

פיתוח כלי דיאגנוסטי לזיהוי
Colletotrichum gloeosporioides
בשתילי לימוניות

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך למדעי החקלאות"

על-ידי

יפעת אברהם

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

ד"ר סטנלי פרימן

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים,
מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן

ופרופ' אדוארד יורקביץ'

המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה,
הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה,
האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות

הבעת תודה

אלפי תודות לשני המנחים היקרים שלי, ד"ר סטנלי פרימן ופרופ' אדוארד יורקביץ', שתמיד היו נכונים לענות על שאלותיי, לעזור לי למצוא כיוונים חדשים במחקר ולעזור לי לפתור בעיות שהתעוררו, ובעיקר – תמכו בי והעניקו לי יחס חם לאורך כל הדרך.

לצוות במו"פ ערבה, ספיר: ד"ר שמעון פיבוניה, רחל לויטה ויעל בר לבן, אשר היו אחראים לצמחי הלימוניום שנשתלו בשדה, סיפקו לי ברצון ובשמחה דגימות לצורך הבדיקות השונות ועזרו לי בכל דרך אפשרית. תודה על שיתוף הפעולה והעזרה.

לחברי המעבדה בעבר ובהווה: לאאידה צויבל ולמרסל מימון על עזרה שלא תסולא בפז בכל הקשור להעמדת הניסויים ולימוד שיטות ניסוי ומחקר, ולסטודנטים אפרת גמליאל-אטינסקי, יוליה דניסוב, מיכל שרון, והראל דן, על מענה על שאלותיי ותמיכה נפשית. תודה מיוחדת לתומר גרשון, שעזר לי רבות בתחום ה-real time PCR. תודה על שהפכתם את סביבת העבודה למהנה, ידידותית ונינוחה.

לסיגל הורוביץ בראון ולאיתי מיארה על העזרה הרבה בהבנת ולימוד תחום ה-real time PCR ובתכנון תחלים.

לפרופסור דני שטיינברג, על עזרה בהצגת הנתונים ובניתוחם הסטטיסטי.

לנציגי דנציגר - משק פרחים "דן", מושב משמר השבעה: אוהד גולדברג, אלעד שמואלי ואלי שחורי, אשר ענו לי על אינספור שאלות בנושא הלימוניום ונתנו לי תמיכה טכנית רבה. תודה מיוחדת על שתילי הלימוניום שסופקו לי לצורך הניסויים השונים.

לחברי המחלקה לפתולוגיה, על סביבת העבודה הנעימה והנכונות לענות על כל שאלה.

לעופר פלג, על שהקדיש מזמנו כדי לתכנן תחלים מתאימים לעבודה זו.

למדען הראשי של משרד החקלאות, על מימון המחקר.

ותודה מעומק הלב למשפחתי היקרה, ולבעלי האהוב אסף – על תמיכה, הבנה ועידוד.

תוכן עניינים

1	תקציר ומטרות
3	רשימת קיצורים
4	1. סקירת ספרות
4	1.1. גידול הלימוניום
5	1.2. הסוג <i>Colletotrichum</i> והמין <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
7	1.3. מחלת האנתרקנוז הנגרמת על-ידי <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> בלימוניום
8	1.4. ספציפיות ה- <i>Colletotrichum</i>
9	1.5. הדברת ה- <i>Colletotrichum</i>
10	1.6. אפיון ודיאגנוסטיקה של <i>Colletotrichum</i>
10	1.6.1. חשיבות אפיון וזיהוי גורם המחלה
11	1.6.2. זיהוי DNA בשיטת PCR
11	1.6.3. זיהוי וכימות DNA בשיטת QRT-PCR
11	1.6.4. ספציפיות התחלים
12	1.6.5. סף זיהוי ורגישות המערכת
13	1.6.6. נרמול נוכחות הפטריה
13	1.6.7. קביעת מספר עותקי הגן הנבדק של הפטריה
14	2. שיטות וחומרים
14	2.1. חומר ביולוגי
14	2.1.1. זני צמחים
14	2.1.2. תבדידי <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (C.g.)
14	2.1.3. דגימות DNA
15	2.1.4. פלסמידים
15	2.2. מצעי מזון, הרכבם ושימושיהם
15	2.3. תנאי גידול פטריה
16	2.4. תנאי גידול צמחים בחממה
16	2.5. מידבק <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
16	2.6. ניסוי תאי ספירה
16	2.7. אילוח צמחים
17	2.8. נוכחות גורם המחלה בצמחים
17	2.8.1. שיטה ויזואלית לקביעת נוכחות גורם המחלה

18	2.8.2. שיטת אכלוס לקביעת נוכחות גורם המחלה
19	2.8.3. שיטה מולקולרית לקביעת נוכחות גורם המחלה
19	2.9. ניסויי שדה
20	2.10. הפקת DNA מצמחים
21	2.11. ניקיון DNA בשיטת פנול-כלורופורם
21	2.12. הפקת DNA מפטריות
21	2.13. ליגציה וטרנספורמציה
22	2.14. הפקת פלסמידים מחיידקים
22	2.15. עיצוב תחלים
23	2.16. PCR רגיל
23	2.16.1. מרכיבי תערובת הריאקציה
23	2.16.2. תנאי הריאקציה
23	2.16.3. בדיקת תוצרי PCR
24	2.16.4. PCR ישיר מחיידקים
24	2.17. Quantitative-real-time PCR (QRT-PCR)
24	2.17.1. מרכיבי תערובת הריאקציה
24	2.17.2. תנאי הריאקציה
24	2.17.3. אנליזת ריאקצית QRT-PCR
25	2.17.4. יצירת גרפי כיוול
25	2.17.5. הצגת גרפי כיוול
25	2.17.6. הרצת דוגמאות/ניסויים
26	3. תוצאות
26	3.1. הכרה ואפיון המחלה והתסמינים באמצעות אילוח מלאכותי של שתילי לימוניום
26	3.1.1. השוואה בין תבדידים שונים של C.g.
26	3.1.1.1. ניסוי תאי ספירה
27	3.1.1.2. בחירת תבדידי הפטריה ושיטת האילוח לשימוש בעבודה
28	3.1.1.3. השוואה בין תבדידים שבודדו מחדש לאחר ביצוע מבחן קוך
29	3.1.2. השוואת ריכוזי אילוח שונים
29	3.1.2.1. חומרת מחלה הנגרמת על-ידי תבדיד מספר 28
30	3.1.2.2. אכלוס איברים שונים בצמח על-ידי תבדיד מספר 28
31	3.1.2.3. חומרת מחלה הנגרמת על-ידי תבדיד מספר 48A
32	3.1.2.4. אכלוס איברים שונים בצמח על-ידי תבדיד מספר 48A
33	3.1.3. השוואת זני לימוניום שונים
34	3.1.3.1. השוואת חומרת המחלה של אילוח שני זני לימוניום בתבדיד 48A

34	3.1.3.2. השוואת אכלוס תבדיד 48A באיברי צמח שונים בשני זני לימוניום
35	3.1.4. ניסויי שדה: השוואת ריכוזי אילוח שונים, זני לימוניום שונים וקיום טיפולי הדברה
35	3.1.4.1. אכלוס צמחים על-ידי הפתוגן
37	3.1.4.2. תמותת צמחים
39	3.2. זיהוי מולקולרי של C.g.
39	3.2.1. זיהוי גן ITS של C.g. באמצעות PCR רגיל
39	3.2.1.1. זיהוי DNA גנומי של הפטריה
39	3.2.1.2. זיהוי C.g. בצמחים מאולחים
40	3.2.2. זיהוי C.g. באמצעות QRT-PCR
40	3.2.2.1. כיולים עבור שני הרצפים ITS ו-TUB I
40	3.2.2.1.1. DNA גנומי של הפטריה מהול במים
40	3.2.2.1.2. DNA גנומי של הפטריה מהול ב-DNA צמחי
41	3.2.2.1.3. פלסמידים המכילים עותק יחיד של הגן
42	3.2.2.2. זיהוי גן הפטריה ב-QRT-PCR בתבדידי C.g. שונים
42	3.2.2.3. ספציפיות התחלים ל-QRT-PCR בתבדידי פטריות שונות
43	3.2.2.4. יישום הכלי שפותח על צמחים מאולחים
43	3.2.2.4.1. השוואת ריכוזי אילוח שונים
43	3.2.2.4.2. השוואת זני לימוניום שונים
44	3.2.2.4.3. ניסויי שדה
45	3.2.3. זיהוי גן 18S rRNA של לימוניום באמצעות QRT-PCR
45	3.2.3.1. כיולים עבור גן 18S rRNA צמחי
45	3.2.3.1.1. DNA גנומי של לימוניום
45	3.2.3.1.2. פלסמידים המכילים עותק יחיד של הגן
46	3.2.3.2. זיהוי גן 18S rRNA בדגימות צמחים מאולחים
47	4. דיון
47	4.1. בחירת תבדידי הפטריה אשר שימשו לעבודה
48	4.2. בחירת שיטת האילוח אשר שימשה לעבודה
48	4.3. זיהוי C.g. באמצעות PCR רגיל
49	4.4. כיולים שונים ל-QRT-PCR
52	4.5. השוואת ריכוזי אילוח שונים
54	4.6. השוואת זני לימוניום שונים
56	4.7. ניסויי שדה
60	רשימת ספרות
I	Abstract

תקציר

הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides* הינה פתוגנית לצמחים הפוגעת גם בצמחי לימוניות חד-או רב-שנתיים ממשפחת העופרתיים Plumbaginaceae. לימוניות הינו גידול רב שנתי מרכזי באזור הערבה, המרובה על-ידי תרביות רקמה ומיועד לייצוא פרחי נוי. הנזק הכלכלי הנגרם לחקלאי הוא גדול וכולל גם את עלויות החלפת השתילים היקרים, הטיפול בהם ואובדן הפרחים העתידיים.

זני לימוניות הרגישים לפטרייה נדבקים במהלך החורף באופן סמוי ומתמוטטים כאשר הטמפרטורות עולות בעונת הקיץ והסתיו (יוני-אוקטובר), תופעה שהחלה בשנת 1995. הצמחים עלולים להגיע נגועים מהמשתלה או להידבק מצמחים חולים – ההדבקה מתבצעת דרך כלים חקלאיים במהלך הקטיף והגזיזום או דרך מערכת ההשקיה, על-ידי הסעת נבגי הפטרייה. בתנאי לחות מתאימים, גורם המחלה נמצא בכל חלקי הצמח – צוואר השורש, עלווה, גבעולים ועמודי הפריחה.

אבחון המחלה נעשה בשיטות קלאסיות לא מדויקות המתבססות על בידוד הפתוגן ואפיון גודל וצורת הנבגים וקצב גידול המושבה. שיטות מולקולריות המבוססות על תחלים ספציפיים לפתוגן, כמו PCR, מאפשרות דיוק רב יותר בזיהוי גורם המחלה. ה-PCR הכמותי, (QRT-) quantitative real-time PCR, רגיש יותר מ-PCR רגיל ומבוסס על זיהוי ההגברה של המקטע ספציפי לכל אורך הריאקציה, ומדידת הקינטיקה שלה. שיטה זו מאפשרת את זיהוי נוכחות הפתוגן בצמח בשלבי הדבקה מוקדמים.

שיטה זו הינה בעלת יכולת לכמת את מידת ההדבקה וכתוצאה לאפשר השוואה בין צמחים שונים. בעבודה זו השתמשנו בשני תבדידים של הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides*, תבדיד מספר 28 ותבדיד מספר 48A. תבדידים אלו, שמקורם מצמחי לימוניות נגועים במחלה, נבחרו בשל אחוז נביטת הנבגים הגבוה שלהם ועוצמת המחלה הגבוהה שחוללו בצמחים מאולחים, ביחס לשאר התבדידים שנבדקו. התברר שעלייה בריכוז הנבגים גורמת לעיכוב באחוז נביטתם. בניסויים מקדימים נבדקו שתי שיטות אילוח צמחים: ריסוס וטבילה. שיטת הטבילה נבחרה להמשך העבודה, מאחר שגרמה להופעת תסמיני מחלה מוקדם יותר ובעוצמה גבוהה יותר.

נבדקה תגובת שני זנים של לימוניות, 'סופרים' (שפותח בקליפורניה) ו-'ספורה' (שפותח בישראל), לפטרייה על-ידי: א. הערכה ויזואלית של חומרת התסמינים בעלים ותמותת שתילים; ב. בידוד הפתוגן מחלקי צמח שונים על מצע חצי בררני לפתוגן. בנוסף, DNA הופק מצמחים חולים ונבחנה עדות לנוכחות הפתוגן בשיטת QRT-PCR באמצעות תחלים ספציפיים לחלק המשתנה של רצף ITS ושל גן β -tubulin (TUB1) של הפטרייה.

צמחים משני הזנים אולחו בניסויי חממה על-ידי טבילתם בריכוזים שונים של תרחיף נבגים (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , ו- 10^7 נבגים למ"ל). בדיקת אחוז אכלוס של חלקי צמח שונים הראתה כי חלקי הצמח העל-קרקעיים מאוכלסים יותר מחלקי התת-קרקעיים, דבר שעשוי לתמוך בכך שמקור הפתוגן בצמח הוא אכן באילוח הנוף. נמצא שבריכוז גבוה יותר של תרחיף נבגים המחלה מופיעה בעוצמה רבה יותר. בנוסף, התגלה כי זן 'ספורה' סביל יותר לפתוגן. בצמחים שאולחו בחממה ולאחר חודש נשתלו בשדה, התסמינים שהופיעו על העלים בשלבים המוקדמים נעלמו עם הזמן והתגלה קושי לבודד את הפתוגן מהצמחים. בקרב צמחים מזן 'סופרים', אך לא מזן 'ספורה', התרחשה תמותה של עד כ-80% מהצמחים לאחר מספר

חודשים מהאילוח. התמותה התרחשה גם בצמחי ה-'סופרים' מקבוצת ביקורת המים, דבר שעשוי לרמוז על אילוחם דרך השורשים או מערכת ההשקיה, לאחר שתילתם בשדה, או על כך שהגיעו חולים לניסוי. ריאקציות PCR רגיל אפשרו זיהוי של DNA פטרייתי בנוכחות ובהיעדר DNA צמחי. עם זאת, התגלה קושי בזיהוי DNA פטרייתי בתוך צמחי לימוניום מאולחים. כיוולי ריאקציות QRT-PCR נעשו בהצלחה על רצפים ITS ו-TUB I של הפטריה, ועל רצף 18S של לימוניום. לצורך זיהוי הפטריה בצמחים חולים בריאקצית QRT-PCR נבחרו התחלים המזהים את גן TUB I מאחר שערכי הריאקציה שלהם היו קרובים יותר לערכים האידיאליים כאשר נבדק DNA פטרייתי בנוכחות DNA צמחי. זאת אף-על-פי שזיהוי גן TUB I נעשה במחזור מאוחר יותר מאשר זיהוי רצף ITS עבור אותה דוגמת DNA פטרייתי. ריאקציות QRT-PCR אפשרו זיהוי איכותי, אך לא כמותי, של הפתוגן ב-DNA בצמחים מניסויי החממה והשדה, בשלבי הדבקה מוקדמים – כבר יום אחד לאחר האילוח. עם זאת, ככל שמועד הדגימה מתרחק מרגע האילוח, יותר דגימות של צמחים שאולחו מזוהות כמאוכלסות על-ידי הפטריה. זיהוי הפטריה בצמח בשיטת QRT-PCR יכול לשמש בעתיד ככלי חשוב לאבחון מוקדם יותר של המחלה במשתלה.

מטרות המחקר

פיתוח כלי מולקולרי באמצעות quantitative real time PCR לזיהוי הפטריה *Colletotrichum gloeosporioides* בצמחי לימוניום מזנים שונים.

מטרות במהלך העבודה:

- אפיון המחלה והתסמינים באמצעות אילוח שתילי לימוניום מזנים שונים ('סופרים' ו-'ספורה');
- מציאת שיטה לזיהוי רצפים ספציפיים לפטריה הפתוגנית באמצעות PCR רגיל ו- quantitative real time PCR (QRT-PCR);
- מציאת שיטה להערכת איכות ההפקה וכיולה באמצעות quantitative real time PCR על-ידי שימוש ברצפים ספציפיים לפטריה ולצמח.

רשימת קיצורים

מ"ל מיליליטר

סל"ד סיבובים לדקה

AUDPC	Area Under Disease Plot Curve
C.g.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Ct	Cycle threshold
g	gram
ITS	internal transcribed spacer
l	liter
LSD	Least Significant Difference
mg	milligram
min	minutes
ml	milliliter
μl	microliter
mm	millimeter
mm ²	square millimeter
ng	nanogram
ntc	no template control
<i>P</i>	מובהקות
pg	picogram
R ²	R square
QRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
Tm	melting temperature
TUB	β-tubulin gene
°C	Celsius degree
v/v	% volume in volume

1. סקירת ספרות

1.1. גידול הלימוניום

הלימוניום (*Limonium*, מכונה גם *Stalice*, *Sea Lavender*, *March-Rosemary*) הוא גידול חד- או רב-שנתי ממשפחת העופרתיים (*Plumbaginaceae*) שמקורו מחצי כדור הארץ הצפוני, והוא כולל מינים בעלי פריחה במגוון צבעים. בארץ הלימוניום מיועד בעיקר לייצוא והוא גדל בעיקר בערבה התיכונה, שם הוא מהווה כיום כ-10% מסך שטח גידול הפרחים, כ-200 דונם המתחלקים בין המושבים עין יהב, חצבה, פארן ועידן, נכון ל-2007-2008. לפני כעשור שטחי גידול הלימוניום בערבה הגיעו לשיא של כ-670 דונם (<http://yair.arava.co.il>; <http://www.fbi.org.il>). הלימוניום גדל בהיקף נמוך יותר גם באזור השרון, בקעת הירדן ועמק חפר, ובעבר גידלו לימוניום גם בקיבוץ נירים בנגב (בר לבן וחובריה, 2003; דיווח אישי, אוהד גולדברג, דנציגר - משק פרחים "דן"). שטחי הגידול הצטמצמו באופן ניכר כתוצאה מהופעת גורם המחלה *Colletotrichum gloeosporioides*, ובנוסף כתוצאה מהופעת גורמי מחלה אחרים כגון פיטופלסמה (Gera et al., 2006) ובעיות כוח אדם.

לאזור הערבה מאפייני אקלים ייחודיים המקנים יתרון לגידול הלימוניום, שהוא צמח חסין יחסית לתנאי סביבה קיצוניים (חום, מליחות) הניתן לגידול במשך שנים רבות: טמפרטורה גבוהה והפרשי טמפרטורה גדולים בין יום ללילה, קרינה גבוהה ויובש. מאפיינים אלו מאפשרים פריחה מוקדמת יותר, איכות פריחה ויבולים טובים יותר, וכתוצאה הופכים את אזור הערבה למתאים במיוחד לגידול הלימוניום (<http://www.fbi.org.il>). מקור הריבוי של השתילים החדשים הוא בתרביות רקמה המיוצרות בחו"ל (יפן, ארה"ב, טיוואן, אוסטרליה, הולנד והודו). שיטת ריבוי זו מאפשרת קבלת חומר צמחי אחיד, נוח לשתילה ובעל און צימוח רב. לארץ מגיעים צמחונים עם שורשונים למשתלות הייבוא (דנציגר ומבחור), שם הם עוברים שלב השרשה בערפול ושלב הקשחה, שבו מדשנים את הצמחים כדי שיגדלו עוד עלים, הנמשכים שלושה שבועות כל אחד (דיווח אישי, אוהד גולדברג, דנציגר - משק פרחים "דן"). בסוף הקיץ הצמחונים נשתלים בשדה, ובתחילת הסתיו (יוני-ספטמבר) במבנה, במנהרות או בשטחים פתוחים. הפריחה (תמונה 1) מתרחשת לאורך כל השנה בהתאם לטמפרטורת הסביבה, עוצמת האור, הטיפולים בג'יברלין והגיזומים, כאשר הקטיפה העיקרית נעשה בעיקר בחורף ב-2-3 גלי פריחה. הפרחים נראים אז במיטבם ומשיגים את מדיר הייבוא הנדרש (אוהד גולדברג, דנציגר - משק פרחים "דן").



תמונה 1: *Limonium safora*: Safora® Dark Blue. מקור: www.danziger.co.il

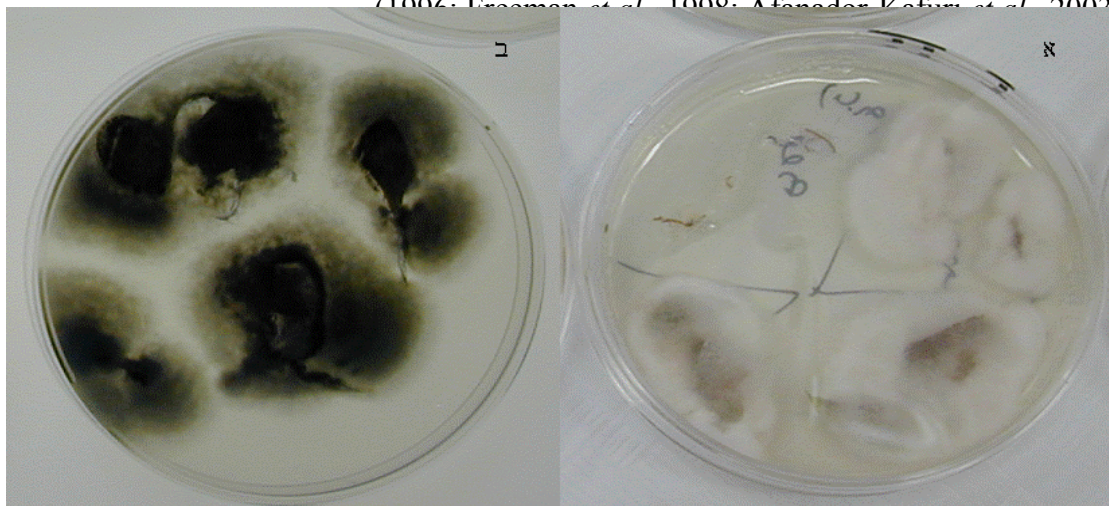
קבוצות צמחי הלימוניום המסחריים הגדלים בארץ מתחלקת לזנים הבאים: 1) **Altaica**: Safora ו-1, Main Blue (2) **Sinuatum** (עדעד): Sinuet ו-1 Million, 3) **Sinensis**: Sensy, 4) קבוצת **Hybrid** (מכלוא): Supreme, Misty, Beltlard ו-1 Emilly, 5) China ו-1 Diamond. הזנים העיקריים הם 'בלטלארד' ו-'אמילי' (<http://yair.arava.co.il>); דיווח אישי, אוהד גולדברג, דנציגר - משק פרחים "דן").

1.2. הסוג *Colletotrichum* והמין *Colletotrichum gloeosporioides*

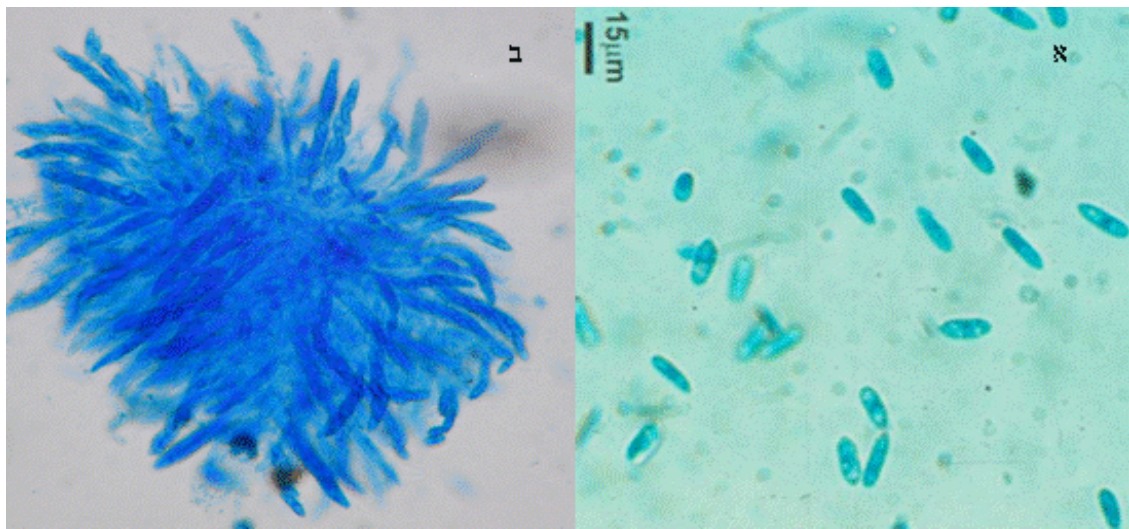
Colletotrichum היא סוג פטרייה פתוגנית לצמחים, מהחשובות בעולם (בעיקר באזורים טרופיים וסובטרופיים), היכולה לגרום להדבקה סמויה או גלויה. המינים בסוג זה גורמים למחלות קשות בעשבים, דגניים, ירקות וגידולים רב שנתיים. כל חלקי הצמח, העל- והתת-קרקעיים, וכל שלבי הגידול עלולים להיפגע - החל מזרע, דרך שתיל ועד לשלב הבוגר, בגידול הוגטיבי, בפרחים ובחנטים ובתוצרת לאחר הקטיפה. בכך נגרמת בעיה כלכלית משמעותית. המחלה מתבטאת ככתמי אנתרקנוז – נקרוזות שחורות מעוגלות/מצולעות ובהן מסות בעלות פיגמנט כתום-ורוד המכילות את הנבגים. הסוג *Colletotrichum* הוא מהנלמדים בעולם ומשמש כמערכת מודל למחקר בתהליכי הדבקה, ייצור פיטואלקסינים, מנגנוני עמידות, ביוכימיה וביולוגיה מולקולרית של תהליך הפתוגנזה (Bailey and Jeger, 1992). מרבית המינים בסוג הם אפורטוניסטיים ופקולטיביים, והשאר הם בעלי סגנון חיים המי-ביוטרופי: בשלבים הראשוניים של אכלוס המאכסן, הפטרייה היא ביוטרופית ומבססת את עצמה בתאים החיים של המאכסן. מאוחר יותר בשלב ההדבקה, כשתאי המאכסן מתים, היא מתנהגת כספרופיט, מתפשטת במהירות בחומר האורגני המת ובכך יוצרת כתמי נקרוזה אופייניים (Waller, 1992). ל-*Colletotrichum* יכולת לשרוד ככרית הדבקה רדומה על פני השטח של המאכסן או בצורה רדומה (לטנטית) בתוך רקמותיו כאשר תנאי הסביבה או פיזיולוגית המאכסן מונעים את התפתחותו. מנגד, כאשר ישנה חפיפה בין תנאי סביבה מתאימים למחלה ושלב התפתחותי נכון בצמח, ההתעוררות היא מהירה ומתאפשרת התפתחות מהירה של המחלה. התפתחות מחלה על גבי הצמח באופן טבעי תלויה בנוכחות מים בכל השלבים שמחוץ למאכסן (Waller, 1992). ההנבגה דורשת לחות גבוהה, שחרור הנבגים והפצתם דורשים מים זורמים, ולצורך נביטה והדבקה דרושות מספר שעות של רטיבות, יחד עם טמפרטורה אופטימלית (20-25°C עבור רוב סוגי ה-*Colletotrichum*) (Cochrane, 1958; Waller, 1992). תופעה ידועה היא שככל שריכוז המידבק גבוה יותר אחוז הנביטה נמוך יותר בגלל נוכחות של מעכבי נביטה עצמיים. התופעה נחשבת כהתאמה אקולוגית המבטיחה הפרדה בזמן ובמקום של תפוצת המין וכהתאמה לפתוגניות (Cochrane, 1958; Lax et al., 1985; Fernando et al., 2000). סיווג המינים מבוסס על המורפולוגיה המגוונת בגידול על מצע טבעי ובתרבות, ובעיקר מאפייני הנבגים (שיכולים להיות גליליים אליפטיים או דמויי חרמש), נוכחות נושאי נבגים (הנקראים setae) וקשיונות, וצורת כרית ההדבקה (Bailey and Jeger, 1992). בנוסף, גם טווח המאכסנים, מאפיינים ביוכימיים ומולקולריים מאפשרים סיווג של 38 המינים הידועים לפי Sutton (1992). עם זאת, מראה המושבה בתרבית הוא מגוון והטרוגני ולכן מקשה על הסיווג.

Colletotrichum הינה הצורה האנאמורפית (השלב האל-מיני), השייכת לסדרת ה-Melanconiales בתת מערכת הפטריות הבלתי מושלמות Deuteromycotina (Fungi imperfecti). בשלב האל-מיני הפטריה מתרבה על-ידי יצירת גופי פרי שטוחים וקעורים בשם acervuli המכילים חומר רירי ובו הנבגים שמופצים בעיקר על-ידי טיפות מים. המין *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.&Sacc. בודד לראשונה ב-1882 מהדרים על-ידי Penzig (Bailey and Jeger, 1992). זהו המין העיקרי הגורם למחלות מבין כל מיני ה-*Colletotrichum* והאלים ביותר (Waller, 1992). מין זה גורם לשני מופעי תסמינים: אנתרקנוז וריקבון צוואר השורש (Engelhard, 1975). התפטר של המין *C. gloeosporioides* הוא אוורירי, בצבע אפרפר עד אפור כהה העשוי להתכהות עם הזמן, שטוח או בעל נפח (תמונה 2). לעיתים רחוקות קיימים נושאי נבגים. אין קשיונות אך קיימים גופי פרי (ascomata) שעשויים להידמות להם. כריות ההדבקה בצבע חום, דמויות אלה, אובליות, לעיתים אונתיות, בגודל $6-20 \times 4-12 \mu\text{m}$. הנבגים נוצרים במסות בצבע ורוד-כתום, ישרים, גליליים, הצלעות מקבילות והקצוות קטומים (truncate). גודלם $12-17 \times 3.5-6 \mu\text{m}$ (תמונה 3א') (Sutton, 1992).

Glomerella הינה הצורה הטלומורפית (השלב המיני), השייכת למשפחת Phyllachoracea, בתת מחלקת Pyrenomycetes, במחלקת Euascomycetes, בתת מערכת Ascomycotina. בשלב המיני, המוכר פחות או שאינו דווח עבור רוב המינים, הפטריה מתרבה על-ידי יצירת גופי פרי מיניים דמויי בקבוק בשם perithecia, המכילים שקים הנקראים ascus, שבכל אחד מהם שמונה נבגי שק הנקראים ascospores (תמונה 3ב') (רותם וחובריו, 1998; Bryson et al., 1992). השלב המיני של המין *C. gloeosporioides* קרוי *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, (1903), ביפן (Kagiwata, 1986) ובישראל (Bar Lavan et al., 2004), ובאופן טבעי בפלורידה (Mertely and Legard, 2004). השלב המיני מגדיל את ההטרוגניות בין אוכלוסיות *C. gloeosporioides* שונות (Nam et al., 1996; Freeman et al., 1998; Afanador Kofuri et al., 2002).



תמונה 2: שני תבדידי *Colletotrichum gloeosporioides* מלימוניום. א. תבדיד מספר 48A. ב. תבדיד מספר 28.



תמונה 3: תבדיד *Colletotrichum gloeosporioides* מלימוניום. א. נבגים אל מיניים. ב. גוף הפרי המיני המכיל אסקוסים ובהם אסקוספורות. צביעה באנילין כחול.

1.3. מחלת האנתרקנוז הנגרמת על-ידי *Colletotrichum gloeosporioides* בלימוניום

מחלת האנתרקנוז בלימוניום הנגרמת על-ידי *C. gloeosporioides* מוכרת מזה זמן רב בעולם. בזן החד שנתי *L. sinuatum* מחלה זו היא בעלת חשיבות כלכלית רבה, בין השאר מאחר שהיא עלולה לגרום לאובדן יבול מוחלט (Engelhard *et al.*, 1972; Engelhard, 1975). ייתכן כי מקורו של גורם המחלה הוא בזרעים (Engelhard, 1975).

ב-1995 הופיעה תמותה של צמחי לימוניום בערבה, שהחלה בחלקות בודדות והתפשטה לשטחים רבים (Pivonia *et al.*, 2000). התמוטטות השטחים גרמה לנזקים כלכליים כבדים כתוצאה מההשקעה המרובה בגידול, איבוד ההכנסות מהתפרחות והצורך להחליף את השתילים, שמחירים גבוהים, כל שנתיים במקום כל עשר שנים: שטח שבו היו 30-40% תמותה הצריך את החלפת כל השתילים שבו.

בארה"ב וקוריאה דווח בעבר כי הפטריה *C. gloeosporioides* פוגעת בעלווה, בגבעולים ובחלקי הפרחים של זני הלימוניום החד שנתיים *L. sinuatum* ו-*L. bonduellii* (Nam *et al.*, 1996; Sobers and Cox, 1973). בצמחים מהערבה בוצע מבחן קוך שאימת כי גורם המחלה הוא *C. gloeosporioides* (Pivonia *et al.*, 2000).

המחלה הפוגעת בשטחי הגידול לרוב מתפתחת בין עונות הגידול בעקבות חום ולחות גבוהים במיוחד בקיץ (דיווח אישי, אוהד גולדברג, דנציגר - משק פרחים "דן"). לעיתים מופיעה תמותה בשיעור נמוך בשתילות חדשות, העשויה להעיד על בעיה אפשרית בעונה הבאה (בר לבן וחובריה, 2003).

הפטריה מאכלסת את צוואר השורש והשורשים של הלימוניום באופן סמוי (לטנטי) במהלך החורף אך בתנאי לחות מתאימים, גורם המחלה נמצא בכל חלקי הצמח – צוואר השורש, עלווה, גבעולים ועמודי הפריחה. ההתמוטטות מתרחשת בצמחים הבוגרים עם עליית הטמפרטורות בקיץ, בעיקר בחודשים יוני-אוקטובר, אך בשלב זה קשה לבודד את גורם המחלה מהצמח. תסמינים אופייניים למחלה בשדה הם גלילת עלים בוגרים כלפי חוץ, התייבשות עלעלי הפרחים, נבילת שושנת עלים צעירה הפורצת לאחר הגיזום ונקרוזה בצוואר השורש (תמונה 4). באזורים בעלי לחות גבוהה מופיעים כיבים על הגבעולים המכילים מסות של נבגים (Pivonia *et al.*, 2000).



תמונה 4: צמחי לימוניום בערבה. א. צמח בריא. ב. תסמינים ראשוניים. ג. תמותת צמחים. מקור: שמעון פיבניה

בעבר דווח כי ייתכנו הבדלים ברמת הרגישות לפתוגן בין זנים שונים (Sobers and Cox, 1973; Engelhard *et al.*, 1972), ואכן חלק מזני הלימוניום הגדלים בארץ נחשבים לרגישים פחות מאחרים למחלה: 'ספורה' ו-'אמילי' (דיווח אישי, אוהד גולדברג, דנציגר - משק פרחים "דן").

בחממה, תמותה של שתילי לימוניום שלא אולחו ומקורם בשלוש משתלות שונות (Pivonia *et al.*, 2000), עשויה להעיד על העברת גורם המחלה מצמחים מאולחים, או על נגיעות התחלתית טרם הגעת השתילים לאתר הניסוי ולשדות החקלאיים. כלומר מקור האילוח של גורם המחלה יכול להיות מהחומר הצמחי מחו"ל או מהמשתלות בארץ. הפטריה יכולה גם לשרוד משנה לשנה בשאריות צמחים בשדה. נבגי הפטריה יכולים לשרוד בקרקע בלחות נמוכה (Freeman *et al.*, 2002b), והמחלה מתפשטת בצמח בלחות מרובה (גשם ומי השקיה) ובטמפרטורה של 15-30°C. במאכסנים אחרים דרך ההפצה המקובלת של נבגי הפטריה היא באמצעות תזת טיפות מים (Waller, 1992). בלימוניום, דרכי ההפצה יכולות להיות מגע בין שורשי הצמחים בשדה, מעבר בצינורות מערכת ההשקיה, ומגע של העובדים וכלי העבודה בתקופת הקטיף והגיוזמים (Maymon *et al.*, 2006).

במקרים מסוימים בצמחי לימוניום מהערבה התגלו גופי פרי מיניים שהכילו אסקוסים ואסקוספורות (Bar Lavan *et al.*, 2004). ייתכן כי לשלב המיני יש חשיבות כלשהי בהישרדות, בהפצה ובפתוגניות הפטריה.

1.4 ספציפיות ה-*Colletotrichum*

בסוג *Colletotrichum* נפוץ למצוא מינים התוקפים מספר מאכסנים כל אחד, או מספר מינים התוקפים מאכסן אחד (Freeman *et al.*, 1998).

מגוון המאכסנים לסוג זה הוא עצום: בפלורידה וברזיל הדריים נתקפים על-ידי *C. gloeosporioides* ו-*C. acutatum* (Peres *et al.*, 2004). ביפן הפתוגן *C. capsici* נמצא כגורם מחלה בלימוניום (Sakoda and Kimishima, 2003) ו-*C. gloeosporioides* מלימוניום דווח כגורם למחלה בתפוז, אפרסק, הדריים, קמפור וצמחים רבים נוספים (Kagiwata, 1986). בקוריאה דווח על הדבקת צמחי לימוניום בתבדידי *C. gloeosporioides* מתפוח עץ וענבים, ועל כך שתבדידי ה- *C. gloeosporioides* מלימוניום גרמו למחלה חמורה בתפוח ובענבים (Nam *et al.*, 1996).

גם בארץ, מיני *Colletotrichum* שכיחים מאוד וגורמים למחלת האנתרקנוז בגידולים רבים: מטעים נשירים וסובטרופיים כמו אבוקדו, שקד (Freeman *et al.*, 2000a), כלנית ותות שדה. ב-1995 הופיע הגורם *C. acutatum* בתות שדה, והוא מופיע בכל עונת גידול מאז (פרימן, 1995) וכך גם *C.*

Freeman) *C. acutatum* ו-*C. fragariae gloeosporioides* מתות שדה גורם לאנתרקנוז בכלנית (*et al.*, 2000b). ב-1983 וב-1990-1992 דווח כי *C. gloeosporioides* גורם למחלה בכלנית (Vigodsky-Hass *et al.*, 1983; Gokkes *et al.*, 1993). *C. gloeosporioides* גורם למחלה בפסיפלורה (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003) ובצמחים נוספים. כלומר ישנם מקרים בהם אין ספציפיות של הפתוגן למאכסן - אותו מין או מספר מינים של *C. gloeosporioides* עלולים לתקוף מאכסנים ממשפחות צמחים שונות, ולגרום בהם למחלות שונות (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). כתוצאה, ייתכן כי מקור האילוח של שתילי הלימוניום במשתלות הינו ממיני צמחים אחרים הנושאים את גורם המחלה באמצעות הדבקה צולבת cross infection (Freeman and Shabi, 1996; Alahakoon *et al.*, 1994; Maymon *et al.*, 2006).

1.5. הדברת ה-*Colletotrichum*

הדברת מחלות ה-*Colletotrichum* פשוטה יחסית: חיטוי זרעים, סניטציה, שימוש בזנים עמידים ובחומר ריבוי נקי והדברה כימית בתזמון מתאים (Bailey and Jeger, 1992). עם זאת, כאשר המחלה כבר התבססה בשדה, קשה להדבירה (Engelhard, 1975).

שיטות גידול ואגרנטניקה משפיעות מאוד על התפשטות והישרדות גורם המחלה. תחילת התבססות המחלה נעשית מצוואר השורש, אך כאשר הלחות גבוהה ואופטימלית להתפתחות והתבססות הפתוגן, כמו התנאים הקיימים בקיבוץ נירים (שכיום כבר לא מגדל לימוניום) או התנאים הנוצרים בגידול הזן מיסטי, לו נוף סבוך, מופיעים גם תסמינים בעלווה ובגבעולים. ייתכן כי ניתן להפחית מעוצמת המחלה ולבקר את חומרתה באמצעות שינוי תנאי הרטיבות על-ידי שיטות השקיה מסוימות (כגון טפטוף טמון), תבניות שתילה וגיזום לצורך אוורור (Waller, 1992; Bailey and Jeger, 1992; Pivonia *et al.*, 2000). ישנו מגוון גדול של חומרים כימיים היעילים נגד פטריות מהסוג *Colletotrichum*. טיפולי הדברה או מניעה כימיים, עוד בשלב המשתלה, עשויים לתרום להפחתת שיעור המחלה בשדה. תרכובות סיסטמיות נמצאו יעילות במיוחד בשל יכולתן לחדור את רקמות המאכסן ולהפחית הדבקות לטנטיות (Waller, 1992). הדברה באוקטב (פרוכלורז) נמצאה יעילה כנגד *C. acutatum* בתות שדה במעבדה, בחממה ובשטח פתוח (Freeman *et al.*, 1997) וכנגד *C. gloeosporioides* (Pivonia *et al.*, 2000). חומר הדברה זה הינו פונגיטוקסי, ויעילותו בעיכוב גידול התפטר של הפתוגן *C. gloeosporioides* מלימוניום גדולה.

ידוע כי חומר ההדברה בנומיל (Benomyl) יעיל בהדברת הפתוגן *C. gloeosporioides* בלימוניום (Sobers and Cox, 1973) אך התגלה כי אוכלוסיות של הפתוגן שבודדו מזני לימוניום שונים מאתרים שונים בארץ (מקיבוץ נירים ומהערבה) מתחלקות לרגישות ולעמידות לחומר ההדברה בנומיל, על בסיס מוטציה נקודתית בגן β -tubulin2, היוצרת הבדל בחומצה אמינית אחת בלבד. מאחר שחומר הדברה זה מעולם לא יושם בשדה על גידולי לימוניום בישראל, ככל הנראה המקור לאוכלוסיות העמידות הוא בריסוסים תכופים ו/או בחשיפת השתילים לחומר בעודם במשתלה או בחו"ל בעת ההקשחה (Maymon *et al.*, 2006).

1.6. אפיון ודיאגנוסטיקה של *Colletotrichum*

1.6.1. השיבות אפיון וזיהוי גורם המחלה

קיימות שיטות רבות למעקב אחרי התקדמות גורם המחלה במאכסן באמצעות כימות ביומסת הפטריה. מעקב זו אינו תמיד פשוט, במיוחד בשלב הביוטרופי, ולצורך כך נעזרים בכימות גופי הפרי, הסטרולים או הכיטין (באמצעות גלוקוזאמין) (Ekblad *et al.*, 1998), או במבחנים המבוססים על אנזימים (Kumar *et al.*, 1993), או בניסויי מעבדה בלבד, על עוצמת הפלואורסנציה של חלבון פלואורסנטי זוהר (GFP) (Chen *et al.*, 2003). לשיטות אלו חסרון משמעותי – הצמח עלול להשפיע על הפרמטרים הנבדקים. אפשרות נוספת היא מעקב אחרי התפתחות תסמיני המחלה, אך נראה כי הם אינם תמיד תואמים למידת אכלוס הפתוגן את המאכסן (Dauch *et al.*, 2006).

בנוסף למעקב אחרי התפתחות המחלה, חשוב לאפיין כראוי את מיני ה-*Colletotrichum* השונים, על מנת לדעת כיצד להדביר ולבקר את המחלות להן הם גורמים. אפיון המין חשוב גם לצורך קביעת ספציפיות של אוכלוסיות למאכסנים, קביעת השונות הגנטית של האוכלוסייה ופיתוח מערך טיפוח לעמידות.

סיווג, אפיון וזיהוי הפתוגן באמצעות מורפולוגיה אינם מדויקים עקב השפעות סביבתיות על תכונות מורפולוגיות. אפיון האוכלוסייה על בסיס של התאם וגטטיבי (VCG) הוא מדויק יותר מאחר שהוא בוחן את יכולת התבדידים להעביר ביניהם חומר גנטי (בר לבן וחובריה, 2003). דיוק גדול אף יותר מתאפשר באמצעות שיטות מולקולריות המבוססות על הגברה באמצעות תחלים ספציפיים למין הפתוגן (Freeman *et al.*, 1998, 2000a, 2000b, 2001b, 2002b; Pivonia *et al.*, 2000; Bar Lavan *et al.*, 2004).

הכנסת אוכלוסיות חדשות של *Colletotrichum* על גבי החומר הצמחי (תרביות הרקמה של הלימוניום) המגיע מחו"ל יכולה להביא להוספת מינים ו/או גנוטיפים של *C. gloeosporioides*, שיהיו בעלי מאפיינים שונים, כמו וירולנטיות או עמידות לחומרי הדברה, ויהיה צורך למצוא תחלים ספציפיים שיזהו אוכלוסיות אלה.

בנוסף לאפיון, האמצעים המולקולריים עשויים לעזור בהבטחת ניקיונם של חומר הריבוי או השתילים מגורם המחלה, ולתרום לשרידות ענף גידול הלימוניום. במידה ומקור המחלה הוא בחומר הייבוא, יש לזהות זאת על מנת לצמצם את הייבוא ממקורות לא איכותיים או לטפל בשתילים ממקור זה. בדרך זו ניתן יהיה למנוע, ככל האפשר, הכנסת גזעים ותבדידים חדשים של *Colletotrichum* לארץ, העלולים לפגוע לא רק בענף הלימוניום, אלא גם בגידולים אחרים, ובכך לגרום לנזק כלכלי אדיר.

האמצעים המולקולריים יכולים לעזור גם בקביעת השלב שבו מתאלח הצמח בפטריה, ובכך לאפשר טיפול ממוקד יותר למניעת האילוח או להקטנת רמתו. בנוסף, הם יאפשרו לזהות את הקורלציה בין התפתחות המחלה לבין השינויים בריכוז ה-DNA של הפתוגן (Barnes and Szabo, 2007).

עם זאת, במקרה של הפתוגן *C. gloeosporioides*, המתחלק לתבדידים ספציפיים למאכסן שיכולים להיות מסווגים ברמת ה-*forma specialis*, האמצעים המולקולריים לעיתים אינם מספיקים לבדם ויש

צורך לאפיין את התבדיד גם בשיטות המורפולוגיות המוכרות ובשיטת ההתאם הוגטיבי (בר לבן וחובריה, 2003; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Freeman *et al.*, 1998).

1.6.2. זיהוי DNA בשיטת PCR

אחד מהאמצעים המולקולריים המשמשים לזיהוי הפטריה הוא ה-PCR. באמצעות תחלים התחמים מקטע ב-DNA, ניתן להגבירו עד לרמה בה יזוהה בהפרדה בג'ל אגרוז. ספציפיות התחלים קובעת את דיוק ורגישות הריאקציה, אם כי אפשר להגדיל את רגישותו ודיוקו על-ידי שימוש בשני זוגות תחלים, היצוני הספציפי לסוג, ופנימי הספציפי למין (Cullen *et al.*, 2002). על-ידי הגברה של מקטע מרצף הפתוגן, ניתן יהיה לאתר אותו בדגימה הצמחית.

1.6.3. זיהוי וכימות DNA בשיטת QRT-PCR

אמצעי מולקולרי נוסף ומתקדם יותר הוא ה-QRT-PCR. שיטה זו נחשבת כמהירה, מדויקת, יעילה ורגישה יותר מאשר PCR רגיל. היא מאפשרת לכמת את הפתוגן ברקמה הצמחית, באופן אבסולוטי או יחסי לדגימה אחרת, כמו גם לקבוע באילו איברים בצמח הוא נמצא (Sचना *et al.*, 2004; Christenesen *et al.*, 2004). ניתן גם לבדוק התבטאות גנים על-ידי הגברה של cDNA, דבר שיאפשר זיהוי של תאי פטריה חיים בלבד (Sचना *et al.*, 2004).

לשימוש בשיטה זו דרושים תחלים המגבירים מקטע קטן יותר מזה המוגבר ב-PCR רגיל, עדיף מקטע בגודל של כ-50-150bp על מנת לקבל תוצאות עקביות (Cullen *et al.*, 2002), אך ניתן גם להגביר מקטעים גדולים יותר (Barnes and Szabo, 2007). אחד היתרונות בשימוש בשיטה זו, בניגוד ל-PCR רגיל, הוא שאין צורך בצעדים נוספים לאנליזת המידע המתקבל, כמו הפרדת התוצרים בג'ל אלקטרופורזה, צביעה ב-EtBr או לעיתים ריצוף (Sचना *et al.*, 2004).

ישנן ארבע שיטות עבודה ב-QRT-PCR (Sचना *et al.*, 2004). בעבודה זו נעשה שימוש בשיטת ה-SYBR Green I. שיטה זו אינה ספציפית לרצף מקטע ה-DNA המוגבר (האמפליקון) אלא מבוססת על שימוש בצבע פלואורסנטי המאיר כאשר הוא נקשר בתוך dsDNA (DNA דו גדילי). עוצמת הפלואורסנציה פרופורציונית לכמות ה-dsDNA בתמיסה. יש למנוע תוצרים לא ספציפיים על-ידי תכנון נכון של תחלים ותנאי הריאקציה. על-ידי יצירה של גרף התכה (פירוט בסעיף 2.17.3.2 בפרק שיטות וחומרים) ניתן להבדיל בין התוצרים הרצויים ללא רצויים. השיטות האחרות הקיימות הן ספציפיות לרצף האמפליקון בזכות היברידיזציה בינו לבין גלאי מסומן כדי ליצור סיגנל פלואורסנטי, זאת בנוסף לספציפיות בין התחלים לרצף DNA המטרה (Sचना *et al.*, 2004).

1.6.4. ספציפיות התחלים

קיימת חשיבות רבה לספציפיות למין של התחלים המשמשים בשיטות האפיון והאבחון המולקולריות מאחר שרקמות צמחים חולים מכילות פעמים רבות פתוגנים או ספרופיטים נוספים, יחד עם הפתוגן הנבחן (Barnes and Szabo, 2007).

מקובל להשתמש בתחלים המגבירים את האזור הוריאבילי internal transcribed spacer (ITS1) או (ITS2), המשתנה בין מינים שונים. אזור זה הוא חלק מה-DNA הריבוזומלי שבגרעין, וישנם מספר יתרון בשימוש בו: רצף זה חוזר על עצמו בתדירות גבוהה; הוא פורסם עבור מרבית מיני הפטריות וזמין;

והוא עובר שינוי אבולוציוני מהיר באופן יחסי (Cullen *et al.*, 2002; Schena *et al.*, 2004; Barnes and Szabo, 2007).

לעיתים קרובות משתמשים בגן β -tubulin השמור לזיהוי פטריות (Schena *et al.*, 2004). למין *C. gloeosporioides* יש מגוון אוכלוסיות גדול, אפילו עבור אותו מאכסן. לכן חשוב למצוא תחלים שיהיו ספציפיים למין אך שיוכלו לזהות את כל האוכלוסיות השונות של *C. gloeosporioides*, בין אם באותו צמח, בצמחים שונים, או בדגימות סביבתיות. שני גנים של β -tubulin ידועים במיני *Colletotrichum* שונים: TUB1 (β -tubulin1) ו-TUB2 (β -tubulin2) (Buhr and Dickman, 1994). בעבודה של Maymon *et al.* (2006) אופיינו אוכלוסיות *C. gloeosporioides* מלימוניום רגישות ועמידות לבנומיל, ורוצפו הגנים ל- β -tubulin. על מנת לזהות אוכלוסיות שונות של *C. gloeosporioides* באמצעות תחלים המבוססים על הגנים של אחת מהאוכלוסיות, יש לוודא כי אותם רצפים המוכרים על-ידי התחלים ימצאו גם באוכלוסיה השנייה.

במקרים בהם התחלים הספציפיים מזהים מינים קרובים, אחת מהגישות להגברת הספציפיות והרגישות של הריאקציה היא העלאת טמפרטורת הצימוד שלהם במערכת על מנת למנוע תוצרי לוואי (Barnes and Szabo, 2007).

1.6.5. סף זיהוי ורגישות המערכת

רגישותו הגדולה של ה-QRT-PCR עלולה לגרום לבעיה. זוג תחלים עלולים ליצור דימר ביניהם, ועוצמת הפלואורסנציה של הדימר תזוהה על-ידי המערכת, וחמור מכך – תיגרר במהלך כל הריאקציה. במקרה זה, דגימה שאינה מכילה DNA וביקורת המים יזוהו גם הן במערכת ודגימות שמכילות DNA של הפטריה יקבלו זיהוי גבוה מהערך האמיתי שלהן. בכלי זה יש צורך לקבוע סף זיהוי עליון: מחזור שלאחריו הזיהוי לא נחשב (להבדיל מסף זיהוי תחתון, Ct), שלפניו הזיהוי לא נחשב, פירוט בסעיף 2.17.3.3 בפרק שיטות וחומרים). בנוסף, הרצה של מספר נמוך יותר של מחזורים (35 מחזורים בלבד) תאפשר להימנע מהגברה של תוצרים לא ספציפיים (Torres *et al.*, 2005).

בעיה נוספת עלולה להיווצר במקרה ורקמות המאכסן מעכבות או משפיעות על הריאקציה, או משבשות את סף הרגישות לזיהוי הפתוגן. לכן יש צורך לכייל את ריכוז DNA המאכסן שישמש בריאקציות כדי לזהות את הריכוז בו השפעת המאכסן על הריאקציה היא מינימלית (Wilson, 1997; Dauch *et al.*, 2006).

מנגד, יכולת הרגישות של ה-QRT-PCR אפשרה לזהות את הפתוגן *C. coccodes* מייד לאחר האילוח (שנעשה בריסוס) ובמשך שבועיים לאחר מכן, ועד לרמה המזערית של 0.25 pg DNA/reaction, כפי שתואר בעבודתם של (Dauch *et al.*, 2006), רמה שאינה מזוהה ב-PCR רגיל. כלומר זיהוי גורם המחלה בעזרת ב-QRT-PCR עשוי להיות אפשרי עוד לפני הופעת תסמיני המחלה. עם התקדמות המחלה והופעת הכתמים הנקרוטיים האופייניים לסוג *Colletotrichum*, כמות ה-DNA הפטרייתי הולכת וגדלה.

ה-QRT-PCR מאפשר לזהות מינים בדגימות סביבתיות ולא להיות מושפע מנוכחות מינים אחרים, בניגוד לשיטת זיהוי באמצעות מצע, בה פתוגנים מסוימים עלולים להסוות את נוכחותו של הפתוגן הרצוי (Schena *et al.*, 2004).

יש לציין כי בדומה ל-PCR רגיל, כמות גדולה מדי של DNA ב-QRT-PCR עלולה לעכב את הריאקציה או לגרום לתוצאה שהיא false-positive (Barnes and Szabo, 2007). בנוסף, חומרים צמחיים כמו חומצות הומיות, טאנינים, תרכובות ליגנין, פוליסכרידים ופיגמנטים עלולים לעכב את הריאקציה (Cullen and Hirsch, 1998; Bridge and Spooner, 2001; Mulé *et al.*, 2006), אם כי הם משפיעים בעיקר במחזורים המאוחרים, החיוניים להצטברות האמפליקון. מכאן שדווקא PCR רגיל עלול להיות מושפע יותר מאשר QRT-PCR על-ידי תרכובות אלה (Mumford *et al.*, 2000).

1.6.6. נרמול נוכחות הפטריה

זיהוי כמותי של הפטריה in planta באמצעות QRT-PCR דורש נרמול התוצאות ביחס לאיכות הפקת ה-DNA ויעילות ריאקציית ה-QRT-PCR, על מנת לקבל תוצאות מדויקות (Schena *et al.*, 2004). בעבודתם של (Christenesen *et al.*, 2004), נרמול זה נעשה באמצעות רצף 18S rRNA הצמחי. הנרמול מאפשר להשוות דגימות צמחים שונות ומועדי לקיחת דגימות שונים. קביעת רמת זיהוי הרצף הפטרייתי ביחס למידת זיהוי הרצף הצמחי 18S תמנע מאיכות ההפקה או שונות הדגימה להשפיע על הזיהוי הכמותי של הרצף הפטרייתי. הדבר נעשה באמצעות הגברה של מקטע רצף House Keeping צמחי – רצף 18S ריבוזומלי - באותה ריאקציה בו יוגבר מקטע רצף הפטריה. בחלוקת הערך הכמותי של רצף הפטריה בערך הכמותי של רצף הצמח שהתקבלו באותה ריאקציית QRT-PCR עבור כל דגימה, יתאפשר לקבל ערך כמותי מנורמל של רצף הפטריה, ואותו אפשר יהיה להשוות בין דגימות צמחים שונות ובין ריאקציות QRT-PCR שונות. הדבר מצריך 2 עקומות כיוול – אחת לפתוגן ואחת לצמח. יש לציין כי מעקב אחרי רצף 18S מאפשר להבחין גם בירידה בכמות ה-DNA הצמחי, הנגרמת כתוצאה מהתמוטטות תאי המאכסן בעקבות המעבר לשלב הספרופיטי של הפטריה (Dauch *et al.*, 2006).

1.6.7. קביעת מספר עותקי הרצף הנבדק של הפטריה

בנוסף לנרמול, ניתן לקבוע את מספר עותקי רצף הפטריה הנבדק בכמות ידועה של דגימה צמחית, וכתוצאה את מספר תאי הפטריה בדגימה, וזאת על-ידי שימוש בפלסמידים. הפלסמידים, שמכילים מקטע מרצף הפטריה או הצמח שאותו רוצים להגביר, משמשים ליצירת עקומת כיוול להערכת מספר המטרות שיוגברו בכל דגימה (Torres *et al.*, 2005).

2. שיטות וחומרים

2.1. חומר ביולוגי

2.1.1. זני צמחים: נתרמו על-ידי חברת דנציגר - משק פרחים "דן" (מושב משמר השבעה, ישראל).

- *Limonium supreme*: [Supreme® Bluenight](#)
- *Limonium safora*: [Safora® Dark Blue](#)

מרבית הניסויים נערכו על צמחים בני 6-10 שבועות. ניסויי השדה נערכו על צמחים בני 2-4 שבועות.

2.1.2. תבדידי *Colletotrichum gloeosporioides* (C.g.):

תבדיד	פונדקאי (זן לימוניום)	מקום	חלק צמח
18	לימוניום 'מיסטי'	קיבוץ נירים	גבעול
28	לימוניום 'מיסטי'	קיבוץ נירים	גבעול
28A	לימוניום 'סופרים'	אילוח בחממה	עלה
48	לימוניום 'מיסטי בלו'	תחנת יאיר	כתר
48A	לימוניום 'סופרים'	אילוח בחממה	עלה
53	לימוניום 'מיסטי וייט'	תחנת יאיר	כתר
62	לימוניום 'בלטלארד'	עידן	כתר
63	לימוניום 'בלטלארד'	עידן	כתר
72	לימוניום 'בלטלארד'	עידן	כתר

מקור: (Maymon *et al.*, 2006). תבדידים מספר 28A ומספר 48A בודדו במבחן קוך מצמחים שאולחו בתבדידים מספר 28 ומספר 48, בהתאמה. תבדידים מספר 28 ו-48A שימשו לעיקר העבודה.

2.1.3. דגימות DNA:

עיקר העבודה בוצעה על DNA שהופק מהצמחים המפורטים בסעיף 2.1.1 ומתבדידי הפטריה המפורטים בסעיף 2.1.2. בנוסף, דגימות ה-DNA הבאות שימשו לבדיקת התחלים ל-PCR ול-QRT-PCR:

מקור	צמח	פטריה
(Horowitz <i>et al.</i> , 2004)	תבדיד 318 מתות שדה	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
מעבדתו של ד"ר סטנלי פרימן	תבדיד 57 מאבוקדו	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
(Freeman <i>et al.</i> , 2002b)	תבדיד 149 מתות שדה	<i>Colletotrichum acutatum</i>
מעבדתו של ד"ר סטנלי פרימן	תבדיד 2 מגפן	<i>Phomopsis viticola</i>
מעבדתו של ד"ר סטנלי פרימן	תבדיד 81 מתות שדה	<i>Macrophomina phaseolina</i>
מעבדתו של ד"ר סטנלי פרימן	תבדיד מאבטיח	<i>Macrophomina phaseolina</i>
מעבדתו של ד"ר סטנלי פרימן	תבדיד 12 ממלון	<i>Didymella bryoniae</i>
(Freeman <i>et al.</i> , 2002a)	תבדיד T39	<i>Trichoderma harzianum</i>
(Denisov <i>et al.</i> , 2005)	תבדיד ממלון	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>

2.1.4. פלסמידים: טבלה 3: הפלסמידים ששימשו בעבודה זו

Plasmid	vector	primers	insert
L-28 Tub1C	T-easy	Tub1C, GENC	C.g. β -tubulin1 gene
L-28 4 ITS4/5	T-easy	ITS4, ITS5	C.g. ITS gene
18S	T-easy	T7, SP6	<i>Limonium supreme</i> 18S gene

מקור לשני הפלסמידים העליונים: (Maymon *et al.*, 2006). וקטור T-easy מ-Promega Corp., Madison, WI, (USA).

2.2. מצעי מזון, הרכבם ושימושיהם

2.2.1. מצע M3S מוצק: משמש לגידול תבדידי ה-C.g. לצורך הפקת נבגי פטריה ושמירת התבדידים לאורך זמן. המצע הכיל: 0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.27% KH_2PO_4 , 0.1% Bacto Peptone, 0.1% Bacto Yeast Extract, 1.0%g Sucrose, 2.0% Difco Agar Granulated, up to 1L Distilled Water (Freeman *et al.*, 1993). המצע עוקר באוטוקלאב ולאחר מכן נשמר בבקבוקים סגורים למשך כמה חודשים בטמפרטורת החדר בחושך, או נמזג לצלחות פטרי ונשמר בעטיפת ניילון במקרר למשך כחודשיים.

2.2.2. מצע M3S נוזלי: שימש לגידול תבדידי ה-C.g. לצורך הפקת DNA. הרכב זהה למצע M3S מוצק, ללא האגר.

2.2.3. מצע MS מוצק חצי בררני ל-C.g.: (Freeman and Katan, 1997). שימש לבידוד הפטריה מחלקי צמחים תוך צמצום הזיהומים הפטרייתיים והבקטריאליים. הרכב זהה למצע M3S מוצק אך בתוספת 10mg iprodione (Rhone Poulenc, Lyon, France ;Rovral 50WP) ו-0.8 מ"ל lactic acid (Sigma-Aldrich, רחובות, ישראל) לליטר מצע, שהוספו למצע לאחר עיקורו וקירורו ל- $50^{\circ}C$. המצע נמזג לצלחות ונשמר בעטיפת ניילון במקרר עד חודש מהמזיגה, מאחר שהחומרים שהוספו מתפרקים לאורך זמן.

2.2.4. מצע LB (Luria-Broth): מצע נוזלי לגידול חיידקים. המצע הכיל: 0.5% yeast extract, 1.0% Tryptone, 1.0% NaCl, up to 1L Distilled Water 100 μ l אנטיוביטיקה מסוג Ampiciline בריכוז 100mM ל-100 מ"ל מצע.

2.2.5. מצע LA (Luria-Agar): הרכב זהה למצע LB בתוספת 1.5% Bacto Agar לליטר מצע.

2.3. תנאי גידול פטריה

תבדידי הפטריה גודלו על מצע M3S מוצק באינקובטור בטמפרטורה של $25^{\circ}C$ בחושך, כאשר מכסה הצלחת כלפי מטה. לאחר שלושה ימי גידול, הצלחות נאטמו עם Parafilm[®]. תבדידים שנדרשו לעבודה לאורך זמן חודשו כל שלושה-ארבעה שבועות על-ידי העברת פיסת מצע המכילה תפטיר פטריה פעיל לצלחת פטרי קטנה חדשה. שימור התבדידים לאורך זמן נעשה ב-15% (v/v) glycerol בהקפאה עמוקה ($-80^{\circ}C$). אם מראה התבדיד שגדל על צלחת החל להשתנות (תפטיר שונה או כמות נבגים מועטה יותר), התבדיד גודל מחדש מההקפאה ב- $-80^{\circ}C$. לצורך הפקת נבגים לאילוח, תבדידים גודלו על גבי צלחת במשך 7-10 ימים לאחר שנזרעו על פני כל שטח הצלחת בזריעת דשא. לצורך הפקת DNA, תבדידי

הפטריה גודלו בארלנמאיירים המכילים 100 מ"ל מצע M3S נוזלי למשך 5 ימים לפחות בטלטול בטמפרטורת החדר.

2.4. תנאי גידול צמחים בחממה

הצמחים גודלו בחממה בטמפרטורה של $25^{\circ}\text{C}+1^{\circ}\text{C}$ עם הארה פלואורסנטית במחזור של 12 שעות אור ביממה, בעציצים קטנים בנפח של כ-120 מ"ל שהכילו מצע המורכב מ-75% קוקוס ו-25% קלקר (פלאמיקס בע"מ, אשקלון, ישראל). העציצים סודרו במגשים שהוצפו במים באופן שהבטיח כי האדמה לא תתייבש. צמחים צעירים מאוד (כבני 2-4 שבועות כמו בניסויי השדה המתואר בסעיף 2.9) דושנו בדשן פלוס של מ. בן שחר בע"מ: 6-6-12 בתוספת ברזל ו-6% מיקרואלמנטים.

2.5. מידבק *Colletotrichum gloeosporioides*

כמתואר ב-Sobers and Cox (1973) בשינויים הבאים: תבדידי הפטריה גודלו על גבי מצע M3S בצלחות פטרי גדולות למשך 7-10 ימים. הנבגים הועברו לכוס סטרילית שהכילה מים סטריליים לאחר שנגרפו מפני הצלחות באמצעות זכוכית נושאת של מיקרוסקופ שחוטאה באלכוהול, הועברה באש ונטבלה במים סטריליים. תערובת המים, התפטיר ונבגי הפטריה הועברה דרך 4 שכבות גאזה שהפרידה בין התפטיר ופיסות אגר לבין הנבגים והמים. תרחיף הנבגים סורכו למשך 5 דקות, ב-8000 סל"ד בטמפרטורה של 4°C במכשיר SORVAL super T21 (לבנט טכנולוגיות, הרצליה, ישראל). משקע הנבגים נשטף במים סטריליים כדי להסיר מעכבי נביטה ועבר סרכוז חוזר, באותם התנאים. לאחר מכן, המשקע הורחף מחדש. על מנת להגיע לריכוז הנבגים הדרוש לאילוח (נפח המידבק וריכוזו משתנים בין הניסויים השונים), ריכוז הנבגים נקבע בתרחיף על-ידי שימוש בתא ספירה מסוג 0.100mm Tiefe Depth Profondeur.

2.6. ניסוי תאי ספירה

משמש לבדיקת אחוז הנביטה של נבגי תבדידי ה-C.g. השונים באמצעות תאי ספירה מסוג KOVA[®] Hycor Biomedical Inc., Garden Grove,) GLASSTIC[®] SLIDE 10 with GRIDS (California, USA). הפקת נבגים בוצעה כמתואר בסעיף 2.5, בתוספת שטיפה נוספת במים סטריליים לפני קביעת ריכוז הנבגים. עבור כל תבדיד מולאו 5 תאים (5 חזרות טכניות) ב-20µl תרחיף נבגים בריכוז ידוע לכל תא, ותאי הספירה הונחו בתא לח. לאחר כ-20 שעות נקבע אחוז הנבגים הנובטים בכל תא, וממוצע אחוז הנביטה של 5 התאים. הממוצע עבור כל תבדיד הוצג בגרף עמודות, כאשר חושב LSD (Least Significant Difference) בין התבדידים השונים או בין הריכוזים השונים בתוכנת JUMP גרסה 5 באמצעות מבחן Tukey-Kramer HSD. מבחן זה שימש גם לחישוב ה-LSD בכל הניתוחים הסטטיסטיים שיפורטו בהמשך.

2.7. אילוח צמחים

תרחיפי נבגים בריכוז הדרוש הוכנו לניסוי, ועורבב היטב לפני האילוח כדי שריכוז הנבגים יהיה אחיד בתמיסה. לתרחיף הנבגים הוסף החומר המשטח Tween (Sigma-Aldrich, רחובות, ישראל) בריכוז

0.05%. אילוח צמחים בוצע בשתי שיטות - ריסוס וטבילה. בשיטת הריסוס (שדרשה כמות נבגים שהופקה מ-2-1 צלחות פטרי גדולות), עלי הצמחים שעל מגש הגידול רוססו עד רוויה בנפח של כ-25 מ"ל תרחיף נבגים (צמחי הביקורת רוססו בנפח דומה של מים, שגם הוא הכיל Tween). בין תבדידים שונים, המרסס נוקה היטב באתאנול ואז במים סטריליים. שיטה זו שימשה רק בניסויים לבחירת שיטת האילוח ותבדידי הפטריה שישמשו לעבודה. בשיטת הטבילה (שדרשה כמות נבגים שהופקה מ-30-10 צלחות פטרי גדולות), הצמחים נטבלו הפוכים במיכל ובו תרחיף הנבגים, כך שכל העלים כוסו בתרחיף למשך כ-3 שניות והוחזרו למגש הגידול (צמחי הביקורת נטבלו במים שגם הם הכילו Tween). שיטה זו שימשה לאילוח בכל הניסויים, אלא אם מצוין אחרת. לאחר האילוח, מגשי הגידול נעטפו למשך ארבעה ימים בשקית ניילון נושמת שמעבירה אור, ליצירת תא לח (תא לח לזמן קצר יותר לא הביא להזדקת הצמחים במחלה ברמה גבוהה מספיק למחקר).

2.7.1. ניסויים לבחירת תבדידי הפטריה אשר שימשו לעבודה: עבור כל אחד מהתבדידים שנבדקו (מספר 18, 28, 48, 53, 62, ו-63) אולחו 10 צמחים בשתי שיטות אילוח שונות: 5 צמחים אולחו בריסוס ו-5 צמחים אולחו בטבילה, כמתואר למעלה. כל הצמחים אולחו בריכוז של 5×10^6 נבגים למ"ל עבור כל תבדיד (בנוסף לטיפול במים עבור הביקורת).

2.7.2. ניסויי הבידוד מחדש: עבור כל תבדיד שנבדק (מספר 28, 28A, 48 ו-48A) אולחו 5 צמחים בטבילה, כמתואר למעלה. כל הצמחים אולחו בריכוז של 5×10^6 נבגים למ"ל עבור כל תבדיד (בנוסף לטיפול במים עבור הביקורת).

2.7.3. ניסויי השוואת ריכוזי אילוח שונים: צמחים מזן 'סופרים' אולחו על-ידי טבילה בתרחיף נבגים של תבדיד מספר 28 או מספר 48A בריכוזים הבאים: 10^3 , 10^4 , 10^5 , ו- 10^6 נבגים למ"ל (בנוסף לטיפול במים עבור הביקורת). בכל טיפול אולחו 16 צמחים.

2.7.4. ניסויי השוואת זני לימוניום שונים: ניסוי זה נערך בעזרת תבדיד מספר 48A בלבד. צמחים משני זני לימוניום, 'סופרים' ו-'ספורה', אולחו בטבילה בתרחיף נבגים בריכוזים של 10^3 ו- 10^6 נבגים למ"ל (בנוסף לטיפול במים עבור הביקורת). בכל טיפול אולחו 16 צמחים.

2.7.5. ניסויי השדה: ניסוי זה נערך בעזרת תבדיד מספר 48A בלבד. צמחים משני זני לימוניום, 'סופרים' ו-'ספורה', אולחו בטבילה בתרחיף נבגים בריכוזים של 10^3 (בחזרה הראשונה בלבד) ו- 10^6 נבגים למ"ל (בנוסף לטיפול במים עבור הביקורת). בכל טיפול אולחו 80 צמחים (בחזרה הראשונה) או 36 צמחים (בחזרה השנייה) מכול זן.

2.8. נוכחות גורם המחלה בצמחים

מצב המחלה בצמחים נקבע באחת או יותר משלוש שיטות שונות:

2.8.1. שיטה ויזואלית לקביעת נוכחות גורם המחלה

בוצעה בכל אחד מהצמחים שאולחו בנפרד. ההתרשמות הויזואלית של כמות, גודל, פיזור ומיקום התסמינים של המחלה, ומספר העלים המתים או העלים שעליהם יש תסמינים, אפשרה לחלק את הצמחים החולים לחמש דרגות של חומרת מחלה (Dauch et al., 2006): 0 – ללא תסמיני מחלה (או תסמיני מחלה קלים ביותר), כ-0% נגיעות; 1 – התחלת תסמיני מחלה, עד 20% ממראה הצמח הכללי נראה

חולה; 2 – תסמיני מחלה ברמה בינונית עד גבוהה, עד 50% ממראה הצמח הכללי חולה; 3 – תסמיני מחלה חמורים, כולל עלים רבים שמתו מהמחלה, עד 80% ממראה הצמח הכללי חולה; 4 – הצמח ממוטט ומת, 100% מחלה. עבור כל טיפול (למשל אילוח בתבדידי C.g. שונים ו/או בריכוזי מידבק שונים ו/או אילוח של זני לימוניום שונים) נקבע ממוצע חומרת המחלה של כל הצמחים בטיפול. התוצאות הוצגו בגרף של חומרת מחלה כנגד זמן לאחר אילוח, וה-LSD בין הטיפולים השונים חושב עבור כל נקודת זמן בנפרד, באמצעות תוכנת JUMP. ההצגה הגרפית אפשרה לחשב את ערך AUDPC (Area Under Disease Plot Curve) שהוא פרמטר המהווה מדד להתפתחות המחלה, שאינו מתייחס לנקודות הזמן השונות אלא לכל תקופת הניסוי. בגרף מוצגים ממוצעי ערכי ה-AUDPC של כל הצמחים בטיפול. ה-LSD בין ערכי ה-AUDPC בטיפולים השונים חושב באמצעות תוכנת JUMP.

2.8.1.1. בניסויים לבחירת תבדידי הפטריה ששימשו לעבודה: כל אחד מבין הצמחים שאולחו עבור כל תבדיד שימש כחזרה להערכת חומרת המחלה בחמישה מועדי בדיקה (ארבעה ימים לאחר האילוח, ושבעה, שבעיים, שלושה שבועות וארבעה שבועות לאחריו), כאשר ההערכה בוצעה עבור כל שיטת אילוח בנפרד.

2.8.1.2. בניסוי הבידוד מחדש: כל אחד מבין 5 הצמחים שאולחו עבור כל תבדיד שימש כחזרה להערכת חומרת המחלה בשלושה מועדי בדיקה (שבוע, שבעיים ושלושה שבועות לאחר האילוח).

2.8.1.3. בניסויי השוואת ריכוזי אילוח שונים והשוואת זני לימוניום שונים: 10 צמחים קבועים מבין 16 הצמחים שאולחו בכל טיפול שימשו כחזרות להערכת חומרת המחלה בששת מועדי הבדיקה (יום לאחר האילוח, ארבעה ימים לאחריו, ושבעה, שבעיים, שלושה שבועות וארבעה שבועות לאחר האילוח).

2.8.2. שיטת אכלוס לקביעת נוכחות גורם המחלה

בדיקת אחוז חלקי הצמח המאוכלסים בפתוגן. דגימות צמחים מניסויי החממה או השדה נשטפו מהקרקע ומנבגים וקורים חיזוניים. הצמחים נחתכו לפני השטח החיצוניים של חלקי הצמח חוטאו באמצעות 10 שניות טבילה ב-70% אלכוהול, ואז 4 דקות טבילה בתמיסת 0.01% כלור פעיל. חלקי הצמחים יובשו קלות והונחו על צלחת M3S שהכילה lactic acid-ו-iprodone. לאחר 7-10 ימים, ניתן היה לראות גדילה של קורי פטריה בחלקי הצמח שהכילו אותה. הצגת התוצאות וניתוחן הסטטיסטי נעשו בשתי דרכים, בהתאם לניסוי:

2.8.2.1. בניסויי אילוח בריכוזים שונים או אילוח זני לימוניום שונים: בכל מועד בדיקה (יום לאחר האילוח, ארבעה ימים לאחריו, ושבעה, שבעיים, שלושה שבועות וארבעה שבועות לאחר האילוח) נלקח צמח אחד מבין 6 הצמחים ששימשו לבדיקת האכלוס (מתוך 16 צמחים שאולחו) עבור כל טיפול. מהצמח נלקחו 3-10 חלקים מכול אחד מאיברי הצמח הנבדקים (צוואר שורש, שורש, פטוטרט וטרף). בניתוח הסטטיסטי של בדיקת האכלוס בניסויים אלו התגלה כי אין שונות מובהקת בין מועדי הבדיקה השונים, ולכן הם מוצגים כחזרות. ממוצע אחוז החלקים המאוכלסים בריכוזי האילוח השונים חושב, ונבנה גרף המציג את אחוז חלקי הצמח המאוכלסים לעומת ריכוז האילוח עבור כל איבר בנפרד (צוואר שורש, שורש, פטוטרט וטרף). לנתונים של כל איבר בוצע קירוב ליניארי, והוצגו משוואת הגרף וערך ה- R^2 , כפי שחושבו בתוכנת EXCEL, ומובהקות שיפוע הקירוב כפי שחושבה באמצעות תוכנת JUMP. אם

בצמחי ביקורת המים זוהה הפתוגן, שאר הטיפולים נורמלו ביחס לביקורת על-ידי הורדת הרקע של המים, ונתונים אלו שימשו בהצגה הגרפית ובהצגת הקירוב הליניארי. המובהקות P חושבה לפי הערכים הממוצעים לאחר הנרמול.

2.8.2.2. בניסויי השדה: 2-4 צמחים ששימשו כחזרות נבדקו בכמה מועדים שונים, ביניהם הייתה שונות מובהקת. מכול צמח נלקחו 6-10 חלקים מצוואר השורש והפטוטרות. חושב ממוצע אחוז החלקים המאוכלסים בכל מועדי הבדיקה עבור כל טיפול, ללא הפרדה לאיברי הצמח השונים. התוצאות הוצגו בגרף של אחוז חלקי הצמח המאוכלסים לעומת ימים לאחר האילוח, עבור כל טיפול בנפרד. עבור הנתונים של כל טיפול בוצע קירוב ליניארי, והוצגו משוואת הגרף וערך ה- R^2 , כפי שחושבו בתוכנת EXCEL, ומובהקות שיפוע הקירוב, כפי שחושבה באמצעות תוכנת JUMP. בנוסף, בכל מועד בדיקה חושב ה-LSD בין צמחי ה-'סופרים' וה-'ספורה' באמצעות תוכנת JUMP.

2.8.3. שיטה מולקולרית לקביעת נוכחות גורם המחלה

DNA שהופק מחלקי עלים או מחלקי צוואר שורש + פטוטרות של הצמחים השונים נבדק לנוכחות הפטריה בריאקצית QRT-PCR באמצעות תחלים ספציפיים. נוכחות הפטריה זוהתה רק באופן איכותי ולא כמותי בצמחים שנבדקו ולכן התוצאות הוצגו באופן איכותי בטבלאות. לא בוצעו ניתוחים סטטיסטיים עבור שיטת זיהוי זו.

2.8.3.1. בניסויי אילוח בריכוזים שונים ואילוח זני לימוניום שונים: בכל מועד בדיקה (יום לאחר האילוח, ארבעה ימים לאחריו, ושבע, שבועיים, שלושה שבועות וארבעה שבועות לאחר האילוח), חלקים מהצמחים שנלקחו לבדיקת האכלוס נשמרו להפקת ה-DNA.

2.8.3.2. בניסויי השדה: נלקח צמח אחד מכול טיפול בכל מועד בדיקה לצורך הפקת DNA. מועדי הבדיקה היו: בשלב החממה - שבוע לאחר האילוח (אך לפני ההדברה הראשונה) וארבעה שבועות לאחר האילוח (אך לפני ההדברה השלישית). בשלב השדה - בכל מועד שבו נלקחו צמחים לבדיקת האכלוס.

2.9. ניסויי שדה

על מנת לקבוע את תגובת הזנים השונים לפתוגן לאורך זמן ומחויץ לחממה, בוצעו שני ניסויי שדה לאורך כמה חודשים, בהם צמחים אולחו בחממה ולאחר חודש הועברו לגידול בשדה. הניסוי הראשון החל בעונת הסתיו ונמשך עשרה חודשים (נובמבר 2006 – ספטמבר 2007), ואילו הניסוי השני החל בעונת הקיץ ונמשך שבעה חודשים (יוני - נובמבר 2007). הניסויים ייקראו ניסוי סתיו וניסוי קיץ, בהתאמה. בניסויי השדה נבדקו השפעות הפרמטרים הבאים: זן הצמח ('סופרים' או 'ספורה'), ריכוז המידבק ששימש לאילוח (10^3 נבגים למ"ל - רק בניסוי הסתיו, 10^6 נבגים למ"ל וביקורת מים) והשפעת טיפול הדברה באוקטב על הישרדות הפתוגן (הדברה או ללא הדברה). הצמחים אולחו בחממה בגיל 2-4 שבועות לפי המתואר בסעיף 2.7.5 בפרק זה וגודלו בה במשך ארבעה שבועות לאחר האילוח, במהלכם מחצית מהצמחים טופלו באוקטב שבוע לאחר האילוח, שבועיים לאחריו וארבעה שבועות לאחריו. ההדברה נעשתה על-ידי טבילת צמחים למשך 4 דקות בתמיסת 0.2% prochloraz (Octave, AgrEvo UK Limited, Hauxton, Cambridge, England). חודש לאחר האילוח, הצמחים נשתלו בשדה בתחנת יאיר בערבה. בניסוי הסתיו לכל טיפול היו ארבע חזרות, בכל חזרה עשרה צמחים, בניסוי הקיץ לכל

טיפול היו בשלוש חזרות, בכל חזרה שישה צמחים. החזרות מוקמו בבלוקים אקראיים, ורק הצמחים המרכזיים בתוך כל בלוק שימשו ללקיחת נתונים (6 צמחים בניסוי הסתיו ו-4 צמחים בניסוי הקיץ). מניסויי השדה נלקחו דגימות צמחים בשלב החממה (שתי חזרות בכל עונת ניסוי) ובשלב השדה (ארבע חזרות בעונה הראשונה, שלוש חזרות בעונה השנייה) לצורך זיהוי נוכחות הפתוגן בשיטת האכלוס (כמתואר בסעיף 2.8.2.2 בפרק זה) ובשיטה המולקולרית (כמתואר בסעיף 2.8.3.2 בפרק זה). בנוסף, נבדקה תמותת הצמחים בשדה בכל חזרה כמה חודשים לאחר האילוח, והוצגה בגרף כממוצע אחוז התמותה בכל החזרות עבור כל טיפול. ערך ה-LSD בין הטיפולים השונים חושב באמצעות תוכנת JUMP.

2.10 הפקת DNA מצמחים

צמחים ששימשו לבדיקת האכלוס שימשו גם להפקת DNA. חלקי הצמח נדגמו ונשטפו במי ברז, יובשו קלות על גבי נייר סופג, נחתכו למקטעים קטנים והוכנסו למבחנה. לפני הפקת ה-DNA הרקמה הצמחית נכתשה בחנקן נוזלי בעזרת מכתש ועלי. דגימות הצמחים לפני ואחרי כתישת הרקמה נשמרו ב-20°C. ה-DNA הופקו מהעלים של הצמחים השונים. במספר ניסויים הופק גם מחלקי צוואר השורש וחלקי הפטוטורות (שהופקו ביחד, אך בנפרד מהעלים). בניסויי השדה אולחו צמחים צעירים מאוד (בני 2-4 שבועות) שהיו קטנים בגודלם, ולכן ה-DNA הופק מכול הצמח (כולל שורשים) בשני המועדים הראשונים. ה-DNA שהופק הורחף במים מולקולריים (Sterile Ultra Pure Water DNase and RNase free, Biological industries, קיבוץ בית העמק, ישראל) ונשמר בטמפרטורה של 4°C לכל אורך העבודה.

ההפקה נעשה בשיטת cTAB כמתואר ב-Galili *et al.* (2000), המיועדת להפקת כמויות DNA גדולות מכמות מועטה של רקמה צמחית, בשינויים הבאים: ההפקה בוצעה במבחנות אפנדורף בנפח של 2 מ"ל עבור רקמה צמחית כתושה במשקל של 0.15-0.25 גרם. בופר המיצוי הוכן משלושה בופרים א', ב', ו-ג', שעורבבו ביחס של 4:10:10 רגע לפני הפקת ה-DNA. בופר א' הוכן מראש והכיל 0.35M Sorbitol, 0.1M Tris-base pH 8, 0.005M EDTA pH 8, 0.2M Tris-base pH 7.5, 0.05M EDTA pH 7.5, 2M NaCl, 2% cTAB. בופר ג' הכיל 5% Sarkosyl. לכל דגימת צמחים כתושה הוספו 500µl מבופר המיצוי, והדגימות הודגרו בטמפרטורה של 65°C למשך 20-25 דקות, במהלכן המבחנות עורבבו בעדינות פעמיים-שלוש כדי שלא יהיה משקע. לכל מבחנה הוספו 500µl תמיסת כלורופורם:איזואמיל אלכוהול ביחס של 1:24, והמבחנות הושארו בטמפרטורה של 65°C ל-10 דקות נוספות, שבמהלכן הן עורבבו בעדינות פעמיים-שלוש. בתום ההדגרה המבחנות סורכזו למשך 10 דקות, ב-10,000 סל"ד ב-4°C. הנוזל העליון מכול מבחנה הועבר למבחנה חדשה והוספו לו 500µl איזופרופאנול. המבחנות עורבבו בעדינות והודגרו בקרח למשך 15 דקות ואז סורכזו למשך 5 דקות, ב-10,000 סל"ד ב-4°C. הנוזל העליון הורחף, ולמשקע (שהכיל את ה-DNA) הוספו 200µl 70% אתאנול. הדגימות סורכזו למשך 3 דקות, ב-10,000 סל"ד ב-4°C. הנוזל העליון הורחף, המשקע יובש (בטמפרטורת החדר או ב-37°C) והורחף. שיטת הפקה זו יעילה גם עבור תפטיר פטריות.

2.11. ניקיון DNA בשיטת פנול-כלורופורם

ניקיון פנול-כלורופורם על-פי התהליך הסטנדרטי המתואר ב-Sambrook and Russell (2001) בוצע לדגימות כהות/מלוכלכות שהופקו בפרוטוקול המתואר בסעיף 2.10 במטרה לבדוק אם ניקיון יכול לשפר את התוצאות ב-QRT-PCR. התגלה שאין שיפור משמעותי באיכות הדגימות.

2.12. הפקת DNA מפטריות

הפקת DNA מפטריות בוצעה על-פי הפרוטוקול המתואר ב-Freeman *et al.* (1993). לאחר גידול תבדידי הפטריה במצע M3S נוזלי התפטיר נאסף על-ידי סינון בואקום ויובש בהקפאה בלויפילייזר במשך יומיים. התפטיר נכתש באמצעות חנקן נוזלי. בין השלבים השונים, התפטיר נשמר בהקפאה בטמפרטורה של -20°C או -80°C .

לכל דגימה הוספו 4 מ"ל בופר ליזיס שמורכב מ: 0.05M Tris pH 8, 0.15M EDTA pH 8, 2% Sarkosyl. בוצע וורטקס והדגימות הודגרו בטמפרטורה של 65°C למשך 20-30 דקות עד להמסה מלאה, כאשר במהלך ההדגרה המבחנות עורבבו בעדינות כמה פעמים. הדגימות סורכזו למשך 20 דקות, ב-10,000 סל"ד, והנוזל העליון הועבר למבחנה חדשה. לכל מבחנה הוספה תמיסת 20% PEG/2.5M NaCl לשיקוע בכמות של 0.7 מהנפח, נעשה וורטקס חזק והמבחנות קוררו בקרח למשך 15-30 דקות. או הדגימות סורכזו למשך 5 דקות, ב-7,000 סל"ד, הנוזל העליון הורחק והמשקע הורחף בבופר TE. לכל מבחנה הוספה תמיסת 7.5N NH_4Oac בכמות של 0.5 מהנפח, והמבחנות הודגרו בקרח למשך 20 דקות. הדגימות סורכזו למשך 20 דקות, ב-10,000 סל"ד. הנוזל העליון הועבר למבחנה חדשה, והוסף איזופרופאנול בכמות של 0.6 מהנפח. המבחנות עורבבו בעדינות, והודגרו בקרח למשך 15-30 דקות. הדגימות סורכזו במשך 5 דקות, ב-5,000 סל"ד, הנוזל העליון הורחק והדגימות יובשו בטמפרטורת החדר. ה-DNA הורחף מחדש במים או בבופר TE. לצורך ניקיון נוסף, למבחנות הוספה תמיסה 1.0M NaCl עד לריכוז סופי של 0.1M ושני נפחי אתאנול 95% קפוא. המבחנות הודגרו בקרח למשך 15-30 דקות. הדגימות סורכזו למשך 5 דקות, ב-5,000 סל"ד, הנוזל העליון הורחק והמשקע יובש, והומס בבופר TE. ה-DNA נשמר בטמפרטורה של 4°C .

2.13. ליגציה וטרנספורמציה

בוצעו באמצעות קיט pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega Corp., Madison, WI, USA), על-פי פרוטוקול הוראות היצרן, בהבדלים הבאים:

בליגציה, כל ריאקציה בנפח של 10 μl הכילה 0.5 μl T4 DNA ligase, 0.5 μl vector pGEM 50 ng/ μl , 3-4 μl PCR product.

בטרנספורמציה, לכל מבחנת חיידקים הוספו 6-10 μl תוצר ליגציה; מכת החום (Heat-shock) בטמפרטורה של 42°C נמשכה דקה וחצי בדיוק; לכל מבחנה הוספו 800 μl LB נוזלי; הדגימות סורכזו למשך 5 דקות, ב-5000 סל"ד כדי לשקע את החיידקים ולזרוע צלחת LA עם אמפיצילין ו-X-gal רק 200 μl מהמצע; מושבות שגדלו על הצלחות נסרקו באמצעות PCR ישיר מחיידקים (כמפורט בסעיף 2.16.4) על מנת לוודא כי המחדר מצוי בתוכן.

2.14. הפקת פלסמידים מחיידקים

בוצעה באמצעות קיט AccuPrep[®] Plasmid Extraction (BIONEER, Alameda, California, USA), לפי הוראות היצרן.

2.15. עיצוב תחלים

בעיצוב התחלים נעשה שימוש בתוכנות הבאות: Primer3, Primer express ו-GenAphora (האחרונה פותחה על-ידי ד"ר עופר פלג מבית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט בפקולטה לחקלאות ברחובות). כל התחלים סונטזו על-ידי IDT (Coralville, Iowa, USA) מלבד תחלים ITS F ו-ITS R שסונטזו על-ידי Sigma-Aldrich (רחובות, ישראל). התחלים מוצגים בטבלה 4.

2.15.1. תחלים לזיהוי הפטרייה ב-QRT-PCR: על-פי הפרמטרים המקובלים, תוכננו כמה תחלים עבור הרצפים ITS, β -tubulin1 (יקרא מעתה TUB I) ו- β -tubulin2 (יקרא מעתה TUB II) של C.g. ומתוכם נבחר זוג התחלים המתאים ביותר: TUB I RT R ו-TUB I RT F. זוג תחלים זה לא מגיב בהיעדר DNA (ביקורת שלילית), דבר שעלול להעיד על יצירת דימר תחלים במכשיר ה-QRT-PCR.

2.15.2. תחלים לזיהוי הצמח ב-QRT-PCR: נבדקו כמה תחלים אוניברסליים לזיהוי רצף אזור ה-18S. תחלים אלה לא זיהו באופן מספק את דגימות ה-DNA מצמחי הלימוניום ששימשו בעבודה זו. מאחר שרצף אזור ה-18S של זני צמחי הלימוניום ששימשו בעבודה זו אינו מצוי במאגר המידע, היה צורך לרצף אותו על מנת לתכנן תחלים מתאימים יותר. על בסיס רצף אזור 18S ריבוזומלי של צמח *Limonium arborescens* (מספר הפקדה AF206953 במאגר הגנים של NCBI) תוכננו תחלים ל-PCR רגיל בתוכנת Primer3. בעזרת תחלים אלה הוגבר מקטע של 462 בסיסים. DNA של צמח לימוניום 'סופרים' הוגבר ב-PCR רגיל עם תחלים אלו. המקטע שהתקבל הופרד בג'ל, נחתך ונוקה בעזרת AccuPrep[®] Gel Purification Kit (BIONEER, Alameda, California, USA). המקטע עבר ליגציה לתוך פלסמיד pGEM[®]-T easy. בוצעה טרנספורמציה של הפלסמיד לחיידקי *E. coli* קומפנטטיים. מושבות החיידקים הטרנספורמנטיים עברו סלקציה בעזרת PCR ישיר מחיידקים, בשימוש עם התחלים האוניברסליים SP6 ו-T7. הפלסמיד הופק ממושבת חיידקים מתאימה ונשלח לריצוף (דניאל ביוטק, רחובות, ישראל), בעזרת התחלים SP6 ו-T7. על בסיס הרצף של לימוניום 'סופרים', תוכננו תחלים המתאימים לזיהוי ב-QRT-PCR, המגבירים מקטע באורך 95 בסיסים. תחלים אלה מזהים גם את רצף 18S של לימוניום 'ספורה'.

שם התחל	רצף	טבלה 4: נחוני התחלים/שימוש בעבודה זו.			מקור
		טמפ' התכה (°C)	אורך	ריאקציה	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	42.1	18	PCR	RNA polymerase promoters (Promega, 2007)
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	47.5	20	PCR	RNA polymerase promoters (Promega, 2007)
CgInt	GGCCTCCCCTCCGGGCGG	73.3	20	PCR	C.g. ITS (Brown <i>et al.</i> , 1996)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52.1	20	PCR	C.g. ITS (Brown <i>et al.</i> , 1996)
ITS F	TCCAGCGTCATTCAACCCT	66.7	20	PCR	C.g. ITS עבודה זו Primer express
ITS R	GTCCGCCACTACCTTTGAGG	65.7	20	PCR	C.g. ITS עבודה זו Primer express
ITS RT F	CTACAGCTGATGTAGGCCCTCA	58.2	22	QPCR	C.g. ITS עבודה זו Primer3
ITS RT R	GCAAGAGTCCCTCCGGATC	57.6	19	QPCR	C.g. ITS עבודה זו Primer3
TUB I RT F	AAACAGCGACGAGACGTTTT	55.2	20	QPCR	C.g. TUB I עבודה זו Primer3
TUB I RT R	CACCCTCGACACCAGCTTAT	56.8	20	QPCR	C.g. TUB I עבודה זו Primer3
18S F	AAACGGCTACCACATCCAAG	55.3	20	PCR	18S <i>Limonium arborescens</i> עבודה זו Primer3
18S R	TCATTACTCCGATCCCGAAG	53.7	20	PCR	18S <i>Limonium arborescens</i> עבודה זו Primer3
18S RT F	GGCTACCACATCCAAGGAA	54.5	19	QPCR	<i>Limonium supreme</i> 18S עבודה זו Primer3
18S RT R	CATTGAGCCCGTATTGTT	53.3	20	QPCR	<i>Limonium supreme</i> 18S עבודה זו Primer3

כל זוג תחלים קרוי על שם הרצף שאותו הוא מגביר, כאשר תחל ה-forward מסומן F ותחל ה-reverse מסומן R, והם רשומים זה אחרי זה. תחלים המיועדים לשימוש במכשיר QRT-PCR כוללים את האותיות RT בשמם.

2.16 PCR רגיל

בוצעו ריאקציות PCR רגיל לצורך זיהוי C.g. על-ידי הגברת רצף ה-ITS ב-DNA גנומי של הפטריה ובצמחים מאולחים בפטריה. כל ריאקציות ה-PCR בוצעו במכשירים הבאים: (1) PTC-100 T-GRADIENT thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA); (2) ATC-401 thermocycler (APOLLO thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) Instrumentation, GENTAUR, Brussels, Belgium)

2.16.1 מרכיבי תערובת הריאקציה: כל ריאקציה בנפח כולל של 20.0µl הכילה: דגימת DNA בכמות של 3pg-300ng; 0.1% Triton[®] x-100; 50mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH 9 at 25°C); 2.5mM MgCl₂; 0.2mM מכול נוקליאוטיד (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 250nM מכול תחל; 1 יחידה של Taq DNA polymerase (Promega Corp., Madison, WI, USA).

2.16.2 תנאי הריאקציה: שלב דנטורציה ראשוני במשך 5 דקות ב-95°C; 30 או 40 מחזורים של: שלב דנטורציה למשך 30 שניות ב-95°C, שלב צימוד תחלים (annealing) למשך 30 שניות ב-50°C (עבור זוגות התחלים 18S F+18S R ו-ITS F+ITS R) או ב-60°C (עבור זוג התחלים CgInt+ITS4), שלב הארכה (elongation) למשך 30 שניות ב-72°C; שלב סיום הארכה למשך 10 דקות ב-72°C; שלב המתנה לזמן בלתי מוגבל ב-4°C.

2.16.3 בדיקת תוצרי PCR: תוצרי ה-PCR הופרדו באמצעות אלקטרופורזה בג'ל המורכב מ: 1.5% agarose, TAE X1 (pH 8). בכל באר הוטענו 2µl (יחד עם 4µl מים להגדלת הנפח) או 12µl של תוצר PCR, 2-3µl של צבע Bromo Phenol Blue. הסמן המולקולרי ששימש להפרדה הוא GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas, Hanover, MD, USA). נעשתה במתח של 80V עם TAE X1 כבופר הרצה. צביעת הג'ל ב-EtBr נעשתה לאחר הרצת תוצרי ה-PCR. לאחר 30-60 דקות הפרדה (כתלות בגודל הג'ל ותוצרי ה-PCR המצופים), הג'ל תועד במצלמה מסוג Thermal imaging system FTI-500 (Fuji film, Pharmacia Biotech, California, USA).

2.16.4 PCR ישיר מחיידקים: שימש לסריקה מהירה של מושבות חיידקים המכילות מחדר מסוים. התחלים ששימשו להגברת המחדר הם של הפלסמיד (T7, SP6). דגימה מכול מושבת חיידקים הועברה באמצעות קיסם למבחנת PCR שהכילה $10\mu\text{l}$ מים סטריליים. המבחנות הוכנסו לטמפרטורה של -20°C למשך 10 דקות כדי לשבור את תאי החיידקים. לכל מבחנה הוספו $10\mu\text{l}$ מתערובת הריאקציה כך שנפח הריאקציה הכללי היה $20.0\mu\text{l}$ והיא הכילה את המרכיבים המפורטים בסעיף 2.16.1. בשינוי אחד בלבד: 1.5 יחידה של *Taq DNA polymerase*. הריאקציה בוצעה בטמפרטורת צימוד תחלים של 50°C ובמשך 40 מחזורים. תוצרי ה-PCR נבדקו באופן שתואר בסעיף 2.16.3. במושבה שמכילה פלסמיד עם מחדר, מקטע ההחדרה שהתקבל הוא בגודל המחדר (כ-500 בסיסים) ועוד 80 בסיסים (התחלים וחלק הפלסמיד שביניהם למחדר). לעומת זאת, במושבה המכילה פלסמיד לבד, המקטע שהתקבל הוא בן 80 בסיסים בלבד.

2.17 (QRT-PCR) Quantitative-real-time PCR

כל ריאקציות ה-QRT-PCR לזיהוי הפטריה בצמח בוצעו במכשיר ROTOR-GENE RT-3000 (CORBETT RESEARCH, Sydney, Australia). כל דגימות הצמחים המאולחים שנבדקו בשיטה זו אולחו בתבנית C.g מספר 48A בלבד.

2.17.1 מרכיבי תערובת הריאקציה: כל ריאקציה בנפח כולל של $15.0\mu\text{l}$ הכילה: 0.5 volume SYBR GREEN buffer (AmpliQ Universal Real Time PCR Master Mix Kit 6mM MgCl_2 – Ampliqon; or ABsolute™ Blue QPCR SYBR® Green Rox Mix - ABgene™ – Tamar, Mevaseret Zion, Israel), 133 nM (for the Absolute™ Mix) or 333nM (for the AmpliQ Mix) each primer, 1pg-100ng DNA sample.

2.17.2 תנאי הריאקציה: שלב דנטורציה ראשוני במשך 15 דקות ב- 95°C ; 40 מחזורים של: שלב דנטורציה למשך 10 שניות ב- 95°C , שלב צימוד תחלים (annealing) למשך 15 שניות ב- 60°C , שלב הארכה (elongation) למשך 15 שניות ב- 72°C .

2.17.3 אנליזת ריאקציות QRT-PCR (<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realttime-home.htm>) (Barnes and Szabo, 2007);

2.17.3.1 גרף פלואורסנציה (Raw Channels): גרף זה מציג מהי עוצמת הפלואורסנציה של כל דגימה בכל אחד מהמחזורים בריאקציה. זהו המידע הגולמי המתקבל במכשיר ה-QRT-PCR, לפני האנליזה על-ידי התוכנה. עבור כל דגימה, ניתן לזהות בו באיזה מחזור במהלך הריאקציה עוצמת הפלואורסנציה שיצרו האמפליקונים זוהתה לראשונה על-ידי המכשיר, ועד איזו רמה היא מגיעה. העלייה בעוצמת הפלואורסנציה מציינת את העלייה בכמות האמפליקון.

2.17.3.2 גרף התכה (Melt): גרף זה מציג את קצב השינוי בעוצמת הפלואורסנציה עם הזמן (dF/dT) לעומת הטמפרטורה. שלב ההתכה הוא התקדמות הדרגתית בהפרשים של 0.5°C לשניה מטמפרטורה נמוכה לגבוהה, במהלכה נמדד השינוי בעוצמת הפלואורסנציה. בנקודת ההתכה, שני גדילי ה-DNA מופרדים ועוצמת הפלואורסנציה דועכת במהירות. השיא הוא בנקודת ההתכה T_m , שתלויה בהרכב הבסיסים של ה-DNA, ואם רצף ה-DNA קצר, גם באורכו. דימר תחלים גורם לשיא בטמפרטורה

נמוכה יותר (כי ה-DNA קצר מאוד). אם זוהתה דגימת ה-DNA על-ידי התחלים, יופיע שיא בטמפרטורה מסוימת. בדגימות שלא מכילות DNA לא יתקבל שיא.

2.17.3.3. ערכי ה-Ct (Cycle threshold): קו ה-Ct משורטט אוטומטית על-ידי התוכנה, ומצביע על המחזור המדויק בו ישנה הגברה מובהקת של המקטע המסונטז מעבר לרמת רעשי הרקע. הנגזרת השנייה של Ct משמעותה המחזור בו התרחשה העלייה הגדולה ביותר בעוצמת הפלואורסנציה.

2.17.3.4. פרמטרים של עקומת הכיול

ההגברה האקספוננציאלית (exponential amplification): פי כמה גדל מספר עותקי האמפליקון בכל מחזור. הערך האידיאלי הוא 2.

שיפוע הקירוב הליניארי של עקומת הכיול (m): חישוב תיאורטי: exponential amplification = $2 = 10^{(-1/m)}$ ואז הערך האידיאלי הוא -3.322. החישוב האמפירי הוא $m = \frac{\Delta Ct}{\log(\text{copy} - \text{no})}$ ואז ניתן לחשב את נתוני ההגברה האקספוננציאלית ויעילות הריאקציה.

יעילות הריאקציה (efficiency): הערך האידיאלי הוא 1. הערך האמפירי מחושב באמצעות השיפוע: $\text{efficiency} = [10^{(-1/m)}] - 1$. במחזורים המוקדמים של הריאקציה, יעילות התגובה גבוהה וקבועה, והיא יורדת במחזורים המאוחרים יותר (Schna *et al.*, 2004).

ערך R: מראה את התאמתו של הקירוב הליניארי לנתונים בעקומת הכיול ונע בין (-1) ו-(1). ככל שהערך המוחלט של R גבוה יותר, הקירוב הליניארי מתאר טוב יותר את המשתנים בעקומת הכיול.

2.17.4. יצירת גרפי כיול: נעשו לפחות שתי ריאקציות QRT-PCR לכל כיול, עם מיהולי DNA עשרוניים חדשים בכל ריאקציה, ולפחות שתי חזרות טכניות (דופליקטים) עבור כל דגימת DNA בכל ריאקציה. בכל גרף כיול הורצו ביקורת חיובית (DNA מתבדיד מספר 48A או מצמח 'סופרים' בריא בבדיקת רצפים פטרייתיים או צמחיים, בהתאמה), ביקורת שלילית (DNA מהצמח או מהפטריה בבדיקת רצפים פטרייתיים או צמחיים, בהתאמה) וביקורת ntc (no template control) בה הוספו מים מולקולריים במקום DNA.

2.17.5. הצגת גרפי כיול: להצגה נבחרה ריאקציה שבה הפרמטרים של עקומת הכיול הם הקרובים ביותר לערכים התיאורטיים כפי שמוצגים בסעיף 2.17.3.4. חושב ערך ה-Ct הממוצע לכל הדופליקטים או הטריפליקטים של דגימת DNA שריכוזה ידוע. תוכנת EXCEL שימשה ליצירת גרף המציג את ה-Ct לעומת log של ריכוז ה-DNA ביחידות pg לריאקציה או log של מספר עותקי פלסמידים לריאקציה. משוואת הקו הישר העובר בין הנקודות וערך ה-R² חושבו בתוכנת EXCEL, נתונים לגבי יעילות הריאקציה נלקחו מתוכנת ה-ROTOR GENE ומובהקות שיפוע הקו הישר חושבה באמצעות תוכנת JUMP.

2.17.6. הרצת דוגמאות/ניסויים: דגימות בריכוז 1 ng/reaction מכול ניסוי שנבדק ב-QRT-PCR נבדקו בלפחות 2 ריאקציות, שכללו ביקורת חיובית ו/או שלילית, וביקורת ntc. מאחר שהתוצאות שהתקבלו היו איכותיות בלבד, במרבית הריאקציות נבדקה חזרה טכנית אחת בלבד לכל דגימה. במקרה שהתוצאות בשתי הריאקציות לא חזרו על עצמן, בוצעו ריאקציות נוספות. התוצאות הוצגו בטבלה, כאשר V משמעו זיהוי חיובי ל-C.g. בדגימה, ו-X משמעו שלא זוהתה C.g. בדגימה.

3. תוצאות

3.1 אפיון המחלה והתסמינים באמצעות אילוח מלאכותי של שתילי לימוניות

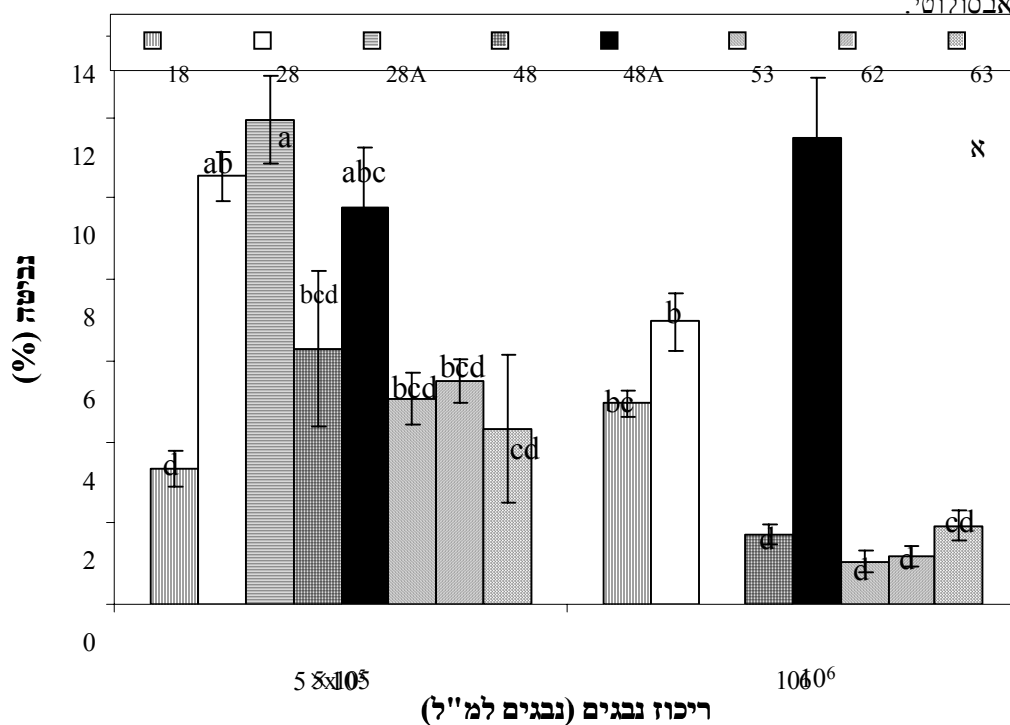
3.1.1 השוואה בין תבדידים שונים של C.g.

3.1.1.1 ניסוי תאי ספירה

אחוזי הנביטה של תבדידי C.g. שונים בשני ריכוזים, 5×10^5 ו- 10^6 נבגים למ"ל, שנקבעו כפי שמתואר בסעיף 2.6 בפרק שיטות וחומרים, מוצגים באיור 1. ריכוזים אלו יישמשו במרבית ניסויי האילוח. הגרף מציג ניסוי אחד בלבד שכלל 5 חזרות לכל תבדיד. עבור תבדידים שהניסוי בוצע עליהם יותר מפעם אחת, נבחר להצגה הניסוי עם שגיאת התקן הקטנה ביותר (אם נעשו שני ניסויים) או הניסוי עם תוצאת הביניים של סטיית התקן (אם נעשו שלושה ניסויים).

השוואת אחוז הנביטה של תבדידי הפטריה השונים העלתה כי בריכוז של 5×10^5 נבגים למ"ל נבגים של תבדידים מספר 28, מספר 28A ומספר 48A נובטים בשיעור גבוה יותר מאלו של התבדידים האחרים, אם כי ההבדל בינם לבין שאר התבדידים אינו תמיד מובהק. עבור מרבית התבדידים נראה כי בריכוז המידבק הגבוה יותר (10^6 נבגים למ"ל), אחוז הנביטה נמוך יותר מאשר בריכוז המידבק הנמוך יותר (5×10^5 נבגים למ"ל). עם זאת, בשני ריכוזים אלו שנבדקו, ערכי אחוז נביטת הנבגים הם נמוכים מאוד

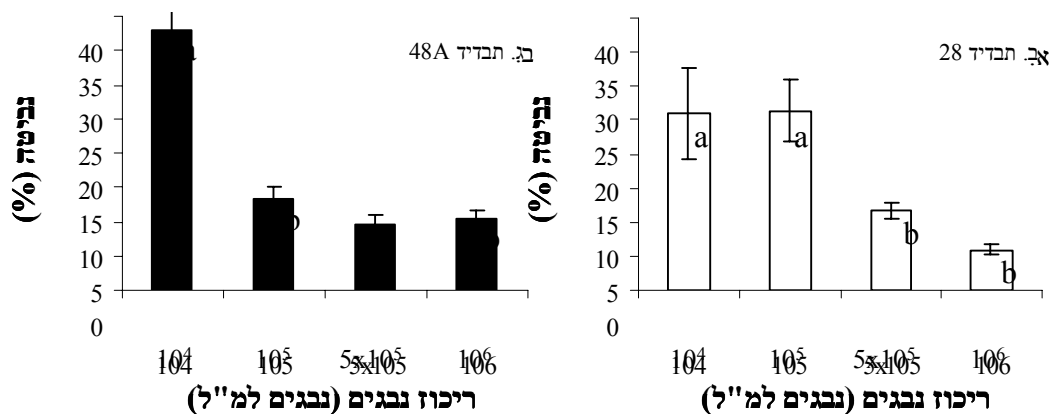
באופן אבסולוטי.



איור 1: ממוצע אחוז נביטת נבגים של תבדידי C.g. שונים. נקבע עבור תרחיף נבגים בשני ריכוזים שונים באמצעות ספירת נבגים לאחר גידול של 20 שעות בתאי ספירה מפלסטיק. LSD (רמת מובהקות $P < 0.0001$) – עבור ריכוז של 5×10^5 נבגים למ"ל – 5.5087, עבור ריכוז של 10^6 נבגים למ"ל – 3.0048 (אין נתונים לגבי אחוז הנביטה של תבדיד מספר 28A בריכוז 10^6 נבגים למ"ל).

כאשר הושווה אחוז הנביטה של תבדיד מספר 28 לזה של תבדיד מספר 48A (איור 2 א' ו-ב'), על שניהם נעשתה עיקר העבודה, התגלה כי ככל שריכוז הנבגים בתרחיף הנבדק הוא גבוה יותר, אחוז הנביטה הוא נמוך יותר. עבור תבדיד מספר 28, לא היה הבדל בין אחוז הנביטה בשני הריכוזים הנמוכים (10^4 ו- 10^5)

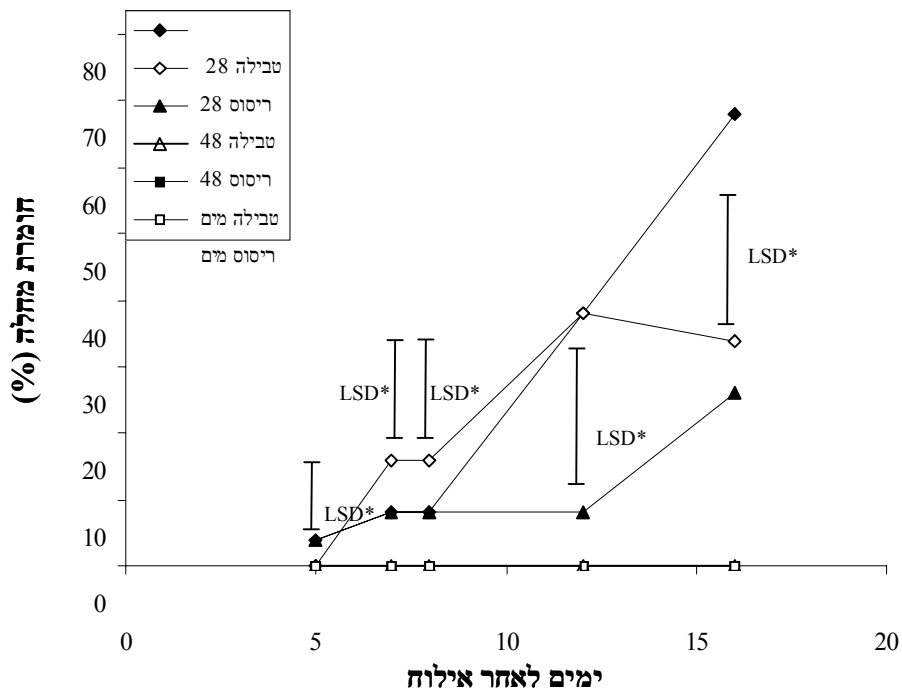
נבגים למ"ל), אך הייתה ירידה דרמטית ומובהקת במעבר לריכוז הבא (5×10^5 נבגים למ"ל), וירידה קטנה יותר, שאינה מובהקת, במעבר לריכוז הגבוה ביותר, הגבוה ממנו פי 2 בלבד (10^6 נבגים למ"ל). תבדיד מספר 48A הציג תמונה שונה במקצת: בשלושת הריכוזים הגבוהים ביותר אחוז הנביטה היה נמוך, ורק בריכוז הנמוך ביותר הייתה עלייה דרמטית ומשמעותית באחוז הנביטה. אחוז הנביטה הגבוה ביותר שנמדד (הנתונים המוצגים הם ממוצעים) היה כ-47%, עבור תבדיד מספר 48A בריכוז של 10^4 נבגים למ"ל.



איור 2: ממוצע אחוז נביטת נבגים של תבדידי C.g. בריכוזים שונים: תרחיף הנבגים בריכוז של 10^4 , 10^5 , 5×10^5 או 10^6 נבגים למ"ל. כל ריכוז נבדק בשני ניסויים לפחות, בכל ניסוי 5 חזרות. א. תבדיד מספר 28: LSD (רמת מובהקות) $17.625 - (P=0.0002)$. ב. תבדיד מספר 48A: LSD (רמת מובהקות) $13.971 - (P<0.0001)$.

3.1.1.2. בחירת תבדידי הפטריה ושיטת האילוח לשימוש בעבודה

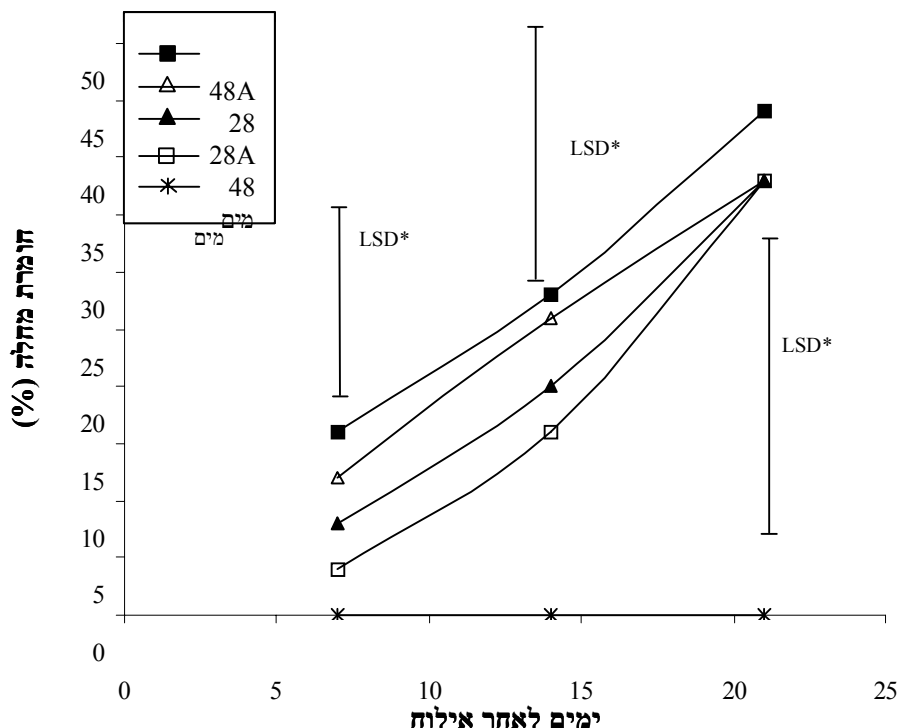
על מנת לבחור את תבדידי C.g. ששימשו בהמשך העבודה ואת שיטת אילוח צמחים הטובה יותר, נעשו ניסויים מקדימים של אילוח צמחים מזן 'סופרים', שאולחו כמתואר בסעיף 2.7.1 בפרק שיטות וחומרים, ונקבעה חומרת המחלה בצמחים בשיטה הויזואלית, כמתואר בסעיף 2.8.1.1 בפרק שיטות וחומרים. איור 3 מציג תוצאות חלקיות של הערכת חומרת המחלה במועדי הבדיקה השונים, אשר על פיהן ועל פי תוצאות ניסויי תאי הספירה, נקבע כי התבדידים ששימשו להמשך העבודה הם מספר 28 ומספר 48. שני תבדידים אלו גרמו למחלה בעוצמה חזקה יותר מאשר שאר התבדידים שנבדקו (מספר 18, 53, 62, 63 ו-72), כאשר לפי ערכי ה-AUDPC המפורטים בכותרת של איור 3, ניתן לראות כי תבדיד מספר 28 היה אגרסיבי יותר מאשר תבדיד מספר 48 באופן משמעותי, וגרם לעד 70% נגיעות בתום תקופת הניסוי. בנוסף, ניתן לראות כי שיטת הטבילה הוכיחה את עצמה כיעילה יותר עבור תבדיד 28 (70% נגיעות בסוף הניסוי בשיטת הטבילה לעומת 35% נגיעות בשיטת הריסוס) ואילוח הצמחים בכל הניסויים שיוצגו נעשה בה. שיטת הטבילה הביאה להופעה מוקדמת יותר של תסמינים וגם למחלה בעוצמה גבוהה יותר בשלבים מתקדמים של הניסוי, כאשר אילוח בתבדיד מספר 48 בשיטת הריסוס לא הביא להתפתחות מחלה בצמחים כלל. בחזרה נוספת של השוואת ההבדלים בין שיטות האילוח היו פחות חד משמעיים, אך חומרת המחלה בצמחים שאולחו בטבילה עדיין הייתה גבוהה יותר, ולכן שיטה זו שימשה לאילוח בכל שאר הניסויים.



איור 3: חומרת המחלה בצמחים שאולחו בתבדידי C.g. מספר 28 ו-48 בשתי שיטות. ריכוז המידבק ששימש לאילוח הוא 5×10^6 נבגים למ"ל, בנוסף לביקורת המים. האילוח נעשה בטבילה או בריסוס. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 5×10^6 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. LSD* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 5 – 10.098, יום 7 ויום 8 – 14.281, יום 12 – 20.51, יום 16 – 19.717. ערכי AUDPC של הגרפים השונים: טבילה 28 – 324, ריסוס 28 – 284, טבילה 48 – 120, ריסוס 48 – 0, טבילה מים – 0, ריסוס מים – 0. LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות $P < 0.0001$): 140.1.

3.1.1.3. השוואה בין תבדידים שבודדו מחדש לאחר ביצוע מבחן קוך

מבחן קוך בוצע על-ידי בידוד מחדש של תבדידים מספר 28 ומספר 48 מצמחים מזן 'סופרים' שאולחו לצורך הניסויים המקדימים, זאת על מנת לוודא כי התבדידים ששימשו לאילוח הם אגרסיביים מספיק. גורמי המחלה שבודדו מחדש זהו כ-C.g. במיקרוסקופ וכינו מספר 28A ומספר 48A, בהתאמה לתבדידים המקוריים, ובהמשך הם שימשו לאילוח צמחים בטבילה. איור 4 מציג את תוצאות הערכת חומרת המחלה בצמחים שאולחו על-ידי ארבעת התבדידים (28, 48, 28A ו-48A) במועדי הבדיקה השונים ואת ערכי ה-AUDPC (בכותרת האיור). ניתן לראות כי תבדיד מספר 28A גורם למחלה בעוצמה מעט נמוכה יותר מאשר תבדיד 28 לאורך הניסוי (אם כי בתום התקופה שני התבדידים הגיעו לערך של כ-37% נגיעות). תבדיד 48A גורם למחלה בעוצמה גבוהה יותר מאשר תבדיד מספר 48, אך ההבדלים אינם מובהקים. עם זאת, מאחר שאחוז הנביטה של תבדיד מספר 48A גבוה יותר משל תבדיד מספר 48 (תוצאות המוצגות בניסוי תאי הספירה, סעיף 3.1.1.1), הניסויים בהמשך נערכו עם תבדיד מספר 48A. מבחן זה בוצע פעם אחת.



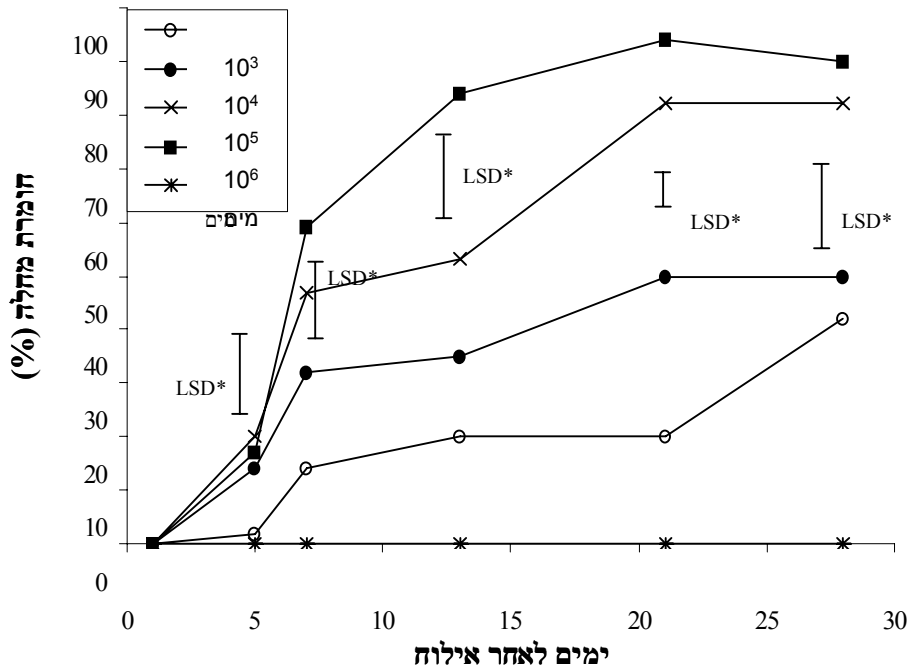
איור 4: חומרת המחלה בצמחים שאולחו בגורמי המחלה המקוריים ובאלו שבודדו במבחן קוד. השוואת מידת האגרסיביות של תבדידים מספר 28 ומספר 48 ושל גורמי המחלה שבודדו מחדש מצמחים שאולחו בתבדידים אלו, ונקראו 28A ו-48A בהתאמה. ריכוז המידבק ששימש לאילוח הוא 5×10^6 נבגים למ"ל, בנוסף לביקורת המים. האילוח נעשה בטבילה. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 5 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. LSD* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 7 – 16,927, יום 14 – 22,868, יום 21 – 26,63. ערכי AUDPC של הגרפים השונים: 28 – 357, 28A – 301, 48 – 259, 48A – 406, מים – 0. LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות $P < 0.0001$): 211.76.

3.1.2.1. השוואת ריכוזי אילוח שונים

האילוח בוצע כמתואר בסעיף 2.7.3 והצגת וניתוח התוצאות נעשו כמתואר בסעיפים 2.8.1.3 ו-2.8.2.1 בפרק שיטות וחומרים. עבור כל תבדיד מובאות תוצאות מייצגות לניסוי זה מתוך שניים שבוצעו.

3.1.2.1.1. חומרת מחלה הנגרמת על-ידי תבדיד מספר 28

איור 5 מציג את הערכת חומרת המחלה של תבדיד מספר 28 במועדי הבדיקה ואת ערכי ה-AUDPC של גרף זה (בכותרת האיור). בצמחי ביקורת המים לא הופיעו כלל תסמיני מחלה. בכל מועד בדיקה חומרת המחלה הייתה גבוהה ככל שריכוז המידבק ששימש לאילוח היה גבוה יותר, אם כי לא תמיד ההבדלים בין ריכוזי המידבק השונים היו מובהקים. עם זאת, ערך ה-AUDPC שמייצג את מהלך התפתחות המחלה לאורך הזמן, שונה במובהק בין כל הטיפולים השונים. בתום תקופת הניסוי, חומרת המחלה של צמחים שאולחו ב- 10^5 נבגים למ"ל הייתה גבוהה משמעותית משל צמחים שאולחו ב- 10^4 נבגים למ"ל: כ-80% נגיעות לעומת 50% בהתאמה. לעומת זאת ההבדל בין חומרת המחלה של צמחים שאולחו בריכוז של 10^3 נבגים למ"ל לצמחים שאולחו ב- 10^4 נבגים למ"ל, או בין צמחים שאולחו ב- 10^5 נבגים למ"ל לכאלה שאולחו ב- 10^6 נבגים למ"ל, היה פחות משמעותי: כ-40% לעומת 50%, או 80% לעומת 90%, בהתאמה. יחס דומה קיים גם בערכי ה-AUDPC של הטיפולים השונים. בחזרה נוספת לניסוי זה נראו תוצאות נמוכות יותר בהערכת חומרת המחלה, אך תבנית דומה בהתנהגות הגרף, בהבדלים בין הריכוזים השונים ובמובהקות ההבדלים. תוצאות חזרה זו אינן מוצגות.

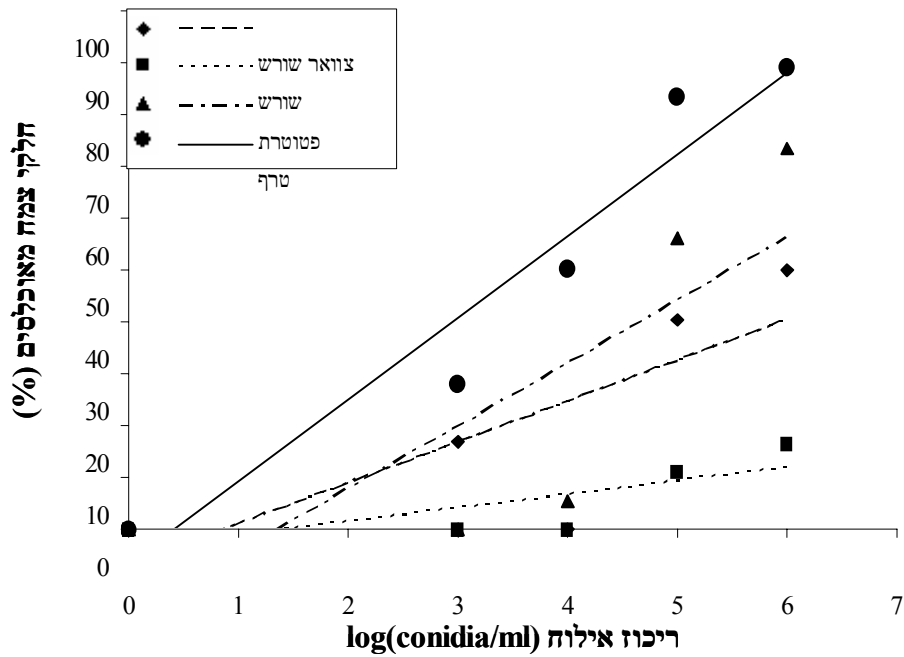


איור 5: חומרת מחלה בצמחים שאולחו בתבדיד C.g. מספר 28. ריכוזי המידבק ששימשו לאילוח היו 0, 10³, 10⁴, 10⁵, ו-10⁶ נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 10 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. LSD* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 0 – 1, יום 5 – 14.28, יום 7 – 14.302, יום 13 – 15.506, יום 21 – 6.562, יום 28 – 15.984. ערכי AUDPC של הגרפים השונים: 10³ – 0.499, 10⁴ – 0.965, 10⁵ – 1.521, 10⁶ – 1.895, מים – 0. LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות $P < 0.0001$): 198.8.

3.1.2.2. אכלוס איברים שונים בצמח על-ידי תבדיד מספר 28

איור 6 מציג את אחוז החלקים המאוכלסים בפתוגן עבור צמחים שאולחו בתבדיד מספר 28. בצמחי ביקורת המים לא זוהה הפתוגן. כל הקירובים הליניאריים הם במגמת עלייה – כלומר ככל שריכוז האילוח גבוה יותר, כך גם אחוז חלקי הצמח המאוכלסים. ניתן לראות כי חלקי הטרפים הם המאוכלסים ביותר (בריכוז האילוח הגבוה ביותר עד 90% מהחלקים שנבדקו מאוכלסים), ולאחר מכן, בסדר יורד, חלקי הפטוטרות (עד 75%), צוואר השורש (עד 50%), ולבסוף חלקי השורש (עד 15%), שמראים רמת אכלוס נמוכה מאוד. ערך ה-R² של חלקי הטרפים הוא גבוה במיוחד. בנוסף, שיפועי הקווים הליניאריים אינם מובהקים, פרט לשיפוע הטרפים.

בחזרה נוספת לניסוי זה נראו תוצאות דומות (אינן מוצגות), כאשר שיפועי הקירובים הם מובהקים עבור חלקי הפטוטרות והטרפים, והם בעלי ערך R² גבוה.

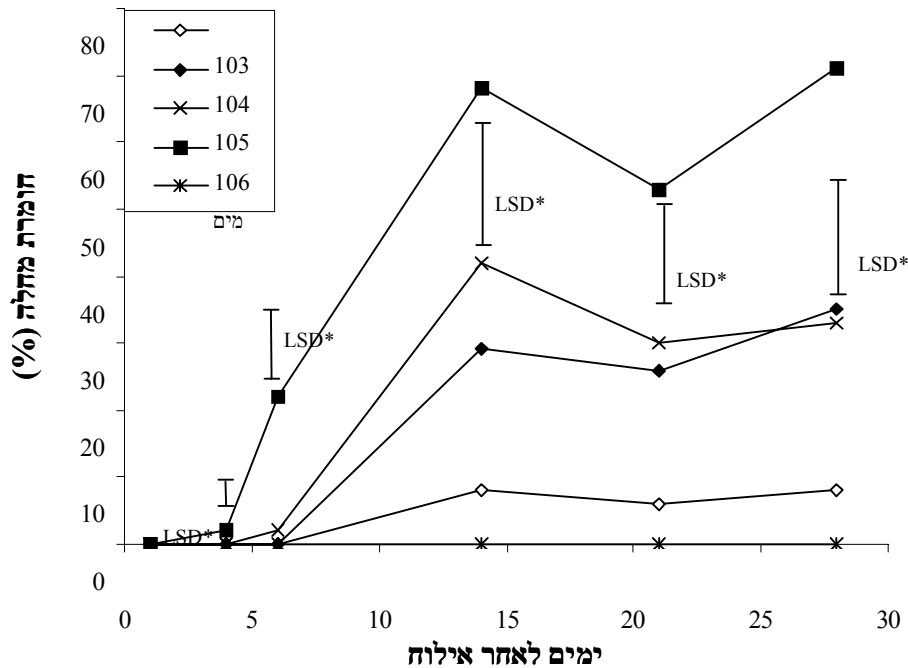


איור 6: אכלוס חלקי צמחים שאולחו בתבדיד מספר 28. ריכוזי המידבק ששימשו לאילוח היו $0, 10^3, 10^4, 10^5$, ו- 10^6 נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 3 חלקים שנזרעו על מצע חצי בררני) עבור כל איבר ב-6 מועדי בדיקה שונים המשמשים כחזרות, וממוצע בין החזרות. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 ומובהקות שיפוע הקו עבור כל איבר: צוואר שורש $y=7.8573x-6.8473$; $P=0.1148$ $R^2=0.6181$; שורש $y=2.6313x-3.8843$; $P=0.1148$ $R^2=0.6181$; פטרות $y=12.131x-16.643$; $P=0.1292$ $R^2=0.5901$; טרף $y=15.773x-6.5852$; $P=0.1074$ $R^2=0.6332$. $P=0.0073$ $R^2=0.9341$.

3.1.2.3. חומרת מחלה הנגרמת על-ידי תבדיד מספר 48A

איור 7 מציג את הערכת חומרת המחלה בצמחים שאולחו בתבדיד מספר 48A במועדי הבדיקה השונים ואת ערכי ה-AUDPC של גרף זה (בכותרת האיור). בצמחי ביקורת המים לא הופיעו כלל תסמיני מחלה. בכל מועד בדיקה חומרת המחלה הייתה גבוהה יותר ככל שריכוז המידבק ששימש לאילוח היה גבוה יותר, אם כי לא תמיד ההבדלים בין ריכוזי המידבק השונים הם מובהקים. ההבדלים בין הטיפולים, אותם מראה ערך ה-AUDPC שמייצג את מהלך התפתחות המחלה לאורך הזמן, מציגים תמונה דומה לגרף חומרת המחלה: טיפול ביקורת המים אינו שונה במובהק מאילוח בריכוז נבגים של 10^3 נבגים למ"ל אם כי הוא בעל ערך נמוך ממנו. האילוחים בריכוזי נבגים של 10^4 ו- 10^5 נבגים למ"ל אינם שונים במובהק זה מזה, אך שונים במובהק מהאילוח ב- 10^3 וב- 10^6 נבגים למ"ל. בתום תקופת הניסוי, חומרת המחלה של צמחים שאולחו ב- 10^6 נבגים למ"ל הייתה גבוהה משמעותית משל צמחים שאולחו ב- 10^5 נבגים למ"ל: כ-70% נגיעות לעומת 35% בהתאמה. גם ההבדל בין חומרת המחלה של צמחים שאולחו בריכוז של 10^3 נבגים למ"ל לזו של צמחי שאולחו ב- 10^4 נבגים למ"ל היה משמעותי, כ-10% נגיעות לעומת 35% נגיעות, בהתאמה. עם זאת, ניתן לראות שלא היה הבדל בין הצמחים שאולחו בריכוז של 10^4 נבגים למ"ל לאלו שאולחו ב- 10^5 נבגים למ"ל.

בחזרה נוספת לניסוי זה נראו תוצאות דומות לניסוי המוצג למעלה ואף טובות יותר: ההבדלים בין חומרת המחלה המוצגת בגרף היו מובהקים בין מרבית ריכוזי האילוח בכל מועדי הבדיקה וערכי ה-AUDPC היו בעלי הבדלים מובהקים בין כל ריכוזי האילוח (התוצאות אינן מוצגות).

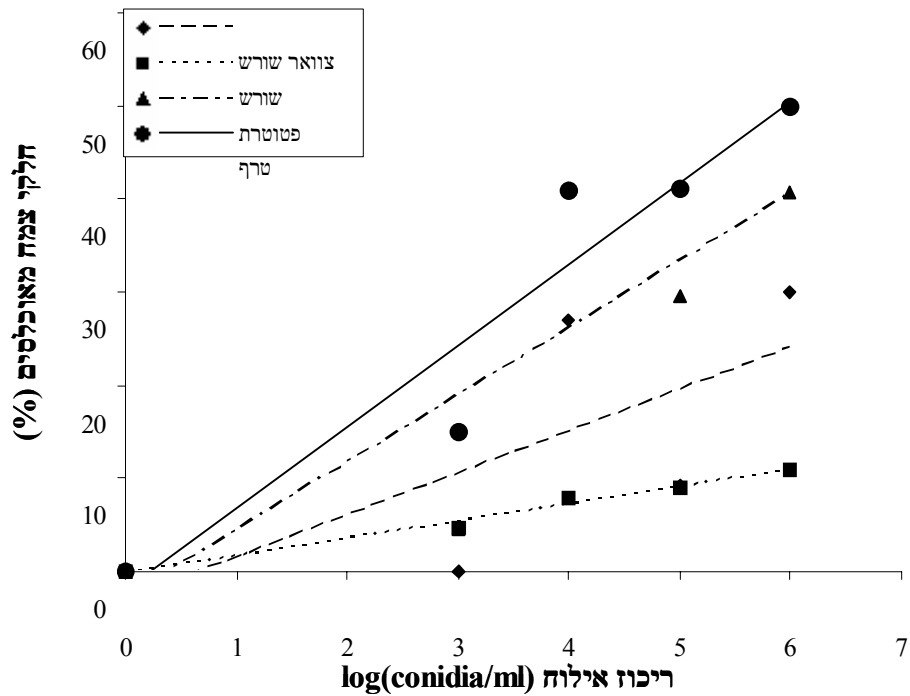


איור 7: חומרת מחלה בצמחים שאולחו בתבדיד C.g. מספר 48A. ריכוזי המידבק ש שימשו לאילוח היו 0 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ו- 10^6 נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 10 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. LSD^* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) בימים לאחר האילוח: יום 1 – 0, יום 4 – 3.5942, יום 7 – 10.236, יום 14 – 18.531, יום 22 – 14.783, יום 28 – 17.268. ערכי AUDPC של הגרפים השונים: 10^3 – 130, 10^4 – 522, 10^5 – 288.06. LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות $P < 0.0001$): 10^6 – 1244.5, מים – 0.

3.1.2.4. אכלוס איברים שונים בצמח על-ידי תבדיד מספר 48A

איור 8 מציג את אחוז החלקים המאוכלסים עבור צמחים שאולחו בתבדיד מספר 48A. בצמחי ביקורת המים זוהה הפתוגן, בעיקר בצוואר השורש, ולכן הערכים המוצגים נורמלו ביחס לרקע ביקורת המים. כל הקירובים הליניאריים הם במגמת עלייה – כלומר ככל שריכוז האילוח גבוה יותר, כך גם אחוז חלקי הצמח המאוכלסים. ניתן לראות כי חלקי הטרפים הם המאוכלסים ביותר (בריכוז האילוח הגבוה ביותר עד 50% מהחלקים שנבדקו מאוכלסים), ולאחר מכן, בסדר יורד, חלקי הפטוטרות (עד 40%), צוואר השורש (עד 30%), ולבסוף חלקי השורש (עד 10%), שמראים רמת אכלוס נמוכה מאוד. ערך ה- R^2 של חלקי השורשים והטרפים הוא גבוה במיוחד. בנוסף, רמת המובהקות של שיפועי הקווים הליניאריים היא נמוכה עבור צוואר השורש והפטוטרות, אך גבוהה עבור השורשים והטרפים.

בחזרה נוספת שנערכה לניסוי זה (תוצאות לא מוצגות), חלקי השורש מאוכלסים יותר מאשר חלקי צוואר השורש. החלקים המאוכלסים ביותר הם עדיין הטרפים ולאחריהם, הפטוטרות. הבדל משמעותי נוסף הוא שאחוז החלקים המאוכלסים בצמחים שאולחו בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל לא היה גבוה יותר מאשר צמחים שאולחו בריכוזים נמוכים יותר בכל איברי הצמח שנבדקו. לכן ערכי ה- R^2 והמובהקות של שיפועי הקירובים בגרף שנבנה היו נמוכים. כאשר נבנה הגרף וחושבו משוואת הגרף, ערך ה- R^2 והמובהקות ללא תוצאות האילוח בריכוז 10^6 נבגים למ"ל, אשר היווה ארטיפקט, ערכי ה- R^2 השתפרו משמעותית עבור כל האיברים פרט לשורש (שערך ה- R^2 שלו היה הגבוה ביותר לפני הורדת תוצאות הטיפול ב- 10^6 נבגים למ"ל), אך שיפועי הקירובים עדיין לא היו מובהקים.



איור 8: אכלוס חלקי צמחים שאולחו בתבדיד מספר 48A. ריכוזי המידבק ששימשו לאילוח היו $0, 10^3, 10^4, 10^5$, ו- 10^6 נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 4-7 חלקים שנזרעו על מצע חצי בררני) עבור כל איבר ב-6 מועדי בדיקה שונים המשמשים כחזרות, וממוצע בין החזרות. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 ומובהקות שיפוע הקו עבור כל איבר: צוואר שורש $y=4.51x-3.0136$; $P=0.1743$ $R^2=0.5158$; שורש $y=1.8523x-0.1289$; $P=0.0737$ $R^2=0.7065$; פטוטרת $y=7.2079x-2.7697$; $P<0.0004$ $R^2=0.9878$; טרף $y=8.7249x-1.9811$; $P=0.0113$ $R^2=0.9125$.

3.1.3. השוואת זני לימוניום שונים

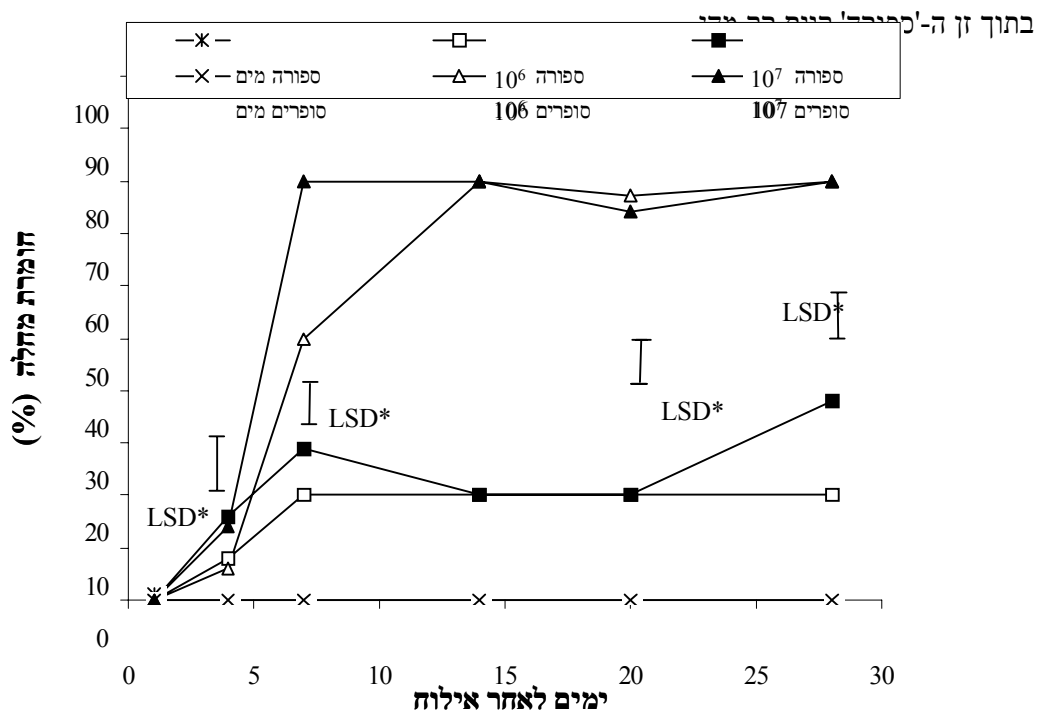
3.1.3.1. השוואת חומרת המחלה באילוח שני זני לימוניום בתבדיד 48A

האילוח בוצע כמתואר בסעיף 2.7.4. הצגת וניתוח התוצאות נעשו כמתואר בסעיפים 2.8.1.3 ו-2.8.2.1 בפרק שיטות וחומרים. מובאות תוצאות מייצגות של חזרה אחת מתוך 3 שבוצעו לניסוי זה, בכולן הצמחים אולחו על-ידי תבדיד מספר 48A בלבד. איור 9 מציג את הערכת חומרת המחלה במועדי הבדיקה השונים ואת ערכי ה-AUDPC של גרף זה (בכותרת). ניתן לראות כי במים לא הופיעו כלל תסמיני מחלה באף אחד מהזנים. ההבדלים בין ריכוזי המידבק ששימשו לאילוח נעלמים עם התקדמות הניסוי: החל משבועיים לאחר האילוח, הצמחים שאולחו בשני ריכוזי המידבק הגבוהים הראו עוצמת מחלה דומה, הנבדלת בין שני הזנים. זן ה-'סופרים' רגיש הרבה יותר למחלה – רמת נגיעות של כ-80% לקראת סוף סיום הניסוי, לעומת 20%-40% עבור זן ה-'ספורה'.

בוצעו שתי חזרות נוספות של ניסוי זה (תוצאות אינן מוצגות), בשתיהן זן ה-'סופרים' הגיב בצורה קשה יותר לאילוח המלאכותי מאשר זן ה-'ספורה', עד כדי רמת הנגיעות של 80%. עוצמת המחלה של צמחים מזן ה-'ספורה' נותרה נמוכה יותר משל צמחים מזן ה-'סופרים', עד 60% באחת החזרות, ועד 20% בחזרה השנייה. בחזרות אלה ההבדלים בין שתי רמות האילוח בכל אחד מהזנים לא היו עקביים – לעיתים צמחים שאולחו בריכוז הנמוך יותר של תרחיף הנבגים הראו רמה גבוהה יותר של תסמינים מאשר אלו שאולחו בריכוז הגבוה יותר של תרחיף הנבגים, אך במרבית מועדי הבדיקה רמות התסמינים היו זהות בשני ריכוזי האילוח או גבוהות יותר עבור צמחים שאולחו בריכוז הנבגים הגבוה יותר. באופן עקבי, באחת החזרות צמחי ה-'ספורה' שאולחו בריכוז הנבגים הנמוך יותר הראו עוצמת מחלה גבוהה יותר מאשר צמחי ה-'ספורה' שאולחו בריכוז הנבגים הגבוה יותר, החל משבועיים לאחר האילוח, אם כי

ההבדלים היו מובהקים רק במועד בדיקה אחד. בנוסף, חזרה זו הייתה היחידה בה היה הבדל מובהק בגרף חומרת המחלה בין שתי רמות האילוח של צמחי 'סופרים', החל משבועיים לאחר האילוח.

בחזרה שתוצאותיה מוצגות, נראה כאילו עיקר התקדמות המחלה נעשה במהירות בשבוע הראשון לאחר האילוח, ולאחר מכן, חומרת המחלה מתייצבת ולא ממשיכה לעלות. בחזרות האחרות, חומרת המחלה המשיכה לעלות אחרי תקופה זו ולמעשה עד תום תקופת הניסוי (ארבעה שבועות לאחר האילוח), בחזרה אחת העלייה הייתה מתונה ובשנייה – תלולה יחסית. כאשר מתייחסים לערכי ה-AUDPC של החזרה המוצגת, ניתן לראות הבדל מובהק בהתפתחות המחלה לאורך זמן בתוך כל זן והבדל גדול יותר בין הזנים השונים. ההבדל המובהק הגדול בין הזנים חוזר על עצמו בשתי החזרות האחרות, אך ההבדל המובהק



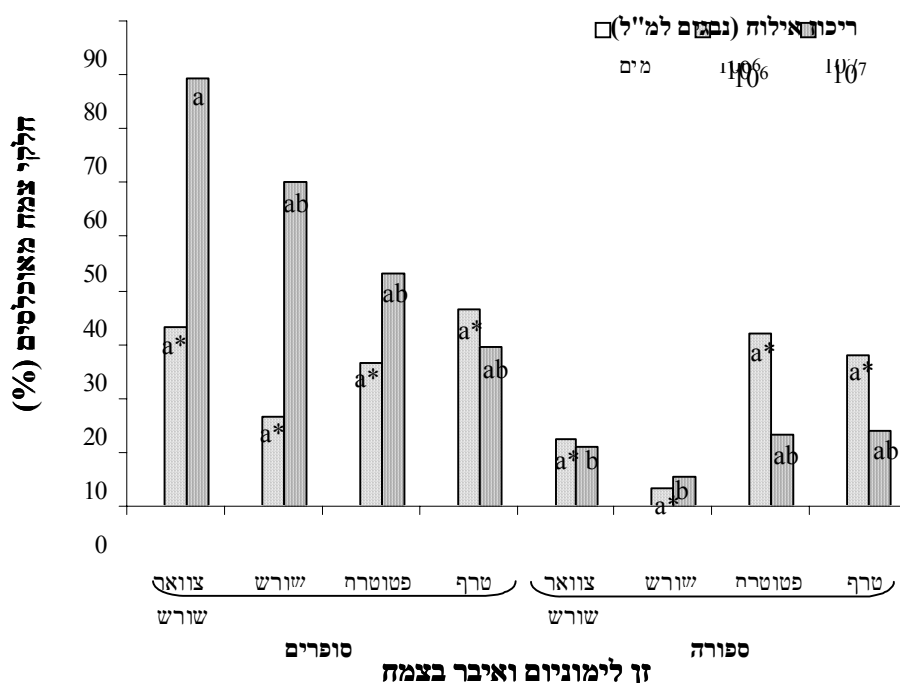
איור 9: חומרת מחלה בצמחים משני זני לימוניום, שאולחו בתבדיד מספר 48A. הריכוזים ששימשו לאילוח היו 0, 10³ ו-10⁶ נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על הערכה ויזואלית של 10 צמחים לכל טיפול בכל נקודת זמן וממוצע בין ההערכות. LSD* (רמת מובהקות P<math><0.0001</math>) בימים לאחר האילוח: יום 0 – 1, יום 4 – 10.298, יום 7 – 7.817, יום 14 – 0, יום 22 – 8.529, יום 28 – 8.537. ערכי AUDPC של הגרפים השונים: ספורה מים – 0, ספורה 10⁶ – 474, ספורה 10⁷ – 615. סופרים מים – 0, סופרים 10⁶ – 1647, סופרים 10⁷ – 1800. LSD עבור AUDPC (רמת מובהקות P<math><0.0001</math>): 93.6.

3.1.3.2. השוואת אכלוס תבדיד 48A באיברי צמח שונים בשני זני לימוניום

איור 10 מציג את אחוז החלקים המאוכלסים. בצמחי ביקורת המים לא זוהה הפתוגן לאורך כל הניסוי, וכך גם בשתי החזרות הנוספות שנערכו לניסוי זה (תוצאות לא מוצגות). במרבית התוצאות ניתן לראות כי עבור צמחים מזן 'סופרים', ככל שריכוז האילוח גבוה יותר, כך גם אחוז חלקי הצמח המאוכלסים. בצמחים מזן 'ספורה', לעומת זאת, אין מתאם בין ריכוז האילוח לבין אחוז חלקי הצמח המאוכלסים. בחזרה שתוצאותיה מוצגות ניתן לראות כי זן ה-'סופרים' רגיש יותר למחלה – חלקי הצמח שנדגמו מזן זה מראים רמת אכלוס גבוהה יותר מאשר חלקי צמח שנדגמו מזן ה-'ספורה', ללא קשר לאיבר ממנו הם נדגמו בצמח.

רמת אכלוס האיברים בתוך זן ה-'סופרים' הייתה שונה מתוצאות הניסויים הקודמים, שנערכו בצמחים מזן 'סופרים' בלבד. האיבר המאוכלס ביותר היה צוואר השורש (בריכוז האילוח הגבוה ביותר עד 80% מהחלקים שנבדקו מאוכלסים), ולאחריו בסדר יורד היו חלקי השורש (עד 60%), הפטרות (עד כ-45%) ולבסוף הטרפים (עד כ-30%), שהיו בניסוי זה בעלי רמת האכלוס הנמוכה ביותר עבור זן 'סופרים' - בניגוד לניסויים הקודמים, בהם הם היו האיברים בעלי רמת האכלוס הגבוהה ביותר. לעומת זאת, רמת אכלוס האיברים בתוך זן ה-'ספורה' הייתה דומה יותר לתוצאות הניסויים הקודמים: פטרות וטרפים (בריכוז האילוח הגבוה ביותר עד כ-14% מהחלקים שנבדקו מאוכלסים), צוואר השורש (עד כ-11%) ולבסוף חלקי השורש (עד כ-6%).

בשתי החזרות האחרות, סדר איברי הצמח לפי רמת אכלוסם בפתוגן הוא זהה לתוצאות מהניסויים הקודמים עבור שני הזנים: טרפים, פטרות, צוואר שורש ושורשים, אם כי לא תמיד איברים מזן ה-'סופרים' היו מאוכלסים יותר מאשר האיברים המקבילים אליהם מזן ה-'ספורה'.



איור 10: אכלוס חלקי צמחים משני זני לימוניות שאולחו בתבדיל מספר 48A. ריכוזי המידבק ששימשו לאילוח היו 0, 10^6 ו- 10^7 נבגים למ"ל. הנתונים מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 3-6 חלקים שנזרעו על מצע חצי בררני) עבור כל איבר וכל זן צמח ב-6 מועדי בדיקה שונים המשמשים כחזרות, וממוצע בין החזרות. LSD (רמת מובהקות $P=0.005$) – עבור אילוח ב- 10^6 נבגים למ"ל: 65.579 (*), ועבור אילוח ב- 10^7 נבגים למ"ל: 66.953.

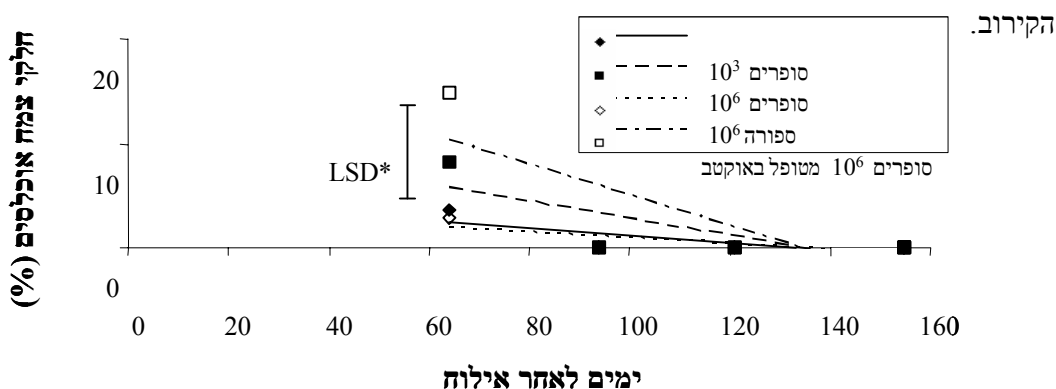
3.1.4. ניסויי שדה: השוואת ריכוזי אילוח שונים, זני לימוניות שונים וקיום טיפולי הדברה

בוצעו שני ניסויי שדה, בסתיו ובקיץ.

3.1.4.1. אכלוס צמחים על-ידי הפתוגן

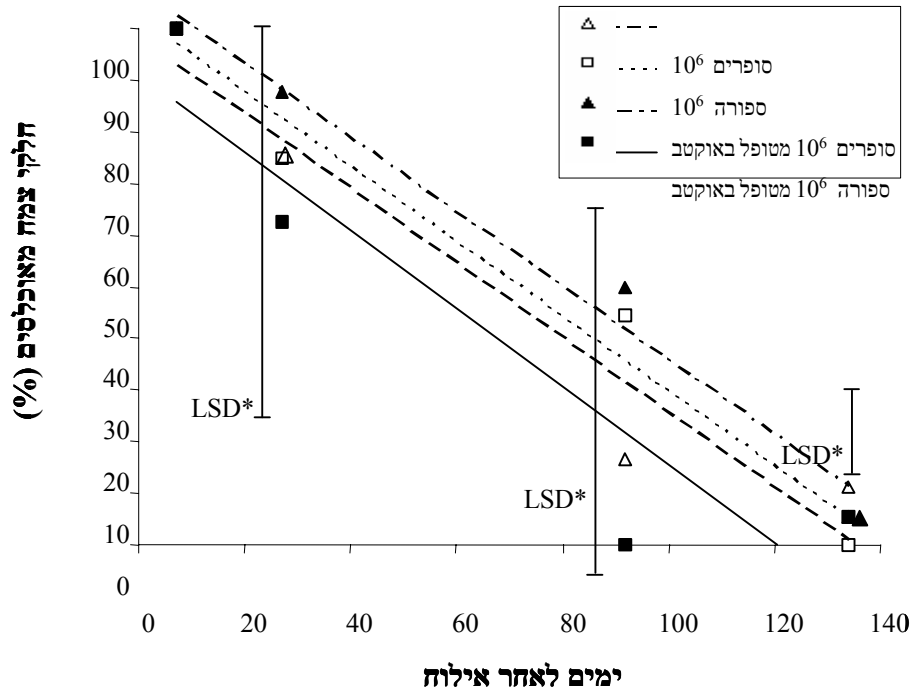
בניסוי הסתיו בדיקת האכלוס נערכה בחמישה מועדים, החל משלב שתילת הצמחים בשדה: כחודשיים (64 ימים), שלושה חודשים (96 ימים), ארבעה חודשים (124 ימים), חמישה חודשים (157 ימים) ועשרה חודשים (311 ימים), לאחר האילוח. רק במועד הראשון ניתן היה לזהות את הפתוגן בחלקי הצמח הנבדקים, שכללו חלקי צוואר שורש ופטרות, אך גם אז אחוז החלקים המאוכלסים היה נמוך מאוד. איור 11 מציג את אחוז החלקים המאוכלסים של צמחים מאולחים בהם זוהה הפתוגן, שנקבע כמתואר

בסעיף 2.8.2.2 בפרק שיטות וחומרים (לא מוצגים הטיפולים בהם לא זוהה הפתוגן). בצמחי ביקורת המים לא מזוהה הפתוגן כלל. בצמחים שאולחו בריכוז הנמוך של הנבגים (10^3 נבגים למ"ל) הפתוגן מופיע רק ב-4% מחלקי צמחים מזן 'סופרים' שלא טופלו באוקטב. בצמחים שאולחו בריכוז הגבוה של הנבגים (10^6 נבגים למ"ל) הפתוגן מופיע בכל הטיפולים מלבד צמחי 'ספורה' שטופלו באוקטב: 15% מחלקי צמחי 'סופרים' שטופלו באוקטב מאוכלסים, 8% מחלקי 'סופרים' שלא טופלו באוקטב, ו-2% מחלקי צמחי 'ספורה' שלא טופלו באוקטב. באופן כללי רמת האכלוס של צמחי 'ספורה' נמוכה יותר מרמת האכלוס של צמחי 'סופרים', ללא תלות בטיפול באוקטב או בריכוז המידבק אשר שימש לאילוח. ניתן לראות כי אף אחד מהטיפולים לא מאפשר ערך R^2 גבוה של הקירוב הליניארי או מובהק של שיפוע הקירוב.



איור 11: אכלוס חלקי צמחים בפתוגן בניסוי שדה שנערך בסתיו (נובמבר 2006 – ספטמבר 2007). נבדקו שני זני לימוניות שאולחו בתבדיל מספר 48A בריכוזים 0, 10^3 , ו- 10^6 נבגים למ"ל. במהלך החודש לאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם עברו הדברה באוקטב. כל הנתונים נלקחו מאותו מועד בדיקה (חודשיים לאחר האילוח וחודש לאחר השתילה בשדה) והם מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 8-10 חלקי צוואר שורש ופטוטורות שנזרעו על מצע חצי ברנזי) עבור 2-4 צמחים המשמשים כחזרות, וממוצע בין החזרות. LSD^* (רמת מובהקות $P < 0.0001$) – 64 ימים לאחר האילוח: 8.9858. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 ומובהקות שיפוע הקו עבור הטיפולים המוצגים בגרף: 'סופרים' 10^3 ; $P=0.2348$ $R^2=0.5856$ $y=-0.0352x+4.7153$; 'סופרים' 10^6 ; $P=0.2348$ $R^2=0.5856$ $y=-0.0274x+3.6718$; 'ספורה' 10^6 ; $P=0.2348$ $R^2=0.5856$ $y=-0.1473x+19.72$; מטופל באוקטב 10^6 'סופרים'; $P=0.2348$ $R^2=0.5856$ $y=-0.1473x+19.72$.

בניסוי הקיץ הבדיקה נערכה בארבעה מועדים, שניים מהם בשלב החממה ושניים לאחר השתילה בשדה: שבוע (7 ימים), כחודש (27 ימים), כשלושה חודשים (92 ימים) וכארבעה וחצי חודשים (134 ימים) לאחר האילוח. איור 12 מציג את אחוז החלקים המאוכלסים של צמחים שאולחו בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל, שנקבע כמתואר בסעיף 2.8.2.2 בפרק שיטות וחומרים. ניתן לראות כי בכל ארבעת המועדים הפתוגן מזוהה בצמחים המאוכלסים, אך עם זאת, אין הבדל מובהק בין הטיפולים השונים בכל נקודת זמן. מספר החלקים מהם בודד הפתוגן על גבי צלחת הולך ויורד ככל שהזמן עובר לאחר מועד האילוח, כאשר במועד הדגימה הראשונה 100% מהחלקים שנבדקו היו מאוכלסים בכל טיפולי האילוח, ובמועד הדגימה האחרונה ערך האכלוס הגבוה ביותר נמדד בצמחים מזן 'סופרים' שלא עברו הדברה – כ-10%. ערכי ה- R^2 הגבוהים מראים מתאם גבוה בין אחוז אכלוס חלקי הצמחים להתקדמות הניסוי בזמן. שיפוע הקירובים הליניאריים הינם מובהקים.

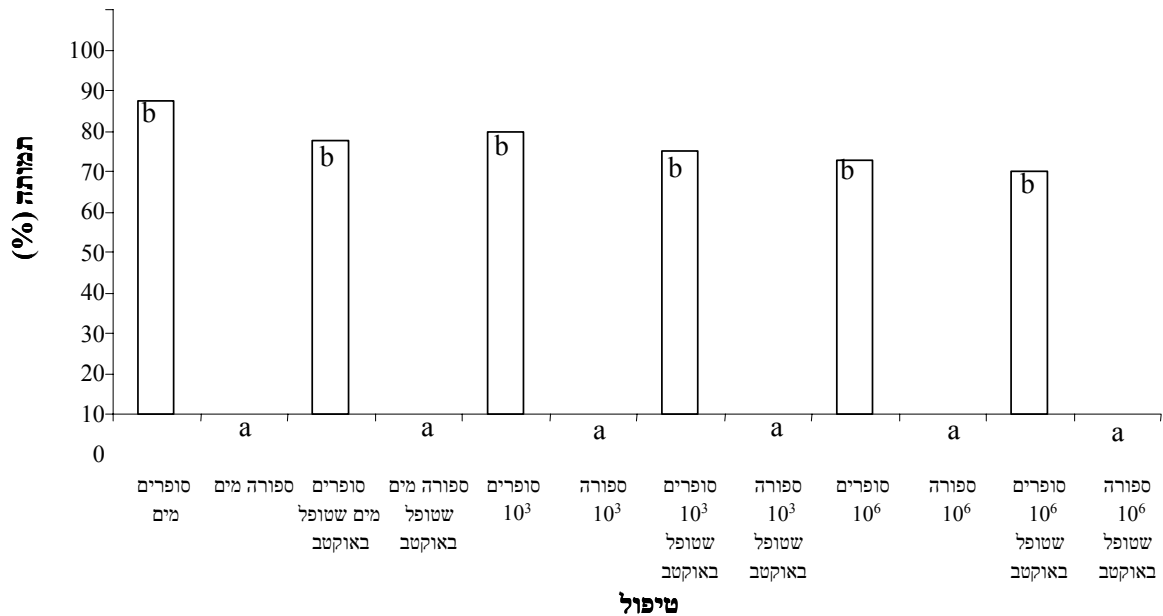


איור 12: אכלוס חלקי צמחים בפתוגן בניסוי שדה שנערך בקיץ (יוני-נובמבר 2007). נבדקו שני זני ליימונים שאולחו בתבדיל מספר 48A בריכוזים 0 ו-10⁶ נבגים למ"ל. במהלך החודש לאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם עברו הדברה באוקטב. הנתונים מבוססים על חישוב אחוז החלקים המאוכלסים (מתוך 4-6 חלקי צוואר שורש ופטוטרות שנורעו על מצע חצי ברנזי) עבור 2-3 צמחים לכל טיפול בכל מועד בדיקה ומוצע בין חזרות אלה. LSD* (רמת מובהקות P<math><0.0001</math>) בימים לאחר האילוח: יום 7 – 0, יום 27 – 78.201, יום 92 – 73.241, יום 134 – 16.66. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 ומבדיקות שיפוע הקו עבור הטיפולים המוצגים בגרף: 'ספורים' 10⁶ $y = -0.7218x + 97.613$, $R^2 = 0.9337$, $P = 0.0337$; 'ספורה' 10⁶ $y = -0.7234x + 101.881$, $R^2 = 0.9691$, $P = 0.0156$; 'ספורים' 10⁶ מטופל באוקטב $y = -0.7178x + 107.42$, $R^2 = 0.9792$, $P = 0.0104$; 'ספורה' 10⁶ מטופל באוקטב $y = -0.7566x + 91.194$, $R^2 = 0.8573$, $P = 0.0741$.

3.1.4.2. תמותת צמחים

נבדקה תמותת הצמחים משני הזנים בניסויי הסתיו והקיץ, כמתואר בסעיף 2.9 בפרק שיטות וחומרים. בשני הניסויים, בכל מועדי הבדיקה ובכל הטיפולים השונים, צמחי ה-'ספורה' לא הראו תמותה כלל. לעומת זאת, הצמחים מזן ה-'ספורים' הראו תמותה בשני הניסויים:

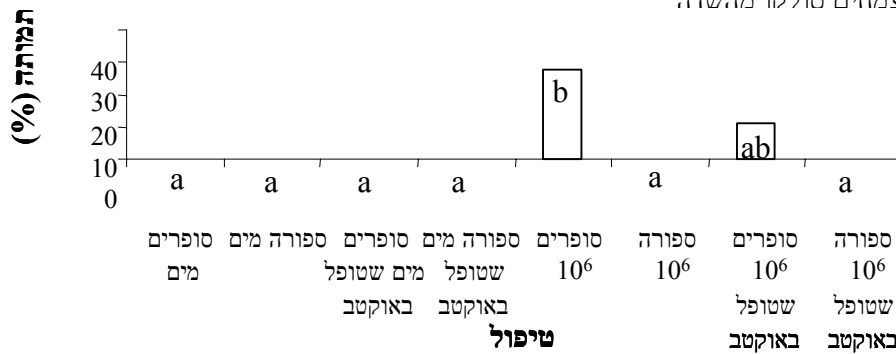
בניסוי הסתיו: חמישה חודשים לאחר האילוח, צמחי ה-'ספורים' לא הראו תמותה כלל (אפריל 2007, תוצאות לא מוצגות). שמונה חודשים לאחר האילוח, הייתה תמותה גדולה בקרב צמחי 'ספורים', כולל הצמחים מקבוצת ביקורת המים (יולי 2007, תוצאות מוצגות באיור 13). הטיפול בו נפגעו הכי מעט צמחים (60% תמותה) היה צמחי 'ספורים' שאולחו בריכוז של 10⁶ נבגים למ"ל וטופלו באוקטב. עשרה חודשים לאחר האילוח (ספטמבר 2007), לא נותרו כלל צמחי 'ספורים' חיים, כולל הצמחים מקבוצת ביקורת המים.



איור 13: תמותת צמחים בניסוי שדה שנערך בסתיו (נובמבר 2006-ספטמבר 2007), שמונה חודשים לאחר האילוח (יולי 2007). נבדקו שני זני לימוניום, שמונה חודשים לאחר שאולחו בתבדיד מספר 48A בריכוזים 0, 10³ ו-10⁶ נבגים למ"ל. במהלך החודש לאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם טופלו באוקטב. הנתונים מבוססים על קביעת אחוז התמותה בכל אחת מארבע החזרות לכל טיפול, והישוב הממוצע. LSD (רמת מובהקות $P < 0.0001$) - 37.078.

בניסוי הקיץ: חמישה חודשים לאחר האילוח חלק מצמחי ה-'סופרים' מתו (נובמבר 2007, תוצאות מוצגות באיור 14) ואחרים היו בשלבי קמילה שונים, אף ששבוע לפני כן כל הצמחים היו עדיין חיים (אך חלקם כבר החלו לקמול). אילוח בריכוז של 10⁶ נבגים למ"ל פגע בזן ה-'סופרים' בצורה הקשה ביותר (כ-25% תמותה). בקרב צמחי 'סופרים' שאולחו בריכוז זה אך טופלו באוקטב, הייתה תמותה נמוכה יותר (כ-11%), שלא הייתה שונה במובהק משאר הטיפולים. אין נתונים נוספים לגבי התמותה בניסוי הקיץ

מאחר שהצמחים סולקו מהשדה



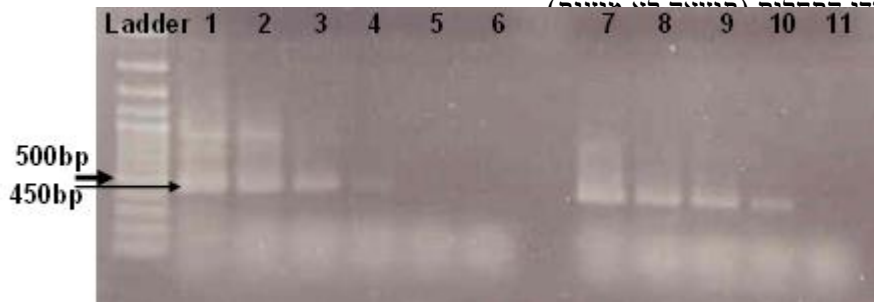
איור 14: תמותת צמחים בניסוי שדה שנערך בקיץ (יוני-נובמבר 2007), חמישה חודשים לאחר האילוח (נובמבר 2007). נבדקו שני זני לימוניום, חמישה חודשים לאחר שאולחו בתבדיד מספר 48A בריכוזים 0 ו-10⁶ נבגים למ"ל. במהלך החודש לאחר האילוח, הצמחים נשמרו בחממה וחלקם טופלו באוקטב. הנתונים מבוססים על קביעת אחוז התמותה בכל אחת משלוש החזרות לכל טיפול, והישוב הממוצע. LSD (רמת מובהקות $P = 0.003$) - 21.501.

3.2. זיהוי מולקולרי של C.g.

3.2.1. זיהוי רצף ITS של C.g. באמצעות PCR רגיל

3.2.1.1. זיהוי DNA גנומי של הפטריה

על מנת לבדוק מהי מידת הרגישות של PCR רגיל לזיהוי הפטריה, בוצעה ריאקציה הגברה למקטע בגודל של כ-450bp ברצף ITS באמצעות תחלים ספציפיים ל-C.g., CgInt ו-ITS4, המפורטים בטבלה מספר 2 בסעיף 2.15 בפרק שיטות וחומרים. נבדק DNA גנומי של תבדיד C.g. מספר 48A מהול במים בריכוזים שונים, וכן מהול באותם ריכוזים בתמיסת DNA צמחי, שהייתה בריכוז קבוע של 90 ng/reaction. בוצעו 3 חזרות לריאקציה ואיור 15 מציג ג'ל אלקטרופורזה שבו הופרדו תוצרי ההגברה של אחת החזרות. ניתן לזהות את תוצר ההגברה של הרצף ITS ב-DNA פטריה גנומי המהול במים עד לריכוז של 300 pg/reaction (באר 4), וב-DNA פטריה המהול ב-DNA צמחי עד לריכוז של 30 pg/reaction (באר 10), אם כי באחת החזרות האחרות התאפשר אף לזהות את רצף ITS ב-DNA פטריה גנומי בריכוז של 30 pg/reaction ואת אותו DNA מהול ב-DNA צמחי בריכוז של 3 pg/reaction (תוצאות לא מוצגות). ביקורת שלילית שהייתה מורכבת מ-DNA הצמחי בלבד לא



איור 15: ג'ל אלקטרופורזה המתאר את תוצרי הגברה ב-PCR של רצף ITS מ-DNA גנומי של C.g. הריאקציה בוצעה באמצעות תחלים CgInt ו-ITS4, בתוכנית של 40 מחזורים וטמפרטורת איחוי של 60°C. התוצר בגודל 500bp שהתקבל מסומן בחץ. (1. F48A 300 ng/reaction (2. F48A 30 ng/reaction (3. F48A 3 ng/reaction (4. F48A 300 pg/reaction (5. F48A 30 pg/reaction (6. F48A 3 pg/reaction (7. F48A 30 ng/reaction מהול ב-DNA צמחי (8. F48A 3 ng/reaction מהול ב-DNA צמחי (9. F48A 300 pg/reaction מהול ב-DNA צמחי (10. F48A 30 pg/reaction מהול ב-DNA צמחי (11. F48A 3 pg/reaction מהול ב-DNA צמחי. ה-DNA הצמחי בו נמהלו דגימות ה-DNA הפטריית היה בריכוז קבוע של 90 ng/reaction.

3.2.1.2. זיהוי C.g. בצמחים מאולחים

נבדק אם PCR רגיל יכול לזהות את הפטריה בצמח מאולח. לצורך כך בוצעה ריאקציה הגברה באמצעות התחלים הספציפיים ל-C.g., CgInt ו-ITS4, ובתנאים המפורטים למעלה. נבדקו 24 דגימות DNA שהופקו מצמחים שהשתתפו בניסויי האילוח המשווים בין זן 'סופרים' לזן 'ספורה' (חזרה שונה מזו המוצגת בסעיף 3.1.3 בפרק התוצאות). דגימות אלה נבדקו גם ב-QRT-PCR. עשרים מהדגימות היו של צמחים מאולחים, וארבע דגימות היו של צמחים מקבוצת הביקורת. הדגימות השונות נבדקו בחזרה אחת בלבד, אך בשלושה ריכוזים שונים של DNA מכול דגימה: 300 ng/reaction, 3 ng/reaction, 30 pg/reaction (הריכוז המצוין הוא של ה-DNA שהופק מהצמחים המאולחים ואין לדעת מהו ריכוז ה-DNA הצמחי וריכוז ה-DNA הפטרייתי המרכיבים אותו). ב-PCR רגיל התאפשר לזהות את הפטריה בצמח מאולח רק בשניים מתוך עשרים הצמחים המאולחים שנבדקו (הפטריה לא זוהתה בצמחי הביקורת). גם במקרים בהם התרחש זיהוי, הבנד היה חלש והופיע רק בריכוזים הגבוהים יותר של ה-

DNA שנבדק (3 or 30 ng/reaction). בריכוז הנמוך יותר של DNA מהצמחים המאולחים שנבדק (300 pg/reaction), המכיל פחות DNA פטרייתי מאשר הריכוזים הגבוהים יותר, לא זוהתה הפטריה באף אחד מהצמחים המאולחים. לשם השוואה, ב-QRT-PCR זהו באופן עקבי שלוש-עשרה מתוך עשרים הדגימות שנבדקו ב-PCR, וארבע דגימות נוספות זהו בחזרה אחת מבין החזרות שהורצו (הפטריה לא זוהתה בצמחי הביקורת).

3.2.2. זיהוי C.g. באמצעות QRT-PCR

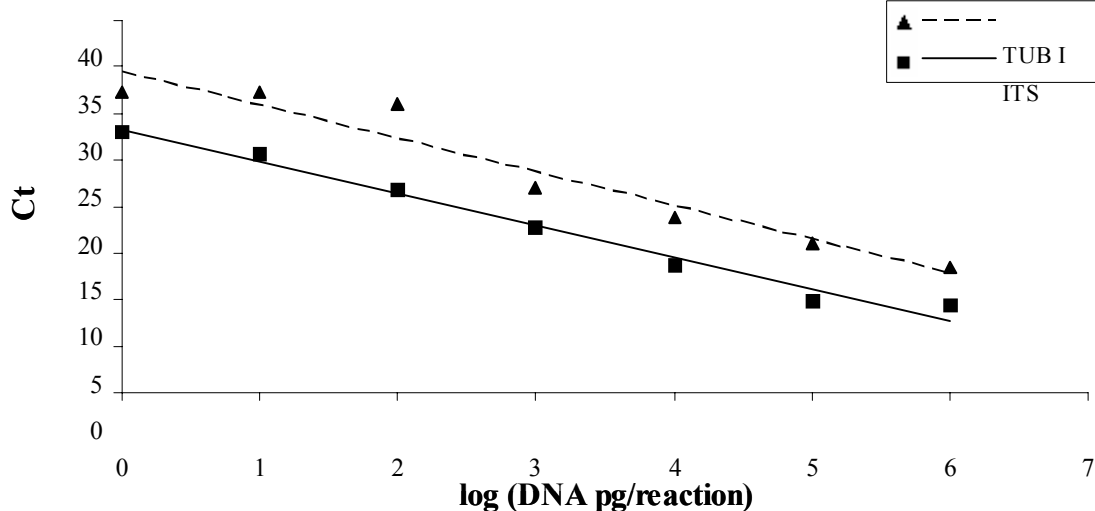
הרצפים ITS ו-TUB I זהו באמצעות תחלים ITS RT (R-ו F) ו-TUB I RT (R-ו F) בהתאמה, המפורטים בטבלה מספר 2 בסעיף 2.15 בפרק שיטות וחומרים.

3.2.2.1. כיולים עבור הרצפים ITS ו-TUB I

3.2.2.1.1. DNA גנומי של הפטריה מהול במים

ה-DNA הגנומי של הפטריה נמהל במיהולים עשרוניים בתחום 10^{-6} pg/reaction (10^{-5} - 2×10^{-5} pg/ μ l).

איור 16 מציג את עקומת הכיול של התחלים המזהים את הרצפים ITS ו-TUB I ב-DNA הגנומי של הפטריה ואת משוואת הקו הישר, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות השיפוע עבור כל זוג תחלים. בדגימות ה-DNA שנבדקו, רצף ITS מזוהה בין מחזורים 7-27, מוקדם יותר מאשר גן TUB I, המזוהה בין מחזורים 14-32 באותם ריכוזי DNA. בנוסף, מידת ההתאמה של הנתונים לקו הליניארי ויעילות הריאקציה גבוהות יותר עבור רצף ITS. עם זאת, התחלים המזהים רצף זה יוצרים דימר, ולא נמצאו תחלים ללא דימר ולכן היה צורך לבדוק רצף נוסף (גן TUB I)



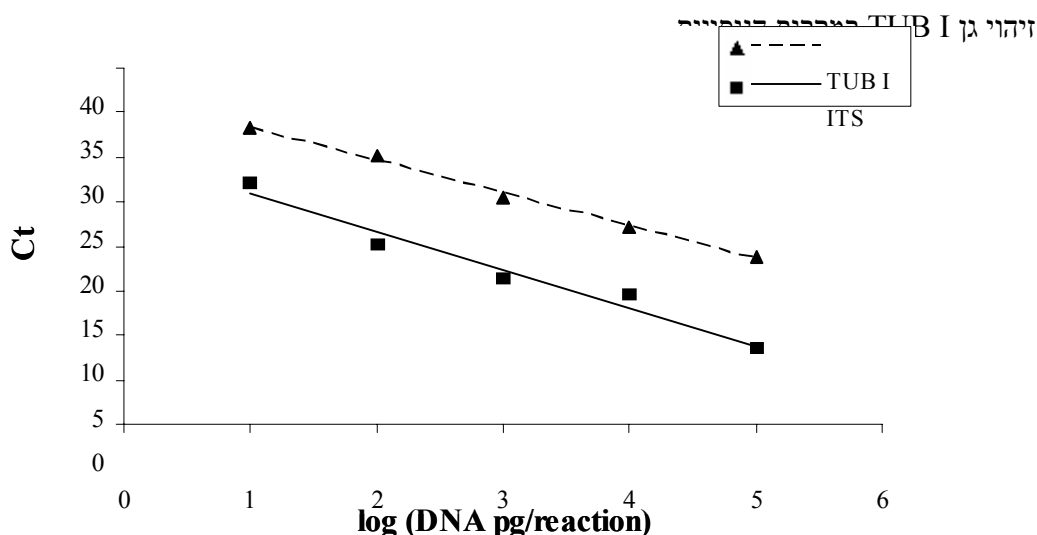
איור 16: ערכי ה-Ct שהתקבלו בריאקציה QRT-PCR עבור ריכוזי DNA גנומי שונים של תבדוד מספר 48 של C.g. הריאקציות בוצעו בעזרת תחלים ITS RT (R-ו F) עבור רצף ITS ותחלים TUB I RT (R-ו F) עבור גן TUB I. ערך ה-Ct המוצג הינו ממוצע עבור שתי חזרות טכניות לכל ריכוז DNA, שנע בין 10^{-6} pg/reaction. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות שיפוע הקו עבור כל רצף: ITS: $R^2=0.9811$ $y=-3.41823x+28.239$; TUB I: $R^2=0.9342$ $y=-3.5966x+34.466$; $P<0.0001$ efficiency=0.95; $P=0.0004$ efficiency=0.87

3.2.2.1.2. DNA גנומי של הפטריה מהול ב-DNA צמחי

לצורך זיהוי הפתוגן בצמחים מאולחים ובדיקת רגישות זיהוי הרצפים של הפטריה ב-QRT-PCR בנוכחות DNA צמחי, בוצעו מיהולים של ה-DNA הגנומי של הפטריה בתמיסת DNA צמחי בריכוז קבוע. ה-DNA הגנומי של הפטריה נמהל במיהולים עשרוניים בתחום 10^{-5} - 10^{-6} pg/reaction

ה-DNA הצמחי ששימש למיהולים הופק מצמחי 'סופרים' בריאים שונים לצורך הכיולים השונים. נערכו מספר ניסויים שונים שבכל אחד מהם נבדק ריכוז אחר של DNA צמחי: רצף ITS זוהה בריכוזים שונים בנוכחות DNA צמחי בריכוז קבוע של 1, 9, 10, 90 או של 900, 500, 90 pg/reaction. גן TUB I זוהה בריכוזים שונים בנוכחות DNA צמחי בריכוז קבוע של 900, 90 pg/reaction ולא זוהה בריכוז של 9 ng/reaction (לא נבדקו ריכוזים נוספים לצורך זיהוי גן זה). איור 17 מציג את עקומת הכיול של התחלים המזהים את הרצפים ITS ו-TUB I ב-DNA הגנומי של הפטריה המהול ב-DNA צמחי (של אותו צמח) בריכוז קבוע של 9 ng/reaction, ואת משוואת הקו הישר, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות השיפוע עבור כל זוג תחלים.

בדגימות ה-DNA שנבדקו, רצף ITS מזוהה בין מחזורים 9-27, מוקדם יותר מאשר גן TUB I, המזוהה בין מחזורים 19-33 באותם ריכוזי DNA פטריה וצמח. לעומת זאת, מידת ההתאמה של הנתונים לקו הליניארי ויעילות הריאקציה גבוהות יותר עבור גן TUB I. יחד עם העובדה כי כל התחלים המזהים את רצף ITS שנמצאו יוצרים דימר שגורם לקריאה שגויה של עוצמת הפלואורסנציה, הדבר גרם להעדפת



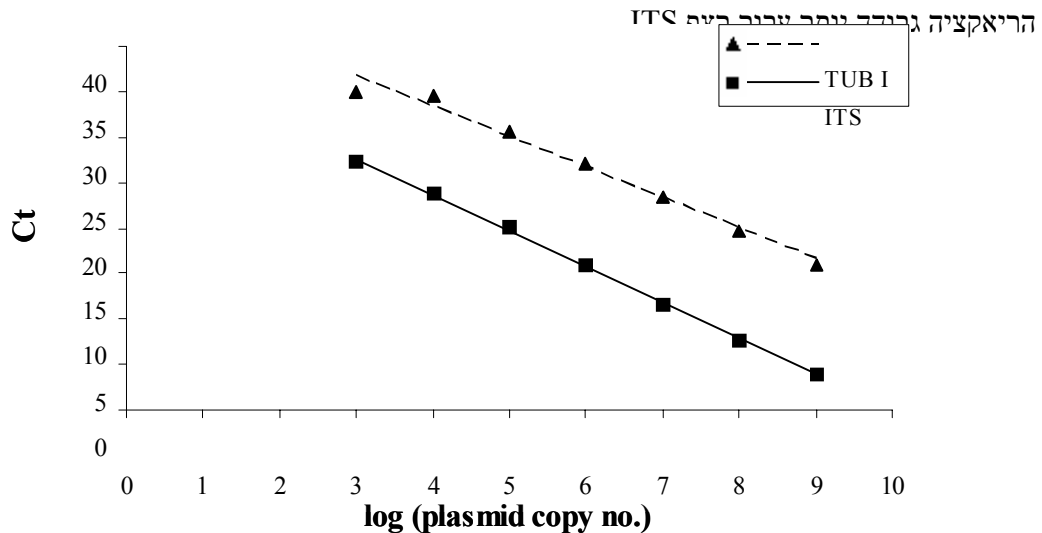
איור 17: ערכי ה-Ct שהתקבלו בריאקציות QRT-PCR עבור ריכוזי DNA גנומי שונים של תבדיל מספר 48 של C.g., מהול ב-DNA צמחי בריכוז קבוע. הריאקציות בוצעו בעזרת תחלים ITS RT (R-ו F) עבור רצף ITS ותחלים TUB I RT (R-ו F) עבור גן TUB I. ערך ה-Ct המוצג הינו ממוצע עבור שתיים או שלוש חזרות טכניות לכל ריכוז DNA, שנע בין 10⁵-10¹⁰ pg/reaction. ריכוז ה-DNA הצמחי הקבוע בו נמהל DNA הפטריה 9000 pg/reaction עובד-כיול כל רצף. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות שיפוע הקו עבור כל רצף: ITS: $y = -3.7163x + 37.083$; TUB I: $y = -4.2577x + 30.092$; $R^2 = 0.9964$; $P = 0.0041$; efficiency = 0.71; $R^2 = 0.9638$; $P < 0.0001$; efficiency = 0.86.

3.2.2.1.3. פלסמידים המכילים עותק יחיד של הרצף

כדי לקבוע את מספר העותקים של כל רצף בכל דגימת DNA, ובכך לאמוד את מידת נוכחות הפתוגן, בוצעו כיולים לכמויות ידועות של פלסמידים המכילים עותק יחיד של הרצף (pGEM[®]-T Easy), המכילים עותק אחד של הרצפים ITS או TUB I (הפלסמידים נקראו L-28 4 ITS4/5 ו-L-28 Tub1C-1) בהתאמה, והם מפורטים בסעיף 2.1.4 בפרק שיטות וחומרים). הפלסמידים נמהלו במיהולים עשרוניים בתחום 10⁹-10³ copies/reaction (250-2.5 × 10⁸ copies/μl). איור 18 מציג את עקומת הכיול של

התחלים המזהים את הרצפים ITS ו-TUB I בפלסמידים ואת משוואת הקו הישר, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות השיפוע עבור כל זוג תחלים.

באותם ריכוזי פלסמיד רצף ITS מזהה בין מחזוריים 9-28, מוקדם יותר מאשר גן TUB I, המזהה בין מחזוריים 16-35. מידת ההתאמה של הנתונים לקו הליניארי דומה עבור שני הרצפים אך יעילות



איור 18: ערכי Ct שהתקבלו בריאקציות QRT-PCR עבור מספרי עותקי פלסמידים שונים המכילים מחדר של רצף ITS או של גן TUB I של C.g. הריאקציות בוצעו בעזרת תחלים ITS RT (R-ו F) עבור רצף ITS ותחלים TUB I RT (R-ו F) עבור גן TUB I. ערך ה- Ct המוצג הינו ממוצע עבור שתי הזרות טכניות לכל ריכוז פלסמידים, שנע בין 10^3 - 10^9 copies/reaction. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומובהקות שיפוע הקו עבור כל רצף: ITS: $y = -3.3404x + 46.659$; $R^2 = 0.984$; $P < 0.0001$; efficiency = 0.96. TUB I: $y = -3.9493x + 39.471$; $R^2 = 0.9993$; $P < 0.0001$; efficiency = 0.79.

3.2.2.2 זיהוי רצף הפטריה ב-QRT-PCR בתבדידי C.g. שונים

בריאקציות ה-QRT-PCR בחלק זה נעשה שימוש ב-DNA שנלקח מתבדידים מספר 48A או 48 או DNA של צמחים שאולחו באמצעות תבדיד 48A. עם זאת, התחלים ITS RT (R-ו F) והתחלים TUB I RT (R-ו F) המשמשים לזיהוי רצפים ITS ו-TUB I, בהתאמה, בתבדידים אלו מזהים גם תבדידים נוספים של C.g. (תוצאות לא מוצגות): תבדידים מספר 18, 28, 53, 62 ו-63 נבדקו בשתי ריאקציות נפרדות (שתי הזרות טכניות לכל תבדיד). ממוצע טמפרטורת ההתכה של תוצרי ההגברה מכול התבדידים שנבדקו (ללא תבדיד מספר 48A) הוא כ- 84.4°C עבור רצף ITS (84.3°C עבור תוצר ההגברה של תבדיד 48 בלבד) וכ- 85.7°C עבור גן TUB I (85.8°C עבור תוצר ההגברה של תבדיד 48 בלבד). בכל התבדידים שנבדקו, רצף ה-ITS מזהה במחזור מוקדם יותר מאשר גן ה-TUB I כאשר נבדקת אותה דגימת DNA.

3.2.2.3 ספציפיות התחלים ל-QRT-PCR בתבדידי פטריות שונות

על מנת לבדוק עד כמה התחלים ששימשו לעבודה הם ספציפיים ל-C.g., הם נבדקו בריאקציות QRT-PCR בנוכחות DNA של פטריות שונות המפורטות בסעיף 2.1.3.2 בפרק שיטות וחומרים. כל דגימות ה-DNA נבדקו בשני ריכוזים, 10 ng/reaction ו- 1000 pg/reaction , בהם ה-DNA של C.g. מזהה בקלות. מבין כל הפטריות שנבדקו (*Phomopsis*, שני תבדידי *Didymella*, *Macrophomina*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium*, *Trichoderma* ושני תבדידי *Colletotrichum*)

gloeosporioides) וזהו תבדיד ה-*Macrophomina* מתות ותבדידי ה-C.g. מתות ומאבוקדו, אך הזיהוי היה מספר מחזורים מאוחר יותר עבור דגימות DNA באותו ריכוז כשל תבדיד מספר 48A, ששימש כביקורת חיובית.

3.2.2.4. יישום הכלי שפותח על צמחים מאולחים

חשוב לזכור כי בריאקציות ה-QRT-PCR השונות שבהן נבדקו דגימות צמחים מאולחים, כל טיפול נבדק באמצעות צמח אחד בלבד. לכן יש להתייחס לתוצאות הראשוניות של עבודה זו בזהירות. בנוסף, הדבר מסביר רצף תוצאות חיוביות של זיהוי הפתוגן על פני ריכוזי אילוח שונים או פרקי זמן שונים ממועד האילוח, שביניהן מופיעה תוצאה שלילית.

3.2.2.4.1. השוואת ריכוזי אילוח שונים

טבלה 3 מתארת זיהוי גן TUB I של C.g. על-ידי QRT-PCR בדגימות עלים של צמחים מזן 'סופרים' שנלקחו מניסוי השוואת ריכוזי אילוח שונים המתואר בסעיף 3.1.2.4 בפרק התוצאות (החזרה שתוצאותיה מוצגות). דגימות הצמחים להפקת ה-DNA נלקחו באותם מועדים שבהם נבדקו הצמחים בשיטה הויזואלית ובשיטת האכלוס. בריכוז האילוח הנמוך ביותר (10^3 נבגים למ"ל) לא מזוהה הפטריה כלל, גם זמן רב לאחר האילוח (61 ימים). בריכוזי האילוח האמצעיים (10^4 ו- 10^5 נבגים למ"ל) הפטריה מזוהה רק לאחר זמן רב מהאילוח, ואילו בריכוז האילוח הגבוה ביותר (10^6 נבגים למ"ל), ניתן לזהות את הפטריה כבר ארבעה ימים לאחר האילוח.

טבלה 3: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR בדגימות DNA מעלים של צמחי 'סופרים' שאולחו בריכוזים

שונים Inoculum (conidia/ml) →	10^3	10^4	10^5	10^6
ימים לאחר אילוח ↓				
1	X	X	X	V
4	X	X	X	X*
7	V	X	X	V
61	X	X*	V	V

הזיהוי נעשה באמצעות תחלים RT TUB I (F ו-R). X - לא מזוהה. V - מזוהה. * רק באחת החזרות מבין 4 חזרות היה זיהוי.

3.2.2.4.2. השוואת זני לימוניום שונים

טבלה 4 מתארת זיהוי גן TUB I של C.g. על-ידי QRT-PCR בדגימות צמחים מזן 'סופרים' ומזן 'ספורה', שנלקחו מניסוי השוואת זני לימוניום שונים המתואר בסעיף 3.1.3 בפרק התוצאות (חזרה אחרת מזו שתוצאותיה מוצגות). דגימות הצמחים להפקת ה-DNA נלקחו באותם מועדים שבהם נבדקו הצמחים בשיטה הויזואלית ובשיטת האכלוס. הפטריה לא זוהתה בכל דגימות ה-DNA שנלקחו מצמחי ביקורת המים במועדים השונים ובזני הצמחים השונים. בצמחי ה-'סופרים' ניתן לזהות את הפטריה בדוגמאות רבות יותר מאשר בצמחי ה-'ספורה', כאשר בריכוז האילוח הגבוה, 10^7 נבגים למ"ל, יותר דוגמאות מכילות את הפטריה מאשר בריכוז האילוח הנמוך, 10^6 נבגים למ"ל, עבור שני זני הצמחים. כמו כן, ככל שמועד לקיחת הדגימות מתרחק ממועד האילוח יותר דגימות מזוהות כחיוביות להימצאות הפטריה. ישנו הבדל בין יכולת זיהוי הפטריה בדגימות העלים ובדגימות צוואר השורש והפטוטורות: הפטריה לא תמיד מזוהה בצוואר השורש, גם בצמחים בהן היא מזוהה בחלקי העלים.

טבלה 4: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR בדגימות DNA מאיברי צמחי 'סופרים' ו-'ספורה' שאולחו

Inoculum (conidia/ml) →	בריכוזים שונים						דגימות מצוואר ושורש+פטטרות					
	מעלים			דגימות			'סופרים'			'ספורה'		
	0	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁶	10 ⁷
ימים לאחר אילוח ↓												
1	X	X	V	X	X	V	X	X	V	X	X	X
4	X	X	V	X	X	X	X	X	X	X	X	X*
8	X	V	V	X	V	V	X	X*	V	X	V	X
15	X	V	V	X*	V	V	X	X	X	X	X	V
22	X	V	V	X	V	V	X	X*	V	X	X	V
29	X	V	V	X	V	V	X	X	V	X	X*	X

הזיהוי נעשה באמצעות תחלים RT (F ו-R). X - לא מזוהה. V - מזוהה. * רק באחת החזרות מבין 4 או 5 חזרות היה זיהוי.

3.2.2.4.3. ניסויי שדה

בדגימות משני המועדים הראשונים (שבוע וארבעה שבועות לאחר האילוח) אין חלוקה לעלים ולצוואר שורש, כי ה-DNA הופק מכלל הצמח. התוצאות המוצגות בטבלה מספר 5 ומספר 6 הן של דגימות צמחים מניסוי השדה שלא טופלו באוקטב כלל. ניתן לראות כי בשני הניסויים, זיהוי הפתוגן הוא בעייתי, ולמעשה הפתוגן זוהה במספר צמחים קטן. במספר מקרים הפתוגן זוהה רק בחזרה אחת מתוך שתיים או שלוש שבועות עובר אותן דגימות DNA (טבלה מספר 5, מסומנים ב-*).

טבלה 5: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR עבור ניסויי שדה שנערך בסתיו (נובמבר 2006 – ספטמבר 2007)

Inoculum (conidia/ml) →	בריכוזים שונים						דגימות מצוואר ושורש+פטטרות					
	מעלים			דגימות			'סופרים'			'ספורה'		
	0	10 ³	10 ⁶	0	10 ³	10 ⁶	0	10 ³	10 ⁶	0	10 ³	10 ⁶
ימים לאחר אילוח ↓												
7	-	X**	**V	-	X**	X**	**	**	**	**	**	**
27	X**	X**	**V	X**	X**	X**	**	**	**	**	**	**
64	X	X	X	X	X	X	X	X	*X	X	X	X
94	X	X	X	*X	X	X	X	X	X	X	X	X
121	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X*	X
155	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
198	X	X	X	X	X	X	X*	X	X	X	X	X

נבדקו דגימות DNA מעלים ומחלקי צוואר שורש ופטטרות של צמחים משני זני לימוניום שאולחו בתבדיד מספר 48A. ריכוזי האינוקולום אשר שימשו לאילוח הם 0, 10³, ו-10⁶ נבגים למ"ל. התחלים RT (F ו-R) שימשו לזיהוי. X - לא מזוהה. V - מזוהה. * רק באחת החזרות מבין 2-3 חזרות היה זיהוי. ** אין הפרדה בין צוואר שורש ועלים.

	טבלה 6: זיהוי גן TUB I של C.g. ב-QRT-PCR עבור ניסוי שדה שנערך בקיץ (יוני-נובמבר 2007)							
	מעלים		דגימור		שורש+פטטרות		דגימות מצוואר ה	
Inoculum (conidia/ml) →	'סופרים' 0	'סופרים' 10 ⁶	'ספורה' 0	'ספורה' 10 ⁶	'סופרים' 0	'סופרים' 10 ⁶	'ספורה' 0	'ספורה' 10 ⁶
ימים לאחר אילוח ↓								
7	X**	**V	X**	X**	**	**	**	**
27	X**	X**	X**	X**	**	**	**	**
92	X	X	X	X	X	X	-	-
134	X	X	X	X	X	X	-	-

נבדקו דגימות DNA מעלים ומחלקי צוואר שורש ופטטרות של צמחים משני זני לימוניום שאולחו בתבדיד מספר 48A. ריכוזי האינקולום אשר שימשו לאילוח הם 0, ו-10⁶ נבגים למ"ל. התחלים TUB I RT (R ו-F) שימשו לזיהוי. X - לא מזהה. V - מזהה. - לא נבדק. הדוגמאות שנלקחו ו-92 ו-134 ימים לאחר האילוח נבדקו פעם אחת בלבד. ** אין הפרדה בין צוואר שורש ועלים.

3.2.3. זיהוי רצף 18S rRNA של לימוניום באמצעות QRT-PCR

3.2.3.1. כיוולים עבור רצף 18S rRNA צמחי

3.2.3.1.1. DNA גנומי של לימוניום

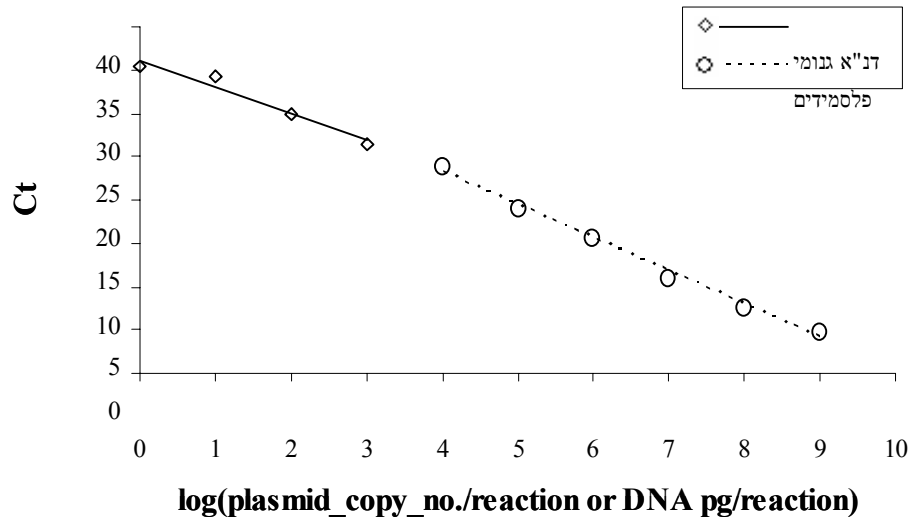
ה-DNA הגנומי של צמח לימוניום 'סופרים' בריא נמהל במיהולים עשורניים בתחום 10³-10¹ pg/reaction (0.2-200 pg/μl). ריכוזי DNA צמחי גבוהים יותר עיכבו את ריאקציית ה-QRT-PCR לחלוטין. הצמח הבריא ששימש לכיול הוא זה ששימש לכיול ה-DNA הגנומי של C.g. המוצג בסעיף 3.2.2.1.2 בפרק זה.

3.2.3.1.2. פלסמידים המכילים עותק יחיד של הרצף

על מנת לקבוע את מספר העותקים של כל רצף בכל דגימת DNA, בוצעו כיוולים לכמויות ידועות של פלסמידים מסוג pGEM[®]-T Easy, המכילים עותק אחד של הרצף 18S מלימוניום 'סופרים' (פלסמיד בשם 18S המפורט בסעיף 2.1.4 בפרק שיטות וחומרים). הפלסמידים נמהלו במיהולים עשורניים בתחום 10⁹-10⁴ copies/reaction (2.5 × 10⁸-2500 copies/μl).

איור 19 מציג את עקומת הכיול של התחלים המזהים את הרצף 18S ב-DNA הגנומי של הצמח ובפלסמידים ואת משוואת הקו הישר, ערך ה-R², יעילות הריאקציה ומובהקות השיפוע עבור זוג התחלים. בדגימות ה-DNA הגנומי שנבדקו, רצף 18S מזהה בין מחזורים 26-35, ובדגימות הפלסמידים, רצף 18S מזהה בין מחזורים 24-5. מידת ההתאמה של הנתונים לקו הליניארי עבור ה-DNA הגנומי ועבור הפלסמידים הינה גבוהה מאוד. יעילות הריאקציה גבוהה עבור ה-DNA הגנומי, ובינונית עבור הפלסמידים.

התחלים שנבחרו לזיהוי הם הטובים מבין אלו שנבדקו (ומפורטים בטבלה 2 בסעיף 2.15 בפרק שיטות וחומרים), אך אינם אידיאליים: הם יוצרים דימר ביניהם ולכן מזהים דוגמאות ntc (no template control) ו-C.g. ברמה נמוכה.



איור 19: ערכי ה-Ct שהתקבלו בריאקציה QRT-PCR עבור ריכוזי DNA גנומי שונים של לימוניום 'סופרים' בריא ועבור מספרי עותקי פלסמידים שונים המכילים מחדר של רצף 18S של לימוניום 'סופרים'. הריאקציות בוצעו בעזרת תחלים 18S RT (F ו-R). ערך ה-Ct המוצג הינו ממוצע עבור שלוש חזרות טכניות לכל ריכוז DNA, שנע בין 10^3 - 10^9 pg/reaction ולכל ריכוז פלסמידים, שנע בין 10^4 - 10^9 copies/reaction. משוואת הקירוב הליניארי, ערך ה- R^2 , יעילות הריאקציה ומבנה קנה שיפוע הקו עבור כל ריאקציה: DNA גנומי $y = -3.1247x + 36.185$, $R^2 = 0.9527$, $efficiency = 0.96$; פלסמיד $y = -3.8205x + 38.489$, $R^2 = 0.9922$, $efficiency = 0.83$, $P < 0.0001$.

3.2.3.2. זיהוי רצף 18S rRNA בדגימות צמחים מאולחים

נבדקו מספר דגימות צמחים מהניסויים השונים משני זני הלימוניום, 'סופרים' ו-'ספורה', ב-QRT-PCR בנוכחות התחלים המתאימים, ובכולן זוהה רצף 18S בהצלחה (תוצאות לא מוצגות). עם זאת, מאחר שהתוצאות המיטביות שהושגו בזיהוי הרצף הפטרייתי בצמח חולה אפשרו לקבל תשובה איכותית בלבד לגבי נוכחות הפטריה (חיובית או שלילית) ולא תשובה כמותית, לא נבדקו כל דגימות הצמחים מהניסויים השונים.

4. דיון

בעבודה זו נעשה ניסיון לפתח כלי לזיהוי מולקולרי של פטריית ה-*Colletotrichum gloeosporioides* בצמחי לימוניות. העבודה בוצעה על שני זני לימוניות ועל שני תבדידי פטרייה. תוצאות הניסויים השונים מראות פוטנציאל לזיהוי נוכחות הפטריה C.g. בצמחי לימוניות בשלבים מוקדמים, עוד לפני הופעת תסמיני המחלה.

4.1. בחירת תבדידי הפטריה אשר שימשו לעבודה

בחירת תבדידי הפטריה ששימשו לעיקר העבודה נעשתה בהתאם לתוצאות ניסויי תאי הספירה (סעיף 3.1.1.1 בפרק תוצאות) ותוצאות ניסויים מקדימים של אילוח צמחים (סעיף 3.1.1.2 ו-3.1.1.3). ניסוי תאי הספירה נערך מספר פעמים מועט מאחר שכבר בתוצאות הראשוניות התבלט תבדיד מספר 28 כבעל אחוז נביטה גבוה יותר משל תבדידים 18, 48, 53, 62 ו-63. ייתכן כי נתון זה מעיד על פוטנציאל הדבקה גבוה יותר של תבדיד מספר 28 ולכן הוא נבחר להמשך העבודה. עם זאת, ייתכן שאין קשר בין יכולת הנביטה ליכולת האכלוס של הרקמה הצמחית: ייתכן שהנבגים שינבטו לא יצליחו לחדור לרקמה בגלל כריות הדבקה (אפרסוריה) שתפקודן לא תקין, ולכן לא בהכרח תפתח מחלה ברמה גבוהה בצמח (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005). באופן כללי, אחוזי נביטה של כל התבדידים, גם מספר 28, בשני הריכוזים שנבדקו הם נמוכים כצפוי, מאחר שהניסוי נערך בריכוזים גבוהים של נבגים שיכולים לגרום לעיכוב נביטה (Fernando *et al.*, 2000; Lax *et al.*, 1985).

במקביל לניסויי תאי הספירה, נערכו ניסויים מקדימים של אילוח צמחים לכל התבדידים. תבדיד מספר 28 הוא אגרסיבי מאוד וגרם למחלה בעוצמה הגבוהה ביותר מבין כל התבדידים. תבדיד מספר 48 גרם למחלה בעוצמה בינונית – נמוכה משל תבדיד מספר 28, אך גבוהה יותר משל שאר התבדידים, אם כי המחלה התפתחה לאחר זמן רב יותר ממועד האילוח מאשר עבור צמחים שאולחו בתבדיד 28. צמחים שאולחו על-ידי תבדידים מספר 18, 53, 62, ו-63 חלו בעוצמה נמוכה מאוד, אם בכלל התפתחה בהם מחלה. סיבה אפשרית לעוצמת המחלה הנמוכה שתבדידים אלו היא אחוזי נביטה הנמוכים שלהם או כריות הדבקה לא אינפקטיביות. מקורם של התבדידים הוא מאזורים שונים וכתוצאה יש להם גנוטיפים שונים ופתוגניות שונה. בנוסף, הצמחים בניסויים המקדימים הוצבו בתא לח למשך זמן קצר (יומיים בלבד), לעומת שאר הניסויים, שבהם הצמחים הוצבו בתא לח למשך ארבעה ימים על מנת לוודא התפתחות מחלה. לפי Leandro *et al.* (2003), ככל שתקופת הלחות ארוכה יותר, כך אחוז הנביטה ומספר כריות ההדבקה גדולים יותר.

מבחן קוד בוצע במטרה להחזיר את האגרסיביות של תבדיד 48 ולבדוק אם ניתן לשפר את האגרסיביות של תבדיד 28. תבדיד מספר 48A, שבודד מצמחים שאולחו בתבדיד מספר 48, התגלה כאגרסיבי יותר מתבדיד 48: אחוז נביטת הנבגים בתאי הספירה וחומרת המחלה בצמחים מאולחים בתבדיד 48A היו גבוהים יותר משל תבדיד מספר 48, ודומים לאלו של תבדיד מספר 28. תבדיד מספר 28A היה דומה במאפייניו לתבדיד מספר 28. לכן המשך העבודה בוצע בתבדידים מספר 28 ומספר 48A. ניסוי זה בוצע רק פעם אחת, בתחילת העבודה.

לפי דיווחים, התפרצות של מחלת האנתרקנוז בשדה לימוניום הינה אלימה ומהירה, כלומר נגרמת על-ידי תבדידי C.g. וירולנטיים מאוד. מעניין לציין כי מתוך שבעה תבדידים שנבדקו בתחילת המחקר, רק לשניים מהם ישנה רמת וירולנטיות גבוהה, אף שכל התבדידים מקורם מצמחי לימוניום. הוירולנטיות, כמו תכונות אחרות של תבדידי הפתוגן, מושפעת מהשונות הגנטית, שמושפעת בתורה מן הצמח ממנו נלקח התבדיד, מהמיקום הגיאוגרפי שבו הוא התגלה ומנוכחות שלב רבייה מיני. בנוסף, ייתכן גם כי רמת הוירולנטיות של תבדידים שונים תשתנה כאשר הם יאלחו זני לימוניום שונים. בעבודתם של MacKenzie *et al.* (2006), ניתן לראות כי גם בצמחים מאכסנים אחרים, הוירולנטיות של המגוון הגדול של תבדידי C.g. משתנה בין התבדידים השונים. הדבר מקנה יתרון מסוים לפתוגן מאחר שתבדידים שאינם כה אגרסיביים עדיין מסוגלים להדביק במחלה זני צמחים פחות עמידים. אופן עליית עוצמת המחלה לאורך זמן שונה בין שני ניסויים שבוצעו עבור תבדידים מספר 28 ומספר 48. בניסוי אחד (סעיף 3.1.1.2 בפרק התוצאות) העלייה היא מקוטעת והדרגתית, ומגיעה לערך חומרת מחלה גבוה עבור תבדיד מספר 28 וערך נמוך עבור תבדיד מספר 48. בניסוי השני, המציג גם צמחים שאולחו בתבדידים 28A ו-48A (סעיף 3.1.1.3), העלייה היא רציפה ודרמטית יותר אך מגיעה לערך בינוני עבור ארבעת התבדידים. ייתכן כי מספר מועדי הערכת חומרת המחלה והמרווחים ביניהם משפיעים על מראה הגרף - בניסוי הראשון היו חמישה מועדי בדיקה במשך 11 ימים, ובניסוי השני רק שלושה מועדים במשך 14 ימים. ניתן להניח כי צורת הגרף בניסוי הראשון היא מדויקת יותר.

4.2. בחירת שיטת האילוח אשר שימשה לעבודה

בסעיף 3.1.1.2 נבחנו שתי שיטות אילוח צמחים – אילוח בריסוס ואילוח בטבילה. אילוח בריסוס הינו בעייתי מכמה סיבות: נפח המידבק קטן מאוד ופני השטח (עלווה) לאילוח הם גדולים מאוד; חלק מהמידבק מתבזבז לחלל האוויר, לעציצים או למגש אליו נעשה האילוח; פיזור המידבק אינו אחיד – עלים תחתונים נחשפים פחות, אם בכלל, למידבק. לעומת זאת, האילוח בטבילה, על אף שדורש נפח גדול בהרבה של מידבק (לכל הפחות 150 מ"ל, ועדיף 300 מ"ל לטיפול, לעומת 25 מ"ל הדרושים לאילוח בריסוס), מאפשר אילוח הומוגני יותר של עלוות הצמחים, חשיפה גדולה יותר של הצמחים למידבק והיצמדות של יותר נבגים לפני שטח הצמחים. מאחר שהאילוח הוא אגרסיבי יותר, ישנם יותר נבגים שינבטו (בשתי השיטות האילוח נעשה באותו ריכוז נבגים, 5×10^6 נבגים למ"ל, ולכן לא צפוי הבדל באחוז הנביטה בין שיטות האילוח). סיבות אלו מאפשרות להסביר מדוע אילוח בריסוס יעיל פחות מאשר אילוח הצמחים בטבילה, בדומה לתוצאות בעבודתם של Berruyer *et al.* (2006). תוצאות הניסויים המקדימים שהשוו בין שתי שיטות האילוח מראות כי האילוח בטבילה גורם למחלה שמתפתח מהר יותר, ובעוצמה חזקה יותר.

4.3. זיהוי C.g. באמצעות PCR רגיל

PCR רגיל מאפשר זיהוי DNA גנומי של הפטריה, לבדו או בנוכחות DNA צמחי בריכוז של 90 ng/reaction. במקרה זה, ריכוז ה-DNA הצמחי הוא גבוה מאוד, אך נראה שנוכחותו אינה מעכבת את ריאקציה ה-PCR הרגיל, בעוד שריאקציה QRT-PCR מעוכבת לחלוטין בריכוז כזה. הדבר סותר את

הנאמר במאמריהם של Mumford *et al.* (2000) ו-Schena *et al.* (2004), כי ה-QRT-PCR מושפע פחות מנוכחות מעכבים צמחיים מאשר PCR רגיל מאחר שהמעכבים משפיעים בעיקר על השלבים האחרונים בריאקציה, החשובים מאוד לקבלת תוצאות ב-PCR רגיל, אך פחות ל-QRT-PCR. על פי התוצאות בסעיף 3.2.1.1, נראה שה-PCR הרגיל רגיש יותר לזיהוי של DNA גנומי של פטריה דווקא בנוכחות ה-DNA הצמחי בריכוז 90 ng/reaction. אך סף הגילוי המינימלי של DNA פטרייתי ב-PCR הרגיל, בין אם בנוכחות או בהיעדר ה-DNA הצמחי, אינו קבוע בכל החזרות וייתכן כי למעשה רגישות הזיהוי אינה תלויה בנוכחות ה-DNA הצמחי. כאשר נבדקו צמחים מאולחים ב-PCR רגיל, הפטריה זוהתה רק בשתיים מתוך עשרים דגימות. בעבודתם של Freeman *et al.* (2001a) הייתה הצלחה רבה יותר בזיהוי דגימות צמחים נגועים ב-*Colletotrichum*. מאחר ש-DNA פטרייתי זוהה בנוכחות DNA צמחי בריכוז גבוה (סעיף 3.2.1.1) נראה כי אי היכולת לזהות את הפטריה בצמח מאולח לא קשורה למעכבים ממקור צמחי שמשבשים את ריאקציה ה-PCR. הסבר אפשרי לחוסר ההצלחה הוא שכמות הפטריה בצמחים המאולחים נמוכה מסף הגילוי ב-PCR רגיל. בנוסף, בניסיונות הפקת DNA מהפתוגן באמצעות שיטת הפקת ה-DNA מהצמחים (שתוארה בסעיף 2.10.1 בפרק שיטות וחומרים) התגלה כי שיטה זו הייתה יעילה בהפקת DNA מתפטיר הפטריה, אך ככל הנראה לא מנבגיה (תוצאות לא מוצגות). מאחר שבסימני האנתרקנוז בצמחים מאולחים יש כמות גדולה של נבגים (Bailey and Jeger, 1992), ייתכן שלא התאפשר להפיק את ה-DNA מהם, ודגימות ה-DNA שנבדקו ב-PCR אינן מכילות את הכמות האמיתית של DNA פטרייתי שהייתה בדגימה הצמחית.

4.4. כיולים שונים ל-QRT-PCR

מחקר ב-QRT-PCR מחייב כיוול של התחלים ושל ה-DNA שישמשו לעבודה על מנת לוודא שהתחלים מזהים את ה-DNA, שבכל מחזור בריאקציה יש הכפלה של ה-DNA, ומהם ערכי יעילות ואיכות הריאקציה לפי ערכי ההרצה. כיולים אלו מוצגים בפרק התוצאות בסעיף 3.2.2.1 עבור שני הרצפים הפטרייתיים ובסעיף 3.2.3.1 עבור הרצף הצמחי. כדיעבד, בעבודה זו לא היה צורך בביצוע הכוילים לצורך עיבוד התוצאות וקביעת כמויות הפתוגן, מאחר שזיהוי הפתוגן בצמחים מאולחים נעשה במחזור כה מאוחר של הריאקציה, עד שהתאפשר זיהוי איכותי בלבד של הדגימות, ולא זיהוי כמותי. מטרת עבודה זו היא לזהות את הפתוגן בדגימות צמחיות, ולכן נעשו שלושה סוגים של כוילים: א. כיוול ה-DNA הגנומי של הפטריה או הצמח - נעשה במטרה לבדוק אילו טווחי ריכוזים של ה-DNA הגנומי מזהים ב-QRT-PCR ומהם ערכי הריאקציה; ב. כיוול ה-DNA הגנומי של הפטריה מהול ב-DNA צמחי בריכוז קבוע וידוע - נעשה במטרה לבדוק מהי השפעת ה-DNA הגנומי של הצמחים המאולחים על ערכי הריאקציה ולבדוק אם הוא עלול לעכב אותה; ג. כיוול פלסמידים המכילים עותק אחד מהרצפים הנבדקים של הפטריה או הצמח (כל רצף בפלסמיד נפרד) - נעשה במטרה לקבוע את כמות הפתוגן בכל דגימה באמצעות קביעת מספר העותקים של הרצף הנבדק בכל דגימה. תוצאות הכוילים מראות כי יש הבדל בין יעילות (efficiency) שני זוגות התחלים לזיהוי רצפים פטרייתיים שנבדקו בעבודה. התחלים המזהים את רצף ITS היו יעילים יותר מהתחלים המזהים את גן

TUB I כאשר בוצע הכיול ל-DNA הגנומי של הפטריה ולפלסמידים (יעילות של 0.95 לרצף ITS ו-0.87 לגן TUB I עבור ה-DNA הגנומי; 0.96 לרצף ITS ו-0.79 לגן TUB I עבור הפלסמידים), ואילו התחלים המזהים את גן TUB I היו יעילים יותר מהתחלים לרצף ITS בביצוע הכיול ל-DNA הגנומי של הפטריה המהול ב-DNA הצמחי (יעילות של 0.71 לרצף ITS ו-0.86 לגן TUB I). מאחר שכיול בנוכחות DNA צמחי מייצג את המערכת הצמחית באופן מדויק יותר, זוג התחלים המזהה את גן TUB I הוא שנבחר להמשך העבודה. תוצאות אלה מנוגדות לתוצאות עבודתם של Bilodeau *et al.* (2007), שבה יעילות שני זוגות תחלים המזהים את הרצפים ITS ו- β -tubulin ב-DNA גנומי של *Phytophthora* הייתה זהה ועמדה על 1.

התחלים לרצף ITS זיהו את הפטריה במחזור מוקדם יותר בריאקציה (Ct) בהשוואה לתחלים לגן TUB I בכל הכיולים, בדומה לתוצאות בעבודתם של Bilodeau *et al.* (2007). כיול הפלסמידים מראה שככל הנראה הדבר אינו קשור לכך שב-DNA הגנומי יש מספר רב של עותקים לרצף ITS אך עותק אחד בלבד של גן TUB I. כאשר נבדקו ריכוזי פלסמידים זהים, כל פלסמיד מכיל עותק אחד בלבד מאחד הרצפים, התחלים לרצף ITS עדיין זיהו את הדגימות הרבה יותר מוקדם מאשר התחלים לגן TUB I. ייתכן שלתחלים לגן TUB I יש קושי בהיצמדות לרצף המתאים ב-DNA הגנומי של הפטריה, ולכן יעילותם קטנה יותר משל התחלים לרצף ITS. עם זאת, התחלים המזהים את רצף ITS גרמו לפלואורסנציה גם בביקורת המים (דגימות ntc) ובביקורת השלילית (דגימות DNA צמחי בלבד), כלומר זיהוי שהיה false positive. לפי Schena *et al.* (2004), פלואורסנציה בדגימות אלו נגרמת כתוצאה מדימר תחלים וזיהוי לא ספציפי של האמפליקון. לעומת זאת התחלים לגן TUB I לא גרמו לפלואורסנציה שגויה. יש לציין כי מכשיר ה-Rotor Gene מאפשר להבחין בין זיהוי נכון וזיהוי שגוי של דגימה, באמצעות הטמפרטורה המוצגת בגרף ההתכה – זיהוי של דימר התחלים או רצף אחר על-ידי התחלים יוצג בטמפרטורה שונה מזו של הרצף הנכון, בגרף ההתכה (Schena *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2005). אך פלואורסנציה שגויה נגררת לאורך גרף הפלואורסנציה ומתווספת לערכים הנמדדים, ולכן במקרה של זיהוי כמותי, היא משפיעה על התוצאות.

עבור גן TUB I, אותם ריכוזים של DNA פטרייתי מזהים במחזורים מאוחרים יותר כאשר הם נמצאים בנוכחות DNA צמחי. לעומת זאת, עבור רצף ITS אין הבדל משמעותי בין ה-Ct של ריכוזים זהים של DNA פטרייתי בנוכחות והעדר DNA צמחי, בהתאמה למרבית העבודות המפורסמות, למשל עבודתם של Fraaije *et al.* (2001), שם נוכחות ה-DNA הצמחי לא עיכבה את זיהוי הפטריה כאשר נבדק גן β -tubulin.

ייתכן שה-DNA הצמחי מעכב את הזיהוי עבור שני הרצפים, אך בעוד שהתחלים לזיהוי גן TUB I מזהים רק את ה-DNA הפטרייתי שמצוי בכמות נמוכה בריאקציה, התחלים לזיהוי רצף ITS מזהים ברמה מסוימת גם את ה-DNA הצמחי שמצוי בכמות גדולה יותר בריאקציה. מאחר שאין הפרדה בקביעת Ct-ה בין ה-DNA הפטרייתי והצמחי באותה מבחנה, ערכי ה-Ct של זוג התחלים לזיהוי רצף ITS מושפעים מנוכחות ה-DNA הצמחי ולכן הם נמוכים.

בעבודתם של Barnes and Szabo (2007), כמות DNA גדולה מ-200 ng/reaction עיכבה לעיתים את ריאקציה ה-QRT-PCR. בעבודה הנוכחית, כמות DNA של 10 ng/reaction בלבד כבר מעכבת את הריאקציה לחלוטין כאשר מדובר ב-DNA הצמחי. מאחר שה-DNA של הפטריה עדיין מזוהה בריכוז כזה, נראה שהעיכוב נגרם בגלל התוספות (טאנינים, תרכובות ליגנין, פוליסכרידים ופיגמנטים) שמגיעות עם הצמחים ולא בגלל ריכוז ה-DNA עצמו (Cullen and Hirsch, 1998; Bridge and Spooner, 2001).

עבור הצמח, התגלה כי התחלים הנבחרים לזיהוי רצף 18S יעילים יותר בזיהוי ה-DNA הצמחי מאשר בזיהוי הפלסמידים. אך התחלים אינם איכותיים מספיק מאחר שהם יוצרים ביניהם דימר, ולכן ישנו זיהוי של דגימות ביקורת המים וביקורת שלילית, אם כי ברמה נמוכה ובמחזור מאוחר. יעילות הריאקציה של הפלסמידים הייתה צפויה להיות גבוהה מאוד עבור שני הרצפים של הפטריה והרצף של הצמח, זאת מאחר שהפלסמידים מהווים ריאקציה נקיה ללא רעשי רקע. הדבר נכון עבור רצף ITS, אך במפתיע, יעילות הריאקציה נמוכה למדי עבור גן TUB I הפטרייתי ורצף 18S הצמחי (עבור גן TUB I, נמוכה אף יותר מיעילות הריאקציה בנוכחות DNA צמחי), בשונה ממה שהתגלה בעבודות אחרות, כמו למשל Reischer *et al.* (2004), שם יעילות ריאקציה הפלסמידים גבוהה מאוד. אחד ההסברים האפשריים ליעילות הנמוכה הוא שיעילות הריאקציה תלויה פעמים רבות ברצף התחלים (Bai *et al.*, 1997) וייתכן שבמקרה זה התחלים מתקשים להיצמד היטב לרצפים המוגברים ואינם ספציפיים מספיק.

סף הרגישות של זיהוי הפלסמידים בעבודה הנוכחית הינו גבוה יחסית והתאפשר לזהות לכל הפחות 10^4 עותקי פלסמידים לריאקציה. ריכוז זה של פלסמידים מזוהה כמכיל את עותקי הרצפים של הפתוגן לפי בדיקת טמפרטורת ההתכה. דגימות שהכילו ריכוזים נמוכים יותר של פלסמידים זוהו, עד כדי עותק בודד של פלסמיד (נבדק עבור רצף ITS בלבד, תוצאות לא מוצגות), אך כאשר נבדקה טמפרטורת ההתכה של דגימות אלו, התגלה כי הן אינן מייצגות את הפתוגן. בעבודתם של Torres *et al.* (2005) סף הזיהוי היה הרבה יותר נמוך – 10 עותקי פלסמידים לריאקציה. ייתכן כי ההבדלים נעוצים באיכות התחלים בעבודות השונות.

כאשר ייושם הכלי שפותח על צמחים מאולחים צצו שתי בעיות:

(א) זיהוי דגימות במחזור מאוחר: כאשר משתמשים ב-QRT-PCR לצורך כמותי, יש לקבוע סף זיהוי עליון - מחזור שלאחריו הזיהוי לא נחשב, גם אם יש עלייה בגרף הפלואורסנציה (Torres *et al.*, 2005). כך, גם אם דגימת המים מזוהמת או שהתחלים יוצרים דימר, הזיהוי לא ילקח בחשבון. כדי להימנע ממקרים אלו או מהגברה של תוצרים לא ספציפיים, ניתן להגביל את הריאקציה ל-35 מחזורים בלבד, להעלות את טמפרטורת הצימוד של הריאקציה (Torres *et al.*, 2005), להוריד את ריכוז התחלים (Mulé *et al.*, 2006) או להשתמש בשיטת עבודה אחרת של QRT-PCR מבין השיטות הקיימות אשר מעלות את הספציפיות של התגובה (TaqMan, Molecular Beacon או Scorpion-PCR) (Schena *et al.*, 2004). בנוסף, כדי לוודא זיהוי נכון של הדגימות, יש לבדוק את גרף טמפרטורת ההתכה ולוודא שהפיק עבור הדגימות המזוהות הוא בטמפרטורה הנכונה.

בעבודה זו, בה התוצאות הן איכותיות ולא כמותיות, אין משמעות למחזור המדויק שבו הדגימה מזוהה, אלא לטמפרטורת ההתכה של הדגימה. לכן, גם דגימה כלשהי זוהתה במחזור מאוחר, הזיהוי נחשב כחיובי כל עוד טמפרטורת ההתכה של הדגימה מורה כי מדובר בפתוגן. בגלל שיטת ניסוי זו, חשוב שביקורות המים בריאקציות השונות לא יזוהו בכלל או לא יזוהו בטמפרטורה זו, וריאקציות שבהן הביקורות זוהו בטמפרטורה של הפתוגן, גם אם ברמה נמוכה ביותר, נפסלו לניתוח התוצאות.

ב) זיהוי חיובי חלקי של הפתוגן: היו מספר מקרים, בהם דגימה מסוימת זוהתה כמכילה את הפתוגן בפעם הראשונה שבה נבדקה, אך בחזרות הבאות הזיהוי היה שלילי. התברר כי ככל שעובר זמן מהפקת ה-DNA עד לבדיקה, יש פחות זיהוי חיובי. בעבודתם של Tondella *et al.* (2002) מוכרת תופעה של דגרדציה של ה-DNA הפטרייתי עם הזמן. ייתכן כי ה-DNA בדגימה, הן הפטרייתי והן הצמחי, עוברים דגרדציה, אך הדבר מורגש רק עבור ה-DNA הפטרייתי בגלל כמותו הקטנה בדגימה.

4.5. השוואת ריכוזי אילוח שונים

בסעיף 3.1.2 בפרק התוצאות, רואים כי עבור שני התבדידים, 28 ו-48A, חומרת המחלה במועדי הבדיקה השונים וערך ה-AUDPC בסוף תקופת הניסוי גבוהים יותר ככל שריכוז המידבק שמשמש לאילוח גבוה יותר. בבדיקת חלקי הצמח המאוכלסים, ניתן לראות כי ככל שריכוז המידבק גבוה יותר, יש יותר חלקי צמח מאוכלסים בשתי החזרות של תבדיד מספר 28 ובאחת החזרות של תבדיד מספר 48A. בספרות ניתן לראות כי באופן כללי פטריית ה-*Colletotrichum* גורמת לעוצמת מחלה גבוהה יותר כשריכוז המידבק גבוה יותר (Hong and Hwang, 1998; Chongo and Bernier, 2000). הדבר צפוי מאחר שבריכוז מידבק גבוה יותר הצמח נחשף ליותר נבגים, ויש מספר אירועי נביטה גדול יותר באופן אבסולוטי, אם כי אחוז הנביטה עצמו קטן יותר. במקרים מסוימים יש עלייה בחומרת המחלה בריכוזי המידבק הנמוכים יותר אך ירידה או חוסר שינוי במעבר בין ריכוז של 10^5 נבגים למ"ל ל- 10^6 נבגים למ"ל (Chakraborty, 1990).

בריאקצית QRT-PCR, הפטרייה זוהתה בצמחים שאולחו בריכוז המידבק הגבוה ביותר (10^6 נבגים למ"ל) של תבדיד מספר 48A בשלבים מוקדמים יותר ובאופן עקבי יותר בהשוואה לצמחים שאולחו בריכוזי המידבק הנמוכים (הצמחים מהניסוי המתואר בסעיף 3.1.2.4, תוצאות הבדיקה מוצגות בסעיף 3.2.2.4.1). באופן כללי, ככל שריכוז המידבק גדל, ומועד הבדיקה מתרחק ממועד האילוח, ה-DNA הפטרייתי מזוהה ביותר דגימות.

ערכי חומרת המחלה וה-AUDPC של תבדיד מספר 28 גבוהים יותר משל תבדיד מספר 48A בשתי החזרות לניסוי, ייתכן מאחר שתבדיד 28 אגרסיבי יותר, הסבר הנתמך על-ידי תוצאות הניסויים המקדימים (סעיף 3.1.1.2).

ערכי חומרת המחלה של צמחים שאולחו בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל של תבדיד מספר 28 או מספר 48A עולה עד בערך שבועיים לאחר האילוח, ואז מתחילה לרדת או מתייצבת עד למועד הבדיקה האחרון, ארבעה שבועות לאחר האילוח. צמחים שאולחו בריכוזים הנמוכים יותר של נבגים מראים תבנית דומה עבור שני התבדידים שנבדקו. תבנית זו שונה מזו שנצפתה בניסויי אילוח הצמחים המקדימים (סעיפים 3.1.1.2 ו-3.1.1.3), בהם חומרת המחלה הלכה ועלתה, ולא נראתה ירידה או התייצבות גם שלושה

שבועות לאחר האילוח (מועד הבדיקה האחרונה). ייתכן וזה נובע מכך שבניסויים המקדימים ריכוז המידבק ששימש לאילוח הוא גבוה במיוחד (5×10^6 נבגים למ"ל) לצורך קבלת עוצמת מחלה גבוהה במיוחד ובמהירות. בנוסף, בעבודתם של Dauch *et al.* (2004) קיימים מספר הסברים אפשריים להאטת התקדמות המחלה וייצוב בהערכת חומרתה: גדילה של עלים חדשים ללא תסמינים, המסתירים עלים חולים עם תסמינים; נשירה של עלים עם תסמינים; גדילת העלים שאולחו מבלי ששטח התסמינים יגדל, כך שהם נראים בריאים יותר; עצירה בגידול הפטריה בתוך הצמח; התאוששות הצמח והתגברותו על המחלה.

אין כמעט הבדל בחומרת המחלה בין צמחים שאולחו בתבדיד 48A ריכוזים של 10^4 ו- 10^5 נבגים למ"ל, אך לעומת זאת, ישנו הבדל גדול בחומרת המחלה בין צמחים שאולחו באותם ריכוזים של תבדיד 28. ייתכן כי עבור כל תבדיד, השפעת צפיפות הנבגים במידבק על התפתחות המחלה היא שונה.

בנוסף לאילוח צמחים, נבדק גם אחוז נביטת נבגי תבדידים מספר 28 ומספר 48A בתאי ספירה, בריכוזי מידבק שונים (סעיף 3.1.1.1). באופן מפתיע, תוצאות אחוז הנביטה עבור ריכוזים של 10^4 ו- 10^5 נבגים למ"ל הפוכות בדיוק להבדלים בין התבדידים בהתקדמות המחלה בצמחים. בנוסף, בריכוזים הקיצוניים שנבדקו (הגבוה ביותר והנמוך ביותר), אחוז הנביטה של נבגי תבדיד מספר 48A גבוה יותר מזה של נבגי תבדיד מספר 28 (לא באופן מובהק), אף שתבדיד מספר 28 הוא אגרסיבי יותר בניסויי אילוח הצמחים. ייתכן שאין קשר בין אחוז הנביטה לאגרסיביות של תבדידים שונים, כמו שניתן לראות בעבודתם של Horowitz *et al.* (2004), בגלל השונות הגנטית שלהם. התבדידים הקיימים באוסף והתבדידים ששימשו בעבודה זו נלקחו ממקורות זני צמחי לימוניום שונים, ויש ביניהם שונות גנטית, כמו שנראה בעבודה של Maymon *et al.* (2006). כמו כן, דווח על שלב מיני ל-C.g. מלימוניום (Bar Lavan *et al.*, 2004), שיכול אף הוא לתרום לשונות הגנטית.

אין השפעה שלילית של ריכוז המידבק העולה על אחוז הנביטה בתבדיד מספר 48A כאשר נבדקים הריכוזים 10^5 , 5×10^5 ו- 10^6 נבגים למ"ל, ויעילות הנביטה נשמרת באופן יחסית. ייתכן כי משמעות הדבר היא שהנבגים של תבדיד זה רגישים פחות לצפיפות מאשר תבדיד מספר 28, מפרישים פחות חומרי עיכוב נביטה עצמיים, או שחומרי העיכוב המופרשים משפיעים על קצב הנביטה אך לא על אחוז הנביטה הכללי (Cochrane, 1958), כאשר ייתכן והשונות הגנטית משפיעה גם על פרמטרים אלה.

אחוז הנביטה הגבוה ביותר שנמדד בכל הניסוי (47% עבור תבדיד 48A בריכוז של 10^4 נבגים למ"ל) נחשב לנמוך. בעבודתם של Fernando *et al.* (2000) בריכוז דומה של נבגי *C. acutatum*, אחוז הנביטה היה מעל 95%. ייתכן כי נבגי פטריית ה-C.g. מלימוניום נובטים ביעילות פחותה, אם כי אחוז הנביטה נבדק לאחר 20 שעות הדגרה, ובנוסף היו מים חופשיים בתאי הספירה וההדגרה נעשתה בטמפרטורה של 25°C – תנאים אופטימליים לנביטה לפי Fernando *et al.* (2000).

במרבית הניסויים שבוצעו, חלקי הצמח המאוכלסים ביותר בפטריה הם הטרפים, ולאחריהם בסדר יורד, הפטוטורות, צוואר השורש והשורשים. מאחר שהאילוח בוצע על-ידי טבילת העלווה בתרחיף הנבגים, והעלווה מקבלת את עיקר כיסוי הנבגים, צפוי כי חלקי העלים יהיו המאוכלסים ביותר מכול חלקי הצמח. תוצאה דומה ניתן לראות גם בעבודתם של Makowski and Mortensen (1998), אשר השוו בין

C. gloeosporioides f. sp. *malvae* שונים שאולחו בפתוגן *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* אכלוס חלקי עלים וחלקי גבעול בצמחים שונים שאולחו בפתוגן *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* שאר חלקי צמחי הלימוניום מאוכלסים אף הם מאחר שאולחו בנבגים בזכות נגירת תמיסת תרזיף הנבגים הודות לכוח המשיכה, ובזכות מעבר אפשרי של הפטריה בצמח, כפי שהוכח שמתקיים בעבודתם של Sukno et al. (2008). עם זאת, ככל שחלקי הצמח הנבדקים נמוכים יותר, הם מאוכלסים ברמה נמוכה יותר מאחר שהם מקבלים ריכוז נמוך יותר של פתוגן בהשוואה לנוף. בנוסף, הפטריה אינה פטריית קרקע אופיינית (Freeman et al., 2002b) ולכן יכולת ההדבקה שלה מהנגר שהגיע לקרקע פחותה יחסית ליכולת ההדבקה דרך המגע הישיר בנוף. ייתכן שאילו אילוח הצמחים היה נעשה מהשורשים (דרך שורשי צמחים חולים, או דרך מערכת ההשקיה), נוכחות הפטריה בהם הייתה גדולה יותר והולכת וקטנה עם העלייה באיברי הצמח, כפי שניתן לדוגמה לראות בעבודתם של Redman et al. (1999) שעסקה במוטנטים של *C. magna*. בתבדיד מספר 28 שיפועי הקווים הליניארים מובהקים רק עבור הטרפים, ואילו בתבדיד מספר 48A – עבור הטרפים והשורשים. ייתכן שנתון זה מצביע על כך שבדיקת אכלוס הפטריה בטרפים מאפשרת קבלת תוצאות מדויקות ואמינות יותר מאשר בדיקת שאר איברי הצמח.

בעבודה זו נבדק אכלוס הצמחים ב-C.g. כפעם בשבוע במשך עד ארבעה שבועות מהאילוח בחממה, בדומה לעבודה שנעשתה על-ידי Makowski and Mortensen (1998), שם התגלה כי עם הזמן אחוז החלקים המאוכלסים בצמחים יורד. אך באופן מפתיע ובניגוד לתוצאותיהם, בניסויי השוואת ריכוזי אילוח שונים והשוואת זני לימוניום שונים, התגלה כי אין משמעות סטטיסטית למועד לקיחת דגימות הצמחים לצורך הזריעה על מצע חצי בררני. הסבר אפשרי הוא שהעבודה של Makowski and Mortensen (1998) נעשתה על צמחים שהם non-target עבור הפתוגן שבדקו *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*, לעומת הלימוניום שהוא צמח מטרה של תבדידי ה-C.g. שנבדקו בעבודה זו. כצפוי, ניתן לראות כי אחוז החלקים המאוכלסים הולך וגדל ככל שריכוז המידבק ששימש לאילוח גדל. תוצאות אלו דומות לתוצאות המופיעות בעבודתם של Mertely and Legard (2004) בה אולחו צמחי תות שדה באמצעות תבדיד של *C. acutatum*.

בבדיקת אחוז חלקי הצמח המאוכלסים היו מקרים מסוימים שבהם זוהה הפתוגן בצלחות שהכילו חלקי צמחים מקבוצת ביקורת המים. במקרים אלו, תוצאות הניסוי הוצגו ביחס לקבוצת ביקורת המים, ששימשה כרקע. מאחר שבהערכת חומרת המחלה ובבדיקת ה-QRT-PCR לא זוהה הפתוגן בצמחים אלו, ככל הנראה מדובר בזיהום חיצוני של הצלחות עליהן נזרעו חלקי הצמח הללו.

4.6. השוואת זני לימוניום שונים

בסעיף 3.1.3 בפרק התוצאות ניתן לראות הבדל משמעותי בין חומרת המחלה המופיעה בצמחי סופרים וספורה שאולחו באותם ריכוזים של נבגי תבדיד מספר 48A. צמחים מזן הספורה מושפעים פחות על-ידי הפתוגן והערכת הנגיעות שלהם היא פחותה משל צמחים מזן סופרים. בנוסף, בבדיקת ה-QRT-PCR, הפתוגן מזוהה בצמחי הסופרים במקרים רבים יותר מאשר בצמחי הספורה. מאחר שדווח כי ייתכנו הבדלים בעמידות לפתוגן בין זנים שונים של צמחי לימוניום (Sobers and Cox, 1973; Engelhard et al., 1972), אכן נראה כי צמחים מזן ספורה הינם סבילים יותר לפתוגן מאשר צמחים מזן סופרים.

בבדיקת אחוז האכלוס, נראה כי לעיתים אחוז חלקי צמחים מזן סופרים המאוכלסים בפתוגן הוא גבוה יותר מאשר צמחים מזן ספורה, ולעיתים המצב הפוך או שווה ביניהם. מאחר ששני זני הצמחים אולחו באותם ריכוזי מידבק, אך תסמיני המחלה נראים פחותים בזן הספורה לעומת זן הסופרים, ייתכן כי ההסבר נעוץ במנגנון עמידותו של זן הספורה לפתוגן: ייתכן שעמידות זן הספורה לפתוגן היא כמותית (Chakraborty, 1990) - כלומר הצמח מצליח להגביל את התפתחות המחלה ולהאט אותה, אך עדיין נוצרים תסמינים והפתוגן מתרבה בצמח, או שמדובר בסבילות (Koch et al., 2002) - צמחים מזן ספורה ניזוקים פחות מצמחים מזן סופרים אף ששניהם נגועים באותה המידה (רותם וחובריו, 1998).

במרבית המקרים בכל שלוש החזרות, אחוז חלקי הצמח המאוכלסים עבור צמחים שאולחו בריכוז הנבגים הגבוה (10^7 נבגים למ"ל) היה גבוה יותר או שווה לזה של צמחים שאולחו בריכוז הנבגים הנמוך יותר (10^6 נבגים למ"ל), אך בשליש מבין המקרים שנבדקו, אחוז חלקי הצמח המאוכלסים היה גבוה יותר עבור צמחים שאולחו בריכוז הנבגים הנמוך יותר. לפי תוצאות הניסויים בתאי הספירה (סעיף 3.1.1.1 בפרק התוצאות), בריכוזים גבוהים של מידבק אין הבדל משמעותי בין אחוז הנביטה בריכוזים גבוהים של נבגים. לפי Chakraborty (1990) ידוע כי אין בהכרח הבדל בחומרת המחלה בין צמחים שאולחו בריכוזי מידבק של 10^5 ו- 10^6 נבגים למ"ל. לכן ייתכן כי גם אין הבדל משמעותי בין תגובת הצמחים לאילוח בריכוזי מידבק של 10^6 ו- 10^7 נבגים למ"ל. כאשר נבדקו ערכי ה-AUDPC, ריכוז המידבק הגבוה יותר גרם מחלה בעוצמה חזקה יותר, עבור זן הסופרים בכל שלוש החזרות של ניסוי זה, ועבור זן הספורה בשתיים מתוך שלוש החזרות, אך ההבדל מובהק רק בחזרה שתוצאותיה מוצגות.

בבדיקת QRT-PCR, הפטריה זוהתה יותר בדגימות מצמחים שאולחו בריכוז הנבגים הגבוה מאשר בדגימות מצמחים שאולחו בריכוז הנבגים הנמוך, עבור שני הזנים. בריכוזי מידבק גבוהים אלו היה צפוי כי הפטריה תזוהה בכל דגימות הצמחים המאולחים ובשני ריכוזי המידבק, מאחר שכבר התאפשר זיהוי של דגימות שאולחו בריכוזים נמוכים יותר, אך זה לא קרה.

קצב התקדמות המחלה והעלייה בחומרתה משתנים בין שלוש החזרות של ניסוי זה. ייתכן שהדבר קשור להבדלים בין העונות בהן נערכו החזרות, אף שהן בוצעו בחממה. הסבר אפשרי נוסף הוא הבדל בין גילאי הצמחים ששימשו לאילוח. בחזרה הראשונה שתוצאותיה מוצגות, שבה קצב המחלה התמתן לאחר כשבוע מהאילוח, נלקחו ממשלוח צמחים אחד, בעוד שבשתי החזרות האחרות, שבהן קצב המחלה המשיך לעלות עד תום תקופת הניסוי, הצמחים נלקחו ממשלוח אחר של צמחים, ובנוסף, הן נערכו בתקופות שונות, ולכן גיל הצמחים בהן היה שונה. בעבודתם של Chongo and Bernier (2000) התגלה כי יש השפעה של גיל צמחי עדשים על פרמטרים כמו חומרת המחלה וכמות התסמינים הנגרמים על-ידי *C. truncatum*.

מלבד צמחים מזן הסופרים בחזרה שתוצאותיה מוצגות, בכל החזרות שנערכו לניסוי הזה עבור שני הזנים, רמת האכלוס באיברי הצמח שנבדקו הולכת ויורדת מהטרפים, לפטוטרות, לצוואר השורש ולשורשים. בנוסף, בשיטת ה-QRT-PCR נמצא שבחלקי הצמח העליונים (טרפים) ישנם יותר זיהויים חיוביים של הפתוגן מאשר בחלקים התחתונים (צוואר השורש ופטוטרות). תוצאות אלה מאששות את ההנחה כי הצמחים שהשתתפו בניסויים בעבודה זו אולחו בשיטת הטבילה מהנוף, ולא הגיעו חולים מהמשתלה. ייתכן שבדיקת אחוז אכלוס של חלקי צמחים שאולחו באופן טבעי בשטחי הגידול תעיד על מקור האילוח

שלהם, אם תבצע בשלבים מוקדמים לאחר האילוח, בהם עדיין ניתן לבודד את הפתוגן מהצמחים החולים. אילוח באמצעות צמחים חולים אחרים עשוי להתבטא בנוכחות הפתוגן בשורשים, אילוח על-ידי העובדים בשדה בעקבות הקטיף והגיזומים עשוי להביא לנוכחות מוגברת של הפתוגן באזור צוואר השורש, ואילו אילוח כתוצאה מהתזת טיפות מים על העלווה, עשוי להראות נוכחות גבוהה של הפתוגן בה.

ככל שמועד לקיחת הדגימות מתרחק ממועד האילוח, הפטריה מזוהה ביותר דגימות ב-QRT-PCR, כנראה מאחר שלפתוגן יש יותר זמן להתבסס בצמח, ולהגדיל את המסה שלו בו. תוצאות דומות ניתן לראות בעבודתם של Dauch *et al.* (2006), אם כי הם בחנו את כמות הפתוגן *C. coccodes* בדגימות רק במהלך השבועיים הראשונים לאחר האילוח.

לפי תוצאות עבודות אחרות, נראה כי בדומה ללימוניום, עשויים להיות הבדלים בין תגובת זנים שונים של צמחים אחרים לאותו תבדיד של הפתוגן C.g. (Mignouna *et al.*, 2001; Dinh *et al.*, 2003;) כמו כן, עשויים להיות הבדלים גם בין תגובת זני לימוניום שונים לפתוגנים אחרים, בין אם בעוצמת המחלה או עצם ההדבקות במחלה (Ebihara *et al.*, 2003; Gera *et al.* 2006). ההבדלים נובעים ממנגנוני עמידות והורשת עמידות שונים.

יש לציין כי באחת הבדיקות ב-QRT-PCR, הפתוגן זוהה בדגימת צמח מביקורת המים. התוצאה לא חזרה על עצמה, ובדגימה מאותו צמח גם לא אותרה הפטריה בזריעה על מצע חצי בררני. כך שניתן שהיה זיהום של ה-DNA בשלבים הסופיים של הכנת ריאקציה ה-QRT-PCR או שהצמח היה מאולח באופן סמוי ברמה מאוד נמוכה, וה-DNA הפטרייתי עבר דגדגציה עם הזמן. הסברים אלה מתאימים גם למקרים בודדים של זיהוי הפתוגן בצמחים מביקורת המים בניסויי השדה (סעיף 4.7).

4.7. ניסויי שדה

בניסויי השדה הצמחים הועברו לשתילה במנהרות בערבה חודש לאחר האילוח. איזור הערבה הוא חם ויבש, ועל צמחים חולים לא מופיעים כתמים חומים נקרוטיים, המופיעים באיזורים לחים וקרים יותר. לכן קושי לאתר נגיעות בצמחים באמצעות ההערכה היוזואלית של הצמחים בשדה, אף שבחממה הופיעו תסמינים.

לפי תוצאות עבודה זו, ניתן לראות כי בחממה, אין השפעה של מועד לקיחת הדוגמאות מהצמחים המאולחים על אחוז האכלוס, אך יש השפעה מסוימת על זיהוי ב-QRT-PCR. כאשר נבדק אחוז חלקי הצמח המאוכלסים בניסויי השדה, (מפורט בסעיף 3.1.4.1 בפרק התוצאות), התגלה כי ככל שמתרחקים ממועד האילוח, אחוז חלקי הצמח המאוכלסים הולך וקטן ויש קושי בבידוד הפטריה, וגם בזיהוי על-ידי QRT-PCR. תופעה דומה ניתן לראות בעבודתם של Makowski and Mortensen (1998), אם כי ישנם הבדלים מהותיים בין העבודות: Makowski and Mortensen בחנו את אחוז האכלוס של *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* בצמחים שונים שהם non-target, ובמהלך שלושה-ארבעה שבועות בלבד לאחר אילוח בחממה. הסבר אפשרי לתופעה הוא שהחלקים שנלקחו לצורך בידודים במצע חצי בררני לא הכילו נבגים או תפטיר מאחר שהם לא אותם חלקים שאולחו במקור (Makowski and

(Mortensen, 1998) והפטריה לא הספיקה להתפשט אליהם. הצמחים גדלו וייתכן שהעלים שאולחו במקור נשרו או נדגמו עלים חדשים ובריאים.

באופן כללי רמת האכלוס של צמחים מזן ספורה נמוכה יותר מרמת האכלוס של צמחים מזן סופרים, דבר המחזק את ההשערה כי זן הספורה סביל יותר לפתוגן, וכי מנגנון העמידות הוא עמידות כמותית (Chakraborty, 1990).

בניסוי השדה שנערך בסתיו, שבו הצמחים אולחו בשני ריכוזי מידבק שונים (10^3 ו- 10^6 נבגים למ"ל), ניתן לראות כי אחוז החלקים המאוכלסים גבוה יותר בצמחים שאולחו בריכוז הגבוה יותר, כצפוי (Mertely and Legard, 2004). עם זאת, באף אחד מהטיפולים ערך ה- R^2 של הקירוב הליניארי אינו גבוה ושיפוע הקירוב אינו מובהק.

האוקטב הוא חומר הדברה פונגיטוקסי, המשפיע לרעה על גדילת תפטיר הפטריה בלבד, אך אינו פוגע בנביטת הנבגים (Read and Hide, 1995; Freeman *et al.*, 1997). אם ברקמה הצמחית נשארים נבגים באופן סמוי, הם יהיו מסוגלים לנבוט בצלחת פטרי. בעבודות רבות נראה כי האוקטב מצליח לפגוע ב-C.g. (Cook, 1989; Hutton, 2006). לעומת זאת, בעבודה זו התוצאות אינן חד משמעיות. נראה כי טיפולי הריסוס באוקטב בשלב החממה הם בעלי השפעה מוגבלת על נוכחות הפטריה. אמנם במועד היחיד בו התאפשר לבדוד את הפטריה על צלחת לאחר העברת הצמחים לשדה בניסוי השדה שנערך בסתיו לא נמצא הפתוגן בחלקי צמחים מזן ספורה שטופלו באוקטב, אך אחוז חלקי הצמחים המאוכלסים של צמחים מזן סופרים שטופלו באוקטב הוא כפול משל צמחים מזן סופרים שלא טופלו. בניסוי השדה שנערך בקיץ ישנם הבדלים שאינם מובהקים ברמת האכלוס של חלקי הצמח מהטיפולים השונים: צמחים מזן סופרים שטופלו באוקטב הם המאוכלסים ביותר, ולאחריהם בסדר יורד, צמחים מזן ספורה שלא טופלו באוקטב, צמחים מזן סופרים שלא טופלו באוקטב, ולבסוף צמחים מזן ספורה שטופלו באוקטב. מאחר שבבדיקות האכלוס התגלה גורם המחלה רק במועד אחד, לא התאפשר לבדוק אם האוקטב מקטין את עוצמת המחלה בצמחים המאולחים.

בבדיקת ה-QRT-PCR ישנו קושי לזהות את הפתוגן בדגימות הצמחים באופן כללי, אם כי בחממה הדבר אפשרי. בבדיקת ה-QRT-PCR של דגימות מצמחים שטופלו באוקטב זוהתה הפטריה דווקא בעיקר בצמחים מקבוצת ביקורת המים ולא בצמחים שאולחו (תוצאות לא מוצגות). לא התאפשר לזהות באמצעות ה-QRT-PCR ירידה בכמות הפתוגן ב-DNA של צמחים שעברו הדברה, לעומת כמות הפתוגן בצמחים שלא עברו הדברה.

ייתכן שאחת הסיבות לתוצאות אלו היא שטיפולי ההדברה בוצעו רק בשלב החממה ולא לכל אורך תקופת גידול הצמחים המאולחים. בנוסף, בעבודתם של Long *et al.* (2001) נטען כי למועד יישום האוקטב על צמחי הלימוניות יש השפעה על יכולתו לפגוע בפטריות, ויישום של חומר ההדברה שעה או שעתיים לאחר האילוח עלול להיות מאוחר מדי, מאחר שבמהלך אותן שעתיים נבגים אחדים כבר עשויים לנבוט ולחדור לתוך הצמח. ידוע כי החקלאים בשדה מיישמים טיפולי הדברה באוקטב לאורך העונה (דיווח אישי, אוהד גולדברג, דנציגר - משק פרחים "דן"), אך כיוון שהמחלה פורצת אף על פי כן, נראה כי אין בזה די וייתכן כי הבעייתיות הוא במועדים הראשונים של ההדברה, שנעשית מאוחר מדי. האוקטב אמנם

מסוגל לתנועה טרנס-למינרית לתוך הצמח, כלומר נכנס לרקמות בנקודות היישום שלו, אך הוא אינו נע בתוך הצמח. בעבודה זו לא נבדק אם חומר ההדברה עצמו משפיע על ריאקציה ה-QRT-PCR ועל תוצאות הזיהוי.

בניסויים המבוקרים בשדה התגלה כי המחלה מתפשטת מצמחים חולים לבריאים, אם כי על פי תוצאות הניסויים המבוקרים בחממה, הובחן שהמחלה שגורם הפתוגן C.g. היא בעלת מחזור מונוציקלי – התפרצות אחת בלבד, ואחריה עיכוב או ירידה בעוצמת המחלה. תצפיות בשטחי הגידול הראו כי גם שם המחלה עלולה להתפשט במהירות בין הצמחים ולעבור מצמחים חולים לצמחים בריאים, דרך שורשי הצמחים, מערכת ההשקיה או העובדים בשדה. בעיה זו עשויה להיפטר באמצעות השקיה בטפטוף טמון (Pivonia *et al.*, 2000).

בניסויים המבוקרים בחממה לא הייתה תמותת צמחים. כאשר נבדקה תמותת צמחים בשדה מספר חודשים לאחר האילוח, התגלו שתי תופעות מעניינות. האחת – לא נצפתה תמותה כלל בקרב צמחי הספורה, דבר המחזק את ההנחה כי הם סבילים יותר לפתוגן. השנייה – נצפתה תמותה בקרב צמחי סופרים בקבוצת ביקורת המים בניסוי השדה שנערך בסתיו. הסבר אפשרי לתופעה זו הוא שהפתוגן, המאכלס במידה מסוימת גם את צוואר השורש והשורשים על אף שהצמחים אולחו מהנוף, הצליח להתפשט לאורך צינורות ההשקיה (על-ידי מעבר של תפטיר או נבגים) או דרך מערכת השורשים של הצמחים, ואילח צמחים בריאים מקבוצת הביקורת. אחוז התמותה גבוה יותר דווקא בצמחים הבריאים (אם כי לא היו הבדלים מובהקים בין הקבוצות) והסבר אפשרי לכך הוא שבעוד שהצמחים שאולחו מספר חודשים קודם לכן הסתגלו במידה מסוימת לנוכחות הפטריה, הצמחים הבריאים נתקלו בה לראשונה בשדה, שם התנאים מאפשרים לה להתפתח במהירות. בשטחי גידול חקלאיים שאולחו באופן טבעי, תמותת הצמחים הרגישים למחלה עשויה להגיע לאחוז גבוה, אך הגידול נעקר כבר לאחר תמותה של 30% מהצמחים כדי למנוע מהמחלה להתפשט לשטחים סמוכים. אילו נשמר, ייתכן שאחוז התמותה היה עולה ואף מגיע במימדיו לנתון שנצפה במחקר, אם כי סביר להניח שבזמן ארוך יותר מאחר שריכוז המידבק הטבעי הוא נמוך יותר. גם בצמחים אחרים הפתוגן עשוי להיות אלים מאוד (Chakraborty *et al.*, 1999).

יש לציין כי לא ניתן להסיק מסקנות על הקשר בין עונת השנה לתמותת הצמחים מאחר שאין מספיק נתונים לגבי ניסוי השדה שנערך בקיץ. רצוי לחזור על ניסוי השדה בתקופה מקבילה לניסוי שנערך בסתיו על מנת לאמת תוצאות, כאשר יש לקחת דגימות צמחיות לבדיקת נוכחות הפתוגן בשיטת האכלוס גם בשלב בו הצמחים עדיין נמצאים בחממה. בנוסף, יש לבדוק את השפעת חומר ההדברה אוקטב כאשר הוא מיושם גם בשלב גידול הצמחים בשדה, לאורך תקופת הניסוי.

חלק גדול מתוצאות עבודה זו צפוי בהתאם לידע קודם במחלות צמחים שונות: לפי ניסויי החממה ניתן לראות שאילוח בריכוז מידבק גבוה יותר מביא להופעת מחלה בעוצמה גבוהה יותר, שמתפתחת במהירות גבוהה יותר, וגורמת הופעת תסמינים רבים יותר (Hong and Hwang, 1998; Chongo and Bernier, 2000). בנוסף, חלקי הצמח שאולחו ישירות בשיטת הטבילה, הטרפים והפטוטורות, מאוכלסים יותר בפתוגן מאשר אותם החלקים שאולחו על-ידי נגר של תרחיף הנבגים (Makowski and Mortensen, 1998). ככל שריכוז המידבק גבוה יותר, גם אחוזי האכלוס גבוהים יותר (Mertely and

(Legard, 2004). מנגד, תוצאות רבות, כמו הקושי בזיהוי גורם המחלה ב-PCR וב-QRT-PCR כמעט בכל מועד לאחר האילוח ובריכוזי המידבק השונים ששימשו לאילוח, ואחוזי הנביטה הנמוכים של הנבגים, לא היו צפויות והקשו על ההתקדמות בעבודה זו. בעבודות אחרות אחוזי הנביטה של תבדידי C.g., שמקורם בצמחים אחרים, גבוהים הרבה יותר מאשר בעבודה זו (Fernando *et al.*, 2000). כמו כן, זיהוי הפתוגן מסוג *Colletotrichum* בשיטות המולקולריות נעשה בקלות יחסית (Dauch *et al.*, 2006). מובן שחלק מההבדלים באחוזי הנביטה בין העבודות השונות נעוצים בשיטת מדידת הנתונים, אך ייתכן שלצמח המאכסן, הלימוניום, יש השפעה על התוצאות שהתקבלו ב-PCR וב-QRT-PCR. בעבודות אחרות, שבחנו את גורם מחלה C.g. בצמחים אחרים, היו פחות קשיים בזיהוי המולקולרי של גורם המחלה. יש לבצע מחקרים נוספים כדי לזהות את הסיבה לקשיים בזיהוי DNA הפתוגן בתוך DNA הלימוניום ב-QRT-PCR. ייתכן כי בצמחי הלימוניום ישנם חומרים ייחודיים כלשהו המעכבים את שיטת הזיהוי ב-QRT-PCR.

רשימת ספרות

מו"פ הערבה
מועצת הפרחים
אוניברסיטת דרום קרוליינה, ביה"ס לרפואה, ארה"ב
דנציגר – משק פרחים "דן"

<http://yair.arava.co.il>
<http://www.fbi.org.il>
<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>
<http://www.danziger.co.il>

בר לבן י., קטן י. ופרימן ס., 2003. אפיון, הישרדות והשפעת טיפולי חום על הפטריה *Colletotrichum gloeosporioides* הגורמת להתמוטטות בצמח הלימוניום. עבודת מסטר, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות.

פרימן ס., 1995. מחלה חדשה במשתלות ובשטח המניב של תות שדה בארץ שמחוללת הפטריה קוליטוטריכום. השדה (דצמבר), ע"ו: 35-40.

רותם י., פלטי י. ובן יפת י., 1998. מחלות צמחים בישראל. 31-40. הוצאת מינהל המחקר החקלאי, המחלקה לפרסומים מדעיים, מרכז וולקני, בית דגן.

Afanador-Kafuri L., Minz D., Maymon M., and Freeman S., 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93: 579-587.

Alahakoon P.W., Brown A.E. and Sreenivasaprasad S., 1994. Crossinfection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44: 93-103.

Bai X., Hosler G., Rogers B.B., Dawson D.B. and Scheuermann R.H., 1997. Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clinical Chemistry* 43: 1843-1849.

Bailey J.A. and Jeger M.J., 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. x-xii. C.A.B International, Wallingford, Oxon, UK.

Bar Lavan Y., Pivonia S., Katan J., Zviebil A. and Freeman S., 2004. Characterization, survival and affect of heat treatments on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of *Limonium* decline. *Phytoparasitica* 32: 188.

Barnes C.W. and Szabo L.J., 2007. Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 97: 717-727.

Berruyer R., Poussier S., Kankanala P., Mosquera G. and Valent B., 2006. Quantitative and qualitative influence of inoculation methods on in planta growth of rice blast fungus. *Phytopathology* 96: 346-355.

Bilodeau G.J., Lévesque C.A., de Cock A.W.A.M., Duchaine C., Brière S., Uribe P., Martin F.N. and Hamelin R.C., 2007. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and Molecular Beacons. *Phytopathology* 97: 632-642.

Bridge P. and Spooner B., 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil* 232: 147-154.

Brown A.E., Sreenivasaprasad S. and Timmer L.W., 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86: 523-527.

Bryson R.J., Caten C.E., Hollomon D.W. and Bailey J.A., 1992. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: Bailey J.A. and Jeger M.J., 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. 27-46. C.A.B International, Wallingford, Oxon, UK.

Buhr T.L. and Dickman M.B., 1994. Isolation, characterization, and expression of a second beta-tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4155-4159.

Chakraborty S., 1990. Expression of quantitative resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* in *Stylosanthes scabra* at different inoculum concentrations and day-night temperatures. *Australian Journal of Agricultural Research* 41: 89-100.

Chakraborty S., Perrott R., Ellis N. and Thomas M.R., 1999. New aggressive *Colletotrichum gloeosporioides* strains on *Stylosanthes scabra* detected by virulence and DNA analysis. *Plant Disease* 83: 333-340.

Chen N., Hsiang T. and Goodwin P.H., 2003. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. *Journal of Microbiological Methods* 53:113-122.

Chongo G. and Bernier C.C., 2000. Effects of host, inoculum concentration, wetness duration, growth stage, and temperature on anthracnose of lentil. *Plant Disease* 84: 544-548.

Christenesen N.M., Nicolaisen M., Hansen M. and Schulz A., 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by Real-Time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1175-1184.

Cochrane V.W., 1958. *Physiology of Fungi*. John & Son, New York.

Cook R.T.A., 1989. Control of *Glomerella cingulata* f.sp. *camelliae* with fungicides. *Plant Pathology* 38: 514-519.

Cullen D.W. and Hirsch P.R., 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 983-993.

Cullen D.W., Lees A.K., Toth I.K. and Duncan J.M., 2002. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology* 51: 281-292.

Dauch A.L., Ahn B., Watson A.K., Seguin P. and Jabaji-Hare S.H., 2006. Molecular monitoring of wild-type and genetically engineered *Colletotrichum coccodes* biocontrol strains in planta. *Plant Disease* 90: 1504-1510.

- Denisov Y., Yarden O. and Freeman S., 2005. Impaired purine biosynthesis affects pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *European Journal of Plant Pathology* 112: 293-297.
- Dinh S.Q., Chongwungse J., Pongam P. and Sangchote S., 2003. Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology* 32: 533-538.
- Ebihara Y., Kato S.M., Uematsu S., Kamata N., 2003. Differences in resistance of Statice (*Limonium sinuatum*) varieties to bacterial wilt caused by *Burkholderia caryophylli*. *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society* 50: 101-103.
- Ekblad A., Wallander H. and Näsholm T., 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytologist* 138: 143-149.
- Engelhard A.W., 1975. Etiology, symptomatology, and economic importance of the diseases of annual statice (*Limonium* spp.). *Plant Disease Reporter* 59: 551-555.
- Engelhard A.W., Howard C.M. and Wilfret G.J., 1972. A new crown rot, leaf and scape spot disease of statice (*Limonium sinuatum*) incited by *Colletotrichum* sp. *Plant Disease Reporter* 56: 894-895.
- Fernando T.H.P.S., Jayasinghe C.K. and Wijesundera R.L.C., 2000. Factors affecting spore production, germination and viability of *Colletotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research* 104: 681-685.
- Fraaije B.A., Lovell D.J., Coelho J.M., Baldwin S. and Hollomon D.W., 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *European Journal of Plant Pathology* 107: 905-917.
- Freeman S., Horowitz S. and Sharon A., 2001a. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology* 91: 986-992.
- Freeman S. and Katan T., 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87: 516-521.
- Freeman S., Katan T. and Shabi E., 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82: 596-605.
- Freeman S., Maymon M., Kirshner B., Rav-David D. and Elad Y., 2002a. Use of GUS Transformants of *Trichoderma harzianum* Isolate T39 (TRICHODEX) for Studying Interactions on Leaf Surfaces. *Biocontrol Science and Technology* 12: 401-407.
- Freeman S., Minz D., Jurkevitch E., Maymon M. and Shabi E., 2000a. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90: 608-614.

- Freeman S., Minz D., Maymon M. and Zveibil A., 2001b. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology* 91: 586-592.
- Freeman S., Pham M. and Rodriguez R. J., 1993. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A + T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Experimental Mycology* 17: 309-322.
- Freeman S. and Shabi E., 1996. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 395-404.
- Freeman S., Shabi E. and Katan T., 2000b. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose disease of anemone (*Anemone coronaria* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5267-5272.
- Freeman S., Shalev Z. and Katan J., 2002b. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. *Plant Disease* 86: 965-970.
- Galili S., Guenounel D., Wingerl S., Hanal B., Schupper A., Ben-Dorl B. and Kapulnik Y., 2000. Enhanced levels of free and protein-bound threonine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing a bacterial feedback-insensitive aspartate kinase gene. *Transgenic Research* 9: 137-144.
- Gera A., Maslenin L., Rosner A., Zeidan M. and Weintraub P.G., 2006. Phytoplasma diseases in ornamental crops in Israel. *Acta Horticulturae* 722: 155-161.
- Gokkes M., Ben Ze'ev I.S., Levy E., Ben-Gal O. and Shabtay Y., 1993. Anemone anthracnose- two outbreaks and eradication a decade apart. *Phytoparasitica* 21: 148.
- Hong J.K. and Hwang B.K., 1998. Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Disease* 82: 1079-1083.
- Horowitz S., Yarden O., Zveibil A. and Freeman S., 2004. Development of a robust screening method for pathogenicity of *Colletotrichum* spp. on strawberry seedlings enabling forward genetic studies. *Plant Disease* 88: 845-851.
- Hutton D., 2006. Successful management of *Colletotrichum* crown and stolon rot in runner production in sub-tropical Australia. *Acta Horticulturae* 708:293-298.
- Kagiwata T., 1986. An anthracnose of statice (*Limonium sinuatum*) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig. *Journal of Agricultural Sciences Tokyo Nogyo Daigaku* 31: 101-110.
- Koch S.H., Ghebremariam D.S. and Swart W.J., 2002. Susceptibility of lupin cultivars to South African isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* associated with lupin anthracnose. *African Plant Protection* 8: 51-56.

- Kumar V.U., Meera M.S., Shishupala S. and Shetty H.S., 1993. Quantification of *Sclerospora graminicola* in tissues of *Pennisetum glaucum* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Pathology* 42: 251-255.
- Lax A.R., Templeton G.E. and Meyer W.L., 1985. Isolation, purification, and biological activity of a self-inhibitor from conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 75: 386-390.
- Leandro L.F.S., Gleason M.L., Nutter F.W., Wegulo S. N. Jr. and Dixon P.M., 2003. Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Epidemiology* 93: 513-520.
- Long P.G., Funnell K.A., Fountain W.F., Bendall M. and Morgan E.R., 2001. Control of a stem canker caused by *Phomopsis limonii* on *Limonium* 'Chorus Magenta'. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29: 247-253.
- MacKenzie S.J., Legard D.E., Timmer L.W., Chandler C.K. and Peres N.A., 2006. Resistance of strawberry cultivars to crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from Florida is nonspecific. *Plant Disease* 90: 1091-1097.
- Makowski R.M.D. and Mortensen K., 1998. Latent infections and penetration of the bioherbicide agent *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* in non-target field crops under controlled environmental conditions. *Mycological Research*. 102: 1545-1552.
- Maymon M., Zveibil A., Pivonia S., Minz D. and Freeman S., 2006. Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive field isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96: 542-548.
- Mertely J.C. and Legard D.E., 2004. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Disease* 88: 407-412.
- Mignouna H.D., Abang M.M., Green K.R. and Asiedu R., 2001. Inheritance of resistance in water yam (*Dioscorea alata*) to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Theoretical and Applied Genetics* 103:52–55.
- Mulé G., Susca A., Logrieco A., Stea G. and Visconti A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111: S28–S34.
- Mumford R.A., Walsh K., Barker I. and Boonham N., 2000. Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 90: 448-453.
- Nam M.H., Yoo S.J. and Kim H.G., 1996. Relationship between virulence and vegetative compatibility group of *Glomerella cingulata* isolates. *Korean Journal of Plant Pathology* 12: 395-401.

Peres N.A.R., Souza N.L., Peever T.L. and Timmer L.W., 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88: 125-130.

Pivonia S., Levita R., Tuberi G., Zachs M., Zviebil A., Nizani Y. and Freeman S., 2000. Decline of perennial *Limonium* cultivars caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica* 28: 286-287.

Promega, 2007. Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems.

Read P.J. and Hide G.A., 1995. Effects of fungicides on the growth and conidial germination of *Colletotrichum coccodes* and on the development of black dot disease of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 126: 437-447.

Redman R.S., Ranson J.C. and Rodriguez R.J., 1999. Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 969–975.

Reischer G.H., Lemmensb M., Farnleitner A., Adlerc A. and Mach R.L., 2004. Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe. *Journal of Microbiological Methods* 59: 141–146.

Sakoda T. and Kimishima E., 2003. Pathogenicity of some isolates of *Verticillium tricorpus* and *Colletotrichum capsici* found in Japan. *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan* 39: 103-107.

Sambrook J. and Russell D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 6.23-6.27. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schena L., Nigro F., Ippolito A. and Gallitelli D., 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110: 893-908.

Sobers E.K. and Cox R.S., 1973. Anthracnose of statice in southern Florida. *Phytopathology* 63: 193-194.

Sukno S.A., García V.M., Shaw B.D., and Thon M.R., 2008. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 823–832.

Sutton B.C., 1992. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey J.A. and Jeger M.J., 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. 1-26. C.A.B International, Wallingford, Oxon, UK.

Tondella M.L.C., Talkington D.F., Holloway B.P., Dowell S.F., Cowley K., Soriano-Gabarro M., Elkind M.S., and Fields B.S., 2002. Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 575–583.

Torres E., Bertolini E., Cambra M., Montón C. and Martín M.P., 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19: 334-340.

Veneault-Fourrey C., Laugé R. and Langin T., 2005. Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4761-4770.

Vigodsky-Haas H., Ozeri Y., Kirshner B. and Ruben M., 1983. Anthracnose disease of anemone. *Phytoparasitica* 11: 3-4.

Waller J.M., 1992. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: Bailey J.A. and Jeger M.J., 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. 167-185. C.A.B International, Wallingford, Oxon, UK.

Wilson I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741-3751.

Abstract

The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* is a plant pathogen that causes wilting and mortality of annual and perennial *Limonium* plants from the Plumbaginaceae family. In the Arava desert, *Limonium* is an important export flower crop, produced by tissue culture. The growers suffer extensive economic damage that also includes the need to replace expensive seedlings.

Limonium cultivars that are susceptible to the fungus may be latently infected during the winter, and mortality occurs when the temperatures increase in the summer and autumn (June-October), a phenomenon that began in 1995. Plants may be infected at the nursery stage, and in addition, the pathogen can be transferred from infected to healthy material in the field – during pruning and picking, or via the irrigation system, that spreads the fungal conidia. Under suitable humidity conditions, the pathogen may affect all plant parts including crown, foliage, stems and the flower pedicles.

The disease is usually diagnosed according to classical methods based on morphological criteria such as conidia size and shape, and colony growth rate, which are not considered accurate parameters for detection. Therefore, molecular techniques, using specific PCR amplification, which are more accurate for identification, have is even more)been recently adopted. The quantitative real-time PCR (QRT-PCR sensitive than regular PCR and is based on identification via reaction and measurement of it's kinetics. This method enables identification of the pathogen in-planta, and can also measure quantitative and qualitative levels of infection.

In this study we used two isolates of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, isolates no. 28 and 48A, which originated from diseased *Limonium* plants. They were chosen due to their high percentage of conidial germination and high disease severity in inoculated plants, relative to other isolates that were examined. In preliminary experiments two plant inoculation methods were examined, spray and dipping in conidial suspensions. The dipping method was chosen due to a more rapid disease response and higher disease severity.

Two local *Limonium* cultivars, 'Supreme' and 'Safora', were evaluated for their response to the pathogen by: a. visual estimation of symptom severity on leaves and seedling mortality; b. isolation from different plant parts on a semi-selective media. In addition, DNA was isolated from infected plants and examined for presence of the pathogen by QRT-PCR with specific primers for the internal transcribed spacer region (ITS) and β -tubulin (TUB I) fungal genes.

Plants from both cultivars were incubated in the greenhouse by dipping them in different concentrations of conidial suspensions (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 conidia per ml). Percentage of pathogen colonization was higher in above-ground parts compared to that in the below-ground parts, indicating that the source of the fungus is from foliar inoculation. Disease severity increased with higher concentrations of conidial suspensions. In addition, the 'Safora' cultivar was more tolerant to the pathogen compared to 'Supreme'. Symptoms that appeared on leaves of inoculated plants in the greenhouse disappeared in time in plants following field transplantation and isolation of the pathogen from the inoculated plants became more difficult. Mortality of inoculated 'Supreme' plants reached 80% a few months after inoculation, whereas 'Safora' plants remained healthy. 'Supreme' plants from the non-inoculated controls also died, indicating that infection spread via roots and/or the irrigation system, after they were transplanted to the field.

Regular PCR reaction enabled identification of fungal DNA in the presence and absence of plant DNA at a threshold concentration of 30 pg/reaction. However, there was difficulty in identification of the fungal DNA in inoculated plants.

Calibrations of QRT-PCR reactions were performed successfully with primers for the *C. gloeosporioides* fungal ITS and TUB I genes, and for the *Limonium* 18S gene. In order to identify the fungus in infected plants by QRT-PCR, primers that identified the TUB I gene were chosen, since their reaction values were closer to the ideal reaction values when fungal DNA was examined in the presence of plant DNA. This was done even though the identification of the TUB I gene was performed in a later cycle in comparison with the identification of the ITS gene, for the same fungal DNA sample.

QRT-PCR reactions enabled qualitative but not quantitative identification of the pathogen in plant DNA from greenhouse and field inoculated plants, during early infection stages – as early as one day post-inoculation with higher inoculum densities. However, as time elapsed, more plant samples inoculated with lower inoculum densities were identified as colonized by the pathogen. The identification of the fungus in-planta by QRT-PCR may be developed as an important diagnostic tool for disease in the nursery in future.

**Development of a diagnostic method for
identifying
Colletotrichum gloeosporioides
in *Limonium* plants.**

M. Sc. Thesis

Submitted to the Faculty of Agriculture, Food and Environmental Sciences
of the Hebrew University of Jerusalem

By

Ifat Abraham

July 2008

Rehovot