

**איתור חומר גנטי עמיד של תות שדה לפטרייה הפתוגנית שוכנת קרקע *Macrophomina phaseolina* והדברת המחלה**

**Selecting resistant strawberry germplasm to the pathogenic soilborne fungus**

***Macrophomina phaseolina* and disease control**

מוגש לקרן המדען הראשי שבמשרד החקלאות ע"י

סטנלי פרימן	מחי לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי
מרסל מימון ובר פיקל	מחי לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי
ניר דאי	מח' לחקר ירקות, מדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי
זכריה תנעמי	מח' לחקר ירקות, מדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי
מוחמד אבו טועמה ונטע מור	שה"מ, משרד החקלאות

Stanley Freeman, Dept. of Plant Pathology and Weed Research, ARO, Rishon LeZion, 7505101. E-mail: freeman@volcani.agri.gov.il

Nir Dai, Dept. of Vegetable Research, ARO, Rishon LeZion, 7505101. E-mail: nirdai@volcani.agri.gov.il

Mohamad Abo-Toamy and Neta Mor, Extension Service, Ministry of Agriculture, Rishon LeZion, 7505101. E-mail: mohmyofi@gmail.com and netmor56@gmail.com

**תקציר**

1. הצגת הבעיה: *Macrophomina phaseolina* הינה פטריית קרקע טיפוסית שגורמת לנבילה ותמותת שתילי תות שדה לאחר איסור השימוש במתיל ברומיד. הנחת העבודה, שקיים חומר צמחי של תות שדה בעל רגישות/עמידות משתנה למקרופמינה.

2. שיטות העבודה: נבחנו שיטות אילוח שונות (אילוח קיסם ומלאכותי והגמעה). נסרקו זנים וקווי הטיפוח לתכונות של סבילות/עמידות לגורם המחלה בחממה ושדה. בוצעו ניסויי הדברת גורם המחלה והפחתת הנזקים בתנאי שדה. נאספו תבדידי מקרופמינה מתות שדה, מלון ועוד פונדקאים והתקבל דוגמאות DNA של הפתוגן מארה"ב. אופיין שונות גנטית של אוכלוסיית הפתוגן בשיטות מולקולריות. נבחן ספציפיות לפונדקאי ע"י הדבקת תות שדה ומלון בפטרייה ממקרורות שונים. נוסה שיטות ליצירת פטרייה טרנספורמנטית ל-GFP.

3. תוצאות עיקריות: נאספו תבדידי מקרופמינה מפונדקאים שונים. אילוח בקיסם נמצא אגרסיבי מידי ולא אמין, אך, אילוח מלאכותי בקישיונות נמצא כשיטת הדבקה טובה בניסויי הזנים השונים. עשרות זנים וקווים מאוסף הזנים של מכון וולקני נסרקו ודורגו למידת סבילותם למחלה בשיטת האילוח המלאכותי בעציצים. ממאגר גנטי זה, נמצאו כמה זנים בעלי סבילות גבוהה למחלה בחממה ותנאי שדה. לא ניתן ללמוד לגבי יעילות התכשירים שנבדקו בשדה למניעת מקרופמינה בתות שדה בגלל השונות הגדולה בין החלקות. נמצא שונות גנטית של אוכלוסיית הפתוגן מתות שדה וממלון בשיטות מולקולריות. תבדידי מקרופמינה

מתות שדה היו אלימים כלפי תות וגם כלפי מלון לעומת תבדידים ממלון שהיו פחות אלימים לתות שדה. לא התקבל תבדיד מקרופומינה מותמר ב-GFP.

4. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות:

נמצא חומר הגנטי סביל/עמיד לאחר סריקה בחממה ושדה שיוכל לשמש בעתיד לפיתוחם של זני תות-שדה בעלי עמידות טובה יותר בהשוואה לזנים הקיימים הרגישים ברובם. תבדידי הפתוגן מתות שדה אלימים כלפי תות וגם מלון לכן צריך לדאוג לחיטוי הקרקע לפני השתילה בקרקע נגועה.

**תוכן עניינים:**

1	.....	תקציר
3	.....	מבוא
4	.....	מטרות מחקר
4	.....	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות מחקר
15	.....	דיון
17	.....	ביבליוגרפיה

**מבוא**

גורמי מחלות שוכני קרקע שתוקפים תות שדה הינם בין ההרסניים לגידול. הפטרייה *Macrophomina phaseolina* היא פטריית קרקע טיפוסית הגורמת למחלות ריקבון שורשים (root rot) וריקבון פחם (charcoal rot). הסימפטומים מתבטאים בנבילה ובתמותת שתילים במגוון רחב של צמחים. עד כה דווח על כ- 200 מינים בוטניים הנתקפים ע"י פטרייה זו, ביניהם תות שדה. כמוכן, פטרייה זו תוקפת תות שדה הגדל באזורים חמים כגון יוון, תורכיה, הודו, מצרים, דרום צרפת, ספרד ומופיעה גם באזורי גידול עיקריים בארה"ב, בקליפורניה ובפלורידה. מקרופומינה גורמת לנבילת שתילי תות שדה תוך כחודש מההדבקה בתנאי טמפרטורה גבוהים (אופטימום הגידול כ- 30 מ"צ). בתרבית, הפטרייה מייצרת תוך 3 ימים גופי ריבוי אל-מיניים – קשיונות שהינם קטנים, שחורים, בלתי רגולריים ומשמשים כגופי ריבוי והישרדות לפתוגן. מעבודה שנעשתה לאחרונה על ידינו, מצאנו שטמפרטורות גבוהות ותנאי יובש מעודדות את המחלה, בעיקר כשצמחים נמצאים בעקה כלשהי (מים, מלחים, טמפ' גבוהות וכו') הם רגישים יותר לגורם המחלה (Zveibil et al., 2012; Zveibil et al., 2005).

גידול תות שדה בארץ התבסס עד לשנת 2010 לערך, על חיטוי הקרקע במתיל ברומיד. חומר זה יצא משימוש ויישומו בשנים האחרונות נאסר. ההשערה שהועלתה ברחבי העולם היא שהופעת המקרופומינה בתות שדה נובעת מהמעבר מחיטוי במתיל ברומיד לשיטות חיטוי חלופות (Hutton et al., 2013; Koike et al., 2013; Mertely et al., 2005). בעבודות שביצענו בשנים האחרונות נמצא שמתאם סודיום יעיל כחומר חיטוי כנגד מקרופומינה בתות שדה ויכול להביא להפחתה במחלה בתנאי שהוא מיושם נכון במידה ונעשה על פי המלצות מערכת ההדרכה על גבי ערוגות מוכנות לשתילה משולב עם חיטוי סולרי של כ- 2-3 שבועות לפני יישום התכשיר (מור וחוב' 2012; Zveibil et al., 2012). אך בשנים האחרונות ישנה בעיה של פרוק מואץ של תכשירי מתאם סודיום, שעלול לפגוע ביעילות בהדברת המחלה. כמוכן, חומרי ההדברה כגון קרבנדזים שמושמים במקרה של גילוי המחלה במשתלות ושדות המניבים לא מספיק יעילים וקיימים מקרים רבים של התפשטות המחלה למרות הטיפול. לכן, נדרש מערך חדש לבקרה בעזרת חומרים נוספים ע"מ לרפא שתילים נגועים.

הנחת העבודה מבוססת על סבירות גבוהה להמצאות חומר צמחי בעל שונות גנטית לרגישות/עמידות למקרופומינה, כמוכן, דווח לאחרונה על עבודות לבחינת רגישות/סבילות משתנה של תות שדה למקרופומינה ממחקר שנעשה באוניברסיטת קליפורניה ב- Davis (Gordon et al., 2013) ([http://ucdaviscaes.wordpress.com/2013/08/27/uc-researchers-develop-strawberry-plants-\(with-disease-resistance\)/](http://ucdaviscaes.wordpress.com/2013/08/27/uc-researchers-develop-strawberry-plants-(with-disease-resistance)/)), בדומה, דווח מאוסטרליה, שהזן Albion (הנמצא באוסף הזנים במכון וולקני) נמצא סביל למחלה לעומת הזן Camarosa מארה"ב (Fang et al., 2011; 2012). כמוכן, מתצפיות שנבחנו בקרקעות מאולחות במקרופומינה באופן טבעי באזור השרון, נמצא שהזן הישראלי "דנדי" אינו נפגע מהפתוגן בהשוואה לתמותה רבה של הזן Festival הרגיש. לכן, זנים ישראלים שטופחו לאחרונה וקווי טיפוח חדשים ייבחנו לעמידות/רגישות למחלה בהסתמך על תוצאות מבטיחות שדווחו לא מכבר.

לסיכום, פטריית המקרופומינה הפכה ב-10 שנים האחרונות למחלת קרקע העיקרית שתוקפת תות שדה בארץ ובעולם. הסברה הרווחת הינה סביב העלמות מתיל ברומיד שהוצא מכלל שימוש בשנים האחרונות והביא להתפשטות גורם המחלה.

## מטרות המחקר

- א. בחינת שיטות אילוח מיטביות לבחינת קווים/זנים לגורם המחלה מקרופומינה, בתנאים מבוקרים.
- ב. זיהוי זנים וקווי הטיפוח בעלי סבילות/עמידות לגורם המחלה מקרופומינה, בתנאי חממה ושדה.
- ג. בחינת חומרי ודרכי הדברת גורם המחלה במשתלות ובשדה המניב.
- ד. בחינת השונות הגנטית ותחום הפונדקאים של תבדידי מקרופומינה מתות שדה ומלונים.
- ה. לימוד האינטראקציה בין זנים/קוים בעלי רגישות שונה באמצעות פטריית מקרופומינה מסומנת ב-GFP.

## פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות מחקר

### א. 1. איסוף תבדידי מקרופומינה נוספים מפונדקאים שונים ו-DNA של תבדידים מארה"ב

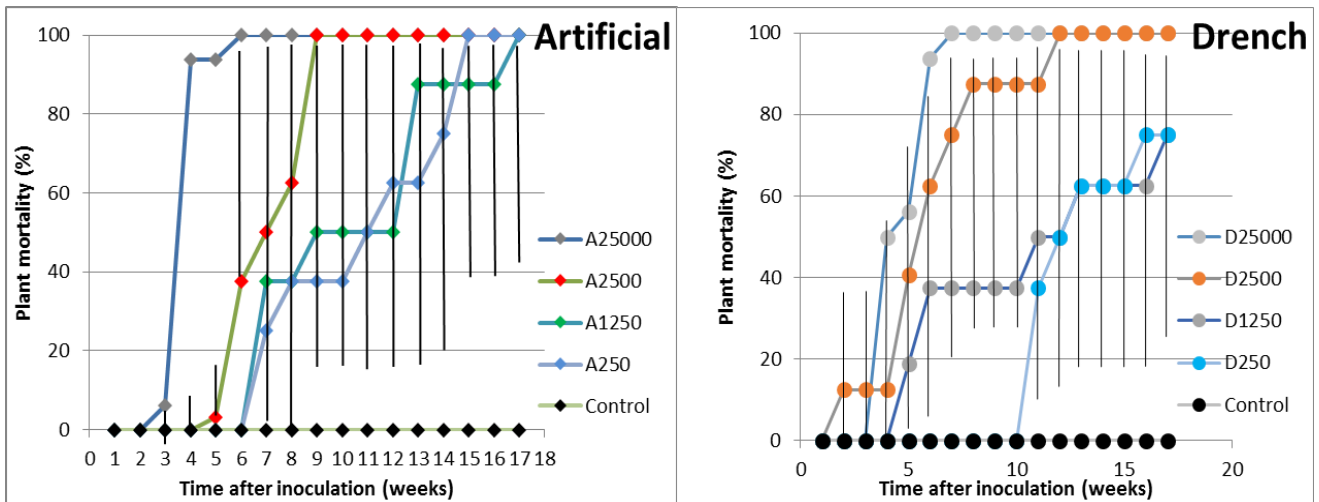
במסגרת המחקר הנוכחי, נדגמו צמחים נבולים וממוטטים ממשתלות השדה ושדות המניבים של תות שדה ודלועים ע"מ לזהות את הפתוגן מבין פטריות שוכני קרקע ביניהם: מקרופומינה, קולטוטריכום, פיטופתורה, ריזוקטוניה וורטיציליום. חלקי צמח (שורשים, כתר, שלוחות וגבעולים) חוטאו ונזרעו על מצעים שונים לגילוי הפתוגנים. מבין כ- 500 הצמחים שהתקבלו במשך המחקר עם סימפטומים של מקרופומינה נבדקו 195 תבדידים. לשונות הגנטית נבחרו קבוצות ובתוך הקבוצות 58 תבדידים נציגים של הפטרייה משני משפחות בוטניות שונות: *Rosaceae* (תות שדה) ו- *Cucurbits* (מלון), סה"כ נבדקו 50 תבדידים (ראה פרק ד'). כמוכן, נתקבלו דוגמאות DNA של 8 תבדידי תות שדה ודלועים ייצוגיים מקליפורניה שבארה"ב באדיבות (Dr. Frank Martin, USDA, Salinas). דוגמאות אלה נכללו באנליזה של השונות הגנטית (ראה בהמשך).

### א. 2. פיתוח שיטת אילוח מיטבי לסריקת חומר גנטי של תות שדה

זני תות-שדה ישראלים ומחו"ל שנמצאים באוסף וקווי טיפוח שנמצאים ברשותנו סופקו ע"י משתלות מורשות וממקור עצמי. בשנת המחקר הראשונה (דוח לתכנית מחקר 16-1821-132) נמצאה שיטת האילוח בעזרת קיסם כאגרסיבית מידי ולא אמינה לעומת אילוח בקישיונות. המשכנו לבחון אילוח מלאכותי באמצעות ערבוב קישיונות בקרקע ובהגמעה.

מתכון הניסויים: 10 צמחים מהזן הרגיש גילי אולחו בכל אחד משיטות האילוח (מלאכותי – Artificial ו- הגמעה – Drench) ואחוז תמותת השתילים הושווה לביקורת מים. כל ניסוי נערך פעמיים. תנאי הגידול כללו טמפ' מבוקרת של 30 מ"צ בתא גידול, שהינה אופטימאלית להתפתחות המחלה.

שיטת אילוח בערבוב (Artificial) קישיונות בקרקע באופן מלאכותי: כפי שפורסם בעבר ( Zveibil et al., 2012) שיטה זו כוללת אילוח של קישיונות מקרופומינה במצע גידול הצמחים. תפטיר הפטרייה גדל במצע נוזלי (PDB) למשך 10 ימים ובהמשך הופקו קישיונות ועורבבו בתערובת גידול צמחים בריכוזים שונים 25,000 עד 250 קישיונות/מ"ל לעציץ (איור 1). הצמחים הושמו לעציצים והועברו לתא גידול ב 30 מ"צ. שיטת אילוח בהגמעת (Drench) קישיונות בקרקע באופן מלאכותי: המידבק הוכן במצע נוזלי ויושם בהשקיה לקרקע בריכוזים של 25,000 עד 250 קישיונות/מ"ל לעציץ. צמחי תות שדה הושמו לעציצים והועברו לתא גידול ב 30 מ"צ (איור 1).

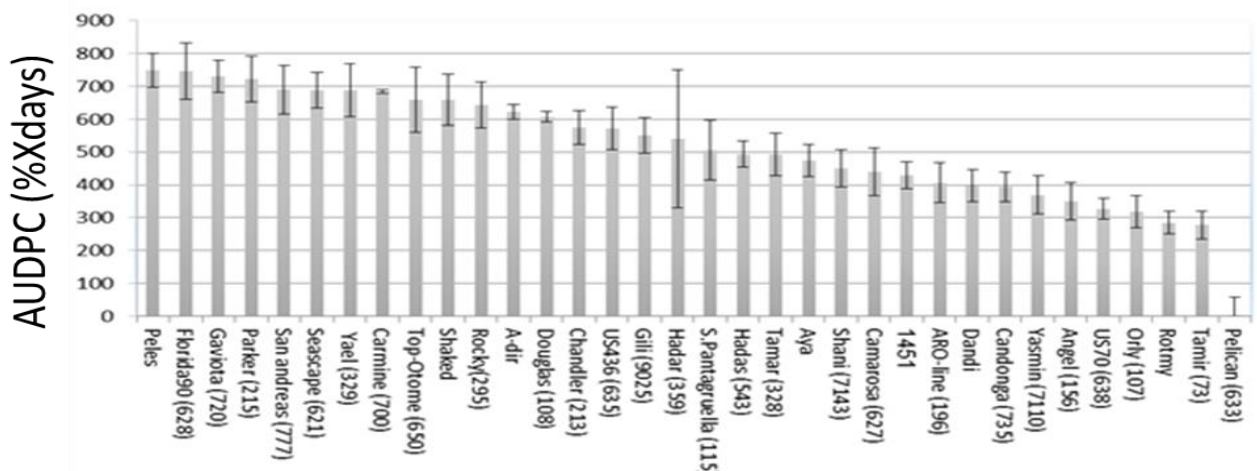


איור 1. הערכת נגיעות של זן גילי, רגיש למחלה לאחר אילוח מלאכותי (Artificial) והגמעה (Drench) בקשיונות מקרופומינה.

שתי שיטות האילוח, ערבוב של קשיונות בקרקע והגמעת הקשיונות נמצאו מתאימות, מהמנות ומהירות יחסית ושמשו לנו לסריקת נגיעות בהמשך המחקר. בשתי השיטות, ניתן להבדיל בין הריכוזים השונים כש- $2 \times 10^3$  קשיונות/מ"ל נתן תוצאות מהמנות שאפשרו הערכת העמידות/רגישות הצמחים בהמשך.

ב 1. זיהוי זנים וקווי הטיפוח בעלי סבילות/עמידות לגורם המחלה מקרופומינה, בתנאי חממה

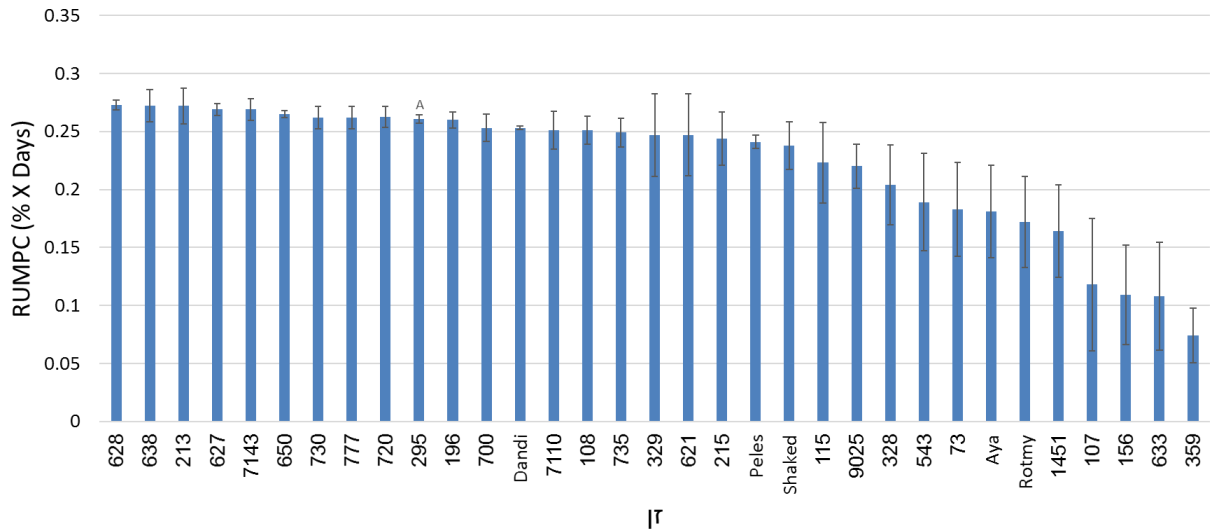
מבחני הסריקה של זנים וקווי הטיפוח נערכו בתא גידול בתנאים מבוקרים באילוח עם קשיונות ב-2017 ו-2018, כפי שתואר. בניסוי הראשון (2017) בשיטת האילוח בערבוב של קשיונות בקרקע היתה המתאימה ביותר ונתנה תוצאות מהמנות ומהירות יחסית. בשיטת אילוח זו ניתן לקבוע שאכן יש לזנים שונים רגישות שונה, כשהזן Pelican נמצא סביל במיוחד למחלה לעומת מספר זנים כגון פלס וזנים אמריקאים אחדים שנמצאו רגישים ביותר למחלה (איור 2).



ז

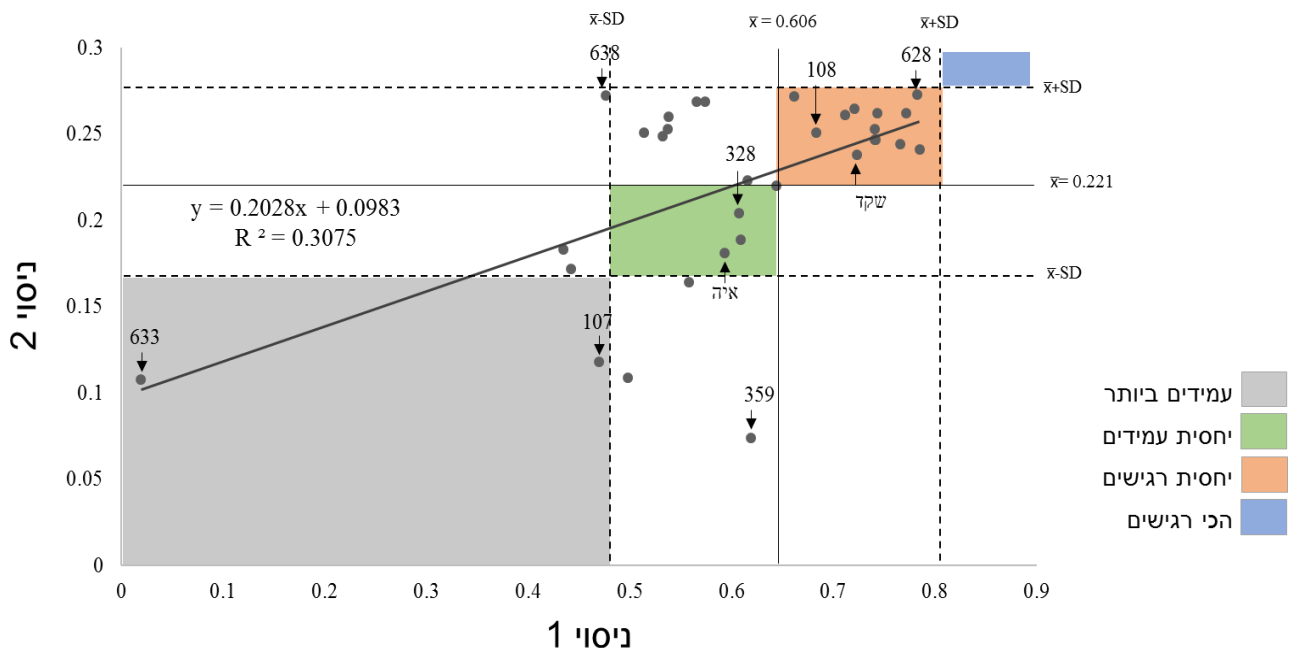
איור 2. הערכת נגיעות של זני וקווי תות שדה לאחר אילוח מלאכותי בקשיונות מקרופומינה ב-2017.

בניסוי השני (2018) נמצאו קוים יחסית עמידים כגון 359 ו- 633 בהשוואה לזנים הרגישים 628, 638, קמרוסה (627) ו צ'נדלר (213), כפי שמוצג באיור 3.



**איור 3.** פתוגניות בשלושים ושתיים זני תות שדה אשר הודבקו ב- *M. phaseolina*: על פי השטח היחסי שמתחת לעקומת התקדמות המחלה (RUMPC). שונות מובהקת נמצאה בין התבדילים השונים ע"פ מבחני Student's t. אותיות שונות מעל כל עמודה מייצגות הבדל משמעותי ברמת מובהקות  $p < 0.05$ .

במבט על תוצאות ניסויי 2017 ו 2018 אפשר לראות זנים, כדוגמת הזן הדר (359), שלא נתנו את אותה תוצאה בשני הניסויים. תוצאה זו היא די מקובלת במבחנים מעין אלו כאשר אנו מנסים להעריך את סבילות הצמח ודוגמים כמדד את תמותת הצמחים. לא כל תנאי הניסוי כמו, מצב הצמחים בתחילת הניסוי, נתוני טמפ', השקיה ודישון לגמרי זהים ולכן תמיד יהיו הבדלים. אף על פי כן כדי לנסות ולעמוד את הדירות התוצאות של מבחנים אלו ערכנו השוואה בין תוצאות מבחני ההדבקה של שנים 2017 ו 2018 בכל 32 זני תות שדה (איור 4).



**איור 4.** רגרסיה לינארית של ממוצע אחוז התמותה משני ניסויי סקירה של שלושים ושתיים זני תות שדה אשר הודבקו ב- *M. phaseolina*. קווים שלמים מייצגים את הממוצע של שלושים ושתיים זנים בכל ניסוי, קווים שבורים מייצגים את סטיית התקן מהממוצע של כל ניסוי. מנתונים אלה נוצרים ארבע ריבועים אשר

מייצגים טווח של עמידות או סבילות למחלה. זן אשר נמצא במרובע הירוק נחשב סביל למחלה בעוד שזן אשר מצוי בריבוע הכחול נחשב רגיש ביותר למחלה. זנים 633 ו-107 נחשבים עמידים ביותר, איה ו-328 נחשבים יחסית עמידים, 108, שקד ו-628 נחשבים יחסית רגישים למחלה. הקרבה לקו הרגרסיה מעיד על מובהקות סטטיסטית של זן מסוים לרגישות או עמידות למחלה. (זנים 638 ו-359 אינם מובהקים מבחינה סטטיסטית בשני הניסויים).

ישנה שונות מובהקת ברגישות או בסבילות של זני תות שדה שונים כנגד הפטרייה *M. phaseolina*. מתוך 32 זנים אשר הודבקו במחלה, 22 זנים מראים שונות באופן מובהק בסבילות למחלה בין זן לזן ( $P < 0.05$ ). עשרה אינם מראים שונות כנגד המחלה באופן מובהק (זנים 638 ו-359 אינם מובהקים מבחינה סטטיסטית בשני הניסויים). זנים 633 ו-107 נחשבים עמידים ביותר, איה ו-328 נחשבים יחסית עמידים, 108, שקד ו-628 נחשבים יחסית רגישים למחלה. הקרבה לקו הרגרסיה מעידה על מובהקות סטטיסטית של זן מסוים לרגישות או עמידות למחלה (איור 4).

## ב 2. זיהוי זנים וקווי הטיפוח בעלי סבילות/עמידות לגורם המחלה מקרופומינה, בתנאי שדה

המבחן נערך בישוב קדימה בחלקת גידול תות שדה בקרקע בשטח פתוח במנהרות נמוכות, בעונה 2018 בחלקה שנצפתה נגיעות קשה במקרופומינה בשטח, הכנת הקרקע כמקובל באזור אך לא עברה חיטוי כל שהוא לפני השתילה. תאריך שתילה: 24.9.2017 במבחן נבחנו כ-20 זנים, ברובם מסחריים וחלקם קווי מטיפוח חדש, מקורות הזנים מטיפוח של מכון וולקני (ניר דאי), חברת פרטיסידס ומשק אפי יוסף. הזנים נשתלו בחלקות באורך 2 מטר חלקה כאשר בכל חלקה כ-24 שתילים. לא בוצעה טבילת שתילים בחומרים נגד מחלות קרקע כמקובל. במהלך המבחן בוצע מעקב אחרי ביצועי השתילים, כאשר המדד העיקרי הוא נגיעות במקרופומינה והתמוטטות. בוצעו מספר הערכות נגיעות במהלך העונה בתאריכים: 14/12/2017, 20/12/2017, 01/02/2018, 17.4.2016, 14/03/2018, 29/03/2018, 23/04/2018, 02/05/2018, 17/05/2018. עד לתאריך 14/12/2017 לא נצפתה התמוטטות בחלקה, תחילת התמוטטות שתילים נצפתה בתאריך 20/12/2017 (טבלה 1). במהלך המבחן הוצבו מכשירים למדידת טמפרטורת הקרקע בעומק 25 ס"מ בערוגה אחת בחלקת הניסוי.

בעונה זו נמדדו טמפרטורה בקרקע בשני עומקים 5 ס"מ ו-10 ס"מ בחודשים נובמבר עד סוף פברואר. עד סוף חודש נובמבר בערך הטמפרטורות בשני העומקים היו זהות, מסוף נובמבר ועד סוף דצמבר יש הפרש של 0.5 מעלות בין שני העומקים כאשר הטמפרטורה גבוהה יותר בעומק 5 ס"מ. מסוף חודש דצמבר ההפרש מצטמק והטמפרטורות דומות. בחודש פברואר הטמפרטורה בעומק הרדוד היה גבוהה יותר.

## טבלה 1. אחוז צמחים מתים תקופתי ומצטבר

אחוז צמחים מתים							תאריך ספירה
17/5/18	2/5/18	23/4/18	29/3/18	14/3/18	1/2/18	20/12/17	שם הזן
24 ABCD	6 CDE	1 A	1 A	0 A	0 A	0 A	771
26 ABC	18 ABCD	10 A	0 A	0 A	0 A	0 A	187
26 ABCD	15 BCDE	6 A	0 A	0 A	0 A	0 A	621
1 CD	0 E	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	638
8 BCD	2 DE	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	184
4 BCD	3 DE	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	וולקני 197
21 ABCD	13 BCDE	9 A	3 A	1 A	0 A	0 A	627
5 BCD	0 E	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	וולקני קו 318
0 D	0 E	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	633
28 AB	23 ABC	7 A	0 A	0 A	0 A	0 A	215
18 ABCD	4 CDE	1 A	0 A	0 A	0 A	0 A	הדר
26 ABCD	11 BCDE	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	אורלי
28 ABC	15 BCDE	6 A	2 A	2 A	1 A	1 A	229
11 BCD	5 CDE	3 A	0 A	0 A	0 A	0 A	מאור
22 ABCD	13 BCDE	6 A	0 A	0 A	0 A	0 A	שני
41 A	38 A	17 A	0 A	0 A	0 A	0 A	יסמין
41 A	28 AB	13 A	3 A	2 A	0 A	0 A	628
30 AB	25 ABC	9 A	0 A	0 A	0 A	0 A	772
8 BCD	2 DE	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	1451
6 BCD	1 E	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	רותמי

\*אותיות שונות באותה עמודה מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים לפי מודל Tukey Kramer ברמת מובהקות  $P < 0.05$ .

התמוטטות ראשונה התחילה בחודש דצמבר בזן 229 אולם לא הייתה מובהקת מבחינה סטטיסטית, לאחר מכן בתחילת אפריל (התחילה התמוטטות מסיבית בשדה), כשהזנים 627 ו-628 הם הראשונים שהתמוטטו בקצב מהיר. החל מאמצע אפריל התגברה ההתמוטטות והקיפה יותר זנים בעוצמה גבוהה יותר. מגמה זו נמשכה במועדי ההערכה המאוחרים יותר. אותם זנים שנפגעו ראשונים המשיכו להתמוטט במהירות יתרה מאלה שהראו סבילות גדולה, שקצב התמוטטותם היתה איטית יותר (כגון הזנים וקוים 633, 638, ו-97), אחריהם הזנים רותמי, 184 ו-1451, הזנים הרגישים ביותר במבחן הם: יסמין ו-628.

### ג. בחינת חומרי ודרכי הדברת גורם המחלה במשתלות ובשדה המניב

בניסויים המוצגים להלן נבדקו תכשירים שניתנים ליישום במהלך הגידול למניעת המחלה בשדה. הרשימה הסתמכה על מחקר מעבדתי ושדה שנעשים על המחלה בגידול מלונים ע"י דר' רוני כהן ממנהל המחקר החקלאי, נווה יער. ניסוי שלישי הוצב באביב 2017 בחלקה שאולחה במחלה ולאחר מכן הוגמעו התכשירים.

#### ניסוי 1- המגדל אלי ונתן אקלר- קדימה

הטיפולים: עמיסטאר 500 סמ"ק/דונם; טופז 300 גר/ד'; דלסן 300 גר/ד'; בליס 250 גר/ד'; וולום 130 סמ"ק/ד'; אוהיו 250 סמ"ק/ד'; היקש לא מטופל. מתכונת הניסוי- בלוקים באקראי בארבע חזרות. גודל חזרה- ערוגה באורך 9 מטר (כ- 100 צמחים). חיטוי קרקע- אדיגן וקונדור בטפטוף (3 שלוחות) מתחת לפלסטיק. מועד שתילה 8/9/16 זן אורלי. השתילים עברו טבילה של 5 דקות בדלסן +0.15 אוקטב 0.1.



ב 27/9/16 קבלה כל החלקה דלסן בהמטרה במינון של 250 גר"ד. טיפול ראשון ניתן בריסוס בנפח תרסיס של כ- 40 ליטר/ד' בתאריך 9/10/16. סוג מרסס- מרסס מוט עם 5 דיזות מניפה. לאחר הריסוס ניתנה המטרה של 15 מ"ק/ד' על מנת לשטוף את התכשירים לקרקע. עמיסטאר רוסס בנפח תרסיס של 49 ל"ד' (שווה ערך למינון של 700 סמ"ק/ד'). חיפו קרקע בפלסטיק חום-כסף ב 14/10/16; ב- 25/10/2016 טיפול שני בהגמעה במזרק-20 סמ"ק תמיסה לשתיל והפעלה של 4-5 מ"ק מים לדונם בטפטוף; ב-7/11/2016 טיפול שלישי בהגמעה במזרק 20 סמ"ק תמיסה לשתיל (למעט התכשיר וולום) והפעלה של 4-5 מ"ק מים לדונם בטפטוף; ב- 2/4/2017 טיפול רביעי בהגמעה בכוסות לפי 50 סמ"ק תמיסה לשתיל (למעט התכשיר וולום) והפעלה של 4-5 מ"ק מים לדונם בטפטוף. נגיעות מצטברת מופיעה בטבלה 2.

טבלה 2. ניסוי 1 - נגיעות מצטברת במקרופומינה עד ה- 5/3/2017.

הטיפול	חזרה 1	חזרה 2	חזרה 3	חזרה 4	סה"כ
עמיסטאר 500	0	0	1	6	7
טופז 300	0	0	0	1	1
דלסן 300	1	0	0	0	1
בליס 250	1	2	1	2	6
וולום 130	1	1	1	1	4
אוהיו 250	1	1	2	5	9
היקש לא מטופל	6	1	1	1	9

המספרים מיצגים את מספר הצמחים שנדבקו במחלה ונבלו בכל חלקה בניסוי.

ניסוי 2- עובדיה חיימוביץ- עין ורד

הטיפולים: עמיסטאר 500 סמ"ק/דונם; טופז 300 גר/ד'; דלסן 300 גר/ד'; בליס 250 גר/ד'; וולום 130 סמ"ק/ד'; אוהיו 250 סמ"ק/ד'; יוניפורם 150 סמ"ק/ד'; פרוליין 100 סמ"ק/ד'+דיסארם 100 סמ"ק/ד'; פרוליין 50 סמ"ק/ד'+דיסארם 50 סמ"ק/ד'; היקש לא מטופל. מתכונת הניסוי: בלוקים באקראי בארבע חזרות. גודל חזרה: ערוגה באורך 10 מטר (כ- 110 שתילים לחזרה), חיטוי קרקע בטפטוף (3 שלוחות) מתחת לפלסטיק באדיגן במינון 100 ליטר לדונם לאחר חיטוי סולרי וקונדור 20 ליטר לדונם; מועד שתילה 12/9/16 - זן רוקי. טיפול ראשון ניתן בריסוס בנפח תרסיס של 40 ליטר/ד' בתאריך 13/10/16. מרסס מוט עם 5 דיזות מניפה. לאחר הריסוס ניתנה המטרה של 15 מ"ק/ד' כדי לשטוף את התכשירים לקרקע. עמיסטאר רוסס בנפח תרסיס של 47 ל"ד' (מעלה את המינון ל 700 סמ"ק/ד') וטופז בנפח של 56 ל"ד'. ב-27/10/2016 טיפול שני בהגמעה במזרק 15 סמ"ק תמיסה לשתיל והפעלת מים במנה של 5 מ"ק לדונם. ב- 10/11/2016 טיפול שלישי בהגמעה כמתואר מעלה והפעלת מים במנה של 5 מ"ק/דונם. נגיעות מצטברת מופיעה בטבלה 3.

טבלה 3. ניסוי 2- נגיעות מצטברת במקרופומינה עד ה- 5/3/2017.

הטיפול	חזרה 1	חזרה 2	חזרה 3	חזרה 4	סה"כ
עמיסטאר 500	1	0	3	1	5
טופז 300	0	0	0	0	0
דלסן 300	1	0	0	0	1
בליס 250	2	2	3	1	8
וולום 130	2	0	1	1	4
אוהיו 250	0	1	4	1	6
יוניפורם 150	4	1	4	0	9
פרוליין 100+ דיסארם 100	0	0	1	0	1
פרוליין 50+ דיסארם 50	0	0	0	---	0
היקש לא מטופל	3	2	2	0	7

המספרים מיצגים את מספר הצמחים שנדבקו במחלה ומתו בכל חלקה בניסוי.

ניסוי 3- אודי נחשון גאולים

בניסוי זה נעשתה הדבקה של הצמחים בקשיונות של מקרופומינה ( $10^5$  קשיונות/מל") שנמהלו במנה של 50 סמ"ק מים לשתיל והושמו בגומא בצמוד לכל שתיל. לפני האילוח הוצאו כל הצמחים שהראו סימני נבילה. האילוח נעשה ב 23/4/2017. הגמעת הצמחים בחומרי ההדברה השונים נעשתה במנת תמיסה של 100 סמ"ק לצמח ב 1/5/2017. מתכונת הניסוי בלוקים באקראי בארבע חזרות. גודל חזרה כשני מטר (-20 30 צמחים). רשימת הטיפולים: פרולין 100 סמ"ק/דונם; פרולין 200 סמ"ק/דונם; עמיסטאר 500 סמ"ק/דונם; היקש לא מטופל. תמותת שתילים בחלקות הניסוימופיעה בטבלה 4.

טבלה 4. ניסוי 3- תמותת צמחים בסוף הניסוי 1/6/2017.

הטיפול	חזרה 1	חזרה 2	חזרה 3	חזרה 4	ממוצע (%)
פרולין 100	8/22	4/28	5/24	3/22	21.3
פרולין 200	2/17	1/21	5/22	2/19	12.5
עמיסטאר 500	3/18	4/23	1/27	2/23	11.6
היקש לא מטופל	4/25	4/20	1/26	4/21	14.7

מספר הצמחים שמתו משמאל יחסית למספר הצמחים הכולל בחזרה המופיע מימין. הממוצע מציג את % הצמחים שנדבקו ומתו ממקרופומינה בסוף הניסוי ביוני 2017.

לסיכום, ניסוי 1 ו- 2 התבצעו בחלקות מסחריות שהיו נגועות קשה במקרופומינה בעונה החולפת. הטיפולים שנעשו בתכשירי החיטוי על פי הפרוטוקול המומלץ הפחיתו כמעט לחלוטין את התמותה מהמחלה כולל בסוף העונה עם העלייה בטמפרטורות באביב. לא ניתן להסיק מהתוצאות המוצגות לגבי יעילותם של התכשירים השונים שנבדקו בניסויים כיוון שהנגיעות בטיפול היקש הלא מטופל היו נמוכות מאוד. ניסוי 3 התבצע בחלקה בה נמצאה ההתמוטטות של צמחים במהלך העונה ובנוסף אילחנו את הצמחים באופן מלאכותי בקשיונות של מקרופומינה. גם בניסוי זה לא ניתן להסיק לגבי יעילותם של התכשירים שנבחנו כיוון שהנגיעות בהיקש ובטיפולים הייתה די דומה.

ניסוי 4 – חיים עמר קדימה

בעונת הגידול 2017/18 נערך ניסוי בחלקה מסחרית שהייתה נגועה קשה במקרופומינה בעונה החולפת. בשורות הניסוי נעשה חיטוי סולרי בלבד ללא חיטוי באדיגן. חיטוי סולרי אינו פוגע במקרופומינה. בניסוי נבדקו תכשירים שניתנים ליישום במהלך הגידול למניעת המחלה בשדה. הרשימה הסתמכה על עבודות מעבדה ושדה שנעשים על המחלה בגידול מלונים ע"י ד"ר רוני כהן ממנהל המחקר החקלאי בנווה יער. מתכונת הניסוי- בלוקים באקראי בארבע חזרות. גודל חזרה- ערוגה באורך 4 מטר (כ- 50 צמחים) מועד שתילה 28/9/17 זן פלס. טיפול ראשון ניתן בריסוס בנפח תריסס של כ- 60 ליטר/ד' \* בתאריך 15/10/2017. סוג מרסס- מרסס מוט עם 5 דיזות מניפה. לאחר הריסוס ניתנה המטרה של 20 מ"ק/ד' על מנת לשטוף את התכשירים לקרקע. הגמעות ראשונות ניתנו ב 29/10/17 וב 12/11/17 (למעט פרולין) בכוסות במנת תמיסה של 50 סמ"ק לצמח. חישוב התכשירים בתמיסה נעשה לפי 7800 שתילים לדונם. שתי הגמעות נוספות ניתנו באביב בתאריכים 4/3/2018 ו- 15/3/2018. לאחר ההגמעות הופעלה השקיה בטפטוף של 15 קוב"ד'. תוצאות הניסוי מוצגות בטבלה 5.

## טבלה 5 - נגיעות מצטברת במקרופמינה עד ה - 25/4/2018

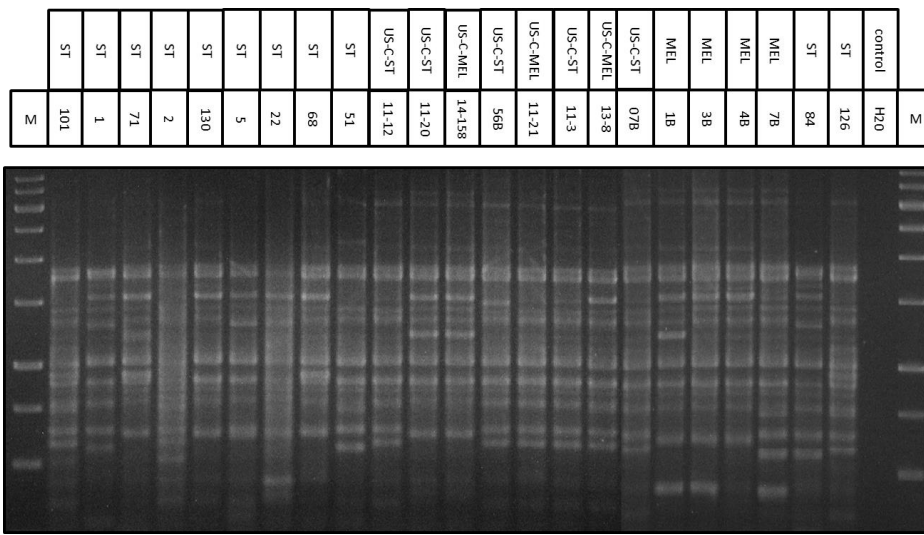
הטיפול	חזרה 1	חזרה 2	חזרה 3	חזרה 4	סה"כ
עמיסטאר	5	6	*0	*0	11
סיגנום	0	8	0	*0	8
דלסן	*4	8	5	0	17
אוהיו	3	23	4	2	32
פרוליין 40	1	*6	0	0	7
קומודור	*11	2	*0	0	13
אמרלד	7	*1	13	0	21
אורטיבה טופ	10	*3	0	0	13
פרוליין 80	1	0	---	---	1
היקש	*0	3	*10	0	13

מהמוצג בטבלה ניתן לראות שיש שונות גדולה בין החזרות בניסוי. מסומנים ב \* החלקות שהיו בערוגה השלישית שיתכן ולא קיבלה חיטוי במתאם סודיום.

באופן כללי, מתוצאות ניסוי זה גם כן, בדומה לניסויים הקודמים לא ניתן ללמוד לגבי יעילות התכשירים שנבדקו למניעת מקרופמינה בתות שדה בגלל השונות הגדולה בין החלקות. יתכן שערוגה אחת מתוך השלושה ששמשו לניסוי קיבלה חיטוי במתאם סודיום כיוון שרוב העונה לא נצפתה בה התמוטטות מהמחלה.

## ד 1. בחינת השונות הגנטית ותחום הפונדקאים של תבדידי מקרופמינה מתות שדה ומלונים.

הופק DNA מתבדידי מקרופמינה מתות שדה (195) ומלון (8) מהארץ, והוספו 8 גודמאות DNA מארה"ב. ה- DNA הוגבר עם התחלים  $(AGG)_5$ ,  $(GACAC)_3$ ,  $(GACA)_4$ ,  $(CAG)_5$  בשיטת ה- Ap-PCR וסווגו לקבוצות מייצגות. DNA של הנציגים הוגבר ומוצג בג'ל ייצוגי (איור 5).

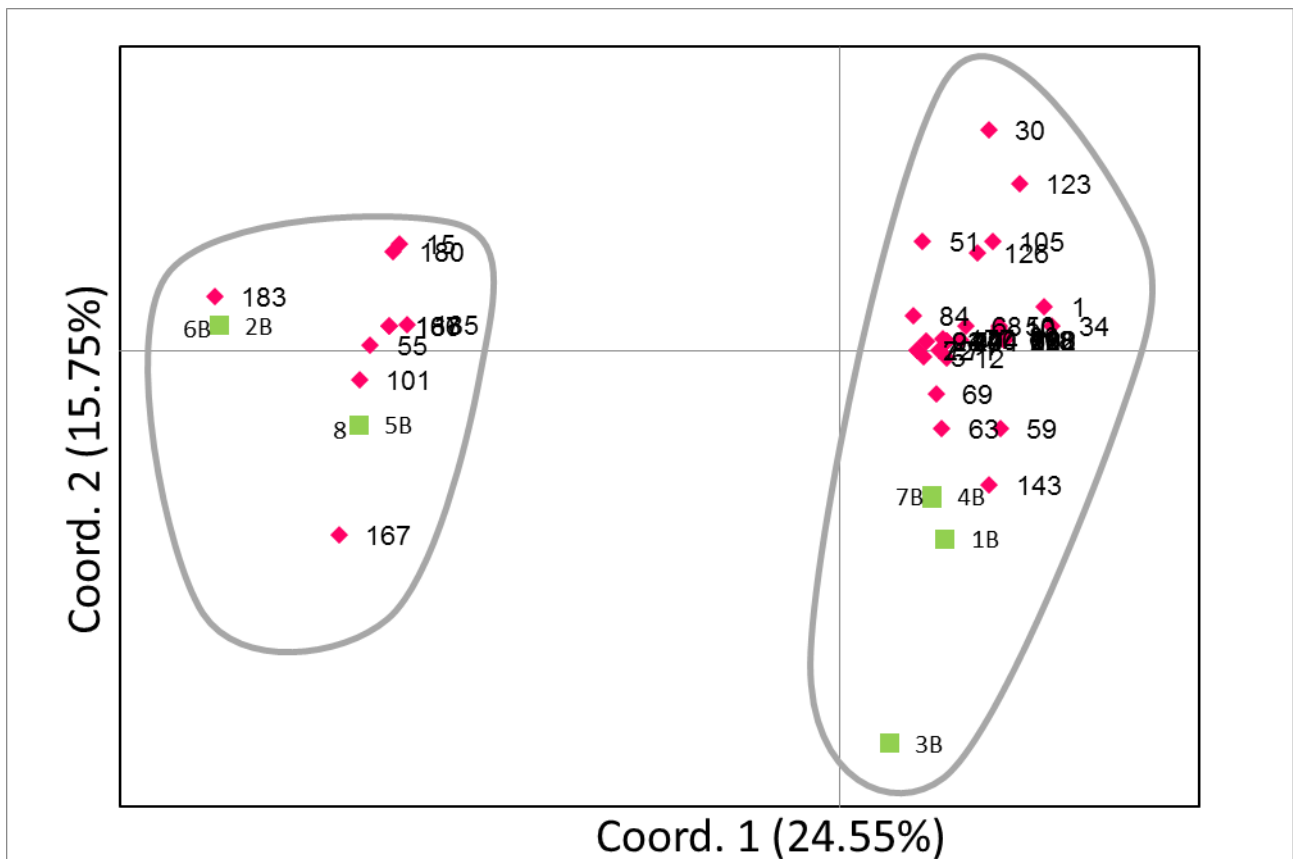


איור 5. הגברת DNA עם תחל  $(AGG)_5$  של תבדידי מקרופמינה מתות שדה (ST) ומלון (MEL) מהארץ ומארה"ב (US).

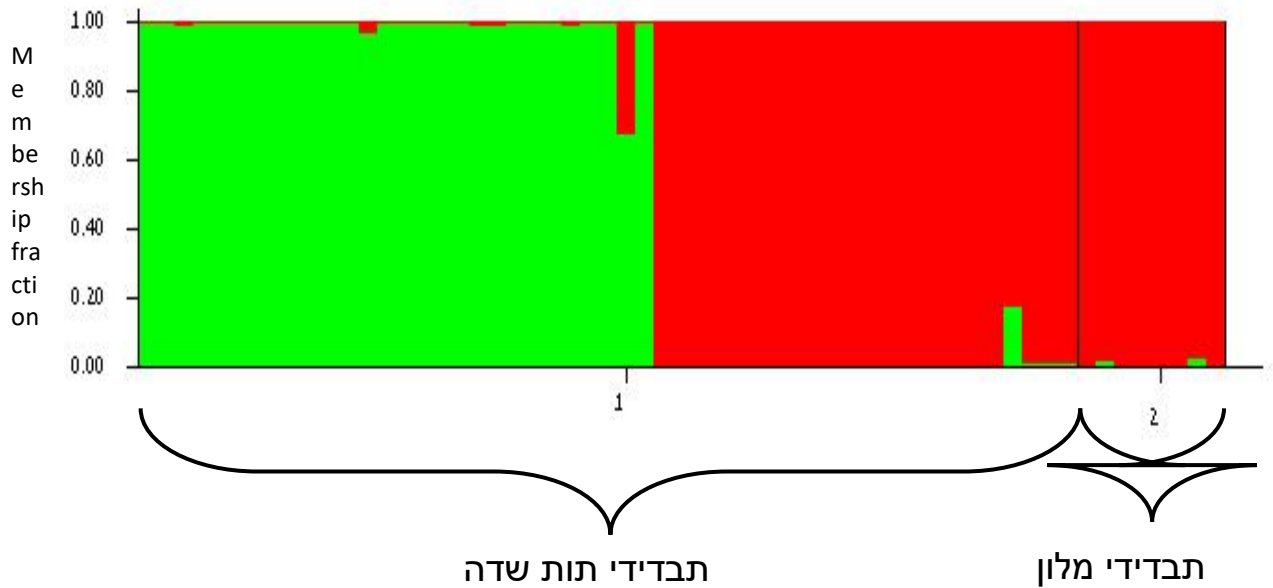
אופיינו 15 קבוצות אוכלוסייה שונות מהארץ, שונה מאלה מארה"ב המצביע על שונות גנטית בתוך אוכלוסיית הפתוגן מתות שדה וגם מלון. יתר התחלים הציגו תוצאות דומות לכן לא הוצגו.

את השונות הגנטית של 195 התבדידים, שנבדקו, בחרנו ליצג ע"י 58 תבדידים נציגים של הפטרייה משני משפחות בוטניות שונות: *Rosaceae* (תות שדה) המיצגים את כל הקבוצות הגנטיות של הפתוגן שנמצאו ו-*Cucurbits* (מלון).

חמישים ושמונה תבדידים אלו נבדקו גם בשיטת ה-SSRs. באנליזות אלו מתפצלים התבדידים לשתי קבוצות שונות גנטית באופן מובהק ע"פ ניתוח המרחקים הגנטיים האינדיבידואלים ע"י קואורדינטות (PCoA- Principal coordinates analysis of pairwise individual genetic distances). ניתוח זה מראה את הקשר הגנטי של כל התבדידים (איור 6) כאשר התבדידים שבודדו ממלון מתחלקים באופן שווה בין שתי הקבוצות הגנטיות. בניסיון לאושש את השונות הגנטית בין התבדידים השונים, התבדידים נותחו באמצעות תוכנת STRUCTURE (איור 7) אשר מנתחת את השונות הגנטית של התבדידים במבחן סטטיסטי נוסף ומעמיק. מקדם ההשתייכות המשוער ע"פ STRUCTURE מראה חלוקה של שתי קבוצות גנטיות; הירוקה והאדומה כשכחצי מתבדידי התות מתחלקים לקבוצה הירוקה וחצי לקבוצה האדומה. תבדידי המלון כולם משתייכים לקבוצה האדומה. ניתוח זה מצא שההסתברות הגבוהה ביותר היא לשתי אוכלוסיות (איור 7).



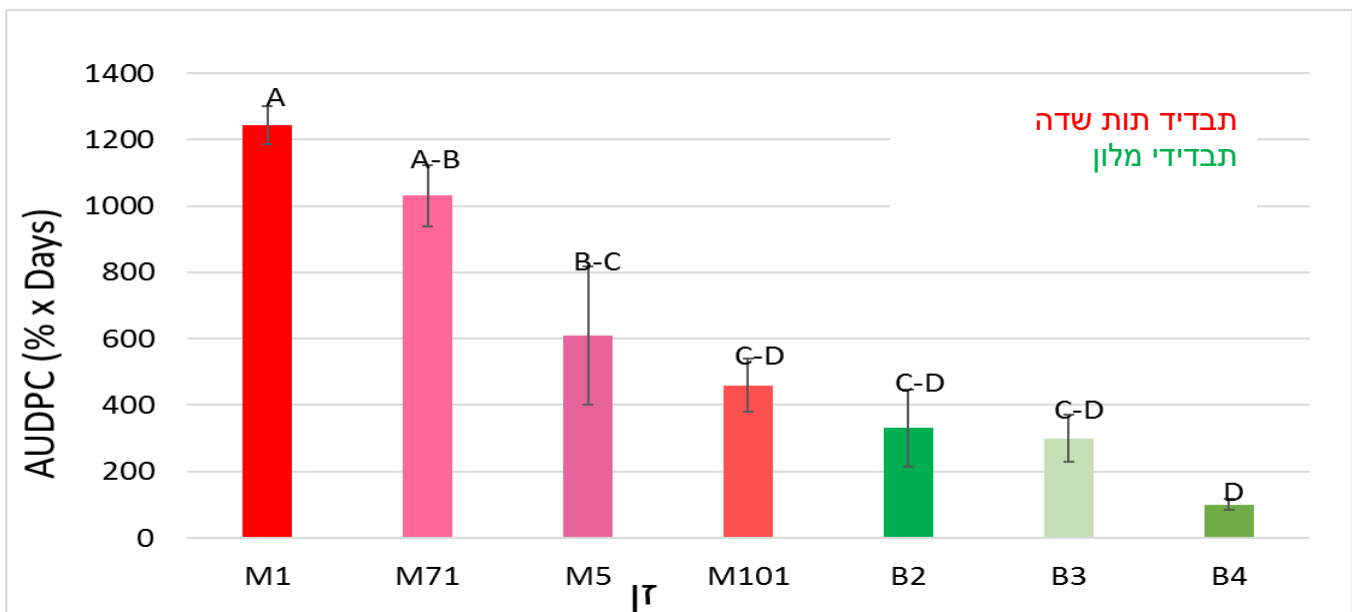
איור 6. קשרים גנטיים בין 58 תבדידי *M. phaseolina* אשר נדגמו משני מאכסנים, 50 בודדו מתות שדה (מעוין אדום) ו- 8 בודדו ממלון (מרובע ירוק) אשר מתוארים ע"י ניתוח המרחקים הגנטיים האינדיבידואלים ע"י קואורדינטות (PCoA- Principal coordinates analysis of pairwise individual genetic distances).



**איור 7.** מקדם ההשתייכות המשוער של כל תבדיד *M. phaseolina* אשר משוער מהפלוטיפ STMS מרובה אתרים גנטיים (Multilocus STMS haplotype) בתוכנת STRUCTURE. כל תבדיד מיוצג ע"י עמודה אנכית אשר מחולקת לשני צבעים (ירוק ואדום) התבדידים מחולקים לפי הצמח המאחסן (תות שדה- אוכלוסייה מספר 1 ומלון- אוכלוסייה מספר 2).

#### ד 2. תחום פונדקאים וספציפיות לפונדקאי

מבחן ספציפיות לפונדקאי תות שדה: מטרת הניסויים לבחון את הספציפיות לפונדקאי בצמחי תות שדה ע"י הדבקה של צמחי תות שדה מהזן "הדר" בשבעה תבדידים של הפטרייה *M. phaseolina* שבודדו מצמחי תות שדה (M1, M5, M71 ו- M101) וממלון (B2, B3 ו- B4); (8 חזרות לכל תבדיד). במבחן הדבקה זה נמצאו הבדלים משמעותיים בין התבדידים (איור 8).

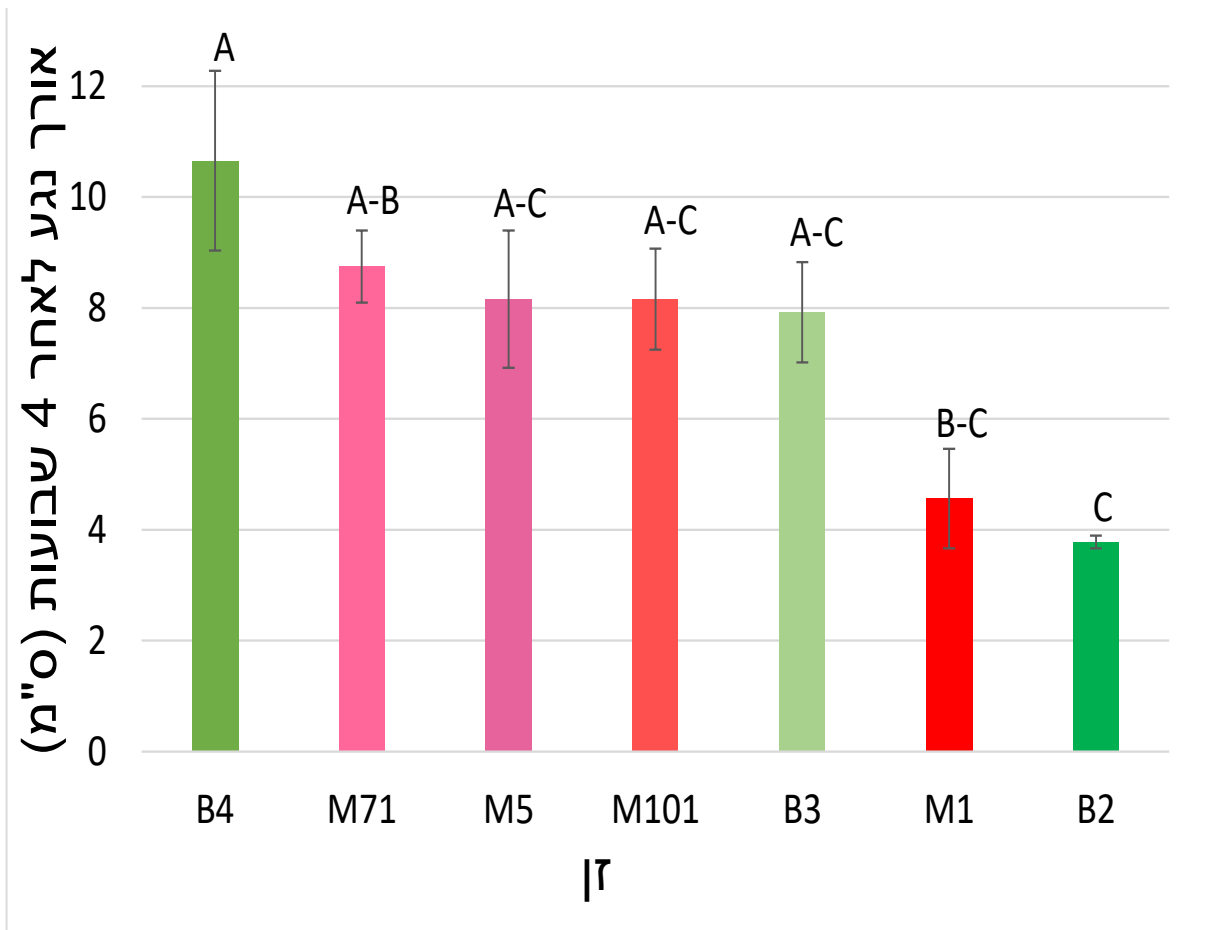


**איור 8.** תמותת צמחי תות שדה מזן "הדר" (359) שהודבקו בארבעה תבדידי *M. phaseolina*: מתות (M1, M5, M71 ו- M101 בגווי אדום) ושלושה ממלון (B2, B3 ו- B4 בגווי ירוק) בשיטת עירבוב הקשיונות במצע הגידול. חומרת המחלה נקבעה על פי השטח היחסי שמתחת לעקומת התקדמות המחלה (AUDPC). שונות מובהקת נמצאה בין התבדידים השונים, ובין תבדידי תות למלון ע"פ מבחני Tukey's HSD. אותיות שונות מעל כל עמודה מייצגות הבדל משמעותי ברמת מובהקות  $P < 0.05$ .

התבדידים M101 ו-M5 אשר בודדו מתות נמצאו אלימים פחות מתבדיד M1 ואלימים באותה מידה כמו תבדידים B2 ו-B3 אשר בודדו ממלון, ע"פ מבחן Tukey HSD ( $\alpha=0.05$ ). בהשוואה כללית של ממוצעי התבדידים שבודדו ממלון לעומת תות שדה נמצא הבדל משמעותי בין הפונדקאים ביכולת התקיפה שלהם כלפי צמחי תות שדה ע"פ מבחן Students t test ( $\alpha=0.05$ ).

#### מבחן ספציפיות לפונדקאי במלון

מטרת הניסויים לבחון את הספציפיות לפונדקאי בצמחי מלון מהזן "אופיר" ע"י הדבקה בשבעה תבדידים של הפטרייה *M. phaseolina* שבודדה מצמחי תות שדה (M1, M5, M71 ו-M101) וממלון (B2, B3 ו-B4); (8 חזרות לכל תבדיד) (איור 9). הדבקת המלונים התבצע באמצעות גירוד שכבה מגבעול הצמח ואילוח של דסקית אגר המכילה את התבדידים השונים של הפטרייה. אל הדסקית הוצמדה דסקית נייר סטרילית אשר הושרתה במים סטריליים ולבסוף עיטוף הנגע בנייר פראפילם. אורך הנגע שהתפתח נמדד אחת לשבוע בהשוואה לצמחי הביקורת.



איור 9. פתוגניות בצמחי מלון זן "אופיר" (540) אשר הודבקו בשבעה תבדידי *M. Phaseolina*: ארבעה מתות (M1, M5, M71 ו-M101 בגוני אדום) ושלושה ממלון (B2, B3 ו-B4 בגוני ירוק) על פי מדד פתוגניות התבדידים השונים כלפי צמחי המלון בשבוע 4. שונות מובהקת נמצאה בין התבדידים השונים ע"פ מבחני Tukey's HSD. אותיות שונות מעל כל עמודה מייצגות הבדל משמעותי ברמת מובהקות  $P < 0.05$ .

תבדיד M1 שנמצא אלים ביותר כלפי צמחי תות שדה נמצא הכי פחות אלים בצמחי מלון יחד עם תבדיד B2 שבודד ממלון שגם בתות שדה נמצא כאלים במידה מעטה בהשוואה לשאר התבדידים שנבדקו. תבדיד B4 שבודד ממלון, נמצא האלים ביותר כלפי צמחי המלון (איור 9). תבדיד M71 שבודד מתות שדה נמצא הבא האלים ביותר אחרי תבדיד B4. תבדידים M5, M101 ו-B3 נמצאו אלימים באותה מידה (מידע לא מצורף).

#### ה. לימוד האינטראקציה בין זנים/קוים בעלי רגישות שונה באמצעות פטריית מקרופמינה מסומנת ב-GFP

תבדיד *Macrophomina* M1 שימש בשני הניסויים לטרנספורמציה של הגן המדווח GFP. תפטיר הפטרייה עוכל עם נובוזיים לקבלת פרוטופלסטים והפלסמידים המעגליים הוחדרו בעזרת PEG. טרנספורמציות נעשו עם ארבעה וקטורים שונים המכילים את הגן ל-GFP: pCPXHY1 eGFP, pCT74 sGFP, וכן שני וקטורים שנבנו לרקומבינציה הומולוגית בבוטריוספריה: gGFP ori AVO4 OPF14, gGFP ori AVO1, OPF1. בנסיון השני נבדקו שני הוקטורים הראשונים ואת הפלסמיד gGFP ori T.A. לאחר עיכול דופן הפטרייה התקבלו פרוטופלסטים שעברו רגנרציה ונתקבלו מס' מושבות לאחר החשיפה לאנטיביוטיקת הסלקציה היגרומיציין. עם זאת, המושבות שעלו לא ביטאו את הגן המדווח GFP. בחלק מהתאים נצפתה זריחה צהובה, שלא הופיעה בזן הבר, אך הפלורסנציה לא הופיע ברצף בכל התאים וגם לא נראתה ירוקה כמו שהייתה צריכה להיות. הדבר חזר על עצמו בכל הוקטורים שנבנו בשתי נסיונות נפרדים שנעשו.

בהמשך ב-2018, ניסינו לבצע טרנספורמציה ל GFP באמצעות הוקטור pSK1019 המצוי בחיידק אגרובקטריום מזן Eha 105. אך, לא התקבלו טרנספורמנטים. בהמשך ביצענו טרנספורמציות עם וקטורים שונים איתם עבדנו במעבדה: gGFP Ori ו gGFPca8, המכילים את הגן GFP וכן pTimer DsRED ו pSK1019 המכיל גן המקודד לגן RFP הזורח באדום. בטרנספורמציות אלה נעשה עיכול של תפטיר הפטריות לקבלת פרוטופלסטים והפלסמידים המעגליים הוחדרו בעזרת PEG. תהליך העיכול עבד מצוין וכך גם הרגנרציה של הפרוטופלסטים אך למרות זאת לא התקבלו טרנספורמנטים זורחים. מאחר והטרנספורמציות עם אגרובקטריום מזן Eha 105 לא הצליחו, העברנו את הוקטור pSK1019 לחיידק אגרובקטריום מזן AGL1. חיידק זה אגרסיבי יותר ובעל יעילות טרנספורמציה גבוהה יותר. גם בשילוב הזה לא קיבלנו טרנספורמנטים. לאחרונה קיבלנו קונסטרוקט GFP חדש המותאם לאגרובקטריום. הוקטור, pCBCT sGFP, הוחדר לחיידקי אגרו AGL1 ושוב ניסינו לעשות טרנספורמציות. גם בוקטור הזה לא עלה בידינו לקבל פיטריה מסומנת.

#### דין

##### א. בחינת שיטות אילוח מיטביות לבחינת קווים/זנים לגורם המחלה מקרופמינה, בתנאים מבוקרים

נבחנו שיטות אילוח שונות (קיסם, ערבוב קשיונות במצע גידול לעומת הגמעה) לקביעת השיטה המהימנה לקבלת מדרג רגישות/עמידות לגורם המחלה. שיטת הקיסם לא היתה מהימנה ולא הבדילה בין זני תות רגישים, סבילים ועמידים. לעומת זה, שתי שיטות האילוח בעירבוב קשיונות בקרקע והגמעת קשיונות נמצאו מתאימות ונתנו תוצאות מהימנות. בשתי שיטות האילוח, היה ניתן להבדיל בין רגישות/סבילות/עמידות זנים מסוימים במהירות יחסית של 5-12 שבועות. בהמשך, נסרקו זנים וקווי הטיפוח לתכונות של סבילות/עמידות לגורם המחלה. נמצאה שונות ברגישות/עמידות החומר הגנטי שעשויה לשמש בעתיד לפיתוחם של זני תות-שדה בעלי עמידות טובה יותר בהשוואה לזנים הקיימים הרגישים ברובם.

ב. זיהוי זנים וקווי הטיפוח בעלי סבילות/עמידות לגורם המחלה מקרופומינה, בתנאי חממה ושדה

בניסויי חממה נמצאה שונות מובהקת ברגישות/בסבילות של זני שדה שונים כנגד הפטרייה *M. phaseolina*. מתוך 32 זנים במבחן, 22 זנים הראו באופן מובהק והדיר שונות בסבילות למחלה (איורים 2-4). לעומת זה, עשרה זנים נוספים הראו מידת רגישות שונה בין שני הניסויים וקשה לדרגם באופן אמין (זנים 638 ו-359 אינם מובהקים מבחינה סטטיסטית בשני הניסויים). זנים 633 ו-107 נחשבים עמידים ביותר, איה ו-328 נחשבים יחסית עמידים, 108, שקד ו-628 נחשבים יחסית רגישים למחלה. בהשוואה הועמדו ניסויי שדה לזיהוי זנים וקווי הטיפוח בעלי סבילות/עמידות לגורם המחלה. בדומה לניסויי החממה, קיימים זנים עם סבילות שדה גדולה יותר מאחרים. עם כן, קיימת התאמה בין ניסויי החממה ושדה שהזנים יסמין, 627 ו-628 הנם רגישים לעומת אחרים כגון הזנים וקוים 633, 638, ו-97, סבילים יותר למחלה. אחרים הזנים רותמי, 184 ו-1451. זנים שהראו סבילות גדולה יותר יכולים לשמש בהמשך תוכניות הטיפוח ליצירת זנים סבילים יותר למחלה ובעלי תכונות טובות אחרות.

ג. בחינת חומרי ודרכי הדברת גורם המחלה במשתלות ובשדה המניב

נכון להיום, רוב חלקות התות אינן נגועות במחלה וחיטוי קרקע במתאם סודיום בשיטה המומלצת מתבצע על גבי ערוגות השתילה בטפטוף מתחת לפוליאטילן בשילוב עם חיטוי סולרי קצר, העשוי לתת מענה להתמודדות עם פטרייה זו. בניסויי השדה 1 ו-2, לא ניתן להסיק מהתוצאות המוצגות לגבי יעילותם של התכשירים כיוון שהנגיעות בטיפול ההיקש הלא מטופל היו נמוכות מאוד. כמוכן, גם בניסוי 3 לא ניתן להסיק לגבי יעילותם של התכשירים שנבחנו כיוון שהנגיעות בהיקש ובטיפולים הייתה די דומה. יש להמשיך ולבחון יעילות תכשירים ושילובים שונים בחלקות נגועות באופן טבעי ומנונים ועיתוי יישום להתמודדות עם מחלת המקרופומינה במהלך הגידול. באופן כללי, מתוצאות ניסוי 4, בדומה לניסויים הקודמים לא ניתן ללמוד לגבי יעילות התכשירים שנבדקו למניעת מקרופומינה בתות שדה בגלל השונות הגדולה בין החלקות. יתכן שערוגה אחת מתוך השלושה ששמשו לניסוי קיבלה חיטוי במתאם סודיום כיוון שרוב העונה לא נצפתה בה התמוטטות מהמחלה. שוב ניתן לחזור למסקנה מעבודות שנעשו בשנים קודמות, שחיטוי קרקע במתאם סודיום בתות שדה עשוי לתת מענה טוב להתמודדות כנגד פטריית המקרופומינה בקרקע. הכנסת שתילים נגועים מהמשתלות עלולה להיות מקור הדבקה נוסף למחלה. על מנת לנסות לבדוק יעילותם של תכשירים הניתנים במהלך הגידול כנגד המחלה יש לשקול לבצע עבודה בעצמים בקרקע מודבקת במחלה.

ד. בחינת השונות הגנטית ותחום הפונדקאים של תבדידי מקרופומינה מתות שדה ומלונים

אוסף תבדידי מקרופומינה לבחינת השונות הגנטית כללה 58 תבדידים שבתוכם אלה ממלונים. כמוכן, נוספו 8 דוגמאות DNA מתרבויות תות שדה ודלועים שנתקבלו בארה"ב. נמצאה שונות גנטית בשיטת ה-Ap-PCR בין נציגי האוכלוסיות שיכול להשליך על ספציפיות לפונדקאי. כמוכן, בשיטת ה-SSR נמצאה שונות גנטית המבדילה בין אוכלוסיות התבדידים (הפתוגן מתותים ומלונים). במבחני פתוגניות התבדידים שבודדו מתות שדה אלימים יותר כלפי צמחי תות שדה מאשר תבדידים שבודדו ממלון באופן מובהק דבר המעיד על ספציפיות לפונדקאי בתות שדה. לעומת זה, צמחי מלון נפגעו מהפטרייה באופן דומה ללא הבדל לפונדקאי. באופן מעשי, מגדלי תות שדה יכולים לחשוש פחות אם ישתלו תות בשטח נגוע במקרופומינה ממקור של



מלונים. מגדלי מלונים עם כן חייבים לדאוג שהגידול לא יישתל בקרקע עם היסטוריית נגיעות של מקרופומינה, ממקור של מלונים וגם מקור של תות שדה.

ה. לימוד האינטראקציה בין זנים/קנים בעלי רגישות שונה באמצעות פטריית מקרופומינה מסומנת ב-GFP  
נעשו מבחני טרנספורמציה רבות בשיטות שונות ועם וקטורים שונים לקבלת תבדידים המכילים GFP מסומן ללא הצלחה. ככל הנראה, החלבון הזוהר GFP לא מתבטא לאחר הטרנספורמציה למרות שהיו תבדידים עמידים להיגרומיצין המצביע על אינטגרציה של הפלסמיד לגנים הפטרייה. לא ניתן יהיה להשתמש בטרנספורמנטים אלה למעקב אחר הפטרייה בצמח. על מנת להצליח במעשה, ככל הנראה נצריך לבנות וקטור חדש עם פרומוטורים חדשים שיאפשר ביטוי הגן GFP לקבלת חלבון זוהר.

### ביבליוגרפיה

- מור, נ., גנאים, נ., צוריאל, ס., פרימן, ס., צויביל, א., כחלון, י., היימן, צ., שכנר, צ. 2010. מקרופומינה בתות-שדה - סיכום עבודות 2008-2010. שדה וירק: גליון 17: 21-24.
- Fang, X., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., and Barbetti, M.J. 2011. Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. *Scientia Horticulturae* 131:39–48.
- Fang, X., Phillips, D., Verheyen, G., Li, H., Sivasithamparam, K., and Barbetti, M.J. 2012. Yields and resistance of strawberry cultivars to crown and root diseases in the field, and cultivar responses to pathogens under controlled environment conditions. *Phytopathologia Mediterranea* 51:69–84.
- Gordon, T., Shaw, D. and Bolda, M. 2013. <http://ucdaviscaes.wordpress.com/2013/08/27/uc-researchers-develop-strawberry-plants-with-disease-resistance>
- Hutton, D.G., Gomez, A.O., and Mattner, S.W. 2013. *Macrophomina phaseolina* and its association with strawberry crown rot in Australia. *International Journal of Fruit Science* 13:149-155.
- Koike, S.T., Gordon, T.R., Daugovish, O., Ajwa, H., Borda, M., and Subbaroa, K. 2013. Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by *Fusarium* and *Macrophomina*. *International Journal of Fruit Science* 13:76–83.
- Mertely, J., Seijo, T., and Peres, N. 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Dis.* 89:434, 2005
- Zveibil, A., and Freeman, S. 2005. First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. *Plant Dis.* 81:1014.
- Zveibil, A., Mor, N., Gnayem, N., and Freeman, S. 2012. Survival, host-pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. *Plant Dis.* 96:265-272.