

**זיהוי נגיעות בחיידקים פיטופתוגניים בצמחי עגבנייה
ומלון באמצעות חישה תרמית**

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית

האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר "מוסמך למדעי החקלאות"

מאת

ליאת פסלר

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של

דר' שאול בורדמן

המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה

הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית

האוניברסיטה העברית בירושלים

רחובות

ודר' יפית כהן

המחלקה להנדסת מערכות חישה, מידע ומיכון

המכון להנדסה חקלאית

מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

בית דגן

תודה,

לשני המנחים הנהדרים שליוו אותי, דר' שאול בורדמן ודר' יפית כהן, על ההכוונה, הלימוד, הסבלנות ובעיקר על הגישה החברית אשר תרמה לאוירה הטובה ולהערכתי הרבה כלפיכם.

לדר' ויקטור אלהנתי ואשר לוי על העזרה המקצועית והסבלנות הרבה בסיוע עם המצלמה התרמית והתחנה המטאורולוגית.

לדר' אופיר בהר על העצות בכל הקשור לעבודה עם החיידק *A. citrulli*.

לדר' שולמית מנוליס על תרומתה האדיבה של חיידקי ה- *Cmm* וגלית שהרבני על הדרכה וייעוץ בעבודה עם החיידק.

לדר' מנחם מושליון וגילאור על לימוד שיטת "מטבע פיוניות בג'ל", שימוש בתוכנת ImageJ והייעוץ בנושא טרנספירציה.

לאילונה וולפסון על הנכונות לעזור ולעודד גבעוני על העזרה בהכנת עציצים.

לפרופ' הילרי פוט על העצות בסטיסטיקה.

ולחברי במעבדה על העזרה והאוירה הטובה.

תוכן עניינים

1.....	רשימת קיצורים.....	
2.....	תקציר.....	
4.....	מבוא.....	
4.....	1. חישה מרחוק.....	
4.....	2. קרינה אינפרא-אדומה ותרמוגרפיה.....	
6.....	3. טרנספירציה ועקות בצמח.....	
6.....	4. חיידקים פיטופתוגנים.....	
	5. מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה הנגרמת ע"י <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	
7.....	6. מחלת הכתם הגדול בדלועים הנגרמת ע"י <i>Acidovorax citrulli</i>	
12.....	מטרת העבודה.....	
13.....	שיטות וחומרים.....	
13.....	1. חיידקים.....	
13.....	1.1 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm).....	
13.....	1.2 <i>Acidovorax citrulli</i>	
13.....	2. צמחים.....	
13.....	3. מצעים.....	
14.....	4. אילוח צמחי עגבנייה ב- Cmm.....	
14.....	4.1 הכנת עקומת כיוול לקביעת ריכוז החיידק.....	
14.....	4.2 אילוח שורשים בטבילה ומעקב.....	
15.....	4.3 אילוח זרעים בטבילה תוך מעקב תרמי והערכת ספיחת חיידקים לזרע.....	
15.....	4.4 אילוח עלווה ומעקב תרמי.....	
16.....	5. אילוח צמחי מלון ב- <i>A. citrulli</i>	
16.....	5.1 אילוח זרעים בטבילה תוך מעקב תרמי והערכת ספיחת חיידקים לזרע.....	
16.....	5.2 אילוח עלווה בהזרקה (אילוח נקודתי) ומעקב תרמי.....	
17.....	5.3 אילוח צמחים בוואקום.....	
17.....	6. מיצוי מהצמח לבדיקת נוכחות חיידק.....	
17.....	6.1 PCR לאימות נוכחות חיידק.....	
19.....	6.2 ג'ל אלקטרופורזה לתוצרי PCR.....	

19.....	מדידת מוליכות פיוניות באמצעות מכשיר פורומטר	7.
19.....	הערכת מפתח פיוניות באמצעות שיטת "מטבע פיוניות בג'ל"	8.
20.....	צילומים תרמיים וצילומים בתחום הנראה	9.
21.....	אנליזות וחישובים	10.
21.....	ThermaCAM Researcher 2.8 SR-1	10.1
22.....	ArcGIS	10.2
22.....	ImageJ	10.3
22.....	סטטיסטיקה	10.4
23.....	תוצאות	
23.....	המערכת עגבנייה - <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	1.
23.....	עקומת כיוול של Cmm	1.1
23.....	בדיקת שיטות אילוח שונות מלוות בצילומים: ניסויים פרלימינאריים ששימשו ללימוד המערכת	1.2
23.....	אילוח שורשים	1.2.1
25.....	אילוח זרעים	1.2.2
26.....	אילוח זרעים בריכוזים שונים	1.2.3
27.....	אילוח עלווה	1.2.4
	השוואת טמפרטורות בין מוקדי צמחי עגבנייה מאולחים ב- Cmm לעומת ביקורת במגשי	1.3
28.....	חישתיל באמצעות צילומים תרמיים	
31.....	המערכת מלון - <i>Acidovorax citrulli</i>	2.
31.....	אילוח זרעים בטבילה	2.1
	השוואת טמפרטורות בעלה מלון המאולה נקודתית בריכוזי <i>A. citrulli</i> שונים של תבדיד M6 לעומת	2.2
31.....	ביקורת באמצעות צילום תרמי רציף	
	השוואת טמפרטורות בעלה מלון המאולה נקודתית בשני תבדידי <i>A. citrulli</i> שונים: M6 ו-	2.3
37.....	M6ΔHrcV לעומת ביקורת באמצעות צילום תרמי רציף	
39.....	בדיקת השפעת האילוח על טרנספירצית הצמח דרך הפיוניות	2.4
39.....	בדיקת מוליכות פיוניות בעזרת פורומטר	2.4.1
41.....	בדיקת מפתח פיוניות בעלה מלון	2.4.2
43.....	דיון	
49.....	רשימת ספרות	
I.....	תקציר באנגלית	

רשימת קיצורים

Ap	Ampicilin
BFB	Bacterial Fruit Blotch
CFU	Colony Forming Units
d.a.i	Days after inoculation
DW	Distilled Water
GIS	Geographic Information System
GPS	Global Position System
Km	Kanamycin
NA	Nutrient Agar
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RH	Relative Humidity
SSM	Site Specific Management
WT	Wild type
i.d	Inoculation day
IR	Infra Red
RGB	Red Green Blue
TIR	Thermal Infra Red

תקציר

ידוע כי עקות בצמח הנובעות ממחלה, שינויים בפיגמנטציה, מחסור בחומרי הזנה, מים ואחרים גורמים לשינויים בהחזר האנרגיה שלו ועל כן מתבטאים בשינוי טמפרטורה. במחקר זה נבדקה השפעת הפתוגנים *Acidovorax citrulli* (A. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) על טמפרטורת הרקמה הנגועה בצמחי עגבנייה ומלון בהתאמה במטרה לזהות ואולי אף לאבחן מחלות אלה. מחלת הנבילה והכיב הבקטריאלי בעגבנייה נגרמת ע"י הפתוגן Cmm. זוהי אחת המחלות החשובות והמגבילות בגידול עגבניות. המחלה פוגעת בצינורות ההובלה, גורמת לנבילה, התנוונות ועלולה לגרום לתמותת הצמח בכל אחד משלבי הגידול. בשנים האחרונות עלתה חשיבותה של המחלה בארץ. בשל כך הוקם מיזם חוס"ן קלויבקטר שמטרתו לפתח אסטרטגיה למניעת הנזקים הנגרמים על ידי מחלת הכיב הבקטריאלי לעגבניות הגדלות בחממות ובבתי רשת ולמניעת התבססות המחלה באזורים בהם היא לא נמצאת. נעשו ניסיונות שונים לבחינת הקינטיקה של התפתחות המחלה בצמחים, אכלוס והתקדמות החיידקים בצמחים נגועים ועוד. פרט לכך נבדקה האפשרות לאבחון מוקדם של נגיעות בחיידק באמצעות חישה תרמית שזוהי בעצם אחת ממטרות המחקר הנוכחי. שיטות אילוח שונות נוסו בצמחי עגבנייה בריכוז גבוה (10^8 CFU/ml) ותועדו על ידי מצלמה תרמית עד לשלב הופעת סימפטומים, לפעמים יותר. התמונות שנלקחו נותחו לקבלת נתונים על טמפרטורת הצמח ביחס לביקורת. בכל הניסויים שנעשו נמדדה באופן עקבי טמפרטורה גבוהה יותר בצמחים מאולחים עם סימפטומים לעומת צמחי הביקורת. בניסוי נוסף של צילום מגשי חישתיל המדמים סידור שתילים במשתלה, אשר אולחו בשורשים במוקדים על המגש, נמדדה טמפרטורה גבוהה יותר בצמחים מאולחים לעומת צמחי ביקורת באופן מובהק לפני הופעת סימפטומים.

המחלה השנייה שנבחנה הייתה מחלת הכתם הגדול בדלועיים (Bacterial Fruit Blotch, BFB) הנגרמת על ידי הפתוגן *A. citrulli*. מחלה זו החלה לצבור חשיבות בסוף שנות ה-80 בארה"ב והתפשטה תוך מספר שנים למקומות רבים בעולם כולל ישראל וכיום מאיימת על גידולי האבטיח והמלון. תבדידי *A. citrulli* מתחלקים לשתי קבוצות כאשר הקבוצה הראשונה (I) כוללת בעיקר תבדידים אשר בודדו מדלועיים שאינם אבטיח (בעיקר מלון) והקבוצה השנייה (II) כוללת תבדידים שבודדו בעיקר מאבטיח. בעבודתי נעשה שימוש בקבוצה הראשונה, בתבדיד הפתוגני M6 ובמוטנט שלו שאינו פתוגני, M6ΔHrcV. היה קושי בשיחזור המערכת של אילוח במגשים כפי שנעשה עם הפתוגן Cmm בעגבניות ולכן הוחלט לצלם סרטון במצלמה התרמית המתעד נקודות אילוח בעלה מלון למשך 24 שעות או יותר עם תלות במועד הופעת הסימפטומים. נבדקו נקודות אילוח בריכוזים שונים לעומת ביקורת ונקודות אילוח של המוטנט לעומת ביקורת. הצילומים נעשו במקביל למדידות נתוני אקלים רציפות של תחנה מטאורולוגית בחממה. בצמחים שאולחו בתבדיד M6 ניתן היה לראות קשר בין קרינה לטמפרטורת הצמח. בשעות קרינה חזקה ורציפה ניתן לראות הבדלי טמפרטורה בין נקודת אילוח לביקורת של מינימום 0.6 מ"צ בריכוז גבוה (10^7 CFU/ml) לפני הופעת סימפטומים. גם במערכת זו, כמו בצילומי אילוח של Cmm בעגבניות, ניתן לראות הבדלי טמפרטורה גבוהים לאחר הופעת סימפטומים.

תוצאות אלו מצביעות על הפוטנציאל הקיים במערכת חישה תרמית לזיהוי ואבחון של מחלות צמחים וצמחי עגבנייה ומלון בפרט בייחוד במשתלות, מה שעשוי להפחית באופן משמעותי את ההפצה של שתילים נגועים בחיידק ובכך לצמצם מקור אילוח ראשוני משמעותי למחלה.

מבוא

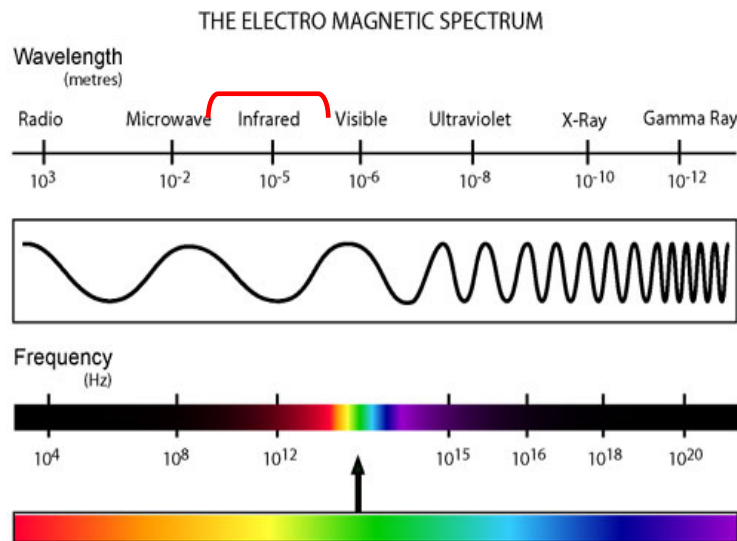
1. חישה מרחוק

חישה מרחוק היא גישה לא הרסנית לאיסוף ועיבוד מידע מרחבי באמצעות חיישנים. היא מבוססת על מדידת אנרגיה המוחזרת או נפלטת מהעצם הנמדד ונקלטת על ידי חיישנים העומדים בפני עצמם או נמצאים על גבי לוויינים, מטוסים או פלטפורמות כלשהן (Nilsson, 1995; Berni et al., 2009a); פריגוז'ין, 2010). בשיטה זו נעשה שימוש במגוון רחב של תחומים בתעשייה, חשמל, אבטחה, צבא, מטאורולוגיה, אסטרונומיה, חקלאות ונוספים. זהו אמצעי המאפשר ניתוח ומדידות ללא מגע פיזי המאפשר עבודה ממרחקים כאשר העצם הנמדד יכול לעבור אנליזות שונות מספר רב של פעמים ללא גרימת נזק (Nilsson, 1995; גולדברג, 2002; Alchanatis et al., 2010). חישה מרחוק בחקלאות נחקרת רבות בשנים האחרונות והיא בעלת פוטנציאל רב כמקור מידע על רמת כיסוי צומח, סוג צומח, עקת שונות וכדומה (גולדברג, 2002; סלע, 2007). שיטה זו בשילוב טכנולוגיות נוספות כמו מערכת האיכון העולמית (Global Position System, GPS) ומערכות מידע גיאוגרפיות, (Geographic Information System, GIS), מאפשרות איסוף וארגון של מידע מרחבי באזורים חקלאיים תוך ייעול תהליכים אגרוטכניים. בין היישומים האפשריים, זיהוי ופענוח של תופעות מרחביות כמו התפשטות מחלות, תפוצת מזיקים, ומחסור או עודף בדישון או מים. בעזרת החיישנים מתקבלת תמונת מצב של השטח כולו אך קבלת ההחלטות ואופן הטיפול יעשו באופן פרטני עבור כל יחידה (Site Specific Management, SSM). נסמך על ההנחה כי טיפול פרטני בהתאם לצורכי תתי החלקות, יעיל מאשר הטיפול הנקבע בהתאם לממוצע השדה (Zhang et al., 2002; Mallarino, 2004; סלע, 2007). גישות המחקר השונות מתמקדות באזורים שונים של הספקטרום ואורכי גל מסוימים לקבלת מידע על הצמחים. ההחזרה בתחום הנראה בצמחים מושפעת מבליעת האור ע"י פיגמנטים כמו כלורופיל וקרנוואידיים המשתמשים באנרגיית האור לפוטוסינתזה. החזר ספקטראלי נוסף הוא בתחום האינפרא אדום הקרוב והאמצעי, המושפעים ממבנה העלה הפנימי ומתכולת המים בעלה בהתאמה (גולדברג, 2002). פרט לאלו קיים התחום של האינפרא אדום התרמי שמבוסס על פליטה של חום, בו עסקתי בעבודה זו.

2. קרינה אינפרא אדומה ותרמוגרפיה

הקרינה האינפרא אדומה נמצאת בתחום הספקטרום האלקטרומגנטי (איור 1) ומחולקת לאינפרא אדום הקרוב (Near Infra Red, NIR), לאינפרא אדום האמצעי (Mid Infra Red, MIR) ולאינפרא אדום הרחוק (Far Infra Red, FIR). האינפרא אדום התרמי (Thermal Infra Red, TIR) השייך לתחום האמצעי-רחוק נמצא בין 3 ל- 15 מיקרון (ThermaCAM Researcher 2.0 User's Manual). תרמוגרפיה היא הדמיה תרמית המבוססת על פליטת קרני אינפרא אדום מאובייקט הנקלטות ומעובדות על ידי חיישנים הרגישים לאורכי גל בתחום זה (3-15 מיקרון). ככל שטמפרטורת האובייקט תהיה גבוהה

יותר כך תיפלט יותר קרינה בתחום האינפרא אדום. בתוך התחום הזה, השתמשתי במחקר הנוכחי באורכי גל שבין 7.5 ל- 13 מיקרון המתאימים יותר לצמחיה.



איור 1. הספקטרום האלקטרומגנטי. קרינה אינפרא אדומה מסומנת באדום, אלו אורכי גל הגבוהים מהתחום הנראה ונעים בין 750 nm ל- 10^6 nm (10^3 -0.75 מיקרון).

נלקח מאתר: <http://www.kollewin.com/blog/electromagnetic-spectrum>

התרמוגרפיה אשר מתבססת על הקרינה האינפרא אדומה התרמית, משמשת ככלי לחישה מרחוק בחקלאות ומאפשרת איסוף מידע על הצמח ברמת הפרט או השדה. דוגמאות לכך ניתן למצוא במחקרים שנעשו בארץ ובעולם לזיהוי עקות בצמח הנובעות מגורמים ביוטיים או אביוטיים אשר גורמות לשינויים בהחזר ופליטת אנרגיה. רוב המחקרים המשתמשים בתרמוגרפיה מתמקדים בעקות אביוטיות, לשם הערכה ומיפוי מצבי מים שונים בצמח. מחקר בתחום זה נעשה בשדות כותנה בקיבוץ שמיר אשר בגליל העליון בישראל (Cohen et al., 2005), בעצי גפן המיועדים לייצור יין בצפון הארץ (Moller et al., 2007), במטעי זיתים בדרום ספרד (Berni et al., 2009b) ונוספים. לעומתם קיימים פחות מחקרים המראים את הפוטנציאל הקיים בצילומים תרמיים לזיהוי צמחים הנגועים במחלות. לדוגמא, Oerke et al (2006) בדקו השפעת נוכחות פתוגנים בצמח על טמפרטורת הרקמה הנגועה. במסגרת המחקר נעשה אילוח של עלי מלפפון בפתוגן *Pseudoperonospora cubensis* הגורם למחלת הכשותית בדלועיים ונלקחו צילומים תרמיים במרווחי זמן מזמן האילוח. ניתוח הצילומים הראה כי ניתן היה להבחין בטווחי טמפרטורה משתנים כפונקציה של זמן כאשר בצמח ביקורת טווח הטמפרטורה היה קטן וללא שינוי. במחקר אחר נבדקה האפשרות להבחין בצמחי טבק נגועים בוירוס (Chaerle et al., 1999). לצורך בחינה זו אולחו עלים של צמחי טבק ב- Tobacco mosaic virus (TMV) וצולמו בפרקי זמן שונים לאחר האילוח. ניתוח הצילומים הראה כי עלייה בטמפרטורה של העלים הנגועים החלה כ- 27-30 שעות ממועד האילוח ואילו הכתמים הנקרוטיים הופיעו רק לאחר שלושה ימים. הסיבות לשינויים אלו הם ככל

הנראה, פעילות מנגנוני הגנה צמחיים המובילים לסגירת פיוניות ונקרוזה מקומית (Chaerle et al., 2006; Oerke et al., 1999). דוגמא נוספת להבדלי טמפרטורה בין צמח נגוע לבריא הוצגה ע"י Oerke et al. (2011) במחקר שנעשה בעלי תפוח נגועים ב- *Venturia inaequalis*. הפעם נראתה ירידה בטמפרטורת העלים הנגועים לעומת הבריאים לפני הופעת סימפטומים. כמו כן תגובה דומה של ירידה בטמפרטורה התקבלה בטבק, 3-4 שעות לאחר טיפול בהרפין של *Erwinia amylovora* (חיידק גורם מחלת החרכון), הגורם לתגובת רגישות יתר (hypersensitive response) בטבק (Boccaro et al., 2001). מחקרים אלו מעידים על כך שעקות ביוטיות בצמחים ניתנות לזיהוי המתבטא באמצעות החישה התרמית, לעיתים לפני הופעת סימפטומים הנראים לעין זאת בדומה לזיהוי מוקדם של עקות מים לפני הופעת סימפטומים.

3. טרנספירציה ועקות בצמח

טרנספירציה היא תהליך של התאדות מים מהצמח, בעיקר מהעלים דרך הפיוניות. כאשר הפיוניות נפתחות לקליטת CO₂ המתקבע בתהליך הפוטוסינתזה, מים מתאדים מהצמח לסביבתו. תפקיד הטרנספירציה בצמח להוביל מים וחומרי הזנה, בעזרת התאדות המים שגורמת לוואקום המוביל לעליית המים ותנועת מסה לאורך הצמח. תפקיד נוסף הוא קירור העלה ומניעת איבוד מים נוסף (Taiz, 1998; Otieno et al., 2007). עם גורמי האקלים המשפיעים על הטרנספירציה נמנים עוצמת הקרינה, טמפרטורה, לחות יחסית ומהירות הרוח (Taiz, 1998). טרנספירציה מוגברת מתרחשת בצמח בשעות הצהריים בערך בין השעות 10:30 לבין 14:30 בשל עוצמת קרינה גבוהה ביחס לשאר שעות היום. נמצא קשר בין טרנספירציה לעקות שונות בצמח הנובעות בין השאר מגורמים כמו יובש או מליחות אשר מביאות לסגירת פיוניות ולכן מביאות לירידה בטרנספירציה (Jordan and Ritchie, 1971; Nilsson, 1995). Alchanati et al. (2010) הסיקו כי ההבדל המקסימאלי בהבדלי טמפרטורה בין צמח המצוי בעקה לצמח רגיל, יתבטא בשעות קרינה מקסימאליות. מקרים נוספים של שינויים בטרנספירציה נצפו גם בעת עקות ביוטיות, כדוגמת מחלות. Chaerle et al. (1999) מצאו כי חלה עלייה בטרנספירציה באזורים בצמח הטבק הנגועים ב- TMV. במקרה אחר נצפתה דווקא ירידה בטרנספירציה בצמחי תפוח נגועים ב- *V. inaequalis* (Oerke et al., 2011). בעבודה זו נבחנה עקה שנגרמה ממחלה חיידקית בצמח מול צמח בריא, כאשר ההשערה היא כי תהיה לכך השפעה על טרנספירצית הצמח הנגוע.

4. חיידקים פיטופתוגנים

חיידקים פיטופתוגנים הם חיידקים הגורמים למחלות בצמחים. חשיבותם כפתוגנים נובעת בעיקר מיכולתם להתרבות במהירות לכמות עצומה של תאים כאשר תנאי התפתחותם אופטימאליים. גודלם הוא כ- 0.6-3.5 מיקרומטר והם יכולים להיות בעלי מגוון צורות כמו מתגים, חוטיים, עגולים וסליליים. ישנם כ- 100 מינים או תת-מינים של חיידקים פיטופתוגנים אשר רובם ספרופיטים פקולטיביים שיכולים לגדול גם על מצעי מזון שונים בתנאי מעבדה ובעלי כושר תנועה באמצעות שוטונים (Agrios, 2005).

(2005). מחלות בקטריאליות גורמות למגוון סימפטומים בצמחים המודבקים כמו כתמים נקרוטיים, נבילה, הצהבת עלים, עפצים, כתמים מימיים ועוד. דרכי החזירה של החיידקים לצמח נעשית דרך פצעים או פתחים טבעיים כמו פיוניות והידטודות לאחר שבאו במגע עם מקורות אלוה כמו חומר ריבוי נגוע, שאריות צמחים נגועים, כלי עבודה, חרקים או מים הנגועים בחיידק (Agrios, 2005). הדרך הטובה ביותר בה מתמודדים עם מחלות בקטריאליות היא מניעה. מאוד קשה למנוע לגמרי אך נעשה מאמץ להפחתת הסיכוי לנגיעות ככל האפשר ע"י שימוש בחומר ריבוי נקי בעזרת חיטוי ואבחון, הרחקת שאריות צמחים נגועים, שימוש בכלים שעברו חיטוי, חיטוי קרקע, מחזורי זרעים, הפחתת לחות יחסית, הדברה, במקביל לביצוע מחקרים לשיפור והתייעלות ובחינת שיטות כמו זנים עמידים, הדברה ביולוגית ונוספים. יש תמיד להעדיף שילוב של מספר גישות בהתמודדות עם המחלה (Agrios, 2005). עבודה זו בחנה כלי (חישה תרמית) להתמודדות עם שני פתוגנים בעלי חשיבות בחקלאות כפי שיפורט בהמשך.

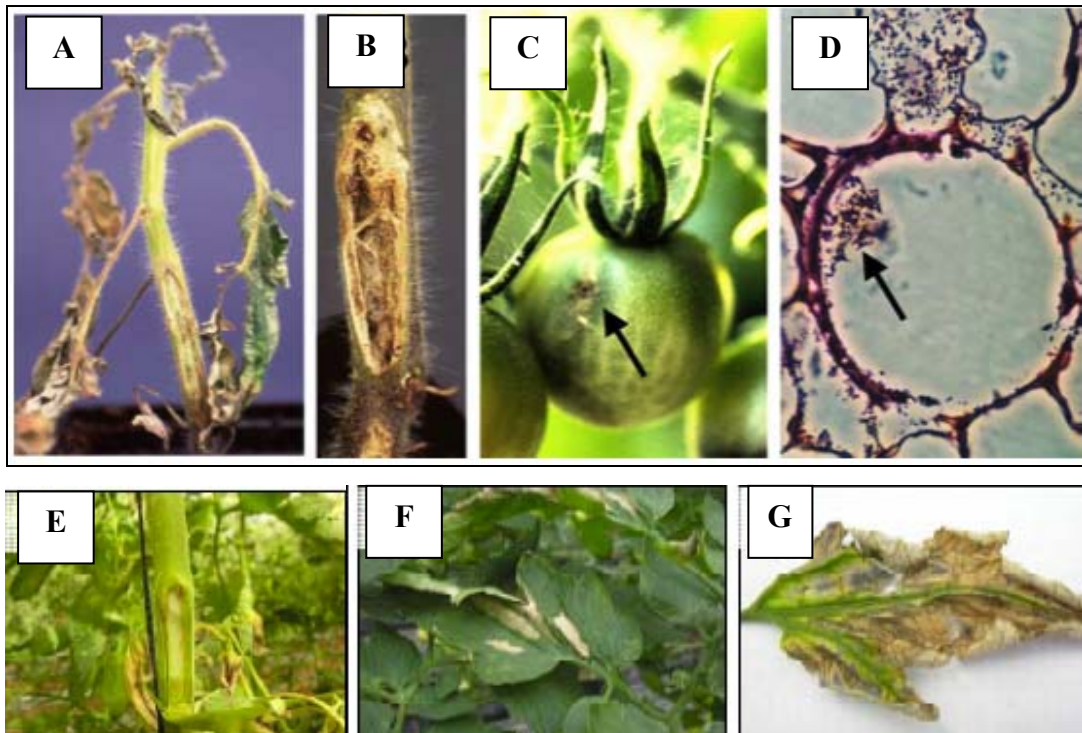
5. מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה הנגרמת ע"י *Clavibacter michiganensis*

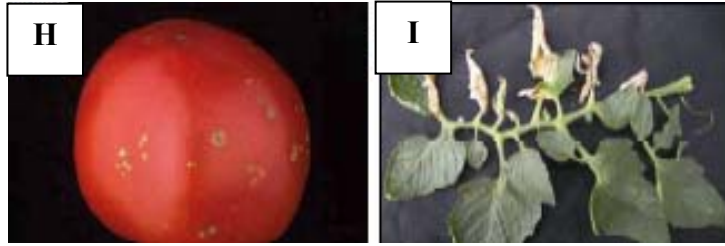
subsp. michiganensis

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm) הוא חיידק גרם חיובי ממשפחת ה-Microbacteriaceae וגורם מחלת הכיב והנבילה הבקטריאלי בעגבניות (Meletzus et al., 1993). המחלה היא סיסטמית וגורמת להתנוונות, נבילה ואף עלולה לגרום לתמותת הצמח בכל אחד משלבי הגידול (שטיינברג, 2010). גורם המחלה מופץ באמצעות זרעים, מי השקיה, גשמים, כלי עבודה ושאריות צמחים כולל צמחים ממשפחת הסולניים (Yogev et al., 2009; שטיינברג, 2010). הוא מסוגל להתרבות כאנדופיט על צמחים שונים ממשפחת הסולניים. לתכונה זו השפעה רבה על הישרדותו כאשר הפונדקאי הראשי איננו בסביבה. הזמן החולף בין ההדבקות במחלה ובין הופעת הסימפטומים תלוי במספר גורמים: גודל אוכלוסיית החיידקים, גיל הצמחים, רמת הרגישות של הזן, האיבר הצמחי הנדבק ותנאי הסביבה. בטמפרטורות של 27 – 24 מ"צ משך זמן ההדגרה הוא 4 עד 6 שבועות בצמחים בוגרים ובצעירים קצת פחות (שטיינברג, 2010). החיידק יכול לחדור לצמח בדרכים רבות ומגוונות החל ממערכת השורשים, גבעול, ענפים, פיוניות, בסיס שערות ואפילו דרך מערכת ההידטודות (Carlton et al., 1998). הסימפטומים העיקריים של המחלה כוללים התקפלות עלים, צריבה של שולי העלים, נבילה של העלים, איבוד טורגור של הצמח, הופעת נקודות עם הילות על הפירות (סימפטום המכונה "עין הציפור"), כיבים כהים בגבעול, השחמה של העצה ויצירת שורשים אדוונטיבים (איור 2) (Carlton et al., 1998; שטיינברג, 2010). החיידק, נושא שני פלסמידים, pCM1 ו-pCM2, הנושאים גנים המקודדים לגורמי וירולנטיות: גן לצלולאז (*celA*) בפלסמיד pCM1 וגן לפרוטאז (*pat-1*) בפלסמיד pCM2. נמצא שעלייה בטמפרטורה עד ל-30-32 מ"צ יכולה לגרום לאיבוד הפלסמידים. כמו כן, שימוש מעבדתי רב באותו תבדיד גרם לא פעם לאיבוד הפלסמיד pCM2. מצב זה יכול ליצור בעיה באבחון החיידק לנוכחות הפלסמיד pCM2 בעזרת PCR ופריימרים למקטע *pat-1* ויש צורך בשימוש

בפריימרים נוספים למקטע *celA* או גנים אחרים מאיי הפתוגניות הנמצאים על הדג"א הכרומוזומלי (Gartemann et al., 2003; Kleitman et al., 2008).

חשיבותה של מחלת הכיב והנבילה הבקטריאלי בעגבניות עלתה בישראל בשנים האחרונות (איור 3) ולמעשה מחלה זו נחשבת כאיום לענף העגבניות במדינה. כתוצאה מכך, לפני כשלוש שנים (2009) הוקם מיזם חוס"ן קלויבקטר שמטרתו לפתח ממשק שיאפשר למגדלים להתמודד עם המחלה. במסגרת המיזם נבחנו מגוון נושאים כגון הגורמים המשפיעים על התפתחות המחלה בזמן ובמרחב, השפעות הגומלין בין הפתוגן, הצמח ותנאי הסביבה, זיהוי מקורות המדבק הראשוני והתמודדות איתו, חקר האפידמיולוגיה ופיתוח שיטות מניעה, קומפוסט ככלי להפחתת נזקי החיידק, שאריות צמחים ואתרי סילוק אשפה כמקור מידבק ראשוני לחלקות הסמוכות, מניעת ההפצה המשנית של המחלה מצמחים נגועים לצמחים בריאים ועוד. המגדלים באזור הבשור העידו כי הימנעות מעבודה על צמחים רטובים מטל ודמיעה בשני חודשי הגידול הראשונים הפחיתה משמעותית את הנגיעות. בנוסף עולה מהניסויים, כי צמחים צעירים רגישים יותר למחלה ומתמוטטים מהר יותר מצמחים בוגרים (שטיינברג, 2010). כטיפול מניעה נמצא כי תוספת כוספת סויה או קומפוסט בקרקע הפחיתו את אוכלוסיית הפתוגן בקרקע וגם את רמת האכלוס של הצמחים באופן מובהק בהשוואה לביקורת (Yogev et al., 2009; שטיינברג, 2010). בנוסף נמצא כי השקיה תחתית או השקיה ללא דשן מפחיתות תהליכי הפצה והדבקה במשתלות. טיפולים אלו נוסו לאחר שהתברר בניסויים כי דשן על העלים מגביר משמעותית את ההדבקה. קיימת חשיבות לפיתוח גישות יעילות להתמודדות עם המחלה (שטיינברג, 2010). חלק מעבודה זו נעשתה במסגרת אותו מיזם והשערת המחקר היא שפגיעת החיידק בצינורות ההובלה המתבטאת בפגיעה בטרנספירציה בעלה, ומאוחר יותר, בנבילה, תתבטא בשינוי בטמפרטורת העלווה.





איור 2. סימפטומים של מחלת הכיב והנבילה הבקטריאלי בצמח עגבנייה. מחלת הנבילה בשלב מתקדם (A), כיב בגבעול (B, E), כתם נקודתי על הפרי המכונה "עיץ הציפור" (C, H), חתך בצינורות ההובלה (עצה) של צמח עגבנייה נגוע ב- *Cmm* (D), שני שלבים שונים של תסמינים בעלעלים שמקורם בהדבקה סיסטמית של הצמח (G, F), הדבקה סיסטמית בעלעלים הנמצאים בצד אחד של העלה (I) (Gartemann et al., 2003; שטיינברג, 2010).

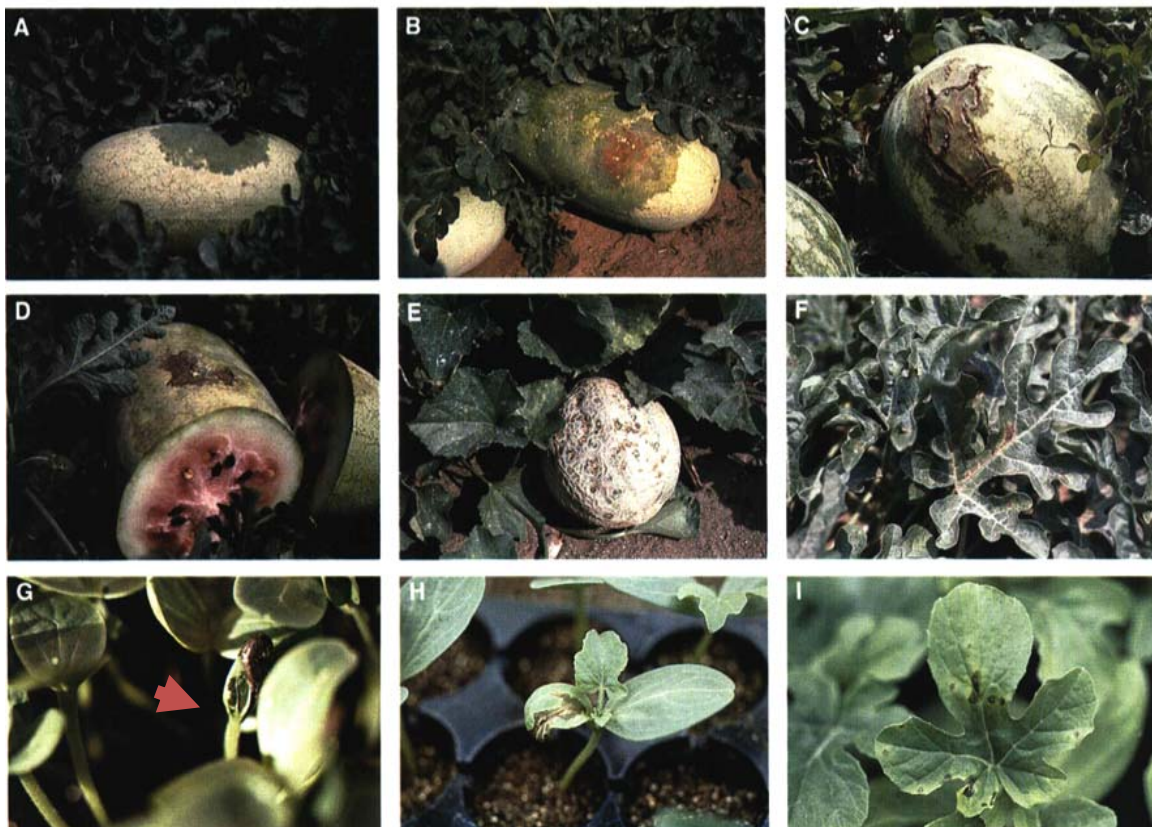


איור 3. נגיעות באזור הבשור. פגיעה של החיידק *Cmm* בגידולי עגבנייה בבית גידול בבשור בשנת 2009.

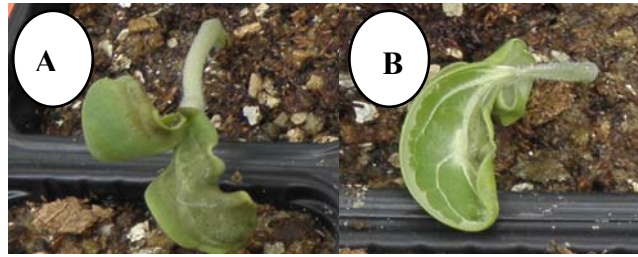
6. מחלת הכתם הגדול בדלועיים הנגרמת ע"י *Acidovorax citrulli*

Acidovorax citrulli הינו חיידק גרם שלילי, בעל צורת מתג, השייך למשפחת ה- Comamonadaceae ולמערכת ה- Betaproteobacteria (Bahar and Burdman, 2010). בעבר נחשב כתת מין ונקרא, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ולפני זה, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad et al., 1978; Willems et al., 1992). חיידק זה גורם למחלת הכתם הגדול בדלועיים (Bacterial Fruit Blotch, BFB). זוהי מחלה הרסנית שהייתה אחראית להפסדים רבים ביכול דלועיים בארה"ב בשנות ה-80 המאוחרות בעיקר אבטיחים (Latin and Hopkins, 1995). המחלה זוהתה לראשונה בשתילים נגועים בשנת 1965 בג'ורג'יה שבארה"ב (Sowell and Schaad, 1979) אבל באותה תקופה לא נגרמו הפסדים בשטחים חקלאים. בשנות ה-80 של המאה הקודמת התפשטה המחלה למקומות רבים בעולם, כולל ישראל וכיום המחלה מאיימת על

גידולי דלועיים ובעיקר אבטיח ומלון. תבדידי *A. citrulli* מתחלקים לשתי קבוצות, כאשר הקבוצה הראשונה (I) כוללת בעיקר תבדידים שבודדו מדלועיים שאינם אבטיח (בעיקר מלון) והקבוצה השנייה (II) כוללת תבדידים שבודדו בעיקר מאבטיח. חלוקה זו מבוססת על פרופילים של טביעת דנ"א (DNA fingerprinting), אנליזות חומצות שומן והבדלים פיזיולוגיים נוספים (Walcott et al., 2000; Burdman et al., 2005). מחזור המחלה בדרך כלל מתחיל בזרעים נגועים בפתוגן ומתבטא בשלב הנבט, בכתמים מימיים כהים בתחתית הפסיגים שבהמשך הופכים נקרוטיים (איור 4, תמונות G ו- H ואיור 5 תמונות A ו- B). בדרך כלל אותם כתמים מתפשטים לאורך העורק הראשי של הפסיג המודבק, הנבט נחלש ולרוב קורס תוך מספר ימים. במידה ולא הופיעו סימפטומים בשלב מוקדם, לא נראה סימפטומים בצמחים בוגרים או שהסימפטומים יהיו חלשים יחסית (איור 4, תמונות F ו- I) בשל סבילות יחסית גבוהה של צמחים בוגרים למחלה. החיידק יכול לשרוד בצמח הנגוע עד שלב הופעת הפרי ובתנאים אופטימאליים תתרחש המחלה בפירות. המחלה מתבטאת בכתמים מימיים על הקליפה שעם הזמן גדלים וחודרים לפרי עד למצב ריקבון (איור 4, תמונות A, B, C, D ו- E) אשר פוסל אותו לשיווק (Latin and Hopkins, 1995). (Bahar et al. (2009). מצאו כי החיידק אף נוכח בצינורות ההובלה של הצמח, לפחות כאשר מדובר בשתילים צעירים.



איור 4. סימפטומים של BFB באבטיח. רמות נגיעות שונות בפרי האבטיח המגיעות עד לריקבון (A- E). כתמים נקרוטיים בעלים של אבטיח (I ו- F), כתם מימי בנבט (G, חץ אדום), כתם נקרוטי טיפוסי בפסיג הנבט (H) (Latin and Hopkins, 1995).



איור 5. סימפטומים של BFB בנבטי מלון. ניתן לראות נקרוזה והתקפלות פסיגים בנבט (A), כתם מימי בחלקו התחתון של הפסיג והתקפלותו (B).

מחלת ה-BFB פוגעת בדלועיים בכל שלבי הגידול. לרוב, הדבקה מוקדמת יותר גורמת נזק רב יותר. ההשלכות של מצב זה הרסניות ביותר לחקלאי במידה ולא איתר את המחלה בשלב מוקדם (Latin, 1993). טמפרטורה בינונית עד גבוהה ואחוזי לחות גבוהים נחשבים לגורמים המעודדים את התפשטות המחלה כאשר חזירת החיידק מתאפשרת דרך פצעים או פתחים טבעיים כמו הידטודות ופיוניות. זרעים נגועים נחשבים כמקור עיקרי להתפשטות המחלה (Latin and Hopkins, 1995). נכון להיום אין מספיק מידע על הישרדות החיידק בין עונות הגידול. ההתמודדות עם המחלה נעשית לרוב בעזרת הקפדה על סניטציה ומניעה, ומאמצים רבים נעשים על מנת לשפר את אמצעי האבחון בזרעים נגועים (Bahar and Burdman, 2010). השיטה העיקרית שמשמשת כיום לגילוי החיידק בזרעים נקראת grow-out seedling (SGO), כאשר אלפי זרעים גדלים למשך שלושה שבועות בתנאים מעודדי מחלה. נבטים המציגים סימפטומים נבדקים לנוכחות החיידק באמצעות PCR או נוגדנים, כאשר נבט אחד נגוע מתוך 30,000 נבטים מספיק על מנת לפסול את כל מכסת הזרעים. זוהי שיטה בעייתית, אינה מדויקת, לוקחת הרבה זמן, תופסת מקום רב ובמידה ויש נבט נגוע שאינו מראה סימפטומים לא ניתן יהיה לגלות זאת. בשנים האחרונות פותחו שיטות דיאגנוסטיקה נוספות ל-*A. citrulli* בזרעים כדוגמת ה-Immunomagnetic Separation (IMS) המלווה ב-PCR. שיטה זו מבוססת על קשירת תאי המטרה מתוך תמיסה (כדוגמת זרעים מרוסקים) אל כדוריות מגנטיות הקשורות לנוגדנים ספציפיים ובידודם ע"י הפרדת הכדורים בעזרת שדה מגנטי (Walcott and Gitaitis, 2000). במהלך השנים האחרונות החלו חברות הזרעים וחברות העוסקות באבחון, לשלב שיטות מבוססות PCR במאמצים לאבחן את הפתוגן בזרעים נגועים כמו פריימרים ספציפיים ל-*A. citrulli* אשר סונטזו במטרה לשמש ככלי דיאגנוסטי יעיל יותר (Bahar and Walcott and Gitaitis, 2000; Bahar et al., 2008). אבל עדיין השיטה המקובלת ביותר היא ה-SGO. חלק מעבודתי נעשה על מחלה זו כאשר השערת המחקר היא, שנוכחות החיידק בצינורות ההובלה בשתילים צעירים כפי שתואר ע"י Bahar et al (2009) והופעת סימפטומים של כתמים מימיים ונקרוזה, ישפיעו על טרנספירצית הצמח ואף יתבטאו בשינוי טמפרטורת הצמח.

מטרת העבודה

מטרת העבודה הייתה לבדוק האם ישנם שינויים משמעותיים ויציבים בטמפרטורה של צמחי עגבנייה או מלון נגועים בחיידקי *Cmm* ו-*A. citrulli* בהתאמה, והאם ניתן לזהות ולאפיין את השינויים הללו באמצעות צילומים תרמיים. זאת, על מנת לאפשר בעתיד שימוש במערכת זו ככלי לאבחון נגיעות מקדים במשתלות לפני העברת השתילים לשדה.

שיטות וחומרים

1. חיידקים

1.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

חיידקי *Cmm* ששימשו בעבודה היו: תבדיד 222, השייך לקבוצה B לפי טביעת אצבעות דנ"א (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) ותבדיד 42 השייך לקבוצה A (לפי PFGE). שניהם בודדו בישראל ב- 2001 מעגבנייה (Kleitman *et al.*, 2008) וסופקו באדיבות על ידי דר' שולמית מנוליס ממרכז וולקני. שניהם גודלו בהדגרה 28 מ"צ על מצע NA במשך 3 ימים.

1.2. *Acidovorax citrulli*

חיידקי *A. citrulli* ששימשו בעבודה היו: תבדיד M6, שבודד ממלונים (פירות) נגועים בישראל (שוק המלה) בשנת 2002 (Burdman *et al.*, 2005) ותבדיד M6ΔHrcV, מוטנט לא פתוגני, פגוע בגן *hrcV* המקודד לחלבון חיוני במערכת הפרשה מסוג III ולכן אין ביכולתו להפריש אפקטורים לוירולנטיות דרך מערכת הפרשה זו (Bahar, 2010). מוטנט זה (Bahar and Burdman, 2010) נוצר ע"י אופיר בהר במעבדה של דר' שאול בורדמן. שני התבדידים גודלו בהדגרה ב- 28 מ"צ על מצע NA בתוספת Ap (אמפיצילין) במשך יומיים.

2. צמחים

הצמחים ששימשו למחקר זה הינם צמחי עגבנייה (*Solanum lycopersicum*) ומלון (*Cucumis melo*). זני עגבנייה היו 1402 ו-1335 אשר סופקו ע"י חברת הזרע ג'נטיקס (ברורים, ישראל), ו-1125 אשר סופק ע"י חברת טופ זרעים (מושב שרונה, ישראל). בחלק מהניסויים שתילים של זנים אלו סופקו ע"י חישתיל (מושב נחלים, ישראל). זרעי מלון מזן אופיר (סוג Ananas) סופקו ע"י זרעים גדרה (ישראל). הצמחים גודלו בחממה מבוקרת בטמפרטורה של 25-28 מ"צ.

3. מצעים

מצע עשיר מוצק (NA) (Difco, Sparks, MD, USA) Nutrient Agar, שימש לגידול חיידקי *Cmm* ו-*A. citrulli*. המצע מכיל 3 g Beef extract, 5 g Peptone ו-15 g Agar בתוך ליטר מים מזוקקים (סה"כ 23 g/liter). עוקר ב- 121 מ"צ בלחץ 1 Bar למשך 20 דקות. לזריעות בידוד של *A. citrulli* תבדיד M6 שימש המצע בתוספת אנטיביוטיקה אמפיצילין (Ap) 100 mg/ml ולזריעות בידוד של המוטנט M6ΔHrcV שימש המצע בתוספת אנטיביוטיקה קנמיצין (Km) 50 μg/ml.

4. אילוח צמחי עגבנייה ב- *Cmm*

4.1. הכנת עקומת כיוול לקביעת ריכוז החיידק

לבניית עקומת כיוול ריכוז חיידקים – צפיפות אופטית של *Cmm*, נלקחו מושבות בודדות מזריעת בידוד ב-NA, נזרעו פעם נוספת בזריעת "דשא" (על כל הצלחת) על צלחות NA וגודלו למשך 72 שעות ב- 28 מ"צ. מושבות מצלחות אלו הועברו בעזרת קיסם צמר גפן מעוקר למים מזוקקים (Distilled Water, DW) מעוקרים במבחנת אפנדורף, להם נעשו מהולים עשרוניים עד 10^{-6} ע"י העברת $100 \mu\text{l}$ תרחיף ל- $900 \mu\text{l}$ DW מעוקרים. ריכוז החיידקים נקבע ע"י זריעת מהולים 10^{-4} עד 10^{-6} על צלחות NA ($50 \mu\text{l}$) תרחיף בזריעת דשא על צלחת), הדגרתן למשך 72 שעות ב- 28 מ"צ וספירת מושבות. דוגמאות ממבחנת המקור נלקחו לפני המהולים לקביעת צפיפות אופטית באורך גל של 600 nm . עקומת הכיוול שימשה להכנת תרחיפי אילוח בריכוזים הרצויים לכל ניסוי.

4.2. אילוח שורשים בטבילה ומעקב

שתילי עגבנייה בני שלוש עד ארבע שבועות אשר סופקו ממשתלות חישתיל, במגשי חישתיל 19×9 , נשלפו מהמגש (עם מצע הגידול) ונטבלו בתרחיף חיידקים למשך כשעתיים, כאשר נפח התרחיף מכסה לפחות כשני שלישי מגובה השורש. התרחיף הכיל חיידקי *Cmm* שגדלו על מצע NA למשך 3 ימים ב- 28 מ"צ והורחפו ב- DW מעוקרים עד לריכוז של 10^8 CFU/ml ($0.09-0.1 = \text{OD}_{600}$), אשר נקבע באמצעות ספקטרופוטומטר Helios Gamma (Thermo Electron Corporation, San Jose, California) לפי עקומת כיוול. ריכוז החיידקים בתרחיף האילוח אומת באמצעות ספירות מסדרת מהולים. בתום האילוח הועברו השתילים לעציצים $11 \text{ cm} \times 9 \text{ cm}$ (קוטר, גובה) המכילים חול, כבול וורמקוליט ביחס של 1:1:1 או בחזרה למגשי חישתיל 14×7 לפי צורכי הניסוי וגודלו בחממה בטמפ' של 25-28 מ"צ, אור וחושך לפי שעות היום. מעקב אחר הצמחים באמצעות מצלמה תרמית (סעיף 11) בוצע בהפרשים של כיומיים-שלושה, למשך מספר ימים (תלוי בניסוי), כדי לאתר הבדלי טמפרטורה הנובעים מנוכחות פתוגן. על מנת להבליט חלקי עלווה או מוקדים של צמחים בצילומים התרמיים, נעשה בהתאם לצורך, שימוש בחומרים אשר ייראו בעלי טמפרטורה גבוהה מאשר העלווה. בצילומים תרמיים של עציצים נפרדים נעשה שימוש בפוליגל כחול (לוח פוליקרבונט) אשר חומם בעזרת שפשוף או שהייה בשמש (איור 6). בצילומים תרמיים של מגשי חישתיל נעשה שימוש ברדיד אלומיניום לסימון מוקדים מאולחים בחיידק. סימון המוקדים ברדיד אלומיניום איפשר לזהות את מיקום המוקדים בתמונה בגלל אמסיביות (שיעור הקרינה של חומר) של רדיד האלומיניום הקטנה מזו של העלווה.



איור 6. פוליגל כחול כרקע לצילום עלווה. שימוש בפוליגל כחול נעשה בצילומים תרמיים של עציצים על מנת ליצור הפרדה בין העלווה לרקע.

4.3. אילוח זרעים בטבילה תוך מעקב תרמי והערכת ספיחת חיידקים לזרע

זרעי עגבנייה הוכנסו במבחנות פלקון של 50 ml אשר הכילו כ- 25-40 ml תרחיף *Cmm* (תלוי בכמות הזרעים). התרחיף הכיל חיידקי *Cmm* שגדלו על מצע NA למשך כ- 3 ימים ב- 28 מ"צ והורחפו ב- DW מעוקרים עד לריכוז של 10^8 CFU/ml. ריכוז החיידקים בתרחיף האילוח אומת באמצעות ספירות מסדרת מהולים שנזרעו על צלחות עם מצע NA. משך האילוח ב- *Cmm* היה ארבע שעות, תוך טלטול (75 rpm), כדי להימנע משקיעת זרעים אשר תקטין את שטח המגע בינם לבין התרחיף. בתום האילוח נזרעו הזרעים בעציצים המכילים חול, כבול וורמקוליט ביחס של 1:1:1, כבול בלבד או כבול ותוף ביחס של 1:1 וגודלו בחממה בטמפ' של 25-28 מ"צ, אור וחושך לפי שעות היום. הצמחים צולמו במצלמה תרמית (סעיף 9) בהתאם לצורכי הניסוי לשם מעקב אחר הבדלי טמפרטורה הנובעים מנוכחות פתוגן. בצילומים אלו נעשה שימוש בפוליגל כחול כרקע (סעיף 4.2, איור 6). הערכת ספיחת חיידקים לזרע נעשתה על מנת לאמת את ריכוז החיידקים המצוי על הזרע לאחר אילוח בריכוז מסויים. הזרעים המאולחים סוננו במסננת אלומיניום סטרילית (לאחר חיטוי באש וקירור) ונלקחו 5 זרעים אשר נכתשו יחדיו במכתש ועלי, הורחפו ב- 500 μ l DW מעוקרים והועברו למבחנת אפנדורף. הנוזל העליון נלקח והושלם ל- 1 ml DW. נעשתה סדרת מהולים עשרוניים במבחנות אפנדורף מהן נלקחו 50 μ l לזריעה על צלחת NA. הצלחות גודלו ב- 28 מ"צ למשך שלושה ימים והמושבות נספרו לקביעת כמות חיידקים לזרע.

4.4. אילוח עלווה ומעקב תרמי

לצורך אילוח עלווה, הוכן תרחיף אילוח בריכוז 10^8 CFU/ml. התרחיף הכיל חיידקי *Cmm* שגדלו על מצע NA למשך כ- 3 ימים ב- 28 מ"צ והורחפו ב- DW מעוקרים. האילוח נעשה ע"י טבילת מספריים בתרחיף וגזירת העלעל הטרמינלי (קיצוני) או חצי ממנו (לפי מה שצוין בניסוי) בשני העלים האמיתיים הראשונים, בצמחי עגבנייה בני 70 יום אשר נזרעו בעציצים המכילים חול, כבול וורמקוליט ביחס של 1:1:1 וגודלו בחממה בטמפ' של 25-28 מ"צ, אור וחושך לפי שעות היום. לאחר כל גזירה נטבלו

המספריים ב- 70% אתנול לחיטוי ונוגבו עד לייבוש. לביקורת שימשו מספריים טבולות ב- DW מעוקרים סטריליים. הצמחים צולמו במצלמה תרמית (סעיף 9) בהתאם לצורכי הניסוי לשם מעקב אחר הבדלי טמפרטורה הנובעים מנוכחות פתוגן. בצילומים אלו נעשה שימוש בפוליגל כחול כרקע (סעיף 4.2, איור 6).

5. אילוח צמחי מלון ב- *A. citrulli*

5.1. אילוח זרעים בטבילה תוך מעקב תרמי והערכת ספיחת חיידקים לזרע

זרעי מלון אולחו בחיידקי *A. citrulli* במבחנות פלקון של 50 ml כפי שתואר עבור המערכת עגבנייה- *Cmm* בסעיף 4.2 אך משך ההדגרה היה שעתיים. המבחנות הכילו כ- 25-40 ml תרחיף (כתלות בכמות הזרעים). התרחיף הכיל חיידקי *A. citrulli* שגדלו על מצע NA עם אמפיצילין למשך יומיים ב- 28 מ"צ והורחפו ב- DW מעוקרים עד לריכוז של 10^8 CFU/ml ($OD_{600} = 0.5$), אשר נקבע לפי עקומת כיוול שנעשתה במעבדתנו ע"י אופיר בהר. מריכוז זה נעשו מהולים עשרוניים כך שהריכוזים (ב- CFU/ml) ששימשו לתרחיף האילוח היו, $10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ ו- 10^3 CFU/ml בהתאם לצורכי הניסוי. ריכוזי החיידקים בתרחיפי האילוח אומתו באמצעות ספירות מסדרת מהולים לאחר זריעות על מצעי NA. בתום האילוח נזרעו הזרעים בעציצי פלסטיק (6 cm x 6 cm) המכילים חול, כבול, וורמקוליט ביחס של 1:1:1. הניסוי בוצע בחממה סגורה בתנאים מבוקרים בטמפרטורה של כ- 28 מ"צ, אור וחושך לפי שעות היום. הצמחים צולמו במצלמה תרמית (סעיף 9) בהתאם לצורכי הניסוי לשם מעקב אחר הבדלי טמפרטורה הנובעים מנוכחות הפתוגן. הערכת ספיחת חיידקים לזרע נעשתה על מנת לאמת את ריכוז החיידקים המצוי על הזרע לאחר אילוח בריכוז מסוים. הזרעים המאולחים סוננו במסננת סטרילית (אשר חוטאה באש והתקררה). כתישת הזרעים והמשך הטיפול היו כפי שתואר עבור זרעי עגבנייה שאולחו בחיידקי *Cmm* בסעיף 4.3 כאשר זרע אחד מהווה חזרה.

5.2. אילוח עלווה בהזרקה (אילוח נקודתי) ומעקב תרמי

אילוח עלווה בהזרקה נעשה על צמחי מלון בגיל שבועיים עד שלוש שבועות. האילוח נעשה על שני העלים האמיתיים הראשונים בעזרת מזרק 1 ml ללא מחט. המזרק הוצמד לחלקו התחתון של העלה תוך כדי לחיצה על צידו השני של העלה בעזרת אצבע, על מנת לאפשר התפשטות הטיפה בנקודת האילוח (ללא פציעה). תרחיף האילוח הכיל חיידקי *A. citrulli*, תבדיד M6 בריכוז של $10^3, 10^5, 10^7$ CFU/ml או תבדיד M6 מול M6ΔHrcV בריכוז 10^6 CFU/ml. ריכוז החיידקים בתרחיף האילוח ואומת באמצעות ספירות מסדרת מהולים. כל סדרת טיפולים נעשתה על גבי אותו עלה, עם חזרות של אותו הטיפול על צמחים נוספים לפי צרכי הניסוי. בכל ניסוי אילוח נעשתה ביקורת של הזרקה DW מעוקרים. ארבע חזרות של 5 דיסקיות עלה (בקוטר 8 mm) נלקחו מכל טיפול לבדיקת ריכוז חיידקים בזמן סמוך לאילוח (זמן 0, כשעתיים לאחר אילוח) ויומיים לאחר האילוח. הדיסקיות נכתשו בעזרת הומוגניזר (Heidoph Instruments, Schwabach, Germany) במבחנת אפנדורף המכילה $300 \mu\text{l}$

DW מעוקרים. לאחר מכן הושלם הנפה ל- 1 ml עם DW מעוקרים. סדרת מהולים עשרוניים נעשתה לכל מיצוי מ- 5 דיסקיות, 50 µl נלקחו לזריעה על צלחות NA וגודלו ב- 28 מ"צ למשך כיומיים, שלושה. מספר המושבות נספרו וחושב CFU לדיסקית. הניסוי בוצע בחממה סגורה בתנאים מבוקרים של 28 מ"צ. הצמחים צולמו ממושכות במצלמה תרמית כמתואר בסעיף 11 ואיור 7 בהתאם לצורכי הניסוי לשם מעקב אחר הבדלי טמפרטורה הנובעים מנוכחות פתוגן לאורך זמן.

5.3. אילוח צמחים בוואקום

אילוח צמחים בוואקום נעשה על מנת לבדוק מפתח פיוניות בעלה מאולח לעומת ביקורת (סעיף 8) ולשם אימות ריכוז חיידקים בצמח במועד האילוח וזמן מה אחריו. מידע זה נתן תמונה מדויקת יותר לגבי ריכוז החיידק בצמח כפי שמתבטא בתמונה התרמית בניסוי אילוח נקודתי (סעיף 5.2). האילוח נעשה על צמחי מלון בעלי 2 עלים אמיתיים (גיל שבועיים וחצי עד שלוש שבועות). הצמחים הוטבלו ב- 800 ml תרחיף אילוח המכיל 0.02% silwet וחיידקי *A. citrulli* בריכוז של 10^2 CFU/ml. ריכוז החיידקים בתרחיף האילוח אומת באמצעות ספירות מסדרת מהולים. הטבילה נעשתה בתוך כלי אטום המחובר למשאבת ואקום, וואקום הופעל למשך דקה אשר נמדדה מ- 200 mbar על מנת לגרום להחדרת חיידקים לתוך העלווה. לפני כל טבילה נעשה ערבוב של התרחיף בעזרת בוחש מגנטי על מכשיר סטירר לוודא את אחידות התרחיף. בדיקת ריכוז חיידקים נעשתה באותו אופן המתואר בסעיף 5.2 ניסוי אילוח זה נעשה במקביל לניסוי אילוח עלווה בהזרקה כפי שתואר מעלה (סעיף 5.2) על ידי אותן תרחיפי אילוח כדי לספק נתונים על ריכוזי חיידקים המתאימים לשני הניסויים.

6. מיצוי מהצמח לבדיקת נוכחות חיידק

מיצוי מהצמח לבדיקת נוכחות חיידק נעשה על מנת לאמת נוכחות *Cmm* בעגבנייה כאשר קיים ספק בנוגע למופע הסימפטומים או בהצלחת האילוח. מקטע גבעול באורך של כ- 2 ס"מ הוכנס לשקית ניילון עבה סטרילית בעזרת פינצטה מחוטאת לאחר שהשכבה החיצונית שלו הוסרה ע"י סכין מחוטאת. הדוגמא נמעכה בשקית בעזרת פטיש. לדוגמא הוספו 500 µl DW מעוקרים, ערבוב נעשה בעזרת פינצטה ו- 1 µl מהדוגמא נלקח למבחנה לצורך ריאקציה PCR או נזרע על צלחת בעזרת מקל זריעה מחוטא. דרך נוספת למיצוי למטרת Polymerase Chain Reaction (PCR) הייתה לקיחת מקטעי עלה למבחנת אפנדורף המכילה 300 µl DW מעוקרים, כתישת מקטעי העלה באמצעות הומוגנייזר ולקיחת 1 µl מהנוזל העליון למבחנה לצורך ריאקציית PCR.

6.1. PCR לאימות נוכחות חיידק

ריאקציה PCR נעשתה לצורכי אימות נוכחות חיידקי *Cmm* לאחר בידוד מהרקמה הצמחית. ריאקציות הגברה למקטעים שונים נעשו במבחנות שונות. הריאקציה כללה, 12.5 µl REDTaq ReadyMix, 1 µl פריימר reverse של (Sigma Aldarich, Saint Louis, Missouri), 1 µl פריימר forward, 1 µl פריימר reverse של

אותו מקטע (רצפי הפריימרים פותחו במעבדתה של דר' שולמית מנוליס ממרכז וולקני), (לפי המפורט בטבלה 1), 0.5 μ l 100% DMSO, 1 μ l מהמיצוי הצמחי (או בביקורת חיובית, מושבת *Cmm* שנלקחה מצלחת עליה נעשתה זריעת בידוד והורחפה ב- 100 μ l DW מעוקרים) והושלמה עם DW מעוקרים לנפח סופי של 25 μ l. לפני הריאקציה, תרחיפי החיידקים הוכנסו להקפאה ב-80 מ"צ למשך 10 דק' ולאחר מכן הוספו ליתר מרכיבי הריאקציה. תוצרי הריאקציה הורצו בג'ל אלקטרופורזה כמתואר בסעיף 6.2. טבלה 2 מתארת את שלבי הריאקציה כמו שנעשה לכל הרצפים.

טבלה 1. פירוט הפריימרים ששימשו לאימות נוכחות חיידקי *Cmm* ע"י PCR

רצף הפריימר	פריימר	גודל המקטע bp	נושא המקטע	המקטע המוגבר
5'GTCTGAGCTCTGGTACACAT 3'	pf1	~500	pCM1	<i>celA</i>
5' TCGTCTGAACTTCGTACCG 3'	pre3			
5' CGTCAGGAGGTCGCTAATA 3'	cmm6	~850	pCM2	<i>pat-1</i>
5' GCTACTATGCAGTTCATGTC 3'	pat-fow			
5' GGATAGATTCGCCAGTTCACC 3'	chpc	~500	דנ"א כרומוזומלי	<i>chpC</i>
5' AGGCAGACACGACCAGTAATTG 3'	chpc-r			

טבלה 2. תנאי ריאקציות PCR

טמפרטורה (מ"צ)	זמן (דקות)	שלב	
95	5	Initial denaturation	1
95	0.75	Denaturation	#2
55	0.75	* Annealing	#3
72	1	Elongation	#4
72	10	Extension	5

שלבים 2-4 חזרו 34 פעמים.

*טמפרטורת ה-Annealing הייתה זהה לכל הפריימרים המצוינים בטבלה 1.

6.2. ג'ל אלקטרופורזה לתוצרי PCR

להכנת ג'ל אגרוז 1.2%, 0.36 גרם אגרוז הוספו ל- 30 ml בופר (0.5 x TEA, 1 mM EDTA, 20 mM Tris acetate, pH 8). דוגמה של 4 µl מכל ראקציית PCR הוטענה והורצה בג'ל במשך 20 דקות ב- 200 V. המרקר ששימש היה (Paqlab, Erlangen, Germany) 1 kb DNA Ladder. לאחר ההרצה נצבע הג'ל על ידי טבילה בתמיסה של Ethidium bromide למשך כ- 10 דק' בטלטול עדין. לאחר הצביעה צולם הג'ל במערכת BioDoc-it™ System (UVP, Opland, California) באור UV באורך גל של 295 nm.

7. מדידת מוליכות פיוניות באמצעות מכשיר פורומטר

שיטה זו שימשה לבדיקת מוליכות פיוניות באזורים שונים בעלים הנגועים בפתוגן בריכוזים שונים לעומת כאלו שאינם נגועים. שיטה זו היוותה כלי נוסף (מלבד המצלמה התרמית) לבחינת הטרנספירציה בצמח ומכאן כמדד לטמפרטורה בזמן נגיעות בפתוגן. אילוח נעשה על עלי מלון עם תבדיל M6 כמתואר בסעיף 5.2 בריכוזים של 10^5 ו- 10^7 CFU/ml או ביקורת. מוליכות פיוניות נבדקה באמצעות פורומטר (Decagon Devices, Washington, USA). מוליכות נמדדה ארבע פעמים ביום בהפרשים של שעה ועשרים דקות מסיום מועד הבדיקה הקודמת. כל בדיקה נערכה כשעה, בה נמדדו 8 חזרות מכל טיפול ללא כיוול של מכשיר הפורומטר (ניסיונות לכיוול נעשו אך נכשלו והוחלט לוותר עליהן בגלל ריבוי הבדיקות ליום ולנקודת זמן). מדידות נערכו לפי הוראות יצרן כאשר בין כל שתי מדידות נעשה חיטוי של אזור המדידה במכשיר ע"י אתנול 70%.

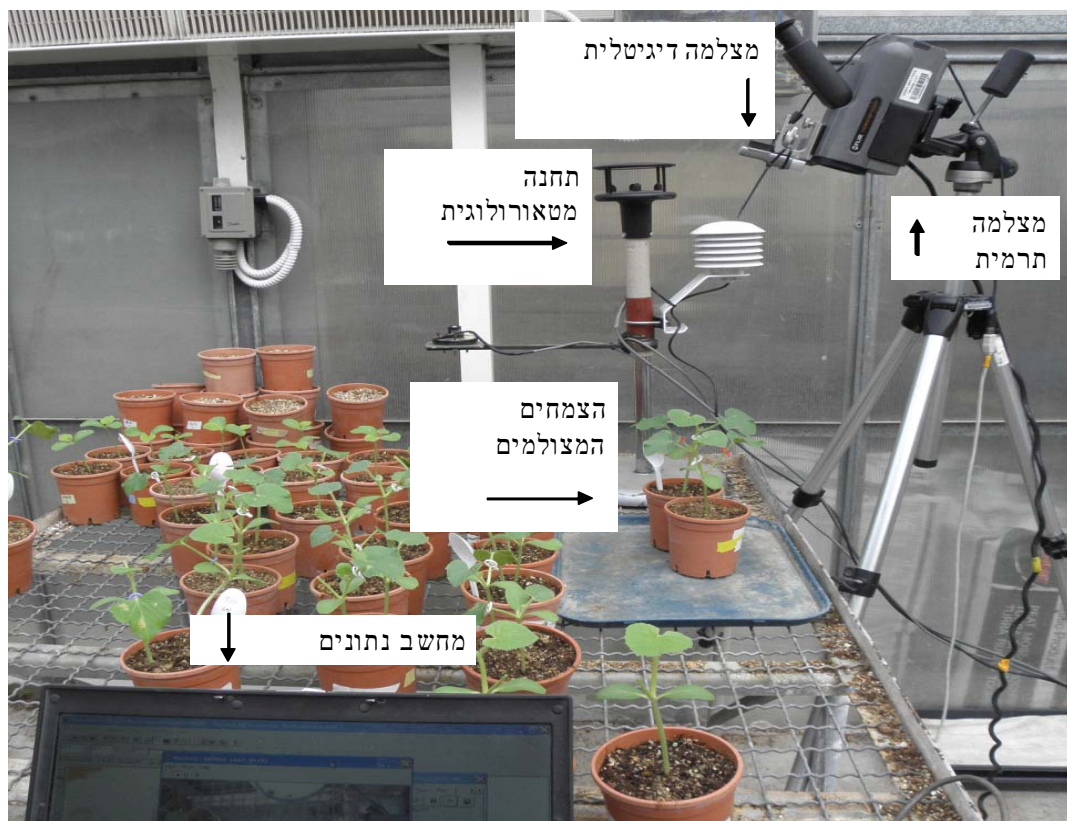
8. הערכת מפתח פיוניות באמצעות שיטת "מטבע פיוניות בג'ל"

שיטה זו שימשה לבדיקת מפתח פיוניות בעלים נגועים בפתוגן לעומת כאלו שאינם ושימשה ככלי נוסף (מלבד המצלמה התרמית והפורומטר) לבחינת הטרנספירציה בעלה. שיטה זו אפשרה קבלת מטבע (תבנית) פני שטח של עלה בזמן נתון בדרך שאינה הרסנית, בו ניתן לצפות לאחר מכן במיקרוסקופ אור. נעשה על עלים של צמחי מלון שאולחו ב- *A. citrulli* בטבילה בואקום כפי שתואר בסעיף 5.3. שיטה זו נלמדה במעבדתו של ד"ר מנחם מושליון בפקולטה, ומשמשת במעבדתו לבדיקת מפתח פיוניות (Sade et al., 2009). השיטה בוצעה בעזרת אקדה נושא לג'ל PROVIL^R novo Light C.D.2 fast set, 50 ml (al., 2009), אשר סופק באדיבות ע"י ד"ר מושליון. הוצאה טיפת משחת ג'ל בעזרת האקדה על מטבע פלסטיק והוצמדה לצד העלה התחתון המאולח כאשר מצידו השני הונחה זכוכית נושא שהוצמדה בעזרת אטב כביסה (תוך כדי תמיכה בעלה למניעת קריעתו) למשך כ- 1-2 דקות ליצירת מטבע. על המטבע הקשיח שנוצר נמרחה לכה באופן יסודי ונדיב על מנת ליצור תבנית זהה. לאחר יבוש במשך כ- 40 דק' הוצמד למטבע עם הלכה, נייר דבק שקוף ששופשף כדי ליצור הצמדה מקסימאלית ולמנוע הופעת בועיות אויר. מיד לאחר מכן הוסר נייר הדבק על מנת להפריד מהמטבע ולהדביק לזכוכית נושא לצורך צפייה במיקרוסקופ (PALM Microlaser Technologies Zeiss, Bernried).

.20 PALM Robosoftware version 3.0 0804 בהגדלה פי Germany בעזרת תוכנת המיקרוסקופ (Germany
תמונות לאנליזה נלקחו בעזרת מצלמת המיקרוסקופ (Hitachi, Tokyo, Japan) HV-D30 CCD.
אנליזה נעשתה בעזרת תוכנת ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

9. צילומים תרמיים וצילומים בתחום הנראה

צילומים תרמיים (infra red, IR) נעשו באמצעות מצלמה תרמית ThermaCAM, model SC2000 (FLIR systems, Stockholm, Sweden) עם חיישן בעל רזולוציה מרחבית של 320 x 240 פיקסלים הרגיש לאורכי גל בטווח של 7.5-13 מיקרון וברגישות של 0.1 מ"צ. הצילומים נעשו עם עדשה בעלת שדה ראייה של 24 מ"צ. צילומים בתחום הנראה נעשו באמצעות מצלמה דיגיטלית F828 (סוני, תל אביב, ישראל) או מצלמת LifeCam NX-6000, (Microsoft, New Jersey, US) אשר שימשה לצילום סרטי אילוח. מצלמות אלה (תחום הנראה) הוברגו על המצלמה התרמית על מנת לאפשר צילום מקביל של האובייקט המצולם במצלמה התרמית בשטח נתון, מדויק ככל הניתן. רוב הצילומים נעשו בשעות בהן הקרינה אופטימאלית ומתרחשת טרנספירציה מרבית בצמח אשר תתבטא בשינויי טמפרטורה בין השעות 11:00 ל- 13:30 בצהרים. במהלך הצילומים נמדדו טמפרטורת אוויר וקרינה, בניסויים בהם צוין, על ידי תחנה מטאורולוגית שמוקמה בחממה בזמן הניסוי וכללה חיישן טמפרטורה ולחות HMP60 (Valsala, Helsinki, Finland) המוגן בתנאי קרינה בבית מסוג 41303-5A (6-Plate Gill) (Radiation Shield) (Campbell Scientific, Utah, USA) וחיישן קרינה, LI-200 Pyranometer (LI-COR, Nebraska, USA). ניתן לראות את המרכיבים השונים באיור 7, הם הוצבו באופן זהה לכל הניסויים פרט לניסוי אילוח מוקדים ב- *Cmm* המתואר בתוצאות סעיף 1.3, בניסוי זה הוצבה מערכת על תקרת החממה אשר איפשרה צילום מלמעלה (לא מוצג).

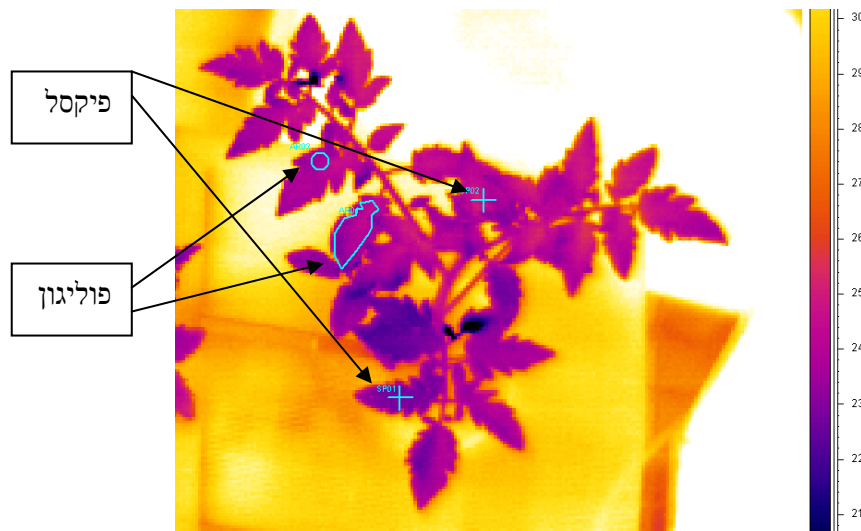


איור 7. מערכת צילום תרמי. הצילום נלקח מניסוי השוואת טמפרטורות בעלה מלון המאולח נקודתית ב- *A. citrulli*, לעומת ביקורת באמצעות צילום רציף ב- IR. הניסויים המלווים בצילום תרמי נערכו בחממה סגורה בתנאים מבוקרים (טמפרטורה של כ- 28 מ"צ), אור וחושך לפי שעות היום (ללא תאורה מלאכותית).

10. אנליזות וחישובים

10.1. ThermaCAM Researcher 2.8 SR-1

באמצעות התוכנה ThermaCAM Researcher 2.8 SR-1 נקבעו מספר פרמטרים המותאמים לתנאי הצילומים התרמיים שנקחו: תחום טמפרטורה אשר נע בין 19 ל- 45 מ"צ, מקדם האמסיויות של האובייקט המצולם (נוף הצמח, עלווה = 0.98), טמפרטורת הסביבה, מרחק מן האובייקט ולחות יחסית באזור המצולם. לאחר מכן שימשה לניתוח התמונה על ידי סימון העלים בתמונה בעזרת פיקסלים או פוליגונים (שטח המבטא מספר פיקסלים) אשר יבטאו טמפרטורה. צורת הסימון נקבעה לפי צרכי הניסוי והתמונה עצמה. תוכנה זו שימשה לניתוח כל התמונות שצולמו במצלמה תרמית בניסויים המתוארים. תמונת IR להמחשה מובאה באיור 8.



איור 8. תמונת IR וסימונים לאנליזה. (להמחשה). ניתן לראות בתמונה את אופן מדידת ערכי הטמפרטורה בעלווה כמו שנעשו בעבודה זו, על ידי פוליגונים או פיקסלים, מצד ימין ניתן לראות את סקלת הטמפרטורות.

ArcGIS .10.2

תוכנת המיפוי ArcGIS שימשה בניסוי להשוואת טמפרטורות של מוקדי צמחי עגבנייה מאולחים ב- *Cmm* לעומת ביקורת. מטרת השימוש בתוכנה הייתה לעזור בבחירת נתונים אשר אין ביניהם אוטוקורלציה מרחבית וכך למזער השפעות סביבתיות על טמפרטורת הצמח שסיבתן אינה תלויה בגורמי הניסוי (לדוגמא: צל או מגע של צמח סמוך). התוכנה שימשה למיפוי הפיקסלים הנבחרים לדיגום בעזרת נתוני קווי אורך ורוחב (מלאכותיים של הקובץ) אשר מתקבלים לאחר סימון פיקסל בתוכנת ה- ThermaCAM Researcher 2.8 SR-1 כמתואר בשיטות וחומרים סעיף 10.1 (איור 8). לאחר עדכון הנתונים בתוכנת ArcGIS, דרך פורמט של קובץ Excel וקבלת נתוני הדיגום במרחב חושב המרחק המינימאלי בין שתי דגימות המבטל מצב של אוטוקורלציה ביניהם. המרחקים בין הדגימות נבדקו פעם נוספת לפי טבלת נתוני מרחקים שנתקבלה מהתוכנה ונבחרו נקודות ללא אוטוקורלציה עליהם בוצעו החישובים.

ImageJ .10.3

תוכנת ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) שימשה בניסוי הערכת מפתח פיוניות. התוכנה אפשרה סימון חלל פנימי בפיונית תוך מדידת המפתח שלה לאחר הפיכת תמונת הפיונית שצולמה במיקרוסקופ לצבעי שחור לבן.

10.4. סטטיסטיקה

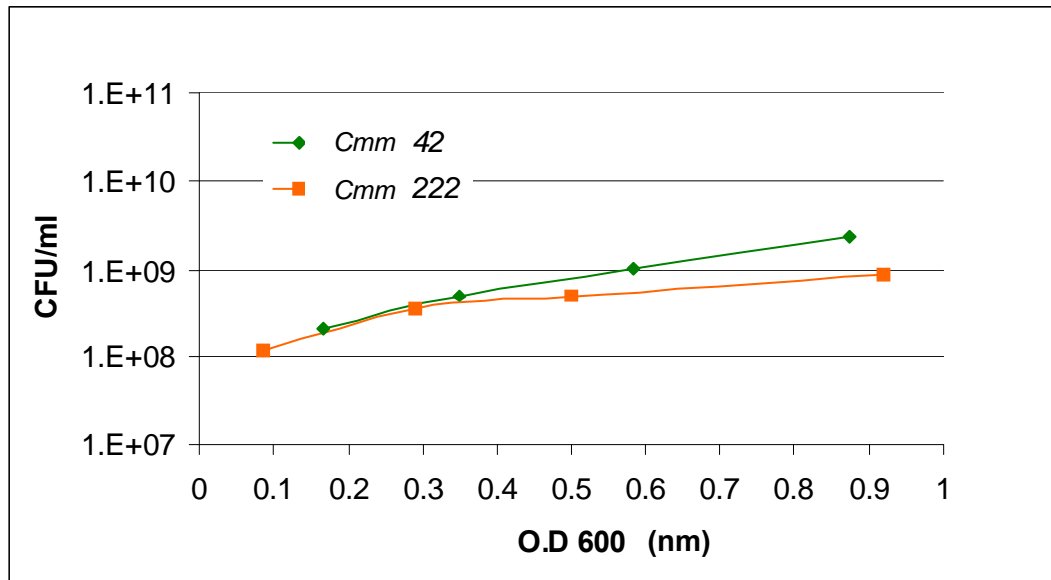
ניתוחים סטטיסטיים נעשו באמצעות תוכנת JMP 7 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). המבחן הסטטיסטי שנעשה היה ANOVA.

תוצאות

1. המערכת עגבנייה - *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)

1.1. עקומת כיוול של *Cmm*

נעשתה על מנת לקבוע צפיפות אופטית בה ריכוז החיידקים הוא 10^8 CFU/ml, זאת כדי לאפשר אילוח בריכוז הרצוי. ברוב ניסויי האילוח נעשה שימוש בתערובת שהכילה את שני תבדידי *Cmm*, תבדיד 42 ותבדיד 222 ביחד בריכוז של 10^8 CFU/ml ($O.D_{600} = 0.09-0.1$).



איור 9. עקומת כיוול *Cmm*. בגרף מתוארים שני התבדידים השונים של *Cmm* ששימשו בעבודה: 222 ו-42.

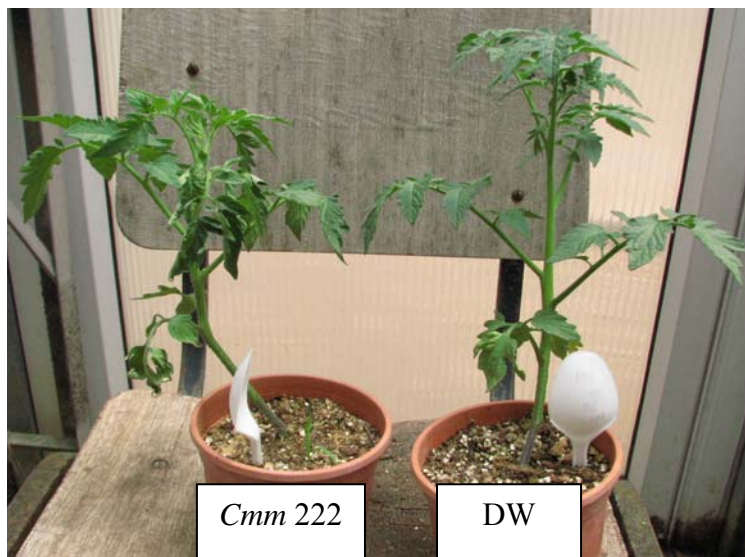
1.2. בדיקת שיטות אילוח שונות מלוות בצילומים: ניסויים פרלימינאריים ששימשו ללימוד המערכת

נעשו ניסיונות אילוח שונים למעקב אחר סימפטומים, מועד הופעתם, ודרך התבטאותם בצילום תרמי, אשר סייעו בתכנון ניסויי המשך, קביעת לוחות זמנים ומועדי צילומים. בין השאר נעשתה עבודה עם זני עגבנייה שונים והחלטות לגבי המשך עבודה התקבלו בעקבות הבדלים בהצגת הסימפטומים בין הזנים, בנוסף התמקדות בזן אחד אפשרה מספר חזרות סביר לניסויים. תוצאות הניסויים מפורטים מטה.

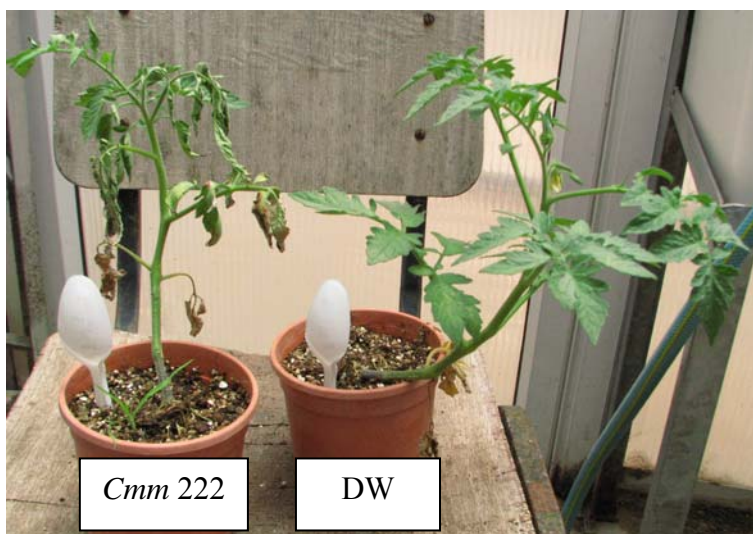
1.2.1. אילוח שורשים

באילוח שורשים ראשון כמתואר בשיטות וחומרים סעיף 4.2, נעשה מעקב אחר הופעת סימפטומים בשישה עשר צמחי עגבנייה מזנים 1125 ו-1335 (8 צמחים לכל זן אשר אולחו בשני תבדידי ה-*Cmm* בנפרד). ארבע צמחים נוספים מכל זן שימשו צמחי ביקורת (ללא אילוח). הניסוי נערך בתחילת חודש יוני 2009. לאחר אילוח שורשים, הצמחים נשתלו בעציצים. סימפטומי המחלה החלו להיראות 12 יום לאחר האילוח. מעקב אחרי הופעת סימפטומים בניסוי נמשך 20 יום לאחר האילוח. בניסוי זה, תבדיד *Cmm* 42

לא גרם להופעת סימפטומים כלל ותבדיד *Cmm 222* גרם להופעת סימפטומים ב- 75% מצמחי 1125 מאולחים וב- 62% מצמחי 1335. איור 10 מציג סימפטומים בזן 1125 שאולח בתבדיד 222 מול ביקורת, 14 ו- 20 יום לאחר האילוח בהתאמה.



A.



B.

איור 10. השפעת אילוח ב- *Cmm 222* על זן עגבנייה 1125. 14 יום לאחר אילוח, ניתן לראות סימפטומים של נבילה בחלקים מהצמח המאולח לעומת צמח הביקורת (A). 20 יום לאחר אילוח, ניתן לראות סימפטומים מתקדמים של נבילה בכל הצמח (B).

ניסוי אילוח שורשים נוסף נעשה עם תערובת תבדידים (*Cmm 42 + Cmm 222*), נקבע בתיאום עם חוקרי המיזם) על 30 צמחי עגבנייה מזן 1125 (15 מאולחים ו- 15 ביקורת). ניסוי זה נערך בנובמבר 2009 ולווה בצילומים תרמיים, לא נראו הבדלי טמפרטורה מובהקים בין שני הטיפולים. בנוסף, אחוז

הצמחים הסימפטומים בסוף הניסוי (27 יום לאחר האילוח) היה נמוך, רק 26.6% מהצמחים המאולחים הראו סימפטומי מחלה. יש לציין כי בניסוי זה כל צמח צולם בנפרד, נקודה בעייתית שתפורט בהמשך (סעיף 1.2.2).

1.2.2. אילוח זרעים

אילוח זרעי עגבנייה מזנים 1125 ו-1335 נעשה עם כל אחד משני תבדידי *Cmm* בנפרד, בעציצים נפרדים, כמו שמפורט בשיטות וחומרים (סעיף 4.3), בחודש יוני 2009. הניסוי כלל 10 חזרות לכל שילוב של זן עגבנייה ותבדיד ו-8 חזרות לצמחי ביקורת. הצילומים התרמיים נעשו על זן 1125 המאולח בתבדיד *Cmm* 222 (נקבע לפי תוצאות ניסוי אילוח שורשים המתואר בסעיף 1.2.1). הצילומים החלו 23 ימים לאחר הזריעה, בתחילת חודש יולי. חשוב לציין שבשיטת אילוח זו, סימפטומים מתחילים להופיע בדרך כלל יותר מאוחר מאשר בשיטת אילוח שורשים. כל עציץ צולם מספר פעמים במצלמה תרמית בהפרשים של שבוע למשך 15 יום בשעות קרינה לפי שיטות וחומרים (סעיף 9). בסוף הניסוי, כ-35 ימים לאחר האילוח, נראו סימפטומים על כ-80% מצמחי זן 1125 שאולחו בתבדיד 222 ועל כ-40% מצמחי זן 1335 שאולחו באותו תבדיד. הם החלו להופיע 18 יום לאחר האילוח. תבדיד *Cmm* 42 לא גרם להופעת סימפטומים כלל. ניסוי זה נערך במקביל לניסוי אילוח שורשים הראשון המתואר בסעיף 1.2.1 בו גם לא נראו סימפטומים ע"י תבדיד 42. התברר בדיעבד כי הייתה בעיה עם האינוקולום ובהמשך סופק תבדיד חדש באדיבותה של דר' שולמית מנוליס ממרכז וולקני.

בניסוי זה, נצפתה מגמה שהצביעה על הבדלי טמפרטורה בצילומים תרמיים בין צמחים בהם הופיעו סימפטומים (אולחו בתבדיד *Cmm* 222) לבין צמחי ביקורת. הטמפרטורה של הצמחים המאולחים הייתה גבוהה יותר מאשר צמחי הביקורת, אך ההבדלים לא היו מובהקים ומספר החזרות היה נמוך (גם עקב זרעים שלא נבטו). בעיה נוספת באותו ניסוי היא שהסימפטומים החלו להופיע מוקדם מן הצפוי ולכן הצילומים החלו לאחר הופעת סימפטומים בחלק מהצמחים (כאמור, המטרה הייתה לבחון האם ניתן לאבחן צמחים נגועים לפני הופעת סימפטומים הנראים לעין).

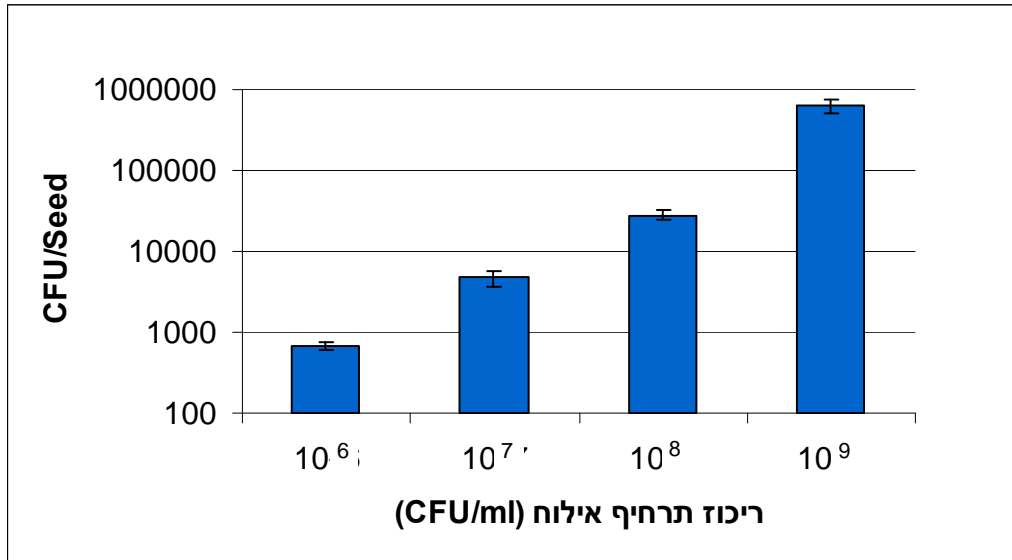
לאחר שנוכחנו מהו מועד הופעת הסימפטומים בשיטת אילוח זו, הזמן הדרוש והספק הצילומים בשעות קרינה, תוכנן ניסוי נוסף שבו אולחו קבוצות זרעים בהפרשים של שבוע, מה שמאפשר קבלת טווח רחב של נתונים בזמן קצר. הניסוי נעשה עם זן עגבנייה 1402 (שהיה זמין באותו מועד), ב-30 צמחים לכל מועד (15 זרעים מאולחים ו-15 ביקורת). בניסוי זה נעשה שימוש בתערובת תבדידים 222 ו-42, כאשר האחרון סופק מחדש ע"י המעבדה של דר' שולמית מנוליס (בגלל הכישלונות בקבלת סימפטומים ע"י תבדיד זה בניסויים הקודמים כפי שתואר לעיל). הזריעות התבצעו בחודש נובמבר 2009 והצילומים נערכו בחודש דצמבר. בניסוי זה לא נמצאו הבדלים בטמפרטורה בין צמחים מאולחים וצמחי ביקורת, לא נראו כלל סימפטומים באף אחד מהצמחים המאולחים ולא נמצאו עקבות *Cmm* בדגימות מצמחים שנזרעו על צלחות או בבדיקות PCR שנעשו אקראית בחלק מהצמחים לאחר מיצוי מהעלים לפי שיטות וחומרים (סעיף 6). בנוסף, היה קשה לעבוד עם זן זה של עגבנייה בשל התפרשותו לצדדים, מה שהקשה על תפישתו בעדשת המצלמה בצילום ממרחקים קטנים בהם עבדנו בחממה. יתרה מזאת, בניסוי זה, כמו

בניסויים הקודמים, הייתה בעיה להשוות בין טמפרטורת צמחים המופיעים בתמונות תרמיות שונות שנלקחו בזמנים שונים. בעיה זו נובעת, לפחות באופן חלקי, מהעובדה שתנאי הסביבה (בעיקר טמפרטורה ורמת קרינה) משתנים במהלך הצילומים מה שמשפיע על הצמחים ומגדיל את השגיאה בין הצילומים השונים. בסך הכל ניסויים אלה שימשו ככלי ללימוד המערכת (שיטות אילוח צילומים וניתוחם) ושגיאותיה על מנת להגדיל את רמת הדיוק לניסויים בהמשך.

1.2.3. אילוח זרעים בריכוזים שונים

ניסוי זה נערך על מנת ללמוד על מועד הופעת סימפטומים בצמחי עגבנייה מזן 1125 לאחר אילוח זרעים בריכוזים שונים של *Cmm* (תערובת של תבדידים 222 ו-42), ועל מידת ספיחת החיידקים לזרעים, כמתואר בשיטות וחומרים (סעיף 4.3). אילוח זרעיות נעשו באמצע פברואר 2010. שלושים וחמישה זרעים אולחו בריכוזים שונים של חיידקים (10^9 - 10^{10} CFU/ml) מול 35 זרעי ביקורת. מתוכם, 20 נזרעו בעציצים ו-15 שימשו להערכת יכולת הספיחה של החיידקים. ניתן היה להבחין בסימפטומים כחודש לאחר אילוח בצמחים בודדים שאולחו ב- 10^6 - 10^9 CFU/ml ללא הבדלים בין הריכוזים. מצב זה לא השתנה עד סוף הניסוי, כארבעה חודשים לאחר האילוח. נוכחות *Cmm* בצמחים אלה אומתה בבדיקת PCR או בזריעה על גבי צלחת. בשאר הצמחים לא ניתן היה להבחין בסימפטומים ספציפיים ל- *Cmm* ובמספר דגימות אקראיות שנבדקו אכן לא נמצא חיידק.

מבחינת מידת הספיחה, ניתן לראות יכולת ספיחה נמוכה ב- 3.5 סדרי גודל מריכוז תרחיף האילוח בכל ארבעת תרחיפי האילוח בריכוזים השונים (4-2 חזרות לריכוז), (איור 11). כלומר, ערכי CFU לזרע היו כ- 3.5 סדרי גודל נמוכים מריכוזי תרחיפי האילוח ב- CFU/ml. ריכוזים נמוכים יותר נבדקו אך לא נתקבלו מושבות. הניסוי נעשה פעם נוספת ונבדקה ספיחת חיידקים לאחר אילוח בריכוז 10^8 CFU/ml בלבד. התוצאות שהתקבלו היו זהות לניסוי הראשון והראו ספיחה נמוכה ב- 3.5 סדרי גודל מריכוז תרחיף האילוח כפי שתואר מעלה.



איור 11. בדיקת ספיחת חיידקים לזרעים. העמודות מציגות ממוצע מספר מושבות לזרע (CFU/seed) לאחר שאולח בריכוז מסוים ושגיאת תקן (SE).

1.2.4. אילוח עלווה

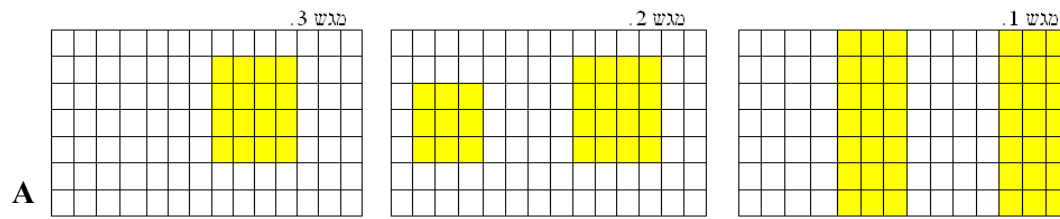
בניסוי ראשון מסוג זה נחתך חצי מהעלעל הטרמינלי ע"י מספריים שנטבלו בתרחיף אילוח כפי שצוין בשיטות וחומרים (סעיף 4.4). אילוח צמחי עגבנייה מזנים 1125 ו-1335 נעשה עם כל אחד משני תבדידי *Cmm* בנפרד (תבדידים 222 ו-42), 9 חזרות לכל שילוב זן-תבדיד, ו-7 צמחים מכל זן שימשו ביקורת (גזירת עלה באמצעות מספריים שנטבלו ב-DW מעוקרים). הניסוי נערך בחודש יוני 2009. לא נראו כלל סימפטומים לכל אורך הניסוי (כחודש ימים ממועד האילוח) או הבדלי טמפרטורה בצילומים תרמיים שנערכו מתחילת יולי. ניסוי זה נערך במקביל לניסוי אילוח שורשים הראשון המתואר בסעיף 1.2.1 ואילוח זרעים המתואר בסעיף 1.2.2 בהם נצפתה בעיה עם התבדיד 42.

בניסוי נוסף מסוגו אשר נערך באוגוסט 2009 בצמחי עגבנייה מזן 1125 נחתכו שני עלעלים טרמינלים בשלמותם בכל צמח (5 צמחים מאולחים ו-5 צמחי ביקורת) ע"י מספריים שנטבלו בתרחיף אילוח מעורב (תבדידים 222 ו-42), כאשר תבדיד 42 סופק מחדש ע"י המעבדה של דר' שולמית מנוליס. ניתן היה לזהות מעט סימפטומים של התקפלות עלעלים אשר סמוכים לאזור המאולח בגזירה והתבטאו בהבדלי טמפרטורה בצילום תרמי אך לא באופן מובהק. בנוסף, הופיעו סימפטומים נוספים מסוג אחר, שמקורם המשוער הוא בוירוס צהבון האמיר. בהמשך הוחלט לא להמשיך עם שיטת אילוח זו בשל אחוזי הופעת הסימפטומים הנמוכים (כ-20% מכלל הצמחים המאולחים) והקושי להשוות בין טמפרטורת צמחים המופיעים בתמונות תרמיות שונות שנלקחו בזמנים שונים (בדומה לסעיף 1.2.2).

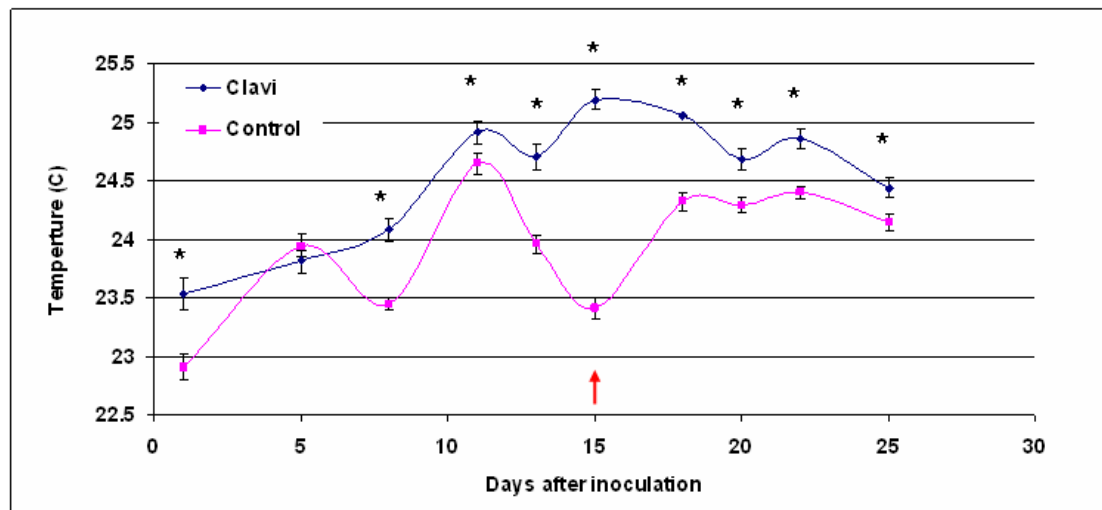
1.3. השוואת טמפרטורות בין מוקדי צמחי עגבנייה מאולחים ב- *Cmm* לעומת ביקורת במגשי

חישתיל באמצעות צילומים תרמיים

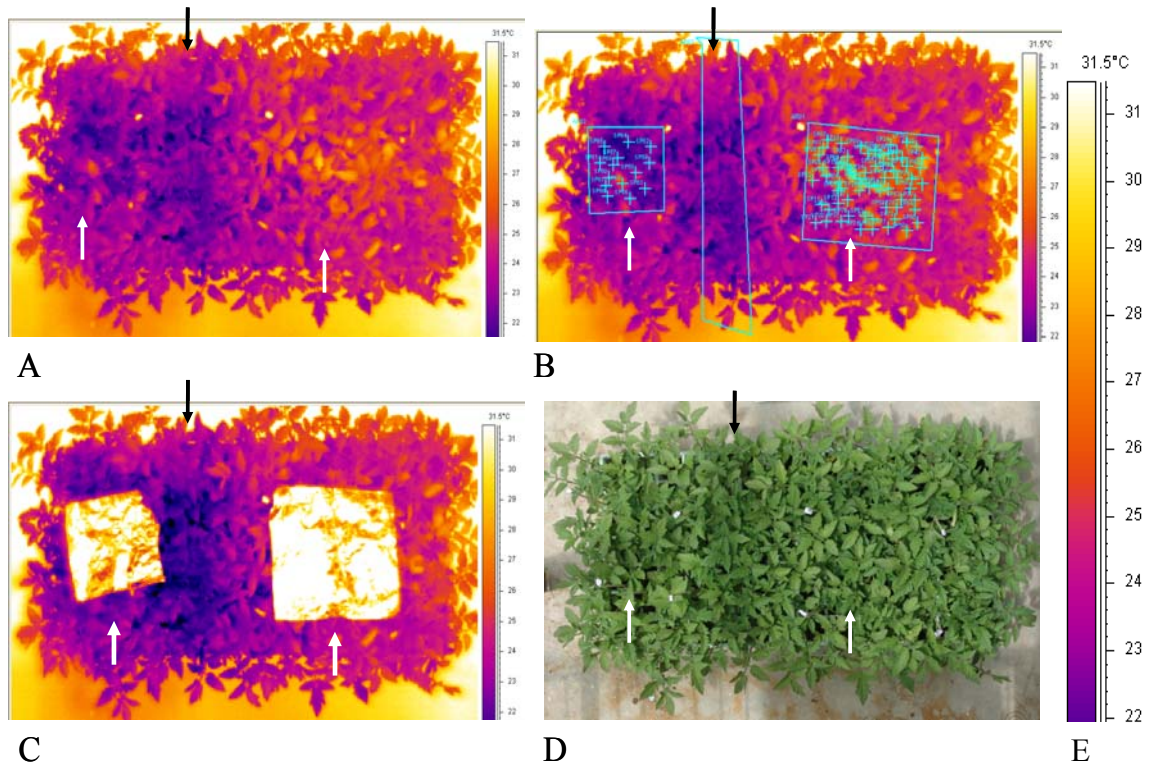
לאור תוצאות הניסויים המקדימים שפורטו לעיל, הוחלט על המשך עבודה עם זן עגבנייה 1125 ותערובת חיידקי *Cmm* ($Cmm\ 222 + Cmm\ 42$) בשיטת אילוח שורשים, בעיקר בגלל הדירות התוצאות, אחוזי הופעת סימפטומים גבוהים יחסית ובמועד הצפוי, ונוחות עבודה. כמו כן, עקב הבעייתיות שהתגלתה בצילום של כל צמח בנפרד (הגדלת השגיאה כתוצאה משינוי בתנאי סביבה המשתנים בזמן בין צילום לצילום), הוחלט לעבור לשיטה לפיה לאחר האילוח, השתילים מוחזרים למגשי החישתיל, כך שניתן לצלם את כל השתילים על המגש באותו זמן וכך לצמצם את השגיאה. כל מגש כלל צמחי ביקורת ומוקדים של צמחים מאולחים. מערכת ניסויית זו גם התאימה יותר לשאלת המחקר מבחינת המיזם שהיא האם ניתן לאבחן נגיעות בחיידק באמצעות צילומים תרמיים לפני שהשתילים עוזבים את המשתלה. שורשי שתילי עגבנייה בני שבועיים אולחו והוחזרו ל- 3 מגשי חישתיל לפי המתואר בשיטות וחומרים (סעיף 4.2). הניסוי הועמד ביולי 2010 וסידור השתילים היה לפי המתואר באיור 12. מעקב נעשה עליהם כל יומיים-שלושה לאחר האילוח למשך 25 ימים, באמצעות צילום תרמי כמתואר בשיטות וחומרים (סעיף 9), ללא נוכחות תחנה מטאורולוגית. במבחן ANOVA נראו הבדלים מובהקים ($P \leq 0.01$) בין טמפרטורת צמחים מאולחים ב- *Cmm* לעומת צמחי ביקורת (איור 13) בכל הימים הנבדקים, פרט ליום 5 לאחר אילוח. באיור 13 ניתן לראות כי ההבדלים נעים בין 0.25 ל- 1.75 מ"צ. כל נקודה באיור מבטאת ממוצע טמפרטורה של טיפול (*Cmm* או ביקורת) ושגיאת תקן של בין 100 ל- 270 דגימות משלושת המגשים, אשר נבחרו בעזרת תוכנת המיפוי ArcGIS (שיטות וחומרים, סעיף 10.2). בניסוי זה, סימפטומי המחלה החלו להופיע רק 15 יום לאחר האילוח (מסומן בחץ אדום באיור 13) כך שהבדלי טמפרטורה התגלו עוד לפני הופעת סימפטומים. איור 14 מציג מגשי חישתיל עם צמחי עגבנייה לאחר טיפול (*Cmm* או ביקורת) ביום 13 לאחר אילוח. בזמן המעקב נלקחו בכל מועד 3 תמונות: תמונת RGB, תמונת תרמית רגילה ותמונת תרמית עם רדיד אלומיניום, כאשר מטרתו של רדיד האלומיניום לכסות את מוקדי האילוח במגש במטרה לתחום אותם ובכך להקל על ניתוח התמונה (לרדיד האלומיניום אמסיביות שונה מזו של העלה ולכן הוא בולט בתמונה) (איור 14). ניתוח נעשה תמיד על צילום תרמי שבוצע לפני הנחת רדיד אלומיניום, מחשש להשפעה שתהיה לו על הטמפרטורה. נבדקו הבדלים בין פנים המגש לחוץ המגש למנוע סטיות הנובעות ממיקום ולא מטיפול, לא נמצאו הבדלים מובהקים בטמפרטורה הנובעים ממיקום. למרות זאת, לא נלקחו דגימות מצמחים חיצוניים במיוחד. בגמר הצילומים נבדקו מספר צמחים שנלקחו באופן אקראי מהמוקדים וסביבתם ונמצאו חיוביים לנוכחות הפתוגן בעזרת בדיקת PCR והרצתם בג'ל, כמתואר בשיטות וחומרים (סעיף 6).



איור 12. סידור מוקדי *Cmm* בשלושת המגשים בניסוי אילוח שורשים במשתלה. מוקדי *Cmm*, צמחי עגבנייה ששורשיהם נטבלו בתרחיף *Cmm* (צהוב); ביקורת, צמחי עגבנייה ששורשיהם נטבלו ב-DW סטריליים מעוקרים (לבן) (A). שלושת המגשים בחממה, שיפודים עם רדיד אלומיניום תחמים את מוקדי האילוח (B).



איור 13. הבדלי טמפרטורה בין צמחי עגבנייה מאולחים לצמחי ביקורת בניסוי אילוח שורשים במשתלה. ימים לאחר אילוח (ציר ה-X); טמפרטורה ממוצעת (ציר ה-Y). ממוצע טמפרטורה של עלי עגבנייה מאולחים ב-*Cmm* (Clavi, קו כחול); ממוצע טמפרטורה של עלי עגבנייה ללא טיפול (Control, קו ורוד) ושגיאת תקן (SE). מועד תחילת הופעת סימפטומים מסומן בחץ אדום. כוכביות מסמנות הבדלים מובהקים ($p \leq 0.01$) בין הטיפולים באותו מועד.



איור 14. מגש חישתיל עם צמחי עגבנייה לאחר טיפול (*Cmm* או ביקורת) ביום 13 לאחר אילוח בניסוי אילוח שורשים במשתלה. המוקדים המאולחים במגש ב- *Cmm* מסומנים בחיצים לבנים בכל התמונות. אזור הצללה, ממנו לא נלקחו דגימות בשל השפעת הצל על טרנספירציית הצמח ולכן גם על הטמפרטורה, מסומן בחץ שחור בכל התמונות. צילום תרמי של המגש (A). צילום תרמי בו מסומנות דגימות המבוטאות בפיקסלים שנלקחו מתוך האזור המאולח (B). דגימות נלקחו גם מסביב לאזורים המאולחים (ביקורת, לא מוצג). רדיד אלומיניום הונח על גבי האזורים המאולחים (חיצים לבנים) לצורך קביעת מיקומם המדויק של הדגימות (C). תמונת RGB של המגש, נלקחה תמיד בו זמנית לצילום התמונה התרמית לצורכי מעקב ובקרה על מצב הצמחים ותנאי הסביבה (D). סקלת טמפרטורה במ"צ (E).

2. המערכת מלון - *Acidovorax citrulli*

2.1 אילוח זרעים בטבילה

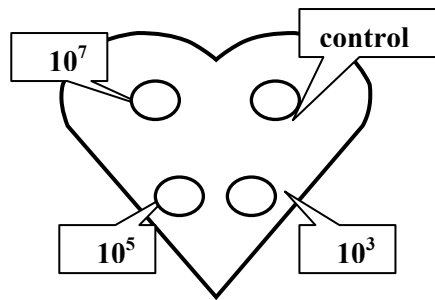
אילוח זרעי מלון נעשה כמתואר בסעיף 5.1. בניסוי זה נעשה ניסיון לשחזר את המערכת המתוארת עבור *Cmm* בפרק תוצאות (סעיף 1.3) לקבלת נוף צפוף המאפשר צילום בו זמנית של מגש שלם עם חלוקה למוקדים. בשל אופן וגיל הופעת הסימפטומים בצמח לא התאפשר להעמיד מערכת זו באופן דומה ולא ניתן היה לקבל תוצאות חד-משמעיות לכן בהמשך הוחלט להתמקד באילוח מסוג שונה (נקודתי) המאפשר מעקב אחר אילוח נקודתי.

2.2 השוואת טמפרטורות בעלה מלון המאולה נקודתית ב- *A. citrulli* M6 בריכוזים שונים לעומת

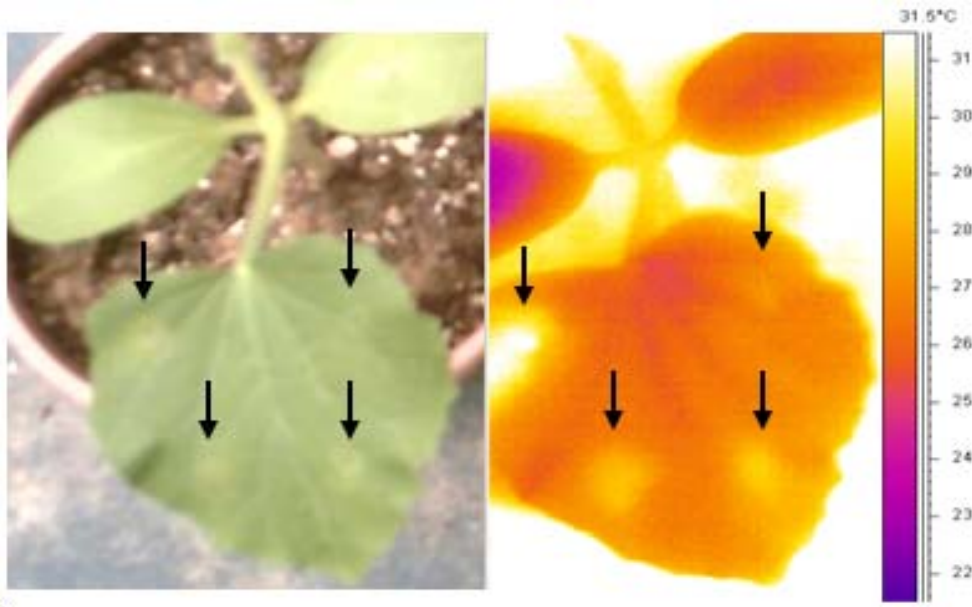
ביקורת באמצעות צילום תרמי רציף

עלי מלון אולחו נקודתית לפי המתואר בשיטות וחומרים סעיף 5.2. כל עלה אולח בשלושה ריכוזים שונים- 10^3 , 10^5 ו- 10^7 CFU/ml, בנקודות שונות על גבי העלה מול ביקורת, כמפורט באיור 15. חזרה אחת של הניסוי בוצעה בספטמבר 2010 ושתי חזרות נוספות בוצעו באמצע חודש אפריל 2011. סה"כ 3 חזרות. כל עלה מלון מאולח (איור 15) מהווה חזרה (סה"כ 3 עלים ב- 3 צמחים נפרדים). בשתי החזרות של הניסוי, שנערכו באפריל 2011, העלים צולמו באופן רציף למשך כ- 34 שעות, צילום תרמי כל 20 שניות וצילום RGB כל 10 דקות, לפי המערכת המתוארת בשיטות וחומרים איור 7. דוגמאות של תמונות ששימשו לאנליזה וניתוח תוצאות מוצגות באיור 16. תוצאות עבור חזרה אחת מכל ריכוז מוצגות באיורים 17 עד 19. באותו ניסוי צולמו 2 צמחים במקביל (שתי חזרות). באיור 20 מוצגים ממוצעי החזרות של הפרשי הטמפרטורה בכל ריכוז בנפרד כפי שחושב משני העלים שצולמו (פרט לריכוז 10^7 CFU/ml, לו חזרה אחת בלבד באיור, בשל קריעת האזור המאולח בעלה באחת החזרות). ניתן לראות חזותית כי הטמפרטורה של האזורים שאולחו גבוהה יותר מכלל העלה שלא הודבק וכן מהביקורת (איור 16). תוצאות אלה אומתו ע"י ניתוח כמותי של הפרשי טמפרטורות העלים בין אזורים מודבקים לאזורים לא מודבקים (איורים 17-19; פירוט בהמשך).

חזרה נוספת של אותו ניסוי נערכה בספטמבר 2010 והתוצאות מסוכמות באיור 21. האיור מציג הפרשי טמפרטורה שנמדדו מצילום עלה אחד. בניסוי זה העלה צולם באופן רציף, צילום תרמי כל 20 שניות וצילום RGB כל 20 דקות לפי אותה מערכת (איור 7). איור 21 מציג נתונים של כ- 28 שעות לאחר אילוח והלאה ולא בסמוך לאילוח (כמו שנעשה בניסוי הקודם), בשל תקלה שאירעה עם המצלמה.



איור 15. תרשים עלה מלון מאולה באופן נקודתי. מתאר את אופן האילוח בעלה מלון כפי שנעשה בניסוי זה, על ידי נקודות אילוח בריכוזים שונים וביקורת.



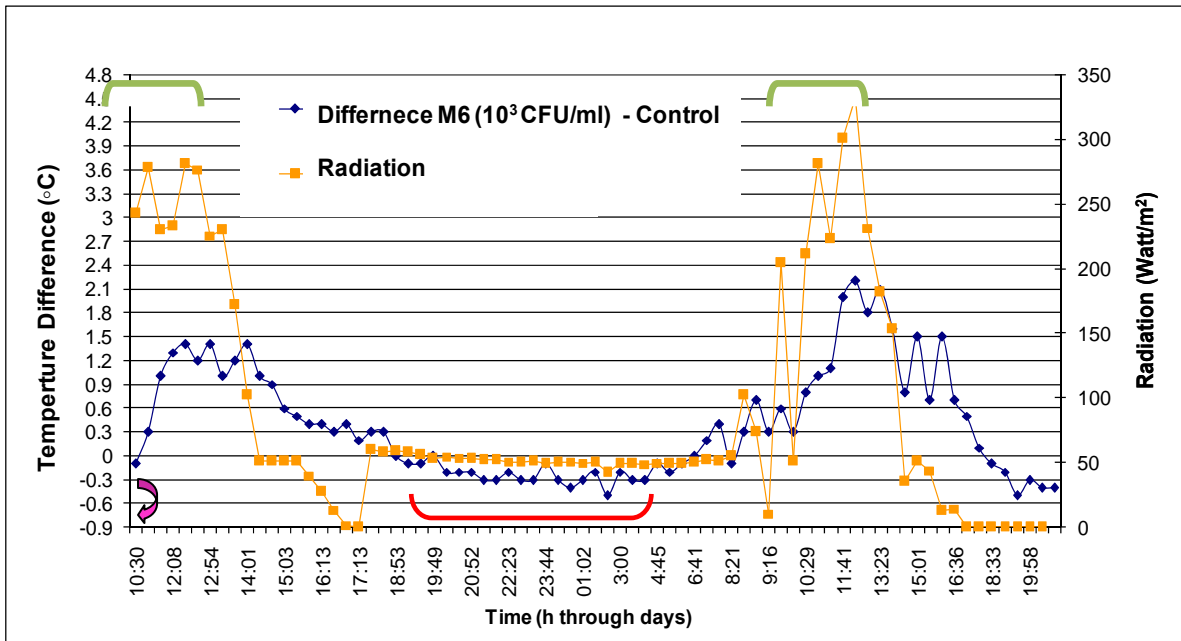
איור 16. ניסוי אילוח נקודתי בעלה מלון. סקלת טמפרטורה ודוגמת תמונת תרמית (ימין) אשר נלקחה כ- 25 שעות לאחר אילוח, בשעה 11 בבוקר. היצים שחורים מצביעים על נקודות האילוח והביקורת בהתאם לתרשים המוצג באיור 15; תמונת RGB רגילה (שמאל) מאותו מועד צילום של התמונה התרמית, היצים שחורים מצביעים על אותן נקודות אילוח וביקורת.

בבדיקה שנעשתה לבדיקת ריכוז חיידק בעלה לאחר אילוח ב- 10^7 CFU/ml נמצא הבדל של כ- 1-2 סדרי גודל פחות מאשר ריכוז תרחיף האילוח בזמן 0 (כ- דיסקית 10^5 - 10^6 CFU) ו- 1-2 סדרי גודל יותר מאשר תרחיף האילוח לאחר יומיים (דיסקית 10^8 - 10^9 CFU). שאר הריכוזים נבדקו אך לא תועדו מחוסר נתונים אמינים עקב זיהומים בצלחות. בדיקת ריכוזי האילוח נעשתה על צמחים שאינם שימשו בצילום הסרט מכיוון שזו בדיקה הרסנית ודורשת מספר חזרות אך מטרתה לייצג את מספר החיידקים בתחילת צילומי הסרט ובסופו.

ניתוח נתונים נעשה על ידי סימון פוליגונים סביב אזורי האילוח בעלה כמתואר בשיטות וחומרים (סעיף 10.1, איור 8). כל פוליגון מבטא ממוצע של טמפרטורות הפיקסלים אותם הוא מכיל. באיורים 17 עד 19 (ניסוי ראשון) ניתן לראות את הפרשי הטמפרטורה בין אזור בעלה מאולה ב-M6 לביקורת (קו כחול)

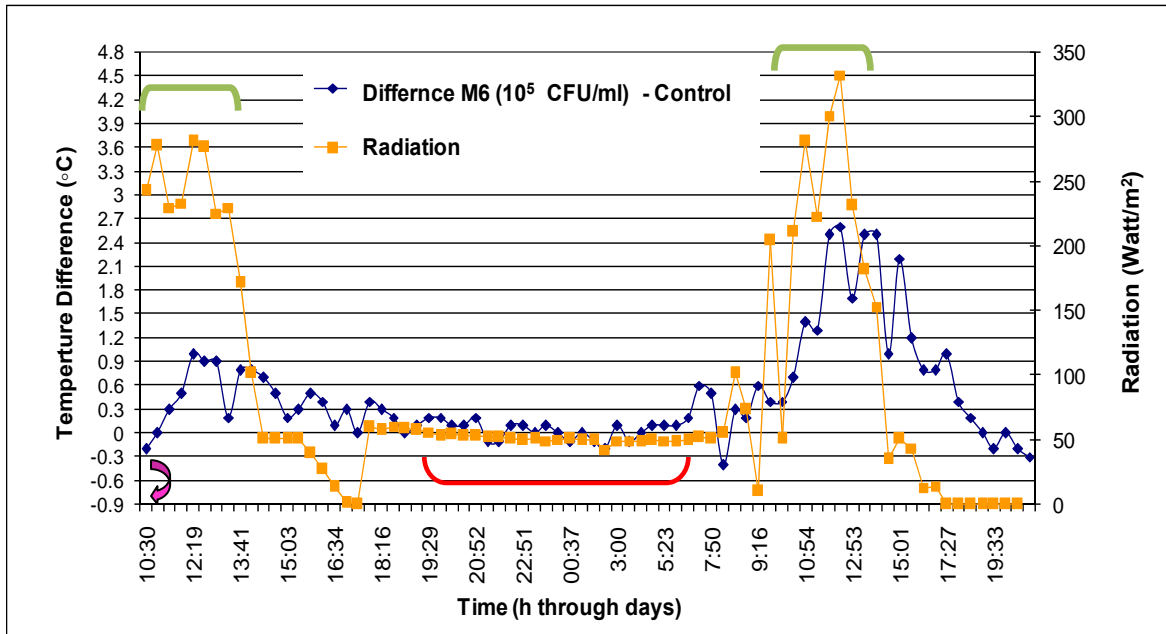
במשך כ- 34 שעות צילום, כאשר הצילום החל בטווח של כחצי שעה לאחר האילוח. בנוסף ניתן לראות את הקשר בין ההבדלים בטמפרטורה לרמת הקרינה (קו כתום). בשעות קרינה חזקות 10:30-14:00 חלה עלייה בטמפרטורת האזור המאולה לעומת הביקורת וניתן להבחין בהפרשים גבוהים בהתאם לריכוז האילוח.

באזור 17 המציג השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולה נקודתית בריכוז 10^3 CFU/ml, ניתן לראות עלייה בטמפרטורה בשעות קרינה רציפות של כ- 1-1.4 מ"צ לפני הופעת סימפטומים ו- 0.8-2.2 מ"צ אחרי הופעת סימפטומים. סימפטומים הופיעו בין 19:15 בערב ביום הראשון ל- 6:25 לפנות בוקר ביום השני (באדום).



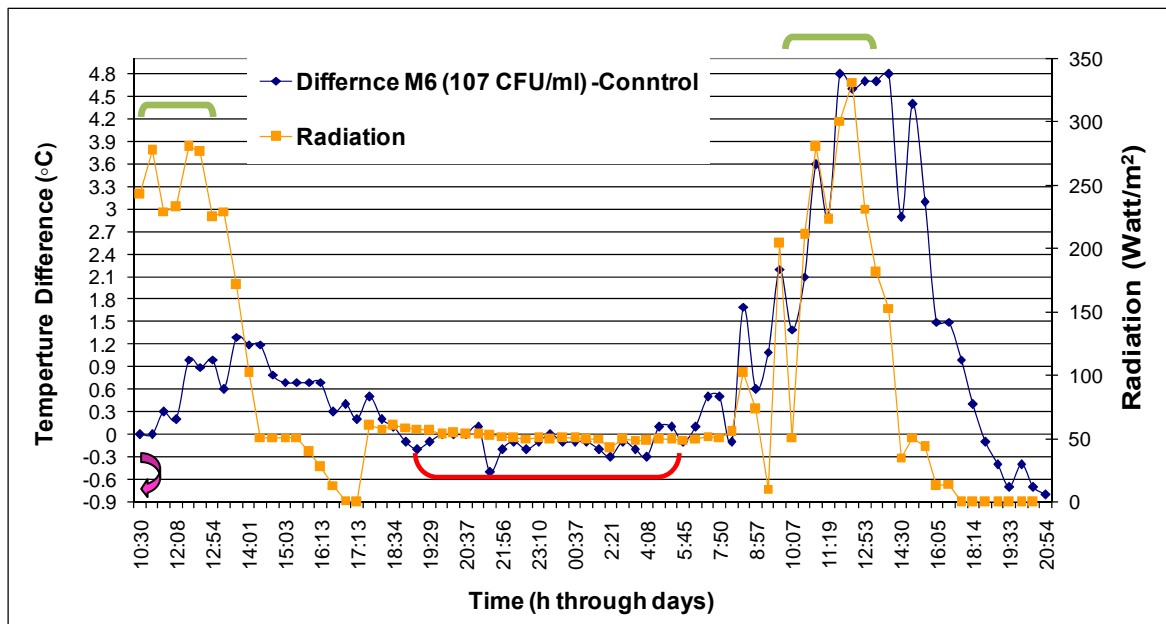
איור 17. השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולה נקודתית בריכוז 10^3 CFU/ml לעומת ביקורת (אפריל 2011). הצילום נערך במשך כ- 34 שעות. זמן הצילום מבוטא כשעות במשך היום (ציר ה-X, הבדלים בטמפרטורת העלה בין אזור מודבק ולא מודבק (קו כחול); קרינה במשך היום (קו כתום); זמן הופעת סימפטומים (באדום), שעות קרינה רציפות (בירוק), זמן אילוח (כחצי שעה לפני תחילת המדידות, חץ ורוד).

באזור 18 ניתן לראות עלייה בטמפרטורה בשעות קרינה רציפות של כ- 0.8-1 מ"צ לפני הופעת סימפטומים ו- 1.4-2.5 מ"צ לאחר הופעת סימפטומים. סימפטומים הופיעו בין 19:15 בערב ביום הראשון ל- 6:25 לפנות בוקר ביום השני (באדום).



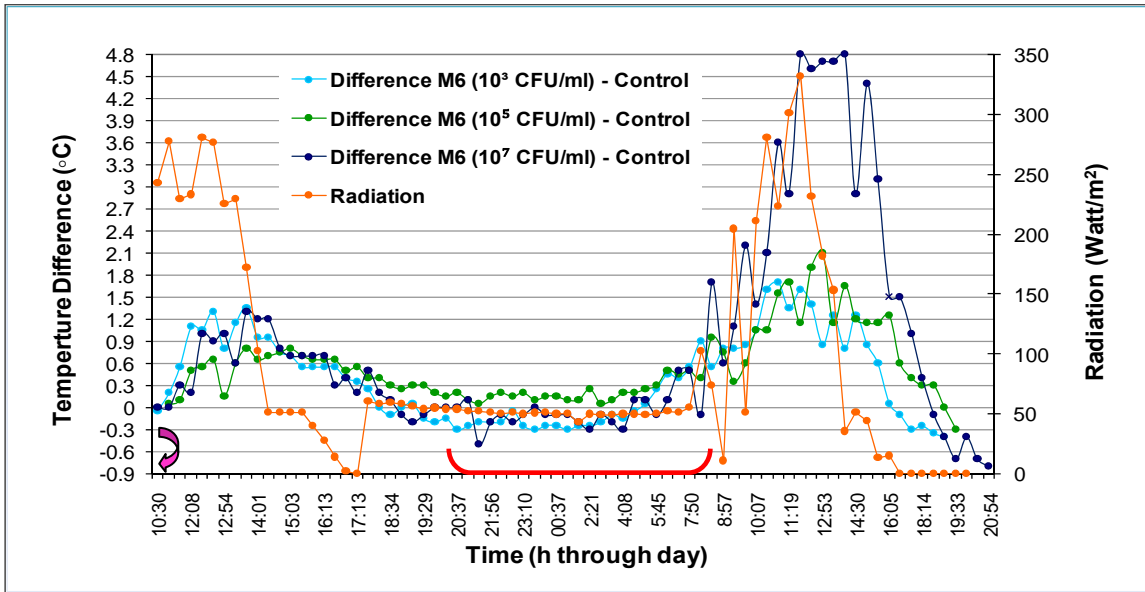
איור 18 . השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולה נקודתית בריכוז 10^5 CFU/ml לעומת ביקורת (אפריל 2011). הצילום נערך במשך כ- 34 שעות. זמן הצילום מבוטא כשעות במשך היום (ציר ה-X , הבדלים (Time); הבדלי טמפרטורה במ"צ (ציר ה-Y משמאל); ערכי קרינה $Watt/m^2$ (ציר ה-Y מימין). הבדלים בטמפרטורת העלה בין אזור מודבק ולא מודבק (קו כחול); קרינה במשך היום (קו כתום); זמן הופעת סימפטומים (באדום), שעות קרינה רציפות (בירוק), זמן אילוח (כחצי שעה לפני תחילת המדידות, חץ ורוד).

באיור 19 ניתן לראות עלייה בטמפרטורה בשעות קרינה רציפות של כ- 1.3-1 מ"צ לפני הופעת סימפטומים (לפנות בוקר לקראת היום השני, חץ אדום) ו- 2.1-4.8 מ"צ לאחר הופעת סימפטומים.

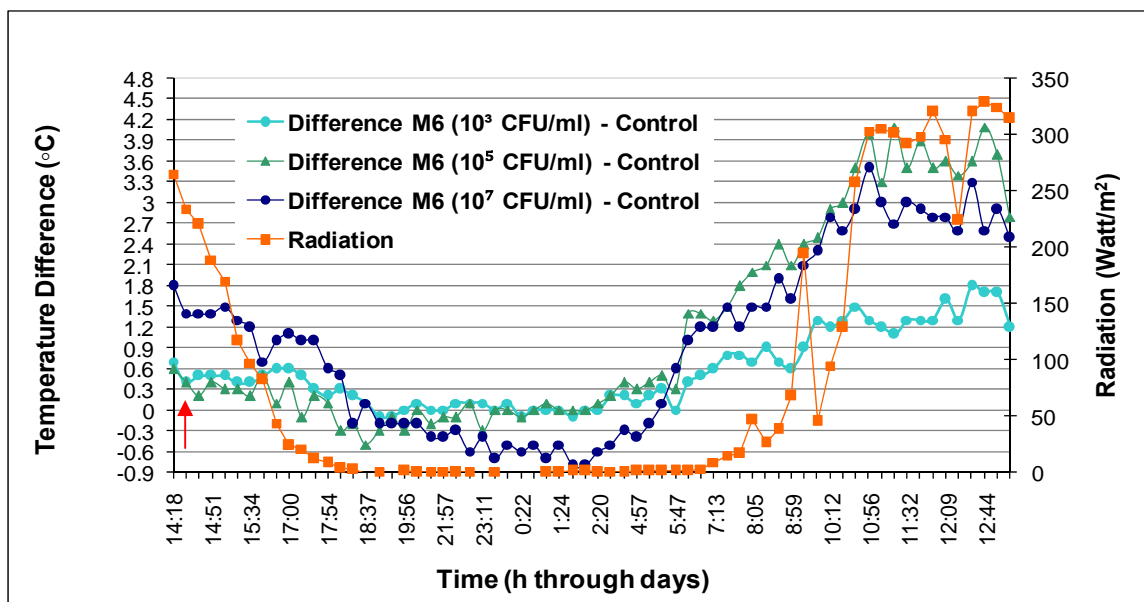


איור 19. השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולה נקודתית בריכוז 10^7 CFU/ml לעומת ביקורת (אפריל 2011). הצילום נערך במשך כ- 34 שעות. זמן הצילום מבוטא כשעות במשך היום (ציר ה-X , Time); הבדלי טמפרטורה במ"צ (ציר ה-Y משמאל); ערכי קרינה $Watt/m^2$ (ציר ה-Y מימין). הבדלים בטמפרטורת העלה בין אזור מודבק ולא מודבק (קו כחול); קרינה במשך היום (קו כתום); זמן הופעת סימפטומים (באדום), שעות קרינה רציפות (ירוק), זמן אילוח (כחצי שעה לפני תחילת המדידה, חץ ורוד).

באיורים 20 ו- 21, המציגים השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולה בשני ניסויים שונים, נצפתה מגמה דומה בהשתנות הטמפרטורה בשלושת הריכוזים. לפי התוצאות המוצגות בשני איורים אלו ההפרש המינימאלי הנצפה בין טיפולים לאחר אילוח בריכוז 10^3 CFU/ml לפני הופעת סימפטומים הוא 0.6 מ"צ והמקסימאלי הוא 1.3 . לאחר הופעת סימפטומים ההפרש המינימאלי בין הטיפולים הוא 0.4 מ"צ והמקסימאלי הוא 1.8 מ"צ. בעלה מלון מאולה בריכוז 10^5 CFU/ml, ההפרש המינימאלי הנצפה בין טיפולים לפני הופעת סימפטומים הוא 0.2 מ"צ והמקסימאלי הוא 0.8 , לאחר הופעת סימפטומים ההפרש המינימאלי בין הטיפולים הוא 0.2 מ"צ והמקסימאלי הוא 2.1 מ"צ. בעלה מלון מאולה בריכוז 10^7 CFU/ml ההפרש המינימאלי הנצפה בין טיפולים לפני הופעת סימפטומים הוא 0.6 מ"צ והמקסימאלי הוא 1.3 , לאחר הופעת סימפטומים ההפרש המינימאלי בין הטיפולים הוא 0.7 מ"צ והמקסימאלי הוא 4.8 מ"צ. הנתונים המוצגים באיור 21 מתחילים 28 שעות לאחר אילוח, לאחר הופעת סימפטומים. זאת מפני שכאמור, בניסוי זה אירעה תקלה עם המצלמה ביום הצילומים הראשון.



איור 20. השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולח נקודתית בשלושת הריכוזים השונים $10^7/10^5/10^3$ CFU/ml לעומת ביקורת (אפריל 2011). הצילום נערך במשך כ- 34 שעות. זמן הצילום מבוטא כשעות במשך היום (ציר ה- X , Time); הבדלי טמפרטורה במ"צ (ציר ה- Y משמאל); ערכי קרינה $Watt/m^2$ (ציר ה- Y מימין). השתנות טמפרטורה בעלה בריכוז 10^3 CFU/ml (קו תכלת); השתנות טמפרטורה בעלה בריכוז 10^5 CFU/ml (קו ירוק); השתנות טמפרטורה בעלה בריכוז 10^7 CFU/ml (קו כחול); קרינה במשך היום (קו כתום); זמן הופעת סימפטומים (באדום), זמן אילוח (כחצי שעה לפני תחילת המדידות, חץ ורוד) כל גרף המבטא ריכוז מייצג ממוצע של שתי חזרות פרט לריכוז 10^7 CFU/ml המבטא חזרה אחת.



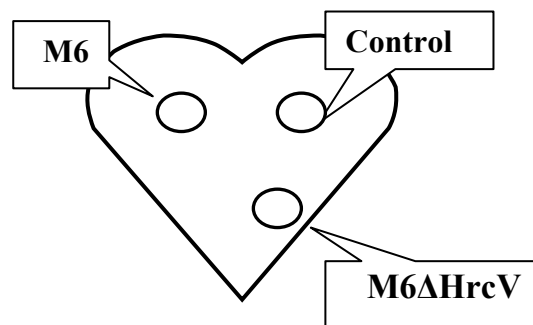
איור 21. השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולח נקודתית בשלושת הריכוזים השונים $10^7/10^5/10^3$ CFU/ml לעומת ביקורת (ספטמבר 2010). הצילום נערך במשך 22.5 שעות. זמן הצילום מבוטא כשעות במשך היום (ציר ה- X , Time); הבדלי טמפרטורה במ"צ (ציר ה- Y משמאל); ערכי קרינה $Watt/m^2$ (ציר ה- Y מימין).

Watt/m² (ציר ה-Y מימין). השתנות טמפרטורה בעלה בריכוז 10³ CFU/ml (קו תכלת); השתנות טמפרטורה בעלה בריכוז 10⁵ CFU/ml (קו ירוק); השתנות טמפרטורה בעלה בריכוז 10⁷ CFU/ml (קו כחול); קרינה במשך היום (קו כתום); הגרף מתאר נתוני טמפרטורה של כ- 28 שעות לאחר אילוח והלאה (בשל תקלה שאירעה עם המצלמה) לכן בתחילת הגרף מוצגים נתונים לאחר הופעת סימפטומים (חץ אדום).

2.3. השוואת טמפרטורות בעלה מלון המאולה נקודתית בשני תבדידי *A. citrulli* שונים: M6 ו-

M6ΔHrcV לעומת ביקורת באמצעות צילום תרמי רציף

עלי מלון אולחו נקודתית לפי המתואר בשיטות וחומרים (סעיף 5.2) ואיור 22. הם אולחו בשני תבדידי *A. citrulli* שונים, בריכוז 10⁶ CFU/ml בנקודות שונות על גבי העלה מול ביקורת וצולם באופן רציף, צילום תרמי כל 20 שניות וצילום RGB כל 10 דקות. ניסוי זה נערך בתחילת אוגוסט 2011.



איור 22. תרשים עלה מלון מאולה. תרשים עלה מלון מאולה נקודתית בשני תבדידי *A. citrulli* (M6 ו-M6ΔHrcV) וביקורת, כפי שנעשה בניסוי זה.

בבדיקה שנעשתה לבדיקת ריכוז חיידק בעלה לאחר אילוח ב-M6 בריכוז 10⁶ CFU/ml לפי שיטות וחומרים סעיף 5.2 (אילוח נקודתי), נמצא הבדל של כשלושה סדרי גודל פחות (ביחידות CFU לדיסקית עלה) מאשר ריכוז תרחיף האילוח בזמן 0 (כשעתיים לאחר אילוח), וארבעה סדרי גודל יותר מאשר זמן 0 לאחר יומיים. בבדיקת ריכוז חיידק בעלה לאחר אילוח ב-M6ΔHrcV בריכוז 10⁶ CFU/ml נמצא הבדל של כ- 2 סדרי גודל פחות מאשר ריכוז תרחיף האילוח בזמן 0, ו-1-2 סדרי גודל יותר מריכוז זמן 0 לאחר יומיים. תוצאות אלה נקבעו לפי 3 חזרות לכל טיפול בזמן נתון כאשר כל חזרה הייתה מורכבת מ-5 דיסקיות עלים (טבלה 3, בדיקה 1).

בדיקה נוספת נעשתה על מנת לקבוע את ריכוז החיידקים בעלה לאחר האילוח, הפעם נעשה לפי שיטות וחומרים סעיף 5.3 (אילוח באמצעות וואקום). האילוח נעשה בריכוז 10² CFU/ml. לגבי תבדיד M6 נמצא הבדל של כ- 4 סדרי גודל מתרחיף האילוח לאחר יומיים, בזמן 0 לא התפתחו מושבות חיידקים בצלחות (נקבע לפי 3 חזרות). תוצאות מוצגות בטבלה 3 (בדיקה 2). בניסוי זה לא התקבלו תוצאות לגבי

אילוח ב- M6ΔHrcV מפני שלא התפתחו מושבות חיידקים בצלחות (ככל הנראה, חיידקים אלה היו בריכוזים מתחת לסף הגילוי).

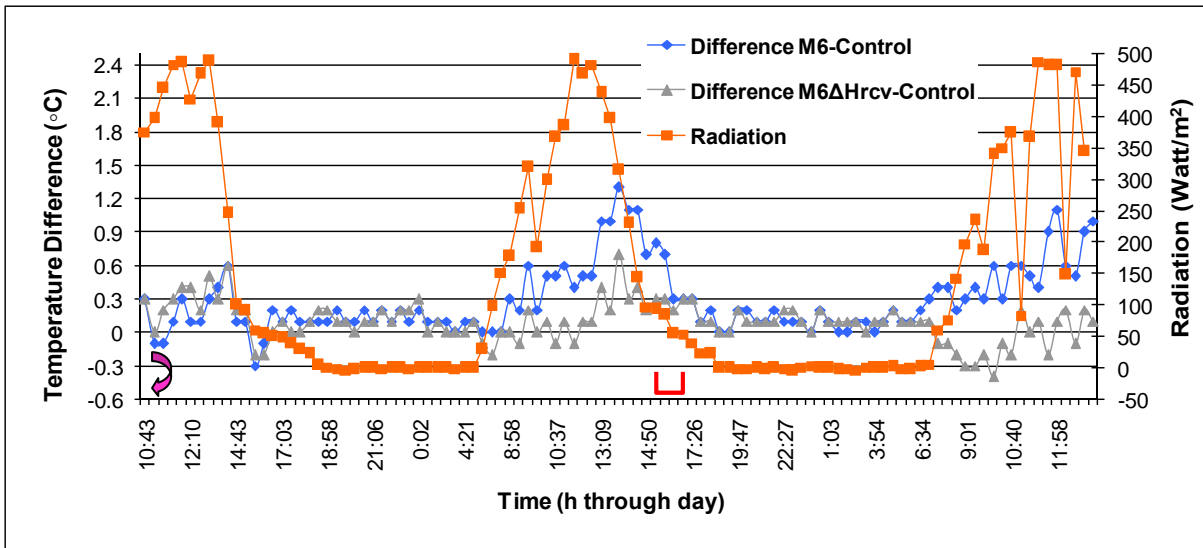
טבלה 3. ריכוז חיידקים בעלים לאחר אילוח נקודתי של עלי מלון

בדיקה 1			
זמן יומיים דיסקית/CFU*	זמן 0 דיסקית/CFU*	ריכוז תרחיף אילוח (CFU/ml)	תבדיד
10 ⁷	10 ³	10 ⁶	M6
10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	M6ΔHrcV
בדיקה 2			
10 ⁶	N.D.	10 ²	M6
N.D.	N.D.	10 ²	M6ΔHrcV

N.D. : לא התגלו מושבות חיידקים בצלחות של אף אחד מהמהולים (non-detected).

*שטח דיסקית, כ- 0.5 cm²

איור 23 מציג את הבדלי טמפרטורת העלה בין אזורים מאולחים בכל אחד מהתבדידים לבין אזורי הביקורת. ניתן לראות באזורים מודבקים ב- M6 עלייה בטמפרטורה בשעות קרינה רציפות של כ- 0.3-1 מ"צ לפני הופעת סימפטומים (מסומן באדום) ו- 0.4-1.1 מ"צ לאחר הופעת סימפטומים. לעומת זאת, לגבי המוטנט M6ΔHrcV ההבדלים היו קטנים בהרבה ועמדו על כ- 0.1-0.7 בשעות קרינה רציפות אך ירדו בהמשך הניסוי בניגוד לתבדיד M6. לניסוי נעשתה חזרה נוספת בו נצפתה מגמה דומה כאשר ההפרש המינימאלי הנצפה בין טיפולים M6 וביקורת לפני הופעת סימפטומים הוא 0.3 מ"צ והמקסימאלי הוא 0.6 מ"צ, ולאחר הופעת סימפטומים, ההפרש המינימאלי הנצפה הוא 0.5 מ"צ והמקסימאלי הוא 1.5 מ"צ. במוטנט נצפו הבדלים שליליים אשר נעו בין 0.4- ל- 0.1-.

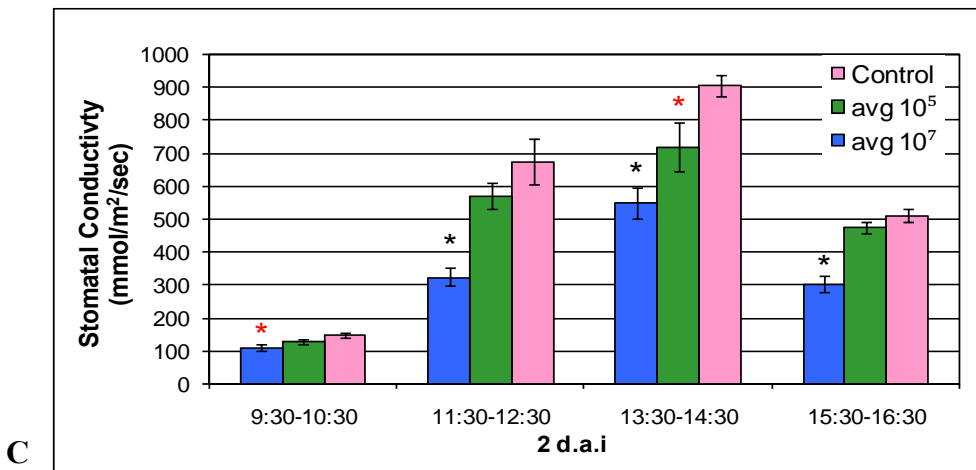
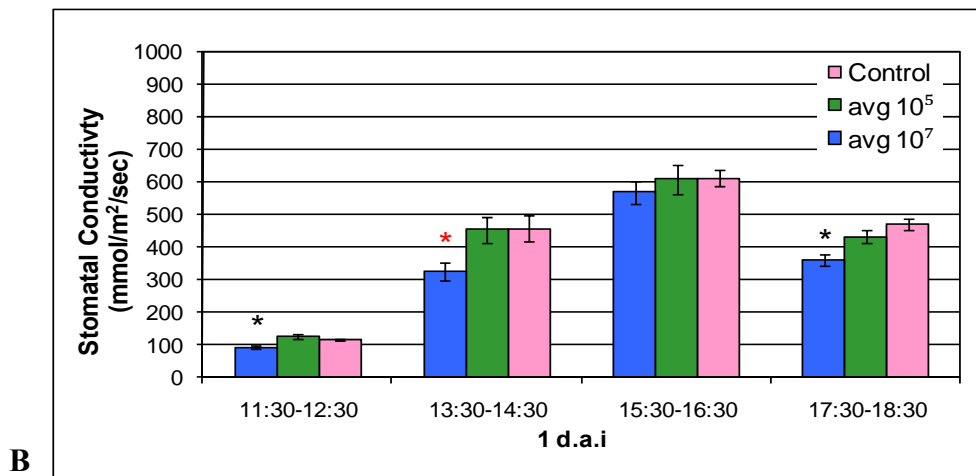
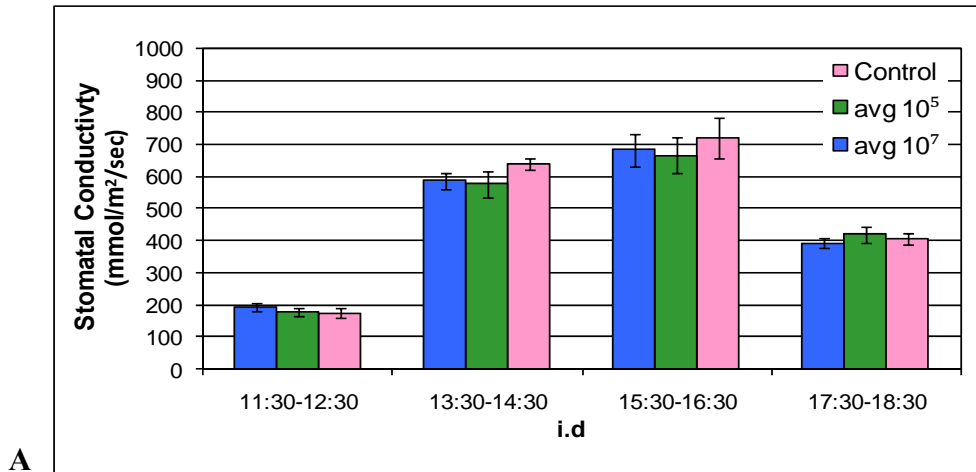


איור 2.3. השתנות טמפרטורת עלה מלון מאולה נקודתית בתבדידי *A. citrulli* לעומת ביקורת. הצילום נערך במשך 49 שעות. זמן הצילום מבוטא כשעות במשך היום (ציר ה-X, Time); הבדלי טמפרטורה במ"צ (ציר ה-Y משמאל); ערכי קרינה Watt/m^2 (ציר ה-Y מימין). הבדלים בטמפרטורת העלה בין אזורים מודבקים ב-M6 (קו כחול) או $\text{M6}\Delta\text{HrcV}$ (קו אפור) לעומת ביקורת; קרינה במשך היום (קו כתום). זמן הופעת סימפטומים מסומן באדום, זמן אילוח (כחצי שעה לפני תחילת מדידות, חץ ורוד).

2.4. בדיקת השפעת האילוח ב- *A. citrulli* על טרנספירציה הצמח דרך הפיוניות

2.4.1. בדיקת מוליכות פיוניות בעזרת פורומטר

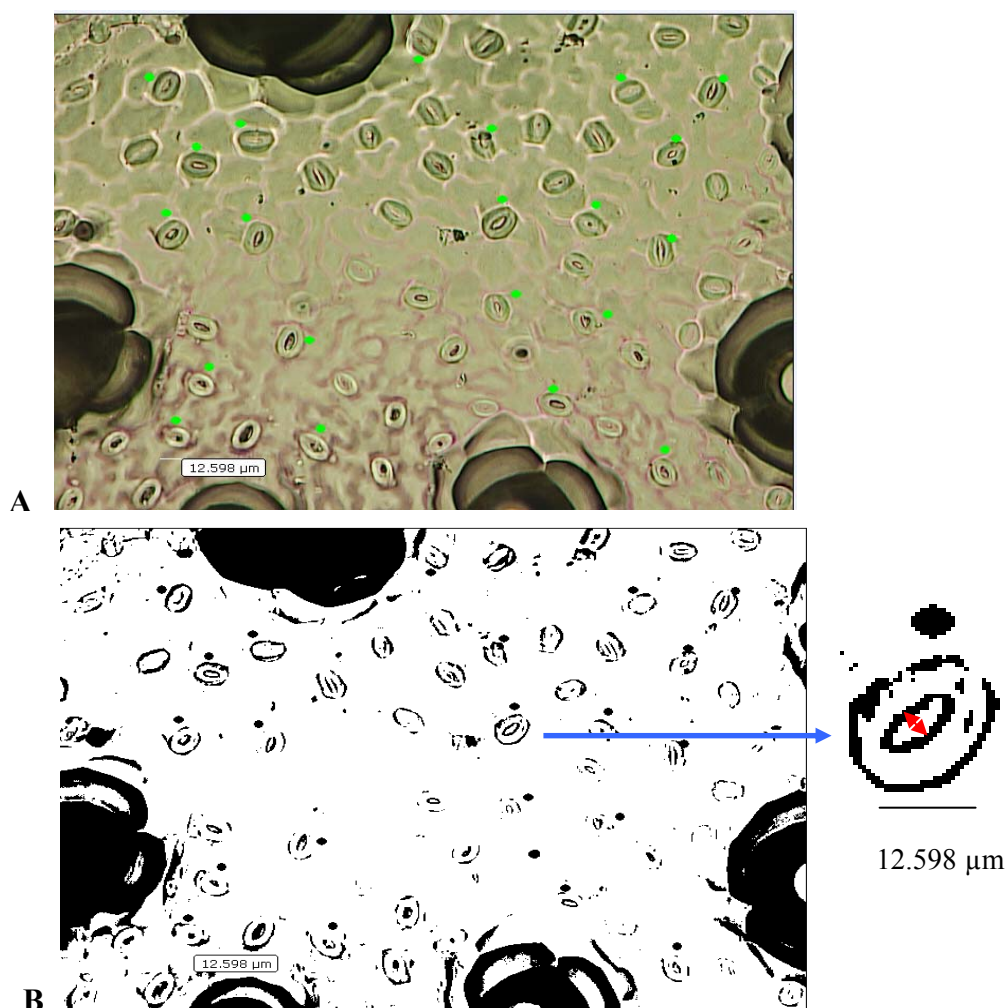
הפורומטר הינו כלי נוסף בו השתמשתי על מנת לבחון טרנספירציה בעלי מלון מאולחים ב- *A. citrulli*. דרך מדידת מוליכות פיוניות, במטרה להשוות לנתוני הטמפרטורה שהתקבלו מהמצלמה התרמית. המדידות נערכו בצמחי מלון מאולחים ב- *A. citrulli* כמתואר בשיטות וחומרים (סעיפים 5.2 ו-7) בחודש אפריל 2011. איור 24 מציג 3 ימי מדידות נפרדים, בארבע זמנים שונים במהלך היום של שני ריכוזי אילוח שונים של *A. citrulli* וביקורת. ניתן לראות מיום ראשון לאחר אילוח (איור 24, B) הבדלים מובהקים בין מוליכות פיוניות בצמחים מאולחים בריכוז 10^7CFU/ml לעומת ביקורת בשעות 11:30-12:30, 13:30-14:30 ו-17:30-18:30. יומיים לאחר האילוח (איור 24, C) התקבלו הבדלים מובהקים בכל ארבעת הזמנים לגבי הריכוז הגבוה, ובריכוז 10^5CFU/ml , התקבלו הבדלים מובהקים במדידות שנעשו בשעה 13:30-14:30. ניתן היה להבחין בהופעת סימפטומים ביום הראשון לאחר אילוח, החל משעה 13:00 והלאה. יש לציין כי בשעה 09:20, לפני המדידות בכל שלושת הימים, הושקו כל הצמחים. בנוסף, היום הראשון לאחר אילוח (איור 24, B) היה מעונן יותר ביחס ליום שלפניו ולאחריו (אין נתונים מטאורולוגיים מאותם ימים) וקרוב לוודאי שהייתה לכך השפעה על המוליכות.



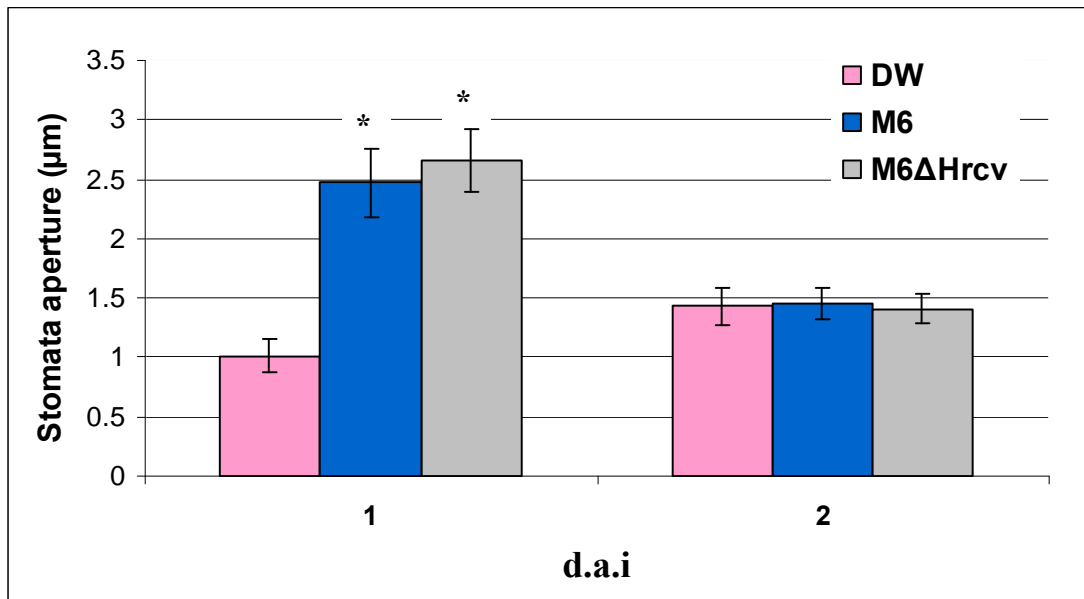
איור 24. מוליכות פיוניות בעלי מלון מאולחים ב- *A. citrulli* לעומת ביקורת כפי שנמדדה במכשיר פורומטר. ארבעה זמני מדידות (שעות) במהלך היום (ציר ה-X); מוליכות פיוניות ב- $\text{mmol/m}^2/\text{sec}$ (ציר ה-Y). אזור בעלה מאולח ב- 10^5 CFU/ml (ירוק); אזור בעלה מאולח ב- 10^7 CFU/ml (כחול); ביקורת (ורוד). כל עמודה מייצגת 6-8 חזרות ושגיאת תקן (SE). מדידות ביום האילוח, (A) i.d, יום 1 לאחר אילוח, (B) 1 d.a.i ויומיים לאחר אילוח (C) 2 d.a.I. כוכבית מסמלת הבדל מובהק בין עלה מאולח לביקורת על פי מבחן סטטיסטי ANOVA $P \leq 0.01$, כוכבית שחורה; $P \leq 0.05$, כוכבית (כתומה).

2.4.2. בדיקת מפתח פיוניות בעלה מלון

מפתח פיוניות נבדק בעלה מלון מאולח בתבדידי *A. citrulli* (M6 או M6ΔHrcV) בריכוז 10^2 CFU/ml. הצמחים אולחו בשיטת אילוח וואקום, כמתואר בשיטות וחומרים (סעיף 5.3). הניסוי נערך בחודש אוגוסט 2011. בדיקת מפתח פיוניות נעשתה בעזרת מיקרוסקופ, בהגדלה פי 20 על גבי מטבע פיוניות שנלקחו בשעות קרינה לפי המתואר בשיטות וחומרים סעיף 8. איור 25 מציג דוגמאות של תמונות שהתקבלו. אנליזת הנתונים הראתה הבדל מובהק ($P \leq 0.01$) בין עלים מאולחים בין שני התבדידים לבין לביקורת ביום ראשון לאחר אילוח. לעומת זאת, יומיים לאחר האילוח לא התקבלו הבדלים מובהקים בין הטיפולים (איור 26).



איור 25. מטבע פיוניות בעלה מאולח ב-*A. citrulli*. מטבע פיוניות בעלה מלון מאולח בריכוז 10^2 CFU/ml, ביום בשני שלאחר האילוח (מיקרוסקופ אור הגדלה פי 20) (A). נקודות ירוקות שימשו לסימון, אין להתייחס אליהן. תמונת אותו מטבע בתוכנת ImageJ המשמשת לאנליזה (שיטות וחומרים סעיף 10.3) עם הגדלה של הפיונית (חץ כחול), מפתח פיונית (חץ אדום) (B).



איור 26. מפתח פיוניות בצמחי מלון מאולחים ב- *A. citrulli*. מספר ימים לאחר אילוח (ציר ה-X); מפתח פיוניות שחושב לאזור בעלה מסך הפיוניות באותו אזור (ציר ה-Y). מפתח פיוניות של עלי צמחי מלון המאולחים ב- M6 (עמודה כחולה); מפתח פיוניות של עלי מלון מאולחים ב- M6ΔHrcV (עמודה אפורה); ביקורת (עמודה ורודה). כל עמודה מבטאת ממוצע של 2-3 אזורי מטבע מ- 3 צמחים (סה"כ 6-8 אזורי דיגום) ושגיאת תקן (SE). כוכבית מסמלת הבדל מובהק בין עלה מאולח לביקורת על פי מבחן סטטיסטי ANOVA ($P \leq 0.001$).

דיון

המחקר הנוכחי עסק בשתי מחלות בקטריאליות בעלות חשיבות רבה, בעולם בכלל ובישראל בפרט. אחת המחלות היא מחלת הכיב והנבילה הבקטריאלית בעגבניות הנגרמת על ידי החיידק *Clavibacter (Cmm) michiganensis* subsp. *michiganensis* (Meletzus et al., 1993). המחלה גורמת להתנוונות, נבילה ואף עלולה לגרום לתמותת הצמח בכל אחד משלבי הגידול (Kleitman et al., 2008). חשיבותה של מחלת הכיב והנבילה הבקטריאלית בעגבניות עלתה בישראל בשנים האחרונות ולמעשה מחלה זו נחשבת כאיום לענף העגבניות במדינה. כתוצאה מכך, לפני כשלוש שנים הוקם מיזם חוס"ן קלויבקטר שמטרתו לפתח ממשק שיאפשר למגדלים להתמודד עם המחלה. חלק מעבודה זו נעשתה במסגרת אותו מיזם והשערת המחקר היא שפגיעת החיידק בצינורות ההובלה המתבטאת בנבילה (Gartemann et al., 2003) תוביל לשינוי טמפרטורת הצמח, נוכחות הפתוגן תפגע בטרנספירציה של הצמח ותגרום לעלייה בטמפרטורה, כפי שתואר במחקרים קודמים (Oerke et al., 2006; Oerke et al., 2011).

המטרה הייתה לבחון האם ניתן לגלות נגיעות בשלבים מוקדמים במשתלה לפני שהשתילים מועברים לחממה ואיתם גם החיידק. לשם כך נעזרנו במצלמה תרמית והוקמו מספר מערכות ניסוייות לבדיקת השערה זו. תחילה נעשה אילוח דרך השורשים על מנת לקבל תמונה ראשונית של התבטאות הסימפטומים בצמח, דרך הופעתם ומועד הופעתם לאחר האילוח. נעשו ניסיונות רבים לעקוב אחר טמפרטורה בעזרת צילומים תרמיים בצמחים מאולחים בשיטות שונות כמו אילוח שורשים, אילוח זרעים ואילוח עלווה לעומת ביקורת, אך הם לווו בבעיות, חלקן בנוגע לעבודה עם החיידק ורובן בנוגע לעבודה עם המצלמה. שיעור הופעת הסימפטומים באילוח עלווה היה נמוך וכך גם בחלק מניסויי אילוח זרעים לכן הוחלט להעמיד ניסוי המשך להשוואת טמפרטורה בין מוקדים ע"י אילוח שורשים (תוצאות סעיף 1.3). היה שיקול נוסף של נוחות עבודה. תוך כדי הניסויים עמדנו על זמן הופעת הסימפטומים של החיידק וראינו כי זמן ההמתנה ארוך ועומד על מינימום של 12 יום מזמן אילוח (תוצאות סעיף 1.2.1) ויכול אף להגיע עד למעלה מחודש. זה הוביל לתכנון ניסויים המאפשרים ניצול זמן אופטימאלי. תוכנן ניסוי אילוח זרעים (תוצאות סעיף 1.2.2), כאשר האילוח נעשה על ארבעה קבוצות זרעים בהפרשים של שבוע. זה אמור היה לקצר את זמן ההמתנה לסימפטומים, לרכז את השימוש במצלמה לזמן קצר ודחוס תוך קבלה של ארבע חזרות כלליות לניסוי וחזרות פנימיות של קבוצות גיל זהות להן ניתן לערוך השוואה בשל תנאים זהים. הבעיה העיקרית בניסוי הייתה שלא הופיעו סימפטומים ולא נראתה נגיעות. בכל הקשור למצלמה, שדה הראייה של העדשה היה קטן מכדי לתפוס את כל הצמח (ובמיוחד של זן 1402, שהתפרס לצדדים שלא כמו זן 1125 או 1335) מהמרחק הקטן ממנו צולם (הצילומים מוגבלים לשטח החממה), צילומים נלקחו לעיצים נפרדים, תמונה אחת לעציץ מאולח ותמונה נפרדת לעציץ ביקורת, מה שהיווה בעיה לאנליזה בהמשך.

מכל שאר הניסויים המקדימים התקבלה תמונה לפיה קיימים הבדלים ברורים בטמפרטורה לאחר שהצמחים מתחילים להראות סימפטומי מחלה. זהו נתון מעודד כי הדבר מוכיח שיש קשר בין המחלה

לטמפרטורת העלווה אך מההיבט היישומי של הצילום התרמי ישנה עדיפות למצב בו ההבדלים בטמפרטורת העלים בין צמחים נגועים וצמחי ביקורת ברורים לפני הופעת סימפטומים. יחד עם זאת, הניסויים שבוצעו עד כה לימדו אותנו שאנו חייבים לשנות את הגישה לגבי יחידת הניסוי. עד כה הגישה הייתה שעלינו להתחיל בלימוד על השפעת *Cmm* על טמפרטורת העלווה ברמת הצמח הבודד ורק בהמשך לעבור לאוכלוסיות של צמחים. גישה זו נראתה לנו הגיונית והיא גם הגישה המקובלת להרבה שאלות מחקר. לאור הניסיונות הבנו שיש מספר בעיות עם גישה זו. נמצאו תנודות בטמפרטורה שככל הנראה נגרמות בעיקר ע"י שינויים במצב הקרינה החיצונית. תנודות אלו בלטו במיוחד במהלך הניסויים שנערכו בחורף, בימים מעוננים. מגבלה נוספת היא כמות הצילומים (חזרות) שניתן לבצע שכן כל צמח מצולם בנפרד. לכן הוחלט לעבוד ברמה של מגשי שתילים כאשר יחידת הצילום היא מגש המכיל 98 שתילים מחולקים למוקדים אשר חלקם מאולחים וחלקם ביקורת (תוצאות סעיף 1.3 איור 12). סידור זה איפשר לקחת תמונה אחת בלבד למטרות אנליזה אשר תקטין שגיאות הנובעות משינויים סביבתיים העלולים להשפיע על טמפרטורת הצמח, בדומה לעבודות אחרות שנעשו בתחום החישה מרחוק בהם נלקח צילום בודד של פני שטח הכוללים מספר טיפולים בעזרת צילום אווירי ממטוס או צילום לוויין (Jones et al., 2002; Lenthe et al., 2007; Moller et al., 2007). למרות שהצילומים נעשו בתוך חממה סגורה בתנאים מבוקרים הייתה השפעה בלתי נמנעת של תנאי סביבה חיצוניים וניתוח נתונים של שני טיפולים שנלקחו מאותה תמונה מבטל שגיאות שנובעות משינויים סביבתיים בין רגע לרגע.

לצורך ניסוי זה הוקמה מערכת על תקרת החממה שאפשרה צילום מלמעלה של כל המגש (במקום צילום צדדי שנלקח עד כה). מערכת זו הייתה אידיאלית לצרכי הניסוי, והתאימה למטרת המיזם לאבחון נגיעות בשלבי משתלה, שכן הסידור במגשים נהוג במשתלות לפני העברתם לחממות (כדוגמת חברת חישתיל). בניסוי זה אכן נראתה טמפרטורה גבוהה יותר במוקדי האילוח לעומת הביקורת. ליתר דיוק, כנהוג בחישה מרחוק, כאשר מתקבל מידע מרחבי יש להתייחס לנתונים אשר אין ביניהם אוטוקורלציה מרחבית וכך למזער השפעות סביבתיות על טמפרטורת הצמח שסיבתן אינה תלויה בגורמי הניסוי. לשם כך השתמשתי בתוכנת המיפוי ArcGIS. לאחר עיבוד נתונים התקבלו הבדלים של כ-0.5 -0.7 מ"צ אשר נראו עוד לפני הופעת סימפטומים ולאחר הופעת סימפטומים נראו הבדלים של עד כ-1.75 מ"צ (תוצאות סעיף 1.3). נתונים אלו מאששים את ההשערה כי נגיעות בחיידק תתבטא בשינויים תרמיים בצמח ואף ראינו כי נגיעות זו גורמת לעלייה בטמפרטורה, הנצפית במצלמה כ-8 ימים לאחר אילוח, שבוע לפני הופעת סימפטומים (תוצאות סעיף 1.3).

התוצאות שהתקבלו מעודדות ומראות כי שיטה זו בעלת פוטנציאל לשימוש ככלי יישומי במשתלות לאבחון מוקדם של נגיעות בחיידק הפיטופתוגני *Cmm* בעגבנייה, כמובן לאחר מחקר נוסף בנושא הכולל חזרות והקמת מערכת ניסיונית שעתידיה יהיה לשמש במשתלות. יש לזכור כי כרגע לא ניתן להצביע על הבדלים בטמפרטורה הנובעים ספציפית מנוכחות הפתוגן, אלא יכולים לנבוע מכל שינוי המשפיע על טרנספירציית הצמח ויכולה לנבוע מעקות שונות כמו מים, נוטריאנטים וירוסים ואחרים (Chaerle et al., 1999; Cohen et al., 2005). עם זאת, יש ביכולתה של שיטה זו למקד את הבעיה לאזור ספציפי ובכך לאפשר לבדוק ולטפל בה באופן נקודתי. בנוסף לכך קיימות עבודות המלמדות על מחקר שנעשה

לקביעת אינדקסים ספקטראליים ספציפיים לעקות מסוגים שונים. לדוגמא, חושבו אינדקסים ספקטראליים לפי ספקטרומים שונים בחיטה המעידים על רמות חנקן שונות ונעשה ניסיון למצוא הפרדה בספקטרומים של חיטה ברמות השקיה שונות (גולדברג, 2002). אמנם כאן מדובר בהחזרים ספקטראליים ולא בפליטה של חום אך קיימת אפשרות להצליב נתונים המתקבלים משתי השיטות, ככל שיעמיק המחקר בנושא ויצטברו מאגרי מידע, יגדלו הסיכויים להתאים אינדקסים ספציפיים לבעיה ובכך יקדמו אפשרות של מתן פתרון ספציפי לבעיה. יתרון ברור לשיטה, הוא ביכולת לאבחן מספר רב של צמחים במדידה אחת על ידי צילום או סריקת פני שטח שאינה הרסנית.

המחלה השנייה בה עסקתי במסגרת מחקרי היא מחלת הכתם הגדול בדלועיים (Bacterial Fruit Blotch, BFB) הנגרמת ע"י החיידק *Acidovorax citrulli* (Bahar and Burdman, 2010) דיווחים ראשונים על המחלה באבטיח התקבלו מג'ורג'יה בארה"ב בשנות השישים (Sowell and Schaad, 1979). בשנות השמונים המאוחרות גרמה המחלה הפסדים רבים בעיקר בשדות אבטיחים באי מאריאנה ובמדינות שונות בארה"ב. מאז המחלה פגעה בשטחי אבטיח נרחבים בארה"ב כמו צפון ודרום קרוליינה, דנבר, אינדיאנה וטקסס. תוך מספר שנים, המחלה התפשטה למקומות רבים בעולם, כולל ישראל וכיום מאיימת על גידולי האבטיח והמלון (Bahar and Burdman, 2010). בעבודתי ניסיתי לזהות שינויים משמעותיים ויציבים בטמפרטורה של צמחי מלון (Latin and Hopkins, 1995). (Bahar et al. 2009) מצאו כי החיידק נוכח בצינורות ההובלה של הצמח, לפחות בשלב של הנבט/שתיל ואחד הסימפטומים המוקדמים שלו היא הופעת כתמים מימיים בפסיגים ובעלים בצידם התחתון. על סמך נתונים אלו ניתן היה לשער כי המחלה תתבטא בשינוי טמפרטורה בעלווה. היתרון בעבודה עם חיידק זה התבטא בהופעה מהירה של סימפטומים, בניגוד לעבודה עם חיידק ה- *Cmm*. לאחר אילוח זרעים, ניתן היה להבחין בהופעת סימפטומים כ- 4 עד 5 ימים לאחר האילוח והזריעה בכל ריכוזי האילוח ובמיוחד בגבוהים (10^5 CFU/ml). תחילה נעשה ניסיון לשחזר את המערכת המתוארת עבור *Cmm* בפרק תוצאות (סעיף 1.3) ע"י אילוח זרעים לקבלת נוף צפוף המאפשר צילום בו זמנית של מגש שלם עם חלוקה למוקדים. בשל אופן וגיל הופעת הסימפטומים בצמח לא התאפשר להעמיד מערכת זו באופן זהה ולא ניתן היה לקבל תוצאות חד-משמעיות, לכן הוחלט להתמקד באילוח מסוג שונה המאפשר מעקב אחר אזור נקודתי. נעשה אילוח נקודתי בריכוזים שונים בארבעה אזורים בעלה מלון בודד וצולם ממושכות במצלמה תרמית כמתואר בפרק תוצאות (סעיף 2.2 איור 16). ניתן היה לראות הבדלי טמפרטורה בין נקודות האילוח לנקודת הביקורת, כאשר ההבדלים המשמעותיים נצפו בשעות בהן נמדדה קרינה מקסימאלית (בין 10:30 ל- 14:00) (Alchanatis et al., 2010). מצב זה מעודד פתיחת פיוניות וגורם לעלייה בטמפרטורת העלה ועקב כך גורם לטרנספירציה מוגברת כך שבמידת הטמפרטורה ניתן להבחין בהבדלים משמעותיים בין טיפול חיידק לביקורת. אנו משערים כי בשל נוכחות החיידק בצינורות ההובלה כפי שתואר ע"י (Bahar et al. 2009), הצמח נכנס למצב עקה, סגר פיוניות על מנת למנוע איבוד מים, הטרנספירציה ירדה ובשל כך הטמפרטורה עלתה.

באיור 21 ניתן לראות שלקראת סוף הניסוי, יש עלייה בהפרשי הטמפרטורה של ריכוז 10^5 CFU/ml לעומת 10^7 CFU/ml. בגרף זה מוצגים נתונים של כיומיים לאחר האילוח, בניגוד לשאר האיורים (-17) 20) בהם מוצגים נתונים של כיום וחצי לאחר אילוח (בגלל התקלה ביום הצילומים הראשון, חסרים נתונים של כ-27 שעות לאחר אילוח). לפי תמונות RGB שצולמו בסוף הניסוי, ניתן לראות כי רקמת האזור המאולח בריכוז הגבוה (10^7 CFU/ml) הגיע למצב נקרוטי קשה וכנראה סופי. מצב זה כנראה גרם לשיבוש והפסקת תהליכים יוצרי אנרגיה וחום (מטבוליזם) ולכן נוטה להיות מושפעת מטמפרטורת הסביבה. לעומת זאת, רקמת האזור המאולח ב- 10^5 CFU/ml עדיין מתפקדת ומגיבה לנוכחות הפתוגן ע"י סגירת פיוניות למניעת איבוד מים ולכן ההתחממות. יש לשים לב שבתחילת הגרף, לפני מות הרקמה המאולחת ב- 10^7 CFU/ml, ניתן לראות הפרשי טמפרטורה גבוהים יותר לעומת האזור המאולח ב- 10^5 CFU/ml, מה שאכן תואם להשערה הזאת.

בניסויים אלה, מצאנו שבזמנים עם קרינה נמוכה אין כמעט הבדלים בין טיפול בחיידק לעומת ביקורת. ידוע שקרינה היא אחד הגורמים העיקריים המשפיעים על טרנספירציה ובהעדרה רמת הטרנספירציה יורדת כך שאין כמעט הבדלים בין הצמחים. לעיתים התקבל מצב של הבדלים שליליים, זהו מצב שבעצם טמפרטורת הצמח המאולח נמוכה מזו של הביקורת. מצב זה התקבל בזמנים ללא קרינה או בזמנים בהם נמדדה קרינה נמוכה מאוד. ניתן לשער כי בזמנים אלו, הצמח לא הפעיל מנגנוני קירור לויסות טמפרטורה (כמו טרנספירציה) ולכן הושפע מטמפרטורת הסביבה ומטבוליזם הגורם לשחרור אנרגיה, בעוד הצמח המאולח ניזוק במערכות אלו באופן הדרגתי ע"י הפתוגן ולכן בהיעדר קרינה ופעילות מטבוליתית תקינה, טמפרטורת הצמח המאולח יורדת בהשוואה לבריא אם כי לא באופן סדיר. בנוסף, לא ניתן היה להבחין במגמה ברורה של הפרשים שליליים בין הצמח המאולח לביקורת. לכן יש צורך במחקר נוסף והבנה מעמיקה יותר של פיזיולוגית הצמח במצבי עקה כדוגמת מחלה על מנת לבחון הפרשים שליליים בטמפרטורה.

מערכת ניסוי נוספת דומה של אילוח נקודתי בעלה מלון הועמדה אך הפעם נעשתה השוואה בין המוטנט M6ΔHrcV, תבדיד M6 וביקורת כפי שמתואר בתוצאות סעיף 2.3. גם כאן היה ניתן להבחין בהבדלי טמפרטורה בין נקודות האילוח בתבדיד M6 לנקודות הביקורת בשעות בהן נמדדה קרינה מקסימאלית, אך לא כך במקרה של המוטנט בו ההבדלים היו קטנים (פרט לחריגות) ולקראת סוף הניסוי נעלמו אף הם. המוטנט אינו פתוגני ופגוע ביכולתו להפריש גורמי וירולנטיות (Bahar and Burdman, 2010) וכנראה זו הסיבה לכך.

שימוש בפורומטר נעשה על מנת לבדוק את התוצאות שהתקבלו באמצעות הצילומים התרמיים ולבחון האם ההבדלים בטמפרטורת העלה נמצאים בקורלציה עם הבדלים במוליכות פיוניות וטרנספירציה. ניסוי זה חזק את הטענה כי אילוח ב- *A. citrulli* גורם לעליית טמפרטורת העלה על ידי ירידה בטרנספירציה. ניתן היה להבחין בירידה במוליכות פיוניות בצמח מאולח לעומת צמח בריא, במיוחד באילוח בריכוז גבוה (10^7 CFU/ml) וביום שני לאחר אילוח (איור 24), לאחר מופע סימפטומים. עם זאת במהלך הניסוי נעשה מעקב אחר מזג האוויר (ללא נתונים מטאורולוגיים) וביום ראשון לאחר אילוח נצפה מזג אויר

מעונן במהלך המדידות. יש לשער כי מצב זה ישפיע על המוליכות במיוחד לאור הקשר בין טמפרטורה וקרינה אשר נצפה בפרק תוצאות (סעיף 2.2 ו-2.3).

פרט לכך לשימוש בפורומטר היו מספר מגבלות. מגבלה ראשונה היא שהמכשיר לא כוייל (כפי שהוזכר קודם לכן, ניסיונות לכיול נעשו אך נכשלו והוחלט לוותר עליהן בגלל ריבוי הבדיקות ליום ולנקודת זמן). מגבלה שנייה היא גודל אזור המדידה במכשיר לעומת האזור המאולח, שעלול לגרום לאי דיוק במדידה. מגבלה נוספת היא האופי המעט הרסני שלו, אשר עלול לפגוע ברקמה בעת המדידה במיוחד לאור מסיביות המכשיר לעומת עובי וחוזק עלה המלון. כל אלו גורמים העלולים להשליך על התוצאות ואין להתעלם מכך. עם זאת, לפי המדידות שנראו במשך היום נצפית מגמה המאפיינת טרנספירציה במשך היום ובתוצאות ניתן היה לראות הבדלים וחלקם אפילו מובהקים בין טרנספירציה באזור מאולח לעומת אזור שאיננו מאולח. לכן הוחלט להתייחס לתוצאות אלו בעבודה זו, אם כי יש צורך בבדיקות נוספות ורצוי להשתמש במכשיר פורומטר מדויק יותר או בשיטת אילוח המיועדת לכל הצמח שתאפשר מדידה מדויקת יותר. אילוח בואקום אמנם מאפשר אילוח צמח שלם וכך גם אילוח זרעים או שורשים, אך בריכוזים הגבוהים בהם עבדתי לא ניתן לאלח בשיטות אלו בלי לגרום לקריסה כמעט מיידית של הצמח.

בשיטה נוספת בה השתמשתי לבדיקת הטרנספירציה על ידי מדידת מפתח פיונית (תוצאות סעיף 2.4.2) כבר הושם שימוש באילוח על כלל הצמח, אילוח בואקום, אם כי בריכוז נמוך מאוד 10^2 CFU/ml, אך בניסוי זה לא נצפתה מגמה דומה. ביום הראשון לאחר אילוח אף נצפו תוצאות הפוכות מהמצופה, בהן צמחים מאולחים בשני תבדידי *A. citrulli* (M6 ו-M6ΔHrcV) הראו מפתח פיוניות גדול יותר באופן מובהק מצמחי ביקורת, וביום השני לאחר אילוח לא נראה הבדל כלל בין הצמחים (תוצאות, איור 24). חשוב לציין שבסוף הניסוי, ואף כשבוע אחרי האילוח, לא נראו סימפטומים בצמחים המאולחים. תוצאות אלו מנוגדות לתוצאות שראינו קודם לכן במצלמה התרמית או בפורומטר. הסבר אפשרי לכך הוא היכולת של הפתוגן לגרום לפתיחת פיוניות לצורך קליטת חמצן ונשימה מוגברת בצמח או אפילו כאמצעי חדירה לצמח (Millerd, 1962; Melotto et al., 2008). יתכן כי ריכוז האילוח הנמוך איפשר לצמח להרוויח זמן להתמודדות עם נוכחות החיידק. יש לשים לב שמפתח הפיוניות בצמח כתגובה לשני תבדידי *A. citrulli* היה דומה. הצמח הגיב לתבדיד M6 כמו שהגיב למוטנט M6ΔHrcV למרות שהמוטנט אינו פתוגני ואינו גורם להופעת סימפטומים. זה יכול לרמז על היכולת של הצמח להתמודד עם נוכחות הפתוגן לפחות באופן זמני ובנוכחות ריכוזים נמוכים. אכן גם לאחר זמן ממושך לא נראו סימפטומים בצמחים. צריך לשים לב שקיים הבדל בין ריכוז האילוח לריכוז שנמדד בפועל ברקמת העלים (תוצאות סעיף 2.2 ו-2.3 טבלה 3) והוא אינו אחיד בין המוטנט M6ΔHrcV ל-M6 למרות שריכוזי האילוח זהים (תוצאות טבלה 3) מה שאכן צפוי, לאור העובדה שהמוטנט אינו פתוגני ולכן לא מסוגל להגיע לריכוזים גבוהים כמו זן הבר (M6). פרט נוסף חשוב, אין להתייחס למדידות טמפרטורה בתחילת הניסוי שכן הן מושפעות מרטיבות תרחיף האילוח ולא מנוכחות החיידק לכן יש לחכות להתייבשות האזור (כחצי שעה).

ישנם מחקרים נוספים התומכים בחישה התרמית ככלי יעיל לאבחון נגיעות פתוגנים כמו פטריות, אאומיציתים ווירוסים בצמחים (Chaerle et al., 1999; Oerke et al., 2006; Oerke et al., 2011).

רובם עוסקים ברמת הצמח הבודד. כדי לקדם מערכת זו ככלי יעיל לאבחון נגיעות בשדה או משתלה יש לערוך ניסויים בהיקפים גדולים יותר המדמים מצבים אלו. ניתן להשתמש באמצעים נוספים על מנת להבין תהליכים פנימיים המתרחשים בצמח. לחישה התרמית יש פוטנציאל לשמש כמערכת אזהרה מפני נגעים ולפעמים אף מפני חומרת המחלה (Oerke et al., 2011). יש ביכולתה לאפשר טיפול מקומי וממוקד ובכך לצמצם את השימוש בחומרי הדברה. במקרים אחרים שסיבתם אינה תלויה בפתוגן כמו נוטריאנטים או מים, יש ביכולתה לחסוך בדישון ולאפשר דישון לפי הצורך או השקיה לפי הצורך, לפעול לפי ממשק חכם שאינו בזבזי ובסופו של דבר יביא לחיסכון בכוח אדם, משאבים, כסף והרבה יותר ידידותי לסביבה.

סיכום

תחום החישה התרמית בחקלאות הינו תחום מבטיח לשיפור וייעול הממשק החקלאי בארץ ובעולם. במחקר זה התקבלו תוצאות מעניינות המצביעות על הבדלי טמפרטורה בין צמחי עגבנייה נגועים ב- *Cmm* לביקורת בתנאים המדמים תנאי משתלה. גם בצמחי מלון נראתה מגמה של הבדלי טמפרטורה בין אזור נגוע ב- *A. citrull* (M6) לאזור ביקורת אך הניסויים נעשו ברמת הצמח הבודד ולא ברמת השדה/משתלה. כדי להפכו לכלי יישומי יש צורך בהקצאת משאבים למחקר נוסף בתחום ובהרחבת הידע בנושא. עם הזמן נוספים מחקרים שונים המלמדים על שימוש במערכת זו לבחינת נזקים אביוטיים כמו חריגות בדישון או עקות מים (Leinonen and Jones, 2004; Cohen et al., 2005; Berni et al., 2009b). חסר יותר מידע בתחום הנזקים הביוטיים ובמיוחד בתחום הפתוגנים החיידקיים. תרומתה של טכנולוגיה זו בתחום החקלאות הינה רבה, החל מהגדלת היבול, דרך הפחתה בהוצאות מיותרות במהלך עונת הגידול, חיסכון בכוח אדם וכלה בשמירה על איכות הסביבה ע"י שימוש מדויק וספציפי בחומרי הדברה ודישון. למחקר עתידי ניתן לבחון שינויי טמפרטורת צמחי מלון מאולחים בואקום בריכוזים נמוכים תוך ניצול ההתפתחות האיטית של הסימפטומים למעקב אחר טמפרטורה ע"י צילומים תרמיים ומפתח פיוניות בהפרשי זמן גדולים. לעשות אבחנה בין פתוגנים הגורמים לירידה בטמפרטורה לעומת כאלו הגורמים לעלייה. יש לבחון זאת באופן פרטני לצמח ולפתוגן ולהתחשב בגורמים העלולים להשפיע על הטמפרטורה והטרנספירציה כמו, עובי קוטיקולה, שעריות וכו'. כמו כן ניתן להשתמש באמצעים נוספים להבנת תהליכים פנימיים המתרחשים בצמח בזמן נגיעות. מידע זה יוכל לסייע באבחון וכן בהתמודדות.

רשימת ספרות

- גולדברג, א., קרניאלי, א., אורלובסקי, ל., רז, מ. (2002). ניטור בצורת ונזקי עקת מים בגידולי בעל, בצפון הנגב, באמצעות חישה מרחוק (אוניברסיטת בן גוריון בנגב, המכון לחקר המדבר, המעבדה לחישה מרחוק. דו"ח מסכם. 1-16.
- סלע, א. (2007). אומדן ומיפוי של מצב מים בצמחי כותנה באמצעות צילומים תרמיים. עבודת גמר. האוניברסיטה העברית בירושלים. 1-57.
- פריגוז'ין, ע., כהן, י., אלהנתי, ו., לוי, א., סרוקר, ו., כהן, י. (2010). הערכת מצב המים בעצי תמר באמצעות צילומים תרמיים. עלון הנוטע 64, 5.
- שטיינברג, ד., מנוליס, ש., קריצמן, ג., רביב, מ., כהן, י., פרנקל, ע., רקח, י. (2010). מיזם חוס"ן קלויבקטר. דו"ח מסכם לשנת 2010. 1-101.

- Agrios, G.N.** (2005). *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press (California, USA).
- Alchanatis, V., Cohen, Y., Cohen, S., Moller, M., Sprinstin, M., Meron, M., Tsipris, J., Saranga, Y., and Sela, E.** (2010). Evaluation of different approaches for estimating and mapping crop water status in cotton with thermal imaging. *Precision Agriculture* 11, 27-41.
- Bahar, O.** (2010). Basic and applied aspects of bacterial fruit blotch of cucurbits caused by *Acidovorax citrulli*. ph.D. thesis The Hebrew University of Jerusalem, 1-107.
- Bahar, O., and Burdman, S.** (2010). Bacterial fruit blotch: A threat to the cucurbit industry. *Israel Journal of Plant Sciences* 58, 19-31.
- Bahar, O., Goffer, T., and Burdman, S.** (2009). Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 909-920.
- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R.R., and Burdman, S.** (2008). New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. *Plant Pathology* 57, 754-763.
- Berni, J.A.J., Zarco-Tejada, P.J., Suarez, L., and Fereres, E.** (2009a). Thermal and narrowband multispectral remote sensing for vegetation monitoring from an unmanned aerial vehicle. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 47, 722-738.

- Berni, J.A.J., Zarco-Tejada, P.J., Sepulcre-Canto, G., Fereres, E., and Villalobos, F.** (2009b). Mapping canopy conductance and CWSI in olive orchards using high resolution thermal remote sensing imagery. *Remote Sensing of Environment* 113, 2380-2388.
- Boccarda, M., Boue, C., Garmier, M., De Paepe, R., and Boccarda, A.C.** (2001). Infra-red thermography revealed a role for mitochondria in pre-symptomatic cooling during harpin-induced hypersensitive response. *Plant Journal* 28, 663-670.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G., and Kopelowitz, J.** (2005). Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Disease* 89, 1339-1347.
- Carlton, W.M., Braun, E.J., and Gleason, M.L.** (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* 88, 525-529.
- Chaerle, L., Van Caeneghem, W., Messens, E., Lambers, H., Van Montagu, M., and Van Der Straeten, D.** (1999). Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. *Nature Biotechnology* 17, 813-816.
- Cohen, Y., Alchanatis, V., Meron, M., Saranga, Y., and Tsipris, J.** (2005). Estimation of leaf water potential by thermal imagery and spatial analysis. *Journal of Experimental Botany* 56, 1843-1852.
- Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Grafen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A.** (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology* 106, 179-191.
- Jones, H.G., Stoll, M., Santos, T., de Sousa, C., Chaves, M.M., and Grant, O.M.** (2002). Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany* 53, 2249-2260.
- Jordan, W.R., and Ritchie, J.T.** (1971). Influence of Soil Water Stress on Evaporation, Root Absorption, and Internal Water Status of Cotton. *Plant Physiology* 48, 783-788.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K.H., Eichenlaub, R., and Manulis-Sasson,**

- S.** (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology* 121, 463-475.
- Latin, R.X.** (1993). Diseases and pests of muskmelons and watermelons. Purdue University Cooperative Extension Service.
- Latin, R.X., and Hopkins, D.L.** (1995). Bacterial fruit blotch of watermelon - the hypothetical exam question becomes reality. *Plant Disease* 79, 761-765.
- Leinonen, I., and Jones, H.G.** (2004). Combining thermal and visible imagery for estimating canopy temperature and identifying plant stress. *Journal of Experimental Botany* 55, 1423-1431.
- Lenthe, J.H., Oerke, E.C., and Dehne, H.W.** (2007). Digital infrared thermography for monitoring canopy health of wheat. *Precision Agriculture* 8, 15-26.
- Mallarino, A., P and Wittry, D ,J.** (2004). Efficacy of grid and zone soil sampling approaches for site-specific assessment of phosphorus, potassium, pH, and organic matter. *Precision Agriculture* 5, 131–144.
- Meletzus, D., Bempohl, A., Dreier, J., and Eichenlaub, R.** (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis Subsp michiganensis* Ncppb382. *Journal of Bacteriology* 175, 2131-2136.
- Melotto, M., Underwood, W., and He, S.Y.** (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46, 101-122.
- Millerd, A., and .Scott, K.J.** (1962). Respiration of the diseased plant. *Annual Review of Plant Physiology* 13, 559-574.
- Moller, M., Alchanatis, V., Cohen, Y., Meron, M., Tsipris, J., Naor, A., Ostrovsky, V., Sprintsin, M., and Cohen, S.** (2007). Use of thermal and visible imagery for estimating crop water status of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* 58, 827-838.
- Nilsson, H.E.** (1995). Remote-sensing and image-analysis in plant pathology. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 17, 154-166.
- Oerke, E.C., Frohling, P., and Steiner, U.** (2011). Thermographic assessment of scab disease on apple leaves. *Precision Agriculture* 12, 699-715.

- Oerke, E.C., Steiner, U., Dehne, H.W., and Lindenthal, M.** (2006). Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *Journal of Experimental Botany* 57, 2121-2132.
- Otieno, D.O., Schmidt, M.W.T., Kurz-Besson, C., Do Vale, R.L., Pereira, J.S., and Tenhunen, J.D.** (2007). Regulation of transpirational water loss in *Quercus suber* trees in a Mediterranean-type ecosystem. *Tree Physiology* 27, 1179-1187.
- Sade, N., Vinocur, B.J., Diber, A., Shatil, A., Ronen, G., Nissan, H., Wallach, R., Karchi, H., and Moshelion, M.** (2009). Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytologist* 181, 651-661.
- Schaad, N.W., Sowell, G., Goth, R.W., Colwell, R.R., and Webb, R.E.** (1978). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp *citrulli* subsp *nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 28, 117-125.
- Sowell, G., and Schaad, N.W.** (1979). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp *citrulli* on watermelon - seed transmission and resistance of plant introductions. *Plant Disease Reporter* 63, 437-441.
- Taiz, L., Zeiger, E.** (1998). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc (California, USA).
- Walcott, R.R., and Gitaitis, R.D.** (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Disease* 84, 470-474.
- Walcott, R.R., Langston, D.B., Sanders, F.H., and Gitaitis, R.D.** (2000). Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. *Phytopathology* 90, 191-196.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., and Deley, J.** (1992). Transfer of Several Phytopathogenic *Pseudomonas* Species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp *avenae* subsp *nov.*, *Comb-Nov*, *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp *cattleyae*, and *Acidovorax Konjaci*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 107-119.

- Yogev, A., Raviv, M., Kritzman, G., Hadar, Y., Cohen, R., Kirshner, B., and Katan, J.** (2009). Suppression of bacterial canker of tomato by composts. *Crop Protection* 28, 97-103.
- Zhang, N.Q., Wang, M.H., and Wang, N.** (2002). Precision agriculture - a worldwide overview. *Computers and Electronics in Agriculture* 36, 113-132.

mainly isolated with non-watermelon plants, while group II is formed by isolates that are generally associated with watermelon. In this work I used a pathogenic strain, M6, that belongs to group I, and a mutant strain that was generated in the background of this strain, and lost its ability to cause disease. For this pathosystem, it was difficult to adapt the inoculated Hishtil tray system, like it was done with *Cmm* in tomato plants. Therefore, plants were inoculated by syringe (local) infiltration of leaves, and thermal changes were documented by thermal movies on inoculated melon leaves, for 24 hours or more, depending on symptom appearance. Different concentration inoculuma were assessed in comparison with non-inoculated controls. Plants inoculated with strain M6, showed a consistent increase in leaf temperature relative to the controls, and this effect correlated with the level of radiation: in hours of strong and continuous radiation we could detect substantial differences between inoculated and non-inoculated spots. The differences generally correlated with the concentration of the initial inocula and were generally detected before disease symptom appearance, as similar as seen in some experiments of tomato plants inoculated with *Cmm*. A similar trend was observed in spots inoculated with the non-pathogenic mutant strain; however, these differences were more attenuated. Results from this work emphasize the potential of thermal sensing for early identification of plants infected with bacterial pathogens, and particularly, before the appearance of visible disease symptoms. Optimization of this approach in the future could allow the detection of bacterial pathogens in commercial nurseries, before plantlets are released to the field, thus significantly contributing to the management of these kinds of diseases, to which no efficient tools to combat them are available so far.

Abstract

It is known that stresses in plants caused by disease agents, changes in pigmentation, lack of nutrients, water and others, cause changes in the plant reflection, which consequently are expressed in temperature differences. The present study examined the effects of two bacterial pathogens, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) and *Acidovorax citrulli* on the temperature of the leaf tissue of tomato and melon plants, respectively, in order to assess the potential of thermal imaging for early diagnosis of infection with these pathogens. Bacterial wilt and cancer of tomato caused by *Cmm* is one of the most important diseases in tomato because of its destructive ability. In the last few years, the importance of the disease in Israel has increased, therefore a "*Clavibacter* project" has been established. Its overall goal is to develop strategies to avoid economic damages caused by the disease in tomato grown in the 'Bsor' area, and preventing the establishment of the disease in areas which it does not constitute a major problem at the moment. Various experiments were made to examine the kinetics of disease development and progress in infected plants, and to examine the potential of early disease detection using thermal imaging on tomato leaves. Different inoculation systems were tested on tomato plants at high inoculum concentration (10^8 CFU/ml) and documented by a thermal camera until the stages at which plant symptoms appeared, and sometimes at later stages. Images taken by the thermal camera were used to analyze temperature data from inoculated plants in comparison with the controls. All experiments done with tomato showed a consistent increase in leaf temperature of *Cmm*-inoculated plants showing disease symptoms, relative to non-inoculated controls. One experiment was done in 'Hishtil' trays. This experiment, which simulated the arrangement of the plantlets in commercial nurseries, allowed detection of increased leaf temperature in *Cmm*-inoculated plants relative to non-inoculated controls before the appearance of visible disease symptoms. The second disease tested was the bacterial fruit blotch of cucurbits, (BFB), caused by *A. citrulli*. This disease gained importance after severe outbreaks in watermelon fields in the United States during the late 1980s. During the 1990s, BFB spread to many parts in the world including Israel, being a serious threat to the cucurbit industry, and mainly watermelon and melon crops. *A. citrulli* strains are divided into two well-distinguished groups: group I includes isolates that has been

This work was carried out under the supervision of

Dr. Saul Burdman

The Department of Plant Pathology and Microbiology

The Robert H. Smith Faculty of Agriculture,

Food and Environment

The Hebrew University of Jerusalem

Rehovot

And

Dr. Yafit Cohen

The Department of Sensing, Information and Mechanization

Engineering

Agricultural Engineering Institute

Volcani Center, Agricultural Research Organization

Bet Dagan

**Identification of infected tomato and melon
plants with phytopathogenic bacteria using
thermal sensing**

M.Sc. Thesis

Submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture,

Food and Environment

The Hebrew University of Jerusalem

By

Liat Fassler

December 2011

Rehovot