

שיטות אבחון לגילוי ולזיהוי של חיידקים גורמי מחלות בצמחים

שולמית מנוליס-ששון ולאורה צ'לופוביץ

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ראשון לציון

תקציר

בפרק זה יתוארו מושגים כלליים על אבחון פתוגנים, בדגש על חיידקים גורמי מחלות בצמחים. מוצגות שיטות המבוססות על עקרונות שונים, כמו שיטות סרולוגיות ומולקולריות, תוך הדגשת היתרונות והחסרונות של השיטות השונות. כמו כן מוצגות השיטות המאפשרות לקבוע את רמת השונות הגנטית באוכלוסיית הפתוגן. מובאות דוגמאות לשימוש בשיטות השונות לאבחון חיידקים גורמי מחלות חשובים בישראל. לבסוף מוצגות שיטות חדשות המתפתחות כל הזמן.

אופן הציטוט: מנוליס-ששון ש' וצ'לופוביץ ל' (2021) **שיטות אבחון לגילוי ולזיהוי של חיידקים גורמי מחלות בצמחים**,

בספר **תובנות חדשות במחלות צמחים**, בעריכת אלעד י', דומברובסקי א', מנוליס-ששון ש' ועזרא ד', הוצאת המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים.

<https://volcaniarchive.agri.gov.il/skn/tu/e54588>



מבוא

אבחון גורמי מחלות בצמחים משמעותו לגלות או לזהות את הפתוגן (גורם המחלה) מכלל אוכלוסיית המיקרואורגניזמים שבצמח. נתייחס לשלושה מושגים: Identification - זיהוי גורם המחלה. כלומר שיוך אורגניזם לא ידוע לקבוצה טקסונומית ידועה בהסתמך על תכונות מסוימות. Detection – גילוי או ניטור נוכחות אורגניזם מסוים בצמח הנדגם. Diversity - שונות גנטית באוכלוסיית הפתוגן, האם מבנה האוכלוסייה אחיד או שניתן להבדיל בין התבדילים השונים של הפתוגן (Louws et al., 1999). ניקח לדוגמה את המקרה של החיידק *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (ראו פרק מחלות צמחים הנגרמות ע"י חיידקים בישראל). כאשר מתקבל במעבדת אבחון צמח פלרגוניום עם סימני מחלה נרצה לדעת מה הגורם לכך, ולכן נבודד מהצמח את גורם המחלה ובאמצעות שיטות אבחון שונות ננסה לזהותו ולשייכו לקבוצה טקסונומית ידועה. לתהליך זה נקרא זיהוי. אולם כאשר נרצה לדעת אם צמחי פלרגוניום שאינם מראים סימני מחלה נושאים את החיידק הספציפי הזה ננסה בשיטות אבחון שונות לגלותו. לתהליך זה נקרא גילוי. אם יש בידינו אוסף של תבדילים שונים של החיידק שכולם הוגדרו כקסנטומונס פלרגוניי ונרצה לדעת האם האוכלוסייה אחידה או שניתן להבדיל בין התבדילים השונים, ננקוט בשיטות שונות המתאימות לבדיקת השונות הגנטית באוכלוסייה. בחירת שיטות האבחון המתאימות תלויה לרוב במטרת האבחון, זיהוי, גילוי או קביעת שונות האוכלוסייה.

לאבחון גורמי מחלות בצמחים יש מספר מטרות: 1. מציאת פתרון למחלה. זיהוי וגילוי גורם המחלה יכול להצביע על דרכים אפשריות להדברה כמו, כימית, ביולוגית, סולרית, משולבת, זנים עמידים, אמצעים אגרוטכניים שונים ועוד. 2. אבחון מוקדם של גורמי המחלה. במקרה כזה ניתן להימנע מהמחלה ע"י שימוש בחומר ריבוי נקי כמו זרעים, ייחורים או שתילים. 3. הבנת האקולוגיה והאפידמיולוגיה של המחלות. לימוד השונות באוכלוסיית הפתוגן יכול לעזור במציאת מקורות המדבק (אינוקולום); האם המחלה התחילה ממוקד אחד או כמה מוקדים, האם אוכלוסיית הפתוגן אחידה. 4. הסגר (קרנטינה). מניעת החדירה של גורמי מחלה חדשים לארץ ניתן להשגה על ידי אבחון פתוגנים שונים בחומר הצמחי המיובא ובידוד הצמחים הנגועים או ניקויים מגורמי המחלה (Bull and Koike, 2015). שלב זה הוא חלק מתפקידם של השירותים להגנת הצומח ולביקורת של משרד החקלאות.

מהן התכונות שנדרוש משיטות אבחון מהימנות?

1. ספציפיות (specificity) היכולת לזהות את גורם המחלה במדויק בלי false positives (תשובה חיובית שגויה) כאשר אינו קיים או false negatives (תשובה שלילית שגויה) כאשר הוא קיים. ספציפיות גבוהה תאפשר אבחנה בין תבדידים פתוגנים לבלתי פתוגנים, בין ספרופיטים (לא פתוגנים החיים על רקמה מתה בעיקר לאחר תמותת הרקמה כתוצאה מהפתוגן) לפתוגנים.

2. רגישות (sensitivity) שמשמעותה המספר הקטן ביותר של תאי הפתוגן בדוגמא הניתנים לגילוי. שיטה טובה תאפשר לגלות ריכוז נמוך ביותר של הפתוגן. מבחינה מעשית חשוב שהרגישות תהיה מתחת לסף הגורם למחלה או כזה היכול לגרום לנזקים כלכליים. לרגישות חשיבות גדולה יותר בגילוי מאשר בזיהוי מכיוון שריכוז הפתוגן ברקמה חולה בד"כ גבוה, לעומת מצב של צמח ללא סימני מחלה כמו במקרה של אוכלוסייה לטנטית (פתוגן החי על הרקמה החיה אך יהפוך לפתוגן כאשר התנאים בצמח ובסביבה יתאימו) או במקרה של זרעים הנושאים את הפתוגן.

3. מהירות ביצוע הבדיקות. נרצה ששיטת האבחון תיתן תשובה מהירה ככל האפשר על מנת לאפשר קבלת החלטות בקשר לנקיטת אמצעים להקטנת נזקי המחלה או כדי לאפשר שימוש באצוות של זרעים נקיים, חומר ריבוי וגטטיבי או מכירת גידול מסוים.

4. אמינות (reliability). צריך שהשיטה תהיה מהימנה, כך שבחזרות שונות תתקבל אותה תשובה.

5. בידוד לתרבית נקיה של הפתוגן. רצוי שהשיטה לא תחייב בידוד החיידק לתרבית נקיה כי אז תתאים לבדיקת מספר גדול של דוגמאות בו זמנית. לעומת זאת, לזיהוי הפתוגן יש צורך בבידוד לתרבית נקיה.

6. עלות נמוכה. תאפשר להגדיל את מספר הבדיקות.

באמצעות שיטות אבחון ניתן לזהות גורמי מחלה ברמות טקסונומיות שונות: סוג, מין, תת מין או פתובר. רמה טקסונומית נמוכה יותר מעידה על כך ששיטת האבחון הינה ספציפית יותר ולכן מתאימה טוב למטרות האבחון.

שיטות האבחון

את שיטות האבחון ניתן לחלק באופן כללי לפי החלוקה הבאה:

1. מורפולוגיות הכוללות, בחינת סימני המחלה בצמח החולה, בידוד הפתוגן על מצעי מזון ובחינת המושבות, וביצוע מבחני פתוגניות.
 2. ביוכימיות ופזיולוגיות המבוססות על תכונות פיזיולוגיות ותזונתיות של הפתוגן.
 3. סרולוגיות המבוססות על נוגדנים כנגד הפתוגן.
 4. מולקולריות המבוססות על דנ"א או רנ"א והכוללות PCR וריצוף גנים או גנומים שלמים.
 5. שיטות המתאימות לקביעת השונות באוכלוסיית הפתוגן.
 6. שיטות אבחון חדשות וכאלה המבוססות על תגובת הצמח החולה.
- כאן המקום להדגיש שלכל השיטות יש יתרונות וחסרונות אליהם נתייחס בתיאורן. לכן בחירת השיטה/שיטות בה ננקוט תלויה במטרת האבחון; זיהוי, גילוי או שונות אוכלוסייה.

1. שיטות מורפולוגיות

1.1. אחת מהדרכים הקלאסיות לזיהוי גורמי מחלה היא בחינת הצמח החולה. סימני המחלה העיקריים הנגרמים ע"י חיידקים הם כתמים, נבילה, כמישה, כיבים, ריקבון רך וגידולים (ראו פרק מחלות צמחים הנגרמות ע"י חיידקים בישראל). הסימפטומים הינם תגובה של הצמח ולכן יש מספר מוגבל של אפשרויות. יתכנו מספר חיידקים שיגרמו לאותם סימפטומים, או חיידק אחד הגורם לסימפטומים שונים באותו הפונדקאי. לפי מראה הנגע ניתן לקבל כיוון ראשוני לגבי הפתוגן ולצמצם את האפשרויות לבדיקה בשיטות אחרות שיאפשרו אבחון מדויק יותר.

הסימפטומים של המחלה כאמור, אינם מספיקים ומחייבים בידוד של הפתוגן וביצוע מבחן קוך (Koch). לבידוד החיידק מהצמח נלקחים לרוב חלקי צמח עם סימני המחלה. כשלא ניתן לראות סימפטומים נלקחות דגימות מהחלקים הידועים כמקומות החדירה הראשוניים של הפתוגן. הרקמה הנבחרת צריכה לאפשר ככל האפשר את בידוד הגורם הראשוני. חיידקים לרוב קל יותר לבודד משלבים מוקדמים של המחלה. רקמה במצב מתקדם מכילה יותר ספרופיטים הגדלים על הרקמה שניזוקה ע"י גורם המחלה הראשוני ואשר לרוב גדלים מהר יותר מהפתוגן על מצעים לא סלקטיביים. לפיכך, לרוב נלקחות רקמות הנראות בריאות בקרבת הרקמה החולה. לאחר בידוד החיידק צריך אוסף של תרביות לצורך השוואה (כביקורות חיוביות) או לקביעת שונות האוכלוסייה. שמירה של חיידקים ע"י העברה של התרבית ממצע למצע מידי פעם, יש לה חסרון מכיוון שהתרבית יכולה לאבד פתוגניות או לשנות תכונות אחרות. ישנן שיטות שונות לשימור תרביות בחיידקים, כשהנפוצה היא הקפאה בגליצרול ב-80- מ"צ למספר שנים או 20- לזמן קצר יותר.

לאחר בידוד החיידק על מצעי מזון (ראו בהמשך) יש צורך לבצע מבחן קוך לשחזור המחלה. בפרק זה אנו מתייחסים למבחני פתוגניות כדרך לאבחון ללא השלב האחרון של מבחן קוך. התנאים הדרושים למבחני פתוגניות כוללים בחירת הפונדקאי המתאים לביצוע המבחן במקרה ויש לפתוגן מספר פונדקאים, בחירת החלק בצמח

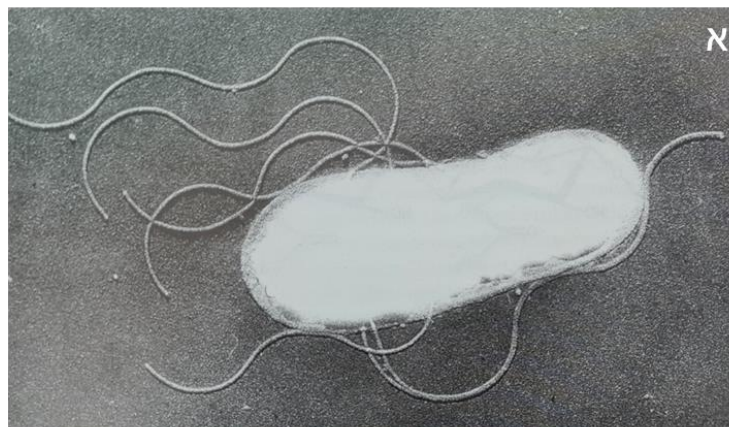
המתאים למבחן (פירות, עלים, נבטים, גבעולים או חלקי רקמה), בחירת ריכוז המדבק, תנאי ההדגרה, טמפרטורה, לחות ואת תקופת האינקובציה של המחלה מהדבקה עד להופעת הסימפטומים.

היתרונות והחסרונות של מבחני הפתוגניות כשיטה לאבחון: התשובה המתקבלת במבחן אינה תמיד ברורה ולעיתים נתונה להערכה סובייקטיבית. מבחני הפתוגניות נמשכים זמן רב ולא מתאימים ליישום בהיקף נרחב. יחד עם זאת, אם יש מבחן מהיר הוא יכול להיות יעיל לאבחון. עדיין משתמשים בשיטה זו בעיקר לזיהוי גורם המחלה. כאשר עלות של זרעי מכלוא גבוהה, הפתוגן נמצא בתוך הזרע ואין שיטה מספיק רגישה, מעדיפים להנביט דגימה של זרעים ולבדוק את הופעת הצמחים החולים בכלל הדגימה. זהו מבחן המתבסס על הופעת הסימפטומים Seedling grow-out assay שהיא שיטה ישירה לבדיקת יכולת העברה של המחלה באצוות של זרעים.

בנוסף, מבחני פתוגניות משמשים לעיתים לאבחון חיידקים בתגובת רגישות יתר המכונה HR (Hypersensitive Response). חיידקים שונים כאשר הם מוחדרים לרקמות של צמח שאינו הפונדקאי יוצרים תגובת רגישות יתר, המתבטאת בכך שהתאים מסביב למקום החדירה מתים וכתוצאה מכך ההדבקה מוגבלת בשל חוסר אפשרות של הפתוגן להמשיך ולהתפתח. לרוב משתמשים במבחן זה בעיקר בטבק בגלל הנוחות להחדרת החיידק לעלה באינפילטרציה. לעיתים משתמשים בצמחים אחרים כמו עגבניות.

2.1. מורפולוגיה של הפתוגן. כאן הכוונה להסתכלות במיקרוסקופ או בבינוקולר על הפתוגן וכן הסתכלות על צורת המושבות המתפתחות על מצעי מזון כלליים או חצי-בררניים (semi-selective media). הסתכלות במיקרוסקופ אור מתאימה לפטריות אך לא לחיידקים. הסתכלות במיקרוסקופ אלקטרוני מתאימה בעיקר לנגיפים. בחיידקים ניתן לעיתים לראות שוטונים או את צורת התא (איור 1 א') אולם מכיוון שחיידקים רבים נראים דומים במיקרוסקופ זו אינה שיטה מעשית.

הסתכלות על צורת מושבות החיידק המתפתחות על מצעי מזון חשובה במקרים רבים של אבחון. הצלחת האידיאלית היא עם תרבית נקיה של הפתוגן המכילה מושבות המופרדות היטב (איור 1 ב' וג'). אולם לרוב זה אינו המצב, בעיקר כשיש ספרופיטים רבים ברקמת הצמח החולה. ולכן יש צורך במצעים חצי-בררניים הנותנים יתרון בגידול לפתוגן על פני הספרופיטים. מרכיבי מצעי המזון הבררניים כוללים מקורות פחמן שונים כמו סוכרים, פחממות מורכבות כמו פקטין, כיטין ועוד, מקורות חנקן אורגני או אנאורגני, מלחים שונים, אנטיביוטיקות שונות נגד חיידקים או חומרי הדברה נגד פטריות, חומרי צבע (אינדיקטורים) המשנים צבע לפי pH כמו crystal violet. יתרונות מצעי המזון החצי בררניים הם העשרה של הפתוגן לעומת אורגניזמים אחרים שנמצאים בצמח החולה, בקרקע, במים וחלקי צמח נרקבים. החסרונות הם שלא ניתן באמצעותם להבחין בין תבדידים פתוגנים ללא פתוגנים או ברמה של תת מינים. כאשר מבודדים חיידקים מרקמת צמח חולה כדאי להשתמש בכמה מצעים, כמו לדוגמה במקרה של החיידק קלויבקטר משיגנזה התוקף עגבניות (איור 1 ד').



איור 1: א' החיידק *Agrobacterium tumefaciens* כפי שנראה במיקרוסקופ אלקטרוני סורק שבו ניתן לראות את השוטונים. ב' מושבות החיידק *Erwinia amylovora* כפי שנראות על מצע חצי בררני CCT. ג' מושבות החיידק *Xanthomonas hortorum pv. pelargonii* כפי שנראות על מצע LPGA. ד' מושבות החיידק *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* כפי שנראות על מצעים שונים. תמונה א' נלקחה (Kado, 2010).

2. שיטות ביוכימיות-פיזיולוגיות

שיטות אלו, המבוססות על תכונות פיזיולוגיות ותזונתיות של הפתוגן בעקבות פירוק מרכיבי מצע שונים, מתאימות בעיקר לחיידקים (Schaad et al., 2001).

1.2. המבחנים השונים כוללים:

- צביעת גרם המבוססת על מבנה דופן החיידקים, כאשר חיידקים גרם שליליים נצבעים באדום ואילו הגרם חיוביים בסגול-כחול (איור 2 א').

- ניצול מקורות פחמן שונים כמקור לפחמן ולאנרגיה המתבטא בגידול התרבית או בשינויים החלים במצע בעקבות הגידול כמו יצירת חומצה או בסיס הניתנים לבדיקה באמצעות אינדיקטורים שונים. מבחנים אלו גם מראים האם הנשימה היא חמצונית או באמצעות תסיסה ולכן הגידול נבדק גם בתנאים אירוביים וגם אנאירוביים.

- ניצול פחמימנים וחומצות אורגניות שונות, לדוגמא, יצירת לבאן (levan) מסוכרוז. במצע המכיל ריכוז גבוה של סוכרוז יש חיידקים היוצרים את הפולימר המורכב מפרוקטוז והגורם ליצירת מושבות מוקואידיות כמו בארוויניה.

- ניצול תרכובות חנקן שונות, לדוגמא, חיזור Nitrate (NO_3). ישנם חיידקים אירוביים היכולים לגדול באופן אנאירובי במצעים העשירים בניטרט העובר חיזור לניטריט (NO_2^-) או N_2 . לחלק מחיידקים הניטריט הוא טוקסי ולכן יש חיזור שלו לחנקן גזי. את החיידקים מגדלים במצע המכיל ניטראט ואז בודקים נוכחות ניטריט באמצעות אינדיקטורים שונים.

- פעילות של אוראז (Urease), אנזים המפרק אוראה.

- פעילות Arginine dihydrolase.

- יצירת אינדולים כמו במקרה של פרוק חומצת האמינו טריפטופן.

- פירוק מקרומולקולות כמו חלבון ביצה, ג'לטין, עמילן או פקטאט.

- פעילות של ציטוכרום C אוקסידאז (cytochrome C oxidase). זהו קומפלקס של כמה חלבונים האחראים למעבר האלקטרונים בתהליך הנשימה.

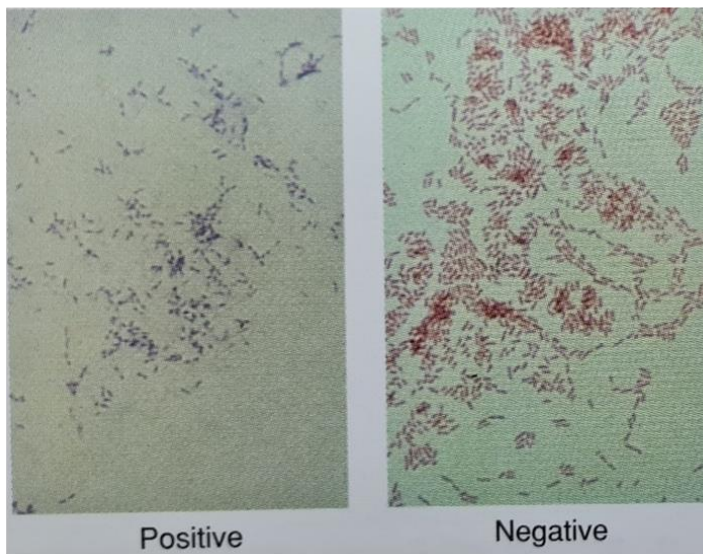
- גידול בטמפרטורה מעל 35 מ"צ.

שיטות אלו יכולות להיות בעלות ערך במקרים מסוימים ולאפשר הפרדה ברמת מינים או אפילו תת מינים. לדוגמא באיור 2 ב' אפשר לראות דוח תוצאות של המבחנים השונים המאפשרים להבחין בין מינים שונים של ארוויניה שאינם גורמים לריקבון רך. החסרונות של שיטות אלו הן שצריך בידוד של החיידקים לתרבית נקיה, הן אינן מאפשרות להבחין בין תבדידים פתוגנים לבלתי פתוגנים ואינן מתאימות לגילוי מכיוון שדרוש זמן ארוך לביצוע המבחנים.

2.2. פרופיל של חומצות שומניות (FAA (fatty acid analysis)

תאי חיידקים מכילים סוגים שונים של חומצות שומניות (מעל 100) המרכיבות בעיקר את ממברנות התא. חומצות השומן נבדלות באורך השרשרת הפחמנית ובמספר ומיקום הקשרים הכפולים. יש חומצות שומן מסועפות המכילות קבוצות שונות כמו הידרוקסי. פרופיל של חומצות שומניות מתבסס על סוג החומצות ועל הכמות היחסית שלהם ואלו ייחודיים לקבוצות שונות של חיידקים. מיצוי ואנליזה של חומצות אלו, לרוב לאחר אסטריפיקציה לקבלת מתיל אסטרים, יכולים לשמש לזיהוי חיידקים שונים. השיטה דורשת מכשיר של גז כרומטוגראף וחיבור למחשב לניתוח התוצאות. צריך ספריה על בסיס של פרופיל חומצות השומן של חיידקים ידועים. מכיוון שהרכב חומצות השומן אינו זהה בתנאי גידול שונים בונים את הספרייה בתנאים סטנדרטיים.

Test	<i>E. alni</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>E. malvarum</i>	<i>E. nigricans</i>	<i>E. paradiastaca</i>	<i>E. persici</i>	<i>E. psidii</i>	<i>E. pyrifoliae</i>	<i>E. quercina</i>	<i>E. rubrifaciens</i>	<i>E. salicis</i>	<i>E. tracheiphila</i>
Tobacco hypersensitivity	- ^b	+	+	-	ND	ND	-	+	-	-	-	ND
Pectate degradation ^c	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
Growth factors required ^d	-	+	+	-	ND	ND	-	ND	+	-	-	+
Pink pigment on YDC	-	-	-	-	ND	+	-	ND	-	+	-	-
Growth at 36°C	+ ^d	-	-	+	ND	+	-	-	-	-	-	-
Growth at 39°C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S from cysteine	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Urease	+ ^d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole test	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	ND	+	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquification	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ^e :												
Salicin	+	-	-	+	+	+	+	ND	+	-	+	-
K-methyl glucoside	ND	-	-	ND	-	-	+	-	+	+	-	-
Melibiose	-	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Inositol	-	-	-	+	ND	ND	+	ND	ND	-	+	ND
L-arabinoise	+	v	-	+	+	+	+	+	-	+	-	ND



איור 2. א' צביעת גרם להבחנה בין חיידקים גרם שליליים וגרם חיוביים. ב' טבלה המתארת תוצאות של מבחנים ביוכימיים ופיסיולוגיים שונים המאפשרים להבחין בין מינים שונים של החיידק ארוויניה שאינם גורמים לריקבון רך (Schaad et al., 2001).

התהליך דורש בשלב ראשון בידוד של החיידקים על מצעים סלקטיביים הנבחרים על פי הסימפטומים. לאחר בחירת מספר מושבות בודדות מהצלחות, מגדלים את החיידקים המבודדים בתנאים סטנדרטיים; ב-28 מ"צ על מצע Tryptic soya broth + agar (TSBA). תאי החיידקים שנאספים מצלחות אגר מורחפים במתנול וסודיום הידרוקסיד במבחנות שנחתמות ועוברות חימום. בתהליך זה דופן התא נהרסת וחומצות השומן הופכות למתיל אסטרים, שהם נדיפים ומתאימים להזרקה ל-GC. האסטרים עוברים מיצוי בממיס מתאים ומופרדים מהפאזה המימית, עוברים יבוש ולאחר מכן מוזרקים ל-gas liquid chromatography בתנאים מוגדרים. חומצות השומן משתחררות בהתאם לנדיפות ומקבלים הפרדה שלהן.

דו"ח התוצאות המתקבל נותן את הרכב חומצות השומן ואת כמותן. לדוגמא, 12:0 כלומר 12 פחמנים בלי קשר כפול. או 17:1 כלומר 17 פחמנים וקשר כפול אחד. הפרופיל המתקבל משווה לספריות של חיידקים ידועים באמצעות תוכנות מתאימות וניתנת התוצאה הקרובה ביותר. לעיתים מתקבלת יותר מתשובה אחת. ההחלטה מי מהם היא הנכונה תלויה במעבדת האבחון המשווה את התוצאות לסימפטומים. השיטה מתאימה לזיהוי חיידקים אך לא לגילוי. החסרונות, חייבים תרבית נקיה של החיידק, צריך גידול בתנאים סטנדרטיים וספריות מתאימות. הזיהוי הוא לרוב ברמה של מינים.

3.2. ניצול מקורות מזון – שיטת הביולוג (BIOLOG)

שיטת הביולוג הוצעה לראשונה בשנת 1989 והיא מבוססת על ניצול מקורות פחמן שונים כמקור אנרגיה יחיד, היוצר פרופיל ע"פ ניצול מקורות הפחמן. הבדיקה נעשית בפלטות של 96 בארות כשבכל באר יש מקור פחמן שונה (יש 95 מקורות פחמן שונים בפלטה). אם החיידק גדל ונושם מקבלים את ראקציית הצבע הסגול המתבססת על חיזור Tetrazolium (היוצר פיגמנט סגול בנוכחות גורם מחזר) כתגובה לתהליך הנשימה ולא ע"י תוצר מטבולי כמו יצירת חומצה המתבססת על שינוי ב-pH (כפי שהוזכר לעיל בשיטות ביוכימיות-פיזיולוגיות). השיטה מתבססת על מספר גדול של מבחנים. יש 2^{95} או 4×10^{28} אפשרויות בפלטה אחת.

מהלך הבדיקה כולל כמה שלבים: 1. בידוד חיידקים מצמח חולה וקבלת מושבות בודדות. 2. צביעת גרם כדי לדעת אם החיידק גרם חיובי או שלילי (יש פלטות שונות). 3. גידול תרבית מבודדת על מצע מתאים והכנת תרחיף המדבק בעכירות מסוימת. 4. מהתרחיף מועברים 150 מיקרוליטר לכל באר בפלטה המכילה את הסוכר ואת הטטרזוליום. 5. הפלטה מועברת לאינקובציה ב-30-35 מ"צ למשך 4-24 שעות. 6. קריאת הפלטה בספקטרופוטומטר או באופן ויזואלי, קבלת דו"ח התוצאות והשוואה למאגר נתונים.

לחברה המספקת את הפלטות יש מאגר נתונים מחיידקים שונים אליהם משווים את התוצאות המתקבלות. במאגר יש מספר מאות של מיני חיידקים שונים. כאשר נמצא אורגניזם שאינו מופיע במאגר הוא מוסף למאגר כך שבפעם הבאה אפשר יהיה לזהותו. באופן כזה כל משתמש יכול להכין ספריות המתאימות לו. יש פלטות המתאימות לכל סוגי החיידקים גרם שליליים וגרם חיוביים, אירוביים ואנאירוביים וכן לחיידקים שגדלים לאט במצע. חסרונות השיטה: צריך לבדוד את החיידקים לתרבית נקיה, הפלטות יקרות ולכן הבדיקה לא נעשית באופן רוטיני אלא רק לאישור תוצאות שהתקבלו בשיטות אחרות במיוחד לגבי פתוגן חשוב או במקרה שצריך להחליט אם להשמיד את החומר הצמחי.

3. שיטות סרולוגיות

בשיטות אלו התחילו להשתמש החל משנות ה-70 של המאה הקודמת. הן מבוססות על יצירת נוגדנים שהן מולקולות של אימונוגלובולינים הנוצרים ע"י לימפוציטים בתגובה לגירוי אנטיגני. האנטיגן הוא בד"כ חלבון ממקור זר המעורר תגובה חיסונית בחיה (משתמשים לרוב בארנבות, עכברים קוויות או כבשים). ישנם נוגדנים פוליקלונליים המהווים אוכלוסייה כללית של נוגדנים המגיבים למספר אנטיגנים או למספר אפיטופים (אתרים אנטיגניים של אותו אנטיגן) ונוגדנים מונוקלונליים שהם אוכלוסייה זחה של נוגדנים המגיבים לאפיטופ אחד של אותו אנטיגן. היכולת לקשור לנוגדן מולקולות שונות כמו אנזימים אפשרה את השימוש הנרחב בשיטות אלו. בעזרת ראגנטים שונים יוצרים קוניוגנטים עם הנוגדן, כאשר לרוב משתמשים באנזימים כמו: Alkaline phosphatase, B-galactosidase -i horseradish peroxidase,

ישנן מספר שיטות סרולוגיות:

אגלוטינציה – זו השיטה הפשוטה ביותר הנקראת slide agglutination שמשמעותה היא היצמדות של תאי החיידקים ליצירת צברים הנובעת מהקשר אנטיגן-נוגדן בין תאים שכנים. לטיפה של הדוגמא הנבדקת מוסיפים נוגדנים ורואים (בעין או בבינוקולר) אם נוצרת אגלוטינציה. השיטה מתאימה לזיהוי חיידקים בתרבית.

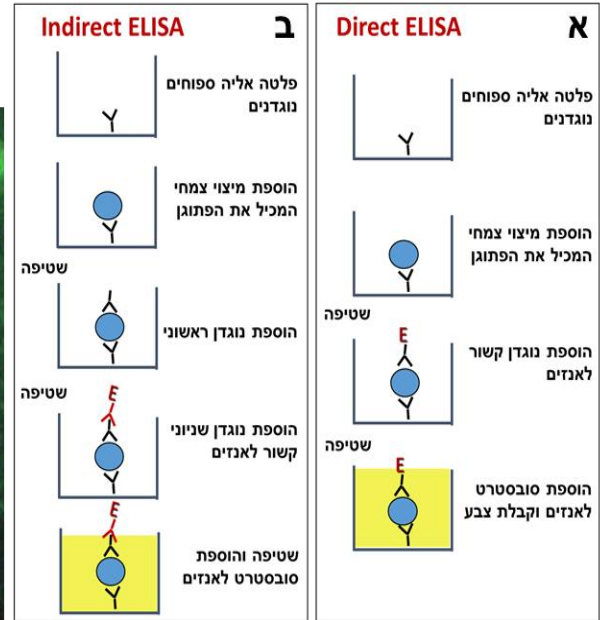
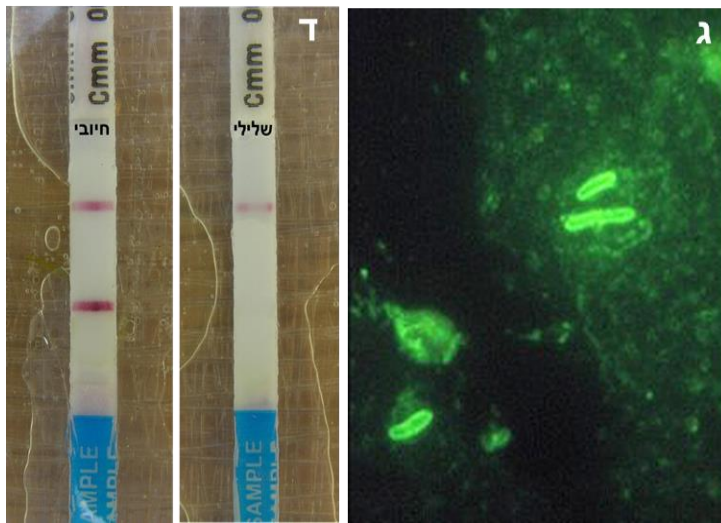
דיפוזיה באגר - בשיטה זו נוגדנים ואנטיגנים עוברים דיפוזיה באגר ובנקודת המפגש נוצר פס לבן כתוצאה משקיעה של הקומפלקס נוגדן-אנטיגן. השיטה הידועה ביותר היא Double diffusion ouchterlony procedure. השיטה מתאימה לאנליזה של תבדידי פתוגן שונים לקביעת קבוצות סרוטיפיות.

Enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA (אליזה) - פיתוח השיטה התאפשר בזכות היכולת לקשור למולקולת הנוגדן אנזים. בשיטה יש קישור של הנוגדן או האנטיגן למצע מוצק המאפשר לבדוק את הראקציה נוגדן-אנטיגן באמצעות יצירת צבע לאחר פעילות האנזים על הסובסטר המתאים. יש אפשרויות שונות לשיטה (איור 3). באליזה ישירה - האנזים קשור קוולנטית ישירות לנוגדן הראשוני (איור 3 א'). באליזה בלתי ישירה - האנזים קשור למולקולה הנקשרת לנוגדן, לרוב נוגדן שניוני שנוצר כנגד הנוגדן הראשוני בחיה אחרת (איור 3 ב'). בשיטה הישירה יש פחות שלבים ואילו השיטה הבלתי ישירה לעיתים רגישה יותר ואין צורך להכין קוניוגנטים לכל נוגדן. מכיוון שהפעילות האנזימטית מהירה נוצרת מיד ראקציית צבע לאחר פירוק הסובסטר. הראקציה נעשית בפלטות של 96 בארות מפוליסטירן אליהם נקשר הנוגדן או האנטיגן. ראקציית הצבע נקראת בקוראי אליזה להם מספר אורכי גל המתאימים לסובסטרטים השונים.

יש אפשרויות נוספות לשיטת האליזה שבהן יש קשירה של האנטיגן לפלטה כמו השיטה הנקראת Competitive ELISA. לדוגמא הצמחית מוסיפים נוגדנים ראשוניים ואת המיצוי מעבירים לפלטה אליה קשור האנטיגן, ולאחר שטיפה מוסיפים נוגדן שניוני מסומן. בתשובה חיובית לא נוצר צבע מכיוון שהנוגדן הראשוני נקשר לחיידק הנמצא במיצוי הצמחי. השיטה מתאימה לחיידקים באוכלוסיות מעורבות ובמיצוי צמחי כאשר קשה לבדוד את החיידק. במקרה כזה צריך לבדוק מיהולים שונים של המיצוי.

אימונופלוורוסנציה - השיטה מבוססת על היכולת של תרכובות פלורוסנטיות להיקשר לנוגדנים. היתרון שלה על פני שיטות סרולוגיות אחרות, שבהן רואים פס השקעה או מודדים פעילות אנזים, שניתן באמצעותה לראות את תא החיידק במיקרוסקופ פלואורוסנטי (איור 3 ג'). השיטה רגישה מאוד ומאפשרת לגלות 10^3 תאים למ"ל. קיטים לחיידקים – מתאימים לגילוי מידי של גורמי מחלה בשדה. חברות מסחריות שונות פיתחו קיטים המבוססים על נוגדנים. לדוגמא, הקיט שפותח עבור החיידק קלויבקטר משיגנזה (איור 3 ד'). הקיטים מתאימים לצמחים המראים סימני מחלה בהם ריכוז הפתוגן גבוה.

ישנן שיטות סרולוגיות נוספות כמו שיטת ה- Luminex (Van der Vlugt et al., 2015; Charlermroj et al., 2013), או כאלה המשולבות עם שיטות מולקולריות אולם הן לא יתוארו כאן.



איור 3. א' סכמה המתארת את השלבים השונים בליזה ישירה. ב' סכמה המתארת את השלבים השונים בליזה בלתי ישירה. ג' חיידקים כפי שנראים במיקרוסקופ בשיטת האימונופלוורסנציה. ד' קיט לזיהוי קלויבקטר מישיגנדה.

יתרונות השיטות הסרולוגיות הן בכך שהשיטות יחסית ספציפיות ורגישות לגילוי הפתוגן, קלות לביצוע ומתאימות לבדיקת מספר דוגמאות גדול. החסרונות נובעים מכך שהנוגדנים יכולים להכיר אנטיגנים דומים בחיידק אחר תופעה הנקראת cross-reactivity. אפשר לפתור את הבעיה על ידי יצירת נוגדנים מונוקלונליים אולם אז יש חשש שלא יכירו את כל הסרוטיפים השונים של הפתוגן דבר המחייב הכנת נוגדנים כנגד כל סרוטיפ ידוע. בנוסף, לעיתים אנטיגנים שונים יכולים להשתנות בתנאי גידול שונים.

4. שיטות מולקולריות

השיטות מבוססות על הגנוטיפ ולכן יתרון הוא בכך שהן יציבות יותר ואינן מושפעות מתנאי הסביבה כמו תזונה, טמפרטורה, גיל התרבית או תנאים פיסיולוגיים אחרים של האורגניזם. הן ניתנות יותר בקלות לאנליזות סטטיסטיות וכאלה המבוססות על תוכנות מחשב, וכתוצאה מכך הזיהוי והגילוי יותר מדויקים. שיטות אלו נכנסו לשימוש באופן מאסיבי לאבחון גורמי מחלות בצמחים החל משנות ה-90. ניתן לחלק את השיטות המולקולריות באופן כללי לכאלה המבוססות על הגנום באופן ישיר, לאלו המבוססות על PCR (Polymerase chain reaction) וכאלה המבוססות על ריצוף גנים או גנומים שלמים.

1.4. שיטות גנומיות ישירות ללא חיתוך הדנ"א. אחת מהשיטות הישירות מבוססת על הומוולוגיה ברמה של כלל הדנ"א (DNA-DNA hybridization). השיטה מתאימה להשוואה בין כלל הגנום של שני מינים או תבדידים שונים.

לאחר מיצוי הדנ"א משני המינים וביצוע דנטורציה לקבלת דנ"א חד גדילי, מאחדים את הדנ"א משני המקורות ובודקים את הקינטיקה של היווצרות דנ"א דו-גדילי. השיטה מאפשרת השוואות ברמה גנטית של כל הגנום או של האזורים החוזרניים בגנום אחד. למעשה אחוז ההומומולוגיה ברמה של דנ"א כללי נחשב בעבר כמרכיב חשוב בהגדרה של מינים (70% DNA homology) (Wayne et al., 1987).

שיטה ישירה אחרת מבוססת על אפיון פרופיל של פלסמידים. מרבית החיידקים מכילים אחד או יותר פלסמידים אותם ניתן להפריד באלקטרופורזה על גלים של אגרוז לפי המשקל המולקולרי. הבדלים גדולים בגודל ובמספר הפלסמידים בין תבדידים שונים מהווים לרוב אינדיקציה לשייכות טקסונומית נמוכה. משתמשים בשיטה בעיקר בחיידקים אנימליים (תוקפי בעלי חיים). היא מתאימה למקרים שבהם יש אפידמיה ורוצים לדעת מה מקור הזיהום.

שיטה אחרת מבוססת על גלאי DNA (dot or colony hybridization). גודל הגלאי יכול להיות ממספר קטן של בסיסים ועד 10 kb. אפשר לקבל את הגלאים בדרך אקראית ע"י שיבוט של מקטעים אקראיים וסריקה לספציפיות (shot-gun cloning). השיטה הספציפית היא באמצעות גנים הידועים כמעורבים בפתוגניות של החיידק ואינם נמצאים באורגניזמים קרובים אחרים. השיטה אינה מתאימה לבדיקות שגרתיות לגילוי מפני שהיא יקרה יותר ואינה רגישה מספיק. כמו כן יש בעיות של רקע הנובעות מחלקי ושרידי צמח ומהאוקלוסייה המיקרוביאלית הנמצאת בצמח. יחד עם זאת, אפשר להשתמש בה לזיהוי.

ישנן שיטות גנומיות ישירות לאחר חיתוך הדנ"א עם אנזימי רסטריקציה כמו השיטה PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) שתואר בסעיף 5 בהמשך בשיטות לקביעת השונות באוכלוסיית הפתוגן.

2.4. שיטות המבוססות על PCR (Polymerase chain reaction). זו השיטה השימושית ביותר הן לגילוי והן לזיהוי חיידקים גורמי מחלות בצמחים. כדי לזהות או לגלות בשיטה זו צריך תחלים (פריימרים) ספציפיים לפתוגן ביחד עם פרוטוקולים בעלי רגישות גבוהה. ישנן מספר דרכים לפיתוח תחלים בעלי ספציפיות לפתוגן: כאשר ידועים מנגנוני הפתוגניות של החיידק אפשר להשתמש בידע לתכנון תחלים ספציפיים. כך לדוגמא, בחיידק אגרובקטריום טומפציאנס הגורם למחלת עפצים עקב נוכחות הפלסמיד Ti (tumor-inducing), אפשר לסנתז תחלים על בסיס הרצף של גנים לוירולנטיות הנמצאים בפלסמיד. מכיוון שכל התבדידים הפתוגניים מכילים גנים לוירולנטיות האחראים להעברת הדנ"א מהחיידק לפונדקאי, תוכננו תחלים על בסיס הגנים ליצירת ההורמונים הצמחיים (Haas et al., 1995). בחיידקים פקטוליטיים, גורמי ריקבון רך בגידולים שונים, סונתזו תחלים על בסיס רצף הגנים ליצירת האנזימים הפקטוליטיים (Nassar et al., 1996). בסטרפטומיצטים משתמשים בתחלים המבוססים על רצף הטוקסין thaxtomin, המקודד ע"י האופרון *txtAB* והגורם ליצירת הסימפטומים האופייניים על גבי פקעות תפוא"א (Qu et al., 2008). כל המינים הפתוגניים של סטרפטומיצטים הידועים כיום נושאים צבר גנים לביוסנתזה של הטוקסין הנמצא על אי-פתוגניות גדול.

ההתקדמות בפיענוח גנומים של פתוגנים שונים מאפשרת לפתח תחלים רבים המבוססים על גנים לפתוגניות. אולם ניתן לפתח תחלים ספציפיים גם כאשר רצף הדנ"א לא ידוע מראש. בדרך זו מתבססים על מציאת קטעי דנ"א ייחודיים לפתוגן, ריצוף המקטע ועל בסיס הרצף פיתוח תחלים ספציפיים לגילוי זיהוי הפתוגן ברגישות גבוהה. מקורות לדנ"א לא ידוע כזה יכולים להיות מקטעי דנ"א משובטים המתקבלים בשיטות RAPD (random amplified polymorphic DNA), ו-rep-PCR (שתי השיטות יתוארו בהמשך), או מקטעים שהתקבלו ע"י insertion elements. כך לדוגמה פותחו תחלים ספציפיים לגילוי קסנטומונס התוקף פלרגוניום (Manulis et al., 1994). אפשר להשתמש ברצפים על בסיס דנ"א פלסמידי כמו במקרה של החיידק ארוויניה אמילבורה. מכיוון שהפלסמיד קשור ליכולת ההתאמה וההישרדות לסביבה של החיידק הוא נשמר ביציבות באוכלוסייה במטע (Bereswill et al., 1992).

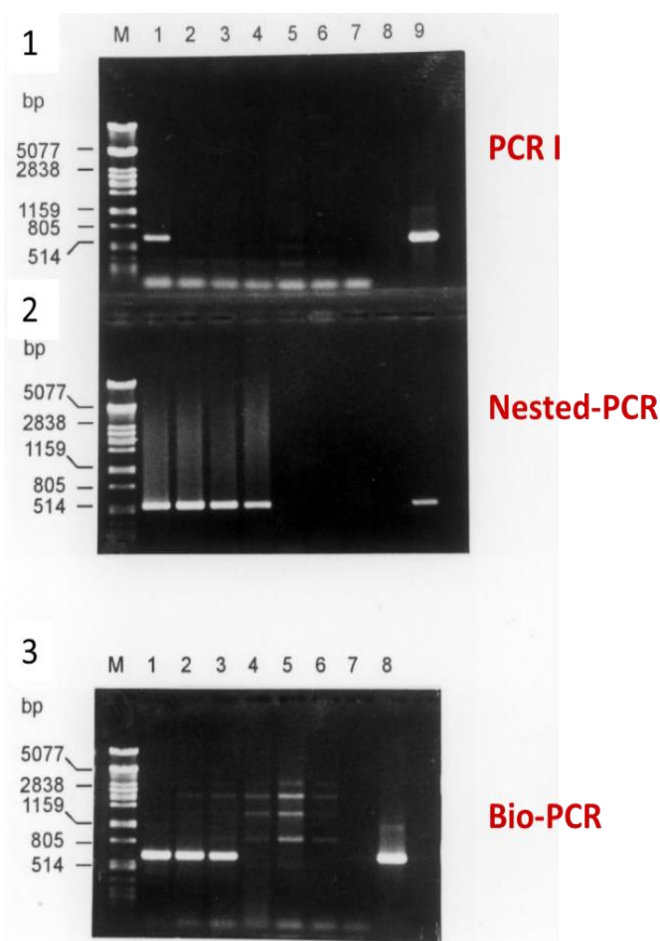
ישנן גרסאות שונות לשיטת ה-PCR עם תחלים ספציפיים כמו: Nested-PCR - הגברה נוספת של תוצר PCR שהתקבל בשלב הראשון עם תחלים פנימיים לזוג הראשון. שלב זה מגביר את הספציפיות של PCR ע"י העלמה של תוצרים לא ספציפיים. מתאים גם לדוגמאות המכילות ריכוזים נמוכים של דנ"א המטרה. Bio-PCR - כוללת שני שלבים, כאשר בשלב הראשון יש גידול על צלחות עם מצע בררני ורק אח"כ כל מה שגדל על הצלחות עובר PCR. בדרך זו מרבים את תאי הפתוגן ומגבירים את רגישות הבדיקה. מתאים לפתוגנים שניתנים לגידול בתרבית ומתרבים מהר. דוגמאות לשתי השיטות האחרונות אפשר למצוא באבחון החיידק פנטואה אגלומראנס בייחורי גבסנית (איור 4) (Manulis, 1998).

multiplex PCR - זוהי ראקציית PCR שבה מאבחנים כמה פתוגנים בו זמנית. כאלה שיוצרים סימפטומים דומים או כשיש צורך לגלות פתוגנים שונים כמו בזרעים. אפשר גם להשתמש בכמה זוגות תחלים לפתוגן אחד, דבר המגביר את הספציפיות והביטחון בתוצאות. לדוגמה גילוי חיידקים מהסוגים קסנטומונס ורלסטוניה בו זמנית בייחורי פלרגוניום מיובאים.

Immunocapture-PCR, או Immunomagnetic מתבססות על שימוש בנוגדנים לריכוז תאי הפתוגן שיש ברסק הרקמה הנגועה ואח"כ ביצוע של PCR.

יתרונות ובעיות בשיטת ה-PCR לאבחון חיידקים בצמחים: הספציפיות הגבוהה של השיטה המבוססת על תחלים ספציפיים מאפשרת לזהות ולגלות את הפתוגן מתוך כלל המיקרואורגניזמים בלי בידוד לתרבית נקיה. השיטה רגישה מאוד ומאפשרת לעיתים לגלות תא בודד אחד בראקציה. היא מהירה וזולה יחסית ומתאימה לבדיקת מספר גדול של דגימות. אולם יש לשים לב לבעיות היכולות לגרום לקבלת תוצאות לא אמינות. מכיוון שרגישות השיטה גבוהה יש חשש לזיהומים ולקבלת תשובה חיובית שגויה (false positive). הזיהומים יכולים לנבוע מהגברה של דנ"א שאינו המטרה, דנ"א חיצוני מתאים או תרביות או אירוסולים, או מזיהומי דנ"א הנובעים מניסויים ובדיקות קודמות. זו נקודה חשובה במיוחד במקרה של גילוי ופחות בזיהוי מפני שבזיהוי לרוב יש בידוד של תרביות וכמות הדנ"א גדולה יותר. ולכן צריך תמיד ביקורת שלילית בכל ניסוי לבדיקת הזיהומים. יתכנו גם בעיות של תשובה שלילית שגויה (false negative) הנובעות מנוכחות תרכובות שונות במיצוי הצמחי אשר יכולות

לעכב את האנזים Taq polymerase, או כתוצאה מפירוק דנ"א המטרה, או בעיות בראגנטים של הראקציה. ריכוז נמוך של דנ"א המטרה הופך את השלבים הראשונים של תהליך ההגברה לקריטיים. לתשובה שלילית שגויה יכולה להיות השפעה גדולה בקרנטינה או בתביעות כנגד חברות זרעים. צריך לכן תמיד ביקורת חיובית המכילה את אותם מרכיבי הראקציה ודנ"א המטרה של הפתוגן הנבדק בכל ניסוי. כאשר רגישות השיטה נמוכה מידי בגלל נוכחות מספר קטן של תאי הפתוגן או מעכבים בתערובת הראקציה, אפשר להגביר את הרגישות במספר דרכים: ביצוע nested-PCR, זיהוי התוצרים שעברו הגברה עם גלאי דנ"א, ביצוע immuno-capture PCR (ריכוז תאי החיידק באמצעות נוגדנים לפני ביצוע PCR) וכן שימוש בתחלים המבוססים על גנים בעלי מספר עותקים גבוה. צריך ללמוד מהו סף המדבק הגורם למחלה בתנאי שדה ואז להתאים את מתן התשובות בהתאם לסף זה.



איור 4. גילוי החיידק פנטואה אגלומראנס בייחורי גבסנית עם תחלים המבוססים על רצף הגן לביוסינתזה של ההורמון ציטוקינין. 1. שלב ראשון של PCR. 2. שלב שני עם פריימרים פנימיים לראשונים המכונה nested-PCR. 3. שיטת ה-Bio-PCR. מייצג סמנים לגודל תוצרי ה-PCR. המספרים מ-1 עד 5 מייצגים ריכוזים שונים של החיידק במיהולים עשורניים בין 10^5 ל- 10^1 תאים למ"ל. שאר המספרים מייצגים ביקורות. באיורים 1 ו-2 מספר 8 מייצג ביקורת שלילית ואילו מספר 9 מייצג ביקורת חיובית. באיור 3 שתי הביקורות האחרונות מיוצגות במספרים 7 ו-8 בהתאם. ניתן לראות כי בשיטת ה-nested-PCR יש עליה ברגישות של פי 1000 לעומת PCR רגיל ואילו ב-Bio-PCR יש עליה ברגישות של פי 100.

Real-time PCR - PCR בזמן אמת. ראקציית ה-PCR היא בעקרון כפי שתוארה לעיל אך כאן משתמשים בצבעים פלואורסנטיים למדידת הדנ"א המסונתז. התוצרים נקראים בזמן אמת תוך כדי הראקציה ואין צורך בהפרדה בגלל כפי שנעשה ב-PCR רגיל. צריך מכשיר PCR ומחשב עם התוכנות המתאימות. השיטה היא כמותית וניתן להשתמש בה מלבד אבחון גם מדידת ביטוי גנים (מדידת רמת הרנ"א) ועוד יישומים שונים. יש שתי שיטות עיקריות

לזיהוי תוצר ב- real-time PCR: 1. שימוש בצבען פלואורסנטי כדוגמת סייבר גרין הנקשר בהעדפה לדנ"א דו גדילי תוך כדי יצירת תוצרי הראקציה. עוצמת הפלואורסנציה מעל הרקע משמשת למדידת רמת הדנ"א. 2. באמצעות היברידיזציה עם גלאים ספציפיים מסנתזים גלאים קצרים שהם ספציפיים לדנ"א שעובר הגברה. לגלאי מחוברת מולקולת צבע התחלים הספציפיים מסנתזים גלאים קצרים שהם ספציפיים לדנ"א שעובר הגברה. לגלאי מחוברת מולקולת צבע פלואורסנטית וכן מולקולה נוספת הקולטת את הפלואורסנציה כאשר היא נמצאת בקרבת מולקולת הצבע. בזמן הסינתזה ע"י ה- Taq פולימראז מולקולת הגלאי מתפרקת ואז המולקולה הפלואורסנטית משתחררת ועקב כך יש עליה בפלואורסנציה. השיטה יותר ספציפית בגלל הגלאי אך יקרה יותר. דוגמאות לשימוש בשיטה זו הן גילוי קלויבקטר משיגנזה בצמחי עגבנייה (Ramachandran et al., 2021), או גילוי בו זמנית של מספר חיידקים בצמחי עגבנייה (Penezova et al., 2020).

התוצאות בשיטת Real-time PCR נקבעות על פי מספר מחזורי ה- PCR לקבלת רמת פלואורסנציה מעבר לרמת הרקע, כאשר הסף נקבע מעט מעל הרקע. מספר המחזורים בהם הפלואורסנציה עולה על הסף נקרא Ct (threshold cycle). מתקבלות עקומות של הגברה בהן ניתן לראות את השלב בו מתקבל התוצר. ככל שיש יותר תוצר נקבל את התוצאה לאחר מספר מחזורים קטן יותר. צריך לעשות סדרת מיהולים של הדנ"א לקבלת עקומת כיוול סטנדרטית על מנת לחשב את רמת הדנ"א באופן אבסולוטי ולא יחסי.

אפשר לראות את התוצאות גם בעקומות דיסוציאציה (עקומות של פירוק הגדילים) כאשר משתמשים בסייבר גרין. אם התוצרים מתקבלים באותה טמפרטורה ולא משנה הכמות זה מעיד על כך שזהו אותו תוצר. יש לכך חשיבות בשיטת הסייבר מכיוון שגם כאשר נוצר תוצר לא ספציפי תתקבל קריאה. אך כאשר עושים את עקומת הדיסוציאציה אפשר לדעת אם התוצר ספציפי. יתרונות השיטה הן כמותיות בעזרת עקומות כיוול, ספציפיות בעיקר עם הגלאי, ובסייבר גרין עם טמפרטורת הדיסוציאציה. השיטה רגישה ומהירה. החסרונות, עלות ומיומנות גבוהה של העובדים המבצעים את הבדיקה.

שיטה להגברה של דנ"א שלא באמצעות PCR. השיטה נקראת LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) ובה הראקציה נעשית במבחנה אחת בטמפרטורה קבועה אחת ואינה דורשת מכשיר כמו ב- PCR. רצף המטרה מוגבר בטמפרטורה קבועה כמו 60-65 מ"צ עם 2-3 סטים של תחלים ופולימראז מיוחד. לרוב משתמשים בארבעה תחלים שונים לזיהוי אזורים שונים בדנ"א המטרה דבר המוסיף לספציפיות. בגלל הטמפרטורה היחסית גבוהה אין צורך לעשות דנטורציה של הדנ"א. זיהוי התוצרים נעשה בצורה פוטומטרית ע"י עליה בעכירות או באמצעות הוספה של סייבר גרין. לשיטה פוטנציאל לשימוש בשדה בגלל פשטותה ועלותה הנמוכה. בשל הספציפיות של התחלים הגברת הדנ"א גבוהה מזו של ה- PCR. השיטה גם פחות רגישה למעכבים לעומת PCR בגלל שימוש בפולימראזות הרגישות פחות מה- Taq (Notomi et al., 2000).

יתרונות השיטה הן בכך שהגברת הדנ"א נעשית בטמפרטורה קבועה וביעילות גבוהה. אין צורך בדנטורציה של הדנ"א. ספציפיות גבוהה בגלל השימוש ב- 4 תחלים המכירים 6 אזורים שונים בדנ"א המטרה. השיטה מהירה,

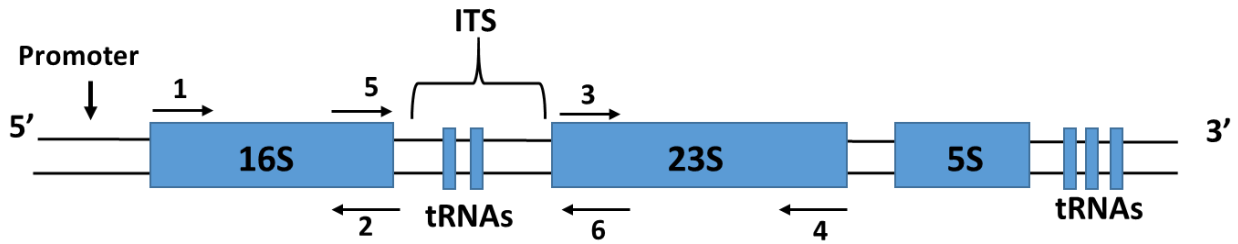
אינה יקרה ואינה דורשת ציוד מיוחד. היתרון העיקרי שלה היא האפשרות של יישום בשדה. מגבלות השיטה: שימושית בעיקר לאבחון אך אינה יעילה לשיבוט או שימושים מולקולריים אחרים. בחירת התחלים מסובכת יותר ולכן קשה יותר לבחור את דנ"א המטרה (ישנן תוכנות לבחירת התחלים). בדיקה בו זמנית של מספר פתוגנים פחות אפשרית בגלל הסיכוי ליצירת דימרים בין התחלים השונים. מכיוון שהתוצר הוא קונקטמר קשה לראותו כפס אחד בג'ל. דוגמאות לשימוש בשיטה זו אפשר למצוא בחיידק ארוויניה אמילובורה (Buhlmann et al., 2013) ובקלויבקטר משיגנזה בזרעי ובצמחי עגבנייה (Yasuhara-Bell et al., 2015).

3.4. ריצוף גנים או גנומים שלמים.

אנליזה באמצעות Ribosomal DNA-based PCR. אנליזה באמצעות הגברה של דנ"א המקודד לרנ"א ריבוזומלי. השיטה מתאימה לזיהוי פתוגנים ברמת מין ותת מין וכן לאפיון אוכלוסיות. בריבוזום של פרוקריוטים תת היחידה הגדולה 50S מורכבת מרנ"א 23S ו- 5S עם 34 חלבונים, תת היחידה הקטנה 30S מורכבת מ- 16S עם 21 חלבונים. האופרון של rDNA בפרוקריוטים כולל 3 גנים שהם פונקציונליים ושומרים מבחינה אבולוציונית. היחידה הקטנה 16S, היחידה הגדולה 23S והגן 5S (איור 5). בין הגנים יש אזור וריאבילי שעובר שיעתוק (intergenic transcribed spacer) ITS.

יש אסטרטגיות רבות המבוססות על רנ"א ריבוזומלי. תחלים לאזורים השמורים מכונים universal primers (תחלים אוניברסאליים) והם משמשים להגברה של מקטעי הגנים מטווח רחב ושונה פילוגנטית של חיידקים. ניתן להשתמש בתחלים 1 ו- 2 להגברה של אזור ה- 16S (מבוסס על העובדה כי בחיידקים הגן 16S שמור ביותר עם שינויים קטנים) או תחלים 3 ו- 4 להגברה של אזור ה- 23S (איור 5). את הרצפים אפשר להשוות לבנק הגנים, שבו מצויים כבר רצפים רבים מאורגניזמים שונים, ולזהות את הפתוגן ברמת המין. אפשר להשתמש בגנים לרנ"א ריבוזומלי לגילוי רגיש של פתוגנים אך רמת ההפרדה היא של מין/סוג. מאגר הרצפים גדל כל הזמן ולכן אנליזה של רצפי הגנים של דנ"א המקודד לרנ"א ריבוזומלי הופכת להיות יותר ויותר שימושית לזיהוי פתוגנים חדשים או בלתי ידועים ומיקרואורגניזמים הקשורים לצמחים שאינם ניתנים לזיהוי בדרכים שגרתיות במעבדה.

האופי האוניברסלי של תחלים אלו מאפשר להשתמש בהם לשיטות אחרות המבוססות על PCR המאפשרות ספציפיות גדולה יותר כמו ITS-PCR (Internally transcribed spacer). בשיטה זו משתמשים בתחלים שמורים על בסיס הגנים הריבוזומליים 16S ו- 23S להגברה של אזור ה- ITS (תחלים 5 ו- 6, איור 5). אזור זה בין שני הגנים יכול לכלול מספר גנים ל- tRNA ואזור שלא מקודד הנמצא תחת לחץ סלקציה מופחת ולכן יותר וריאבילי מזה של הגנים ל- 16S או 23S. כאן הזיהוי מתבסס על מספר ואורך תוצרי ה- PCR. אפשר להגביר את הספציפיות ע"י חיתוך באנזימי רסטרקציה של תוצר ה- ITS-PCR, או ע"י אנליזה של רצף אזור זה. הגישה הכללית שבה נוהגים לרוב היא, בשלב ראשון משתמשים בתחלים אוניברסליים לגנים 16S ו- 23S להגברה של אזור ה- ITS של הפתוגן ותבדידים קרובים לו ואח"כ תכנון תחלים ספציפיים על בסיס אנליזה השוואתית של רצף הדנ"א ונוכחות רצפים לא הומולוגיים.



איור 5. האופרון של דנ"א המקודד לרנ"א ריבוזומלי בפרוקריוטים. החיצים מציינים תחלים אוניברסליים.

אנליזה באמצעות ריצוף גנים שמורים

לזיהוי חיידקים ואפיון אוכלוסיות משתמשים בריצוף גנים לתחזוקה של התא (housekeeping genes) והשוואת הרצפים לאלו הנמצאים בבנק הגנים. כך לדוגמא, ריצוף הגן *gapA* (Cigna et al., 2017) אפשר להגדיר את החיידק *Pectobacterium brasiliense* התוקף תפוז"א, גם בעשב הבר חלמית, שהינו נפוץ בשדות תפוז"א בארץ (Tsrer et al., 2019). בנוסף, ריצוף גן זה אפשר לגלות לראשונה בישראל את המין *P. parmentieri* בשנת 2020 (Tsrer et al., 2020). לאבחון חיידקי סטרפטומיצטים בקרקע ובפקעות תפוז"א משתמשים לעיתים בגן *atpD* כפי שתואר ע"י Correa et al. (2015). שימוש בריצוף מספר גנים שמורים לאפיון אוכלוסיות פתוגנים יתואר בסעיף 5 בהמשך.

אנליזה באמצעות ריצוף גנומים שלמים

שיטות ריצוף הדנ"א התפתחו עם השנים והתהליך מסוכם יפה במאמר בעיתון Nature על 40 שנים לריצוף דנ"א (Shendure et al., 2017). הדור הראשון פותח ע"י סגור ב-1975, הדור השני פותח ב-2005 כאשר בשיטה זו נעשה ריצוף בו זמנית של מספר מולקולות גדול. לשיטות מהדור השני קוראים next generation sequencing (NGS). כיום משתמשים בעיקר בפלטפורמה של חברת אילומינה. ב-2015 פותחו שיטות ריצוף חדשות מהדור השלישי. הריצוף בשיטות אלו נעשה על מולקולה בודדת בזמן אמת. יש שתי חברות הפועלות בדרך זו אך באופן שונה, PacBio וחברת Oxford Nanopore Technologies. נתאר את השיטה של ננופור שבה הריצוף נעשה ע"י מעבר מולקולת הדנ"א דרך חור (nanopore) במכשיר הריצוף. מעבר המולקולה מייצר שינויים בזרם חשמלי הספציפיים לכל בסיס. המעבר של מולקולת הדנ"א מהיר אך מספיק לקריאת השינויים בזרם החשמלי; ניתן לקרוא 450 בסיסים לשניה בננופור אחד וניתן להגיע ל-10 Gb בהרצה אחת. המכשיר קטן מאוד (ניתן להחזקה בכף יד), נייד ומתחבר ב-USB למחשב לעומת המכשיר הגדול של חברת PacBio. שיטת הננופור מאפשרת ריצוף של מקטעי דנ"א ארוכים, ניתנת לביצוע במעבדה והיא זולה באופן יחסי. גם הניתוח הביואינפורמטי הראשוני פשוט יחסית מכיוון שהחברה מספקת מספר תוכנות לאנליזה של הרצפים ולביצוע *de novo assembly*.

זיהוי פתוגנים בצמחים בהם סימני המחלה לא ברורים ואינם מצביעים בברור על גורם מחלה ידוע יכול להיות בעייתי מכיוון שהצמחים החולים נשלחים למעבדות שונות לבדיקת נוכחות גורמי מחלה אפשריים (נגיפים, פטריות

וחיידקים) אולם למרות זאת לא תמיד מתקבלת תשובה לגבי גורם המחלה. ריצוף כלל הדנ"א מהצמח החולה בשיטת הננופור יכול לעזור במקרה זה. דוגמא לכך מתוארת במאמר (Chalupowicz et al., 2019) שבו הראנו כי ריצוף של כלל הדנ"א מצמחים נגועים בהם גורם המחלה לא היה ידוע אפשר להצביע על גורם אפשרי. לשיטת ריצוף זו יתרון בכך שבבדיקה אחת ניתן לגלות את גורמי המחלה כולל פתוגנים לא ידועים בארץ או כאלה שלא ניתנים לריבוי על מצעי מזון. השיטה יכולה לתת כיוון לחיפוש גורם מחלה אפשרי שביחד עם שיטות אחרות ניתן לאימות ביתר קלות. בשיטת הננופור אפשר היה לרצף במהירות את הגנום של חיידקי אצידוורקס שבודדו מסולניים ולהראות שהם דומים לאלו שתוקפים אבטיח (Chalupowicz et al., 2020).

5. שיטות לקביעת השונות באוכלוסיית הפתוגן

השיטות לקביעת השונות (Diversity assessment) מתאימות לקלסיפיקציה ואפיון טיפוסים שונים באוכלוסיית הפתוגן. הן מאפשרות ללמוד על הדינמיקה של אוכלוסיות הפתוגן ובכך לספק דרכים לפתרון מעשי של מחלות צמחים. באמצעות שיטות אלה אפשר גם לקבל מקטעים ספציפיים לפתוגן למטרות של זיהוי וגילוי. לצורך כך משתמשים ב-DNA fingerprinting – הצגה של קובץ מקטעי דנ"א מדוגמת דנ"א ספציפית, מעין טביעת אצבעות או ברקוד של מוצרים שונים. מרבית השיטות מבוססות על PCR אך ישנן שיטות כמו PFGE ו-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) המבוססות על חיתוך הדנ"א.

1.5. שיטת ה-PFGE. בשיטה זו הדנ"א של כלל הגנום נחתך באמצעות אנזימי רסטריקציה נדירים. מתקבלות מולקולות מאוד גדולות של דנ"א ולכן ההפרדה נעשית בשדה חשמלי משתנה. שלא כמו באלקטרופורזה רגילה, שבה ניתן להפריד על ג'לים של אגרוז מולקולות מ-100 בסיסים ועד 50 kb, מולקולות גדולות מ-50 kb ואף מעל 10 mb אפשר להפריד בשדה חשמלי משתנה. בחיידקים לא מפיקים את הדנ"א מכיוון שהוא נשבר אלא משתמשים בתאים שלמים וחיתוך הדנ"א נעשה ישירות בג'ל האגרוז. הרצת הדנ"א נעשית במכשיר מיוחד שבו מספר אלקטרודות המפוזרות מסביב לתא ההרצה. המכשיר מייצר שדות חשמליים משתנים בין כל זוג של אלקטרודות, כתוצאה מכך מולקולות הדנ"א הגדולות נעות במהירויות שונות דרך החללים שבג'ל האגרוז. את התוצאות ניתן להציג בדנדרוגרמות (עץ פילוגנטי). דוגמא לשימוש בשיטה זו לאפיון שונות האוכלוסייה אפשר למצוא בחיידק קלויבקטר משיגנזה (Kleitman et al., 2008) או דיקאה סולני (Van der Wolf et al., 2014).

2.5. שיטות המבוססות על PCR, כמו rep-PCR (repetitive DNA PCR-based genomic fingerprinting), האנליזה מבוססת על הימצאות רצפים חוזרניים ספציפיים בגנום. בחיידקים מצאו רצפים חוזרניים המכונים REP (repetitive extragenic palindromic sequences), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences), BOX-elements (Louws et al., 1998). כיום משתמשים במושג זה לגבי כל הרצפים החוזרניים גם בפטריות. השיטה מבוססת על תכנון תחלים כך שיתנו הגברה של קטעי דנ"א בין שני רצפים חוזרניים. התחלים הם אוניברסליים ונותנים הגברה של קטעי דנ"א בגדלים שונים. כך אפשר לקבל מערך של 10-

30 קטעי דנ"א לגנום בגדלים שבין 200 בסיסים ל- 6 kb. משתמשים בשיטה זו לזיהוי פתוגנים, להבחנה בין תבדידים שונים ולהערכת השונות הגנטית של פתוגנים לצמחים. יש תחלים מתאימים לחיידקים גרם שליליים או לגרם חיוביים. דוגמאות לכך אפשר למצוא באפיון אוכלוסיית החיידק קלויבקטר משיגנזה (Kleitman et al., 2008).

בשיטה אחרת המכונה RAPD (random amplified polymorphic DNA) משתמשים בתחלים שהם אוליגונוקלאוטידים קצרים (לרוב 10 בסיסים) בעלי רצפים אקראיים בתנאים המקלים על ראקציית ה-PCR (לרוב 35-40 מ"צ, ריכוז מלח גבוה, ריכוז DMSO נמוך). התחלים הקצרים מתחברים לדנ"א המטרה באתרים שהם חלקית או באופן מלא משלימים לרצף ולכן הראקציה נעשית בטמפרטורה נמוכה. באופן כזה מתקבלים תוצרי PCR בגדלים שונים המופרדים בג'ל של אגרוז. השיטה לא מחייבת ידע על רצף הדנ"א של המטרה, אך דורשת סריקה של מספר תחלים אקראיים כדי לקבל טביעת אצבעות רצויה. כך לדוגמה הראנו בחיידק קסנטומונס פלרגוני כי שימוש בשיטה זו הצביע על אחדות האוכלוסייה ולכן ניתן היה לבודד קטע דנ"א ייחודי ולהשתמש בו לאבחון (Manulis et al., 1994). היתרונות של השיטה הן כמויות קטנות של דנ"א, אין צורך בידע מוקדם על רצף התחלים ודנ"א המטרה, השיטה קלה וזולה, מאפשרת לקבל כמה תוצרים בראקציה אחת, רנדומלית בגנום וניתנת לאוטומטיזציה. אם נמצא קטע שהוא ספציפי לקבוצה חיידקים מסוימת אפשר לעשות שיבוט, ריצוף ומזה לסנתז תחלים שהם ספציפיים לפתוגן למטרות של גילוי וזיהוי.

החסרונות של השיטה הן הצורך בדנ"א נקי וגבה מולקולרי, חשש מזיהומים מפני שהתחלים לא ספציפיים ויכולים להגביר מקטעים באורגניזמים מזהמים שונים, וכן הצורך בתנאי סטנדרטיזציה מחמירים בגלל רגישות הראקציה. כמו כן מקטעים בגדלים דומים לא בהכרח אחידים.

שיטה אחרת המכונה AFLP (amplified fragment length polymorphism) מזכירה את שיטת ה-RFLP בהבדל שאת התוצרים שעברו חיתוך מזהים ב-PCR ולא בהיברידיזציה דרומית (Savelkoul et al., 1999). הגדלים של מולקולות הדנ"א המתקבלות הם בד"כ עד 600 בסיסים והפרדת הדוגמאות נעשית לרוב בג'לים של אקריל אמיד. השיטה מראה נוכחות או העדר של מקטעי רסטריקציה ולא הבדל באורך והיא מתאימה לכל דנ"א בלי קשר למקור או לגודל. השיטה דורשת קצת יותר עבודה משתי השיטות האחרות. צריך לבודד דנ"א ברמת ניקיון גבוהה, חיתוך, ליגציה וסימון פלורוסנטי או סימון רדיואקטיבי. לדוגמה אפיון אוכלוסיית החיידק ארוויניה אמילורה (Rico et al., 2004).

שלושת השיטות ל- genomic fingerprinting שתוארו לעיל מתאימות להערכת השונות בפתוגנים שונים. Rep-PCR ו-AFLP מתאימות גם לקלסיפיקציה של פתוגנים לרמת המין, בעוד שה-RAPD מתאימה לכך פחות. לרוב, אוכלוסיות של פתוגנים מאפיינים ביותר משיטה אחת לצורך אנליזה השוואתית, מכיוון שלעיתים בשיטה אחת לא מוצאים פולימורפיזם ואילו בשיטה שניה כן.

3.5. שיטות המבוססות על ריצוף גנים. אחת מהשיטות שתוארו כבר לעיל מבוססת על ריצוף גנים לדנ"א ריבוזומלי. שיטה אחרת נקראת MLST (Multi Locus Sequence Typing) או MLSA (Multi Locus Sequence Analysis). השיטה מבוססת על ריצוף גנים לתחזוקה של התא והשוואת הרצפים. גנים לתחזוקה מתבטאים כל הזמן ודרושים לפעילויות בסיסיות של התא כמו סינתזת דנ"א, נשימה, סינתזת חלבונים וכו'. בשיטה זו בוחרים בין 8-10 גנים לתחזוקה, מבצעים את ראיית ה-PCR ולאחר מכן מרצפים את התוצרים (בד"כ קטעים בין 400-500 בסיסים) ומשווים ביניהם. צריך לשם כך מאגר נתונים של הרצפים השונים. בחירת הגנים לתחזוקה שונה בין מינים שונים.

ההבדל בין MLST ל-MLSA הוא באנליזה של התוצאות. ב-MLST כל רצף נחשב כאלל ואם רצף זהה זה נחשב לאותו טיפוס. ב-MLSA מסתכלים על כל הרצף וכל השינויים ברצף נלקחים בחשבון. ב-MLST משתמשים לרוב בתבדידים השייכים למינים המוגדרים היטב ואילו ב-MLSA משתמשים למינים בהם הגבולות לא מוגדרים היטב. לדוגמא, אפיון תבדידי *Dickeya solani* מתפוחי אדמה נעשה לאחר ריצוף הגנים לתחזוקה *dnaX*, *dnaN*, *Van der Wolf et al.*, (2014). *fusA*, *gapA*, *gyrA*, *purA*, *rplB*, *rpoS*, *recA* והשוואת הרצפים בין התבדידים השונים.

יתרונות השיטה הן שהתוצאות הינן חד משמעיות, הדירות וניתנות לאנליזה דרך מאגרי מידע באינטרנט. החסרונות הן בכך שמכיוון ומשתמשים בגנים לתחזוקה ואלו שמורים, לא תמיד ניתן למצוא מספיק הבדלים בין הגנים של התבדידים השונים. לפעמים חשובים הבדלים ברמת הוירולנטיות של התבדידים ואלו לא נלקחים כאן בחשבון. למרות זאת זוהי שיטה חשובה שיש לה שימושים רבים באפידמיולוגיה של מחלות בעיקר אנימליות וכעת גם בצמחים.

6. שיטות אבחון חדשות וכאלה המבוססות על תגובת הצמח החולה.

שיטות חדשות לאבחון פתוגנים מתפתחות כל הזמן על בסיס עקרונות השונים מאלו שתוארו לעיל או שילוב ביניהם. כך לדוגמא באמצעות Infrared Spectroscopy אפשר להבחין בין מינים שונים של פקטובקטריום ודיקאה התוקפים תפוחי אדמה (Abu-Aqil et al., 2020). שילוב של שיטות מולקולריות ואימונולוגיות בננוטכנולוגיה מאפשר פיתוח של מכשירים זעירים וניידים לגילוי פתוגנים ישירות בשדה. נושא זה מתאפשר בעקבות פיתוח ננו חלקיקים אליהם אפשר לקשור באופן קוולנטי מולקולות ביולוגיות שונות כמו חלבונים או חומצות גרעין. שטח מחקר זה עדיין בשלבים ראשונים של פיתוח והוא מסוכם במאמר סקירה (Kashyap et al., 2015).

בנוסף לשיטות האבחון הישירות המבוססות על גילוי וזיהוי הפתוגן, מפותחות שיטות עקיפות המתבססות על תגובת הצמח החולה. צמחים מפרישים תרכובות אורגניות נדיפות לסביבה לצרכים שונים כמו במהלך גידול, הגנה והישרדות. מולקולות אלו המופרשות מפני העלים יכולות להצביע על המצב הפיזיולוגי של הצמח מבלי שעצם הבדיקה תפגע בו. בעזרת GC-MS אפשר ללמוד את הפרופיל של מולקולות אלו. כך לדוגמא הוצע אף אלקטרוני (e-nose) למדידת פרופיל של החומרים המופרשים, אך עדיין יש בעיה בניתוח הנתונים (Martinelli et al., 2015).

(2015). פרמטרים אחרים שנבדקים הם שינויי טמפרטורה של העלווה ופני השטח של הצמח, שינויי פלואורסנציה, שינויים ספקטרליים, שינויים בקצב הטרנספירציה של הצמח החולה לעומת הבריא ועוד (Fang and Ramasamy, 2015).

השיטות החדשות המתבססות על סנסורים וביוסנסורים לחישה מרחוק של הצמח החולה מספקות דרכים נוספות להתמודדות עם מחלות צמחים בשדה עוד לפני הופעת הסימפטומים, מאפשרות ללמוד על התפתחות המחלה בזמן ובמרחב ומקלות על ההחלטות האם ובאיזה אמצעים לנקוט להדברת המחלה (Oerke, 2020).

סיכום

בפרק זה הצגנו שיטות שונות לאבחון חיידקים ופתוגנים של צמחים באופן כללי. מהפכה בתחום חלה עם פיתוח השיטות הסרולוגיות והמולקולריות, בעיקר PCR, שאפשרו לזהות ולגלות את הפתוגנים בצמחים תוך ביצוע מספר רב של בדיקות בו זמנית ובעלויות לא גבוהות. יחד עם זאת יש לזכור שלכל השיטות יש יתרונות וחסרונות והן אינן ניתנות תשובה מספקת בכל המקרים, ולכן צריך לבחור את השיטות המתאימות בהתאם לצורך הספציפי. אם לדוגמה רוצים לנטר גורם מחלה מסוים בסביבה ויש דרך מולקולרית או סרולוגית עדיף להשתמש בהן. לעומת זאת במקרים שלא ידוע מהו הגורם (כמו פתוגן המאלח פונדקאי חדש או פתוגן לא מוגדר) אפשר לבצע ריצוף כללי ואח"כ לאמת את התוצאות בשיטות אחרות. לאבחון בשדה אצל המגדל אפשר להשתמש בשיטות סרולוגיות כמו סטריפים עם נוגדנים או שיטות מולקולריות שלא באמצעות PCR. אך יש לזכור כי לרוב רגישות השיטות הללו נמוכה ולכן הן מתאימות רק לצמחים המראים סימני מחלה בהם ריכוז הפתוגן גבוה. פיתוח שיטות אבחון חדשות המתאימות לבניית סנסורים או ביוסנסורים לחישה מרחוק והמבוססות על תגובת הצמח שהתחיל לפני מספר שנים, ימשיך לדעתנו גם בעתיד ויספק דרכים נוספות לאבחון גורמי מחלות בצמחים.

מקורות

Abu-Aqil G., Tsrer L., Shufan E., et al., (2020) Differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. phytopathogens using infrared spectroscopy and machine learning analysis. Journal of Biophotonics 13: e201960156.

Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W. and Geider K. (1992) Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology 58: 3522-3526.

Bühlmann A., Pothier J.F., Rezzonico F., et al., (2013) *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. Journal of Microbiological Methods 92: 332-339.

- Bull C. T. and Koike S. T. (2015) Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 53: 157-180.
- Chalupowicz L., Dombrovsky A., Gaba V., *et al.*, (2019) Diagnosis of plant diseases using the Nanopore sequencing platform. *Plant Pathology* 68: 229-238.
- Chalupowicz L., Reuven M., Dror O., Sela N., Burdman S. and Manulis-Sasson S. (2020) Characterization of *Acidovorax citrulli* strains isolated from solanaceous plants. *Plant Pathology* 69:1787-1797.
- Charlarmroj R., Himananto O., Seepiban C., *et al.*, (2013) Multiplex detection of plant pathogens using a microsphere immunoassay technology. *PloS ONE* 8: e62344.
- Corrêa D. B. A., Salomão D., Rodrigues-Neto J., Harakava R. and Destéfano S.A.L. (2015) Application of PCR-RFLP technique to species identification and phylogenetic analysis of *Streptomyces* associated with potato scab in Brazil based on partial *atpD* gene sequences. *European Journal of Plant Pathology* 142: 1-12.
- Fang Y. and Ramasamy R. P. (2015) Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* 5: 537-561.
- Haas J. H., Moore L.W., Ream W. and Manulis S. (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied Environmental Microbiology* 61: 2879-2884.
- Kado C. I. (2010) *Plant Bacteriology*, American Phytopathological Society.
- Kashyap P. L., Kumar S. and Srivastava A. K. (2017) Nanodiagnosics for plant pathogens. *Environmental Chemistry Letters* 15: 7-13.
- Kleitman F., Barash I., Burger A., *et al.*, (2008) Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology* 121: 463-475.
- Louws F. J., Bell J., Medina-Mora C. M., *et al.*, (1998) rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 88: 862-868.
- Louws F. J., Rademaker J. and De Bruijn F. (1999) The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37: 81-125.

- Manulis S., Valinsky L., Lichter A. and Gabriel D. (1994) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4094-4099.
- Manulis S., Kogan N., Valinsky L., Dror O. and Kleitman F. (1998) Detection of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* in gypsophila plants by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 104: 85-91.
- Martinelli F., Scalenghe R., Davino S., *et al.*, (2015) Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 1-25.
- Nassar A., Darrasse A., Lemattre M., *et al.*, (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2228-2235.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., *et al.*, (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28: e63.
- Oerke E.-C. (2020) Remote sensing of diseases. *Annual review of phytopathology* 58: 225-252.
- Peňázová E., Dvořák M., Ragasová L., *et al.*, (2020) Multiplex real-time PCR for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and pathogenic *Xanthomonas* species on tomato plants. *PLoS ONE* 15(1): e0227559.
- Qu X., Wanner L. A. and Christ B. J. (2008) Using the TxtAB operon to quantify pathogenic *Streptomyces* in potato tubers and soil. *Phytopathology* 98: 405-412.
- Ramachandran S., Dobhal S., Alvarez A. M. and Arif M. (2021) Improved multiplex TaqMan qPCR assay with universal internal control offers reliable and accurate detection of *Clavibacter michiganensis*. *Journal of Applied Microbiology* doi:10.1111/JAM.15017
- Rico A., Ortiz-Barredo A., Ritter E. and Murillo J. (2004) Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology* 96: 302-310.
- Savelkoul P., Aarts H., De Haas J., *et al.*, (1999) Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3083-3091.

- Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. eds. (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press. The third edition is available at 2021.
- Shendure J., Balasubramanian S., Church G. M., *et al.*, (2017) DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* 550: 345-353.
- Tsrer (Lahkim) L., Lebiush S., Erlich O., Galilov I., Chalupowicz L., Reuven M., Dror O. and Manulis-Sasson S. (2019) First report of latent infection of *Malva nicaeensis* caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Israel. *New Disease Reports* 39: 4.
- Tsrer (Lahkim) L., Erlich O., Lebiush S., Galilov I., Hazanovsky M., Chalupowicz L., Reuven M., Dror O. and Manulis-Sasson S. (2020) First report of *Pectobacterium parmentieri*, one of the causal agents of potato blackleg and tuber soft Rot diseases, in Israel. *Plant disease* 104: 2288.
- Van Der Vlugt R. A., Van Raaij H., De Weerd M. and Bergervoet J. H. (2015) Multiplex detection of plant pathogens through the luminex magplex bead system. In *Plant Pathology*. Springer, pp. 283-299 .
- Van Der Wolf J. M., Nijhuis E. H., Kowalewska M. J., *et al.*, (2014) *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 768-774.
- Yasuhara-Bell J., Baysal-Gurel F., Miller S. A. and Alvarez A. M. (2015) Utility of a loop-mediated amplification assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in seeds and plant tissues. *Canadian journal of plant pathology* 37: 260-266.
- Wayne L., Brenner D., Colwell R., *et al.*, (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37: 463-464.