

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 וצמח נסיונות), **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).

חוקרים נוספים המעורבים במחקר:

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

חתימת ופרטי החוקר הראשי:

נבות גלפז, מו"פ צפון וצמח נסיונות, 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
5	מבוא – רקע מדעי ומטרות המחקר
	פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות לתקופת הדו"ח
	תכנית 1: איתור גנים המעורבים בהקניית רגישות ועמידות ל-TR4, לצורך בניית תשתית גנטית
8.....	לפיתוח זנים מקומיים עמידים לגורם המחלה
	תכנית 2: ייבוא ובחינה בתנאי הארץ של מיני בר ושל זנים עמידים ל-TR4 בעלי
10.....	פוטנציאל מסחרי: עמידות וביצועים חקלאיים
14.....	תכנית 3: פיתוח עמידות ל-TR4 באמצעות עריכה גנומית
18.....	תכנית 4: אבחון, זיהוי ואפידמיולוגיה של גורם המחלה
21.....	תכנית 5: דיכוי ובקרה ביוטית ואביוטית של גורם המחלה
23.....	תכנית 6: גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות פוזריום בבנות
	תכנית 7: אנליזה מטבולומית רחבת היקף של תפליטים (exudates) של שורשי זני בונה,
27.....	עמידים ורגישים, נגועים ב-TR4
31	תכנית 8: פיתוח פרוטוקולים לגידול בונה במצע מנותק
33	נספחים

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, ייבוא 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 תרבות רקמה, פיתוח תרבות תאים עובריות), ד"ר חיה פרידמן (מנהל המחקר החקלאי, ייעוץ פיתוח תרבות 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 במים ובקרקע).

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, Tropical Race 4 (TR4) 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, ביואינפורמטיקה, 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, ואפידימולוגיה של TR4, (3) חיטוי, ובחינה ופיתוח של תנאים סופרסיביים (ביוטים וא-ביוטיים) למחולל המחלה (ו-4) גידול במצע מנותק. להלן תמצית התוצאות שהושגו בשנה הראשונה למיזם:

1) בחינה ופיתוח של זנים עמידים למחלה:

(א) בחינה של זנים קיימים, שפותחו ברחבי העולם:

יובאו 4 קלונים טיפואניים סבילים למחלה, שהם הפתרון הגנטי היחיד הקיים כיום בעולם. הקלונים נבחנו בתנאים מבוקרים לעמידות לווריאנט המקומי של TR4, ונמצאו כבעלי עמידות חלקית למחולל המחלה, בדומה לרמת העמידות שדווחה במקומות אחרים בעולם. הקלונים נשתלו בשתי חלקות מבחן בעמק הירדן ובגליל המערבי. קלון 218 מסתמן כבעל ביצועים חקלאיים טובים. בשנה ב' של המחקר, תורחב הבחינה של קלון זה לחלקות נוספות באזורי הגידול השונים של הבננה בארץ.

יובאו שלושה זנים מסדרת FHIA, בעלי עמידות טובה למחולל המחלה, אולם בבחינה מולקולרית נמצא שהם נושאים בגנום את וירוס ה-BSV, שאינו קיים בארץ, ולכן לא נוכל לבחון אותם בארץ בתנאי שדה.

(ב) פיתוח זנים עמידים באמצעות עריכה גנומית בבננה: פותחו תרחיפי תאים ממקור של תפרחות זכריות.

בשבועות הקרובים נוודא, באמצעות רגנרציה, שתרחיפי התאים מכילים תאים עוברים, שמתוכננים לשמש בשנה

ב' לטרנספורמציה ולעריכה הגנומית של גנים נבחרים. נבנו תבניות גניות בינאריות של Cas9/Cpf1 מותאמות

לבננה ובחינת היתכנות עם גן מדווח. נבנו תבניות גניות בינאריות להשתקת הגן PDS ולביטוי PX11 ו-RFP.

נעשו ניסויים ראשוניים לטרנספורמציה של בננה.

פוחתה מערכת של השריית שורשים בבננה באמצעות *Agrobacterium rhizogenes* (AR). בחנו טרנספורמציה עם 5 גזעים של A.R. הצלחנו לקבל השריה של שורשי hairy roots (hr). בשלב זה של המחקר עדיין לא הצלחנו לקבל שורשים מותמרים.

(ג) איתור גנים מועמדים, שיהוו מטרה לעריכה גנומית לצורך פיתוח זנים עמידים ל-TR4: פותח פרוטוקול לאילוח וסריקה של רמת העמידות של צמחי בננה למחולל המחלה. פרוטוקול זה שימש לקביעת רמת העמידות לווריאנט המקומי של מחולל המחלה ב-30 זני בננה מכל רחבי העולם (מחציתם דווחו כעמידים, ומחציתם כרגישים). 7 זנים, 4 שנמצאו כעמידים במיוחד, ו-3 שנמצאו כרגישים במיוחד, אולחו במחולל המחלה, ושורשיהם נדגמו ב-3 נקודות זמן, לצורך אנליזת ביטוי ורצף (RNAseq). אנליזה ביואינפורמטית מתבצעת כעת על הרצפים, לצורך איתור גנים מועמדים המעורבים בהקניית רגישות/עמידות למחולל המחלה. במקביל, מתבצע סקר ספרותי לצורך גיבוש רשימת הגנים המועמדים, שיהוו מטרה לעריכה גנומית, לצורך פיתוח זנים מקומיים עמידים למחולל המחלה. בנוסף, מפותחת מערכת לזיהוי תפליטים של שורשי בננה, כמקור לאיתור גנים/מסלולים מטבוליים המאפשרים את משיכת הפטריה לשורשי הבננה. גנים מועמדים שיעלו בעבודה זו יהוו גם הם מטרה לעריכה גנומית, שמטרתה פיתוח זנים עמידים למחלת פנמה.

(2) זיהוי, אבחון, ואפידמיולוגיה של TR4:

כילה שיטה לאבחון מולקולרי באמצעות PCR של מחולל המחלה, הן בצמחים נגועים, והן בתבדיד שבודד מאותם צמחים. כילה שיטה לאילוח וסריקה לרמת רגישות/עמידות זני בננה שונים לגורם המחלה. התקבלו טרנספורמטים יציבים ל-GFP של הפתוגן, לבחינת מנגנון איכלוס הפתוגן לעמידות/רגישות בזני בננה שונים, ובמאכסנים פוטנציאליים אחרים (צמחי בר הגדלים בשטחי מטעי הבננה). בהשוואת השונות גנטית בין התבדידים המקומיים לאלה מחו"ל בעזרת ap-PCR נמצא שהאוכלוסייה של TR4 בארץ אחידה. הוחל באיבחון השונות הגנטית של אוכלוסית הפתוגן בשיטת ה-VCG. רוצפו הגנומים של 5 תבדידי הפתוגן (2 מהארץ, ירדן, פיליפינים ואינדונזיה). תוצאות הריצוף העלו שמקור הווריאנט של TR4 שנמצא בארץ הוא ירדן, ולא דרום מזרח אסיה.

(3) חיטוי, ובחינה ופיתוח של תנאים סופרסיביים (ביוטים וא-ביוטיים) למחולל המחלה:

(א) חיטוי: פוחתה מערכת לבחינת תכשירי חיטוי, באמצעות הצמדת נבגים של פוזריום לגלילים שבהם חריצים. גלילים אלה הוכנסו לתוף מחורר שמסתובב בתוך מתקן חיטוי ייעודי שנבנה במעבדה למטרות אלה. באמצעות מערכת זאת נבחנו יעילותם של מספר תכשירים בקטילת נבגים של הפטריה לצורך חיטוי יעיל של הוקטורים העיקריים של הפטריה: כלים חקלאיים וסוליות נעליים. נמצאו תכשירים יעילים, ואנו בוחנים תכשירים נוספים. תוכנן ונבנה מתקן לחיטוי בהתזה של כלים חקלאיים, שמותקן על בריכות חיטוי קיימות. המתקן נבחן בהצלחה במכון להנדסה חקלאית במנהל המחקר החקלאי, והוצב בחוות מחקר הבנות בצמח להמשך בדיקות. נבנתה חממת הסגר לצורך בחינת קטילת הפטריה בקרקע ובצמחים, שתופעל מתחילת שנת 2019. הוקם "מטע בנות" בעציצים גדולים בתוך חממת ההסגר, לצורך ניסויי קטילה והפחתת מדבק בצמח ובקרקע.

(ב) פיתוח תנאים סופרסיביים למחולל המחלה: בודדנו מאות חיידקים משורשי בננה ומקרקעות מחוות מחקר הבננה בצמח, עמק הירדן. 200 תבדידים נקיים נסרקו לדיכוי TR4 על מצע פטרי. 13 תבדידים נמצאו כיעילים ברמות שונות בדיכוי התפתחות הפטריה. בוצעה בחינת עיכוב הדדי של 13 התבדידים, לצורך יצירת קונסורציה של חיידקים שונים, שיבצעו פעילות עיכוב סינרגיסטית של TR4. מ-13 התבדידים הורכבו 4 קונסורציה, שרמת יעילות דיכוי TR4 של כל אחת מהן תבחן במערכת של שתילי בננה בתנאים מבוקרים, בתחילת שנה ב' של המחקר.

(4) גידול במצע מנותק:

נבחנה מטריצה של שני סוגי ערוגות בממדים שונים (20×100 ו- 30×40), ושני סוגי מצעי שתילה (טוף ופרלייט), ונאספו נתוני צימוח ויבול בארבעת סוגי הטיפולים. נמצאה נחיתות במדדים השונים לגידול בערוגה הצרה והעמוקה (30×40) ביחס לערוגה הרחבה והרדודה (20×100). הצימוח והיבול במצע הטוף היה טוב יותר ביחס למצע הפרלייט. בשנה ב' ייבחנו ששה שילובים שיורכבו משלושה מועדי שתילה ושני מרווחי נטיעה שונים, בטיפול שנמצא כמיטבי בשנה א': מצע טוף בערוגה רחבה ורדודה.

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 רעלים. 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). מחלת פנמה התגלתה בארץ בקיץ-סתיו 2016. צמחים נגועים התגלו בחלקה בחוף הכרמל ובשתי חלקות בעמק הירדן. ב-2017 לא התגלו חלקות נוספים עם צמחים נגועים במחולל המחלה, אולם ב-2018 המחלה התפרצה ביתר שאת, והתגלתה ב-5 חלקות השייכות לארבעה משקים שונים בעמק הירדן. קיים 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 תשתית 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-ביוטיים) 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 סומאקלנוליים 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 אנליזה ביטוי (RNA-seq), שתספק מידע הן ברמת ביטוי הגנים, והן ברמת הרצף. אנליזה זו תביא לזיהוי גנים צמחיים ופטרייתיים המעורבים באינטראקציות צמח-פתוגן. במקביל, ייערך סקר ספרות לצורך איתור גנים מועמדים. תגובש רשימה מצומצמת של גני מטרה, שישמשו 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 דנפתח 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 ובריאות:

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 ₪/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.

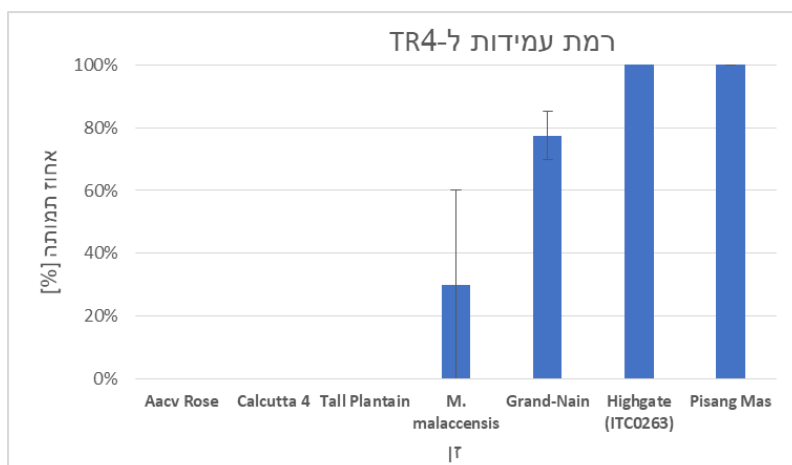
צוות המחקר: ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, ייבוא וריבוי זני בננה, אנליזות ביטוי ורצף), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, מבחני עמידות לגורם המחלה), ד"ר עדי פייגנבאום (מנהל המחקר החקלאי, אנליזה ביואינפורמטית), ד"ר נעה סלע (מנהל המחקר החקלאי, אנליזה ביואינפורמטית), ד"ר נורית קציר (איתור גנים מועמדים), פרופ' 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 א', כפי שהוגדרו בהצעת המחקר:

- (1) ייבוא וריבוי זנים עמידים ורגישים ל-TR4.
- (2) בחינה של רמת העמידות ל-TR4 בזנים השונים.
- (3) אילוח זנים נבחרים ב-TR4 ואנליזת ביטוי (RNA seq).
- (4) סקר ספרות לאיתור גנים המעורבים בהקניית עמידות/רגישות לפוזריום.

תוצאות וממצאים: לצורך המחקר יובאו מהבנק הגנטי בבלגיה (<https://www.crop-diversity.org/mgis>) קלסטרם (רקמה לא ממוינת שמקורה בתרבות רקמה) של 15 זנים שדווחו כעמידים ל-TR4. הזנים נבחרו ע"ס דיווחים בספרות ותקשורת אישית עם חוקרי בננה מובילים בעולם. אליהם נוספו עוד 15 זנים שנחשבים כרגישים למחולל המחלה, הנמצאים באוסף הזנים בחוות המחקר בצמח. כל הזנים רובו במעבדת תרבות הרקמה "צמח תרבות". 10 צמחים מכל אחד מהזנים הועברו להערכת רמת העמידות לווריאנט המקומי של-TR4, במעבדתו של ד"ר סטנלי פרימן. כל זן נבחן בשני ניסויים נפרדים.

שיטות העבודה, ורמת העמידות של כל אחד מהזנים הנבחים, מופיעות בדיווח על תכנית מספר 4. 7 זנים נבחרו להמשך המחקר: 4 זנים שנמצאו עמידים (M. malaccensis, Calcutta 4, high-plantain, Aacv Rose), ו-3 זנים שנמצאו רגישים (Pisang mas-ו Highgate, Grand-Nain).



איור 1: רמת העמידות של הזנים שנבחרו לאנליזת הביטוי ל-TR4. רמת העמידות מבוטאת באחוז התמותה 4 שבועות לאחר האילוח. התוצאות המוצגות הן ממוצע של שני ניסויים. בכל ניסוי נבחנו 10 צמחים. הנתונים המוצגים: ממוצע ± שגיאת תקן.

בניסוי המשך, שורשי הזנים הנבחרים אולחו בגורם המחלה, ודגימות שורש לאנליזת ביטוי נאספו בזמן 0 (לפני ההדבקה), ו-9, 24 ו-96 שעות לאחר הדבקה. RNA הופק מהשורשים, ונשלח לריצוף (RNA-seq) ביחידה לריצוף במכון לחקר הגנום באוניברסיטת אילינוי. הרצפים התקבלו במחצית דצמבר 2018, ומנותחים כעת ע"י ד"ר עדי פייגנבאום וד"ר נעה סלע, לצורך איתור גנים שדגם הביטוי בתגובה להדבקה בפטריה, או הרצף שלהם, שונים בזנים העמידים לעומת הזנים הרגישים.

במקביל, מתקיים סקר ספרותי, לצורך איתור גנים מועמדים להקניית רגישות/עמידות לפוזריום בבננה, כמו גם גידולים אחרים. אנליזה ביואינפורמטית נוספת מאתרת גנים פטרייתיים שמעורבים בתהליכי קישור וחדירה לצמח הבננה, בזנים הרגישים והעמידים, בשורשים שנדגמו בנקודות הזמן השונות בניסוי ההדבקה.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

התכנית בוצעה בהתאם למתוכנן, ללא בעיות מיוחדות.

מסקנות ולקחים:

ההתקדמות בשנה א' הייתה בהתאם למצופה. כוילה שיטת הדבקה בפטריה, רמת העמידות ל-TR4 של 30 זני בננה נקבעה, ו-7 זנים, 4 עמידים למחולל המחלה, ו-3 רגישים, שימשו לניסוי ההדבקה ב-TR4, שמטרתו איתור גנים מועמדים להקניית רגישות/עמידות ל-TR4, באמצעות אנליזת ביטוי ורצף (RNAseq) של שורשים שאולחו ב-TR4: גנים המבוטאים דיפרנציאלית בתגובה לאילוח בפטריה בין זנים עמידים לרגישים, או כאלה שיש בהם הבדלים ברצף המקודד (CDS) בין זנים רגישים לעמידים.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

בתחילת 2019 נסיים את האנליזה הביואינפורמטית של תוצאות ניסוי האילוח שבוצע בשנה א', ונגבש רשימת גנים המקנים עמידות או רגישות ל-TR4, שמהם ייבחרו גני מטרה לעריכה גנומית. בנוסף, באנליזה הביואינפורמטית של אותו מסד נתונים, נאתר גנים פטרייתיים המעורבים בתהליכים שונים של הדבקה וחדירה לצמח הבננה, שבעזרתם אנחנו מקווים לאתר גנים נוספים בבננה, שיהוו מטרה לעריכה גנומית, לצורך פיתוח זנים עמידים, באמצעות ביטול יכולת הפטריה לזהות ולחדור לשורשי הבננה.

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).

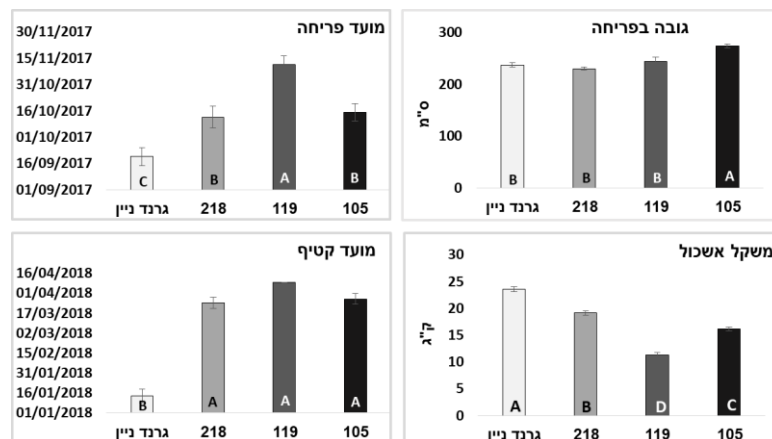
מטרות המחקר הספציפיות כפי שהוגדרו בהצעת המחקר:

- 1) בחינה ראשונית של הביצועים החקלאיים של קלונים טיוואנים מסדרת GCTCV.
- 2) בחינה של רמת העמידות ל-TR4 של הקלונים הטיוואנים בתנאים מבוקרים.
- 3) ריבוי היברידיים עמידים ל-TR4 מסדרת FHIA.
- 4) יבוא מיני בר, זנים עמידים ל-TR4, בעלי פוטנציאל מסחרי.

תוצאות וממצאים:

1) בחינה ראשונית של הביצועים החקלאיים של קלונים טיוואנים מסדרת GCTCV.

לצורך המחקר יובאו קלסטרס (רקמה לא ממויינת שמקורה בתרבות רקמה) של 4 קלונים טיוואנים סבילים למחלת פנמה מהבנק הגנטי בבליה (<https://www.crop-diversity.org/mgis/>), מסדרת GCTCV (218, 119, 105) כבר בינואר 2016. הזנים רובו במעבדת "צמח תרבות", ונשתלו בחלקת הניסוי ב-2.9.16 בחוות ניסיונות הבנות בצמח, עמק הירדן, במתכונת של תצפית, 60 שתילים מכל אחד מהזנים הבאים: קלונים 218, 119, 105, והזן המשקי גרנד-ניין. ממשק הגידול כמקובל בעמק הירדן. ראוי לציין שצמחי הקלונים הטיוואנים היו קטנים באופן משמעותי מאלה של זן הביקורת, גרנד ניין.



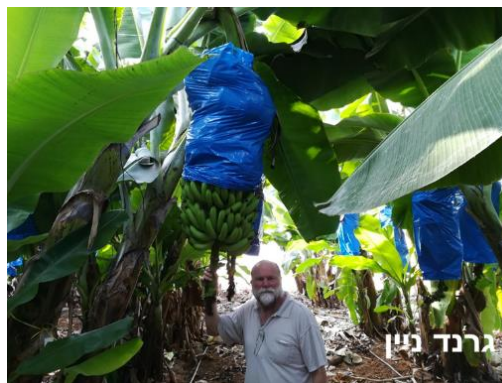
איור 1: מועד פריחה, גובה צמח, משקל אשכול ומספר כפות באשכול בקלונים הטיוואנים וזן הביקורת, גרנד ניין, בחלקת הניסוי בחוות הניסיונות בצמח, יבול א'. מספר צמחים בכל זן: 60. הנתונים המוצגים: ממוצע $\pm$ שגיאת תקן.

באיור 1 מוצגים נתונים על תכונות מרכזיות על פיהן מוערכים זני בננה: מועד פריחה וקטיף, גובה הצמח, ומשקל האשכול. בכל הקלונים הטיוואנים נמצא איחור משמעותי במועד הפריחה והקטיף ביחס לזן המשקי. סביר להניח שהנחיות בגודל השתילים של הקלונים הטיוואנים ביחס לשתילי הזן המשקי גרנד ניין בעת השתילה היא הגורם המרכזי לאיחור הניכר.

קלון 105 מסתמן כזן גבוה, "רזה" (היקף גזעול קטן) ובעל אשכול קטן. צמחי הקלון 119 אינם גבוהים מצמחי הזן המשקי גרנד ניין, אולם משקל האשכול היה נמוך ביותר. קלון 218 הוא בעל הביצועים הטובים ביותר מבין הקלונים הטיוואנים:

גובהו דומה לזה של הזן גרנד-ניין, ומשקל האשכול היה גבוה בהרבה ביחס לקלונים הטיוואנים האחרים. קטיפ יבול ב' בחלקה נמצא בעיצומו.

ב-15.8.2017 נשתלה חלקת תצפית נוספת בקיבוץ יחיעם בגליל המערבי. החלקה פרוחה בקיץ 2018, והקטיפ נמצא בעיצומו. חלקה זו חזקה מאד, ומאפשרת בחינה של פוטנציאל הגידול והיבול של הקלונים הטיוואנים. בדומה לממצאים בחלקה בעמק, ההתרשמות בשלב מוקדם זה היא שלקלונים 105 ו-119 אין פוטנציאל מסחרי בארץ, עקב גובהם הרב, ואשכולותיהם והפרי הקטנים יחסית. קלון 218 מסתמן כזן מבטיח, בעל אשכולות יפים. בחלקה נשקלו עד כה למעלה מ-10 אשכולות של קלון 218 שמשקלם מעל 40 ק"ג, וחלקם מעל 50 ק"ג! תוצאות יבול א' בחלקת יחיעם ויבול ב' בחלקת צמח יובאו בדו"ח הבא.

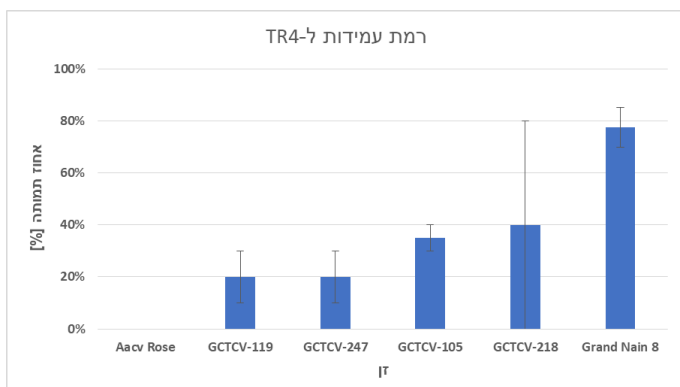


תמונה 1: אשכולות מייצגים של צמחים נבחרים, קלון 218 (שמאל) וזן הביקורת המשקי גרנד ניין (ימין) בחלקת יחיעם.

קלון 247 יובא שנה לאחר שאר הקלונים, ונשתל באוגוסט 2018 להערכה ראשונית בחוות מחקר הבנות בצמח, ובמקביל עובר ריבוי, לצורך שתילה במספר משקים בעמק הירדן והגליל המערבי בקיץ 2019 ואביב 2020.

בחינת רמת העמידות ל-TR4 של הקלונים הטיוואנים בתנאים מבוקרים.

צמחי הקלונים הטיוואנים 105, 119, 218, 247 רובו במעבדת תרבית הרקמה "צמח תרבות", והועברו לקבוצת פרימן להערכת עמידותם לווריאנט המקומי של TR4. פירוט שיטות העבודה מופיע בדיווח על תכנית מספר 4.



איור 2: רמת העמידות של הקלונים הטיוואנים ל-TR4. רמת העמידות מבטאת באחוז התמותה 4 שבועות לאחר האילוח. התוצאות המוצגות הן ממוצע של שני ניסויים. בכל ניסוי נבחנו 10 צמחים. הנתונים המוצגים: ממוצע $\pm$ שגיאת תקן. הזנים Aacv Rose ו-Grand Nain 8 משמשים כזני ביקורת (רגיש ועמיד, בהתאמה).

ארבעה שבועות לאחר האילוח, אחוז הצמחים המתים בקרב הקלונים הטיוואנים נע בין 20%-40%. תוצאות אלה תואמות את הדיווחים בספרות, על עמידות חלקית של קלונים אלה, בהשוואה לזנים רגישים. כך, למשל, אחוזי התמותה בזן המשקי גרנד ניין היו גבוהים בהרבה-כמעט 80%. לעומת זאת, בקרב צמחי הזן העמיד הלא-מסחרי Aacv Rose לא נמצאה תמותה כלל 4 שבועות לאחר ההדבקה.

(3) ריבוי היברידיים עמידים ל-TR4 מסדרת FHIA.

קלסטרים של שלושה זנים היברידיים (FHIA 01, 18, 25), שפותחו באמצעות הכלאות במכון השבחת הבננה FHIA שבהונדורס, יובאו לארץ בינואר 2017, ושימשו לריבוי במעבדת תרבויות הרקמה בצמח. 5 צמחים מכל זן הועברו לחממת ההסגר של השירותים להגנת הצומח ביולי 2017, לצורך הערכת ניקיון ממחלות ומזיקים. במהלך הבדיקות המעבדתיות נמצא שזנים אלה מאכסנים בגנום את הוירוס Banana Streak Virus. האבחון הראשוני נעשה באמצעות הגברה של מקטע גנומי עם פריימרים ספציפיים לנגיף ה-BSV, והאימות נעשה באמצעות אנליזת רצף של המקטע המוגבר. וירוס זה גורם נזקים בהיקף ניכר באזורי גידול בננה שונים בעולם, ועד כה טרם התגלה בישראל, ולכן, עקב החשש להכנסת גורם מחלה חדש בארץ, בתיאם עם השירותים להגנת הצומח, אנחנו מנועים מלבצע עבודת שדה עם זנים אלה.

(4) ייבוא מיני בר, וזנים עמידים ל-TR4 בעלי פוטנציאל מסחרי.

במהלך השנה הראשונה של התכנית נעשה מאמץ להביא קווים גנטיים משני סוגים: א. זנים נוספים שפותחו לצורך עמידות ל-TR4, בעלי פוטנציאל לגידול מסחרי: קווים טרנסגניים ומוטנטים שפותחו באוסטרליה ובסין (פירוט במבוא לתכנית), והיברידיים נוספים שפותחו בתכניות השבחה במוסדות שונים בעולם (FHIA, EMBRAPA). במהלך 2017 ביקרתי במעבדותיהם של שניים מהמובילים העולמיים כיום בפיתוח זנים עמידים למחלת פנמה, James Dale מאוסטרליה, Ganjun Yi-ו מסין, שדיווחו בשנים האחרונות על פיתוח זנים עמידים, באמצעות הנדסה גנטית ושונות סומא-קלונאלית. השניים נמצאים כעת בשלבים של מסחור הזנים, ולא נאותו להעביר לנו את הזנים לבדיקה בארץ. בדיקה במכוני ההשבחה FHIA (הונדורס), ו-EMBRAPA (ברזיל) לא העלתה זנים נוספים שראוי לבחון בארץ, מעבר להיברידיים של FHIA שיובאו לארץ, ונמצאו נגועים בוירוס BSV (פירוט בסעיף 3 של התכנית). ב. מיני בר שמקורם באזורים בדרום-מזרח אסיה, בדגש על מלזיה ואינדונזיה, בהם, לפי ההערכות, שוק TR4 במשך שנים רבות, ולכן התפתחו שם עם השנים מיני בר עמידים למחלה. מטרת הייבוא של זנים אלה, שאינם בעלי פוטנציאל מסחרי, היא לצורך מחקר בסיסי באספקטים שונים של מחלת פנמה, למשל לימוד מנגנוני עמידות לפטריה, איתור גנים ומסלולים מטאבוליים המקנים עמידות, וכו'. במסגרת התכנית הובאו לארץ בינואר 2017 מיני הבר Malaccensis, Aacv Rose, Musa itinerans, Basjoo. הם נמצאו בעלי רמת עמידות גבוהה יחסית ל-TR4 בניסוי בתנאים מבוקרים (פירוט התוצאות בתכנית מספר 4), ו-4 צמחים מכל זן נשתלו באוסף הגנטי בחוות מחקר הבננות בצומת צמח, לצרכי מחקר עתידי.

מסקנות ולקחים:

במסגרת התכנית ייבאו ארבעה קלונים טיפואניים סבילים למחלת פנמה, ולראשונה הם נבחנו, במדינה בה שוררים תנאי גידול סובטרופיים, לרמת העמידות לווריאנט המקומי של TR4, ולביצועים חקלאיים בשדה. רמת העמידות של ארבעת הקלונים הטיפואניים הסבילים נבחנה 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 האינוקולום נמוכה בהרבה, קלונים אלה מסוגלים לתת יבול סביר במשך 4-5 דורות, לפני שנזקי המחלה הופכים את הגידול ללא-כלכלי, וכיום הם מהווים את הפתרון היחיד בתחום הזנים למחלה. מבחני השדה (בחלקות נקיות ממחולל המחלה) נמצאים בראשית דרכם, ומרמזים לכך שקלון 218 הוא זן מבטיח, בעל אשכולות ומשקל פרי טובים. ראוי לציין שבמדינות

שונות, למשל הפיליפינים, קלון 218 הוא הקלון המוביל, ומגודל בקנה מידה נרחב בקרקעות מאולחות במחולל המחלה. ניסיון לייבא ולבחון זנים אחרים שדווחו כבעלי עמידות טובה וביצועים מסחריים לא עלה יפה: ב-3 הזנים ההיברידיים של FHIA נמצא וירוס ה-BSV, שהוא מזיק שאינו קיים בארץ, ולכן אין באפשרותנו לבחון אותם בתנאי שדה. חוקרים מסין ומאוסטרליה, שפיתחו זנים שעשויים להיות בעלי עניין מסחרי, סירבו בשלב זה לאפשר בחינה של זנים אלה בישראל. ראוי לציין שעד כה טרם נשתל אפילו דונם מסחרי אחד מזנים אלה, והתועלת בהם טרם הוכחה, כך שכרגע אין לעולם הבננה פתרון למחלת פנמה בתחום הזנים, מעבר לקלונים הטיוואנים, שהם בעלי עמידות חלקית.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

התכנית בשנה א' בוצעה כמתוכנן. ניסיון לייבא ולבחון זנים אחרים שדווחו כבעלי עמידות טובה וביצועים מסחריים לא עלה יפה, עקב בעיות פיטוסניטריות ואי הסכמת המפתחים לבחון את הזנים בישראל. הקלונים הטיוואנים 105 ו-119 נמצאו כלא מסחריים בתנאי הארץ, עקב נחיתות במשקל האשכול וגודל הפרי, ולכן בשנה ב' הזנים שנמשיך לבחון הם הקלונים הטיוואנים 218 ו-247.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

בשנה ב' של המחקר נתרכז בהערכת הביצועים החקלאיים של הקלונים הטיוואנים 218 ו-247. קלון 218: יושלם איסוף נתוני יבול ב' (עמק הירדן-חוות צמח) ויבול א' (גליל מערבי-יחיעם), וישתלו חלקות מבחן חדשות במספר משקים בגליל המערבי ובעמק הירדן. 247: יושלם (בהנחה שלא ייגרם עיכוב במועד הקטיף עקב אירועי קרה בחורף 19-2018) איסוף נתוני יבול א' (עמק הירדן-חוות צמח), וישתלו חלקות מבחן חדשות במספר משקים בגליל המערבי ובעמק הירדן.

תכנית #3: פיתוח עמידות ל-TR4 באמצעות עריכה גנומית:

צוות המחקר: ד"ר עמית גל-און (מנהל המחקר החקלאי, עריכה גנומית), פרופ' אבי לוי (מכון וויצמן למדע, עריכה גנומית), שרה סלומון (צמח תרבות רקמה, פיתוח תרחיפי תאים עובריים), ד"ר חיה פרידמן (מנהל המחקר החקלאי, ייעוץ פיתוח תרבות תאים עובריים).

מטרות:

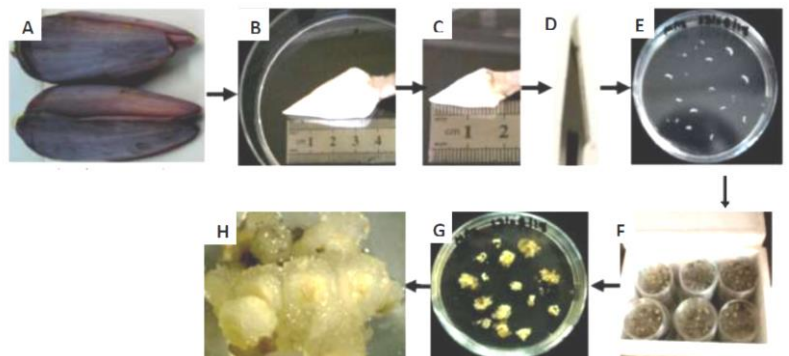
- 3.1 פיתוח פרוטוקול ליצירת תרחיף תאים אמבריונים ופרוטופלאסטים של בננה.
- 3.2 בניית תבניות גניות בינאריות של Cas9/Cpf1 מותאמות לבננה ובחינת ייתכנות עם גן מדווח.
- 3.3 פיתוח מערכת של השריית שורשים בבננה באמצעות *Agrobacterium rhizogenes* (AR).

פירוט המשימות:

3.1 פיתוח פרוטוקול ליצירת תרחיף תאים עובריים ופרוטופלאסטים של בננה:

פיתוח קלוסים עובריים מקודקודי פריחה של בננה כשלב ראשון בגידול Embryogenic Suspension Cells (ECS). טרנספורמציה של בננה מבוססת על תרחיף תאים עובריים, אשר יכול להישמר לאורך שנים ולשמש לניסויי טרנספורמציה רבים, ולכן עיקר המאמץ בשנה הראשונה הושקע בפיתוח תרחיף של תאים עובריים (ECS). לצורך לימוד שיטות העבודה ביקרה שרה סלומון במעבדתו של ד"ר חורחה לופז במכון INIVIT בקובה, שהיא אחת המעבדות המובילות כיום בעולם בתחום של ייצור תאים עובריים בבננה. פיתוח תרחיפי התאים העובריים נעשה במקביל, תוך שיתוף פעולה מלא והעברה הדדית של ידע, במעבדת תרבות הרקמה 'צמח תרבות רקמה', ובקבוצת גל-און. הפיתוח מבוסס על יצירת קאלוס עוברי (embryogenic callus) אשר נמשך כחצי שנה, והעברת התאים העובריים למדיה נוזלית ליצירת ECS. השתמשנו בפרחים זכריים של בננה (immature flower) כשיטה ליצירת קלוסים עובריים. כ-820 פרחים מ-60 ניצני פריחות זכריות גודלו בכל אחת מהמעבדות על מצע משרה קאלוסים (איור 1). קלוסים התפתחו מהתפרחות ולאחר כ-4 חודשים ניתן לזהות התחלה של יצירת ECS. בשתי המעבדות זוהו תאים עובריים בקאלוסים, שהועברו לאחרונה לגידול של תרחיף תאים. להערכתנו בעוד כשלושת החודשים, בתחילת 2019, התאים העובריים ב-ECS יהיו מוכנים לניסויי טרנספורמציה.

Fig. 1. Steps in induction of embryogenic callus from immature male flowers of banana (*Musa AAA*, cv. *Grande naine*). Male flower buds (A) disinfected after removal of the bracts (B and C) and flower whorles were excised (D) inoculated on callus induction media (F) callus development (G) and appearance of callus with embryogenic characteristics (H).



3.2) בניית תבניות גניות בינאריות של Cas9/Cpf1 מותאמות לבננה ובחינת היתכנות עם גן מדווח:

תבנית גנית להשתקת הגן PDS בגידולים שונים קיימת במעבדה pARS-Cas9-sgRNA(PDS). על בסיס התבנית הקיימת נבנית תבנית בבננה עפ"י (Chandrasekaran et al., 2016). הכנת התבנית נדחתה לסוף שנה ראשונה היות שתרחיף התאים עדין אינו זמין לטרנספורמציה. לניסויי הטרנספורמציה השתמשנו בתבנית גנית המבטאת את הגן PX11 תחת בקרת הפרומוטור Ubiq של תירס (התקבל מאסף אהרוני, שותף לפרויקט - Polturak et al., 2016). בנוסף השתמשנו בתבנית המבטאת את הגן הפלורסנטי RFP תחת בקרת פרומוטור של Ubiq שנלקח מגנום התירס (מחד פסיג). הוקטור נבנה במעבדתו של אבי לוי, שותף בפרויקט.

ניסויי טרנספורמציה – המעבדה של גל-און נערכה לעבודה בתרבית רקמה לפיתוח טרנספורמציה בבננות, שכללה התאמת חדרי גידול ושטחי עבודה סטריליים. עיקר העבודה נעשית ע"י הפוסטדוק דר. באקאלה, בעל מומחיות ונסיון רב בתחום תרביות רקמה. בשנה הראשונה עיקר המאמץ הושקע בטרנספורמציה של שורשים.

3.3) א. פיתוח מערכת של השריית שורשים בבננה באמצעות Agrobacterium rhizogenes (AR)

המטרה היא פיתוח מערכת של שורשים, hairy roots (hr) בבננה באמצעות *A. rhizogenes* ככלי לסריקה מהירה של גנים המעורבים בעמידות כנגד TR4. היות שטרנספורמציה צמחי בננה היא ממושכת ובחינת צמחים בוגרים היא מורכבת הנחנו שהשימוש בשורשי hr לסריקת גנים היא קצרה ונוחה יותר. לצוות המחקר ניסיון רב בהשרית שורשי hr שעברו עריכה גנטית בגידולים שונים כמו, תפוז"א, עגבניה, מלון ומלפפון. שאין מידע על השרית שורשי hr בבננה באמצעות *A. rhizogenes*.

בחנו את היכולת להשרות שורשים עם 4 גזעים שונים של *A. rhizogenes* (AR). בשלב ראשון ביצענו טרנספורמציה לצמחוני בננה שגודלו *in vitro* עם שני גזעים של *A. rhizogenes* ATCC15834 ו-K599 המכילים תבנית גנית המבטאת את הגן המדווח GFP. בניסויים אלו לא הצלחנו לבצע הדבקה של ה-AR באמצעות ואקום אינפילטרציה לאחר סוניקציה. הצמחים מתו ולא הצליחו להשרות יצירה של hr על מדיום המכיל קנמיצין. באמצעות שימוש במעכבי אתילן 1-methycyclopropane (1-MCP) לפני ביצוע הטרנספורמציה הצלחנו לקבל שורשים שהופיעו 30-45 יום לאחר הטרנספורמציה. השורשים שהתקבלו לא ביטאו GFP וגם לא היו עמידים לקנמיצין (איור 2).

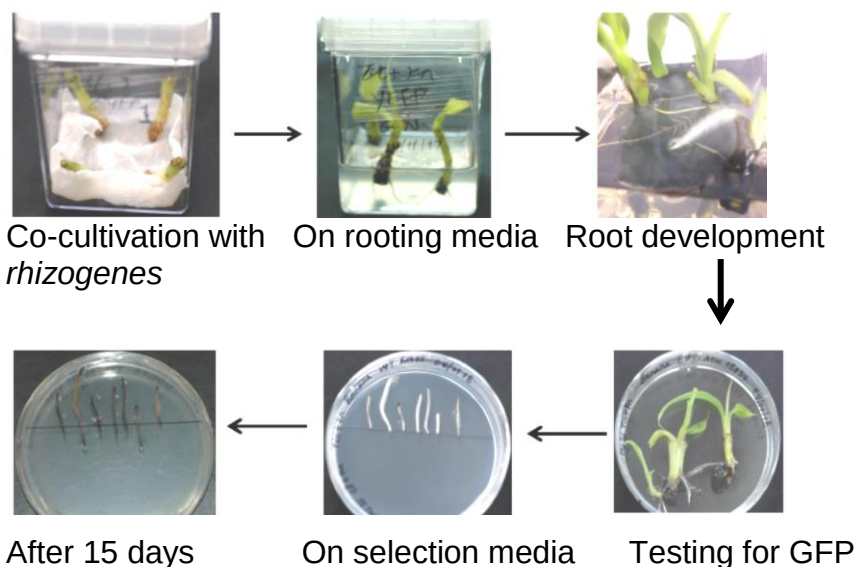
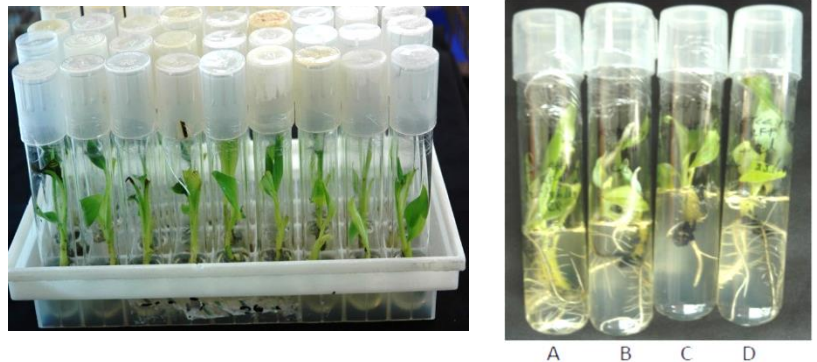


Fig. 2. Steps in induction of hairy roots in banana shoots infected with *A. rhizogenes*. *In vitro* grown banana shoots were treated with the ethylene action inhibitor 1-aminocyclopropane (1-MCP) for 2 h co-cultivated with *A. rhizogenes* strains harboring the GFP reporter gene for 3 days and grown in Magenta boxes. Putative roots were tested for expression of GFP and/or grown on selection media (50 mg l⁻¹ Kan).

בניסוי נוסף החדרנו לארבעה גזעים שונים של *A. rhizogenes* (ATCC15834, K599, LBA-9402, LBA-1334) פלסמיד בינארי המכיל גן מדווח (RFP) red florescent protein תחת הפרומוטר Ubq. הטרנספורמציה נעשתה על רקמות שונות של צמחוני בננה כאשר כל צמחון גודל בנפרד על מצע סטרילי מתאים (איור 3). בניסוי זה נראתה התפתחות של שורשי hr אלא שגם הפעם לא הצלחנו לגדל את שורשי ה-hr על מצע סלקטיבי וכמו כן לא נצפה ביטוי של הגן המדווח RFP.

אנו מניחים כי היכולת להשרות שורשי hr בצמחוני בננה ללא ביטוי של גנים מדווחים (GFP או RFP) וגן לסלקציה (NPTII) מקורו מטרנספורמציה חלקית, שבה הפלסמיד (Ri) המכיל את הגנים Rolls המעורבים בהשריית שורשי hr עבר אינטגרציה לגנום הבננה בעוד שהפלסמיד הבינארי המכיל את הגן לסלקציה והגנים המדווחים לא עבר אינטגרציה.

Fig. 3. Growing individual banana shoots in tissue culture tubes following infection with *A. rhizogenes* strains and phenotypic variation among roots induced by LBA9402 (B), LBA1334 (B and C) and ATCC15834. Roots (white arrow) induced by LBA1334 on flower explant cultured in the dark to induce callus.



השימוש בגנים מדווחים כמו GFP ו-RFP מחייב דיגום של הרקמה שפוגע לעיתים בהתפתחות הצמחון. מסיבה זו השתמשנו בגן המדווח PX11 הגורם להתפתחות צבע סגול נראה לעין ללא פגיעה ברקמה הצמח (Polturak et al., 2016).

הפלסמידים הבינאריים המכילים את הגן המדווח PX11 תחת הפרומוטר 35S-Ubq הוחדר ל-*A. rhizogenes* לגזע LBA-1334 וטרנספורמציה נעשתה לרקמות שונות של בננה. תוצאות ראשוניות הראו יצירת שורשי hr המבטאים צבע סגול (איור 4) שמעידה על חדירת ה-T-DNA לגנום. התקבלו מספר מועט של שורשי hr בהשוואה לטרנספורמציה למלון או טבק (תוצאות לא מוצגות). השורשים המעטים שהתקבלו מהרקמות השונות וביחוד מפרחים מעידים על הצלחה מוגבלת בשימוש ב-*A. rhizogenes* להשריית שורשי hr בבננה.

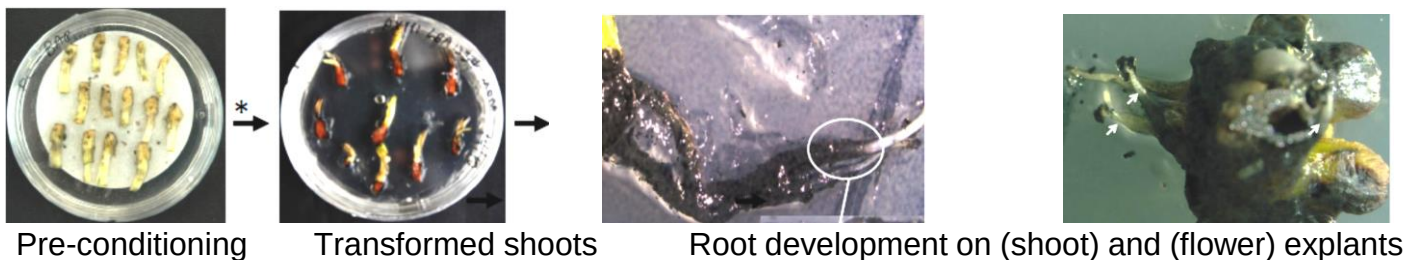


Fig. 4. Root development in transformed banana explants. Vertically splitted banana explants were pre-conditioned for 2 days and transformed with *A. rhizogenes* strain LBA 1334 harboring the PX11 reporter gene (betaline) under the control of the maize Ubq promotor.

3.3 ב. פיתוח טרנספורמציה יציבה בבננה. במקביל לעבודה עם *A. rhizogenes* החלטנו לפתח גם טרנספורמציה יציבה stable transformation בבננה ככלי עזר להמשך המחקר של עריכה גנומית בבננה. הניסויים הראשונים נעשו עם חיידקי EHA105 *A. tumefaciens* המכילים את התבנית הבינארית PX11. איור 5 מראה ראשית יצירת צמחונים על מדיום סלקציה.

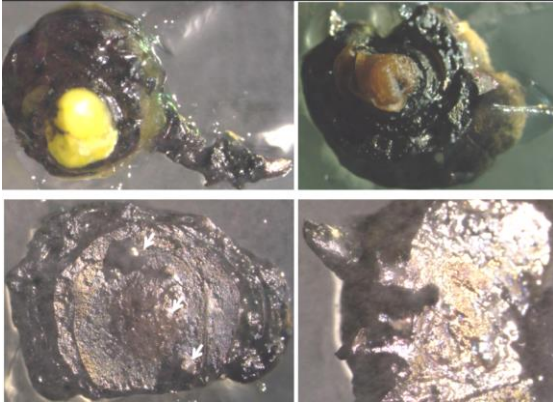


Fig. 5. Stable transformation of banana explants with *A. tumifaciens* strain EHA105. Intercalary meristems obtained from *in vitro* grown banana plants were dissected either horizontally or vertically, pre-conditioned for 2 days and transformed with *A. tumifaciens* strain harboring the PX11 reporter gene, and explants are grown on selection media.

מסקנות להמשך המחקר:

1. בשנה הראשונה השקענו מאמץ רב לקבלת שורשים מותמרים hr באמצעות גזעים שונים של *A. rhizogenes*. במרבית הניסויים לא הצלחנו לקבל שורשי hr טרנספורמנטים בניגוד להצלחה שיש לנו בגידולים אחרים, דו-פסיגיים. במספר ניסויים הצלחנו להשרות יצירת שורשי hr מוגבלת מפרחים. לאור זאת החלטנו להמשיך את מחקר השריית שורשי hr לעוד כחצי שנה בכדי לבסס את התוצאות שהתקבלו. אנו רואים בפיתוח שורשי hr טרנספורמנטים כלי חשוב להמשך המחקר בסריקה לעמידות כנגד TR4 ולכן החלטתנו להמשיך במאמץ המחקרי לתקופה מוגבלת.
2. בשנה השנייה נמשיך לבסס את הטרנספורמציה היציבה עפ"י פרוטוקולים קיימים המאפשרים קבלת צמחונים טרנסגניים. גידול שורשי בננה (רגילים) בתרבית נבחן בהצלחה בשנה הראשונה. כך שאם לא נצליח לבסס את המערכת של השריית שורשי hr בצמחים טרנסגניים נבצע את הסריקה לעמידות על שורשי צמחים טרנסגניים שעברו ריבוי *in-vitro*.
3. התקדמות המחקר בפיתוח קלוסים ותרחיפים עובריים בשנה הראשונה מהווה בסיס חשוב למיקוד המאמץ של עריכה גנומית בתאים אלו בשנה השנייה. אנו מעריכים שבתחילת 2019 התאים העובריים יהיו מוכנים, וישמשו לביצוע ניסויי הטרנספורמציה.
4. כיוול המערכת של עריכה גנומית באסטרטגית knock-out תעשה עם התבנית לפגיעה בגן PDS של בננה.
5. יבחנו שיטות שונות לביצוע עריכה גנומית בתאי ECS ללא יצירת צמחונים טרנסגניים.

Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Mol Plant Pathol 17:1140-1153

Polturak et al., 2016 Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. New Phytologist 210:269-283.

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 במים ובקרע).

מטרות ספציפיות (שנה א')

4.1 שיטת אבחון מבוססת PCR (Dita et al., 2010) בהשוואה לשיטה מבוססת QPCR של חברת Clear Detections, ושיטות נוספות (Aguayo et al., 2017) לאור דיווחים על חוסר דיוק בשיטה המקובלת של Dita אשר לא מזהה את כל ה VCGs של TR4.

במשך שנת המחקר הנוכחית, (בספטמבר ואוקטובר 2018) התגלו עוד 3 חלקות עם נגיעות במחלה: קיבוץ מסדה, קיבוץ דגניה ב' וקיבוץ גשר (יש חשד גם לנגיעות באשדות יעקב). ע"מ לבחון את שיטת הגילוי ב-PCR בוצעה הבחינה באמצעות פריימרים של Dita. נמצא פסי הגברה אופייניים (נספח תוצאות, איור 1א') והופעלה גם שיטת גילוי ב-PCR בשיטה אחרת, של O'Neill et al. (2016) (נספח תוצאות, איור 1ב'). בשתי השיטות התגלתה נוכחות גורם המחלה ע"י הגברה של פס בודד ספציפי. כמו כן, הופעלה שיטת הגילוי על רקמה נגועה באופן טבעי מבלי לבודד את הפטרייה מראש (איור 1ג'). לכן, שיטת הגילוי ע"ס O'Neill et al. אמינה, ואין צורך לפתח ולנסות עוד שיטות מולקולריות כעת.

4.2 קביעת שיטת אילוח מהימנה עם וללא פציעה של מערכת השורשים.

אולחו צמחי בננה בריכוזים שונים של נבגי TR4/מ"ל (10^3 עד 10^6 בלי או עם פציעה ע"י קיטום שורשים) בטבילה ובשיטת עירבוב הפטרייה בריכוזים שונים במצע הגידול (דוחן). שבועיים עד חודש לאחר האילוח, נקבע הריכוז ה-CFU במצע במיהול צלחות לבחינת אחוז הישרדות המידבק במצע. צמחי בננה מתרבות הושתלו במצע המאולח ונעשה מעקב אחר הופעת סימפטומים. שיטה זו לא היתה מוצלחת ולקח הרבה מעבר לחודש לקבל סימפטומים של המחלה, בנוסף כמות המצע לעיקור היה בנפחים לא ריאליים להעמדת ניסויים לסריקת עמידות בצמחים רבים. לכן, בוצע אילוח קלאסי של טבילת שתילים בתרחיף נבגים (10^4 עד 10^6 בלי או עם פציעה ע"י קיטום שורשים) ונקבע ריכוז של 10^6 ללא פציעה כריכוז אופטימלי לסריקת זנים קוים לעמידות למחלה (נספח תוצאות, איורים 2 ו-3).

4.3 בחינת תבדיד GFP לביסוס איכוס צמחים מאולחים.

יוצר תבדיד פטרייה טרנסגנית המבטא GFP יציב לאחר מספר העברות במצע עם האנטיביוטיקה לסלקציה (Hygromycin) (נספח תוצאות, איור 4). התבדיד הטרנסגני נבחן לפתוגניות בצמחי תרבות ונמצאה פתוגניזם ואלים כנגד צמחי בננה שיוצרו בתרבות רקמה. (נספח תוצאות, איור 5). בעתיד, התבדיד ישמש לווידוא שאכן שהפטרייה הטרנסגנית ניתנת לזיהוי בתוך הצמח המאולח (בעזרת מיקרוסקופ קונפוקלי) ונבחן את יחסי הגומלין בין הפטרייה לקוים סבילים/עמידים למחלה.

4.4 איסוף תבדידים מהארץ והשוואה עם אוסף תבדידים מחו"ל, לקביעת שונות גנטית וביסוס שיטת הזיהוי ע"ס VCG.

מאגר התבדידים מהארץ התרחב לאחר שנתגלו עוד 3 מקומות בהם קיימת נגיעות במחלה. המקומות: קיבוץ מסדה, קיבוץ גשר וקיבוץ דגניה ב'. בוצעה בחינת שונות גנטית בעזרת ap-PCR ונמצא שבין התבדידים המקומיים לאלה מחו"ל. נמצאה אוכלוסיה אחידה המצביעה על הכנסה יחידה ואוכלוסיה קלונאלית של הפטריה בארץ (נספח תוצאות, איור 6). התחלנו ליצור מוטנטים של NIT1 ו-nit בשיטות המקובלות, החיונית לאבחון גזע TR4, אשר דווחה כאוכלוסייה קלונאלית. למרות שדווח על גילוי VCG נוסף לאחרונה, עבודה זו החלה (נספח תוצאות, איור 7). כל התבדידים ייסרקו מול סטרים של NIT1 ו-nit לבחינת שייכות לקבוצת VCG מסוימת. לאחרונה נתקבלו באישור השירותים להגנת

הצומח במשרד החקלאות אישור ייבוא של תבדידים של פוזריום גזע 1 מ Dr. Altus Viljoen, (Stellenbosch Univ., South Africa) אשר ברשותו אוספים רחבי היקף של תבדידי TR4 מכל העולם, זאת כדי לוודא את קבוצת ה-VCG המסוים (0120; 01213/16; 0121 או 0122). עבודה זו מתקדמת ותמשך בשנה ב' של המחקר.

4.5. בחינה של רמת העמידות ל-TR4 בזנים השונים

לאחר קבלת אישור שחרור של הזנים המיובאים מהשירותים להגנת הצומח, 30 זני בננה שונים, (כ-10 צמחים מכל זן) הועברו לחממת ההסגר בבית-דגן, לסריקת עמידות/רגישות למחלה. שורשי הצמחים אולחו ב-TR4, ע"פ פרוטוקול שפותח במעבדה של פרימן – פרויקט 4, סעיף 4.2. כ-4 שבועות לאחר האילוח הוערכה רמת עמידות הזנים השונים לפטרייה, ע"ס הסימנים המקובלים: אחוז עלים מתים, החמה בגזעול ובעיקר פקעת הבננה, ותמותת הזנים (נספח תוצאות, איור 9).

מסקנות ולקחים:

1. בשנה האחרונה (2018) המחלה נתגלתה בעוד שני משקים, עם חשד לנגיעות בעוד 3 מקומות. נבחנו 2 שיטות מולקולריות לגילוי גורם המחלה. שיטת O'Neill et al. אמינה, ואין צורך לפתח ולנסות עוד שיטות מולקולריות כעת. נמצאה גם נוכחות גורם המחלה בהגברת PCR ישירה על רקמה שנדגמה מצמחים נגועים בשיטה זו.
2. נקבע ריכוז של 10^6 ללא פגיעה כריכוז אופטימלי לסריקת זנים קיום לעמידות למחלה – שיטה זו שימשה להערכת רמת העמידות ל-TR4 של זני בננה שיובאו מח"ל ולצורך אילוח בתבדיד המסומן ב-GFP שפותח במסגרת הפרויקט.
3. בוצעה בחינת שונות גנטית בעזרת ap-PCR ונמצא שבין התבדידים המקומיים לאלה מחו"ל נמצא אוכלוסיה אחידה המצביעה על הכנסה יחידה ואוכלוסיה קלונאלית של TR4 בארץ. כמו כן, הוחל באיבחון השונות הגנטית של אוכלוסית הפתוגן בשיטת ה-VCG.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

תוספת למחקר:

בוצע ריצוף גנומי של 5 תבדידי הפתוגן (2 אתרים בארץ – שפיה ועין גב; 3 תבדידים מחו"ל – ירדן, אינדונזיה והפיליפינים) להשוואת ה-SNPs, ע"מ לקבוע את מקור הפתוגן המקומי בדומה שבוצע ע"י קבוצה סינית/הולנדית: (Si-Jun Zheng et al., 2018; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900031>) לאחר הצלבת הנתונים של הריצוף שלנו ואלה מחו"ל נמצא ללא כל צל של ספק שמקור הפתוגן בארץ מירדן (נספח תוצאות, איור 8). 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 ב':

4.5 המשך אבחון שונות גנטית וביסוס שיטת ה-VCG

חיוני להמשך אבחון השונות הגנטית של הפתוגן וריצוף תבדידים נוספים לבחון את מקורם.

4.6 הפעלת שיטת הזיהוי שנמצאה כאמינה ביותר, לבחינת נוכחות הפטרייה בחומר הצמחי

עבודה זו תמשך לכיול המערכת לבחינת השיטה היעילה ביותר לגילוי הפתוגן ברקמה הצמחית הנגועה.

4.7 כיול שיטת ריכוז מים למדידת הפטרייה בריכוזים נמוכים

ייתכן והפתוגן מועבר במים לכן, חובה לנסות לכייל שיטת גילוי בפאזה הזאת.

4.8 שימוש בתבדיד GFP ללימוד איכלוס צמחים מאולחים ומאכסנים פוטנציאליים

לאחר שקיים תבדיד מסומן וחומר גנטי רגיש/סביל/עמיד למחלה התבדיד המסומן יעזור בפיענוח מנגנון העמידות/רגישות בין הפתוגן לפונדקאי.

4.9 איתור מאכסנים אלטרנטיביים ל-TR4

חשוב ביותר מאחר וצומחים עשבים רעים בחלקות הבננה הנגועים וייתכן שהפתוגן יכול להיות מוסע באופן לטנטי בין מאחסן לא ספציפי לבננה.

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).

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

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.

בוצעה בדיקה לעיכוב *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) בצלחות פטרי עפ"י הסכימה הבאה:

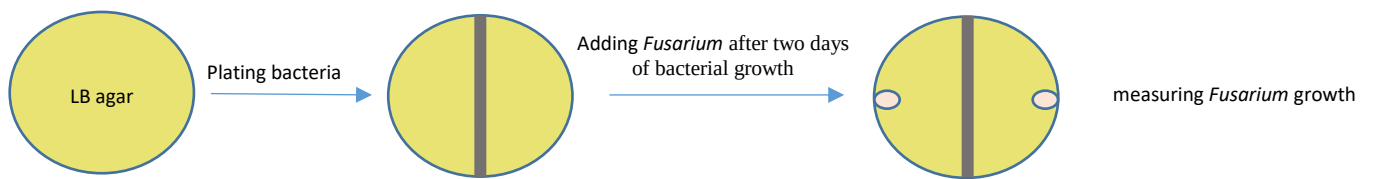
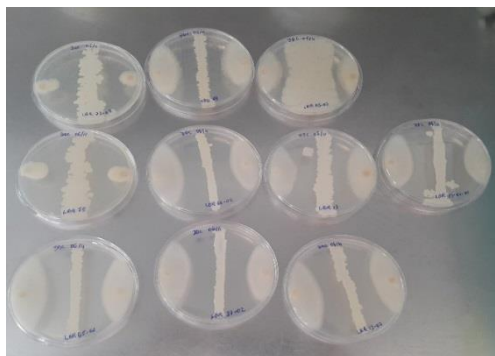


Fig 1: A schematic description of the process of screening bacteria against FORC

דוגמא למספר צלחות בהן גדלו חיידקים בעלי פעילות חלקית או גבוהה נגד FOC, יחסית לביקורת ללא חיידק נראית

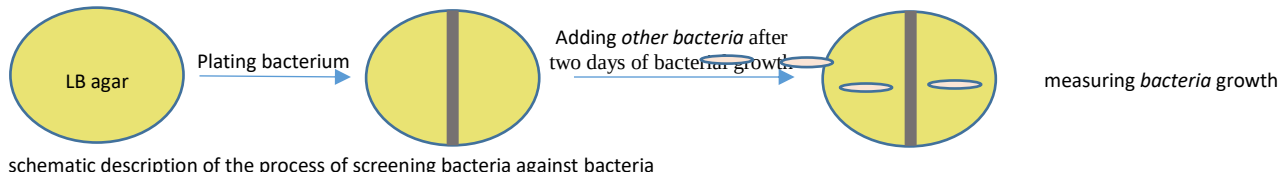
באיורים הבאים:



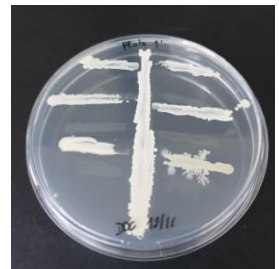
סיכום עיכוב זני הפוזריום ע"י התבדידים:

Bacteria isolated from:	Banana root	Soil
Initial number	120	80
Effective against FORC	12	8
Effective against FOC	10	3
Effective against both of them	10	3

בכדי לתכנן קונסורציה של חיידקים לקבלת פעילות סינרגיסטית אפשרית ש צורך לוודא שהחיידקים לא הורגים אחד את השני. לשם כך בוצעה בדיקת עיכוב הדדי על פי הסכימה:



דוגמא למספר צלחות בהן נבחן עיכוב הדדי של החיידקים נראית באיור הבא: כרגע מבוצעים נסיונו ראשוניים לאילוח צמחי בננות ב-13 התבדידים המובילים, לוידוא בטיחות בשימוש (לודא שהחיידקים לא מזיקים לצמחים). לאחר שאלו יסתיימו יבוצעו ניסויי אילוח של הצמחונים בקונסורציה השונים ובחינת הורדת הפתוגנה ע"י FOC.



רשימת הקונסורציה שיורכבו, על בסיס בחינת העיכוב ההדדי:

Consortium A: bacteria LBR 55+ LBR 17+ 60 + 02

Consortium B: bacteria LBR 66-02+ LBR 47+ LBR 72-02

Consortium C: bacteria LBR 13-01-01+ LBR 65-02+ LBR 27-02

Consortium D: bacteria LBR 03-02+ LBR 13-02+ KBS 07

מסקנות ולקחים: בידינו מספר מדברים ביולוגים (חיידקים) שמראים מידת עיכוב גידול גורם המחלה בצלחות פטרי. ניתן לבנות מהם מספר קונסורציה לבחינת עבודה בעצמים ללא הפרעה הדדית.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית: אין

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה: בחינת מדברים ביולוגים (חיידקים) שמראים מידת עיכוב גידול גורם המחלה-בחממה. בחינת השפעה משולבת עם ביופחם ומיקוריזה.

תכנית #6: גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות פוזריום בבנות.

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).

מטרות ספציפיות לשנה א':

- (1) לצמצם את הפצת הפטריה מעצים נגועים לעצים בריאים באמצעות כלי עבודה מאולחים ולמנוע את הפצת הפטריה ממטעים נגועים באמצעות כלי עבודה מאולחים.
- (2) להדביר את מחולל המחלה במוקדי נגיעות ולהקטין את הפצת הפטריה במטעים כאלה.
- (3) להדביר את מחולל המחלה במוקדי נגיעות, ולהקטין את הפצת הפטריה בקרקע במטעים כאלה.

תוצאות לשנה א' על פי המטרות הספציפיות:

- (1) לצמצם את הפצת הפטריה מעצים נגועים לעצים בריאים באמצעות כלי עבודה מאולחים ולמנוע את הפצת הפטריה ממטעים נגועים באמצעות כלי עבודה מאולחים.

(א) בחינת חומרים לחיטוי כלים ואמצעי עבודה באמצעות טבילה בתכשיר חיטוי יעיל: בשלב ראשון פיתחנו שיטה להצמדת נבגים של פוזריום לגלילים שבהם חריצים. גלילים אלה הוכנסו לתוף מחורר שמסתובב בתוך מתקן חיטוי ייעודי שנבנה במעבדה למטרות אלה (תמונה 1). התוף מונח על גבי אמבט כשהשליש התחתון שלו שרוי באמבט שמלא בתמיסת תכשיר החיטוי הנבדקת. מנוע מסובב את התוף במהירות 20 סל"ד. באמבט מותקן גוף חימום אשר שומר את תמיסת החיטוי בטמפרטורה הרצויה. הגלילים שעליהם נבגי פוזריום מחולל מחלת ריקבון הכתר בעגבניות הוכנסו לתוף החיטוי ונחשפו לתמיסת החיטוי למשך דקה. הסיבה לבחירת הפטריה למבחנים אלה בשלב הראשון ולא את מחולל מחלת פנמה היא, כי זהו הפתוגן שבו נבצע את הבחינות בשדה (כדי לא להפיץ את מחולל המחלה בבנות).

תמונה 1. מתקן לחיטוי שמבוסס מיכל עגול מחורר, שמונח על גבי אמבט ומנוע שמסובב את התוף במהירות 20 סל"ד. תוף החיטוי שרוי באמבט מחומם אשר שומר את תמיסת החיטוי בטמפרטורה



גלילי פלסטיק חרוץ נטבלו בתרחיף נבגים ולאחר מכן הוכנסו לתוף. התוף נטבל בכל פעם בתמיסת תכשיר חיטוי כפי שמופיע בטבלה 1. התוף הופעל למשך דקה. לאחר מכן הוצאו הגלילים והוכנסו לתמיסת מים מעוקרים. המכלים הוכנסו למכשיר אולטרסוני למשך 15 שניות לצורך הפרדת הנבגים מהגלילים ולאחר מכן התמיסה פוזרה על גבי צלחות מצע מזון. לאחר חמישה ימי הדגרה נספרו המושבות שצמחו וחושב אחוז הקטילה.

טבלה 1. השפעת תכשירי חיטוי בריכוזים שונים על קטילת נבגי פוזריום מחולל מחלת רקבון הכתר בעגבניות.

תכשיר/ ריכוז (%)	שעור קטילה (%)			חומר פעיל
	0.5	1	2	
בקטרון	80	100	100	אמוניום רביעוני +נחושת
היפוכלורית	75	90	100	כלור פעיל
ברומוספט	50	90	100	אמוניום רביעוני
LMA	20	60	80	חומצה חלשה
היקש (מים)	0	0	0	

תכשירים שמבוססים על חומרים פעילי שטח נראים יעילים ביותר בקטילת נבגי הפטריה. גם הריכוזים שנבחנו הם ריכוזים מעשיים ליישום מעשי. התכשיר LMA לא נראה יעיל ולכן לא ייבחן בהמשך. המשך תוכנית העבודה במסגרת מטרה זו מתמקד בשני כיוונים:

a. בחינת יעילות הקטילה של פוזריום מחוללת מחלת פנמה. כרגע ברשותנו תבדיד של הפטריה ואפשרות לבחון את האמצעים כנגדו. נבחן את יעילות הקטילה באמצעות תכשירים אלה במשך חשיפה קצר מ-30 שניות.

b. בחינת תכשירים נוספים. נבחן את התכשירים הללו בהשוואה לתכשיר ספורקיל שהוא תכשיר הייחוס לקטילת פוזריום בבננה. בנוסף, נבחן תכשירים נוספים שחלקם כבר נמצאים ברשותנו.

ב) פיתוח אמצעים ליישום יעיל של תכשירי חיטוי לצורך חיטוי כלי עיבוד ושינוע ומשטחים שלא ניתן לטבול אותם: כדי לחטא כלים אשר עוברים מחלקה לחלקה, בחנו את הדרכים לבצע את החיטוי בצורה יעילה. המערכת הקיימת כיום מבוססת על בריכות חיטוי שמוצבות בכניסה לחלקות ובהן תמיסת חיטוי. בריכות אלה אינן יעילות שכן הבוץ שמצטבר בקרקע גורם לפירוק החומר הפעיל במהירות. כמו כן, רכב שנוסע בבריכה מעלה בכל פעם את הבוץ ולכן אינו מאפשר תמיסת חיטוי נקייה. לכן, תוכננה, נבחנה, ונבנתה מערכת חיטוי חדשה אשר מותקנת כחלק ממערכת בריכות הטבילה שהותקנו בכניסה למטעי בננה בארץ (תמונה 2). 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 הבריכה 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.
- 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.



תמונה 2. מערכת ריסוס לחיטוי כלי רכב בכניסה למטעי בננה.

(2) 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 (תמונה 3). לאחר מספר חודשים (בחודש ינואר 2019) כאשר מצמחי האם יגילו צמחי בת (נצרים) ניישם תכשירים שנועדו לקטול את הצמחים ואת הפטריה. בשלב הראשון נבחן את קטילת הצמחים בלבד. נבחן שילוב של יישום תכשירים בהגמעה לקרקע ובהזרעה לגזעול.



תמונה 3. צמחי בננה לצורך קטילה באמצעות תכשירים כדי להקטין את מדבק הפטריה.

(3) להדביר את מחולל המחלה במוקדי נגיעות, ולהקטין את הפצת הפטריה בקרקע במטעים כאלה.

(א) בחינת יעילות תכשירים לחיטוי קרקע בקטילת הפטריה בקרקע – במערכות מבוקרות: המערכת המבוקרת בה נשתמש, 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 נכניס קרקע יבשה ומנופה ונטמין בה שקיות רשת שמכילות פוזריום. בשלב הזה של המחקר יצרנו מדבק קרקע של הפטריה. הליך יצור המדבק הוא ארוך (מספר חודשים). כרגע יש בידינו מדבק ואנו ערוכים לבחינת קטילה בקרקעות כפי שתואר בתוכנית המחקר. בקצרה: הקרקעות במכלים יושקו בתמיסת תכשיר החיטוי מעורבת בכמות מים לקבלת תכולת רטיבות של 80% מקיבול שדה בקרקע הנבדקת (4 חזרות). תכולת רטיבות קבועה של 80% מקיבול שדה מאפשרת פעילות מיטבית לתהליכים הביולוגיים בקרקע. בתום הניסוי נוציא את גופי הקיימא מהמיכלים ונבדוק שיעור החיוניות. בתום ניסויים אלה נוכל לקבוע את הריכוזים של התכשירים אשר יעילים בקטילת גופי הריבוי של הפטריה.

מסקנות ולקחים:

בשנת 2018 נתגלתה המחלה בעוד חמש חלקות בעמק הירדן. מיקום החלקות מלמד על דפוס אפשרי של התפשטות מחולל המחלה באמצעות שינוע של מיכון, כלים חקלאיים, עובדים ורכב. על כן ישנו הכרח להאיץ את החדרת פעולות החיטוי כדי למנוע מחד התפשטות המחלה לחלקות נוספות באמצעות ציוד חקלאי. בנוסף, חשוב להתחיל בטיפולים בקרקע כדי לחטא לפחות את שכבת הקרקע העליונה ובכך למנוע את האפשרות שקרקע כזו תהווה מקור הפצה.

סטיות ושינויים מתוכנית העבודה המקורית:

- בתחילת ביצוע התוכנית לא היה בידינו מבנה מתאים לניסויים בתנאי הסגר. במהלך שנת המחקר הראשונה השלמנו את התאמת בית צמיחה למטרות אלה והתחלנו לבצע ניסויים שבהם אנו מטפלים בצמחי בננות מאולחים בפטריה. לכן, אנו יכולים כעת לבצע את המטרות 3-7 (להלן) כפי שהוגדרו בתוכנית המקורית בשנים א' וב'.
- בתוכנית המקורית הייתה 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 השנייה.

מטרות המחקר המיועדות לשנת המחקר השנייה:

1. המשך בחינת חומרים לחיטוי כלים ואמצעי עבודה באמצעות תכשיר חיטוי יעיל
2. המשך בחינת תכשירים ואופן יישומם לצורך חיטוי כלי עיבוד ושינוע
3. בחינת יעילות תכשירים לחיטוי קרקע בקטילת פוזריום בקרקע – במערכות מבוקרות
4. בחינת שילוב אמצעים לקטילת פוזריום בקרקע – במערכות מבוקרות
5. בחינת תוספים אורגנים בקטילת פוזריום במערכות מבוקרות
6. בחינת דיכוי התבססות מחולל המחלה בעקבות טיפולי קרקע – ניסויי עציצים
7. בחינת יעילות אמצעים משולבים לחיטוי קרקע בקטילת הפטריה בקרקע – במערכות מבוקרות

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

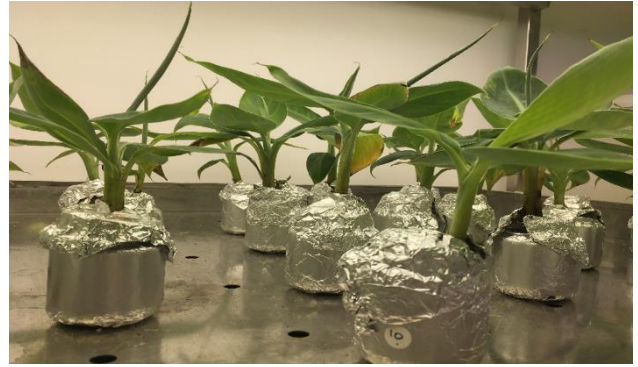
צוות המחקר: פרופ' אסף אהרוני (מכון וייצמן למדע, אנליזה מטבולית של הפרשת קרקע), ד"ר סטנלי פרימן (מנהל המחקר החקלאי, הדבקות והנבטה, של גורם המחלה), ד"ר נבות גלפז (מו"פ צפון, זני בננה רגישים ועמידים לגורם המחלה).

מטרות המחקר הספציפיות (שנה ראשונה):

1. פיתוח שיטה לאיסוף תפליטים מצמחי בננה במצע נוזלי.
2. זיהוי כמות מקסימלית של חומרים/מטבוליטים משניים המצויים בתפליטי שורש צמח הבננה הגדל במצע נוזלי.
3. זיהוי חומרים משניים בצמחים, בפרט בבננה, דורש שילוב של עבודה אנליטית וחישובית עם תוצאות ניסויים
4. אנליזה מטבולית של תפליטים משורשים של צמחי בננה עמידים לעומת תפליטים מצמחים רגישים הגדלים במצע נוזלי.
5. חשיפת נבגים ונבגים נובטים של הפטרייה לתפליטי שורשים של זנים עמידים ורגישים ל-TR4 בצלחות פטרי .

תוצאות וממצאים:

א. הקמת מערכת הידרופונית לגידול הבננות ואיסוף האקסודטים: שתילי בננה גודלו במשך 20 יום במיכל זכוכית בנפח 80ml עם מצע Hoagland 0.5X (תמונה מס' 1). לאחר 20 יום מצע הגידול הוחלף למים מזוקקים פעמיים, פעמיים במשך 10 ימים. לאחר 30 יום, המים שבצנצנות נאספו לשם בחינת הרכב האקסודטים בעזרת Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). 50ml מתוך מצע המים, של כל אחד משתילי הבננה, עבר סינון והקפאה בחנקן נוזלי. הדוגמאות עברו ייבוש בהקפאה (Lyophilization), שבסיומה הורחפו ב-1.8ml מים מזוקקים פעמיים והוקפאו בשנית בחנקן נוזלי. הדוגמאות עברו תהליך חוזר של ייבוש והקפאה והורחפו ב-150µl ממס המורכב מ-80% מתנול ו-0.1% חומצה פורמית במים לפני שעברו תהליך סינון שני בפילטר של 22µm של מסנן מסוג PVDF. דוגמאות האקסודטים הורצו במערכת ה-LC-MS עם יכולת זיהוי רזולוציה גבוהה, UPLC-qTOF, בשני מצבי יינון. בימים אלו אנו מנתחים את הנתונים שהתקבלו מן ההרצה. בניתוח מקדים של הנתונים, ניתן היה להבחין במספר גדול של מטבוליטים שהתרכזו לקראת סיום ההרצה בכרומטוגרמה, מה שמעיד על טבעם הליפופילי. לפיכך, הכמות הנמוכה יחסית של המטבוליטים השניוניים, עם התכונות הסמיפלוריות יכלו להיבחן באקסודטים שנאספו צורך ניסוי זה. ואילו, כדי לבחון את המטבוליטים בעלי התכונות הליפופיליות, הדוגמאות הורצו פעם נוספת, תחת שיטת בדיקה אחרת, המאפשרת בחינה של מגוון סוגי ליפידים, (דהיינו, Lipidomics). אנו חוקרים כעת את התוצאות שהתקבלו מניסוי זה.



תמונה 1. הקמת מערך ניסוי של איסוף אקסודטים משתילי בננה הגדלים במערכת הידרופונית.

ב. הקמת מערך ניסוי לאיסוף אקסודטים משתילי בננה הגדלים באדמה בהשוואה לאיסוף ממערכת הידרופונית: מחצית מ-60 שתילי הבננה הועברו למצע אדמה (אדמה סופקה על ידי נבות גלפז) והחצי השני נשמר במיכלי הזכוכית לגידול הידרופוני (תמונה מס' 2). איסוף אקסודטים מאדמה דורש זמן ולכן חילקנו את מערך הניסוי לאיסוף מ-5 צמחים מכל מערכת גידול (אדמה כנגד הידרפוניה) כל 3 ימים, 6 נקודות זמן סה"כ. הצמחים שבמערכת ההידרופונית גודלו תחילה במצע Hoagland 0.5X ו-7 ימים קודם לאיסוף, המצע הוחלף למים מזוקקים פעמיים, פעמיים, כל 3 ימים. מצע הגידול סונן, הוקפא והוכן לקראת אנליזה להרכב מטבוליטים כפי שהוסבר לעיל.

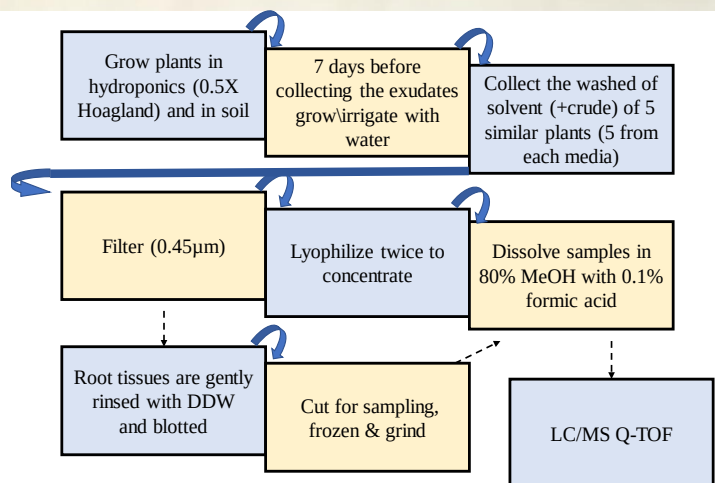
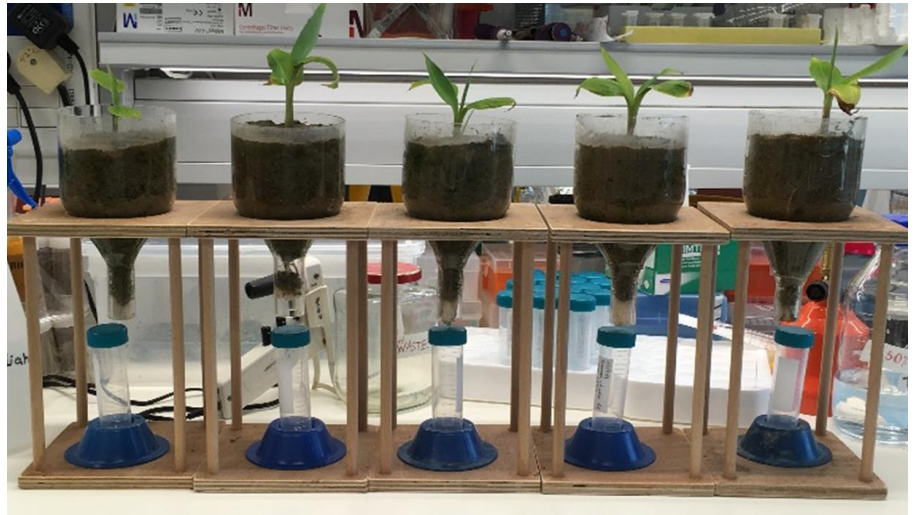
הצמחים אשר גודלו באדמה, הושקו תחילה עם מים ודשן מסוג NPK על ידי מערכת השקיה בטפטפות ו-7 ימים קודם לאיסוף, נותקו והושקו במי ברז כל 3 ימים. בכדי לאסוף את האקסודטים של השורשים, השקנו את הצמח בממס של 50% מתנול במים ואספנו את כלל הנוזל שעבר דרך כלי הגידול, סה"כ 20-25ml לשתיל בננה (תמונה מס' 3). הנוזל שנאסף עבר סינון ועורבב עם מים מזוקקים פעמיים (לקבלת נפח כפול של דוגמא בעת הייבוש בהקפאה), הוקפא בחנקן נוזלי, יובש תחת הקפאה והוכן לקראת בחינה אנליטית.

הנתונים נבדקו במכשיר UPLC-qTOF לבחינה מיוחדת של אקסודטים הנאספים הן ממערכת גידול באדמה והן בהידרופוניה ונמצאים תחת ניתוח למטבוליטים המצויים בדוגמאות. תמונה מס' 4 מספקת מבט על שטף העבודה וההכנות הנדרשת לאיסוף האקסודטים משתי מערכות גידול הצמחים, אדמה והידרופוניה.



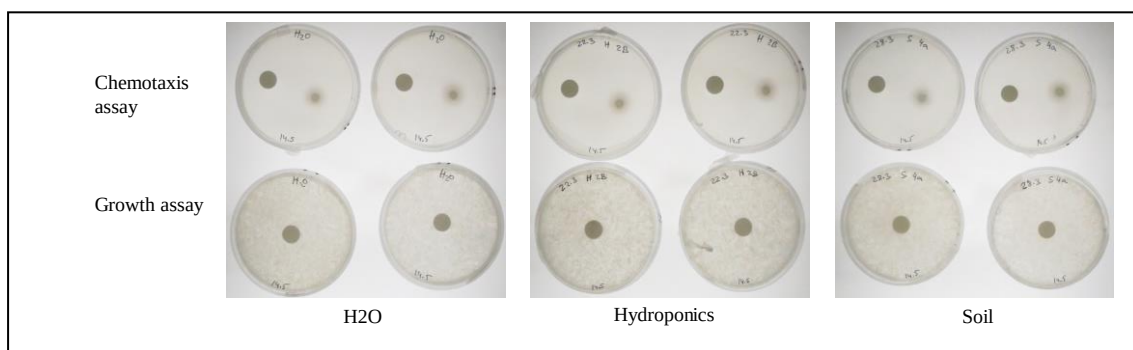
תמונה 2. גידול שתילי בננה באדמה (שמאל) והידרופוניה (ימין) לשם איסוף אקסודטים.

תמונה 3. מערך הניסוי אשר פותח לשם איסוף אקסודטים של שורשי שתילי בננה הגדלים בקרקע. האקסודטים נאספים בבקבוקונים, המתמלאים בממס אורגני שעובר באדמה שבעציץ הזכוכית. בניסוי זה, מים ומתנול (1:1) שימשו לשטיפת האקסודטים מתוך האדמה.



תמונה 4. מבט על שטף העבודה הנדרש לאיסוף אקסודטים בצמחי בננה הגדלים במצע אדמה והידרופוניקה.

א. בחינת השפעה של אקסודטים מהשורשים על הפטרייה *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*: מספר דוגמאות שנבחרו בצורה אקראית ממערכי הניסוי לאיסוף מאדמה ומהידרופוניקה, הורחפו מחדש במים מזוקקים פעמיים שעוקרו, והוקפאו והועברו למעבדה של סטנלי פרימן כדי לבחון את צורת הגדילה של הפטרייה בנוכחות האקסודטים. לצורך הבדיקה, דיסקית נייר הוטבלה בדוגמאת האקסודטים של השורשים והונחה בצלחת פטרי עם אגר. בדקנו את גדילת כורי הפטריה אל עבר דיסקית הנייר שמוקמה באזור אחר בצלחת (מבחן 'chemotaxis') ועל גבי דיסקית הנייר שמוקמה במרכז הצלחת, מבחן גדילה (תמונה מס' 5). בשני המבחנים שנערכו, גדילה ומשיכה לא יכולנו להבחין בכל התנהגות מיוחדת או שונה של הפטרייה. כפי שאיננו יודעים את תכולת האקסודטים, קשה לקבוע בברור את הסיבה לחוסר השפעה על גדילת הפטרייה.



תמונה 5. בחינת השפעה של אקסודטים משורשי בננה על גדילה ומשיכה של פטריית *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*

מסקנות ולקחים:

1. המערכת ההידרופונית שפותחה הינה מתאימה לגידול שתילי בננה
2. בשלב זה איננו יודעים מדוע לא התקבלו חומרים משניים כגון פלבנואידים בתפליט: דבר זה נתון לשיפור ובדיקות נוספות.
3. בתהליך שהתבצע בהידרופוניקה נמצאו מספר רב של חומרים שומניים.
4. המערכת הגידול באדמה שפותחה הינה מתאימה לגידול שתילי בננה.
5. בשלב זה איננו יודעים אם השיטה שהקמנו לאיסוף תפליטים מצמחים שגדלו באדמה מתאימה. צריכים ניסויים נוספים לקבוע את יעילות השיטה ולשפרה.
6. לא נמצאה השפעה של התפליט על הפטרייה בגדילה ובמשיכה ככל הנראה בשל אבוד החומרים המשניים במהלך איסוף התפליט.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

1. העבודה בשנה זו נעשתה ללא תקציב ובשל כך ההתקדמות הייתה איטית מהצפוי.
2. התחלנו בהקמת השיטה להפקת תפליטים משורשי בננה באדמה: דבר זה הוסף לעבודה בשל החשיבות לשמור על עבודה בסביבה הטבעית ביותר האפשרית (בהשוואה לאיסוף תפליטים במערכת הידרופונית).

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

1. המשך הקמת השיטות לאיסוף מטבוליטים הו בהידרופוניקה והן מצחים הגדלים באדמה.
 2. זיהוי חומרים בתפליטים ושורשי בננה.
 3. זיהוי החומר המעורב במשיכת הפטרייה לשורש הבננה.
-

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:

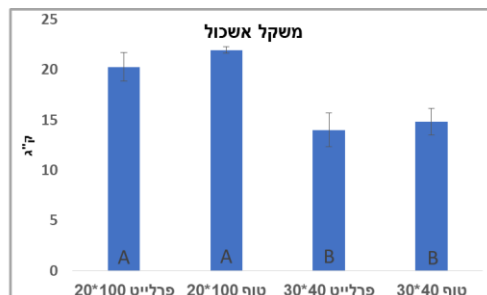
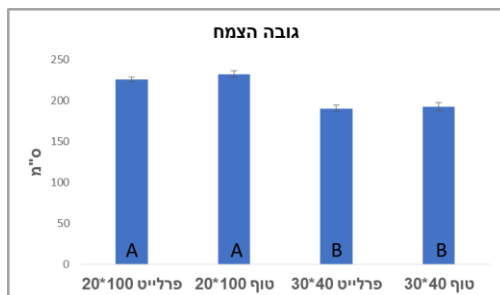
8.1. שתילת תצפית ראשונית: מצעי גידול ורוחב ערוגה שונים.

8.2. איסוף נתונים צמחיים-תצפית ראשונית.

תוצאות וממצאים:

הניסוי נשתל ב-5.5.2017, בחוות צמח. נבחנו שני סוגי ערוגות, בממדים הבאים: 1) 30 ס"מ עומק * 40 ס"מ רוחב, 2) 20 ס"מ עומק X 100 ס"מ רוחב. אורך שני סוגי הערוגות זהה, 12 מטר. בכל סוג ערוגה נבחנו 2 סוגי מצעים: 1) טוף 0-8, 2) פרלייט 212, שניהם תוצרת "טוף מרום גולן". המרווח בין השתילים: 1 מטר. 10 שתילים לטיפול. 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 ppm חנקן.

בשני סוגי המצעים, הצמחים שגדלו בערוגות ה-20*100 התפתחו טוב יותר מהצמחים בערוגות ה-30*40: היקף הגזעול היה גדול יותר, וגובה הצמח גבוה יותר (איור 1). הגידול המשופר התבטא במשקל אשכול גבוה יותר (איור 1). בהשוואת שני סוגי המצע נמצאה מגמה לא מובהקת סטטיסטית, למשקל אשכול גבוה יותר במצע הטוף ביחס למצע הפרלייט.



איור 1: משקל אשכול וגובה הצמח במצעים וסוגי הערוגות השונים. הנתונים המוצגים: ממוצע $\pm$ שגיאת תקן. עשרה שתילים בכל סוג טיפול.

מסקנות ולקחים:

נמצאה נחיתות בממדים השונים לגידול בערוגה הצרה והעמוקה (30*40) ביחס לערוגה הרחבה והרדודה (20*100). נראה שהדבר נובע מאופי פריסת השורשים וממדי העיקר (פקעת הבננה). מערכת השורשים בבננה הינה שטחית, ומתפרסת לרדיוס ניכר, והעיקר הינו בעל קוטר רב. נראה שרוחב ערוגה של 40 ס"מ פגע בהתפתחות מערכת השורשים, שהביאה לביצועים נחותים של הצמח ביחס לערוגה ברוחב 100 ס"מ. בין סוגי המצע, בערוגות ה-20*100, נמצא שמשקל האשכול במצע הטוף גבוה יותר ביחס למצע הפרלייט (22 ק"ג לעומת 20.2 ק"ג, בהתאמה). הדבר יכול לנבוע מקיבול מים ודשן טוב יותר במצע הטוף. כך שבהמשך התכנית נתמקד בגידול בערוגות ה-20*100 ממולאת במצע הטוף.

ככלל, האשכולות בטיפול ערוגות ה-20*100 במצע הטוף, היו במשקל סביר לשתילת אביב בעמק הירדן, ביחס לאשכולות חלקות מטע מסחריות, שמגיעים בממוצע ל-25 ק"ג, כך שכ"יריית פתיחה" התוצאה בטיפול זה מניחה את הדעת. סיבה אפשרית לנחיתות הקלה שנמצאה במצע המנותק לעומת המטע, היא מועד השתילה הלא שגרתי (שתילות אביב

מתקיימות בחצי הראשון של אפריל, בעוד שאנחנו ביצענו את השתילה באמצע מאי), וכמובן הצורך לשפר את פרוטוקול הגידול במצע מנותק.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

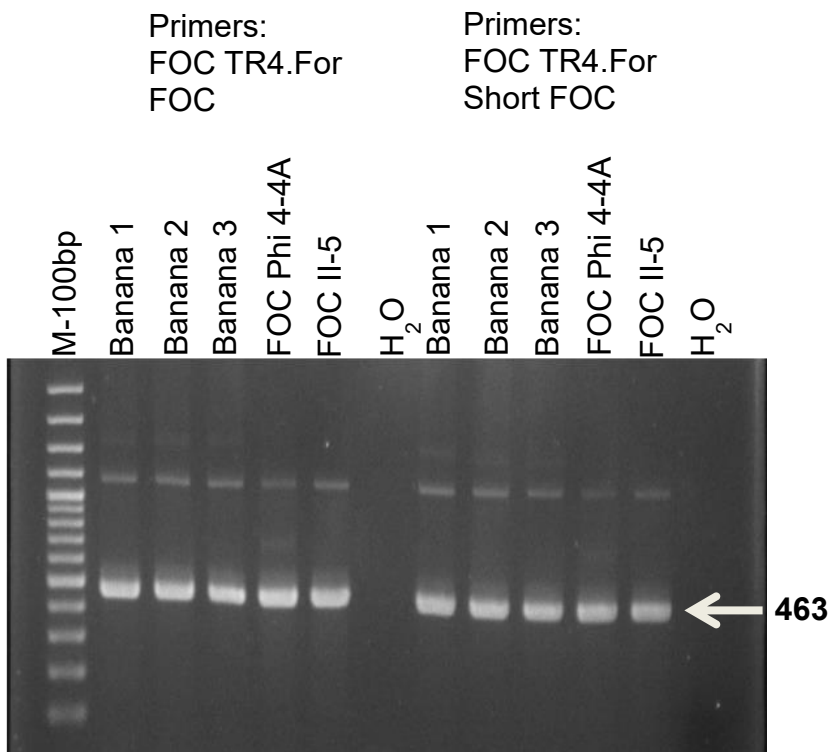
התכנית התבצעה ע"פ המתוכנן, מלבד הקדמת השתילה, שהתבצעה במאי 2017, חצי שנה לפני המועד הרשמי של התחלת התכנית, ומאפשרת לנו להאיץ את התקדמות התכנית.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

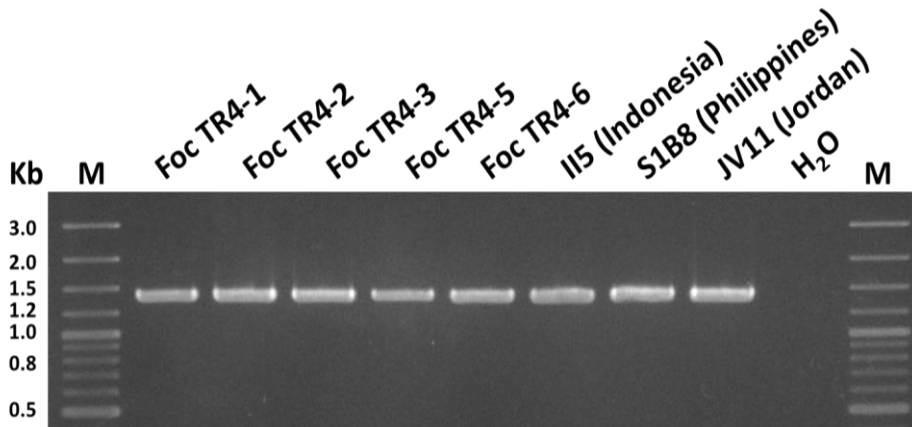
מטרת שנה ב' היא בחינת מרווחי ומועדי שתילה שונים.

נבחנו שישה טיפולים שונים: שלושה מועדי שתילה: אפריל, יוני, ואוגוסט. בכל מועד שתילה נבחנו שני מרווחי שתילה: 1 מטר, ו-0.8 מטר.

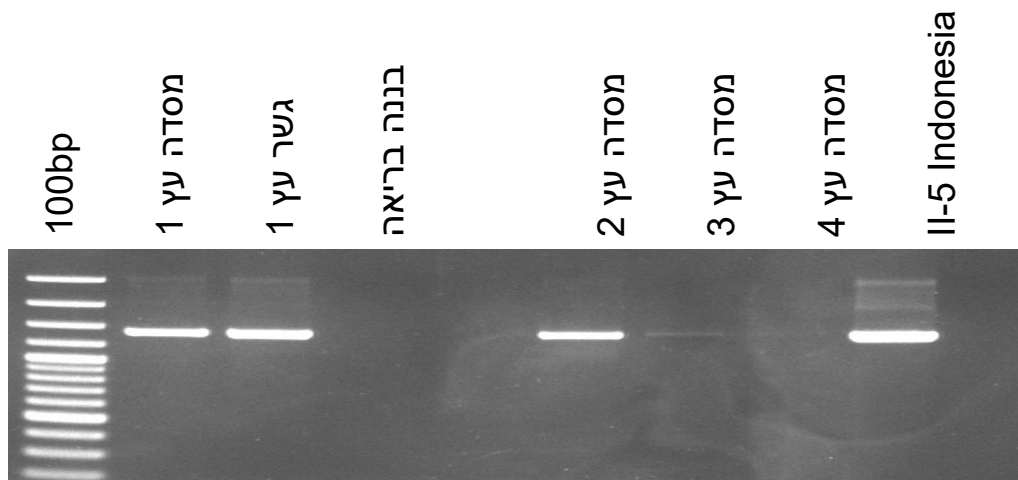
ייעשה שימוש בערוגת ה-20*100 ממולאת במצע הטוף, שנמצאה כמתאימה ביותר לגידול הבננה במצע מנותק בשנה א'. איסוף נתוני צימוח, פריחה ויבול, יתקיים במהלך השנה.



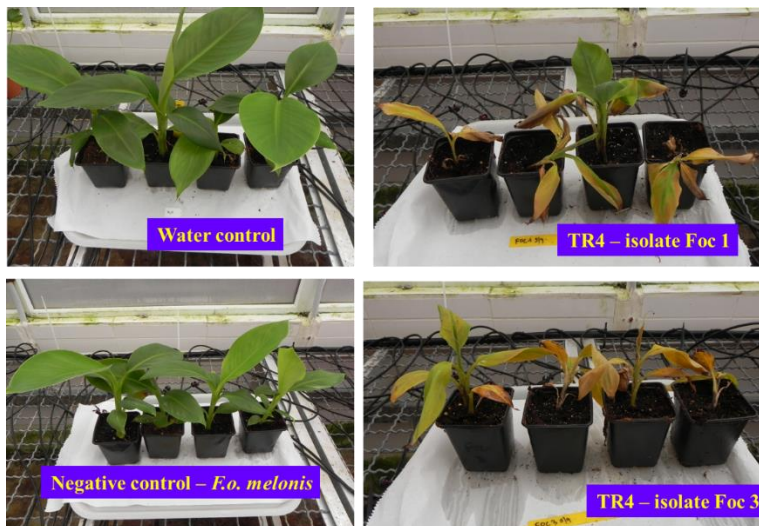
איור 1א'. זיהוי של הגברת DNA מתבדילי *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (גזע TR4) משפיה ישראל (Banana 1 ו-Banana 2; Banana 3); בהשוואה לביקורת DNA מתבדילים מאינדונזיה (FOC II-5) ו-FOC Phi 4-4A (מהפיליפינים) ע"פ Dita et al. 2010.



איור 1ב'. Molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. s.p. *cubense* tropical race 4 (TR4), according to O'Neill et al. 2016. A specific DNA band of 1.4 Kb was amplified for TR4 isolates from Israel (Foc TR4-1, Foc TR4-2 and Foc TR4-3 from Shfeya; Foc TR4-5 and Foc TR4-6 from Ein Gev), representative TR4 isolates (II5 from Indonesia; S1B8 from the Philippines and JV11 from Jordan) and negative water control.

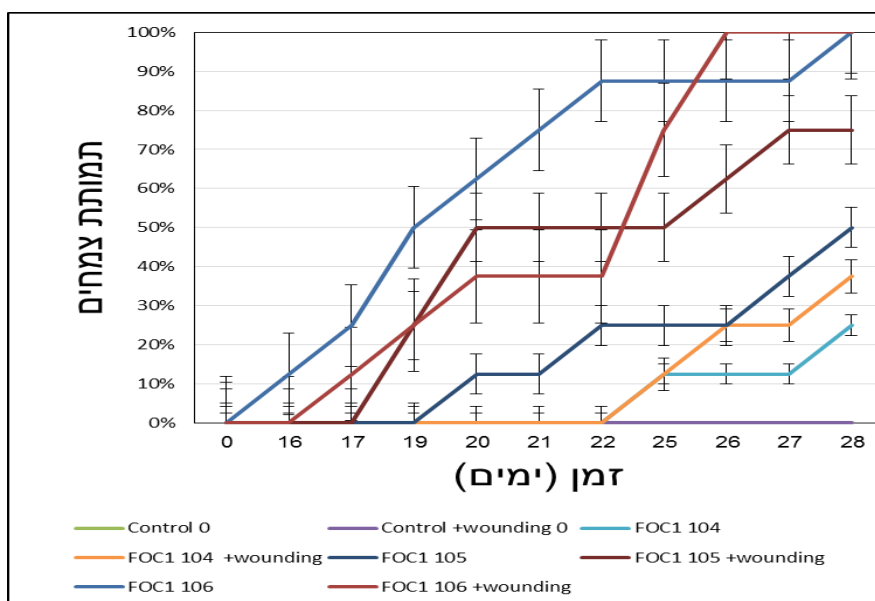


איור 1ג. זיהוי הפטרייה של *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (race TR4) ישירות בצמח לאחר הפעלת פריימרים ספציפיים של O'Neill et al. (2016). רקמת עץ נגוע ממסדה (1-4), עץ נגוע מגשר, ביקורת DNA מאינדונזיה, ביקורת מים ועץ בריא.

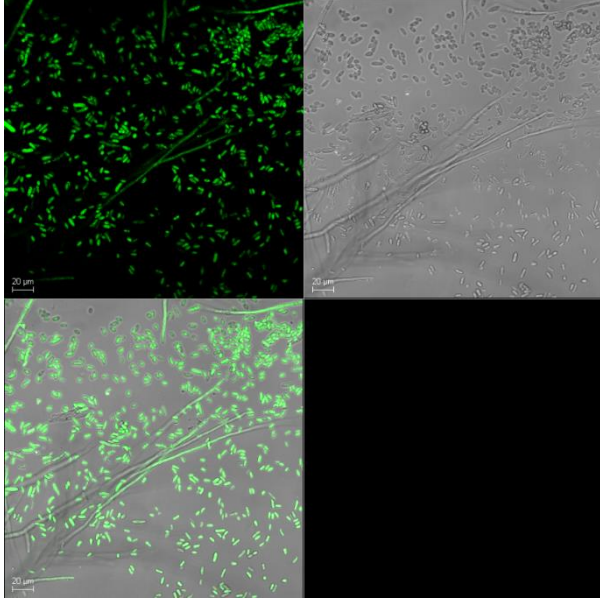


איור 2. מבחן קור עם תבדידי הפטרייה *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race TR4 משפיה בארץ.

Pathogenicity confirmation assays of *Fusarium oxysporum* f. s.p. *cubense* tropical race 4 (TR4), 4 weeks after inoculation of Cavendish plants (c.v. Grand Naine) in Israel. **A**, water inoculated negative control; **B**, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* inoculated negative control; **C** and **D**, Foc TR4-2 (Shfeya cultivation plot, Carmel coastal plain) and Foc TR4-5 (Ein Gev cultivation plot, eastern shore of lake Galilee) inoculated wilted plants, respectively.



איור 3. כיוול תמותת שתילי בננה בריכוזים של נבגי TR4, תבדיד FOC1 עם ובלי פציעה, חודש לאחר האילוח. ריכוזי נבגי TR4/מ"ל (10^4) עד 10^6 בלי או עם פציעה ע"י קיטום שורשים) וטבילת שורשי נבטי בננה בסוספנסיה של הנבגים.



איור 4. תבדיד *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (race TR4) משפיע מסומן בגן מדווח GFP.

בִּיקוּר



FOC 1
pCPXHY1 eGFP
6



FOC 1 pCT74
GFP
6

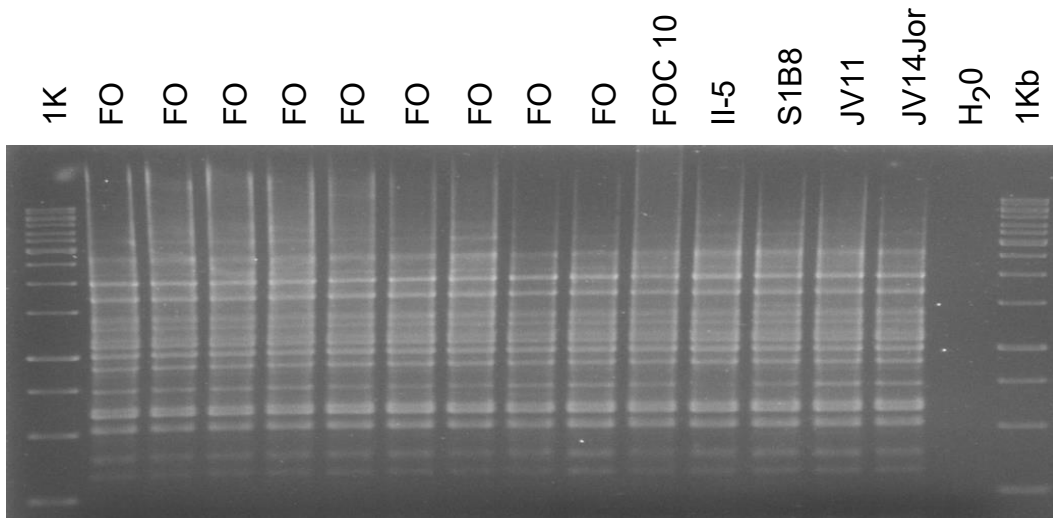


ללא
פציעה



פציעה

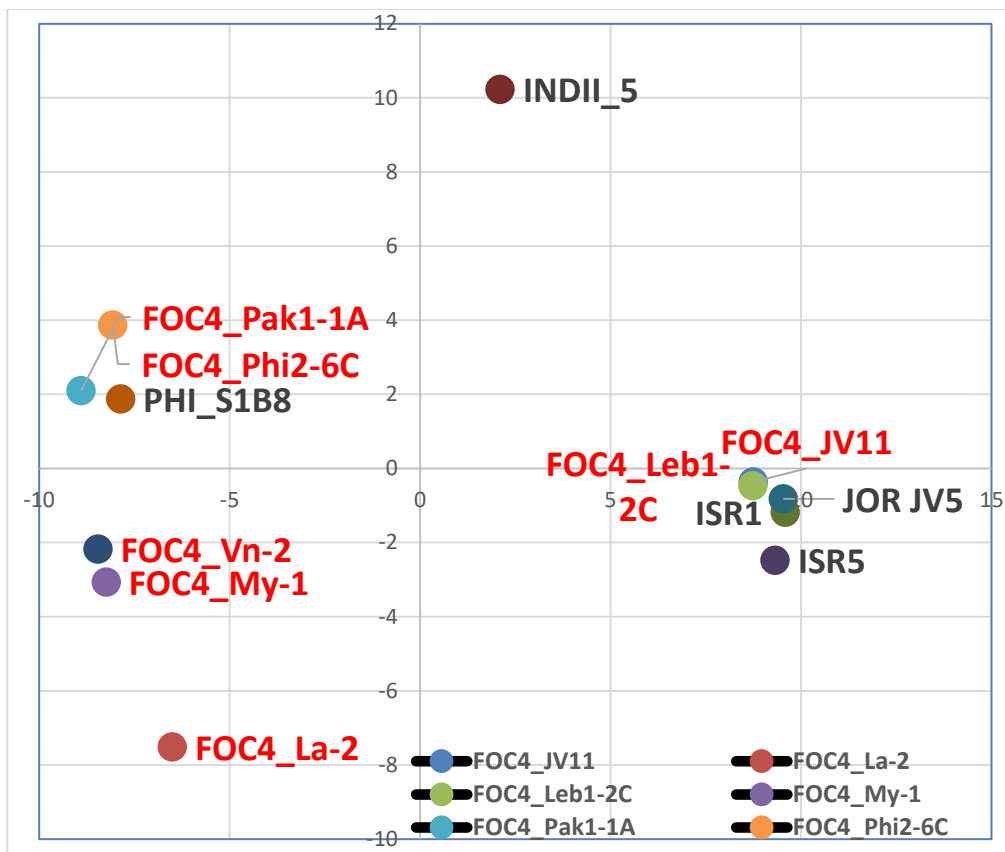
איור 5. אילוח צמחים עם תבדידי TR4 מסומנים ב-GFP. תבדידי ה-GFP פתוגנים ויציבים להמשך העבודה.



איור 6. שונות גנטית לפי aq -PCR עם פריימר $(GACA)_4$ של תבדידי *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (race TR4) מהארץ (FOC 1-10) ונציגים מאינדונזיה, פיליפינים וירדן.



איור 7. מבחן התאם ווגטיבי של תבדידי *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (race TR4 and race 1) מהארץ וממקומות שונים בעולם.



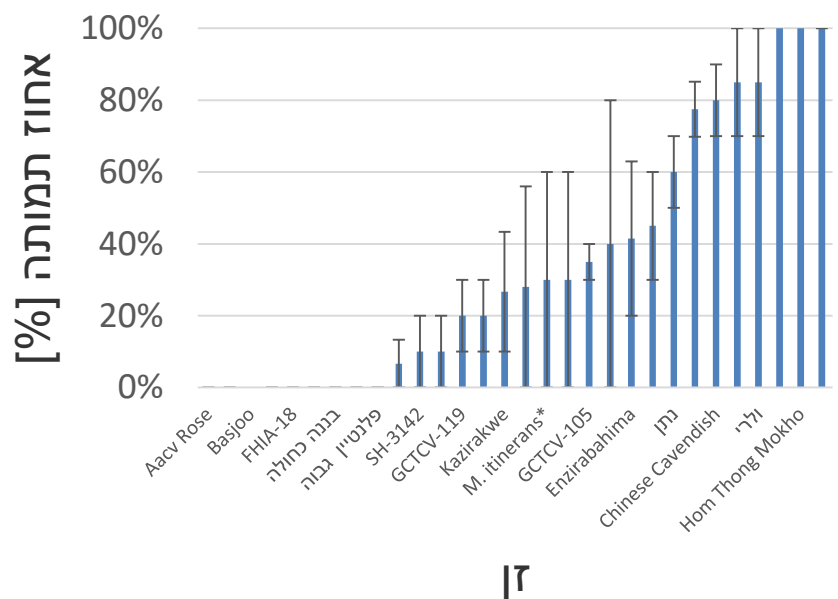
איור 8. – PCA
Principal component analyses plot based on high quality SNPs from 12 isolates of TR4 worldwide after full genome analysis.

Kema Sequence data

FOC4_JV11 – Jordan
FOC4_Leb1-2C – Lebanon
FOC4_La-2 – Laos
FOC4_My-1 – Myanmar
FOC4_Vn-2 – Vietnam
FOC4_Pak1-1A – Pakistan
FOC4_Phi2-6C –

Israeli Sequence data

ISR1 – Shfeya
ISR5 – Ein Gev
Jor_JV5 – Jordan
PHI_S1B8 – Philippines
INDII_5 – Indonesia



איור 9.

תמותת זני בנגה לאחר אילוח כפי שכולל בסעיף 4.2