

הדברה ידידותית לסביבה, מבוססת פטריות אנטגוניסטיות, כנגד הגורם למחלת הריקבון השחור,
הפטרייה *Macrophomina phaseolina*

מוגש להנהלת ענף הכותנה, לסיכום שנת המחקר ב- 2020
ד"ר אופיר דגני – מיגל - מכון למחקר מדעי בגליל, קריית שמונה (ofird@telhai.ac.il).

מבוא ותיאור הבעיה

1. כותנה ומחלת הריקבון השחור - גידול הכותנה בישראל תלוי במצב המים הזמינים, איכות הסיבים הנדרשים בשוק העולמי (זנים) והמחירים אותם ניתן לקבל בשווקים אלו. העלייה בשנים האחרונות בהיקפי גידול זני הפימה לוותה בעלייה בשכיחות הנזקים הנגרמים מגורמי מחלות קרקע. משורשי צמחים נובלים וגם מצמחים בריאים בודדו פטריות מסוגים שונים (ד"ר רוני כהן וחובריו) [1]. הפטרייה הבולטת בתדירות הגילוי היא *Macrophomina phaseolina*, המוכרת כגורם למחלת הריקבון השחור בכותנה. הפטרייה מופצת בקרקע ותוקפת מעל 500 מינים שונים מכ- 100 משפחות צמחים [2]. סימני המחלה בכותנה מתפתחים בשלבים מאוחרים של הגידול וכוללים התייבשות העלים והגבעולים, נבילה ותמותה של הצמח.

2. השפעת יחסי הגומלין בין פתוגנים שוכני קרקע על מחלת הריקבון השחור בכותנה – להבדיל ממחלות עלים דוגמאות חילדון או קימחון בהם פתוגן אחד גורם למחלה, מחלות המועברות בקרקע יכולות להיגרם על ידי קומפלקס של גורמי מחלה המשפיעים אחד על השני ועל הצמח החולה [3]. הנושא נבחן לעומק, במימון מועצת הכותנה ב- 2018-2019. בסדרת ניסויים המלווה באיתור מבוסס Real-Time PCR (qPCR), בתירס וכותנה, בנבטים בתנאים מבוקרים, ובעציצים לאורך עונת גידול מלאה [4]. התוצאות מוכיחות את קיומם של יחסי אנטגוניסטיות (דיכוי הדדי) בין *Magnaporthe oryzae* ל- *M. phaseolina* בכותנה הגורמים לירידה משמעותית של *M. phaseolina* בכותנה. השפעה זו ניכרת גם במדדי הגידול והיבולים שהשתפרו באופן משמעותי באילוח המשולב בשני הפתוגנים, בהשוואה לאילוח בכל פתוגן. בנוסף התוצאות מלמדות על אורח חיים סמוי, כאנדופיט, של הפטרייה *M. maydis* בכותנה [4]. ממצא זה מאפשר כעת להשתמש בפטרייה זו לחיזוק מיקרוביום הצמח כנגד מחלת העובש השחור.

3. הדברה ביולוגית מבוססת מיני *Trichoderma* - בשנתיים האחרונות נסרקו במעבדת ד"ר אופיר דגני 8 תבדידים של פטרייה הנחשבת כמדביר ביולוגי, *Trichoderma* sp., ואותרו 3 תבדידים בעלי פעילות מעכבת כנגד *M. maydis*, הגורם למחלת הנבילה המאוחרת בתירס. תוצרי ההפרשה של תבדידים אלו מנעו את גדילת הפתוגן בצלחות תרבית, הפחיתו באופן משמעותי את התבססותו והתפתחותו ברקמות צמחי תירס והניבו שיפור משמעותי במדדי הצמיחה וביבולים בניסויים בחדר גידול ובשדה [5]. בעקבות הצלחה זו, ניתן כעת לבחון תבדידים אלו כנגד הגורם למחלת העובש השחור בכותנה, *M. phaseolina*. שיטות הדברה כימית נחשבות ליעילות וכלכלית להתמודדות עם מחלות קרקע [6-8]. יחד עם זאת הן מלוות בחשש מתמיד מפני התפתחות עמידות כנגד התכשירים. בנוסף לתכשירים כימיים יש השפעה סביבתית נרחבת, הם פוגעים גם במיקרואורגניזמים מועילים בקרקע ועשויים להיות רעילים לאדם ולחיות המשק [9]. הדברה ביולוגית הינה ידידותית לסביבה. המדביר הביולוגי משתנה יחד עם השתנות הפתוגן ומרוץ חימוש זה נמשך כל עוד הישרדות המדביר הביולוגי תלויה בפונדקאי שלו. הפוטנציאל של יישום הדברה ביולוגית כנגד קווי הפתוגן *M. phaseolina* בארץ טרם נבחן.

מטרת המחקר

בחינת ממשק הדברה מבוסס מדבירים ביולוגים פוטנציאליים, פטריות *Trichoderma sp.* ו- *M. maydis* כנגד הגורם למחלת העובש השחור בכותנה, הפטרייה *M. phaseolina*. המחקר בדק בתנאי מעבדה האם מדבירים ביולוגים אלו, או תוצרי הפעילות שלהם, מעכבים את התפתחות הפתוגן. בנוסף נבדקה השפעת המדבירים על התפתחות נבטים בעציצים בחדר גידול, על חומרת המחלה בשלבי הגידול הראשוניים ועל התפתחות הפתוגן בגוף הצמחים.

תיאור המחקר

1. בחינת פטריות *Trichoderma sp.* להדברת הגורם למחלת העובש השחור בכותנה בתנאי *in vitro*.
ברשותנו אוסף של 8 תבדידי קווי *Trichoderma* ממקורות שונים (טבלה 1). השפעת תבדידים אלו נבדקה במבחני אנטגוניסטיות (מיקופרזיטיזם) *in vitro* כנגד *M. phaseolina* בצלחות תרבית. במבחנים אלו דסקיות תפטיר (6 מ"מ קוטר) משתי הפטריות הנבדקות (*M. phaseolina* ופטריית ה- *Trichoderma*) הונחו בשני הקצוות של צלחת מצע משותפת, שהודגרה בטמפרטורה של 28°C, בחושך, למשך 7-10 ימים. תוצאת המפגש בין 2 הפטריות תכריע האם אחת מהן גדלה על גבי האחרת או ששתיהן נעצרו בנקודת מפגש הקורים שלהן (לרוב תוך יצירת קו גבול כהה).
מבחן נוסף להשפעת תבדידי ה- *Trichoderma* התמקד בהשפעת תוצר פעילותן במצע נוזלי ובצלחות מצע. לבחינת השפעה זו במצע נוזלי, חמש דסקיות תפטיר בקוטר 6 מ"מ נלקחו משולי מושבות בנות 3 ימים, של כל תבדיד *Trichoderma*, נזרעו והודגרו במצע נוזלי עשיר (Potato dextrose broth, PDB) בטמפרטורה של 28°C, בחושך. לאחר שבוע נוזל הגידול סונן ורמת החומציות שלו תוקנה ל- pH=5.10 (רמת החומציות של מצע PDB רגיל), באמצעות NaOH. הנוזל סונן דרך בקבוקי ביופילטר (מסנן 0.22 מיקרון) לצורך סטריליזציה. מהנוזל המסונן נמזגו 100 מ"ל לבקבוק ארלנמייר 250 מ"ל סטרילי. לנוזל הוספה תמיסת גלוקוז 6% מעוקרת, לריכוז סופי בבקבוק של 2%, היתה לכמות הגלוקוז במצע PDB רגיל. לכל בקבוק הוספו 5 דסקיות תפטיר של *M. phaseolina* והבקבוקים הודגרו בתנאים הנ"ל. השפעת נוזל הגידול נבדקה באמצעות סינון הנוזל ושקילת הביומסה של הפטרייה.
במקביל נבחנה גם השפעת תוצרי הפעילות של תבדידי ה- *Trichoderma* בצלחות מצע. כאן לנוזל אשר סונן מתרביות תבדידי ה- *Trichoderma*, שגודלו כמתואר מעלה, הוספה אבקת Potato dextrose agar (PDA) בהתאם להמלצת היצרן. התערובת עוקרה, ונמזגה לצלחות מצע. הצלחות נזרעו באמצעות דסקית תפטיר *M. phaseolina* בקוטר 6 mm (משולי מושבת פטרייה שגודלה קודם לכן בטמפרטורה של 28°C, בחושך) וקצב גדילת המושבה נמדד לאחר 6 ימים בהשוואה לקצב הגידול של הפטרייה שגדלה על מצע PDA רגיל.

2. שיטת האילוח בניסויי עציצים

לצורך האילוח, 2 ק"ג גרעיני חיטה הושרו במים רגילים למשך לילה. לאחר מכן יובשו גרעיני החיטה כ-4 שעות על גבי נייר סופג. הגרגרים הוכנסו לקופסאות פלסטיק עמידות לחום (חומוסיות) עם כיסוי במכסה + ניר אלומיניום למניעת התחממות. הקופסאות עוקרו באוטוקלאב (30 דקות בחום של 121 מעלות). אילוח הקופסאות נעשה בהוד ביולוגי, לאחר קירורם לטמפרטורת החדר ביחס של 10 דסקיות תפטיר (בגודל 6

מ"מ קוטר) ל- 100 גרם חיטה. הקופסאות נסגרו במכסה עטוף בניילון נצמד ועליו נייר אלומיניום והדגרו למשך 10 ימים ב- 28°C, בחושך.

3. בחינת פטריות *Trichoderma spp.* להדברת הגורם למחלת העובש השחור בכותנה, נבטים בחזר

גידול. הניסוי בוצע בחדר גידול (16 שעות אור ו- 8 שעות חושך, טמפר' ממוצעת 28°C, 45% לחות). לצורך הניסוי הוכנו עציצים בנפח של 2 ליטר עם אדמה גננית ו- 30% פרלייט גס (מס' 4) לצורך אוורור. הקרקע אולחה שבוע לפני הניסוי, בשכבה העליונה של אדמת העציץ עד לגובה של 5 ס"מ, (אזור בית השורשים), בזרעי חיטה מעוקרים ומאולחים ב- *M. phaseoilina* שהוכנו כמתואר בסעיף 2. זרעי הכותנה מסוג "פימה" הושרו כ- 15 דקות במים ונטמנו בקרקע בעומק 5 ס"מ בכל עציץ. כל קבוצת ניסוי וכן הביקורת שאינה מטופלת כללה 6 חזרות (כל חזרה היא עציץ המכיל 5 נבטים). לכל זרע הוספו 3 דסקיות (בקוטר 6 מ"מ) של תפטיר הפטרייה/ות לפי סוג הטיפול.

הטיפולים שבוצעו כללו אילוח משלים ב- *M. phaseoilina*, לבד או עם התבדילים T7407, P1, T71470, T7507. הביקורת הייתה צמחים לא מאולחים וללא הדברה. האילוח ביחד עם התבדיל T71470 שימש כביקורת נוספת היות והפעילות האנטגוניסטית של זן זה הייתה חלשה. לאורך הניסוי בוצעו טיפולי דשן וטיפולים נגד מזיקים שונים, על מנת לשמור על גורם פגיעה רק מהאילוח בפטרייה. מהזריעה ועד סוף הניסוי הושקו העציצים ב- 60 מ"ל מים ביום בשעות הבוקר. לאחר 3 ימים נבחנו אחוזי הצצה בכל טיפול. לאחר 40 יום נמדדו מצב צמח כללי, הופעת תסמינים, שלב פנולוגי, משקל השורש ומשקל הצמח. בנוסף נלקחה מכל עציץ דגימת שורשים במשקל 0.7 גרם להפקת DNA ואיתור כמותי מבוסס על qPCR של DNA הפתוגן ברקמות הצמח (שורש).

4. הדברה מבוססת על פתוגן התירס *M. maydis*

ניסוי זה נערך פעמיים והתקבלו תוצאות דומות. עציצים בנפח 2 ליטר מולאו ב- 70% אדמת שתילה מסחרית וב- 30% פרלייט מס' 4 (לצורך אוורור). העציצים הוחזקו בחדר גידול במחזורים של 8 שעות אור ו- 16 שעות חושך, בלחות של 45% וטמפרטורה של 28°C. בטיפול האילוח "לפני הזריעה", שבועיים לפני הזריעה אולחה הקרקע בזרעי חיטה שהוכנו כמתואר בסעיף 2, על ידי ערבוב 12 גרם זרעים מהפטרייה/ות הנבחרת/ות בשכבה העליונה של אדמת העציץ עד לגובה של 5 ס"מ, (אזור בית השורשים). זרעי הכותנה מסוג "פימה" הושרו כ- 15 דקות במים מזוקקים ונזרעו בעומק של 5 ס"מ (5 זרעים לעציץ). בטיפול האילוח "עם הזריעה", 3 דסקיות (6 מ"מ קוטר) תפטיר פטרייה/ות הוספו לכל זרע, עם הזריעה. בטיפול האילוח "לאחר הזריעה" הוספו 3 דסקיות תפטיר פטרייה לכל זרע, שבועיים לאחר הזריעה. בנוסף, בחלק מהטיפולים "לאחר הזריעה" בוצע אילוח בדקירה בחלק התחתון של הגבעול באמצעות קיסמי עץ מאולחים שהודגרו במשך הלילה בתפטיר הפטרייה. מזמן אילוח העציצים ועד סוף הניסוי הושקו העציצים ב- 60 מ"ל מים ביום בשעות הבוקר. בדיקת הצצה התבצעה 3 ימים לאחר הזריעה. בסיום הניסוי (יום 42) בוצע לכל העציצים אומדן מצב פנולוגי - אורך, ביומסה, מספר עלים. בנוסף נלקחה מכל עציץ דגימת שורשים במשקל 0.7 גרם להפקת DNA.

5. מבחן מולקולארי מבוסס Real-Time PCR

הפקת DNA נעשתה במתואר קודם לכן [10], על ידי מילוי שקית BioMed ב- 4 מ"ל תמיסת C-TAB לשקית עם הדגימה וכתישת הדוגמא ע"י כותש חשמלי. תמצית הדגימה הועברה לאפנדוף וסורכזה ב- rpm 13000. הנוזל העליון (700 מיקוליטר) הועבר למחנה חדשה, אליה הוספו 700 מיקרוליטר תמיסת

כלורופום: איזו אמיל (1: 24). לאחר סרוכז נוסף ב- 13000 ipm, הועבר המקטע העליון (500 מיקרוליטר) והוספה לו כמות שווה של כלורופום: איזו אמיל. שוב בוצע סרוכז ב- 13000 ipm. לאחר מכן הוצאו 300 מיקרוליטר עליונים ולהם הוספו 200 מיקרוליטר איזופרופנול קר. התערובת הועברה למשך 20 דקות למקפיא -20 מעלות. השלב הבא כלל סרוכז בטפרטורה של 4 מעלות למשך 20 דקות ב- 13000 ipm, סילוק הנוזל והוספה של 0.5 מ"ל של אתנול להפקה. סרוכז נוסף של 4 מעלות ב- 13000 ipm למשך 10 דקות, סילוק הנוזל העליון וייבוש הדגימות למשך לילה בהוד. הדגימות הורחפו מחדש ב- 100 מיקרוליטר מים באיכות Ultra Pure ושמרו במקפיא ב- 20 מעלות.

לצורך ביצוע qPCR השתמשנו במגש 96 באריות. כל בארית הכילה 2 מיקרוליטר מדגימת ה-DNA, מהולה ב- 195 מיקרוליטר מים באיכות Ultra Pure. הפריימרים (מפורטים ב- [4]) נמהלו לריכוז 100 Mm לפי הוראות יצרן (Hylab, רחובות). מהילת הפריימרים Cox ו- A200 Mm בוצעה ביחס של 1/5 והפריימרים Mpk ו- Mm נמהלו ביחס של 1/10 עם מים להפקה. הכנת הסטוק לריאקציה בוצעה על ידי הוספת הפולימראז, Siber green, בהתאם להוראות היצרן. ה-qPCR בצוע במגש 386 כשכל דגימה מכילה 3 מיקרוליטר של תערובת הסטוק + 2 מיקרוליטר של תערובת הפקת ה-DNA.

6. עיבוד סטטיסטי

כל העיבודים הסטטיסטיים נעשו באמצעות תוכנת JMP, 15th edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). לבחינת מובהקות התוצאות השתמשנו ב-one way analysis of variance (ANOVA) וב-post hoc מבוסס Student's *t*-test לכל זוג ממוצעים, ללא תיקון המבוסס על מבחנים מרובים. סף המובהקות הוא $p < 0.05$. מספר החזרות מצוינות לכל תרשים בנפרד. בניתוח תוצאות ניסוי העיצים ובאנליזת ה-qPCR לא נמצאה מובהקות סטטיסטית מפאת השונות הגדולה היות וחלק מצמחי הטיפולים לא נדבקו בגורם המחלה.

תוצאות המחקר

1. בחינת פטריות *Trichoderma* sp. להדברת הגורם למחלת העובש השחור בכותנה בתנאי *in vitro*.

בסדרת ניסויים במעבדה, בחנו את פוטנציאל ההדברה של מיני *Trichoderma* (מפורטים בטבלה 1) להדברת הגורם למחלת העובש השחור הפטרייה *M. phaseolina*.

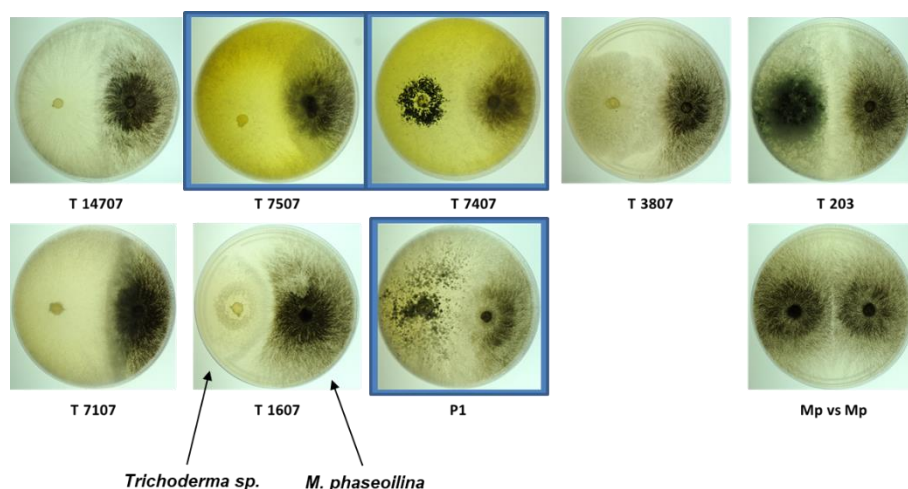
טבלה 1 – מיני ה-*Trichoderma* ששימשו במחקר ותוצאות מבחן האימות בצלחות תרבית

Species	Designation	Origin	Reference	Confrontation Assay Winner ²	Tested in Sprouts
<i>Trichoderma asperelloides</i>	T203	ATCC 36042, CBS 396.92	[5,11]	Antagonism	No
<i>Trichoderma asperelloides</i>	T1607	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[12]	Antagonism	No
<i>Trichoderma</i> sp. O.Y. 7107	T7107	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[12]	T7107	No
<i>Trichoderma atroviride</i>	T3807	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[12]	Antagonism	No
<i>Trichoderma</i> sp. O.Y. 14707	T14707	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[12]	Antagonism	Yes
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	T7507	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[12]	<i>T. longibrachiatum</i>	Yes
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	T7407	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[5,12]	<i>T. longibrachiatum</i>	Yes
<i>Trichoderma asperellum</i>	P1	<i>Zea mays</i> , Prelude cv.	[13]	<i>T. asperellum</i>	Yes

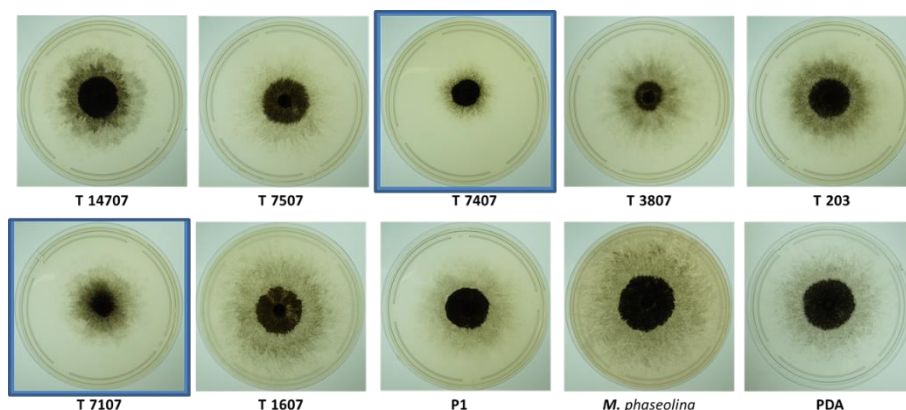
¹ Mediterranean sponge *Psammocinia* sp. ² Confrontation assay results, including the following possibilities: *M. maydis* or *Trichoderma* sp. mycoparasitism (one of the fungi is growing above the

colony surface of the other) and antagonism—none of the two fungi can extend above the other, and their growth was stopped in the meeting point with the other fungus, usually producing a dark line.

מבחן אנטגוניזם אשר בחן את הפעילות המעכבת של קווי ה- *Trichoderma* (איור 1) הראה שלפחות לשלושה מהתבדידים הנסרקים, P1, T.7407 T.7507, יש יכולת לגדול על גבי הפתוגן *M. phaseolina* ולמנוע את התפשטותו. בשלב הבא בחנו את השפעתם המעכבת של תוצרי ההפרשה של תבדידי ה- *Trichoderma* במבחן בצלחות מצע מוצק (איורים 2, 3). הנוזל אשר סונן מתרביות תבדידי ה- *Trichoderma* שימש להכנת מצעים עשירים בשילוב עם PDA. לאחר 3 ימים צולמו הצלחות (איור 2) ונמדד רדיוס המושבות (איור 3). למטבוליטים המופרשים מהתבדידים T7407 ו-T7107 נמצאה השפעה מעכבת משמעותית ($p < 0.05$) על גדילת הפתוגן *M. phaseolina* במבחן זה.

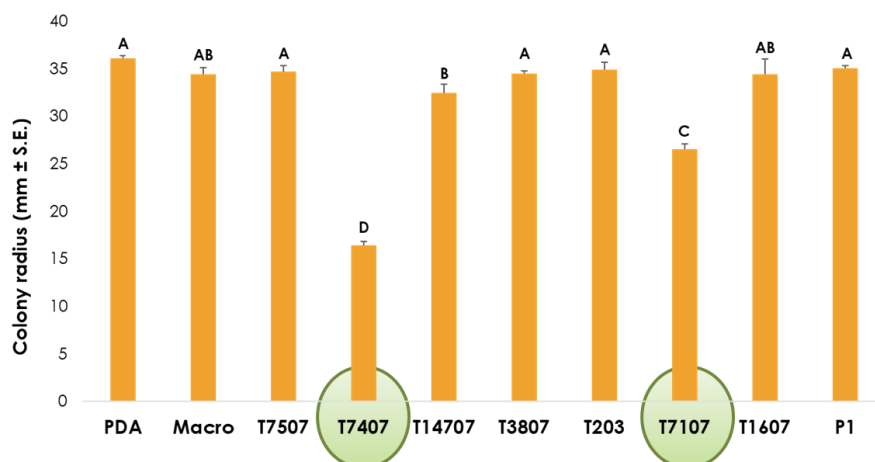


איור 1 – מיקופרזיטיזם של *Trichoderma spp.* כנגד פתוגן הכותנה *M. phaseolina*. תבדידי ה- *Trichoderma* (מתוארים בטבלה 1) נזרעו משמאל ו- *M. phaseolina* (Mp) מימין. הפטריות נזרעו על גבי צלחות מצע מוצק עשיר (PDA) והודגרו במשך 3 ימים ב- בטמפרטורה של 28°C, בחושך. במסגרת כחולה מסומנים תבדידי *Trichoderma* שהראו יכולת לגדול על גבי הפתוגן *M. phaseolina*.



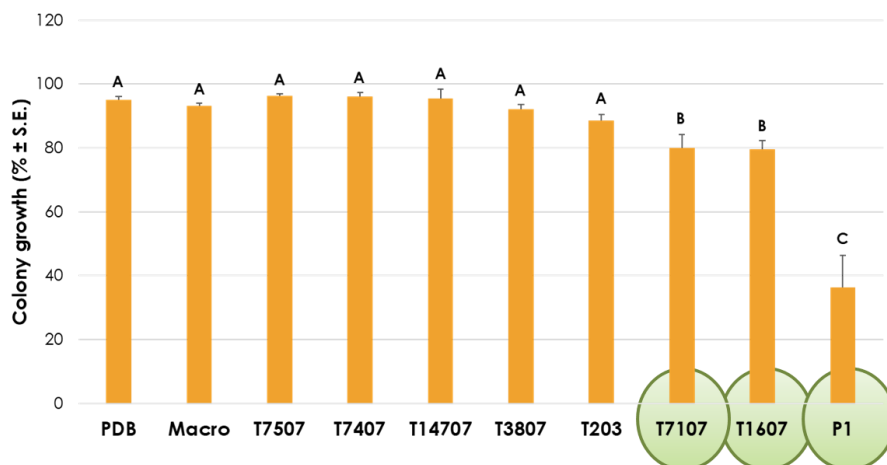
איור 2 – השפעת נוזל הגידול של *Trichoderma spp.* על התפתחות פתוגן הכותנה *M. phaseolina* בצלחות מצע מוצק. הפטרייה *M. phaseolina* נזרעה על גבי צלחות מצע מוצק עשיר (PDA) המכיל את המטבוליטים המופרשים של תבדידי *Trichoderma* (מתוארים בטבלה 1) שגדלו קודם לכן במצע נוזלי.

הצלחות הודגרו במשך 3 ימים בטמפרטורה של 28°C, בחושך. במסגרת כחולה מסומנים תבדידי *Trichoderma* שתוצרי ההפרשה שלהם עכבו את גדילת פתוגן הכותנה.



איור 3 – מדידת רדיוס מושבות הפתוגן *M. phaseolina* שגודלו על גבי מצע מוצק המכיל תוצרי הפרשה של תבדידי *Trichoderma*. תנאי הניסוי כמתואר באיור 2. מדידת רדיוס המושבות בוצעה ביום 3 לגידול. ממוצעים מייצגים 5 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטית ($p < 0.05$, עמודות מודגשות בעיגול ירוק).

במבחן האחרון שבוצע בתנאי מעבדה נבדקה התפתחות הפתוגן במצע נוזלי (תרבית ניחת) כשהמצע מכיל את נוזל הגדול של תבדידי ה- *Trichoderma* (לאחר תיקון pH) ותוספת PDB. לאחר 3 ימי הדגרה ניתן היה לראות כי התבדידים P1, T1607 ו-T7107 עכבו באופן משמעותי ($p < 0.05$) את גדילת הפתוגן (איור 4).



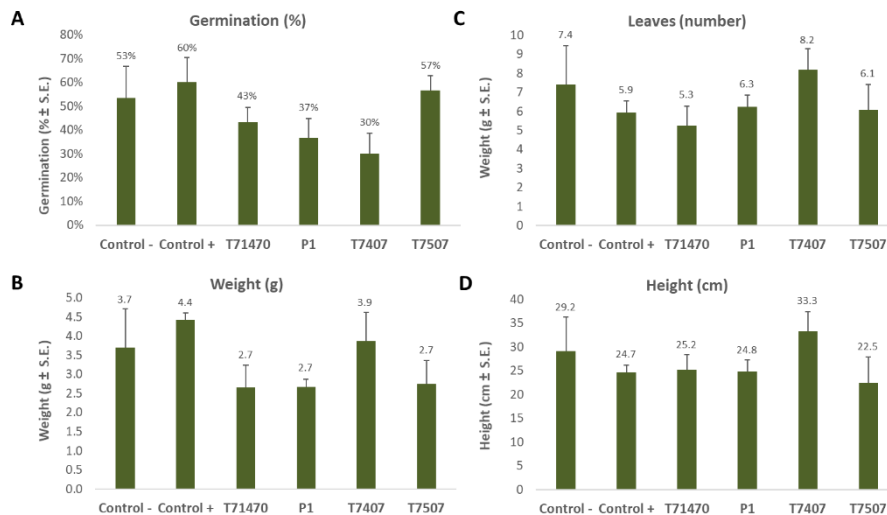
איור 4 – השפעת נוזל חוץ תאי של פטריות *Trichoderma spp.* כנגד פתוגן הכותנה, *M. phaseolina*, במצע נוזלי בתרבית ניחת. הפטרייה *M. phaseolina* נזרעה על גבי צלחות המכילו את המטבוליטים המופרשים של תבדידי *Trichoderma* (מתוארים בטבלה 1) שגדלו קודם לכן במצע נוזלי. מדידת רדיוס המושבות בוצעה ביום 3 לגידול. ממוצעים מייצגים 5 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטית ($p < 0.05$, עמודות מודגשות בעיגול ירוק).

מסיכום ניסויי המעבדה

תבדידי ה- *Trichoderma* T7407, T7507, P1 נבחרו כטיפולי הדברה שייבחנו ביישום בנבטים בעציצים. התבדיד T14707 נבחר לניסוי העציצים כביקורת שלילית (מין שככל הנראה אין לו השפעה מעכבת כלשהי כנגד הפתוגן).

2. בחינת פטריות *Trichoderma spp.* להדברת הגורם למחלת העובש השחור בכותנה, בנבטים בחדר גידול.

בניסוי זה נבחנה הדברה המבוססת על תבדידי *Trichoderma* נבחרים, בצמחי כותנה מזן פימה בעציצים, עד גיל 40 יום. אף כי לא נמצאה מובהקות סטטיסטית בין הטיפולים, או הטיפולים והביקורות, יש הבדלים ניכרים שמצביעים על יעילות של טיפולי ההדברה (איור 5). אחוזי ההצצה שנמדדו לאחר 3 ימים מהזריעה, היו גבוהים גם בביקורת המאולחת ונמוכים יחסית בטיפולי הטריכודרמה, למעט בטיפול T7507 שהשיג אחוזי הצצה דומים לביקורות. מדדי הצמיחה שנאמדו בתום הניסוי, 40 יום מהזריעה, מראים על יתרון ברור לצמחים המטופלים ב- *T. longibrachiatum* (T7407). טיפול זה, ביחס לטיפול בתבדיד הביקורת T71470, הניב שיפור של 45% במשקל הרטוב של הצמחים (הביקורת החיובית הייתה גבוהה מסיבה לא ברורה במדד זה), 32% בגובה הצמחים ו- 56% במספר העלים.



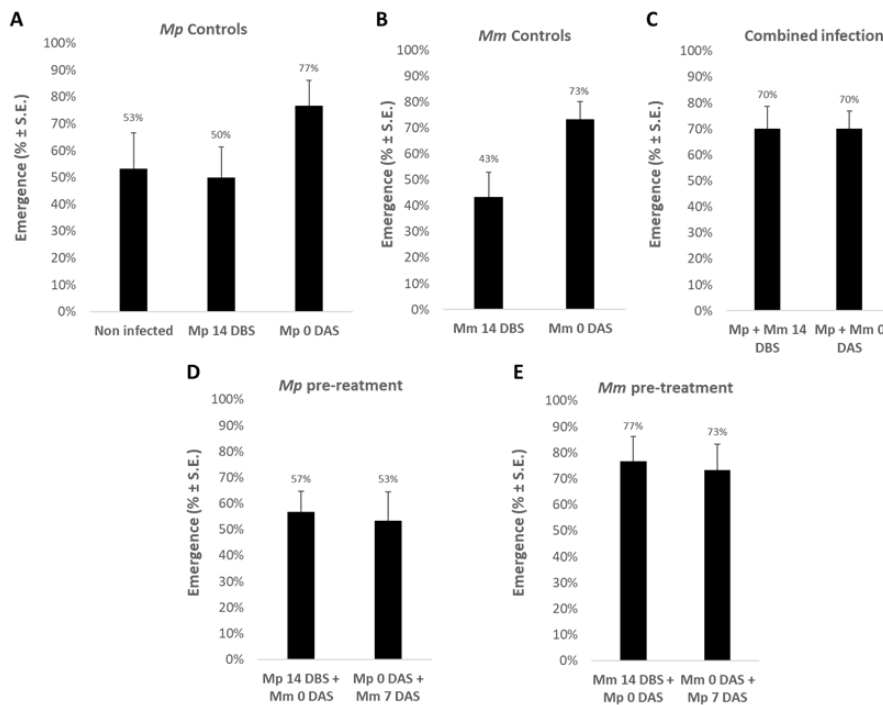
איור 5 – ההדברה כנגד מחלת העובש השחור בכותנה באמצעות פטריות *Trichoderma spp.* בנבטים בחדר גידול. נבטי כותנה מזן פימה אולחו בפטרייה *M. phaseolina* וגודלו בחדר גידול במשך 40 יום. טיפולי הדברה נעשו על ידי הוספת 3 דסקיות תפטיר (בקוטר 6 מ"מ) של תבדידי ה- *Trichoderma* (מתוארים בטבלה 1) לכל זרע עם הזריעה. אחוזי הצצה (A) נאמדו 3 ימים לאחר הזריעה. שאר מדדי הצימוח: משקל רטוב (B), מספר עלים (C) ו- גובה הצמחים (D) נמדדו ביום 40 לגידול. לא נמצא הבדל מובהק סטטיסטית בין הטיפולים או הטיפולים והביקורות.

3. הדברה מבוססת על פתוגן התירס *M. maydis*.

כאן נבדקה השפעת סדר האילוח בפתוגנים *M. maydis* ו- *M. phaseolina* על חומרת המחלה והתפתחות הפתוגנים ברקמות הצמחים הנגועים. הנושא נבדק בשני ניסויים עוקבים והתקבלו תוצאות דומות. מוצגות התוצאות של הניסוי השני שכלל תוספת טיפול של אילוח בדקירה 14 יום מהגידול להעצמת התסמינים.

3.1 השפעה על ההצצה

בדיקת הצצה שבוצעה 3 ימים לאחר הזריעה מראה כי 2 הפתוגנים פגעו בהצצה כאשר יושומו 14 יום לפני הזריעה, לעומת אילוח הקרקע עם הזריעה. ההבדל בין 2 מועדי האילוח היה שיפור של 53% באילוח ב-*M. phaseolina* ו-69% באילוח ב-*M. maydis* כאשר נעשה עם הזריעה. אילוח משולב ב-2 הפתוגנים יחד, 14 יום לפני הזריעה או ביום הזריעה, גרם לדיכוי הדדי, ולמדדי נביטה גבוהים (70% לעומת 43-50%, כאשר אולחו הצמחים בפתוגנים בנפרד 14 יום לפני הזריעה). השפעה ניכרת נמצאה גם לסדר האילוח. אילוח מוקדם של הצמחים ב-*M. maydis* (14 יום לפני הזריעה או ביום הזריעה) מנע את הפגיעה של *M. phaseolina* בנביטה (77% ו-73% לעומת 57% ו-53%, 14 יום לפני הזריעה וביום הזריעה, בהתאמה).



איור 6 – השפעת סדר האילוח בפתוגנים *M. phaseolina* ו-*M. maydis* על הצצת נבטי כותנה. נבטי כותנה מזן פימה גודלו בחדר גידול. ערכי הצצה נאמדו 3 ימים לאחר הזריעה. צמחים אולחו בנפרד או במשולב בפתוגנים *Mp* – *M. phaseolina* ו-*Mm* – *M. maydis*. DBS – ימים לפני הזריעה, DAS – ימים לאחר הזריעה. ערכים מייצגים ממוצע של 6 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.

3.2 השפעה על מדדי צימוח ביום 40 לגידול

מדדי הצימוח בגיל 40 יום מהזריעה (טבלה 2), מראים מגמות דומות לאלו של ערכי ההצצה. לאילוח מוקדם (14 יום לפני הזריעה) בכל אחד מהפתוגנים הייתה השפעה מעכבת על הצמיחה. השפעה שלילית זו הופחתה כאשר האילוח בוצע ביום הזריעה, כאשר האילוח בוצע בשני הפתוגנים יחד, או כאשר האילוח ב-*M. maydis* בוצע 14 יום לפני הזריעה והאילוח ב-*M. phaseolina* בוצע ביום הזריעה. תוספת אילוח בדקירה (במיוחד באילוח המשולב ביום הזריעה ו-14 יום אחרי הזריעה) פגע במדדי הצימוח כצפוי.

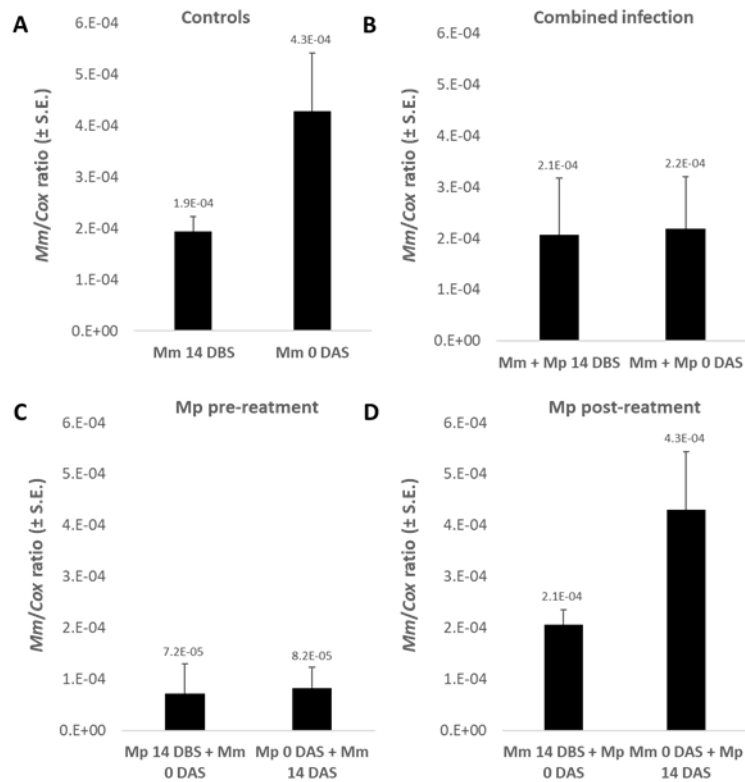
טבלה 2 – השפעת סדר האילוח בפתוגנים *M. phaseolina* ו-*M. maydis* על חומרת המחלה בבבטי כותנה
 מזן פימה, לאחר 40 יום בחדר גידול¹

	Treatment	Height (cm)	Weight (g)	Leaves (No.)	Plants (%)
<i>Mp</i> controls	Non infected	29.2 ± 7.1	3.7 ± 1.0	7.4 ± 2.0	66% ± 10%
	<i>Mp</i> 14 DBS	23.3 ± 3.3	3.8 ± 1.0	5.8 ± 0.8	43% ± 12%
	<i>Mp</i> 0 DAS	24.7 ± 1.5	4.8 ± 0.4	5.9 ± 0.2	70% ± 9%
<i>Mm</i> controls	<i>Mm</i> 14 DBS	22.9 ± 4.9	3.9 ± 0.9	6.3 ± 0.6	33% ± 11%
	<i>Mm</i> 0 DAS	26.7 ± 1.5	4.6 ± 0.3	6.0 ± 0.3	73% ± 7%
Combined infection	<i>Mp</i> + <i>Mm</i> 14 DBS	24.3 ± 1.5	4.8 ± 0.5	6.3 ± 0.3	63% ± 8%
	<i>Mp</i> + <i>Mm</i> 0 DAS	21.1 ± 1.4	4.0 ± 0.5	6.0 ± 0.4	70% ± 4%
	<i>Mp</i> + <i>Mm</i> 0 + 14 DAS St.	13.4 ± 4.2	2.1 ± 0.8	6.3 ± 1.1	40% ± 15%
<i>Mp</i> pre- treatment	<i>Mp</i> 14 DBS + <i>Mm</i> 0 DAS	23.6 ± 2.3	3.9 ± 0.6	5.3 ± 0.5	50% ± 9%
	<i>Mp</i> 0 DAS + <i>Mm</i> 14 DAS	24.7 ± 1.5	4.1 ± 0.3	5.6 ± 0.3	50% ± 12%
	<i>Mp</i> 0 DAS + <i>Mm</i> 14 DAS St.	24.6 ± 2.6	4.0 ± 0.2	5.8 ± 0.4	47% ± 11%
<i>Mm</i> pre- treatment	<i>Mm</i> 14 DBS + <i>Mp</i> 0 DAS	24.3 ± 1.8	4.5 ± 0.4	6.0 ± 0.3	70% ± 11%
	<i>Mm</i> 0 DAS + <i>Mp</i> 14 DAS	24.2 ± 1.3	4.0 ± 0.3	5.3 ± 0.3	67% ± 11%
	<i>Mm</i> 0 DAS + <i>Mp</i> 14 DAS St.	22.7 ± 2.3	3.4 ± 0.6	5.3 ± 0.5	63% ± 8%

¹ *Mp* – *M. phaseolina*, *Mm* – *M. maydis*. DBS – days before sowing, DAS – days after sowing. Values represent average of 6 replications ± standard error.

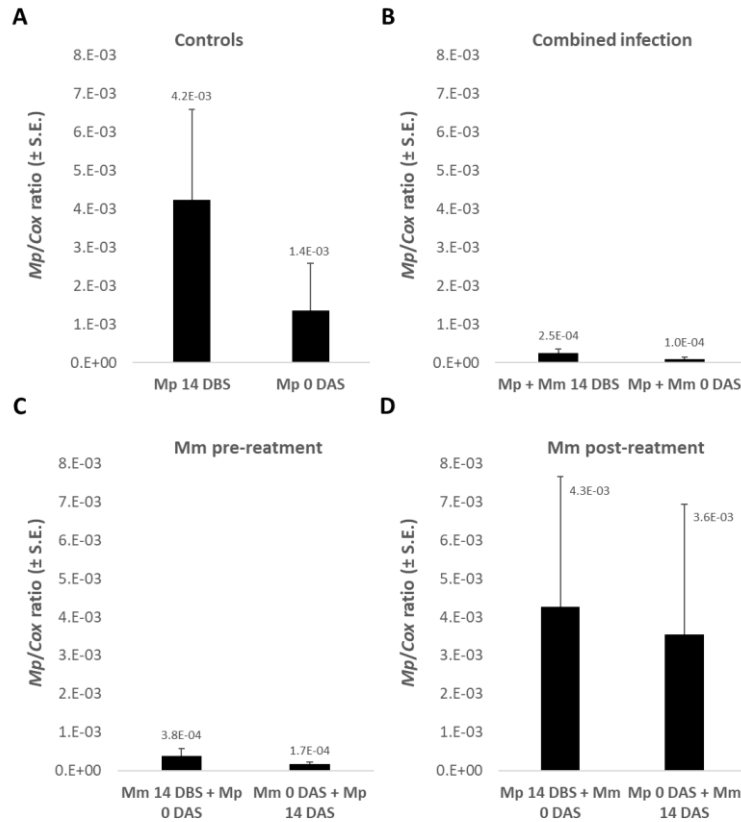
3.3 השפעה על DNA הפתוגנים בשורשי הצמחים

מעקב מולקולארי מבוסס Real-Time PCR, אחר DNA הפתוגנים *M. phaseolina* ו-*M. maydis* בשורשי הצמחים ביום 40 לגידול, מלמד ברוב המקרים על התאמה בין נוכחות הפתוגנים וחומרת התסמינים (עיכוב במדדי הצימוח). כמות ה-DNA של *M. maydis* הייתה גבוהה כאשר האילוח נעשה ביום הזריעה, לבד או לפני האילוח ב-*M. phaseolina* (שבוצע שבועיים לאחר מכך), ונמוכה במיוחד כאשר הקרקע אולחה קודם לכן ב-*M. phaseolina* (איור 7).



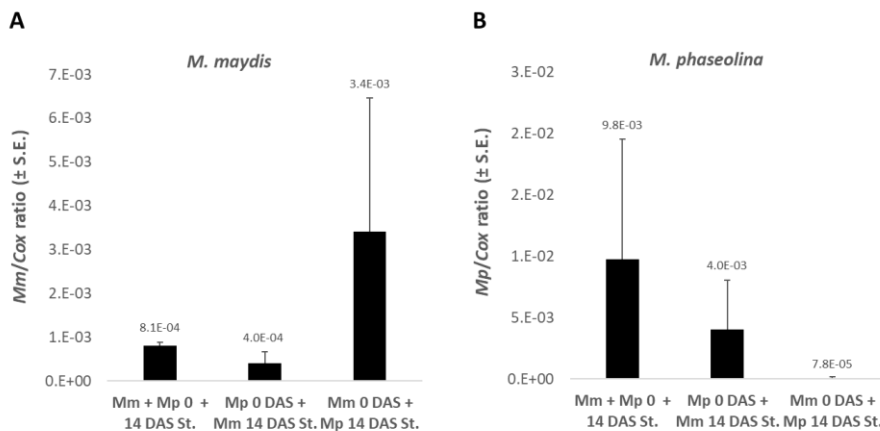
איור 7 – השפעת סדר האילוח על DNA הפתוגן *M. maydis* בשורשי הצמחים, ביום 40 לגידול. הצמחים אולחו בנפרד (A), במשולב (B), או אחד אחרי השני (C, D) בפתוגנים *Mp* – *M. phaseolina* ו- *M. maydis*. DBS – ימים לפני הזריעה, DAS – ימים לאחר הזריעה. ציר Y מציג את היחס בין מקטע DNA הספציפי של כל פתוגן לגן משק הבית המקודד לציטוכרום C אוקסידאז (COX), האנזים האחרון במערכת הנשימה התאית. ערכים מייצגים ממוצע של 6 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.

השינויים בכמות ה-DNA של הפתוגן *M. phaseolina* באותם הצמחים, היו ניכרים (איור 8). אילוח סימולטני בשני הפתוגנים או אילוח מקדים ב-*M. maydis* (14 יום לפני הזריעה או ביום הזריעה), הפחית דרמטית את כמות ה-DNA של פתוגן הכותנה.



איור 8 – השפעת סדר האילוח על DNA הפתוגן *M. phaseolina* בשורשי הצמחים, ביום 40 לגידול. תיאור הניסוי, הקיצורים והצירים כמו באיור 7.

לבסוף, תוספת אילוח בדקירה עם קיסמי עץ מאולחים, בחלק התחתון של הצמח, 14 יום לאחר הזריעה (איור 9), מראה שכש – *M. maydis* מאולח קודם לכן, מתקבלת עליה של פי 8.5 בכמות ה-DNA שלו, בהשוואה ל-DNA שלו באילוח סימולטני או באילוח מקדים ב-*M. phaseolina*. זו תמונה דומה למדי לאילוח כזה ללא דקירה (איור 7). מעניין לראות שכמות ה-DNA של *M. phaseolina* נמצאת במגמה הפוכה: כמויות כמעט אפסיות באילוח המקדים של *M. maydis* וכמויות גבוהות יחסית באילוח המשולב. תמונה זו דומה אף היא לאילוח ללא דקירה (איור 8) למעט האילוח המשולב שללא דקירה גרם לכמויות נמוכות של *M. phaseolina*.



איור 9 – השפעת אילוח בדקירה על DNA הפתוגנים *M. maydis* ו-*M. phaseolina* ביום 40 לגידול. תיאור הניסוי, הקיצורים והצירים כמו באיור 7.

מסקנות והמלצות להמשך

הדברה ביולוגית כנגד מחלות קרקע הינה בחזית המחקר המדעי בעולם וחשיבותה מתגברת [14]. בעבודה זו נסרקו 8 תבדידי טריכודרמה, בתנאי מעבדה כנגד הפתוגן *M. phaseolina*. אלו שהניבו את התוצאות הטובות ביותר בניסויים המקדימים, P1, T7407, T7507, נבחרו כטיפולי הדברה ביישום בנבטים בעציצים. בתום הניסוי, 40 יום מהזריעה, הטיפול ב- *T. longibrachiatum* (T7407) הניב שיפור ניכר במשקל הרטוב של הצמחים, בגובה הצמחים ובמספר העלים בהשוואה לביקורת.

בנוסף נבחן שימוש ב- *M. maydis*, אנדופיט בצמחי כותנה, כמדביר ביולוגי פוטנציאלי כנגד מחלת הריקבון השחור בכותנה. כאן נמצא שאילוח סימולטני בשני הפתוגנים או אילוח מקדים ב- *M. maydis* (14 יום לפני הזריעה או ביום הזריעה), הפחית דרמטית את כמות ה-DNA של פתוגן הכותנה ושיפר את מדדי הצימוח.

התוצאות ההקדמיות שהושגו בעבודה זו מצביעות על כדאיות ברורה להמשך המחקר וביסוסו בתנאי שדה בעונת גידול מלאה. עבודת המשך דומה נעשתה לאחרונה בהתייחס למחלת הנבילה המאוחרת בתירס [5,15]. הבשלת ההדברה הביולוגית כנגד הגורם למחלת הריקבון השחור ומיצוי הפוטנציאל הגלום בה, הינם בעלי ערך רב. יש לשקול שילוב מדבירים ביולוגים שונים להעצמת יעילות הטיפולים. כמו כן יש לקחת בחשבון שבמקרים קשים יעילותה של הדברה ביולוגית עשויה להיות מוגבלת ויש לבחון את היישום הביולוגי במשולב עם הדברה כימית, כפי שהוצע לאחרונה [9]. אסטרטגיה זו מצריכה בחינה מוקדמת של עמידות המדבירים הביולוגים לטיפולים הכימיים. חשיבותה של הדברה משולבת ביולוגית-כימית היא בכך שהיא מפחיתה משמעותית את השימוש בתכשירי הדברה, תוך שמירה על יעילות גבוהה.

רשימת ספרות

1. Cohen, R. *Macrophomina phaseolina*, a multi-host soil fungus: on similarities and differences in the interactions with *Cucurbitaceae* and *Gossypium hirsutum* (cotton) plants. In Proceedings of the The 5th conference of the Israel society of crop and vegetable sciences, Ministry of Agriculture and Rural Development, Beit-Dagan, Israel, 5-6 March 2018, 2018.
2. Kaur, S.; Dhillon, G.S.; Brar, S.K.; Vallad, G.E.; Chand, R.; Chauhan, V.B. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Crit Rev Microbiol* **2012**, *38*, 136-151, doi: [10.3109/1040841X.2011.640977](https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.640977).
3. Dor, S.; Degani, O. Uncovering the Host Range for Maize Pathogen *Magnaportheopsis maydis*. *Plants (Basel)* **2019**, *8*, doi: [10.3390/plants8080259](https://doi.org/10.3390/plants8080259).
4. Degani, O.; Dor, S.; Abraham, D.; Cohen, R. Interactions between *Magnaportheopsis maydis* and *Macrophomina phaseolina*, the Causes of Wilt Diseases in Maize and Cotton. *Microorganisms* **2020**, *8*, 249, doi: [10.3390/microorganisms8020249](https://doi.org/10.3390/microorganisms8020249).
5. Degani, O.; Dor, S. *Trichoderma* Biological Control to Protect Sensitive Maize Hybrids Against Late Wilt Disease in the Field. *Journal of Fungi* **2021**, *7*, 315, doi: [10.3390/jof7040315](https://doi.org/10.3390/jof7040315).
6. Degani, O.; Dor, S.; Chen, A.; Orlov-Levin, V.; Stolov-Yosef, A.; Regev, D.; Rabinovitz, O. Molecular Tracking and Remote Sensing to Evaluate New Chemical Treatments Against the Maize Late Wilt Disease Causal Agent, *Magnaportheopsis maydis*. *J Fungi (Basel)* **2020**, *6*, 54, doi: [10.3390/jof6020054](https://doi.org/10.3390/jof6020054).
7. Degani, O.; Dor, S.; Movshowitz, D.; Fraidman, E.; Rabinovitz, O.; Graph, S. Effective chemical protection against the maize late wilt causal agent, *Harpophora*

- maydis*, in the field. *PloS one* **2018**, *13*, e0208353, doi:10.1371/journal.pone.0208353.
8. Degani, O.; Movshowitz, D.; Dor, S.; Meerson, A.; Goldblat, Y.; Rabinovitz, O. Evaluating Azoxystrobin Seed Coating Against Maize Late Wilt Disease Using a Sensitive qPCR-Based Method. *Plant Dis* **2019**, *103*, 238-248, doi: [10.1094/PDIS-05-18-0759-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0759-RE).
 9. Ons, L.; Bylemans, D.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.A. Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1930, doi: [10.3390/microorganisms8121930](https://doi.org/10.3390/microorganisms8121930).
 10. Degani, O.; Dor, S.; Movshovitz, D.; Rabinovitz, O. Methods for Studying *Magnaportheopsis maydis*, the Maize Late Wilt Causal Agent. *Agronomy* **2019**, *9*, 181, doi: [10.3390/agronomy9040181](https://doi.org/10.3390/agronomy9040181).
 11. Samuels, G.J.; Ismaiel, A.; Bon, M.-C.; De Respini, S.; Petrini, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* **2010**, *102*, 944-966, doi: [10.3852/09-243](https://doi.org/10.3852/09-243).
 12. Gal-Hemed, I.; Atanasova, L.; Komon-Zelazowska, M.; Druzhinina, I.S.; Viterbo, A.; Yarden, O. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and environmental microbiology* **2011**, *77*, 5100-5109, doi: [10.1128/AEM.00541-11](https://doi.org/10.1128/AEM.00541-11).
 13. Degani, O.; Danielle, R.; Dor, S. The microflora of maize grains as a biological barrier against the late wilt causal agent, *Magnaportheopsis maydis*. *Agronomy* **2021**, doi: [10.3390/agronomy11050965](https://doi.org/10.3390/agronomy11050965).
 14. Kumar, K.K.; Sridhar, J.; Murali-Baskaran, R.K.; Senthil-Nathan, S.; Kaushal, P.; Dara, S.K.; Arthurs, S. Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects. *Journal of invertebrate pathology* **2019**, *165*, 74-81, doi: [10.1016/j.jip.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008).
 15. Degani, O.; Rabinovitz, O.; Becher, P.; Gordani, A.; Chen, A. *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma asperellum* Confer Growth Promotion and Protection against Late Wilt Disease in the Field. *Journal of Fungi* **2021**, *7*, 444, doi: [10.3390/jof7040315](https://doi.org/10.3390/jof7040315).