

# מחלת הצהבון באיחוניום

עבד גרה, רקח בנימין, אריה רוזנר- המחלקה לוירולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.  
ויינטראוב פיליס- המחלקה לאנטומולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.  
צוברי גבריאל, נבון אמנון- מו"פ ערבה.  
אוקו אורנה- שה"מ.

## מבוא

לימוניום (Limonium) משמש כצמח גינה ולייצור פרחי קטיף. היקף הגידול בישראל כ- 1000 דונם עם יצוא של כ- 45 מיליון פרחים. עיקר הגידול, כ- 700 דונם נעשה בערבה. בראשית אוקטובר 2000 נצפתה בחלקות לימוניום בערבה מחלה לא מוכרת שסימניה אופייניים למחלות פילודי (Phyloddy). סימני המחלה- הצהבה, עיוות פרחים וניוון צמחים. בצמחים שנפגעו פסקה הצמיחה הוגטטיבית, וחל שינוי בצורת העלים מעלה עגול למחודד, עיוות פרחים ונינוס. ממדי התופעה הלכו וגדלו עד למצב של השמדת חלקות. שיעור הנזק הגיע ל- 60-10 אחוז. סימני המחלה העלו חשד שמדובר במחלת הצהבון הנגרמת על ידי פיטופלסמה.

בבדיקות ראשוניות של חתכים דקים שבוצעו במיקרוסקופ אלקטרוני, במעבדתנו, נצפו גופיפים דמויי פיטופלסמה בתאי שיפה של צמחי לימוניום עם סימנים. בבדיקות מולקולריות (PCR) שנערכו עם תחלים אוניברסליים לפיטופלסמה, התקבלו תוצרים ספציפיים התואמים למקטע בגודל מתאים לפיטופלסמה כפי שנראה בגיל אגרוז.

גורמי המחלה של מחלות הצהבון הינם חיידקים חסרי דופן מקבוצת ה-Mollicutes. חיידקים אלו מועברים מצמח אחד לשני בצורה צירקולטיבית, בעיקר על-ידי מינים ספציפיים של ציקדות, בהם הגורם חודר מבעד למעי למערכת נוזלי הדם של החרק ומשם לתוך בלוטות הרוק, מתרבה ומועבר עם הרוק בעת ההזנה. מינים רבים של ציקדות מסוגלות לרכוש את גורם המחלה וזה מתרבה בתוכן אך מכיוון שברובן, אינו גורם המחלה מצליח להגיע לחלל בלוטות הרוק, אין הן מסוגלות להיות וקטור. הקושי הוא לכן, לא רק באיסוף, הגדרה וזיהוי גורם המחלה בציקדה, אלא בהכרח לגדל את הציקדות החשודות כווקטורים במעבדה על צמחים בריאים, והוכחת מעגל שלם של רכישה והדבקה בתנאים מבוקרים. אין מידע לגבי מיני ציקדות הפעילות בערבה אם כי צמחיית המלוח משמשת פונדקאי למינים אחדים של *Circulifer*. חיידקי הפיטופלסמה מוגבלים בתנועתם בצמח למערכת צינורות השיפה. הם מופיעים בריכוז נמוך מאוד ופיזורם בצמח אינו אחיד. עובדות אלו, יחד עם היות הפיטופלסמה פרייט אובליגטורי שלא ניתן לגידול בתרבית, מקשים מאוד על דיאגנוסטיקה של המחלה ועל בדיקת חומר הריבוי.

## מטרות המחקר

1. זיהוי ואפיון גורמי המחלה בלימוניום.
2. זיהוי הווקטור המעביר את גורם המחלה.
3. בחינת הפוסטולטים של קודך תוך שימוש בגורם המחלה שזוהה, הווקטור שנלכד וצמחי יעד חופשיים מגורם מחלה.
4. לימוד האפידמיולוגיה של המחלה ע"י מעקב בזמן ובמרחב אחר הופעת גורם המחלה והווקטור.

## פירוט הניסויים והתוצאות

### 1. זיהוי ואפיון גורם המחלה בלימוניום

#### שיטות וחומרים:

#### זיהוי ביולוגי ומיקרוסקופי:

1. כתש מעלים עם תסמיני מחלה נבדק לנוכחות חלקיקים דמויי וירוס במיקרוסקופ אלקטרוני, בשיטת הדיפ.
2. קטעי רקמה נאספו, קובעו ונחתכו באולטרה מיקרוטום. החתכים נצבעו ונבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני לנוכחות חלקיקים דמויי פיטופלסמה.
3. ענפים מצמחים נגועים הורכבו על צמח האינדיקטור, וינקה רפואית.

#### זיהוי מולקולרי:

DNA כללי הופק מרקמות של צמחים נגועים ובריאים. לפי הפרוטוקול של Murray and Thompson (9). DNA זה שימש כתבנית להגברה ב-PCR תוך שימוש בשני זוגות תחלים אוניברסליים המתבססים על מעקובת ייחודית בגן המקודד ל-16S rRNA לכלל הפיטופלסמה. בניסוי זה הדני"א הכללי מצמח נגוע ובריא יחד עם ביקורת חיובית שמקורה בוינקה נגועה בפיטופלסמה וביקורת שלילית ללא דני"א נכללו בריאקציות ה-PCR. בריאקציה הראשונה היה שימוש בזוג תחלים P1 ו-P7. תוצרי הריאקציה הראשונה נמהלו 1:40 ונכללו בריאקציה עוקבת שניה באותם תנאים אך תוך שימוש בזוגות תחלים שונים הממוקמים פנימה לזוג התחלים הראשון, דבר המאפשר שכפול בשיטת Nested-PCR. התוצרים אשר התקבלו בסיום מהלך השכפול השני הופרדו לפי גודל בגיל אגרוז 1%. לאחר צביעה באתידיום ברומיד הגיל נבדק בצילום תחת מנורת U.V. מקטע ה-DNA עבר שיבוט לפלסמיד ואנליזת קצף.

#### תוצאות ודין:

1. בבדיקת כתש צמחים במיקרוסקופ אלקטרוני לא נצפו חלקיקים דמויי וירוס.
2. בבדיקת חתכים דקים שבוצעה במיקרוסקופ אלקטרוני נצפו גופיפים דמויי פיטופלסמה בתאי שיפה של צמחי לימוניום עם סימנים. גופיפים אלו לא נצפו בתאים של לימוניום בריא.
3. בניסויי הרכבה של ענפים מצמחי לימוניום נגועים על צמחי וינקה רפואית, התקבלו סימני הצהבה ונינוס כשבועיים לאחר ההרכבה.
4. בבדיקות מולקולריות (PCR) שנערכו עם תחלים אוניברסליים ולאחריהם בריאקציה עוקבת שניה עם תחלים שונים. חלק מזוגות התחלים נתנו תוצאות לא אמינות. זוגות התחלים r16SF2 ו-r16SR2 נתנו תוצאות אמינות. מקטע בגודל 1150 בסיסים התקבל בכל המקרים בהם השתמשנו ב-DNA שהופק מצמח נגוע (תמונה 1). לא התקבלו תוצרי אמפליפיקציה כאשר השתמשנו ב-DNA שהופק מצמחים בריאים.

**תמונה 1: אנליזת PCR של לימוניום עם תחלים אוניברסליים (P1/P7) וריאקציה עוקבת שניה עם זוגות התחלים r16SF2 ו-r16SR2. M – סמן מולקולרי, 1 – צמח לימוניום בריא, 2-4 – צמחי לימוניום המראים סימני מחלה.**

M 1 2 3 4



בבדיקת רצף הנוקלאוטידים של ה-DNA, נמצא שרצף הנוקלאוטידים דומה לרצף DNA של פיטופלסמה. זהות כמעט מוחלטת (99.3%) נמצאה עם ה- Elm Yellows Phytoplasma (טבלה 1).

**טבלה 1: שיעור הזהות של רצף ה-DNA מפיטופלסמה מלימוניום ופיטופלסמות אחרות.**

% identity	Name
99.29	EY-Arl
98.95	EY-IL-1
98.78	EY-IL-2
98.95	PLL-Bd-Bri
98.60	FM-C
98.69	FM-C-MC9
98.52	FM-FRA9083
98.55	EY-CP-P
97.29	EriWB5
96.94	AshY1
96.77	StLL-AUS
95.81	LfWB
96.59	VC-F1
96.68	AL-Y-L
96.68	FD70
96.42	RuS-IT
96.25	FD-HD1
96.86	EY-NY
96.77	EY1-WVEY
95.50	JWB-Ch
95.02	CL-L-YJ-C8
94.84	FPD-PanD
94.84	LfY5
94.84	TPP-TPD
93.46	ViLL
93.10	LaS-P12
93.28	WX
93.28	WWB-5
93.08	Dan-Vir
94.67	BGWL

**דינו:**

תוצאות הבדיקה במיקרוסקופ אלקטרוני והבדיקה המולקולרית מוכיחות שבצמחי לימוניום עם סימני הצהבת האמיר ועיוות הפרח היתה נגיעות בפיטופלסמה. בצמחים אלו לא נמצאה נגיעות במחלות וירוס. במיקרוסקופ אלקטרוני, נמצאה התאמה בזיהוי פיטופלסמה מלימוניום נגוע לזיהוי המולקולרי ב-PCR, לעומת אי זיהוי פיטופלסמה מלימוניום בריא. זוגות התחלים r16SF2 ו-r16SR2 נתנו תוצאות אמינות. בבדיקת רצף הנוקלאוטידים של ה-DNA, נמצאה זהות כמעט מוחלטת (99.3%) עם ה- Elm Yellows – Phytoplasma.

## 2. איתור צמחי בר ותרבות שמשמשים פונדקאי לפיטופלסמה באזורים שונים

צמחי מנתור, וינקה רפואית וענבי שועל שהראו סימני נינוס והצהבה, סימפטומים אופייניים למחלת הצהבון, נאספו מעידן (ערבה), בסמוך לחלקה מסחרית של לימוניום בה נתגלתה נגיעות בפיטופלסמה. הצמחים נבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני ובבדיקה מולקולרית לנוכחות פיטופלסמה. תוצאות הבדיקה מוכיחות שבכל הצמחים עם סימני הצהבה והנינוס היתה נגיעות בפיטופלסמה. תוצאות הבדיקות של צמחי גבסנית ו לויקדנדרון שהראו סימני נינוס ועיוותי עלים ונאספו בחצבה ורמת הגולן, בהתאמה היו שליליות. במהלך השנה, נבדקו דוגמאות של לימוניום וצילוזה שנאספו מאזור השרון לנוכחות פיטופלסמה ונמצאו חיוביות. מדריכי שה"מ מדווחים על נגיעות בשיעור של 10-30 אחוז בחלקות מסחריות.

## 3. ניטור פעילותם של ציקדות עלים

לניטור הפעילות של החרקים הפוטנציאליים בחלקות לימוניום, נעשה שימוש במלכודות דבק צהובות ודיגום בואקום.

### **א. מלכודות דבק צהובות:**

במהלך השנה פוזרו מלכודות דביקות במספר חלקות בערבה, על-מנת להגדיר את האוכלוסיות הנפוצות בעונת הגידול. מלכודות צהובות עם דבק הונחו במנהרות לימוניום של ארבעה חקלאים במקומות שונים בערבה הצפונית. כמות תכשירי ההדברה הייתה שונה מחקלאי לחקלאי. אחד החקלאים לא השתמש בתכשירים כלל, כי רוב הצמחים היו נגועים. המלכודות הונחו בשטח למשך שבוע, הציקדות זוהו, נוקו עם הקסאן (Hexane) והושמו בכוהל לאנליזת PCR.

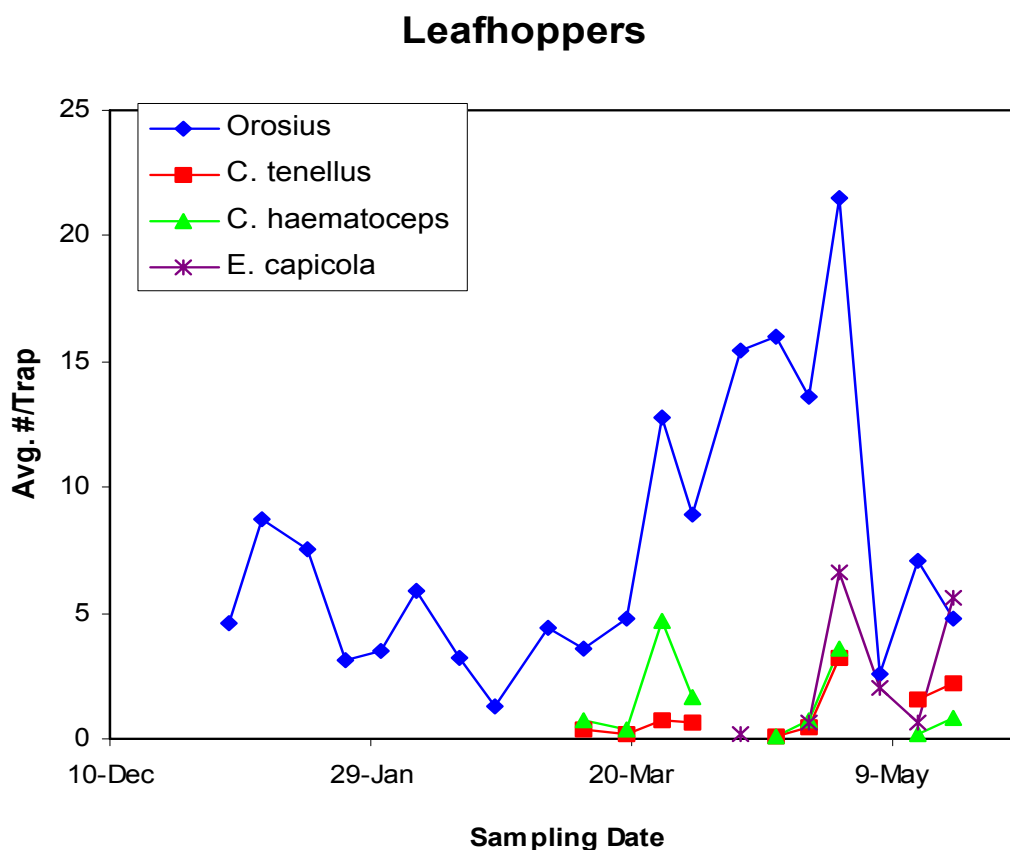
### **תוצאות:**

במהלך ניטור הפעילות של החרקים הפוטנציאליים בחלקות לימוניום נמצאו שישה מינים של ציקדות הידועות כקטורים של פיטופלסמה במלכודות (טבלה 2) העיקריים היו: *E. capicola*, *O. orientalis*, *C. tenellus*, *C. haematoceps*, האוכלוסייה הגדולה ביותר הייתה של *O. orientalis* בכל מקום. 73% מכלל ה- *O. orientalis* היו חיוביים ב- PCR ו- 50% מכלל ה- *Circulifer spp.* נמצאו חיוביים אף הם. במשך הקיץ בגלל החום נלכדו מעט ציקדות.

**טבלה 2: מספר הציקדות שנתפסו במלכודות דבק שהונחו במנהרות לימוניום במהלך שנה (דצמבר 2000 - דצמבר 2001).**

Species	Total # Caught
<i>Orosius orientalis</i>	8279
<i>Circulifer haematoceps</i>	825
<i>Circulifer tenellus</i>	832
<i>Exitianus capicola</i>	883
<i>Austroagallia sinuata</i>	94
<i>Psammotettix spp.</i>	32

איור 1 מראה את המספר הממוצע של ציקדות שנתפסו בכל מלכודות שהונחו במנהרות לימוניום עד שהחקלאי הוציא את הצמחים מהחממה.

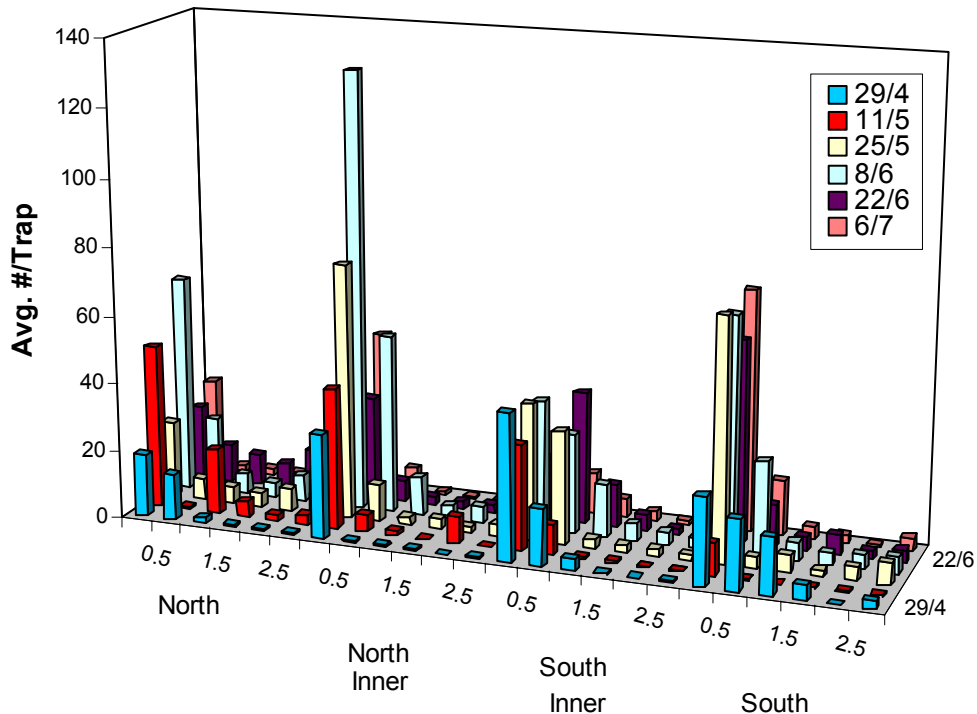


ב. הניסוי כלל שלוש מנהרות, צמודות אחת לשנייה, שבתוכן הונחו מלכודות דבק צהובות. כדי למדוד את הגובה שהציקדות נכנסות למנהרות, המלכודות הונחו בגבהים: 0.5 מ', 1 מ', 1.5 מ', 2 מ', 2.5 מ', ו-3 מ'. סידרה אחת בכניסה לכל מנהרה, ואחת 10 מ' בתוך כל מנהרה. כיוון המנהרות היה מצפון לדרום, כאשר הרוח באה בעיקר מהצפון. המלכודות הוחלפו כל שבועיים.

#### **תוצאות:**

**באיור 2** אפשר לראות את המספר הממוצע של *O. orientalis* שנתפס במלכודות בגבהים השונים. רואים רק *O. orientalis* כי הם היו האוכלוסייה הגדולה ביותר, אבל הדגם של ההופעה זהה בסוגים האחרים במספרים שונים. השיא של שני המינים *Circulifer* היו 14 פרטים למלכודת, והשיא של *E. capicola* היה פחות מ-8 פרטים למלכודת. מתוצאות אלה נראה שאפשר לשים גדר בכניסות למנהרות כדי למנוע את כניסת הציקדות. כמו כן כדאי לחתוך את חלונות האוורור (Ventillation) יותר גבוה במנהרות.

### Height Study - Orosius



ג. **דגימות ואקום**: דגימות ואקום של צמחי לימוניים מהמנהרות נלקחו פעם בשבוע. הדיגום נעשה באמצעות ואקום ידני. שקיות האיסוף הועברו למעבדה. קבוצות של עד 10 חרקים של *Circulifera* sp., שעדיין חיים הועברו לשתילי לימוניים צעירים לשניים-שלושה ימים נוספים. הצמחים הוחזקו בחממה מבוקרת טמפרטורה, הושקו ודושנו ונבדקו ויזואלית להתבטאות הסימפטומים האופייניים למחלה. לאחר חודש ימים נערכה בדיקה מולקולרית לצמחים חשודים. החרקים המתים נאספו ואוכסנו במבחנות microfuge ב-95% אלכוהול וישמשו לאנליזה באמצעות PCR.

**ניסויי ההעברה באמצעות ציקדות שנאספו בשדה נגוע**: במטרה לבדוק האם הציקדות יכולות להדביק לימוניים בריא בפיטופלסמה, נאספו בערבה, ציקדות חיות ע"י וואקום נייד בשטח של לימוניים נגוע בפיטופלסמה. הציקדות הועברו למעבדה בגילת, 5-10 פרטים הושמו ל-48 שעות על כל צמח בריא מבודד. לאחר מכן נאספו הציקדות והושמו בכוהל (95% אתנול) לאנליזה PCR. גם הצמחים הועברו לבדיקת PCR.

#### תוצאות:

ששת המינים של ציקדות פרט ל- *Exitianus capicola* העבירו את הפיטופלסמה ביעילות גבוהה. 85%-90% מכלל הצמחים שנבדקו נמצאו חיוביים לפיטופלסמה (**טבלה 3**). בדיקת מקרוסקופ אלקטרוני הראתה נוכחות פיטופלסמה בצמחים.

**טבלה 3: ניסויי העברה של פיטופלסמה באמצעות ציקדות חיות שנאספו ע"י וואקום נייד בשטח של לימוניום נגוע בפיטופלסמה והועברו לשתילי לימוניום בריאים.**

Species	Date	# Test plants	# Plants positive
			for phytoplasma
<i>O. orientalis</i>	2 April	6	6
	23 May	2	0
	11 June	1	1
	4 November	5	4
	19 November	8	8
<i>C. haematoceps</i>	24 April	6	6
	21 May	4	3
<i>C. tenellus</i>	24 April	6	6
	21 May	3	2
<i>E. capicola</i>	21 May	1	0
	3 June	1	0
	11 June	1	1
<i>Psammotettix</i> sp.	11 June	1	1

**ניסויי ההעברה באמצעות ציקדות בריאות שגודלו במעבדה:** מושבות נקיות של *O. orientalis* שהתבססו מנימפות שבקעו ונמצאו חופשיים מפיטופלסמה ב-PCR, גודלו על צמחי שומשום (*Sesamum indicum*) או שעועית (*Phaseolus vulgaris*) בריאים. קבוצות של עד עשרה פרטים הונחו על צמחי לימוניום נגועים בפיטופלסמה לשלשה ימים והועברו לשומשום ל-3-4 שבועות לפני שהועברו לשתילי לימוניום בריאים. הצמחים הוחזקו בחממה מבוקרת טמפרטורה, הושקו ודושנו למשך חודש-חודשיים. בתקופת האחזקה נבדקה התבטאות הסימפטומים האופייניים למחלה. ונערכה בדיקה מולקולרית לצמחים חשודים.

**תוצאות:**

מושבות נקיות של *O. orientalis* רכשו והעבירו ביעילות גבוהה פיטופלסמה מלימוניום נגוע ללימוניום בריא. יותר מ-90% מכלל הצמחים שנבדקו נמצאו חיוביים לפיטופלסמה (טבלה 4). בדיקת מקרוסקופ אלקטרוני הראתה נוכחות פיטופלסמה בצמחים.

**טבלה 4: ניסויי העברה של פיטופלסמה מלימוניום נגוע לשתילי לימוניום בריאים באמצעות אוכלסית מעבדה של *Orosius orientalis*.**

Date removed from field	# Test plants	# Plants positive for phytoplasma
January	6	6
April	6	5
May	1	1

## המסקנות המדעיות

הושלם הזיהוי והאפיון של הפיטופלסמה הגורמת למחלת הצהבון בלימוניום. גופיפים דמויי פיטופלסמה נצפו במיקרוסקופ אלקטרוני, בתאי שיפה של צמחי לימוניום עם סימנים. בבדיקות PCR שנערכו עם תחלים אוניברסליים, ולאחריהם בריאקציה עוקבת עם תחלים ספציפיים, התקבל מקטע DNA בגודל 1150 בסיסים בכל המקרים בהם השתמשנו ב-DNA שהופק מצמח נגוע. לא התקבלו תוצרי אמפליפיקציה כאשר השתמשנו ב-DNA שהופק מצמחים בריאים. בבדיקת רצף הנוקלאוטידים של ה-DNA, נמצאה זהות כמעט מוחלטת (99.3%) עם ה-ElmYellows Phytoplasma. אותרו מספר צמחי בר ותרבות שמשמשים פונדקאי לפיטופלסמה. נמצאו שישה מינים של ציקדות הידועות כוקטורים של פיטופלסמה. האוכלוסייה הגדולה ביותר הייתה של *O. orientalis*. ששת המינים של ציקדות שנלכדו בשטחי לימוניום נגועים העבירו את הפיטופלסמה ביעילות גבוהה. נבדק הגובה המקסימלי ממנו הציקדות נכנסות למנהרות. מומלץ לסגור את הכניסות למנהרות עם רשת, כדי למנוע את כניסת הציקדות. כמו כן, כדאי לחתוך את חלונות האוורור (Ventilation) בגובה של 1.5 מ'.

## פרסומים מדעיים מביצוע העבודה (כולל עבודת שהוצגו בכנסים):

**Gera, A.,** Cohen, J., Alexandrov, S., Oku O., Navon, A., Fiboniah, S., Zuberi, G., and Ziedan, M. 2001. Limonium: A new disease caused by phytoplasma. Pracheem 5, 51-53.

תוצאות העבודה הוצגו ביום עיון לחקלאים בערבה ובכיננוס בינלאומי מקצועי שהתקיים בגרמניה. פורסם מאמר בירחון מגדלי הפרחים "פרחים".