Tuf column	+	22

\*Concentration of *Cmm* in water was  $2 \times 10^3$  CFU/ml

\*\* Each treatment included 100 plants

**איור 4: הישרדות חיידקי קלויבקטר במים לאחר טיפול בקולונות חול או טוף**

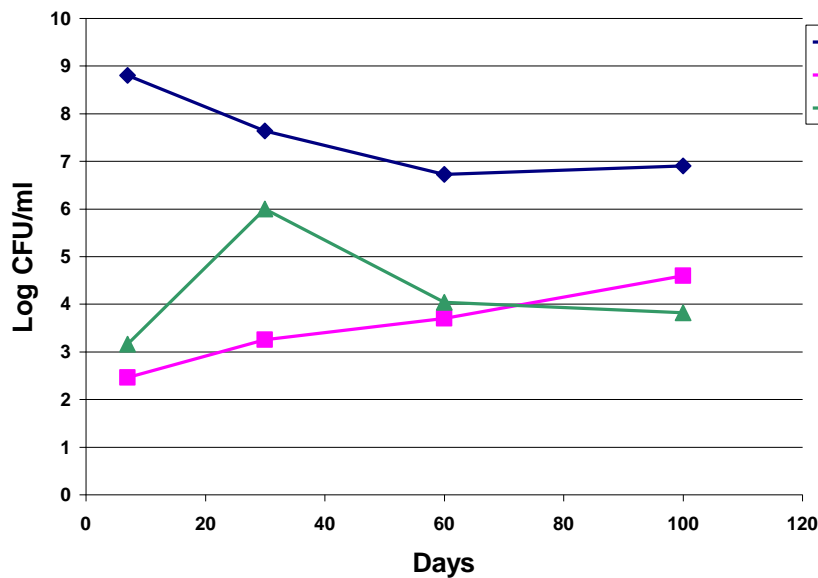


התוצאות מראות כי החיידקים שורדים במים גם לאחר 100 ימים. קולוניות של חול או טוף מורידות את רמת האינקולום מתחת לסף הגילוי. אחוז הצמחים החולים המתקבלים לאחר השקיה במים שעברו טיפול יורד מ- 98% ל- 22 או 26% בהתאמה. הופעת צמחים חולים לאחר הטיפול במים מראה כי הטיפול אינו מוחלט וכי קיימים עדיין חיידקים הגורמים להופעת מחלה.

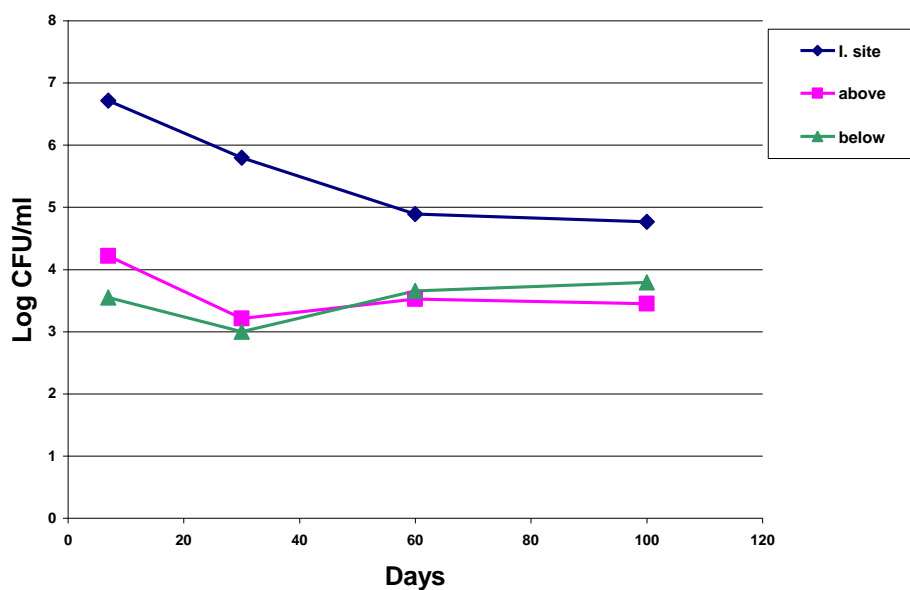
#### ד. הישרדות הפתוגן בצמחים שונים ממשפחת הסולניים.

הישרדות הפתוגן בפלפל וחציל נבדקה לאחר אילוח הצמחים בחיידקים הנושאים עמידות לאנטיביוטיקה ריפאמפיצין וסטרפטומיצין. נוכחות החיידק נבדקה במקום האילוח ו-5 ס"מ מעל ומתחת למקום ההדבקה. מהתוצאות המובאות באיורים 5 ו-6 ניתן לראות כי החיידקים שורדים ברמה גבוהה בשני הצמחים ללא יצירת סימני מחלה. כמו כן נמצא כי יש מעבר של החיידקים בגבעול לשני הכיוונים.

#### **איור 5: הישרדות קלויבקטר בצמחי פלפל**



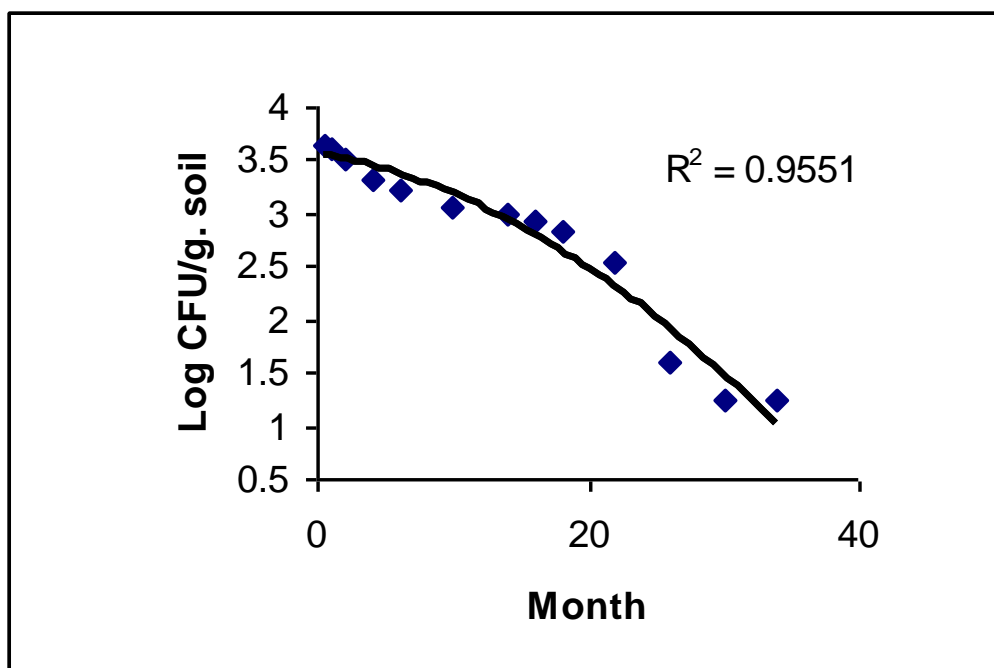
# איור 6: הישרדות קלויבקטר בצמחי חציל



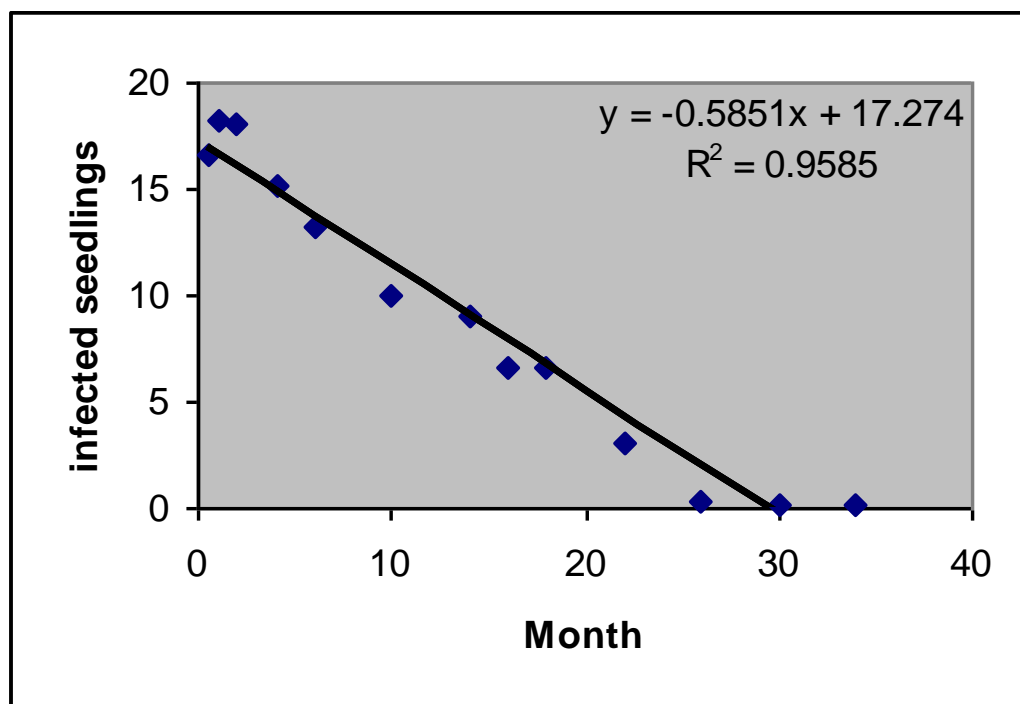
## ה. הישרדות החיידק בקרקע

קביעת ריכוז קלויבקטר בקרקע נגועה נמדדה במהלך 34 חודשים. תוצאות באיור 7 מראות כי חלה ירידה הדרגתית בריכוז החיידקים בשני סדרי גודל אולם עדיין נותרה אוכלוסיה הניתנת לגילוי (בין 10 ל- 30 חיידקים לגרם קרקע). בדיקת פוטנציאל המחלה של קרקע זו (איור 8) מראה כי רמת החיידקים ששורדת לאחר 22 עד 26 חודשים מסוגלת לגרום למחלה. תוצאות ניסויים אלו מצביעות על כך שהחיידק יכול לשרוד למשך תקופה ארוכה בקרקע (כשנתיים) והרמה מספיקה להופעת סימני מחלה בשתילי עגבניות.

## איור 7 : קביעת ריכוז קלויבקטר בקרקע נגועה.



איור 8: פוטנציאל המחלה של קרקע נגועה בקלויבקטר



## ו. בדיקת האפשרות של שימוש בתבדיד אנדופיטי לעיכוב קלויבקטר

החיידק בו השתמשנו הוא תבדיד *Cnm100* שאינו מכיל את שני הפלסמידים הדרושים לפתוגניות. הוכנו במקביל 2 תבדידים, האחד נושא עמידות לריפאמפיצין והשני לסטרפטומיצין. באיורים 9 ו-10 ניתן לראות כי התבדיד האנדופיטי מתפתח בצמחי עגבניה לרמה גבוהה בסביבות ה- $10^8$ - $10^9$  חיידקים למ"ל. רמה זו מקבילה לזו המתפתחת ע"י הפתוגן. כמו כן נמצאו ריכוזים גבוהים של האנדופיט 2 ס"מ מעל ומתחת לאזור ההדבקה. באילוח הצמחים בפתוגן לאחר האילוח באנדופיט נמצאה ירידה משמעותית בריכוז הפתוגן בניסוי 1 (איור 9) ואילו בניסוי 2 הירידה בריכוז הפתוגן לעומת האנדופיט לא היתה משמעותית (איור 10). אחוז הצמחים עם סימני מחלה היה באילוח עם אנדופיט+פתוגן נמוך משמעותית לעומת פתוגן בניסוי 1 בלבד (טבלה 5).

## טבלה 5: אחוז צמחי עגבניה עם סימני מחלה לאחר הדבקה בפתוגן ובאנדופיט.

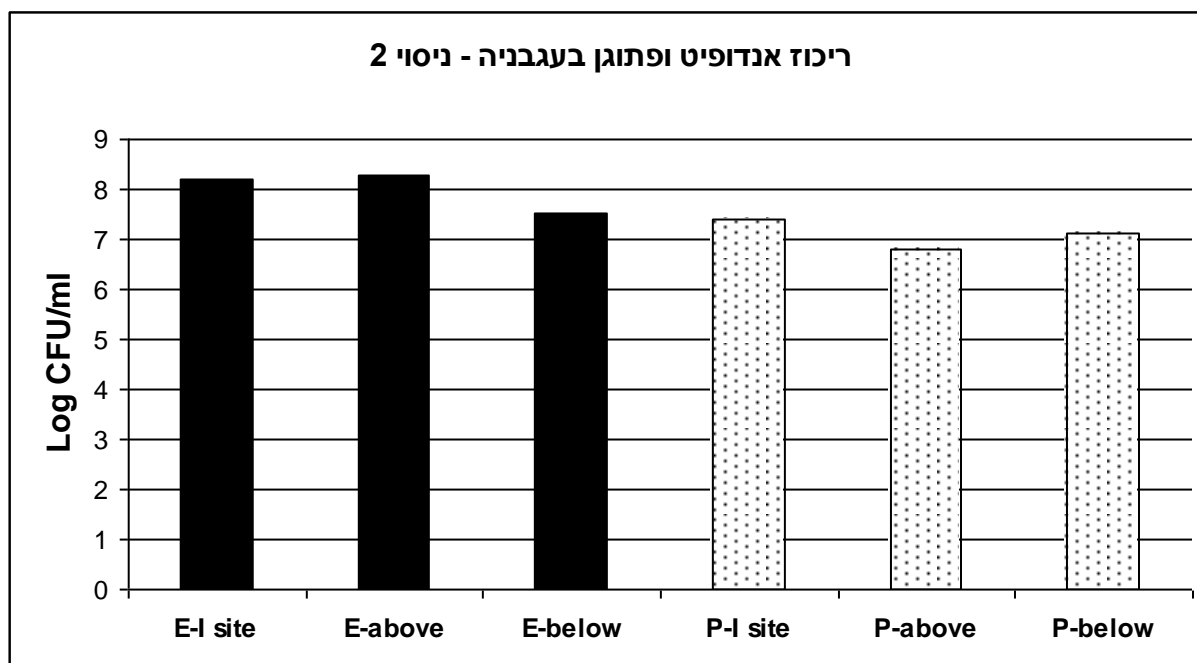
נעשו 2 חזרות בכל ניסוי עם 7-9 צמחים לחזרה.

אחוז צמחים עם סימני מחלה ניסוי 2	אחוז צמחים עם סימני מחלה ניסוי 1	
100	61	פתוגן בלבד
71	25	פתוגן + אנדופיט

**איור 9: ריכוזי אנדופיט ופתוגן בצמחי עגבניה לאחר 60 ימים מההדבקה.**  
 E מציין אנדופיט, P מציין פתוגן. הריכוזים נבדקו במקום ההדבקה ו-2 ס"מ מעל ומתחת לאזור ההדבקה.  
 תוצאות ממוצע של שתי חזרות.



**איור 10: ריכוזי אנדופיט ופתוגן בצמחי עגבניה לאחר 60 ימים מההדבקה.**



### מסקנות:

אחת הבעיות המרכזיות במחלה הנגרמת ע"י *Cmm* היא איבחון מדויק של גורם המחלה. לעיתים מתקבלים בחממות צמחים המראים סימני מחלה אופייניים אולם בבדיקה נוספת מתברר שגורם התופעה לא היה חיידק הקלויבקטר. מהעבודה שעשינו עד עתה מתברר כי השיטה הטובה לאיבחון כיום היא ביצוע PCR ישיר הנותן תשובה מהירה. במקביל יש לבדוד את החיידק על מצעי מזון ולבצע לאחר מכן ראקצית PCR עם שני זוגות פריימרים. הבעיות שיש הן של False positive. כלומר תגובות חיוביות עם חיידקים שאינם פתוגניים. בעיות אלו יפתרו בעתיד הקרוב עם סיום פרוייקט הגנום של הפתוגן המתבצע כעת בגרמניה. במקרה כזה נוכל לבצע ראקצית PCR שתכלול גם רצפים מהכרומוזום. קביעת סף הרגישות של גילוי הפתוגן בזרעים מראה כי בדגימה של 2000 זרעים (המתאימה ל- 10 ק"ג זרעים) ניתן לגלות זרע נגוע אחד. בדגימה של 10,000 זרעים ניתן לגלות מעל 5 זרעים נגועים. ולכן במקרה של אצוות גדולות יותר גם הדגימות צריכות להיות גדולות יותר בגלל הירידה בסף הרגישות. החיידק שורד במים ובצמחים אחרים ממשפחת הסולניים. ולכן בנוסף לזרעים המהווים את המקור העיקרי למחלה יש לטפל גם במקורות אינוקולום נוספים. בקרקעות שבהן נתגלו צמחים נגועים נמצא שהחיידק שורד למשך מספר שנים ולכן בקרקעות אלו יש לטפל ולמצוא דרכים לחיטוי. אפשרות השימוש בתבדיד אנדופיטי להדברת המחלה מראה כי התבדיד מאכלס את הצמח ומגיע לרמות גבוהות היכולות לעכב את התפתחות הפתוגן. ניסויים ראשוניים אלו מצביעים על כדאיות המשך בדיקת הנושא וחיפוש דרכים שונות לאפליקציה של האנדופיט או אנדופיטים אחרים. דרכים נוספות אותן יש לבחון בעתיד הוא השימוש בצמחים עמידים או כנות עמידות.

### **ספרות מצוטטת**

- Alvarez, A. M. and W. S. Kaneshiro, 1998. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. Proceeding of the 3rd international seed testing association plant disease committee, Zurich, Switzerland.
- Jahr, H., J. Drier, et al., 2000. The endo-beta-1,4-glucanase *CelA* of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 703-714.

## סיכום

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח: א. פתוח שיטה לזיהוי ספציפי של תבדידים פתוגניים באמצעות איפיון אוכלוסיית החיידק בארץ מבחינה ביוכימית ומולקולרית ופיתוח פריימרים המבוססים על גנים הדרושים לפתוגניות. ב. בדיקת כושר ההישרדות האנדופיטית של החיידק הפתוגני בעגבניות ובצמחים אחרים ממשפחת הסולניים, וכן בדיקת כושר ההישרדות בקרקע ובמים וזאת על מנת ללמוד על מקורות האינקולום ומציאת הדרכים לטיפול בהם. ג. בדיקת אפשרות השימוש בתבדיד אנדופיטי בלתי פתוגני להדברה ביולוגית של הפתוגן.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות: איפיון האוסף של כ- 120 תבדידים בשיטות שונות הראה התאמה טובה בין שיטת ה-PCR למבחני פתוגניות. שיטת מיצוי הפתוגן מהזרעים כוללת שלב של טחינת הזרעים כאשר הגודל הדגימה אינו עולה על 2000 זרעים. סף הרגישות של השיטה הוא זרע נגוע אחד בדגימה של 2000 זרעים ומעל 5 זרעים נגועים לדגימה בת 10,000 זרעים. בדיקת הישרדות הפתוגן במים הראתה כי ניתן למצוא את החיידק גם לאחר 100 ימים וכי קולונות של חול או טוף מורידות את רמת האינקולום. בדיקת הישרדות החיידקים בצמחים אחרים ממשפחת הסולניים כמו פלפל וחציל הראתה כי החיידק שורד גם לאחר כ- 4 חודשים במקום ההדבקה ומעל ומתחת למקום זה. החיידק שורד בקרקע תקופה ארוכה ופוטנציאל גרימת המחלה של קרקע זו הוא כשנתיים. חיידק אנדופיטי בלתי פתוגני מתפתח ומתפשט בצמחי עגבניה ברמה הקרובה לזו של הפתוגן ובניסויים ראשוניים נמצאה ירידה במספר הצמחים החולים בהדבקה משותפת.
3. המסקנות המדעיות: השיטה הטובה ביותר לאיבחון כיום היא ביצוע PCR ישיר ובמקביל בידוד החיידק על מצעי מזון וביצוע ראקצית PCR נוספת עם שני זוגות פריימרים. בדיקת סף הרגישות של גילוי החיידק בזרעים מראה כי על מנת לגלות זרע נגוע אחד גודל הדגימה לא יעלה על 5000 זרעים לחזרה. הסף שמתחתיו לא נגרמת מחלה בצמחים הגדלים בתנאי חממה הוא כ- 60 CFU לגרם זרעים. החיידק נמצא שורד בצמחים אחרים ממשפחת הסולניים, במים ובקרקע ולכן בנוסף לזרעים המהווים את המקור העיקרי למחלה יש לטפל גם במקורות אינקולום נוספים. ניסויים ראשוניים של שימוש בתבדיד אנדופיטי לעיכוב המחלה מצביעים על כדאיות המשך בדיקת הנושא וחיפוש דרכים שונות לאפליקציה של האנדופיט או אנדופיטים אחרים.
4. הבעיות שונתרו לפתרון: בשיטת ה-PCR לא התקבלו מקרים בהם היו חיידקים פתוגניים שלא הגיבו, אך היו מקרים הפוכים בהם היתה תגובה חיובית עם חיידקים שלא היו פתוגניים. עם סיום פרוייקט הגנום של קלויבקטר יבחרו פריימרים נוספים שיאפשרו להתגבר על בעיות של False positive. יש להמשיך ולבדוק את יכולתו של תבדיד לא פתוגני לעכב את התפתחות המחלה בעגבניה.
5. התוצאות הוצגו בהרצאה במסגרת יום עיון בנושא "הפחתת השימוש בחומרי הדברה" של המדען הראשי (דצמבר 2003, בית דגן) ובכנס החברה הישראלית לפיטופתולוגיה (פברואר 2004). חלק מהתוצאות סוכמו במאמר שנמצא בהדפסה וכן במאמר נוסף שנמצא בתהליכי כתיבה.

Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T. and Manulis, S. 2005.

Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. Plant Pathology (in press).