

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

מוגש להנהלת ענף הכותנה, לסיכום שנת המחקר ב- 2023

1. שמות השותפים למחקר

- דר' אופיר דגני – מיגל - מכון למחקר מדעי בגליל, קריית שמונה (ofird@telhai.ac.il).
- דר' 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: אסף גורדני, אלחנן דימנט, תמיר מלול, דניאל דמנצ'וק 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 ביוטיות 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 T7507 והובילה ל- 86% 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]. הדברה משולבת יושמה פה (2023) לראשונה בכותנה בשדה מסחרי. המחקר לווה באיתור מולקולארי של הפתוגן ברקמות הצמחים ובצילום מהאוויר בתחום האור הנראה, אינפרה-אדום קרוב ותרמי להערכת הטיפולים.

בנוסף נחקר המיקרוביום של צמחי כותנה תחת ההשפעה של מחלת ריקבון הפחם. הרעיון של חיזוק המיקרופלורה הטבעית של צמחי כותנה כנגד מחלת ריקבון הפחם כמעט ולא נחקר בעולם באופן ישיר והידע בנושא מועט. עבודה שבצענו בתירס [10] מראה על הפוטנציאל הגבוה של גישה זו. בתירס בודדנו פטריות וחיידקים מזרעים, העמדנו אותם במבחן צלחות נגד הפתוגן ואלו שגברו עליו הוחדרו בחזרה לזרעים ונבדקו בנבטים שגודלו על קרקע מאולחת בגורם המחלה. התוצאות מראות על שיפור משמעותי במדדי הצמיחה ובעיכוב הפתוגן גורם המחלה. כאן בוצעו צעדים ראשוניים לקראת יישום שיטה זו למיגון זרעים כנגד פתוגן הכותנה. העשרת זרעים בפטריות מועילות עשויה להוות פתרון יעיל, חסכוני, ירוק שעשוי להתאים לכל שיטת גידול. בנוסף השימוש בגישה זו יצמצם משמעותית את השימוש בחומרי הדברה ועשוי להגן על הצמחים מפני מחלות קרקע אחרות. בנוסף לימוד המיקרופלורה של שורשים תחת עקת ריקבון הפחם ובהשפעת טיפולים מונעים עשויה לספק מידע חשוב לגבי גורמי סיכון אפשריים (פתוגנים רדומים או פעילים), יעילות הטיפולים כנגד מחלות אחרות והתאמת שיטות הדברה עתידיות.

הטיפול המשולב ביולוגי-כימי בנבטים בחדר גידול ובשדה מסחרי שנבחן ב- 2023, פורסם לאחרונה בכתב עת מדעי [11] וניתן לראות את הפירוט המלא בסימוכין:

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. *J. Fungi* 2024, 10, 250. <https://doi.org/10.3390/jof10040250>

תמצית העבודה מוגשת כאן.

3. מטרת המחקר

1. פיתוח גישה חדשה להתמודדות עם מחלת ריקבון הפחם בכותנה, המבוססת על ממשק ביולוגי-כימי משולב שייבחן, אל מול הדברה כימית בלבד (איור 1):

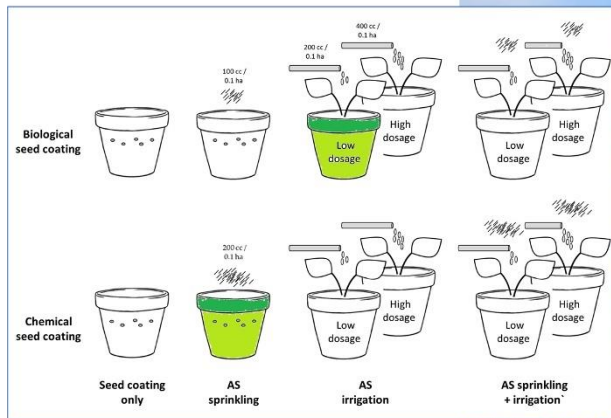
I. בנבטים בחדר גידול עד גיל 52 יום.

II. בעונת גידול מלאה בשדה מסחרי בחולדה.

יישום חישה מרחוק באמצעות רחפן, בצילום באור הנראה ובחיישן תרמי, לסיוע בהערכת יעילות הטיפולים.

2. לימוד המיקרוביום של צמחי כותנה תחת השפעת מחלת ריקבון הפחם. העבודה תאפשר בהמשך חיזוק המיקרופלורה הטבעית של צמחי כותנה כנגד המחלה על ידי העשרת זרעים בפטריות מועילות ולימוד גורמי מחלה נוספים העשויים להשפיע עליה.

Integrated management of Cotton Charcoal Rot Disease



איור 1 – תיאור גרפי של המחקר. התמודדות עם מחלת ריקבון הפחם בכותנה, המבוססת על ממשק ביולוגי-כימי משולב נבחנה, אל מול הדברה כימית והדברה ביולוגית בנפרד, בחדר גידול בתנאים מבוקרים ובשדה מסחרי [11]. הטיפולים בחדר הגידול ובשדה היו זהים וכללו עיטוי זרעים כימי/ביולוגי בלבד, ותוספת Azoxystrobin (מירדור, אדמה-מכתשים) בזילוף בפס הזריעה (100 סמ"ק לדונם) ו/או הגמעה ב-2 מינונים (200 או 400 סמ"ק לדונם). בתמונה צמח נגוע במחלת ריקבון הפחם על רקע שדה הניסוי בחולדה.

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 150 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.

טבלה 1 – מיני ה-*Trichoderma* ששימשו במחקר

Species	Designation	Origin	Reference
<i>Trichoderma</i> sp. O.Y. 7107	T7107	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[7,12]
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	T7407	<i>Psammocinia</i> sp. ¹	[7,12,13]
<i>Trichoderma asperellum</i>	P1	<i>Zea mays</i> , Prelude cv.	[7,10]

¹ Mediterranean sponge *Psammocinia* sp.

4.2 הדברה ביולוגית בנפרד ובמשולב עם הדברה כימית בעציצים בחדר גידול בנבטים.

הניסויי בוצע ב-7 חזרות לטיפול (כל חזרה עציץ 2.5 ליטר המכיל 5 נבטי כותנה מזן גוליית V6), בחדר גידול בתנאים מבוקרים. נבחנו טיפולי הדברה ביולוגית מבוססי מיני *Trichoderma* (טבלה 1) בנפרד ובמשולב עם

Azoxystrobin (עמיסטר, אדמה מכתשים), אל מול צמחי ביקורת עם אילוח ללא הדברה, עם אילוח + הדברה כימית או ללא אילוח וללא הדברה. סה"כ בוצעו 12 טיפולים כמפורט בטבלה 2.

טבלה 2 – תיאור הטיפולים ולוחות הזמנים בניסוי חדר הגידול

No.	Treatment	Designation	Azoxystrobin Dosage (Active Ingredient)	Timetable
1	Chemical seed coating ¹			
2	Biological seed coating with <i>Trichoderma</i> species mix ²	SC only	Non (Control)	Before seeding
3	Chemical seed coating and AS ³ sprinkling in the sowing hole.		0.88 mg dissolved in 20 mL DDW ⁴ (equivalent to 200 mL/0.1 ha)	
4	Biological seed coating and AS sprinkling in the sowing hole.	Sp	0.44 mg dissolved in 20 mL DDW (equivalent to 100 mL/0.1 ha)	With the seeding
5	Chemical seed coating and AS irrigation (low dosage)			
6	Biological seed coating and AS irrigation (low dosage)	D200	0.88 mg dissolved in 10 mL DDW	10- and 21-days post sowing
7	Chemical seed coating and AS irrigation (high dosage)			
8	Biological seed coating and AS irrigation (high dosage)	D400	1.76 mg dissolved in 10 mL DDW (equivalent to 400 mL/0.1 ha)	
9	Chemical seed coating, AS sprinkling, and irrigation (low dosage)			
10	Biological seed coating, AS sprinkling, and irrigation (low dosage)	Sp + D200	As in treatments 3–4 + 5–6	With the seeding and 10- and 21-day post sowing
11	Chemical seed coating, AS sprinkling, and irrigation (high dosage)			
12	Biological seed coating, AS sprinkling, and irrigation (high dosage)	Sp + D400	As in treatments 3–4 + 7–8	

¹ 1standard mix of thiram, captan, carboxin, and Metalaxyl-M; ² mix of fungal spores, mycelium fragments, and extrolites from *Trichoderma* T7107, T7407, P1 cultures; ³ AS: Azoxystrobin; ⁴ DDW: double-distilled water.

טיפולי האילוח: (1) נעשה שימוש באדמה מקומית כבדה שאולחה שבוע לפני הניסוי, ב- 10 ג' (לעציץ) זרעי דוחן מעוקרים ומאולחים ב- *M. phaseolina* (לפי [8]). (2) אילוח משלים בוצע בכל עציצי הטיפולים עם ההצצה (שבוע מהזריעה) ושבועיים מהזריעה באמצעות הוספת 3 דסקיות פטרייה (קוטר 6 מ"מ) מתרבית של *M. phaseolina* לכל נבט.

לאורך הניסוי בוצעו טיפולי דשן וטיפולים נגד מזיקים שונים, על מנת לשמור על גורם פגיעה רק מהאילוח בפטרייה. לאחר 29 ו- 52 יום נבדקו הופעת תסמינים, מדדי צימות, ונוכחות ה-DNA של הפטרייה בשורש של כל צמח (ע"י qPCR [7]).

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

הניסוי בוצע בגד"ש שדות חמ"ד בחלקת השער – חלקה 3 בצידה הדרומי צמוד למאגר מי ההשקיה.

4.3.1. מבנה החלקות והטיפולים

הניסוי בוצע במתכונת של חלקות מפוצלות בבלוקים באקראי ב- 8 חזרות (איור 2). הגורם הראשי שנבדק היה טיפולי ההגמעה דרך מערכת ההשקיה בשני מועדי יישום. בגורם זה נבחנו 3 טיפולי הגמעה: 1. הגמעה בחומר מרידור של חברת מכתשים אדמה (Azoxystrobin 250 g/l) במינון 400 סמ"ק לדונם. 2. הגמעה במינון 200 סמ"ק לדונם. 3. ללא הגמעה. שלוחות הטפטוף נפרסו על 2 פסי הדריכה בתוך שש שורות הזריעה ובין השישיות כמקובל במשק. הגורם המשני שנבדק היו 4 טיפולים בפס הזריעה שכללו טיפול כימי בזילוף במרידור במינון 200 סמ"ק לדונם, עיטוי זרעים בטריכודרמה, שילוב של עיטוי זרעים וטיפול כימי בזילוף כימי במרידור במינון מופחת של 100 סמ"ק לדונם, וביקורת.

בלוק לדוגמה (1 מתוך 8):

		סה"כ 96 חלקות, שטח חלקת ניסוי 0.11 דונם					
		6 מ'			17.5 מ'		
		4	7	8	6	3	2
		3	6	3	7	8	6
		6	5	2	4	1	4
		7	2	1	8	2	7
		5	4	4	5	4	8
		8	3	3	1	5	5
		1	1	6	5	6	1
		2	8	7	4	7	3
		הגמעה		ביקורת		הגמעה	
		200	400	ללא	200	400	
		סמ"ק/ד		סמ"ק/ד		סמ"ק/ד	
		ללא		ללא		ללא	

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

איור 2. פריסת הטיפולים בחלקה ופירוט הטיפולים.

4.3.2. הכנת החלקה, הזריעה והטיפולים הנלווים

כל חלקת ניסוי הייתה באורך של 27 מטר וברוחב של שש שורות כ- 5.80 מטר. סה"כ 96 חלקות בשטח כולל של כ- 15 דונם. כרב החלקה היה אבטיח מללי. בהכנת החלקה בוצע דיסקוק. לאחר מכן ב- 23.01 בוצע קילטור קל להצנעת קוטל העשבים פנדיגן שרוסס במינון 550 סמ"ק לדונם. ב- 8.03 רוססה החלקה בחומרים טרבوترקס במינון של 190 סמ"ק לדונם למניעת הצצה. לפני הזריעה ב- 29.03 בוצע עיגול במעגלה חלקה ליישור פני הקרקע. הזריעה בוצעה ב- 4.04.2023 במזרעת מונוסם. בחלקה נזרע השנה הזן גוליית 6 בדומה ליתר החלקות שבהן נזרעה פימה בגד"ש שדות חמד. זן זה נבחר מתוך ניסיון מצטבר של המשק שהוא עמיד יותר למחלת ריקבון הפחם מאשר הזן V-70 שנזרע בשנה שעברה.

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

שלבי הגידול המרכזיים והטיפולים של ניסוי השדה בחולדה, מפורטים בטבלה 3.

טבלה 3. תאריכים מרכזיים בניסוי השדה בחולדה.

Date	Seeding and sprouting assessment	Days from sowing
09/04/2023	Seeding	0
23/04/2023	Soil surface peek valuation	14
	Irrigation and Azoxystrobin treatments	
22/05/2023	Watering opening	43
23/05/2023	1 st Azoxystrobin irrigation	44
26/06/2023	2 nd Azoxystrobin irrigation	78
	Sampling and harvest	
22/06/2023	Midseason sampling	74
07/09/2023	End season sampling	151
18/09/2023	Remote sensing (visible and thermal imaging)	162
05/11/2023	Harvest and yield assessment	210

הזריעה בוצעה בשילוב של הזרקת מים בנפח של 100 ליטר לדונם בפס הזריעה כדי להבטיח נביטה אחידה יותר למרות שהזריעה בוצעה ב"רטוב". לאחר הזריעה ב- 9.04 רוסס החומר אור במינון 4 סמ"ק לדונם להדברת עשבייה קימת. בשבוע השני של אפריל, ירדו בחלקה כ- 93 מ"מ כולל אירוע ברד. 40 מ"מ מתוכם ירדו במשך 3 שעות ב- 13.04. הנבטים הראשוני שהציצו בחלקת הניסוי נפגעו, אבל פחות מאשר בחלקות שנזרעו מוקדם יותר. ב- 27.04 בוצעה בדיקת הצצה. בכל החלקות הדרומיות הסמוכות למאגר המים הייתה הצצה מאד לקויה. סיבת הפגיעה לא אותרה בוודאות. ייתכן ומזיק הקרקע טחבית מצויה פגע בזרעים. פגיעה דומה נמצאה בחלקות כותנה נוספות הסמוכות למאגר. חלקות אלו בניסוי נפסלו להמשך הגידול. במספר מקומות נמצא שהידוק מנע חדירה טובה של המזרעה ובכך נפגע העומד.

ב- 7.05 בוצע ריסוס להדברת עשבייה קיימת בחומרים סטיפל נוזלי בשילוב אנוק במינונים 3 סמ"ק לדונם ו- 1 גרם לדונם בהתאמה. הריסוס בוצע על השורה בלבד. ב- 11.05, בוצע ניטור עומד של זוג השורות האמצעיות בכל חלקת ניסוי, מתוך מחשבה שהן אלו שייקטפו בהמשך. מתוך 84 חלקות נמצאו 42 ראיות לקטיף. ב- 12.05 בוצע קילטור ומיד לאחר מכן נפרסו שלוחות הטיפטוף. דיגום ראשון של הצמחים בביקורות בלבד לנוכחות DNA של הפטרייה. כמו כן בוצע בזוג השורות המרכזיות בכל חלקת ניסוי שנועדו לקטיף מדידת אורכים חסרים בגין עומד לקוי.

ב- 21.05 הוצבה מערכת ההשקיה של הניסוי על ידי גיא רשף והצוות של חברת נטפים. ב- 22.05 בוצעה פתיחת המים במנת מים כוללת של 40 מ"מ. ב- 23.05 יום לאחר תחילת פתיחת המים לאחר מתן של כשני שלישים ממנת המים בוצעה ההגמעה הראשונה על ידי גיא רשף מחברת נטפים.

ב- 20.06 בוצע ריסוס במרסס ירידות בחומרים טרבולי במינון 115 סמ"ק לדונם בשילוב טרגט במינון 225 סמ"ק לדונם. הריסוס נועד להדברת עשבייה קיימת בחלקה שהייתה משובשת קשה במיוחד בעשבים חלבלוב קעור וענבי שועל. ש לציין שההדברה הייתה חלקית בלבד. ב- 22.06 74 ימים מזריעה, בוצע דיגום ראשון של צמחים לנוכחות DNA של הפטרייה בשורשים. ב- 26.06 בוצעה ההגמעה השנייה על ידי גיא רשף, של החומרים בשילוב ההשקיה לאחר מתן שני שלישי ממנת המים הכוללת של 40 מ"מ. ב- 24.07 בוצע ניטור לנוכחות המחלה בכל חלקות הניסוי. ב- 7.09, 151 ימים מזריעה בוצעה ספירה של צמחים חולים בשתי השורות המרכזיות בכל שישייה, ובנוסף דיגום צמחים לנוכחות המחלה. ב- 18.09 בוצע צילום מרחפן על ידי

גיל שושני מהמחלקה לחקלאות מדייקת במיגל. הצילום בוצע במצלמה טרמית, במצלמה היפרספקטרלית ובמצלמת RGB. סגירת מים בוצעה ב- 10.09. החלקה הושקתה במנת מים כוללת של 636 מ"מ, במשטר השקיות של פעמיים בשבוע.

לצורך הכנת החלקה לקטיף בוצע שילוך ראשון ב- 19.09 בחומרים ראונדאפ במינון 400 סמ"ק לדונם בשילוב, סטריפטיז במינון 60 סמ"ק לדונם וקוויק במינון 200 סמ"ק לדונם. שילוך שני בוצע ב- 28.09 בחומר סטריפטיז במינון 40 סמ"ק לדונם. קטיף הניסוי בוצע ב- 5.11 בקטפת מסחרית עוטפת של גדי"ש צבר קמ"ה, המצוידת במערכת GPS והערכת משקל מצטבר לצורך הערכת היבול בכל חלקת ניסוי ברוב של 6 שורות. קביעת היבול התבססה על פי קביעת מיקום ידני מדויק של החלקות בעזרת אנטנה לקליטת לוויינים בתוספת תיקון קרקעי - RTK, וניתוח תוצאות השקילות בעזרת תוכנת ARCPRO של חברת ESRI.

הדברת מזיקים בחלקת הניסוי בוצעה יחד עם החלקה המסחרית. בסה"כ בוצעו בחלקה 9 טיפולים להדברת מזיקים כולל 2 פיזורים של חוטי פרומון לבלבול הזכרים של ההלקטית הורודה. עיקר הטיפולים כוונו להתמודדות עם מזיק זה. נתונים מטאורולוגיים נמדדו במהלך עונת הגידול (טבלה 4) והתקבלו ערכים מקובלים המתאימים להתפתחות מחלת רקבון הפחם.

טבלה 4. נתונים מטאורולוגיים של שדה הניסוי בחולדה.¹

Parameters	Value
Dates	09/04/2023–07/09/2023
Temperature (2 m above soil, °C)	24.2 ± 6.3
Humidity (%)	67.0 ± 30.8
Radiation (W/m ²)	294.4 ± 50.9
Precipitation (mm)	81.8

¹ Average data (± standard deviation) according to meteorological station Hulda 24 of The Land Conservation Division, Israel Ministry of Agriculture.

4.3.4. הערכת מחלה

ביום ה- 74 וביום ה- 151 לאחר הזריעה נלקחו דגימות שורשים מ-2 צמחים בריאים מכל חלקה. סה"כ נאספו 7-8 צמחים מכל טיפול להפקת DNA. בסוף העונה נדגמו גם שורשי צמחים חולים. צמח חולה הוגדר על פי התסמינים הבאים: הצמח אדום, יבש, וערום חלקית מעלים. בנוסף בחתך אורך רדוד (בוצע מדגמית) ניתן לראות השחמה. פגיעת המחלה בחלקה נמדדה בעזרת ספירת כל הצמחים החולים בכל חלקה.

4.4. מבחן מולקולארי מבוסס Real-Time PCR

הפקת DNA נעשתה במתואר קודם לכן [14], על ידי מילוי שקית BioMed ב- 4 מ"ל תמיסת C-TAB לשקית עם הדגימה וכתישת הדוגמא ע"י כותש חשמלי. תמצית הדגימה הועברה לאפנדוף וסורכזה ב- 13000 rpm. הנוזל העליון (700 מיקוליטר) הועבר למבחנה חדשה, אליה הוספו 700 מיקרוליטר תמיסת כלורופום:איזו אמיל (1: 24). לאחר סרכוז נוסף ב- 13000 rpm, הועבר המקטע העליון (500 מיקרוליטר) והוספה לו כמות שווה של כלורופום:איזו אמיל. שוב בוצע סירכוז ב- 13000 rpm. לאחר מכן הוצאו 300 מיקרוליטר עליונים ולהם הוספו 200 מיקרוליטר איזופרופנוול קר. התערובת הועברה למשך 20 דקות למקפיא -20 מעלות. השלב הבא כלל סירכוז בטמפרטורה של 4 מעלות למשך 20 דקות ב- 13000 rpm, סילוק הנוזל והוספה של 0.5 מ"ל

של אתנול להפקה. סירכוז נוסף של 4 מעלות ב- 13000 rpm 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- [15], 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	[16]
	MpKRI	5'-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3'			
Pair 2	COX-F	5'-GTATGCCACGTCGCATTCCAGA-3'	Control	Cytochrome c oxidase (COX) gene product	[17,18]
	COX-R	CAACTACGGATATATAAGRRCRRAACT G-3'			

תערובת התגובה בכל בארית - 5 μL כללה: 2.5 μL של iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix; Bio-Rad Laboratories Ltd (ראשון לציון, ישראל), 2 μL דוגמת DNA, ו-0.25 μL 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.

4.5. איתור אנדופיטים בשורשי הכותנה.

בסך הכל נבדקו 168 שורשים לאורך כל תקופה הגידול, 84 בכל מועד דיגום. שורשי הכותנה שנדגמו עברו חיטוי חיצוני, נחתכו והונחו על גבי מצע עשיר. הצלחות הודגרו ב- $28 \pm 1^\circ\text{C}$ בחושך למשך 10 ימים. האנדופיטים הפטרייתיים שהתפתחו בודדו לצלחות מצע חדשות ועברו זיהוי מולקולארי. מתפטיר האנדופיטים הופק DNA באמצעות Master Pure Yeast DNA Purification set kit (Sigma) ובוצע PCR באמצעות הפריימרים הכללים לפטריות ITS1 ו-ITS4 המקודדים ל-universal internal transcribed spacer [9]. המקטע שהתקבל (כ-600 בסיסים) נשלח לריצוף.

4.65. עיבוד סטטיסטי

ניתוח ועיבוד סטטיסטי בוצעו באמצעות תוכנת GraphPad Prism, גרסה 10.1.0 (316) 17/10/2023 (SAS Institute Inc., GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), ותוכנת JMP pro, גרסה 16 (Cary NC, ארה"ב). הנתונים נותחו באמצעות ניתוח שונות דו-כיוונית (ANOVA) ברמת מובהקות של $p < 0.05$. צפויה שונות גבוהה בתוצאות ניסוי העציצים בחדר הגידול (ערכי שגיאת תקן גבוהים), בהתחשב בקושי האובייקטיבי של אילוח אחיד של הצמחים. בניסויי השדה בתנאי נגיעות טבעיים בקרקע, תרחיש כזה

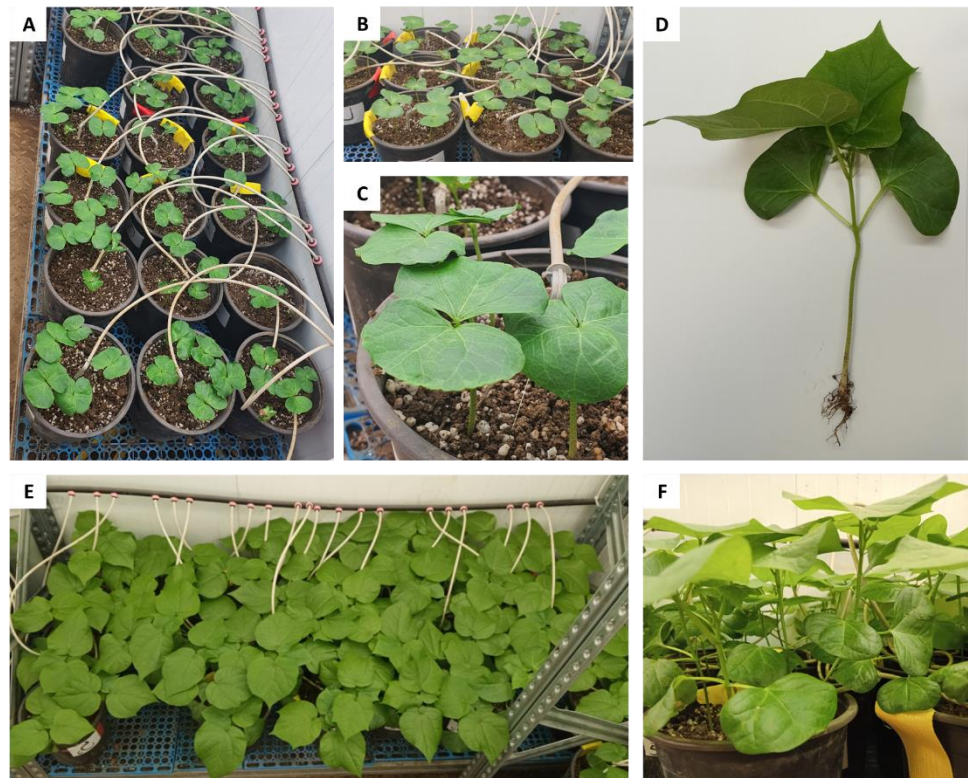
סביר, והבעיה מחמירה. כתוצאה מכך, זה מאתגר להשיג הבדלים מובהקים סטטיסטית. כדי לשמור על עוצמת הבדיקה ולהפחית את הסיכון לשגיאות מסוג II, בחרנו במבחן פישר (LSD).

5. תוצאות המחקר

מוצגות התוצאות העיקריות מתוך מדידות רבות שנערכו. הממצאים המלאים מוצגים במאמר המדעי [11].

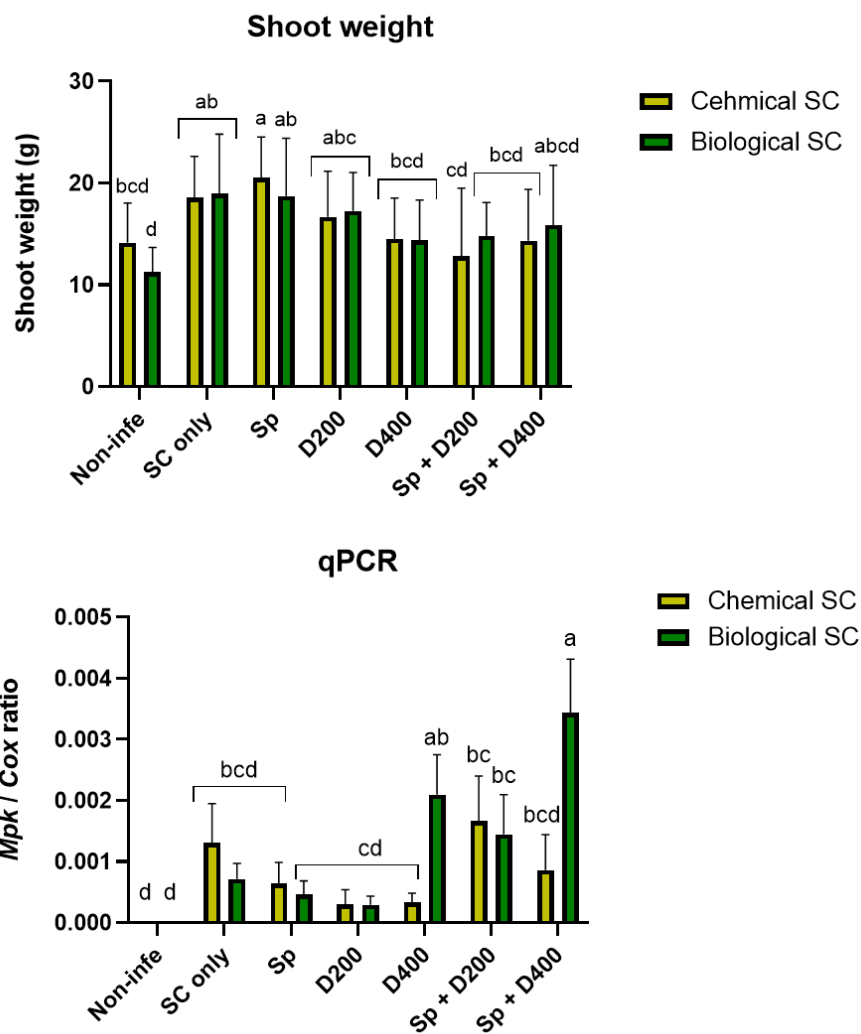
5.1. הדברה ביולוגית בנפרד ובמשולב עם הדברה כימית בעציצים בחדר גידול בנבטים.

המחקר כלל טיפולים ביולוגיים, כימיים ומשולבים שניתנו במקביל לנבטים בחדר גידול ולצמחים בשדה מסחרי. בסביבה מבוקרת בחדר גידול, השוואת טיפולי העיטוי הביולוגי עם מקביליהם הכימיים הניבה תוצאות דומות ברוב המדדים (איור 3).



איור 3 – תמונות ניסוי העציצים בחדר גידול. דילול מחמישה לצמח אחד בכל עציץ בוצע ביום ה-29 לאחר הזריעה (A–C). צמח מפותח לדוגמה ביום ה-29 לאחר הזריעה (D). צמחים בזמן הקציר ביום ה-52 לאחר הזריעה (E,F).

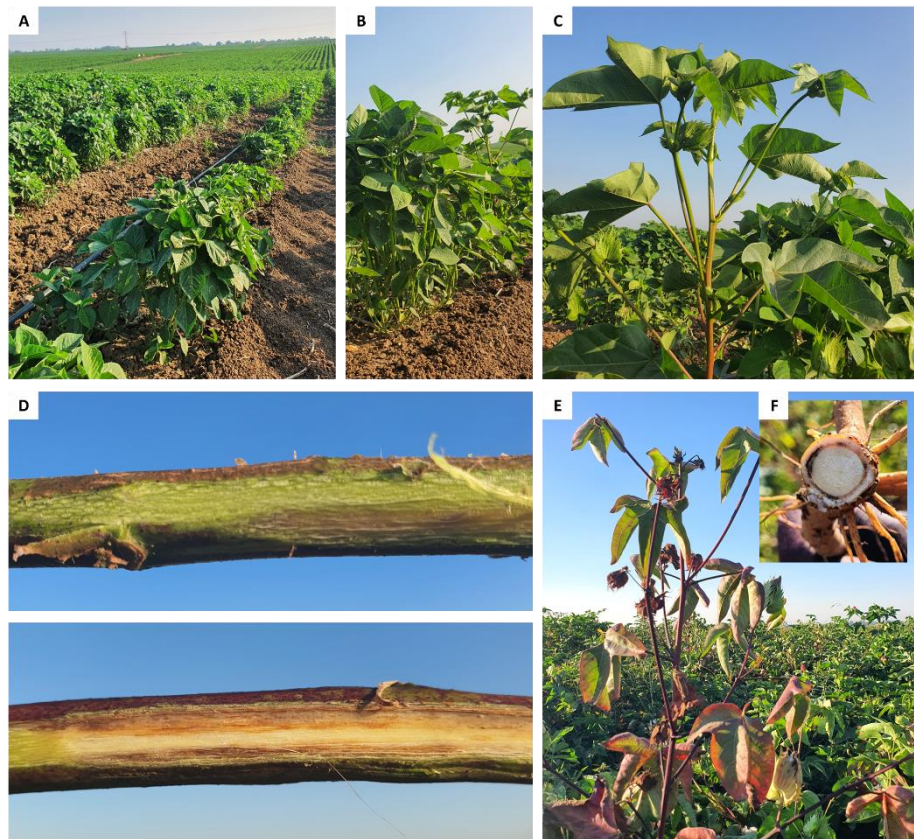
ביום 52, העיטוי הביולוגי או הכימי לבד (SC only) ובמשולב עם זילוף Azoxystrobin בזריעה (Sp), הניבו עלייה של עד 38% ו-45% במשקל השורש והנוף (בהשוואה לצמחים לא נגועים, איור 4 פנל עליון). עיטוי זרעים ביולוגי או כימי בשילוב הגמעה של הפונגיציד במינון נמוך (D200) דיכאו את רמות הפתוגן בשורשים בשיעור של עד 78% (נמדד ב- Real-Time PCR בהשוואה לצמחים עם עטוי כימי בלבד, איור 4, פנל תחתון). יצוין כי בהערכת משקל הנצר (יום 29 לאחר הזריעה, תוצאות לא מוצגות), הטיפול בעטוי זרעים ביולוגי בלבד עלה ($p < 0.05$) על כל שאר הטיפולים הביולוגיים ועל כל טיפולי ההגמעה של Azoxystrobin. מנגד, השפעות שליליות נצפו במועד זה (יום 29) במדדי הצימוח שמעל האדמה, בצמחים שקיבלו עיטוי זרעים כימי יחד עם הגמעת Azoxystrobin.



איור 4 – נתוני ניסוי העציצים בחדר גידול ביום ה-52 לאחר הזרעה. **תרשים עליון** – משקל נצר. **תרשים תחתון** כמות יחסית של DNA הפתוגן בשורשי הצמחים. נעשתה השוואה בין עיטוי זרעים כימי (עמודות צהובות) לבין עיטוי זרעים ביולוגי (עמודות ירוקות) בטיפולים השונים. Non-infe – צמחים לא נגועים; SC only – עיטוי זרעים בלבד, Sp – זילוף Azoxystrobin בתוספת לעיטוי הזרעים, D200/D400 – הגמעת Azoxystrobin במינון נמוך/גבוה בתוספת לעיטוי הזרעים, Sp+D200/D400 – שילוב של זילוף והגמעה במינון גבוה או נמוך של Azoxystrobin בתוספת לעיטוי הזרעים. בכל קבוצת ניסוי בוצעו 4-7 חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-d) מייצגות הבדל מובהק סטטיסטית.

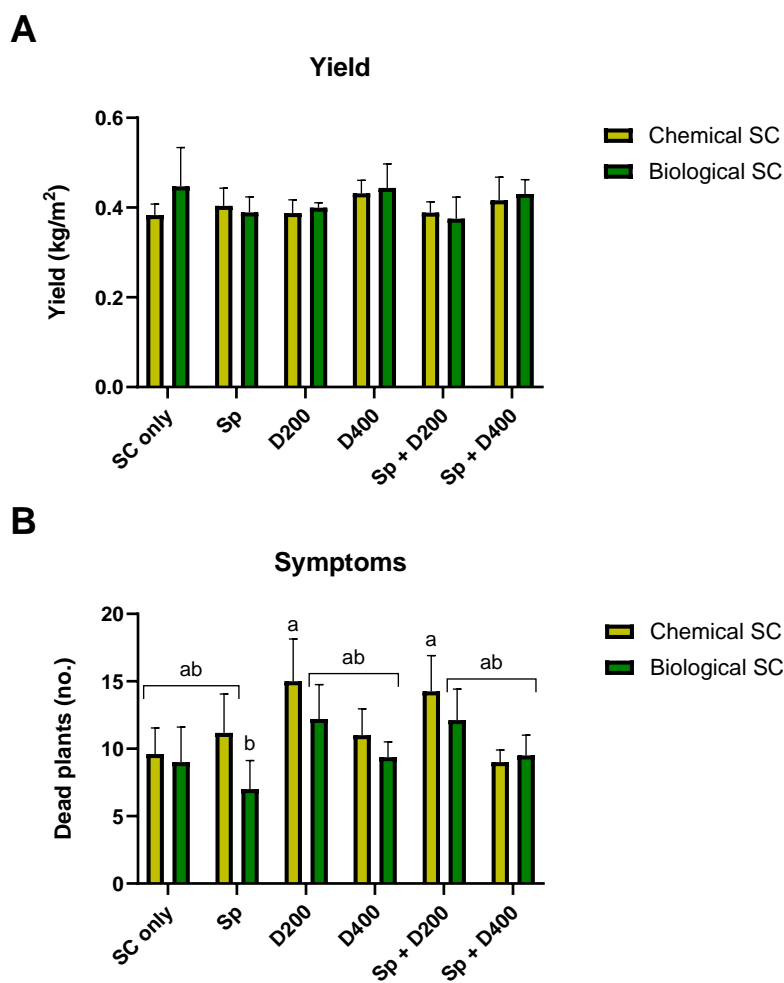
5.2. הדברה כימית וביולוגית לאורך עונת גידול מלאה בשדה (גד"ש חולדה).

פוטנציאל ההדברה הביולוגית של השילוב בין מיני הטריכודרמה שנבחרו לבין קוטל הפטריות Azoxystrobin כנגד פטריית הפתוגן *M. phaseolina* נבדק בניסוי לבחינת יעילותם בשדה חקלאי. בשלב הגידול הראשוני (עד 74 ימים) הצמחים גדלו בצורה נורמלית וכצפוי, לא הראו סימני מחלה (איור 5 – A,B,C). בשלב הגידול המאוחר לעומת זאת (לאחר 74 ימים), הצמחים החלו להראות סימני מחלה חמורים (איור 5 – D,E,F)



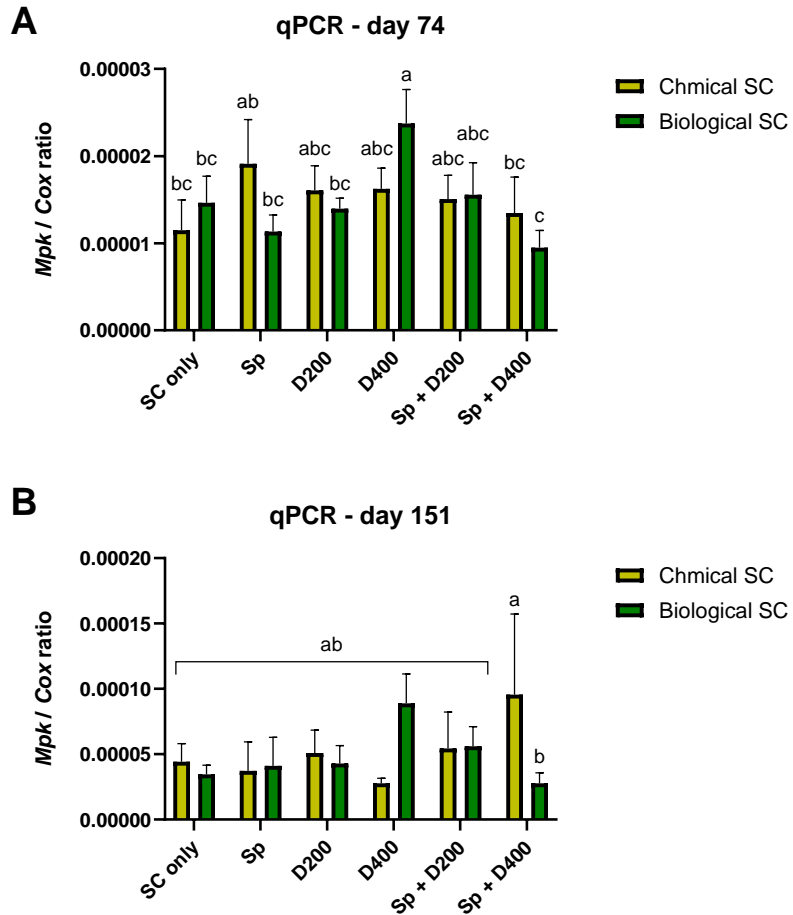
איור 5 - צמחי כותנה מניסוי השטח בשלבי גידול שונים. **A, B, C** - צמחים בשלב הגידול הראשוני (עד 74 ימים). **D** - חתך אורך של ענף בריא (תמונה עליונה) ושל ענף חולה (תמונה תחתונה). **E** - סימפטומים של כמישת צמח כתוצאה מנגיעות במחלה. **F** - חתך רוחב של ענף חולה.

הערכת היבול הושפעה ממספר החזרות הקטן (3-4 חזרות לטיפול) שנגרמה עקב חלקות בשולי השדה שקיבלו השקיה לא מלאה, וסבלו מבעיות עשבייה ואחרות. מספר החזרות הנמוך מנע אפשרות לקבל מובהקות סטטיסטית. בגרף A באיור מס' 6 ניתן לראות השוואה כמותית של היבול בין כל סוגי הטיפולים שניתנו, ניתן לראות כי עיטוי ביולוגי (SC only) או שילוב בין העיטוי הביולוגי ל- Azoxystrobin בהגמעה (D400) העלו את כמות היבולים (17% ו-16% בהתאמה) לעומת צמחים שקיבלו עיטוי זרעים כימי בלבד (ללא מובהקות סטטיסטית). בגרף B באיור 6 ניתן לראות את תסמיני המחלה בהשפעת הטיפולים השונים ביום 151 לגידול. ניתן לראות כי במרבית הטיפולים, הצמחים שקיבלו עיטוי ביולוגי היו בריאים יותר בהשוואה לאלו שקיבלו עיטוי כימי. זילוף Azoxystrobin (Sp) היה יעיל כתוספת לעיטוי הביולוגי והניב שיפור של 27% בכמות הצמחים הבריאים. הגמעה במינון גבוה (D400) גרמה לירידה בסימפטומים ועלייה ביבול לעומת הגמעה במינון נמוך (D200, ללא מובהקות).



איור 6 – הערכת מחלה (A- 210 ימים לאחר הזריעה) והערכת רמת תסמינים (B – 151 ימים לאחר הזריעה). נעשתה השוואה בין עיטוי זרעים כימי (עמודות צהובות) לבין עיטוי זרעים ביולוגי (עמודות ירוקות) בטיפולים השונים. SC only – עיטוי זרעים בלבד, Sp – זילוף Azoxystrobin בתוספת לעיטוי הזרעים, D200/D400 – הגמעת Azoxystrobin במינון נמוך/גבוה בתוספת לעיטוי הזרעים, Sp+D200/D400 – שילוב של זילוף והגמעה במינון גבוה או נמוך של Azoxystrobin בתוספת לעיטוי הזרעים. בכל קבוצת ניסוי בוצעו 3-6 חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-b) מייצגות הבדל מובהק סטטיסטית (בגרף A לא היו הבדלים מובהקים).

באיור מס' 7 מוצגת כמות ה-DNA היחסית של *M. phaseolina* כתלות בסוג הטיפול ובסוג עיטוי הזרעים. גרף A מראה תוצאות לאחר 74 ימי גידול וגרף B מראה תוצאות לאחר 151 ימי גידול. ניתן לראות שלאחר 74 ימים רמת הפתוגן הממוצעת נמוכה יותר (בערך פי 2-4). כמות ה-DNA של הפתוגן הנמוכה ביותר שנמדדה ביום ה-74 התקבלה בצמחים שקיבלו עיטוי זרעים ביולוגי יחד עם תוספת זילוף והגמעה של Azoxystrobin (Sp+D400). לעומת זאת, בעיטוי ביולוגי והגמעת Azoxystrobin בכמות גבוהה ללא זילוף (D400) נמדדה רמת הנגיעות הגבוהה ביותר. גם ביום ה-151 רמת הנגיעות הנמוכה ביותר התקבלה בצמחים אשר קיבלו עיטוי זרעים ביולוגי יחד עם תוספת זילוף והגמעה של Azoxystrobin (Sp+D400). לרמת נגיעות דומה הגיעו הצמחים אשר קיבלו עיטוי זרעים כימי בתוספת הגמעה במינון גבוה (D400). רמת DNA הפתוגן הגבוהה ביותר ביום 151 הייתה של הצמחים אשר קיבלו עיטוי זרעים כימי יחד עם תוספת זילוף והגמעה של Azoxystrobin (Sp+D400).



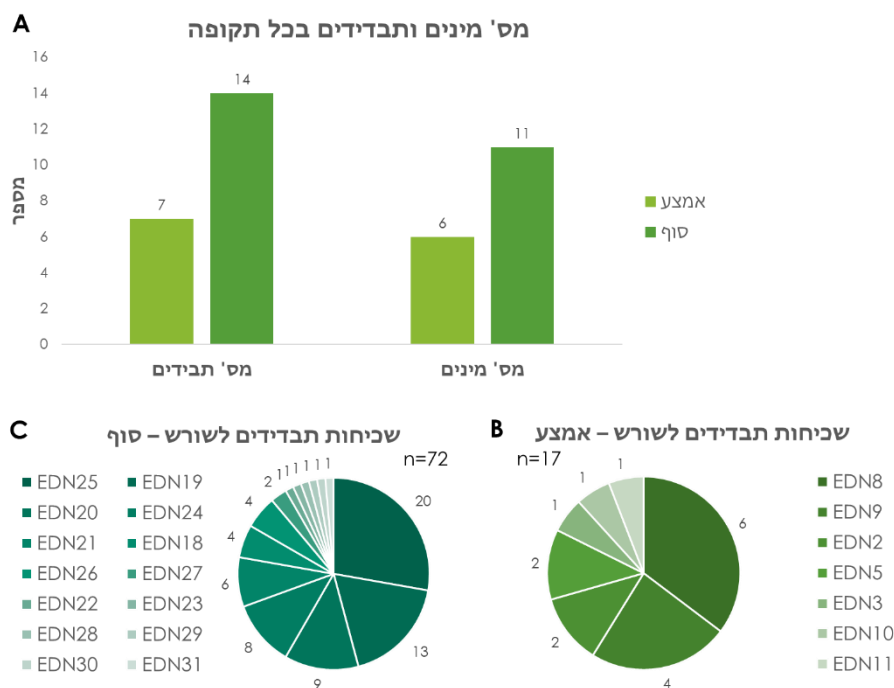
איור 7 – כמות יחסית של DNA של *M. phaseolina* ביום 74 ו-151 לזריעה. מדגימות שורשים מצמחים בחלקות הניסוי שעברו טיפולים שונים הופק DNA והמקטע הייחודי לפתוגן הוגבר ב- qPCR והשווה אל מול גן מנרמל הקיים בצמח הכותנה (COX). SC only – עיטוי זרעים בלבד, Sp – זילוף Azoxystrobin בתוספת לעיטוי הזרעים, D200/D400 – הגמעת Azoxystrobin במינון נמוך/גבוה בתוספת לעיטוי הזרעים, Sp+D200/D400 – שילוב של זילוף והגמעה במינון גבוה או נמוך של Azoxystrobin בתוספת לעיטוי הזרעים. בכל קבוצת ניסוי בוצעו 3-6 חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן. אותיות שונות (a-c) מייצגות הבדל מובהק סטטיסטית.

ניתוח המתייחס להערכת תסמינים בניסוי השטח (איור 6B) ומביא בחשבון את כל הטיפולים יחד בכל קבוצה, חשף יתרון משמעותי ($p = 0.043$ מבחן t מזווג) מבחינת בריאות הצמחים להדברה המשולבת הביולוגית-כימית על פני ההדברה הכימית המסורתית (עיטוי זרעים כימי וישום אזוקסיסטרובין על ידי זילוף עם זריעה ו/או השקיה במהלך העונה). כמו כן, נמצאה קורלציה שלילית משמעותית ($p = 0.0016$) בין מספר הצמחים החולים לבין היבול. לבסוף, זוהתה קורלציה חיובית חזקה ($p = 0.0002$) בסוף העונה בין ה-DNA של *M. phaseolina* בשורשי הצמחים לבין מספר הצמחים החולים.

5.3. איתור אנדופיטים בשורשי הכותנה.

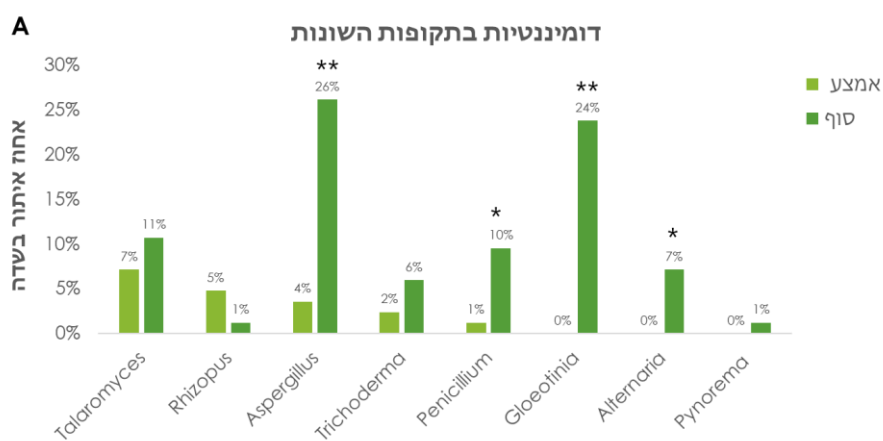
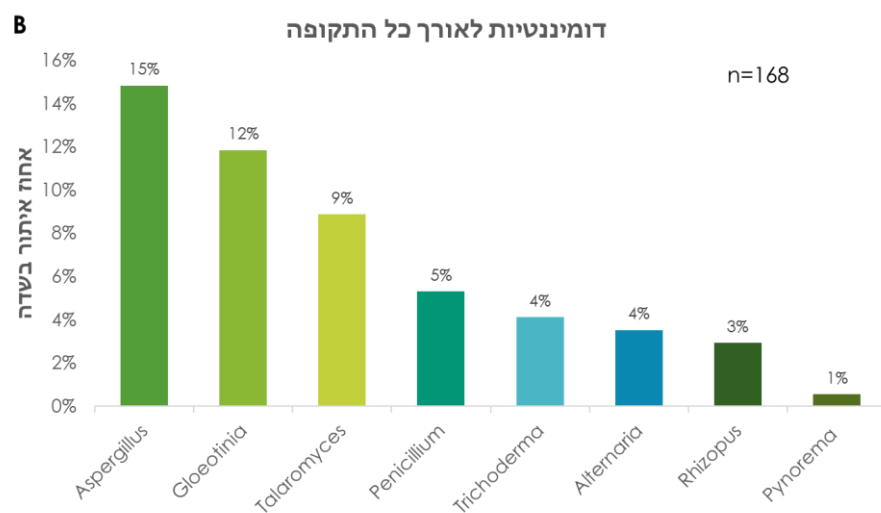
במחקר נבדקו 168 שורשים לאורך כל תקופת הגידול, 84 בכל מועד דיגום. משורשים אלו בודדו 91 תבדידים. אלו חולקו לקבוצות בעלות מאפייני מושבה דומים ונציג מכל קבוצה זוהה באמצעו קביעת רצף של הגן universal internal transcribed spacer (ITS). זהו 21 תבדידים המחולקים ל-8 סוגים (genus) של

פטריות ובהם 12 מינים. הגרפים הבאים (איור 8) מציגים את מס' מיני הפטריות ומספר התבדידים שבודדו בכל תקופת צמיחה. בודדו גם חיידקים אך אלו לא מוצגים בעבודה זו. ניתן לראות שבכל תקופה (דיגום האמצע ביום 74 ודיגום סוף ביום 151) לחוד מס' התבדידים כמעט זהה למס' המינים (איור 8A). הדבר מלמד כי שיטת המיון – הבחירה בתבדיד מייצג על סמך מורפולוגית המושבות הייתה מוצלחת וכי רק במעט מקרים מושבות שנחשבו למין שונה היו למעשה אותו המין. בסוף העונה, אוכלוסיית הפטריות בשורשים הייתה כמעט פי שניים גדולה יותר ביחס לאמצע העונה. כשבדקנו את השכיחות של כל תבדיד בשורשי הכותנה (כמות הפעמים שאותר בשורשים, איור 8A, 8B), ניתן לראות עלייה משמעותית בכמות התבדידים (וגם במגוון שלהם) בשורשים בסוף העונה ביחס לאמצע.



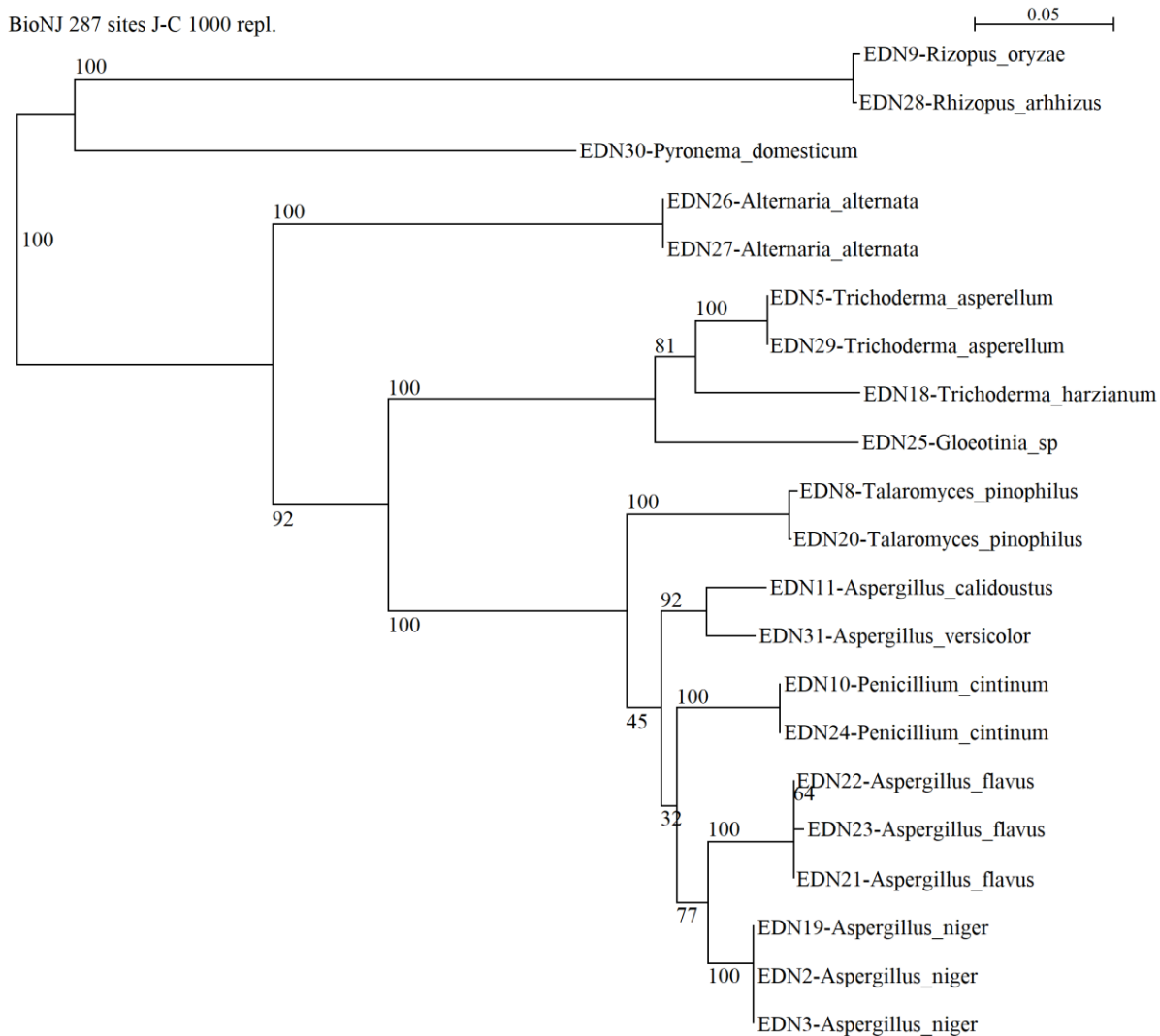
איור 8 – כמות המינים וכמות התבדידים שזהו בשורשי כותנה באמצע העונה (יום 74) ובסופה (יום 151) (A). בתרשימים התחתונים מוצגת שכיחות התבדידים. כל תבדיד שזוהה מייצג קבוצת תבדידים בעלי מאפייני מושבה (צבע וצורה דומים) והתרשימים מראים כמה פעמים כל תבדיד אותר בשורשים. באמצע העונה (B) בודדו 17 תבדידים המחולקים ל- 7 קבוצות שנציג שלהן זוהה ואילו בסוף העונה (C) בודדו 72 תבדידים המייצגים 14 קבוצות (בעלות מאפיינים דומים) שנציג שלהן זוהה.

הדומיננטיות הכללית (שכיחות גילוי בשורשים) של כל סוג פטרייה לאורך תקופת הצמיחה כולה מוצגת באיור 9A. אפשר לראות כי פטריות משלושה סוגים (genus), *Talaromyces*, *Aspergillus* ו-*Gloeotinia*, בולטות בתדירות האיתור ומהוות מעל ל- 30% מהתבדידים. באמצע תקופת הגידול זהו 5 סוגי פטריות שאותרו גם בסופה. יחד עם זאת לקראת הקציר אותרו 3 סוגי פטריות חדשים. זאת ועוד, המגמה הכללית שנמצאה היא עלייה בשכיחות של רוב סוגי הפטריות לקראת סוף עונת הגידול עם מובהקות סטטיסטית משמעותית (איור 9B). בולטות הן *Aspergillus* ו-*Gloeotinia*. שרשמו עליה משמעותית בתדירות האיתור לקראת הקציר. רק במעט מקרים היו פטריות ששכיחות האיתור שלהן כמעט ולא השתנתה בין שני מועדי הדיגום, כמו ה-*Talaromyces*.



איור 9 – תדירות האיתור הכללית של סוגי הפטריות (A) וההבדלים בתירות זו בין אמצע העונה (יום 74) וסופה (יום 151, B).

אנליזה פילוגנטית של כל 21 התבדידים מחזקת את זהותם. ניתן לזהות בעץ הפילוגנטי קבוצת מינים בעלי פוטנציאל הדברה, הכוללת את הטריכודרמה - אנדופיט המיושם בהדברה ביולוגית ונבדקת יעילותו כנגד המקרופומינה (סביר כי מדובר בתבדיד הטריכודרמה ששימש לעיטוי הזרעים), ואת הגלואאוטיניה הקרובה גנטית לטריכודרמה שעשויה להיות גם היא פטרייה פוטנציאלית לשימוש בהדברה ביולוגית. בעץ ניתן גם לראות את כמות התבדידים הרבה המשויכת לסוג אספרגילוס ומגוון המינים בסוג פטרייה זה, המדגיש את התפוצה שלו בשדה - כמעט 40 אחוז מכלל הפטריות שנמצאו.



איור 10 – אנליזה פילוגנטית של כל 21 התבדדים שאותרו בעבודה זו. האנליזה בוצעה באמצעות התוכנה SeaView גרסה 5.05 (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>) תוך שימוש בשיטה המבוססת על רמת ה-DNA הפרסימונית (dnajpars) עם הגדרות ברירת המחדל ו- bootstrap עם 1000 חזרות. הסולם מתאר את אחוזי הדמיון הגנטי בין רצפים. המספר מעל כל ענף מציין כמה פעמים מתוך 100, נצפה אותו ענף כשחזרו על האנליזה. בדרך כלל, ערך bootstrap מעל 70 נחשב לציון סביר לאימות נכונותו של הענף.

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 מדבירים ביולוגיים וכימיים בחדר גידול 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. בניסוי בחדר הגידול, השוואת טיפולי העיטוי הביולוגי לעומת הטיפולים הכימיים המקבילים הניבה לרוב תוצאות דומות בשני תאריכי הדגימה. ביום 52, העיטוי הביולוגי או הכימי לבד (SC only) ובמשולב עם זילוף Azoxystrobin בזריעה (Sp), הניבו עלייה של עד 38% ו-45% במשקל השורש והנוף (בהשוואה לצמחים לא נגועים). עיטוי זרעים ביולוגי או כימי בשילוב הגמעה של הפונגיציד

במינון נמוך (D200) דיכאו את רמות הפתוגן בשורשים בשיעור של עד 78%. לעומת זאת, השפעות שליליות נצפו בהתפתחות הצמחים כאשר ייושמו טיפולים כימיים מלאים, המבוססים על עיטוי זרעים ולאחריו זילוף והגמעה.

בשדה, הגישה המשולבת לא הראתה ביצועים שונים מהגישה הכימית, בהתחשב בתסמיני הצמחים ונגיעות השורשים. חלק מהטיפולים המשולבים נראו מבטיחים בהפחתת תסמיני המחלה, כמו עיטוי ביולוגי בשילוב עם זילוף Azoxystrobin בזריעה. יתרון משמעותי לבריאות הצמחים בשדה נמצא להדברה המשולבת הביולוגית-כימית לעומת ההתערבות הכימית (בהתחשב בכל הטיפולים בכל קטגוריה יחד). לגבי היבול, לא נמדדו הבדלים מובהקים סטטיסטית בין הטיפולים הביולוגיים והכימיים, תוצאה המצביעה על כך שעיטוי זרעים עם Trichoderma בלבד מקנה הגנה מספקת לשמירה על היבול ושליטה במחלה. עם זאת, יש לאמת מסקנה זו על ידי חזרה על הניסוי בשדה.

הניסוי בשנה זאת הוכיח שוב שכדי לנסות להוכיח שוב את היכולת של טיפולים שונים להתמודדות עם המחלה, יש לבצע ניסוי בחלקות גדולות. הניסוי בחלקה בחולדה, כפי שבוצע בחלקות קטנות עם חזרות שהצריכו 4 מעברים בכל פס נסיעה של הטרקטור, בתנאי הקרקע של חולדה גרמו להידוק רב, למעבר לא מדויק בצמוד לשורות שכבר נזרעו, ובכך פגעו בחלק מהחלקות בנביטה, הצצה, בעומד הסופי וגם בהתפתחות הצמחים. מעברים אלו גם פגמו באיכות הקילטור ומכאן גם בהתמודדות עם העשבייה בחלקה. יש לציין שתנאי הגידול הקשים האלו ייתכן וחשפו את הצמחים לפגיעה של המחלה יותר בהשוואה לחלקה המסחרית בה בוצע הניסוי.

ממצאי המחקר מציעים שיטה ידיונית לסביבה לשליטה ב- *M. phaseolina* בשדות כותנה. התערבות משולבת ביולוגית וכימית להגנה על גידולי כותנה מ-CRD נחשבת ידיונית לסביבה שכן היא יכול להפחית משמעותית את השימוש בקוטלי פטריות כימיים תוך חיזוק וייצוב יכולתם של המדבירים 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.

המחקר הראשוני שבוצע כאן בהבנת המיקרוביום של שורשי כותנה תחת השפעת מחלת ריקבון הפחם וטיפולים מונעים, מעודד מחקר המשך ללימוד יחסי הגומלין של התבדילים עם *M. phaseolina*. במחקרים דומים זוהו יחסי דיכוי הדדי המפחיתים את חומרת המחלה, לצד יחסים סינרגיסטים המגבירים אותה. כל אלו יכולים להוות מקור מידע חשוב להתאמת שיטות הדברה כנגד המחלה.

8. תודות

לחברת נטפים, לגיא רשף וצוות ההקמה שאפשרו את ביצוע הניסוי.
לדודי ואורי אבנן ולצוות גד"ש שדות חמ"ד על הסיוע ושיתוף הפעולה.
למועצת הכותנה על מימון הניסוי.
לגד"ש צב"ר קמ"ה על ההירתמות לקטיף.

9. רשימת ספרות

1. Cohen, R. In *Macrophomina phaseolina, a multi-host soil fungus: On similarities and differences in the interactions with Cucurbitaceae and Gossypium hirsutum (cotton)*

- plants*, The 5th conference of the Israel society of crop and vegetable sciences, Ministry of Agriculture and Rural Development, Beit-Dagan, Israel, 5-6 March 2018, 2018; Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, Rehovot, the Hebrew University of Jerusalem Ministry of Agriculture and Rural Development, Beit-Dagan, Israel.
- .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.; 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.
 - .11 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.
 - .12 Gal-Hemed, I.; Atanasova, L.; Komon-Zelazowska, M.; Druzhinina, I.S.; Viterbo, A.; Yarden, O., Marine isolates of *Trichoderma* spp. As potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and environmental microbiology* **20**.5100-5109 ,77 ,11

- .13 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.
- .14 Degani, O.; Dor, S.; Movshovitz, D.; Rabinovitz, O., Methods for studying *Magnaportheopsis maydis*, the maize late wilt causal agent. *Agronomy* **2019**, *9*, 181.
- .15 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.
- .16 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.
- .17 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.
- .18 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.
- .19 Kumar, K.K.; Sridhar, J.; Murali-Baskaran, R.K.; Senthil-Nathan, S.; Kaushal, P.; Dara, S.K.; Arthurs, S., Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects. *Journal of Invertebrate Pathology* **2019**, *165*, 74-81.