

## דו"ח סופי 2015-2017 מוגש למדען משרד החקלאות – תקציב לקליטת חוקרים חדשים

**שם התחום:** הגנת הצומח.

**שם התוכנית:** פיתוח אמצעים למניעת הנזקים הנגרמים בזן התפוח 'פינק ליידי' על ידי החיידק *Erwinia amylovora* המחולל את מחלת החירכון.

**חוקרת ראשית:** מרי דפני ילין.

**שמות השותפים למחקר:** דני שטיינברג, שולמית מנוליס-ששון, מרים זילברשטיין, יהודית מוי ואורלי מאירייס.

**סטטוס התוכנית:** סופית

**מועד התחלה וסיום התוכנית:** 2015-2017

**רקע ותאור הבעיה**

חירכון הינה מחלה הנגרמת על ידי החיידק *E. amylovora* החודר לעצים דרך הפרחים בזמן תקופת ההאבקה על ידי הדבורים, ועשוי לגרום לנזקים קשים כתלות בתנאי מזג האוויר, בעיקר בגידול האגסים. בשנים מסוימות הנזק הנגרם הינו זניח, ואילו בשנים אחרות הנזקים קשים, עד כדי איום על רווחיות ענף האגס כולו. מערכות תומכות החלטה מקומיות התפתחו במקומות שונים בעולם וכן בישראל, בה פותחה המערכת "גרעין ופרח" אשר משמשת בהצלחה לחיזוי אירועי הדבקה במטעי האגס ולמתן המלצות לטיפול. לאחרונה מתרבים הדיווחים בארץ על נזקי חירכון במטעי תפוח מהזן 'פינק ליידי' ('Cripps Pink'), צאצא של הכלאה בין 'Golden Delicious' ו'Lady Williams'), זן חדש ומבטיח בעולם. פריחתו של זן זה הינה מוקדמת יחסית לזני התפוח האחרים בארץ ומתרחשת ביחד עם פריחת האגס, מה שמעלה את רגישותו להדבקה. שימוש במודל "גרעין ופרח" עשוי להתאים גם לתפוח פינק ליידי, באם התנאים האופטימליים להדבקה בחירכון דומים בין אגס לבין זן זה, ואוכלוסיות התבדידים זהות מבחינה אפידמיולוגית.

**מטרות המחקר**

**מטרה ארוכת טווח:** פיתוח אמצעים למניעת הנזק הנגרם על ידי החיידק *E. amylovora* בזן פינק ליידי.

**מטרות ביניים:** (i) בחינת יכולת מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח" לחזות את מועדי ההדבקה בחירכון של תפוח פינק ליידי ואת היעילות של טיפולים שיושמו על פי החיזוי. (ii) מעקב אחר התקדמות המחלה בתוך עץ פינק ליידי נגוע ובין עצים במטע, ובחינת היכולת לעצור התקדמות זאת על ידי טיפולי סניטציה. (iii) אפיון השונות הגנוטיפית וההבדלים האפידמיולוגית של אוכלוסיות ה-*E. amylovora* התוקפים תפוחי פינק ליידי ואגסים.

**מהלך המחקר ושיטות עבודה**

**1. הערכת יכולת החיזוי של מערכת תומכת ההחלטה "גרעין ופרח" בחירכון בתפוח מזן פינק ליידי**

**1.1. בחינת התאמת מערכת תומכת ההחלטה "גרעין ופרח" בזן פינק ליידי:** בכדי לבחון התאמה של מערכת תומכת ההחלטה "גרעין ופרח" (שפותחה בארץ לזני אגס) לחיזוי חירכון בתפוח מזן פינק ליידי, נערך מעקב ב-24 חלקות מסחריות לא מרוססות כנגד חירכון (ניטעו בין השנים 2003 ל-2013). במקביל, נאספו נתוני מזג אוויר מ-14 תחנות מטאורולוגיות סמוכות, הכוללים: טמפרטורה, כמות גשם, ומשך זמן הרטיבות. ליד כל אחת מהתחנות המטאורולוגיות היו בין 1 ל-3 חלקות. החל מ-5% פריחה, ועד להופעת הנגיעות או עד לנשירת עלי כותרת בחודשים מרץ עד מאי, נערך מעקב במטעים ונרשם מועד הופעת המחלה. לאחר הפריחה, בחודשים יוני ויולי, תועדה רמת חומרת המחלה בחלקות הנגועות על פי סולם הערכת נגיעות הבא: 0- מטע בריא, כאשר סימני הנגיעות לא נראים כלל; 1 - המחלה נוכחת, כאשר בעצים בודדים (עד 5%) יש נגיעות בתפרחות בודדות; 2 - נגיעות נמוכה,

בחלק מהעצים עד 25% יש נגיעות של תפרחות בודדות ובעצים בודדים (עד 5%) יש נגיעות של כמה עשרות תפרחות לעץ; 3 - נגיעות בינונית, בעצים מסוימים (25-50%) יש נגיעות ובחלק קטן מהעצים (עד 5%) יש נגיעות של כמה עשרות תפרחות נגועות לעץ. 4 - נגיעות גבוהה, במרבית מהעצים (יותר מ 50%) יש נגיעות ובעצים מסוימים (עד 25%) יש כמה תפרחות נגועות לעץ. 5 - נגיעות גבוהה מאוד, במרבית העצים (יותר מ 50%) יש כמה עשרות תפרחות נגועות לעץ. כושר החיזוי של מערכת "גרעין ופרח" השווה לזה של מודל בשם "Maryblight" שפותח במדינת מרילנד בארצות הברית. בהצבת נתוני מזג האוויר במודל "Maryblight" צוינה לחות רק החל מ 4 שעות רטיבות עלה ביום.

**1.2 טיפולי תכשירי הדברה:** בשלושה ניסויים בחנו את יעילות טיפול בסטרנר 0.2% ונחושטן 0.1% על פי חיזוי "גרעין ופרח" בהשוואה לטיפול פעמיים בשבוע. הניסויים הוצבו במטעי תפוח פינק לידי בלוע אביטל (בחלקה של אלרום), בעמק קדש (בחלקה של אביבים) ובמטולה. הטיפולים: יישומים ניתנו על פי התרעות "גרעין ופרח" או פעמים בשבוע במהלך הפריחה. היישומים שניתנו: (i) ב 2016 בלוע אביטל: 4 יישומים על פי ריסוס קבוע פעמים בשבוע בתקופת הפריחה (27/3 עד 7/4) ו 2 יישומים על פי התרעות גרעין ופרח (27/3, 31/3). נפח הריסוס 254 ליטר לדונם בשני המועדים הראשונים, 145 ליטר לדונם ב 4/4, ו 150 ליטר לדונם ב 7/4. (ii) ב 2016 בעמק קדש: ריסוס קבוע פעמים בשבוע ניתן 8 פעמים במהלך הפריחה (החל מה 16/3 עד 10/4) ואילו על פי התרעות ניתנו 5 ריסוסים (בתאריכים 16/3, 20/3, 26/3, 30/3 ו 10/4). נפח הריסוס 120 ליטר לדונם. (iii) ב 2017 בלוע אביטל: 6 יישומים על פי ריסוס קבוע פעמים בשבוע במהלך הפריחה (החל מ 7/4 עד 25/4), וריסוס יחיד ניתן על פי התרעות גרעין ופרח בתאריך 10/4. נפח הריסוס: 370 ליטר לדונם. (iv) ב 2017 במטולה: 5 ריסוסים ניתנו פעמים בשבוע בריסוס קבוע (בתאריכים 13/4-29/3), ו 3 ריסוסים על פי התרעות (29/3, 3/4, 9/4). נפח ריסוס: 155 ליטר לדונם, הערכת הנגיעות נעשתה באמצע יוני על פי הסולם שתואר למעלה.

## **2. מעקב אחר התקדמות המחלה בתוך עץ פינק לידי נגוע ובין עצים במטע ויעילות טיפולי הסניטציה**

**2.1 התקדמות המחלה:** למעקב אחר התקדמות המחלה בתוך העץ, הוצב ניסוי בחלקות תפוח פינק לידי. ב-2015 הניסוי נערך במטע תפוח בעמק קדש שבגליל ובאפיק שבדרום הגולן, ב-2016 רק בקדש. הניסוי התבצע על ידי סימון 120 תפרחות נגועות הממוקמות באופן שונה בעצים שאינם מטופלים. התפרחות נלקחו מ 5 שורות סמוכות, בכל שורה 4 עצים ברצף, בתחילת ובאמצע שורה. בכל עץ סומנו 6 תפרחות נגועות. בין החודשים מאי-אוגוסט (אחת לחודש) נבחנו התקדמות הנגע בענפים מתחת לפריחה.

**2.2 טיפולי סניטציה:** לבחינת השפעת הרחקת הענפים הנגועים בחורף או בקיץ על רמת הנגיעות בחירכוך בעונת האביב העוקבת, הוצב ניסוי בחורף 2016 בחלקות פינק לידי במלכיה ובאפיק. ב 2017 חזרנו על הניסוי בגיזום קייצי וחורפי בקדש ובחלקת סנדאונר בברעם. הטיפולים נעשו לכל עץ בחורף לאחר הגיזום המשקי: (i) גיזום הענף הנגוע עד מתחת לצומת הנגועה. (ii) גיזום מתחת לתפרחת הנגועה בלבד. (iii) לביקורת הושארו התפרחות הנגועות. הניסוי נערך ב 5 חזרות, כל חזרה הכילה 4 עצים. במלכיה ובקדש, גיזום דומה נעשה בשורות שכנות זו לזו בקיץ 2016, והתוצאות נבחנו במהלך 2017.

**2.3 חיוניות חירכוך לאורך השנה בענפי תפוח מהזן פינק לידי:** במהלך שנת 2015 נאספו תפרחות נגועות ובוצע אימות הפתוגן כמתואר בסעיף 3.1, להלן. התבדידים נאספו מחלקות שונות. ב 2016 נאספו בכל חודש 10 תבדידים מחלקת קדש. בשל מיעוט חלקות פינק לידי נגועות, נאספו 10 תבדידים גם מחלקת תפוח נגועה מהזן סנדאונר של קיבוץ ברעם. זן זה דומה במועד הפריחה והקטיפ לזן פינק לידי, ובעל אותם הורים בהכלאה.

## **3. אפיון השונות הגנוטיפית וההבדלים האפידמיולוגית של אוכלוסיות ה-*E. amylovora* התוקפים תפוחי פינק לידי ואגסים.**

**3.1 אפיון שונות גנוטיפית:** תבדידי חירכוך מתפוח מהזן פינק לידי נאספו מאזורי גידול שונים בארץ. הבידוד התבצע מרקמת הגבול בין רקמה נגועה לרקמה בריאה, על גבי מצע מזון סלקטיבי CCT (חברת Difco) המכיל 5 ppm ציקלו-הקאמיד ו 20 ppm Thallium Nitrate. התבדידים נשמרו ב- 20% גליצרול במקפא בטמפרטורה של  $-80^{\circ}\text{C}$ . אנליזת PCR וריצוף עם

הפריימרים A: 5'-CGGTTTTTAACGCTGGG-3' ו B: 5'-GGGCAAATACTCGGATT-3' בוצעו לצורך זיהוי וודאי של הפתוגן.

על מנת ללמוד את הדינמיקה של אוכלוסיית החירכון בעולם, פותחו פריימרים המבחינים בין תבדידים המשתייכים לקבוצות CRISPER שונות (Rezzonico Fabio), מידע שטרם פורסם. לבקשתו, לא נרשמו כאן הרצפים). הפריימרים ששימשו לאנליזה: C1f04 ו C1rf09. התוצרים הפולימורפיים הורצו על גיל 1.2% לקבלת תוצרים 215 bp (CRISPER1 D-genotype), 275 bp (CRISPER1 A-genotype), או ללא תוצר (CRISPER1 D derived -genotype). לביקורת שימשו הפריימרים A ו B (סעיף 3.1 לעיל). על מנת לוודא כי הבנד החסר הינו מאפיין קבוצה גנוטיפית, נערך PCR נוסף של מקטע המכיל 2,500 bp, שהורם על ידי הפריימרים C1f1 ו C1r1, והתוצר נשלח לריצוף. עמידות לסטרנר נבחנה על ענפים נגועים מתפוח (סה"כ 65 בידודים) ומאגס (סה"כ 19 בידודים) בשנות המחקר על ריכוזים של 0, 5, 10, 25, 50, 100 ו 200 ppm.

**3.2 בחינת שונות במידת האלימות בין תבדידי תפוח ואגס:** לבחינת מידת האלימות של תבדידי החירכון של תפוח ושל אגס, הוצב ניסוי במעבדה. תבדידים משני המינים גודלו למשך לילה במצע מזון נוזלי NB, ונמחלו במים סטריליים ל 6 ריכוזים בטווח של  $10^2$  ל  $10^7$  חיידקים למ"ל, להדבקת ענפים עם תפרחות בעלות פרחים חיוניים. התפרחות נאספו ממטעי תפוח מהזן פינק ליידי בתל פרס בתקופת האביב. במעבדה נגזמו הענפונים כ 5 ס"מ מתחת לתפרחות. הענפונים ננעצו בתוך ספוגים רוויים במים. הניסוי הועמד ב 3 חזרות, כל חזרה מהווה ענף עם לפחות 3 תפרחות בהן פרחים פתוחים. לאחר ההדבקה הוכנסו התפרחות לתא גידול בטמפרטורה של  $22^{\circ}\text{C}$  וכוסו ל 12 שעות בניילון, לשמירה על לחות גבוהה. מצב התפרחות נבחן כל 3 ימים. ב 2016 נבדקו התבדידים מאגס: תבדיד 538 בודד מיסוד המעלה ב 2011; 597 מרמות נפתלי ב 2013; 560 בודד מצובה ב 2010; 588 בודד מברעם ב 2011. מתפוח, זן פינק ליידי בודדו כולם ב 2015: תבדיד 18 מחלקת לשון מלכיה; 24 מחוות מתתיהו חלקת פינק ליידי; 29 מחלקת ווינברג ממטולה; ותבדיד 38 מחלקה ו' יונתן. ב 2017 נבחנו התבדידים: מאגס - 583 בודד מיסוד המעלה ב 2011; 597 בודד מרמות נפתלי ב 2013; 238 בודד מפרוד ב 1995; 511 בודד מיסוד המעלה ב 2009. מתפוח פינק ליידי כל התבדידים בודדו ב-2016: תבדיד 14 מחלקות משפחת גרינברג ממטולה; 19 מחלקת לשון במלכיה; 23 מחלקת י"ב במלכיה; ותבדיד 16 מחלקת סאסא.

**3.3 בחינת רמת נגיעות במטע תפוח כתלות במרחק ממטע אגס קרוב:** (i) ב 2015, לאחר הופעת התפרחות הנגועות בחלקות, נבחרו 3 שורות באקראי, בכל שורה נספרו תפרחות נגועות ב 3 עצים בתחילת השורה, באמצע ובסוף השורה. בכל עץ ספרנו מספר תפרחות נגועות. התצפית נערכה בשתי חלקות – חלקת אביבים בעמק קדש, ובאפיק – הדר ד'. (ii) באביב 2016 בחלקת תפוח מזן פינק ליידי הסמוכה לחלקות אגס בחלקת קדש, נבחנה הנגיעות בכל עץ בארבע שורות, בכ 65 עצים לאורך השורה (סה"כ נספרו תפרחות נגועות ב 261 עצים). (iii) באביב 2016 בחלקת תפוח מזן זהוב הסמוכה לחלקת אגס (חלקה בקיבוץ יפתח) התפרחות היו ממוקמות ב 4 שורות. בכל שורה נספרו התפרחות הנגועות בכ 46 עצים (סה"כ נספרו תפרחות נגועות ב 184 עצים).

## תוצאות המחקר

**1.1 בחינת התאמת מערכת תומכת ההחלטה "גרעין ופרח" בזן פינק ליידי:** על מנת לבחון את התאמת מערכות תומכות החלטה הקיימות באגס לטיפול בחירכון בפינק ליידי, ביצענו תצפיות בחלקות פינק ליידי הנמצאות באזורים גאוגרפיים שונים. כחודש לאחר הופעת הנגיעות לראשונה, הוערכה חומרת המחלה בחלקות. ב- 2015 מצאנו כי ב- 21 מתוך 24 החלקות הייתה נגיעות ברמות שונות. ב 13 חלקות ראינו כי המחלה נוכחת, אך רק בשתי חלקות נמצאה נגיעות ברמה גבוהה מאוד. חלקות אלו היו בקדש ואפיק ושתייהן היו הסמוכות למטעי אגס. הופעת הנגיעות לראשונה בכל החלקות ב 2015 התרכזה סביב חמישה מועדים, 9-15 יום לאחר התראה: (i) 19/4/15, (ii) 24/4/15, (iii) 30/4/15, (vi) 3-5/5/15, (v) 12/5/15. בשתי חלקות – רמג"ש וד' 160 היה חיזוי אך לא הייתה נגיעות. בלוע אביטל הייתה נגיעות אך לא הייתה התרעה, על פי שני המודלים. בשנת 2016 חזרנו ל 22 חלקות שנבחנו גם ב-2015 ועקבנו אחר רמת הנגיעות. רק ב-8 חלקות (7 מהן בגליל ואחת באפיק שבגולף) נראתה נוכחות של המחלה.

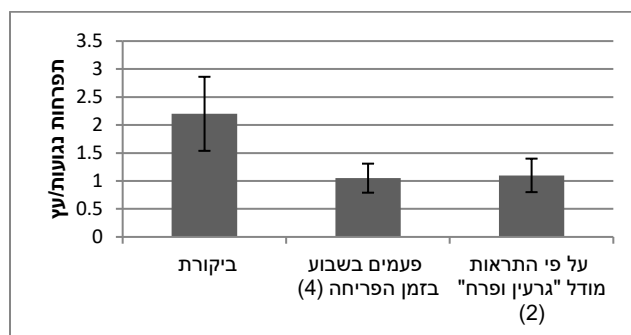
בחלקה אחת (קדש) נצפתה נגיעות גבוהה. ב 5 חלקות הנגיעות נצפתה בעיקר סביב מועד אחד (25/4/16) ובשלוש החלקות הנותרות זוהתה נגיעות בתאריכים 2/5/16, 5/5/16, 9/5/16. ב 2017 נמצאה נגיעות רק באפיק וקדש – מתוך 24 החלקות (אותן חלקות שנבחנו ב 2015). בשתי החלקות המחלה נוכחת, והופיעה 13 ו 15 ימים לאחר התרעה. מבין החלקות הנגועות: ב 2015, מתוך 21 חלקות נגועות, מערכת תומכת החלטה גרעין ופרח חזתה נגיעות ב 19 חלקות (90.5%), בעוד ש Maryblight חזתה את הנגיעות רק ב 8 חלקות (38.1%). ב 2016 נראתה נגיעות ב 8 חלקות וב 2017 רק בשתי חלקות בשנים אלו שתי המערכות תומכות ההחלטה התריעו נכונה ב 100% מהמקרים (טבלה מס' 1). מבין החלקות בהן לא הופיעה נגיעות: ב 2015 בשתי חלקות התקבלו בגרעין ופרח וב 100% Maryblight התרעות שווא (false positive). ב 2016 מתוך 14 חלקות ב Maryblight ניתנה התרעה שווא ב 100% מהחלקות, ואילו בגרעין ופרח רק ב 71.4% מהחלקות. ב 2017 מתוך 22 חלקות ללא נגיעות Maryblight התריעה לשווא ב 95.4% מקרים, ואילו גרעין ופרח ב 86.4% (טבלה 1). ביחס למודל "גרעין ופרח" ב- 2015, סך ימי ההתראה היה גבוה יותר במודל של "Maryblight" ב 2016 פי 1.7 וב 2017 פי 1.2.

**טבלה מס' 1:** מספר החלקות בהן הופיע חירכון על פי התאמה למערכות תומכות החלטה "גרעין ופרח" ו- Maryblight בשנים 2015-2017: (i) יש התרעה במודל ונצפתה נגיעות (True positive), (ii) אין התרעה על פי המודל ולא נצפתה נגיעות (True negative), (iii) יש התרעה ע"פ המודל אך לא נצפתה נגיעות (False positive), ו- (iv) אין התרעה ע"פ המודל אך נצפתה נגיעות (False negative).

2017	2016	2015	2017	2016	2015	
Maryblight			גרעין ופרח			
		13			2	False negative
21	14	2	19	10	2	False Positive
1			3	4		True Negative
2	8	8	2	8	19	True Positive
<b>24</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>סה"כ חלקות שנבדקו</b>

**1.2 בחינת יעילות טיפולי נחושת וסטרנר בתפוח פעמיים בשבוע או על פי התרעות מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח":** ב 2016 בחלקת אביבים בעמק קדש, רמת נגיעות בחלקה הייתה נמוכה (2.2 תפרחות נגועות לעץ בממוצע בביקורת הלא-מטופלת. איור מס' 2). טיפול בנחושתן וסטרנר על פי התראות המודל הפחית נגיעות בהשוואה לביקורת, אך ההשפעה לא הייתה מובהקת. בניסוי שבוצע בלוע אביטל (חלקת קיבוץ אלרום), לא נמצאה כלל נגיעות בכל חלקות הביקורת הלא מטופלות, וכן בטיפול של יישום נחושתן פעמיים בשבוע. נגיעות נמצאה רק בחזרה אחת של הטיפול בנחושתן על פי התרעות המודל. בשני הניסויים שבוצעו ב- 2017, במטולה ובלוע אביטל, לא הייתה נגיעות כלל.

**איור מס' 2:** יעילות הטיפול בסטרנר ונחושתן במטע תפוח. התוצאות המוצגות הינן ממוצעים ± שגיאת תקן.

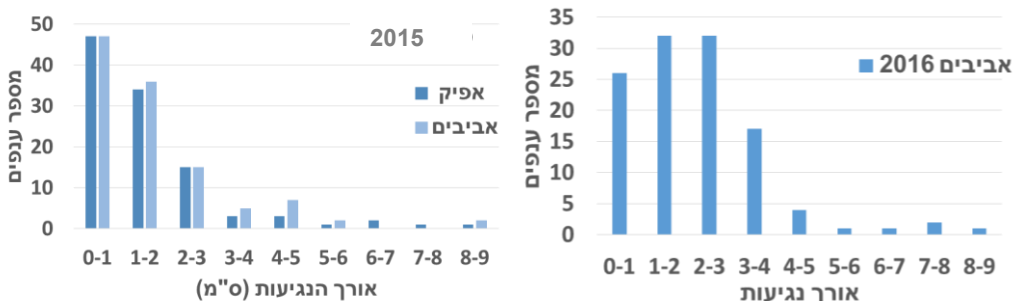


**2. מעקב אחר התקדמות המחלה בתוך עץ פינק ליידי נגוע ובין עצים במטע ויעילות טיפולי הסניטציה.**

**2.1 התקדמות המחלה:** ב 2015 מתוך הענפים שנדגמו עד אוגוסט, המחלה התקדמה למרחק של עד 2 ס"מ ב 96% מהמקרים, ורק ב 4% מהענפים ההתקדמות הייתה למרחק גדול מ 5 ס"מ לתוך הענף (איור מס' 4). בחודש אוגוסט, מבין הענפים שנבחנו באפיק ובאביבים, הייתה התקדמות של הנגיעות בפחות מ 0.4 ס"מ רק ב- 5% ו 10% מהענפים, בהתאמה. 8% מכלל הענפים נשברו

במהלך תקופת המדידה ובשל כך לא ניתן היה למדוד את מרחק ההתקדמות בהם. ב 2016 התוצאות שהתקבלו היו דומות ל 2015, כאשר רק ב 4% הגיעה התקדמות הנגיעות ל 5 ס"מ ומעלה.

**איור מס' 4:** התפלגות אורך הנגיעות בענפים הנגועים בחירכון בחלקות תפוח מהזן פינק לידי בישוב אביבים בעמק קדש ובישוב אפיק בדרום רמת הגולן. מוצגות תוצאות המדידה של הענף הפגוע מתחת לתפרחת. המדידה המוצגת התבצעה באוגוסט 2015 ובספטמבר 2016.



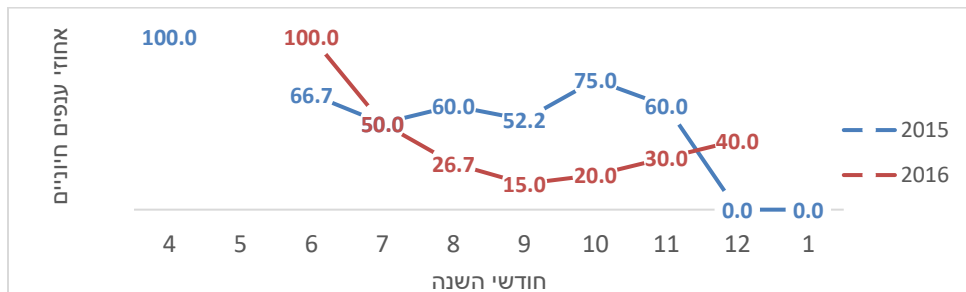
**2.2 טיפולי סניטציה:** ב 2016 נראה כי גיזום הענפים הנגועים (גיזום עד הצומת הקרובה) בחורף עשוי להפחית את הנגיעות החדשה, וכי גיזום רק של התפרחות (גיזום מתחת לדורבן הנגוע) לא שינה את שיעור הנגיעות. ב 2016, באפיק 20% בלבד מהעצים היו נגועים והכילו בין 1 ל 3 תפרחות נגועות בלבד. במלכיה רק 10% מהעצים היו נגועים, כאשר בין 1 ל 2 תפרחות לעץ היו נגועות (טבלה מס' 5). גם ב 2017 בברעם (בזן סנדאונר) ובקדש בזן פינק לידי רמת הנגיעות הטבעית הייתה נמוכה מאוד ולא התקבלו מגמות דומות לאלו שנראו ב 2016.

**טבלה מס' 4:** ההשפעה של גיזום תפרחות או ענפים נגועים בחורף. בחינת הנגיעות נעשתה באביב העוקב למועד הגיזום. התוצאות המוצגות הינן ממוצע של מספר תפרחות נגועות לעץ ± שגיאת תקן. \*בברעם ב 2017 הניסוי נערך בזן סנדאונר בשל מחסור בחלקות פינק לידי נגועות.

2017 - קדש		2017 - ברעם*		2016 מלכיה	2016 אפיק	מועד הגיזום
קיץ	חורף	קיץ	חורף	חורף 2016	חורף 2016	
1.67±0.36	0.58±0.19	0.05±0.05	0.15±0.11	0.1±0.02	0.375±0.12	ביקורת
2.00±0.56	0.67±0.33	0.05±0.05	0.05±0.05	0.08±0.01	0.125±0.06	הורדת ענף
2.75±0.73	0.33±0.14	0.00±0.00	0.10±0.07	0.225±0.04	0.400±0.12	הורדת תפרחת

**2.3 חיוניות חיידקי E. amylovora בתפוח:** מכל התפרחות שנדגמו באפריל 2015, בודדו חיידקים חיוניים (איור מס' 6). חיוניות החיידקים הלכה וירדה במהלך השנה, ובדצמבר 2015 לא נמצאו חיידקים חיוניים בתפרחות הנגועות. באופן דומה, נמצאה חיוניות של 100% ביוני 2016, שדעכה משמעותית לאורך השנה, אך לא אבדה לחלוטין גם בדצמבר. חיוניות התבדילים שנבחנה בזן סנדאונר ב- 2016 דומה לזו שנבחנה בזן פינק לידי.

**איור מס' 6:** חיוניות תבדילי תפוח מהזן פינק לידי לאורך חודשי השנה 2015 ו- 2016.



**3. אפיון השונות הגנוטיפית וההבדלים האפידמיולוגית של אוכלוסיות ה E. amylovora התוקפים תפוחי פינק לידי ואגסים.**

**3.1 אפיון שונות גנוטיפית:** בטבלה מס' 5 ניתן לראות כי נמצאו בארץ 3 טיפוסים של חירכון. טיפוסים אלו נבדלים זה מזה על פי שימוש בפריימרים C1R09 ו C1F04, המזהים קיומם של רצפים בגדלים שונים של 276 bp (A) ו- 215 bp (D) או בהעדר רצף זה

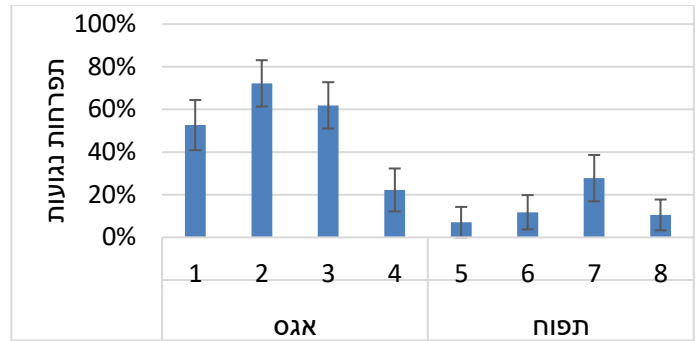
(D- derived). בעמק קדש בחלקות של הישוב אביבים, במטע אגס ותפוח, בהן נבדקו 11 ו 19 תבדידים בהתאמה, נמצא כי בשניהם הטיפוס הנפוץ הינו D-derived. גם ביפתח, בו נבדקו שני המינים, נמצא כי מרבית התבדידים שייכים לטיפוס זה. בחלקות אפיק, בהן נבדקו שני המינים, נמצאו בתפוח שלושת הטיפוסים ובאגס שני טיפוסים בלבד. ב 2017 בחלקות אביבים, אפיק, יפתח נבחנו עמידות של חידקים לסטרנר בדוגמאות ענפים נגועים מתפוח ומאגס. באביבים ואלרום ניתן לראות עמידות לסטרנר בחלקות תפוח, כשזו לא נמצאה בחלקת אגס הקרובה, ועל אף שחלקות אלו לא רוססו בסטרנר בשנות המחקר.

**טבלה מס' 5:** שימוש בסמנים גנטיים מבוססי רצפי CRISPER לבחינת שונות בין תבדידי חירכון. שלושת טיפוסים החירכון שנמצאו בחלקות תפוח ואגס שונות מוצגים (A, D, D-derived). בנוסף מופיעים מספר התבדידים העמידים לסטרנר שנמצאו מתוך סה"כ תבדידים שנבחנו לעמידות.

CRISPER1 genotype	תפוח			אגס			ישוב	
	A	D	D-derived	לסטרנר עמידים	A	D		D-derived
אביבים			15	0/5	1		10	
אבירים			1					
אבני איתן					1			
אלרום								
אפיק	2		1	1/2	2	1	1	
ברעם		9	1			1		
דישון				0/1			1	
חוות מטעים				0/2		2		
יונתן							1	
יסוד המעלה						1	1	
יפתח			5	0/2	1		5	
כפר יובל				0/1		1		
מטולה			2				1	
מלכיה	1		5					
מעין ברוך							1	
מרום גולן							1	
מתתיהו		2						
סאסא	2	1						
עלמה				0/1			1	
פרוד				1/1	1	1		
צובה					1			
ראש פינה					1			
רמות נפתלי						1		
<b>סה"כ</b>	<b>3/10</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>30</b>	<b>2/15</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>23</b>
<b>התפלגות התבדידים בכל מין</b>	<b>30%</b>	<b>15.7</b>	<b>25.5%</b>	<b>58.8%</b>	<b>13.3%</b>	<b>27.6%</b>	<b>27.6%</b>	<b>79.3%</b>

**3.2 אפיון שונות פנוטיפית:** בניסוי שהועמד ב 2016 במשך 22 יום לא נראו הבדלים בחיוניות הפרחים בין התפרחות בריכוזים השונים של המדבק, וכן בביקורות שלא הודבקו. בניסוי ב 2017 הופרדו הביקורות מיתר הטיפולים, והועמדו באותו חדר גידול בתנאים זהים, אך על מדף שונה. כמו כן הופרדו גם הריכוזים השונים. בניסוי זה מצאנו הבדלים מובהקים בין התבדידים בשיעור התפרחות הנגועות, על פי מקור התבדד, כאשר תפרחות הביקורת נשארו חיוניות עד סוף הניסוי. נמצא כי באופן מובהק תבדידי האגס היו אלימים יותר בהשוואה לתפוח מוזן פינק ליידי (מבחן סטטיסטי – Contingency Analysis  $P < 0.01$ ). באיור מס' 7 ניתן לראות את שיעור התפרחות הנגועות 10 ימים אחרי אילוח יזום בריכוז של 100 Cfu/ml.

**איור מס' 7:** שיעור תפרחות נגועות 8 ימים אחרי הדבקה בריכוז חידקים של 100 cfu/ml. תבדידי אגס: 1 - יסוד המעלה (583), 2 - רמות נפתלי (597), 3 - פרוד (238), 4 - יסוד המעלה (511). תבדידי תפוח: 1- מטולה גרינברג (14), 2- מלכיה לשון (19), 3- מלכיה י"ב תבדיד (23), 4- סאסא (16).



**3.3. בחינת רמת נגיעות במטע תפוח כתלות במרחק מחלקת אגס הקרובה:** (i) ב 2015 מצאנו באפיק השפעה משמעותית של הנגיעות כתלות בשורה במטע. כאשר בחנו את ההבדלים במרחקים (כתלות בשורה), מצאנו הבדל מובהק (HSD,  $P=0.0249$ ) במספר התפרחות הנגועות לעץ, עם 20.2 תפרחות נגועות קרוב לתחילת השורה, ובסוף השורה 8.0 תפרחות בממוצע. באמצע השורה נספרו 19.1 תפרחות נגועות בממוצע, שלא נבדלו באופן מובהק ממספר התפרחות שבתחילת או בסוף השורה. בקדש, לא נמצא שינוי מובהק במספר התפרחות הנגועות לאורך השורה. (ii) ב 2016 בחנו שנית את רמת הנגיעות, והפעם נספרו התפרחות הנגועות בכל העצים לאורך השורה. באביבים, בזן פינק לידי, נמצא קשר מובהק בין מספר העץ בשורה מכיוון האגס לבין רמת הנגיעות בו. ככל שמתרחקים מחלקת האגס הסמוכה כך ירד מספר התפרחות הנגועות. רמת הנגיעות נבדלה באופן מובהק בין השורות השונות. השפעת גומלין נראתה לשורה ולמספר העץ, כלומר יש תלות בין רמת הנגיעות במרחקים השונים מהאגס כתלות במיקום השורה במטע. ביפתח, בזן זהוב, השונות הגדולה בחלקה הייתה בין השורות. אבל לא נראתה השפעה מובהקת למרחק מחלקת האגס הקרוב (טבלה מס' 6).

**טבלה מס' 6:** ניתוח שונות – השפעת הגורמים השונים שנבחנו על מספר התפרחות הנגועות לעץ. הגורמים: (i) מספר העץ מחלקת אגס הקרובה, (ii) השפעת השורה, ו (iii) יחסי הגומלין בין השורה למספר העץ.

יפתח 2016		אביבים 2016		השפעת הגורמים
Prob > F	F Ratio	Prob > F	F Ratio	
0.1921	1.7076	0.0143*	6.0433	מספר עץ
<0.0001*	14.3753	<0.0001*	31.786	שורה
0.1583	1.7404	0.0012*	5.3619	שורה x מספר עץ

### סיכום ומסקנות

לצורך פיתוח אמצעים למניעת הנזק הנגרם על ידי החיידק *E. amylovora* בזן פינק לידי מצאנו במחקר זה כי: (i) מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח" חזתה את מועד הופעת המחלה ב 2015 ב 90.5% מהמקרים ואילו המודל Maryblight חזה נגיעות בשיעור נמוך יותר, של 38%. ב- 2016 ו 2017 הנגיעות שנראתה בחלקות התפוח שנטרו הייתה נמוכה יחסית. שתי המערכות תומכות החלטה חזו את הנגיעות באופן דומה אך במודל Maryblight היו יותר ימי התרעה ב 20-70% ביחס לגרעין ופרח. במערכת גרעין ופרח קיימים שני מדדי סיכון (ג', ו ב') על פי תנאי מזג האוויר. בהשוואה בין מערכות תומכות החלטה שהוצגה בדוח נלקחו בחשבון שני מדדי הסיכון, על אף שבמקרים בהם דרגת הסיכון הבסיסית במטע נמוכה, אין צורך לרסס בהתרעות ב' מה שמפחית את מספר ימי ההתרעה בגרעין ופרח. טיפול עם נחושתן וסטרנר נבחן על פי המודל במשך שנתיים, אבל בשל רמת הנגיעות הנמוכה בשנים אלו לא ניתן להסיק מסקנות על יעילות הטיפול. (ii) בשתי חלקות שונות, האחת בגולן והשנייה בגליל, נראה כי במרבית מקרים התקדמות המחלה בענפים הייתה למרחקים קצרים (אם בכלל); רק ב 4% ההתקדמות הייתה למרחק גדול מ 5 ס"מ. ממצא זה מעיד על התקדמות מועטה יחסית של המחלה במהלך העונה. בנוסף, נראה כי חיוניות החירכון בענפים דועכת במהלך

השנה. (iii) מבין תבדידי התפוח והאגס נמצאו 3 טיפוסים גנוטיפים שונים המבוססים על רצפי CRISPER. התפלגות התבדידים בין אוכלוסיות חיידקי החירכון בתפוח ובאגס הייתה דומה. בשני המינים ניתן לראות את שלושת הטיפוסים, כאשר טיפוס D-derived הוא הנפוץ ביותר. בניסוי האלימות נראה כי יש הבדלים באלימות תבדידים שמקורם מתפוח לעומת תבדידים שמקורם מאגס, אם כי תוצאות אלו התקבלו רק בשנה אחת של המחקר. ממצא זה יכול לנבוע מירידת אלימות תבדידי החירכון לאחר המצאותם על התפוח. בנוסף, ייתכן כי ההבדל בין אלימות של תבדידים מתפוח ומאגס מקורה בשנת הבידוד. תבדידי האגס שנבחנו היו ישנים יותר מתבדידי התפוח שנאספו במחקר זה ב 2016. סיבה נוספת להבדל עשויה להיות בשל מיקום החלקות השונה. תוצאה תומכת בשונות התבדידים נראתה גם כאשר נמצא כי במטעים סמוכים ממינים שונים יש שונות ברמת העמידות לסטרנר. מעניין כי על אף העובדה שחלקות התפוח אינן מרוססות בסטרנר נמצאו תבדידי חירכון עמידים לתכשיר, גם אם אלו לא נמצאו בחלקת אגס הסמוכה.

לסיכום: במהלך המחקר ראינו כי התקדמות המחלה בענפי התפוח נעצרת במהלך עונת הקיץ. החיידקים אינם מגיעים לגזע, לא נראו כיבים פעילים בחלקות, וחיוניות החיידקים הולכת ויורדת במהלך העונה. יחד עם זאת, ניתן למצוא חיידקים חיוניים גם לקראת הפריחה בשנה העוקבת, ואפילו עליה קלה בחיוניות בדצמבר 2016 אם כי הסיבה לכך לא ברורה. התוצאות מרמזות כי עיקר הנגיעות לחלקות התפוח מקורה בחיידקים שנמצאים בחלקות האגס הסמוכות. אין לשלול כי הנגיעות עשויה לשרוד (אם כי בשיעור נמוך) בחלקות התפוח. במחקר זה ראינו עוד כי אין סכנה מהותית מחירכון לעצי תפוח מזן פינק ליידי. הרגישות הגבוהה למחלה של זן זה, יחסית לזני התפוח האחרים, נובעת כנראה בשל מועד הפריחה המוקדם של הזן פינק ליידי. מודל גרעין ופרח, המשמש לחזות הדבקה בחירכון באגס, יכול לתת מענה גם למגדלי התפוח. יחד עם זאת, שימוש על פי המודל בתכשירי הדברה הקיימים כיום, צריך להבחן בשל העובדה שיעילות סטרנר פוחתת בשנים האחרונות.

ההתקדמות במחקר שחלה ממועד כתיבת הדו"ח האחרון: בדו"ח מוצגות התוצאות משלוש שנות המחקר. תוצאות המחקר בשנה השלישית (2017) תמכו בתוצאות המחקר בשתי שנות המחקר הראשונות, אם כי רמת הנגיעות בשנה זאת הייתה הנמוכה ביותר, רק שתי חלקות תפוח נגיעות מבין החלקות שנבדקו. מרבית בחינת השונות הגנטית בין התבדידים נעשתה ב 2017. פעילויות שנעשו במו"פ במהלך תקופה: במהלך שנות המחקר הוצגו תוצאות המחקר - (i) בכנסי מגדלי תפוח ואגס בראש פינה, (ii) בסיורים למדריכים ואנשי מקצוע שאורגנו במו"פ צפון ב 2015 וב 2016. ו (iii) בכנס 1<sup>st</sup> ISFB שהתקיים בג'ירונה, ספרד, (vi) 2017 - סמינר לתלמידי תואר שני בתל חי.

בעיות שהתעוררו, והמלצות להמשך המחקר או שינוי במחקר: המחקר לא נתן תשובות ברורות לשלוש נקודות שנבחנו: (i) האם יישום נחושתי בשילוב עם סטרנר על פי המודל יעיל להפחתת נגיעות החירכון בתפוח. יחד עם זאת, נוצלה הפלטפורמה של הניסוי לבחון השפעת יישום נחושתי על שיעורי האבקה, חנטה ונתוני פרי. נמצא, כי יישום תכוף של תכשירי נחושת בזמן הפריחה פוגע בחנטה, כתלות במרחק מהזן המפרה בחלקה. תוצאות ניסוי זה מוצגות בדו"ח נפרד (ii) האם הרחקת ענפים נגיעים מהעץ בתפוח מפחיתה נגיעות בשנה העוקבת. (iii) מרבית הנתונים מעידים כי המקור של גורם המחלה במטעי התפוח הוא מחלקות אגס נגיעות סמוכות. הממצא כי יש הבדלים ברמת האלימות של תבדידים שבודדו מאגס לבין אלה שבודדו תפוח, יכול לנבוע בשל ירידת אלימות תבדידי החירכון לאחר המצאותם על התפוח. על מנת לבחון הבדלים אלו ביסודיות יש לחזור על ניסוי האלימות עם תבדידים שבודדו כולם באותה שנה, ומחלקות סמוכות. נושאים אלו יכולים להבחן בעונה הקרובה על ידי שימוש בהדבקות מכוונות.

תודות: למשה רודף שלום וליאור בביש מנאות גולן, שעזרתם הרבה תרמה להעמדת ניסוי התכשירים. תודות לדיוויד ממטע אלרום, ולמיכאל פרץ בעל המטע בקדש, ותודות רבות לרמי רולף, רז דפני, ולראיד חוסן על יישום התכשירים.