

התפשטות סיסטמית של החיידק *Erwinia amylovora*,

מחולל מחלת החרכון, בעצי אגס

מ. ראובני¹, ש. מנוליס², פ. קלייטמן², א. דרור², ד. שצגלוב¹ ונטלי שצגלוב¹
¹המכון לחקר הגולן, קצרין, ²מינהל המחקר החקלאי-המחלקה למחלות צמחים.

תקציר

בדיקת קצב התפשטות החידק *Erwinia amylovora* בעצי אגס נבחנה על עצים שגודלו במיכלים בבית רשת במרכז וולקני וכן על עצים שגודלו בקרקע תחת בית רשת בתחנת אבני איתן, רמת הגולן. העצים אולחו באביב באופן מלאכותי על ידי דקירה או הזרקה של תרחיף של חידק הפתוגן לקצות צימוח צעיר. ההדבקות באבני איתן בוצעו על צימוחים שיושבים על הגזע המרכזי של העץ ועל שני ענפים צדדיים הגדלים באופן אנכי או באופן אופקי לגזע המרכזי. ההדבקות על העצים בוולקני בוצעו על הגזע המרכזי של העצים בלבד. דגימות צמחיות הוסרו במועדים שונים לאחר האילוח מהענפים ו/או הגזעים במרחקים שונים ממקום האילוח, ונבחנו לנוכחות הפתוגן. כמו כן נמדד אורך הכיב שנוצר בעקבות ההדבקה.

נמצא כי לא בכל המקרים שבהם יש הדבקה של הצימוח הצעיר מתפתח בעקבות זאת כיב על הגזע. קצב התפשטות החידק בעצי אגס מזן ספדוצינה היה גבוה יותר מאשר בעצים מזן ספדונה שגודלו באבני איתן, עובדה הקשורה כנראה, להתפתחות וגטטיבית (vigor) גבוהה יותר של זן זה. עוד נמצא כי התפשטות החידק בגזע בן ארבע שנים (בשני הזנים באבני איתן) היתה דומה או גבוהה יותר מאשר בענפים צדדיים. ברוב המקרים, התפשטות החידק כלפי חלקים עליונים של הענפים הצדדיים בעצים שגודלו באבני איתן היתה גבוהה יותר מהתפשטותו כלפי האיזור התחתון של הענף. לא נמצאו הבדלים משמעותיים בקצב ההתפשטות בגזע של שני הזנים באבני איתן. התוצאות בעצי ספדונה שגודלו במרכז וולקני הראו מגמה הפוכה. התפשטות החידק תלויה, כנראה גם בטמפרטורה (עונות השנה) ובגורמים פיסיולוגיים נוספים, בנוסף לשלב הפנולוגי וגיל העץ. כך נמצא כי ההתפשטות בעצים היתה נמרצת באביב, אך נחלשה במהלך הקיץ (חודשים יולי-אוגוסט). בעצים שגודלו בשני האתרים, חלה ירידה משמעותית ברמת נוכחות החידק שנמצאה בבדיקות ברקמות ועצירה בקצב התפשטותו במהלך הקיץ והסתיו.

מבוא ותיאור הבעיה

מחלת החרכון נחשבת לאחת המחלות המסוכנות וההרסניות ביותר של האגס והתפוח ובמידה פחותה יותר של עצי פרי גרעיניים אחרים. המחלה נגרמת על ידי החיידק *Erwinia amylovora* החודר אל רקמות הצמח דרך צופני הפרחים ומשם לדורבנות הפירות והזמורות הצדדיות לענפים צעירים ומהם לענפים הראשיים. בתנאים מתאימים מתפשטת המחלה עד לכנה וגורמת לתמותת העץ בתוך מספר חודשים. על מנת למנוע את המשך התפשטות המחלה בתוך רקמות העץ נוקטים באמצעי גיזום של הענפים הנגועים. ברם, מתברר כי החידק נמצא ברקמות פנימיות של העץ ונדידתו הינה מהירה מכפי שניתן לראות על העץ על פי סימני הנגיעות האופייניים למחלה. עובדה

זו מקשה על קביעת מדיניות הגיזום של העץ לשם הסרת הרקמות הנגועות ושל אלו המכילות את החידק. מטרת העבודה היא לעקוב אחר קצב ההתפשטות הסיסטמית של החידק בתוך הרקמות הפנימיות של עצי אגס לאחר הדבקות מכוונות בתנאי אקלים של איזורנו. מעקב זה יאפשר ביצוע אמצעי סניטציה מתאימים להפחתת רמת המידבק בעץ. עבודות שנעשו באוניברסיטת קורנל במדינת ניו יורק הראו כי תנועתו הסיסטמית של החידק בעצי תפוח צעירים לאחר הדבקה מכוונת היתה מהירה מאד ובתוך מספר שבועות אובחן החידק בכנה של עצים בני שנתיים. גיזומים שנעשו על פי איבחון החידק ברקמות, כפי שהתקבל מתוצאות הבדיקות, עצרו את התפשטות המחלה. בעבודה זו מוצע להשתמש בשיטות המחקר שפותחו בקורנל ובמכון וולקני על מנת לעקוב אחר קצב התפשטותו של החידק ברקמות עצי אגס באיזורנו. **למיטב ידיעתנו נושא זה לא נחקר עדיין על עצי אגס** וחשיבותו רבה בתנאי האקלים של איזורנו השונים מאד מאלו של צפון מדינת ניו-יורק.

מטרות המחקר

- 1) לבחון את קצב ההתפשטות של החיידק לאחר הדבקה בעצי אגס הגדלים במיכלים או בקרקע תחת בית רשת במרכז וולקני או ברמת הגולן, בהתאמה.
- 2) לבחון את קצב ההתפשטות של החידק לאחר הדבקה בענפים צדדיים הגדלים בכיוון אנכי או אופקי לגזע המרכזי.
- 3) לבדוק כושר הישרדות החיידק בעצי אגס נגועים בבית רשת לאחר אילוח מכוון.

פירוט הניסויים שבוצעו

בדיקת קצב התפשטות החיידק.

הניסויים במרכז וולקני (שנה שלישית). הניסויים נעשו בעצי אגס בני 8 שנים מהזן ספדונה הגדלים בדליים בבית רשת. אילוח העצים נעשה ע"י דקירת הצימוח הצעיר היוצא ישר או קרוב מאוד לגזע המרכזי. לניסוי נלקחו 19 עצים בעלי צימוח צעיר מתאים. ההדבקות נעשו באביב בדקירת הצימוח הצעיר במחט דקה המכילה חיידק הנושא עמידות לסטרפטומיציין. ההדבקות כוסו בשקית ניילון לחה למשך 48 שעות. בזמנים שונים לאחר ההדבקה נבדקו סימני המחלה וכן נעשתה בדיקה לנוכחות החיידקים. גודל הכיב המתפתח נמדד כלפי מעלה ומטה מאזור ההדבקה. לקביעת נוכחות החיידקים נלקחו קטעי הרקמה מהגזע במקום החיבור של הצימוח הצעיר ובמרחק של 5 ו-10 ס"מ מקצוות הכיב. קטעי הרקמה שהוסרו הורחפו בתמיסה פיזיולוגית ורוסקו בהומוגניזר. מהתרחיף הוכנו מיהולים עשרוניים שנזרעו על מצע סלקטיבי (CCT) המכיל סטרפטומיציין בריכוז של 100 מיקרוגרם לסמ"ק. הצלחות הועברו לאינקובציה למשך יומיים ב-28 מ"צ. מושבות אופייניות לפתוגן נספרו והתוצאות חושבו לפי מספר החיידקים לסמ"ר רקמה. בנוסף נעשה אימות למושבות האופייניות ל- *Erwinia amylovora* בשיטת ה-PCR.

הניסויים באבני איתן ברמת הגולן (שנה שלישית) - נעשו בעצי אגס בני 4 שנים מהזנים ספדונה וספדוצינה הגדלים בקרקע בבית רשת. אילוח העצים נעשה בצימוח הצעיר היוצא ישר או קרוב מאוד לגזע המרכזי (במרכזו), או במרכז ענף צדדי הגדל בכיוון אנכי לגזע ובענף צדדי הגדל בכיוון אופקי לגזע המרכזי (סך הכל שלושה אתרי הדבקה בכל עץ). במקרה הצורך הסתייענו בקשירת הענפים. לניסוי נבחרו 41 עצי ספדונה ו- 8 עצי ספדוצינה (כעץ מפרה), שהיו מסודרים בשלוש שורות.

ההדבקות נעשו באביב בתאריכים 10.4 ו- 23.4.2000, בדקירת הצימוח הצעיר במחט המכילה חיידק בעל רגישות לסטרפטומיציין. הענפונים המודבקים כוסו בשקית ניילון לחה למשך 24 שעות. איסוף הדוגמאות והשיטות לקביעת נוכחות החידק נעשו כפי שתואר לעיל. מושבות אופייניות לפתוגן נספרו והתוצאות חושבו לפי מספר החיידקים לסמ"ר רקמה. בנוסף נעשה אימות למושבות האופייניות ל- *Erwinia amylovora* בשיטת ה-PCR.

בנוסף לבדיקות המעבדה, נבחנה ההתפשטות של החידק על ידי מדידות ויזואליות שנערכו במועדים שונים לאחר האילוח במרכז וולקני. ברמת הגולן בוצעו בדיקות אלו בתחילה אחת לשבוע ואח"כ כל שבועיים. המדידות כללו אורך הכיב (כתמי הנגיעות בחרכון) כפי שנצפו על הענף או הגזע בכיוון כלפי החלק התחתון או העליון של כל אחד מהענפים או הגזע המרכזי. כמו כן נמדדו הקוטר (באתר ההדבקה) ואורך של הענף הצדדי או הגזע המרכזי של כל אחד מהעצים המודבקים וכן המרחק ממקום ההדבקה לקצה הענף או הגזע בתחילת הניסוי (1.5.00) ובסוף השנה (15.11.00). חושב הפרש הגידול בין שני המועדים של האורך והקוטר של הענפים והגזע.

תוצאות:

א. התפתחות כיבים והתפשטותם בעצים המודבקים - במרכז וולקני

סימני הדבקה הופיעו בכל העצים כהשחרה של הצימוח הצעיר לאחר 6-8 ימים. למרות הופעת סימני המחלה בכל העצים לא בכולם התפתחו כיבים בגזע. מתוך 19 עצים רק ב- 7 נראו בברור כיבים. איור 1 מתאר התפתחות הכיבים בעצי ספדונה כתלות בזמן. התוצאות מייצגות ממוצע של 7 עצים. בכיבים ניתן להבחין לראשונה לאחר כ- 30 עד 40 ימים מההדבקה. לאחר 60 ימים כמעט ולא נראה שינוי בגודל הכיבים שלא השתנה גם במהלך הקיץ והסתיו. התפתחות הכיבים כלפי מטה היתה גדולה מזו כלפי מעלה. תוצאות אלו תואמות את התוצאות שהתקבלו בשנה השניה של המחקר.

ב. התפשטות והישרדות החיידק בעצים המודבקים - מרכז וולקני

בדיקת נוכחות החיידקים בעצים נמדדה בזמנים שונים לאחר האילוח. במדידה הראשונה שנעשתה לאחר 30 ימים נלקחו דגימות מהגזע במרחק של 5 ס"מ כלפי מעלה וכלפי מטה ממקום ההדבקה. ב- 16 עצים מתוך 19 נמצאו חיידקים בריכוזים שונים, בין 50⁵ - 10⁵. בבדיקה נוספת לאחר 60 ימים נמצאו חיידקים רק ב- 6 עצים. אלו העצים שבהם התפתחו כיבים. הישרדות החיידקים בעצים אלו נבדקה בדגימות שנלקחו מקצוות הכיב ומתוארת באיור 2. נמצאה ירידה משמעותית בכמות החיידקים עם הזמן. לאחר 40 ימים ריכוז החיידקים בעצים אלו היה גבוה,

בין 10^5 ל- 10^8 . לאחר 90 ימים לא ניתן היה למצוא חיידקים ב- 4 עצים. בכל העצים נלקחו דגימות גם בסתיו ורק בשני עצים ניתן היה לגלות את החיידקים.

ג. התפתחות כיבים והתפשטותם בעצים המודבקים – אבני איתן, רמת הגולן.

סימני הדבקה ראשוניים על העצים הופיעו לאחר 7 ימים ברוב הענפונים הצעירים. ברם, קצב התפשטות החידק ויצירת כיבים בענף הצדדי או בגזע המרכזי לא היתה זהה בכל העצים. במרווחים של 7 ימים בתחילת הניסוי ואח"כ במרווחים של 14 ימים נמדד סך כל אורך הכיבים (אורך הכתמים של חרוך שנצפו באופן ויזואלי) על כל אחד מהענפים או הגזעים המודבקים. התוצאות באיור 3 מראות את ממוצע קצב ההתפשטות של החידק ברקמות העץ כפי שנמדדו בגזע המרכזי של כל אחד מהעצים והזנים. התוצאות מראות כי קצב התפשטות החידק בעצי ספדוצינה היה גבוה מזה של עצי ספדונה. ניתן לראות כי חלה האטה משמעותית בסוף הקיץ ועד לעצירה כמעט מוחלטת בסתיו. ניתוח תוצאות התפשטות החידק כלפי החלק העליון או התחתון של הגזע מראה בבירור (איור 4) כי קצב ההתפשטות בזן ספדוצינה כלפי מעלה היה גבוה במקצת מאשר כלפי מטה. לא נצפו הבדלים בזן ספדונה.

בעבודה בשנה זו נבחנה גם התפשטות החידק בענף צדדי הגדל באופן אנכי לגזע בהשוואה לענף צדדי הגדל באופן אופקי לגזע. התוצאות באיור 5 מראות את ממוצע קצב ההתפשטות של החידק ברקמות העץ כפי שנמדדו בשני הזנים בענף צדדי אופקי או אנכי. בזן ספדוצינה בלבד נמצא כי קצב התפשטות החידק היה גבוה יותר בענף שגדל אנכית לגזע, בהשוואה לענף שגדל באופן אופקי לגזע. הבדלים אלו לא היו מובהקים בכל מועדי המדידה. ברם, קצב התפשטות החידק בזן ספדונה היה דומה בשני טיפוסים הענפים. ניתוח תוצאות התפשטות החידק כלפי החלק העליון או התחתון של כל אחד מהענפים הצדדיים בכל אחד מהזנים מאשש ממצאים אלו (איור 6) רק בזן ספדוצינה נמצא הבדל בין קצב ההתפשטות בין ענף הגדל באופן אנכי בהשוואה לענף הגדל באופן אופקי. כמו כן נמצא כי ההתפשטות כלפי מעלה היתה גבוהה יותר בשני הזנים כלפי מעלה מאשר כלפי מטה (איור 6).

ד. התפשטות החידק – בדיקות מעבדה (אבני איתן)

בנוסף לבדיקות הויזואליות בוצעו כאמור גם בדיקות לנוכחות החידק וזיהויו במעבדה. לשם כך נבחרו שלושה עצי ספדונה ושלושה עצי ספדוצינה שעליהם בוצע מעקב בדיקות המעבדה לאורך השנה. הדגימות נלקחו מכל אחד מהעצים בנקודת הגבול שבו נראה הכתם (הכיב) הנוצר על הגזע ועל כל אחד משני טיפוסים הענפים. בסך הכל נבדקו בכל מועד 36 דגימות. התוצאות באיור 7 מראות את אחוז הדגימות שבהן נמצאו רמות שונות של חיידקים. האיור מדגים רק מועד בדיקה אחד בכל אחד מהחודשים. התוצאות מראות כי בתחילת חודש מאי (3 שבועות לאחר הדבקה) נוכחות החידקים נצפתה ברוב הדגימות ברמות שונות ורק ב 16% מהדגימות לא נמצאה נוכחות חיידקים. אולם כעבור 30 ימים נוספים חלה ירידה משמעותית במספר הדגימות המכילות חיידקים וב 80% מהדגימות לא נמצאו כלל חיידקים. מגמה זו המשיכה גם בחודשים הבאים (איור 7). חשוב לציין כי העצירה כמעט מוחלטת בהתפשטות החידק בקיץ ובסתיו בבדיקות הויזואליות, עדיין היו דגימות (9%-15) שבהן נמצאו חיידקים בבדיקות המעבדה.

המשך המעקב אחר העצים במכון וולקני שאולחו בשנת 1999 ושפיתחו כיבים הראה שמתוך 22 עצים רק בשניים היתה תמותה של הגזע. בשאר העצים לא נראתה פגיעה בעלול ובפריחה. באבני איתן ברמת הגולן נמצא כי מתוך 24 עצים שאולחו ב 1999 היתה תמותה בחמשה עצים. בחלק מהעצים היתה תמותה חלקית (בענפים) ובחלקם האחר הפגיעות היו לא משמעותיות.

ה. הקשר בין התארכות הגזע והענפים ואורך הכתם (הכיב) הנוצר בכל אחד מהזנים באבני איתן. על מנת לבחון את הקשר בין התפשטות הכתם בגזע וכושר ההתארכות של הגזע של כל אחד מהזנים נמדד אורך הגזע של כל אחד מהעצים בתחילת העונה (1.5.00) ובסוף השנה (15.11.00). התוצאות המובאות בטבלה 1 מציגות את ממוצע ההפרש בין האורך והקוטר של הגזע בין שני המועדים וסך אורך הכתם (כיב) שנוצר בגזע. התוצאות מראות בבירור כי הגידול בזן ספדוצינה היה נמרץ יותר בהשוואה לספדונה, כפי שזה בא לידי ביטוי בהתארכות הגזע. הגידול בקוטר הגזע היה גבוה יותר בזן ספדונה. ממוצע אורך הכתם (כיב) של מחלת החרכון שנוצר בעקבות אילוח העצים היה גבוה יותר באופן משמעותי בגזע של עצי ספדוצינה, בהשוואה לעצי ספדונה. תוצאות אלו מעידות על הקשר בין ההתפתחות הנמרצת יותר של הזן ספדוצינה ואורך הכתם הנוצר על הגזע בעקבות הדבקה.

טבלה 1. הקשר בין התארכות הגזע ואורך הכתם (הכיב) הנוצר בכל אחד מהזנים

הזן	הפרש אורך, ס"מ	הפרש קוטר, ס"מ	אורך כתם, ס"מ
ספדוצינה	13.4 א	0.06 ב	86.3 א
ספדונה	3.8 ב	0.3 א	42.8 ב

המספרים בתוך העמודות (בין הזנים) המלווים באותיות שונות מובהקים באופן סטטיסטי ($P=0.05$)

התוצאות המובאות בטבלה 2 מראות ניתוח באופן דומה של התוצאות על הענפים הצדדיים. במקרה זה לא נמצאו הבדלים משמעותיים באורך הכתמים בין שני הזנים, על אף שבענף אנכי אורך הכתם בזן ספדוצינה היה גבוה במקצת (לא מובהק באופן סטטיסטי) מאשר בזן ספדונה. כמו כן ברוב המקרים לא נמצאו הבדלים באורך הענף (פרט למקרה אחד) או בקוטר הענפים.

טבלה 2. הקשר בין התארכות הענפים ואורך הכתם (הכיב) הנוצר בכל אחד מהזנים

	ענף אנכי		ענף אופקי	
	ספדוצינה	ספדונה	ספדוצינה	ספדונה
הפרש אורך, ס"מ	18.8 א	26.2 א	0.0 ב	19.4 א
הפרש קוטר, ס"מ	0.01 א	0.08 א	0.08 א	0.02 א
אורך כתם, ס"מ	33.3 א	21.4 א	24.4 א	20.7 א

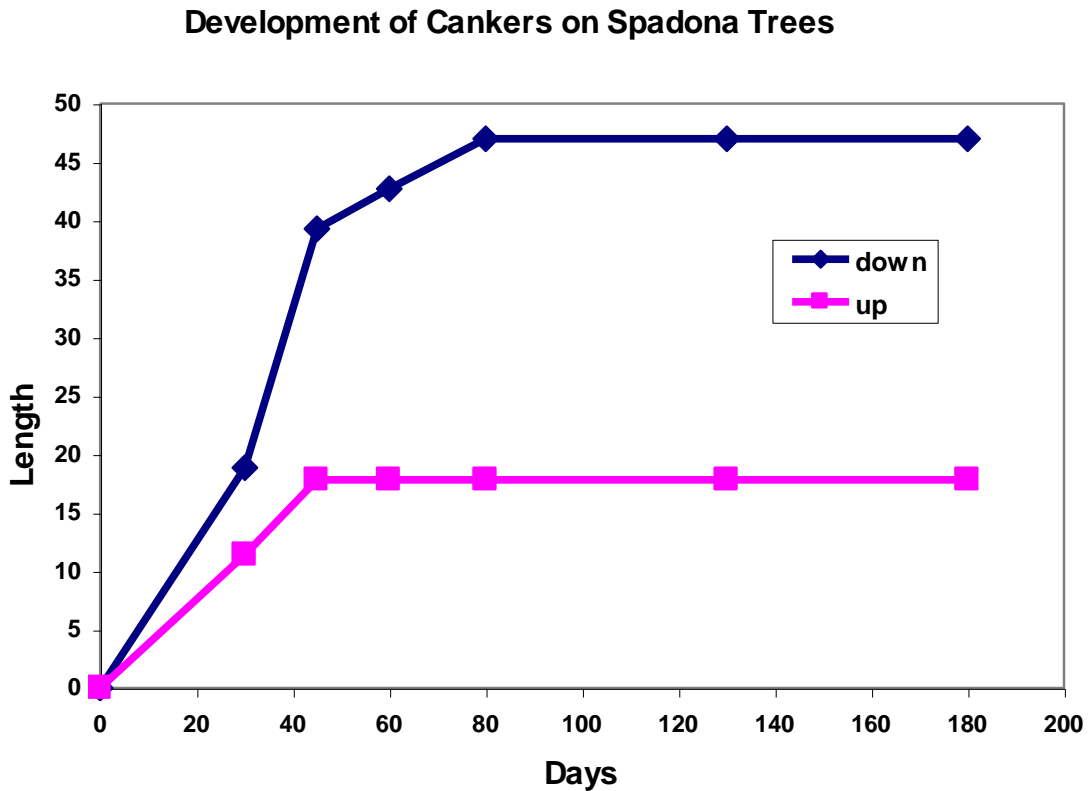
המספרים בתוך השורות עבור כל ענף אנכי או אופקי (השוואה בין הזנים), המלווים באותיות שונות מובהקים באופן סטטיסטי ($P=0.05$)

מסקנות:

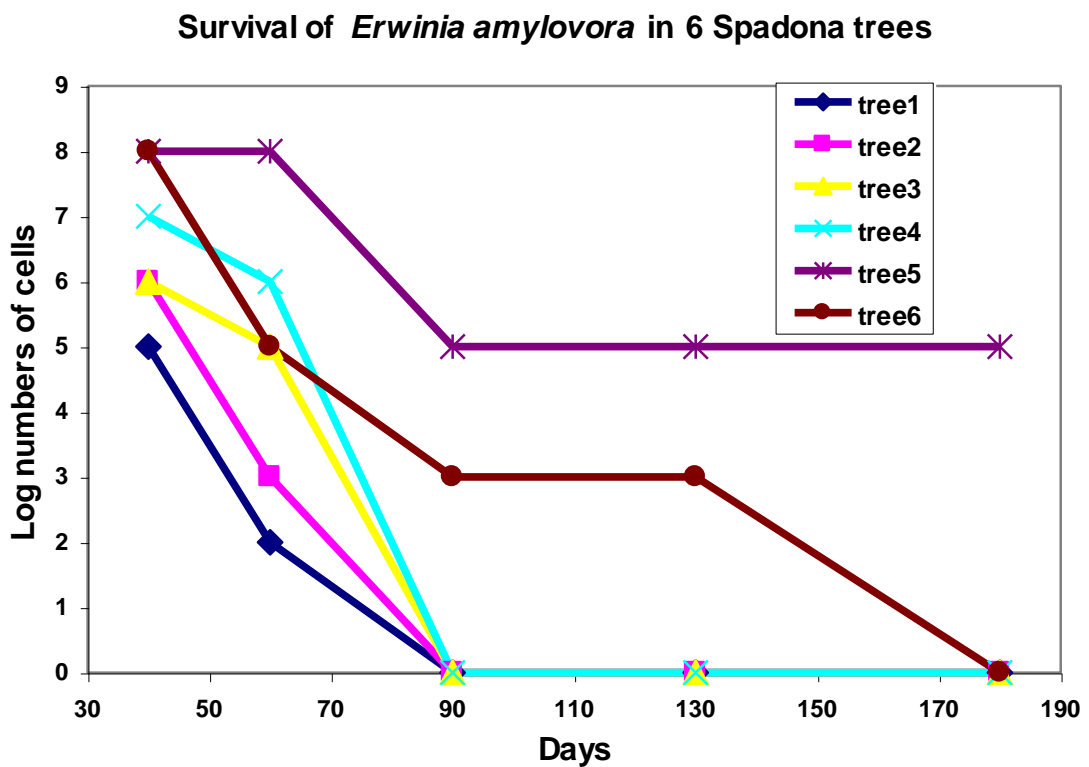
תוצאות המחקר שהתקבלו בשנה הנוכחית מחזקות את הממצאים שהתקבלו בשנה שעברה.

1. לא בכל המקרים שבהם יש הדבקה של הצימוח הצעיר מתפתח בעקבות זאת כיב על הגזע. קצב התפשטות החידק בעצי אגס מזן ספדוצ'ינה היה גבוה יותר מאשר בעצים מזן ספדונה שגודלו באבני איתן, עובדה הקשורה כנראה להתפתחות וגטיבית נמרצת יותר של זן זה, כפי שזה בא לידי ביטוי בהתארכות הגזע במהלך השנה.
 2. התפשטות החידק בגזע בן ארבע (בשני הזנים באבני איתן) היתה דומה או גבוהה יותר מאשר בענפים צדדיים.
 3. התפשטות החידק בעצים שגודלו באבני איתן כלפי חלקים עליונים של הצמח היתה גבוהה יותר מהתפשטותו כלפי איזור תחתון של העץ. התוצאות בעצים שגודלו במרכז וולקני הראו מגמה הפוכה.
 4. התפשטות החידק תלויה, כנראה גם בטמפרטורה (עונות השנה) ולא רק בשלב הפנולוגי וגיל העץ. כך נמצא כי ההתפשטות בעצים שגודלו באבני איתן היתה נמרצת באביב, אך נחלשה במהלך הקיץ והסתיו. בשנת 1999 נמצאה עליה מחודשת בסתיו. בעצים שגודלו במרכז וולקני, חלה ירידה משמעותית ברמת החידק ברקמות ועצירה בקצב התפשטותו במהלך הקיץ והסתיו.
 5. רמת נוכחות החידקים ברקמות היתה גבוהה בתחילת העונה אך ירדה באופן משמעותי בהמשך העונה בקיץ ובסתיו. לא ניתן לגלות את החיידקים במרחקים העולים על 5 ו-10 ס"מ מקצוות הכיב.
- התוצאות שהתקבלו בעצים בבית הרשת מחזקות את אלו שהתקבלו בשנים שעברו ומצביעות על כך שבחודשי האביב מרס-מאי במרכז וולקני ובאפריל-יולי ברמת הגולן יש התפשטות מהירה של החיידקים בגזע ושבעקבותיה מתפתח כיב. לאחר מכן יש האטה משמעותית או עצירה בהתפשטות החיידקים ובהתפתחות הכיב עד לסתיו. לשאלה מדוע בעצים מסויימים מתפתח כיב ובאחרים לא, עדיין אין מענה והיא קשורה אולי בתהליכים פסיולוגיים הקשורים בעץ.

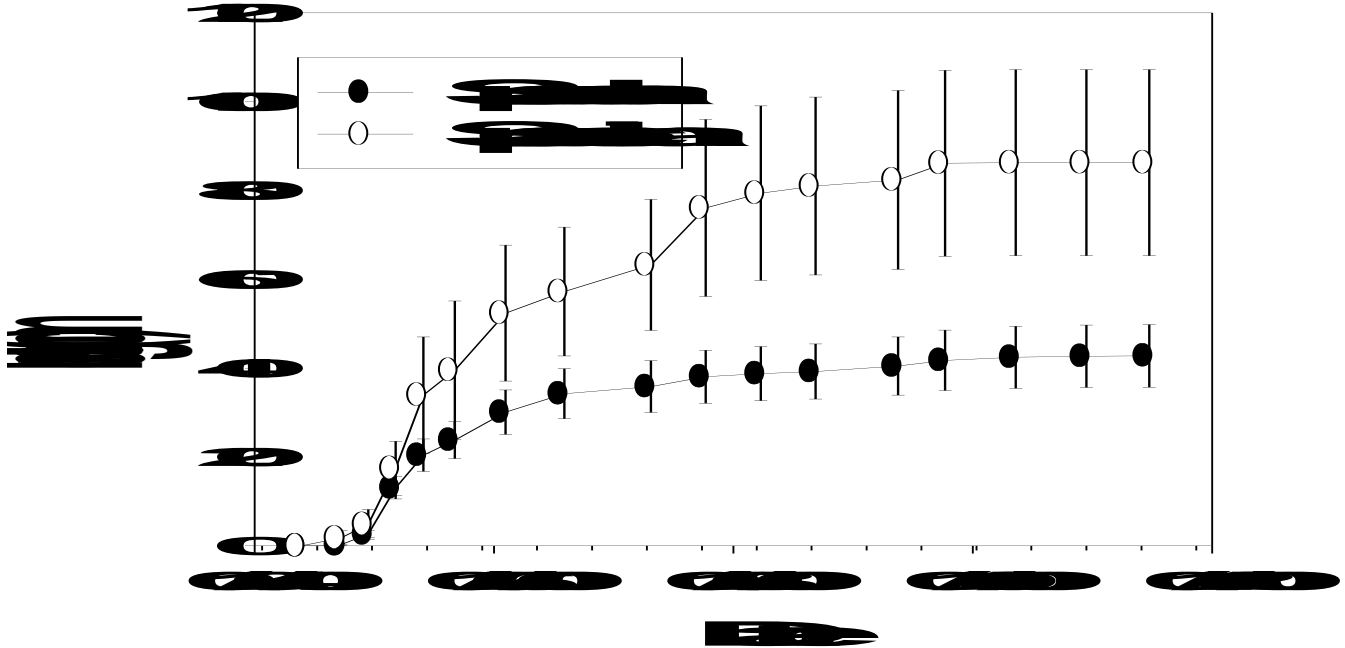
איור 1. התפתחות כיבים והתפשטותם בעצי ספדונה בגזע מרכזי כלפי מעלה או כלפי מטה (מרכז וולקני, 2000).



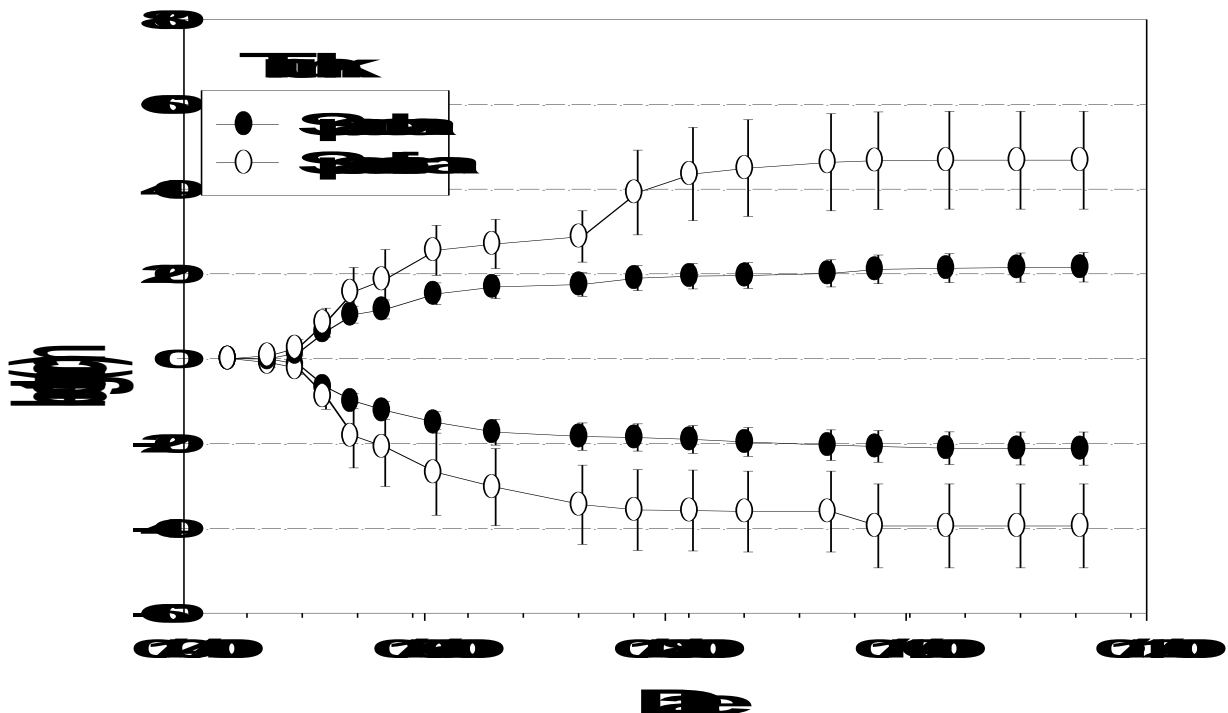
איור 2. הישרדות חיידקים בדגימות שנלקחו מגזעים של עצי ספדונה (מרכז וולקני, 2000).



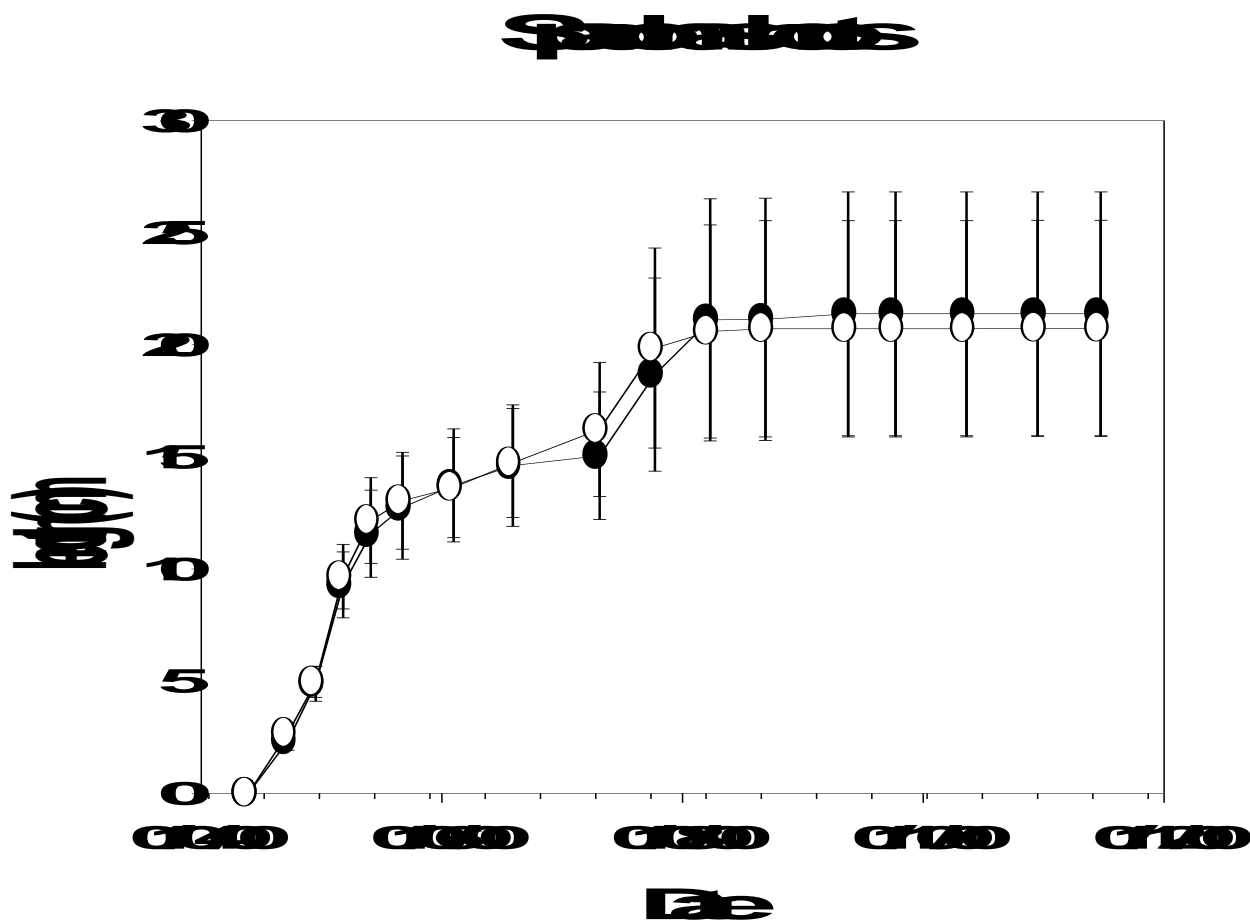
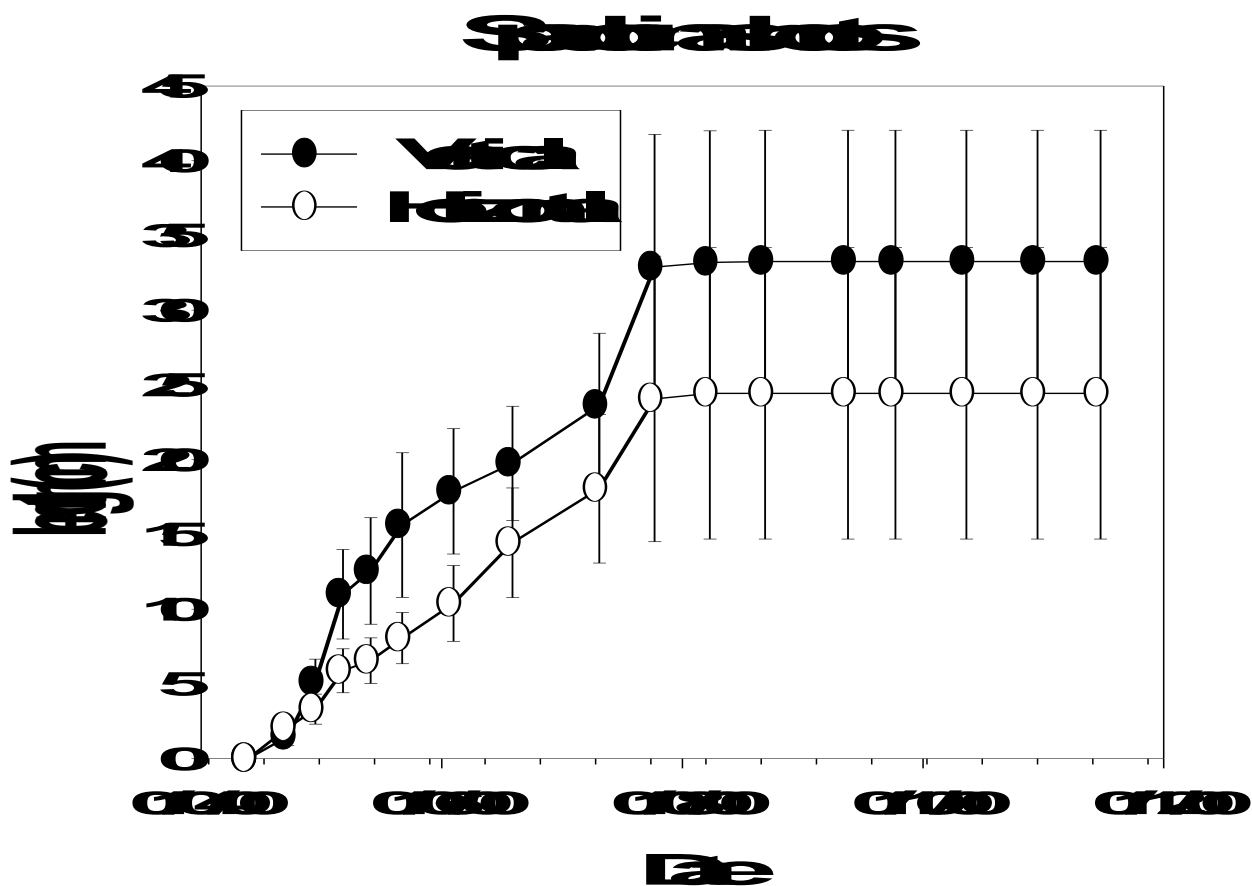
איור 3. קצב התפשטות החרכון בגזע מרכזי של עצי אגס בזנים ספדונה וספדוצינה (אבני איתן 2000).



איור 4. קצב התפשטות החידק כלפי מטה או כלפי מעלה בגזע של עצי אגס ספדונה וספדוצינה (אבני איתן 2000).

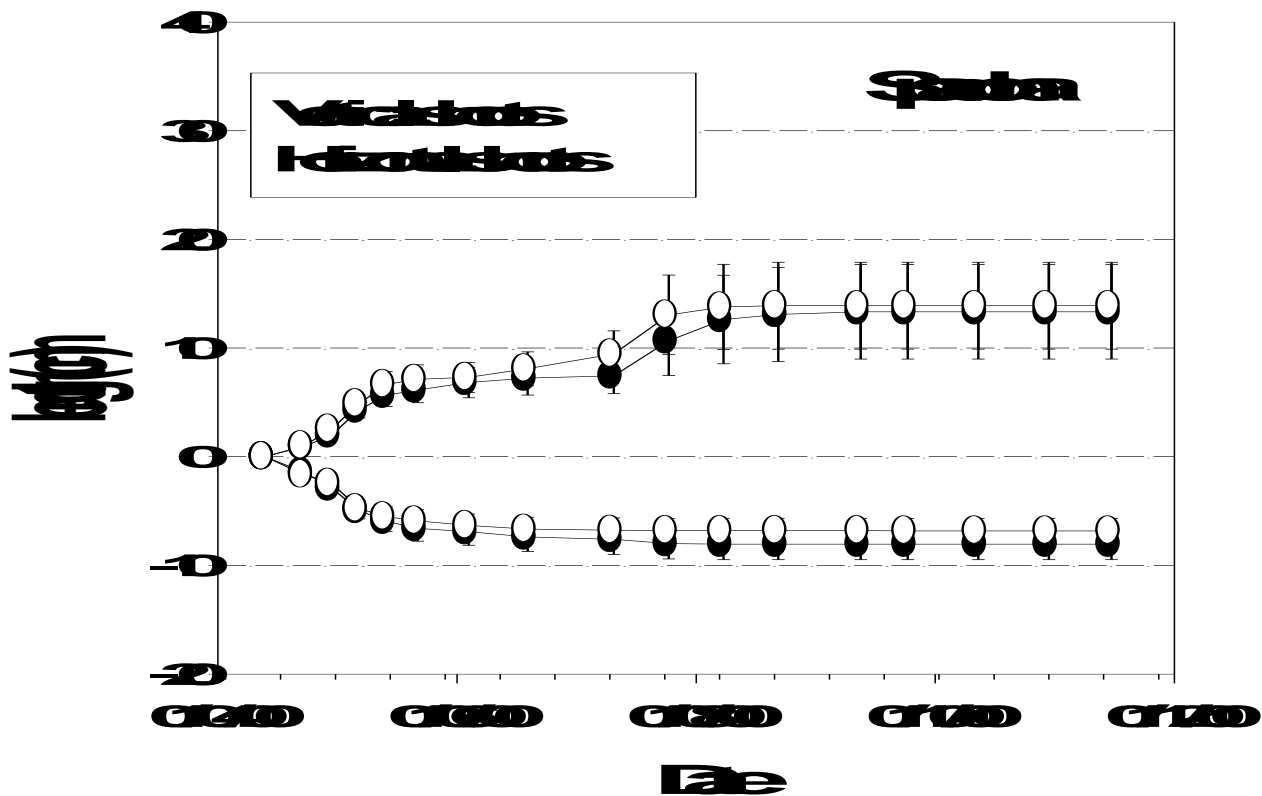
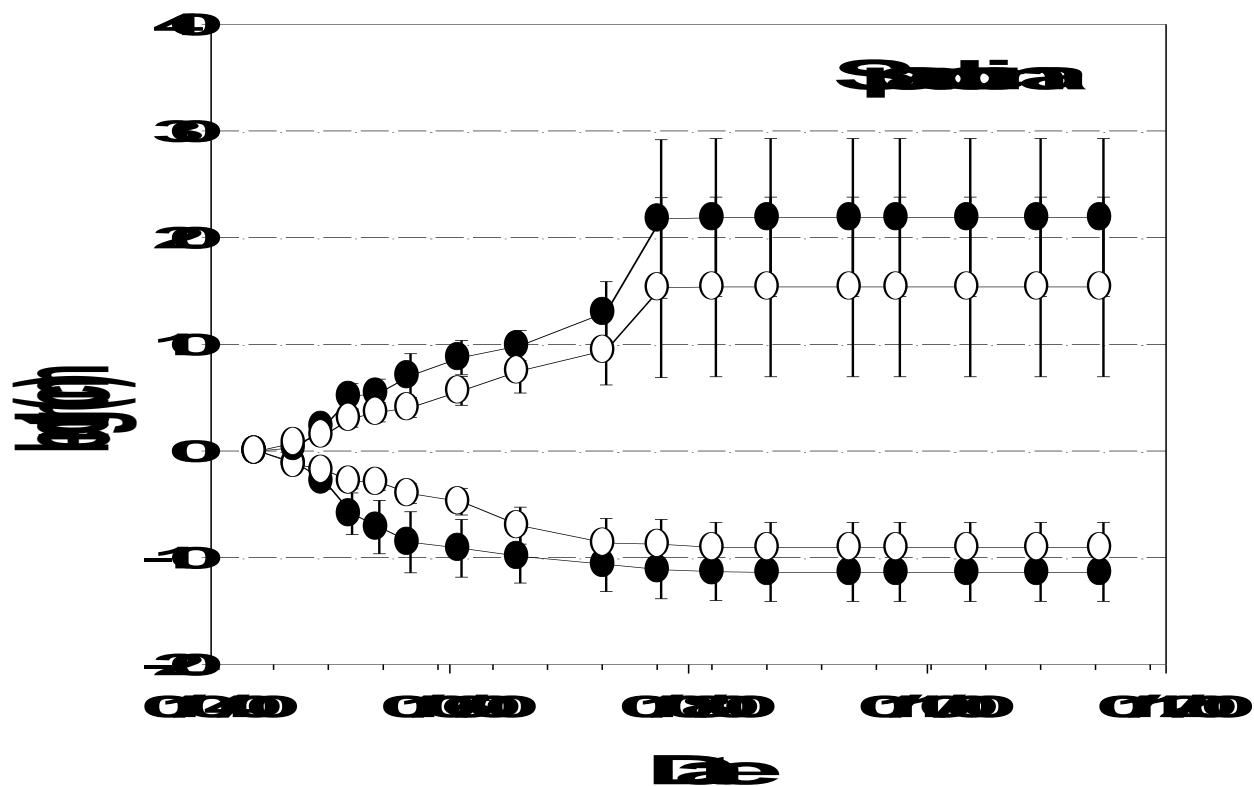


איור 5. קצב התפשטות החידק בשני ענפים צדדיים (אופקי ואנכי) בשני הזנים (אבני איתן 2000).



איור 6. קצב התפשטות החירכון כלפי מעלה או כלפי מטה בענפים צדדיים (אופקי ואנכי) בשני הזנים (אבני איתן 2000).

התפשטות החירכון



איור 7. רמת נוכחות חיידקי *E. amylovora* בדגימות צמחיות שנלקחו מעצי ספדונה

וספדוצינה בנקודות גבול הכתם הנראה על הגזע וענפים צדדיים

(אבני איתן 2000).

