



מיזם חוס"ן – קלויבקטר

דו"ח מסכם לשנת 2009

נערך על ידי

דני שטיינברג

יוזמי המיזם

אלי מתן, יואל מסיקה, מורדי בטון, חזי אנטיגנוס.

חברי ועדת ההיגוי

מירון סופר (יו"ר), יענקלה מוסקוביץ, ליאור קטרי, עומר זאידן, מיקי קפלן, מאיר יפרח, חזי אנטיגנוס, ציון דקו, דני שטיינברג.

חברי הועדה המקצועית

דני שטיינברג (מרכז), גיורא קריצמן, שולמית מנוליס, אמנון קורן, מירון סופר, יואל חדד, שלי גנץ, יעל רקח, מאיר מזרחי, יוסי אביאיה מלאכי, שלמה ישראל, נטע מור, שלמה אילני, שמוליק גרוס.

החוקרים

שולמית מנוליס, גיורא קריצמן, מיכה רביב, שאול בורדמן, יפית כהן, ויקטור אלחנתי, יעל רקח, דני שטיינברג.

הבעות תודה

אנו מודים לרבים ששותפו, עזרו וביצעו את הפעילויות הרבות עליהן דווח כאן: לחנה יחזקאל, ליאנה גנות, מייקל לופטהאוס, בנימין אורן ושמואל ואקנין ממו"פ דרום; גלית שהרבני, אורית דרור, מנחם בורנשטיין ורן שולחני ממנהל המחקר החקלאי; ולליאת פסלר מהפקולטה לחקלאות ברחובות. אנו מודים לעשרות המגדלים שאיפשרו לסוקרים לבקר בחלקות הגידול שלהם לצורך ביצוע הסקרים וספקו את המידע הנדרש לצורך ניתוח הנתונים. תודה מיוחדת לשי ביטון ממושב מבטחים שאיפשר לבצע את ניסויי ההדברה במבני הגידול שלו. תודה לגורמים הממנים את המיזם, משרד החקלאות ופיתוח הכפר (דרך המדען הראשי של המשרד), מועצת הצמחים והקרן הקיימת.

תוכן העניינים

עמוד

4	דבר יו"ר ועדת ההיגוי ומרכז הועדה המקצועית
5	הפעילויות שבוצעו במסגרת המיזם
6	תקציר מנהלים
8	הגורמים המשפיעים על התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בזמן ובמרחב דני שטיינברג, גלית שהרבני, מנחם בורנשטיין, רן שולחני, מייקל לופטהאוס, בנימין אורן, שמואל ואקנין ושולמית מנוליס
25	השפעת תנאי הסביבה והפונדקאי על האלימות והתפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה שולמית מנוליס, גלית שהרבני, אורית דרור, מנחם בורשטיין, רן שולחני, ודני שטיינברג
41	מניעת ההפצה המשנית של מחלת הכיב הבקטריאלי מצמחים נגועים לצמחים בריאים דני שטיינברג, גלית שהרבני, מנחם בורנשטיין, רן שולחני, מייקל לופטהאוס ושולמית מנוליס
53	התמודדות עם מקורות המידבק הראשוני של מחלת הכיב הבקטריאלי בצמחי עגבנייה גיורא קריצמן ובני קירשנר
59	קומפוסט ככלי להפחתת נזקי קלויבקטר מיכאל רביב וגיורא קריצמן
63	בחינת הפוטנציאל של חישה תרמית לגילוי מוקדם של מוקדי קלויבקטר בעגבנייה ליאת פסלר, יפית כהן, ויקטור אלחנתי ושואל בורדמן
70	עמידות צמחי עגבנייה לתבדידים של החיידק <i>Clavibacter michiganensis</i> יעל רקח

דבר יו"ר ועדת ההיגוי:

מיזם חוס"ן קלויבסטר הוא מיזם דו משמעי:

המשמעות הראשונה, המחקרית. התמודדות עם מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבניות שטומנת בחובה פוטנציאל לגרום נזקים כבדים לענף חקלאי עיקרי במדינת ישראל. ענף שמפרנס מאות משפחות במישרין, וענף שיש בו השלכות כלכליות מעבר לאכילת פרי טרי, חשוב ככל שיהיה.

השנייה, בהגדרתו כמיזם.

זה מחקר רב תחומי ושותפים בו חוקרים רבים משטחי התמחות רבים. אבל, זה רק חלק מייחודו. צורת הארגון וניהול, והגמישות שבמיזם מהווה פריצת דרך בתחום המחקרים החקלאיים. קיימת אפשרות התאמת המחקרים להתקדמות ולתוצאות המתקבלות. כבר בשנה הראשונה צורה זו הוכיחה את יעילותה ומציבה אבני דרך למיזמים הבאים. נוצר מודל שראוי לחיקוי.

על העבודה המחקרית הרבה, והתוצאות המעוניינות, והחשובות, אפשר ללמוד מקריאת הדו"ח.

על חווית העבודה שלי, כמנהל המיזם בכפיפה אחת עם מיטב החוקרים בתחומים רבים, אי אפשר ללמוד מהדו"ח. אבל זו הייתה, ועודנה חווה של עשייה חשובה בשירות חקלאות ישראל. על כך, אני מודה לכל השותפים.

אני בטוח שבשנים הבאות של מיזם חוס"ן קלויבסטר נהיה עדים להגשמת כל המטרות של המיזם.

ומילת הערכה לממנים, המדען הראשי של משרד החקלאות ומועצת הצמחים. ללא מקור מימון, הצוות והארגון אינם יכולים להרים פרויקט כמו זה.

א'ר'ן סופר

דבר מרכז הועדה המקצועית:

מיזם חוס"ן קלויבסטר נולד בשטח. היזמים היו המגדלים, אנשי ההדרכה ואנשי המו"פ האזורי. ברוח זו הוגדרו יעדי המיזם: "לפתח אסטרטגיה למניעת הנזקים הנגרמים על ידי מחלת הכיב הבקטריאלי לעגבניות הגדלות בחממות ובבתי רשת ולמנוע את התבססות המחלה באזורים בהם היא לא נמצאת, וליישם את האסטרטגיה שתפותח בקנה מידה מסחרי". ועדת ההיגוי הנחתה את חברי הועדה המקצועית שיש להשיג את היעדים שהוגדו בתוך ארבע שנים. כדי לעמוד בדרישה זו היה צורך להקים מערך מחקרי ייחודי ולפעול במקביל, בכל הכיוונים.

הפעילויות המחקריות שבוצעו בשנת המיזם הראשונה מסוכמות בחוברת זו. בשנה זו ביצעו סקרים בחלקות מסחריות בהיקף חסר תקדים, בוצעו ניסויים במבני גידול מסחריים, באתר הקרנטינה במו"פ דרום, בחממות ובתי רשת בפקולטה לחקלאות, במכון וולקני ובנווה יער, ובמעבדות החוקרים. המחקרים שבוצעו עוסקים בתחום היישומי ובתחום הבסיסי כאחד. הממצאים שהושגו אפשרו, כבר לאחר שנה לשנות ולשפר את ההמלצות להתמודדות עם המחלה.

מחלת הכיב הבקטריאלי נפוצה במרבית המדינות בעולם בהם מגדלים עגבניות. בראשית מרץ 2010 נסעתי לביקור מקצועי בתורכיה ולמדתי שהמחלה מהווה גורם משמעותי בגידול העגבניות גם שם. למדתי גם, שהידע שצברנו בארץ בשנה הראשונה של המיזם הוא חסר תקדים. אנו מתחילים להבין טוב יותר מהיכן מגיע המידבק, איך הוא נפוץ במרחב, איך משתנה רגישות הפונדקאי במהלך הזמן, איך משפיעים תנאי הסביבה ומה הקשר בין כל אלה להתפרצות המחלה. ההבנה של המערכת הביולוגית המורכבת היא תנאי לפיתוח ממשק יעיל למניעת נזקי המחלה.

בשני תחומים נבדל מיזם חוס"ן קלויבסטר מתוכניות מחקר "רגילות": קשרי העבודה ההדוקים והחלפת המידע הרציף בין החוקרים השותפים במיזם והקשר הבלתי אמצעי עם "השטח". שניהם חיוניים להשגת היעד השאפתני אותו לקחנו על עצמנו.

ד'נ' '68 י'א'ר'ד

הפעילויות שבוצעו במסגרת המיזם

מרכז/מריצה	הפעילות	משתתפים	האירוע	מקום	תאריך
דני	הגאת המיזם	מדלי ענביות מאזור הבשור	מפגש מדגלים - חברת הזרע	מרכז קהילתי אבשלום	26/06/2008
דני	דיון על תוכנית העבודה לשנת 2009	הועדה המקצועית של המיזם	דיון	מכון וולקני	16/12/2008
דני	הגאת המיזם	ההנהלה המקצועית של הענף	מפגש של הועדה המקצועית לענביות למאכל	מכון וולקני	12/01/2009
מירון	דיון על תוכנית העבודה לשנת 2009	וועדת ההיגוי של המיזם	דיון	מכון וולקני	28/01/2009
דני	הגאת המיזם	חברי העמותה לפיתוחתולוגיה	ועידה השנתית של העמותה הישראלית לפיתוחתולוגיה	מכון וולקני	09/02/2009
דני	הגאת המיזם בפוסטר	פסח לקהל	יום פסח	בשור	04/03/2009
דני	הגאת המיזם וסיום בניסויים	השותפים בתוכנית DFG וקהל	מפגש DFG	מכון וולקני	15/03/2009
דני	הגאת המיזם	מדלי ענביות	מפגש מדגלים - זרעים גדרה	גבעת ברנר	01/04/2009
דני	הגאת המיזם	מדגלים	כנס מדגלים מיוחד	בשור	14/05/2009
חוקר המיזם	דיווח ועידתן על הניסויים המתבצעים על ידי החוקרים	ועדה ההיגוי והועדה המקצועית של המיזם	דיון	חות הבשור	18/06/2009
דני	הגאת המיזם	חברת המחלקה לפתולוגיה	סמינר מחלקתי	מכון וולקני	01/07/2009
דני	הגאת המיזם	מדלי ענביות מרמת הגלב	יום עין ענביות	מ"פ רמת גלב	05/07/2009
חוקר המיזם	הגאת הממצאים וסיום בניסויים	חברי ועדת ההיגוי והוועדה המקצועית	דו"ח ביניים על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	חות הבשור	24/11/2009
מירון	דיון על הממצאים ואישור תוכנית עבודה ל- 2010	חברי ועדת ההיגוי	דיון על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	חות הבשור	24/11/2009
דני	הגאת הממצאים וסיום בניסויים	מדלי ענביות מאזור הבשור	דיווח על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	חות הבשור	29/12/2009
דני	דיווח על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	חברי ועדת DSH	מפגש של DSH ישראל	ברורים	19/01/2010
דני	דיווח על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	חברי העמותה	כנס של העמותה הישראלית לגידול וירקות	פקולטה לחקלאות	02/02/2010
מנחם	דיווח על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	חברי העמותה לפיתוחתולוגיה	ועידה השנתית של העמותה הישראלית לפיתוחתולוגיה	מכון וולקני	08/02/2010
דני	סיום באגרי הניסויים	מדגלים, אנשי חברות ומבקרים	יום פסח	מ"פ דרום	24/02/2010
דני	דיון על תוכנית העבודה לשנת 2010	הועדה המקצועית של המיזם	דיון	מכון וולקני	01/03/2010
דני	דיווח על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	דיווח על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	מפגש מדגלים - זרעים גדרה	מבטחים	07/03/2009
דני	דיווח על ממצאי המחקרים בשנה הראשונה	מדגלים	מפגש מדגלים	שקף	24/03/2009

תקציר מנהלים

מחלת הכיב הבקטריאלי נגרמת על ידי הפתוגן *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. המחלה גורמת לנזקים קשים בעגבניות, עד כדי השמדת הגידול. יעדי מיזם חוס"ן קלויבקטר (כפי שהוגדרו על ידי ועדת ההיגוי) הם לפתח אסטרטגיה למניעת הנזקים הנגרמים על ידי מחלת הכיב הבקטריאלי לעגבניות הגדלות בחממות ובבתי רשת ולמנוע את התבססות המחלה באזורים בהם היא לא נמצאת וליישם את האסטרטגיה שתפותח בקנה מידה מסחרי. מטרות המחקרים שבוצעו בשנת 2009, שנת המיזם הראשונה, היו: 1. לכמת את הגורמים המשפיעים על התפתחות המחלה בזמן ובמרחב; 2. לפתח אמצעים יעילים להתמודדות עם מקורות המידבק ההתחלי העיקריים; 3. לפתח אמצעים יעילים למניעת ההפצה המשנית של הפתוגן מצמחים נגועים לצמחים שכנים, בריאים; 4. לבחון את תרומת העמידות הגנטית. במסגרת זו ביצענו סקרים בחלקות מסחריות באזור הבשור בהיקף חסר תקדים, ניסויים ותצפיות במבני גידול מסחריים, ניסויים באתר הקרנטינה במו"פ דרום, בחממות ובבתי רשת בפקולטה לחקלאות, במכון וולקני ובנווה יער, וניסויים במעבדות החוקרים במוסדות השונים. המחקרים שבצענו עסקו בתחום היישומי ובתחום הבסיסי כאחד.

המחלה זוהתה בשנת 2009 ב - 53% מהחלקות הגידול שנכללו בסקר בחבל הבשור. בניתוח הנתונים שנאספו עלה שמקורות המידבק ההתחלי העיקריים (לא לפי סדר החשיבות) הם מבני הגידול עצמם ונראה שגם מהשתילים המגיעים מהמשתלות. מצאנו שהמחלה מופצת בעיקר לאורך שורות הגידול ושישנם מצבים בהם המחלה מופצת למרחקים (לעיתים של עשרות צמחים) ממוקדי הנגיעות הראשוניים ומצבים אחרים בהם המחלה מופצת מהמוקדים רק למרחק של צמחים בודדים, או בכלל לא. נגיעות בחומרה גבוהה התפתחה בשתילות פברואר-מרץ כשהצמחים גדלו בתחילת הקיץ כשטמפרטורות היו מתונות. בשתילות סוף הסתיו (כשהצמחים גדלו במשך החורף, כשהטמפרטורות היו נמוכות) ובשתילות מאי-יוני (כשהצמחים גדלו בקיץ, כשהטמפרטורות היו גבוהות) משך הזמן שעבר מהשתילה ועד להופעת נגיעות גבוהה היה ארוך יותר, וחומרת המחלה הייתה נמוכה יותר.

בניסויים שנעשו במכון וולקני נמצא כי צמחים צעירים רגישים יותר למחלה ומתמוטטים מהר יותר מצמחים מבוגרים. גם כאשר האילוח נעשה בעלים צעירים לעומת עלים מבוגרים יותר נמצא כי שכיחות המחלה גבוהה יותר. בניסויים אלה לא נמצא קשר לרמת האכלוס בצמחים, כלומר רמת החיידקים בצמח וברקמה הצעירים לא היו שונים במובהק מאלו של צמחים ורקמות מבוגרים. מסדרת ניסויים אחרת עלה שהמחלה מופצת למרחקים גדולים בתוך השורות כאשר הפעולות

האגרוטכניות בתחילת הגידול מתבצעות כשהצמחים רטובים מדמיעה או מטל/גשם. זו דרך ההפצה העיקרית של המחלה ובעטייה נגרם מרבית הנזק. פעולות הגיזום, הזירוד וההדליה המבוצעות במהלך כל תקופת הגידול גם כן מפיצות את המחלה, אך למרחקים קצרים. הפתוגן גם מופץ בדרך האוויר אך במרבית המקרים הצמחים שאולחו בדרך זו לא מראים את תסמיני המחלה האופייניים. ממצאים אלה שמשו לפיתוח מודל קונספטואלי המסביר את דרכי ההפצה המשנית ולפיתוח ההמלצות למגדלים שיאפשרו להפחית, או אף למנוע, את ההפצה המשנית.

אימתנו את העובדה שהוכחה על ידנו בשנים הקודמות כי עיקר מקור המדבק הקרקעי והישרדות הפתוגן בקרקע לאורך זמן נמצאים בקשר הדוק לנוכחות שאריות צמחים העמוסות בפתוגן ומוצנעות בקרקע. נמצא כי סילוק החומר האורגני מהקרקע באופן ידני [לצרכי מחקר] הביא לאחר תקופה קצרה להעלמות הפתוגן מהקרקע אל מתחת לסף הגילוי. כמו כן נמצא כי שאריות צמחים שנקצצו עי ידי מכשירי עיבוד ונשארו בקרקע שדושנה בחנקן והפעילות המיקרוביאלית שלה עודדה על ידי שמירת הלחות של הקרקע על ידי השקיה למשך 3 שבועות איבדה חלק מאוכלוסיית הפתוגן וכושר ההישרדות שלו לאורך זמן נפגם.

האפשרות להפחית אוכלוסיית החיידקים ברקמות של צמחי עגבנייה שהיו מאולחים בגורם המחלה נבדקה בתנאי מעבדה בעזרת קומפוסטים. נמצא כי תהליך הקומפוסטציה הביא להכחדה מלאה של החיידקים בתוך כ – 140 יום, דבר המאפשר שימוש בחומר גלם רב ערך זה.

במחקר אחר בחנו את האפשרות להשתמש בחישה תרמית לגילוי מוקדם של נגיעות צמחי עגבנייה במחלה בשלב המשתלה. בניסויים ראשונים נמצאה מגמה של עליה בטמפרטורת העלים של צמחים נגועים, אם כי יש לחזור ולבדוק באם מגמה זו משמעותית.

לפתוגן המחולל את מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבניות מספר קבוצות גנטיות אך אין מידע אם קיימים הבדלים באלימות בין הקבוצות. מהיבט אחר, אין בארץ זני עגבניות מסחריים העמידים לחיידק. במחקר שבוצע בחממות הפקולטה לחקלאות מצאנו שני קווים בעלי עמידות טובה כנגד הפתוגן ועוד קו בעל עמידות בינונית, שניתן יהיה להשתמש בהם כמקורות עמידות לטיפול זנים עמידים. בניסויים שערכנו נמצאו הבדלים באלימות התבדידים: חלק מהתבדידים היו בעלי אלימות גבוהה ואחרים שגרמו היו בעלי אלימות נמוכה. לעומת זאת, לא נמצאו הבדלים מובהקים באלימות בין תבדידים מהקבוצות הגנטיות השונות ובכל קבוצה היו תבדידים בעלי אלימות גבוהה ותבדידים בעלי אלימות נמוכה כלפי הזנים שנבחנו.

הגורמים המשפיעים על התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בזמן ובמרחב

דני שטיינברג¹, גלית שהרבני¹, מנחם בורנשטיין¹, רן שולחני¹, מייקל לופטהאוס², בנימין אורן²,
שמואל ואקנין² ושולמית מנוליס¹

¹המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מינהל החקר החקלאי, בית דגן
²חווה הבשור, מו"פ דרום

1. תקציר

מחלת הכיב הבקטריאלי הנגרמת על ידי הפתוגן *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* היא מחלה פוליציקלית. המגיפה מתחילה במספר קטן של צמחים שאולחו ממקורות המידבק הראשוני ולאחר מכן מופצת מהם לצמחים השכנים, הבריאים. מטרות המחקר היו 1. לקבוע מהם מקורות המידבק הראשוני ודרכי ההפצה המשנית העיקריים של המחלה; 2. לכמת את ההשפעה של גורמים שונים על התפתחות המחלה בחלקות מסחריות; ו - 3. לבחון את ההשפעות של סוג הרקמה המאולחת, מקור המידבק הראשוני ותגובת זנים שונים על משך זמן ההדגרה ועל צורת התסמינים המתפתחים בצמחים הנגועים. במהלך שנת המחקר הראשונה בצענו שני סקרים באזור הבשור (הסקר המקיף והסקר המפורט). הסקר המקיף בוצע ב - 226 חלקות והסקר המפורט ב - 15 חלקות. המחלה זוהתה בשנת 2009 ב - 53% מהחלקות הגידול שנכללו בסקר בחבל הבשור. בניתוח הנתונים שנאספו עלה שמקורות המידבק ההתחלי העיקריים הם מבנה הגידול עצמו ונראה שגם מההשתילים המגיעים מהמשתלות. לגבי ההפצה המשנית, מצאנו שהמחלה מופצת בעיקר לאורך שורות הגידול ושישנם מצבים בהם המחלה מופצת למרחקים (לעיתים של עשרות צמחים) ממוקדי הנגיעות הראשוניים ומצבים אחרים בהם המחלה מופצת מהמוקדים רק למרחק של צמחים בודדים, או בכלל לא. משך זמן הדגירה וחומרת המחלה הושפעו ממקור המידבק ההתחלי והרקמה המאולחת. תסמיני המחלה האופייניים זהו בכל המקרים במהלך של עד חודש לאחר האילוח, בלי תלות במקור המידבק ובאיבר הצמחי המאולח. אבל, נגיעות בחומרה גבוהה התפתחה רק במקרים בהם האיבר הצמחי המאולח היה השורשים או העלים, בתנאי שהצמחים היו צעירים בזמן האילוח. משך זמן הדגירה וחומרת המחלה הושפעו גם מתנאי הסביבה. נגיעות בחומרה גבוהה התפתחה בשתילות פברואר-מרץ כשהצמחים גדלו בתחילת הקיץ כשהטמפרטורות היו מתונות. בשתילות סוף הסתיו (כשהצמחים גדלו במשך החורף, כשהטמפרטורות היו נמוכות) ובשתילות מאי-יוני (כשהצמחים גדלו בקיץ, כשהטמפרטורות היו גבוהות) משך הזמן שעבר מהשתילה ועד להופעת נגיעות גבוהה היה ארוך יותר, וחומרת המחלה הייתה נמוכה יותר.

2. מבוא

הפתוגן *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* מחולל את מחלת הכיב הבקטריאלי (bacterial canker) בעגבניות. זו מחלה סיסטמית בעיקרה ואחת החשובות והמגבילות בגידול עגבניות. המחלה גורמת לנבילה, התנוונות כללית ולתמותת הצמחים בכל שלבי הגידול. מחולל המחלה ידוע כמועבר בזרעים בתוכם או על-פני הקליפה והמקור העיקרי לאילוח חלקות מרוחקות הוא זרעים. החידק יכול לשרוד גם בקרקע למשך מספר שנים בשאריות צמחים. שיירי צמחי עגבניה נגועים שנשארים על פני הקרקע ובתוכה, או צמחים אחרים ממשפחת הסולנניים יכולים להוות מקור להדבקה. 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, לחידק זה יש יכולת להתרבות כאנדופיט (ללא יצירת סימפטומים) על צמחים שונים ממשפחת הסולנניים, כולל עגבניה. לתכונה זו עשויה להיות השפעה חשובה על תפוצת המחלה. בתנאי מגיפה האוכלוסייה מתרבה ומגיעה לרמה גבוהה. הזמן החולף בין ההדבקות במחולל המחלה ובין הופעת התסמינים תלוי במספר גורמים: גודל אוכלוסיית החידקים, גיל הצמחים, רמת העמידות, האיבר הצמחי הנדבק ותנאי הסביבה. בטמפרטורות של 24 – 27 מעלות צלזיוס משך זמן ההדגרה הוא 4 עד 6 שבועות בצמחים בוגרים. בצמחים צעירים משך זמן זה קצר יותר. התפשטות החידק בשטחי הגידול נובעת ממקורות האילוח הראשוניים – זרעים או קרקע, בנוסף מי השקיה, כלי עיבוד, חומרי אריזה, מבקרים ועובדים, מגע בצמחים לצורך קטיף, גיזום, הדליה, סופות חול, שטחים שכנים וסניטציה גרועה. החידק יכול לחזור לצמח בדרכים רבות ומגוונות החל ממערכת השורשים, גבעול, ענפים, ואפילו דרך הטריכומות ומערכת ההידטודות בעלים. הסימנים העיקריים של המחלה כוללים התקפלות עלים, צריבה של שולי העלים, נבילה של העלים, איבוד טורגור של הצמח, הופעת נקודות עם הילות

על הפירות - סימפטום המכונה "עין הציפור", כיבים כהים בגבעול העצה המקבלת פיגמנט כהה כעין חלודה ויצירת שורשים אדוונטיבים. בנוסף, החידק מייצר רעלן גליקופטיד.

מקור המידע שפורט למעלה הוא ממחקרים שבוצעו במקומות שונים בעולם. הידע הוא רב, אך לא ברור מה מכל הידוע לגבי מקורות המידבק הראשוני, דרכי ההפצה המשנית והתסמינים מתקיים גם בישראל. לדעותינו לא כל מקורות המידבק הראשוני האפשריים, ולא כל דרכי ההפצה המשנית האפשריים (על פי הספרות המקצועית) חשובים כאן באותה המידה. איתור מקורות המידבק הראשוני העיקריים ודרכי ההפצה המשנית החשובות בישראל הם תנאי לפיתוח גישות יעילות להתמודדות עם המחלה.

משיחות עם מגדלים באזור הבשור התברר שמחלת הכיב הבקטריאלי התפתחה אצל חלק מהם בעוצמה רבה אבל אצל אחרים המחלה לא התפתחה כלל או שעוצמתה הייתה נמוכה. שונות בעוצמת המחלה נצפתה אפילו בין מבנים סמוכים. יותר מכך, היו מקרים בהם התפתחה מחלה בעוצמה רבה בעונה אחת ולאחר שהמגדלים ביצעו פעולות מסוימות חומרת הנגיעות בשנה העוקבת פחתה והיו מקרים בהם המחלה לא התפתחה כלל. בגלל מורכבות ממשק הגידול לא ניתן תמיד להקיש בבירור אילו מהפעולות שביצעו (או שלא ביצעו) המגדלים הביאו לתוצאה זו. חלק זה של המחקר מבוסס על ההנחה שמידע מהימן אודות הפעולות שבצעו המגדלים יאפשר להגדיר מדוע המחלה מתפתחת במבנים מסוימים, אצל מגדלים מסוימים, ובמבנים אחרים ואצל מגדלים אחרים – לא.

מטרות המחקר הם :

1. לאפיין את צורת הפיזור המרחבי של מוקדי המחלה הראשוניים ושל ההפצה המשנית (ברזולוציה של מבנה, אזור ובקנה מידה ארצי) כדי לקבוע את מקורות המידבק הראשוני ודרכי ההפצה המשנית העיקריים.
2. לכמת את ההשפעה של גורמים שונים על התפתחות המחלה בחלקות מסחריות
3. לבחון את ההשפעות של סוג הרקמה המאולחת, מקור המידבק הראשוני ותגובת זנים שונים על משך זמן ההזדגרה ועל צורת התסמינים המתפתחים בצמחים הנגועים.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

3.1. התפתחות המחלה בזמן ובמרחב

3.1.1. הסקר המקיף

מידע אודות הופעת מחלת הכיב הבקטריאלי והתפתחותה נאסף בסקר שבוצע בחלקות גידול מסחריות באזור הבשור ורמת הנגב. בכל אחד מהישובים בהם מגדלים עגבניות נבחרו מספר מגדלים (שהסכימו שהסוקרים יבקרו במבני הגידול שלהם) ואצל כל אחד מהם נסרקו מספר מבני גידול. הסקר החל בתחילת חודש מאי 2009 ונמשך עד היום. במהלך הביקור הראשון נרשם מידע כללי אודות המבנה, כלהלן: סוג המבנה (בית רשת, חממה, מינחרה עבירה), גודל המבנה (בדונמים), מועד השתילה, הזן, נקודת הציון של המבנה. הסוקרים ביקרו בכל אחד מהמבנים הנסקרים מידי חודש, מהמועד בו נוצר הקשר עם המגדל ועד לסיום הגידול במבנה. מספר הפעמים בו ביקרו הסוקרים בכל אחד ממבני הגידול נע מפעם אחת ועד לשבע פעמים (הממוצע היה 3-4 פעמים). בכל אחד מהביקורים במבנה, הסוקרים עברו בין שורות הצמחים הלוח וחזרו. מספר השורות הנסקרות בכל מבנה היה תלוי בגודלו, אבל מספר השורות שנסקרו בכל מבנה לא פחת מ-10. תוך כדי הליכה סימנו הסוקרים על גבי תרשים של המבנה את מקום הליכתם ובאם זיהו צמחים שהיו עליהם תסמיני המחלה האופייניים. לאחר סיום הסקירה, הוערכה רמת הנגיעות הכללית של החלקה הנסקרת על פי סולם שכלל 6 דרגות (טבלה 1). במקרים בהם זוהו התסמינים לראשונה במבנה מסוים או כשהייה ספק בזיהוי, השתמשו הסוקרים בקיט של חברת Agdia כדי לאמת את הזיהוי. מכל אחד מהמבנים בהם זוהתה נגיעות נלקחה דגימה צמחית שהועברה למעבדה של ד"ר שולמית מנוליס לקביעת הטיפוס של התבדיל בשיטת Pulse field.

לאחר סיום הסקר המקיף נפגשו הסוקרים עם המגדלים למילוי שאלון מפורט. בשאלון נאסף מידע אודות **החלקה** (המשתלה ממנה נרכשו השתילים; הגידול הקודם; מועד סיום הגידול הקודם), **הפעולות האגרוטכניות שבוצעו** (האם בוצע חיטוי כימי לפני הגידול, ואיזה; האם בוצע חיטוי סולארי; האם בוצע חיטוי חלל; האם חוטי ההדליה הוחלפו לפני השתילה; האם מערכת הטפטוף הוחלפה לפני השתילה; ומידע אודות הניידות של הפועלים והציוד החקלאי), **ומידע אודות המחלה** (האם נעשו פעולות להתמודדות עם המחלה לפני ובמהלך הגידול, האם הייתה נגיעות בחלקה בעבר ומה הייתה חומרתה, ואם ידוע למגדל על נגיעות בחלקות גידול סמוכות). כל הנתונים נשמרו בקובץ אקסל שכלל רשומות. כל רשומה הכילה את כל המידע שנאסף אודות חלקת גידול מסוימת.

טבלה מספר 1. הסולם ששימש להערכת רמת הנגיעות בחלקות הסקר המקיף

דרגה	רמת נגיעות	תיאור מילולי
0	מבנה בריא	תסמיני המחלה לא נראו בצמחים כלל
1	נוכחות	במבנה היו צמחים בודדים עם התסמינים האופייניים. הנגיעות נראתה על העלים בלבד, אין צמחים בנגיעות בינונית או קשה
2	נגיעות נמוכה	במבנה היו צמחים עם התסמינים האופייניים (עד 5% מהצמחים). הנגיעות הייתה בעלים בלבד, או שהיה מספר קטן של צמחים עם נגיעות בינונית או קשה.
3	נגיעות בינונית	במבנה היו צמחים רבים עם התסמינים האופייניים (בין 5 ל - 30% מהצמחים) של המחלה. היו גם צמחים עם נגיעות בינונית או קשה.
4	נגיעות גבוהה	במבנה היו צמחים רבים מאד עם התסמינים האופייניים (יותר מ - 30% מהצמחים) של המחלה. צמחים רבים היו עם נגיעות בינונית או קשה.
5	נגיעות גבוהה מאד	רוב הצמחים במבנה היו פגועים בנגיעות בינונית או קשה. מעשית, הגידול "הושמד".

בדו"ח זה יוצגו ממצאי הסקר המתייחסים לחלקות בהן בוצעו השתילות בתקופה שהחלה באוגוסט 2008 והסתיימה בספטמבר 2009. לא כללנו בניתוח הנוכחי חלקות שנשתלו מאוחר מספטמבר 2009 מפני שמצאנו שבחלקות אלה הנגיעות לא היגיעה לחומרתה המרבית בזמן ניתוח הנתונים (מרץ 2010). הנתונים שנאספו בסקר נותחו בחתכים שונים שיפורטו בהמשך. בשלב הראשון בוצעו חתכים המתארים מידע סטטיסטי (כמו למשל, התפלגות השטח של מבני הגידול השונים). המדד בו השתמשנו במקרה זה היה שטח הגידול, בדונמים והממצאים הוצגו כערכי שכיחות המתארים את השטח היחסי של כל מדד (למשל, מה הייתה הפרופורציה של השטח שנשתל בחממות, בבתי רשת ובמינהרות עבירות). מאחר ולא כל הרשומות הכילו מידע אודות כל המדדים, בכל הצגה צוין מה היה השטח (בדונמים) שבו השתמשנו לצורך החישוב. בשלב הבא נבחן הקשר בין מדדים שונים לחומרת המחלה. במקרה זה השתמשנו (לתיאור המחלה) בכמה מדדים שונים, כלהלן: (1) שטח הגידול היחסי (באחוזים) בו התפתחה נגיעות בינונית או גבוהה (דרגות 3+4 מטבלה 1). לדוגמא, מתוך סך שטח הגידול בבתי רשת, מה הפרופורציה של השטח שהיה נגוע בדרגות 3+4; (2) החודש בו זוהתה המחלה לראשונה במבנה הגידול. במקרה זה השתמשנו רק ברשומות בהן הייתה בדיקה אחת או יותר בהן לא זוהתה המחלה כלל (דרגה 0, טבלה 1) ולאחריה בדיקה על נגיעות בדרגה 1 ומעלה; (3) החודש בו הנגיעות היגיע לחומרתה המרבית. במקרה זה השתמשנו רק ברשומות בהן זוהתה נגיעות בכל רמה שהיא.

3.1.2 הסקר המפורט

בחישה עשר מבנים בהם זוהו תסמיני המחלה האופייניים הראשונים בצענו סקר מפורט. בכל מבנה סומן שטח מוגד (של 4-6 ערוגות לרוחב, לאורך של 32-48 מ' לאורך). הסוקרים ביקרו בחלקות הסקר המפורט מדי שבוע. בכל מועד הם סרקו ויזואלית את כל הצמחים שהיו באזור המסומן והעריכו בכל אחד מהם את חומרת הנגיעות תוך שימוש בסולם בן 5 דרגות, כלהלן: (1) צמחים בריאים: צמחים שלא נראו עליהם תסמיני המחלה אופייניים (יתכן שצמחים אלה היו מאוכלסים בפתוגן); (2) נגיעות נמוכה: צמחים שעל חלק מהעלעלים, או העלים שלהם, נראו תסמיני המחלה האופייניים. במבט כללי נראו הצמחים חיוניים. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים לא עלה על 10%; (3) נגיעות בינונית: צמחים אלה היו עלים רבים שנפגעו מהמחלה, אך חלק מהעלים נראו לא פגועים. הצמחים לא החלו לכמוש. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים לא עלה על 40%; (4) נגיעות גבוהה: צמחים אלה מרבית העלים נפגעו מהמחלה, או שהצמחים היו בשלבי כמישה ראשוניים. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים עלה על 50% אך עדיין היו עלים שנראו לא פגועים; (5) צמחים מתים: צמחים שמתו (או כמשו) כתוצאה מהתפתחות המחלה. מאחר והסולם בו השתמשנו הוא לא סולם כמותי (משתנה סדר ולא משתנה רציף) לא חושבו ערכי נגיעות ממוצעים עבור צמחים שונים של אותו הטיפול. במקום זאת, השתמשנו במדדים שונים של שכיחות (באחוזים). למשל, שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה האופייניים (נגיעות בדרגה של $1 <$); שכיחות הצמחים שהתפתחה בהם נגיעות בחומרה גבוהה ומעלה (נגיעות בדרגות 4 ו - 5). נתוני השכיחות הם נתונים כמותיים (משתנה רציף) והם שימשו לתיאור עקומי התפתחות המחלה לאורך זמן. מאחר והמעקב היה רציף, ניתן היה לקבוע כמה מוקדי מחלה ראשוניים היו באזורים הנסקרים ומה היה מספר הצמחים הנגועים בכל כתם, בכל מועד הערכה. הפיזור המרחבי של המחלה באחת החלקות תואר באמצעות תוכנת GS+ המאפשרת לצייר מפות מרחביות כשצבעים שונים משמשים לביטוי עוצמת המחלה במרחב.

3.2. הגורמים המשפיעים על התפתחות המחלה בחלקות מסחריות

השפעת פעולות שונות שבצעו המגדלים על התפתחות המחלה נבחנה תוך שימוש בנתונים שנאספו בסקר המקיף. הניתוח בוצע על כל הרשומות שהכילו את המידע הרלוונטי, בחתכים שונים. הניתוחים בוצעו כמפורט בסעיף 3.1.1. לעיל.

3.3. הגורמים המשפיעים על משך זמן ההדגרה ועל צורת התסמינים המתפתחים בצמחים הנגועים

3.3.1. סוג הרקמה המאולחת

בניסוי שבוצע במכון וולקני נבחנה השפעת סוג הרקמה המאולחת על התפתחות תסמיני המחלה וחומרתם. צמחי עגבנייה מהזן 1225 נשתלו במצע מנותק (שקיות HOT) בבית רשת בתאריך 23 למרץ, 2009. הצמחים אולחו בתרחיף חיידקים בריכוז של 10^8 חיידקים לסמ"ק בטבילת שורשים, בעלים התחתונים (על ידי גזירה של עלים באמצעות מספריים שנטבלו בתרחיף החיידקים) או בפרחים (שרוססו עד גזירה בתרחיף החיידקים). כל טיפול כלל 20 צמחים שונים. הופעת תסמיני המחלה וחומרתם על כל אחד מהצמחים נרשמה מידי שבוע, במשך כל תקופת ביצוע הניסוי, תוך שימוש בסולם בן 5 דרגות שפורט בסעיף 3.1.2. לעיל. שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה האופייניים (נגיעות בדרגה של $1 <$); שכיחות של הצמחים שהתפתחה בהם נגיעות בינונית או גבוהה (דרגות 3-5) ושכיחות הצמחים בחומרה גבוהה ומעלה (נגיעות בדרגות 4 ו-5) שימשו לתיאור עקומי התפתחות המחלה לאורך זמן. העקומים היו עקומים סיגמואידים וחישבנו עבורם משוואות רגרסיה תוך שימוש בנוסחה: $Y = a / (1 + e^{-(X - X_0)/b})$ כאשר, Y = שכיחות הצמחים המאולחים; X = זמן (בימים) ממועד השתילה; a = הפרמטר הראשון של המשוואה המבטא את האסימפטוטה העליונה (מידת הנגיעות המרבית); X_0 ו- b = הפרמטר השני והשלישי של המשוואה המתארים את מקום נקודת הפיתול וקצב התקדמות המחלה, בהתאמה. כאשר משוואות הרגרסיה היו מובהקות, חישבנו שני מדדים המתארים את עקום התפתחות המחלה: Y_{max} = שכיחות המחלה המרבית (באחוזים) שנאמד על פי משתנה a של המשוואה; ערך T_{50} = הזמן (בימים) שעבר מהשתילה ועד למועד בו הייתה שכיחות המחלה 50% מהערך של Y_{max} .

3.3.2. מקור המידבק הראשוני

בחוות הבשור בצענו ניסוי בו בחנו את השפעת מקור המידבק הראשוני על התפתחות תסמיני המחלה וחומרתם. שתילים מהזן 1225 נשתלו בתאריך 27 ליוני 2008 בשקיות של מצע מנותק. הניסוי כלל ארבעה טיפולים כלהלן: (1) צמחי היקש שלא אולחו; (2) צמחים שאולחו בזמן השתילה על ידי טבילת השורשים שלהם בתרחיף חיידקים; (3) צמחים שנשתלו בריאים, ושבמצע הגידול שלהם הוכנסו שורשים שנלקחו מצמחי עגבנייה נגועים במחלת הכיב הבקטריאלי; (4) צמחים שנשתלו בריאים לתוך מארז של מצע מנותק באורך של 1 מ'. הצמח הקיצוני בכל מארז נשתל לאחר שהוא אולח בשורשים (כמו טיפול 2) והוא שימש כמקור המידבק הראשוני לצמחים האחרים במארז שנשתלו בריאים. כל טיפול כלל 16 צמחים. הערכות הנגיעות ודרך ניתוח הנתונים בוצעו כמפורט למעלה.

3.3.3. תגובת זנים שונים למחלה

בחלק מהניסויים שבצענו במחקר השתמשנו ביותר מזן אחד. השתמשנו בנתונים שנאספו בניסויים אלה כדי לבחון אם יש הבדלים בתגובת הזנים בהם השתמשנו למחלה. הצמחים אולחו בשיטת המספריים המאולחות או בטבילת השורשים בזמן השתילה. הנגיעות הוערכה מידי שבוע והנתונים נותחו כפי שצוין למעלה. בנוסף, ניתחנו נתונים שנאספו במבחן זני צירי שבוצע בחוות הניסויים ברמת הנגב על ידי שלי גנץ וצוות החווה. התברר שהצמחים שנכללו בניסוי נדבקו באופן טבעי במחלה. חומרת המחלה הייתה נמוכה ובהערכה הערכנו את שכיחות הצמחים שעל העלים שלהם נראו עליהם תסמיני המחלה האופייניים. כל הזנים הושקו במים שפירים וחלקם גודלו בסמוך, והושקו במים מליחים. דבר זה איפשר לנו לבחון את השפעת סוג מי ההשקיה על התבטאות תסמיני המחלה.

3.4. ניתוחים סטטיסטיים

השתמשנו בתוכנות JMP, Excel ו- SigmaPlot לביצוע הניתוחים הסטטיסטיים. בכל מקרה השתמשנו במבחן המתאים. בין היתר, נותחו הנתונים באמצעות מבחני ANOVA חד-ודו-כיווניים. כשערכי ה- F היו מובהקים נקבעו ההבדלים בין הטיפולים באמצעות מבחן HSD ברמת מובהקות של $P=0.05$. חלק מהנתונים נותחו באמצעות רגרסיה פשוטה, רגרסיה מרובת משתני או רגרסיה לא-ליניארית. במקרים אלה הוצג מתאם המתאם המרובה (r^2) וערך המובהקות (P) של משוואת הרגרסיה. כאשר הנתונים שנאמדו היו לא פרמטריים אלא משתני סדר (כמו הסולם להערכת רמת הנגיעות המופיע בטבלה 1), הנתונים לא נותחו באמצעות מבחני ANOVA (המתאימים למשתנים רציפים). במקום זה, השתמשנו במבחן χ^2 לבחינת ההבדלים בין ערכי

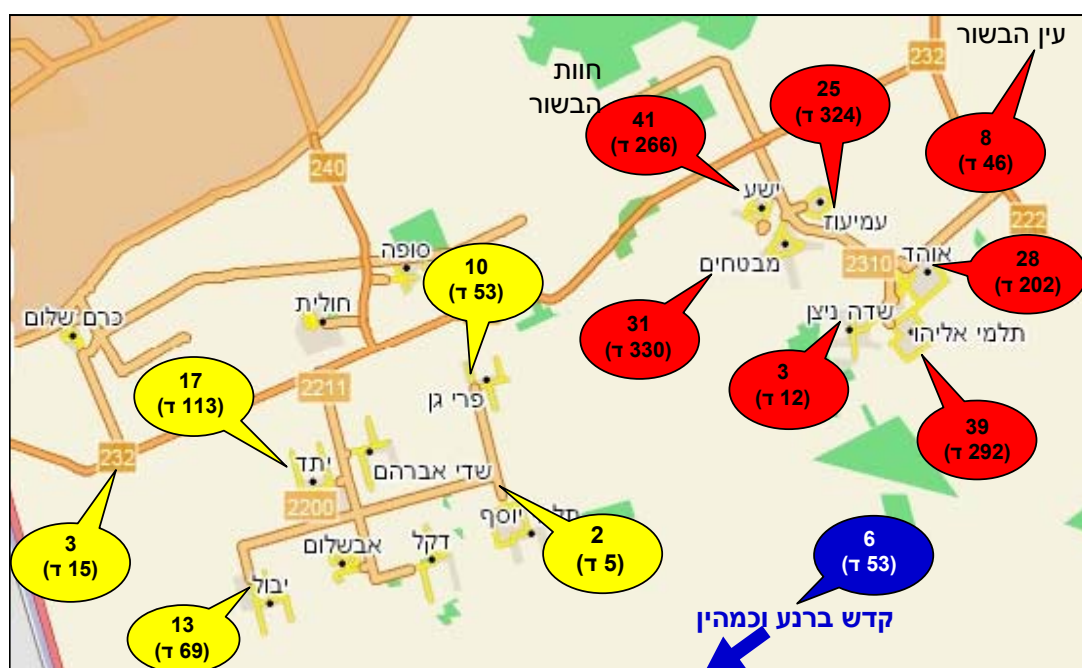
השכיחות השונים. המקרים בהם בוצעו ניתוחים סטטיסטיים נוספים יוצגו בפרק התוצאות, להלן. במספר מקרים הוצגו הממוצעים וערכי השונות (שגיאת תקן) של הממוצע.

4. תוצאות

4.1. התפתחות המחלה בזמן ובמרחב

4.1.1 הסקר המקיף

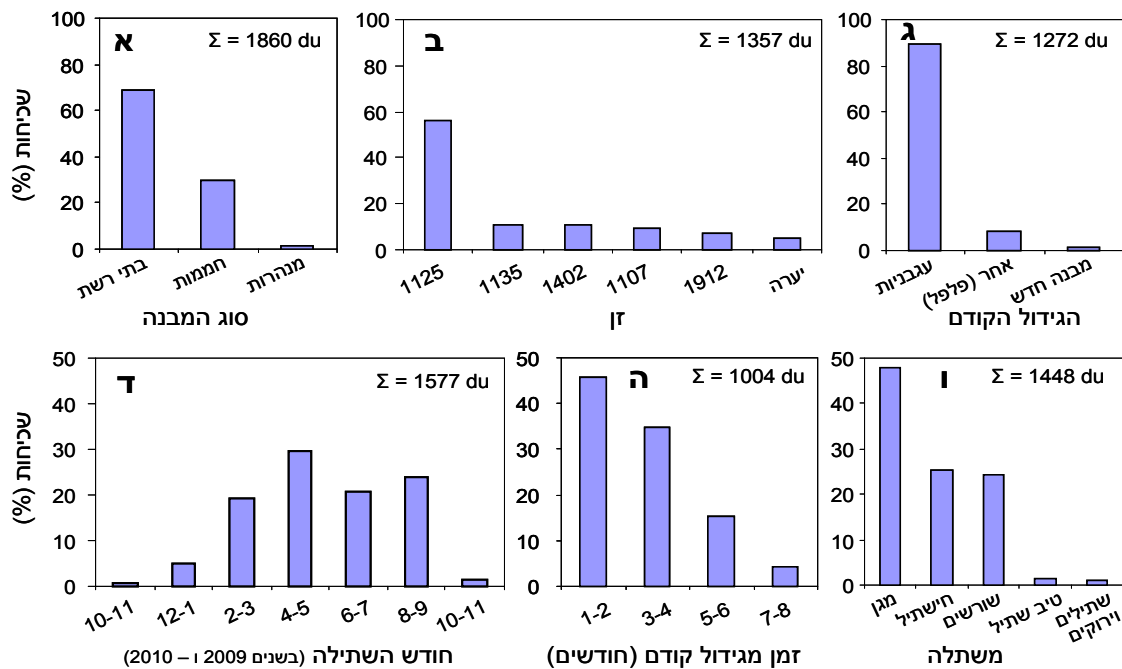
הסקר המקיף שיוצג כאן כלל 226 רשומות, בשטח גידול של 1,860 דונם. מספר המבנים והשטח הנסקר בכל אחד מהישובים מופיעים באיור 1. מידע סטטיסטי אודות השטח הנסקר, בחתכים שונים, מוצג באיור 2. שני שליש מהשטח הנסקר גודלו העגבניות בבתי רשת ובשליש מהשטח, בחממות; הגידול במינהרות עבירות היה בהיקף שולי. בסך הכול נשתלו 27 זנים שונים כשהזן 1125 היה המרכזי ונשתל בהיקף של 56% מהשטח. במרבית השטח (90%) הגידול הקודם היה עגבניות וב – 45% מהשטח הזמן שעבר מסיום הגידול הקודם לשתילה החדשה היה קצר מחודשיים. מרבית השטח נשתל בחודשים אפריל-מאי, והשתילים נרכשו בעיקר ממשתלת מגן (48% משטח הגידול) וממשתלות חישתיל ושורשים (כ – 25% מהשטח, מכל משתלה).



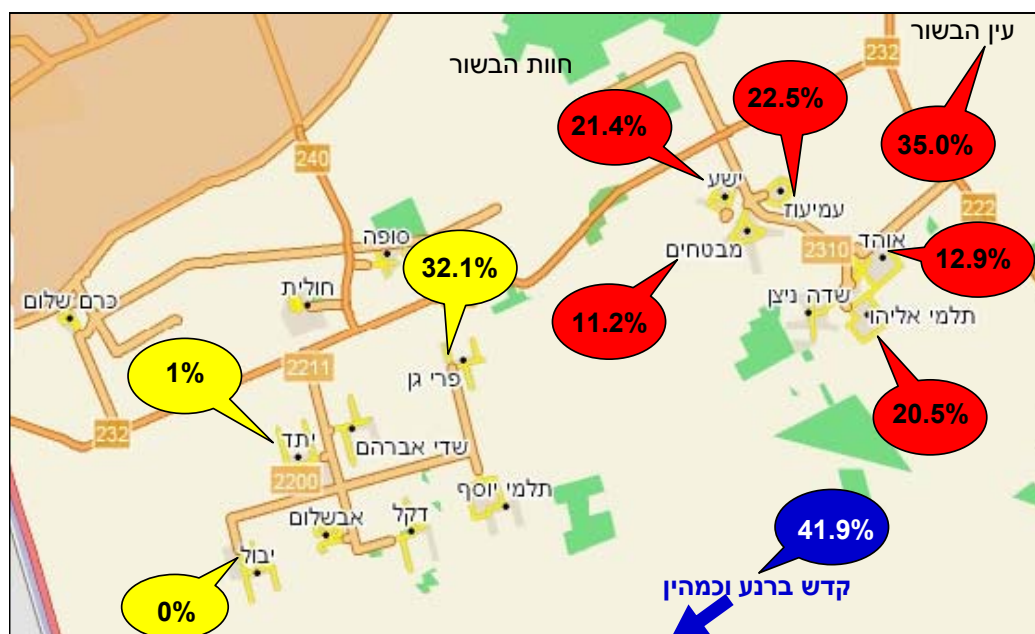
איור 1. אזור ביצוע הסקר המקיף. המספרים מתארים את מספר מבני הגידול המסחריים שנסקרו בכל אחד מהישובים ואת השטח הנדגם בדונמים, בתוך בסוגרים.

מידע אודות התפתחות המחלה מוצג באיורים 3-5. בצד המערבי של השטח הנסקר היה רק מבנה אחד בו התפתחה מחלה בחומרה בינונית או גבוהה. לעומת זאת, בישובים האחרים היה שטח של 10% לערך (במבטחים ואוהד), 20% לערך (תלמי אליהו, עמיעוז וישע), 30% לערך (פרי גן ועין הבשור) או 40% לערך (קדש ברנע וכמהין) נגוע בחומרה בינונית או גבוהה (איור 3). ראוי לציין שהסקר בקדש ברנע וכמהין לא היה מייצג כי הסוקרים ביקרו רק בחלקות נגועות. בשאר המקרים המדגם היה מייצג. בחישוב כללי, המחלה התפתחה, ברמה כל-שהיא, ב – 53% מהשטח הנדגם. יותר חלקות נגועות בנגיעות בינונית וגבוהה היו בשתילות פברואר-מרץ ובמבנים בהם הגידול הקודם היה עגבניות. התברר שבמידה ובגידול הנוכחי הייתה נגיעות בקלויבקטר ברמה כל שהיא (מרמה נמוכה עד גבוהה) הנגיעות בגידול הנוכחי הייתה דומה. בכל המבנים בהם המחלה לא זוהתה בגידול הקודם כלל או שהיא הייתה ברמה של נוכחות, לא היו בגידול הנוכחי חלקות עם רמת הנגיעות בינונית או גבוהה. ממצא זה מצביע על חשיבות המידבק המקומי בהתפתחות המחלה. היו הבדלים בשכיחות השטח היחסי שהיה נגוע בנגיעות בינונית וגבוהה בין הזנים השונים, אבל ממצא זה לא מצביע בהכרח על הבדלים ברגישות בין הזנים מפני שזנים שונים מותאמים לעונות שנה שונות. שלא כצפוי, התברר שהיו הבדלים משמעותיים בשטח הגידול היחסי בו התפתחה נגיעות בחומרה בינונית או גבוהה בין משתלות. בחלקות בהן מקור השתילים היה ממשתלת חישתיל היו במובהק פחות חלקות נגועות מאשר בחלקות בהן מקור השתילים היה ממשתלת מגן או שורשים (איור 4). כדי לוודא שלא מדובר בממצא שגוי שמקורו בכך שהנתונים ששימשו לניתוח אינם מאוזנים, נותחו הנתונים מחדש, בחתכים שונים. ההבדלים בין המשתלות חזרו על עצמם כשהניתוח בוצע בחתכים של זנים, מועד השתילה, ישובים, וגידול קודם (איור 5). ממצא זה

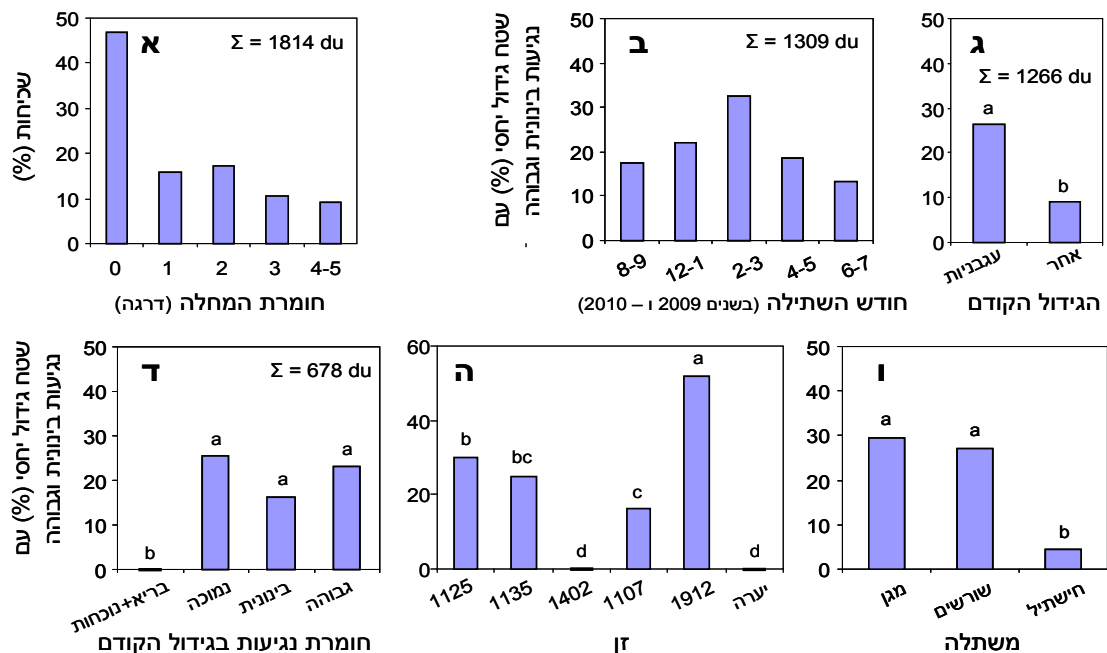
מרמז על כך שמקור השתילים (המשתלה) הוא אחד ממקורות המידבק הראשוני. ממצא זה מקבל חיזוק נוסף מהניתוח של הפיזור המרחבי של אוכלוסיות טיפוס הפתוגן. בשנים 2000 עד 2007 כל התבדידים שבודדו מיתד ופרי גן היו מטיפוס A וכל התבדידים שבודדו ממבטחים, תלמי אליהו, אוהד, עמיעוז וישע היו מטיפוס B. בשנתיים האחרונות (שנת 2008 שקדמה לסקר הנוכחי ושנת 2009, שנת הסקר הנוכחי) בודדו מהאזור המערבי תבדידים מטיפוס E ו-Z (טיפוס A לא בודד שם כלל) ומהאזור המזרחי תבדידים מטיפוס B, אך גם תבדידים מהטיפוסים E ו-Z. לא ניתן היה למצוא קשר חד ערכי בין טיפוס תבדיד מסוים לזן או למשתלה מסוימת (איור 6). בשנתיים האחרונות היו גם מקרים בהם המחלה זוהתה באופן חד-פעמי במקומות אחרים בארץ. כך למשל בודד טיפוס B מעין יהב וסגולה, טיפוס E מסגולה וטיפוס Z ממלילות.



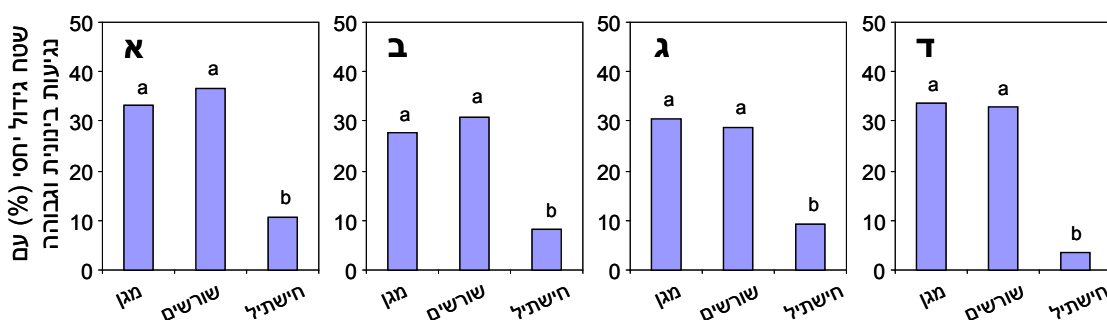
איור 2. נתונים אודות החלקות בהן בוצע הסקר המקיף. א. סוג המבנה; ב. זני העגבניות השכיחים ביותר; ג. הגידול הקודם; ד. חודש השתילה; ה. הזמן שעבר מסיום הגידול הקודם; ו. מקור השתילים. בכל איור מצוין שטח הגידול (בדונמים) ששימש לחישוב ההתפלגויות השונות.



איור 3. פיזור הנגיעות במחלת הכיב הבקטריאלי במרחב שנדגם בסקר המקיף. המספרים מציינים את החלק היחסי (באחוזים) של שטח הגידול שנדגם בכל אחד מהישובים, שהיה נגוע בדרגות נגיעות בינונית וחמורה.



איור 4. א. התפלגות הנגיעות במחלת הכיב הבקטריאלי בחלקות עגבנייה באזור הבשור בהן בוצע הסקר המקיף. ב-ו: שטח הגידול בו התפתחה מחלת הכיב הבקטריאלי בחומרה בינונית+גבוהה בחתכים לפי מדדים שונים. השטח היחסי חושב בהשוואה לשטח הגידול הכולל (המצוין באיורם א-ד) או בהשוואה לשטח הגידול של כל זן (ה) או משתלה (ו). ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק נקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P=0.05$.

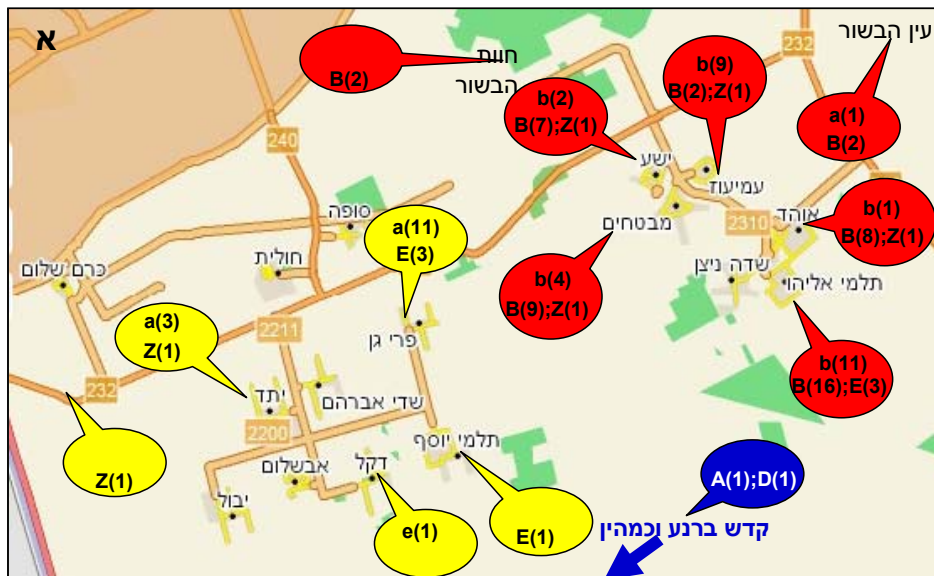


איור 5. השפעת מקור השתילים על שטח הגידול בו התפתחה מחלת הכיב הבקטריאלי בחומרה בינונית+גבוהה בחתכים לפי מדדים שונים. א. שטחי הגידול של זן 1125 בלבד; ב. במבנים שנשתלו בין החודשים מרץ ומאי 2009 בלבד; ג. נגיעות רק בחלקות הגידול ביישובים פריגן, עמיעוז, תלמי אליהו וישע; ד. במבנים בהם הגידול הקודם היה עגבניות בלבד. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק נקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P=0.05$.

4.1.2 הסקר המפורט

התפשטות מחלת הכיב הבקטריאלי באחת מחלקות הסקר המפורט בזמן ובמרחב מוצגת באיור 7. המחלה זוהתה לראשונה בתאריך 31 למאי, 2009 (69 ימים משתילה). במועד זה תסמיני המחלה האופייניים נראו על 1.5% מהצמחים ובסך הכול היו 8 מוקדים ראשוניים. עם הזמן, נוספו עוד מוקדים ומספרם המרבי היה 19 (עם הזמן חלק מהם התלכדו). בחלק מהמוקדים מספר הצמחים הנגועים עלה עם הזמן והיו מוקדים שגודלם היה 30 צמחים ויותר; במוקדים אחרים, לא היה שינוי משמעותי במספר הצמחים הנגועים. להתפשטות המחלה במרחב הייתה תבנית קבועה: המחלה התפשטה לאורך שורות הגידול ולא בין שורות הגידול; אפילו לא בין שורות סמוכות של אותה הערוגה. בתאריך 17 ליולי 2009 (118 ימים משתילה) נראו תסמיני המחלה האופייניים על 37% מהצמחים בשטח הנסקר (איור 7). דגם הפצה דומה נצפה גם בחלקות האחרות של הסקר המפורט.

דוגמא נוספת של תבנית הפיזור המרחבי מוצגת באיורים 8 ו-9. במקרה זה השטח הנסקר היה ברוחב של 5 ערוגות לאורך של 44 מטרים. בכל השורות היו צמחים נגועים. אבל, הייתה שונות גבוהה מאד בשכיחות הצמחים הנגועים ובשכיחות הצמחים שהיו נגועים בנגיעות קשה+מתים בין השורות. כך למשל בשורה 5 הופיעו תסמיני המחלה האופייניים רק על 18 צמחים (4%) ואף אחד מהם לא היה פגוע בצורה קשה, בעוד שבשורה 4, השורה הסמוכה באותה הערוגה, הופיעו תסמיני המחלה האופייניים ב-302 צמחים (68%) - 229 מהם (54%) היו נגועים בנגיעות קשה או שמתו מהמחלה. בשורות 7 ו-8 הסמוכות היו מוקדים ראשוניים וחלק מצמחים בשורות אלה מתו. אבל, הפצת המחלה מהמוקדים הראשוניים לצמחים השכנים הייתה מוגבלת (איורים 8, 9).



ב	טיפוס הפתגון	מס' תבדידים	הזנים מהם בודדו התבדידים	משתלות מהן נרכשו השתילים
	A	1	1335	חישתיל
	B	42	1525 522 1107 1402 1335 1225	חישתיל, מגן, שורשים
	D	1	1335	שורשים
	E	5	1125	חישתיל, מגן, שורשים
	Z	5	1125 1107	מגן, שתילים וירוקים

איור 6. טיפוס התבדידים של החיידק המחולל את מחלת הכיב הבקטריאלי באזור הנסקר. א. הפיזור המרחבי של הטיפוסים במרחב. באותיות קטנות – טיפוס התבדידים שבודדו בין השנים 2000 ו- 2007; באותיות גדולות – טיפוס התבדידים שבודדו בשנים 2008 ו- 2009. בסוגריים – מספר התבדידים שהיו מכל טיפוס. ב. מין התבדידים משנת 2009 לפי חתכים שונים.

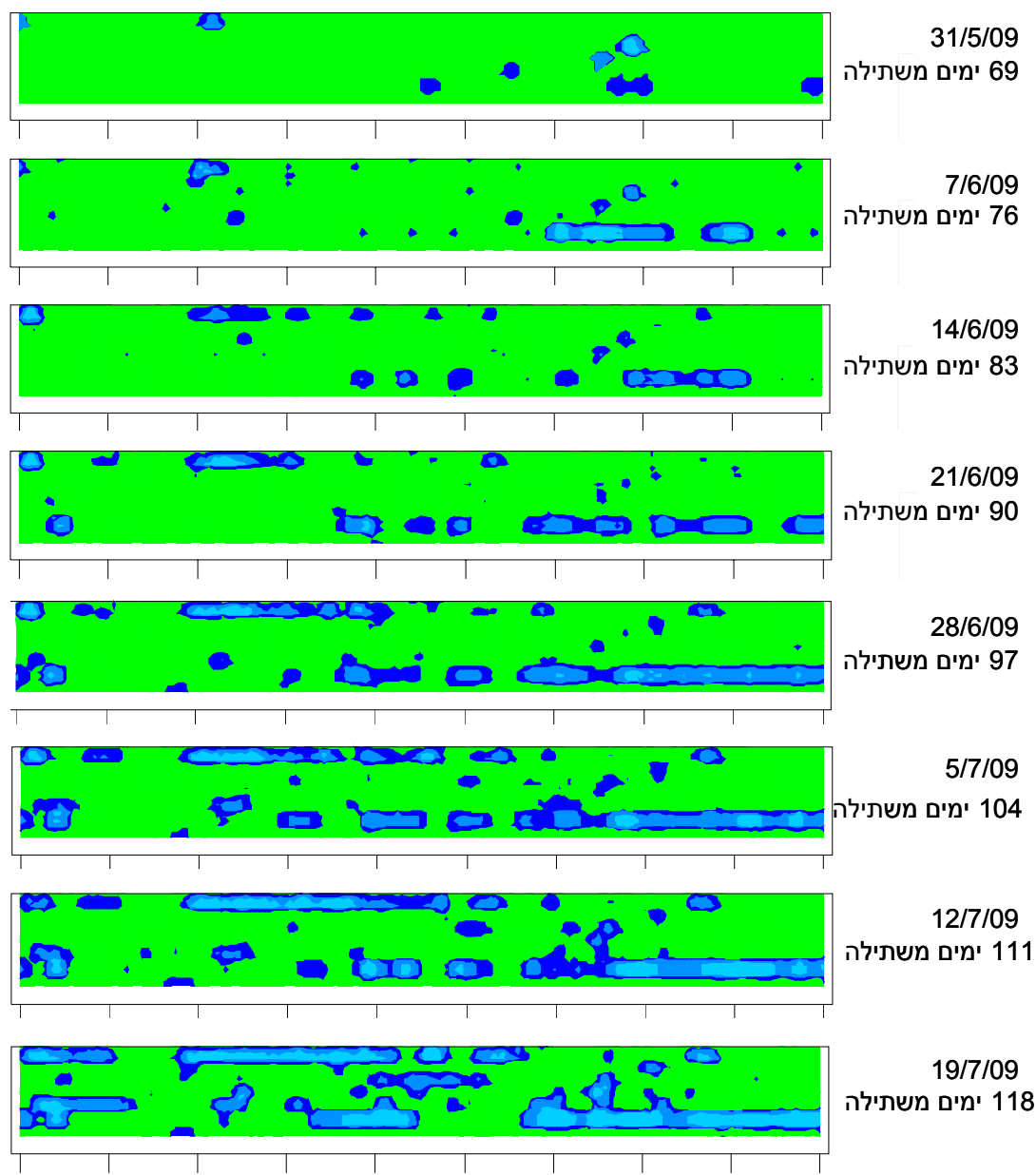
באיור 10 מוצגים נתונים אודות התפתחות המחלה בחלקות הסקר המפורט. כשהמגיפות תוארו בציר זמן של ימים משתילה הייתה שונות רבה במועד ההתפרצות המחלה (המדד היה של הצמחים שהיו נגועים בנגיעות קשה או שמתו מהמחלה). כך למשל, ההפרש בזמן התפרצות המחלה בין החלקה בו היא התפרצה במועד המוקדם ביותר לחלקה בו היא התפרצה במועד המאוחר ביותר היה כ- 110 ימים (איור 10א). אבל, כשהמגיפות תוארו בציר זמן כרונולוגי, השונות פחתה מאוד וההפרש במועד התפרצות המחלה בין החלקות היה רק 22 ימים (איור 10ב). מוקדי המחלה הראשונים הופיעו בין תחילת חודש מאי לאמצע חודש יוני. בכל אחת מהחלקות נוספו מוקדי מחלה חדשים בתקופה של חודש לערך, שלאחריה לא נראו מוקדים חדשים נוספים (איור 10ג). השונות בגודל הממוצע של המוקדים בחלקות הדגימה הייתה קטנה מאוד כשהשינויים בגודל המוקד צוירו על ציר זמן כרונולוגי (איור 10ד).

4.2. הגורמים המשפיעים על התפתחות המחלה בחלקות מסחריות

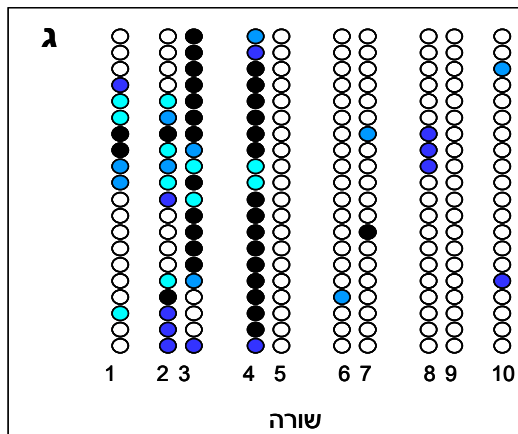
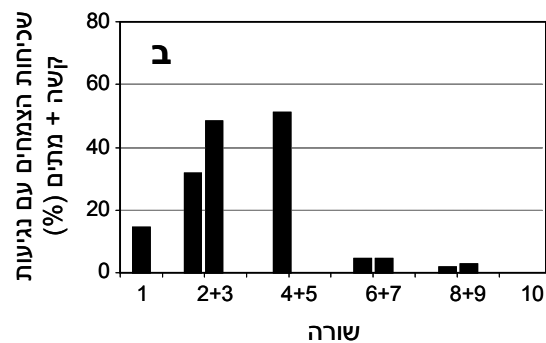
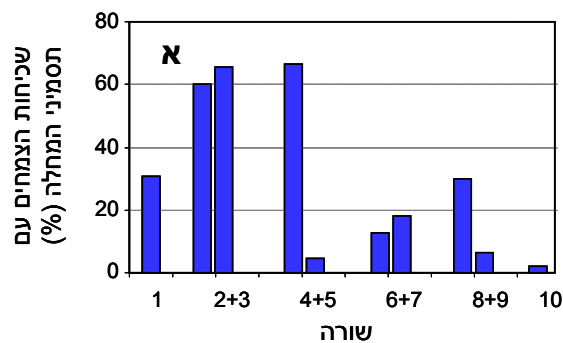
מידע שנאסף בסקר המפורט נותח בחתכים שונים. כאן יוצגו חלק מהממצאים שהייתה (או שלא הייתה) להם השפעה על שטח הגידול היחסי עם נגיעות בינונית וגבוהה. להפתעתנו, התברר שחיטוי כימי של הקרקע לפני הגידול השפיע על הנגיעות במחלה. בחלקות בודדות בלבד (4 חלקות) יושם פורמלין, לכן לא ניתן היה לבחון את השפעתו. לעומת זאת, בחלקות בהן יושמו התכשירים אדיגן, קונדור, מתיל ברומיד, או שילובים ביניהם, השטח היחסי שהיה נגוע ברמת נגיעות בינונית או גבוהה היה קטן מהשטח היחסי של חלקות בהן לא בוצע שום חיטוי. תוצאה זו מפתיעה מפני שהתכשירים שצוינו לא פעילים כלל כנגד חיידקים. המחלה לא התפתחה בנגיעות בינונית או גבוהה באף אחת מהחלקות בהן הקרקע חוטאה בחיטוי סולארי (החיטוי הסולארי יושם על שטח של 65 דונם בלבד). התוצאה משמעותי אם כי המדגם קטן. חיטוי חלל המבנה לפני הגידול, החלפת חוטי ההדליה או צינורות הטפטוף (לא מוצג) לא השפיעו על המגיפות שהתפתחו. הפעולות שביצעו המגדלים בחלקות הנגועות במהלך העונה לא השפיעה על חומרת המחלה (איור 11). מגדלים שונים בצעו פעולות שונות, בניהן סניטציה, ריסוסי נחושת, שינוי סדר העבודה (בחלקות הנגועות בסוף) וקיצור משך הגידול. התברר גם שאי ניידות העובדים או כלי העיבוד לא השפיעה על חומרת המגיפות שהתפתחו. להפך, בחלקות בהן בוצעו העיבודים על ידי כלי עבודה ופועלים חיצוניים (לא פועלים של המגדל) הייתה נגיעות נמוכה יותר מאשר בחלקות בהן הפעולות בוצעו רק על ידי הפועלים או הציוד של המגדל (איור 12).

השתמשנו בנתונים שנאספו בסקר המקיף כדי לקבוע את השפעת מועד השתילה על משך זמן הדגירה (בחודשים) ועל הזמן שעבר מהשתילה ועד לזיהוי תסמיני המחלה. במקרים אלה אין מידע, כמובן, על מועד ההדבקה ועל מקור המידבק. באיור 13א מוצג הזמן בו זוהו תסמיני המחלה הראשונים בחלקות הסקר המקיף כתלות במועד השתילה. לנתונים אלה חושב קו רגרסיה לא-ליניארי והוא שימש לקביעת הזמן הממוצע בו זוהו התסמינים כתלות בחודש השתילה (איור 13ב). התברר שבשתילות החורף עברו כ- 5 חודשים עד שניתן היה לזהות את תסמיני המחלה הראשונים; לעומת זאת, בשתילות אפריל נראו תסמיני המחלה הראשונים

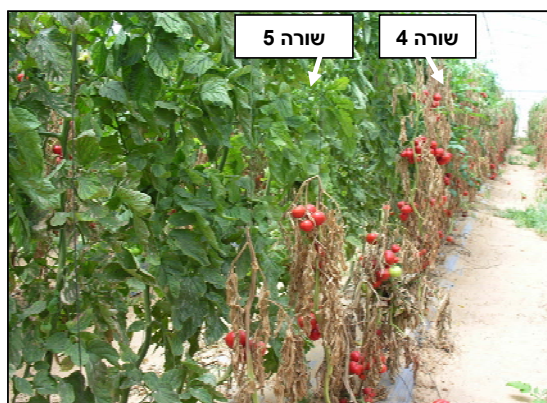
כחודשיים וחצי אחרי השתילה (איור 13). בצורה דומה חושב פרק הזמן שעבר מהשתילה ועד שהנגיעות היגיעה למלא עוצמתה. התברר שבשתילות ספטמבר הנגיעות היגיעה למלא עוצמתה כשמונה חודשים לאחר השתילה (בחודש מאי של השנה העוקבת) בעוד שבשתילות מרץ-מאי הנגיעות היגיעה למלא עוצמתה בתוך 4 חודשים בלבד (איור 14 א, ב). ניתוח הנתונים איפשר לגלות הבדלים בעוצמת המחלה שהתפתחה במועדי השתילה השונים. אמנם המחלה התפתחה במהירות רבה בשתילות שבוצעו בחודש מאי, אבל רק בחלק קטן מחלקות אלה התפתחה נגיעות בחומרה בינונית או גבוהה. לעומת זאת, במרבית החלקות שנשתלו בחודש פברואר התפתחה בסופו של דבר נגיעות בחומרה בינונית או גבוהה (איור 14).



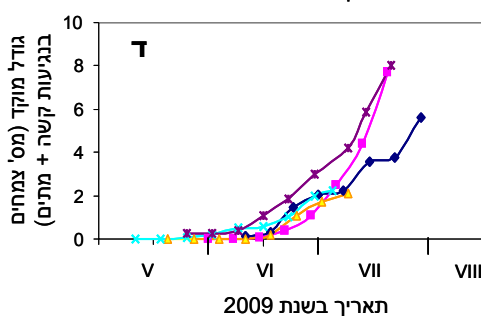
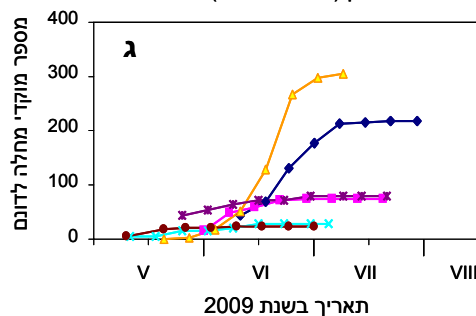
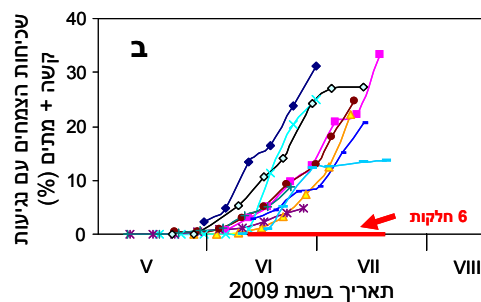
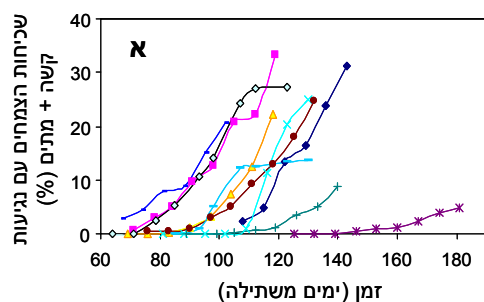
איור 7. תיאור ויזואלי של התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בחלקה מסחרית של עגבניות במושב תלמי אליהו בזמן ובמרחב. שטח האזור הנסקר היה 36 מ' לאורך לרוחב של 4 ערוגות. הנתונים נותחו מרחבית באמצעות תוכנת GS+. הצבעים מסמנים את חומרת הנגיעות של הצמחים, כלהלן: ■ צמחים ללא תסמינים; ■ צמחים בנגיעות נמוכה; ■ צמחים בנגיעות בינוניות; ■ צמחים בנגיעות גבוהה+מתים.



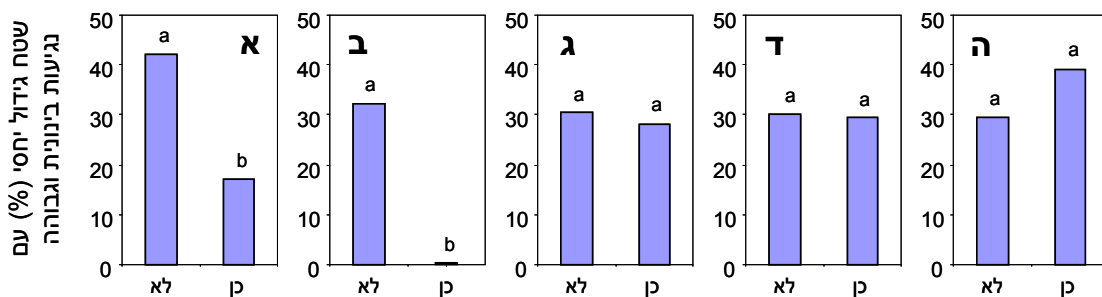
איור 8. תיאור ויזואלי של הפיזור המרחבי של מחלת הכיב הבקטריאלי בחלקה מסחרית של עגבניות בממשק של בוארון בתאריך 22/6/2009. שטח האזור הנסקר היה 44 מ' לאורך לרוחב של 5 ערוגות. א ו ב: שכיחות הצמחים בל אחת מהשורות שהראו את תסמיני המחלה (א) או שהצמחים היו נגועים בנגיעות קשה או מתים. ג. הצגת הנגיעות בקטע הכולל 200 צמחים (כל עיגול מסמל צמח אחד). הצבעים מסמנים את חומרת הנגיעות של הצמחים, כלהלן: ○ = צמחים ללא תסמינים; ● = צמחים בנגיעות נמוכה; ● = צמחים בנגיעות בינונית; ● = צמחים בנגיעות גבוהה; ● = צמחים מתים.



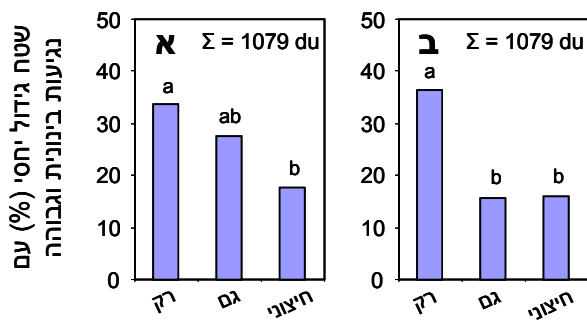
איור 9. צילום של החלקה המסחרית של עגבניות בממשק של בוארון בה בוצע הסקר המפורט. השורות המסומנות מופיעות במפה שבאיור 8.



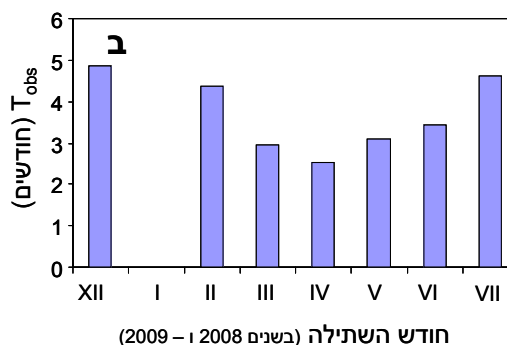
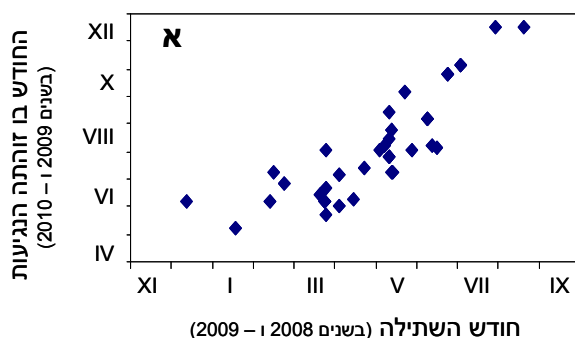
איור 10. התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בחלקות עגבניות מסחריות בהן בוצע הסקר המפורט. א. שכיחות הצמחים שהיו בנגיעות קשה+מתים בתלות בזמן שעבר מהשתילה; ב. שכיחות הצמחים שהיו בנגיעות קשה+מתים כתלות בזמן הכרונווגי; ג. מספר מוקדי המחלה הראשוניים לדונם; ד. ההשתנות של גודל המוקד הממוצע עם הזמן.



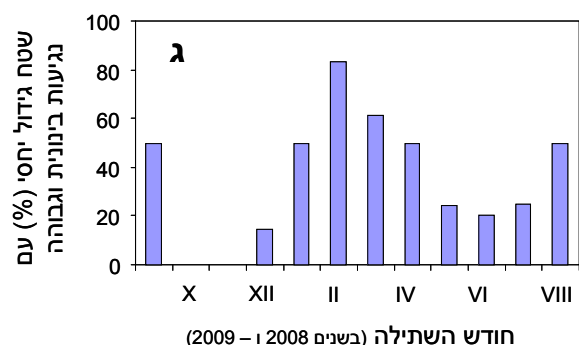
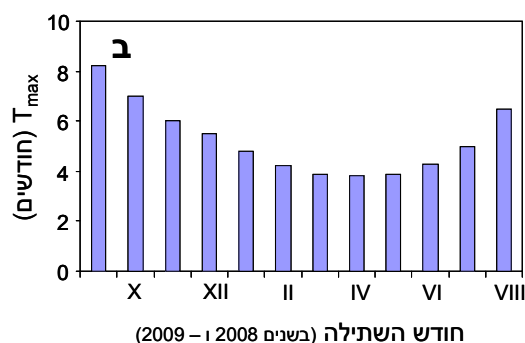
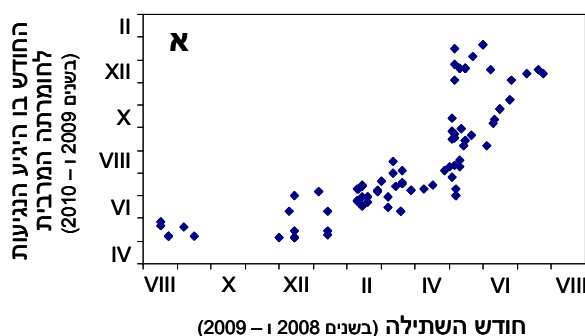
איור 11. השפעת פעולות שבוצעו על ידי המגדלים על שטח הגידול בו התפתחה מחלת הכיב הבקטריאלי בחומרה בינונית-גבוהה (לא = הפעולה לא בוצעה; כן = הפעולה בוצעה). א. חיטוי כימי של הקרקע (באדיקן, קונדור, מתיל ברומיד או שילובים בניהם) לפני הגידול; ב. חיטוי סולארי של הקרקע לפני הגידול; ג. חיטוי חלל המבנה לפני הגידול; ד. החלפת חוטי ההדליה לפני הגידול; ה. המגדלים דיווחו על ביצוע פעולות להתמודדות עם המחלה במהלך הגידול. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק כנקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P=0.05$.



איור 12. השפעת ניידות העובדים (א) וכלי העיבוד (ב) על שטח הגידול בו התפתחה מחלת הכיב הבקטריאלי בחומרה בינונית-גבוהה. רק = הפועלים או כלי העיבוד שייכים למגדל ועובדים רק בשטחי הגידול שלו; גם = הפועלים וכלי העיבוד עובדים גם אצל מגדלים אחרים; חיצוני = העבודה והעיבודים נעשים על ידי קבלן חיצוני. השטח היחסי חושב בהשוואה לשטח הכולל (המצוין באיורים). ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק כנקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P=0.05$.



איור 13. השפעת מועד השתילה על מועד זיהוי מחלת הכיב הבקטריאלי בחלקות עגבנייה באזור הבשור בהן בוצע הסקר המקיף. א. החודש בו זוהתה הנגיעה בחלקות המידגם; ב. הזמן בחודשים שעבר מהשתילה ועד למועד בו זוהתה הנגיעה.

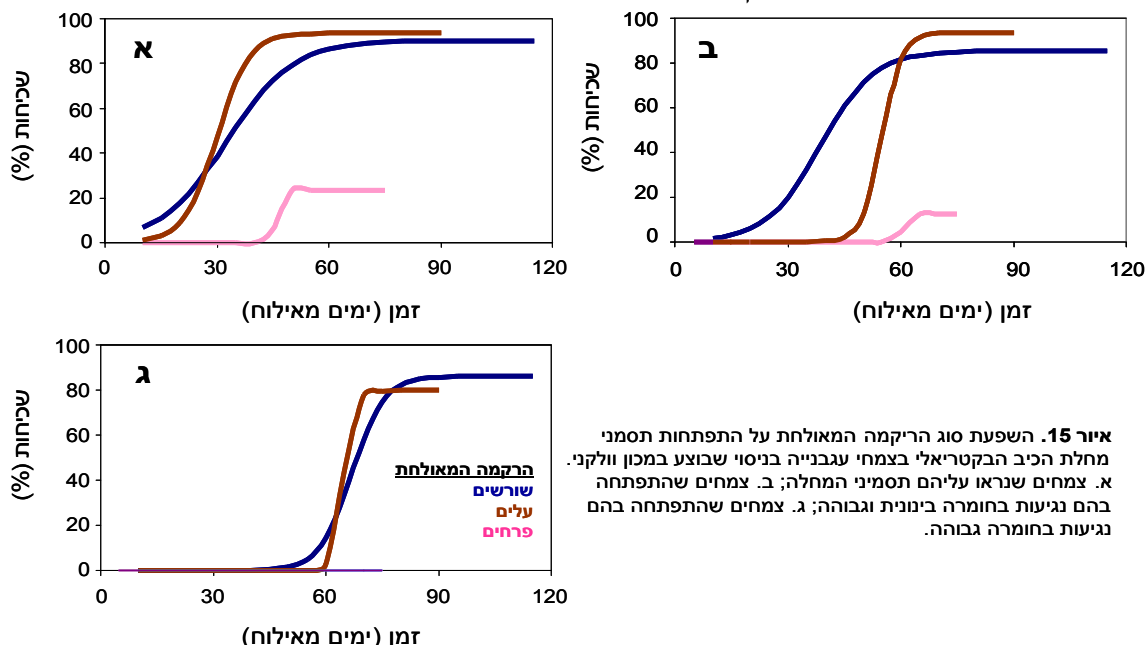


איור 14. השפעת מועד השתילה על התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בחלקות עגבנייה באזור הבשור בהן בוצע הסקר המקיף. א. החודש בו הנגיעה הגיעה לחומרתה המרבית; ב. הזמן בחודשים שעבר מהשתילה ועד למועד בו הנגיעה הגיעה לחומרתה המרבית; ג. השפעת מועד השתילה על שטח הגידול היחסי בו הייתה הנגיעה המרבית בדרגות חומרה בינונית + גבוהה.

4.3. הגורמים המשפיעים על משך זמן ההדגרה ועל צורת התסמינים המתפתחים בצמחים הנגועים

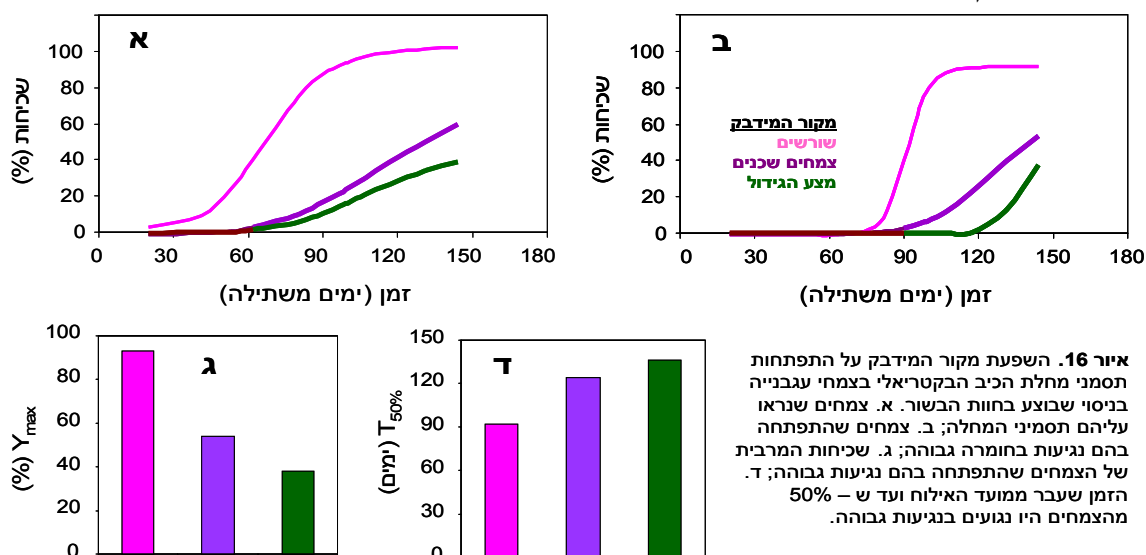
4.3.1 סוג הרקמה המאולחת

סוג הרקמה המאולחת השפיעה על התפתחות המחלה ועל חומרת התסמינים שהתפתחו. צמחים שאולחו דרך השורשים וצמחים שהנוף שלהם אולח במספרים מאולחים בטאו את תסמיני המחלה בתוך שבועיים לערך; ארבעה שבועות מהאילוח כל הצמחים הראו את תסמיני המחלה אופייניים. במרבית הצמחים (>80%) התפתחה נגיעות גבוהה, וזאת החל מחודשיים לאחר האילוח. לעומת זאת, בחלק קטן מהצמחים שאולחו דרך הפרחים המחלה היגיעה לגבעולים ובאף אחד מהם לא התפתחו תסמינים בצורה חמורה (איור 15).

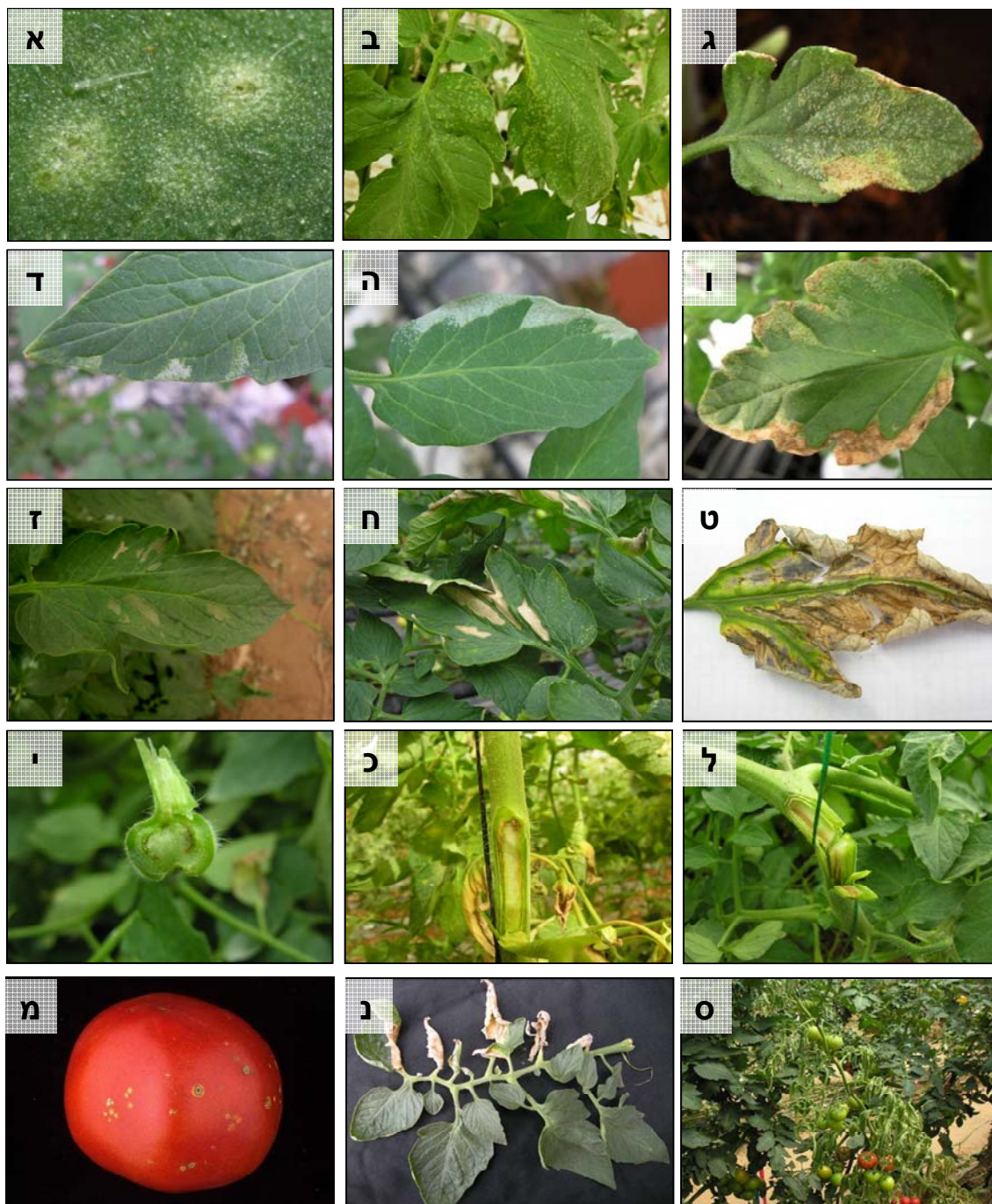


4.3.2 מקור המידבק הראשוני

מקור המידבק השפיע גם הוא על התפתחות המחלה ועל קצב הופעת התסמינים. בניסוי שבוע בחוות הבשור תסמיני המחלה הופיעו בתוך כחודש מהשתילה כשהאילוח בוצע דרך השורשים ונגיעות גבוהה התפתחה החל מחודשיים וחצי לאחר האילוח. גם בניסוי זה נפגעו מרבית הצמחים. כשמקור המידבק היה שורשים נגועים שנטמנו במצע הגידול או מצמחים סמוכים שגדלו באותו מארז, התסמינים הופיעו מאוחר יותר ושכיחות הצמחים שנפגעו קשה הייתה נמוכה הרבה יותר (איור 16).



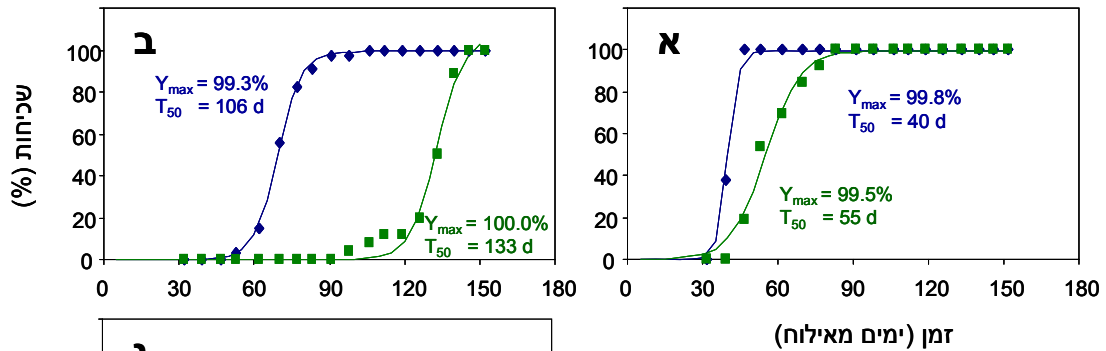
בניסויים אלה ובניסויים האחרים שבצענו במסגרת המיזם השתמשנו במקורות מידבק שונים והאילוח בוצע בדרכים שונות. התסמינים שהתפתחו היו שונים זה מזה כתלות בצורת האילוח ובמקור המידבק. תמונות מאפיינות מתוארות באיור 17. ההדבקה הייתה חיצונית דרך הטריכומות (איור 17 א-ג), ההידטודות (איור 17 ד-ו) או הדבקה סיסטמית (איור 17 ז-ל). למחלה גם תסמינים אופייניים על הפירות, העלים והצמח השלם (איור 17 מ-ס).



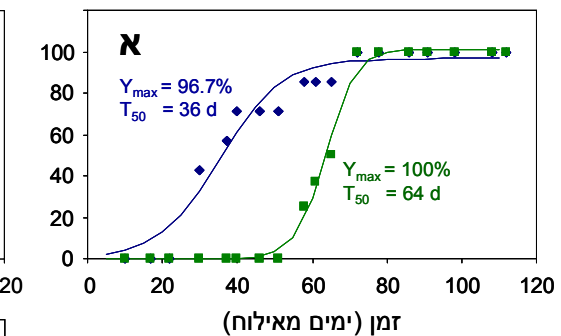
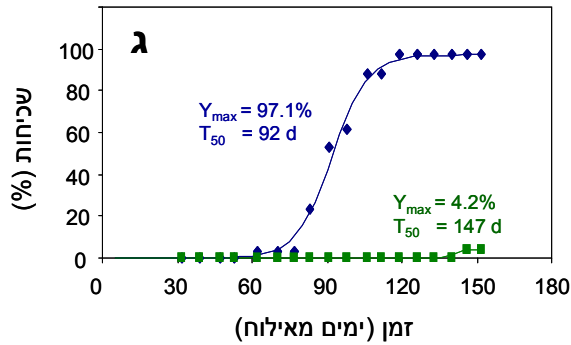
איור 17. תסמינים של מחלת הכיב הבקטריאלי בעלי עגבנייה. א-ג: הדבקה חיצונית של טריכומות; ד-ו: שלבים שונים של הדבקה חיצונית של הידטוודות; ז-ט: שלבים שונים של תסמינים בעלים שמקורם בהדבקה סיסטמית של הצמח; י-ל: החמה של צינורות הקסלים; מ: תסמינים אופייניים של "עין הציפור" בפר; נ: הדבקה סיסטמית בעלעלים הנמצאים בצד אחד של העלה; ס: נבילה בצמח נגוע סיסטמית.

4.3.3 תגובת זנים שונים למחלה

בכל הניסויים בהם אולחו צמחים בהדבקה מלאכותית, הופיעו תסמיני המחלה הראשונים בתוך שבועיים-שלושה מהאילוח (יוצא הדופן היחידי הוא זן הצירי 1335 באחד הניסויים). בתוך חודשיים הופיעו התסמינים במרבית הצמחים המאולחים. אבל, היו הבדלים במועד הופעת התסמינים, בערכי T_{50} ובערכי Y_{max} בין הזנים, שיטות האילוח ומועד האילוח. ככלל, זן הצירי 1335 היה עמיד יותר מהזן 1225 (איורים 18 ו-19). כל צמחי הזן 1225 נפגעו קשה, בסופו של דבר, אבל בפחות מ- 50% מצמחי הזן 1335 התפתחה נגיעות קשה. כשנשתלו הזנים 1225 ו- 1402 בתחילת החורף, עד לסיום הניסוי (חודשיים וחצי משתילה) היו ערכי Y_{max} נמוכים מ- 20%. הסיבה היא כנראה הטמפרטורות הלא מיטביות ששררו אז. בניסוי הזנים שבוצע ברמת הנגב היו הבדלים מובהקים בשכיחות המחלה בין השנים השונים, כשהזנים 107-74 ו- 546-DRC היו הנגועים ביותר והזנים 1335 ו- 963 היו הפחות נגועים. היו הבדלים מובהקים בשכיחות הצמחים הנגועים שהושקו במים מליחים לעומת אלה שהושקו במים שפירים (איור 21).

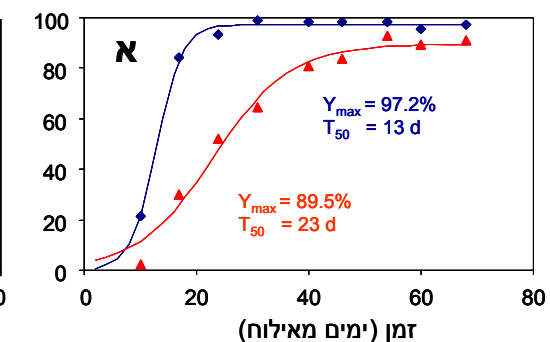
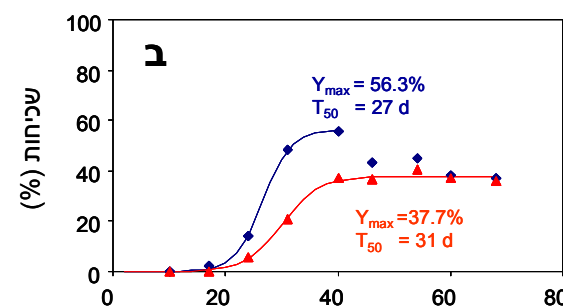


איור 18. התפתחות תסמיני מחלה הכיב הבקטריאלי בצמחי עגבנייה מהזנים 1125 (בצבע כחול) וזן הצ'רי 1335 (בצבע ירוק) בניסוי שבוצע בחוות הבשור. השתילים נשתלו בתאריך 19 לאוגוסט 2009 ואולחו שבועיים לאחר השתילה בשיטת "המספריים המאולחים". א. שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה; ב. שכיחות הצמחים שהתפתחה בהם נגיעות בחומרה גבוהה ומעלה; ג. שכיחות הצמחים שמתו כתוצאה מהמחלה. Y_{max} = הנגיעות המירבית, באחוזים; T_{50} = הזמן בימים שעבר ממועד האילוח ועד שהנגיעות היגיעה ל - 50% מרמתה המרבית.

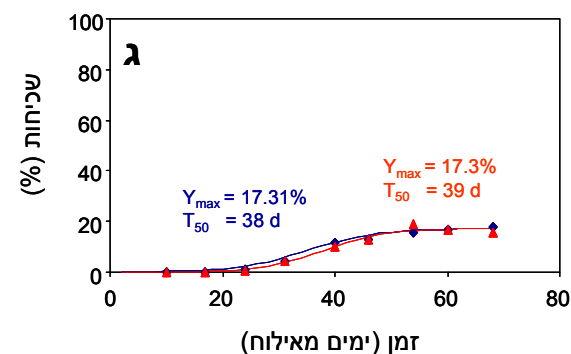


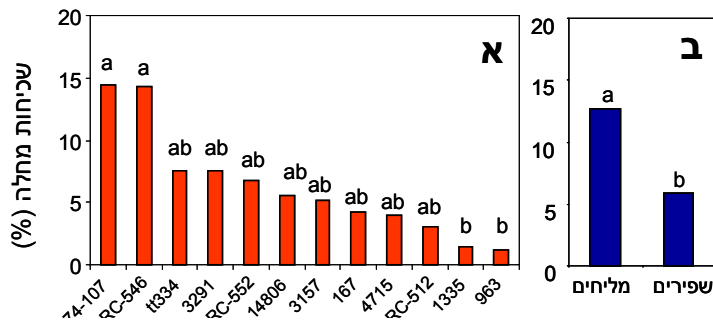
איור 19. התפתחות תסמיני מחלה הכיב הבקטריאלי בצמחי עגבנייה מהזנים 1125 (בצבע כחול) וזן הצ'רי 1335 (בצבע ירוק) בניסוי שבוצע במכון וולקני. השתילים נשתלו בתאריך 16 לפברואר 2009 ואולחו כחודש לאחר השתילה בשיטת "המספריים המאולחים". א. שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה; ב. שכיחות הצמחים שהתפתחה בהם נגיעות בחומרה גבוהה ומעלה; ג. שכיחות הצמחים שמתו כתוצאה מהמחלה. Y_{max} = הנגיעות המירבית, באחוזים; T_{50} = הזמן בימים שעבר ממועד האילוח ועד שהנגיעות היגיעה ל - 50% מרמתה המרבית.

זמן (ימים מאילוח)



איור 20. התפתחות תסמיני מחלה הכיב הבקטריאלי בצמחי עגבנייה מהזנים 1125 (בצבע כחול) ו - 1402 (בצבע אדום) בניסוי שבוצע בחוות הבשור. השתילים נשתלו בתאריך 15 לאוקטובר 2009 לקרקע כשהם מאולחים. א. שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה; ב. שכיחות הצמחים שהתפתחה בהם נגיעות בחומרה גבוהה ומעלה; ג. שכיחות הצמחים שמתו כתוצאה מהמחלה. Y_{max} = הנגיעות המירבית, באחוזים; T_{50} = הזמן בימים שעבר ממועד האילוח ועד שהנגיעות היגיעה ל - 50% מרמתה המרבית.





איור 21. התפתחות תסמיני מחלה הכיב הבקטריאלי במבחן זני צ'רי שהתקיים בתחנת הנסיונות ברמת הנגב. הצמחים נדבקו באופן טבעי במחלה והנגיעות (שכיחות הצמחים שהיו עליהם תסמיני המחלה) הוערכה בתאריך 4 ליוני 2009. א. שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה; ב. השפעת סוג המים בהם הושקו הצמחים על שכיחות המחלה. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק נקבע על ידי מבחן HSD (ברמת מובהקות של $P=0.05$)

5. דיון

כדי לתעד את המתרחש בחלקות גידול מסחריות בצענו שני סקרים באזור הבשור (הסקר המקיף והסקר המפורט). הסקר המקיף בוצע ב- 226 חלקות והסקר המפורט ב- 15 חלקות. מחלת הכיב הבקטריאלי נפוצה מאד בשטח גידול העגבניות העיקרי בארץ, המחלה זוהתה בשנת 2009 ב- 53% מהחלקות הגידול שנכללו בסקר בחבל הבשור. עוצמת המגיפה שהתפתחה לא הייתה גבוהה, ורק ב- 37% מהחלקות לערך התפתחה נגיעות בחומרה בינונית עד גבוהה. מצב זה שונה מהמגיפה שהתפתחה בחבל הבשור בעונת 2007; הסיבות האפשריות לכך יפורטו בהמשך. המחלה גם זוהתה השנה במספר מקומות אחרים בארץ: ברמת הנגב המחלה התפתחה במספר מבנים וגרמה בהם לנזקים משמעותיים. זה אינו חידוש, מפני שהמחלה מבוססת באזור זה והיו גם מבנים נוגעים בשנים הקודמות. באזור נתיבות זוהתה המחלה במספר מבנים (בבית הגדי, מלילות ומקומות נוספים), חלקם נפגע קשה מהמחלה. למעשה, המבנים הנוגעים ביותר שנראו השנה היו באזור נתיבות. נראה שהמחלה מבוססת באזור זה מפני שהמגדלים איתם שוחחנו דיווחו שתסמינים דומים נראו גם בשנים הקודמות. המחלה נצפתה לראשונה בחלקת גידול אורגנית בערבה, בעין יהב. חלקה זו נשתלה ב- 25 לספטמבר 2008 ותסמיני המחלה הראשונים זוהו בחודש ינואר. בכל המבנה היו צמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה (בפיזור אקראי). אבל המחלה לא התפשטה במרחב. בערוגה אחת הייתה נגיעות משמעותית יותר והמגדל עקר את הצמחים לאורך כל הערוגה. נגיעות ברמה בינונית נצפתה גם בחממות עגבנייה בסגולה ולאחרונה גם בשקף.

השתמשנו בנתונים שנאספו בסקרים כדי לנסות ולהסביר את הסיבות לשונות בעוצמת המגיפות שהתפתחו בחלקות המסחריות. הסקרים מהווים "צילום מצב" של המתרחש במבני הגידול ויש להתייחס למסקנות שיתוארו להלן בזהירות משתי סיבות. הראשונה, המדדים השונים שנכללו בסקר לא היו מאוזנים. למשל, השטח הנסקר בישובים שונים לא היה זהה, לא כל הזנים נשתלו בכל המועדים בכל מקום, ממשיק הגידול בין מבנים היה שונה, וכו'. חוסר האיזון עשוי להטות את המסקנות. הסיבה השנייה היא שהמערכת הביולוגית מורכבת ובמקרים רבים מספר גורמים, ויחסי הגומלין שבניהם, ולא גורם בודד משפיעים על התוצאה הסופית. בגלל שנתוני הסקר לא מאוזנים לא ניתן לאמוד בכל המקרים את ההשפעות המשותפות (והמנוגדות) של הגורמים המשפיעים השונים. לכן ניתוח ממצאי הסקר צריך לשמש להעלאת היפותזות לגבי הגורמים המשפיעים ולשאלת שאלות שיבחנו בדרכים אחרות. לא ניתן להשתמש בממצאי הסקר להסקת מסקנות סופיות לגבי ההשפעה של גורם זה או אחר על המערכת הביולוגית. בשורות הבאות נדון בממצאי הסקר ונציין את ההיפותזות שעלו מהממצאים. התחלנו כבר לבחון חלק מהנושאים בניסויים מסודרים שדווחו בדו"חות האחרים הנמצאים בקובץ זה.

הסקר איפשר להגדיר את מקורות המידבק ההתחלי החשובים בישראל. בהתבסס על הממצאים נראה שמקורות המידבק ההתחלי העיקריים (לא לפי סדר החשיבות) הם מבנה הגידול עצמו והשתילים המגיעים מהמשתלות. הגענו למסקנה שמבנה הגידול הוא מקור מידבק חשוב בגלל שהשטח היחסי בו התפתחה נגיעות בינונית או גבוהה היה גדול יותר במבנים בהם הגידול הקודם היה עגבניות (איור 4ג) ובחלקות בהן גידול העגבניות הקודם היה נגוע (איור 4, ד) מאשר במבנים בהם לא גידלו עגבניות או שלא הייתה נגיעות בעונה הקודמת. בנוסף, התברר שביצוע חיטוי קרקע לפני הגידול הפחית את הנגיעות יחסית לחלקות בהן לא בוצע חיטוי. ההשפעה של החיטוי הסולארי מובנת (איור 11 ב) אך התברר שגם חיטוי בתכשירים שאינם פעילים ישירות על חיידקים (כמו אדיגן, קונדור או מתיל ברומיד) הפחית את הנגיעות (איור 11 א). הסבר אפשרי לממצא זה הוא שהמחלה אלימה יותר כששורשי הצמחים נפגעים מפגעים אחרים (כמו נמטודות) או נוגעים במחלות אחרות (כמו הדוררת) כנגדם יושמו התכשירים. מן הראוי לבחון היפותזה זו בהמשך המחקר.

הסקנו אם כן שמקור מידבק התחלי חשוב הוא מבנה הגידול עצמו. נשאלת השאלה היכן שורדים החיידקים במבנה הגידול. מניתוח נתוני הסקר בו מצאנו שלחיטוי החלל ולהחלפת חוטי ההדליה לפני הגידול לא הייתה השפעה על חומרת המגיפה שהתפתחה (איור 11 ג, ד). ניתן להסיק מכך שהחיידקים השורדים מחוץ לקרקע

(על המבנה, חוטי ההדליה וצינורות הטפטוף) לא מהווים מקור מידבק ראשוני חשוב. ממצא זה קיבל חיזוק במסגרת הניסויים שבצענו השנה. התברר שהחיידקים השורדים על המבנה מסוגלים לאלח ולאכלס צמחים בריאים שנשתלו בו. אבל, בצמחים המאוכלסים לא התפתחו תסמיני המחלה כלל (ראו דו"ח של גיורא קריצמן ובני קירשנר). נראה אם כן שהחיידקים השורדים בקרקע (או במצע הגידול) הם מקורות המידבק החשובים יותר. במסגרת המיזם אנחנו מנסים לפתח שיטות להתמודדות עם מידבק השורד בקרקע (ראו דו"ח של מיכה רביב והדו"ח של גיורא קריצמן).

הגענו למסקנה שהשתילים המגיעים מהמשתלות עשויים להיות מקור מידבק לחלקות הגידול מפני שהיו הבדלים מובהקים בנגיעות בין שתילים שהגיעו ממשתלת חישתיל לבין אלה שהגיעו ממשתלות שורשים או מגן (איור 4 ה, איור 5). יתכן שיש הבדלים בדרך הכנת שתילי העגבנייה במשתלות השונות או שיש סיבות אחרות להבדלים בין המשתלות. סימוכין נוספים למסקנה שמקור השתילים עשוי להיות מקור מידבק ראשוני חשוב היא השינוי שחל באוכלוסיית הפתוגן במשך הזמן: בעוד שעד שנת 2007 (כולל) היו במרחב הבשור שני טיפוסים פתוגן (טיפוס A בצד המערבי וטיפוס B בצד המזרחי), הרי שבשנים 2008 ו-2009 נעלם טיפוס A מהצד המערבי והופיעו טיפוסים חדשים (E ו- Z) בכל המרחב (איור 6). בנוסף, המחלה התגלתה בצורה ספוראדית במקומות מרוחקים (כמו הערבה, עמק הירדן ולכיש) בחלקות שלא היו נגועות לפני כן. הדרך היחידה בה יכלו אירועים אלה להתרחש היא על ידי הימצאות של שתילים מאולחים. המשתלות עושות את כל שביכולתן לייצר שתילים בריאים אבל אם מסקנה זו נכונה הרי שהן לא מצליחות במאמציהן. מאחר ויש לדבר חשיבות מרחיקת לכת לגבי הצלחת ההתמודדות עם המידבק הראשוני, יש לבחון בצורה מכוונת את חשיבות המשתלות כמקור מידבק ראשוני. כדאי יהיה לעשות זאת בשיתוף המשתלות הנוגעות בדבר ויחד איתן לפתח גישות להפחתת התופעה. במסגרת המיזם אנחנו בוחנים אפשרות לזהות בשלבים מוקדמים את השתילים המאוכלסים, עוד במשתלה (ראו דו"ח של שאול בורדמן וחובריו).

המטרה השנייה של המחקר הנוכחי הייתה לאפיין את תבנית הפיזור של הצמחים הנגועים במבני הגידול כדי שאפשר יהיה לקבוע את דרך/דרכי ההפצה המשנית העיקרית של המחלה בישראל. ממצאי הסקר המפורט נראה שהמחלה מופצת בעיקר לאורך שורות הגידול (איורים 7-9). מכאן עולה שבמבני הגידול המסחריים ההפצה של הפתוגן בדרך האוויר ובמגע של עלים או של שורשים אינה הדרך העיקרית. ממצא מעניין אחר שעלה מניתוח הנתונים הוא שישנם מוקדים ראשוניים מהם המחלה מופצת למרחקים גדולים לאורך השורות (לעיתים של עשרות צמחים) ומוקדים ראשוניים אחרים מהם המחלה מופצת רק למרחק של צמחים בודדים, או בכלל לא. להבנת נושא זה חשיבות רבה באפידמיולוגיה של המחלה. במחקר אחר המבוצע במסגרת המיזם מצאנו שהמחלה מופצת למרחקים קצרים במהלך פעולות הגיזום, הזירוד וההדליה המבוצעות במהלך הגידול ולמרחקים ארוכים יותר כשפעולות אלה מבוצעות כשהצמחים רטובים ממי דמיעה ומטל (ראו דו"חות של שולמית מנוליס וחבריה ושל דני שטיינברג וחובריו). להבנת הגורמים המשפיעים על ההפצה המשנית חשיבות רבה והוא חלק מעבודת הדוקטורט של גלית שהרבני.

מחלת הכיב הבקטריאלי היא מחלה פוליציקלית. המגיפה מתחילה במספר קטן של צמחים שאולחו ממקורות המידבק הראשוני; מצמחים אלה המחלה מופצת לצמחים השכנים, הבריאים. נשאלת השאלה מה החשיבות של מקורות המידבק הראשוני יחסית לחשיבות של ההפצה המשנית? כמובן שלא ניתן לתת תשובה מוחלטת, חד משמעית, לשאלה זו. בכל מקרה, יש חשיבות בדיון בנושא מפני שמכך נגזרת היעילות של האמצעים שינקטו להפחתת הנגיעות בחלקות הגידול. הסקר המפורט שבצענו התבצע בחלקות מסחריות בהן זוהו תסמיני המחלה הראשונים. ניתן להניח שצמחים אלה נדבקו ממקורות המידבק הראשוני (שהיה מתוך או מחוץ מבנה). בשש מתוך 15 החלקות שנכללו בסקר המפורט, המחלה לא הופצה כלל מהצמחים הנגועים לצמחים השכנים. בארבע חלקות מספר המוקדים הראשוניים לדונם היה 70 או פחות (בהנחה ששדות 2400 צמחים לדונם הרי שמדובר בפחות מ- 3% מהצמחים); בשני מבנים היו בין 200 ל- 310 מוקדים ראשוניים (8-13%). בתשעת המבנים בהם המחלה הופצה מהצמחים הנגועים הראשונים לשכניהם, בסוף העונה היו 5 עד 35% מהצמחים נגועים בנגיעות בינונית או קשה (איור 10 ב, ג). לא נמצא קשר בין מספר מוקדי הנגיעות הראשונים בחלקה לנגיעות הסופית (תוצאות לא מוצגות). המשמעות היא שהיו מקרים בהם יש מספר גדול של מוקדי נגיעות ראשוניים אבל הנגיעות בסוף העונה נמוכה, ומקרים בהם יש מספר קטן של מוקדי נגיעות ראשוניים אבל הנגיעות בסוף העונה גבוהה. המסקנה העולה מכך היא שהחשיבות היחסית של ההפצה המשנית גדולה מזו של המידבק הראשוני. מסקנה זו גם נתמכת בממצא שעלה מניתוח הסקר המקיף בו מצאנו שלא היו הבדלים בשטח הגידול היחסי עם נגיעות בינונית או גבוהה בין מבנים שבשנה הקודמת הייתה בהם נגיעות נמוכה לבין מבנים שבשנה הקודמת הייתה בהם נגיעות גבוהה (איור 14). סביר להניח שבמבנים בקבוצה הראשונה היו יותר צמחים שנדבקו ממקורות המידבק הראשוני ושבקבוצה השנייה היו פחות צמחים כאלה.

למרות זאת, לא היה הבדל בחומרת המגיפות שהתפתחה בהם. המסקנה העולה מכך היא שיש חשיבות רבה בפיתוח שיטות יעילות להפחתת ההפצה המשנית. התחלנו כבר לעשות זאת ויש הצלחות בנושא (ראו דו"ח של דני שטיינברג וחובריו). אבל, אין להסיק מכך שלא חשוב לעסוק בהפחתת מקורות המידבק הראשוני. נהפוך הוא. כפי שצוין למעלה נושא זה הוא מהנושאים בהם מטפל המיזם.

משך זמן הדגירה ורמת הנגיעות הושפעו ממקור המידבק ההתחלי ומהרקמה המאולחת. תסמיני המחלה האופייניים זוהו בכל המקרים בפרק זמן של עד חודש לאחר האילוח, בלי תלות במקור המידבק ובאיבר הצמחי המאולח. אבל, נגיעות גבוהה התפתחה רק במקרים בהם האיבר הצמחי המאולח היה השורשים או העלים, בתנאי שהצמחים היו צעירים בזמן האילוח (ראו דו"ח של מנוליס וחבריה). התברר שהמחלה מגיעה לגבעולים גם לאחר אילוח של הפרחים, אבל במקרה זה התפתחו התסמינים לאחר זמן רב ובעוצמה נמוכה (איורים 15 ו-16).

משך זמן הדגירה וחומרת המחלה הושפעו גם מתנאי הסביבה. נגיעות גבוהה התפתחה בשתילות פברואר-מרץ (איורים 4, 13 ו-14) כשהצמחים גדלו בתחילת הקיץ והטמפרטורות היו מתונות. בשתילות סוף הסתיו (כשהצמחים גדלו במשך החורף והטמפרטורות היו נמוכות) ובשתילות מאי-יוני (כשהצמחים גדלו בקיץ והטמפרטורות היו גבוהות) משך הזמן שעבר מהשתילה ועד להופעת תסמיני המחלה היה ארוך יותר, וחומרת הנגיעות שהתפתחה הייתה נמוכה יותר (איורים 4, 13, 14 ו-20 ג). המשמעות של ממצא זה היא שניתן להתחמק מהמחלה על ידי הימנעות משתילה בחודשים המועדים. כנראה שזו אחת הסיבות לכך שבשנת 2009 חומרת המחלה, בקנה מידה איזורי, הייתה נמוכה-בינונית. מרבית המגדלים בעונה זו התחמקו מהמחלה מפני שרוב השתילות לא היו בחודשים פברואר-מרץ (איור 2 ד). יתכן שלתנאי הסביבה השפעה נוספת על הפתוגן: מהממצאים עולה שחומרת המחלה בצמחים שהיו נגועים בנגיעות קלה החמירה באופן פתאומי בחודשים מאי-יוני. החמרה זו נצפתה גם בצמחים צעירים שנשתלו בחודשים פברואר מרץ וגם בצמחים מבוגרים מאד שנשתלו בספטמבר-אוקטובר והיו נגועים בנגיעות קלה במהלך כל החורף (איור 10 ב, ד ו-14 א). יתכן שבטווח טמפרטורות מסוימות יש עליה ברמת האלימות של החיידקים המאכלסים את הרקמות. ממצאים דומים דווחו על ידי שולמית מנוליס וחבריה (ראו דו"ח). להבנת הגורמים המשפיעים על אלימות הפתוגן חשיבות רבה והוא חלק מעבודת הדוקטורט של גלית שהרבני.

צורת התסמינים המופיעים על אברי הצמח הייתה שונה בהתאם למקור המידבק (חיצוני או פנימי) והאיבר המאולח (עלה, גבעול, פרח או פרי). כשמקור המידבק היה חיצוני והחיידקים חדרו דרך הטריכומות של העלים או הפרי או דרך ההידטודות, נוצרו על איברים אלה תסמינים ייחודיים (איור 17 א-ו). לאחר שהצמח כבר מאולח, החיידקים נעים בצינורות הקסילים שלו ומדביקים את אברי הצמח האחרים בצורה סיסטמית. על האברים שנוגעו בצורה סיסטמית מתפתחים תסמינים אחרים (איור 17 ז-ס). מכאן עולה שניתן לקבוע אם מקור המידבק היה חיצוני או פנימי על פי אופי התסמינים. אבל, אם התסמינים הנראים מרמזים שהצמח נגוע סיסטמית, לא ניתן לקבוע מה היה האיבר הצמחי שנידבק ומתי ההדבקה התרחשה למעשה.

אמנם אין זנים חסונים (כאילה שאינם נדבקים בפתוגן כלל) אך נראה שקיימים הבדלים בתגובה של זני עגבנייה שונים למחלה. ההבדלים מתבטאים במשך תקופת הדגירה, בקצב ההתפתחות של תסמיני המחלה ובחומרת הנגיעות המרבית המתפתחת. למרות שהיו הבדלים בסקר הנרחב בין זנים שונים (איור 14) לא ניתן להסיק מכך מסקנות לגבי רגישותם, מפני שזנים שונים נשתלים במועדים שונים וכפי שהראנו למועד השתילה השפעה על חומרת הנגיעות. הראנו גם שבאזור רמת הנגב הייתה נגיעות גבוהה יותר מאשר באזורים האחרים (איור 3) וניתן להסיק מכך אולי שזני הצ'רי (המגודלים שם) רגישים יותר מהזנים האחרים. מסקנה זו אינה נכונה מפני החלקות שנדגמו באזור רמת הנגב לא נבחרו בצורה אקראית. נהפוך הוא, נראה שזני הצ'רי רגישים פחות למחלה מזני העגבניות האחרים (איורים 21-18). בכל מקרה, זה נושא חשוב ואנו מתכוונים לבחון אותו בצורה מסודרת בשנת המיזם השנייה.

לסיכום, אמנם ציינו שהסקר מהווה רק "צילום מצב" של המתרחש בחלקות המסחריות ושלא ניתן להסיק ממנו מסקנות סופיות לגבי ההשפעות של גורמים שונים על התפתחות המחלה, אבל ראינו שניתוח הממצאים איפשר להתמקד בגורמים החשובים המשפיעים על המערכת. בשנת המיזם השנייה נמשיך ונעסוק בנושאים שעלו, נבחן אותם צורה מכוונת ובכך נקדם את היעד של המיזם "פיתוח אסטרטגיה למניעת הנזקים הנגרמים על ידי מחלת הכיב הבקטריאלי לעגבניות הגדלות בחממות ובבתי רשת ולמניעת התבססות המחלה באזורים בהם היא לא נמצאת".

השפעת תנאי הסביבה והפונדקאי על האלימות והתפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה

שולמית מנוליס, גלית שהרבני, אורית דרור, מנחם בורשטיין, רן שולחני, ודני שטיינברג

המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, בית דגן

1. תקציר

מטרת העבודה הכללית היא להבין את יחסי הגומלין שבין הפתוגן, הפונדקאי ותנאי הסביבה והשפעתם על התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בצמחי עגבנייה הגדלים בחממות ובבתי רשת בתנאי הגידול בארץ. מטרת העבודה לשנה הראשונה של המחקר היו: 1. לבדוק את השפעת הטמפרטורה על הופעת תסמיני מחלה, 2. לבחון את השפעת הגיל הפיזיולוגי של הצמחים וגיל הרקמה המאולחת על אכלוס והופעת תסמיני מחלה, 3. לבחון את השפעת סוג המידבק הראשוני על הפרשת החיידקים במי הדמיעה. בניסויים שנעשו בבשור נבחנה השפעת מועד האילוח מתוך הנחה שבכל חודש שוררת טמפרטורה שונה. תוצאות המחקר שבוצע במהלך שמונה החודשים החל מאפריל 2009 מצביעות על כך שהטמפרטורה (חודש האילוח) משפיעה על משך הזמן עד להתמוטטות הצמחים. בניסויים שנעשו במכון וולקני נמצא כי צמחים צעירים רגישים יותר למחלה ומתמוטטים מהר יותר מצמחים מבוגרים. גם כאשר האילוח נעשה בעלים צעירים לעומת עלים מבוגרים יותר נמצא כי שכיחות המחלה גבוהה יותר. בניסויים אלה לא נמצא קשר לרמת האכלוס בצמחים, כלומר רמת החיידקים בצמח וברקמה הצעירים לא היו שונים במובהק מאלו של צמחים ורקמות מבוגרים. נבדקה השפעת סוג המידבק הראשוני על הפרשת החיידקים במי הדמיעה, מתוך השערה שנוכחות החיידקים במי הדמיעה של צמחים מאולחים מהווה מקור עיקרי להפצה מישנית של המחלה. תוצאות הניסויים הראו שמקור המידבק הראשוני אינו משפיע על הפרשת החיידקים במי הדמיעה וכי הופעתם במי הדמיעה אינה תלויה בגיל העלים ובנפח הטיפות למרות שהצמחים נמצאו מאוכלסים בחיידקים. העבודה על מטרות המחקר השונות תמשך גם בשנה השנייה של המחקר ותוצאותיה יאפשרו להגדיר את התנאים להתפתחות המחלה ולמציאת הדרכים להתמודדות עימה.

2. מבוא

גורמים שונים יכולים להשפיע על ההדבקה, האכלוס והתפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה. בספרות המקצועית פורסמו עבודות שהראו את השפעת הטמפרטורה על משך זמן הדגירה ועל חומרת המחלה ונמצא שהתסמינים התפתחו מהר יותר בטמפרטורות גבוהות יותר (עד 30 מ"צ). גם תצפיות קודמות שלנו הראו תלות בטמפרטורה; בחודשי החורף והקיץ יש ירידה בהדבקות ובהופעת סימני המחלה הנגרמים ע"י קלויבקטר למרות שצמחי העגבנייה נמצאו מאוכלסים בפתוגן. אולם בספרות לא קיים מידע לגבי השפעת הטמפרטורה על גודל האוכלוסייה ועל האלימות של החיידקים בצמחי עגבנייה הגדלים בבתי גידול מסחריים.

השפעת הפונדקאי על התפתחות המחלה תוארה בעבודות שבדקו את השפעת גיל הצמח ונמצא כי התסמינים התפתחו במהירות גבוהה יותר בצמחים בני שבועיים. גם תצפיות קודמות שלנו הראו כי צמחים בוגרים עמידים יותר למחלה ונגרם להם פחות נזק מצמחים צעירים. אולם בספרות לא דווח על ההשפעה של גיל הרקמה המאולחת על התפתחות המחלה ולא קיים מידע לגבי השפעת גיל הצמח על אכלוס הפתוגן ברקמות ועל התבטאות גנים לוירולנטיות בצמחים וברקמות המאולחים.

הדבקת עלים יכולה להתרחש דרך פתחים טבעיים בעלים (פיוניות, בסיס שערות והידטודות). למרות שפציעה לפני האילוח מגבירה את חומרת המחלה היא אינה תנאי הכרחי לאילוח העלים. עבודות קודמות הראו כי הידטודות יכולות להוות מקום חדירה לפתוגן אולם אין מידע לגבי חשיבותם בהפצה מישנית של המחלה. לא ידוע גם כיצד ההפצה המישנית יכולה לגרום לאפידימיה כאשר ישנם מקורות מידבק ראשוני שונים.

פורסמו עבודות המתארות את התקדמות הפתוגן בצמח העגבנייה לאחר ההדבקה ואת רמת אוכלוסיית החיידק. נמצא שנבילת צמחי עגבנייה נצפתה רק כאשר רמת אוכלוסיית הפתוגן עלתה מעל 10^8 תאים לגרם רקמה. אולם לא ידוע באם הפתוגן צריך לאכלס את כל רקמות הצמח ברמה כזו בכדי לגרום להתמוטטות או שההתמוטטות נגרמת גם אם רמת האכלוס הגבוהה קיימת רק בחלק מהצמח. בנוסף לא ברור עם יש קשר בין רמת האכלוס להפעלת גנים לוירולנטיות.

מחקרים על מנגנון הפתוגניות של החיידק קלויבקטר תבדיד NCPPB382 הראו כי חיידקים פתוגניים הכילו שני פלסמידים (pCM1, pCM2) הנושאים גנים לפתוגניות. תבדידים שאיבדו את הפלסמידים האלה הפכו ללא פתוגניים, או פתוגניים באופן חלקי, אך עדיין אכלסו ביעילות צמחי עגבניות. הפלסמיד הראשון (pCM1) נושא גן לאנדוגלוקנאז (*celA*) והפלסמיד השני (pCM2) נושא גן הדרוש לפתוגניות (*pat-1*) המראה הומוולוגיה לסרין פרוטאז. נמצא כי שינוי בטמפרטורת גידול החיידקים מ-26 מ"צ ל-32 מ"צ גרם לאיבוד פלסמידים. הגנום של התבדיד NCPPB382 פוענח ועליו נמצא איזור הנקרא "אי פתוגניות" המכיל גנים הדרושים לפתוגניות. פגיעה באזור זה הפחיתה באופן דרמטי את אכלוס הפתוגן בצמח. רוב העבודות המולקולאריות שתוארו נעשו על תבדיד NCPPB382. בעבודת המחקר הנוכחית הניסויים יבוצעו עם שני תבדידים מקומיים, Cmm42 ו-Cmm32. אין כל מידע מולקולארי לגבי תבדידים אלה, למעט העובדה שתבדיד 42 שייך לקבוצה A ותבדיד 32 שייך לקבוצה B על פי אפיון ב-PFGE.

היפותזות העבודה הן:

1. הטמפרטורה בזמן ההדבקה משפיעה על קצב התמותה של הצמחים המאולחים. התמוטטות הצמחים תלויה בגודל אוכלוסיית החיידקים ברקמות הצמחיות ומתרחשת רק בטווח טמפרטורות מוגדר.
2. התמוטטות הצמחים המודבקים תלויה בגיל הפיזיולוגי שלהם בזמן ההדבקה. הצמחים ימותו רק אם ההדבקה התרחשה בשלבי הגידול הראשוניים שלהם, כאשר כל הרקמות הצמחיות מאוכלסות ברמה גבוהה של הפתוגן.
3. נוכחות החיידקים במי הדמיעה של צמחים מאולחים מהווה מקור עיקרי להפצת המחלה לצמחים שכנים. הופעת החיידקים במי הדמיעה תלויה במקור המדבק הראשוני ובריכוזו.

מטרת העבודה הכללית היא להבין את יחסי הגומלין שבין הפתוגן, הפונדקאי ותנאי הסביבה והשפעתם על התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בצמחי עגבנייה הגדלים בחממות ובבתי רשת בתנאי הגידול בארץ.

מטרות המחקר הספציפיות הן:

1. בחינת השפעת הטמפרטורה על הופעת תסמיני מחלה, אכלוס והתבטאות גנים לוירולנטיות.
2. בחינת השפעת הגיל הפיזיולוגי של הצמחים וגיל הרקמה המאולחת על אכלוס, הופעת תסמיני מחלה והתבטאות גנים לוירולנטיות.
3. בחינת השפעת סוג המידבק הראשוני על הפרשת החיידקים במי הדמיעה וחשיבות מי הדמיעה בהפצת משנית של המחלה.
4. בידוד החיידקים וקביעת טיפוס הפתוגן ב-PFGE במסגרת הסקר הארצי.

ממצאי הניסויים של מטרה 1 יאפשרו לקבוע כיצד משפיעה הטמפרטורה על הוירולנטיות של הפתוגן ועל התבטאות המחלה בצמחים נגועים ויאפשרו לקבוע את "חלון הטמפרטורות" – טווח הטמפרטורות המאפשר לחיידקים לאכלס את רקמות הצמחים ולגרום להתמוטטותם. ממצאי הניסויים של מטרה 2 יאפשרו לקבוע מדוע צמחים המאולחים כשהם צעירים רגישים יותר ולקבוע את טווח "חלון הזמן" להדבקה הגורמת לתמותה. ממצאי הניסויים של מטרה 3 יאפשרו לקבוע את התרומה של מי הדמיעה המופרשים מעלי העגבניות להפצת המחלה במרחב ולקבוע מהו "חלון ההזדמנויות" בו המחלה מופצת מצמח אחד למשנהו. בשנה הראשונה של המחקר עבדנו במקביל על ארבעת המטרות.

3. תאור הניסויים שבוצעו

להלן נפרט באופן כללי את הניסויים ושיטות העבודה. תאור ספציפי יותר של כל ניסוי יובא בתוצאות. הניסויים בוצעו בחוות הבשר ובבתי גידול במכון וולקני. צמחי העגבניות לניסויים היו: זן מאכל 1225 וזן צ'רי 1335. האילוח נעשה עם שני תבדירים שבודדו מאזור הבשר Cmm42 (טיפוס A) ו-Cmm32 (טיפוס B). הכנת המדבק נעשתה ע"י גידול החיידקים על צלחות עם מצע NA (Nutrient agar) ב-28 מ"צ במשך 48 שעות. לאחר מכן התאים הורחפו במים מעוקרים ל-0.5 OD (600 nm) מתרחף זה נעשה מיהול עשירי לקבלת ריכוז של 10^8 חיידקים לסמ"ק. התרחף לאילוח הצמחים הוכן משני התבדירים ביחס של 1:1.

שיטות האילוח היו: גזירה של שני עלים אמיתיים ראשונים עם מספריים שנטבלו בתרחף החיידקים או טבילת השורשים של שתילים (עם 3-4 עלים אמיתיים שנרכשו ממשלה) לפני השתילה בתרחף חיידקים בריכוז של 10^8 חיידקים לסמ"ק במשך שעה וחצי. בחלק מהמקרים הצמחים אולחו באזור חיבור הפטוטרט לגבעול ע"י דקירה והנחת טיפה של 10 מיקרוליטר מתרחף חיידקים בריכוז של 10^9 תאים/מ"ל.

הערכות הנגיעות בוצעו מידי שבוע-שבועיים ויזואלית תוך שימוש בסולם בן 5 דרגות, כלהלן: 1. צמחים בריאים: צמחים שלא נראו עליהם תסמיני המחלה אופייניים (יתכן שצמחים אלה היו מאוכלסים בפתוגן); 2. נגיעות נמוכה: צמחים שעל חלק מהעללים, או העלים שלהם, נראו תסמיני המחלה האופייניים. במבט כללי נראו הצמחים חיוניים. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים לא עלה על 10%; 3. נגיעות בינונית: בצמחים אלה היו עלים רבים שנפגעו מהמחלה, אך חלק מהעלים נראו לא פגועים. הצמחים לא החלו לכמוש. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים לא עלה על 40%; 4. נגיעות גבוהה: בצמחים אלה מרבית העלים נפגעו מהמחלה, או שהם היו בשלבי כמישה ראשוניים. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים עלה על 50% אך עדיין היו עלים שנראו לא פגועים; 5. צמחים מתים: צמחים שמתו (או כמשו) כתוצאה מהתפתחות המחלה. מאחר והסולם בו השתמשנו הוא לא סולם כמותי (משתנה סדר ולא משתנה רציף) לא חושבו ערכים נגיעות ממוצעים עבור צמחים שונים של אותו הטיפול. במקום זאת, השתמשנו במדדים שונים של שכיחות (באחוזים). למשל, שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה האופייניים (נגיעות בדרגה של $1 <$); שכיחות של הצמחים שהתפתחה בהם נגיעות בחומרה גבוהה ומעלה (נגיעות בדרגות 4 ו-5) ושכיחות הצמחים שמתו מהמחלה (דרגה 5). נתוני השכיחות הם נתונים כמותיים והם שימשו לתיאור עקומי התפתחות המחלה לאורך זמן. העקומים היו עקומים סיגמואידים וחישבנו עבורם משוואות רגרסיה תוך שימוש בנוסחה: $Y = a / (1 + e^{-(X - X_0)/b})$ כאשר, Y = שכיחות הצמחים המאולחים; X = זמן (בימים) ממועד השתילה; a = הפרמטר הראשון של המשוואה המבטא את האסימפטוטה העליונה (מידת הנגיעות המרבית); b ו- X_0 = הפרמטר השני והשלישי של המשוואה המתארים את מקום נקודת הפיתול וקצב התקדמות המחלה. כאשר משוואות הרגרסיה היו מובהקות, חישבנו שני מדדים המתארים את עקום התפתחות המחלה: Y_{max} = שכיחות המחלה המרבית (באחוזים) שנאמד על פי משתנה a של המשוואה; ערך ה- T_{50} = הזמן (בימים) שעבר מהשתילה ועד למועד בו הייתה שכיחות המחלה 50% מהערך של Y_{max} .

השתמשנו בתוכנות Excel, Jump ו-Sigmaplot לביצוע הניתוחים הסטטיסטיים. בכל מקרה השתמשנו במבחן המתאים. בין היתר, נותחו הנתונים באמצעות מבחני ANOVA חד ודו-כיווניים. כשערכי ה- F היו מובהקים נקבעו ההבדלים בין הטיפולים באמצעות מבחן HSD ברמת מובהקות של $P=0.05$. חלק מהנתונים נותחו באמצעות רגרסיה פשוטה, רגרסיה מרובת משתני או רגרסיה לא-ליניארית. במקרים אלה הוצג מתאם המתאם המרובה (r^2) וערך המובהקות (P) של משוואת הרגרסיה. במספר מקרים הוצגו הממוצעים וערכי השונות (סטיית תקן) של הממוצע.

קביעת איכלוס הצמחים בחיידקים נקבעה מדי חודש בדגימות שנלקחו מאזור ההדבקה, במרחק של 0.75 מ' ובמרחק של 1.5 מ', מצמחים בדרגות חומרת נגיעות שונה. דגימות הצמחים נשקלו, רוסקו במים מעוקרים, עברו מיהולים עשורניים ונזרעו על מצע מזון חצי סלקטיבי (CNS). לאחר 5 ימי הדגרה בטמפרטורה של 28 מ"צ המושבות נספרו וריכוז החיידקים חושב לגרם רקמה. אם היה צורך נבחנו מושבות חיידקים חשודים ב-PCR עם תחלים ספציפיים על בסיס הגנים ליורלנטיות *pat-1* ו-*celA* הנמצאים על פלסמידים וכן מהגן *chpC* הנמצא על אי הפתוגניות.

איבוד הפלסמידים מהחיידקים שבודדו נבדק באמצעות PCR עם התחלים על בסיס הגנים *pat-1* ו-*celA* הנמצאים על הפלסמיד הגדול והקטן בהתאמה.

4. תוצאות ודין

4.1 השפעת הטמפרטורה על אכלוס, הופעת תסמיני מחלה והתבטאות גנים לוירולנטיות

4.1.1 השפעת מועד השתילה והאילוח על התפתחות המחלה

הניסויים נעשו בחוות הבשור במנהרות שונות. שתילת העגבניות נעשתה מידי חודש מתוך הנחה שבכל חודש שוררת טמפרטורה שונה. האילוח נעשה שבועיים לאחר השתילה ע"י גזירה של שני עלים ראשונים עם מספריים. זמני השתילה ותאריכי האילוח מסוכמים בטבלה 1.

השפעת מועד האילוח על שכיחות המחלה (%) נקבעה על פי מספר הצמחים עם סימני מחלה מתוך כלל הצמחים שאולחו בכל מנהרה (איור 1) ועל פי מספר הצמחים עם נגיעות קשה/מתים מתוך כלל הצמחים (איור 2). ניתן לראות באיור 1 כי בכל המנהרות הצמחים שאולחו פתחו תסמיני מחלה אופייניים, ערך ה- Y_{max} היה 100%. אולם במנהרה 3 (אילוח בחודש יוני) ערך ה- T_{50} היה הגבוה ביותר (67.3 ימים מאילוח).

כאשר מחשבים את שכיחות המחלה של סה"כ הצמחים המתים/נגועים קשה (איור 2) Y_{max} היה 100% אולם התחלת הופעת התמוטטות צמחים נצפתה כ- 60 ימים לאחר האילוח. גם במקרה זה ערך ה- T_{50} של הצמחים במנהרה 3 היה הגבוה ביותר (134 ימים מאילוח).

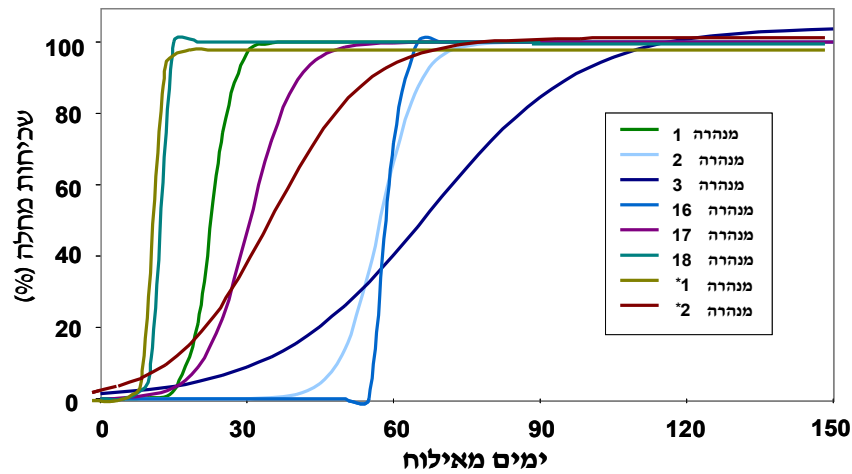
ערכי ה- T_{50} (הזמן הדרוש ל- 50% מהצמחים להיות נגועים) של ניסוי זה מתוארים באיור 3 (מספר הצמחים עם סימני מחלה מתוך כלל הצמחים המאולחים) ואיור 4 (מספר הצמחים עם נגיעות קשה/מתים מתוך כלל הצמחים המאולחים). ניתן לראות כי בחודשים מאי, יוני ויולי הזמן עד להתפתחות סימפטומים ב- 50% מהצמחים הוא הארוך ביותר (איור 3). הזמן עד לתמותה של 50% מהצמחים היה הארוך ביותר כאשר האילוח נעשה בחודש יוני (איור 4). מגמה של עליה בזמן זה מסתמנת גם בחודש נובמבר.

תוצאות שהתקבלו עד עתה מצביעות על כך שקיים קשר בין מועד האילוח לזמן בו 50% מהצמחים מתמוטטים. לא ברור במה שונה חודש יוני משאר חודשי הקיץ (יולי ואוגוסט). אולם כאשר בוחנים את הקשר בין מועד האילוח לזמן בו 50% מהצמחים נגועים (איור 3) ניתן לראות כי אכן קיימת מגמה שבה בחודשי הקיץ מתארך הזמן עד להופעת תסמיני המחלה. מכיוון שבשנה הקרובה נחזור על ניסוי זה נוכל לאמת את התוצאות.

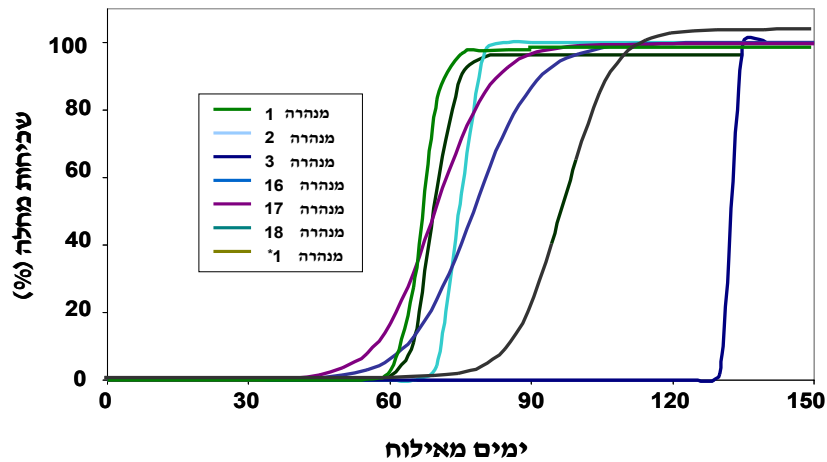
בכל המנהרות מפוזרים אוגרי נתונים למדידת טמפרטורה ולחות בכל שעות היממה. ניתוח של נתונים אלו יאפשר לקבוע אם אכן קיים קשר בין הטמפרטורה בזמן האילוח להופעת תסמיני המחלה ברמות השונות.

טבלה 1: זמני שתילה ואילוח צמחי העגבניות במנהרות השונות

מספר מנהרה	חודש האילוח	מועד השתילה	מועד האילוח
מנהרה 1	אפריל	22/03/2009	05/04/2009
מנהרה 2	מאי	21/04/2009	07/05/2009
מנהרה 3	יוני	20/05/2009	04/06/2009
מנהרה 16	יולי	18/06/2009	02/07/2009
מנהרה 17	אוגוסט	19/07/2009	29/07/2009
מנהרה 18	ספטמבר	19/08/2009	03/09/2009
מנהרה 1	אוקטובר	20/09/2009	05/10/2009
מנהרה 2	נובמבר	25/10/2009	09/11/2009



איור 1: השפעת מועד האילוח על שכיחות המחלה (%) של סה"כ צמחים נגועים מתוך כלל הצמחים שאולחו בכל מנהרה. בכל מנהרה היו 17-34 צמחים. משוואות הגרפים, T_{50} , r^2 , מוצגים בטבלה 2.

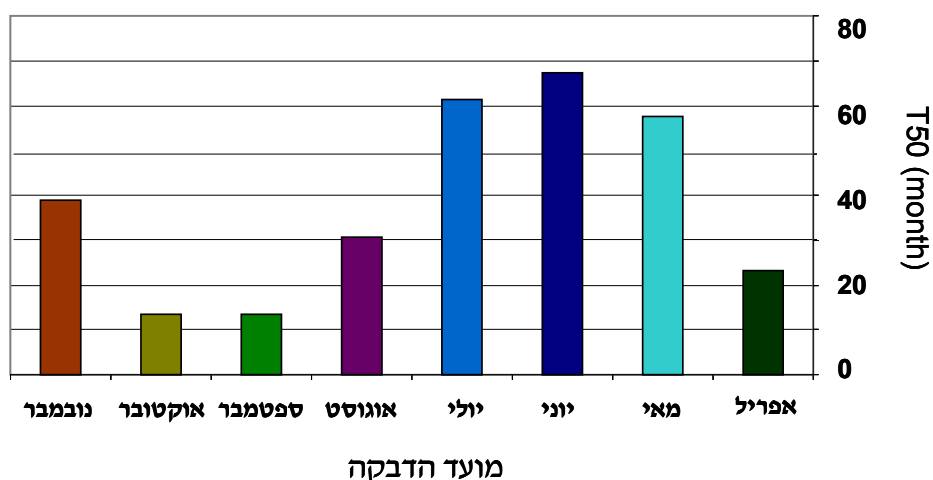


איור 2: השפעת מועד האילוח על שכיחות המחלה (%) של סה"כ צמחים נגועים קשה/מתים מכלל הצמחים שאולחו בכל מנהרה. בכל מנהרה היו 17-34 צמחים. משוואות הגרפים, T_{50} , r^2 , מוצגים בטבלה 2.

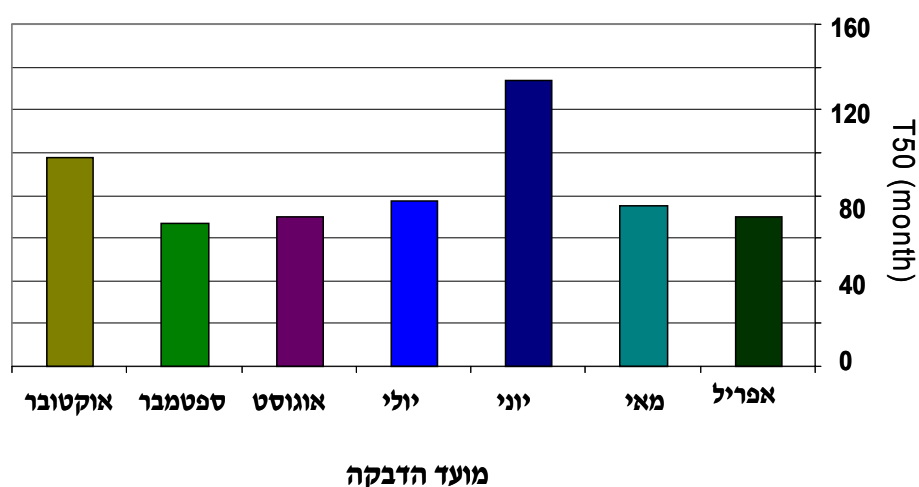
טבלה 2: הפרמטרים של המשוואות המתארות את התוצאות באיורים 1 ו-2.

סה"כ צמחים נגועים								
מנהרה	1	2	3	16	17	18	*1	*2
a (Y max)	100	100	104.2	100	100	100	98.2	101.7
b	2.095	3.965	15.53	0.541	4.569	0.42	0.83	9.81
X_0	22.76	57.34	67.22	59.5	30.64	11.15	12.45	38.66
R^2	0.999	0.997	0.964	0.999	0.982	1	0.962	0.954
T_{50}	23.2	57.6	67.3	61.2	30.8	13.3	13.6	38.8

צמחים נגועים קשה/מת							
מנהרה	1	2	3	16	17	18	*1
a (Y max)	96.39	100.1	100	99.9	99.57	97.8	103.2
b	2.101	1.493	0.435	6.583	5.9	1.87	5.116
X_0	69.29	74.7	131.7	77.6	69.47	66.75	97.39
R^2	0.994	0.999	1	0.998	0.999	0.998	0.997
T_{50}	69.7	75.3	133.8	77.7	69.6	67.2	97.6



איור 3: השפעת מועד ההדבקה על הזמן הדרוש ל- 50% מהצמחים להיות נגועים (T_{50}). החודשים מתארים את מועד ההדבקה במנהרות השונות כפי שמסוכם בטבלה 1.



איור 4: השפעת מועד ההדבקה על הזמן הדרוש ל- 50% מהצמחים להיות נגועים קשה/מתים (T_{50}). החודשים מתארים את מועד ההדבקה במנהרות השונות כפי שמסוכם בטבלה 1.

4.1.2. השפעת הטמפרטורה על התפתחות החיידקים במצע נוזלי

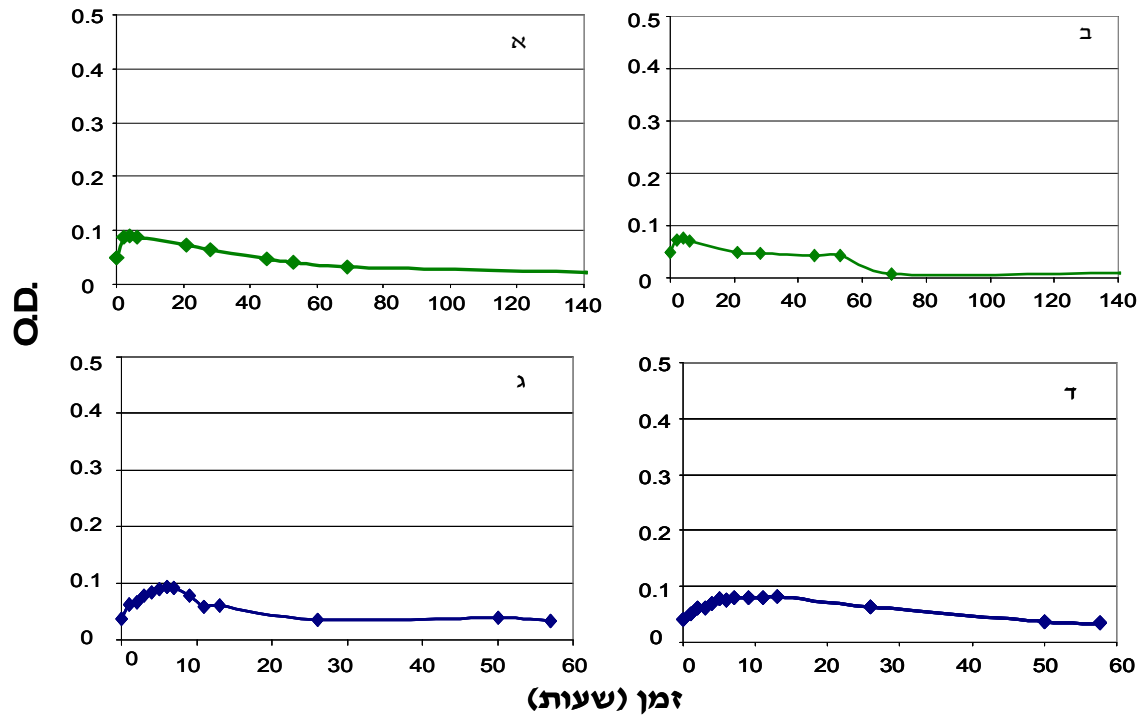
על מנת לבדוק אם השפעת הטמפרטורה על התפתחות המחלה נובעת מהשפעה ישירה על גידול החיידקים בדקנו בשלב ראשון בנסויי מעבדה את השפעת טמפרטורת הגידול על התפתחות החיידקים במצע נוזלי. החיידקים גודלו במצע מינימלי (M9) ובמצע עשיר (LB) בטמפרטורה של 28, ו- 40 מ"צ. עוצמת הבליעה (OD 600) של התרחיף נבדקה בזמנים שונים ובמקביל נזרעה דגימה מהתרחיף על מצע חצי ברירני (CNS). מהחיידקים שבודדו נבדקה נוכחות הפלסמידים באמצעות PCR עם פריימרים על בסיס הגנים לוירולנטיות *pat-1* ו- *celA* הנמצאים על הפלסמיד הגדול והקטן בהתאמה.

בטמפרטורה של 40 מ"צ (איור 5) שני התבדידים על שני המצעים לא התרבו. לעומת זאת שני התבדידים גדלו היטב בטמפרטורה של 28 מ"צ על המצע העשיר (LB). בטמפרטורה זו שהיא אופטימלית לגידול החיידקים לא נמדדה התרבות במצע המינימלי (איור 6).

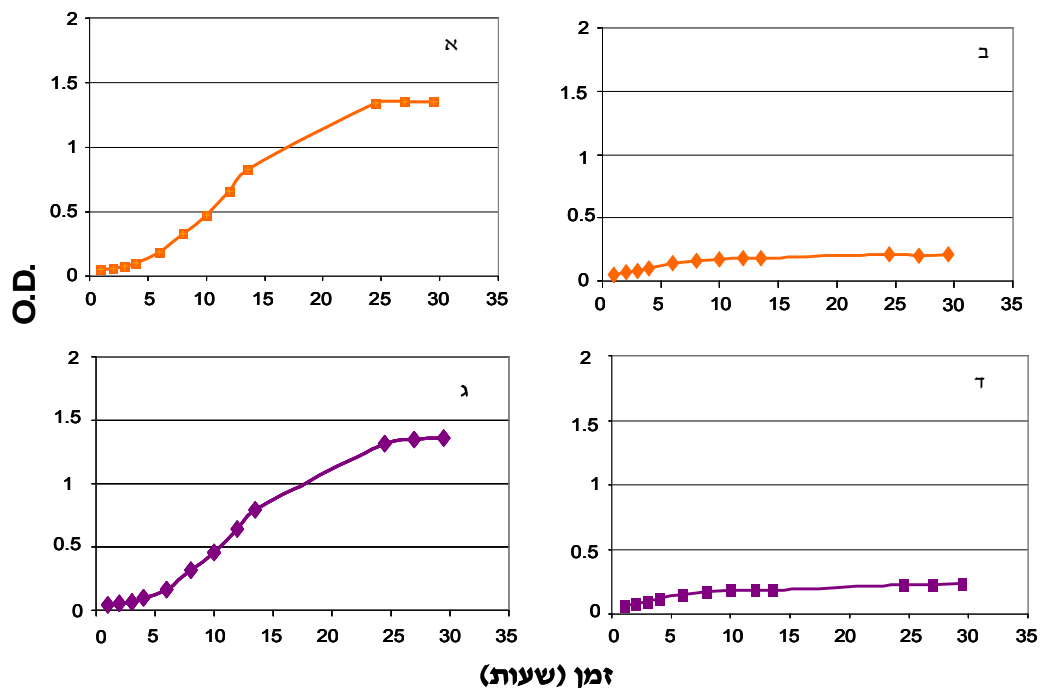
זריעת החיידקים על צלחות המכילות מצע גידול הראתה שהחיידקים לא מתרבים בטמפרטורה הגבוהה ובמצע המינימלי. נעשו בידודים של החיידקים שגדלו בטמפרטורות השונות ובמצעים השונים אולם לא נמצאו חיידקים שאיבדו את הפלסמידים הקטן או הגדול. יתכן שאיבוד הפלסמידים מתרחש מהר יותר בחיידקים הגדלים בצמחים לעומת המצע. כמו כן תתכן האפשרות שהתבדידים איתם השתמשנו לאילוח הצמחים אינם מאבדים את הפלסמידים בקלות כפי שקורה עם התבדיד NCPPB382.

העובדה שהחיידקים לא מתרבים בטמפרטורה גבוהה של 40 מ"צ גם על מצע עשיר תומכת לכאורה בתוצאות שהוצגו לעיל (איורים 1,2,3,4) המראים את השפעת הטמפרטורה על התפתחות סימני המחלה והתמוטטות

הצמחים. אולם מכיוון שהניסויים נעשו במצע סינטטי אין אפשרות, בשלב זה, לקבוע שגם בצמחים בטמפרטורות גבוהות החיידקים אינם מתרבים היטב. בהמשך המחקר נבודד פלסמידים מהתבדילים שבודדו בארץ והמשמשים לניסויים במיזם זה. לאחר אפיון הפלסמידים תיבדק נוכחותם בצמח המודבק בתנאי טמפרטורות שונים.



איור 5: עקומות גידול החיידקים על שני מצעים שונים LB ו-M9 בטמפרטורה של 40 מ"צ. **א-** תבדיל 32 מצע LB **ב-** תבדיל 32 מצע M **ג-** תבדיל 42 מצע LB **ד-** תבדיל 42 מצע M



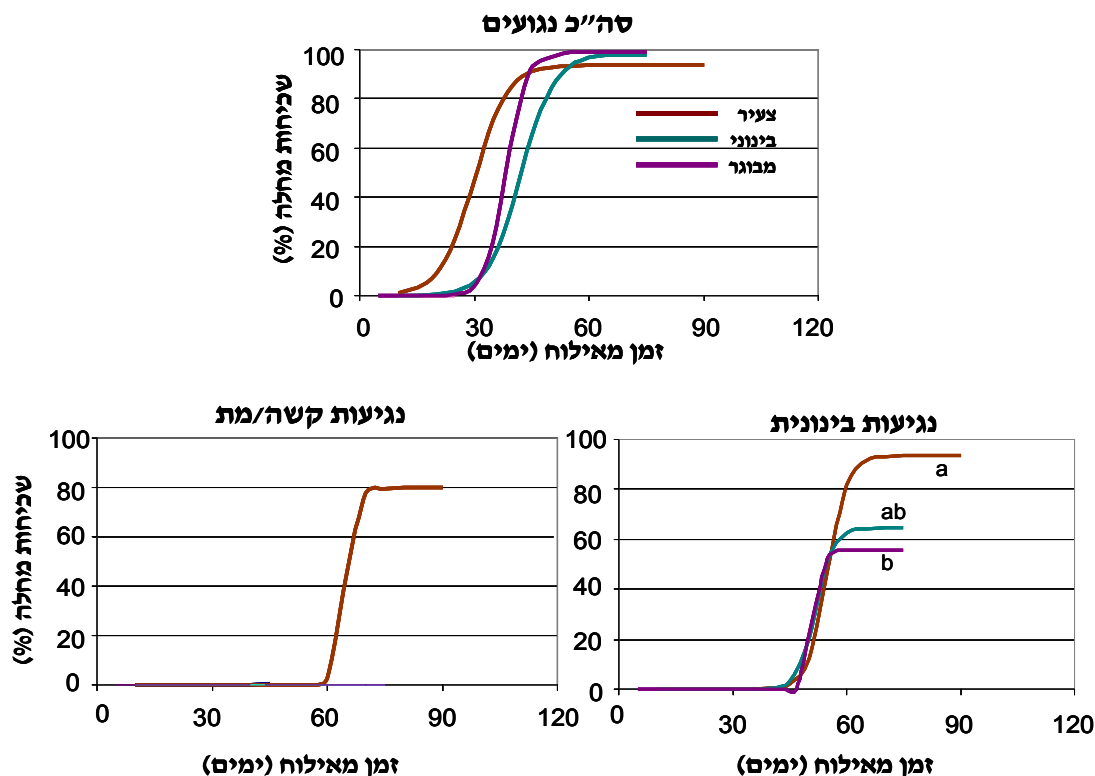
איור 6: עקומות גידול חיידקים על שני מצעים שונים LB ו-M9 בטמפרטורה של 28 מ"צ. **א-** תבדיל 32 מצע LB **ב-** תבדיל 32 מצע M **ג-** תבדיל 42 מצע LB **ד-** תבדיל 42 מצע M

4.2. השפעת הגיל הפיזיולוגי של הצמחים וגיל הרקמה המאולחת על הופעת תסמיני מחלה, אכלוס והתבטאות גנים לוירולנטיות

4.2.1. השפעת גיל הצמח וגיל הרקמה המאולחת על שכיחות המחלה

הניסויים נעשו עם צמחי עגבנייה שנשתלו בבתי רשת במכון וולקני. השפעת הגיל הפיזיולוגי של הצמח על התפתחות המחלה נבחנה בצמחים בגילאים שונים כאשר האילוח נעשה ע"י גזירה של שני עלים עליונים (עלים צעירים ביותר בצמח) (איור 7). בכדי לבחון את השפעת גיל הרקמה על התפתחות המחלה, אולחו עלים בגבהים שונים בצמחים באותו הגיל (איור 8). באיור 7 ניתן לראות כי כאשר בוחנים את סה"כ הצמחים עם סימני מחלה אין הבדל בין הצמחים בגילאים השונים. Y_{max} היה דומה בכל הצמחים בין 93% ל- 99% (טבלה 3). גם ב- T_{50} לא נמצא הבדל משמעותי. כאשר מחשבים את שכיחות המחלה של הצמחים עם נגיעות בינונית לא היה הבדל ב- T_{50} אך היה הבדל ב- Y_{max} , 93% בצמח הצעיר לעומת 64% ו- 55% בצמחים שהוגדרו בגיל בינוני ומבוגר, בהתאמה. כלומר יותר צמחים צעירים מראים נגיעות בינונית לעומת צמחים מבוגרים. מגמה זו בולטת במיוחד כאשר מחשבים את שכיחות המחלה של צמחים בנגיעות קשה או מתים. רק בצמחים שאולחו בגיל צעיר נמצאו צמחים עם נגיעות קשה. בצמחים בגיל בינוני ומבוגר לא נמצאו צמחים שמתו (איור 7). T_{50} של הצמחים הצעירים היה 65 ימים.

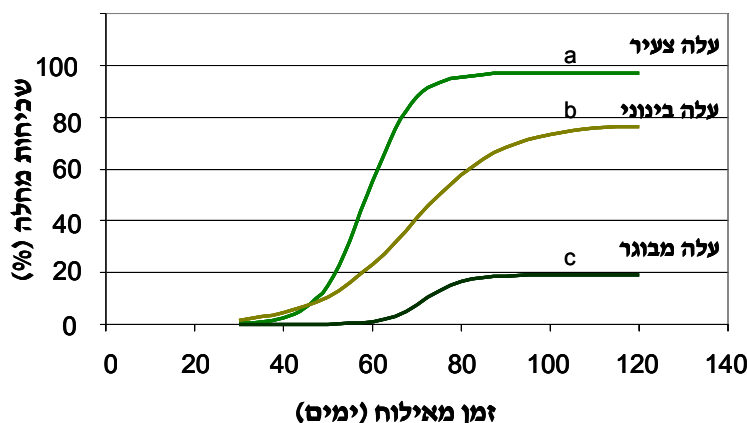
כאשר בחנו את השפעת גיל העלה על שכיחות המחלה (איור 8) ניתן לראות כי עלה צעיר רגיש יותר למחלה מעלים מבוגרים יותר. Y_{max} בעלה צעיר היה 97% לעומת 77% ו- 19% בעלה בינוני ומבוגר, בהתאמה (טבלה 4). ההבדלים בשכיחות המחלה בגיל הרקמה מתבטאים גם ב- T_{50} .



איור 7: השפעת הגיל הפיזיולוגי של הצמח על שכיחות המחלה (%). צמחים בגילאים שונים, עם עלים 3/4 (צעיר), עלים 7/8 (בינוני) ועלים 11/12 (מבוגר) אולחו בגזירה של העלים העליונים. מבחן χ^2 נעשה לצמחים עם נגיעות בינונית ביום ה- 70 לאחר האילוח.

טבלה 3: הפרמטרים של המשוואות המתארות את התוצאות באיור 7

עלים 3/4 - צעיר		עלים 7/8 - בינוני		עלים 11/12 - מבוגר			
נגוע	בינוני פלוס	קשה/מת	נגוע	בינוני פלוס	נגוע	בינוני פלוס	
93.7	93.57	79.78	98.19	64.65	99.19	55.6	a (Y max)
4.322	2.625	1.445	4.32	2.35	2.673	0.415	b
29.883	54.96	64.76	42.17	51.82	38.25	53.83	X ₀
0.987	0.999	0.996	0.994	0.992	0.999	1	R ²
30.1	55.3	65.5	42.4	52.3	38.6	57.1	T ₅₀



איור 8: השפעת גיל הרקמה על שכיחות מחלה (%). בצמחים בעלי 12 עלים אולחו העלים 3/4 (עלה מבוגר), עלים 5/6 (עלה בינוני) ועלים 11/12 (עלה צעיר). שכיחות המחלה נקבעה ע"י מספר העלים עם סימני מחלה מתוך כלל העלים שאולחו. סה"כ היו 12 צמחים בכל טיפול ובכל צמח אולחו 2 עלים. מבחן χ^2 נעשה ביום ה-80 לאחר האילוח.

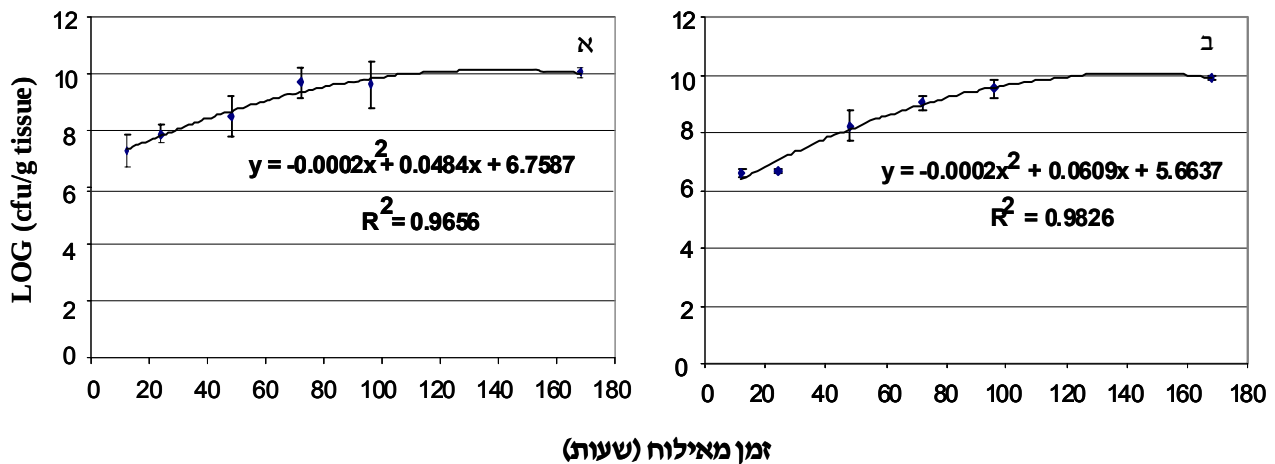
טבלה 4: הפרמטרים של המשוואות המתארות את התוצאות באיור 8.

עלה מבוגר	עלה בינוני	עלה צעיר	
19.0	77.0	96.9	A (Y _{max})
4.3	10.3	5.1	b
71.7	68.7	58.6	X ₀
0.99	0.93	0.95	R ²
0.0001>	0.004	0.002	P
72.4	68.8	58.8	T ₅₀

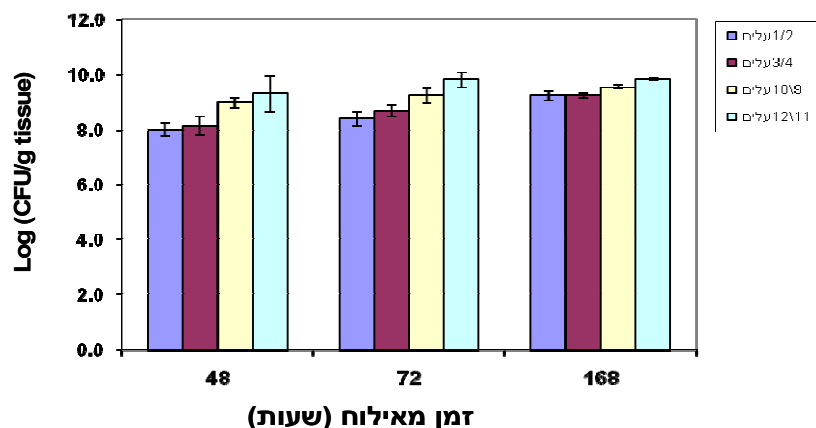
4.2.2. השפעת גיל הצמח וגיל הרקמה על האכלוס בחיידקים

כדי לקבוע אם השפעת גיל הצמח או גיל הרקמה על שכיחות המחלה מתבטאת גם באיכלוס שונה של הרקמות ע"י הפתוגן נקבעה רמת החיידקים באזור ההדבקה בזמנים שונים לאחר האילוח (איורים 9, 10). לא נמצא הבדל באיכלוס הצמחים בגילאים שונים. לאחר 168 שעות רמת החיידקים באזור ההדבקה הגיעה ל- 10^{10} תאים לגרם רקמה (איור 9). גם גיל הרקמה לא השפיע על האכלוס (איור 10). לאחר 168 שעות מהאילוח רמת החיידקים באזור ההדבקה של רקמות בגילאים שונים הגיעה ל- 10^9 - 10^{10} חיידקים לגרם רקמה.

העובדה שצמחים צעירים ורקמה צעירה רגישים יותר למחלה ומתמוטטים מהר יותר (איורים 7,8) מראה שקיים טווח גילאים שבו הרגישות למחלה היא הגבוהה ביותר "חלון רגישות". האפשרות שהסיבה לכך נובעת מהתפתחות מהירה של החיידקים ברקמות הצעירות נבדקה ועל פי התוצאות לא נמצא הבדל משמעותי באיכלוס הרקמות השונות (איורים 9,10). יתכן שבצמחים וברקמות צעירות הפעלה של גנים לוירולנטיות הינה מהירה יותר. נושא זה ייבדק בהמשך המחקר באמצעות qRT-PCR. אפשרות נוספת יכולה לנבוע מכך שברקמות צעירות מערכת ההגנה של הצמח מופעלת לאט או מאוחר יותר. אולם נושא זה לא ייבדק במסגרת מחקר זה.



איור 9: השפעת הגיל הפיזיולוגי של הצמח על אכלוס באזור ההדבקה בזמנים שונים לאחר האילוח. צמחים בגילאים שונים עם עלים 1-2 (א) ועלים 3-4 (ב) אולחו בגזירה של העלים העליונים. אזור האילוח נדגם 12,24,48,72,96,168 שעות לאחר האילוח.



איור 10: השפעת גיל הרקמה על אכלוס באזור ההדבקה בזמנים שונים לאחר האילוח. בצמחים בעלי 12 עלים אולחו העלים 1/2, 3/4, 9/10, 11/12. אזור ההדבקה נדגם 48,72,168 שעות לאחר האילוח.

4.2.3. אכלוס והתקדמות החיידקים בצמחים נגועים

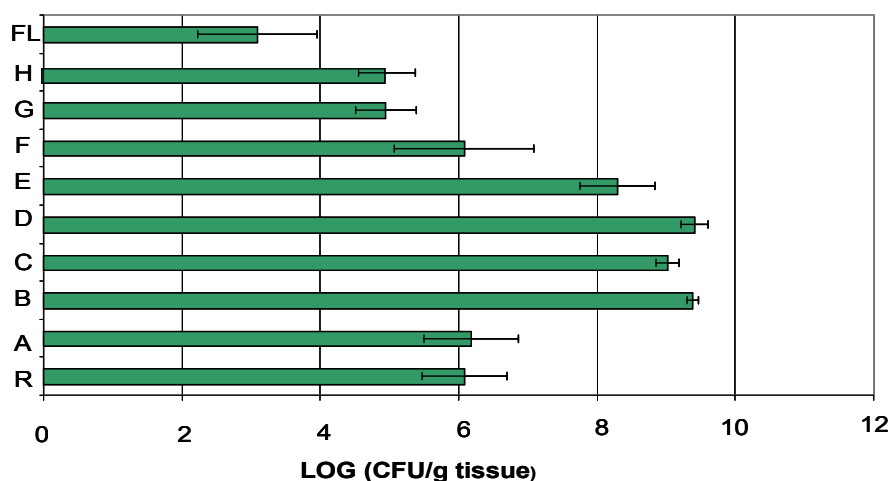
במהלך הניסויים השונים שנעשו במכון וולקני ובבשור למטרות שונות של המחקר התקבלו צמחים נגועים בגילאים שונים. חלק מהצמחים היו ללא סימפטומים וחלקם עם סימפטומים ברמות שהוגדרו על פי הסקלה שתוארה לעיל. בצמחים אלו נבדקו רמות החיידקים בחלקים שונים של צמח. ניסויים אלו יאפשרו לענות על השאלה האם החיידקים מתרכזים באזור ההדבקה או שישנה התקדמות לאורך כל הצמח כך שכולו מתאכלס, והאם יש קשר בין רמת האיכלוס בצמח לרמת הנגיעות.

אוכלוסיית החיידקים נבדקה בצמחים שנראו בריאים (ללא סימפטומים) בחלקים שונים של הצמח (איור 11). הצמחים שנבדקו נלקחו מניסוי שבחן את השפעת גיל הרקמה על שכיחות המחלה. ניתן לראות כי כל רקמות הצמח מאוכלסות בחיידקים ונמצא גרדיאנט בין אזורי ההדבקה לשאר החלקים בצמח. כך האכלוס הגבוה ביותר היה באזורי ההדבקה B, C, D, E והגיע ל- 10^8 - 10^9 חיידקים לגרם רקמה. הפרחים נמצאו מאוכלסים פחות משאר האברים (10^3 חיידקים לגרם רקמה). גם בשורשים נמצאו ריכוזים גבוהים של החיידקים (איור 11).

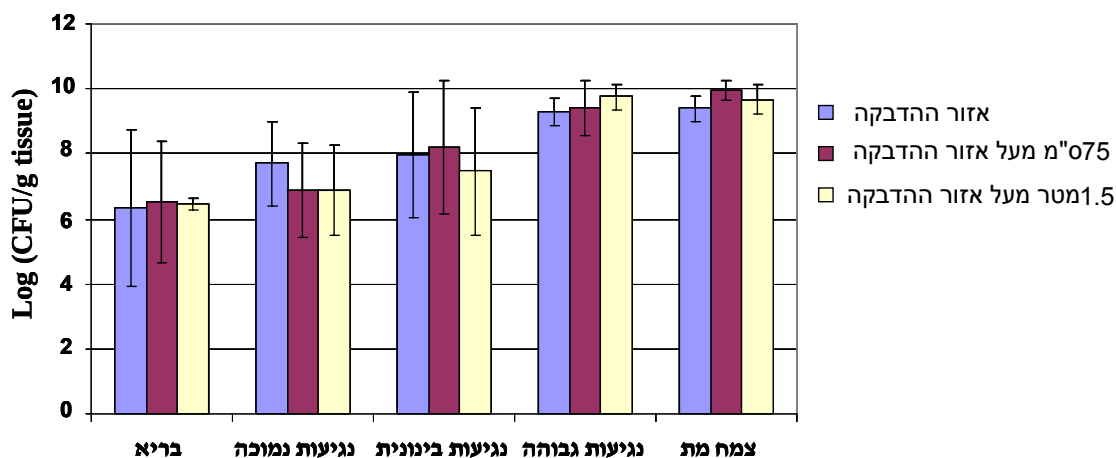
בניסוי אחר נבדק האיכלוס בצמחים בעלי דרגות נגיעות שונה באזור האילוח ובמרחקים של 75 ו-150 ס"מ מאזור ההדבקה (איור 12). הצמחים נלקחו מניסוי שנערך בבשור ובחן את השפעת הטמפרטורה על שכיחות המחלה. בצמחים מתים או בעלי נגיעות גבוהה איכלוס חלקי הצמח השונים היה גבוה בשני סדרי גודל מזה של צמחים שנראו בריאים או בעלי נגיעות נמוכה. אולם התוצאה המשמעותית היא שלא נמצאו הבדלים ברמת האיכלוס בין אזור ההדבקה לבין חלקי הצמח במרחק של 75 ס"מ או 150 ס"מ מאזור ההדבקה בכל הצמחים בדרגות הנגיעות השונה. כלומר גם בצמחים שנראו בריאים אכלוס החלקים העליונים של הצמח היה גבוה והגיע ל- 10^6 חיידקים לגרם רקמה (איור 12).

בדיקה דומה, קביעת איכלוס הצמחים בעלי דרגת נגיעות שונה בחלקי הצמח השונים, נעשתה בצמחים שנלקחו מניסוי שנערך במכון וולקני ובחן את השפעת ההפצה המשנית על ידי מי הדמיעה על שכיחות המחלה (איור 13). גם במקרה זה נמצא שכל חלקי הצמח היו מאוכלסים ברמה גבוהה בחיידקים בצמחים בעלי דרגת נגיעות שונה. אומנם נמצאו הבדלים ברמת החיידקים של הצמחים עם הנגיעות הנמוכה לעומת הגבוהה או בינונית אך רמת האיכלוס של 10^6 - 10^7 חיידקים לגרם רקמה נחשבת לגבוהה.

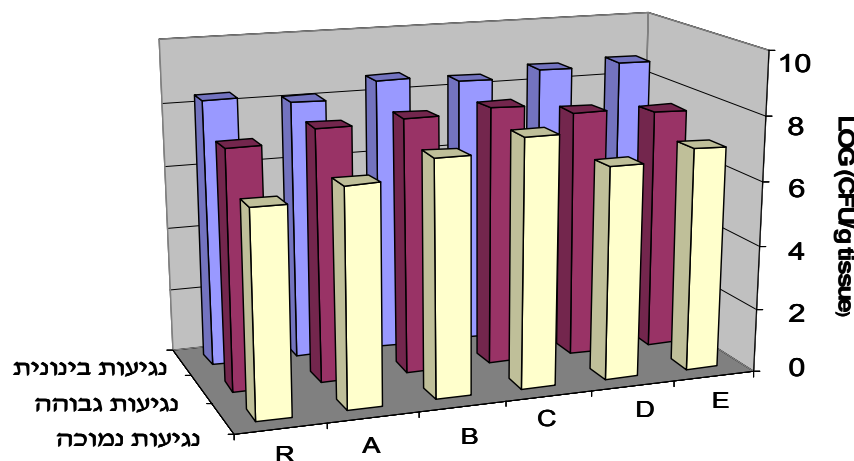
בחממה 22 באזור הבשור (חממה מסחרית) נמצאו צמחים נגועים בקלויבקטר. נדגמו 11 צמחים שהוגדרו בעלי נגיעות בינונית ונבדק האיכלוס בחלקים שונים של הצמח (איור 14). בכל חלקי הצמח שנבדקו נמצאה אוכלוסיה של חיידקים החל מ- 10^4 ועד 10^{10} תאים לגרם רקמה. גם כאן נמצא גרדיאנט. בריכוזי החיידקים באזור שבין 50 עד 100 ס"מ מעל צואר השורש לחלקים האחרים של הצמח. אולם חשוב לציין שהצמחים היו מאוכלסים לכל אורכם.



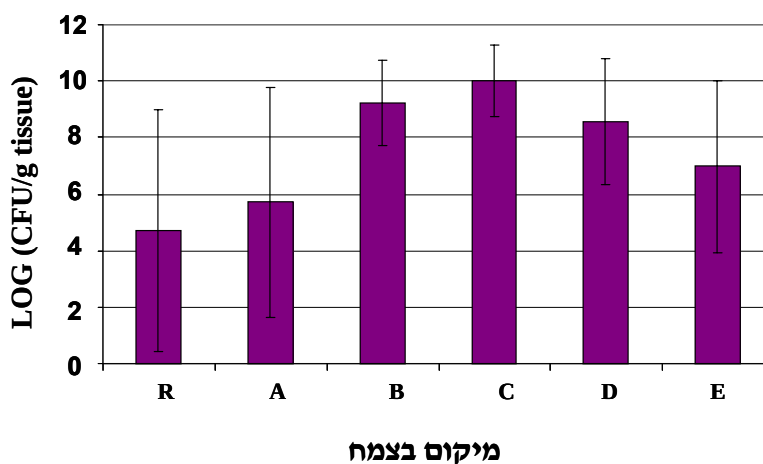
איור 11: אוכלוסיית החיידקים בצמחים ללא סימפטומים בחלקים שונים של הצמח. R=שורש, A= צוואר השורש, B, C, D, E= אזור ההדבקה, F= 50 ס"מ מעל אזור ההדבקה, G= 150 ס"מ מעל אזור ההדבקה, H= 20 ס"מ מתחת לקודקוד הצמח, FL= פרחים. N=11.



איור 12: ריכוז אוכלוסיית החיידקים בחלקים שונים של צמחים בעלי רמות נגיעות שונות. הדגימות נלקחו מאזור ההדבקה, 75 ס"מ ו-150 ס"מ מעל אזור ההדבקה. N=100.



איור 13: בדיקת אוכלוסיית החיידקים בצמחים בעלי רמות נגיעות שונות בחלקים שונים של הצמח. R=שורש, A=צוואר שורש, B=50 ס"מ מעל צוואר השורש, C=100 ס"מ מעל צוואר השורש, D=150 מעל צוואר השורש, E=קודקוד הצמח. N=32. במבחן דו גורמי לא נמצא הבדל מובהק באיכלוס בחלקי הצמח השונים אך נמצא הבדל מובהק בין הצמחים עם הנגיעות השונה (נגיעות בינונית=A, נגיעות גבוהה=B, נגיעות נמוכה=C, $P<0.05$).



איור 14: אוכלוסיית החיידקים בחלקים שונים של הצמח בצמחים שנדבקו באופן טבעי בחממה מסחרית בבשור ושהוגדרו כבעלי נגיעות בינוניות. הצמחים נדבקו הדבקה טבעית. R=שורש, A=צוואר שורש, B=50 ס"מ מעל צוואר השורש, C=100 ס"מ מעל צוואר השורש, D=150 ס"מ מעל צוואר השורש, E=קודקוד הצמח. N=11.

לשם בחינת השפעת גיל הצמחים וגיל הרקמות על התבטאות גנים לוירולנטיות, גודלו צמחים בחממות במכון וולקני. צמחים ורקמות בגילאים פיזיולוגיים שונים (כפי שתואר לעיל) אולחו באזור חיבור הפטוטרט לגבעול בתרחיף חיידקים בריכוז של 10^9 תאים/מ"ל. בזמנים מוגדרים לאחר האילוח (12,24,48,72,168 שעות) נאספו רקמות מאזור ההדבקה ונבדקה רמת אוכלוסיית הפתוגן וביטוי גנים לוירולנטיות. ביטוי הגנים נעשה באמצעות שיטת ה-qRT-PCR והגנים שנבדקים הם: *pat-1*, *celA* הנמצאים על הפלסמידים וכן *chpC* הנמצא באזור אי הפתוגניות. ממצאי הניסויים של חלק זה במחקר יאפשרו לקבוע אם רגישות הצמחים הצעירים לאילוח נובעת מהפעלת גנים לוירולנטיות ע"י החיידק ברקמה הצעירה והם יסוכמו בדוחות הבאים.

4.3. בחינת השפעת סוג המידבק הראשוני על הפרשת החיידקים במי הדמיעה וחשיבות מי הדמיעה בהפצה משנית של המחלה

4.3.1. השפעת סוג המידבק הראשוני על הפרשת החיידקים במי הדמיעה

בחלק זה של המחקר בחנו את הימצאות החיידקים וריכוזם במי הדמיעה של צמחים שאולחו באיברי הצמח השונים. שיטות האילוח היו: אילוח שורשים ע"י טבילה בתרחיף חיידקים בריכוזים שונים, אילוח שורשים ע"י הטמנת מידבק (שורשים מאולחים) במצע הגידול ואילוח צמחים ע"י גזירה. הצמחים המאולחים הוכנסו לתא מיוחד בו שוררים תנאים המעודדים הפרשת טיפות מי דמיעה (תמונה 1). נוכחות החיידקים במי הדמיעה נבדקה החל משבוע לאחר השתילה ועד לזמן בו לא נוצרו יותר טיפות הדמיעה. טיפות מי הדמיעה נאספו

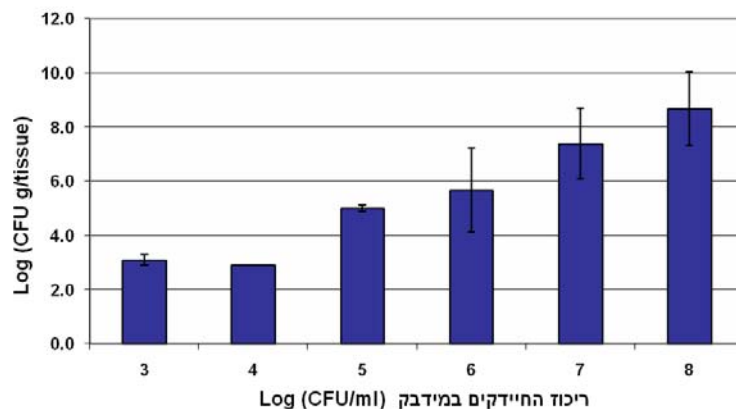
ונזרעו על צלחות פטרי המכילות מצע חצי ברירני (CNS). מי הדמיעה נלקחו מעלים בגבהים שונים כדי לקבוע אם יש הבדל בנוכחות החיידקים בעלים שונים. נפח הטיפות נמדד בכדי לבדוק את הקשר בין נוכחות חיידקים לגודל טיפה.



תמונה 1: יצירת דמיעה בתנאי חממה. א - מכשיר אדים ליצירת לחות גבוהה. ב. כיסוי החממה והפעלת המכשיר למשך הלילה. ג- היוצרות טיפות דמיעה על עלה העגבנייה.

א. אילוח שורשים בטבילה

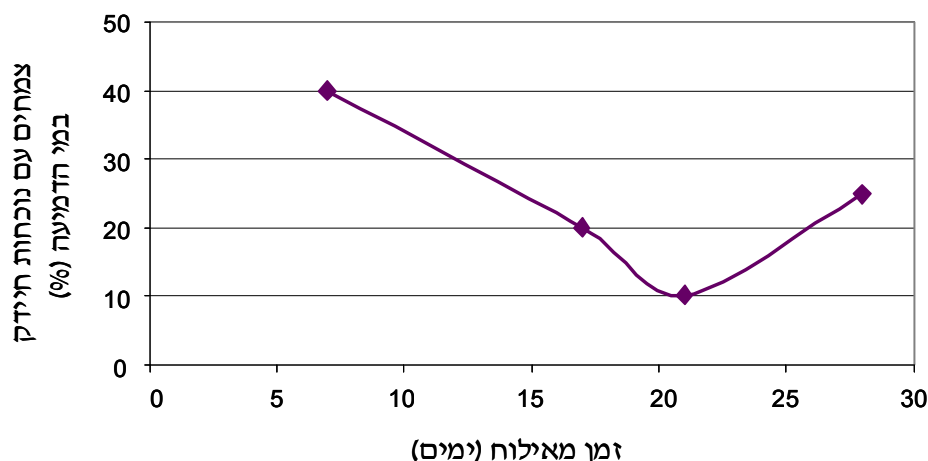
בניסויים שנעשו במכון וולקני שורשי צמחי עגבנייה הודבקו בתרחיף חיידקים בריכוזים שונים ($10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$ חיידקים למ"ל). הניסוי החל בתאריך 8.11.09 ואסוף מי הדמיעה נעשה בתאריכים 15/11/09, 19/11/09, 23/11/09 בבוקר שלאחר הפעלת המתקן. רק בתאריך 23/11/9 נמצאו חיידקים במי הדמיעה בשני צמחים שאולחו בריכוז 10^8 חיידקים למ"ל. בשאר הריכוזים ובזמנים האחרים לא נמצאו חיידקים במי הדמיעה. כדי לבדוק אם הצמחים היו מאולחים חודש לאחר האילוח נלקחה דגימה מצוואר שורש של הצמחים ונבדק ריכוז החיידקים בהם (איור 15). בכל הצמחים נמצאו חיידקים בצוואר השורש בתלות בריכוז החיידקים במידבק. כלומר ככל שרמת החיידקים במדבק היתה גבוהה יותר איכלוס החיידקים בצוואר השורש היה גבוה יותר, אולם למרות זאת לא הופיעו חיידקים במי הדמיעה (מלבד שני צמחים). האם הסיבה לכך נובעת מאופן אילוח השורשים לא ברור בשלב זה.



איור 15: אכלוס חיידקים בצוואר השורש בצמחים שאולחו בריכוזים שונים. ממוצע החיידקים חושב מהצמחים שנמצאו מאוכלסים. בריכוז מידבק של 10^3 75% מהצמחים היו מאוכלסים, בריכוז 10^4 25%, בריכוז 10^5 67% ובריכוזים $10^6, 10^7$ ו- 10^8 100% מהצמחים היו מאוכלסים.

ב. אילוח צמחי עגבנייה ע"י הטמנת שורשים נגועים בקרקע

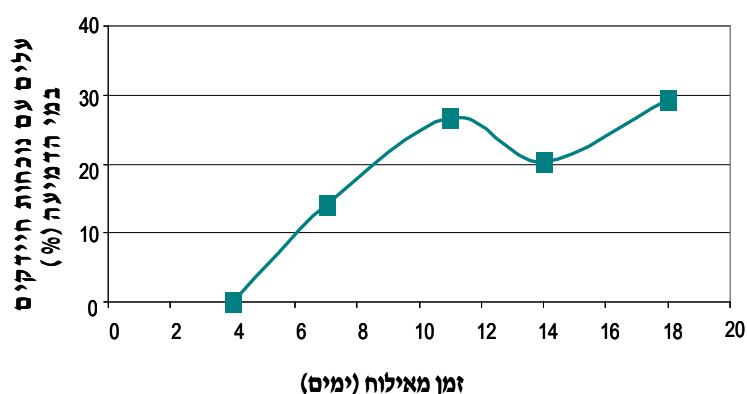
צמחי עגבנייה נשתלו בעציצים המכילים 50% טוף נקי ו- 50% חול מחוות הבשור. בכל עציץ נטמנו 2.5 גר' שורשים שנלקחו מצמחים נגועים והמכילים בממוצע 10^9 CFU לגרם רקמה. העציצים הוכנסו למתקן ליצירת דמיעה 7, 17, 21, 28 ימים לאחר האילוח ונבדקה נוכחות החיידקים במי הדמיעה (איור 16). התוצאות מראות כי נוכחות החיידקים במי הדמיעה אינה קשורה לזמן מהאילוח ואינה מופיעה בכל הצמחים.



איור 16: צמחים שבהם נמצאו חיידקים במי הדמיעה (%). הבדיקה נערכה 7, 17, 21, 28 ימים לאחר האילוח. בכל זמן נלקחו 20 צמחים מי הדמיעה נאספו מכל העלים בצמח.

ג. אילוח צמחי עגבנייה על ידי גזירת שני עלים ראשונים

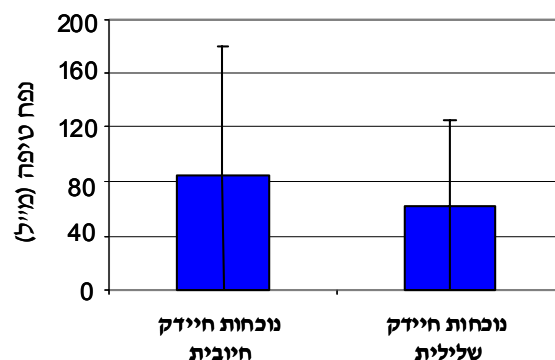
שתילי עגבנייה אולחו על ידי גזירת שני עלים אמיתיים ראשונים (בצמחים בעלי 4 עלים). לאחר הכנסת הצמחים למתקן ליצירת מי דמיעה נאספו מי הדמיעה 4,7,11,14,21 ימים לאחר האילוח מעלים שונים בצמחים (איור 17). התוצאות מראות על מגמת עליה במספר העלים שבהם נמצאו חיידקים במי הדמיעה. לאחר 18 ימים ב- 30% מהעלים נמצאו חיידקים. לאחר זמן זה לא הופרשו מהצמחים מי דמיעה. כשבועיים לאחר האילוח 15% צמחים הראו סימפטומים וכחודש לאחר האילוח 85%. אכלוס צוואר השורש בחיידקים נקבע לאחר חודש מהאילוח. 100% מהצמחים היו מאוכלסים במוצע של 10^9 חיידקים לגרם רקמה.



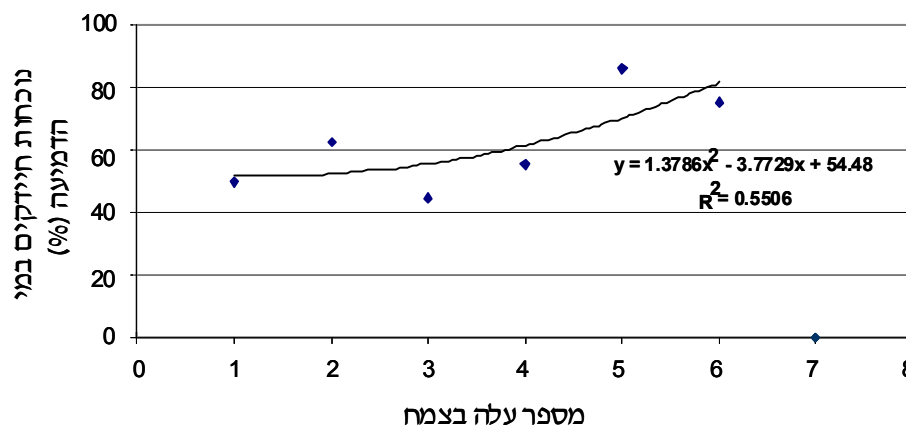
איור 17: שכיחות העלים בהם נמצאו חיידקים במי הדמיעה. הבדיקה נערכה 4,7,11,14,21 ימים לאחר האילוח.

4.3.2. בדיקת הקשר בין נפח טיפות מי הדמיעה וגיל העלה לנוכחות החיידקים

במהלך הניסוי של אילוח בגזירה נבדק הקשר בין נפח הטיפה שנאספה מעלים שונים לבין נוכחות חיידקים בטיפה (איור 18) וכן הקשר בין מספר עלה בצמח לבין נוכחות חיידקים במי הדמיעה (איור 19). לא נמצא קשר בין נפח טיפות מי הדמיעה של העלים לבין נוכחות החיידקים. כמו כן לא נמצא קשר בין גיל העלה לנוכחות החיידקים במי הדמיעה שנאספו מהעלים (איור 19). תוצאות אחרונות אלו מצביעות על כך שהפרשת החיידקים במי הדמיעה אינה קשורה לגיל העלים (לפחות עד עלה מספר 6). יתכן שבעלים מבוגרים יותר אין הפרשת חיידקים במי הדמיעה, אך לא יכולנו לענות על כך מכיוון שלא נוצרו מי דמיעה בצמחים מבוגרים יותר למרות ההכנסה למתקן.



איור 18: הקשר בין נפח טיפות מי הדמיעה שנאספו מעלים שונים לבין נוכחות חיידקים במי הדמיעה. הטיפות נאספו מכל העלה. $N=40$.



איור 19: הקשר בין גיל העלה בצמח (ספירה מלמטה, עלה 1 = עלה אמיתי ראשון) לבין נוכחות חיידקים במי הדמיעה (%).

תוצאות הניסויים האחרונים מצביעים, בשלב זה, על כך שמקור המדבק הראשוני אינו משפיע על הפרשת החיידקים במי הדמיעה. למרות שמרבית הצמחים נמצאו מאוכלסים ברמה גבוהה הופעת החיידקים במי הדמיעה אינה תלויה בגיל העלים ובנפח הטיפות. מכיוון שתופעת הדמיעה תלויה בלחות הסביבה ומופיעה בטווח גיל מסוים של הצמח הרי שאם הצמח נגוע, גם ללא סימני מחלה, יש סיכוי סביר לכך שיופרשו חיידקים במי הדמיעה.

4.4. בידוד החיידקים וקביעת טיפוס הפתוגן ב- PFGE במסגרת הסקר הנרחב

חלק נוסף של העבודה קשור לסקר של הופעת המחלה באזורים שונים בארץ. בעבודות קודמות מצאנו באוכלוסיית הפתוגן בארץ ארבעה טיפוסים שונים של החיידק על פי ההפרדה ב- PFGE (המבוססת על הפרדה באלקטרופורזה של מולקולות דנ"א גדולות). באזור הבשור נמצאו שני טיפוסים עיקריים, אולם בשנתיים האחרונות נמצאו טיפוסים נוספים שבודדו מבתי גידול שונים בארץ. הגדרת טיפוס החיידק יכולה לאפשר מעקב אחר מקורות המדבק הראשוני והמשני ואת ההפצה של הפתוגן. תוצאות הסקר הנרחב מסוכמות בדוח המוגש ע"י פרופ' שטיינברג.

5. סיכום

אחת מהיפותזות העבודה שלנו היא שהטמפרטורה בזמן האילוח משפיעה על התמוטטות הצמחים. בניסויים שנעשו בבשור במנהרות שונות נבחנה השפעת מועד האילוח מתוך הנחה שבכל חודש שוררת טמפרטורה שונה. תוצאות המחקר שבוצע במהלך שמונה החודשים החל מאפריל 2009 מצביעות על כך שהטמפרטורה (חודש האילוח) משפיעה על משך הזמן עד להתמוטטות הצמחים. בחודשי הקיץ, מאי יוני ויולי הזמן בו 50 אחוז מהצמחים מראים סימני מחלה היה ארוך יותר לעומת החודשים הבאים.

הניסוי נמשך גם בחודשי החורף ויאפשר לנו לקבוע את "חלון הטמפרטורות" כלומר את טווח הטמפרטורות המאפשר לחיידקים לאכלס במהירות את רקמות הצמחים ולגרום להתמוטטותם.

היפותזות עבודה נוספת היא שהתמוטטות הצמחים המודבקים תלויה בגיל הפיזיולוגי של הצמח ושל הרקמה המאולחת. בניסויים שנעשו במכון וולקני נמצא כי צמחים צעירים רגישים יותר למחלה ומתמוטטים מהר יותר מצמחים מבוגרים. גם כאשר האילוח נעשה בעלים צעירים לעומת עלים מבוגרים יותר נמצא כי שכירות

המחלה גבוהה יותר. בניסויים אלה לא נמצא קשר לרמת האכלוס בצמחים, כלומר רמת החיידקים בצמח וברקמה הצעירים לא היו שונים בהרבה מאלו של צמחים ורקמות מבוגרות יותר ואינם מסבירים את התופעה. חשיבות ניסויים אלו היא בכך שהם מאפשרים לקבוע את "חלון הרגישות" של הצמחים ובכך להימנע מפעולות העלולות לגרום לאילוח הצמחים.

במחקר זה נבדקה גם השפעת סוג המידבק הראשוני על הפרשת החיידקים במי הדמיעה, מתוך השערה שנוכחות החיידקים במי הדמיעה של צמחים מאולחים מהווה מקור עיקרי להפצה המישנית של המחלה.

תוצאות הניסויים הראו שמקור המדבק הראשוני אינו משפיע על הפרשת החיידקים במי הדמיעה וכי הופעתם במי הדמיעה אינה תלויה בגיל העלים ובנפח הטיפות למרות שהצמחים נמצאו מאוכלסים בחיידקים. מכיוון שתופעת הדמיעה תלויה בגיל הצמח ובתנאי הסביבה הרי שאם הצמח נגוע, גם ללא סימני מחלה, יש סיכוי סביר לכך שיופרשו חיידקים במי הדמיעה. ממצאי ניסויים אלה יאפשרו לקבוע את "חלון ההזדמנויות" בו המחלה מופצת מצמח אחד למשנהו ואת הדרכים להימנע מההפצה המישנית של המחלה.

מניעת ההפצה המשנית של מחלת הכיב הבקטריאלי מצמחים נגועים לצמחים בריאים

דני שטיינברג¹, גלית שהרבני¹, מנחם בורנשטיין¹, רן שולחני¹, מייקל לופטהאוס² ושולמית מנוליס¹

¹המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מינהל החקר החקלאי, בית דגן
²מ"פ דרום, חוות הבשור

1. תקציר

החידק המחולל את מחלת הכיב הבקטריאלי מופץ מהצמחים הנפגעים ראשוניים (צמחי המוקד) לצמחים הבריאים הסמוכים בדרכים שונות. אין כיום מידע מי מבין דרכי ההפצה השונות עליהן דווח בעולם אכן מתקיים בישראל, ולא ידוע מי מבין הדרכים המתקיימות בישראל היא החשובה ביותר. המטרה ארוכת הטווח של מחקר זה היא לפתח גישות שיאפשרו למנוע את הפצת המחלה מצמחים נגועים לצמחים השכנים, הבריאים. במסגרת זו מטרת המחקר בשנה הראשונה היו 1. לאפיין את דרכי ההפצה של הפתוגן מצמחי המוקד הנגועים לצמחים השכנים; 1 - 2. לבחון את היעילות של אמצעים שונים למניעת ההפצה המשנית. במהלך שנת המחקר הראשונה בצענו 8 ניסויים, שלושה במכון וולקני, ארבעה במו"פ דרום ואחד במבנה גידול מסחרי במושב מבטחים. מהניסויים עלה שהמחלה מופצת למרחקים גדולים בתוך השורות כאשר הפעולות האגרוטכניות בתחילת הגידול מתבצעות כשהצמחים רטובים מדמיעה או מטל/גשם. זו דרך ההפצה העיקרית של המחלה ובעטייה נגרם מרבית הנזק. פעולות הגיזום, הזירוד וההדליה המבוצעות במהלך כל תקופת הגידול גם כן מפיצות את המחלה, אך למרחקים קצרים. הפתוגן גם מופץ בדרך האוויר אך במרבית המקרים הצמחים שאולחו בדרך זו לא מראים את תסמיני המחלה האופייניים. ממצאים אלה שמשו לפיתוח מודל קונספטואלי המסביר את דרכי ההפצה המשנית ולפיתוח ההמלצות למגדלים שיאפשרו להפחית, או אף למנוע, את ההפצה המשנית.

2. מבוא

המגיפה אותה מחולל החידק *Clavibacter michiganensis* (Cmm) מוגדרת כמגיפה פוליצקלית. במגיפות פוליצקליות נפגעים הצמחים הראשוניים ממידבק ששרד מהעונה הקודמת בחלקת הגידול או בחלקות סמוכות או שהוא הגיע עם חומר הריבוי; אלה הם צמחי המוקד הראשוני. צמחי המוקד הראשוני מהווים מקור מידבק לשכניהם הבריאים. זה שלב ההפצה המשנית של המחלה ובו עוסק מחקר זה. בספרות המקצועית יש עדויות לכך שההפצה המשנית של החידקים מתרחשת במגע בין צמחים חולים לבריאים (מגע של שורשים או של עלים), במהלך פעולות הזירוד, הגיזום וההדליה המבוצעות במהלך הגידול (ובמיוחד כאשר הגידול מבוצע בשיטת ההדליה ההולנדית), דרך מי נקז ומי נגר. יש גם עדויות לכל שהפתוגן מופץ בדרך האוויר. אברי הצמח הנפגעים הם השורשים, הגבעולים, הטרפים והפטוטרוט, הפרחים והפירות. אין כיום מידע מי מבין דרכי ההפצה השונות עליהן דווח בעולם אכן מתקיים בישראל, ומבין הדרכים המתקיימות בישראל, לא ידוע מי היא הדרך החשובה ביותר. הנחת העבודה העיקרית העומדת בבסיס מחקר זה היא שניתן יהיה להתמודד עם מחלת הכיב הבקטריאלי על ידי מניעת (או לפחות – הפחתת) ההפצה המשנית. המטרה ארוכת הטווח היא לפתח גישות שיאפשרו למנוע את הפצת המחלה מצמחי המוקד לצמחים השכנים, הבריאים. במסגרת זו מטרת המחקר בשנה הראשונה היו 1. לאפיין את דרכי ההפצה של הפתוגן מצמחי המוקד לצמחים השכנים; 1 - 2. לבחון את היעילות של אמצעים שונים למניעת ההפצה המשנית. במסגרת זו בצענו ניסויים בחממות ובתי רשת במרכז וולקני בבית דגן, במינהרות עבירות בחוות הבשור ובבית רשת מסחרי במושב מבטחים.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

3.1. ניסויים במכון וולקני

בסדרת ניסויים שבוצעה במכון וולקני נבחן אם גורם המחלה עובר מצמחי המוקד לצמחים הבריאים הסמוכים. במגע ישיר בין שורשים, במי נקז המפיצים את החיידקים משורש נגוע לשורשים של הצמחים השכנים, במגע ישיר בין עלים של צמחי המוקד לצמחים הבריאים הסמוכים, במגע של פועלים הנוגעים בנוף בידיהם ובכלי עבודה (כמו מזמרות), או על ידי תאי חיידקים המופצים בדרך האוויר והמאלחים ישירות את הנוף. בנוסף בחנו את ההשפעה של סוג הקרקע ושל מצע הגידול בהעברה בין שורשים. הקמנו מערך מחקרי מיוחד לבחינת כל אחת מדרכי ההפצה האפשריות בחממת מחקר בוולקני.

בניסוי הראשון (שיכונה להלן V1) נשתלו נבטי עגבנייה מהזן VT-62920 בתאריך 25.1.2009. ניסוי זה כלל מספר טיפולים, (להלן: 1) עשרה צמחים נשתלו בשקיות גידול עם מצע קוקוס (HOT) נפרדות; הצמחים הוצבו בשתי שורות בצורה שנמנע המגע בין עלי צמחים סמוכים ובין מערכות השורשים שלהם. שני צמחים מתוך העשרה נשתלו כשהם מאולחים (על ידי טבילת שורשים). אלה היו צמחי המוקד. העובדים נקטו פעולות סניטציה קפדניות כדי שלא יעבירו את המחלה מהצמחים הנגועים לשכניהם במהלך הפעולות האגרוטכניות. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית רק בדרך האוויר. (2) שמונה עשרה צמחים נשתלו בשקיות גידול עם מצע קוקוס (HOT) נפרדות; הצמחים הוצבו בשתי שורות והיה מגע בין עלי צמחים סמוכים אך לא בין מערכות השורשים שלהם. שני צמחים מתוך השמונה-עשרה נשתלו כשהם מאולחים (על ידי טבילת שורשים). העובדים נקטו פעולות סניטציה קפדניות כדי שלא יעבירו את המחלה מהצמחים הנגועים לשכניהם במהלך הפעולות האגרוטכניות. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית בדרך האוויר ובמגע בין עלים. (3) הצמחים נשתלו בשני צינורות ארוכים במצע טוף-כבול; בכל אחד מהצינורות נשתלו 11 צמחים והיה מגע בין עלי צמחים סמוכים וגם בין מערכות השורשים שלהם. הצמח הרביעי בכל שורה נשתל לאחר שאולח על ידי טבילת שורשים (צמח המוקד). באחד הצינורות לא היו חורים בצד התחתון והוא הוצב בשיפוע מתון כך שעודפי מי ההשקיה מהצד העליון של הצינור התנקזו (תוך מעבר דרך צמח המוקד, שהיה הרביעי בשורה) לצידו התחתון. העובדים נקטו פעולות סניטציה קפדניות כדי שלא יעבירו את המחלה מהצמחים הנגועים לשכניהם והפעולות האגרוטכניות בוצעו מכיוון מעלה הצינור למורדו. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית בדרך האוויר, במגע בין עלים, במגע בין שורשים ומכיוון מעלה הצינור למורד, גם במי הנקז. הצינור השני היה דומה לראשון, אך הוא הוצב בצורה אנכית ונפערו פתחים מתחת לכל אחד מהצמחים, כך שמי ההשקיה העודפים התנקזו ישירות בלי שעברו מצמח לצמח. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית בדרך האוויר, במגע בין עלים, במגע בין שורשים אך לא במי הנקז. (4) פרטי טיפול זה דומים לאלו שפורטו עבור טיפול 3, ההבדל הוא שבכל שורה היו 10 צמחים ושהצמחים נשתלו בתבניות פלסטיק גדולות במצע חול. (5) גם פרטי טיפול זה דומים לאלו שפורטו עבור טיפול 3, ההבדל הוא שבכל שורה היו ארבעה צמחים (הצמח המאולח היה הראשון בשורה) והצמחים נשתלו במארג קוקוס (growbags). החל משבוע לאחר השתילה ומידי שבוע-שבועיים נסרקו כל הצמחים ויזואלית ונרשם אם נראו עליהם תסמיני המחלה האופייניים. בתאריך 5.5.2009 (100 ימים משתילה) נלקחו דגימות מהגבעולים של כל הצמחים כדי לקבוע אם הם היו מאוכלסים בחיידקי ה-Cmm.

בשני ניסויים אחרים שבוצעו בוולקני גודלו צמחים בבית רשת בשקיות גידול עם מצע קוקוס (HOT) נפרדות; הצמחים הוצבו בשתי שורות סמוכות והיה מגע בין עלי צמחים סמוכים בתוך השורות, אך לא היה מגע בין מערכות השורשים שלהם. הניסוי הראשון נשתל בתאריך 16.2.2009 והיו בו הזנים 1125 ו- 1335 והניסוי השני בתאריך 27.7.2009 וכל הצמחים היו מהזן 1225. ניסויים אלה יכוננו להלן V2 ו-V3, בהתאמה. בכל ניסוי היו 8 שורות צמחים שבכל אחת מהן היו 15 צמחים. הצמח החמישי והצמח האחד-עשרה בכל שורה אולחו בפתוגן. בניסוי הראשון הצמחים המאולחים נשתלו בריאים ואולחו שבועיים לאחר השתילה בשיטת ה"מספריים המאולחים"; בניסוי השני נטבלו שורשי הצמחים המאולחים בתרחיף חיידקים לפני השתילה. צמחים אלה היו צמחי המוקד ובניסויים נבחנו הפצת המחלה מהם לצמחים הבריאים, הסמוכים. הפעולות האגרוטכניות בוצעו בכל שורה בכיוון קבוע שהוגדר מראש. בניסוי הראשון (V2) לא נעשו מאמצים למנוע את הפצת המחלה בתוך השורה, אך הידיים וכלי העבודה חוטאו בין השורות. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית בדרך האוויר, במגע בין עלים, בידי הפועלים המבצעים את העבודה ובכלים בהם נעשה שימוש להסרת העלים והענפים הצדדיים. גם בניסוי השני (V3) הידיים וכלי העבודה חוטאו בין השורות אבל הניסוי כלל כמה טיפולים בתוך השורה שנבדלו זה מזה, (להלן: 1) לא נעשו מאמצים למנוע את הפצת המחלה בתוך השורה. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית בדרך האוויר, במגע בין עלים, בידי הפועלים המבצעים את העבודה ובכלים בהם נעשה שימוש להסרת העלים והענפים הצדדיים. (2) העלים והענפים הצדדיים הוסרו באמצעות סכין מיוחדת, שהלהב שלה חומם באופן רציף על ידי מבער. בבדיקות מקדימות נמצא שהחיידקים נקטלים על ידי החום אותו מייצר המבער. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית בדרך האוויר, במגע בין עלים, בידי הפועלים המבצעים את העבודה אך לא באמצעות הכלי בו נעשה שימוש להסרת העלים והענפים הצדדיים. (3) בניסויים אחרים מצאנו שבצמחים המאולחים סיסטמית מופרשים חיידקים במי הדמיעה, דרך ההידטודות. בטיפול זה השרינו דמיעה כשהצמחים היו בגיל של 7, 14 ו- 20 ימים

מהשתילה. כיסינו את השורות בהן רצינו להשרות דמיעה ביריעת פוליאטילן גדולה ובשעות הערב ובלילה הפעלנו מערכת מתזים שהעלתה את הלחות היחסית אך לא הרטיבה ישירות את הצמחים. למחרת בבוקר, כשהצמחים היו רטובים מדמיעה, בוצע מגע בצמח הראשון בשורה ולאחריו בכל הצמחים העוקבים, לפי הסדר. מגע זה שימש כהדמיה לנגיעה של פועלים המטפלים בצמחים במהלך הגידול. המטרה הייתה לבדוק אם המגע בצמחי המוקד הרטובים מדמיעה מעביר את החיידקים שהופרשו במי הדמיעה שלהם לצמחים שהיו בהמשך השורה. חשוב לציין שבזמן ביצוע המגע לא נראו עדיין תסמיני המחלה האופייניים על צמחי המוקד. בהמשך הגידול טופלו כל הצמחים בטיפול זה כמו הצמחים שבטיפול 1. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה מצמחי המוקד אפשרית בדרך האוויר, במגע בין עלים, בהפצה היזומה שבוצעה כשהצמחים היו רטובים מדמיעה, בידי הפועלים המבצעים את העבודה ובכלים בהם נעשה שימוש להסרת העלים והענפים הצדדיים. 4) כמו טיפול 3, אך המגע בוצע בצהריים כשהצמחים היו יבשים. המטרה הייתה לבחון אם עצם המגע בצמחי המוקד מפיץ את החיידקים, או שיש משמעות למגע כשצמחי המוקד רטובים ממי דמיעה. במקרה זה, הפצה משנית של המחלה אפשרית בדרך האוויר, במגע בין עלים, בהפצה היזומה שבוצעה כשהצמחים היו יבשים, בידי הפועלים המבצעים את העבודה ובכלים בהם נעשה שימוש להסרת העלים והענפים הצדדיים. התפתחות המחלה על צמחי המוקד ועל שכניהם שנשתלו בריאים הוערכה מידי שבוע. בתאריכים 16.6.2009 (120 ימים משתילה) ו- 29.11.2009 (125 ימים משתילה) נלקחו דגימות מגבעולי כל הצמחים מניסוי V2 ו- V3, בהתאמה, כדי לקבוע אם הם היו מאוכלסים בחיידקי ה- *Cmm*.

3.2. ניסויים במו"פ דרום

בחוות הניסיונות של מו"פ דרום בבשור ביצענו כמה ניסויים לבחינת הגורמים החשובים בהפצת המחלה במרחב. כדי לבחון את מידת החשיבות של פעולות הגיזום, הזירוד וההדליה המבוצעות במהלך הגידול המקובל בשיטה ההולנדית, ביצענו שני ניסויים בהם גודלו צמחים בשיטת גידול זו ובשיטת ההדליה הספרדית. צמחים מהזן 189 נשתלו בתאריך 26.6.2008 (ניסוי B1) לקרקע וצמחים מהזן 1225 נשתלו בתאריך 22.3.2009 (ניסוי B2) בשקיות גידול עם מצע קוקוס (HOT). הניסויים בוצעו במינהרות עבירות שגודל כל אחת מהן היה 4x6 מ' שבכל אחת מהן היו 4 שורות צמחים עם 17 צמחי עגבנייה. בכל שורה היה צמח אחד או שניים שאולחו וששימשו כצמחי המוקד. כיוון הפעולות האגרנטיות בכל שורה היה קבוע (מתחילת השורה והלאה) ולכן היו לפני צמחי המוקד וגם בהמשכם 4 עד 10 צמחים. בניסוי B1 אולחו צמחי המוקד בשיטת המספרים המאולחים 42 ימים משתילה ובניסוי B2 אולחו צמחי המוקד בסמוך לפני השתילה על ידי טבילת השורשים בתרחיף חיידקים. הפועלים שביצעו את הפעולות האגרנטיות הונחו לעבוד תמיד מכיוון תחילת השורה והלאה, ולחטא את הידיים ואת כלי העבודה במעבר משורה לשורה (וממבנה למבנה). הניסויים הוצבו במתכונת של אקראיות גמורה, עם 4 חזרות לכל טיפול. במהלך הגידול נערך מעקב אחר הצמחים ונרשם לגבי כל אחד מהם באם נראו עליו תסמיני המחלה האופייניים ומה חומרתם. לקראת סוף הניסוי נלקחו דגימות מהצמחים שנראו בריאים ונבחן באם הם היו למעשה מאוכלסים בפתוגן. הבחינה בוצעה באמצעות הקיט של חברת Agdia.

באחד המבנים של ניסוי B2 נבחנה ההשפעה של מחלת הכיב הבקטריאלי על יבול העגבניות. מכל אחד מהצמחים שהיו במבנה (68 צמחים בסך הכול) נקטפו העגבניות הבשלות מידי שבוע עד 10 ימים. היבול נשקל ושימש לחישוב היבול המצטבר לצמח. כשהגיעו הצמחים לגובה של כשני מטר לערך (גובה המבנה) הם נקטמו ובכך הופסק למעשה הגידול שלהם. הקיטום בוצע כחודשיים משתילה והניסוי נמשך עוד כחודש וחצי לאחר מכן. בסוף העונה חולקו הצמחים שהיו במבנה זה לחמש קבוצות. בקבוצה הראשונה נכללו ששת צמחי המוקד (שכולם מתו בסופו של דבר); בקבוצה השנייה נכללו 10 צמחים שמתו כתוצאה מההפצה המשנית של המחלה; בקבוצה השלישית נכללו 22 צמחים שהתפתחו עליהם תסמינים ברמת נגיעות נמוכה-בינונית; בקבוצה הרביעית נכללו 26 צמחים שנראו לכאורה בריאים, אך התברר (באמצעות הקיט) שהם היו למעשה מאוכלסים בפתוגן; בקבוצה החמישית נכללו 4 צמחים שהתברר שהם היו בריאים עד לסוף העונה. עבור כל קבוצה חושב היבול הממוצע שנצבר במהלך הזמן. עקומי צבירת היבול עבור כל קבוצה חושבו באמצעות רגרסיה של עקום סיגמואלי והבדלים ביבול המצטבר בין הקבוצות חושבו באמצעות מבחן ANOVA.

בשני ניסויים אחרים שבוצעו במו"פ דרום גודלו צמחים במנהרות העבירות בשקיות גידול עם מצע קוקוס (HOT) נפרדות. צמחי עגבנייה מהזן 1225 נשתלו בתאריך 14.9.2009. ניסויים אלה יכוננו להלן B3 ו- B4, בהתאמה. בכל מבנה היו 4 שורות צמחים שבכל אחת מהן היו 17 צמחים. הצמח הראשון והצמח השני בכל שורה אולחו בפתוגן בזמן השתילה. צמחים אלה היו צמחי המוקד ובניסויים נבחנה הפצת המחלה מהם לצמחים הבריאים, הנמצאים בהמשך השורה. ניסוי B3 כלל 8 מבנים (מינהרות עבירות). כשהצמחים היו בגיל של 9, 17 ו- 22 ימים מהשתילה השרינו דמיעה על שתי שורות צמחים בכל מבני הניסוי. השיטה הייתה זהה לזו שתוארה למעלה בניסוי V3. כשהצמחים היו רטובים מדמיעה, בוצע מגע בצמח הראשון והשני בשורה (צמחי המוקד) ולאחריו בכל הצמחים העוקבים בשורה (15 בסך הכול), לפי הסדר. בזמן המגע לא נראו עדיין תסמיני המחלה האופייניים על צמחי המוקד. בשעות הצהריים, כשהצמחים היו יבשים, בוצע מגע דומה בשתי שורות הצמחים האחרות שבכל מבנה. המטרה הייתה לבחון אם עצם המגע בצמחים הנגועים מפיץ את

החידודים, או שחשוב שהמגע יתבצע כשהצמחים רטובים ממי דמיעה. בארבעה המבנים בוצע ריסוס בתכשיר הדברה נחושת (קוצייד 0.5%) בצהרי היום שקדם להשריית הדמיעה (8, 16 ו- 21 ימים משתילה). המטרה הייתה לבחון באם ריסוס מקדים עשוי למנוע את ההפצה המשנית. הניסוי, שכלל 8 מבנים, הוצב במתכונת של ניסוי דו-גורמי בחלקות מפוצלות. הגורם הראשון (בחלקות הראשיות) היה ההדברה הכימית והוא כלל שתי רמות (היקש וריסוס נחושת); הגורם השני (בחלקות המשנה) היה דרך הפצת המחלה מצמחי המוקד וגם הוא כלל שתי רמות (מגע כשהצמחים היו רטובים מדמיעה, או יבשים). בהמשך הגידול טופלו הצמחים כמקובל ובכל שורה בוצעו הפעולות האגרוטכניות בכיוון קבוע שהוגדר מראש; לא נעשו מאמצים למנוע את הפצת המחלה בתוך השורה, אך הידיים של הפועלים וכלי העבודה בהם השתמשו חוטאו בין השורות ובין המבנים.

ניסוי B4 כלל 2 מבנים (מינהרות עבירות). בימים בהם הושרתה הדמיעה במבני ניסוי B3 (בגיל של 9, 17 ו- 22 ימים מהשתילה) הורטב הנוף של אחד מהמבנים בצהריים על ידי מתזים. כשהצמחים היו רטובים מההמטרה, בוצע מגע בצמח הראשון והשני בשורה (צמחי המוקד) ולאחריו בכל הצמחים העוקבים בשורה (15 בסך הכול), לפי הסדר. בזמן המגע לא נראו עדיין תסמיני המחלה האופייניים על צמחי המוקד. לאחר מכן בוצע מגע דומה בשלוש שורות הצמחים האחרות שמבנה זה ובארבעת שורות הצמחים של המבנה הסמוך, בו לא הופעלה מערכת המתזים והצמחים שם היו יבשים. המטרה הייתה לבחון אם מגע המתבצע כשהצמחים רטובים מגשם או מטל (ולא ממי דמיעה) מפיץ את הפתוגן מצמחי מוקד לצמחים הבריאים, השכנים. בהמשך הגידול טופלו גם צמחים אלה כמקובל ובכל שורה בוצעו הפעולות האגרוטכניות בכיוון קבוע שהוגדר מראש; לא נעשו מאמצים למנוע את הפצת המחלה בתוך השורה, אך הידיים של הפועלים וכלי העבודה בהם השתמשו חוטאו בין השורות ובין המבנים.

3.3. ניסויים במבנים מסחריים

כדי לבחון אם ריסוס בתכשיר נחושת, בשלבי הגידול הראשונים, מפחית את ההפצה המשנית ביצענו ניסוי במבנה מסחרי של המגדל שי ביטון ממושב מבטחים. ניסוי זה יכונה להלן ניסוי C1. צמחי עגבנייה מהזן 1225 נשתלו בתאריך 5.6.2009 בבית רשת שגודלו 12 דונם. הגידול הקודם במבנה היה עגבניות והתפתחה בו מגיפה ברמה בינונית של מחלת הכיב הבקטריאלי. הניסוי כלל חמישה טיפולים שנבדלו זה מזה במועד ישום תכשיר ההדברה קוצייד (ברכוז של 0.5%) במרסס המשקי. בטיפול 1 לא יושם הקוצייד כלל (היקש). בכל אחד מהטיפולים האחרים יושם הקוצייד פעמיים: בטיפול 2 הוא יושם שבוע ושבוועיים משתילה; בטיפול 3 יושמו הריסוסים שבועיים ושלושה שבועות משתילה; בטיפול 4 יושמו הריסוסים שלושה וארבעה שבועות משתילה ובטיפול 5 יושמו הריסוסים ארבעה וחמישה שבועות משתילה. המטרה הייתה לבחון אם קיים "חלון זמן" בו ריסוס נחושת מגן על הצמחים הבריאים ומפחית את ההפצה המשנית מצמחי המוקד. הניסוי הוצב במתכונת של בלוקים באקראי עם 4 חזרות לכל טיפול וגודל כל חלקת ניסוי היה 600 מ"ר. כל הפעולות האגרוטכניות האחרות בוצעו במבנה על פי המקובל במשק ובהתאם להנחיות המגדל. במהלך העונה הופיעו התסמינים האופייניים של המחלה ובהמשך החלו צמחים למות. בתאריך 2.12.2009 (153 ימים משתילה) נסרקו הצמחים שגדלו בארבע ערוגות המרכזיות של כל חלקת ניסוי ויזואלית ונספר מספר הצמחים שמתו. המספרים שימשו לחישוב שכיחות הצמחים המתים (באחוזים) לחלקה, ולטיפול.

3.4. שיטות עבודה כלליות

בשורות שלהלן נפרט את שיטות העבודה הכלליות בהן השתמשנו בניסויים השונים. אילוח מלאכותי בוצע בשתי שיטות: בשיטת המספרים המאולחים ובטבילה. עבור השיטה הראשונה הוכן תרחיף של חיידקי *Cmm* בריכוז של 10^8 תאי חיידק למ"ל. מספרים נטבלו בתרחיף החיידקים לאחר מכן הם שימשו לחיתוך העלה האמיתי הראשון והשני של הצמחים. החיתוך בוצע בסמוך לגבעול והפצע שנוצר בפטוטרת איפשר לחיידקים שהיו על פני המספרים לחדור לרקמות הצמחיות. בשיטת הטבילה, נטבלו שתילים שנרכשו מהמשתלה (עם 3-4 עלים אמיתיים) בתרחיף חיידקים (ברכוז של 10^8 תאי חיידק למ"ל) למשך שעה וחצי. לאחר מכן הם נשתלו במקום שיועד להם. בחלק הניסויים בחנו אם צמחים, שלא נראו עליהם תסמיני המחלה האופייניים, היו למעשה מאוכלסים בפתוגן. לצורך כך נלקחו דגימות מהקליפה של גבעולי הצמחים; הדגימות נחתכו באמצעות סכין חדה והכילו קטע קליפה שטחי (שכלל את צינורות העיצה וחלק מצינורות השיפה). דגימות אלה נבחנו באמצעות קיטים ייעודיים של חברת Agdia או שבוצעו מהם בידודים על גבי מצע מזון סמי-סלקטיבי (CNS). אם היה צורך נבחנו מושבות חיידקים חשודים ב-PCR עם תחלים ספציפיים. בדיקות אלה שימשו לקביעה אם הצמח הנדגם היה מאוכלס או שהוא לא היה מאוכלס בפתוגן.

הופעת תסמיני המחלה וחומרתם נרשמו במשך כל תקופת ביצוע הניסויים. ההערכות היו ויזואליות תוך שימוש בסולם בן 5 דרגות, כלהלן: (1) צמחים בריאים: צמחים שלא נראו עליהם תסמיני המחלה אופייניים (יתכן שצמחים אלה היו מאוכלסים בפתוגן); (2) נגיעות נמוכה: צמחים שעל חלק מהעללים, או העלים שלהם, נראו תסמיני המחלה האופייניים. במבט כללי נראו הצמחים חיוניים. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים לא עלה על 10%; (3) נגיעות בינוניות: בצמחים אלה היו עלים רבים שנפגעו מהמחלה, אך חלק

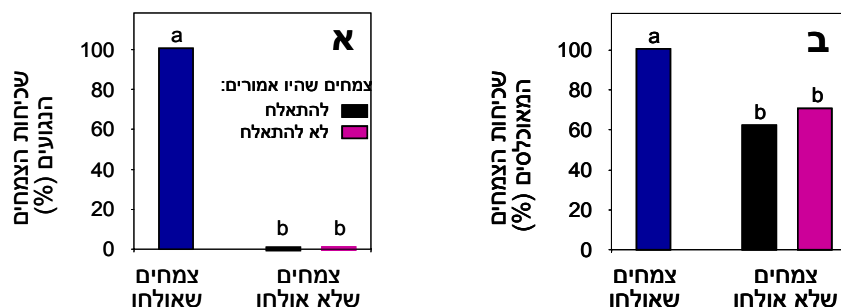
מהעלים נראו לא פגועים. הצמחים לא החלו לכמוש. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים לא עלה על 40% (4; 5) נגיעות גבוהה: בצמחים אלה מרבית העלים נפגעו מהמחלה, או שהצמחים היו בשלבי כמישה ראשוניים. שיעור הפגיעה בשטח הירוק של הצמחים עלה על 50% אך עדיין היו עלים שנראו לא פגועים; 5) צמחים מתים: צמחים שמתו (או כמשו) כתוצאה מהתפתחות המחלה. מאחר והסולם בו השתמשנו הוא לא סולם כמותי (משתנה סדר ולא משתנה רציף) לא חושבו ערכי נגיעות ממוצעים עבור צמחים שונים של אותו הטיפול. במקום זאת, השתמשנו במדדים שונים של שכיחות (באחוזים). למשל, שכיחות הצמחים שנראו עליהם תסמיני המחלה האופייניים (נגיעות בדרגה של $1 <$); שכיחות של הצמחים שהתפתחה בהם נגיעות בחומרה גבוהה ומעלה (נגיעות בדרגות 4 ו-5) ושכיחות הצמחים שמתו מהמחלה (דרגה 5). נתוני השכיחות הם נתונים כמותיים (משתנה רציף) והם שימשו לתיאור עקומי התפתחות המחלה לאורך זמן. העקומים היו עקומים סיגמואליים וחישובנו עבורם משוואות רגרסיה תוך שימוש בנוסחה: $Y = a / (1 + e^{-(X - X_0)/b})$ כאשר Y = שכיחות הצמחים המאולחים; X = זמן (בימים) ממועד השתילה; a = הפרמטר הראשון של המשוואה המבטא את האסימפטוטה העליונה (מידת הנגיעות המרבית); X_0 ו- b = הפרמטר השני והשלישי של המשוואה המתארים את מקום נקודת הפיתול וקצב התקדמות המחלה, בהתאמה. כאשר משוואות הרגרסיה היו מובהקות, חישובנו שני מדדים המתארים את עקום התפתחות המחלה: Y_{max} = שכיחות המחלה המרבית (באחוזים) שנאמד על פי משתנה a של המשוואה; ערך ה- T_{50} = הזמן (בימים) שעבר מהשתילה ועד למועד בו הייתה שכיחות המחלה 50% מהערך של Y_{max} .

השתמשנו בתוכנות JMP, Excel ו-SigmaPlot לביצוע הניתוחים הסטטיסטיים. בכל מקרה השתמשנו במבחן המתאים. בין היתר, נותחו הנתונים באמצעות מבחני ANOVA חד-ודו-כיווניים. כשערכי ה- F היו מובהקים נקבעו ההבדלים בין הטיפולים באמצעות מבחן HSD ברמת מובהקות של $P=0.05$. חלק מהנתונים נותחו באמצעות רגרסיה פשוטה, רגרסיה מרובת משתני או רגרסיה לא-ליניארית. במקרים אלה הוצג מתאם המתאם המרובה (r^2) וערך המובהקות (P) של משוואת הרגרסיה. במספר מקרים הוצגו הממוצעים וערכי השונות (שגיאת תקן) של הממוצע.

4. תוצאות

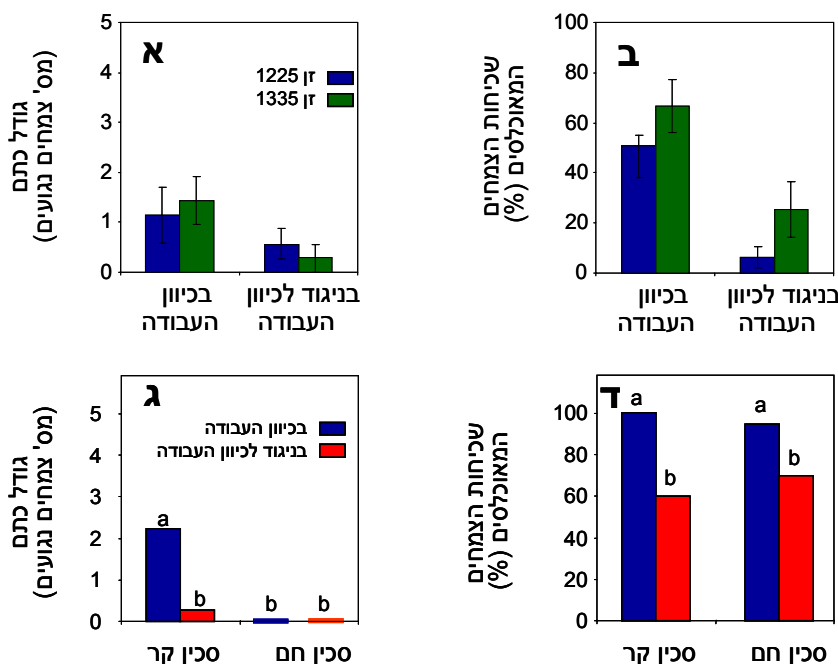
4.1. ניסויים במכון וולקני

בכל צמחי המוקד שאולחו בניסוי V1 נראו תסמיני המחלה האופייניים; ערך ה- T_{50} היה 38 ימים וערך ה- Y_{max} היה 100%. מרבית צמחי המוקד מתו בסופו של דבר ($Y_{max} = 93\%$) וערך ה- T_{50} עבור התמותה היה 53 ימים. אף אחד מהצמחים האחרים שנכללו בניסוי לא הראה את תסמיני המחלה האופייניים. אבל, בדגימות של חלקי גבעול שנלקחו מצמחים אלה התברר שמרביתם (65% מהם) היו למעשה מאוכלסים בחיידקים. לא היו הבדלים בשכיחות האיכלוס של הצמחים שנשתלו בריאים בין הטיפולים השונים, ובכל טיפול לא הייתה כיווניות או מידרג מסוים במיקום הצמחים שנשתלו בריאים בהשוואה למיקום צמחי המוקד. כך למשל, צמחים שנשתלו בריאים במעלה השיפוע של טיפולים 3 ו-4 היו מאוכלסים כמו גם צמחים שנשתלו במורד השיפוע; ובאותו האופן, צמחים שנשתלו בריאים והוצבו בסמוך לצמחי המוקד של טיפולים 2 ו-5 היו מאולחים כמו צמחים שנשתלו במרחק. גם הצמחים של טיפול 1, שלא נגעו כלל זה בזה ושמערכות השורשים שלהם היו נפרדות אוכלסו באותה המידה. כדי להציג תוצאות אלה חולקו כל הצמחים לשלוש קבוצות: בראשונה נכללו צמחי המוקד; בשנייה נכללו הצמחים שהיו אמורים לכאורה להתאלח במידה והפתוגן היה מופץ מצמחי המוקד לצמחים השכנים במגע של עלים או שורשים או באמצעות מי נקז; בקבוצה השלישית נכללו הצמחים שגדלו במיקום בו לא היה מגע בין העלים או השורשים שלהם עם צמחי המוקד או שהם היו במיקום בו מי הנקז לא היו אמורים להגיע אליהם. בניתוח זה התייחסנו לצמחים אלה כאל צמחים ש"לא היו אמורים להתאלח". ממצאי ניתוח זה מוצגים באיור 1. כפי שכבר צוין, לא היה הבדל בנגיעות ובשכיחות האיכלוס בין הקבוצה השנייה לשלישית ושתייהן נבדלו במובהק מצמחי הקבוצה הראשונה.



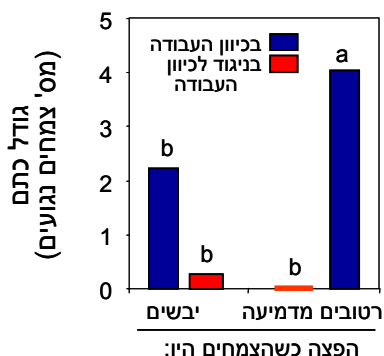
איור 1. הפצת מחלת הכיב הבקטריאלי במרחב בניסוי V1 שבוצע במכון וולקני בשנת 2009. חלק מהצמחים אולחו בזמן השתילה ואחרים נשתלו בריאים. השתילים הבריאים הוצבו בסמוך לצמחים המאולחים כך שהיו "אמורים" או "לא אמורים" להתאלח. הסבר על הטיפולים – בטקסט. א': שכיחות הצמחים שהראו את התסמינים האופייניים של המחלה; ב': שכיחות הצמחים שהיו מאוכלסים בפתוגן. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק כנקבע על ידי מבחן χ^2 (ברמת מובהקות של $P=0.05$).

בניסויים V2 ו- V3 בחנו את השפעת הפעולות האגרוטכניות המבוצעות במהלך הגידול על הפצת המחלה מצמחי המוקד לצמחים השכנים, הבריאים. גם בניסויים אלה כל צמחי המוקד הראו את תסמיני המחלה האופייניים וכולם מתו בסופו של דבר. התברר שהמחלה אכן מופצת במהלך הפעולות האגרוטכניות, בכיוון העבודה של הפועלים: המחלה הופצה בכיוון העבודה למרחקים גדולים יותר, במובהק, מאשר בניגוד לכיוון העבודה. אבל, בשני בניסויים גודל המוקד בכיוון העבודה היה מוגבל ולא עלה על שני צמחים, בממוצע. כשפעולות הגיזום והזירוד בוצעו עם סכין סטרילית (שחוטאה בחום) לא הופיעו תסמינים על הצמחים הסמוכים לצמחי המוקד בכיוון העבודה וגם לא בניגוד לכיוון העבודה. כמו בניסוי V1, גם בניסויים אלה מרבית הצמחים שנראו לכאורה בריאים היו למעשה מאוכלסים בגורם המחלה: בכיוון ההליכה הייתה שכיחות האיכלוס 50-100% ובניגוד לכיוון ההליכה הייתה שכיחות האיכלוס 65-7%. חיטוי כלי העבודה בחום לא השפיע על שכיחות הצמחים המאוכלסים (איור 2).



איור 2. השפעת הפעולות האגרוטכניות על הפצת מחלת הכיב הבקטריאלי, בניסויים שבוצעו במכון וולקני בעונת 2009. א' ו- ב': ניסוי V2 בו היו שני זנים 1125 ו- 1335 והפעולות האגרוטכניות בצעו באמצעי עבודה לא מחוטאים; ג' ו- ד': ניסוי V3 בו בוצעו הפעולות האגרוטכניות בסכין לא מחוטאת (סכין קר) או בסכין שחוטאה בחום (סכין חם). א' ו- ג': מספר הצמחים שהראו את התסמינים האופייניים של המחלה בכיוון, או בניגוד לכיוון העבודה; ב' ו- ד': שכיחות הצמחים המאוכלסים בכיוון, או בניגוד לכיוון העבודה. הקווים האנכיים מייצגים את שגיאת התקן. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק כנקבע על ידי מבחן HSD (ברמת מובהקות של $P=0.05$).

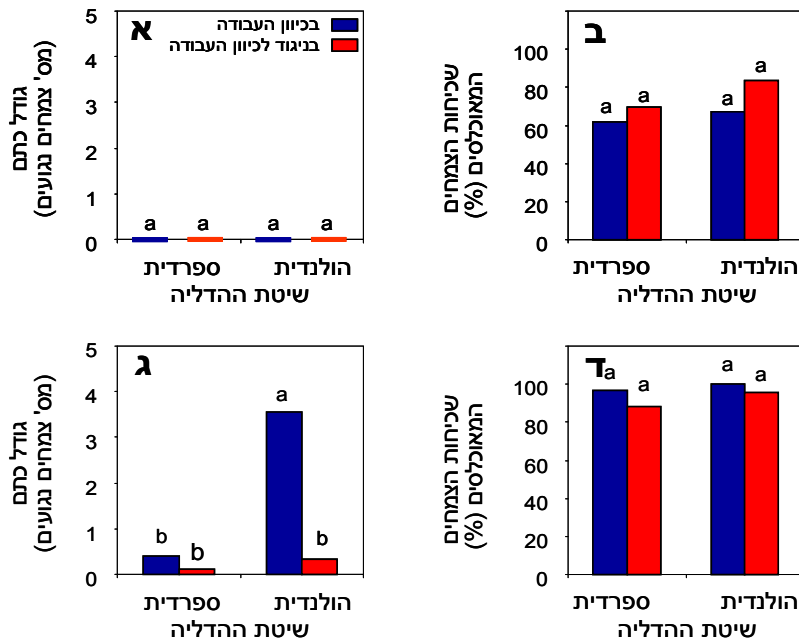
בניסוי V3 גם בחנו אם נגיעה בצמחים בשעה שהם היו רטובים מטיפות דמיעה משפיעה על מרחק ההפצה של המחלה מצמחי המוקד לצמחים השכנים, הבריאים. התברר, שנגיעה בצמחי המוקד הרטובים הפיצה את המחלה למרחק גדול יותר מאשר נגיעה בצמחים כשהם היו יבשים. חשוב לציין שבשני הטיפולים בוצעו פעולות הגיזום והזירוד עם כלי עבודה לא מחוטא, לכן המוקד שנוצר בטפול ה"יבש" נגרם כתוצאה מהפצת המחלה על ידי כלי העבודה, בעוד שהמוקד שנוצר בטיפול ה"רטוב" הוא תוצאה של הנגיעה בצמחים הרטובים בתחילת הגידול ובנוסף, הפצה בכלי העבודה. מרחק ההפצה בטיפול זה היה המרחק המירבי האפשרי (4 צמחים) משום שזה היה מספר הצמחים שהיו בניסוי ושהוצבו ב"מורד" השורה מצמחי המוקד (איור 3).



איור 3. הפצת מחלת הכיב הבקטריאלי במרחב בניסוי V3 שבוצע במכון וולקני בשנת 2009. הצמחים גודלו בשיטת ההדליה ההולנדית ובתחילת הגידול נעשתה הפצה יזומה של המחלה מצמחי מוקד לצמחים הבריאים הסמוכים, כשהצמחים היו יבשים או כשהם היו רטובים מדמיעה. הפעולות האגרוטכניות בוצעו בלי לחטא את כלי העבודה. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק כנקבע על ידי מבחן HSD (ברמת מובהקות של $P=0.05$).

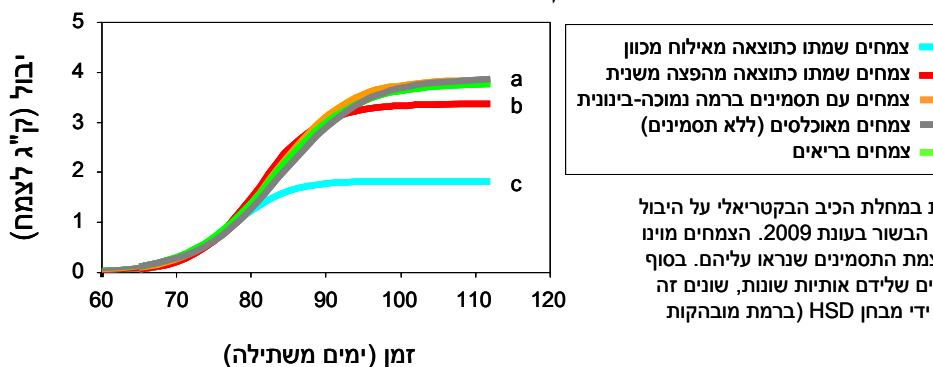
4.2. ניסויים במו"פ דרום

כל צמחי המוקד שנכללו בניסויים B1 ו- B2 הראו את תסמיני המחלה האופייניים. בניסוי הראשון 53% מהצמחים מתו בסופו של דבר וערך ה- T_{50} עבור התמותה היה 63 ימים. בניסוי השני 80% מהצמחים מתו בסופו של דבר וערך ה- T_{50} עבור התמותה היה 79 ימים. בניסוי הראשון אף אחד מהצמחים שנשתלו בריאים לא הראה את תסמיני המחלה האופייניים, בשני טיפולי ההדליה. לעומת זאת, בניסוי השני היה הבדל מובהק בגודל הכתם שנוצר בין טיפולי ההדליה ובתוך השורה. במבנים שגודלו בשיטת ההדליה ההולנדית נוצרו מוקדי נגיעות ברורים בכיוון העבודה שגודלם הממוצע היה 3.5 צמחים; מוקד זה היה גדול במובהק מהמוקדים שנוצרו בניגוד לכיוון העבודה במבני ההדליה ההולנדית, ובשני כיווני העבודה במבני ההדליה הספרדית; שם היה הגודל הממוצע של המוקדים שנוצרו 0.5 צמחים או פחות. למרות שהמרבית הצמחים במבני הגידול (בשני הניסויים, בשתי שיטות ההדליה ובשני כיווני העבודה) לא התפתחו התסמינים האופייניים למחלה, התברר שחלק משמעותי מהם היה למעשה מאוכלסים בפתוגן (איור 4).



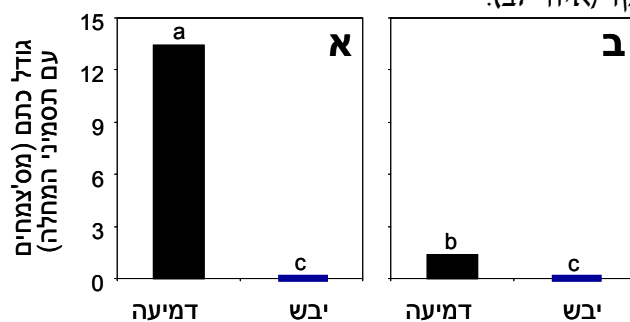
איור 4. השפעת הפעולות האגרונומיות על הפצת מחלת הכיב הבקטריאלי, במרחב, בניסויים שבוצעו בחוות הבשור בשנים 2008 (ניסוי B1, א' ו- ב') ו- 2009 (ניסוי B2, ג' ו- ד'). בניסויים גודלו הצמחים בשיטת ההדליה ההולנדית או בשיטת ההדליה הספרדית. א' ו- ג': מספר הצמחים שהראו את התסמינים האופייניים של המחלה בכיוון, או בניגוד לכיוון העבודה; ב' ו- ד': שכיחות הצמחים המאכלסים בכיוון, או בניגוד לכיוון העבודה. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק כנקבע על ידי מבחן HSD (ברמת מובהקות של $P=0.05$).

העקומים המתארים את היבול המצטבר של העגבניות בכל אחת מחמשת הקבוצות היו עקומים סיגמואידים. בצמחים הבריאים המשיך הקטיפי עד כ- 105 ימים מהשתילה. לאחר מכן לא נקטפו עוד פירות בגלל שהצמחים שהגיעו לתקרת המבנה, נקטמו. בכל אופן, היבול הנקטף היה שווה ערך ליבול של 10 טון לדונם. בצמחים שהיו מאוכלסים בפתוגן אך לא נראו עליהם תסמיני המחלה, ובצמחים שהיו נגועים ברמת נגיעות נמוכה עד בינונית, לא הייתה פגיעה ביבול כלל, וכמות היבול הייתה זהה למעשה ליבול הצמחים הבריאים. בצמחים שמתו כתוצאה מההפצה המשנית של המחלה המשיך היבול להיצבר עד למועד מותם; העצירה בצבירת היבול התרחשה ביום 95 משתילה, כעשרה ימים מוקדם יותר מאשר בצמחים הבריאים. כמות היבול המצטבר הייתה נמוכה במובהק מיבול הצמחים הבריאים והנזק היה 18.1%. בצמחי המוקד, שמתו מוקדם יותר, הפסיק היבול להצטבר 85 ימים משתילה והנזק שנגרם להם היה 53.4% (איור 5).

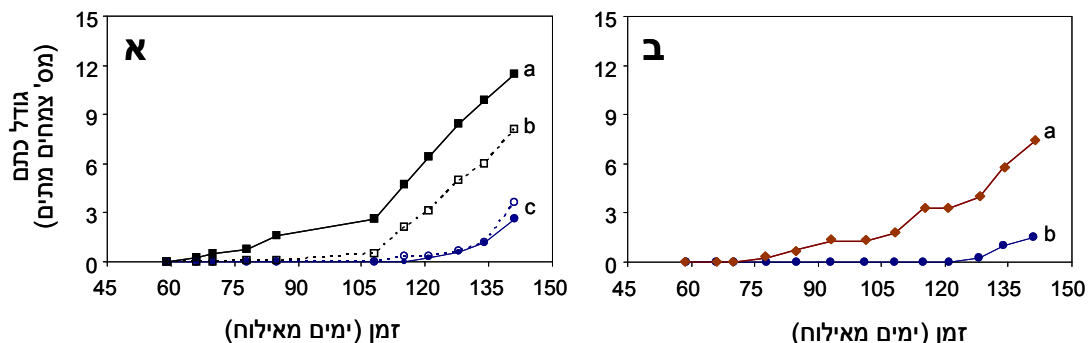


איור 5. השפעת הנגיעות במחלת הכיב הבקטריאלי על היבול בניסוי B2 שבוצע בחוות הבשור בעונת 2009. הצמחים מיוני לחמש קבוצות על פי עוצמת התסמינים שנראו עליהם. בסוף הניסוי, ערכים של טיפולים שלידם אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק כנקבע על ידי מבחן HSD (ברמת מובהקות של $P=0.05$).

בניסוי B3 בחנו את חשיבות מי הדמיעה בהפצה המרחבית של המחלה. שמונה ימים לאחר השתילה כבר בודדו חיידקי ה- *Cmm* מטיפות מי הדמיעה של צמחי המוקד. שבוע לאחר ביצוע ההפצה היוזמה כבר נראו התסמינים האופייניים להדבקה דרך הידטודות בחלק מהצמחים שנשתלו בריאים בשורות בהן הושרתה דמיעה. שבוע לאחר מכן, כבר נראו התסמינים על מרבית הצמחים בשורות אלה. לא נראו תסמינים כלל בשורות הצמחים בהם בוצע המגע כשהצמחים היו יבשים. במבנים שרוססו בתכשיר הנחושתי הייתה הפחתה נכרת במספר הצמחים שנראו עליהם התסמינים הללו (איור 6). חשוב לציין שבמועד זה עדיין לא נראו התסמינים המאפיינים הדבקה סיסטמית בצמחי המוקד. בהמשך התפתחו תסמיני המחלה האופייניים להדברה סיסטמית בכל צמחי המוקד. חומרת התסמינים בצמחים אליהם הופצה המחלה מצמחי המוקד, עלתה עם הזמן. הצמחים הראשונים החלו למות כחודשיים משתילה בשורות בהם ההפצה בוצעה כשהצמחים היו רטובים מטיפות מי הדמיעה. כשלושה וחצי חודשים לאחר מכן, חלה עליה בקצב התמותה של צמחים אלה ובתום הניסוי (ארבעה וחצי חודשים מהשתילה) מרבית הצמחים בשורות אלה מתו מהמחלה (11.5 צמחים מתוך ה- 15 האפשריים, בממוצע). לעומת זאת, בשורות בהן בוצעה ההפצה כשהצמחים היו יבשים החלו הצמחים הראשונים למות כארבעה חודשים משתילה והצמחים המתים היו סמוכים לצמחי המוקד; נראה שהם מתו כתוצאה מהפצת המחלה במהלך פעולות הגיזום והזירוד. בסוף הניסוי היה גודל המוקד בשורות אלה 2.6 צמחים בממוצע (איור 7א). תמונה הממחישה את ההבדל בנגיעות בין שני טיפולים אלה מתוארת באיור 8. הריסוס בתכשיר נחושתי יום לפני ביצוע ההפצה היוזמה דחה את המועד בו החלו הצמחים למות (כשההפצה בוצעה כשהצמחים היו רטובים מדמיעה) ובסוף הניסוי מתו בשורות טיפול זה 8.1 צמחים בממוצע; הבדל שהיה מובהק מהחלקות שלא רוססו בתכשירי הדברה. כמובן שבשורות שבהן בוצעה ההפצה כשהצמחים היו יבשים לא השפיע הריסוס כלל (איור 7א). בניסוי B4, בו בוצעה ההפצה כשהצמחים היו רטובים מהמטרה, החלו הצמחים למות כחודשיים וחצי משתילה, ובסוף הניסוי מתו בממוצע 7.5 צמחים בשורה (מתוך ה- 15 האפשריים). במבנה בו בוצעה ההפצה כשהצמחים היו יבשים מתו רק 1.5 צמחים בממוצע בשורה, וכולם היו בסמוך לצמחי המוקד (איור 7ב).



איור 6. הפצת מחלת הכיב הבקטריאלי במרחב בניסוי שבוצע בחוות הבשור בשנת 2009 (ניסוי B3). בתחילת הגידול נעשתה הפצה יזומה של המחלה מצמחי מוקד לצמחים הבריאים הסמוכים, כשהצמחים היו יבשים או כשהם היו רטובים מדמיעה. תסמיני המחלה הוערכו שבועיים לאחר ביצוע ההפצה היוזמה. הצמחים רוססו בנחושת (ב) או שהם לא רוססו בנחושת (א) יום לפני ההפצה היוזמה. ערכים של עמודות שלידן אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק נקבע על ידי מבחן HSD (ברמת מובהקות של $P=0.05$).



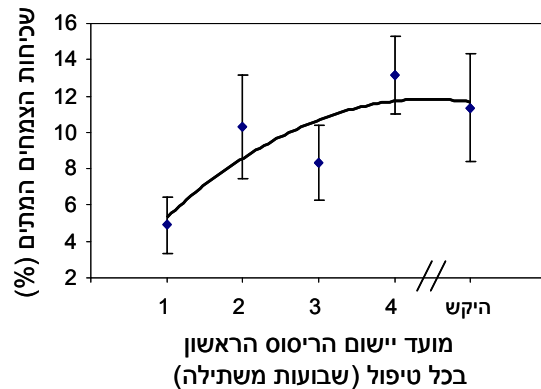
איור 7. הפצת מחלת הכיב הבקטריאלי במרחב בשני ניסויים (B3, א ו-B4, ב) שבוצעו בחוות הבשור בשנת 2009. הצמחים גודלו בשיטת ההדליה ההולנדית ובתחילת הגידול נעשתה הפצה יזומה של המחלה מצמחי מוקד לצמחים הבריאים הסמוכים, בשעה שהצמחים היו יבשים (עיגולים כחולים) או כשהם היו רטובים מדמיעה (ריבועים שחורים) או מהמטרה במתלים (מעוינים חומים). בניסוי המתואר באיור א' היו חלקות שרוססו בנחושת יום לפני שבוצעה ההפצה היוזמה (סימנים ריקים, קו מקווקו). בסוף הניסוי, ערכים שלידם אותיות שונות, שונים זה מזה במובהק נקבע על ידי מבחן HSD (ברמת מובהקות של $P=0.05$).



איור 8. הפצת מחלת הכיב הבקטריאלי מצמחי מוקד לצמחים הסמוכים בניסוי שבוצע בחוות הבשור בשנת 2009 (ניסוי B3). הצמחים גודלו בשיטת ההדליה ההולנדית ובתחילת הגידול נעשתה הפצה יזומה של המחלה מצמחי המוקד (שהיו בתחילת השורות) לצמחים הבריאים הסמוכים, בשעה שהצמחים היו יבשים (A) או כשהם היו רטובים מדמיעה (B). התמונה צולמה ארבעה וחצי חודשים לאחר השתילה. החיצים מציינים את כיוון ההפצה.

4.3. ניסויים במבנים מסחריים

כפי שמתרחש בדרך כלל במבנים מסחריים, פיזור המחלה בבית הרשת במושב מבטחים בו בוצע ניסוי C1 היה במוקדים; במבנה היו אזורים בהם מתו מספר רב של צמחים מהמחלה ואזורים אחרים (לפעמים סמוכים) בהם לא מתו מהמחלה צמחים כלל. לכן, הייתה שונות גבוהה מאד בנגיעות בין חזרות של אותו הטיפול. למרות זאת, נראה שלטיפולים הייתה השפעה על שכיחות הצמחים המתים: בחלקות הטיפול בו יושמו הריסוסים בשבוע הראשון והשני לאחר השתילה מתו פחות צמחים מהמחלה מאשר בחלקות שלא רוססו כלל בתכשירי הדברה (4.9% – 11.3%, בהתאמה). התמותה בטיפולים שרוססו מהשבוע השני והלאה נעה בין 9 ל- 13.1%. בכל מקרה, ההבדלים בתמותה בין הטיפולים השונים לא היו מובהקים בגלל השונות הגבוהה בין החזרות. למרות זאת, נראה שיש קשר בין שכיחות הצמחים המתים למועד יישום חומר ההדברה הנחשתי (איור 9).



איור 9. השפעת עיתוי ההדברה הכימית על תמותת צמחי עגבנייה ממחלת הכיב הבקטריאלי בניסוי C1 שבוצע במבנה מסחרי במבטחים בעונת 2009. בכל אחד מהטיפולים יושמו שני ריסוסים נחושתי (קוצייד, 0.5%) והטיפולים נבדלו זה מזה במועד יישום הריסוס הראשון. הנגיעות הוערכה שישה חודשים מהשתילה. הקווים האנכיים מייצגים את שגיאת התקן.

5. דיון

במחקר זה בחנו את דרכי ההפצה של החיידק *Cmm* מצמחי המוקד הראשוני לצמחים הבריאים השכנים. בניסויים עליהם דיווחנו כאן בחנו דרכי הפצה שונות: במגע ישיר בין שורשים או של עלים של צמחי המוקד לצמחים השכנים, במהלך פעולות הזירוד, הגיזום וההדליה המבוצעות בשיטת ההדליה ההולנדית המקובלת בישראל, דרך מי נקז, בדרך האוויר, ובמגע של הפועלים בצמחים יבשים ובצמחים הרטובים מטל/גשם או מדמיעה דרך ההידטודות. מתוצאות ניסוי V1 נראה שהחיידקים מופצים בדרך האוויר ואולי גם בחלק מהדרכים האחרות שצוינו. אבל, אף אחד מהצמחים המאוכלסים לא הראה את תסמיני המחלה (איור 2). מניסויים V2 – V3 ו- B1 – B2 עלה שהחיידקים הופצו במהלך עבודות הגיזום, הזירוד וההדליה בכיוון העבודה, אבל גודל הכתם שנוצר קטן מאד – צמחים ספורים בלבד. העובדה שחיטוי של כלי העבודה (הסכין החם; ניסוי V3) מנעה את ההפצה מרמזת על כך שהמגע הפיזי של הפועלים בצמחים לא גרם לאילוח המשני; האילוח התרחש רק כשהצמחים הבריאים נחתכו בכלי עבודה לא מחוטא. מסקנה זו מחוזקת גם בממצאי הניסויים בבשור בהם גודלו הצמחים בשיטת ההדליה הספרדית. במהלך הגידול בשיטת ההדליה הספרדית הפועלים נוגעים בצמחים בזמן הקשירה וההדליה; אבל, הם לא חותכים את עלים או מזרזים את הענפים הצדדיים. בארבעת הניסויים התרחשה כנראה גם הפצה של חיידקים בדרך האוויר למרחק, מפני שצמחים רבים (בכיוון העבודה ובניגוד לכיוון העבודה) היו מאוכלסים בפתוגן. כמו בניסויים V1 ו- V2, גם כאן צמחים אלה לא הראו את תסמיני המחלה האופייניים (איורים 2 ו- 4). כאשר נעשתה הדמיה למגע בתחילת הגידול בצמחי המוקד ולאחר מכן בצמחים הסמוכים, כשצמחי המוקד היו רטובים מדמיעה או מטל, המחלה הופצה למרחק הגדול ביותר האפשרי. כשבוצע המגע כשהצמחים היו יבשים, לא הופצה המחלה למרחק, ובהמשך התפתחו התסמינים בצמחים הסמוכים לצמחי המוקד כתוצאה מפעולות הזירוד והגיזום (איורים 3 ו- 7). בהקשר זה ראוי לציין שהמגע בצמחים הרטובים היה רק בתחילת הגידול, ושמספר הפעמים בו נגעו בצמחים היה קטן. אבל, זה הספיק כדי להשפיע בצורה משמעותית על בריאות הצמחים במהלך כל עונת הגידול, עד לסוף העונה (איור 8).

כאשר מנתחים את החשיבות היחסית של דרכי ההעברה השונות של חיידקי ה- *Cmm* מצמחי המוקד לסביבה כפי שעלו מסדרת הניסויים שתוארה כאן יש לזכור ולהתייחס לתבנית הפיזור של המחלה בחלקות גידול מסחרי (ראה דו"ח של שטיינברג וחבוריו). בשטחים מסחריים המחלה מתפתחת במוקדים המפוזרים בצורה לא אקראית במבני הגידול. המוקדים הם לאורך שורות וישנם מצבים בהם צמחים הנמצאים בשורה אחת נוגעים קשה או מתים והצמחים הגדלים בשורה הסמוכה של אותה הערוגה נראים בריאים, ללא תסמינים. בבדיקות שנערכו בצמחים הנראים בריאים עלה שחלק ניכר מהם היה מאוכלס למעשה בגורם המחלה. גודל המוקדים לאורך השורות הפגועות כלל צמחים רבים, עד כמה עשרות (איור 10).

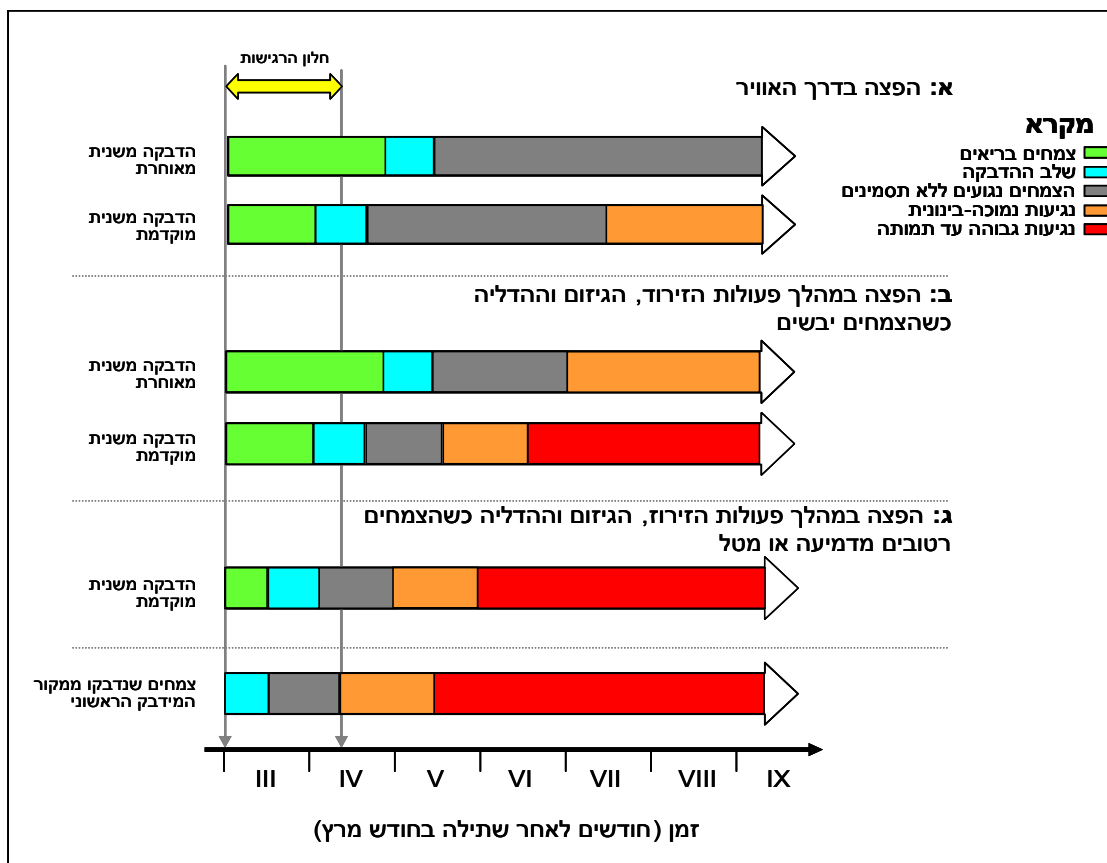


איור 10. מוקד של מחלת הכיב הבקטריאלי בחלקה מסחרית (חלקת בוארון) בשנת 2009. בתמונה ניתן לראות שורה אחת של צמחים בערוגה שהושמדו מהמחלה בעוד שבצמחים הגדלים בשורה הסמוכה, באותה הערוגה, לא נראים תסמינים המחלה האופייניים. בבדיקות שבוצעו באמצעות הקיט של חברת Agdia נמצא שמרבית הצמחים הנראים בריאים מאוכלסים למעשה בגורם המחלה.

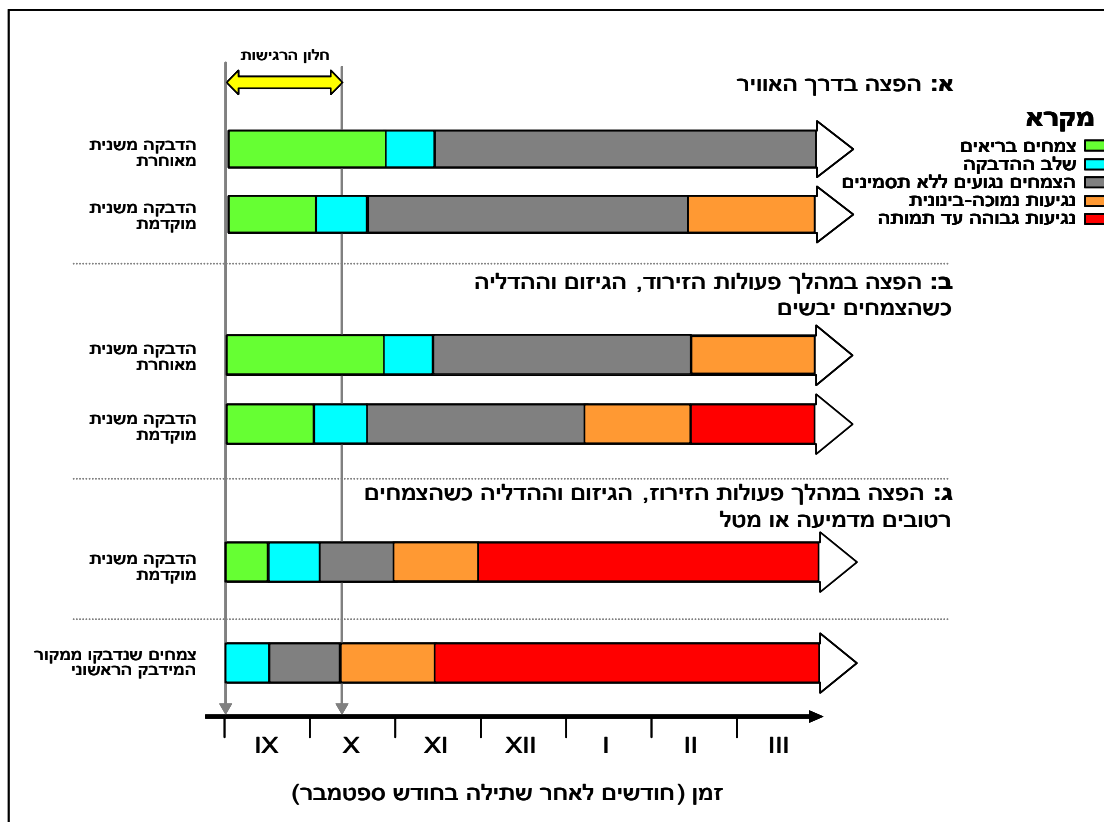
ממצאי הניסויים שתוארו כאן, ומהתצפיות שביצענו בשטחים המסחריים נראה שהמחלה מופצת מצמחי המוקד הראשונה לצמחים הסמוכים בכמה דרכים. אבל, לא בכל המקרים התסמינים המתפתחים בצמחים הסמוכים חמורים באותה המידה. יש מצבים בהם הצמחים הסמוכים נפגעים קשה או מתים מהמחלה. במקרים אחרים התסמינים הם ברמת חומרה נמוכה או בינונית וישנם גם מקרים בהם הצמחים המאוכלסים בפתוגן לא מפתחים את תסמיני המחלה האופייניים עד לסוף העונה. בהסתמך על הממצאים יוצג כאן מודל קונספטואלי המתאר את דרכי ההפצה המשנית השונות, כתלות בתנאי הסביבה ואת חומרת התסמינים שיתפתחו בסופו של דבר. הנחות המוצא של המודל הן כלהלן: (1) צמחי המוקד הראשוני מתאלחים בפתוגן בתחילת הגידול. (2) צמחי העגבנייה רגישים להדבקה במהלך כל תקופת הגידול שלהם, אבל רק הצמחים המתאלחים בשלבי הגידול הראשונים יפתחו בסופו של דבר תסמיני מחלה חמורים או שימותו מהמחלה. לא ידוע כרגע עד איזה גיל מדובר ולכן יוגדר באופן שרירותי שתקופה זו נמשכת כחודש עד חודש וחצי מהשתילה. תקופה זו תכונה להלן "חלון הרגישות". (3) ההפצה המשנית מתרחשת בדרך האוויר במהלך כל תקופת הגידול, אבל ההדבקה המתרחשת בעקבות כך אינה יעילה מבחינה זו שלוקח זמן רב עד שהחידקים מצליחים להגיע לצינורות ההובלה של הצמחים, להתרבות בהם ולגרום למחלה. (4) המחלה מופצת במהלך פעולות הזירוד, הגיזום וההדליה כשהצמחים יבשים לאורך השורות, עם כיוון העבודה. בדרך זו הפתוגן מופץ ומאלח את הצמחים השכנים למרחקים קצרים. (5) דמיעה מתרחשת רק בשלבי הגידול הראשונים (בחלון הרגישות) וכשמתבצעות הפעולות האגרוטכניות בתקופה זו כשהצמחים רטובים מדמיעה (אך גם מטל), המחלה מופצת למרחקים גדולים על ידי הפועלים, בתוך השורות.

המודל מתואר בצורה סכמאטית באיורים 11 ו- 12. התרחישים המתוארים בשני האיורים שונים זה מזה במועד השתילה של הצמחים; בעוד שבאיור 11 מתואר מצב בו הצמחים נשתלים בתחילת האביב (בחודש מרץ) וגדלים במהלך האביב, הקיץ והסתיו, הרי שבאיור 12 מתואר מצב בו הצמחים נשתלים בתחילת הסתיו (בחודש ספטמבר) וגדלים במהלך הסתיו, החורף והאביב. התרחישים שונים מפני שתנאי הסביבה בשני העונות (ובעיקר הטמפרטורה) שונים והם משפיעים על קצב התפתחות המחלה והתבטאות התסמינים. **צמחי המוקד הראשוני** נפגעים בתחילת הגידול ותסמיני המחלה יראו עליהם בתוך חודש, חודש וחצי. הנגיעות של צמחים אלה תתפתח במהירות והם יהיו נגועים בחומרה גבוהה או שהם ימותו בתוך חודשיים-שלושה מהשתילה. צמחי המוקד הראשוני מפוזרים במבנה הגידול בצורה אקראית, או בכתמים. צמחים בריאים שיפגעו בשעה שהפעולות האגרוטכניות בזמן חלון הרגישות בוצעו **כשהצמחים היו רטובים מדמיעה או מטל** יראו את תסמיני המחלה הסיסטמיים הראשונים בתוך חודשים משתילה (ניתן יהיה לראות את התסמינים האופייניים להדבכת ההידטודות – בקצוות העלעלים – בתוך שבוע מההפצה, אבל בדרך כלל קשה לזהות תסמינים אלה). צמחים אלה יפגעו קשה ואף ימותו מהמחלה בתוך חודשיים שלושה. זו דרך ההפצה המשמעותית יותר של המחלה בישראל והיא מתרחשת בכיוון העבודה, לאורך השורות. **ההפצה המתרחשת במהלך פעולות הגיזום והזירוד כשהצמחים מבוגרים יותר**, מעבר לחלון הרגישות, תגרום לתסמינים חמורים עד תמותה בחלק מהצמחים אך במרבית הצמחים יתפתחו תסמינים ברמת נגיעות נמוכה עד בינונית. הפצת המחלה מתרחשת בכיוון העבודה, לאורך השורות. **ההפצה בדרך האוויר** היא דרך ההפצה השכיחה ביותר. חלק מהצמחים שאולחו בצורה זו יבטאו תסמינים ברמה נמוכה עד בינונית אך במרביתם לא יתבטאו תסמיני המחלה כלל ולכן לא ניתן לדעת שהם מאכלסים את הפתוגן. ההפצה במקרה זה היא למרחב, לא לאורך השורות ולכן גם צמחים הנמצאים בשורות סמוכות, ואף בשורות הרחוקות מצמחי המוקד עלולים להיפגע.

בניסוי אחד בחנו את השפעת המחלה על צבירת היבול. יש להתייחס לממצאי ניסוי זה בזהירות הראויה מפני שמדובר רק בניסוי אחד ומפני שהגידול הופסק אחרי 3 חודשים. בכל מקרה, מציאנו שמחלת הכיב הבקטריאלי לא גרמה לנזק ליבול בצמחים שאוכלסו בצורה א-סימפטומטית בגורם המחלה וגם לא לצמחים בהם המחלה התפתחה בחומרה נמוכה עד בינונית. היבול הפסיק להצטבר רק במועד בו חומרת הנגיעות הייתה גבוהה או כשהצמחים מתו (איור 5). לממצא זה, אם יאומת בניסויים נוספים, חשיבות רבה מאחר והמשמעות היא שעצם זיהוי התסמינים לא מרמזת בהכרח שתהיה פגיעה ביבול. כפי שכבר צוין למעלה רק בחלק קטן מהצמחים הנגועים תתפתח נגיעות קשה או שהם ימותו בסופו של דבר. הגורם הקובע זאת הוא מועד ההדבקה ודרך האילוח מכאן עולה שגם במצבים בהם המחלה זוהתה כדאי להמשיך בגידול ובתחזוקת הצמחים מפני שלא ניתן לדעת מראש מה תהיה חומרת המחלה הסופית ואם יגרם כלל נזק ליבול. בעבר היו מקרים בהם מגדלים "הפסיקו להשקיע" במבנים בהם זהו תסמיני המחלה בהנחה שהצמחים ימותו בסופו של דבר.



איור 11. מודל קונספטואלי המתאר את חומרת הנגיעות במחלת הכיב הבקטריאלי שתפתח בצמחי עגבנייה שנשתלו באביב, כתלות במקור המידבק (ראשוני או משני), מועד ההדבקה (בזמן חלון הרגישות או מאוחר מכך) ודרך הפצת המידבק (על ידי הפועלים או בדרך האוויר). חומרת הנגיעות מבוטאת בצבעים, על פי המקרא. הנחות המוצא של המודל מפורטות בטקסט.



איור 12. מודל קונספטואלי המתאר את חומרת הנגיעות במחלת הכיב הבקטריאלי שתפתח בצמחי עגבנייה שנשתלו בסתיו, כתלות במקור המידבק (ראשוני או משני), מועד ההדבקה (בזמן חלון הרגישות או מאוחר מכך) ודרך הפצת המידבק (על ידי הפועלים או בדרך האוויר). חומרת הנגיעות מבוטאת בצבעים, על פי המקרא. הנחות המוצא של המודל מפורטות בטקסט.

בהתבסס על התובנות שעלו מהניסויים שבצענו, בחנו את האפשרות להגן על הצמחים בתקופת "חלון הרגישות" תוך שימוש בתכשיר הדברה נחושתי. הכוונה הייתה לבחון אם תכשיר ההדברה ימנע את ההפצה

המשנית של המחלה מצמחי המוקד לצמחים הבריים הסמוכים. בניסוי B3 ו C1 – יושמו 2-3 ריסוסים בנחושת, בתחילת הגידול. נראה שהריסוס בנחושת הפחית את שכיחות הצמחים שמתו בסופו של דבר מהמחלה אבל יעילות הטיפול לא הייתה גבוהה והריסוס לא מנע כליל את התפתחות המחלה. בכל מקרה, העובדה ששניים - שלושה ריסוסים שבוצעו במהלך החודש הראשון של הגידול השפיעו על תמותת הצמחים - 5-6 חודשים לאחר מכן מחזקת את המסקנה שיש להתמודד עם המחלה בשלבי הגידול הראשונים.

לסיכום, הממצאים שעלו ממחקר זה אפשרו להגדיר את דרכי ההפצה המשנית של המחלה בישראל ולקבוע את דרך ההפצה המשנית העיקרית. אם ממצאים אלה נכונים (ויש לאמתם בסדרות ניסויים נוספות) נראה שניתן היה להפחית בצורה משמעותית את ההפצה המשנית של המחלה. זאת, תוך שמירה על כמה כללים פשוטים, כלהלן. התקופה הקריטית היא תקופת הגידול הראשונית ("חלון הרגישות"). בתקופה זו יש להקפיד שהפעלים המבצעים את פעולות הגיזום, הזירוד וההדליה **לא יכנסו למבני הגידול ולא יגעו בצמחים כשהצמחים רטובים מדמיעה, מטל או מגשם**. מאחר ומועדי הפעולות הללו ידועים מראש, כדאי לרסס את הצמחים בתכשיר נחושת יום לפני כן, כדי להגן על הצמחים. כך ניתן יהיה למנוע את דרך ההפצה העיקרית של המחלה. הדרך בה המחלה מופצת למרחקים גדולים ובה הצמחים המאולחים נפגעים בצורה קשה. דרך אחרת בה יש לנקוט, כדי למנוע את ההפצה המתרחשת בזמן הפעולות האגרוטכניות היא לעבוד עם כלי עבודה. ניתן להשתמש בכלים המחוטאים בחום, כפי שנעשה בניסויים שלנו, או לחטא את המזמרות בחומר חיטוי (כמו אקונומיקה). לא ניתן למנוע את ההפצה בדרך האוויר, אך נראה שדרך זו אינה משמעותית מפני שמרבית הצמחים שנוגעו באמצעותה לא מבטאים כלל את תסמיני המחלה או שהתסמינים קלים. שמירה על כללים פשוטים אלה תאפשר להפחית בצורה משמעותית, או אף למנוע, את הנזק אותו גורמת מחלת הכיב הבקטריאלי במבני גידול העגבנייה בישראל.

התמודדות עם מקורות המידבק הראשוני של מחלת הכיב הבקטריאלי בעמחי עגבנייה

גיורא קריצמן ובני קירשנר

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מינהל החקר החקלאי, בית דגן

1. תקציר

בשנה הראשונה למחקר עסקתי בשלוש בעיות עיקריות הקשורות במחלת הכיב הבקטריאלי של העגבניות. 1. בחינת כושר ההישרדות של הפתוגן על פני משטחים בחלל המבנה כגון רשתות, יריעות, שלד המבנה – חלקי מתכת וחלקי עץ, חוטי הדליה וצינורות ההשקיה. כן נבחנו מקורות מדבק אפשריים אלו כמקור להדבקה ראשונית של שתילים נקיים בבית הצמיחה. שאלה זאת נבחנה בשתי עונות שנה. בעונה האביבית הוכח כי החיידקים שורדים להוציא חלקי מתכת שמאוד מתחממים. בנוסף הוכחנו כי צמחים נקיים נדבקים בחממה מאולחת בהדבקה ללא מגע קרקע. המסקנה המעשית היא שיש בסיס להמליץ על חיטוי המבנה בתמיסת סודיום היפוכלורייט – [אקונומיקה] בריכוז של 1% בגמר הגידול. 2. טיפול בשאריות חומר אורגני מאולח בפתוגן. הנשאר בבית הצמיחה לאחר תום הגידול – שורשים, פירות עלים וחלקי גבעול. אימתנו את העובדה שהוכחה על ידי בשנים הקודמות כי עקר מקור המדבק הקרקעי והישרדות הפתוגן בקרקע לאורך זמן נמצאים בקשר הדוק לנוכחות שאריות צמחים העמוסות בפתוגן ומוצנעות בקרקע. נמצא כי סילוק החומר האורגני מהקרקע באופן ידני [לצרכי מחקר] הביא לאחר תקופה קצרה להעלמות הפתוגן מהקרקע אל מתחת לסף הגילוי. כמו כן נמצא כי שאריות צמחים שנקצצו על ידי מכשירי עיבוד ונשארו בקרקע שדושה בחנקן והפעילות המיקרוביאלית שלה עודדה על ידי שמירת הלחות של הקרקע על ידי השקיה למשך 3 שבועות איבדה חלק מאוכלוסיית הפתוגן וכושר ההישרדות שלו לאורך זמן נפגם. ניסויים אלו מצדיקים את בחינת מכונה להפרדת קרקע משאריות צמחים במבנה נגוע נושא שיבחן בשנה השנייה. 3. הדברת הפתוגן בקרקע תבחן בשלוש שיטות: א. תוספים אורגניים לאחר תהליך קומפוסטציה נושא נפרד שמדווח עליו בפרק אחר שהמוביל של הנושא הוא החוקר מיכה רביב. ב. תוספים אורגניים עתירים בחלבון- בחנו בניסוי בית צמיחה בדליים הדברת הפתוגן שאילח את מצע הגידול בעזרת תוסף אורגני – כוספת סויה – כמות מחושבת שוות ערך למנה של 2 טון לדונם. התוצאות היו חד משמעיות הפתוגן הודבר. ג. הדברה כימית – שיפור היישום של תכשיר פורמלין [פורדור 37] להדברה של הפתוגן בחדר קרקע עד לעומק של כ 45 ס"מ. הנושא נבחן במעבדה והוכח כי הבעיה של חוסר הפעילות שנתגלתה במהלך השימוש בתכשיר נעוצה בשיטת היישום – יישום פרופורציונאלי הגורם לדילול המנה של החומר הפעיל אל מתחת לסף הפעילות שלו. הדרך המוצעת על ידנו היא יישום מרוכז ודחיקה במנת ההשקיה. בחלקות זעירות היישום המוצע הצליח. בשנה השנייה נבצע יישום בבית צמיחה מסחרי.

2. מבוא

מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבניות הפכה לבעיה כלכלית כבדה ומסכנת את גידול העגבנייה בארץ. על מנת שנוכל להציע דרכים להתמודדות עם מחולל מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה, אנו מחפשים את מקורות המדבק הראשוניים העיקריים ומחפשים דרכים מעשיות לפתרון כלכלי של הורדת רמת המדבק אל מתחת לסף אוכלוסייה המאפשר התפתחות מגיפה. במסגרת הפרויקט שלושה נושאים נלמדים על ידנו:

1. בחינת כושר ההישרדות של החיידק קלויבקטר משיגנזה על גבי משטחים שונים בחלל בית הצמיחה כמקור מדבק ראשוני.
2. בחינת חשיבות שאריות הצמחים הנגועים בקרקע בית הצמיחה על משך ההישרדות של הפתוגן בקרקע והדרכים לסילוקן כחלק ממהלך ההתמודדות עם הקרקע כמקור מידבק ראשוני ועקרי.
3. מציאת דרכים להדברת הפתוגן בקרקע על ידי שילוב של סעיף "2" עם: א. טיפול בקרקע באמצעות קומפוסט סופרסיבי לפתוגן [פרק נפרד מבוצע ומדווח על ידי מיכה רביב]. ב. טיפול קרקע באמצעות תוספים אורגניים עתירי חלבון כגון כוספת סויה. ג. בחינה מחודשת של דרך יישום תכשיר פורמלין לקרקע [פורדור 37] שיהיה יעיל להדברת הפתוגן.

מטרות המחקר של שלושת הנושאים המוצגים הם:

1. הוכחת חשיבותם האפידמיולוגית של מקורות המדבק הראשוניים המצויים בתוך בתי הצמיחה.
2. מציאת דרכים כלכליות ברות יישום להתמודדות עם מקורות המדבק בתוך בתי הצמיחה למניעת אילוח שתילים נקיים שישתלו בבתי צמיחה בעלי היסטוריה של נגיעות במחלה ומניעת התפתחות מקורות מדבק אלו בבתי צמיחה. במסגרת הפרויקט נבחן דרכי הדברה כימית וביולוגית-אורגנית.
3. העברת הידע בצורה של פרוטוקולים ברי יישום להדרכה ולחקלאים.

3. תוצאות

3.1 חשיבות המשטחים השונים של חלל בית הצמיחה כמקור מדבק ראשוני

- השיטה: גידול צמחי עגבניות נגועים בפתוגן קלוויבקטר משיגנזה ובמהלך הגידול. לבחון נוכחות הפתוגן על פני משטחים שונים בבית הגידול על ידי שימוש במקלוני אוזניים להסרת חיידקים מהמשטחים הנבדקים והעברתם מידית על פני מצע מתאים בצלחת פטרי. מושבות חשודות הוגדרו מורפולוגית, PCR ובמבחן לפתוגניות. בטבלה המצורפת תוצאות חיוביות [+], המצביעות על נוכחות של פתוגן פעיל על גבי המשטחים הנבדקים. או תוצאות שליליות [-] בהן לא נמצא הפתוגן.
- בדיקת הישרדות החיידק קלוויבקטר משיגנזה 12 מאי 2009 חממיות הבשור בהן צומחות עגבניות מאולחות בפתוגן.

חממית מספר	צנרת. טפטפת	מסגרת מתכת	רשת	מסגרת עץ	חוטי הדליה
7	+	-	-	+	+
8	+	-	-	-	+
9	+	-	+	+	+
10	-	-	+	-	+
11	+	-	+	-	+
12	+	-	+	+	+
13	+	-	+	+	+
14	-	+	+	+	+

- בדיקת הישרדות החיידק קלוויבקטר משיגנזה 25 מאי 2009 חממיות הבשור בהן צומחות עגבניות מאולחות בפתוגן.

חממית מספר	צנרת. טפטפת	מסגרת מתכת	רשת	מסגרת עץ	חוטי הדליה
7	+	-	-	+	+
8	-	-	-	-	+
9	+	+	+	+	+
10	+	-	+	-	+
11	+	+	+	-	+
12	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-

• תמונה המתארת צמחים נגועים בחממית



בהמשך בחנו אם העמדת צמחי עגבנייה נקיים בבית צמיחה שגדלו בו צמחים חולים יגרום לחלק מהצמחים להידבק בחיידק שמקורו פני משטחים שונים במבנה.

לצורך הבדיקה הועמדו צמחים נקיים בעציצים כאשר הם מנותקים לחלוטין מכל מגע עם הקרקע. צמחים אלו הועברו לאחר מספר ימים מהחממה הנגועה לתא צמיחה נקי בבית דגן במטרה לבחון אילוח חיצוני של הצמחים והדבקות הצמח בפתוגן.

• תמונה המתארת כיצד הועמדו הצמחים בחממית המאולחת



תוצאות בדיקת הצמחים שהובאו לבית דגן - התפלגות היאלחות ונגיעות של צמחי עגבנייה נקיים שהועמדו בתאריך 14.06.09 בחממיות בבשור, שהיו בהן צמחים נגועים למשך שבוע והועברו להמשך צמיחה לחממה נקייה בבית דגן ס"ה 30 שתילים.

76.7%	נוכחות על פני העלים
33.3%	אכלוס בתוך העלה
33.3%	אכלוס הגבעולים לאחר 40 יום גידול

בעקבות ממצאים אלו נשתלו צמחים נקיים בכל החממיות שצמחו בהן צמחים מאולחים כאשר הצמחים היו מנותקים מכל מגע עם הקרקע ראה תמונה בהמשך.

- תמונה המתארת גידול צמחים נקיים בחממיות בה נתגלה הפתוגן על פני משטחים שונים בחלל המבנה.



בתום הניסוי נלקחו גבעולים מכל צמח וצמח בחממיות הנבדקות לבדיקת נוכחות הפתוגן בתוך רקמת הגבעול. בטבלה הבאה סיכום הממצאים.

- סכום צמחים נגועים מבחן גבעול קלוייבקטר בתאריך 31.8.09: כל הצמחים שנשתלו כ"מלכודת" קלוייבקטר היו מנותקים באופן מוחלט מהקרקע כך שנגיעות שנמצאה מקורה בחיידקים ממשטחים שונים בחלל המבנה.

חממית מספר	שורה	מספר הצמח בשורה	חיובי לקלוייבקטר
7	1	8	+
8	4	3	+
9	2	8	+
10			
11	3	8	+
12	0		
13	0		
14	2	3	+

בהמשך בחנו תופעה של אילוח צמחים בריאים שהוצבו במתקן בו היו צמחים נגועים. עבודה זאת בוצעה בבתי גידול במרכז וולקני ב - 4 בתי צמיחה שונים על פי הכינויים שלהם בטבלה המצורפת. הבדיקה כללה אילוח על פני העלה ונוכחות חיידקים פתוגנים בתוך העלה (הצמח נדבק במחולל המחלה).

- בדיקת אילוח צמחי עגבנייה נקיים שהועמדו בחממות שונות באתר המחלקה בוולקני בשכנות לצמחים שחלקם נמצא נגוע. 14-15.8.09

תוך העלה	פני העלה	בית הצמיחה
2/10	3/10	"מתקני העברה במצע"
0/10	0/10	"אגסים 1"
0/10	0/10	"אגסים 2"
1/10	3/10	"סטנלי 1"
1/10	1/10	"סטנלי 2"

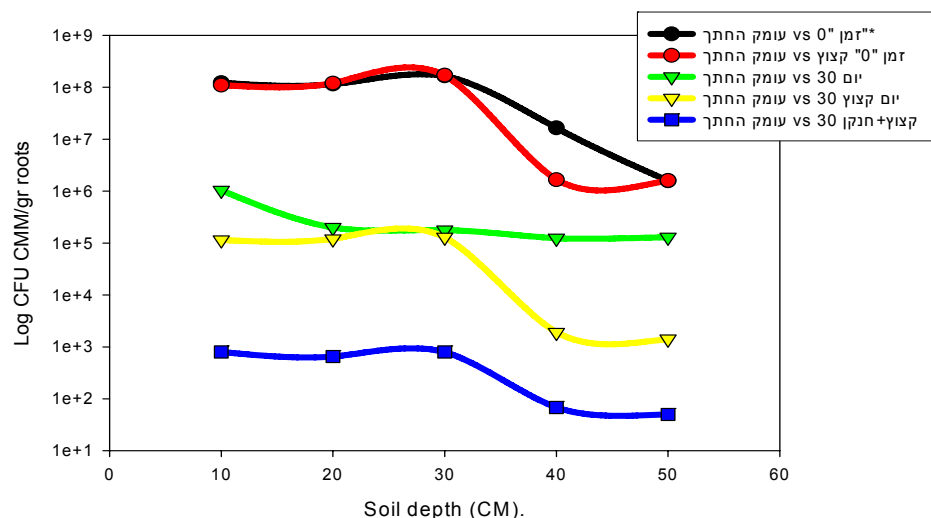
מהממצאים עולה שהפתוגן קלוויבקטר משיגנזה מסוגל לשרוד בעונות מסוימות על פני משטחים בחלל בתי הצמיחה. כמו כן הוכח כי מקור מדבק זה פעיל ומהווה מקור מדבק ראשוני בבית הצמיחה. חיטוי בתכשיר סודיום היפוכלורייט (אקונומיקה) בריכוז של 1% חומר פעיל חיטא היטב את המשטחים. המסקנה היא שחשוב לחטא את חלל בתי הצמיחה בתום הגידול ולפני הכנסת צמחים בריאים לבית הצמיחה.

3.2 טיפול בשאריות חומר אורגני מאולח בפתוגן.

השיטה:

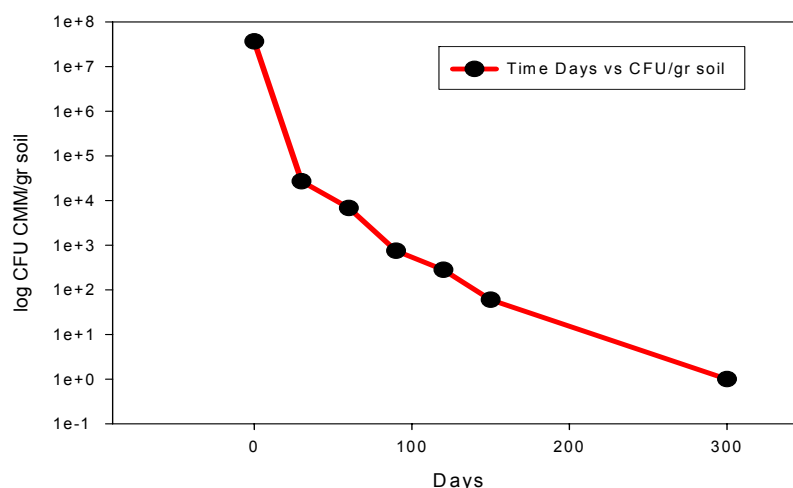
1. בדיקת הישרדות הפתוגן בתוך שאריות צמחים בקרקע.
 2. בדיקת הישרדות הפתוגן חופשי בקרקע
 3. בדיקת השפעת עידוד פירוק שאריות הצמחים בקרקע על ידי קיצוץ והוספת חנקן על הישרדות הפתוגן.
- נאספו שורשים מחממה נגועה על ידי איסוף קרקע מעומקים שונים וסינון. מדגם שורשים מכל עומק האוכלוסייה של הפתוגן מבוטאת כ CFU לגרם שורש.

השפעת עומק השכבה והטיפול על הישרדות הפתוגן קלוויבקטר בקרקע



- הישרדות הפתוגן שנמצא בקרקע מנוגעת באופן טבעי. הקרקע חולית נשמרה בלחות למשך 300 ימים. בגרף המצורף רואים את קצב העלמות החיידק לאורך זמן.

.הישרדות החיידק קלויבקטר בקרקע כאשר הוא חופשי בקרקע חולית שנשמרה לכה



התוצאות עד כאן מראות כי עקר ההישרדות של הפתוגן בקרקע הוא בתוך שאריות הצמחים. חיידק חופשי נעלם מהקרקע בפרק זמן של חודשים. הראנו כי פעולת עידוד פירוק החומר האורגני בקרקע על ידי קיצוץ והוספת חנקן מעודדת העלמות הפתוגן. המסקנה היא שכל פעולה שתביא לסילוק מהיר של החומר האורגני תעודד העלמות הפתוגן מאדמת בית הגידול.

3.3. הדברת הפתוגן בקרקע באמצעות תוסף אורגני עתיר חלבון – כוספת סויה

השיטה מבוססת על הניסיון הקודם שלי והפרסומים בנושא המראים כי הוספת תוסף אורגני העשיר בחלבון יוצר בעיה לאוכלוסי הקרקע אשר חייבים לפרק החלבון לשימוש בשלדים הפחמימניים שלו תוך שחרור אמוניה. אמוניה הינה רעילה למיקרואורגניזמים לצמחים ולנמטודות.

מקום הניסוי – חממה 269 בבית דגן. צורת הגידול – דליים במצע תערובת טוף חומר אורגני של גבעת עדה בחממה 400 דליים מסודרים על שולחנות עם הדליה והשקיה בטפטוף.

שלב א' זריעת זרעי עגבנייה מאולחים בתערובת חיידקי קלויבקטר. גידול הצמחים עד לסמני מחלה מובהקים בכל עציץ כ 5 צמחים. בדיקת הצמחים לנוכחות מחלה. הורדת הנוף והשורשים קיצוצם לפרוסות והחזרתם למצע בתוך הדלי תוך ערבוב לכל נפח התערובת.

שלב ב' חלוקת הדליים לשתי קבוצות: בחדר הראשון – מטופלים. בחדר הפנימי, היקש ללא טיפול. לכל דלי מקבוצת המטופלים הוספו 40 גרם כוספת סויה אשר עורבבה ידנית הדלי הושקה וכוסה בשקית פלסטיק. לאחר 21 יום השקיות הורדו המצע בדליים קבל השקיה גדושה ועל פני כל דלי פוזרו זרעי עגבנייה נקיים שכוסו לשם הנבטה בשכבה דקה של פרלייט נקי חדש.

שלב ג' גידול הצמחים כולל קיטום כאשר הגיעו לגובה מטר וחצי.

בתאריך 29.10.09 נבדקו גבעולי הצמחים על פי מדגם שורתי התוצאות:

טיפול ההיקש: ב - 5 מתוך 10 מדגמי שורות נמצאו צמחים חולים

בטיפול כוספת הסויה: בכל הניסוי נתגלה צמח אחד שנבדק במחלה.

מצע גידול מנוגע באופן טבעי בפתוגן שימש לניסוי גדול זה (400 דליים בכל דלי 5 צמחים) הראה כי הפתוגן שורד היטב במצע. הוספת תכשיר סויה ברמה המקבילה ל - 2 טון לדונם הדגרה של 21 ימים שטיפה לסילוק שאריות האמוניה הביאה את התוצאה המקווה הדברה מושלמת של הפתוגן במצע הגידול. המסקנה היא שיש לבחון תוצאה זאת בבית צמיחה מסחרי עם קרקע מנוגעת.

קומפוסט ככלי להפחתת נזקי קלויבקטר

מיכאל רביב¹, גיורא קריצמן²

¹מיינהל המחקר החקלאי, נווה יער, ²מיינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

1. תקציר

נבדקה בתנאי מעבדה האפשרות להפחית אוכלוסיית חיידק ה- *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganensis* (להלן Cmm) בעזרת קומפוסטים. נמצא כי קומפוסטים בשלים הפחיתו את אוכלוסיית החיידק לרמה אפסית. בהמשך יערך ניסוי בבשור לבחינת האפשרות להשתמש בקומפוסט מדכא לשם הפחתת אוכלוסיית החיידק בתוך קרקע נגועה. נבדקה האפשרות להפחית את אוכלוסיית החיידק בתוך צמחי עגבנייה נגועים, לאחר גמר העונה, ע"י קומפוסטציה שלהם. נמצא כי תהליך הקומפוסטציה גורם להכחדה מלאה של החיידק בתוך כ- 140 יום, דבר המאפשר שימוש בחומר גלם רב ערך זה (הכולל כמות גדולה של יסודות הזנה). האפשרות להשתמש בקומפוסט זה לצורך גידול עגבניות, ללא הדבקה משנית תיבדק בחלקה נקייה בחוות הבשור.

2. מבוא

מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה הנגרמת על ידי החיידק *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganensis* (להלן Cmm) גורמת לנזקים קשים לגידול העגבנייה בארץ ובעולם. בעבודה קודמת הראינו כי קומפוסטים מסויימים היו מסוגלים לדכא את פעילות החיידק ולהפחית את הנגיעות במחלה (Yogev et al., 2009). מטרת העבודה הנוכחית היא:

1. השוואת כושר הדיכוי של קומפוסטים שונים כלפי קלויבקטר לשם הבנת הקשרים שבין תכונותיהם השונות לבין כשר הדיכוי שלהם.

2. בחינת שרידות המדבק בעת קומפוסטציה של שאריות צמחי עגבנייה נגועים.

2. תיאור הניסויים שבוצעו

2.1. כושר הדיכוי של קומפוסטים שונים

נאספו קומפוסטים ממספר יצרנים מסחריים ושרידות ה- Cmm בהם נבדקה, בהשוואה לקומפוסט העשוי מזבל בקר+צמחי עגבנייה, אשר יוצר בנווה יער ובהשוואה לכבול. כמו כן בוצעו בקומפוסטים אלו אנליזות כימיות שונות במטרה לאתר קשרים בין תכונותיהם לבין כושרם לקטול את הבקטריה.

2.2. שרידות המדבק בעת קומפוסטציה של שאריות צמחי עגבנייה נגועים

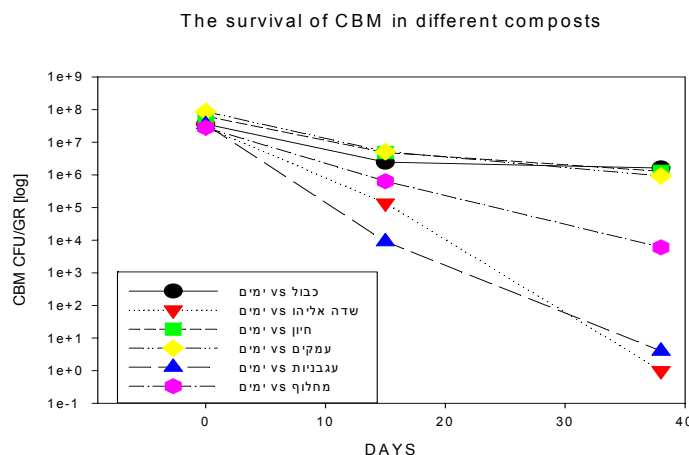
אחד ממקורות המדבק האפשריים בקלויבקטר הם צמחים נגועים. שיטה יעילה ונכונה מבחינה סביבתית למחזור חומר צמחי הינה הקומפוסטציה. יש סיכוי סביר שכמו במקרים של פתוגנים רבים אחרים, הקלויבקטר לא ישרוד את תהליך הקומפוסטציה, במהלכו החומר נתון בטמפרטורות גבוהות ובפעילות פירוק מיקרוביאלית אינטנסיבית ביותר.

בתאריך 25.5.09 הגיעו צמחי עגבנייה נגועים מרוסקים לנווה יער. בשל אטימתם בשקי פוליאטילן הם התחילו לתסוס והעלו ריח חמוץ (דבר שאינו רצוי לתהליך קומפוסטציה תקין). הם עורבבו ביחס נפחי של 1:1 עם זבל חצרות והוכנסו באותו יום לתאים. תהליך הקומפוסטציה בוצע במתקן המבוקר של נווה יער. הקומפוסט הוכנס לשני תאים ונשמר לאורך התקופה הטרמופילית בטמפרטורות של 55 מ"צ (ביקורת מקובלת) בהשוואה - 65 מ"צ. עם הגעת הצמחים והזבל נלקחו מדגמים שלהם וכך גם במהלך הקומפוסטציה (בערך אחת לחודש, בעת ביצוע היפוכים) ובסופה. מדגמים נלקחו בנפרד משתי שכבות: השכבה הקרה, יחסית (עומק 5-10 ס"מ) ומלב הערימה, באזור החם ביותר שלה. המדגמים נופו למקטע גס (מעל 2.0-1.5 ס"מ) ומקטע דק. במדגמים אלו נבדק השינוי בריכוז המדבק עם הזמן. בכל מועד דגימה היו 8 מדגמים (2 תאים X שני עומקים X שני מקטעי גודל). בנוסף בוצעו אנליזות כימיות של חמרי הגלם ושל התערובת עם התחלת התהליך, ושל התוצר הסופי.

3. תוצאות

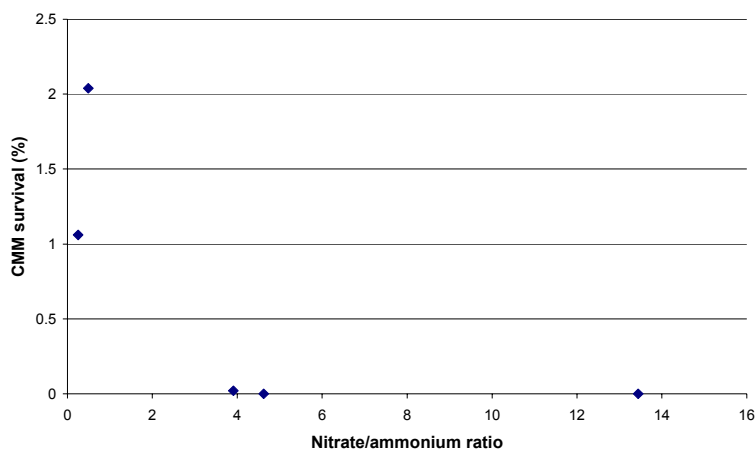
3.1. כושר הדיכוי של קומפוסטים שונים

נמצא כי קומפוסט נווה יער וקומפוסט של אחד היצרנים המסחריים גילו כושר הכחדה רב כלפי הפתוגן. לקומפוסט מסחרי נוסף היה כושר הכחדה בינוני ולשניים נוספים וכן לכבול – נמוך (איור 1).



איור 1: שרידות CMM בסוגי קומפוסט שונים לאורך תקופה של 38 יום.

נמצא כי יש קשר שלילי ברור בין מידת בשלות הקומפוסט, כפי שבאה לידי ביטוי במספר תכונות כימיות (לדוגמא, היחס בין חנקן לאמון בפאזה המימית של הקומפוסט) לבין שרידות הפתוגן (איור 2).

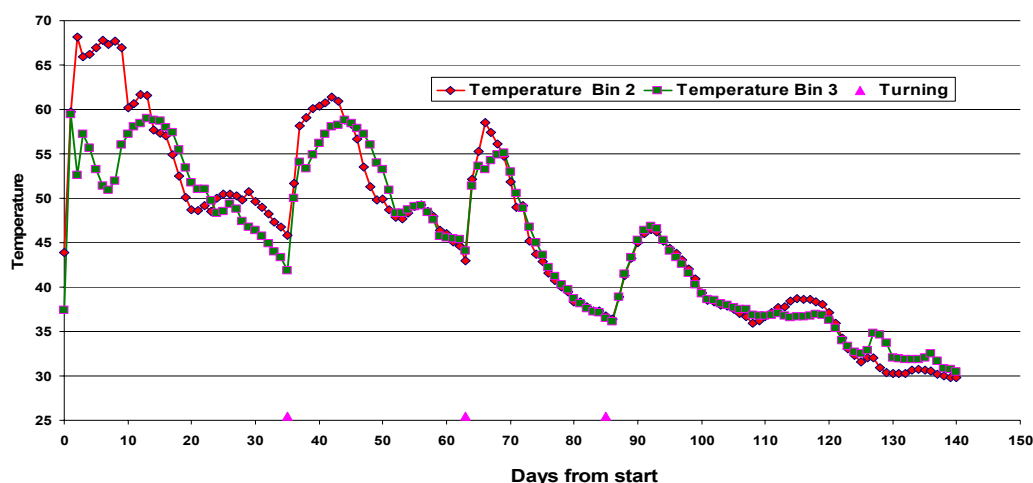


איור 2: הקשר שבין שיעור שרידות מדבק ה Cmm לבין יחס ריכוזי החנקן/אמון במיצויי הקומפוסטים השונים, כמדד מקובל לבשלותם.

על בסיס תוצאות אלו אותר קומפוסט מסחרי אשר ישמש בשלבים הבאים של מחקר.

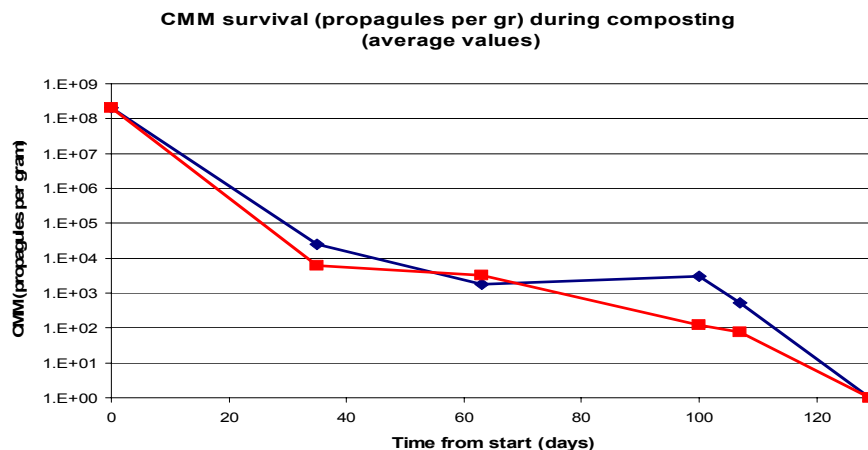
3.2 שרידות המדבק בעת קומפוסטציה של שאריות צמחי עגבנייה נגועים

מהלך הקומפוסטציה היה תקין ונמשך 140 יום, עד לירידה לטמפרטורת הסביבה. במהלך תקופה זו הקומפוסטים עורבבו 3 פעמים על מנת להבטיח הומוגניזציה של החומר (איור 3). בנוסף, הופעלו המפוחים למשך 4 ו 12.5 שעות בתאים בהם טמפרטורות הסף להפעלתם היו 65 ו 55 מ"צ, בהתאמה. תכולת הרטיבות של הקומפוסטים היתה כ 55% בתחילת התהליך וכ 35% בסיומו. במהלך הקומפוסטציה הושקו הערימות בכ 200 ליטר מים לכל מ"ק חומר גלם. הקומפוסט שהתקבל ישמש לבחינת האפשרות להשתמש בו לגידול צמחי עגבנייה, ללא אילוחם. לשם כך הועבר הקומפוסט לחוות הבשור.



איור 3: הטמפרטורות ומועדי ההפיכות במהלך הקומפוסטציה של תערובת של צמחי עגבנייה נגועים ב CMM וזבל חצרות.

איור 3 מראה מהלך קומפוסטציה תקין, במהלכו שררו לאורך כשבועיים טמפרטורות העולות על 65 מ"צ בתא בו טמפרטורת המטרה כוונה לערך זה. בשני התאים שררה טמפרטורה העולה על 55 מ"צ, המקובל כערך סף לקטילת מגוון רב של פתוגנים לתקופה של כ 40 יום. הסטנדרד האמריקאי דורש טמפרטורה כזו למשך העולה על 15 ימים, כך שהיה סביר להניח כי החשיפה לטמפרטורות גבוהות אלו הספיקו לקטילת המדבק. תוצאות הבדיקות שבוצעו במעבדתו של ד"ר קריצמן במהלך הקומפוסטציה לבחינת שרידות מדבק ה Cmm במהלך הקומפוסטציה מובאות באיור 4. לשם הפשטות מובאות תוצאות ממוצעות של כל עומקי המדגם ודרגות סינון הקומפוסט.



איור 4: דעיכת מדבק ה CMM במהלך הקומפוסטציה.

עד למועד הבדיקה של ההפיכה השניה ניתן לראות ירידה של כ – 4-5 סדרי גודל ברמת המדבק. לא ניכר הבדל מובהק בין שני התאים, כלומר בין שני משטרי הטמפרטורה. הדגימות שנלקחו עם סיום הקומפוסטציה היו נקיות לחלוטין מ Cmm. עובדה זו מלמדת כי, כפי שניתן לצפות מתופעת דעיכת המדבק בקומפוסטים בשלים, קטילת הבקטריה הינה תוצאה משולבת של טמפרטורות גבוהות (בשלב הראשון של התהליך) ופעילות מיקרוביאלית (בשלביו המתקדמים יותר של התהליך). לסיכום ניתן לקבוע טנטטיבית כי קומפוסטציה של צמחי עגבנייה נגועים מביאה לקטילה מלאה, ככל הנראה, של מדבק ה CMM. יש, כמובן, צורך לאמת ממצא זה לפחות בניסוי אחד נוסף, בטרם ניתן יהיה לפרסמו כהמלצה.

תכונותיו הכימיות – הזנתיות של הקומפוסט שיוצר סבירות. בטבלה מס. 1 מובאים ערכים ממוצעים של המדגמים השונים שנלקחו משני הקומפוסטים.

טבלה 1: נתונים כימיים ממוצעים של קומפוסטים שיוצרו מתערובת של צמחי עגבנייה וזבל חצרות.

Measured parameter	Units	Average
Organic matter	%	37.2
C/N ratio		10.7
Total N	%	2.06
Total P	%	1.01
Total K	%	4.08
In a 1:10 water extract		
pH		7.1
EC	dS m ⁻¹	11.44
N-NO ₃	mg l ⁻¹	226.8
N-NH ₄	mg l ⁻¹	37.2
P-PO ₄	mg l ⁻¹	22.6
K ⁺	mmol _c l ⁻¹	78.6
Cl ⁻	mg l ⁻¹	1950
Na ⁺	mmol _c l ⁻¹	25.5
Dissolved organic matter	mg l ⁻¹	2152

מנתונים אלו ניתן להסיק כי תרומתו ההזנתית של קומפוסט זה צפויה להיות ממוצעת. ביישום לקרקע ברמות מקובלות (4-6 מ"ק לדונם) תרומת החנקן הכללי היא כ- 66 ק"ג לדונם, מהם כ- 8 ק"ג זמינים מיידית. לעומת זאת תרומת האשלגן של קומפוסט זה גבוהה מאד (כ- 130 ק"ג לדונם), כאשר רובו הגדול של האשלגן זמין מיידית. ביישום כמצע גידול יש הכרח לשטוף קומפוסט זה, על מנת להדיח עודפי מלחים. מסקנה המתבקשת מתוצאות אלו היא כי בעתיד יהיה רצוי לבצע את העירבוב עם מקור זבל טרי יותר מזה ששימש במקרה זה. הדבר יאפשר קבלת קומפוסט פחות מלוח ובעל תכולת חנקן גבוהה יותר.

4. דיון

במחקר הנוכחי אימתנו מימצא קודם (Yogev et al., 2009) בדבר כושרם של קומפוסטים מסויימים לקטל Cmm בתנאי מעבדה. יש, כמובן, צורך לברר את משמעותו המעשית של מימצא זה, בתנאי יוּסוּם קומפוסט לקרקע נגועה, דבר שיעשה בהמשך המחקר בחוות הבשור עם קומפוסט שהוגדר כבעל כושר דיכוי.

מימצא חדש, בעל חשיבות רבה מאד, של המחקר הנוכחי הוא שתהליך קומפוסטציה תקין מביא להכחדה מוחלטת של Cmm. מאחר שאין לכך סימוכין קודמים בספרות יש, לדעתנו, הכרח לחזור על ניסוי זה בטרם ניתן יהיה לפרסמו כהמלצה של המיזם לחקלאים. כמו כן יש לבדוק האם יישום קומפוסט זה לא יביא לאילוח שאריתי, כזה שאמנם לא אותר בבדיקות מעבדה, אך יגרום לנגיעות בצמחי עגבנייה שישתלו בשטח. ניסוי כזה עומד להתבצע בקרוב בחוות הבשור.

5. רשימת ספרות מצוטטת

Yogev, A., Raviv, M., Kritzman, G., Hadar, Y., Cohen, R., Kirshner, B. and J. Katan (2009). Suppression of bacterial canker of tomato by composts. Crop Protection. 28: 97-103.

בחינת הפוטנציאל של חישה תרמית לגילוי מוקדם של מוקדי קלויבקטר בעגבנייה

ליאת פסלר¹, יפית כהן¹, ויקטור אלחנתי² ושאול בורדמן¹

¹הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות

²המכון להנדסה חקלאית, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

1. תקציר

המחקר הנוכחי דן בשאלה האם יש לחישה תרמית הפוטנציאל לגילוי מוקדם של נגיעות צמחי עגבנייה בחיידק *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) במיוחד בשלב המשתלה. המטרות של המחקר עד כה היו לכייל ו/או לפתח את שיטות העבודה עם המחלה במעבדתנו, ולהתאים את שיטות הביצוע של צילומים תרמיים וניתוחם לשאלת המחקר, תוך כדי תחילת לימוד על השפעת נגיעות ב-Cmm על טמפרטורת העלווה של צמחי עגבנייה. מטרות אלה הושגו ואף נראה בניסויים ראשוניים, מגמה של עליה בטמפרטורת העלים של צמחים נגועים, אם כי עלינו לבדוק בהמשך האם מגמה זו משמעותית. בדו"ח הנוכחי אנו מתארים את הממצאים העיקריים ואת השיפורים שאנו מציעים להכניס לשנה השנייה של המחקר, שלדעתנו יאפשרו לנו לקבוע האם לחישה תרמית יש את הפוטנציאל לתרום לגילוי מוקדם של נגיעות ב-Cmm.

2. מבוא

טמפרטורת העלים של צמחים הינה תוצאה של גורמים סביבתיים כגון טמפרטורת האוויר, קרינת השמש, מהירות רוח ולחות יחסית, ושל גורמים פיסיוולוגיים. היות ומים הינם המבלע העיקרי לקליטת קרינת אינפרא-אדומה בתחום התרמי ברקמה הצמחית, ישנה קורלציה חזקה בין מצב המים של הצמח וטמפרטורת העלה. בדרך כלל, הסינגל התרמי תלוי בהפרשים בקצב הטרנספירציה, כאשר שטחים בעלי טמפרטורה גבוהה משקפים סגירת פיוניות וטמפרטורות נמוכות קשורות לפתיחה פיוניתית או פגיעה ברקמה. שינויים בקצב הנשימה עשויים גם הם להשפיע על טמפרטורת העלה אם כי בד"כ הם בעלי השפעה נמוכה בהרבה משינויים בקצב הטרנספירציה.

גורמי מחלות יכולים להשפיע באופן משמעותי על טמפרטורת העלה. בנוסף לפגיעה כללית בפעילות המטבולית של הרקמה הנגועה, הגורמת בעצמה לשינויים בטמפרטורת הרקמה, פתוגנים רבים משפיעים ישירות על מוליכות המים בעלה ע"י פגיעה בפעילות הפיוניות ו/או בקוטיקולה. בד"כ שינויים אלו ניתנים לגילוי לפני שתסמיני המחלה נראים לעין ולפני היווצרות יחידות ההפצה. לכן, בציילום תרמי (Thermal Imaging, TI) טמון פוטנציאל לאיתור מוקדם וממוקד של מחלות.

על רקע זה, **המטרה ארוכת הטווח** של התוכנית היא לבחון את הפוטנציאל של החישה התרמית לגילוי מוקדם של מוקדי *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (קלויבקטר, Cmm) בעגבנייה, בעיקר בתנאי משתלה. ההנחה היא שאם נצליח להוכיח שהדבר ניתן לביצוע, אפשר יהיה לפתח את הטכנולוגיה ליישום הגישה במשתלות, מה שעשוי להפחית באופן משמעותי את ההפצה של שתילים נגועים בחיידק (וכך, לצמצם מקור אילוח ראשוני משמעותי למחלה).

המטרות הספציפיות לשנת המחקר היו: (1) ללמוד ולכייל את שיטות העבודה עם החיידק/המחלה, לרבות שיטות האילוח; (2) להגדיר/לאפיין את הפרוטוקול לביצוע צילומים וניתוחם; ו- (3) להתחיל בסדרות של ניסויים ללימוד דפוס השינוי התרמי בעלי עגבנייה כתגובה להדבקה ב-Cmm.

הדו"ח מתייחס לתקופת מאי 2009 - פברואר 2010. עיקר העבודה נעשתה ע"י ליאת פסלר בהנחיית ש' בורדמן, י' כהן ווי' אלחנתי. ליאת החלה את עבודתה במאי 2009 כעובדת לפי שעות. באוקטובר 2009 נרשמה כתלמידת מאסטר וזהו נושא המחקר שלה.

3. תיאור הניסויים העיקריים והתוצאות

3.1 כללי

הניסויים העיקריים שנעשו במהלך התוכנית מתוארים מטה. כל הניסויים בוצעו בפקולטה לחקלאות, כאשר לניסויי האילוח שימשה חממה עם טמפ' בטווח של 25-28 מ"צ. השתמשנו בשני זני המיזם 1125 ו-1335 (בעיקר הראשון, ראה מטה), אלא אם צוין אחרת. תבדידי החיידק Cmm אשר שימשו בעבודה הם אלה שנבחרו לעבודה במסגרת המיזם, Cmm222 ו-Cmm42.

הניסויים הראשונים בוצעו כדי ללמוד ולכיל את שיטות האילוח שישמשו במהלך התוכנית. עסקנו ב-3 שיטות: אילוח זרעים, אילוח שורשים ואילוח עלים באמצעות גזירה. שתי השיטות האחרונות כבר שימשו חוקרים אחרים של המיזם ולכן שיטות אלה נלמדו ישירות מהם. פרוטוקולים של שיטות אלה נלקחו מהקבוצה של שולמית מנוליס, שגם סיפקה את התבדידים שמשמשים במחקר - Cmm42 ו-Cmm222 - ופרוטוקולים לביצוע PCR לזיהוי החיידקים. את שיטת אילוח זרעים פיתחנו במעבדתנו.

לאחר כיוול של שיטות האילוח, נעשו מספר ניסויים על מנת לפתח פרוטוקולים של צילומים תרמיים וניתוחם. למעשה, עיקר הניסויים שבוצעו עד כה במסגרת המיזם הוקדשו למטרה זו. כמובן שניסויים אלה הולידו מספר תובנות לגבי שאלת המחקר - השפעת Cmm על טמפ' העלה של עגבנייה - ולגבי שיפור הניסויים להמשך התוכנית. נבדקו מספר דרכים לביצוע הצילומים כך שתתאפשר רזולוציה מקסימאלית תוך כדי ביצוע של צילומים בקצב סביר. חשוב לציין שהמצלמה התרמית שימשה תוכניות מחקר אחרות והמועד האופטימלי לביצוע הצילומים הוא בין השעות 14:00-11:30. מגבלות אלה מגדילות את הצורך באופטימיזציה של פרוטוקול הצילום. היות ועבדנו במקביל עם שלושת שיטות האילוח, על מנת לאפשר מספר חזרות סביר לניסויים, בהמשך המחקר בחרנו לעבוד בעיקר עם זן אחד, 1125.

להלן תאור של הניסויים העיקריים שבוצעו עד כה. היות ולהמשך המחקר, שיטות האילוח הרלוונטיות הן בעיקר אילוח זרעים ובמידה מעטה יותר, אילוח שורשים, אין פירוט על שני הניסויים שבוצעו בתחילת המחקר במתכונת של אילוח ע"י גזירת עלים.

3.2 ניסוי מס' 1. השוואה בין שיטות שונות לאילוח זרעים

במהלך המחקר בשנה הראשונה הלכה והתהוותה ההשערה לפיה הסיכויים ליישום הנושא של חישה תרמית לגילוי Cmm רלוונטיים בעיקר לשלב המשתלה. לכן החלק העיקרי של המחקר הופנה לכיוון של נגיעות בשלב מוקדם. במילים אחרות, השאלה היא האם ניתן להיעזר בחישה תרמית כדי לגלות שתילים נגועים ב-Cmm לפני שהם "עוזבים" את המשתלה. הנחת העבודה היא שתילים נגועים מקורם בזרעים שהיו נגועים בחיידק או שאולחו בשלבים המוקדמים במשתלה. לכן היינו צריכים לפתח שיטה לאילוח מלאכותי של זרעי עגבנייה ב-Cmm. הניסוי המתואר מטה נעשה לאחר ניסיונות פרלימינאריים בהם שילבנו ריכוזים שונים של חיידק, ומשכים שונים של הדגרת זרעים בתרחיף האילוח.

מטרות הניסוי. מטרת הניסוי הייתה להשוות בין אילוח זרעים באמצעות טבילה בתרחיף החיידק עם או בלי הפעלה של וואקום. נבדקו ריכוזי חיידקים שנספחים לזרעים וחיוניות הזרעים. היות וניסוי ספציפי זה בוצע על זרעים מטופלים (עם חומרים מחטאים), גם השווינו בין זרעים שעברו שטיפה לפני האילוח לבין כאלה שלא עברו שטיפה.

תיאור הניסוי. הזרעים אולחו בחיידקי Cmm222 בריכוז 10^8 cfu/ml. הטיפולים היו: (1) זרעים לא שטופים בואקום; (2) זרעים שטופים בואקום; (3) זרעים לא שטופים בטבילה; ו- (4) זרעים שטופים בטבילה. כל טיפול בוצע ב-4 חזרות עם 12 זרעים כ"א. ניסוי זה בוצע על זרעים משני הזנים 1125 ו-1335. הטיפול בואקום נעשה במשך 30 דקות עם עצירה של 5 דקות לסירוגין (ספירת הזמן החלה מרגע שיש הגעה ל-200 mbar). טיפול הטבילה נמשך 4 שעות.

לאחר האילוח הוספנו את הזרעים והשארנו אותם לייבוש במשך לילה בטמפ' חדר. למחרת הפרדנו מכל חזרה זרעים והזרעים הנותרים, כתשנו במכתש ועלי לאחר תוספת של 1 מ"ל מים מזוקקים. המיצוי הועבר למבחנת אפנדורף, ולאחר ביצוע מיהולים עשרוניים, דגימות מהמיהולים נזרעו במצע מוצק לספירת חיידקים.

תוצאות עיקריות ומסקנות. בשני הזנים, מספרי CFU לזרע הגבוהים ביותר התקבלו בטיפול שטיפת זרעים וטבילה בתרחיף ללא הפעלת וואקום (המספרים נעו בין 10^2 ל- 10^3 חיידקים לזרע), אם כי ההבדלים בין הטיפולים השונים לא היו מובהקים בגלל שונות גבוהה בין החזרות.

לא היו הבדלים משמעותיים בין הטיפולים השונים (כולל ביקורות בלי חיידקים) בשיעור הנביטה של הזרעים. אבל הייתה מגמה לפיה שעורי הנביטה גבוהים יותר התקבלו בטיפולים בהם לא הופעל ואקום. חשוב לציין שבניסוי ספציפי זה לא נראו תסמיני מחלה על הצמחים שהתפתחו מצמחים מאולחים בכל הטיפולים (בניסוי זה המעקב נמשך חודשיים לאחר הזריעה).

לצרכי אילוח נראה שטבילה בתרחיף חיידקים ללא הפעלת ואקום עדיפה על הפעלת ואקום, זאת למרות שבניסוי ספציפי זה לא נראו תסמיני מחלה באף טיפול. יתכן שאם היינו שומרים על הצמחים תקופה ארוכה יותר היו מתפתחים תסמינים (למרות שבחלק מניסויי אילוח זרעים, תסמיני המחלה נראו באופן ברור אחרי כחודש וחצי ואף מוקדם יותר; למשל ראו מטה ניסוי מס' 3). בסופו של דבר, להמשך הניסויים בחרנו בטיפול בו הזרעים מודגרים למשך 4 ש' בתרחיף עם 10^8 CFU/ml של החיידק, בטמפ' חדר ובלי שימוש בואקום. טיפול זה הניב תוצאות סבירות מבחינת אחוזי נביטה וקבלת צמחים נגועים בחיידק, אם כי ההבדלים בין הטיפולים השונים לא היו גדולים. חשוב לציין שבמסגרת הדיון שהתקיים ב-1.3.2010 בוועדה מקצועית, הוצע לנסות טבילה במשך 2 ש' בלבד עם אוורור, על מנת לשפר את אחוזי הנביטה של הזרעים (נקודה חשובה מאד היות ובהמשך אנו מתכננים לעבור לביצוע של ניסויים במתכונת של מגשי שתילים וחשוב מאד לשפר את אחוזי הנביטה לאחר טיפול האילוח; ראו בפרק הדיון).

3.3. ניסוי מס' 2. אילוח שורשי עגבנייה מזנים 1335 ו-1125 ב-Cmm

מטרת הניסוי. הכרת שיטת אילוח שורשים ומעקב אחר הופעת תסמינים.

תיאור הניסוי. שורשים של שתילים בני כ-4 שבועות אולחו בתרחיפי חיידקי Cmm בריכוז 10^8 CFU/ml ($OD_{600} \sim 0.1$) במים סטריליים. בניסוי זה השתמשנו בתבדידים Cmm222 ו-Cmm42 (בנפרד). השתילים הוצאו ממגשי החישתיל והושרו בתרחיפי האילוח למשך שעתיים, ולאחר מכן נשתלו בעציצים שהכילו מצע כבול:ורמיקוליט:חול ביחס 1:1:1. שתילי ביקורת הושרו למשך שעתיים במים סטריליים ולאחר מכן נשתלו בעציצים המכילים אותו מצע. כל שילוב (זן עגבנייה – תבדיד Cmm) נבחן ב-8 חזרות, וצמחי הביקורות כללו 4 חזרות לכל זן. הצמחים נשמרו במהלך הניסוי בחממה בטמפ' 25-28 מ"צ והושקו לפי הצורך.

תוצאות עיקריות ומסקנות. תסמיני נבילה אופייניים למחלה החלו להופיע בצמחים משני הזנים מאולחים בתבדיד Cmm222, 12 ימים לאחר האילוח. לאחר 20 יום מהאילוח, תסמיני המחלה נראו בכל צמחי 1125 וב-7 מתוך 8 צמחי 1335. תסמיני מחלה לא נצפו בצמחי הביקורת ובצמחים משני הזנים שאולחו בתבדיד Cmm42 עד לסיום הניסוי (25 יום לאחר אילוח). באיור 1 ניתן לראות צמחי 1125, 14 יום (איור 1א) ו-20 יום (איור 1ב) לאחר האילוח בתבדיד Cmm222 והשוואה לצמחי הביקורת. תמונות דומות התקבלו עם צמחים מהזן 1335.

התבדיד Cmm42 לא היה אינפקטיבי. כתוצאה מכך, ביקשנו דגימה חדשה של תבדיד זה מהמעבדה של שולה מנוליס.

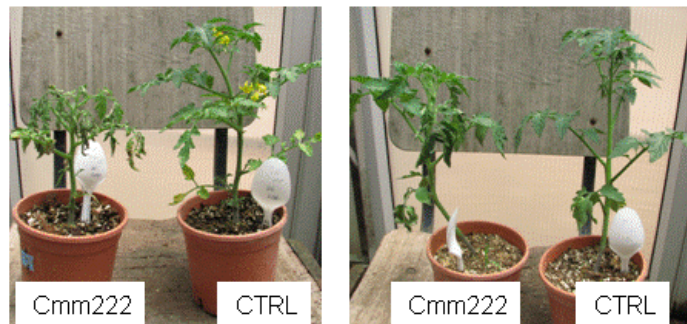
3.4. ניסוי מס' 3. אילוח זרעי עגבנייה 1335 ו-1125 בחיידקי Cmm

מטרת הניסוי. בדיקת שיטת האילוח ומעקב אחר התפתחות תסמינים במקביל לצילומים במצלמה תרמית לצורך מעקב אחר שינויים תרמיים בצמח (שימוש ראשון במצלמה התרמית ובתוכנת הניתוח).

תיאור הניסוי. אילוח זרעים בתרחיפי חיידק Cmm בריכוז 10^8 CFU/ml במים סטריליים. בניסוי זה השתמשנו בתבדידים Cmm222 ו-Cmm42 (בנפרד). הזרעים הושרו בתרחיפי האילוח למשך 4 שעות (על פי הטיפול שנבחר מהניסוי מס' 1) ולאחר מכן נשתלו בעציצים שהכילו מצע כבול:ורמיקוליט:חול ביחס 1:1:1. שתילי ביקורת הושרו למשך 4 שעות במים סטריליים ולאחר מכן נשתלו בעציצים המכילים אותו מצע. כל שילוב (זן עגבנייה – תבדיד Cmm) נבחן ב-10 חזרות, וצמחי הביקורות כללו 8 חזרות לכל זן. הצמחים נשמרו במהלך הניסוי בחממה בטמפ' 25-28 מ"צ והושקו לפי הצורך.

תוצאות עיקריות ומסקנות. בצמחים שאולחו בתבדיד Cmm42 לא נראו סימפטומים כלל (ניסוי זה נערך במקביל לניסוי מס' 2 עם אותו מקור- לא אינפקטיבי של Cmm42). בצמחים מאולחים עם Cmm222, תסמיני המחלה החלו להופיע בצמחים בודדים לאחר 3-4 שבועות. שישה שבועות לאחר האילוח, בזן 1335

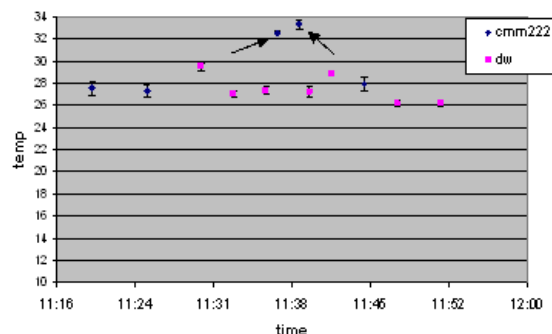
נראו תסמינים ב- 4 צמחים (מתוך 10), ובאותו מועד, בזן 1125, 8 צמחים (מתוך 10) מאולחים ב- Cmm222 הראו תסמיני מחלה.



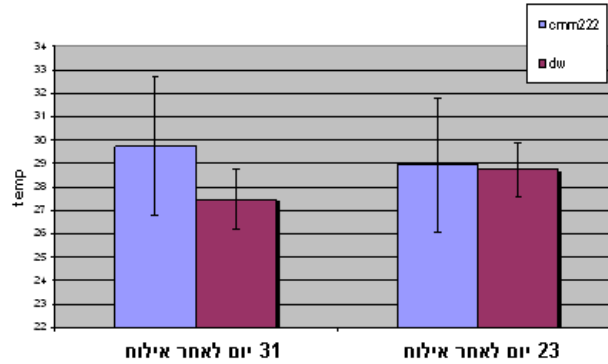
איור 1. צמחי 1125 מאולחים ב- Cmm222 לעומת צמחי הביקורת (CTRL), 14 (א) ו- 20 (ב) יום לאחר אילוח שורשים בריכוז 10^8 CFU/ml.

בניסוי זה, נוסו לראשונה שיטות שונות של ביצוע וניתוח הצילומים התרמיים. הצילומים בוצעו עם מצלמה תרמית מסוג FLIR 2000SC, וכן מצלמה רגילה. המצב האופטימלי היה הצבת המצלמות במרחק של כ- 1.6 מ' מנוף הצמחים. התוכנה שנבחרה לניתוח הצילום היא ThermaCam Researcher, והתמונות נותחו תוך ביצוע סימון המתאר את שטח העלים, הפקת הטמפרטורה של האזור המסומן, יצירת בסיס נתונים וניתוח סטטיסטי.

לפי ניתוח הצילומים התרמיים, לא ניתן היה להבחין בשינוי מגמתי בטמפרטורת העלווה כפונקציה של שעת הצילום (איור 2; מגמה זו חזרה בכל הצילומים בניסוי זה ובניסויים אחרים). בניסוי זה, כמו בתצפיות נוספות על טמפ' עלים לאחר אילוח זרעים, התקבלה מגמה לפיה צמחים נגועים ב- Cmm הראו טמפ' עלווה גבוהה יותר מצמחי הביקורת, אבל בד"כ ההבדלים לא היו מובהקים (איור 3). צמחים שהראו תסמיני מחלה הראו טמפ' עלווה גבוהה מצמחים נגועים שעוד לא הראו תסמיני מחלה ומצמחי הביקורת והדבר בא לידי ביטוי 31 יום לאחר האילוח (איורים 2 ו- 3). לאחר ניסוי זה, בוצע ניסוי במתכונת של אילוח שורשים (בדומה למתואר בניסוי מס' 2 מעלה, עם זן 1125, אך עם תערובת של תבדידים Cmm222 ו- Cmm42). באותו ניסוי התקבלה מגמה דומה מבחינת הבדלים בטמפרטורת העלווה בין צמחים מאולחים סימפטומטיים, אסימפטומטיים וצמחי ביקורת, כלומר, צמחים מאולחים החלו להראות טמפ' גבוהה מצמחי הביקורת יחד עם הופעת תסמיני המחלה.



איור 2. טמפרטורת עלים כפונקציה של זמן צילום. ממוצעי טמפרטורת עלים של צמחים מזן 1125, 31 יום לאחר אילוח זרעים (כחול, Cmm222; ורוד, ביקורת). כל נקודה בגרף מייצגת צמח שונה. החיצים מצביעים על צמחים מאולחים שכבר הראו תסמיני מחלה.



איור 3. ממוצעי טמפרטורת עלים של צמחים מזן 1125, 23 ו-31 יום לאחר אילוח זרעים. העמודות מייצגות טמפרטורה ממוצעת של כלל הצמחים מכל טיפול. טיפול האילוח כולל צמחים עם וללא תסמינים.

3.5. ניסוי מס' 4. אילוח זרעים בפרקי זמן שונים

מטרת הניסוי. המטרה הייתה לבצע ניסוי במתכונת של אילוח זרעים דומה לניסוי שתואר מעלה (ניסוי 3) אבל בהיקף גדול יותר, עם מספר רב של חזרות ומועדי צילומים. לצורך כך, קבוצות זרעים אולחו ונזרעו בזמנים שונים (בהפרש של שבוע) ובוצעו צילומים תרמיים בשלבים מוקדמים. היתרון במתכונת זו היא שיש מספר רב של סדרות של צמחים מצולמים שאולחו באותו פרק זמן (איור 4). בניסוי זה, המצלמה התרמית הייתה גם זמינה לתקופה ארוכה מה שאפשר ביצוע של מספר צילומים במהלך כל שבוע.

תיאור הניסוי. בניסוי זה שימש הזן 1402 (זן החורף המומלץ במיזם). כאמור קבוצות זרעים אולחו בהפרש של שבוע, במשך 4 שבועות (4 מועדי אילוח/זריעה) בתרחיף חיידקים בריכוז 10^8 CFU/ml במים סטריליים. בניסוי זה השתמשנו בתבדידים Cmm222 ו-Cmm42 (בתערובת 1:1). הזרעים הושרו בתרחיפי האילוח למשך 4 שעות ולאחר מכן נשתלו בעציצים שהפעם הכילו מצע המקובל לייצור שתילי עגבנייה (60% טוף, 40% קוקוס מקור: שחם גבעת עדה). זרעי הביקורת הושרו למשך 4 שעות במים סטריליים ולאחר מכן נשתלו בעציצים המכילים אותו מצע. בכל מועד אולחו ונזרעו 15 זרעים מכל טיפול (אילוח וביקורת). הצמחים נשמרו במהלך הניסוי בחממה בטמפי' 25-28 מ"צ והושקו לפי הצורך.

תוצאות. הניסוי הסתיים לפני מס' שבועות. הוא הצליח מבחינת הופעת תסמיני מחלה במרבית הצמחים המאולחים, אם כי ההתרשמות הייתה שבזן זה, התסמינים פחות חמורים מאשר בזני 1125 ו-1335 (לפחות על פי ניסוי זה). בימים אלה אנו מנתחים את התוצאות של הצילומים התרמיים.



איור 4. ניסוי אילוח זרעים בפרקי זמן שונים (פעם בשבוע) עם זן 1402. צילום חלקי של צמחי הניסוי (צמחים שנזרעו במועדים שונים). כל הצמחים צולמו ע"י המצלמה התרמית בפרקי זמן שונים. התוצאות בשלבי ניתוח בימים אלה.

4. דיון

במסגרת התקופה הראשונה של המחקר (מאי 2009 – פברואר 2010), הצבנו לעצמנו את המטרות הבאות: (א) הכרה ו/או פיתוח של שיטות עבודה עם החיידק, לרבות שיטות אילוח רלוונטיות למחקר שלנו במסגרת המיזם; (ב) כיול של פרוטוקול צילומים תרמיים וניתוחם; ו- (ג) ביצוע ניסויים ראשוניים על מנת ללמוד על השפעת Cmm על טמפרטורת העלווה של צמחי עגבנייה.

לגבי המטרה הראשונה, הצלחנו לכייל ו/או לפתח את שיטות העבודה במעבדתנו. שיטת אילוח שורשים נלמדה ממעבדתה של שולה מנוליס ויושמה בהצלחה אצלנו. הדבר נכון גם לשיטת אילוח באמצעות גזירת עלים, למרות שכאמור, בשלב הנוכחי שיטה זו אינה רלוונטית להמשך המחקר שלנו שכן הוא יתמקד בבחינת הפוטנציאל של שימוש בחישה תרמית לגילוי נגיעות ב-Cmm בשלב מוקדם (משללה). לצורך כך, השיטה הרלוונטית ביותר הינה שיטת אילוח זרעים אותה פיתחנו אצלנו תוך בדיקה של פרמטרים שונים. למרות שברוב הניסויים התקבלו אחוזי נביטה גבוהים, עדין יש מקום לשפר את השיטה מבחינה זו, בעיקר לניסויי ההמשך שיערכו במתכונת של מגשי שתילים (ראו בהמשך). כאמור, אנו מקבלים את ההמלצות שהושמעו במסגרת הדיון של הועדה המקצועית ב-1.3.2010 ונבחן את האפשרות להפחית את משך אילוח הזרעים מ-4 ש' לשעתיים, ומתן אוורור בזמן האילוח.

כמו כן, לבחינת שיטת אילוח הזרעים, אנו מתכוונים לבדוק כמה חיידקים נספחים לזרעים. כפי שצינו בפרק התוצאות, בדיקות שנעשו על זרעים מאולחים ב- 10^8 CFU/ml הראו בין 10^2 ל- 10^3 חיידקים לזרע. אולם מדובר בניסוי אחד בלבד והשונויות בו הייתה גבוהה. אנו גם מעוניינים לדעת כמה חיידקים נספחים לזרע בתרחיפי אילוח פחות מרוכזים, ומהו הריכוז המינימאלי שיכול להביא להופעת תסמיני מחלה. שאלה זו רלוונטית לשאלת המחקר שלנו שכן בסופו של דבר, אנו צריכים לגלות מהו סף המינימום גם מבחינת רגישות החישה התרמית לגילוי שתילים נגועים. בימים אלה, העמדנו ניסוי בו אילחנו קבוצות של זרעים (מזן 1125 בריכוזים הולכים ועולים (מ-10 עד 10^9 CFU/ml, באופן עשורני) של תערובת Cmm42-Cmm222 (40 זרעים לריכוז). מחצית מהזרעים נזרעו בעציצים ואנו נעקוב אחר התפתחות תסמינים. המחצית השנייה של הזרעים יישמשו לקביעת כמות חיידקים לזרע לאחר כתישה וזריעה של מיהולים עשורניים.

ביצוע הצילומים התרמיים וניתוחם: ליאת רכשה ניסיון רב בעבודה עם המצלמה ועם התוכנה הדרושה לניתוח הצילומים, דבר שיאפשר בהמשך ביצוע של עבודה ברמה מקצועית גבוהה ובפרק זמן קצר יותר.

אפיון ההשפעה של נגיעות ב-Cmm על טמפרטורת העלווה של עגבנייה: ניסויים שונים בשלושת שיטות האילוח הראו מגמה דומה לפיה לצמחים נגועים ב-Cmm, טמפרטורת עלים גבוהה יותר. יחד עם זאת, מניסויי אילוח זרעים ושורשים התקבלה תמונה לפיה ההבדלים ברורים יותר לאחר שהצמחים מתחילים להראות תסמיני מחלה. מצד אחד זה מעודד כי הדבר מוכיח שיש קשר בין המחלה לטמפרטורת העלווה, מצד שני, ברור שמההיבט היישומי של הצילום התרמי נדרש מצב בו ההבדלים בטמפרטורת העלים בין צמחים נגועים וצמחים נקיים מהחיידק ברורים לפני הופעת תסמיני המחלה. פרמטרים שנצטרך לשפר בניסויים הבאים הם מספר החזרות לכל טיפול וביצוע של צילומים באופן רציף יותר, בסמוך למועד הצפוי להופעת התסמינים. בהקשר זה יש לציין כי יתכן שבניסויים הללו פספסנו מצבים שהיו סמוכים להופעת תסמינים וכבר היה ניתן לראות הבדלים בטמפרטורות מכיוון שלא בוצעו צילומים במועדים אלה. מבחינה זו, העובדה שליאית כבר מנוסה עם העבודה עם המצלמה תאפשר להגדיל את מספר החזרות. יתרה מזאת, שתי מצלמות תרמיות חדשות הינן בתהליך רכישה ע"י הקבוצה של יפית כהן וויקטור אלחנתי, מה שיגדיל באופן משמעותי את הזמינות של המצלמה התרמית לניסויים במסגרת המיזם ויאפשר ביצוע של צילומים במועדים רבים יותר בכל ניסוי. למעשה, השיפורים הנ"ל כבר באו לידי ביטוי בניסוי אילוח זרעים שנמצא בשלבי ניתוח בימים אלה (ניסוי מס' 4 לעיל).

יחד עם זאת, הניסויים שבוצעו עד כה לימדו אותנו שאנו חייבים לשנות את הגישה לגבי יחידת הניסוי. עד כה הגישה הייתה שעלינו להתחיל בלימוד על השפעת Cmm על טמפרטורת העלווה ברמת הצמח הבודד, ורק בהמשך לעבור לאוכלוסיות של צמחים. גישה זו נראתה לנו הגיונית והיא גם הגישה המקובלת להרבה שאלות מחקר (בד"כ רצוי להתחיל בחקר תופעה ביולוגית ב"קטן", ברמת הפרט). כיום אנו מבינים שיש מספר בעיות עם גישה זו. ראשית, אף-על-פי שלא נמצאה מגמה של שינוי בטמפרטורת העלווה של צמחי עגבנייה בין השעות בהן מתבצעים הצילומים, נמצאו תנודות בטמפרטורות ("רעש") שככל הנראה נגרמות בעיקר ע"י שינויים במצב הקרינה החיצונית. תנודות אלה בלטו במיוחד במהלך הניסויים שנערכו בחורף, בימים מעוננים. ברור

ש"רעש" מסוג זה פוגע בלימוד התופעה. בעיה נוספת של גישת "בדיקת הצמח הבודד" היא המגבלה של כמות הצילומים (חזרות) שניתן לבצע שכן כל צמח מצולם בנפרד. גם ניתוח התמונות דורש זמן. לכן, החלטנו שבהמשך המחקר, אנו נעבוד ברמה של מגשי שתילים ויחידת הצילום תהיה המגש, דבר שיבטל את ה"רעש" שתואר לעיל. לצורך כך, אנו נזרע מוקדים בגדלים שונים של זרעים מאולחים, מוקפים ע"י זרעים נקיים מהחידק (ולהפך) ונעקוב אחר הטמפרטורה של השתילים. ניסוי ראשון במתכונת זו הועמד לפני שבוע (איור 5) ובשבוע הבא אנו מתחילים עם הצילומים התרמיים. בנוסף, בעקבות הדיון בוועדה המקצועית והערות של אמנון קורן, הוחלט להוסיף מגשים בהם שתילים מאולחים בחידק ע"י אילוח שורשים. אנו מסכימים שמתכונת זו תאפשר לבחון את ייתכנות הגישה ביעילות רבה יותר בגלל האחידות הרבה יותר בין הצמחים בהשוואה לאילוח זרעים, והעובדה שאילוח שורשים מביא להופעת תסמינים מוקדמים יותר בהשוואה לאילוח זרעים (ובמועד צפוי יותר – כשבועיים לאחר האילוח).



איור 5. ניסוי אילוח זרעים במגשים ב"מוקדים" (זן 1225). כל מגש מכיל אזורים (מוקדים) של נבטים שמקורם בזרעים מאולחים לעומת זרעים נקיים מהחידק. הניסוי הועמד בסוף חודש בפברואר 2010 והצילומים התרמיים יחלו בתחילת חודש מרץ.

לסיכום, עד כה כיילנו/פיתחנו את השיטות הדרושות לעבודה עם החידק/מחלה במעבדתנו והתאמנו את השימוש של המצלמה התרמית והניתוחים לשאלת המחקר. אנו סבורים שהשיפורים שיוכנסו להמשך המחקר יאפשרו לנו לקבוע במהלך השנה השנייה האם בצילום התרמי טמון הפוטנציאל לגילוי נגיעות בקלויבקטר בשתילי עגבנייה, לפני הופעת תסמינים.

עמידות צמחי עגבנייה לתבדידים של החיידק *Clavibacter michiganensis*

יעל רקח

הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות

1. תקציר

לפתוגן (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) בעגבניות מספר קבוצות גנטיות שונות (A, B, C, D, E ו-Z) אך אין מידע אם קיימים הבדלים באלימות בין הקבוצות. מהיבט אחר, אין בארץ זני עגבניות מסחריים העמידים לחיידק ואין כרגע טיפול יעיל כנגדה. בבדיקה ראשונית בפקולטה לחקלאות נמצאו בשנים האחרונות מספר מקורות עמידות למחלה. מטרת לשנת המחקר האחרונה היו: 1. למצוא אם קיימים הבדלים באלימות של תבדידים מקבוצות שונות שנמצאו בארץ; 2. לבחון את הקווים העמידים שנמצאו בפקולטה לחקלאות ולהעריך את מידת התאמתם לשמש כמקורות עמידות לטיפול זנים עמידים בעתיד; 3. לבחון את יכולתם של התבדידים לגבור על גנים לעמידות בקווים שנמצאו עמידים. במחקר זה בוצו ניסויים בחממות בתנאים מבוקרים בפקולטה לחקלאות. מתוך המבחנים הרבים שנערכו, נראה כי יש בידינו 2 קווים בעלי עמידות טובה כנגד החיידק ועוד קו בעל עמידות בינונית, שניתן יהיה להשתמש בהם כמקורות עמידות לטיפול זנים עמידים בעתיד. בניסויים שערכנו נמצא כי יש הבדלים באלימות תבדידים. קיימים תבדידים בעלי אלימות גבוהה ואחרים שגרמו לסימפטומים חלשים ולשכיחות מחלה נמוכה. לעומת זאת, לא נמצאו הבדלים מובהקים באלימות בים תבדידים מהקבוצות הגנטיות השונות ובכל קבוצה היו תבדידים בעלי אלימות גבוהה ותבדידים בעלי אלימות נמוכה כלפי הזנים שנבחנו.

2. מבוא

הפתוגן (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) הכיב הבקטריאלי (bacterial canker) בעגבניות. המחלה סיסטמית, גורמת לנבילה, התנוונות כללית ותמותת הצמחים בכל שלבי הגידול ונחשבת לאחת המחלות החשובות והמגבילות בגידול העגבנייה. עד לפני כשנתיים נמצאו בארץ מגוון רחב של תבדידים מאיזורים שונים אולם בבדיקות אפיון גנטיות שנערכו במעבדתה של ד"ר שולה מנוליס ממכון וולקני התברר כי כולם שייכים לשתי קבוצות גנטיות שונות (קבוצה A וקבוצה B). בשנתיים האחרונות התגלו ע"י ד"ר מנוליס תבדידים רבים מארבע קבוצות גנטיות נוספות (E, D, C ו-Z), אולם לא קיים בידינו ידע על הבדלים באלימות בין תבדידים של החיידק או בין הקבוצות השונות שקיימות כיום בארץ. כמו כן אין דיווחים בעולם על קיומם של גזעים שונים של החיידק גורם המחלה. מהיבט אחר, אין בארץ זני עגבניות מסחריים העמידים לחיידק ואין כרגע טיפול יעיל כנגדה. בבדיקה ראשונית בפקולטה לחקלאות נמצאו בשנים האחרונות מספר מקורות עמידות למחלה. בניסויים שנעשו בשנים האחרונות בהם הורכבו זנים רגישים על מקורות עמידות אלה ואחרים נמצא כי שיטת ההרכבה לא נתנה מענה לבעיה הכללית שנוצרת ע"י מחלה זו. על כן, הפתרון של שימוש בזנים עמידים הוא בעל חשיבות רבה, אולם מאחר וחסרה התייחסות בספרות המקצועית לאלימות של תבדידים ממקורות שונים או לגבי קיום גזעים שונים של הפתוגן, מתבקש הצורך לבחון היבטים של אלימות תבדידים בנפרד ובמשולב עם התייחסות למקורות העמידות.

המטרות ארוכות הטווח של העבודה הן לבחון מספר היבטים הנוגעים לאלימות תבדידים שונים מהארץ (מכל הקבוצות, A, B, C, D, E ו-Z) וכן לבחון אם קיימים הבדלים ביכולתם לגבור על עמידותם של קווים ממקורות עמידות שונים. במידה וקיימים הבדלים כאלה לבחון האם ניתן להגדיר תבדידים כאלה כגזעים שונים של החיידק. הנחת העבודה, מבוססת על תוצאות של ניסויים הקדמיים, שהראו כי התבדידים נבדלים ביניהם במספר פרמטרים של אלימות.

המטרות לשנת המחקר האחרונה היו:

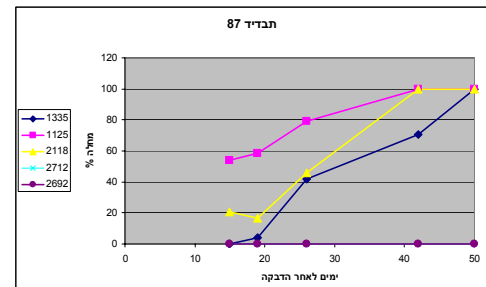
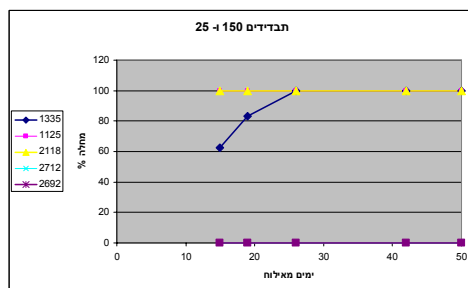
1. למצוא אם קיימים הבדלים באלימות של תבדידים מקבוצות שונות שנמצאו בארץ.
2. לבחון את הקווים העמידים שנמצאו בפקולטה לחקלאות ולהעריך את מידת התאמתם לשמש כמקורות עמידות לטיפול זנים עמידים בעתיד.

3. לבחון את יכולתם של התבדידים לגבור על גנים לעמידות בקווים שנמצאו עמידים.

3. עיקרי הניסויים והתוצאות

בשלב הראשון, חמישה תבדידים מקבוצות A ו-B שבודדו מאזורים שונים בארץ ע"י ד"ר שולה מנוליס, שימשו להדבקת קווי עגבניות ממקורות עמידות שונים שנמצאו בצוות טיפוח עגבניות בפקולטה לחקלאות ברחובות. בשלושה ניסויים בתנאים מבוקרים בחממות הודבקו שלושה קווי בקורת רגישים וארבעה קווים שהראו דרגות שונות של עמידות בניסויים קודמים.

התברר כי קיימת שונות בעצמת המחלה ובסימפטומים גם בין הבקורות הרגישות (איור 1). זן השרי 1335 (שיר) רגיש פחות מזן 1125 (עגבנייה רגילה) שמשמשים כבקורות רגישות במיזם וכן מזן בקורת נוסף (2118). מתוך ארבעת מקורות העמידות שנבחנו, קו אחד התברר כרגיש וקו נוסף (3313) היה בעל עמידות בינונית, דהיינו סימפטומים באינדקס נמוך (התייבשות עלים בלבד) אולם שעור המחלה בתום הניסויים הגיע ל-100%. בשלב זה הוחלט להפסיק את המשך בחינת שני הקווים האלה על מנת לאפשר נפח עבודה גדול יותר בתחומי עניין אחרים. כמו כן התברר כי אכן קיימים הבדלים באלימות (וירולנטיות) בין התבדידים (איור 1). שני קווים (2692 ו-2712) הראו עמידות מוחלטת בתנאי החממה לכל התבדידים ואיתם אנו ממשיכים בניסויים (תמונה 1).

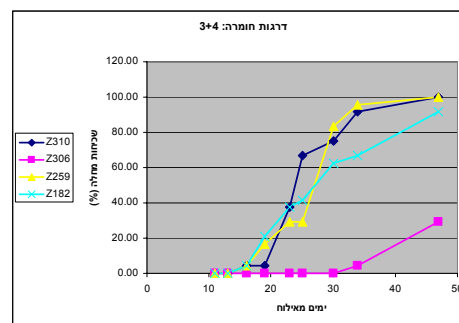
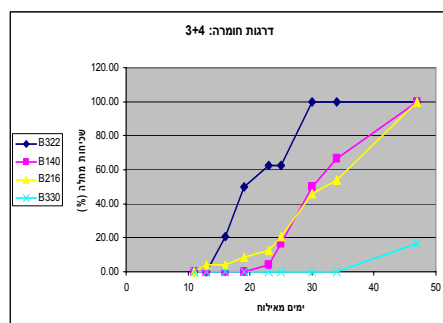


איור 1: הבדלים בין תבדידים אלימים (גרף שמאלי) לבין תבדיד אלים פחות (גרף ימני). ניתן גם להבחין בהבדלי התגובה לפתוגן בין שלושת קוי הבקורת (1125, 1335, 2118).

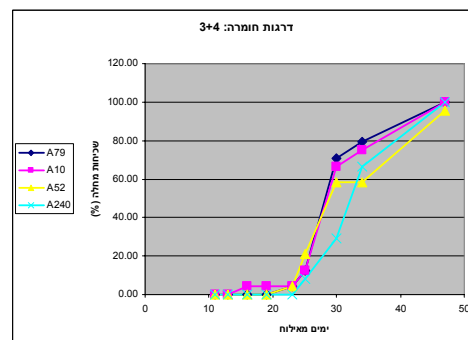
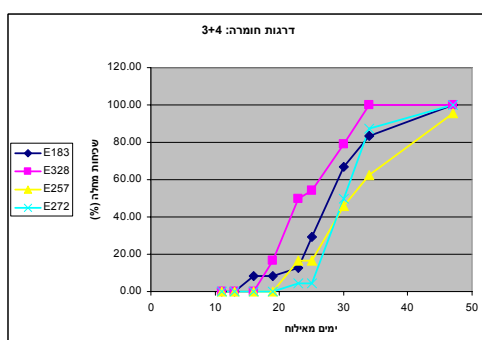


תמונה 1: זן בקורת רגיש מימין, והקווים 2692 ו-2712 משמאל בהתאמה.

לאחרונה נמצאו בארץ ע"י ד"ר שולמית מנוליס קבוצות גנטיות נוספות של החיידק ולא היה ברור מה מידת האלימות שלהם. על כן נערכו מספר ניסויים נוספים. הקו 1125, שהוא קו הביקורת הרגיש ביותר הודבק ב-22 תבדידים מקבוצות A, B, C, D, E ו-Z. מטרת הניסוי הייתה לבחון האם קיימים הבדלים באלימות תבדידים בתוך הקבוצות ובין הקבוצות. בניסוי זה נעשה שימוש באינדקס חומרת מחלה כפי שהוחלט לאור תוצאות קודמות. הניסוי הראה כי קיימים הבדלים באלימות התבדידים בתוך הקבוצות השונות (איור 2) אולם אין הבדלים ספציפיים באלימות בין הקבוצות השונות (איור 3). למשל באיור 2 התבדידים Z306 ו-B330 הם אלימים פחות ושכיחות המחלה בסוף הניסוי (47 ימים לאחר הדבקה הייתה 30%-18% בהתאמה).



איור 2: הבדלים בין תבדידים בקבוצת Z (מימין) ובין תבדידים בקבוצת B (משמאל)



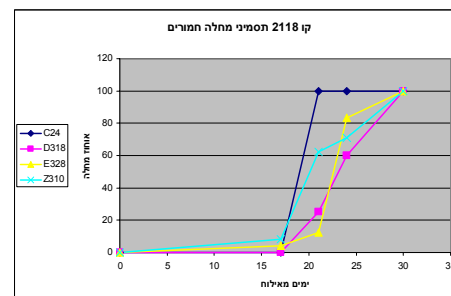
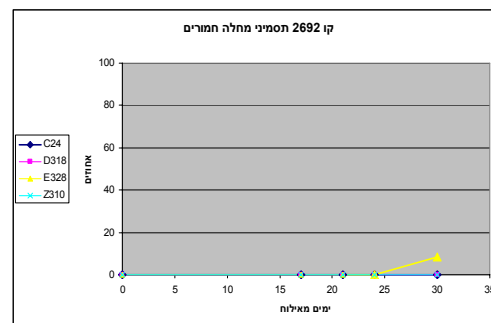
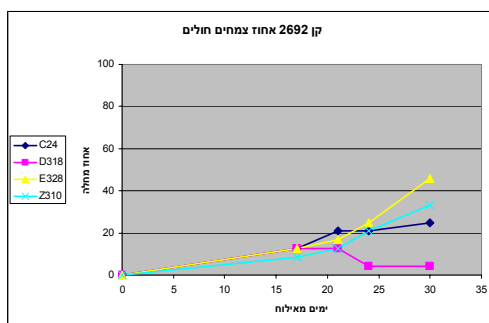
איור 3: הבדלים בין תבדידים מקבוצת A (מימין) ובין תבדידים מקבוצת E (משמאל)

בהמשך, מאחר והקווים העמידים נבחנו בשלב ראשון רק עם תבדידים מקבוצות A ו-B, לא היה ברור אם עמידותם לא תשבר בהדבקה עם חיידקים מהקבוצות הגנטיות החדשות של החיידק, דהיינו קבוצות E, D, C ו-Z. בניסוי נוסף הודבקו 3 קווי הבקורת הרגישים ושני הקווים העמידים (2692 ו-2712) בתבדידים האלימים ביותר שנמצאו בניסוי הקודם מכל אחת מהקבוצות E, D, C ו-Z. נמצא כי בהדבקה בתבדידים מהקבוצות הנ"ל עמידות הקווים היתה חלשה יותר מאשר בתבדידים מקבוצות A ו-B, כלומר אלה תבדידים יותר אלימים. סימפטומים קלים של התייבשות עלעלים הופיעו בעד כ- 45% מהצמחים בקו 2692 ועד כ- 25% בקו 2712, אולם צמחים אלה לא הראו סימני מחלה מתקדמים ולא הגיעו לנבילה מוחלטת, כל זאת 30 יום לאחר אילוח (איור 4). בכ – 7% מהצמחים הופיעו סימני מחלה חמורים בתבדיל E328. קווי הבקורת הרגישה בניסוי זה הגיעו לנבילה מוחלטת כבר 17 יום לאחר ההדבקה. יש לחזור על ניסוי זה פעם נוספת.

4. דיון ומסקנות

מתוך המבחנים הרבים שנערכו, נראה כי יש בידינו 2 קווים בעלי עמידות טובה כנגד החיידק ועוד קו בעל עמידות בינונית, שניתן יהיה להשתמש בהם כמקורות עמידות לטיפול זנים עמידים בעתיד.

האוסף הגדול של התבדידים, שאובחן גנטית ע"י ד"ר שולמית מנוליס, ושעומד לרשות המשתתפים במיזם, איפשר ניתוח היבטים רבים שקשורים לאלימות התבדידים. התברר בניסויים שערכנו כי יש הבדלים באלימות תבדידים. תבדידים אלימים מאוד הם למשל: C24, A10, D318, E328, Z310 ו-B322 וכאלה ש גורמים לסימפטומים חלשים ולשכיחות מחלה נמוכה כמו: Z306 ו-B330. יש לקחת ממצאים אלה בחשבון כאשר באים לבחון עמידות פוטנציאלית של מקורות עמידות, לבל תוסקנה מסקנות שגויות שעלולות להיות בעלות השלכות כלכליות קשות. יש גם להביא בחשבון כי הניסויים הם למעשה סימולציה של המצב בשטחי הגידול ונערכים בתנאים מחמירים ומעודדי מחלה, דהיינו, בתנאי טמפרטורה מבוקרים, רמת מדבק גבוהה וצמחים בגיל צעיר מאוד (3-4 עלים אמיתיים בזמן הדבקה). כל אלה משפיעים על תוצאות הניסויים ועל כן כל ניסוי צריך להיערך לפחות פעמיים. בשלב הבא יש לבחון את התוצאות שהתקבלו בתנאי שדה וכן בגידול ארוך טווח בתנאים מבוקרים.



איור 4: אחוז צמחים מהקו העמיד 2692 עם תסמיני מחלה חמורים (למעלה, מימין) ואחוז צמחים חולים (למעלה, משמאל) לעומת קו הביקורת הרגיש 2118 (למטה)

מניסיון שנצבר בפקולטה לחקלאות העלתה האפשרות כי ייתכן ולהורשת תכונת העמידות יש פוטנציאל להיות בעלת אפקט דומיננטי (לא ברור עדיין אם מעורב בו גן דומיננטי יחיד או מספר גנים). לאחרונה הועמד ניסוי נוסף לבחינת הסוגיה האם מכלואים בין מקורות העמידות לקווים רגישים ישמרו על תכונת העמידות (דהיינו שהתכונה עוברת בתורשה דומיננטית, גם אם חלקית) וכן נבדקה הסוגיה האם לרקע הגנטי של ההורה הרגיש השפעה על עמידות המכלוא. ניסוי זה עדיין לא הסתיים. כמו כן מניסויים הקדמיים שנערכו בעבר יש לבדוק את האפשרות שקיימת אינטראקציה בין תבדילים, ולהדביק צמחי עגבנייה בתערובת של תבדילים ולבחון במיוחד את תגובת הקווים העמידים.