

מחלת פנמה בבננה: ייבוא, ופיתוח באמצעות עריכה גנומית, של זנים עמידים, ופיתוח פרוטוקולים לזיהוי, חיטוי ודיכוי גורם המחלה (פוזריום גזע TR4).

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י:

נבות גלפז (מו"פ צפון), **עמית גל-און** (מנהל המחקר החקלאי), **סטנלי פרימן** (מנהל המחקר החקלאי), **אברהם גמליאל** (מנהל המחקר החקלאי), **דרור מינץ** (מנהל המחקר החקלאי), **אסף אהרוני** (מכון וויצמן למדע), **אבי לוי** (מכון וויצמן למדע), **עמר פרנקל** (מנהל המחקר החקלאי), **יעל מלר הראל** (השרותים להגנת הצומח).

חוקרים נוספים המעורבים במחקר:

עדי פייגנבאום (מנהל המחקר החקלאי), **נעה סלע** (מנהל המחקר החקלאי), **יאיר ישראלי** (צמח ניסיונות), **יובל לוי** (שה"מ), **גל אור** (שה"מ), **שרה סלומון** (צמח תרבויות רקמה), **חיה פרידמן** (מנהל המחקר החקלאי), **נורית קציר** (מנהל המחקר החקלאי).

חתימת ופרטי החוקר הראשי:

נבות גלפז, מו"פ צפון וצמח ניסיונות, navot.galpaz@mail.huji.ac.il

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים. הממצאים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

תוכן העניינים**עמוד**

2.....	שמות התכניות, החוקרים המעורבים, ותחומי אחריותם
3	תקציר מנהלים
7	מבוא – רקע מדעי ומטרות המחקר
	פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות לתקופת הדו"ח
	<u>תכנית 1:</u> איתור גנים המעורבים בהקניית רגישות ועמידות ל-TR4, לצורך בניית תשתית גנטית
10.....	לפיתוח זנים מקומיים עמידים לגורם המחלה
	<u>תכנית 2:</u> ייבוא ובחינה בתנאי הארץ של מיני בר ושל זנים עמידים ל-TR4 בעלי
14.....	פוטנציאל מסחרי: עמידות וביצועים חקלאיים
19.....	<u>תכנית 3:</u> פיתוח עמידות ל-TR4 באמצעות עריכה גנומית
34.....	<u>תכנית 4:</u> אבחון, זיהוי ואפידמיולוגיה של גורם המחלה
43.....	<u>תכנית 5:</u> דיכוי ובקרה ביוטית ואביוטית של גורם המחלה
52.....	<u>תכנית 6:</u> גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות פוזריום בבנות
	<u>תכנית 7:</u> אנליזה מטבולומית רחבת היקף של תפליטים (exudates) של שורשי זני בונה,
59.....	עמידים ורגישים, נגועים ב-TR4
64	<u>תכנית 8:</u> פיתוח פרוטוקולים לגידול בונה במצע מנותק

שמות התכניות, החוקרים המעורבים, ותחומי אחריותם

תכנית #1: איתור גנים המעורבים בהקניית רגישות ועמידות ל-TR4, לצורך בניית תשתית גנטית לפיתוח זנים מקומיים עמידים לגורם המחלה. צוות המחקר: ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, ייבוא וריבוי זני בננה, אנליזות ביטוי ורצף), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, מבחני עמידות לגורם המחלה), ד"ר עדי פייגנבאום (מנהל המחקר החקלאי, אנליזה ביואינפורמטית), ד"ר נעה סלע (מנהל המחקר החקלאי, אנליזה ביואינפורמטית), פרופ' רוברט פלור (מכון וויצמן למדע, ייעוץ בנושא אינטראקציות פתוגן-צמח), ד"ר יאיר ישראלי (צמח ניסיונות, ייעוץ בנושא זני בננה), יובל לוי (ממ"ר בננות, שה"מ, ייעוץ בנושא גידול הבננה).

תכנית #2: ייבוא ובחינה בתנאי הארץ של מיני בר ושל זנים עמידים ל-TR4 בעלי פוטנציאל

מסחרי: עמידות וביצועים חקלאיים. צוות המחקר: ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, יבוא זני בננה, מבחני שדה), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, מבחני עמידות לגורם המחלה), ד"ר יאיר ישראלי (צמח ניסיונות, ייעוץ בנושא זני בננה ומבחני שדה), יובל לוי (שה"מ, ייעוץ בנושא גידול הבננה).

תכנית #3: פיתוח עמידות ל-TR4 באמצעות עריכה גנומית. צוות המחקר: ד"ר עמית גלאון (מנהל המחקר החקלאי, עריכה גנומית), פרופ' אבי לוי (מכון וויצמן למדע, עריכה גנומית), שרה סלומון (צמח תרבויות רקמה, פיתוח תרבויות תאים עובריות), ד"ר חיה פרידמן (מנהל המחקר החקלאי, ייעוץ פיתוח תרבויות תאים עובריות).

תכנית #4: אבחון, זיהוי ואפידמיולוגיה של גורם המחלה. צוות המחקר: ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, אפידמיולוגיה, זיהוי גורם המחלה בצמח), ד"ר דרור מינץ (מנהל המחקר החקלאי, זיהוי גורם המחלה בקרקע), ד"ר יעל מלר-הראל (השירותים להגנת הצומח, זיהוי גורם המחלה בקרקע).

תכנית #5: דיכוי ובקרה ביוטית ואביוטית של גורם המחלה. צוות המחקר: ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, דיכוי בעזרת מיקוריזה), ד"ר דרור מינץ (מנהל המחקר החקלאי, דיכוי בעזרת חיידקים), ד"ר עמר פרנקל (מנהל המחקר החקלאי, דיכוי בעזרת ביופחם), ד"ר אלן גרבר (מנהל המחקר החקלאי, ייעוץ בנושא ביופחם), ד"ר יגאל אלעד (מנהל המחקר החקלאי, ייעוץ בנושא ביופחם).

תכנית #6: גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות פוזריום בבננות. צוות המחקר: פרופ' אברהם גמליאל (מנהל המחקר החקלאי, בקרה משולבת של גורם המחלה, חומרי חיטוי), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, הדבקות בגורם המחלה).

תכנית #7: אנליזה מטבולומית רחבת היקף של תפליטים (exudates) של שורשי זני בננה, עמידים ורגישים, נגועים ב-TR4. צוות המחקר: פרופ' אסף אהרוני (מכון וויצמן למדע, אנליזה מטבולית של הפרשת קרקע), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, הדבקות והנבטה, של גורם המחלה), ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, זני בננה רגישים ועמידים לגורם המחלה).

תכנית #8: פיתוח פרוטוקולים לגידול בננה במצע מנותק. צוות המחקר: ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, ניהול מחקרי השדה), ד"ר יאיר ישראלי (צמח ניסיונות, ייעוץ בנושא גידול הבננה), יובל לוי (שה"מ, ייעוץ בנושא גידול הבננה).

תקציר מנהלים

ענף הבננות בישראל הוא ענף יציב ורווחי. הוא הגדול מבין בענפי המטע בישראל, ברמת היצרנות, עם 150-170 אלף טון פרי לשנה. בהתאם, ענף הבננה מספק עבודה באופן ישיר לכ-2,000 עובדים, ומספר דומה באופן עקיף. מחלת פנמה בבננה נגרמת ע"י הפטרייה שוכנת הקרקע *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. ב-1989 התגלה גזע חדש וקטלני של מחלת פנמה, (TR4) Tropical Race 4 באינדונזיה ומלזיה. הפטרייה התפשטה תוך שנים ספורות למדינות שונות בדרום מזרח אסיה (טאיוואן, פקיסטן, סין, פיליפינים, הודו, מיאנמר, ועוד), אוסטרליה, אפריקה (מוזמביק) והמזרח התיכון (ירדן, לבנון, עומן), והביאה להשמדתם של מטעים בהיקף עצום ברחבי העולם. ב-2016 התגלו בארץ שלושה מטעים נגועים במחלת פנמה, ונכון לדצמבר 2018 המחלה נמצאת במגמת התפשטות. עד היום טרם נמצא טיפול כימי/פיזיקלי/ביולוגי להדברת הפטרייה ו/או הנבגים בקרקע, ולא קיימים זנים מסחריים, בעלי עמידות מלאה לגורם המחלה. כך שמחלת פנמה מהווה איום קיומי על ענף הבננה בישראל.

בנובמבר 2017 החל מיזם בנושא מחלת פנמה בבננה. במסגרת המיזם מבוצעות שמונה תכניות מחקר, ע"י שמונה קבוצות מחקר שונות, בעלות מומחיות במגוון רחב של תחומים: מחקר וגידול צמח הבננה, תרבות רקמה, מחלות צמחים בכלל ופוזריום בפרט, חיטוי וטיוב קרקע, עריכה גנומית, ביולוגיה מולקולרית, ומטבולומיקה ואנליזה אנליטית של הפרשות שורש. המיזם מופעל כמחקר אינטגרטיבי: בכל תכנית מעורבות לפחות שתי קבוצות מחקר, מתקיימות פגישות תכופות לסיעור מוחות, ומתבצע שיתוף של פרוטוקולים ואמצעים הדרושים למחקר, להשגת סינרגיזם ותוצאה מיטבית.

מטרת המיזם היא רכישת ידע בסיסי, ופיתוח פרוטוקולים ותוצרים לטווח הקצר והבינוני, שיאפשרו למגדלי הבננות בארץ להמשיך לקיים את הענף ברווחיות טובה, גם בנוכחות מחלת פנמה. המיזם מתרכז בארבעה תחומים מרכזיים הקשורים בהתמודדות עם מחלת פנמה, בהם קיימים פערי ידע: (1) בחינה ופיתוח של זנים עמידים למחלה, (2) זיהוי, אבחון, ואפידמיולוגיה של TR4, (3) חיטוי, ובחינה ופיתוח של תנאים סופרסיביים (ביוטים וא-ביוטים) למחולל המחלה (4-ו) גידול במצע מנותק.

להלן תמצית התוצאות שהושגו בשנה ב' של המיזם:

ענף הבננה בישראל הוא ענף יציב ורווחי, והגדול בענפי המטע בישראל ברמת התוצרת. מחלת פנמה בבננה נגרמת ע"י הפטרייה שוכנת הקרקע *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. ב-1989 התגלה גזע חדש וקטלני של מחלת פנמה (TR4) באינדונזיה ומלזיה, ומשם התפשט למדינות שונות באסיה, אוסטרליה, אפריקה והמזרח (ירדן, לבנון, עומן), וגרם להשמדתם של מטעים בהיקף עצום. ב-2016 התגלו בארץ שלושה מטעים נגועים במחלת פנמה, והיא נמצאת במגמת התפשטות. עד היום טרם נמצא טיפול כימי/פיזיקלי/ביולוגי להדברת הפטרייה ו/או הנבגים בקרקע, ולא קיימים זנים מסחריים, בעלי עמידות מלאה ל-TR4, כך שמחלת פנמה מהווה איום קיומי על ענף הבננה בישראל. במסגרת המיזם הנוכחי מבוצעות שמונה תכניות מחקר, ע"י צוות מחקר אינטרדיסציפלינרי ואינטגרטיבי, בעל מומחיות במחקר וגידול בבננה, תרבות רקמה, מחלות צמחים בכלל ופוזריום בפרט, חיטוי גורמי מחלות, עריכה גנומית, ביולוגיה מולקולרית, ומטבולומיקה.

מטרת המיזם היא רכישת ידע, ופיתוח פרוטוקולים ותוצרים לטווח הקצר והבינוני, שיאפשרו את המשך קיום ענף הבננה בישראל ברווחיות טובה בנוכחות מחולל מחלת פנמה. המיזם מחולק לארבעה חלקים הקשורים בהתמודדות עם מחלת פנמה: (1) בחינה ופיתוח של זנים עמידים ל-TR4, (2) זיהוי, אבחון, ואפידמיולוגיה של TR4, (3) חיטוי, ופיתוח של תנאים סופרסיביים ל-TR4 (4-ו) גידול במצע מנותק. תמצית התוצאות שהושגו בשנה הראשונה למיזם:

חלק 1) בחינה ופיתוח של זנים עמידים ל-TR4:

(א) בחינה של זנים עמידים מהעולם: שלושה קלונים טיוואנים עמידים חלקית לגורם מחלת פנמה, שכרגע מהווים את הפתרון הגנטי היחיד למחלה, נבחנו בחלקות תצפית בעמק הירדן ובגליל המערבי. הקלונים 105 ו-119 אינם מתאימים לתנאי הארץ, עקב גובהם הרב ואשכול ופרי קטנים. לאחר שלוש שנות קטיפה (יבול ג') בחלקה בעמק הירדן, קלון 218 מסתמן כזן בעל פוטנציאל חקלאי טוב: הוא אמנם גבוה, אולם משקל האשכול ואיכות הפרי טובים, ודומים לאלה של הזן המשקי, גרנד ניין.

בתחילת שנה ב' התחלנו בתהליך של ברירה של צמחים מצטיינים, לצורך פיתוח קלונים מקומיים מצטיינים של קלון 218. הקריטריונים לסלקציה היו גובה מתון, פריחה מוקדמת יחסית, ואשכול כבד. 12 צמחים נבחרו, רובו במעבדת תרבות רקמה, ונשתלו לצורך מבחן קלונלי: באוגוסט 2019 נשתלו 4 חלקות מבחן, וחלקת מבחן נוספת תישתל באפריל 2020.

קלון נוסף, 247, נשתל באיחור של שנה ביחס לקלונים האחרים. נתוני יבול א' של קלון זה הפתיעו לטובה, עם תוספת למשקל האשכול של 3.3 ק"ג ביחס לזן המשקי, גרנד-ניין. קלון זה נשתל בחלקות מסחריות שונות להערכת ביצועיו בתנאים שונים, ותהליך של סלקציות, בדומה לזה שמתקיים בקלון 218, יתבצע בשנה ג'.

(ב) פיתוח זנים עמידים באמצעות עריכה גנומית בבננה: פותחו תרחיפי תאים ממקור של תפרחות זכריות. בשבועות הקרובים נודא, באמצעות רגנרציה, שתרחיפי התאים מכילים תאים עובריים, שימשו בשנה ב' לטרנספורמציה ולעריכה הגנומית של גנים נבחרים. נבנו תבניות גניות בינאריות של Cas9/Cpf1 מותאמות לבננה ולבחינת היתכנות עם גן מדווח. נבנו תבניות גניות בינאריות להשתקת הגן PDS ולביטוי PX11 ו-RFP. החלו ניסויים ראשוניים לטרנספורמציה של בננה. פותחה מערכת של השריית שורשים בבננה באמצעות *Agrobacterium rhizogenes* (AR). נבחנה טרנספורמציה עם 5 גזעים של A.R, והתקבלה השריה של שורשים (hairy roots). עד כה טרם הצלחנו לקבל שורשים מותמרים.

(ג) איתור גנים מועמדים, שיהוו מטרה לעריכה גנומית: בשנה א' 4 זנים שנמצאו כעמידים במיוחד, ו-3 שנמצאו כרגישים במיוחד, אולחו ב-TR4, ושורשיהם נדגמו ב-3 נקודות זמן, לצורך אנליזת ביטוי ורצף.

נמצא מספר רב של גנים בעלי רמת ביטוי דיפרנציאלית בין הזנים העמידים לזנים הרגישים. נמצא ייצוג ייתר לקבוצת הגנים המעורבים בקביעת דופן התא, בעיקר ליגנין, תוצאה המרמזת לכך שמניעת חדירה, או מעבר של הפטריה מתא לתא, הוא רכיב מרכזי בעמידות לגורם המחלה של הזנים העמידים.

באנליזת הרצף המקודד נמצאו 1982 פולימורפיזמים הומוזיגוטים, ב-988 גנים, המשותפים לכל 4 הזנים העמידים, ושונים מ-3 הזנים הרגישים, ונמצא ייצוג גבוה של רצפטורים וגני RGA-גנים שמעורבים במנגנוני הגנה בפני פתוגנים. רשימה קצרה של 9 הגנים המועמדים המבטיחים ביותר להקניית עמידות לגורם מחלת פנמה תועבר בינואר 2020 לאנשי העריכה הגנומית, לצורך פיתוח זנים מקומיים עמידים למחלת פנמה.

סקר ספרותי העלה שגנים אלה, רובם ככולם, נמצאו בעבר כמעורבים בהקניית עמידות לפתוגנים בכלל, ולפטריות בפרט, במיני צמחים שונים, ממצא שמחזק את הרלוונטיות שלהם לצורך פיתוח זנים עמידים למחלת פנמה.

פותחה שיטה לאיסוף יעיל של חומרים הנמצאים בתפליטי שורש בננה. נעשתה אנליזה מטבולומית של תפליטים שהתקבלו ונמצא כמות ומגוון מבני רב. אנליזה של תפליטי הפרופילים כנגד מאגר מידע פנימי אפשר זיהוי של חומרים משניים שונים. בהמשך הפרויקט נשתמש בתפליטים של שורשי הבננה לזיהוי חומרים הגורמים למשיכת הפטרייה לשורש. מידע זה יוכל לשמש לניטרול משיכת הפטרייה לשורשי הבננה.

חלק 2) זיהוי, אבחון, ואפידמיולוגיה של TR4:

בשנה 2019 המחלה נתגלתה בעוד ארבעה מקומות (דגניה ב', שער הגולן, גשר ובית זרע) ואובחנה בשיטת PCR אמינה. שיטת ווידוא ה-VCG אפשרה להוכיח שאכן האוכלוסייה בארץ קלונאלית בהשוואה לתבדידים אחרים שהתקבלו מחו"ל. מבדידים משתילים שהונחו בתעלות ניקוז לא התגלתה פטריית TR4, תוצאה המרמזת לכך שלא הייתה הפצה במים מחלקות שנבדקו. בעזרת תבדידים מסומנים ב-GFP נמצא שתפטיר הפטרייה חדר למערכת השורשים של הזנים הרגישים והעמידים, אך בזנים העמידים נצפתה רק חיצוני ע"ג השורשים, ללא חדירה לשאר חלקי הצמח. בעשבים רעים שאולחו בפטריית TR4 נמצא שכל השורשים ורוב הגבעולים של עשבי הבר הודבקו ע"י הפתוגן, מקור פוטנציאלי לפיזור המחלה. נמצאו מיני מיקוריזה שמצליחים להפחית באחוזי תמותת שתילים אך אין טיפול שמפחית ב-100% - הנושא חייב בדיקה מעמיקה יותר.

גיבוש פרוטוקול לדיטקציה של TR4 בקרקע נמצא בעיצומו. נבחנו מספר פרוטוקולים להפקת דנ"א של TR4 מהקרקע, ונמצא קיט בעל יעילות גבוהה. נקבע סף רגישות הזיהוי של TR4 של שני זוגות פריימרים.

חלק 3) חיטוי, ובחינה ופיתוח של תנאים סופרסביים ל-TR4.

תכשירים לחיטוי כלים ואמצעי שינוע: מצאנו תכשירים יעילים להשמדת גופי ריבוי של הפטריה. שלושה תכשירים (TOG, בקטרון, ספורקיל) שכולם תכשירים פעילי שטח על בסיס אמוניום רביעוני, נמצאו יעילים בקטילה במשך חשיפה קצר של שניות. תכשירים אלה מתאימים לשימוש מיידי על ידי המגדלים.

בנוסף בנינו מתקן לחיטוי כלי רכב שמבוסס על אגן הטבילה שמשמש לשטיפה ראשונית של הגלגלים ומערכת ריסוס שמבטיחה כיסוי של כל גחון הרכב בריכוז קבוע של תכשיר. ניתן כבר ליישם את המתקן באופן מסחרי.

קטילת שורשים להפחתת הפצה של הפטריה באמצעות חומר צמחי נגוע: קוטלי עשבים מעורבים בנפט קוטלים ביעילות את צמחי הבננות ומאפשרים צמצום של הפצת מחולל המחלה באמצעות חומר צמחי נגוע. התכשיר גרלון יעיל במיוחד בקטילה. בשנה ג' אנו מתמקדים בשילוב התכשיר עם פונגיצידים כדי לקטול את הפטריה ברקמות הצמחים בהם יישמו את קוטל העשבים.

קטילת הפטריה בקרקע באמצעות תכשירי חיטוי: אמצעים לחיטוי קרקע – התכשירים המקובלים לחיטוי קרקע יעילים בקטילת הפטריה כפי שנבדק במערכות מבוקרות. שילוב חיטוי סולרי משפר את הקטילה. גם שילוב של תוספים אורגנים ממקורות שונים עם חימום במשטר חיטוי סולרי תורם לקטילה יעילה של הפטריה.

דיכוי גורם מחלת פנמה בעזרת ביופחם: במהלך שנת המחקר פותחה שיטה יעילה לאילוח הפתוגן דרך הקרקע ולא באמצעות טבילה. במחקר נבדקו שני סוגי ביופחם: ביופחם מענפי אורן (PINE) וביופחם משבבי אקליפטוס (EUC) ובריכוזים שונים של 1% ו-3%. ביופחם EUC 3% הראה הפחתה הדירה ומובהקת סטטיסטית בחומרת המחלה בהשוואה לטיפול ללא ביופחם ונבחר להמשך המחקר בשנה ג

דיכוי גורם מחלת פנמה בעזרת חיידקים מעכבים: בידינו מספר קונסורציה ומדבירים ביולוגים (חיידקים) שמראים עיכוב גידול גורם המחלה בצלחות פטרי וכן בניסוי חממה עם צמחים מאולחים. חלק מהקונסורציה והחיידקים הראו פוטנציאל ביותר מניסוי חממה אחד. יש לחזור מספר פעמים על בדיקת כל אחד מהקונסורציה שהראו פוטנציאל בניסוי חממה כדי לבחור את הטיפולים האופטימאליים. תבדידים מסויימים וגם קונסורציה ספציפיים הראו נזק-דהיינו החמרה בתסמיני המחלה, הגם שכולם הראו דיכוי של הפתוגן במעבדה. המחקר בתבדידים וקונסורציומים אלו יופסק.

חלק 4) גידול במצע מנותק:

נבחנו שני משתנים, במבנה תצפית: 3 מועדי שתילה, ושני מרווחים. סה"כ 6 טיפולים שונים. בכל מועדי השתילה נמצאה הקדמה משמעותית, כ-4 שבועות, במועד הקטיף, ביחס לחלקות מסחריות שנשתלו באותו מועד. נמצאה מגמה, לא מובהקת סטטיסטית, של פגיעה במשקל האשכול, עם הירידה במרווחי השתילה. שתילות אפריל ויוני הניבו, בשני מרווחי השתילה, אשכולות קטנים מאד, נחותים בהשוואה לאשכולות מאותו מועד שתילה בחלקות מטע מסחריות. משקל האשכול במועד שתילת אוגוסט, מועד השתילה העיקרי, טוב, ודומה למשקל האשכול הממוצע בחלקות מטע מסחריות. המוקד בהמשך העבודה יהיה, לפיכך, מועד שתילת אוגוסט.

מבוא – רקע מדעי ומטרות המחקר

מחלת פנמה בבננה (Fusarium Wilt) נגרמת ע"י הפטרייה שוכנת הקרקע *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). הנבגים הנובטים של Foc חודרים למערכת השורשים, הפטרייה מתרבה ומתפתחת בצינורות ההובלה, וחודרת לאברי הצמח השונים, תוך שחרור רעלנים. הבננה הנגועה מייצרת בצינורות ההובלה הנגועים ג'ל צמיג, הסותם אותם. כתוצאה מכך הצמח נובל, מתייבש בהדרגה ולבסוף מת. מחלת פנמה נחשבת "חשוכת מרפא", מכיוון שעד היום טרם נמצא טיפול כימי/פיזיקלי/ביולוגי יעיל להדברת הפטרייה ו/או הנבגים בקרקע, עקב עמידותם הרבה, והעומק הרב בו הם מצויים, והעדרם של זנים עמידים מסחריים. גזע 1 של foc הביא להכחדתו של זן המסחר הקודם, Gros-Michel, שהוחלף ע"י זנים עמידים ממשפחת הקבנדיש בשנות ה-50 של המאה ה-20. ב-1989 התגלה גזע חדש וקטלני של Foc, Tropical Race 4 (TR4), באינדונזיה ומלזיה, התוקף את הזנים ממשפחת הקבנדיש. הפטרייה התפשטה תוך שנים ספורות למדינות שונות בדרום-מזרח אסיה (טאיוואן, פקיסטן, סין, הודו, פיליפינים, לאוס, מיאנמר), אוסטרליה, אפריקה (מוזמביק), והמזרח התיכון (ירדן, לבנון, עומן). ב-2019 דווח לראשונה על הימצאות המחלה באמריקה הלטינית (קולומביה), ובטורקיה. מחלת פנמה התגלתה בארץ בקיץ-סתיו 2016. צמחים נגועים התגלו בחלקה בחוף הכרמל ובשתי חלקות בעמק הירדן. ב-2017 לא התגלו חלקות נוספות עם צמחים נגועים במחולל המחלה, אולם ב-2018 המחלה התפרצה ביתר שאת, והתגלתה ב-5 חלקות השייכות לארבעה משקים שונים בעמק הירדן. ב-2019 תועדה התפשטות של המחלה בכל החלקות הנגועות, ובנוסף, התגלו לראשונה צמחים נגועים בחלקות של שני משקים נוספים, וקיים חשש להתפשטות נרחבת של מחולל המחלה בשנים הקרובות בארץ.

חשש זה מבוסס על העובדות הבאות: (1) כושר ההתפשטות הגבוה של המחלה באמצעות קרקע, מי השקיה ונגר, כלי-עבודה, בגדים ונעליים, וגלגלים מאולחים בפטרייה, (2) העובדה שמטעי הבננות בארץ שתולים באופן כמעט בלעדי בזנים ממשפחת הקבנדיש, הרגישים ל-TR4, ו-3) גורם המחלה נמצא בקרקע במשך תקופה ארוכה לפני איתור הצמחים הסימפטומטיים, עקב הזמן הרב החולף בין אילוח החלקה, לגילוי סימני המחלה בצמחים הנגועים. הסכנה המיידית המרחפת על עתיד ענף הבננות בארץ מחייבת פיתוח מהיר של ידע תשתיתי וכלים מעשיים להתמודדות עם המחלה בתנאים המקומיים.

מטרת המיזם היא רכישת ידע בסיסי, ופיתוח פרוטוקולים ותוצרים לטווח הקצר והבינוני, שיאפשרו למגדלי הבננות בארץ להמשיך לקיים את הענף ברווחיות טובה, גם בנוכחות 'מחלת פנמה'. המיזם מתרכז בארבעה תחומים מרכזיים הקשורים בהתמודדות עם מחלת פנמה, בהם קיימים פערי ידע: (1) בחינה ופיתוח של זנים עמידים למחלה, (2) זיהוי, אבחון, ואפידמיולוגיה של TR4, (3) בחינה ופיתוח של ממשקי חיטוי של וקטורים של מחולל המחלה, ויצירת תנאים סופרסיביים (ביוטים וא-ביוטים) לגורם המחלה, ו-4) גידול במצע מנותק.

1) זנים עמידים: הפתרון המוחלט היחיד למחלה, הוא שימוש בזנים עמידים, אולם עד כה טרם דווח על זנים בעלי עמידות מלאה וביצועים חקלאיים מספקים. קלונים סומאקלונליים טיוואנים סבילים (עמידים חלקית למחלה), בעיקר קווים 119 ו-218, הם הזנים היחידים המגודלים כיום בקנה מידה נרחב באזורים נגועים ב-TR4, ומהווים את הפתרון היחיד למחלה כיום. 3 קלונים טיוואנים עמידים ל-TR4 (105, 119, 218) יובאו ב-2016, ורמת עמידותם ל-TR4, וביצועיהם החקלאיים, נבחנים בתנאי הארץ. אנליזת רצף (resequencing) של קווים איזוגניים אלה תאפשר את זיהויים של הגן/גנים המוטנטיים, שפגיעה בהם מקנה עמידות ל-TR4, ואת פיתוחם של זנים מקומיים (קלונים של 'גרנד-ניין') עמידים ל-TR4 באמצעות עריכה גנומית. קווים גנטיים נוספים המשלבים פוטנציאל לעמידות ל-TR4 ולביצועים חקלאיים טובים הם מוטנטים סומקלונאליים וקווים מהונדסים גנטית, שפותחו לאחרונה בסין ובאוסטרליה, והיברידיים שפותחו במכון המחקר FHIA שבהונדורס. במסגרת התכנית נעשה מאמץ להביא זנים אלה להערכת עמידותם ל-TR4 וביצועיהם החקלאיים בתנאי הארץ. במסגרת התכנית נעשה שימוש בזנים ומיני בר עמידים, חסרי ערך מסחרי, וזנים

ורגישים למחלה (15 זנים מכל סוג), שטרם נחקרו בהקשר לעמידות/רגישות לגורם המחלה, והובאו לארץ בתחילת 2017, לצורך איתור גנים ומסלולים פיזיולוגיים ומטבוליים חדשים הקשורים בהקניית עמידות/רגישות ל-TR4. הזנים העמידים והרגישים ביותר יאולחו בפטרייה, והשורשים יעברו אנליזת ביטוי (RNA-seq), שתספק מידע הן ברמת ביטוי הגנים, והן ברמת הרצף. אנליזה זו תביא לזיהוי גנים צמחיים ופטרייתיים המעורבים באינטראקציות צמח-פתוגן. במקביל, יערך סקר ספרות לצורך איתור גנים מועמדים. תגובש רשימה מצומצמת של גני מטרה, שימשו להתמרת הזן המשקי 'גרנד-ניין', בטכנולוגיה של עריכה גנומית, לצורך פיתוח זנים בעלי עמידות גבוהה למחלה ורמת יבול ואיכות פרי טובים בתנאים המקומיים. ראוי לציין שלאחרונה אושר הגידול בתוצרים של עריכה גנומית בישראל. בשנה האחרונה פורסמו מספר עבודות בהן נעשה שימוש בעריכה גנומית בבננה. במהלך התכנית נפתח את הכלים לעריכה גנומית בבננה (Knock out-ו Knock-in): פיתוח תרחיף תאים עוברים, יצירת תבניות גניות המתאימות לחד-פסיגיים, טרנספורמציה במגוון שיטות, ורגנרציה של התאים המותמרים.

(2) זיהוי, אבחון ואפידמיולוגיה של TR4: נלמדים אספקטים שונים של אבחון ואפידמיולוגיה של גורם המחלה, כאמצעי לפיתוח אמצעים לניהול מדיניות התמודדות עם גורם המחלה בחלקות נגועות ובראות:

(א) זיהוי מולקולארי של TR4: ישנו צורך בזיהוי ספציפי וכמותי של TR4 ברקמת הצמח, בקרקע, ובמים. זיהוי מולקולרי איכותי בלבד (PCR) של גזע TR4 מרקמת צמח נגועה נמצא בשימוש רוטיני במעבדת פרימן, אולם קיימים דיווחים על קושי ביכולת הזיהוי הספציפית של פרוטוקול זה של ה-VCGs השונים של TR4. במהלך התכנית יפותחו פרוטוקולים מבוססי qPCR לזיהוי כמותי וספציפי של ה-VCGs של TR4 הקיימים בארץ. עד כה לא דווח על פרוטוקולים לזיהוי ספציפי של TR4 במים ובקרקע. לזיהוי מוקדם של TR4 בקרקע ובמים אלה חשיבות רבה, מכיוון שאלה הם שני המדיומים העיקריים להפצת המחלה. פערי ידע יגושרו, ויפותחו פרוטוקולים לזיהוי TR4 בקרקע ובמים. יעשה שימוש בשיטות ספציפיות לבידוד דנ"א פטרייתי מהקרקע, ומערכת דיאליזה שיכולה לעבוד על עשרות ליטרים של מים נקיים ולרכזם.

(ב) אפידמיולוגיה: הבנת האפידמיולוגיה של המחלה חשובה לפיתוח מדיניות ואמצעי הגנה. ייבחנו אספקטים שונים של האפידמיולוגיה של המחלה בתנאי הארץ. ייבחן משך הישרדות גורם המחלה בקרקע, בחומר הצמחי הנגוע (שורשים, גזעולים, עלים ופירות) ובמים. נבחן האם הנבגים מופצים ברוח (אבק ועלים שרופים). כמו כן תיבחן השאלה מהן רקמות הבננה שהפטרייה מסוגלת להדביק, בדגש על הפרי, מכיוון שפרי הוא הרקמה היחידה שמוצאת מחוץ למטע, ויש לה פוטנציאל להפיץ את המחלה. כמו כן, במסגרת התכנית, יאולחו מספר זנים עמידים ורגישים למחלה בפטרייה מסומנת בחלבון GFP, לצורך לימוד מנגנוני חדירת והתפשטות הפטרייה בצמח הבננה.

(ג) צמחים מאכסנים: תבחן השאלה האם צמחים הגדלים במטעי הבננה בארץ יכולים לשמש כמאכסנים לפטרייה, ובכך לשמר ואף להעלות את רמת האינקולום של הפטרייה בחלקה, בעיקר בתקופה בה לא גדלים צמחי בננה בחלקה. תבחן נוכחות הפטרייה במיני הצמחים העיקריים הגדלים במטעי הבננה בארץ.

(3) חיטוי ודיכוי מחולל המחלה: עד כה, לא דווח על טיפול כימי/פיזיקלי/ביולוגי אפקטיבי לדיכוי, הדברה או בקרה של הפטרייה גורמת המחלה או הנבגים בקרקע. במסגרת התכנית ייבחנו אמצעים שונים לחיטוי ודיכוי המחלה:

(א) חיטוי קרקע: התמודדות יעילה עם פוזריום בבננה מחייבת לגבש גישה מערכתית שמתחשבת בכל הרכיבים במשולש קרקע-פתוגן-פונדקאי, כדי לשלב את מגוון האמצעים על מנת לקטול את גופי ההשתמרות בקרקע ובנוסף לצמצם את התבססותם המחודשת. תבחן הדברה משולבת: חומרי חיטוי כימיים (מתאם סודיום, DMDS, וכלורופיקרין) חיטוי סולרי, ותוספים אורגנים שמקורם בשיירים מתעשיית השמן ושיירי צמחים ממשפחת המצליבים, שנמצאו יעילים בהדברת ודיכוי מיני פוזריום שונים.

(ב) חיטוי וקטורים להעברת גורם המחלה: התכשיר המסחרי העיקרי המשמש לחיטוי TR4 בבורות הטבילה לרכב ובמדרכי הרגל הוא SPOREKILL (DIDECYLDIMETHYL-AMMONIUM CHLORIDE), בזכות יעילות חיטוי גבוהה וזמן מגע קצר הנדרש לקטילה. אולם מחירו הגבוה (60 ש"ח/ליטר) מהווה עול כבד על המגדלים. במסגרת התכנית תיבדק יעילותם של תכשירים גנריים וזולים יותר מאותה משפחת חומרים. כמו כן תיבדק יעילותם של חומרי החיטוי השונים בתנאי שטח: לאחר זמני חשיפה שונים לקרינת השמש, בנוכחות קרקע, ועוד. במסגרת התכנית פותח אב-טיפוס חסכוני ויעיל, לחיטוי כלי-רכב, בהתזה.

(ג) דיכוי TR4 באמצעים ביוטיים וא-ביוטיים: ייבחנו מגוון אמצעים, in-vitro ובקרקע: חיידקים מדכאי פוזריום שבודדו בעבר במעבדת מינץ, מיקוריזה, שנמצאה יעילה במבחני שדה בחלקות מאולחות ב-TR4 בפיליפינים, ביו-פחם, שנמצא יעיל בדיכוי מחלות קרקע שונות, כולל פוזריום במינים אחרים. הפרשות השורש של הבננה מאפשרות את נביטת הפטריה. עד כה טרם זוהו המטבוליטים מעודדי הנביטה. הרכב המטבוליטים בהפרשות השורש של זנים עמידים ורגישים ל-TR4 יאופיין, במטרה לאתר חומרים המעודדים/מדכאים את נביטת הפטריה.

(4) פיתוח ממשק לגידול בננה במצע מנותק:

אחד הפתרונות המקובלים כיום בעולם להתמודדות עם "מחלת פנמה" הוא מעבר לגידול באזורים בהם הקרקע נקייה מגורם המחלה. אופציה כזאת לא קיימת בישראל, עקב מחסור בקרקעות. מעבר לגידול בננות במצע מנותק הוא אסטרטגיה שעשויה לאפשר המשך גידול באזורי הבננה בארץ, גם במקרה של אילוח נרחב של הקרקע בחלקות הקיימות. מערכת השורשים של הבננה שטחית, ומרוכזת בעומק 0-30 ס"מ, כך שהגידול בערוגות רדודות אפשרי. בנוסף, לגידול במצע מנותק יתרונות נוספים: אפשרות לגידול אינטנסיבי תוך השגת רמת יבול גבוהה במיוחד, ושליטה במועדי הפריחה, הקטיף והשיווק. במהלך התכנית יפותח פרוטוקול גידול, ותוערך הכלכליות, של צורת גידול זו.

פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות לתקופת הדו"ח

תכנית #1: איתור גנים המעורבים בהקניית רגישות ועמידות ל-TR4, לצורך בניית תשתית גנטית לפיתוח זנים מקומיים עמידים לגורם המחלה.

צוות המחקר: ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, ייבוא וריבוי זני בננה, אנליזות ביטוי ורצף), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, מבחני עמידות לגורם המחלה), ד"ר עדי פייגנבאום (מנהל המחקר החקלאי, אנליזה ביואינפורמטית), ד"ר נעה סלע (מנהל המחקר החקלאי, אנליזה ביואינפורמטית), ד"ר נורית קציר (איתור גנים מועמדים), פרופ' רוברט פלור (מכון וויצמן למדע, ייעוץ בנושא אינטראקציות פתוגן-צמח), ד"ר יאיר ישראלי (צמח ניסיונות, ייעוץ בנושא זני בננה), יובל לוי (ממ"ר בננות, שה"מ, ייעוץ בנושא גידול הבננה).

מטרות המחקר הספציפיות לשנה ב', כפי שהוגדרו בהצעת המחקר:

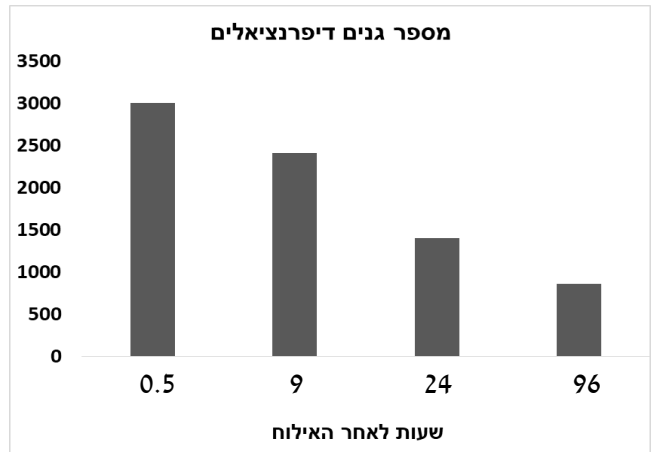
- 1) סיום האנליזות השונות של ניסוי הטרנסקריפטום של הזנים הרגישים והעמידים לגורם המחלה (TR4).
- 2) ריצוף הגנום של 3 קלונים טיוואנים עמידים ל-TR4, ו-2 זנים רגישים.
- 3) אינטגרציה של תוצאות הניסויים השונים, וגיבוש רשימה של גנים המקנים רגישות או עמידות ל-TR4, לצורך עריכה גנומית.

תוצאות וממצאים:

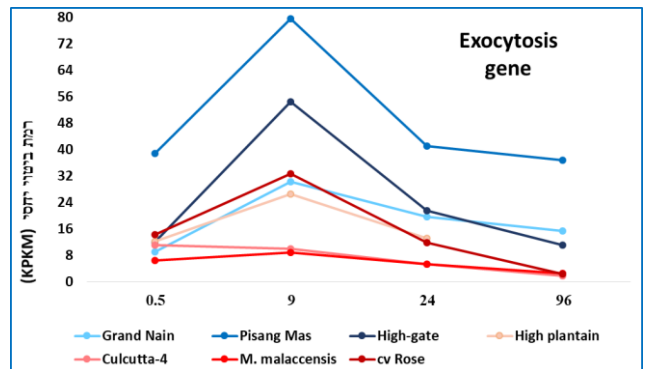
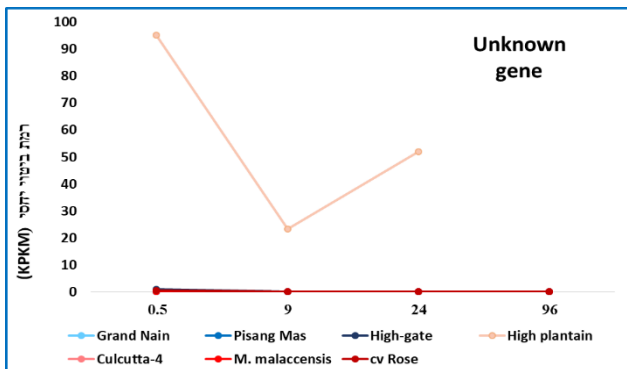
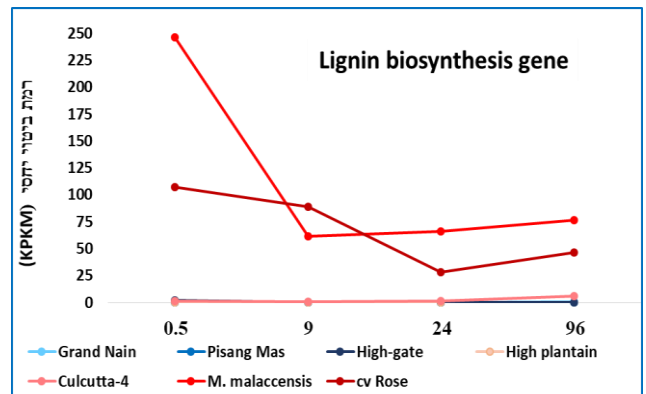
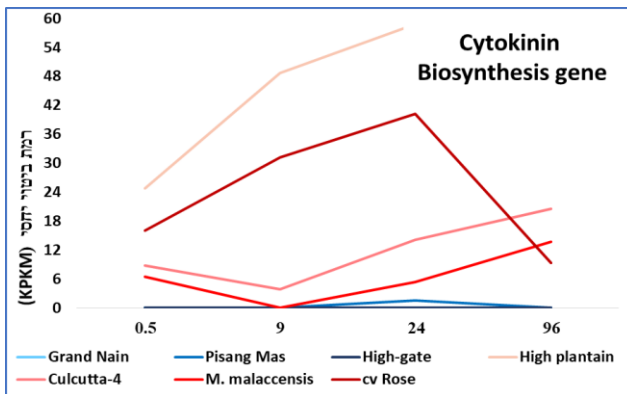
- 1) סיום אנליזות הביטוי והרצף של הזנים הרגישים והעמידים לגורם המחלה.
בשנה א' נבחנו רמת העמידות לווריאנט המקומי של גורם מחלת פנמה, פטריה הפוזריום מגזע TR4, בקרב 34 זני בננה. 7 זנים בעלי רמת רגישות או עמידות גבוהה במיוחד (4 עמידים ו-3 רגישים) נבחרו למבחני האילוח. שורשי 7 הזנים הנבחרים אולחו בגורם המחלה, ודגימות שורש לאנליזת ביטוי נאספו בזמן 0.5, 9, 24 ו-96 שעות לאחר הדבקה. תיאור מפורט של הניסוי מופיע בדו"ח סיכום שנה א' של המיזם. RNA הופק מהשורשים, ונשלח לאנליזת טרנסקריפטום (RNA-seq) ביחידה לריצוף במכון לחקר הגנום באוניברסיטת אילינוי, ברמת כיסוי של 30X. הרצפים נותחו ע"י ד"ר עדי פייגנבאום וד"ר נעה סלע, לצורך איתור גנים דיפרנציאלים, שרמת הביטוי בתגובה להדבקה בפטריה שונה בזנים העמידים לעומת הזנים הרגישים. ריצוף ה-mRNA שימש גם לאיתור פולימורפיזמים ברמת הרצף בין הזנים הרגישים לעמידים.

ביטוי דיפרנציאלי: ה-reads שהתקבלו בריצוף מופו לגנום הבננה, וכימות רמת הביטוי של כל אחד מ-35,272 גני הבננה בכל אחת מהדגימות בוצעה ע"י מיפוי המקטעים לגנום הרפרנס של הבננה, ע"י התוכנות STAR ולאחר מכן cufflinks. לצורך מציאת ביטוי דיפרנציאלי של גנים נעשה שימוש בתוכנה DESeq2. מספר הגנים הדיפרנציאליים בזמני הדיגום השונים, בין לפחות זן עמיד אחד לשלושת הזנים הרגישים, הייה בטווח של 857-2998, וככל שמועד הדיגום היה רחוק מההדבקה, מספר הגנים הדיפרנציאליים ירד (איור 1). נמצאו רק 12 גנים שהיו בעלי ביטוי דיפרנציאלי בכל 4 הזנים העמידים, ביחס ל-3 הזנים הרגישים.

איור 1- מספר הגנים בעלי הביטוי הדיפרנציאלי בזמני הדיגום השונים. ערך הסף להבדל בביטוי של גן נתון הוא הבדל של >2 בערך KPKM בזן עמיד אחד או יותר, ביחס לשלושת הזנים הרגילים. מספר הגנים הדיפרנציאליים בכל זמן דיגום הוא סכימה של סך הגנים הדיפרנציאליים בכל הזנים העמידים ביחס לרגילים.

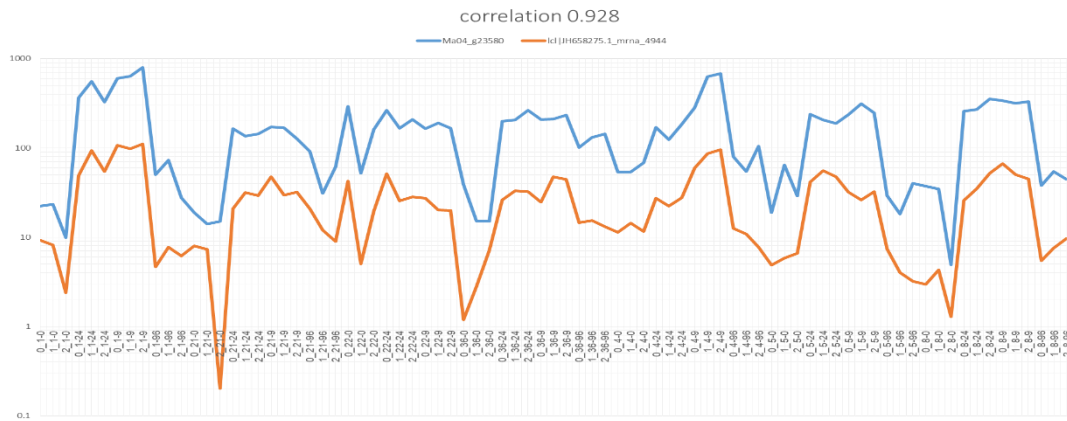


אנליזת הביטוי שימשה לאיתור גנים מועמדים בהקניית רגישות/עמידות לגורם המחלה. הקריטריונים לאיתור הגנים המועמדים היו עוצמת ההבדלים ברמת הביטוי בין הזנים העמידים לזנים הרגילים, והתפקיד הביולוגי המשוער (על סמך הרצף) של הגן. גובשה רשימה בת 62 גנים מועמדים. הפונקציות הביולוגיות המרכזיות בקרב הגנים המועמדים: דופן תא, הגנה מפני פתוגנים, הורמונים, וגנים בעלי פעילות לא ידועה. גובשה 'רשימה קצרה' הכוללת 5 גנים מועמדים (טבלה 1). רמות הביטוי של 4 גנים נבחרים, בעלי דגם ביטוי דיפרנציאלי חזק, מוצגות באיור 2.



איור 2- דוגמאות נבחרות לגנים מועמדים בהקניית עמידות/רגישות ל-TR4. בכל אחד מהגרפים מוצגת רמת הביטוי בכל אחד מהזנים הנבחרים, בארבע נקודות הזמן לאחר האילוח ב-TR4. הזנים העמידים נצבעו בצבעים חמים, והזנים הרגילים נצבעו בצבעים קרים. בזן High-plantain לא התבצע דיגום בזמן 96 שעות לאחר האילוח. כל דגימה מורכבת מ-3 צמחים, והיא בוצעה ב-3 חזרות טכניות.

קביעות רמות הביטוי של גני הבננה והפטריה בכל אחת מדגימות השורש אפשרה לנו לאתר קורלציות ברמת הביטוי של שני האורגניזמים. נמצאו 686 קורלציות חיוביות ברמה של >0.75 , ו-201 אנטי-קורלציות ברמה של >-0.75 בין צמדי גנים מהפטריה ומהבננה. כך, למשל, רמת הביטוי של הגן המעורב בסינטזת ליגנין המוצג באיור 2, נמצאת בקורלציה שלילית ל-27 גנים פטריתיים (טבלה 1).



איור 3-דוגמא לקורלציה גבוהה בין גן בנני לגן פטרייתי בזמני הדיגום השונים של ניסוי האילוח. ציר Y-רמת הביטוי בכל אחת מהדגימות שרופפו. ציר X-הדגימות השונות. גן הבננה-בכחול. גן הפטריה-בכתום.

אנליזת רצף: אנליזת ה-RNA-seq אפשרה לנו לאתר פולימורפיזמים גנטיים (SNPs, INDELS) המבדילים בין זנים עמידים ורגישים. איתור SNPs ו-INDELS התבצע ע"י שימוש בתוכנות Picard, SAMtools ו-GATK. נמצאו 1982 פולימורפיזמים הומוזיגוטים ב-988 גנים, המשותפים לכל 4 הזנים העמידים, ושונים מכל 3 הזנים הרגישים. בגיבוש ה'רשימה הקצרה' לעריכה גנומית של הגנים הפולימורפים, ניתנה עדיפות לגנים המעורבים בהגנה מפתוגנים, וביצירת דופן התא, שהפולימורפיזם בהם מביא לשינוי מסגרת הקריאה (INDELS) או ל-SNPs לא-סינונימיים, שהשינוי בהם מביא לשינוי ח"א בזנים העמידים לעומת הזנים הרגישים, ושרמת הביטוי שלהם בניסוי האילוח היא בינונית או גבוהה. גובשה רשימת גנים מועמדים ע"ס הפולימורפיזם שלהם, הכוללת 3 רצפטורים המיוחסת להם מעורבות בהגנה מפני פתוגנים, וגן המעורב במבנה דופן התא (טבלה 1).

(2) ריצוף הגנום של הקלונים הטיוואנים העמידים ל-TR4, לצורך זיהוי גנים מועמדים בהקניית עמידות/רגישות למחלה. דנ"א הופק מכל אחד משלושת הקלונים העמידים מסדרת GCTCV (105, 119, 218), ומשני זנים רגישים, המשמשים כרפרנס: 'זיו' ו'גרנד ניין'. ריצוף הגנום של כל אחד מהזנים בוצע בטכנולוגיית whole genome resequencing, בכיסוי של $\sim 20\times$. זיהוי ה-SNPs וה-INDELS התבסס על עימוד המקטעים הקצרים ע"י תוכנות מיפוי כגון bwa מול גנום הרפרנס, וניתוח תוצאות המיפוי ע"י תוכנות חישוביות כדוגמת Picard, SAMtools ו-GATK. זיהוי שינויים ברמת הגנום, כגון: כניסת רטרו/טרנספוזונים, ואירגון מחדש של מקטעים גנומיים גדולים בזנים העמידים התבסס על ניתוח הרצפים (contigs) שהורכבו ע"י de-novo assemblies והשוואתם לגנום הרפרנס ע"י כלים להשוואה גנומיות כדוגמת Mummer. בסה"כ נמצאו פולימורפיזם ב-38 גנים בין 3 הקלונים הטיוואנים ל-2 הזנים הרגישים, ואף אחד מהם אינו בעל אנטציה שעשויה לרמז על הקניית עמידות או רגישות לפטריית ה-TR4.

(3) גיבוש רשימה של גנים המקנים רגישות או עמידות ל-TR4, שימשו כגני מטרה לעריכה גנומית. בשנים א' ו-ב של המחקר, עשינו שימוש במספר משאבים, במטרה לאתר גנים מועמדים לעריכה גנומית, לצורך פיתוח זנים עמידים למחלת פנמה: אנליזת טרנסקריפטום (RNAseq) של שורשי זנים עמידים ורגישים לגורם המחלה

שנדגמו בארבע נקודות זמן לאחר האילוח בפטריה, ריצוף הגנום של 3 קלונים טיוואנים סבילים למחלה והשוואתו לשני זנים סבילים, וסקר ספרותי, לצורך איתור גנים שנמצאו כמעורבים בהקניית רגישות או עמידות לפטריית הפוזריום בצמחים שונים (עגבניה, אורז, ארבידופסיס וגידולים נוספים) לאחר אינטגרציה של הגישות השונות, גובשה הרשימה הבאה של גנים מועמדים לעריכה גנומית:

קורלציה לביטוי גני פטריה?	פוליפורמיזם במסגרת הקריאה בין הזנים העמידים לרגישים?	ביטוי דיפרנציאלי בין זנים עמידים לרגישים?	קטגוריה	גן מספר
קורלציות שליליות ל-27 גנים, קורלציות חיוביות ל-3 גנים	לא	לא מבוטא כלל בזנים הרגישים, ביטוי גבוה ב-2 זנים עמידים	דופן תא (סינטזת ליגנין)	1
קורלציות שליליות ל-2 גנים	לא	לא מבוטא כלל בזנים הרגישים, ביטוי בינוני-גבוה ב-4 הזנים העמידים	הורמונים (ציטוקינינים)	2
קורלציה חיובית לגן אחד	2 SNPs לא סינומיים (משנים ח"א)	ביטוי בינוני בזנים הרגישים, ביטוי גבוה מאד ב-4 הזנים העמידים	proteinase inhibitor	3
קורלציות שליליות ל-8 גנים	לא	ביטוי נמוך בזנים הרגישים, ביטוי גבוה מאד ב-3 זנים עמידים	דופן תא (סינטזת ליגנין)	4
אין	לא	לא מבוטא כלל בזנים הרגישים, ביטוי בינוני ב-2 זנים עמידים	רצפטור	5
אין	6 SNPs לא סינומיים	לא. ביטוי גבוה בכל הזנים.	רצפטור	6
אין	2 SNPs לא סינומיים	לא. ביטוי בינוני בכל הזנים.	רצפטור	7
אין	3 SNPs לא סינומיים	לא. ביטוי גבוה בכל הזנים.	דופן תא	8
אין	1 SNP לא סינומי	לא. ביטוי גבוה בכל הזנים.	רצפטור	9

טבלה 1: רשימת הגנים המועמדים לעריכה גנומית. הרשימה גובשה על סמך האנליזות השונות שנערכו. הפרמטרים שבגינום/ם הגן נחשב מתאים לעריכה גנומית הודגש.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

התכנית בוצעה בהתאם למתוכנן, ללא בעיות מיוחדות.

מסקנות ולקחים:

האנליזות הביואינפורמטיות לאיתור גנים מועמדים הסתיימו.

אנליזת הביטוי של שורשי זני בנות עמידים ורגישים לגורם המחלה, סיפקה הן מידע הן על רמת הביטוי של הגנים השונים לאחר האילוח בפטריה, והן מידע על הרצף המקודד של הגנים (CDS) בזנים השונים.

באנליזה של רמת הביטוי, נמצא מספר רב של גנים בעלי רמת ביטוי דיפרנציאלית בין הזנים העמידים לזנים הרגישים, אולם רק 12 גנים היו בעלי ביטוי דיפרנציאלי בכל 4 הזנים העמידים, ביחס ל-3 הזנים הרגישים, דבר המרמז לכך שהבסיס הגנטי לעמידות בקרב זנים אלה אינו זהה. הקבוצה הפונקציונלית שנמצאה בייצוג הגבוה ביותר היא קבוצת הגנים המעורבים בקביעת דופן התא, בעיקר ליגנין, תוצאה המרמזת לכך שמניעת חדירה, או מעבר של הפטריה מתא לתא, הוא רכיב מרכזי בעמידות לגורם המחלה של הזנים העמידים.

באנליזת הרצף המקודד של שבעת הזנים נמצאו 1982 פולימורפיזמים הומוזיגוטים, ב-988 גנים, המשותפים לכל 4 הזנים העמידים, ושונים מ-3 הזנים הרגישים, ונמצא ייצוג גבוה של גני RGA-רצפטורים שמעורבים במנגנוני הגנה בפני פתוגנים.

סקר ספרותי העלה שהגנים המועמדים לעריכה גנומית (טבלה 1), רובם ככולם, נמצאו בעבר כמעורבים בהקניית עמידות לפתוגנים בכלל, ולפטריית בפרט, ממצא שמחזק את הרלוונטיות שלהם לצורך פיתוח זנים עמידים למחלת פנמה.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

תכנית זו הסתיימה בשנה ב'. בתחילת שנה ג' (ינואר 2020) תועבר רשימת הגנים המועמדים, המופיעים בטבלה 1, לאנשי העריכה הגנומית, ד"ר עמית גלאון ופרופ' אבי לוי, לצורך פיתוח זנים עמידים למחלה באמצעות עריכה גנומית.

תכנית #2: ייבוא ובחינה בתנאי הארץ של מיני בר ושל זנים עמידים ל-TR4 בעלי פוטנציאל מסחרי: עמידות, ביצועים חקלאיים, ואיכות פרי.

צוות המחקר: ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, יבוא זני בננה, מבחני שדה), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, מבחני עמידות לגורם המחלה), ד"ר יאיר ישראלי (צמח ניסיונות, ייעוץ בנושא זני בננה ומבחני שדה), יובל לוי (שה"מ, ייעוץ בנושא גידול הבננה).

מטרות המחקר הספציפיות לשנה ב', כפי שהוגדרו בהצעת המחקר:

בשנה א' נעשה מאמץ לייבא ולבחון בתנאי הארץ זנים עמידים למחלת פנמה: קלונים טיוואנים בעלי סבילות למחלה, היברידיים עמידים לגורם המחלה מסדרת FHIA, וזנים מסחריים עמידים שפותחו בעולם. מכיוון שבבדיקה מולקולרית נמצא שצמחי הזנים ההיברידיים מסדרת FHIA נושאים בגנום את נגיף ה-BSV, והם הושמדו בהוראת השירותים להגנת הצומח, ולאחר בדיקה מקיפה, נמצא שאין כיום זנים עמידים אחרים שניתן לייבא ולבחון בתנאי הארץ (פירוט בדו"ח שנה א' של המחקר), המטרות הספציפיות לשנה ב' של תכנית זו עודכנו, באישור ועדת ההיגוי. המוקד בתכנית המחקר הוא בקלונים הטיוואנים: פיתוח בקנה מידה גדול של קלונים מצטיינים מותאמים לתנאי הארץ הנגזרים מקלון 218, ובחינה חקלאית וסלקציות לצמחים מצטיינים של קלון 247, שהראה תוצאות מבטיחות ביבול א'.

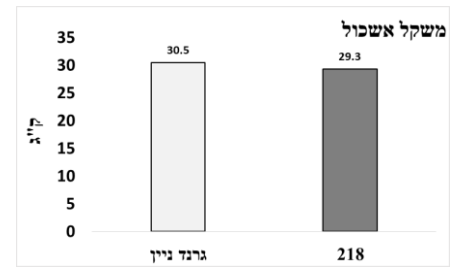
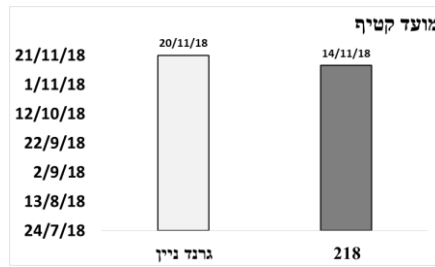
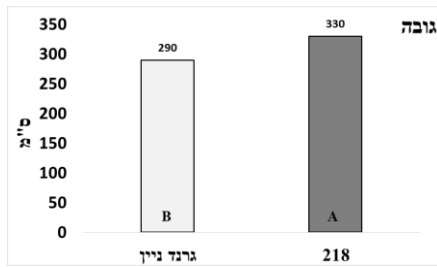
מטרות המחקר המעודכנות לשנה ב' הן:

- (1) המשך בחינת הביצועים החקלאיים של הקלון הטיוואני 218 בשני איזורי גידול.
- (2) ברירה של צמחים מצטיינים של קלון 218, ובחינה קלונלית באתרים שונים, והמשך סלקציות.
- (3) בחינה חקלאית של קלון 247, וסלקציות של צמחים מצטיינים.

תוצאות וממצאים:

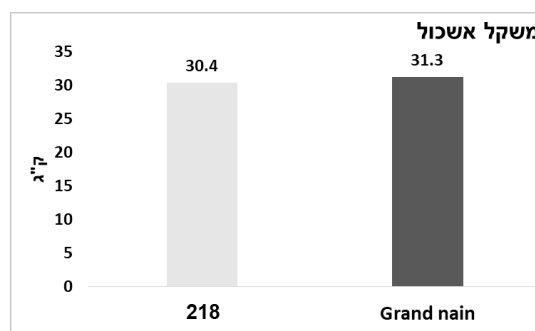
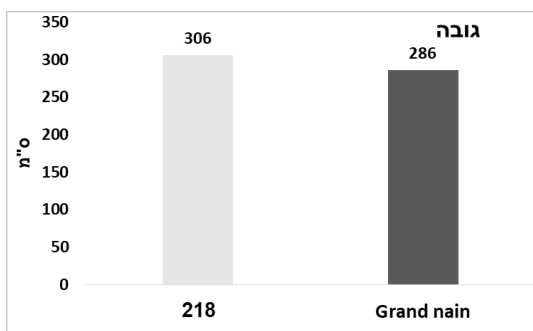
(1) המשך הבחינה של הביצועים החקלאיים של הקלון הטיוואני 218 בשני איזורי גידול.

הקלונים הטיוואנים 105, 119 ו-218 נבחנו בחלקות תצפית בעמק הירדן ובגליל המערבי. החלקה בעמק הירדן נשתלה באוגוסט 2016, ותוצאות שנה א' העלו שהקלונים 105 ו-119 אינם מתאימים לתנאי הארץ, עקב גובהם הרב ואשכול ופרי קטנים. קלון 218 היה בעל הביצועים הטובים ביותר מבין הקלונים הטיוואנים: גובהו דומה לזה של הזן גרנד-ניין, ומשקל האשכול היה גבוה בהרבה ביחס לקלונים הטיוואנים האחרים. לפיכך, המעקב בשנה ב' התמקד בקלון 218. קלון 218 מסתמן, לאחר קטיפת יבול ב', כזן גבוה, עם תוספת גובה של 40 ס"מ ביחס לצמחי זן הביקורת, גרנד ניין. במועד הקטיפה נמצאה הקדמה של שבוע ביחס לזן המשקי (ל"מ), ומשקל האשכול הייה דומה לזה של הזן המשקי. (איור 1).



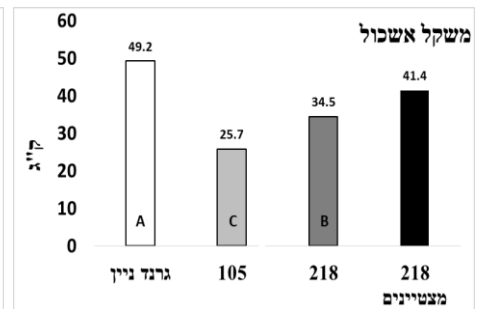
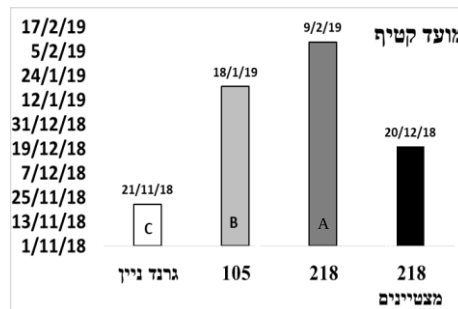
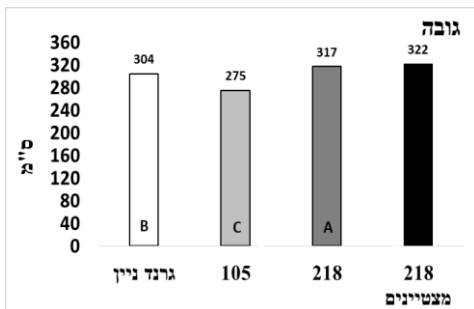
איור 1: גובה צמח, מועד קטיף, ומשקל אשכול בקלון 218 וזן הביקורת, גרנד ניין, בחלקת הניסוי בחוות הניסיונות בצמח, יבול ב'. מספר צמחים בכל זן: 60.

הקטיף של יבול ג' נמצא בעיצומו, אולם תוצאות הביניים דומות למדי לתוצאות יבול ב' בחלקה. צמחי קלון 218 פרחו 8 ימים לפני הזן המשקי גרנד ניין, הצמחים גבוהים בכ-20 ס"מ, ומשקל האשכול דומה, 30.4 ק"ג, לעומת 31.3 בזן המשקי (איור 2).



איור 2: גובה צמח, ומשקל אשכול בקלון 218 וזן הביקורת, גרנד ניין, בחלקת הניסוי בחוות הניסיונות בצמח, יבול ג' (תוצאות לא סופיות). מספר צמחים בכל זן: 50.

חלקת התצפית בגליל המערבי נשתלה באוגוסט 2017 בשטחי קיבוץ יחיעם. צמחי הקלונים הטיוואנים בחלקת הניסוי סבלו מפיגור מובנה ביחס לצמחי הגרנד ניין, עקב נחיתות בגודל השתיל במועד הנטיעה, ופגיעה מצד חזירי בר מיד לאחר השתילה, שהביאו לאיחור במועדי הפריחה והקטיף, ולפחיתה במשקל האשכול. צמחי קלון 119 נפגעו קשה במיוחד מחזירי הבר, כמעט כל הצמחים נפגעו, ולכן ולא הניבו פרי ביבול א'. בדומה לתוצאות יבול א' בעמק הירדן, לקלון 105 אשכול קטן, ואילו אשכולות קלון 218 מרמזים לפוטנציאל טוב, ולכן החל ביבול ב' אנחנו מתמקדים באיסוף הנתונים בקלון זה. קטגורית "218 מצטיינים" מתייחסת ל-12 צמחים שנבררו לצורך מבחן קלונלי, ופיתוח קלונים מצטיינים בתנאי הארץ של 218, והם בעלי ביצועים משופרים בפרמטרים שונים ביחס לכלל צמחי קלון 218, למשל הקדמה במועד הפריחה והקטיף ועלייה במשקל האשכול (איור 2). הקטיף של יבול ב' בחלקה נמצא בתחילתו, והתוצאות יוצגו בדו"ח המסכם.



איור 3: גובה צמח, מועד קטיף, ומשקל אשכול בקלונים 218, 105, גרנד ניין, בחלקת הניסוי ביחיעם, יבול א'. מספר צמחים בכל זן: 90. 218 מצטיינים: 12 צמחים מצטיינים, שנבחרו להמשך ריבוי ומבחן קלונלי.

(2) ברירה של צמחים מצטיינים של קלון 218, בחינה קלונלית באתרים שונים, והמשך סלקציות.

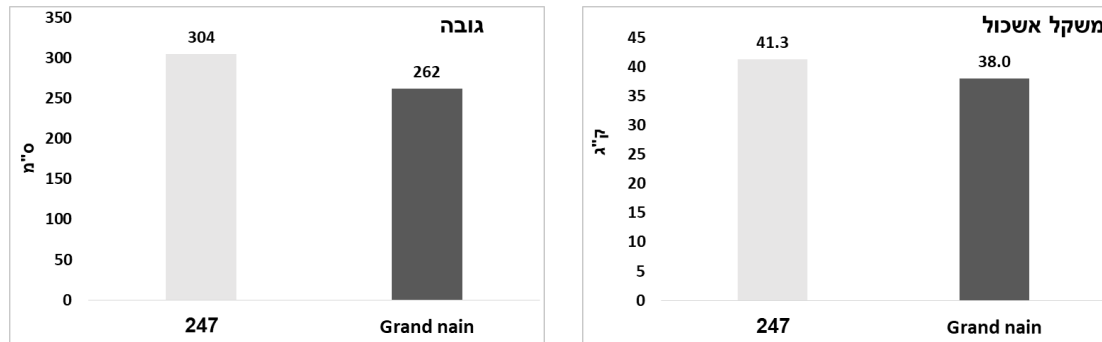
עוצמת הצימוח והיבול בחלקה ביחיעם אפשרה לנו ברירה של צמחים מצטיינים, שמטרתה פיתוח קלונים מקומיים מצטיינים של קלון 218. הקריטריונים לסלקציה היו פריחה מוקדמת יחסית, ואשכול כבד (איור 2). 12 צמחים נבחרו, וחומר צמחי נלקח מהם לריבוי במעבדת 'צמח תרבות', לצורך מבחן קלונלי. באוגוסט 2019 נשתלו 4 חלקות מבחן, בעמק הירדן (מעגן, דגניה ב', ושער הגולן) ובגליל המערבי (חניתה). בכל חלקה נשתלו כ-50 שתילים מכל אחד מהקלונים, והזן המשקי, גרנד ניין. סה"כ כ-650 שתילים בכל חלקת מבחן. הצמחים מתפתחים יפה, ונתונים מחלקות המבחן השונות יוצגו בדו"ח המסכם. חלקת מבחן נוספת של הסלקציות שביצענו ל-218 תישתל באפריל 2020, במתווה דומה לשתילות הקיץ, ע"מ להתרשם מביצועי הקלונים הנ"ל גם בשתילה במועד אביב.



תמונה 1: אשכולות מייצגים של צמחים נבחרים, קלון 218 (שמאל) זן הביקורת המשקי גרנד ניין (ימין) בחלקת יחיעם.

(3) בחינה חקלאית של קלון 247.

קלון 247 יובא לישראל שנה לאחר שאר הקלונים הטיוואנים, ונשתל באוגוסט 2018 להערכה ראשונית בחוות מחקר הבנות בצמח. קלון זה מסתמן כזן רזה וגבוה (תוספת גובה של 42 ס"מ, ופחיתה של 2.5 ס"מ בהיקף הגזעול, ביחס לזן המשקי), בעל אשכול כבד, ופרי יפה (איור 4).



איור 4: גובה צמח ומשקל אשכול בקלון 247 וזן הביקורת, גרנד ניין, בחלקת הניסוי בחוות הניסיונות בצמח, יבול א'. מספר צמחים: 247 : 22, גרנד ניין: 60.

במקביל צמחים לא מבוררים של קלון זה רובו במעבדת צמח תרבות. 50 שתילי קלון 247 נשתלו בכל אחת מחלקות המבחן הקלונלי של 218 (פירוט בסעיף 2 של תכנית זו), לצורך אפיון הקלון בחלקות מסחריות שונות. סריקה לאיתור צמחים מצטיינים של קלון 247 תבוצע בחלקות השונות, לצורך פיתוח קלונים מקומיים מצטיינים הנגזרים מקלון 247, כשהדגש בסלקציות יהיה הנמכת הקומה, פריחה מוקדמת, אשכול כבד, ואיכות פרי טובה.

מסקנות ולקחים:

במסגרת התכנית יבאנו ארבעה קלונים טיוואנים סבילים למחלת פנמה, ולראשונה הם נבחנים, במדינה בה שוררים תנאי גידול סובטרופיים, לרמת העמידות לווריאנט המקומי של TR4, ולביצועים חקלאיים בשדה. רמת העמידות של ארבעת הקלונים הטייוואנים הסבילים נבחנה בשנה א' בתנאים מבוקרים בקבוצת פרימן. התוצאות תואמות את הידע שנצבר בעולם: זנים אלה הם בעלי עמידות חלקית למחולל המחלה. הם פחות עמידים מזני בר שונים שנבחנו במסגרת התכנית, אולם עמידים במידה ניכרת ביחס לזנים הרגישים. ראוי לזכור שבתנאי שדה, בהם רמת האינקולום נמוכה בהרבה, קלונים אלה מסוגלים לתת יבול סביר במשך 4-5 דורות, לפני שנזקי המחלה הופכים את הגידול ללא-כלכלי, וכיום הם מהווים בעולם הבננה את הפתרון היחיד בתחום הזנים למחלה. בשנה ב' נמשך המעקב אחרי הביצועים החקלאיים קלון 218, ולאחר שלושה יבולים, הוא מסתמן בעמק הירדן כזן עם אשכולות כבדים ואיכות פרי טובה. בשנה ב' התחלנו בתהליך של סלקציות, שמטרתן פיתוח קלונים מקומיים מצטיינים, בעלי אשכול כבד, קומה מתונה, ופריחה וקטיף מוקדמים, על בסיס קלון זה. הנתונים הראשוניים שהתקבלו לגבי קלון 247 הפתיעו לטובה, עם תוספת למשקל האשכול של 3.3 ק"ג ביחס לזן המשקי, גרנד-ניין. קלון זה נשתל בחלקות מסחריות שונות להערכת ביצועיו בתנאים שונים, ותהליך של סלקציות, בדומה לזה שמתקיים בקלון 218, יתבצע בשנה ג'.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

לאחר השינויים שהתבצעו בתכנית, שעיקרם התמקדות בקלונים הטייוואנים הסבילים למחלה 218 ו-247, התכנית בשנה ב' בוצעה כמתוכנן, והביצועים החקלאיים של קלונים אלה נראים טובים, ומבטיחים.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

בשנה ג' של המחקר נתרכז במשימות הבאות:

- 1) המשך הערכת הביצועים החקלאיים של הקלונים הטייוואנים 218 ו-247. קלון 218: יושלם איסוף נתוני יבול ג' (עמק הירדן-חוות צמח) ויבול ב' (גליל מערבי-יחיעם), קלון 247: יושלם איסוף נתוני יבול א' בחוות צמח, תחילת איסוף נתוני צימוח, פריחה ויבול א' בחלקות המסחריות השונות.
- 2) תחילת הערכה קלונלית ב-5 חלקות המחקר של 12 הסלקציות של 218 שנבררו בשנה ב'.
- 3) המשך ברירת צמחים מצטיינים של קלון 218 ו-247 ב-7 חלקות המבחן השונות בהן הם מגודלים.

Project#3: Developing Banana Resistant to *Fusarium oxysporium* f. sp. cubense Using Genome Editing Approach

Second Year Report

1. Specific research objectives of the research

1. Developing *A. rhizogenes* system to induce hairy roots as a tool for candidate gene screening
2. Stable transformation of banana for generating transgenic plants
3. Developing protocol for production of cell suspension and protoplast
4. Initiation of Embryogenic Callus and ECS with FPX
5. Preparing binary vectors for banana transformation towards resistance to *Fusarium oxysporium*
6. Replacement of an endogenous target by a resistance gene candidate by genome editing

2. Results and findings

2.2. Develop *A. rhizogenes* system to induce hairy roots as a tool for candidate gene screening

The objective of developing an *A. rhizogenes* system to induce hairy roots is to use the hairy roots as a tool for screening candidate genes that would be targeted in banana genome, for developing plants resistance to Fusarium. Since stable transformation and generation of banana plants is a time taking activity, the use of hairy roots for screening candidate genes is assumed to significantly shorten the time required. In the attempts we made to induce transgenic hairy roots, in the last 2 years, we transformed banana explants (*in vitro* plants or immature flowers) with 6 strains of *A. rhizogenes* strains (K599 – Cuccumopine; LBA 9402 – Agropine; ATCC15834 – Agropine; LBA1331 – Agropine; MSU440 – Manopine; Aqua 1 – Agropine) harboring plasmids with GFP, RFP or PX11 reporter genes. In order to induce wounding of the explants and/or enhance the infection process the explants were treated by heat shock and/or sonication before vacuum infiltration of the Agrobacterium suspension. Unfortunately, neither of the treatments resulted in generation of transgenic roots. Some of the reasons that might be contributed to such a result could be a) Absence of cambium in monocots including banana (in other plant systems the cambium is highly susceptible to infection). B) Failure of callus development at the wounded/infection sites (unlike other plants callus development in wounded banana explants is not common) c) Origin of roots in banana is deep in the pseudostem, whereas in dicots infected with *A. rhizogenes*, roots have been observed arising from the surface of explants (like leaves/cotyledons). D) The very fragile nature of young banana explants: Although young explants are highly preferred for Agrobacterium mediated transformation,

young banana explants are highly fragile to mechanical wounding. To this end, the young explants have been observed to get damaged or produce endogenous hairy like roots during 2 days of preconditioning (Fig. 1). In addition, the explants were covered with exudates or rot/decay during co-cultivation, which makes development of the expected transgenic roots difficult. Therefore, attempts to induce transgenic roots, in such kind of banana explants, with *A. rhizogenes* seems implausible. This assumption can be supported by absence of published literature in any of the journals, we have referred to date.

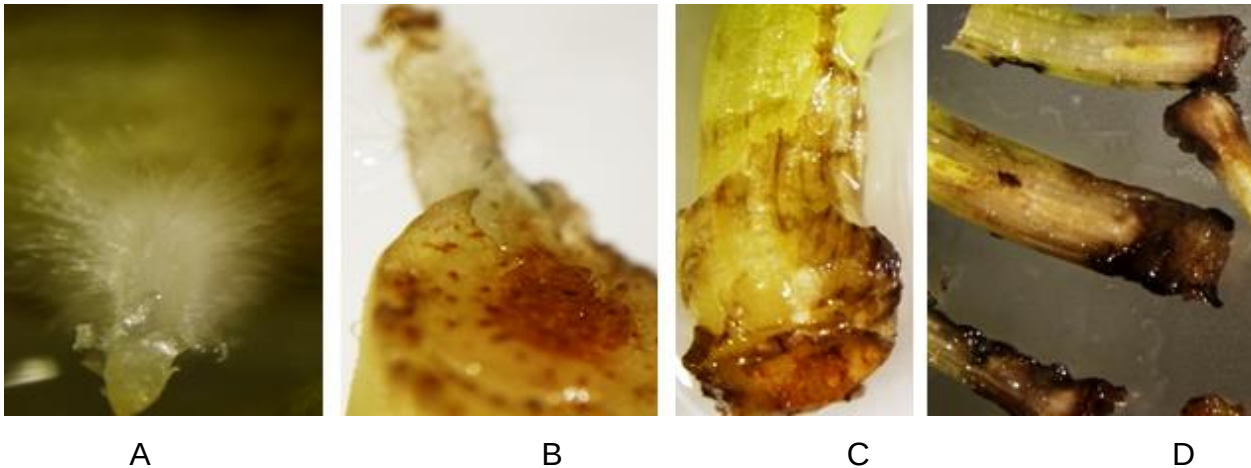


Fig.1. Changes in banana young explants pre-and post-transformation. Appearance of banana explants 2 days after preconditioning (A-C) and 4 days of co-cultivation with *A. rhizogenes* suspension (D).

2.2 Stable transformation of banana for generating transgenic plants

Following the observations from the *A. rhizogenes* experiments conducted, we attempted to generate stably transgenic banana plants. A preliminary experiment has been conducted by transforming banana explants with *A. tumefaciens* strain EHA105 harboring a binary vector with the PX11, GFP or RFP reporter genes (Fig. 2.). However, neither of the transformation experiments gave a transgenic plant expressing neither of the reporter genes. In addition, we transformed suspension cells obtained from the previous year-initiated callus, to also check if the cells might have the capacity to be transformed and regenerated. Both *A. tumefaciens* strains EHA105 and AGL1 harboring a binary vector either with GFP or RFP reporter genes were used to infect these cells. However, we observed neither expression of the reporter genes nor regeneration of the control cells.

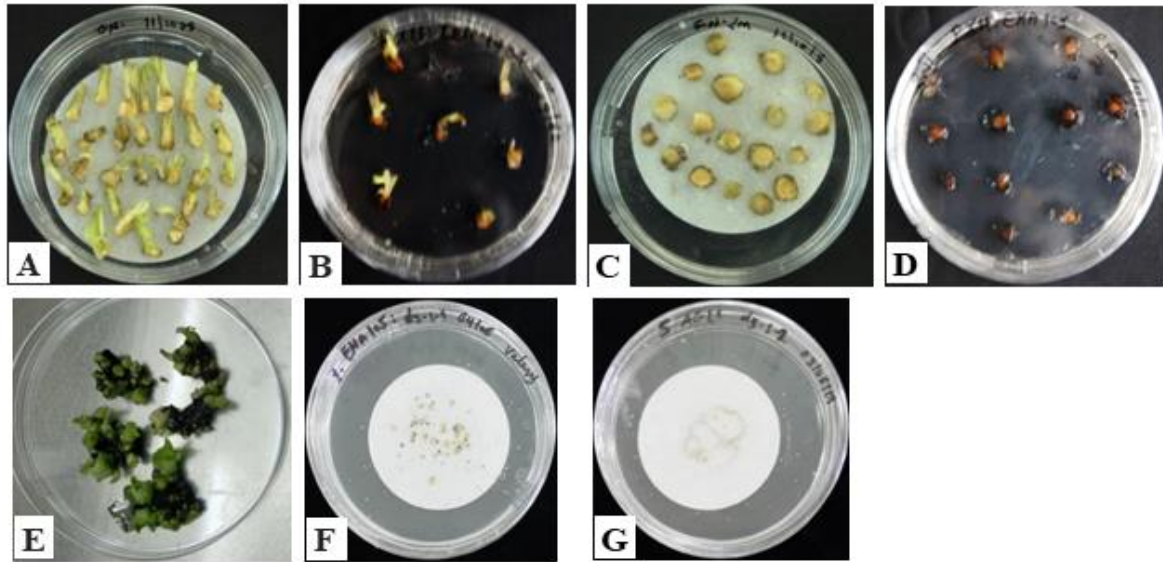


Fig. 2. Stable transformation of banana explants. Meristem shoot excisions (A & B) or intercalary meristems slices (C & D) obtained from *in vitro* grown banana plants were dissected either vertically or horizontally, pre-conditioned for 2 days and transformed with *A. tumefaciens* strain EHA105 harboring a binary vector with the PX11 reporter gene, and explants were grown on a selection media. Suspension cells obtained from the previous year-initiated callus were also tested for their ability to regenerate after transformed with either *A. tumefaciens* strains EHA105 (F) or AGL1 (G) harboring a binary vector either with GFP or RFP reporter genes.

In the literature, previous attempts done to transform Grand Naine explants were able to show regeneration of only a very few numbers of plants from 100s of explants or just only a few spots that showed expression of the reporter gene/s used. Whereas successful transformation studies in this banana cultivar entirely depended on the use of good quality ECS. It could probably possible that these limitations of generating of transgenic Grand Naine banana plants from explants but ECS might be due to presence of endophytic microorganisms that hinder the infection process, by the *Agrobacterium* or other physiological/biochemical conditions both at pre and post transformation. The failure of the suspension cells to be transformed could have been attributed from their quality as evidenced by their failure to regenerate.

2. 3. Transformation of Calluses Generated From Banana Immature Male Flowers

Recently, we obtained two plasmid constructs from Prof. Avi Levis lab, one of which is an RFP reporter gene under the control of *Musa acuminata* Ubiquitin promoter (Fig. 3. A), in order to evaluate its expression in banana explants and develop transformation protocol. We hypothesized that explants (callus) from IMFs (Fig. 3 B arrows and bracket), 'being embryogenic' after about 5 months on callus induction medium, could respond to *agrobacterium* infection.

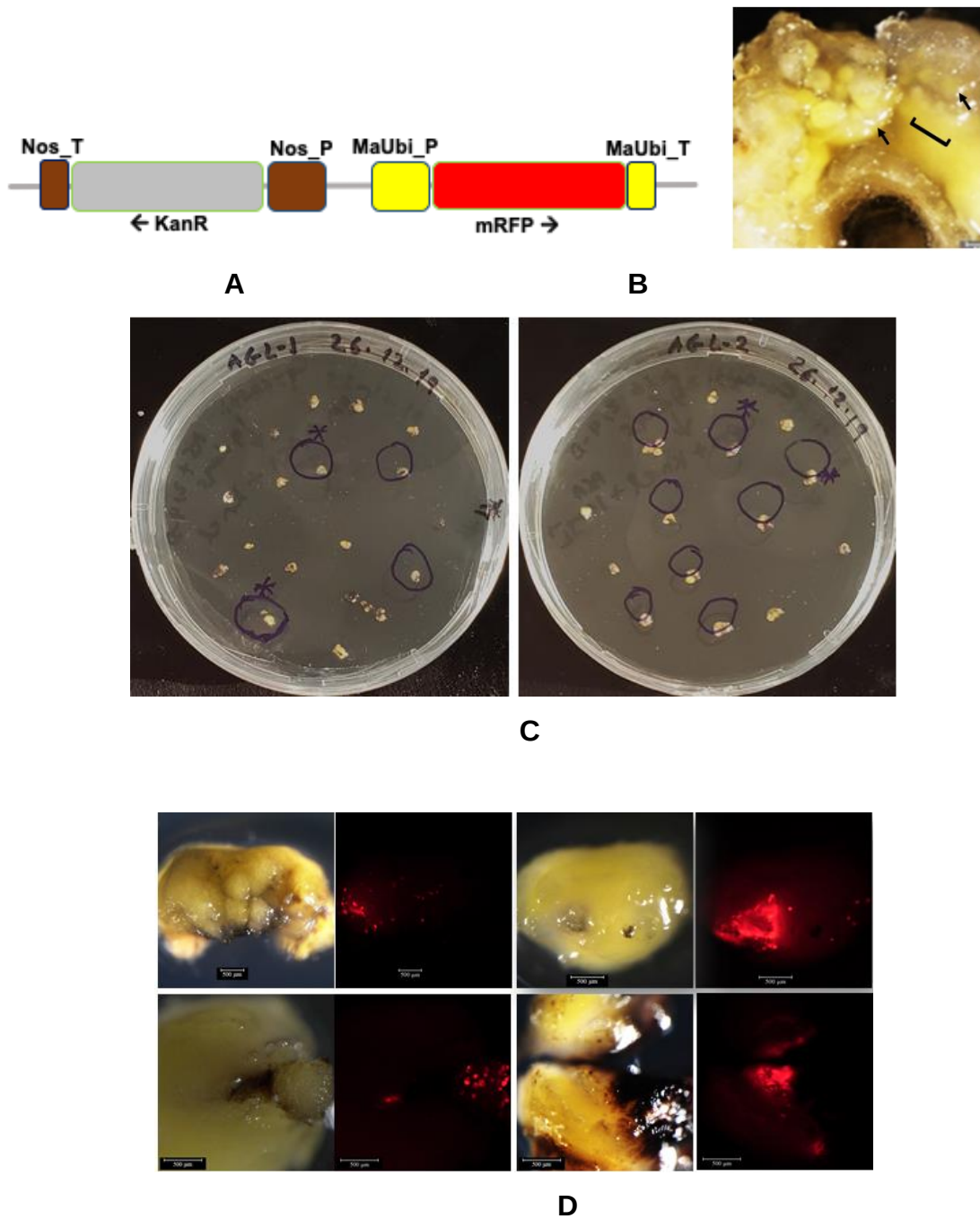


Fig. 3. Transformation of callus/proembryos obtained from the IMF method. The plasmid construct (A) was transformed into the *Agrobacterium* strains and suspensions with low OD (~0.3 OD₆₀₀) were used to infect the explants excised from IMFs on callus induction medium (B). The Kan resistant embryos (C) and level of expression of the reporter gene in some of the representative samples (D). Pictures were taken 14 days after initiation of the experiment. The marked embryos are those that showed expression of the reported gene and the asterix (C) indicate embryos that showed relatively higher level of expression of the same.

The calluses/embryos were excised and infected with *A. tumefaciens* strain AGL1 or *A. rhizogenes* strains ATCC 15834 and LBA 9402, each harboring the plasmid construct indicated in Figure 3A.

After 9 days of cocultivation and 5 days on selection media with 100 mg L⁻¹ Kanamycin (Kan), in the dark, most of the embryos transformed with *A. tumefaciens* strain AGL1 showed resistance to Kan (Fig. 3 C), while those explants transformed with the two *A. rhizogenes* strains suffered from chlorosis (data not shown). This suggests that the embryos infected with AGL1 are transformed while those infected with ATCC 15834 and LBA 9402 are not. Interestingly, the embryos showed high level of expression of the reporter gene (Fig. 3D), which seems also stable transformation of the embryos with the reporter gene. Attempts will be made to regenerate plants from the transformed embryos or similar explants that will be transformed in the future. Besides, these observations give us valuable information for future work as far as what type of promoter/s we could use when preparing plasmid constructs in the future.

2.4 Generation of Embryogenic Cell Suspensions (ECS) From Immature Flowers (IMFs)

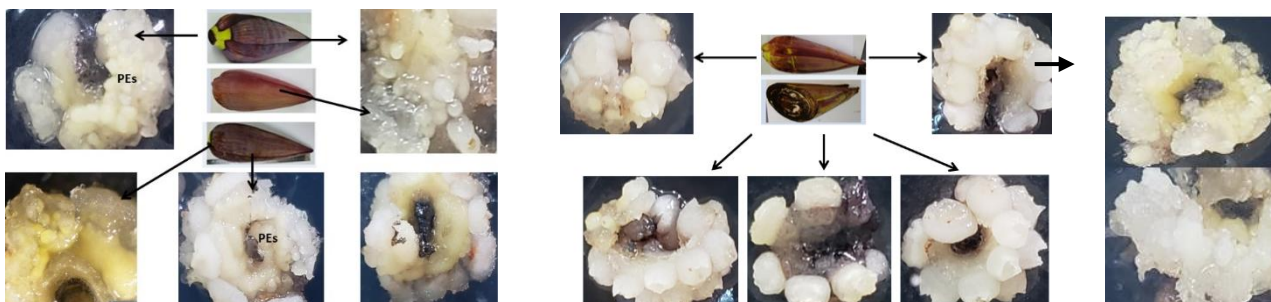
Successful genetic transformation in banana mainly relies up on the use of Embryogenic Suspension Cells (ECS), which can also be maintained for years and be readily used in further transformation studies. The procedure involves generation of friable embryogenic callus (4-6 months) and transfer of selected embryogenic callus to liquid suspension medium for generating ECS. Using the Immature Male Flower (IMF) method for generating embryogenic callus (EC), a total ~120 male flower buds of different age (Fig. 4.) were obtained from banana plantations (Tzemach, The Jordan Valley) at different times of the year and excised Immature Male Flower Buds (IMFBs) were inoculated on callus induction medium. When “Embryogenic callus” complexes develop, samples were transferred to suspension medium to generate production of ECS. Until recently most of the samples start to release cells for some time and then stop dividing, which made the processes difficult. In this work we were not able to get the type of ECS that we expected to use for transformation. In addition to this, we obtained two times, ECS that was initiated at Tzemach. Although cells in the 1st sample multiplied well, they were not able to regenerate or transformed. However, the 2nd sample failed to multiply, and the cells died in less than a week after arrival. We assume that the way the cells have been brought to the lab or some other variable might have contributed to their failure to multiply. While compiling this report we have been informed that new batch of cells will arrive to our lab.

Date	No. of Buds	Type of Buds	
25-06-2019	18*		
08-7-2019	20*		
24-07-2019	20		
31-07-2019	16		
16-09-2019	14		
23-09-2019	22		
03-10-2019	17		
Total = 127			

Young Buds Included

Fig. 4. Date, number and representative types of male flower buds used to induce EC production since late June 2019.
Relatively younger flower buds were used after mid Sep 2019.

However, recently, we've come to understand that one of the major obstacles that has been hindering us from generating good quality ECS could be the age of the flower bud's used. Especially in Grand Naine, a few reports indicate that only very young male flower buds could be used to generate ECS. When comparing the types of male flower buds that we've received at different time of the year to initiate ECS, most of them look too old to do the same. As of mid Sep 2019, we've received young flower buds and the response seems promising.



Callus initiated from old IMF buds

Callus initiated from young IMF buds

80 days old

Fig. 5. Types of male flower buds and calluses obtained in the last 6 months. Calluses initiated from old male flower buds look yellowish (after 90-120) and the flowers are detached from the base of the callus complexes. Calluses initiated from young male flower buds look whitish and friable calluses started to develop after 45-50 days of initiation. These friable calluses appeared to become white and a few somatic embryos appeared after 80 days of initiation.

While IMFs obtained from relatively old male flower buds took more than 90-120 days to show calluses with a few somatic embryos, those IMFs started from young flower male buds were able to produce white ECs with a few somatic embryos in about 80 days (Fig. 4). Such calluses seem very

promising for ECS production and a few samples have been transferred to liquid suspension medium. Most of the young IMFs are expected to give good quality EC, which would be transferred to liquid medium in the coming days/months (Fig. 5). On the other hand, from those calluses, initiated from old flowers, and transferred to ECS initiation medium a few of them have started to divide and release cells. Although it is too early to judge the quality of these cells in terms of their regeneration potential, we will test them in the coming 2-3 months and if they are found to give good regenerates, they will be transformed with the available *Agrobacterium* strains harboring reporter genes, and additional binary vectors received from Prof. Avi Levy's lab.

2.5 Initiation of Embryogenic Callus and ECS with FPX

Recently, Japanese scientists reported the capability of a compound called fipexide (FPX) in inducing callus, both in monocots and dicots. We tested this compound in Valery and Grand Naine banana explants and found out that it could induce callus and somatic embryo formation when *in vitro* grown explants were incubated for about 3 months (Fig. 6). While significantly large number of explants were obtained from Valery explants, Grand Naine explants were covered with endogenous microorganisms, when the embryos were removed or during the establishment period of the ECS.

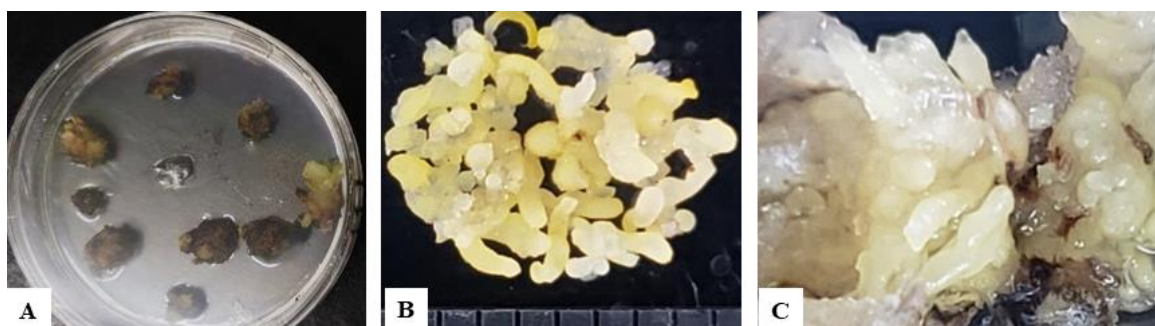


Fig. 6. Development of somatic embryos in FPX (30 uM) treated Valery explants. Swelling of the explants after 3 months (A) Somatic embryos obtained from the internal parts of the explants (B) and callus with somatic embryos from explants excised from including the meristem tip and leaf sheathes and incubated on the same medium (C).

Those embryos from Valery were incubated in suspension medium in order to understand if they can produce ECS. The embryos started to release single cells after a few number of days and continued to multiply. However, removing the initial material from the flasks resulted in cessation of further increment in the volume of cells and/or change in their composition/shape. For better results, determining size of the explant, concentration of the FPX and duration of treatment seems indispensable. To this end, Grand Naine explants were treated with 25 or 50 uM FPX and observations on the change of the explant growth and differentiation is underway and Figure 6 show some of the changes that are expected.

When we assume that some of the embryos could release cells in suspension we transfer them and incubate with shaking. One of the problems that we faced with this treatment is growth of endophytic microorganisms that appeared during and after incubation in the semisolid medium. When transferring some of the embryos, similar problems were observed. This might be due to the nature of FPX, which might enhance growth of these microorganisms that are otherwise not easily become culturable. It is our expectation that the FPX may work as it is expected to be, for induction of ECS. Since there are no literature to refer (in banana), and conduct experiments as we wish, it is our expectation that it could take time to optimize some of the important helpful parameters. However, initiating more number of plants for callus induction and production of ECS seems highly important. Currently, 150 invitro grown plantlets of appropriate size are incubated in a semisolid supplemented with 25, 30 and 35 μM FPX (Fig.6).



Fig. 7. Response of Grand Naine explants exposed to different concentration of FPX. Explants were treated with 25 μM FPX for a month (A & B) 25 μM FPX for 35 days (C) 50 μM FPX for a month (D). The picture was taken immediately after removing the leaf sheaths (A – C) and 15 days after placing the explants on semisolid medium supplemented with 50 μM FPX (D).

2.6. Generation of ECS at Tzemach

It is to be recalled that the 1st attempt of generating ECS started at Tzemach. To this end, a series of experiments have been executed and ECS with regeneration potentials have been obtained (Fig. 8). However, the ECS has not been yet multiplied in sufficient quantities to use it in different experiments.

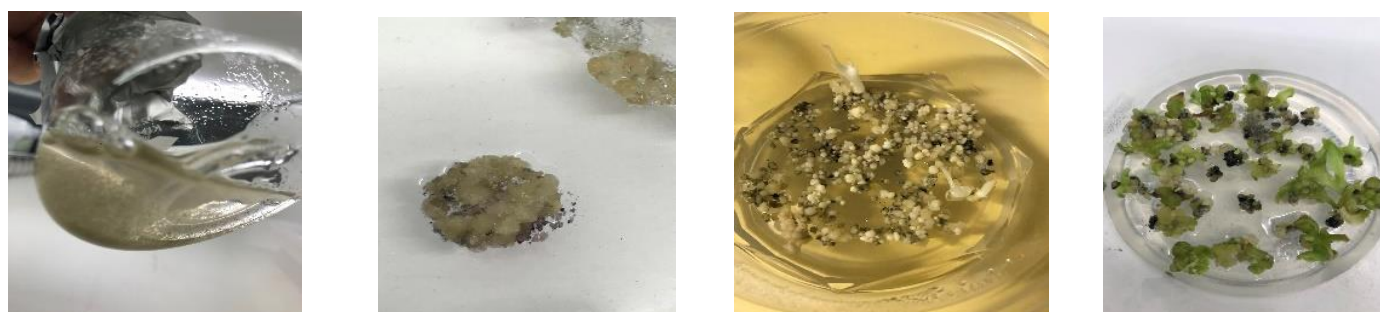


Fig 8. Generation of banana plants from ECS. Embryogenic callus in suspension medium to generate ECS (A), ECS on embryo formation media (B), Embryo maturation (C) and formation of banana plantlets.

As indicated previously, generation of ECS in banana is one of the most challenging activities in banana improvement programs. Since we've identified the problems and we've started to make comparison among different protocols we believe in that in the coming few months, a good ECS could be generated.

2.7. Binary vectors for banana transformation towards resistance to *Fusarium oxysporium*

During the second year we (Levy lab.) have built a series of constructs to develop resistance to *Fusarium oxysporium*. These constructs will serve three different approaches:

1. Transgenic approach: Express RGA2 or a new resistance gene under a strong heterologous promoter.
2. Cisgenic Approach: Express RGA2 or a new resistance gene from banana under a native banana promoter.
3. Gene targeting: Overexpress of endogenous RGA2 by replacement of native promoter by a strong banana promoter once a resistance gene is isolated, we will replace the sensitive gene by a resistance gene.
4. During the past year, we have completed constructs for part 2.5.1 and 2.5.2 and we are in the process of building constructs for 2.5.3 (details on 2.5.3 in future plans).

2.7.1 Constructs for the transgenic approaches are described in Figure 7

Here our goal is to overexpress the RGA2 gene under a strong promoter, namely the maize Ubiquitin promoter or the 35S promoter. This approach has been shown to be successful for conferring resistance to banana sensitive to the disease (Dale et al., 2017).

Transgenic approach: Express RGA2 or new resistance gene under strong promoter

Constructs for calibration of Banana transformation protocol and gene editing

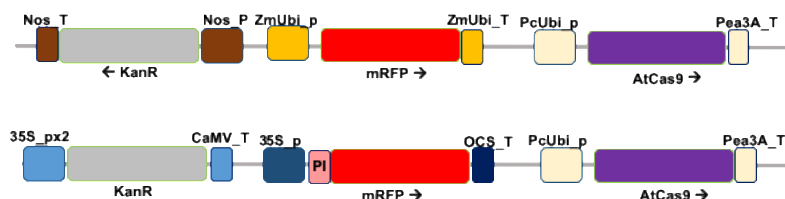


Fig. 9 Binary vectors for selection of transgenic approach strong promoter. Two cassettes were prepared for evaluation of promoters. RFP reporter gene was expressed under Maize ubiquitin promoter, or under CaMV35S promoter. Expression of these cassettes was tested in *Lemna minor*.

The maize ubiquitin promoter gave strong RFP expression and was therefore selected for further use.

NOS_P- Nopaline synthase promoter, KanR- Kanamycin resistance gene, NOS_T- Nopaline synthase terminator, ZmUbi_P- Maize ubiquitin promoter, mRFP-monomeric red fluorescent protein, ZmUbiT- Maize ubiquitin terminator, PcUbi_P- Parsley ubiquitin promoter, AtCas9- Arabidopsis optimized Cas9, Pea3A_T- Pea 3A terminator, 35S_px2- CaMV 35S double promoter, CaMV_T- CaMV 35S terminator, 35S_P- CaMV 35S promoter, PI- Potato proteinase inhibitor transit peptide, OCS_T- Octopine synthase promoter.

The constructs for the transgenic approach were built and were given to Bekele Abebie from the group of Amit Gal-On. They will serve for calibration of banana transformation. They are modular in structure and the mRFP locus was replaced (see figure 8) by the resistance RGA2 gene and can be replaced in the future by a new gene found through this study.

2.7.2 Cis-genic approach

The Cis-genesis approach consists in transformation of banana with DNA whose origin is from banana. The DNA consists in expression of the banana resistance RGA2 gene under a strong banana promoter and a banana terminator. If this chimeric gene confers resistance to sensitive banana, we will excise the T-DNA components. In order to isolate a strong banana promoter, we searched for a constitutive and strongly expressed banana gene. Ubiquitin proteins are constitutive and often strongly expressed. We assumed that a homolog of the tomato Ubiq10 protein might fulfill the desired features. In collaboration with Navot Galpaz and Adi Feingenboim, screening RNA-Seq data, such homolog was identified out of the Ubiquitin family: the Ma03_g24340 gene was found to fulfil our requirements. The genomic sequence surrounding the gene was analyzed and a 1621 bp fragment upstream of the MaUbi-ATG was amplified as a putative promoter. The genomic sequence downstream of the stop codon was analyzed and a 1585 bp fragment was amplified as a putative banana terminator. In order to validate the predictions we had made and the functionality of these sequences a construct was prepared, as shown in Figure 8A and transformed into a duckweed species, *Lemna minor*, with the help of Maja Cohen from the Levy lab. *Lemna minor* was chosen for validation, first, because currently we do not have banana transformation working in the consortium and second, because it is a monocot and a relative of banana. As can be seen in Figure 8B, transgenic calli expressing the MaUbi cassette (promoter and terminator) Have a strong expression similar to the maize Ubiquitin promoter ZmUbiP. This was a reproduced result in independent experiments.

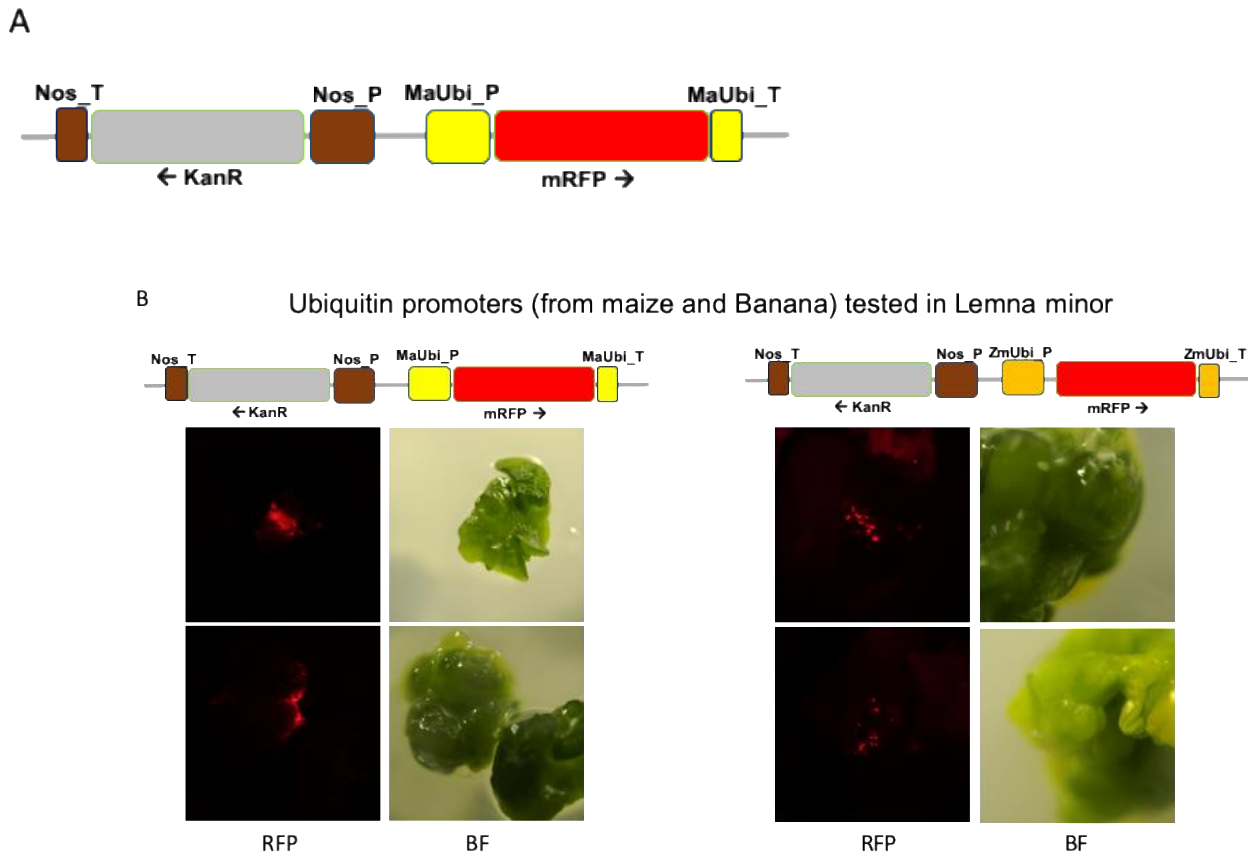


Fig. 10. Evaluation of Banana Ubiquitin promoter expression for cisgenic approach. A. Binary vector with Gran Nain Ubiquitin Ma03_g24340 promoter and terminator flanking an RFP reporter. B. Ubiquitin promoters of Banana and Maize evaluation by RFP fluorescence in Lamna minor. The expression of the two promoters is high. Gran Nain Ubiquitin Ma03_g24340 promoter and terminator can be used for overexpression of Banana candidate resistance genes. NOS_P- Nopaline synthase promoter, KanR- Kanamycin resistance gene, NOS_T- Nopaline synthase terminator, MaUbi_P- Banana Ubiquitin promoter, MaUbi_T- Banana Ubiquitin terminator, ZmUbi_P- Maize ubiquitin promoter, mRFP-monomeric red fluorescent protein, ZmUbiT- Maize ubiquitin terminator.

For the resistance gene, we have isolated from the resistance *M. malaccensis* line obtained from Navot, the RGA2 homolog. This homolog is close in sequence to the published resistance *malaccensis* gene (Dale, J., James, A., Paul, J. *et al.* Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4. *Nat Commun* **8**, 1496 (2017) doi:10.1038/s41467-017-01670-6), and different from the sensitive one, however it has some variant amino acids that might be due to natural polymorphism and that presumably do not affect resistance. It has been cloned, at the moment under the ZmUbi promoter (Figure 9). It will be cloned under the MaUbi promoter.

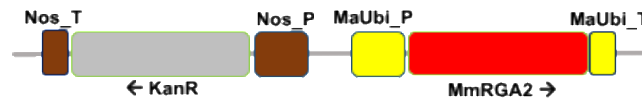


Fig. 11. Cassette for cisgenic expression of TR4 resistant line's RGA2. Based on the high RFP expression conferred by the Banana Ubiquitin promoter in *Lemna minor* (Fig 8B), a new cassette with resistance candidate gene will be prepared. An RGA2 open reading frame was amplified from *M. malaccensis* DNA using PCR primers as in Dale et al., 2017, and sequenced. Next, *M. malaccensis* RGA2 will be cloned between the Banana Ubiquitin promoter and terminator. NOS_P- Nopaline synthase promoter, KanR- Kanamycin resistance gene, NOS_T- Nopaline synthase terminator, MaUbi_P- Banana Ubiquitin promoter, MaUbi_T- Banana Ubiquitin terminator, MmRGA2- *M. malaccensis* RGA2 open reading frame.

3. Conclusions and lessons

- Yet, we're not able to generate reliable hairy roots from banana explants transformed with 6 *A. rhizogenes* strains, harboring different reporter genes.
- Execution of additional experiments, to generate roots with *A. rhizogenes*, from embryogenic callus and/or somatic embryos might be helpful for generation of hairy roots from these materials. We hypothesized that many cells on the calluses could be infected by the *A. rhizogenes* strains and possibly hairy roots will be generated.
- Since there are established protocols, transformation of ECS and generation of transformed banana plants with *A. tumefaciens* strain EHA105 and AGL1 seems to be highly important. For this purpose, the use of appropriate responsive explants for generating transgenic plants, in a relatively short period of time will be compared.
- With the commonly used immature flower method, generation of Embryogenic callus for establishing ECS seems promising. The young IMFs are very responsive to the callus induction treatments and generation of good quality ECS seems possible.
- Among samples taken from old calluses, for initiation of ECS, a few of them have started to release cells. Although their nature is not predictable at this juncture, if we are able to see their regeneration potential, we will transform and regenerate them.
- The FPX seems another promising compound for callus production and possibly generation of ECS. From the previous work and our current observation identifying the right time when to take the calluses or somatic embryos to the liquid medium may give a positive result.
- Direct transformation and regeneration of explants following FPX treatment seems important. FPX treated plantlets will be transformed to see if there is possibility of infection by the *Agrobacterium* strains. In addition, regeneration of plants from the somatic embryos might help

to get large number of explants for further testing, e. g. multiplying the transgenic plants that we're expecting to get.

- A new banana promoter-terminator system was characterized for strong constitutive expression in banana.
- A new version of the Malaccensis resistance RGA2 candidate gene was characterized and cloned
- Constructs are ready for transformation into banana for the transgenic and the cis approach

4. FUTURE WORK

- Production of ECS from the induced calluses and continuing new setups. Induction of ECS from both calluses that we get will be used for generation of ECS.
- Optimization of procedures for transformation of ECS. There are different reports that show how banana transformation is being done.
- Production of Embryogenic callus with a modified protocol. There is a recently obtained protocol that we would like to test
- Optimization of ECS establishment from FPX treated explants
- Regeneration of plants from FPX induced somatic embryos
- Transformation and regeneration of different explants (callus, ECS, somatic embryos)
- Multiplication of *in vitro* plants and continuation of transformation of meristem tips or for using them for generating ECS with FPX
- Transformation of left-over calluses obtained during production of EC. We expect that, the remaining part of the embryogenic callus (after removing the embryogenic callus for initiation of cell suspension) the part that remain could respond to agrobacterium infection.
- Developing the CRISPR-based gene targeting approach

Our general gene targeting strategy is similar to that described in earlier study in tomato. It is based on DSB induction in the target gene and amplification of the donor, as shown in Figure 10.

Gene Targeting Strategy:

Combine efficient DSB induction and donor amplification

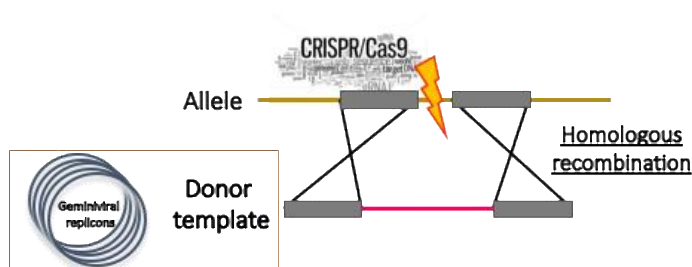


Fig. 12. Gene targeting concept. We want to replace a native allele with a new combination of native sequences. For example, replace the Gran Nain TR4 sensitive line's RGA2 by the *M. malaccensis* RGA2. The donor template will have the replacing sequence flanked by sequences homologous to the target region. To obtain a high amount of the donor template, it is cloned within a geminiviral replicon. The target native allele is specifically cut by CRISPR/Cas9, to induce homologous recombination repair and thereby replacement of the native allele with the donor.

We will try two scenarios: The first, as shown in Figure 11, consists in replacing the RGA2 native promoter by the strong constitutive banana promoter that we have isolated. The second scenario consists in replacing the coding region of the sensitive endogenous allele by the resistant one (from a resistance variety)—this will be done once the actual sensitive allele will be identified.

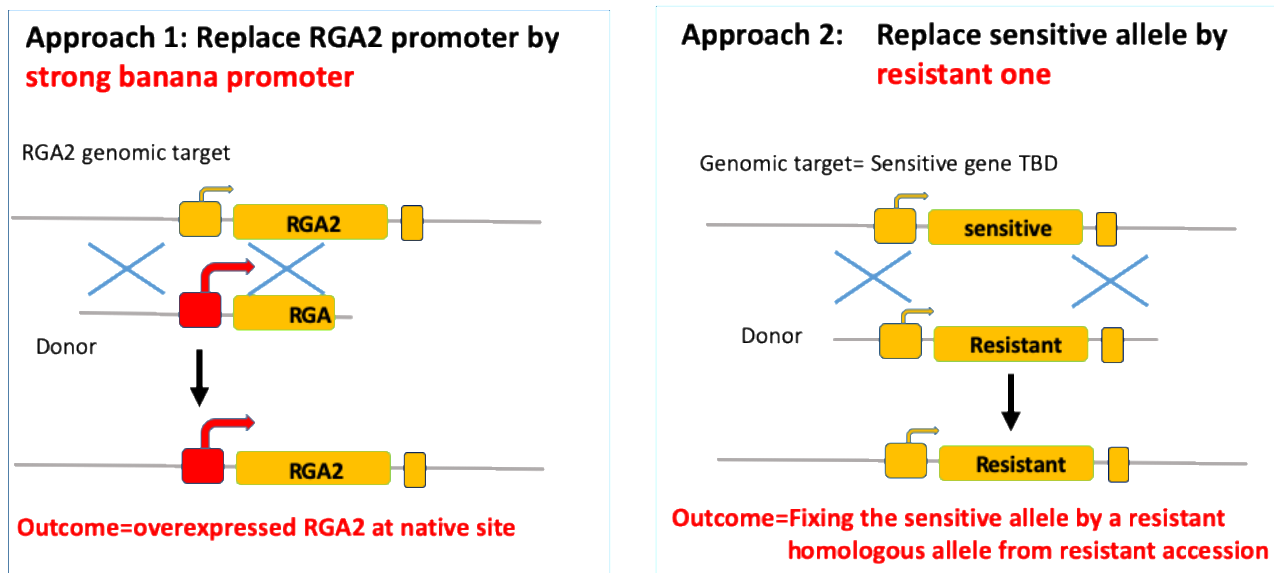


Fig. 13. Gene targeting approaches. Approach 1 – overexpression of RGA2 at its native site—replace the TR4 sensitive Gran Nain RGA2 promoter by a strong Banana promoter (Ubiquitin promoter as in Figure 8B). We expect this approach to confer TR4 resistance if the limiting factor of sensitivity is the RGA2 expression level. Approach 2 – replacing a sensitive allele by a resistant homologous allele – replace the TR4 sensitive Gran Nain RGA2 open reading frame, or part of it, by the same part of *M. malakensis* RGA2. We expect this approach to confer TR4 resistance if the limiting factor of sensitivity is the RGA2 protein sequence.

The system will be adapted for work in monocots, using as a source to build a gemini viral replicon the Wheat Dwarf Virus (WDV) as shown in Figure 12.

Construct for gene-targeting (To Be Done)

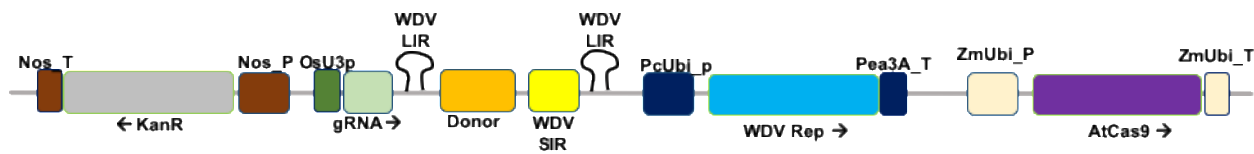


FIGURE 12 Gene-targeting cassette with Wheat Dwarf Virus (WDV) geminiviral amplicon. The amplified region is between the the WDV LIR sequences and contains the donor sequence for homologous recombination. The guide RNA (gRNA) is designed for recognition the genomic target and its specific digestion by Cas9. Both WDV Rep and AtCas9 are under promoters that give good expression in monocots. NOS_P- Nopaline synthase promoter, KanR- Kanamycin resistance gene, NOS_T- Nopaline synthase terminator, OsU3p- Rice U3 promoter, LIR- long intergenic region, SIR- short intergenic region, PcUbi_P- Parsley ubiquitin promoter, Rep- replication initiator protein, Pea3A_T- Pea 3A terminator, ZmUbi_P- Maize ubiquitin promoter, AtCas9- Arabidopsis optimized Cas9, ZmUbiT- Maize ubiquitin terminator.

תכנית #4: אבחון, זיהוי ואפידמיולוגיה של גורם המחלה. צוות המחקר: ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, אפידמיולוגיה, זיהוי גורם המחלה בצמח), ד"ר דרור מינץ (מנהל המחקר החקלאי, זיהוי גורם המחלה בקרקע), ד"ר יעל מלר-הראל (השירותים להגנת הצומח, זיהוי גורם המחלה בקרקע).

תכנית זו מורכבת משני חלקים: א': אבחון, זיהוי ואפידמיולוגיה של גורם המחלה, ב': איתור גורם המחלה בקרקע, ובוצעה ע"י שתי קבוצות מחקר שונות. הדיווחים על שני החלקים מופיעים אחד אחרי השני.

חלק א': אבחון, זיהוי ואפידמיולוגיה של גורם המחלה

מטרות המחקר הספציפיות לשנה ב', כפי שהוגדרו בהצעת המחקר, ותוצאות וממצאים:

4.4 המשך אבחון שונות גנטית וביסוס שיטת ה-VCG

נבדקה קבוצת התאם וגטטיבי (VCG) של תבדידים מהאזורים החדשים. לצורך זה יצרתי מוטנטים לנציגים מכל אתר והכלאתי אותם עם מוטנטים מקבוצת VCG שונות מהארץ ומחו"ל. כל המוטנטים מהארץ עברו השלמה האחד עם השני וכן עם התבדידים מירדן, אינדונזיה והפיליפינים ומכאן שכולם שייכים לאותה קבוצת התאם וגטטיבית (VCG) השייכת ל- TR4, 01213 (טבלה 1).

טבלה 1. סיכום של נציגי הפטרייה, מקור אוגרפי וקבוצת התאם.

שם תבדיד	מקור גאוגרפי	קבוצת VCG
FOC 1	שפייה	1213
FOC 5	עין גב	1213
FOC 16	מסדה	1213
FOC 18	גשר	1213
FOC 26	דגניה ב'	1213
II-5	אינדונזיה	1213
S1B8	פיליפינים	1213-01216
JV11	ירדן	1213
CAV 095	קיפרסול, דרום אפריקה	0120
CAV 105	קיפרסול, דרום אפריקה	0120
CAV 188	טנזניה	1212
CAV 786	אוסטרליה	0124

4.5 תחילת לימוד האפידמיולוגיה של גורם המחלה בשדה

נדגמו צמחים חולים וחלקי הצמחים הובאו למעבדה ל"מיפוי" נוכחות הפתוגן בחלקי הצמחים הנגועים (איור 1).

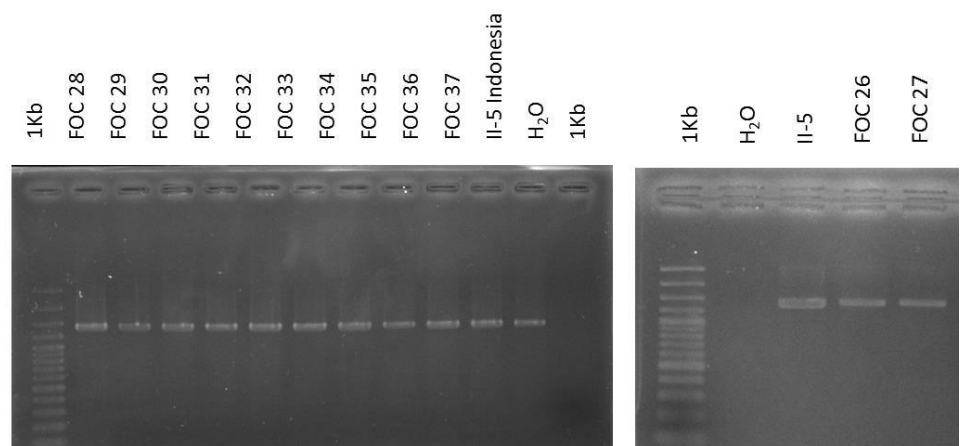


איור 1. "מיפוי" נוכחות הפתוגן בחלקי הצמחים הנגועים

כפי שניתן לראות (באיור 1, למעלה) נוכחות הפטרייה נמצאה בחלקים השונים בצמח לפי ההחמה בצורות ההובלה. ניתן לבדוד את הפטרייה מהפרקים וגם מהגבעולים, אך לא ידוע האם הפטרייה מועברת לפרי מאחר ולא נמצאו צמחים לדיגום עם פירות על העץ בשנת 2019. נמצא בניסויי חממה שהפטרייה יכולה לעבור מהטרפים סיסטמית עד לקצה העלים.

4.6 הפעלת שיטת זיהוי אמינה לבחינת נוכחות הפטרייה בחומר הצמחי

בחדשים האחרונים (אוגוסט – אוקטובר, 2019) נאספו 35 תבדידים חדשים שבודדו מדוגמאות מקיבוץ גשר, מסדה, קיבוץ דגניה ב', קיבוץ שער הגולן, שפייה וקיבוץ בית זרע. כולם אומתו כ FOC TR4 בשיטות מולקולריות. דוגמא לזיהוי עם פריימרים ספציפיים מ O'Neill et al. 2016 מצורפת (איור 2).

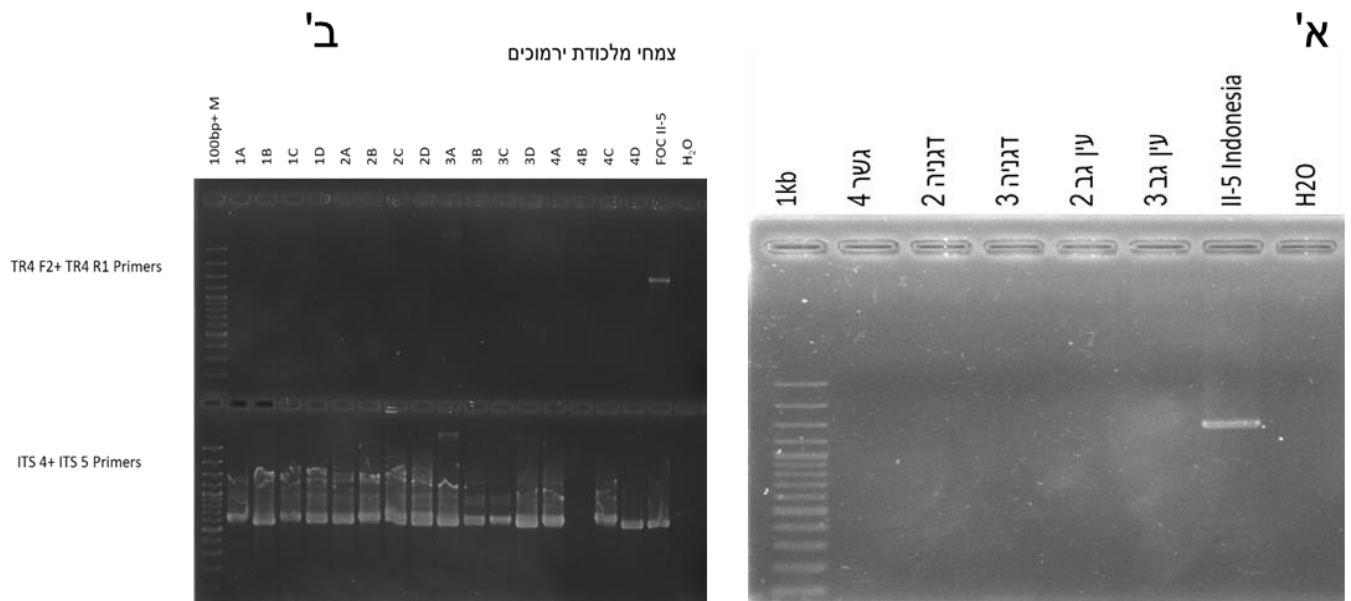


איור 2. דוגמאות 26,33-37 מדגניה ב', דוגמא 27 ממסדה, דוגמאות 28-32 מגשר עם הגברה חיובית לפטרייה TR4.

4.7 כיוול שיטת ריכוז מים למדידת הפטרייה בריכוזים נמוכים

בחינת נוכחות הפטרייה במים נבדק באמצעות צמחי מלכודת שנשתלו בסמוך לזרימת מי נגר, סביב חלקות נגועות בעין גב, מסדה דגניה, גשר ומאגר ירמוכים. הבחינה נעשתה ע"י בידודים משתילים שהונחו בתעלות ניקוז סביב החלקות הנגועות. חלקי הצמחים הונחו לאחר חיטוי חיצוני על מצעים סלקטיביים. מכל שתיל שצמחו בו פטריות מהסוג פוזריום, נלקחו מושבות לגידול במצע נוזלי, הופק DNA ונעשה PCR עם הפריימרים הספציפיים של O'Neill et al. 2016.

TR4 FOC לא התגלה בצמחי המלכודת, כפי שניתן לראות בג'ל המצורף (איור 3).

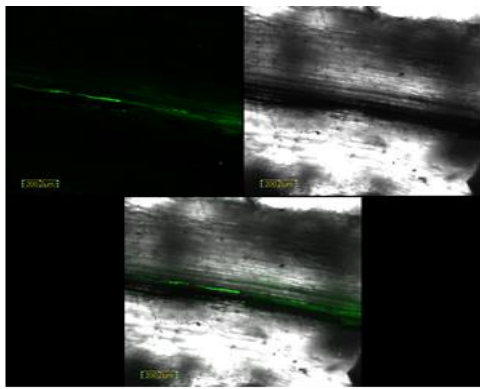


איור 3. א. הגברה של דוגמאות DNA של פטריות שבודדו בצמחי בננה ממי נגר מעין גב, מסדה דגניה, וגשר, וב' מוירמוכים הגברה חיובית של פס אבחון של DNA מביקורת של הפטרייה TR4

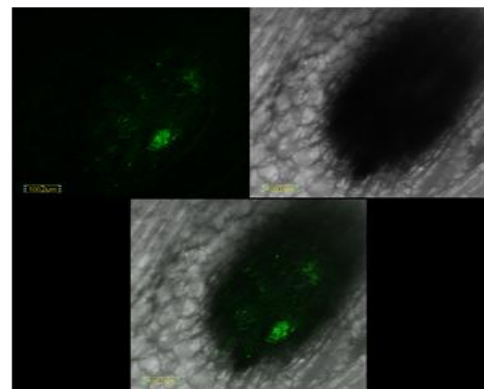
4.8 שימוש בתבדיד GFP ללימוד איכלוס צמחים מאולחים ומאכסנים פוטנציאליים

שלושה זנים רגישים (Grand Nain, Pisang Mass, Lakatan) ושניים עמידים (Calcutta 4, Aacv Rosa) אולחו בתבדיד מסומן ב GFP. האילוח נעשה בטבילה בתרחיף בריכוז 10^6 נבגים למ"ל למשך 30 דקות, 10 צמחים לטיפול. בתום הטבילה, נשתלו הצמחים באדמה.

נעשה מעקב אחר השורשים במיקרוסקופ קונפוקאלי לאורך הזמן. כשבועיים לאחר האילוח נראה תפטיר של הפטרייה בכל הזנים שנבדקו כאשר היה איכלוס וחדירת התפטיר למערכת השורשים של הזנים הרגישים אך בזנים העמידים הפטרייה לא חדרה לצינורות ההובלה ונצפתה רק חיצונית ע"ג השורשים (איור 4).



Grand Nain8 14dpi



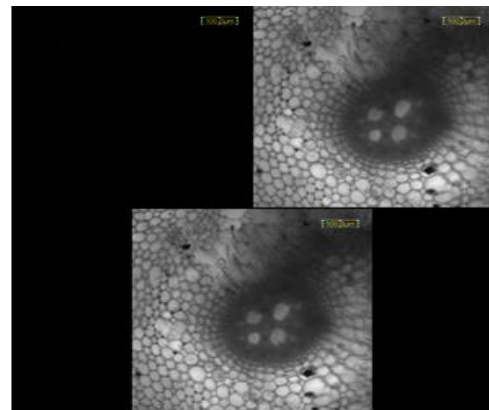
Grand Nain8 17dpi

רגיש



Calcutta4 14

עמיד



Calcutta4 14dpi

איור 4. מעקב אחר השורשים של בננה (רגיש – Grand Naine ו- עמיד Calcutta 4) המודבקים בתבדיר TR4 מסומן ב-GFP באמצעות מיקרוסקופ קונפוקאלי לאורך 14 יום מהאילוח.

4.9 איתור מאכסנים אלטרנטיביים ל-TR4

זרעים של עשבים רעים, הצומחים באיזור גידול בנות, נאספו או הוזמנו מבנק הגנים והונבטו באדמה; 10 צמחים מכל עשב אולחו בפטריית FOC-TR4 המהונדסת ב-GFP (איור 5). האילוח נעשה ע"י טיפוסף של מ"ל אינוקולום בריכוז 10^6 לאיזור בית השורשים. לאחר כחודש בחנו 5 צמחים מכל עשב לנוכחות לטנטית של הפטרייה המסומנת, ע"י חיטוי וזריעה של חלקי הצמח על מצע סלקטיבי עם היגרומיצין. חמשת הצמחים הנוספים ידגמו לאחר חודשיים.



אמרנטוס



חרדל



מעוג



ינבוט



מרור הגינות



טיון דביק



גזר קיפח



איטון מרצעני



ירבוז לבן



שיבולת

איור 5. עשבים רעים שאולחו ב4TR מסומן ב-GFP.

הודבקו ע"י הפתוגן, ללא GFP כפי שנבחן (טבלה 2), כל השורשים של עשבי הבר שאולחו בתבדיד המסון ב- תופעה שך סימפטומים. כמוכן, רוב הגבעולים גם הודבקו, סימן שיש מעבר סיסתמי של הפטריה לנוף.

טבלה 2. אכלוס צמחי בר בתבדיד 4TR מסומן ב-GFP

שם העשב	אחוז צמחים מאולחים	איכלוס שורש	איכלוס גבעול	איכלוס תפוחת
ירבוז	100 (5/5)	+	+	-
גזר קיפח	80 (4/5)	+	-	לא נבדק
חרדל	100 (5/5)	+	+	לא נבדק
איטון מרצעני	80 (4/5)	+	-	לא נבדק
ינבוט	40 (2/5)	-	+	לא נבדק
מרור הגינות	60 (3/5)	+	+	לא נבדק
טיון דביק	100 (5/5)	+	-	לא נבדק
שיבולת	40 (2/5)	+	+	לא נבדק
מעוג	60 (3/5)	+	+	לא נבדק
ירבוז שרוע	40 (2/5)	+	+	-

5.4 בחינת מדבירים ביולוגים (חיידקים ומיקוריזה) שמראים מידת עיכוב גידול גורם המחלה-בחממה

ניסויי מיקוריזה

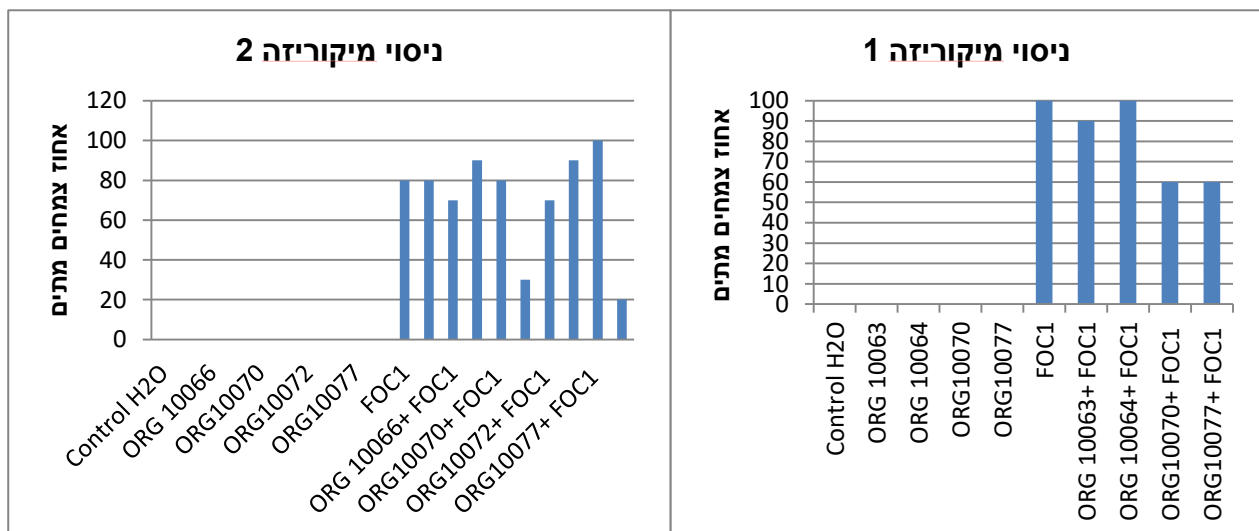
פוטנציאל ההגנה של מיקוריזה כנגד גורם המחלה TR4 נבחן בעצמים בחממה במספר ניסויים. תכשירי המיקוריזה עורבבו בקרקע שבועיים לפני ההדבקה להגנת שתילים ואז הודבקו בנבגים של פטריית ה- TR4 (10 צמחים לטיפול, טבילה למשך 30 דקות ב- 10^6 נבגים למ"ל).

הניסוי כלל צמחי ביקורת, צמחים מאולחים בתבדיר TR4, צמחים מאולחים במיקוריזה וצמחים מאולחים במיקוריזה וב TR4. בגמר ההדבקה הצמחים נשתלו בעצמים קטנים ועקבנו אחריהם למשך חודש ימים. הצמחים דורגו לפי דרגת חומרת המחלה (0 - בריא, 1- נגיעות בגבעול/25% עלים יבשים, 2- 50% מהעלים מתים, 3- 75% מהעלים מתים, 4- צמח מת).



0 1 2 3 4

איור 6. דירוג נגיעות צמחים לפי חומרת המחלה (0 - בריא, 1- נגיעות בגבעול/ 25% עלים יבשים, 2- 50% מהעלים מתים, 3- 75% מהעלים מתים, 4- צמח מת).



איור 7. אחוז תמותה של צמחי בננה שאוכלסו במיני מיקוריזה לפני אילוח בתבדיר TR4. כפי שנראה, בשני ניסוי המיקוריזה, ישנם מינים שמצליחים להפחית באחוזי תמותת השתילים אך אין טיפול שמפחית ב- 100% תמותת שתילים בהשוואה לביקורת ה- TR4.

מסקנות ולקחים

1. בשנה האחרונה (2019) המחלה נתגלתה בעוד ארבעה מקומות (דגניה ב', שער הגולן, גשר ובית זרע). שיטת האבחון המולקולרי על בסיס פריימרים של O'Neill et al. 2016 היו נאמנים ואימתו נוכחות הפטרייה TR4 במטעים אלה. נמצא גם נוכחות גורם המחלה בהגברת PCR בצמחים נגועים טבעי בשיטה זו.
2. שיטת וידוא ה-VCG אפשרה להוכיח שאכן האוכלוסייה בארץ קלונאלית בהשוואה לתבדידים אחרים שהתקבלו מחו"ל.
3. בחינת נוכחות הפטרייה במים נבדקה באמצעות צמחי מלכודת שנשתלו בסמוך לזרימת מי נגר, סביב חלקות נגועות במטעים שונים, ובמאגר ירמוכים בעמק הירדן. מבידודים משתילים שהונחו בתעלות ניקוז שצמחו בו פטריות מהסוג פוזריום, לא התגלתה מופע של TR4. ניתן עם כן לקבוע שלא הייתה הפצה במים מחלקות שנבדקו, או מהירמוך.
4. שלושה זנים רגישים (Grand Nain, Pisang Mass, Lakatan) ושניים עמידים (Calcutta 4, Aacv Rosa) אולחו בתבדיד מסומן ב-GFP כדי לבחון את מנגנון ההדבקה. נמצא שתפטיר הפטרייה חדרה למערכת השורשים של הזנים הרגישים אך בזנים העמידים הפטרייה לא חדרה לצינורות ההובלה ונצפתה רק חיצוני ע"ג השורשים.
5. זרעים של עשבים רעים, הצומחים באיזור גידול בנות, אולחו בפטריית FOC-TR4 כדי לבחון האם הם יכולים להידבק באופן לטנטי. נמצא שכל השורשים ורוב הגבעולים של עשבי הבר שאולחו הודבקו ע"י הפתוגן, שיכולים להוות מקור לאילוח ופיזור הפתוגן מחלקות נגועות.
6. בשני ניסויי מיקוריזה, ישנם מינים שמצליחים להפחית באחוזי תמותת השתילים אך אין טיפול שמפחית ב-100% תמותת שתילים בהשוואה לביקורת ה-TR4 - הנושא חייב בדיקה מעמיקה יותר.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית

תוספת למחקר:

לאור ביצוע ריצוף הגנום של 5 תבדידי הפתוגן (2 מקומות בארץ – שפיע ועין גב; 3 תבדידים מחו"ל – ירדן, אינדונזיה והפיליפינים) להשוואת מוטציות ה-SNPs נקבע שמקור הפתוגן המקומי מירדן. ממצא זה חשוב ביותר ע"מ למנוע העברת גורם המחלה לאיזורים אחרים בארץ שלא נגועים, הנטועים בבננה בסמיכות לגבול הירדני.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה ג'

4.5 המשך לימוד האפידמיולוגיה של גורם המחלה בשדה

נדגמו צמחים חולים וחלקי הצמחים הובאו למעבדה ל"מיפוי" נוכחות הפתוגן בחלקי הצמחים הנגועים אך לא נמצאו צמחים לדיגום עם פירות על העץ בשנת 2019. נמשיך להעריך נוכחות הפתוגן בפירות של עצים נגועים ע"מ לבחון האם הפתוגן מועבר בפירות או בשיזרה של הפרי.

4.9 המשך איתור מאכסנים אלטרנטיביים ל-TR4

נמשיך לאסוף זרעים של עשבים רעים, הצומחים באיזור גידול בננות, לבחון את הפוטנציאל שלהם להעביר את המחלה גם בזרעים שהם מפיצים.

4.10 המשך לימוד האפידמיולוגיה של גורם המחלה בחממה ושדה בעזרת תבדיד מסומן ב- GFP

ימשכו הניסויים למעקב אחר נוכחות הפטרייה בצמחים המאולחים בתבדיד המסומן. ימשך סקר הנגיעות במטעים בארץ ונוסיף לבחון את נוכחות הפטרייה והתפשטותה בשדה. דוגמאות יובאו בכל עת לבחון המחלה משטחים החשודים כנגועים.

4.11 נוכחות והישרדות הפטרייה בקרקע נגועה ובמים

נוכחות הפטרייה תבחן ע"י דגימות קרקע מאזורים שונים ליד צמחים המאולחים באופן טבעי. שיטת הזיהוי המולקולרי שתמצא כאמינה ביותר מוקדם יותר בתכנית, תבוצע על דגימות DNA שיופק מהקרקע. קיימים קיטים מסחריים להפקת DNA שירכשו לביצוע העבודה (אך נוכחות הפתוגן החי תיבדק בשיטות מגוונות נוספות כולל מיהולים בצלחות). כמוכן, ישתלו צמחי בננה "בוחן" בקרקע במטע הנגוע לבחינת נוכחות הפטרייה.

4.12 רצוף ואנליזה של גני SIX

לאור ריצוף הגנום של הפטרייה, גנים האחראים להפרשות אפקטורים כגון גני ה- SIX (secreted into xylem) ירוצפו ונבחן את משמעותם בגרימת מחלה ע"י טרנספורמציות חסר של גנים אלה.

5.4 בחינת מדבירים ביולוגים (חיידקים ומיקוריזה) שמראים מידת עיכוב גידול גורם המחלה-בחממה

ימשכו בחינות פוטנציאליות של מיקוריזה ואנדופיטים שיכולם להשרות עמידות בצמחי בננה למחלה.

חלק ב': אבחון גורם המחלה בקרקע

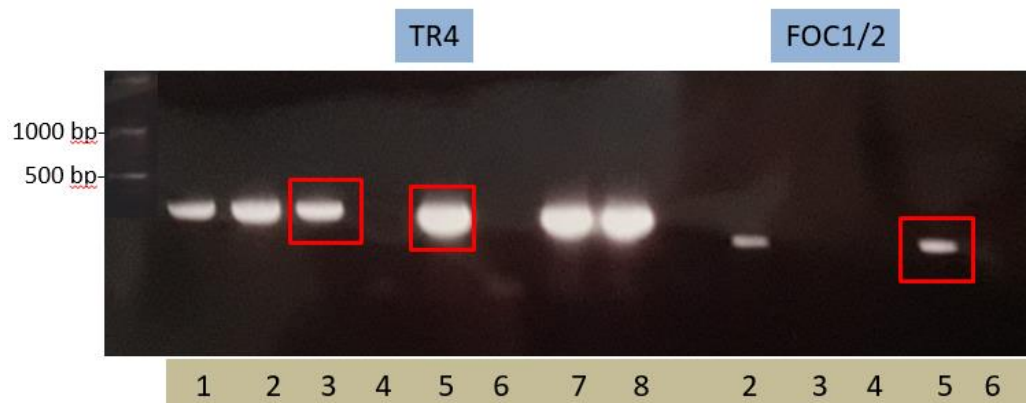
מטרות המחקר הספציפיות לשנה ב, 'כפי שהוגדרו בהצעת המחקר:

- (1) בחירה קיט יעיל להפקת DNA פטרייתי מקרקע
- (2) זיהוי DNA של TR4 בקרקע מאולחת בשיטות שונות
- (3) מדידה סף הרגישות של השיטות השונות

תוצאות וממצאים:

המחקר התחיל בדצמבר 2018. דגימה של קרקע לא נגועה מצפון הארץ חולקה לשתי קבוצות. הקבוצה הראשונה עוקרה באוטוקלב והשנייה נשארה ללא טיפול. לאחר אילוח של הקרקעות עם תרחיפי נבגים של הפטרייה (על פי Zhang et al-2013), ריכוז הפטרייה בקרקע נמדד על ידי דילולים סדרתיים של תרחיף הקרקע המעוקרת. במקביל, מהקרקע שלא עוקרה, הופק DNA בשלוש שיטות שונות (שני קיטים והפקה ידנית בCTAB). יעילות שיטות ההפקה הושוותה לפי ריכוז ה-DNA הסופי, ולפי ייצוג DNA TR4 ב-DNA הכללי. זיהוי מולקולרי של TR4 נעשה ב-PCR עם פריימרים ספציפיים ל-TR4 (Dita et al 2010, Lin et al 2009) FocTR4F/R FOC1/2. הקיט Exgene soil

(מחברת Geneall), KIT2, ' נבחר כיעיל ביותר (יאור 1). בהמשך, סף גילוי TR4 עם שני זוגות הפריימרים הספציפיים נבחן על ידי אילוח עם תרחיף נבגים בריכוזים הולכים ויורדים, והפקת ובדיקת PCR. הפריימרים FOCTR4F-R אפשרו לגלות עד 2×10^3 cfu/g לעומת FOC1-2, עם סף גילוי של 2×10^4 cfu/g. בהמשך, DNA הופק מקרקע מחלקה נגועה בפנמה ובבדק ב PCR. לאחר שלא התקבל תוצר PCR עם FOCTR4F-R, בדיקת NESTED PCR (Dita et al, 2013) אפשרה קבלת תוצר אבל ללא ספציפיות ל TR4.



איור 1: זיהוי DNA 4TR ב PCR עם שני זוגות של פריימרים ספציפיים. DNA שנבדקו הם: , תבדיד 2, TR4, עץ נגוע, 3-קרקע עם KIT1, , קרקע עם 5 CTAB, קרקע עם KIT2. הריבוע האדום מראה על התוצר DNA הספציפי.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

התכנית בוצעה בהתאם למתוכנן, ללא בעיות מיוחדות.

מסקנות ולקחים:

הגענו למסקנה שהקוט EXGENE SOIL הוא היעיל ביותר. בנוסף, מדדנו את סף הרגישות של שיטת ה PCR עם שני זוגות הפריימרים. בסוף הבנו שריכוז המדבק בקרקע נגועה טבעית מתחת לסף הרגישות של שיטת ה PCR ולכן השיטה לא שמישה

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

בשנה ג, נפתח שיטות זיהוי רגישות יותר, לצורך בדיקות קרקעות טבעיות. כגון NESTED PCR או REALTIME PCR שמתייחס לגן ספציפי W (Li et al, 2013).

תכנית #5: דיכוי ובקרה ביוטית ואביוטית של גורם המחלה.

צוות המחקר: ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, דיכוי בעזרת מיקוריזה), ד"ר דרור מינץ (מנהל המחקר החקלאי, דיכוי בעזרת חיידקים), ד"ר עמר פרנקל (מנהל המחקר החקלאי, דיכוי בעזרת ביופחם), ד"ר אלן גרבר (מנהל המחקר החקלאי, ייעוץ בנושא ביופחם), ד"ר יגאל אלעד (מנהל המחקר החקלאי, ייעוץ בנושא ביופחם).

תכנית זו מורכבת משני חלקים: א': דיכוי גורם המחלה בעזרת חיידקים מעכבים, ב': דיכוי גורם המחלה בעזרת ביופחם, ובוצעה ע"י שתי קבוצות מחקר שונות, והדיווחים על שני החלקים מופיעים אחד אחרי השני.

חלק: א': דיכוי גורם המחלה בעזרת חיידקים מעכבים

מטרת המחקר בשנה ב': בידוד ובחינת מדבירים ביולוגים (חיידקים) שמראים מידת עיכוב גידול גורם המחלה-בחממה.

תוצאות וממצאים:

לאחר סריקה של כמה מאות חיידקים שבודדו משורשי בננה ומקרקות מחוות צמח הגענו לכ- 200 תבדידים נקיים. לכל התבדידים בוצע מבחן השראת עיכוב גדילה של זני פוזריום. לאחר מכן התחלנו ביצירה של קונסורציום של כמה זני חיידקים שונים עפ"י הסכימה הבאה:

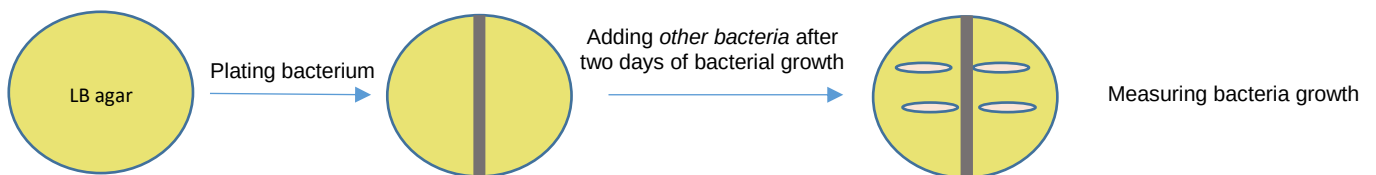
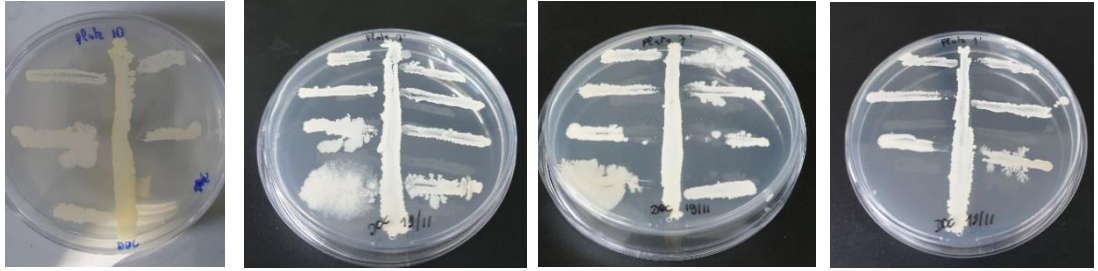


Figure 1: SCHEMATIC DESCRIPTION OF THE PROCESS OF SCREENING BACTERIA AGAINST OTHER BACTERIA

דוגמא למספר צלחות בהן נבחן עיכוב הדדי של החיידקים נראית באיור הבא:

יצרנו כ- 12 קונסורציומים עם 38 חיידקים ו- 6 חיידקים בודדים שהראו כולם פוטנציאל לעיכוב *Fusarium oxysporum* (Foc) בצלחות פטרי. קונסורציומים נוצרו בחיבור חיידקים שלא מעכבים אחד את השני בצלחת פטרי.





איור 2. מבחן ביולוגי במעבדה לעיכוב הדדי של תבדידי חיידקים שונים, לתכנון קונסורציה בהן אין נזק הדדי בין החברים

Consortia/treatment name	Isolates name
Consortium 1	L55 + L17 + S60
Consortium 2	L66-02 + L47 + L72-02
Consortium 3	M141A/A + M141B
Consortium 10	M91 + M209B + M209A
Consortium 11	M203 + M138 + M56
Consortium 12	M145 + M26 + M40B + M76
Consortium 13	M88B+M7B + M80A/A
Consortium 14	M172A + M172B + M88A + M7A
Consortium 15	M6B/A + M80B + M6B/B
Consortium 16	M196 + M38 + M197 + M170
Consortium 17	L65-02 + L13-02 + K07
Consortium 18	S89 + S32 + S10
Treatment 4	NYG5
Treatment 5	G14
Treatment 6	G07
Treatment 7	S25
Treatment 8	APO9

Treatment 9	D1
-------------	----

Table 1: different treatment for greenhouse experiments

לשם אילוח עציצים בחממה החיידקים גדלו למשך הלילה כדשא על גבי צלחות פטרי ב 30C, הביומסה נאספה מעל גבי האגאר, נשטפה והורחפה במים. התרחיף שימש להשקיית השתילים פעם ביום למשך שלושה ימים ולאחר ההשקייה השלישית הצמחים הועברו ונשתלו בעציצים שהוכנו כמתואר למטה.

יצירת פרוטוקול לאילוח FOC בחממה על ידי דוחן:

FOC גדל על דוחן סטרילי למשך כשבועיים

חלוקה לעציצים בצורה זוהה

דוחן מאולח מעורבב עם מצע גידול



פיזור מיכלים בחממה וגידול כ 1-1.5 חודשים



חלוקת עציצים לטיפולים במיכלים



שתילה ואילוח
בחיידקים/קונסורציה



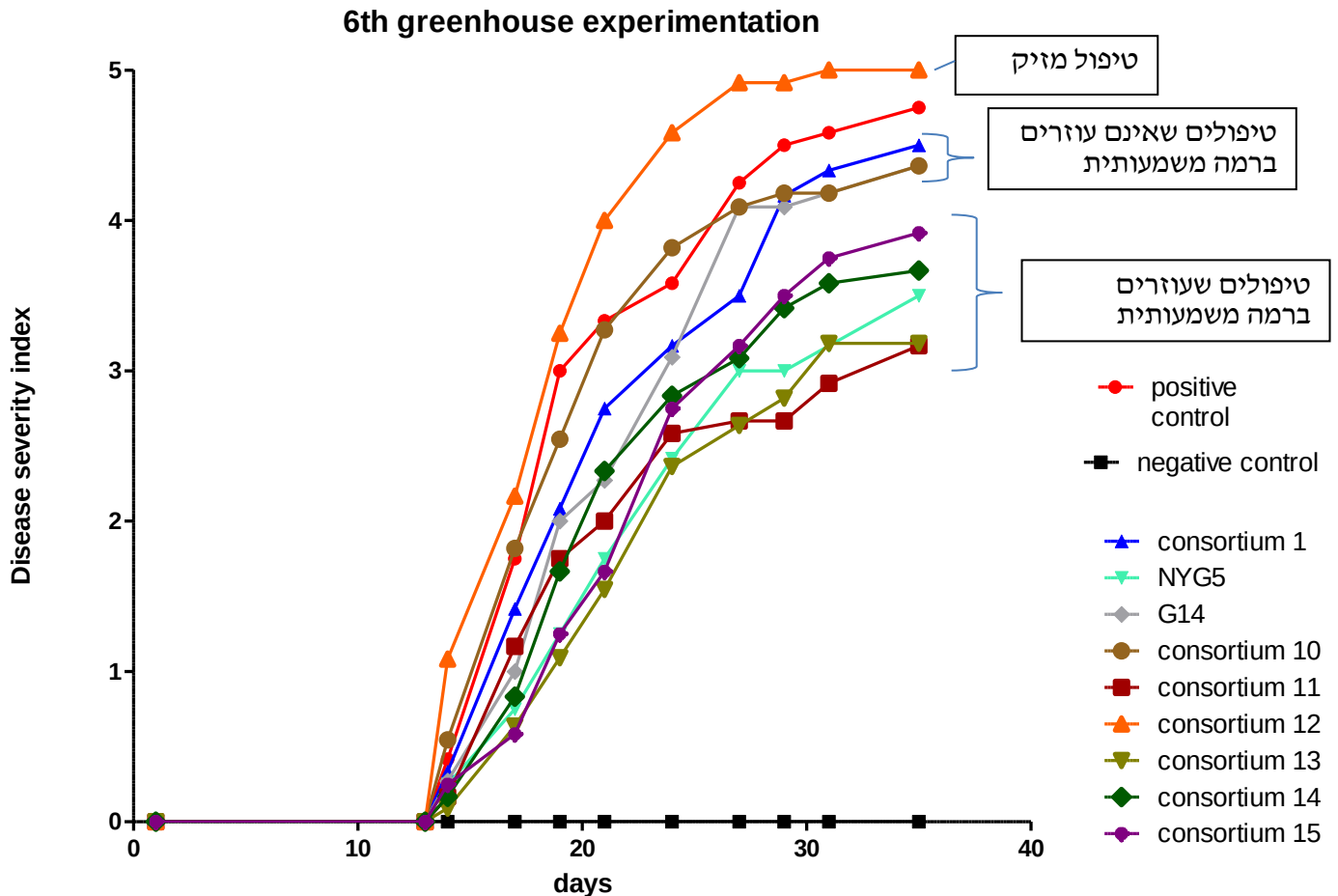
איור 2: פרוטוקול לניסוי חממה עם FOC

בתצורה הסופית של הניסוי ישנם 6 עציצים מאותו טיפול בכל מיכל פלסטיק ו- 2 מיכלים כאלו בכל ניסוי, כך שיש 12 עיצונים לכל טיפול. סידור המיכלים בחממה הנו באקראי והמיקום שלהם משתנה מדי 1-2 ימים למניעת השפעת

המיקום (איוורור, טמפרטורה, תאורה). כל ניסוי אורך כ 1-1.5 חודשים, בתלות בגודל השתילים שמתקבלים וקצב הגדילה ווהתפתחות המחלה. סה"כ בוצעו עד כה 6 מחזורי גידול בחממה.

תוצאות הניסוי האחרון מתוארות באיור הבא:

Figure 3: תוצאות של הניסוי חממה מס' 6



מסקנות ולקחים: בידינו מספר קונסורציה ומדברים ביולוגים (חיידקים) שמראים מידת עיכוב גידול גורם המחלה בצלחות פטרי וכן בניסוי חממה. חלק מהקונסורציה והחיידקים הראו פוטנציאל ביותר מניסוי חממה אחד ועל כן יפוצלו לחיידקים בודדים כדי להגדיר את התבדיד הטוב ביותר ולבחון באם ישנה סינגייה בין פעילות החיידקים שמשפרת את הביצועים. יש לחזור מספר פעמים על בדיקת כל אחד מהקונסורציה שהראו פוטנציאל בניסוי חממה כדי לבחור את הטיפולים האופטימאליים נגד *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). תבדידים מסויימים וגם קונסורציה ספציפיים הראו נזק- דהיינו החמרה בתסמיני המחלה, הגם שכולם הראו דיכוי של הפתוגן במעבדה. זה כנראה קורה בשל גרימת נזק לצמח או הגדלת פגיעותו למחלה.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית: אין

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה: חזרות על ניסויי החממה במתכונת הנוכחית לשם אימות הממצאים עד כה (חזרות על קונסורציה מבטיחים, פירוק קונסורציה מבטיחים לחיידקים בודדים) ובחינת השפעה

משולבת עם ביופחם ומיקוריזה עם החיידקים שהראו פוטנציאל בניסוי חממה. בסוף השנה אנו מקווים להצטרף לניסויים במטע נגוע לבחון את הפחתת המחלה ע"י חיידק/קונסורציום/קומבינציה עם מיקוריזה ו/או ביופחם בשטח.

חלק: ב': דיכוי גורם המחלה בעזרת ביופחם

מטרת המחקר בשנה ב': בחינת ביופחם לעיכוב הפטרייה בתנאי חממה. משימות שנה ב: פיתוח שיטת הדבקה יעילה דרך הקרקע ובחינת השפעת סוגי ביופחם שונים וריכוזיהם על דיכוי מחלת הפוזריום

תוצאות וממצאים:

פיתוח שיטת הדבקה יעילה דרך הקרקע: פרויקט בחינת יעילות הביופחם החל בפיתוח שיטת אילוח השונה משיטת הטבילה אשר שימשה עד כה במיזם. ממידע קודם אנו יודעים כי מרבית הפעילות הצפויה של יישום ביופחם נגרמת בעזרת עיכוב התפתחות אוכלוסיה מיקרוביאלית על שורשי הצמח אשר מונעות מהפתוגן להתבסס ולחדור בקלות אל הצמח. על כן נדרש פיתוח שיטה אשר תדמה את התמודדות הפתוגן בקרקע בנוכחות הביופחם. במסגרת הניסוי גודלה הפטרייה על מצע דוחן למשך 12 יום. בסיום התקופה נחתך לחתיכות דקות ועורבב ידנית באופן הומוגני בתוך מצע הגידול ביחס משקלי של 0.35% וביחס של 0.5% משקלי. המצע המאולח שימש לשתילת שתילים צעירים בני 30 יום שאחרי האילוח גודלו בתא גידול ב-32 מ"צ. בנוסף הועמד טיפול בקורת עם דוחן 0.5% ללא ביופחם. כעבור 30 יום נבדקו הצמחים. פותח סולם נגיעות אורדינאלי כמשתנה סדר בדרגות של 0-5 לפי חומרה נזק עולה. הסולם מוצג באיור מספר 1). כל הצמחים סבלו מסימפטומים של המחלה בדרגה ממוצעת של 3.6 עבור טיפול האילוח ב-0.5% ו 3.2 עבור האילוח ב-0.35%. ריכוז 0.35% משמש אותנו מעתה כשיטת האילוח המעודפת.



0 1 2 3 4 5
סולם דרגות הנגיעות

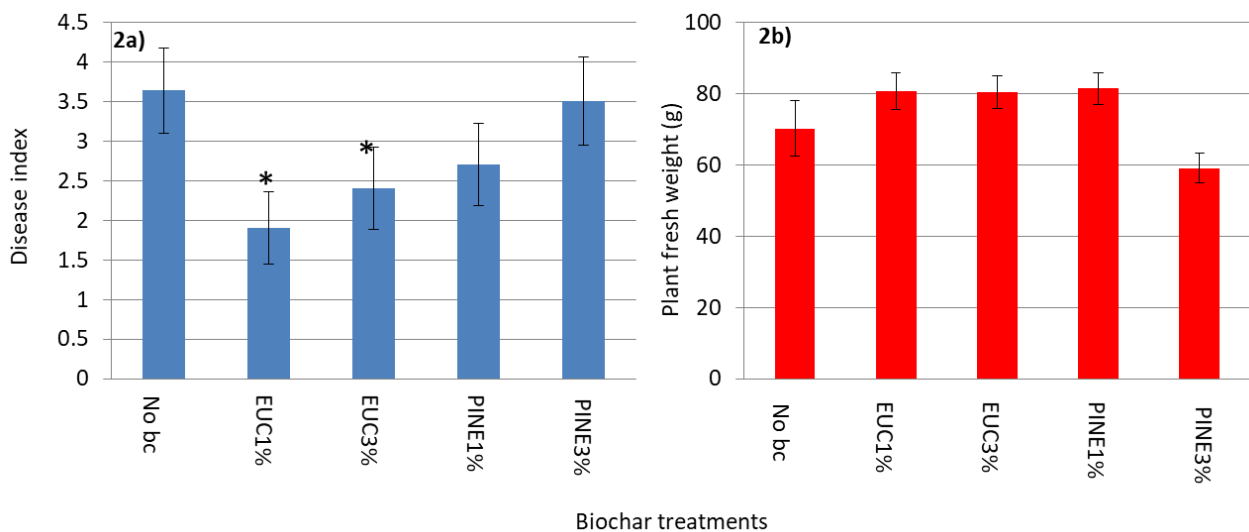
איור 1) סקלת הנגיעות של משתני סדר אורדינאליים, דרגה 0 מסמלת צמח בריא ודרגה 5 צמח מת

בחינת סוגים וריכוזים שונים של ביופחם ככלי להפחתת נזקי מחלת הפוזריום.

במהלך המחקר נבדקו שני סוגים של ביופחם, הראשון יוצר משבבי גזם עצי אקליפטוס בריכוזים של 1% משקלי ו3% משקלי (יצוינו בהמשך כ EUC1 ו EUC3 בהתאמה) וביופחם אשר יוצר מגזם עצי אורן בריכוזים של 1% ו3% (יצוינו בהמשך כ PINE1 ו PINE3 בהתאמה). הביופחם עורבב במצע שתילה שבועיים לפני האילוח בפוזריום והורטב מידי יומיים ב100 מ"ל מים לק"ג לשמירתו המצע לח ולשפעול של האוכלוסיות המיקרוביאליות. במקביל בוצע שפעול למצע גידול

ללא תוספת ביופחם. כעבור שבועיים בוצע אילוח במצעי הגידול בשיטת האילוח עם דוחן בריכוז 0.35% משקלי. הניסוי בוצע על 18 צמחים עבור כל טיפול. בסיום הניסוי הוערכה דרגת המחלה והניתוח הסטטיסטי בוצע במבחן א-פרמטרי Wilcoxon להבדל בין כל אחד מטיפולי הביופחם אל מול טיפול הבקורת (מבחן מקביל א-פרמטרי למבחן Dunett). הניסוי נערך פעמים.

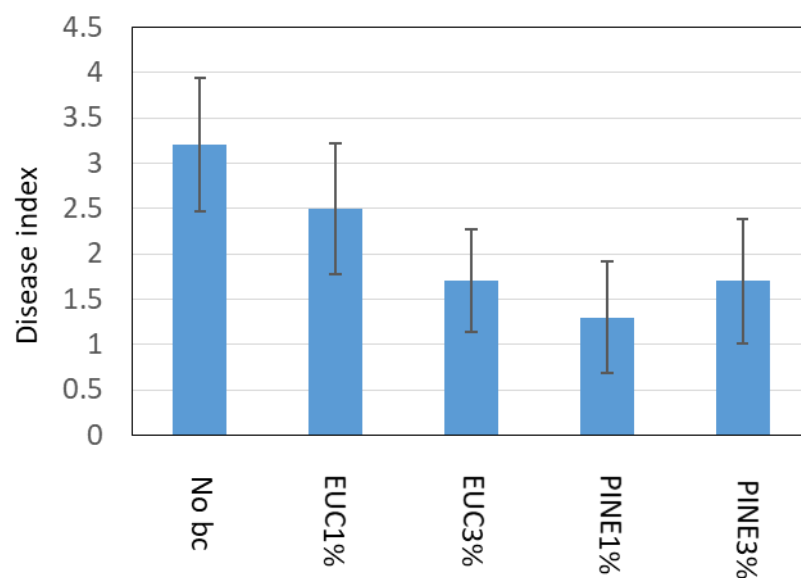
תוצאות ניסוי 1 מציגות את אינדקס חומרת המחלה 36 ימים לאחר האילוח. כל הטיפולים המאולחים בפוזריום הראו סמפטומים של המחלה כולל הצהבת עלים, נבילה ותמותת צמחים. יחד עם זאת, הפחיתו הטיפולים בביופחם EUC1 (אינדקס חומרת מחלה 1.90) ו EUC3 (2.41) במובהק את חומרת המחלה בהשוואה לטיפול הבקורת (המאולח בפוזריום ללא ביופחם 3.61). הטיפולים בביופחם PINE1 ו PINE3 לא הפחיתו באופן מובהק את חומרת המחלה בהשוואה לבקורת (2.7 ו 3.5 בהתאמה, איור 2A). יישום הביופחם בטיפולי בקורת לא מאולחים העלה את המשקל הרטוב של צמחי הבננות בנוכחות ביופחם EUC1, EUC3 ו PINE1 ב 8.7-13.5% בהשוואה לטיפול הבקורת אך הבדל זה לא היה מובהק. איור 2b). באיור 3 ניתן לראות את ההבדלים היוזואלים בין טיפול EUC1 לבין טיפול הבקורת המאולח בפוזריום בלבד. בחזרה השניה של הניסוי מוצגים מדדי המחלה 26 יום אחרי האילוח (איור 4). בניסוי זה הייתה ההפחתה המובהקת בחומרת המחלה בטיפולי ה EUC3 (1.7) וב PINE1 (1.3) בהשוואה לטיפול הבקורת ללא ביופחם (3.2). טיפולי ביופחם PINE 3 (1.75) ו EUC1 (2.5) לא הפחיתו במובהק את חומרת המחלה. יישומי הביופחם העלו את הביומסה הרטובה של צמחי הבננה בהשוואה להקש בעד 13.8% בטיפול ה EUC3, אך עקב השונות הגדולה ללא מובהקות מהבדיקות.



איור 2) הערכת חומרת המחלה בניסוי 1 36 ימים אחרי האילוח בפוזריום עבור אינדקס חומרת המחלה (2a) ועבור משקל הצמח הטרי (2b). לכוכבית מסמנת טיפול ביופחם הנבדל מטיפול הבקורת המאולח בפוזריום ללא ביופחם לפי מבחן –פרמטרי Wilcoxon.



איור 3: חומרת המחלה בסוף הניסוי ביום 36 אחרי האילוח ביישום ביופחם EUC1% (ימין) בהשוואה לטיפול ללא ביופחם (שמאל).



איור 4) הערכת חומרת המחלה בניסוי השני אשר בוצעה 26 ימים אחרי האילוח בפוזריום. כוכבית מסמנת טיפול ביופחם הנבדל מטיפול הבקורת המאולח בפוזריום ללא ביופחם לפי מבחן –פרמטרי Wilcoxon.

סיכום ומסקנות:

- (1) שיטת האילוח בעזרת דוחן בריכוז 0.35% משקלי הינה שיטה יעילה לבחינת יישום חומרים בקרקע בתנאים בהם איננו מעוניינים להחדיר את הפתוגן ישירות אל תוך השורשים.
- (2) ביופחם הפחית את חומרת המחלה בניסויי אילוח קרקע, נראה כי יש חשיבות לסוג הביופחם בו אנו משתמשים ולריכוזו. ביופחם העשוי מענפי אורן מראה תוצאות לא יציבות ופחות אחידות לכן לא נבחר בשימוש למחקר ההמשך. הטיפול בביופחם EUC3 הראה הפחתה מובהקת בחומרת המחלה בשני הניסויים והתוצאותיו עם שונות קטנה יותר לכן נמשיך עם ביופחם זה גם בניסויי שנה ג'. מהתוצאות גם עולה כי ביופחם לבדו איננו יכול לשמש אמצעי הדברה וחייב להיות משולב עם שיטות הדברה נוספות.

סטיות מתוכנית המחקר המקורית

בשנה זאת עמדנו במטרות המחקר

תוכניות לשנה ג' ושינויים מבוקשים בתוכנית המקורית:

כבר בזמן הגשת התוכנית העלנו את ההשערה כי ביופחם יהיה יעיל רק בשילוב עם אמצעי הדברה נוספים. אחת מהשיטות אשר רצינו לבדוק בהצעה המקורית של שנה ג הייתה שילוב עם חיידקים מועילים שיפזרו במהלך פרויקט. אנו מבקשים לבצע שינוי בתוכנית: אמנם בשלב הבא של המחקר נבדוק מספר מצומצם מאוד של חיידקים אנטגוניסטים עם ביופחם אך אנו מעוניינים לנסות ולשלב את הביופחם עם זני בננות מבטיחים בעלי עמידות חלקית כנגד המחלה ולבדוק את יכולת הביופחם לתרום להפחתת המחלה בעזרת שילוב זה (מטרה אשר לא הופיעה בתכנון המקורי). הוספת נדבך בדיקת השילוב עם הזנים בעלי העמידות החלקית תקטין את מספר השילובים שייבדקו עם חיידקים אנטגוניסטים אשר קיים ספק אם ביופחם בכלל יעודד אותם לפעילות מוגברת.

תכנית #6: גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות פוזריום בבננות. צוות המחקר: פרופ' אברהם גמליאל (מנהל המחקר החקלאי, בקרה משולבת של גורם המחלה, חומרי חיטוי), דר' סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, הדבקות בגורם המחלה).

תוצאות לשנה השניה על פי המטרות הספציפיות

מטרה: לצמצם את הפצת הפטריה מעצים נגועים לעצים בריאים באמצעות כלי עבודה מאולחים ולמנוע את הפצת הפטריה ממטעים נגועים באמצעות כלי עבודה מאולחים

א. המשך בחינת חומרים לחיטוי כלים ואמצעי עבודה באמצעות תכשיר חיטוי יעיל

בתום השנה הראשונה פיתחנו שיטה לבחינת חשיפת נבגים של פוזריום לתכשירי חיטוי. השיטה מבוססת על ספיחת הנבגים למשטח שמבוסס על בד לא ארוג שנטבל במצע אגר נוזלי, ולאחר התקרשות מתקבל מארג של מצע אגר קרוש שאחוז על ידי סיבי הבד ומאפשר מחד ספיחה טובה של נבגים, ומאידך לחשוף אותו לטבילה או ריסוס בתכשירים הנבדקים. לאחר הטיפול, ניתן לשחרר את הנבגים לתוך תמיסה נוזלית ולבחון את חיוניות הנבגים. בשנת המחקר השנייה נבחנו תכשירים רבים שמבוססים על חומרים פעילי שטח. התכשירים נבחנו על שתי פטריות: פוזריום מחולל ריקבון הכתר בעגבניות, ופוזריום הבננה. הנבגים נטבלו בתמיסות של התכשירים הנבדקים לפרקי זמן שונים. לאחר מכן, נשטפו הנבגים מהמשטח הנושא ונבדקה מידת החיוניות שלם.

טבלה 1. יעילות הקטילה של נבגים של פטריות פוזריום בטבילה בתכשירי חיטוי בריכוזים שונים למשך 30 שניות

תכשיר	ריכוז (%)	*FORL	TR4	הערות לתכשיר
בקטרון	0.5	100	100	בקטרון AQ-515 מכיל 45% מלח
	1	100	100	אמוניום רביעוני ו-0.55% נחושת
	2	100	100	
ספורקיל	0.5	100	100	N,N-Didecyl-N,N-dimethylammonium Chloride
	1	100	100	
	2	100	100	
TOG	0.5	100	100	1TOG - תכשיר המכיל תיאבנדזול (15%), 8 הידרוקסי קינולין (15%)
	1	100	100	
	2	100	100	
כלור	0.5	75	80	תמיסה תת כלורית בריכוז 3%
	1	90	95	
	2	100	100	
ברומוספט	0.5	50	40	Didecyl dimethyl ammonium bromide (10%)
	1	90	100	
	2	100	100	

LMA	0.5	20	15	תכשיר ניסיוני של חברת
	1	60	30	לוקסמבורג
	2	80	60	
מים (ביקורת)	0	0	0	

Fusarium oxysporum f. sp. Radices lycopersici – *FORL מחולל מחלת ריקבון שורשים וכתר בעגבניות. משמש אותנו כפטריות בוחן במקרים בהם לא ניתן לבחון יעילות קטילה בתנאי הסגר.

תוצאות הבדיקות מצביעות על שלושה תכשירים טובים שניתן להמשיך לבחון אותם לשימוש מעשי. לשם כך, בחנו את יעילות שלושת התכשירים בקטילת נבגים של פוזריום TR4 בחשיפה לפרקי זמן קצרים. נבגים של פוזריום TR4 שהוצמדו למשטח כפי שתואר לעיל נטבלו בתמיסות תכשירי החיטוי לפרקי זמן קצרים של מספר שניות (טבלה 2). מיד בתום הטבילה נשטפו המשטחים במים כדי לסלק שאריות תכשירי חיטוי. לאחר מכן, נבחנה חיוניות הנבגים.

טבלה 2. יעילות הקטילה של נבגים של פטריות פוזריום בטבילה בתכשירי חיטוי בריכוזים שונים למשך 30 שניות

תכשיר	ריכוז (%)	משך חשיפה, שניות שעור קטילה (%)		
		5	10	15
בקטרון	0.5	0	40	75
	1	35	40	100
	2	80	100	100
ספורקיל	0.5	55	75	100
	1	30	100	100
	2	100	100	100
TOG	0.5	0	20	40
	1	80	100	100
	2	90	100	100
מים (ביקורת)	0	0	0	

ב. פיתוח אמצעים ליישום יעיל של תכשירי חיטוי לצורך חיטוי כלי רכב, כלי עיבוד ושינוע, ומשטחים שלא ניתן לטבול אותם:

תוכננה, נבחנה, ונבנתה מערכת חיטוי חדשה אשר מיועדת להוות חלק ממערכת אגני הטבילה שנבנו ומופעלים בכניסה למטעי בננה בארץ (איור 1). המערכת מבוססת על העקרונות הבאים:

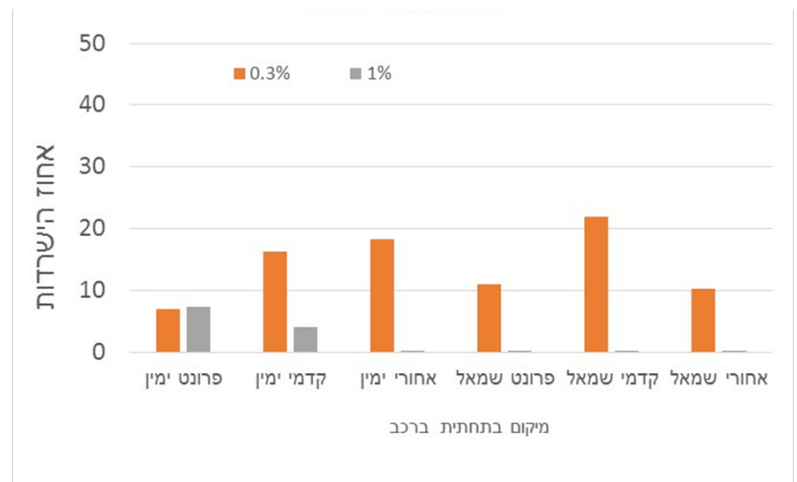
- ניצול הבריכות הקיימות שאינן יעילות כאלמנט שטיפה ראשון שהוא שלב חשוב בכל מערך החיטוי
- משטח גלילים אשר מונח בתחתית בריכת החיטוי. גלגלי הרכב מורעדים תוך מעבר על הגלילים וכך נשטפים. באופן זה הבוץ שבקרקעית הבריכה לא עולה בכל מעבר רכב. הבריכה מלאה במים וכן עודפים מתמיסת החיטוי (ראה להלן).

- בקצה הבריקה מוצבת מערכת ריסוס אשר טמונה בתוך מעבר מוגבה ייעודי דמוי גדודיות שמוצבות על כבישים כדי להאט את מהירות כלי הרכב. מערכת הריסוס מופעלת עם מעבר כלי הרכב מעליה. באופן כזה נחשף כל כלי רכב לתמיסת חיטוי חדשה בריכוז הדרוש.
- מערכת הריסוס מבוססת של שני מוטות ריסוס במרחק 80 ס"מ אחד מהשני שעליהן מותקנות פומיות מניפה במרווחים של 25 ס"מ. הצבת המוטות נועדה לאפשר חפיפה וכיסוי מרבי של גחון הרכב.
- תנועת כלי הרכב על גבי הגדודיות היא איטית ומאפשרת את משך החשיפה הנדרש לתמיסת הריסוס
- עודפי תמיסת הריסוס אשר ניגרים, זורמים אל בריכת השטיפה וכך תורמים לחיטוי חלקי גם בבריכת השטיפה.
- מתקן דומה נבנה במכון להנדסה חקלאית כדי לבחון בצורה יותר מדויקת משתנים של ריכוז תכשירים ומשך חשיפה שאינו תלוי במהירות הרכב הנוסע. המתקן במכון מותקן על משטח בטון ולא בתוך בור טבילה. מעל מתקן הריסוס מותקן מסוע אשר מסיע את מטרות הריסוס מעל מוטות הריסוס.
- נבגים של פוזריום FORL, מחולל מחלת ריקבון השורשים והכתר בעגבניות, הוצמדו לרפידות בד לא ארוג שהוספגו בתמיסת אגר. הרפידות נטבלו במצע אגר מים נוזלי, ולאחר קרישתו פוזרו הנבגים. הרפידות הוכנסו לשקיקי תה ושמשו לבחינת יעילות הקטילה של אמצעי החיטוי:
- במתקן הניסויי במכון להנדסה – השקיקים נתלו על רשת מתכת שהוצמדה למסוע ונעה מעל פסי הריסוס במהלך הניסוי
- במתקן בתחנת הניסויים בצמח – השקיקים הוצמדו לתחתית הרכב שנע על מתקן החיטוי.
- במהלך הניסוי הוסעו השקיקים (על גבי המסוע או הרכב) מעל המתקן בעת שהופעל על פי המשתנים שמופיעים בתוצאות. לאחר החשיפה לתכשיר, השקיקים הוכנסו למבחנות שבהם תמיסת פיזיולוגית של מים מעוקרים. במעבדה בוצע סדרת מיהולים ולאחר מכן פוזר התרחיף על צלחות מצע מתאים, והצלחות הודגרו למשך שבוע באינקובטור. לאחר שבוע נספרו המושבות שצמחו בצלחות וחושב שיעור הקטילה.



- איור 1.** מערכת ריסוס לחיטוי כלי רכב. ימין – מתקן ריסוס שנבנה במכון להנדסה חקלאית. שמאל – מתקן שנבנה בתחנת הניסויים בצמח כחלק מבור הטבילה בכניסה לתחנה.
- בניסויים במתקן במכון להנדסה הישגנו שיעור קטילה מלא של נבגי FORL על ידי תמיסות בקטרון וספורקיל (כל תכשיר בנפרד) בריכוז 1%, בחשיפה בפרק זמן של 10 שניות. ממצאים אלה מצביעים על כושרם של התכשירים לקטול נבגים בתוך פרק זמן קצר.
- בחנו את התכשירים במתקן בצמח. פרק הזמן שבו נחשפו הנבגים לתמיסות בקטרון וספורקיל (כל תכשיר בנפרד) היה 10 שניות (הנסיעה האיטית ביותר שניתן היה לקבוע ברכב). נבחנה הקטילה במקומות שונים בגחון הרכב. בנוסף בחנו ריכוז מופחת של התכשיר.

חשיפת הנבגים לריסוס תמיסת בקטרון בריכוז 1% גרם קטילה מלאה של הנבגים במרבית המקומות בגחון הרכב (איור 2). ניתן לראות כי במרבית האתרים הושגה קטילה מלאה. ריכוז 1% הוא הריכוז האפקטיבי. ריכוז נמוך מכך אינו יעיל בקטילת הנבגים (איור 2).



איור 2. קטילת נבגי FORL באמצעות תמיסת בקטרון לאחר ריסוס במתקן חיטוי. הנבגים הוצמדו לגחון הרכב. ונחשפו לתמיסת הריסוס במהלך נסיעת הרכב מעל מתקן החיטוי.

מטרה: להדביר את מחולל המחלה במוקדי נגיעות ולהקטין את הפצת הפטריה במטעים כאלה.

א. קטילת צמחים נגועים להקטנת המדבק וצמצום הפצת המחלה.

אנו בוחנים אמצעים לקטילת צמחים נגועים על שורשיהם כדי לקטול את מרכיב גופי הריבוי של הפטריה שנמצאים בתוכם. זאת במטרה לצמצם את המדבק הקיים וכן למנוע את הפצתו. הדרכים המקובלות בעולם הן קטילה בתכשירי גלייפוסט, אולם אלה קוטלים את הצמח, אך לא את הפטריה. בשנת המחקר הראשונה יצרנו בבתי הצמיחה שברשותנו "מטע" של צמחי בננות אשר גדלים בדליים גדולים (איור 3). לאחר מספר חודשים (בחודש ינואר 2019) כאשר הציצו והתפתחות צמחי בת (איור 3 ימין) ביצענו את ניסויי הקטילה.



איור 3. קטילת צמחים כדי להפחית את מדבק הפטריה בקרקע, וכדי למנוע הפצה באמצעות שורשים נגועים. ימין – צמחי הבננות עם צמחי בת לפני תחילת ניסוי הקטילה. שמאל. שבועיים לאחר הזרקת תכשירים לעיקר וגזום הנוף.

הניסויים בוצעו פעמיים לכל טיפול. ביצענו את הטיפולים הבאים:

1. יישום גרלון או גלייפוסט בריכוזים שונים כפי שמצוין – התכשירים הוזרקו לארבעה נקבים בבסיס הגזע. הנקבים נקדחו ולאחר מכן הוזרקו 2 סמ"ק של תכשיר לכל נקב (סה"כ 8 סמ"ק תכשיר לצמח). התכשירים הוזרקו בפורמולציה של התכשיר מעורבב בנפט בריכוזים שצוינו.

2. היקש – ללא הזרקת תכשיר כלל.

בכל טיפול בוצעו שני טיפולי נוף – גיזום הנוף, לעומת הזרקת ללא גיזום הנוף. שבועיים לאחר ביצוע הטיפולים הוצאו הצמחים מהעציצים. השורשים נשטפו, הגזעול נחצה לאורכו והעיקר לרוחבו. ובדקנו בכל האיברים את שיעור הקטילה במדדים הבאים:

- תמותה חיצונית – סולם 0-2: 0 התחדשות מלאה של הצמח והנצרים; התחדשות חלקית של הצמח או הנצרים; 2- אין התחדשות כלל.
- תמותה גזעול (חתך אורך) – סולם 0-2: 0 גזעול בצבע תקין ללא סימני ריקבון; ריקבון חלקי; 2- רקבון מלא.
- תמותת העיקר – סולם 0-2: 0 גזעול בצבע תקין ללא סימני ריקבון; ריקבון חלקי; 2- רקבון מלא.
- תמותת שורשים – סולם 0-2: 0 שורשים בצבע תקין ללא סימני ריקבון; ריקבון חלקי; 2- רקבון מלא.

טבלה 3. קטילת צמחי בננה בעקבות יישום קוטלי עשבים על צמחי בננה באמצעות הזרקת לבסיס הגזעול.

מקום ההזרקת	תמותה חיצונית	תמותת גזעול	תמותת העיקר	תמותת שורשים
טיפול	(0-2)	(0-2)	(0-2)	(0-2)
היקש	ללא	0	0	0
גרלון 3%	צמח ראשי בלבד	0	0	0
	צמח ראשי ונצרים	2	1.8	1.6
גרלון 5%	צמח ראשי בלבד	2	2	1.8
	צמח ראשי ונצרים	2	2	2
גלייפוסט 3%	צמח ראשי בלבד	1.8	1.2	0.8
	צמח ראשי ונצרים	2	1.3	0.8

כל הטיפולים שכללו יישום קוטלי עשבים נבדלו מההיקש ללא טיפול (מבחן t, $p < 0.05$)

הטיפולים שכללו יישום גרלון היו יעילים ביותר בקטילת הצמחים על אבריהם השונים (טבלה 3). ניתן לראות כי ביישום התכשיר אין צורך בגיזום מקדים של הנוף. לעומת זאת היישום של גלייפוסט גרם תמותה חלקית בכל אברי הצמח. בשלב זה הוצבו ניסויים שמשלבים את קטילת הצמחים עם יישום פונגיצידים כדי לבחון את הפעולה המשולבת של קטילת הצמחים עם הפחתת כמות הפטריה ברקמות הצמח. בניסויים אלה שמבוצעים בחממת ההסגר אילחנו צמחי בננה. לאחר 8 שבועות גידול ולאחר הופעת תסמיני מחלה, נקטול את הצמחים ביישום משולב של קוטלי עשבים ופונגיצידים.

מטרה: בחינת יעילות אמצעים משולבים לחיטוי קרקע בקטילת הפטריה בקרקע

א. בחינת יעילות תכשירים לחיטוי קרקע בקטילת הפטריה בקרקע – במערכות מבוקרות: המערכת המבוקרת בה השתמשנו, מורכבת משני חלקים עיקריים: מיכלי קרקע ומערכת לבקרת הטמפרטורה במשך כל התהליך. במערכת זו ניתן לבחון את יעילותם של תכשירים בקטילת פגעים בקרקע תוך בקרה על תנאים כגון שמירה על אווירת קרקע קבועה, משטר הטמפרטורה, תכולת רטיבות הקרקע וגודל חלקיקי הקרקע. למיכל הקרקע הכנסנו קרקע יבשה ומנופה והטמנו בה שקיות רשת שמכילות גופי קיימא של TR4. הקרקעות במכלים הושקו בתמיסת תכשיר החיטוי מעורבת בכמות

מים לקבלת תכולת רטיבות של 80% מקיבול שדה בקרקע. ריכוז התכשיר חושב למשקל הסופי של הקרקע עם המים. תכולת רטיבות קבועה של 80% מקיבול שדה מאפשרת פעילות מיטבית לתהליכים הביולוגיים בקרקע. הטיפולים כללו חשיפה בשני משטרי חימום. המשטר הראשון היה חשיפה לטמפרטורה קבועה (25 מ"צ). בנוסף חשפנו את המכלים לטמפרטורה במשטר של חיטוי סולרי ששורר בקרקע בעומק 10 ס"מ בעונת הקיץ (מינימום 35 מ"צ, מקסימום 45 מ"צ). כל טיפול בוצע בארבע חזרות. בתום חשיפה למשך שבוע הוצאנו את גופי הקיימא מהמכלים ובחנו את שיעור החיוניות.

טבלה 4. השפעת תכשירי חיטוי על קטילת כלמידוספורות של פוזריום TR4 במערכת מבוקרת של מכלי קרקע

תכשיר	ריכוז (ח"מ)	שער קטילה (%)	
		ללא חימום (25 מ"צ)	משטר חיטוי סולרי
היקש	0	0	50
מתאם סודיום	30	80	100
	50	100	100
DMDS	30	70	100
	60	100	100

התכשירים מתאם סודיום ופלדין יעילים בקטילת התכשירים כאשר הם מיושמים בריכוזים הרלוונטיים לאלה שמיושמים בשדה (טבלה 4). יישום בריכוז מופחת גורם קטילה חלקית של הכלמידוספורות בקרקע. שילוב של חימום הקרקע במשטר חיטוי סולרי משפר את הקטילה, במיוחד כאשר אנו מיישמים את תכשירי החיטוי במינון מופחת. ניתן לראות כי תכשירי החיטוי יעילים בקטילת גופי הקיימא של פוזריום ויכולים לשמש לצורך פעילות זאת במטעי בנות.

ב. בחינת יעילות תוספים אורגנים לחיטוי קרקע בקטילת הפטריה בקרקע – במערכות מבוקרות

למיכל הקרקע הכנסנו קרקע יבשה ומנופה. לפני הכנסת הקרקע ערבבנו בה חומר אורגני ממקורות שונים (טבלה 5). ריכוז התוספים האורגנים חושב ל-1% ממשקל הקרקע היבשה. לאחר מכן הטמנו בה שקיות רשת שמכילות גופי קיימא של TR4. הקרקעות במכלים הושקו בכמות מים לקבלת תכולת רטיבות של 80% מקיבול שדה בקרקע. הטיפולים כללו חשיפה בשני משטרי חימום. המשטר הראשון היה חשיפה לטמפרטורה קבועה (25 מ"צ). בנוסף חשפנו את המכלים לטמפרטורה במשטר של חיטוי סולרי ששורר בקרקע בעומק 10 ס"מ בעונת הקיץ (מינימום 35 מ"צ, מקסימום 45 מ"צ). כל טיפול בוצע בארבע חזרות. בתום חשיפה למשך שבוע הוצאנו את גופי הקיימא מהמכלים ובחנו את שיעור החיוניות.

טבלה 5. השפעת תוספים אורגנים ממקורות שונים על קטילת כלמידוספורות של פוזריום TR4 במערכת מבוקרת של מכלי קרקע ובשילוב משטר חיטוי סולרי

תוסף	מקור	שער נביטה מספר נבגים לגר' קרקע	
		ללא חימום (25 מ"צ)	משטר חיטוי סולרי
היקש	0	100,000	100
כרובית	עלים יבשים טחונים	1500	0
רוקט	עלים יבשים טחונים	2000	0
כוספת סויה	תוצר יבש לאחר הפקת השמן	800	0

כל התוספים שנבדקו הפחיתו באופן משמעותי את חיוניות הכלמידוספורות בקרקע. שילוב של חימום הקרקע במשטר חיטוי סולרי לפרק זמן קצר של שבוע גרם קטילה מלאה של גופי ההשתמרות של הפטריה.

מסקנות ולקחים:

תכשירים לחיטוי כלים ואמצעי שינוע – מצאנו תכשירים יעילים להשמדת גופי ריבוי של הפטריה. שלושה תכשירים נמצאו יעילים בקטילה במשך חשיפה קצר של שניות. תכשירים אלה מתאימים לשימוש מיידי על ידי המגדלים. מתקן לחיטוי כלי רכב – בנינו מתקן לחיטוי כלי רכב שמבוסס על אגן הטבילה שמשמש לשטיפה ראשונית של הגלגלים ומערכת ריסוס שמבטיחה כיסוי של כל גחון הרכב בריכוז קבוע של תכשיר. ניתן כבר ליישם את המתקן באופן מסחרי. אמצעים לקטילת שורשים – קוטלי עשבים מעורבים בנפט קוטלים ביעילות את צמחי הבננות ומאפשרים צמצום של הפצת מחולל המחלה באמצעות חומר צמחי נגוע.

אמצעים לחיטוי קרקע – התכשירים המקובלים לחיטוי קרקע יעילים בקטילת הפטריה כפי שנבדק במערכות מבוקרות. יש צורך לבחון את יעילותם בשדה. שילוב חיטוי סולרי משפר את הקטילה. גם שילוב של תוספים אורגנים ממקורות שונים עם חימום במשטר חיטוי סולרי תורם לקטילה יעילה של הפטריה.

סטיות ושינויים מתוכנית העבודה המקורית

בתוכנית המקורית היתה מתוכננת פעילות לחיטוי קרקע בחלקות נגועות. זו לא בוצעה בגלל ההסגר והאיסור לבצע כל פעילות בחלקות אלה. עם הגילוי של חלקות נוספות והצורך הדחוף למצוא פתרונות לצמצום ההפצה, אנו מתכננים לקיים את הפעילות הזו בשנת המיזם השלישית.

מטרות המחקר המיועדות לשנת המחקר השלישית

1. בחינת יעילות תכשירים לחיטוי קרקע בקטילת פוזריום בקרקע – במערכות מבוקרות ובחלקות נגועות.
2. יישום תכשירים פונגיצידיים בשילוב קוטלי עשבים כדי להפחית את פוטנציאל ההפצה של הפטריה על ידי צמחים נגועים.
3. יישום תכשירים פונגיצידיים לאחר אילוח צמחים (בחממת הסגר) כדי לדכא/להדביר את הפתוגן בצמח ולמנוע תחלואה.
4. יישום תכשירים כדי להשרות עמידות של הצמח לתחלואה.
5. ליווי היישום של מתקני חיטוי כלי רכב במשקי בננות.

תכנית #7: אנליזה מטבולומית רחבת היקף של תפליטים (exudates) של שורשי זני בננה, עמידים ורגישים, נגועים ב-TR4.

צוות המחקר: פרופ' אסף אהרונ (מכון וייצמן למדע, אנליזה מטבולית של הפרשת קרקע), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, הדבקות והנבטה, של גורם המחלה), ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, זני בננה רגישים ועמידים לגורם המחלה).

מטרת המחקר הכללית:

אנליזה מטבולומית ופונקציונלית רחבת היקף של תפליטים (exudates) של שורשי זני בננה, עמידים ורגישים, נגועים ב-TR4.

מטרות המחקר הספציפיות (שנה שנייה):

1. זיהוי חומרים בתפליטים ושורשי בננה.
2. זיהוי החומר המעורב במשיכת הפטרייה לשורש הבננה.

תוצאות וממצאים:

1. בחינת ביקורות לאנליזת מטבוליטים של תפליטי שורש משתילי בננה שגודלו בהידרופוניקה: דוגמאות תפליטים של שתילי בננה שגודלו במשך 20 יום במצע הידרופוניקה נאספו, הופקו והורצו לאנליזת מטבוליטים בעזרת כרומטוגרפיה נוזלית וספקטרוסקופיית מסות (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). מספר ביקורות נעשו על מנת לבחון את איכות ההפקה, ההרצה ואת הדירות התוצאות:

א. אנליזת סך הפחמן האורגני [Total Organic Carbon (TOC)] שמטרתה לבחון את כמות הפחמן שמומס בכל דוגמת תפליט הראתה ערכים זהים בין כל דוגמאות התפליטים שעברו סינון וגם ביקורות שלא עברו סינון (טבלה 1). ממצא זה חשוב להמשך האנליזה מכיוון ומאפשר השוואה מהימנה בין דוגמאות והדירות בין חזרות, ומעיד כי שינוי כלשהוא ברמת המטאבוליטים בין הדוגמאות מקורו בהרכב החומר של התפליט עצמו ולא בכמות/ריכוז חומר שונה בכל דוגמת תפליט.

ב. בחינת סטנדרט פנימי שהוכנס במהלך ההפקה לכל דוגמא. החומר אלפא-טומטין (α -tomatine) הוכנס בכמות זהה לכל תפליט במהלך תהליך ההפקה על מנת לשמש כסטנדרט פנימי לנרמול תוצאות. חומר זה מיוצר על ידי צמחים במשלחת הסולניים אך לא מיוצר בשורש הבננה. הממצאים מראים כי כמות זהה של החומר נמצאה בכל הדוגמאות (איור 1) ועל כן חומר זה יוכל לשמש אותנו בהמשך האנליזות כסטנדרט מנרמל מהימן.

ג. התפלגות הדוגמאות במרחב על ידי אנליזת PCA (Principal Component Analysis) הראתה הדירות גבוהה מאד של הדוגמאות שעברו סינון לעומת דוגמת הביקורת שלא עברה סינון וביקורת ה-blank (איור 2). משמעות הממצא היא ששיטת איסוף התפליטים שהוקמה מייצרת הדירות במהלך ההפקה וההרצה.

טבלה 1. ריכוז הפחמן האורגני בדוגמאות תפליטי שורש מסוננים ולא מסוננים.

	TOC (ppm)
Filtered Rep1	9.50
Filtered Rep2	9.58
Filtered Rep3	9.00
Non-filtered Rep	9.53

Blank

Banana Rep4

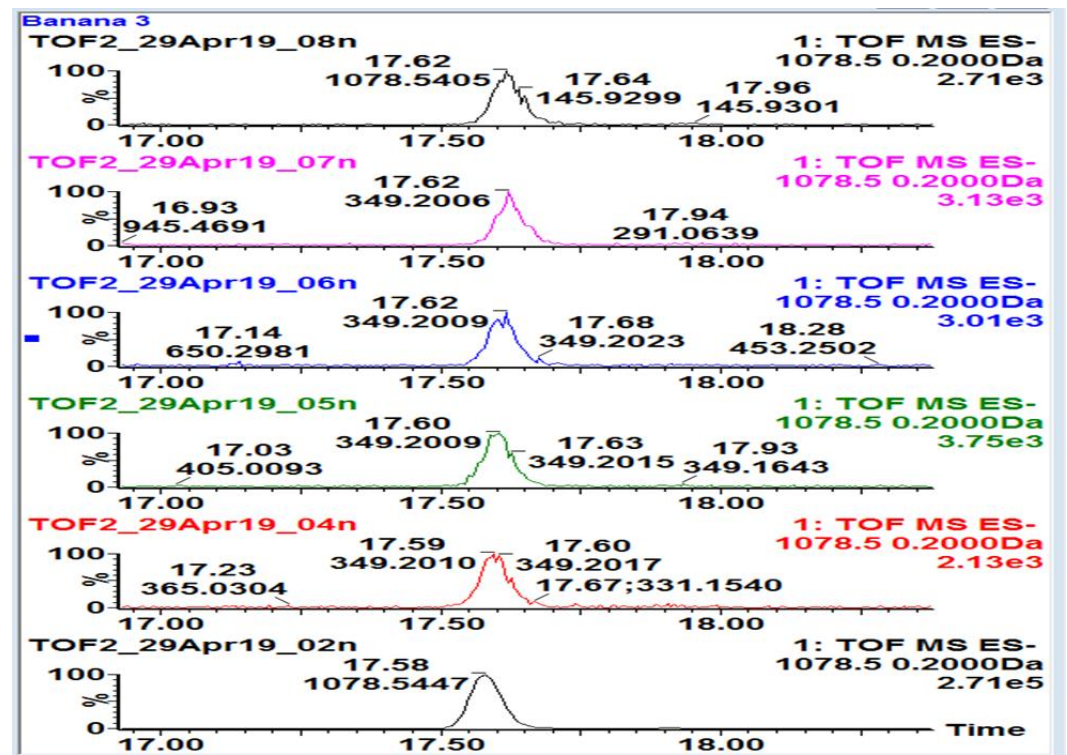
Banana Rep3

Banana Rep2

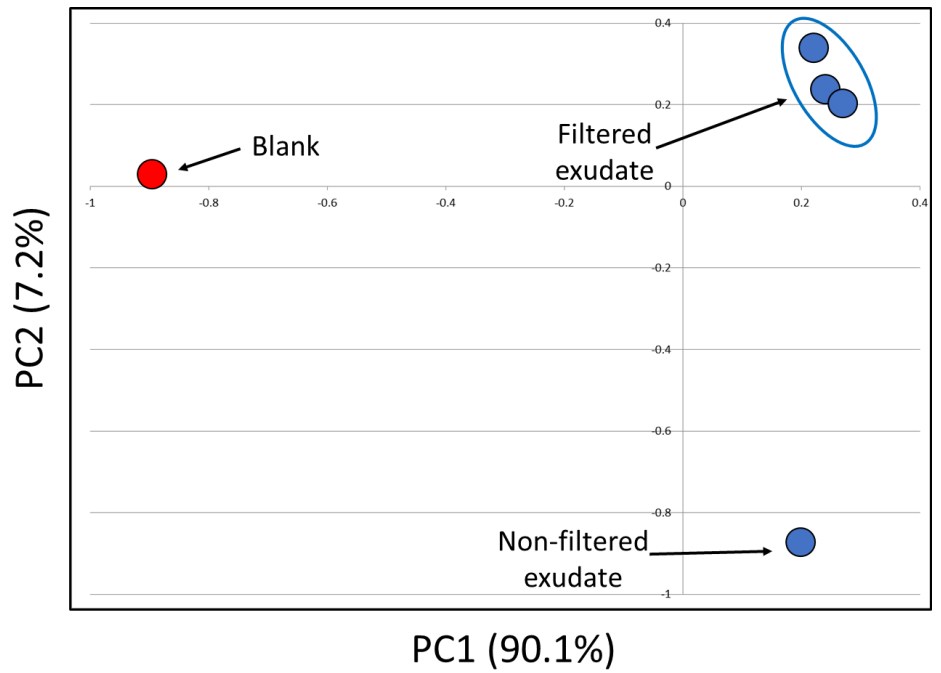
Banana Rep1

Mix15

(a mix of natural compounds)



איור 1. רמות החומר אלפא-טומטין (α -tomatine) שהוכנס בכמות זהה לכל תפליט במהלך תהליך ההפקה על מנת לשמש כסטנדרט פנימי לנרמול תוצאות. Blank = ביקורת שעברה של כל תהליך ההפקה ללא נוכחות של שורשי בננה, Mix 15 = דוגמא המכילה קבוצת סטנדרטים כולל אלפא-טומטין.



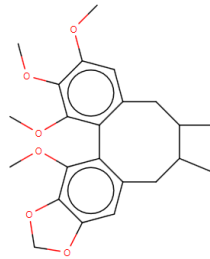
איור 2. התפלגות הדוגמאות במרחב על ידי אנליזת PCA (Principal Component Analysis) שמראה הדירות גבוהה מאד של הדוגמאות שעברו סינון לעומת דוגמת הביקורת שלא עברה סינון וביקורת ה-Blank.

2. ניתוח מטאבולי ראשוני של תפליטי שורש משתילי בננה שגודלו בהידרופוניקה. בוצע ניתוח מטאבולי ראשוני של כרומטוגרמות תפליטי השורש שהורצו, כנגד ספריות חומרים מבוססות שקיימות במעבדה. הכרומטוגרמות עתידות לעבור אנליזה תחת תרשים עבודה מעודכן שפותח לאחרונה אצלנו במעבדה ומכיל ספריות חומרים רחבות ועשירות יותר. עד כה, הצלחנו לזהות טנטטיבית כמה חומרים בתפליטי שורש הבננה (טבלה 2 ואיור 3).

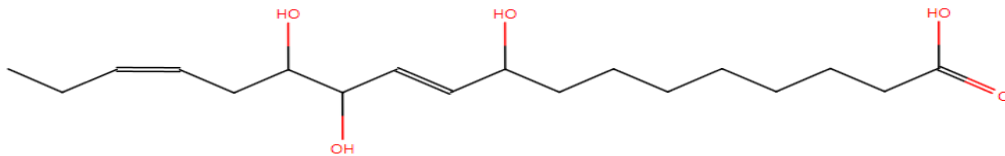
טבלה 2. חומרים משניים שזוהו טנטטיבית עד כה בתפליטי שורש הבננה.

Compound #	Putative compound name	Molecular formula
1	Dibenzocyclooctadiene lignan (schilancifolignan)	C ₂₃ H ₂₈ O ₆
2	8,12,13-trihydroxy-9,10-15,16-diene-Octadecanoic acid (trihydroxy fatty acid)	C ₁₈ H ₃₂ O ₅
3	Kenposide A (O-Hexosyl-pentosyl-geraniol)	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀
4	5-Methoxy-1,7-diphenyl-3-heptanone	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
5	4-O-geranyl-p-coumaroyl alcohol	C ₁₉ H ₂₆ O ₂
6	Sesqiterpenyl-coumarin	C ₂₄ H ₃₀ O ₄

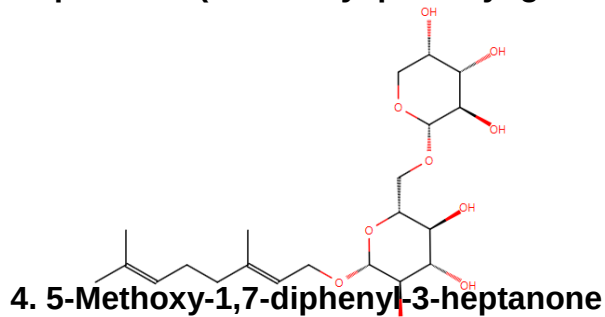
1. Dibenzocyclooctadiene lignan (schilancifolignan)



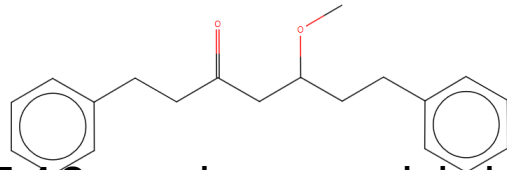
2. 8,12,13-trihydroxy-9,10-15,16-diene-Octadecanoic acid (trihydroxy fatty acid)



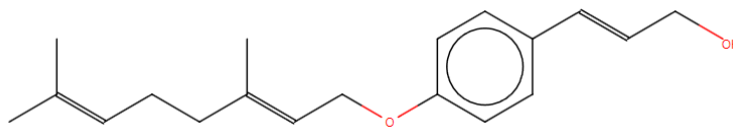
3. Kenposide A (O-Hexosyl-pentosyl-geraniol)



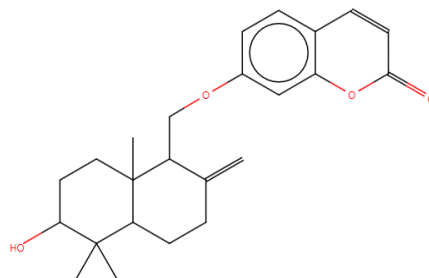
4. 5-Methoxy-1,7-diphenyl-3-heptanone



5. 4-O-geranyl-p-coumaroyl alcohol



6. Sesquiterpenyl-coumarin



איור 3. המבנה הכימי של החומרים שזוהו טנטטיבית בתפליטי שורש הבננה.

מסקנות ולקחים:

1. המערכת ההידרופונית שפותחה הינה מתאימה לגידול שתילי בננה.
2. שיטת איסוף תפליטי השורש מצמחי בננה שגודלו בהידרופוניקה הוכחה כיעילה, הן מבחינת הדירות בין הדוגמאות והן מבחינת נרמול.

3. ניתוח מטבולומי ראשוני של תפליטי שורש הבננה הראה פוטנציאל לזיהוי חומרים כנגד ספריות חומרים מבוססות שפותחו במעבדה.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

1. לא היו שינויים מהותיים. מסיבות טכניות עדיין לא התחלנו בפרקצונציה של תפליטים לצורך זיהוי חומרים המושכים את הפטרייה TR4 לשורש הבננה.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

1. המשך ייעול השיטות לאיסוף תפליטי שורש מצמחי בננה שגודלו במצע הידרופוני.
2. המשך אנליזה מטבולומית של תפליטי שורש הבננה וזיהוי חומרים נוספים.
3. אנליזה מטבולומית לתפליטי שורש צמחי בננה עמידים ורגישים לפטרייה בזמנים שונים מרגע האילוח בפטרייה (שת"פ עם סטנלי).
4. ביצוע פרקצונציות של תפליטי שורש הבננה במטרה לבודד חומרים פעילים המעכבים את הפטרייה.

תכנית #8: פיתוח פרוטוקול לגידול בננה במצע מנותק.

צוות המחקר: ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, ניהול מחקרי השדה), ד"ר יאיר ישראלי (צמח ניסיונות, ייעוץ בנושא גידול הבננה), יובל לוי (שה"מ, ייעוץ בנושא גידול הבננה).

מטרות המחקר הספציפיות כפי שהוגדרו בהצעת המחקר:

- (1) שתילת תצפית מרווחי ומועדי שתילה שונים.
- (2) איסוף נתוני צימוח, פריחה, ויבול: תצפית מרווחי ומועדי שתילה שונים.

תוצאות וממצאים:

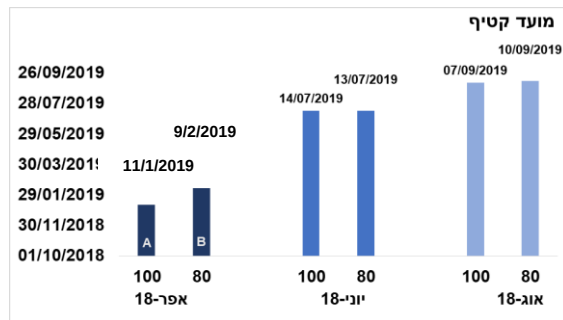
בשנה א' נבחנו שני משתנים: שני ממדי ערוגה: (1) 30 ס"מ עומק * 40 ס"מ רוחב, (2) 20 ס"מ עומק X 100 ס"מ רוחב, ו-2 סוגי מצעים: (1) טוף 0-8, (2) פרלייט 212. לאחר איסוף נתוני צימוח, פריחה ויבול, נבחרו להמשך העבודה ערוגות 20 ס"מ עומק X 100 ס"מ, ומצע טוף 0-8, שהשילוב ביניהם הניב את התוצאות הטובות ביותר.

בשנה ב' נבחנו שני משתנים: מועד ומרווח השתילה. השתילה התבצעה בשלושה מועדים: אפריל 2017, יוני 2017, ואוגוסט 2017. בכל מועד שתילה, נבחנו שני מרווחי שתילה: 1 ו-0.8 מטר.

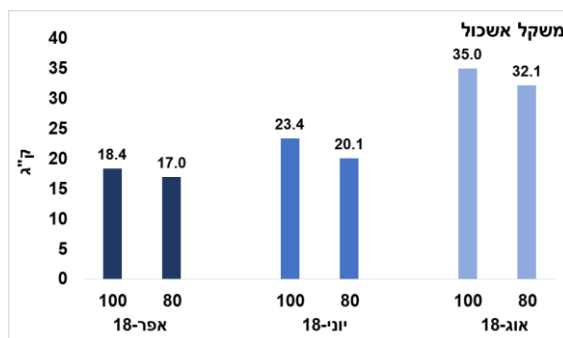
במרווחי שתילה 1 מטר נשתלו 12 צמחים, במרווח ה-0.8 מטר נשתלו 15 צמחים. השקייה: שתי שלוחות, טפטפת 1.6 ליטר לשעה, מרווחים: 40 ס"מ, 4 פולסים, 6 ליטר ליום. דישון: גופר 5-2-5 (+3, מכיל מיקרואלמנטים), לפי 80 חקק חנקן. בוצע איסוף נתונים מלא: גובה הצמח והיקף הגזעול, מועד פריחה וקטיף, משקל אשכול ופרי, וממדי פרי. ההשוואה בניסוי זה אינה בין מועדי השתילה השונים, אלא בכל מועד שתילה בין המרווחים השונים.

במועד הקטיף, בשתילת אפריל נמצא איחור מובהק, בן 4 שבועות, במרווח הצפוף, 80 ס"מ, ביחס למרווח 100 ס"מ, ואילו בשני מועדי השתילה האחרים לא נמצאה למרווחי השתילה השפעה על מועד הקטיף (איור 1). בכל מועדי השתילה נמצאה הקדמה משמעותית, כ-4 שבועות, במועד הקטיף, ביחס לחלקות מסחריות שנשתלו באותו מועד.

נמצאה מגמה, לא מובהקת סטטיסטית, של פגיעה במשקל האשכול, עם הירידה במרווחי השתילה. שתילות אפריל ויוני הניבו, בשני מרווחי השתילה, אשכולות קטנים מאד, נחותים בהשוואה לאשכולות מאותו מועד שתילה בחלקות מטע מסחריות. משקל האשכול במועד שתילת אוגוסט, מועד השתילה העיקרי, טוב, ודומה למשקל האשכול הממוצע בחלקות מטע מסחריות (איור 2). משקל האשכול בשתילת אוגוסט במרווח ה-80 ס"מ הייה נמוך ב-8% ביחס למרווח ה-100 ס"מ, אולם האומד במרווח זה גבוה ב-20% ביחס לאומד במרווח ה-100 ס"מ.



איור 1: מועד קטיף. כל אחד מהטיפולים השונים הינו שילוב של מועד שתילה (אפריל, יוני ואוגוסט 18) ומרווח שתילה (80 ו-100 ס"מ). הנתונים המוצגים: ממוצע $\pm$ שגיאת תקן.



איור 2: משקל אשכול. כל אחד מהטיפולים השונים הינו שילוב של מועד שתילה (אפריל, יוני ואוגוסט 18) ומרווח שתילה (80 ו-100 ס"מ). הנתונים המוצגים: ממוצע $\pm$ שגיאת תקן.

מסקנות ולקחים:

בשנה ב' של המחקר התמקדנו בגידול בערוגת ה-20*100 ממולאת במצע הטוף, שנתנו את התוצאות הטובות ביותר בשנה א'. נבחנו שלושה מועדי שתילה ושני מרווחים. בכל מועדי השתילה, התפתחות הצמחים הייתה מהירה מאד, והתבטאה בהקדמת מועד הקטיף בכ-4 שבועות ביחס למועד הקטיף בחלקות מסחריות שנשתלו באותו מועד. סביר להניח שקצב ההתפתחות המהיר נובע מהתחממות מהירה של הקרקע הרדודה במצעים המנותקים, לעומת המסה האדירה בחלקות המטע, שמתחממת ומתקררות לאט יותר. אשכולות מועדי השתילה אפריל ויוני היו קטנים מאד, ומשקלם נמוך ב-7-8 ק"ג ביחס לאשכולות במועדי שתילה מקבילים, שגודלו בחלקות מסחריות. לכן ההתמקדות בשנה ג' תהיה במועד שתילת אוגוסט, בו משקל האשכול היה דומה מאד לזה של חלקות מסחריות. השילוב בשתילת אוגוסט של משקל אשכול טוב, וגידול מהיר, המאפשר קבלת חליפים (אשכולות של צמחי בת, שנקטפים בשנה בה נקטפים אשכולות צמחי האם) נראה מבטיח.

למרות שמשקל האשכול במרווח ה-80 ס"מ בשתילת אוגוסט היה נמוך ב-2.9 ק"ג ביחס למרווח ה-100 ס"מ (32.1 ו-35 ק"ג, בהתאמה), סך היבול במרווח הקטן יותר היה גבוה ב-15% (482 ו-420 ק"ג, בהתאמה), כך שנושא מרווחי השתילה מעניין, ונמשיך לחקור אותו גם בשנה ג'.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

התכנית התבצעה ע"פ המתוכנן.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

1. איסוף נתוני צמיחה, פריחה ויבול-יבול ב', בניסוי מועדי השתילה והמרווחים: "אספו הנתונים הבאים: גובה הצמח והיקף הגזעול, מועד פריחה וקטיף, משקל האשכול ומשקל, אורך ורוחב אצבע מייצגת.
2. גיבוש פרוטוקול ראשוני לגידול בננה במצע מנותק: לאחר סיכום נתוני יבול ב' בטיפולים השונים של ניסוי המרווחים ומועדי השתילה, נגבש פרוטוקול ראשוני לגידול בננה במצע מנותק, שיכלול את הפרמטרים הבאים: סוג המצע, רוחב הערוגה, מרווח ומועד השתילה, והדשייה.
3. הערכת ראשונית של כלכליות הגידול במצע מנותק : לאחר סיכום נתוני יבול ב' של ניסוי המרווחים ומועדי השתילה, נבצע הערכה ראשונית של כלכליות הגידול במצע מנותק, בהשוואה לחלקה מסחרית.