

דוח לתוכנית מחקר מספר 132-1326-08

## **מחלת הכתמים השחורים ברימון: בידוד אפיון ולימוד גורם המחלה.**

מוגש לענף הפירות

על ידי

דוד עזרא המחלקה למחלות צמחים וחקר העשבים, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, בית דגן.

David Ezra Department of Plant Pathology and Weed Research, ARO, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet-Dagan Israel 50250

E-mail: [dezra@volcani.agri.gov.il](mailto:dezra@volcani.agri.gov.il)

דצמבר 2009

טבת תש"ע

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.**

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: / לא**

חתימת החוקר \_\_\_\_\_:

## תקציר

הרימון (*Punica granatum L.*) נמנה על משפחת הרימוניים (Punicaceae) הכוללת סוג זה בלבד. הרימון הינו עץ עתיק מאוקלם היטב באזורנו, הוא מצוי בארץ כגידול תרבותי יותר מ-5000 שנה. רוב הפגעים במטע נגרמים על ידי חרקים כגון: כנימות עלה, כנימות קמחיות, כחליל הרימון, עשים ועוד. בשנים האחרונות חלה עליה משמעותית בכמות הנטיעות של מטעי רימון בארץ וזאת עקב העלייה בדרישה לפרי בעיקר לייצוא. עיקר הייצוא הוא לאירופה, לשם קישוט ומאכל. לאחרונה חלה עליה במודעות ליתרונות הבריאותיים של רימונים, בעיקר בשל התכולה הגבוהה של חומרים נוגדי חמצון בפרי, דבר הגרם לעליה בצריכת הפרי. מתחילת שנות השבעים עלה היקף הייצוא ממאה טונות ללמעלה מ-15000 טונות כיום. היקף המטעים בארץ מוערך כיום על כ-20000 דונם ויותר. תחזית היבול, על פי מועצת הצמחים, היא לכ-45000 טון בשנת 2011. אין ספק כי ענף זה הינו בהתפתחות ופוטנציאל הרווחיות של הענף מיצוא פרי משמעותי ביותר לחקלאי הישראלי.

בשנים האחרונות זוהתה תופעה חדשה במטעי רימונים המתאפיינת בהופעת כתמים שחורים על פני פירות הרימון. הכתמים נראים מיד לאחר החנטה והם הולכים ומתרבים עם גדילת הפרי. כתמים אלה נמצאים גם על העלים וגורמים להצהבתם ונשירתם לאחר זמן מה. פנים הפרי והרקמה הנאכלת אינם נפגעים אך חזותו של הפרי ואיכותו נפגעים, במקרים מסוימים עד למצב בו הפרי אינו ראוי כלל לייצוא ולעיתים אף לא לשיווק מקומי. בבחינת התסמינים לא נמצאו עדויות לפגיעה על ידי חרקים. בבידודים ראשוניים שבוצעו נצפתה נוכחותה של פטריית האלטרנריה (*Alternaria spp.*) בתדירות גבוהה מהצפוי בפרי בריא. ברימון עלולה פטרייה זו לגרום למחלת הריקבון השחור בפנים הפרי אך בדרך כלל היא לא פוגעת בעלים או בפני הפרי. בתצפיות שבוצעו בשנים קודמות (2006-2007) נמצא כי ריסוסים בפונגצידים הפחיתו את חומרת הפגיעה, דבר המרמז על כך שיתכן וגורם המחלה הינו פטרייה. מספר חומרים עברו רישוי לשימוש נגד המחלה בענף זה. במבחני קוך שבוצעו בהדבקת עלים מנותקים במעבדה והדבקת עצים צעירים בבתי רשת, על ידי תבדידים של *A. alternata* שבודדה מרימונים נגועים נצפתה הופעת התסמינים המוכרים מהפרדס.

**מטרות המחקר המוצע הינן:** 1. לבסס את ממצאי מבחני הקוך שבוצעו במעבדה על ידי הדבקת עצים בתנאי פרדס/בתי רשת. בכדי לקבוע חד משמעית שאכן *A. alternata* הינה הגורם למחלה במטע יש לבצע את מבחני הקוך במטע או בתנאים המתקיימים במטע. 2. אפיון מולקולארי של התבדידים הפתוגניים לרימון אך לא לעצי פרי אחרים. אפיון זה יעשה על ידי השוואת פרופיל גנטי של תבדידים שונים, פתוגנים ולא פתוגנים, שבודדו מעצי פרי שונים. מידע זה יקדם אותנו לקראת האפשרות לזהות את גורם המחלה באופן ספציפי באמצעים העומדים לרשותנו במעבדה. אמצעים אלה יאפשרו לנו לעקוב אחר המצאות תבדידים אלה במטעים שונים ועל התפשטות המחלה במטעים בארץ. 3. לנסות להתחקות אחר מקור התבדידים החדשים. במקרה שנגלה כי מקורם מ *A. alternata* התוקפת עצי פרי מסוימים אפשר יהיה למנוע שתילה חדשה של רימונים בסמוך למקורות מדבק אלה.

## מבוא ותיאור הבעיה :

הרימון (*Punica granatum* L.) נמנה על משפחת הרימוניים (Punicaceae) הכוללת סוג זה בלבד. הרימון הינו עץ עתיק מאוקלם היטב באזורנו, הוא מצוי בארץ כגידול תרבותי יותר מ 5000 שנה. מוצאו כנראה מפרס ו/או אסיה הדרומית מערבית. הרימון הינו גידול החופשי, יחסית, ממחלות במטע. רוב הפגעים במטע נגרמים על ידי חרקים כגון: כנימות עלה, כנימות קמחיות, כחליל הרימון, עשים וכו'. מספר תופעות ידועות ברימון הינן נקודות שחורות על העלים והפירות הנגרמים ע"י כנימות עש (white flies), תריפסים (trips), כנימות קמחיות (mealy bugs) וחרקים אחרים. ישנם גם מספר דיווחים מהודו וסין על מחלת נבילה הנגרמת על ידי פטרייה פתוגנית (*Ceratocystis fimbriata*). במחלה זו העלים מצהיבים ומתייבשים על הענפים ולאחר זמן קצר הצמח כולו מת. סקירת הספרות מעלה כי עיקר המחלות הנגרמות על ידי פטריות הינם מחלות של לאחר האסיף ואחסון. דוגמאות לגורמי מחלות כאלה הינם: ריקבון העובש האפור (*Botrytis cinerea*), ריקבון העובש הירוק (*Penicillium digitatum*), ו-*Cladosporium* spp. עובש אפור בדרך כלל מתחיל בגביע (calyx), עם התפתחות המחלה קליפת הפרי הופכת חומה בהירה ובעלת מירקם עורי (leathery). פגיעה אפשרית נוספת הינה ריקבון פנימי (Heart rot) כתוצאה מ-*Aspergillus* spp. או *Alternaria* spp. פירות נגועים מראים שינוי קל בצבע הקליפה והשחרה מאסיבית של פנים הפרי. המחלה מתפתחת עוד בהיות הפרי על העץ. בארץ ידועה גם מחלה הנקראת ריקבון הכתר, מחלה זו מקורה כפי הנראה בעקיצת חרק או עש שבעקבותיה קומפלקס של פתוגנים גורם לריקבון באזור הכתר של הפרי. פטרייתיות בארץ.

בשנים האחרונות חלה עליה משמעותית בכמות הנטיעות של מטעי רימון בארץ וזאת עקב העלייה בדרישה לפרי, בעיקר לייצוא. ייצוא רימונים מאזורנו החל עוד לפני הקמת המדינה אך הופסק בשנות השלושים. בתחילת שנות השבעים החל ייצוא הפרי מחדש, בעיקר לאירופה ובעיקר לשם קישוט ומעט למאכל. היצוא עלה מתחילת שנות השבעים ממאה טונות לכ- 500 טונות בשנת 1988 ועומד כיום על כ 15000 טון המתחלקים: כ- 6000 טון שוק מקומי, ייצוא כ 4000 טון ושיווק לתעשייה העומד על כ 5000 טון (נתונים מסיכום עונת 2007). היקף המטעים בארץ, כיום, מוערך על כ-20000 דונם ויותר. תחזית היבול, על פי מועצת הצמחים, היא לכ- 45000 טון בשנת 2011. אין ספק כי ענף זה הינו בהתפתחות מואצת ופוטנציאל הרווחיות של הענף מייצא פרי משמעותי ביותר לחקלאי הישראלי.

בשנים האחרונות מופיעה תופעה חדשה במטעי רימון באזור יישובי גדרה, במושבות השומרון ולאחרונה גם בשרון ובצפון הארץ. על פני פירות הרימון, מיד לאחר החנטה, הופיעו כתמים שחורים ההולכים ומתרחבים עם גדילת הפרי. מספר הכתמים השחורים הולך ומתרבה עם הזמן (תמונה 1א). הכתמים הללו נמצאים גם על העלים וגורמים להצהבתם ולנשירת לאחר זמן מה (תמונה 1 ב). פנים הפרי והרקמה הנאכלת אינם נפגעים, כפי הנראה, אך חזותו של הפרי ואיכותו נפגעים במקרים מסוימים עד למצב בו הפרי אינו ראוי כלל לייצוא ולעיתים אף לא לשיווק מקומי. כל הזנים נפגעים. בתחילה התופעה הופיעה באופן החמור ביותר על זני ה"שמי" ו"וונדרפול" כאשר הזנים האחרים הנטועים בקרבם נפגעו רק

מאוחר יותר ובאופן מופחת אך כיום אנו רואים כי המחלה תוקפת את כל הזנים באותו זמן ובעוצמה דומה. בבחינת התסמינים לא נמצאו עדויות לפגיעה על ידי חרקים. מדגימות שנאספו והובאו למעבדה במכון וולקני בודדו גורמי מחלה אפשריים. בבידודים ראשוניים נצפתה נוכחותה של פטריית האלטרנריה (*Alternaria spp.*) בתדירות גבוהה מהצפוי בפרי בריא. אלטרנריה הינה פטרייה ספרופיטית הנמצאת כמעט על כל רקמת צמח נבדקת. הפטרייה יכולה לשרוד על פני הצמח ללא גרימת נזק אך ידועים גזעים של הפטרייה הגורמים למחלות שונות בצמחים. ברימון, כפי שכבר הוזכר, יכולה הפטרייה לגרום למחלת הריקבון השחור בפנים הפרי אך לא ידוע על פגיעות בעלים או בפני הפרי. מחלה בעלת תסמינים דומים קיימת בהדרים ונקראת מחלת הכתמים החומים (*Alternaria brown spot*). מחלה זו נגרמת על ידי הפטרייה *Alternaria alternata* pv. *Citri* ומופיעה בעלים ובפירות. הפטרייה תוקפת בעיקר זני הדר שיש בהם גנום שמקורו בזני מנדרינה מסוימים כגון דנסי ומכלואים שלו ובמיוחד הזן מינאוואלה. המחלה מאופיינת בהופעת נקודות כהות על הפרי מיד לאחר החנטה, המתרבים וגדלים עם גדילת הפרי. בעלים, נוצרים כתמים שחורים הגורמים בסופו של דבר להצהבת העלה ולנשירתו. בתצפיות (2006) בהן נעשה שימוש בחומרי הדברה, התצפיות בוצעו בשני הזנים- וונדרפול ושמי, נעשה שימוש בחומר הדברה המכיל Propineb-dithiocarbamate ו-copper oxychloride בריכוז 0.3%. הריסוסים בוצעו במהלך פריחת הרימונים בשלושה מועדים, כאשר טיפול אחד כלל ריסוס יחיד, טיפול שני כלל שני מועדי ריסוס וטיפול שלישי כלל שלושה מועדי ריסוס במהלכו של חודש אחד. מתוצאות תצפית זו מתברר כי ריסוס אחד הוריד את רמת הנגיעות בפירות, בזן שמי, ב- 12%, שני ריסוסים 46% ושלושה ריסוסים ב- 73%, לעומת הביקורת (בוונדרפול 26%, 12% ו 67% בהתאמה). מתצפית זו ניתן להבין כי הריסוסים הורידו את רמת הנגיעות ב"נקודות השחורות", וככל שבוצעו ריסוסים רבים יותר, רמת הנגיעות פחתה. בשנה האחרונה (מאי –אוגוסט 2007) בוצעו ניסויים על ידי יהודית ורדי, יצחק קוסטו (שה"מ) ארז אבישר (לידור) ועידן שמאי (לוקסמבורג) בהם השתמשו בתכשיר קופרואנטרקול (0.3%) וקנון נחושת (0.4%). הריסוסים בוצעו במהלך הפריחה מידי שבועיים בשני זנים שמי ווונדרפול. הניסויים כללו ריסוסים בקופרואנטרקול בלבד קנון נחושת בלבד, אלטרנציה ביניהם והיקש. מהתוצאות שנאספו בשלושה מועדים שונים בין מאי לאוגוסט מתברר כי מספר הכתמים הממוצע לפרי ירד באופן משמעותי לעומת ההיקש וההבדלים גדלו בכל בדיקה. כך גם התגלה לגבי אחוז הפירות הנגועים והדבר חזר על עצמו בשני הזנים השונים. תוצאות אלה תומכות בעובדה שגורם המחלה הינו פטרייה כפי שאנו משערים מתוצאות הבידודים במעבדה (מידע לא מפורסם תקשורת אישית). במבחני קוך שבוצעו בהדבקת עלים מנותקים במעבדה על ידי תבדידים של *A. alternata* שבודדה מרימונים נגועים נצפתה הופעת התסמינים המוכרים מהפרדס. הדבקה של עלים אלה על ידי תבדידים היפרפתוגנים מהדרים הראתה תסמינים מופחתים של המחלה על העלים. הדבקות שבוצעו על ידי תבדידים לא פתוגנים של הפטרייה לא גרמו לתסמינים כלשהם והתנהגו בדומה לביקורות המים.

לפני מספר שנים זוהתה תופעה חדשה במטעי רימון באזור יישובי גדרה ובמושבות השומרון. על פני פירות הרימון, מיד לאחר החנטה, הופיעו כתמים שחורים ההולכים ומתרחבים עם גדילת הפרי. מספר

הכתמים השחורים הולך ומתרבה עם הזמן. הכתמים הללו נמצאים גם על העלים וגורמים להצהבתם ולנשירת לאחר זמן מה. פנים הפרי והרקמה הנאכלת אינם נפגעים, כפי הנראה, אך חזותו של הפרי ואיכותו נפגעים במקרים מסוימים עד למצב בו הפרי אינו ראוי כלל לייצוא ולעיתים אף לא לשיווק מקומי. הזנים הנפגעים באופן החמור ביותר הינם "שמי" ו"וונדרפול" כאשר זנים אחרים הנטועים בקרבם נפגעו רק מאוחר יותר ובאופן מופחת. בבחינת התסמינים לא נמצאו עדויות לפגיעה על ידי חרקים. מדגימות שנאספו והובאו למעבדה במכון וולקני בודדו גורמי מחלה אפשריים. בבידודים ראשוניים נצפתה נוכחותה של פטריית האלטרנריה (*Alternaria* spp.) בתדירות גבוהה מהצפוי בפרי בריא. אלטרנריה הינה פטרייה ספרופיטית הנמצאת כמעט על כל רקמת צמח נבדקת. הפטרייה יכולה לשרוד על פני הצמח ללא גרימת נזק אך ידועים גזעים של הפטרייה הגורמים למחלות שונות בצמחים. ברימון, כפי שכבר הוזכר, יכולה הפטרייה לגרום למחלת הריקבון השחור בפנים הפרי אך לא ידוע על פגיעות בעלים או בפני הפרי. מחלה בעלת תסמינים דומים קיימת בהדרים ונקראת מחלת הכתמים החומים (*Alternaria brown spot*). מחלה זו נגרמת על ידי הפטרייה *Alternaria alternata* pv. *Citri* ומופיעה בעלים ובפירות. הפטרייה תוקפת בעיקר זני הדר שיש בהם גנום שמקורו בזני מנדרינה מסוימים כגון דנסי ומכלואים שלו ובמיוחד הזן מינאוולה. המחלה מאופיינת בהופעת נקודות כהות על הפרי מיד לאחר החנטה, המתרבים וגדלים עם גדילת הפרי. בעלים, נוצרים כתמים שחורים הגורמים בסופו של דבר להצהבת העלה ולנשירתו.

**מטרות המחקר המוצע הינן:** 1. לבסס את ממצאי מבחני הקוך שבוצעו במעבדה על ידי הדבקות עצים בתנאי פרדס/בתי רשת. בכדי לקבוע חד משמעית שאכן *A. alternata* הינה הגורם למחלה במטע יש לבצע את מבחני הקוך במטע או בתנאים המתקיימים במטע. 2. אפיון מולקולארי של התבדידים הפתוגניים לרימון אך לא לעצי פרי אחרים. אפיון זה יעשה על ידי השוואת פרופיל גנטי של תבדידים שונים, פתוגנים ולא פתוגנים, שבודדו מעצי פרי שונים. מידע זה יקדם אותנו לקראת האפשרות לזהות את גורם המחלה באופן ספציפי באמצעים העומדים לרשותנו במעבדה. אמצעים אלה יאפשרו לנו לעקוב אחר המצאות תבדידים אלה במטעים שונים ועל התפשטות המחלה במטעים בארץ. 3. לנסות להתחקות אחר מקור התבדידים החדשים. במקרה שנגלה כי מקורם מ *A. alternata* התוקפת עצי פרי מסוימים אפשר יהיה למנוע שתילה חדשה של רימונים בסמוך למקורות מדבק אלה.

### **עיקרי הניסויים לתקופת הדו"ח**

1. ביסוס ממצאי מבחני הקוך בעלים מנותקים על ידי הדבקות עצים שלמים בבתי רשת. בכדי לקבוע חד משמעית שאכן *A. alternata* הינה הגורם למחלה במטע יש לבצע את מבחני הקוך במטע או בתנאים המתקיימים במטע. תבדידים שבודדו במהלך השנה הקודמת מעלים ופירות נגועים והתגלו במבחני העלים המנותקים במעבדה כפתוגנים לרימון שימשו למבחני הקוך על צמחים שלמים בבתי הרשת. תרביות של תבדידים אלה.

ייחורים באורך 20 ס"מ נחתכו מעצים בריאים שאינם מראים סימפטומים של המחלה. ייחורים אלה הושרשו בבית זכוכית במשטר טמפרטורה של 25°C, תאורה 12 שעות אור 12 שעות חושך והשקיה

שלוש פעמים ביום למשך חמש דקות בעירפול במצע וורמקוליט. לאחר כשלושה שבועות עלים החלו ללבלב. הצמחים הושארו בתנאים אלה עוד כחודשיים או עד לקבלת ציצת שורשים בתחתית הייחור. הייחורים המושרשים הועברו לעציצים המכילים אדמת עציצים. לתוך מגש פלסטיק הוכנסו ארבע עציצים. למגש הוספו מים והוא נעטף בשקית ניילון. טיפות של 10µl תרחיף נבגים בריכוז של 10<sup>6</sup>cfu/ml הונחו על העלים שסומנו (תמונה 1). השקיות נסגרו והושארו בבית זכוכית בטמפרטורה של 25°C למשך חודש. סימפטומים של המחלה החלו להופיע שבוע לאחר ההדבקה. מגש שהיווה ביקורת שלילית של מים הוכן באותו אופן והוחזק באותם תנאים. תוצאות נרשמו שבוע לאחר ההדבקה וחודש לאחריה. שבעה תבדידים ממקורות שונים (זנים שונים ומיקומים שונים) ומאברים שונים (עלים, פירות) שימשו למבחני קוך על צמחים שלמים בינהם שתי פטריות שעל פי מראן בגידול על צלחות פטרי אינן משתייכות לאלטרנריה (כתומה ולבנה להלן). פטריות אלה הדביקו עלים במבחני העלים במעבדה ברמה חזקה מלבד תבדיד אחד שהדביק ברמה חלשה עד בינונית. בביקורת המים לא נצפו תסמינים כלל (תמונה 1 ג'). הפטרייה הכתומה שהדביקה חזק את העלים המנותקים במעבדה לא הדביקה כלל את הצמחים השלמים. הפטרייה הלבנה, הדביקה את הצמחים באופן חזק אך אופן הופעת התסמינים והתפשטות התסמינים בצמח נראו שונים לחלוטין מאלה המתקבלים במטע (תוצאות לא מובאות). שתי פטריות שזוהו כאלטרנריה הדביקו את העצים בצורה חזקה כאשר התסמינים זהים לאלה המתקבלים במטע ושתי פטריות (אלטרנריה) הדביקו את העצים ברמה חלשה עד בינונית.



**תמונה מספר 1: מבחני קוך בצמחים שלמים**  
**א. תבדיד אלטרנריה שגרם לתסמינים חזקים על העצים המודבקים**  
**ב. תבדיד אלטרנריה שגרם לתסמינים בינוניים על העצים המודבקים**  
**ג. ביקורת מים ללא תסמינים**

## 2. אפיון מולקולארי של גורם המחלה

לאחר זיהוי הפטרייה בצורה הקלאסית על בסיס פנוטיפ בגידול על מצעי מזון סינטטים והסתכלות מיקרוסקופית על גופי הרבייה, הנבגים ומבנים אחרים, בוצע זיהוי מולקולארי. הזיהוי המולקולארי מתבסס על קביעת הרצף של מספר ריצפי DNA הידועים כשמורים באבולוציה בן מינים שונים. על פי שינויים קטנים המאותרים במקטעים אלה אפשר להעריך עד כמה שני רצפים המשווים זה לזה רחוקים או קרובים אבולוציונית האחד לשני. אנחנו משתמשים ברצפים המקודדים ל DNA ריבוזומלי מאזור ה

5.8S ITS ומרצפים המקודדים לגנים של *actin* ו *β-tubulin*, השוואתם של כל רצף לחוד וסיכום ההשוואות לשלושת הרצפים יחד מאפשרת הערכה מספיק גבוהה בכדי לקבוע לאיזה אורגניזם ידוע, מושא ההשוואה הכי דומה. ההשוואות מבוצעות אל מול רצפים המפורסמים במאגרי המידע שנמצאים באתר ה-NCBI. הגברת המקטעים בוצעה על ידי שימוש בהתחלים אוניברסלים (המתאימים למגוון רחב של פטריות), בתהליך PCR על גבי DNA גנומי של הפטריות הנבדקות, שהופק מהפטריות על ידי שימוש בערכה מסחרית להפקת DNA מצמחים (GeneElute™ (Plant Genomic DNA Miniprep) Kit, Sigma, St. Louis, Mo, USA. הרצפים המוגברים שובטו לפלסמיד pGEM® Teasy Vector (Promega, Madison, WI, USA) והוחדרו לחיידקי *E. coli* αDH5 לשם הגברה. הפלסמידים מוצו מהחיידקים על ידי שימוש בערכה מסחרית (HiYield Plasmid Mini Kit, RBC BioSciences, Taiwan) ונשלחו לקביעת מעקובת הבסיסים (ריצוף) של המקטע המוגבר (MacroGene, Korea).

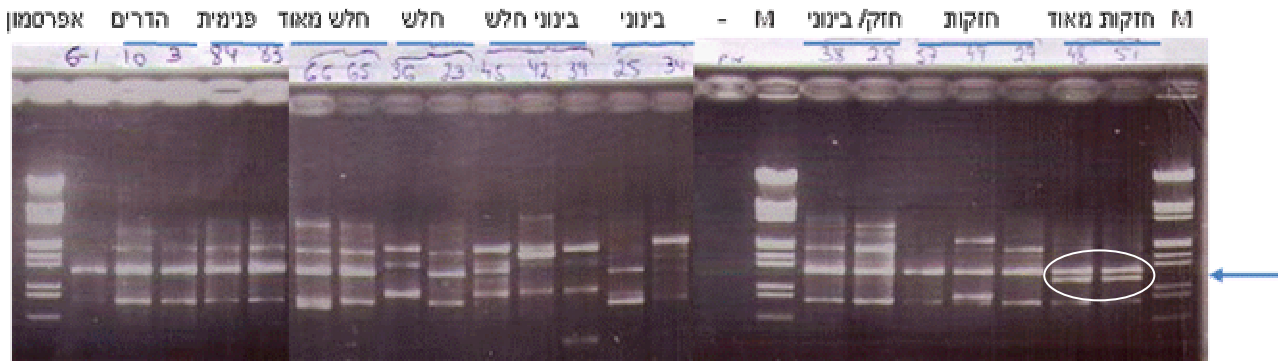
הרצפים שהתקבלו הושוּו למאגר הגנים הנמצא באתר ה-NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

מתוצאות ההשוואות שלנו מתברר כי הפטרייה שבודדה מפרי ועלים חולים, וגרמה במבחני קוך להופעת תסמינים כמו במטע הן במבחני עלים מנותקים והן במבחני קוך על צמחים שלמים הינה *Alternaria alternata*. הוזהות לרצפי ה-ITS, 5.8S rDNA המפורסמים בבנק הגנים הראתה 100% זהות בהשוואת 490 נוקלאוטידים, ל *A. alternata*. הוזהות לרצפים מהגן *β-tubulin* הראו 100% זהות לרצפים מ *Alternaria sp.* עם הוזהות הגבוהה ביותר (402 מתוך 405 נוקלאוטידים) ל *A. alternata* והוזהות לרצפי הגן ל *actin* ל *Alternaria sp.* ברמה של 99% (191 מתוך 202 נוקלאוטידים). מתוך תוצאות רצפים אלה אנו יכולים לקבוע כי גם על בסיס המידע המולקולארי גורם מחלת הכתמים השחורים ברימון הינו הפטרייה *A. alternata*.

איפיון מולקולרי בעזרת פרימרים ארביטררים (arPCR) מאפשר לנו לבצע הגברת מקטעים בעזרתם של פרימרים בעלי רצפים חוזרניים, כאשר בפטריות זהות או דומות מאוד מבחינת ההרכב והסידור הגנטי שלהן נקבל את אותם דפוסים בהפרדת תוצרי ההגברה. אם יש שוני מבחינת הסדר או התכולה הגנטית של תבדידים אפשר שיתקבלו דפוסים שונים. דפוסים אלה עשויים להוות את הסמן לזיהוי תבדידים מסוימים אלה בתהליך ה-PCR אל מול תבדידים אחרים. השתמשנו בחמישה פרימרים כאלה (GACAC, CAG, ACTT, ACTG, AGG). למעלה מחמישים תבדידים שונים שנבחנו במבחני עלים מנותקים בכדי לברר את רמת הפתוגניות שלהם, חולקו למספר רמות פתוגניות על פי עוצמת התסמינים שהתקבלו על העלים (פתוגניות: חזק מאוד, חזק, לא פתוגניות: חזק/בינוני, בינוני, חלש/בינוני, חלש וחלש מאוד).

מלבד תבדידים אלה גם תבדידים שמקורם באפרסמון, הדרים ותבדידים מאלטרנריה שבודדה מריקבון שחור של רימון שימשו כביקורות. ראקציות PCR בעזרת הפרימרים הנ"ל בוצעו על DNA שבודד מתבדידים אלה ותוצר ההגברה הופרד על גל אלקטרו פורזה. דפוסי ההפרדה הושוּו בניסיון למצוא תוצר הגברה השונה בקבוצת התבדידים הפתוגניים לעומת הלא פתוגניים. בשניים מתוך חמשת הפרימרים

(GACAC ו CAG), הופיעו מקטעי DNA ייחודיים (1300 ו 1350, 1100 בסיסים בהתאמה) לתבדידים הפתוגניים בלבד (תמונה 2 ותוצאות לא מובאות).



### תמונה 2: הפרדת תוצרי הגברה בעזרת פרימרים חוזרניים GACAC

התבדידים השונים נתנו דפוסי הפרדה דומים מלבד מקטע DNA ייחודי בגודל של כ 1300 בסיסים שהופיע בתבדידים החזקים מאוד.

מקטעים אלה בודדו ושובטו לצורך קביעת מעקובת הבסיסים שלהם ונמצא שהמקטעים אינם דומים לרצפים הנמצאים בבנק הגנים.

### דיון

מטרות עבודתנו בשנת 2008 היו לבסס את ממצאי המעבדה בהם תבדידים של הפטרייה אלטרנריה אלטרנתי שבודדה מעלים ופירות רימון בעלי סימפטומים של מחלת הנקודות השחורות גרמו להופעת סימפטומים דומים על גבי עלים מנותקים. ביסוס הפתוגניות של תבדידים אלה בוצעה על ידי אילוח עצים שלמים בבתי רשת בתבדידים החשודים וקבלת התסמינים על העצים ועצם כך השלמת מבחני קוך. מטרה נוספת בשנה זו הייתה לאפיין את התבדידים הפתוגניים שנמצאו מבחינת זיהויים המולקולרי והשוואת התבדידים השונים פתוגניים לרימון וכאלה שאינם פתוגניים מרימון ומעצי פרי אחרים. השוואה זו בוצעה על ידי שימוש בתהליך ה apPCR ובעזרת חמישה פרימרים חוזרניים שונים. מהתוצאות נוכחנו לראות כי בשניים מתוך החמישה מתקבלים מקטעי DNA ייחודיים לתבדידים הפתוגניים שאינם מופיעים בתבדידים הגורמים לסימפטומים חלשים או בכלל לא גורמים לסימפטומים. מקטעי DNA אלא אינם דומים לרצפים הקיימים במאגר הגנים של בנק הגנים באתר ה NCBI דבר המרמז על האפשרות שמדובר במקטעים ייחודיים וחדשים שהתפתחו בתבדידי זה באופן עצמאי. בנסיון להתחקות אחר מקור התבדידים החדשים אפשר לראות מתוצאות האפיון המולקולרי כי לא ברור האם התבדידים הפתוגניים לרימון התפתחו מתבדידים הקיימים על עצי פרי אחרים. ייתכן ואפיון המקטעים הייחודיים לתבדידים הפתוגניים, באופן פרטני יותר, יאפשר לזהות את מקורם ולקשרם לתבדידים פתוגניים אחרים מעצי פרי אחרים.



### 3. סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).  
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.  
**הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
1. לבסס את ממצאי מבחני הקוך שבוצעו במעבדה על ידי הדבקת עצים בתנאי פרדס/ בתי רשת. 2. אפיון מולקולארי של התבדידים הפתוגניים לרימון אך לא לעצי פרי אחרים 3. לנסות להתחקות אחר מקור התבדידים החדשים
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
בוצעו מבחני קוך על עצים שלמים שהציגו סימפטומים מתאימים למחלה ולכן נקבע כי <i>A. alternata</i> . הינה גורם המחלה ברימונים. בוצע אפיון מולקולרי של התבדידים הפתוגניים לרימון וכן של תבדידים שונים מרימונים נגועים ושאינם נגועים ומפירות אחרים. נמצאו ושובטו מקטעי DNA ייחודיים לתבדידים הפתוגניים לרימון בלבד. אין באפשרותנו, לאור התוצאות, היכולת לקבוע את מקור התבדידים הפתוגניים.
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.
המסקנות המדעיות הן שהמחלה נגרמת כתוצאה מהדבקה בפטרייה פתוגנית מה <i>Alternaria alternata</i> כפי הנראה חדשה לישראל, המראה זהות לפטריות אחרות ממקורת שונים ברמת הרצף של רצפים שמורים (ITS, actin, Tubulin), אך עם זאת מגלים שוני ברמה המולקולארית בשל נוכחות לפחות אחד שקיים בתבדידים הפתוגניים אך לא בתבדידים הלא פתוגניים וממקורות אחרים.
ההשלכה להמשך המחקר הינה שיש להמשיך ולאפיין את הפטרייה, יש ליצור ולבסס סמן מולקולרי מהמקטע השונה בתבדידים הפתוגניים ויש לבצע ניסויים שילמדו אותנו על האפידמיאולוגיה של הפטרייה והמחלה.
הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.
אנו משערים כי מטרות המחקר יושגו בתקופה שהוקצבה לביצוע תוכנית המחקר
האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - <u>יש לפרט</u> : פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
כן, פרסום בעלון הנוטע המבוסס על עבודה זו פורסם ומצורף למסמך זה

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות ↙
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) ↙
חסוי – לא לפרסם ↙