

שיטה פשוטה ומהירה לבדיקת אילוח זרעי פלפל במחולל הגרב הבקטרי

מאת אייזיק אסולין, אנליסט בע"מ - יישום ידע מדעי, קרית ויצמן, רחובות
יואב בשן, המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה, הפקולטה לחקלאות, רחובות

בעבודה סדירה לאבחון נגיעות של זרעי פלפל מסחריים בחידיקי *Xanthomonas vesicatoria*, מחולל הגרב הבקטרי בפלפל, הוברר שהשיטות הקיימות אינן מתאימות לבדיקות שיגרה. במעבדתנו פותחה שיטה המגלה את נוכחות חידיקי הפתוגן בזרעי פלפל, ברמות נגיעות של 10^3 חידיקים לגרם זרעים. השיטה מבוססת על העשרה סלקטיבית במצעי מזון המכילים חומר אנטיביוטי. למרות מספרם הרב של החידיקים הספרופיטים הנמצאים על-פני הזרעים (3×10^4 מושבות לגרם זרעים) - אפשר לגלות ולאבחן בקלות את נוכחות המושבות הפתוגניות.

מבוא

חשיבותם של זרעים פטורים ממחלות כתנאי ראשוני לגידול מוצלח - אינה מטלת בספק. דרך שזרעי פלפל רגישים לחום, לכן אין אפשרות של חיטוי תרמי יעיל בזרעים אלו. כדי להעריך את יעילותן של שיטות חיטוי שונות - דרושה שיטת אבחון מתאימה. שיטה כזאת אמורה גם למלא את הצורך של יצרני הזרעים לבדיקת דוגמאות מסחריות רבות תוך פרק זמן קצר יחסית. שרון וחבוריה (1) דיווחו על שיטה חדשה לאבחון נגיעות של זרעי פלפל בחידיק כ' וסיקטוריה. לשיטה חסרונות אחרים, המקשים על בדיקות שיגרה הנעשות לעתים בהתראת זמן קצרה יחסית. בעבודה זו ניסינו לפתח שיטה מעבדתית אמינה ומהירה יותר, תוך הימנעות משימוש בחומר הצמחי הבעייתי.

שיטות וחמרים

חיטוי זרעים. זרעי פלפל מהזן "מאור" (הרגיש לגרב הבקטרי) חוטאו ב-2% כהל אתילי ואחר-כך ב-2% היפוכלורית הנתרן למשך 10 דקות. תהליך החיטוי נעשה בתלתחן, כדי לאפשר התחרת חמרי החיטוי לחללי הזרע ושיחרור בעות אורדי. בתום הטיפול נשטפו הזרעים שלוש פעמים במים מעוקרים ויובשו למשך הלילה במגדף. תרביית חידיקים. לניסוי שימשה תרביית חידיקי כ' וסיקטוריה בגיל 24-36 שעות, שאלימותם הוכחה בבדיקות פתוגניות. אילוח זרעים. זרעים מדוגמאות מסחריות, עם חיטוי ובלעדיו, הוכנסו לתוך תרחיף חידיקים בריכוז של 10 ± 10 או 10^3 . הזרעים אולחו תוך הפעלה תלתחן למשך 10 דקות, ויובשו למשך הלילה במגדף.

מצעי העשרה. זרעי פלפל שרו בכופר פוספט (PB) מעוקר, או בכופר פוספט מעוקר המכיל דאוכסיכולט (PBD). השרייה נעשתה תוך טלטול שלוש שעות ב-28-29 מ"צ. בגמר הטלטול נזרעו 0.2 סמ"ק ישירות על צלחות מצע-מזון אגר שהכיל דאוכסיכולט (ND) ופוזרו על משטח צלחת פטרי בעזרת מקל זכוכית. ביקורת לספירה כללית של חידיקים נעשתה בשיטת Pour plate במצע מסחרי (PCA) Plate Count agar.

כופר פוספט (PB) שימש כנחל העשרה. הצלחות הודגרו ב-28-29 מ"צ למשך 48 שעות. לאחר 24 שעות כבר אפשר היה להבחין במושבות המתפתחות.

זיהוי המושבות של החידיק. מושבות של החידיק כ' וסיקטוריה על מצע-מזון אגר הן צהובות, מוקואידיות, גרם-שליליות. גודל המדגם. נלקחו מדגמים מ-19 דוגמאות מסחריות שונות, כ-5 גרמים מכל דוגמה. הניסויים נעשו בשלוש חזרות.

תוצאות ומסקנות

התוצאות מובאות בטבלה 1.

טבלה 1. זיהוי באמצעות מצעי העשרה.			
מושבות לגרם זרעים		שילוב מצעי העשרה ¹	
ספרופיטים	<i>X. vesicatoria</i>	מרצק	נחלי
מחוטא, ללא חידיקים			
0	0	ND	PBD
0	0	ND	PB
0	0	PCA	PBD
0	0	PCA	PB
מחוטא, 10^3 חידיקים בסמ"ק			
10^2	10^2	ND	PBD
10^2	2×10^1	ND	PB
10^2	0	PCA	PBD
10^2	0	PCA	PB
לא מחוטא, 10^3 חידיקים בסמ"ק			
16	10^2	ND	PBD
2×10^3	6×10^2	ND	PB
3×10^4	10^1	PCA	PBD
3×10^4	10^2	PCA	PB
מחוטא, 10^9 חידיקים בסמ"ק			
0	3×10^3	ND	PBD
10^2	0	ND	PB
10^2	6×10^2	PCA	PBD
10^2	10^3	PCA	PB
לא מחוטא, 10^9 חידיקים בסמ"ק			
10^2	2×10^3	ND	PBD
10^4	8×10^1	ND	PB
10^3	10	PCA	PBD
3×10^4	10^2	PCA	PB
זרעים מסחריים			
1.1×10^2	6×10^2	ND	PBD

מקרא:
 - PBD - נחל העשרה כופר פוספט המכיל דאוכסיכולט.
 - PB - נחל העשרה כופר פוספט.
 - ND - מצע מזון אגר המכיל דאוכסיכולט.
 - PCA - מצע מסחרי plate count agar.
 * - ממוצע ספירה של 6 דוגמאות.

בחומר צמחי נלווה; מהירות — התוצאות מתקבלות תוך יומיים ולא דרוש זמן רב להכנות. בשיטה שפיתחנו אפשר לגלות רמות אילוח של כ- 10^3 חידקים לגרם זרעים. אנו שוקרים על שיפור השיטה, באופן שתאפשר גילוי של 10 חידקים לגרם זרעים. בשלב זה אפשר להציע שיטה זו לצורך עבודה במספר רב של דוגמאות מסחריות, לקבלת זרעים פטורים מהמחלה.

הבעת תודה

תודתנו לד"ר חיים שלזינגר, ולד"ר משה טישל ולאפרים גבאי, שעזרו בעצות מועילות ובעריכת מאמר זה.

ספרות

1. שרון ע., אוקון י. בשן י., הניס י. (1980) "השדה" ס"א: 501—498.
2. Schaad, N.W. and Kendrick, R. (1975). *Phytopathology*, 65: 1034—1036.

A SIMPLE AND QUICK METHOD FOR THE DETECTION OF *XANTHOMONAS VESICATORIA* IN COMMERCIAL PEPPER SEEDS

I. Assouline* and Y. Bashan**

A method for detection of *Xanthomonas vesicatoria*, the causal agent of bacterial scab of pepper, was developed. The method is based on selective enrichment of the pathogen in liquid medium, containing deocycholic acid and a further spread on solid agar medium supplemented with the same substance; by using this method, it was easy to detect the pathogen colonies.

* Analyst Ltd. Kiryat Weizmann, P.O.Box 1176, Rehovot, Israel

** Department of Plant Pathology and Microbiology, Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

מטבלה 1 נובע, שתוצאות חיוביות התקבלו בכל המקרים שבהם אולחו זרעי פלפל בחידק כ' וסיקטוריה ב- 10^3 או ב- 10^2 . לאחר חיטוי או בלעדיו. התוצאה הטובה ביותר — מספר גדול של חידקים פתוגניים ומספר קטן של מושבות ספרופיטיות — התקבלה כאשר השתמשנו בבופר פוספט המכיל דאוכסיכולט (PBD), המעכב חידקים גרם-חיוביים, מלווה בזרעה על מצע-מזון אגר המכיל דאוכסי-כולט. יחד עם זאת, במקרה של זרעים מדוגמה מסחרית, מספר המושבות הספרופיטיות היה קטן ביותר (16 מושבות לגרם זרעים). בטיפול שכלל דאוכסיכולט, הן במצע ההעשרה הנוזלי וכן במצע המוצק. לעומת 3×10^4 חידקים לגרם זרעים שהתקבלו כאשר השתמשנו במצעים אלו ללא דאוכסיכולט. בבדיקת דוגמאות מסחריות נמצא, ש-34% מהן נמצאו מאולחות בחידק.

דיון

עבודות בדבר זיהויים של חידקים פתוגניים בזרעי פלפל — מועד-טות. אחת השיטות המתוחכמות היא העבודה של עדנה שרון וחוב (1), שבה השתמשו במצע של עלי פלפל רגישים לחידק כ' וסיקטוריה לגילוי נוכחות חידק זה. השיטה אמנם אטרקטיבית ורגישה, אולם דרישותיה רבות:

- א. החזקת חממה פטורה מהמחלה לגידול השתילים.
- ב. יש לוודא לפני כל שימוש, שהשתילים הצעירים המשמשים לניסוי פטורים מחידקים או נושאים חידקים סמויים.
- ג. לדאוג למאגר של שתילי פלפל הגדלים לאט.
- ד. לגיל העלה תפקיד חשוב בהדבקה.
- ה. שנות התרבות המדבקה.

לכן, אין אפשרות לבצע בדיקות זרעים רבות בהתראת זמן קצרה. נוסף לכל אלו, השיטה דורשת זמן רב וציוד יקר. השימוש במצעי העשרה לגילוי חידקי כ' וסיקטוריה בזרעי פלפל לא נעשה עד כה, מכיון שמספר החידקים הספרופיטיים המאכלסים את הזרעים הוא רב, כ- 10^6 לגרם זרעים, ויש חשש מפני מיסוך החידקים הפתוגניים. אמנם, עבודות לגילוי חידקי כ' קמפסטריס (מחולל שחור גידים בכרווביים) כבר נעשו בעזרת מצעי העשרה (Schaad & al.), אבל השיטה לא התאימה למקרה שלנו. השיטה המתוארת במאמר זה ממלאת אחר הציפיות הנדרשות משיטת אבחון מיקרוביאלית פשוטה: אמינות — מכיון שאין שימוש

תדפיס מ"השדה", כרך ס"ב, חוברת ב', מרחשוון תשמ"ב, נובמבר 1981