

35

# תקציר הדו"ח:

## 1. הצגת הבעיה:

*Pseudomonas Syringae* PV. *syringae* היא בקטריה גוזרמת להשחרה הבקטריאלית בעצי מנוו. המחלה פוגעת בנוף עצי המנוו, בחודשי החורף וגורמת לתמותה רבתי של הצמוח הצעיר שהתפתח בסוף הקיץ ובסתיו. נזקי המחלה קשים במיוחד בחורף בשום וסוער. עקב הופעתה, נעצרת כליל התפתחותם של עצים צעירים וגורם נזק כבד ליבול המנוו בעצים מבוגרים. ריסוסים במרק בורדו, בתקופת החורף נמצאו היעילים ביותר בהדברת המחלה. למרות הקשיים הנובעים מהשימוש במרק בורדו, הטיפול בחומר זה מיושם ברוב מסעי המנוו בארץ. אולם נמצא כי בשנים בהם החורף סוער במיוחד, למרות טיפולי ההדברה, מופיעה המחלה במלוא עוצמתה וגורמת נזקים כבדים מאד. נראה לכן כי השימוש בריסוס מרק בורדו אינו נותן פתרון מרבי בכל התנאים. מטרת המחקר היו: איתור מקורות המידבק, הדברתם בדרך הדברה חלופית, שתפעל ביעילות גם בחורפים קשים. פיתוח מערכת הדבקה מלאכותית, שתאפשר ההפתחות סימני מחלה ללא קשר לעונות השנה ולטמפ' התיצונות. ניסויי הדברה פרלימנרים להשגת מקורות המידבק.

## 2. מהלך ושיטות עבודה:

תחילה אותר מצע ברדני לגורם המחלה. נבדקה נוכחות הבקטריה בעלים, ענפים וטיפות שאף מיוחדות שהופרשו ע"י ענפי מנוו נוזעים. לא כן בדקנו אם גורם המחלה נישא ברוח (צלחות KB-1KBC נחשפו לאוויר המסע) או בעזרת מי הושמים.

נבדקה האפשרות להדבקות מלאכותיות בענפים ובעלים מנותקים וכן בשתילים, בתנאים שונים. (סמפרטורות, אורך יום, זנים, ומשך זמן מיסבי).

## 3. תוצאות עיקריות:

המצע הברדני המונה CBC נמצא יעיל בבידוד התיידק מאוכלוסיה מהטבע. בבדיקות האוויר לא אותר גורם המחלה, הבטריה נמצאו בעלים וענפים נוזעים, בטיפות דמויות שרף ובמי גשם שנאספו. נמצא כי עיקר המידבק מויע מענפים עם נזיעות בת שנה.

בהדבקות המלאכותיות, למרות הניסיונות הרבים, לא נמצאו התנאים המתאימים להתפתחות סימני מחלה בחורף, דבר שהיווה גורם מוביל בעבודה) לרוב ההדבקות היו בגובול אזור ההדבקה בלבד. בקטריה שנאספו אומתו כגורם המחלה ע"י בדיקת פתוגניות בסבך, אוקסידאז, בדיקות בינכימיות, אחדות מהן נבדקו ב-Gas chromatograph.

## 4. מסקנות והמלצות:

המצע הברדני KBC מומלץ לבידוד בקטריה זו. ענפים עם נזיעות בת שנה הם מקור מידבק אפשרי למחלה, בהם יצטרכו לטפל בעתיד. בדיקות חיוניות לאימות הבקטריה הן בדיקת פתוגניות בסבך, אוקסידאז, L-tartrate, L-lactate, Titchalose - B-glucosidase.

דוח מחקר 97-887-132 מסכם

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

הנושא: היבטים אפדמיולוגיים ואטיולוגיים בהתפתחות מחלת  
ההשחרה הבקטריאלית בעצי המנגו, שלב מקדים לבחינת  
אסטרטגית הדברה חדשה.

שמות החוקרים: דר' יעקב פנקס ז"ל, מרסל מימון ודר' גיורא  
קריצמן, המח' למחלות צמחים, מכון וולקני, בית דגן.  
Dr. Yaakov Pinkas, Maimon Marcel, And Dr. Giora Kritzman,  
Dept. of plant Pathology, ARO, Volcani Center, Bet Dagan.

## תקציר:

1. הצגת הבעיה: *Pseudomonas Syringae pv. syringae* היא בקטריה הגורמת להשחרה הבקטריאלית בעצי מנגו. המחלה פוגעת בנוף עצי המנגו, בחודשי החורף וגורמת לתמותה רבתי של הצמוח הצעיר שהתפתח בסוף הקיץ ובסתיו. מזקי המחלה קשים במיוחד בחורף גשום וסוער. עקב הופעתה, נעצרת כליל התפתחותם של עצים צעירים ונגרם נזק כבד ליבול המנגו בעצים מבוגרים. ריסוסים במרק בורדו, בתקופת החורף, נמצאו היעילים ביותר בהדברת המחלה. למרות הקשיים הנובעים מהשימוש במרק בורדו, הטיפול בחומר זה מיושם ברוב מטעי המנגו בארץ. אולם נמצא כי בשנים בהם החורף סוער במיוחד, למרות טיפולי ההדברה, מופיעה המחלה במלוא עוצמתה וגורמת נזקים כבדים מאד. נראה לכן כי השימוש בריסוסי מרק בורדו אינו נותן פתרון מרבי בכל התנאים.
- מטרות המחקר היו: איתור מקורות המידבק, והדברתם בדרך הדברה חלופית, שתפעל ביעילות גם בחורפים קשים. פיתוח מערכת הדבקה מלאכותית, שתאפשר התפתחות סימני מחלה ללא קשר לעונות השנה ולטמפ' החיצונית. ניסויי הדברה פרלימנרים להשמדת מקורות המידבק.
2. מהלך ושיטות עבודה: תחילה אותר מצע בררני לגורם המחלה. נבדקה נוכחות הבקטריה בעלים, ענפים וטיפות שרף מיוחדות שהופרשו ע"י ענפי מנגו נגועים. כמו כן בדקנו אם גורם המחלה נישא ברוח ( צלחות KBC וKB נחשפו לאוויר המטע ) או בעזרת מי הגשמים.
- נבדקה האפשרות להדבקות מלאכותיות בענפים ובעלים מנותקים וכן בשתילים, בתנאים שונים. (טמפרטורות, אורך יום, זנים, ומשך זמן מיטבי).
3. תוצאות עיקריות: המצע הבררני המכונה KBC נמצא יעיל בבידוד החיידק מאוכלוסיה מהטבע.
- בבדיקות האוויר לא אותר גורם המחלה, הבקטריות נמצאו בעלים וענפים נגועים, בטיפות דמויות שרף ובמי גשם שנאספו. נמצא כי עיקר המידבק מגיע מענפים עם נגיעות בת שנה.
- בהדבקות המלאכותיות, למרות הניסיונות הרבים, לא נמצאו התנאים המתאימים להתפתחות סימני מחלה בחורף, ( דבר שהיווה גורם מגביל בעבודה ) לרוב ההדבקות היו בגבול אזור ההדבקה בלבד.
- בקטריות שנאספו אומתו כגורם המחלה ע"י בדיקת פתוגניות בטבק, אוקסידאז, בדיקות ביוכימיות, אחדות מהן נבדקו ב Gas chromatograph.
4. מסקנות והמלצות: המצע הבררני KBC מומלץ לבידוד בקטריה זו. ענפים עם נגיעות בת שנה הם מקור מידבק אפשרי למחלה, בהם יצטרכו לטפל בעתיד. בדיקות חיוניות לאימות הבקטריה הן בדיקת פתוגניות בטבק, אוקסידאז, B-glucosidase ו Trehalose, L-lactate, L-tartrate.

א. נושא המחקר: היבטים אפדמיולוגיים ואטיולוגיים בהתפתחות מחלת ההשחרה הבקטריאלית בעצי המנגו, שלב מקדים לבחינת אסטרטגית הדברה חדשה.

### ב. מבוא ומטרות המחקר לתקופת הדוח:

*Pseudomonas Syringae* pv. *syringae* היא בקטריה הגורמת להשחרה הבקטריאלית בעצי מנגו. המחלה פוגעת בנוף עצי המנגו, בחודשי החורף וגורמת לתמותה רבתי של הצמוח הצעיר שהתפתח בסוף הקיץ ובסתיו. בענפים נגועים משנה הקליפה את צבעה והופכת שחורה. נזקי המחלה קשים במיוחד בחורף גשום וסוער. עקב הופעתה, נעצרת כליל התפתחותם של עצים צעירים ונגרם נזק כבד ליבול המנגו בעצים מבוגרים. בשנים 1991 ו-1992 הייתה פגיעת המחלה קשה במיוחד והנזק שהיא גרמה (בכל אחת מהשנים הללו) הוערך במאות אלפי שקלים. בזמנו, עם הגדרת גורם המחלה, נערכו מספר ניסויי הדברה ובהם הוכח כי 3 ריסוסים במרק בורדו, בתקופת החורף, יעילים ביותר בהדברת המחלה. מרק בורדו נמצא יעיל ביותר בהשוואה לתכשירי נחושת אחרים שנבדקו. מאז בצוע הניסויים ולמרות הקשיים הנובעים מהשימוש במרק בורדו (פגיעה במשאבות המרססים), הפך הטיפול בחומר זה להמלצה המיושמת ברוב מטעי המנגו בארץ (להוציא את אזור הערבה שאינו נפגע כלל במחלה). אולם נמצא כי בשנים בהם החורף סוער במיוחד, למרות טיפולי ההדברה, מופיעה המחלה במלוא עוצמתה וגורמת נזקים כבדים מאד. נראה לכן כי ההמלצה לשימוש בריסוסי מרק בורדו אינה נותנת פתרון מרבי בכל התנאים.

מטרות המחקר לתקופת הדוח היו:

1. איתור מקורות המידבק (ראשוני ומשני) והדברתם בדרך הדברה חלופית.
2. פיתוח מערכת הדבקה מלאכותית, שתאפשר התפתחות סימני מחלה ללא קשר לעונות השנה ולטמפ' החיצונית.
3. ניסויי הדברה פרלימנרים להשגת מקורות המידבק.

### ג. פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדוח:

1 - איתור מצע בררני.

ב-1987 פורסמו תוצאות מחקר ובו דווח על מצע בררני חדש המאפשר איתור של *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* בזרעי שעועית (3). מכיוון שמדובר באותה בקטריה הגורמת להשחרה בקטריאלית במנגו בחנו את מידת התאמת המצע המכונה KBC למטרותינו.

תרבויות שמקורן ענפי מנגו מאזורים שונים בארץ, הועברו מהקפאה למצע (KB) King B. ארבע מ"9 תבדידים שנבחנו בניסוי זה גרמו סימני מחלה אופייניים בשתילי מנגו בעוד חמשת הנותרים לא יצרו סימנים כלשהם. התבדידים נדרעו על שני מצעי גידול: על KB ועל KBC. אחרי 24 שעות שניים מתוך חמשת התבדידים שלא גרמו סימני נגיעות לא התפתחו עדיין. ניתן היה לזהותם רק לאחר 48 שעות. שלושת הנותרים וכל התבדידים מהקבוצה השניה שפיתחו סימני מחלה בהדבקה מלאכותית במנגו, זוהו כבר לאחר 24 שעות. כל תשעת התבדידים היו כצפוי פלורוסצנטיים, גם כשגדלו על KBC.

שעור הבידוד החוזר (Recovery rate) נע בניסיונותינו בין 81% ל-100% כשרובם קרובים יותר ל-100%. יתכן ו KBC נופל במעט ביעילותו בהשוואה ל KB, אולם יתרונו הגדול הנובע מבררנותו הרבה (ראה להלן), מחפה על חסרון זה. יש לזכור שעל KBC גזלים גם מיני פסאודומנס פלורוסנטים שאינם פתוגנים למנגו ולכן שיטת הבדיקה בה נקטנו כללה בשלב ראשון בידוד על מצע KBC. בשלב שני הודבקו שתילי טבק בתבדידים הפלורוסצנטים בלבד לאיתור הפתוגניים שביניהם ורק אלה האחרונים נלקחו להדבקת שתילי מנגו לאיתור גורם המחלה. במסגרת בדיקות שמטרתם היתה איתור מקורות המידבק פתחנו במטע מנגו צלחות פטרי שהכילו את שני המצעים (KB ו KBC). תוצאות של ניסוי מייצג הראה שאף לא על אחת מהצלחות שנפתחו התפתחו תבדידים פלורוסצנטים אולם על KB התפתחו מספר רב מאד של מושבות בקטריאליות ופטריות, בעוד שהצלחות שהכילו KBC נשארו נקיות לחלוטין. עקב יתרונו של מצע זה, כל העבודות שהיו קשורות בבידוד החיידק מהטבע נערכו בעזרת מצע זה.

## 2 - איתור מקורות המידבק.

תחילה בדקנו האם גורם המחלה נישא ברוח. בשלב ראשון פתחנו צלחות פטרי שהכילו מצע בררני בשתי חלקות מנגו בבית דגן. הצלחות נפתחו אחת לשבועיים, לאורך חודשי החורף למשך 15 זקות בכל פעם. בבדיקות הללו לא אותר כלל גורם המחלה. נראה לכן שהחיידק אינו מגיע לאתר ההדבקה בעזרת הרוח.

בדיקת נוכחות החיידק במי הגשמים נבדקה במשך כל שנות המחקר. לצורך כך הוצבו בחמישה אתרים במטע זריעים, ובמטע צריפין כלים לאיסוף מי גשם. נפח כל כלי היה 1 ליטר. הכלים הוצבו בגובה של כמטר מתחת לעצים. יום לאחר הגשם נבדקו המים לנוכחות החיידק. מי הגשם שנאספו סוננו דרך פילטר 0.45 מיקרון. הפילטר טולטל ב- saline. התרחיף שהתקבל נזרע על מצע KBC.

בשנה הראשונה מתחילת עונת הגשמים ובמשך דצמבר כולו לא אותר גורם המחלה. לעיתים נתגלו במים חיידקים פלורוסצנטים אולם הללו לא היו פתוגנים. בסוף ינואר נתגלו לראשונה עשרות בקטרייות פלורוסצנטיות בשתיים מחמשת הדוגמאות שנאספו. בדיקת מידגם של המושבות הללו הצביע על נוכחות הגורם הפתוגני במים. ממועד זה ואילך נתגלה גורם המחלה במי הגשמים בקביעות (גם כשכמות המשקעים לא היתה גבוהה במיוחד). נראה היה בברור כי כמות החיידקים הולכת וגוברת ככל שהחורף מתקדם. למרות נוכחות החיידק לא נראו על העצים סימני נגיעות חדשים, אלא רק בחודש מרץ. בשנה השנייה התגלה גורם המחלה כבר בתחילת חודש נובמבר, הפעם ריכח הבקטריות היה קבוע פחות או יותר לאורך העונה, ונע בין 1000 ל-100000 בקטריות למ"ל מי גשם. למרות זאת הופיעו סימני נגיעות קלים בסוף העונה בלבד. בחודשים פברואר- מרץ 97 אף ירד ריכח הבקטריות בשני סדרי גודל. בשני המטעים שנבדקו נראו כתמי השחרה בעיקר בעלים ומעט מאד בגיבעולים.

נראה שלבד מנוכחות החיידק יש צורך בגורמים נוספים המסייעים להופעת הנגע. להערכתנו טמפרטורות נמוכות וגורמי פציעה (ברד), או פציעות מכניות אחרות (תורמים לכך, תנאים אלו כמעט שלא התקיימו).

יש להדגיש כי העצים שמתחתם הוצבו הכלים לאיסוף מי גשמים הכילו ענפים נגועים במחלה שנפגעו ממנה בשנה קודמת. עוד בתחילת החורף בודדנו את גורם המחלה מענפים ועלים נגועים (ענפים עם נגיעות בת שנה ושנתיים). לאור זאת בדקנו האם ענפים אלו היו את המקור למידבק ראשוני. לבדיקת הנחה זו הסירונו מהמטע ענפים עם נגיעות בת שנה ושנתיים (כל קבוצת ענפים אוגדה בנפרד). אגדי הענפים הוכנסו לתא גידול ( $20^{\circ}\text{C}$ ), בתנאי עירפול (10 שניות כל דקותיים). מכל אחת מאגדי הענפים נאספו מי עירפול שניגרו מהם ונצטברו במשך שעתיים. דגימות המים נלקחו במועדים שונים: בזמן 0, לאחר 4, 5 ו-6 ימים לאיתור גורם המחלה (טבלה מס. 1).

נראה שבתנאי הניסוי משתחררת מהענפים הנגועים הבקטריה גורמת המחלה. כמותה לאורך ציר הזמן הולכת וגוברת. נראה לנו כי עיקר המידבק מגיע מענפים עם נגיעות בת שנה שנשארו על העצים.

טבלה מס. 1.

### שעור הבקטריות במי העירפול

נגיעות בת שנה		נגיעות בת שנתיים		מועד הדיגום
מספר נפח מי העירפול לקטניות	מספר נפח מי העירפול לקטניות	מספר נפח מי העירפול לקטניות	מספר נפח מי העירפול לקטניות	
0.004	340	6.8	250 מ"ל	זמן 0
0.124	620	13.9	325 מ"ל	לאחר 4 ימים
3.1	580	112.9	230 מ"ל	לאחר 5 ימים
2.5	590	183	245 מ"ל	לאחר 6 ימים

איתור חייו גורם המחלה על פני רקמות הצמח: במסגרת זו נבחנו אוכלוסיית הבקטריות בחלקי העץ השונים: על פני עלים (בריאים ונגועים), על פני ענפים ובצלוקות שנוצרו בענפים. עלים בריאים ונגועים נלקחו ממטע צריפין ומהמטע בבית דגן. כל קבוצת עלים טולטלה ב-150 מ"ל סליין למשך שעה, אח"כ נעשה סינון לריכוך התרחיף. זריעות נעשו למצע KBC.

בעלים הבריאים שנבדקו לא נמצאו כלל בקטריות פתוגניות, בדגימה אחת נמצאה אוכלוסייה של בקטריות פלורסנטיות אך הן לא היו פתוגניות. בעלים עם כתמי השחרה אופייניים במטע אחד לא התקבלו בקטריות פתוגניות, ואילו במטע שני קיבלנו כ-320 בקטריות בממוצע לעלה. בשני המטעים אומתו הכתמים ככתמי השחרה בקטריאלית (ע"י כתישה חריעה). מהתוצאות לא ברורה תרומת העלים לאינוקולום בשטח.

איתור טיפות שרף מיוחדות שהופרשו על ידי ענפי מנגו נגועים. בבדיקת השרף נעשתה ע"י הרחפה והמסה בסליין. חלק מטיפות השרף שנבדקו על ידנו נראו כשרף אמיתי. אולם חלקן היו טיפות דמויות שרף המורכבות ממיליוני בקטריות, צמודות יחדיו המופרשות מתוך הרקמות הנגועות. לאחר טלטול,

נוצר תרחיף כבד מאד של תאי בקטריות שהוגדרו כ- *Pseudomonas Syringae* יתכן ולפנינו מקור המידבק הראשוני אותו אנו מחפשים. נפיצות התופעה בזנים שונים לא ברורה, רוב הדוגמאות שנמצאו היו של שרף רגיל. יש להניח כי יכולת פיזור הבקטריות משרף זה בעת החורף טובה מאוד מאחר והוא מסיס מאד במים.

### 3 - הדבקות מלאכותיות.

לאור התוצאות השליליות שנתקבלו בניסויי הדבקה מלאכותית שנערכו בבית רשת, במשך 3 חודשי החורף (הדבקות לסרוגין כל שבועיים) ולאור העובדה שהדבקה מוצלחת אפשרית במצב הטוב בתקופה מצומצמת בלבד (בשני חודשי החורף המאוחרים), ניסינו לפתח מערכת הדבקה מלאכותית שתבטיח התפתחות סימני מחלה ללא קשר לעונת השנה ולטמפרטורה החיצונית. לצורך כך ניסינו להשהות שתילים משני זני מנגו (קיט וקנט) בתנאים המדמים תנאי חורף (לילה -  $9^{\circ}\text{C}$ , יום -  $17^{\circ}\text{C}$ . זמן תאורה כביום קצר). השתילים הושהו בתנאים אלו למשך שבועיים או חודש בטרם הודבקו בשני תבדידים של גורם המחלה (הדבקות של עלים וענפים כאחד). הדבקות נעשו בריכוז של  $10^7$  בקטריות למ"ל. 20 מיקרוליטר תרחיף טופטפו לנקודת ההדבקה, נעשתה פציעה של הרקמה לאחריה טופטפו 10 מיקרוליטר נוספים. תוצאות הניסוי ניתנות לסיכום כדלקמן:

- 1 - לא נמצאה השפעה ברורה למשך תקופת הפרה-דיספחיציה על רגישות השתילים להדבקה.
- 2 - נמצא הבדל באלימות שני התבדידים שנבחנו.
- 3 - כמצופה הזן קיט היה בעל רגישות רבה יותר מקנט.
- 4 - התנאים שבהם שהו השתילים בשלב הפרה-דיספחיציה וההדבקה לא הספיקו ליצירת כתמי נגיעות גדולים. גודל הכתמים נע בין 2 ל-15 מ"מ בלבד (נמדד מעבר לגבולות אזור ההדבקה).
- 5 - ניתן היה לזהות באזורים המודבקים טיפות דמויות שרף שהיו במעשה Ooze - שהנן הפרשות המכילות מספר עצום של הבקטריה גורמת המחלה.

השימוש במיתקן זה (חממה רב אקלימית), ענה רק חלקית על מטרותינו ולא ניתן היה להוריד את הטמפרטורות בתא בו בוצע הניסוי. מאוחר יותר אותר תא גידול קטן בו ניתן לווסת את הטמפרטורה, לקבוע את משך היום ואת עוצמת התאורה.

לקביעת התנאים, שיאפשר את התפתחות המחלה (פרהדיספחיציה), נקבעו תחילה בתא התנאים הבאים: ביו השעות 8-16 היתה הטמפרטורה בתא  $17^{\circ}\text{C}$ , והתאורה היתה מלאה. בשעות 16-8 הורדה הטמפרטורה ל- $4^{\circ}\text{C}$  והאור כובה למשך הלילה.

בגלל מגבלת גודל התא, בוצעו ההדבקות בתבדיד אחד בלבד, תבדיד 26, שהראה סימני נגיעות קשים יותר בניסויים קודמים. בסידרת הדבקות ראשונה הודבקו שתילי קיט בלבד.

הדבקת השתילים נעשתה באופן הבא: 20 מיקרוליטר תרחיף, בריכוז של  $10^7$  בקטריות למ"ל, טופטפו לנקודת ההדבקה, נעשתה פציעה של הרקמה לאחריה טופטפו 10 מיקרוליטר נוספים. הדבקות נעשו אחת לשבוע, מזמן אפט ועד שישה שבועות, לעשרה נקודות בכל פעם. כביקורת נעשתה אותה פעולה עם סליין במקום תרחיף החיידקים. ההדבקות נעשו לעלים ולגבעולים. בהדבקות בזמן אפט בגבעולים, (עם הכנסת השתילים לתא), כבר לאחר שבוע נראית הדבקה באזור החתך. אך רק לאחר כשבועיים, הכתם התפשט לאזור החתך. בהדבקות שנעשו לאחר שבוע פרהדיספחיציה אחרי כשבוע וחצי ממועד ההדבקה מילא הכתם את כל אזור ההדבקה. סימנים אלה היו מוגבלים

לאזור הפציעה בלבד ולא המשיכו להתפשט גם כאשר השתילים שהו בתנאים אלו חודש וחצי. במקרים בודדים חרג הכתם מאזור ההדבקה וגם אז זה היה במ"מ ספורים בלבד.

בהדבקות בעלים לרוב התקבלה נקודת השחרה קטנה ביותר, בגבול הדקירה, (כחצי מ"מ בהשוואה לביקורת) בשני מיקרים קבלנו התפשטות סקטוראלית של ההשחרה בצינורות ההובלה בלבד. גם הפעם לא נמצאה השפעה ברורה למשך תקופת הפרהדיספחיציה על רגישות השתילים להדבקה.

לאור התוצאות שקיבלנו הוחלט להקצין עוד יותר את התנאים בהם שהו השתילים. שתילים חדשים הוכנסו לתא. בתא נקבעו התנאים הבאים: ביו השעות 7-16 היתה הטמפרטורה בתא  $12^{\circ}\text{C}$ , והתאורה צומצמה ל-50% אור. בשעות 16-7 הורדה הטמפרטורה ל- $4^{\circ}\text{C}$  והאור כובה למשך הלילה. ההדבקות נעשו באותו אופן.

גם בתנאים החדשים שנבדקו לא קיבלנו את סימני המחלה האופייניים. התוצאות חזרו על עצמן באותה הצורה ממש, הכתמים שהתקבלו לא חרגו אל מעבר לנקודת ההדבקה אלא במ"מ בודדים (עד 5 מ"מ).

בשלב הזה לא היה ברור אם ההנחה שלנו לפיה המחלה בעצי המנגו מתאפשרת רק לאחר חשיפת העץ למשטר של "טמפרטורות חורף" למשך פרק זמן מסוים אכן נכונה, והועלה חשד כי הבקטריה איתה עבדנו איבדה את הפתוגניות שלה. לכן בודדו שוב בקטריות מענפים נגועים במטע (צריפין ובית דגון), ואלו שימשו להדבקה שתילים ששהו 6 שבועות בתנאים האחרונים. הדבקה נעשתה במקביל בתבדיד ששימש אותנו במהלך הניסויים.

בכל ההדבקות התקבלה תוצאה אחידה, הכתם התפשט מעט מעבר לנקודת ההדבקה (עד 7 מ"מ). למרות שעבדנו עם שתילי קיט (זן הידוע כרגיש יותר למחלה) ובתנאי חורף קיצוניים ביותר לא הצלחנו ליצור כתמי נגיעות גדולים, לא התקבלו בתנאים אלו טיפות Oozing. מכיוון שלא ניתן היה להוריד את טמפ' הלילה מתחת ל- $4^{\circ}\text{C}$ , ההדבקות בתא הופסקו.

אימות הבקטריות כ *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*:  
הבקטריות שהתקבלו בניסיונות לאיתור מקורות המידבק נבדקו, במטרה לאמת את זהותן. לצורך כך נעשו בדיקות B-glucosidas, L-lactate, L-tartrate, Trehalose (2), לבקטריות שעברו בהצלחה בדיקת אוקידאז ופתוגניות בטבק. 10 בקטריות מהאוסף נשלחו להגדרה ב-Gas chromatograph. סה"כ נבדקו כ-150 בקטריות מייצגות.

כ-93% מהבקטריות שעברו בהצלחה בדיקת אוקסידאז ופתוגניות בטבק נמצאו כ *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* גם בכל הבדיקות הביוכימיות שנעשו. 7% הנותרים היו חיוביים בבדיקת Trehalose, (במקום שלילי), יתר הבדיקות התאימו לקבוצת הפתוגן שלנו.

ב-Gas chromatograph 5 מתוך העשרה שנבדקו נמצאו שייכים ל-קבוצת ה- *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, ביניהם תבדיד 26 ששימש בהדבקות המלאכותיות. חמשת הנותרים השתייכו לקבוצת ה- *Pseudomonas savastanoi*, וכולם זהו כפתוגניים בבדיקות הביוכימיות. במידה וימשך מחקר זה יהיה צורך לרכוש תבדיד של בקטריה מוגדר, מספריה, ולהשוות אותו לתבדידים המצויים בידינו, ב-Gas chromatograph ובהדבקות במנגו.



### ד. מסקנות והשלכותיהן לעתיד:

המצע הבררני KBC נמצא מתאים לבידוד *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. אמנם שיעור התאוששות הבקטריות עליו היה נמוך במעט מאשר KB, אך בררנותו הרבה מחפה על חיסרון זה. בניסיונות לאיתור מקורות המידבק באוויר, לא נמצא גורם המחלה כלל נראה לכן שהחיידק אינו מגיע לאתר ההדבקה בעזרת הרוח. בבדיקת מי גשם נמצא הגורם הפתוגני במים. רמת החיידק במים השתנתה לאורך העונה ונעה בין  $10^5$  ל- $10^6$ . ענפים עם נגיעות בת שנה ושנתיים נבדקו בתנאי ערפול (הדמיה לגשם). נמצא כי אלו שיחררו למים את גורם המחלה. כמות הבקטריות עלתה ככל שמשך הערפול עלה. בענפים אלה יצטרכו לטפל להדברת המחלה. מקור מידבק נוסף הן טיפות שרף שהכילו כמויות גדולות של בקטריה. נפוצות התופעה לא ברורה. בניסיונות לפיתוח מערכת הדבקה מלאכותית, שתבטיח התפתחות סימני מחלה בכל עת, למרות הניסיונות הרבים, לא נמצאו התנאים המתאימים לכך. הסיבה לכך לא ברורה, יתכן שהדבר נובע מתנאי הפרהדיספחיציה (לא ניתן היה להוריד את טמפר' הלילה מתחת ל-4°C). יתכן שהבקטריה מאבדת את הפתוגניות שלה כאשר היא גדלה במצע. בעתיד ננסה להדביק עם מיצוי צמחי מענפים נגועים.

לצורך אימות הבקטריות כ- *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* נעשו בדיקות בהצלחה בדיקת אוקידאז ופתוגניות בטבק. כ- 93% מהבקטריות אלו אומתו כגורם המחלה. 7% הנותרים היו חיוביים בבדיקת Trehalose, (במקום שלילי), יתר הבדיקות התאימו לקבוצת הפתוגן שלנו. 10 בקטריות מהאוסף נשלחו להגדרה ב-Gas chromatograph. 5 מתוך העשרה שנבדקו נמצאו שייכים ל-קבוצת הפתוגן שלנו, ביניהם תבדד 26 ששימש בהדבקות המלאכותיות. במידה ויוחלט בעתיד להמשיך בשיטת זיהוי זו, יהיה צורך לרכוש תבדד של בקטריה מוגדר, מספריה, שיהווה רפרנס אמין לבקטריה שלנו.

### ה. פרסומים:

לא היו פרסומים בנושא.

### ו. סיכום לדוח:

- מטרות המחקר לתקופת הדוח היו: איתור מקורות המידבק, בניסיון להדבירם בדרך הדברה חלופית. פיתוח מערכת הדבקה מלאכותית, שתאפשר התפתחות סימני מחלה בכל עת, ניסיונות ראשוניים להשמדת מקורות המידבק.
- עיקרי הניסויים והתוצאות: לאיתור מקורות המידבק נבדקו מי גשם, רוח, ענפים ועלים נגועים ובריאים. המידבק נמצא במי הגשם, בענפים נגועים בני שנה ושנתיים, בעלים ובטיפות דמויות שרף. ניסיונות לפיתוח מערכת הדבקה מלאכותית לא הצליחו. בקטריות חשודות אומתו כפתוגן. (פרוט נוסף בדוח).
- מסקנות והשלכות: המצע הבררני KBC מומלץ לבידוד בקטריה זו. ענפים עם נגיעות בת שנה הם מקור מידבק אפשרי למחלה, בהם יצטרכו לטפל בעתיד.

בדיקות חיוניות לאימות הבקטריה הן בדיקת פתוגניות בטבק, אוקסידאז, B-glucosidase ו Trehalose, L-lactate, L-tartrate .  
 4. בעיות שונות לטיפול: פיתוח מערכת הדבקה מלאכותית. יש לרכוש תבדיל של בקטריה מוגדר, מספריה, ולהשוות אותו לתבדידים המצויים בידינו. כמו כן יש לנסות ולהדביר את מקורות המידבק שאותרו.  
 5. הפצת ידע: לא הוחל בהפצת ידע.

#### ספרות

- 1 - Mohan, S.K., Schaad, N.W., 1987. An improved agar plating for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, & *P. Syringae* pv. *Phaseolicola* in contaminated been seed. *Phytopathology* 77: 1390-1385.
- 2- N.W. Schaad, 19 , Laboratory guid for identification of plant pathogenic bacteria

