

היבטים אפידמיולוגיים והישרדות של הפטרייה
Fusarium mangiferae
גורם מחלת עיוות התפרחות והצימוח בעצי מנגו

עבודת גמר
מוגשת לפקולטה להחקלאות, מזון וסביבה
על שם רוברט ה. סמית
האוניברסיטה העיברית בירושלים
לשם קבלת התואר "מוסמך למדעי החקלאות"

מאת

עדי ביטון

דצמבר, 2011

רחובות

כסלו, תשע"ב

היבטים אפידמיולוגיים והישרדות של הפטרייה
Fusarium mangiferae
גורם מחלת עיוות התפרחות והצימוח בעצי מנגו

עבודת גמר
מוגשת לפקולטה להחקלאות, מזון וסביבה
על שם רוברט ה. סמית
האוניברסיטה העיברית בירושלים
לשם קבלת התואר "מוסמך למדעי החקלאות"

מאת

עדי ביטון

דצמבר, 2011

רחובות

כסלו, תשע"ב

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

דר' סטנלי פרימן, המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר
העשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן;
ופרופ' דני שטיינברג, המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר
העשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

עבודה זו מוקדשת לזכרה של אפרת גמליאל אטינסקי
שבהיכרות כ"כ קצרה השאירה חותם כ"כ עמוק

תודות

סטנלי ודני, תודה על התמיכה המקצועית לכל אורך הדרך ועל
הסבלנות האין סופית שגיליתם. למדתי מכם המון.
לחברי למעבדה שהיו נכונים לעזור תמיד, בייחוד תודה ענקית
למרסל שלימדה אותי את הצעדים הראשונים במעבדה ותמיד
הייתה שם כדאי ללוות, לתמוך ולהקשיב.
תודה לכל צוות המעבדה של דני ובעיקר למנחם שידע לתת
פיתרון יצירתי לכל בעיה ולרן שתמיד עזר מכל הלב.
תודה לאדי שהציב סטנדרטים חדשים לסבלנות וגילה
מקצועיות מרשימה בתחומו.
תודה לכל מי שעזר לסחוב, להרים, להשקות, לעשב
ולהתלכלך
ותודה אחרונה לאהבה החדשה בליבי שהפכה את התקופה
האחרונה לקסומה ומרגשת.

תוכן עניינים

1	תקציר
3	מבוא
5	סקירת ספרות
5	2.1 מחלת עיוות התפרחות והצימוח במנגו
6	2.2 הפתוגן <i>Fusarium mangiferae</i>
8	2.3 הפונדקאי <i>Mangifera indica</i>
9	2.4 בקרת המחלה
11	2.5 סיכום
12	שיטות וחומרים
12	3.1 חומר ביולוגי
12	3.2 מצעי מזון והרכבם
13	3.3 תנאי גידול הפטרייה
13	3.4 הכנת תמיסת נבגים לאילוח
13	3.5 אילוח הצמחים
13	3.6 בחינת איכלוס הפקעים
14	3.7 זיהוי הפתוגן
	3.8 שימוש ב Fluorescein diacetate (FDA)
15	כמדד לחיוניות הנבגים
15	3.9 תיאור הניסויים שבוצעו
	3.9.1 הישרדות נבגי הפטרייה <i>Fusarium mangiferae</i>
15	כתלות במשך החשיפה לשמש ובעוצמת הקרינה.
	3.9.2 בחינת השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים
	על שכיחות הפקעים המאוכלסים בפטרייה <i>Fusarium mangiferae</i>
17	שבוצעו בעצי מנגו צעירים

3.9.3 בחינת יכולת הישרדות הפטרייה *Fusarium*

mangiferae

18 על שטח פני הפרי ובציפה

3.9.4 בחינת יעילות הפונגיציד אוקטב בהגנה ובריפוי פקעים

מפני אילוח

19 בפטרייה *Fusarium mangiferae*

תוצאות

4.1 הישרדות נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae*

21 כתלות במשך החשיפה לשמש ובעוצמת הקרינה

4.2 השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים

על שכיחות הפקעים המאוכלסים בפטרייה

28 *Fusarium mangiferae*

4.3 הישרדות הפטרייה *Fusarium mangiferae*

על שטח פני הפרי ובתוך פרי המנגו בניסוי

30 שהתקיים במטע נגוע ובמטע שאינו נגוע

4.4 יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בהגנה ובריפוי

של פקעים מפני אילוח בפטרייה

31 *Fusarium mangiferae*

דיון ומסקנות

5.1 הישרדות נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae*

33 כתלות במשך החשיפה לשמש ובעוצמת הקרינה

5.2 השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים

על שכיחות הפקעים המאוכלסים בפטרייה

34 *Fusarium mangiferae*

5.3 הישרדות הפטרייה *Fusarium mangiferae*

על שטח פני הפרי ובתוך פרי המנגו בניסוי שהתקיים

36 במטע נגוע ובמטע שאינו נגוע

5.4 יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בהגנה ובריפוי

של פקעים מפני אילוח בפטרייה

36

Fusarium mangiferae

38

מקורות ספרות

תקציר

מחלת עיוות התפרחות והצימוח במנגו קיימת ברוב אזורי גידול המנגו בעולם וגורמת לנזקים כבדים לענף גידול המנגו. המחלה בארץ נגרמת ע"י הפטרייה *Fusarium mangiferae* Britz, Wingeld & Marasas. נבגי הפטרייה חודרים לרקמה הצמחית דרך חפי הפקע ומתבססים תוך יצירת חוסר איזון הורמונאלי, מטאבולי ונוטרייטי שמביא ליצירת תפרחות וצימוח וגטטיבי מעוותים. מהתפרחות לרוב לא ניתן לקבל פרי והן מהוות מקור לאינוקולום להדבקה.

מטרת מחקר זה היתה ללמוד על האפידמיולוגיה של הפתוגן שמשפיעה באופן ישיר על חומרת מחלת עיוות התפרחות והצימוח של המנגו. אופן השתמרותם של הנבגים ודרכי הפצתם מושפעים בין היתר מתנאים א-ביוטיים. לכן, על מנת לבחון את יכולתם להשתמר במטע הנגוע ולעבור בין מטעים, בחנו את רגישותם לקרני השמש בעוצמות שונות. נבגי הפטרייה נמצאו רגישים לקרינת שמש ישירה וחיותם פחתה ככל שמשך החשיפה היה ממושך יותר ובעוצמות קרינה חזקות יותר. גורם נוסף שמשפיע על ההפצה של הנבגים ועל חומרת המחלה הוא מזיק הנפוץ בגידולי מנגו: אקרית הפקע של המנגו *Aceria mangiferae*. תזונתן של האקריות מתאי האפידרמיס של חפי הפקע גורמת ליצירת פצעים מזעריים שדרכם יכולים הנבגים לחדור ביתר קלות ולהתבסס ברקמה הצמחית. לכן, נבדקה עוצמת המחלה ברקמה פצועה ביחס לרקמה לא פצועה. יתרה על כן, על מנת למצוא את התנאים המיטביים להדבקה נעשה האילוח בריכוז נבגים משתנה. פן נוסף אשר נבחן בהקשר זה הינו תרומתו של זמן התבססות ארוך לאחר האילוח לעוצמת המחלה ולהופעת סימפטומים בתפרחות. שיעור המחלה עלה באופן משמעותי כאשר הרקמה הצמחית נפצעה בזמן האילוח. זמן התבססות ארוך לפני בדיקת איכלוס בצמחים ואילוח בריכוזים עולים של נבגים עד לריכוז 10^6 , הביא לעלייה בשכיחות הפקעים המאוכלסים. כדי ללמוד את דרכי ההפצה של נבגי הפטרייה, בחנו את ההשערה שלפיה הנבגים מצליחים להשתמר ע"ג הפרי ו/או מצליחים לחדור לפרי ולאכלס את הציפה. במידה והפטרייה אכן שורדת בפירות, פירות מאוכלסים/נגועים עלולים לאחר הקטיף להפיץ את הפתוגן בין מטעים באמצעות כלים מכאניים או למדינות המייבאות את הפרי בנוסף לגידול מקומי. נבגי פטרייה חיוניים נמצאו על גבי קליפות הפירות במטע. אבל, היעדר איכלוס נבגים בתוך קליפות הפירות, מעלה את הסברה כי אין הם מסוגלים לחדור את קליפות הפירות. עד היום נבדקו ללא הצלחה טכניקות שונות לבקר את המחלה במטעים; פיתוח זנים עמידים, שימוש בהורמונים צמחיים, הדברה כימית ועוד. כיום עיקר המאמץ מושקע בפעולות סניטציה הדורשות השקעה כלכלית רבה ואינן מביאות להפחתה משמעותית בכמויות המידבק. למרות שנמצאו חומרי הדברה כימיים יעילים כנגד המחלה, אופן יישומם לא נחקר דיו. לכן, בחנו את היעילות שבשימוש בפונגיצידי פרוכלורוז, המעכב ביעילות את הפטרייה בצלחות פטרי, לפני ואחרי אילוח הצמחים במועדי

ריסוס שונים. השימוש בפונגיציד פרוכלורוז הביא ליעילות מקסימלית בהגנה על פקעים
מאילוח למשך שבועיים ממועד יישומו ובריפוי פקעים מאוכלסים כשלושה שבועות לאחר
ההדבקה.

מבוא

מחלת עיוות התפרחות והצימוח במנגו זוהתה לראשונה בהודו בשנת 1891 (Marasas et al 1993, Ploetz et al 2006). לפני כ- 35 שנה, זוהתה המחלה גם בישראל ובימינו היא מתפשטת בארץ ובעולם ומהווה איום על ענף גידול המנגו. הגורם למחלה בארץ זוהה כפטרייה *Fusarium mangiferae* Britz, Wingeld & Marasas (Marasas et al 2006).

מחלת עיוות התפרחות והצימוח גורמת לנזקים כבדים במטעי המנגו, החל מירידה בתפוקה ועד לאובדן מוחלט של כל היבול. בעקבות חדירת הפתוגן והתבססותו נגרם חוסר איזון הורמונלי, מטאבולי ונוטרייטי ברקמות הצמח (Chakrabarti 2011). בעקבות ייצור מוגבר של ציטוקינינים המופרשים מהפתוגן ומהרקמה החולה מופר האיזון ההורמונלי של העץ והתפרחות צומחות מעוותות (Van Staden and Nicholson 1989, Van Staden et al 1988, Ram et al 1983, Nicholson and Van Staden 1988, Singh 2006). התפרחות הנגועות מתייבשות על העצים במהלך הקיץ, כך שלרוב לא ניתן לקבל פרי מתפרחת חולה (Ploetz 1998, Kumar et al 1993). הן מהוות מקור אינוקולום להדבקה משנית לתפרחות סמוכות או בין עצים (Gamliel-Atinsky 2009b).

בשנים האחרונות מופיעה המחלה אף במטעים שטרם סבלו ממנה בעבר (קליין-גואטה 2003). במחקרים קודמים נמצא כי הנבגים מופצים בעיקר דרך האוויר ולכן הם חשופים לתנאים א-ביוטיים (Gamliel-Atinsky et al 2009 a). מכיוון שהנבגים חסרי מלינין, סביר להניח שהם רגישים לקרינה אולטרה סגולה (קליין-גואטה 2003),

אקרית הפקע של המנגו *Aceria mangiferae* נחשדה בעבר כמחוללת המחלה (Hassan 1944), אך נמצא כי האקריות מצויות בשכיחות גבוהה גם בעצים בריאים. הן נפוצות ברוח, נוחות על העלים ומוצאות את דרכן אל תוך הפקעים. האקריות ניזונות מתאי האפידרמיס של חפי הפקע תוך יצירת פצעים מזעריים ברקמה. במחקרים קודמים נמצא כי אותם פצעים משמשים, ככל הנראה, כנקודת חדירה של הנבג וכך להגברת עוצמת המחלה ושכיחותה (Gamliel-Atinsky et al 2009a).

אופן ההתמודדות עם המחלה מבוסס כיום בעיקר על סניטציה במטעים. פעולת הסניטציה דורשת השקעה כלכלית ולרוב אינן מספיק יסודיות. למרות שנמצאו חומרי הדברה כימיים יעילים כנגד המחלה, אופן יישומם אינו נחקר דיו (Gamliel-Atinsky et al 2009b,c). המטרה העיקרית של המחקר היא להרחיב את הידע הקיים בהיבטים אפידמיולוגיים של

הפתוגן ויכולת שרידותו אשר משפיעים באופן ישיר על חומרת מחלת עיוות התפרחות והצימוח של המנגו. המטרות של המחקר הן:

1. בדיקת רגישות נבגי הפטרייה לקרינת השמש.

2. קביעת ריכוז נבגים מינימאלי והשפעת תנאים מכאניים על הדבקה וקבלת סימפטומים בשתילים.

3. בדיקת יכולת הפטרייה לאכלס את קליפת הפרי ולשרוד במטע ובפרי הקטוף.

4. יעילות חומר ההדברה פרוכלורוז בהגנה על פקעים מהדבקה ובריפוי פקעים לאחר הדבקה בפתוגן.

סקירת ספרות

1. מחלת עיוות התפרחות והצומח במנגו

1.1 נזקי המחלה

מחלת עיוות התפרחות והצימוח במנגו *Mangifera indica* L. מהווה את אחד הפגעים ההרסניים ביותר בגידול המנגו בעולם (Gamliel-Atinsky et al 2009a). אובדן היבול במקרים חמורים יכול להגיע ל- 90% מסך היבול השנתי (Ploetz et al 2002). סה"כ התפוקה השנתית הגלובלית של מנגו בשנת 2004 נאמדה ב 26.5 מיליון טון עם מגמת עלייה לשנים לאחר מכן (Chakrabarti 2011). הנזק הנגרם בהודו, אשר מגדלת את מחצית מכמות היבול הגלובלי, נאמד בכ- 80% ומאיים להכחיד את ענף גידול המנגו ביבשת כולה (Chakrabarti 2011, Ploetz 1998).

1.2 התפשטות ותפוצת המחלה

בשנים שעברו מאז גילויה בהודו בשנת 1891 (Kumar et al 1993, Watt 1891), התפשטה המחלה למדינות שכנות ואף עברה בקצב מהיר יחסית בין היבשות אסיה, אפריקה ואמריקה. כיום המחלה נפוצה כמעט בכל אזורי גידול המנגו בעולם (Freeman et al 1999): ישראל, מלזיה, פקיסטן, מצרים, דרום אפריקה, סודן, אוגנדה, ברזיל, אל סלוודור, מקסיקו, ארה"ב וונצואלה ועוד (Marasas et al 2006, Ploetz 1998).

1.3 הגורם למחלה

בעבר, נשמעו טיעונים שונים ורבים בדבר הגורם למחלה (Kumar et al 1993). דובר על אקריות הפקע *Aceria mangiferae* כגורמות המחלה (Hassan 1944), על חוסרים תזונתיים (Prasad et al 1965), או על חוסר איזון הורמונלי (Dang and Daulta 1982). בשנת 1966 הצליחו חוקרים לבדוד מתוך תפוחת חולה את הפטרייה: *Fusarium subglutinans* Nelson, Tousson and Marasas ולקבוע שהיא הגורם היחידי למחלת עיוות הצימוח והתפרחות במנגו (Britz et al 2002, Summanwar et al 1966).

2. הפתוגן *Fusarium mangiferae*

2.1 זיהוי והגדרת הפתוגן

מאז שנת 1966 הוגדר הפתוגן מחדש כ- *Fusarium mangiferae* ונעשו בידודים נוספים שלו מתוך רקמה צמחית חולה (Varma et al 1974, Otero-Colina et al 2010, Freeman et al 1966, Lima et al 2009, Youssef et al 2007, 1999) ע"י שימוש בטכניקות בידוד זיהוי שונות. למשל, בשנת 1999, הפטרייה נבדקה וזוהתה כגורם למחלה ע"י שימוש בתבדיד מהונדס המסומן בגן ל- β -Glucuronidase (GUS) (Freeman et al 1999). בשנת 2002 תיאר Britz שני מינים של הפתוגן; *F. sterilihyphosum* שנפוץ בדרום אפריקה ו-*F. mangiferae* שנפוץ במצרים, ישראל, פלורידה ודרום אפריקה. *F. sterilihyphosum* זוהה ב 2009 גם בברזיל ע"י Lima. בשנת 2010, במקסיקו הושלם מבחן קור ע"י Otero-Colina עם *F. mexicanum*. באותה שנה חוקרים מסין הצליחו לראשונה להשלים את מבחן קור עם מין נוסף: *F. proliferatum* שבודד ממטעים נגועים בדרום סין (Zhan et al 2010).

2.2 שייכות פילוגנטית

את הפתוגן ניתן לשייך לקומפלקס מינים הנקרא *Gibberella fujikuroi* (Marasas et al 2009, Lima et al 2006). לקומפלקס משתייכים תשעה מינים; *F. sacchri*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. proliferatum*, *F. circinatum*, *F. mexicanum*, *F. subglutinans*, *F. sterilihyphosum* ו- *F. mangiferae*. בין המינים ניתן להבחין לפי אנליזה של רצפים גנטיים כגון: β -tubulin, histon H3 ופקטור אלוגנציה α EF1 (Lima et al 2009, Otero-Colina et al 2010, Steenkamp et al 2000).

2.3 המורפולוגיה של הפתוגן

F. mangiferae ידועה בצורתה האל מינית בלבד. התפטיר בעל מבנה מסועף, ממנו צומחים נבגים בצורת מגל. הנבגים יכולים להיות חד תאיים בגודל $2.5-3 \times 8-12$ מיקרומטרים או רב תאיים (עד 5 תאים לנבג) בגודל $3-4.5 \times 32-53$ מיקרומטרים. מופע הפטרייה ע"ג מצע PDA הינו תפטיר בעל מראה צמרירי בצבע לבן-כתום (Gamliel-Atinsky et al 2009 a, קליין-גואטה 2003).

2.4. דרכי ההפצה של הפתוגן

דרכי ההפצה של המחלה מובנות באופן חלקי. ההנחה העיקרית בנוגע להפצת נבגים בין מטעים היא ע"י העברה באמצעות שתילים נגועים ו/או הפצה ע"י הרוח. מניסוי שדה שבוצע לאחרונה (Gamliel-Atinsky et al 2009b) נמצאו כמויות גדולות של נבגי הפתוגן באוויר בתוך מטע נגוע, נתון שמרמז על הפצה ע"י הרוח כאמצעי מרכזי בהתפשטות המחלה. בבחינת דרכי ההפצה בין פקעים על אותו עץ ישנו פרמטר נוסף המשפיע באופן משמעותי על יכולת התפשטות המחלה וחומרתה; אקריות הפקע של המנגו *Aceria mangiferae* הנפוצה במטעים בריאים ונגועים, נושאת על גופה את נבגי הפטרייה וכך מהווה וקטור לפתוגן (Chakrabarti 2011, Gamliel-Atinsky et al 2009b).

2.5. חדירה והתבססות הפתוגן ברקמה

מניסוי אשר בחן מידת אכלוס של חלקי הצמח השונים בפתוגן לאחר אילוח בתנאים אופטימליים עלה כי נבגי הפטרייה התבססו בפקעים. מעבר לכך, נמצא כי הפתוגן אכלס יותר פקעים אמיריים מאשר צידיים (Gamliel-Atinsky et al 2009c).

בנוכחות אקריות הפקע התבססות הפתוגן טובה יותר. לפתוגן יש יכולת לחדור ביתר קלות את רקמת האפידרמיס של חפי הפקע דרך הרקמה הפצועה מתזונת האקריות (Gamliel-Atinsky et al 1993, Kumar et al 2009b). מחקרים קודמים הראו שהפתוגן מצליח לחדור גם לרקמה שאיננה פצועה (Freeman et al 1999, Ghosal and Chakrabarti 1989), ההבדל הוא בחומרת המחלה שכן פקעים אשר אולחו בנוכחות אקריות או לחילופין נפצעו באופן מכוון סבלו משכיחות פקעים מאוכלסים גבוהה יותר (Gamliel-Atinsky et al 2009c).

לאחר התבססות הפטרייה בפקעים יש לה יכולת לסנתז ולהפריש הורמונים צמחיים ביתר (בעיקר ציטוקינינים) הגורמים לחלוקה לא סדירה של התאים ולהתפתחות תפרחות וצימוח מעוותים. בנוסף להורמונים הצמחיים המופרשים ע"י הפטרייה, הרקמה הנגועה מייצרת גם היא ציטוקינינים השונים בהרכבם הכימי מהציטוקינינים המיוצרים ע"י העצים הבריאים (Van Staden and Nicholson 1989, Nicholson and Van Staden 1988).

2.6. התנאים הסביבתיים האופטימליים לפתוגן להדבקה ולהתפתחות מחלה

הדבקה והתפתחות מחלה מחייבות טמפרטורה בין 5-37 מ"צ. טמפרטורה של 28 מ"צ לנביטה ו- 25 מ"צ להתפתחות מחלה יחד עם 8 שעות של הרטבה הם התנאים האופטימליים להתפתחות מחלה. תנאים אלו תואמים את התנאים הסביבתיים באזורי גידול

המנגו בעולם כך שטמפרטורה ותנאי רטיבות אינם גורם מגביל והפתוגן מסוגל לשרוד בין עונות (Gamliel-Atinsky et al 2009c).

2.7. השרדות הפתוגן

קרינת השמש הינה גורם מגביל עבור יכולת הפטרייה לשרוד במטע. קרינת שמש ישירה יכולה להפחית את רמת המידבק במטע. היכולת של פטרייה להתגונן ממקי השמש תלויה בריכוז המלנין בדופן הנבגים (Rotem and Aust 1991). נבגי הפטרייה *F. mangiferae* חסרי מלנין ועל כן סביר להניח שהם רגישים לחשיפה ישירה לקרינת השמש (Gamliel-Atinsky et al 2009b, Atinsky et al 2009b קליין- גואטה 2003).

F. mangiferae מוגדרת כמחלת נוף. הפטרייה אינה מייצרת כלמידוספורות אך מסוגלת לשרוד בתוך רקמה צמחית הקבורה בקרקע (Youssef et al 2007). למרות שהפתוגן אינו מועבר סיסטמית דרך השורשים אל הנוף או דרך הזרעים, יכולת שרידותו של הפתוגן בקרקע עלולה להוות אינוקולום בעיקר כאשר משתמשים בקרקע כמצע לזריעת שתילים (Youssef et al 2007, Gamliel-Atinsky et al 2009b).

3. הפונדקאי: *Mangifera indica*

עצי מנגו שייכים למין *Mangifera* במשפחת האלתיים. המנגו ניתן לגידול באזורים טרופיים וסאב-טרופיים. הפריחה מתרחשת החל מאמצע החורף והבשלת הפירות בחודשי הקיץ המוקדמים. עצי המנגו יכולים להגיע לגובה של 30 מטרים אך בגידולים חקלאיים העצים בגובה 3-10 מטרים. הייבול מעץ אחד יכול להגיע לכ- 300 ק"ג פרי בשנה כאשר התנאים אידיאליים (Bally 2006).

3.1 סימפטומים בתפרחות ובצימוח של העץ

עיקר הסימפטומים ניכר בתפרחות של העץ. הפרחים של התפרחות המעוותות הם בד"כ זכרים ועקרים, הם צפופים, גדולים יותר מהפרחים הבריאים ומכילים עלי כותרת ואבקנים מרובים. הניצנים נפוחים ורדומים. תפרחות נגועות מתייבשות זמן קצר לאחר חנטת הפרי אך לרוב הן לא מניבות פרי ומהוות מקור אינוקולום להדבקה משנית לתפרחות סמוכות או ע"י הרוח בין עצים. (Ploetz et al 2002, Gamliel-Atinsky et al 2009b,c, Kumar et al 1993). סימפטומים נוספים של המחלה נצפים גם בצימוח הוגטטיבי של העץ, בעיקר בעצים צעירים. הצימוח מוגבר וצפוף של ענפים בעלי פרקים קצרים ועלים ננסיים מעוותים (Gamliel-Atinsky 2009b,c, Kumar et al 1993, Lima 2008).

3.2. פיזיולוגיה של העץ הנגוע

המחלה מאופיינת בחוסר איזון של חומרי הזנה, מטאבוליטים והורמונים. Singh הראה במחקרו משנת 1991 שרמות נמוכות מהרגיל של החומרי הזנה P, K, Ca והמיקרו-חומרי הזנה Fe, Zn, Cu, B לעומת רמות גבוהות של N ו-Mn מאפיינות פקעים נגועים בפתוגן. חוסר האיזון מתבטא גם ברמות שונות של מטאבוליטים כמו המטאבוליט השניוני מנגיפרין שנמצא בתפרחות מעוותות ברמות גבוהות (Ghosal and Chakrabarti 1989). מטאבוליט זה פועל כחלק ממנגנון ההגנה של הצמח ונמצא בריכוזים גבוהים בעקבות חדירה של הפתוגן. במחקר שפורסם ב Singh, 2006, הראה כי מנגפרין גורם לעלייה ברמות האוקסין בצמח ולפעילות מוגברת של אנזימים אוקסידנטים ואלו מביאים לפעילות אנטי-פטריתית. תגובת הצמח בביטוי יתר של מנגפרין באה לידי ביטוי באופן משמעותי בזן מנגו עמיד יחסית למחלה. תוצאות המחקר העלו את הסברה שהמנגפרין מתפקד כסטימולטור לאיזון חוסר היציבות ההורמונאלית והמטבולית הנגרם בעקבות התפתחות הפתוגן ברקמה הצמחית (Singh 2006). Shah et al ב-2009, חיזקו ממצאים אלו, והראו במחקרם שרקמות צמחיות נגועות בפתוגן מאופיינות ברמות נמוכות של מיקרוחומרי הזנה כגון Zn, Cu, Fe. יתרה על כן, הם הראו שלמיקרו-חומרי הזנה תפקיד חשוב בטרנסלוקציה של המנגיפרין ברקמות הצמחיות כקומפלקס יוני. מבחינה הורמונאלית, נמצאו ציטוקינינים ברקמה חולה שהיו שונים בהרכבם (נגזרות שונות של המולקולה) ובריכוזם מהציטוקינינים ברקמה בריאה (Van Staden and Nicholson 1989, Nicholson and Van Staden 1988, Van Staden et al 1989).

4. בקרת המחלה

חוסר הבהירות בנוגע לגורם המחלה, האטיולוגיה והאפידמיולוגיה של המחלה הביאו לחיפוש דרכים חדשות ומגוונות לבקרה על המחלה וניסיונות להדבירה (Chakrabarti 2011). עד היום ניסיונות לבקר את המחלה באופן יעיל נחלו הצלחה מועטה (Kumar 2011). פיתוח זנים עמידים, שימוש בהורמונים צמחיים ומוסטי צמיחה אחרים כמו KNO_3 נמצאו לא יעילים להגנה מיטבית על תפרחות בריאות (Chakrabarti 2011, Noriega-Cantú et al 1999). רק שילוב מושכל בין אסטרטגיות הדברה שונות הביא לפחיתה משמעותית בהתפשטות המחלה אך לא לריפוי רקמה נגועה (Noriega-Cantú 1999).

4.1. סניטציה

כיום, עיקר המאמץ בהדברת המחלה במטעים נגועים נעשה ע"י סניטציה (Ploetz et al 2002, Chakrabarti 2011). גזום והשמדה של תפרחות חולות מדי שנה יכול להוריד את האינוקולום במטע (López-Estrada et al 2005). לצורך כך הענף נחתך בין 20-80 ס"מ

מתחת לתפרחת החולה, מורחק מהמטע ונשרף (López-Estrada et al 2005,)
Chakrabarti 2011). ב Desai et al 1962 הצליחו להפחית את הופעתן של תפרחות
חולות ב 90% בעונת הגידול הבאה לאחר הגיזום. בספרו Chakrabarti (2011) סקר את
היעילות בהפחתת עוצמת המחלה ע"י סיניטציה במטע וכן גם הראה שקיימת מחלוקת בנוגע
ליעילות הטכניקה הן לתקופה ארוכת טווח והן לתקופה קצרת טווח. כשנתיים לאחר הגיזום
התחזקה עוצמת המחלה יותר ממידתה לפני הטיפול (Kumar and Beniwal 1992,)
López-Estrada et al 2005). גם לגבי יעילות הטיפול בטווח הקצר לא היו הדירות ונמצא
שהטכניקה לא יעילה לצורך בקרה על המחלה (Bindra and Bakhetia 1971, Kumar et al
2011). יישום הטכניקה מעלה מגבלות רבות, כגון הנגישות המוגבלת לחלקים הגבוהים
של העץ, העלות של כח אדם לצורך ביצוע הגיזום (Ploetz 1998), וההשפעה הפיזיולוגית
ודפוס הצמיחה הצפוף של העץ לאחר הגיזום (López-Estrada et al 2005).

4.2. חומרי הזנה

שימוש בתוספת חומרי הזנה כגון ריסוס בכלאטים של נחושת ואבץ הביא לבקרה חלקית ע"י
איזון רמות המיקרו-חומרי הזנה בחלקי העץ הנגועים (Ghosal and Chakrabarti 1989).
העלאה של רמות מיקרו-חומרי הזנה חסרים תרמה לטרנסלוקציה יעילה של רמות המנגיפרין
בצמח וכתוצאה מכך לתפקוד טוב יותר של מערכת ההגנה הצמחית ולהפחתה בהופעת
הסימפטומים (Shah et al 2009, Kumar et al 1993). אולם במקרים מסוימים תוספת של
חומרי הזנה שיפרה את הזנת העץ והביאה ליבול רב יותר ולא בהכרח לבקרה של המחלה
(Kumar et al 1993).

4.3. הדברה כימית

בעבר נבדקה יעילותן של תרכובות כימיות שונות בדיכוי התפתחות תפרחות מעוותות בעצים
נגועים כגון תערובת של קובלט, קדמיום וניקל. אלו הביאו לירידה משמעותית בהתפתחות
תפרחות מעוותות, לעלייה ביבול ובאיכות הפרי (Singh and Dhillon 1989, Singh et al)
Singh and Dhillon (1994). החיסרון שבטכניקה זה הוא שאריותם ורעילותם לבני אדם (Singh and Dhillon)
(1989).

שיטות הדברה כימיות כללו ריסוס בפונגיצידיים סיסטמיים כמו benomyl, carbendazim ו-
thiophnate-methyl (Chakrabarti 2011, Noriega-Cantú 1999). השימוש בפונגיצידיים
סיסטמיים לא הביא להדברה של הפתוגן ו/או לבקרה משמעותית במחלה בעקבות ספיחתם
לאזור היישום בצמח ואי יכולתם לנוע בצמח באופן סיסטמי. גם יישום של אקריצידיים כגון
phosphomidon ו 0.05% dimethoate בלבד לא הביא לבקרת המחלה (Chakrabarti)
(2011).

4.4. הדברה משולבת

כיום, הדרך היעילה ביותר לשמור על מטע נקי מהפתוגן היא להימנע מהכנסת שתילים נגועים ו/או הרכבת חומר צמחי מעצים חולים. במידה והפתוגן כבר נמצא במטע חשוב לשלב את מגוון הטכניקות המוכרות כגון מחזורי סניטציה תכופים ע"מ למנוע עד כמה שניתן את התפשטות המחלה לעצים או מטעים סמוכים (Noriega-Cantú et al , 1998 , Ploetz 1999). טיפול אינטנסיבי במטע ע"י יישום פונגיצידיים מיד לאחר הגיזום, ולאחר מכן, טיפול באקריצידיים, תוספת של חומרי הזנה וריסוס כלאטים של אבץ ונחושת נמצאו יעילים בשלב הצימוח הוגטטיבי וצמיחת הפקעים. לבסוף ריסוס נוסף בפונגיצידיים בשלב הפריחה עד שלב יצירת הפירות הביא לבקרה יעילה של המחלה אך אין הוא בהכרח כלכלי ליישום חקלאי (Chakrabarti 2011, Noriega-Cantú et al 1999).

5. סיכום

למרות שאין מדובר במחלה חדשה, *F. mangiferae* עדיין מהווה בעיה חשובה ביותר בגידול המנגו. במהלך השנים האחרונות נערך מחקר רחב שעסק באפידמיולוגיה והדברה של המחלה, בתחומים כמו אינטראקציה של הפטרייה עם אקרית הפקע, דרכי הפצה בין מטעים והישרדות הפתוגן. למרות מחקרים אלה עדיין לא קיים פתרון שימושי ויעיל להדברת הפתוגן. שילוב בין טכניקות הדברה שונות הראו תוצאות לא הדירות ולא ניתן להתייחס אליהן כאל פיתרון מבטיח לבקרת המחלה.

שיטות וחומרים

1. חומר ביולוגי

1.1 פטריות

התבדיד אשר היה בשימוש במחקר זה הוא טיפוס הבר של הפטרייה *F. mangiferae*, תבדיד מספר 34, מקורו של התבדיד מישראל.

1.2 חומר צמחי

בניסויים השתמשנו בשתילי מנגו כבני 3-5 שנים מזן מאיה שמקורם במשתלת אקסלרוד במושב גן שורק. השתילים הועברו לחממה במכון וולקני בהיותם צעירים והוחזקו עד לצמיחתם של לפחות 10 פקעים לשתיל לפני שימושם בניסוי הדבקה. בניסויים בהם נעשה שימוש בפירות נקטפו פירות מעצי מנגו בוגרים מהזן מאיה מהמטע הניסויני של מכון וולקני בבית דגן.

2. מצעי מזון והרכבם

מרכיבים עבור 1 ליטר של מצע (לחומרים המפורטים הוספו מים מזוקקים להשלמת נפח ל 1 ליטר):

2.1 מצע מוצק PDA + Chloramphenicol שימש לגידול רגיל של הפטרייה.

39 גרם PDA (potato dextrose agar) (Difco, Sparks, Nevada, USA), 0.25 גרם Chloramphenicol (Sigma, St. Louis MO., USA).

2.2 מצע מוצק PDA 1% + Chloramphenicol שימש לזריעת הפקעים לבחינת אכלוס ע"י הפטרייה

24 גרם PDB (potato dextrose broth) (Difco, Sparks, Nevada, USA), 10 גרם Agar (Difco, Nevada USA).

2.3 מצע סלקטיבי NASH (Snyder & Nash 1962) לבידוד הפטרייה

15 גרם Bactopeptone (Difco, Sparks, Nevada, USA), 1 גרם KH_2PO_4 , 0.5 גרם $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 גרם Chloramphenicol (Sigma, St. Louis MO., USA), 20 גרם PCNB Agar (Difco, Nevada USA). לאחר אוטוקלאב וצינון עד 50 מ"צ הוסף: 1 גרם Streptomycin sulfate (Pentachloronitrobenzene) ו-0.2 גרם.

3. תנאי גידול הפטרייה

הפטרייה גודלה ע"ג מצע PDA + C שהוחזק באינקובאטור, בטמפרטורה של 25 מ"צ ומשטר אור של 12 שעות חושך/אור. מדי שבועיים פיסת תפטיר חי הועברה לצלחות עם מצע טרי לגידול מחדש.

4. הכנת תרחיף נבגים לאילוח

אל תפטיר של הפטרייה שגודל במשך כשבועיים, הוספו 20 מ"ל מים סטריליים. תפטיר הפטרייה גורד בנוכחות המים באמצעות מקל דריגלסקי וסונן דרך שכבה כפולה של פד גזה אל תוך כוס כימית. מהתסנין נלקחו 100 מיקרוליטר תרחיף נבגים לתוך 900 מיקרוליטר מים לצורך מיהול וספירת נבגים תחת המיקרוסקופ. ספירת הנבגים נעשתה ע"י שימוש בהמיציטומטר לצורך מציאת הריכוז ההתחלתי של התרחיף והכנת תרחיף חדש בריכוז הנדרש למטרת האילוח. לתרחיף הוספו מים מזוקקים סטריליים עד לריכוז 10^6 נבגים למ"ל (ריכוז אופטימלי לצורך אילוח או עד לריכוז הנדרש לצורך הניסוי) (Freeman et al, 1999).

5. אילוח הצמחים

אילוח הצמחים נעשה בעזרת תרחיף נבגים בריכוז 10^6 (או ריכוזים אחרים ע"פ המצוין בטקסט). על חפי הפקע הונחה טיפה של 20 מיקרוליטר מתרחיף הנבגים. לאחר מכן העץ כוסה בשקית ניילון רטובה לפרק זמן של 24 שעות לשמירת לחות גבוהה. עבור הניסויים שכללו פציעת הפקעים במהלך האילוח, נעשתה ע"י שימוש במחט רפואית סטרילית לדקירת חפי הפקע באותה נקודה בה הונחה טיפת תרחיף הנבגים.

6. בחינת אכלוס הפקעים

פקעים באורך 1 ס"מ נגזמו מהשתילים, והוכנסו לשקיות ניילון פלסטיות. הפקעים נלקחו למעבדה ושם עברו חיטוי באמצעות השרייה למשך 10 שניות באתאנול 70% ומיד לאחר מכן באקונומיקה (10 גר' כלור לליטר) למשך 3.5 דקות. לאחר מכן הפקעים הוצאו מהאקונומיקה, נשטפו במים סטריליים והונחו לייבוש על נייר סופג סטרילי. לאחר הייבוש הם הועברו לצלחות פטרי המכילות מצע 1% PDA. שימוש במצע אגר 1% איפשר לנעוץ את הפקעים בתוך האגר בצורה שבה הם נשארו יציבים. כל צלחת חולקה ל 3 חלקים, בכל חלק ננעץ פקע. הצלחות אוחסנו בתנאי החדר (טמפ' 20-25 מ"צ) למשך 5-7 ימים. לאחר פרק הזמן הנ"ל נבדקו הצלחות עם הפקעים לבחינת אכלוס הפקעים ע"י הפטרייה. בפקעים שאוכלסו נצפה תפטיר הפטרייה צומח אל המצע.

7. זיהוי הפתוגן

7.1 זיהוי ויזואלי

זיהוי הפתוגן המאכלס את הפקעים היה לרוב ויזואלי. תפטיר הפטרייה צמח מתוך הפקע אל מצע ה-PDA וזוהה על פי מראה הייחודי לו; תפטיר צמרירי בצבע לבן-כתום. במידה ועלה ספק בזיהוי, נלקח מעט מהתפטיר להסתכלות תחת המיקרוסקופ. בבדיקה מיקרוסקופית הפטרייה זוהתה לפי המבנה המסועף של התפטיר, צורת הנבגים המוארכים וכמותם הרבה. במידה וגם בשיטה זו לא זוהתה הפטרייה באופן חד משמעי נעשה שימוש באנליזת DNA.

7.2 אנליזת DNA

7.2.1 הפקת DNA גנומי מתפטיר הפטרייה

תפטיר הפטרייה שהתפתחה מתוך הפקעים הועבר למבחנות אפנדורף 2 מ"ל עם 100 מיקרוליטר של כדוריות זכוכית בקוטר 710-1810 מיקרומטר (Sigma, St. Louis MO, USA) לצורך הפקת DNA גנומי. לכל מבחנה הוספו 700 מיקרוליטר של בופר שבירת תאים (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1% SDS, 2% Triton X-100, 500 mM phenol/chloroform/isoamyl). לאחר מכן, הוספו 500 מיקרוליטר תמיסה של alcohol ביחס 25:24:1 (v:v:v) לכל מבחנה. המבחנות עורבבו באמצעות וורטקס במהירות 8 למשך 15 דקות, לאחר מכן הן סורקזו בצנטרפוגה למשך 5 דקות, ב-4 מ"צ, במהירות של 12000 סל"ד. הנוזל העליון הועבר למבחנות אפנדורף חדשות ולכל מבחנה הוסף 50 מיקרוליטר של sodium acetate 3M, CH₃COON_a pH 5.2 ו-1 מ"ל של 100% אתאנול קר. לאחר שעתיים בקירור של 20 מ"צ הדוגמאות סורקזו בצנטרפוגה למשך 5 דקות, ב-4 מ"צ, במהירות 1200 סל"ד. משקע ה-DNA נשטף עם כהל 70%, יובש והורחף ב-100 מיקרוליטר בופר TE (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA) ונשמר ב-4 מ"צ לקראת ריאקציית PCR.

7.2.2 ריאקציית PCR (Polymerase Chain Reaction)

בריאקציה זו מוכפלים קטעי DNA בין שני תחלים ספציפיים למקטעי ה-DNA, המוספים לריאקציה, על ידי האנזים Taq DNA polymerase. מספר ההכפלות הרב של אותו מקטע DNA מאפשר את קבלת תוצר הסינתזה בכמות רבה. נפח סופי של כל ריאקציה היה 20 מיקרוליטר המורכבים מ: 0.2 mM MgC, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.2 mM dNTPs', 10-100 ng DNA, 1µM primer, 1 unit Taq DNA polymerase (Promega MJ Research, USA), הריאקציה התבצעה ב-PTC-100 Thermocycler (Madison, USA). בחירת התחלים הספציפיים להתאמה למקטעי ה-DNA נעשתה על סמך

עבודתם של Zheng and Ploetz משנת 2002 בתחום פיתוח שיטת PCR על בסיס השוני הגנטי בין התבדידים.

7.2.3 הפרדת מקטעי DNA בג'ל אגרוז

הפרדת תוצרי PCR נעשתה בג'ל אגרוז 1.8%. לביקורת שימשו תוצרי PCR, מ DNA של תבדיד *F. mangiferae* 506/2 (המהווה תבדיד ייצוגי). הג'לים הוכנו מבופר הרצה 1 XTAE (50xTAE: 2M Tris acetate, 50 mM EDTA, pH8.0). ה DNA הוסף לבופר הטענה (0.25%(w/v) Bromphenol blue, 0.25% (w/v) Xylen cyanol, 50% (v/v) Glycerol), בנפח 0.2. הדוגמאות הורצו במתח 80V למשך שעתיים. לאחר ההפרדה הג'ל הושרה בתמיסת Ethidium bromide בריכוז $\mu\text{g/ml}$ למשך 2 דקות ונשטף במים מזוקקים פעמיים. מקטעי ה DNA שהופרדו תועדו ע"י צילום תחת מנורת UV.

8. שימוש ב Fluorescein diacetate (FDA) כמדד לחיות הנבגים

במחקר זה נעשה שימוש באבקת Fluorescein (Sigma, St. Louis, MO., USA) (diacetate (FDA) לזיהוי חיות נבגי הפטרייה לאחר חשיפה לפרקי זמן שונים בשמש. ה-FDA חודר לתאים ובנוכחות אנזימים שונים (כגון: פרוטאזות, ליפאזות ואסטרס) עובר הידרוליזה שתוצרה הוא זהירה פלורוסנטית (Schnürer and Rosswall 1982). פעילות האנזימים קיימת רק בתאים חיוניים ועל כן רק בהם תתרחש ההידרוליזה ותביא לתוצר הפלואורסנטי. תנאי נוסף לקבלת התוצר הוא ממברנת תא שלמה (Schnürer and Rosswall 1982). אבקת ה-FDA אוחסנה בטמפרטורה של 4- מ"צ. 0.005 גרם אבקה נמהל ב- 1 מ"ל אצטון לקראת שימוש בניסוי. לכל 1 מ"ל תרחיף נבגים הוסף 8 מיקרוליטר תרחיף FDA.

9. תיאור הניסויים שבוצעו

9.1 הישרדות נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות במשך החשיפה לשמש ובעוצמת הקרינה

9.1.1 בחינת חיות נבגי הפטרייה *F. mangiferae* לאחר חשיפתם לשמש על פי כושר הנבגים לייצר מושבות ע"ג מצע סלקטיבי

נבגי הפטרייה, טיפוס הבר מס' 34 של *F. mangiferae* הועברו מצלחת פטרי לאחר שבועיים של גידול בתנאים אופטימליים (אינקובטור בטמפ' 25 מ"צ עם 12 שעות אור/חושך) אל צלחות פטרי ריקות. אופן ההעברה נעשה ע"י חיתוך פיסת אגר באורך 2 ס"מ וברוחב 1 ס"מ עם תפטיר הפטרייה מצלחת הגידול ומריחת התפטיר בתוך צלחת הפטרי

הריקה ממצע. ההעברה נעשתה ללא הרטבה במים ע"מ לשמור על תנאים ללא רטיבות בזמן החשיפה לשמש, בנוסף, כמות הנבגים אינה זהה בכל הצלחות. עבור כל טיפול הוקצו שתי צלחות פטרי, כל צלחת שימשה כחזרה עבור הטיפול. הצלחות נחשפו לקרינת שמש ישירה על גג הבניין של המכון להגנת הצומח במרכז וולקני למשך פרקי זמן קבועים מראש של 40, 60, 90, 120, 150, 180, 220, 280 דקות. כביקורת שימשו צלחות עם תפטיר שלא נחשפו לקרינת השמש והושארו לפרק זמן של כ-150 דקות בחושך. מיד בתום החשיפה לשמש הוספו לצלחות הפטרי עם הנבגים היבשים 1 מ"ל תרחיף בופר פוספאט pH=7. לאחר טיטול עדין של הצלחות, הועבר הנוזל למבחנות אפנדורף 1.5 מ"ל. עבור כל מבחנה נבדק ריכוז הנבגים ע"י ספירה במיקרוסקופ עם המיציטומטר ונמהל בהתאם לריכוזים יורדים של 10^5 , 10^4 , 10^3 נבגים למ"ל. 100 מ"ל מכל ריכוז נבגים הועבר לצלחת פטרי עם מצע NASH. תרחיף הנבגים פוזר באופן אחיד ע"ג המצע באמצעות מקל דגראדסקי. הצלחות הונחו בתנאי החדר (טמפ' 20-25 מ"צ) למשך 4 ימים עד לשלב ספירת מספר המושבות.

לצורך חישוב ההישרדות נספרו המושבות שהתפתחו בצלחות הפטרי. מקור כל מושבה הוא מנבג בודד שנשאר חיוני למרות החשיפה לקרינת השמש. המושבות נספרו מהצלחת עם המייהול הנמוך שאיפשר ספירה מדוייקת של המושבות. מספר המושבות הוכפל לפי המייהול להערכה של חיות הנבגים מכל צלחת והשווה לביקורת. נתונים על עוצמות קרינת השמש שנמדדו באיזור ובשעות בהן התקיים הניסוי נלקחו מהמכון המטאורולוגי בבית דגן. עבור הניתוח הסטטיסטי חושבה משוואת רגרסיה מתאימה ונקבעה מידת השונות הניסויית הניתנת להסבר.

9.1.2 בחינת חיות נבגי הפטרייה *F. mangiferae* לאחר חשיפתם לשמש לפרקי זמן שונים

על פי זהירה פלואורסנטית

לצורך בחינת חיות הנבגים באמצעות זהירה פלואורסנטית הוספו למבחנות האפנדורף עם תרחיף הנבגים שלא נמהלה (כמפורט בסעיף 9.1.1) 8 מיקרוליטר תרחיף FDA. הדוגמאות נבדקו בעזרת מיקרוסקופ קרינה אולטרה סגולה בעל מצלמה. מכל מבחנה נלקחו שתי דגימות לבדיקה תחת המיקרוסקופ. כל דגימה צולמה בשני אזורים שונים על משטח הנשיאה תחת המיקרוסקופ. כל אזור צולם לראשונה תחת אור לבן רגיל ובפעם השנייה תחת אור UV. מהצילום הראשון ניתן היה לספור את כלל הנבגים באותו איזור צילום. הצילום השני הראה רק את הנבגים החיוניים שזהרו באור פלואורסנטי כתוצאה מחדירת ה FDA לתאים. על כן, הספירה של הצילום השני כללה רק את הנבגים החיוניים. הנבגים נספרו באור רגיל לעומת אור UV עבור כל הטיפולים. אחוז ההישרדות חושב באופן יחסי לביקורת. הביקורת שלא נחשפה כלל לשמש היוותה 100% הישרדות ושאר הטיפולים חושבו ביחס אליה. גורם הטמפרטורה אינו נבחן בניסוי זה על סמך מחקר קודם שנעשה ע"י קליין-גואטה שהראתה

שחיות הנבגים אינה פוחתת כתוצאה משינויים בטמפרטורה בטווח הטמפרטורה הממוצעת של חודשי השנה (5-35 מ"צ).

ניסויים אלה נערכו בשעות הצהריים (11:00-14:00) כשהתקיימו 7 ניסויים במועדים שונים: יולי 2010, אוקטובר 2010, מרץ 2011, יוני 2011, אוגוסט 2011 ואוקטובר 2011. ניסוי זהה שהתקיים בשעות הבוקר (7:30-11:30) בוצע פעמיים בחודש ספטמבר 2011. עבור כל ניסוי חושבה בנפרד משוואת רגרסיה ונקבעה מידת השונות הניסויית הניתנת להסבר. השוואה בין חיות נבגי הפטרייה *F. mangiferae* לפי זהירה לעומת חיות לפי התפתחות מושבות בצלחות פטרי כתלות בזמן החשיפה לשמש נעשתה ע"י התאמת משוואת רגרסיה ליניארית עבור שני הניסויים וקיום מבחן שונות מקו רגרסיה 1:1.

על מנת לקבוע את מידת ההשפעה שיש לעוצמות קרינה שונות על שרידות הנבגים חושב ערך T_{50} עבור כל ניסוי. ערך זה מייצג את הזמן שלוקח ל-50% מהנבגים לאבד את חיותם. השוואה בין ערכי ה- T_{50} של הניסויים שהתקיימו בשעות הצהריים לעומת הניסויים שהתקיימו בשעות הבוקר מאפשרת לבחון את התלות שיש לחיות הנבגים בעוצמת קרינת השמש.

9.2 בחינת השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים על שכיחות הפקעים המאוכלסים בפטרייה *Fusarium mangiferae* שבוצעו בעצי מנגו צעירים

18 שתילי מנגו הועברו מחממת הגידול לבית רשת במכון וולקני. בכל שתיל נספרו כ-10 פקעים לפחות. השתילים חולקו לקבוצות בנות ארבעה שתילים כל אחת וכל קבוצת שתילים אולחה באחד מהריכוזים: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ו-0 נבגים/מ"ל. טיפול 10^4 ו 10^5 בוצעו על אותם 4 שתילים כאשר כל פקע אולח בריכוז שונה, זאת ע"מ לבחון שונות בתגובה לטיפולים על אותו עץ. כך שסך הטיפולים של הריכוז המשתנה היו 5 + ביקורת ללא אילוח. כביקורת השלילית שימשו שני שתילי מנגו נוספים ללא אילוח בתרחיף נבגים אלא על כל פקע הונח 20 מיקרוליטר מים מזוקקים בלבד. בתוך כל טיפול היה משתנה נוסף אשר נבדק והוא פציעת הפקעים. שני צמחים מתוך הארבעה של כל טיפול נדקרו במחט סטרילית בשלב האילוח.

לאחר האילוח כוסו הצמחים בניילון למשך 24 שעות. בחינת אכלוס הפקעים התבצעה בשני מועדים שונים: מחצית מהצמחים לאחר שלושה שבועות והמחצית הנותרת לאחר שלושה חודשים. במועד הדיגום השני, לפני בחינת איכלוס הפקעים, נבחנו הצמחים באופן ויזואלי להופעת סימפטומים למחלה.

ניסוי זה בוצע שלוש פעמים: באוקטובר 2009, בנובמבר 2010 ובינואר 2011. הערכים הסופיים בכל טיפול נבחנו לבחינת שונות לפי מבחן Paired t-test. לנתונים חושבה משוואת

רגרסיה מתאימה ונקבעה מידת השונות הניסויית עבור כל טיפול. עבור בחינת הקשר בין שכיחות הפקעים המאוכלסים בפטרייה *F. mangiferae* לבין שני מועדי הערכת הנגיעות חושבה משוואת רגרסיה ליניארית וקיום מבחן שונות מקו רגרסיה 1:1.

9.3 בחינת יכולת הישרדות הפטרייה *Fusarium mangifera* על שטח פני הפרי ובציפה

במטע הניסיוני של מכון וולקני הנגוע במחלת עיוות התפרחות והצימוח נבחרו 6 עצים נגועים מזן מאיה. מכל עץ נבחרו 10 פירות. סה"כ נבחרו לניסוי 60 פירות מהמטע הנגוע עבור ארבעה טיפולים. בטיפול הראשון, אולחו הפירות בתרחיף נבגים בריכוז 10^6 . האילוח התבצע ע"י טבילת הפרי למשך 30 שניות בכוס כימית המכילה 400 מ"ל תרחיף נבגים יחד עם חומר משטח (Tween 20 0.02%). מיד לאחר הטבילה הפירות הוכנסו לתא לח למשך 24 שעות. התא לח הוכן ע"י הכנסת הפירות לשקית ניילון רטובה וסגירתה למניעת בריחת הלחות. בטיפול השני, נשמרו הפירות בתא לח למשך 24 שעות ללא אילוח. הכנסת הפירות לתא לח נעשתה בכדי לבחון את יכולת הנבגים לחדור את קליפת הפרי בתנאים של לחות מוגברת. תנאים אלו תואמים את התנאים הסביבתיים באזורי גידול המנגו בעולם המאופיינים בכמות משקעים רבה ותנאי רטיבות ממושכים (Gamliel-Atinsky et al 2009c). בטיפול השלישי, סומנו הפירות במטע ללא כל טיפול בכדי לבדוק אם הפטרייה מאכלסת את הפירות במטע נגוע גם ללא אילוח מכון וולקני וללא תנאים של לחות מוגברת. בטיפול הרביעי ששימש כביקורת, נבחרו 20 פירות משתילי מנגו בוגרים שאינם נגועים במחלה מתוך חממת הגידול במכון וולקני. כל הפירות שטופלו חולקו ל- 4 קבוצות (5 פירות לקבוצה ששימשו כחזרות לניסוי).

לאחר שבועיים נקטפו כל הפירות והובאו למעבדה. הפירות שנכללו בכל חזרה (5 פירות) הוכנסו לכוס כימית בגודל 800 מ"ל עם 400 מ"ל מים מזוקקים סטריליים טולטלו למשך דקה. הנוזל הועבר למבחנות צנטריפוגה גדולות והועבר סרכז למשך 10 דקות במהירות 8000 סל"ד (צנטריפוגה מסוג Sorvall Super T 21). המשקע נזרע בצלחות פטרי עם מצע NASH סלקטיבי ל *Fusarium* הצלחות נבדקו מדי יום במשך 7 ימים לבחינת הופעת הפתוגן.

לאחר השטיפה נלקחו מכל פרי 7 דגימות מהקליפה באורך כ 1.5 ס"מ, ברוחב 2 ס"מ ובעומק 1 ס"מ. הדגימות נזרעו בצלחות פטרי עם מצע NASH סלקטיבי ל *Fusarium*, ונשמרו בתנאי החדר (20-25 מ"צ) למשך 7 ימים לצורך בחינת אכלוס ע"י הפתוגן. מתוך רקמה צימחית אשר מאוכלסת ע"י הפתוגן צומח תפטיר הפטרייה לאחר 3-5 ימים מהזריעה. זיהוי הפתוגן נעשה ויזואלית ללא בחינה מיקרוסקופית.

ניסוי זה בוצע פעמיים ביוני 2010 וביוולי 2011.

9.4 בחינת יעילות חומר ההדברה אוקטב בהגנה ובריפוי פקעים מפני אילוח בפטרייה *Fusarium mangiferae*

9.4.1 חומר ההדברה פרוכלורז/ אוקטב Prochloraz/Octave®

השייך לקבוצת האימידאזולים החומר הפעיל בתכשיר נקרא פרוכלורז (נוסחה אמפירית $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$), נמצא בריכוז של 500 גר/ק"ג. הפונגיציד אוסון בטמפרטורת החדר כאבקה. בכדי להכינו לשימוש לפי הוראות היצרן לשימוש בעצי פרי, הומסה 0.25 גר' אבקה לתוך 250 מ"ל מים (0.1%).

9.4.2 מהלך הניסויים

כל ניסוי מנה 18 שתילי מנגו צעירים אשר הועמדו בבית רשת במכון וולקני. השתילים אולחו בריכוז 10^6 ורוסו בחומר הדברה אוקטב 0.1% בזמנים שונים לפני האילוח. אופן הריסוס נעשה באמצעות מרסס ידני ממרחק של כ 30 ס"מ. על כל פקע הותזו שתי התזות תמיסה עד לנגירה בכדי לשמור על יישום כמות זהה של חומר הדברה.

כל מועד ריסוס הוגדר כטיפול. בניסוי הראשון, כל שלושה שתילים רוסו 1, 14, 21 ימים לפני האילוח, ו 1, 3, 5, 7 ימים לאחר האילוח. בניסוי השני, השתילים רוסו 1, 14, 21, 28 ימים לפני האילוח ו- 2, 5, 7, 14 לאחר האילוח. בניסוי השלישי רוסו השתילים 7, 21, 28 ימים לאחר האילוח. כביקורת חיובית המייצגת את אחוזי ההדבקה המקסימליים, הועמדו שלושה שתילים מאולחים ללא ריסוס בכל אחד מהניסויים. כביקורת שלילית, הועמדו שלושה שתילים מאולחים שרוסו יום אחד לפני האילוח, כמדד ליעילות מקסימלית של חומר ההדברה.

כשבועיים לאחר הטיפול האחרון נגזמו הפקעים, חוטאו והונחו בצלחות פטרי במצע PDA +C 1%. הצלחות הונחו בתנאי החדר ב 20-25 מ"צ למשך 5-7 ימים. לאחר מכן נבחן איכלוס הפקעים ע"י הפטרייה. בפקעים המאוכלסים התפתח תפטיר הפטרייה בצלחות הפטרי. זיהוי הפטרייה היה לרוב ויזואלי ע"י זיהוי תפטיר הפטרייה. במידה ועלה ספק בזיהוי, נלקח מעט מהתפטיר לצפייה תחת המיקרוסקופ לזיהוי התפטיר והנבגים האופייניים לפטרייה. במידה וגם לאחר בחינה מיקרוסקופית לא עלו תוצאות חד משמעיות, תפטיר הפטרייה נבחן באופן מולקולרי באמצעות הפקת DNA ואנליזת PCR.

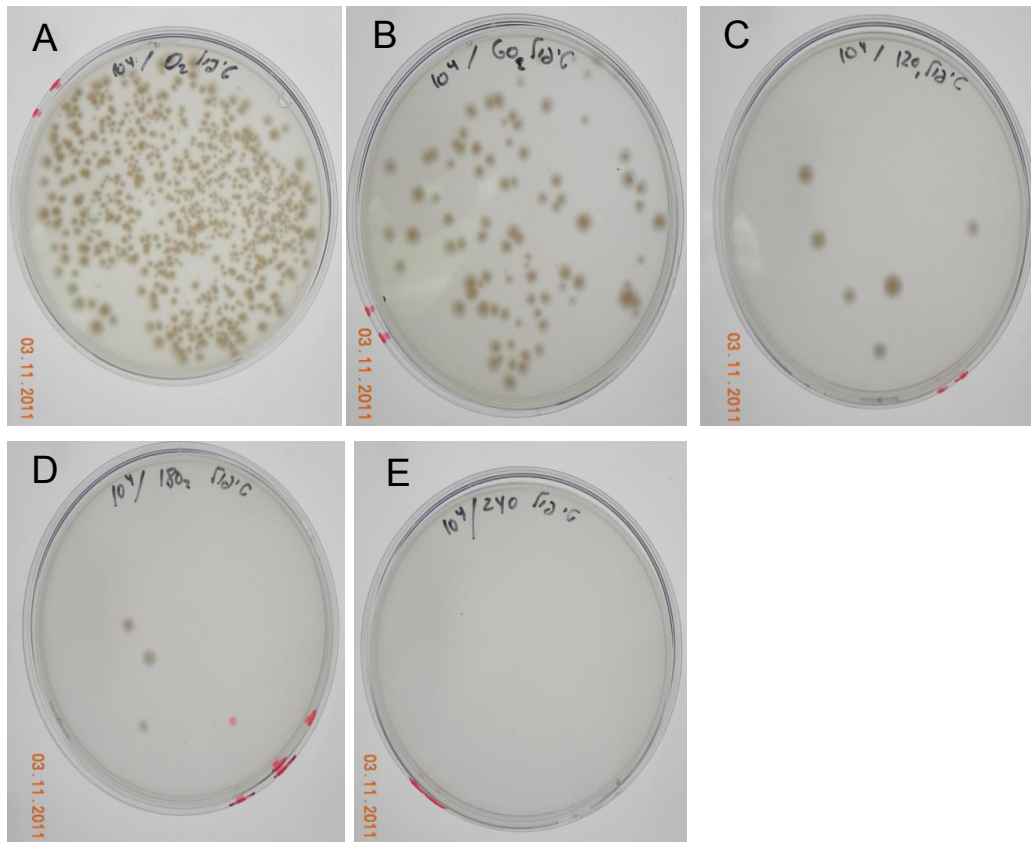
יעילות הפונגיציד בכל טיפול נקבעה לפי מספר הפקעים המאוכלסים מתוך כלל הפקעים בכל טיפול. יעילות ההדברה המקסימלית בניסוי היא הביקורת השלילית (ריסוס השתילים יום

לפני האילוח) ואליה הושוו התוצאות של הטיפולים השונים. על מנת לחשב את יעילות ההדברה המקסימלית היה צורך במציאת אחוזי ההדבקה המקסימליים ולשם כך הועמדה הביקורת החיובית (אילוח השתילים, ללא ריסוס). כך שמספר הפקעים שנמצאו מאוכלסים בטיפולים השונים חושב באופן יחסי ליעילות ההדברה המקסימלית שחושבה באופן יחסי ליעילות ההדבקה המקסימלית. עבור כל ניסוי חושבה משוואת רגרסיה מתאימה ונקבעה מידה השונות הניסויית הניתנת להסבר.

תוצאות

1. הישרדות נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות במשך החשיפה לשמש ובעוצמת הקרינה

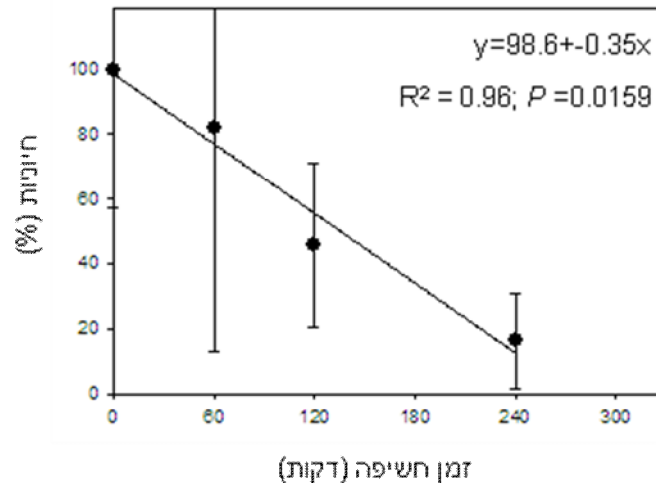
משך ההישרדות של נבגי הפטרייה *F. mangiferae* שנחשפו לקרינת שמש ישירה נבחנה בסדרה של ניסויים. בשלב ראשון נקבעה ההישרדות של הנבגים שנחשפו לשמש, לפרקי זמן שונים, על פי כושרם לייצר מושבה ע"ג מצע סלקטיבי ל *Fusarium* (איור 1).



איור 1: השפעת קרינת שמש ישירה על הישרדות נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae*. ההישרדות נקבעה על פי התפתחות מושבות בצלחות פטרי עם מצע סלקטיבי לאחר חשיפה לפרקי זמן שונים. A - ללא חשיפה, B - 60 דקות, C - 120 דקות, D - 180 דקות, E - 240 דקות.

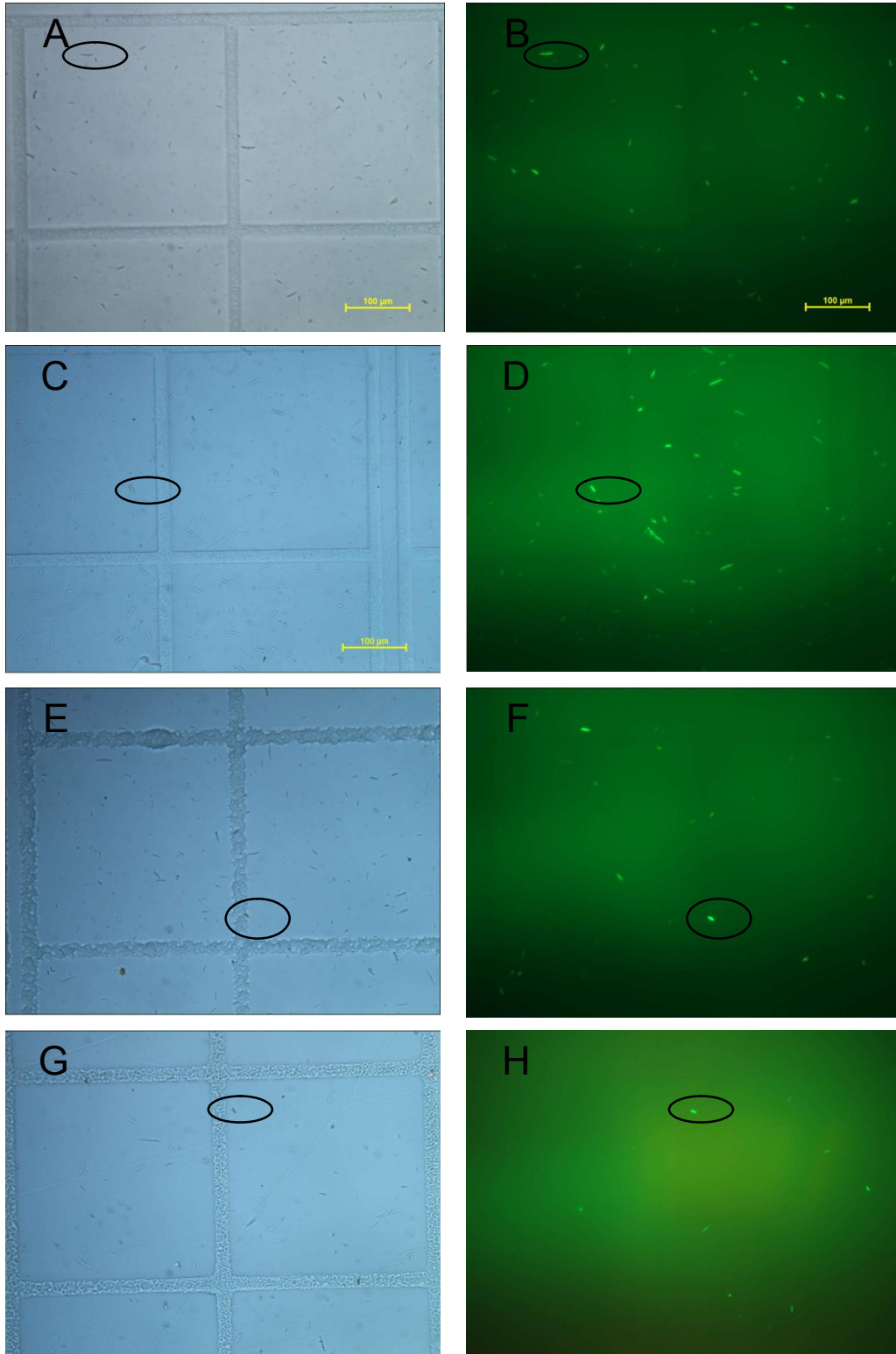
ככל שמשך זמן החשיפה לקרינת השמש היה ארוך יותר, כך פחתה החיות של נבגי הפטרייה *F. mangiferae* (איור 1, איור 2) כנקבע על פי מספר המושבות שהתפתחו ע"ג הצלחות:

לאחר חשיפה של 240 דקות מספר המושבות שהתפתחו היה אפסי לעומת הביקורת (טיפול 0) שלא נחשפה כלל לשמש. ערך ה- T_{50} שחושב ע"פ משוואת הרגרסיה הוא 120 דקות.

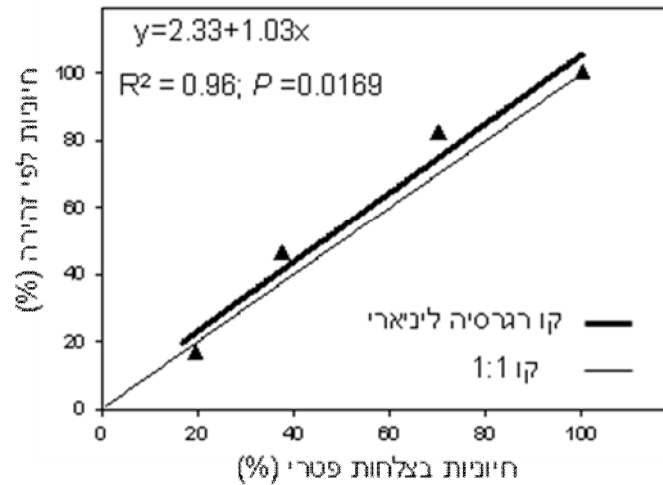


איור 2: חיות הנבגים של הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות במשך החשיפה לשמש. הקווים האנכיים מציינים את סטיית התקן.

באותו הניסוי נקבעה גם חיות הנבגים על פי זהירותם באור פלואורסנטי בעקבות השימוש בתרחיף FDA (איור 3). נבגים חיוניים ששרדו את החשיפה לשמש נצבעו בחומר הפלואורסנטי וזהרו תחת אור UV; ככל שהנבגים נחשפו לפרקי זמן ממושכים יותר לקרינת שמש ישירה, כך פחתה חיותם ועוצמת הזהירה שלהם באור הפלואורסנטי. השוואה בין שתי השיטות לבחינת חיות הנבגים (התפתחות מושבות ע"ג מצע לעומת זהירה פלואורסנטית) הראה התאמה מובהקת ($P = 0.0169$) ביניהן (איור 4). לא היה הבדל מובהק ($P > 0.05$) בין שיפוע קו הרגרסיה לבין קו 1:1. מכאן עולה שניתן לקבוע את חיות הנבגים על פי זהירותם באור פלואורסנטי.

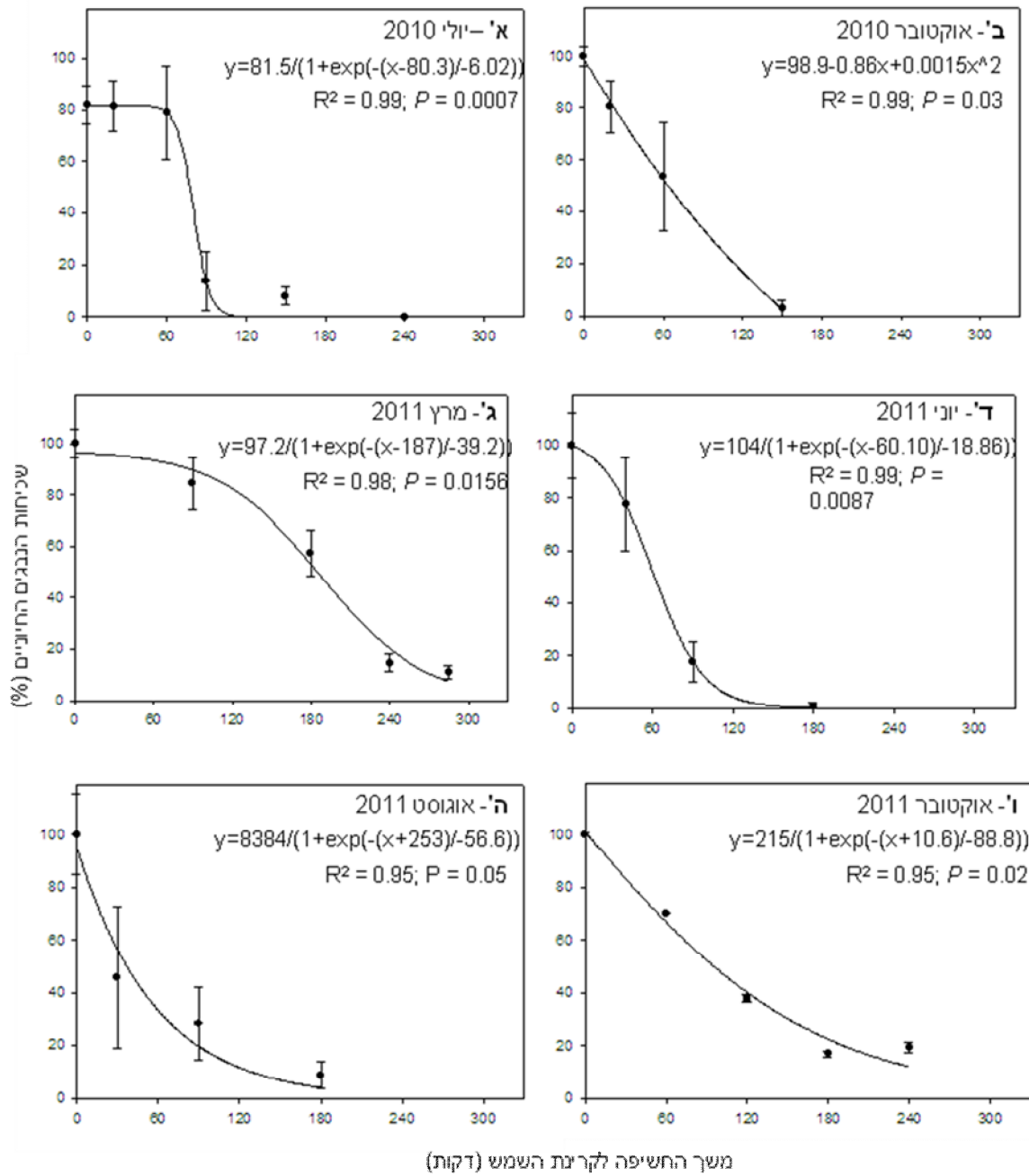


איור 3: נבגי *Fusarium mangiferae* בצילום מיקרוסקופי עם אור רגיל מצד שמאל (A,C,E,G), ומצד ימין (B,D,F,H) אותם נבגים אך עם אור UV. הצילומים נעשו לאחר חשיפה לשמש לפרקי זמן שונים (זמן 0 צילום A ו-B, זמן 60 צילום C ו-D, זמן 90 צילום E ו-F, זמן 150 צילום G ו-H) בניסוי שנערך בשעות הצהרים בחודש יולי 2010. בכל זוג תמונות מסומן בעיגול נבג תחת אור רגיל ואותו נבג זוהר תחת אור UV.

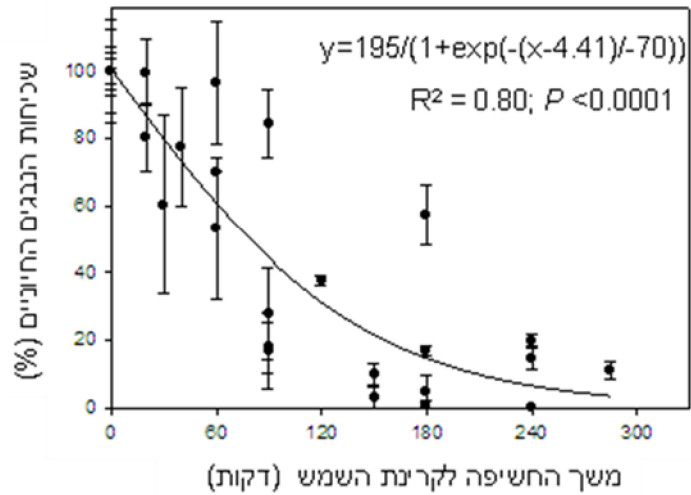


איור 4: השוואה בין חיות נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae* לפי זהירה לעומת חיות לפי התפתחות מושבות בצלחות פטרי כתלות בזמן החשיפה לשמש.

בניסויים הנוספים שנערכו לבחינת ההישרדות של נבגי הפטרייה קבענו את משך ההישרדות על פי זהירת הנבגים באור פלואורסנטי. בניסויים שבוצעו בשעות הצהרים הייתה רמת קרינה בטווח של 600-900 וואט/מ"ר. משך זמן חשיפה ממושך לקרינת השמש גרם לירידה בהישרדות הנבגים (איור 5, איור 6). עבור כל ניסוי בנפרד הותאמה משוואת רגרסיה מתאימה; כל משוואות הרגרסיה היו מובהקות (ברמת מובהקות של לפחות $P < 0.05$); המשוואות הסבירו לפחות 95% מהשונות הניסויית בכל הניסויים (איור 5). בשלב שני, קובצו ממצאי כל הניסויים שבוצעו בשעות הצהרים, נותחו יחדיו והותאמה עבורם משוואת רגרסיה סיגמואידית אחת. מובהקות המשוואה הייתה $P < 0.0001$ והיא הסבירה כ-80% מהשונות הניסויית. ערך ה- T_{50} שחושב על פי משוואת הרגרסיה היה 63.7 דקות; לאחר 280 דקות של חשיפה לשמש אחוז ההישרדות היה אפסי (איור 6).



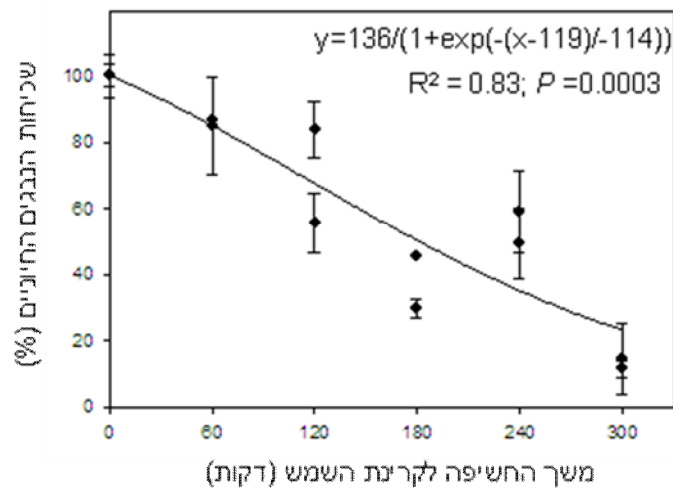
איור 5: שכיחות הנבגים החיוניים של הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות במשך החשיפה לקרינת השמש, בניסויים שנערכו בשעות הצהרים במהלך השנה. שכיחות הנבגים החיוניים נמדדה ע"פ שימוש ב-FDA. הקווים האנכיים מציינים את סטיית התקן.



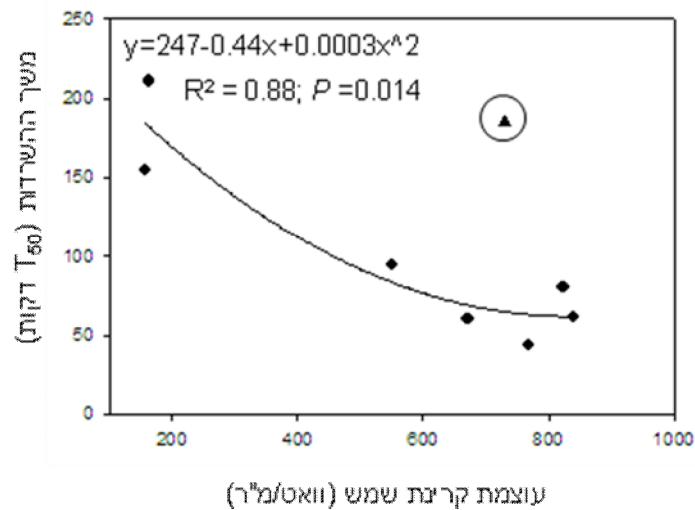
איור 6: שכיחות הנבגים החיוניים של הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות במשך החשיפה לקרינת השמש, בניסויים שנערכו בשעות הצהריים במהלך השנה. שכיחות הנבגים החיוניים נמדדה ע"פ שימוש ב-FDA. הקווים האנכיים מציינים את סטיית התקן.

בניסויים שנערכו בשעות הבוקר המוקדמות היו רמות הקרינה בטווח של 30-600 וואט/מ"ר. גם בניסויים אלו פחתה חיות הנבגים עם זמן החשיפה לשמש אך באופן מתון יותר (איור 7). ערך ה- T_{50} שחושב ע"פ משוואת הרגרסיה היה גבוה יותר וערכו 119.2 דקות. לאחר 280 דקות של חשיפה לשמש אחוז ההישרדות היה 26.8%, ערך שהיה גדול באופן מובהק מאפס.

עוצמת קרינת שמש גבוהה הביאה לירידה בהישרדות הנבגים (איור 8). ערכי ה- T_{50} מייצגים את משך הזמן שבו 50% מהנבגים מאבדים את חיותם. ניתן לראות שככל שעוצמת הקרינה גבוהה יותר כך ערכי ה- T_{50} שנמדדו נמוכים יותר.



איור מספר 7: הישרדות הנבגים של הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות במשך החשיפה לקרינת השמש בניסויים שנערכו בשעות הבוקר. שכיחות הנבגים החיוניים נמדדה ע"פ שימוש ב-FDA. הקווים האנכיים מציינים את סטיית התקן.



איור 8: זמן הגעה ל- T_{50} של נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות בעוצמת קרינת השמש. על הגרף קיימת נקודה חריגה (מסומנת במשולש ומוקפת בעיגול) שלא נכללה בהתאמה של המשוואה וחשוב השונות הניסויית. הנקודה הוגדרה כחריגה מפני שערך ה- T_{50} שהתקבל נמצא גבוה באופן משמעותי משאר הערכים ביחס לעוצמת הקרינה.

2. השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים על שכיחות הפקעים המאוכלסים

בפטרייה *Fusarium mangiferae*

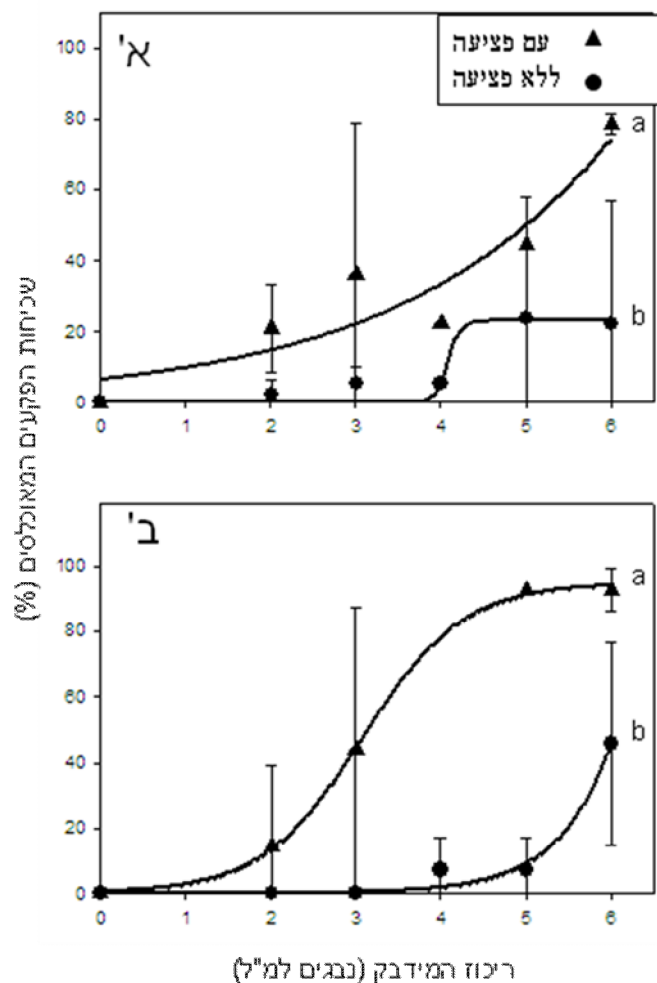
השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים על שכיחות הפקעים המאוכלסים בפטרייה *F. mangiferae* נבדקה ע"י אילוח שתילי מנגו בריכוז מידבק משתנים, עם וללא פציעות הפקעים בזמן האילוח (איור 9). איכלוס הפקעים נבחן בשני מועדים, שלושה שבועות ושלושה חודשים אחרי האילוח. במועד הדגימה הראשון נמצא קשר סיגמואידי בין שני המשתנים בעל מובהקות $R^2=0.97$ בכל אחד מהטיפולים (טבלה 1). גם במועד הדגימה השני בטיפול נמצא קשר סיגמואידי בין שני המשתנים בעל ערך מובהקות $R^2=0.98$ ו- $R^2=0.97$ בהתאמה (טבלה 1). מקדמי משוואות הרגרסיה מוצגים בטבלה 1.

טבלה 1: מקדמי משוואות הרגרסיה וערכי המובהקות עבור העקומים המופיעים באיור 9.

		מקדמי משוואות הרגרסיה*				
P	R^2	X_0	b	a	טיפול	מועד דיגום
0.04	0.97	13.83	2.43	1943	עם פציעה	א'
0.0159	0.97	4.08	0.07	23	ללא פציעה	
0.0008	0.97	3.07	0.6	94.8	עם פציעה	ב'
0.003	0.97	8.1	0.61	1434	ללא פציעה	

* a = הערך של האסימפטוטה; b = שיפוע קו הרגרסיה בנקודת הפיתול; c = ערך ה- X בנקודת הפיתול

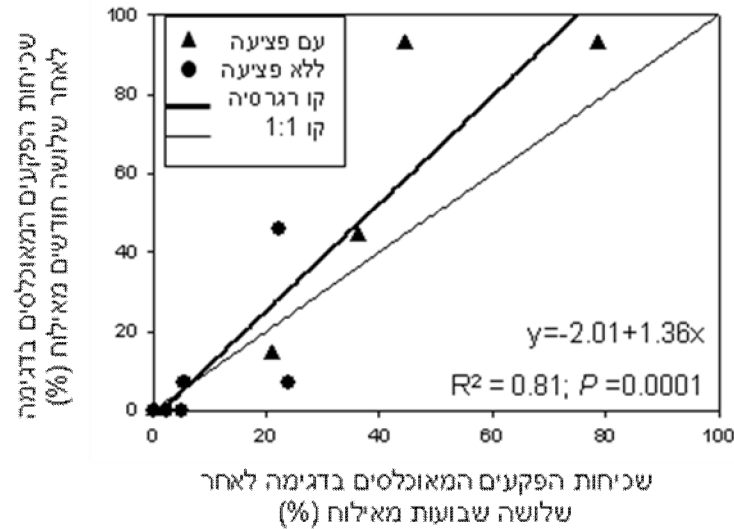
כשאלוחו שתילי המנגו בריכוזי מידבק גבוהים הייתה שכיחות גבוהה של הפקעים המאוכלסים. בנוסף, היה הבדל מובהק ($P=0.05$) בין הערכים הסופיים של הטיפול בו נפצעו הפקעים בשלב האילוח לבין הטיפול ללא הפציעה בשני מועדי הדיגום. במועד א', בו נדגמו הפקעים כשלושה שבועות לאחר האילוח, בטיפול עם הפציעה, הייתה עלייה בשכיחות הפקעים המאוכלסים החל מריכוז 10^5 עד לריכוז הגבוה ביותר שנבדק, 10^6 . שכיחות הפקעים המאוכלסים המירבית הגיעה ל 80% בטיפול זה (איור 9 א'). לעומת זאת, במועד הדגימה השני - שלושה חודשים לאחר האילוח - השכיחות המירבית הייתה 100%; העלייה בשכיחות הפקעים המאוכלסים נראתה כבר בריכוז 10^3 (איור 9 ב').



איור 9: השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים על שכיחות הפקעים המאוכלסים בפטרייה *Fusarium mangiferae* בניסוי שבוצע בעצי מנגו צעירים ונבדק בשני מועדי הערכת נגיעות. (א') לאחר שלושה שבועות, (ב') לאחר שלושה חודשים. הקווים האנכיים מציינים את סטיית התקן. מובהקותם של ערכי שכיחות הפקעים המאוכלסים הסופית בכל טיפול נבחנו לפי מבחן Paired t-test. האותיות השונות מייצגות הבדלים מובהקים ($P < 0.05$) בין הטיפולים באותו מועד. מקדמי משוואות הרגרסיה וערכי המובהקות שלה מתוארים בטבלה 1.

אילוח בריכוזים נמוכים הביא לשכיחות פקעים מאוכלסים נמוכה בשני מועדי הדיגום (איור 9). שכיחות הפקעים המאוכלסים במועד הראשון נשארה נמוכה עד לריכוז 10^4 ; ערכי שכיחות האיכלוס היו קרובים לאפס אך שונים מאפס באופן מובהק ($P < 0.05$) לפי מבחן t-test. במועד הדגימה השני, שכיחות הפקעים המאוכלסים בטיפול ללא פציעה ועם פציעה נשארה בערכים שלא היו שונים מאפס באופן מובהק ($P > 0.05$) עד לריכוז 10^5 ו- 10^3 , בהתאמה.

הקשר בין שכיחות הפקעים המאכלסים בפטרייה *F. mangiferae* בדגימה שבוצעה שלושה שבועות לאחר האילוח לדגימה שבוצעה שלושה חודשים לאחר האילוח היה ליניארי ומובהק ($P=0.0001$). מאחר ושיפוע קו הרגרסיה היה גדול מאחד, הרי שבמשך הזמן שעבר בין שתי הדגימות הייתה עלייה בשכיחות הפקעים המאכלסים (איור 10).



איור 10: הקשר בין שכיחות הפקעים המאכלסים בפטרייה *Fusarium mangiferae* בין שני מועדי הערכת הנגיעות שבוצעו שלושה שבועות ושלושה חודשים לאחר האילוח בעצי מנגו צעירים.

באף אחד מהטיפולים לא נראו תסמינים אופייניים של המחלה בתפרחות ובצימוח. התפרחות נראו לכאורה בריאות וכך גם הצימוח של העלווה בכל השתילים המאולחים.

3. השרדות הפטרייה *Fusarium mangiferae* על שטח פני הפרי ובתוך פרי המנגו בניסוי שהתקיים במטע נגוע ובמטע שאינו נגוע

בניסוי שנערך לבחינת הישרדות הפטרייה *F. mangiferae* על שטח פני הפרי ובתוך פרי המנגו נבדקו פירות ממטע נגוע אחרי שהייה בתא לח וכאלו ללא שהייה בתא לח, כביקורת נבדקו פירות ממטע שאינו נגוע. ניתן היה לבדוד את הפטרייה מתשטיף פירות שנקטפו ממטע נגוע לאחר ששהו במשך 24 שעות בתא לח; נבגים בודדו גם מתשטיף פירות שלא שהו כלל בתא לח. מפירות אשר נקטפו ממטע שאינו נגוע לא ניתן היה לזהות את הפטרייה בתשטיף הפירות (טבלה 2). משני המטעים, הבריא והנגוע, לא היה ניתן לבדוד את הפטרייה בתוך הפרי.

טבלה 2: יכולת השרדות הפטרייה *Fusarium mangiferae* על שטח פני הפרי ובתוך פרי המנגו בניסוי שהתקיים במטע נגוע ובמטע שאינו נגוע.

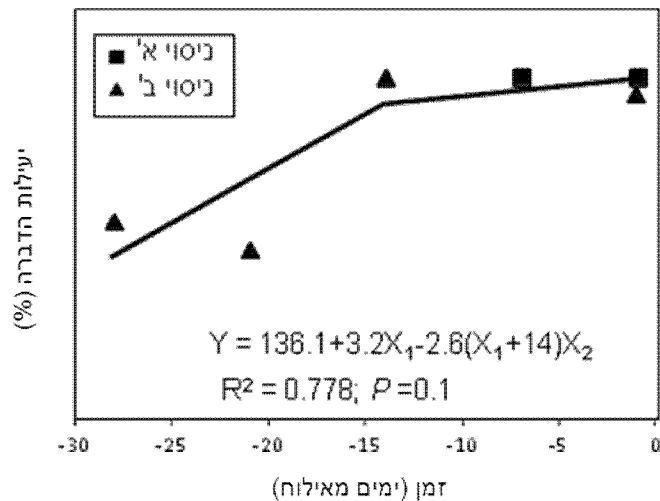
מקום הבדיקה	פירות ממטע נגוע	פירות ממטע נגוע	פירות ממטע שאינו נגוע
על גבי הפרי ^a	+	+	-
בתוך הפרי ^b	-	-	-

a – מתשטיף הפירות במים מזוקקים, סירכוז זרעית המשקע ע"ג מצע סלקטיבי ל *Fusarium*.
 b – מדגימות באורך כ 1.5 ס"מ, ברוחב 2 ס"מ ובעומק 1 ס"מ של קליפת הפרי שנזרעו ע"ג מצע NASH סלקטיבי ל *Fusarium*.

4. יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בהגנה ובריפוי של פקעים מפני אילוח בפטרייה

Fusarium mangiferae

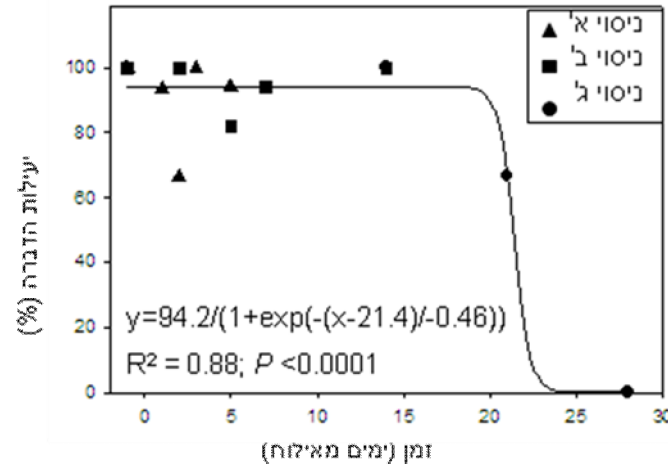
בסדרת ניסויים שבוצעה בשתילים בחנו את יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בהגנה על פקעים מפני אילוח בפטרייה *F. mangiferae* ובריפוי פקעים שאולחו בפטרייה. יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בהגנה על הפקעים הייתה ברמתה מקסימלית כשהתכשיר יושם עד כשבוועיים לפני האילוח. יישום הפונגיציד מוקדם יותר הביא לירידה משמעותית ביעילות הפונגיציד עד ליעילות של כ- 50% כשהוא יושם 20 ימים מיום האילוח (איור 11).



איור 11: יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בהגנה על פקעים מפני אילוח בפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות בזמן יישומו לפני האילוח (שבוע בזמן 0) בשני ניסויים (א', ב') שבוצעו בעצי מנגו צעירים. לנתונים הותאמה משוואת רגרסיה ליניארית במקטעים. $=Y$ יעילות ההדברה (באחוזים), $X_1 =$ זמן לפני האילוח (בימים), $X_2 =$ משתנה דמה; $X_2 = 0$ כאשר $X_1 < 14$ ו- $X_2 = 1$ כאשר $X_1 > 14$; 14 ימים הייתה נקודת הפיתול של הרגרסיה.

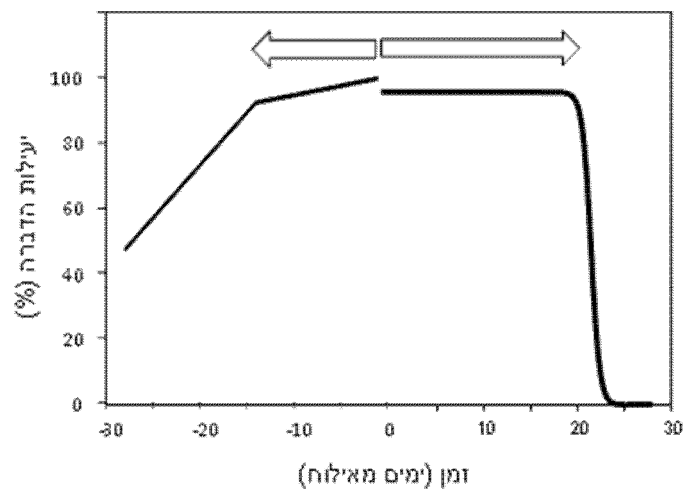
בניסויים שנערכו בכדי לבחון את יעילות הפונגיציד בריפוי פקעים מאולחים רוסו פקעים

שכבר אולחו בפרקי זמן שונים לאחר האילוח. במשך כ- 20 ימים לאחר האילוח הייתה יעילות הפונגיציד בריפוי פקעים מירבית; כשיושם התכשיר בפרקי זמן ארוכים מכך הייתה ירידה חדה ביעילותו עד ליעילות אפסית לאחר 28 ימים מיום האילוח (איור 12).



איור 12: יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בריפוי פקעים מאולחים בפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות בזמן יישומו לאחר האילוח בשלושה ניסויים (א', ב', ג') שבוצעו בעצי מנגו צעירים. ניסוי א' נמשך 5 ימים, ניסוי ב' נמשך 14 ימים, ניסוי ג' נמשך 28 ימים.

קיבוץ ממצאי שתי סדרות הניסויים יאפשר לאמוד את משך ההגנה והריפוי של התכשיר. הפונגיציד פרוכלורז בריכוז של 0.1% בצורה יעילה על הפקעים למשך תקופה של כ- 5 שבועות מהם שבועיים כתכשיר מרפא ושלושה שבועות כתכשיר מגן (איור 13)



איור 13: יעילות הפונגיציד פרוכלורז (0.1%) בהגנה ובריפוי פקעים מאילוח בפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות בזמן יישומו לפני ואחרי האילוח (שבוע ב-0 בניסויים שבוצעו בעצי מנגו צעירים. החיצים האופקיים מציינים את משך הזמן, לפני ואחרי ההדברה, בו יעילות ההדברה הייתה גבוהה מ- 90%.

דיון ומסקנות

1. הישרדות נבגי הפטרייה *Fusarium mangiferae* כתלות במשך החשיפה לשמש ובעוצמת הקרינה

חשיפת הנבגים לפרק זמן ממושך בשמש הראה כי הנבגים רגישים לקרינתה (איור 1, איור 2, איור 3, איור 5, איור 6). ממצאים אלו מאששים את ההנחה שהיעדר מלנין בדופן התאים מונע מהנבגים לשרוד תחת שמש ישירה (Gamliel-Atinsky et al 2009b, קליין-גואטה 2003, Rotem and Aust 1991). אולם הישרדות הנבגים אינה פוחתת בבת אחת אלא ישנם נבגים אשר כושר הישרדותם עולה על האחרים ואלו שורדים זמן רב יותר. ככל הנראה הישרדות הנבג תלויה במשתנים רבים כגון גילו, שלב התפתחותי או תרדמת אשר מאפשרים לנבג לשרוד חשיפה קצרה לשמש. משתנים נוספים אשר עלולים להשפיע על שרידות הנבגים הם נוכחות הנבגים בסביבה לחה, והצללה חלקית ומלאה (שעות החשכה). אופן העברת הנבגים מצלחות הריבוי לצלחות הניסוי נעשה בצורה יבשה ללא הרחפת תפטיר הפטרייה בנוזל והבטיח למנוע את תרומתה של סביבה נוזלית לשרידות הנבגים. הנבגים הונחו בחוץ, על גג הבניין, באותה נקודה שבה קיימת חשיפה ישירה לשמש ללא הצללה. מעבר לכך, הניסוי התקיים בימים בהירים ללא עננות בכדי לשמור על חשיפה רציפה לשמש ללא הצללה.

ה FDA גורם להידרוליזה שתוצריה זהירות תאים חיוניים: בעלי ממברנת תא שלמה ופעילות אנזימטית (Schnürer and Rosswall 1982) (איור 3). פעולת הזריעה בצלחות עם מצע סלקטיבי וצמיחת הפטרייה בצלחות אוששה את ההנחה שהנבגים המזוהים כחיוניים בטכניקת הזהירה הפלואורסנטית אכן שומרים על חיותם ומסוגלים להקים מושבה (איור 1, איור 2).

השימוש בחומר הפלואורסנטי FDA מהווה אינדיקטור אמין לשרידות הנבגים וכיוצא בזה כאינדיקטור לחיותם. שכיחות הנבגים החיוניים הנמדדת ע"י זריעה במצע סלקטיבי ל-*Fusarium* זהה לשכיחותם הנמדדת ע"י ה- FDA (איור 4). אחוזי הישרדות בצלחות לפי מבחן t-test לא היו שונים באופן מובהק ($P > 0.05$) מאחוזי הישרדות שנמדדו בניסויים בהם נספרו הנבגים החיוניים תחת המיקרוסקופ.

פרק הזמן בו הנבגים שורדים בשמש תלוי באופן מובהק בעוצמת הקרינה (איור 5, איור 6, איור 7). בניסויים שנערכו בשעות הצהרים (איור 5, איור 6) הנבגים נחשפו לעוצמות קרינה גבוהות וערך ה- T_{50} שנמדד היה 63.7 דקות. כאשר הניסוי התקיים בשעות הבוקר (איור 7) תחת עוצמות קרינה פחות גבוהות, ערך ה- T_{50} שנמדד היה 119.25 דקות. כלומר, הנבגים שרדו למשך פרק זמן ארוך יותר תחת עוצמות קרינה נמוכות. ממצאים נוספים אשר מחזקים

מסקנה זו הם משך זמן החשיפה המקסימלי של נבגים לשמש השתנה בין הניסויים שהתקיימו בשעות הצהרים לבין הניסויים שהתקיימו בשעות הבוקר. תחת עוצמות קרינה גבוהות הישרדות הנבגים פחתה לערכים אפסיים לאחר 280 דקות של משך זמן חשיפה לקרינת שמש ישירה. לעומת זאת, משך זמן חשיפה זהה בעוצמות קרינה נמוכות יותר מאפשר את הישרדותם של כ-30% מהנבגים. ערכי ה- T_{50} שנמדדו בכל הניסויים, בוקר וצהרים, מראים קשר מובהק בין עוצמת הקרינה להישרדות הנבגים (איור 8). ככל שעוצמת הקרינה גבוהה יותר כך ערך ה- T_{50} נמוך יותר. כלומר, משך הזמן שלוקח ל-50% מהנבגים לאבד את חיותם קצר יותר. כאשר חיות הנבגים פוחתת עם החשיפה לקרינת השמש הדבר פוגע בכושר הפצה וביכולת ההדבקה שלהם. ממצאים אלו מחזקים את הצורך לשמור על רמת סניטציה גבוהה במטעים וכך לאפשר חדירה של קרני שמש שתוריד את רמות המידבק.

2. השפעת ריכוז המידבק ופציעה של הפקעים על שכיחות הפקעים המאוכלסים

בפטרייה *F. mangiferae*

אילוח בריכוז 10^6 יחד עם פציעת הרקמה ומתן זמן התבססות ממושך מביאים לשכיחות הדבקת פקעים מקסימלית ומייצגים את התנאים האידיאליים להתבססות הפטרייה בפקעים (איור 9). שכיחות הדבקת הפקעים הגבוהה שנמצאה לאחר אילוח בריכוזי מידבק גבוהים היא תוצאה של נבגי פטרייה חיוניים רבים יותר שמצליחים להתבסס ולאכלס את הפקעים מאשר בריכוזים נמוכים. במטעים נגועים קיימים ריכוזי מידבק גבוהים אשר מקורם בתפרחות המעוותות. כאשר לא מרחיקים את התפרחות הנגועות מופצים מהם הנבגים (Ploetz et al 2002, Gamliel-Atinsky et al 2009b,c, Kumar et al 1993).

פציעת הפקעים בשלב האילוח מאפשרת לפטרייה לחדור ביתר קלות ככל הנראה דרך הפצעים ולהתבסס טוב יותר ברקמה הצמחית. ממצא זה מחזק ניסויים קודמים שהראו כי בנוכחות אקריות הפקע *Aceria mangiferae*, הגורמת לפציעת הפקעים, התבססות הפטרייה טובה יותר (Gamliel-Atinsky et al 2009b, Kumar et al 1993). בנוסף, פרק זמן של שלושה חודשים מיום האילוח ועד למועד הדיגום איפשר לפטרייה להתבסס בכל הפקעים שאולחו ונפצעו (איור 9 ב').

ריכוז נמוך של מידבק יכול להביא לשכיחות פקעים מאוכלסים גבוהה כאשר הרקמה הצמחית פצועה בזמן האילוח וניתן זמן התבססות ארוך (איור 9 ב'). תוצאות אלו מחזקות את המסקנה הקודמת בדבר התנאים האופטימליים להדבקה. ללא התנאים הללו, כלומר ללא פציעה, שכיחות הפקעים המאוכלסים אינה שונה מאפס באופן מובהק ($P>0.05$) ונשמרת באותה רמה עד לעלייה משמעותית הקרובה לאופטימום בריכוז המידבק ההתחלתי. ככל הנראה רקמה פצועה מאפשרת לנבגים להתבסס בצורה טובה גם כאשר ריכוזם נמוך ולהביא לשכיחות פקעים מאוכלסים אשר שונה מאפס באופן מובהק ($P<0.05$). יתרה על כן, בריכוז

10^6 שכיחות הפקעים המאוכלסים לא הגיעה ל- 100% כאשר הרקמה הצמחית לא הייתה פצועה (איור 9). נתון זה מחזק מסקנה קודמת שהדבקה מקסימלית של פקעים מתאפשרת כאשר הרקמה הצמחית פצועה וריכוז המידבק גבוה מ 10^4 . משתנה נוסף אשר תורם לשכיחות פקעים מאוכלסים גבוהה הוא מתן זמן התבססות ארוך (איור 9 ב'). אילוח באותם ריכוזים ובאותם תנאים של פציעה וללא פציעה הביא לשכיחות פקעים גבוהה כאשר ניתן זמן התבססות של שלושה חודשים.

ממצאים אלה מחזקים את הצורך לשמור על ריכוזי מידבק נמוכים במטעים הנגועים. זאת על ידי הרחקת התפרחות הנגועות המשחררות מידבק רב ויישום של אקריצידיים בכדי למנוע את פציעת הפקעים ע"י אקרית הפקע של המנגו. פעולה זו עלולה לשמור על רמות מחלה נמוכות ולהגביל באופן משמעותי את התפשטות המחלה.

קשר ליניארי בין מספר הפקעים המאוכלסים בפטרייה *Fusarium mangiferae* לאחר שלושה שבועות לבין מספר הפקעים המאוכלסים לאחר שלושה חודשים הוא ככל הנראה תוצאה של ההשפעה החיובית שיש לזמן התבססות ארוך על שכיחות הפקעים המאוכלסים (איור 10). בפקעים שאולחו ונדגמו להערכת נגיעות לאחר 3 שבועות היו ככל הנראה, נבגים שלא הספיקו לנבוט ולהתבסס בפקעים וכתוצאה מכך אחוז הנגיעות היה נמוך. לעומת זאת, כאשר הערכת הנגיעות נעשתה לאחר 3 חודשים מיום האילוח, אחוז הפקעים המאוכלסים היה גבוה יותר. נתונים אלו מעידים על כך שהיעדר זיהוי איכלוס בשלב מוקדם אינו מעיד על היעדר איכלוס בשלב מאוחר יותר. בכדי לבחון איכלוס באופן אמין יש לאפשר זמן התבססות ממושך עבור הנבגים ברקמה הצימחית.

היעדר סימפטומים ויזואליים בתפרחות ובצימוח כתוצאה מנגיעות בפטרייה *Fusarium mangiferae* לאחר שלושה חודשים מיום האילוח מעלה כי במשך הזמן שבו נערך הניסוי, הפטרייה איכלסה את הפקעים אך טרם גרמה לחוסר איזון ברמות ההורמונים, המטאבוליטים והחומרי הזנה באופן שהביא להופעת הסימפטומים. ייתכן שהתפרחות המעוותות והצימוח הוגטטיבי היו מופיעים בעונת הגידול הבאה לאחר התבססות ארוכה יותר של הפטרייה בפקעים.

3. יכולת הישרדות הפטרייה *F. mangiferae* על שטח פני הפרי ובתוך פרי המנגו בניסוי שהתקיים במטע נגוע ובמטע שאינו נגוע

עצי המנגו מניבים, סמוך לתפרחות החולות, פירות שמקורן מתפרחות בריאות. נבגי הפטרייה המופצים מהתפרחות הנגועות נוחתים על קליפות הפירות (Ploetz et al 2002, Gamliel-Atinsky et al 2009b,c, Kumar et al 1993). לאור תוצאות ניסוי זה עולה כי הנבגים מצליחים לשרוד ע"ג הפרי אך לא לחדור לתוכו דרך קליפת הפרי (טבלה 2). שימוש באותם כלים מכאניים לצורך קטיף במטעים שונים, ארגזי הובלה לבית האריזה וחזרה למטע וייצוא הפירות לחו"ל ללא טיפול הדברה לאחר קטיף עלול לאפשר הפצה רחבה יותר של הנבגים מאשר בתוך המטע או בין מטעים סמוכים ע"י הרוח. מכיוון שהפטרייה לא מסוגלת לחדור לתוך הפרי, טיפול חיצוני בהדברת הנבגים ימנע מהפירות להיות מקור מידבק בין מטעים.

4. יעילות הפונגיצידי פרוכלורז (0.1%) בהדברת הפטרייה *F. mangiferae* כתלות בזמן יישומו לפני ואחרי האילוח

ההנחה הראשונה בהעמדת הניסוי שבחן את יעילות הפונגיצידי פרוכלורז לפני ולאחר אילוח הייתה שיעילותו של חומר ההדברה תגיע לאחוזים אפסיים תוך שבוע ולמשך פרק הזמן הזה הועמד ניסוי א'. כאשר תוצאותיו הראו יעילות מקסימלית בפרק הזמן הזה, נעשה ניסוי נוסף בו נבדקה היעילות לאחר שבועיים מיום האילוח מתוך הנחה שבפרק הזמן הזה ניתן יהיה לראות דעיכה ביעילות חומר ההדברה. בסופו של דבר רק בהעמדת ניסוי ג' שארך חודש ימים ניתן היה לראות ירידה ביעילות עד הגעה לאחוזים אפסיים.

בניסוי ההגנה רוטטו השתילים כשבועיים לפני האילוח, ובניסוי השני, כחודש לפני האילוח. לאחר חודש ימים נמדדה יעילות של כ 60% (איור 11). תוצאות ניסוי ההגנה מראות שהפונגיצידי יעיל למשך זמן של שבועיים בהגנה על הפקעים מפני הדבקה. שמירה על יעילות הדברה מקסימלית לפרק זמן ממושך מאפשרת הפחתה בתדירות יישום חומר ההדברה. יעילות הפונגיצידי בניסוי הריפוי הייתה פחות טובה ולאחר חודש ימים היא הגיעה לערכים אפסיים (איור 12). יעילות מקסימלית בריפוי הפקעים נשמרה עד שבועיים מיום האילוח.

הפונגיצידי פרוכלורז (0.1%) יעיל בריפוי פקעים נגועים בפטרייה כשלושה שבועות לאחר ההדבקה ומגן על פקעים בריאים מפני הדבקה כשבועיים לפני ההדבקה (איור 13). במטעים נגועים התפרחות המעוותות מהוות מקור מידבק אשר ממנו מופצים הנבגים לפקעים סמוכים או בין מטעים ע"י הרוח (Gamliel-Atinsky 2009b). ללא טיפול, קצב התפשטות המחלה מהיר מאוד ויכול להביא לאובדן רוב הייבול תוך מספר שנים (Chakrabarti 2011). כיום הטכניקה היעילה ביותר בבקרת המחלה במטעים היא אסטרטגיית הדברה משולבת בסניטציה לצורך הרחקת התפרחות הנגועות ובהדברה כימית לצורך בקרה על המידבק

הקיים במטע שלא ינגע פקעים בריאים. טכניקה זו עדיין לא הוכיחה את עצמה בארץ ומתבססת רק על ניסויים בחו"ל (Ploetz 1998, Noriega-Cantú et al 1999). החיסרון בטכניקה זו הוא העלות הכלכלית הדרושה ביישומה. לפי ההמלצות המוכרות עד היום בספרות יש צורך ביישום בתדירות גבוהה רב מגוון חומרי הדברה (Gamliel-Atinsky et al 1999, Chakrabarti 2011, Noriega-Cantú et al 2009b,c). ממצאי ניסוי זה הבוחן את יעילות הפונגיצייד פרוכלורז, מעלים כי יישום ההדברה מדי חודש במטעים נגעים יכולים למנוע הדבקה חדשה של פקעים, יאפשר הפחתה משמעותית בתדירות השימוש בחומר ההדברה וישמור על אחוזי מחלה נמוכים, כל זאת תחת תנאים מבוקרים. יישום חומר ההדברה מדי חודש וחצי יאפשר הדברה ביעילות של 60%. מעבר לפרק הזמן הזה יעילות ההדברה הינה אפסית. יש לבחון מסקנות אלו בניסוי אשר יתקיים במטע תחת תנאים שאינם מבוקרים. יישום מדי חודש יביא להוזלה בעלויות הבקרה על המחלה שמהווה גורם מגביל ביישום חקלאי ולהפחתת הזיהום הסביבתי כתוצאה משימוש בחומרי הדברה. אפשרות יישום ההדברה מדי חודש בכדי להגן על הפקעים הבריאים מפני הדבקה ובכדי לרפא פקעים שהודבקו זה מכבר מהווה פריצת דרך בתחום ההדברה.

מקורות ספרות

1. קליין גואטה ד. 2003. היבטים אפידמיולוגיים והישרדות של *Fusarium mangiferae* גורם מחלת עיוות התפרחות והצימוח בעצי מנגו. עבודת גמר, האוניברסיטה העברית, הפקולטה לחקלאות רחובות.
2. Bally, I. S. E. 2006. *Mangifera indica* (mango). Traditional Trees of Pacific Islands: Their Culture, Environment, and Use. Permanent Agriculture Resources p. 441-464.
3. Bindra, O. S. and Bakhetia, D. R. C. 1971. Investigation on the etiology and control of mango malformation. Indian Journal of Horticulture 28: 80-85.
4. Britz, H., Steenkamp, E. T., Coutinho T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O. and Wingfield, M. J. 2002. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. Mycologia 94: 722-730.
5. Chakrabarti, D. K. 2011. Mango Malformation. Springer Science, Business Media B.V. p. 15, 107-124.
6. Dang, J.K. and Daulta, B.S. 1982. Mango malformation- a review. Pesticides 16: 5-11.
7. Desai, M. V., Patel, K. P., Patel, M. K. and Thirumalachar, M. J. 1962. Control of mango malformation in Gujrat. Current science 31: 292-393.
8. Freeman, S., Maimon, M. and Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. Phytopathology 89: 456-461.
9. Gamliel-Atinsky, E., Freeman, S., Szejnberg, A., Maymon, M., Ochoa, R., Belausov, E., and Palevsky, E. 2009 a. Interaction of the mite *Aceria mangiferae* with *Fusarium mangiferae*, the causal agent of mango malformation disease. Phytopathology 99: 152-159.

10. Gamliel-Atinsky, E., Szejnberg, A., Maymon, M., Shtienberg, D. and Freeman, S. 2009 b. Inoculum availability and conidial dispersal patterns of *Fusarium mangiferae*, the causal agent of mango malformation disease. *Phytopathology* 99: 160-166.
11. Gamliel-Atinsky, E., Szejnberg, A., Maymon, M., Vintal, H., Shtienberg D. and Freeman, S. 2009 c. Infection dynamics of *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease. *Phytopathology* 99: 775-781.
12. Ghosal, D.K. and Chakrabarti S. 1989. The disease cycle of mango malformation induced by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* and the curative effects of mangiferin-metal chelates. *Journal of Phytopathology* 125: 238-246.
13. Hassan, A. S., 1944. Notes on *Eriophyes mangifera* S. N. (Acarina). *Bull. Soc. Fouad. Entomol.* 28: 179-180.
14. Kumar, J. and Beniwal, S. P. S. 1992. Mango malformation. *Plant diseases of international importance: diseases of fruit crops.* Prentice Hall Publishing 3: 357-393.
15. Kumar, P., Misra, A. K. and Modi, D. R. 2011. Current status of mango malformation in India. *Asian Journal of Plant Sciences* 10: 1-23.
16. Kumar, J., Singh, U. S. and Beniwal, S. P. S. 1993. Mango malformation: one hundred years of research. *Annual Reviews Phytopathology* 31: 217-232.
17. Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S.S, Campos, M.A. and Leslie, F. 2009. A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil. *Plant Pathology* 58: 33-42.
18. López-Estrada, M. E., Noriega-Cantú, D. H., Otero-Colina, G., and Gutiérrez-Reyes, G. 2005. Orchard management and sanitary pruning on the incidence of mango malformation. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11: 113-120.

19. Marasas, W. F. O., Ploetz, R. C., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D. and Steenkamp, E. T. 2006. Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. *Journal of Contaminant Hydrology* 96: 667-672.
20. Nicholson, R. I. D. and Van Staden, J. 1988. Cytokinins and mango flower malformation. I: Tentative identification of the complement in healthy and malformed inflorescences. *Journal of Plant Physiology* 132: 720-724.
21. Noriega-Cantú, D. H., Teliz, D., Mora-Aguilera, G., Rodríguez-Alcazar, J., Zavaleta-Mejia, E., Otero-Colina, G. and Campbell, C. L. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrated management. *Plant Disease* 83: 223-228.
22. Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R. C., Aoki, T., O'Donnell, K. and Freeman S. 2010. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Population Biology* 100: 1176-1184.
23. Ploetz, R. C. 1998. Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. In Summerell, B. (ed.). *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. APS Press. P. 1-8.
24. Ploetz, R. C. and Gregory, N. F. 1993. Mango malformation in Florida: distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships among strains within and among different orchards. *Acta Horticulturae* 341: 388-394.
25. Ploetz, R., Zheng, QI., Vazquez, A. and Abdel Sattar, M.A. 2002. Current status and impact of mango malformation in Egypt. *International Journal of Pest Management* 48: 279-285.
26. Prasad, A., Singh, H. and Shukla, T.N. 1965. Present status of mango malformation disease. *Indian Journal of Horticulture* 22: 254-265.

27. Ram, S., Sirohi, S. C. and Rathore, V. S. 1983. Naturally occurring cytokinins in mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Journal of Plant Physiology* 10: 65-73.
28. Rotem, J., and Aust, H. J. 1991. The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. *Phytopathology* 133: 76-84.
29. Schnürer, J., and Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 1256-1261.
30. Shah, S. A., Iqbal, Z., Ahmad, K., Danish, M., Khan, Z. I., Hassandogar, Z. U., Shaheen, A., Arshad, M. U., Ahmad, S. S., Sher, M. and Valeem, E. E. 2009. The extent of micro minerals in healthy and malformed organs of mango. *Pakistan Journal of Botany* 41: 2817-2820.
31. Singh, V. K., 2006. Physiological and biochemical changes with special reference to mangiferin and oxidative enzymes level in malformation resistant and susceptible cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). *Scientia Horticulturae* 108: 43-48.
32. Singh, Z. and Dhillon, B. S. 1989. Hormonal changes associated with vegetative malformation of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Phytopathology* 125: 193-197.
33. Singh, Z., Dhillon, B. S. and Arora, C. L. 1991. Nutrient levels in malformed and healthy tissues of mango (*Mangifera indica* L.). *Plant and Soil* 133: 9-15.
34. Singh, Z., Singh, L., Arora, C. L. and Dhillon, B. S. 1994. Effect of cobalt, cadmium, and nickel as inhibitors of ethylene biosynthesis on floral malformation, yield, and fruit quality of mango. *Journal of Plant Nutrition* 17:1659-1670

35. Steenkamp, E., Britz, H., Coutinho, T., Wingfield, W. M., Wingfield, M. 2000. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Molecular Plant Pathology* 1: 187-193.
36. Summanwar, A.S., Raychaudhuri, S.P. and Phatak, S.C. 1966. Association of the fungus *Fusarium moniliforme* Sheld. With the malformation in mango (*mangifera indica* L.). *Indian Phytopathology* 19: 227-228.
37. Van Staden, J., Bayley, A. D. and Macrae, S. 1989. Cytokinins and mango flower malformation III. The metabolism of [³H]isopentenyladenine and [8-¹⁴C]zeatin by *Fusarium moniliforme*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 433-438.
38. Van Staden, J. and Nicholson, R. I. D. 1989. Cytokinins and mango flower malformation II. The cytokinin complement produced by *Fusarium moniliforme* and the ability of the fungus to incorporate [8-¹⁴C]adenine into cytokinins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 423-431.
39. Varma, A., Lele, V. C., Raychoudhuri, S.P., Ram, A. and Sang, A. 1974. Mango malformation: a fungal disease. *Journal of Phytopathology* 79: 254-257.
40. Watt, G. 1891. A dictionary of economic products of India. Government Printing Press, Calcutta.
41. Youssef, S. A., Maymon, M., Zveibil, A., Klein-Gueta, D., Sztejnberg, A., Shalaby, A. and Freeman, S. 2007. Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt. *Plant Pathology* 56: 257-263.
42. Zhan, RL., Yang, SJ., Ho, HH., Liu, F., Zhao, YL., Chang, JM. and He, YB. 2010. Mango malformation disease in south china caused by *Fusarium proliferatum*. *Journal of Phytopathology* 158: 721-725.

43. Zheng, Q., and Ploetz, R. 2002. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. *Plant Pathology* 51: 208-216.

ABSTRACT

Mango malformation disease caused by the fungus *Fusarium mangifera* Britz, Wingeld & Marasas is a serious disease occurring in most mango producing regions worldwide. Conidia penetrate via buds causing metabolic, nutrient and hormonal imbalances. The disease is characterized by malformation of vegetative growth and inflorescences causing significant economic losses since malformed inflorescences do not bear fruit.

The main object of this work was to study epidemiology of the pathogen directly affecting severity of disease. Conidial survival and dispersal are influenced among others by biotic conditions. Therefore, viability was tested under different solar radiation intensities. Conidia were found to be sensitive to solar radiation and their viability was negatively affected by the duration of exposure and intensity of radiation. An important factor affecting conidia dispersal and disease severity is the mango bud mite *Aceria mangiferae*, an herbivore of the mango tree, found within the mango buds in both malformed and healthy trees. It feeds by penetrating its stylets into the epidermal cell wall, creating wounds in the bud tissues. Germinating conidia can penetrate more easily and infect the plant tissue through these wounds. Therefore, severity of disease was compared in wounded versus unwounded tissue. Furthermore, to determine the appropriate conditions for infection different inoculum concentrations were tested. Another aspect tested, was the correlation between an extended colonization period after infection, to disease severity and the appearance of malformed floral symptoms. Disease severity, determined by the incidence of fungal colonization in buds, was found to be significantly higher ($P < 0.05$) in wounded tissue, over an extended colonization period using inoculum concentrations of 10^6 spores per ml. In order to study the dispersal patterns of *F. mangiferae* survival of conidia was examined on the fruit surface and whether the pathogen was capable of penetrating and colonizing the fruit cortex and flesh. The purpose of this study was to determine whether harvested fruit can serve as an inoculum source dispersing the conidia between orchards, via mechanical tools or to mango importing countries which possess their own mango industry where the pathogen is absent. Viable conidia were found on the outer surface of the fruit

but none were found within fruit. These findings suggest that conidia cannot penetrate the fruit surface. To date, many techniques have been tested for controlling the disease; the use of tolerant cultivars, use of plant hormones, chemical fungicides and more. The current status indicates that sanitation is the only method that can be used for the reduction of inoculum in the orchard. Although certain fungicides (e.g. Prochloraz / Octave®) have been shown to control the pathogen *in vitro*, their efficacy and timing for control has not been established in diseased orchards. In this study, the fungicide Prochloraz / Octave® was found effective in protecting the panicles for a period of two weeks before infection and successfully cured infected panicles when applied up till three weeks post-infection.

**Epidemiological aspects and survival
of *Fusarium mangiferae* causal agent
of Mango Malformation Disease**

M.Sc. Thesis
Submit to the Faculty of Agriculture, Food and
Environment
The Hebrew University of Jerusalem

By
Adi Biton

Rehovot
2011

December