



2015-2016 דו"ח דו שנתי מוגש למדען משרד החקלאות – תקציב לקליטת חוקרים חדשים.

שם התוכנית: פיתוח אמצעים למניעת הנזקים הנגרמים בזן התפוח 'פינק לידי' על ידי החיידק *Erwinia amylovora* המחולל את מחלת החירכון
שמות השותפים למחקר: מרי דפני ילין, דני שטיינברג, שולמית מנוליס-ששון, מרים זילברשטיין, יהודית מוי ואורלי מאירייס.
סטטוס התוכנית: נמשכת
מועד התחלה וסיום התוכנית: 2015-2017

רקע: 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 באוויר 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 לחזות אירועי הדבקה במטעי האגס ולתת המלצות לטיפול. לאחרונה מרבית הדיווחים בארץ על נזקי חירכון במטעי תפוח מהזן 'פינק לידי', זן חדש ומבטיח בעולם. פריחתו של זן זה הינה מוקדמת יחסית לזני התפוח בארץ ומתרחשת ביחד עם פריחת האגס, מה שמעלה את רגישותו להדבקה. שימוש במודל "גרעין ופרח" עשוי להתאים גם לתפוח 'פינק-לידי' באם התנאים האופטימליים להדבקה בחירכון דומים בין תפוח ואגס, ואוכלוסיות התבדידים זהה מבחינה אפידמיולוגית.

מטרות המחקר

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

מטרות ביניים: (i) הערכת יכולת מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח" לחזות ולטפל על פי החיזוי בחירכון בתפוח בזן 'פינק לידי'. (ii) מעקב אחר התקדמות המחלה בתוך עץ 'פינק לידי' נגוע ובין עצים במטע, ובחינת היכולת לעצור התקדמות זאת ע"י טיפולי סניטציה. (iii) אפיון שונות גנוטיפית ואפידמיולוגית בין אוכלוסיות ה *E. amylovora* בתפוח ובאגס.

מהלך המחקר ושיטות עבודה:

1. הערכת יכולת מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח" לחזות ולטפל על פי החיזוי בחירכון בתפוח.
1.1. בחינת התאמת מערכת תומכת החלטות מקומית "גרעין ופרח" בזן 'פינק לידי': בכדי לבחון התאמה של מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח" שפותח באגס לחיזוי חירכון בתפוח נערך מעקב

ב 24 חלקות מסחריות לא מרוססות כנגד חירכון (ניטעו בין השנים 2003 ל 2013) יחד עם איסוף נתוני מזג אויר 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, נאספו נתונים במטע על תחילת הופעת המחלה. לאחר הפריחה, בחודשים יוני ויולי, תועדה רמת חומרת המחלה על פי מפתח הערכת נגיעות: 0- מטע בריא, כאשר סימני הנגיעות לא נראים כלל; 1- המחלה נוכחת, כאשר בחלק מהעצים (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 רבים (50%-25%) יש נגיעות ובחלק קטן מהעצים (עד 5%) יש נגיעות של כמה עשרות תפרחות נגיעות לעץ. 4 - נגיעות גבוהה, במרבית מהעצים (יותר מ 50%) יש נגיעות ובעצים רבים (עד 25%) יש כמה תפרחות נגיעות לעץ. 5- נגיעות גבוהה מאוד, במרבית העצים (יותר מ 50%) יש כמה עשרות תפרחות נגיעות לעץ. נתוני הופעת המחלה נבחנו בהשוואה לתחזית מערכות תומכות החלטה "גרעין ופרח" ו"Maryblyt" שפותחה בארצות הברית, כאשר ב "Maryblyt" צוינה לחות רק החל מ 4 שעות לחות ביום.

1.2 טיפולי תכשירי הדברה: בחינת יעילות טיפול בסטרנר 0.2% ונחושתן 0.1% על פי חיזוי המודל בהשוואה לטיפול פעמים בשבוע. הניסוי הועמד בשתי חלקות – בלוע אביטל במשק אלוהם ובעמק קדש בחלקה של הישוב אביבים. הטיפולים: יישומים ניתנו על פי התרעות של גרעין ופרח או פעמים בשבוע במהלך הפריחה (טבלה 1+2). ספירת הניסוי נעשתה באמצע יוני.

טבלה מס' 1: יישומים בתקופת הפריחה בתפוח מזן פינק לידי בלוע אביטל. נפח הריסוס ניתן עד נגירה.

תאריך	נפח תרסיס (ליטר/דונם)	מצב פריחה	ריסוס על פי התרעות	ריסוס קבוע בפריחה
27 למרץ	254	7%	+	+
31 למרץ	254	60%	+	+
4 לאפריל	145	שיא+1		+
7 לאפריל	150	סוף		+

טבלה מס' 2: יישומים בתקופת הפריחה בעמק קדש. נפח תרסיס 120 ליטר לדונם.

תאריך	מצב פריחה	ריסוס על פי התרעות	ריסוס קבוע בפריחה
16 למרץ	3-5%	+	+
20 למרץ	10%	+	+
23 למרץ	20-25%		+
26 למרץ	40-60%	+	+
30 למרץ	100%	+	+
3 לאפריל	שיא +1		+
6 לאפריל	שיא+4		+
10 לאפריל	סוף פריחה	+	+

1.3. בחינת חיוניות גרגירי אבקה ובדיקת אחוז חנטה בעקבות מספר טיפולים בנחושת מורשית: ריסוס ב 0.1% נחושתן ניתן במהלך שיא פריחה במשך יומיים. לפני תחילת הניסוי נבחרו 10 תפרחות לעץ מארבעה עצים צמודים לטיפול עם פרחים פתוחים עם אבקנים בשלים וכוסו בשקיות רשת. המועדים ליישום: (1) יישום ביום הראשון, (2) יישום ביום השני, או (3) יישום ביום הראשון והשני.

בהשוואה לביקורת לא מטופלת. בתום הריסוסים ביום השני, נלקחו הפרחים למעבדה לבחינת שיעור הנביטה לאחר אינקובציה של האבקנים בתמיסת הנבטה המכילה 10% סוכרוז, $2 \times 10^{-3} \text{ M H}_3\text{BO}_3$ ו $3 \times 10^{-6} \text{ M Ca(NO}_3)_2$. הניסוי נעשה על תפרחות מחלקת תפוח מהזן פינק לידי במטולה פעמים.

1.4 בחינת שיעור הנטה בטיפולי נחושת בהשוואה לעצים לא מטופלים בתפוח: מבין העצים בניסוי תשירי ההדברה (סעיף 1.2) נבחרו 12 עצי ביקורת ו 10 עצים מהטיפולים השונים. בכל עץ סומנו ארבע תפרחות לענף כאשר כל תפרחת מכילה שבעה פרחים, על גבי ארבעה ענפים, סה"כ 16 תפרחות לעץ. נתוני החנטה של אלרום נאספו בתאריך 13/6/16 והקטיף התבצע ב 18/10/16. הניסוי התבצע גם בחלקת קדש, אך בשל פעילות אגרנטית של החקלאי לא ניתן היה לבחון את התוצאות.

2. מעקב אחר התקדמות המחלה בתוך עץ 'פינק לידי' נגוע ובין עצים במטע:

2.1 התקדמות המחלה: ביצוע מעקב אחר התקדמות המחלה התבצע על ידי סימון 120 תפרחות נגועות הממוקמות באופן שונה בעצים שאינם מטופלים. התפרחות נלקחו מ 5 שורות, בכל שורה 4 עצים ברצף, בתחילת ובאמצע שורה ובכל עץ סומנו 6 תפרחות. בין החודשים מאי - אוגוסט בחנו את הענפים הנגועים אחת לחודש. ב 2015 הניסוי נערך במטע תפוח בעמק קדש (חלקת הישוב אביבים) שבגליל ובאפיק שבדרום הגולן, ב 2016 רק בקדש. ההתקדמות בכל תפרחת נמדדה אחת לחודש מתחת לפריחה. **2.2 טיפולי סניטציה:** לבחינת השפעת הסניטציה על הנגיעות בחורף או בקיץ. הטיפולים נעשו 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. במלכיה ובאביבים (עמק קדש). גיזום דומה נעשה בשורות שכנות בקיץ 2016, והתוצאות יבחנו במהלך 2017.

3. אפיון תבדידי *E. amylovora* בתפוח:

3.1 בידוד ובחינת עמידות לסטרנר: תבדידים 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 ציקלוהקאמיד ו 20 ppm תמיסת thallium nitrate. התבדידים נשמרו ב 20% גליצרול במקפוא בטמפרטורה של -80°C .. אנליזת PCR וריצוף עם הפרימרים A: $5'$ -CGGTTTTTAACGCTGGG-3' ו B: $5'$ -GGGCAAATACTCGGATT-3' בוצעה לצורך זיהוי וודאי של הפתוגן.

3.2 חיוניות חירכון לאורך השנה בענפי תפוח מהזן פינק לידי: במהלך שנת 2015 נאספו תפרחות נגועות ונבדקה חיוניות החיידקים כמתואר בסעיף 3. התבדידים נאספו מחלקות שונות. ב 2016 כל חודש נאספו 10 תבדידים מחלקת קדש. בשל מיעוט חלקות פינק לידי נגועות, נאספו 10 תבדידים גם מחלקת תפוח מהזן סנדאונר של קיבוץ יפתח שדומה במועד הפריחה והקטיף לזן פינק לידי.

4. אפיון שונות גנוטיפית: על מנת ללמוד את הדינמיקה של אוכלוסיית החירכון בעולם פותחו פרימרים המבחינים בין תבדידים המשתייכים לקבוצות CRISPER שונות (Rezzonico Fabio), מידע שטרם

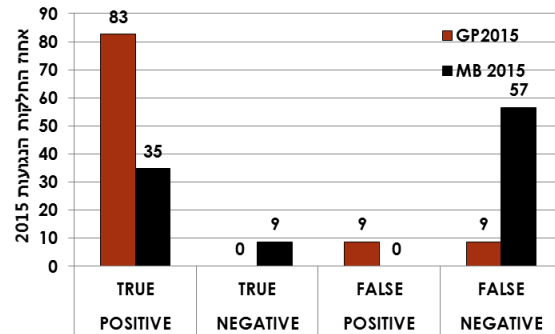
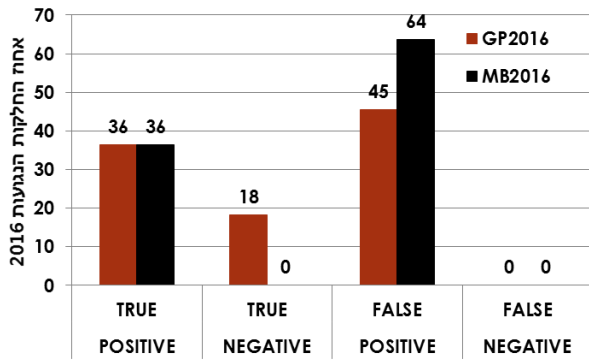
פורסם, לבקשת Rezzonico לא נרשמו כאן הרצפים). הפרימרים ששימשו לאנליזה: C1f04 ו C1rf09. התוצרים הפולימורפים הורצו על גיל 1.2% לקבלת תוצרים 215 bp, 275 bp, או ללא תוצר. לביקורת שימשו הפרימרים A ו B. על מנת לוודא כי הבנד החסר הינו מאפיין קבוצה גנוטיפית, נערך PCR נוסף של מקטע המכיל 2500 bp, שהורם על ידי הפרימרים: C1f1 ו C1r1 והתוצר ישלח בשנת המחקר השלישית לריצוף לצורך אפיון האזור.

5. בחינת שונות במידת האלימות בין תבדידי תפוח ואגס: באביב 2016 נאספו 4 תבדידים מתפוח ושלושה תבדידים מאגס גודלו למשך לילה במצע מזון נוזלי NB, ונמהלו במים סטרילים לשישה ריכוזים בטווח של 10^2 ל 10^7 חיידקים למ"ל. להדבקת ענפים עם תפרחות בהם פרחים חיוניים. התפרחות נאספו ממטעי תפוח מהזן 'פינק לידי' בתל פרס בתקופת האביב. גיזום הענפונים נעשה במעבדה חמישה ס"מ מתחת לתפרחת. הענפונים ננעצו בתוך ספוגים רוויים במים. הניסוי הועמד ב 3 חזרות כל חזרה מהווה ענף עם לפחות 3 תפרחות בהן פרחים פתוחים. התפרחות הוכנסו לתא גידול בטמפרטורה של 22°C וכוסו בניילון לשמירה על לחות גבוהה. לאחר 12 שעות הוסר הכיסוי. מצב התפרחות נבחן כל 3 ימים. למשך שלושה שבועות. בתום הניסוי נבחנו התפרחות למידת חיוניות. תפרחות מדגמיות נכתשו ונזרעו על CCT לבחינת נוכחות חיידק החירכון.

תוצאות השנה הראשונה והשנייה:

1.1 על מנת לבחון את התאמת מערכות תומכות החלטה לטיפול בחירכון בפינק לידי ביצענו תצפיות בחלקות פינק לידי הנמצאות באזורים גאוגרפים שונים. כחודש לאחר הופעת הנגיעות לראשונה, הוערכה עוצמת הנגיעות בחלקות. ב 2015 מצאנו כי ב 21 מתוך 24 החלקות היתה נגיעות ברמות שונות. שלוש עשרה חלקות היו נגיעות בעוצמת נגיעות נמוכה כאשר נראתה נוכחות בעד 5% מהעצים בתפרחות בודדות. רק בשתי חלקות נמצאה נגיעות ברמה גבוהה מאוד וניתן היה לראות במרבית העצים עשרות תפרחות נגיעות. הופעת הנגיעות לראשונה בכל החלקות התרכזה סביב חמישה מועדים: (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 שבגולן) נראתה נוכחות ב 5% מהעצים בתפרחות בודדות ובחלקה אחת, בקדש, ראינו נגיעות גבוהה כאשר בעצים רבים נמצאה נגיעות של 10-5 תפרחות נגיעות לעץ. ב 5 חלקות הנגיעות הופיע בעיקר סביב מועד אחד (25/4/16) ובשלוש החלקות הנותרות הנגיעות זוהתה נגיעות בתאריכים 2/5/16, 5/5/16, 9/5/16 יותר מ 15 ימים לאחר תום הפריחה.

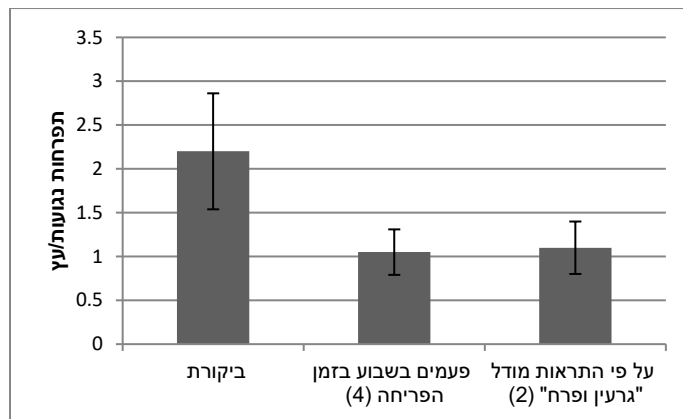
ב 2015 83% ממקרי הנגיעות נצפו על ידי המודל גרעין ופרח וב 2016 רק 36%, כאשר הנגיעות הופיעה 9-14 יום לאחר התראה. המודל "Maryblyt" חזה ב 2015 35% מהאירועים וב 2016 36%. סך כל מספר ימי ההתראה ב 2015 ו 2016 היה גבוה פי 1.2 ו 1.7, בהתאמה, במודל של "Maryblyt" ביחס למודל "גרעין ופרח" (תמונה 1).



תמונה מס' 1: בחינת אחוז החלקות בהם הופיע חירכון על פי מודל "גרעין ופרח" (GP) ו (MB) Maryblyt בשנים 2015 ו 2016. החלקות חולקו לפי היחס של ההתרעות להופעת הנגיעות: (i) יש התרעה במודל ונצפתה נגיעות (True positive), (ii) אין התרעה על פי המודל ולא נראתה נגיעות (True negative), (iii) אירועים אשר נחזו על ידי המודל אך לא התקיימו (False positive), ו (iv) אירועים אשר התקיימו אך לא נחזו (False negative).

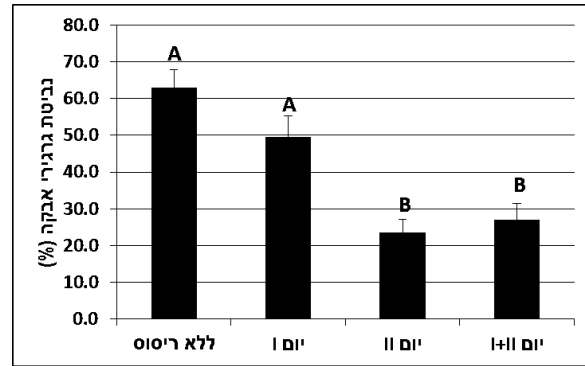
1.2 בחינת יעילות טיפולי נחושת וסטרנר בתפוח פעמים בשבוע או על פי התרעות מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח": בחלקת אביבים בעמק קדש טיפול בנחושתן וסטרנר הפחית נגיעות בהשוואה לביקורת שניתן פעמים בשבוע או על פי התראות המודל. ההשפעה לא הייתה מובהקת כפי הנראה בשל רמת נגיעות נמוכה בחלקה עם 2.2 תפרחות נגיעות לעץ בממוצע בביקורת הלא מטופלת (תמונה מס' 2). בלוע אביטל (חלקת קיבוץ אלרום), לא נמצאה כלל נגיעות בכל הביקורות הלא מטופלות וכן בטיפול של יישום נחושתן פעמים בשבוע. רק בחזרה אחת נמצאה נגיעות בטיפול נחושתן על פי התרעות מזג האוויר.

תמונה מס' 2: יעילות הטיפול בסטרנר ונחושתן במטע תפוח התוצאות המוצגות הינן ממוצע ± שגיאת תקן.



1.3 בחינת חיוניות גרגירי אבקה ובדיקת אחוז חנטה בעקבות מספר טיפולים בנחושת מורשית: שני ריסוסים יום אחר יום בנחושתן הורידו את חיוניות גרגירי האבקה באופן מובהק פי 2.3. פגיעה המשמעותית נראתה לאחר ריסוס של יומיים ברצף, אך גם אם ניתנה פעם אחת ביום של איסוף גרגירי האבקה ניתן לראות פחיתה מובהקת בחיוניות ($HSD P < 0.05$, תמונה 3). בניסוי נוסף שנעשה כמה ימים מאוחר יותר באותה החלקה (תוצאות לא מוצגות), הפגיעה של שני ימי ריסוס רצופים הורידה מחיוניות גרגירי האבקה באופן מובהק פי 3.8 ביחס לביקורת.

תמונה מס' 3: חיוניות גרגירי אבקה בעקבות ריסוס בנחשתן. חיוניות גרגירי אבקה בעקבות ריסוס אחד או שנים. חלקת תפוח מהזן פינק לידי במטולה. איסוף האבקה של כל הטיפולים נעשה ביום השני לניסוי.

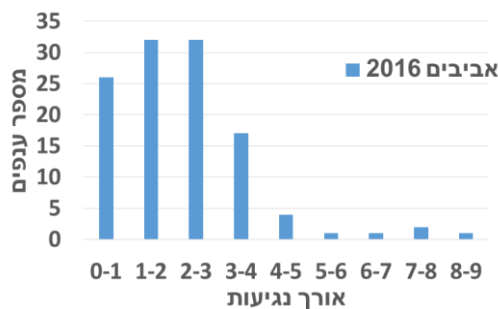
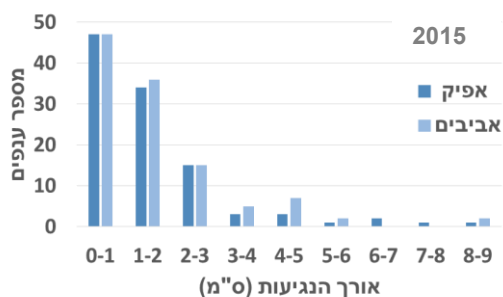


1.4 בחינת שיעור חנטה בטיפולי נחשת בהשוואה לעצים לא מטופלים באגס: בין הטיפולים השונים לא נראתה השפעה של טיפול בנחשתן על שיעור חנטה, גודל הפרי ומספר הזרעים הממוצע לפרי. התוצאות מוצגות בטבלה מס' 3. ניתוח רב גורמי הראה כי לכיוון השורה השפעה גבוהה על קוטר הפרי ($P < 0.001$). בשנה הבאה אנו נשים דגש על בחירת תפרחות על פי כיוון השורה מרחק מזנים שכנים.

טבלה מספר 3: תוצאות ניסוי ריסוס תערובת נחשתן 0.1% וסטרנר 0.2% על פי מועדים שונים וההשפעה על שיעור חנטה ותפרחות שחנטו לעץ, משקל, קוטר ומספר זרעים ממוצע לפרי. הניסוי נערך בלוע אביטל בזן בתפוח פינק לידי. בין הטיפולים לא נראה הבדל מובהק על פי ניתוח שונות חד גורמי (Anova). ערכי P לכל גורם מוצגים בטבלה.

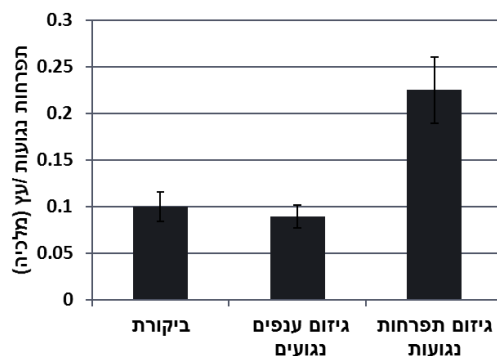
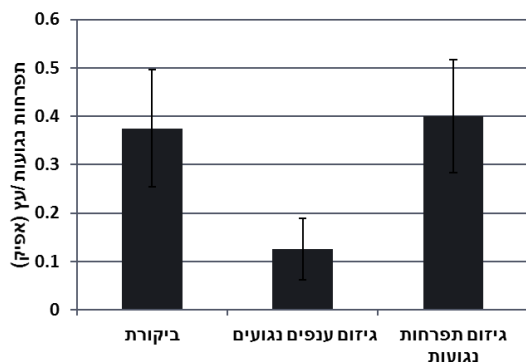
טיפול	חנטים לעץ (%)	תפרחות שחנטו (%)	משקל (ג')	קוטר (מ"מ)	זרעים
ביקורת	7.7	87.5	188.3	74.9	6.6
לפי התראה	8.4	92.5	196.7	76.9	6.5
פעמים בשבוע	8.9	90.0	193.1	76.9	6.7
P value	0.6206	0.8506	0.0887	0.0199	0.9111

2. מעקב אחר התקדמות המחלה בתוך עץ 'פינק לידי' נגוע ובין עצים במטע:
2.1 התקדמות המחלה: מתוך הענפים שנדגמו עד אוגוסט 2015, נראתה התקדמות של 1-2 ס"מ ב 96% מהמקרים ורק ב 4% ההתקדמות הייתה גבוהה מ 9-5 ס"מ לתוך הענף (תמונה 4). בחודש אוגוסט 2015, מבין הענפים שנבחנו הייתה התקדמות של המחלה רק ב 5% ו 10% מהענפים באפיק ובאביבים בהתאמה בפחות מ 0.4 ס"מ. 8% מכלל הענפים נשברו במהלך תקופת המדידה ובשל כך לא נלקחו נתונים לניתוח הסטטיסטי. ב 2016 התוצאות שהתקבלו היו דומות כאשר רק ב 4% הגיעה הנגיעות ל 5-9 ס"מ.



תמונה מספר 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 ב 2015 באוגוסט וב 2016 בספטמבר.

2.2 טיפולי סניטציה: התוצאות מראות כי גיזום הענפים הנגועים (גיזום עד הצומת הקרובה) בחורף מפחית את הנגיעות החדשה, וכי גיזום רק של התפרחות (גיזום מתחת לדורבן הנגוע) מעלה את שיעור הנגיעות. התוצאות שהתקבלו אינן מובהקות סטטיסטית, כפי הנראה בשל הרמה הנמוכה של הנגיעות. ב 2016, באפיק 20% בלבד מהעצים היו נגועים והכילו בין 1 ל 3 תפרחות נגועות בלבד. במלכה רק 10% מהעצים היו נגועים, כאשר בין 1 ל 2 תפרחות היו נגועות לעץ (תמונה מס' 5).



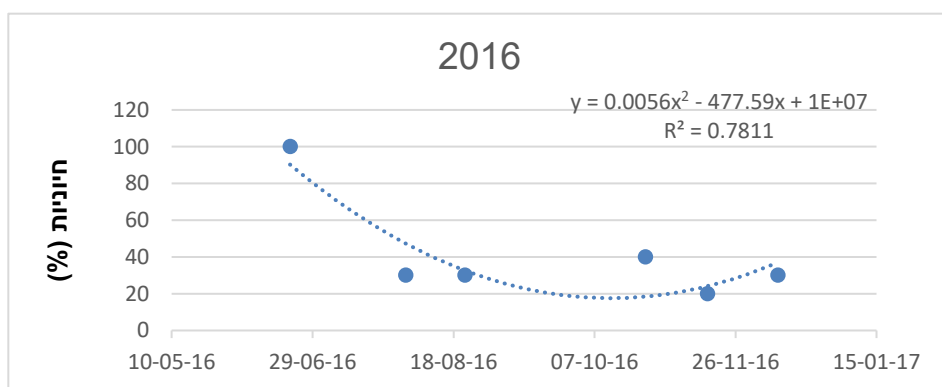
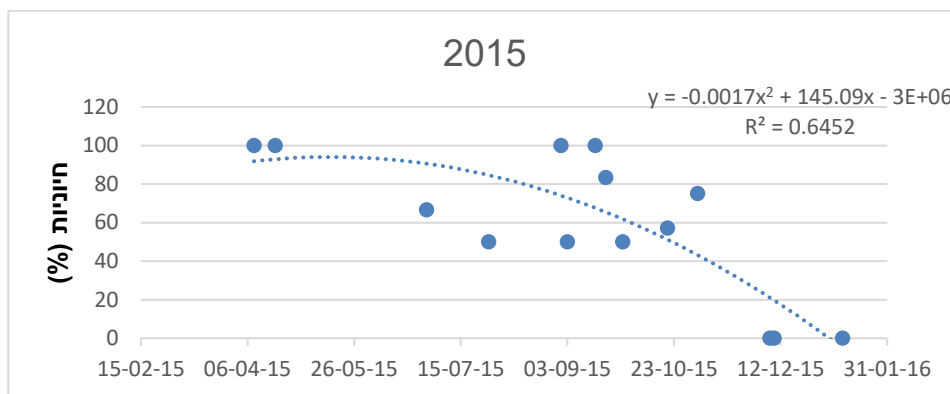
תמונה מס' 5: גיזום תפרחות או ענפים נגועים בהשוואה לביקורת בה לא הורדנו כלל את התפרחות הנגועות. התוצאות המוצגות הינן ממוצע \pm שגיאת תקן.

3. אפיון תבדידי *E. amylovora* בתפוח:

3.1 בידוד ובחינת עמידות לסטרנר: ממטעי פינק לידי נגועים בחירכון, בודדו החיידקים על צלחות עם מצע סלקטיבי של CCT. שלושים ושלושה תבדידים מ 8 חלקות פינק לידי נשמרו ב -80°C . בנוסף נבדקה עמידות של 22 תבדידים לסטרנר 6 תבדידים (27%) גדלו על 5 ppm סטרנר, ותבדיד אחד בלבד (4.5%) גדל על 50 ppm.

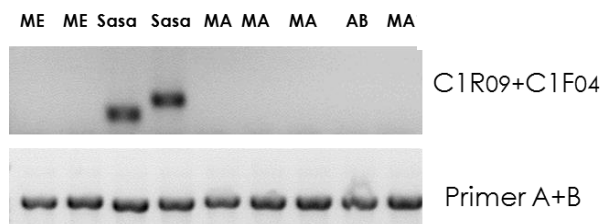
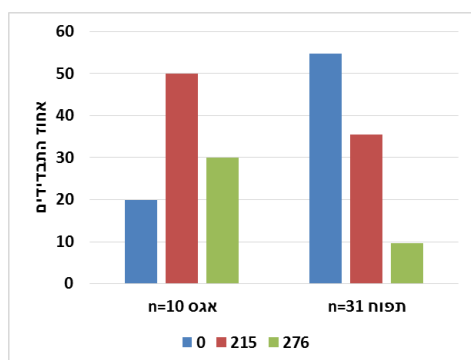
3.2 בחינת חיוניות חירכון לאורך השנה: בתמונה מס' 6 ניתן לראות כי באפריל 2015 בכל התפרחות שנבדקו נמצאו חיידקים חיוניים. חיוניות החיידקים הלכה וירדה במהלך השנה ובדצמבר 2015 לא נמצאו חיידקים חיוניים בתפרחות הנגועות. ביוני 2016 נראה גידול על צלחות של 100% כאשר לאורך

השנה הייתה ירידה משמעותית בחיוניות, אך היא לא אבדה לחלוטין במהלך דצמבר (תמונה מס' 4). חיוניות התבדידים כפי שנבחנה בסנדאונר ב 2016 הראתה ערכים דומים לזו שנבחנה בזן פינק לידי.



תמונה מס 6: חיוניות תבדדי תפוח מהזן פינק לידי לאורך השנה 2015 ו 2016.

4. אפיון שונות גנוטיפית: בתמונה מס' 7 ניתן לראות כי קיימים בארץ 3 טיפוסים של חירכון. טיפוסים אלו נבדלים זה מזה על פי שימוש בפרימרים C1F04 ו C1R09 המזהים קיומם של רצפים בגדלים שונים של 276 bp ו 215 bp או בהעדר רצף זה (0 bp). 3 הטיפוסים נמצאו גם בתבדדי תפוח וגם בתבדדי אגס, אם כי היחס בין הטיפוסים שונה, בעוד שבאגס התבדיד הנפוץ הוא של 215 bp, בתפוח התבדיד הנפוץ חסר בנד בשימוש עם הפרימרים הנ"ל. על מנת לוודא כי הבנד החסר הינו מאפיין קבוצה גנוטיפית, נערך PCR נוסף של מקטע המכיל 2500 bp, שהורם על ידי הפרימרים: C1f1, ו C1r1 והתוצר נשלח בימים אלו לריצוף לצורך אפיון האזור.



תמונה 7: שימוש בסמנים גנטיים מבוססי רצפי CRISPER לבחינת שונות בין תבדידי חירכון. מצד ימין: תוצאות ראקציה ה-PCR עם פרימרים C1R09 + C1F04 של האזור המבדיל, ופרימרים B+A המזהים חירכון לביקורת. מצד שמאל נמצאה גרף המשקף את התפלגות התבדילים בין הטיפוסים השונים בין תבדידי התפוח לתבדידי האגס. ME=מטולה, MA=מלכיה, AB=אבירים.

5. אפיון שונות פנוטיפית: במשך 22 יום לא נראו הבדלים בחיוניות הפרחים בין התפרחות בריכוזים השונים וכן בביקורות שלא הדבקו. 33 ימים לאחר הדבקה התפרחות נכתשו לבחינת נוכחות חיידקים. אורך הנגיעות לאחר ההדבקה ואחוז התפרחות הנגועות מצוינות בטבלה מס' 4.

טבלה מס' 4: אורך נגיעות ואחוז תפרחות נגועות כתוצאה מהדבקה בריכוזים שונים של חירכון לעומת ביקורת ללא הדבקה מלאכותית.

% תפרחות נגועות		אורך נגיעות בס"מ		ריכוז תבדיד
תפוח	אגס	תפוח	אגס	
84.4	88.9	6.53	5.08	ללא הדבקה
81.9	67.4	6.42	6.44	1.0E-07
84.0	74.2	7.29	6.56	1.0E-06
76.4	90.2	5.92	11.64	1.0E-05
85.4	100.0	7.63	7.33	1.0E-04
80.6	73.6	2.27	7.98	1.0E-03
84.7	93.0	4.59	6.33	1.0E-02

לסיכום השנה הראשונה והשנייה:

לצורך פיתוח אמצעים למניעת הנזק הנגרם על ידי החיידק *E. amylovora* בזן 'פינק ליד' מצאנו בשתי שנות המחקר הראשונות כי: (i) על ידי הצלבה עם נתונים שנאספו מתחנות מטאורולוגיות סמוכות למטעים, מערכת תומכת החלטה "גרעין ופרח" חזתה את מועד הופעת המחלה ב 2015 ב 83% מהמקרים ואילו המודל Maryblyt חזה נגיעות בשיעור נמוך יותר של 35%. ב 2016 הנגיעות שנראתה בחלקות התפוח והאגס הייתה נמוכה יחסית. שני מערכות תומכות החלטה חזו את הנגיעות באופן דומה אך "גרעין ופרח" חסך 40% ימי עבודה. טיפול עם נחושתן וסטרנר על פי המודל נבחן שנה אחת בחלקות עם רמת נגיעות נמוכה וצריך להבחן שוב בשנת המחקר השלישית. חיוניות גרגירי האבקה נפגעה כתוצאה משימוש יומיומי בנחושת. נראה כי אין פגיעה בשיעור החנטה אבל יש לחזור על הניסוי בשנת המחקר השלישית. (ii) בשתי חלקות שונות האחת בגולן והשנייה בגליל נראה כי במרבית הענפים ההתקדמות הייתה נמוכה ורק ב 4% ההתקדמות הייתה בטווח שבין 5 ל 9 ס"מ. מה שמעיד על התקדמות מועטה יחסית של המחלה במהלך העונה אשר בחודש יולי נעצרה כמעט לגמרי. ב 2015 ראינו כי אובדת חיוניות החירכון בענפים בדצמבר. ב 2015 עדיין נראו ענפים חיוניים ייתכן כי בשל

הטמפרטורות הגבוהות בתחילת החורף. ניסוי יעילות הגיזום בחורף לא הראה תוצאות מובהקות וצריך לחזור ולהבחן בשנת הניסוי השלישית. (iii) מבין תבדידי התפוח והאגס נמצאו 3 טיפוסים גנוטיפים שונים המבוססים על רצפי CRISPER, התפלגות התבדידים בין אוכלוסיות חיידקי החירכון בתפוח ובאגס הייתה שונה. בשנת המחקר האחרונה נבחן מספר גדול יותר של תבדידים, וכן נבחן תבדידים מחלקות שכנות לבחינת דמיון או שוני בין הטיפוסים השונים. הבדלים בין אלימות התבדידים של תפוח ואגס לא נראו בניסוי שנערך ב 2016 בשל זיהומים או בשל נגיעות שהייתה קימת בתפרחות מהשטח. יש לחזור על הניסוי בשנית ב 2017, לבחון את האלימות על תפרחות אגס (ולא על תפוח כפי שנעשה ב 2017) ולהפריד בין הטיפולים השונים על מנת למנוע אפשרות להדבקה לא רצויה.

ביצוע מול תוכנית (כחול - שינויים מהתוכנית הכתובה)

מטרות	2015	2016	2017
1. בחינת התאמת המודל "גרעין ופרח"	מעקב אחר נגיעות ב- 25 חלקות לא מטופלות	1. המשך מעקב נגיעות. 2. העמדת ניסוי תכשירי הדברה.	1. המשך מעקב נגיעות 2. העמדת ניסוי תכשירי הדברה בשתי חלקות
2. מעקב אחר התקדמות המחלה בעצים, וטיפולי סניטציה	סימון עצים נגועים שאינם מטופלים ומעקב התקדמות	1. המשך מעקב 2. העמדת ניסוי סניטציה ברעם, קדש	1. בחינת ניסוי סניטציה וניתוח תוצאות ברעם (סאונדאונר) וקדש (פינק לידי) 2. העמדת ניסוי סניטציה נוסף בשתי חלקות
3. אפיון שונות אפידמיולוגית וגנטית	1. איסוף תבדידים ובידודם על מצע מזון 2. בחינת עמידות לסטרנר	1. אפיון שונות גנוטיפית ע"י PFGE. במקום זה – נעשה אפיון על פי סמנים גנטיים (חורף). 2. בחינת שונות אפידמיולוגית בין תבדידים.	1. אנליזת ריצוף ובחינת שונות גנטית 2. בחינת עמידות לסטרנר 3. בחינת שונות אפידמיולוגית בין תבדידים

תודות: למשה רודף שלום וליאור בביש מנאות גולן, העמדת הניסוי התכשירים התקיימה בעקבות עזרתם הרבה. תודות לדיויד ממטע אלרום, ולמיכאל פרץ בעל המטע בקדש, ותודות רבות לרמי רולף, רז דפני, ולראיד חוסן על יישום התכשירים.