

דו"ח לתוכנית מחקר מספר 132-1739-15 (132-1893-16)

שנת המחקר השלישית מתוך שלוש שנים

**מיזם חוס"ן בוטריוספריה: חקר הגורמים הפתוגנים המעורבים ופיתוח
שיטות למניעת הנזק באבוקדו ונשירים**

Studying the spatial and temporal dynamics of pests in agricultural areas

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות ופיתוח הכפר ולמועצת הצמחים

ע"י

דני שטיינברג מחלקה לפתולוגיה של צמחים, מינהל המחקר החקלאי, ראשון לציון
סטנלי פרימן מחלקה לפתולוגיה של צמחים, מינהל המחקר החקלאי, ראשון לציון
דוד עזרא מחלקה לפתולוגיה של צמחים, מינהל המחקר החקלאי, ראשון לציון
עומר פרנקל מחלקה לפתולוגיה של צמחים, מינהל המחקר החקלאי, ראשון לציון
אלי סימנסקי חברת נבטים, מושב כרמל

D. Shtienberg, Dept. of Plant Pathology, ARO, Reshon LeZion; danish@volcani.agri.gov.il

S. Freeman, Dept. of Plant Pathology, ARO, Reshon LeZion;

freeman@volcani.agri.gov.il

D. Ezra, Dept. of Plant Pathology, ARO, Reshon LeZion; dezra@volcani.agri.gov.il

O. Frenkel, Dept. of Plant Pathology, ARO, Reshon LeZion; omerf@volcani.agri.gov.il

E. Simanski, Nevatim, Moshav Carmel; eli@nevateam.co.il

תקציר

הצגת הבעיה. בעיה קשה במיוחד נצפתה בנטיעות חדשות ובמיוחד של אבוקדו, אפרסק ונקטרינה. בשנים 2013 ו- 2013 דווח על תמותה בשיעור של כ- 30% משתילי האבוקדו במטעים צעירים (עד שנתיים מנטיעה), בהיקף ארצי. במקביל, דווח ממשתלות האבוקדו על תמותה בהיקף של כ- 20% משתילים במהלך הייצור, משלב ההרכבה ואילך. **מטרות המחקר.** 1. לאפיין את מקורות המידבק הראשוני העיקריים של פטריות מקבוצת הבוטריוספריה המנגעות עצי אבוקדו ונשירים; 2. לפתח גישות ליצור חומר ריבוי של אבוקדו ונשירים הנקי ממחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצת הבוטריוספריה; 3. לפתח גישות להתמודדות עם נגיעות בפטריות מקבוצת הבוטריוספריה בנטיעות חדשות של אבוקדו ונשירים ובעצים בוגרים המשמשים כעצי אם. **שיטות העבודה.** המחקר התבצע במעבדה (בכלים מולקולריים מתקדמים), בחממות ובתי רשת בהם גידלנו צמחים בעציצים ובניסויים שבצענו במטעים מסחריים בכל רחבי הארץ. **תוצאות עיקריות.** פיתחנו פרוטוקול, שכבר מיושם מסחרית, לטיפול בחומר ריבוי באבוקדו. יישום הפרוטוקול פתר את בעיית התמותה של שתילי אבוקדו צעירים. הצענו פרוטוקול לטיפול בחומר ריבוי של נשירים. הראינו שקיימת פגיעה משמעותית באברי צמח רפרודוקטיביים (פרחים ופירות – לפני ואחרי הקטיף) באבוקדו, נשירים ומנגו, ובחנו גישות להתמודדות עם הבעיה. **מסקנות והמלצות.** המפתח להתמודדות עם הנזק שגורמות פטריות הבוטריוספריה במשתלות של אבוקדו ונשירים ובנטיעות צעירות הוא שימוש בחומר ריבוי נקי. ניתן להתמודד עם התפתחות המחלה ועם הנזק שהיא גורמת במטעים המבוגרים. בניגוד לידוע בספרות, נבגי הפטריות מופצים אווירנית ביובש, דבר שיש לו השלכות מרחיקות לכת מבחינת האפידמיולוגיה של המחלה. הנזק הנגרם לעצי נשירים מבוגרים הוא תוצאה של קומפלקס פטריות – פטריות בוטריוספריה ופטריות רקב – המנגע את העצים. הגנה על העצים בפני חלק מהקומפלקס ימנע את הנזק. שימוש בתכשיר קנון מפחית את התמותה של השתילים הצעירים ומשפר את המצב התברואתי של עצים מבוגרים. התכשיר אינו פעיל כפונגיציד והוא אינו קוטל את הפטריות המעורבות. מצאנו שטיפול ב"קנון" באבוקדו משפיעל מנגנון "פרימינג" ועשוי ע"י כך להקנות הגנה מסוימת בעת הדבקה בבוטריוספריה.

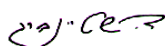
מעריכים מומלצים לבדיקת הדו"ח המדעי

- ❖ פרופ' שחל עבו, הפקולטה לחקלאות, רחובות
- ❖ דר' יובל כהן, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
- ❖ דר' ארנון דג, מינהל המחקר החקלאי, תחנת מחקר גילת

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים. הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים.

תאריך: 28 בפברואר, 2017

חתימת החוקר: 

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר

Ezra, D., Hershovich, M. and Shtienberg, D. 2017. The etiology of gummosis syndrome of deciduous fruit trees in Israel and its impact on tree productivity. Plant Disease 101: (accepted for publication)

עזרא ד., סימנסקי א., אנטמן ש., שולחני ר., בורנשטיין מ., גולני מ., הרשקוביץ מ., ליארזי א., שטיינברג ד. 2015. בוטריוספריה בנשירים: הגדרת הגורם הפתוגני והתפתחות המחלה בשתילים ובעצים. הועדה ה-36 של העמותה הישראלית לפיטופתולוגיה. בית דגן (תקציר).

שטיינברג, סימנסקי א., שולחני ר., בורנשטיין מ., גולני מ., לוי אוקון נ., שרון מ., ופרימן ס. 2015. התייבשות ותמותה של עצי אבוקדו צעירים: זיהוי הגורם הפתוגני ופיתוח גישות להתמודדות עם הבעיה. הועדה ה-36 של העמותה הישראלית לפיטופתולוגיה. בית דגן (תקציר).

תוכן העניינים

עמוד

4	מבוא
5	מטרות המחקר
5	עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר
15	דיון
18	פרסומים מדעיים
18	פטנטים
18	הרצאות וימי עיון
19	תוספת למיזמים
21	סיכום עם שאלות מנחות
23	נספח לדו"ח של שנת המיזם הראשונה

מבוא

בשנים האחרונות זוהו בעצי פרי ממינים שונים, בגפני מאכל ויין, בעצי נוי ובעצי יער תסמיני התייבשות של ענפים ובמקרים חמורים אף התמוטטות ותמותה של עצים. התסמינים נצפו במטעים, כרמים, חורשות ועצי נוי בכל רחבי הארץ מהנגב בדרום ועד עמק החולה ורמת הגולן בצפון. בעיה קשה במיוחד נצפתה בנטיעות חדשות ובמיוחד של אבוקדו, אפרסק ונקטרינה. בשנים 2013 ו- 2013 דווח על תמותה בשיעור של כ- 30% משתילי האבוקדו במטעים צעירים (עד שנתיים מנטיעה), בהיקף ארצי. במקביל, דווח ממשתלות האבוקדו על תמותה בהיקף של כ- 20% משתילים במהלך הייצור, משלב ההרכבה ואילך. מדובר במאות אלפי שתילים. גם ממטעים צעירים של נשירים דווח על תמותה, אך בהיקף מצומצם יותר. מרקמות צמחיות סימפטומטיות בודדו ברוב המקרים פטריות המשתייכות לקבוצת ה- *Botryosphaeria*. הזיהוי אומת בשיטות מולקולאריות. הדיווחים בספרות המקצועית הקשורים למחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצה זו מتركזים, רובם ככולם, בתיאור התסמינים והפטריות המעורבות. מעטים הפרסומים בהם דווח על דרכים למנוע את התפתחות המחלות או ניסיונות להדביר את הגורם לאחר שתסמיני המחלה כבר הופיעו. הנחת המוצא העיקרית במחקרים שפורסמו היא שמקור המידבק הוא מקומי (בעצים או בגפנים הגדלים במטע, בכרם או ביער), שנבגי גורם המחלה מופצים מענפים נגועים לסביבתם הקרובה במהלך אירועי גשם וחודרים לרקמות הצמחיות דרך פצעים הנגרמים במהלך הגיזום. לכן מאמצי ההדברה מוכוונים לסניטציה של איברים צמחיים סימפטומטיים ולהגנה על פצעי הגיזום באמצעות תכשירי הדברה. בשנתיים האחרונות בצענו תצפיות, בדיקות וניסויים במטעים בוגרים, במטעים בהם היו נטיעות חדשות, במשתלות בהן מייצרים שתילי אבוקדו, נשירים וגפן יין ובמטעים בהם גדלים עצי אם. התובנות שעלו מתצפיות והניסויים, יחד עם מידע שנרכש אודות הביולוגיה והאפידמיולוגיה של גורמי המחלה המשתייכים למין בוטריוספריה, הביאו אותנו להעלות את היפותזות העבודה הבאות: א. מקור המידבק העיקרי של הפטריות הגורמות לתסמינים המתפתחים ממרכז העץ לכיוון השוליים בנטיעות החדשות ובמטעי הנשירים המבוגרים הוא משתילים שנרכשו מהמשתלות כשהם היו כבר מאוכלסים בגורם המחלה; מקור המידבק במשתלות הוא מחומר ריבוי נגוע שנלקח מעצי אם מאולחים. ב. מקור המידבק העיקרי של הפטריות הגורמות לתסמינים המתפתחים משולי העץ לכיוון המרכז הוא מהפצה משנית מקומית; מקור המידבק הוא מעצי פרי ו/או עצי יער נגועים הגדלים בסמוך. לאחר שבצענו מחקרים מקדימים בנושא, החל בראשית 2014 מיזם שכונה "מיזם חוס"ן בוטריוספריה" במימון קרן המחקרים של המדען הראשי של משרד החקלאות ומועצת הצמחים. דו"ח זה מסכם את המחקרים שבוצעו במסגרת המיזם בשנתו השנייה.

מטרות המחקר

בהסתמך על היפותזות העבודה שתוארו קבעה ועדת ההיגוי של המיזם את היעד שלו, כלהלן: "פיתוח גישות ליצור חומר ריבוי נקי ממחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצת הבוטריוספריה באבוקדו ונשירים ולהתמודדות עם נגיעות קיימת בנטיעות חדשות". המטרות הספציפיות, כפי שהוגדרו על ידי הוועדה המקצועית של המיזם, הם כלהלן:

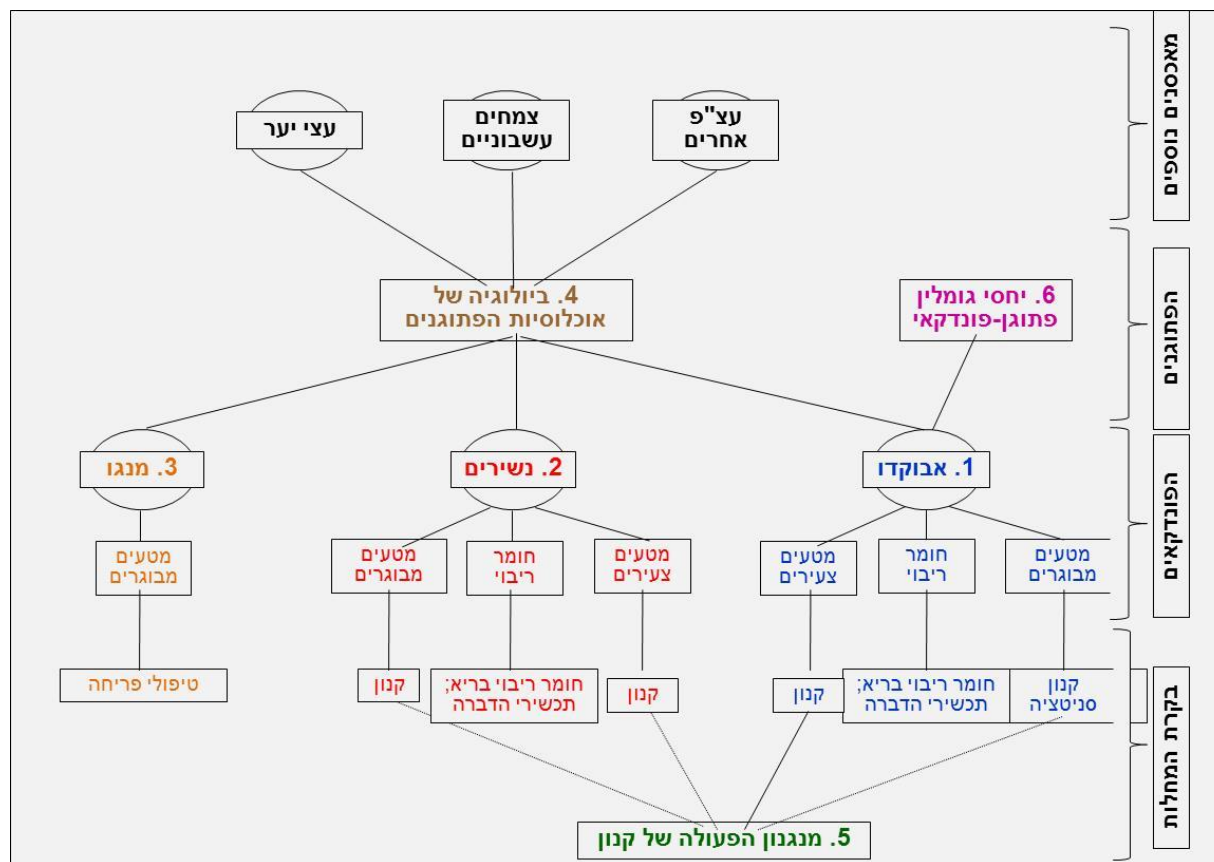
1. לאפיין את מקורות המידבק הראשוני העיקריים של פטריות מקבוצת הבוטריוספריה המנגעות עצי אבוקדו ונשירים;
2. לפתח גישות ליצור חומר ריבוי של אבוקדו ונשירים הנקי ממחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצת הבוטריוספריה;
3. לפתח גישות להתמודדות עם נגיעות בפטריות מקבוצת הבוטריוספריה בנטיעות חדשות של אבוקדו ונשירים ובעצים בוגרים המשמשים כעצי אם.

עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

הרציונל שעמד בבסיס הפעילות המחקרית שהתבצעה במסגרת המיזם

הפעילות המחקרית שהתבצעה בשנת המיזם השנייה התמקדה בשתי קבוצות גידולים: אבוקדו ונשירים (משמש, נקטרינה, אפרסק, דובדבן ושזיפים). בשנה זו פעלו במסגרת המיזם חמש קבוצות מחקר. קבוצת המחקר ברשותו של דני שטיינברג (קבוצה מספר 1 מסומנת בצבע כחול באיור מספר 1) התמקדה בחקר האפידמיולוגיה וההדברה של המחלה באבוקדו. קבוצה זו השקיעה מאמצים באיתור מקור המידבק העיקרי של גורם המחלה במטעים הצעירים ובפיתוח גישות לייצור חומר ריבוי בריא. בנוסף, היא בחנה את האפשרות להשתמש בתכשיר קנון במטעי אבוקדו נגועים, צעירים ומבוגרים, ואת התרומה של סניטציה במטעים המבוגרים. קבוצת המחקר ברשותו של דוד עזרא (קבוצה מספר 4, מסומנת בצבע אדום באיור מספר 1) התמקדה בחקר האפידמיולוגיה וההדברה של המחלה בנשירים. קבוצה זו השקיעה מאמצים בחקר האטיולוגיה והאפידמיולוגיה של גורם המחלה ובמעורבות של פטריות מקבוצות נוספות (פטריות רקב). גם במחקרי קבוצה זו נבחנה היעילות של התכשיר קנון בניסויים במטעים צעירים ומבוגרים. קבוצת המחקר ברשותם של ורד יריחמילוביץ וסטנלי פרימן (קבוצה מספר 3, מסומנת בצבע ירוק באיור מספר 1) התמקדה בחקר מנגנון הפעולה באמצעות התכשיר קנון מונע את המחלה באבוקדו ונשירים. למחקר זה אופי בסיסי אבל יש לו משמעויות יישומיות הקשורות באופטימיזציה של השימוש בתכשיר קנון. קבוצת המחקר ברשותו של סטנלי פרימן (קבוצה מספר 2, מסומנת בסגול באיור מספר 1) התמקדה בפיתוח כלי חיוני לחקר האטיולוגיה והאפידמיולוגיה של גורם

המחלה – טרנספורמציה של הפתוגן גדי שיבטא גן מדווח זורח (GFP). כלי מחקר נחוץ לחקר יחסי הגומלין שבין הפתוגן לפונדקאי ולחקר דרכי הפצתו במרחב. התובנה הנוכחית היא שנבגי המחלה מופצים במרחב בהתזה בטיפות גשם אבל תצפיות שלנו מראות לכאורה שהנבגים מופצים במרחב באוויר גם ביובש. אם כך הדבר, מעבר לחידוש המדעי, יש משמעויות רבות לבקרת גורם המחלה. כפי שצוין למעלה פטריות מקבוצת הבוטריוספריה תוקפות צמחים רבים ממשפחות בוטניות שונות ובכלל זה עצי פרי ויער וגם צמחים עשבוניים. לא ברור באם תבדידים של אותו הפתוגן מסוגלים לעבור ממאכסן אחד לשני ובאם המעבר מתרחש באופן מתדירעשי בטבע. מידע בנושא חיוני להבנת המערכת הביולוגית ולהגדרה של מקורות המידבק האפשריים של מטעי עצי הפרי במרחב. יש לכך השלכות מעשיות לבקרת המחלה. קבוצת המחקר מספר 5 ברשותו של עומר פרנקל (קבוצה מספר 5, מסומנת בצבע חום באיור מספר 1) עסקה בפיתוח כלים מתאימים ובחקר הביולוגיה של אוכלוסיות הפתוגנים העיקריים המחוללים את המחלה באבוקדו ובנשירים בארץ. בסעיפים הבאים יוצגו עיקרי הממצאים של חמש קבוצות המחקר. **בגלל מגבלת המקום יוצגו כאן עיקרי הממצאים והמסקנות בלבד. כלל התוצאות מוצגות בנספח המצורף לדו"ח זה.**



איור מספר 1. סכימה של המחקרים שהתבצעו בשנת המיזם השנייה. המספרים הרשומים באיור והמלל בצבעים שונים מציינים את קבוצות המחקר השונות המעורבות במיזם.

קבוצת מחקר מספר מחקר 1: התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה באבוקדו

מחקר זה בוצע באחריות דני שטיינברג ובהשתתפות סטנלי פרימן, רן שולחני מנחם בורנשטיין (ממינהל המחקר החקלאי), אלי סימנסקי (מחברת נבטים) ויונתן מעוז (ממועצת הצמחים).

המטרות שהוגדרו לפני תחילת המיזם לצוות מחקר זה הושגו כבר במהלך שנת המיזם השנייה. במחקר

שבצע הצוות בשנת המיזם השלישית הוא התרכז בשלושה נושאים הקשורים להתפתחות המחלה במטעי אבוקדו בוגרים, כלהלן: 1. חקר הביולוגיה של גורם המחלה תוך התמקדות בהפצה האווירנית של נבגים א-מיניים; 2. חקר האטיולוגיה של המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים ופיתוח גישות לבקרתה; ו - 3. בחינת גישות להתמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטטיביים של עצים בוגרים. הנושא הראשון של המחקר התמקד בחקר הביולוגיה של גורם המחלה תוך התמקדות בהפצה אווירנית של נבגים א-מיניים. תצפיות שבצענו בשנים האחרונות העידו, לכאורה, שההפצה של אברי הריבוי של פטריית הבוטריוספריה בארץ היא אווירנית. מאחר והפטריית משתייכות למערכת פטריות השק הסקנו שההדבקה התרחשה על ידי נבגי שק. אבל, למרות ניסיונות חוזרים ונשנים שאותם בצענו מאז שנת 2012, מועד התחלת המחקר, לא הצלחנו ולו פעם אחת, לזהות גופי פרי מיניים של בוטריוספריה. בהסתמך על דגם הפיזור המרחבי של המחלה, בגלל שלא הצלחנו לזהות ולו פעם אחת את השלב המיני של גורם המחלה, ומסיבות נוספות שלא יפורטו כאן, העלינו את ההיפותזה שבתנאים המתקיימים בארץ הנבגים הא-מיניים של פטריות מהסוג בוטריוספריה מופצים אווירנית, ביובש. בחלק זה של המחקר פיתחנו מערך ניסויי לבחינת ההפצה האווירנית של נבגים א-מיניים והוכחנו שהם אכן מופצים במרחב, ביובש. לממצא זה משמעות מרחיקות לכת לגבי האפידמיולוגיה של גורם המחלה.

הנושא השני של המחקר התמקד בחקר האטיולוגיה של המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים ופיתוח גישות לבקרתה. בחודש מאי 2015 היה בכל רחבי הארץ גל חום שגרם לנשירה של פרחים ושל חנטים צעירים. בחלק מהמקרים נראו על השזרות של התפרחות תסמינים הדומים לאלה המתפתחים על ענפים הנגועים בבוטריוספריה. עם חלוף הזמן התסמינים התקדמו מהתפרחות אל הענפים שנשאו אותן וגם עליהם התפתחו תסמיני המחלה האופייניים. נשירת פירות צעירים היא תופעת ידועה באבוקדו והיא מתרחשת במקרים רבים בעצים הנמצאים בשנת "און" (עצים הנושאים יבול כבד). הנשירה הטבעית מוגבלת לשלבים הראשונים של התפתחות הפירות והיא לא מתרחשת לאחר מכן. לא ידוע באם איכלוס בפתוגנים מעודד את הנשירה הטבעית של הפירות ומגביר אותה, או לא. מצאנו שהפתוגן מאכלס פרחים ותפרחות וגורם לנשירה משמעותית של חנטים ופירות צעירים. הראנו גם שריסוס תכשירי הדברה בתקופת הפריחה מפחית את הפגיעה באיברים הרפרודוקטיביים.

הנושא השלישי של המחקר התמקד בבחינת גישות להתמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטיביים של עצים בוגרים. הראנו שגיוזם והרחקה של ענפים יבשים מאפשר לעצים להתאושש ולהתפתח כראות. בנוסף בחנו את האפשרות שריסוס רסק גזם נגוע באוריא יעודד את ההתפתחות של מיקרואורגניזמים שיפרקו את החומר הצמחי המאולח. הטיפול לא היה יעיל ולא קיים עדיין אמצעי לטיפול בגזם נגוע.

קבוצת מחקר מספר 2. התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה בנשירים

מחקר זה בוצע באחריות דוד עזרא ובהשתתפות מעין גרינברג ודני שטיינברג (ממינהל המחקר החקלאי).

בשנים האחרונות אנו בוחנים את מעורבותן של פטריות ממשפחת הבוטריוספריה בתופעת התייבשות של שתילים צעירים ועצים מבוגרים ממשפחת הנשירים ובעיקר משמש, נקטרינה, אפרסק ושזיפים. במהלך השנתיים האחרונות זיהינו והגדרנו מספר פטריות מרקמות סימפטומטיות של עצים חולים בניהן בלטו הפטריות *Neoscytalidium digitatum* sp., *Lasiodiplodia* sp. והפטרייה – *Phelinus* sp. שהינה פטריית רקב. במבחי קוך שבוצעו הראינו שהדבקה של עצים צעירים בתנאי מעבדה בפטריות אלה גרמו להופעת תסמינים המוכרים מהמטעים אך עם זאת עצים אלה בדרך כלל לא מתו כתוצאה מהדבקות שבצענו. בתחילת הפרויקט בחנו את עצי המקור לחומר רכב המשמש את המשתלות לייצור שתילים לחקלאים. במטע המקור ראינו כי על העצים ישנן פטריות רקב רבות. במהלך המחקר זיהינו כי על רבים מעצים המבוגרים המבטאים את התסמין האופייני להדבקה בפטריות מהסוג בוטריוספריה – הפרשת מסיבית של שרף – מתפתחים גופי פרי של פטריות רקב (בעיקר פלינוס). בתחילה העלינו את ההשערה כי פטריות הרקב משניות והן מתפתחות על העצים בגלל חולשתם הנובעת מהמחלה הנגרמת על ידי פטריות בוטריוספריה. אבל, בחלוף הזמן העלנו את ההשערה שהמעורבות של שתי הפטריות (רקב ובוטריוספריה) היא האחראית להידרדרות של העצים ולהתייבשות של הענפים, כאשר כל אחת מהפטריות תורמת את חלקה להליך. בשנת המחקר האחרונה עמדו לנו מספר מטרות: 1. לבחון ולייצר פרוטוקול ניקוי לחומר רכב (עיניים) על ידי שימוש בחומרי הדברה שנמצאו יעילים כנגד הפטריות *N. digitatum* - *Lasiodiplodia*; 2. לבחון האם ישנה רגישות שונה לכנות השונות המשמשות את השתלנים, לפטריות הבוטריוספריה; 3. ביצוע מבחני קוך עם פטריית הרקב פלינוס שבודדה מעצים חולים בנפרד ובשילוב עם *N. digitatum*.

הנושא הראשון בו עסקנו הוא פיתוח פרוטוקול לטיפול בחומר רכב נגוע כנגד שתי הפטריות מהסוג בוטריוספריה המנגעות את מטעי הנשירים בישראל: *Neoscytalidium dimidiatum* ו - *Lasiodiplodia theobromae*. ניסויי ההדבקה, הטיפול וההרכבה של העיניים (המודבקות והמטופלות)

על כנות בריאות הוכיחו שתכשירי ההדברה שנמצאו פעילים כנגד הפטריות במבחני מעבדה אינם יעילים ולא מונעים את הדבקת הכנות בפתוגנים כתוצאה מההרכבה.

הנושא השני בו עסקנו הוא בחינת הרגישות של שלושת הכנות העיקריות בהן נעשה שימוש על ידי השתלנים בארץ לייצור שתילי נשירים. ממצאי הניסויים מצביעים על קיומם של הבדלים בתגובת הכנות לשני הפתוגנים. כנת הנסן הייתה הכי פחות רגישה ללזיאודיפלודיה, אחריה הכנה 677 עם רגישות גבוהה יותר ולבסוף הכנת מריאנה שהייתה הרגישה ביותר. שלושת הכנות היו רגישות מאוד לניאוסוכיטאלידיום והיו הבדלים מסויימים בניהן: תגובת הכנות הנסן ו - 677 הייתה דומה ושתיהן היו רגישות פחות מהכנה מריאנה.

הנושא השלישי בו עסקנו הוא המעורבות של קומפלקס של פטריות במחלה המתפתחת בנשירים. עצי מימש ונקטרינה שאולחו בשתי הפטריות הרלוונטיות נחתכו בסוף שנת המחקר הנוכחית בכדי לבחון את התקדמות הפטריות והתסמינים בעצה. מהתוצאות נראה שפטריות הבוטריוספריה הינן הפטריות הדומיננטיות היות והתסמינים שנרגמו בעצים המאולחים התקדמו למרחק גדול יותר בגזעי העצים וגרמו לתסמיני מחלה אופייניים חזקים הרבה יותר משגרמה פטריית הפלינוס. אפשר לשער שפטריות הבוטריוספריה המגיעות עם הרכב למשתלה מדביקות את העצים הצעירים. בחלק מהמקרים הן הורגות את הצמחים הצעירים כבר במשתלה או מיד לאחר השתילה בשטח. במקרים אחרים העצים החזקים יותר ממשיכים בגדילה במטע במשך שנים. לאחר כשבע עד 14 שנים מהנטיעה, לאחר שהעצים נחשפים לעקות שונות, פטריות הבוטריוספריה המאכלסות אותן בצורה אנדופיטית מתפרצות וגורמות לתפתחות של תסמיני המחלה האופייניים - גומוזיס על הגזעים והענפים. במקביל לכך, פטריית הפלינוס הנפוצה במטעים מדביקה את העצים דרך פצעי הגיזום, מתפתחת בהם באטיות וכשעקה בה שרויים העצים משמעותית (העקות נגרמות מגורמים א-ביוטיים ומהתפתחות פטריות הבוטריוספריה) היא מתחילה להיות פעילה. הפעילות המשותפת של שתי הפטריות גורמת להיחלשות העצים, שבירת ענפים ובסופו של דבר למוות של העצים הנגועים.

למיטב הבנתנו האפשרות ניתן לצמצם את הנזקים הנגרמים למטעי הנשירים מפטריות הבוטריוספריה. ניתן לעשות זאת על ידי שימוש החומר רכב נקי לחלוטין מפטריות. דבר זה אפשרי רק אם חומר הרכב יילקח מעצים שיגודלו בתנאים סטריליים תוך שמירה מוקפדת על בריאותם וניקיונם. הדבר יכול להתקיים אם יבנו בית יסוד ובית גרעין חדשים בריאים מגורמי המחלות. ריפוי חומר רכב שנלקח כשהוא כבר נגוע בעזרת תכשירי הדברה אינו ישים בהינתן לתכשירים ולטכנולוגיות הנמצאת בדינו כרגע. לאחר הנטיעה, יש לשמור על העצים הצעירים והבוגרים במטע מפני הדבקות בפטריות רקב. זאת, על ידי טיפול בפצעי

הגיזום בחורף. יש להרחיק גופי הפרי של פטריות רקב אם קיימות וולבצע סניטציה קפדנית של ענפים החשודים בנגיעות. יישום ממשק זה מחייב כמובן את שיתוף הפעולה של הרשויות ושל הנוטעים כאחד.

קבוצת מחקר מספר 3. התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה במנגו

מחקר זה בוצע באחריות נועם אלקן (ממינהל המחקר החקלאי).

אחת המחלות השכיחות ביותר בגידולים סובטרופיים לאחר הקטיף הינה ריקבון העוקץ. הפטריות הגורמות לריקבון העוקץ מאכלסות את ענפי הפרי באופן דמוי אנדופיטי, ללא תסמינים נראים לעין. במהלך הבשלת הפרי או עם החלשות מקומית של הצמח הפטריות עלולות לגרום לריקבונות עוקץ בפרי או לתמותה-לאחור בענפים במטע. מגוון פטריות עלולות לגרום לרקבונות עוקץ ובכלל זה מספר מינים מהסוג Botryosphaeriaceae אשר דווחו כמחוללי מחלה מרכזיים בהתפתחות ריקבונות העוקץ. פטריות אלה גורמות להופעת ריקבון עוקץ, תמותת ענפים לאחור (Dieback) והיווצרות כיבים (cankers) בענפים העלולים לעיתים להוביל להתמוטטות של עצים שלמים, בעקבות חיגור. האתגר בהדברת הפתוגנים הגורמים לריקבון העוקץ לפני הקטיף נובע מהמיקום שבו נמצאים גורמי המחלה. הנבגים חודרים אל רקמות הצמחיות מבעד לפצעים או פתחים בתפרחות. לאחר מכן, פטריות אלו מאכלסות את צינורות ההובלה של ענפי העץ ונמצאות במצב אנדופיטי. התפרצות של המחלה מתאפשרת כאשר העץ או הענף מצוי תחת תנאי עקה או בפרי הבשל שלאחר קטיף, במיוחד לאחר אחסון ממושך. בשלב זה הפטרייה מתעוררת ועוברת למצב הנקרותרופי (התוקפני) וגורמת לסימפטומים האופייניים בעצי הפרי השונים. היעד המרכזי של המחקר הנוכחי הוא אפיון התוקפנות של תבדידי *Lasiodiplodia* על גבי ענפים ובפירות תוך חיפוש דרכי התמודדות עם גורמי המחלות. התקדמות המחקר בשתי החזיתות תוכל להוביל בעתיד לשימוש בשיטות הדברה יעילות יותר.

בחינה של 40 תבדידי *Lasiodiplodia theobromae* ו *Lasiodiplodia pseudotheobromae* הראתה כי קיימת שונות גדולה ברמת האלימות של התבדידים השונים על גבי ענפוני אבוקדו, מנגו ונקטרינה. מעניין לציין כי *L. theobromae* באופן כללי יותר אלימה ויוצרת באופן משמעותי יותר נבגים מתבדידי *L. pseudotheobromae*. בהדבקת פירות מנגו ואבוקדו נמצאה שונות גדולה ברמת האלימות של התבדידים השונים. ענפונים מתים במטע מכילים כמויות גדולות ביותר של נבגים אשר נמצאים בקרבה פיזית לפרחים. פטריות הבוטריוספריה חודרות לעץ דרך פתחים טבעיים אשר קיימים גם בפרחים. לכן, נבדקו טיפולים של שני ריסוסי פונגיצידיים (סוויץ, לונה אקפריאנס או לונה טרנקיליטי) בפריחה במטעי מנגו. נמצא כי ריסוסי פונגיצידיים בפריחה הפחיתו בחצי את כמות הענפונים המתים לעץ. בנוסף, נמצא כי פירות אשר נקטפו מעצים אשר רוסו בפונגיצידיים בפריחה פיתחו באופן משמעותי פחות ריקבונות

עוקץ לאחר אחסון ארוך. הפתוגנים העיקריים הגורמים לריקבונות בפירות מנגו לאחר קטיף היו *Lasiodiplodia* ו- *Alternaria*, בבדיקה ראשונית בצלחות נמצא כי פטריות אלו רגישות יותר לתכשיר ההדברה 'פלודיאוקסוניל' (סקולר) מאשר לתכשיר 'פרוכלורז' (ספורטק- הנמצא בשימוש מסחרי לאחר הקטיף). אכן, טיפול לאחר קטיף ב'פלודיאוקסוניל' (סקולר) בפירות מנגו מודבקים בלסיודיפלודיה הפחית באופן מובהק את אחוז וחומרת הריקבון בהשוואה לטיפול ב'פרוכלורז' (ספורטק).

קבוצת מחקר מספר 4. מעבר אוכלוסיות של פטריות מהסוג בוטריוספריה בין מאכסנים שונים

מחקר זה בוצע באחריות עומר פרנקל ובהשתתפות דוד עזרא, חופית קול מימון, דני שטיינברג, סטנלי פרימן, נועם אלקן, תום שריר, אורנה ליארזי, רן שולחני, מנחם בורנשטיין, מיכל שרון ומיכל הרשקוביץ (ממינהל המחקר החקלאי).

בשנים האחרונות עולה החשיבות של מחלות מקבוצת הבוטריוספריה ברחבי העולם וכך גם כמות הידע המפורסם. עם זאת רוב הידע הגנטי מתמקד בהרכב מיני הפתוגנים המצוי על המאכסנים השונים וקיים ידע מועט מאד על הבדלים בתוך אוכלוסיות הפתוגנים. צבירת ידע זה משמעותית ביותר כדי להבין באם הפתוגנים המרכזיים בארץ (כלומר *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. pseudotheobromae* ו- *N. dimidiatum*) יכולים לעבור בין מאכסנים שונים וכדי ללמוד ולהבין מהם מקורות המדבק הראשוניים והשניוניים. מטרות המחקר הינן: (1) שימוש בסמנים מולקולריים לזיהוי קבוצות גנטיות שונות ברמות המינים ואוכלוסיות בתוך מיני הפתוגנים: *L. theobromae*; *N. dimidiatum* ו- *L. pseudotheobromae*. (2) ניסיון לזהות תכונות פנוטיפיות הבדילות בין האוכלוסיות והתאמתן למאכסנים השונים.

במסגרת המחקר פותחו סמנים שונים ללימוד המבנה האוכלוסייתי של הפטרייה *N. dimidiatum*, רוצפו גנים אינפורמטיביים ועבור הפתוגים *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* ונסרקו סט של סמני SSRs ו- SCAR. מתוצאות המחקר עולה כי במין *N. dimidiatum* קיימות בארץ שתי קבוצות גנטיות מרכזיות (קבוצות 2 ו- 4) ועלו עדויות לקיום של שתי קבוצות נוספות (קבוצה 1 ו- 3). קבוצה 2 בודדה רק מנשירים בעוד שקבוצה 4 נמצאה מעט בנשירים אך גם במאכסנים אחרים כגון מנגו וגפן. תבדידי קבוצה 4 היו אלימים יותר מתבדידי קבוצה 2 גם כשנבחנו על ענפוני נשירים וגם כשנבחנו על ענפוני מנגו ואבוקדו. לא נמצאו הבדלים משמעותיים בהתאמת שתי הקבוצות לטמפרטורות עולות. נמצאו הבדלים גנטיים בין אוכלוסיות *L. theobromae* שבודדו מאבוקדו לבין האוכלוסיות שבודדו מנשירים ומגפן. שאוכלוסיות הפטרייה *L. pseudotheobromae* נמצאו רק על גבי גפנים ואבוקדו והתקיימו ללא מבנה אוכלוסייתי נפרד בין המאכסנים השונים. בשורת ניסויים שבוצעו על גבי ענפוני אבוקדו במטרה לזהות קשר בין אלימות לקבוצות הגנטיות לא נמצאו הבדלים סטטיסטים מובהקים בין המינים *L. theobromae*

ו - *L. pseudotheobromae* ולא בין הקבוצות הגנטיות של הפתוגן *L. theobromae*. במבחן על גבי מאכסנים שונים (אפרסק ומנגו) היו התבדידים מהקבוצה הגנטית שלא מצויה באבוקדו אלימים יותר. מתוצאות המחקר אנו מסיקים כי זרימת הגנים בין אבוקדו לנשירים אינה חופשית ושקיימים גורמי סלקציה המגבילים את המעבר בין שני הפונדקאים. יש להמשיך ולחקור את התופעה כדי לאושש את המסקנה וכדאי בהמשך להרחיב את המחקר ולכלול בו גם את גידול הגפן בו הייתה השונות הגדולה ביותר.

קבוצת מחקר מספר 5: חקר מנגנון השראת עמידות באבוקדו באמצעות ריסוס של החומר קנון

מחקר זה בוצע באחריות ורד יריחימוביץ ובהשתתפות סטנלי פרימן אייל הלון, עדי פייגנבוים, רן שולחני ודני שטיינברג (ממינהל המחקר החקלאי).

במחקר שבוצע במסגרת מיזם חוס"ן בוטריוספריה דווח שטיפול בתכשיר "קנון", המכיל את החומר הפעיל חומצה זרחיתית, הפחית באופן מובהק תמותת שתילי אבוקדו נגועים בפטריות מהסוג *Botryosphaeria*. במבחני רעילות של התכשיר כנגד הפטרייה בצלחות פטרי, לא נמצא עיכוב גידול התפטיר. מהספרות, ידוע כי חומרים כגון פוסיפיט עשויים להשרות בצמחים מנגנון "פרימינג". מנגנון זה מוביל לתגובה ראשונית קלה, המלווה בשעתוק גנים ו/או בייצור מטבוליטים משניים בעלי תפקיד הגנתי, לאחר מכן, בעת התקפת הפתוגן, מתרחשת בצמח תגובה שניונית חזקה בעוצמתה המסוגלת לבלום את התפשטות המחלה.

בעקבות המידע המוצג לעיל הועלתה היפותזת העבודה הטוענת כי באבוקדו טיפול ב"קנון" עשוי באופן עקיף להקנות עמידות לפטריות מהסוג *Botryosphaeria* ו/או לפתוגנים נוספים ע"י הפעלת מנגנון "פרימינג". היעד המרכזי של המחקר הנוכחי היה לאפיין את מנגנון השראת העמידות המופעלת ע"י קנון באבוקדו, כאשר מטרת המחקר הספציפיות שהוגדרו היו: 1. לאפיין את מערך הגנים המשופעלים לאחר הטיפול. 2. לבחון את קינטיקת הביטוי של גנים ספציפיים לאחר טיפול. ו-3. לבחון האם יש צורך בטיפול נוסף להמשיך את השיפעול.

לבחינת נושאים אלו ביצענו בשנה הקודמת ניסויים בשתילי אבוקדו 'האס' שטופלו ע"י ריסוס בתכשיר "קנון". רנ"א שהופק מעלים של שתילי ביקורת ומשתילים מטופלים שימש לאנליזות ביטוי. השנה הרחבנו את אנליזות הביטוי ושלחנו דגימות עלים לבדיקת רמות SA. האנליזות המורחבות הדגימו כי טיפול ב"קנון" השרה עלייה זמנית בביטויים של 5 מתוך 6 גני Pathogenesis related proteins (PRs) שיש להם תפקיד הגנתי בצמח. עלייה זו התרחשה ללא תלות בשינוי ברמת free SA ובביטוי פקטורי

שעתוק מסוג *NPR1-like*, הקשורים בדרך כלל למנגנון ה Systemic Acquired Resistance (SAR). בסוף שנת המחקר שעברה החלנו בנייתו תוצאות אנליזת RNA-Seq שביצענו לבחינת השינוי בטרנסקריפטום לפני ואחרי טיפול ה"קנון". השנה, נותחו מחדש הנתונים ע"י De-novo assembly לבניית מאגר המכיל כ- 54,000 גנים. בחינה מחודשת של תוצאות ה RNA-Seq, הפעם כנגד המאגר החדש, הדגימה שדפוסי הביטוי של 9,750 DEGs (Differently expressed genes) הראו שונות מובהקת לאחר הטיפול ב"קנון". בהמשך, בדיקות מיפוי KEGG annotations אששו תוצאות מיפוי קודם והורו כי טיפול ה"קנון" השרה עלייה זמנית בביטוי 7 מתוך 8 גני PRs, ללא תלות בביטוי גני *NPR1-like*. בדיקות המיפוי הדגימו בנוסף כי טיפול ה"קנון" השרה עלייה זמנית גם בדגמי ביטויים של גנים המקודדים לסינתזה, חישה ותגובה לאתילן, ולגני סינתזת פוליאמינים. עוד הודגם שינוי זמני בביטוי גנים המקודדים לקולטנים מסוג pattern-recognition receptors (PRR), לגנים המקודדים ל Mitogen activated protein kinases (MPKs) ולפקטורי שעתוק מסוג WRKYs, כולם קשורים למסלולי MAPK signaling - המתרחשים בד"כ בעת התקפת פתוגנים. לבסוף נמצא כי טיפול ה"קנון" השרה גם כן שינוי משמעותי בדגם ביטויים של 155 גני Heat shock proteins (HSP) ושל קב' גנים הקשורים למסלולי דטוקסיפיקציה בצמחים (Metabolism of Xenobiotics by Cytochrome P450).

מכלול התוצאות שקיבלנו תומך אם כן ברעיון שטיפול ב"קנון" באבוקדו משפעל מנגנון "פרימינג" ועשוי ע"י כך להקנות הגנה מסוימת בעת הדבקה בבוטריוספריה. כדי לבדוק נושא זה, ביצענו בשנת מחקר זו ניסיונות במערכת שתילי 'האס' שטופלו ב"קנון" ואולחו כעבור שלושה ימים בתפטיר בוטריוספריה. כצמחי ביקורת, השתמשנו בשתילים לא מטופלים שאולחו בפטרייה. מדידות שבוצעו חודשיים לאחר האילוח, הראו כי התפשטות התפטיר באזור האילוח הייתה כצפוי מוגבלת בצמחים שטופלו ב"קנון", בהשוואה לצמחי ביקורת. למרות זאת, ובאופן מפתיע, גם כתשעה חודשים לאחר האילוחים לא נראו סימנים וויזואליים של התפשטות המחלה בשתילי הביקורת ובשתילים המטופלים ולכן לא ניתן היה לאושש את ההנחה שהטיפול המקדים ב"קנון" אכן הגביל את התפשטות המחלה. יש לחזור על ניסויים אלו בצורה מורחבת בכדי לבדוק בצורה מעמיקה יותר את רמת ההגנה שמקנה טיפול ה"קנון" לאחר הדבקה בבוטריוספריה.

קבוצת מחקר מספר 6: פיתוח כלי לבחינה (ברמת הצמח השלם) של יחסי הגומלין המתקיימים בין הפתוגן לפונדקאי

מחקר זה בוצע באחריות סטנלי פרימן ובהשתתפות מרסל מימון (ממיהל המחקר החקלאי) בתצפיות שבצענו באבוקדו נראה שהפתוגנים חודרים לענפים הרב-שנתיים במקום החיבור של ענפים אלה עם הענפונים החד-שנתיים, ששם יש סדקים/פצעים. לאחר ההדבקה הפטרייה מתפשטת לאורך הרקמות הפנימיות של הענפים הרב שנתיים. באזורים הנגועים הרקמה הפנימית משנה את צבעה מהצבע הבהיר האופייני של רקמה בריאה לצבע חום נקרוטי. הרקמה הפגועה, הנקרוטית, היא רקמת הקסילים אך במספר מקרים נראה שגם אזור הקליפה, הפלואם, נפגע. שינוי צבע לא מרמז בהכרח על המקום בו נמצאת בפועל הפטרייה מפני שיתכן שהתפטיר נמצא הרבה מעבר למקום בו נראים תסמיני הנקרוזה. לחילופין יתכן שהנקרוזות מתפתחות במקומות מרוחקים ממקום הימצאות התפטיר. חשוב לדעת היכן נמצאת הפטרייה בפועל כי מידע זה חיוני לביצוע פעולות סניטציה. בנוסף, מידע זה ירמז על המנגנון בו פוגעת הפטרייה ברקמות הצמחיות. ניסיונו לבחון את מיקום הפטרייה ברקמות הנגועות בעזרת שימוש בפטרייה מהונדסת גנטית ל - GFP (חלבון פלואורסצנטי זוהר). הכוונה היא להשתמש בפטרייה הזוהרת שתתקבל לאילוח רקמות מעוצות של שתילים. לאחר מכן יילקחו רקמות צמחיות מהשתילים הנגועים, במרחקים שונים ממקום האילוח, ממקומות סימפטומטיים וממקומות א-סימפטומטיים. דגימות אלה יבחנו באמצעות מיקרוסקופ קונפוקאלי (בו ניתן לראות את תפטיר הפטרייה הצבוע בצבע זוהר) וכך נוכל לקבוע היכן נמצא תפטיר הפטרייה בפועל.

תבדידי *L. pseudotheobromae* ו- *L. theobromae*, AVO 4 ו- AVO 6 בהתאמה, שימשו בכל הניסויים לטרנספורמציות מולקולריות של הגן המדווח GFP. בכל הניסויים לטרנספורמציות מולקולריות לא התקבלו טרנספורמנטים עם ביטוי של GFP באף אחד מהתבדידים ובאף אחד משיטות הטרנספורמציות שנוסו. הצלחנו לקבל טרנספורמנטים שהיו עמידים לחומר האנטיביוטיקה היגרומיצין וחלק מהטרנספורמנטים זהרו בצבע צהוב לא אופייני ולא בהיר. אבל, לא נראה שניתן יהיה להשתמש בטרנספורמנטים אלה למעקב אחר הפטרייה בצמח. ככל הנראה, החלבון הזוהר GFP לא מתבטא לאחר הטרנספורמציה למרות שהיו תבדידים עמידים להיגרומיצין המצביע על אינטגרציה של הפלסמיד לגנים הפטרייה. על מנת להצליח במעשה, יש, ככל הנראה, לבנות וקטור חדש עם פרומוטורים חדש שיאפשר ביטוי של GFP לקבל החלבון הזוהר.

דיון

בפתיח של פרק המבוא של דו"ח זה מתוארת המוטיבציה שהייתה הבסיס להקמתו של מיזם חוס"ן בוטריוספריה: ההתייבשות והתמותה של שתילי אבוקדו ונשירים במשתלות ובנטיעות צעירות ושל עצים במטעים בוגרים. במהלך השנים 2012 ו- 2013 התחלנו בבדיקות מקדימות ובמחקר ראשוני שהתמקדו בחקר הגורמים להתפתחות התסמינים. בבידודים שבצענו מרקמות צמחיות נגועות בודדנו פטריות מהמין בוטריוספריה. השלמנו את מבחן קוך והראינו שהפטריות האלה גרמו לתסמינים שהיו זהים לאלו שנראו במטעים. בהסתמך על הממצאים הראשוניים העלנו את ההיפותזה שמקור המידבק ההתחלי העיקרי של המחלה במשתלות ובנטיעות הצעירות הוא חומר ריבוי מאולח בצורה לטנטית (א-סימפטומטית) שנלקח מעצי אם נגועים. על פי תרחיש זה, השתלנים משתמשים (ללא ידיעה, כמובן) בחומר ריבוי מאולח ומייצרים ממנו שתילים נגועים. הנוטעים רוכשים את השתילים הנגועים ושותלים אותם במטעים. בהסתמך על היפותזת העבודה שהעלינו ובגלל מגבלות התקציב החליטה ועדת ההיגוי של המיזם שהמחקר יתמקד רק בחלק מהבעיה והגדירו את היעד של המיזם, כלהלן: "פיתוח גישות ליצור חומר ריבוי נקי ממחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצת הבוטריוספריה באבוקדו ונשירים ולהתמודדות עם נגיעות קיימת בנטיעות חדשות". המטרות הספציפיות, כפי שהוגדרו על ידי הוועדה המקצועית של המיזם, היו:

1. לאפיין את מקורות המידבק הראשוני העיקריים של פטריות מקבוצת הבוטריוספריה המנגעות עצי אבוקדו ונשירים;
2. לפתח גישות ליצור חומר ריבוי של אבוקדו ונשירים הנקי ממחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצת הבוטריוספריה;
3. לפתח גישות להתמודדות עם נגיעות בפטריות מקבוצת הבוטריוספריה בנטיעות חדשות של אבוקדו ונשירים ובעצים בוגרים המשמשים כעצי אם.

במהלך השנה הראשונה והשנה השנייה של המיזם הראינו שעצי האם של אבוקדו אכן מאולחים בפטריות מקבוצת הבוטריוספריה; הוכחנו שבמשתלות יש שתילים נגועים והראינו (באבוקדו) שהרכבה של רוכב מאולח על כנה בריאה גורם להתפתחות תסמיני הריקבון האופייניים ברוכב וגם בכנה. בשנה השלישית של המיזם הצלחנו להראות שתרחיש זה מתקיים גם בנשירים. ממצאים אלה אוששו את היפותזת העבודה והיו הבסיס לפיתוח גישות ליצור חומר ריבוי של אבוקדו ונשירים הנקי ממחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצת הבוטריוספריה. בחנו גישות להתמודדות עם המחלה במשתלות ובנטיעות צעירות של אבוקדו ויחד עם אנשי שה"מ והשירותים להגנת הצומח פיתחנו פרוטוקולים והנחיות לייצור חומר ריבוי נקי ולטיפול בחומר ריבוי מאולח. הפרוטוקולים שפתחנו יושמו באופן מידי

בשטח, ובהצלחה. לאחר יישום המסקנות פחתה התמותה של שתילים במשתלות ובנטיעות חדשות באופן דרמטי: מאז שנת 2015 שכיחות השתילים המתים במשתלות ובנטיעות החדשות היא בסדר גודל של אחוזים בודדים (1-3%) כפי שהיה בעבר. [כזכור, בשנים 2013 ו- 2013 שכיחות השתילים המתייבשים והמתים במשתלות ובנטיעות החדשות הייתה בהיקפים של 20-30%!!]. מבחינה זו הישגנו את מטרות המחקר. בשנת המיזם השלישית השלמנו את העבודה גם בנשירים וגם שם הראינו ששימוש בחומר ריבוי נקי הוא המפתח להצלחה. בנשירים לא הצלחנו לפתח פרוטוקול לטיפול בחומר ריבוי מאולח והמסקנה שלנו היא שהפתרון הוא טיפול קפדני בעצי האם לשמירה על בריאותם.

ידוע שהפטריות החשובות התוקפות את האבוקדו והנשירים בארץ - *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* מאכלסות ותוקפות מינים רבים של עצי פרי ויער וצמחים עשבוניים חד ורב-שנתיים הנמצאים במרחב. לא ידוע אם הפטריות המאכלסות את הצמחים במרחב עוברות מהם למטעי האבוקדו והנשירים, בהם מתמקד מיזם זה. כדי להבין באם פתוגנים אלה יכולים לעבור בין מאכסנים שונים וכדי ללמוד ולהבין מהם מקורות המדבק הראשוניים והשניוניים במטעים צעירים ומבוגרים פיתחנו סמנים שונים ללימוד המבנה האוכלוסייתי של הפטריות. הממצאים העיקריים של המחקר היו כלהלן: במין *N. dimdiatum* קיימות בארץ שתי קבוצות גנטיות מרכזיות (קבוצות 2 ו- 4) ועלו עדויות לקיום של שתי קבוצות נוספות (קבוצה 1 ו- 3). קבוצה 2 בודדה רק מנשירים בעוד שקבוצה 4 נמצאה מעט בנשירים אך גם במאכסנים אחרים כגון מנגו וגפן. נמצאו הבדלים גנטיים בין אוכלוסיות *L. theobromae* שבודדו מאבוקדו לבין האוכלוסיות שבודדו מנשירים ומגפן. אוכלוסיות הפטרייה *L. pseudotheobromae* נמצאו רק על גבי גפנים ואבוקדו והתקיימו ללא מבנה אוכלוסייתי נפרד בין המאכסנים השונים. ממצאים אלה אנו מסיקים כי זרימת הגנים בין אבוקדו לנשירים אינה חופשית ושקיימים גורמי סלקציה המגבילים את המעבר בין שני הפונדקאים.

בשנות המיזם השנייה והשלישית ניסינו לפתח כלי לחקר הביולוגיה של גורם המחלה: תבדיד של הפטרייה המהונדס גנטית ל- GFP (חלבון פלואורסצנטי זוהר). מאמצי המחקר בתחום זה לא צלחו ולא קיבלנו תבדי מהונדס זוהר.

במסגרת המחקרים שעסקו במטרת המיזם השלישית ניסינו לפתח פתרונות להתמודדות עם הבעיה במטעים קיימים. ההנחה שעמדה בבסיס חלק זה של המחקר הייתה שחלק מהעצים שכבר נטועים נגועים בגורמי המחלה. בניסויים שבצענו בשיתוף עם חברת לוכסמבורג מצאנו ששימוש בתכשיר קנון מפחית את התמותה של השתילים הצעירים ומשפר את המצב התברואתי של עצים מבוגרים. בהסתמך על ממצאי הניסויים שבצענו התכשיר קיבל רישוי מהשירותים להגנת הצומח והוא מומלץ לשימוש על ידי אנשי שירות ההדרכה והמיקצוע. אבל, חוסר מידע בסיסי מונע את האופטימיזציה של השימוש בתכשיר.

אין למעשה מידע אודות הסיבה לפעילותו של התכשיר (הוא אינו פעיל כפונגיציד והוא אינו קוטל את הפטריות המעורבות), אין מידע אודות משך פעילותו ולגבי היעילות של יישומים עוקבים. במסגרת המיזם בחנו נושאים אלה במחקר שעל פניו הוא מחקר בסיסי אבל השלכותיו יהיו יישומיות. מן הראוי לציין שבתוכנית העבודה המקורית לא תכננו לעסוק בנושא ועשינו זאת בגלל ממצאי הביניים שהושגו. הדבר התאפשר בגלל צורת הניהול הגמישה של המיזם ובגלל שהוא מנוהל באופן בלתי תלוי על ידי וועדת היגוי חיצונית המנווטת את כיווני המחקר שיתבצעו על פי הממצאים שהושגו. מחקר זה התמקד בחקר המנגנון בו משפיעה חומצה זרחיתית (המרכיב הפעיל בקנון) על עצי אבוקדו. היפותזת העבודה הייתה שהחומר לא פעיל ישירות כנגד הפטריות אלא משפעל את מערכת ההגנה הטבעית של העצים. מכלול התוצאות שקיבלנו תומך אם כן ברעיון שטיפול ב"קנון" באבוקדו משפעל מנגנון "פרימינג" ועשוי ע"י כך להקנות הגנה מסוימת בעת הדבקה בבוטריוספריה. כדי לבדוק נושא זה, ביצענו בשנת מחקר זו ניסיונות במערכת שתילי 'האס' שטופלו ב"קנון" ואולחו כעבור שלושה ימים בתפטיר בוטריוספריה. כצמחי ביקורת, השתמשנו בשתילים לא מטופלים שאולחו בפטרייה. מדידות שבוצעו חודשיים לאחר האילוח, הראו כי התפשטות התפטיר באזור האילוח הייתה כצפוי מוגבלת בצמחים שטופלו ב"קנון", בהשוואה לצמחי ביקורת. למרות זאת, ובאופן מפתיע, גם כתשעה חודשים לאחר האילוחים לא נראו סימנים וויזואליים של התפשטות המחלה בשתילי הביקורת ובשתילים המטופלים ולכן לא ניתן היה לאושש את ההנחה שהטיפול המקדים ב"קנון" אכן הגביל את התפשטות המחלה. יש לחזור על ניסויים אלו בצורה מורחבת בכדי לבדוק בצורה מעמיקה יותר את רמת ההגנה שמקנה טיפול ה"קנון" לאחר הדבקה בבוטריוספריה.

מאחר והשגנו את היעד של המיזם באבוקדו כבר בשנת המיזם השנייה התחלנו לעסוק בשנה זו בהיקף מוגבל, ובשנת המחקר השלישית בהיקף מלא, בחקר גורמים המשפיעים על התפתחות המחלה בעצי אבוקדו ונשירים מבוגרים. בנשירים, עקבנו אחר התפתחות העצים הפגועים ואחר יצירת היבול והראינו שהמחלה גורמת לעיכוב בהתפתחות העצים ולפגיעה בכמות היבול ובאיכותו. באבוקדו בחנו דרכים שונות לבקרת המחלה בעצים מבוגרים נגועים, ובכלל זה הגמעת העצים בקנון וגיזום. מצאנו שהגמעת העצים המבוגרים בקנון משפרת במידת מה את בריאות העצים אך רק בחלק מהמקרים ולא בהכרח בצורה משמעותית. התברר שיזום הענפים היבשים והרחקתם הוא אמצעי יעיל מאד והעצים שנגזמו נשארו בריאים במשך זמן רב. מאחר ומקובל היום להשאיר את הגזם במטע ולרסקו במרסקת מקצועית בחנו את משך ההישרדות של פטריות הבוטריוספריה בגזם המרוסק ומצאנו שהן שורדות לפרקי זמן של כמה חודשים. בחנו גישות שונות לטיפול בגזם המרוסק המאולח (חיטוי סולארי, ריסוסים באוריאה) והתברר שהשיטות שבחנו לא היו יעילות ויישומן לא קטל את הפתוגנים. המסקנה היא שבמטעי האם, בהם צריך לשמור על בריאות העצים באופן בלתי מתפשר, יש להוציא את הגזם מהמטע ולא לרסקו

בשטח. בשנת המיזם השלישית עסקנו בנושא חדש נוסף - חקר האטיולוגיה של המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים באבוקדו ובמנגו ופיתוח גישות לבקרתה. מן הראוי לציין כאן שהמחקר במנגו לא תוכנן בהתחלה ועסקנו בו מאחר והתברר שפטריות הבוטריוספריה גורמות לנזקים משמעותיים גם בגידול זה. מצאנו שפטריות הבוטריוספריה מאכלסות פרחים ותפרחות וגורם לנשירה משמעותית של חנטים ופירות צעירים. הראנו גם שריסוס תכשירי הדברה בתקופת הפריחה מפחית את נשירת הפירות (באבוקדו) ואת התפתחות ריקבנות עוקץ (במנגו) באיחסון. ההשפעות של טיפולי הפריחה בניסויים שבעכנו על כמות היבול ואיכותו היו משמעותיות מאד ויש לחזור על הניסויים בקנה מידה רחב כדי לאוששם. בנשירים הראינו שהגורם להתייבשות ענפים ולתמותת עצים בוגרים הוא שילוב בין פטריות בהוטריוספריה לפטריית הקירבון פלינוס. לממצא זה חשיבות מפני שהמשמעות היא שהגנה על העצים במטע (ובמיוחד על פצעי הגיזום) במטע בפני פטרייה זו עשויה להפחית משמעותית את הנזק שיגרם לעצים שכבר מאולחים בבוטריוספריה.

פרסומים מדעיים

Ezra, D., Hershovich, M. and Shtienberg, D. 2017. The etiology of gummosis syndrome of deciduous fruit trees in Israel and its impact on tree productivity. Plant Disease 101: (accepted for publication)

פטנטים. לא הוגשו פטנטים שנבעו ממחקר זה

הרצאות וימי עיון:

עזרא ד., סימנסקי א., אנטמן ש., שולחני ר., בורנשטיין מ., גולני מ., הרשקוביץ מ., ליארי א., שטיינברג ד. 2015. בוטריוספריה בנשירים: הגדרת הגורם הפתוגני והתפתחות המחלה בשתילים ובעצים. הועידה ה-36 של העמותה הישראלית לפיטופתולוגיה. בית דגן (תקציר).

שטיינברג, סימנסקי א., שולחני ר., בורנשטיין מ., גולני מ., לוי אוקון נ., שרון מ., ופרימן ס. 2015. התייבשות ותמותה של עצי אבוקדו צעירים: זיהוי הגורם הפתוגני ופיתוח גישות להתמודדות עם הבעיה. הועידה ה-36 של העמותה הישראלית לפיטופתולוגיה. בית דגן (תקציר).

בשנות היזם הראשונה והשנייה היו **37 אירועים** (סיורים מקצועיים, הרצאות בכנסים ובימי עיון) בהם הוצגו ממצאי המיזם לחוקרים, אנשי הדרכה, מגדלים, ואחרים, בכל רחבי הארץ. רשימת האירועים

שהתקיימו הוצגה בדו"חות המיזם שהוגשו בשנים הקודמות. בטבלה הבאה מוצגים האירועים שהתקיימו בשנת המיזם השלישית:

תאריך	מקום	פורום	משתתפים	אירוע
28/1/2016	ראשון לציון	סיכום עונה ארצי – ענף האבוקדו	העוסקים בענף האבוקדו	הרצאה
3/2/2016	הגושרים	קורס שנתי	מגדלים, מדריכים ואנשי תעשייה	הרצאה
22/2/2016	גרנות	סיכום עונה	מגדלי אבוקדו	הרצאה
10/3/2016	ראשון לציון	קורס מגדלי אבוקדו	מגדלי אבוקדו	הרצאה
13/4/2016	אוהלו	קורס פקחים	פקחים, מגדלים ואנשי הדרכה	הרצאה
22/2/2017	גרנות	שולחן אבוקדו	חברי שולחן האבוקדו במועצת הצמחים	הרצאה
27/3/2017	ראשון לציון	סיכום עונה ארצי – ענף האבוקדו	העוסקים בענף האבוקדו	הרצאה

תוספת למיזמים

1. כיצד שילוב התוצאות של קבוצות המחקר מקרב את המיזם לקראת מימוש יעדיו

החוקרים השותפים במיזם עבדו בהרמוניה מלאה תוך שיתוף פעולה פורה. החוקרים נפגשים מידי חודש-חודשיים לדיון ולעידכון הדדי של הממצאים. תבדידים של גורמי המחלה הנאספים על ידי חוקר אחד עוברים לחוקרים האחרים. כל החוקרים השותפים משתמשים באותן שיטות עבודה כדי שתהיה הלימה של הממצאים. יש קשר הדוק עם שולחנות המגדלים, מדריכי הגידול והנוטעים עצמם. וועדת ההיגוי והוועדה המקצועית של המיזם התכנסו במהלך 2016 לכמה פגישות דיווח והדיונים המקצועיים שהתקיימו שיפרו משמעותית את המחקרים. ממצאי המחקרים מיושמים מיידית בשטח.

ההוכחה הטובה ביותר לקיומם של קשרי עבודה פוריים של השותפים במיזם היא העובדה שצוות עוזרי המחקר שהשתתפו בו זכה בתואר "צוות מצטיין" בתחרות העובדים והצוותים המצטיינים של משרד החקלאות ופיתוח הכפר. הצוות נבחר לעלות לתחרות בשלב הבין-משרדי. הטקסט המפרט את הנימוקים לזכייה (שנכלל בדו"ח שהגשנו בשנה שעברה ולא יפורט כאן שוב) תיאר בצורה טובה ובלתי אמצעית את שיתוף הפעולה המתקיים בין קבוצות המחקר השותפות במיזם.

חשוב לציון כאן את התרומה הגדולה שהייתה למבנה של מיזמי חוס"ן להצלחת המיזם. וועדת ההיגוי נפגשה כמה פעמים מידי שנה לקבלת דיווחים על ביצוע המחקרים ולקבלת החלטות על כיווני המחקר בשנה העוקבת. וועדת ההיגוי החליטה במהלך המיזם לאשר שלושה כיווני מחקר חדשים (אבוקדו – מחקרים בעצים מבוגרים; חשיבות התפתחות המחלה בפריחה של עצי מנגו; חקר מנגנון הפעולה של

קנון) שלא נכללו בהצעת המחקר המקורית ונבעו מתובנות שעלו במהלך המיזם. גם המפגשים של הוועדה המקצועית, בה שותפים חוקרים, מדריכים, ואנשי מקצוע אחרים תרמו רבות לאיכות המחקרים שבוצעו ולהצלחת המיזם. אנו ממליצים שמתכונת מיזמי חוס"ן תיושם בכל המיזמים היישומיים המבוצעים.

סיכום המחקרים שבוצעו

מטרות למחקרי המשך	סטיות ושינויים	מסקנות ולקחים	מטרות המחקר בשנה הנוכחית	תחות וקבוצת המחקר* אבוקדו [#] - 1
חקר ההפצה האווירנית ביובש של הפטריות; אימות הממצאים ופיתוח גישות להגנה על תפרחות למניעת נשירת פירות	קבוצת המחקר סיימה את משימותיה בשנת המיזם השנייה והמחקר שבוצע השנה הוא תוספת לתוכנית המקורית	הפתוגן נפוץ אווירנית ביובש, תוקף אברי ריבוי וגורם לנשירת פירות	חקר הביולוגיה והאטיולוגיה של גורם המחלה ובחינת גישות לבקרתה בעצים מבוגרים	
פיתוח שיטה לטיפול בעיניים נגועות המשמשות כחומר ריבוי	קבוצת המחקר עמדה בכל היעדים שהוקצו לה ומעבר לכך	עיניים מאולחות עשויות להוות מקור מידבק ראשוני. יש הבדלים בתגובת כנות לגורם המחלה. נראה שפעילות משותפת של פטריות בוטריוספריה ופטריית ריקבון פלינוס גורמות לפגיעה בעצים מבוגרים	הגדרת מקורות המידבק הראשוני והתמודדות עימם וחקר ההשפעה המשולבת של פטריות מקבוצות שונות	נשירים – 2
אופטימיזציה של הטיפול בתפרחות	נושא שלא הוגדר בתוכנית המחקר המקורית. הוא נוסף בגלל ממצאי שנת המיזם השנייה	ריסוסים בפריחה מאפשרים למנוע את התפתחות ריקבונות עוקף בפירות לאחר הקטיף	בחינת ההשפעה של אילוח פרחים וחנוטים בגורם המחלה על התפתחותה בפירות	מנגו [#] – 3
בחינת השונות הגנטית הגדלה הקיימת באוכלוסיות הפתוגנים בגפן	קבוצת המחקר עמדה בכל היעדים שהוקצו לה	זרימת הגנים בין אבוקדו לנשירים אינה חופשית וקיימים גורמי סלקציה המגבילים את המעבר בין שני הפונדקאים.	בחינת ההרכב הגנטי של אוכלוסיות פטריות הבוטריוספריה במאכסנים שונים	ביולוגיה של אוכלוסיות – 4
בדיקה בניסויים מבוקרים של השפעת הקנון העצים מאולחים	נושא שלא הוגדר בתוכנית המחקר המקורית. הוא נוסף בגלל ממצאי שנת המיזם הראשונה	טיפול ב"קנון" באבוקדו משפיע מנגנון "פרימינג" ועשוי ע"י כך להקנות הגנה מסוימת בעת הדבקה בבוטריוספריה.	חקר מנגנון הפעולה של קנון (חומצה זרחיתית) במניעת המחלה באבוקדו	מנגנון פעולה של קנון [#] – 5
אין טעם להמשיך במחקר		לא הייתה הצלחה בהכנת תבדידים מהונדסים	הכנת תבדידי פטרייה מהונדסים המכילים את חלבון GFP - ה	יחסי גומלין פתוגן-פונדקאי – 6

* המספרים הרשומים בטבלה תואמים את מספרי קבוצות המחקר המצוינים באיור מספר 1
[#] מחקרים חדשים שלא נכללו בהצעת המחקר המקורית שהוגשה. הם בוצעו בעקבות החלטת וועדת ההיגוי של המיזם לקיימם.

סיכום עם שאלות מנחות לדו"ח מחקר מס': 15-1739-132

הניסויים שנעשו תוך השוואה לתוכנית העבודה:

תוכנית העבודה שפורטה בהצעת המחקר בוצעה במלואה, בחלק מהמקרים כבר סיימנו את המתוכנן כבר בשנים הקודמות. חלק מהניסויים שבצענו בשנת המיזם השלישית לא נכללו כלל בתוכנית העבודה מפני שהוחלט עליהם כהרחבה של התוכנית הראשונית. בכלל זה: חקר התפתחות המחלה בעצי אבוקדו ונשירים מבוגרים, התפתחות המחלה במנגו, חקר מנגנון הפעולה של קנון, ועוד.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:

בקרת המחלה בחומר ריבוי של נשירים. בחינת גישות לבקרת המחלה באיברים ווגטיביים (ענפים) של עצי אבוקדו מבוגרים ובאיברים רפרודוקטיביים (תפרחות ופירות) של עצי אבוקדו ומנגו. חקר מנגנון הפעולה של התכשיר קנון. איפיון אוכלוסיות פטריות הבוטריוספריה במאכסנים שונים.

כיצד הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח:

כל המטרות המתוכננות של המיזם הושגו. חלקם (כפי שצוין) – כבר בשנת המיזם הראשונה. לכן בצענו מחקרים נוספים שלא נכללו בהצעת המחקר המקורית, בהצלחה רבה.

מה התבצע מתוך טבלת המשימות ואבני הדרך:

הכל (ויותר מכך).

מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו בעתיד:

המפתח להתמודדות עם הנזק שגורמות פטריות הבוטריוספריה במשתלות של אבוקדו ונשירים ובנטיעות צעירות הוא שימוש בחומר ריבוי נקי. ניתן להתמודד עם התפתחות המחלה ועם הנזק שהיא גורמת במטעים המבוגרים. בניגוד לידוע בספרות, נבגי הפטריות מופצים אווירנית ביובש, דבר שיש לו השלכות מרחיקות לכת מבחינת האפידמיולוגיה של המחלה. הנזק הנגרם לעצי נשירים מבוגרים הוא תוצאה של קומפלקס פטריות – פטריות בוטריוספריה ופטריות רקב – המנגע את העצים. הגנה על העצים בפני חלק מהקומפלקס ימנע את הנזק.

הבעיות שנותרו לפיתרון ושינויים שחלו בעבודה ומה אמורה להיות ההתייחסות בהמשך:

מאחר והמחקרים הנוגעים במשתלות ובנטיעות צעירות הסתיימו, יש לשים לב במחקרי המשך לנושא ההפצה האווירנית ביובש של נבגי הפטריות ולמשמעות ההדבקות של תפרחות ופרחים על התפתחות הפירות לפני ואחרי האיחסון.

פירוט בכתב:

Ezra, D., Hershovich, M. and Shtienberg, D. 2017. The etiology of gummosis syndrome of deciduous fruit trees in Israel and its impact on tree productivity. Plant Disease 101: (accepted for publication)

פטנטים:

לא הוגשו פטנטים שנבעו ממחקר זה.

הרצאות וימי עיון (בשנת המיזם השלישית):

עזרא ד., סימנסקי א., אנטמן ש., שולחני ר., בורנשטיין מ., גולני מ., הרשקוביץ מ., ליארזי א., שטיינברג ד. 2015. בוטריוספריה בנשירים: הגדרת הגורם הפתוגני והתפתחות המחלה בשתילים ובעצים. הועידה ה-36 של העמותה הישראלית לפיטופתולוגיה. בית דגן (תקציר).

שטיינברג, סימנסקי א., שולחני ר., בורנשטיין מ., גולני מ., לוי אוקון נ., שרון מ., ופרימן ס. 2015. התייבשות ותמותה של עצי אבוקדו צעירים: זיהוי הגורם הפתוגני ופיתוח גישות להתמודדות עם הבעיה. הועידה ה-36 של העמותה הישראלית לפיטופתולוגיה. בית דגן (תקציר).

תאריך	מקום	פורום	משתתפים	אירוע
28/1/2016	ראשון לציון	סיכום עונה ארצי – ענף האבוקדו	העוסקים בענף האבוקדו	הרצאה
3/2/2016	הגושרים	קורס שנתי	מגדלים, מדריכים ואנשי תעשייה	הרצאה
22/2/2016	גרנות	סיכום עונה	מגדלי אבוקדו	הרצאה
10/3/2016	ראשון לציון	קורס מגדלי אבוקדו	מגדלי אבוקדו	הרצאה
13/4/2016	אוהלו	קורס פקחים	פקחים, מגדלים ואנשי הדרכה	הרצאה
22/2/2017	גרנות	שולחן אבוקדו	חברי שולחן האבוקדו במועצת הצמחים	הרצאה
27/3/2017	ראשון לציון	סיכום עונה ארצי – ענף האבוקדו	העוסקים בענף האבוקדו	הרצאה

פרסום הדו"ח:

ללא הגבלה.



נספח לדו"ח של שנת המיזם השלישית

מיזם חוסין בוטריוספריה: חקר הגורמים הפתוגנים המעורבים ופיתוח שיטות למניעת הנזק באבוקדו, נשירים ומנגו

מוגש לוועדת ההיגוי של המיזם

ע"י

דני שטיינברג, סטנלי פרימן, דוד עזרא, עומר פרנקל, נועם אלקן וורד יריחימוביץ

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

מעין גולני

חברת לוכסמבורג תעשיות בע"מ, תל-אביב

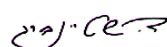
אלי סימנסקי

חברת נבטים, מושב כרמל

במחקר שותפו האנשים הבאים:

מכון וולקני: רן שולחני, מנחם בורנשטיין, מרסל מימון, מיכל הרשקוביץ, אורנה ליארזי, מיכל שרון, חופית קול מימון, אייל הלון, עדי פייגבוים, תום שריר, מעין גרינברג ברן. **שרות ההדרכה והמקצוע:** מיקי נוי, הדר כהן, ליאו וינר, אלי קלוסקי. **מועצת הצמחים:** יונתן מעוז, משה ברוקנטל, רני בר-נס, אודי גפני. **השרותים להגנה"צ:** נוספים: אהוד אדלר, ברק כהן, רוני לוי.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים. הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר הראשי: 

חברי וועדת ההיגוי של המיזם

מועצת הצמחים: משה ברוקנטל (מנהל אירגוני של המיזם), אודי גפני, רני בר-נס, יונתן שאולסקי; **מועצת גפן יין:** צחי דותן; **שה"מ:** יוסי גרינברג; **שירותים להגנה"צ:** עדנה לוי; **מו"פ צפון:** אלקנה בן ישר; **מכון וולקני:** דני שטיינברג.

חברי הוועדה המקצועית של המיזם

מינהל המחקר החקלאי: דני שטיינברג (מרכז הוועדה המקצועית של המיזם), סטנלי פרימן, דוד עזרא, עומר פרנקל, משה פליישמן, אתי אור; **מו"פ צפון:** דורון שניידר, אדולפו לוין, מרי דפני ילין; **שרות ההדרכה והמקצוע:** שמוליק גרוס, שאול בן יהודה, מיקי נוי, שמעון אנטמן, ערן הרכבי; **השירותים להגנת הצומח:** ראול קלינרמן; **מועצת הצמחים:** איציק דהאן; **אנשי הדרכה בהגנת הצומח:** אלי סימנסקי, סיגל פרץ, שמוליק עובדיה. **שתלנים:** ברכה אור, זוהר חנני, אבישי חסקלברג, אלי חייט.

תוכן העניינים

עמוד

25	תקציר מנהלים
28	פרק 1: התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה באבוקדו דני שטיינברג, סטנלי פרימן, רן שולחני, מנחם בורנשטיין, אלי סימנסקי, יונתן מעוז
48	פרק 2: התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה בנשירים דוד עזרא, מעין גרינברג בן ודני שטיינברג
61	פרק 3: התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה במנגו נועם אלקן
67	פרק 4. מעבר אוכלוסיות הפטריות מהסוג הבוטריוספריה בין עצי פרי שונים עומר פרנקל, דוד עזרא, חופית קול מימון, דני שטיינברג, סטנלי פרימן, נועם אלקן, תום שריר, אורנה ליארוזי, רן שולחני, מנחם בורנשטיין, מיכל שרון ומיכל הרשקוביץ
77	פרק 5. חקר מנגנון השראת עמידות באבוקדו באמצעות ריסוס החומר "קנון" ורד יריחימוביץ, אייל הלון, עדי פייגנבוים, דני שטיינברג, רן שולחני, סטנלי פרימן
97	פרק 6. פיתוח כלי לבחינה (ברמת הצמח השלם) של יחסי הגומלין המתקיימים בין הפתוגן לפונדקאי סטנלי פרימן ומרסל מימון
101	פרק 7. נספח – דיווח על הממצאים בשנת המיזם השלישית

תקציר מנהלים

בשנים האחרונות זוהו בעצי פרי ממינים שונים, בגפני מאכל ויין, בעצי נוי ובעצי יער תסמיני התייבשות של ענפים ובמקרים חמורים אף התמוטטות ותמותה של עצים. בעיה קשה בקנה מידה ארצי נצפתה בנטיעות חדשות ובמיוחד של אבוקדו, אפרסק ונקטרינה. כמו כן, דווח ממשתלות אחדות על תמותה ניכרת בשנים האחרונות של שתילים במהלך הייצור, משלב ההרכבה ואילך; מדובר במאות אלפי שתילים. פגיעה משמעותית נצפתה גם בעצים בוגרים של מיני נשירים שונים ובכלל זה משמש, אפרסק, נקטרינה, שזיף (בחלק מהזנים) ובמטעים בוגרים של אבוקדו. בחודש ינואר 2014 הוקם מיזם ארצי שנקרא חוס"ן בוטריוספריה. המטרות הספציפיות של המיזם, כפי שהוגדרו על ידי הוועדה המקצועית שלו, הם: 1. לאפיין את מקורות המידבק הראשוני העיקריים של פטריות מקבוצת הבוטריוספריה המנגעות עצי אבוקדו ונשירים; 2. לפתח גישות ליצור חומר ריבוי של אבוקדו ונשירים הנקי ממחלות הנגרמות על ידי פטריות מקבוצת הבוטריוספריה; 3. לפתח גישות להתמודדות עם נגיעות בפטריות מקבוצת הבוטריוספריה בנטיעות חדשות של אבוקדו ונשירים ובעצים בוגרים המשמשים כעצי אם. בדו"ח זה אנו מדווחים על התוצאות של הבדיקות והניסויים שבצענו בשנת המיזם השלישית.

במחקר שבצענו בשנת המיזם השלישית **באבוקדו** התרכזנו בשלושה נושאים הקשורים להתפתחות המחלה במטעי אבוקדו בוגרים. הנושא הראשון של המחקר התמקד בחקר הביולוגיה של גורם המחלה תוך התמקדות בהפצה אווירנית של נבגים א-מיניים. בחלק זה של המחקר פיתחנו מערך ניסויי לבחינת ההפצה האווירנית של נבגים א-מיניים והוכחנו שהם אכן מופצים במרחב, ביושב. לממצא זה משמעויות מרחיקות לכת לגבי האפידמיולוגיה של גורם המחלה. הנושא השני של המחקר התמקד בחקר האטיולוגיה של המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים ופיתוח גישות לבקרתה. מצאנו שהפתוגן מאכלס פרחים ותפרחות וגורם לנשירה משמעותית של חנטים ופירות צעירים. הראנו גם שריסוס תכשירי הדברה בתקופת הפריחה מפחית את הפגיעה באיברים הרפרודוקטיביים. הנושא השלישי של המחקר התמקד בבחינת גישות להתמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטיביים של עצים בוגרים. הראנו שגיזום והרחקה של ענפים יבשים מאפשר לעצים להתאושש ולהתפתח כראוי. בנוסף בחנו את האפשרות שריסוס רסק גזם נגוע באוריאה יעודד את ההתפתחות של מיקרואורגניזמים

שיפרקו את החומר הצמחי המאולח. הטיפול לא היה יעיל ולא קיים עדיין אמצעי לטיפול בגזם נגוע.

במחקר שבצענו בשנת המיזם השלישית **בנשירים** ניסנו לברר האם יש הבדלים ברגישות כנות שונות לגורמי המחלה. מצאנו שיש הבדלים משמעותיים ברגישות הכנות השונות להדבקה על ידי בוטריוספריה שמקורה ברכב נגוע. הכנה מריאנה נפגעה בצורה הקשה ביותר מבין הכנות שנבדקו ואחריה הכנה 677 כאשר הכנה אנסן הייתה הפחות רגישה משלושתן. המשכנו בניסיונות לפתח פרוטוקול לטיפול בחומר הרכב על ידי טבילתו בחומרי הדברה. טבילת עיניים מאולחות בתכשיר סוויץ לא פגע בחיוניות העיניים אך הוא לא היה יעיל במניעת המחלה. להערכתנו טיפול בחומר הרכב של נשירים בחומרי הדברה אינו יעיל ולא יוכל לשמש כפתרון. המשכנו את המעקב אחרי עצים שהודבקו בשנה הראשונה של מיזם בפלינוס ובבוטריוספריה ומצאנו ששילוב של שתי הפטריות מעודד את המחלה אך פטריות הבוטריוספריה שומרות על הדומיננטיות בגרימת הנזק.

בשנת המיזם השלישית בצענו מחקרים גם **במנגו** מאחר וריקבון העוקץ היא אחת המחלות השכיחות ביותר בגידולים סובטרופיים. בניסויים בחנו את היעילות של ריסוסים שיושמו הפריחה על התפתחות המחלה בפירות לפני ואחרי הקטיף. נמצא כי ריסוסי פונגיצידיים בפריחה הפחיתו בחצי את כמות הענפונים המתים לעץ. בנוסף, נמצא כי פירות אשר נקטפו מעצים אשר רוססו בפונגיצידיים בפריחה פיתחו באופן משמעותי פחות ריקבונות עוקץ לאחר אחסון ארוך. הפתוגנים העיקריים הגורמים לריקבונות בפירות מנגו לאחר קטיף הם *Lasiodiplodia* ו- *Alternaria*, בבדיקה ראשונית בצלחות נמצא כי פטריות אלו רגישות יותר לתכשיר ההדברה 'פלודיאוקסוניל' (סקולר) מאשר לתכשיר 'פרוכלורז' (ספורטק- הנמצא בשימוש מסחרי לאחר הקטיף). אכן, טיפול לאחר קטיף ב'פלודיאוקסוניל' (סקולר) בפירות מנגו מודבקים בלסיודיפלודיה הפחית באופן מובהק את אחוז וחומרת הריקבון בהשוואה לטיפול ב'פרוכלורז' (ספורטק).

במסגרת המחקר פיתחנו סמנים לחקר המבנה של אוכלוסיות הפטריות המשתייכות לסוג בוטריוספריה כדי לבחון באם הם יכולים לעבור בין מאכסנים שונים וכדי ללמוד ולהבין מהם מקורות המדבק הראשוניים והשניוניים. נמצא כי במין *N. dimidiatum* קיימות בארץ שתי קבוצות גנטיות מרכזיות (קבוצות 2 ו- 4) ועלו עדויות לקיום של שתי קבוצות נוספות (קבוצה 1 ו- 3). קבוצה 2 בודדה רק מנשירים בעוד שקבוצה 4 נמצאה מעט בנשירים אך גם במאכסנים

אחרים כגון מנגו וגפן. תבדידי קבוצה 4 היו אלימים יותר מתבדידי קבוצה 2 גם כשנבחנו על ענפוני נשירים וגם על ענפוני מנגו ואבוקדו. עבור אוכלוסיות ה *L. theobromae* נמצאו הבדלים גנטיים בין אוכלוסיות שבודדו מאבוקדו לבין אוכלוסיות שבודדו מנשירים ומגפן. מהממצאים נראה כי זרימת הגנים בין האבוקדו לנשירים איננה חופשית ושקיימים גורמי סלקציה המגבילים אותה.

בשנים הקודמות של המיזם מצאנו שטיפול בתכשיר "קנון", המכיל את החומר הפעיל חומצה זרחיתית, הפחית באופן מובהק תמותת שתילי אבוקדו נגועים. במבחי רעילות של התכשיר כנגד הפטרייה בצלחות פטרי לא נמצא עיכוב בגידול התפטיר ולכן העלינו את ההיפותזה שהתכשיר משרה עמידות בצמחים המטופלים. במחקר שבצענו השנה בחנו הנחה זו וניסינו לאפיין את מערך הגנים המשופעלים לאחר הטיפול ולבחון באם טיפול חוזר משפר ומאריך את משך ההשפעה של הטיפול. מכלול התוצאות שקיבלנו אושש את ההנחה שטיפול ב"קנון" באבוקדו משפעל מנגנון "פרימינג" ועשוי ע"י כך להקנות הגנה מסוימת בעת הדבקה בבוטריוספריה. כדי לבדוק נושא זה, ביצענו בשנת מחקר זו ניסיונות במערכת שתילי 'האסי' שטופלו ב"קנון" ואולחו כעבור שלושה ימים בתפטיר בוטריוספריה. כצמחי ביקורת, השתמשנו בשתילים לא מטופלים שאולחו בפטרייה. מדידות שבוצעו חודשיים לאחר האילוח, הראו כי התפשטות התפטיר באזור האילוח הייתה מוגבלת בצמחים שטופלו ב"קנון", בהשוואה לצמחי ביקורת.

בספרות המקצועית דווח שפטריות מהסוג הבוטריוספריה חודרות לרקמות צמחיות דרך פצעים. כדי לבחון את מיקום הפטרייה ברקמות הנגועות ניסינו לבצע טרנספורמציות מולקולריות של הגן המדווח GFP (חלבון פלואורסצנטי זוהר) בתבדידי הפטריות *L. pseudotheobromae* ו- *L. theobromae*. כל הניסויים וכל שיטות הטרנספורמציה בהם השתמשנו לא צלחו ולא הצלחנו לפתח את כלי המחקר היעיל הזה לחקר יחסי הגומלין שבין הפתוגן לפונדקאים שלו.

פרק 1: התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה באבוקדו

דו"ח לשנת המחקר השלישית

המוגש לוועדת ההיגוי של מיזם חוס"ן בוטריוספריה

ע"י

דני שטיינברג, סטנלי פרימן, רן שולחני, מנחם בורנשטיין
המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

אלי סימנסקי
חברת נבטים, מושב כרמל

יונתן מעוז
מועצת הצמחים

1. תקציר

במחקר שבצענו בשנת המיזם השלישית התרכזנו בשלושה נושאים הקשורים להתפתחות המחלה במטעי אבוקדו בוגרים. הנושא הראשון של המחקר התמקד בחקר הביולוגיה של גורם המחלה תוך התמקדות בהפצה אווירנית של נבגים א-מיניים. תצפיות שבצענו בשנים האחרונות העידו, לכאורה, שההפצה של אברי הריבוי של פטריית הבוטריוספריה בארץ היא אווירנית. מאחר והפטירות משתייכות למערכת פטריות השק הסקנו שההדבקה התרחשה על ידי נבגי שק. אבל, למרות ניסיונות חוזרים ונשנים שאותם בצענו מאז שנת 2012, מועד התחלת המחקר, לא הצלחנו ולו פעם אחת, לזהות גופי פרי מיניים של בוטריוספריה. בהסתמך על דגם הפיזור המרחבי של המחלה, בגלל שלא הצלחנו לזהות ולו פעם אחת את השלב המיני של גורם המחלה, ומסיבות נוספות שלא יפורטו כאן, העלינו את ההיפותזה שבתנאים המתקיימים בארץ הנבגים הא-מיניים של פטריות מהסוג בוטריוספריה מופצים אווירנית, ביובש. בחלק זה של המחקר פיתחנו מערך ניסויי לבחינת ההפצה האווירנית של נבגים א-מיניים והוכחנו שהם אכן מופצים במרחב, ביובש. לממצא זה משמעויות מרחיקות לכת לגבי האפידמיולוגיה של גורם המחלה.

הנושא השני של המחקר התמקד בחקר האטיולוגיה של המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים ופיתוח גישות לבקרתה. בחודש מאי 2015 היה בכל רחבי הארץ גל חום שגרם לנשירה של פרחים ושל חנטים צעירים. בחלק מהמקרים נראו על השזרות של התפרחות תסמינים הדומים לאלה המתפתחים על ענפים הנגועים בבוטריוספריה. עם חלוף הזמן התסמינים התקדמו מהתפרחות אל הענפים שנשאו אותן וגם עליהם התפתחו תסמיני המחלה האופייניים. נשירת פירות צעירים היא תופעת ידועה באבוקדו והיא מתרחשת במקרים רבים בעצים הנמצאים בשנת "און" (עצים הנושאים יכול כבד). הנשירה הטבעית מוגבלת לשלבים הראשונים של התפתחות הפירות והיא לא מתרחשת לאחר מכן. לא ידוע באם איכלוס בפתוגנים מעודד את הנשירה הטבעית של הפירות ומגביר אותה, או לא. מצאנו שהפתוגן מאכלס פרחים ותפרחות וגורם לנשירה משמעותית של חנטים ופירות צעירים. הראנו גם שריסוס תכשירי הדברה בתקופת הפריחה מפחית את הפגיעה באיברים הרפרודוקטיביים.

הנושא השלישי של המחקר התמקד בבחינת גישות להתמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטטיביים של עצים בוגרים. הראנו שגיוזם והרחקה של ענפים יבשים מאפשר לעצים להתאושש ולהתפתח כראות. בנוסף בחנו את האפשרות שריסוס רסק גזם נגוע באוריאיה יעודד את ההתפתחות של מיקרואורגניזמים שיפרקו את החומר הצמחי המאולח. הטיפול לא היה יעיל ולא קיים עדיין אמצעי לטיפול בגזם נגוע.

2. מבוא

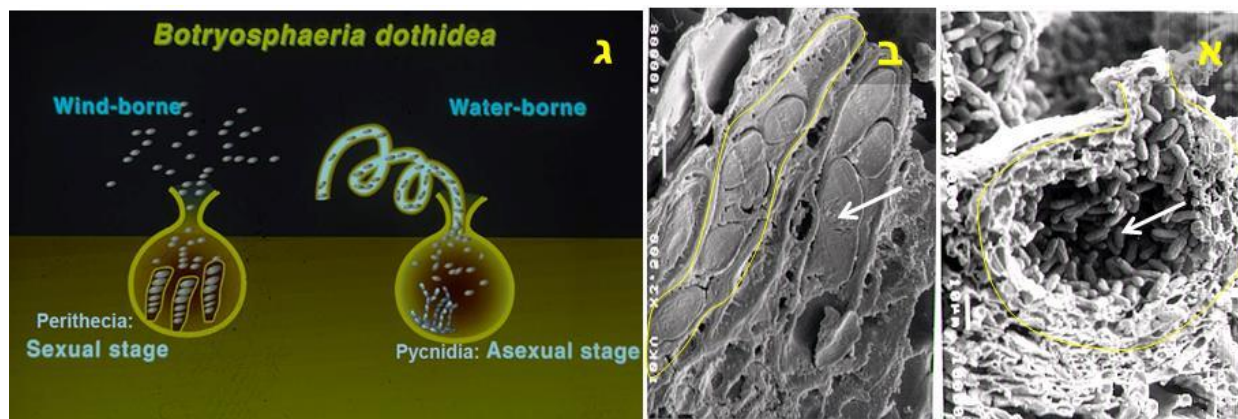
בשנים האחרונות זוהו במטעי אבוקדו בוגרים תסמיני מחלה שכללו התייבשות של ענפים ברמות חומרה שונות: מהתייבשות של ענפים בודדים במטע ועד להתייבשות של ענפים רבים בכל אחד מהעצים במטע. תסמיני התייבשות ופגיעה נראו גם על תפרחות, על חנטים ועל פירות. מענפים סימפטומטיים בודדנו בעיקר (אבל לא באופן בלעדי) פטריות המשתייכות לסוג *Botryosphaeria* ובמיוחד את המינים *Lasiodiplodia theobromae* (LT) ו- *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (LPT). הזיהוי אומת בשיטות מולקולאריות. השלמנו את מבחן קוך והוכחנו שאכן פטריות מהסוג בוטריוספריה גורמות להתייבשות ענפים. לא ידוע עדיין מה הגורם להתייבשויות ולתסמינים שנצפו בתפרחות, בחנטים ועל הפירות.

פטריות מהסוג *Botryosphaeria* משתייכות למשפחה Botryosphaeriaceae שהיא חלק ממערכת פטריות השק (Ascomycota). לפטריות המשתייכות למערכה זו שני מחזורי חיים המתקיימים זה בצד זה: מחזור חיים א-מיני (anamorph) ומחזור חיים מיני (teleomorph). שם השלב המיני של הפטרייה LT הוא *Botryosphaeria rhodina* השלב המיני של הפטרייה LPT לא זוהה עדיין. ניתן למצא מידע רב בנושא באתר: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site

במסגרת מחזור החיים הא-מיני הפטריות המשתייכות למערכת פטריות השק מייצרות גופי פרי א-מיניים הנקראים פיקנידיות (pycnidia). גופי הפרי האלה הם בצורה של כד חלול השקוע בתוך הרקמה הצמחית. הקצה של גוף הפרי נמצא מחוץ לרקמה ונראה מבחוץ כנקודה שחורה שגודלה כחצי מילימטר. בחלל גוף הפרי הא-מיני נוצרים אברי הריבוי של הפתוגן - נבגים א-מיניים - הנקראים פיקנידיוספורות (pycnidiospores). נבגים אלה הם תוצאה של רבייה וגטטיבית, א-מינית, והם זהים גנטית זה לזה ולתבדוד הפטרייה מהם נוצרו. הנבגים הא-מיניים הצעירים הם חד-תאיים וצבעם בהיר; כשהם מתבגרים הם הופכים להיות דו-תאים וצבעם הופך לכהה. חלל הפיקנידיה מלא בחומר גילטיני. כשמצטברים על פני הריקמה הצמחית הנגועה, בה שקועים גופי הפרי, מים חופשיים (מטל או מגש) נוצר הפרש לחצים אוסמוטי בין המים (הנמצאים בחוץ) לחומר הגילטיני (הנמצא בפנים). בגלל הפרשי הלחצים מים חודרים לתוך גוף הפרי וככל שכמותם גדולה יותר, כך עולה הלחץ בחלק הפנימי של גוף הפרי. בשלב מסוים הלחץ הוא כה חזק עד כי גוף הפרי מתבקע והחומר הגילטיני הממלא את החלק הפנימי שלו יוצא החוצה בצורה של פלט גילטיני. פלט זה נקרא *chirri* והוא מכיל את הנבגים הא-מיניים שהיו בתוך גוף הפרי. ויזואלית, זה נראה כמו משחת שיניים היוצאת מתוך שפורפרת של משחת שיניים הנלחצת בחוזקה (איור מספר 1 או 1 – ג1). הפלט הגילטיני נמש בפילם של המים הנמצאים על פני הרקמה הצמחית הנגועה והנבגים מתפזרים בו. כשפוגעת טיפה של מי גשם בפילם המים המכיל את הנבגים, הכוחות הקינטיים הנוצרים מתזזים נתזים לסביבה. הנתזים מכילים את הנבגים ואילו מופצים מהאיבר הצמחי הנגוע לסביבה. מרחק ההפצה של מרבית נתזי המים, והנבגים שבתוכם, קצר מאד (סנטימטרים ספורים). במידה ונושבת רוח חלק מהנתזים מופצים למרחקים של כמה עשרות סנטימטרים ולעיתים אף למרחקים של מטרים בודדים. בהתייחס להפצה של נבגים א-מיניים של בוטריוספריה ממקור מידבק פעיל במטע אבוקדו, מרבית הנבגים מופצים באותו העץ מענפים גבוהים לענפים נמוכים (בגלל שמרבית הטיפות המותזות נופלות כלפי מטה). חלק קטן של הנבגים מופצים לעצים הסמוכים באותה השורה ומיעוטם לעצים הנמצאים בשורה הסמוכה. הסבירות שנבגים א-מיניים יופצו ויגיעו לעצים רחוקים יותר באותה השורה, לשורות אחרות באותו המטע, או למטעים סמוכים, אינה גבוהה, אם בכלל. לסיכום – מקובל להניח שהפצה משנית של נבגים א-מיניים של פטריות ממערכת פטריות השק מתרחשת באופן בלעדי במהלך ירידת גשמים ושההפצה היא למרחקים קצרים.

במסגרת מחזור החיים המיני שלהן פטריות המשתייכות למערכת פטריות השק יוצרות גופי פרי מיניים הנקראים פסאודוטציות (pseudothecia). לגופי פרי אלה צורת כדור והם נוצרים על פני הרקמה הצמחית; גודלם כמילימטר אחד. בחלל גוף הפרי המיני מתפתחים שקים (asci) שבכל אחד מהם שמונה נבגי שק (ascospores). נבגי השק הם תוצאה של רבייה מינית של שני טיפוסים פטרייה והם שונים מבחינה גנטית זה-מזה ומתבדדי הפטריות מהם נוצרו. נבגי השק הם דו-תאים. לאחר שנבגי השק הגיעו לבשלות הם מופצים. ההפצה מתרחשת לאחר שגוף הפרי המיני שנרטב מגשם או מטל, מתייבש. הייבוש גורם להפעלה של כוחות קינטיים הגורמים להתפוצצות של דפנות גוף הפרי ושל הקצוות של השקים. הנבגים המיניים, נבגי השק, נורים מתוך השקים כלפי מעלה - כמו שפגזים נורים מקנה של תותח - לגובה של כמה סנטימטרים (איור מספר 1 או 1 – ג1). במידה ונושבות רוחות, הנבגים עשויים להילכד בהן ולהיות מופצים למרחקים גדולים - עד כמה עשרות קילומטרים. בהתייחס להפצה של נבגים מיניים של בוטריוספריה ממקור מידבק פעיל במטע

אבוקדו, הנבגים עשויים להיות מופצים באותו העץ, לעצים סמוכים בשורה, לעצים הנמצאים בשורות הצמודות, לשורות אחרות באותו המטע וגם למטעים סמוכים. לא מן הנמנע שההפצה תתרחש גם למטעים אחרים, שאינם נמצאים בסמוך למקור המידבק. מאחר וההפצה היא בדרך האוויר הנבגים הנופלים מאלחים בסבירות גבוהה יותר את החלקים ההיקפיים, העליונים, של העצים המודבקים ולא את החלקים הפנימיים, התחתונים, שלהם. לסיכום – מקובל להניח שהפצה משנית של נבגים מיניים של פטריות ממערכת פטריות השק מתרחשת לאורך התרחשות גשם או טל ושההפצה היא למרחקים גדולים.



איור מספר 1. צילומים במיקרוסקופ אלקטרוני סורק של גוף פרי א-מיני (pycnidia) של הפטרייה *Ascochyta rabiei* (א) ושל גוף פרי מיני (pseudothecia) של אותה הפטרייה הנקראת *Mycosphaerella rabiei* (ב). הקווים בצבע צהוב מסמנים את גבול גוף הפרי הא-מיני ואת הגבול של שק אחד החצויים לאורכם. החיצים הלבנים נבגים אל מיני ונבג מיני. בתרשים ג מוצגת סכימה של השלב האל-מיני והשלב המיני של הפטרייה *Botryosphaeria dothidea* המשתייכת גם היא למערכת פטריות השק.

תצפיות שבצענו בשנים האחרונות העידו, לכאורה, שההפצה של אברי הריבוי של פטריית הבוטריוספריה בארץ היא אווירנית. להמחשה מוצגות התמונות באיור מספר 2. באביב 2015 התפתחה נגיעות קשה במטע אבוקדו מהזן ריד של קיבוץ יקום. בחלק מהעצים התפתחה נגיעות קשה בתפרחות. הנגיעות גרמה בתחילה להתייבשות התפרחות ולאחר מכן גם להתייבשות של הענפים עליהן התפתחו התפרחות. בבידודים שנעשו מאיברים צמחיים סימפטומטיים בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה. בעצים הפגועים נראה היה שהנגיעות התפתחה מהשוליים כלפי המרכז, ועל העצים הנגועים היו מוקדי נגיעות רבים שנראו בלתי תלויים זה-בזה (איור מספר 2א). לדברי המגדל לא נצפו במטע זה תסמיני מחלה משמעותיים בשנה הקודמת והנגיעות "התפרצה פתאום". תמונה דומה נצפתה השנה, 2016, במטע אבוקדו של גשר הזיו בו זוהו בצמרות חלק מהעצים תסמיני התייבשות רבים הנראים בלתי תלויים זה בזה (איור מספר 2ב). גם במקרה זה בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה מרקמות צמחיות סימפטומטיות. התברר שגם מטע זה לא היה נגוע משמעותית בעונה הקודמת. כפי שהוסבר למעלה דגם מחלה זה תואם להדבקה של נבגים המופצים בדרך האוויר. מאחר והפטריית LT ו-LPT משתייכות למערכת פטריות השק הסקנו שההדבקה התרחשה על ידי נבגי שק. אבל, למרות ניסיונות חוזרים ונשנים שאותם בצענו מאז שנת 2012, מועד התחלת המחקר, לא הצלחנו ולו פעם אחת, לזהות גופי פרי מיניים של בוטריוספריה. מן הראוי לציין שיש לנו ניסיון בעבודה במערכות מחקר דומות: בשנת 1995 זיהינו לראשונה בארץ את השלב המיני של הפטרייה *Mycosphaerella rabiei* מחוללת מחלת האסקוכיטה בחימצה; כמה שנים לאחר מכן זיהינו את השלב המיני של הפטרייה *Peyronallaea pinodes* מחוללת מחלת האסקוכיטה באפונה, ובשתי המערכות הביולוגיות הללו בצענו מחקרים מקיפים בנושא התפתחו השלב המיני. את השלב המיני של הבוטריוספריה לא מצאנו, בכל המקרים הצלחנו לבדוד מרקמות צמחיות סימפטומטיות את השלב הא-מיני של הפטריות. נשאלת אם כן, השאלה, מה מקור המידבק הראשוני של הפטריות האלה ואיך הוא מופץ במרחב. בהסתמך על דגם הפיזור המרחבי של המחלה, בגלל שלא הצלחנו לזהות ולו פעם אחת את השלב המיני של גורם המחלה, ומסיבות נוספות שלא יפורטו כאן, העלינו את ההיפותזה שבתנאים המתקיימים בארץ הנבגים הא-מיניים של פטריות מהסוג בוטריוספריה מופצים אווירנית, ביובש. מן הראוי לציין שזו היפותזה חדשנית מאחר ולמיטב ידיעתנו לא דווח בספרות המקצועית

על הפצה אווירנית של נבגים א-מיניים של פטריות המשתייכות למערכת פטריות השק. אם תאושש היפותזה זו, מעבר לחדשנות המדעית, יהיו לכך השלכות מרחיקות לכת על פיתוח גישות לבקרת המחלה בעצים בוגרים.



איור מספר 2. תמונות שצולמו בקיץ 2015 במטע אבוקדו מהזן ריד ביקום (א) ובקיץ 2016 במטע אבוקדו מהזן האס של גשר הזיו בהם נראים תסמיני התייבשות בתפרחות ובענפים של העצים. בבידודים שבוצעו מאברי צמח סימפטומטיים בודדו פטריות מהסוג הבוטריוספריה.

באמצע חודש מאי 2015 היה בכל רחבי הארץ גל חום קיצוני. המועד היה זמן קצר לאחר סיום שלב הפריחה של האבוקדו. גל החום גרם לנשירה של פרחים ושל חנטים צעירים והיו מטעים בהם מרבית התפרחות לא נשאו פרי. התסמינים על התפרחות התחלקו לשני סוגים: הסוג הראשון כלל תפרחות בהן לאחר נשירת הפרחים והחנטים השזרות נשארו ירוקות לאורך זמן; הסוג השני כלל תפרחות בהן השזרות השחירו ונראו עליהן תסמינים הדומים לאלה המתפתחים על ענפים עשבוניים הנגועים בבוטריוספריה. עם חלוף הזמן התסמינים התקדמו מהתפרחות אל הענפים שנשארו אותן וגם עליהם התפתחו תסמיני המחלה האופייניים (איור מספר 2). לא ברור באם עקת החום הייתה הגורם הבלעדי להתייבשות התפרחות או שבנוסף לכך מעורב גם גורם פתוגני. באביב 2016 אמנם לא היה גל חום קיצוני כמו במאי 2015 אבל למרות זאת, במטעים רבים נראו תפרחות עם תסמינים דומים גם בשנה זו. לאחר שהחנטים הגיעו לגודל של 5-7 סנטימטרים, ניתן לראות על העצים פירות שהשזרה שלהם נגועה או שהחלק העליון שלהם רקוב. פירות אלה נושרים בסופו של דבר. נשירת פירות צעירים היא תופעת ידועה באבוקדו והיא מתרחשת במקרים רבים בעצים הנמצאים בשנת "און" (עצים הנושאים יבול כבד). לאחר שהפירות נושרים ניתן לראותם על הרצפה, מתחת לעצים. הנשירה הטבעית מוגבלת לשלבים הראשונים של התפתחות הפירות והיא לא מתרחשת לאחר מכן. לא ידוע באם איכלוס בפתוגנים מעודד את הנשירה הטבעית של הפירות ומגביר אותה, או לא.

התסמינים הבולטים ביותר בעצי אבוקדו נגועים בבוטריוספריה הם ענפים יבשים (איור מספר 2). במועד המתאים המגדלים גוזמים את הענפים היבשים. מסיבות שונות מקובל כיום לרסק את הגזם ולהשאירו במטע, בין העצים. בניסויים שבצענו בשנת המחקר הקודמת מצאנו שגורם המחלה שורד ברסק גזם נגוע למשך תקופה ארוכה (שלושה חודשים ויותר). בגלל החשש שרסק הגזם הנגוע משמש כמקור מידבק ראשוני של הפתוגן, יש לפתח אמצעים לקטול אותו. הניסיון לקטול את גורם המחלה המאכלס את רסק הגזם באמצעות חיפוי סולארי נכשל. דיווחנו על כך בדו"ח המסכם של שנת המיזם השנייה. מאחר וכך, יש להמשיך ולבחון אמצעים שיאפשרו לקטול את גורם המחלה השורד על רסק הגזם. במחקרים רבים שבוצעו במערכות ביולוגיות שונות הוכח שהישרדות פתוגנים ברקמות צמחיות מנותקות תלויה בהישרדות של הרקמות הצמחיות עצמן. פעולות אגרוטכניות הגורמות לפירוק הרקמות הצמחיות מקצרות, לכן, את משך ההישרדות של הפתוגנים. כך למשל מקובל במספר מדינות לרסק את עלי התפוח שנשרו לקרקע במהלך החורף בתכשיר אוריאה. התכשיר החנקני מעודד את הפעילות של מיקרואורגניזמים שונים המתפתחים על העלים ומפרקים אותם. פעולה זו גורמת לפגיעה משמעותית בהישרדות של הפטרייה *Venturia inaequalis* המחוללת את מחלת הגרב בתפוח. גופי הפרי המיניים של הפטרייה, המתפתחים על העלים היבשים הנמצאים על הקרקע במהלך החורף, נפגעים וכמות המידבק ההתחלי הראשוני של גורת המחלה בעונה העוקבת נמוך והמחלה לא

גורמת לנזקים. זה טיפול זול, יעיל ואינו רעיל לאדם ולסביבה. אין מידע באם הטיפול יעיל גם כנגד גורמי מחלה המאכלסים אברי צמח מעוצים (כמו רסק גזם).

במחקר שבצענו בשנת המיזם השלישית התרכזנו בנושאים הקשורים להתפתחות המחלה במטעי אבוקדו בוגרים. המטרות הספציפיות של המחקרים שבצענו היו:

1. חקר הביולוגיה של גורם המחלה תוך התמקדות בהפצה אווירנית של נבגים א-מיניים;
2. חקר האטיולוגיה של המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים ופיתוח גישות לבקרתה;
3. בחינת גישות להתמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטטיביים של עצים בוגרים.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

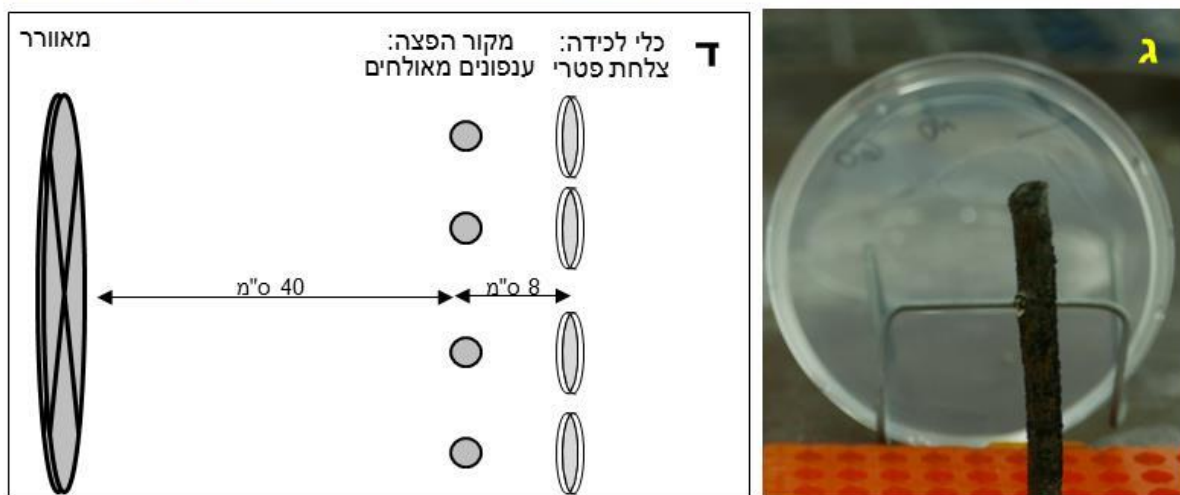
3.1 הביולוגיה של גורם המחלה – הפצה אווירנית של נבגים א-מיניים

כפי שצוין במבוא ההיפותזה שעמדה בבסיס המחקר הנוכחי היא שמקור המידבק הראשוני העיקרי של גורם המחלה הוא נבגים א-מיניים המופצים בדרך האוויר. אם כך הדבר, ההפצה וההדבקה לא מתרחשות בהכרח רק בימים גשומים. כדי לבחון את תקפות ההיפותזה שהועלתה וכדי לאפיין את המועדים בשנה בהם מתרחשת הפצה משנית, דגמו מחלקת אבוקדו מהזן האס במח"ע (נטיעת 2005) ענפונים חד-שנתיים עשבוניים. הענפונים העשבוניים נוצרים במהלך 2-4 החודשים שקדמו למועד הדגימה שלהם. חשוב לציין שעצי האבוקדו בחלקה זו נגועים מאד במחלה. הדגימות החלו בחודש מרץ 2014, הן בוצעו מידי חודש-חודשיים, ונמשכו עד לסוף שנת 2016. בסך הכל בוצעו 6 דגימות בשנת 2014, 5 דגימות בשנת 2015 ו- 8 דגימות בשנת 2016. בכל מועד נדגמו 33-35 ענפונים עשבוניים אסימפטומטיים, כאילה שלא נראו עליהם תסמיני מחלה כל שהם. הענפונים הובאו למעבדה, חוטאו חיצונית באקונומיקה 1% למשך דקה ולאחר מכן נחתכו למקטעים בגודל של חצי ס"מ לערך שהונחו בצלחות פטרי על גבי מצע מזון (PDA; 0.5%), 5 מקטעים בצלחת. הצלחות הודגרו בחדר גידול בטמפרטורה של 22 ± 2 מעלות צלזיוס למשך חמישה ימים. לאחר חמישה ימים הצלחות נסקרו ויזואלית ונקבע באם התפתחו עליהן מושבות אופייניות של פטריות מהסוג הבוטריוספריה. הממצאים שימשו לקביעת שכיחות הענפונים העשבוניים שהיו מאוכלסים בגורם המחלה בכל מועד דגימה ולאורך הזמן. הממצאים נותחו באמצעים רגרסיית Sinus כשהמשתנה התלוי היה שכיחות הענפונים העשבוניים המאוכלסים והגורם הבלתי תלוי היה זמן (ימים מהראשון לינואר בכל שנה).

בניסיון להגדיר אם קיימת היתכנות להפצה אווירנית של נבגים א-מיניים של פטריות הבוטריוספריה בתנאים טבעיים דגמנו ענפים מעוצים שנוגעו באופן טבעי מחלקות אבוקדו מסחריות. הדגימות נלקחו ממספר מטעים מאזורי הארץ השונים ובכלל זה ממח"ע, גשר הזיו, כפר גליקסון, כיסופים ויקום. הזינים היו האס, אטינגר וריד. הענפים הונחו בתא לח למשך כמה ימים ולאחר מכן הם הוצאו והוחזקו בתנאי החדר. הענפים נבחנו ויזואלית בעין לא מזוינת ולאחר מכן באמצעות בינוקולאר בהגדלות של $10 \times$ עד $50 \times$.

כדי לבחון באם נבגים א-מיניים אכן מופצים אווירנית במרחב בנינו מערך ניסויי הדומה, בעיקרון, ליימינהרת רוח". בשלב הראשון הכנו את מקור ההפצה. בחלק מהניסויים מקור ההפצה היה הענפים המעוצים שנוגעו באופן טבעי בחלקות האבוקדו המסחריות שתוארו בפסקה הקודמת. בניסויים אחרים מקור ההפצה היה ענפונים שאולחו מלאכותית. ענפונים עשבוניים, חד-שנתיים, של אבוקדו מהזן האס שנדגמו מהעצים הגדלים במכון וולקני. הענפונים נחתכו למקטעים באורך של כ- 10 ס"מ ואלה ננעצו בעציצים שהכילו פרלייט (שימש לתמיכה בהם). בכל האחד מהעציצים היו כמה קטעי ענפונים והם הונחו בתוך תבניות פלסטיק שבקרקעיתן היו מים. קטעי הענפונים אולחו בפטרייה LT על ידי הנחת דיסקית אגר בקוטר 7 מ"מ המכילה תפטיר בחלקם העליון. לאחר מכן התבניות נסגרו בשקיות ניילון כדי ליצור בהן תנאי לחות גבוהה והן הונחו בחדר גידול בטמפרטורה של 23 ± 2 מעלות צלזיוס (איור מספר 3א). הפטרייה חדרה לענפון העשבוני ובתוך כשבועיים כל הענפון הפך להיות נקרוטי ונראו עליו גופי הפרי האופייניים של גורם המחלה (איור מספר 3ב). בשלב הבא השתמשנו בענפים המעוצים מהמטעים, או בענפונים החד-שנתיים שאילחנו ובחנו באם נבגים א-מיניים של הפטרייה שנוצרו עליהם נפלטים החוצה ומופצים - גם בתנאי יובש. זה נעשה בצורה הבאה. בשולי חדר גידול סגור הצבנו מאוורר רוטורי של חברת בריזה מדגם KYT1403 עם קוטר כנפיים של 14". המאוורר מכיל 6 כנפיים והוא הופעל במהירות קבועה. במרחק של 40 ס"מ מהמאוורר (אלא אם נרשם אחרת) הוצב מקור ההפצה (ענפים מעוצים או ענפונים עשבוניים) הנבחן. בסמוך אליהם, במרחק של 8 ס"מ, הונחו כלי הלכידה של הנבגים: צלחות פטרי שהכילו מצע PDA $\frac{1}{4}$ (המכיל, 9.75 גר' PDA; 5.25 גר' אגר, 250 מ"ג כלורם פניקול בליטר מים). הצלחות נפתחו לפרקי זמן קבועים, כמפורט בהמשך, שבמהלכו נלכדו בהם נבגים

שהופצו אווירנית בהשפעת הרוח שייצר המאוורר (איור מספר 3). סכימה של המערך הניסויי מוצגת באיור מספר 3. לאחר שעבר פרק הזמן שנקבע, הצלחות נסגרו והונחו להדגרה בטמפרטורת החדר. לאחר 3-5 ימים נספר מספר מושבות הבוטריוספריה שהתפתחו עליהן. בניתוח תוצאות הניסויים חישבנו, עבור כל ניסוי, את החלק היחסי (באחוזים) של הנבגים שהופצו בכל אחד מהטיפולים שנכללו בו. את מספר הנבגים שהופצו אמדנו על פי מספר מושבות הבוטריוספריה שהתפתחו בצלחות. את המספר המרבי של הנבגים שהופצו בכל ניסוי (הערך של 100%) נאמד בשיטות סטטיסטיות, על פי הערך האסימפטומטי העליון בניסויים בהם בוצעה לכידה לאורך זמן, או שהוא נקבע על פי מספר המושבות שהתפתחו בטיפול בו נלכדו מירב הנבגים.



איור מספר 3. המערך הניסויי שנבנה לחקר ההפצה האווירנית של נבגי הפטרייה *Lasiodiplodia theobromae*. **א.** מקור ההפצה: ענפונים עשבוניים, חד-שנתיים של אבוקדו מהזן האס אולחו על ידי הנחה של דסקית המכילה תפטיר של הפטרייה LT בחלקם העליון; **ב.** ענפון נגוע עליו נראים מקצבים של נבגים א-מיניים שהופרשו מגופי הפרי, הפיקנידיות. **ג.** כלי הלכידה של הנבגים: צלחת פטרי פתוחה הנמצאת בסמוך למקור ההפצה; **ד.** תרשים עילי של המערך הניסויי שפותח לחקר ההפצה האווירנית של נבגים א-מיניים של הפטרייה LT.

לאחר שהתברר שנבגים א-מיניים של הפטרייה LT אכן מופצים אווירנית ביושב, בחנו את משך הזמן בו מקור צמחי נגוע מפיץ נבגים למרחב. עשינו זאת על ידי החלפת כלי הלכידה (צלחות הפטרי הפתוחות) מידי 10 או 20 דקות במשך שעה עד שעתיים מתחילת הניסוי. כל טיפול (טיפול = משך לכידה) כלל 4 חזרות (חזרה = ענף נגוע ששימש כמקור וצלחת פטרי שהונחה בסמוך ושימשה ככלי הלכידה). לאחר תקופת הדגירה ספרנו את מספר

המושבות שהתפתחו על כל צלחת פטרי וחיבנו את מספר הנבגים הכולל המצטבר. בסופו של דבר חיבנו את החלק היחסי של הנבגים שהופצו כתלות בזמן.

בסדרת הניסויים הבאה בחנו את מהירות הרוח בה ניתקים הנבגים הא-מיניים מהשרשרות שנפלטו מגופי הפרי בהם נוצרו וקבענו את המרחק אליהם הם מופצים. כדי לעשות זאת מדדנו תחילה את עוצמת הרוח הנוצרת במרחקים שונים מהמאוורר. המדידה של עוצמת הרוח בוצעה באמצעות מד רוח אל-קולי דו-מימדי תוצרת חברת Gill. התברר, שבמרחק של 40 ס"מ מהמאוורר עוצמת הרוח הייתה 2.2 מ' לשנייה (7.9 ק"מ לשעה) וככל שהמרחק מהמאוורר היה גדול יותר, כך עוצמת הרוח הייתה נמוכה יותר. הקשר בין עוצמת הרוח (WV) למרחק (D) היה: $WV = 10.04 \times e^{0.79 \times D}$ ($R^2 = 0.945$; $P < 0.0001$) ומשוואה זו שימשה לקביעת עוצמת הרוח במרחקים שונים מהמאוורר. בניסוי לבחינת עוצמת הרוח בה ניתקים הנבגים הא-מיניים מהשרשרות שנפלטו מגופי הפרי הצבנו את מקור ההפצה (ענפונים עשבוניים מאולחים) במרחקים שונים מהמאוורר; כלי הלכידה (צלחות הפטרי הפתוחות) היו תמיד באותו המרחק ממקור ההפצה (8 ס"מ). מקורות ההפצה הוצבו במרחקים שנו מ – 30 ס"מ ועד 210 ס"מ מהמאוורר. אלה היו הטיפולים בניסוי וכך ניתן היה לבחון את ההשפעה של עוצמת הרוח על הינתקות והפצת הנבגים. בסדרת ניסויים אחרת בחנו את המרחק אליו מופצים הנבגים. בניסויים אלה מקור ההפצה היה במרחק קבוע של 40 ס"מ מהמאוורר וכלי הלכידה הוצבו, בטיפולים שונים, במרחקים שונים ממקור ההפצה.

בסדרת ניסויים נוספת בחנו את ההשפעות של גורמים שונים על ההיפלטות של נבגים א-מיניים מגופי הפרי. בניסויים אלה השתמשנו בענפונים חד-שנתיים עשבוניים מאולחים. לפני התחלת הניסויים הסרנו את כל הנבגים הא-מיניים שנפלטו מגופי הפרי; עשינו זאת על ידי שפשוף עדין של הענפונים באמצעות פד גזה. השפשוף הרחיק את הנבגים שכבר נפלטו. לאחר מכן הונחו הענפונים הנגועים (שלא היו על פניהם נבגים) בתוך קופסיות קטנות שהונחו בתוך מכלי פלסטיק בגודל $19 \times 15 \times 9$ ס"מ (גובה ארוחב אורך). בחלק התחתון של מכלי הפלסטיק הונח נוזל (מלחים או מים מזוקקים, כמפורט בהמשך) בגובה של 2-5 ס"מ. הענפונים שהיו בתוך הקופסיות הקטנות לא נחשפו ישירות לנוזל. מכלי הפלסטיק נאטמו באמצעות מכסים לפרקי זמן שונים (פרטים בהמשך). לאחר שהסתיים הזמן המתוכנן, הוצעו הענפונים בזהירות מהמכלים והוצבו במערך הניסויי שתואר למעלה כדי לבחון כמה נבגים נפלטו מגופי הפרי הא-מיניים. בסדרת ניסויים זו הלכידה שימשה כאומדן לכמות הנבגים הא-מיניים שנוצרו בגופי הפרי ונפלטו מהם בתנאי יובש.

בניסוי הראשון בסדרה זו בחנו את השפעת הלחות היחסית על היצירה והפליטה של הנבגים הא-מיניים מגופי הפרי. בתוך מכלי הפלסטיק ייצרנו לחויות יחסיות שונות באמצעות תמיסות רוויות של מלחים. את המידע לגבי הלחות היחסית הנוצרת לקחנו מהספרות ואימתנו אותו על ידי מדידה של הלחות היחסית שנוצרה בפועל בתוך מכלי הפלסטיק הסגורות. מדדנו את הלחות היחסית באמצעות קוראי נתונים אלקטרוניים (דטא לוגרים) מדגם U23-001 של חברת Hobo שהונחו בתוך קופסיות הפלסטיק הסגורות. הלחות היחסית של האוויר במכלים שלקרקעיתן הוספו מים מזוקקים היא 99%. חשוב לציין שהיו מים חופשיים בתוך מכלי הפלסטיק; הלחות היחסית של האוויר הנמצא במכלים שלקרקעיתן הוספה תמיסה רוויה של MgCl היא 33%; וכך הלאה: $49\% - KNO_2$; $78\% - NaCl$; $85\% - KCl$. הענפונים הנגועים הונחו בתוך המכלים האטומים שבקרקעיתן היה מים מזוקקים או תמיסות המלח למשך 48 שעות. לאחריהן הענפונים הוצאו והועברו למערך הניסויי לבחינת כמות הנבגים שנוצרו ושנפלטו מגופי הפרי.

בניסוי השני שבצענו בסדרה זו בחנו את ההשפעה של משך התקופה בה הלחות היחסית הייתה גבוהה (99%) על היצירה והפליטה של הנבגים הא-מיניים מגופי הפרי. הענפונים הנגועים הונחו בתוך הקופסיות האטומות שבקרקעיתן היה מים מזוקקים ונשארו שם לפרקי זמן שונים שנו משעה אחת ועד ל-168 שעות (אלה היו הטיפולים בניסוי). בתום כל פרק זמן מתוכנן הענפונים הוצאו בזהירות והועברו למערך הניסויי שתואר למעלה לבחינת כמות הנבגים שנוצרו ושנפלטו מגופי הפרי.

בניסוי השלישי שבצענו בסדרה זו בחנו את ההשפעה של הטמפרטורה על היצירה והפליטה של נבגים א-מיניים מגופי הפרי. הענפונים הנגועים הונחו בתוך הקופסיות האטומות שבקרקעיתן היה מים מזוקקים והמכלים הונחו באינקובטורים שונים בטווח טמפרטורות שנו בין 4 ל- 37 מעלות צלזיוס (אלה היו הטיפולים בניסוי). לאחר 48 שעות הענפונים הועברו למערך הניסויי שתואר למעלה לבחינת כמות הנבגים שנוצרו ושנפלטו מגופי הפרי.

3.2 התפתחות הפטרייה באברי צמח רפרודוקטיביים והתמודדות עמה

3.2.1 האטיולוגיה של המחלה

במהלך השנים בהם פעל מיזם חוס"ן בוטריוספריה אילחנו רקמות צמחיות שונות של אבוקדו בשתי שיטות עיקריות. הראשונה – החדרה של דיסקית אגר המכילה תפטיר של הפטרייה לפצע שייצרנו בקליפה של ענפים עשבוניים או של ענפים מעוצים וכיסוי האזור בנייר סופג לח ובפאראפילם; השנייה – ריסוס של תפרחות או של ענפים עשבוניים בתרחיף נבגים ועטיפה של הרקמות המאולחות בשקיות ניילון למשך 24 שעות לשמירה על תנאי רטיבות. במקרים רבים ההדבקות הצליחו, אך לא בכולן. לא הצלחנו עדיין להבין את הגורם לשונות בהצלחה. בכל מקרה, ברור שבמערכת הטבעית הגורם המדביק הוא נבגים א-מיניים המופצים בהתזה בעת התרחשות של אירועי גשם או של נבגים א-מיניים או מיניים המופצים אווירנית, כששוררים תנאי ויבש. בהמשך לממצאים חיוביים שהתקבלו על ידי צוות המחקר של דוד עזרא שאילח פקעים של עצי פרי נשירים בפטריות מהסוג בוטריוספריה, בחנו את האפשרות שנבגי הפטרייה LT מסוגלים לאלח פקעים של אבוקדו. שתילי אבוקדו מהזן האס בני שלוש שנים, הגדלים בעציצים גדולים, הוכנסו לתא גידול בטמפרטורה של 25 מעלות צלזיוס ותאורה למשך 12 שעות ביממה. הפקעים אולחו על ידי הנחה של טיפת תרחיף נבגים בנפח של 10l μ בריכוז של 10^4 או 10^5 נבגים לסמ"ק. תרחיף הנבגים הוכן במים או באגר מים 0.5%. כהיקש שימשו פקעים שהונחו עליהם טיפות של מים או של אגר מים ללא נבגים. בשני צמחים התפתחו תפרחות והתפרחות אולחו בתרחיף נבגים במים, בריסוס. שבוע לאחר האילוח הצמחים הוכנסו לתנאי עקת חום של 40 מעלות צלזיוס למשך יומיים. כשבועיים לאחר מכן ניסינו לבודד את הפטרייה. הבידודים נעשו מענפים עשבוניים במרחק של 5-10 ס"מ מתחת לפקעים שאולחו. באותו המועד ניסינו לבודד את הפטרייה גם מהשזרות של התפרחות שאולחו. חשוב לציין שהעלים שגדלו בקודקודי הצמוח של השתילים נפגעו מעקת החום ונראו עליהם סימני התייבשות. עבור כל טיפול חישבנו את שכיחות האיברים (קטעי הענפים העשבוניים או השזרות של התפרחות) בהם בודד גורם המחלה מכלל האיברים שנבחנו.

במהלך קיץ 2015 נדגמו תפרחות ירוקות ותפרחות בהן נראו תסמיני התייבשות (להלן התפרחות האסימפטומטיות והסימפטומטיות, בהתאמה) ממטעים שונים ברחבי הארץ. נדגמו תפרחות מטעי מח"ע, יקום, רגבה וכפר גליקסון. הדגימות נלקחו מהזנים האס, פינקרטון, ריד והרוסט. בשנת 2016 בוצעו בידודים נוספים מתפרחות שנדגמו ממטעי מח"ע וממטע האבוקדו ביקום. בסך הכל נדגמו ונבחנו 331 תפרחות סימפטומטיות ועוד 274 תפרחות אסימפטומטיות. מכל תפרחת נלקחו דגימות של שזרות מאזורים שהיו על גבול האזור הנגוע (בתפרחות הסימפטומטיות) או מאזור בריא (בתפרחות האסימפטומטיות). הדגימות נחתכו למקטעים בגודל של חצי סמ" ואלה הונחו בצלחות פטרי על גבי מצע מזון (PDA; 0.5%). הצלחות הודגרו בחדר גידול בטמפרטורה של 22 ± 2 מעלות צלזיוס למשך חמישה ימים. לאחר חמישה ימים הצלחות נסרקו ויזואלית ונקבע באם התפתחו עליהן מושבות של פטריות מהסוג בוטריוספריה. הממצאים שימשו לקביעת שכיחות התפרחות שהיו מאוכלסות בגורם המחלה (באחוזים).

בכדי לבדוק באם איכלוס בפתוגנים מעורב בנשירה הטבעית של פירות אבוקדו צעירים ניסינו לבודד פטריות מהסוג בוטריוספריה מפירות סימפטומטיים שהיו מחוברים עדיין לעץ. הבידודים בוצעו מהשזרה, העוקץ ומהפרי. בסך הכל בוצעו בידודים מ – 24 פירות. בנוסף, ניסינו לבודד את גורם המחלה גם מפירות סימפטומטיים ומפירות אסימפטומטיים שנשרו והיו על הרצפה, מתחת לעצים. הפירות נאספו ממטע האבוקדו של מח"ע, זן האס. בסך הכל בוצעו בידודים מ – 13 פירות. הנתונים שימשו לחישוב שכיחות הפירות המאוכלסים בבוטריוספריה (באחוזים).

3.2.2 התמודדות עם המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים

כפי שצוין למעלה הנחנו שפטריות מהסוג בוטריוספריה נפוצות אווירנית, ושהנבגים הא-מיניים המופצים מסוגלים לאלח את אברי התפרחת (פרחים ושזרות). אם תרחיש זה אכן מתקיים, הפטרייה מגיעה אל החנטים ואל הפירות דרך השזרות הנגועות. כדי לבחון באם את ההתכנות של תרחיש זה, ניסינו למנוע אותו ובחנו את התוצאה. למטרה זו בצענו בשנת 2016 שני ניסויים בהם יישמנו תכשירי הדברה ישירות לתפרחות ובחנו באם הטיפול הפחית את איכלוס אברי התפרחת בפטרייה ובאם הייתה לו השפעה על התפתחות החנטים והפירות. במטע אבוקדו של הזן האס במח"ע בצענו ניסוי בשיתוף חברת כצ"ט (להלן – ניסוי תפרחות מספר 1) ובמטע אבוקדו של הזן ריד ביקום ביצענו ניסוי בשיתוף חברת תפזול (להלן – ניסוי תפרחות מספר 2). ניסוי תפרחות מספר 1 כלל שלושה טיפולים, כלהלן: (i). היקש; התפרחות לא רוססו בתכשירי הדברה כלל; (ii). סקולאר:

התפרחות רוססו בתכשיר סקולאר המכיל 230 גרם fludioxanil בליטר. תכשיר זה משווק על ידי חברת אגריקה והוא רוסס בריכוז של 0.1%; (iii). **סוויץ**: התפרחות רוססו בתכשיר סוויץ המכיל 375 גרם cyprodinil ו- 250 גרם fludioxanil בק"ג. גם תכשיר מזה שווק על ידי חברת אגריקה והוא רוסס בריכוז של 0.1%. ניסוי מספר 2 כלל שני טיפולים, כלהלן: (i). **היקש**; התפרחות לא רוססו בתכשירי הדברה כלל; (ii). thiofanate methyl: התפרחות רוססו בתכשיר המכיל 70% חומר פעיל של thiofanate methyl בתוארית של תרכיז רחף. תכשיר זה משווק על ידי חברת תפזול והוא רוסס בריכוז של 0.08%. בשני הניסויים יחידת ניסוי הייתה תפרחת בודדת. כל טיפול כלל 4 חזרות שבכל אחת מהן היו 25 תפרחות. בתחילת הפריחה סימנו את התפרחות שיכללו בניסוי באמצעות סרטי סימון צבעוניים וריססנו אותם מספר פעמים במרסס רובים, עד נגירה. בניסוי תפרחות מספר 1 התכשירים יושמו בתאריכים 4 ו- 21 באפריל, 2016 ובניסוי תפרחות מספר 2 הם יושמו בתאריכים 4 ו- 17 באפריל וב- 4 ו- 10 במאי. במהלך העונה נדגמו תפרחות מרוססות מהטיפולים השונים לבדיקת איכלוסן בפטריות מהסוג בוטריוספריה. בניסוי תפרחות מספר 1 היו שבעה מועדי דגימה ובניסוי תפרחות מספר 2 היו שלושה מועדי דגימה. בכל המועדים (חוץ מהמועד האחרון) נדגמה מכל חזרה תפרחת אחת. התפרחות הנדגמות חולקו לאיברים שונים: פרחים – ובהמשך חנטים קטנים, שזרה משנית ושזרה ראשית. מכל איבר צמחי נדגמו 5 קטעים בגודל של 0.5 מ"מ שחוטאו חיצונית ולאחר מכן הונחו על צלחות פטרי לבדיקת איכלוסן בבוטריוספריה. במועד ההערכה האחרון שהיה ב- 24 ביוני בניסוי תפרחות מספר 1 וב- 10 באוגוסט בניסוי תפרחות מספר 2 נדגמו כל התפרחות המסומנות שנותרו על העצים. כל תפרחת נסקרה ויזואלית ונרשם באם נראו עליה תסמיני התייבשות אופייניים ובאם היו עליה פירות אבוקדו. לאחר מכן בוצעו בידודים לבחינת איכלוס התפרחת בפטריות מהסוג בוטריוספריה. הנתונים שימשו לחישוב שכיחות התפרחות הסימפטומטיות ושכיחות התפרחות האסימפטומטיות שהיו מאוכלסות בפטריות מהסוג בוטריוספריה, באחוזים. בנוסף, חושבה שכיחות התפרחות הסימפטומטיות שעליהן לא התפתחו פירות ושכיחות התפרחות האסימפטומטיות שעליהן התפתחו פירות אבוקדו. בדו"ח זה יוצגו תוצאות ההערכות שבוצעו במועד ההערכה האחרון.

3.3 התמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטיביים של עצים בוגרים

בעקבות השרב שהיה בחודש מאי 2015 נראו במטע האבוקדו מהזן ריד של קיבוץ יקום התייבשויות של התפרחות בהיקף משמעותי. עם חלוף הזמן ההתייבשויות עברו מהתפרחות לענפים והיו עצים שנפגעו באופן קשה כתוצאה מכך. בחלק מהעצים לא היה כלל יבול. בחודש אוגוסט 2015 העמדנו במטע זה ניסוי לבחינת היעילות של טיפול סניטציה. בשלב הראשון הוערכה מידת הנגיעות של כל העצים שהיו בשתי השורות שהועמדו לרשותנו על ידי הנוטע. ההערכה התבססה על סולם בן 4 דרגות, כלהלן: 0 = לא היו על העץ ענפים יבשים; 1 = על העץ היו מעט ענפים יבשים (עד 2 ענפים בממוצע); 2 = על העץ הייתה כמות בינונית של ענפים יבשים (3-5 ענפים, בממוצע); 3 = על העץ הייתה כמות גדולה של ענפים יבשים (יותר מ- 6 ענפים, בממוצע). כשלא הייתה זהות בדרגה בין שני צדי העץ נרשמה הדרגה הגבוהה יותר. לאחר שכל העצים הוערכו הם חולקו לשתי קבוצות על פי מידת הפגיעה שלהם והעצים בכל קבוצה חולקו אקראית לשתי קבוצות שבכל אחת מהן היו ששה עצים. בשלב הבא הוגרלו הטיפולים והעצים סומנו בסרטי סימון צבעוניים. הטיפולים היו: (i). היקש – בעצי טיפול זה הרקמות הצמחיות הנגועות לא הוסרו – (ii). סניטציה – בעצי טיפול זה כל הרקמות הצמחיות הסימפטומטיות נגזמו והורחקו. בזמן העמדת הניסוי נלקחה דגימה של ענפים חד-שנתיים עשבוניים לבדיקת איכלוסן בפטריות מהסוג הבוטריוספריה, כמתואר בסעיף 3.1.1. בהמשך, ביצענו מידי חודש-חודשיים הערכות נגיעות של העצים שנכללו בניסוי. הדוגמים הסתכלו על כל אחד מהעצים משני הצדדים והעריכו את מידת ההתייבשות של כל עץ בנפרד. ההערכה האחרונה הייתה בסוף חודש יולי, 2016, כשנה לאחר העמדת הניסוי. לשם ניתוח הנתונים חושבה עבור כל טיפול השכיחות של העצים שהיו בכל דרגת נגיעות. לאחר מכן נבחן באם היו הבדלים מובהקים בערכי השכיחות בכל דרגה בין שני הטיפולים. לשם כך השתמשנו במבחן χ^2 . בדו"ח זה יוצגו התוצאות המתייחסות לדרגת התייבשות 2 או יותר. בארבעת מועדי ההערכה הראשונים גם דגמנו ענפים חד-שנתיים עשבוניים מכל העצים שנכללו בניסוי ובחנו באם הם מאוכלסים בפטריות מהסוג בוטריוספריה. הבדיקות בוצעו כמתואר בסעיף 3.1 לעיל.

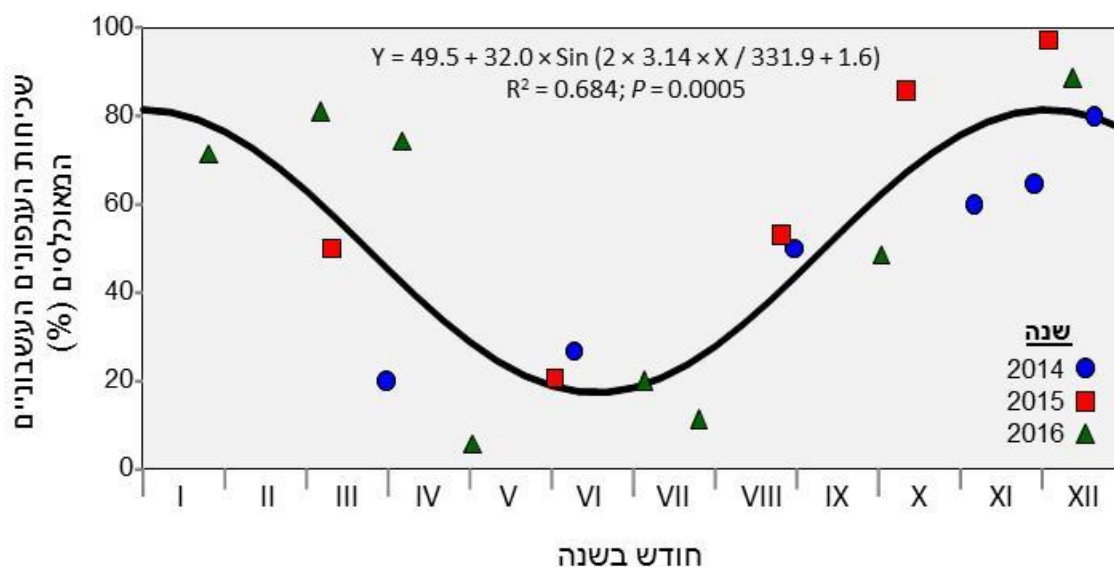
כדי לבחון באם ריסוס של אוראה על רסק גזם נגוע משפיע על הישרדות פטריות מהסוג בוטריוספריה המאכלסות את רסק הגזם, בצענו ניסוי בחלקת האבוקדו מהזן האס של מח"ע. חלקה זו נגועה מאד בבוטריוספריה (מחלקה זו נדגמו הענפים העשבוניים במהלך השנים 2014-2016; סעיף 3.1 לעיל) והמגדל גזם אותה באופן מסחרי בחודש מרץ 2016. הענפים שנגזמו (שחלקם היו נגועים במחלה וחלקם לא) רוסקו

במרסקת גזם מסחרית ופוזרו כמקובל על הקרקע, בין שורות העצים. בתחילת חודש אפריל 2016 סימנו ניסוי שכלל שני טיפולים: (i). היקש - חלקות טיפול זה לא טופלו כלל; (ii). ריסוס באוריאה - חלקות טיפול זה רוססו באוריאה בריכוז של 0.3% ובמינון של 60 ליטר לדונם. כל טיפול כלל 4 חזרות במתכונת של בלוקים באקראי וגודל כל חלקת ניסוי היה 7×3 מ'. הריסוסים בוצעו בתאריכים 4 ו-17 באפריל וב-1 במאי, 2015. במועד העמדת הניסוי ובהמשך, מידי שבועיים עד ארבעה שבועות, נדגמו ניסוי רסק גזם מהמרכז של כל חלקת ניסוי. רסק הגזם הובא למעבדה וניסונו לבודד ממנו פטריות מהסוג בוטריוספריה בשיטות שתוארו בסעיף 3.1 לעיל. עבור כל מועד דגימה חישבנו את שכיחות קטעי רסק הגזם המאוכלסים, באחוזים. השתמשנו במבחן χ^2 כדי לבחון באם לריסוס באוריאה הייתה השפעה על שכיחות האיכלוס.

4. תוצאות

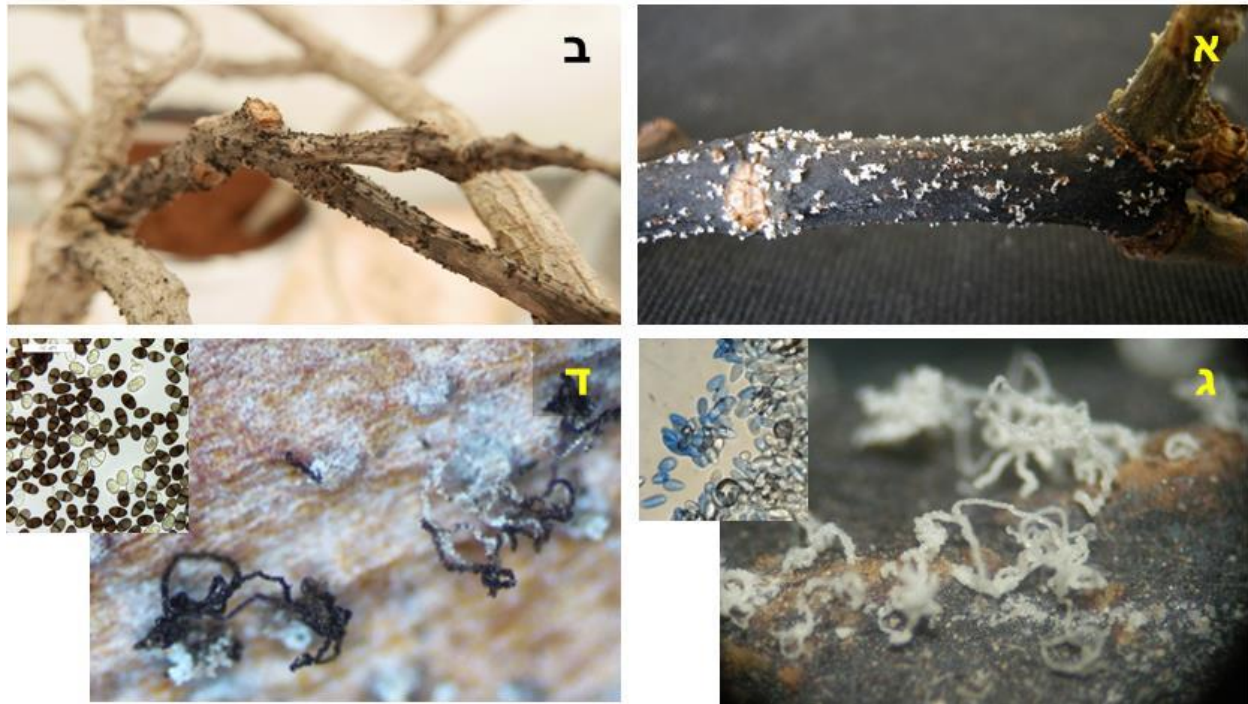
4.1 הביולוגיה של גורם המחלה – הפצה אווירנית של נבגים א-מיניים

במהלך שלוש שנות הדגימה בודדה פטריות מהסוג הבוטריוספריה בענפונים העשבונים החד-שנתיים שנלקחו ממשע האבוקדו במח"ע. שכיחות האיכלוס של הענפונים השתנתה במהלך השנה: השכיחות הגבוהה ביותר הייתה בחודשי ראשית החורף (אוקטובר-ינואר) והנמוכה ביותר בחודשי ראשית הקיץ (מאי-יולי). בחודשים פברואר-אפריל השכיחות ירדה בהדרגה ובחודשים אוגוסט-ספטמבר השכיחות עלתה בהדרגה (איור מספר 4).



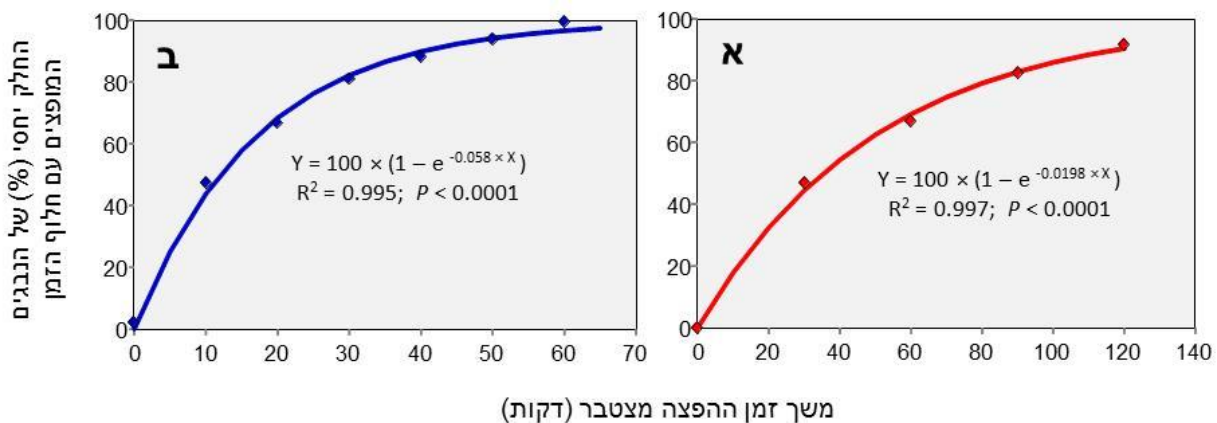
איור מספר 4. איכלוס של ענפים חד-שנתיים עשבונים שנדגמו ממשע אבוקדו במח"ע בפטריות מקבוצת הבוטריוספריה כתלות במועד הדגימה בשנה. הדגימות נלקחו במהלך השנים 2014, 2015 ו-2016.

כשהנחנו ענפים מעוצים שנוגעו באופן טבעי בתא לח, הופיעו עליהם אחרי זמן מה תסמינים של גורם המחלה שלא נראו לפני כן. בתחילה התסמינים נראו ויזואלית כנקודות בצבע לבן שהתפתחו על הענפים אבל בהמשך השתנה הצבע שלהם לשחור (איור מספר 5 א ו-ב). כשהענפים נבחנו באמצעות בינוקולאר (בהגדלה של 10×) נתן היה לראות שהנקודות מורכבות מ"שרוכים" מסולסלים היוצאים מגופי פרי שקועים בתוך הרקמה הנגועה. בהגדלה גדולה יותר (50×) ניתן היה להבחין שהשרוכים היו למעשה שרשרות של נבגים שנפלטו מהפיקנדיות בתוך chirri. לאחר שהחומר הגילטיני התייבש הנבגים שנפלטו נשארו מחוברים זה-לזה. כשנבגים היו צעירים (חד-תאיים) הצבע של הנקודות (=שרשרות הנבגים) היה לבן וכשהם התבגרו ופכו לדו-תאיים הצבע של הנקודות (שרשרות הנבגים) היה שחור (איור מספר 5 ג ו-ד). החיבור בין הנבגים לא היה חזק וטלטול קטן של הענפים הנגועים גרם לפיזורם באוויר ולהפצתם; את ענן של הנבגים שהתפזרו באוויר ניתן היה לראות אפילו בעין בלתי מזוינת.



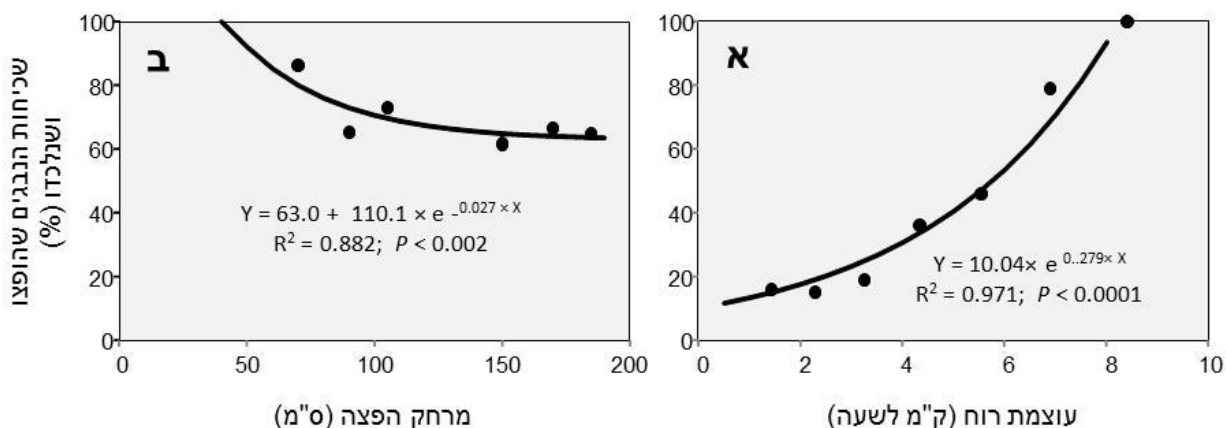
איור מספר 5. תמונות של ענפי אבוקדו נגועים שנלקחו ממטעים שאולחו באופן טבעי. הענפים הונחו בתא לח למשך כמה ימים שלאחריהם הם הוצאו והוחזקו בחדר. על הענפים נראה לבד שהיה בהתחלה לבן ולאחר מכן שחור (א ו – ב). במבט בבינוקולר ניתן לראות שהלבד מורכב משרשרות נבגים צעירים (ג) או מבוגרים (ד) של בוטריוספריה.

השתמשנו במערך הניסויי שבנינו לבחינת ההפצה האווירנית של נבגי הפטרייה LT בתנאי יובש. התברר, שהנבגים הא-מיניים הנפלטים מגופי הפרי מופצים באוויר. משך ההפצה היה שונה כתלות במקור החומר המפיץ. כשבחנו את ההפצה מענפים מעוצים שנלקחו ממטעים מסחריים כ – 90% מהנבגים שהופצו עשו כן בתוך שעות מתחילת הניסוי. כשמקור ההפצה היה הענפים העשבוניים שאולחו מלאכותית, כל הנבגים הופצו בתוך שעה מתחילת הניסוי (איור מספר 6). בניסויים הבאים השתמשנו רק בענפים העשבוניים שאולחו מלאכותית לכן בחנו את משך ההפצה של הנבגים במשך שעה אחת בלבד.



איור מספר 6. משך ההפצה של נבגים א-מיניים של הפטרייה *Lasiodiplodia theobromae* מענפי אבוקדו מהזן האס שנוגעו באופן טבעי במטע מח"ע (א) ומענפים עשבוניים, חד-שנתיים, שאולחו באופן מלאכותי (ב). הנתונים נאספו במערך הניסויי שנבנתה לחקר ההפצה האווירנית של הנבגים במכון וולקני (פרטים בטקסט).

הכמות היחסית של הנבגים הא-מיניים שהופצו הייתה תלויה בעוצמת הרוח. ככל שעוצמת הרוח הייתה גבוהה יותר, כך הופצו יותר נבגים. אבל, גם רוח בעוצמת נמוכה מאד (2-4 קמ"ש) גרמה לניתוק ולהפצה של הנבגים (איור מספר 7א). בעוצמת רוח של 8 קמ"ש, מרבית הנבגים (יותר מ- 75%) הופצו למרחק של 185 ס"מ. זה היה המרחק המרבי אותו היה ניתן לבחון במערך הניסויי שהקמנו (איור מספר 7ב).



איור מספר 7. ההשפעה של עוצמת הרוח על ההפצה האווירנית של נבגים א-מיניים של הפטרייה *Lasiodiplodia theobromae* (א) והמרחק אליהם הופצו הנבגים (ב). הניסויים בוצעו במערך הניסוי המבוקר שנבנה לחקר ההפצה האווירנית של נבגים א-מיניים.

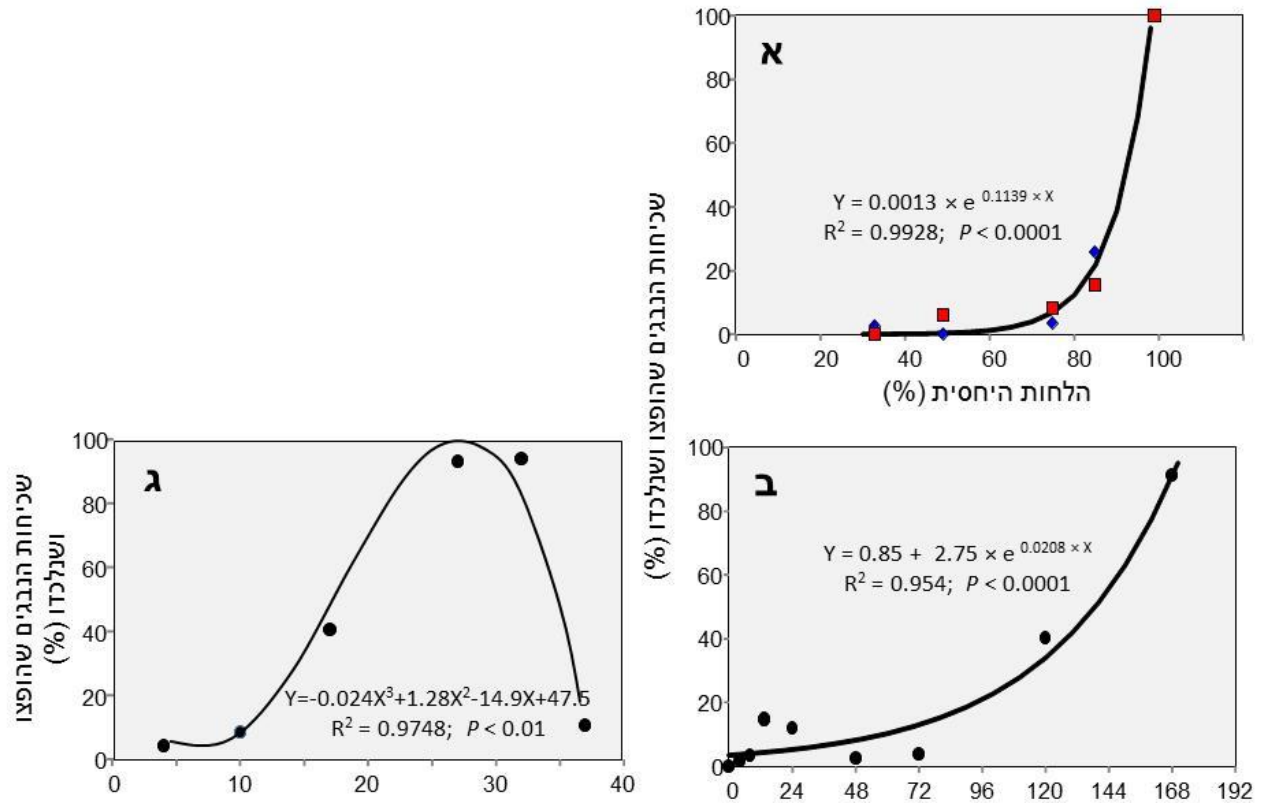
תנאי הסביבה אליהם חשופים האיברים הצמחיים הנגועים קובעים באם יוצרו נבגים א-מיניים בתוך הפיקנידיות ובאם הנבגים יפלטו החוצה. כשהלחות היחסית הייתה נמוכה לא נוצרו ולא נפלטו נבגים א-מיניים כלל. בלחות יחסית של 75% נוצרו ונפלטו מעט נבגים אבל רק בלחות יחסית גבוהה מאד (99%) נוצרו ונפלטו נבגים א-מיניים בכמות גדולה (איור מספר 8א). נדרש פרק זמן ארוך של לחות יחסית גבוהה כדי שייווצרו וייפלטו נבגים בכמות גדולה, אבל גם כששררה לחות יחסית גבוהה לפרק זמן קצר יחסית של 8 שעות נוצרו ונפלטו נבגים א-מיניים (איור מספר 8ב). השפעת הטמפרטורה על ההיווצרות והפליטה של הנבגים הא-מיניים הייתה דומה להשפעתה על צימוח התפטיר של הפטרייה: הטמפרטורה הקרדינאלית התחתונה הייתה 10 מעלות צלזיוס בערך, הטמפרטורה הקרדינאלית העליונה – 38 מעלות והטמפרטורה המיטבית – 28 מעלות צלזיוס (איור מספר 8ג).

4.2 התפתחות הפטרייה באברי צמח רפרודוקטיביים והתמודדות עמה

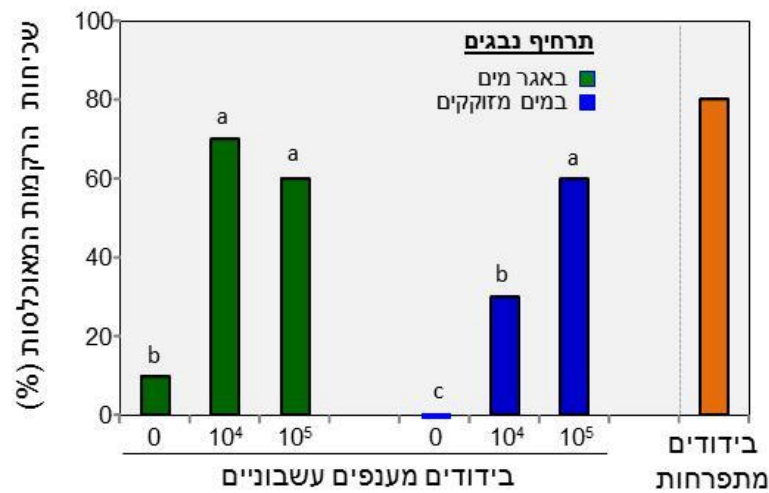
4.2.1 האטיולוגיה של המחלה

לאחר ששתילי האבוקדו שאולחו בטיפת מים בפקעים האמירים שהו בתנאי עקת חום, הפטרייה LT בודדה מענפים שנמצאו במרחק של כמה סנטימטרים מתחת לפקעים המאולחים. הפטרייה בודדה מחצי מהענפים, בממוצע, והיו הבדלים כתלות במדיום האילוח (מים או אגר מים) ובריכוז הנבגים 10^4 או 10^5 נבגים לסמ"ק. הפטרייה בודדה גם ממרבית השזרות של התפרחות שאולחו (איור מספר 9).

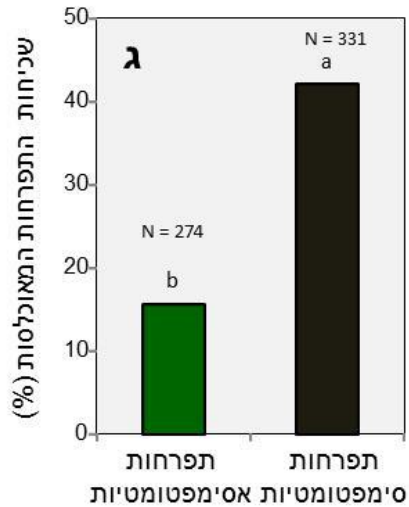
בסך הכל ניסינו לבדוד את פטריות הבוטריוספריה מ- 605 תפרחות. ב- 139 מתוך 331 הבידודים שבצענו מתפרחות שנראו עליהם תסמיני התייבשות (42.0%) התפתחו פטריות מהסוג הבוטריוספריה; לעומת זאת, ב- 43 מתוך 274 הבידודים שבצענו מתפרחות שלא נראו עליהן כל תסמינים (15.6%) התפתחו הפטריות (איור מספר 10). כמובן שעצם הבידוד של הפטריות לא מרמז, בהכרח, שהן היו אילה שגרמו להתייבשות התפרחות, הפרחים והחנטים. כדי לאושש זאת צריך להשלים את מבחן קוך.



איור מספר 8. ההשפעה של הלחות היחסית (א), משך התקופה בה הלחות היחסית הייתה גבוהה (ב) והטמפרטורה (ג), על הפלטות נבגים של הפטרייה *Lasiodiplodia theobromae* מגופי פרי א-מיניים. הניסויים בוצעו במערך הניסוי המבוקר שנבנה לחקר ההפצה האווירנית של נבגים א-מיניים.

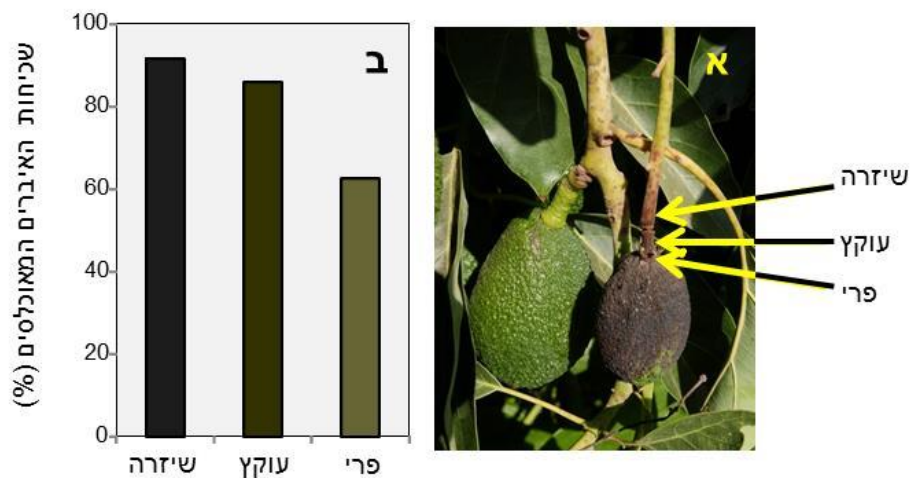


איור מספר 9. שכיחות הענפים העשבוניים והתפרחות שמהם בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה. כשבוע לאחר אילוח הפקעים השתילים נחשפו לעקת חום. בכל טיפול, ערכי עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק ברמת מובהקות של $P > 0.05$.

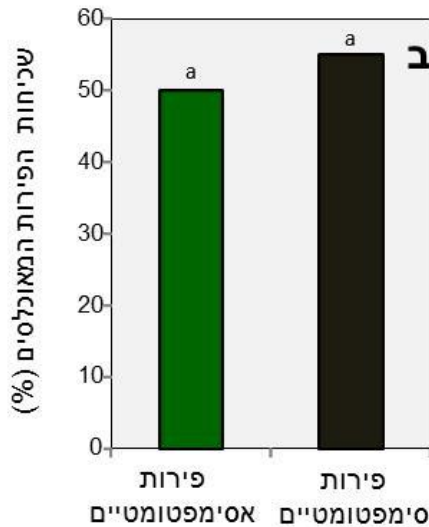


איור מספר 10. תמונות שצולמו בקיץ 2015 לאחר עקת החום שהייתה באמצע חודש מאי. **א.** תפרחת שממנה נשרו כל הפרחים והחנטים אבל היא נשארה ירוקה. **ב.** תפרחת שנראים עליה תסמיני התייבשות ועל השזרה הראשית של התפרחת התפתחות תסמיני מחלה הדומים לאלה הנגרמים על ידי פטריות הבוטריוספריה (מסומן בחץ לבן). **ג.** שכיחות התפרחות האסימפטומטיות והסימפטומטיות מהן בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה. N = מספר התפרחות הכללי. ערכי עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק ברמת מובהקות של $P > 0.05$.

במרבית הפירות הסימפטומטיים כשנדגמו בשעה שהם היו עדיין מחוברים לעץ בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה מהשזרה, מהעוקץ ומהפרי (איור מספר 11). למרות שהפירות נדגמו כשהם היו מחוברים לעצים, הם היו נושרים בסופו של דבר; אנו מסיקים זאת מפני שבמרבית המקרים עצם המגע בשזרה גרם לנשירה של הפרי הפגוע שהיה מחובר אליה. המטע ממנו נדגמו הפירות היה השנה במצב של שנת "און" ומספר הפירות על העצים היה גדול. מסיבה זו, כנראה, הנשירה במטע הייתה משמעותית ביותר וכמות הפירות שנשרו והיו על הרצפה מתחת לעצים הייתה משמעותית (איור מספר 12א). חלק מהפירות שהיו על הרצפה היו ירוקים ונראו במועד הצילום כבריאים אבל על חלקם נראו תסמיני השחרה וריקבון. בבידודים שבצענו מהפירות משני הסוגים בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה בשכיחות דומה (איור מספר 12ב).



איור מספר 11. תמונה של פרי גוע המחובר עדיין לעץ ועליו מסומנים המקומות מהם בוצעו הבידודים (א) ושכיחות הבידודים בהם זוהתה הפטרייה בוטריוספריה (ב).



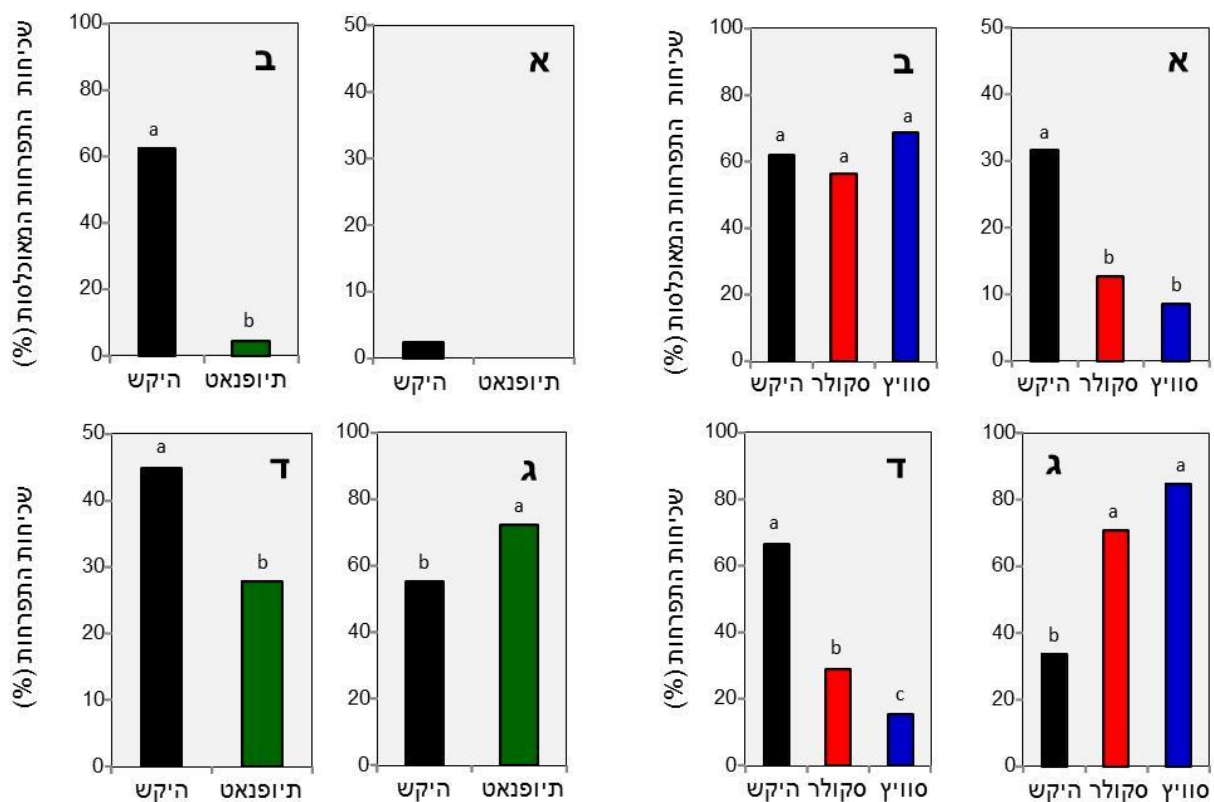
איור מספר 12. תמונה של פירות שנשרו על הרצפה במטע מהזן האס במ"ע (א). להדגשה, סומנו הפירות בעיגולים לבנים. שכיחות הפירות בהם בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה (ב). ערכי עמודות שלידן אותיות דומות אינן שונים זה מזה במובהק ברמת מובהקות של $P > 0.05$.

4.2.2 התמודדות עם המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים

בניסוי תפרחות מספר 1 ב – 30% מהתפרחות שלא נראו עליהן תסמיני התייבשות (התפרחות האסימפטומטיות) היו למעשה מאוכלסות בפטריות מהסוג בוטריוספריה. ריסוס התפרחות בחודש אפריל, בפריחה, הפחית את שכיחות האיכלוס של התפרחות האסימפטומטיות (איור מספר 13א). הריסוסים גם העלו במובהק את שכיחות התפרחות האסימפטומטיות שנשארו פירות: מ – 30% בטיפול ההיקש ועד ל – 70-80% בחלקות המרוססות. אבל, לא היו הבדלים מובהקים באיכלוס התפרחות בגורם המחלה או בין החלקות המרוססות לחלקות ההיקש (איור מספר 13 ב). הריסוסים הפחיתו במובהק את שכיחות התפרחות הסימפטומטיות שלא נשארו פירות, מ – 65% בהיקש ל – 15-30% בתפרחות שרוססו (איור מספר 13ד). בעיקרון, השפעת הריסוס של התפרחות בניסוי תפרחות מספר 2 הייתה דומה להשפעה שהתקבלה בניסוי תפרחות מספר 1: הריסוס בתיופנאט מתיל הגדיל במובהק את שכיחות התפרחות האסימפטומטיות שנשארו פירות (איור מספר 14ג) והפחית במובהק את שכיחות התפרחות הסימפטומטיות שלא נשארו פירות (איור מספר 14ד). אבל, היו הבדלים בין השני הניסויים בשכיחות האיכלוס של התפרחות האסימפטומטיות – בניסוי מספר 2 הוא היה נמוך מאד (איור מספר 14א) ובניסוי זה הריסוס כן הפחית את שכיחות התפרחות הסימפטומטיות המאוכלסות (איור מספר 14ב).

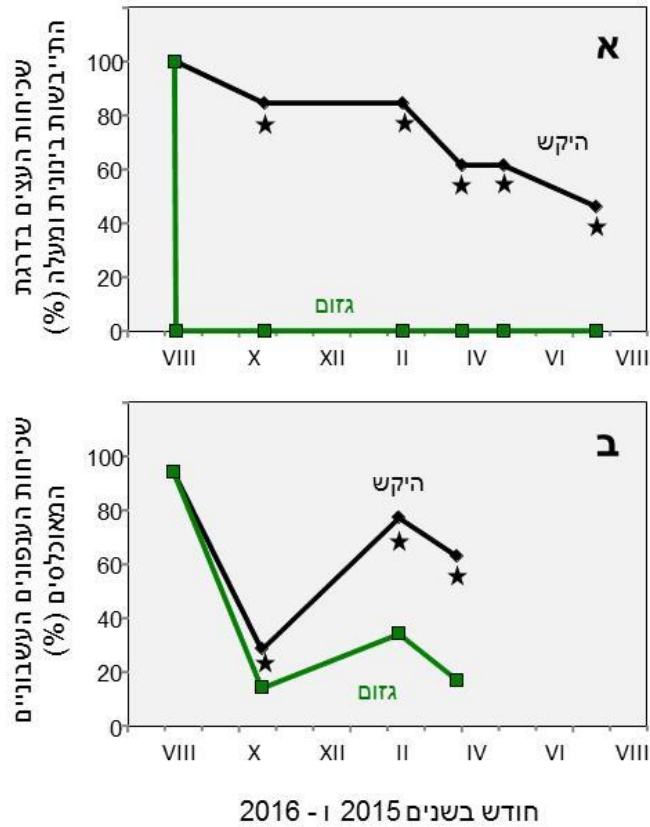
4.3 התמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטיביים של עצים בוגרים

בזמן העמדת הניסוי בחלקת האבוקדו ביקום כל העצים שנכללו בניסוי היו בדרגת נגיעות 2 או יותר (נגיעות בינונית ומעלה). במהלך ביצוע פעולות הסניטציה הסרנו את כל הענפים היבשים ולכן כל העצים שהשתייכו לטיפול זה סווגו לדרגה 0. במהלך הזמן שעבר ממועד ביצוע הסניטציה התפתח צימוח צעיר, ירוק בחלק מעצי טיפול ההיקש ונראה היה לכאורה שחומרת הפגיעה בהם פחתה. למרות זאת, כחצי שנה אחרי הטיפול, בחודש פברואר 2016 90% מעצי טיפול ההיקש עדיין סווגו כנגועים בדרגה 2 או יותר. בחודש יולי 2016, כשנה לאחר ביצוע טיפול הסניטציה, כ – 50% מעצי טיפול ההיקש עדיין סווגו כנגועים בדרגה 2 או יותר. לעומת זאת, כל העצים בהם בוצעה סניטציה שמרו על הבריאות שלהם ולא נראו עליהם כל תסמיני התייבשות (איור מספר 15א). הצלחנו לבודד פטריות מקבוצת הבוטריוספריה מ – 94.1% מהענפונים הירוקים החד-שנתיים שנדגמו במועד העמדת הניסוי. בדגימות שבצענו לאחר מכן הייתה תנועתיות בשכיחות האיכלוס, אבל בכל המועדים היו הבדלים מובהקים בשכיחות האיכלוס של הענפונים העשבוניים בין עצי טיפול הגיזום לעצי טיפול ההיקש שהיו בסמיכות להם (איור מספר 15ב).

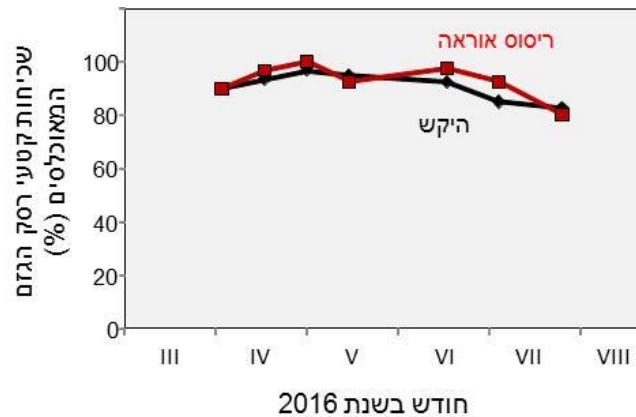


איורים מספר 13 (מימין) ו-14 (משמאל). השפעת ריסוסים כנגד בוטריוספריה שיושמו בתקופת הפריחה על בריאות התפרחות ועל התפתחות פירות עליהן בניסוי שבוצע באביב 2016 בחלקת אבוקדו מהזן האס במח"ע (איור מספר 13) ובחלקת אבוקדו מהזן ריד ביקום (איור מספר 14). א - ב. שכיחות התפרחות האסימפטומטיות והסימפטומטיות, בהתאמה, מהן בודדו פטריות מהסוג בוטריוספריה. ג. שכיחות התפרחות האסימפטומטיות שעליהן התפתחו פירות אבוקדו גדולים; ד. שכיחות התפרחות הסימפטומטיות שעליהן לא התפתחו פירות. בכל תרשים, ערכי עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק ברמת מובהקות של $P > 0.05$.

בניסוי שבצענו במח"ע בחנו באם ריסוס של גזם נגוע באוריה מזרז את פירוק רסק הגזם ומפחית את המידבק של הפטרייה השורד עליו. התברר שהרוב המוחלט של קטעי רסק הגזם שנדגמו היו מאוכלסים בפטריות מהסוג בוטריוספריה. בטיפול ההיקש הפתוגן שרד על רסק הגזם עד לסוף הניסוי, במשך 4 חודשים. התברר גם שריסוס רסק הגזם באוריה לא השפיע כלל על הישרדות הפטרייה ושכיחות קטעי רסק הגזם שהיו מאוכלסים בפטרייה בשני הטיפולים לא הייתה שונה במובהק, בכל מועדי הדגימה (איור מספר 16).



איור מספר 15. השפעת טיפול הגיזום על בריאות העצים (א) ועל שכיחות הענפונים העשבוניים המאוכלסים בפטריות מהסוג בוטריוספריה (ב) בניסוי שבוצע בחלקת אבוקדו מהזן ריד ביקום. טיפול הגיזום בוצע בחודש אוגוסט 2015. דרגת התייבשות בינונית ומעלה - על העצים היו 3-5 ענפים יבשים, או יותר. בכל תרשים, בכל מועד הערכה, ערכי סימנים שלידם כוכבית שונים זה מזה במובהק ברמת מובהקות של $P > 0.05$.



איור מספר 16. השפעת ריסוסי אוראה על הישרדות פטריות מהסוג בוטריוספריה על רסק גזם. הניסוי בוצע במטע אבוקדו מהזן האס במטע מח"ע בו העצי נגועים מאד בגורם המחלה. באף אחד ממועדי הדגימה לא היו הבדלים מובהקים בשכיחות האיכלוס בין שני הטיפולים כנקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות של $P > 0.05$.

5. דיון**5.1 הביולוגיה של גורם המחלה – הפצה אווירנית של נבגים א-מיניים**

דגם הפיזור המרחבי של הנגיעות בעצים בוגרים ובמטעים בוגרים מתאים לדגם פיזור של פתוגן שיחידות הריבוי שלו מופצות בדרך האוויר (איור מספר 2). מאחר שהסוג *Botryosphaeria* משתייך למערכת פטריות השק, סביר היה להניח שאיברי הריבוי שהופצו ושגרמו להדבקות החדשות היו נבגי שק (אסקוספורות). נבגי השק מופצים בתנאי יובש, אווירנית, למרחקים גדולים. תוצאות הבידודים העיתיים שבצענו בענפונים העשבוניים, החד-שנתיים, שנדגמו ממטע האבוקדו של מח"ע (איור מספר 4) מאוששים מסקנה זו. הענפונים העשבוניים נוצרו במהלך שקדמו למועד הדגימה שלהם ואוכלסו בגורם המחלה רק אחרי שנוצרו, משמע בסמיכות למועד הדגימה. מצאנו שבחודשי הקיץ (מאי-יולי) שכיחות הענפונים המאוכלסים הייתה הנמוכה ביותר אבל היא התחילה לעלות בחודשי סוף הקיץ (אוגוסט-ספטמבר). בחודשים אלה לא יורדים גשמים ולכן הפצה של נבגים א-מיניים (פיקנידיוספורות) לא הייתה יכולה להתרחש. המסקנה המתבקשת היא שההדבקה הייתה תוצאה של הדבקה באברי ריבוי המופצים אווירנית ביובש - נבגי השק. הבעיה היא שלא הצלחנו לזהות, ולו פעם אחת, את גופו הפרי המיניים של פטריות הבוטריוספריה (הנקראים פסאודוטציות), למרות המאמצים שהשקענו בכך. [חשוב לציין שהעובדה שלא הצלחנו לזהות את גופי הפרי המיניים אינה אומרת בהכרח שהם לא קיימים]. בכל המקרים, ובכל הרקמות הסימפטומטיות אותן בחנו, זיהינו רק את גופי הפרי הא-מיניים (פיקנידיות), בכמויות גדולות. תצפיות שבצענו בחממות של מכון וולקני במהלך שנות המיזם העלו בנו ספקות לגבי הפרדיגמה שהפצה של נבגים א-מיניים מתרחשת רק כשיורדים גשמים. למרות שעצי האבוקדו הנגועים שגידלנו בחממות לא נחשפו באופן ישיר לגשם נראה היה לכאורה שהמחלה נפוצה מהם לעצים בריאים שגדלו בסמוך (תוצאות לא מוצגות). לא היה לנו הסבר לתצפיות אלה. בהמשך, זיהינו על ענפי העצים הנגועים שגדלו בחממות תסמיני מחלה שלא ראינו עד כה – נקודות שחורות שהיו מפוזרות בתוך האזורים הנקרוטיים של הרקמה הסימפטומטיות. כשהסתכלנו על הנקודות השחורות בזכוכית מגדלת, ולאחר מכן בבינוקולר, התברר שהנקודות השחורות היו שרשרות של נבגים יבשים שנפלטו מגופי פרי א-מיניים. הנבגים לא היו מחוברים בחוזקה זה לזה וכשהענף טולטל, ואפילו לא בחוזקה, הם השתחררו לאוויר. חיפשנו, ולא מצאנו, תסמינים דומים בענפים סימפטומטיים שנוגעו באופן טבעי במטעי אבוקדו מסחריים. אבל, כשהנחנו ענפים מעוצים שנוגעו באופן טבעי בתא לח התפתחו תסמינים דומים (איור מספר 5). לשם בחינת האפשרות שנבגים א-מיניים מופצים אווירנית ביובש פיתחנו מערך ניסויי ייחודי (איור מספר 3). התברר שנבגים א-מיניים של הפטרייה LT אכן מופצים אווירנית ביובש (איור מספר 6) ושהפצה מתרחשת גם כשנושבות רוחות קלות מאד (איור מספר 7). ממצא זה יכול להסביר מדוע לא זוהה התסמין המדובר במטעים המסחריים: אם מספיקה רוח של כ-8 ק"מ לשעה כדי להפיץ את כל הנבגים הא-מיניים שנפלטו, הרי שבתנאים טבעיים אחרי שה - chirri נפלט מגופי הפרי ומתייבש, הנבגים מתנתקים ומופצים מידית. זאת מאחר שכמעט בכל רגע נתון, כמעט בכל מטע, נושבת רוח בעוצמה גבוהה מ-8 קמ"ש.

התובנה שתוארה למעלה אינה מובנת מאליה. על פי הידוע בספרות המקצועית נבגים א-מיניים של פטריות המשתייכות למערכת פטריות השק נפלטים מגופי הפרי בהם נוצרו רק בנוכחות של מים חופשיים על פני האיברים הנגועים והם מופצים למרחקים קצרים רק כשיורדים גשמים. הממצאים שלנו מצביעים על האפשרות שנבגים א-מיניים של הפטרייה LT נפלטים מגופי הפרי הא-מיניים כששוררת לחות יחסית גבוהה (גם ללא נוכחות של מים חופשיים) והם מופצים אווירנית ביובש. לממצא זה השלכות חשובות לגבי המחקר העוסק בביולוגיה של פטריות, אבל יש לו חשיבות רבה גם בהבנת האפידמיולוגיה של גורם המחלה ובפיתוח גישות יעילות לבקרתה. מהממצאים נראה שגורם המחלה יכול להיות מופץ למרחקים גדולים בדרך האוויר. המשמעות היא שמטע אבוקדו בריא עלול להינגע ממטעי אבוקדו נגועים הנמצאים בסמוך או אף במרחק. יותר מכך, מאחר וידוע שהפטרייה LT היא רב פונדקאית ומסוגלת לנגע מאות מינים של עצים שונים, מטע אבוקדו בריא עלול להינגע ממטעים בהם גדלים עצים ממינים אחרים ואף מעצים שאינם בהכרח עצי פרי. כולם עלולים, פוטנציאלית, להיות מקור מידבק ראשוני של גורם המחלה במטעי האבוקדו.

אחרי שבחנו שוב ושוב את הממצאים ואוששנו אותם ניסויית, התחלנו לבצע סדרת ניסויים שמטרתם הייתה לבחון באם יש גורם המגביל את התפתחות המגיפה. זיהוי של גורם כזה יכול לשמש לפיתוח ממשק מושכל לבקרת המחלה. במערך הניסויי שפתחנו ניסינו לכמת את התנאים המשפיעים על ההיווצרות, ההיפלטות וההפצה של נבגים א-מיניים מגופי הפרי בהם נוצרו. כשבחנו את השפעת עוצמת הרוח על ההפצה של הנבגים שנפלטו מגופי הפרי מצאנו שהיא מתרחשת גם ברוחות קלות (איור מספר 7). מכאן עולה ששלב ההפצה של יחידות הריבוי של הפתוגן למרחב אינו מהווה גורם המגביל את התפתחות המגיפה. בשלב הבא בחנו את הגורמים המשפיעים על היווצרות הנבגים הא-מיניים ועל ההיפלטות שלהם מגופי הפרי בהם נוצרו. בדו"ח זה

מתוארים ממצאי הניסויים הראשונים שבצענו. יש להתייחס אליהם בזהירות הראויה מפני שלא הספקנו עדיין לחזור על הניסויים ולאמת את המסקנות. מצאנו, שנבגים נוצרים ונפלטים רק כששוררת לחות יחסית גבוהה מאד (מעל 90%) לפרקי זמן ארוכים (איור מספר 8 א ו – 8). נראה שהטמפרטורה אינה גורם המגביל את התפתחות המגיפה מפני שהנבגים הא-מיניים נוצרו ונפלטו בטווח טמפרטורות רחב (איור מספר 8). העובדה שנדרשת לחות יחסית גבוהה, לזמן ארוך לשם היווצרות והיפלטות נבגים מגופי הפרי הא-מיניים מעודדת מפני שתנאים אלה אינם שכיחים בישראל. כמותם יאפשר בהמשך לפתח מערכת חיזוי שתשמש בעתיד ככלי לאופטימיזציה של בקרת המחלה.

5.2 התפתחות הפטרייה באברי צמח רפרודוקטיביים והתמודדות עמה

תסמיני מחלת הבוטריוספריה על אברי צמח ווגטטיביים ברורים ובלטים. קל מאד לראות ענפים יבשים על הרקע של הענפים הבריאים האחרים של העץ (איור מספר 2). בחלק מהמקרים ענפים פגועים נושאים פירות; הפירות המתייבשים נשארים מחוברים לענפים הפגועים וקל לזהותם. לא מפתיע, אם כך, שתסמיני המחלה באיברי הצמח הווגטטיביים הם אלה שזוהו לראשונה וברור מדוע תשומת הלב של הנוטעים, המדריכים והחוקרים, התמקדה בפגיעה באיברים הווגטטיביים. אבל, מתברר שהמחלה פוגעת גם באברי הצמח הרפרודוקטיביים. קשה יותר לזהות את הפגיעה באיברים הרפרודוקטיביים מפני שהיא ממוסכת (כמוסבר בהמשך) ומפני שהאיברים הפגועים – תפרחות, חנטים ופירות – נושרים. אחרי הנשירה האיברים הפגועים כבר לא קיימים ולכן קשה יותר לאבחן את הפגיעה ולאמוד את הנזק שנגרם. בבדיקות, בתצפיות ובניסויים שבצענו השנה התמקדנו בהתפתחות המחלה באברי צמח רפרודוקטיביים.

כפי שכבר צוין בחודש מאי 2015 שררו בארץ תנאי שרב קיצוניים. לאחר האירוע הייתה נשירה של פרחים וחנטים במטעי אבוקדו רבים. המגדלים ואנשי ההדרכה ייחסו את הפגיעה בתפרחות באופן בלעדי לעקת החום והיובש. אבל, תצפיות שבצענו במטעים הנגועים הצביעו על האפשרות שגם גורמים ביוטיים, ובאופן ספציפי – פטריות מהסוג בוטריוספריה - היו מעורבות ושאינטראקציה בין הגורמים הא-ביוטיים (שרב ויובש) לגורם הביוטי (בוטריוספריה) העצימה והחמירה את הפגיעה בתפרחות. בתפרחות פגועות רבות נראו תסמיני התייבשות האופייניים למחלת הבוטריוספריה והצלחנו לבדוד מהן את גורם המחלה בשכיחות שהייתה גבוהה במובהק משכיחות הבידודים מתפרחות שהיו א-סימפטומטיות (איור מספר 10). בהתבסס על ממצאים אלה העלנו את ההיפותזה שנבגים א-מיניים של פטריות הבוטריוספריה שהופצו אווירנית ביובש, אילחו ואכלסו את הפקעים, הפרחים והתפרחות. תסמיני מחלה לא התפתחו על איברי התפרחת המאוכלסים והם נשארו אסימפטומטיים. כשהעצים נחשפו לעקת החום והיובש, הפטרייה עברה משלב התפתחות האנדופיטי שלה לשלב התפתחות פתוגני והגבירה את הנזק שנגרם מעקת החום והיובש. התרחיש המתואר מאפיין את הביולוגיה של פטריות מהסוג בוטריוספריה בעצים ממינים שונים אבל למיטב ידיעתנו לא דווח עדיין על קיומו באבוקדו. כדי לבחון את ההיתכנות של התרחיש המתואר אילחנו פקעים אמיריים של עצי אבוקדו בנבגים א-מיניים של LT והכנסנו את העצים לזמן מוגבל לתא גידול בו שררו טמפרטורות גבוהות (כחיקוי לעקת חום). לאחר זמן ניסינו לבדוד את הפטרייה מהענפים והתברר שאכן, תנאי העקה עודדו את התקדמות הפתוגן ברקמות הצמחיות (איור מספר 9).

גורם המחלה המאלח את אברי התפרחת (גם במקרים בהם לא נראים כל תסמינים על האיברים המאולחים), מתקדם על השזרות ודרכם מגיע ומאלח את החנטים ואת הפירות המתפתחים (איור מספר 11). על חלק מהחנטים והפירות מתפתחים תסמיני מחלה וחלקם נושרים גם ללא שנראים עליהם תסמיני מחלה (איור מספר 12). נשירה זו מצטרפת לנשירה הטבעית של החנטים ("דילול טבעי") ולא ניתן לדעת אם הנשירה היא תוצאה של האילוח בגורם המחלה או שהיא חלק מהליך ההתפתחות הטבעי של הפירות במטע האבוקדו. בשנת 2016 בצענו שני ניסויים בהם יושמו ריסוסים על תפרחות עוד לפני שנראו עליהם תסמינים כל שהם. ארבעה-חמישה חודשים לאחר מכן, כשהפירות היו כבר גדולים, נקבע מה הייתה שכיחות התפרחות שנשארו פירות. בשני הניסויים היה הבדל מובהק בשכיחות התפרחות שנשארו פירות בין החלקות ההיקש לחלקות המרוססות. תוצאה זו התקבלה שהשוואה בוצעה עבור התפרחות האסימפטומטיות, שוויזואלית נראו בריאות (איורים מספר 13 ו – 14) וגם עבור התפרחות הסימפטומטיות (איורים מספר 13 ו – 14). המשמעות היא שבלא תלות אם נראים על התפרחות תסמינים או לא, ריסוס של תכשירי הדברה בפריחה משפר את ההצלחה ומעלה את היבול. זו נקודה חשובה מפני שהפסד יבול זה אינו מוחשי: המגדלים לא רואים את הנזק (כי הפירות נשרו) והם לא יכולים לדעת מה היה הפסד היבול. כמובן שניתן לראות את הפירות שנשרו על הרצפה (איור מספר 12) אבל מקובל לייחס נשירת הפירות זו באופן בלעדי לגורמים פיסיוולוגיים (נשירה טבעית) ולא לגורמים פתוגניים (בוטריוספריה). יש לחזור ולבחון את ממצאי הניסויים האילה בצורה

רחבה יותר בשנים נוספות. באם הממצאים הנוספים יהיו תואמים לאלה שתוארו כאן, יש להתייחס לכך בחשיבות הראויה. מן הראוי לציין שממצאים דומים התקבלו בניסויים שבצע נועם אלקן במסגרת מיזם זה במטעי מנגו (פרק מספר 3 בדו"ח זה).

לא כל הפירות המאולחים נושרים במהלך הגידול שלהם במטע. חלקם ממשיכים להתפתח כיאות, הם מבשילים ונקטפים. אבל, הם נושאים בצורה חבויה, רדומה, את גורם המחלה. זה מקור המידבק של ריקבונות עוקץ המתפתחים לאחר הקטיף. יישום ריסוסים בפריחה המפחית את אכלוס התפרחות בגורם המחלה, יצמצם את ריקבונות העוקץ לאחר הקטיף. ממצאי מחקריו של נועם אלקן מאוששים טענה זו.

5.3 התמודדות עם גורם המחלה באברי צמח ווגטטיביים של עצים בוגרים

בשנת המחקר הנוכחית בחנו את משך ההשפעה של גיזום ענפים סימפטומטיים בניסוי שבצענו בחלקת אבוקדו מהזן ריד של קיבוץ יקום. החלקה נוגעה בצורה קשה באירוע השרב שהתרחש במאי 2015 בו נפגעו תפרחות וגורם המחלה התקדם מהתפרחות לענפים שנשאו אותם וגרם להתייבשותם. בחלוף הזמן נראה היה שהעצים הפגועים של טיפול ההיקש "החלימו" בהתמדה (איור מספר 15א). זה קרה מפני שחלק מהענפים היבשים נשברו ונשרו ובגלל שבמשך הזמן התפתחו ענפים ירוקים חדשים שהסתירו את הענפים היבשים ומיסכו את הפגיעה. מעניין היה לראות שעצי טיפול הגיזום מהם הוסרו והורחקו כל הענפים היבשים, נשאו בריאים למשך זמן רב. הסיבה לכך לא הייתה היעדר הדבקה, מפני שחלק מהענפונים העשבוניים האסימפטומטיים שנדגמו מהעצים היו למעשה מאוכלסים בגורם המחלה (איור מספר 15ב). הסיבה לכך טמונה כנראה בעובדה שהתפתחות תסמינים מתרחשת אחרי שהעצים נחשפו לתנאי עקה (כמו עקת חום ויובש) ואלה לא התרחשו במהלך תקופת הניסוי. המסקנה מניסוי זה היא שגיזום והרחקה של אברי צמח ווגטטיביים נגועים משפר את המצב הבריאותי של העצים. חשוב להיות מודעים לעובדה שאברי הצמח הווגטטיביים עשויים להיות מאולחים בגורם המחלה אבל הוא לא יתפרץ עד שלא יתרחשו תנאי עקה.

הענפים היבשים הנגזמים על ידי הנוטעים מרוסקים ומפוזרים במטע, מתחת לעצים. בבדיקות שבצענו בשנה שעברה התברר שפטריית מהסוג בוטריוספריה המאכלסות את רסק הגזם שורדות בו לתקופות ארוכות. ממצאי הניסוי שבצענו השנה מאוששים ממצא זה (טיפול ההיקש; איור מספר 16). בגלל החשש שהפתוגן השורד על רסק הגזם הנגוע יופץ במרחב וידביק את העצים (חשש שהתעצם עם הוכחת הפיזור האווירני ביובש של הנבגים הא-מיניים), חשוב לקטול את הפתוגן השורד על רסק הגזם. בשנה שעברה בחנו את היעילות של טיפול סולארי ומצאנו שהוא לא קטל את הפתוגן ביעילות מספקת. בניסוי שבצענו השנה במטע מח"ע ריססנו את רסק הגזם באוריאה בתקווה שתוספת החנקן תעודד את הפעילות של מיקרואורגניזמים שיפרקו את רסק הגזם הנגוע ויזרוזו בכך את הקטילה של הפטריות המאכלסות את רסק הגזם. התברר שלטיפול לא הייתה כל השפעה (איור מספר 16). מכאן עולה שלא הצלחנו עדיין להצביע על שיטה יעילה לטיפול ברסק גזם נגוע המפוזר במטע מתחת לעצים. המסקנה העולה מכל היא שבמטעים המשמשים כמקור של חומר ריבוי למשתלות (בהם העצים משמשים כעצי אם), בהם הבריאות של אברי הצמח הווגטטיביים ניא קריטית, יש לסלק את הגזם הנגוע מהמטע ואין לרסק את הגזם ולפזר את הרסק על הקרקע בין שורות העצים.

6. הבעת תודה

אנו מודים לכל המעורבים במחקר ובישום הממצאים - אנשי שרות הדרכה והמקצוע (מיקי נוי, הדר כהן, עמי קינן, ליאו וינר, אלי קלוסקי ואודי גפני), אנשי מועצת הצמחים (משה ברוקנטל, רני בר-נס), וכל המגדלים שאפשרו לנו לבצע את הניסויים במטעים שלהם ותרמו מזמנם וממרחם; תקצר היריעה לפרט כאן את השמות של כולם. אנו מודים לאהוד אדלר מחברת אגריקה ולברק כהן מחברת תפוזל שהיו שותפים בביצוע ניסויי התפרחות במח"ע וביקום, בהתאמה. אנו מודים לגורמים המממנים את המיזם: קרן המדען הראשי של משרד החקלאות ומועצת הצמחים (שולחן אבוקדו).

פרק 2: התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה בנשירים

דו"ח לשנת המחקר השלישית

המוגש לוועדת ההיגוי של מיזם חוס"ן בוטריוספריה

ע"י

דוד עזרא, מעיין גרינברג ברן, ודני שטיינברג

המחלקה למחלות צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן

1. תקציר

בשנת המחקר האחרונה ניסנו לברר האם יש הבדלים ברגישות הכנות השונות, המשמשות את השתלנים להכנת השתילים, ברגישותן לגורמי המחלה. כמו כן המשכנו בניסיונות לפתח פרוטוקול ניקוי של חומר הרכב מפטריות הבוטריוספריה על ידי טבילה בחומר הדברה. דבר נוסף שעשינו השנה היה המשך המעקב אחרי עצים שהודבקו בשנה הראשונה למיזם בשתי הפטריות העיקריות פלינוס ובוטריוספריה (ניאוסכיטאלידיום למשמש ולאזיודיפלודיה לנקטרינה). מצאנו שיש הבדלים משמעותיים ברגישות הכנות השונות להדבקה על ידי בוטריוספריה שמקורה ברכב נגוע. הכנה מריאנה נפגעה בצורה הקשה ביותר מבין הכנות שנבדקו ואחריה הכנה 677 כאשר הכנה אנסן הייתה הפחות רגישה משלושתן. טיפול בעזרת חומר ההדברה סויץ בעינים שאולחו והורכבו על כנות הראה שהחומר אינו פוגע בחיות העינים אך עם זאת לא נראה שהוא היה יעיל בניקוי חומר הרכב מהפתוגנים בעיקר בניאוסכיטאלידיום. להערכתנו טיפול בחומר הרכב של נשירים בחומרי הדברה במטרה לנקות אותן לקראת ההרכבה, בדומה לנעשה באבוקדו אינו יעיל ולא יוכל לשמש אותנו כפתרון. בחינת רגישות כנות להדבקות בפתוגנים אלה הראתה שיש שוני ברגישות הכנות לפתוגנים השונים. שילוב שתי פטריות שנמצאו במהלך הפרויקט כמעורבות במחלת הגומוזיס בנשירים בוטריאוספריה ופלינוס בהדבקות עצים נבדקה לאורך שנתיים כאשר נראה כי בשיתוף הזה פטריות הבוטריוספריה שומרות על הדומיננטיות בגרימת הנזק.

2. מבוא

בשנים האחרונות אנו בוחנים את מעורבותן של פטריות ממשפחת הבוטריוספריה בתופעת התייבשות של שתילים צעירים ועצים מבוגרים ממשפחת הנשירים ובעיקר משמש, נקטרינה, אפרסק ושזיפים. במהלך השנתיים האחרונות זיהינו והגדרנו מספר פטריות מדוגמאות עצים חולים בניהן בלטו הפטריות *Phelinus* sp. – ו *Lasiodiplodia* sp., *Neoscytalidium digitatum* שהינה פטריית רקב. במבחני קוד שבוצעו הראינו שהדבקה של עצים צעירים בתנאי מעבדה בפטריות אלה גרמו להופעת תסמינים המוכרים מהמטעים אך עם זאת עצים אלה בדרך כלל לא מתו כתוצאה מהדבקות אלה. בתחילת הפרויקט בחנו את עצי המקור לחומר רכב המשמש את המשתלות לייצור שתילים לחקלאים. במטע המקור ראינו כי על העצים ישנן פטריות רקב רבות. במהלך המחקר זיהינו כי על הרבה מבין העצים במטעים המבוגרים יותר אנו רואים בנוסף להפרשת השרף המזוהה עם התקפת פטריות הבוטריוספריה גם גופי פרי של פטריות רקב (בעיקר פלינוס). בתחילה העלינו את ההשערה כי פטריות רקב אלה הינן משניות ומופיעות על העצים בגלל חולשתם הנובעת מהמחלה הנגרמת על ידי פטריות בוטריוספריה אך עם הזמן עלתה המחשבה ואתה ההבנה כי יתכן ודווקא מעורבות משותפת של שתי הפטריות (רקב ובוטריוספריה) היא שאחראית על ההידרדרות של העצים והתייבשות הענפים כאשר כל אחת מהפטריות תורמת את חלקה להליך. בשנת המחקר האחרונה עמדו לנו

מספר מטרות: 1. לבחון ולייצר פרוטוקול ניקוי לחומר רכב (עיניים) על ידי שימוש בחומרי הדברה שנמצאו יעילים כנגד הפטריות *N. digitatum* - Lasiodiplodia; 2. לבחון האם ישנה רגישות שונה לכנות השונות המשמשות את השתלנים, לפטריות הבוטריוספריה; 3. ביצוע מבחני קוך עם פטריית הרקב פלינוס שבודדה מעצים חולים בנפרד ובשילוב עם *N. digitatum*.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

בסעיף זה יפורטו בקיצור שיטות העבודה בהם השתמשנו. פרטים אודות הטיפולים בניסויים ודרכי הבדיקה שבצענו יפורטו בהמשך.

3.1 טיפול בחומר רכב כנגד פטריות בוטריוספריה

3.1.1 בחינת חומרי הדברה לטיפול בחומר הרכב בכדי לפתח פרוטוקול טיפול יעיל

היות וחומר הרכב שהגיע מבית המקור הינו חשוד כמקור אפשרי להפצת המחלה בעצים הצעירים החלטנו כבר בשנה שעברה לבחון דרכים לטיפול בחומר הרכב בעזרת חומרי הדברה לפני הליך ההרכבה. בכדי שצעד כזה יהיה יעיל יש תחילה לקבוע מהם חומרי ההדברה היעילים ביותר כנגד הפטריות ולאחר מכן לבחון מהם משכי הזמן והריכוזים שיהיו יעילים כנגד גורם המחלה אך לא יפגעו בחומר הרכב בצורה שלא תאפשר את גידולו התקין. בשנה שעברה דיווחנו על ניסויים לבחינת יעילות חומרי ההדברה סוויץ ומיראז שנמצאו כיעילים ביותר במבחני מצעים מורעלים, לטיפול בחומר רכב. חומר הרכב שנבדק היה חומר ששימש להרכבות ראש והתחלנו בניסויים לטיפול בעיניים. בשנה האחרונה התמקדנו בטיפול בעיניים בלבד ובחומר יחיד- סוויץ. כמו כן השנה הדבקנו שני זנים (משמש ונקטרינה) בשתי פטריות (ניאוסוכיטאלידיום ולאזיודיפלודיה בהתאמה).

עצים של משמש ונקטרינה שימשו כמקור רכב. ענפונים הנושאים עיניים מתאימות להרכבה נגזמו והובאו למעבדה שם על גבי כל עין הונחו 10 מיקרוליטרים של תרחיף נבגים בריכוז 10^4 נבגים למ"ל. הפטריות גודלו על מצע מזון PDA למשך כשבוע שלאחריו כעשרה מ"ל מים סטריליים הוספו לצלחת והתפטיר גורד בעזרת מקל דריגלסקי סטרילי. הנוזל המכיל נבגים וחתיכות תפטיר הועבר דרך שלוש שכבות של גאזה סטרילית וריכוז הנבגים נקבע על ידי ספירתם תחת מיקרוסקופ. מספר ענפונים הושארו ללא הדבקה כביקורת. לאחר מכן הענפונים הושארו בטמפרטורת חדר למספר שעות ולאחר מכן הם הוכנסו לשקית נאטמו והועברו למקרר 4 מ"צ למשך כשבועיים. טיפול זה בא להבטיח שהעיניים קיבלו תקופת קור מספקת שיאפשרו להן לפרוץ בהמשך. לאחר כשבועיים מקלות ההרכבה הנושאות עיניים הועברו לטיפול בחומר ההדברה סוויץ בריכוז 0.1%. הטיפול עצמו בוצע על ידי טבילת המקלונים בתמיסת חומר ההדברה למשך 20 דקות. במקביל חומר מודבק שלא הועבר טיפול בחומרי הדברה נשמר בכדי לשמש ביקורת להשפעת ההדבקה על העיניים. בכדי לוודא שההדבקה על ידי הנבגים הצליחה מספר מקלונים שימשו לבידוד הפטרייה מחומר הרכב. העיניים הורכבו על צמחי קנה 677 או הנסן נקיים. שלוש עצים לכל טיפול כשעל כל עץ הורכבו שלוש עיניים מכל טיפול כלומר היו סה"כ 9 חזרות לכל טיפול בכל ניסוי (ניסוי ראשון) או שתי עיניים על כנה על חמישה צמחים (טיפול שני). העיניים שהורכבו נעטפו כמקובל בסרט הרכבות והושארו לקליטה למשך כשלושה שבועות. העצים עצמם הוחזקו לאורך כל התקופה בית רשת או בחממה. לאחר כחודש וכל שבוע לאחר מכן העיניים נבחנו לפריצה (גידול עלים) איור 1.



איור מספר 1: עיניים מורכבות על כנת הנסן בניסוי השפעת חומרי הדברה ואילוח בפתוגן על החיות של העיניים לאחר חודש מההרכבה. א. עין מתה שהתייבשה; ב. עין ירוקה שעדיין לא פרצה; ג. עין שפרצה

הטיפולים שבוצעו היו:

- ❖ הדבקה בנבגים ללא טיפול בחומר ההדברה (נאוסכיטאלידיום על עיניים של משמש ולאזוידופלודיה על עיניים של נקטרינה)
- ❖ הדבקה + טיפול בסוויץ
- ❖ ללא הדבקה בנבגים + טיפול בסוויץ
- ❖ ללא הדבקה וללא טיפול בחומרי הדברה (ביקורת)

הניסוי בוצע פעמיים. בחינת התפרצות העיניים בוצעה פעם ראשונה לאחר חודשיים ופעם שניה לאחר ארבעה חודשים.

3.1.2 בחינת רגישות הכנות לפטריות הבוטריוספריה

בדומה למתואר בסעיף 3.1.1 עיניים של משמש ונקטרינה אולחו ולאחר ששהו בקירור שבועיים הורכבו על שלוש כנות שונות: מריאנה, הנסן ו6771. גם בניסוי זה הורכבו כביקורת עיניים שלא אולחו. על כל כנה הורכבו שלוש עיניים (איור 2). לאחר הרכבה נבחנו הצמחים במשך שלושה חודשים והעיניים שהורכבו תועדו. מספר העיניים שפרצו, נשארו ירוקות ללא פריצה או מתו תועדו. כמו כן נבחנה תגובת הכנה. בתום הניסוי הצמחים נחתכו מעל ומתחת לעיניים שהורכבו וצבע הרקמה באזורים אלה תועד (החמה או צבע של רקמה בריאה). נלקחו דוגמאות מכל החיתוכים ובוצעו בידודים בכדי לבחון האם הפטרייה בה הודבקו העיניים עברה מהעין המודבקת לכנה.



איור מספר 2: תגובת הכנות להרכבת עיניים בטיפולים השונים (מייצג בלבד). א. עיניים של נקטרינה מאולחת בלאזיודיפלוזיה על כנת הנסן שנקלטה ופרצה. ב. עין משמש מאולחת על כנת מריאנה. הפרשת הצמג על כנת המריאנה היתה יוצאת דופן בעוצמתה לעומת תגובת כנות ההנסן וכנת 677 שהורכבו בעיניים דומות. ג. עין משמש מאולחת על כנת 677 שלא נקלטה ותגובת הפרשת צמג מהכנה. ד. עין משמש מאולחת על כנת הנסן לא פרצה אך נשארה ירוקה.

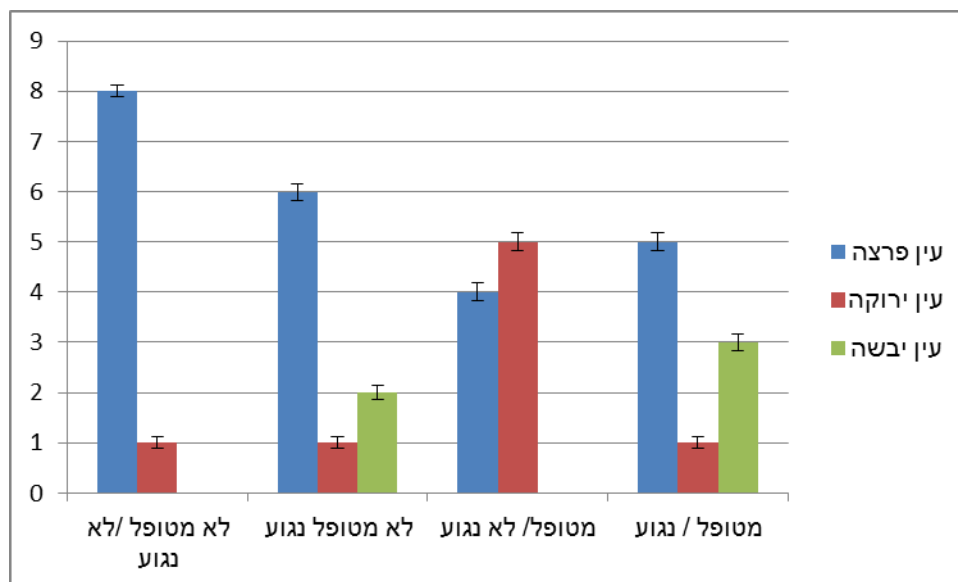
3.1.3 בחינת התפתחות תסמיני המחלה בעצים מודבקים בבוטריוספריה, פלינוס ובשניהם

בשנה השנייה של המיזם כשהבנו שישנה מעורבות של יותר מפטרייה אחת בתופעת התמוטטות העצים ובמיוחד הבוגרים הדבקו שתילים של נקטרינה ומשמש בניאוסכיטאלידיום ובפלינוס (פטריית הרקב) ההדבקה בוצעה כך שהיו עצים שהודבקו רק בניאוסכיטאלידיום, עצים שהודבקו רק בפלינוס ועצים שהודבקו בשניהם. במהלך השנתיים האחרונות עצים אלה גודלו בחממה ובחנו את התפתחות התסמינים עליהם מידי מספר חודשים. בתום הניסוי נחתכו שלושה עצים לכל טיפול לאורך הגזע ותועדו. גודל ההחמה (בס"מ) והתסמינים בעצה תועדו. הצמחים התקבלו ממשלת חנני. משמש על 677 ונקטרינה על 677. ההדבקות בוצעו על ידי חיתוך השיפה ומעט מהעצה הנחת פיסת מצע מזון עם תפטיר פעיל של הפטרייה, הנחת צמר גפן רטוב על התפטיר ואיטום בעזרת סרט פארפילם. לאחר מספר חודשים הורדת הסרט והשארית הצמחים בחממה תוך השקיה יומית וגיזום בהתאם לצורך.

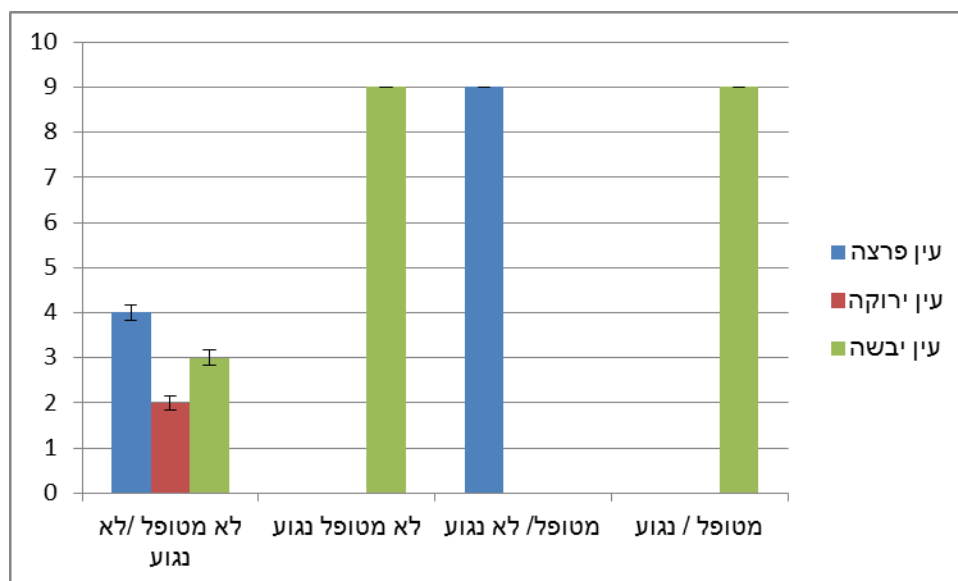
4. תוצאות

4.1.1 בחינת חומרי הדברה לטיפול בחומר הרכב בכדי לפתח פרוטוקול טיפול יעיל

מתוצאות הניסוי הראשון שבצענו ניתן לראות שבטיפולים הנגועים ישנן עיניים שהתיובשו לעומת הטיפולים הלא נגועים בהם יש פריצה של העיניים והשארות שלהן ירוקות ללא פריצה. ההשוואה המשמעותית ביותר מבחינת הניסוי הינה בין העיניים שאולחו וטופלו לאלה שאולחו ולא טופלו. בהשוואה זו אפשר לראות שאין הבדלים מהותיים בתוצאות. בהשוואת הטיפולים נמצא כי אין השפעה מובהקת סטטיסטית בין הטיפולים מלבד הבדל בין הטיפולים בהם נעשה שימוש בחומר ההדברה עם וללא אילוח (מטופל נגוע לעומת מטופל לא נגוע) בהם נמצא שיש הבדל בהתייבשות העיניים. המשמעות היא שבמקרה זה הטיפול בחומר ההדברה אינו עוזר.



איור מספר 3. מצב העיניים (נקטרינה) לאחר ארבעה חודשים מההרכבה בטיפולים השונים באילוח בלאזיוודיפלודיה. עין פרצה הינה עין שצמחה ויצרה ענפון; עין ירוקה הינה עין שנשארה חיה וירוקה אך לא גדלו עליה עלים; עין יבשה הינה עין שמתה ולא התפתחה.



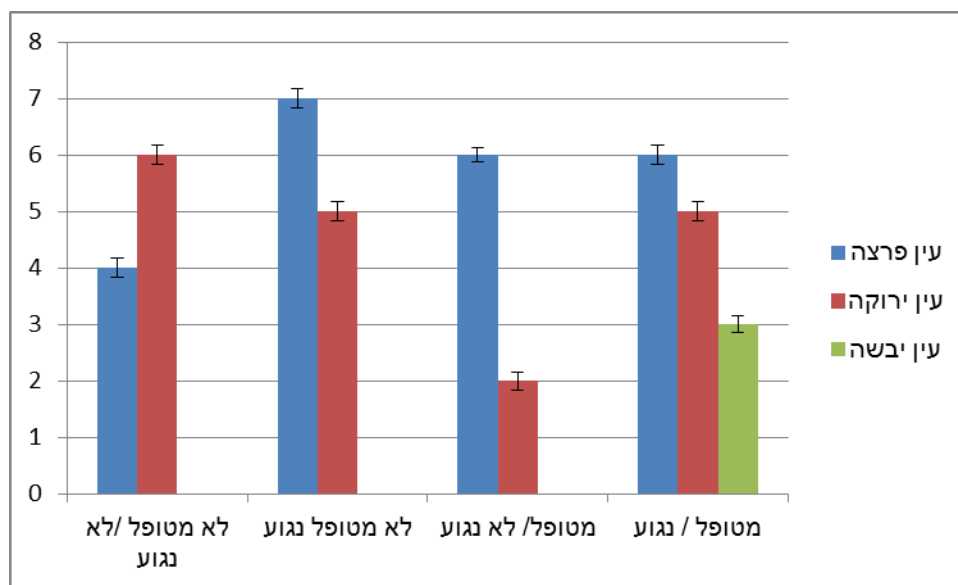
איור מספר 4. מצב העיניים (משמש) לאחר ארבעה חודשים מההרכבה בטיפולים השונים באילוח בנאוסכיטאלידיום. עין שפרצה הינה עין שצמחה ויצרה ענפון; עין ירוקה הינה עין שנשארה חיה וירוקה אך לא גדלו עליה עלים; עין יבשה הינה עין שמתה ולא התפתחה.

בניסוי המשמש אפשר לראות כי יש הבדל שנמצא גם כמובהק סטטיסטית, בין הטיפולים של המטופל נגוע למטופל לא נגוע (מבחן פירסון $\alpha > 0.05$) כאשר ההבדל מתבטא בכך שהטיפול בחומרי ההדברה לא עזר ותוצאת ההדבקה הייתה שכל העיניים מתו בעוד בעיניים שלא הודבקו בניאוסכיטאלידיום שרדו ופרצו. ההשריה

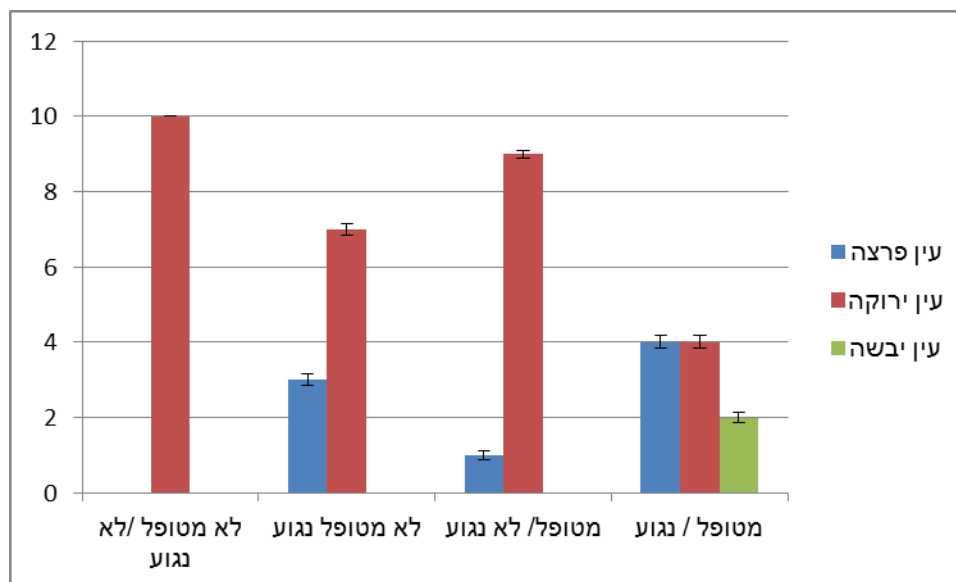
בחומר ההדברה לא פגעה בחיות העיניים ויכולתם לפרוץ. למסקנה דומה אפשר להגיע מהשוואת הטיפולים לא מטופל נגוע מול מטופל נגוע. כך גם בהשוואת הטיפולים לא מטופל נגוע ללא מטופל לא נגוע.

בניסוי הראשון אפשר לראות שבנקטרינה שהודבקה בלאסיוזיפלודיה (איור מספר 3) בשני הטיפולים בהם העיניים אולחו גם בזה שלא עבר טיפול בחומר ההדברה וגם בזה שעבר טיפול מספר העיניים הממוצע שמת דומה ועומד על כעין בממוצע. מספר העיניים שפרצו די דומה בכל הטיפולים ללא כל השפעה של חומר ההדברה או האילוח מכאן ניתן להניח שהטיפול בחומר ההדברה לא עוזר לניקוי העיניים מהפטרייה אך עם זאת כנראה שהאילוח לא היה יעיל מאוד בהרכב זה של הפטרייה והזן. כשמסתכלים על התוצאות המתקבלות באילוח משמש (איור מספר 4) עם נאוסכיטאלידיום התוצאות נראות שונות אך לא משנות את התמונה מבחינת יעילות הטיפול בחומר ההדברה. בטיפולים בהם היה אילוח בעזרת נאוסכיטאלידיום אפשר לראות שכל העיניים מתו כלומר ההדבקה היתה יעילה. עם זאת הטיפול בחומר ההדברה לא שיפר את מצב העיניים שאולחו ופרצו. עיניים שלא אולחו וטופלו בחומר ההדברה פרצו כולן כלומר חומר ההדברה לא השפיע על החיות של העיניים עצמן. בביקורת הלא מטופלת ולא מאולחת אפשר לראות עיניים בכל המצבים ניתן להניח שישנה גם השפעה טכנית של הצלחת ההרכבה עצמה.

בניסוי השני בוצעה הערכת העיניים רק פעם אחת לאחר כחודש מההרכבה. התוצאות מוצגות באיורים מספר 5 ו - 6. בהשוואה בן הטיפולים הלא מטופלים בחומר הדברה לא רואים הבדלים סטטיסטיים כלל. גם בהשוואה בן הטיפולים המטופלים בחומר הדברה אין הבדלים סטטיסטיים. בהשוואת הטיפולים המאולחים (מטופל נגוע ללא מטופל נגוע) אפשר לראות הבדל סטטיסטי רק בעין היבשה (על פי $0.05 > \alpha$ likelihood בלבד). גם פה המשמעות שהטיפול לא עוזר אך גם לא פוגע בחיות העיניים.



איור מספר 5: מצב העיניים (נקטרינה) ניסוי שני לאחר חודש מההרכבה בטיפולים השונים באילוח בלאזיודיפלודיה. עין שפרצה הינה עין שצמחה ויצרה ענפון; עין ירוקה הינה עין שנשארה חיה וירוקה אך לא גדלו עליה עלים; עין יבשה הינה עין שמתה ולא התפתחה.



איור מספר 6: מצב העיניים (משמש) לאחר חודש מההרכבה בטיפולים השונים באילוח בנאוסכיטאלידיום עין שפרצה הינה עין שצמחה ויצרה ענפון; עין ירוקה הינה עין שנשארה חיה וירוקה אך לא גדלו עליה עלים; עין יבשה הינה עין שמתה ולא התפתחה..

בהשוואה בין הטיפולים בהם נעשה שימוש בחומר ההדברה רואים כי יש הבדל במספר העיניים שפרצו ובמספר העיניים היבשות אבל הבדל זה אינו סטטיסטי לעומת זאת יש הבדל סטטיסטי במספר העיניים הירוקות (מבחן פירסון $\alpha > 0.05$). בהשוואת הטיפולים בהם לא נעשה שימוש בחומר ההדברה אנו רואים כי יש הבדל במספר העיניים שפרצו, הבדל זה הינו מובהק (ע"פ מבחן $\alpha > 0.05$) כך גם בהבדל במספר העיניים הירוקות. בהשוואת הטיפולים המאולחים (מטופל נגוע מול לא מטופל נגוע) אפשר לראות הבדלים במספר העיניים הירוקות וכך גם במספר העיניים היבשות אבל הבדלים אלה אינם סטטיסטיים.

גם בניסוי זה אפשר לראות שאין הבדל מהותי במספר העיניים שפרצו או נשארו ירוקות בטיפולים השונים דווקא בטיפול בו אולחו העיניים וטופלו בחומר ההדברה התייבשו מספר עיניים אבל גם אלה לא משנות את התוצאות בצורה מהותית. אפשר גם לראות שחומר ההדברה לא פוגע בחיות העיניים ואולי אפילו מעודד טיפה את העיניים. בשני הטיפולים בהם היה שימוש בחומר ההדברה אפשר לראות שמספר העיניים שפרצו היה גדול יותר מבאלה שלא נעשה שימוש בחומר ההדברה אך גם פה התוצאות לא שונות סטטיסטית.

בשורה התחתונה מהניסויים שבוצעו השנה ובשנה שעברה אנחנו יכולים לסכם שהטיפולים בחומרי ההדברה לא הועילו ולא ניקו את העיניים המאולחות. יש לזכור כי האילוח נעשה באופן ישיר על העיניים בריכוז יחסית גבוהה. אילוח טבעי לא יהיה ברמה של אלפי נבגים לעין ויתכן שטיפול בחומר רכב מצמחי אם נקיים יחסית יעזור במשהו.

4.1.2 בחינת רגישות הכנות לפטריות הבוטריוספריה

מצב החממה בכנות השונות ומרחק אליו היא הגיע בהתייחס למיקום ההרכבה תועדו לכל צמח. המרחק בס"מ נמדד מההרכבה עצמה ועד למיקום בו החממה הסתיימה וצבע הרקמה חזר להיות כשל רקמה בריאה. מידע זה מוצג פה באיור 7 ו-8.

ניתן לראות כי יש הבדל בתגובת הכנות לעיניים של נקטרינה המאולחות בלאסיודיפלודיה לעומת עיניים של משמש המאולחות בנאוסכיטאלידיום. כך לדוגמא מספר הצמחים היבשים (מתים) או המציגים חממה חמורה יותר, על כנת 677 שהורכבו בעיניים של נקטרינה מאולחת (צמח אחד שלוש עיניים) לעומת שני צמחים של משמש על 677. כנת ההנסך על פי התוצאות הראתה מעט מאוד החממה בצמחים שהורכבו עם עיניים של

נקטרינה לעומת אותה כנה שהודבקה בעיניים של משמש מאולחות. בעוד כנות הנסן שהורכבו בנקטרינה לא הראו החמה לאורך הרקמה כנות אלה שהורכבו במשמש הראו החמה בשלושת הצמחים שהורכבו כאשר שניים מתוכם התייבשו ומתו. כנת המריאנה הייתה הרגישה ביותר מבין שלושת הכנות שנבחנו והראתה התייבשות והחמה כשהורכבה בני סוגי העיניים (נקטרינה 3 מתוך 4 צמחים התייבשו ומשמש שני צמחים התייבשו והשניים האחרים הראו החמה מסיבית). ניתן לסכם שכנת ההנסן הינה הפחות רגישה מהכנות שבדקנו אחריה כנת ה677 והרגישה ביותר הייתה כנת המריאנה.

התפרסות ההחמה נבחנה על ידי חיתוך הצמחים לאורכם ומדידה בס"מ של הופעת החמה בעצת הצמח. בניסוי זה כל העיניים אולחו ולא טופלו בחומרי הדברה. מטרת הניסוי הייתה לבחון האם לכנה יש השפעה על עוצמת ומהירות ההתפתחות של תסמיני המחלה כשהדבקה מקורה בעיניים מאולחות בגורם המחלה. עיניים של נקטרינה אולחו בלאזיודיפלודיה בעוד עיניים של משמש אולחו בניאוסכיטאלידיום. אפשר לראות שהתפתחה החמה בצורה שונה על הכנות השונות. כך בעיניים של נקטרינה שהורכבו על הנסן כמעט ולא רואים התפתחות של החמה בעצה והעיניים פרצו וצמחו בצורה טובה. על גבי כנת 677 אפשר לראות התפתחות של החמה בעצה אבל לא למרחק גדול (כס"מ אחד כלפי מטה) מלבד צמח אחד מהארבע שהתייבש ומת בחלקו העליון ובחלק התחתון פיתח החמה חזקה מאוד (צמח 2). בכנת המריאנה המצב משתנה. מתוך 4 הצמחים עליהם הורכבו העיניים שלושה התייבשו ומתו.

בהסתכלות על המצב בהרכבות המשמש אפשר לראות שהכנות פיתחו החמה ויותר צמחים התייבשו כשהורכבו עיניים של משמש נגועות כנראה שהניאוסכיטאלידיום אגרסיבי יותר מהלאזיודיפלודיה או באילוח העיניים וההתבססות בהן או בעצם המעבר וגרירת המחלה בכנות. כשמסתכלים על המפה (איור מספר 7) אפשר לראות שכנות ההנסן ןה 677 מגיבות יחסית דומה ובשתייהן ישנה התפתחות של החמה בעיצה של העצים שלא מתו והתייבשו ובשניהן ישנם עצים שהתייבשו ומתו (הנסן 2 צמחים משלוש ו 677 2 צמחים מארבע). בכנת המריאנה אפשר לראות תגובה יותר קשה של העצים אומנם רק צמח אחד התייבש לגמרי וצמח נוסף התייבש חלקית (היות וכנת המריאנה מפתחת מספר גזעים עליהם הורכבו העיניים בחלק מהצמחים הורכבה עין אחת על גזע אחד בעוד שתי העיניים האחרות הורכבו על גזע אחר. בצמח מספר 2 גזע אחד התייבש לגמרי בעוד הגזע השני עליו הייתה מורכב העין השלישית פיתח החמה חזקה אך לא התייבש לגמרי), שני הצמחים הנוספים פיתחו החמה מאוד חזקה שככל הנראה אם היו מושארים צמחים אלה לאחר הניסוי גם הם היו מתייבשים ומתים.

ניתן אם כך להבין מניסוי זה שישנה רגישות שונה של הכנות שנבחנו לפתוגנים השונים כאשר כנת ההנסן רגישה פחות ללאזיודיפלודיה אחריה 677 עם רגישות גבוהה יותר וכנת המריאנה שנמצאה הרגישה ביותר. לגבי הניאוסכיטאלידיום כנות ההנסן והכנה 677 נראות דומות ברגישותן וכנת המריאנה מעט יותר רגישה אך כולן רגישות מאוד לניאוסכיטאלידיום.



איור מספר 8: הרכבת עיניים של נקטרינה ומשמש מאולחות בלאזיודיפלודיה ונאוסכיטאלידיום על כנות שונות. א. עין נקטרינה על כנת 677 העין התפתחה לענפון; ב. עין נקטרינה על הנסן העין התפתחה לענפון; ג. עין משמש על כנת מריאנה העין מתה ולאחר זמן כל הצמח התייבש ומת; ד. עין משמש על כנת 677 העין נשארה ירוקה אבל לא פרצה.

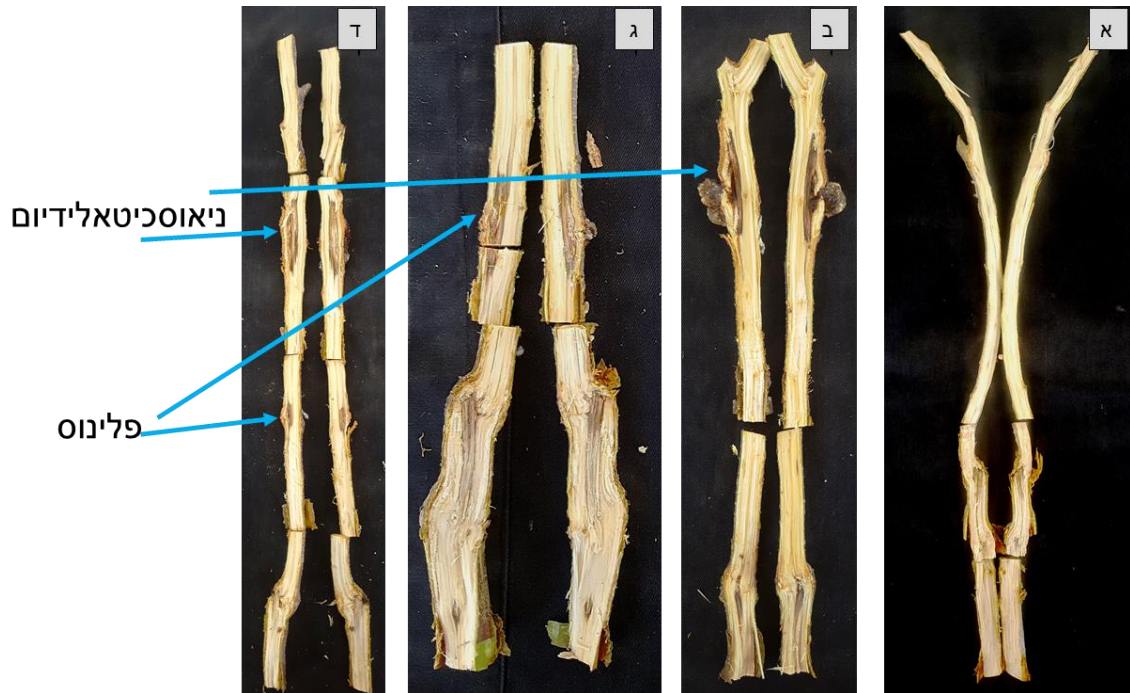
4.1.3 בחינת התפתחות תסמיני המחלה בעצים מודבקים בבוטריוספריה, פלינוס ובשניהם

את התוצאות של חלק זה ביטאנו כ"מפת החמה" בה הרקמה עם ההחמה מופיעה בצבע אדום בעוד הרקמה הנראית בריאה בצבע ירוק (ראה גם איורים מספר 10 ו-11). כשמשוים את עוצמת ההחמה בצמחי המשמש המודבקים בפלינוס (36%) לזו שבנקטרינה (26%) נראה שבמשמש הפטרייה התקדמה בעצה יותר מאשר בנקטרינה (על פי חישוב השטח עם ההחמה מתוך כלל השטח שנרשם) אם מסתכלים על כל צמח ניתן לראות שמלבד בצמח אחד של משמש ההתקדמות של הפטרייה בצמחים שנדגמו הייתה די דומה ולמרחק של כס"מ אחד בלבד מנקודת ההדבקה גם במשמש וגם בנקטרינה. בהשוואה דומה בהדבקות הניאוסכיטאלידיום רואים את אותה התוצאה בקירוב בהשוואה בן שני זני הנשירים רק שהמרחק אליו הגיעה ההחמה הרבה יותר גדול מזה שראינו לפלינוס (ארבע ס"מ כלפי מעלה במשמש ו-2 בנקטרינה וכשניים במשמש כלפי מטה וארבע בנקטרינה) בצמח אחד של משמש ההתפשטות של הפטרייה בעצה היתה יוצאת דופן והגיעה לס"מ מנקודת ההדבקה כלפי מטה ושיעור כלפי מעלה אך מצב זה לא חזר על עצמו. בהדבקות הכפולות, הפלינוס הודבק בחלק התחתון של הגזע בעוד הניאוסכיטאלידיום הודבקה בחלק העליון של הגזע. במרבית הצמחים הנקרוזות לא התחברו האחת לשנייה מלבד צמח אחד (מספר 1) בנקטרינה בו היתה התחברות של התסמין כנראה בשל התקדמות ארוכה יותר של ההחמה מצד הניאוסכיטאלידיום. בס"כ מהמפה ומהתמונות אפשר להניח שההתקדמות בעצים הצעירים הייתה לאורך השנתיים לא מאוד חזקה ומשמעותית.

	החמה
	בריא

החמה														מס'	טיפול			
-9	-6	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	6	7						
																בקורת	משמש	
														1		פלינוס		
														2				
														3				
														1		נאוסכיטלידיום		
														2				
														3				
														1		אילוח כפול: פלינוס		
														2				
														3				
														1		אילוח כפול: נאוסכיטלידיום		
														2				
														3				
																בקורת		נקטרינה
														1		פלינוס		
														2				
														3				
														1		נאוסכיטלידיום		
														2				
														3				
														1		אילוח כפול: פלינוס		
														2				
														3				
														1		אילוח כפול: נאוסכיטלידיום		
														2				
														3				

איור מספר 9: מפת החמה של תגובת העצה בעצים מודבקים בניאוסכיטלידיום ופלינוס, בני שלוש שנים. צבע ירוק- רקמה הנראית בריאה, צבע אדום רקמה המבטאת החמה של העצה.



איור מספר 10: צמחי משמש מודבקים בניאוסכיטאלידיום ופלינוס. חתך אורך של הצמחים מאזור ההרכבה בתחתית ועד למעל ההדבקה העליונה בניאוסכיטאלידיום. שתי נקודות הדבקה: תחתונה בה הודבק הצמח בפלינוס ועליונה בה הודבק הצמח בניאוסכיטאלידיום. א. ביקורת לא מודבקת; ב. ניאוסכיטאלידיום; ג. פלינוס ד. הדבקה כפולה פלינוס ונאוסכיטאלידיום



איור מספר 11: צמחי נקטרינה מודבקים בניאוסכיטאלידיום ופלינוס. חתך אורך של הצמחים מאזור ההרכבה בתחתית ועד למעל ההדבקה העליונה בניאוסכיטאלידיום. שתי נקודות הדבקה: תחתונה בה הודבק הצמח בפלינוס ועליונה בה הודבק הצמח בניאוסכיטאלידיום. א. ביקורת לא מודבקת; ב. ניאוסכיטאלידיום; ג. פלינוס; ד. הדבקה כפולה פלינוס ונאוסכיטאלידיום.

5. דיון

בשנת המחקר האחרונה של פרויקט זה בחנו את האפשרות לטפל בחומר רכב נגוע כנגד שתי הפטריות המרכזיות, ממשפחת הבוטריוספריה, המנגעות נשירים במטע הישראלי: *Neoscytalidium dimidiatum* ו- *Lasiodiplodia theobromae*. ניסויי ההדבקה, טיפול והרכבה של העיניים על כנות נקיות הראו לנו שחומרי ההדברה שנבחנו ונמצאו פעילים כנגד הפטריות האלה במבחני מעבדה אינם מספיקים בכדי למנוע את ההדבקה של הכנות בפתוגנים כתוצאה מההרכבה. בחינת רגישות של שלוש כנות מרכזיות המשמשות את השתלנים בארץ לייצור שתילי נשירים הראתה רגישות משתנה לשני הפתוגנים כאשר רגישותן של הכנות ללזיודיפלודיה הייתה פחותה מלניאוסכיטאלידיום. כבר בשנת המחקר הקודמת הבנו מהניסויים והתוצאות שישנה מעורבות של יותר מפטריה אחת במחלה בנשירים. הסתבר שבבידודים מעצים נגועים במספר גדול של המקרים בודדו באופן עקבי, שתי פטריות האחת מהבוטריוספריה (לזיודיפלודיה או ניאוסכיטאלידיום) והשנייה פלינוס (*Phelinus* sp). פטרייה זו משתייכת לקבוצת פטריות המדף שהינן פטריות רקב המפרקות את עצת העץ. בדרך כלל פטריות אלה מתבטאות רק בעצים מוחלשים הנמצאים תחת עקות שונות. כשפטריות אלה נוכחות בצמח לרוב חל פירוק של העצה הגורם למות העץ. ידע זה שנוסף לנו עורר את השאלה: האם הדבקה בפטרייה זו תגרום לתסמינים הדומים לאלה שאנו רואים במטע והאם הדבקה בשתי הפטריות יחד תביא למותו המהיר יותר של העץ. עצי מישמש ונקטרינה שאולחו בשתי הפטריות הרלוונטיות נחתכו בסוף שנת המחקר הנוכחית בכדי לבחון את התקדמות הפטריות והתסמינים בעצה של העצים השונים. מהתוצאות נראה שפטריות הבוטריוספריה הינן הפטריות הדומיננטיות יותר היות והן התפרסו למרחק גדול יותר בגזעי העצים וגרמו לתסמיני מחלה אופייניים חזקים הרבה יותר משגרמה פטריית הפלינוס. אפשר לשער שפטריות הבוטריוספריה המגיעות עם הרכב למשתלה מדביקות את העצים הצעירים. בחלק מהמקרים הן הורגות את הצמחים הצעירים כבר במשתלה או מיד לאחר השתילה בשטח. במקרים אחרים העצים החזקים יותר ממשיכים בגדילה במטע במשך שנים. לאחר כשבע עד 14 שנים השפעת נוכחות הבוטריוספריה בנוסף לחשיפת העצים לעקות שונות, הנובעות מאופן הגידול שלהם מאפשר לפטריות אלה להתפרץ בעצים ולגרום לתסמיני המחלה (גומוזיס של הגזעים והענפים). במקביל פטריית הפלינוס שהינה פטרייה נפוצה מדביקה את העצים במטע דרך פצעי הגיזום ו/או מגיעה עם הצמחים הצעירים מהמשתלה, מתפתחת באטיות בצמח עד לנקודה בה העקה בה שרוי הצמח הן מהגידול והן מההשפעות של פטריית הבוטריוספריה, מתחילה בפעילות פירוק העץ דבר המתבטא בשטח בהיחלשות העץ, שבירת ענפים ובסופו של דבר במוות של העץ.

לדעתי, האפשרות לטפל בחומר הרכב לאחר הורדתו מעצי האם לא יצליח בעזרת החומרים והטכנולוגיה הנמצאת בידינו כרגע. האופן בו אפשר יהיה לצמצם את הפגיעה של פטריות אלה ולשפר את מצב העצים בעתיד יהיה רק על ידי ייצור חומר רכב נקי לחלוטין מהפטריות הללו, דבר שאפשר יהיה לעשות רק אם חומר הרכב יגיע מעצים המיועדים לשם כך, מגודלים בתנאים סטריליים תוך שמירה מוקפדת על בריאותם וניקיונם. הדבר יכול להתקיים אם יבנו בית יסוד ובית גרעין חדשים נקיים שרק מהם יילקח חומר רכב מאושר. שמירת העצים הבוגרים והצעירים במטע מפני הדבקות בפטריות רקב במהלך הגידול על ידי הגנה על פצעי הגיזום לאחר גיזום העצים בחורף לאחר הקטיף, הורדת גופי הפרי של פטריות הרקב והרחקת מקור הנגיעות, סניטציה לא מתפשרת שמשמעותה חיתוך, עקירה והרחקת כל צמח או חלקיו החשודים בנגיעות. הדבר כמובן דורש את שיתוף הפעולה של הרשויות והחקלאים כאחד.

6. הבעת תודה

אנו מודים לזוהר ממשלת חנני על העזרה ועל התמיכה במחקרים.

פרק 3. התמודדות עם מחלת הבוטריוספריה במנגו

דו"ח לשנת המחקר השלישית

המוגש לוועדת ההיגוי של מיזם חוס"ן בוטריוספריה

ע"י

נעם אלקן

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר קטיף, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

1. תקציר

בחינה של 40 תבדידי *Lasiodiplodia theobromae* ו *Lasiodiplodia pseudotheobromae* הראתה כי קיימת שונות גדולה ברמת האלימות של התבדידים השונים על גבי ענפוני אבוקדו, מנגו ונקטרינה. מעניין לציין כי *L. theobromae* באופן כללי יותר אלימה ויוצרת באופן משמעותי יותר נבגים מתבדידי *L. pseudotheobromae*. ריקבון העוקץ היא אחת המחלות השכיחות ביותר בגידולים סובטרופיים כגון מנגו ואבוקדו. המחלה גורמת לפחתים משמעותיים לאחר הקטיף ונגרמת ממגוון פטריות פתוגניות. פטריות הבוטריוספריה הינן גורם הריקבון העיקרי, כאשר פטריית הלסיודיפלודיה הינה הפתוגן המרכזי. בהדבקת פירות מנגו ואבוקדו נמצאה שונות גדולה ברמת האלימות של התבדידים השונים. ענפונים מתים במטע מכילים כמויות גדולות ביותר של נבגים אשר נמצאים בקרבה פיזית לפרחים. פטריות הבוטריוספריה חודרות לעץ דרך פתחים טבעיים אשר קיימים גם בפרחים. לכן, נבדקו טיפולים של שני ריסוסי פונגיצידיים (סוויץ', לונה אקפריאנס או לונה טרנקיליטי) בפריחה במטעי מנגו. נמצא כי ריסוסי פונגיצידיים בפריחה הפחיתו בחצי את כמות הענפונים המתים לעץ. בנוסף, נמצא כי פירות אשר נקטפו מעצים אשר רוססו בפונגיצידיים בפריחה פיתחו באופן משמעותי פחות ריקבונות עוקץ לאחר אחסון ארוך. הפתוגנים העיקריים הגורמים לריקבונות בפירות מנגו לאחר קטיף הם *Lasiodilpodia* ו *Alternaria*, בבדיקה ראשונית בצלחות נמצא כי פטריות אלו רגישות יותר לתכשיר ההדברה 'פלודיאוקסוניל' (סקולר) מאשר לתכשיר 'פרוכלורז' (ספורטק- הנמצא בשימוש מסחרי לאחר הקטיף). אכן, טיפול לאחר קטיף ב'פלודיאוקסוניל' (סקולר) בפירות מנגו מודבקים בלסיודיפלודיה הפחית באופן מובהק את אחוז וחומרת הריקבון בהשוואה לטיפול ב'פרוכלורז' (ספורטק).

2. מבוא

אחת המחלות השכיחות ביותר בגידולים סובטרופיים לאחר הקטיף הינה ריקבון העוקץ. הפטריות הגורמות לריקבון העוקץ מאכלסות את ענפי הפרי באופן דמוי אנדופיטי, ללא תסמינים נראים לעין. במהלך הבשלת הפרי או עם החלשות מקומית של הצמח הפטריות עלולות לגרום לריקבונות עוקץ בפרי או לתמותה-לאחור בענפים במטע. מגוון פטריות עלולות לגרום לריקבונות עוקץ (דיסקין ושותפים, 2015) ובכלל זה מספר מינים מהסוג Botryosphaeriaceae אשר דווחו כמחוללי מחלה מרכזיים בהתפתחות ריקבונות העוקץ. פטריות אלה גורמות להופעת ריקבון עוקץ, תמותת ענפים לאחור (Dieback) והיווצרות כיבים (cankers) בענפים העלולים לעיתים להוביל להתמוטטות של עצים שלמים, בעקבות חיגור (Barr et al. 1987).

האתגר בהדברת הפתוגנים הגורמים לריקבון העוקץ לפני הקטיף נובע מהמיקום שבו נמצאים גורמי המחלה. הנבגים חודרים אל רקמות הצמחיות מבעד לפצעים או פתחים בתפרחות. לאחר מכן, פטריות אלו מאכלסות את צינורות ההובלה של ענפי העץ ונמצאות במצב אנדופיטי. התפרצות של המחלה מתאפשרת כאשר העץ או הענף מצוי תחת תנאי עקה או בפרי הבשל שלאחר קטיף, במיוחד לאחר אחסון ממושך. בשלב זה הפטרייה מתעוררת ועוברת למצב הנקרטרופי (התוקפני) וגורמת לסימפטומים האופייניים בעצי הפרי השונים.

כיום טרם דווח על טיפולים יעילים כנגד מחלת ריקבון העוקץ. מחקרים שונים מתבצעים בימים אלו, חלקם מתבססים על ניסיון להפחתת שיעור הפטריות הפתוגניות עוד במטע באמצעות תכשירי הדברה, כדוגמת פלודיאוקסוניל למניעת ריקבונות עוקץ בהדרים (Zhang 2007). מחקרים אחרים מתרכזים בניסיונות לעכב התפתחות הריקבונות לאחר קטיף באמצעות טכנולוגיות אחסון שונות ואמצעים כימיים או פיזיקליים (Prusky et al. 2009).

היעד המרכזי של המחקר הנוכחי הוא אפיון התוקפנות של תבדידי *Lasiodiplodia* על גבי ענפונים ובפירות תוך חיפוש דרכי התמודדות עם גורמי המחלות. התקדמות המחקר בשתי החזיתות תוכל להוביל בעתיד לשימוש בשיטות הדברה יעילות יותר.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

3.1 אפיון תוקפנות תבדידי *Lasiodiplodia*

3.1.1 ענפונים

ענפוני אבוקדו, מנגו ונקטרינה בקוטר של 4-6 מ"מ נחתכו לאורך של 6 ס"מ וחוטאו ב 1% אקונומיקה למשך 2 דקות. שלושה ענפונים הונחו בצלחות פטרי על גבי מצע מי אגר כאשר אמצע המצע נחתך החוצה וקצוות הענפונים נשענו על גבי מצע מי-האגר, כך רוב הענפון היה באוויר. אמצע כל ענפון נפצע באופן אחיד ועל גבי הפציעה הונחו 4 מ"מ תפטיר (מצלחת PDA). הצלחות עם הענפונים הודגרו ב 23 מ"צ למשך 7-10 ימים וחומרת המחלה הוערכה בכל יום.

3.1.2 פירות

לאחר קטיף של פירות מנגו 'שלי' ואבוקדו 'אטינגר', הפירות אוחסנו ב 20 מ"צ עד לשלב של התחלת הבשלה (שבירת צבע). בשלב הזה הפירות חוטאו ב 1% אקונומיקה למשך שתי דקות. עוקץ הפרי נתלש ומקום הפציעה אולח ב 20 מיקרוליטר של תמיסת נבגי *Lasiodiplodia theobromae* בריכוז 10^5 . הפירות אוחסנו ב 23 מ"צ למשך שבוע, קוטר הריקבון נמדד וחומרת המחלה הוערכה בכל יום.

3.2 ריסוסי פריחה במטעי מנגו

כחלק משיתוף פעולה עם חברת BAYER, פירות מנגו 'קיט' רוססו בפריחה ארבע פעמים (כל שבוע) בריסוסים שונים נגד קימחון. בניסוי זה החלפנו את שני הריסוסים האמצעיים בפריחה בריסוסי פונגיצידיים: 'סוויץ' (Cyprodinil+Fludioxonil), 'לונה' אקפריאנס' (tebuconazole+fluopyram), 'לונה' טרנקיליטי (pyrimethanil+fluopyram) וסרניד (המכיל חיידקי בצילוס והפרשותיהם) כנגד ריקבונות עוקץ ובהשוואה לפרי לא מרוסס או מרוסס רק נגד קמחונות (PMt). חודשיים לאחר הריסוסים נבדקו כמות הענפונים המתים בכל עץ. לאחר הקטיף, הפירות אוחסנו ב 12 מ"צ בהמשך הפירות הועברו לשבועיים אחסון בחיי-מדף (20 מ"צ). ריקבונות העוקץ הוערכו בהוצאה מקירור ובחיי-מדף.

3.3 טיפול בפונגיצידיים בפירות מנגו לאחר קטיף

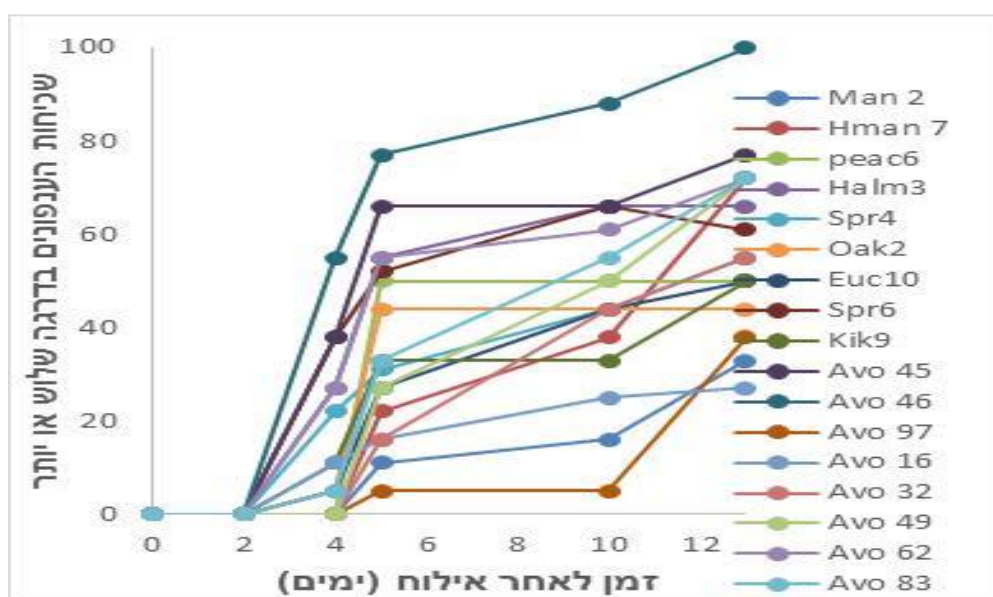
לאחר הקטיף פירות מנגו 'קיט' אוחסנו ב 20 מ"צ עד לשלב של התחלת הבשלה (שבירת צבע). בשלב הזה הפירות חוטאו ב 1% אקונומיקה למשך שתי דקות. עוקץ הפרי נתלש ומקום הפציעה אולח ב 20 מיקרוליטר של תמיסת נבגי *Lasiodiplodia theobromae* בריכוז 10^5 . לאחר 18 שעות, הפירות נטבלו בחומרי הדברה שונים: סקולר עם החומר הפעיל 'פלודיאוקסוניל', או ספורטק עם החומר הפעיל 'פרוכלורז' בריכוזים של 150 או 300 ח"מ חומר פעיל. בהמשך הפירות אוחסנו ב 23 מ"צ למשך עשרה ימים, קוטר הריקבון נמדד וחומרת המחלה הוערכה בכל יום.

4. תוצאות

4.1 אפיון תוקפנות של תבדידי *Lasiodiplodia*

מבידודי פטריות מכל אזורי הארץ נמצאו פטריות בוטריוספריה שונות הכוללות גם: *Lasiodiplodia theobromae* ו- *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. בודדו כ 40 תבדידים שונים. נראה כי הפטרייה גורמת לתמותת ענפים במטעי אבוקדו וזאת מכיוון שהצלחנו לבדוד את הפטרייה הזאת מענפים מתים ותפרחות מתות. מבחני כוך, הראו כי לתבדידים שונים יש רמות אלימות שונות, המבחינים התבצעו על ענפונים, עצים ופירות אבוקדו ומנגו.

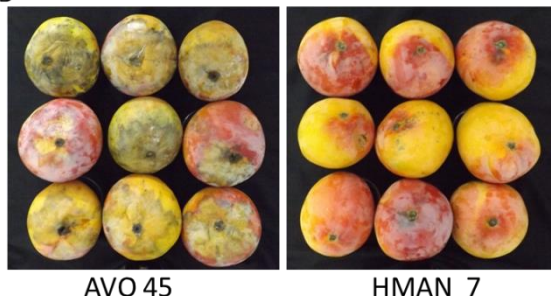
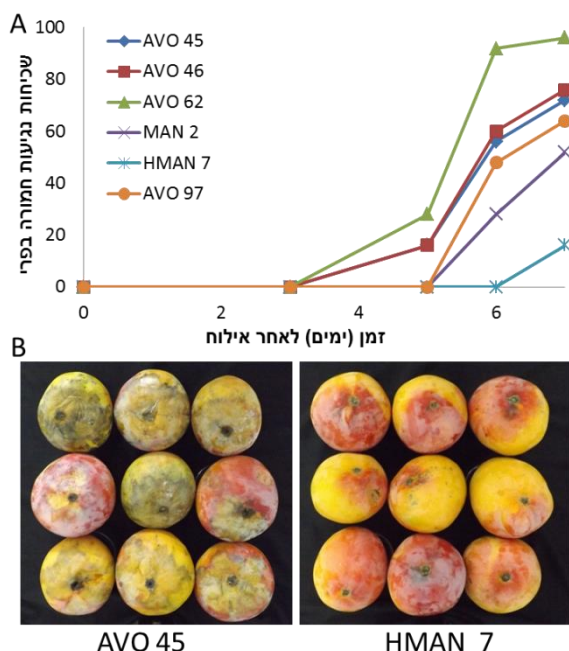
אלימות התבדידים נבחנה כשלוש פעמים על ענפונים מנותקים מעצי מנגו או אבוקדו ופעם אחת על ענפי נקטרינה. בבחינת אלימות התבדידים על ענפי אבוקדו 'האס' מנותקים, נמצא כי יש שונות רבה ברמת האלימות של התבדידים השונים (איור מספר 1). שונות דומה נמצאה בניסויים השונים. בימים אלו אנו מנסים לבחון את ההתאמה בין רמת האלימות של תבדידים שונים לסמנים מולקולריים (בשיתוף פעולה עם המעבדות של פרופי דני שטיינברג ודרי' עומר פרנקל).



איור מספר 1: אפיון דרגת האלימות של תבדידי לסיודיפלודיה שונים על ענפונים מנותקים של אבוקדו 'האס' על פי אינדקס תוקפנות 1-5.

4.2 בחינת אלימות של תבדידי *Lasiodiplodia theobromae* בפירות מנגו

Lasiodiplodia theobromae ו- *pseudotheobromae* הן שתי פטריות מרכזיות הגורמות לריקבונות עוקץ. בודדו כ 40 תבדידים שונים של לסיודיפלודיה מכל רחבי הארץ. מבחני כוך הראו כי הפטרייה גורמת לתמותת ענפים במטעים וריקבונות עוקץ בפירות מנגו ואבוקדו. תוקפנות תבדידים מעניינים הוגדרה על פירות מנגו 'שלי' (איור מספר 2) ואבוקדו 'אטינגר' (תוצאות לא מוצגות). ניתן לציין, כי קיימת התאמה בין אלימות התבדידים שונים בענפים לאלימות של אותם תבדידים בפירות.



איור מספר 2: בחינת אלימות תבדידי *Lasiodiplodia theobromae* תוך הדבקת עוקצי מנגו 'שלי' ומעבב אחר חומרת הנגיעות במשך שבוע. **A.** אחוז פירות נגועים באופן חמור (מעל 3, באינדקס נגיעות 1-5). **B.** תמונה מייצגת של פירות נגועים שבוע לאחר ההדבקה.

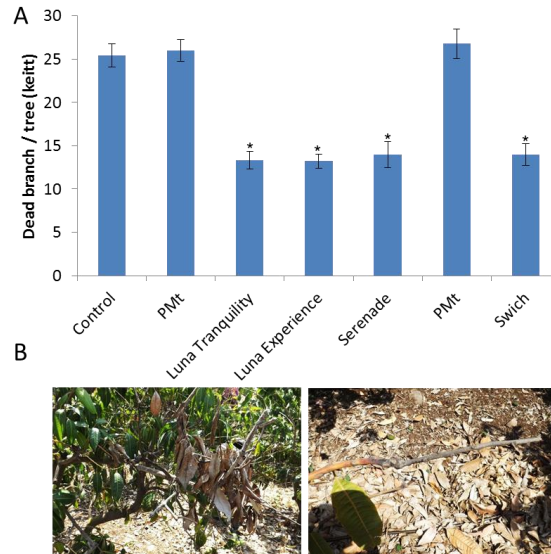
4.3 השפעת ריסוסי פונגיצידיים בפריחה על ריקבונות עוקץ לאחר קטיף

פטריית פתוגניות הגורמות לריקבונות עוקץ יכולות לחדור בזמן הפריחה. כחלק משיתוף פעולה עם חברת BAYER, פירות מנגו מהזן 'קיט' רוססו בפריחה (מרץ-אפריל) בטיפול משולב של שני ריסוסי קימחון ועוד שני ריסוסים של: 'סוויץ' (Cyprodinil+Fludioxonil), 'לונה אקפריאנס' (tebuconazole+fluopyram), 'לונה טרנקיליטי' (pyrimethanil+fluopyram) וסרניד (המכיל חיידקי בצילוס והפרשותיהם) בהשוואה לפרי לא מרוסס או מרוסס רק נגד קמחונות (PMt). כעשרה שבועות לאחר סיום הריסוסים נבדקו מספר הענפונים המתים לעץ תוך תמותה לאחר (Die back). בניסיון נמצא כי ריסוסים בפריחה הפחיתו במחצית את כמות הענפונים המתים בממוצע לעץ (איור מספר 3).

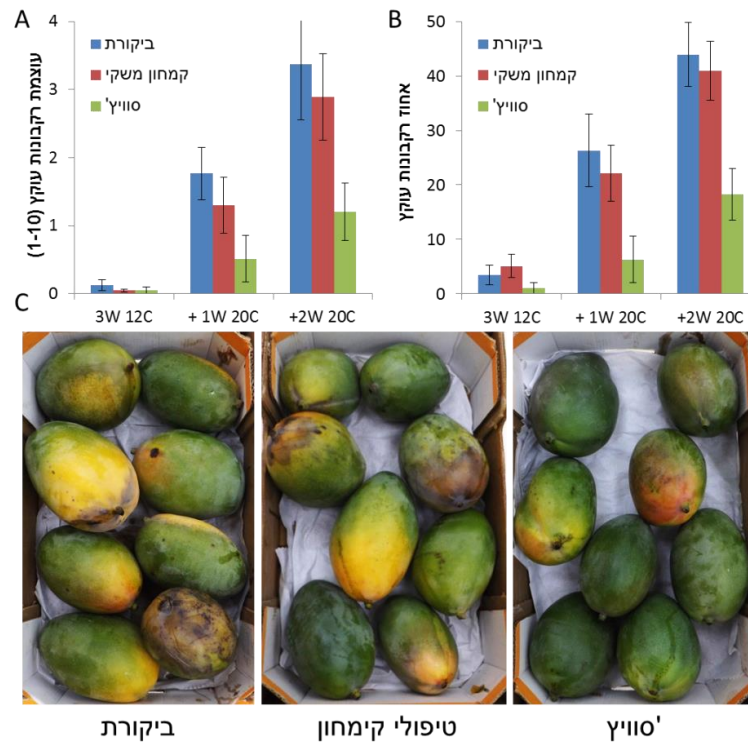
לאחר הקטיף באמצע אוגוסט הפרי אוחסן ב 12°C למשך שלושה שבועות ושבויעים נוספים בחיי מדף (20°C). התוצאות הראו כי ריסוסי פריחה ב'סוויץ' הובילו להפחתה משמעותית באחוז ובחומרת ריקבונות העוקץ לאחר אחסון ממושך (איור מספר 4). תוצאות דומות התקבלו לשני ריסוסי פריחה עם 'לונה אקפריאנס' ו'לונה טרנקיליטי' (תוצאות לא מוצגות).

4.4 בחינת טבילת פירות לאחר-קטיף בחומרי הדברה כימיים לצורך הדברת לסידופלודיה

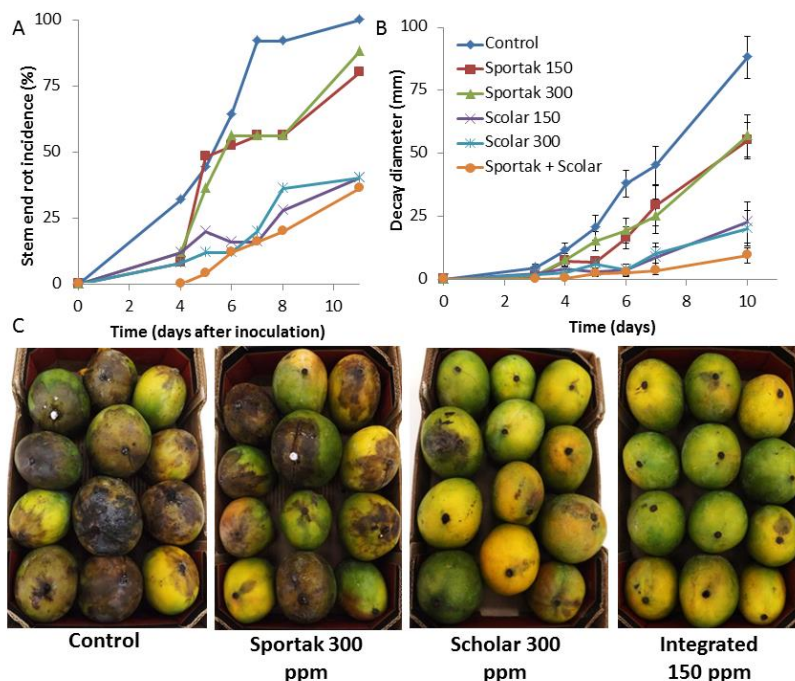
פירות מנגו ואבוקדו קטופים הודבקו ע"י נבגים של LT או LPT. לאחר 18 שעות הפירות נטבלו בחומרי הדברה שונים (סקולר עם החומר הפעיל 'פלודיאוקסוניל', או ספורטק עם החומר הפעיל 'פרוכלורז'). הפירות אוחסנו באווירה לחה בטמפרטורת החדר. בדיקת התוצאות הראו כי החומר 'סקולר' היה יעיל יותר מהחומר המסחרי 'ספורטק' כנגד הפטרייה לסידופלודיה הגורמת לריקבונות עוקץ בכך שהפחית את אחוז הפירות הרקובים ואת חומרת המחלה (איור מספר 5). תוצאות דומות התקבלו בעונת 2015 עם הזנים 'שלי' ו'קיט'. ובאבוקדו 'פינקרטון'.



איור מספר 3: השפעת שני ריסוסי פריחה בפונגיצידיים שונים על כמות הענפים המתים לעץ מנגו בוגר. **A.** כמות ענפונים מתים לעץ בטיפולים השונים. **B.** תמונות מייצגות של ענפונים מתים תוך תמותה לאחר (Die back).



איור מספר 4: השפעת שני ריסוסי פריחה ב'סוויץ' על עוצמת (A) ואחוז (B) רקבונות עוקץ בפירות מנגו 'קיט' לאחר קטיף. C. תמונות מייצגות של ארגזים מהטיפולים השונים לאחר אחסון בקור וחיי מדף.



איור מספר 5: בחינת היעילות של טבילות בחומרי הדברה בריכוזים שונים לאחר אילוח ב- *L. theobromae*. **A.** אחוז הריקבונות שהתפתחו לאורך זמן. **B.** קוטר ריקבון לאורך זמן. **C.** תמונות מייצגות מהטיפולים השונים.

5. דיין

אחת המחלות השכיחות לאחר הקטיף ביותר בגידולים סובטרופיים הינה ריקבון העוקץ. המחלה נגרמת ממגוון פטריות פתוגניות. פטריות הבוטריוספריה הינן גורם הריקבון העיקרי, כאשר פטריית הלסיודיפלודיה הינה הפתוגן המרכזי בניהן. בשנת 2014 ריקבונות העוקץ היו בעיה משמעותית ביותר במגוון לאחר קטיף. בחינה של 40 תבדידי *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* הראתה כי קיימת שונות גדולה ברמת האלימות של התבדידים הן בהדבקת פירות או ענפוני מגו ואבוקדו. מעניין לציין כי *L. theobromae* אלימה יותר ויוצרת באופן משמעותי יותר נבגים מתבדידי *L. pseudotheobromae*. ענפונים מתים מכילים כמויות גבוהות ביותר של נבגים אשר נמצאים בקרבה פיזית גדולה לפרחים אשר מכילים פתחים טבעיים שמאפשרים את חדירת פטריות הבוטריוספריה. לכן, נבדקו טיפולים של שני ריסוסי פונגיצידיים (סוויץ, לונה אקפריאנס או לונה טרנקיליטי) בפריחה. נמצא כי ריסוסי פונגיצידיים בפריחה הפחיתו את אחוז הפטריות הפתוגניות בעוקצי הפירות והפחיתו בחצי את כמות הענפונים המתים לעץ. בנוסף, נמצא כי בפירות שנקטפו מעצים שרוססו בפונגיצידיים בפריחה היו פחות ריקבונות עוקץ לאחר אחסון ארוך. הפתוגנים העיקריים הגורמים לריקבונות בפירות מגו לאחר קטיף הם *Lasiodilpodia* ו- *Alternaria*. בבדיקה ראשונית על גבי צלחות פטרי, נמצא כי פטריות אלו רגישות יותר לחומר פלודיאוקסונילי (סקולר) מאשר לחומר 'פרוכלורו' (ספורטק- הנמצא בשימוש מסחרי לאחר הקטיף). אכן, טיפול לאחר קטיף בחומר 'פלודיאוקסונילי' (סקולר) בפירות מגו מודבקים בלסיודיפלודיה הפחית באופן מובהק את אחוז וחומרת הריקבון בהשוואה לטיפול ב'פרוכלורו' (ספורטק). כיום, חקלאים שונים בארץ התחילו לשלב בריסוסים כנגד קימחון ריסוסים כנגד בוטריוספריה. בנוסף הוגשה בקשה לאישור השימוש בחומר 'סקולר' בפירות מגו לאחר הקטיף ובחומר 'סוויץ' במטעי מגו.

6. הבעת תודה

אנו מודים לרוני לוי מבית אריזה 'איתן' על העזרה הרבה והאפשרות לעבוד במטעי המגו שלו. בנוסף, אנו מודים גם לבית אריזה מור-פירות השרון על העזרה ואספקת הפירות.

פרק 4: מעבר אוכלוסיות של פטריות מהסוג הבוטריוספריה בין מאכסנים שונים

דו"ח לשנת המחקר השלישית

המוגש לוועדת ההיגוי של מיזם חוס"ן בוטריוספריה

ע"י

עומר פרנקל, דוד עזרא, חופית קול מימון, דני שטיינברג, סטנלי פרימן, נועם אלקן, תום שריר, אורנה ליארזי, רן שולחני, מנחם בורנשטיין, מיכל שרון ומיכל הרשקוביץ
מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ראשון לציון

1. תקציר

בשנים האחרונות עולה החשיבות של מחלות מקבוצת הבוטריוספריה ברחבי העולם וכך גם כמות הידע המפורסם. עם זאת רוב הידע הגנטי מתמקד בהרכב מיני הפתוגנים המצוי על המאכסנים השונים וקיים ידע מועט מאד על הבדלים בתוך אוכלוסיות הפתוגנים. צבירת ידע זה משמעותית ביותר כדי להבין האם מיני פתוגנים מרכזיים בתנאי הארץ (כלומר *L.pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia.pseudotheobromae* ו- *N. dimidiatum*) יכולים לעבור בין מאכסנים שונים וכדי ללמוד ולהבין מהם מקורות המדבק הראשוניים והשניוניים. **מטרות המחקר הינן: 1**) שימוש בסמנים מולקולריים לזיהוי קבוצות גנטיות שונות ברמות המינים ואוכלוסיות בתוך מיני הפתוגנים: *L. theobromae*; *N. dimidiatum*; ו- *L. pseudotheobromae* (2); ניסיון לזהות תכונות פנוטיפיות אשר מבדילות בין האוכלוסיות והתאמתן למאכסנים השונים.

במסגרת המחקר פותחו סמנים שונים ללימוד מבנה אוכלוסיות של הפטרייה *N. dimidiatum*, רוצפו גנים אינפורמטיביים ועבור הפתוגים *L. theobromae* ו- *L.pseudotheobromae*. נסרקו סט של סמני SSRs ו- SCAR. מתוצאות המחקר עולה כי במין *N. dimidiatum* קיימות בארץ שתי קבוצות גנטיות מרכזיות (קבוצות 2 ו- 4) ועלו עדויות לקיום של שתי קבוצות נוספות (קבוצה 1 ו- 3). קבוצה 2 בודדה רק מנשירים בעוד שקבוצה 4 נמצאה מעט בנשירים אך גם במאכסנים אחרים כגון מנגו וגפן. תבדידי קבוצה 4 היו אלימים יותר מתבדידי קבוצה 2 גם כשנבחנו על ענפוני נשירים וגם על ענפוני מנגו ואבוקדו. לא נמצאו הבדלים משמעותיים בהתאמת שתי הקבוצות לטמפרטורות עולות. עבור אוכלוסיות ה- *L. theobromae* נמצאו הבדלים גנטיים בין אוכלוסיות שבודדו מאבוקדו לבין אוכלוסיות שבודדו מנשירים ומגפן. בעוד שאוכלוסיות הפטרייה *L. pseudotheobroma* נמצאו רק על גבי גפנים ואבוקדו והתקיימו ללא מבנה אוכלוסייתי נפרד בין המאכסנים השונים. בשורת ניסויים שבוצעו על גבי ענפוני אבוקדו במטרה לזהות קשר בין אלימות וקבוצות הגנטיות לא נמצאו הבדלים סטטיסטיים מובהקים בין שני *L. theobromae* ל- *L.pseudotheobromae* ולא בין הקבוצות הגנטיות של הפתוגן *L. theobromae*. במבחן על גבי מאכסנים שונים (אפרסק ומנגו) היו התבדידים מהקבוצה הגנטית שלא מצויה באבוקדו אלימים יותר. מתוצאות המחקר אנו מסיקים כי זרימת הגנים בין אבוקדו לנשירים איננה חופשית ושקיימים גורמי סלקציה המגבילים את המעבר. יש להמשיך ולחקור את התופעה כדי לאושש את המסקנה ולהרחיב בהמשך את המחקר לגידול הגפן בו הייתה השונות הגדולה ביותר.

2. מבוא

בשנים האחרונות מתגברים הדיווחים על נזקי מחלות בהם מעורבות פטריות מקבוצת הבוטריוספריה. במהלך השנתיים הקודמות של המחקר דווח כי הפתוגנים המרכזיים שבודדו בעצי פרי בישראל שייכים לשני קבוצות שונות. הפטרייה *Neoschytalidium dimidiatum* נצפתה בייחוד בנשירים ופטריות מהמין *Lasiodiplodia spp.* נצפו במגוון רחב יותר של מינים כולל אבוקדו, נשירים, גפנים, מנגו ועוד מינים רבים. למרות שפטריות

אלו נצפו במקומות רבים בעולם, המידע הגנטי על האוכלוסיות שלהן מצומצם ביותר. מידע זה חשוב בהרבה מעבר לרמה התאורטית ונדרש כדי להבין באם קיים מעבר אוכלוסיות חופשי בין מיני המאכסנים השונים ואם אכן קיימים הבדלים גנטיים, חשוב להבין כיצד הם מתבטאים מבחינה אקולוגית ואפידמיולוגית במאכסנים השונים. המידע שפורסם ברובם המכריע של העבודות עד היום, מבלבל וסותר. כך למשל למעט עבודה אחת לא נבחנו כלל ההבדלים בתוך קבוצת ה- *lasiodiplodia* בין שני המינים הקריפטיים *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* (Boyogueno et al., 2012). מינים אלו הוגדרו על ידי Alves et al., (2010) ומחייבים התייחסות מחודשת וזהירה לכל ההבדלים הגנטיים שתוארו בתוך האוכלוסיות של מיני *Lasiodiplodia* עד פרסום זה. במהלך שנת המיזם השנייה, פיתחנו סט של סמנים גנטיים ששימשו להעמקת הידע שלנו על אוכלוסיות הפתוגנים המתקיימים במאכסנים השונים. זאת, כדי לאפשר לנו להבין באם קיים בידול בין האוכלוסיות שמקורן במאכסנים שונים ולחקור את ההבדלים האקולוגיים בין האוכלוסיות.

היפותזת העבודה הראשית היא כי קיימות מספר אוכלוסיות נפרדות גם בתוך כל אחד משלושת מיני הפתוגנים שניתנים לזיהוי בעזרת כלים מולקולריים. האוכלוסיות יכולות לעבור בין מאכסנים שונים אך מתקיימים ביניהן הבדלים במידת ההתאמה למאכסנים השונים ולתנאים סביבתיים ואקולוגיים המועדפים על ידי האוכלוסיות השונות. המטרות הספציפיות של המחקר הינן: (1) שימוש בסמנים מולקולריים לזיהוי קבוצות גנטיות שונות ברמות המינים ואוכלוסיות בתוך מיני הפתוגנים: *N. dimidiatum*; *L. theobromae* (LT) ו- *L. pseudotheobromae* (LPT) (2) זיהוי תכונות פנוטיפיות המבדילות בין האוכלוסיות והתאמתם למאכסנים השונים.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

3.1 זיהוי קבוצות הגנטיות בעזרת סמנים מולקולריים

3.1.1 ריצוף קבוצות גנים אינפורמטיביים לזיהוי פולימורפיזם בתוך האוכלוסייה

אנליזת ה- MLST (Multilocus sequencing typing) בוצעה עבור כל אחד ממיני הפטריות בעזרת פרימרים שסונתזו לאזורים השמורים של הגנים הבאים Chitin synthase, beta-tubulin, calmodulin, EF-1 α , Actin Internal transcribe spacer (ITS), Carbon & Kohn, (1999). רצפי הגנים נשלחו לריצוף בחברת Macrogen, מתוך ששת הגנים, נבחרו שלושת הגנים האינפורמטיביים ביותר, Actin, Calmodulin, Chitin synthase שרוצפו עבור כל תבדידי *N. dimidiatum* שקיימים באוסף שלנו (N=21). הרצפים עובדו בעזרת תוכנה פילוגנטית MEGA 6. העץ הפילוגנטי נבנה בעזרת שיטת Maximum likelihood method ו- 100 Bootstraps לחישוב אורכי הענפים

3.1.2 שימוש בסמני SSRs לזיהוי קבוצות גנטיות תוך מיניות במינים *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae*

מתוך סט הסמנים שפותח ונבדק בשנה השנייה למיזם נבחרו 4 סמני ה- SSRs וה- SCAR האינפורמטיביים עבור תבדידי *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* (טבלה מספר 1). המבנה הגנטי של התבדידים מכל מין בנפרד נותחו בעזרת תוכנת Genalex6.3. כאוכלוסיות הוגדרו תבדידים שמקורם במאכסנים הבאים: (1) אבוקדו; (2) מנגו; (3) גפן; (4) נשירים (אפרסק נקטרינה, שקד ותפוח). חושבו שכיחות האללים, המגוון הגנטי בתוך כל קבוצה, ומטריצת המרחק הגנטית. הבדלים בין הקבוצות נבחנו במבחן AMOVA (analysis of molecular variances).

טבלה מספר 1: הפרימרים ששימשו לאפיון אוכלוסיות (*L. theobromae* (LT) ו-*L. pseudotheobromae* (LPT))

שם ורצף הפרימר	תוצר LT	תוצר LPT	שוונות בין מינית	שוונות תוך מינית	מספר אללים LT	מספר אללים LPT
LAS3 F:GACTCATTACGGTCTCATGG R:GTGGAGCGGAAGTGTCTGCT	Y	Y	Y	1	3	1
9A2 F:AGAATGGCGATACTGCTG R:AGATTCTGGACCGCTGAGTT	Y	Y	Y	Y	2	3
LAS21 F:GGAAGATGATGGGATGGTTGC R:GTACAAGAACGAAGTCCGGGT	Y	Y	Y	Y	2	1
LAS27 F:CGAACAGGGTTTCGTGACGT R:CTCATATCTCGCCGGTTGCC	Y	Y	Y	Y	2	1

3.2 בחינת הבדלים פנוטיפיים בין תתי אוכלוסיות השונות גנוטיפית זו מזו

חלק זה של העבודה השתמשנו בשיטה לאילוח קטעי ענפים מנותקים. ענפים עשבוניים של אבוקדו, נשירים או מנגו נחתכו לקטעים באורך של 6-7 ס"מ. קטעי הענפים הונחו על צלחות פטרי שהכילו מצע אגאר בהיקף הצלחת (רק הקצוות של קטעי הענפים היו על המצע והמרכז שלהם היה באוויר). במרכז קטע הענף יצרנו באמצעות סקלפל פצע קטן והנחנו עליו דיסקית קטנה של פטריית המבחן. כעבור מספר ימים התפתחו על קטעי הענפים כתמים נקרוטיים שגודלם היה תלוי ברגישות הריקמה הצמחית ובאלימות תבדיד הפטרייה. השתמשנו בסולם בן שש דרגות להערכת גודל הכתם הנקרוטי (איור מספר 1). שיטה זאת שמשה אותנו לבצע בדיקת וירולנטיות של התבדידים מספר מערכות.



איור מספר 1: אינדקס נגיעות להערכת חומרת הנגיעות של תבדידי *L. theobromae* ו-*L. pseudotheobromae*, על ענפונים. כל צלחת פטרי החילה אגר עם שלושה מקטעי ענפונים ודיסקית של הפתוגן *N. dimidiatum* על ענפונים. הונחה במרכז הענפון אחרי ביצוע חתך.

3.2.1 הבדלים פנוטיפיים בין קבוצות גנטיות שונות ב - *N. dimidiatum*

הניסוי לקביעת טמפרטורת האופטימום של תבדידי *N. dimidiatum* בוצע בצלחות פטרי. עשרה תבדידים מקבוצה גנטית 2 ושלושה תבדידים מקבוצה גנטית 4, שני התבדידים מקבוצה גנטית 1 והתבדיד היחיד מקבוצה גנטית 3 גודלו כתרבית נקייה משך שבוע. מכל צלחת נלקחו דיסקיות תפטיר והונחו במרכז צלחת PDA (ארבע צלחות לכל תבדיד בכל טמפרטורה). הצלחות הונחו באינקובטורים בטמפרטורות של 15, 20, 25, 30 ו - 37 מ"צ. אחרי 72 שעות נמדד שטח המושבה.

בניסוי הראשון לקביעת האלימות של קבוצות גנטיות שונות ב - *N. dimidiatum* נבדקו מספר תבדידים השונים גנטית זה מזה על ענפוני אפרסק והתקדמות הכתם תועדה לאורך זמן. בסט הניסויים השני, נבחרו במכוון שלושה תבדידים מקבוצה גנטית 2 הכוללת תבדידים מנשירים בלבד (שניים מאפרסק ואחד נקטרינה), ושלושה תבדידים מקבוצה גנטית 4 הכוללת תבדידים ממאכסנים שונים כולל מנגו (שני תבדידים) ומשמש (תבדיד אחד). התוצאות נותחו במתכונת של ניסוי דו-גורמי מקונן עם המאכסן וקבוצה גנטית כגורמים ראשיים ושלוש תבדידים כגורם מקונן בתוך כל קבוצה גנטית. חומרת המחלה נבדקה 3, 4, 5 ו - 7 ימים אחרי תחילת הניסוי. התוצאות המוצגות בעבודה מציינות את הניתוח שבוצע עבור המדידות ביום 5 כיום מייצג.

3.2.2 הבדלים פנוטיפיים בין קבוצות גנטיות שונות של *L. theobromae* ו - *L. pseudotheobromae*

במסגרת המחקר התברר כי המגוון הגנטי של תבדידי האבוקדו נמוך יחסית וכי בנשירים ובמנגו מצויים מספר גנוטיפים ייחודיים שאינם מופיעים באבוקדו. כדי לנסות ולזהות באם התבדידים נבדלים גם באלימות, בוצעו שני סטים של ניסויים. בשורת הניסויים הראשונה בוצעו חמישה ניסויי חזרה ונבחרו תבדידים בעלי גנוטיפ האופייני לאבוקדו בהשוואה לגנוטיפים שאינם מופיעים באבוקדו (תבדידים ממנגו, אפרסק ושקד). בהמשך בוצע גם ניסיון לבדוק באם קיים סמן גודל כל שהוא המתקשר עם אלימות מוגברת. ניסוי דומה בוצע גם על תבדידי *L. pseudotheobromae* אם כי עבור פתוגן זה לא נמצאו הבדלים גנטיים המבדילים בין תבדידים ממאכסנים שונים. האילוח של תבדידי *L. theobromae* ו - *L. pseudotheobromae* בוצע תמיד באותו ניסוי ולכן גם הושוותה רמת האלימות גם בין שתי הפטריות. בשלב השני נבדק באם קיימת התאמה בין הגנוטיפים מאבוקדו ומשאר המינים כלפי מאכסנים שונים (תופעה הקרויה host specialization). כפי שתואר בסעיף 3.2.1 נבחנו ארבעה נציגים משתי הקבוצות הגנטיות על גבי ענפוני אפרסק, מנגו ואבוקדו. הניסוי נותח כניסוי דו-גורמי בו המאכסן והקבוצה הגנטית שימשו כגורמים הראשיים במודל. בנוסף נבחנו גם תבדידי *L. pseudotheobromae* במערכת אך הם נותחו באופן המשווה בין שני מיני הפטרייה בלבד.

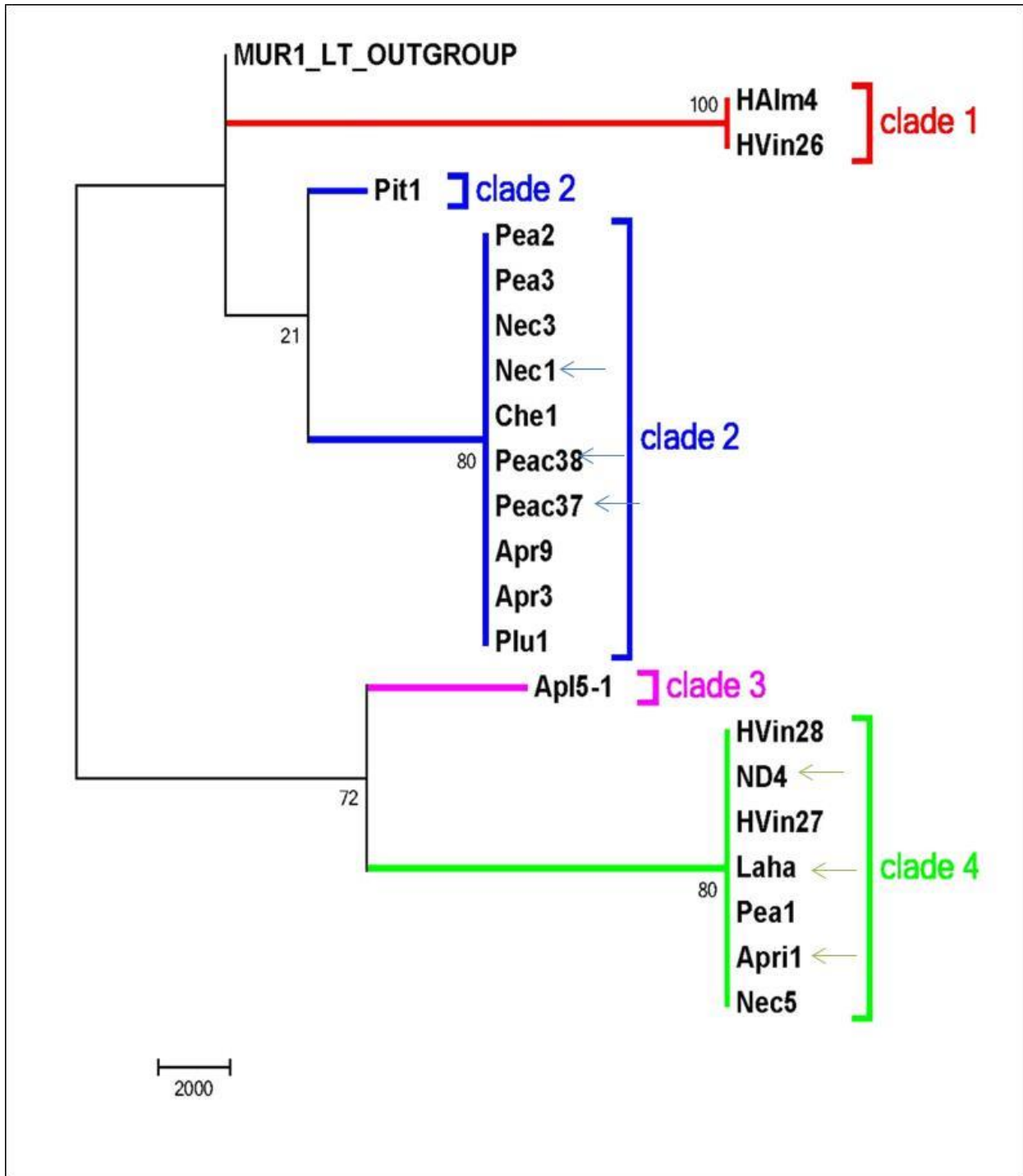
4. תוצאות

4.1 זיהוי הבדלים בין אוכלוסיות בעזרת סמנים מולקולריים

4.1.1 שימוש בריצוף קבוצות גנים אינפורמטיביים לזיהוי פולימורפיזם בתוך האוכלוסיה

שלושת הגנים Calmodulin Actin ו - CHS היו בעלי SNPs פולימורפים שחילקו את האוכלוסייה לקבוצות נפרדות ושימשו לבניית העץ הפילוגנטי. תבדידי *N. dimidiatum* מתחלקים ל - 4 קבוצות גנטיות. שתי קבוצות כללו מספר גדול יותר של תבדידים כלהלן: קבוצה 2 כללה רק תבדידים ממיני נשירים וקבוצה 4 שכללה תבדידים ממינים רבים כולל מנגו וגפן ומעט נשירים. שתי קבוצות גנטיות נוספות הכילו מספר נמוך של תבדידים, קבוצה 1 הכילה תבדידים מגפן ושקד וקבוצה שלוש הכילה תבדיד בודד מתפוח.

שימוש באותם ששת הגנים עבור 8 תבדידי הפתוגנים *L. theobromae* ו - *L. pseudotheobromae*, הראה הבדלים ברורים בין תבדידים משני מיני הפתוגנים הקריפטים (בין 2 ל - 10 SNPs). אם זאת לא נמצאו כלל הבדלים בין תבדידים מאותו מין. בעקבות תוצאות אלו לא בוצע יותר שימוש ב MLST עבור הפטריות הנ"ל והמאמץ עבר לניתוח סמני microsatellite ו - SCAR.



איור מספר 2: עץ פילוגנטי המבוסס על רצפי שלושה גנים, CHS, Calmodulin ו Actin, ערכי ה Bootstrap מצוינים בערכים של 0-100. חצים מסמנים את התבדידים שנבדקו

4.1.2 שימוש בסמני SSRs לזיהוי קבוצות גנטיות תוך מיניות ב *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobroma*

המגוון הגנטי (Genetic diversity) של תבדידי *L. theobromae* ותבדידי *L. pseudotheobromae* עבור כל אחד מקבוצות המאכסנים מופיעים בטבלה מספר 2. עבור תבדידי *L. theobromae* המגוון הגנטי היה נמוך יותר עבור מנגו ואבוקדו מאשר עבור נשירים וגפן. התפלגות האללים מראה שעבור סמן 9A האלל גודל 450 הינו נפוץ פחות מגודל 600 ובאבוקדו שכיחותו נמוכה יותר מבשאר המאכסנים. עבור אוכלוסיות *L. pseudotheobromae* הפתוגן נמצא רק באבוקדו ובגפן ולא בשאר המאכסנים, אך לא נמצאו הבדלים במגוון הגנטי בין תבדידי הגפן והאבוקדו.

טבלה 2: מדד השונות הגנטית של תבדידי *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* שנדגמו ממאכסנים שונים (אבוקדו, נשירים, גפן ומנגו).

<i>L. theobromae</i>			<i>L. pseudotheobromae</i>		
מאכסן	מספר תבדידים	Gene diversity	מאכסן	מספר תבדידים	Gene diversity
אבוקדו	42	0.273+0.047	אבוקדו	41	0.381+0.140
נשירים	27	0.388+0.088	נשירים	0	-----
גפן	16	0.518+0.057	גפן	9	0.420+0.141
מנגו	10	0.242+0.140	מנגו	0	-----

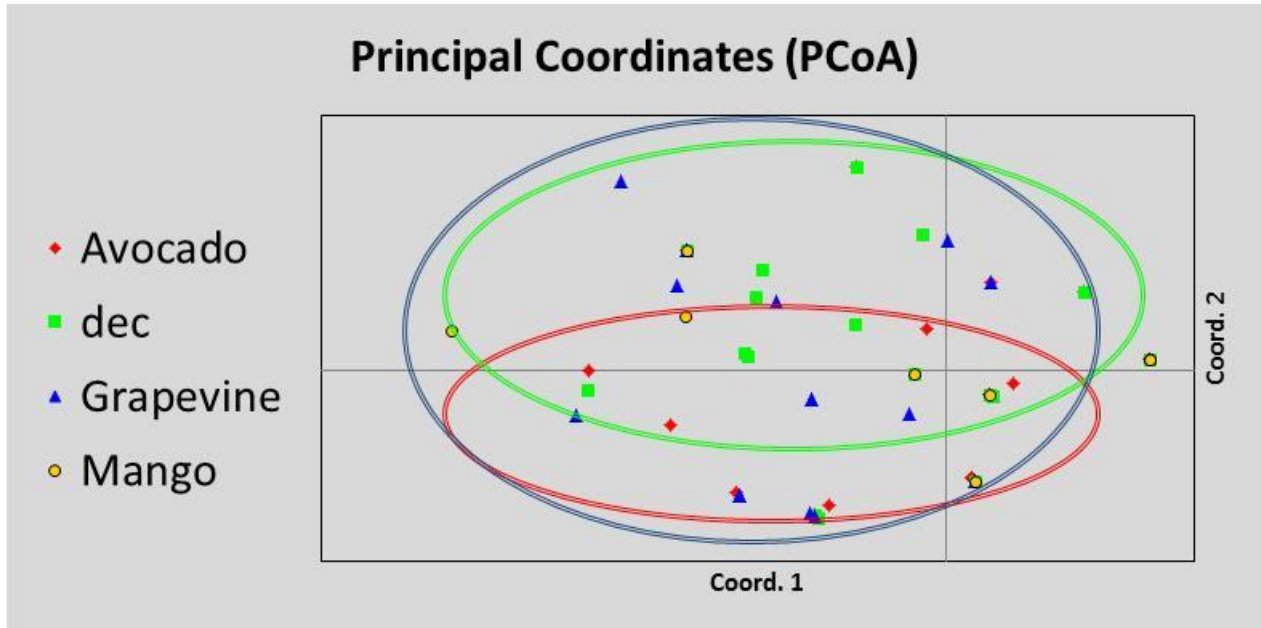
תוצאות מבחן ה AMOVA להבדלים בין אוכלוסיות הפטרייה *L. theobromae* מצורף בטבלה מספר 3. הבדלים סטטיסטים מובהקים זוהו בין אוכלוסיות הפתוגן מאבוקדו לבין אלו שנמצאו בנשירים ובגפנים וכמו כן בין אוכלוסיות הפתוגן בגפנים ואוכלוסיות הנשירים. ניתוח התבדידים בעזרת Principle coordinate analysis מראה כי מספר ההאפלוטיפים (המבנים הגנטיים) של תבדידי האבוקדו מצומצם ביחס לתבדידים משאר המינים. כלומר, על המינים האחרים קיימים האפלוטיפים שאינם נמצאים באבוקדו. מבחנים דומים בוצעו גם על תבדידי הפטרייה *L. pseudotheobromae* אך לא נמצאו הבדלים גנטיים בין תבדידי מהאבוקדו לתבדידים מהגפנים והם חלקו האפלוטיפים משותפים.

טבלה מספר 3: מכון AMOVA וערכי PhiPT להשוואה בין מבני תתי אוכלוסיות של *L. theobromae* ממאכסנים שונים. ערכי P הקטנים מ- 0.05 מסומנים בכוכבית ומעידים על הבדל מובהק בין תתי אוכלוסיות

הסתברות (P)	מספר תבדידים אוכלוסייה 2	מספר תבדידים אוכלוסייה 1	PhiPT	אוכלוסייה ממאכסן	אוכלוסייה ממאכסן
0.02*	27	43	0.04	נשירים	אבוקדו
0.002*	16	43	0.16	גפן	אבוקדו
0.004*	16	27	0.09	גפן	נשירים
0.119	10	43	0.03	מנגו	אבוקדו
0.410	10	27	0.00	מנגו	נשירים
0.158	10	16	0.04	מנגו	גפן

טבלה מספר 4: מבחן AMOVA וערכי PhiPT להשוואה בין מבני תתי אוכלוסיות של *L. pseudotheobromae* באבוקדו ובגפנים שהיו שני המאכסנים היחידים עליהם התגלה הפתוגן.

הסתברות (P)	מספר תבדידים אוכלוסייה 2	מספר תבדידים אוכלוסייה 1	PhiPT	אוכלוסייה ממאכסן	אוכלוסייה ממאכסן
0.382	9	41	0.00	גפן	אבוקדו

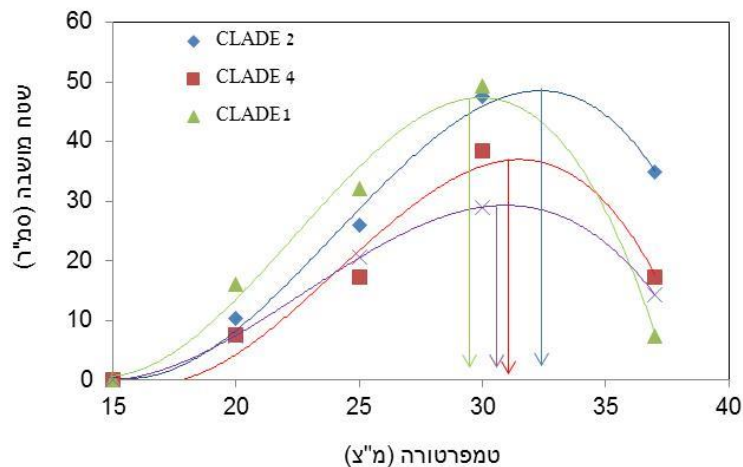


איור מספר 3: אנליזת Principle coordinate analysis (PCoA) של אוכלוסיות *L. theobromae* כהצגה גרפית המבוססת על המבנה הגנטי של כל תבדיד. תבדידי אבוקדו (Avocado), נשירים (dec) גפן (Grapevine) ומנגו (Mango) מסומנים באדום, ירוק, כחול וצהוב, בהתאמה. עיגולים מגדירים את טווח המגוון הגנטי של תבדידי האבוקדו (אדום), נשירים (ירוק) וגפן (כחול)

4.2. בחינת הבדלים פנוטיפים בין תתי אוכלוסיות השונות גנוטיפית

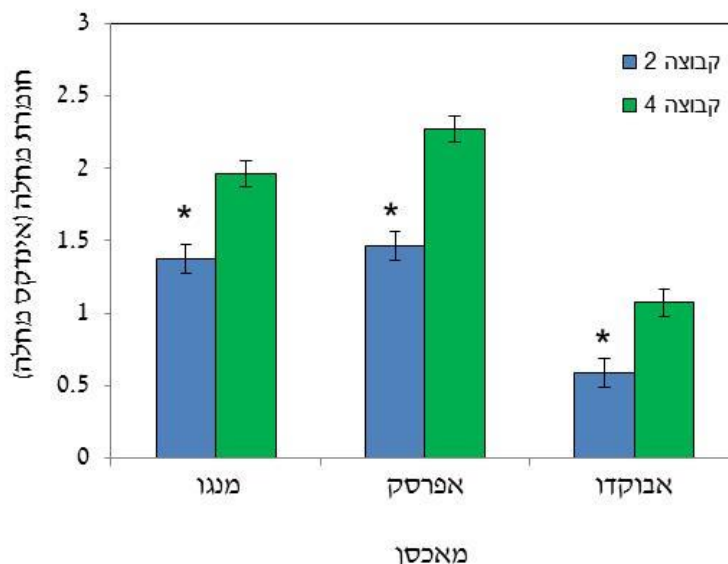
4.2.1 בחינת הבדלים בתכונות פנוטיפיות בין תבדידי *N. dimidiatum* מקבוצות גנטיות שונות

עקום הטמפרטורה של ממוצע תבדידי הקבוצות מוצג באיור מספר 4. האופטימום של התבדידים מקבוצה 2 ו 4 - היה בין 31 ל - 33 מ"צ וההבדלים בין הקבוצות היה זניח. האופטימום עבור שני התבדידים מקבוצה גנטית 1 היה נמוך מ - 30 מעלות.



איור מספר 4: עקום תגובה לטמפרטורה של תבדידי *N. dimidiatum* מקבוצות גנטיות שונות בניסוי *In vitro*. כל עקום כולל ממוצע של תבדידי הקבוצה הגנטית.

בדיקת האלימות של קבוצות התבדידים על גבי אבוקדו, מנגו ואפרסק, נותח כניסוי דו-גורמי מקונן והתוצאות המוצגות הן עבור חומרת המחלה ביום החמישי מתחילת הניסוי. המודל היה מובהק והסביר 69.6% מהשונות ($r^2=0.69$). כל הגורמים הראשיים בניסוי היו מובהקים כולל אפקט התבדידים ברמת מובהקות של $p<0.001$ אך האינטראקציה בין הגורמים לא הייתה מובהקת $p=0.254$. בכל שלושת המאכסנים הייתה אלימות התבדידים מקבוצה 4 גבוהה יותר מאשר תבדידי קבוצה 2 (איור מספר 5). מידת האלימות בהשוואה בין המנגו והאפרסק לא נבדלה סטטיסטית אך הייתה גבוהה יותר מאשר על ענפוני האבוקדו בהם הייתה הדבקה מוגבלת ביותר.



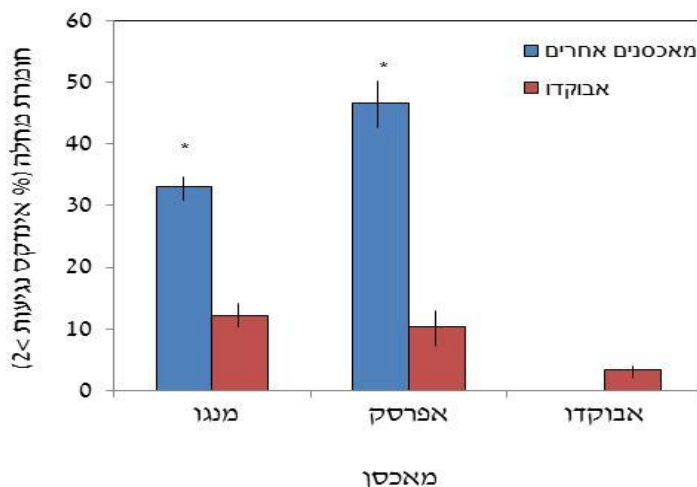
איור מספר 5: תגובת ענפונים של מאכסנים שונים (מנגו, אפרסק ואבוקדו) לתבדידי *N. dimidiatum* מקבוצה גנטית 2 (עמודות כחולות) וקבוצה גנטית 4 (עמודות ירוקות). כל עמודה הינה ממוצע של שלושה תבדידים שונים שנבדקו ב- 4 חזרות. קווים אנכיים מייצגים שגיאת תקן. כוכבית מסמנת הבדלים סטטיסטיים בין הקבוצות הגנטיות של הפתוגן עבור כל מאכסן בנפרד לפי מבחן HSD ברמת מובהקות של $p=0.05$.

4.2.2 בחינת הבדלים בתכונות פנוטיפיות בין ובתוך תבדידי *L. theobromae* ו *L. pseudotheobromae* מקבוצות גנטיות שונות

סט של 18 תבדידי תבדידי *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* נבדק בחמישה ניסויי חזרה עוקבים על גבי מקטעי אבוקדו. במהלך הניסויים הושוותה רמת האלימות (מחושבת כעקום התפתחות המחלה המבוססת על אחוז מקטעי הגבעול בהם חומרת המחלה במקטע הייתה מעל דרגה 2. בוצעו השוואות בין תבדידים שבודדו מאבוקדו אל מול שאר המאכסנים, בין אללים שונים (סמן גודל 450 אל מול סמן גודל 600 של פרימר 9A2) ועבור סמן גודל 386 אל מול סמן גודל 391 של פרימר Las27 אך הקשר בין האלימות לסמנים אלה לא היה מובהק. יש לציין כי היו הבדלים מובהקים בין התבדידים עצמם, שני התבדידים האלימים ביותר בודדו מאבוקדו (AVO45, AVO46) אך גם שני התבדידים החלשים ביותר בודדו מאבוקדו (AVO 97, AVO83). גם בהשוואה בין שני מיני הפתוגנים *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* לא נמצאו הבדלים מובהקים בין אלימות שני המינים (ערכי AUDPC של 136.5 ו- 152.38 בהתאמה).

ניסוי נוסף השווה בין אלימות התבדידים השונים על גבי שלושה מאכסנים שונים (אבוקדו, אפרסק ומנגו). בניסוי זה מוצגות התוצאות עבור היום השביעי אחרי האילוח ומייצגות את אחוז הענפונים בהם התפתחה סימני מחלה בדרגה 2 ומעלה. בניסוי זה היו הגורמים הראשיים המאכסן ומקור התבדידים מובהקים אך כך גם האינטראקציה בין הגורמים ולכן מוצגים באיור מספר 6 ההשוואות בין קבוצות התבדידים על כל מאכסן בנפרד. (איור מספר 6). מהתוצאות עולה כי תבדידים מגנוטיפים האופייניים לאבוקדו היו פחות אלימים על

אפרסק ומנגו מאשר תבדידים שנדגמו מנשירים ומנגו. לא נמצאו הבדלים על גבי ענפוני האבוקדו בין התבדידים מהקבוצות השונות אך חשוב לציין כי בניסוי הנ"ל הייתה חומרת ההדבקה על ענפוני האבוקדו נמוכה ולא מאפיינת.



איור מספר 6: תגובת ענפונים של מאכסנים שונים (מנגו, אפרסק ואבוקדו) לתבדידי *L. theobromae* מקבוצת תבדידים בעלי האפלוטיפ גנטי שלא קיימת בתבדידי האבוקדו (עמודות כחולות) אל מול קבוצת תבדידים בעלי האפלוטיפים גנטיים הנפוצים באבוקדו (עמודות אדומות). כל עמודה הינה ממוצע של שלושה תבדידים שונים. קווים אנכיים מייצגים שגיאת תקן. כוכבית מסמנת הבדלים סטטיסטיים בין הקבוצות הגנטיות של הפתוגן עבור כל מאכסן בנפרד לפי מבחן HSD ברמת מובהקות של $p=0.05$

5. דיון

בשנים האחרונות עולה החשיבות של מחלות הנגרמות על ידי פטריות מהסוג הבוטריוספריה ברחבי העולם וכך גם כמות המידע המפורסם. עם זאת, רוב הידע הגנטי מתמקד בהרכב מיני הפתוגנים המצוי על המאכסנים השונים וקיים ידע מועט על הבדלים בתוך אוכלוסיות הפתוגנים. צבירת ידע זה משמעותית ביותר כדי להבין באם מיני פתוגנים מרכזיים הקיימים בארץ, כלומר *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* ו- *N. dimidiatum* יכולים לעבור בין מאכסנים שונים וכדי ללמוד מהם מקורות המדבק הראשוניים והשניוניים.

ממצאי המחקר שבצענו עולה כי בארץ קיימות מספר אוכלוסיות של הפטרייה *N. dimidiatum* כששתי קבוצות מסתמנות כנפוצות ומשמעותיות יותר מהשאר. קבוצה 2 כוללת רק תבדידים מנשירים בעוד שקבוצה 4 מגוונת יותר והיא כוללת גם תבדידים ממנגו, גפן ונשירים. אמנם מספר התבדידים שהצלחנו לאסוף היה מוגבל אך ניתן להסיק בזהירות כי תבדידי קבוצה גנטית 2 לא עוברים בקלות למאכסנים אחרים. עם זאת העובדה שתבדידים מקבוצה 4 נמצאים גם בנשירים, והממצא שתבדידי קבוצה זו אלימים יותר מהתבדידים המשתייכים לקבוצה 2 על מגוון רחב של מאכסנים, מחזקת את האפשרות כי מעבר *N. dimidiatum* אל הנשירים ממינים אחרים אפשרי. נותרו עדין שאלות פתוחות, ביניהן מדוע קבוצה 4 לא השתלטה על האוכלוסייה גם בנשירים. ייתכן שקבוצה 4 חדשה יותר והגיעה רק לאחרונה או שקיימים מגבלות אקולוגיות שמעניקות יתרון לקבוצה 2 להמשיך ולשגשג על גבי הנשירים. ייתכן גם שקיימת תלות בעונות האיסוף של התבדידים. בנוסף חשוב להמשיך ולעקוב גם אחרי קבוצות גנטיות 1 ו- 3 שנמצאו בתפוח ובגפן. בניסוי שביצענו התבדיד היחיד מקבוצה 3 (שמקורו בתפוח) היה אלים מאד ויש לעקוב אחרי התופעה גם בעתיד.

למרבה הצער רוב רובו של הידע הקיים בעולם על הרכב אוכלוסיות הפטריות *Lasiodiplodia spp.* הצטבר לפני ששני המינים המרכזיים כלומר *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* הופרדו רשמית לשני מינים שונים. במסגרת המחקר מצאנו שרוב הסמנים שנחשבו פולימורפים הראו בעצם הבדלים בין *L. theobromae* ו- *L. pseudotheobromae* ולא בתוך האוכלוסיות של כל מין. במסגרת המחקר הצלחנו למצוא שלושה סמני

SSRs פולימורפים בתוך המין ה- *L. theobromae* וכמו כן פיתחנו סמן SCAR נוסף להגדלת הרזולוציה התוך מינית. מהמחקר עולה כי שני המינים מתנהגים בצורה שונה. הפטרייה *L. pseudotheobromae* בודדה רק מאבוקדו, גפנים (ובהמשך גם אגוזי אדמה) אך לא ממנגו ונשירים. בנוסף, נראה כי קיים מעבר גנים חופשי (Panmixia) בין התבדידים מגפן ומאבוקדו. הסיבה מדוע אוכלוסיות *L. pseudotheobromae* איננו מצוי על נשירים ומנגו איננה ברורה וגם לא ברורה הסיבה לקיום שני המינים במקביל על אבוקדו וגפן. ייתכן שהמין הגיע לארץ רק לאחרונה ועדין לא הצליח להתבסס בשאר המאכסנים. אפשרות אחרת היא שמנגוני הפצת הפתוגן מוגבלת יותר ונעשים למרחקים קצרים יותר מאשר המרחקים אליהם מופצים נבגי הפטרייה *L. theobromae* (דני שטיינברג, הודעה בע"פ). במבחיני אלימות על מקטעי ענפים לא נראה כי האלימות של תבדידי הפטרייה *L. pseudotheobromae* נמוכה מזו של תבדידי *L. theobromae*. בנוסף במבחיני קוד התברר שתבדידי הפטרייה *L. pseudotheobromae* מסוגלים להדביק גם נשירים ומנגו ולכן לא ניתן לשלול מעבר עתידי של פטרייה זו גם למאכסנים אלו.

מצאנו הבדלים בין אוכלוסיות הפטרייה *L. theobromae* שבודדו מאבוקדו לבין אלו שבודדו מגפן ומנשירים. זה נתון חשוב המעיד כי כנראה לא קיימת זרימה חופשית של הפתוגן בין מאכסנים אלו. במסגרת המחקר נראה כי האפלוטיפים גנטיים שלא נמצאו על גבי אבוקדו היו אלימים יותר כלפי אפרסק ומנגו מאשר האפלוטיפים האופייניים לאבוקדו. האלימות המוגברת יכולה להסביר אולי את היכולת של תבדידים אלה לתקוף נשירים ומנגו אבל אינה יכולה להסביר מדוע האפלוטיפים אלו לא נמצאו על גבי אבוקדו. בניסויים שבצענו בענפוני אבוקדו לא ניתן היה לזהות מתאם בין מקור התבדיד לסמנים גנטיים לבין אלימות מוגברת או מופחתת של התבדידים על גבי אבוקדו, כך שלא ניתן לתלות זאת ברמת האלימות או התאמה למאכסן (host specialization). נתון נוסף הדורש תשומת לב עתידית הוא העובדה שבגפן היו תבדידים בעלי מגוון גנטי גבוה והאפלוטיפ ייחודי. בעתיד יהיה צורך להבהיר את חשיבות הגפנים כמקור הפצה ומקור מבלע לגנוטיפים שונים. לסיכום אכן נראה כי אוכלוסיות שלושת מיני הבוטריוספריה אינם עוברים באופן חופשי בין מאכסנים שונים. עם זאת, נראה שברוב המקרים קיימת יכולת מעבר מוגבלת (שייתכן והיא מאופיינת בכשירות נמוכה יותר). נראה כי יש עדין צורך להשקיע מאמצים להבין את הסיבות האקולוגיות לאי הופעת גנוטיפים מסוימים על מינים כגון אבוקדו. ייתכן גם יש גם צורך לשלב כלים גנומיים ללימוד הטרינסקריפטום של הפטריות להבין את אותם הבדלים גנומיים ככלי ליצירת ממשק יעיל לניהול המחלות.

6. הבעת תודה

אנו מודים למגדלים והחקלאים אשר שיתפו פעולה ותרמו להצלחת המחקר.

7. ספרות מצוטטת

- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28:1-13.
- Boyogueno, A., Begoude, D., et al. (2012). High gene flow and outcrossing within populations of two cryptic fungal pathogens on a native and non-native host in Cameroon. *Fungal biology* 116: 343-353.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.

פרק 5: חקר מנגנון השראת עמידות באבוקדו באמצעות ריסוס החומר "קנון"

דו"ח לשנת המחקר הראשונה

המוגש לוועדת ההיגוי של מיזם חוס"ן בוטריוספריה

ע"י

ורד יריחימוביץ, אייל הלון, עדי פייגנבוים

המחלקה לחקר עצי הפרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ראשון לציון

דני שטיינברג, רן שולחני, סטנלי פרימן

המחלקה לפתולוגיה של צמחים, המנהל המחקר החקלאי, בית דגן

1. תקציר

הצגת הבעיה: במחקר שבוצע במסגרת מיזם חוס"ן בוטריוספריה דווח שטיפול בתכשיר "קנון", המכיל את החומר הפעיל חומצה זרחיתית, הפחית באופן מובהק תמותת שתילי אבוקדו נגועים בפטריות מהסוג *Botryosphaeria*. במבחני רעילות של התכשיר כנגד הפטרייה בצלחות פטרי, לא נמצא עיכוב גידול התפטיר. מהספרות, ידוע כי חומרים כגון פוסיפיט עשויים להשרות בצמחים מנגנון "פרימינג". מנגנון זה מוביל לתגובה ראשונית קלה, המלווה בשעתוק גנים ו/או בייצור מטבוליטים משניים בעלי תפקיד הגנתי, לאחר מכן, בעת התקפת הפתוגן, מתרחשת בצמח תגובה שניונית חזקה בעוצמתה המסוגלת לבלום את התפשטות המחלה. **מטרת המחקר:** בעקבות המידע המוצג לעיל הועלתה היפותזות העבודה הטוענת כי באבוקדו טיפול ב"קנון" עשוי באופן עקיף להקנות עמידות לפטריות מהסוג *Botryosphaeria* ו/או לפתוגנים נוספים ע"י הפעלת מנגנון "פרימינג". היעד המרכזי של המחקר הנוכחי היה לאפיין את מנגנון השראת העמידות המופעלת ע"י קנון באבוקדו, כאשר מטרת המחקר הספציפיות שהוגדרו היו: 1. לאפיין את מערך הגנים המשופעלים לאחר הטיפול. 2. לבחון את קינטיקת הביטוי של גנים ספציפיים לאחר טיפול. ו-3. לבחון האם יש צורך בטיפול נוסף להמשיך את השיפעול. **שיטות עבודה תוצאות ומסקנות:** לבחינת נושאים אלו ביצענו בשנה הקודמת ניסויים בשתילי אבוקדו 'האסי' שטופלו ע"י ריסוס בתכשיר "קנון". רני"א שהופק מעלים של שתילי ביקורת ומשתילים מטופלים שימש לאנליזות ביטוי. השנה הרחבנו את אנליזות הביטוי ושלחנו דגימות עלים לבדיקת רמות SA. האנליזות המורחבות הדגימו כי טיפול ב"קנון" השרה עלייה זמנית בביטויים של 5 מתוך 6 גני Pathogenesis related proteins (PRs) שיש להם תפקיד הגנתי בצמח. עלייה זו התרחשה ללא תלות בשינוי ברמת free SA ובביטוי פקטורי שעתוק מסוג *NPRI-like*, הקשורים בדרך כלל למנגנון ה Systemic Acquired Resistance (SAR). בסוף שנת המחקר שעברה החלנו בניתוח תוצאות אנליזת RNA-Seq שביצענו לבחינת השינוי בטרנסקריפטום לפני ואחרי טיפול ה"קנון". השנה, נותחו מחדש הנתונים ע"י De-novo assembly לבניית מאגר המכיל כ- 54,000 גנים. בחינה מחודשת של תוצאות ה RNA-Seq, הפעם כנגד המאגר החדש, הדגימה

שדפוסי הביטוי של 9,750 DEGs (Differently expressed genes) הראו שונות מובהקת לאחר הטיפול ב"קנון". בהמשך, בדיקות מיפוי KEGG annotations אששו תוצאות מניסוי קודם והורו כי טיפול ה"קנון" השרה עלייה זמנית בביטוי 7 מתוך 8 גני PRs, ללא תלות בביטוי גני NPR1-like. בדיקות המיפוי הדגימו בנוסף כי טיפול ה"קנון" השרה עלייה זמנית גם בדגמי ביטויים של גנים המקודדים לסינתזה, חישה ותגובה לאתילן, ולגני סינתזת פוליאמינים. עוד הודגם שינוי זמני בביטוי גנים המקודדים לקולטנים מסוג receptors pattern-recognition (PRR), לגנים המקודדים ל-Mitogen activated protein kinases (MPKs) ולפקטורי שעתוק מסוג WRKYs, כולם קשורים למסלולי MAPK signaling - המתרחשים בד"כ בעת התקפת פתוגנים. לבסוף נמצא כי טיפול ה"קנון" השרה גם כן שינוי משמעותי בדגם ביטויים של 155 גני Heat shock (HSP) proteins ושל קב' גנים הקשורים למסלולי דטוקסיפקציה בצמחים (Metabolism of Xenobiotics by Cytochrome P450). משמעות שינויים אלו נידונה בדו"ח.

מכלול התוצאות שקיבלנו תמך אם כן ברעיון שטיפול ב"קנון" באבוקדו משפיע מנגנון "פרימינג" ועשוי ע"י כך להקנות הגנה מסוימת בעת הדבקה בבוטריוספריה. כדי לבדוק נושא זה, ביצענו בשנת מחקר זו ניסיונות במערכת שתילי 'האס' שטופלו ב"קנון" ואולחו כעבור שלושה ימים בתפטיר בוטריוספריה. כצמחי ביקורת, השתמשנו בשתילים לא מטופלים שאולחו בפטרייה. מדידות שבוצעו חודשיים לאחר האילוח, הראו כי התפשטות התפטיר באזור האילוח הייתה כצפוי מוגבלת בצמחים שטופלו ב"קנון", בהשוואה לצמחי ביקורת. למרות זאת, ובאופן מפתיע, גם כתשעה חודשים לאחר האלוחים לא נראו סימנים וויזואליים של התפשטות המחלה בשתילי הביקורת ובשתילים המטופלים ולכן לא ניתן היה לאושש את ההנחה שהטיפול המקדים ב"קנון" אכן הגביל את התפשטות המחלה. יש לחזור על ניסויים אלו בצורה מורחבת בכדי לבדוק בצורה מעמיקה יותר את רמת ההגנה שמקנה טיפול ה"קנון" לאחר הדבקה בבוטריוספריה.

2. מבוא

שימוש בתכשיר המסחרי "קנון" באבוקדו. התכשיר המסחרי "קנון" (המכיל את החומר הפעיל חומצה זרחיתית H_3PO_3), מוכר זה שנים כתכשיר המשמש לצורך הדברת אורגניזמים ממערכת ה-Oomycota (פטטריות לא אמתיות כגון: *Phytophthora cinammomi*) בעצי אבוקדו נגועים (Perez-Jimenez, 2008). במקרה זה, פעילות התכשיר נובעת בעיקר מפעילות ישירה כנגד גופי ריבוי וכנגד תפטיר הפטרייה. בניסויים שבוצעו במסגרת מיזם חוס"ן בוטריוספריה נמצא שטיפול ע"י ריסוס בתכשיר "קנון" הפחית באופן מובהק תמותת שתילי אבוקדו נגועים בפטריות מהסוג *Botryosphaeria*. כמו כן, במבחני רעילות של התכשיר כנגד הפטרייה בצלחות פטרי, לא נמצא עיכוב גידול התפטיר עד ריכוזים של 1000 ח"מ. ממצא זה הצביע על האפשרות שתכשיר "קנון" עשוי להקנות עמידות לפטריות מהסוג *Botryosphaeria* לא ע"י פעילות ישירה כנגד הפטרייה כי אם ע"י שפעול מנגנוני הגנה טבעיים של הצמח.

מנגנוני ההגנה של הצמח. ככלל, מנגנוני ההגנה הטבעיים בצמחים נחלקים לשני סוגי תגובות. תגובת הגנה מקומית, במקום פגיעת הפתוגן, הגורמת להגבלת או מניעת חדירת הפתוגן ותגובה סיסטמית, באזורים המרוחקים ממקום הפגיעה, המביאה לשיפור יכולת הצמח להתמודד עם הפתוגן. **מנגנוני הגנה מקומיים -** מנגנון ההגנה המקומית המכונה תגובת רגישות יתר (Hypersensitive Response – HR), מתאפיין בהופעת כתמים נרקוטיים במקום חדירת הפתוגן. תגובה זו דורשת לעיתים היכרות של גן של הפתוגן (avr), המשמש כמשרן, עם גן לעמידות של הצמח (Resistance gene-R), המשמש ככל הנראה כקולטן. היכרות זו מאתחלת שרשרת של אירועים הגוררת מספר תופעת פיזיולוגיות ביניהן זירחון חלבונים וייצור חמצן פעיל (ROS-Reactive Oxygen Species) הדרושים להפעלת ה-HR (Torres et al., 2006; Heath, 2000). **מנגנוני הגנה סיסטמיים -** דרך נוספת בה מתמודד הצמח עם פתוגנים הינה הפעלת מנגנוני הגנה סיסטמיים המופעלים בעקבות תמותת תאים או בעקבות תגובת ה-HR. ניתן להבחין בשני מנגנוני הגנה סיסטמיים: מערכת הגנה המכונה עמידות סיסטמית נרכשת (Systemic Acquired Resistance - SAR), הפועלת בעיקר כנגד פתוגנים ביוטרופיים ומערכת הגנה המכונה עמידות סיסטמית מושרית (Induced Systemic Resistance - ISR), הפועלת ביעילות בעיקר נגד פתוגנים נקרוטרופיים (Walters et al., 2013). בעוד מערכת ה-SAR מעוררת ע"י

חומצה סליצילית (SA), מערכת ה-ISR, אינה תלויה ב-SA ומקובל להניח כי מנגנון הגנה זה מעורר ע"י חומצה גיסמונית (JA) ואתילן. שתי המערכות מתאפיינות בהקניית עמידות לטווח רחב של פתוגנים ע"י אינדוקציית גנים המקודדים לחלבונים האחראים לתגובות הגנה ועקה. בפרט, הפעלת מנגנון ה-SAR מלווה בעלייה בביטוי גנים המקודדים לחלבוני PR (Pathogenesis related proteins) (Qing Fu and Dong, 2013) ואילו מנגנון ה-ISR, הפועל דרך JA מאופיין בהגברת סינתזת חומרי טבע דוחי מאכל ביניהם אלקלואידים, פוליפנולים וטרפנואידים (Dixon, 2001).

חלבוני PR וחלבוני NPR. לחלבוני PRs מנגנוני פעילות שונים. ביניהם ניתן למנות את קבוצת חלבוני האנדוגולוקאנזות (PR2), המשמשים לפרוק גלוקן (פולימר של גלוקוז המצוי בין היתר בצמחים ופטירות), קבוצת חלבוני הכיטינאזות (PR3-4), הפועלים כנגד כיטין המצוי בדופן תאי הפטריות, קבוצת חלבוני Thaumatin-like proteins (TLPs or PR-5) המתאפיינים בקשת רחבה של פעילות אנטי-פטרייתית, וקבוצת חלבוני PR1 שתפקידן הביוכימי טרם זוהה (Sels et al., 2008).

המנגנון דרכו עלייה ב-SA מבקרת ביטוי גני PR1s נחקר באופן מעמיק בצמחי מודל. בפרט, בארבידופסיס ובטבק ביטוי גנים ממשפחת PR1 נמצא בקשר הדוק עם עלייה ברמת SA, ולכן עלייה בביטוי גנים אלו משמשת לעיתים תכופות כמקרה לתגובת SAR. יש לציין כי בצמחים ניתן למצוא חומצה סליצילית בשתי צורות עיקריות, כחומצה חופשית: free SA, וכצורונים מצומדים: SA conjugated forms. בעוד לחומצה סליצילית חופשית תפקיד מוכח בהגברת ביטוי גני PR1s, לתצמיד SA לכשעצמם אין תפקיד ידוע בהשראת גני SAR וחשיבותם נובעת מכך שהם מהווים מאגרי תשמורת המשמשים ליצירה מהירה של free SA, לאחר פירוקם. באופן כללי, עבודות שנערכו בצמחי מודל הדגימו כי עלייה בביטוי גנים המקודדים לחלבוני PR1s, המתרחשת לאחר הצטברות free SA, מבוקרת באופן חיובי ע"י בקרי שעתוק הנקראים NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPR1-like). חלבונים אילו נמצאים בעיקר בציטופלסמה וקשורים בקשרי S-S ליצירת מבנה אוליגומרי. ע"פ המודל המקובל כיום נטען כי עלייה ברמת free SA גוררת לפירוק מבנה האוליגומרי ולשחרור יחידות NPR1 וכניסתם לגרעין. לאחר כניסת מונומרי NPR1 לגרעין התא, נקשרים חלבונים אלו לבקרי שעתוק נוספים המבקרים באופן חיובי את ביטוי גני PR1, כמו גם את ביטוי גני NPR1-like עצמם. במצבים בהם רמת free SA גבוהה במיוחד, חלבוני NPR3 ו-NPR4 פועלים כבקרים שלילים, מאפשרים אוביקוויטניזציה של חלבון ה-NPR1 ודגרדציה שלו במערכת הפרטאוזום. פעילות זו מאפשרת כוונן עדין של תגובת ההגנה של הצמח בתגובה לרמות שונות של free SA, ולפיכך, למידת תפקוד חלבונים אלו ובחינת ביטויים בתנאים שונים, חיונית להבנת פעילות מנגנוני ההגנה בצמח (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013).

לבסוף, חשוב לציין כי למרות הידע הרב הקיים בנושא בקרת ביטוי גני PRs דרך free SA, מצבור רב של עדויות מהשנים האחרונות מורה כי עלייה ברמת ביטוי גני PRs עשויה להתרחש גם כן באופן בלתי תלוי ב-SA-independent activation of PRs). כך לדוגמה בעבודה שנערכה בטבק הודגמה עלייה בביטוי גני PR1 ו-PR5 לאחר טיפול משולב במתיל-גיסמונט ובאתילן (ראה מסוכם ב - Pieterse and van Loon, 1999). כמו כן דווח כי עלייה בייצור פוליאמינים כדוגמת ספרימידן לאחר הדבקת צמחי טבק ב-TMV, לוותה באינדוקציה של ביטוי מספר גני PRs באופן שאינו תלוי ב-SA (Tiburcio et al., 2014).

"פרימינג": תופעה אידאלית להתגוננות כנגד פתוגניים הינה תופעה המכונה "פרימינג". תופעה זו מוגדרת כמצב בו יכולתו של צמח להתגונן מוגברת באופן המאפשר לו תגובת הגנה מהירה ויעילה (Conrath, 2011; Conrath et al., 2006). במצב זה, סיגלל חיצוני (משרן) המכין את הצמח למתקפה אפשרית, מוביל לתגובה ראשונית קלה, שעשויה להיות מלווה בשעתוק של גנים ספציפיים ו/או בייצור מטבוליטים משניים בעלי תפקיד הגנתי. לאחר מכן, בעת התקפת הפתוגן, מתרחשת תגובה שניונית משמעותית המסוגלת לבלום את התפשטות המחלה (בדומה לתגובה חיסונית ביונקים). מהספרות, ידועים מספר חומרים כימים הפועלים כמשרנים המעוררים תגובת "פרימינג". לדוגמה, נמצא כי משרן כימי הקרוי BABA (β -aminobutyric acid), גורם ל"פרימינג" הן במסלול תלוי SA ובמסלול שאינו תלוי ב-SA (Van der Ent et al., 2009). גם אשלגן זרחיתי (Potassium Phosphite KPhi) הינו חומר כימי הפועל כמשרן. בהתאם, בעבודות שנערכו בתפוז

הוכח כי טיפול מקדים ב-KPhi השרה תגובת "פרימינג" שאפשרה התמודדות יעילה בתגובה להדבקה עם *Phytophthora infestans* (פטריה ממערכת ה-Oomycota הגורמת למחלת כימשון בתפ"א). בהמשך דווח כי טיפול ב-KPhi הגביר בן היתר את ביטויים של שני גנים *StNPR1* ו-*StWRKY* המקודדים לבקרי שעתוק המופעלים בין היתר ע"י SA, והגביר יצירת קלוז, פוליסכריד המקנה תמיכה לדופן תאים צמחיים (Machinandiarena et al., 2012). בנוסף, בעבודה עדכנית שפורסמה לא מכבר דווח כי טיפול בפוספיט בתפ"א הוביל לשינוי מהותי ברמת הטרנסקריפטום החל משלוש שעות לאחר הטיפול (Burra et al., 2014).

גנים מאבוקדו הקשורים למנגנון ה-SAR בעבודות קודמות שבוצעו בשנים האחרונות באבוקדו וזהו ואופייני מספר גנים הקשורים להשראת מנגנון ה-SAR (Engelbrecht and van den Berg, Backer et al., 2015) בעבודות אלו אופיין דגם ביטויים בעיקר לאחר הדבקה ב-*Phytophthora cinammomi* הגורמת לריקבונות שורש, ובתנאים של הצפה (flooding). כך דווח לדוגמה כי לאחר הדבקה בפיטופטורה נצפתה עלייה ברמת הביטוי של *PaRR5* בשורשי שתילי אבוקדו (Reeksting et al., 2014). כמו כן דווח על עלייה ברמת ביטויים שלהגנים *PaNPR2*, *PaNPR3* המקודדים לבקרי שעתוק של תגובת SA, ושל תעתיק *PaPRI*, בשורשי שתילי אבוקדו שהודבקו בפטרייה ו/או שטופלו ב-SA (Backer et al., 2015).

יעדי המחקר: בהתבסס על התוצאות שהתקבלו לאחר טיפול בתכשיר "קנון" בשתילי אבוקדו נגועים ב-*Botryosphaeria*, ובתוצאות מבחני הרעילות של התכשיר כנגד הפטרייה בצלחות פטרי, הועלתה היפותזות העבודה הטוענת כי גם באבוקדו תכשיר ה"קנון" עשוי באופן עקיף להקנות עמידות לפטריות מהמין *Botryosphaeria* ו/או לפתוגנים נוספים ע"י הפעלת מנגנון "פרימינג". היעד המרכזי של המחקר הנוכחי שהוגדר היה לאפיין את מנגנון השראת העמידות המופעלת ע"י קנון באבוקדו, כאשר מטרת המחקר הספציפיות שהוגדרו היו: 1. לאפיין את מערך הגנים המשופעלים לאחר הטיפול. 2. לבחון את קינטיקת הביטוי של גנים ספציפיים לאחר טיפול. ו-3. לבחון האם יש צורך בטיפול נוסף להמשיך את השיפועול.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

3.1-3.2 הרחבת אנליזות RT-PCR וכימות רמות SA

בשנת המחקר הקודמת עסקנו בנושאים 1 ו-2. מערכות הניסוי שלנו כללו שתילי 'האס' מורכבים על כנות זריעה (דגניה 117), שגודלו בעציצים במתקן בית רשת בבית דגן וטופלו בתכשיר קנון-50 (0.3% בריסוס) ושתילי ביקורת (לא מטופלים). לאחר ביצוע הטיפולים נדגמו מ-2 קבוצות השתילים (טיפול וביקורת) מספר עלים במספר נקודות זמן. בכל נקודת זמן נדגם חומר צמחי מ-3-4 צמחים (4 חזרות ביולוגיות: כאשר חזרה ביולוגית = pool של חומר צמחי שנאסף מ-4 או 3 צמחים מטופלים ולא מטופלים). בשלב ראשון החלטנו לבדוק את רמת ביטויים של מספר גנים המקודדים לחלבונים המשתתפים במנגנוני ההגנה השונים הפועלים בצמח. התוצאות שהתקבלו במהלך השנה הקודמת עשויות היו לרמוז כי טיפול "קנון" גורם לעלייה בסינתזת SA, הגוררת לעלייה בדגם ביטויים של גנים ממערכת ה-SAR; לחילופין, ניתן היה לשער ששינויים שנצפו בדגם ביטוי גני *PRs* נגרמים ללא תלות בעלייה ברמה האנדוגנית של SA. במסגרת העבודה שבוצעה בשנה זו הרחבנו את האנליזות הביטוי בשיטת RT-PCR בעלי צמחים מטופלים לעומת ביקורת.

3.3 המשך אפיון כלל מערך הגנים (טרנסקריפטום) המשתנה בעקבות טיפול ה"קנון".

בשנת המחקר הקודמת בוצע אנליזת RNA-seq לדוגמאות מצמחים בזמן אפס (לפני טיפול ב"קנון") ובזמנים 48, 72 ו-168 ש' לאחר הטיפול ב"קנון". אנליזה זו מתבססת על ריצוף עמוק של RNA בטכנולוגיות מתקדמות (פלטפורמת ILLUMINA-SOLEXSA). טכנולוגיה זו מאפשרת כיסוי מעקובתי רחב של RNA המופק מדוגמאות שונות, ומאפשרת בו זמנית הן זיהוי גנים בעלי תבנית ביטוי המבדילה בין דוגמאות, והן זיהוי גנים הנבדלים ברצף בין דוגמאות. אנליזות RNA-Seq הראו כי טיפול קנון השרה שינוי מהותי ברמת הטרנסקריפטום. במקביל, מכיוון שמאנליזות RT-PCR למדנו שהשינויים החלים בעקבות טיפול ה"קנון"

הינם מהירים (ראה סעיף 4.1), לצורך השלמת התמונה, שלחנו השנה דוגמאות רנ"א נוספות שנדגמו 24 ש' לאחר טיפול, לצורך בניית ספריות וריצופן. ריצוף הספריות בוצע ע"י ספק חיצוני (יחידת שירות ביואינפורמטי בוויצמן), באמצעות מכשיר Illumina Hiseq 2000 בקריאות של 100 בסיסים לכל קריאה. לאחר קבלת התוצאות עובדו הנתונים מחדש, הפעם תוך יצירת De-novo assembly של המקטעים שהתקבלו.

3.4 ניסויי טיפול ב"קנון" ואילוח ב – *Botryosphaeria*

במסגרת העבודה שבוצעה בשנה זו בוצעו ניסויים נוספים בהם טיפולי ה"קנון" לוו בהדבקת צמחים ב – *Botryosphaeria* (נעשה שימוש בתפטר LPT). הניסויים שהועמדו כללו 36 צמחים בני שנתיים (6 צמחים לטיפול: 3 חזרות ביולוגיות, כל חזרה ביולוגית = חומר צמחי שנדגם משני שתילים). בכל צמח/שתיל, בוצעו טיפולים שונים המתוארת בטבלה מספר 1. הניסויים בוצעו באופן בלתי תלוי בשני מועדים במהלך השנה, ולוו בדגימות עלים משתילים מטופלים ושתילי ביקורות באזור מעל האילוח/או הפציעה. במקביל, בוצעו מדידות להערכת מדדי איכלוס בחלקי הצמח המאולחים ב – *Botryosphaeria*.

טבלה מספר 1. ניסויי טיפול בקנון ואילוח ב-*Botryosphaeria*

טיפול	תיאור (הערות)
1	ביקורת ללא פציעה
2	ביקורת עם פציעה ללא אילוח (בכל צמח בוצעו מספר חתכים אורכיים במספר ענפונים)
3	ריסוס בקנון ללא אילוח
4	אילוח ללא טיפול "קנון" (בכל צמח בוצעו מספר חתכים אורכיים במספר ענפונים. האילוחים בוצעו ע"י החדרת דיסקיות תפטר למקום הפציעה)
5	אילוח לאחר טיפול ב"קנון" הצמחים טופלו ב"קנון" ושלושה ימים לאחר הטיפול בוצעו אילוחים כמתואר מעלה.

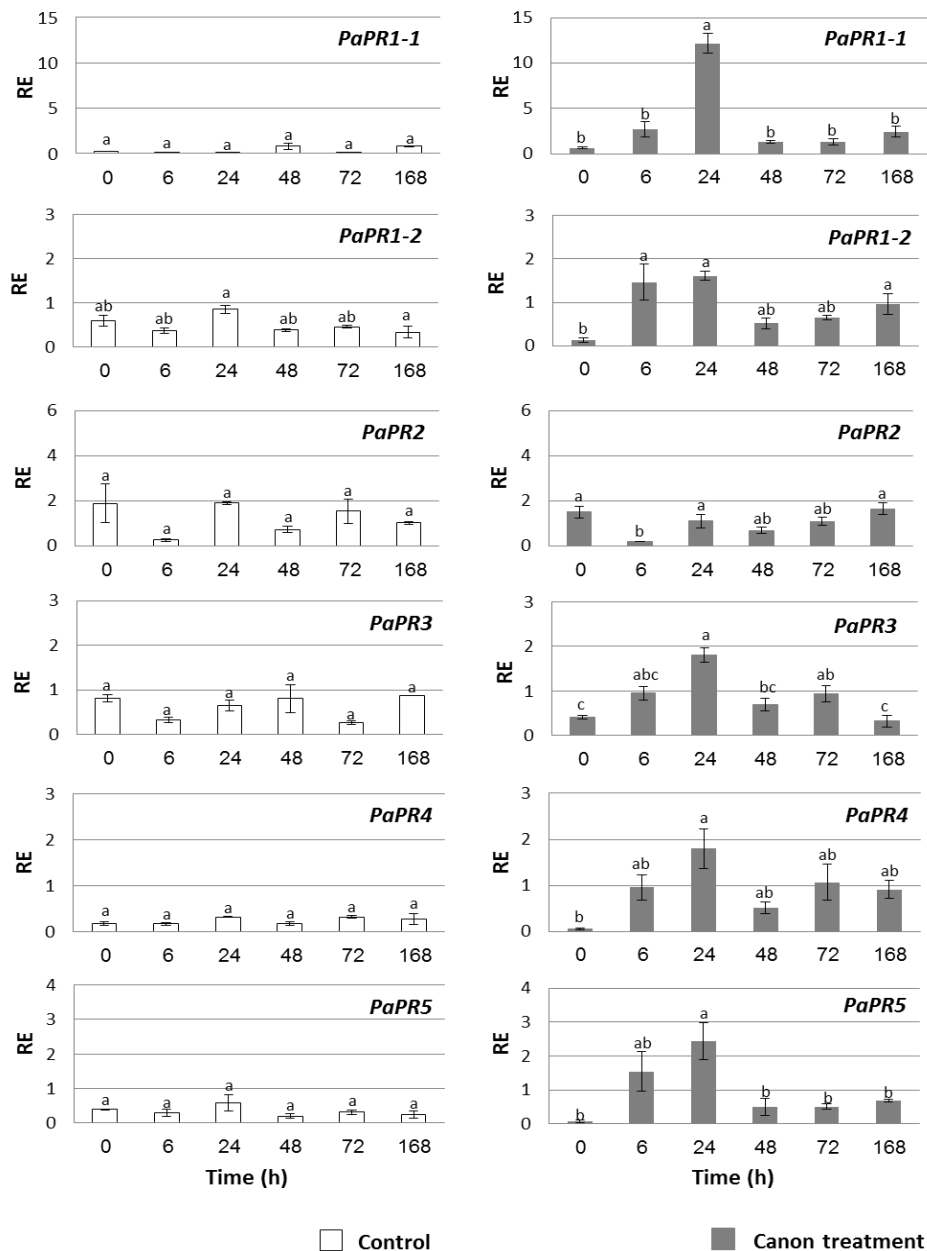
4. תוצאות ודין

4.1 הרחבת אנליזות RT-PCR

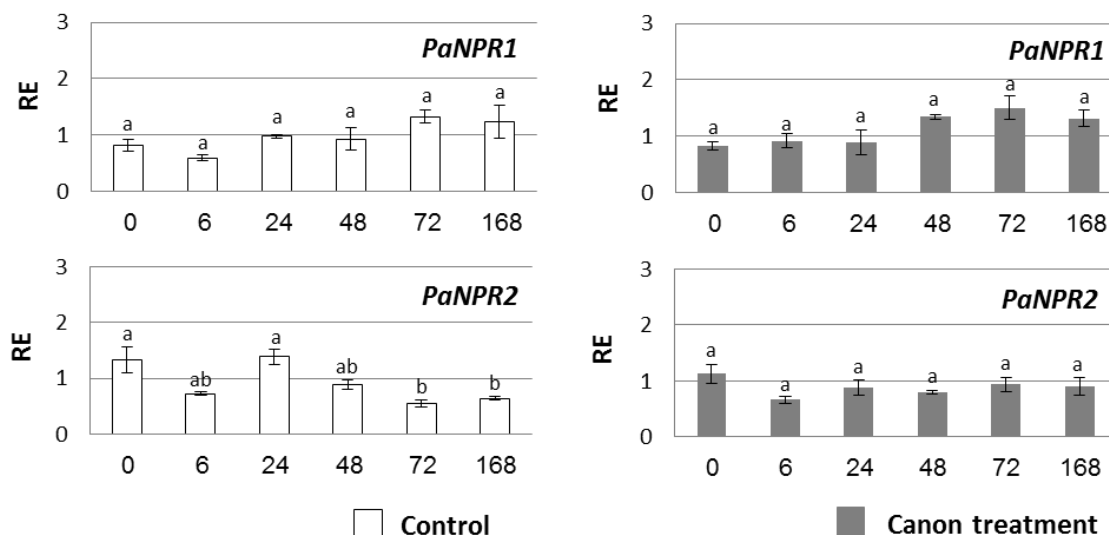
בדו"ח שהוגש בשנה שעברה הדגמנו באמצעות אנליזות RT-PCR שזמן קצר לאחר הטיפול ב"קנון", חלה עלייה זמנית בביטוי *PaPR5* ו-*PaPRI* בעלים שנדגמו מצמחים מטופלים בהשוואה לצמחי ביקורת. הבדיקות שביצענו כללו אנליזה של דגימות שנדגמו בזמן אפס (לפני טיפול), 6, 24 ו-48 ש' לאחר טיפול. במהלך שנה זו השלמנו את הבדיקות הללו ובדקנו שוב את דגם ביטויים גנים אלו ושל 4 גני PRs נוספים, באותן דגימות ששימשו לאנליזה בשנה שעברה, ובדגימות מנקודת הזמן מאוחרות יותר (72 ו-168 ש' לאחר טיפול). התוצאות המסוכמות הדגימו כי טיפול ה"קנון" השרה עלייה זמנית בביטויים של 5 מתוך 6 הגנים שנבדקו. העלייה הזמנית ברמת ביטויים של חמשת גני ה-*PaPRs* נצפתה החל מ 6 ש' לאחר הטיפול, הגיעה לשיא כ 24 ש' לאחר טיפול, ואחר-כך ירדה לרמת ביטוי התחלתית (איור מספר 1).

בצמחי מודל עלייה ברמת ביטוי גני *PRI* משמשת לרוב כסמן לתגובת SAR, והיא קשורה בעליית ביטוי הבקר החיובי *NPR1* (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013). בהתבסס על התוצאות שהתקבלו, ועל הידע הקיים בספרות, ניתן היה לשער כי העלייה בביטוי גני *PRs* הנצפית באבוקדו בהשפעת טיפול ה"קנון", עשויה להיות קשורה בהפעלת חלבוני *NPR1*. עד כה זוהו באבוקדו 5 גני NPR1-like. בפרט, שניים מתוכם, המכונים *PaNPR1* ו-*PaNPR2*, הינם בעלי הומולוגיה גבוהה ל-*AtNPR1* ועל כן נטען כי הם עשויים לפעול באופן דומה ל-*NPR1* מארבידופסיס, קרי, לבקר באופן חיובי ביטוי גני *PRs* כתלות בעלייה ב SA (Backer et al., 2015). בכדי לבדוק תרחיש זה ביצענו בשנה שעברה אנליזות ראשוניות לבחינת דגם ביטוי גני *PaNPR1*

1-*PaNPR2* בצמחים מטופלים וצמחי ביקורת. אנליזות אלו הורחבו בשנה זו. כפי שניתן לראות באיור מספר 2, אנליזות הביטוי הראו כי לאורך כל פרק הזמן הנבדק לא נצפה שינוי מהותי ברמת הצטברות התעתיקים הללו בצמחים מטופלים בהשוואה לצמחי ביקורת. יתרה מזאת, ניתן לראות כי בפרט, בפרק הזמן בין 24-6 ש' לאחר טיפול, פרק הזמן שבו ניתן היה לצפות לעלייה בביטוי בקרים חיובים אלו, רמת הצטברות התעתיקים נותרה כמעט קבועה.



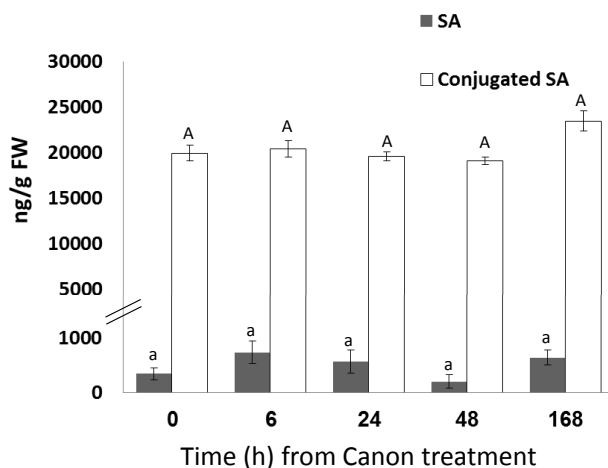
איור מספר 1. אנליזת RT-PCR לבחינת ביטוי גני *PaPRs* בצמחי ביקורת ובצמחים מטופלים ב"קנון". רמת ביטוי הגנים נורמלה יחסית לביטוי *PaGAPDH* ומוצגת בערכים של ביטוי יחסי (RE). כל עמודה מייצגת ממוצע של שלוש חזרות ביולוגיות \pm שגיאת תקן. בציר ה-X מצוינים מועדי הדיגום בשעות. זמן אפס (0) מציין את נק' הזמן לפני הריסוס. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות הביטוי בין נק' הזמן השונות בצמחי ביקורת ובצמחים מטופלים.



איור מספר 2. אנליזת RT-PCR לבחינת ביטוי גני *PaNPR1* ו- *PaNPR2* בצמחי ביקורת ובצמחים מטופלים ב"קנון". רמת ביטוי הגנים נורמלה יחסית לביטוי *PaGAPDH* ומוצגת בערכים של ביטוי יחסי (RE). כל עמודה מייצגת ממוצע של שלוש חזרות ביולוגיות \pm שגיאת תקן. בציר ה- X מצוינים מועדי הדיגום בשעות. זמן אפס (0) מציין את נק' הזמן לפני הריסוס. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות הביטוי בין נק' הזמן השונות בצמחי ביקורת ובצמחים מטופלים.

4.2 כימות רמות SA

לאחר שהוברר כי טיפול ה"קנון" משרה עלייה זמנית בביטוי מספר גני *PaPRs* ללא תלות בעלייה בבקרי השעתוק החיובים מסוג *PaNPR1* ו-*PaNPR2*, החלטנו לשלוח את אותן דגימות העלים ששימשו לאנליזות מולק', לבדיקת רמות free SA ו-conjugated SA forms. תוצאות כימות רמות SA הדגימו כי לאורך כל פרק הזמן הנבדק, רמת ה-SA conjugated forms הייתה גבוהה בכמה וכמה סדרי גודל מרמת ה free SA (SA). בנוסף, הודגם כי בפרק הזמן הנבדק לאחר טיפול ב"קנון" לא נצפה שינוי מובהק ברמת הצטברות SA. רמת ה-conjugated SA נותרה אף היא כמעט קבועה, למעט נקודת הזמן 168 ש', בה חלה עלייה ברמת הצטברות צורונים אלו (איור מספר 3). תוצאות אלו מבססות את ההשערה כי טיפול ה"קנון" משרה עלייה זמנית בביטוי גני *PRs* באופן שאינו תלוי ב SA.



איור מספר 3. אנליזת כימות רמות SA ולפני ואחרי הטיפול ב"קנון". כל עמודה מייצגת ממוצע של שלוש חזרות ביולוגיות. בציר ה- X מצוינים מועדי הדיגום בשעות. זמן אפס (0) מציין את נק' הזמן לפני הריסוס. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות הביטוי בין נק' הזמן השונות.

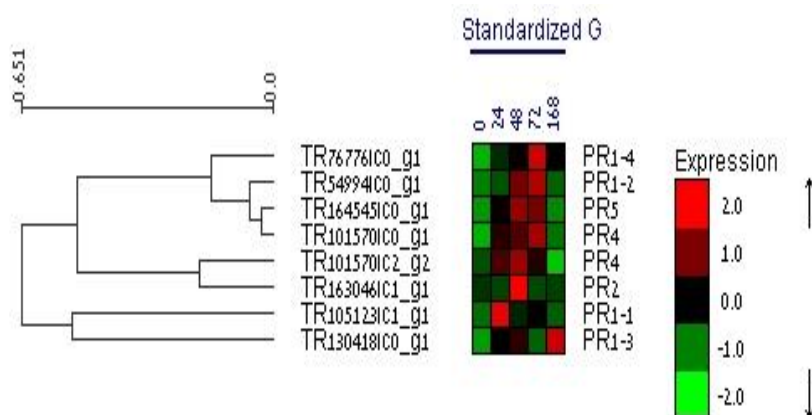
4.3 המשך אפיון כלל מערך הגנים (טרנסקריפטום) המשתנה בעקבות טיפול ב"קנון"

בשנה שעברה שלחנו לאנליזות RNA-seq דוגמאות שנדגמו לפני טיפול ב"קנון" (T_0) ולאחר 48, 72 ו-168 ש' טיפול ב"קנון". תוצאות הריצוף שהתקבלו עובדו מול טרנסקריפטום שהיה מצוי ברשותנו ושימש כפרנס (טרנסקריפטום זה רוצף מתערובת RNA מרקמות עלים של הזן 'האס'). מכיוון שתוצאות אנליזות הביטוי שנערכו עם חומר צמחי שנגדם מניסוי הראשון הראו שהשינויים שחלים לאחר טיפול ב"קנון" הינם מהירים (ראה סעיף 4.1), החלטנו להשלים את בדיקות ה RNA-seq תוך שימוש בדוגמאות RNA שהופקו מעלים שנדגמו 24 ש' לאחר הטיפול. כמו כן, מכיוון שבעיבוד נתונים מול מאגר שרוצף ללא טיפול ב"קנון" יש סיכוי לאיבוד אינפורמציה משמעותית, הוחלט לעבד מחדש את כלל נתוני אנליזות ה- RNA-seq, הפעם תוך יצירת De-novo assembly של המקטעים שהתקבלו.

נתוני קריאות הרצפים שהתקבלו מהספריית השונות בזמנים השונים ונתוני ה-De novo assembly מסוכמים בטבלאות 1 ו-2 ומוצגות בנספחים א' וב'. נתונים אלו אפשרו בניית מאגר חדש המכיל כ-54,000 גנים. בחינה מחודשת של תוצאות ה RNA-Seq, הפעם כנגד המאגר החדש, הדגימו שדפוסי הביטוי של 9,750 DEGs (Differently expressed genes) הראו שונות מובהקת לאחר הטיפול ב"קנון" (ראה נספח ג'). ע"פ דגם ביטוי הגנים שהתקבל ניתן היה לסווג את כלל ה DEGs שהתקבלו ל 5 תת-קבוצות (clusters) (ראה נספח ג'-איור 1-2). הקבוצה הראשונה של גנים אלו כללה גנים שביטויים עלה באופן זמני, הגיע לשיא לאחר 24 ש' וחזר לרמתו ההתחלתית בסוף פרק הזמן הנבחן. הקבוצה השנייה של גנים אלו כללה גנים שביטויים עלה באופן רציף ומתון לאחר הטיפול ב"קנון" ורמתם נותרה גבוהה יחסית בסיום פרק הזמן המבחן. הקבוצה השלישית מנתה גנים אשר רמתם עלתה באופן זמני במהלך פרק הזמן הנבדק, הגיעה לשיא בין 24-48 ש' ואחר כך ירדה וחזרה לרמת הביטוי ההתחלתית ולבסוף, קב' הגנים 4 ו-5 מנו מספר גנים יחסית מועט שרמת ביטויים התאפיינה בירידה זמנית בפרק הזמן הנבדק. בכדי לבדוק באופן מפורט את תוצאות ביטוי הגנים לאחר הטיפול ב"קנון", בוצעו מבחני העשרה של GO annotations, ובדיקות מיפוי של KEGG annotations. בדו"ח זה מוצגים חלק מתוצאות מבחנים ומיפויים אלו.

4.3.1 שינוי בדגם ביטויים של גני PRs

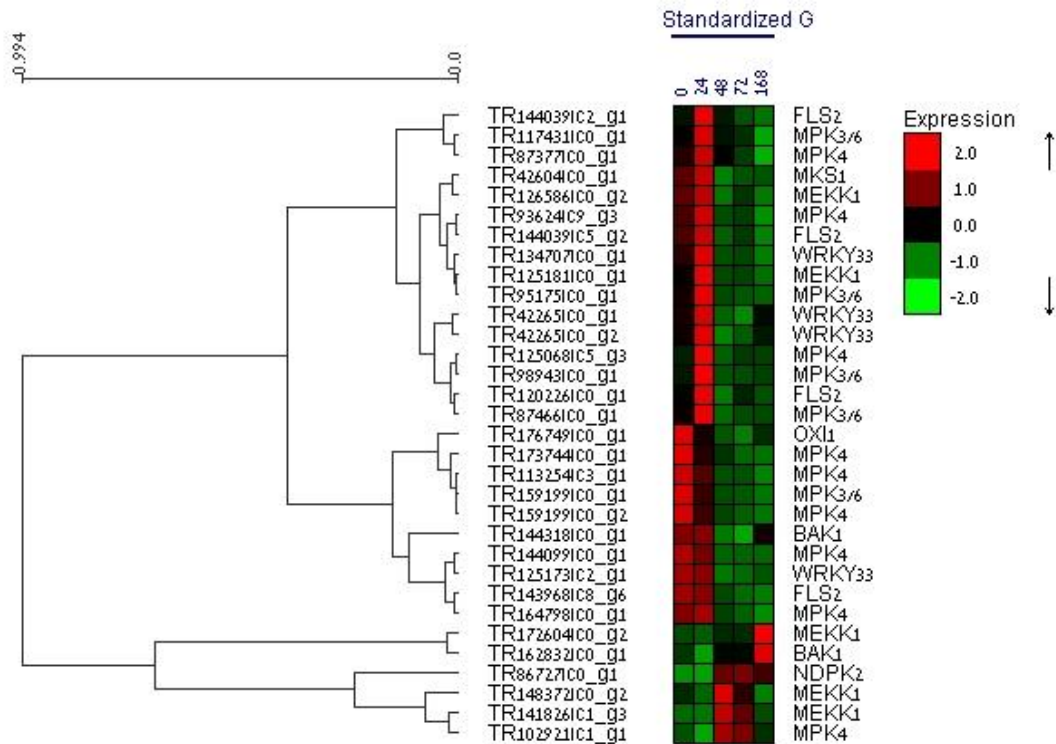
מבחני העשרה הדגימו כי בקבוצת ה DEGs נכללו 8 גני PRs שונים. עיבוד תוצאות ביטוי גנים אלו בעזרת סכמת heat map הדגימה כי רמת ביטויים של 7 גני PRs עלתה באופן זמני בפרק הזמן שבין 24-72 ש' לאחר הטיפול (איור מספר 4). מנגד, בחינת ביטוי כלל הגנים הורה שלמרות שבמאגר הטרנסקריפום החדש נכללו 5 גני *PaNPR-like*, אף לא אחד מהם הראה דגם ביטוי דיפרנציאלי לאחר הטיפול ב"קנון" (לא מוצג). תוצאות אלו תומכות בתוצאות שהתקבלו באנליזת RT-PCR בניסוי הקודם (ראה סעיף 4.1), ומאששות את הרעיון כי באבוקדו "קנון" משרה עלייה ברמת ביטוי גני PRs ללא תלות בSA.



איור מספר 4. סכמת heatmap המראה את דגמי הביטוי של גני PRs לפני ואחרי הטיפול ב"קנון".
FDR<0.01 2 fold

4.3.2 שינוי בדגם הביטוי של גני הקשורים ל MAPK signaling

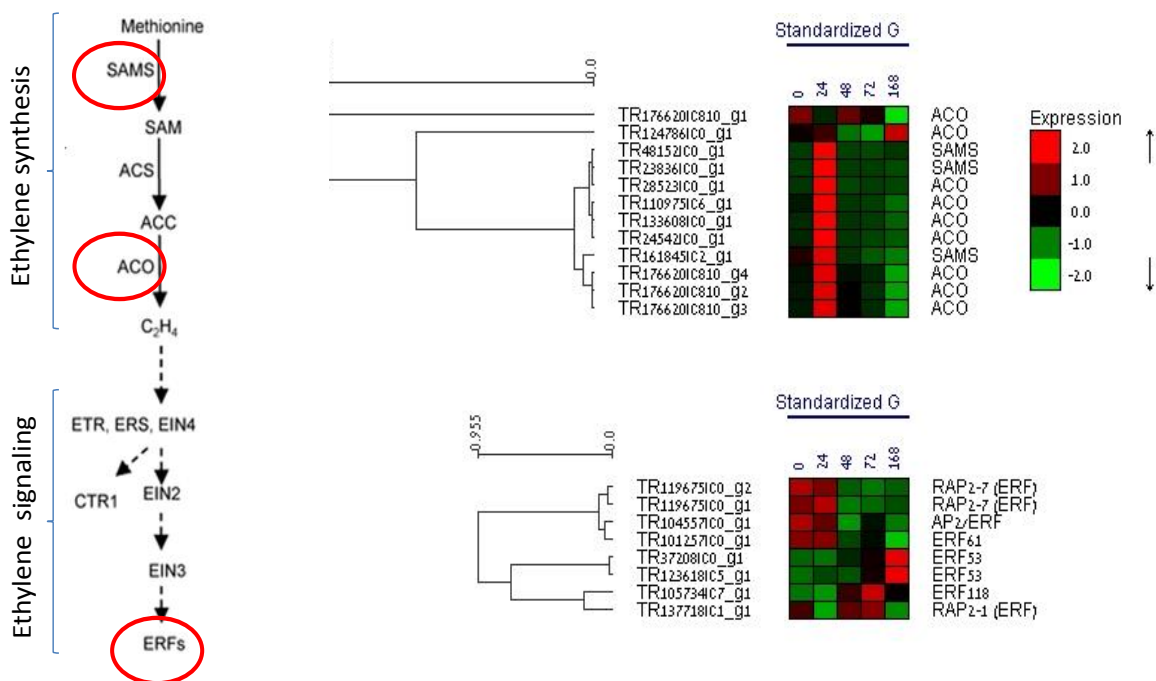
כאשר צמחים עוברים תהליכי "פרימינג" המידע אודות התרחשות תהליך זה נשמר עד לחשיפת הצמח לגירוי כלשהו (כגון התקפת פתוגן). ניתן להתייחס לתופעה זו כ"זכרון" בעת תגובת הגנה. מחקרים שנערכו בצמחי מודל מורים כי קיימים מספר סמנים מולק' אשר עליהם ביטויים מעידה על התרחשות תהליכי "פרימינג". תהליכי "פרימינג" מתאפיינים לדוגמא בעלייה זמנית ברמת ביטויים של קולטנים מסוג pattern-receptors recognition (PRR), בהצטברות תעתיקי Mitogen activated protein kinases (MPKs) ובעלייה ברמת ביטוי פקטורי שעתוק שונים (Martinez-Medina et al., 2016). קולטני PRR מהווים קב' של חלבונים בעלי פעילות קינאז הממוקמים בממברנות התאים. לקולטנים אלו תפקיד בחינת מרכיבים מסוימים המצויים בפתוגנים שונים. לדוגמא, בעוד קולטנים מסוג FLAGELING-SENSING 2 (FLS2), אחראים לזיהוי חלבוני פלגלין המצויים במעטפת חיידקים, קולטנים מסוג Elongation factor Tu (EFR), אחראים לזיהוי חלבון ה EF-Tu שהינו אחד החלבונים הנפוצים ביותר בחיידקים. בנוסף, קולטנים מסוג EIX1/2 ו-CEBiP אחראים לזיהוי קיסלאנאז וכיטין המצויים בדופן תאי הפטריות (Zipfel., 2008). זיהוי המרכיבים האלו על ידי הקולטנים השונים, גורם לאקטיבציה של חלבוני MPKs, להפעלת סדרת מפלים זרחוניים ולעלייה בביטוי גנים המקודדים לפקטורי שעתוק כדוגמת WRKYs וMYC2 (ראה נספח ד'). באופן לא מפתיע, וכפי שהודגם בצמחי מודל, מיפוי ה-KEGG הצביע על קיום שינוי מהותי ברמת ביטויים של גנים הקשורים להפעלת תהליכי MAPK signaling, בעקבות טיפול ה"קנון" (נספח ד'). איור 5, מורה כי חלק מהגנים הללו הראו דגם עלייה זמנית בפרק זמן שנע בין 24-72 ש' לאחר טיפול. תוצאות אלו עשויות להעיד כי "קנון" מפעיל מנגנון "פרימינג" המלווה באקטיבציה זמנית של גנים הקשורים ל MAPK signaling אשר מופעלים באופן טבעי בעת התקפת פתוגן. מצד שני, הודגמה גם מגמה הפוכה שהראתה כי חלק מתעתיקי MPKs ירדו ברמת ביטויים לאחר הריסוס ב"קנון". בשלב זה תופעה זו אינה מובנת לנו.



איור מספר 5. סכמת heatmap המראה את דגמי הביטוי של גנים הקשורים למסלולי MAPK signaling המופעלים בעת הדבקת ו/או התקפת פתוגן, לפני ואחרי הטיפול ב"קנון". FDR<0.01 2 fold.

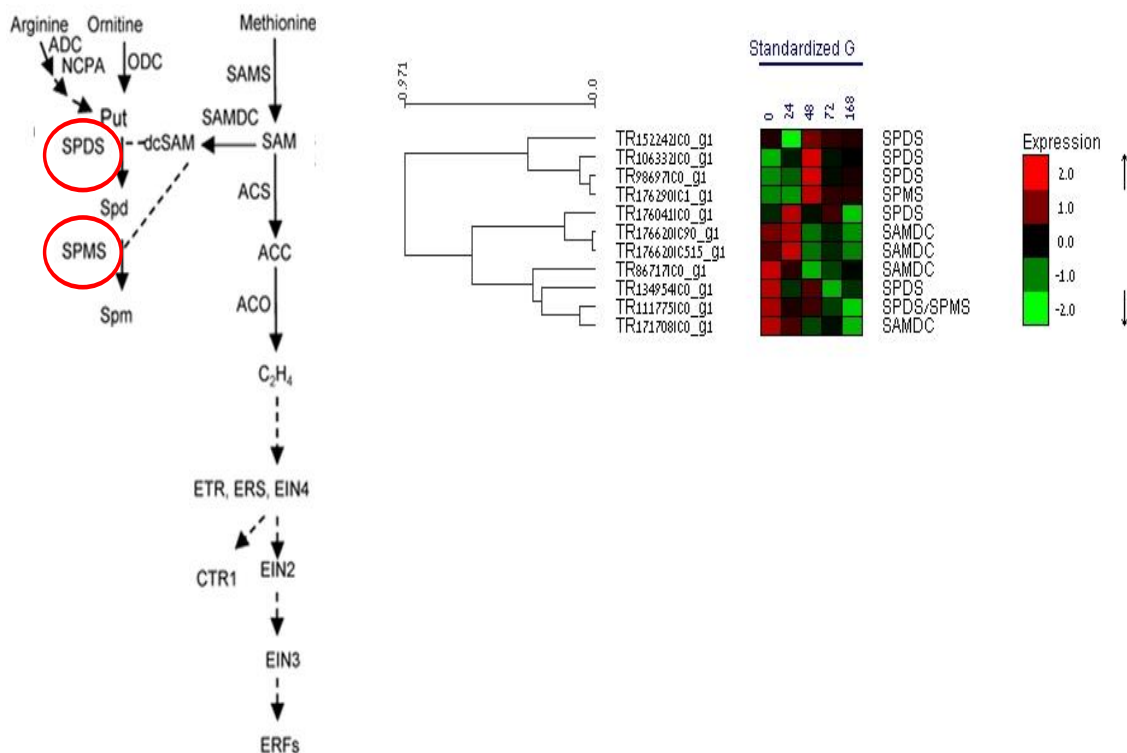
4.3.3 שינוי בדגם ביטויים של גנים הקשורים לסינתזה, חישה ותגובה להורמונים צמחים

מיפוי ה-KEGG אפשר לזהות שינויים מהותיים גם ברמת ביטויים של גנים הקשורים להורמונים צמחיים שונים ביניהם גני מסלולי סינתזה, חישה ותגובה לאתילן, כמון גני סינתזת פוליאמינים. כך לדוגמה, הודגמה עלייה זמנית ברמת ביטויים של מספר איזופורמים המקודדים לחלבוני ACC oxidase (ACO), ועלייה מאוחרת יותר ברמת ביטויים של מספר גנים המגיבים לאתילן (איור מספר 6). עלייה חדה ברמת ביטוי גני ACO, המשחקים תפקיד מרכזי בבקרת סינתזת אתילן, ועלייה מאוחרת בניס המגיבים לאתילן כגון אנדוגני Ethylene responsive factors (ERFs), עשויה להעיד כי טיפול ה"קנון" גורר עלייה זמנית בייצור אתילן.



איור מספר 6. סכמת heatmap המראה את דגמי הביטוי של גנים הקשורים לסינתזת חישה ותגובה לאתילן לפני ואחרי הטיפול ב"קנון". FDR < 0.01 2 fold. משמאל, סכמה המתארת את מסלולים הקשורים לסינתזת חישה ותגובה לאתילן. מסומנים באדום גנים שדגם הביטוי שלהם השתנה בעקבות הטיפול. מסומנים באדום גנים במסלול שביטויים השתנה בעקבות טיפול ב"קנון".

מהספרות, ידוע כי S-adenosyl methionine מהווה חומר מוצא לא רק ליצירת אתילן אלא גם ליצירת פוליאמינים. באופן מעניין, מיפוי ה-KEGG הדגים כי בנוסף לשינוי בביטויים של גנים המעורבים בסינתזת אתילן, ריסוס ב"קנון" לווה גם בעלייה זמנית ברמת ביטויים של 7 גנים הפעילים בסינתזת פוליאמינים, בעוד ביטויים של איזופורמים אחרים של אותם גנים ירד לאחר הטיפול (איור מספר 7). פוליאמינים משחקים תפקידים שונים בבקרת מגוון תהליכים בתא. יצוין כי ברוב העבודות שבהם נלמד תפקידם של פוליאמינים במצבי עקות ביוטיות, התמקדה תשומת הלב בעיקר באיפון תפקידם ההגנתי של תצמיד פוליאמינים ותרכובות פנוליות, למרות זאת, עבודות עדכניות מורות כי דווקא פירוק ספרימידן עשוי לגרור עלייה ברמת ROS ובכך לגרור לתגובת HR (Moschou et al., 2008). כמו כן דווח כי עלייה בייצור ספרימידן לאחר הדבקת צמחי טבק ב-TMV, לוותה באינדוקציה של ביטוי מספר גני PRs באופן שאינו תלוי ב-SA (Yamakawa et al., 1998). מעניין יהיה לבחון בעתיד האם הריסוס ב"קנון" באבוקדו משרה עלייה ברמת אתילן אנדוגני/או הצטברות פוליאמינים והאם קיים קשר בין שינויים אלו ועלייה ברמת ביטוי גני PRs.

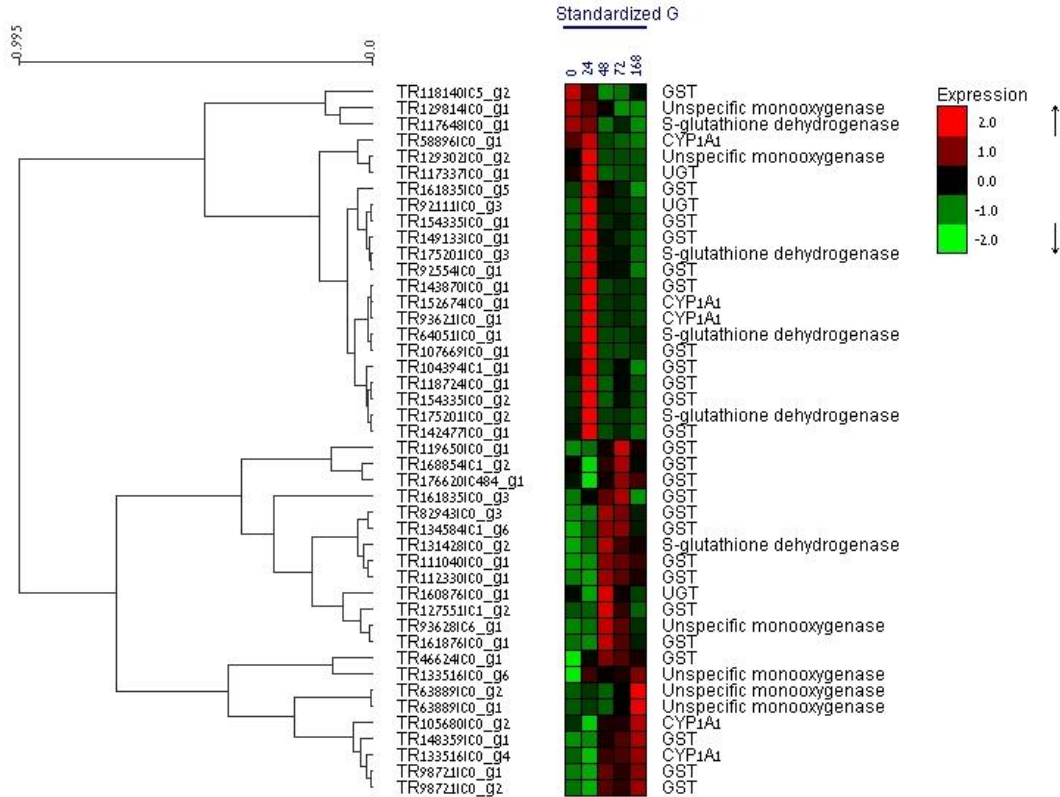


איור מספר 7. סכמת heatmap המראה את דגמי הביטוי של גנים הקשורים לסינתזת פולימינים לפני ואחרי הטיפול ב"קנון". FDR<0.01 2 fold. משמאל, סכמה המתארת את אחד המסלולים הקשורים לסינתזת פולימינים. מסומנים באדום גנים במסלול שביטויים השתנה בעקבות טיפול ב"קנון".

4.3.4 שינוי בדגם ביטויים של גנים הקשורים למסלולי דטוקסיקציה בצמחים

אחד הממצאים הנוספים מאנליזת מיפוי ה-KEGG העיד על שינוי ניכר שחל בעקבות הריסוס ב"קנון" במערך ביטויים של גנים המשויכים למסלולי דטוקסיקציה בצמחים. אחת הדרכים שפיתחו צמחים להתמודדות עם רעלניים חיצוניים, כגון חומרי הדברה ורעלנים שונים (Xenobiotics), כוללת קישור קוולנטי של רעלנים אלו לטריפטיד גלוטטיון והעברתם לווקאולה תוך שימוש בטרנספורטר טונופליסי תלוי ATP (Labrou et al., 2015). אנזימי הדטוקסיקציה בצמחים מקודדים ע"י מספר משפחות גנים שהמרכזיות בהם הן משפחות גני UDP-glycosyltransferases, משפחת גני ה-GSTs (Glutathione-S transferases), משפחת גני ה-CYPs (Cytochrome Monooxygenases P450), ו-UDP-glycosyltransferases. משפחת גני ה-GSTs מונה מספר רב של נציגים הפועלים בין היתר בהגנה כנגד עקה חימצונית ובתהליכי דטוקסיקציה, ע"י זירוז קונויגציה של רעלנים שונים לקבי תיול של גלוטטיון מחזור (GSH). בקרת פעילות GSTs תלויה בחיבת אותות סביבתיים שונים או במשרנים ספציפיים הגורמים לעלייה בביטוי גני GSTs (Labrou et al., 2015). איור 8, מורה כי ריסוס שתילי אבוקדו ב"קנון" לווה בשינוי בדגם ביטויים של 26 גנים המקודדים לחלבוני GSTs ו-10 גני CYPs, ששויכו ברובם לתת קב' I או III ולפיכך ביטויים עלה באופן זמני בפרק הזמן בין 24-72 ש' לאחר הטיפול. דגם ביטוי זה יכול כביכול להורות ששינויים אלו הינם חלק ממערך ה"פרימינג", לחילופין ניתן לשער שעלייה ביטוי בגני GSTs ובגני CYPs, מטרתה

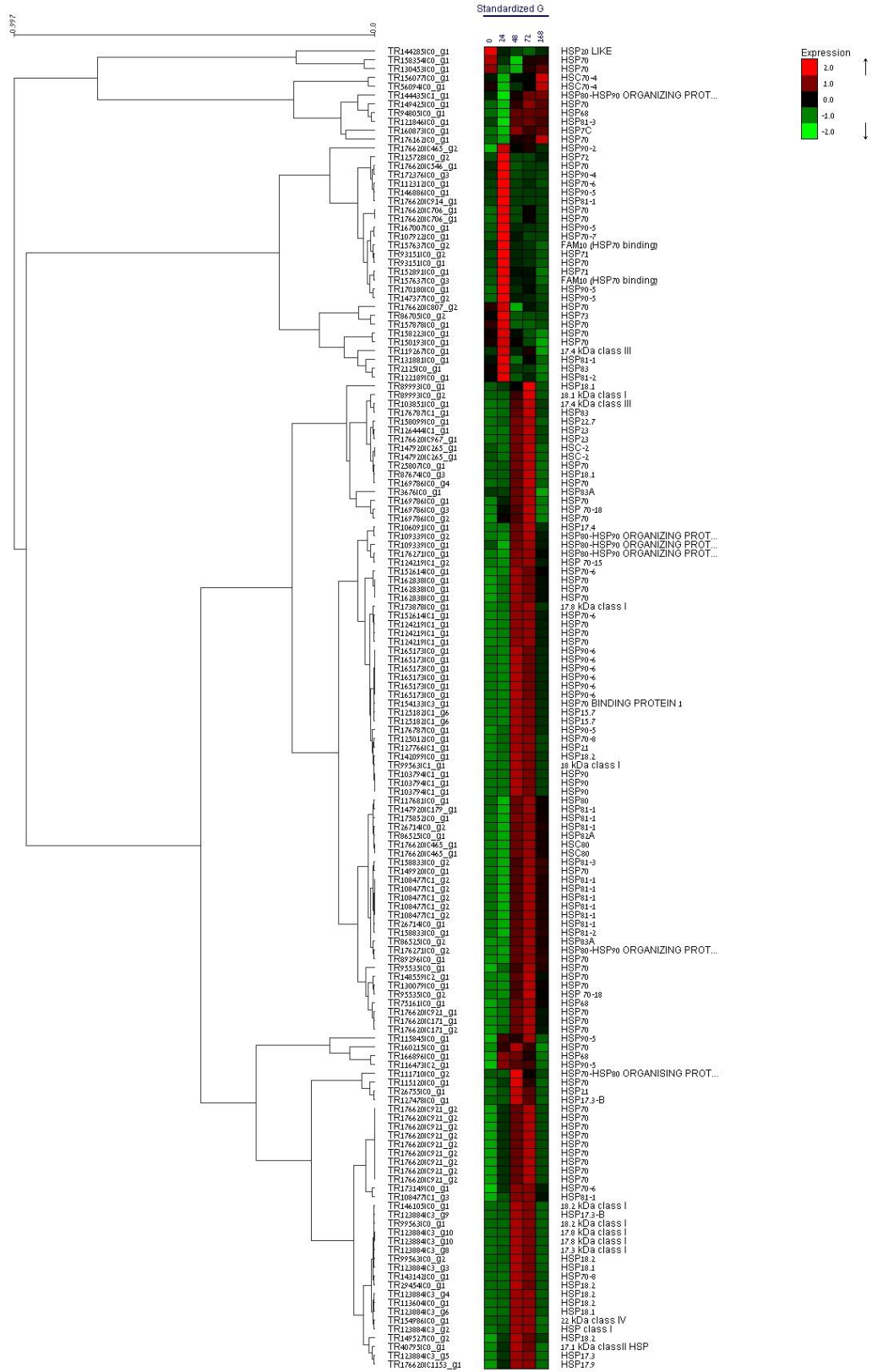
הפעלת תהליכי דטוקסיפקציה בעקבות חדירת החומצה הזרחיתית לצמח. מנגנון מעין זה יכול אולי להסביר אולי מדוע התגובה ל"קנון" מתאפיינת בשינוי זמני במערך ביטויים של גנים שונים.



איור מספר 8. סכמת heatmap המראה את דגמי הביטוי של גנים הקשורים למסלולי דטוקסיפקציה בצמחים לפני ואחרי הטיפול ב"קנון". $FDR < 0.01$ 2 fold.

4.3.5 שינוי בדגם ביטויים של גני (HSP) Heat shock proteins

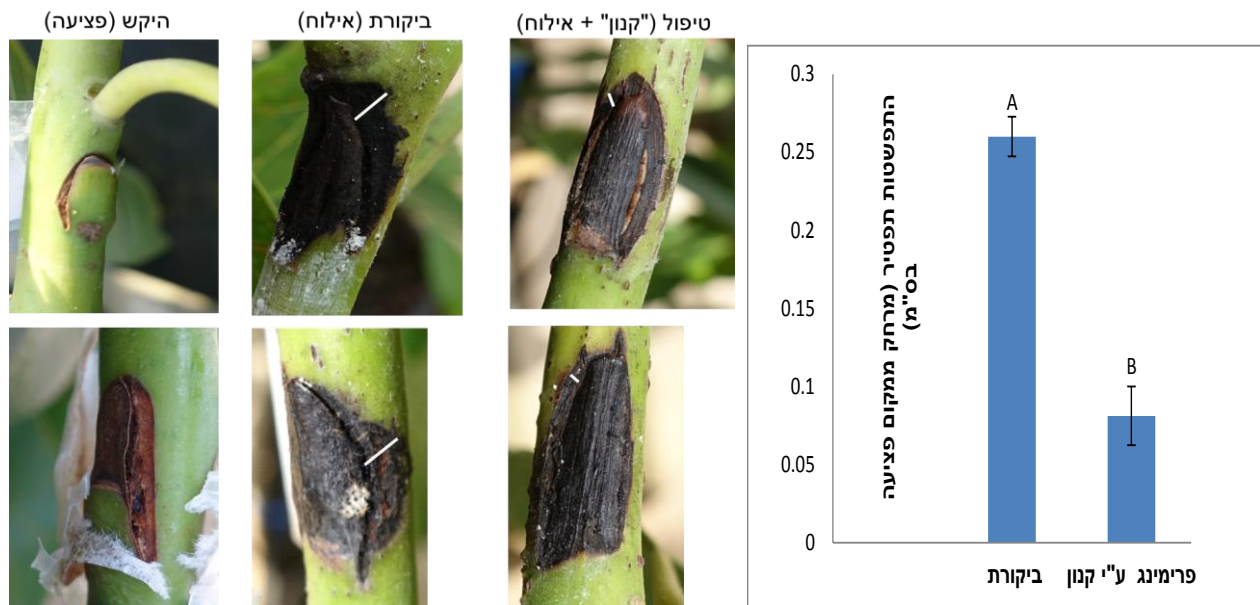
עיבוד נתוני הריצוף הראה שאחד השינויים הבולטים ביותר שחל לאחר הטיפול ב"קנון" היה שינוי מובהק בדגם ביטויים של 155 גנים המקודדים לחלבוני HSP (איור מספר 9). חלבונים אלו הפועלים בעיקר כצ'פרונים משויכים למספר משפחות בצמח המשחקות תפקידים מרכזיים בתנאי עקה שונים. יצוין כי בספרות קיימים מספר דיווחים המעידים כי טיפול "פרימינג" משרים בין היתר עמידות לעקות חום ומלווים בעלייה ב-HSPs. במקרה שלנו ראינו כי הגנים המשויכים למשפחות HSP שונות עלו באופן זמני ואו או רציף לאחר הטיפול. יהיה צורך להמשיך ולחקור מהו התפקיד אותו ממלאים חלבוני HSP שונים לאחר טיפול ב"קנון" לאור תוצאות אלו מעניין יהיה לבדוק האם טיפול זה מקנה עמידות גם בעקות א-ביוטיות כגון עקות חום.



איור מספר 9. – סכמת heatmap המראה את דגמי הביטוי של גני HSP לפני ואחרי הטיפול ב"קנון".
 FDR<0.01 2 fold

4.4 ניסויי טיפול ב"קנון" ואילוח ב – *Botryosphaeria*

מכלול התוצאות המסוכם בסעיפים הקודמים תומך אם כן ברעיון כי טיפול ב"קנון" באבוקדו משפיע מנגנון "פרימינג" ועשוי ע"י כך להקנות הגנה מסוימת בעת הדבקה בבוטריוספריה. בכדי לבדוק נושא זה, ביצענו ניסיונות במערכת שתילי 'האסי' שטופלו ב"קנון" ואולחו כעבור שלושה ימים בתפטיר בוטריוספריה. כצמחי ביקורת, השתמשנו בשתילים לא מטופלים שאולחו בפטרייה, ובשתילי היקש (mock) (טיפול פציעה ללא אילוח). הניסויים בוצעו ב-2 מועדים: נובמבר 2015, ואפריל 2016 ולווו בדגימות עלים מעל אזור האילוח ו/או הפציעה, בזמנים שונים. בניסוי שבוצע במועד הראשון (נוב' 2015), לא ניתן היה לראות כלל סימנים וויזואליים של החמה המעידיים על התפשטות הפטרייה במקום האילוח ו/או סימפטומים וויזואליים מאוחרים של נגיעות בבוטריוספריה, ולכן החלטנו לא לבצע אנלזיות מולקי' בחומר שנדגם. לעומת זאת, בניסוי שבוצע במועד השני (באפריל 2016), החלו להיראות כעבור חודשים סימנים ברורים של החמה באזורי האילוח (איור מספר 10). תוצאות מדידות שבוצעו חודשיים לאחר האילוח, באזור האילוח, הראו כי סימני החמה היו מוגבלים יותר באופן מובהק בצמחים שטופלו ב"קנון" בהשוואה לצמחי ביקורת (ללא טיפול מקדים ב"קנון"). בנוסף בצמחי ההיקש ניתן היה לראות החמה קלה בלבד אזורי הפציעה.



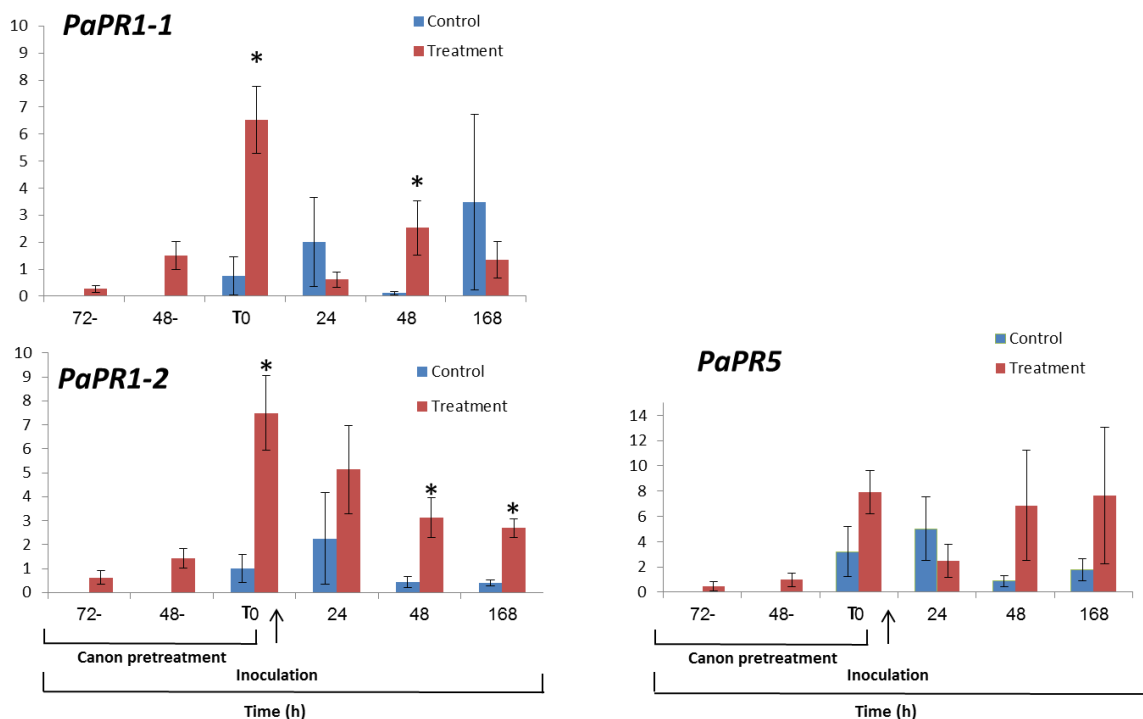
איור מספר 10. עיכוב התפשטות פטריית בוטריוספריה לאחר טיפול ב"קנון". הערכים בגרף מימין מבטאים ממוצע של 10-12 חזרות לטיפול \pm שגיאת תקן. בכל שתיל בוצעו כ 2-4 אילוחים ואורך אזור ההחמה נמדד במ"מ. משמאל מוצגות תמונות מייצגות של אזורי הפציעה ו/או האילוח בשתילים שעברו טיפול מקדים ב"קנון", בשתילים ביקורת לא מטופלים, ובצמחי היקש

לאחר שהודגמו שונות במדדי איכלוס הפטרייה, ניתן היה לצפות כי לאחר התגובה הראשונית לטיפול ה"קנון", תתרחש תגובה שניונית משמעותית שתבלום את התפשטות המחלה בשתילים מטופלים, בהשוואה לשתילי ביקורת. באופן מפתיע, גם כתשעה חודשים לאחר האילוחים לא נראו סימנים וויזואליים של התפשטות מחלת בוטריוספריה בשתילי הביקורת ובשתילים המטופלים (לא מוצג). למרות זאת, החלטנו להשוות את דגם ביטויים מספר גני *PaPRs* בשתילים שעברו טיפול פרימינג ואולחו, בהשוואה לשתילי ביקורת. תוצאות ביטוי *PaPRI-1*, *PaPRI-2* ו-*PaPR5* מוצגות באיור 11. התוצאות שהתקבלו הדגימו כי בדומה לתוצאות שהתקבלו בניסויים קודמים, טיפול ה"קנון" השרה עלייה זמנית בביטוי גנים אלו. במקרה זה, השיא בביטוי גנים אלו נצפה כ שלושה ימים לאחר הטיפול. התוצאות שהתקבלו הראו בנוסף כי האילוחים שבוצעו על רקע הטיפול ב"קנון" בזמן אפס (T_0) גרמו לעלייה חוזרת בהצטברות תעתיקי *PaPRI-*

PaPR1-1, *PaPR5-2* ו-*PaPR5*, אם כי, באופן בלתי צפוי, עלייה זו לא הייתה גבוהה יותר מאשר העלייה שנצפתה בתגובה הראשונית.

במקביל, בשתילי הביקורת ניתן היה לראות תגובה מסוימת לאלוח, שבאה לידי ביטוי בעלייה לא מובהקת בהצטברות תעתיקי ה-*PaPRs*. יחד עם זאת, בפרט, רמת ביטוי *PaPR1-1* ו-*PaPR1-2*, בפרק הזמן שנע בין 48-168 ש' לאחר האילוח, הייתה גבוהה יותר בשתילים שעברו "פרימינג", בהשוואה לשתילי ביקורת.

יצוין כי הצפי של תוצאות ניסוי זה היה שטיפול ה"קנון" יגרום לעלייה חדה וגבוהה בביטוי גני *PRs* בצמחים מטופלים ומאולחים, בהשוואה לצמחי ביקורת (צמחים מאולחים שלא טופלו ב"קנון"). תוצאה זו התקבלה באופן חלקי. יחד עם זאת מכיוון שהאילוחים שבוצעו לא גרמו להתפרצות סימפטומים של המחלה, יש לחזור על ניסויים אלו בצורה מורחבת. בכדי לבדוק בצורה מעמיקה יותר את רמת ההגנה שמקנה טיפול ב"קנון" לאחר הדבקה ב-*Botryosphaeria*



איור מספר 11. בחינת דגם ביטוי גני *PaPRs* בצמחים מאולחים בבוטריוסופרה שעברו טיפול פרימינג ב"קנון" ובצמחי ביקורת מאולחים. רמת ביטוי הגנים נורמלה יחסית לביטוי *PaGAPDH* ומוצגת בערכים של ביטוי יחסי (RE). כל עמודה מייצגת ממוצע של שלוש חזרות ביולוגיות \pm שגיאת תקן. בציר ה-X מצוינים מועדי הדיגום בשעות. זמן אפס (0) מציין את נק' הזמן לפני האילוח. כוכביות מייצגות את המובהקות בשונות הביטוי בין צמחים מטופלים וצמחי ביקורת בנק' זמן ספציפיות.

5. הבעת תודה

ברצוננו להביע תודה לחברת "לוקסמבורג" על הענקת מלגה שאפשרה את העסקת מר אייל הלון בפרויקט זה.

6. רשימת ספרות מצוטטת

- Backer R, Mahomed W, Reeksting BJ, Engelbrecht J, Ibarra-Laciette E, van den Berg N. 2015. Phylogenetic and expression analysis of the NPR1-like gene family from *Persea americana* (Mill.). *Frontiers in Plant Science* 6, 1-15.
- Burra DD, Berkowitz O, Hedley PE, Morris J, Resjoe S, Levander F, Liljeroth E, Andreasson E, Alexandersson E. 2014. Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. *Bmc Plant Biology* 14, 1-17.
- Conrath U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* 16, 524-531.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B, Prime APG. 2006. Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 1062-1071.
- Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF. 2011. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. In: Biologists. ASoP, ed. *The Arabidopsis Book* 9, e0156.
- Dixon RA. 2000. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Engelbrecht J, van den Berg N. 2013. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South African Journal of Science* 109, 1-8.
- Heath MC. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44, 321-334.
- Heitz T, Smirnova E, Widemann E, Aubert Y, Pinot F, Menard R. 2016. The rise and fall of Jasmonate biological activates. *Subcell Biochem* 86, 405-426.
- Labrou NE, Papageorgiou AC, Palvi O, Flemetakis E. 2015. Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Curr Opin Biotechnol* 32, 186-194.
- Machinandiarena MF, Lobato MC, Feldman ML, Daleo GR, Andreu AB. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology* 169, 1417-1424.
- Mahomed W, Berg N. 2011. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biol* 11, 1-14.
- Martinez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse CMJ, Pozo MJ, Ton J, van Dam NM, Conrath U. 2016. Recognizing Plant Defense Priming. *Trends Plant Sci* 21, 818-822.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis GD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA. 2008. Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20, 1708-1724
- Pieterse CM, van Loon LC. 1999. Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci* 4, 52-58.
-

- Pajerowska-Mukhtar KM, Emerine DK, Mukhtar MS. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in Plant Science* 18, 402-411.
- Perez-Jimenez RM. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2, 1-24.
- Qing Fu Z, Dong X. 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infections into Global Defense. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 64, 839-863.
- Reeksting BJ, Coetzer N, Mahomed W, Engelbrecht J, van den Berg N. 2014. De novo sequencing, assembly, and analysis of the root transcriptome of *Persea americana* (Mill.) in response to *Phytophthora cinnamomi* and flooding. *Plos One* 9, e86399
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 941-950.
- Seyfferth C, Tsuda K. 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science* 5, 697.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141, 373-378.
- Van der Ent S, Van Hulten M, Pozo MJ, Czechowski T, Udvardi MK, Pieterse CMJ, Ton J. 2009. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and beta-aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist* 183, 419-431.
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* 64, 1263-1280.
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. 1998. Spermine Is a Salicylate-Independent Endogenous Inducer for Both Tobacco Acidic Pathogenesis-Related Proteins and Resistance against Tobacco Mosaic Virus Infection1. *Plant Physiol* 118, 1213-1222.
- Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* 20, 10-16.

7. נספחים

7.1. נספח א'

Table 1. Characteristics of the raw Canon treated avocado data

Sample	#PE clean reads	%mapping
A-0	15273935	87.62
B-0	13043752	91.35
C-0	18553830	86.41
A_24	19727731	94.03
B_24	16376693	93.56
C_24	14917044	93.38
A-48	15867587	90.99
B-48	18364662	91.26
C-48	13439950	91.6
A-72	27515497	91.5
B-72	18832867	90.58
C-72	32116863	91.75
A-168	14740725	91.38
B-168	16735100	90.19

Number of clean RNA-seq reads and mapping percent on the *de-novo* transcripts catalogue are presented

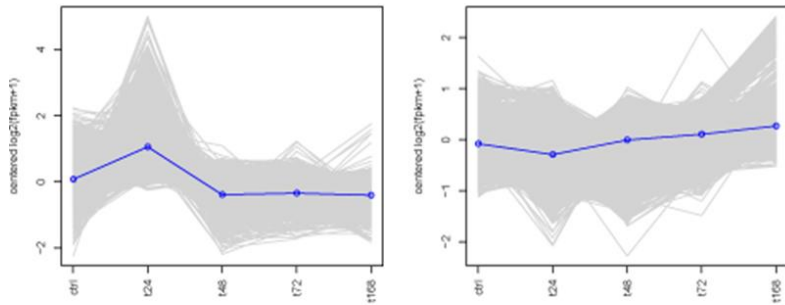
7.2. נספח ב'

Table 2. Statistical summary of the *de-novo* transcriptome catalogue.

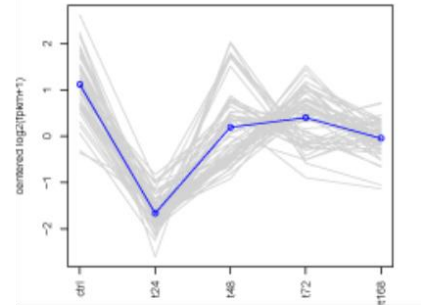
Total trinity transcripts	78,864
Total trinity 'genes'	54,055
Contig N50	1,777
Median contig length	780
Average contig length (bp)	1,148.72
Total assembled bases	90,592,687

7.3. נספח ג'

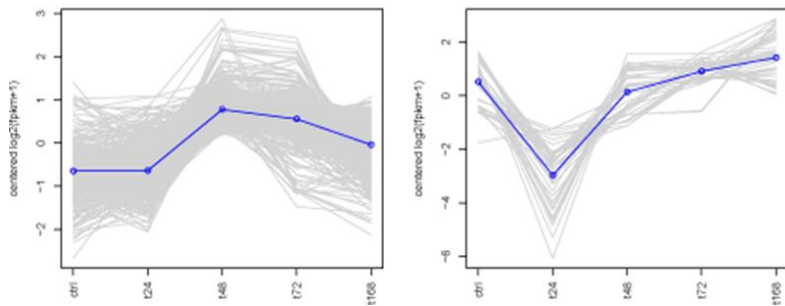
subcluster_1_log2_medianCentered_fpk.matrix, 5347 tra; subcluster_2_log2_medianCentered_fpk.matrix, 3545 tra;



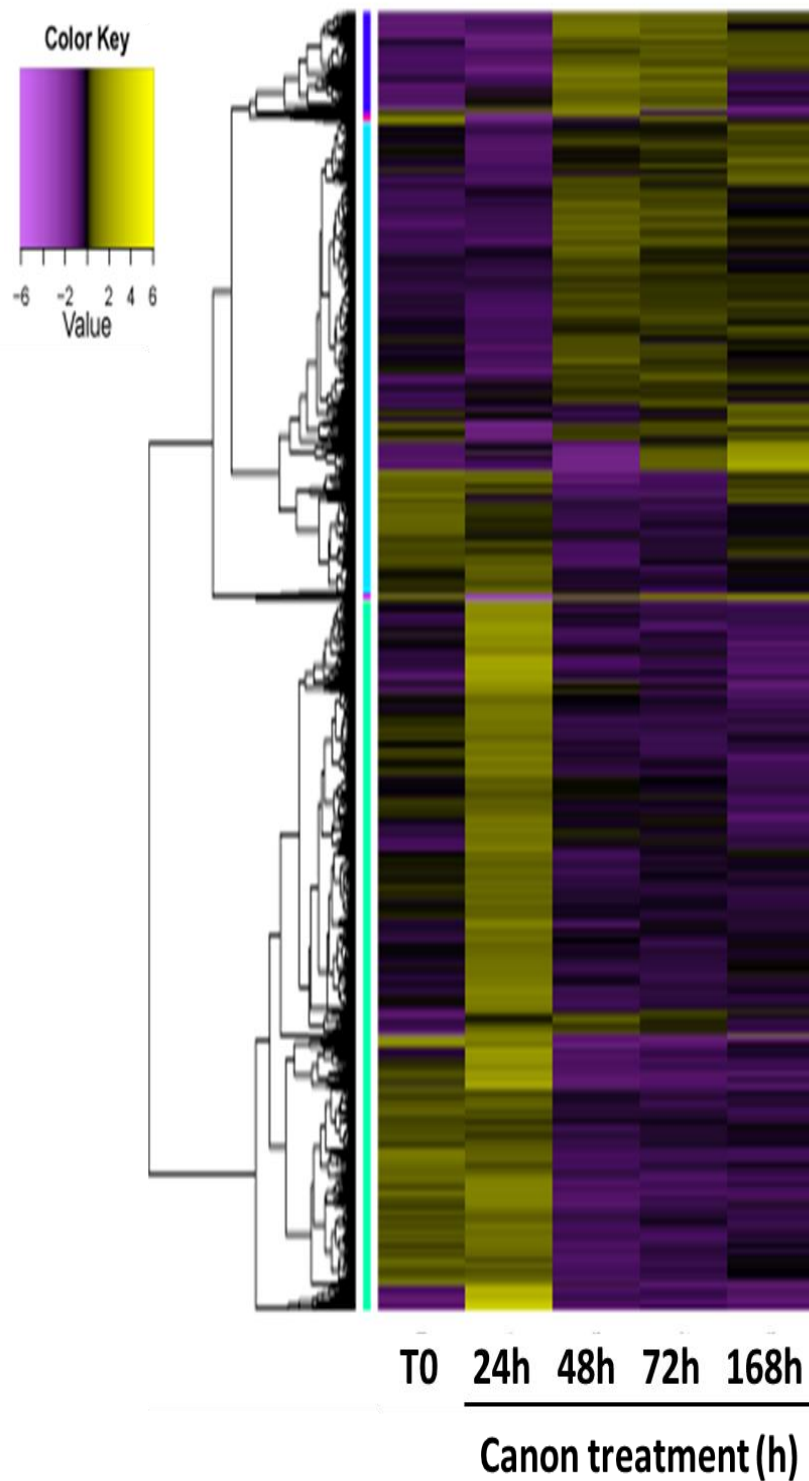
subcluster_5_log2_medianCentered_fpk.matrix, 56 tra;



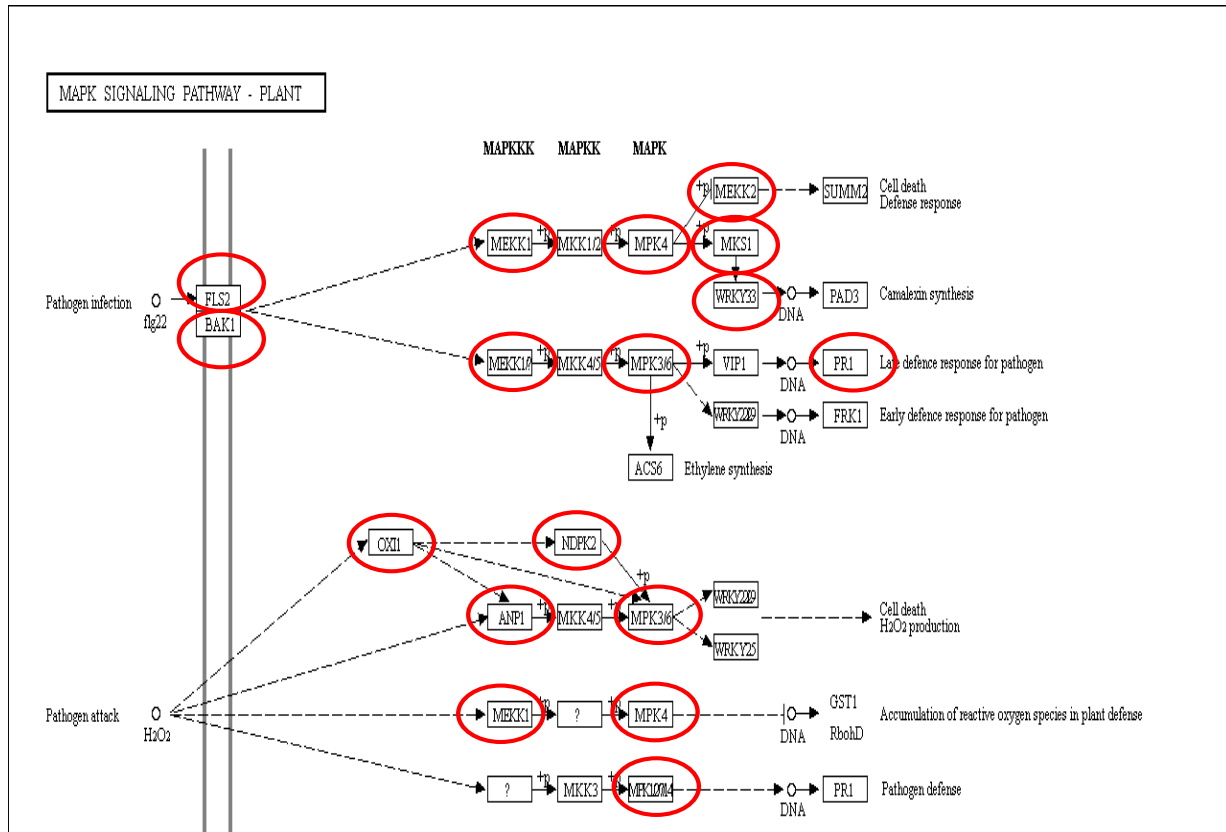
subcluster_3_log2_medianCentered_fpk.matrix, 759 tra; subcluster_4_log2_medianCentered_fpk.matrix, 43 tra;



איור מספר 1. דגם ביטויים של גנים שונים המבוטאים באופן דיפרנציאלי לפני ואחרי טיפול ב"קנון" בהתאם לתת-קבוצות (clusters) שהתקבלו. (מצוינים בסוגרים מספר הגנים בעלי דגם ביטוי ספציפי בתוך כלל תת-קבוצה).



איור מספר 2. אנליזת RNA-seq של גנים המבוטאים באופן דיפרנציאלי (DEGs) לפני ואחרי טיפול ב"קנון". אנליזת Hierarchical cluster ו סכמת heatmap המראה את דגמי הביטוי של 9,750 גנים בעלי ביטוי דיפרנציאלי ברקמות עלים בזמן אפס (T0) ולאחר 24, 48, 72 ו-168 ש' מטיפול ב"קנון". FDR<0.01, 2 fold.



איור מספר 3. סכמה המייצגת אירועי MAPK signaling החלים לאחר התקפת פתוגן ו/או הדבקת פתוגן. מסומנים בעיגולים גנים המקודדים לחלבונים שונים במסלולים אלו שדגם ביטויים שונה בעקבות טיפול ה"קבון".

פרק 6. פיתוח כלי לבחינה (ברמת העמח השלם) של יחסי הגומלין המתקיימים בין הפתוגן לפונדקאי

דו"ח לשנת המחקר השלישית

המוגש לוועדת ההיגוי של מיזם חוס"ן בוטריוספריה

ע"י

סטנלי פרימן ומרסל מימון

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי, ראשו לציון

1. תקציר

בספרות המקצועית דווח שפטריות מהסוג הבוטריוספריה חודרות לרקמות צמחיות דרך פצעים. ניתן לבחון את מיקום הפטרייה ברקמות הנגועות בעזרת שימוש בפטרייה מהונדסת גנטית ל- GFP (חלבון פלואורסצנטי זוהר). תבדדי *L. pseudotheobromae* ו- *L. theobromae*, AVO 6 ו- AVO בהתאמה, שימשו בכל הניסויים לטרנספורמציות מולקולריות של הגן המדווח GFP. כל שיטות הניסויים לטרנספורמציה באמצעות אגרובקטריום ופרוטופלאסטים לא צלחו. השתמשנו במספר שונה של פלסמידים מיושרים ומעגלים, כפי שמתואר מטה. לאור אי ההצלחה בשיטות שתוארו, ניסינו לקבל טרנספורמנטים ע"י בניית וקטור שיתאים לבוטריוספריה המכיל מקטע הומולוגי, שמקורו ברצף גנומי אקראי של בוטריוספריה. בעבר הצלחנו לבנות מחדר בשיטה דומה שהצליח לסמן את הפטרייה קולטוטריכום.

2. מבוא

בתצפיות שבצענו באבוקדו נראה שהפתוגנים חודרים לענפים הרב-שנתיים במקום החיבור של ענפים אלה עם הענפונים החד-שנתיים, ששם יש סדקים/פצעים. לאחר ההדבקה הפטרייה מתפשטת לאורך הרקמות הפנימיות של הענפים הרב שנתיים. באזורים הנגועים הרקמה הפנימית משנה את צבעה מהצבע הבהיר האופייני של רקמה בריאה לצבע חום נקרוטי. הרקמה הפגועה, הנקרוטית, היא רקמת הקסילם אך במספר מקרים נראה שגם אזור הקליפה, הפלואם, נפגע. שינוי צבע לא מרמז בהכרח על המקום בו נמצאת בפועל הפטרייה מפני שיתכן שהתפטיר נמצא הרבה מעבר למקום בו נראים תסמיני הנקרוזה. לחילופין יתכן שהנקרוזות מתפתחות במקומות מרוחקים ממקום הימצאות התפטיר. חשוב לדעת היכן נמצאת הפטרייה בפועל כי מידע זה חיוני לביצוע פעולות סניטציה. בנוסף, מידע זה ירמז על המנגנון בו פוגעת הפטרייה ברקמות הצמחיות. כמוכן, השימוש בתבדיד מסומן יאפשר לנו לבחון את הביולוגיה הבסיסית של הפתוגן, כגון יצירת נבגים אל מיניים ותפקידם בפיזור המחלה.

ניסינו לבחון את מיקום הפטרייה ברקמות הנגועות בעזרת שימוש בפטרייה מהונדסת גנטית ל- GFP (חלבון פלואורסצנטי זוהר). פלסמיד המכיל את החלבון יוחדר לפטרייה באחד השיטות המקובלות (שיטת הפרוטופלאסטים או בעזרת אגרובקטריום-טרנספקציה) המבוצעות במעבדה של פרימן באופן רוטיני. הכוונה היא להשתמש בפטרייה הזוהרת שתתקבל לאילוח רקמות מעוצות של שתילים. לאחר מכן יילקחו רקמות צמחיות מהשתילים הנגועים, במרחקים שונים ממקום האילוח, ממקומות סימפטומטיים וממקומות א-סימפטומטיים. דגימות אלה יבחנו באמצעות מיקרוסקופ קונפוקאלי (בו ניתן לראות את תפטיר הפטרייה הצבוע בצבע זוהר) וכך נוכל לקבוע היכן נמצא תפטיר הפטרייה בפועל.

3. תיאור הניסויים שבוצעו

3.1 טרנספורמציות לבוטריוספריה

תבדידי *L. theobromae* ו-*L. pseudotheobromae*, AVO 4 ו- AVO 6 בהתאמה, שימשו בכל הניסויים לטרנספורמציות מולקולריות של הגן המדווח GFP, בכל הניסויים לטרנספורמציות מולקולריות. תחילה ניסינו לעשות טרנספורמציה ל GFP באמצעות הוקטור pSK1019 המצוי בחיידק אגרובקטריום מזן Eha 105. בשני הפטריות לא התקבלו טרנספורמנטים. בהמשך ביצענו טרנספורמציות עם וקטורים שונים איתם עבדנו במעבדה: gGFP Ori ו-gGFPca8 המכילים את הגן GFP וכן pTimer DsRED המכיל גן המקודד לגן RFP הזורח באדום. בטרנספורמציות אלה נעשה עיכול של תפטיר הפטריות לקבלת פרוטופלסטים והפלסמידים המעגליים הוחדרו בעזרת PEG. תהליך העיכול עבד מצוין וכך גם הרגנרציה של הפרוטופלסטים אך למרות זאת לא התקבלו טרנספורמנטים זורחים.

מאחר והטרנספורמציות עם אגרובקטריום מזן Eha 105 לא הצליחו, העברנו את הוקטור pSK1019 לחיידק אגרובקטריום מזן AG1. חיידק זה אגרסיבי יותר ובעל יעילות טרנספורמציה גבוהה יותר. גם בשילוב הזה לא קיבלנו טרנספורמנטים.

בהמשך ניסינו לעשות טרנספורמציות עם וקטורים חדשים ל- GFP: pCPXHY1 eGFP שהתקבל מספרד ו pCT74 sGFP שהתקבל ממדינת אורוגוון, ארה"ב. הטרנספורמציה נעשתה לפרוטופלסטים עם פלסמיד מעגלי כדי לנסות להעלות את יעילות הטרנספורמציה נעשו במקביל גם טרנספורמציות עם פלסמיד מיושר. גם בטרנספורמציות אלו לא התקבלו טרנספורמנטים חיוביים, בחלק מהקורים נראה חלבון זורח שעבר דגנרציה אך לא היה ביטוי קבוע ויציב בכל התאים.

לאחרונה קיבלנו קונסטרוקט GFP חדש המותאם לאגרובקטריום. הוקטור, pCBCT sGFP, הוחדר לחיידקי אגרו 1 AG1 ושוב ניסינו לעשות טרנספורמציות. גם בוקטור הזה לא עלה בידינו לקבל פטרייה מסומנת.

מאחר שהטרנספורמציות לבוטריוספריה לא הצליחו עם הפלסמידים שהיו ברשותנו, הוחלט לבנות קונסטרוקטים שיכילו מקטע הומוולוגי מהפטריות ולהגדיל בכך את הסיכוי לאינטגרציה הומוולוגית שלהם. תבדידי *L. theobromae* ו-*L. pseudotheobromae*, AVO 4 ו- AVO 6 בהתאמה, הוגברו ב- PCR עם 20 תחלים אקראיים קצרים. תוצרי הראקציה הורצו על גיל אגרוז ומקטעים בגודל של כ- 700-1500 bp נחתכו מהגיל. 20 מיקטעים כאלו מוצו ושובטו לפלסמיד pGEM. הפלסמידים הוחדרו לחיידקים, רובו ונשלחו לריצוף. הרצפים שהתקבלו הושוו למאגרי המידע ב- NCBI. ארבעה מקטעים (שניים מכל תבדיד) שלא קודדו לשום חלבון בעל תפקיד ידוע וללא מסגרות קריאה נמצאו מתאימים להמשך עבודה. תחלים למקטעים מרצפים אלו תוכנו, ובעזרתם הוספו אתרי חיתוך לשני אנזימים שקיימים בוקטור GFP. המקטעים החדשים הוגברו ב- PCR ועברו ליגציה לפלסמיד pGEM. בהמשך, הווקטור ל GFP נחתך ואת פלסמיד ה- pGEM עם המקטעים ההומוולוגים מבוטריוספריה באותם אנזימי רסטריקציה נעשתה ליגציה משותפת. בדרך זו נבנו ארבעה וקטורים, כל אחד המכיל מקטע הומוולוגי אחר לבוטריוספריה. הווקטורים הוחדרו לחיידקים ונעשתה הפקה של כמות גדולה של הווקטורים ואלו שימשו בניסויי הטרנספורמציה. נעשו שני ניסויי טרנספורמציה בהם נוסו החדרת כל וקטור לפטרייה עם המקטע ההומוולוגי המתאים לה, בשיטה של טרנספורמציה לפרוטופלסטים. כל התהליך עבד בהצלחה: העיכול היה מושלם, הפרוטופלסטים עברו רגנרציה טובה ונוצרו הרבה מושבות לאחר החשיפה לאנטיביוטיקת הסלקציה היגרומיצין. עם כל זאת, המושבות שנוצרו לא ביטאו את הגן המדווח GFP. הייתה זריחה צהובה בחלק מהתאים, שלא הופיעה בזן הבר, אך הפלורסנציה לא הופיע ברצף בכל התאים וגם לא נראתה ירוקה כמו שהייתה צריכה להיות. הדבר חזר על עצמו בכל ארבעת הווקטורים שנבנו בשתי ניסיונות נפרדים שנעשו.

4. תוצאות

לא התקבלו טרנספורמנטים עם ביטוי של GFP באף אחד מהתבדידים מאף אחד משיטות הטרנספורמציות שנוסו. כן התקבלו טרנספורמנטים שהיו עמידים לחומר האנטיביוטיקה היגרומיצין וחלק מהטרנספורמנטים זהרו בצבע צהוב לא אופייני ולא בהיר.

5. דיון

לא נראה שניתן יהיה להשתמש בטרנספורמנטים אלה למעקב אחר הפטרייה בצמח. ככל הנראה, החלבון הזוהר GFP לא מתבטא לאחר הטרנספורמציה למרות שהיו תבדידים עמידים להיגרומיצין המצביע על אינטגרציה של הפלסמיד לגנים הפטרייה. על מנת להצליח במעשה, ככל הנראה נצטרך לבנות וקטור חדש עם פרומוטורים חדש שמאפשר ביטוי הגן GFP לקבל חלבון הזוהר.

פרק 7: נספח

דיווח על ממצאי המיזם בשנה האחרונה

תאריך	מקום	פורום	משתתפים	אירוע
28/1/2016	ראשון לציון	סיכום עונה ארצי – ענף האבוקדו	העוסקים בענף האבוקדו	הרצאה
3/2/2016	הגושרים	קורס שנתי	מגדלים, מדריכים ואנשי תעשייה	הרצאה
22/2/2016	גרנות	סיכום עונה	מגדלי אבוקדו	הרצאה
10/3/2016	ראשון לציון	קורס מגדלי אבוקדו	מגדלי אבוקדו	הרצאה
13/4/2016	אוהלו	קורס פקחים	פקחים, מגדלים ואנשי הדרכה	הרצאה
22/2/2017	גרנות	שולחן אבוקדו	חברי שולחן האבוקדו במועצת הצמחים	הרצאה
27/3/2017	ראשון לציון	סיכום עונה ארצי – ענף האבוקדו	העוסקים בענף האבוקדו	הרצאה