

# טיפול במיקרואורגניסמים מועילים לשיפור מדדי צימוח, עמידות והפחתת נזקי מחלות בקאלה

## ובנץ חלב

Beneficial microorganisms for improved growth, resistance and reduced loss by pathogens in *Ornithogalum* and *Zantedeschia*

דיווח מחקר שנתי לתכנית המחקר – קוד מדען 20-01-0089

256-1022-18

שנות המחקר: שנה שלישית מתוך 3 שנים

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

### שמות השותפים למחקר:

איריס ירדניה	מכון וולקני, תקן	<a href="mailto:iris@volcani.agri.gov.il">mailto:iris@volcani.agri.gov.il</a>	עמידות נ"ח וקאלה
מיכל שרון	מו"פ ההר	<a href="mailto:michalsh@volcani.agri.gov.il">michalsh@volcani.agri.gov.il</a>	בידוד ואפיון פטריות פתוגניות
שירי פרייליך	נווה יער, תקן	<a href="mailto:shiri.freilich@gmail.com">shiri.freilich@gmail.com</a>	מיקרוביום בקרקע
סיגל בראון מיארה	מכון וולקני, תקן	<a href="mailto:sigalhor@volcani.agri.gov.il">sigalhor@volcani.agri.gov.il</a>	השפעת חומרים על נמטודות
שוש ויצמן	שה"מ, תקן	<a href="mailto:shoshw@shaham.moag.gov.il">shoshw@shaham.moag.gov.il</a>	ליווי ניסוי איסוף דוגמאות
פיני שניר	שה"מ, תקן	<a href="mailto:psnr@shaham.moag.gov.il">psnr@shaham.moag.gov.il</a>	ליווי משק מודל

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים הכתובים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם בגדר המלצות גידול לחקלאים.

איריס ירדניה

חתימת החוקר:

### תקציר הדו"ח

**הבעיה:** נץ חלב (נ"ח) כתום וקאלה (אתיופיקה וצבעונית) הנם גידולי גיאופיטים בהם קיים יתרון יחסי למגדל הישראלי בשוק האירופי. הוצאת תכשירי הדברה וחיטוי קרקע ובראשם מתיל ברומיד מסל חומרי ההדברה וצניחה ביעילות תכשירים מותרים (מתאם סודיום - אדיגן) הותירה את המגדלים ללא מענה לפחיתת יכול הנגרמת ע"י מחלות קרקע. גידול במצע מנותק הינו אחת הגישות המובילות בהפחתת נגעים הנגזרים מעייפות קרקע. בהתאם לכך, בדקנו את השפעתם של שלושה מוצרים ביולוגיים, מסחריים, משפרי גידול על קאלה ונץ חלב, בשני סוגי מצעים מנותקים, מצע פרלייט ומצע גן.

**מטרה:** שיפור איכות הגידולים נץ-חלב וקאלה במצעים מנותקים (פרלייט ומצע גן) באמצעות גישה בת קיימא המתבססת על יישום תכשירים מבוססי מיקרואורגניסמים תומכי גידול (ביולוגיים) למצע הגידול, וכן תכשיר המבוסס על פורמולציה בלעדית של תמציות צמחים המיועד ליישום בקרקע.

**שיטות:** התכשירים יושמו למצעי הגידול פרלייט ומצע גן ונערך מעקב מדדי גידול, איכות ויבול, כולל בדיקת ההשפעה על חומר הריבוי. נערכה אנאליזת מיקרוביום בטכנולוגיית ריצוף עמוק ללימוד הרכב המיקרואורגניסמים בקרקע, נלמדה השפעת הטיפול על עמידות מושרית ברמה הפיסיולוגית ונבחן ביטוי גנים המהווים סמנים לעמידות בצמחים. כמו כן נבחנה השפעת החומרים על נוכחות נמטודות חופשיות בניסוי in-vitro ובניסויי עציץ.

**תוצאות שנה ג':** בשנה זו נבדקה השפעת החומרים על גידול צמחי קאלה ונ"ח מחומר ריבוי חדש במצע גן. במצע גן העשיר יותר מפרלייט, לא נמצאה השפעה מיטיבה של החומרים הביולוגיים על הגידול, או על הרכב המיקרואורגניסמים בקרקע. נמצא בבירור כי הגורם המשפיע ביותר על אוכלוסיות המיקרואורגניסמים הינו סוג המצע ולאחריו הצמח. התוסף גרין אפ נמצא בעל השפעה משמעותית על נמטודות מהסוג *Meloidogyne javanica*. שלושת התכשירים, גרין אפ, ריזוקטול ואקוסנס הקנו עמידות מסויימת כנגד חיידקי פקטובקטריום.

**רקע:** שימוש יתר בחומרי הדברה בחקלאות ונזק סביבתי עצום, הובילו לשינוי בחקיקה העולמית בנוגע לשימוש בפסטיצידים ולהוצאה מחוץ לחוק של חומרים רבים. הדוגמה הרלבנטית ביותר הינה איסור השימוש במתיל ברומיד, אשר פגע בגידולים רב-שנתיים כולל גיאופיטים, ללא חלופות מתאימות. ענף הגיאופיטים נכנס לעידן חדש ללא הדברה רחבת טווח ונוצר צורך בפיתוח אמצעים להבטחת בריאות הגידולים. העדר תכשירים אפקטיביים מאפיין גידולים כמו קאלה ונץ חלב בהם חומר הריבוי משמש במחזוריים רב-שנתיים, אך גם גידולים חד-שנתיים כמו כלנית סובלים מעייפות קרקע/מצע גידול כאשר החלקות משמשות לגידול רב שנתי. חשיבות המיקרוביום (Microbiome) זכתה להכרה בעשור האחרון, כגורם אינטגרטיבי הלוקח בחשבון את השפעת כלל אוכלוסיות המיקרואורגניזמים בקרקע על הצומח, כחלק מתפקוד יעיל של מערכות חקלאיות/אקולוגיות (Berendsen et al., 2012). אוכלוסיית המיקרואורגניזמים בקרקע הינה חלק מבריאות הצומח וקיומה של סביבה מאוזנת ובת קיימה. מחקר זה נועד לשלב במהלך הגידול גישות שיתרמו להתפתחות בריאה של צמחי גיאופיטים תוך הפחתה למינימום של חומרי הדברה. העדר חומרי הדברה מותרים לשימוש ותובנות חדשות לגבי חשיבות המיקרוביום, הובילו לעניין מחודש בתכשירים מבוססי מיקרואורגניזמים, המשפיעים על בית השורשים, על כושר קליטת המינרלים ועל עמידות הצמח בפני עקות ביוטות/אביוטיות (Mendes et al., 2013). אלה עשויים להתבטא ביבול, באיכות ובגידול רב-שנתי. ההצעה נועדה לבחון טיפולים תומכים מבוססי מיקרואורגניזמים וכן תמצית צמחית, לצורך שיפור תברואה וביצועים של גידולי הגיאופיטים נץ חלב דוביום וקאלה אתיופיקה. הטיפולים נבחרו על סמך עבודה הקדמית בתנאי חממה במצע מנותק (פרלייט) בשני הגידולים. שניהם מציגים רגישות גבוהה למחלת הריקבון הרך המועברת בבצלים/פקעות, ומהווים מודל לגידולים רב-שנתיים בהם יש חשיבות יתרה לשימור הסניטציה של חומר הריבוי.

**התכשירים:** מתבססים על פורמולציות מסחריות הניתנות ליישום נרחב: 1. חיידקים פרוביוטיים מקבוצת הבצילוס -תכשיר Ecosense® S10 שהוכנס לשימוש חקלאי בישראל לאחרונה; 2. תכשיר נבגי החיידק בצילוס סובטיליס Rhizoctol® שהציג יעילות בתפוא"א כנגד ריזוקטוניה וארויניה, אך יעילותו לא נבדקה בצורה מסודרת בענף הפרחים. 3. תכשיר המבוסס על תמציות צמחים (הרכב מוגן בפטנט) ומכיל סיליקה (הידועה כמשרת עמידות), התכשיר נקרא גרין אפ קרקע ומיוצר ע"י חברת Green Life Group.

**החומר הצמחי:** הסוג נץ חלב (*Ornithogalum*) נמנה בעבר על משפחת היקינתוניים (*Hyacinthaceae*) ובסקירה סיסטמטית מעודכנת שויך למשפחת האספרגיים (*Asparagaceae*) (Chase & Reveal, 2009, Martinez-). הסוג כולל עשבוניים, חד-פסיגיים, בעלי בצל, שושנת עלים ועמודי פריחה זקופים הנושאים עד עשרות פרחים (Littlejohn, 2006). נ"ח כתום (*O. dubium*) קיים במסחר כפרח קטוף רק משנות ה-2000, הקדימו אותו מינים בעלי לבן כמו *O. thyrsoides* (נ"ח מכבדי), *O. Saundersiae* ו- *O. arabicum* (נ"ח ערבי), המינים המובילים מייצור הולנדי ואפריקאי (Tun et al., 2013). בישראל מגדלים בעיקר נ"ח כתום, המאכלס כ-80% משטחי הגידול (כ-250 דונם) וביתרת השטח נ"ח מכבדי. היקף השיווק מישראל לאירופה מגיע לכ-10 מיליון ענפים (מתוך כ-40 מיליון) בממוצע של 23 סנט אירו. בנוסף משווקים מישראל 600,000 עציצים ו-15 מיליון בצלים להפחה בעולם, המייצרים פדיון של 20-15 מיליון אירו בשנה.

הסוג קאלה *Zantedeschia* spp. נמנה על משפחת הלופיים (Aracea) וכולל 8 מינים, שני מיני קאלה לבנה בתוכם בת-קאלה אתיופית *Z. aethiopica* ו-6 מינים מקבוצת *Aestivae* המיוצגת במסחר בעיקר ע"י טיפוס היברידיים צבעוניים, תוצרי הכלאות בין-מיניות (Luzzatto-Knaan et al., 2014). הסוג אנדמי לדרום מזרח היבשת האפריקאית משם התפשט כצמח נוי לרחבי העולם וזכה לטיפול מסיבי בהולנד, ניו-זילנד, וארה"ב. הגידול מצוי במקום 15 המכובד ברשימת הנמכרים של הבורסות ההולנדיות ובעל פוטנציאל פיתוח. שני הגידולים סובלים ממחלות המועברות בקרקע, וכן ממחלת הריקבון הרך הנגרמת ע"י החיידק פקטובקטריום (*Pectobacterium* spp.). המחלות ריזוקטוניה (*Rhizoctonia solani*) ופיתיום (*Pythium ultimum*) הנגרמות ע"י פטריות קרקע מהוות גורם ראשוני בהדבקה. הפטריות פוגעות בשורשים צעירים במהלך נביטת הפקעות והבצלים, גורמות לעיכוב התפתחות כללי וכן להופעת כתמים מימיים אפורים שחורים ע"ג השורשים (פיתיום), או ריקבון בסיס הגבעולים והצהבת עלים (ריזוקטוניה). מחלת הריקבון הרך, נחשבת במידה רבה למחלה משנית התוקפת בנוכחות גורמי מחלה ראשוניים כמו ריזוקטוניה ופיתיום (Byther & Chastagner, 1993).

טיפולים תומכים במיקרואורגניסמים מועילים, צפויים להפחית מחלות ופגעים נוספים במנגנונים של תחרות, אנטגוניזם (ישיר), הגברת קליטת מינרלים בצמח ושיפור עמידותו לעקות ולמחלות (Mendes et al., 2013). המחקר נועד לבחון השפעת התכשירים הביולוגיים על הפיסיולוגיה; היבול, מועד הפריחה והרכב המיקרוביום, כמו גם על אוכלוסיית הפתוגנים במצע וע"ג השורשים.

ירידת יעילות חיטויי קרקע מקבוצת המתאם סודיום (אדיגן) ותופעת ה"פירוק המואץ" הנגרמת ע"י חיידקים מפרקים (יעקב גוטליב וחובריו; 2015), דחפה את מגדלי הגיאופיטים להשתמש במצעים מנותקים. גידול במצע מנותק מאפשר יישום יעיל של חיטוי סולרי לפני טיפול באדיגן, שליטה טובה במחלות ע"י מינוני דשן מדויקים, שליטה ב-pH ויישום חומרי הדברה בהשקיה במהלך תקופת הגידול. החיסרון במעבר למצע מנותק הינו עלותו הגבוהה המאלצת שימוש רב-שנתי כדי לצמצם עלויות. שימוש כזה אינו מונע "התעייפות" המצע, ירידה ביבול ולעיתים התפרצות מחלות. תמיכה בגידולים במצע מנותק ע"י שימוש במיקרואורגניסמים מעודדי גידול, עשוי לעודד שימוש רב-שנתי במצע מבלי לפגוע באיכות הגידולים.

היפותזת המחקר: אכלוס מצע הגידול ע"י מיקרואורגניסמים מועילים ישפיע על הרכב המיקרוביום במצע. יפחית נגיעות במחלות ויוביל לשיפור מדדי צימוח בגידולי גיאופיטים. בהיבט רב-שנתי השפעה חיובית על חומר הריבוי תאפשר יותר ממחזור גידול אחד.

מטרות המחקר: הפחתת נזקי פטריות קרקע וריקבון רך במצעים מנותקים, באמצעות טיפולים בתכשירים ביולוגיים (מיקרואורגניסמים מעודדי גידול ותמצית צמחים) בנץ חלב וקאלה. מטרות משנה: 1. לימוד השפעת שני טיפולים מיקרוביאליים (חיידקים פרוביוטיים אקוסנס וריזוקטול) וטיפול Green Up (תמציות צמחים) על התפתחות צמחי קאלה ונץ חלב מחומר ריבוי חדש בשנה הראשונה ואח"כ רב שנתי (יאספו מדדי גידול, יבול, התפתחות מחלות ובריאות חומר ריבוי); 2. תבחן השפעת הטיפול על הרכב המיקרוביום בריזוספרה 3. תתבצע הערכה כמותית של מחלות קרקע בשלושה מועדים (יבדקו: ריזוקטוניה, פיתיום, פוזריום ופקטובקטריום); 4. יתבצעו בדיקות עמידות ואופיין ביטוי גנים ידועים לעמידות בתגובה לטיפולים.

**עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:**

**עידוד גידול בחלקות הניסוי:** חלקות קאלה ונץ-חלב טופלו בשלושה חומרים ביולוגיים במצע פרלייט, בחממה במו"פ לכיש במהלך שתי עונות גידול 2017-2018. בשנת המחקר האחרונה, נשתל חומר ריבוי חדש, בחממה בבית דגן במצע גן המכיל קוקוס/כבול/קומפוסט ביחס 10:20:70. בכל עונות הגידול: הצמחים נטבלו עם השתילה בטיפול מיקרואורגניסמים, גרין-אפ או מים (בקורת), ולאחר חודש משתילה נתנו טיפולי תגבור. טיפולים אלה בוצעו לכל החלקות מדי שבועיים בעזרת מזלף, ע"ג הצמחים והמצע, במשך כל העונה עד סיום הקטיף. נבחנו הבדלים בין הטיפולים במדדי הגידול (צימוח, איכות הפרח ומקדם ריבוי). בנוסף, נלקחו דגימות קרקע מסביבת השורשים של הצמחים מכל טיפול, מהם הופק DNA לאנליזת מיקרוביום.

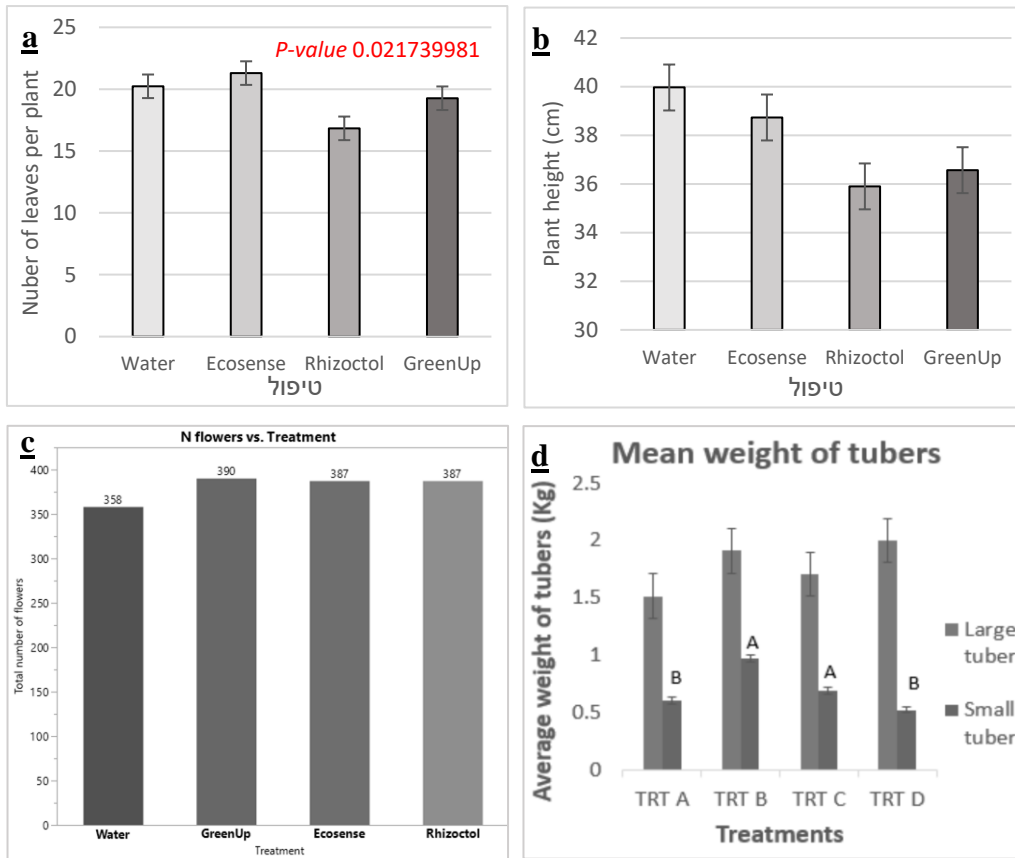
**חומר צמחי:** המחקר בוצע על צמחי ק. לבנה, *Zantedeschia aethiopica* (ZA) וצמחי נץ-חלב כתום *Ornithogalum dubium* (OD) מחומר ריבוי חדש בעונות 1 ו-3 ומחומר ריבוי שנה שנייה בעונה 2.

#### **הטיפולים הביולוגיים שניתנו במהלך המחקר:**

ריכוז	פירוט	טיפול	
	מי ברז ביקורת	מיס	A
0.1%	תכשיר נוזלי מעודד סביבת השורשים, מכיל חיידקי <i>Bacillus subtilis</i>	Agriotics Ecosense	B
0.1%	תכשיר אבקה מתחלב, משמש כאנטגוניסט בהדברה ביולוגית למחלות קרקע, מכיל חיידקי <i>B. subtilis</i> .	Rhizoctol	C
0.5%	תכשיר אנטימיקרוביאלי (דטרגנט), מכיל מיצוי קליפות קוקוס ואנס וסיליקה.	GreenUp-soil	D

#### **אנאליזת גידול קאלה אתיופיקה:**

פקעות המקור נרכשו ממשק אדרי בכפר הס. פקעות שנה שניה גודלו מחומר בגודל +16 בלבד. בשנה השלישית הפקעות הועברו למצע גן וגודל חומר קטן אשר פוצל מפקעות השנה השנייה. לאורך כל שנות המחקר, הפקעות נשמרו בהתאם לטיפול המיקרואורגניסמים שקיבלו בשנה קודמת ואותו טיפול ניתן בשנה העוקבת. צפיפות השתילה הייתה 45 פקעות ל-5 מטר רץ, 18 פקעות למטר רבוע. תגובת הצמחים לטיפולים נמדדה במספר עלים לצמח בששת השבועות הראשונים לגידול ובגובה הצמחים (איור 1). בשנת הגידול השנייה ועם פקעות גדולות, הטיפולים הפחיתו (לא במידה מובהקת) את קצב פתיחת העלים ביחס לביקורת ופגעו בגובה הצמחים בחודש הראשון, אולם פער זה (לא מובהק סטטיסטית) הצטמצם בהמשך. בסוף העונה השנייה (אך לא בעונה השלישית במצע גן), ניכר יתרון במספר הפרחים המצטבר לטיפול ביחס לביקורת, עבור כל הטיפולים כאשר טיפול גרין אפ קרקע המבוסס על מיצוי צמחים וסיליקה נתן כ-50 פרחים יותר למטר בממוצע (איור c1). טיפול זה גם נתן את הפקעות הגדולות ביותר בתום העונה. בתום העונה השלישית ובמצע גן לעומת פרלייט בעונות קודמות, לא ניכר יתרון מובהק לטיפולים התומכים (איור 2).



**איור 1:** מדדי גידול של קאלה לבנה בחממת הגידול במיפ לכיש תחת יישום טיפולים תומכי גידול בעונה שנייה. (a) ממוצע מספר העלים הפתוחים של כל החזרות לכל טיפול (A-D), חודש לאחר שתילה; (b) ממוצע גובה הצמחים של כל החזרות לכל טיפול (A-D), לפני תחילת הפריחה (אמצע ינואר); (c) ממוצע מספר הפרחים של כל החזרות לכל טיפול (A-D) מכל עונת הקטיפ; (d) ממוצע משקל הפקעות לפי גודל (גדול +16 או קטן מתחת ל-15) בסוף העונה של כל החזרות לכל טיפול (A-D). בקורת מים (A); חידקים פרוביוטיים - Agriotis (B); Ecosense; ריזוקטול (C) וגרין אפ קרקע (D). העמודות מייצגות ממוצע של 6 חזרות באורך 5 מטר ו-45 צמחים לחזרה. הקווים מעל העמודות מייצגים מרווח של טעות תקן אחת. מצורפת למטה טבלאות ניתוח סטטיסטי ומבחני השוואה.

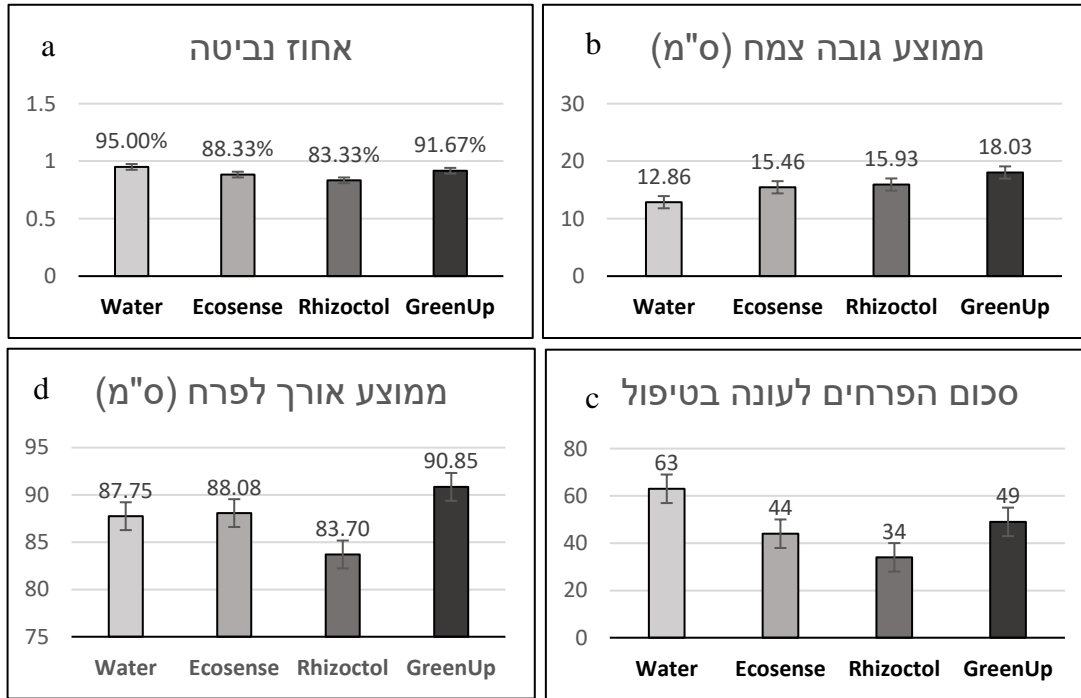
Anova (1.c) מספר הפרחים ואורך ממוצע לפרח						
Groups	Count	Sum	Average (length)	Variance		
Water	358	21358	59.65921788	99.03760387		
Ecosense	387	23342	60.31524548	98.79155454		
Rhizoctol	387	23552	60.85788114	111.4279364		
GreenUp	390	23453	60.13589744	87.38765408		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	274.666164	3	91.55538801	0.923493334	0.428650769	2.610764369
Within Groups	150494.9455	1518	99.14028032			

ממוצע גובה לצמח (1.b)

ממוצע מספר עלים לצמח (1.a)

Groups	Count	Sum	Average (length)	Variance	Groups	Count	Sum	Average (leaf number)	Variance
Water	30	1199	39.966	48.722	Water	30	607	20.233	31.633
Ecosense	30	1162	38.733	44.202	Ecosense	30	639	21.3	35.734
Rhizoctol	30	1077	35.9	35.817	Rhizoctol	30	505	16.833	17.798
GreenUp	30	1097	36.566	37.6333	GreenUp	30	578	19.266	45.443

אנליזת גידול קאלה אתיופיקה שנה שלישית: קאלה אתיופיקה גודלה מפקעות שנאספו בתום השנה השנייה במו"פ לכיש. נשתלו רק פקעות בגודל פריחה +16. הפקעות נשמרו בהתאם לטיפול המיקרואורגניסמים שקיבלו בשנה קודמת וקיבלו את אותו טיפול גם בשנה הנוכחית. צפיפות השתילה הייתה 25 פקעות ל-5 מטר רץ, 10 פקעות למטר רבוע. תגובת הצמחים לטיפולים עם החומרים מעודדי הגידול נמדדה במספר עלים לצמח בששת השבועות הראשונים ובגובה הצמחים (איור 2).



**איור 2: מדדי גידול של קאלה לבנה בחממת הגידול במכון וולקני תחת יישום טיפולים תומכי גידול שונים.** (a) ממוצע אחוז הנביטה של כל החזרות לכל טיפול (A-D), חודש לאחר שתילה; (b) ממוצע גובה הצמחים של כל החזרות לכל טיפול (A-D), לפני תחילת הפריחה (אמצע ינואר); (c) סכום הפרחים של כל החזרות לכל טיפול (A-D) מכל עונת הקטיף; (d) ממוצע אורך לגבעול פורח בזמן הקטיף של כל החזרות לכל טיפול (A-D). בקורת מים (A); חיידקים פרוביוטיים - Agriotis Ecosense (B); ריזוקטול (C) וגריין אפ קרקע (D). העמודות מייצגות ממוצע של 6 חזרות באורך 1 מטר ו-10 צמחים לחזרה. הקיום מעל העמודות מייצגים מרווח של טעות תקן אחת. מצורפות למטה טבלאות ניתוח סטטיסטי ומבחני השוואה (ANOVA & t-test).

**אחוז נביטה**

Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Water	6	5.7	0.95	0.007		
Ecosense	6	5.3	0.883333	0.021667		
Rhizoctol	6	5	0.833333	0.098667		
GreenUp	6	5.5	0.916667	0.017667		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.044583	3	0.014861	0.409962	0.7475805	3.098391212

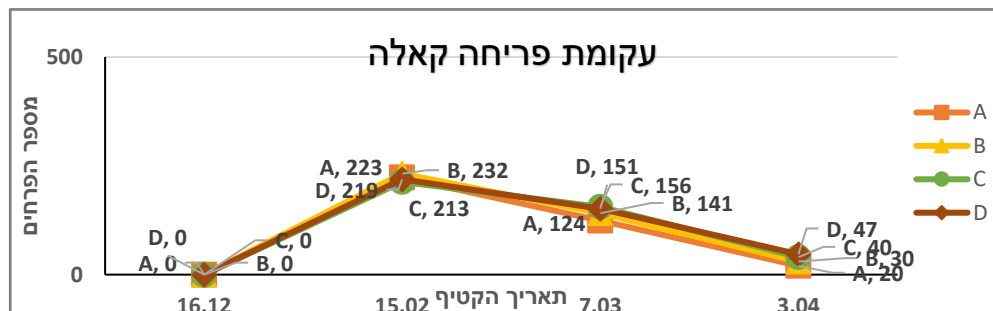
**ממוצע גובה צמח**

Groups	Count	Sum	Average	Variance	P-value	
Water	36	463	12.86111	32.12302		
Ecosense	36	556.5	15.45833	36.34821	0.0241	
Rhizoctol	36	573.5	15.93056	60.4879	0.0316	
GreenUp	36	649	18.02778	31.97063	0.0003	
Source of Variation	SS	df	MS	F		F crit

Between Groups	486.7639	3	162.2546	4.03293	0.008702	2.669256
----------------	----------	---	----------	---------	----------	----------

### סכום הפרחים

Groups	Count	Sum	Average	Variance	P-value	
Water	18	63	3.5	9.558824		
Ecosense	18	42	2.333333	5.882353	0.00735	
Rhizoctol	18	35	1.944444	2.761438	0.00694	
GreenUp	18	51	2.833333	9.441176	0.23800	
Source of Variation	SS	df	MS	F		F crit
Between Groups	24.375	3	8.125	1.175671	0.325512	2.739502



SUMMARY	Count	Sum	Average	Variance
A	4	358	89.5	11061.67
B	4	387	96.75	12152.92
C	4	387	96.75	10862.25
D	4	390	97.5	11045.67
16.12	4	0	0	0
15.02	4	887	221.75	63.58333
7.03	4	572	143	199.3333
3.04	4	63	15.75	16.25

**איור 3:** עקומת פריחה של קאלה לבנה (שנה שנייה) הפרחים נקטפו בחממת הגידול במו"פ לכיש תחת יישום הטיפולים השונים (A-D) לאורך כל עונת הקטיפה. בקורת מים (A); חיידקים פרוביוטיים - Agriotis Ecosense (B); ריזוקטול (C) וגרין אפ קרקע (D).

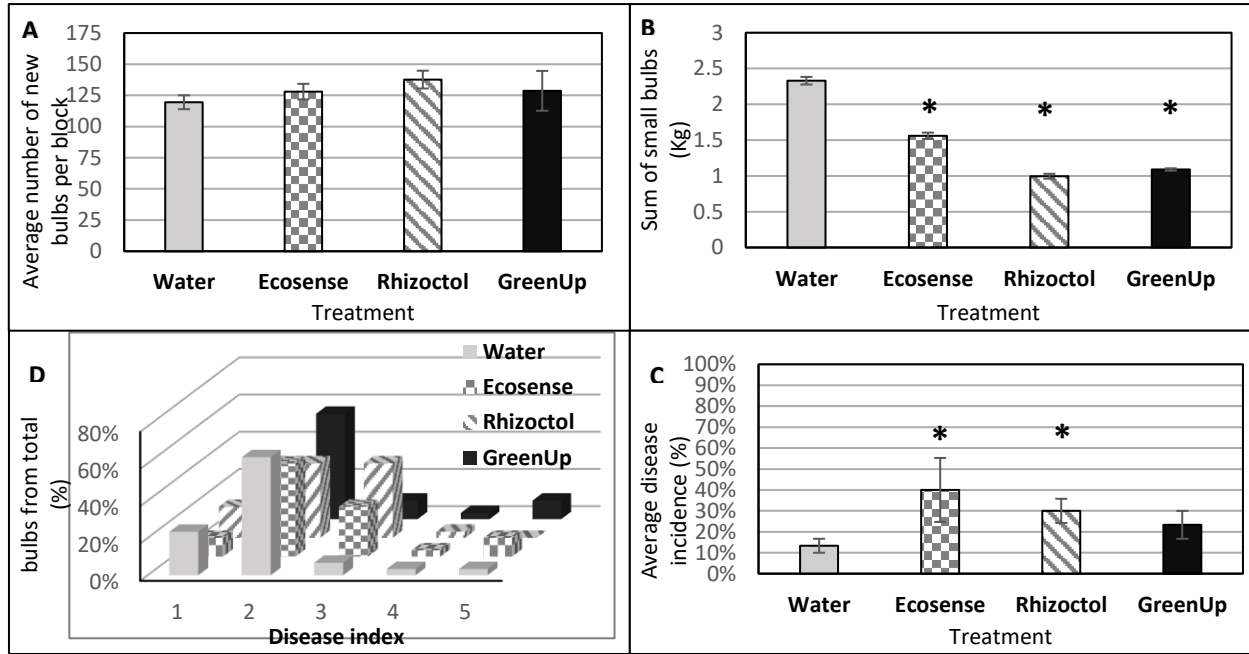
ANOVA	SS	df	MS	F	P-value
Source of Variation					
Rows	170.25	3	56.75	0.765455	0.5415

לא ניכר הבדל בפיזור הפרחים במהלך העונה (איור 3). במועדי הקטיפה המוקדמים המיטביים למגדלים מבחינה כלכלית, לא ניכר יתרון לטיפולים מעודדי הגידול. כמו כן, לא נצפה הבדל מובהק בכמות הפרחים בתום עונת הגידול, למרות שמבחינת מספר הפרחים הסופי, היה יתרון קל לטיפולים.

גם מדידת אורך הפרחים הראויים למסחר (מעל 70 ס"מ - תוצאות אינן מוצגות) לא הציגה העדפה מובהקת לטיפולים, למרות שבטיפולי Rhizoctol ו-GreenUp היו מעל לעשרה פרחים במוצע לחזרה, לעומת טיפולי Ecosense וביקורת המים עם פחות מעשרה פרחים באורך מסחרי במוצע לחזרה. בסוף העונה לאחר ייבוש הצמחים, נתגלו הבדלים בפקעות בין הטיפולים לביקורת שהראו סימני רגישות מוגברים של הטיפולים למחלת הרקבון הרך ולתנאי הסביבה כמוצג באיור 4. בפקעות אשר מוינו לשני גדלים אמנם לא נמצאו הבדל מובהק בסכום משקלן הכולל, עם זאת, נמצא כי בסכום משקל הפקעות הקטנות בלבד המוצג באיור 4, אשר מהוות את רוב הפקעות החדשות שנוצרו במהלך הגידול, כל הטיפולים שקלו פחות לעומת הביקורת באופן מובהק. בכמות הפקעות החדשות שנוצרו (פקעיות), בטיפולי Rhizoctol נוצרו יותר פקעיות מטיפולי הביקורת באופן מובהק, כאשר בטיפולי Ecosense ו-GreenUp היתה כמות שווה של פקעיות ולא נמצאה מובהקות בינם לביקורת. בבחינת שכיחות ועוצמת המחלה בפקעות (אינדקס מחלה) נמצא כי המחלה שכיחה יותר בטיפולי החיידקים לעומת הביקורת באופן מובהק. כפי שנראה באיור 4, טיפולי Ecosense מציג כ-40 פקעות מהטיפולי בהן נצפו

סימני מחלה ברורים ובטיפול Rhizoctol 30% שכיחות מחלה בפקעות, לעומת 13% בטיפול הביקורת. בעוצמת המחלה המוצגת באיור 4 נראה כי מרביתן של הפקעות (<50%) בכל הטיפולים היו ללא סימני מחלה ברורים. עם זאת, בטיפולי החיידקים ניתן לראות יותר פקעות שנמדדו עם רמת מחלה נמוכה (index=3), לעומת טיפולי GreenUp והביקורת שנצפו עם פקעות בריאות יותר.

איור 4: מדדי ריבוי ופגיעה ממחלת רקבון רך בפקעות בת קאלה אתיופית שנה שנייה, לאחר עונת גידול בחממה מו"פ לכיש במצע



**פרייט.** (A). ממוצע פקעות חדשות שנוצרו במהלך העונה מסביב לפקעת שנשתלה, לחזרה אחת של חלקת טיפול. (B). סכום משקל הפקעות לפי גודל קטן, שקוטרן מתחת ל- 15mm, בסוף עונת הגידול לכל החזרות בכל טיפול. (C). שכיחות המחלה לפי ממוצע אחוז הפקעות לחזרת טיפול בהם נראו סימני מחלה ברורים (3-5 באינדקס מחלה). הקיום על העמודות מייצגים מרווח של טעות תקן אחת ממוצע הטיפול. כוכבית מעל העמודה מייצגת שוני מובהק מטיפול המים ברמת ביטחון של 95%. (D). חומרת המחלה בפקעות לפי הטיפולים השונים. חומרת המחלה מחושבת לפי ממוצע אחוז הפקעות לטיפול בחמישה מצביי בריאות שונים (אינדקס מחלה); (1) בריא לחלוטין; (2) מעט רך; (3) כתם של רקבון רך; (4) כחצי מהפקעות רקובה; (5) רקוב לחלוטין.

## נץ חלב כתום

בעונת הגידול 2018 מדדי הצימוח מהנביטה ועד הפריחה לא הראו עידוד גידול לעומת הביקורת. עבור מדד כמות העלים לבצל, רק טיפול Rhizoctol נמצא בעל פחות עלים (n=13) משאר הטיפולים ומטיפול הביקורת (n=16) באופן מובהק (p=0.015). עבור המדדים קוטר שושנת העלים ואורך השורש לא נמצא שוני מובהק לאף אחד מהטיפולים לעומת הביקורת. טיפול GreenUp הציג ממוצע קוטר עלים הכי גדול (n=14.4), אך ממוצע השורש הכי ארוך, נצפה בביקורת 7.33cm, לעומת הטיפולים שנמדדו עם ממוצעי אורך שורש של 5.63cm בטיפולי Ecosense ו Rhizoctol ו 6.08cm בטיפול GreenUp.

גידול נץ החלב בחממה במכון וולקני במהלך 2019, כלל הערכת שלושה שלבים התפתחותיים; נביטה, צימוח וגטטיבי והתמיינות לפריחה. בשלושת המדדים לא נמצאו הבדלים מובהקים לעומת טיפול הביקורת באף אחד מהטיפולים. ממוצע אחוז הנביטה הגיע לבסוף בעונה זו ל- 100% בכל חלקות הנץ חלב, אולם נצפתה הדרגתיות בין הטיפולים השונים, בהבדלים של אחוזים בודדים בלבד. שבועיים לאחר השתילה בטיפול GreenUp נמדד ממוצע של 98.6% נביטה, התוצאה הגבוהה ביותר שנמדדה באותה עת. טיפול Rhizoctol הראה את הנביטה המעוכבת ביותר עם 94.4%, בעוד טיפול Ecosense וטיפול המים תועדו



עם 96% ו- 97% נביטה בעת המדידה, בהתאמה. בניגוד לתוצאות הנביטה ולתוצאות מהשנה הקודמת, טיפול GreenUp נמצא חודש לאחר השתילה עם ממוצע קוטר עלים הכי קטן ( $n=25$ ) לעומת הביקורת שהראתה את הקוטר הגדול ביותר ( $n=26.8$ ). במדידת הגבעולים שהתמיינו לפריחה, טיפול GreenUp נמצא עם אחוז ההתמיינות הקטן ביותר (48.6%) ודווקא טיפול Rhizcotol תועד עם אחוז ההתמיינות לפריחה הגבוה ביותר (54.1%), כאשר בביקורת (52.8%) התוצאה קרובה יותר לטיפול Rhizoctol. עונת גידול 2018 בנץ חלב כתום

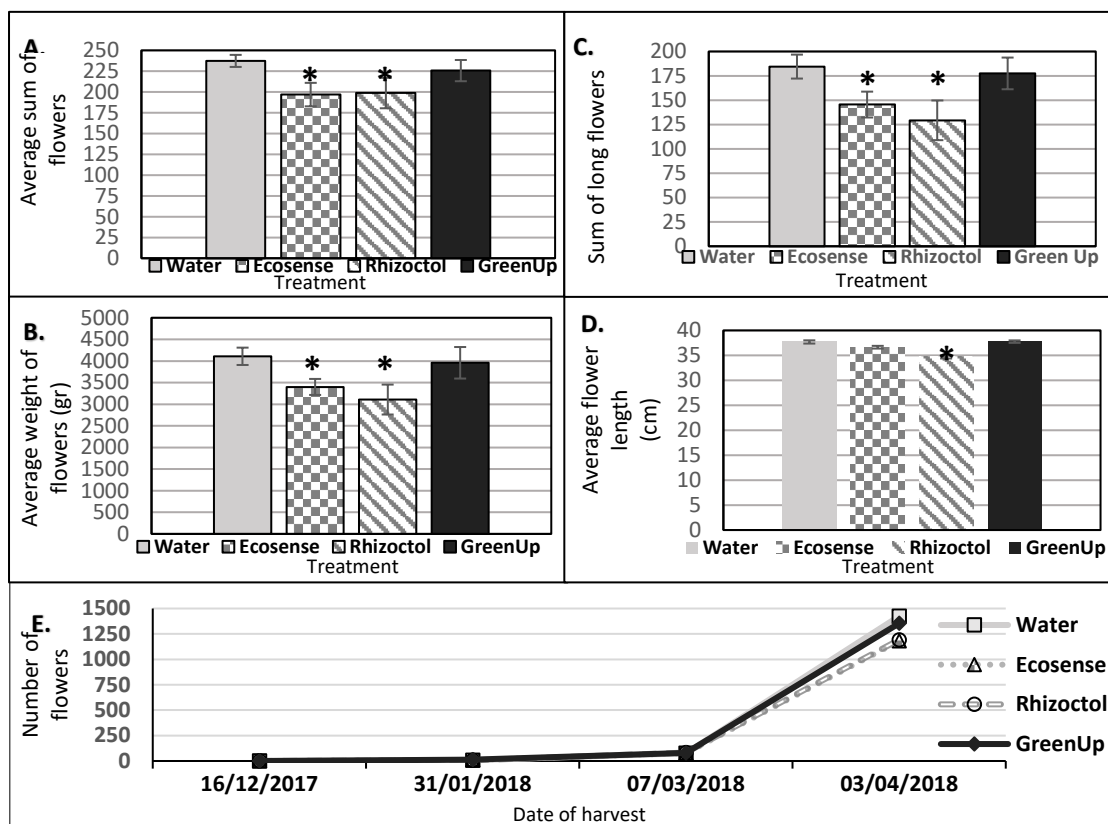
בכדי להצליח לקטוף במצב איכות אידיאלי, הפרחים נקטפו בשלושה מועדים במהלך עונת הפריחה, בסנכרון עם גלי הפריחה של הגידול. בשני מועדי הקטיף הראשונים ב-2018 הייתה כמות מעטה מאוד של פרחים יחסית לשטח הגידול (פחות ממאה פרחים לטיפול), לעומת הקטיף האחרון שכלל 93% מהפרחים שנקטפו בחממה במשך כל העונה (איור 5). עובדה זאת מצביעה על כך שלא התקבל אפקט של הקדמת פריחה באף אחד מהטיפולים ומפאת ההבדל הכמותי בין הקטיפים, ניתוח הנתונים המוצג באיור 12 מתייחס למועד הקטיף השלישי. בכל מדדי הפריחה טיפול הביקורת הראה יבול ומדדי קטיף משופרים לעומת טיפולי החיידקים. במדד אורך הפרח טיפול Ecosense אמנם הראה ממוצע נמוך מהביקורת אך ללא מובהקות, לעומת טיפול Rhizoctol שנמצא בו ממוצע אורך פרח קצר במובהק מהביקורת ( $p=0.037$ ). בממוצע משקל הפרחים, כמות הפרחים ומספר הגבעולים הראויים למסחר, הביקורת הציגה נתונים גבוהים יותר באופן מובהק מטיפולי Ecosense ו-Rhizoctol. טיפול GreenUp לא נבדל באופן מובהק מהביקורת בכל המדדים. ספירת כתמי ההדבקה בריקבון רך בכל אחת מחזרות הטיפולים, כמוצג (איור 6) טיפול Ecosense הראה יותר כתמי הדבקה בטיפול המים, אך לא במידה מובהקת. בסוף העונה לאחר ייבוש הצמחים, לא נמצאו הבדלים מובהקים בגודל הבצל, כמות הבצלים החדשים ובשכיחות וחומרת המחלה בבצלים. בנוסף, כפי שניתן לראות באיור 6, נצפו רמות מחלה גבוהות בבצלים מכל הטיפולים, ללא מובהקות ביניהם, כאשר טיפולי החיידקים מציגים שכיחות וחומרת מחלה זהות (53%) וטיפול GreenUp (65%) וביקורת המים (62%) עם חומרת מחלה מעט גבוהה יותר בתום העונה.

### עונת גידול 2019 בנץ חלב כתום

גם בעונה זו קטיף הפרחים בוצע בשלושה מועדים המיוצגים בעקומת הפריחה המתוארת (איור 7). כמות הפרחים בכל קטיף וסך הפרחים לעונה לא הציגו יתרון מובהק לטיפולים לעומת הביקורת. בהשוואה לשנה הקודמת, בשנה זו הביקורת היתה שווה לטיפולים עם 105 פרחים, חוץ מטיפול Rhizoctol שבשנה זו הניב יותר פרחים ( $n=110$ ). גם עבור מדד גרם לס"מ המוצג באיור 7, שלושת הטיפולים נמצאו דומים לביקורת המים. בסיכום משקל הפרחים המתואר באיור 7 נמצא כי הצמחים בטיפול GreenUp שקלו פחות באופן מובהק מטיפול המים ( $p=0.046$ ) הפריחה לא הקדימה באף אחד מהצמחים בחממה ונמשכה בגלים כמעט קבועים עד תחילת חודש מאי כפי שנראה באיור 7. בתום העונה, מדידת הבצלים המתוארת (איור 8) הראתה שטיפולי GreenUp ו-Rhizoctol ייצרו יותר בצלים חדשים (במהלך העונה) מטיפולי Ecosense וביקורת המים באופן מובהק ( $p=0.044$ ). בקוטר הבצלים שנשתלו לא נמצא הבדל בסוף העונה בין הטיפולים השונים, הטיפולים והביקורת התייצבו על קוטר בצל ממוצע של כ-35 mm. בבחינת נגיעות מחלת ריקבון רך בבצלים שהוצאו מן החממה המתוארת באיור 8 נמצא כי שכיחות המחלה הגבוהה ביותר היתה

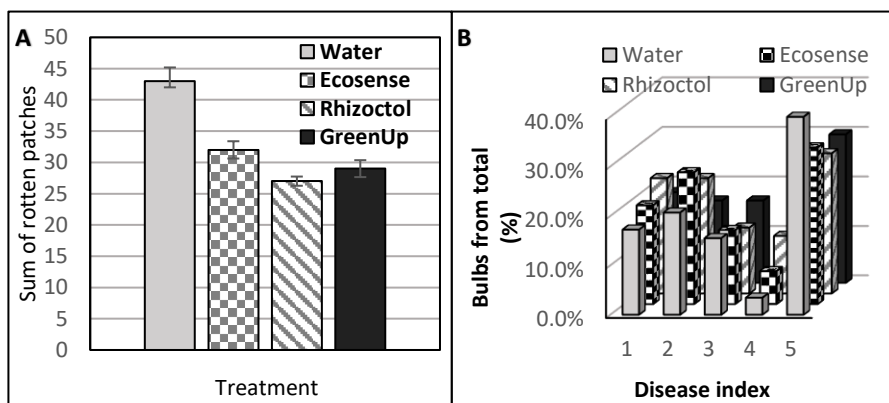
בטיפול Greenup ובמובהקות מביקורת המים ( $p=0.04$ ). רוב הפקעות בכל הטיפולים לא הראו סימני מחלה ברורים ואחוזים בודדים בלבד ( $n<3\%$ ) היו רקובים לחלוטין ( $index=5$ ).

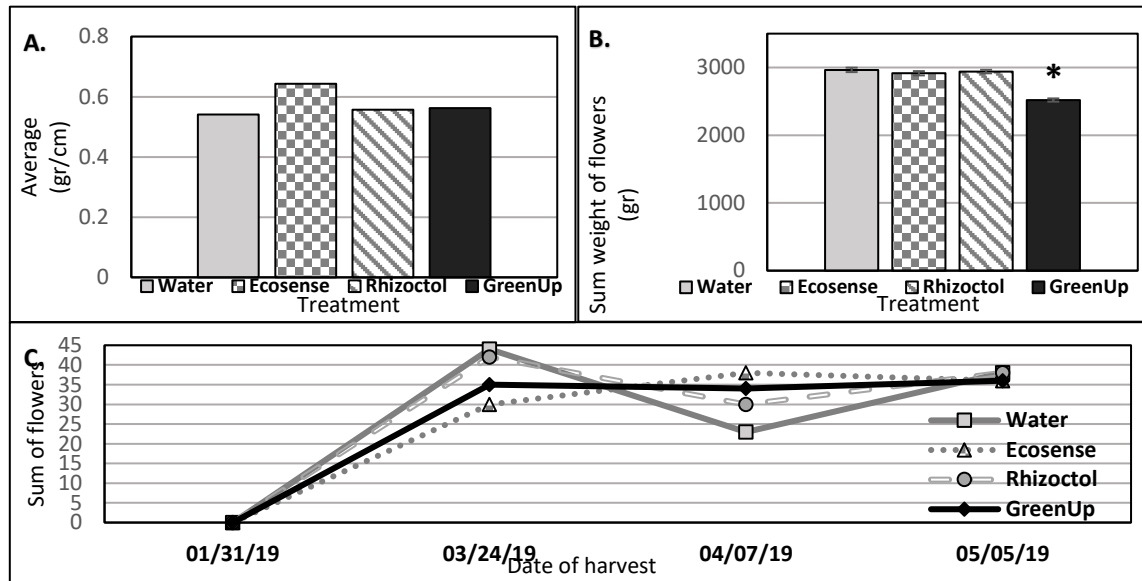
איור 5: מדדי קטיף של נץ-חלב כתום (שנה שנייה) בחממת הגידול במו"פ לכיש תחת יישום הטיפולים השונים. (A) ממוצע מספר הפרחים



לחזרה מכל עונת הקטיף בכל טיפול. (B) ממוצע משקל הפרחים לטיפול. (C) ממוצע מספר הפרחים שאורכם מעל 30 ס"מ בכל טיפול. (D) ממוצע אורך הפרח הקטוף לכל טיפול. (E) עקומת פריחה של נץ חלב במהלך שלושת הקטיפים בעונה וכמות הפרחים לקטיף בכל טיפול. הקווים על העמודות מייצגים מרחק של טעות תקן אחת מממוצע הטיפול. תוצאות אשר נמצאו שונות במובהק מטיפול המים  $p<0.05$  מסומנות בכוכבית מעל העמודה.

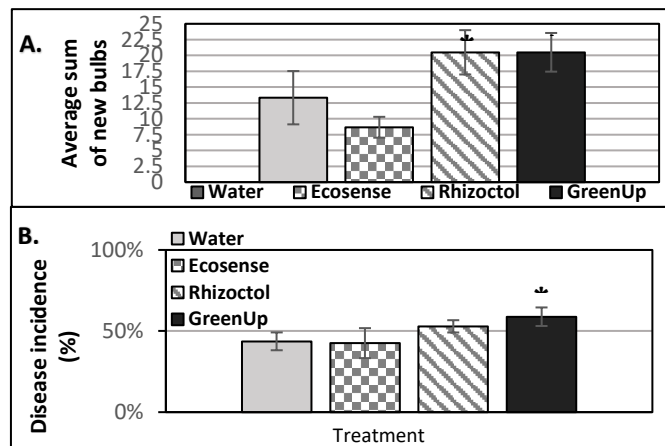
איור 6: מדדי ריבוי ופגיעה ממחלת רקבון רך בבצלי נץ חלב כתום (בצלי שנה שנייה), לאחר עונת גידול בחממה מו"פ לכיש במצע פרלייט. (A) סכום כתמי ההדבקה ברקבון רך בתוך הערוגה, משש חזרות לכל טיפול. הקווים על העמודות מייצגים רווח של טעות תקן אחת מממוצע הטיפול. (B) חומרת המחלה בפקעות לפי הטיפולים השונים. חומרת המחלה מחושבת לפי ממוצע אחוזי הבצלים לטיפול בחמישה מצבי בריאות שונים (אינדקס מחלה); (1) בריא לחלוטין; (2) מעט רך; (3) כתם של רקבון רך; (4) כחצי מהפקעת רקובה; (5) רקוב לחלוטין.





**איור 7:** מדדי קטיף של נץ-חלב כתום (בצלי שנה ראשונה) בחממת הגידול במכון וולקני תחת יישום הטיפולים השונים. (A) ממוצע משקל הפרח הקטוף חלקי ממוצע אורך הפרח הקטוף בכל טיפול. (B) ממוצע משקל הפרחים לטיפול. (C) עקומת פריחה של נץ חלב במהלך שלושת הקטיפים בעונה וכמות הפרחים לקטיף בכל טיפול. הקוים על העמודות מייצגים רווח של טעות תקן אחת ממוצע הטיפול. סימון כוכבית מייצג שוני מובהק  $p < 0.05$  מטיפול המים.

**איור 8:** מדדי ריבוי ופגיעה ממחלת רקבון רך בבצלי נץ חלב כתום (בצלי שנה ראשונה), לאחר עונת גידול בחממה במכון וולקני במצע ג'. (A) ממוצע בצלים חדשים שנוצרו במהלך העונה מסביב לבצל שנשתל, לחזרה אחת של חלקת טיפול. (B) שכיחות המחלה לפי ממוצע אחוז הפקעות לחזרת טיפול בהם נראו סימני מחלה ברורים (3-5 באינדקס מחלה). הקוים על העמודות מייצגים רווח של טעות תקן אחת ממוצע הטיפול. סימון כוכב מייצג שוני מובהק  $p < 0.05$  מטיפול המים.



### השפעת חומרים מעודדי גידול על שרידות נמטודות *in vitro*

12,000 נמטודות *Meloidogyne javanica* משורשי עגבנייה (*Solanum lycopersicum*) הופקו לניסוי זה. ההפקה נעשתה תחילה על ידי טחינה של שורשי עגבנייה בני חודשיים אשר אולחו בנמטודות וניתן לזהות בהם עפצים. השורשים נגזרו בגסות ונטחנו במעבד מזון, יחד עם אקונומיקה 6% ביחס 1:3 עם מים, ולאחר מכן הועברו במסננות רשת (אחת על השנייה) בקוטר 30 מ"מ, 60 מ"מ, 120 מ"מ ו-300 מ"מ, מהנמוכה לגבוהה, בהתאמה. לאחר הסינון שנאסף למבחנה ומספר שלבי סינון והשקעה, הוסף בופר MES למבחנה לנפח רצוי. עד שלב זה נעשה סינון להפקת ביצי נמטודות אשר טרם בקעו, כך שבזמן הניסוי, הנמטודות יהיו אחידות בגיל וללא השפעה מוקדמת. הביצים נספרו במיקרוסקופ, לפי חמש טיפות נפרדות של 5  $\mu$  והממוצע של ביצים בנפח זה. הביצים הושמו להדגרה ב-25 מ"צ ולאחר 5 ימים נבדק שיעור הבקיעה. אם שיעור הבקיעה לא היה מספק, המבחנות נבדקו שוב לאחר 7 ימים מתחילת ההדגרה. הבקיעה נבדקה ע"י חמש טיפות נפרדות של 10  $\mu$

הממוצע של זחלים חיים בנפח זה. מתוך כך חושב הנפח הנדרש ל- 12,000 נמטודות לניסוי (300 נמטודות לחזרה, 10 חזרות, 4 טיפולים) ודילול בבופר כך שבכל 300µ יהיו 300 נמטודות בממוצע. צלחת עם 40 באריות שימשה לניסוי זה. תחילה לכל בארית נמזגו 300µ של בופר עם נמטודות, ולאחר מכן כל שורה של עשר באריות טופלה ב 300µ של אחד הטיפולים השונים, אשר היו בריכוז כפול היות והם מדוללים בחצי עם בופר הנמטודות. השורות סומנו והצלחות נעטפו בנייר אלומיניום והושמו באינקובציה עם טלטול עדין ל48 שעות ב28 מ"צ. בתום ההדגרה, כל הנוזל מכל בארית עבר סינון במסננת נפרדת והמסננת הונחה מעל 900µ בופר MES לשעתיים בכדי לתת לנמטודות החיות לרדת דרך הרשת. לאחר שעתיים המבחנות נסגרו ונלקחו לספירה או לשמירה ב4 מ"צ. הספירה נעשה ע"י הכנסת 900µ מהמבחנה לפרפרט עם גריד, וספירת הנמטודות הנמצאות בנוזל מכל מבחנה.

התוצאות (איור 9) הצביעו על הפוטנציאל של כל החומרים הנבדקים להפחית נמטודות במצעי הגידול. מעניין לבחון כיצד פועלים החיידקים האנטגוניסטיים על הפחתת נמטודות והאם גרין-אפ קרקע מסוגל להביא לקטילה מלאה של נמטודות ובאיזה מנגנון. תוצאה חיובית במקרה זה יכולה להיות בעלת השלכות רבות.

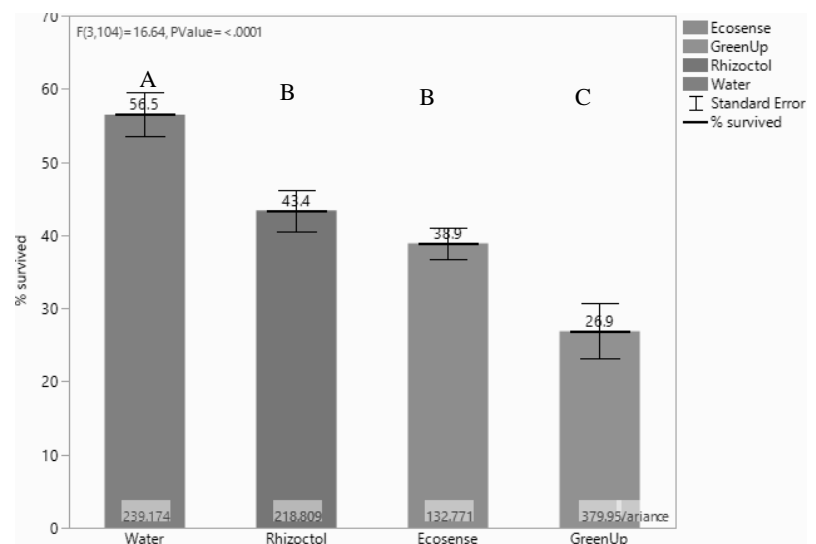
**איור 9. הבדלים ברמת הרגישות של נמטודות *Meloidogyne javanica* לטיפולים ביולוגים שונים.** ממוצעי שיעור ההישרדות של נמטודות (מתוך 300 לבור) לאחר 48 שעות הדגרה עם הטיפולים השונים. התוצאות מייצגות ממוצע משלוש חזרות נפרדות של הניסוי, אשר נעשו בין ספט' 2018 לינואר 2019, במעבדה של ד"ר סיגל בראון מיארה, המחלקה לנמטולוגיה, מכון וולקני, בית דגן. הנתונים עברו ניתוח להשוואת ממוצעים באמצעות מבחן Anova, האותיות מייצגות שיוך לקבוצות שונות סטטיסטית ברמת מובהקות 0.05. מצורפת טבלאת ניתוח סטטיסטי ומבחני השוואה.

Comparisons for each pair using Student's t				
Confidence Quantile				
t	Alpha			
1.98304	0.05			
LSD Threshold Matrix				
bs(Dif)-LSD				
	Water	Rhizoctol	Ecosense	GreenUp
Water	-8.408	4.691	9.210	21.197
Rhizoctol	4.691	-8.408	-3.889	8.098
Ecosense	9.210	-3.889	-8.408	3.580
GreenUp	21.197	8.098	3.580	-8.408

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Connecting Letters Report		
Level	Mean	
Water	56.481481	A
Rhizoctol	43.382716	B
Ecosense	38.864198	B
GreenUp	26.876543	C

Levels not connected by same letter are significantly different.



Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Treatment	3	12116.070	4038.69	16.6423	<.0001*
Error	104	25238.321	242.68		
C. Total	107	37354.391			

Means for Oneway Anova					
Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
Ecosense	27	38.8642	2.9980	32.919	44.809
GreenUp	27	26.8765	2.9980	20.931	32.822
Rhizoctol	27	43.3827	2.9980	37.438	49.328
Water	27	56.4815	2.9980	50.536	62.427

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### השפעת חומרים מעודדי גידול על שרידות נמטודות במצעי הגידול

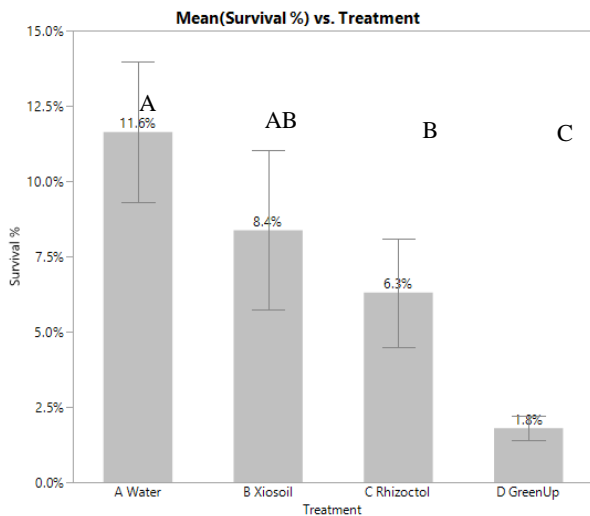
12,000 נמטודות *Meloidogyne javanica* משורשי עגבנייה (*Solanum lycopersicum*) הופקו לניסוי זה כמתואר למעלה בדיוק. לצורך הניסוי הנוכחי, הביצים נספרו במיקרוסקופ, לפי חמש טיפות נפרדות של 5µ ונקבע הממוצע של ביצים בנפח זה. הביצים הושמו להדגרה ב25 מעלות צלזיוס, ולאחר 5 ימים נבדק שיעור הבקיעה. הבקיעה נבדקה ע"י חמש טיפות נפרדות של 10µ והממוצע של זחלים חיים בנפח זה. כך חושב הנפח הנדרש ל- 12,000 נמטודות לניסוי זה, (500 נמטודות לחזרה, 6 חזרות, 4 טיפולים) ובוצע דילול

בבופר כך שבכל 100µ יהיו 500 נמטודות בממוצע. לניסוי הנוכחי במצעי גידול, נאסף חול רווי במי גשם (קיבול שדה) במשקל 480 גרם לטיפול. החול הושם בשקית אטומה ועורבב עם הטיפול המיועד לו (לאחר סימון) בריכוז עבודה ובנפח של 27.5 מ"ל לכל שקית של 480 ג' חול. לאחר מכן, כל שקית עם טיפול חולקה לשש כוסיות מסומנות אשר בכל אחת 80 ג' של חול מטופל. לכל כוסית הוספו 500 נמטודות בשלב J2 המדבק, והושמו לאינקובציה של 48 שעות ב- 25 מעלות צלזיוס וללא אטימה של הפקק. לאחר ההדגרה כל כוסית נשפכה למסננת שהושמה על משפך ברמן מלא במים כך שהחול יירטב אך לא יוצף או ישקע. המסננות נשאר ללא תזוזה על המשפכים למשך הלילה ב-25 מ"צ. למחרת נלקחו כ-20 מ"ל מכל משפך. לאחר שעתים הורדו המים במבחנה ל-2 מ"ל ע"י שאיבת וואקום. המבחנות נסגרו ונלקחו לספירה או לשמירה ב-4 מעלות צלזיוס. הספירה נעשה ע"י הכנסת סך הנוזל מהמבחנה לפרפרט עם גריד, וספירת הנמטודות הנמצאות בנוזל מכל מבחנה במיקרוסקופ.

התוצאות (איור 10) הצביעו על הפוטנציאל של כל החומרים הנבדקים להפחית נמטודות בחול. כיון שחלק מהמגדלים עדיין מגדלים נץ חלב וקאלה בקרקעות חוליות, חלקן נגועות בנמטודות, יש בתוצאות עניין עבור המגדלים. לגבי מצעי גידול נדרשת בדיקה נפרדת. מעניין לבחון באיזה מנגנון פועלים החיידקים האנטגוניסטיים על הפחתת נמטודות והאם גרין-אפ קרקע מסוגל להביא לקטילה מלאה. התוצאות בכל מקרה מצדיקות המשך עבודה בכיוון זה.

**איור 10. הבדלים ברמת הרגישות של נמטודות *Meloidogyne javanica* לטיפולים ביולוגים שונים.** ממוצעי שיעור ההישרדות של נמטודות (מתוך 500 לכוס) לאחר 48 שעות הדגרה עם הטיפולים השונים. התוצאות מייצגות ניסוי אחד משלוש חזרות נפרדות של הניסוי, אשר נעשו בין דצמבר 2019 לפברואר 2020, במעבדה של ד"ר סיגל בראון מיארה, המחלקה לנמטולוגיה, מכון וולקני, בית דגן. הנתונים עברו ניתוח להשוואת ממוצעים באמצעות מבחן t, האותיות מייצגות שיוך לקבוצות שונות סטטיסטית ברמת מובהקות 0.05. מצורפת טבלאת ניתוח סטטיסטי ומבחני השוואה.

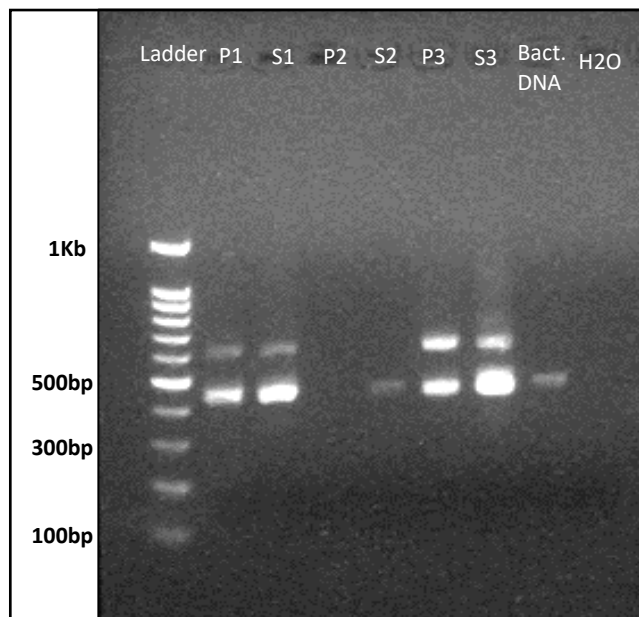
Oneway Anova					
Summary of Fit					
Rsquare					0.391885
Adj Rsquare					0.300668
Root Mean Square Error					0.04866
Mean of Response					0.07025
Observations (or Sum Wgts)					24
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Treatment	3	0.03051783	0.010173	4.2962	0.0171*
Error	20	0.04735667	0.002368		
C. Total	23	0.07787450			



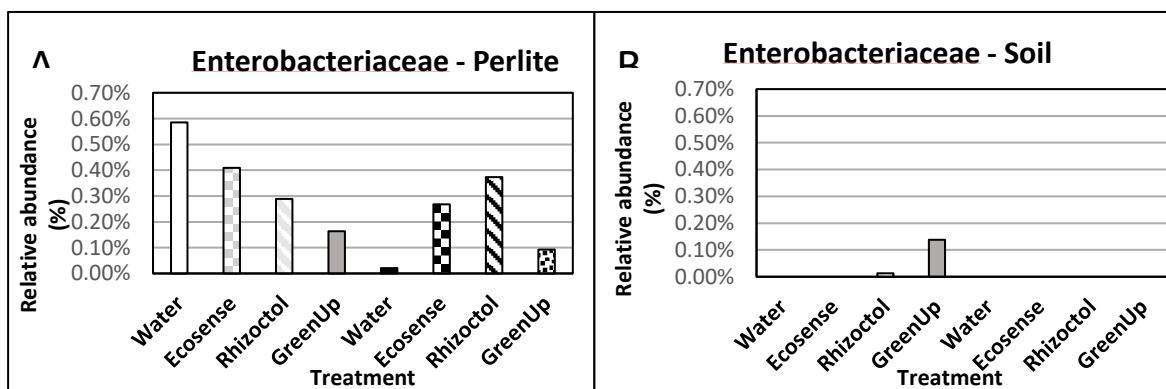
## אנליזת מיקרוביום של סביבת השורש

במשך שנתיים של גידול ובמצעים שונים בכל שנה נבדקה סביבת השורשים של צמחי ק. לבנה ונץ חלב כתום הכוללת את המצע עצמו, את אזור הריזוספירה וקצוות שורשים המכילים חיידקים אנדופיטים. תוצאות ההשוואה בין שיטות ההפקה משני המצעים שנדגמו לאיכות תוצר ההגברה מוצגות (איור 11). ניתן לראות כי הקיט המסחרי (MN Nucleospin) הניב תוצרים איכותיים ויציבים יותר משני המצעים. בנוסף, במצע גן נראה שהופקה כמות DNA גדולה יותר.

**איור 11: השוואת שיטות הפרדת DNA גנומי מחיידקי קרקע.**  
 בתמונה מוצגים תוצרי PCR לאחר 40 דקות הרצה במתח של 100 Volt בגיל אלקטרופורזה המכיל 0.1% Etbr ו- 1.8% אגרוז בבופר 0.5\*TAE. כל בארית הכילה 8µl תוצר PCR לנתיב. Ladder להשוואת גודל המקטעים. הבנדים (bands) מייצגים DNA שהופק משילובים שונים של מצע גידול ושיטת הפקה ומסומנים בהתאם לכך לפי הסדר הבא: **P**- דגימת קרקע ממצע פרלייט מטיפול במים בעונת הגידול 2018 (לכיש) ב- *Ornithogalum dubium* דגימת קרקע ממצע גן מטיפול במים בעונת הגידול 2019 (וולקני) ב- *Bact. Ornithogalum dubium*. -ביקורת חיובית, תערובת של *E. coli k12* ו- *Pectobacterium brasiliense* (מסטרטרים (שגדלו ב- LB טרי) יחד עם 5 גרם מצע גן טרי. ההפקה מדגימה זו נעשתה באמצעות MN Nucleospin Soil Kit. **H2O**- ביקורת שלילית לריאקציית PCR. שיטת ההפקה מסומנות במספרים: **1** - פרוטוקול מיצוי פנולי. **2** - הפקה עם C-TAB בלבד. **3** - MN Nucleospin Soil Kit. \*משני המצעים, הדוגמא נלקחה מחלקה DA3 (חזרה 3 לטיפול המים) מגידול הנץ-חלב.



הסיווג הטקסונומי שנעשה על הרצפים שנמצאו, נעשה לפי רמת קרבה של 97%, ולמעשה מאפשר סקירה של התוצאות עד לרמת המשפחה ללא חשש להטיה של התוצאות והשייך הטקסונומי. הבדלים ברמת המחלה בריקבון רך אינם מתבטאים בצורה משמעותית בתוצאות אלו, אך כפי שניתן לראות (איור), חיידקי *Enterobacteriaceae*, המשפחה הטקסונומית אליה שייך חיידק ה- *Pectobacterium* עד לאחרונה, נמצאה בנוכחות גבוהה יותר במצע הפרלייט ובטיפול המים בנוץ חלב בפרט. עם זאת, בכל הדגימות לא נמצאה משפחה זו בשיעור יחסי הגדול מ- 1% מגודל אוכלוסיית החיידקים שנמצאו בדגימה. בנוסף, אחוזים גבוהים מהרצפים שנמצאו (4.48%-14.19%) נותרו ללא זיהוי טקסונומי (unassigned). מספרם של הרצפים הלא משויכים נמצא בקורלציה שלילית לכמות הרצפים שנמצאו בדגימה המוצגים באיור 16, כך שבמצע הפרלייט שהניב פחות רצפים נמצאו יותר רצפים לא משויכים, מאשר מצע גן שהניב יותר רצפים.



**איור 12: נוכחות חיידקים ממשפחת *Enterobacteriaceae* בסביבת השורשים של שני מיני גיאופיטים בשני מצעי גידול שונים.** תדירות יחסית של רצפי DNA שזוהו כשייכים למשפחת *Enterobacteriaceae*, בדגימות קרקע מסביבת השורשים של ק. לבנה (בשחור) ונץ חלב כתום (באפור), במצע גידול פרלייט (אגריקל, ישראל) (A), ובמצע גן, רם 39 (טוף מרום גולן, ישראל) (B).

**הבדלים באוכלוסיית החיידקים בין מצע פרלייט למצע גן**

לאחר שנת הגידול הראשונה, והעברת הגידול למכון וולקני ובהתחשב בתוצאות ניסוי מקדים שנערך שנה לפני תחילת המחקר הנוכחי, הוחלט לבדוק את הבדלי הדינמיקה באוכלוסיות המיקרואורגניזמים בקרקע בין מצע אינרטי (פרלייט) למצע עשיר בחומר אורגני (מצע גן). התוצאות מראות באופן חד משמעי (איור a13) כי בניסוי זה ההשפעה הגדולה יותר על אוכלוסיית החיידקים בסביבת השורש של הצמח נובעת מההבדל במצע הגידול. בגרף (PCoA) Principal of coordinates analysis למדידת קרבה בין אוכלוסיות (איור a13) ציר 1 מהווה 17.9% מהשונות המוסברת בין מצעי הגידול, בעוד ציר 2 מהווה 7.3% וצירים 3, 4 ו-5 מהווים כ- 4.5% כל אחד. ניתן לראות כי כל התוצאות ממצע הגן מתרכזות מעל ציר 1, המעיד על שונות גדולה יותר בין הדגימות משנה זו. מצע הפרלייט מתרכז בין צירים 2 ו-3 ומציג הבדלים קטנים יותר בין הדגימות. חשוב לציין כי דגימות ממצע גן הניבו יותר קבוצות רצפים (OTUs) מהדגימות שנלקחו ממצע הפרלייט כפי שנראה באיור 14. מעבר לכך, בביקורת המים בגידול הנץ חלב במצע פרלייט נמצאו הכי מעט OTUs מכל שאר הדגימות בשני המצעים, לעומת אותו טיפול ומין צמח במצע גן, שנמצא בעל הכמות הרבה ביותר של OTUs מבין כל הדגימות בשתי עונות הגידול. השונות במגוון החיידקים ממחלקות טקסונומיות שונות, ירדה משמעותית כאשר נבדקו מיני צמחים שונים באותו מצע ואיזור גאוגרפי, לעומת הגדלת השונות כשנבדקו צמחים מאותו מין, במצע ואיזור גידול שונים. תוצאה זו מעידה על כך שהמצע והאיזור משפיעים יותר ממין הצמח על המגוון. דוגמא לכך היא חיידקים מהמחלקה *aerolineae* מהמערכה *Chloroflexi*, אשר קיימים באחוזים דומים בשני מיני הצמחים במצע גן אך לא נמצאו כלל בדגימות ממצע הפרלייט. גם חיידקים מהמערכה *cyanobacteria* והמחלקה *Chloroplast* נמצאו בשוני משמעותי בין המצעים, כאשר נוכחותם במצע הפרלייט הינה בסדר גודל אחד יותר מבדגימות מצע גן.

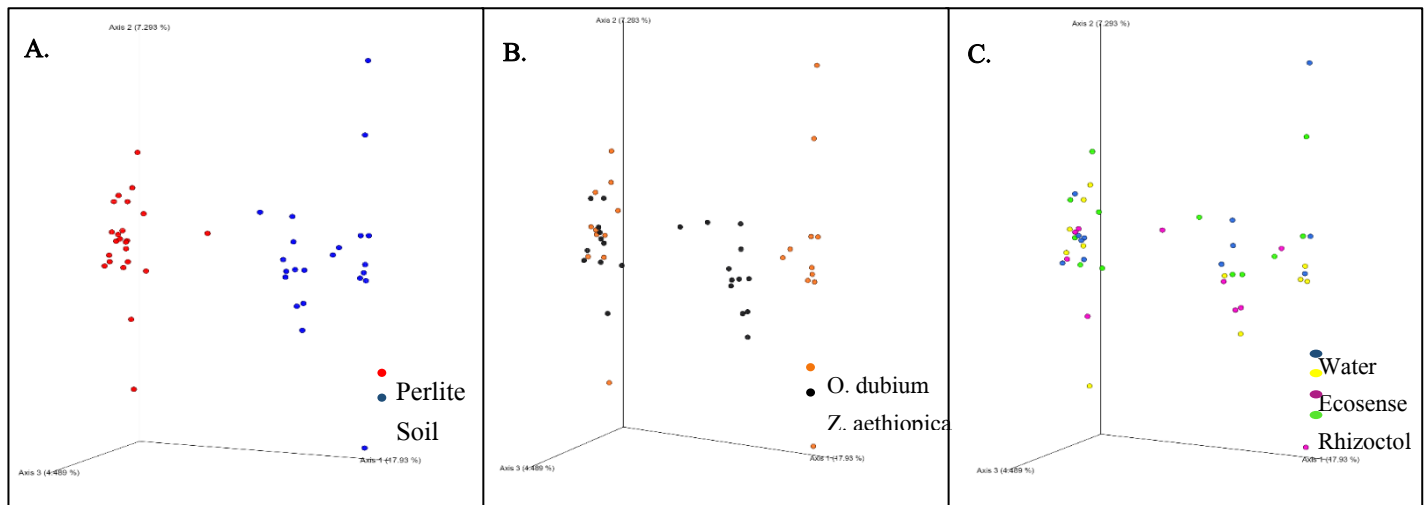
### הבדלים באוכלוסיית החיידקים בין ק. לבנה לנץ חלב כתום

לפי התוצאות נראה כי למצע הגידול השפעה גדולה יותר על ההבדלים באוכלוסיית החיידקים מאשר למין הצמח. מדדי PCoA למדידת קרבה מראים בשנה הראשונה המוצגת באיור 15 התפצלות בין שני המינים, אך לא הייתה מובהקות לשוני זה בשנה זו ולמעשה, המינים הציגו הרכב אוכלוסייה קרוב כמוצג באיור 13. אולם, בשנה השנייה של הגידול נמצא הבדל בין אוכלוסיות חיידקים של שני מיני הצמחים, לפי מדד PCoA, כפי שניתן לראות באיור 15. יתרה מכך, בשנה זו נמצא הבדל מובהק לשוני בין האוכלוסיות ( $p=0.0028$ ). זהו ההבדל המובהק היחיד שנצפה בין הדגימות השונות, בתוך אותו מצע גידול. כלומר, הטיפולים השונים במיקרואורגניסמים תומכי גידול ותכשיר GreenUp soil לא השפיעו על הרכב אוכלוסיית המיקרואורגניסמים בקרקע במידה מובהקת למרות הבדלים קטנים המתוארים בהמשך.

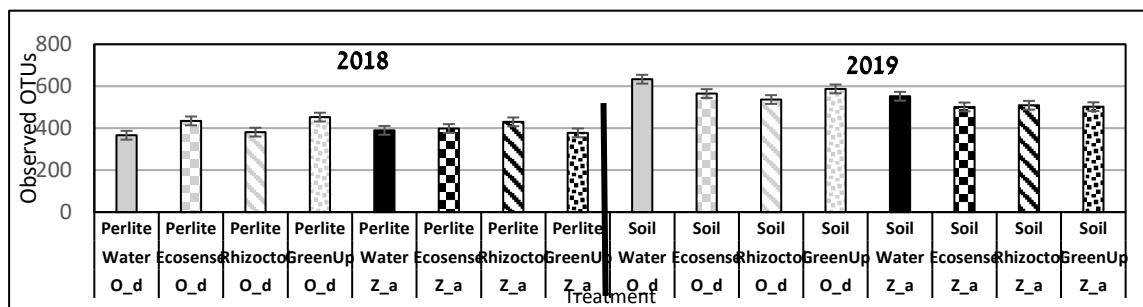
### הבדלים באוכלוסיית החיידקים בין תכשירים מעודדי גידול שונים

כפי שנראה באיור 15, אוכלוסיות החיידקים לא הושפעו מסוג הטיפול בניסוי זה, באף אחת משנות הגידול. למרות חוסר המובהקות בין הטיפולים, בסקירה מעמיקה יותר של ההרכב הטקסונומי ברמת המחלקה (class) בין הדגימות השונות, נמצא כי למחלקה *Bacilli*, אליה שייכים החיידקים אשר מרכיבים שניים

מהטיפולים שנבדקו במחקר זה (טיפולי Ecosense ו- Rhizoctol המכילים חיידקי *Bacillus subtilis*), קיימת נוכחות מוגברת במצע הפרלייט.



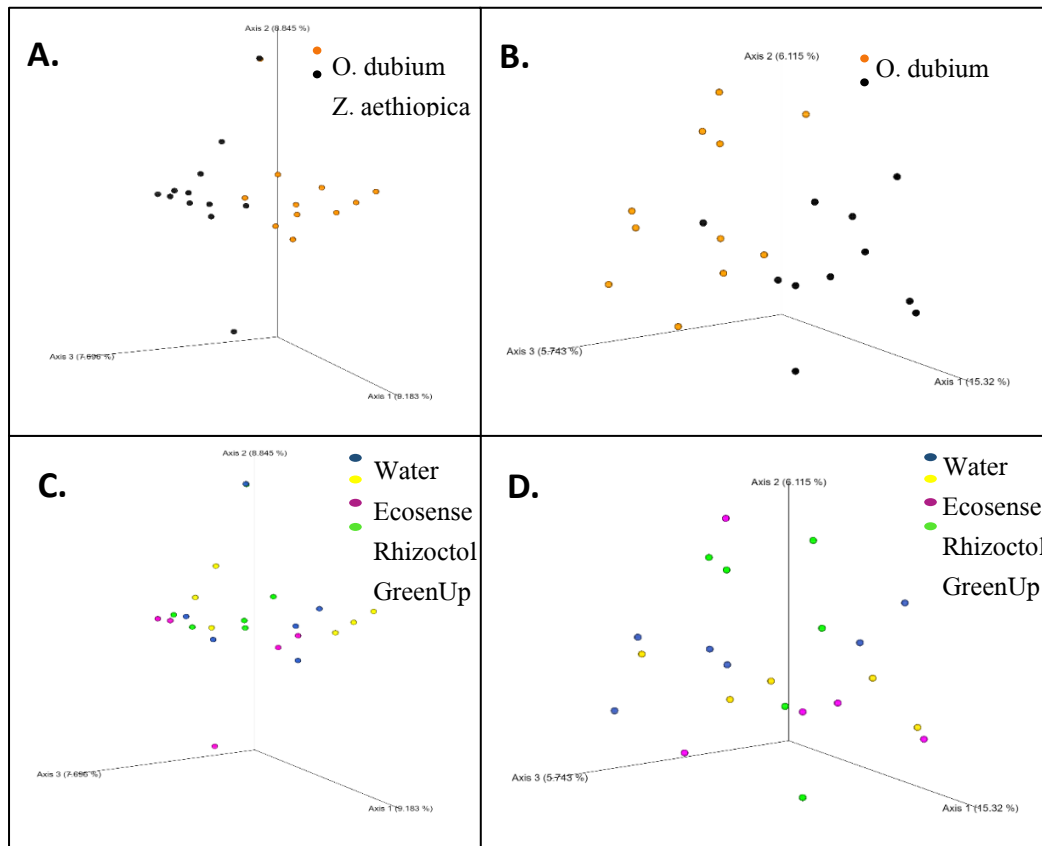
**איור 13:** דיאגרמת PCoA (Principal of coordinates) לקביעת קרבה בהרכב אוכלוסיות החיידקים של סביבת השורש בין שני גידולי גיאופיטים ובין שני מצעי גידול שונים תחת טיפולים מעודדי גידול שונים. (A) דיאגרמת PCoA של סביבת השורשים בקאלה לבנה ובנגן-חלב כתום בשתי עונות הגידול בחלוקה לפי מצעי הגידול (פרלייט באדום, מצע גן בכחול). (B) דיאגרמת PCoA לקרבה בהרכב אוכלוסיית המ"א של סביבת השורשים בין קאלה לבנה (בשחור) לבין נץ-חלב כתום (בכתום) בשתי עונות הגידול. (C) דיאגרמת PCoA של סביבת השורשים בקאלה לבנה ובנגן-חלב כתום בשתי עונות הגידול בחלוקה לפי טיפולים (ביקורת מים בכחול, Ecosense בצהוב, Rhizoctol בסגול, GreenUp בירוק). ניתוח הנתונים התבצע באמצעות ניתוח שונות (Permanova) ברמת מובהקות ( $P \leq 0.0001$ ). ניתוח הנתונים נעשה ע"י ד"ר נועה סלע במכון וולקני.



**איור 14:** ממוצע כמות ה-Operational Taxonomic Units (OTUs) לטיפול שזוהו בסביבת השורשים בקאלה לבנה (*Z\_a*) ובנגן-חלב כתום (*O\_d*) בשתי עונות הגידול בחלוקה לפי מצעי הגידול (פרלייט שנה ראשונה (2018), Soil – מצע גן שנה שנייה (2019), ולפי מין הצמח (*O\_d* – נץ חלב כתום, *Z\_a* – קאלה לבנה) ולפי סוג הטיפול שניתן לצמחים במהלך הגידול (Water, Ecosense, Rhizoctol, GreenUp). רצפים שנמצאו זהים ב- 97% אוחדו לאותו OTU. ניתוח הנתונים נעשה ע"י ד"ר נועה סלע במכון וולקני.

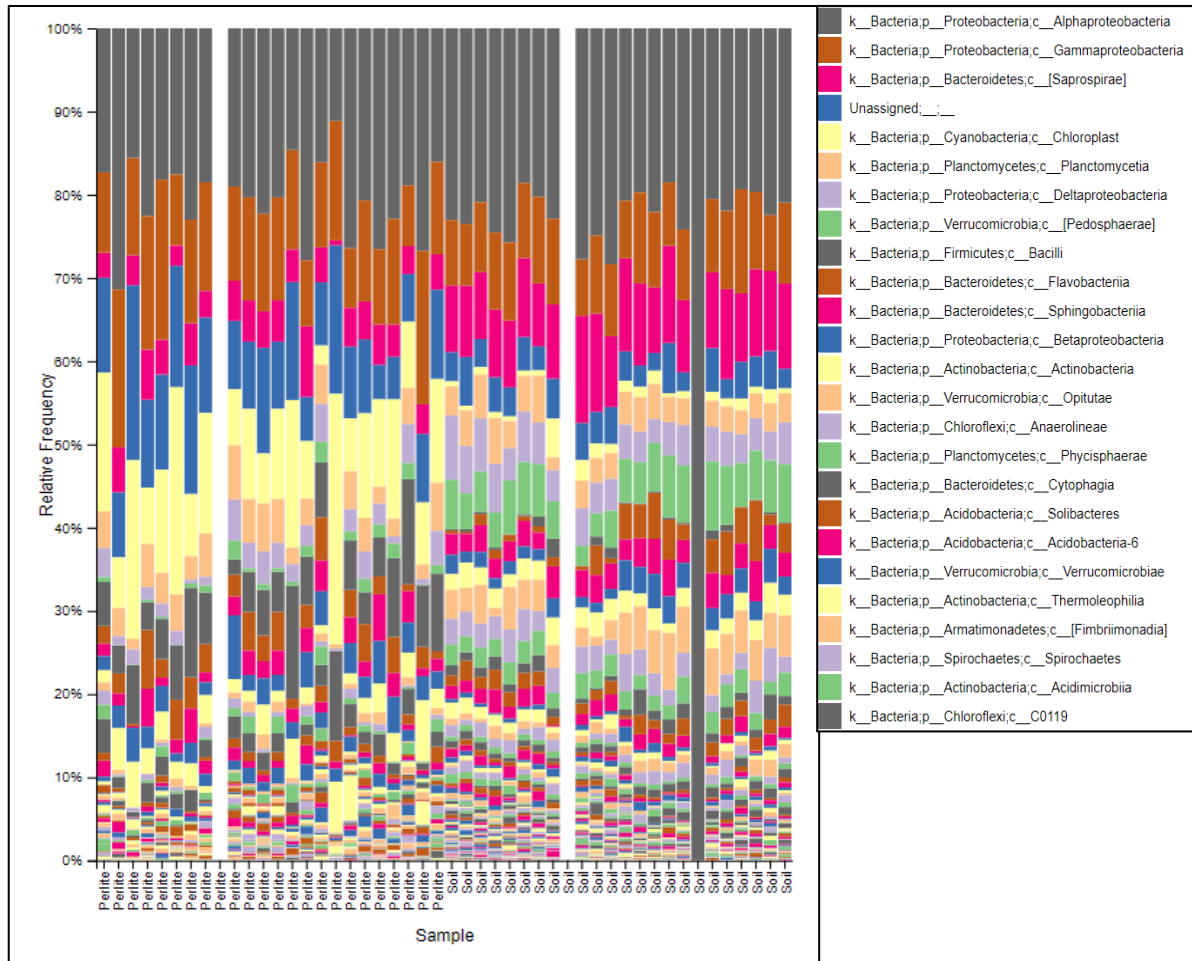
מחלקה זו, נמצאה בשיעור יחסי של 0%-2.228% במצע גן (חוץ מאחת מדגימות טיפול Ecosense שנמצא בה 100% של חיידקי מחלקה זו, ועל כן הושמטה משאר ההשוואות והניתוח הסטטיסטי) ושל 1.826%-13.558% במצע פרלייט. עם זאת, האחוזים הכי גבוהים של ייצוג מחלקה זו נצפו דווקא בטיפולי המים ו-GreenUp. בהסתכלות על כל אחת משנות הגידול והמצעים בנפרד, גם כן לא נמצאו הבדלים ברורים או מובהקים בהרכב אוכלוסיות החיידקים בין הטיפולים השונים, כפי שמוצג באיור 15, כאשר אין משמעות באנליזה לשיפעת (abundance) המינים (Unweighted Unifrac). בנוסף, בדיקה עם התחשבות בשיפעת מיני החיידקים (Weighted Unifrac), לא הניבה מובהקות ולא נצפה הבדל בין הטיפולים.





**איור 15:** דיאגרמת PCoA (Principal of coordinates) לקביעת קרבה בהרכב אוכלוסיות החיידקים של סביבת השורש בין שני גידולי גיאופיטים שונים תחת טיפולים מעודדי גידול שונים. דיאגרמת PCoA של סביבת השורשים בקאלה לבנה ובנץ-חלב כתום לשתי עונות הגידול בנפרד ובחלוקה לפי: (A) מין הצמח במצע פרלייט (נץ חלב בכתום, קאלה בשחור); (B) מין הצמח במצע גן (נץ חלב בכתום, קאלה בשחור); (C) טיפולים שניתנו במהלך הגידול במצע פרלייט (ביקורת מים בכחול, Ecosense בצהוב, Rhizoctol בסגול, GreenUp בירוק). (D) טיפולים שניתנו במהלך הגידול במצע גן (ביקורת מים בכחול, Ecosense בצהוב, Rhizoctol בסגול, GreenUp בירוק). ניתוח הנתונים התבצע באמצעות ניתוח שונות (Permanova) ברמת מובהקות ( $P_v \leq 0.0001$ ). ניתוח הנתונים נעשה ע"י ד"ר נועה סלע במכון וולקני.

לסכום: אנאליזת PCoA מראה כי ההבדל המשמעותי ביותר נגרם כתוצאה מהשפעת מצע הגידול וכנראה מכמות החומר האורגני. בתוך מצע השתילה אשר גם נמצא עשיר יותר (מצע גן) ומגוון יותר ניתן לראות התפצלות באוכלוסיה בין שני מיני הצמחים – קאלה אתיופיקה ונץ חלב לעומת הפרלייט בו ההתפצלות אינה מובהקת. בשנת הגידול הראשונה כן נצפה הבדל המושפע מסוג הצמח גם במצע פרלייט. הטיפולים תומכי הגידול בכל מקרה לא הראו הבדלים ביניהם בהרכב אוכלוסיית החיידקים.



**איור 16.** אנליזה טקסונומית להרכב אוכלוסיית המייד של סביבת השורשים בקאלה לבנה ובנץ-חלב כתום בשתי עונות הגידול בחלוקה לפי מצעי הגידול (Perlite - פרלייט שנה שנייה, Soil - תערובת שתילה שנה שלישית). הרצפים מיוצגים ברמת ביטחון של 97%. ניתוח ותצוגת הנתונים נעשו ע"י ד"ר נעה סלע במכון וולקני.

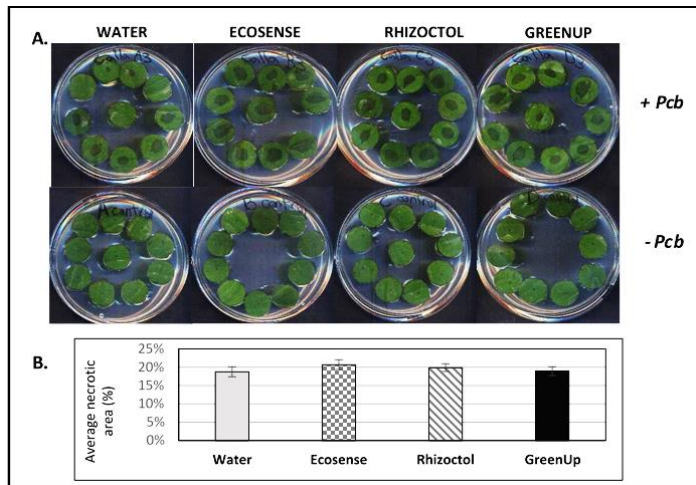
### מבחני עמידות בעלים המטופלים: בת קאלה אתיופית

לאחר טיפול בחממה בעלי ק. לבנה והדבקת אתגר במעבדה על עלים צעירים מהחממה המטופלת וכפי שמתואר באיור 17 לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים השונים לביקורת בהשראת עמידות בעלי ק. לבנה. ביקורת המים והטיפולים מציגים כ- 20% הדבקה משטח העלה במוצע וכמוצג בתמונות ישנה גדילה של חיידקי *Pcb3* אשר נראית דומה בין הצלחות השונות.

### בדיקת רמת ביטוי של גנים נבחרים בתגובה להדבקת אתגר עם פתוגן בק. לבנה

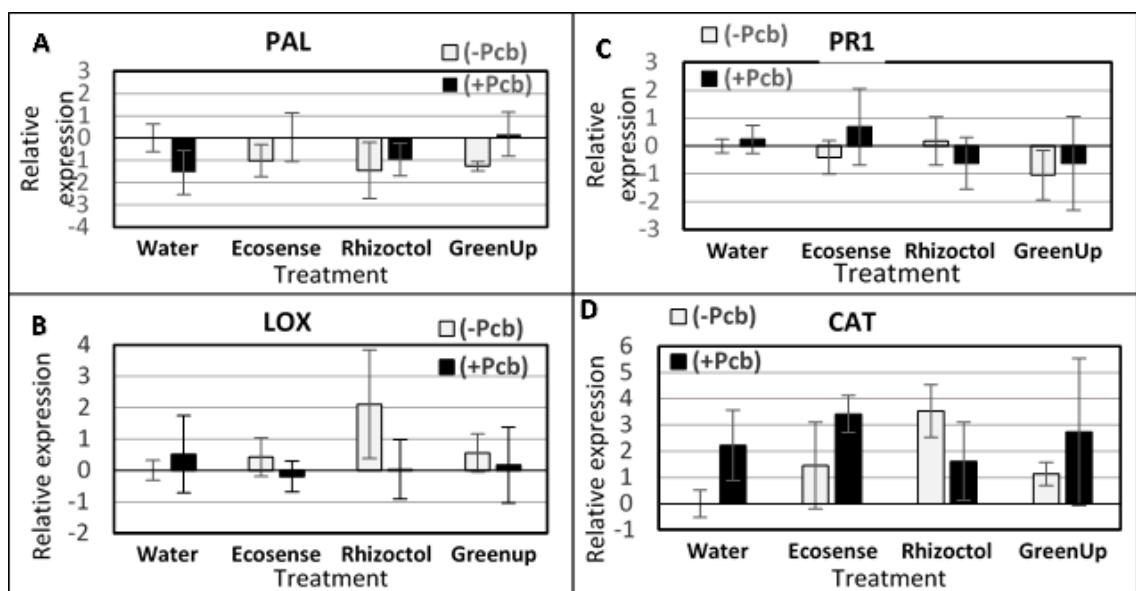
על מנת ללמוד האם הטיפולים השונים משפיעים את מערכות ההגנה של הצמח בק. לבנה, טרם חדירת פתוגן, נבחרו שני מסלולי עמידות מושרית, SAR ו-ISR. רצפי גנים הידועים כחלק מפעילות המסלולים שימשו לבדוק את פעילותם בנוכחות הטיפולים השונים והדבקת אתגר עם החיידק *Pcb3* אשר נמצא בהדבקה טבעית בשדות חקלאיים בישראל ועל כן ידוע כמחולל מחלה. רצפי הגנים מק. לבנה המקודדים לאנזים PAL (מעורב ביצירה של SA) ו-PR1 (מקודד לחלבוני הגנה הנוצרים בעקבות אינטראקציה פתוגנים) נבחרו כמייצגים את מנגנון ה-SAR. רצפי הגנים לגן LOX2 (מקודד אנזים קריטי ליצירה הסופית

של JA) והגן CAT (משועתק לאנזים Catalase, נוגד חמצון אחראי על ויסות בין מסלולי ההגנה) נבחרו כמייצגים את מנגנון ה-ISR, כאשר הגן המקודד לחלבון האנדוגני Actin שימש כגן מכייל (איור 18).



**איור 17:** הבדלים ברמת הרגישות של עלי קאלה לחיידק *Pectobacterium brasiliense* (Pcb) תחת השפעת טיפולים ביולוגים שונים. (A) דסקיות עלי קאלה שנאספו בחממת הגידול במכון וולקני מחלקת הניסוי השונות 24 שעות לאחר מתן הטיפולים ואולחו במעבדה, מציגות התפתחות תסמיני מחלה על פי השטח הנקרטי. טיפולים משמאל לימין – מים (ביקורת), טיפול חיידקים פרוביוטיים Agriotics Ecosense, טיפול חיידקים אנטגוניסטים Rhizoctol, טיפול תמצית צמחית GreenUp, 48 שעות לאחר איסוף ו-24 שעות לאחר הדבקת אתגר עם נפח של 10µl תרחיף חיידקי Pcb (ריכוז ממוצעי אחוז השטח הנקרטי בין הטיפולים השונים). העמודות מציגות שטח נקרטי (cm<sup>2</sup>) כאחוז מתוך כל שטח הדיסקית. הקיום על העמודות מייצגים מרחק של טעות תקן אחת ממוצע הטיפול בדסקיות עלי קאלה. נבדקה שונות סטטיסטית ברמת מובהקות 0.05 לעומת

טיפול המים. העלים נלקחו מארבעת הטיפולים בשש חזרות, 5 עלים לכל חזרה. מכל עלה קורצו כ-4 דסקיות שעורבבו בצלחות עבור כל חזרה. התוצאות מוצגות לאחר הפחתת ביקורת שהודבקו במים סטרילים.



**איור 18:** ביטוי גנים במסלולי הגנה בעלי בת קאלה אתיופית *Zantedeschia aethiopica*. מבחני ביטוי יחסי, המבוצעים במערכת Real Time qPCR, עם צביעת SYBR. הגרפים מראים ביטוי יחסי לכל גן שנבדק לפי הגן אקטין (Actin) מק. לבנה כבקרה אנדוגנית לפעילות ארבעה גנים שונים להגנה בצמח המוצגים בנפרד. (A) ביטוי הגן לאנזים PAL; (B) ביטוי הגן לחלבון PR1; (C) ביטוי הגן לאנזים LOX2; (D) ביטוי הגן לאנזים Catalase. דגימות cDNA הופקו ממיצוי RNA של דסקיות עלי מאולחים בחיידק *Pectobacterium brasiliense* (+Pcb) או ביקורת עלי לא מאולחים (-Pcb), שנלקחו משלוש חזרות ביולוגיות שונות לטיפול 24 שעות לאחר יישום הטיפולים בחממה במכון וולקני. כל ניסוי בוצע פעמיים, באיור מוצגות תוצאות ניסוי מייצג. הקיום על העמודות מייצגים מרחק של טעות תקן אחת ממוצע הטיפול.

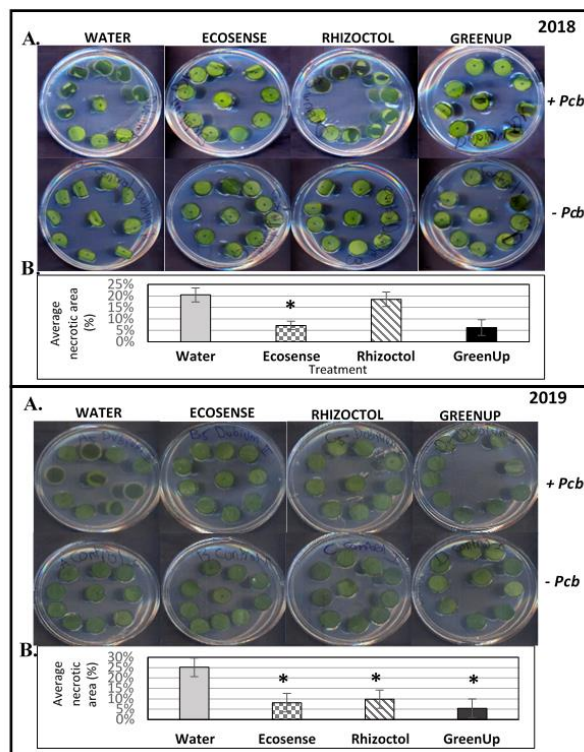
איור 18 מראה כי בנוכחות החיידק Pcb3 מופעל מנגנון ה-ISR ומעוכב ביטוי מנגנון ה-SAR. כל הטיפולים בנוכחות חיידקי Pcb3, הראו ירידה בביטוי הגן LOX לעומת הביקורת. אולם ללא נוכחות Pcb3 נראתה עלייה בביטוי הגן, בכל הטיפולים לעומת הביקורת ולעומת הביטוי בנוכחות הפתוגן, כאשר המובהק ביותר הינו טיפול Rhizoctol. הירידה בביטוי הגן LOX בנוכחות Pcb3 מראה כי אין שיפוע (Priming) בביטוי הגן. עבור הגן CAT נצפה ביטוי מוגבר ביישום כל הטיפולים ונצפתה הגברה נוספת בנוכחות Pcb3 לעומת

הביקורת. הטיפול ב Rhizoctol לא הציג הגברה בנוכחות Pcb3 לעומת הביקורת אלא ירידה. לפי התוצאות המוצגות באיור 18 כל הטיפולים משפיעים גנים במסלול ISR ללא נוכחות פתוגן, אולם הדבקת אתגר בפתוגן לא בהכרח מובילה לשפעול נוסף (Priming) והגברת עמידות. בביטוי הגנים למסלול SAR נרשמו מגמות מעורבות בין הטיפולים המצביעות בעיקר על דיכוי המסלול בנוכחות הטיפולים והדבקה בחיידק. על סמך התוצאות מסתמן כי שלושת הטיפולים בעלי יכולת השראת מנגנון ISR בצמח וכתוצאה, מסתמן דיכוי מסוים של מערכת ה-SAR עם ובלי נוכחות הפתוגן. יש לציין כי טיפול Rhizoctol המכיל חיידק אנטגוניסטי, נמצא כמשרן החזק ביותר לביטוי גנים לעמידות במסלול ISR כאשר נבדק ללא נוכחות חיידקי Pcb3. אולם, בנוכחות חיידקי Pcb3 נראתה ירידה בביטוי כל הגנים המצביעה על העדר תגובת Priming הנחשבת לאפקטיבית במקרה של הגנה מפתוגנים נקרוטרופיים.

### השפעת הטיפולים על עמידות להדבקה בפתוגן בנץ חלב כתום

כמתואר באיור 19 (בחלק העליון), בעלים שנלקחו ממו"פ לכיש בגידול בפרלייט, ביקורת המים הציגה את שטח ההדבקה הגבוה ביותר, אולם רק טיפול Ecosense הראה שוני מובהק ביחס לביקורת ( $p=0.025$ ). ניתן להגיד כי טיפול זה עכב את חיידקי Pcb3. בנוסף ניתן לראות כי טיפול Rhizoctol לא הציג אפקט של השראת עמידות בהשוואה לטיפול המים. למרות המובהקות של Ecosense (7.14%) לעומת הביקורת (20.48%), טיפול GreenUp הציג את ממוצע שטח ההדבקה הנמוך ביותר (6.22%). בחלקו התחתון של איור 19, נראה כי בבדיקה זהה שבוצעה על עלים מטופלים מחממת הגידול במכון וולקני, נצפתה השראת עמידות מוגברת בעלים של שלושת הטיפולים לעומת הביקורת באופן מובהק ( $p=4 \cdot 10^{-6}$ ). גם בשנה זו ובגידול במצע גן, הטיפול האנטגוניסטי (Rhizoctol) נראה פחות יעיל משני הטיפולים האחרים

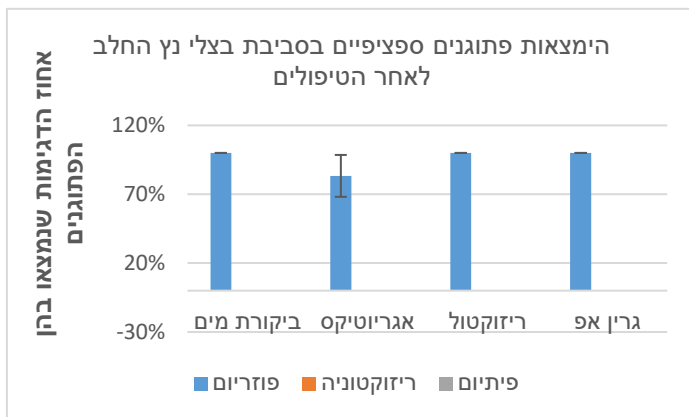
בעיכוב חיידקי Pcb3, לא נמצא שוני מובהק בין שלושת הטיפולים.



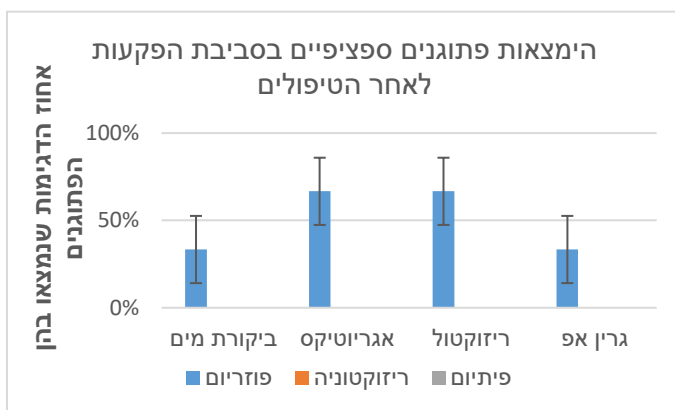
איור 19: תבדלים ברמת הרגישות של עלי נץ-חלב לחיידק *Pectobacterium brasiliense* (Pcb) ביוגנים שונים. (A) דסקיות עלי נץ-חלב שנאספו בחממת הגידול במו"פ לכיש (איור 2018), ומחממת הגידול במכון וולקני (איור 2019), מחלקות הטיפול השונות ואולחו במעבדה, מציגות הבדלים בהתפתחות תסמיני מחלה על פי התפתחות השטח הנקרטי. טיפולים – מים (ביקורת), טיפול חיידקים פרוביוטיים Agriotics Ecosense, טיפול חיידקים אנטגוניסטים Rhizoctol, טיפול תמצית צמחית GreenUp. 48 שעות לאחר איסוף ו-24 שעות לאחר הדבקת אתגר עם  $10 \mu\text{l}$  תרחיף חיידקי Pcb ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) או מים בלבד (- Pcb). (B) השוואה בין ממוצעי השטח הנקרטי בין הטיפולים השונים. העמודות מציגות שטח נקרטי  $\pm$  (cm<sup>2</sup>) כאחוז מתוך שטח הדיסקית והקוים על העמודות מייצגים מרווח שגיאת תקן אחת מממוצע הטיפול בדסקיות עלי נץ חלב. הכוכביות מייצגות שונות סטטיסטית ברמת מובהקות  $p < 0.05$  לעומת טיפול המים. העלים נלקחו מארבעת הטיפולים בשש חזרות, 5 עלים לכל חזרה. מכל עלה קורצו כ-4 דסקיות שעורבבו בצלחות עבור כל חזרה. התוצאות מוצגות לאחר הפחתת ביקורת שהודבקו במים סטרילים.

## נגיעות בבצלים ופקעות בתום עונת הגידול:

בסיום הגידול נלקחו מכל טיפול 6 דגימות מפקעות הקאלה ובצלי נץ החלב. הדגימות נשטפו והחלקים המתים הורחקו. הדגימות נטבלו באתנול 70% ולאחר מכן למשך 3 דקות בתמיסת סודיום היפוכלוריד בריכוז 1%, הוספגו והונחו על מצעים שונים לגידול פטריות: Potato dextrose agar (PDA) בתוספת 0.25 ג' לליטר כלורמפניקול – מצע התומך בגידול מגוון רחב של פטריות. Water agar (WA) בתוספת 0.25 ג' לליטר כלורמפניקול - מצע שאינו מכיל מקור פחמן או חנקן ומתאים לבידוד ריזוקטוניה. Nash&Snyder – מצע המכיל  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , פפטון, סטרפטומיצין ו PCNB והינו סלקטיבי לפוזריום. ומצע PARP המכיל אגר תירס, אמפיצילין, ריפאמפיצין, פימריצין ו PCNB והינו סלקטיבי לבידוד פיתיום ופיטופתורה. בבידודים שנעשו גם בפקעות הקאלה וגם בבצלי נץ החלב לא נמצאו ריזוקטוניה או פיתיום (איור 12 ו 13). פוזריום נמצא בבידודים רבים, על מצע ה Nash&Snyder, וגם על מצע ה PDA וה WA. בבידודים מבצלי נץ חלב (איור 20) שיעור בידוד הפוזריום לאחר הטיפולים השונים היה 100% בביקורת ובכל הטיפולים פרט לאגריוטיקס בו שיעור הבידוד היה מעל 80%. בבידודים מפקעות הקאלה (איור 21) שיעור בידוד פטריית הפוזריום היה בין 33% (בביקורת המים וטיפול הגרין אפ) ל 67% (טיפול האגריוטיקס והריזוקטול). שגיאת התקן בטיפולים בניסוי זה הייתה גבוהה יחסית. לא נערכו בדיקות PCR לקביעת מין הפוזריום או מידת הפתוגניות שלו. על סמך סימפטומים בחומר הריבוי לא ניתן לקבוע כי מין הפוזריום שבודד היה פתוגני לצמחי הגיאופיטים.



איור 21. בידודים שנעשו מפקעות הקאלה בסיום הניסוי. מכל הטיפולים בודדו פטריות פוזריום, מאף אחד מהטיפולים לא בודדו פטריות פיתיום או ריזוקטוניה. הקווים מעל העמודות מייצגים את שגיאת התקן של כל טיפול.



איור 21. בידודים שנעשו מפקעות הקאלה בסיום הניסוי. מכל הטיפולים בודדו פטריות פוזריום, מאף אחד מהטיפולים לא בודדו פטריות פיתיום או ריזוקטוניה. הקווים מעל העמודות מייצגים את שגיאת התקן של כל טיפול.

## **סיכום תוצאות ודיון**

### **מבחני גידול בחממה**

לאחר שלוש שנות מחקר לא נמצאו הבדלים משמעותיים אשר עשויים להביא לשיפור כלכלי של הגידול לטובת החקלאי. ברוב המקרים טיפולי החיידקים הפחיתו את עוצמת הצימוח והפריחה, בעוד שהמיצוי האנטיביוטי גרין-אפ גרם לעיכוב קל בפריחה. החיידקים לא נתנו מענה לבעיות בקאלה ובנץ חלב, באף אחת מעונות הגידול, בשני המצעים שנבחנו - מצע אינרטי או מצע עשיר. תנאי הסביבה הינם גורם מכריע בהצלחה של הדברה ביולוגית (Chaparro et al., 2012), לא ניתן לשלול את האפשרות כי הייתה להם השפעה גם בניסויים שלנו. ריכוזי התכשירים עמם עבדנו המומלצים על פי היצרן, הציגו יכולת נמוכה לשיפור ההתמודדות עם הסביבה בגידולים אלה. יש לציין כי תכשיר הגרין-אפ הציג בהרבה מקרים צימוח מוגבר, אך בכל זאת בשקלול הגורמים הכלכליים, ביקרת המים הייתה המשתלמת ביותר לחקלאי. הטיפולים לא נמצאו בעלי ערך כלכלי מוסף, אך אין בכך לשלול את הגישה לחלוטין.

### **ביטוי גנים**

לימוד ביטוי גנים סמנים לעמידות לאחר מתן הטיפולים ובתוספת הדבקת אתגר, מצביע על אינדוקציה של מסלול הח' הג'סמונית בתגובה לטיפולים השונים. תגובה זו אופיינית גם להדבקה בחיידק Pc בטיפול הביקורת, ללא הטיפולים הביולוגיים (Behiry et al., 2018). עם זאת, ניתן לראות כי גם ללא נוכחות החיידק הטיפולים אכן מייצרים השראה למסלול הח' הג'סמונית והשתקה של מסלול הח' הסליצילית לעומת טיפול המים שאינו מראה פעילות של גנים אלו ללא נוכחות הפתוגן. בצורה זו הטיפולים היו אמורים לעודד את הצמח ולהגן על עצמו מבעוד מועד נגד פתוגנים נקרוטרופים (Syed Ab Rahman et al., 2018). כדי להבין לעומק את המנגנון ואת עומק העמידות המוקנית על ידי הטיפולים התומכים, יש ללמוד את תגובת הצמח לאורך זמן, להתמקד במשך ההגנה המוקנית בתגובה לטיפולים התומכים כולל לימוד הטרנסקריפטום לאחר יישום הטיפולים ובמהלך הדבקות אתגר.

### **מיקרוביום**

אנאליזת PCoA מראה כי ההבדל המשמעותי ביותר נגרם כתוצאה מהשפעת מצע הגידול וכנראה מכמות החומר האורגני בתוך מצע השתילה אשר גם נמצא עשיר יותר (מצע גן) ומגוון יותר. במצע זה ניתן לראות התפצלות באוכלוסיה בין שני מיני הצמחים –קאלה אתיופיקה ונץ חלב לעומת הפרלייט בו ההתפצלות אינה קיימת. האנליזה להרכב נעשתה לפי מגוון טקסונומי בלבד וללא התחשבות בשפעה של המינים השונים המאכלסים את הקרקע. באופן זה, מינים נדירים יותר בעלי שפעה נמוכה נכנסים גם הם לאנליזה, וידוע על פי שיטה זו, כי ההבדל הגדול מתקבל בין קרקעות שונות (Edwards et al., 2015). בשנת הגידול הראשונה נצפה הבדל המושפע מסוג הצמח גם במצע פרלייט, אולם בשנה השנייה הבדלים אלו נעלמו, תופעה אשר יכולה לקרות מהתייצבות המצע בעונה השנייה בנוכחות הדשן, ההשקיה וההדברה. נמצא בעבר כי ליישומים חיצוניים שאינם ביולוגיים (דשן, חומציות, חומרי הדברה) ישנה השפעה קיצונית על מיקרואורגניזמים בקרקע, וכי השוני הנגרם הוא פחות במגוון ויותר בהרכב היחסי בין המינים ושפעתם (Eo and Park, 2016). כמו כן, העשרתם של *Proteobacteria* ו *Actinobacteria* יכולה להתקשר ישירות לדישון (Dai et al., 2018), בעיקר במצע הפרלייט האינרטי, ופחות בתגובה לטיפולים הביולוגיים השונים. בנוסף לכך, אין בספרות

תקדים לניסוי מיקרוביום רחב מסוג זה בשימוש עם מצע פרלייט. מצע זה אינרטי ואינו מכיל שום חומרי הזנה, כך שיכולתו לאכסן ולקיים מיקרואורגניזמים מועטה יותר מזו של מצע גן בעל כמות גבוהה של חומר אורגני. מתוך כך, הנחת העבודה הייתה כי נראה הבדלים משמעותיים יותר בפרלייט, כשלמעשה היישומים החיצוניים במהלך הגידול השפיעו דווקא על רמת הדמיון במצע האינרטי, שם האפקט היה גדול ומיסכו את ההבדלים שנראו בשנה הראשונה בין שני מיני הצמחים. מסיבה זו, הוחלט לעבור למצע גן עשיר בשנה השלישית. במצע גן ניתן לראות גם מגוון ועושר טקסונומי גבוהים יותר בנוסף לעובדה כי הצמח עצמו אחראי על עיצוב הרכב אוכלוסיית המיקרואורגניזמים בסביבת השורש (Berg and Smalla, 2009; Lamb et al., 2011). הטיפולים תומכי הגידול בכל מקרה לא הציגו הבדלים מובהקים ביניהם בהרכב אוכלוסיית החיידקים. ישנה עדות לנוכחות מוגברת של חיידקי הבצילוס בטיפולים בהם ניתנו, עד לכמות של אחוז אחד מתוך כלל האוכלוסייה. כמו כן לא נמצא קשר בין הטיפולים, הרכב המ"א בסביבת השורש ונגיעות בריקבון רך בחממה.

### **נמטודות**

התכשירים מראים השפעה על גדילת נמטודות. בשלב הראשון בבופר, נראה כי דווקא למיקס הפרוביוטי ישנה פעילות חזקה יותר ממיקס החיידקים האנטגוניסטים אך ללא הבדל מובהק ביניהם. במצע החול, שני החיידקים לא נבדלים בפעילותם במידה מובהקת, אולם המיקס האנטגוניסטי מסתמן פעיל יותר ושונה באופן מובהק מטיפול המים. תכשיר אקוסנס אינו שונה במובהק מטיפול המים אולם קיים ההבדל משמעותי ביחס למים בטיפול הגרין אפ. בחלק הראשון של הניסוי כל יחסי הגומלין בין החומרים לנמטודות מתקיימים בבופר המותאם לנמטודות. בחלק השני הקרקע מאווררת ורוויית מים (קיבול שדה), עובדה זו מאפשרת פעילות מיקרוביאלית יותר טבעית ואירובית ויצבות לאורך זמן של תכשיר הגרין אפ. היות ותהליך האינקובציה עם הנמטודות נמשך כ-48 שעות ניתן לשער כי בחול הייתה התעצמות של אפקט הטיפול לעומת ניסוי הבאריות (Liarzi et al., 2016).

לסכום, למרות הרצון למצוא טיפול ביולוגי תומך שיפחית את רמת הנגיעות בפתוגנים בשני גידולי הגיאופיטים, הטיפולים התומכים לא הציגו תוצאה חד משמעית ובולטת בעידוד גידול הצמחים או בהפחתת מחלת הריקבון הרך. ייתכן כי קיימים טיפולים יעילים יותר לגידולים אלה, אך ייתכן גם כי האפקט אינו מרשים מספיק והעומס הנוסף למגדל ביישום הטיפולים ותוספת העלות שלהם אינו מוצדק כלכלית. יחד עם זאת חשוב לציין כי יש ערך מוסף לטיפולים בהקניית עמידות לצמחים ובהקשר של נוכחות נמטודות בחלקות הגידול. ההשפעה הדרמטית על נמטודות בהחלט מצדיקה המשך מחקר בכיוון זה. תוצאות המיקרוביום מציעות כי שינוי מיקרוביום במצע הגידול ע"י טיפול חיצוני אינו טריוויאלי וכדי לגרום להפרת שיווי המשקל הטבעי בקרקע או במצע גידול יש ליישם את החומרים בצורה הרבה יותר אינטנסיבית. הצמח אחראי במידה רבה להרכב המיקרואורגניזמים בסביבת השורשים שלו וקשה מאוד להשפיע חיצונית ולאורך זמן על הרכב זה. ייתכן כי שיטות יישום אחרות כמו למשל מתן מינון נמוך של התכשירים מעודדי הגידול במי ההשקיה היה אפקטיבי יותר ובהחלט יש מקום להמשיך ולבחון תכשירים ידידותיים לסביבה כחלק ממערך הדברה משולב של מחלות צמחים. כמו כן, ייתכן שבעזרת התאמה מדויקת של מצעי הגידול, בדומה ל"רפואה מותאמת אישית" ניתן להשפיע על הרכב המיקרוביום ובכך בעקיפין על תברואת הצמח ומשתני הגידול שלו.

- Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA, 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* **17**, 478-86.
- Behiry, S. I., Ashmawy, N. A., Abdelkhalek, A. A., Younes, H. A., Khaled, A. E., and Hafez, E. E. (2018). Compatible- and incompatible-type interactions related to defense genes in potato elucidation by *Pectobacterium carotovorum*. *J. Plant Dis. Prot.* 125, 197–204. doi:10.1007/s41348-017-0125-5.
- Berg, G., and Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
- Byther RS, Chastagner GA, 1993. Diseases. In: De Hertogh A, Le Nard M, eds. *The Physiology of Flower Bulbs*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 71-100.
- Chase MW, Reveal JL, 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**, 122-7.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol. Fertil. Soils* 48, 489–499. doi:10.1007/s00374-012-0691-4.
- Dai, Z., Su, W., Chen, H., Barberán, A., Zhao, H., Yu, M., et al. (2018). Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. *Glob. Chang. Biol.* 24, 3452–3461. doi:10.1111/gcb.14163.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., et al. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E911–E920. doi:10.1073/pnas.1414592112.
- Eo, J., and Park, K. C. (2016). Long-term effects of imbalanced fertilization on the composition and diversity of soil bacterial community. *Agric. Ecosyst. Environ.* 231, 176–182. doi:10.1016/j.agee.2016.06.039.
- Lamb, E. G., Kennedy, N., and Siciliano, S. D. (2011). Effects of plant species richness and evenness on soil microbial community diversity and function. *Plant Soil* 338, 483–495. doi:10.1007/s11104-010-0560-6.
- Liarzi, O., Bucki, P., Miyara, S. B., and Ezra, D. (2016). Bioactive volatiles from an endophytic *Daldinia* cf. *concentrica* isolate affect the viability of the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *PLoS One* 11, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0168437.
- Littlejohn GM, 2006. Star of Bethlehem *Ornithogalum*. In: Anderson NO, ed. *Flower Breeding and Genetics*. Amsterdam: Springer, Netherlands, 739-52.



- Luzzatto-Knaan T, Kerem Z, Doron-Faigenboim A, Yedidia I, 2014. Priming of protein expression in the defence response of *Zantedeschia aethiopica* to *Pectobacterium carotovorum*. *Mol Plant Pathol* **15**, 364-78.
- Martinez-Azorin M, Crespo MB, Juan A, Fay MF, 2011. Molecular phylogenetics of subfamily Ornithogaloideae (Hyacinthaceae) based on nuclear and plastid DNA regions, including a new taxonomic arrangement. *Annals of Botany* **107**, 1-37.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM, 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *Fems Microbiology Reviews* **37**, 634-63.
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., and Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci.* 267, 102–111.  
doi:10.1016/j.plantsci.2017.11.012.
- Tun OM, Lipsky A, Knaan TL, Kerem Z, Yedidia I, 2013. The plant activator BTH promotes *Ornithogalum dubium* and *O. thyrsoides* differentiation and regeneration in vitro. *Biologia Plantarum* **57**, 41-8.

יעקב גוטליב, נטע מור ותמר להב (2015). חיטוי קרקע שבה יש פרוק מואץ של מתאם סודיום. פרסומי שה"מ.