

העשרה ביולוגית של זרעי כותנה להקניית עמידות כנגד הגורם למחלת ריקבון הפחם, הפטרייה
Macrophomina phaseolina

מוגש להנהלת ענף הכותנה, לסיכום שנת המחקר ב- 2024

1. שמות השותפים למחקר

- ד"ר אופיר דגני – מיגל - מכון למחקר מדעי בגליל, קריית שמונה (ofird@telhai.ac.il).
- ד"ר און רבינוביץ – מיגל - מכון למחקר מדעי בגליל, קריית שמונה (onnrab@gmail.com).
- ד"ר אסף חן – מיגל - מכון למחקר מדעי בגליל, קריית שמונה (assafc@migal.org.il).
- עוזרי מחקר: אלחנן דימנט, עדן אטדגי, פלג הדרי וגיל שושני.

2. מבוא ותיאור הבעיה

הפטרייה *Macrophomina phaseolina*, מופצת בקרקע ותוקפת מעל 500 מינים שונים מכ- 75 משפחות צמחים. הפתוגן גורם למחלת ריקבון הפחם בכותנה שתסמיניה מתפתחים בשלבים מאוחרים של הגידול וכוללים התייבשות העלים והגבעולים, נבילה ותמותה של הצמח [1]. עוצמת המחלה קשורה ברמת הנגיעות בקרקע, אלימות קווי הפטרה ועמידות המאכסן. השקיה משופרת מפחיתה את המחלה [1]. הגברת הנזקים בשדות כותנה בארץ קשורה כנראה למעבר לזני פימה רגישים ולהתחממות הגלובאלית [1]. טווח הפונדקאים הרחב וכושר ההישרדות הגבוה של הפטרייה בקרקע הופכים את השליטה במחלה למאתגרת במיוחד [2]. בהיעדר צמחים עמידים, השימוש בקוטלי פטריות מערכתיים הוא הגישה העיקרית להפחתת הנזקים [3], אך תכשירים אלו מעטים [4]. טיפול אפשרי כזה הוא בחומר Azoxystrobin שנבחן בארץ ונמצא יעיל בהפחת המחלה [1]. בנוסף החומרים Carbendazim ו-Thiophanate methyl נמצאו יעילים [3].

תרכובות כימיות מוחלפות בהדרגה בתכשירים ביולוגיים ידידותיים לסביבה עקב הופעתם של קווי פטרייה עמידים לקוטלי פטריות וחשש הציבור לגבי השפעותיהם הבריאותיות והסביבתיות. לפטריות מהסוג *Trichoderma* פוטנציאל הדברה גבוה ויכולת לעודד צמיחה בצמחי כותנה נגועים ב- *M. phaseolina* [5]. מדבירים ביולוגיים אלו פיתחו מגוון מנגנוני שיבוש כנגד פתוגנים הכוללים ייצור אנטיביוטיקה, תחרות על חומרי הזנה ומיקו-טפילות. בנוסף, הם יכולים להשפיע לטובה על בריאות הצמח ולשפר עמידות מערכתית לעקות ביוטייות וסביבתיות [6].

לאחרונה פיתחנו מבחן מולקולארי המאפשר בחינת יעילות טיפולים ביולוגיים בנבטים, בהם המחלה א-סימפטומטית [7]. יישום תבדידי טריכודרמה נבחרים, *T. asperellum* (P1) ו-*T. longibrachiatum* (T7407) ו-T7507, בנבטים בעציצים הוריד את כמות הפתוגן ברקמות השורש של הצמחים לרמות אפסיות ($p < 0.05$). בתום הניסוי, 42 יום מהזריעה, הטיפול ב- T7407 הניב שיפור בהישרדות הצמחים (34%), ובמדדי צימוח (32-56%) בהשוואה לביקורת [7].

הדברה משולבת ביולוגית-כימית מבוססת על שילוב של מיני טריכודרמה יחד עם תכשיר כימי במינון נמוך המקנה להן יציבות ועוצמה בתנאי הסביבה המשתנים. הדברה זו נבחנה על ידנו בתירס [8], בעציצים בעונה מלאה בשטח פתוח. בשנת 2022 יישמנו לראשונה בכותנה הדברה ביולוגית מבוססת פטריות אלו, לבד ובמשולב עם הדברה כימית, בעונה מלאה בעציצים בתנאי שדה ובשדה מסחרי [9]. בעציצים בשטח פתוח היישום הביולוגי לבדו הגן על הצמחים מהמחלה ושיפר את מדדי הצימוח. תוספת Azoxystrobin במינון

נמוך שיפרה את יעילות הטיפול הביולוגי ב- *T. longibrachiatum* והובילה ביום 176 ל- 86-91% ירידה בנגיעות. בשדה חקלאי בחולדה עיטוי זרעים ביולוגי יחד עם זילוף מטבוליטים מופרשים של הפטריות בפס הזריעה היה יעיל כמו הדברה כימית ב- Azoxystrobin והניב שיפור בבריאות הצמחים (77%) והיבולים (9%) [9].

ההדברה משולבת ביולוגית-כימית יושמה ב- 2023 לראשונה בכותנה בשדה מסחרי [10]. המחקר לווה באיתור מולקולארי של הפתוגן ברקמות הצמחים ובצילום מהאוויר בתחום האור הנראה, אינפרה-אדום קרוב ותרמי להערכת הטיפולים. העיטוי הביולוגי או שילוב בין העיטוי הביולוגי ל- Azoxystrobin בהגמעה 400 סמ"ק לדונם העלו את כמות היבולים (17% ו- 16% בהתאמה) לעומת צמחים שקיבלו עיטוי זרעים כימי בלבד (ללא מובהקות סטטיסטית). בנוסף הוביל המיגון הביולוגי המשולב ל- 14-31% שיפור בבריאות, ול- 22-37% ירידה בנגיעות בפתוגן. הממצאים מצביעים על כך ששילוב של טיפולים ביולוגיים וכימיים שומר על יעילות גבוהה. אולם נדרש ביסוס השיטה ובחינתה גם בשדות אחרים, תוך יישום תערובת תכשירי הדברה עם מנגנון פעולה שונה, כדי למנוע התפתחות עמידות לתכשיר. נושא זה נבדק ב- 204 בעציצים בתנאי שדה בעונת גידול מלאה, ובשדה מסחר בגדות.

תמצית העובדה מוגשת כאן.

3. מטרת המחקר

1. ביסוס ושיפור הגישה החדשה להתמודדות עם מחלת ריקבון הפחם בכותנה, המבוססת על ממשק ביולוגי-כימי משולב שייבחן, אל מול הדברה כימית בלבד:

- I. בעציצים בשטח פתוח, בעונה מלאה – יישום אורטיבה טופ לבחינת תערובת תכשירים בעלי מנגנון פעולה שונה למניעת התפתחות עמידות.
 - II. בעונת גידול מלאה בשדה מסחרי בגדות.
2. בחינת זן חדש, מיכל (1185) לעמידות למחלה.
3. שיפור ואופטימיזציה למעקב מרחוק אחר יעילות הטיפולים.

4. תיאור המחקר

4.1 גידול *M. phaseolina* ומיני הטריכודרמה ששימשו במחקר זה

דסקית פטרייה בקוטר 6 מ"מ משולי תרבית אשר גדלה במשך 4-6 ימים, הועברה למרכז של צלחת מצע עשיר (PDA). הצלחות הודגרו ב- $28 \pm 1^\circ \text{C}$ בחושך. לצורך גידול תפטיר במצע עשיר נוזלי (PDB), הועברו 5 דסקיות כאלו, לבקבוק ארלנמייר עם 150 מ"ל מצע. התרביות הודגרו למשך 6 ימים בטלטול של 110 rpm, בתנאים הני"ל. הפטרייה יחד עם נוזל הגידול נטחנה ותערובת קטעי התפטיר והנבגים שהתקבלו יחד עם התוצרים המופרשים שלה, שימשו לעיטוי זרעים (ערבוב, הדגרה של 10 דקות עם הזרעים וייבוש). מיני ה- *Trichoderma* שימשו במחקר זה מתוארים בטבלה 1.

4.2 השפעת Azoxystrobin על התפתחות מיני *Trichoderma* והפתוגן במעבדה.

הניסוי בוצע ב- 5 חזרות לטיפול. השפעת התכשירים נבחנה בנפרד בצלחות תרבית - גידול הפתוגן במצע מוצק, המכיל עמיסטר (Azoxystrobin 250 g/l, אדמה מכתשים) בריכוזי חומר פעיל 1, 0.01, 0.0001 מ"ג/ליטר. באופן דומה בוצע מבחן להשפעת התכשיר אורטיבה טופ (Azoxystrobin 200 g/l),

Difenoconazole 125 g/l, אדמה מכתשים) הביקורת הייתה מצע ללא חומר הדברה. הצלחות נזרעו בפתוגן והודגרו כמתואר בסעיף 4.1. לאחר 2 ימים מהזריעה נמדד קוטר המושבות והוערך אחוז העיכוב בהשוואה לביקורת.

טבלה 1 – מיני ה-*Trichoderma* ששימשו במחקר

Species	Designation	Origin	Reference
<i>Trichoderma</i> sp. O.Y. 7107	T7107	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[7,11]
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	T7407	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[7,11,12]
<i>Trichoderma asperellum</i>	P1	<i>Zea mays</i> , Prelude cv.	[7,13]

¹ Mediterranean sponge *Psammocinia* sp.

4.3. הדברה ביולוגית בנפרד ובמשולב עם הדברה כימית בעציצים בתנאי שדה לאורך עונת גידול מלאה.
הניסויי בוצעו ב- 7-8 חזרות לטיפול (כל חזרה עציץ 10 ליטר המכיל 5 נבטי כותנה מזן גוליית 6), בחוות המטעים של מו"פ צפון, בעציצים בשטח פתוח (איור 1). הזרעים בטיפול הביולוגי היו אורגניים ולעומתם נבחנו זרעים מסחריים בעיטוי הכימי המקובל (סנטוריני-טיפול כללי כנגד מחלות). נבחנו טיפולי הדברה ביולוגית מבוססי מיני *Trichoderma* בנפרד ובמשולב עם הדברה כימית, אל מול צמחי ביקורת עם אילוח ללא הדברה, עם אילוח + הדברה כימית או ללא אילוח וללא הדברה:

1. זרעים מעוטים ביולוגית.
2. זרעים מעוטים ביולוגית, זילוף עמיסטר 100 סמ"ק לדונם בזריעה.
3. זרעים מעוטים ביולוגית, זילוף עמיסטר 100 סמ"ק לדונם בזריעה, הגמעת אורטיבה-טופ 400 סמ"ק לדונם.

ביקורת

1. זרעים מעוטים ביולוגית, ללא אילוח.
2. זרעים לא מעוטים, ללא אילוח.
3. זרעים לא מעוטים + אילוח.
4. זרעי מעוטים כימית (סנטוריני), ללא אילוח.
5. זרעים מעוטים כימית (סנטוריני) + אילוח.

נעשה שימוש באדמה מקומית כבדה מעורבת ב- 25% פרלייט גס (מספר 4) לצורך אוורור. לאורך הניסוי בוצעו טיפולי דשן וטיפולים נגד מזיקים שונים, על מנת לשמור על גורם פגיעה רק מהאילוח בפטרייה. במיוחד ניתן בהגמעה קוהינור (350 גרם Imidacloprid לליטר, אדמה מכתשים) במינון המקביל ל 100-200 סמ"ק לדונם, כנגד כנימות עש הטבק.

טיפול האילוח: (1) הקרקע אולחה שבוע לפני הניסוי, ב- 100 ג' (לעציץ) זרעי דוחן מעוקרים ומאולחים ב- *M. phaseoilina* (לפי [8]). (2) אילוח משלים בוצע בכל עציצי הטיפולים לאחר 6 ימים (בהצצה) ו- 13 ימים מהזריעה. האילוח המשלים בוצע באמצעות הדבקת הקרקע ב- 3 דסקיות (קוטר 6 מ"מ) לנבט (סה"כ 15 בעציץ) מתרבית של *M. phaseoilina* שגודלה כמתואר מעלה. ההדברה הביולוגית כללה עיטוי זרעים בתערובת (mix) של שלוש פטריות הטריכודרמה כמתואר קודם לכן [10] (טבלה 1). ההדברה הכימית בוצעה בזילוף עם הזריעה של 4.91 מיקרוליטר לעציץ (המקביל ל- 100 סמ"ק/דונם בשדה) ובהגמעה (2 ליטר לעציץ במקום ההשקיה הרגילה), במינון של 19.64 מיקרוליטר לעציץ (מקביל ל- 400 סמ"ק/דונם בשדה), בשני מועדים במהלך העונה: 50 ו- 70 יום מהזריעה.



איור 1. הניסוי בהדברה משולבת ביולוגית-כימית, בעציצים בשטח פתוח, חוות המטעים, מו"פ צפון, 2024. תמונה צולמה ביום 78 לגידול.

לאחר כשבוע נבדקו אחוזי הצצה בכל טיפול. לאחר 46 יום בוצע דילול לשני צמחים בעציץ. ביום 68 בוצע דיגום אמצע לאמדן הצמיחה והמחלה וביום 106 הניסוי נקצר. הערכת כיסוי העלווה בוצעה באמצעות התוכנה Canopeo (Oklahoma State University), כלי ניתוח תמונה תוך שימוש בערכי צבע במערכת אדום-ירוק-כחול (RGB) [14], בגובה של 0.5 מ', מפני הקרקע בעציץ. בקציר נבדקו משקל יבש (לאחר ייבוש של 3 ימים ב-105 מ"צ) ונוכחות ה-DNA של הפטרייה בשורש של כל צמח (ע"י qPCR [7]).

4.4. הדברה כימית וביולוגית לאורך עונת גידול מלאה בשדה (גד"ש חולדה).

4.4.1. מבנה החלקות והטיפולים

הניסוי בוצע במתכונת של ניסוי דו גורמי בחלקות מפוצלות בבלוקים באקראי ב-4 חזרות, חלקות הניסוי היו באורך של 85-95 מטר וברוחב 6 שורות (5.76 מטר). גורם ראשי, הגמעה – עם הגמעה במרידור 375 סמ"ק/דונם 64 ו-97 יום מהזריעה וללא הגמעה. גורם משני, 6 טיפולים: 2 זנים גוליית 6 ו-1185 - מיכל, עם זילוף בפס של מרידור (חברת מכתשים אדמה Azoxystrobin 250 g/l) במינון 200 סמ"ק לדונם, ללא זילוף בפס, עיטוי ביולוגי לזרעים בזן גוליית 6, ועיטוי ביולוגי בשילוב זילוף כימי במרידור במינון מופחת של 100 סמ"ק לדונם (**איור 2**). סה"כ 12 טיפולים ב-48 חלקות ניסוי בשטח של כחצי דונם כל אחת. השטח הכולל של הניסוי היה 24 דונם. בשאר השטח של כ-16 דונם גודלה הכותנה כמו בטיפול הביקורת ללא הגמעה.

בלוק לדוגמה (1 מתוך 4):
סה"כ 48 חלקות, שטח חלקת ניסוי 0.11 דונם

Species	Designation
Trichoderma sp. O.Y. 7107	T7107
Trichoderma asperellum	P1
Trichoderma longibrachiatum	T7407

	ביקורת ללא מיגון	1
ביולוגי	Mix - עיטוי זרעים	2
כימי	זילוף מרידור 200 סמ"ק/ד	3
משולב	Mix - עיטוי זרעים ב- 100 סמ"ק/ד + זילוף מרידור 100 סמ"ק/ד	4

144 מ' (6 מ' x 24)

2	1	4	3	2	1	3	4	3	1	4	2	3	4	2	1	2	4	3	1	3	1	4	2
4	3	1	2	1	4	3	2	4	3	2	1	2	4	1	3	1	2	3	4	3	4	2	1
ביקורת	הגמעה	ביקורת	הגמעה	ביקורת	הגמעה	ביקורת	הגמעה	400 סמ"ק/ד	ללא	400 סמ"ק/ד	ללא	400 סמ"ק/ד	ללא	400 סמ"ק/ד	ללא								

איור 2. ניסוי שדה גדות 2024 - פריסת הטיפולים בחלקה ופירוט הטיפולים.

4.4.2. הכנת החלקה, הזריעה והטיפולים הנלווים

הכותנה בחלקת סוללה גודלה בדו- גידול על כרב חיטה לשחת. החלקה בשטח כולל של 40 דונם הוקדשה במיוחד לטובת גידול הכותנה, מתוך השטח הכולל של 250 דונם שבהם גודל תירס לתחמיץ. בחלקה הייתה פגיעה קשה של מקרופומינה בשנת 2023. החיטה נקצרה ב- 22.04, אסיף השחת בוצע ב- 02.05. להכנת השטח לקראת הזריעה, בוצע דיסוק, סימון ערוגות, 2 תיחוחים ומעגלה. הזריעה בוצעה ב- 7.05 במזרעת מונוסם, 13 זרעים למטר.

4.4.3. טיפולים, השקיה ומעקב אחר מדדי צימות, מחלה לאורך העונה ויבולים

לאחר הזריעה בוצעו שתי השקיות להנבטה עם שלוחות הטיפטוף על שורות הזריעה, ב- 4 הסטות. מנת המים הכללית בהנבטה הייתה כ- 80 מ"מ.

תאריכי הטיפולים והניטור בחלקה

- 15.05 - הצצה.
- 20.05 - נפרסה מערכת המזינים להגמעה על ידי צוות חברת נטפים. שלוחות הטיפטוף הוסטו לפסי הדריכה.
- 31.05 - ריסוס בחומר סלקט סופר להדברת דורת ארס צובא (קוצאב) במינן 120 סמ"ק לדונם.
- 9.06 - ריסוס כל השטח בחומרים סטייפל ואנווק במינונים 4.5 גרם לדונם וגרם לדונם בהתאמה. העשבים העיקריים בחלקה, עוקץ העקרב, ירבוז מופשל, ירבוז יוני, ולששית הצבעים.
- 17.06 - עישוב בעיקר של שאריות קוציאב וירבוזים.
- 19.06 - הוחלף צינור ההזנה של חלקות הביקורת מ- 63 מ"מ, ל- Lay flat, כדי להעלות את הלחץ בחלקות אלו.
- 26.06 - ריסוס מוגן, בין השורות להדברת עשבייה קיימת ולמניעת הצצה נוספת בחומרים בסטה ו- טרבوترקס במינונים 500 סמ"ק לדונם ו- 300 סמ"ק לדונם בהתאמה.
- 10.07 - הגמעה ראשונה בחומר מרידור במינן 375 סמ"ק לדונם.

- 19.07 - פרח למטר.
- 20.07 - עישוב תיקון.
- 24.07 - ריסוס בוננזה במינון 100 סמ"ק לדונם מהאוויר, להתמודדות עם כנימות עלה וכנימת עש הטבק
- 12.08 - הגמעה שנייה.
- 20.08 - ריסוס נגד זיפית, בחומר אטלס במינון 100 סמ"ק לדונם מהאוויר.
- 6.10 - סגירת מים. מנת המים הכללית שהחלקה הושקתה הייתה 538 קוב לדונם.
- 14.10 - הכנה לשילוך, ריסוס קרקע בחומרים ראונדאפ וקוויק במינון 300 סמ"ק לדונם כל אחד בשילוב טלסטאר במינון 150 סמ"ק לדונם.
- 20.10 - שילוך ראשון ריסוס קרקע, סטריפטיז במינון 70 סמ"ק לדונם.
- 27.10 - שילוך שני ריסוס קרקע, סטריפטיז במינון 40 סמ"ק לדונם.
- 6.11 - קטיף בקטפת עוטפת John Deere 690 של שותפות משמר העמק הזורע.

הערות: ריסוסי הקרקע ללא GPS גרמו לנזק בגלל דריסה. בכל חלקת ניסוי תועד המשקל על פי הבקר של הקטפת בתחילת החלקה ובסופה. היבול על פי ההערכת המשקל של הקטפת תוקן על פי המשקל בפועל של הגלילות בחלקה.

4.4.4 הערכת מחלה

ביום ה-96 וביום ה-161 לאחר הזריעה נלקחו דגימות שורשים מ-2 צמחים בריאים מכל חלקה. סה"כ נאספו 7-8 צמחים מכל טיפול להפקת DNA. ביום 96 בוצעה הערכת מחלה ב-2 השורות המרכזיות בכל חלקה. צמח חולה הוגדר על פי התסמינים הבאים: הצמח נמוך או מעוכב בהתפתחות, עלי הצמח מאדימים, יבשים, ומועטים. בנוסף בחתך אורך רדוד (בוצע מדגמית) ניתן לראות השחמה.

4.5 מבחן מולקולארי מבוסס Real-Time PCR

הפקת DNA נעשתה במתואר קודם לכן [15], על ידי מילוי שקית BioMed ב-4 מ"ל תמיסת CTAB לשקית עם הדגימה וכתישת הדוגמא ע"י הומוגניזציה חשמלית. תמצית הדגימה הועברה לאפנדורף וסורכה ב-18000 rcf. הנוזל העליון (700 מיקרוליטר) הועבר למבחנה חדשה, אליה הוספו 700 מיקרוליטר תמיסת כלורופום:איזואמיל אלכוהול (1:24). לאחר סרכוז נוסף ב-18000 rcf, הועבר המקטע העליון (500 מיקרוליטר) והוספה לו כמות שווה של כלורופום:איזואמיל. שוב בוצע סרכוז ב-18000 rcf. לאחר מכן הוצאו 300 מיקרוליטר עליונים ולהם הוספו 200 מיקרוליטר איזופרופנול קר. התערובת הועברה למשך 20 דקות למקפיא -20 מעלות. השלב הבא כלל סרכוז בטמפרטורה של 4 מעלות למשך 20 דקות ב-18000 rcf, סילוק הנוזל והוספה של 0.5 מ"ל של אתנול אבסולוט 70%. סרכוז נוסף של 4 מעלות ב-18000 rcf למשך 10 דקות, סילוק הנוזל העליון וייבוש הדגימות למשך לילה בהוד. הדגימות הורחפו מחדש ב-100 מיקרוליטר מים באיכות Ultra Pure ונשמרו במקפיא ב-20 מעלות. לצורך ביצוע qPCR השתמשנו במגש 96 באריות. הפריימרים (מפורטים ב- [16], טבלה 5) נמהלו לריכוז $10 \mu\text{m}$ לפי הוראות יצרן (Hylab, רחובות).

טבלה 5. רצפי הפריימרים בהם נעשה השימוש באבחון המולקולארי המבוסס qPCR

Pairs	Primer	Sequence	Uses	Amplification	References
Pair 1	MpKFI	5'-CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3'	Target gene	300–400 bp <i>M. phaseolina</i> species-specific fragment	[17]
	MpKRI	5'-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3'			
Pair 2	COX-F	5'-GTATGCCACGTCGCATTCCAGA-3'	Control	Cytochrome c oxidase (COX) gene product	[18,19]
	COX-R	CAACTACGGATATATAAGRRCRRAACT G-3'			

תערובת התגובה בכל בארית - 5 μ L כללה: 2.5 μ L של iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix; Bio-Rad Laboratories Ltd (ראשון לציון, ישראל), 2 μ L דוגמת DNA, ו-0.25 μ L מכל אחד מהפריימרים קדימה ואחורה, 10 מיקרומטר כל אחד. הליך qPCR כלל שלב הפעלה (דקה אחת ב-95 מעלות צלזיוס), 40 מחזורי דנטורציה (15 שניות ב-95 מעלות צלזיוס), חישול והארכה (30 שניות ב-60 מעלות צלזיוס), ועקומת התכה. לכל דוגמה בוצעו ארבע ריאקציות כדי להבטיח את העקביות של אותן חזרות טכניות. כמות ה-DNA נורמלה באמצעות גן משק הבית COX (פריימרים בטבלה 5), שנמצא גם בפתוגן וגם בצמחים. ההנחה הייתה שלכל הדגימות הייתה אותה רמת יעילות.

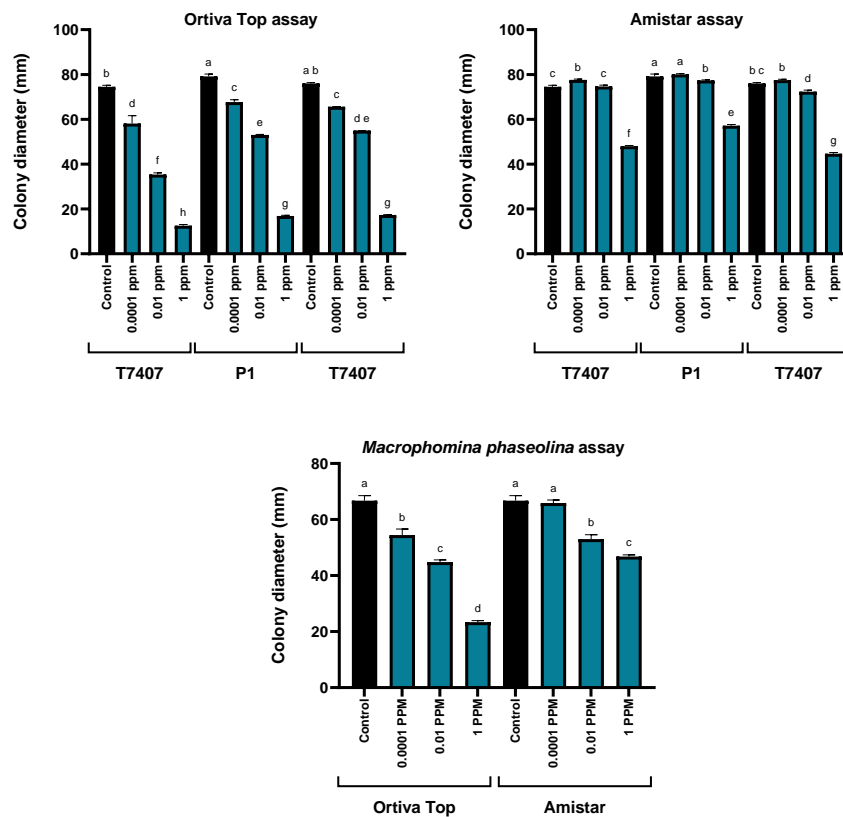
4.6. עיבוד סטטיסטי

ניתוח ועיבוד סטטיסטי בוצעו באמצעות תוכנת GraphPad Prism, גרסה 10.4.1 (627) 18/11/2024 (SAS Institute Inc., San Diego, CA, USA), ותוכנת JMP pro, גרסה 16.2.0 (GraphPad Software Inc., Cary NC, USA). בהתאם לבדיקת נורמליות הנתונים נותחו באמצעות ניתוח שונות (ANOVA) או במבחן א-פרמטרי (Kruskal-Wallis) ברמת מובהקות של $p < 0.05$. צפויה שונות גבוהה בתוצאות ניסוי העיצים בחדר הגידול (ערכי שגיאת תקן גבוהים), בהתחשב בקושי האובייקטיבי של אילוח אחיד של הצמחים. בניסויי השדה בתנאי נגיעות טבעיים בקרקע, תרחיש כזה סביר, והבעיה מחמירה. כתוצאה מכך, זה מאתגר להשיג הבדלים מובהקים סטטיסטיים. כדי לשמור על עוצמת הבדיקה ולהפחית את הסיכון לשגיאות מסוג II, בחרנו במבחן Uncorrected Dunn's test.

5. תוצאות המחקר

5.1. השפעת Azoxystrobin על התפתחות מיני *Trichoderma* והפתוגן במעבדה.

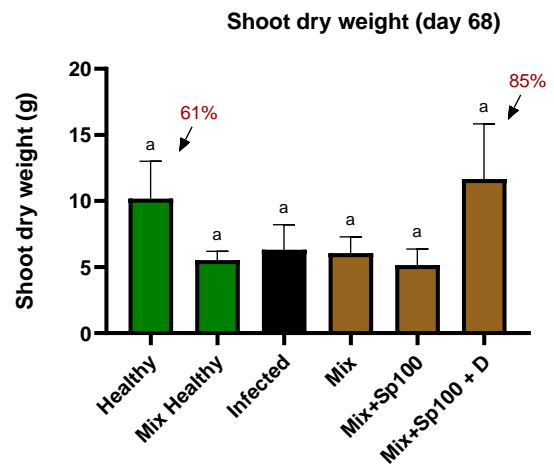
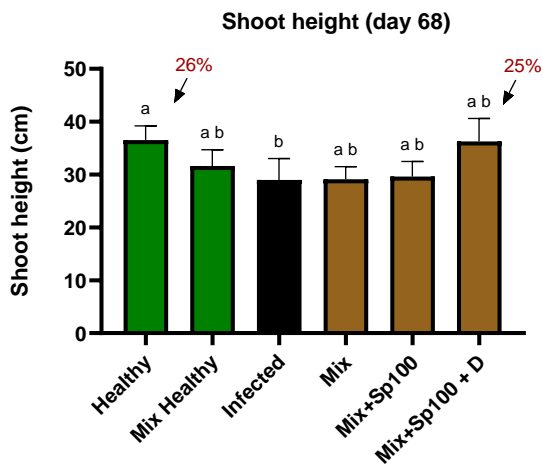
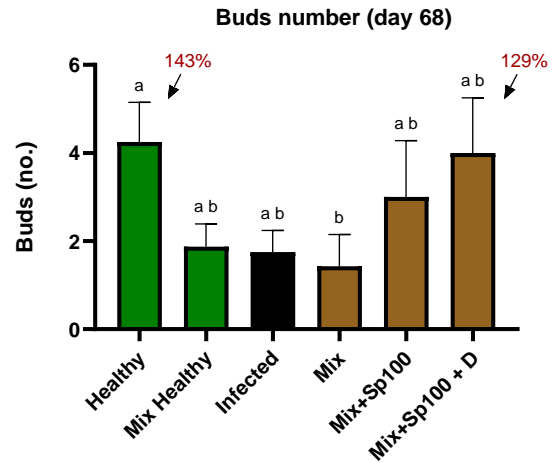
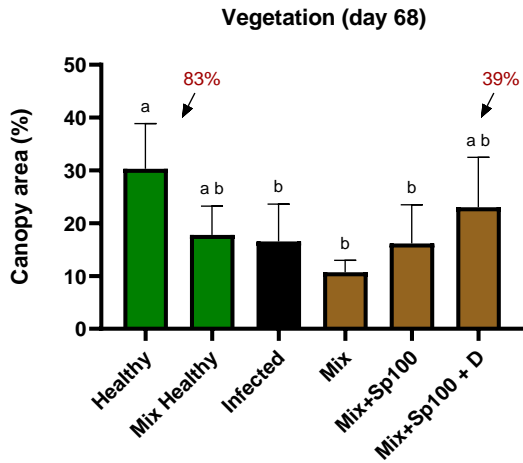
המדבירים הביולוגיים והפתוגן נבחנו בנפרד במעבדה ללימוד הרגישות שלהם לריכוזים עולים של תכשירי ההדברה עמיסטר ואורטיבה טופ. נמצא שהמדבירים הביולוגיים עמידים לריכוזים נמוכים של התכשיר (בעיקר לעמיסטר). באופן דומה, הפתוגן *M. phaseolina* גילה רגישות (תלוי ריכוז) לתכשירים שהייתה רבה יותר לאורטיבה טופ (איור 3).



איור 3. מבחן בצלחות מצע לרגישות פטריות הטריכודרמה (טבלה 1) והפתוגן *M. Phaseolina* לריכוזים עולים של התכשירים עמיסטר (Azoxystrobin 250 g/l, אדמה מכתשים) ואורטיבה טופ (Azoxystrobin 200 g/l, Difenconazole 125 g/l, אדמה מכתשים), בריכוזי חומר פעיל 1, 0.01, 0.0001 מ"ג/ליטר. הביקורת הייתה מצע עשיר ללא חומר הדברה. ערכים מייצגים ממוצע של 5 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-d) מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטי במבחן ניתוח שונות ברמת מובהקות של $p < 0.05$ (ANOVA).

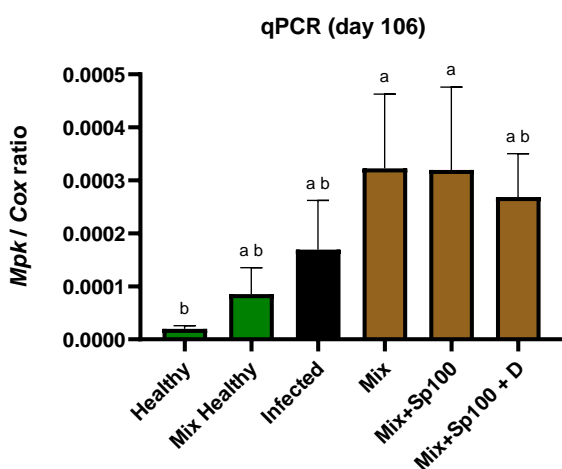
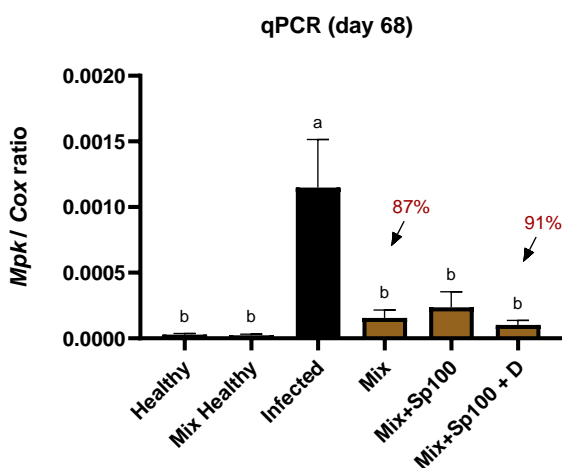
5.2. הדברה ביולוגית בנפרד ובמשולב עם הדברה כימית בעציצים בתנאי שדה לאורך עונת גידול מלאה.

בניסוי העציצים בשטח פתוח, באמצע העונה (יום 68) העיטוי הביולוגי עם תוסף כימי בזילוף והגמעה (Mix+Sp100 + D) שיפר את הצמיחה במדדי כיסוי עלווה (39%), גובה הנצר (25%), מספר כפתורי פריחה (129%) ומשקל יבש (85%), בהשוואה לביקורת הלא מטופלת (ללא מובהקות סטטיסטית עקב השונות הרבה) (איור 4). יותר על כן, באמצע העונה, העיטוי הביולוגי לבד ובמשולב עם הטיפול הכימי הניב שיפור של 87% ו-91% בהפחתת הנגיעות (איור 5). בסוף העונה (יום 106), כמות הפתוגן בצמחים הנגועים ללא טיפול קטנה פי 7 (ייתכן כתוצאה מהמחלה הקשה בצמחים אלו והתייבשות הרקמות שלוותה בהתפרקות ה-DNA), אך נשארה כמעט ללא שינוי בטיפול הביולוגי או בטיפול המשולב. מדידת המשקל היבש של הצמחים בסוף העונה תומכת בנתונים של אמצע העונה עם 34% שיפור במשקל היבש של הצמחים (ללא מובהקות סטטיסטית) בטיפול המשולב של עיטוי הביולוגי עם תוסף כימי בזילוף והגמעה (Mix+Sp100 + D) (איור 6).

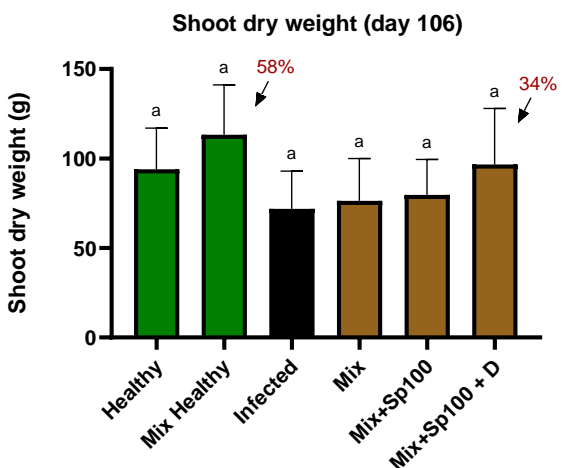


איור 4. ניסוי עציצים בשטח פתוח – מדדי צמיחה באמצע העונה (יום 68). הטיפולים: Healthy – ביקורת לא מאולחת, Mix Healthy – זרעים מעוטים ביולוגית ללא אילוח, Infected – זרעים לא מטופלים גועים, Mix – זרעים מעוטים ביולוגית גועים, Mix+Sp100 – זרעים מעוטים ביולוגית גועים עם זילוף עמיסטר 100 סמ"ק/דונם בזריעה, Mix+Sp100 + D – זרעים מעוטים ביולוגית גועים עם זילוף עמיסטר כנ"ל והגמעת אורטיבה טופ 400 סמ"ק/דונם 50 ו- 70 יום מהזריעה. אחוזים מייצגים הבדל מהביקורת הלא מטופלת (בשחור). ערכים מייצגים ממוצע של 7-8 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-b) מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטי במבחן ניתוח שונות (ANOVA) או במבחן א-פרמטרי (Kruskal-Wallis) ברמת מובהקות של $p < 0.05$.

איור 5 - ניסוי עציצים בשטח פתוח – ניטור
 כמות DNA יחסית (לגן משק הבית Cox) של הפתוגן *M. phaseolina* בשורשים, באמצע העונה (יום 68) ובסוף העונה (יום 106). אחוזים מייצגים הבדל מהביקורת הלא מטופלת (בשחור). הטיפולים כמו באיור 4. אחוזים מייצגים הבדל מהביקורת הלא מטופלת (בשחור). ערכים מייצגים ממוצע של 6-8 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-b) מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטי במבחן א-פרמטרי (Kruskal-Wallis) ברמת מובהקות של $p < 0.05$.

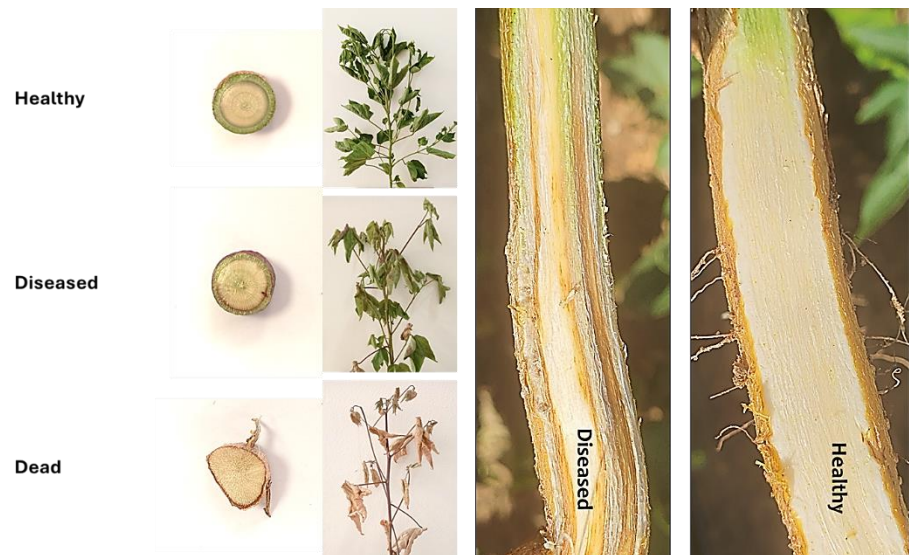


איור 6 - ניסוי עציצים בשטח פתוח – הערכת
 המשקל היבש של הצמחים בסוף העונה (יום 106). הטיפולים כמו באיור 4. אחוזים מייצגים הבדל מהביקורת הלא מטופלת (בשחור). ערכים מייצגים ממוצע של 4-5 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. לא אותר הבדל סטטיסטי בין הטיפולים.



5.3. הדברה כימית וביולוגית לאורך עונת גידול מלאה בשדה (גד"ש חולדה).

טיפול ההגמעה (לבד ובשילוב עיטוי ביולוגי) היו יעילים – במיוחד בשטח הדרומי שבו המחלה הייתה קלה יותר (**איורים 7-9**). טיפולי ההגמעה בשלושת הזרעים שנבדקו (גוליית 6 מעוטים כימית או ביולוגית ומיכל מעוטה כימית) והובילו באמצע העונה לכ- 40% ירדה בנגיעות השורשים בפתוגן. בסוף העונה השפעה זו ירדה לכ- 20% (עם ערך מעט גבוה יותר בטיפול העיטוי הביולוגי).

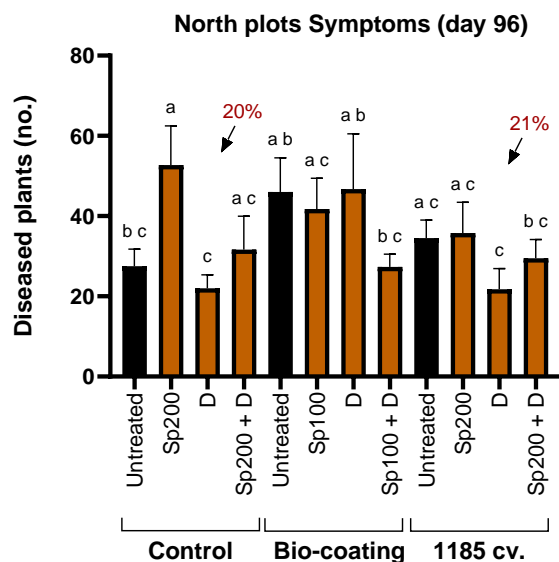
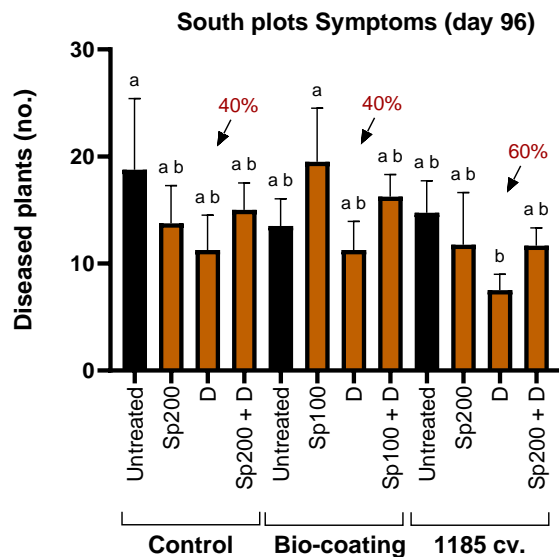


איור 7 - ניסוי שדה גדות – תסמיני מחלה בצמחים ובחתך רוחב בגבעול (שמאל) ובחתך אורך בגבעול (ימין). תמונות צולמו ביום 84. השחמת צינורות ההובלה היא כתוצאה מייצור Gossypol פוליפנול צמחי המשמש להגנה.

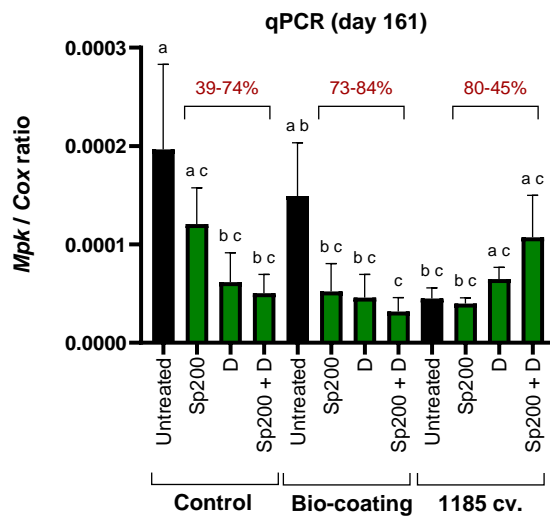
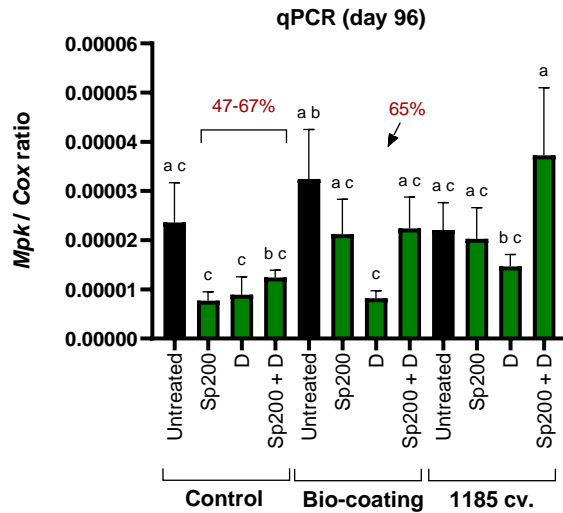


איור 8 - ניסוי שדה גדות – תמותת צמחים בשדה ביום 84 לגידול.

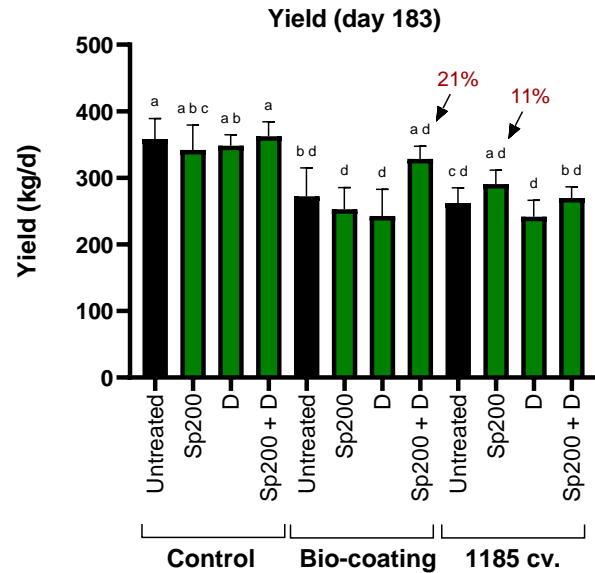
איור 9 - ניסוי שדה גדות – ניטור תסמיני המחלה באמצע העונה (יום 96) בחלקה דרומית (גרף עליון) ובחלקה הצפונית (גרף תחתון). הטיפולים: Untreated – זרעים מעוטים כימית (בסנטוריני) או ביולוגית, ללא מיגון כימי כלשהו. Sp200 – זרעים כנ"ל עם זילוף מרידור 200 סמ"ק/דונם בזריעה. D – זרעים כנ"ל עם הגמעת מרידור 375 סמ"ק/דונם בשני מועדים: 64 ו- 97 יום מהזריעה. Sp200 + D – זרעים כנ"ל עם זילוף מרידור בזריעה והגמעה. אחוזים מייצגים הבדל מהביקורת הלא מטופלת (בשחור). ערכים מייצגים ממוצע של 3-4 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-c) מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטי במבחן א-פרמטרי (Kruskal-Wallis) ברמת מובהקות של $p < 0.05$.



במעקב מולקולארי אחר הפתוגן בצמחים באמצע העונה, העיטוי הביולוגי יחד עם הטיפול הכימי הפחית את הנגיעות ב- 65% (**איור 10**). בסוף העונה הטיפולים הכימיים (לבד או בשילוב העיטוי הביולוגי) גרמו לירידה של עד 84% בכמות הפתוגן בשורשים. הזן מיכל (1185) נמצא כעמיד, אך רגיש לריכוזים גבוהים של Azoxystrobin. אומדן יבולים בוצע ביום 183 על פי ההערכת המשקל של הקטפת ותיקון על פי המשקל בפועל של הגליליות בחלקה (**איור 11**). על רקע המחלה הקשה, הטיפולים לא היו שונים מהביקורת. יחד עם זאת, הטיפולים הכימיים שיפרו ב- 21% את היבולים בזרעים המעוטים ביולוגית וב- 11% את היבולים בן מיכל (1185).



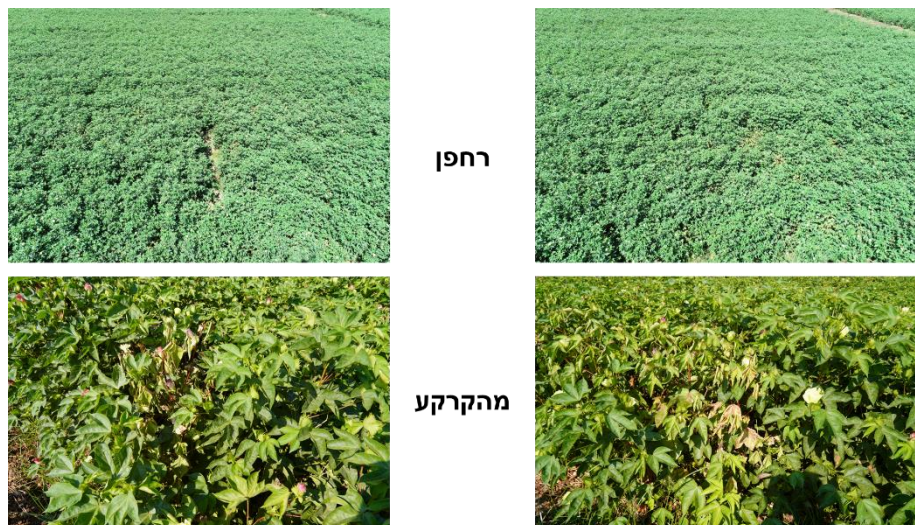
איור 10 - ניסוי שדה גדות – ניטור כמות DNA יחסית (לגן משק הבית Cox) של הפתוגן *M. phaseolina* בשורשים, באמצע העונה (יום 96) ובסוף העונה (יום 161). הטיפולים כמתואר באיור 9. אחוזים מייצגים הבדל מהביקורת הלא מטופלת (בשחור). ערכים מייצגים ממוצע של 4-8 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-c) מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטי במבחן ניתוח שונות (ANOVA, יום 96) או במבחן א-פרמטרי (Kruskal-Wallis, יום 161) ברמת מובהקות של $p < 0.05$.



איור 11 - ניסוי שדה גדות – אומדן יבולים בסוף העונה (יום 183) על פי ההערכת המשקל של הקטפת ותיקון על פי המשקל בפועל של הגליליות בחלקה. הטיפולים כמתואר באיור 9. אחוזים מייצגים הבדל מהביקורת הלא מטופלת (בשחור) בכל אחת מהקטגוריות (Bio-coating ו- 1185 cv.). ערכים מייצגים ממוצע של 3-4 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-b) מעל העמודות מייצגות הבדל מובהק סטטיסטי במבחן ניתוח שונות (ANOVA) ברמת מובהקות של $p < 0.05$.

5.3. פיתוח כלים לזיהוי מחלת ריקבון הפחם בעזרת חישה מרחוק ובינה מלאכותית

במהלך עונת הגידול בוצעו חמישה צילומים עם מצלמות בתחום האור הנראה (RGB) בתאריכים שונים בשדה הכותנה החל מאמצע אוגוסט עד אמצע-סוף ספטמבר, בשלב הפנולוגי של פריחה ותחילת יצירת הלקטים (**איור 12**). ארבעה מהצילומים בוצעו מהקרקע בעזרת מצלמת Sony Alpha-7R3 (42-megapixel mirrorless), רזולוציה מרחבית 0.2 מ"מ. צילום אחד בוצע בעזרת רחפן Matrice 300 RTK – בעזרת מצלמת RGB מובנית L1 מגובה 3 מ' מעל פני הקרקע, רזולוציה מרחבית 0.8 מ"מ. שילוב של חישה מרחוק ולמידת מכונה (Machine Learning – ML) מוכוון חקלאות לצורך זיהוי עצמים ומאפיינים ויזואליים בעזרת למידה עמוקה (deep learning).



איור 12 - ניסוי שדה גדות – צילומים עם מצלמות בתחום האור הנראה (RGB) מרפן Matrice 300 RTK ומהקרקע, לצורך שילוב של חישה מרחוק ולמידת מכונה מכוון חקלאות לצורך זיהוי עצמים ומאפיינים ויזואליים בעזרת למידה עמוקה (deep learning).

7. סיכום, מסקנות והמלצות להמשך

מחלת ריקבון הפחם (CRD) בכותנה היא מחלה הרסנית עם אפשרויות התמודדות מוגבלות. הגורם למחלה הוא הפטרייה *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, הנמצאת באדמה ופוגעת במגוון יבולים חשובים, כולל כותנה. הדברה משולבת של CRD נבדקה כאן באמצעות מדברים ביולוגיים וכימיים בחווה (עציצים בשטח פתוח) ובשדה. עיטוי זרעים ביולוגי עם מיני *Trichoderma* ולאחריו יישום התכשיר Azoxystrobin נבדק בהשוואה לעיטוי זרעים ביולוגי בלבד או גישה כימית מלאה, המבוססת על עיטוי זרעים בלבד או בשילוב עם תוספת Azoxystrobin במהלך העונה.

בעציצים בשטח פתוח, כבר באמצע העונה (יום 68) העיטוי הביולוגי עם תוסף כימי בזילוף והגמעה שיפר את הצמיחה (129% יותר כפתורי צמיחה ו- 85% שיפור במשקל היבש) והפחית משמעותית (91%) את הנגיעות. הטיפול הביולוגי לבד השיג 85% ירדה בנגיעות במועד זה. על אף המחלה הקשה של צמחי הביקורת שמנעה אומדן מולקולרי מדויק של הפתוגן בסוף העונה, בטיפול המשלב עיטוי ביולוגי ותוסף כימי בזילוף והגמעה, השיג 34% שיפור במשקל היבש של הצמחים. בשדה, העיטוי הביולוגי בשילוב טיפולים כימיים גרם ביום 96 לירידה של 40% בכמות הצמחים החולים ולהפחתה של 65% בנגיעות. בסוף העונה הטיפול הביולוגי לבד או בשילוב ממשק כימי הביא לירידה של עד 84% בנגיעות. למרות זאת לא נמדדה השפעה על היבול עקב המחלה הקשה. בכל זאת נרשמה השפעה חיובית לטיפולים הכימיים אל מול צמחים אורגנים מעוטים ביולוגית או צמחי הזן מיכל (1185). האחרון הראה עמידות למחלה, אך הניב מעט יבול בהשוואה לזן גוליית 6 ואף היה רגיש יחסית לטיפולים ב-Azoxystrobin.

הניסוי בשנה זאת הוכיח שוב את היכולת של הטיפולים הביולוגיים להתמודדות עם המחלה. אלו יעילים במיוחד כשהמחלה מרוסנת ואילו במקרים של מחלה קשה כמו בגדות, ההשפעה החיובית בדיכוי הפתוגן לא מוצאת ביטוי בשיפור היבולים. ממצאי המחקר מציעים שיטה ידיוותית לסביבה לשליטה ב-*M. phaseolina* בשדות כותנה. התערבות משולבת ביולוגית וכימית להגנה על גידולי כותנה מ-CRD יכולה להפחית את השימוש בקוטלי פטריות כימיים תוך חיזוק וייצוב יכולתם של המדברים הביולוגיים למנוע את השפעת הפתוגן. תוצאות המחקר הנוכחי מעודדות התאמות ויישום עתידי של אסטרטגיות ההדברה המתוארות כאן גם כנגד מחלות אחרות של כותנה וביבולים נוספים. עבודות המשך יכללו שיפור פרוטוקול ההדברה הביולוגית במבחי מעבדה ונבטים:

- בחינת תערובות שונות של תבדידי טריכודרמה.
- העצמת פעילות תבדידי הטריכודרמה באמצעות תוספת של מיקרו-אצות.
- בחינת תבדידי טריכודרמה חדשים שטרם נוסו.
- בחינת הדברה משולבת עם פורמולת חרסית לשחרור איטי של Azoxystrobin (שפותחה לאחרונה במעבדתנו) בשדה.

זיהוי מחלת המקרופומינה בעזרת חישה מרחוק ובינה מלאכותית – המשך מחקר

התמונות שנאספו ב- 2024 משדה הניסוי בגדות, יצטרפו לבסיס הנתונים ההולך ונבנה לצורך אטומיזציה מבוססת למידת מכונה לאומדן מהיר ומדויק של נזקי המחלה בשדות חקלאיים. לצורך כך יש להשלים את השלבים הבאים:

- שיפור תוצאות מודל הזיהוי שבוסס לראשונה בניסוי חולדה ב- 2023.
- תיוג התמונות בעזרת פקח מזיקים – זיהוי צמחים חולים, בשילוב ולידציה קרקעית.
- צילום ברזולוציה מרחבית גבוהה מאוד לטובת זיהוי ואימון מכונה יעילים.
- שיפור אימון אלגוריתם ה-UNET – ארכיטקטורה המצטיינת ביכולתה לאפיין כל פיקסל בודד (סגמנטציה סמנטית). האימון יבוצע על קבוצת תמונות האימון תוך השוואה לקבוצת תמונות הוולידציה. מאגר התמונות המתויגות יחולק לקבוצת אימון (70%), אימות (וולידציה) (20%), ובדיקה (10%). קבוצת הבדיקה לא נחשפת למודל בזמן האימון. חלוקת תמונות לאריחים (tiles) בגודל 448*448 פיקסלים. במהלך האימון התמונות יעברו אוגמנטציה בסיסית: סיבוב ושיקוף

8. תודות

לחברת נטפים, לגיא רשף וצוות ההקמה שאפשרו את ביצוע הניסוי.
לצביקה לזר ולצוות גדי"ש גדות על הסיוע ושיתוף הפעולה.
למועצת הכותנה על מימון הניסוי.

9. רשימת ספרות

1. Cohen, R.; Elkabetz, M.; Paris, H.S.; Gur, A.; Dai, N.; Rabinovitz, O.; Freeman, S., Occurrence of *Macrophomina phaseolina* in Israel: Challenges for disease management and crop germplasm enhancement. *Plant Disease* **2022**, *106*, 15-25.
2. Almeida, Á.M.R.; Saraiva, O.F.; Farias, J.R.B.; Gaudêncio, C.A.; Torres, E., Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2001**, *36*, 1231-1238.
3. Bashir, M.R.; Mehmood, A.; Sajid, M.; Zeshan, M.A.; Mohsin, M.; Khan, Q.A.; Tahir, F.A., Exploitation of new chemistry fungicides against charcoal rot of sesame caused by *Macrophomina phaseolina* in Pakistan. *Pakistan Journal of Phytopathology* **2017**, *29*, 257-263.
4. Marquez, N.; Giachero, M.L.; Declerck, S.; Ducasse, D.A., *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. *Front Plant Sci* **2021**, *12*, 634397-634397.
5. Bastakoti, S.; Belbase, S.; Manandhar, S.; Arjyal, C., *Trichoderma* species as biocontrol agent against soil borne fungal pathogens. *Nepal journal of biotechnology* **2017**, *5*, 39-45.
6. Martinez-Medina, A.; Pozo, M.J.; Cammue, B.P.; Vos, C.M., Belowground defence strategies in plants: The plant-Trichoderma dialogue. In *Belowground defence strategies in plants*, Springer: 2016; pp 301-327.
7. Degani, O.; Becher, P.; Gordani, A., Real-time PCR early detection of *Trichoderma* treatments efficiency against cotton charcoal rot disease. *Journal of Natural Pesticide Research* **2023**, *4*, 100027.

- .8 Gordani, A.; Hijazi ,B.; Dimant, E.; Degani, O., Integrated biological and chemical control against the maize late wilt agent *Magnaportheopsis maydis*. *Soil Systems* **2023**, 7, 1.
- .9 Degani, O.; Gordani, A.; Dimant, E.; Chen, A.; Rabinovitz, O., The cotton charcoal rot causal agent, *Macrophomina phaseolina*, biological and chemical control. *Front Plant Sci* **2023**, 14.
- .10 Degani, O.; Chen, A.; Dimant, E.; Gordani, A.; Malul, T.; Rabinovitz, O., Integrated management of the cotton charcoal rot disease using biological agents and chemical pesticides. *Journal of Fungi* **2024**, 10, 250.
- .11 Gal-Hemed, I.; Atanasova, L.; Komon-Zelazowska, M.; Druzhinina, I.S.; Viterbo, A.; Yarden, O., Marine isolates of *Trichoderma* spp. As potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and environmental microbiology* **2011**, 77, 5100-5109.
- .12 Degani, O.; Dor, S., *Trichoderma* biological control to protect sensitive maize hybrids against late wilt disease in the field. *Journal of Fungi* **2021**, 7, 315.
- .13 Degani, O.; Danielle, R.; Dor, S., The microflora of maize grains as a biological barrier against the late wilt causal agent, *Magnaportheopsis maydis*. *Agronomy* **2021**, 11, 965.
- .14 Patrignani, A.; Ochsner, T.E., Canopeo: A powerful new tool for measuring fractional green canopy cover. *Agronomy journal* **2015**, 107, 2312-2320.
- .15 Degani, O.; Dor, S.; Movshovitz, D.; Rabinovitz, O., Methods for studying *Magnaportheopsis maydis*, the maize late wilt causal agent. *Agronomy* **2019**, 9, 181.
- .16 Degani, O.; Dor, S.; Abraham, D.; Cohen ,R., Interactions between *Magnaportheopsis maydis* and *Macrophomina phaseolina*, the causes of wilt diseases in maize and cotton. *Microorganisms* **2020**, 8, 249.
- .17 Babu, B.K.; Saxena, A.K.; Srivastava, A.K.; Arora, D.K.J.M., Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. **2007**, 99, 797-803.
- .18 Li, W.; Hartung, J.S.; Levy, L., Quantitative real-time pcr for detection and identification of *candidatus liberibacter* species associated with *Citrus huanglongbing*. *J Microbiol Methods* **2006**, 66, 104-115.
- .19 Weller, S.; Elphinstone, J.; Smith, N.; Boonham, N.; Stead, D., Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic pcr (taqman) assay. *Applied and environmental microbiology* **2000**, 66, 2853-2858.