

זיהוי וטיפול במחלת עוות התפרחות במנגו - 2004

סטנלי פרימן, איידה צויבל, יהודה ניצני ומרסל מימון, מח' למחלות צמחים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
אורי לביא, טלי פז ודוד סעדה, מח' להשבחה וגנטיקה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
אלי תומר, מכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן,
יצחק אדטו ואלקנה בן-ישר, מיגל הגליל
עמי קינן, חוות ניסיונות, צמח

מבוא

מחלת עוות התפרחות והצימוח במנגו הנגרמת ע"י הפטרייה *Fusarium mangiferae* נפוצה כיום ברוב מדינות העולם המגדלות מנגו. בארץ, המחלה התבססה בנגב המערבי וחבל הבשור, באזור המרכז (רחובות עד חדרה), ולאחרונה ברוב המטעים בצפון. קיים חשש להתבססותה באזור זה, שהוא אזור עיקרי לגידול. סימני הנגיעות מתבטאים כידוע בדחיסות רבה מאד של התפרחת המזכירה בצורתה ראש כרוב ותפרחת נגועה אינו נושא פרי. המחלה מהווה איום על קיום הענף.

מטרות המחקר לתקופת הדווח

- הדברת גורם המחלה במטע.
- פיתוח כלי דיאגנוסטי ספציפי ויעיל.

עקרי הניסויים שבוצעו ותוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

1. ניסוי הקדמי להדברה של גורם המחלה במטע נגוע במכון וולקני

א. ניסוי שדה ראשון במטרה לבחון היבטים אפידמיולוגיים וואפשרות ריפוי של שמחלה נערך במטע הנגוע קשה במכון וולקני בין פברואר לאפריל 2004. בוצע ניסוי "הגנה" ו- "ריפוי" ע"י כיסוי פקעים אמירם של תפרחות בשקיות וריסוס הפקעים בפרוכלורז. הכיסוי נועד לבחון האם הפטרייה קיימת בעץ או שיש התקפה חדשה מדי שנה. בנוסף, רצינו לבחון האם ניתן למנוע הדבקות חיצונית. וריסוסים (מירז') נוזלי 45 – ח.פ. פרוכלורז בריכוז 0.5%) נועדו לקטול את גורם המחלה, (בין אם סיסטמי או חיצוני). הניסוי כלל 9 עצי ביקורת, 9 עצים מרוססים ו- 12 עצים עם כיסויים. נמצאה הפחתה משמעותית במספר התפרחות הנגועות כתוצאה מטיפול הריסוס בפרוכלורז בהשוואה לביקורת (טבלה 1).

טבלה 1:

טיפול	מס' תפרחות בניסוי	מס' תפרחות נגועות	% נגיעות
ביקורת	292	51	17.5
כיסוי בשקיות	433	95	21.9
ריסוס בפרוכלורז	437	30	6.8

2. ניסויי שדה מורחבים להדברה של גורם המחלה במטע נגוע במשמר השרון ובמכון וולקני

ב. בשני ניסויי שדה (משמר השרון ומכון וולקני) טופלו עצים נגועים בריסוס והגמעה בפרוכלורז. ריסוס: [מירז", בריכוז 2500 ppm (0.5% פורמולציה) בתוספת "משטח 90" בריכוז 0.1% ניתן פעם בשבוע מאמצע נובמבר עד תפרחות באורך מלא, 2005]. הגמעה: (דרך מערכת ההשקיה) הזרקת "מירז" בריכוז של 0.04 ppm 40 חומר פעיל (0.5% פורמולציה) למערכת ההשקיה באמצעות "דוד דישון" ייחודי. כל טיפול כלל 50 עצים מפוזרים ב-8 בלוקים. במהלך חודשי הניסוי, (נובמבר – עכשיו) נעשו 2 השקיות בחודש (בימי שמש) בכמות של 5 קוב לדונם. תוצאות הקדמיות מצביעות עלהשפעה של הטיפולים במשמר השרון ומכון וולקני (טבלה 2).

טבלה 2:

טיפול	עיתוי	אחוז אכלוס בפטרייה	
משמר השרון	נוב' (2004)	ינואר (2005)	אפריל (2005)
ביקורת	41.1	38.8	
הגמעה	31.7	21.1	
ריסוסי פרוכלורז	42.8	9.4	
מכון וולקני	נוב' (2004)	ינואר (2005)	אפריל (2005)
ביקורת	1.1	11.4	
הגמעה	3.8	7.1	
ריסוסי פרוכלורז	2.4	22.1	

חשוב לציין שבדיקות אכלוס הינן הקדמיות ואינן מצביעות על כמות התפרחות הנגועות. נתון זה יבדק באביב - קיץ של 2005.

3. פיתוח כלי דיאגנוסטי ספציפי ויעיל

לצורך זיהוי ייחודי, אמין ויעיל של גורם המחלה ננקטו מספר גישות במקביל:

1. DNA הופק מעלי מנגו (מהזן קיט) ומתפטיר של *F. mangiferae* ממקורות שונים וכן מפטריות פוזריום שאינן ספציפיות למנגו. דוגמאות DNA אלה שימשו ליצירת דגם פסים ייחודי בשיטת AFLP לכל דוגמא. פסים ייחודיים ל-*F. mangiferae* בודדו מתוך הג'ל ורוצפו. על בסיס הרצף סונטזו תחלים (פריימרים) ייחודיים לכל מעקובת.

2. במטרה להגביר את רגישות המבחן, אותרו רצפים חוזרים של ה-ITS (Ribosomal DNA) ייחודיים ל-*F. mangiferae*.

3. זוגות הפריימרים שתוארו לעיל שמשו להגברה של DNA שהופק מהזן קיט ומפטריות שונות בריאקצית PCR במטרה לבחון את ייחודיות (ספציפיות) הריאקציה.

4. במטרה לבדוק את רגישות המבחן ואת היכולת לזהות כמויות קטנות ככל האפשר של הפטרייה, נעשתה הגברה של המקטעים הייחודיים בתערובות DNA של הפטרייה ושל מנגו מהזן קיט.
 5. נעשו תערובות בכמויות משתנות של DNA מהזן קיט ובכמות קבועה של DNA זהוכמויות הולכות ויורדות של DNA הפטרייה. כמו כן, נבדקה ההגברה במכשיר ובתנאים של Real time (quantitative) PCR. מצאנו שניתן לזהות במבחן כמויות של 0.01 ng של DNA הפטרייה ואולי אף פחות מזה.

המשך המחקר:

1. הכלי הדיאגנוסטי יבדק in vivo קרי בדוגמאות תפרחות וצימוח ווגטיבי מעצי מנגו נגועים ולא נגועים.
2. השיטה תיושם לבדיקות אפידמיולוגיות ולבדיקת יעילות הטיפול לריפוי המחלה.

דין

1. מחלת עוות התפרחות והצימוח במנגו הנגרמת ע"י הפטרייה *F. mangiferae* התבססה בנגב המערבי וחבל הבשור, באזור המרכז, ולאחרונה ברוב המטעים בצפון.
2. בניסוי ההקדמי (ראה לעיל), לא נמצא הבדל במספר התפרחות הנגועות בין הביקורת לטיפול כיסוי התפרחות בשקיות. מכאן ניתן להסיק שהפקעים נוגעו לפני הכיסוי בשקיות או לחילופין, הפטרייה הייתה קימת בעץ קודם לכיסוי. בריסוס בפרוכלורז נמצאה הפחתה משמעותית במספר התפרחות הנגועות לעומת ביקורת.
3. בניסויי הריסוס בפרוכלורז נמצאו השפעה משמעותית של ההגמעה על אחוז האכלוס בפטרייה. כמו כן, בניסוי במשמר השרון אחוז האכלוס בטיפול הריסוס ירד בצורה משמעותית בהשוואה לביקורת לא מטופלת. חשוב לציין שתוצאות האכלוס הינן הקדמיות ואינן מצביעות על כמות התפרחות הנגועות. נתון זה יבדק במהלך חודשי האביב וקיץ של 2005.
4. לאור הצלחת השלב הראשון של הפיתוח הכלי הדיאגנוסטי (בדיקות in vitro) נמשיך בפיתוח הכלי במטרה להגיע לזיהוי ייחודי ברמת רגישות גבוהה ככל האפשר.

סיכום לדו"ח מחקר מס': 1139-132

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח:

- ניסויי שדה לטיפול במחלה.
- פיתוח כלי דיאגנוסטי ייחודי ויעיל.

עיקרי הניסויים ותוצאות:

במטע וולקני נמצאה הפחתה משמעותית במחלה כתוצאה מהריסוס. ב. בשני ניסויי שדה נוספים נמצא אחוז אכלוס מופחת בטיפול ההגמעה והריסוס בפרוכלורז לעומת הביקורת. ג. בשיטות מולקולריות אותרו מעקובות DNA ייחודיות לפטרייה. מעקובות אלה הוגברו בהצלחה ב-PCR.

מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

א. הפטרייה מנגעת פקעים לפני הכיסוי בשקיות או לחילופין, הפטרייה קימת בעץ קודם לכיסוי. ריסוס בפרוכלורז הפחית באופן משמעותי את כמות התפרחות הנגועות בהשוואה לביקורת.

ב. בדיקות אכלוס לאחר טיפול בפרוכלורז הינן הקדמיות. בהמשך ייקבע מספר התפרחות הנגועות לכל טיפול. ג. השלב הראשון של אפיון מעקובות DNA ייחודיות לפטרייה ובדיקתו in vitro נסתיים. בשלב הבא, הכלי ייבדק in vivo ובכך ננסה לשפר את הייחודיות והרגישות של המבחן.

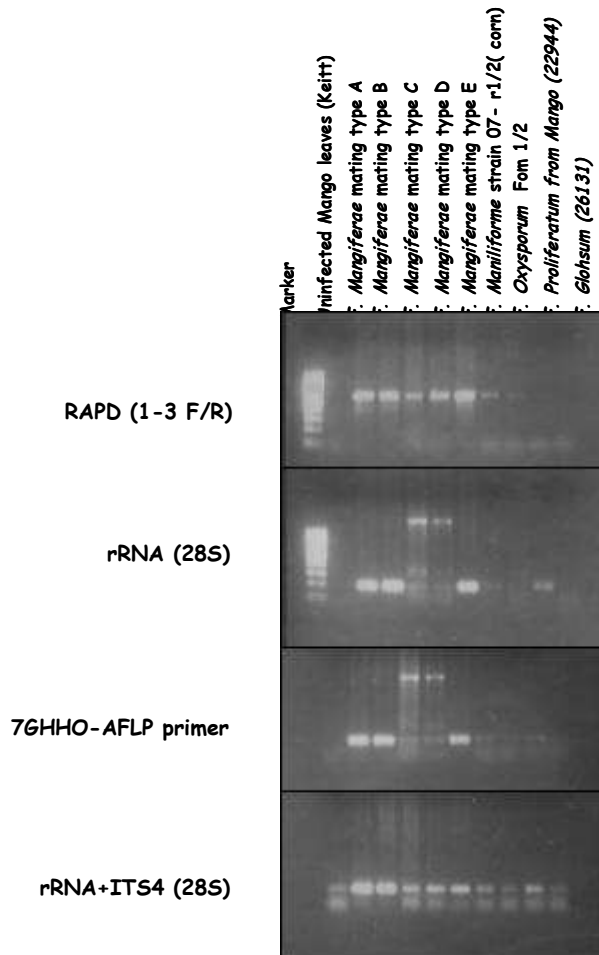
הבעיות שנתרו לפתרון:

- א. בדיקת התכנות הטיפולים ע"י ספירת התפרחות הנגועות באביב – קיץ 2005.
- ב. המשך כיוול ופיתוח שיטות לטיפול במטע בפרוכלורז ובחומרים נוספים במטרה לטפל בעץ נגוע.
- ג. המשך פיתוח כלי דיאגנוסטי ייחודי ויעיל.

נספח 1

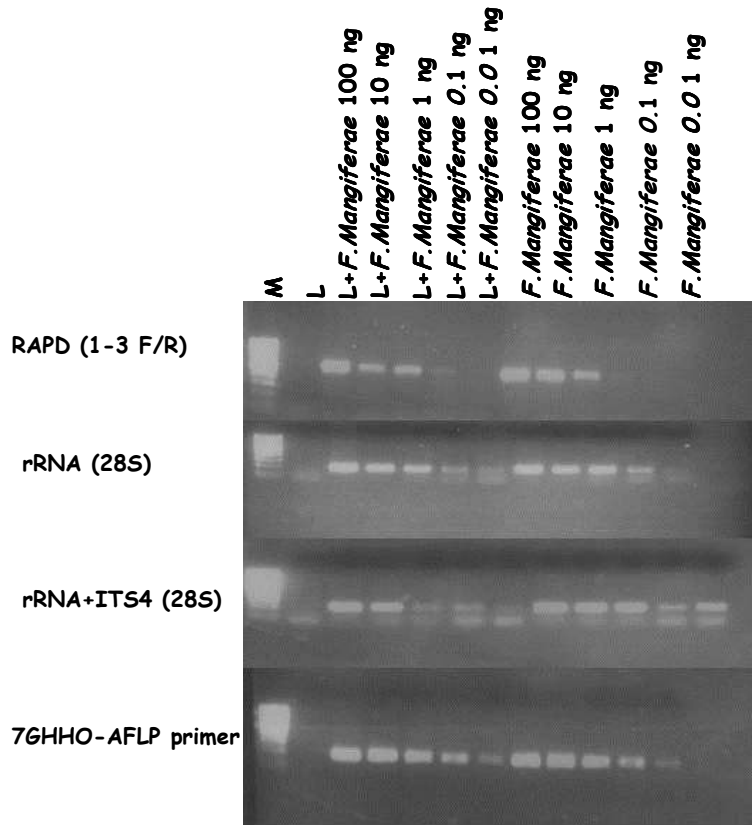
בדיקת תחלים (פריימרים) ייחודיים לפטרייה *F. mangiferae* mating type A בריאקצית

PCR על תבדידי פטרייה שונים ועלי מנגו לא נגועים מזן קיט.



נספח 3

בדיקת רגישות של תחלים (פריימרים) ייחודיים לפטרייה הפתוגנית *F. mangiferae* בריאקצית PCR. נבדקו כמויות שונות של DNA מעלי מנגו והפטרייה בתערובת עם כמות קבועה של DNA ממנגו. כמות DNA פטרייה 100-0.01 ng וכמות DNA מנגו (L) 100 ng.



סיכום תוצאות בדיקת איכות (ייחודית ורגילות) של זוגות פריימרים שונים לזיהוי *F. mangiferae*.
(0 – העדר פס; + עצמת פס בינונית; ++ עצמת פס חזקה)

		<i>Fusarium From corn</i>	Non infected leaves (Elkana)	Non infected flower-2	Non infected flower-3	Non infected flower-4	Infected flower-Ramat magshimim	Infected flower-Lotem	Infected flower + mildew infection	Infected flower-3
76HO (AFLP)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76HHO (AFLP)	0	+	+	+	+	+	+	++	+	+
77J (AFLP)	0	+	0	++	0	++	++	++	+	+
20-E (AFLP)	+	++	0	+	0	+	+	+	0	+
19-L (AFLP)	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+
RAPD	0	+	0	+	+	+	0	++	0	+
cDNA-3	0	++	0	+	0	+	++	++	+	+
cDNA-33	0	+	+	0	0	0	0	0	0	+
28S-2	0	++	+	++	+	++	+	++	+	++
rRNA-2	0	0	0	+	+	++	+	++	+	+
rRNA 2-F+ ITS4	0	0	0	++	++	++	++	++	++	++