

איך משתמר מחולל הניקוד הבקטרי מעונה לעונה ?

מאת יואב בשן, יעקב אוקון, יגאל הניס, המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה, הפקולטה לחקלאות

הקרקע, וכן זרעים ועלים של עגבניות ללא סימפטומים של מחלת הניקוד הבקטרי — משמשים מקורות אילוח פוטנציאליים במחולל המחלה. הוא בעל כושר השתמרות תוך-עונתית טוב. בתנאי יובש אוכלוסייתו מדוכאת מאוד, אולם אינה נשמדת; ועם השתפרות התנאים — מתפרצת האוכלוסייה ומחוללת את המחלה.

ללמוד את תנאי ההתקיימות וההשתמרות של חיידק זה בטבע.

שיטות וחמרים

(א) בידוד הפתוגן ממדגמי קרקע מדגמי קרקע במשקל 100 גרם נלקחו באוכי סטרילי לתוך כלים סטריליים, בעזרת שימוש בכוח-ליה בעזרת. הדגימות נעשו באפריל 1976, משדה עגבניות נגוע, ובמרס 1977 — מאותו שדה, שבאותו זמן גדלו עליו דגנים. בידוד הפתוגן במעבדה נעשה

מבוא

ככלל, חיידקים המחוללים מחלות בצמחים, מהיו-תם חסרי צורות-קיימא עמידות — אינם עשויים להשתמר זמן רב בטבע, מחוץ לרקמה צמחית כלשהי. האפשרויות העיקריות להשתמרות ממושכת הן: בקרי-קע, בשיירי צמחים, בזרעים, בצמחים הנראים ברי-אים, וכן בצמחים לא פוגדקאים. המידע בספרות על אודות השתמרותו של החידק פסאודומונאס טומי-סו, מחולל מחלת הניקוד הבקטרי בעגבניה, דל ביותר (1,2,3,5). בעבודה המתוארת בזה ניסינו



נבט חולה בניקוד בקטרי מזרעים ננועים.

לים, ונזרעו על מצע K מוצק בצלחות פטרי. הזרעים הנתורים מכל טיפולי החיסוי נזרעו במצע כבול + ורמיקולייט סטרילי וטופלו כמו בסעיף ג'.

ה) בידוד הפתוגן מצמחים החיים בתנאי יובש ובתא ערפל

30 צמחים בגיל 5 עלים, שגדלו בחממה, הודבקו במחלה. עם הופעת הסימפטומים הוצאו 15 צמחים מתא הערפל וגודלו בתנאי חממה רגילים במשך חדשיים. 15 הצמחים האחרים נשארו בתא- הערפל במשך כל זמן הניסוי. מכל צמח בכל פרק-זמן נדגמו באקראי 3 עלעלים שגדלו לאחר ההדבקה הראשונית. העלעלים הוחזקו דקה אחת בחיפוכלוריד הנתרן, ונשטפו 5 פעמים במים מעוקרים. אחר-כך רוסקו במרסק סטרילי, והתמיסה נמהלה עד 10^{-6} בתמיסה פיסיולוגית מעוקרת. מושבות פלואורס-צנטיות חשודות נבדקו כמו בסעיף א'. להיקש שימשו צמחים לא מודבקים, לשם גילוי מספר הספ-רוסיטים הפלואורסצנטיים בצמח.

עלידי לקיחה 6 מדגמים של 0.5 גרם כל אחד וסולסולם במשך שעה בחוך ארלנמייירם שהכילו 45 מ"ל מים מעוקרים + 0.1% אגר. מכל ארלנמיייר נלקחו 2 מדגמים של 0.5 מ"ל תרחיף, ונזרעו על צלחות פטרי שהכילו מצע King-K חצי סלקטיבי (4), שעליו נותן הפתוגן מושבות בעלות גזון פלואורס-צנטי ירקק בולט. מושבות פלואורסצנטיות נקיות הודבקו בשיטת הריסוס על צמחים, לבדיקת הפתור-גנייה שלהם לעגבניה.

ב) בידוד הפתוגן מזרעי עגבניה

מזרעים מסחריים מהזנים VF-134, Mech-55, east-55, ממשלוח שמתוכו נזרעו חלק בחוות הפ-קולטה לחקלאות ברחובות, בשטח שלא גדלו עליו עגבניות, ונתנו צמחים ננועים - נלקחו מדגמים בני 400 זרעים כל אחד. המדגמים טופלו בצורות הבאות: 1) זרעים שלמים סולסלו במשך 48 שעות בתוך תמיסה פיסיולוגית סטרילית בטמפרטורה של 30 מ"צ. 2) מדגם אחר נטחן לאבקה, וזו הורחפה בתמיסה פיסיולוגית וסולסלה במשך שעה ב-30 מ"צ. בתום פרק-הזמן המתאים, לפי הטיפול, סוננו התרחיפים דרך נייר סינון מעוקר, והתסנין הועבר דרך מסנן מליפור מעוקר (המונע מעבר חיידקים דרכו). המליפור הושם על מצע המכיל מצע K רגיל + פניצילין וציקלוקהסאמיד, והודגרו למשך 24 שעות ב-30 מ"צ. מושבות פלואורסצנטיות חשודות כפי שומסו נבדקו לפתוגניות, כמו בסעיף א'.

ג) קבלת צמחים חולים מזרעים מסחריים ננועים

מאותן שקיות זרעים נלקחו מדגמים של 1000 זרעים כל אחד. המדגמים נזרעו במנבטות צפופות שהכילו כמצע כבול + ורמיקולייט (ביחס 1:1). לאחר הוריעה כוסי פני השטח בוורמיקולייט סטרילי בעובי של 0.5 ס"מ. עם תחילת ההצצה הועברו הצמחים לתא ערפל למשך שבוע. להיקש שימשה שקית זרעים מזן VF-198, שהזרעים שבתוכה לא הראו נגיעות בניסויים במשך יותר משנה.

ד) חיטוי זרעים ובדיקת טיב החיטוי

8 גרמים זרעים מאותן שקיות חוטאו בשרייה ככוהל 70%, תוך הפעלת תתלחץ בבקבוק יניקה ושחרורו הפתאומי לשם החדרת הכוהל לסדקי הזר-עים. אחר-כך הועברו החיפוכלוריד הנתרן 1% למשך דקה אחת ונשטפו 5 פעמים במים מעוקרים. טיפול חיטוי זה משמיד בצורה יעילה גם את החיידקים הנתבאים בסדקי הזרעים. עם תום הטיפול יובשו הזרעים בתנור ב-40 מ"צ למשך 24 שעות. מדגמים בני גרם אחד, מהטיפולים, הושמו לתוך מצע נוזלי, והודגרו ב-30 מ"צ למשך 24 שעות. גרם אחד נוסף נטחן במטחנה, והאבקה טופלה כגיל. כעבור 24 שעות נלקחו מדגמים של 0.1 מ"ל מהמצעים הנזר-

של קליפתם, אך לא בתוכם. אפשר למנוע נגיעות במחלה ממקור זה — עלידי חיטוי כימי פשוט של הזרעים.

הערה: בניסויי-שדה בורעים אלו, שערך אמנון קורן מהמחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה ב" חוות הפקולטה לחקלאות, התברר שחלק מן הנב" טים גדלו חולים באופן טבעי, גם ללא התנאים המלאכותיים של תא הערפל.

ג) הישרדות הפתוגן בצמחים החיים בתנאי יובש וערפל

מכיון שקורה במשך העונה, שהתנאים אינם מאפשרים הריבוי והתרבות וקיום נוחים של החידק (חום פתאומי, חוסר לחות) — נבדק, אם בעקבות הדבקה חד-פעמית בפתוגן הוא יוכל להשתמר בתנאים של יובש או ערפל על-פני העלים. הניסוי נערך לפי „שיטות וחמרים“ סעיף ה', ונמשך חדשיים, כדי שיהיה פרק-זמן מספיק למעקב. התוצאות מסוכמות בטבלה 2.

טבלה 2. מספרי הפתוגן והספרופיטים על העלים, מושבות במ"ג חומר יבש, בתלות בתנאים שבהם גדל הצמח.

זמן ימים	ערפל		יובש	
	פתוגן	ספרופיטים	פתוגן	ספרופיטים
7	376	1	3	0
25	1414	0	2	0
40	180	2	0	1
60	48	0	0	0

מהניסוי נובע:

1. לחידק יש אפשרות להתרבות בצמח — בעקבות הדבקה חד-פעמית בתנאי לחות מתאימים.
2. רמת הפתוגן החי על הצמח בתנאי ערפל — גבוהה לאין שיעור בהשוואה לרמתו בתנאי יובש.
3. עצם נוכחות חידקים פתוגניים, אפילו בכמויות זעומות, מראה שייתכנו התפרצות והתהוות אכלוסיות-צנק, כאשר התנאים מתאימים לכך.

דיון

ידוע, שרוב מיני החידקים הפיטופתוגניים אינם משתמרים בקרקע. והנה, בבדיקות הקדמיות של קרקעות שעליהן גדלים צמחים נגועים בס' סומטו התברר, שאין שום קושי לבודד את הפתוגן הזה מהקרקע. עובדה זו, כשלעצמה, אינה מוכיחה השתמרות, שכן יש תוספת אינוקולום לקרקע באופן מתמיד, משטיפת צמחים נגועים הגדלים באותה קרקע. אולם כאשר נערכה תצפית בשנה שבה כבר לא היו עגבניות בשדה, כלומר כאשר מקור האינוקולום האפשרי היה אך ורק מהשנה הקודמת, בהשתמרות ישירה בקרקע או בשרשי צמחים לא פונדקאים

תוצאות ומסקנות

א) הישרדות הפתוגן בקרקע מעונה לעונה

באפריל 1976 נלקחו מדגמי קרקע משדה נגוע קשות במחלת הניקוד הבקטרי באיזור מבקיעים. כשנה אחריכן נלקחו מאותו שדה, שאז גדלו בו דגנים, מדגמים נוספים. להיקש שימשה קרקע מהיפקולטה לחקלאות, שעליה לא גדלו עגבניות מעולם. בדיקות הפתוגניות נעשו לתבדידים פלואורסצנטיים בלבד. בדיקות אלו מסוכמות בטבלה 1.

טבלה 1. בדיקת תבדידים פלואורסצנטיים מהקרקע, החשודים בס' סומטו.

מקור התבדידים	פלואורסצנטיים	פתוגניים
מבקיעים, אפריל 1976	25	24
מבקיעים, מרס 1977	40	3
רחובות, מרס 1977	2	0

מהתצפיות נובע, כי במשך עונת הגידול היתה כמות הפתוגן בקרקע גדולה ביותר, וכמעט כל תבדיד פלואורסצנטי היה של ס' סומטו. בגידול הדגני שאחר העגבניות — פחתה כמות הפתוגן בקרקע, אך עדיין היה מצוי; משמע, שאילו היה השדה נשתל מחדש בעגבניות — היה נוצר מוקד הדבקה שלו בשדה. בקרקע ההיקש לא אותר הפתוגן, והימושבות הפלואורסצנטיים היו ספרופיטיות בלבד.

ב) נוכחות הפתוגן בזרעים מסחריים

ניסויים אלו נערכו לשם בירור האפשרות של מעבר המחלה לשטחי הגידול המסחרי — עלידי זרעים מסחריים רגילים.

שקיות זרעים מהזנים VF-134¹ ומכאיסט 55 שהראו נגיעות קודמת בשדה, נבדקו לפי „שיטות וחמרים“ סעיפים ב', ג', ד'. הפתוגן נמצא בורעי שני הזנים, בין שלמים ובין סחונים. בזן VF-134¹ נמצאו 95% נבטים נגועים, ובזן מכאיסט 55 היו 10% נבטים נגועים. לאחר החיטוי החיצוני לא נמצא הפתוגן בשני הזנים, ואף לא נמצאו נבטים נגועים. מניסויים אלו נובעות המסקנות הבאות:

1. קיימת אפשרות, שמחולל המחלה מועבר בורעים.
2. החיטוי המסחרי התרמי, שנעשה בורעים, אינו משמיד את מחולל המחלה.
3. משלוח הזרעים שהראה נגיעות בבדיקה מעבדית — פיתח צמחים מודבקים טבעית בתנאי ערפל.
4. גם אם יש שקית זרעים מאולחת במידה פחותה מהשקיות שנבדקו, הרי שבתנאים של מנב"ס צפופה מסוגל צמח חולה אחד להדביק במרוצת הזמן את שאר הצמחים.
5. הדרך שבה מגיע הפתוגן לזרעים — עדיין אינה ידועה.
6. הפתוגן נמצא בורעים נגועים — בתוך הסדקים

יותר. בתנאי יובש, לעומת זה, יש הפחתה ניכרת באוכלוסיית הפתוגן.

מעבודה זו, וכן מעבודה מקליפורניה (7), אפשר להסיק כי פ' סומטו הוא בעל כושר השתמרות תוך-עונתית טוב, והוא נמנה עם חושבי העלים הקבועים. בתנאי יובש אוכלוסייתו אמנם מדוכאת מאוד — אך אינה נשמדת, ועם השתפרות התנאים — היא מתפרצת ומחוללת את המחלה.

הוכח אפוא כי קרקע, זרעים ואף עלים ללא סימפסומים — משמשים מקורות אילות פוטנציאליים של עגבניות במחולל מחלת הניקוד הבקטרי.

ה בע ת ת ו ד ה

המתברים מודים לאמנון קורן מהמחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה, שסיפק את הזרעים לניסויים. מחקר זה נתמך חלקית על-ידי מענק מס' 823/026 של הקרן למינהל המחקר החקלאי, משרד החקלאות.

ס פ ר ו ת

1. וולקני צ. (1976): מחלות בקטריאליות של צמחים. האנציקלופדיה לחקלאות ג': 685—692. הוצאת האנציקלופדיה לחקלאות. ת"א.

2. וולקני צ., זוסרא ד., כהן ר. (1971): מחלת כתמי הנקודות הבקטרית בעגבניה. השדה ג"א: 751—753.

3. Goto, M. (1972). Proceeding of the third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Wageningen: 39—53.

4. King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954). J. Lab. Clin. Med. 44: 301—307.

5. Leben, C. (1974). Ohio Agri. Res. Develop. Cen. Special circular 100. 21 pp.

6. Schneider, R.W., Grogan, R.G. (1977). Phytopatol. 67: 388—394.

7. Schneider, R.W., Grogan, R.G. (1977). Phytopatol. 67: 898—902.

— שוב נמצא הפתוגן בקרקע. גם בקליפורניה נמצא הפתוגן בקרקעות שונות בשנה שאחר גידול העגבניות (6). לעובדה זו ערך מעשי רב ביותר, שכן במקומות שונים בארץ מגדלים עגבניות שנה אחר שנה באותם שטחים.

הועלתה סברה (2), שתיכנן השתמרות פ' סומטו בזרעים; ואולם סברה זו לא הוכחה. והנה בעבור דתנו הוכח מעל לכל ספק, שהפתוגן אכן נוכח בזרעים המסחריים המשוקים בישראל: אף לאחר זריעתם במצע גידול סטרילי התקבלו נבטים נגועים באחוזים ניכרים. מציאות הפתוגן בקליפת הזרע מראה, שעליידי חיטוי פשוט יחסית אפשר למנוע הפצה — לפחות ממקור אינוקולום זה.

בשיטת הגידול המתבססת על זריעה במשתלה והעקת הצמחים אחר-כך לשדה, למנהרות פלסטיק, יש חשיבות רבה לנגיעות זרעים; שכן אפילו בנגיעות מזערית, משייצו אף צמחים נגועים ספורים — הרי כתוצאה מתנאי הגידול תהיה התפשטות מגפתית לכל הצמחים עוד בשלב המשתלה, דבר הקורה לא אחת במציאות.

כיצד הגיעו החידקים לזרעים? מדוע לא הושמדו בחיטוי התרמי שנעשה בזרעים? כיצד השתמר הפתוגן על הזרעים במשך כשנה? שאלות אלו הן עדיין ללא מענה. אפשרויות קיימות הן: א) בזמן התנסה היו הצמחים חולים, והפתוגן הגיע לזרעי הפרי הצעיר שחנט; ב) בזמן הפקת הזרעים הגיעו אליהם כמויות גדולות של הפתוגן שנמצאו על העלים, ונספחו עליהם.

במרוצת עונה גידול העגבניות קיימים לעתים פרקיזמן, שבהם התנאים סוב-אופטימליים לריבוי ולהדבקה. למרות זאת הובחן בתצפיות-שדה, שעם חידוש התנאים האופטימליים — יש התחדשות של המחלה. בעבודתנו נמצא, שכאשר קיימת לחות מרובה — קיים ריבוי מתמיד של הפתוגן וחלות הדב-קות חדשות ומרובות על העלים המתפתחים, ומקור הדבקות אלה בנוכחות הפתוגן בעלים המבוגרים