

האקולוגיה והאפידמיולוגיה של מחלת האסקוכיטה באפונת בר ובאפונה תרבותית

עבודת גמר

**מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית
של האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך במדעי החקלאות"**

על ידי

מעין גולני

האקולוגיה והאפידמיולוגיה של מחלת האסקוכיטה באפונת בר ובאפונה תרבותית

עבודת גמר

**מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית
של האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך במדעי החקלאות"**

על ידי

מעין גולני

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

פרופ' דני שטיינברג

המכון להגנת הצומח

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים

מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

פרופ' שחל עבו

המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות

הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית

האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות

תודות

- **שחל ודני** - פשוט תודה על הכול. תודה שליוויתם אותי לאורך כל הדרך, כל אחד בדרכו המיוחדת ובסבלנות רבה. למדתי ממכם המון והשקעתם מעל ומעבר. בזמן העבודה הצלחתם להעביר אלי את ההתלהבות והעניין בתחום ובנושא כאשר ברור שעבודה זו נוגעת רק בקצה הקרחון.
- **תודה מיוחדת לחברי המעבדה של דני ויגאל**: דליה רב-דוד, מנחם בורנשטיין, חיים וינטל, רן שולחני, דר' עומר פרנקל, רועי ברק, הילל אוזקילינק, המה מורטי וליאור ישראלי. על לימוד שיטות העבודה, הנסיעות לצפון, השיחות בנושאים שברומו של עולם ועוד ועוד.
- **תודה לחברי המעבדה של שחל**: רות פינחסי וון-אוס, יעל זהבי, רועי פלך וארז רחמים על העזרה הרבה, בעיקר בהרמת המורל.
- **תודה לד"ר עמיר שרמן וחברות המעבדה** - רות אשד והדס שפרן שעזרו לי רבות בעבודה המולקולרית ולמרות הקשיים שהיו בדרך הגענו לתוצאות מצוינות.
- **תודה להוריי ולמשפחתי** על התמיכה והעידוד.
- **תודה לאורית** - אישתי היקרה, שתמכה לאורך כל הדרך, שקראה ותיקנה הגהה בשעות הקטנות של הלילה ויחד דילגנו מעל כל המכשולים להשלמת המלאכה.
- **תודה לילדתי הקטנה והמתוקה - טל**. שנולדה ביחד עם העבודה ונתנה לי מוטיבציה וכוח לסיים את הכתיבה.

תוכן העניינים

עמוד

1	תקציר
3	1. מבוא
4	2. סקירת ספרות
4	2.1 האבולוציה של יחסי פתוגן-פונדקאי בממשק האקולוגי-חקלאי
5	2.2 פונדקאים
6	2.3 הפתוגנים והמחלות
8	2.4 הפתוגן <i>Mycosphaerella pinodes</i>
12	2.5 זיהוי הפטריות הגורמות לאסקוכיטה באפונה
12	2.6 שונות גנטית והבדלים בתכונות תבדידים שבודדו ממקורות בר ותרבות
15	3. שיטות וחומרים
15	3.1 זיהוי הפתוגנים שהתפתחו על אפונת בר ותרבות
17	3.2 השוואת הדרישות האקולוגיות של תבדידי אסקוכיטה ממין זהה, מאפונה תרבותית ואפונת בר
19	3.3 השוואת הדרישות האקולוגיות של תבדידים שבודדו מהמין <i>P. fulvum</i> מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים
21	3.4 בחינת ההבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידי אסקוכיטה שבודדו ממני אפונה שונים
22	3.5 התפתחות מחלת האסקוכיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים
23	3.6 ניתוחים סטטיסטיים
24	4. תוצאות
24	4.1 זיהוי הפתוגנים שהתפתחו על אפונת בר ותרבות
26	4.2 השוואת הדרישות האקולוגיות של תבדידי אסקוכיטה ממין זהה, מאפונה תרבותית ואפונת בר
30	4.3 השוואת הדרישות האקולוגיות של תבדידים שבודדו מהמין <i>Pisum fulvum</i> מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים
37	4.4 בחינת ההבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידי אסקוכיטה ממין מסוים, שבודדו ממני אפונה שונים
38	4.5 התפתחות מחלת האסקוכיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים
48	5. דיון
48	5.1 הפתוגנים מטיפוס אסקוכיטה, המצויים על אפונת הבר והאפונה התרבותית
49	5.2 ההבדלים בדרישות האקולוגיות של תבדידי אסקוכיטה מהמין <i>M. pinodes</i> שנדגמו מאפונה תרבותית ומאפונת בר
52	5.3 השוואת הדרישות האקולוגיות של תבדידים שבודדו מהמין <i>P. fulvum</i> מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים
54	5.4 ההבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידי אסקוכיטה מהמין <i>M. pinodes</i> , שבודדו ממני אפונה שונים
55	5.5 התפתחות מחלת האסקוכיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים
56	5.6 דיון מסכם
58	6. רשימת ספרות

תקציר

האפונה הפכה לגידול חשוב לפני כ- 10,000 שנה עם תרבות הצמחים במזרח התיכון ונפוצה מאזור זה לחלקי העולם האחרים. המחלה העיקרית הפוגעת באפונה בארץ ובעולם הינה מחלת האסקוכיטה. כל זני האפונה המסחריים רגישים למחלה, ומגיפה קשה יכולה לגרום לאובדן יבולים משמעותי. המחלה נגרמת על ידי קומפלקס של שלוש פטריות, שהחשובה שבהן היא *Mycosphaerella pinodes*. במספר אתרים בארץ, שדות אפונה תרבותית (*Pisum sativum* L.) סמוכים לבתי גידול של אפוני בר מהמינים *P. elatius* ו- *P. fulvum*.

בבסיס עבודת המחקר ההנחה שתהליכי קו-אבולוציה מתמשכים, המתקיימים בין הפתוגנים הגורמים למחלת האסקוכיטה לבין מיני אפונת הבר והאפונה התרבותית אותם הם תוקפים, השפיעו על תכונות הפתוגנים. השערת העבודה הייתה שקיימים הבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידים מאפונת התרבות לבין תבדידים ממיני אפונת בר ושהבדלים קשורים לתנאי הסביבה בה התפתחו התבדידים ולמין הפונדקאי אותו הם תוקפים.

במטרה לברר מיהם הפתוגנים מטיפוס אסקוכיטה, המצויים על אפוני בר ותרבות, נדגמו תבדידים מאוכלוסיות אפונת הבר הגדלות בתנאי אקלים שונים ומאוכלוסיות אפונה תרבותית. התבדידים בודדו ובוצע זיהוי למין הפתוגן על פי מאפייניהם המורפולוגיים והשוואת רצפי DNA לרצפי ביקורת. זיהוי התבדידים הראה כי באוכלוסיות האפונה התרבותית ואפונת הבר שבארץ, נפוץ בעיקר המין *M. pinodes*. ייתכן והסיבה לכך הינה התאמה טובה יותר של *M. pinodes* לפונדקאים שהתפתחה במהלך הקו-אבולוציה ויתרונו על פני הפתוגנים הנוספים התוקפים אפונה כיוון שהוא המין היחיד בו מתקיים שלב הרבייה המינית בתנאי הסביבה הטבעיים כחלק ממחזור החיים של הפתוגן. בעקבות ממצא זה הוחלט שהמחקר הנוכחי יתמקד בפתוגן *M. pinodes*.

במטרה להשוות דרישות אקולוגיות של תבדידי *M. pinodes* שבודדו מאפונה תרבותית ומאפונת בר בוצעה סידרת ניסויים במעבדה בהם השתמשנו בתבדידים שנדגמו מעמק בית שאן מצמחי בר ומשדות תרבותיים סמוכים ובתבדידים שנדגמו מצמחי בר ותרבות באזורים גיאוגרפים נפרדים. בסדרת הניסויים הראשונה נבחנה השפעת הטמפרטורה על צימוח התפטיר ונביטת הנבגים האל-מיניים של התבדידים השונים. לא היו הבדלים בתגובה לטמפרטורה בין התבדידים שנדגמו מצמחי הבר והתרבות. בחינת משך הרטיבות הדרוש להדבקת צמחי בוחן ממין הבר ומהמין התרבותי הראתה כי על-מנת שתפתח מחלה משמעותית דרוש משך רטיבות של יותר מ- 10 שעות. נמצא כי מין הפונדקאי ממנו נדגמו התבדידים (בר או תרבות) לא השפיע באופן משמעותי על משך הרטיבות הדרוש להדבקה. מהתוצאות ניתן להסיק, כי לא קיימים הבדלים בשלוש דרישות אקולוגיות קארדינליות עיקריות בין תבדידי *M. pinodes* מאפונת הבר *P. fulvum* ומהאפונה התרבותית *P. sativum*.

כדי לבחון אם יש הבדלים בדרישות אקולוגיות חשובות של תבדידי *M. pinodes* שבודדו מהמין *P. fulvum* מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים, בוצעה סידרת ניסויים במעבדה בהם השתמשנו בתבדידים שנדגמו מאוכלוסיות *P. fulvum* בגליל המערבי, בגליל המזרחי ובעמק בית שאן. כאשר נבחן צימוח תפטיר ונביטת נבגים אל-מיניים בתחום טמפרטורות רחב נמצאה התאמה דומה ולא נמצאו הבדלים משמעותיים בין התבדידים. גם כאשר נבחנה השפעת משך הרטיבות על ההדבקה במחלה בצמחי בוחן ועל שיעור נביטת הנבגים, לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין התבדידים. בנוסף, בחינת מדדי אלימות של תבדידים שנדגמו מאפונת בר באזורי אקלים שונים כלפי צמחי בוחן תרבותיים והשוואת רמת

האלימות שלהם לתבדידים שבודדו מאפונה תרבותית, הראתה כי אין הבדל משמעותי בין התבדידים גם בתכונה זו. מהתוצאות ניתן להסיק כי אין הבדל משמעותי בדרישות אקולוגיות ובפתוגנה של התבדידים שנבחנו וכי האזור האקלימי ממנו נדגמו התבדידים לא השפיע על תכונותיהם.

במטרה לבחון את ההבדלים בדרישות אקולוגיות ובפתוגנה בין תבדידי *M. pinodes*, שבודדו ממיני אפונת הבר *P. elatius* ו-*P. fulvum* הגדלים בתפוצה סימפטריית, בוצעה סידרת ניסויים במעבדה בהם השתמשנו בתבדידים שבודדו משני המינים מנחל עמוד שבגליל המזרחי. כאשר נבחנה השפעת הטמפרטורה על צימוח התפטיר של תבדידים שנדגמו מאוכלוסיות אפונת בר ממינים שונים, נצפתה תגובה דומה לטמפרטורה. בניסוי שבחן מדדי אלימות של תבדידים כלפי צמחי בוחן ממינים שונים אומנם היו הבדלים מובהקים בין תבדידים שבודדו משני מיני אפונת הבר, אך ניתוח גורמי השונות הראה כי למין הפונדקאי ממנו בודדו התבדידים לא הייתה השפעה מובהקת על התכונה. מהתוצאות ניתן להסיק כי הפתוגן *M. pinodes* לא פיתח התאמה ספציפית נפרדת ל-*P. elatius* ו-*P. fulvum*.

במטרה לכמת ולתאר את התפתחות מחלת האסקוקיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים של אפונת בר, בוצע סקר להערכת חומרת הנגיעות הטבעית במחלת האסקוקיטה בצמחי אפון קיפח *P. elatius*. הסקר נערך בערוצי הנחלים כזיב ועמוד המאופיינים בתנאי אקלים שונים, בשתי עונות גידול עוקבות. נמצא כי פיזור האוכלוסיות במרחב שנסקר לא היה אחיד וכלל כתמים בהם היו מספר משתנה של צמחים. תסמיני המחלה הראשוניים הופיעו מיד לאחר הנביטה והצצת האפונים בתחילת החורף; כאשר גדלו הצמחים במקומות בהם הקרקע הייתה מחופה בעלים שנשרו מעצים שגדלו בסמוך, נגיעותם הייתה פחותה מזו של צמחים שגדלו במקומות בהם הקרקע הייתה חשופה. במרבית המקרים המחלה לא הופצה מהעלים התחתונים שנפגעו לעלים העליונים. במהלך העונה מספר צמחי האפונה פחת באופן דרסטי והצמחים ששרדו נמצאו בדרך כלל מוגנים בתוך שיחים. עד סיום העונה התפתחו במרבית הצמחים ששרדו מספר רב של עלים והמחלה שהתפתחה בעלים התחתונים (שחלקם נשרו) ככל הנראה לא סיכנה את התפתחותם ואת השלמת יצירת התרמילים והפצת הגרגרים.

מהממצאים שנאספו בעבודה זו נראה, כי בניגוד להנחת העבודה הראשונית, אוכלוסיות הפתוגן התוקפות אפוני בר ואפונה תרבותית בישראל לא שונות האחת מהשנייה באופן מהותי. בתוך כל אוכלוסיה, מתקיימת שונות גנטית שאינה מושפעת מהפונדקאי עליו התפתחו התבדידים (בר או תרבות) או מהאזור האקלימי בו הם נדגמו. הדמיון בתכונות התבדידים שנדגמו מאוכלוסיות הבר והתרבות והיכולת של כל התבדידים לגרום למחלה חמורה בשני מיני האפונה מרמזים על מעבר אפשרי בין אוכלוסיות הפתוגן מצמחי הבר לתרבות ולהפך. במידה ואכן מתקיים מעבר מאוכלוסיות צמחי הבר לצמחי התרבות, הרי שמידבק המתפתח על שאריות צמחי אפונת בר עשוי להיות גורם למידבק ראשוני לאוכלוסיות האפונה התרבותית הגדלות בתפוצה סימפטריית. אם כך הדבר, יש לבחון את המשמעויות האפידמיולוגיות של מקור מידבק ראשוני זה.

1. מבוא

האפונה הפכה לגידול חשוב לפני כ- 10,000 שנה עם תרבות הצמחים במזרח התיכון ונפוצה מאזור זה לחלקי העולם האחרים (Zohary & Hopf, 1988). המחלה העיקרית הפוגעת באפונה בארץ ובעולם הינה מחלת האסקוכיטה שנקראת באנגלית *Ascochyta blight*. כל זני האפונה המסחריים רגישים למחלה, ומגיפה קשה יכולה לגרום לאובדן יבולים משמעותי (Bretag et al., 1995a). המחלה נגרמת על ידי קומפלקס של שלוש פטריות שהחשובה שבהן היא *Mycosphaerella pinodes* הגורמת לכתמים על התרמילים, הגבעולים והעלים ובנוסף גם לריקבון בבסיס הגבעול (Tivoli & Banniza, 2007; Bretag et al., 2006).

במזרח התיכון נפוצים שלושה מיני אפונת בר: *P. humile*, *Pisum elatius* ו- *P. fulvum* (Zohary & Hopf, 1973). במספר אתרים בארץ, שדות אפונה תרבותית (*Pisum sativum* L.) סמוכים לבתי גידול של אפוני בר. ידוע כי מחלת האסקוכיטה לא גורמת למגפות חמורות באוכלוסיות הבר (Dinoor, 1974), אך לא ידוע אם התבדידים המתפתחים על אפוני בר דומים בתכונותיהם ובהתאמתם האקולוגית לאלו המתפתחים על גבי צמחי האפונה התרבותיים והאם הם מסוגלים לאלח שדות אפונה תרבותית סמוכים. בבסיס עבודת המחקר הנוכחית ההנחה שתהליכי הקו-אבולוציה מתמשכים, בין הפתוגנים הגורמים למחלת האסקוכיטה לבין מיני אפונת הבר והאפונה התרבותית אותם הם תוקפים, השפיעו על תכונות הפתוגנים. בהסתמך על הנחה זו, השערת העבודה היא שקיימים הבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידים מאפונת התרבות לבין תבדידים ממיני אפונת בר, ושההבדלים קשורים לתנאי הסביבה בה הם מתפתחים ולמין הפונדקאי אותו הם תוקפים. המחקר הנוכחי התמקד בפתוגן *M. pinodes* מאחר והוא גורם המחלה העיקרי באפונה התרבותית. המטרה ארוכת הטווח של העבודה הייתה לאפיין את הדרישות האקולוגיות והאפידימיולוגיות של הפטרייה *M. pinodes* המחולל העיקרי של מחלת האסקוכיטה באפונת בר ובאפונה תרבותית. מטרת המשנה של העבודה היו:

1. לברר מיהם הפתוגנים מטיפוס אסקוכיטה, המצויים על אפוני בר ותרבות.
2. להשוות את הדרישות האקולוגיות של תבדיד *M. pinodes* שבודדו מאפונה תרבותית ומאפונת בר.
3. להשוות את הדרישות האקולוגיות של תבדיד *M. pinodes* שבודדו מהמין *P. fulvum* מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים.
4. לבחון את ההבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדיד *M. pinodes*, שבודדו ממיני אפונת הבר *P. elatius* ו- *P. fulvum* הגדלים בתפוצה סימפטריית.
5. לכמת ולתאר את התפתחות מחלת האסקוכיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים של אפונת בר. בעבודה נדגמו תבדידים מאוכלוסיות אפונת הבר הגדלות בתנאי אקלים שונים ומאוכלוסיות אפונה תרבותית. התבדידים בודדו ובוצע זיהוי למין הפתוגן על פי מאפייניהם המורפולוגיים והשוואת רצפי DNA לרצפי ביקורת. לאחר מכן, נבחנו הדרישות האקולוגיות של התבדידים ונבדקה רמת האלימות של כל תבדיד כלפי צמחי בוחן ממיני אפונת בר ותרבות. בנוסף נסקרה התפתחות המגפה בבתי הגידול הטבעיים של אפונת הבר *P. elatius*.

2. סקירת ספרות

2.1 האבולוציה של יחסי פתוגן-פונדקאי בממשק האקולוגי-חקלאי

האפונה התרבותית (*Pisum sativum*) נחשבת כאחת מקטניות הגרגרים החשובות (Davies, 1976), והינה גידול הקטנית הנפוץ ביותר באירופה והשני בחשיבותו בעולם (FAO, 2008). סבורים כי גידול האפונה החל עם החקלאות הניאוליטית במזרח הקרוב לפני כ-10,000 שנים (Zohary & Hopf, 1973). האפונה תפסה מקום מרכזי בהיסטוריה של החקלאות כחלק מחבילת הגידולים המייסדים (בניהם חיטה, שעורה, עדשים וחימצה), שאומצו במעבר לכלכלה המבוססת על חקלאות במזרח התיכון הניאוליטי (Zohary & Hopf, 1973; Zohary & Hopf, 1988). כעדות לכך נמצאו בחפירות ארכיאולוגיות מתקופה זו (6,000-7,000 לפנה"ס) במזרח הקרוב מצבורי זרעי אפונה מפוחמים (Zohary & Hopf, 1973). לאחר המהפכה הניאוליטית בדרום מזרח תורכיה (Lev-Yadun et al., 2000), חבילת הגידולים המייסדים התפשטה מאזור המוצא והגיעה לדרום הלבנט תוך כאלף שנים (Abbo et al., 2003; Abbo et al., 2009). הגידולים המזרח תיכוניים התפשטו לאירופה, מרכז ומזרח אסיה, צפון ומזרח אפריקה ולאחרונה גם לעולם החדש (Diamond, 1997). למהפכה הניאוליטית ולאיימוץ החקלאות הייתה השפעה רבה על אוכלוסיות צמחי הבר והתרבות ועל הפתוגנים הקשורים אליהם (Stukenbrock & Harlan, 1976; Burdon, 1993; McDonald, 2008).

במזרח התיכון, גידולים תרבותיים וקרוביהם מאוכלוסיות הבר גדלים בתפוצה סימפטריית עוד מראשית החקלאות (Lev-Yadun et al., 2000; Zohary, 1973; Zohary & Hopf, 1988; Harlan & Zohary, 1966). מרכזי המוצא העיקריים והמשניים של הגידולים התרבותיים הם בדרך כלל אזורי המוצא של הפתוגנים שלהם (Leppik, 1970). הטרוגניות בתנאי הסביבה ושונות גנטית הם חלק מהגורמים המבדילים בין אוכלוסיות טבעיות ואוכלוסיות בבתי גידול חקלאיים. כוחות סלקציה הדדיים הפועלים בין צמחי הבר והתרבות והפתוגנים שלהם מעצבים את דפוסי ההתפתחות והכשירות של הפתוגנים (Dinooor, 1993; Eshed, 1984; Burdon, 1993). בתהליך הקו-אבולוציה הפתוגנים של הגידולים התרבותיים נעשו אגרסיביים וסביר להניח כי הפתוגנים הגורמים להרס הגידולים התרבותיים התפתחו מקרוביהם המאכלסים את אוכלוסיות הבר הסמוכות (Harlan, 1976; Burdon, 1987). לעומת המצב באוכלוסיות הצמחים המבויתים, הפתוגנים התוקפים את אוכלוסיות צמחי הבר בדרך כלל אינם כה אגרסיביים וברוב המקרים המגפות המתפתחות אינן חמורות (Dinooor & Eshed, 1987). כיום יש מעט מאוד מידע זמין על פטריות פתוגניות באוכלוסיות של קרובי הבר של קטניות המזרח הקרוב (Abbo et al., 2007; Frenkel et al., 2008).

יחסי הגומלין בין אוכלוסיות הפתוגנים והמאכסנים שלהם גרמו להתפתחות מסלולים אבולוציוניים שונים באוכלוסיות הבר והתרבות (Burdon & Thrall, 2008). באפונה עשויה להתקיים זרימת גנים בין המסלולים בדרכים שונות כגון צמחי בר המתקיימים בשולי שדות ופליטי תרבות בקרב אוכלוסיות מיני הבר (Zohary & Hopf, 1973; Abbo et al., 2008). חקר האפידמיולוגיה והביולוגיה של אוכלוסיות הפתוגן בצמחי הבר ובצמחי תרבות חיוני להבנת דפוס התנהגות המחלה, ההתפתחות האבולוציונית של הפרזיטיות ועמידות הפונדקאי במערכות הטבעיות (Leppik, 1970; Stukenbrock & McDonald, 2008). הבנה טובה יותר של האינטראקציה בין הפתוגן והפונדקאי במערכת הטבעית

(באוכלוסיות הבר) יכולה לשפר את הבנת יחסי הגומלין שנוצרו במערכת החקלאית (Abbo et al., 2007). ראוי שהמחקר יתחיל במרכזי המוצא של הגידולים החקלאיים כיוון שמרכזים אלו כאמור, הינם בדרך כלל מרכזי המקור של אוכלוסיית הפתוגנים שלהם (Leppik, 1970; Stukenbrock & McDonald, 2008).

הבהרת היחסים האבולוציוניים בין פונדקאי הבר והתרבות מחד גיסא, והפתוגנים המתאימים להם מאידך גיסא, צריכה להתבצע על ידי בחינה הדדית של קבוצות הפונדקאים עם פתוגנים שמקורם מאוכלוסיות הבר והתרבות (Frenkel et al., 2008). עבודה כזו נעשתה עם מספר דגניים שמקורם במזרח הקרוב (Eshed & Wahl, 1975; Dinooor & Eshed, 1987; Leonard et al., 2004) ובחימת בר שמקורה בישראל (Frenkel et al., 2008), הממצאים של חלק מעבודות אלה יפורטו בהמשך.

2.2 הפונדקאים

הסוג *Pisum*, המשתיך לסדרת הקטניות, משפחת הפרפרניים (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973), מכיל בתוכו שלושה מיני בר, אפון קיפח (*P. elatius*), אפון נמוך (*P. humile*) ואפון מצוי (*P. fulvum*) (Danin, 2004) ואת המין התרבותי *P. sativum* (Davis, 1970). כל המינים הינם דיפלואידים ובעלי מספר כרומוזומים זהה ($2n=14$). כמו כן, כולם בעלי מנגנון האבקה עצמית המתאפשרת כתוצאה מבקיעת המאבקים ושחרור האבקנים לפני פתיחת הפרח (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973).

המינים *P. elatius* ו-*P. humile* קרובים מבחינה גנטית למין התרבותי *P. sativum* (Zohary & Hopf, 1973). יתר על כן, Davis (1970) הציע שמיני הבר הנ"ל לא יחשבו כמינים נפרדים ויחד עם המין התרבותי יחשבו כמין ביולוגי אחד שעבר אדפטציה לתצורת נוף שונות. לעומת זאת *P. fulvum* מהווה מין נפרד (Davis, 1970). ממצאים ציטולוגיים (על פי צימוד הכרומוזומים במיוזיס של היברידיים) הראו כי *P. humile* הוא האב הקדמון של המין התרבותי (Zohary & Hopf, 1973; Palmer et al., 1985).

2.2.1 אפוני הבר

מין הבר *P. elatius* Bieb. הינו צמח מטפס גבוה (250-80 ס"מ) בעל פרחים גדולים (3-2.5 ס"מ) בצבע כחול-לילך וארגמן הנישאים על עוקץ (2-1 פרחים לעמוד). אפון זה נפוץ באזורים הלחים של אגן הים התיכון כולל צפון ישראל ובדרך כלל מקיים אוכלוסיות קטנות של פרטים (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973; Waines, 1975). האוכלוסיות משגשגות בצמחיית חורש עליה צמחי האפון מטפסים באופן אקראי. בנוסף, Zohary ו-Hopf (1973) תיארו אוכלוסיות שהתפתחו בצמחייה צפופה נמוכה של עשבים ושיחים (תצורת מקל), בשולי שדות חקלאיים וסבך שיחים בצידי דרכים.

המין *P. fulvum* Sibth. & Sm. הינו עדין יותר בהשוואה ליתר מיני אפונת הבר. גובהו בין 15-50 ס"מ, פרחיו בצבעי צהוב-חום או כתום-חום, קטנים יחסית (1.7-1 ס"מ) ותרמיליו קצרים (3.5-2.5 ס"מ) (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973). מבין מיני האפונה *P. fulvum* הינו המין המסתעף ביותר (Hoey et al., 1996), הוא מאופיין בעלי לוואי ועלעלים משוננים וזרעים שחורים. אזור התפוצה העיקרי של *P. fulvum* הוא מזרח הים התיכון, כולל ישראל. הוא גדל באזורים בעלי אקלים ים-תיכוני בלבד, ונפוץ בעיקר בצמחייה מסוג גריגה (תצורת צומח פתוחה, בה שולטים שיחים מעוצים קטנים בגובה שבין 50 ל-150

ס"מ). בנוסף, הוא מאכלס שולי שדות, גלי אבנים וטרסות (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973). בישראל, וייתכן שבמקומות נוספים באזור תפוצתו, ניתן למצוא *P. fulvum* סמוך ל-*P. elatius* ו-*P. humile*. נמצא כי *P. fulvum* שונה ממיני האפונה האחרים (בר ותרבות) מבחינה מורפולוגית ונראה כי הוא מבודד מבחינה התרבותית (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973). הפצת הזרעים של מיני אפונת הבר מתרחשת כאשר התרמיל מתייבש ומתבקע, הקשוות מסתלסלות, וכתוצאה מכך הזרעים מותזים למרחק של מספר מטרים (Waines, 1975). לזרעי אפונת בר מעטפת זרע קשה המקנה עיכוב נביטה ומאפשרת להם להישאר רדומים בקרקע למספר שנים (Davies, 1976).

2.2.2 אפונה תרבותית

האפונה מהווה גידול קטנית מרכזי באירופה וצפון אמריקה וגידול משני במדינות מתפתחות כגון סין והודו (Davies, 1993; FAO, 2008). גרגרי האפונה בעלי תכולת חלבון גבוהה (עד 22%) והם מהווים מקור חשוב ביותר לחלבון בתזונת האדם ובעלי החיים המבויתים בעיקר במדינות מתפתחות (Owusu-Ansah & McCurdy, 1991; Davies, 1993). בהודו לדוגמה, קטניות בכלל ואפונה בפרט מהווים מקור חשוב לחלבון, כיוון שצריכת בשר אסורה בקרב ההינדים (Smartt, 1990). באופן מסורתי השתמשו בגרגרי אפונה בצורתם היבשה. החל משנות החמישים של המאה ה-20 פותחו שיטות עיבוד חדשות שאפשרו שימוש בגרגרי אפונה לתעשיית השימורים ולהקפאה, לצורך כך התפתחה תעשייה חדשה שדרשה יכול גרגרים לא בשלים (Davies, 1976). כיום אפונה נמכרת כמזון טרי, משומר, מיובש או קפוא (Davies, 1993). הייצור העולמי של האפונה מסתכם בכ-10 מיליון טונות של גרגרים יבשים וכ-8.3 מיליון טונות של אפונה ירוקה טרייה. היבול הממוצע הינו כ-160 ק"ג/דונם (FAO, 2008).

האפונה התרבותית (*P. sativum*) תופסת מקום מרכזי בהיסטוריה של המחקר הביולוגי שכן שימשה את מנדל בניסוח עקרונות התורשה המפורסמים שלו. בנוסף, אפונה ממשיכה לשמש כאובייקט למחקרים גנטיים עד היום (Ellis & Poyser, 2002).

למין *P. sativum* מגוון מורפולוגי רחב והזנים הזמינים למגדלי האפונה נבדלים בתכונותיהם כגון בגובה הצמחים, במספר תרמילים הנוצרים לגבעול ובאופן הצימוח (מסיים ובלתי מסיים). הזנים המגודלים מותאמים לכל מדינה ואזור על פי הפרקטיקה החקלאית המקומית (Davies, 1993). צבע הפרחים משתנה ונע בין סגול לירוק ולבן. גודל הפרח נע בין 1.0-3.5 ס"מ. בניגוד לאפונת הבר התרמילים באפונה התרבותית לא מתבקעים כאשר הם מתייבשים (Waines, 1975), קליפת הגרגר בדרך כלל חלקה, הם גדולים יחסית ובעלי נביטה חופשית.

2.3 הפתוגנים והמחלות

פטריות מהסוג *Ascochyta* הם פתוגנים של מספר קטניות למאכל המגודלות בעונת החורף באזורים רבים בעולם ובמספר מקרים המחלות שהן מחוללות מהוות גורם מגביל בייצור (Peever, 2007). במשך השנים הופצו הפתוגנים לרוב האזורים בעולם בהם מגדלים קטניות, בדרך כלל בזרעים נגועים (Morrall & McKenzie, 1974; Kaiser, 1997ab; Peever et al., 2004). כאשר התנאים האקולוגיים אפשרו,

הפתוגנים התאקלמו במקומות אליהם הופצו. כך, למשל, נמצאו פתוגנים של אסקוכיטה בארה"ב ובאוסטרליה מספר שנים מועט אחרי שהחלו לגדל שם חימצה ועדשים באזורים נרחבים (Kaiser, 1997). חלק מהפתוגנים מהסוג אסקוכיטה (כמו *A. fabae*, *A. lentis*, *A. pisi*, *A. rabiei* ו-*A. viciae*) מראים התאמה ספציפית לפונדקיהם (Host specificity). תבדידים של מינים אלה לא גורמים לסימפטומים נראים לעין בפונדקאים אחרים (מהם לא בודדו). היו מקרים בהם הצליחו לאלח את הצמחים האחרים והצליחו לבודד את הפתוגנים מהרקמות שנראו בריאות (Hernandez-Bello et al., 2006). במחקרים אחרים, מין פתוגן אחד מסוג לתקוף ולגרומ למחלה במספר מיני קטניות. למשל, יש מחקרים המצביעים על כך ש-*Mycosphaerella pinodes* יכולה לתקוף מיני קטניות שאינם *P. sativum* (Bretag, 2004). נמצא כי *M. pinodes* יכולה לתקוף מיני *Pisum*, *Lathyrus*, *Vicia*, *Vigna*, *Medicago*, *Phaseolus* ו-*Cicer*, *Lupinus*, *Rhizolium*, *Lens*, *Melilotus* (Bretag, 2004).

2.3.1 אסקוכיטה באפונה

ארבעה פתוגנים מהסוג אסקוכיטה מסוגלים לתקוף את צמחי האפונה: הפטרייה *Ascochyta pisi* Lib. גורמת לכתמים על התרמילים, הגבעולים והעלים. הפטרייה *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Vesterg. גורמת לכתמים על התרמילים, הגבעולים והעלים ובנוסף גם לריקבון בבסיס הגבעול. הפטרייה *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch העלים, לפצעים על הגבעולים ולריקבון בבסיס הגבעול (Jones, 1927). שלושת הפטריות המוזכרות להלן נפוצות בכל רחבי העולם. הן מתפתחות לבד או יחדיו, ואז הן מכונות קומפלקס האסקוכיטה (Wallen, 1965; Punithalingam & Holliday, 1972). הפתוגן הרביעי הינה הפטרייה *Phoma koolunga* Davidson, Hartley, Priest, Krysinska-Kaczmarek, Herdina, McKay & Scott דומים לאלו של *M. pinodes*. פטרייה זו הוגדרה רק לאחרונה ודווח על קיומה, לעת עתה, רק באוסטרליה (Davidson et al., 2009). סבורים כי הפטריות הגורמות לאסקוכיטה באפונה נוצרו מאב קדמון אחד והן מחוללות מחלה רק בפונדקאי ממין דומה למין ממנו הן בודדו (Peever, 2007). הפטרייה *M. pinodes* (השלב המיני של *A. pinodes*) נפוצה בכל אזורי גידול האפונה בעולם, במיוחד באזורים הממוזגים של אירופה, צפון אמריקה, אוסטרליה וניו-זילנד (Wallen, 1965; Lawyer, 1984; Bretag et al., 1995a). פטרייה זו נחשבת כפתוגן החשוב ביותר של האפונה התרבותית (Allard et al., 1993; Moussart et al., 1998).

2.3.2 אסקוכיטה במיני הבר

למרות העובדה ששלושת המינים בסוג *Pisum* גדלים באופן טבעי בישראל, מחלת האסקוכיטה לא גורמת למגפות חמורות באוכלוסיות הבר (Dinoor, 1974). מיני אסקוכיטה שונים יכולים לתקוף קטניות נוספות (ברש, 1960). הפטרייה *M. pinodes* בודדה ממיני טופח (*Lathyrus*), שעועית (*Phaseolus*) ובקיה (*Vicia*) (Lawyer, 1984), חלקם גדלים בסמוך לאוכלוסיות אפונת הבר (מיני טופח נפוצים למין אזור הגליל ועד לחבל לכיש ומיני בקיה נפוצים מהגליל ועד צפון הנגב) (Danin, 2004). לא ידוע אם הפתוגנים המחוללים

את מחלת האסקוכיטה יובאו לארץ ואז התפשטו באוכלוסיות הבר או שהתקיימו בארץ מלכתחילה כפתוגנים משניים באוכלוסיות הבר (Dinoor, 1974).

2.3.3 אסקוכיטה באפונה תרבותית

אסקוכיטה הינה מחלה חמורה בגידול האפונה ברחבי העולם (Bretag, 2004). כל זני האפונה המסחריים רגישים, ומגיפה קשה יכולה לגרום לאובדן יבולים משמעותי. סקרים שנערכו באוסטרליה בשנים 1983-1986 הראו כי זוהי המחלה הנפוצה ביותר באפונה בדרום אוסטרליה והיא גורמת לירידה משמעותית ביבול הגרגרים (Bretag et al., 1995a).

מחלת האסקוכיטה גורמת לפחיתה ביבול ורמת הנזק תלויה בשלב הפנולוגי של הצמחים בזמן ההדבקה (Tivoli et al., 1996). המחלה גורמת לירידה בקצב ההטמעה ברקמות הפגועות ולאיבוד מים מוגבר מהצמח (Garry et al., 1996; Garry et al., 1997). כתוצאה מכך יש פגיעה במסה הכללית של צמחי אפונה (Tivoli et al., 1996). התפתחות המחלה מפחיתה את מספר הגרגרים לתרמיל ולגבעול (-18% 25% הפחיתה) ולהקטנת גודל הגרגר (13.5-16%) (Tivoli et al., 1996; Garry et al., 1998).

מבין שלוש הפטריות הגורמות למחלת האסקוכיטה *M. pinodes* גורמת לנזק הרב ביותר ליבול (Tivoli et al., 1996). התפתחות המחלה עלולה לגרום לפחיתה ממוצעת של 10-20% ביבול (Bretag et al., 1997; Xue et al., 1997; al., 1995a) ובמקרים קיצוניים הנזק עשוי להגיע ל-75% מהיבול (Lawyer, 1984). תנאי האקלים הם הקובעים את חומרת המחלה המתפתחת ואת גובה היבול הנפגע (Skolko et al., 1954).

2.4 הפתוגן *Mycosphaerella pinodes*

2.4.1 הישרדות ומידבק ראשוני

חמישה מקורות עיקריים תוארו בספרות כמקור המדבק הראשוני למחלת האסקוכיטה הנגרמת על ידי *M. pinodes*: זרעים, שאריות צמחים, קרקע, צמחי ספיח ופונדקאים חלופיים (Bretag & Ramsey, 2001; Tivoli & Banniza, 2007). הפתוגן יכול לשרוד מספר שנים בזרעים (בקליפה החיצונית או בפסיגים), על שאריות צמחי אפונה, ובקרקע כתפטיר רדום, כסקלרוטיות וככלמידוספורות (Dickinson & Sheridan, 2006; Bretag et al., 1995b; Bretag et al., 2006; Wallen & Cuddy, 1968; 1968). משך הישרדות בקרקע או בשאריות צמחים נע בין 4 חודשים ועד ליותר מ-20 שנה, כתלות בתנאי הסביבה (Cruickshank, 1952; Carter & Moller, 1961; Bretag, 1991). במחקר שנערך על ידי Cruickshank (1952) נמצא כי הפתוגן שרד פחות מ-4 חודשים כאשר לא היו בקרקע שאריות של הפונדקאי. עוד נמצא כי הפטרייה *M. pinodes* שורדת טוב יותר על שאריות צמחים הנמצאים על פני השטח לעומת שאריות הטמונות בקרקע. זאת מאחר והצמחים שהיו על פי הקרקע היו יבשים יותר ועברו תהליכי פירוק מועטים יותר (Zhang et al., 2005). מחקרים הראו כי פיקנידיוספורות שנטמנו בקרקע הפכו לכלמידוספורות (Carter & Moller, 1968; Dickinson & Sheridan, 1961). מדבק מהקרקע יכול להיות משמעותי ל-*M. pinodes* שמתנהגת כספרופיטית כאשר היא בתוך הקרקע (Dickinson & Sheridan, 1968) ויכולה להשתמר בתוך קרקע שגודלה עליה אפונה בעבר (Carter & Moller, 1961).

הפתוגן *M. pinodes* עובר בזרעים (Moore, 1946) וקיימת סכנה של מעבר זרעים נגועים בין אזורים (Ali et al., 1982) ובין ארצות (Neergaard, 1979). משך הישרדות בזרעים של עד 4 שנים נמדד על ידי Corbière וחבריו (1994). כאשר הזרעים היו נגועים ברמה גבוהה ניתן היה למצוא את הפטרייה גם בעובר ובפסיגים (Moussart et al., 1998). זרעים נגועים משפיעים על הנביטה וגורמים להדבקה הנבט (Wallen et al., 1967). קצב המעבר מהזרעים לצמחים הנובטים קובע כמה זרעים נגועים יתפתחו לצמחים נגועים, ונתון זה משפיע על התפתחות מקור המדבק המשני למגיפה (Tivoli & Banniza, 2007). מעבר המחלה מהזרע לצמח בדרך כלל מתרחש בתנאי רטיבות ולכן איננו בעייתי באזורים יבשים (Bretag et al., 1995b).

2.4.2 יצירת נבגים והפצתם

הפטרייה *M. pinodes* הינה הומוטאלית (אינה זקוקה לטיפוסי התאם שונים לצורך רבייה מינית). גופי הפרי המיניים (פסאודוטציות) נוצרים על גבי עלעלים מזדקנים במהלך המחצית השנייה של עונת הגידול (Tivoli & Banniza, 2007). התפתחות רבייה מינית או אל-מינית תלויה בתנאי סביבת הגידול הספציפית, בנוכחות חומרי הזנה ובשלב הפנולוגי של הצמח. פיקנידיות מתפתחות בדרך כלל בשלב הווגטטיבי של הצמח ופסאודוטציות מתפתחות בסוף שלב האסיף על רקמות זקנות (Agrios, 2004). פסאודוטציות מתפתחות בתנאי מחסור בחומרי הזנה ופיקנידיות כאשר יש חומרי הזנה בשפע (Bretag et al., 2006). כמו כן נראה כי הפחתה בריכוז הפיטואלקסין פיסאטין קשורה גם היא במעבר לייצור פסאודוטציות (Roger & Tivoli, 1996; Roger et al., 1999a). גופי הפרי מתפתחים בתחילה בבסיס הצמח ובהמשך מתפשטים כלפי מעלה (Roger & Tivoli, 1996). לעיתים קרובות פיקנידיות ופסאודוטציות נמצאות במקביל על אותו העלה (Tivoli & Banniza, 2007). לגופי הפרי המיניים תפקיד חשוב ביצירת שונות תוך מינית ולהפצת הפתוגן במרחב (Kaiser, 1997).

מספר הפיקנידיות המתפתחות מושפע ממספר גורמים אביוטיים. מספר מחקרים בחנו את הטמפרטורה האופטימאלית להיווצרות פיקנידיות *in vitro*. החוקרים Hare & Walker (1945) דיווחו כי טווח הטמפרטורות האופטימאלי הינו 20-28 מ"צ, וטווח של 20 ו-24 מ"צ דווח על ידי Lawyer (1984) ו-Roger & Tivoli (1996) בהתאמה. מספר הפיקנידיות גדל בתנאי לחות גבוהה (Kerling, 1949; Lawyer, 1984), כאשר מים חופשיים נמצאים ומגבילים (על ידי מיהול) את זמינות הפיסאטין (Heath & Wood, 1993; Allard et al., 1971; Leach, 1959; Hare & Walker, 1944). הפיקנידיות הנוצרות מכילות נוזל צמיג (ooze) המכיל את הפיקנידיוספורות (Trapero- Kaiser, 1997b). כתוצאה מהשפעת הלחות וזמינות המים על התפתחות הפיקנידיות תתפתח בשנים יבשות מחלה ברמת נגיעות נמוכה (Lawyer, 1984).

2.4.3 תהליך ההדבקה

תהליך ההדבקה על ידי פיקנידיוספורות כולל נביטה, יצירת אפרסוריה וחדירה (Clulow et al., 1991; Clulow et al., 1992; Nasir et al., 1992). בטמפרטורה אופטימאלית של 20 מ"צ הפיקנידיוספורות מתחילות לנבוט לאחר שעתיים, אפרסוריום נוצר לאחר 6 שעות ונחשון הנביטה חודר לעלה לאחר 8 שעות

(Roger et al., 1999a). התהליך מואט או נעצר כתוצאה מירידה בלחות היחסית בזמן ההדבקה. הפיקנידיוספורות יכולות לשרוד תקופת יובש בכל שלבי התהליך והן ממשיכות בהתפתחותן כאשר התנאים מתאימים (Roger et al., 1999b).

דווח כי הדבקה של אפונה ב- *M. pinodes* התרחשה בטמפרטורות בין 10-30 מ"צ, הטמפרטורה האופטימאלית להדבקה היא בתחום 15-18 מ"צ (Wallen, 1965) או 20 מ"צ (Bretag, 1991). בטמפרטורות שאינן אופטימאליות נדרש משך רטיבות ארוך יותר לצורך ההדבקה (Bretag, 1991). נמצא גם כי גרדיאנט ההדבקה במחלה תלוי בכיוון הרוח (Zhang et al., 2004). יעילות ההדבקה תלויה גם במספר הפיקנידיוספורות במדבק (Heath & Wood, 1971; Bretag, 1991) ובלחות היחסית (Heath & Wood, 1971).

הטמפרטורה ומשך רטיבות העלים הם גורמים חשובים המשפיעים על היווצרות המחלה לאחר הפיזור וההדבקה ועל יצירת גופי פרי בפתוגנים רבים בכלל, ועל *M. pinodes* בפרט (Carter & Moller, 1961; Rotem et al., 1978). המחלה מתפתחת במהירות כאשר שוררים תנאי רטיבות והטמפרטורות מתונות (Kerling, 1949). הטמפרטורה האופטימאלית לנביטה של נבגים היא 20-25 מ"צ (Sattar, 1934), אך רוב הנבגים מסוגלים לנבוט בטווח טמפרטורות של 5-35 מ"צ (Jones & Vaughan, 1921). הדבקה יכולה להתרחש באותו טווח טמפרטורות, אך טמפרטורת האופטימום להדבקה נמוכה במספר מעלות מטמפרטורת האופטימום לנביטה (Wallen et al., 1967). בטמפרטורות נמוכות דרוש זמן ארוך יותר של רטיבות עלים לצורך הדבקה (Carter, 1963; Bretag, 1991).

אחרי 24 שעות מאילוח ב- *M. pinodes* ניתן למצוא תפטיר בתוך התאים וביניהם. התפטיר מתפתח מהר וללא דפוס התקדמות מסודר וגורם לנקרוזה בתאים אליהם הוא חודר ובתאים הסמוכים אליהם (Heath et al., 1969). הסימפטומים הראשוניים המופיעים לאחר ההדבקה ב- *M. pinodes* נראים כנקודות קטנות בצורת כתמים (Tivoli & Banniza, 2007). בתנאי יובש הנקודות יישארו קטנות ללא גבולות ברורים. בתנאי לחות גבוהה הנקודות גדלות ונהפכות לחומות עד שחורות, מתפתחים שולים ברורים וניתן להבחין בחלוקה מוגדרת לאזורים (Jones, 1927). כתמי האסקוקיטה המתפתחים נראים בדרך כלל כטבעות קונצנטריות המכילות פיקנידיות שחורות (Tivoli & Banniza, 2007).

השלב השני בהדבקה כולל התרחבות אגרסיבית של התפטיר המלווה בהפצת טוקסינים, אנזימים וחומרים מעכבים שמאפשרים התפשטות מהירה של התפטיר בתאים המתים, על ידי הסרת מחסומים פיזיים ודיכוי מערכת ההגנה של הצמח (Heath & Wood, 1971; Shiraiishi et al., 1994). בנוסף, Bailey (1969) הראה כי ריכוז הפיסאטין יורד ככל שהצמח מזדקן והרקמות נעשות יותר רגישות להדבקה על ידי *M. pinodes*. לצורת הנוף אפקט חשוב על התפתחות המחלה כיוון שהיא משפיעה על התנאים המיקרו-אקלימיים בקמה (Le May et al., 2009).

עלים עם נגיעות גבוהה נובלים לפני שהכתמים גדלים, בעיקר בחלקים התחתונים של הצמח (Tivoli & Banniza, 2007); עלים פחות נגועים יכולים להתייבש ולהישאר על הצמח. כתמים על הגבעולים מתפתחים כלפי מטה ומעלה, ובהדרגתיות יוצרים חיגור סביב הגבעול. זרעים נגועים לא תמיד מראים סימפטומים ועלולים להיראות מצומקים. התפשטות המחלה מהזרעים לנצרים המתפתחים, גורמת לריקבון בסיס הגבעול (foot rot) כשהצמחים מתקרבים לבגרות, ההדבקה תגרום להזדקנות העלים התחתונים ולהשחרה של חלקי הגבעול בבסיס הצמח (Jones, 1927).

2.4.4 ההפצה במרחב

באזורים בהם אפונה הינה גידול עיקרי כל שנה, סביר שפונדקאים אלטרנטיביים אינם מהווים מקור חשוב למדבק ראשוני (Lawyer, 1984). במחקרם Roger ו-Tivoli (1996) הראו שמחזור המחלה מתחיל בהפצת אסקוספורות. לאחר ההדבקה מתפתחות פיקנידיות במהירות בכתמים על העלים, על רקמות ירוקות אחרות ועל רקמות מזדקנות. מספר הפיקנידיות נמצא במתאם חיובי לחומרת המחלה המתפתחת. הפיקנידיוספורות מופצות בנתזי גשם או מי השקיה עד למרחק 30 ס"מ מעל פני הקרקע (Tivoli & Nene, 1996; Carter & Moller, 1961; Roger & Reddy, 1987; Kaiser, 1992). עקב כך הן מאיצות את הזדקנות העלים (Kerling, 1949). כתוצאה מההזדקנות המוקדמת של הרקמות מתחילה היווצרות פסאודוטציות (היכולות להתפתח רק על רקמה זקנה). בגלל השוני בגיל הרקמות, חומרת המחלה המתפתחת בחלקי הצמח התחתונים גבוהה יותר מזו המתפתחת בחלקיו העליונים (Tivoli et al., 1996).

רמת המדבק עולה וחומרת המחלה מתגברת לאחר גשמים. לאחר 1-2 ימים הפסאודוטציות משחררות אסקוספורות (Zhang et al., 2005) המופצות על ידי הרוח (Roger & Tivoli, 1996) ונמצא כי הן מגיעות למרחק של יותר מ-1.6 ק"מ (Lawyer, 1984). בזמן ההפצה רוב האסקוספורות נלכדות על ידי נוף האפונה הסמוך ורק חלק קטן מהם נפוץ מעבר לכך (Roger & Tivoli, 1996). באוסטרליה, תחת תנאי גידול סטנדרטיים, הפסאודוטציות נוצרות על שאריות הצמחים של הגידול מהשנה הקודמת (Carter & Moller, 1961) וריכוז האסקוספורות הנישאות באוויר מגיע לרמתו הגבוהה ביותר מהסתיו המאוחר עד תחילת החורף, אז הפסאודוטציות מבוגרות דין ואסקוספורות בשלות מתפתחות לראשונה (Bretag, 1991; Peck et al., 2001).

2.4.5 התפתחות המגפה

טמפרטורה ולחות לאחר האילוח הינם גורמי מפתח סביבתיים באפידמיולוגיה של אסקוכיטה על קטניות ולהם השפעה גדולה על משך האינקובציה והתקופה הלטנטית. בתנאים אופטימאליים של טמפרטורה ורטיבות העלים, זמן האינקובציה של *M. pinodes* הוא 1-2 ימים ומשך התקופה הלטנטית הוא 3-4 ימים (Roger et al., 1999a). צמחים עלולים להתקף בכל שלבי הגידול וכל חלקי הצמח רגישים. אם במהלך העונה תנאי הלחות מספיקים, תתרחש הדבקה משמעותית של התרמילים שתגרום להדבקה של גרגרים (Bretag et al., 2006). מקובל כי משוואות פולינומיות הן המתאימות ביותר לחזות את שלבי ההדבקה, האינקובציה, הלטנטיות והתפתחות המחלה כפונקציה של טמפרטורה ומשך רטיבות (Zhang et al., 2004).

2.4.6 עמידות גנטית והתחמקות

כיום לא קיימים זני אפונה העמידים למחלה, ולהבדלים בין הזנים השפעה מועטה על חומרת המחלה המתפתחת (Bretag & Brouwer, 1995). תגובת הפונדקאי לפטרייה מחוללת המחלה מושפעת מריכוז הנבגים, גיל המושבה של הפטרייה ממנה נאספו או הופצו הנבגים ופתוגניות התבדוד (Onfroy et al., 2007). בחיפוש אחר עמידות למחלה נתקלים בבעיית שונות בתגובת צמחים מאותו הזן להדבקה במחלה (Skolko et al. 1954), זאת כתוצאה משונות בתנאי הסביבה ובגלל ההטרוגניות הגנטית הקיימת לעיתים

בתוך הזן הנבחן (Ali-Khan et al., 1973). כמו כן, Ali וחובריו (1978) מצאו הבדלים בתגובת זנים שונים של אפונה תרבותית לאותם התבדילים של מיני האסקוקיטה ונראה כי לזנים שונים גן או גנים שונים לעמידות.

בגנוטיפים פרימיטיביים של הזן התרבותי, התחמקות הינה אחת הדרכים בעזרתן הצמחים מפחיתים את אפקט המחלה (Wroth & Khan, 1999). ההתחמקות מושגת על ידי נשירת העלים הפגועים בסמוך לאחר האילוח, על ידי כך נמנעת היווצרות חיגורים על גבי הגבעולים וגופי הפרי (הנמצאים על גבי העלים הנושרים) מורחקים פיזית מהעלים הבריאים הנשארים על הצמחים. נמצא מתאם חיובי בין מספר העלים שנדבקו למספר העלים שנשרו (Wallan, 1974).

2.5 זיהוי הפטריות הגורמות לאסקוקיטה באפונה

הבחנה בין הפטריות על סמך הבדלים מורפולוגיים (גודל הפיקנידיות, צורה וגודל של הקונידיוספורות או העדר ונוכחות כלמידוספורות) אינה ודאית כיוון שהיא מבוססת על הבדלים דקים. הצורה והגודל של אברי הריבוי מושפעים מתנאי הגידול והסתמכות עליהן עלולה לגרום לטעויות בזיהוי (Faris-Mokaiesh et al., 1996) לכן פותחו מספר שיטות חלופיות להבחנה בין מיני הפטריות. למשל Faris Mokaiesh וחובריו (1995) פיתחו שיטה לזיהוי *M. pinodes* בעזרת מבחן קישור אנזימטי (אינו בשימוש מסחרי), ו-Faris Mokaiesh וחובריו (1992) הראו כי ניתן להבדיל בין שלוש הפטריות על ידי שיטות אימונולוגיות.

כיום, טכנולוגיה המבוססת על PCR של מקטעי DNA היא כלי חשוב בציטוגנטיקה וטקסונומיה של פטריות (Williams et al., 1990; McDonald, 1997) ובעזרתה ניתן להגיע לזיהוי והבחנה בין מיני פטריות האסקוקיטה (Wang et al., 2000). המינים *M. pinodes* ו-*P. pinodella* זוהו בעבר על ידי שימוש בסמני RAPD (Onfroy, 1999), על ידי חיתוך ה-DNA המיטוכונדריאלי באנזימי רסטרקציה (Fatehi et al., 2003) וזיהוי בשיטת rDNA-RFLP (Lubeck et al., 1998). לאחרונה דווח ניסיון להבחין בין *M. pinodes*, *A. pisi* ו-*P. pinodella* על ידי השוואת רצפי אזור מקטע ה-Internal transcribed spacer (ITS) באתרי ה-rDNA. נמצא כי שיטה זו מאפשרת להבחין בין *A. pisi* לבין *M. pinodes* ו-*P. pinodella*, אך לא ניתן היה להבדיל בין *M. pinodes* ובין *P. pinodella* (Fatehi et al., 2003). ניתוח פילוגנטי של רצפי *G3PD* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) מאפשר הבחנה בין *M. pinodes* ו-*P. pinodella* (Peever et al., 2007).

2.6 שונות גנטית והבדלים בתכונות תבדילים שבודדו ממקורות בר ותרבות

פתוגנים מהסוג אסקוקיטה הראו שונות גנטית רחבה בארצות רבות בהן הפונדקאי והפתוגן התקיימו ביחד במשך זמן ממושך (Wilson & Kaiser, 1995). השוואה פילוגנטית בין תבדילים שבודדו מאוכלוסיות בר של *Cicer* spp. ותבדילים שבודדו מחימצה תרבותית (*C. arietinum*) הראתה שהם דומים מאד כמעט זהים אלו לאלו (Peever et al., 2007). הדמיון בין הפטריות המאכלסות אוכלוסיות רב-שנתיות וחד שנתיות מהפונדקאים מהסוג *Cicer* מרמזות כי יתכן שאוכלוסיות הבר מהוות מקור לפטריות האסקוקיטה שגורמות למגיפות בשדות החימצה התרבותית. תבדילים שבודדו מהבר הראו שונות גבוהה יותר ברצפי ה-DNA לעומת תבדילים מהתרבות בכל הקטניות שנבדקו (Peever, 2007; Peever et al., 2007).

במחקר שנערך על ידי Frenkel וחבריו (2008) נמצאו הבדלים בדרישות האקולוגיות של תבדידים שבודדו מחימצת הבר *C. judaicum* ותבדידים שבודדו מחימצת תרבותית. תבדידים מהתרבות גדלו מהר יותר בטמפרטורות גבוהות, דבר המרמז על התאמה לטמפרטורות הממוצעות באביב המאוחר. קצב הגדילה של תבדידים מחימצת הבר *C. judaicum* היה כמעט דומה בשתי הטמפרטורות שנבדקו 15 ו-25 מ"צ אך עקום ההתפלגות הראה התאמה טובה יותר לטמפרטורה הנמוכה האופיינית בחורף. כמו כן, נמצאו הבדלים משמעותיים באגרסיביות התבדידים מהמקורות השונים. תבדידים ממקור תרבותי היו אלימים יותר כנגד זני חימצת תרבותית מתבדידים ממקור הבר. למרות שתבדידים שמקורם היה ב- *C. judaicum* הצליחו להדביק את זני התרבות, הניחו Frenkel וחבריו כי אין מעבר תדיר בין אוכלוסיות הבר והתרבות (Frenkel et al., 2008). תוצאה זו מרמזת על התאמה דיפרנציאלית של הפתוגן *Didymella rabiei* לחימצת הבר *C. judaicum* ולחימצת התרבותית *C. arietinum*.

תופעה דומה תוארה על ידי Krupinsky (1997) שחקר את מחלת הספטוריה בחיטה התרבותית וקרוביה מאוכלוסיות הבר. הוא מצא כי תבדידים שמקורם באוכלוסיות הבר היו פחות אגרסיביים מתבדידים שמקורם מהתרבות, אך התבדידים מהבר היו בעלי טווח רחב יותר של אגרסיביות, כולל מספר תבדידים בעלי אגרסיביות גבוהה.

הבדלים משמעותיים באגרסיביות נמצאו גם בתוך קבוצת התבדידים שמקורם בחימצת הבר (Frenkel et al., 2008). תופעה דומה תוארה על ידי Dinooor & Eshed (1987) שדיווחו על הבדלים משמעותיים באגרסיביות בין תבדידי *Erysiphe graminis* שבודדו משעורת בר. ככול הנראה אחת הסיבות העיקריות לשונות הרבה בין תבדידי הבר הינה הטרוגניות רבה בנישות הגידול במערכת הטבעית לעומת המערכת החקלאית (Frenkel et al., 2008). כיוון שחימצת הבר הראתה רגישות דומה למספר תבדידים שבודדו מאוכלוסיות הבר והתרבות, לא ניתן לשלול את האפשרות כי *C. judaicum* משמש כפונדקאי לתבדידים מהתרבות (Frenkel et al., 2008).

במספר מחקרים הצליחו לחלק תבדידים של פטריות אסקוכיטה לקבוצות נפרדות על סמך תכונותיהם. לדוגמה, Wallen (1957) מצא לפחות 4 גזעים נפרדים של *A. pisi* בקנדה, כאשר כל גזע נמצא באזור גיאוגרפי אחר. כיוון שאותם זני האפונה גדלו בכל האזורים, הוא הציע שתנאי הסביבה היו הגורם להתפתחות הגזעים באזורים השונים. כמו כן, Gilpatrick & Busch (1950) דיווחו כי מצאו הפרדה ל-3 גזעים פיסיוולוגיים שונים על פי הבדלים בפתוגנזה בין 7 תבדידים של *A. pisi* כלפי 8 זני בוחן של אפונה ו-3 מיני בוחן של בקיה. מוקדם יותר Jones (1927) דיווח על הבדלים בפתוגנזה בין תבדידים של *A. pisi* ממדינות שונות. מספר ניסויים מקדימים הראו כי תבדידים של *A. pisi* שבודדו מאפונה תרבותית מסוגלים לגרום למחלה באפונה התרבותית ואפונת הבר, אולם תבדידים שבודדו מאפונת בר גרמו למחלה רק באפונת הבר (מידע שלא פורסם על ידי Horton, Chilvers & Peever מתוך Peever, 2007).

בבחינת השונות המולקולרית בין תבדידי *M. pinodes* ממערב קנדה, ניו-זילנד, צרפת, אוסטרליה, בריטניה ואירלנד שבוצעה על ידי Zhang וחבריו (2003) נמצא כי ההבדלים הרבים ביותר היו בין תבדידים מאזורים שונים אך עדיין היו הבדלים משמעותיים בין תבדידים מאותו האזור. הם הניחו שמתקיימים מספר "טיפוסים" של הפטרייה (Pathotypes) ברוב אזורי הגידול של האפונה. בנוסף Tohamy וחבריו (1997) דיווחו כי הצליחו לחלק את תבדידי הפטרייה *M. pinodes* ל"פתוברים" (Pathovers) שונים על סמך דפוס RAPD (שיטה לבחינת פולימורפיזם על ידי הגברה של מקטעים

אקראיים ב-DNA). בנוסף, Clulow וחבריו (1991) דיווחו על קיום של "גזעים" בתוך האוכלוסייה הכללית של *M. pinodes* ו-Ondrej (1974) דיווח כי מצא 5 "גזעים" נפרדים של *M. pinodes* בציכוסלובקיה.

לעומת זאת, במחקרים רבים נמצאה שונות רבה בוירולנטיות ובאגרסיביות של תבדידי *M. pinodes* (Bretag, 1991; Nasir & Hoppe, 1991; Nasir et al., 1992; Onfroy et al., 1999). מדבק שהוכן ממושבות שמוצאן מנבג בודד של תבדידים שנדגמו מאזורים שונים באוסטרליה שימש לאילוח טווח רחב של גנוטיפים בתנאים מבוקרים. התוצאה הייתה טווח רחב של נגיעות בצמחים השונים מנמוך עד גבוה, ולא ניתן היה להפריד בין הקווים העמידים לקווים הרגישים. המסקנה הייתה שהגורם העיקרי שהשפיע על התגובה של הגנוטיפים השונים היה תנאי הסביבה ומכאן הניחו החוקרים כי באוסטרליה לא מתקיימות קבוצות נפרדות של תבדידים בעלות אגרסיביות שונה (Wroth, 1998). בנוסף, Wroth (1998) לא הצליח לחלק את התבדידים של *M. pinodes* שבחן לקבוצות בהתבסס על האינטראקציה שלהם לפונדקאים שאולחו. ניתוח התנהגות התבדידים על פי תגובת הפונדקאי הראתה שתבדידים רבים הראו פתוגניות דומה למרות שבודדו מפונדקאים שונים ומאתרים שונים.

3. שיטות וחומרים

3.1 זיהוי הפתוגנים שהתפתחו על אפונת בר ותרבות

תנאי מקדים לתחילת עבודה זו היה קיום של אוסף תבדידים שהוכח כי הם עשויים לחולל את מחלת האסקוכיטה באפונה תרבותית ובאפונת בר. איסוף התבדידים מאפונה נגועה בשטח ולאחר מכן בידודם במעבדה נעשה בשנים 2005 ועד 2007. לאחר איתור צמח אפונה שנראו עליו תסמיני מחלה הדומים לאלו של מחלת האסקוכיטה, נאספו האיברים הנגועים והפתוגנים בודדו ממקטעי העלים והגבעולים הנגועים. המקטעים נטבלו במשך דקה בתמיסת סודיום היפוכלוריט 0.1% והועברו לצלחת פטרי על מצע PDA שהכיל 39 ג' ליטר Potato Dextrose Agar ו-0.025% Chloramphenicol. הצלחות הודגרו בחדר עם 12 שעות אור ב-20 מ"צ. לאחר שהתרבית גדלה, הועברה דיסקית מתוך אזור שנראה נקי מזיהומים לצלחת חדשה בעלת מצע דומה למחזור גידול נוסף. כאשר התרבית הייתה נקייה בוודאות מזיהומים היא גודלה במשך כשבוע עד להופעת פיקנידיות. לאחר מכן נלקחה מהתרבית דיסקית קטנה ככל האפשר הנושאת פיקנידיות והיא הורחפה ב-1 ml מים מעוקרים. מתוך התרחיף נלקחו 120 µl ופוזרו בצלחת פטרי על מצע PDA והצלחות הוחזרו לחדר המואר ב-20 מ"צ. לאחר נביטת הנבגים (בערך יומיים) הוצאה דיסקית המכילה נבג אחד שנבט (תוך תצפית בבינקולר). הדיסקית הועברה לצלחת חדשה, נאטמה בפארפילם והוחזרה לחדר המבוקר להמשך גידול.

במטרה להבטיח שהתבדידים המשווים במחקר שייכים לאותו המין, ובכדי להגדיר את מיני האסקוכיטה השונים התוקפים את האפונה במקומות שונים בארץ, פותח פרוטוקול לזיהוי בעזרת רצפי DNA (שיאפשר קביעה ודאית ככל האפשר למין הפטריה). בשלב הראשון בוצע ריצוף של האזור המקודד למקטע ה-ITS Internal transcribed spacer (ITS) לצורך הבחנה בין המינים *M. pinodes* ו-*P. pinodella* זאת לעומת *A. pisi*. בשלב השני בוצע ריצוף של הגן המקודד לאנזים Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) במטרה להבדיל בין המינים *M. pinodes* ו-*P. pinodella*. זיהויו של כל תבדוד התבסס על מידע מולקולרי ומורפולוגי (Peever et al., 2007).

על מנת לבחון את אמינות שיטת הזיהוי גודלו מושבות ורוצפו אזור ה-ITS והגן *G3PD* מתבדידים של שלושת מיני קומפלקס האסקוכיטה: *M. pinodes*, *P. pinodella* ו-*A. pisi* שזהותם אומתה מראש על ידי חברת Centraalbureau voor Schimmelcultures ההולנדית והם נבחנו במקביל לתבדידים שנאספו ברחבי הארץ לצורך המחקר.

בשלב הראשון הגדרת הפטרייה נעשתה על פי מאפיינים מורפולוגיים: גודל הנבגים, מספר התאים שנראו בכל נבג ויצירת כלמידוספורות. מאחר והפטריה *M. pinodes* היא החשובה והנפוצה שבין פטריות האסקוכיטה בארץ ובעולם (Bretag et al., 2006). הוחלט שהמחקר יתמקד בפטרייה זו ורק תבדידים מדגימות שזוהו כ-*M. pinodes* נבחנו בהמשך העבודה. בשלב הבא נלקחו מכל תרבית שגדלה בצלחות הפטרי מספר דיסקיות והועברו לגידול במצע נוזלי מעוקר שהכיל 2 ג' ליטר Bacto™ Yeast Extract ו-10 ג' Glucose L. מיכלי הגידול טולטלו במהירות 130 rpm ב-20 מ"צ, למשך שבוע עד ליצירת תפטיר בכמות מספקת. לאחר שבוע הנוזלים נשאבו בוואקום דרך בד Miracloth והתפטיר הוקפא במינוס 80 מ"צ.

הפקת DNA גנומי מהתבדידים נעשתה בעזרת הערכה Master Pure Yeast DNA Purification Kit (Epicenter, U.S.A), על פי הוראות היצרן. קביעת ריכוז ה-DNA נעשתה על ידי ספקטרופוטומטר

המחשב את יחס בליעת האור באורכי הגל - 260 nm ו- 280 nm ובוצע מיהול אחיד לכמות של 30 ng/μl. הגברה על ידי Polymerase Chain Reaction (PCR) - האנזים (JMR) Super Term Taq polymerase והבופר המתאים סופקו ע"י חברת Holding. ריאקציה ה-PCR בוצעה בנפח 25 μl וכללה את מרכיבי הריאקציה המתוארים על ידי Barve וחבריו (2003). כ-DNA template שימש DNA הגנומי שהופק מהפטריות.

תנאי הריאקציה היו כלהלן. להגברת אזור ה-ITS: התכה של 3 דקות ב-94°C, לאחר מכן 35 מחזורים שכללו שלב התכה של חצי דקה ב-94°C, שלב קישור (annealing) של חצי דקה ב-60°C ושלב סינתזה של דקה ב-72°C, לסיום בוצעה סינתזה של 10 דקות ב-27°C והפחתה ל-11 מ"צ לתמיד. תכנית זו שימשה לסינתזת מקטעים באורך של עד 500 bp. תנאי הריאקציה להגברת הגן *G3PD*: התכה של 3 דקות ב-94°C, לאחר מכן 35 מחזורים שכללו שלב התכה של חצי דקה ב-94°C, שלב קישור של חצי דקה ב-63°C ושלב סינתזה של דקה ב-72°C, לסיום בוצעה סינתזה של 5 דקות ב-72°C והפחתה ל-11 מ"צ לתמיד. גם תכנית זו שימשה לסינתזת מקטעים באורך של עד 500 bp.

כל התחלים הספציפיים ששימשו בעבודה סונתזו ע"י Sigma Genosys לאורך של 19-20 בסיסים. התחלים ITS1 ו-ITS4 שימשו להגברת מקטע ה-ITS (White et al., 1990) והתחלים GPD1 ו-GPD2 שימשו להגברת הגן *G3PD* (Berbee et al., 1999) (טבלה 1). שמונה μl מנפח תוצרי ה-PCR הוטענו בתוספת 2 μl (x6) loading dye (חומר צבע) על גיל אגרוז 1.5% המכיל 0.5 μg/ml (Ethidium Bromide) EtBr בבופר הרצה (TAE (TRIS Acetate EDTA), והורצו במשך 40-60 דקות במתח של 60-100 volt (כתלות בגודל הגיל). לאחר הרצת תוצרי ה-PCR הגיל נבחן במנורת אולטרא-סגול ונבדק האם נוצרו תוצרים בגודל המצופה (כ-500 bp בקירוב) על ידי השוואה לסמן גודל בסולם 100 bp שהורץ במקביל. לאחר מציאת תוצרי PCR אלו עברו ניקוי משאריות התחלים והנוקלאוטידים בעזרת הערכה ExoSAP-IT® (USB, Amersham) על פי הוראות היצרן.

טבלה מס' 1: רשימת התחלים אשר שימשו לאנליזות PCR.

שם התחל	שם המקטע / הגן	רצף התחל 3'→5'
ITS1	ITS	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	ITS	TCCTCCGCTTATTGATATGC
GPD1	<i>G3PD</i>	CAACGGCTTCGGTCGCATTG
GPD2	<i>G3PD</i>	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC

אנליזות רצף נעשו באופן אוטומטי לפי השיטה האנזימטית (Sanger et al., 1977). קריאת הרצף נעשתה בחברת Macrogen (Seoul, Korea), תוך שימוש במכשיר ABI PRISM 3700 DNA Sequencer - System (Applied Biosystems, U.S.A.). בדיקת הרצפים ותיקונם נעשתה ע"י תוכנת Vector NTI של חברת Invitrogen (www.invitrogen.com). השוואת הרצפים בוצעה על ידי BLAST לרצפים שהופקדו במאגר ה-NCBI (Information National Center for Biotechnology) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.2 השוואת דרישות אקולוגיות של תבדידי אסקוכיטה ממין זהה, מאפונה תרבותית

ומאפונת בר

3.2.1 בחינת השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי

השפעת הטמפרטורה על צימוח התפטיר של תבדידים שבודדו מאפונה תרבותית ומאפונת בר נבחנה בסדרת ניסויים. בניסוי הראשון נכללו שני תבדידים מתפוצה סימפטריית שנדגמו מעמק בית שאן מאוכלוסיית צמחי הבר *P. fulvum* ושניים שנדגמו משדות תרבותיים סמוכים (טבלה 2). בניסוי השני נכללו 3 תבדידים מתפוצה אלופטריית שנדגמו מ- *P. fulvum* שמקורם מנחל עירון, אזור לכיש ומבואות ירושלים ושני תבדידים שמקורם ב- *P. sativum* מהגלבוע ועמק בית-שאן (טבלה 3).

טבלה מספר 2. רשימת התבדידים שנדגמו מצמחים הגדלים בתפוצה סימפטריית מ- *P. sativum* ו- *P. fulvum*

אתר בידוד	פונדקאי מקור	התבדיד
עמק בית-שאן	<i>P. sativum</i>	SE-01
עמק בית-שאן	<i>P. sativum</i>	SE-02
עמק בית-שאן	<i>P. fulvum</i>	FM-01
עמק בית-שאן	<i>P. fulvum</i>	FM-02

טבלה מספר 3. רשימת התבדידים שנדגמו מצמחים הגדלים בתפוצה אלופטריית מ- *P. sativum* ו- *P. fulvum*

אתר בידוד	פונדקאי מקור	התבדיד
לכיש	<i>P. fulvum</i>	FS-01
מבואות ירושלים	<i>P. fulvum</i>	FY-01
נחל עירון	<i>P. fulvum</i>	FV-01
הגלבוע	<i>P. sativum</i>	SD-01
עמק בית-שאן	<i>P. sativum</i>	SE-01

גדילת התפטיר נבחנה *in vitro* בטמפרטורות: 5, 10, 15, 20, 25, 30 ו- 35 מ"צ. דיסקיות אגר (בקוטר 8 או 9 מ"מ) נחתכו בעזרת מקדח פקקים מהיקף מושבה בת 14 ימים והונחו במרכז צלחת פטרי בקוטר 90 מ"מ שהכילה PDA. הצלחות נאטמו בפאראפילם והודגרו בתא גדילה מבוקר טמפרטורה (19 ± 1 מ"צ) במשטר של 12 שעות אור. הקוטר של כל מושבה נמדד מידי יומיים במשך 14 יום, בכיוונים ניצבים. השטח (ממ"ר) חושב על סמך ממוצע שתי המדידות. הניסוי הועמד באקראיות גמורה, כל טיפול (תבדיד) נבדק ב- 4 חזרות (צלחות פטרי) והניסוי בוצע פעמיים. על פי גודל שטח התפטיר שצימח כל תבדיד, בכל אחת מהטמפרטורות שנבדקו, חושבה משוואת הפולינום. פתרון המשוואה עבור $y=0$ אפשר לחשב את הטמפרטורה הקרדינלית התחתונה והעליונה; הנגזרת הראשונה שימשה לחישוב טמפרטורת האופטימום.

בניסוי נוסף נבדקה השפעת הטמפרטורה על נביטת פיקנידיוספורות מתבדידים שנדגמו באתר עמק בית-שאן ומקורם באפונת בר ואפונה תרבותית (טבלה 2). תרחיף נבגים הוכן על ידי ריחוף פיקנידיות ממושבות של תבדידי הפטריה שגודלו בצלחות פטרי, במשך כשבוע על גבי PDA ושהו ב- 19 ± 1 מ"צ במשטר תאורה של 12 שעות. מבחנות המכילות 2 סמ"ק של תרחיף הנבגים (בריכוז 4×10^5 נבגים לסמ"ק בתמיסת אגר נוזלי 0.1%) הודגרו באינקובטורים ונחשפו לטמפרטורות 5, 10, 15, 20, 25, 30 ו- 35 מ"צ (ללא תאורה). לאחר 24 שעות נלקחו $25 \mu\text{l}$ מהתרחיף ולהם הוספו $25 \mu\text{l}$ cotton blue במטרה להפסיק את הנביטה ולצבוע את הנבגים. מכל מבחנת ריאקציה נלקחה דגימה של $10 \mu\text{l}$ והיא נסרקה תחת

מיקרוסקופ אור בהגדלה $\times 20$. בכל נבג שנצפה, נבדק אם אורך נחשון הנביטה היה ארוך מרוחב הנבג; נבגים כאלו הוגדרו כנובטים. שיעור הנביטה (באחוזים) חושב על פי מספר הנבגים שנבטו מסך כל הנבגים שנבדקו. הניסוי הועמד באקראיות גמורה, כל טיפול (תבדיד) נבדק ב- 3 חזרות (מבחנות ריאקציה) והניסוי בוצע פעמיים. טמפרטורת הנביטה התחתונה, המיטבית והעליונה לכל תבדיד נקבעו על פי שכיחות הנביטה הממוצעת לכל תבדיד, בכל אחת מהטמפרטורות שנבדקו.

3.2.2 השפעת משך הרטיבות ומין הפונדקאי

משך הרטיבות הדרוש לצורך הדבקה של תבדידים שנדגמו מאפונה תרבותית ומאפונת בר, נקבע בסדרת ניסויים שבוצעו בחדרי גידול. לשם כך נעשה שימוש בשלושה מינים של צמחי בוחן. הזן התרבותי קרינה מהמין *P. sativum*, קו הבר Pf 101 מהמין *P. fulvum* שמקורו באזור הר מירון וקו הבר מהמין *P. elatius* שנאסף בעונה 2007-08 באזור חירבת איקרית. הצמחים גדלו בעציצים (2 צמחים בעציץ) בגודל של 1 ליטר במצע טוף עם כבול אשר הושקו ודושנו על פי הצורך. צמחי הבוחן אולחו בגיל של 14 ימים לערך (הצמחים היו בני 3-4 עלים אמיתיים).

בניסוי הראשון נבחן הקשר בין משך הרטיבות לחומרת המחלה שהתפתחה על ידי התבדידים בצמחי בוחן ממיני אפונה שונים (בר ותרבות). בשני ניסויים אחרים נכללו תבדידים שנדגמו בעמק בית-שאן ומקורם באפונת בר ואפונה תרבותית (טבלה 2). מהתבדידים שנכללו בניסויים הוכן תרחיף נבגים בריכוז 5×10^5 נבגים לסמ"ק (על פי המתואר בסעיף 3.2.1) בתוספת משטח Tween 80 בריכוז של 0.1%. הצמחים רוססו בתרחיף הנבגים של הפתוגן על ידי מרסס לחץ אויר ידני עד נגירה. לאחר האילוח הצמחים כוסו בשקית פוליאיתילן רטובה שעליה הונחה שקית נוספת (לשמירת הלחות) והוצבו בתאי גידול בטמפרטורה של 19 ± 1 מעלות צלזיוס ותאורה למשך 12 שעות. לאחר פרקי הזמן של 3, 5, 7, 10 או 24 שעות הוסרו השקיות והצמחים נשארו בחדר הגידול למעקב. חומרת המחלה (מדד המבטא את מידת הפגיעה בנוף הצמחים, באחוזים) הוערכה ויזואלית, החל מהופעת הסימפטומים, מדי 2-3 ימים עד שלא היה עוד שינוי בחומרת המחלה. בתום הניסוי חושבו ערכי RAUDPC (Relative Area Under the Disease Progress Curve) מדד המבטא את עוצמת המגיפה במהלך הזמן שעבר מהאילוח ועד לסיום הניסוי (באחוזים) (Shaner & Finney, 1977). בניסוי הראשון הוערכה חומרת המחלה על העללים שהיו קיימים בזמן האילוח בלבד (4 עלים אמיתיים בקירוב), ולא על העלים שהתפתחו לאחר האילוח. כמו כן, מייד לאחר הופעת הסימפטומים על העלים נערך מעקב אחר מספר כתמי המחלה שהתפתחו במהלך תקופת הניסוי. לאחר שהכתמים התלכדו הוערכה רק חומרת המחלה. לצורך ניתוח שונות והשוואות ממוצעים נורמלו נתוני חומרת המחלה בעזרת טרנספורמצית ארק-סינוס. המודל הלינארי ששימש לניתוח ב-ANOVA (הירארכי-פאקטוריאלי):

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + M_k[\alpha_i] + C_l + \alpha\beta_{ij} + \alpha C_{il} + M_k[\alpha_i] \times \beta_j + M_k[\alpha_i] \times C_l + \beta C_{jl} + \alpha\beta C_{ijl} + \varepsilon_{ijklm}$$

של פיקנידיוספורות של אותם התבדידים. מבחנות ריאקציה המכילות תרחיף נבגים (2 סמ"ק בריכוז 4×10^5 נבגים לסמ"ק בתמיסת אגר נוזלי 0.1%) הודגרו באינקובטורים ונחשפו לטמפרטורות 10 ו- 20 מעלות צלזיוס (ללא תאורה). לאחר 0, 2, 4, 6, 8 או 10 שעות נלקחו $25 \mu l$ מהתרחיף ולהם הוספו $25 \mu l$ cotton blue כדי להפסיק את הנביטה ולצבוע את הנבגים. מכל מבחנת ריאקציה נלקחה דגימה של $10 \mu l$ והיא נסרקה תחת מיקרוסקופ אור בהגדלה $\times 20$. בכל נבג שנצפה נבדק אם אורך נחשון הנביטה היה ארוך מ

מרוחבו של הנבג; נבגים אלו הוגדרו כנבגים שנבטו. שיעור הנביטה (באחוזים) חושב על פי מספר הנבגים שנבטו מסך כל הנבגים שנבדקו. הניסוי הועמד באקראיות גמורה, כל טיפול (תבדיד) נבדק ב- 3 חזרות (מבחנות) והניסוי בוצע פעמיים.

טבלה מספר 4. רכיבי המודל ששימשו לניתוח השונות בניסוי לבחינת השפעת משך הרטיבות על האגרסיביות של התבדידים כלפי צמחי בוחן ממיני אפונה שונים.

רכיב במודל	גורם השונות	אפקט
Y_{ijklm}	חומרת מחלה	
μ	ממוצע כללי	קבוע
α_i	מין הפונדקאי	קבוע
$M_k[\alpha_i]$	תבדיד מקונן במין הפונדקאי	אקראי
β_j	מין מאולח	קבוע
C_l	משך רטיבות	אקראי
$\alpha\beta_{ij}$	השפעת הגומלין בין מין הפונדקאי והמין המאולח	קבוע
αC_{il}	ה"ג בין מין הפונדקאי ומשך הרטיבות	אקראי
$M_k[\alpha_i] \times \beta_j$	ה"ג בין תבדיד מקונן במין הפונדקאי והמין המאולח	אקראי
$M_k[\alpha_i] \times C_l$	ה"ג בין תבדיד מקונן במין הפונדקאי ומשך הרטיבות	אקראי
βC_{jl}	ה"ג בין המין המאולח ומשך הרטיבות	אקראי
$\alpha\beta C_{ijl}$	ה"ג בין מין הפונדקאי, המין המאולח ומשך הרטיבות	אקראי
$M_k[\alpha_i] \times \beta C_{jl}$	ה"ג בין תבדיד מקונן במין הפונדקאי, המין המאולח ומשך הרטיבות	אקראי
ϵ_{ijklm}	השונות האקראית בין הצמחים	אקראי

3.3 השוואת דרישות אקולוגיות של תבדידים שבודדו מהמין *P. fulvum* מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים

3.3.1 בחינת השפעת הטמפרטורה ואתר הדגימה

על מנת לבחון האם קיימים הבדלים בתגובה לטמפרטורה בין תבדידים שנדגמו מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים, בוצע ניסוי שבדק את השפעת הטמפרטורה על צימוח התפטיר. לניסוי נבחרו תבדידים שנדגמו ממספר אתרים בצפון בארץ: עמק בית שאן (סמוך לקיבוץ מסילות), הגליל המזרחי (נחל עמוד) והגליל המערבי (נחל כזיב וסמוך לח' געתון, שני אזורי מיקרו-אקלים שונים); כל התבדידים נדגמו מ- *P. fulvum* (טבלה 5). הניסויים נערכו כמתואר בסעיף 3.2.1 לעיל. טמפרטורת הצימוח התחתונה, המיטבית והעליונה לכל תבדיד חושבה על פי גודל שטח התפטיר שצימח כל תבדיד, בכל אחת מהטמפרטורות שנבדקו. בניסוי נוסף נבחנה השפעת הטמפרטורה על נביטת פיקנידיוספורות של אותם התבדידים. מכל אתר נבחר באופן אקראי תבדיד יחיד (סך הכל 4) ובנוסף נבחר תבדיד שנדגם מאופן תרבותי, *P. sativum* לצורך השוואה (טבלה 5). הניסוי נערך כמתואר בסעיף 3.2.1 לעיל. טמפרטורת הנביטה התחתונה, המיטבית והעליונה לכל תבדיד נקבעה על פי אחוז הנביטה הממוצע לכל תבדיד, בכל אחת מהטמפרטורות שנבחנו.

3.3.2 השפעת משך הרטיבות הדרוש להדבקה ואתר הדגימה על התפתחות המחלה

כדי לבחון האם יש הבדלים בדרישות למשך הרטיבות בין תבדידים שנדגמו מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים, בוצעו מספר ניסויים. בניסוי הראשון נבחנה השפעת משך הרטיבות על האגרסיביות של התבדידים כלפי צמח בוחן מהמין *P. fulvum*. הניסוי נערך כמתואר בסעיף 3.2.2 לעיל. בניסוי הנ"ל חומרת המחלה הוערכה על צמחים שלמים (8-10 זוגות עלעלים) וחישוב ערכי ה- RAUDPC בוצע בהתאם. בתום הניסוי נשקלה הביומסה העל-קרקעית וחושב המשקל הרטוב הממוצע לכל צמח. ערך זה מהווה מדד לעוצמת הפגיעה בצמח כיוון שקיים מתאם בין עוצמת הפגיעה למספר העלים הנושרים מהצמח Wallen, (1974). לצורך ניתוח שונות והשוואות ממוצעים, ערכי חומרת המחלה נורמלו בעזרת טרנספורמצית ארק-סינוס. המודל הלינארי ששימש לניתוח ה- ANOVA: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + C_j + \alpha C_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ (טבלה 6). בניסוי נוסף נבחנה השפעת משך הרטיבות על שעורי הנביטה של פיקנידיוספורות של תבדידים אלה. הניסוי נערך כמתואר בסעיף 3.2.2.

טבלה מספר 5. רשימת התבדידים שנדגמו באתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים.

אתר בידוד	פונדקאי מקור	התבד"ד
גליל מזרחי	<i>P. fulvum</i>	FA-01
גליל מזרחי	<i>P. fulvum</i>	FA-02
גליל מערבי	<i>P. fulvum</i>	FC-01
גליל מערבי	<i>P. fulvum</i>	FC-02
גליל מערבי	<i>P. fulvum</i>	FG-01
גליל מערבי	<i>P. fulvum</i>	FG-02
עמק בית-שאן	<i>P. fulvum</i>	FM-01
עמק בית-שאן	<i>P. fulvum</i>	FM-02
עמק בית-שאן	<i>P. sativum</i>	SE-01

טבלה מספר 6. רכיבי המודל ששימשו לניתוח השונות בניסוי לבחינת השפעת משך הרטיבות על האגרסיביות של התבדידים כלפי צמח בוחן מהמין *P. fulvum*.

אפקט	גורם השונות	רכיב במודל
	חומרת מחלה	Y_{ijk}
קבוע	ממוצע כללי	μ
קבוע	תבד"ד	α_i
אקראי	משך רטיבות	C_j
אקראי	השפעת הגומלין משך הרטיבות x תבד"ד	αC_{ij}
אקראי	השונות האקראית בין הצמחים	ε_{ijk}

3.3.3 פרופיל האגרסיביות של תבדידי אסקוכיטה שבודדו מהמין *P. fulvum* מאתרים המאופיינים

בתנאי אקלים שונים

כדי לבחון האם יש הבדלים בפרופיל האגרסיביות של תבדידים שנדגמו מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים, בוצע ניסוי בתאי גידול מבוקרים. בניסוי נבחנה האגרסיביות של התבדידים שנבחנו בסעיף 3.3.2 כלפי הזן התרבותי קרינה. הניסוי נערך על צמחים שלמים. מהתבדידים שנבחרו הוכן תרחיף נבגים בריכוז 5×10^5 נבגים לסמ"ק (על פי המתואר בסעיף 3.2.1) בתוספת משטח Tween 80 בריכוז של 0.1%. צמחי הבוחן גדלו בחממה במצע טוף וכבול עם דישון והשקיה על פי הצורך. בגיל 14 ימים הצמחים רוססו בתרחיף הנבגים של הפתוגן על ידי מרסס לחץ אוויר ידני עד נגירה. לאחר האילוח הצמחים כוסו בשקית פוליאאתילן רטובה ועליה שקית נוספת לשמירת הלחות והוצבו בתאי גידול בטמפרטורה של 19 ± 1 מעלות

צלזיוס ותאורה למשך 12 שעות. לאחר 24 שעות הוסרו השקיות והצמחים נשארו בחדר הגידול למעקב. חומרת המחלה הוערכה ויזואלית ברמת כל הצמח, החל מהופעת הסימפטומים, מדי 2-3 ימים עד שלא היה עוד שינוי בחומרת המחלה. בתום הניסוי חושבו ערכי RAUDPC. בניסוי נוסף נבחנו 5 תבדידים נוספים שנדגמו באתרים שונים בארץ ממניי אפונת בר ואפונה תרבותית (טבלה 7).

טבלה מספר 7. רשימת התבדידים שנדגמו באתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים וממניי אפונה שונים.

אתר בידוד	פונדקאי מקור	התבדיד
לכיש	<i>P. fulvum</i>	FS-01
לכיש	<i>P. fulvum</i>	FZ-01
הגלבע	<i>P. sativum</i>	SD-01
עמק בית-שאן	<i>P. sativum</i>	SE-01
גליל מזרחי	<i>P. elatius</i>	EA-05

3.3.4 השפעת מיקום העלה בצמח ואתר הדגימה על התגובה לפתוגן

כדי לבחון האם מיקום העלה על הגבעול והאתר בו נדגמו התבדידים מהווים גורמים המשפיעים על התגובה למחלה, נערך ניסוי *in vitro* בעלים מנותקים של צמחי בוחן מהמין *P. fulvum* (בכל עלה זוג עלעלים). העלים מוספרו לפי מיקומם לאורך הגבעול (1 - העלה התחתון ביותר; 3 - העלה העליון ביותר) והונחו בצלחת פטרי על גבי מצע שהכיל 0.15% אגר. כל טיפול (תבדיד × עלה) נבחן ב-4 חזרות. לצורך האילוח הוכן תרחיף נבגים מכל תבדיד בריכוז 4×10^5 נבגים לסמ"ק, האילוח נעשה על ידי הנחת $10 \mu\text{l}$ מתרחיף הנבגים של התבדיד במרכז של כל עלעל. צלחות הפטרי נאטמו בפארפילם והונחו בתא גידול מבוקר טמפרטורה (19 ± 1) מ"צ ותאורה (12 שעות אור). יומיים לאחר האילוח ובמשך כשבועיים לאחר מכן הוערכו שני מדדים שמבטאים את חומרת הפגיעה מהמחלה: השטח הנקרטי והשטח הפגוע (בממ"ר). השטח הנקרטי הוא השטח בו היה גוון העלעל חום-שחור והתפתחו עליו הפיקנידיות. השטח הפגוע כלל את השטח הנקרטי ומסביבו אזור בו התפתחו על העלעל תסמיני מחלה אחרים (כלורוזה ותמותת תאים). לניתוח שימש המודל הלינארי: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + C_j + \alpha C_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, כאשר Y_{ijk} - חומרת מחלה, μ - ממוצע כללי, α_i - תבדיד, C_j - מיקום העלה, αC_{ij} - השפעת הגומלין מיקום העלה והתבדיד, ε_{ijk} - השונות האקראית בין העלים.

3.4 בחינת ההבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידי אסקוכיטה שבודדו ממניי אפונה שונים

3.4.1 השפעת הטמפרטורה על צימוח תפטי

כדי לבחון האם קיימים הבדלים בתגובה לטמפרטורה בין תבדידים שנדגמו ממניי שונים של אפונת בר הגדלים בתפוצה סימפטוטית, נבחרו שלושה תבדידים שנדגמו מ-*P. elatius* ו-4 תבדידים שנדגמו מ-*P. fulvum* כל התבדידים נדגמו מאתר נחל עמוד שבגליל המזרחי (טבלה 8). הניסויים נערכו כמתואר בסעיף 3.2.1 לעיל. על פי גודל שטח התפטי שצימח כל תבדיד, בכל אחת מהטמפרטורות שנבדקו, חושבה משוואת הפולינום. פתרון המשוואה עבור $y=0$ אפשר לחשב את הטמפרטורה הקרדינלית התחתונה והעליונה; הנגזרת הראשונה שימשה לחישוב טמפרטורת האופטימום.

3.4.2 פרופיל האגרסיביות של תבדידי אסקוכיטה שנדגמו מאוכלוסיות *P. elatius* ו-*P. fulvum* בתפוצה סימפטית, כלפי אפונה תרבותית ואפונת בר

כדי לבחון האם קיימים הבדלים בפרופיל האגרסיביות של תבדידים שנדגמו ממינים שונים של אפונת בר, הגדלים בתפוצה סימפטית, נבחרו 4 תבדידים שנדגמו בנחל עמוד מ-*P. elatius* ו-3 תבדידים שנדגמו בסמיכות מ-*P. fulvum* (טבלה 8). בנוסף אליהם (לצורך השוואה) נבחו תבדיד שנדגם בעמק בית-שאן מ-*P. sativum* (SE-01). התבדידים שימשו לאילוח הזן התרבותי קרינה, קו הבוחן ממין הבר -*P. elatius* וקו הבוחן ממין הבר *P. fulvum*. הניסויים בוצעו כמתואר בסעיף 3.3.3 לעיל. לצורך ניתוח שונות והשוואות ממוצעים, ערכי חומרת המחלה נורמלו בעזרת טרנספורמצית ארק-סינוס. לניתוח שימש המודל הלינארי הבא: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, כאשר Y_{ijk} - חומרת מחלה, μ - ממוצע כללי, α_i - תבדיד, β_j - מין צמח הבוחן, $\alpha\beta_{ij}$ - השפעת הגומלין בין מין צמח הבוחן והתבדיד, ε_{ijk} - השונות האקראית בין הצמחים.

טבלה מספר 8. רשימת התבדידים שנדגמו באתר נחל עמוד שבגליל המזרחי. התבדידים נדגמו מ-*P. elatius* ו-*P. fulvum*

התבדיד	פונדקאי מקור	אזור דיגום	אתר דיגום
FA-01	<i>P. fulvum</i>	גליל מזרחי	נחל עמוד
FA-02	<i>P. fulvum</i>	גליל מזרחי	נחל עמוד
FA-03	<i>P. fulvum</i>	גליל מזרחי	נחל עמוד
EA-01	<i>P. elatius</i>	גליל מזרחי	נחל עמוד
EA-02	<i>P. elatius</i>	גליל מזרחי	נחל עמוד
EA-03	<i>P. elatius</i>	גליל מזרחי	נחל עמוד
EA-04	<i>P. elatius</i>	גליל מזרחי	נחל עמוד

3.4.3 השפעת מיקום העלה בצמח ומין הפונדקאי על התגובה לפתוגן

כדי לבחון האם מיקום העלה על הגבעול ומין הפונדקאי ממנו נדגמו התבדידים מהווים גורמים המשפיעים על התגובה למחלה, בוצעה הערכה נוספת, נפרדת, לחומרת המחלה בכל עלה בצמחי הבוחן שאולחו בניסוי זה. לערכי חומרת המחלה הממוצעים בוצע ניתוח שונות על פי המודל הלינארי המפורט (הירארכי-פאקטוריאלי): $Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + M_k[\alpha_i] + \delta_l + \alpha\beta_{ij} + \alpha\delta_{il} + M_k[\alpha_i] \times \beta_j + M_k[\alpha_i] \times \delta_l + \beta\delta_{jl} + \alpha\beta\delta_{ijl} + M_k[\alpha_i] \times \beta\delta_{jl} + \varepsilon_{ijklm}$ (טבלה 9).

3.5 התפתחות מחלת האסקוכיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים

בנחל עמוד (גליל מזרחי) ובנחל כזיב (גליל מערבי) בוצע סקר להערכת חומרת הנגיעות הטבעית במחלת האסקוכיטה בצמחי אפון קיפח מהמין *P. elatius*. הסקר בוצע בשתי עונות גידול עוקבות 2007/08 ו-2008/09. בכל אתר נבחרו 8 חתכים בשטח של 2x30 מ' שבהם נפוץ מין הבר *P. elatius* (על סמך סקר למיפוי אוכלוסיות בנות-קיימא של אפונת הבר שנערך בשנים 2003-2007). הסקר להערכת הנגיעות בעבודה זו בוצע, מידי חודש, בין החודשים ינואר למרץ 2008 ובין נובמבר 2008 למרץ 2009. בכל מועד תועדו כל צמחי האפון הקיפח שגדלו בתחום כל אחד מהחתכים ונרשם אם הם היו נגועים באסקוכיטה, ובאילו עלים. בנוסף, בכל חתך תואר כיסוי הקרקע (חשוף או מכוסה עלים). בעונת 2008/09 נרשם המיקום הפיזי של כל הצמחים בחתך. לצורך בחינת ההבדלים בין אתר נחל עמוד לאתר נחל כזיב בוצע ניתוח שונות בעזרת המודל הלינארי: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \alpha_i[\beta_j] + \varepsilon_{ijk}$, כאשר Y_{ijk} - חומרת מחלה, μ - ממוצע כללי, α_i - נחל, $\alpha_i[\beta_j]$ - חודש מקונן בנחל, ε_{ijk} - השונות האקראית בין הצמחים. ובנוסף במודל-

$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, כאשר Y_{ijk} - חומר מחלה, μ - ממוצע כללי, α_i - סוג חיפוי הקרקע, β_j - שנה, $\alpha\beta_{ij}$ - השפעת הגומלין בין סוג חיפוי הקרקע והשנה, ε_{ijk} - השונות האקראית בין הצמחים.

טבלה מספר 9. רכיבי המודל בניתוח השונות בניסוי לבחינת השפעת מיקום העלה בצמח ומין הפונדקאי על האגרסיביות של התבדידים כלפי צמחי בוחן ממיני אפונה שונים.

רכיב במודל	גורם השונות	אפקט
Y_{ijklm}	חומר מחלה	
μ	ממוצע כללי	קבוע
α_i	מין הפונדקאי	קבוע
$M_k[\alpha_i]$	תבדיד מקונן במין הפונדקאי	אקראי
β_j	מין מאולח	קבוע
δ_i	מיקום העלה בצמח	קבוע
$\alpha\beta_{ij}$	השפעת הגומלין בין מין הפונדקאי והמין המאולח	קבוע
$\alpha\delta_{il}$	ה"ג בין מין הפונדקאי ומיקום העלה בצמח	קבוע
$M_k[\alpha_i] \times \beta_j$	ה"ג בין תבדיד מקונן במין הפונדקאי והמין המאולח	אקראי
$M_k[\alpha_i] \times \delta_l$	ה"ג בין תבדיד מקונן במין הפונדקאי ומיקום העלה	אקראי
$\beta\delta_{jl}$	ה"ג בין המין המאולח ומיקום העלה	קבוע
$\alpha\beta\delta_{ijl}$	ה"ג בין מין הפונדקאי, המין המאולח ומיקום העלה	קבוע
$M_k[\alpha_i] \times \beta\delta_{jl}$	ה"ג בין תבדיד מקונן במין הפונדקאי, המין המאולח ומיקום העלה	אקראי
ε_{ijklm}	השונות האקראית בין הצמחים	אקראי

3.6 ניתוחים סטטיסטיים

בעבודה זו בוצעו הניתוחים הסטטיסטיים הבאים: חישובי שגיאת וסטית התקן, ניתוחי שונות (ANOVA), מבחני תחום מרובה בשיטת Tukey-Kramer, מבחני t להסתכלויות צמודות ובלתי צמודות וחישוב ערכי LSD לקביעת ההבדלים בין הטיפולים. הניתוחים בוצעו בעזרת תוכנת JMP 6 (SAS Institute, Cary, NC). המודלים של ניתוחי השונות מתוארים לעיל בסעיפים בהם תוארו הטיפולים שנכללו בניסויים.

4. תוצאות

4.1 זיהוי הפתוגנים שהתפתחו על אפונת בר ותרבות

4.1.1 זיהוי התבדידים שנאספו בשיטות מולקולריות

על מנת לבחון את אמינות שיטת הזיהוי רוצפו אזור ה- ITS והגן *G3PD* מתבדידים של שלושת מיני קומפלקס האסקוכיטה: *M. pinodes*, *P. pinodella* ו-*A. pisi* שזהותם אומתה מראש על ידי חברת - Centraalbureau voor Schimmelcultures ההולנדית. השוואת רצפי הביקורת למאגר ה- NCBI העלתה כי ניתן להשתמש ברצפי הגן *G3PD* ולהגיע לזיהוי מדויק של מין התבדיד (טבלה 01). מהשוואת ריצפי אזור ה- ITS לרצפים הקיימים במאגר ה- NCBI עלה כי במרבית התבדידים לא ניתן היה להגיע לזיהוי ודאי של מין התבדיד, כיוון שרצף ה- ITS אינו ספציפי וזהה במספר מינים. בכל התבדידים, מלבד התבדיד Mesil06, נמצאה התאמה אפשרית למין *M. pinodes*, מחציתם גם נמצאו זהים למין *P. pinodella*. בכל התבדידים נמצא חוסר התאמה ברור למין *A. pisi* שהתבטא בהבדל של 14 בסיסים בקירוב ו- 5 "קפיצות" בקירוב במסגרת הקריאה של הגן (טבלה 11). כאשר משווים את ריצפי הגן *G3PD* לרצפים הקיימים במאגר ה- NCBI התקבל כי קיים בכל התבדידים, לבד מתבדיד Mesil06, רצף ספציפי והתאמה מלאה למין *M. pinodes*. לא ניתן לשייך את תבדיד Mesil06 למין מסוים בוודאות כיוון שאין לרצפי התאמה מלאה למין סטנדרט ידוע (טבלה 12).

טבלה מספר 10. השוואת רצפי הגן *G3PD* ואזור ה- ITS מתבדידים בעלי זהות ידועה*, לרצפי הגן שמופיעים במאגר ה- NCBI.

תבדיד	גן מרוצף	דמיון ל - <i>M. pinodes</i>		הערות	זיהוי על פי מאגר NCBI
		בסיסים	קפיצות		
<i>M. pinodes</i>	<i>G3PD</i>	518/518	0	הבדל של 7 בסיסים מ- <i>P. Pinodella</i>	<i>M. pinodes</i>
<i>P. pinodella</i>	<i>G3PD</i>	516/516	0	הבדל של 6 בסיסים מ- <i>M. pinodes</i>	<i>P. pinodella</i>
<i>A. pisi</i>	<i>G3PD</i>	519/519	0	הבדל של 2 בסיסים מ- <i>(A. sp. Georgia6)</i>	<i>A. pisi</i>
<i>M. pinodes</i>	ITS	487/487	0	-	<i>Phoma sojicola</i> , <i>Didymella fabae</i> , <i>Phoma pinodella</i> , <i>M. pinodes</i>
<i>P. pinodella</i>	ITS	473/473	0	-	<i>P. sojicola</i> , <i>D. fabae</i> , <i>P. pinodella</i> , <i>M. pinodes</i>
<i>A. pisi</i>	ITS	501/501	0	-	<i>A. pisi</i>

טבלה מספר 11. השוואת רצפי מקטע ה-ITS בתבדידים שנדגמו מצמחי אפונה תרבותית ובר, לרצפי הגן שמופעים במאגר ה-NCBI.

NCBI זיהוי על פי מאגר	דמיון ל - <i>A. pisi</i>		דמיון ל - <i>P. pinodella</i>		דמיון ל - <i>M. pinodes</i>		הפונדקאי ממנו בודד	תבד"ד
	קפיצות	בסיסים	קפיצות	בסיסים	קפיצות	בסיסים		
<i>M. pinodes</i>	5	470/483	-	-	0	486/486	<i>P. sativum</i>	SE-01
<i>M. pinodes</i>	6	435/450	1	475/476	0	475/476		SE-02
<i>Phoma sojicola, Didymella fabae, Phoma pinodella, M. pinodes</i>	5	477/490	-	-	0	487/487		SE-03
<i>M. pinodes</i>	6	442/456	-	-	0	485/485		SE-04
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	5	477/490	-	-	0	487/487	<i>P. elatius</i>	EA-01
<i>M. pinodes</i>	5	488/501	1	483/484	0	484/484		EA-03
<i>M. pinodes, Phoma sojicola</i>	5	475/488	-	-	0	485/485		EA-04
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	5	477/490	-	-	0	484/484	<i>P. fulvum</i>	FA-01
<i>M. pinodes</i>	6	447/461	-	-	0	488/488		FA-02
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	4	338/348	-	-	0	380/380		FA-03
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	5	478/491	-	-	0	488/488		FC-01
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	5	477/491	-	-	0	484/485		FC-02
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	5	477/490	-	-	0	487/487		FC-03
<i>M. pinodes</i>	6	443/457	1	483/484	0	484/484		FG-01
<i>M. pinodes</i>	6	437/451	1	477/478	0	478/478		FG-02
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	4	381/391	-	-	0	420/420		FM-01
<i>P. sojicola, D. fabae, P. pinodella, M. pinodes</i>	4	381/391	-	-	0	423/423		FM-02
<i>Ascochyta pisi, Ascochyta viciae</i>	-	-	-	-	0	486/487		Mesil06

טבלה מספר 12. השוואת רצפי הגן *G3PD* מתבדידים שנדגמו מצמחי אפונה תרבותית ובר, לרצפי הגן שמופעים במאגר ה-NCBI.

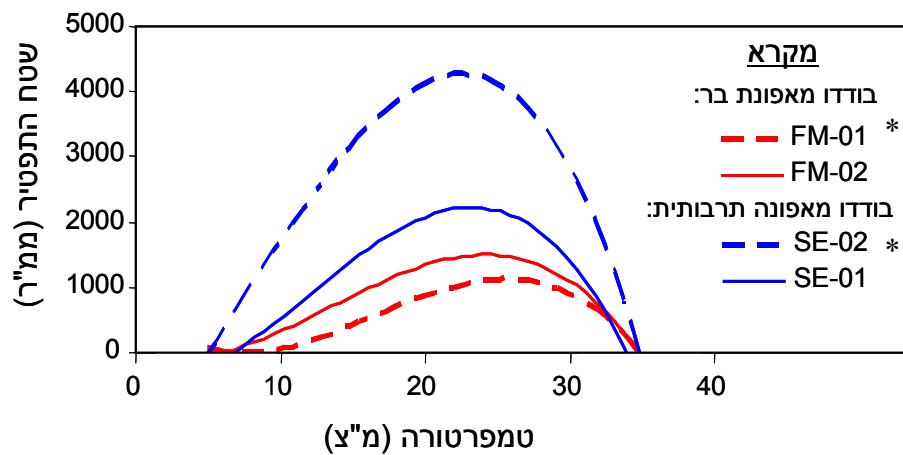
זיהוי על פי מאגר NCBI	הבדל מ- <i>P. pinodella</i> (מס' בסיסים)	דמיון ל- <i>M. pinodes</i>		הפונדקאי ממנו בודד	התבדיד
		מס' קפיצות	מס' בסיסים		
<i>M. pinodes</i>	8	0	518/518	<i>P. sativum</i>	SE-01
<i>M. pinodes</i>	7	0	517/518		SE-02
<i>M. pinodes</i>	7	0	518/518		SE-03
<i>M. pinodes</i>	8	0	518/518		SE-04
<i>M. pinodes</i>	8	0	518/518	<i>P. elatius</i>	EA-01
<i>M. pinodes</i>	8	0	518/518		EA-03
<i>M. pinodes</i>	8	0	513/513		EA-04
<i>M. pinodes</i>	7	0	517/518	<i>P. fulvum</i>	FA-01
<i>M. pinodes</i>	11	1	500/501		FA-02
<i>M. pinodes</i>	11	1	499/500		FA-03
<i>M. pinodes</i>	7	0	517/518		FC-01
<i>M. pinodes</i>	7	0	517/518		FC-02
<i>M. pinodes</i>	7	0	517/519		FC-03
<i>M. pinodes</i>	8	0	518/518		FG-01
<i>M. pinodes</i>	7	0	518/518		FG-02
<i>M. pinodes</i>	7	0	518/519		FM-01
<i>M. pinodes</i>	7	0	518/518		FM-02
<i>Ascochyta sp.</i> (<i>Georgia6</i>)	-	0	514/514		Mesil06

4.2 השוואת דרישות אקולוגיות של תבדידי אסקוכיטה ממין זהה, מאפונה תרבותית ומאפונת בר

4.2.1 בחינת השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי

בסדרת הניסויים בחנו את השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי ממנו בודד התבדיד (*P. sativum* או *P. fulvum*) על צימוח התפטיר. בניסוי שכלל תבדידים שמקור בידודם מעמק בית-שאן היו הבדלים בשטח הצימוח של התבדידים השונים. תבדידים שמקורם באפונה תרבותית גדלו באופן יחסי מהר יותר מתבדידים שמקורם באפונת בר, בכל הטמפרטורות שנבחנו (איור 1). נמצא כי התפטיר, בכל התבדידים, מתחיל לגדול בטמפרטורות שבין 5-9 מ"צ, הצימוח המיטבי היה בטמפרטורה שבין 23-25 מ"צ והגדילה נעצרה בטמפרטורה של 34 מ"צ בקירוב (טבלה 13).

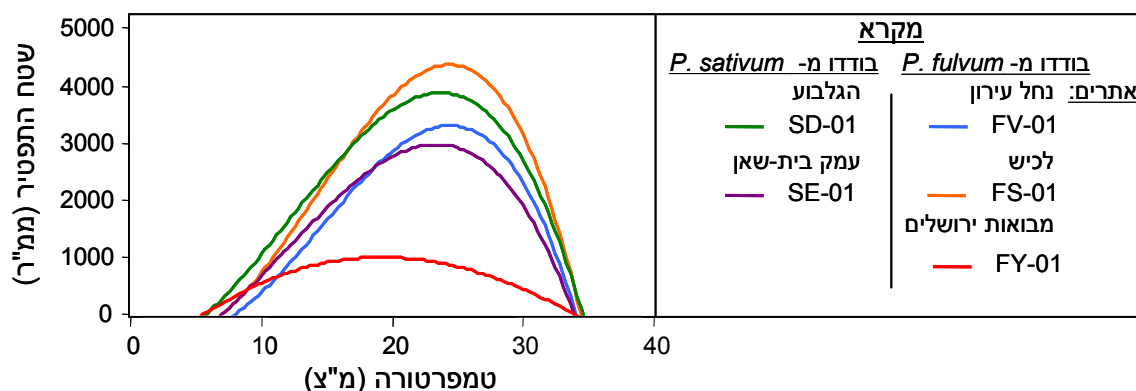
בניסוי נוסף בו נבחנו תבדידים שבודדו מאפונת בר או אפונה תרבותית מאתרים שונים בארץ. להבדיל מהתבדידים מעמק בית-שאן, בתבדידים אלו היה שטח התפטיר דומה, חוץ מהתבדיד שמקורו באפונת בר מאזור ירושלים, שגדל בקצב נמוך יחסית לשאר התבדידים (איור 2). נמצא כי בדומה לתבדידים שבודדו מעמק בית-שאן גם תבדידים אלו גדלו באופן דומה בטמפרטורות 5-35 מ"צ (טבלה 14).



איור מספר 1. השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי (הצמח ממנו בודד התבדיד) על צימוח תפסיר הפטרייה *M. pinodes*. בניסוי נבחנו תבדידים שבודדו מצמחי אפונת בר מהמין *P. fulvum* ומצמחי אפונה תרבותית מהמין *P. sativum* שנדגמו באזור עמק בית-שאן. שטח התפסיר נמדד בצלחות פטרי לאחר 12 ימים. ערכי מקדמי המתאם המרובה (R^2) של משוואות הרגרסיה המתוארות באיור הם בטווח 0.41-0.79. כל משוואות הרגרסיה מובהקות ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$ אלא אם סומן כוכבית במקרא. במקרה זה המשוואה מובהקת ברמת מובהקות של $P \leq 0.1$.

טבלה מספר 13. ממוצע ערכי טמפרטורות הצימוח המיטביות, העליונות והתחתונות של תבדידי הפטרייה *M. pinodes* כפי שחושבו ממשוואות הפולינומים שנתקבלו בשתי החזרות על הניסוי לבדיקת השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי.

טמפרטורות צימוח			התבדיד	פונדקאי
עליונה	מיטבית	תחתונה		
33.9	23.8	7.1	SE-01	<i>P. sativum</i>
34.5	22.8	5.5	SE-02	
34.5	25.5	9.0	FM-01	<i>P. fulvum</i>
34.3	23.2	6.2	FM-02	



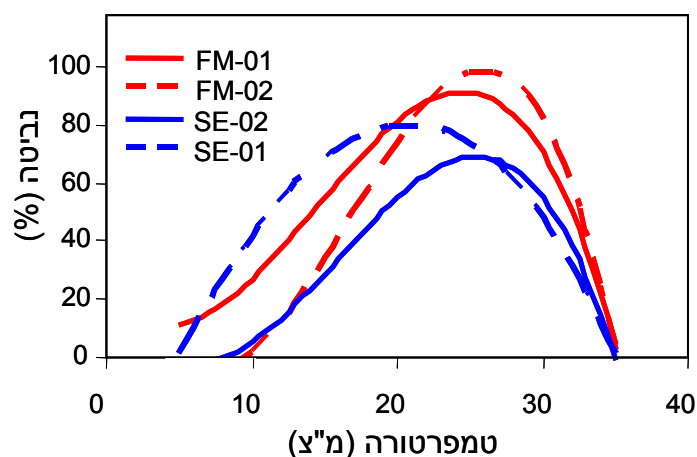
איור מספר 2. השפעת הטמפרטורה, מין הפונדקאי והאתר ממנו בודד התבדיד על צימוח תפסיר הפטרייה *M. pinodes*. בניסוי נבחנו תבדידים שבודדו מצמחי אפונת בר מהמין *P. fulvum* במספר אזורי אקלים שונים ומצמחי אפונה תרבותית מהמין *P. sativum* שנדגמו באזור עמק בית-שאן והגלבע. שטח התפסיר נמדד בצלחות פטרי לאחר 12 ימים. ערכי מקדמי המתאם המרובה (R^2) של משוואות הרגרסיה המתוארות באיור הם בטווח 0.58-0.85. כל משוואות הרגרסיה מובהקות ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$.

בניסוי בו נבחנה השפעת הטמפרטורה על נביטת פיקנידיוספורות נצפתה מגמה דומה להשפעת הטמפרטורה על צמיחת התפסיר. כאשר משווים את ערכי ה- $GR_{(50)}$ (Germination rate) בין התבדידים, ניתן לראות הבדל של 10 מ"צ בקירוב בין שני התבדידים שבודדו מ-*P. sativum* והבדל של 3 מ"צ בקירוב

בין שני התבדידים שבודדו מ- *P. fulvum* (איור 3). הטמפרטורה המיטבית לנביטה הינה 22-25 מ"צ וטווח טמפרטורות הנביטה הינו בקירוב 4-35 מ"צ (טבלה 15).

טבלה מספר 14. ממוצע ערכי טמפרטורות הצימוח המיטביות, העליונות והתחתונות של תבדידי הפטרייה *M. pinodes* כפי שחושבו ממשוואות הפולינומים שנתקבלו בשתי החזרות על הניסוי לבדיקת השפעת הטמפרטורה, מין הפונדקאי ומקום הבידוד של התבדיד.

טמפרטורות צימוח			התבדיד	אזור	פונדקאי
עליונה	מיטבית	תחתונה			
34.5	23.8	6.1	SD-01	הגלבוע	<i>P. sativum</i>
34.0	23.8	6.5	SE-01	עמק בית-שאן	
34.0	24.6	8.1	FV-01	נחל עירון	<i>P. fulvum</i>
34.4	23.6	6.3	FS-01	לכיש	
33.8	20.1	5.6	FY-01	מבואות ירושלים	



איור מספר 3. השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי על נביטת נבגים אל-מיניים של הפטרייה *M. pinodes* לאחר 24 שעות. בניסוי נבחנו תבדידים שבודדו ממיני האפונה *P. fulvum* ו- *P. sativum* בעמק בית-שאן. ערכי מקדמי המתאם המרובה (R^2) של משוואות הרגרסיה המתוארות באיור הם בטווח 0.85-0.93. כל משוואות הרגרסיה מובהקות ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$.

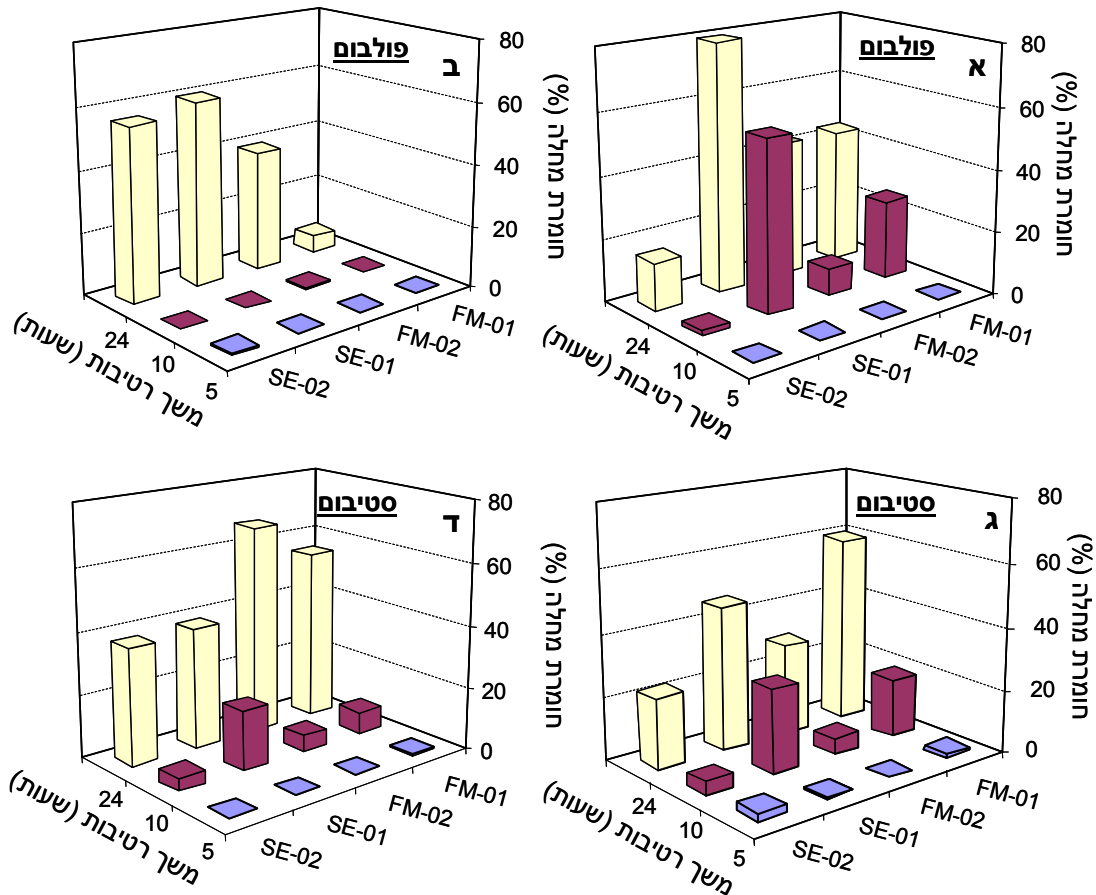
טבלה מספר 15. ממוצע נתוני טמפרטורות הנביטה של נבגים אל-מיניים (פיקנידיוספורות) מהפטרייה *M. pinodes* כפי שחושבו ממשוואות הפולינומים שנתקבלו בשתי החזרות על הניסוי לבדיקת השפעת הטמפרטורה על נביטת נבגים מתבדידים שבודדו ממיני אפונה שונים מעמק בית-שאן (איור 3).

טמפרטורות נביטה			תבדיד	פונדקאי
עליונה	מיטבית	תחתונה		
35.4	22.7	5.0	SE-01	<i>P. sativum</i>
35.5	22.0	6.3	SE-02	
34.8	23.7	2.1	FM-01	<i>P. fulvum</i>
37.7	25.8	4.8	FM-02	

4.2.2 בחינת השפעת משך הרטיבות ומין הפונדקאי

בבחינת השפעת משך הרטיבות ומין הפונדקאי על התפתחות המחלה בקו בוחן ממין הבר *P. fulvum* ובזן התרבותי קרינה היו הבדלים בתגובת הצמחים להדבקה בשתי החזרות של הניסוי. בכל מקרה, נמצא כי דרוש משך רטיבות של יותר מ- 10 שעות על-מנת שתופיע מחלה ברמת נגיעות משמעותית. תחום חומרת

המחלה המרבי, לאחר 24 שעות לחות, נע בין 5%-80% (איור 4 א-ב, ג-ד). בנייתוח השונות של שתי החזרות נמצא כי למשך הרטיבות ולהשפעת הגומלין משך רטיבות \times תבדיד הייתה השפעה מובהקת על חומרת הנגיעות הסופית, RAUDPC ומספר הכתמים הנקרטיים (טבלה 16), אולם הפונדקאי ממנו בודד התבדיד ומין הצמח שאולח לא היו גורמים משמעותיים בתגובת הצמחים להדבקה. בנייתוח החזרה הראשונה של הניסוי נמצא הבדל מובהק בין התבדידים, ללא קשר למוצאם, אך הבדל זה לא נשמר בחזרה השנייה, באותם התנאים (טבלה 16).



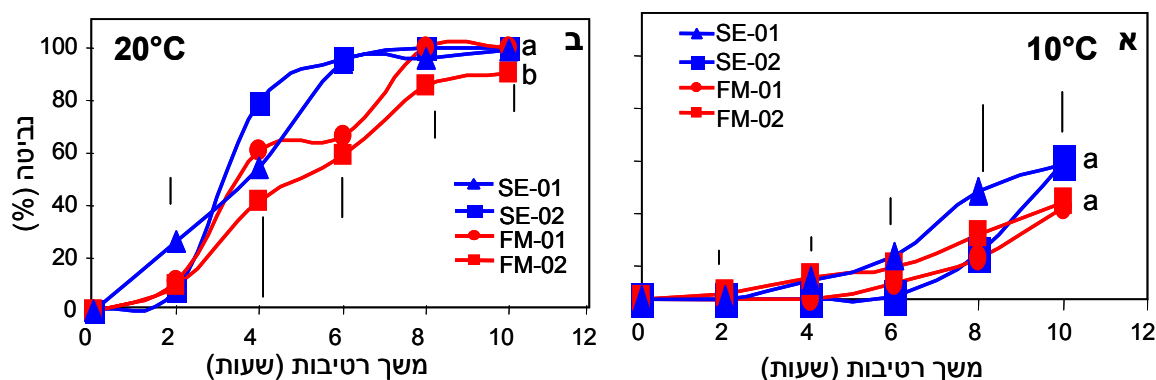
איור מספר 4. השפעת מין הפונדקאי ומשך הרטיבות על התפתחות מחלת האסקוכיטה באפונה לאחר אילוח בפיקנידיוספורות של *M. pinodes*. בניסוי אולחו שני מיני אפונה בגיל שבועיים, כל אחד בשתי חזרות: קו בוחן ממין הבר *P. fulvum* (א, ב) וזן בוחן "קרונה" מהמין *P. sativum* (ג, ד). הניסוי נערך בצמחים שלמים בעציצים. הנגיעות הוערכה 15 ימים לאחר האילוח. ניתוח שונות לנתונים מוצג בטבלה מספר 16.

בניסוי נוסף נבחנו ההבדלים במשך הרטיבות הדרוש לנביטת פיקנידיוספורות בין תבדידים שמקורם מאפונת בר ואפונה תרבותית. הניסוי נערך בשתי טמפרטורות: 10 ו-20 מ"צ על מנת לבחון את השפעת הגומלין בין הטמפרטורה ומשך הרטיבות. נמצא כי לאחר 10 שעות רטיבות, בכל התבדידים, הנביטה המכסימאלית ב-10 מ"צ הגיעה ל-50% לעומת כמעט 100% נביטה ב-20 מ"צ (איור 5 א-ב). ב-10 מ"צ לא היה הבדל מובהק באחוזי הנביטה בין התבדידים במרבית משכי הרטיבות (איור 5א). לעומת זאת ב-20 מ"צ היו הבדלים בשיעורי הנביטה בין משכי הזמן השונים, אך לא ניתן לקבוע כי לגורם הפונדקאי השפעה על אחוזי הנביטה (איור 5ב).

טבלה מספר 16. השפעת משכי רטיבות שונים על חומרת הנגיעות הסופית, RAUDPC ומספר הכתמים הנקרטיים בשני מיני אפונה לאחר אילוח בתבדידים שבודדו ממיני אפונה תרבותית ובר במשכי רטיבות שונים [ערכי P(F) כפי שנתקבלו בניתוח שונות].

גורם השונות	דרגות חופש	חומרת נגיעות סופית		RAUDPC		כתמים נקרטיים (לעלה)	
		ניסוי 1	ניסוי 2	ניסוי 1	ניסוי 2	ניסוי 1	ניסוי 2
מין הפונדקאי (H)	1	0.9156	0.6388	0.9263	0.5759	0.7993	0.4929
תבדיר [H]	2	<0.0001	0.5071	<0.0001	0.1073	0.0006	0.1710
מין מאולח (I)	1	0.5086	0.1201	0.6539	0.0474	0.1339	0.0912
משך רטיבות (W)	2	<0.0001	0.0022	0.0200	0.0014	0.0094	0.0008
I × H	1	0.1964	0.0006	0.1878	<0.0001	0.5450	0.0024
W × H	2	0.4763	0.7238	0.6089	0.7817	0.8404	0.4247
I × [H]	2	0.0107	0.5770	0.0155	0.2037	0.1075	0.0092
תבדיר W × [H]	4	0.0028	0.0286	0.0002	0.0022	0.0497	0.0243
W × I	2	0.5828	0.3484	0.7746	0.0058	0.2245	0.0230
W × I × H	2	0.2766	<0.0001	0.2479	<0.0001	0.2738	0.0001
תבדיר W × I × [H]	4	0.1162	0.5987	0.0137	0.6509	0.0307	0.0415

* ערכי חומרת המחלה ששימשו לניתוח מופיעים באיור 4.



איור מספר 5. השפעת שתי טמפרטורות: 10°C (א) ו-20°C (ב) ומין הפונדקאי על שיעור הנביטה לאורך זמן של פיקנידיוספורות מהפטרייה *M. pinodes* שהופקו מתבדידים שבודדו ממיני אפונה תרבותית ואפונת בר מעמק בית-שאן. הנבגים הורחפו באגר 0.1%, הדגימות הנבחנו נסרקו תחת מיקרוסקופ אור (x20). כמדד לנביטה שימש אורך נחשון נביטה גדול מרוחב הנבג. הקווים האנכיים מציינים את התחום הקטן ביותר המובהק (LSD) ברמת מובהקות $P \leq 0.05$.

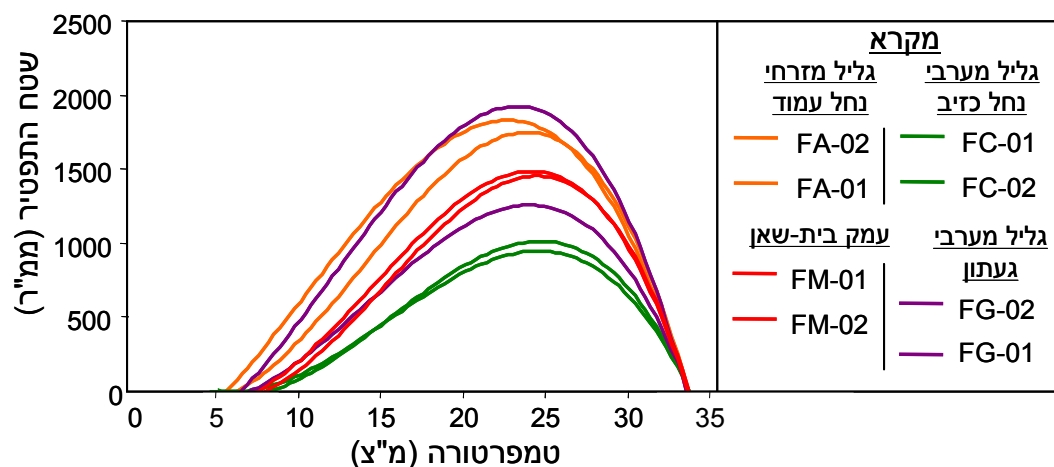
4.3 השוואת דרישות אקולוגיות של תבדידים שבודדו מהמין *P. fulvum* מאתרים

המאופיינים בתנאי אקלים שונים

4.3.1 בחינת השפעת הטמפרטורה ואתר הבידוד

השפעת הטמפרטורה והאתר ממנו נדגמו התבדידים (גליל מערבי, גליל מזרחי ועמק בית שאן) על צימוח התפטיר נבחנו בסדרת ניסויים. קצב הצימוח של התבדידים מנחל עמוד, בכל הטמפרטורות, היה מהיר יותר מאשר התבדידים שבודדו מעמק בית-שאן, וקצב הצימוח של התבדידים מנחל כזיב בגליל המערבי היה האיטי ביותר. השוואת תגובת התבדידים לטמפרטורות מ-5 מ"צ עד 35 מ"צ מראה כי קצב צימוח התפטיר של התבדידים בתרבית היה דומה בין צמדי התבדידים מהאתרים השונים (מלבד התבדידים מגעתון בגליל המערבי) (איור 6). בדומה לממצאים שהתקבלו בניסויים שתוארו בסעיף 4.2.1 גם בניסוי אלו לא נמצאו הבדלים משמעותיים בטמפרטורות הצימוח של התבדידים. על פי טמפרטורות הצימוח

הממוצעות, ההבדל בין התבדידים שולי ועומד על 2 מ"צ. טמפרטורת הצימוח המיטבית הינה כ- 23-24 מ"צ (טבלה 17).



איור מספר 6. השפעת הטמפרטורה ואתר הבידוד על צימוח תפטיר הפטרייה *M. pinodes* לאחר 12 ימים. בניסוי נבחנו תבדידים שבודדו מצמחי *P. fulvum* נגועים שנמצאו ב- 3 אזורים אקלימיים שונים: הגליל המזרחי, הגליל המערבי ועמק בית שאן. ערכי מקדמי המתאם המרובה (R^2) של משוואות הרגרסיה המתוארות באיור הם בטווח 0.57-0.64. כל משוואות הרגרסיה מובהקות ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$.

טבלה מספר 17. ממוצע ערכי טמפרטורות הצימוח המיטביות, העליונות והתחתונות של תפטירי תבדירי הפטרייה *M. pinodes* כפי שחושבו ממשוואות הפולינומים שנתקבלו בשתי החזרות על הניסוי לבדיקת השפעת הטמפרטורה על צימוח תפטיר תבדירים ממקומות בידוד שונים מבחינה אקלימית.

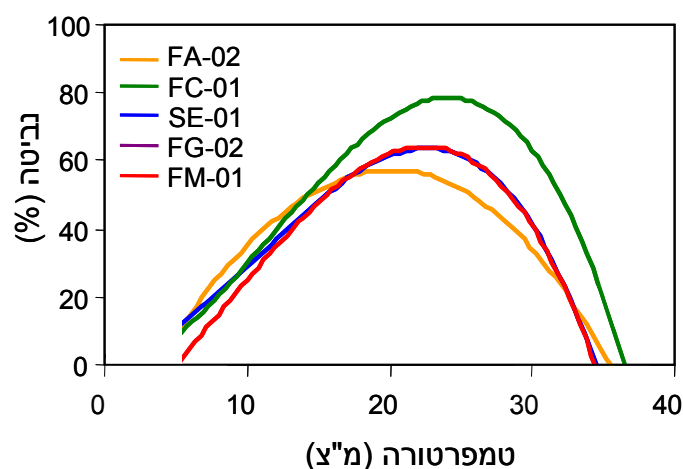
טמפרטורות צימוח				
אזור	שם התבדיר	תחתונה	מיטבית	עליונה
גליל מזרחי	FA-02	6.4	23.5	34.0
גליל מזרחי	FA-01	6.3	23.7	34.1
גליל מערבי	FC-01	7.0	24.3	34.1
גליל מערבי	FC-02	6.6	22.5	34.0
גליל מערבי	FG-02	6.4	23.6	34.1
גליל מערבי	FG-01	6.5	23.4	34.1
עמק בית-שאן	FM-01	7.6	24.6	34.3
עמק בית-שאן	FM-02	6.9	24.0	34.0

בניסוי שבחן את השפעת הטמפרטורה ואתר הבידוד על שיעור הנביטה של פיקנידיוספורות, לא נמצא הבדל משמעותי בשיעורי הנביטה של פיקנידיוספורות. בטמפרטורה המיטבית (כ- 23-25 מ"צ) שיעור הנביטה המכסימאלי הגיע ל- 60-80%. השוואת ערכי ה- $GR_{(50)}$ בין התבדירים הראתה הבדל של עד 5 מ"צ (איור 7, טבלה 18).

4.3.2 בחינת השפעת משך הרטיבות הדרוש להדבקה ואתר הבידוד על התפתחות המחלה

בבחינת השפעת משך הרטיבות ואתר הבידוד על התפתחות המחלה בקו בוחן ממין הבר *P. fulvum*, נמצא כי כשהוערכו כל העלים (גם אלו שנוצרו לאחר ההדבקה) חומרת המחלה הסופית הגיעה לנגיעות מרבית של 25%-3%. בעלים שהודבקו הייתה רמת הנגיעות המרבית 80% (ראה סעיף 3.2.2 ו-4.2.2). בשתי החזרות של הניסוי התקבלו תוצאות שונות: בחזרה הראשונה, לאחר 24 שעות רטיבות, נצפתה מחלה ברמת נגיעות

נמוכה יחסית לרמת הנגיעות שתועדה בחזרה השנייה על הניסוי, בכל התבדידים שנבחנו. בנוסף, בחזרה השנייה נמצאו הבדלים משמעותיים ברמות הנגיעות בין התבדידים והתבדיד שמקורו בנחל כזיב (גליל מערבי) היה אלים יותר מאשר התבדידים האחרים.



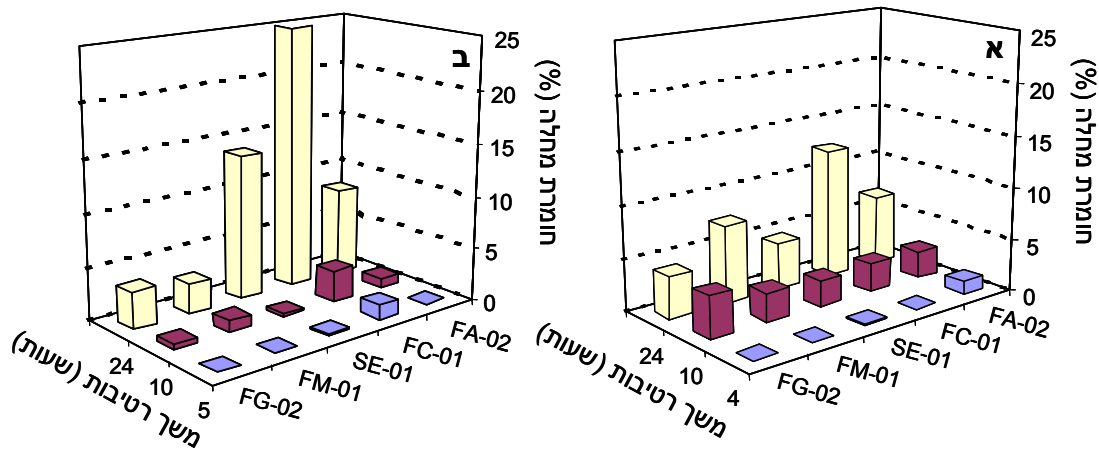
איור מספר 7. השפעת הטמפרטורה ואתר הבידוד על נביטת נבגים אל-מיניים של הפטרייה *M. pinodes* לאחר 24 שעות. בניסוי נבחנו תבדידים שבודדו מצמחי *P. sativum* ו-*P. fulvum* שנדגמו מ-3 אזורים אקלימיים שונים: הגליל המזרחי, הגליל המערבי ועמק בית שאן. ערכי מקדמי המתאם המרובה (R^2) של משוואות הרגרסיה המתוארות באיור הם בטווח 0.69-0.99. כל משוואות הרגרסיה מובהקות ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$.

טבלה מספר 18. ממוצע ערכי טמפרטורות הנביטה המיטביות, התחתונות והעליונות של נבגים אל-מיניים (פיקנידיוספורות) מהפטרייה *M. pinodes* כפי שחושבו ממשוואות הפולינומים שנתקבלו בשתי החזרות על הניסוי לבדיקת השפעת הטמפרטורה על נביטת נבגים מתבדידים ממקומות בידוד שונים מבחינה אקלימית.

טמפרטורות נביטה				
עליונה	מיטבית	תחתונה	תבדיד	אזור
35.3	23.7	5.1	FA-02	גליל מזרחי
35.9	25.2	4.9	FC-01	גליל מערבי
34.7	22.6	2.4	SE-01	עמק בית-שאן
35.3	26.5	7.1	FG-02	גליל מערבי
34.9	23.4	4.6	FM-01	עמק בית-שאן

בהשוואה בין התבדידים שמקורם במין הבר *P. fulvum* לתבדיד מהמקור התרבותי (SE-01) לא נמצאו הבדלים בין התבדידים (איור 8 א, ב). בניתוח השונות של ערכי חומרת המחלה הסופיים, ה-RAUDPC ומשקל החומר הרטוב בתום שבועיים מאילוח נמצא כי למשך הרטיבות הייתה השפעה מובהקת, לעומת זאת לא היה הבדל מובהק בין התבדידים (טבלה 19).

בחינת משך הרטיבות הדרוש לנביטה של פיקנידיוספורות מהתבדידים לעיל הראתה כי במשכי זמן מסוימים לאחר החשיפה למים קיימים הבדלים בין התבדידים: ב-20 מ"צ לאחר 4 שעות היה הבדל מובהק בין התבדיד מנחל עמוד (גליל מזרחי) לבין שאר התבדידים. שעתיים לאחר מכן ההבדל נעלם ואחוזי הנביטה היו דומים. ב-10 מ"צ לאחר 8 ו-10 שעות הרטבה היה הבדל מובהק בין התבדיד מעמק בית שאן שבודד ממין הבר והתבדיד שבודד מהמין התרבותי מאותו האתר. תבדידים מהבר שבודדו מאתרים שונים לא נבדלו בשעורי הנביטה במשכי הרטיבות שנבדקו (איור 9 א, ב).

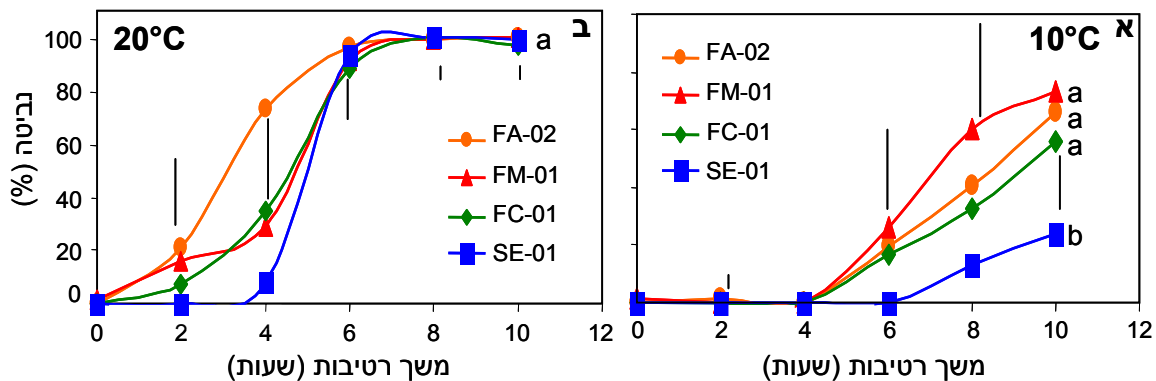


איור מספר 8. השפעת אתר הבידוד ומשך הרטיבות על עוצמת מחלת האסקוכיטה באפונה בר, מהמין *P. fulvum* לאחר הדבקה בפיקנידיוספורות. הניסוי נערך פעמיים (א ו-ב) בצמחים שלמים בעציצים. הנגיעות הוערכו, ברמת הצמח השלם, 15 ימים לאחר האילוח. ערכי P(F) שנתקבלו בניתוח השונות מוצגים בטבלה מספר 10.

טבלה מספר 19. השפעת משכי רטיבות שונים ומקור התבדילים על חומרת הנגיעות הסופית, RAUDPC ומשקל חומר רטוב באפונה [ערכי P(F) נתקבלו בניתוח שונות].

משקל חומר רטוב	RAUDPC			חומרת נגיעות סופית		ד"ח	גורם
	ניסוי 1	ניסוי 2	ניסוי 1	ניסוי 2	ניסוי 1		
0.2942	0.3404	0.1669	0.2992	0.5806	4	(I)	תבדיל
<0.0001	0.0245	<0.0001	0.0277	0.0031	2	(W)	משך רטיבות
0.1393	0.2348	0.7980	0.7132	0.3146	8	W × I	W × I

* ערכי חומרת המחלה ששימשו לניתוח הנתונים מופיעים באיור 8.



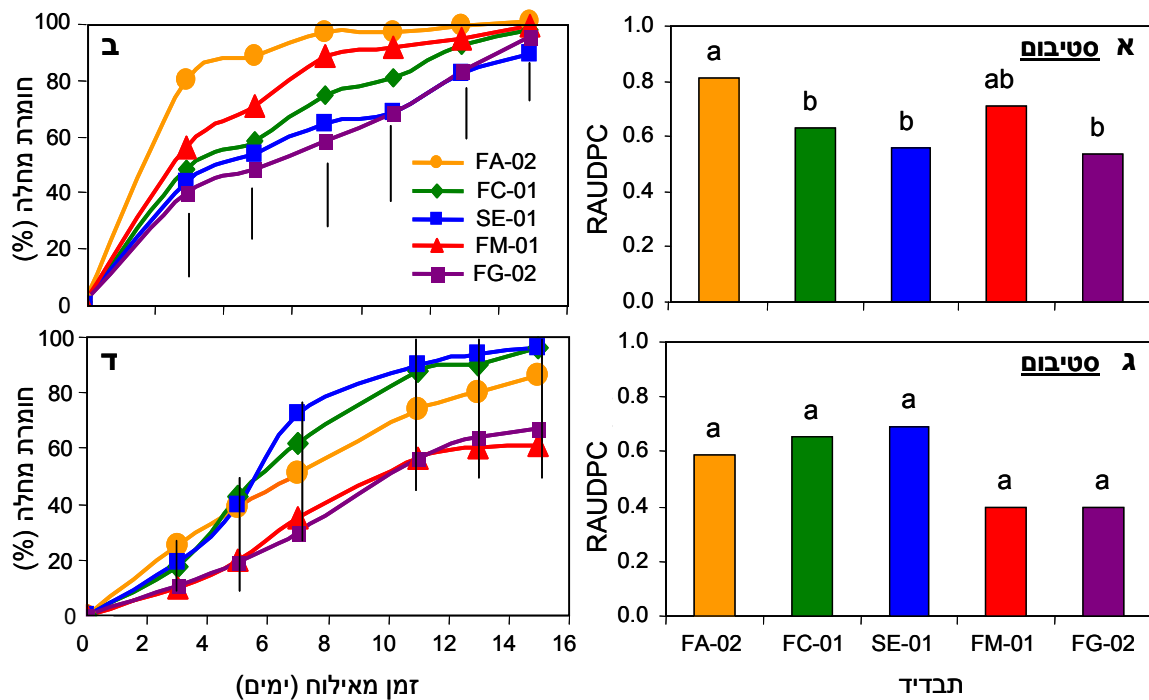
איור מספר 9. השפעת שתי טמפרטורות: 10°C (א) ו-20°C (ב) ואתר הבידוד על שיעור הנביטה לאורך זמן של פיקנידיוספורות של הפטרייה *M. pinodes*, שהופקו מתבדילים שבודדו מאזורי אקלים שונים. הנבגים הורחפו באגר 0.1%, הדגימות הנבחנות נסרקו תחת מיקרוסקופ אור (×20). המדד לנביטה הינו אורך נחשון נביטה הגדול מרוחב הנבג. הקווים האנכיים מציינים את התחום הקטן ביותר המובהק (LSD) ברמת מובהקות $P \leq 0.05$.

4.3.3 בחינת פרופיל האגרסיביות כלפי אפונה תרבותית, של תבדילי אסקוכיטה שבודדו מהמין *P.*

fulvum מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים

בסדרת הניסויים בחנו את השפעת אתר הבידוד על רמת האלימות של התבדילים כלפי זן בוחן תרבותי הרגיש יותר למחלה מקווי הבר. בניסוי בו נכללו תבדילים שבודדו מהגליל המזרחי, הגליל המערבי ועמק

בית-שאן לא נמצאו הבדלים עקביים ברמת האלימות בשתי החזרות של הניסוי. כמו כן, לא נמצא הבדל מובהק בין התבדוד שמקורו במין התרבותי לבין התבדודים שמקורם במין הבר. בין שתי החזרות של הניסוי היו הבדלים בתגובת הצמחים, בעיקר בשבוע הראשון לאחר האילוח (איור 10 א, ב). תמונה דומה עולה מניסוי נוסף בו נכללו תבדודים שבודדו מהגליל המזרחי, מבואות ירושלים, אזור לכיש, נחל עירון והגלבע (מקור חלק מהם מפונדקאים שונים). גם בניסוי זה לא נמצאו הבדלים מובהקים בין התבדודים ונראה כי הזן התרבותי היה רגיש באותה המידה ללא קשר לאתר הבידוד או הפונדקאי ממנו בודדו התבדודים (איור 11 א, ב).

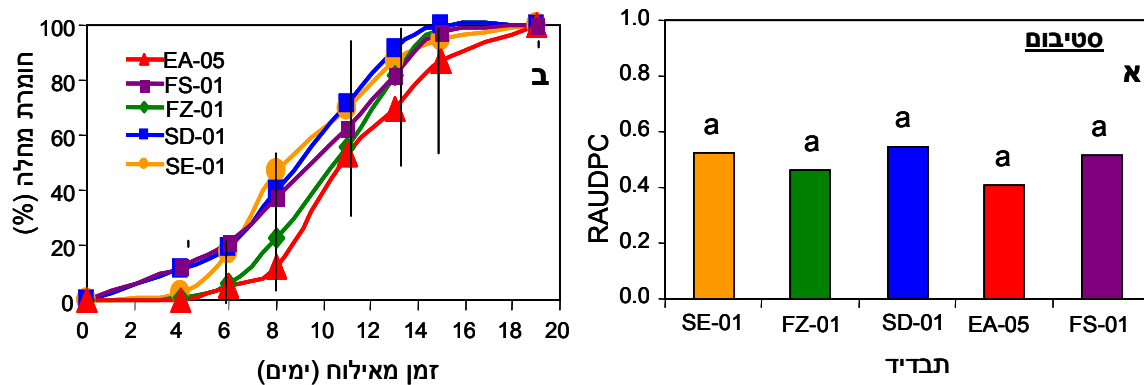


איור מספר 10. השפעת אתר הבידוד על רמת האלימות של תבדודי *M. pinodes* שבודדו מצמחי אפונת בר מהמין *P. fulvum* ומאפונה תרבותית מהמין *P. sativum* כלפי הזן התרבותי קרינה בשני ניסויים. א, ב ניסוי 1, ג, ד ניסוי 2. ב, ד. עקומי התפתחות המחלה. הצמחים גדלו בעציצים ואולחו בהדבקה מלאכותית בגיל שבועיים. הקווים האנכיים מציינים את התחום הקטן ביותר המובהק (LSD) ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$; א, ג. בחינת ההבדל בין ממוצע ערכי RAUDPC שחושבו על פי הנתונים המוצגים באיורים ב, ד. עמודות שלידן אותיות שונות, נבדלות זו מזו באופן מובהק כנקבע על פי מבחן HSD ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$.

4.3.4 בחינת השפעת מיקום העלה ואתר הבידוד

במסגרת הניסויים שנערכו בסעיף 4.3.2 נצפה כי העלים התחתונים של צמחי אפונת הבר נשרו מספר ימים לאחר שפיתחו סימפטומים של המחלה. למרות הנגיעות במחלה, הצמח המשיך לפתח עלים חדשים (מעין מנגנון התחמקות, תמונה 1). בחינת השפעת מיקום העלה בצמח ואתר הבידוד על הרגישות למחלת האסקוכיטה נבחנה בעזרת עלים מנותקים שמוספרו על פי מיקומם לאורך הגבעול (עלה מורכב מזוג עלעלים). בניסוי נבחנו שני פרמטרים לפגיעה בעלה: השטח הנקרטי והשטח הפגוע (בממ"ר). בעלה התחתון ביותר השטח הנקרטי היה גדול יותר (ממוצע הפגיעה בשני עלעלים) מאשר בעלים 2 ו-3 (איור 12). בניית השונות נמצא כי למיקום העלה על הצמח השפעה מובהקת על השטח הנקרטי אך לא נמצאו הבדלים מובהקים בין התבדודים (טבלה 20). בנוסף, גם על פי תוצאות השטח הפגוע בעלים ניתן לראות כי העלה התחתון רגיש יותר למחלה ונפגע באופן חמור יותר מעלים גבוהים יותר בצמח (איור 13). ניתוח

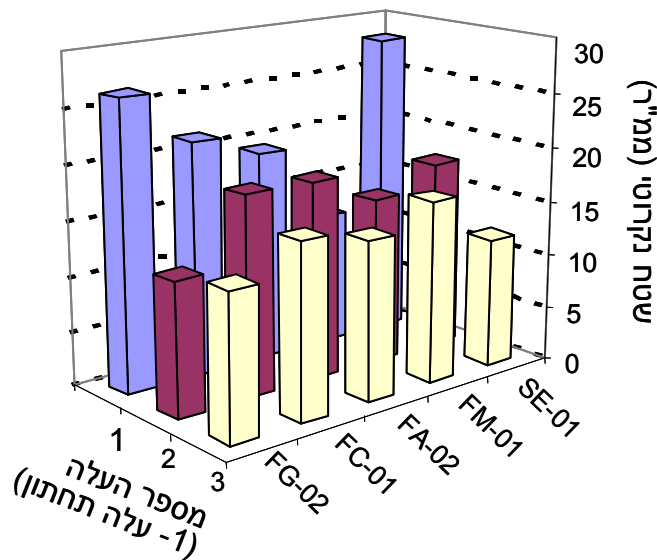
השונויות לערכי השטח הפגוע הראה כי מיקום העלה בצמח הינו גורם משמעותי בתגובתו להדבקה במחלה. בשונה מהניתוח לערכי השטח הנקרטי, במדד זה נמצאו הבדלים מובהקים בין התבדידים (טבלה 21).



איור מספר 11. השפעת אתר הבידוד על רמת האלימות של תבדידי *M. pinodes* שבודדו מצמחי אפונת בר מהמינים *P. elatius* ו-*P. fulvum* מאפונה תרבית מהמין *P. sativum* כלפי הזן התרבותי קרינה. ב. עקום התפתחות המחלה. הצמחים גדלו בעציצים ואולחו בהדבקה מלאכותית בגיל של 14 ימים. הקווים האנכיים מציינים את התחום הקטן ביותר המובהק (LSD) ברמת מובהקות $P \leq 0.05$; א. בחינת ההבדל בין ממוצע ערכי RAUDPC שחושבו על פי הנתונים המוצגים באיור ב. עמודות שלידן אותיות שונות, נבדלות זו מזו במובהק כנקבע על פי מבחן HSD ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$.



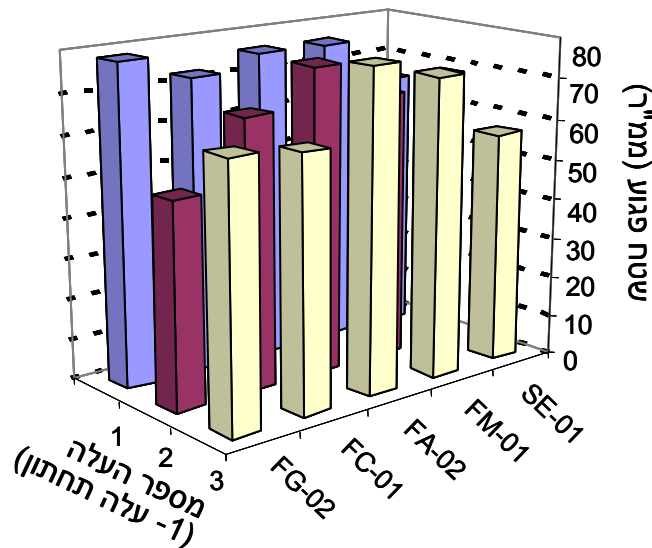
תמונה מספר 12. נשירת העלים התחתונים בצמחי אפונת בר מהמין *P. fulvum*, כשבוע לאחר אילוח בתבדידים מהפטרייה *M. pinodes*.



איור מספר 12. השפעת מיקום העלה על תגובתו להדבקה בתבדידים מהפטרייה *M. pinodes* שנדגמו מאזורים אקלימיים שונים. הניסוי בוצע בעלי אפונה מנותקים בצלחות פטרי ונמדד גודל השטח הנקרטי שהתפתח בעלה.

טבלה מספר 20. ערכי P(F) שנתקבלו בניתוח שונות לערכי השטח הנקרטי שהתפתח בעלים (בממ"ר), כפי שהושפעו ממיקום העלה בצמח ואתר דגימת התבדיד, בתגובה להדבקה בתבדידי *M. pinodes*.

מקור שונות	ד"ח	Prob>F
מספר העלה	2	<0.0001
תבדיד	4	0.2469
מספר העלה X תבדיד	8	0.0014



איור מספר 13. השפעת מיקום העלה על התגובה להדבקה בתבדידים מהפטרייה *M. pinodes* שנדגמו מאזורים אקלימיים שונים. הניסוי בוצע בעלי אפונה מנותקים בצלחות פטרי ונמדד גודל השטח הפגוע בעלה.

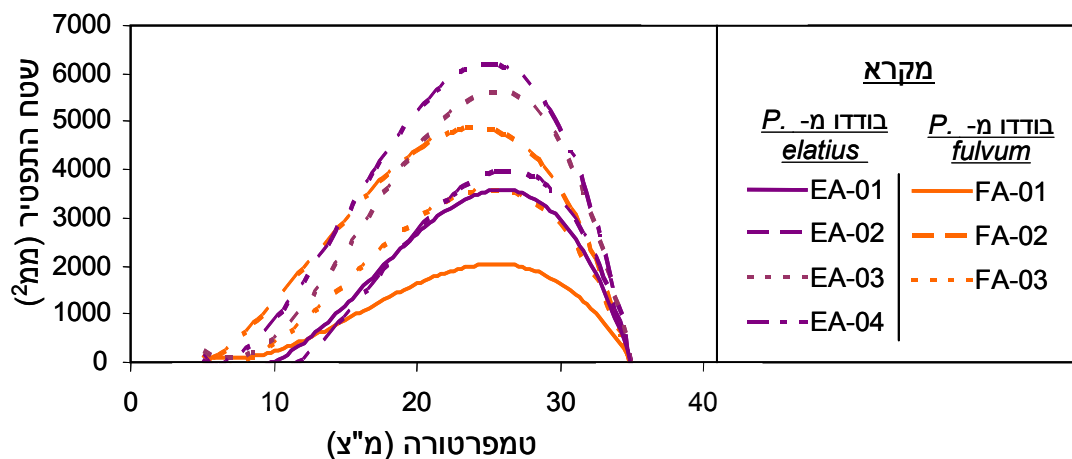
טבלה מספר 21. ערכי P(F) שנתקבלו בניתוח שונות לערכי חומרת המחלה בעלים (באחוזים) כפי שהושפעו ממיקום העלה בצמח ואתר דגימת התבדיד, בתגובה להדבקה בתבדידי *M. pinodes*.

מקור שונות	ד"ח	Prob>F
מספר העלה	2	0.0007
תבדיד	4	0.0102
מספר העלה X תבדיד	8	0.2049

4.4 בחינת ההבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידי אסקוכיטה ממין מסוים, שבודדו ממיני אפונה שונים

4.4.1 בחינת השפעת הטמפרטורה על צימוח תפטיר

בבחינת השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי ממנו בודד התבדיד (מהמין *P. fulvum* או *P. elatius*) על צימוח התפטיר לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין התבדידים. ניתן לראות הבדלים בגודל השטח בין תבדידים לאחר שבועיים, אולם לא ניתן להצביע על הבדל בין שתי קבוצות התבדידים (איור 14). בכל התבדידים הגדילה התחילה בטמפרטורות שבין 5.6-9.3 מ"צ, הצימוח המיטבי היה בטמפרטורות שבין 20.3-25.1 מ"צ והגדילה נפסקה בטמפרטורה של כ-34-35 מ"צ (טבלה 22).



איור מספר 14. השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי ממנו בודדו התבדיד על צימוח תפטיר הפטרייה *M. pinodes*. בניסוי נבחנו תבדידים שבודדו ממיני אפונה בר *P. fulvum* ו-*P. elatius* שנדגמו בנחל עמוד שבגליל המזרחי. הניסוי בוצע בצלחות פטרי, גידול התפטיר הופסק לאחר 12 ימים ושטחו נמדד.

טבלה מספר 22. ממוצע נתוני טמפרטורות צימוח התפטיר של תבדידי הפטרייה *M. pinodes* כפי שחושבו ממשוואות הפולינומים שנתקבלו בשתי החזרות על הניסוי לבדיקת השפעת הטמפרטורה ומין הפונדקאי ממנו בודד התבדיד. ערכי מקדם המתאם המרובה של הרגרסיה (R^2) הם בין 0.47-0.99 (איור 14). במבחן t להסתכלויות בלתי צמודות נמצא כי אין הבדל מובהק בין ממוצעי התבדידים לפי שני הפונדקאים בשלוש טמפרטורות הצימוח: תחתונה, מיטבית ועליונה ($P(t) > 0.051$, $P(t) > 0.134$, $P(t) > 0.141$ בהתאמה).

טמפרטורות צימוח			תבדיד	פונדקאי
עליונה	מיטבית	תחתונה		
34.3	21.5	6.3	FA-01	<i>P. fulvum</i>
34.1	20.3	5.6	FA-02	
34.0	23.8	7.3	FA-03	
34.4	24.0	8.4	EA-01	<i>P. elatius</i>
34.4	24.3	9.3	EA-02	
34.4	23.7	6.8	EA-03	
34.9	25.1	6.7	EA-04	

4.4.2 בחינת פרופיל האגרסיביות של תבדידי אסקוכיטה שבודדו מהמינים *P. elatius* ו-*P. fulvum*

מאתר אקלימי דומה, כלפי אפונה תרבותית ואפונת בר

כדי לבחון אם מין האפונה ממנו נדגם התבדיד משפיע על האגרסיביות של הפתוגן, בוצע ניסוי לבדיקת תגובתם של שני מיני אפונת בר והמין התרבותי שאולחו בתבדידים שנדגמו משני מיני הבר באתר נחל עמוד ובתבדיד שנדגם מהזן התרבותי בעמק בית-שאן. מניתוח תוצאות התפתחות המחלה וערכי ה-RAUDPC בצמחי הבוחן ובחינת מובהקות השפעת הגורמים ניתן ללמוד כי במרבית המקרים הייתה השפעה מובהקת למין הצמח שאולח. בנוסף, בשתי החזרות של הניסוי נמצאו הבדלים מובהקים בין התבדידים והתקיימה השפעת גומלין בין תבדידים מסוימים לבין מין הצמח הבוחן שאולח (טבלה 23).

טבלה מספר 23. ערכי P(F) כפי שנתקבלו בניתוח שונות לחומרת נגיעות סופית ו-RAUDPC בצמחי בוחן משלושה מיני אפונה (בר ותרבות) לאחר אילוח בתבדידים מאותם מיני האפונה (איור 15).

RAUDPC		חומרת נגיעות סופית*		ד"ח	מקור השונות
ניסוי 1	ניסוי 2	ניסוי 1	ניסוי 2		
0.2968	<0.0001	<0.0001	0.0209	2	מין מאולח (I)
<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0167	5/6	תבדיד (P)
0.0004	<0.0001	0.0003	<0.0001	10/12	I×P

* ערכי חומרת המחלה ששימשו לניתוח הנתונים מופיעים באיורים 15 ו-16.

מעקומי התפתחות המחלה ומבחינת ערכי ה-RAUDPC ניתן ללמוד כי הזן התרבותי קרינה היה רגיש יותר למחלת האסקוכיטה ממיני הבר (איור 15 א-ו, איור 16 א-ו). הדבר בלט במיוחד בחזרה מס' 2 של הניסוי כאשר כל התבדידים גרמו לחומרת מחלה של 80% עד 100% (איור 16 ד). כמו כן, נראה כי חלק מהתבדידים שמרו על רמת אלימות קבועה יחסית כלפי שלושת המינים המאולחים (איור 15 ב, ד, ו) ונראה כי מכל פונדקאי בודדו תבדידים שהיה להם מידת אלימות שונה כלפי מיני האפונה השונים (איור 16 ב, ו).

4.4.3 בחינת השפעת מיקום העלה והפונדקאי ממנו בודד התבדיד

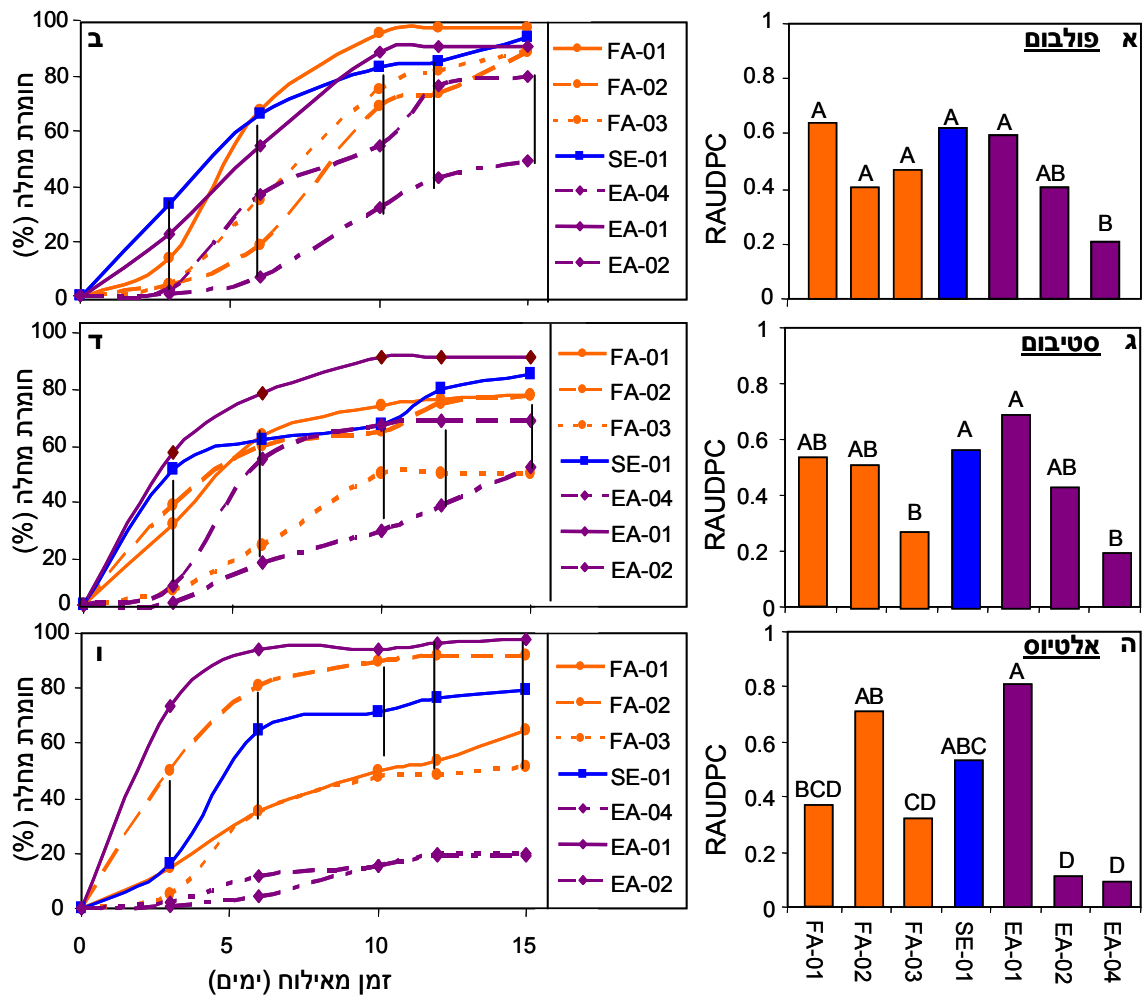
מידת השפעת מיקום העלה בצמח והפונדקאי ממנו בודד התבדיד על הרגישות למחלת האסקוכיטה נבחנו על ידי הערכת חומרת המחלה בכל זוג עלעלים בנפרד (להלן "עלה", חומרת המחלה ברמת הצמחים מוצגת באיור 16). בתגובת העלים על פי מיקומם לאורך הגבעול, נמצאו הבדלים בתגובה על פי מין צמח הבוחן שממנו נלקחו העלים. עלים 1-3 מהזן התרבותי היו רגישים באותה המידה והרגישות פחתה בעלה הרביעי (העליון ביותר, איור 17 ב). בקווי הבר, נראה כי ככל שהעלה היא גבוה יותר בצמח, כך הייתה חומרת המחלה שהתפתחה עליו נמוכה יותר (איור 17 א, ג). בניתוח השונות נמצא כי למיקום העלה הייתה השפעה מובהקת בתגובה לאילוח. כמו כן, בדומה לממצאים קודמים, נמצאו הבדלים מובהקים בין התבדידים ללא קשר לפונדקאי ממנו בודדו (טבלה 24).

4.5 התפתחות מחלת האסקוכיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים

4.5.1 פיזור מרחבי של אוכלוסיית צמחי אפונת הבר מהמין *P. elatius* בנחל כזיב ונחל עמוד

צמחי אפונת הבר גדלים במרחב בפיזור כתמי ובכל כתם היה מספר צמחים שונה. בסקר שבוצע בנחלים כזיב ועמוד בשנים 2007-2009 נמצא כי כ-40% מהצמחים גדלים בכתמים המונים ארבעה צמחים ויותר, ו-8% מהצמחים גדלים בכתמים המונים 10 צמחים ויותר (איור 18). ארבעה מתוך 16 חתכים שתועדו

בכל חודש בחורף 2007/08 נבחרו להצגה באופן אקראי. אפיון הצמחים בכל חתך מראה כי בחודשים דצמבר וינואר כמעט כל הצמחים בחתך היו נגועים לפחות בעלה אחד ובכל חתך הפיזור המרחבי של הצמחים נע מצמח בודד או כתם בעל מספר צמחים מצומצם ועד לכתם המכיל עשרות צמחים הגדלים בצפיפות (איור 19 א-ד).

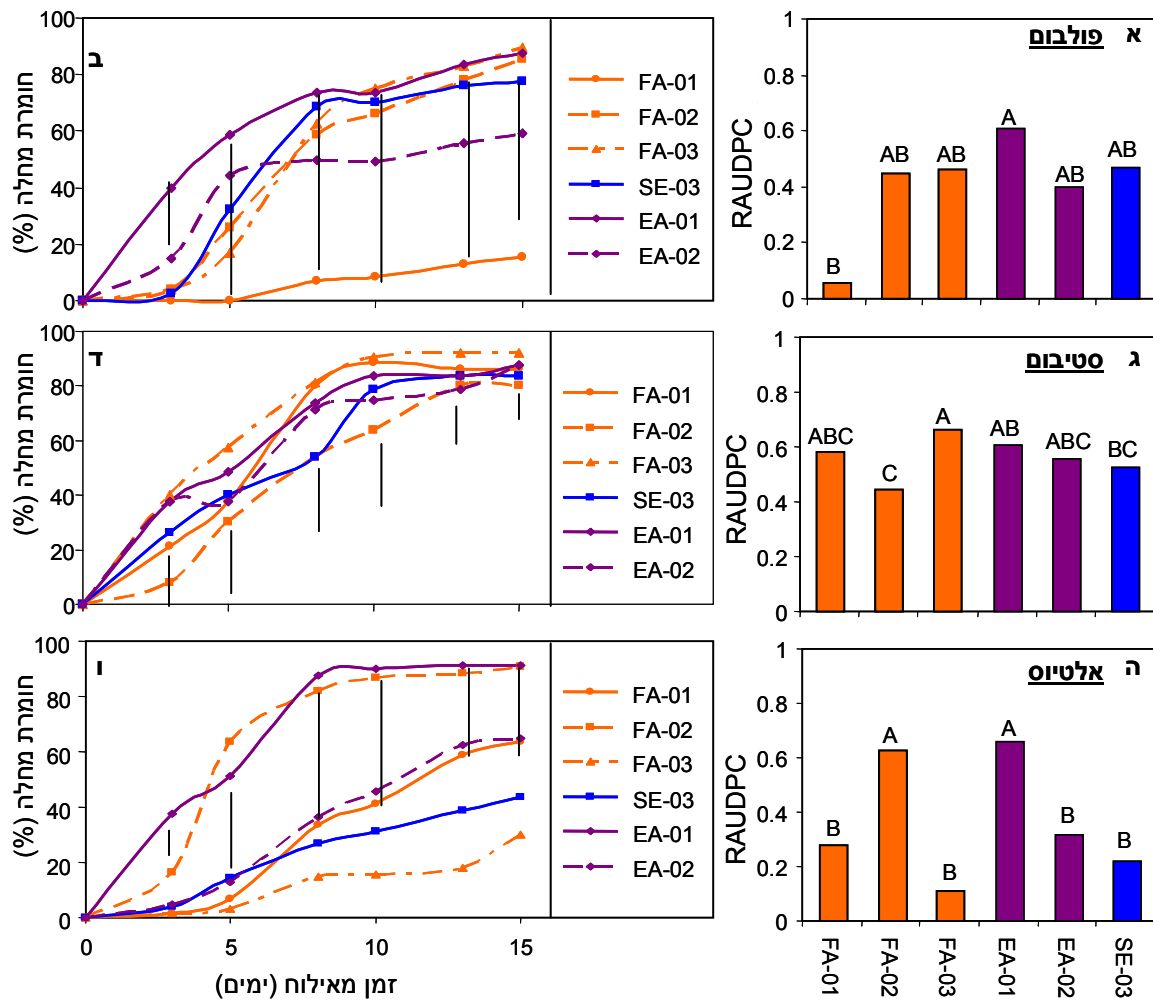


איור מספר 15. השפעת מין האפונה ממנו בודד התבדיל ומין האפונה המאולח על רמת האלימות של תבדילי *M. pinodes*, חזרה 1. התבדילים בודדו מיני אפונת בר *P. fulvum* ו- *P. elatius* ומהמין התרבותי *P. sativum* ואולחו קווי בוחן מאותם המינים. ב, ד, ו. עקומי התפתחות המחלה במינים *P. sativum fulvum* ו- *P. elatius* בהתאמה. הצמחים גדלו בעציצים ואולחו בהדבקה מלאכותית בגיל שבועיים. לאחר האילוח נשמרו תנאי לחות של 100% למשך 24 שעות. הקווים האנכיים מציינים את התחום הקטן ביותר המובהק (LSD) ברמת מובהקות $P < 0.05$. א, ג, ה. בחינת ההבדל בין ממוצע ערכי RAUDPC שחושבו על פי הנתונים המוצגים באיורים ב, ד, ו (בהתאמה). עמודות שלידן אותיות שונות, נבדלות זו מזו במובהק כנקבע על פי מבחן HSD ברמת מובהקות של $P < 0.05$.

4.5.2 התפתחות המחלה באוכלוסיית אפונת בר מהמין *P. elatius* בנחלים כזיב ועמוד

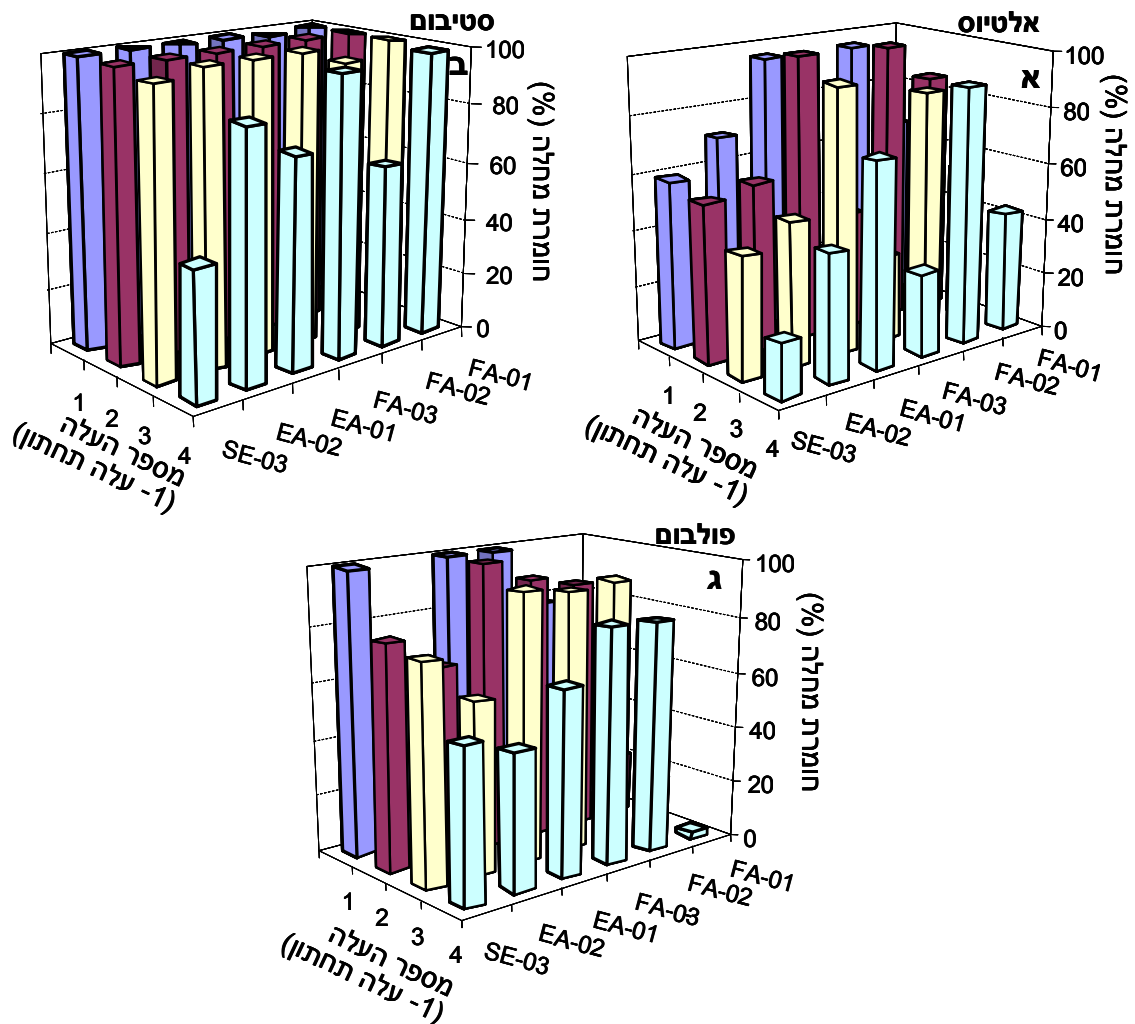
התפתחות המחלה באוכלוסיות אפונת הבר *P. elatius* נבחנה בנחלים כזיב ועמוד בחורפים 2007/08 ו-2008/09. בחורף 2007/08 התפתחות המחלה בשני הנחלים הייתה דומה. מספר הצמחים שגדלו באתרים קטן לאורך העונה וכמות הצמחים הנגועים פחתה גם היא. מספר העלים הנגועים עלה במקביל לגדילת הצמחים במהלך העונה. בחורף 2008/09 מהלך המחלה היה שונה מזה שהתרחש בחורף 2007/08 אולם נמצא דמיון בין שני אתרי הדגימה. בנחל עמוד הייתה ירידה חדה בכמות הצמחים שגדלו בנחל בעקבות

שטפונות והנגיעות במחלת האסקוכיטה הייתה נמוכה יחסית לעונה הקודמת. בסוף העונה שרדו מעט צמחים, אך מרביתם פיתחו כמות עלים גדולה מזו של הצמחים בעונה הקודמת. כמות הצמחים הנגועים עלתה במהלך החודשים דצמבר וינואר ופחתה מאוד בהמשך. גם בנחל כזיב נצפתה ירידה חדה בכמות הצמחים באתרי הדגימה במהלך העונה. כמות הצמחים הנגועים עלתה במהלך העונה וירדה לקראת סופה בדומה למה שהתרחש בנחל עמוד. בדומה לזה גם כמות העלים הנגועים עלתה במהלך העונה ופחתה לקראת סופה. כמו בנחל עמוד, גם בנחל כזיב שרדו מעט צמחים בעלי מספר רב יחסית של עלים בריאים (איור 20).



מעקב אחרי השינוי בשכיחות הצמחים הנגועים, שנערך ברמת החתך הבודד בעונת 2007/08, מראה כי בחתכים מסוימים נעלמו כל הצמחים הנגועים ונשארו רק צמחים בריאים (למשל חתך 8 בנחל עמוד); לעומת זאת היו חתכים ששיעור הצמחים הנגועים בהם עלה במהלך העונה (למשל חתך 6 בנחל

כזיב). באופן כללי ניתן לראות כי בנחל כזיב כמות הצמחים הנגועים הייתה גבוהה יותר מאשר בנחל עמוד וכי כמעט בכל החתכים בנחל עמוד נעלמו הצמחים הנגועים יחד עם מרבית מהצמחים הבריאים (איור 21).



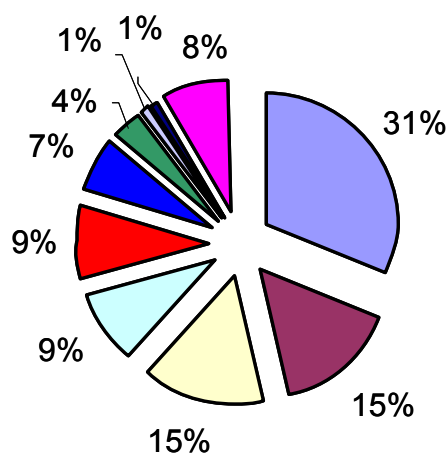
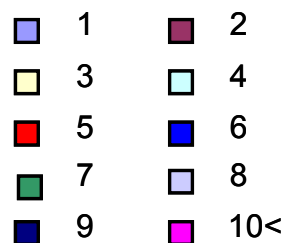
איור מספר 17. השפעת מיקום העלה בצמח ומין הפונדקאי ממנו בודדו התבדידים על התפתחות מחלת האסקוכיטה בעלים 1-4 (1 – עלה תחתון ביותר) בצמחי אפונה ממיני בר ותרבות (התפתחות המחלה בצמח השלם מתוארת באיור 16). התבדידים בודדו ממיני אפונת הבר *P. fulvum* ו-*P. elatius* שנמצאו בנחל עמוד שבגליל המזרחי ומהמין התרבותי *P. sativum* מעמק בית-שאן. חומרת המחלה הממוצעת בכל מספר עלה נקבעה לאחר 15 ימים מהדבקה על פי אחוז השטח הנקרטי מתוך שטח העלה הכולל.

כאשר בוחנים את הקשר בין שכיחות הצמחים הנגועים ובין שכיחות העלים הנגועים בכל חתך נראה כי בשתי העונות ובשני הנחלים, קיים מתאם בין שני הגורמים וככל ששכיחות הצמחים הנגועים הייתה גבוהה יותר כך גם עלתה שכיחות העלים הנגועים (איור 22 א, ג, ה, איור 23 ג, ה, ז, ט). כאשר בוחנים את הקשר בין צפיפות האוכלוסייה ומספר הצמחים הנגועים, לא נמצא קשר בין צפיפות הצמחים באתר לשכיחות המחלה בצמחים (איור 22, איור 23). בניתוח השונות לערכי חומרת המחלה בצמחים, בשתי העונות ובשני אתרי הדגימה, נמצא כי בעונת 2007/08 הצמחים בנחל עמוד היו ברמת נגיעות גבוהה יותר באופן מובהק מהצמחים בנחל כזיב. בעונת 2008/09 הצמחים בנחל כזיב היו חולים יותר, להבדיל מהשנה הקודמת (טבלאות 25, 26).

טבלה מספר 24. ערכי P(F) כפי שנתקבלו בניתוח שונות לחומרת נגיעות סופית באסקוקיטה בעלים מנותקים משלושה מיני אפונה. העלים אולחו בתבדידים שבודדו ממיני אפונה תרבותית ובר והושפעו ממין הצמח שעליו אולחו וממספר העלה שהודבק.

חומרת נגיעות סופית	ד"ח	מקור השונות
0.7884	2	מין הפונדקאי (H)
0.5147	3	תבדיד [H]
0.1883	2	מין מאולח (I)
<0.0001	3	מספר עלה (N)
0.9144	4	H × I
0.0169	6	H × N
<0.0001	6	I × [H]
0.7076	9	N × [H]
0.0615	6	I × N
0.6141	12	H × I × N
0.9416	18	תבדיד I × N × [H]

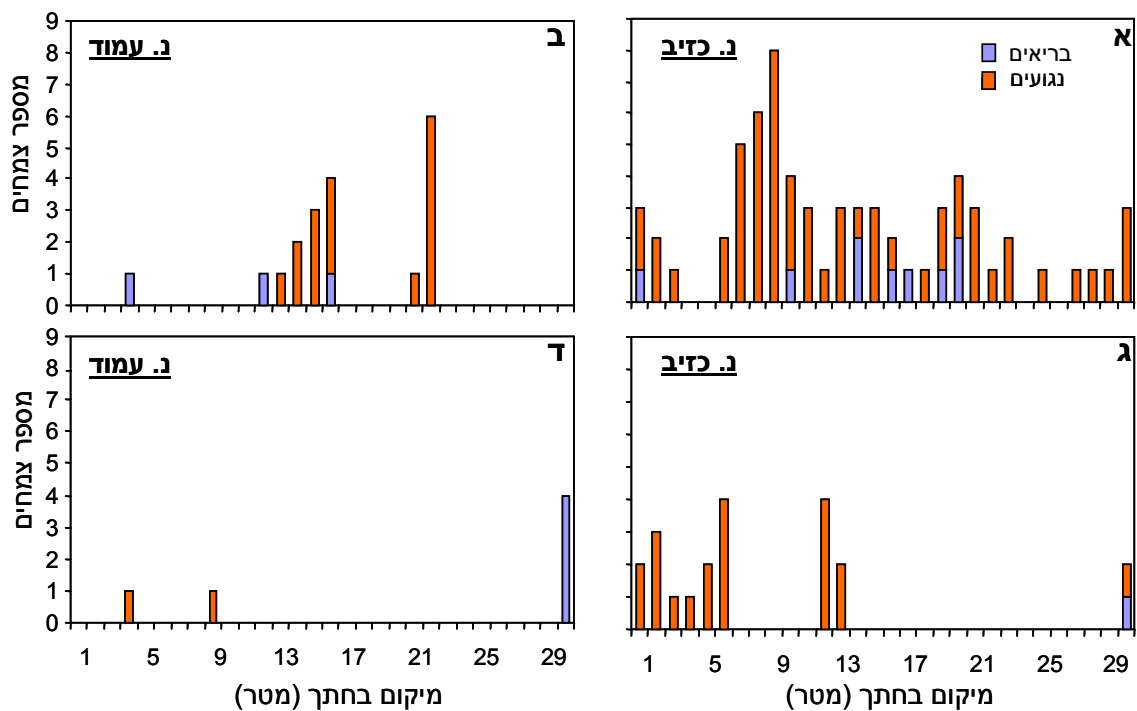
מספר צמחים בכתם



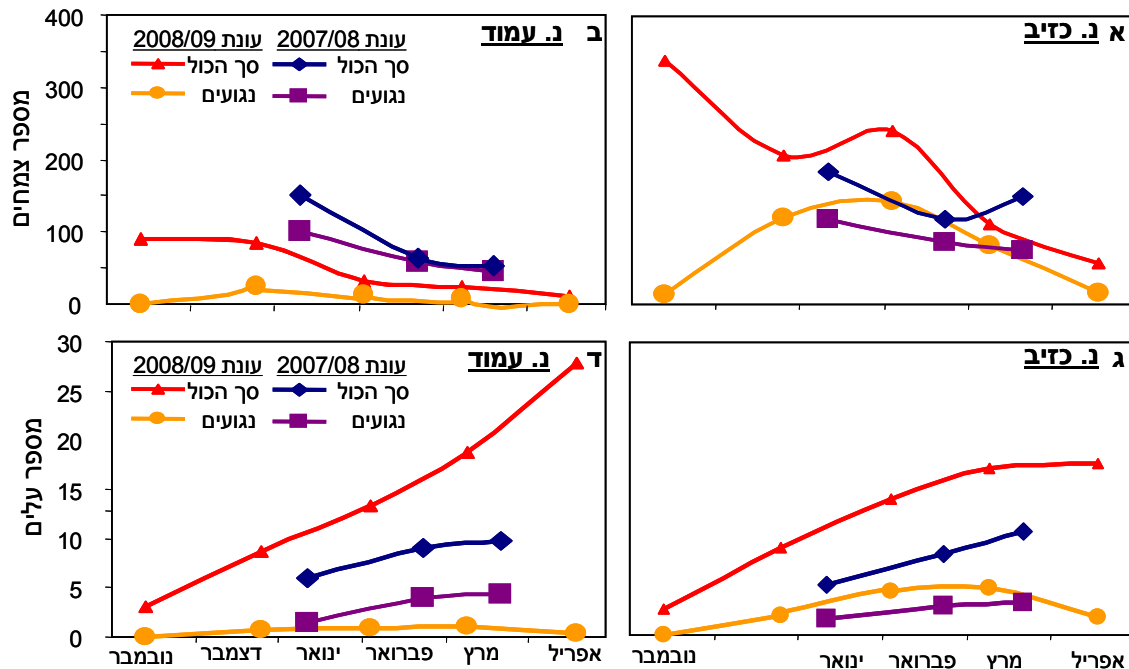
איור מספר 18. התפלגות פיזורם המרחבי של צמחי אפונת הבר *P. elatius* על פי מספר הצמחים הגדלים בצמידות (כתם), בנחל כזיב ונחל עמוד, בשתי עונות עוקבות 08/09. סף המדד לפיזור כתמי הינו מרחק של פחות ממטר בין הצמחים.

4.5.3 השפעת פני הקרקע על התפתחות המחלה

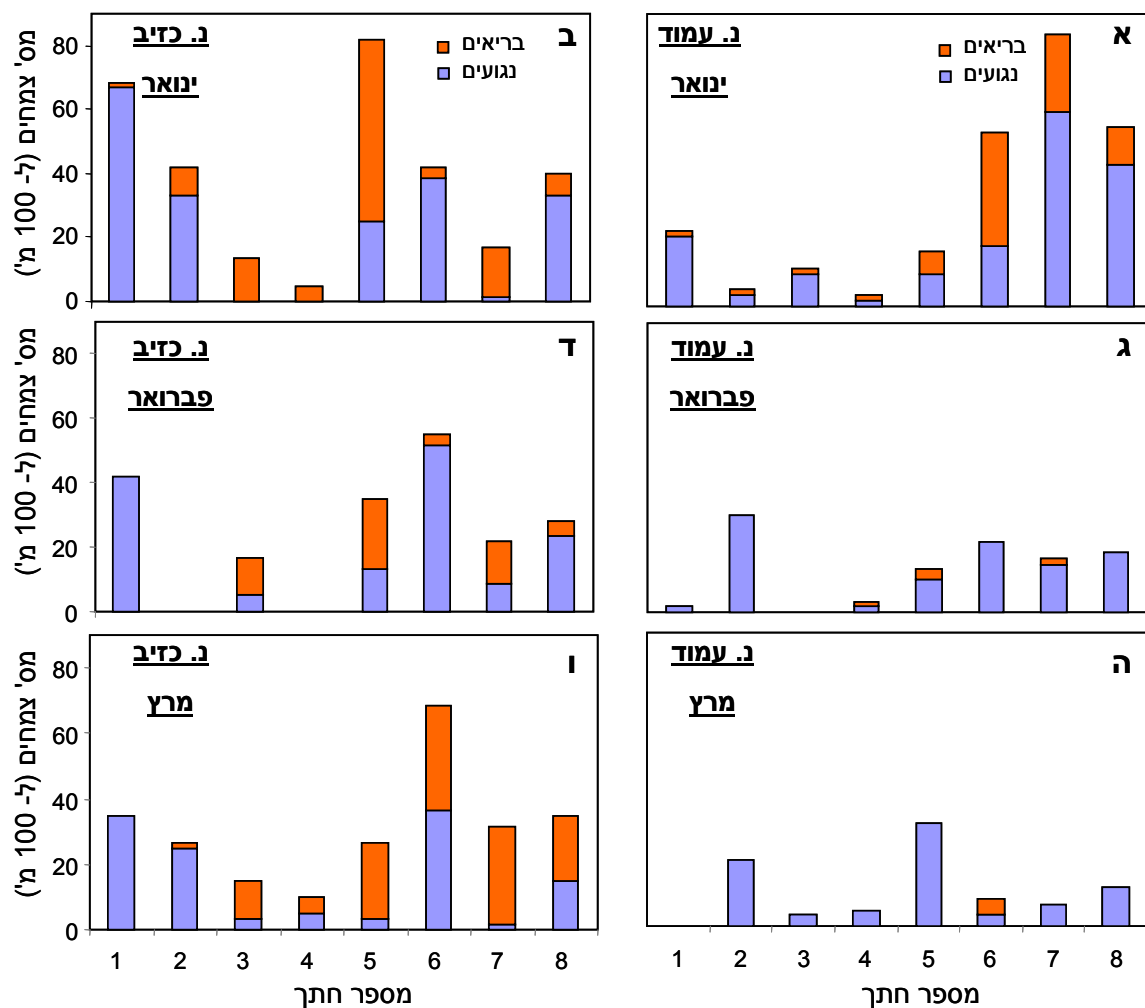
בחלקים מנחל כזיב הנחל זורם בתוך או בסמוך לשדרת עצי דולב. בחודשי הסתיו עלי הדולבים הנושרים מחפים את הקרקע ויוצרים מעין שכבת עלים בגובה מספר סנטימטרים. על מנת לבדוק אם לחיפוי הקרקע בעלים הייתה השפעה על חומרת המחלה בצמחים, בוצעה השוואה בין ערכי חומרת המחלה בחתכים שבהם הקרקע הייתה חשופה לחתכים בהם הקרקע הייתה מחופה בעלי הדולב. בניתוח השונות לערכי חומרת המחלה נמצאה השפעת גומלין מובהקת בין סוג החיפוי לבין השנה הנבדקת (טבלה 27). בניתוח לפי שתי העונות, בחתכים בהם הקרקע הייתה מחופה בעלים, חומרת המחלה הייתה נמוכה מהחתכים בהם הקרקע הייתה חשופה (איור 24).



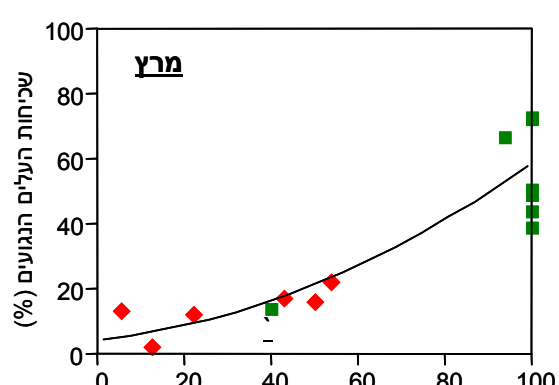
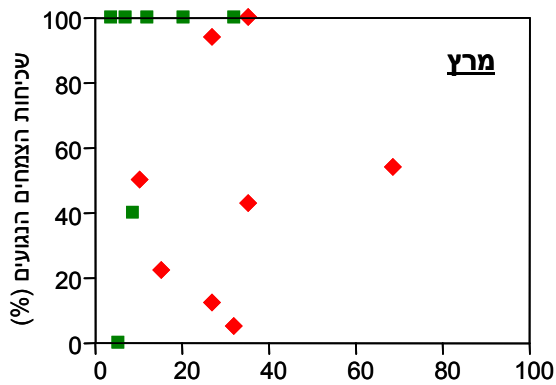
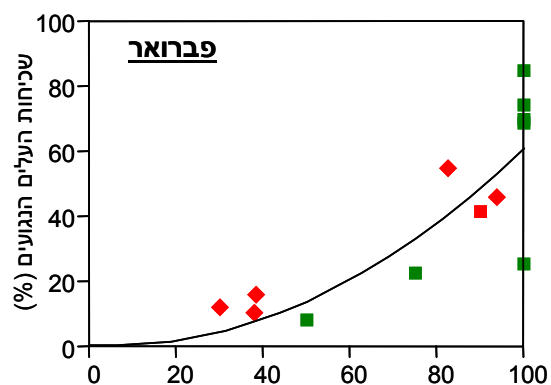
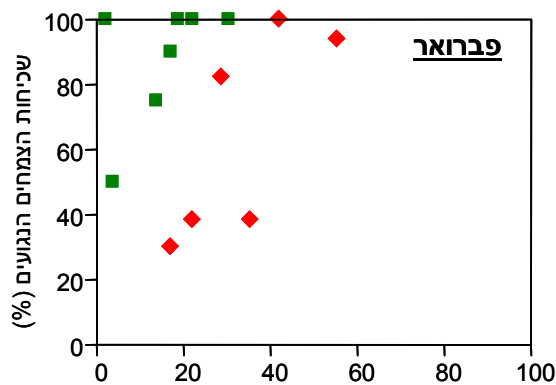
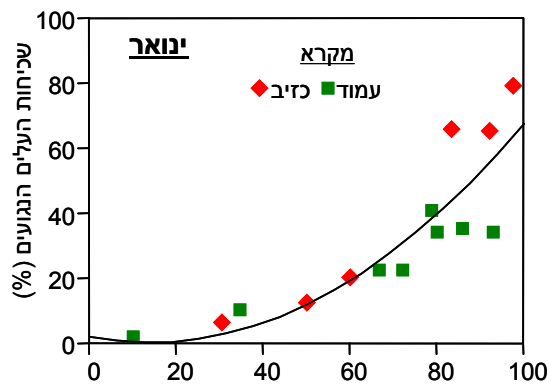
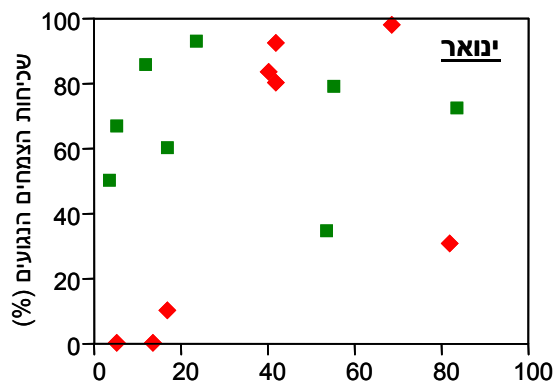
איור מספר 19. פיזור מרחבי של מחלת האסקוכיטה באפונת בר מהמין *P. elatus* בנחלים כזיב ועמוד בחורף 2007/08. החתכים שנסקרו גודלם 2×30 מ' והם נבחרו בערוץ הנחל על סמך סקר מקדים למיפוי אוכלוסיות אפונה ברות קיימא. בכל חתך תוארו כל צמחי האפונה והוערכה מידת פגיעתם ממחלת האסקוכיטה על פי הסימפטומים האופייניים למחלה. א, ג. נסקרו בנחל כזיב בחודשים ינואר ופברואר בהתאמה (מתוך 16 חתכים שנדגמו). ב, ד. נסקרו בנחל עמוד בחודשים דצמבר וינואר בהתאמה (מתוך 16 חתכים שנדגמו).



איור מספר 20. המהלך האפידמיולוגי של מחלת האסקוכיטה, לאורך עונת הגידול, באפונת בר מהמין *P. elatus* בנחלים כזיב ועמוד בעונות הגידול 2007/08 ו-2008/09. החתכים שנסקרו בגודל 2×30 מ' והם נבחרו בערוץ הנחל על סמך סקר מקדים למיפוי אוכלוסיות אפונה ברות קיימא. בכל סקירה נוספת נסקר אותו תא שטח שנבחר בתחילה. בכל חתך תוארו כל צמחי האפונה, הוערך האם הם נגועים במחלה ומידת נגיעות העלים, זאת על פי הסימפטומים האופייניים למחלה. א, ב. עקומות המתארות שינוי במספר הצמחים הכולל ובמספר הצמחים הנגוע במחלה לאורך תקופת הגידול בשתי העונות, בנחלים כזיב ועמוד בהתאמה. ג, ד. עקומות המתארות שינוי במספר העלים הכולל ובמספר העלים הנגועים במחלה (בממוצע לצמח) לאורך תקופת הגידול בשתי העונות, בנחלים כזיב ועמוד בהתאמה.



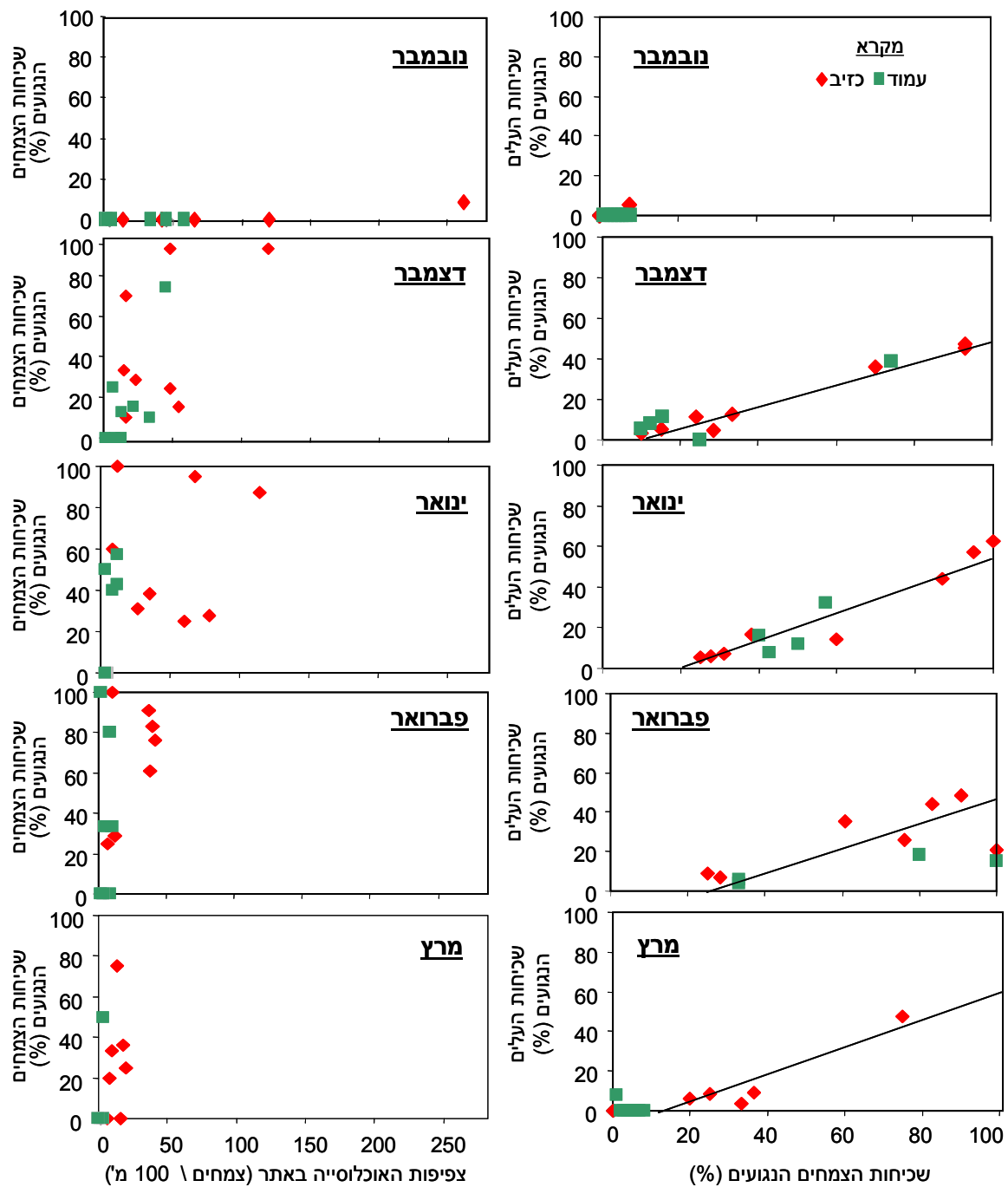
איור מספר 21. תפוצת מחלת האסקוקיטה באפונת בר מהמין *P. elatius* לפי חתכים, לאורך עונת הגידול 2007/08, בנחלים כזיב ועמוד. החתכים שנסקרו בגודל 2×3 מ' והם נבחרו בערוץ הנחל על סמך סקר מקדים למיפוי אוכלוסיות אפונה ברות קיימא. בכל סקירה נוספת נסקר אותו תא שטח שנבחר בתחילה. בכל חתך תוארו כל צמחי האפונה והוערך האם הם נגועים על פי הסימפטומים האופייניים למחלה. א, ג, ה. מתארים את שכיחות הצמחים הבריאים לעומת הצמחים הנגועים בכל חתך בנחל עמוד בחודשים ינואר, פברואר ומרץ (בהתאמה). ב, ד, ו. מתארים את שכיחות הצמחים הבריאים לעומת הצמחים הנגועים בכל חתך בנחל כזיב בחודשים ינואר, פברואר ומרץ בהתאמה.



צפיפות האוכלוסייה בחתך (צמחים \ 100 מ')
שכיחות הצמחים הנגועים (%)

שכיחות הצמחים הנגועים (%)
שכיחות העלים הנגועים (%)

איור מספר 22. שכיחות מחלת האסקוקיטה באפונת בר מהמין *P. elatius* בנחלים כזיב ועמוד לאורך עונת הגידול 2007/08. העקומים בצד ימין מתארים את הקשר בין שכיחות העלים הנגועים לשכיחות הצמחים הנגועים בכל חתך. העקומים בצד שמאל מתארים את הקשר בין צפיפות האוכלוסייה לשכיחות הצמחים הנגועים בחתך.



איור מספר 23. שכיחות מחלת האסקוקיטה באפונת בר מהמין *P. elatius* בנחלים כזיב ועמוד לאורך עונת הגידול 2008/09. העקומים בצד ימין מתארים את הקשר בין שכיחות העלים הנגועים לשכיחות הצמחים הנגועים בכל חתך. העקומים בצד שמאל מתארים את הקשר בין צפיפות האוכלוסייה לשכיחות הצמחים הנגועים בחתך.

טבלה מספר 25. טבלת ניתוח שונות לערכי שכיחות המחלה באוכלוסיות אפונת הבר מהמין *P. elatius* בעונת 2007/08. בסקר נדגמו 8 אתרים בנחלים כזיב ועמוד, בחודשים ינואר עד מרץ.

מקור השונות	ד"ח	סר"ס	F	P(F)
נחל	1	1.02	5.93	*0.0151
חודש (נחל)	4	13.92	20.13	<0.0001
שארית	715	123.56		

* שכיחות המחלה בנחל עמוד גבוהה באופן מובהק מזו שבנחל כזיב.

טבלה מספר 26. טבלת ניתוח שונות לערכי שכיחות המחלה באוכלוסיות אפונת הבר מהמין *P. elatius* בעונת 2008/09. בסקר נדגמו 8 אתרים בנחלים כזיב ועמוד, בחודשים נובמבר עד אפריל.

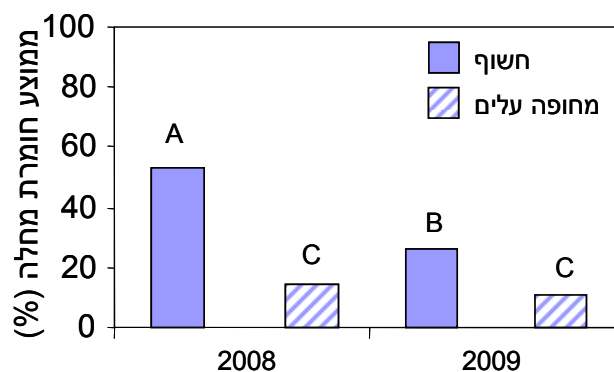
מקור השונות	ד"ח	סר"ס	F	P(F)
נחל	1	2.63	32.67	*<0.0001
חודש (נחל)	8	22.04	34.05	<0.0001
שארית	1182	95.47		

* שכיחות המחלה בנחל כזיב גבוהה באופן מובהק מזו שבנחל עמוד.

טבלה מספר 27. טבלת ניתוח שונות לערכי שכיחות המחלה באוכלוסיות אפונת הבר מהמין *P. elatius* בנחל כזיב, בעונות 2007/08 ו-2008/09. בנייתוח נבחנו חתכים בהם הקרקע הייתה מחופה בעלי שלכת לעומת חתכים בהם הקרקע הייתה חשופה.

מקור השונות	ד"ח	ר"מ	F	P(F)
חיפוי	1	17.69	5.11	0.26
שנה	1	5.47	1.58	0.42
חיפוי × שנה	1	3.45	26.11	*<0.0001
שארית	1300	0.13		

* על גבי צמחים בקרקע חשופה התפתחה מחלה חמורה יותר באופן מובהק בהשוואה לזו שהתפתחה בצמחים מחופים בעלי דולב.



איור מספר 24. ניתוח ערכי חומרת המחלה הממוצעת שנתקבלה כתוצאה מהשפעת גומלין בין חיפוי הקרקע לבין השנה הנבדקת. עמודות שלידן אותיות שונות, נבדלות זו מזו במובהק כנקבע על פי מבחן HSD ברמת מובהקות של $P < 0.05$.

5. דיון

במשך 10,000 שנה מתקיימות ברחבי המזרח הקרוב אוכלוסיות צמחי תרבות בסמוך לאוכלוסיות קרוביהם מהבר; ביניהם גם אפונה תרבותית ומספר מיני אפונת בר (Abbo et al., 2003). במהלך העשורים האחרונים נאספו נתונים רבים על האפידמיולוגיה (במחלות) של דגני הבר במזרח הקרוב בעיקר בחיטה, שעורה ושיבולת שועל (Dinoor, 1974; Eshed & Wahl, 1975; Dinoor et al., 1991). לעומת זאת, נעשתה עבודה מועטה הנוגעת לפתוגנים ולמחלות של קטניות הגרגרים של המזרח הקרוב, וזו עסקה בחימצה בלבד (Frenkel et al., 2007).

אסקוכיטה הינה מחלה חמורה בגידול האפונה ברחבי העולם (Bretag, 2004). כל זני האפונה המסחריים רגישים, ומגיפה קשה יכולה לגרום לאובדן יבולים משמעותי (Bretag et al., 1995a). מבין הפטריות הגורמות למחלה *M. pinodes* גורמת לנזק הרב ביותר ליבול (Tivoli et al., 1996). המטרה ארוכת הטווח של עבודה זו הייתה לאפיין את הדרישות האקולוגיות והאפידמיולוגיות של הפטרייה *M. pinodes*. במסגרת זו בדקתי מיהם הפתוגנים מטיפוס אסקוכיטה, המצויים על אפוני בר ותרבות, בחנתי את הדרישות האקולוגיות והפתוגניות של תבדידי *M. pinodes* שבודדו מאפונה תרבותית וממינים שונים של אפונת בר הגדלים באתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים, ותיארתי את התפתחות מחלת האסקוכיטה בבתי גידול טבעיים של אפונת בר. כל הניסויים המוצגים בעבודה זו מאופיינים בשונות גבוהה בתוך הטיפולים ובין טיפולים זהים, זאת בדומה למתואר על ידי Lichtenzweig וחבריה (2005) במערכת הפתוגן - פונדקאי *C. arietinum-D. rabiei* הדומה מאוד במאפייניה למערכת שנבחנה בעבודה זו. כיוון שכל הניסויים בוצעו בתנאים אחידים ומבוקרים, ניתן לשער שהשונות הינה מאפיין פנימי של המערכת בין *M. pinodes* ופונדקאיה והגורם לכך אינו ידוע. התנאים ה"אחידים" שסופקו לא היה במ די למזער את ה"רעש".

5.1 הפתוגנים מטיפוס אסקוכיטה, המצויים על אפונת הבר והאפונה התרבותית

באופן מסורתי, היה נהוג לקבוע את מין הפתוגנים הגורמים למחלת האסקוכיטה באפונה התרבותית על ידי מאפיינים מורפולוגיים, אולם בשיטה זו קיים קושי לקבוע זיהוי ודאי של המין (Faris-Mokaiesh et al., 1996). לאחרונה פותחו אמצעים לזיהוי על סמך השוואת רצפי גנים כגון *G3PD* ואזור ה-ITS של ה-rDNA (Fatehi et al., 2003; Peever et al., 2007). ממחקרים רבים בהם נבחנה תפוצת מיני הפתוגנים הגורמים למחלת האסקוכיטה באפונה על ידי זיהויים בשיטות השונות (Faris-Mokaiesh et al., 1995; Fatehi et al., 2003; Peever et al., 2007; Onfroy, 1999; Lubeck et al., 1998), עולה כי המין *M. pinodes* הוא הנפוץ ביותר בשדות האפונה התרבותית בכל רחבי העולם (Bretag et al., 2006). ככל הידוע, עד היום לא פורסם מידע על הפתוגנים מחוללי המחלה באוכלוסיות אפוני הבר.

זיהוי התבדידים שנדגמו מאוכלוסיות האפונה התרבותית ואפוני הבר *P. elatius* ו-*P. fulvum* הראה כי תפוצת מיני הפתוגנים בישראל דומה לזו המתוארת באוכלוסיות האפונה התרבותית ברחבי העולם, וכי באוכלוסיות האפונה התרבותית ואפונת הבר מתקיים מצב דומה. כ-18 תבדידים שנדגמו באוכלוסיות אפונת הבר והאפונה התרבותית ונבחנו בעבודה זו זוהו כשייכים למין *M. pinodes*, מלבד תבדיד אחד שזוהה כשייך לסוג אסקוכיטה אך מינו אינו ידוע (טבלאות 10-12). תבדידים אלו, שלאחר מכן נבחנו בניסויים השונים, נבחרו מתוך אוסף תבדידים רחב שכלל כ-40 תבדידים נוספים שעל פי מאפייניהם

המורפולוגיים נמצא כי כמעט כולם שייכים למין *M. pinodes* למעט מספר קטן של תבדידים מהמינים *P. Pinodella* ו-*A. pisi*.

אני משער כי מספר גורמים תורמים לכך שהמין *M. pinodes* הוא הנפוץ ביותר בשדות האפונה התרבותיים ברחבי העולם. סיבה אחת יכולה להיות התאמה טובה יותר של *M. pinodes* מזו של *P. Pinodella* ו-*A. pisi* לפונדקאים שהתפתחה במהלך הקו-אבולוציה. למין *M. pinodes* יתרון משמעותי על פני הפתוגנים הנוספים התוקפים אפונה כיוון שהוא המין היחיד בו נמצא שלב הרבייה המינית בתנאי הסביבה הטבעיים כחלק ממחזור החיים של הפתוגן (Bretag et al., 2006). בעזרת הפצת אסקוספורות הנישאות ברוח, בתחילת העונה ובמהלכה, הפטרייה נפוצה במרחב ומסוגלת להגיע לאזורי גידול נוספים בסביבת מקור ההפצה (Roger & Tivoli, 1996). לעומת זאת, במינים *P. Pinodella* ו-*A. pisi* מתקיים רק השלב האל-מיני שהפצתו במרחב מוגבלת בדרך כלל למספר מטרים בלבד (Bretag et al., 2006). רבייה מינית גם תורמת להגדלת השונות הגנטית וכתוצאה מכך גדלה השונות הפנוטיפית המאפשרת, ככל הנראה, הסתגלות טובה יותר לתנאי סביבה משתנים וללחצי סלקציה המופעלים על הפתוגן, גם על ידי הפונדקאים אותם הוא תוקף.

ייתכן ותפוצת הפתוגן תלויה גם במקור התבדידים (Dinoor, 1974). ניתן להסביר את התפוצה של *M. pinodes* באפוני הבר והתרבות בשני אופנים שונים. האחד, במידה והפתוגנים המחוללים את מחלת האסקוכיטה יובאו לארץ ואז התפשטו באוכלוסיות הבר, סביר להניח שהמין *M. pinodes*, שהוא המין הנפוץ ביותר בעולם מבין הפתוגנים הגורמים למחלה, יובא לארץ (למשל בזרעים נגועים) בתדירות רבה יותר. לאחר ההתבססות בשדות התרבותיים ייתכן והפתוגן נפוץ לאוכלוסיות אפוני הבר, למשל על ידי הפצת נבגים מיניים ברוח. במקרה הזה כיוון ההפצה היה מאוכלוסיות התרבות לאוכלוסיות הבר. לעומת זאת, במידה והפתוגנים התקיימו באוכלוסיות הבר בארץ מלכתחילה, ייתכן וכיוון ההפצה היה מאוכלוסיות הבר אל האוכלוסיות בשדות התרבותיים. כיוון שלמין *M. pinodes* ככל הנראה התאמה טובה יותר לפונדקאים שלו הוא נהפך לפתוגן העיקרי התוקף את אפוני הבר. באופן זה הפתוגן נפוץ אל שדות האפונה התרבותית על ידי הפצה ברוח מאוכלוסיות אפוני הבר, וכיוון שקיימת קירבה גנטית בין אפוני הבר והאפונה התרבותית ייתכן וההתאמה לאפוני הבר אפשרה לפתוגן לתקוף גם את מין האפונה התרבותית.

5.2 ההבדלים בדרישות האקולוגיות של תבדידי אסקוכיטה מהמין *M. pinodes* שנדגמו

מאפונה תרבותית ומאפונת בר

הסתגלות אבולוציונית של הפתוגן לפונדקאי הינה תנאי מוקדם לקיומו של הפתוגן. באותו האופן הסתגלות לתנאי הסביבה דומה בחשיבותה, ולכן יש לצפות שהפתוגן יגיע לכשירות מיטבית בתנאי הסביבה להם הוא פיתח התאמה במהלך האבולוציה (Kawecki & Ebert, 2004). המערכת החקלאית שונה מהמערכת הטבעית במספר מאפיינים כגון מגוון מינים, אחידות גנטית תוך מינית, עומד הצמחים, אור, תנאי המיקרו-אקלים בסביבת הצמח ועוד. כתוצאה מכך בשתי המערכות מופעלים לחצי סלקציה שונים על הפתוגנים התוקפים את האוכלוסיות. לחצי סלקציה באזורי המחיה נחשבים לגורם העיקרי להסתגלות לתנאים אקולוגיים (Hutchinson, 1959).

אחד הגורמים החשובים המשפיעים על התפתחות מחלות בצמחים הינם תנאי מאקרו-אקלים באזור הגידול (Dinoor & Eshed, 1987). הטמפרטורה משפיעה על יכולת הפתוגן לתקוף את הפונדקאי

ולגרום למחלה. כמו כן, הטמפרטורה משפיעה על משך התקופה הלטנטית וחומרת המחלה המתפתחת (Burdon, 1987; Thomas & Blanford, 2003). ההתאמה של תבדידי *M. pinodes* ממקור בר ותרבות לטמפרטורה הייתה דומה. כאשר נבדק צימוח תפטיר של תבדידים משתי אוכלוסיות אפונת בר ואפונה תרבותית סמוכות מעמק בית-שאן (איור 1, טבלה 13) וגם כאשר נבחנו תבדידי בר ותרבות מאזורים גיאוגרפים נפרדים, נמצא כי טמפרטורות הצימוח התחתונות, המיטביות והעליונות דומות (איור 2, טבלה 14).

אומנם נראה כי ההתאמה לטמפרטורה דומה, וכי הפונדקאי (בר או תרבות) ממנו נדגם התבדיד אינו מהווה גורם המשפיע על תכונותיו, אולם נצפה הבדל בקצב הצימוח בין תבדידים שונים (איור 1). המשמעות הביולוגית של הבדל בקצב הצימוח בתבדידי *M. pinodes* אינה ידועה. במחקר שבחן תבדידים מהמין *Alternaria brassicicola* גם נמצאה שונות גבוהה בקצב הגידול של תבדידים שנדגמו מאוכלוסיות הבר של הפונדקאי *Cakile maritima* (Thrall et al., 2005). במקרה הנ"ל נמצא מתאם חיובי בין קצב הגדילה של התפטיר וקצב התפתחות המגיפה בשדה והועלתה השערה כי ייתכן וקצב גידול גבוה מהווה יתרון וסביר שתבדיד הגדל מהר יותר יהיה דומיננטי בתוך אוכלוסיית הפתוגן. במחקר לא נמצא קשר ישיר בין קצב הגדילה ואגרסיביות התבדיד או גודל הכתם שהוא יוצר בצמח (Thrall et al., 2005).

התאמה דומה לטמפרטורה ממוצעת של 23 מ"צ בקירוב נצפתה גם בבחינת נביטת הנבגים האל-מיניים (איור 3, טבלה 15). נתון זה מתאים לממצאיו של Sattar (1934) שקבע כי הטמפרטורה האופטימאלית לנביטה של נבגים, מתבדידים מהמין *M. pinodes* שבודדו מצמחי אפונה תרבותיים, היא 20-25 מ"צ.

בחינת משך הרטיבות הדרוש להתפתחות מחלה בצמחי בוחן ממין הבר ומהמין התרבותי, הראתה כי על-מנת שתתפתח מחלה משמעותית דרוש משך רטיבות של יותר מ-10 שעות (איור 4). בשתי החזרות של הניסוי נמצא כי מין הפונדקאי ממנו נדגמו התבדידים (בר או תרבות) לא השפיע באופן משמעותי על הדרישה למשך הרטיבות הדרוש להדבקה (טבלה 16). האפקט המובהק להשפעת הגומלין בין התבדידים ומשכי הרטיבות מעיד על אינטראקציה גבוהה עם התנאי הסביבה (טבלה 16). אינטראקציה דומה נצפתה בתבדידים מהמין *Erysiphe graminis* שנבחנו כלפי מספר מיני שעורת בר בתנאי תאורה שונים (Dinoor & Eshed, 1987). בדומה לממצאים בניסוי הראשון בסדרת הניסויים שבחנה את השפעת משך הרטיבות על התפתחות מחלת האסקוכיטה בצמחי בוחן, גם כאשר נבחנה השפעת משך הרטיבות על שיעור נביטת הנבגים, נמצא כי אין הבדל משמעותי בין התבדידים (איור 5).

לסיכום, בבחינת דרישות הטמפרטורה והרטיבות לנביטה, צימוח ומדדי מחלה נמצאו הבדלים בין תבדידים אך לא בין מקורות - בר מול תרבות. כמו כן, נמצאה שונות רחבה בפתוגן. בניסויים אלו נמצא כי זני האפונה התרבותיים ומיני אפונת הבר אינם עמידים למחלה, אך במיני אפונת הבר נראה כי קיימים מנגנוני התחמקות מהמחלה. באופן בר, על ידי טיפוס על שיחים לגובה (באופן קיפח) ונשירת עלים נגועים, מורחקים מקורות המידבק מהעלים הבריאים המתפתחים.

ידוע כי במהלך הקו-אבולוציה בין הפונדקאים לפתוגנים שלהם מתקיים מעין "מרוץ חימוש". הפתוגנים, לעומת הפונדקאים, בעלי זמן דור קצר ואוכלוסיה גדולה ולכן הם מתפתחים מהר יותר מהפונדקאים ומסוגלים להתגבר במהירות, למשל, על עמידות המופיעה אצל הפונדקאי. אסימטריה זו יכולה לגרום להופעת הסתגלות אבולוציונית מקומית של הפתוגן, שמתבטאת בכשירות רבה יותר למול אוכלוסיות סימפטיות של הפונדקאי (Kaltz & Shykoff, 1998). מחקרים שבחנו התפתחות מגיפות בגידולים חקלאיים הראו, כי פתוגנים של גידולים יכולים להסתגל במהירות לפונדקאים שלהם והם

מסוגלים להתגבר על גנים לעמידות המופעלים על ידי מערכות ההגנה של הצמחים. תהליך זה, ככל הנראה, מתרחש גם במערכת הטבעית בהם הפונדקאים והפתוגנים מראים שונות גבוהה בתוך האוכלוסייה (Burdon & Thrall, 2000).

אחת התוצאות החשובות של תהליכי הקו-אבולוציה היא הופעת הסתגלות אבולוציונית מקומית. כתוצאה מכך פתוגנים יראו יכולות גבוהות יותר כלפי פונדקאים מקומיים מאשר כלפי פונדקאים מאוכלוסיות רחוקות (Kaltz & Shykoff, 1998). הסתגלות מקומית מושפעת בעיקר מזרימת גנים (Gandon et al., 1996), גודל האוכלוסייה, קצב היווצרות מוטציות וזמן היווצרות דור חדש (Gandon & Michalakis, 2002). בכל הפרמטרים הנזכרים לעיל, לפתוגנים יש יתרון על פני הפונדקאים שלהם, ולכן הם נחשבים לבעלי יתרון אבולוציוני בתהליך ההסתגלות לשינויים המתרחשים בפונדקאים ובתנאי הסביבה (Hamilton et al., 1990). במערכת פתוגן-פונדקאים שנבחנה בעבודתי נראה כי ל- *M. pinodes* מספר יתרונות בקו-אבולוציה עם מיני האפונה השונים, כגון רבייה מינית, הפצת נבגים מיניים למרחק רב ומספר גדול של יחידות תפוצה. זאת לעומת מיני האפונה המראים יכולת הפצה של הזרעים למרחק מספר מטרים בלבד, רבייה עצמית ומספר קטן יחסית של פרטים בכל תת אוכלוסייה.

במחקר קודם הועלתה ההשערה כי הסתגלות מקומית, כגון הסתגלות לתנאי הסביבה, קשורה בירידה בזרימת הגנים בין אזורים גיאוגרפיים בהם שוררים תנאי אקלים שונים (Capelle & Neema, 2005). דוגמה המחזקת השערה זו תוארה במחקר שבדק את ההסתגלות של הפטרייה *Colletotrichum lindemuthianum* באוכלוסיות הבר של שעועית מצויה. במחקר נמצאה שונות גבוהה בין האוכלוסיות והוגדרו מספר תתי קבוצות בתוך מין הפתוגן, גם כאשר נבחנו תתי אוכלוסיות של הפתוגן בתוך קבוצות צמחים שמנו מעט פרטים. במקרה הנ"ל, בשונה מהמערכת פתוגן-פונדקאי המתוארת בעבודה זו, זרימת הגנים בתוך אוכלוסיית הפטרייה *C. lindemuthianum* מועטה כיוון שגופי הפרי האל-מיניים נפוצים למרחק קצר ובהעדר שלב מיני לא מתקיימים שחלופים בין התבדידים. סביר להניח כי כפי שמוזכר לעיל, זרימת הגנים הגבוהה שככול הנראה מתקיימת בין אוכלוסיות *M. pinodes* ממסכת על התפתחות הסתגלות אבולוציונית מקומית.

במערכת חימצת התרבות וקרוביה מהבר תוארה תופעה שונה על ידי Frenkel וחבריו (2008). שם נמצאו הבדלים בדרישות האקולוגיות של תבדידים שבודדו מחימצת הבר *C. judaicum* ותבדידים שבודדו מהחימצת התרבותית *C. arietinum* והוצעו לכך שני הסברים אפשריים. האחד קיום קבוצות Pathotypes שונות בתוך המין *D. rabiei* והשני היווצרותו של התאם בין הפונדקאי לפתוגן שהתפתח בעקבות הסטת עונת גידול החימצה, מגידול חורפי לגידול אביבי, ועקב כך חשיפת הפתוגן במערכת החקלאית לתנאי סביבה שונים. כיוון שאוכלוסיות אפונת הבר נפוצות בפיזור כתמי אקראי הדומה בתפוצתו לאוכלוסיות חימצת הבר וחלק מהאוכלוסיות צמודות לאוכלוסיות צמחי התרבות, סביר היה להניח כי בשתי המערכות קיימים יחסי גומלין פתוגן-פונדקאים דומים. לכן הנחת העבודה העיקרית של מחקר זה הייתה כי בדומה לממצאים בחימצת הבר, גם באפונה, עקב תהליכי קו-אבולוציה, התפתח התאם בין הפתוגנים הגורמים למחלת האסקוכיטה ובין מיני אפונת הבר והתרבות המהווים להם פונדקאים. וכי קיימים הבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנה בין תבדידים מהתרבות לבין תבדידים ממיני אפונת בר.

מתוצאות הניסויים שבחנו תבדידים ממקור בר או תרבות ניתן להסיק, כי בניגוד למצופה, לא התפתח התאם שונה בין *M. pinodes* לאפונת הבר *P. fulvum* ולאפונה התרבותית *P. sativum*. כיוון שמחזור הגידול באוכלוסיות הבר ובשדות התרבותיים דומה, ייתכן והתפתחה בשתי המערכות התאמה דומה לתנאי הסביבה. כמו כן, ייתכן וקיימת בין הפונדקאים זרימת גנים, למשל על ידי צמחי בר

המתקיימים בשולי שדות ופליטי תרבות בין אוכלוסיות צמחי הבר (Zohary & Hopf, 1973; Abbo et al., 2008).

בכל הניסויים נצפו הבדלים משמעותיים בין החזרות השונות שבוצעו באותם התנאים. תופעה דומה תוארה בעבר (Wroth & Khan, 1999) וייתכן שהגורמים לכך הם שונות גנטית בין צמחי הבוחן ו/או הבדלים בתנאי המיקרו-אקלים בסביבת הצמחים (Ali-Khan et al., 1973). בדומה ל-Ali וחובריו (1978), שמצאו הבדלים בתגובת זנים שונים של אפונה תרבותית לאותם התבדילים של מיני האסקוקיטה, בעבודה זו נמצאו הבדלים בתגובת מינים שונים של אפונה תרבותית ואפונת בר וסביר להניח כי במינים השונים קיימים גן או גנים שונים לעמידות.

5.3 השוואת הדרישות האקולוגיות של תבדילים שבודדו מהמין *P. fulvum* מאתרים המאופיינים בתנאי אקלים שונים

המין *P. fulvum* נפוץ באזורי אקלים שונים בישראל. אוכלוסיות הגדלות בגליל המערבי, באזור אקלים ים-תיכוני, חשופות בחורף לטמפרטורות יחסית נוחות לעומת אוכלוסיות בגליל המזרחי ובעמק בית שאן שהינם על גבול האזור האירנו-טורני המאופיין באקלים צחיח למחצה וטמפרטורות קיצוניות יותר (טבלה 28). כיוון שידוע כי פתוגנים מתאימים את עצמם לא רק לפונדקיהם אלא גם לתנאים האביוטיים באזורי הגידול (Kawecki & Ebert, 2004), וטמפרטורה ולחות לאחר האילוח הינם גורמי מפתח סביבתיים באפידמיולוגיה של אסקוקיטה באפונה (Roger et al., 1999a), ראיתי לנכון להשוות את הדרישות האקולוגיות של תבדילים שנדגמו בגליל המזרחי לאלו שנדגמו בגליל המערבי.

טבלה מס' 28. טמפרטורות מינימום ומכסימום יומיות ממוצעות* באזור נחל כזיב ונחל עמוד על פי נתוני השירות המטאורולוגי הישראלי (www.ims.gov.il/ims/climate).

אתר/חודש	נובמבר	דצמבר	ינואר	פברואר	מרץ
נ. עמוד	15.1-25.6	11.3-20.1	9.5-18.1	9.2-19.2	10.8-22.5
נ. כזיב	13.8-22	10.1-17.5	8.3-15.3	8-15.7	9.7-18

* הממוצעים חושבו על פי מדידות שנעשו בשנים 1981-2000.

השוואת הדרישות האקולוגיות של תבדילי *M. pinodes* שבודדו מהמין *P. fulvum* מעמק בית-שאן, נחל כזיב ונחל עמוד הראתה כי אין הבדלים משמעותיים בין התבדילים. כאשר נבחן צימוח תפטר בטמפרטורות שונות נמצאה התאמה דומה, טמפרטורת הצימוח המיטבית הייתה 23 מ"צ בקירוב וטמפרטורות הגדילה התחתונות והעליונות היו כ- 6.5 ו- 34 מ"צ בהתאמה (איור 6, טבלה 17). התאמה דומה לטמפרטורה, בנוסף להבדלים מועטים בין התבדילים, נמצאה גם כאשר נבחנה נביטת נבגים אל-מיניים מהתבדילים הנ"ל בטווח טמפרטורות רחב (איור 7, טבלה 18).

בחינת סטטיסטית של הנתונים מראה כי יש הבדל מובהק בתגובת התבדילים לרטיבות ומכאן נובע כי לאחר 24 שעות רטיבות מתפתחת מחלה חמורה יותר מאשר לאחר 10 שעות רטיבות. מבנה הניסוי לא אפשר לבחון את השפעתו של גורם הפונדקאי ממנו נדגמו התבדילים במודל הסטטיסטי. אולם, כיוון שכל תבדיל שנבחן הינו מאזור שונה ובשני הניסויים לא נמצאו הבדלים מובהקים בין התבדילים, ניתן להסיק שהאזור האקלימי ממנו בודדו התבדילים לא מהווה גורם חשוב התורם לתכונותיהם (טבלה 19).

גם כאשר נבחנה השפעת משך הרטיבות על שיעור נביטת הנבגים, לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין התבדילים שמקורם באזורים השונים, בשתי הטמפרטורות שנבדקו (איור 9).

בחינת אלימות התבדילים שנדגמו מאפונת בר באזורי אקלים שונים כלפי צמחי בוחן תרבותיים (מזן קרינה) והשוואת רמת האלימות שלהם לתבדילים שבודדו מאפונה תרבותית, הראתה כי לא היה הבדל משמעותי בין התבדילים בתכונה זו. גם בניסוי הזה, בדומה לקודמיו, נצפתה שונות רבה בתגובת הצמחים להדבקה במחלה (איורים 10 ו-11). מחקרים קודמים שבחנו מערכות פתוגן-פונדקאי נוספות מצאו שונות גבוהה בתכונות הוירולנטיות והאלימות בתוך ובין אוכלוסיות הפתוגנים (Gibbs & Brasier, 1973; Brasier & Webber, 1987; Swart et al., 1991; Thrall et al., 2001). המחלה על עלים מנותקים שנלקחו ממפרקים שונים במעלה הצמח (בגילאים שונים), נמצא כי קיימים הבדלים ברגישות העלים להדבקה במחלה והעלה התחתון ביותר רגיש יותר למחלה מאשר העלים שמעליו (איורים 12 ו-13). ואולם על פי הניתוח הסטטיסטי של הנתונים לא ניתן לקבוע בוודאות כי קיימים הבדלים בין התבדילים (טבלאות 20 ו-21). תוצאות מבחני האלימות תומכות בהשערה כי לאזור האקלימי ממנו בודדו התבדילים לא הייתה השפעה משמעותית על תכונות האלימות.

תוצאות סדרת הניסויים בהם נבחנו הדרישות האקולוגיות והפתוגנזה של תבדילים שבודדו מ- *P. fulvum* מאתרים בגליל המערבי, בגליל המזרחי ובעמק בית שאן (כולל תבדיל שנדגם מאפונה תרבותית) המאופיינים בתנאי אקלים שונים, מחזקות את המסקנה שעלתה מהניסויים הקודמים בעבודה זו, כי מקור התבדילים לא השפיע בצורה מובהקת על תכונותיהם. מסקנה דומה לגבי השפעת מקורו הגיאוגרפי של הפתוגן נתקבלה גם על ידי Dinoor ו-Eshed (1987) שבחנו תבדילים מהמין *Erysiphe graminis* שנדגמו מאוכלוסיות שעורת הבר *Hordeum spontaneum* במספר אתרים באזורי אקלים שונים בישראל (ממישור החוף ועד להרי ירושלים). בדומה לממצאים בעבודה זו גם Dinoor ו-Eshed מצאו הבדלים ברורים בין תבדילים שונים, לעיתים מאותו מקור גיאוגרפי.

ממצאי הניסויים בחלק זה אינם תואמים לתיאוריה שהועלתה על ידי Schwarzbach מצוטט על ידי Dinoor & Eshed (1987), שמצאו תבדילי *E. graminis* בעלי אגרסיביות רבה יותר, כלפי שעורת הבר, באזורים המאופיינים בתנאים יבשים יותר בישראל. Schwarzbach סבר כי הדבר נובע מתנאי האקלים "העוינים" שגורמים לתבדילי הקמחון להיות אלימים יותר על מנת לשרוד. בהתאמה לתיאוריה זו Dinoor ו-Eshed (1987) דיווחו כי מצאו בתבדילי קימחון שנדגמו באזור ממזרח לירושלים יותר גנים לויירולנטיות מאשר בתבדילים שנדגמו באזור השפלה ומישור החוף.

במרבית המקרים בעבודה זו צמחי אפונת הבר הראו עמידות גבוהה למחלה בהשוואה לצמחי הבוחן מהזן התרבותי קרינה. כאשר משווים את התפתחות המחלה לאחר שבועיים, ברמת הצמח השלם, נמצא כי חומרת המחלה הסופית שהתפתחה בצמחי הבוחן ממין הבר *P. fulvum* הייתה בין 25%-30 פגיעה (איור 8) לעומת 60%-100 פגיעה בצמחי האפונה התרבותית (איור 10 ב', ד'). מכאן ניתן להסיק כי מין הבר *P. fulvum* עמיד יותר לפתוגן מאשר המין התרבותי *P. sativum* ואף ייתכן כי במיני האפונה השונים באים לידי ביטוי מנגנוני הגנה שונים בפני הדבקה באסקוכיטה, כפי שהוצע על ידי Ali וחבריו (1978), שמצאו הבדלים בין זני אפונה תרבותיים.

5.4 ההבדלים בדרישות האקולוגיות ובפתוגנזה בין תבדידי אסקוכיטה מהמין *M.*

pinodes, שבודדו ממיני אפונה שונים

כפי שנוכר לעיל, אחת התוצאות החשובות של קו-אבולוציה היא הופעת הסתגלות אבולוציונית מקומית שכתוצאה ממנה פתוגנים עשויים להראות התאמה טובה יותר כלפי פונדקאים מקומיים מאשר כלפי פונדקאים מאוכלוסיות רחוקות (Kaltz & Shykoff, 1998). כיוון שמערכות טבעיות מאופיינות בהטרוגניות רבה בנישות הגידול לעומת המערכות החקלאיות (Harlan, 1976) גם באוכלוסיות הגדלות בתפוצה סימפטריית נצפה למצוא התאמה שונה בין הפתוגן לפונדקאים המאכלסים נישות אקולוגיות שונות.

כאשר נבחנה השפעת הטמפרטורה על צימוח התפטיר של תבדידים שנדגמו מאוכלוסיות אפונת בר ממינים שונים, נצפתה תגובה דומה לטמפרטורה (איור 14, טבלה 22). בניסויים שבחנו את רמת האלימות של התבדידים כלפי צמחי בוחן ממיני אפונה שונים, אומנם נמצאו הבדלים מובהקים בין תבדידים שנדגמו משני מיני אפונת הבר השונים (טבלה 23-24) אך למין הפונדקאי ממנו נדגמו לא הייתה השפעה מובהקת על תכונת האלימות של התבדידים (טבלה 24).

בחינה של תגובת הפונדקאים השונים לאילוח באותם התבדידים מראה כי בחלק מהמקרים נצפתה רגישות דומה של שלושת הפונדקאים לאותו התבדידים ובשאר המקרים הפונדקאים מראים רגישות שונה לאותו התבדיד. תגובה דומה של שלושת מיני הבוחן לאילוח באותו התבדיד מרמזת כי ההבדלים ברמת האלימות בין התבדידים נשמרים גם כאשר האלימות נבחנת כלפי פונדקאים שונים. תוצאה זו מרמזת על כך שהגנוטיפ של התבדידים משפיע על ביטוי התכונה יותר מהגנוטיפ של הפונדקאים ומהאינטראקציה עם הסביבה. רגישות שונה של פונדקאים לאילוח באותו התבדיד נצפתה גם כאשר תבדידי *E. graminis* שנדגמו מאוכלוסיות שעורת בר באזורי אקלים שונים, נבחנו כלפי פונדקאים מאזורים שונים. כמו כן, בדומה לניסוי הנ"ל, נצפתה שונות רבה בתגובת כל פונדקאי לפתוגן (Dinoor & Eshed, 1987).

ייתכן שההבדלים המובהקים בין תבדידי *M. pinodes* מעידים שבתוך אוכלוסיית הפתוגן קיימות תת אוכלוסיות שונות או שמדובר באוכלוסיה אחת בעלת שונות גבוהה בתכונה האלימות (טבלה 23). הבדלים משמעותיים באגרסיביות נמצאו גם בין תבדידי *Didymella rabiei* שמקורם בחימצת הבר (Frenkel et al., 2008), תבדידי *Erysiphe graminis* שבודדו משעורת בר (Dinoor & Eshed, 1987) ותבדידי *Stagonospora nodorum* שבודדו מחיטת הבר וקרוביה (Krupinsky, 1997). ממצאים אלו מחזקים את ההשערה כי הכוחות המעצבים את השונות בתוך ובין אוכלוסיות הפתוגן הינם מורכבים, בייחוד במצבים בהם מתקיימים תנאי סביבה שונים בסביבת אוכלוסיות הפונדקאים (Burdon & Elmqvist, 1996). ייתכן שאחת הסיבות לשונות הרבה בין תבדידי הבר היא ההטרוגניות הרבה הקיימת בנישות הגידול במערכת הטבעית, לעומת המערכת החקלאית, אם כי הדבר לא נבחן באופן ישיר. לסיכום, לא נמצאה השפעה מובהקת של מין הפונדקאי על הדרישות האקולוגיות והפתוגנזה של תבדידי *M. pinodes* שבודדו ממיני האפונה השונים, הגדלים בתפוצה סימפטריית.

בדומה לגנוטיפים פרימיטיביים של הזן התרבותי (Wroth & Khan, 1999) גם במיני אפוני הבר *P. elatius* ו-*P. fulvum* נראה כי התחמקות מהמחלה על ידי נשירת העלים הנגועים היא אחת הדרכים בעזרתן הצמחים מפחיתים את אפקט המחלה (תמונה 1). נמצא כי האיברים הרגישים ביותר למחלה הם העלים התחתונים (הזקנים ביותר בצמח) כאשר גם במקרה זה מין הפונדקאי ממנו נדגם התבדיד לא

השפיע על חומרת המחלה המתפתחת (טבלה 24). כאשר בוחנים את תגובת הצמחים והעלים להדבקה במחלה, ניתן ללמוד כי הזן התרבותי רגיש יותר ממיני הבר שנבחנו למרבית התבדידים (איורים 16-17). מתוצאות סדרת הניסויים שעסקה בתבדידים משני מיני אפונה הגדלים בתפוצה סימפטריה, ניתן להסיק כי הפתוגן *M. pinodes* לא פיתח התאמה ספציפית נפרדת ל- *P. elatius* ו- *P. fulvum*. עדויות להתפתחות התאמה לפונדקאי נמצאו בין *Microbotryum violaceum* ופונדקאיו (Bucheli, et al., 2000). אך גם במקרה הנ"ל כאשר נבחנה התאמתו לשני פונדקאים הגדלים בתפוצה סימפטריה לא נמצאו הבדלים גנטיים משמעותיים בין תבדידי הפטרייה (van Putten et al., 2005). לעומת זאת, נמצאו עדויות לכך שהפתוגן *Melampsora lini* הסתגל לתת אוכלוסיות מקומיות של הפונדקאי *Linum marginale* ובדומה ליחסי הפתוגן *M. pinodes* ופונדקאיו גם לפתוגן *M. lini* יכולת הפצה מרחבית רחבה יותר ביחס לפונדקאים שלו (Thrall et al., 2001).

ביחסי הגומלין בין הפתוגן *M. pinodes* ופונדקאיו מאפונת הבר, במערכת הטבעית, לא נראה יתרון לתבדידים אלימים כיוון שהתבדידים האלימים גורמים לנשירת העלים עליהם הם התפתחו וכתוצאה מכך מורחק גורם המידבק מהצמח ופוחתים הסיכויים להדבקה נוספת של אזורים בריאים בצמח. במערכת החקלאית נראה כי יש יתרון לתבדידים אלימים, כיוון שבמערכת זו אלימות גבוהה תגרום להתפתחות כמות מידבק משני גדולה יותר שתאפשר הדבקת אזורים נוספים בצמח הנגוע ובצמחים סמוכים לו. לכן, היינו מצפים למצוא כי התבדידים שנדגמו מאוכלוסיות האפונה התרבותית יהיו אגרסיביים יותר מתבדידים שנדגמו מאוכלוסיות הבר. אולם, התבדידים שנבחנו הראו טווח רחב של אגרסיביות כלפי מיני הבוחן ולא הייתה לפונדקאי ממנו נדגמו השפעה על רמת האלימות (איורים 15-16). יתכן ומעבר הדדי ותדיר של תבדידים בין אוכלוסיות הפונדקאים תרם להגדלת השונות בין התבדידים ולמיסוך הבדלים אלו, במידה ונוצרו. בניגוד לממצאים המתוארים בנוגע לתבדידי *M. pinodes* בעבודה זו, Krupinsky (1997) מצא כי תבדידים שמקורם באוכלוסיות הבר היו פחות אגרסיביים מתבדידים שמקורם מהתרבות. ייתכן ולאוכלוסיית *M. pinodes* במערכת הטבעית מאפיינים של אוכלוסיות על (Metapopulations) המורכבות מתת אוכלוסיות קטנות המאכלסות צמחי פונדקאים הנפוצים בפיזור כתמי, בבתי גידול מתאימים. לכל תת אוכלוסיה אפשר שתהיה דינאמיקה משלה, אך ככל הנראה יש קשרי הגירה בין האוכלוסיות ומתקיימת זרימת גנים ביניהן. אוכלוסיות הפתוגן בכל כתם מורכבות מגנוטיפים שעברו תהליך קו-אבולוציוני עם אוכלוסיית הפונדקאי המקומית ביחד עם גנוטיפים שהגיעו לאחרונה לאחר תהליך קו-אבולוציוני עם אוכלוסיות פונדקאים אחרות (Dybdahl & Lively, 1996).

5.5 התפתחות מחלת האסקוקיטה בזמן ובמרחב בבתי גידול טבעיים

בסקר שבחן את תפוצת צמחי אפונת הבר מהמין *P. elatius* בערוצי הנחלים כזיב ועמוד המאופיינים בתנאי אקלים שונים (מוזכר לעיל) נמצא כי פיזור האוכלוסיות במרחב שנסקר לא היה אחיד וכלל כתמים בהם היו מספר שונה של צמחים (איור 18), זאת בדומה לתפוצת קטניות נוספות כגון חימצה, עדשים ועוד (Smartt, 1990). במקטעי הנחל שנסקרו במהלך העונה (חתכים) נמצא כי מספר רב של אפוני בר נבטו והציצו לאחר הגשמים הראשונים בתחילת החורף. במקביל הופיעו תסמיני המחלה הראשונים, ככל הנראה לאחר הפצת מדבק ראשוני שמקורו היה בשאריות צמחים מהעונה הקודמת. כאשר התנאים היו מתאימים, המחלה הגיעה לכיסוי מלא של הצמחים בחתך או לחילופין לנגע בצמחים בודדים (איורים 19 ו-21). הפצת המחלה הושפעה גם מכיסוי ותוואי הקרקע בחתך (טבלה 27, איור 24). מהשפעת כיסוי הקרקע

בעלים על התפתחות המחלה ניתן לשער כי ככל הנראה המחלה התפתחה מנבגים אל-מיניים שהופצו לטווח קצר, שהדביקו בעיקר את החלק התחתון של הצמחים.

תצפיות הראו, כי במהלך העונה התקיימו מעט אירועי הדבקה משניים ונראה כי לא התקיימה הפצת אסקוספורות, זאת כיוון שלא נצפתה הדבקה על העלים העליונים של הצמחים. במידה ולא נוצרו גופי פרי מיניים בתחילת העונה ובמהלכה, תצפית זו לא תומכת בהשערה שהמחלה המתפתחת באוכלוסיות הבר מסכנת את השדות התרבותיים הסמוכים. יתכן כי בשתי שנות המחקר לא נוצרו התנאים המתאימים להתפתחות פסאודוטציות ובהינתן תנאים מיטביים יתפתח המידבק הנ"ל.

תנאי הסביבה הינם גורמי מפתח באפידמיולוגיה של אסקוכיטה באפונה (Roger et al., 1999a). אזור נחל עמוד מתאפיין בטמפרטורות גבוהות יותר (טבלה 28) וכמות משקעים קטנה יותר (390 מ"מ לעומת 800 מ"מ) בהשוואה לאזור נחל כזיב (www.ims.gov.il/ims/climate). ההבדלים בתנאי האקלים, השפיעו כנראה על התפתחות המחלה בין שני האתרים (טבלאות 25 ו-26).

נמצא כי במהלך העונה כמות הצמחים במערכת הטבעית ירדה באופן דרסטי (איור 20), ככל הנראה בגלל מספר גורמים כגון הצללה של צמחים רחבי עלים בתחילת העונה, רעיה על ידי בעלי חיים וסחיפה על ידי מים שזרמו בערוצי הנחלים. הצמחים ששרדו נמצאו בדרך כלל מוגנים בתוך שיחים, אשר ייתכן ומהווים להם גם מעין מגן מפני נבגי המחלה הנישאים באוויר או כאלו שהופצו בנתזי המים. המתאם שנראה כי מתקיים בין שכיחות הצמחים הנגועים באתרים לבין שכיחות העלים הנגועים ייתכן ומעיד על מעבר מדבק משני לאזורים בריאים בצמחים הנגועים (למשל על ידי טיפות גשם הניתזות מהקרע). חוסר המתאם שנראה בין צפיפות הצמחים באתרים לבין שכיחות הצמחים הנגועים ייתכן ומעיד על כך שלא התקיים מעבר משמעותי של מדבק בין הצמחים באותו האתר, ייתכן ובגלל המרחק בין הצמחים (איורים 22 ו-23).

עד סיום העונה מרבית הצמחים ששרדו פיתחו מספר רב של עלים (איור 20) והמחלה שהתפתחה בעלים התחתונים (שחלקם נשרו) ככל הנראה לא סיכנה את התפתחותם ואת השלמת יצירת התרמילים והפצת הגרגרים. בשנים בהן שוררים תנאי סביבה מתאימים, המחלה נפוצה גם לתרמילים ולגרגרים והם יהוו מקור מידבק בעונה הבאה (שטיינברג, תצפית לא פורסמה, 2008).

5.6 דיון מסכם

הנתונים שנאספו בעבודה זו מראים, כי בניגוד להנחת העבודה הראשונית, אוכלוסיות הפתוגן התוקפות אפוני בר ואפונה תרבותית בישראל לא שונות האחת מהשנייה באופן מהותי. בתוך כל אוכלוסיה, ככל הנראה, קיימים מספר גנוטיפים שונים שאינם מושפעים מהפונדקאי עליו הם התפתחו (בר או תרבות) ומהאזור האקלימי בו הם נדגמו.

בדומה לממצא בחימצת הבר (Frenkel et al., 2007), גם אפונת הבר הראתה רגישות דומה למספר תבדידים מהתרבות ומהבר, כיוון שכך לא ניתן לשלול כי אפונת הבר משמשת כפונדקאית לתבדידים מהתרבות ולהפך. ייתכן וקטניות נוספות, הגדלות בסמיכות, גם הן מהוות פונדקאים לתבדידי *M. pinodes* בדומה לחימצת הבר *C. judaicum* שככול הנראה מהווה פונדקאי ל-*P. pinodella* (Frenkel et al., 2007).

לפטרייה *Mycosphaerella graminicola* מאפיינים דומים ל-*M. pinodes* (שלב מיני, הפצת נבגים ברוח ושלב אל-מיני המופץ בנתזי המים). בחינה של אוכלוסיות *M. graminicola* שנדגמו מאוכלוסיות הבר ותרבות במזרח התיכון הראתה שהן שונות אחת מהשנייה וכי מתקיימת זרימת גנים בין

שתי האוכלוסיות. מיפוי האוכלוסיות הראה כי אוכלוסיות הפתוגן שנדגמו מחיטת התרבות, התפצלו ככל הנראה מאוכלוסיות הפתוגן הקדומות בערך לפני 10,000 שנים כאשר החקלאות הייתה בראשיתה. במשך הזמן גדלו אוכלוסיות הפתוגן שהתפתחו באוכלוסיות החיטה התרבותית וקטנה אוכלוסיית הפתוגן במערכת הטבעית. זאת בהתאם למגמת הפצת החיטה התרבותית בעולם והקטנת שטחי הבר לעומת הגדלת שטחי הגידול התרבותי. השוואת רצפי גנים בין האוכלוסיות הראתה כי כיום לא מתקיימת זרימת גנים בין האוכלוסיות, אך ככל הנראה מספר אירועים כאלו התרחשו בעבר (Stukenbrock et al., 2007). יש לציין כי המחקר הנ"ל בחן מספר מועט של תבדידים ממספר אתרים בודדים ברחבי המזרח התיכון ולכן ייתכן ומסקנותיו אינן משקפות את המצב לאשורו על פני כל אזורי גידול החיטה במזרח הקרוב.

במחקר קודם הועלתה השערה כי הקרבה בין אוכלוסיית קרובי הבר וצמחי התרבות מאפשרת מעבר של פתוגנים בין האוכלוסיות ולכן סביר להניח שהפתוגנים של הגידולים החקלאיים תוקפים גם את אוכלוסיות קרובי הבר של הגידולים, במיוחד את אלו הנמצאים בסמוך (Frenkel et al., 2007). בעבודה זו, הדמיון בתכונות שנבדקו בין התבדידים שנדגמו מאוכלוסיות *P. fulvum* ו-*P. elatius* באזורים השונים לתבדידים שנדגמו מאפונה תרבותית והיכולת של תבדידים אלו לגרום למחלה חמורה באפונה התרבותית ובאפונת הבר, מראים כי קיימת אפשרות להדבקה הדדית בין אוכלוסיות הפתוגן באוכלוסיות אפונת הבר ואוכלוסיותיו בשדות האפונה התרבותית. לכן אני משער שהדמיון בין התבדידים נובע ממעבר הדדי של הפתוגן בין אוכלוסיות אפונת הבר והתרבות. במידה ואכן מתקיים מעבר זה ניתן לשער כי מידבק המתפתח על שאריות צמחי אפונת בר עשוי להיות גורם למידבק ראשוני באוכלוסיות האפונה התרבותית הסמוכות (למשל בעמק בית-שאן) ולהפך.

כדי לשרטט את אילן היוחסין של הפטרייה ואת כיוון זרימת הגנים יש לבצע מחקר השוואתי בין רצפי ה-DNA של התבדידים השונים. מחקר כזה יאפשר לקבוע אם מדובר באוכלוסיה אחת המתחלקת לתת קבוצות עם הגיון גיאוגרפי או ביולוגי כלשהו או מספר גזעים. במחקר נוסף ניתן להשוות אוכלוסיות נוספות (למשל *P. humile* מהגולן) ועל פי הדמיון בין האוכלוסיות ייתכן וניתן יהיה להבין טוב יותר את הפצת הפתוגן במרחב במהלך האבולוציה.

6. רשימת ספרות

- ברש, י. 1960. גורמי מחלת האסקוכיטה של אפונה בישראל. עבודת גמר, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים. רחובות. 65 עמ'.
- Abbo, S., Frenkel, O., Sherman, A. and Shtienberg, D. 2007. The sympatric *Ascochyta* pathosystems of Near Eastern legumes, a key for better understanding of pathogen biology. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:111-118.
- Abbo, S., Saranga, Y., Peleg, Z., Kerem, Z., Lev-Yadun, S. and Gopher, A. 2009. Reconsidering domestication of legumes versus cereals in the ancient Near East. *Quart. Rev. Biol.* 84:29-50.
- Abbo, S., Shtienberg, D., Lichtenzweig, J., Lev-Yadun, S. and Gopher, A. 2003. The chickpea, summer cropping, and a new model for pulse domestication in the ancient Near East. *Quart. Rev. Biol.* 78:435-448.
- Abbo, S., Zezak, I., Schwartz, E., Lev-Yadun, S. and Gopher, A. 2008. Experimental harvesting of wild peas in Israel: implications for the origins of Near East farming. *J. Archaeol. Sci.* 35:922-929.
- Agrios, G. N. 2004. *Plant Pathology* (5th Ed.). Elsevier Academic Press. Amsterdam.
- Ali, S. M., Nitschke, L. F., Dubè, A. J., Krause, M. R. and Cameron, B. 1978. Selection of pea lines for resistance to pathotypes of *Ascochyta pinodes*, *A. pisi* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Aust. J. Agric. Res.* 29:841-849.
- Ali, S. M., Paterson, J. and Crosby, J. 1982. A standard technique for detecting seed-borne pathogens in peas, chemical control, and testing commercial seed in South Australia. *Aust. J. Exp. Agri. Anim. Husb.* 22:348-352.
- Ali-Khan, S. T., Zimmer, R. C. and Kenaschuk, E. O. 1973. Reactions of pea introductions to *Ascochyta* foot rot and powdery mildew. *Can. Plant Dis. Surv.* 53:155-156.
- Allard, B., Bill, L. and Touraud, G., 1993. L'antracnose du pois: revue bibliographique et synthèse. *Agronomie* 13:5-24.
- Bailey, J. A. 1969. Phytoalexin production by leaves of *Pisum sativum* in relation to senescence. *Ann. Appl. Biol.* 64:315-324.
- Ben-Ze'ev, N. and Zohary, D. 1973. Species relationships in the genus *Pisum* L. in Israel. *Isr. J. Bot.* 22:73-91.
- Berbee, M. L., Pirseyedi, M. and Hubbard, S. 1999. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91:964-977.

- Beresford, R. M. and Royle, D. J., 1988. Relationships between leaf emergence and latent period for leaf rust (*Puccinia hordei*) on spring barley and their significance for disease monitoring. *Z. Pflanzen. Pflanzen.* 95:361-71.
- Brasier, C. M. and Webber, J. F. 1987. Positive correlations between in-vitro growth rate and pathogenesis in *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathol.* 36:462-466.
- Bretag, T. W. 1991. Epidemiology and control of Ascochyta blight of field peas. Ph.D. Thesis. La Trobe University. Australia.
- Bretag, T. W. 2004. Review: Ascochyta blight in field peas. Victorian Department of Primary Industries, Horsham.
- Bretag, T. W. and Brouwer, J. B. 1995. Effects of different plant phenotypes on the severity of Ascochyta blight in field peas (*Pisum sativum* L.) in southern Australia. In '2nd European Conference on Grain Legumes: Improving Production and Utilization of Grain Legumes'. Copenhagen. Denmark. p. 92. (AEP)
- Bretag, T. W. and Ramsey, M. D. 2001. Foliar diseases caused by fungi: *Ascochyta* spp. In: Compendium of Pea Diseases and Pests, Kraft, J. M. and Pflieger, F. L. (Eds), APS Press: The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 24-28.
- Bretag, T. W., Keane, P. J. and Price, T. V. 1995a. Effect of Ascochyta blight on the grain yield of field peas (*Pisum sativum* L.) grown in southern Australia. *Aust. J. Exp. Agric.* 35:531-536.
- Bretag, T. W., Keane, P. J. and Price, T. V. 2006. The epidemiology and control of Ascochyta blight in field peas: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 57:883-902.
- Bretag, T. W., Price, T. V. and Keane, P. J. 1995b. Importance of seedborne inoculum in the etiology of the Ascochyta blight complex of field peas (*Pisum sativum* L.) grown in Victoria. *Aus. J. Exp. Agric.* 35:525-530.
- Bucheli, E., Gautschi, B. and Shykoff, J. A. 2000. Host-specific differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* as revealed by microsatellites. *J. Evol. Biol.* 13:188-198.
- Burdon, J. J. 1987. Disease and Plant Population Biology. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Burdon, J. J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Ann. Rev. Phytopath.* 31:305-323.
- Burdon, J. J. and Elmqvist, T. 1996. Selective sieves in the epidemiology of *Melampsora lini*. *Plant Pathol.* 45:933-943.
- Burdon, J. J. and Thrall, P. H. 2008. Pathogen evolution across the agro- ecological interface: implications for disease management. *Evol. Applic.* 1:57-65.

- Burdon, J. J. and Thrall, P. T. 2000. Coevolution at multiple spatial scales: *Linum marginale-Melampsora lini* - from the individual to the species. *Evol. Ecol.* 14:261-281.
- Burdon, J. J., Thrall, P. H. and Ericson, L. 2006. The current and future dynamics of disease in plant communities. *Ann. Rev. Phytopath.* 44:19-39.
- Capelle, J. and Neema, C. 2005. Local adaptation and population structure at a micro-geographical scale of a fungal parasite on its host plant. *J. Evol. Biol.* 18:1445-1454.
- Carter, M. V. 1963. *Mycosphaerella pinodes*: The phenology of ascospore release. *Aust. J. Biol. Sci.* 16:800-817.
- Carter, M. V. and Moller, W. J. 1961. Factors affecting the survival and dissemination of *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Vesterg. in South Australian irrigated pea fields. *Aust. J. Agric. Res.* 12:878-889.
- Clulow, S. A., Lewis, B. G. and Matthews, P. 1991. Infection of pea epicotyls by *Mycosphaerella pinodes*. *Mycol. Res.* 95:817-820.
- Clulow, S. A., Lewis, B. G. and Matthews, P. 1992. Expression of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in *Pisum sativum*. *Plant Pathol.* 41:362-369.
- Clulow, S. A., Matthews, P. and Lewis, B. G. 1991. A pathotype classification of *Mycosphaerella pinodes*. *J. Phytopath.* 131:322-332.
- Corbière, R., Gelie, B., Molinero, V., Spire, D. and Agarwal, V. K. 1994. Investigations on seedborne nature of *Mycosphaerella pinodes* in pea seeds. *Seed Res.* 22:26-30.
- Cruickshank, I. A. M. 1952. Fungus diseases of peas in New Zealand. Report of the Science Congress. Royal Society of New Zealand. Wellington. pp. 52-54.
- Danin, A. 2004. Distribution Atlas of Plants in the Flora Palaestina Area. Israel Academy of Sciences and Humanities. Jerusalem. pp. 519.
- Davidson, J. A., Hartley, D., Priest, M., Herdina, M. K., McKay, A. and Scott, E. S. 2009. A new species of *Phoma* causes Ascochyta blight symptoms on field peas (*Pisum sativum*) in South Australia. *Mycologia* 101:120-128.
- Davies, D. R. 1976. Peas. In: *Evolution of Crops Plants*, Simmonds, N. W. (Ed.), Longman, New York, pp. 172-174.
- Davies, D. R. 1993. The Pea Crop. In: *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*, Casey, R. and Davies, D. R. (Eds.), CAB International, Wallingford, pp. 323.
- Davis, P. H. 1970. *Pisum*. In: *Flora of Turkey*, Davis, P. H. (Ed.) Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 370-372.
- Diamond, J. 1997. *Guns, Germs, and Steel. The Fates of Human Societies*. New York, USA: Norton WW and Company.

- Dickinson, C. H. and Sheridan, J. J. 1968. Studies on the survival of *Mycosphaerella pinodes* and *Ascochyta pisi*. *Ann. Appl. Biol.* 62:473-483.
- Dinoor, A. 1974. Role of wild and cultivated plants in the epidemiology of plant diseases in Israel. *Ann. Rev. Phytopath.* 12:413-436.
- Dinoor, A. and Eshed, N. 1984. The role and importance of pathogens in natural plant communities. *Ann. Rev. Phytopath.* 22:443-466.
- Dinoor, A. and Eshed, N. 1987. The analysis of host and pathogen populations in natural ecosystems. in: *Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics*, Wolfe, M. S., and Caten, C. E. (Eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 75-88.
- Dybdahl, M. F. and Lively, C. M. 1996. The geography of coevolution: comparative population structures for a snail and its trematode parasite. *Evol.* 50:2264-2275.
- Ellis, T. H. N. and Poyser, S. J. 2002. An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytol.* 153:17-25.
- Eshed, N. and Wahl, I. 1975. Role of wild grasses in epidemics of powdery mildew on small grains in Israel. *Phytopathol.* 65:57-63.
- FAO. 2008. From FAOSTAT on-line statistical database. Food and agriculture organisation of the United Nations. [<http://faostat.fao.org/>].
- Faris Mokaiesh, S., Corbiere, E., Bertrand, J. and Spire, D. 1992. Studies on the variability of three *Ascochyta* species in pea. In 1st European Conference on Grain Legumes, Angers, France, pp. 357-358.
- Faris Mokaiesh, S., Corbiere, R., Lyons, N. F. and Spire, D. 1995. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycosphaerella pinodes* in pea seeds. *Ann. Appl. Biol.* 127:441-455.
- Faris-Mokaiesh, S., Boccara, M., Denis, J. B., Derrien, A. and Spire, D. 1996. Differentiation of the "Ascochyta complex" fungi of pea by biochemical and molecular markers. *Curr. Genet.* 29:182-190.
- Fatehi, J., Bridge, P. D. and Punithalingam, E. 2003. Molecular relatedness within the "Ascochyta pinodes-complex". *Mycopathol.* 156:317-327.
- Frenkel, O., Sherman, A., Abbo, S. and Shtienberg, D. 2008. Different ecological affinities and aggressiveness patterns among *Didymella rabiei* isolates from sympatric domesticated chickpea and wild *Cicer judaicum*. *Phytopathol.* 98:600-608.
- Gandon, S. and Michalakis, Y. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.* 15:451-462.

- Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalakis, Y. and Olivieri, I. 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263:1003-1009.
- Garry, G., Jeuffroy, M. H. and Tivoli, B. 1998. Effects of Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes* Berk. and Blox.) on biomass production, seed number and seed weight of dried-pea (*Pisum sativum* L.) as affected by plant growth stage and disease intensity. *Ann. Appl. Biol.* 132:49-59.
- Garry, G., Jeuffroy, M. H., Ney, B. and Tivoli, B. 1997. Effects of Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes* Berk. and Blox.) on the decrease in photosynthesizing leaf area and the reduction of photosynthetic efficiency by green leaf area of dried-pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Pathol.* 47:473-479.
- Garry, G., Tivoli, B., Jeuffroy, M. H. and Citharel, J. 1996. Effects of Ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on the translocation of carbohydrates and nitrogenous compounds from the leaf and hull to the seed of dried-pea. *Plant Pathol.* 45:769-777.
- Gibbs, J. N. And Brasier, C. M. 1973. Correlation between cultural characters and pathogenicity in *Ceratocystis ulmi* from Britain, Europe and America. *Nature* 241:381-383.
- Gilpatrick, J. D. and Busch, L. V. 1950. Studies on the pathogenicity of different isolates of *Ascochyta pisi* Lib. *Plant Dis. Rep.* 34:383-387.
- Hamilton, W., Axelrod, R. and Tanese, R. 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3566-3573.
- Hare, W. W. and Walker, J. C. 1944. Ascochyta diseases of canning pea. *Wisconsin Agric. Exp. Station Res. Bulletin.* 150:1-31.
- Hare, W. W. and Walker, J. C. 1945. Ascochyta diseases of canning pea. *Wisconsin Res. Bulletin.* 150:1-8.
- Harlan, J. R. 1976. Disease as a factor in plant evolution. *Ann. Rev. Phytopath.* 14:35-51.
- Harlan, J. R. and Zohary, D. 1966. Distribution of wild wheat and barley. *Science* 153:1074-1080.
- Heath, M. C. and Wood, R. K. S. 1969. Leaf spots induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Bot.* 33:657-670.
- Heath, M. C. and Wood, R. K. S. 1971. Role of cell-wall-degrading enzymes in the development of leaf spots caused by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Bot.* 35:451-474.

- Hernandez-Bello, M. A., Chilvers, M. I., Akamatsu, H. and Peever, T. L. 2006. Host specificity of *Ascochyta* species infecting legumes of the *Viciae* and *Ciceraceae* tribes and the pathogenicity of an interspecific hybrid. *Phytopathol.* 96:1148-1156.
- Hoey, B. K., Crowe, K. R., Jones, V. M. and Polans, N. O. 1996. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 92:92-100.
- Hutchinson, G. E. 1959. Homage to Santa Rosalia or why are there so many kinds of animals? *Am. Nat.* 93:145-159.
- Jones, F. R. and Vaughan, R. E. 1921. Anthracnose of the garden pea. *Phytopathol.* 11:500-503.
- Jones, L. K. 1927. Studies on the nature and control of blight, leaf and pod spot, and foot-rot of peas caused by species of *Ascochyta*. New York State Agric. Exp. Station Res. Rep. 547:1-46.
- Kaiser, W. J. 1992. Epidemiology of *Ascochyta rabiei*. In: Disease Resistance Breeding in Chickpea, Singh, K. B. and Saxena, M. C. (Eds.), Aleppo, Syria: ICARDA, pp. 117-134.
- Kaiser, W. J. 1997a. Inter- and intranational spread of *Ascochyta* pathogens of chickpea, faba bean and lentil. *Can. J. Plant Pathol.* 19:215-224.
- Kaiser, W. J. 1997b. The teleomorph of *Ascochyta rabiei* and its significance in breeding chickpea. In: Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker-Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas, Udupa, S. M. and Weigand, F. (Eds.), Aleppo: ICARDA, pp. 3-21.
- Kaltz, O. and Shykoff, J. A. 1998. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* 81:361-370.
- Kawecki, T. J. and Ebert, D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7:1225-1241.
- Kerling, L. C. P. 1949. Attack of peas by *M. pinodes* (Berk. et Blox.) Stone (Neerl.). *Tijdschrift over Plantenziekten.* 55:41-68.
- Kohn, L. M. 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Ann. Rev. Phytopath.* 43:279-308.
- Krupinsky, J. M. 1997. Aggressiveness of *Stagonospora nodorum* isolates from perennial grasses on wheat. *Plant Dis.* 81:1032-1036.
- Lawyer, A. S. 1984. Foliar diseases caused by fungi. In: The Compendium of Pea Diseases, Hagedorn, D. J. (Ed.), American Phytopathol. Society, St Paul, pp. 11-15.

- Le May, C., Ney, B., Lemarchand, E., Schoenyand, A. and Tivoli, B. 2009. Effect of pea plant architecture on spatiotemporal epidemic development of *Ascochyta* blight (*Mycosphaerella pinodes*) in the field. *Plant Pathol.* 58:332-343.
- Leach, C. M. 1959. Effect of visible and ultraviolet radiations on the sporulation of *Ascochyta pisi* and other seed-borne fungi. *Phytopathol.* 49:543.
- Leonard, K. J., Anikster, Y. and Manisterski, J. 2004. Patterns of virulence in natural populations of *Puccinia coronata* on wild oat in Israel and in agricultural populations on cultivated oat in the United States. *Phytopathol.* 94:505-514.
- Leppik, E. E. 1970. Gene centers of plants as sources of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopath.* 8:323-344.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A. and Abbo, S. 2000. The cradle of agriculture. *Science* 288:1602-1603.
- Lichtenzweig, J., Gamliel, E., Frenkel, O., Michaelido, S., Abbo, S., Sherman, A. and Shtienberg, D. 2005. Distribution of mating types and diversity in virulence of *Didymella rabiei* in Israel. 113:15-24.
- Lubeck, P. S., Alekhina, I. A., Lubeck, M. and Bulat, S. A. 1998. UP-PCR genotyping and rDNA analysis of *Ascochyta pisi* Lib. *J. Phytopathol.* 146:51-55.
- McDonald, B. A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathol.* 87:448-453.
- Moore, W. C. 1946. Seed-borne diseases. *Ann. Appl. Biol.* 33:228-231.
- Morrall, R. A. A. and McKenzie, D. L. 1974. A note on the inadvertant introduction to North America of *Ascochyta rabiei*, a destructive pathogen of chickpea. *Plant Dis. Rep.* 58:342-345.
- Moussart, A., Tivoli, B., Lemarchand, E., Deneufbourg, F., Roi, S. and Sicard, G. 1998. Role of seed infection by the *Ascochyta* blight pathogen of dried pea (*Mycosphaerella pinodes*) in seedling emergence, early disease development and transmission of the disease to aerial plant parts. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:93-102.
- Nasir, M. and Hoppe, H. H. 1991. Studies on pathotype differentiation within *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Bloxam) Vestergren, a component of the *Ascochyta*-disease-complex of peas (*Pisum sativum* L.). *Z. Pflanzen. Pflanzen.* 98:619-626.
- Nasir, M., Hoppe, H. H., and Ebrahim-Nesbat, F. 1992. The development of different pathotype groups of *Mycosphaerella pinodes* in susceptible and partially resistant pea leaves. *Plant Pathol.* 41:187-94.
- Neergaard, P. 1979. *Seed Pathology. Vols. I & II.* Macmillan Press Ltd. London.

- Nene, Y. L. and Reddy, M. V. 1987. Chickpea diseases and their control. In: The Chickpea, Saxena, M. C. and Singh, R. S. (Eds.), Wallingford, CAB International, pp. 233-270.
- Ondrej, M. 1974. Study of physiological races of the phytopathogenic fungus *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Stone in relation to the host. Rev. Appl. Mycol. 55:737.
- Onfroy, C., Baranger, A. and Tivoli, B. 2007. Biotic factors affecting the expression of partial resistance in pea to *Ascochyta* blight in a detached stipule assay. Eur. J. Plant Pathol. 119:13-27.
- Onfroy, C., Tivoli, B., Corbiere, R. and Bouznad, Z. 1999. Cultural, molecular and pathogenic variability of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella* isolates from dried pea (*Pisum sativum*) in France. Plant Pathol. 48:218-229.
- Owusu-Ansah, Y. J. and McCurdy, S. M. 1991. Pea proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. Food Rev. Int. 7:103-134.
- Palmer, J. D., Jorgensen, R. A. and Thompson, W. F. 1985. Chloroplast DNA variation and evolution in *Pisum* patterns of change and phylogenetic analysis. Genetics 109:195-214.
- Peck, D. M., McDonald, G. K. and Davidson, J. A. 2001. Blackspot survival in soil and stubble and aerial dissemination through the Season. In: Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference, Hobart, Australia.
- Peever, T. L. 2007. Role of host specificity in the speciation of *Ascochyta* pathogens of cool season food legumes. Eur. J. Plant Pathol. 119:119-126.
- Peever, T. L., Barve, M. P., Stone, L. J. and Kaiser, W. J. 2007. Evolutionary relationships among *Ascochyta* species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes *Cicereae* and *Vicieae*. Mycologia. 99:59-77.
- Peever, T. L., Salimath, S. S., Su, G., Kaiser, W. J. and Muehlbauer, F. J. 2004. Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the pacific northwest of the United States. Mol. Ecol. 13:291-309.
- Punithalingam, E. and Holliday, P. 1972. *Mycosphaerella pinodes*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 340:1-2.
- Roger, C. and Tivoli, B. 1996. Spatio-temporal development of pycnidia and pseudothecia and dissemination of spores of *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*). Plant Pathol. 45:518-528.
- Roger, C., Tivoli, B. and Huber, L. 1999a. Effects of temperature and moisture on disease and fruit body development of *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*). Plant Pathol. 48:1-9.

- Roger, C., Tivoli, B. and Huber, L. 1999b. Effects of interrupted wet periods and different temperatures on the development of Ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Plant Pathol.* 48:10-18.
- Rotem, J., Cohen, Y. and Bashi, E. 1978. Host and environmental influences on sporulation in vivo. *Ann. Rev. Phytopath.* 16:93-101.
- Royle, D. J. 1994. Understanding and predicting epidemics: a commentary based on selected pathosystems. *Plant Pathol.* 43:777-789.
- Sattar, A. 1934. A comparative study of the fungi associated with blight diseases of certain cultivated leguminous plants. *Trans. British Mycol. Soci.* 18:276-301.
- Shaner, G. and Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathol.* 67:1051-1056.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Saitoh, K., Kato, T., Toyoda, K., Yoshioka, H., Kim, H. M., Ichinose, Y., Tahara, M. and Oku, H. 1994. Suppressors: determinants of specificity produced by plant pathogens. *Plant Cell Physiol.* 35:1107-1119.
- Skolko, A. J., Groves, J. W. and Wallen, V. R. 1954. Ascochyta diseases of peas in Canada with special reference to seed transmission. *Can. J. Agric. Sci.* 34:417-427.
- Smartt, J. 1990. *Grain Legumes: Evolution and Genetic Resources*. Cambridge University Press. New York.
- Stukenbrock, E. H. and McDonald, B. A. 2008. The origins of plant pathogens in agroecosystems. *Ann. Rev. Phytopath.* 26:46-75.
- Stukenbrock, E., Banke, H., Javan-Nikkhah, S. M. and McDonald, B. A. 2007. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Mol. Biol. Evol.* 24:398-411.
- Swart, W. J., Wingfield, M. J., Palmer, M. A. and Blanchette, R. A. 1991. Variation among South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathol.* 81:489-493.
- Thomas, M. B. and Blanford, S. 2003. Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* 18:344-350.
- Thrall, P. H., Barrett, L. G., Burdon, J. J. and Alexander, H. M. 2005 Variation in pathogen aggressiveness within a metapopulation of the *Cakile maritima-Alternaria brassicicola* host-pathogen association. *Plant Pathol.* 54:265-274.
- Thrall, P. H., Burdon, J. J., and Young, A. 2001. Variation in resistance and virulence among demes of a plant host-pathogen metapopulation. *J. Ecol.* 89:736-748.
- Tivoli, B. and Banniza, S. 2007. Comparison of the epidemiology of Ascochyta blights on grain legumes. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:59-76.

- Tivoli, B., Be'asse C., Lemarchand, E. and Masson, E. 1996. Effect of Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on yield components of single pea (*Pisum sativum*) plants under field conditions. *Ann. Appl. Biol.* 129:207-216.
- Tohamy, A. M., Nour Eldin, H. A., Mohamed, Z. K., Gad El-Karim, G. A. and Madkour, M. A. 1997. Identification of three *Ascochyta* spp. by random amplified polymorphic DNA. *Phytopathol.* 87:S97.
- Trapero-Casas, A., Navas-Cortes, J. A., and Jimenez-Diaz, R. M. 1996. Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major source of primary inoculum for Ascochyta blight epidemics in chickpea crops in southern Spain. *Eur. J. Plant Patholol.* 102:237-245.
- Van Putten, W. F., Biere, A. and Van Damme, J. M. M. 2005. Host-related genetic differentiation in the anther smut *Microbotryum violaceum* in sympatric, parapatric and allopatric populations of two host species *Silene latifolia* and *S. dioica*. *J. Evol. Biol.* 18:203-212.
- Waines, J. G. 1975. The biosystematics and domestication of peas (*Pisum* L.) *Bull. Torrey Bot. Club* 102:385-395.
- Wallan, V. R. 1974. Influence of three Ascochyta diseases of peas on plant development and yield. *Can. Plant Dis. Surv. Sept.* 54:86-90.
- Wallen, V. R. 1957. The identification and distribution of physiological races of *Ascochyta pisi* Lib. in Canada. *Can. J. Plant Sci.* 37:337-341.
- Wallen, V. R. 1965. Field evaluation and importance of the Ascochyta complex on peas. *Can. J. Plant Sci.* 45:27-33.
- Wallen, V. R. and Cuddy, T. F. 1968. Ascochyta blight of field peas. *Can. Agric.* 13:24-25.
- Wallen, V. R., Wong, S. I. and Jeun, J. 1967. Isolation, incidence, and virulence of *Ascochyta* spp. of peas from the soil. *Can. J. Bot.* 45: 2243-2247.
- Wang, H., Hwang, S., Chang, F. K., Turnbull, F. G. D. and Howard, R. J. 2000. Characterization of *Ascochyta* isolates and susceptibility of pea cultivars to the Ascochyta disease complex in Alberta. *Plant Pathol.* 49:540-545.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, Innis, M. A. Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (Eds.), Academic press, San Diego, pp. 315-322.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

- Wilson, A. D. and Kaiser, W. J. 1995. Cytology and genetics of sexual incompatibility in *Didymella rabiei*. *Mycologia* 87:795-804.
- Wroth, J. M. 1998. Variation in pathogenicity among and within *Mycosphaerella pinodes* populations collected from field pea in Australia. *Can. J. Bot.* 76:1955-1966.
- Wroth, J. M. and Khan, T. N. 1999. Differential responses of field pea (*Pisum sativum* L.) to Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*): rating disease in the field. *Aust. J. Agric. Res.* 50:601-615.
- Xue, A. G., Warkentin, T. D. and Kenaschuk, E. O. 1997. Effect of timings of inoculation with *Mycosphaerella pinodes* on yield and seed infection on field pea. *Can. J. Plant Sci.* 77:685-689.
- Zhang, J. X., Fernando, W. G. D. and Xue, A. G. 2003. Virulence and genetic variability among isolates of *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Dis.* 87:1376-1383.
- Zhang, J. X., Fernando, W. G. D. and Xue, A. G. 2004. Temporal and spatial dynamics of mycosphaerella blight (*Mycosphaerella pinodes*) in field pea. *Can. J. Plant Pathol.* 26:522-532.
- Zhang, J. X., Xue, A. G. and Fernando, W. G. D. 2005. Effect of residue type and burial depth on survival of *Mycosphaerella pinodes* in Manitoba. *Can. J. Plant Pathol.* 27:132-136.
- Zohary, D. and Hopf, M. 1973. Domestication of pulses in the old world. *Science* 182:887-894.
- Zohary, D. and Hopf, M. 1988. Domestication of Plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe, and the Nile Valley, Oxford University Press, Oxford. New York.
- Zohary, M. 1973. Geobotanical Foundations of the Middle East. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.

Abstract

Pea (*Pisum sativum* L.) was domesticated about 10,000 years ago in the Near-East and the crop spread to Europe, Africa, central and east Asia, and as a post Columbian introduction to the New World. The main foliar disease threatening domesticated pea crops throughout the world is Ascochyta blight. The disease is caused by a complex of three fungi, and most important is *Mycosphaerella pinodes*. All commercial pea cultivars may be infected, and under suitable conditions severe epidemics develop causing significant yield losses (30-75 %). In several areas in Israel, domesticated pea grows sympatrically with the wild pea species *P. elatius* and *P. fulvum*, and co-evolutionary processes occur between these species and their pathogens. My research hypothesis was that the ecological requirements and pathogenesis of isolates infecting domesticated and wild peas are different and that these differences were originated from the environmental conditions prevailing in the sites where the plants were growing.

The first aim was to determine which pathogen species is affecting domesticated and wild peas in Israel. Diseased plant organs were sampled from domesticated and wild pea populations growing in different climatic conditions. The pathogens were isolated and identified based on morphological characteristics and via comparisons of DNA sequences with control sequences. It was found that *M. pinodes* is the most common species on both domesticated and wild pea in Israel (94.5 % of the samples). These findings may be explained by the strong compatibility of *M. pinodes* with its hosts resulting from the mutual co-evolutionary history and due to the fact that it is the only species capable of completing the teleomorph stage under natural conditions. Based on this finding, it was decided to focus on *M. pinodes*.

Next the ecological requirements of *M. pinodes* isolates originated from domesticated and wild peas were compared. The experiments were carried out with isolates sampled from wild pea population and adjacent pea fields in the Beit-She'an valley and with isolates originated from distant geographical areas. In the first set of experiments, the effect of temperature on spore germination and hyphae growth was studied. The minimal, optimal and maximal temperature ranges for spore germination and hyphae growth were 2.1-8.1, 20.1-25.8 and 33.8-37.7 °C. Differences in the response of all sampled isolates to temperatures were insignificant. In a second set of experiments the moisture requirements necessary for infection and disease development were determined in potted plants. For development of severe infections (disease severity > 30 %), over 10 hours of wetness after inoculation were required. However, the isolates' origin (domesticated or wild host) did not affect significantly

the moisture requirement of the isolate. These results suggest that there are no differences in the ecological requirements tested between *M. pinodes* isolates sampled from wild *P. fulvum* and domesticated *P. sativum*.

In another set of experiments I examined if there are differences in ecological requirements of *M. pinodes* isolates sampled from *P. fulvum* native to sites characterized by diverse climatic conditions. In these experiments isolates sampled from *P. fulvum* populations in the western and eastern Galilee and Beit-She'an valley were used. Effects of temperature on spore germination and hyphae growth were similar for all isolates irrespective of their site of origin. Similar results were observed when the moisture duration required for infection and disease development were studied. In addition, it was found that the aggressiveness of isolates sampled from wild plants growing in sites with diverse climatic conditions against domesticated pea did not differ significantly from the aggressiveness of isolates sampled from domesticated pea. These results suggest that the ecological requirements and pathogenesis of *M. pinodes* isolates sampled from domesticated and wild pea, growing in sites with diverse climatic conditions are not dissimilar.

Next, I tested the differences in the ecological requirements and pathogenesis of *M. pinodes* isolates originated from the wild species *P. elatius* and *P. fulvum*, growing in sympatric distribution, in wadi Amuud in the eastern Galilee. Again, temperature effects on the isolates sampled from the wild species were similar. Differences in on both wild pea species were insignificant. These results suggest that *M. pinodes* did not adapt separately and specifically to *P. elatius* or *P. fulvum*.

In two successive years, 2008 and 2007, a survey was performed to explore the natural epidemic of Ascochyta blight in *P. elatius* plants in natural habitats. The survey was carried out in wadi Amuud and wadi Cziv (in the eastern and western Galilee, respectively) which are characterized by diverse climatic conditions. Pea populations in the surveyed sites were sporadic and were composed of isolated spots, each with a variable number of plants (1-107). Disease severity was environment-dependent: unsuitable dry (rainless) conditions resulted in a few infected plants; however, under wet (rainy) conditions disease intensity was severe. First Ascochyta symptoms appeared soon after emergence at the beginning of winter (December). The inoculum probably originated from infected plant residues from the previous season. In niches where the plants grew on soil covered with falling leaves from proximate trees, lower disease intensity was observed as compared with plants growing in niches with bare soil. This may suggest that pycnidiospores, developed in pycnidia developed in infected plant residues from the previous season, were the source of initial inoculum. In most cases the disease did not spread from the infected, bottom leaves to the newly emerged upper leaves.

During the growth seasons, the number of surviving *P. elatius* plants diminished gradually. The surviving plants are often those that grow into raspberry or other spiny shrubs and are therefore protected from grazing cattle and other herbivores. By the end of the season (April), the surviving plants had a large number of leaves and the bottom infected ones (which part of them dropped already) apparently did not affect the development of pods and the dispersal of the seeds.

The findings of this study did not lend support to my original research hypothesis. Namely, *M. pinodes* populations attacking wild and domesticated peas in Israel seems not to have developed specific adaptations to either the wild or the domesticated host. Consequently, the sampled populations did not differ significantly in the tested ecological traits. The different populations harbor a considerable genetic variation but this variation is not related necessarily to the host species from which it was isolated (wild or domesticated) or to the climatic conditions prevailing in the area where it grew. The lack of dissimilarity in tested traits amongst isolates from wild and domesticated peas and the ability of the isolates from both origins to infect and cause disease in both host species (given sufficient climate conditions), suggest that opportunities exist for mutual infection between pathogen populations from wild and domesticated populations. This means that an inoculum developing on wild pea plants may serve as a primary inoculum for domesticated crops and *vice versa*. The epidemiological consequences of these findings warrant a separate study.

This research was carried out under supervision of:

Prof. Dani Shtienberg

**Department of Plant Pathology and Weed Research, Agricultural Research
Organization, The Volcani Center, Bet Dagan**

Prof. Shahal Abbo

**Institute of Plant Science & Genetics in Agriculture, The Robert H. Smith Faculty of
Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot**

**Ecological and epidemiological aspects
of the *Ascochyta* blight disease in
wild and domesticated pea**

M.Sc. Thesis

**Submitted to The Robert H. Smith Faculty of Agriculture,
Food and Environment
The Hebrew University of Jerusalem**

By

Ma`ayan Golani

Rehovot

May 2010

**Ecological and epidemiological aspects
of the *Ascochyta* blight disease in
wild and domesticated pea**

M.Sc. Thesis

**Submitted to The Robert H. Smith Faculty of Agriculture,
Food and Environment
The Hebrew University of Jerusalem**

By

Ma`ayan Golani

Rehovot

May 2010