

**שיפור יבולים והקניית עמידות לעקות במספר גידולים חקלאיים באמצעות הפטרייה  
הסימביונטית *Sebacina vermifera* ו/או תכשירי חיידקים מעודדי צמיחה**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף ירקות

על ידי:

עוז ברזני (חוקר ראשי)	המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני
ניר דאי	המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני
דוד עזרא	המכון להגנת הצומח, מרכז וולקני
מיכל ברזילי	מכון למדעי הצמח, מרכז וולקני
אנאית מט	מכון למדעי הצמח, מרכז וולקני
יורם קפולניק	מכון למדעי הצמח, מרכז וולקני
גמליאל אברהם	המכון להנדסה חקלאית, מרכז וולקני
יעקב אוקון	הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית

Oz Barazani, Dept. of Vegetable Research, Institute of Plant Sciences, Bet Dagan 50250. E-mail:  
barazani@ agri.gov.il

Nir Dai, Dept. of Vegetable Research, Institute of Plant Sciences, Bet Dagan 50250. E-mail: nirdai@  
agri.gov.il

David Ezra, Dept. of Plant Pathology and Weed Research, Institute of Plant Protection, Bet Dagan  
50250. E-mail: dezra@ agri.gov.il

Michal Barzilaj, Dept. of Vegetable Research, Institute of Plant Sciences, Bet Dagan 50250. E-mail:  
michal@ agri.gov.il

Anahit Mett, Dept. of Vegetable Research, Institute of Plant Sciences, Bet Dagan 50250. E-mail:  
amett@ agri.gov.il

Yoram Kapulnik, Dept. of Agronomy and Natural Resources, Bet Dagan 50250. E-mail: kapulnik@  
agri.gov.il

Gamliel Abraham, Dept. of Growing, Production and Environmental Engineering, Institute of Agricultural  
Engineering, Bet Dagan 50250. E-mail: agamliel@ agri.gov.il

Yaacov Okon, Department of Plant Pathology and Microbiology, Faculty of Agricultural Food and  
Environmental Quality Sciences, The Hebrew university of Jerusalem. E-mail: okon@agri.huji.ac.il

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים  
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר הראשי: 

## 1. תקציר:

בשנת הפעלת המחקר הראשונה התמקדה העבודה בביסוס מערכות הניסוי עם המיקוראורגניזמים הנבחנים בניסויי חממה ושדה- בבחינה של ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית *Sebacina vermifera* על צמחי עגבנייה ומלפפון, ובחינת ההדבקה בתכשיר נבגים של *Penicillium bilaii* על צמחי תירס וסורגום. הניסויים נערכו ברובם בעציצים בתנאי חממה; השפעת *P. bilaii* על צמחי תירס נבחנה גם בניסוי שדה בצאלים. השפעה מיטיבה של הפטרייה *S. vermifera* נמצאה רק בצמחי עגבנייה ומלפפון שגדלו בחול ולא באלו שגדלו באדמת עציצים (שחם) או בטוף מועשר בכבול. תוצאות אלו שבאו לידי ביטוי בגובה הצמחים מרמזות כי ההשפעה המיטיבה של הפטרייה קשורה ביכולת קליטת יסודות ההזנה. אולם, לפטרייה לא הייתה כל השפעה על משקל הנצר הטרי והיבש של צמחי עגבנייה ומלפפון שגדלו בחול, כמו גם בשני מצעי הגידול האחרים. תוצאות אלו תומכות בהנחה כי ההשפעה המיטיבה של הפטרייה קשורה בקצב צימוח מהיר הנובע משינוי מאזן ההורמונאלי בצמח. ההשפעה של הפטרייה *P. bilaii* על צמחי תירס וסורגום נבחנה במשטרי זרחן שונים, בניסויי חממה ושדה. בכל מערכות הניסויים לא נמצאה כל השפעה על הצמחים במדדי הצמיחה שנבחנו. תוצאות אלו מלמדות כי לתכשיר זה אין השפעה על צמחי המבחן בתנאים הקיימים בארץ, ולכן יבחנו בשנת המחקר הבאה תכשירי חיידקים אחרים שיובאו מחו"ל. בנוסף, תתמקד העבודה עם הפטרייה האנדופיטית *S. vermifera* בשנת המחקר הקרובה בבחינת ההשפעה על יכולתה לשפר את מידת התמודדות הצמח עם עקות אביוטיות. צמחים יחשפו לעקות מלח ברמות שונות ויבחנו מדדי צימוח. בנוסף נבחן את ההשפעה כי המנגנונים המעורבים קשורים בשפעול של המערכת האנטי-אוקסידנטית בצמח על ידי הפטרייה. אלו יבחנו על ידי מדידות של רמות ROS בצמחים החשופים לעקת המלח, ומדידת רמת הפעילות של אנזימים הקשורים במערכות ההגנה כנגדם. ננסה גם לפתח דרכים לזיהוי וכימות רמת המידבק על מנת לפתח מערכת לבחינת ההשפעה של רמת המדבק על מידת יכולת התכשירים השונים לשפר צימוח.

## 2. מבוא:

העלייה הדרסטית במחירי התשומות לחקלאות וצמצום השימוש בתכשירים כימיים, שלהם אנו עדים בשנים האחרונות, מחייבת את המחקר החקלאי לאתר ולפתח חלופות חדשות של אמצעים ביולוגיים יעילים וזולים להגדלת יבולים, הקניית עמידות צמחים לעקות, ולהשאת יעילות קליטת המינרלים מהקרקע. בטבע קיימים מיקוראורגניזמים היכולים לסייע לצמח בשיפור צמיחה ובניצול טוב יותר של בית גידולו (Plant Growth Promoters- PGP). על אף שבעבר נבחנו ואף הוכנסו לשימוש בחקלאות תכשירים מיקרוביאליים מוצלחים כגון חיידקי ריזוביום ופטריית הטריכודרמה, נראה שהיום יותר מתמיד, יש הצדקה בבחינה של מיקוראורגניזמים המשפיעים על תהליכים בצמח וסביבתו. עקב הפיתוח המואץ שנעשה בתחום התכשירים הביולוגיים בעולם יש הכרח באיתור ובבחינה מחדש של תבדידים חדשים ו/או תואריות (פורמולציות) המזמנות טווח יישומים בעלי יעילות (cost effective) רחבים יותר.

השפעתם המיטיבה של PGP מתייחסת בהרבה מהמקרים לשינוי המאזן ההורמונאלי בצמח (5-1 ואחרים). שלא כמותם, עידוד צמיחה על ידי הדבקה של צמחי טבק בפטרייה האנדופיטית *S. vermifera*,

נגרם כתוצאה מעיכוב של ביטוי של גנים המעורבים בסינתזת אתילן בצמח (3). תהליך זה שגורם לעיכוב עקיף או ישיר בסינתזה של אתילן בצמחים וגורם לשינוי המאזן ההורמונאלי בו, גורם מצד אחד לעידוד צמיחה אך גם להקניית עמידות כנגד עקות סביבתיות שונות (4). כמו כן, נראה שגידול במערכת השורשים כתוצאה מעידוד הצמיחה תורם להקניית עמידות לתנאי סביבה קשים במערכות טבעיות וחקלאיות, בהם לצמחים מודבקים יהיה יתרון על פני צמחים לא מודבקים בתחרות על משאבים מוגבלים. השפעתם של תכשירי חיידקים מסחריים נבחנת ביכולתם לשפר את זמינות יסודות המזון העיקריים (חנקן, זרחן ואשלגן) בצמח.

בניגוד למיקרואורגניזמים סימביוטיים, כמו פטריות האקטו-מיקוריזה וחיידקים קושרי חנקן, שלהם טווח מצומצם של פונדקאים, ל-PGP כולל הפטריות האנדופיטיות *Sebacina vermifera* קשר עם טווח רחב של מיני צמחים. במערכת ניסויים עם צמחי טבק, תרמו שתי האחרונות לצמיחה מהירה של עמודי התפרחת, עלייה בביימוסה, ולעלייה ביבול ההלקטים (3, 6). בשורה ארוכה אחרת של מחקרים, הוכחה תרומתה של הפטרייה האנדופיטית *P. indica* לעידוד צמיחה והגדלת יבולים של צמחי תרבות שונים (7-10 ואחרים). לאחרונה, בניסוי שדה שנערך בגרמניה הוכח אף שהפטרייה הגדילה את שיעור הצמיחה של צמחי שעורה ובעקבות כך לשיפור היבול ללא תלות במשטרי הזנה (11). בנוסף, מוכרים ומשווקים כיום פורמולציות שונות של חיידקי קרקע משפרי צמיחה מטיפוסים שונים. תוכנית מחקר זו עוסקת בבדיקת יעילותם של פטרייה אנדופיטית *Sebacina vermifera*, ושל תכשירים מיקרוביאליים הקיימים בשוק.

### 3. פירוט עיקר הניסויים ומסקנותיהם:

#### א. מערך ניסויים עם הפטרייה *Sebacina vermifera*

בהצעת המחקר הוצע לבחון את ההשפעה של הפטרייה *S. vermifera* (Sv) על מספר גידולים חקלאיים בעלי חשיבות כלכלית. בשל הצורך להוכיח את תרומת הפטרייה לטווח גידולים רחב נבחרו ארבעה גידולים לשמש כצמחי בוחן: (1) חיטה - כנציג משפחת הדגניים; (2) תות שדה - כנציג של משפחת הורדניים; (3) פלפל - כנציג משפחת הסולניים; (4) מלון - כנציג הדלועיים. מערך הניסויים שהוצע כלל מבחנים בתנאי מעבדה וחדרי גידול מבוקרים, ופיתוח פורמולאציה של הפטרייה שתיבדק בשלב מתקדם יותר של המחקר בניסויי שדה.

לאור הצלחה חלקית של הניסויים עם הפטרייה בחדרי הצמיחה היה ברור שהניסויים צריכים להתבצע בעציצים גדולים בתנאי חממה. לצורך כך הגשנו בקשה לאישור של ניסויי חממה לשירותים להגנת הצומח ולביקורת. תהליך זה שלקח כמה חודשים שבהם הצטרכנו להתאים את החממה של ד"ר ד. עזרא (שותף בתוכנית זו) לתקנים, אושר לבסוף בתאריך 11.4.10. לאור זאת, דו"ח התקדמות זה מסכם מספרי ניסויי חממה שנערכו עד כה.

בניסוי חממה ראשון בעציצים נבחנה ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית על צמחי עגבנייה שרי מטיפוח המכון ומלפפון זן בלדי פתוח. דרך ההדבקה בפטרייה נעשה בשלבי הנביטה של הזרעים על גבי מצע Gamborg (GB5) שהוכן על פי הוראות היצרן (Duchefa). המצעים אולחו בתרבית נקייה של קורי הפטרייה כשבוע לפני הנחה של זרעים סטריליים. סטריליזציה של הזרעים התבצעה בתמיסת היפולכלורית בריכוז 1% למשך 7 דקות ולאחריה שטיפה במים מעוקרים. זרעים הונחו בקופסאות מג'נטה על גבי מצעים מודבקים או נקיים (ביקורת). כחמישה ימים לאחר ההנבטה הועברו הנבטים לעציצים בנפח

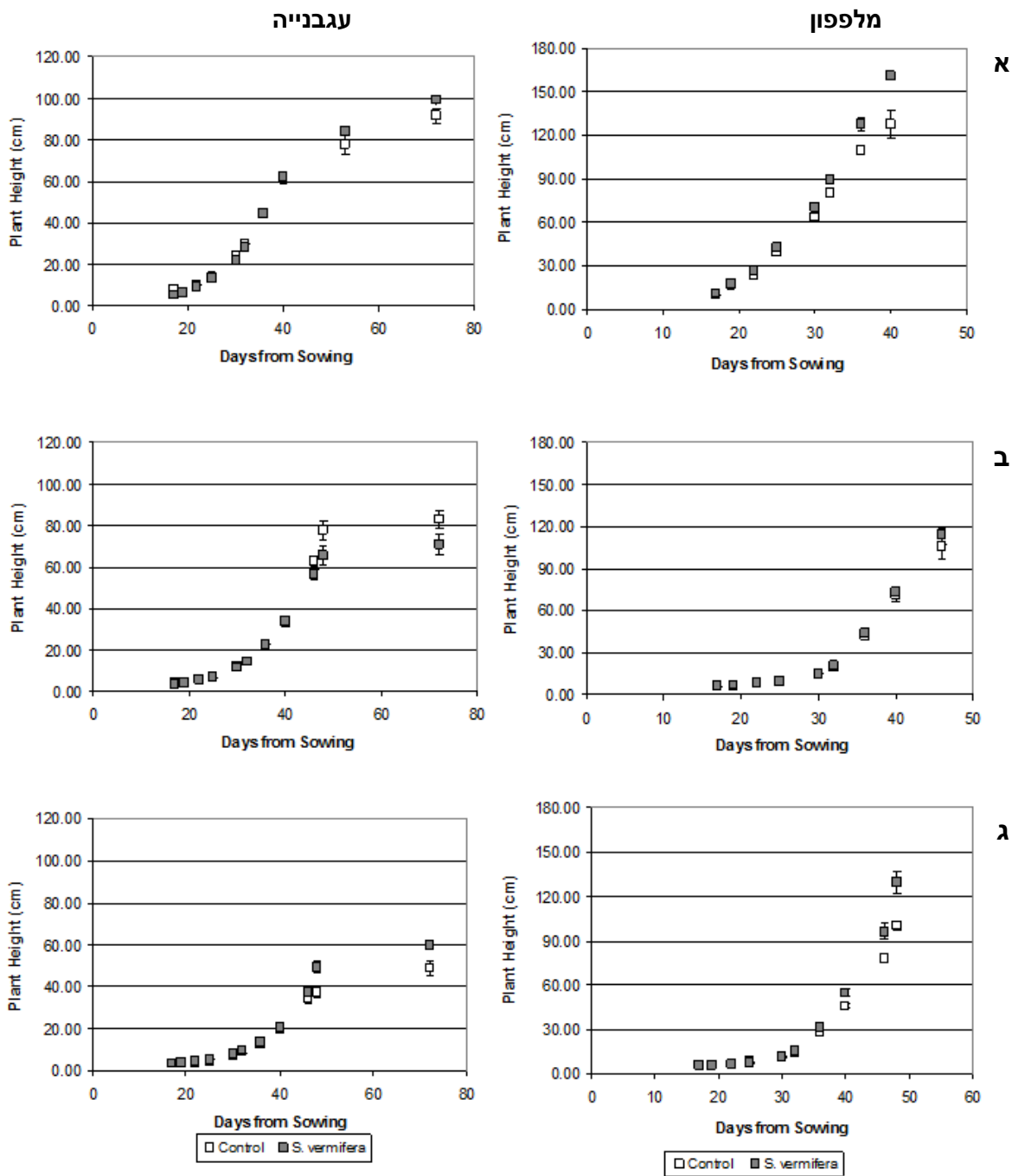
של 1 ל' עם תערובת עציצים, טוף וכבול ביחס של 1:3, או חול (תמונה 1). הצמחים הושקו באמצעות מערכת ממוחשבת פעם ביום בנפח של 100 מ"ל שאפשר קבלת נקז; וצמחים גודלו בטמפרטורה ממוצעת של 25 מעלות צלסיוס (יום ולילה). פעם בשבוע הושקו כל הצמחים בנפח זהה (100 מ"ל) של תמיסת דשן (אור 4-2-6 + 6% יסודות מיקרו + סידן + מגנזיום, דשן גת) 1.5 מ"ל/ליטר. מדידות של קצב הצימוח, משקל טרי ויבש של הנצר שימשו להערכת מידת ההשפעה של הפטרייה על הצמיחה.



**תמונה 1.** מראה כללי של מערך הניסוי עם צמחי המלפפון. משמאל צמחים הגדלים באדמת עציצים בהשוואה לצמחים הגדלים בחול.

כצפוי צמחים שגדלו בתערובת אדמת עציצים (שחם) התפתחו טוב יותר מאשר צמחים שגדלו בטוף או חול (איור 1, תמונות 1-3). אולם, השפעת הפטרייה על הצמיחה של צמחי עגבנייה ומלפפון הייתה שונה במצעים השונים. ממדידה של גובה צמחי עגבנייה שגדלו בתערובת של אדמת עציצים, נראה כי בסוף הניסוי (72 יום מהנביטה) לא היו הבדלים בין צמחים המודבקים בפטרייה לצמחי הביקורת הלא מודבקים ( $F_{1,12}=4.16$ ,  $P=0.06$ ). צמחים שגדלו בטוף, לעומת זאת, היו צמחי הביקורת לאחר 72 יום גבוהים פי 1.18 מצמחים מודבקים, אך גם הבדלים אלו לא היו מובהקים סטטיסטית ( $F_{1,12}=3.30$ ,  $P=0.09$ ). לעומתם, הבדלים צמחי עגבנייה מודבקים שגדלו בחול היו גבוהים באופן מובהק מצמחי הביקורת הלא מודבקים. הבדלים אלו החלו להתבטא כ- 50 יום מהנביטה, ובתום הניסוי היו הצמחים המודבקים גבוהים פי 1.2 ( $F_{1,12}=7.61$ ,  $P=0.01$ ) מצמחי הביקורת (איור 1, תמונה 1).

מערכת הניסוי עם צמחי המלפפון הסתיימה כאשר הצמחים הגיעו לגובה התקרה של חדר הצמיחה. בגלל הבדלים בהתפתחות הצמחים על גבי מצעי הגידול השונים (תמונה 1, איור 1) הופסק הניסוי במועדים שונים. בדומה לניסוי ההדבקה של צמחי העגבניות, הייתה ההשפעה של הפטרייה על הצימוח מובהקת רק בחול שבו בתום הניסוי (48 יום מהנביטה) היו הצמחים המודבקים גבוהים באופן מובהק פי 1.3 ( $F_{1,12}=11.33$ ,  $P<0.01$ ) מצמחי הביקורת (איור 1). חשוב לציין כי בשני צמחי המבחן לא נמצאו הבדלים במשקל הנצר בין צמחים מודבקים לצמחי ביקורת, הן ממדידת המשקל הטרי והן היבש, בכל אחד משלושת מצעי הגידול. איור מס' 2 מציג את תוצאות המשקל היבש של הנצר של צמחים שגדלו בחול. משקל השורשים לא ניתן היה למדידה בגלל הקושי להפריד אותם מן המצע.



**איור 1.** ההשפעה של הפטרייה *S. vermifera* על התארכות צמחי מלפפון ועגבנייה באדמת עציצים (א), תערובת טוף וכבול (ב) וחול (ג). התוצאות מציגות ממוצע ושגיאת התקן של שבעה צמחים לכל טיפול.



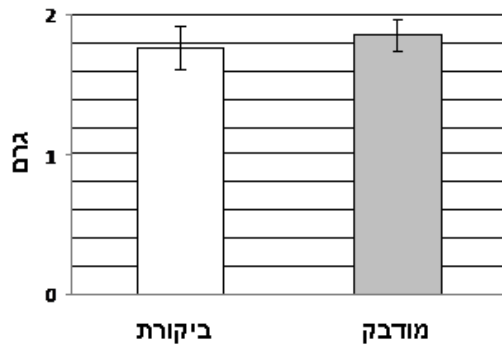
מודבק      ביקורת



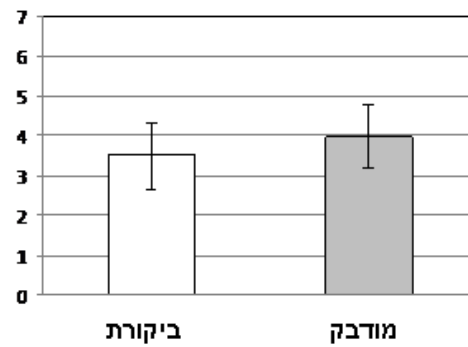
מודבק      ביקורת

**תמונה 2.** ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית על צמחי עגבנייה שגדלו בתערובת של אדמת עציצים (שמאל), וחול (ימין).

**עגבנייה**

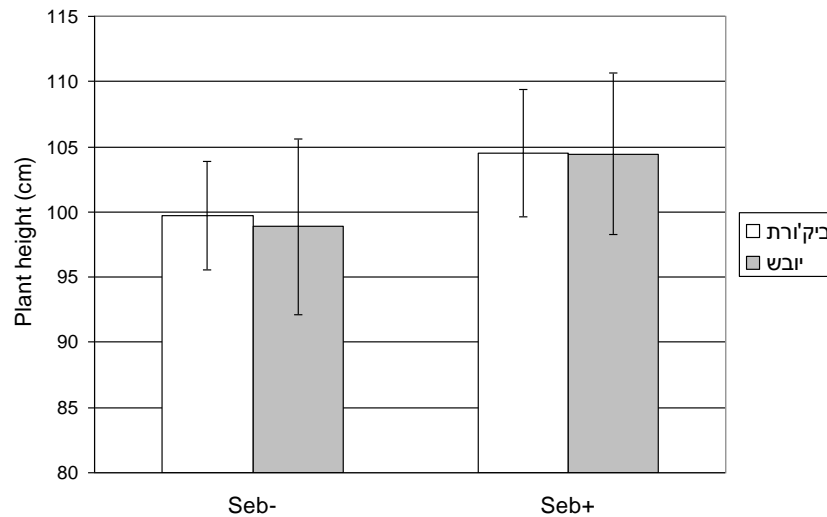


**מלפפון**



**איור 2.** ההשפעה של הדבקה של צמחי מלפפון ועגבנייה על משקל היבש של הנצר. התוצאות מציגות ממוצע ושגיאת תקן של שבעה צמחים שנקצרו בתום מערך הניסוי.

במערך ניסוי שני, נבחנה ההשפעה של הדבקה בפטרייה האנדופיטית על צמחי מלפפון בחול, שכלל גם טיפול של יובש מתון. לאחר ההעברה של הנבטים לעציצים הם הושקו באמצעות מערכת טפטוף (ראה לעיל). כחודש לאחר מכן, הוסרו הטפטפות באופן אקראי ממחצית הצמחים. הצמחים שנחשפו ליובש הושקו פעם בשבוע ולאחר כחודש נוסף פעמיים בשבוע. פעם בשבוע הוספה להשקיה של כל הצמחים תמיסת דשן כמתואר לעיל. התוצאות של הניסוי המתוארות באיור מספר 3 מרמזות כי לא נמצאו הבדלים בגובה הצמחים בין טיפול היובש לביקורת, הן בצמחים שלא הודבקו בפטרייה והן באלו המודבקים. בניגוד לניסוי הקודם לא נמצאו גם הבדלים בין צמחים מודבקים בפטרייה לצמחים שלא הודבקו (איור 3). מכיוון שהמגמה של עידוד הצמיחה של שני צמחי המודל כפי שנבחנה בניסוי הקודם (איור 1) מחזקת תוצאות של עבודות אחרות (כמפורט במבוא), נראה כי בעיות טכניות שנתקלנו בהן במהלך ניסוי זה הן המקור להבדלים בתוצאות שבין הניסויים. כך, נקז של מי השקיה מעציצי הביקורת תרם לחלחול של מים מתחתית עציצים שנחשפו ליובש, שיתכן שגרם גם למעבר של קורי פטרייה בין העציצים.



**איור 3.** גובה צמחי מלפפון מודבקים בפטרייה האנדופיטית (Seb+) וצמחי ביקורת לא מודבקים (Seb-) תחת תנאי השקיה אופטימאליים (ביקורת) ובעקת מים מתונה (יובש).

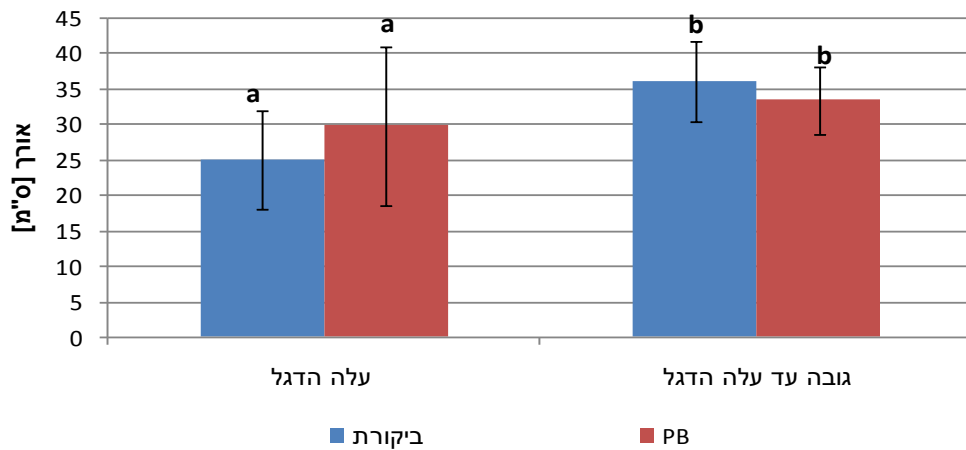
**מסקנות:** העובדה שהפטרייה השפיעה על הצימוח בחול אך לא בטוף מועשר בכבול, או תערובת עציצים מרמזת כי השפעת הפטרייה קשורה ביכולת קליטת יסודות ההזנה. אולם, לפטרייה לא הייתה כל השפעה על ייצור הביומסה העל קרקעית. תוצאות אלו מחזקות תוצאות מחקר קודם כי ההשפעה של הפטרייה על גובה הצמחים קשורה בשינוי המאזן ההורמונאלי בצמח (3). נראה לכן כי להקדמת מועד הפריחה יכולה להיות השפעה בשיפור רמת היבולים.

בשנת המחקר הבאה יתמקד המחקר בתרומת הפטרייה האנדופיטית על צמחים החשופים לעקת מלח ובירור המנגנונים המעורבים בכך. בנוסף ייעשה ניסיון לפתח מדדים כמותיים להערכה של רמת ההדבקה בפטרייה על מנת לבסס מערכת ניסוי של מידת ההשפעה של רמת המדבק על הצימוח של צמחי המבחן.

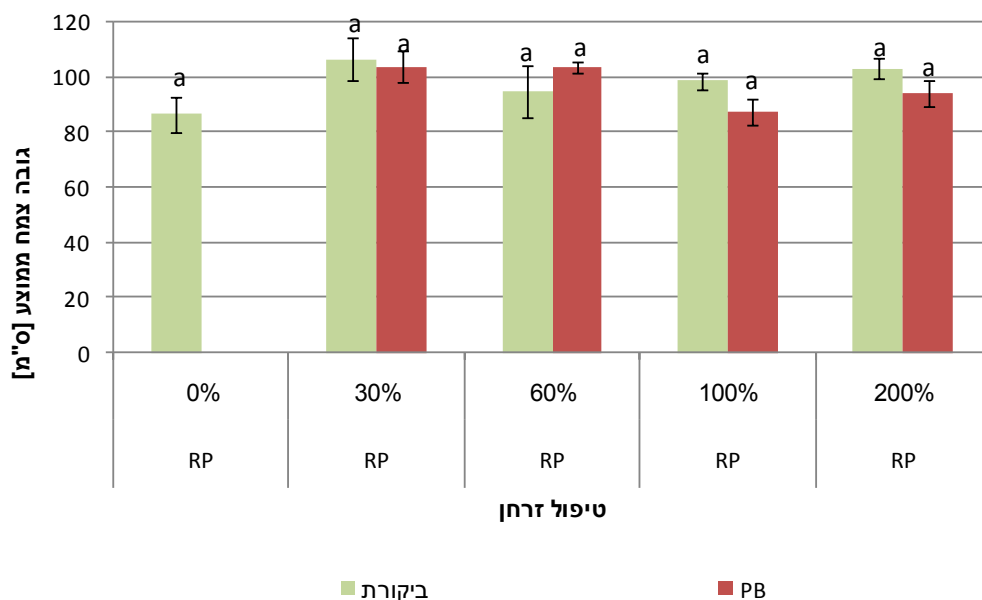
### **ב. מערך ניסויים עם תכשירי הפטרייה *Penicillium bilaii***

מטרת הניסויים בשנת המחקר הראשונה הייתה לבדוק את תרומת הפטרייה *Penicillium bilaii* שיושמה כתכשיר מסחרי ("Jump start") המכיל נבגים, להזנת צמחים בזרחן. התכשיר יושם במספר ניסויים ונבדקו מדדי גידול שונים. נערכו ניסויי חממה ושדה לבדיקת התכשיר.

**ניסוי חממה בתירס וסורגום** – הניסויים נערכו בחממה מבוקרת במנהל המחקר החקלאי שבו נבחנה תרומת הפטרייה על מדדי הצימוח של צמחי תירס (הזן - Royalty), צמחי סורגום (BMR 301, חברת תרסיס) ומקור הזרחן בלעדי היה סלע פופסט (Rock phosphate) שאינו זמין לצמח. כמו כן נבדקו רמות הזרחן הבאות שיושמו כסופר פוספט: 0, 13, 27, 45, 90 (P מ"מ). הצמחים גודלו בדליים של 5 ליטר המכילים מצע חול:וירמיקוליט (1:1). תמיסת דשן בריכוז 7:0:7 (שפר כימיקלים) ניתנה מידיי שבוע בריכוז של 5 ppm. מעקב אחר התפתחות הצמחים, (תירס וסורגום) ויבולם מלבד כי בתום הגידול נראה כי הצמחים הושפעו מרמת הזרחן הזמין בקרקע לא הייתה לפטרייה כל השפעה מובהקת על התפתחות הסורגום בניסוי זה (איור 4 ואיור 5).



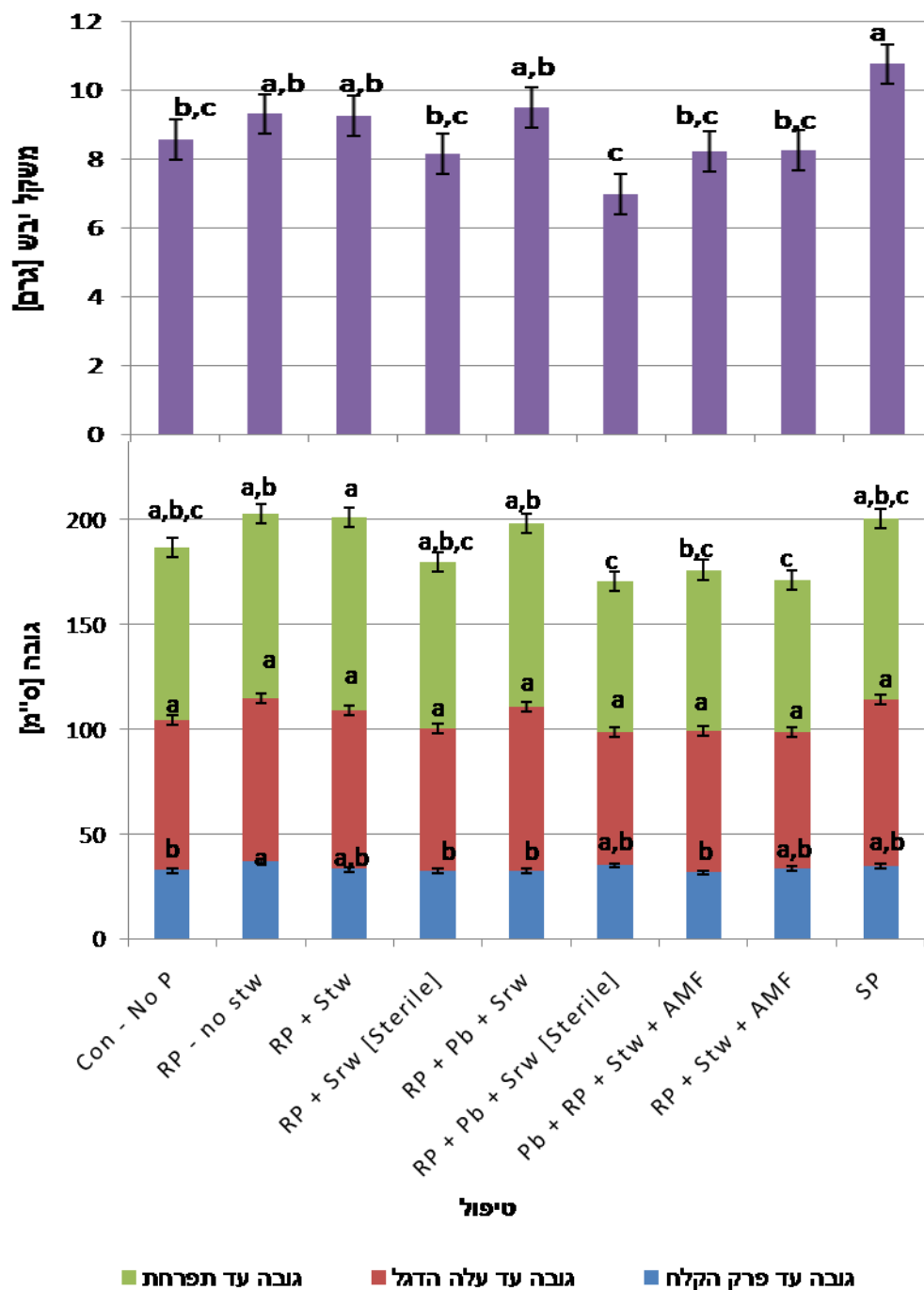
**איור 4.** תרומת הפטרייה *Penicillium Bilaii* על מדדי הצימוח של צמחי תירס בתוספת סלע פוספט בריכוז 45 ppm זרחן בלעדי. הניסוי נערך בתנאי חממה



**איור 5.** תרומת הפטרייה *Penicillium Bilaii* על גובה צמחי סורגום אשר נמדדו לאחר 12 שבועות גידול בתנאי חממה בתוספת סלע פוספט בריכוזים משתנים כמקור זרחן בלעדי.

במטרה לבחון את השפעת התכשיר בשילוב עם מדבק המכיל פטרייה היוצרת מיקוריזה (*Arbuscular mycorrhiza fungi*), נערך ניסוי חממה נוסף בתירס כצמח מודל. הניסוי כלל שימוש בדשן זרחני מסוג סופר-פוספט (Super phosphate) בריכוז 45 P ח"מ ומדבק מיקוריזה מין *Glomus intraradices*. יישום הפטרייה *Penicillium Bilaii* התבצע בניסוי זה באמצעות גידולה על "מצע קש" (כמקור פחמן) למשך שבועיים ויישומה למצע הגידול כ-4 ס"מ מתחת לפני הזרע. הצמחים גודלו במשך 10 שבועות ולאחר נקצרו והועברו לייבוש. נראה כי לא קיימת השפעה מובהקת של הטיפולים על גובה הצמחים או משקלם (איור 6).

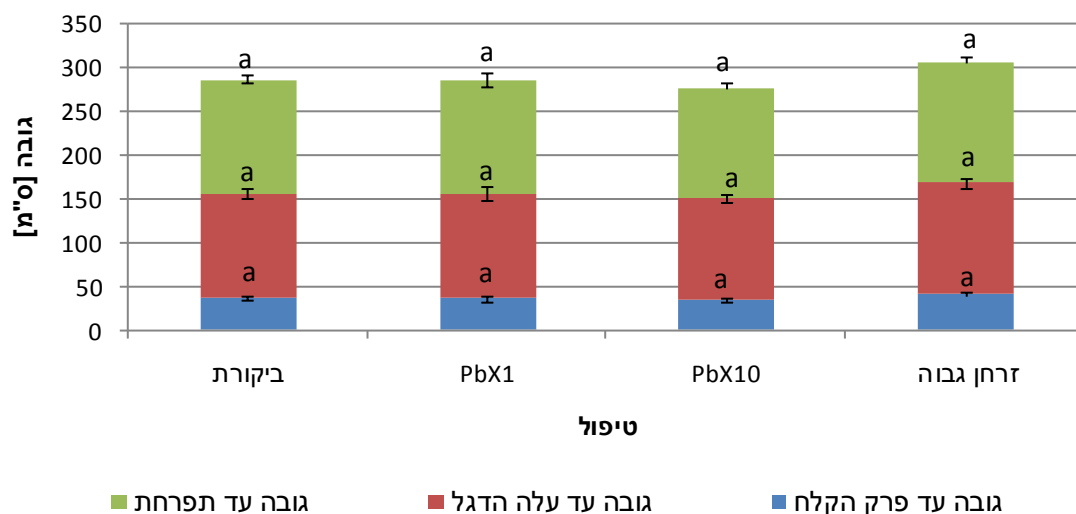




**איור 6.** תרומת הפטרייה *PB=Penicillium Bilaii* על מדדי הצימוח של צמחי תירס שגדלו בחממה. למצע הוסף סלע פוספט (RP) או דשן סופר-פוספט (SP) כמקור זרחן בלעדי. התכשיר עורבב בקש טחון (Stw) ויושם במצע השתילה. בחלק מהטיפולים התבצע עיקור של המצע טרם החדרת הפטרייה (Sterile). כמו-כן בחלק מהטיפולים הוסף לתכשיר מדבק המכיל פטריית מיקוריזה (AMF).

ניסוי שדה בתירס – במטרה לבחון את יעילות התכשיר בתנאי שדה, נערך ניסויי שדה בקיבוץ צאלים. התכשיר יושם על-גבי זרעי תירס (מהזן Royalty) בריכוז המומלץ לפי הוראות היצרן ובריכוז הגבוהה פי 10. הניסוי נערך בבולקים באקראי, 5 חזרות, גודל חלקה 20 מ<sup>2</sup>, הזריעה נערכה ידנית וזרחן (סלע

פוספט) הוסף לקרקע ביסוד (6 ק"ג ל-10 מ' רץ לריכוז הזרחן הגבוהה ולא הוסף כלל לריכוז הנמוך) הצמחים גדלו במשך 8 שבועות ולאחר מכן נמדדו מדדי הצימוח והיבול. נמצא כי טיפולי הניסוי לא השפיעו כלל על התפתחות התירס. קיימת מגמת שיפור במשקל הקלחים בתוספת התכשיר אך אינה מובהקת – למרות שיישום פי 10 של תכשיר גורם לירידה בהתפתחות הצמחים ויבולם (איור 7).



**איור 7.** תרומת הפטרייה על גובה צמחי תירס שגדלו בתנאי שדה (צאלים, קיץ 2010).

מסקנות: בחינת התכשיר המסחרי, בתנאי חממה ושדה, מלמדת כי יעילותו נמוכה ואינה תורמת להתפתחות הצמחים באופן מובהק. יישום מוגבר (פי 10), שילוב של פטריית עם המיקוריזה, מקורות ורמות זרחן שונים לא תרמו.

בהמשך המחקר נעבור לבחינה של תכשיר מיקרוביאלי אחר בהתאם לתוכנית המחקר המקורית.

## פרסומים מדעיים

אין

**סכום עם שאלות מנחות:**

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה</b>
בשנה זו התמקדה העבודה בבחינת ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית על שני צמחי המבחן מלפפון ועגבנייה, ובבירור ההשפעה של תכשיר נבגים של הפטרייה <i>Penicillium bilaii</i> על צמחי תירס וסורגום. הניסויים נערכו בתנאי חממה, בעציצים. בנוסף נבחנה ההשפעה של <i>P. bilaii</i> על צמחי תירס גם בניסוי שדה בצאלים. ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית <i>S. vermifera</i> נבחנה גם בחשיפה לתנאי עקה של יובש מתון.
<b>עיקרי הניסויים והתוצאות</b>
נראה כי לפטרייה האנדופיטית השפעה מיטיבה על הצימוח בקרקע חולית בלבד, מה שמרמז כי השפעתה קשורה בשיפור קליטת יסודות הזנה. אולם, ההשפעה באה לידי ביטוי בגובה הצמחים בעוד שלא הייתה לה כלל השפעה על הביומסה של הצמח. ניסוי ראשוני בחשיפה ליובש לא הראה על תוצאות מובהקות בין צמחים מודבקים לפטרייה לצמחי הביקורת.
להדבקה באמצעות תכשיר נבגים של <i>P. bilaii</i> לא הייתה השפעה על מדדי הצימוח שנבחנו בתירס וסורגום בתנאי חממה. גם ניסוי שדה לא לימד על השפעות מיטיבות של הפטרייה על צמחי תירס.
<b>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</b>
הושגו מטרות המחקר לשנת הפעלתו הראשונה. מתוצאות הניסויים עם הפטרייה עדיין לא ברור אם ההשפעה המיטיבה על הצמיחה תורמת גם לשיפור יבולים. לאור זאת, נמקד את העבודה בשנת המחקר הבאה בבחינת ההשפעה של הפטרייה תחת תנאי עקה אביוטית.
בבחינת תכשיר קיים של <i>P. bilaii</i> נמצא כי לתכשיר זה אין השפעה על צמחי תירס וסורגום. ההשפעות של הפטרייה פטרייה לא באו לידי ביטוי גם בשילוב של פטרייה מיקוריזה.
<b>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר?</b>
בחינה של השפעת הפטרייה האנדופיטית תחת תנאי עקה א-ביוטית; פיתוח טכניקה לכימות של מידת ההדבקה של השורשים בפטרייה; בבחינה של תכשירים קיימים יבחנו בשנת המחקר הבאה תכשירים נוספים שקיימים בשוק.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: <b>פרסומים בכתב</b> - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; <b>פטנטים</b> - יש לציין שם ומס' פטנט; <b>הרצאות וימי עיון</b> - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
עדיין לא פורסם
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
< רק בספריות
< ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
<b>&lt; חסוי – לא לפרסם</b>
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא – החוקרים מעורבים בתוכנית המשך שכבר הוגשה לקרן על ידי שבתאי כהן, מו"פ רמת נגב.

1. Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272: 201-209
2. Barazani O, Friedman J (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J Chem Ecol* 25: 2397-2406
3. Barazani O, Von Dahl CC, Baldwin IT (2007) *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuata* by inhibiting ethylene signaling. *Plant Physiology* 144: 1223-1232
4. Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *Fems Microbiology Letters* 251: 1-7
5. Xie H, Pasternak JJ, Glick BR (1996) Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology* 32: 67-71
6. Barazani O, Benderoth M, Groten K, Kuhlemeier C, Baldwin IT (2005) *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 146: 234-243
7. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Butehorn B, Franken P (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2741-2744
8. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel KH (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13386-13391
9. Singh A, Sharma J, Rexer KH, Varma A (2000) Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica* - A revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science* 79: 1548-1554
10. Rai M, Varma A (2005) Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica* Nees. *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 107-112
11. Achatz B, von Rüden S, Andrade D, Neumann E, Pons-Kühnemann J, Kogel K-H, Franken P, Waller F (2010) Root colonization by *Piriformospora indica* enhances grain yield in barley under diverse nutrient regimes by accelerating plant development. *Plant Soil* 333: 59-70

## 1. תקציר:

בשנה השנייה של המחקר התמקדה העבודה בביסוס מערכות הניסוי עם המיקרואורגניזמים הנבחרים בניסויים בחדר צמיחה, חממה ושדה- בבחינה של ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית *Sebacina vermifera* על גידול צמחי עגבנייה ומלפפון, ובחינת ההדבקה בתכשיר אזוספירילום ופטריית מיקוריזה על התפתחות צמחי עגבנייה ותיירס. פיתוח סמן מולקולארי המבוסס על מקטע של 5.8S rDNA אפשר לנו לבחון את יכולת המדבק בפטרייה האנדופיטית סבצינה. אנו מקווים ששימוש בסמן זה יאפשר לנו בעתיד לזהות את הפטרייה בקרקעות הארץ ולבצע ניסויי חממה ושדה בקנה מידה גדול יותר. עד כה, מגבלות ההיתר של היחידה להגנת הצומח אפשרו לבצע ניסויים במקום מוגבל עם תנאי אקלים שלא אפשרו ניסויים עם צמחים לזמן ארוך. למרות זאת, בוצעו ניסויים לבחינת מידת ההשפעה של הפטרייה על גידולי הבוחן תחת תנאי עקה אביוטיים של מליחות שתוצאותיהם מובאים בדו"ח מחקר זה. בנוסף, נבחנה דרך האפליקציה של הפטרייה ונמצא כי השפעה מיטיבה יותר נמדדה כאשר בוצעה הדבקה באמצעות השקיה מאשר ערבוב של תפטיר הפטרייה במצע הגידול. בשנת מחקר זו גם נבחנה מידת יכולתו של החיידק מעודד הצמיחה אזוספירילום על התפתחות צמחי עגבנייה ותיירס עם וללא נוכחות פטריית מיקוריזה. בכדי לבחון מהו המנגנון המעורב ביכולת עידוד הצמיחה בוצע מערך ניסויים נוסף בו נבחנה ההדבקה בשני קווים מוטנטים של החיידק הפגועים ביכולת לייצר אוקסין ו-NO. בניסוי עם צמחי עגבנייה למדנו כי ליכולת ייצור NO יש חשיבות רבה על מידת יכולת ההשפעה של החיידק על הצימוח, אך השפעה מעודדת צמיחה הייתה משמעותית דווקא בנוכחות פטריית המיקוריזה. מתוצאות המחקר המסוכמות בדו"ח זה ובזה שקדם לו, אנו לומדים כי לאפליקציות חקלאיות בשילוב של מיקרואורגניזמים מעודדי צמיחה יש פוטנציאל בהקניית עמידויות ושיפור יבולים של גידולים חקלאיים.

## 2. מבוא:

העלייה הדרסטית במחירי התשומות לחקלאות וצמצום השימוש בתכשירים כימיים, שלהם אנו עדים בשנים האחרונות, מחייבת את המחקר החקלאי לאתר ולפתח חלופות חדשות של אמצעים ביולוגיים יעילים וזולים להגדלת יבולים, הקניית עמידות צמחים לעקות, ולהשאת יעילות קליטת המינרלים מהקרקע. בטבע קיימים מיקרואורגניזמים היכולים לסייע לצמח בשיפור צמיחה ובניצול טוב יותר של בית גידולו (Plant Growth Promoters- PGP). על אף שבעבר נבחנו ואף הוכנסו לשימוש בחקלאות תכשירים מיקרוביאליים מוצלחים כגון חיידקי ריזוביום ופטריית הטריכודרמה, נראה שהיום יותר מתמיד, יש הצדקה בבחינה של מיקרואורגניזמים המשפיעים על תהליכים בצמח וסביבתו. עקב הפיתוח המואץ שנעשה בתחום התכשירים הביולוגיים בעולם יש הכרח באיתור ובבחינה מחדש של תבדידים חדשים ו/או תואריות (פורמולציות) המזמנות טווח יישומים בעלי יעילות (cost effective) רחבים יותר.

השפעתם המטיבה של PGP מתייחסת בהרבה מהמקרים לשינוי המאזן ההורמונלי בצמח [1-5] (אחרים). שלא כמותם, עידוד צמיחה על ידי הדבקה של צמחי טבק בפטרייה האנדופיטית *S. vermifera*, נגרם כתוצאה מעיכוב של ביטוי של גנים המעורבים בסנינתזת אתילן בצמח [3]. כמו כן, נראה שגידול במערכת השורשים כתוצאה מעידוד הצמיחה תורם להקניית עמידות לתנאי סביבה קשים במערכות טבעיות וחקלאיות, בהם לצמחים מודבקים יהיה יתרון על פני צמחים לא מודבקים בתחרות על משאבים מוגבלים וביכולת הקניית עמידות לעקות סביבה.

### 3. פירוט עיקר הניסויים ומסקנותיהם:

#### א. מערך ניסויים עם הפטרייה *Sebacina vermifera*

בדו"ח הקודם דיווחנו על יכולתה של הפטרייה לעודד צימוח של צמחי מלפפון ועגבנייה. בשנת המחקר השנייה נבחנה מידת יכולתה של הפטרייה להשפיע על הצמח בעקת מלח, בכוונה לבחון באם לזו היכולת להשפיע על הצמח בהתמודדות עם עקות אביוטיות. גם בשנת מחקר זו התמודדנו עם הבעייתיות של העבודה בתנאים המוגבלים של חדר הצמיחה-- לא תמיד בהצלחה. בוצעו מספר רב של ניסויים עם צמחי מלפפון ועגבנייה, ובניסיון למצוא דרך מתאימה יותר לעבודה בתנאי חדר הצמיחה עברנו אף לבחון שימוש בצמחי מבחן ממשפחת הדגניים. התוצאות המתוארות להלן מסכמות מספר ניסויים מייצגים שנעשו במסגרת שנת המחקר הנוכחית.

#### א.1. פיתוח סמן לזיהוי צמחים מודבקים בפטרייה האנדופיטית

שימוש בסמן מולקולארי יאפשר לבחון את רמת המדבק ולאשר את נוכחות הפטרייה האנדופיטית בשורשים מודבקים. בחרנו לפתח סמן המבוסס על האופרון של ה-rDNA שכולל את הגנים המקודדים ל-18S rRNA, 5.8S ו-28S, ובאופן ספציפי על מקטעי ה-internal transcribed spacer שמשני צידי ה-5.8S (ITS1 ו-ITS2) (איור 1). שיעור גבוה יחסית של מוטציות באזורים הלא מקודדים של ה-ITS מאפשר שימוש במקטעים אלו לצורך לימוד שונות גנטית וקשרים אבולוציוניים בין יחידות טקסונומיות [6].

איור 1 מציג את המפה הגנטית של האופרון (א') והמקטע שבודד ורוצף מתרבית של הפטרייה (ב'). תרבית סטרילית של הפטרייה גודלה במצע Potato Dextrose Broth (PDB) בטלטול (100 rpm) למשך כעשרה ימים. לאחר סרוז, נכתשו קורי הפטרייה באמצעות מכתש ועלי תחת חנקן נוזלי. DNA הופק בשימוש בקיט של Qiagen, ובהתאם להוראות היצרן. בשלב ראשון תוכנן זוג פריימרים בהתבסס על רצפים הומולוגיים של פטריות בסיסה אחרות. אלו שימשו לבידוד מקטע ה-5.8S שכלל גם את ה-ITS1+2, ומקטעים מאזור ה-3' וה-5' של ה-18S ו-28S, בהתאמה (איור 1). לרצף המבודד מהפטרייה *S. vermifera* נמצא דמיון של 94% לפטרייה *Piriformospora indica* (איור 1ב) שגם לה השפעה מיטיבה על צימוח של מספר גידולים חקלאיים [7-9]. תכנון שני זוגות פריימרים ספציפיים לפטרייה (טבלה 1) אפשר פיתוח של סמן זה ששימש לאישור רמת המדבק בניסויים המתוארים להלן.

#### טבלה 1. שני זוגות פריימרים שתוכננו להגברה של 5.8S מקטעי ITS בפטרייה האנדופיטית

	Forward primer	Reverse primer	size
1	TGC TGG TGG CAA CAC ATG TG	GTT AGG CAT GTG GAT TCG TC	510
2	CAT TCT CCT TTC AAT CGT CCA AG	TGA TAC ATT TCG GAT CAG TTG CA	385

לאחר שטיפה של שורשים מודבקים במים מזוקקים הופק DNA כללי משורשי הצמחים. שימוש בריאקצית PCR עם שימוש בזוג הפריימרים הייחודי אפשר לוודא באם שורשי הצמחים הודבקו בפטרייה (איור 1ג').



## א.2. השפעה של הפטרייה *S. vermifera* על צמחי מלפפון שנחשפו לעקת מלח

צמחי מלפפון ועגבנייה הונבטו בעציצים בגודל 11, במצע של חול עם או ללא נוכחות הפטרייה האנדופיטית. אילוח בפטרייה נעשה באמצעות תפטיר פטרייה שהתקבל מתרבית שגודלו על מצע PDB בטלטול של כשבוע. לאחר סרוכז של התפטיר, שטיפה במים מזוקקים וכתישה בוצע ערבוב של מצע הגידול בתפטיר הפטרייה. כשלושה שבועות לאחר הנביטה, חולקו הצמחים באופן אקראי לארבע קבוצות כששתיים מתוכן הושקו בתמיסת מלח (NaCl) ברמה של  $EC=4$  ( $dS m^{-1}$ ). המלחה זו, בתנאי עקה מתונה התבצעה בהשקיה כל 3 ימים; הביקורת כללה השקיה במי ברז רגילים. תוספת דשן ניתנה בהתאם לצורך באמצעות תמיסה שכללה 4 מיליליטר לליטר של דשן מור 5:3:8 + 3% מיקרואלמנטים. במהלך הניסויים בוצע מעקב אחר גובה הצמחים, נבחנה צבירת הביומסה ואף בוצעה אנליזה של כמות הכלורופיל ורמת הפעילות האנטי-אוקסידאנטית בעלי הצמח.

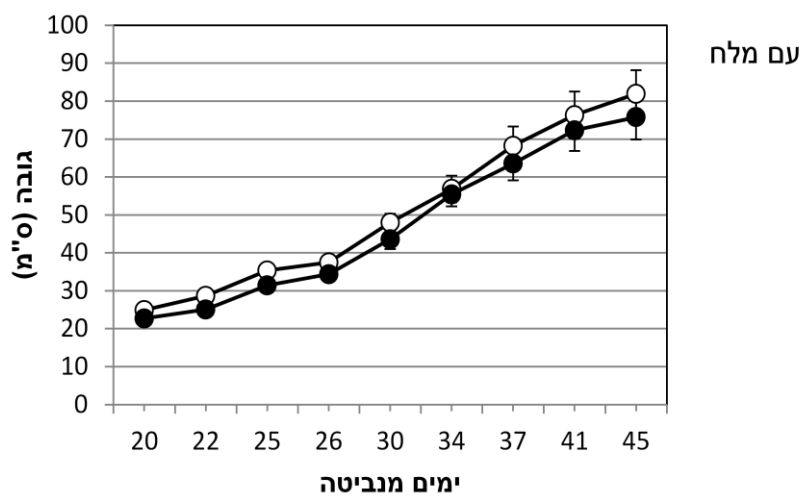
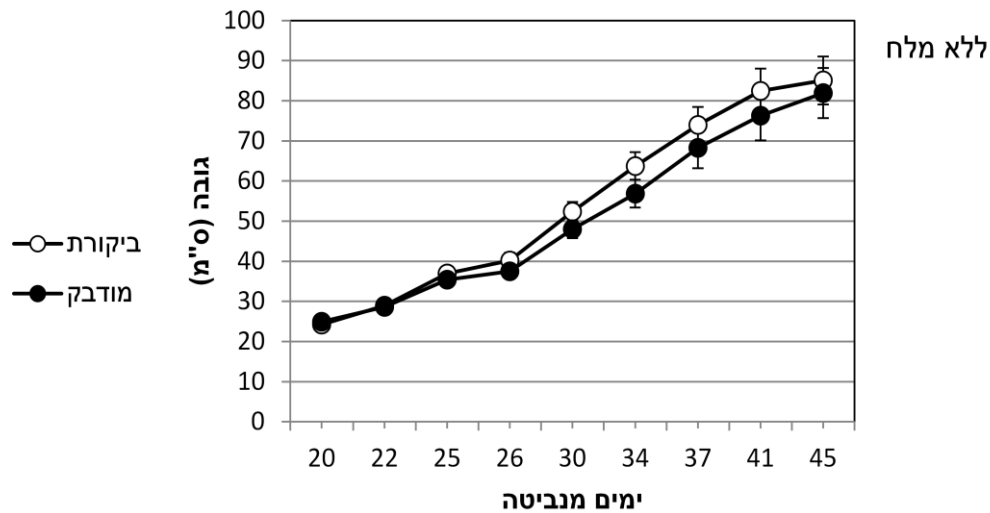
בניגוד לממצאי השנה הקודמת (התוצאות מדווחות בדו"ח המסכם את שנת המחקר הראשונה),

לא נמצא הבדל בקצב הצמיחה בין צמחים שהודבקו בפטרייה לצמחי הביקורת הלא מודבקים (איור 2, טיפול ללא מלח). יתר על כן, לא נמצאו הבדלים מובהקים בכמות החומר הטרי והיבש בין צמחים שהודבקו בפטרייה האנדופיטית לצמחי ביקורת לא מודבקים (איור 3, טיפול ללא מלח). תוצאות דומות התקבלו גם בניסוי על צמחי עגבנייה (תוצאות לא מוצגות), כמו גם בשורה רבה של ניסויים נוספים. תוצאות אלו מדגישות את הקשיים בהם נתקלנו בבניית מערכת המבחן. חשוב לציין שבכל הניסויים פעלנו על פי מערך עבודה קבוע שנבנה בשורה של ניסויים בשנת המחקר הראשונה. אנו משערים כי קיים קשר בין רמת המדבק ליכולת הפטרייה להשפיע על קצב הצימוח וצבירת הביומסה. בהמשך בכוונתנו לאשר זאת באמצעות שימוש בסמן המולקולארי ב- qPCR.

הדבקה בפטרייה גרמה לירידה משמעותית של פי 1.1 ברמת הכלורופיל בעלים (איור 4, טיפול

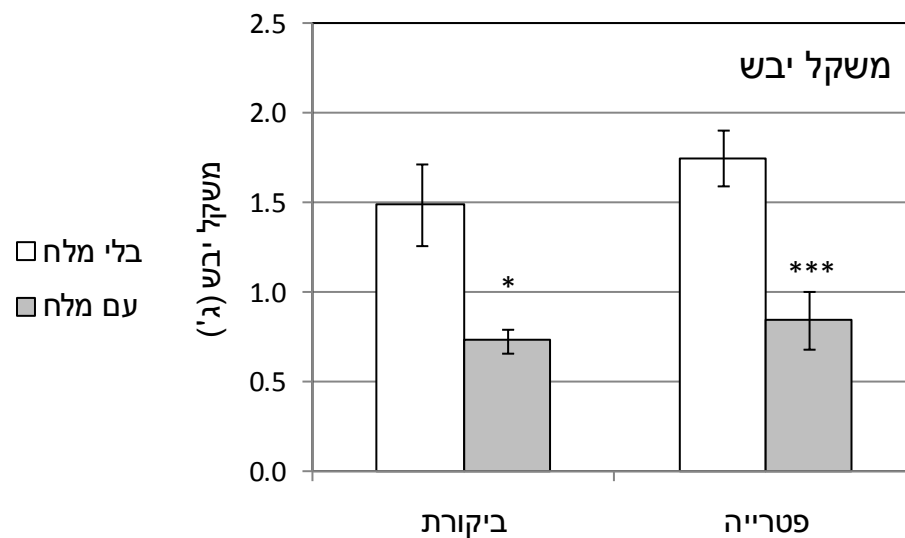
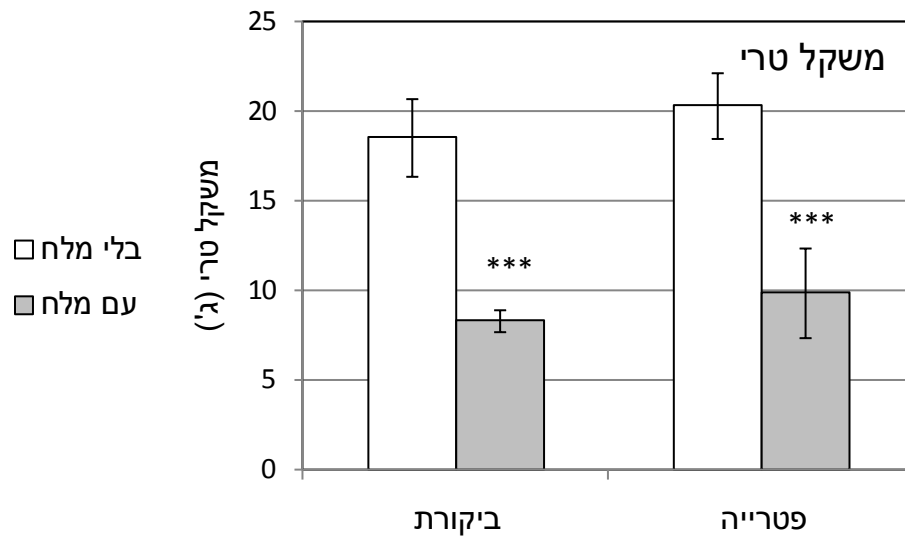
ללא מלח), כפי שנבחנה באמצעות קביעת כמות הכלורופיל היחסית בשימוש עם SPAD-502 Chlorophyll Meter (Konica Minolta). תוצאות אלו המראות כי להדבקה בפטרייה יש השפעה הדומה למצב של עקה בצמח, מרמזות גם כי בהתקיים תנאים מסוימים, הפטרייה האנדופיטית יכולה להפוך לאגרסיבית ולגרור בעקבותיה תגובה הדומה להדבקה במיקרואורגניזם פרזיט. בדומה, הסבירו תופעה של עיכוב צמיחה של צמחי חיטה בהדבקה בפטריית המיקוריזה *Glomus* sp. במבלע של פחמן אל הפטרייה [10]. אנו משערים כי לרמת המדבק תתכן השפעה על כיוון ההשפעה של הפטרייה על הצמח. כך, ברמה גבוהה של מדבק יכולה הפטרייה אף לעכב צימוח.





**איור 2.** התארכות הגבעול של צמחי מלפפון שגדלו עם וללא הדבקה בפטרייה האנדופיטית. הצמחים הושקו בהשקיה עם וללא תוספת של מלח (NaCl) בריכוז שהעלה את מוליכות מי ההשקיה ל-EC של 4  $(dS m^{-1})$ .

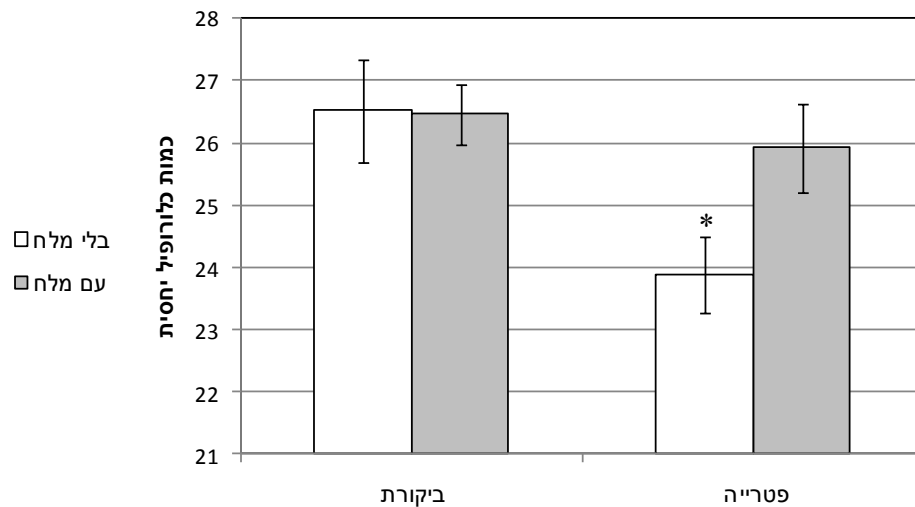
עקת המלח ניתנה ברמת המלחה מתונה שלא גרמה לירידה משמעותית בקצב הצימוח של צמחי מלפפון, הן באלו שלא הודבקו בפטרייה האנדופיטית וגם באלה שכן (איור 2). בדומה, לא הייתה השפעה לטיפול ההמלחה על רמת הכלורופיל בצמח (איור 4). אולם, עקת המלח גרמה לירידה מובהקת בצבירת הביומסה העל קרקעית כפי שנבחנה מבחינה של כמות החומר הטרי והיבש (איור 3). בדומה, צמחים שהודבקו בפטרייה האנדופיטית צברו פחות ביומסה על קרקעית כאשר הושקו בתמיסת מלח ברמה סופית של  $EC=6$  בהשוואה לצמחים מודבקים שהושקו במי ברז (איור 3). אך כמות הכלורופיל בצמחים מודבקים שגדלו בהשקיה בתמיסת המלח הייתה גבוהה באופן מובהק מזו שבצמחים מודבקים שהושקו במי ברז (איור 4). תוצאות אלו הצביעו על כך שיתכן כי להדבקה בפטרייה יש השפעה מיטיבה ביכולת התמודדות צמחים עם העקה האביוטית. לצורך זה בחנו גם את רמת הפעילות האנטי-חימצונית של מיצוי מהעלים.



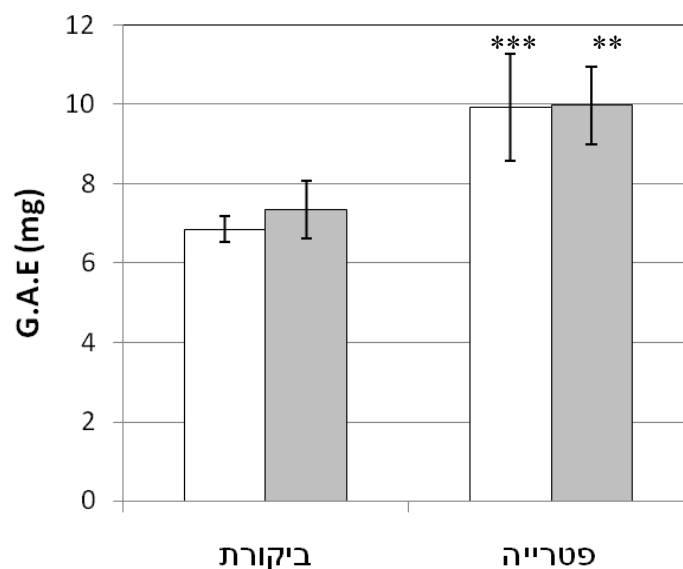
**איור 3.** משקל טרי (א') ומשקל יבש (ב') של צמחי מלפפון שגדלו עם וללא הדבקה בפטרייה האנדופיטית. הצמחים הושקו בהשקיה עם וללא תוספת של מלח (NaCl) בריכוז שהעלה את מוליכות מי ההשקיה ל-4 (dS m<sup>-1</sup>). כוכביות מציינות הבדלים מובהקים בין טיפול ההמלחה לביקורת ברמה של 0.05 (\*) ו-0.001 (\*\*\*) בצמחים לא מודבקים ומודבקים בנפרד.

רמת הפעילות האנטי-חימצונית נבחנה במבחן (FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power), בהשוואה לסטנדרט של חומצה גאלית. מבחן זה מבוסס על חיזור הקומפלקס Fe<sup>3+</sup>-TPTZ ל-Fe<sup>2+</sup>-TPTZ (ב-pH נמוך 12). הבדיקה בוצעה בתנאי חושך, כאשר ל-20 μg מדוגמת מיצוי דוגמת העלים ב-80% אצטון, הוספו 200 μg מהריאגנט FRAP (12). לאחר הדגרה בטמפרטורת החדר למשך 4 דקות הדוגמא הועברה לפלטת ELISA לקריאה באורך גל של 593 nm בספקטרופוטומטר. תוצאות המבחן הראו כי רמת הפעילות האנטי-חימצונית של צמחים המודבקים בפטרייה היו גבוהים באופן מובהק מאלו של צמחים לא מודבקים (איור 5). אולם, בצמחים מודבקים בפטרייה האנדופיטית לא נמדדו כל הבדלים בפעילות האנטי-חימצונית בין צמחים שהושקו במי ברז לבין אלו שהושקו בתמיסת המלח (איור 5).

תוצאות אלו תומכות בהשערותינו כי תגובת הצמח להדבקה בפטרייה יכולה באופן עקיף גם לשפר את יכולת התמודדותו של הצמח לעקה באמצעות מניעת הצטברות של רדיקלים חופשיים.

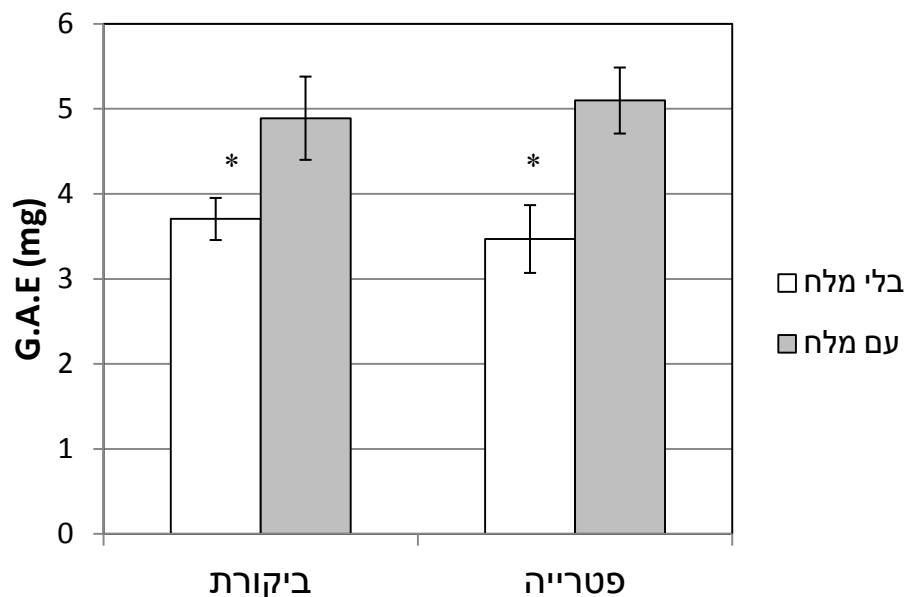


**איור 4.** כמות כלורופיל בעלים של צמחי מלפפון שגדלו עם וללא הדבקה בפטרייה האנדופיטית. הצמחים הושקו בהשקייה עם וללא תוספת של מלח (NaCl) בריכוז שהעלה את מוליכות מי ההשקייה ל- 4 EC ( $\text{dS m}^{-1}$ ). כמות הכלורופיל נבחנה באמצעות SPAD-502 Chlorophyll meter. כוכבית מציינת הבדלים ברמת מובהקות של 0.05 בין צמחים מודבקים ללא מודבקים בטיפול ללא המלח.



**איור 5.** רמת הפעילות האנטי-כימיונית הכללית של מיצוי מעלים של מלפפון שגדלו עם וללא הדבקה בפטרייה האנדופיטית. הצמחים הושקו בהשקייה עם וללא תוספת של מלח (NaCl) בריכוז שהעלה את מוליכות מי ההשקייה ל- 4 EC ( $\text{dS m}^{-1}$ ). רמת הפעילות נקבעה בהשוואה לפעילות אקוויולנטית של חומצה גאלית (mg). כוכביות מתארות הבדלים ברמת מובהקות של 0.01 (\*\*), ו- 0.001 (\*\*\*) בין טיפול ההמלחה (עמודת אפורות) לביקורת ללא המלח (עמודות לבנות), בצמחים המודבקים והלא מודבקים בנפרד.

מערכת ניסוי דומה שנערכה עם צמחי עגבנייה מלמדות כי בהשקיה במי מלח עלתה רמת הפעילות האנטי-חמצונית באופן מובהק פי 1.3 בהשוואה לצמחים שהושקו במי ברז (איור 6). אולם, שלא בדומה לצמחי המלפפון, לא הייתה השפעה של הפטרייה על רמת הפעילות האנטי-חמצונית של הצמח (איור 6). שימוש בסמן המולקולארי אישר הדבקה אפקטיבית של שורשי הצמחים. תוצאות אלו תומכות גם הן באפשרות שלרמת המדבק יש השפעה על מידת וכיוון ההשפעה של הפטרייה על הצמיחה.



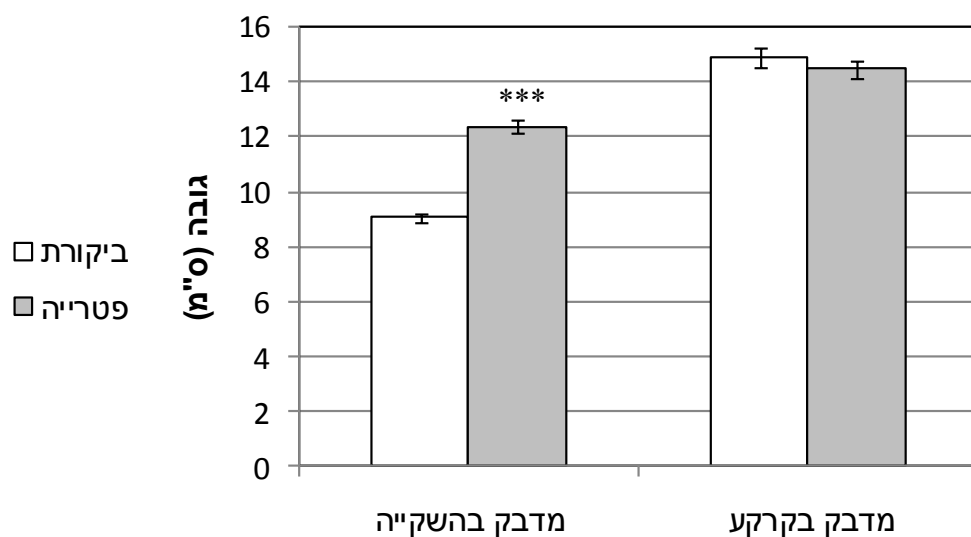
**איור 6.** רמת הפעילות האנטי-חמצונית הכללית של מיצוי מעלים של עגבניה שגדלו עם וללא הדבקה בפטרייה האנדופיטית. הצמחים הושקו בהשקיה עם וללא תוספת של מלח (NaCl) בריכוז שהעלה את מוליכות מי ההשקיה ל-6 EC ( $\text{dS m}^{-1}$ ). רמת הפעילות נקבעה בהשוואה לפעילות אקוויולנטית של חומצה גאלית (mg). כוכבית מציינת הבדלים ברמת מובהקות של 0.05 בין צמחים בטיפול עם וללא המלח.

### 3.א. בחינת דרך ההדבקה על מידת ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית על הצמיחה

כדי לפתח דרך הדבקה אפקטיבית לצמחים בחנו את מידת ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית בשני דרכי הדבקה: (1) באמצעות ערבוב של הפטרייה במצע הגידול (על פי פרוטוקול הדבקה שפותח בשנת המחקר הראשונה); (2) באמצעות מי ההשקיה. בשתי השיטות, גודלה תרבית של הפטרייה בטלטול במצע PDB (Potato Dextrose Broth) למשך כעשרה ימים, התרבית סורכזה ונשטפה מספר פעמים במים מזוקקים, נכתשה ושימשה לאילוח של הקרקע אם בערבוב במצע הגידול או בתוספת למי ההשקיה. ההדבקה בטיפול האחרון בוצעה מיד לאחר העברת הנבטים למצע הגידול (תערובת עציצים, שחם). הצמחים גודלו במגשי הנבטה, שני מגשים לכל דרך מדבק; כביקורת שימשו צמחים שגודלו במגשי הנבטה ללא נוכחות הפטרייה. גובה הצמחים נמדד בכל שלושה ימים; התוצאות המוצגות באיור 7 מתארות את גובה הצמחים בתום הניסוי, כחודש לאחר השתילה.

התוצאות המתוארות באיור 7 מלמדות כי הדבקה בהשקיה גרמה לעלייה מובהקת של פי 1.4 בגובה הצמחים. לערבוב של הפטרייה בקרקע לא הייתה כל השפעה על הצימוח. אנו מסיקים כי לשיטת

ההדבקה יש השפעה על רמת המדבק כשלזו יש חשיבות על כיוון ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית על הצימוח.



**איור 7.** ההשפעה של דרך ההדבקה בפטרייה האנדופיטית *S. vermifera* על גובה צמחי עגבנייה. הדבקה נעשתה באמצעות ערבוב של תפטיר הפטרייה בקרקע (מדבק בקרקע) או באמצעות מי ההשקיה (מדבק בהשקיה). כוכביות מציינות הבדלים ברמת מובהקות של 0.001 בין צמחים מודבקים בפטרייה לצמחי ביקורת לא מודבקים.

בהמשך לתוצאות מערכות הניסוי משנת המחקר הראשונה שהציעו כי לפטרייה השפעה תחת משטר הזנה נמוך, בוצע ניסוי ראשוני לבחינה של השערה זו בשימוש עם צמחי אורז. בגלל רגישותם הרבה של צמחי אורז לחוסר ברזל [11] בחרנו לבחון את מידת ההשפעה של הוספת תפטיר הפטרייה למצע (כמתואר בתחילת סעיף א.3) על התפתחות צמחי אורז לאחר נביטתם. כביקורת שימשו צמחי אורז שנבטו במצע ללא נבגי הפטרייה. התוצאות המוצגות באיור 8 מלמדות כי לפטרייה עשויה להיות השפעה מיטיבה על הצצה וגדילה ראשונית של צמחי אורז ללא תוספת ברזל. השפעת הפטרייה בתצפית זו הייתה חלקית כך שלאחר השלב הראשון בו לא הוספנו ברזל (מובא באיור 8) היינו חייבים להוסיף ברזל בכמות מתונה של 5 ח"מ כדי שנבטי האורז יוריקו וימשיכו לגדול. צמחי הביקורת, שלא הודבקו, התנוונו לגמרי בשלב זה ולא ניתן היה להצילם ע"י תוספת ברזל כאמור (איור 8). ללא צמחי ביקורת לא ניתן היה לכמת את מידת ההשפעה על הצימוח. תוצאות דומות התקבלו בניסוי נוסף בלתי תלוי.



ביקורת

פטרייה

**איור 8.** השפעת הפטרייה האנדופיטית *S. vermifera* על נבטי אורז תחת עקת ברזל.

## ב. מערך הניסויים עם תכשירים מסחריים של חיידקים מעודדי צמיחה

בשנה זו בחנו את השפעתם של שני מיקורואורגניזמים הידועים כמועילים להתפתחות צמחים על גדילה וניבה של צמחי תירס, וגדילת צמחי עגבנייה. אחד מהמיקורואורגניזמים הוא פטריית המיקוריזה, המסייעת לצמח בקליטת מינרלים, משפרת את מאזן המים בצמח ומעלה עמידותו כנגד עקות ביוטיות ואביוטיות. השני הינו חיידק האזוספירילום. חיידק זה הידוע כחיידק ריזוספירה התורם להתפתחות הצמח בעיקר באופן הורמונלי אך גם ידוע כחיידק המקבע חנקן אטמוספרי.

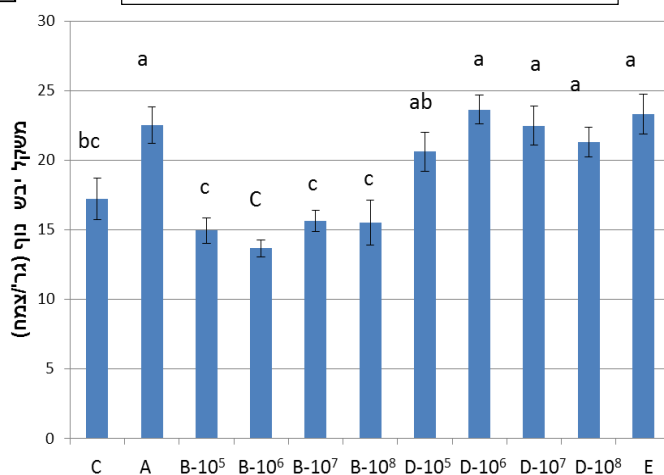
### ניסוי מיקוריזה ואזוספירילום בתירס:

בניסוי זה גידלנו צמחי תירס בדליים בנפח 10 ליטר, 2 צמחים בכל דלי, מצע הגידול היה חול דיונה. הצמחים אולחו בחיידקי אזוספירילום מסחריים (מחברת Sintesis Quimica, ארגנטינה). האילוח נעשה בזמן הזריעה בריכוזים שונים של החיידק. ישום פטריית המיקוריזה נעשה בשילוב במצע הגידול מדבק סחרי (אגרוגולד, ישראל) שהכיל 220 יחידות הדבקה לגר' מדבק. לאחר שישה שבועות מהנביטה, הצמחים נמדדו ונשקלו, בסוף תקופת הגידול הוגטטיבית. באיור 9 מתוארת השפעת טיפולי חיידקי אזוספירילום ומיקוריזה על התפתחות צמחי תירס (מקרא להלן).

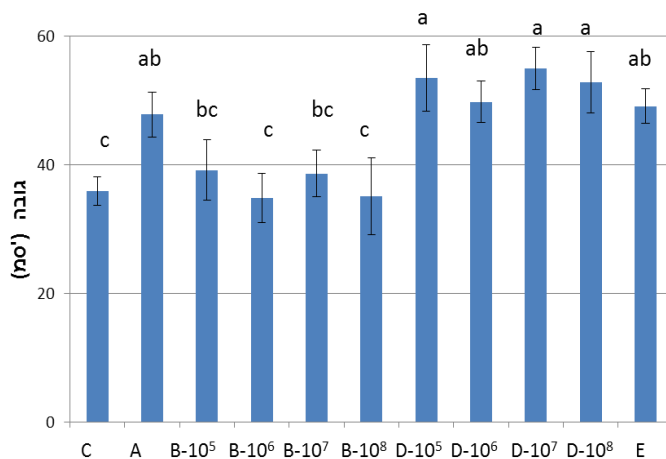
ממרבית המדדים (ביומסת נוף וגובה הגבעול) עולה כי במערכת גידול זו ניכרה השפעתה של המיקוריזה על מדדי ההתפתחות בתירס: כאשר יושמה לבד (בטיפול A), או יחד עם החיידק (טיפול D), ניכרה עלייה במדדי הצימוח. יחד עם זאת, בניסוי זה לא ניכרה ההשפעה של החיידקים המיושמים ללא המיקוריזה על המדדים. באיור 9 ניתן לראות כי תוספת מדבק פטריית המיקוריזה גרם להבדל מובהק סטטיסטית בכל המדדים שנבדקו (9 א-ג) בצמחי התירס. זאת ועוד, כל הטיפולים שהכילו את מדבק פטריית המיקוריזה נבדלו מטיפולי הביקורת במשקלם היבש ובמדדי הגובה (ראה 9 א' ו 9 ב'). לעומת זאת, חיידקי אזוספירילום בעצמם לא תרמו להתפתחות הצמח דבר שהתבטא במשקל יבש דומה בטיפולים הבלתי מאולחים. למרות שריכוזי החיידקים נעו בין  $10^5$  ל- $10^8$  לא נמצאה תגובה חיובית לחיידקים במשקל הצמח היבש או בגובה.

א9

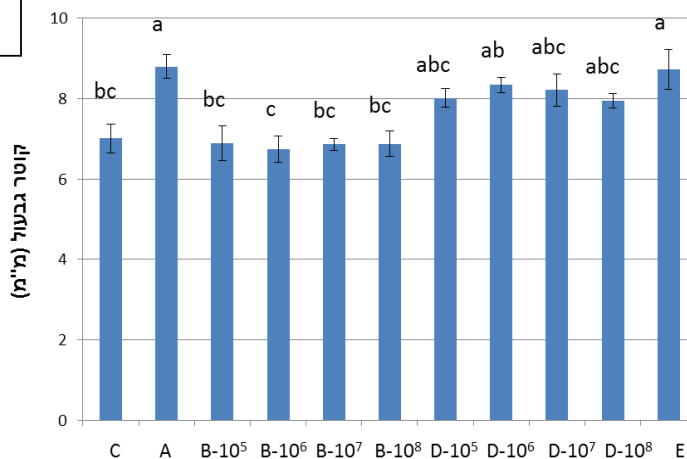
מדדים התפתחותיים בצמחי תירס



ב9



ג9



**איור 9.** השפעת יישום חיידקים בריכוזים משתנים, עם ובלי אילוח בפטריית המיקוריזה, על המשקל היבש של נוף התירס (איור א9), גובה הצמח (איור ב9) וקוטר הגבעול (איור ג9).  
**מקרא:** C- ביקורת חול; A הדבקה בפטריית מיקוריזה; B- 10<sup>5</sup>, הדבקה בחיידקי אזוספירילום בצפיפות 10<sup>5</sup> CFU; D-10<sup>5</sup>; D-10<sup>6</sup>, D-10<sup>7</sup>, D-10<sup>8</sup>, הדבקה משולבת בפטריית מיקוריזה וחיידק אזוספירילום בצפיפות 10<sup>5</sup> CFU; E- הדבקה משולבת בפטריית מיקוריזה, חיידקים ופולימר.

## ניסוי אזוספירילום בעגבנייה ותירס:

במטרה לבדוק את השפעתם של חיידקי אזוספירילום על התפתחות צמחי עגבנייה ותירס ובאותה עת גם להצביע על מנגנוני פעולה אפשריים נעשה שימוש בחיידקים מגזע הבר ושורת מוטנטים. הניסויים נערכו בתירס ובעגבנייה שגדלו בחול כמצע גידול. ניסוי התירס נערך במיכלים בנפח 10 ליטר שנערך באביב 2011 ואילו ניסוי העגבנייה נערך בסתיו 2011 כאשר הצמחים גדלו בעציצים של 3 ליטר. שני הניסויים נערכו באופן בלתי תלוי בבית צמיחה במינהל המחקר החקלאי ונדגמו כ-30 ו-60 יום מתאריך הצצת הצמחים.

ניסוי עגבניות: הניסוי הורכב מתבדיד WT (זן הבר) של אזוספירילום וכן שני מוטנטים של החיידק: האחד, מוטנט בכוסר החיידקים לייצר NO (Nitric Oxide) (המיוצר בתהליכי חיזור ניטראט ע"י החיידק ומעורב ביצירת שורשים צדדים, כאשר NO מעורב במסלול העברת סיגנלים ליצירת IAA), והאחר, חיידק מוטנט הפגוע ביצירת ההורמון אוקסין- $ipdC$ . הצמחים אולחו בכל אחד מהבדידים במועד הזריעה בריכוז של  $10^7$  CFU לנבט. במהלך הגידול קיבלו הצמחים דשן המותאם לחיידקי אזוספירילום שבעקרון בעל רמת חנקן מופחתת.

באיור 10 מובאות תוצאות השפעת יישום המיקרואורגניזמים השונים בעגבנייה לאחר 30 יום מהצצה. גובה העגבנייה באיור 10א', משקל שורש טרי באיור 10ב', משקל נוף טרי באיור 10ג'.

ניתן לראות כי לאחר חודש של גידול תוספת חיידקי אזוספירילום גרמה לעליה מובהקת במשקל השורש והנוף (10א' ו-10ב'). לעומת זאת, חיידקים מוטנטים שאינם יוצרים את ההורמון הצמיחה אוקסין, לא תרמו להתפתחות השורש או הנוף. זאת ועוד, חיידקים שאינם מסוגלים מיצרים ניטריק-אוקסייד (NO) תורמים, אומנם באופן שאינו מובהק סטטיסטי, להתפתחות השורש – אך אינם תורמים להתפתחות הנוף.

מסתבר כי במועד הוצאה מוקדם זה חיידקי אזוספירילום כבר מצליחים לעודד התפתחות של נבטי עגבנייה ותרומה זו של עידוד הצימוח תלויה כנראה בכוסר החיידקים ליצר IAA. העובדה כי חיידקים מוטנטים בכוסר ייצור ניטריק אוקסייד יכולים להשפיע על התפתחות השורש, אך לא הנוף, מלמדת כי חיידקי אזוספירילום ניחנים במנגנונים נוספים שלהם תרומה להתפתחות הצמח בשלבים מוקדמים של התפתחותם.

באיור 11 מובאות תוצאות השפעת יישום המוטנטים השונים בעגבנייה לאחר 60 יום מהצצה. גובה העגבנייה באיור 11א', משקל שורש טרי באיור 11ב', משקל נוף טרי באיור 11ג'. ניתן לראות כי לאחר 60 ימי גידול תוספת חיידקי אזוספירילום גרמה לעליה במשקל השורש, הנוף וגובה הצמח (10א', 10ב' ו-10ג'). לעומת זאת, חיידקים מוטנטים שאינם יוצרים את ההורמון הצמיחה אוקסין, ואינם מיצרים ניטריק-אוקסייד (NO) אינם תורמים להתפתחות השורש או הנוף באופן מובהק. ניתן להתרשם כי הבדלים ראשוניים שהיו במועד הדגימה הראשון לא התבטאו בשלבי גידול מאוחרים יותר.



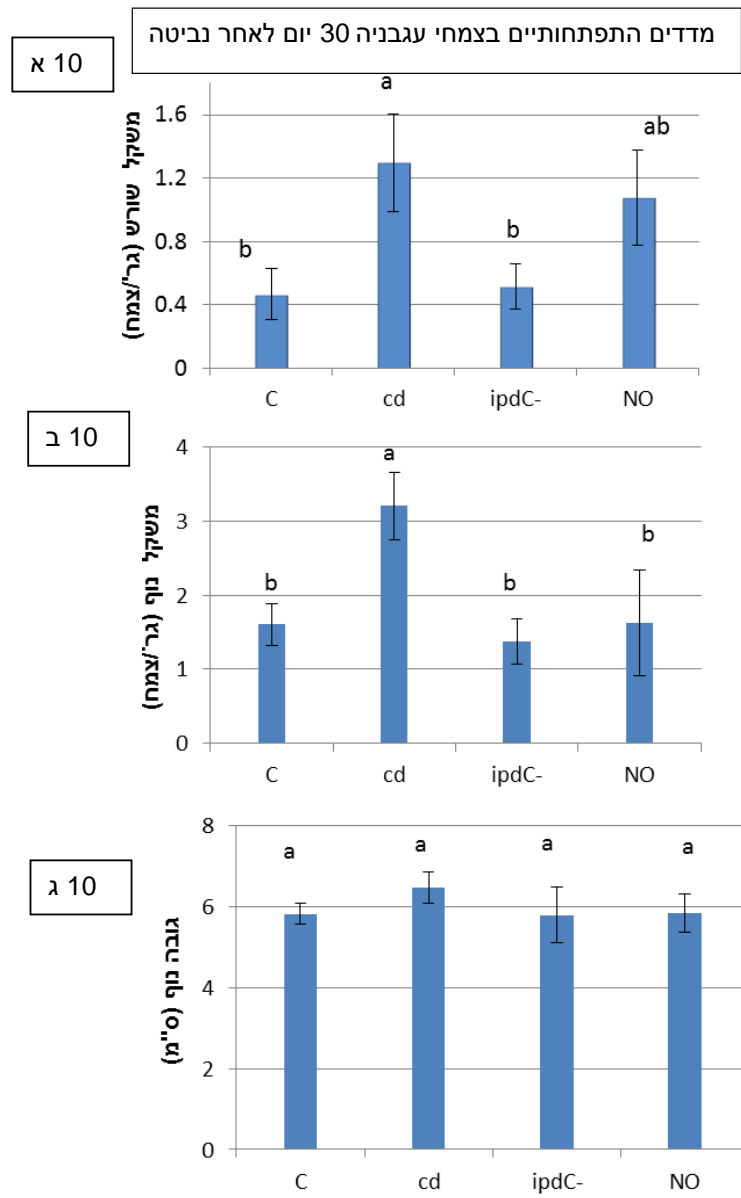
### ניסוי תירס:

ניסוי זה כולל גם הוא את התבדיד WT (זן הבר) של אזוספירילום וכן שני מוטנטים של החיידק *Azospirillum*: האחד, מוטנט בכושר החיידקים לייצר NO (Nitric Oxide) (המיוצר בתהליכי חיזור ניטראט ע"י החיידק ומעורב ביצירת שורשים צדדים, כאשר NO מעורב במסלול העברת סיגנלים ליצירת IAA), והאחר, חיידק מוטנט הפגוע ביצירת ההורמון אוקסין-ipdC. הצמחים אולחו בכל אחד מהבדידים במועד הזריעה בריכוז של  $10^7$  CFU לנבט. במהלך הגידול קיבלו הצמחים דשן המותאם לחיידקי אזוספירילום שבעקרון בעל רמת חנקן מופחתת.

באיור 12 מובאות תוצאות השפעת יישום המיקרואורגניזמים השונים בתירס לאחר 30 יום מהצצה. גובה הצמח באיור 12א', משקל שורש טרי באיור 12ב', משקל נוף טרי באיור 12ג'. ניתן לראות כי לאחר חודש של גידול תוספת חיידקי אזוספירילום לא גרמה לעליה מובהקת במשקל השורש והנוף (12א ו-12ב). מסתבר כי במועד הוצאה מוקדם זה חיידקי אזוספירילום אינם מצליחים לעודד התפתחות של נבטי תירס ויתכן כי זהו מועד קצר להתבטאות תרומה כל שהיא. על כן, נדגמו הצמחים במועד מאוחר יותר – כ-6 יום מההצצה – ונראה כי גם במועד זה לא קיימת השפעה של האילוח על התפתחות הצמחים (איור 13).

מקרא לאיורים 10 עד 13

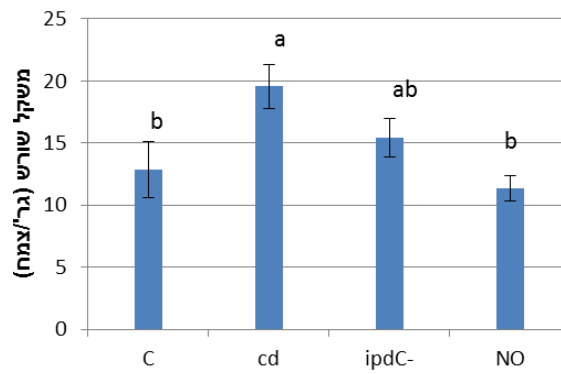
C	ביקורת
CD	זן הבר
ipdc	מוטנט לאוקסין
NO	מוטנט לNitric Oxide



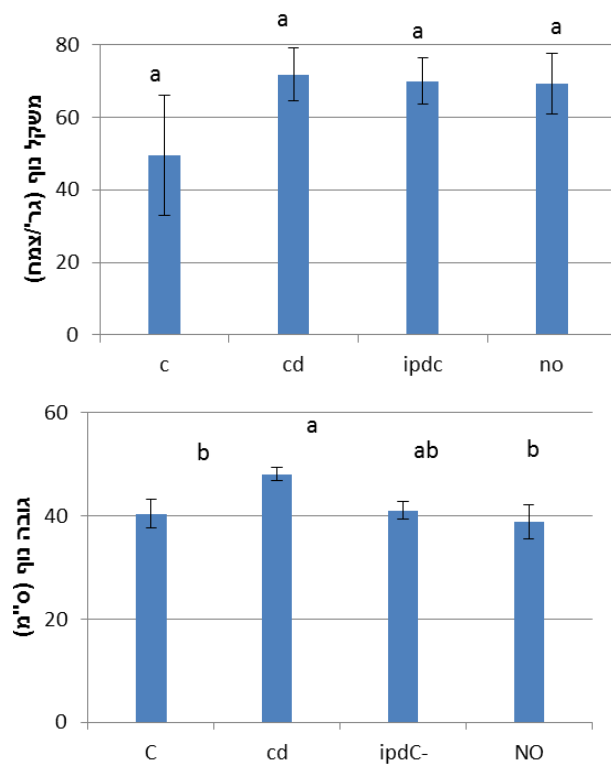
**איור 10.** השפעת יישום מיקרואורגניזמים על מדדים התפתחותיים בצמחי עגבניה 30 יום לאחר נביטה.

מדדים התפתחותיים בצמחי עגבניה 60 יום לאחר נביטה

11 א



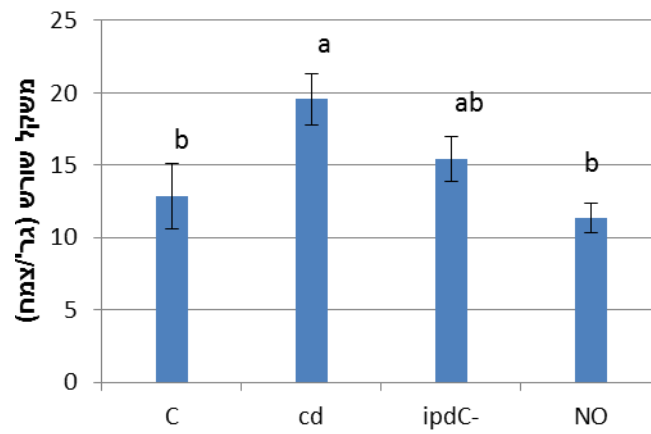
11 ב



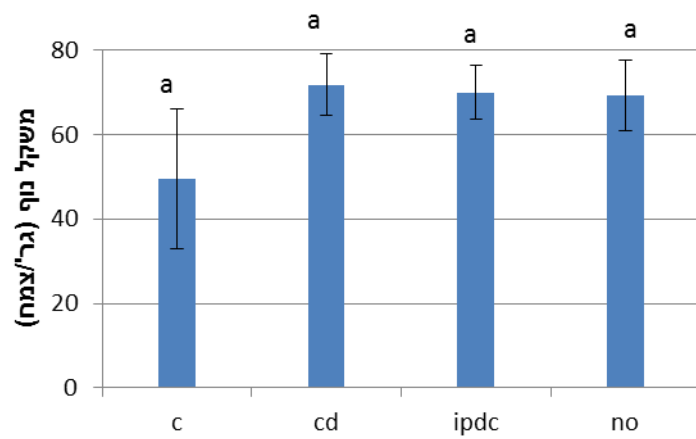
איור 11. השפעת יישום מיקרואורגניזמים על מדדים התפתחותיים בצמחי עגבניה 60 יום לאחר נביטה.

מדדים התפתחותיים בצמחי עגבניה 30 יום לאחר נביטה

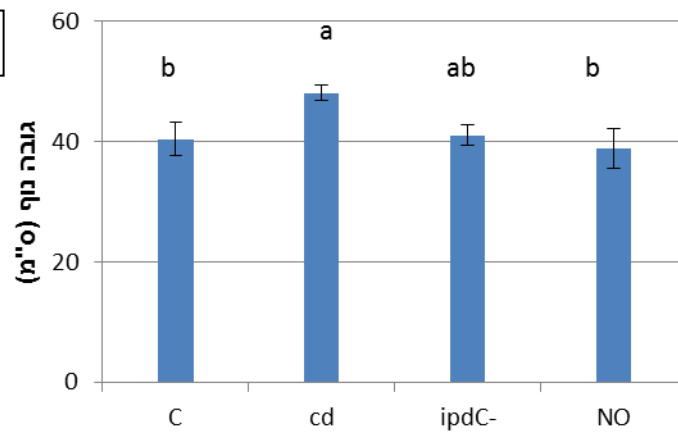
12 א



12 ב



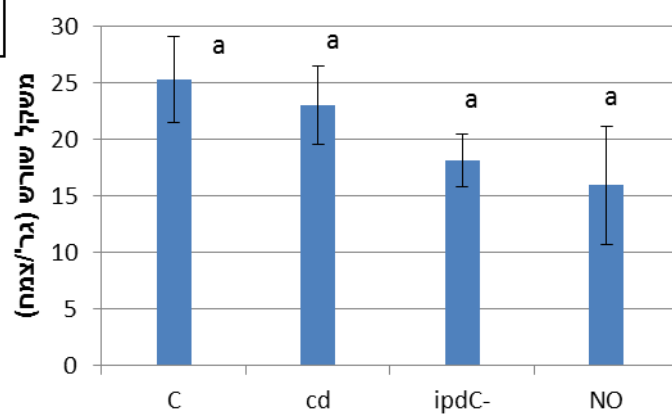
12 ג



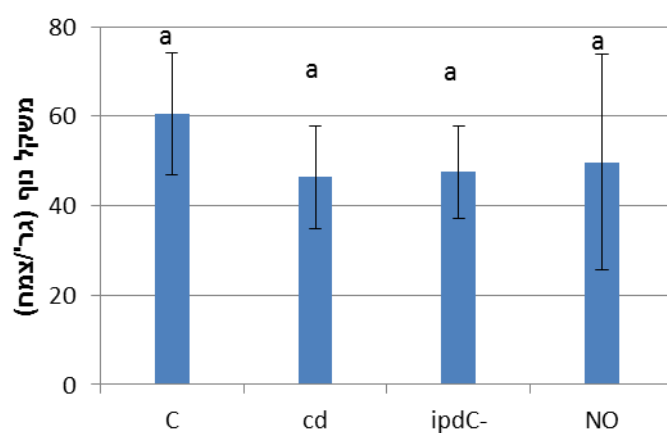
איור 12. השפעת יישום מיקרואורגניזמים על מדדים התפתחותיים בצמחי עגבניה 30 יום לאחר נביטה.

מדדים התפתחותיים בצמחי תירס 60 יום לאחר נביטה

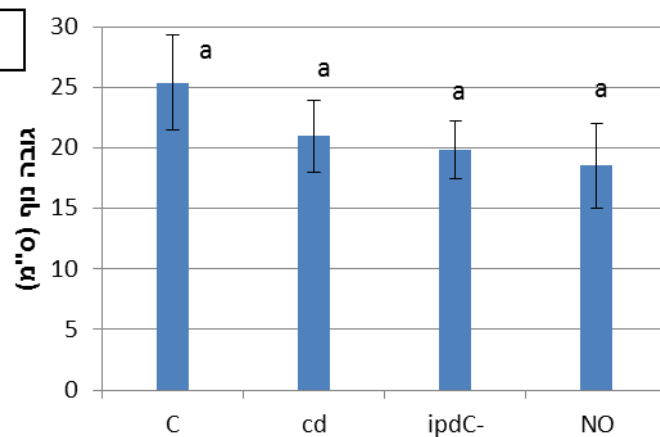
13 א



13 ב



13 ג



איור 13. השפעת יישום מיקרואורגניזמים על מדדים התפתחותיים בצמחי תירס 60 יום לאחר נביטה.

**Barazani, O.,** Baldwin, I.T. (In Press) A mixed bag: The plant growth-promoting *Sebacina vermifera* impairs defense mechanisms against herbivores. In: *Sebacinales: Forms, Functions and Biotechnological Applications* Oelmüller, R., Kost, G., Tripathi, S., and Varma, A. (Eds.) Springer-Verlag, Germany.

**סכום עם שאלות מנחות:**

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה</b>
בשנה זו התמקדה העבודה בבחינת ההשפעה של הפטרייה האנדופיטית על שני צמחי המבחן מלפפון ועגבנייה תחת תנאי עקה אביוטית ובבירור ההשפעה של תכשיר אזוספירילום על צמחי תירס ועגבנייה. בגלל מגבלות ההיתר של היחידה להגנת הצומח נערכו הניסויים עם הפטרייה האנדופיטית בחדר צמיחה. ניסויים עם האזוספירילום בוצעו בעציצים בתנאי חממה.
<b>עיקרי הניסויים והתוצאות</b>
<b>א.</b> הדבקה של צמחי עגבנייה האנדופיטית לא תרמה לעלייה בשיעור הצימוח והגדלת הביומסה, כפי שנמצא בשנת המחקר הקודמת, אך לא הייתה לה השפעה שלילית על הצימוח. מדדים של רמת הכלורופיל ורמת הפעילות האנטי-אוקסידנטית בצמח מלמדות כי תגובת הצמח לפטרייה היא בדומה לחשיפה לעקה. לכן, במערכת ניסוי נוספת נבחנה ההשפעה בהדבקה בפטרייה על יכולת צמחי הבוחן להתמודד עם עקת מלח. מערך הניסוי הראה כי להדבקה באמצעות מי ההשקיה יש השפעה טובה יותר על מידת יכולת הפטרייה להשפיע על הצימוח.
<b>ב.</b> לתכשיר המסחרי של אזוספירילום הייתה השפעה מעודדת צמיחה על צמחי תירס רק בנוכחות פטריית מיקוריזה. במערכת ניסוי נוספת עם שני קווים מוטנטים של החיידק, האחד שאינו מייצר אוקסין והשני ללא יכולת לייצר NO, נמצא כי ההשפעה של החיידק על הצימוח תלויה יותר ביכולתו לייצר NO.
<b>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</b>
הושגו מטרות המחקר לשנת הפעלתו השנייה. מתוצאות הניסויים עם הפטרייה עדיין לא ברור אם ההשפעה המיטיבה על הצמיחה תורמת גם לשיפור יבולים אך יתכן שיכולתה להעלות את הפעילות האנטי חימצונית בצמח יש תרומה בהקניית עמידות תחת תנאי עקה אביוטית.
פיתוח של סמן מולקולארי לפטרייה יאפשר אולי לזהות את הפטרייה בקרקעות של א"י והרחבת הניסויים לתנאי חממה ושדה.
בבחינה של תכשיר מסחרי של חיידק מעודד צמיחה (אזוספירילום) נמצא כי שילובו עם הדבקה בפטריית מיקוריזה תורמת לשיפור יכולתו לעודד צמיחה.
<b>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר?</b>
בגלל מגבלות ההיתר של היחידה להגנת הצומח, כל הניסויים עם הפטרייה האנדופיטית נערכו בתנאים מגבילים של חדר צמיחה. כדי לבחון את השפעתה על הצימוח יש לערוך ניסויים רחבים יותר בתנאי חממה ושדה.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: <b>פרסומים בכתב</b> - <u>ציטוט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; <b>פנטטים</b> - יש לציין שם ומס' פטנט; <b>הרצאות וימי עיון</b> - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
כמפורט בעמוד 17
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) <
<
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא בשלב זה

1. Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272: 201-209
2. Barazani O, Friedman J (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J Chem Ecol* 25: 2397-2406
3. Barazani O, Von Dahl CC, Baldwin IT (2007) *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuata* by inhibiting ethylene signaling. *Plant Physiology* 144: 1223-1232
4. Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *Fems Microbiology Letters* 251: 1-7
5. Xie H, Pasternak JJ, Glick BR (1996) Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology* 32: 67-71
6. Freeland JR, Petersen SD, Kirk H (2006) *Molecular Ecology*. Wiley.
7. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Butehorn B, Franken P (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2741-2744
8. Singh A, Sharma J, Rexer KH, Varma A (2000) Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica* - A revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science* 79: 1548-1554
9. Achatz B, von Rüden S, Andrade D, Neumann E, Pons-Kühnemann J, Kogel K-H, Franken P, Waller F (2010) Root colonization by *Piriformospora indica* enhances grain yield in barley under diverse nutrient regimes by accelerating plant development. *Plant Soil* 333: 59-70
10. Graham JH, Abbott LK. 2000. Wheat responses to aggressive and nonaggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 220: 207-218.
11. Mori. S, Nishizawa N, Hayashi H, Chino m, Yoshimura E, Ishihara E (1991) Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency? *Plant and Soil* 130: 143-156.
12. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* 299, 15-27.