

תקציר הדו"ח:

1. הצגת הבעיה:

מטרת המחקר היתה לפתח שיטות יעילות ורגישות לגילוי החיידק הפתוגני הנמצא בצורה סמויה בצמחי פלרגוניום.

2. מהלך ושיטות עבודה:

מהלך המחקר כלל שיפור השיטה האימונופלורוסנטית, בדיקת תנאים שונים להעשרת אוכלוסיית החיידקים ביחורים הנבדקים, בדיקת נוגדנים ממקורות שונים, פיתוח השיטה המולקולרית לשימוש ביחורי פלרגוניום, התפשטות החיידקים בצמח, הופעת סימני מחלה ומעקב אחר פיזור החיידקים בצמח.

3. תוצאות עיקריות:

תוצאות המחקר הביאו לשיפור מהלך הבדיקה האימונופלורוסנטית כך שרגישות הזיהוי גדלה בסדר גודל אחד. בנוסף לכך קיצור שלבי הכנת הדוגמא מאפשר ביצוע בדיקות בזמן קצר יחסית. שתי השיטות המולקולריות שנבדקו והמבוססות על שיטת ה-PCR נמצאו יעילות לזיהוי ריכוז נמוך של הפתוגן בצמח. השיטה שנבחרה לשימוש היא שיטת ה-BIO-PCR המאפשרת לגלות תאים חיים. מבחני פתוגניות שנערכו בצמחי פלרגוניום הראו שהריכוז המינימלי הגורם להופעת מחלה הוא 10^4 חיידקים לסמ"ק וכי ניתן לגלות את הפתוגן גם בגבעולים הרחוקים מאזור ההדבקה. בצמחים מאולחים שנמצאו בטמפרטורה גבוהה של 35°C ריכוז החיידקים יהיה גבוה יותר.

4. מסקנות והמלצות:

השוואת השיטות השונות לזיהוי החיידק בצמחי פלרגוניום מאולחים הראתה שהן השיטה האימונופלורוסנטית והן השיטה המולקולרית טובות לגילוי ריכוז נמוך של החיידק בצמח. אולם מכיוון שהשיטה המולקולרית ספציפית יותר לפתוגן אנו משתמשים בה לאמת תוצאות חיוביות המתקבלות בשיטה האימונופלורוסנטית.

בנושא: פיתוח ושיפור שיטות האיבחון של חיידק הקסנטומונס בפרגוניום

מוגש ע"י: שולמית מנוליס, קוגן נינה ואורית דרור, המחלקה למחלות צמחים, מנהל

המחקר החקלאי, בית דגן, דואר אלקטרוני: vpshula@volcani.agri.gov.il

הקדמה

המחלה החשובה והמגבילה ביותר בגידול פלרגוניום היא מחלת הכימשון הבקטריאלי הנגרמת על ידי החיידק *Xanthomonas campestris pv. pelargonii* (Xcp). הדרך המעשית היחידה המקובלת כיום להדברת המחלה היא להשתמש בחומר ריבוי נקי מגורם המחלה ובו בזמן לנקוט באמצעי תברואה קפדניים. על מנת לייצר צמחי-אם חופשיים מהמחלה משתמשים בשיטת ה- culture indexing. השיטה מבוססת על בדיקות המאפשרות לזהות את החיידק הנמצא בצורה סמויה בצמח, סילוק הצמחים הנגועים והקמת מלאי של צמחי-אם למשתלות גרעין ויסוד. שיטה זו לקבלת חומר ריבוי נקי מחייבת שימוש בשיטות איבחון אמינות ועילולות לזיהוי החיידקים הפתוגניים. מטרת המחקר היא לפתח שיטות יעילות ורגישות לגילוי החיידק הפתוגני הנמצא בצורה סמויה בצמחי פלרגוניום. בשנה הראשונה של המחקר התרכזנו בשיפור השיטה האימונופלורוסנטית, בבדיקת תנאים שונים להעשרת אוכלוסיית החיידקים ביחורים ומציאת התנאים השונים להכנת הדוגמא הצמחית לביצוע ראקצית PCR. בשנה השניה נבחנו מספר פרוטוקולים המבוססים על שיטת ה- PCR לגילוי החיידק הפתוגני בצמחי פלרגוניום. בשנה השלישית בדקנו את איבחון החיידק בחלקי צמח שונים לאחר הדבקה בריכוז נמוך של הפתוגן, בחנו מצעי גידול בררנים שונים והכנו נוגדנים חדשים כנגד הפתוגן.

תוצאות

א. שיפור השיטה האימונופלורוסנטית

1. השיטה בה אנו משתמשים לזיהוי החיידק ברקמה הצמחית מבוססת על נוגדנים שהוכנו כנגד תבדיל פתוגני של קסנטומונס, הנקשרים לחיידקים הנמצאים בדוגמא הצמחית ואשר אליהם נקשרים נוגדנים שניוניים פלורוסנטיים. אחת הבעיות בשיטה נובעת מהפרעות שיוצרים חלקי צמח הנמצאים בדוגמא הצמחית והמקשים על זיהוי החיידק. לפיכך בשנה הראשונה של המחקר בדקנו תנאים שונים להכנת הדוגמא לבדיקה בשיטה האימונופלורוסנטית. לצורך ניסויים אלו הוספנו ריכוזים שונים של

החיידיק ($10^3 - 10^7$ חיידקים לסמ"ק) לדוגמאות היחורים שעברו אח"כ בדיקה במיקרוסקופ פלורוסנטי ובמקביל נורעו על צלחות פטרי המכילות מצע LPGA (המכיל yeast extract, peptone, glucose). התנאים שנבדקו היו:

- 1.1 ריסוק הרקמה הצמחית לרסק דק לעומת חיתוך לחתיכות קטנות וטלטול התמיסה. נמצא כי חיתוך הרקמה היה יעיל יותר. הטילטול איפשר יציאה של החיידקים מהרקמה לנוזל ללא הפרעות מחלקי צמח שונים.
- 1.2 ריסוק או חיתוך הדוגמא הצמחית וטלטול בתמיסת סליין לעומת מצע TY (מצע לא עשיר המכיל $(\text{Tryptone, yeast extract, CaCl}_2)$). ריסוק או חיתוך בסליין היה טוב יותר לעומת TY, כנראה בגלל מניעת התרבותם של חיידקים ספרופיטיים היכולים להפריע לבדיקה במיקרוסקופ או להקשות על ההבחנה בחיידיק הקסנטומונס בצלחות פטרי.
- 1.3 טלטול הדוגמא הצמחית ב- 4°C לעומת 27°C למשך הלילה. טלטול ב- 4°C היה יעיל יותר מכיוון שבדרך זו היתה יציאה של החיידקים לתמיסה מבלי שנעשה ריבוי לחיידקים הספרופיטיים.
- 1.4 הכנת הדוגמא הצמחית לבדיקה במיקרוסקופ על פי השיטה המקובלת באירופה לעומת השיטה הנעשית על ידינו. לא היה הבדל ברגישות הזיהוי בין שתי השיטות אך בשיטה שבה אנו נוקטים הרקע היה נקי וברור יותר.

2. בדיקת תנאים שונים להעשרת אוכלוסיית החיידקים ביחורים הנבדקים.

- 2.1 אילוח הצמחים נעשה ע"י דקירה בגבעול או ריסוס עם תרחיף חיידקים ובדיקת נוכחות החיידקים בגבעול או בעלים. התוצאות הראו שאילוח ע"י דקירה היה יעיל יותר. ניתן להסביר תוצאה זו בכך שעיקר החדירה של החיידיק נעשית דרך פצעים ולא דרך פתחים טבעיים המצויים בעלים. דקירת הגבעול ב- 10^5 חיידקים לסמ"ק ובדיקת נוכחות החיידקים בגבעול או בעלה הראתה שבגבעול היו הרבה יותר חיידקים לעומת העלים.

כל הניסויים שדרשו אילוח צמחים נעשו מעתה ואילך ע"י דקירת הגבעול וזיהוי החיידקים מחלקי גבעול בלבד ולא מהעלים.

- 2.2 יחורים מודבקים הושארו במקרר לתקופה של שבועיים עד לבדיקה. התוצאות הראו שלקיחת יחורים טריים יעילה יותר לבדיקה באימונופלורסנציה ולזריעה על צלחות פטרי, כנראה בגלל רקבון של היחורים שהושארו במקרר.

3. בדיקת נוגדנים ממקורות שונים.

בשנה השלישית הכנו נוגדנים חדשים כנגד החיידיק הפתוגני. נוגדנים אלו נבדקו בשיטת האימונופלורסנציה ונמצאו טובים (מיהול של 700:1). במקביל בדקנו נוגדנים

פוליקלונליים שנרכשו ממקור מסחרי. נמצא שהם לא היו טובים יותר מהנוגדנים שהוכנו על ידינו (מיהול של 1:250).

ב. פיתוח השיטה המולקולרית

1. בדיקת תנאים שונים להכנת הדוגמא הצמחית לראקציה ה-PCR.
ליחורים הוספו ריכוזים שונים של החיידק (10^4 – 10^1 חיידקים לסמ"ק) ונבדקו התנאים הבאים:
1.1 מיהול הדוגמא הצמחית במים לעומת סליין. מיהול במים היה טוב יותר.
1.2 הוספת פרוטאינו-K ואינקובציה 12 דקות ב- 55°C היה יעיל יותר.
1.3 הקפאת התאים והפשרתם לפני ראקציה ה-PCR איפשר לבצע את הראקציה ישירות על התאים ללא צורך בהפקת דנ"א.

2. שיטת ה-Nested-PCR

בשיטה זו מבצעים ראקציה הגברה נוספת לתוצרי ראקציה ה-PCR הראשונה. לצורך כך משתמשים בזוג תחלים שהם פנימיים לזוג הראשון. מתוך רצף הבסיסים של שני הקצוות של קטע דנ"א אותו בודדנו מהחיידק קסנטומונס פלרגוניי, בחרנו זוג תחלים פנימיים ובעזרתם בצענו את הראקציה שניה. יתרון השיטה הוא בהגברת הרגישות הגילוי של החיידקים.
בשלב ראשון בצענו את שיטת ה-N-PCR עם חיידקים מתרבית נקיה. בהשוואה לראקציה ה-PCR הראשונה התקבלה עליה של פי 1000 ברגישות הזיהוי (תמונה 1).
בראקציה ה-PCR הראשונה ניתן לגלות 500 חיידקים ואילו בראקציה שניה פחות מחיידק בודד.
כאשר מבצעים את שתי הראקציות בנוכחות חומר צמחי - מיצוי מצמחי פלרגוניום - מקבלים ירידה ברגישות הגילוי פי 10, כנראה בשל נוכחות חומרים מעכבים. יחד עם זאת עדיין ניתן לגלות חיידק בודד.

3. Bio-PCR

בשיטה זו מבצעים בשלב ראשון העשרה של החיידקים על צלחת עם מצע מזון ובשלב שני מבצעים ראקציה ה-PCR אחת עם זוג ראשון של פריימרים. כאשר בדקנו בשיטה זו ריכוזי חיידק שונים בנוכחות מיצוי צמחי, נמצא שהרגישות דומה לזו שהושגה ב-N-PCR. כלומר, ניתן היה לזהות עד חיידק בודד אחד. יתרונה של

השיטה הוא בכך שניתן לזהות באמצעותה חיידקים חיים בלבד. חסרונה הוא בזמן הגידול של החיידקים בצלחות האורך בין יומיים לשלושה.

4. בדיקת מצעים סלקטיבים שונים לבידוד החיידק *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* על מנת לשפר את שיטת ה-Bio-PCR המתבססת כאמור על ריבוי החיידק בצלחת וביצוע ראקצית PCR, נבדקו 2 מצעים שונים. מצע אחד מכיל Tween 80 (בנוסף ל-Peptone, CaCl₂, KBr ואנטיביוטיקות שונות). אינקובציה של הצלחות נעשית ב-28°C במשך 4 ימים. מצע סלקטיבי שני מכיל Esculin-Trehalose. ההדגרה נעשית ב-28°C ל-5-6 ימים. התוצאות הראו שמצעים אלו סלקטיביים ל-*Xcp* ואינם גורמים להפרעות בביצוע ראקצית ה-PCR. ב-5 ניסויים שערכנו לקביעת יעילותם של מצעים אלו בהשוואה למצע LPGA, לא היה להם יתרון בכל המקרים. תוצאות אלו מחייבות כמובן בדיקות נוספות. מכיוון שזמן האינקובציה על מצעים אלו ארוך יותר אנו ממשיכים בשלב זה להשתמש במצע LPGA עד שנוכל להוכיח את יעילותם של מצעים אלו.

ג. התפשטות החיידקים בצמח והופעת סימני מחלה

1. קביעת הריכוז המינימלי הגורם להופעת סימני מחלה

צמחי פלרגוניום אולחו בריכוזים שבין 10^7 ל- 10^2 חיידקים לסמ"ק. הדבקת הצמחים נעשתה ע"י דקירת הגבעול מספר פעמים עם מחט שנטבלה בתרחיף החיידקים. נפח הנוזל היה לא יותר מאשר 10 מיקרוליטר, כך שמספר החיידקים שהוחדר בפועל לצמחים היה בין 10^5 לחיידק בודד. הצמחים נשמרו בחממה בטמפרטורה של 27°C ובלחות גבוהה. עד ריכוז של 10^4 חיידקים לסמ"ק ניתן לראות סימני מחלה לאחר כשבועיים. ריכוזים נמוכים יותר לא גרמו להופעת סימני מחלה גם לאחר חודשיים ויותר.

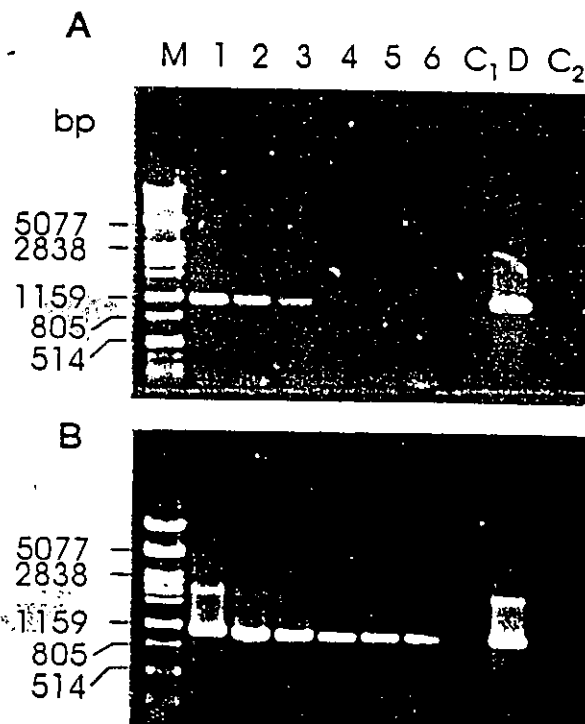
2. השוואת השיטות השונות לגילוי החיידק בצמחי פלרגוניום מאולחים בפתוגן.

צמחי פלרגוניום אולחו בריכוזים נמוכים החל מ-100 חיידקים לצמח. האילוח נעשה ע"י דקירת הגבעול בתרחיף מתאים של חיידקים. הצמחים הוחזקו בחממה בטמפרטורה של 27-30°C. דוגמאות מהגבעול המודבק הוסרו, רוסקו בסליין והוכנו לבדיקה בשיטות הבאות: זריעה על צלחות LPGA, מיקרוסקופ פלורוסנטי ו-PCR בשתי השיטות שתוארו לעיל. הצמחים נבדקו לאחר שבוע, שבועיים ושלושה. התוצאות מתוארות בטבלה 1.

ברכוז הגבוה של 100 חיידקים לצמח ניתן לגלות את הפתוגן בכל השיטות ובכל הזמנים. בריכוז של 10 חיידקים לצמח ניתן לזהות כבר לאחר 7 ימים בשיטות ה-PCR ובאימונופלורוסנציה. בריכוז הנמוך ביותר ניתן לגלות את החיידק לאחר שלושה שבועות רק בשיטת ה-Bio-PCR ובאימונופלורוסנציה. התוצאות מראות כי גילוי החיידק באמצעות זריעה על צלחות רגיש פחות מזה המתקבל בשיטת האימונופלורוסנציה ובשיטות ה-PCR. האימונופלורוסנציה בהשוואה ל-PCR היתה רגישה באותה מידה אך מכיוון שיש בעיה של תגובה לא ספציפית עם חיידקים אחרים לא ניתן לאמת בכל מקרה את התגובות החיוביות המתקבלות בשיטת האימונופלורוסנציה. השיטה המועדפת על ידינו בשלב זה היא שיטת ה-Bio-PCR מכיוון שניתן לגלות באמצעות חיידקים חיים בלבד ועלותה נמוכה מזו של ה-N-PCR.

3. מעקב אחר פיזור החיידקים בצמח. לצורך כך השתמשנו בחיידק הנושא עמידות ספונטנית לאנטיביוטיקה ריפאמפיצין. מטרת הניסויים היתה לקבוע היכן מתרכזים החיידקים בחלקי הצמח השונים, לאורך זמן ובתנאי טמפרטורה שונים. בנוסף לזיהוי על צלחות המכילות אנטיביוטיקה השתמשנו גם בשיטות האיבחון שפותחו בשלבים ראשונים של המחקר; אימונופלורוסנציה ו-Bio-PCR. צמחי פלרגוניום אולחו ע"י דקירה בגבעול בריכוזים שבין 10^2 ל- 10^4 חיידקים לסמ"ק, שהם בקירוב 1, 10, 100 חיידקים לצמח. נוכחות החיידקים נבדקה בגבעול המודבק, בגבעול מהסתעפות קרובה ובגבעול מהסתעפות רחוקה מהמודבק. בנוסף בדקנו התפשטות החיידקים בצמחים שהוחזקו בטמפרטורה של $27-30^{\circ}\text{C}$ לעומת $32-35^{\circ}\text{C}$. בכל ניסוי לכל ריכוז נלקחו 3 צמחים. תוצאות מסוכמות בטבלה 2. על פי התוצאות ניתן לראות כי לאחר חודש וחודשיים יש מעבר של החיידקים מהאזור המודבק ליחורים הקרובים והרחוקים. בצמחים שהוחזקו מספר ימים בטמפרטורה גבוהה יותר ניתן לגלות את החיידקים בריכוזים של 10 ו-100 חיידקים לצמח בגבעולים הרחוקים מאזור ההדבקה. יש להדגיש שהתוצאות בטבלה 2 מייצגות שני ניסויים שונים. בשני ניסויים נוספים לא הצלחנו לגלות כלל את החיידקים ביחורים הקרובים והרחוקים בצמחים ששהו בטמפרטורה של $25-28^{\circ}\text{C}$. הבדלים אלו נובעים לדעתנו מהשונות הגדולה הקיימת בין הצמחים בניסויים השונים. על מנת לאמת את התוצאות יש לחזור על ניסויים מספר גדול יותר של פעמים.

תמונה 1: ביצוע ראקציות PCR על חיידקי קסנטומונס פלרגוני



A - ראקציית PCR ראשונה

B - ראקציית PCR שניה

M סמנים למשקל מולקולרי

מספרים 1-6 מייצגים ריכוזים בין 10^6 ל- 10^8 חיידקים למ"ל

C - ביקורות שליליות עם מים בלבד ללא החיידק

D - ביקורת חיובית עם דנ"א של החיידק הפתוגני

טבלה 1: גילוי קסנטומונס פלרגוניי בצמחי גרניים באמצעות 4 שיטות שונות

ימים לאחר אילוח	צלחות	IF	N-PCR	BIO-PCR	חיידקים לצמח
7	-	-	-	-	1
	-	+	+	+	10
	+	+	+	+	100
14	-	-	-	-	1
	-	+	+	+	10
	+	+	+	+	100
21	-	+	-	+	1
	+	+	+	+	10
	+	+	+	+	100

+ או - מציינים תגובה חיובית או שלילית בהתאמה.

BIO-PCR - ריבוי על צלחות וביצוע ראקצית PCR ראשונה.

Nested-PCR - N-PCR

IF - בדיקה באימונופלורוסנציה.

צלחות - זריעה על צלחות LPGA וזיהוי החיידק לאחר 3 ימים.

טבלה 2 : התפשטות החיידקים מהגבעול המודבק לגבעולים אחרים בצמחי פלרגוניום

זמן		חיידקים לצמח		גבעול מודבק		גבעול קרוב		גבעול רחוק	
				35°C	27°C	35°	27°	35°	27°
14 ימים		1	-	-	-				
		10	+	+	+				
		100	+	+	+		-		
חודש		1	+	+	+	-	-	-	-
		10	+	+	+	+	-	+	-
		100	+	+	+	+	-	+	+
חודשיים		1	+	+	+	-	-	-	-
		10	+	+	+	+	-	+	+
		100	+	+	+	+	+	+	+

גבעול קרוב – הסתעפות הקרובה לגבעול המודבק
גבעול רחוק – הסתעפות הרחוקה מהגבעול המודבק

מסקנות

1. תוצאות סעיף א איפשרו לנו לשפר את הכנת הדוגמא הצמחית לבדיקה האימונופלורוסנטית. הבדיקה כפי שנעשת כיום לאחר הכנסת השיפורים השונים מגדילה את רגישות הזיהוי בסדר גודל אחד כך שניתן לזהות במיקרוסקופ 10^5 ולעיתים 10^4 חיידקים לסמ"ק המוספים לדוגמא הצמחית ו- 10^3 - 10^2 חיידקים לסמ"ק לאחר הדבקת גבעולים של צמחי פלרגוניום. בנוסף לכך קיצור שלבי הכנת הדוגמא מאפשר לבצע יותר בדיקות בזמן קצת יחסית. לבדיקה נלקחים גבעולים מ- 25 יחורים, הנחתכים לחתיכות קטנות ועוברים טלטול במשך הלילה בתמיסת סליין ובטמפרטורה של 4°C . תנאים אלו מאפשרים קבלת רקע נקי יותר ומונעים התרבות חיידקים ספרופיטיים המפריעים לבדיקה במיקרוסקופ. גם בגידול על צלחות פטרי מתקבלות פחות מושבות של חיידקים ספרופיטיים כך שנוכחותם של חיידקי ' הקסנטומונס קלה יותר לזיהוי. בהשוואה לצלחות פטרי הזיהוי בשיטה האימונופלורוסנטית רגיש פי 10.
2. שתי השיטות המולקולריות שנבחנו על ידינו נמצאו יעילות לזיהוי ריכוז נמוך של הפתוגן בצמח, אולם השיטה המועדפת על ידינו היא שיטה ה-Bio-PCR. בשיטה זו נעשה ריבוי על צלחת המכילה מצע LPGA ולאחר יומיים עד 3 מתבצעת ראקצית PCR. השיטה היא ספציפית לפתוגן ורגישה, ניתן לגלות באמצעות חיידקים בודדים: בנוסף לכך היא מגלה חיידקים חיים בלבד. שיטה זו מאפשרת לנו לאמת תוצאות חיוביות המתקבלות בבדיקה האימונופלורוסנטית.
3. מבחני פתוגניות שנערכו בצמחי פלרגוניום לקביעת הריכוז המינימלי הגורם להופעת מחלה הראו שעד ריכוז של 10^4 חיידקים לסמ"ק ניתן לראות סימני מחלה לאחר כשבועיים. ריכוזים נמוכים יותר לא גרמו להופעת סימני מחלה גם לאחר חודשיים. השוואת השיטות השונות לזיהוי החיידק בצמחי פלרגוניום מאולחים הראתה שניתן לזהות בשיטות המולקולריות ריכוזים נמוכים שאינם מראים סימני מחלה.
4. ניסויים ראשוניים שנעשו במטרה לעקוב אחר התפשטות החיידקים בצמח הראו כי לאחר חודש ניתן לגלות את הפתוגן בגבעולים הקרובים והרחוקים מהגבעול המדבק. החזקת הצמחים למשך מספר ימים בטמפרטורה גבוהה גרמה לריבוי החיידקים. על ניסויים אלה יש לחזור מספר גדול של פעמים על מנת לאמת את התוצאות הראשוניות.

סיכום

1. מטרת המחקר היתה לפתח שיטות יעילות ורגישות לגילוי הפתוגן הנמצא בצורה סמויה בצמחי פלרגוניים.
 2. תוצאות המחקר הביאו לשיפור מהלך הבדיקה האימונופלורוסנטית. השיטה המולקולרית שנמצאה יעילה היא שיטת ה- BIO-PCR. במבחני פתוגניות נמצא הריכוז המינימלי הדרוש להופעת סימני מחלה.
 3. כתוצאה מהמחקר נבחר הפרוטוקול הטוב ביותר לגילוי ריכוז נמוך של הפתוגן בצמח, בזמן קצר יחסית ובעלות נמוכה. הפרוטוקול כולל בידוד החיידק מגבעולים של יחורים נבדקים על צלחות ובאמצעות השיטה האימונופלורוסנטית. תוצאות חיוביות מאושרות בשיטה ה-PCR.
 4. לימוד הגורמים להתרבות החיידק בצמח החל במהלך המחקר. נמצא שיש מעבר של החיידקים מהגבעול המודבק ליחורים חדשים. כמו כן נמצא כי בצמחים המוחזקים מספר ימים בטמפרטורה גבוהה התרבות החיידקים גדולה יותר. אולם בשל הוריאביליות הגדולה בין הצמחים יש לחזור על ניסויים אלו.
 5. הרצאה בכנס לשיטות דיאגנוסטיטיות של פתוגנים בצמחיים שנערך בגרמניה – בון, ספטמבר 1996.
- הרצאה בכנס של העמותה למדע ומחקר חקלאות וצמחיה שנערך במכון וולקני ב- 1997.

Manulis, S., Kogan, N., Valinsky, L., Levi, M. and Wieman, L. 1997.
 Detection of plant pathogenic bacteria in ornamentals by the PCR technique.
 In: Diagnosis and identification of plant pathogens, Pages 189-192. Dehne
 H.-W (ed.), Kluwer Academic Publishers