השפעת שינויי מיקרואקלים על יחסי צמח-פתוגן-מדביר ביולוגי במערכת קימחון העגבנייה

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע״ש רוברט ה׳ סמית

האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר ״מוסמך״ במדעי החקלאות

מאת אוהד אגרא

שבט תשע״א רחובות פברואר 2011

עבודה זו נערכה בהדרכתו של
פרופ׳ יגאל אלעד, המחלקה
לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים
מִנהל המחקר החקלאי, בית דגן

עבודה זו מוקדשת באהבה

להורי היקרים- ישראל ואפרת אגרא

ולאשתי נטלי

תודות

ברצוני להודות לאנשים שעזרו, תמכו ועודדו אותי לאורך כל הדרך.

ליגאל אלעד, תודה על האפשרות והזכות להיות תלמידך במחקר זה. בזכותך נפתח בפני הצוהר לחקר מחלות צמחים, תחום שהוא ללא ספק המרתק, המעניין והמאתגר שעסקתי בו עד כה. תודה על העצות החכמות, ההכוונה הרבה והנכונות לעזור, בכל עת, תמיד עם חיוך.

לדני שטיינברג, הדלת שתמיד פתוחה אינה קלישאה במקרה זה. תמיד היית שם בשביל לתת עצות ולתרום מן הידע והניסיון הרב שלך.

לדליה רב דויד, האימא השנייה שלי בשנתיים האחרונות. לא הייתי מצליח לבצע את המחקר ללא עזרתך הרבה. היית לי אוזן קשבת ויד נוספת למשך כל הדרך. לא אשכח לעולם את הדאגה והאכפתיות לכל צרכיי במשך המחקר וגם בשעות שמעבר.

למנחם בורנשטיין ורן שולחני, הצוות הטכני המנצח. גרמתם לניסויים להראות כמו שצריך להיות. מעטים יוכלו להבין את ההשקעה והמסירות הנדרשים לכך, ועל כך אני מודה לכם מקרב לב.

לצוות המעבדה: ברק וחנן שותפי ללימודים ולמעבדה, מעיין, ליאור, משה, לימור וחיים על הנכונות לסייע בכל עת.

תודה מיוחדת למשפחתי היקרה ולאשתי האהובה על הסובלנות והתמיכה, לא הייתי מצליח בלעדיכם.

המחקר מומן על ידי הפרובינציה האוטונומית של טרנטו, קול קורא, 2006 פרויקט Envirochange.

מחבר עבודה זו זכה במלגה מטעם העמותה הישראלית למחלות צמחים

תוכן העניינים

עמוד

תקציר 11

מבוא 13

סקירת ספרות 15

חומרים ושיטות 31

1. שיטות עבודה כלליות 31
2. אפיון יחסי הגומלין בין הצמח הפונדקאי- הפתוגן- והמדביר הביולוגי 33
3. השפעת גורמי מיקרואקלים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים 35
4. השפעת גורמי אקלים ויישום מדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה 37
5. ניתוחים סטטיסטים 37

תוצאות 39

1. אפיון יחסי הגומלין בין הצמח הפונדקאי- הפתוגן- והמדביר הביולוגי 39
2. השפעת גורמי מיקרואקלים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים 45
3. השפעת גורמי אקלים ויישום מדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה 57

דיון ומסקנות 61

1. אפיון יחסי הגומלין בין הצמח הפונדקאי- הפתוגן- והמדביר הביולוגי 61
2. השפעת גורמי מיקרואקלים ונוכחות מחלה על הישרדות המדבירים הביולוגים 64
3. השפעת גורמי אקלים ויישום מדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה 66
4. סיכום 67

רשימת ספרות 69

Abstract 81

תקציר

קימחון העגבנייה נגרם ע״י הפטרייה *Oidium neolycopersici*. פטרייה זו, כרוב גורמי מחלות הקימחון, הינה אקסופרזיטית, אינה חודרת עמוק לרקמת הצמח וניזונה בעיקר על השכבה החיצונית של התאים. הנזק הנגרם ע״י קימחון העגבנייה מתבטא בכיסוי תפטיר לבן סבוך בעל נבגים רבים המצוי על גבי העלים, ציר העלה, הפטוטרת, הגבעול ועלי הגביע. כתוצאה מכך נגרמת ירידה ביכולת ההטמעה של הצמח ולעיתים ישנה ירידה באיכות הפרי ותמותת הצמח בנגיעות גבוהה. שלבים רבים במופעי הפתוגן רגישים לגורמי מיקרואקלים שונים. התפתחות המחלה מיטבית בטמפרטורת מתונות (22-25 מ״צ) ולחות יחסית בינונית (70-85%).

בשנים האחרונות גבר העניין בהדברת קימחונות באמצעות מיקרואורגניזמים אנטגוניסטים כגון פטריות, חיידקים, ושמרים המשמשים כמדבירים ביולוגים, כחלק מהנטייה העולמית להפחתת השימוש בחמרי הדברה כימיים בחקלאות. עד כה נמצא כי יעילות התכשירים הביולוגיים נמוכה מזו של התכשירים הכימיים ואין ההדברה עקבית במשך תקופת הגידול או בעונות שונות, בין היתר בגלל רגישות המקרואורגניזמים לתנאי מיקרואקלים. נדרשת הבנה מעמיקה יותר של האנטראקציה בין הצמח, הפתוגן והמקרואורגניזמים המועילים והשפעת גורמי מיקרואקלים על מערכת זו. עבודה זו מתרכזת בהשפעת תנאי המיקרואקלים על התפתחות והישרדות המיקרואורגניזמים וזאת במסגרת פרויקט השפעת שינוי אקלים על החקלאות.

שני מיקרואורגניזמים (חיידק - .*Pseudomonas* sp ושמר - .*Rodoturula* sp) הדבירו את קימחון העגבנייה כשיושמו בנפרד או בשילוב (60% או 78% יעילות הדברה בהתאמה). שילוב המדבירים בתרחיף הריסוס לא השפיע על הישרדות כל אחד מן המדבירים על פני העלה. בתצפיות מיקרוסקופ אלקטרונים סורק נמצא שבעלים ללא קימחון מתרכזים תאי החיידק באזורי החיבור בין תאים. בעלים עם תפטיר הקימחון החיידק מתרכז בנישות הנוצרות על פני העלה על ידי התפטיר. לעומת זאת לנוכחות תפטיר הפטרייה על פני העלה לא הייתה השפעה על פיזורו המרחבי של השמר על גבי העלים והוא מתרכז בנקודות החיבור בין תאים.

לגורמי מיקרואקלים השפעה מובהקת על הישרדות החיידק *Pseudomonas* sp. B52. בתנאים מבוקרים (אנקובטורים) נבדקה השפעת הטמפרטורה (10, 15, 20, 25, 30, 35 מ״צ) והלחות היחסית (60-70% או 85-90%) על רמת אוכלוסיית החיידק. נמצא כי הישרדות מיטבית הייתה בטמפרטורות נמוכות (10, 15 מ״צ) ולחות יחסית נמוכה. בחדרי גידול הישרדות החיידק הייתה מיטבית גם כן בטמפרטורות נמוכות (15 מ״צ) ועל עלים עם קימחון. במרבית הניסויים בתנאים מבוקרים חלה ירידה משמעותית באוכלוסיית החיידק ב- 24 השעות הראשונות לאחר היישום (לכדי 50% מהכמות ההתחלתית), כנראה עקב רגישות רבה לגורמי מיקרואקלים שונים שנבחנו. בתנאי שדה נבחנה השפעת הלחות היחסית ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית החיידק. נמצא כי הישרדות מיטבית התרחשה בתנאי לחות יחסית גבוהה ובנוכחות מחלה. גורמי מיקרואקלים השפיעו על הישרדות החיידק גם באופן עקיף. בצמחיי עגבנייה שהיו בעקת חום הישרדות החיידק הייתה נמוכה מזו על צמחים שלא הראו סימני עקה.

בניגוד לחיידק, אוכלוסיית המדביר הביולוגי, שמר *Rodoturula* sp. מסוג Y13 הייתה יציבה במידה רבה בתנאי מיקרואקלים שונים (הנזכרים לעיל) בניסויים רבים שנערכו במחקר הנוכחי בתנאים מבוקרים ובתנאי שדה. אוכלוסיית השמר נשארה יציבה וגבוהה (מעל ל-80% מהכמות ההתחלתית)

בתנאים מבוקרים בטווח הטמפרטורות 10-35 מ״צ וברמות לחות יחסית שנבדקו. בתנאי שדה אוכלוסיית השמר נשארה יציבה ולא הושפעה מתנאי לחות יחסית ונוכחות מחלה, גם לאחר 16 יום. אוכלוסיית השמר לא הושפעה באופן עקיף מעקת חום על צמחי עגבנייה בוגרים.

לסיכום, בעבודה זו אופיינו יחסי הגומלין בין הצמח הפונדקאי (עגבנייה), הפתוגן (קימחון העגבנייה) ומדביריו הביולוגים (שמר וחיידק). נבדקה השפעת גורמי מקרואקלים על מערכת יחסי גומלין זו. החיידק B52 נמצא כרגיש לתנאי מקרואקלים שונים בעוד השמר Y13 הראה רגישות מועטת לתנאי מיקרואקלים, והוא בעל יכולת הישרדות טובה בתנאים שונים. ניתן לנצל תופעה זו על מנת להגביר את היעילות של הדברה ביולוגית על ידי שימוש במדבירים ביולוגים אשר רגישים במידה מועטה לגורמי אקלים שונים. ככלל, נראה ששינוי אקלים גלובלי עשוי להשפיע על חלק מהאנטראקציות בין גורמי מחלה ומדבירים ביולוגים.

מבוא

קימחון העגבנייה נגרם ע"י הפטרייה *Oidium neolycopersici*. פטרייה זו, כרוב גורמי מחלות הקימחון, הינה אקסופרזיטית, אינה חודרת עמוק לרקמת הצמח וניזונה בעיקר על השכבה החיצונית של התאים. הנזק הנגרם ע"י קימחון העגבנייה מתבטא בכיסוי תפטיר לבן סבוך בעל נבגים רבים המצוי על גבי העלים, ציר העלה, הפטוטרת, הגבעול ועלי הגביע. כתוצאה מכך נגרמת ירידה ביכולת ההטמעה של הצמח ולעיתים ישנה ירידה באיכות הפרי ותמותת הצמח בנגיעות גבוהה (Jarvis *et al.*, 2002). שלבים רבים במופעי הפתוגן רגישים לגורמי מיקרואקלים שונים. התפתחות המחלה מיטבית בטמפרטורת מתונות (22-25 מ"צ) ולחות יחסית בינונית (70-85%) (Jacob *et al.*, 2008). בשנים האחרונות גבר העניין בהדברת קימחונות באמצעות מיקרואורגניזמים אנטגוניסטים כגון פטריות, חיידקים, ושמרים המשמשים כמדבירים ביולוגים, כחלק מהנטייה העולמית להפחתת השימוש בחמרי הדברה כימיים בחקלאות. עד כה נמצא כי יעילות התכשירים הביולוגיים נמוכה מזו של הכימיים ואין ההדברה עקבית במשך תקופת הגידול. הסיבה לכך היא שתכשירים אלו מבוססים על אורגניזמים חיים, הדורשים תנאים ספציפיים לצורך התפתחותם ופעילותם. התנאים בבתי צמיחה (טמפרטורה, לחות יחסית גבוהה וחוסר אוורור) הינם מיטביים להתפתחות המדביר הביולוגי והפתוגן. יתכן וניתן לנסות להתגבר על בעיית יעילות תכשירי ההדברה הביולוגיים ע"י שינוי קל בתנאים (במיוחד בטמפרטורה ובלחות היחסית) באופן שיעודדו יותר את התפתחות המדביר הביולוגי על פני הפתוגן (Paulitz and Bélanger, 2001; Elad *et al.*, 1999), לשם כך דרושה הבנה מעמיקה יותר של האנטראקציה בין הצמח, הפתוגן והמדביר הביולוגי והשפעת גורמי אקלים על מערכת זו.

תצפיות מעידות כי שינויי אקלים אזוריים, בעיקר עלייה בטמפרטורה, הם בעלי פוטנציאל להשפעה ניכרת על מערכות טבעיות מקומיות (IPCC, 2007). עקב פיתוח מערכות חיזוי מדויקות יש בידנו מידע לגבי ההשלכות החזויות של שינויי אקלים על מספר מערכות ביולוגיות (Harvell *et al.*, 2002). בעוד המחקר והידע לגבי שינויי אקלים ברמה גלובלית הינו נרחב, עדיין חסר ידע לגבי השלכות שינויי אקלים על יחסי פתוגן צמח במערכות מקומיות (Coakley, 1999).

מאחר ומערכת יחסי הגומלין בין הצמח לפתוגן ולמיקרואורגניזמים על פני העלה מושפעת מתנאי מיקרואקלים, נוצר הצורך לאפיין את השפעת שינויי מיקרואקלים צפויים על מערכת זו, וזאת במסגרת חקר השפעת שינויי אקלים על מחלות צמחים. המטרה הספציפית של עבודה זו הייתה לאפיין השפעת גורמי מיקרואקלים על יחסיי הגומלין בין צמח העגבנייה, מחלת הקימחון הנגרמת ע"י הפטרייה *O. neolycopersici* ומיקרואורגניזמים מדבירים ביולוגים של המחלה.

סקירת ספרות

1. הפונדקאי- עגבנייה (*Solanum lycopersicum*)

העגבנייה (*Lycopersicum esculentum* L.) הינה צמח חד שנתי עשבוני ממשפחת הסולניים (*Solanaceae*), על משפחה זו נמנים בין השאר תפו"א, חצילים, פלפל ומינים רבים אחרים של צמחי תרבות ובר. מקור צמח העגבנייה באמריקה המרכזית והדרומית, פרו ומקסיקו (זידאן, 2001). ניתן להבדיל בין שני סוגי גידול שונים: עגבניות למאכל המגודלות בעיקר במבנים ועגבניות לתעשייה המגודלות בשטח הפתוח. לכל שיטת גידול מאפיינים משלה. בעגבניות לתעשייה משתמשים בזנים בעלי אופי צימוח מסיים ומועד הגידול הוא בהתאם לעונות השנה, בעגבניות למאכל משתמשים בזנים בעלי אופי צימוח בלתי מסיים. בישראל, בעבר נשתלו העגבניות למאכל בבתי צמיחה, בעיקר בנגב המערבי בעונת החורף. גידול זה התאפיין בתקופת ניבה מוגבלת בחודשים דצמבר-מרץ, אך בעקבות פיתוחים טכנולוגיים ושיטות גידול חדישות, התרחב הגידול לשאר אזורי הארץ, וכעת ניתן לגדל עגבניות בבתי צמיחה או בבתי רשת במשך כל השנה, באזורי גידול שונים ובמשך תקופת ניבה ממושכת (גנץ, 2008). בישראל כיום (2008) היקף הגידול הוא כ – 26,000 דונם של עגבניות למאכל, המגודלות בעיקר באזור אשכול, השפלה, רמת נגב, מרחבים ושדות נגב, ו – 24,000 דונם של עגבניות לתעשייה המגודלות בעיקר בחלקה הצפוני של המדינה. יבול העגבניות נעמד בשנת 2008 על כ – 425,000 טונות מתוכם 177,000 טון למאכל. הפדיון הכללי מעגבניות בשנת 2008 עמד על כ – 707.9 מליון ₪, מתוכם 630.4 מליון ₪ מעגבניות למאכל. בשנים האחרונות חלה עלייה בייצור לייצוא, בעונת 2006 הגיע הייצור לייצוא להיקף של 27,000 טונות, בעיקר של עגבניות צ'רי בבודדים ובאשכולות (גנץ, 2008; למ"ס, 2009).

לגורמי אקלים השפעה על גידול והנבה של צמחי העגבנייה. הטמפרטורה היא הגורם המרכזי המשפיע על מרבית שלבי התפתחות העגבנייה והיא משפיעה באופן ישיר הן על היבול והן על איכות התוצרת. הטמפרטורה המיטבית לגידול היא 22-26 מ"צ ביום ו 14-17 מ"צ בלילה. הפרעות קיצוניות בפוריות צמחי העגבנייה עלולות להתרחש בטמפרטורות גבוהות ונמוכות, במצבים אלו נעשה לעיתים שימוש בטיפולים מיוחדים כגון ריסוס בחומרי צמיחה או ניעור התפרחות, וזאת כדי לשפר את החנטה ואת התפתחות הפרי. גורם נוסף המשפיע על הצימוח הוא הלחות היחסית. לחות יחסית בתחום 60-80% מטיבה עם הגדילה וההתפתחות הצמחים, והדבר מתבטא בצמיחה ובפוריות מיטבית. בלחות גבוהה ונמוכה נגרמת ירידה באיכות היבול וכמותו. צמחי העגבנייה אינם מגיבים לאורך יום (פוטופריודה), אך מחסור קרינה בבתי הצמיחה במהלך החורף גורם להשפעה שלילית על הצמחים ועל מרכיבי היבול (Daie and Campbell, 1981).

באזורים רבים נפוצה שיטת הגידול בשני מחזורים לשנה אשר מאפשרת ייבול גבוה באיכות טובה. מועד השתילה מכוון לזמן שבו התנאים האקלימיים מתאימים לפריחה וחנטה. ברוב אזורי הגידול השתילה הסתווית מתקיימת בסוף אוגוסט ובמשך ספטמבר, כך שהקטיף מתבצע בסוף נובמבר או בתחילת דצמבר ועד חודש יולי. השתילה האביבית מתבצעת במהלך החדשים פברואר-מרץ. ניתן לשתול במשך כל חדשי השנה, אך הדבר מקצר את תקופת ניבה וכמות היבול נמוכה ביחס לזו המתקבלת מהשתילה במועד המיטבי (גנץ, 2008).

מחלות רבות תוקפות את צמח העגבנייה בתקופת גידולו הממושכת, חלקן פוגעות גם בגידולים סולניים אחרים כתפוחי אדמה. בהן מחלות נגיפיות כגון צהבון האמיר (TYLCV), מוזאיקת העגבניות

(TMV), המועברות בחלקן על ידי כנימות; מחלות חיידקיות כגון כיב חיידקי (*Clavibacter michiganense*, גרב (*Xanthomonas vesicatoria*); ומחלות פטרייתיות ככימשון (*Phtophtora infestans*), עובש אפור (*Botrytis cinerea*) חלפת (*Alternaria solani*) קימחונית (*Leveillula taurica*), ריקבון הכתר (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) ריקבון הנבילה (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersic*) וקימחון (*Oidium neolycopersici*) (צרור וחוב׳, 1998; מסיקה, 2008). בשנים האחרונות חלו שני שינויים משמעותיים בענף העגבניות בישראל. האחד: איסור השימוש במתיל ברומיד- דבר הגורם לעלייה ניכרת במחלות ופגעי קרקע כגון דוררת, מחלת השורש המשועם (*Pyrenochaeta lycopersici*), נימיות ועלקות. השני: מעבר לגידול בבתי צמיחה – דבר שהעלה משמעותית את שעור ההתפרצויות של מחלות נוף כגון כימשון, עובש אפור ועובש עלים. ראוי לציין במיוחד את התפרצותה המחודשת של מחלת הכיב החיידקי שגרמה לנזקים רבים בשנים האחרונות. לצד העלייה בהתפרצות מחלות שונות ועם ההתקדמות מדע הביוטכנולוגיה פותחו זנים של עגבנייה עמידים למחלות שונות. כיום מיושמים באופן מסחרי זנים בעלי עמידות לנימיות, מיני פוזריום, דוררת, עובש עלים, ועוד, ובנוסף זנים עמידים למחלות נגיפיות כגון צהבון האמיר ומוזאיקת העגבנייה (מסיקה, 2008).

2. קימחונות (Erysiphaceae)

2.1 מאפיינים כללים של הקימחונות

משפחת הקימחונות (Erysiphaceae) משתייכת למחלקת פטריות השק (אסקומיציטים). משפחה זו כוללת למעלה מ-500 מינים והיא אחת מקבוצות הפתוגנים המזיקים ביותר, התוקפת למעלה מ-1,500 מיני צמחים. גידולים רבים נתקפים ע״י הקימחונות ובניהם שעורה, ירקות, פירות ופרחים ונגרמים נזקים כמותיים ואיכותיים המשמעותיים ליבול (פלטי, 1998ג; Braun *et al.*, 2002). הפטריות מחוללות הקימחון הן טפילות מוחלטות, שריבוין נעשה בעיקר ע״י נבגים אל-מיניים (conidia). לעתים נעדרת לגמרי הדרגה המינית, ולעיתים היא מופיעה על הפונדקאי בשלב גידול מאוחר. שני הצורות האל-מיניות העיקריות בארץ הם קימחון (*Oidium*) הכולל חמישה סוגים וקימחונית (*Oidiopsis*). הסימן הבולט של הקימחון הוא הכסוי הלבן או אפרפר על פני עלי הצמח הנגוע, שמופיע לעתים גם על פני החלק התחתון של העלה. באופן כללי הנזק הנגרם לפונדקאים מקימחונות הוא איטי ומתמשך והצמחים הנגועים עשויים להתקיים זמן רב לאחר ההדבקה הראשונה וליצור מספר רב של אירועי הדבקה נוספים. מניחים שהפגיעה האיטית נובעת הן בשל העובדה שהקימחון אינו חודר לרקמת הצמח והוא מוגבל ע״פ רוב לתאי האפידרמיס, כך שכמות המזון הנצרכת ע״י הפטרייה אינה גבוהה, והן בשל העובדה שהפטרייה אינה מייצרת חומרים רעילים (פלטי, 1998א).

2.3 הפתוגן- *Oidium neolycopersici* Kiss

קימחון העגבנייה נגרם ע״י הפטרייה *O. neolycopersici*. מקור המדבק הראשוני מנבגים אל-מיניים, מאחר והשלב המיני לא נמצא. בקצה נחשון הנביטה נוצרת כרית ההצמדה (Appressorium) בדרך כלל מעל מקום חיבורם של שלושה תאי אפידרמיס של העלה וממנה גדל קור ההדבקה ונשלחים מצצים (Haustoria) לשכבת האפידרמיס, שממנה ניזונה הפטרייה (Kiss *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2000).

הנבגים הנוצרים על גבי נושא נבגים (conidiophore) ישר ולא מסועף, הם נבגים אליפסואידים בגודל 22-46×10-20 מיקרון, חסרי גופי פיברוזין.

2.4 המחלה- קימחון העגבנייה

מחלת הקימחון נגרמת על ידי הפטרייה *O. neolycopersici* זוהתה לראשונה באנגליה ב- 1986 (Fletcher *et al.*, 1988). לאחר מכן תוארה המחלה בכל רחבי אירופה ובמקומות שונים בעולם, כמו קליפורניה (Arredondo *et al.*, 1996; Marois *et al.*, 2001) ויפן (Matsuda *et al.*, 2001). מקור *O. neolycopersici* אינו ידוע, יש הטוענים כי הוא היה קיים מקדמת דנא, בשל העובדה שקיימים קוים עמידים לקימחון זה בקרב מיני בר של *Lycopersicum* (Kiss *et al.*, 2001), אך הסיבה להתפרצותו המהירה ברחבי העולם בשנים האחרונות אינה ברורה. יתכן שאחראים לכך גידול זנים רגישים, התנועה של חומר צמחי בין מדינות, יכולת התפוצה הרבה של נבגי הפתוגן ויכולתו להתקיים על מאכסנים רבים (Jones *et al.*, 2000).

טווח הפונדקאים של *O. neolycopersici* בעולם כולל כ-60 מינים מ- 13 משפחות בוטניות, בעיקר ממשפחת הסולניים (סולנום שחור *Solanum ptycanthum*, תפו״א *S. tuberosum*, חציל *S. melongena*, טבק *Nicotiana tabacum* ועגבנייה *L. esculentum*) והדלועיים (Whipps *et al.*, 1998; *et al.*, 1999 LaMondia) אך יתכן שהנושא מורכב בגלל נוכחות פטוטיפים (pathotypes) שונים (Huang *et al.*, 2000).

הנזק הנגרם ע״י הפטרייה מתבטא בכיסוי תפטיר לבן סבוך בעל נבגים רבים בעיקר בצד העלה העליון ובמידה פחותה בצד התחתון. כתוצאה מכך פוחתת יכולת ההטמעה של הצמח, נפגעת איכות הפרי ובנגיעות גבוהה אף מת הצמח (Whipps *et al.*, 1998). מחקרים לא מצאו הבדלים במידת הנזק בזנים שונים של העגבנייה ולא דווח על זן עמיד בקרב הזנים התרבותיים (Lindhout *et al.*, 1994; Bai *et al.*, 2005). עמידות ל *O. neolycopersici* נמצאה בקווי עגבנייה (*Lycopersicum*) מהבר (Mieslerova *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2005). עמידות קווי הבר מתאפיינת בהתפתחות מוגבלת של התפטיר ובמניעת תהליך ההנבגה כך שלא נוצרים נבגים חדשים ואירועי הדבקה נוספים (Lebeda *et al.*, 2002; Lindhout *et al.*, 1994).

2.5 אפידמיולוגיה של מחלת קימחון העגבנייה

התפתחות מחלת הקימחון בעגבנייה כולל מספר שלבים מוגדרים, המושפעים מגורמי סביבה שונים, נביטה גידול והתבססות בעלה; יצירת הנבגים והפצתם; התפתחות מחלה והישרדות קצרת טווח (Jarvis *et al.*, 2002). בסעיפים הבאים יסקר המידע אודות הגורמים השונים המשפיעים על השלבים במחזור התפתחות המחלה.

2.5.1 נביטת נבגים, גידול והתבססות בעלה

נבגים, המתפזרים בעיקר ע״י הרוח נוחתים על חלקי הצמח הירוקים, ובתנאי סביבה מתאימים נובטים (פלטי, 1988א). משך הנביטה משתנה בין מיני הקימחונות. נבג של *O. neolycopersici* יכול לנבוט בתוך 3-5 שעות לאחר מגע עם עלה הצמח. פתוגנים מסדרת הקימחונות הם פתוגנים אקטופרזיטים ובשלב

הנביטה הנבג אינו חודר לרקמת הצמח, כך שהוא חשוף לתנאי הסביבה (פלטי, 1988). תנאים מגבילים בשלב זה, יכולים למנוע את השלמת מחזור החיים של הפתוגן בפונדקאי ובכך למנוע את ההדבקה (Whipps and Budge, 2000). מחקרים רבים בדקו טווחי טמפרטורת הנביטה בקימחונות שונים. בהשוואה בין 12 קימחונות שונים נמצא כי טווח הטמפרטורות המינימאלי לנביטה הוא בין 0-17 מ״צ, המקסימאלי הוא בין 28-36 מ״צ, והמיטבי הוא בין 11-28 מ״צ. כמו כן נמצא כי הנביטה של מרבית מיני הקימחונות פוחתת בצורה חדה בטמפרטורות מעל 30 מ״צ (Jarvis *et al.*, 2002). בקימחון העגבנייה התקבלו תוצאות דומות: נביטת נבגים מיטבית התרחשה ב- 25 מ״צ ובלחות יחסית גבוהה (99%). קצב הנביטה ירד משמעותית בטמפרטורות נמוכות מ- 15 מ״צ, וגבוהות מ- 30 מ״צ. כמו כן ירד קצב הנביטה עם הירידה בלחות היחסית. לעוצמת הקרינה השפעה על הנביטה. נביטה מיטבית (36%) הייתה בחושך מוחלט (0 לוקס), בעוצמות אור גבוהות (5150 לוקס) ירד אחוז הנביטה ל- 15%. השפעת תנאי המיקרו אקלים על התארכות נחשון הנביטה היה הייתה דומה להשפעתה על שעור הנביטה, בטמפרטורה ולחות מיטבית הגיע אורך הנחשון עד ל- 40 מיקרומטר. יצור כרית הצמדה על ידי הנבגים שנבטו היה מיטבי ב- 25 מ״צ ומינימאלי בטמפרטורות גבוהות מ- 30 מ״צ. נצפתה עלייה בשיעור ייצור כרית ההצמדה בטווח הלחויות הנמוכות (7-55%) אך עם העלייה באחוזי הלחות היחסית (55-99%) לא נצפתה עליה נוספת בשיעור כריות ההצמדה, והוא היה גבוה מ 25%. שיעור ייצור כרית ההצמדה הגבוה ביותר (כ- 30%), התקבל בהדגרת הנבגים בעוצמת אור בינונית (1750 לוקס) והוא היה גבוה באופן מובהק לעומת העלים ששהו בחושך מוחלט (0 לוקס) בהם שיעור ייצור כרית ההצמדה היה כ 20% (Jacob et al., 2008).

2.5.2 <u>הפצת הנבגים</u>

נושאי הנבגים של קימחונות נושאים בקצותיהם נבגים אל מיניים ואלה מתפזרים בעיקר ע״י תנועת אוויר ולעיתים ע״י חרקים. עיקר פיזור הנבגים מתקיים בצהרי היום ולעיתים קיים פיזור נוסף, קטן יותר לאחר חשכה. באופן כללי שחרור נבגים לאוויר מושפע ממהירות הרוח, הטמפרטורה, קרינת שמש, לחות יחסית, גשם, רטיבות עלה ובמיוחד מגרעון לחץ האדים על פני הרקמה (VPD - Vapour Pressure Deficit) המוכתב כתוצאה משילוב בין הטמפרטורה והלחות היחסית (פלטי, 1998; Jarvis *et al.*, 2002). ייצור נבגים בתנאים מבוקרים היה אופטימאלי ב 20 מ״צ, לעומת 16 או 26 מ״צ. כמו כן ייצור הנבגים בשלוש לחויות יחסיות (99%, 80-85, 70-75) נבדק במשך 16 ימים ונמצא כי החל מהיום השביעי לניסוי חלה ירידה בכושר ההנבגה בלחות גבוהה (99%), בניגוד לשתי הלחויות הנמוכות יותר, בהן נמצאה עלייה בכושר ייצור הנבגים (Jacob et al., 2008). שחרור נבגים אווירניים של קימחונות עולה עם מהירות הרוח ועם טמפרטורה מרבית יומית של 24 - 19 מ״צ (Jarvis, 2002). שחרור הנבגים מנושא הנבגים של *O. neolycopersici* לא התקיים במשבי רוח חלשים יחסית (0.1 מ׳/ שנייה) ונדרשה מהירות של 1 מ׳/ שנייה לצורך שחרורם (Oichi *et al.*, 2006).

2.5.3 <u>התפתחות מחלה</u>

מגפות הנגרמות ע״י קימחונות מושפעות מאינטראקציה בין הלחות והטמפרטורה. לכל קימחון תנאי סביבה מיטיבים לצורך התפתחותו (Whipps *et al.*, 2000). מועד התרחשות ההדבקה העיקרי בגידול עגבניות בחממות הוא בעיקר בסתיו ובאביב, מאחר ותנאי הסביבה בעונות אלו מתאימים להתרחשות

ההדבקה והתפתחות המחלה. בשטח הפתוח בתנאים דומים, מתקיימת ההדבקה בתקופה מוגבלת יותר (פלטי, 1998א).

נמצא ב *O. lycopesici* כי טווח הטמפרטורות להופעת המחלה הינו 10-35 מ״צ, כשנצפתה עוצמת מחלה גבוהה בטמפרטורות נמוכות מ 30 מ״צ (Douglas, 2003), טווח הלחות המיטבי היה 60-80% (Whipps and Budge, 2000). ב *O. neolycopersici*, בתנאי שדה נמצא כי התפתחות המחלה הייתה מיטבית במבנה בו שררו טמפרטורות מתונות (20-30 מ״צ), ולחות יחסית בינונית (60-90%), בעוד במבנה בו שררו טמפרטורות גבוהות (25-40 מ״צ) ולחות נמוכה רמת המחלה הייתה נמוכה (יעקב, 2007).

התפתחות הקימחון על הפונדקאי תלויה בסוג הצמח ובשלב הפנולוגי שלו, ורגישותו משתנה בחלקי הצמח השונים. ניתן לחלק את הצמחים לשלוש קבוצות לפי הרגישות יחסית בשלב פנולוגי מסויים ובחלקי הצמח השונים (פלטי, 1998א ; Jarvis *et al.*, 2002) : א. בצמחים מעוצים רב שנתיים החלקים הצעירים רגישים לקימחון והוא מופיע בהם זמן קצר לאחר היווצרותם. כל עוד יש בצמח לבלוב והיווצרות של רקמה צעירה ורגישה תמשיך המחלה להתפתח בו; ב. בצמחים רב שנתיים לא מעוצים כתות שדה החלקים הרגישים הן הרקמות הירוקות, ועלים בכל הגילאים רגישים למחלה; ג. בפונדקאים עשבוניים חד שנתיים (ירקות, שעורה, פרחים וכדי) החלקים הבוגרים הם הרגישים יותר. בגיל צעיר מאוד של הצמח הרגישות למחלה נמוכה מאוד, ובגיל ביניים יתפתח הקימחון רק בתלות בתנאי סביבה נוחים לו ובד״כ גם בתלות בכמות מדבק גבוהה. בצמחים בוגרים וגם ברקמות הבוגרות של צמחים בכלל הרגישות לקימחון גבוהה יותר, כך שהקימחון יוכל להתפתח גם בתנאי סביבה פחות נוחים.

2.5.4 <u>הישרדות הפטרייה בין עונות הגידול</u>

השלב המיני (Cleistothecium) של הפטרייה טרם נמצא בקימחון העגבנייה ומכאן שהפטרייה נפוצה רק באמצעות הנבגים האל-מיניים. הישרדות הפטרייה בין עונות הגידול יכולה להתקיים בצורת תפטיר על עלי הפונדקאי או על פונדקאי ביניים. בחקלאות מודרנית, צמחי העגבנייה גדלים במשך כל ימות השנה, כך שהפטרייה יכולה להתקיים בשלב האל- מיני על הגידול או על שאריות צמחים בין מחזורי שתילות.

2.6 שיטות להתמודדות עם קימחון

השיטה העיקרית להדברת קימחונות היא שימוש בחומרים כימיים. מדיווחים אודות שימוש בחמרי הדברה כימיים באירופה, נמצא כי הכמות הגבוהה ביותר של פונגיצידים יועדה להדברת מיני קימחונות (Ko *et al.*, 2003; Kiss, 2003). בעקבות העלייה במודעות הצרכנים בשנים האחרונות, לנזקים הנגרמים לסביבה ולאדם בעקבות השימוש בחמרים אלו, נוצר לחץ ציבורי להקטנת השימוש בתכשירים כימיים ובמציאת חלופות שאינן כימיות. קיימות חלופות להדברה בתכשירים כימיים סינטטיים ובניהן, הדברה באמצעות תמציות צמחים, הדברה ביולוגית באמצעות מיקרואורגניזמים אנטגוניסטים, הדברה באמצעים אגרוטכניים הכוללת פעולות תברואה ייחודיות נגד מחלות ושימוש בזני צמחים בעלי עמידות או סבילות לקימחון.

2.6.1 <u>הדברה כימית</u>

קיימים למעלה מ-30 חומרים פעילים להדברת הקימחון. תכשירי הגפרית כדוגמת, הליוגפרית וסולפולי, הינם תכשירים המשמשים כמדבירים כימיים מוצלחים של קימחון מזה זמן רב. תכשירים אלה בעלי

פעילות פרוטקטנטית והם מורשים בשימוש גם בחקלאות האורגנית. יתרונם הגדול של תכשירי הגפרית, המאפשר את השימוש בהם לאורך תקופה כה ארוכה, הוא העובדה שלא מתפתחת כנגדם עמידות. עם זאת, קיימות מספר בעיות ביישום תכשירים אלו ובינהן, השפעה פיטוטוקסית בתנאי חום ויובש, פעילות נגד אויבים טבעיים של מזיקים כמו אקריות טורפות ובחלק מהם גם קיימות מגבלות שימוש במקביל לתכשירי הדברה אחרים (פלטי, 1998ב).

בשל המגבלות הקיימות בשימוש בגפרית פותחו תכשירים בעלי פעילות סיסטמית. יתרון בולט בשימוש בחמרים אלה הוא ששימוש בהם אפשרי לאחר הופעת הסימנים ובמרווחים בין ריסוסים גבוהים יותר (20-30 ימים), כתוצאה מכך כמות וריכוז הריסוסים פחת. קבוצה זו כוללת מס' רב של תכשירים ביניהם, מעכבי ביוסינתזה של ארגוסטרול (sterol de-methylation inhibitors, DMIs), ותכשירים עם חומרים פעלים כגון: סטרובילורינים, בנזימידאזולים ועוד. עם עליית שכיחות ותדירות המחלה נעשה שימוש תכוף בהדברה כימית, כך שעולה הסבירות להיווצרות עמידות. דוגמא לכך היא קימחון הדלועיים שקצב היווצרות העמידות לבנזימידאזולים הידרוקסיפרימידין (Hydroxypyrimidine), DMIs וסטרובילורינים בו הוא בדרך כלל הגבוה ביותר (במיוחד בחממות), תופעה דומה מתרחשת גם בקימחונות השעורה והגפן (Hollomon and Wheeler, 2002).

2.6.2 <u>הדברה ביולוגית</u>

בשנים האחרונות גבר העניין בהדברת קימחונות באמצעות מיקרואורגניזמים אנטגוניסטים, כחלק מהנטייה העולמית להפחתת השימוש בחמרי הדברה כימיים בחקלאות. עד כה נמצא כי יעילות התכשירים הביולוגיים נמוכה מזו של הכימיים מאחר ואין ההדברה עקבית במשך תקופת הגידול. הסיבה לכך היא שתכשירים אלו מבוססים על אורגניזמים חיים, הדורשים תנאים ספציפיים לצורך התפתחותם ופעילותם. התנאים בבתי צמיחה (חום, לחות יחסית גבוהה וחוסר אוורור) הינם תנאים מיטביים להתפתחות המדביר הביולוגי והפתוגן. יתכן וניתן לנסות להתגבר על בעיית יעילות תכשירי ההדברה הביולוגיים ע"י אחד מהאמצעים הבאים: 1) שינוי בתנאים (במיוחד בטמפרטורה ובלחות היחסית) באופן שיעודדו יותר את התפתחות המדביר הביולוגי על פני הפתוגן (Paulitz and Bélanger, 2001; Elad *et al.*, 1999); 2) הרחבת מספר המנגנונים ביישום של הדברה ביולוגית, על ידי יישום במקביל של יותר ממין אחד של אנטגוניסט (Guetsky *et al.*, 2001; 2002); 3) איתור מדבירים ביולוגים בעלי יציבות והדירות בפעולתם בתנאי סביבה משתנים (מנדלסון, 2006).

עד כה נמצאו למעלה מ-40 מינים של מיקרואורגניזמים בעלי פעילות אנטגוניסטית נגד קימחונות וקיימים גם מספר תכשירים מסחריים. מאחר שהפטריות מחוללות הקימחונות הינן ביוטרופיות, מנגנוני הפעילות המוכרים אינם מבוססים על תחרות, אלא בעיקר על היפרפרזיטיות, אנטיביוזיס ובחלקם הקטן גם השראת עמידות (Kiss, 2003; Eken, 2005). פטריות *Ampelomyces* spp. הן מהדוגמאות הבולטות של היפרפרזיטיות (Kiss *et al.*, 2004) קורי פטריות אלה חודרים לקורי הקימחונות, יוצרים פיקנידיות וניזונים בתוכם תוך כדי פגיעה ביכולת הנביגה של הפתוגן וחיוניותו הכללית. הפטרייה *A. quisqualis* (AQ10) נמצאה יעילה כמדבירה ביולוגית של קימחון במלפפון וגרמה להפחתה בעוצמת המחלה בשיעור של עד 98% (Elad et al., 1998), כאשר התנאי ליעילותה הוא שערכי הלחות היחסית יהיו גבוהים מ 80% (Bélanger *et al.*, 1997). תכשיר נוסף נגד קימחון הינו Serenade המבוסס על שילוב של החיידק *Bacillus subtilis* QST713 והפרשותיו בתכשיר. מנגנון פעולתו הינו פרזיטיזם, אנטיביוזיס ועמידות

מושרת (Highland, 2000; Jacobsen *et al.*, 2004). פטריות מסוג *Pseudozyma flocculosa* נמצאו כמדביר ביולוגי יעיל של קימחון התוקף ורדים וחיטה ועל בסיס נבגיי פטרייה זו פותח התכשיר המסחרי Sporodex®. הפטרייה מפרישה חומרים אנטיביוטיים הגורמים לפלסמוליזה של תפטיר הקימחון (Paulitz and, Bélanger, 2001).

3. יחסי גומלין צמח – פתוגן – מיקרופלורה מועילה על פני העלה

בחלק זה יפורטו השפעות גורמים שונים על יחסי הגומלין בין הצמח (בעיקר ברמת העלה) לפתוגן ובין הצמח לאוכלוסייה מיקרוביאלית. השפעת המבנה הפיזי והכימי של פני העלה על יחסי גומלין אלו, תגובת הצמח לאנטרודוקציה של מיקרואורגניזמים (פתוגן ואנטגוניסטים), דינאמיקה של אוכלוסיות מקרביאליות על פני העלה ושיטות למדידה וכימות של אוכלוסיות אלו.

3.1 פני העלה – מקום מחייה של אוכלוסיות מקרואורגניזמים

פני השטח של העלה מהווים סביבת חיים לאוכלוסיות מיקרואורגניזמים מגוונות הכוללת חיידקים, שמרים, פטריות ועוד. מרבית המיקרואורגניזמים הנמצאים על פני העלה (אפיפטים -Epiphytes) אינם בעלי יכולת תנועה ואלה שאינם פתוגנים החודרים לתוך העלה חשופים לתנאי הסביבה המצויים בפני העלה ותלויים בחומרי מזון הנמצאים על פני העלה שמקורם מהצמח או מהסביבה. בניגוד לתנאים להם חשופים אברי צמח אחרים כגון שורשים, תנאי הסביבה על פני העלה הם דינמיים מאד. העלה חשוף לשינויים בעוצמת הקרינה, מחזורי רטיבות ויובש (גשם, טל, אידוי), פיזור של מינרלים שמקורם חיצוני ושינויים כתוצאה מנוכחות גורמים ביוטים על פני העלה (הפרשות כנימות, פצעי מזיקים). בנוסף לדינמיות של תנאי הסביבה מאופיינים פני העלה בטופוגרפיה ייחודית הכוללת אזורים דמויי גבעות, פסגות, שקעים ומכתשים. טופוגרפיה זו מוכתבת על ידי נוכחות עורקים, שערות וטריכומות, תאי אפידרמיס, פיוניות והקוטיקולה והשעוות המכסות את העלה. הגיוון והדינמיות בתנאי הסביבה ובתנאים הטופוגרפיים, הם הגורמים להטרוגניות הרבה באוכלוסיות מקרואורגניזמים המתפתחות על פני העלה (Andrews, 1992; Juniper, 1991).

3.2 המבנה הפיזי והכימי של פני העלה והשפעתו על אוכלוסיות מקרוביאליות

השכבה החיצונית ביותר של העלה, הקוטיקולה, הינה שכבה ליפידית הבנויה משעוות ופולימרים ליפופילים. תפקידה העיקרי של שכבה זו הוא למנוע איבוד מים מהעלה ולהוות מגן מפני חדירה של גורמים זרים, לכן לקוטיקולה תכונות הידרופוביות. הקוטיקולה היא שכבה ממברנאלית דרכה יכולים לעבור חומרים שונים, לדוגמא שעוות הנוצרות באפידרמיס מופרשות לחלק החיצוני של הקוטיקולה, מצד אחד, וחדירה של חומרים מסיסים אל תוך העלה מצד שני. בתשטיפים של פני העלה ניתן לאתר מגוון רב של חומרים הנמצאים על פני העלה כגון: K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, סוכרים, כוהלים, חומצות אמינו, חומצות אורגניות, שאריות פקטין, ויטמינים ועוד. הפרשות העלים משתנות בהתאם למין הצמח וגילו, מיקום העלה בצמח, קרינה, טמפרטורה, פציעת העלה, שעת היום והפרשות של בעליי- חיים ומיקרואורגניזמים על פני העלה (Schönherr and Baur, 1996). בנוסף לקוטיקולה מפוזרות על פני העלה שערות במגוון גדלים וסוגים, בלוטות הפרשה והידטודות. גורמים נוספים המשפיעים על המבנה הטופוגרפי של פני העלה הם עורקים ותאי אפידרמיס הנמצאים מתחת לקוטיקולה, ולהם מבנה קמור היוצר שקעים

בחיבור בין תאים סמוכים. המבנה הטופוגרפי הלא אחיד יוצר גיוון בפיזור חומרי הזנה, מים ותנאי סביבה, דבר המביא כאמור להטרוגניות באוכלוסיות מקרוביאליות על פני העלה (Andrews, 1992).

למאפיינים הפיזיים של פני העלה השפעה על אוכלוסיות מקרוביאליות הן על ידי השפעה ישירה והן בהשפעה עקיפה על ידי השפעה על תנאי המיקרואקלים בפני העלה. פני העלה מכוסים שכבת קוטיקולה הידרופובית הגורמת לפיזור המים על פני העלה בצורה ייחודית, דבר המשפיע על אוכלוסיות מקרואורגניזמים על פני העלה. השערות המשפיעות גם הן על המבנה הטופוגרפי, משמשות בין היתר מגן פיזי לעלה מפני פתוגנים. לאופן סידור העורקים בעלה, ותאי האפידרמיס השפעה על המבנה הטופוגרפי של פני העלה גם כן. למבנה הטופוגרפי השפעה ישירה על נחיתת נבגים, וגדילה של נחשוני נביטה, כריות הצמדה וקורים של פטריות (Allen *et al*., 1991). שערות וטריכומות מהוות מגן פיזי למניעת נחיתה והתבססות של נבגים ומונעות מגע ישיר בין פני העלה לנבגים, כמו במיקרוה של נבגי חלדון השעועית (*Uromyces appendiculatus*) . בדגניים גדילת הנחשונים מתבצעת לרוב בניצב לעורקים כמו במיקרוה של חלדון קנה בחיטה (*Puccinia graminis*), לעומת זאת ברחבי עלים שונים סידור העורקים הוא יותר א-סימטרי וגדילת נחשוני הנביטה מתרחשת, לרוב, במקומות הנמוכים שעל פני העלה, מעל החיבור בין תאים כמו במיקרוה של גורם מחלת הגחלון (אנתרקנוז) (*Colletotrichum lindemuthianum*) בשעועית (Mercer *et al*., 1971). מיקום כרית ההצמדה גם הוא מושפע מהטופוגרפיה של פני העלה. במינים רבים יצירת כרית ההצמדה מתרחשת באתר ספציפי כגון בפיונית או מעל נקודת החיבור בין תאים סמוכים, דבר זה מחייב את הפטרייה "לחוש" את פני העלה (thigmotropic sensing), כמו במיקרוה של מיני כשותית (*Peronospora* spp.) בגידולים שונים (Preece *et al*., 1967).

אוכלוסיות חיידקים מתרכזות לרוב בבסיסן של טריכומות, בפתחיי פיוניות, מעל חיבור בין תאים סמוכים, חריצים לאורך העורקים, שקעים בקוטיקולה ומתחתיה, ליד הידטודות, ובמבנים ייחודיים לצמחים כגון שקעי פיוניות בהרדוף. אוכלוסיות גדולות יותר גדלות בצידו התחתון של העלה מאשר על צידו העליון של העלה (Beattie and Lindow, 1999). באגס התרכזו אוכלוסיות *Pseudomonas syringae* pv. *syiringae* בבסיסן של טריכומות ובפתחי פיוניות (Mansvelt and Hatting, 1987). בעלי גפן נמצאו ריכוזים של *Xanthomonas citri* ו- *X. campestris* pv. *citrumelo* מעל חיבור בין תאים סמוכים (Davis and Brlansky, 1991). במלפפון התרכזו אוכלוסיות *Pseudomonas syringae* pv. *syiringae* ו- *P.s.* pv. *lachrymans* בחריצים לאורך העורקים ובצמוד לצמתי עורקים (Leben, 1988). באורז נמצאו גזעים שונים של *Xanthomonas campestri*s pv. *oryzae* בסמוך להידוטודות (Mew *et al*., 1984). בתות שדה נמצא כי אוכלוסיות חיידקים מגוונות, כגון מיני: *Pseudomonas, Stenotrophomonas*, *Bacillus* ו- *Arthrobacter* "מעדיפות" להתרכז על השערות, אולם נראה כי תופעה זו מתרחשת הודות להפרשת חומרים מהשערות ולא עקב תנאי מיקרואקלים עדיפים (Krimm *et al*., 2004). מיקום האוכלוסייה יכול להיות תלוי בגודלה וקצב התפתחותה כפי שנמצא עבור מושבות של פטרייה דמוית שמר מסוג *Aureobasidium pullulans*, על עלי תפוח. בתחילת העונה כאשר האוכלוסייה קטנה, ריכוז המושבות הוא לאורך העורקים ובחריצים על פני העלה. בהמשך העונה כאשר האוכלוסייה גדלה, ניתן לאתר אוכלוסיות גדולות גם במקומות גבוהים יחסית על פני העלה (Andrews *et al*., 2002).

מבנה והרכב הקוטיקולה משפיע על הדיפוזיה של חומרי הזנה ואידו מים מפני העלה, לכן יכול להשפיע רבות על אוכלוסיות מקרואורגניזמים. שינויים במבנה והרכב הקוטיקולה משפיעים על הגדילה והתפתחות של אוכלוסיות מיקרוביאליות (Beattie, 2002). חומרים המצויים על העלה משמשים לצורך תהליכי היצמדות, גדילה וריבוי של אוכלוסיות אלו (Andrews and Harris, 2000). פיזור חומרי ההזנה על פני העלה אינו אחיד (Mercier, 2000), ובמרבית שטח פני העלה ישנה כמות מינימאלית של חומרי הזנה (Derridj, 1996). זמינות חומרי הזנה המכילים פחמן משפיעה על התפתחות אוכלוסיות חיידקים יותר מאשר חומרי הזנה המכילים חנקן (Wilson *et al.*, 1994). נמצאה ירידה משמעותית בכמות הסוכרים המסיסים על העלה במקביל להתפתחות אוכלוסיות חיידקי *Pseudomona fluorescenss* (Mercier, 2000). אולם לא ניתן לומר שהתנהגות האוכלוסייה היא ביחס ישר לגורם המגביל כפי שמתקבל במצב קבוע, בגלל יחסי גומלין בין חומרים שונים והדינאמיקה הייחודית המתרחשת על פני העלה. בתחילת העונה, או בשלבי הגידול הראשונים, כאשר העלים צעירים- הפרשת סוכרים ומינרלים שונים מן העלה היא בכמות נמוכה יחסית. ככל שהצמח והעלים מתבגרים, כן גוברת הפרשת חומרים אל פני העלה. סוכרים המופרשים מן העלה הם גורם מגביל בגדילת שמרים על העלה בתחילת העונה, בשלבים יותר מאוחרים חנקן מהווה גורם מגביל. (Kinkel, 1997; Ercolani, 1991; Thompson *et al.*, 1993). בעלי לימון נמצא כי חיידקים אפיפיטים אינם יכולים לנצל סוכרים פשוטים כגון גלוקוז בתחילת העונה, לכן הם מנצלים חומצות אמינו כמקורות פחמן וחנקן. הבדלים בצריכת חומרי מזון על ידי חיידקים נמצאו גם בין עלים צעירים לעלים בוגרים של שעועית (Blakeman, 1985). ללחות היחסית ולכמות המים החופשיים על פני העלה השפעה מכרעת על חיידקים אפיפיטים, כפי שיסקר להלן. ירידה בכמות המים החופשיים באזורים מוגנים על פני העלה מביאה לרוב לעלייה בריכוז המומסים באותו איזור. אוכלוסיות חיידקים שונות מתאימות את פוטנציאל המומסים שלהן על מנת לשרוד בתנאים אלו (Beattie and Lindow, 1994). ההתאמה מתבצעת על ידי צבירה של מומסים החודרים דרך ממברנת החיידק, ועלייה בריכוז המומסים על ידי סינתיזה אנדוגנית (Csonka and Hanson, 1991).

3.3 מיקרואקלים בפני העלה והשפעתו על מקרואורגניזמים

בצמוד לפני השטח של העלה מצויה שכבת מעבר של אויר שעובייה מספר מילימטרים בודדים. תנאי המיקרואקלים בפני העלה הם דינמיים ונתונים לשינויים כתלות בטמפרטורה, לחות יחסית, טל, גשם, רוח וקרינה. תאי האפידרמיס יוצרים מקומות גבוהים מתחת למרכז התא ונמוכים מתחת לנקודת החיבור בין תאים סמוכים, דבר המשפיע על צורת פיזור המים על פני העלה. באזורים נמוכים יותר מתקיימת לחות יחסית גבוהה יותר. שערות מסוגים שונים יוצרות גם הן אזורים גבוהים מאד ונמוכים הנבדלים בתנאי המיקרואקלים בכלל והלחות בפרט. אזורים נמוכים אלו מועדפים לגידול של מיקרואורגניזמים (Beattie and Lindow, 1995). יתרה מזו, תנאים אלו יכולים להשתנות באזורים שונים של אותו עלה; לדוגמא: הבדל טמפרטורה של עד 3 מעלות בחלקים שונים של אותו עלה כתוצאה מאידוי שונה ועובי שונה של שכבת המעבר (Burrage, 1971).

נושא השפעת גורמי אקלים על אוכלוסיות מיקרוביאליות על פני העלה נחקר רבות הן בהיבט של חקר מערכת היחסים בין הפתוגן לצמח והן במערכות של הדברה ביולוגית. לגרעון לחץ האדים (VPD) הנגרם משילוב הטמפרטורה ולחץ האדים השפעה מכרעת על יעילותם של מרבית המדבירים הביולוגים של

פתוגנים ביוטרופים כגון קימחונות. למרבית המדבירים דרושים תנאים של לחות יחסית גבוהה (>85%) וטמפרטורות מתונות (20-28 מ״צ) המקנים גרעון לחץ אדים נמוך (<2.5 mbar) (Elad *et al.*, 1998).
פעילות אנטגוניסטית של נבגי הפטריות *Stephanoascus flocculosus* ו- *S. rugulosus* (מאוחר יותר אופיינו כפטריות דמויות שמר השייכות לסוג *Pseudozyma*) כנגד קימחון המלפפון (*Sphaerotheca fuliginea*), התקבלה בצורה מיטבית ב-26 מ״צ ולחות יחסית גבוהה מ- 80% עם פחיתה ביעילות ככל שהטמפרטורה עלתה והלחות היחסית ירדה (Jarvis *et al.*, 1989). לעומת זאת, נמצא כי יעילות השמר Y-16 בהדברת קימחון במלפפון גבוהה בלחות בינונית (75%) יותר מאשר בלחות גבוהה (95%) (מנדלסון, 2006). עבור מדבירים ביולוגים אחרים של קימחון המלפפון (*Tilletiopsis washingtonensis, T. pallescese, T. minor*), נמצאה יעילות גבוהה, בהפחתת חומרת מחלה, בחדרי גידול בהם שררה לחות יחסית גבוהה (>85%), אולם בניסויים בחממה יעילות ההדברה הייתה פחותה כנראה בגלל גרעון לחץ אדים גבוה מידי (Urquhart, 1994; Hijwegen 1992). *S. flocculosus* הושפעה פחות מגורמי אקלים, מאשר *S. rugulosus* (Jarvis *et al.*, 1989), גם במבחן מול *Ampelomyces quisqualis* ו- *Verticillium lecanii*, כנגד קימחון המלפפון (Dik, 1998). השפעת גורמי אקלים על מדבירים ביולוגים אלו (*Stephanoascus flocculosus* ו- *S. rugulosus*) ומדביר ביולוגי נוסף, פטרייה דמוית שמר מסוג *Tilletiopsis washingtonensis*, כנגד קימחון הוורד (*Sphaerothecapannosa* var. *rosae*) נמצאה דומה. שלושת המדבירים הראו פעילות טובה כנגד הפתוגן אולם, עם תלות בלחות יחסית גבוהה וטמפרטורה מתונה (26 מ״צ) (Hajlaoui and Bélanger, 1991). נמצא כי שמרים ממין *Sporobolomyces roseus*, מדבירים ביולוגים של קימחון החיטה, שרדו היטב בלחות יחסית גבוהה (>90%) (Bashi and Fokkema, 1977). עבור קימחון המלון (*Podosphaera fusca*), נבחנו שני סוגי פטריות אנטגוניסטיות (Mycotal®) *Lecanicillium lecanii*, (AQ10®) *Ampelomyces quisqualis* ושלושה גזעים של חיידקי *Bacillus subtilis*. בניסויים בחדרי גידול יעילות כל המדבירים הייתה טובה יותר בלחות יחסית גבוהה (>90%). בניסויי חממה יעילות הפטריות הייתה תלויה בהוספת תוסף שומני אולם החיידקים הדבירו בצורה יעילה גם בתנאים של לחות יחסית נמוכה (Romero et al., 2007). עקב רגישותם הרבה של מדבירים ביולוגים ללחות יחסית הוצע, בשנים עברו, כי הגברת הלחות בבתי צמיחה תשפר את פעילותם (Paulitz and Bélanger, 2001), מחקרים אחרים הציעו הקטנת התלות בלחות יחסית גבוהה על ידי הוספת גליצרול וג׳לטין לתרחיף הריסוס(Spencer and Ebben, 1983), או שמנים מסוגים שונים (Verhaar *et al.*, 1999; Philipp *et al.* 1990). בשנים האחרונות נמצאו מספר מדבירים ביולוגים שהראו רגישות פחותה לתנאי מיקרואקלים. בניסויים שבחנו את יעילות *Penicillium oxalicum* בהדברת קימחון התות (*Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*) נמצא יעילות גבוהה בחדרי גידול ובתנאי חממה (De Cal *et al.*, 2008).

השפעת גורמי אקלים על חיידקים אפיפיטים נחקרה רבות בהקשר של מיקרואורגניזמים על פני העלה (Beattie and Lindow, 1999; Lindow and Brandl, 2003). ושל יחסי פתוגן צמח. שינויים בזמינות מים הם כנראה הגורם המגביל ביותר עבור אוכלוסיות חיידקיות שונות. חיידקי *Pseudomonas syringae* pv. *syiringae* ו- *P.s.* pv. *lachrymans* (פתוגנים לשעועית ומלפפון בהתאמה) שרדו טוב יותר

בתנאי לחות יחסית גבוהה (80%) (Leben, 1988). הורדת הלחות היחסית בחדרי גידול ובתנאי חממה גרמה לירידה באוכלוסיית חיידקים מסוגים שונים (*Rhizomonas suberitaciens, Eschrichia coli, Pseudomonas syringae*). בין גזעים שונים של חיידקים אפיפיטים (*Pseudomonas syringae*) נרשמה השפעה שונה ללחות היחסית (O'Brien *et al.*, 1991). רמת האוכלוסייה של מוטנטים בעלי יכולת פחותה לנוע הייתה נמוכה יותר מאשר אוכלוסייה נורמאלית של חיידקי *Pseudomonas syringae* מה שמצביע על הצורך לנוע, על פני העלה לכוון מקומות מוגנים בהם הלחות היחסית גבוהה (Beattie and Lindow, 1994; Haefele and Lindow, 1987). התלות הגבוהה בלחות יחסית מחייבת התאמה מצד אוכלוסיות אפיפטיות. החיידקים יכולים להשפיע על הפוטנציאל המטרי על ידי צבירה של מומסים, ויצירת שכבה סוכרית היגרוסקופית למניעת איבוד מים, אולם פעולה זו מחייבת השקעת אנרגיה (Roberson and Firestone, 1992). לכן אוכלוסיות מיקרוביאליות מתפתחות היטב במקומות נמוכים ובחריצים על פני העלה, בהם הלחות היחסית גבוהה יותר. יתכן גם שהתפתחות האוכלוסיות במקומות אלו נובעת מהצטברות של חומרי הזנה והגנה פיזית מפני קרינה או סחיפה של מים (Blakeman, 1985; Beattie and Lindow, 1995). בעבר היה קשה לאפיין את תנאי המיקרואקלים השוררים על פני העלה משום שהמיקרואורגניזמים על פני העלה קטנים מהגלאי הפיזיקאלי הקטן ביותר. כיום עם התקדמות המחקר פותחו שיטות מדידה בעזרתן ניתן לאפיין את תנאי המיקרו- אקלים אליהם נחשפות אוכלוסיות מיקרוביאליות על פני העלה. מחקרים חדשים, שהשתמשו בסימון גנים הקשורים לזמינות מים בחיידקים, מצאו כי חיידקי *Pantoea agglomerans* ו-*Pseudomonas syringae* נחשפים לפוטנציאל מים של (-0.05) - (-0.42)MPa, לעומת מדידות פיזיקאליות שמדדו כי פוטנציאל המים בפני העלה היו בין -0.2 ל- -2.07 MPa, בעלי שעוית, בתנאי יובש, דבר המעיד על התנאים המיוחדים השוררים בשכבת האוויר הצמודה לפני העלה (Beattie and, Axtel 2002). פני העלה חשופים לקרינת השמש, דבר המחייב התאמה מצד המיקרואורגניזמים, ואכן נמצאה על פני העלה כמות יחסית גדולה של חיידקים עם פיגמנטציה המקנה עמידות לקרינת UV, וכי כמותם עלתה בשעות בהן הקרינה הייתה חזקה (Sundin and Jacobs, 1999; Jacobs and Sundin, 2001).

3.4 תגובת הצמח לאנטרודוקציה של מיקרואורגניזמים

מרבית המידע לגבי יחסי גומלין אלו נובע מחקר מערכות של צמח- פתוגן. הצמח מגיב בצורה דומה לפתוגנים שונים. התגובה היא מקומית ו/או סיסטמית וכוללת קליטה והעברה של סיגנלים, מעבר יונים, שפעול גנים וריאקציות ביוכימיות. מטרת כל אלו לעכב או למנוע את חדירת הפתוגן. עבור אוכלוסיות מועילות מתרחשות תגובות דומות, וניתן לנצלן לטובת אוכלוסיות אלו. מרבית המיקרואורגניזמים מפרישים, בעת המגע עם הצמח, חומרים שונים כגון: אוליגוסוכרים, חלבונים וגליקופפטידים. לצמח יכולת לזהות חומרים אלו בריכוזים נמוכים מאוד (10^{-12} M), על ידי קולטנים ספציפיים על דופן וממבראנת התא (Andrews and Harris, 2000). חיידקיי ריזוביום גורמים לתגובת הגנה בצמח הפונדקאי הכוללת שפעול של גנים (Nod) שגורמים לעליה בהפרשת חומרים מהשורשים. חומרים אלו "מושכים" חיידקים נוספים, הגורמים להפרשות נוספות באפקט של משוב חיובי. חיידקים אלו מדכאים את תגובת ההגנה של הצמח על ידי הפרשת סוכרים (extracellular polysaccharide, EPS), כך שבנוסף לזרימת

חומרי הזנה מהצמח לחיידקים מתרחש ״דו-שיח״ של חילופי מידע (Boller, 1995). מיקרואורגניזמים מועילים יכולים לגרום בצמח לתגובה דומה לזו המתקבלת מחדירת פתוגן. תגובה זו גורמת בצמח לתגובת עמידות סיסטמית נרכשת (Systemic acquired resistance, SAR), או להשראת עמידות סיסטמית (Induced systemic resistance, ISR) (Pieters *et al.*, 1996). במרבית המקרים תגובה זו מתרחשת כאשר המיקרואורגניזמים נמצאים בסביבת השורש והפתוגן תוקף את החלקים העיליים של הצמח כמו במערכת של חיידקי פסאודומונס המשרים עמידות סיסטמית כנגד עובש אפור בעגבניות (Audenaert *et al.*, 2002). יחסיי הגומלין בין חיידקי *Pseudomonas syringae* לעגבניות נחקרו רבות. במערכת פתוגן צמח זו החיידק יוצר קשר הדוק עם הצמח על מנת להחדיר את גורמי הווירולנטיות, בעזרת מערכת הפרשה ייחודית לתאי הצמח, שבתגובה מפעיל את מערכת ההגנה הכוללת תמותת תאים מקומית (Hypersensitive Response, HR) (Lindow and Brandl, 2003). לגודל האוכלוסייה על העלים בכלל, ועל העלים ללא סימפטומים בפרט, יש השפעה מכרעת על יכולת החיידק לגרום למחלה בצמח, בגלל המגע הישיר הדרוש בין החיידק לתאי הצמח (Wilson *et al.*, 1999). לאחרונה נמצא קשר ישיר בין הפעלת מערכת ההגנה הצמחית לבין ירידה בפוטנציאל המים בתאי הצמח ועקב כך ירידה בפוטנציאל המים בחיידקים פתוגנים. יתכן וחלק ממערכת הגנה זו כולל שינוי בפוטנציאל המים בתאים כחלק מיצירת תנאים שאינם מיטיבים עם אוכלוסיות החיידק (Wright and Beattie, 2004). גם לחיידקים שאינם פתוגנים נמצאה מערכת הפרשה ייחודית זו ויתכן כי בעתיד יהיה אפשר לנצלה לטובת התבססות אוכלוסיות מועילות (Preston *et al.*, 2001). לסוג הצמח השפעה מכרעת על הישרדות אוכלוסיות חיידקיות. חיידקים פתוגנים לצמח ממין מסוים ישרדו עליו בצורה טובה יותר מאשר חיידקים שאינם פתוגנים לאותו מין (O'Brien and Lindow, 1989; Leben, 1988).

3.5 שינויי פני העלה על ידי מיקרואורגניזם

הגורמים המגבילים את התפתחות המיקרואורגניזמים על פני העלים הם רבים, לכן במהלך האבולוציה פיתחו אוכלוסיות מיקרוביאליות התאמות לתנאים קשים אלו ויכולת לשנות את סביבת המחיה והגברת קליטת חומרי הזנה על מנת לאפשר התפתחות אוכלוסייה בצורה מיטבית (Lindow and Brandl, 2003). חיידקים מסוגים שונים מסוגלים להגדיל את רטיבות העלה על ידי הפרשת חומרים משטחים (biosurfactants), וכך להגדיל את המסיסות והדיפוזיה של חומרי הזנה המרוחקים מהם, ולסייע לחיידקים בתנועה על פני העלה למקומות בהם זמינות חומרי ההזנה גדולה יותר (Bunster *et al.*, 1989). חיידקים ממין *Pseudomonas syringae* מפרישים טוקסין (syringomycin), המעודד יצירת תעלות יונים בממבראנות התאים בעלה, וכתוצאה מכך לדליפת יונים ומטבוליטים שונים מהתא ולקריסתו. בריכוזים נמוכים של הטוקסין לא מתרחשת קריסה של התא ושחרור היונים וחומרים שונים מהתא משמש להזנת החיידק (Hutchison *et al.*, 1995). באוכלוסיות מיקרוביאליות רבות נמצאה יכולת יצור והפרשה של חומרים מבקרי גדילה צמחיים (לדוגמא Indoleacetic acid, IAA), אשר בין היתר גורמים להתרופפות דופן התאים ושחרור סוכרים המשמשים להזנת אוכלוסיות אלו (Holland *et al.*, 2002). אוכלוסיות חיידקיות לרוב יוצרות צברים (aggregates) על פני העלה. לאכלוס פני העלה בצורה זו השפעה מכרעת על יכולת להתבסס, לשגשג ולהיות מופץ בתנאים הקשים השוררים על פניו. הפרשת סוכרים אל מחוץ לתא

(EPS), הינה מרכיב חשוב ביצירת צברים אלו ושינוי הסביבה הקרובה למושבות החיידק. שכבה סוכרית זו מונעת איבוד מים ושומרת על הפוטנציאל האוסמוטי הרצוי בסביבת המושבה (Lindow and Brandl, 2003). בנוסף מגנה שכבה זו מפני נזקי חמצון (Kiraly et al. 1997), ומגדילה את ריכוז חומרי ההזנה בסביבת המושבה (Costerton *et al.*, 1995). חדירת חיידקים לתוך העלה מתבצעת במיקרוים רבים דרך פיוניות. לתאי הסגירה בפיוניות נמצא תפקיד מכריע במערכת ההגנה הצמחית כנגד חדירת חיידקים בדרך זו על ידי קליטת מולקולות המופרשות מחיידקים והעברת סיגנל לסגירת הפיונית. בכדי למנוע תגובה זו חיידקים ממין *P. syringae* מפרישים חומרים וירולנטים הגורמים לפתיחה מחודשת של הפיוניות ומתאפשרת חדירה לעלה (Melotto *et al.*, 2006). ניתן לומר כי במהלך הקו- אבולוציה של מיקרואורגניזמים וצמחים כל אחד מהצדדים סיגל לעצמו תכונות המקנות לו יתרונות על פני הצד השני, ואילו הצד השני, בתגובה, פיתח אמצעים להתמודדות עם התנאים החדשים.

3.6 דינאמיקה ויחסי גומלין בין אוכלוסיות מיקרוביאליות על פני העלה

בכדי להשתמש במיקרואורגניזמים להדברה ביולוגית נגד פתוגנים התוקפים את העלים יש צורך בהבנה עמוקה של יחסיי הגומלין בין הצמח, הפתוגן והמיקרואורגניזמים. יחסי גומלין אלו מושפעים מגורמים חיצוניים, כגון מיקרואקלים בפני השטח של העלה, ומגורמים הקשורים בצמח עצמו, כגון גיל העלה, צורת העלה ועוד, וגורמים התלויים במיקרואורגניזמים על פני העלה, כגון דפוס האכלוס על פני העלה (Blakeman, 1985). ניתן לתאר התפתחות אוכלוסייה מיקרוביאלית בארבעה שלבים עיקריים: 1) היווצרות על ידי חלוקת תאים, 2) גדילה והגירה נכנסת, 3) תמותה ו- 4) תפוצה (Andrews and Harris, 2000). לגדילה והגירה תפקיד מכריע בקיום אוכלוסייה על העלה. חשיבות שלב ההגירה הנכנסת באוכלוסיית פטריות על פני העלה הוכחה על ידי חיטוי פני העלה בפרקי זמן המאפשרים הגירה נכנסת, אבל לא מאפשרים היווצרות (Kinkel *et al.*, 1989). הוכח כי מעבר של חיידקים מצמחי מקור הסמוכים לפרדס, לעצי תפוז חיוני לגדילת האוכלוסייה על העלים (Lindow and Anderson, 1996). תפוצה יכולה להתבצע בצורה אקטיבית או פאסיבית, ונמדדת על ידי לכידת יחידות תפוצה באוויר או שטיפת עלים. את קצב ההיווצרות והתמותה ניתן להעריך כאשר קצב הגדילה והתפוצה ידוע או מבוקר בתנאי הניסוי, לדוגמא: צמחים בחדרי גידול עטופים בפוליאתילן (Wilson and Lindow, 1994). במצעי גידול ניתן לחשב את: (היווצרות) - (תמותה) בתנאי סביבה משתנים. ערכים חיוביים משמעותם שהאוכלוסייה גדלה ותוצאה שלילית משמעותה שהאוכלוסייה קטנה. שימוש במיקרוסקופ פלורוסנטי וצביעות של תאים חיים, או חלבונים ספציפיים (Green Fluorescent Proteins, GFP) משמשים כלי להערכת קצב היווצרות והתמותה (Spear *et al.*, 1999) או לדינמיקה הכללית של יחסי גומלין בין אוכלוסיות על פני העלה (Lu *et al.*, 2004). שיטה זו שימשה בעבר על מנת לאפיין באופן מדויק את תהליך ההדבקה במערכות צמח פתוגן על פני העלה (Lee et al., 2002; Maor *et al.*, 1998; Spellig *et al.*, 1996). בהוספת גורם שלישי למערכת פתוגן – צמח, המדביר הביולוגי, שיטה זו יכולה לשמש לאפיון מערכת יחסים מורכבת זו. לדוגמא נמצא כי המדביר הביולוגי *Pseudozyma flocculosa* שרד יותר טוב על עלים של מינים שונים הנגועים בקימחונות שונים מאשר על עלים ללא סימפטומים. יתכן וזאת עקב הפרשת חומרים מהפתוגן המשפעים על גדילת המדביר הביולוגי (Neveu *et al.*, 2007). על פני העלה אוכלוסיות מיקרואורגניזמים

(בעיקר חיידקים ושמרים, פחות פטריות) מתבססות בצברים המכוסים בתוצרים חוץ תאיים המסייעים בהצמדות לעלה, מספקים הגנה ומעורבים בתהליכים הקשורים בהתפתחות האוכלוסייה על ידי תיווך בהעברת סיגנלים בין פרטים שונים באוכלוסייה. בצברים אלו יכולה להתבסס אוכלוסייה המורכבת מפרטים ממינים שונים או מפרטים מאותו מין (Andrews and Harris, 2000). מחקרים בנושא מצאו עדויות לביטוי גנים הקשורים לחישה קבוצתית (Quorum sensing), המבקרת את צפיפות המושבה (Costerton *et al.*, 1999). בקרה על צפיפות המושבה בצורה זו נקשרה לייצור והפצה שלחומר נדיף מסוג (N- acyl-homoserine lactones, AHLs) (Fuqua *et al.*, 1994). ליחסי הגומלין בין אוכלוסיות שונות על פני העלה יכולה להיות השפעה מכרעת על התפתחות אוכלוסייה כזו או אחרת. במחקרים רבים הקשורים להדברה ביולוגית, מירב תשומת הלב ניתנת להשפעה של חיידקים ופטריות אנטגוניסטיות על אוכלוסיות פתוגניות (Paulitz and Bélanger, 2001; Elad *et al.*, 1999). דיכוי האוכלוסייה כאמור יכול להתרחש במספר מנגנונים כגון: טפילות, תחרות על חומרי מזון, הפרשת חומרים אנטיביוטים ועוד. לדוגמא נמצא כי אוכלוסיות של חיידקים ממין *Pseudomonas fluorescns* מונעות התפתחות אוכלוסיות של חיידקי *Erwinia amylovora* הגורמים למחלת החרכון באגס, בין היתר עקב תחרות על חומרי מזון (Wilson and Lindow, 1994 בצד השפעת מדבירים ביולוגים על פתוגנים, תיתכן גם הפרשת חומרים על ידי הפתוגן היכולה להשפיע על אוכלוסיית המדביר הביולוגי של אותו פתוגן, כמו במיקרוה של פטריית הפוזריום בעגבניות (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*) המפרישה חומצה פוזרית הפוגעת בהפרשת חומרים אנטיביוטים (2,4-diacetylphloroglucinol, DAPG) המעורבים במנגנון הפעילות של המדביר הביולוגי *Pseudomonas fluorescens* (Duffy *et al.*, 2004). כאמור, ניתן להשתמש ביחסי הגומלין בין אוכלוסיות שונות לטובת הדברה ביולוגית של אוכלוסיות פתוגניות כאשר אוכלוסייה ממין אחד מדכאת את ההתפתחות של אוכלוסייה ממין אחר.

3.7 פיזור בזמן ובמרחב של אוכלוסיות מיקרוביאליות על פני העלה

אוכלוסיות חיידקיות נוטות להתפזר על פני העלה בצורה לוגריתמית נורמאלית בגלל התפוצה בצברים ואכלוס אזורים קטנים יחסית משטח העלה בהם שוררים תנאים מתאימים. תופעה זו נפוצה אפילו בין עלים "זהים" וקטעים שונים על אותו עלה (Andrews and Harris, 2000). פטריות חוטיות ושמרים נוטים להתפזר בצורה נורמאלית, ולא לוגריתמית, כנראה עקב שונות בצורת ההפצה או כתלות במאפיינים של סביבת המחייה (Fokkema and Schippers, 1986). כאמור אוכלוסיות מיקרוביאליות גדולות יותר מתפתחות בצידו התחתון של העלה מאשר בצידו העליון, ובעלים תחתונים מאשר בעלים עליונים (Andrews and Harris, 2000). פיזור האוכלוסייה בזמן הינו דינמי ותלוי במספר גורמים: 1) שינויים בגודל האוכלוסייה בטווח הקצר כתלות באירועי אקלים כגון גשם, טל, שרב וכו'; 2) שינויים בגודל האוכלוסייה בטווח הארוך (עונתיים) כתלות בגדילת האוכלוסייה; 3) שינויים בהרכב האוכלוסייה בטווח הארוך- בתחילת העונה דומיננטיות של חיידקים, לאחר מכן שמרים ולבסוף פטריות חוטיות כאשר העלים מזדקנים (Kinkel, 1997). לאוכלוסיות שונות דפוסי אכלוס שונים. כאשר אולחו עלי שעועית בשמרים וחיידקים, לאחר 30 שעות השמרים התרכזו בחיבור בין תאים, בחלקים השטוחים (lamina) של העלה והחיידקים התרכזו בחיבור בין תאים לצד עורקים, פיוניות ושערות (Blackeman, 1985).

4. שינויי אקלים ומחלות צמחים

אחד עשר השנים האחרונות (1995-2006) הן 11 מתוך 12 השנים החמות ביותר בעידן המודרני (מאז 1850). במאה שנה האחרונות (1906-2005) חלה עלייה לינארית בטמפרטורת כדו"א ב- 0.74 מ"צ בשנה. תופעת ההתחממות הגלובלית מתבטאת בעלייה חדה בטמפרטורת פני כדו"א, הנמסות קרחונים, עלייה בגובה פני הים ועלייה בשכיחות אירועי מזג אויר קיצוניים. הגורם העיקרי לתופעה זו הוא גדילה מתמדת באוכלוסיית העולם הגורמת לעלייה בפליטת גזים משריפת דלקים, ותעשיות שונות. גזים אלו גורמים לשינוי בהרכבה הכימי של האטמוספרה ולהגברת "אפקט החממה". כיום ברור כי רמת הפחמן דו חמצני (CO_2) גבוהה מבעבר וממשיכה לעלות אקספוננציאלית. תצפיות מעידות כי שינויי אקלים אזוריים, בעיקר עלייה בטמפרטורה, הם בעלי השפעה ניכרת על מערכות טבעיות מקומיות (IPCC, 2007). עקב פיתוח מערכות חיזוי מדויקות יש בידנו מידע לגבי ההשלכות של שינויי אקלים על מערכות ביולוגיות שונות (Harvell *et al.*, 2002). בעוד המחקר והידע לגבי שינויי אקלים ברמה גלובלית הינו נרחב, עדיין חסר ידע לגבי השלכות שינויי אקלים על יחסי פתוגן צמח במערכות מקומיות (Coakley, 1999).

בכדי להבין את השפעת שינויי אקלים על מחלות צמחים יש לשלב ידע המופק ממערכות חיזוי מחלה המבוססות על מזג אוויר יחד עם ידע ממודלים חדשים לשינויי אקלים (Evans *et al.*, 2008). שינויי אקלים כגון עלייה בטמפרטורה, ירידה בלחות היחסית, ושינוי בכמות ופיזור המשקעים יכולים להשפיע באופן ישיר על הפתוגן או על הווקטור בכמה דרכים עיקריות: **1)** שינוי בתפוצה הגיאוגרפית- בעקבות שינויי אקלים- אזורים אשר בהם שררו תנאים שאינם מאפשרים את התפתחות הפתוגן הופכים להיות מיטביים להתפתחות הפתוגן. לדוגמא נמצא כי עליית טמפרטורת מינימום בחורף תגרום לעלייה בחומרה ובתפוצה של *Phytophthora* בעצי אלון בצרפת (Begot *et al.*, 2004). שינויי טמפרטורת מינימום בחורף מ- (-10) ל- (-6) מ"צ תגדיל את ההישרדות של מיני חלדונות מסוימים (Pfender and Vollmer, 1999). שינויי אקלים יכולים לגרום גם לשינויי בתפוצה הגיאוגרפית של וקטורים שונים כמו במיקרוה של מחלת ה- dieback בעצי אלון ביפן המופצת על ידי חיפושית ממין *Platpus quercivorus* (Kamata *et al.*, 2002). **2)** שינוי במועד ומשך הופעת המחלה- עקב שינויי אקלים תיתכן הקדמת ההופעה של מחלה או הימשכות שלה במשך יותר זמן מהמקובל כיום. לדוגמא הקדמת השלב האביבי, ב-80 יום של מחלת ה- Phoma stem canker בקנולה באנגליה בהשוואה בין שנים עברו (1960-1990) לשנים עתידיות (2020-2050) עקב שינויי טמפרטורה ומשקעים (Evans *et al.*, 2008). **3)** זירוז שלבים במחזור החיים וקצב ההתפתחות של הפתוגן והגברת הווירולנטיות- עבור מרבית הפתוגנים או הוקטורים, טמפרטורה הינה גורם מגביל בהתפתחות. עליית טמפרטורה יכולה להביא לזירוז במחזור החיים. לדוגמא, קצב נביטת נבגים של חלדונות עולה עם העלייה בטמפרטורה (Tapsoba and Wilson, 1997). שינויי אקלים יכולים להביא גם להקטנת הגורמים הנ"ל (Coakley, 1999), כמו במיקרוה של עלייה ברמת ה- CO_2 וההשפעה על קימחון השעורה (Hibberd *et al.*, 1995). לשינויי אקלים תתכן גם השפעה עקיפה על תחלואה בעקבות השפעה על רגישות הצמח הפונדקאי או המיקרופלורה הטבעית שעל גביו. שינויי אקלים יכולים לגרום לשינוי במבנה הצמח. הגדלת מספר העלים, שטחם ועוביים תביא לעלייה בלחות היחסית על פני העלה וכך יעלה הסיכוי להדבקות במחלות הדורשות תנאי לחות גבוהה (Garrett *et al.*, 2006). עלייה ברמת ה- CO_2

גורמת לירידה במשך הזמן בו הפיוניות פתוחות ולכן תקטין את האפשרות להידבקות במחלות החודרות בדרך זו (McElron *et al*., 2005). בנוסף, לעלייה ברמת ה- CO_2 והאוזון יכולה להיות השפעה על עמידות הצמח בפני מחלות שונות (Plessl *et al*., 2005).

מאחר ומערכת יחסיי הגומלין בין הצמח לפתוגן ולמיקרואורגניזמים על פני העלה מושפעת מגורמי מיקרואקלים, נוצר הצורך לאפיין את השפעת שינויי מיקרואקלים צפויים על מערכת זו, וזאת במסגרת חקר השפעת שינויי אקלים על מחלות צמחים. המטרה הספציפית של עבודה זו הייתה לאפיין השפעת גורמי מיקרואקלים על יחסיי הגומלין בין צמח העגבנייה, מחלת הקימחון- הנגרמת ע"י הפטרייה *Oidium neolycopersici* ומיקרואורגניזמים מדבירים ביולוגים של המחלה.

חומרים ושיטות

1. שיטות עבודה כלליות

1.1 גידול צמחי עגבנייה

צמחי עגבנייה מהזנים 1125, 1912, 3371 (הזרע ג'נטיקס, חוות ברורים, שקמים), בעלי 3-5 עלים אמיתיים מפותחים, הובאו ממשתלת חישתיל (אשקלון) כ 40-50 יום לאחר זריעה. השתילים נשתלו בעציצים בעלי קוטר 12 ס"מ בנפח של כ-1 ליטר, במצע גידול של טוף (עד 8 מ"מ):כבול ביחס 7:3, בהתאמה. הצמחים הושקו מידי 1-2 ימים, בהתאם לצורך בטפטפות 4 ליטר/שעה למשך 10 דקות, כך שנתקבל 25-50% נקז. הצמחים דושנו במי ההשקיה בדשן NPK 5:3:8. ריכוז הדשן במי ההשקיה היה 150, 30, 120 מ"ג/ליטר (NPK), (EC 2.2 ds/m). השתילים גודלו בחממה נקייה ממחלות וממזיקים, בטמפרטורת יום 22-30 מ"צ וטמפרטורת לילה 15-18 מ"צ.

1.2 הדבקה והערכת נגיעות בקימחון

העבודה נערכה עם הפטרייה *Oidium neolycopersici*, הגורמת למחלת קימחון העגבנייה. התבדיד הראשוני התקבל מהדבקה טבעית באזור הבשור ונשמר על צמחים חיים במשך כל תקופת העבודה. אילוח הצמחים בכל ניסוי התבצע בשיטת האילוח הרטוב- ריסוס בתרחיף נבגים. תרחיף הנבגים נוצר ע"י טבילת עלי עגבנייה נגועים בקימחון 15-25 ימים מאילוח, במי ברז (Huang *et al.*, 2000; Whipps *et al.*, 2000). לאחר ספירת ריכוז הנבגים בהמוציטומטר, נמהל תרחיף הנבגים לריכוז 5×10^4 נבגים למ"ל. האילוח התבצע בתוך 10 דקות מהכנת התרחיף על ידי ריסוס באמצעות מרסס יד, בגודל טיפות קטן ובנפח של כ-5-10 מ"ל לצמח, בהתאם לגיל הצמח. כל הריסוסים בוצעו על עלים יבשים והצמחים הושארו בחדר אילוח עם חלונות פתוחים כדי לאפשר ייבוש מהיר של התרסיס. הריסוס בוצע בגובה של כמטר מעל הצמחים תוך תנועה, במטרה להשיג אילוח אחיד ככל הניתן של הצמחים (Nicot *et al.*, 2002).

הערכת חומרת הנגיעות של הצמחים המאולחים בוצעה בצורה חזותית, בשלושה עלים (תחתון, אמצעי ועליון) המייצגים את כלל הצמח. מדד חומרת המחלה מבטא באחוזים את שטח העלים המכוסה בסימני המחלה (Horsfall and Barrat, 1945). הסימן הבולט של הקימחון הוא כסוי הלבן - אפרפר על פני עלי הצמח הנגוע, שמופיע לעתים גם על פני החלק התחתון של העלה. בניסויים שנערכו בחדרי גידול הוערכה חומרת המחלה כל 2-3 ימים. בניסויים שנערכו בבית רשת הוערכה חומרת המחלה אחת לשבוע. בחלק מהניסויים ערכי הנגיעות במועדים שונים במהלך הניסוי שימשו לחישוב ערכי השטח שמתחת לעקומת התפתחות המחלה (AUDPC - Area Under the Disease Progress Curve) , מדד המבטא את חומרת המחלה במהלך הניסוי. לפי

הנוסחה:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{D_{i+1} + D_i}{2}\right] x[T_{i+1} - T_i]$$

D_i - חומרת המחלה ביום הראשון

T_i -המועד הראשון בו נצפתה המחלה

1.3 גידול מיקרואורגניזמים

מספר מיקרואורגניזמים (חיידקים ושמרים) שבניסויים מקדימים שבוצעו במעבדתו של פרופ' יגאל אלעד נמצא שיש להם פעילות ביולוגית כנגד מיקרואורגניזמים מחוללי מחלות (להלן "המדבירים הביולוגיים"). מיקרואורגניזמים אלה בודדו משטח פני צמחים ונשמרו במעבדה, אולם טרם נשלמה הגדרתם וזיהויים, ולכן ניתנו להם שמות זמניים. המדבירים הביולוגים שנבדקו בעבודה זו הם חיידק B52 . *Pseudomonas* sp ושמר Y13 *Rhodotorula* sp. המדבירים נשמרו על מצעים מוצקים, כפי שיפורט להלן, ב-5 מ"צ. לקראת כל ניסוי הם הועברו וגודלו במצע נוזלי.

החיידק B52 גודל ונשמר על מצע נוטריינט שהכיל 23 ג'/ליטר Nutrient Agar (Difco, MI, USA) ו- 0.01 ג'/ליטר Benomyl (DuPont, Delaware, USA) (0.5% חומר פעיל במצע). השמר Y13 גודל ונשמר במצע PDA שהכיל 39 ג'/ליטר של Potato Dextrose Agar (Difco) ו-0.25 ג'/ליטר .Sigma, St) Louis, USA) Chloramphenicol. גידול השמרים והחיידקים התבצע במצע נוזלי YMDB/ NB, בהתאמה בטלטול במשך 48 שעות, בטמפרטורה קבועה של 25 מ"צ. מצע YMDB הכיל 3 ג'/ליטר של Bacto Yeast extract (Difco), 3 ג'/ליטר Malt extract (Difco), 5 גר'/ליטר Bacto Peptone (Difco), ו-10 ג'/ליטר גלוקוז. מצע NB הכיל 8 ג'/ליטר Nutrient Broth (Difco). המיקרואורגניזמים טולטלו בתמיסת YMDB/ NB בנפח 100 מ"ל בבקבוקי ארלנמאייר של 250 מ"ל, והטלטול בוצע בקצב של 130 סל"ד במטלטל Minitron Infors (Bottmingen, Switzerland) בתום הגידול הופרדו התאים מהתרחיף ע"י סרכוז בצנטריפוגה Sorvall Super T21 (Waltham, MA, USA) במשך 30 דקות וב- 8,000 סל"ד בטמפרטורה של 4 מ"צ. בניסויים בהם גודלו המיקרואורגניזמים במצע מינימאלי הם טולטלו במשך 48 שעות במצע מינימאלי המכיל: 10.5 ג'/ליטר K_2HPO_4, 4.5 ג'/ליטר KH_2PO_4, 1 ג'/ליטר $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 ג'/ליטר $C_6H_5Na_3O_7 * 2H_2O$ ו-1 מ"ל/ליטר של תמיסת $MgSO_4$ בריכוז 0.1 M (Hendricks, 1972).

1.4 ריסוס המדבירים הביולוגים על צמחים

תרחיף המיקרואורגניזמים לריסוסים הוכן במים מזוקקים וריכוזם נבדק באמצעות קריאת עכירות (O.D.) בפוטוספקטרומטר Spectronic Genesys 5 (Waltham, MA, USA). לצורך קביעת ריכוזם הוכנו עקומי סטנדרט של יחידות ריבוי (CFU) כפונקציה של עכירות וזאת על ידי מיהולים עשרוניים של תרחיפי מיקרואורגניזמים וזריעה על מצעים מוצקים. נקבע כי התרחיפים לניסויים יוכנו לפי קריאת עכירות אופטית של 0.6-0.65 באורך גל של 650 ננומטר לשמר, המקביל לריכוז של 5×10^6 תאים למ"ל ובעכירות אופטית של 0.6-0.65 באורך גל של 450 ננומטר לחיידקים, המקביל לריכוז של 5×10^8 תאים למ"ל. לתרסיס הוסף המשטח Tween 80 (Sigma) בריכוז 0.01%. הריסוסים בוצעו באמצעות מרססי יד בנפח של ליטר ובגודל טיפות קטן, כדי לאפשר ייבוש מהיר של התרסיס. נפח התרסיס היה בהתאם לגודל הצמח (5-10 מ"ל לצמח).

1.5 בדיקת רמת אוכלוסיית המיקרואורגניזמים

לצורך בדיקת רמת האוכלוסייה של כל אחד מהמיקרואורגניזמים נדגמו 3 עלעלים מ-3 עלים שונים בכל צמח, משלושה צמחים שונים. העלעלים הוכנסו למבחנות פלקון (Corning, MI, USA) בנפח 50 מ"ל עם 20 מ"ל מים סטרילים המכילים משטח Tween 80 (Sigma) בריכוז 0.01%. המבחנות טולטלו למשך 30 דקות ולאחר מכן נערכו מיהולים עשרוניים מכל מבחנה. מכל מיהול נזרעו 3 טיפות בנפח 10 מיקרוליטר על מצע מוצק מתאים. הצלחות הועברו להדגרה ב-25 מ"צ. מספר יחידות ריבוי (Colony Forming Unit, CFU) נספר לאחר 24 שעות בתרביות החיידק ו- 48 שעות בתרביות השמר. גודל האוכלוסייה לס"מ עלה (Y) חושב לפי הנוסחה:

$$Y_{CFU/cm^2\ leaf} = Y_{CFU/drop} \times 10^{-n} \times 100_{10\ \mu l/ml} \times 20_{ml/falcon} \times (1/LA_{(cm)})$$

n - פקטור המיהול

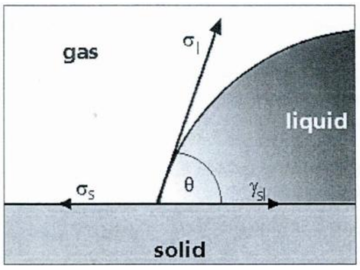
LA (cm) - השטח של 3 עלעלים (משני צידי העלעל) בס"מ

האוכלוסיות ההתחלתיות של כל מיקרואורגניזם בטיפולים השונים היו שונות למרות הריסוס בתרחיף זהה. על מנת להשוות את רמת האוכלוסייה בזמנים שונים חושב גודל האוכלוסייה בכל מועד דגימה כאחוז מהכמות הראשונית (מיד לאחר הריסוס) של אותה אוכלוסייה, לאחר המרה לוגרתמית. בדרך זו ניתן היה להשוות את רמת האוכלוסייה בטיפולים שונים.

2. אפיון יחסיי הגומלין בין הצמח הפונדקאי- הפתוגן- והמדביר הביולוגי

2.1 מדידת זווית המגע בין תמיסת הריסוס לבין העלה

זווית המגע בין תמיסת הריסוס לבין העלה בנוכחות קימחון העגבנייה וללא סימניי מחלה נמדדה באמצעות מכשיר אופטי למדידת זווית המגע Drop Shape Analysis, DSA1, v1.91 (Kruss, Hamburg, Germany). טיפות בגודל 10 מיקרון, מתמיסות שונות המכילות מים, מים עם המשטח Tween 80 (Fluka) בריכוז 0.01%, ומים עם משטח והמדבירים הביולוגים כל אחד בנפרד, טופטפו על עלים מצמחים בריאים ועל צמחים עם סימנים של המחלה. לכל טיפול בוצעו 4 חזרות. זווית המגע נמדדה במשך 30 שניות, וחושבה לפי נוסחת יאנג: $\sigma_s = \gamma_{sl} + \sigma_l * cos\theta$ (Cheng *et al.*, 2006)



איור 1: זווית המגע הנוצרת בין נוזל למשטח מוצק על פי יאנג. S ו- l מציינים את הפאזה המוצקה והנוזלית בהתאמה; σ_l, σ_s - מתארים את מתח הפנים של שני הפאזות בנפרד; γ_{sl} - מתאר את מתח הפנים בין שני הפאזות; θ – מתאר את זווית המגע בין שני הוקטורים σ_l, σ_s

2.2 תצפיות במיקרוסקופ אלקטרונים סורק (Scanning Electron Microscope S.E.M)

דסקיות עלים בקוטר 1.0-0.5 ס"מ נלקחו מצמחי עגבנייה עם סמני מחלה וללא סימני מחלה כ- 24 שעות לאחר ריסוס במדבירים הביולוגים. הדוגמאות עברו קיבוע בגלוטראלדהיד 2.5-5% (Sigma) בבופר פוספט 0.1 M pH 7.2 למשך לילה ב- 4 מ"צ. נערכו 5 שטיפות בבופר פוספט 0.1 M ודהידרציה הדרגתית באתנול (25, 50, 75, 95%) למשך 20 דקות בכל ריכוז, ושעה באתנול 100%. הדוגמאות יובשו באווירת CO_2 ב- Critical Point Dryer C.P.D 030 (BAL-TEC, Schalksmühle, Germany) וקובעו על בסיסים ממתכת (סטבים). הדוגמאות צופו בשכבת זהב בעובי .2 Ang, ע"י 5150 sputter (Polaron, Watford, England). ההסתכלות נעשתה במיקרוסקופ אלקטרונים סורק (S.E.M.) מדגם JSM-5410 (Jeol, Tokyo, Japan).

2.3 השפעת הפרשות עלים עם וללא קימחון על גדילת המדביר הביולוגי חיידק B52

נדגמו 3 עלעלים משלושה צמחים שונים בטיפולי צמחים בריאים ללא סימפטומים ומצמחים עם סימני מחלה, בעלים מפותחים מהמפרקים 9-11. העלעלים הושמו במבחנות פלקון עם 20 מ"ל תמיסת אתנול 70% שהוכנה ע"י מיהול אתנול 100% במים מזוקקים פעמיים. הדגימות טולטלו למשך 20 דקות במטלטלת ב-130 סל"ד ב- 25 מ"צ. נוזל הדגימה זוקק ורוכז על ידי נידוף בחנקן עד לקבלת 4-5 מ"ל נוזל ללא אתנול. נוזל המיצוי הועבר לארלנמייר עם 50 מ"ל מצע גידול מינימאלי (סעיף 3.1.). לכל תמיסה הוספו 50 מיקרוליטר של תרחיף החיידק B52, בריכוז של 5×10^8 תאים למ"ל. בנוסף הוכן תרחיף ביקורת שהכיל מצע מינימאלי וחיידק ללא מיצוי תשטיף עלים. התרחיפים הודגרו בטלטול במשך 24 שעות, בטמפרטורה של 25 מ"צ, בקצב של 130 סל"ד. הוכן עקום המתאר את גדילת החיידק, לאורך זמן, בתמיסות תשטיפי העלים ובביקורת. מדידת גודל האוכלוסייה, בפרקי זמן קצובים, נערכה על ידי זריעת דגימות על מצעי מזון מוצקים. גודל האוכלוסייה (CFU למ"ל תמיסה) חושב על פי הנוסחה:

$Y_{CFU/ml} = Y_{CFU/drop} \text{ x } 10^{-n} \text{ x } 100_{10\mu l/ml}$; n - פקטור המיהול ; לכל טיפול נערכו 3 חזרות.

2.4 השפעת גיל העלה בצמח על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים

צמחי עגבנייה גודלו בחממה נקייה ממחלות וממזיקים, בטמפרטורת יום 25-35 מ"צ וטמפרטורת לילה 18-22 מ"צ, למשך חודשיים עד לקבלת צמחים בוגרים (20-21 פרקים). הצמחים רוססו במדבירים הביולוגים. רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נמדדה בשלושה גבהים בצמח, תחתון (עלים 1-2), אמצעי (עלים 8-9) ועליון (עלים 18-19). רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נמדדה בזמן 0 (מייד בתום הריסוס), 1, 3, ו- 7 ימים לאחר הריסוס, ונקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית. לכל טיפול נערכו 3 חזרות.

2.5 השפעת שילוב מדבירים בתרחיף הריסוס על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים

צמחי עגבנייה (9-11 עלים), ללא סימני מחלה רוססו בתרחיפי מדבירים שונים: החיידק בלבד, השמר בלבד, תרחיף הכולל ריכוזים מלאים של החיידק והשמר ביחס 1:1, שילוב המדבירים בתרחיף מהול פי שניים וביקורת מים. הצמחים הועברו לשני חדרי גידול בהם שררה טמפרטורה של 25±1 מ"צ, 12 שעות אור ולחות יחסית של 70-75%. רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נמדדה בזמן 0 (מייד בתום הריסוס), 1, 3, ו- 5 ימים לאחר הריסוס, ונקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית. לכל טיפול נערכו 3 חזרות.

2.6 השפעת שילוב מדבירים בתרחיף הריסוס על התפתחות מחלת הקימחון

צמחי עגבנייה (9-11 עלים), ללא סימני מחלה רוססו בתרחיפי מדבירים שונים: החיידק בלבד, השמר בלבד, תרחיף הכולל גם את החיידק, וגם את השמר ביחס 1:1, שילוב המדבירים בתרחיף מהול פי שניים וביקורת מים. לאחר שהעלים התייבשו, טופלו הצמחים בתמיסת אילוח. הצמחים רוססו בתמיסות המדבירים השונות לאחר 16 יום שוב. הצמחים הודגרו בחדר גידול בטמפרטורה של 1±22 מ"צ, משטר תאורה של 16 שעות אור בעוצמה 5150 לוקס ולחות יחסית 70-75%. חומרת המחלה בטיפולים השונים הוערכה על ידי הערכת אחוז כיסוי העלים בסמפטומים בשלושה גבהים: תחתון, אמצעי ועליון. ההבדלים בחומרת המחלה, נבדקו גם על ידי השוואת השטחים שמתחת לעקומת התפתחות מחלה (AUDPC). לכל טיפול נערכו 4 חזרות.

היתרון בשילוב שני המדבירים בתרחיף לעומת כל אחד מן המדבירים בנפרד הוערך בניסוי זה. כאשר נעשה שימוש בשני מדבירים ההשפעה על הפתוגן יכולה להיות אנטגוניסטית, אדטיבית, או סינרגיסטית. השפעה אנטגוניסטית משמעותה היא שיעילות שילוב המדבירים בתרחיף נמוכה מסכום יעילותם של כל אחד מן המדבירים בנפרד. השפעה אדטיבית משמעותה שיעילות שילוב המדבירים זהה לסכום יעילותם של כל אחד מן המדבירים בנפרד. השפעה סינרגיסטית משמעותה היא שיעילות שילוב המדבירים בתרחיף גבוהה מסכום יעילותם של כל אחד מן המדבירים בנפרד (Guetsky, 2002). חומרת המחלה הצפויה חושבה לפי נוסחת אבוט (Abbott):

$E_{(exp)} = (a + b) - (ab/100)$ $\qquad$ $SF = E_{(obs)}/E_{(exp)}$

a- יעילות ההדברה ע"י השמר בלבד $\qquad$ b- יעילות ההדברה ע"י החיידק בלבד

$E_{(exp)}$- יעילות ההדברה הצפויה ע"י שילוב המדבירים בתרחיף

$E_{(obs)}$- יעלות ההדברה ע"י שילוב המדבירים בתרחיף, שהתקבלה בניסוי

SF הוא הגורם הסינרגי. כאשר SF=1 השפעת השילוב היא אדטיבית. כאשר SF>1 השפעת השילוב היא סינרגיסטית. כאשר SF<1 השפעת השילוב היא אנטגוניסטית.

3. השפעת גורמי מיקרואקלים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים

3.1 ניסויים באנקובטורים

3.1.1 <u>השפעת הטמפרטורה, הלחות היחסית ונוכחות המחלה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים</u>

צמחי עגבנייה מהזנים 1125, 1912, בעלי 3-5 עלים אמיתיים אולחו אילוח רטוב בפתוגן ונשמרו בחדר גידול בטמפרטורה של 1±22 מ"צ, משטר תאורה של 16 שעות אור בעוצמה 5150 לוקס ולחות יחסית 70-75% עד להופעת סימפטומים של המחלה. צמחים לא מאולחים מאותו גיל וזן נשמרו בתנאים דומים. מרגע הופעת הסימפטומים בצמחים המאולחים, רוססו כל הצמחים (עם וללא סימני מחלה) במדבירים הביולוגים השונים, ובביקורת מים והועברו לאנקובטורים בטמפרטורות שונות (10, 15, 20, 25, 30, 35 מ"צ) למשך שבוע בעוצמת אור של 2500 לוקס. הצמחים הונחו בתבניות פלסטיק והושקו לפי הצורך. תמיסת ההשקייה הייתה תמיסת 0.1 הוגלנד שנמהלה מתמיסת הוגלנד מרוכזת, שהכילה את המרכיבים הבאים: KNO_3, $Ca(NO_3)_2$, KH_2PO_4, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, בריכוז 1M. בנוסף: H_3BO_3 (70 mM), $MnCl_2$ (14mM), $CuCl_2$ (0.5 mM), $ZnSO_4$ (1 mM), $NaMoO_4$ (0.2 mM), NaCl (10 mM), $CoCl_2$ (0.01 mM),

FeEDTA (20 mM). שתי רמות לחות יחסית הושגו על ידי כיסוי הצמחים בפוליאתילן (85-95%) וללא כיסוי (65-75%). רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נמדדה בזמן 0 (מייד בתום הריסוס), 1, 3, ו- 7 ימים לאחר הריסוס, ונקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית. לכל טיפול נערכו 3 חזרות.

3.2 ניסויים בחדרי צמיחה

3.2.1 השפעת הטמפרטורה ונוכחות המחלה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים

לצורך הניסויים שנערכו בחדרי צמיחה, הצמחים גודלו בחממה עד לגודל של 9-11 עלים אמיתיים (50 – 80 ס״מ), לאחר מכן אולחו הצמחים באילוח רטוב של קימחון העגבנייה, והועברו לחדר גידול נפרד של 22±1 מ״צ, משטר תאורה של 16 שעות אור בעוצמה 5150 לוקס ולחות יחסית 70-75% עד להופעת סימפטומים של המחלה. צמחים לא מאולחים מאותו גיל וזן נשמרו בתנאים דומים. מרגע הופעת הסימפטומים בצמחים המאולחים, רוססו כל הצמחים (עם וללא סימני מחלה) במדבירים הביולוגים השונים, ובביקורת מים והועברו לחדרי צמיחה בטמפרטורות שונות (15, 20, 30, 35 מ״צ) למשך שבוע בעוצמת אור של 2500 לוקס. הצמחים הונחו בתבניות פלסטיק והושקו ודושנו לפי הצורך. רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נמדדה בזמן 0 (מייד בתום הריסוס), 1, 3, ו- 7 ימים לאחר הריסוס. לכל טיפול נערכו 3 חזרות.

על מנת לבדוק את הישרדות המדבירים הביולוגים בטווח זמן ארוך יותר משבוע לאחר הריסוס, נדגמה רמת האוכלוסייה על הצמחים שהיו בחדרי צמיחה בטמפרטורה של 15 ו- 20 מ״צ גם לאחר 10 ו- 14 יום. הישרדות המדבירים נקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית.

3.3 ניסויים בתנאי שדה

3.3.1 השפעת הלחות היחסית ונוכחות המחלה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים על צמחים

צמחי עגבנייה בוגרים (180-200 ס״מ), שתולים בדליים בנפח 10 ליטר, במצע גידול של טוף:כבול ביחס 3:7, בהתאמה, גודלו בבית רשת (50 מאש נגד חרקים). בבית הרשת נקבעו שני משטרי אקלים (רמות לחות יחסית) ושתי רמות תחלואה בקימחון העגבנייה. לצורך קבלת לחות גבוהה הופעלה מערכת הרטבה על גבי יריעות רשת בגודל 3 × 2 מ׳, שמוקמו בצידיו הפנימיים של המבנה ובין שורות הצמחים. על הרשתות הותזו מים למשך 30 שניות כל 5 דקות במהלך היום (8:00 בבוקר עד 18:00 בערב). בנוסף התבצע איגום מים במיכלי פלסטיק בגודל 36 × 56 ס״מ, על רצפת המבנה. משטר הלחות היחסית הנמוכה נתקבל ללא תוספת הלחות והגדלת המרווח בין הצמחים. בכל טיפול אקלים נמדדה הלחות היחסית והטמפרטורה על ידי שני אוגרי נתונים ממוחשבים Hobo H8 (Onset Computer Corp., Pocasset, MA) שהוצבו בגובה הצמחים (150 ס״מ מהרצפה).

שתי רמות קימחון העגבנייה הושגו על יד אילוח בתרחיף נבגים של מחצית מהצמחים בבית הרשת. האילוח התבצע כשבועיים לאחר השתילה. הצמחים רוססו אחת לשבוע בכל אחד מהמדבירים, ובמים (ביקורת). הישרדות המדבירים הביולוגים נבדקה בכל שבוע במשך תקופת הניסוי (8 שבועות), על ידי מדידת רמת האוכלוסייה בזמן 0 (מייד בתום הריסוס), 1, 3, ו- 7 ימים לאחר הריסוס. לכל טיפול נערכו 3 חזרות. הישרדות המדבירים נקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית. הניסוי בוצע פעמיים.

על מנת לבדוק את השפעת הטיפולים השונים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים בטווח זמן ארוך משבוע לאחר הריסוס, נדגמה רמת האוכלוסייה מצמחים עם וללא סימני מחלה, אשר היו בתנאי האקלים השונים לאחר יישום בודד ומעקב אחר גודל האוכלוסייה 0, 1, 3, 7, 10, 14 ו- 16 יום לאחר

הריסוס. לכל טיפול נערכו 3 חזרות. רמת האוכלוסייה נקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית. הניסוי בוצע פעמיים.

3.3.2 <u>השפעת עקת יובש על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים</u>

צמחי עגבנייה, שתולים בעציצים בנפח 0.5 ליטר, גודלו בחממה נקייה ממחלות וממזיקים, בטמפרטורת יום 25-35 מ״צ וטמפרטורת לילה 18-22 מ״צ, למשך חודש עד גובה 50-80 ס״מ. הצמחים הועברו לחממה בה נקבעו 3 משטרי השקיה: מנה אחת של 133 מ״ל לעציץ, פעם אחת ביום בשעות הבוקר, מנה אחת של 266 מ״ל, פעם אחת ביום בשעות הבוקר ושתי מנות של 266 מ״ל, אחת בשעות הבוקר ואחת בשעות אחה״צ. על מנת לבטל השפעה של ריכוזי דשן שונים בגלל משך השקייה שונה, בכל טיפולי ההשקיה לא ניתן דשן. הצמחים הושארו בחממה למשך שבוע לאקלום למשטרי ההשקיה. לאחר שבוע רוססו הצמחים במדבירים הביולוגים ובביקורת מים. רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נמדדה בזמן 0 (מייד בתום הריסוס), 1, 3, ו- 7 ימים לאחר הריסוס, ונקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית. לכל טיפול נערכו 3 חזרות.

4. השפעת גורמי אקלים ויישום מדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה

צמחי עגבנייה בוגרים (19-21 עלים) גודלו בבית רשת בתנאי אקלים שונים ושתי רמות קימחון כמתואר בסעיף 3.3. הצמחים רוססו אחת לשבוע, בכל אחד מהמדבירים הביולוגים, ובביקורת מים, החל מ- 19 יום לאחר האילוח, למשך 8 שבועות. חומרת המחלה, בטיפולים השונים, הוערכה אחת לשבוע, במשך 81 יום, על ידי הערכת אחוז הנגיעות בשלושה גבהים: תחתון, אמצעי ועליון. ההבדלים בחומרת המחלה, נבדקו גם על ידי השוואת השטחים שמתחת לעקומת התפתחות מחלה (AUDPC). לכל טיפול נערכו 10 חזרות.

5. ניתוחים סטטיסטים

הנתונים שנאספו בניסויים נותחו בעזרת התוכנות JMP 6 ו-Excel 2003 על פי מתכונת הניסויים. הניתוחים הסטטיסטיים בוצעו ברמת מובהקות של $P\leq0.05$, וכללו ניתוחי שונות (ANOVA) עם משתנה בודד, שניים ושלושה משתנים. מובהקות ההבדלים בין הטיפולים והאינטראקציה בינם בכל ניסוי נקבעה באמצעות מבחן תחום מרובה לפי שיטת Tukey-Kramer. הערך הנמוך ביותר המובהק (LSD), נבדק גם הוא לפי מבחן Tukey-Kramer ברמת מובהקות $P\leq0.05$. ההסברים לגבי המשתנים שנבחנו בניתוח הסטטיסטי שבוצע מפורטים בפרק התוצאות בכל ניסוי. בניסויים בהם נבדקה גדילת המדבירים בתמיסות עלים שונות, נעשתה עקומת גידול בעזרת תוכנת Sigma Plot . עקומת גידול שחושבה על ידי תוכנה זו חושבה לפי הנוסחה הבאה:

$$Y_{\log\left(\frac{CFU}{ml}\right)} = Y_0 + \frac{a}{1+e^{-\left(\frac{x-x_0}{b}\right)}}$$

$Y_{\log\left(\frac{CFU}{ml}\right)}$- גודל האוכלוסייה בזמן מסוים　　Y_0- גודל האוכלוסייה ההתחלתי

X- זמן　　x_0- נקודת הפיתול של העקום　　b- שיפוע המשיק בנקודת הפיתול

a- גודל האוכלוסייה המקסימאלי

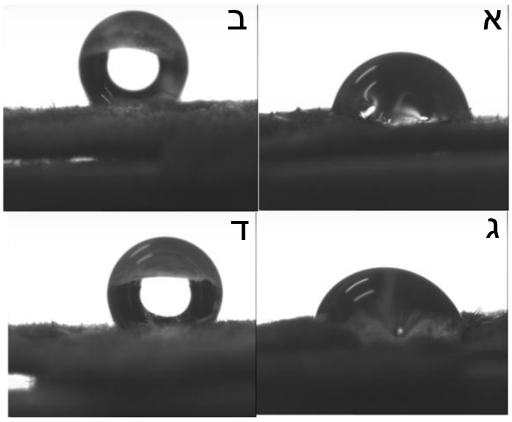
מקדמי המשוואה וערכי המובהקות מפורטים בפרק התוצאות.

תוצאות

1. אפיון יחסי הגומלין בין הצמח הפונדקאי, הפתוגן והמדביר הביולוגי

1.1 זווית המגע בין תמיסת הריסוס לבין העלה

על מנת לבדוק האם למדביר הביולוגי בתרחיף הריסוס ולנוכחות המחלה על פני העלה ישנה השפעה על זווית המגע בין הטיפה לעלה עגבנייה, טיפות בנפח 10 µl, מתמיסות שונות המכילות מים, מים עם המשטח Tween 80 ומים עם משטח והמדבירים הביולוגים טופטפו על עלים. זווית המגע בין תרחיפי הריסוס לבין העלה בנוכחות קימחון העגבנייה וללא סימניי מחלה נמדדה באמצעות מכשיר אופטי למדידת זווית המגע. בניתוח שונות דו גורמי נמצא כי ללא סימני מחלה (איור 2 א׳, ג׳, טבלה 1) ו/או בהוספת משטח (איור 2 ג׳, ד׳, טבלה 1) קטנה באופן מובהק זווית המגע בין הטיפה לעלה (טבלה 2). גם לנוכחות המדביר הביולוגי בתרחיף הריסוס ישנה השפעה על זווית המגע; בתרחיף שהכיל את החיידק B52 זווית המגע הייתה גבוהה יותר, באופן מובהק, מתמיסת ביקורת מים (טבלאות 1, 2).



איור 2 : השפעת נוכחות מחלה (ללא = א׳, ג׳, עם = ב׳, ד׳) ומשטח (ללא = א׳, ב׳, עם = ג׳, ד׳) על זווית המגע בין טיפה בנפח 10 µl לעלה העגבנייה.

טבלה 1 : השפעת נוכחות מחלה על העלה ותמיסת הריסוס על זווית המגע בין הטיפה לעלה עגבנייה. (שגיאת תקן± זווית המגע במעלות).

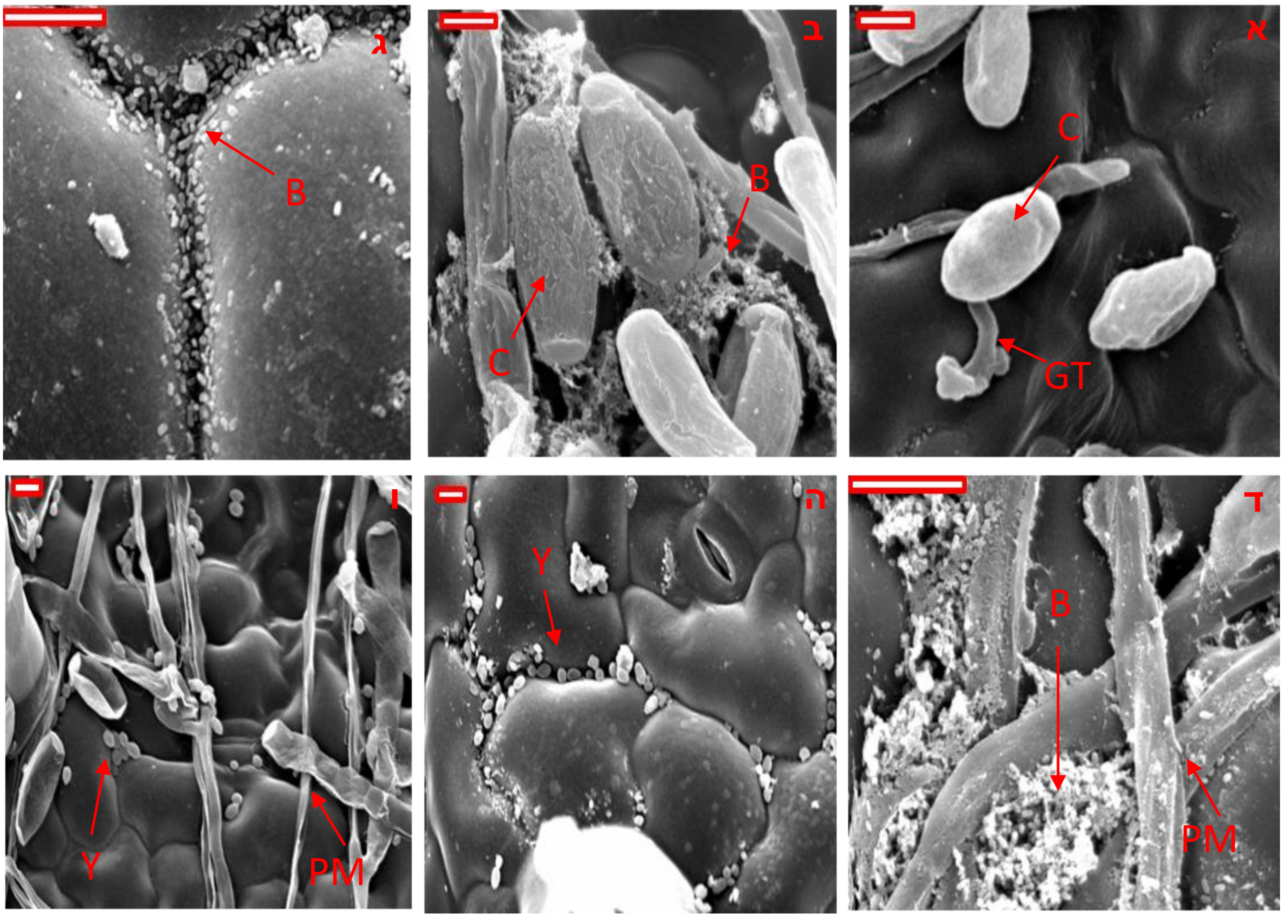
נוכחות מחלה	מדביר ביולוגי	משטח	זווית המגע (°)
ללא	מים	ללא	88.1±1.8
		עם	76.6±2.0
	שמר	עם	81.2±2.5
	חיידק	עם	82.1±3.7
עם	מים	ללא	123.1±3.1
		עם	115.2±3.8
	שמר	עם	114.2±4.0
	חיידק	עם	127.8±2.1

טבלה 2 : ערכי $P(F)$ מניתוח שונות דו גורמי של השפעת הרכב תמיסת הריסוס ונוכחות מחלה על העלה על זווית המגע בין הטיפה לעלה עגבנייה, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

טיפול	מחלה	משטח	מדביר	מחלה × משטח	מחלה × מדביר
Prob > F	**<0.0001**	**0.0099**	**0.0439**	0.9885	0.2487

1.2 תצפיות במיקרוסקופ אלקטרונים סורק (Scanning Electron Microscope, S.E.M)

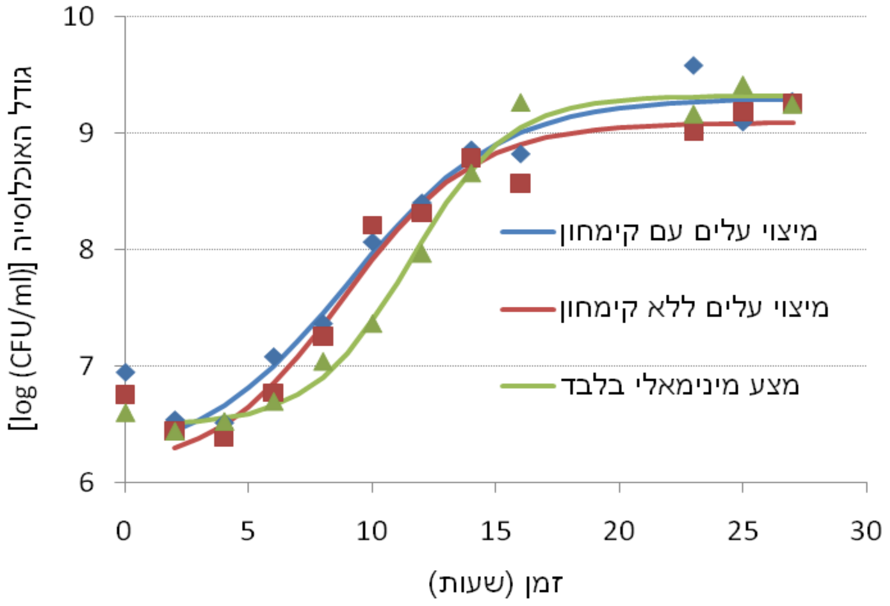
על מנת לאפיין יחסיי הגומלין בין הפטרייה למדבירים הביולוגים, ואת השפעת נוכחות התפטיר על הפיזור המרחבי של המדבירים הביולוגים על פני העלה, דסקיות עלים נלקחו מצמחי עגבנייה עם סמני מחלה וללא סימני מחלה כ- 24 שעות לאחר ריסוס במדבירים הביולוגים לצורך תצפית באמצעות מיקרוסקופ אלקטרונים סורק. ללא נוכחות המדבירים הביולוגים ניתן היה לראות נביטה של נבגים, והתפתחות נחשון נביטה (איור 3 א'). בנוכחות החיידק B52 לא נראתה נביטת נבגים (איור 3 ב'). בעלים ללא סימני מחלה נמצא פיזור של החיידק במקומות נמוכים בנקודות החיבור בין תאים (איור 3 ג'), לעומת זאת, בעלים עם סימני מחלה החיידק התרכז בנישות וגומחות הנוצרות על פני העלה על ידי התפטיר (איור 3 ד'). נראה כי לנוכחות תפטיר הפטרייה על פני העלה לא הייתה השפעה על פיזורו המרחבי של השמר Y13 על פני העלה, ובאופן כללי בדומה לחיידק, השמר התרכז מעל לנקודות החיבור בין תאים (איור 3 ה', ו').



איור 3: עלי עגבנייה עם (א', ב', ד', ו') וללא (ג', ה') קימחון העגבנייה (PM), הכולל נבגים (C) נחשון נביטה (GT), ותפטיר. 24 שעות לאחר ריסוס במדבירים ביולוגים: חיידק (B) *Pseudomonas* sp. B52 (ב', ג', ד'), ושמר (Y) *Rhodotorula* sp. Y13 (ה', ו'), או ללא מדבירים (א'). צילום במיקרוסקופ אלקטרונים סורק. ▭ = 10 מיקרון.

1.3 השפעת תשטיפי עלים על גדילת החיידק B52

מאחר שבתצפיות במיקרווסקופ אלקטרונים סורק (סעיף 1.2), ובמספר ניסויים שיתוארו להלן נמצא כי רמת אוכלוסיית החיידק B52 נשארה גבוהה יותר על גבי עלים עם סימני מחלת הקימחון, נערך ניסוי במבנה חד גורמי במטרה לבדוק האם נוכחות קימחון על העלה מביאה להפרשות שונות המשפיעות על גדילת החיידק. החיידק גודל, במשך 28 שעות, בתמיסות שונות שהכילו מיצוי עלים עם וללא סימני נגיעות ותמיסת ביקורת שהכילה מצע נוזלי מינימאלי בלבד (איור 4). בניתוח מובהקות קווי הרגרסיה, השטח מתחת עקום הגדילה וגודל האוכלוסייה הסופי, נמצא כי להפרשות העלים עם או ללא סימני קימחון לא הייתה השפעה מובהקת על גדילת החיידק (טבלה 3).



איור 4 : השפעת תשטיפי עלים שבמקורם היו נגועים בקימחון או לא נגועים על גדילת החיידק B52 *Pseudomonas* sp. במצע מינימאלי, במשך 28 שעות.

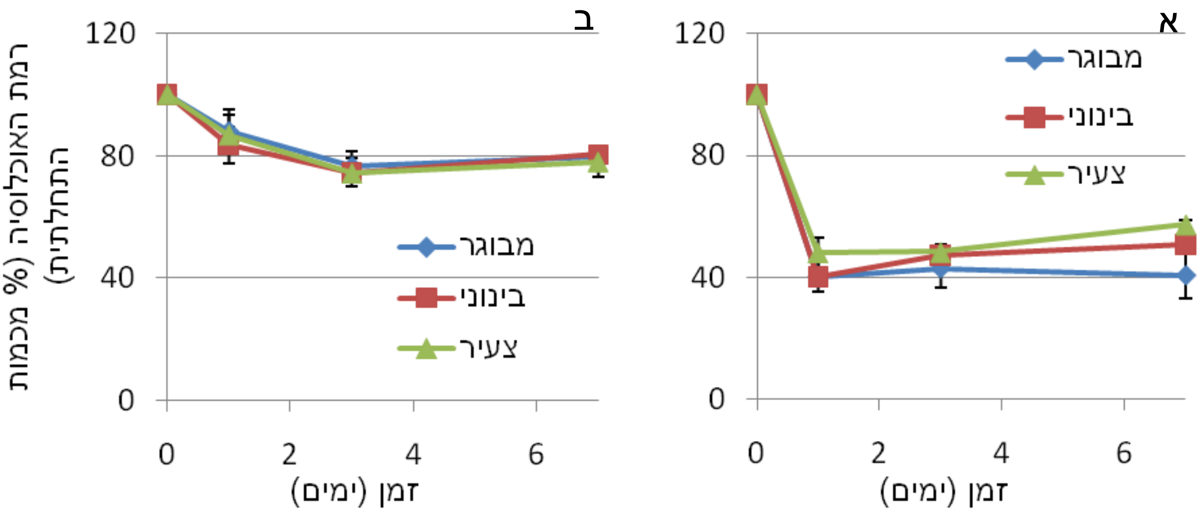
טבלה 3 : ניתוח מובהקות קווי הרגרסיה, גודל האוכלוסייה הסופי והשטח מתחת עקום הגדילה של החיידק B52 *Pseudomonas* sp. לאחר גידול בתמיסות המכילות תשטיפי עלים וביקורת.

טיפול (תשטיף)	מרכיבי משוואת הרגרסיה: a	b	x_0	y_0	*P* value	*R*		גודל האוכלוסייה הסופי [log(CFU/ml)]		ש"ית
עלה עם קימחון	3.13	3.04	9.12	6.17	**<0.0001**	0.98	a	9.27	a	222.9
עלה ללא קימחון	3.0	2.63	8.86	6.09	**<0.0001**	0.97	a	9.25	a	217.8
ביקורת מצע מינימאלי ללא תשטיף	2.83	1.99	11.53	6.49	**<0.0001**	0.99	a	9.25	a	219.1

ש"ית – השטח התחום מתחת לעקום הגדילה.
בכל טור, אותיות שונות מציינות טיפולים השונים זה מזה באופן מובהק ($P \leq 0.05$), על פי מבחן Tukey HSD.

1.4 השפעת גיל העלה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים

על מנת לבדוק האם לגיל העלה ישנה השפעה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נערך ניסוי במבנה חד גורמי בו יושמו כל אחד מהמדבירים הביולוגים על צמחים בוגרים (20-21 עלים). נבדקה רמת האוכלוסייה, בשלושה גבהים, במשך שבוע ימים אחרי הריסוס. רמת האוכלוסייה נקבעה כאחוז מהכמות ההתחלתית. נמצא הבדל מובהק בגודל אוכלוסיית שני המדבירים החל מ-24 שעות לאחר היישום ועד לשבוע לאחר מכן (טבלה 4). נרשמה ירידה משמעותית בגודל אוכלוסיית החיידק B52 כ-24 שעות לאחר הריסוס, עד לרמה של 40% מהכמות ההתחלתית בעלה בינוני או צעיר, לאחר מכן חלה התייצבות בגודל האוכלוסייה ורמתה נשארה קבועה גם לאחר שבוע (49% מהכמות ההתחלתית) (איור 5 א'). לא נמצאה השפעה מובהקת לגיל העלה על רמת אוכלוסיית החיידק במהלך שבוע ימים (טבלה 4). בניגוד לחיידק, רמת האוכלוסייה של השמר Y13 הייתה יציבה יותר במהלך תקופת הניסוי ורמתו נשארה גבוהה (80%) גם לאחר שבוע בעלים בגילאים השונים (איור 5 ב'). לא נמצאה השפעה מובהקת לגיל העלה על רמת אוכלוסיית השמר במהלך שבוע ימים (טבלה 4).



איור 5: השפעת גיל העלה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים: א'- *Pseudomonas* sp. B52, ב'- *Rhodotorula* sp. Y13, במשך שבוע ימים. הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

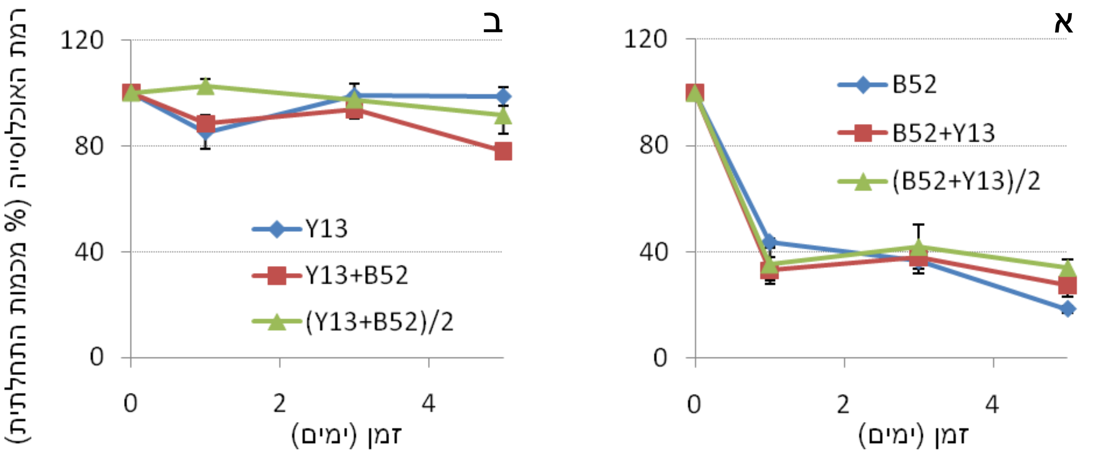
טבלה 4: ערכי $P(F)$ מניתוח שונות דו גורמי של השפעת סוג המדביר וגיל העלה על רמת האוכלוסייה המדבירים הביולוגים, במשך שבוע על צמחים בוגרים, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

טיפול / יום	1	3	7
מדביר ביולוגי	**<0.0001**	**<0.0001**	**<0.0001**
גיל העלה	0.5716	0.9269	0.0995
מדביר ביולוגי × גיל העלה	0.7154	0.6093	0.0501

1.5 השפעת שילוב מדבירים ביולוגים בתרחיף הריסוס על רמת אוכלוסייתם על גבי העלים

על מנת לבדוק את השפעת שילוב שני המדבירים הביולוגים בתרחיף הריסוס, על רמת האוכלוסייה של כל אחד מן המדבירים הביולוגים, נערך ניסוי במבנה חד גורמי בו יושמו תרחיפים המכילים את תערובת שני המדבירים ביחד, כל אחד מהם בנפרד ותרחיף מעורב מהול לחצי הריכוז (על מנת לשלול השפעה של ריכוז כללי של מיקרואורגניזמים בתערובת). התרחיפים יושמו על צמחים בינוניים (9-11 עלים). רמת האוכלוסייה של כל אחד מן המדבירים נבדקה במשך 5 ימים אחרי הריסוס.

נצפתה ירידה משמעותית בגודל אוכלוסיית החיידק B52 כ-24 שעות לאחר הריסוס עד לרמה מינימאלית של 35% בצמחים שרוססו בתרחיף שמר וחיידק יחד. לאחר 5 ימים רמת האוכלוסייה ירדה במעט. בצמחים שרוססו בתרחיף החיידק והשמר מהולים לחצי הריכוז הייתה רמת האוכלוסייה גבוהה (33.6%) מאשר בצמחים שרוססו בתרחיף החיידק בלבד (18.3%) (איור 6 א׳). בניגוד לחיידק, רמת אוכלוסיית השמר Y13 נשארה יציבה יותר 24 שעות בצמחים שרוססו בתרחיף השמר והחיידק יחדיו. רמת אוכלוסייה זו הייתה שונה מרמת האוכלוסייה בצמחים שרוססו בתרחיף השמר בלבד (98.6% מרמת האוכלוסייה ההתחלתית) (איור 6 ב׳).



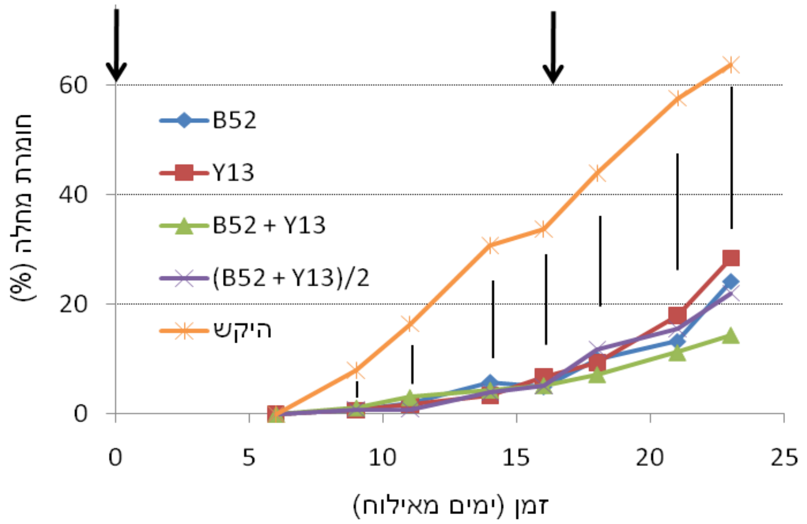
איור 6: השפעת שילוב המדבירים בתרחיף הריסוס על רמת האוכלוסייה של כל אחד מן המדבירים: חיידק *Pseudomonas* sp. B52 (א׳), ושמר *Rhodotorula* sp. Y13 (ב׳). יושמו תרחיפים המכילים את תערובת שני המדבירים, כל אחד מהם בנפרד ותרחיף מעורב מהול לחצי הריכוז על צמחים בגובה בינוני (9-11 עלים). הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

1.6 השפעת שילוב מדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה

על מנת לבדוק את השפעת שילוב שני המדבירים הביולוגים (החיידק B52, והשמר Y13), בתרחיף הריסוס, על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה בצמחים בגובה בינוני (9-11 עלים), נערך ניסוי במבנה חד גורמי. הצמחים רוססו בתרחיפי ריסוס המוזכרים בסעיף 5.1., ובביקורת מים. לאחר ישום המדבירים הביולוגים אולחו הצמחים בקימחון העגבנייה באילוח רטוב. הצמחים רוססו שוב בתרחיפי המדבירים הביולוגים לאחר 16 יום. חומרת המחלה, הוערכה במשך 23 יום. ההבדלים בחומרת המחלה, נבדקו גם על ידי השוואת השטחים שמתחת לעקומת התפתחות מחלה (AUDPC).

נמצא כי חומרת המחלה הופחתה באופן משמעותי על ידי כל אחד מטיפולי המדבירים הביולוגים, לעומת ריסוס בביקורת מים (איור 7). לא התקבל הבדל מובהק בין שילובי שני המדבירים בתרחיף לבין

תרחיף הכולל רק את אחד מן המדבירים במשך תקופת הניסוי (איור 7, טבלה 5). נבחן אם מתקבלת השפעה אדטיבית, סינרגטית או אנטגוניסטית עבור שילוב המדבירים לעומת כל אחד מהם בנפרד. נמצא כי שילוב המדבירים אינו גורם להשפעה סינרגיסטית. במרבית תקופת הניסוי התקבל ערכי אפקט סינרגי (ערך SF נמוך מ-1, (0.93 עבור 23 יום לאחר אילוח, 0.86 עבור השטח מתחת לעקום התפתחות מחלה), המצביעים על השפעה אנטגוניסטית כלומר סכום ההשפעות של כל אחד מן המדבירים גדול מהשפעת שילוב המדבירים בבחינת השטח שמתחת לעקום התפתחות המחלה התקבלו תוצאות דומות (טבלה 5).



איור 7: השפעת שילוב המדבירים הביולוגים חיידק B52 .*Pseudomonas* sp, ושמר .*Rhodotorula* sp Y13 בתרחיפים המכילים את תערובת שני המדבירים ביחד, כל אחד מהם בנפרד ותרחיף מעורב מהול לחצי הריכוז, על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה בצמחים בינוניים (9-11 עלים), במשך 23 יום. החצים מציינים ריסוס בתרחיפים השונים. הקווים האנכיים מציינים את הערך הנמוך ביותר המובהק (LSD), על פי מבחן Tukey HSD, ($P \leq 0.05$).

טבלה 5: השפעת המדבירים הביולוגים ושילובם בתרחיפי ריסוס על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה בצמחים בינוניים (9-11 עלים), במשך 23 ימים.

טיפול		AUDPC* (ימים×% כיסוי)		חומרת מחלה לאחר 23 יום (% כיסוי עלים)
היקש	a	522.6	a	63.6
Y13	b	124.5	b	28.4
(B52+Y13)/2	b	114.6	b	22.0
B52	b	113.7	b	24.1
B52+Y13	b	92.8	b	14.4

*AUDPC – השטח שמתחת לעקום התפתחות המחלה במשך 23 ימים.
בכל טור, אותיות שונות מציינות טיפולים השונים זה מזה באופן מובהק ($P \leq 0.05$), על פי מבחן Tukey HSD.

2. השפעת גורמי מיקרואקלים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים

2.1 רמת האוכלוסייה בתנאים מבוקרים (ניסויים באנקובאטורים)

על מנת לבדוק את השפעת הטמפרטורה, הלחות היחסית ונוכחות קימחון על העלים על רמת האוכלוסייה המדבירים הביולוגים נערך ניסוי במבנה תלת גורמי בו יושמו המדבירים על צמחים קטנים (3-5 עלים) עם וללא סימני מחלה. הצמחים הודגרו באנקובאטורים בטמפרטורות קבועות (10- 35 מ״צ), ושתי רמות לחות יחסית.

עבור אוכלוסיית החיידק B52 נמצא כי השפעת הגומלין בין הטמפרטורה והלחות היחסית הייתה לרוב מובהקת (טבלה 7). ככלל, רמת האוכלוסייה הייתה גבוהה יותר בלחות יחסית נמוכה ובטמפרטורות בינוניות (20-30 מ״צ), מאשר בלחות יחסית גבוהה בטמפרטורות נמוכות (10-15 מ״צ) או גבוהות (35 מ״צ) (טבלה 6). בטיפולי הלחות יחסית הגבוהה נרשמה ירידה משמעותית בגודל האוכלוסייה בטמפרטורות בינוניות וגבוהות (20-35 מ״צ), לאחר 24 שעות עד לרמה מינימאלית של 21% מהכמות ההתחלתית ב-25 מ״צ, בעלים עם סימני מחלה. לאחר שבוע ימים רמת האוכלוסייה בטמפרטורה בינונית (20, 25 מ״צ), לחות יחסית נמוכה, ובנוכחות קימחון, הייתה גבוהה יותר מאשר בטיפולים האחרים (טבלה 6).

בניגוד לחיידק, רמת האוכלוסייה של השמר Y13 נשמרה יציבה לאחר 24 שעות ובמשך כל שבוע הבדיקה; רמת האוכלוסייה בתום השבוע הייתה מעל ל-80% מהכמות ההתחלתית במרבית הטיפולים (טבלה 8). בנוסף, עבור השמר Y13 נמצא כי השפעות הגומלין בין הלחות היחסית והטמפרטורה ובין הטמפרטורה לבין נוכחות מחלה היו מובהקות (טבלה 9). באופן כללי רמת האוכלוסייה המיטבית הייתה בטמפרטורות בינוניות (15-25 מ״צ), כאשר ב-15 מ״צ רמת האוכלוסייה טובה יותר בלחות יחסית גבוהה. ב-20-25 מ״צ רמת האוכלוסייה גבוהה יותר בלחות נמוכה (טבלה 8). בטמפרטורות גבוהות (30-35 מ״צ), או נמוכות (10 מ״צ) לא נמצאה השפעה מובהקת ללחות (טבלה 9).

טבלה 6: השפעת הטמפרטורה, הלחות היחסית ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית החיידק *Pseudomonas* sp. B52, על צמחים צעירים (3-5 עלים). (שגיאת תקן±% מכמות התחלתית).

לחות יחסית	סימני מחלה	טמפרטורה	יום 1	יום 3	יום 7
גבוהה	עם	10	95±2	97±8	97±17
		15	102±19	115±21	77±17
		20	44±1	54±17	45±11
		25	33±17	46±5	26±13
		30	66±17	55±3	69±9
		35	57±8	62±17	70±2
	ללא	10	99±17	97±11	67±12
		15	77±15	119±4	93±9
		20	54±10	45±5	37±6
		25	21±2	26±13	28±14
		30	52±9	50±5	32±17
		35	38±7	45±12	43±6
נמוכה	עם	10	74±2	89±22	70±20
		15	93±1	80±4	90±11
		20	97±7	114±8	115±6
		25	105±5	121±12	122±6
		30	59±9	114±10	106±7
		35	105±2	130±3	105±9
	ללא	10	83±12	89±33	108±18
		15	89±11	66±1	85±9
		20	108±2	122±4	126±3
		25	109±2	117±6	120±2
		30	76±7	100±22	108±12
		35	121±9	123±16	107±6

טבלה 7: ערכי $P(F)$ מניתוח שונות תלת גורמי של השפעת הטמפרטורה, הלחות היחסית ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית החיידק *Pseudomonas* sp. B52 על צמחים צעירים, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

טיפול	יום 1	3	7
לחות יחסית	<0.0001	<0.0001	<0.0001
מחלה	0.8702	0.0775	0.4925
לחות יחסית × מחלה	**0.0102**	0.7819	0.0035
טמפרטורה	<0.0001	0.0013	0.0585
לחות יחסית × טמפרטורה	**<0.0001**	**<0.0001**	<0.0001
מחלה × טמפרטורה	0.2638	0.8949	0.3112
לחות יחסית × מחלה × טמפרטורה	0.6004	0.6587	**0.0355**

טבלה 8 : השפעת הטמפרטורה, הלחות היחסית ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית השמר *Rhodotorula* sp. Y13, על צמחים צעירים (3-5 עלים). (שגיאת תקן±% מכמות התחלתית).

לחות יחסית	סימני מחלה	טמפרטורה	יום 1	יום 3	יום 7
גבוהה	עם	10	98±7	90±3	83±2
		15	93±1	107±2	99±3
		20	116±4	115±1	103±1
		25	123±7	110±4	111±4
		30	95±4	88±7	81±7
		35	101±2	92±3	85±1
	ללא	10	92±4	88±7	86±7
		15	92±3	104±3	84±5
		20	96±6	86±5	91±4
		25	99±7	91±7	77±6
		30	99±5	94±8	84±6
		35	112±7	99±11	86±4
נמוכה	עם	10	94±5	89±10	82±4
		15	94±4	83±5	68±4
		20	139±3	129±7	127±2
		25	138±4	122±2	145±8
		30	109±6	114±6	94±5
		35	107±6	103±2	89±7
	ללא	10	98±3	101±3	87±3
		15	91±2	77±3	71±1
		20	111±2	119±2	112±5
		25	118±7	119±5	111±2
		30	114±3	108±5	91±1
		35	111±8	106±7	90±4

טבלה 9 : ערכי $P(F)$ מניתוח שונות תלת גורמי של השפעת הטמפרטורה, הלחות היחסית ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית השמר *Rhodotorula* sp. Y13 במשך שבוע על צמחים צעירים, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

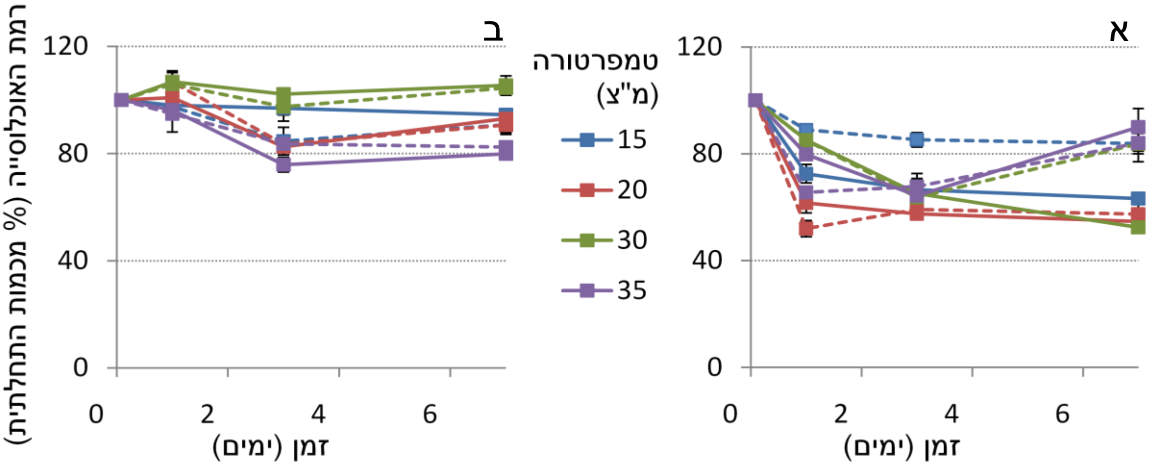
טיפול	יום 1	יום 3	יום 7
לחות יחסית	<0.0001	<0.0001	<0.0001
מחלה	0.0006	0.0268	<0.0001
לחות יחסית × מחלה	0.8962	0.2028	0.6007
טמפרטורה	<0.0001	<0.0001	<0.0001
לחות יחסית × טמפרטורה	**0.0014**	**<0.0001**	**<0.0001**
מחלה × טמפרטורה	**<0.0001**	**0.0015**	**<0.0001**
לחות יחסית × מחלה × טמפרטורה	0.5824	0.1007	0.3361

2.2 רמת האוכלוסייה בתנאים מבוקרים (ניסויים בחדרי גידול)

2.2.1 <u>השפעת הטמפרטורה ונוכחות קימחון על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים</u>

על מנת לבדוק את השפעת הטמפרטורה ונוכחות קימחון על העלים על רמת האוכלוסייה המדבירים הביולוגים נערך ניסוי במבנה דו גורמי בו יושמו המדבירים על צמחים בגודל בינוני (9-11 עלים) עם וללא סימני מחלה. הצמחים הועברו לחדרי גידול בטמפרטורות קבועות (15-35 מ״צ).

כ-24 שעות לאחר ריסוס נרשמה ירידה משמעותית בגודל אוכלוסיית החיידק B52, עד לרמה של 50%מהכמות ההתחלתית ב-22 מ״צ (איור 10 א׳). כמו כן נמצא כי השפעת הגומלין בין הטמפרטורה לנוכחות מחלה הייתה מובהקת בזמן זה (טבלה 8). בטמפרטורה של 15 מ״צ ובעלים עם קימחון הרמת האוכלוסייה הייתה טובה יותר (89%), מאשר בטמפרטורות גבוהות יותר עם וללא קימחון (איור 10 א׳ טבלה 8). גם לאחר שבוע, השפעת הגומלין בין טמפרטורה לנוכחות מחלה על רמת האוכלוסייה של החיידק הייתה מובהקת (טבלה 8)؛ רמת האוכלוסייה הייתה גבוהה יותר על עלים עם קימחון בטמפרטורה של 35 מ״צ (96.3%) מאשר בטיפולים האחרים (איור 10 א׳). בניגוד לחיידק, רמת האוכלוסייה של השמר Y13 נשמרה יציבה בתקופה שבין יום אחד לשבעה ימים, עם רמה סופית של מעל ל-80% מהכמות ההתחלתית במרבית הטיפולים (איור 10 ב׳). בנוסף נמצא כי 24 שעות לאחר היישום הייתה לטמפרטורה השפעה מובהקת על רמת אוכלוסיית השמר (טבלה 8). ב-30 או 20 מ״צ רמת אוכלוסיית השמר הייתה גבוהה יותר (106.5, 103.6% בהתאמה), מאשר בטמפרטורות 15 או 35 מ״צ (97.6, 95.6% בהתאמה) (איור 10 ב׳). גם לאחר שבוע לטמפרטורה הייתה השפעה מובהקת על רמת האוכלוסייה השמר, כאשר רמת האוכלוסייה מיטבית הייתה בטמפרטורה של 30 מ״צ (105.1%), לעומת הטיפולים האחרים (איור 10 ב׳, טבלה 8).



איור 10: השפעת טמפרטורה ונוכחות מחלה (עם = קו מקווקו, ללא= קו רצוף) על רמת אוכלוסיית החיידק *Pseudomonas* sp. B52 (א׳), והשמר *Rhodotorula* sp. Y13 (ב׳), בצמחים בגודל בינוני (9-11 עלים), במשך שבוע ימים. הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

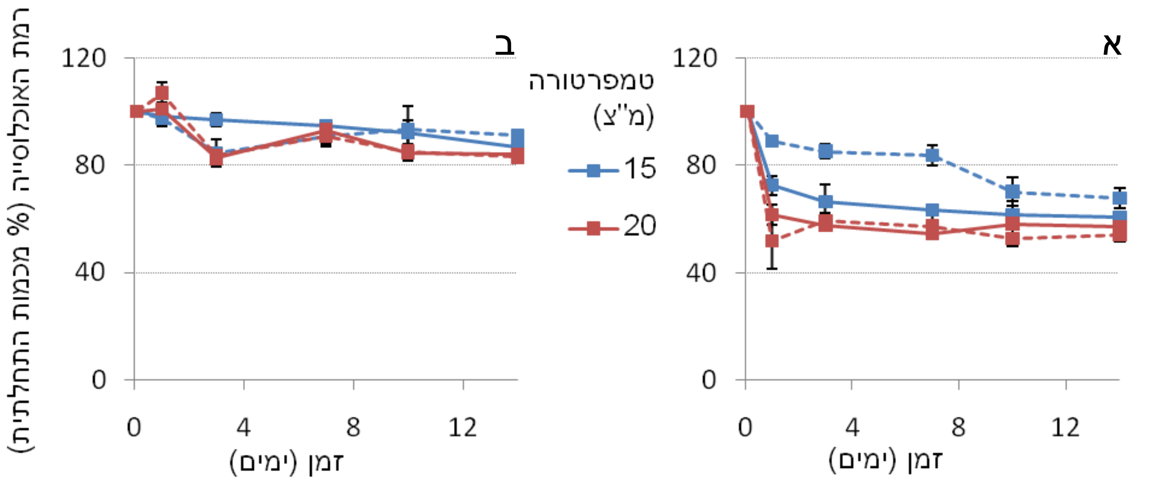
טבלה 10: ערכי $P(F)$ מניתוח שונות דו גורמי של השפעת טמפרטורה ונוכחות מחלה על רמת האוכלוסייה המדבירים הביולוגים במשך שבוע על צמחים בינוניים, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

מדביר ביולוגי	יום / טיפול	1	3	7
B52	טמפרטורה	<0.0001	**0.0117**	<0.0001
	מחלה	0.5836	0.0923	0.0030
	טמפרטורה × מחלה	**0.0224**	0.1575	**0.0045**
Y13	טמפרטורה	**0.0039**	<0.0001	**<0.0001**
	מחלה	0.6457	0.3345	0.6861
	טמפרטורה × מחלה	0.5268	**0.0373**	0.7887

2.2.2 <u>רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים על צמחים בגובה בינוני (9-11 עלים) בהדגרה ממושכת</u>

על מנת לבדוק את השפעת הטמפרטורה ונוכחות קימחון על העלים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים בטווח הארוך נערך ניסוי במבנה דו גורמי בו יושמו המדבירים על צמחים בגובה בינוני (9-11 עלים) עם וללא סימני מחלה. הצמחים הועברו לחדרי גידול בטמפרטורות קבועות (15, 20 מ״צ). רמת אוכלוסיית המדבירים בטיפולים השונים נבדקה לאורך 14 יום.

בשבוע הראשון רמת האוכלוסייה של החיידק B52 הייתה גבוהה יותר על עלים עם קימחון ב-15 מ״צ (83.6% מהכמות ההתחלתית, שבוע לאחר הריסוס) לעומת צמחים ללא קימחון בטמפרטורה זהה (63.3%), או ב-20 מ״צ (עם וללא קימחון 57.3, 54.6% בהתאמה) (איור 11 א׳). בטווח הארוך יותר, אחרי 10 ו-14 ימים לטמפרטורה הייתה השפעה מובהקת על רמת האוכלוסייה של החיידק (טבלה 11). רמת האוכלוסייה מיטבית הייתה בטמפרטורה של 15 מ״צ לעומת 20 מ״צ (64.1 ו-55.5% בהתאמה לאחר 14 יום) (איור 11 א׳, טבלה 11). נמצא כי באופן כללי רמת האוכלוסייה של השמר Y13 נשארה גבוהה בטיפולים השונים גם לאחר 14 יום (83% מהכמות ההתחלתית) (איור 11 ב׳) בניגוד לחיידק בתנאים זהים (54% מהכמות ההתחלתית). לא נמצאה השפעה מובהקת לטמפרטורה או לנוכחות מחלה על העלים או לשילוב בינם, על רמת האוכלוסייה של השמר (טבלה 11).



איור 11 : השפעת הטמפרטורה ונוכחות מחלה (עם = קו מקווקו, ללא= קו רצוף) על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים חיידק *Pseudomonas* sp. B52 (א'), ושמר*Rhodotorula* sp. Y13 (ב'), במשך 14 יום, בצמחים בגודל בינוני (11-9 עלים). הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

טבלה 11 : ערכי $P(F)$ מניתוח שונות דו גורמי של השפעת טמפרטורה ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים במשך 14 ימים על צמחים בינוניים, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

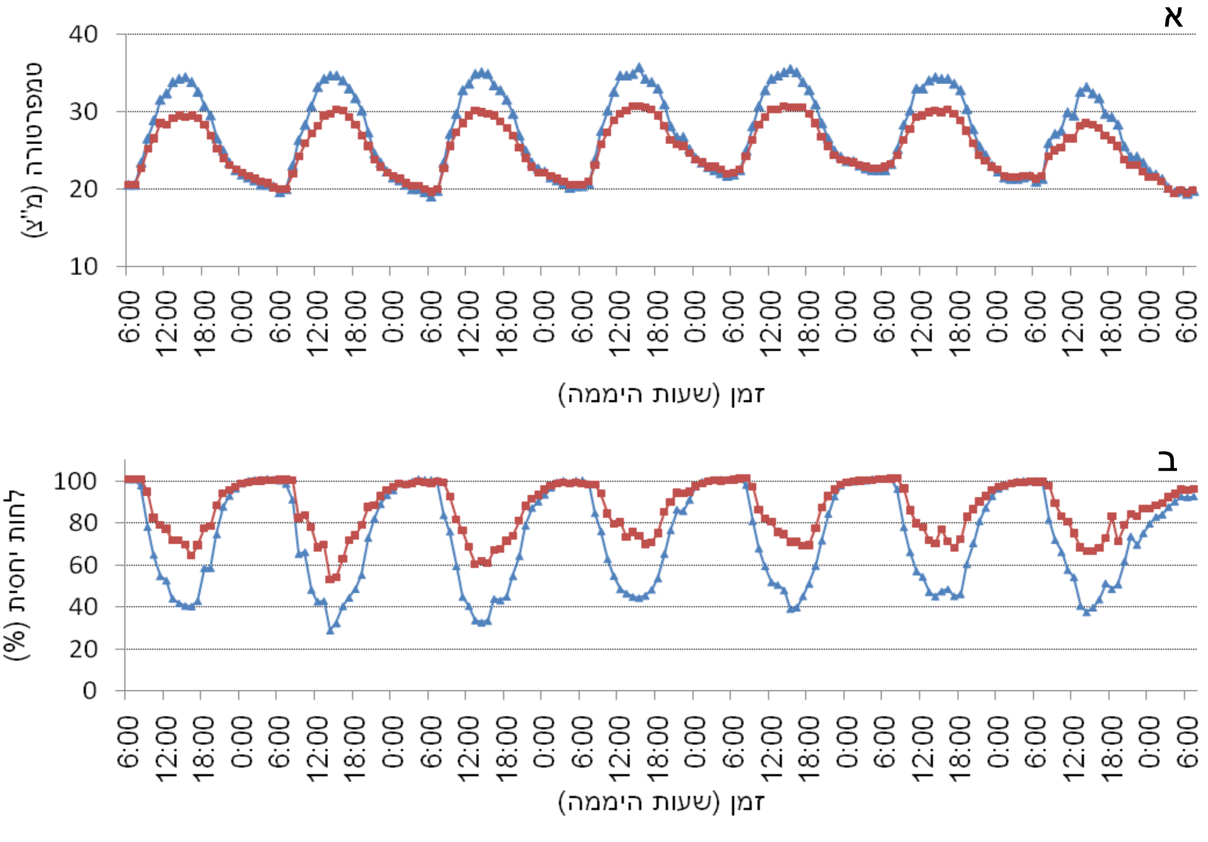
מדביר ביולוגי	טיפול / יום	1	3	7	10	14
B52	טמפרטורה	0.0010	0.0004	0.0001	**0.0366**	**0.0164**
	מחלה	0.5027	0.0087	0.0016	0.7296	0.5322
	טמפרטורה × מחלה	**0.0256**	**0.0203**	**0.0073**	0.1416	0.1236
Y13	טמפרטורה	0.0341	0.0119	0.7924	0.1023	0.0507
	מחלה	0.2378	0.0511	0.2555	0.8234	0.4140
	טמפרטורה × מחלה	0.2378	0.0221	0.7924	0.9406	0.2323

2.3 רמת האוכלוסיות בתנאים כמו-מסחריים (ניסויים בבית רשת, 2009)

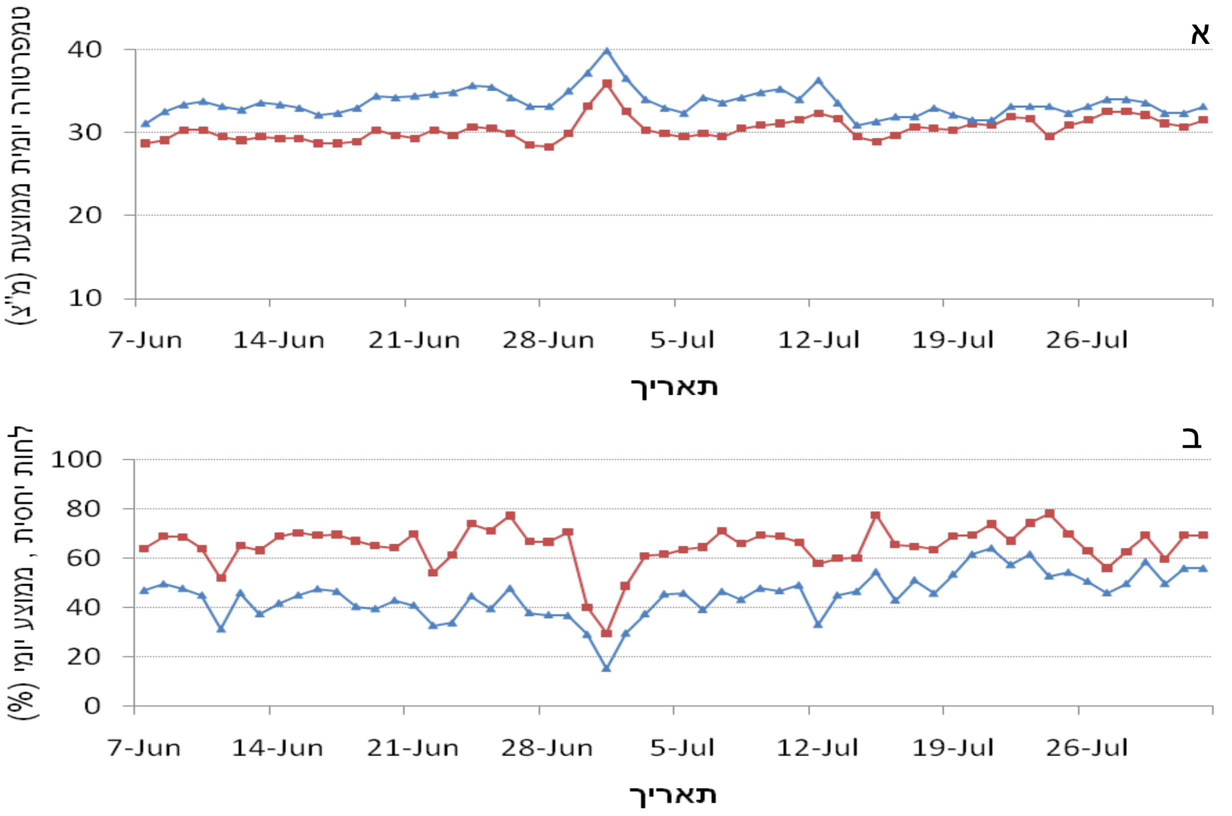
2.3.1 <u>השפעת הלחות היחסית ונוכחות קימחון על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים</u>

על מנת לבדוק את השפעת הלחות היחסית ונוכחות קימחון על העלים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נערך ניסוי בו יושמו המדבירים על צמחים בוגרים (18-21 עלים) עם וללא סימני מחלה. הצמחים גודלו בבית רשת בו נקבעו שני משטרי לחות יחסית, בשני חלקים של המבנה (חלק לח, וחלק יבש). הצמחים רוססו במדבירים הביולוגים: חיידק B52, שמר Y13 וביקורת מים אחת לשבוע, החל מ-19 יום לאחר האילוח, במשך שמונה שבועות. נבדקה רמת האוכלוסייה במשך שבוע ימים אחרי כל ריסוס.

במרבית שבועות הניסוי שררו תנאי אקלים שונים במשטרי הלחות השונים, במשך היממה ההבדל המשמעותי ביותר התקבל בשעות היום בהן בחלק הלח של המבנה הייתה לחות יחסית גבוהה, וטמפרטורה נמוכה, באופן משמעותי לעומת החלק היבש של המבנה. בשעות הלילה, הלחות היחסית עלתה עד לרמה מקסימאלית (100%), והטמפרטורה הייתה דומה, בשני חלקי המבנה (איור 12). במהלך השבוע החמישי לניסוי (5/7 – 28/6) חלה עלייה משמעותית בטמפרטורה וירידה בלחות. בשיאה של עלייה זו (1/6), בחלק היבש של המבנה שררה טמפרטורה מקסימאלית של 40 מ״צ ולחות היחסית מינימאלית של 15%. בחלק הלח של המבנה הטמפרטורה המקסימאלית הייתה 36 מ״צ והלחות היחסית המינימאלית הייתה 30% (איור 13). החל מתקופה זו (שבוע חמישי) ועד לסופו של הניסוי, הצמחים בחלק היבש של המבנה פיתחו סימנים אופייניים לתגובת צמחי עגבנייה לעקת חום (Daie and Campbell, 1981), כגון: קיפול עלים והקשחתם, עצירת התפתחות ופגיעה בחנטה. בחלק הלח של המבנה לא נצפו סימני עקת חום בצמחים.

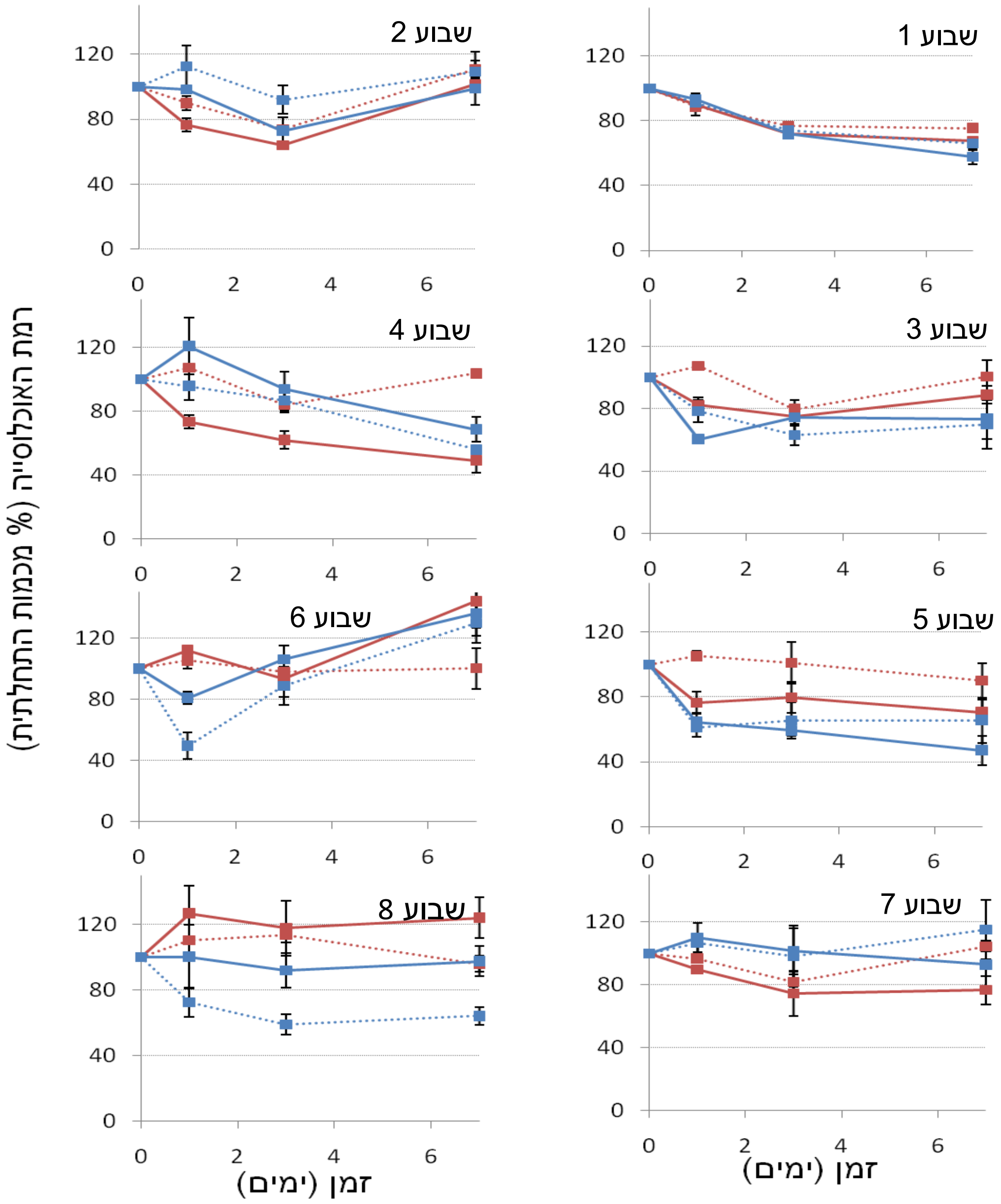


איור 12: הדגמת הטמפרטורה (א), והלחות היחסית (ב), בשני משטרי לחות יחסית, גבוהה (■), ונמוכה (▲), במהלך השבוע השלישי לניסוי, כפי שנמדדה בגובה הצמחים (150 ס״מ מהרצפה).



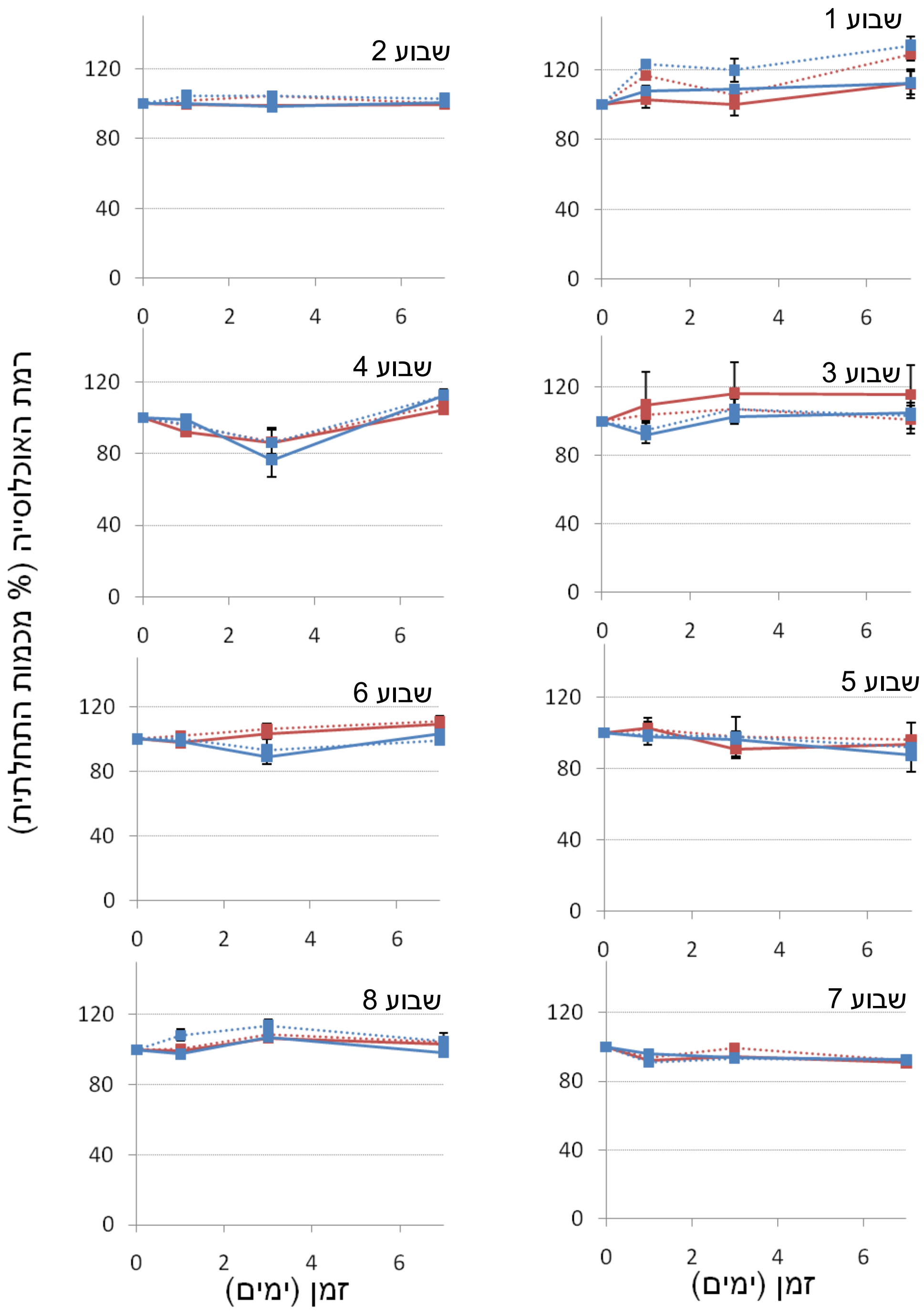
איור 13 : טמפרטורה יומית ממוצעת (א׳) ולחות יחסית (ב׳) בשני משטרי לחות יחסית, גבוהה (■), ונמוכה (▲), במהלך תקופת הניסוי, כפי שנמדדה בגובה הצמחים (150 ס״מ מהרצפה).

במרבית שבועות הניסוי התקבל הבדל משמעותי בין טיפולי הלחות היחסית ברמת אוכלוסיית החיידק B52 כ-24 שעות לאחר הריסוס, כאשר בחלקו הראשון של הניסוי (4 שבועות הראשונים) רמת האוכלוסייה הייתה גבוהה יותר בחלק היבש של המבנה (מלבד שבוע 3). בחלקו השני של הניסוי (4 שבועות אחרונים) רמת אוכלוסיית החיידק הייתה גבוהה יותר (לאחר 24 שעות) בחלק הלח של המבנה (מלבד שבוע 7) (איור 14, טבלה 12). במרבית תקופת הניסוי לא נמצאה השפעה מובהקת לנוכחות מחלה על העלים על רמת אוכלוסיית החיידק (טבלה 12). בשבוע הרביעי ובתחילתו של השבוע החמישי נמצא כי השפעת הגומלין בין הלחות היחסית ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית החיידק הייתה מובהקת (טבלה 12).



איור 14: השפעת הלחות היחסית (אדום = גבוהה, כחול = נמוכה), ונוכחות מחלה (עם = קו מקווקו, ללא= קו רצוף) על רמת אוכלוסיית החיידק *Pseudomonas* sp. B52, על צמחים בוגרים, במקטעים שבועיים, במשך שבועות 1-8 של הניסוי. הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

בשמר Y13 רמת האוכלוסייה נשארה יציבה ולא הושפעה באופן מובהק מן הטיפולים השונים. בנוסף רמת האוכלוסייה בכל טיפול נשמרה יציבה למשך שבוע ימים לאחר היישום. תופעות אלו נצפו במשך כל תקופת הניסוי (8 שבועות) (איור 15, טבלה 12).



איור 15: השפעת הלחות היחסית (אדום = גבוהה, כחול = נמוכה), ונוכחות מחלה (עם = קו מקווקו, ללא= קו רצוף) על רמת אוכלוסיית השמר *Rhodotorula* sp. Y13, על צמחים בוגרים, במקטעים שבועיים, במשך שבועות 1-8 של הניסוי. הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

טבלה 12 : ערכי *P(F)* המובהקים מניתוח דו גורמי של השפעה של גורמי אקלים ונוכחות מחלה על רמת האוכלוסייה המדבירים הביולוגים בצמחים בוגרים, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

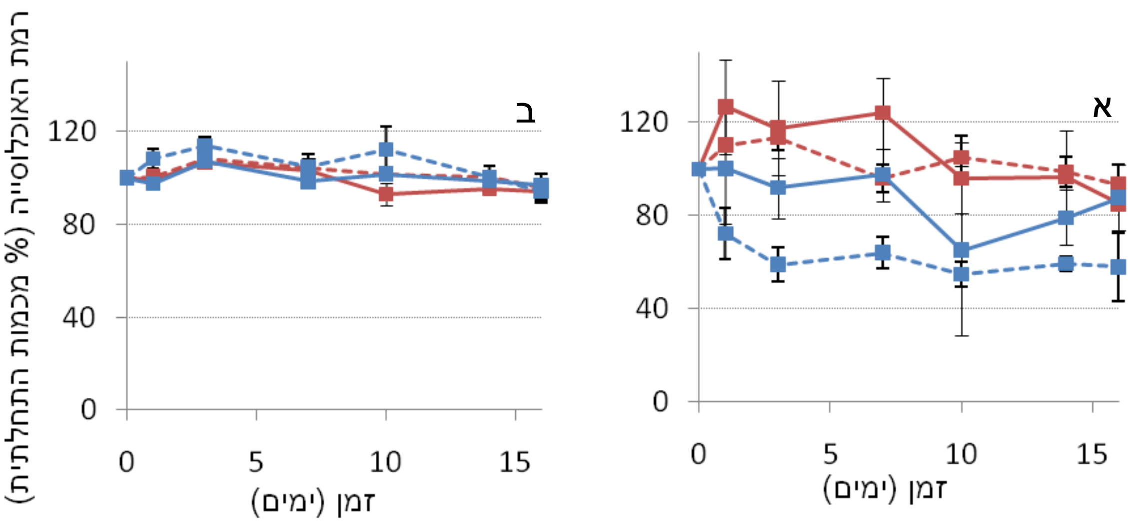
	מדביר	B52			Y13		
	טיפול יום	לחות יחסית	מחלה	לחות יחסית × מחלה	לחות יחסית	מחלה	לחות יחסית × מחלה
שבוע 1	7	0.0229	0.0486			0.0151	
שבוע 2	1	0.0141				0.0399	
	3					0.0178	
שבוע 3	1	0.0005	0.0014				
שבוע 4	1			0.0204			
	3	0.0453					
	7			0.0004			
שבוע 5	1			0.0190			
	3	0.0222					
שבוע 6	1	<0.0001	0.0098				
	3				0.0250		
	7				0.0062		
שבוע 7	1	0.0269					
שבוע 8	1	0.0444				0.0361	
	3	0.0093					
	7	0.0092	0.0070				

לא נתקבלו ערכי *P(F)* מובהקים במקומות בהם לא מצוינים הערכים.

2.3.2 <u>רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים בטווח הארוך בעקבות יישום בודד</u>

על מנת לבדוק את השפעת הלחות היחסית ונוכחות קימחון על העלים על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים בטווח הארוך על צמחים בוגרים, נערך ניסוי במבנה דו גורמי בו יושמו המדבירים הביולוגים פעם אחת על צמחים בוגרים (19-21 עלים), אשר הוצבו בשני חלקי המבנה בהם שררו תנאי לחות יחסית ורמות נגיעות שונים (כמתואר בסעיף 4.2.). נבדקה רמת האוכלוסייה במשך 16 ימים אחרי הריסוס.

במשך מרבית ימי הניסוי נמצאה השפעה מובהקת ללחות היחסית על רמת אוכלוסיית החיידק B52 (טבלה 13). רמת אוכלוסייה גבוהה נמצאה בלחות יחסית גבוהה (97.6% לאחר 14 יום) לעומת לחות יחסית נמוכה (69.1% מהכמות ההתחלתית באותו יום) (איור 16 א'). גם בבחינת השטח התחום מתחת לעקום רמת האוכלוסייה בטיפולים השונים נמצאה השפעה מובהקת ללחות היחסית (טבלה 13). רמת האוכלוסייה של השמר Y13 נשארה גבוהה יחסית בטיפולים השונים גם לאחר 16 יום (94% מהכמות ההתחלתית בלחות יחסית נמוכה ובנוכחות קימחון), בניגוד לחיידק בתנאים זהים (54% מהכמות ההתחלתית) (איור 16 ב'). לא נמצאה השפעה מובהקת ללחות היחסית או לנוכחות מחלה על העלים או לשילוב בינם, על רמת אוכלוסיית השמר Y13 בטווח הארוך (טבלה 13).



איור 16 : השפעת הלחות היחסית (גבוהה = אדום, נמוכה = כחול) ונוכחות מחלה (ללא = קו רצוף, עם = קו מקווקו), על רמת האוכלוסייה המדבירים הביולוגים חיידק *Pseudomonas* sp. B52 (א'), ושמר *Rhodotorula* sp. Y13 (ב'), במשך 16 יום לאחר ריסוס, על צמחים בוגרים (18-21 עלים). הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

טבלה 13 : ערכי $P(F)$ מניתוח שונות דו גורמי של השפעת הלחות היחסית ונוכחות מחלה על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים בטווח הארוך, על צמחים בוגרים, על פי מבחן Tukey HSD ($P\leq0.05$).

מדביר ביולוגי	יום / טיפול	1	3	10	14	16	ש"ת*
B52	לחות יחסית	**0.0447**	**0.0054**	0.0093	**0.0210**	0.1411	**0.0085**
	מחלה	0.1400	0.1211	0.2221	0.4177	0.3149	0.0879
	לחות יחסית × מחלה	0.6950	0.2027	**0.0499**	0.2942	0.0944	0.1789
Y13	לחות יחסית	0.3243	0.3006	0.0594	0.4824	0.9200	0.2626
	מחלה	0.0399	0.1423	0.0667	0.2390	0.8409	0.0763
	לחות יחסית × מחלה	0.0768	0.3575	0.8570	0.4094	0.5511	0.6262

*ש"ת- שטח תחום מתחת לעקום רמת האוכלוסייה במשך 16 יום.

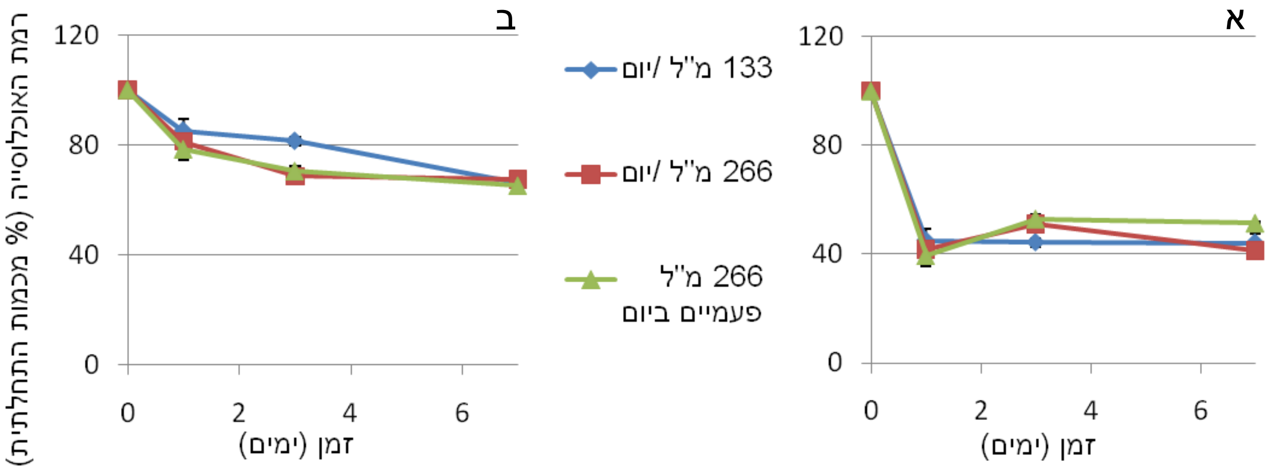
2.3.3 <u>השפעת עקת יובש על רמת אוכלוסיית המדבירים</u>

על מנת לבדוק את השפעת עקת יובש על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים נערך ניסוי במבנה חד גורמי בו יושמו המדבירים הביולוגים על צמחי עגבנייה בגובה בינוני (9-11 עלים), אשר שהו במשטרי השקיה שונים : 133 מ"ל ליום, 266 מ"ל ליום ו- 266 מ"ל פעמיים ביום.

חלה ירידה משמעותית בגודל אוכלוסיית החיידק B52 כ-24 שעות לאחר הריסוס עד לרמה מינימאלית של 40% במשטר השקיה מספק (2 x 266 מ"ל), ולאחר מכן נשמרה רמת האוכלוסייה זהה עד לסיום הניסוי (איור 17 א'). לא התקבל הבדל משמעותי ברמת האוכלוסייה בין טיפולי ההשקיה השונים.

בניגוד לחיידק, רמת האוכלוסייה של השמר Y13 נשארה יציבה יותר 24 שעות לאחר הריסוס וגם במשך

שבוע מיום הריסוס עם רמה מינימאלית של 65.3% מהכמות ההתחלתית, במשטר השקיה מספק (266 מ״ל x 2) (איור 17 ב׳). לא נמצאו הבדלים משמעותיים ברמת האוכלוסייה בין טיפולי ההשקיה השונים.

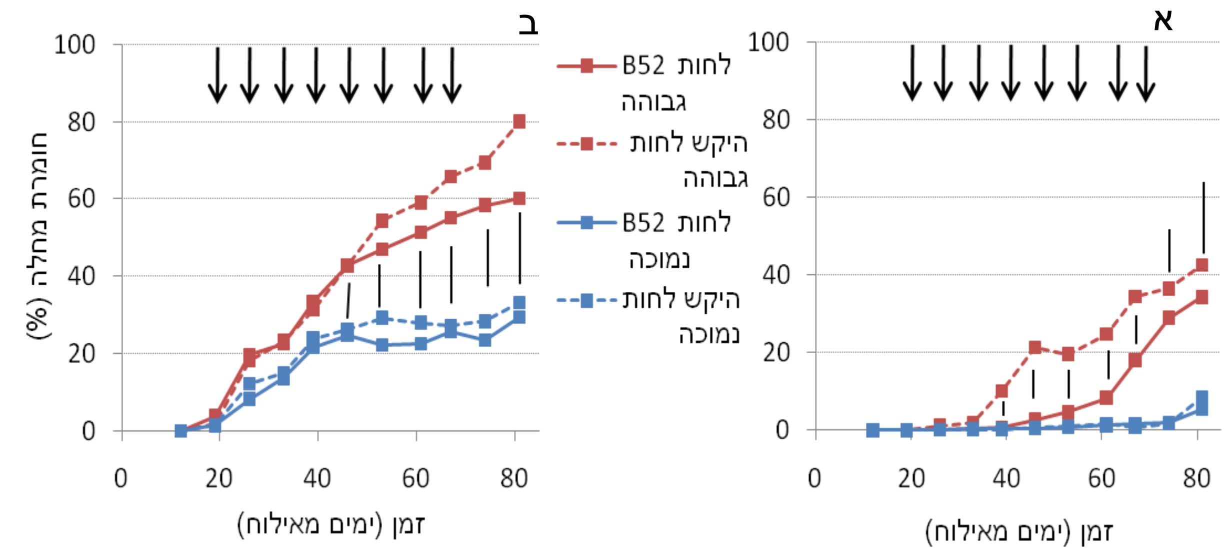


איור 17 : השפעת עקת יובש על רמת אוכלוסיית המדבירים הביולוגים חיידק *Pseudomonas* sp. B52 (א׳), ושמר *Rhodotorula* sp. Y13 (ב׳). הקווים האנכיים מציינים שגיאת תקן.

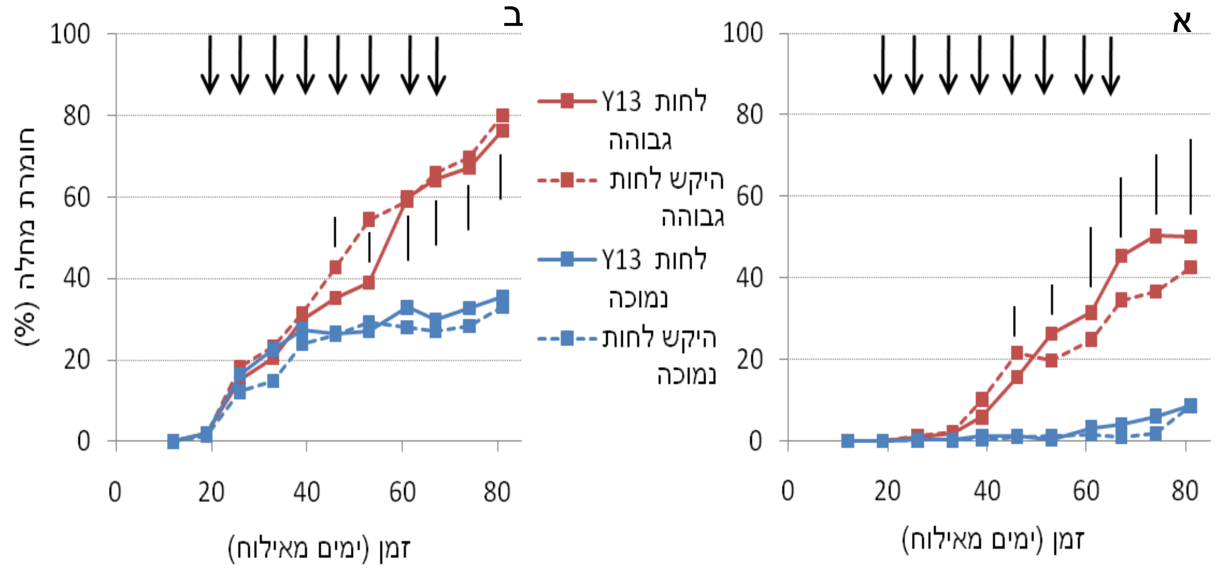
3. השפעת גורמי אקלים ומדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה

על מנת לבדוק את השפעת הלחות היחסית, נגיעות התחלתית, וישום מדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה בצמחים בוגרים נערך ניסוי במבנה תלת גורמי. צמחי עגבנייה בוגרים (19-21 עלים), גודלו בבית רשת בו נקבעו שני משטרי אקלים (לחות יחסית), ושתי רמות נגיעות בקימחון (כמפורט בסעיף 4.2). הצמחים רוססו במדבירים הביולוגים : חיידק B52, שמר Y13 וביקורת מים אחת לשבוע, החל מ- 19 יום לאחר האילוח, במשך שמונה שבועות. חומרת המחלה, בטיפולים השונים, הוערכה אחת לשבוע, במשך 81 יום, על ידי הערכת אחוז הנגיעות בשלושה גבהים : תחתון, אמצעי ועליון. ההבדלים בחומרת המחלה, נבדקו גם על ידי השוואת השטחים שמתחת לעקומת התפתחות מחלה (AUDPC).

ניתן לחלק את התפתחות המחלה בתקופת הניסוי לשלושה חלקים. בחלקו הראשון של הניסוי (12- 33 יום לאחר האילוח), ישנה השפעה מובהקת לנגיעות ההתחלתית. מחלה חמורה יותר התפתחה בצמחים שאולחו (איור 18 ב׳, איור 19 ב׳), לעומת אלו שלא אולחו (איור 18 א׳, איור 19 א׳). בחלקו השני של הניסוי (39-67 יום לאחר האילוח) השפעת הגומלין בין הלחות היחסית לנגיעות התחלתית מובהקת. בלחות יחסית גבוהה ונגיעות התחלתית התפתחה מחלה חמורה יותר מאשר בלחות נמוכה וללא נגיעות התחלתית (איורים 18, 19). בנוסף, ניתן לראות כי ישום החיידק מפחית את חומרת המחלה בצמחים שלא אולחו (איור 18 א׳). השפעה זו לא התקבלה בצמחים שאולחו או עבור המדביר הביולוגי Y13. בחלקו השלישי של הניסוי (74-81 יום לאחר האילוח), עם הפסקת הריסוסים במדבירים הביולוגים (67 יום לאחר האילוח), והעלייה בחומרת המחלה בצמחים שלא אולחו, לא הופחתה המחלה על ידי המדבירים הביולוגים. בבחינת השטח מתחת לעקום התפתחות המחלה (AUDPC), וחומרת המחלה הסופית (81 יום לאחר האילוח) נמצא השפעה מובהקת ללחות היחסית על התפתחות המחלה בטיפולים השונים (טבלה 14).



איור 18: השפעת הלחות היחסית ויישום המדביר הביולוגי *Pseudomonas* sp. B52, אחת לשבוע, על התפתחות קימחון העגבנייה בצמחים בוגרים, ללא (א׳) ועם (ב׳) נגיעות התחלתית. החצים מציינים יישום המדביר הביולוגי. הקווים האנכיים מציינים את הערך הנמוך ביותר באופן מובהק (LSD) ($P\leq0.05$), על פי מבחן Tukey HSD.



איור 19: השפעת הלחות היחסית ויישום המדביר הביולוגי *Rhodotorula* sp. Y13, אחת לשבוע, על התפתחות קימחון העגבנייה בצמחים בוגרים, ללא (א׳) ועם (ב׳) נגיעות התחלתית. החצים מציינים יישום המדביר הביולוגי. הקווים האנכיים מציינים את הערך הנמוך ביותר באופן מובהק (LSD) ($P\leq0.05$), על פי מבחן Tukey HSD.

טבלה 14 : השפעת הלחות היחסית, נגיעות התחלתית וישום מדבירים ביולוגים על התפתחות קימחון העגבנייה בצמחים בוגרים (19-21 עלים), במשך 81 יום.

נגיעות התחלתית*	לחות יחסית	מדביר ביולוגי	AUDPC** (ימים×% כיסוי)		חומרת מחלה לאחר 81 יום (% כיסוי עלים)	
עם	גבוהה	היקש	2842.5	a	80	a
		B52	2551.5	a	60	ab
		Y13	2595.2	a	76.1	a
	נמוכה	היקש	1454.6	bc	33.1	c
		B52	1248.7	bc	29.4	cd
		Y13	1646.7	b	35.5	c
ללא	גבוהה	היקש	1066.6	cd	42.5	bc
		B52	572.1	ed	34.3	c
		Y13	1395.3	bc	44.1	bc
	נמוכה	היקש	76.6	f	8.5	e
		B52	69.18	f	5.5	e
		Y13	141.3	ef	8.6	ed

* נגיעות התחלתית הושגה ע״י אילוח רטוב של הצמחים בתרחיף נבגים בתחילת הניסוי.

** AUDPC - השטח שמתחת לעקום התפתחות המחלה במשך 81 ימים.

בכל טור, אותיות שונות מציינות טיפולים השונים זה מזה באופן מובהק ($P\leq0.05$), על פי מבחן Tukey HSD.

דיון ומסקנות

פני השטח של העלה מהווים סביבת חיים לאוכלוסיות מיקרואורגניזם מגוונות הכוללת חיידקים, שמרים, פטריות ועוד. הגיוון והדינמיות בתנאי הסביבה ובתנאים הטופוגרפיים, הם הגורמים להטרוגניות הרבה באוכלוסיות מיקרואורגניזם המתפתחות על פני העלה (Andrews, 1992; Juniper, 1991). בכדי להשתמש במיקרואורגניזם להדברה ביולוגית נגד פתוגנים התוקפים את העלים יש צורך בהבנה עמוקה של יחסי הגומלין בין הצמח, הפתוגן והמקרואורגניזמים. יחסי גומלין אלו מושפעים מגורמים חיצוניים, כגון מיקרואקלים על פני השטח של העלה, מגורמים הקשורים בצמח עצמו, כגון גיל העלה, צורת פני השטח של העלה, וגורמים התלויים במיקרואורגניזם על פני העלה, כגון דפוס האכלוס על פני העלה, העדפות מזוניות ויחסי גומלין בין אוכלוסיות (Blakeman, 1985). לגורמי מיקרואקלים השפעה מכרעת על התפתחות מחלות נוף שונות בינן קימחון העגבנייה. שלבים רבים במופעי הפתוגן (*Oidium neolycopersici*) רגישים לגורמי מיקרואקלים שונים. התפתחות המחלה הינה מיטבית בטמפרטורת מתונות (22-25 מ״צ) ולחות יחסית בינונית (70-85%) (Jacob et al., 2008). יתכן וניתן להפחית או למנוע התפתחות מחלה על ידי שינוי מכוון של תנאי האקלים על מנת שלא יהיו מיטביים להתפתחות מחלה (Paulitz and Bélanger, 2001; Elad *et al*., 1999).

תצפיות מעידות כי שינויי אקלים אזוריים, בעיקר עלייה בטמפרטורה, הם בעלי פוטנציאל להשפעה ניכרת על מערכות טבעיות מקומיות (IPCC, 2007). עקב פיתוח מערכות חיזוי מדויקות יש בידנו מידע לגבי ההשלכות החזויות של שינויי אקלים על מספר מערכות ביולוגיות (Harvell et al., 2002). בעוד המחקר והידע לגבי שינויי אקלים ברמה גלובלית הינו נרחב, עדיין חסר ידע לגבי השלכות שינויי אקלים על יחסי פתוגן צמח במערכות מקומיות. שינויי אקלים כגון עלייה בטמפרטורה, ירידה בלחות היחסית ושינוי בכמות ופיזור המשקעים יכולים להשפיע באופן ישיר על הפתוגן או על הווקטור בכמה דרכים: **1)** שינוי בתפוצה הגיאוגרפית, **2)** שינוי במועד ומשך הופעת המחלה, **3)** זירוז שלבים במחזור החיים וקצב ההתפתחות של הפתוגן והגברת הווירולנטיות (Coakley, 1999). מטרת עבודה זו הייתה לאפיין השפעת גורמי מיקרואקלים על יחסי הגומלין בין צמח העגבנייה, מחלת הקימחון- הנגרמת ע״י הפטרייה *Oidium neolycopersici* ומיקרואורגניזמים שהינם מדבירים ביולוגים של המחלה.

1. אפיון יחסי הגומלין בין הצמח הפונדקאי, הפתוגן והמדביר הביולוגי

1.1 זווית המגע בין תמיסת הריסוס לעלה ותצפיות במיקרוסקופ אלקטרונים

נבדקה השפעת הרכב התמיסה ונוכחות מחלה על העלה, על זווית המגע בין הטיפה לעלה. במחקרים קודמים נמצא כי פטריות רבות מפרישות חלבונים (Hydrophobins) אשר מקנים תכונות הידרופוביות לפני העלה (Wösten and De Vocht, 2000), ומעורבים בתהליכי היצמדות הפתוגן לפונדקאי (Wösten, 1994). במחקר הנוכחי על עלים ללא סימני מחלה ו/או בהוספת משטח קטנה באופן מובהק זווית המגע בין הטיפה לעלה. גם לנוכחות המדביר הביולוגי בתמיסת הריסוס ישנה השפעה על זווית המגע; בתמיסה שהכילה את החיידק זווית המגע הייתה גבוהה יותר, באופן מובהק, מאשר בטיפת מים ללא החיידק (טבלאות 1, 2). למיטב ידיעתנו זהו הדיווח הראשון על תופעה זו. נוכחות התפטיר על פני העלה יוצרת פני

שטח הדרופוביים, לדבר יש משמעות מכרעת על יחסי הגומלין בין הצמח, הפתוגן והמדביר הביולוגי. כאשר יש תפטיר על פני העלה: טיפת התרסיס, המכילה את המדביר הביולוגי, "מתכדרת" על פני העלה ונחשפת לפחות שטח פנים של העלה. על פניו הדבר אמור לגרום לכך שהישרדות המדבירים הביולוגים לא תהייה מיטבית על עלים עם תפטיר הפטרייה, אולם בניסויים אחרים שנערכו, נמצא כי הישרדות החיידק B52 הייתה מיטבית יותר על עלים עם סימני מחלה. יתכן ולנפח התרסיס ולגודל הטיפה ישנה השפעה מבטלת- כאשר נפח התרסיס גבוה וגודל הטיפות קטן, מתבצע כיסוי אחיד של כל העלה, כולל האזור עליו יש תפטיר. במיקרוה זה נוכחות התפטיר על העלה מספקת יותר נישות וגומחות בהן מתקיימים תנאים מיטביים להישרדות החיידק.

מסקנה זו התאמתה בתצפיות שנערכו באמצעות מיקרוסקופ אלקטרונים סורק (סעיף 1.2). בעלים ללא סימני מחלה ישנו פיזור של החיידק במקומות נמוכים בנקודות החיבור בין תאים, לעומת זאת בעלים עם סימני מחלה, החיידק מתרכז בנישות וגומחות הנוצרות על פני העלה על ידי התפטיר (איור 3). נראה כי לנוכחות תפטיר הפטרייה על פני העלה אין השפעה על פיזורו המרחבי על פני העלה של השמר, על עלים עם וללא קימחון השמר מתרכז בעיקר במקומות הנמוכים על פני העלה, כגון: נקודות החיבור בין תאים, בסמוך לשערות ובחריצים (איור 3). במחקרים קודמים שאפיינו את הפיזור המרחבי של אוכלוסיות מיקרוביאליות נמצאו תוצאות דומות. אוכלוסיות *Pseudomonas* spp. התרכזו בסמוך לשערות וטריכומות, בשקעים וחריצים בקוטיקולה ומעל נקודות החיבור בין תאים בעלי עגבנייה (Mariano and McCarter, 1993), אגס (Mansvelt and Hattingh, 1987), תפוח (Mansvelt and Hattingh, 1989) ובגידולים נוספים (Beattie and Lindow, 1999). גם שמרים אפיפיטים מסוג *Sporobolomyces roseus* ו- *Cryptococcus laurentii* התרכזו לרוב במקומות נמוכים בעלי חיטה (Dik et al., 1992).

1.2 השפעת תשטיפי עלים על גדילת החיידק B52

מאחר שבתצפיות במיקרוסקופ אלקטרונים סורק, ובמספר ניסויים נמצא כי הישרדות החיידק B52 הייתה טובה יותר על גבי עלים עם סימני מחלת קימחון, בדקנו אם הפרשות העלה, עם או ללא סימני קימחון, משפיעות על גדילת החיידק. נמצא כי להפרשות העלים עם או ללא סימני קימחון לא הייתה השפעה מובהקת על גדילת החיידק (סעיף 1.3).

המסקנה העיקרית, מחלק זה של המחקר, היא שהישרדות החיידק על עלים עם סימני מחלה הייתה מיטבית יותר בגלל שנוכחות תפטיר על גבי העלה מספקת יותר נישות וגומחות בהן מתקיימים תנאים מיטביים להישרדות החיידק, ולא עקב הפרשה של חומרים מהעלה עקב נגיעות במחלה (עלייה ב"דליפות" העלה), או הפרשה של הפתוגן עצמו. מסקנה זו עומדת בניגוד למסקנות ממחקרים אחרים. במחקר קודם הוצע כי נוכחות תפטיר קימחון על עלי מלפפון מעודדת הישרדות של *Sporothrix flocculosa*, אולם לא הוצע הסבר לתופעה (Dik et al., 1998). במחקרים אחרים, עם אותו מדביר ביולוגי, (Neveu *et al.*, 2007; Bélanger and Decon, 1996), הוצע כי הפתוגן מפריש מולקולות המשמשות סיגנל להיצמדות המדביר הביולוגי גם בפונדקאים אחרים כולל עגבנייה.

הצעתנו במחקר הנוכחי היא שלמרות שהאזור הנגוע על העלה הוא הידרופובי, בתנאי ריסוס בנפח גבוה וגודל טיפות קטן מתקבל כיסוי אחיד של העלה גם באזורים הנגועים במחלה, ומתאפשרת חדירה של החיידק לאזורים מוגנים על ידי תפטיר על העלה, וכתוצאה מכך הישרדותו טובה יותר בתנאים אלו.

1.3 השפעת גיל העלה על הישרדות המדבירים הביולוגים

נבדק האם קיים הבדל בין המדבירים הביולוגים (חיידק B52, או שמר Y13) ביכולת הישרדותם ואם גיל העלה משפיע על הישרדותם. נמצא הבדל מובהק בגודל אוכלוסיית שני המדבירים החל מ-24 שעות לאחר היישום ועד לשבוע לאחר מכן. אוכלוסייה החיידק B52 פחתה משמעותית כ-24 שעות לאחר הריסוס, עד לרמה של 40% מהכמות ההתחלתית בעלה בינוני או צעיר. לאחר מכן חלה התייצבות בגודל האוכלוסייה ורמתה נשארה קבועה גם לאחר שבוע (49% מהכמות ההתחלתית). בניגוד לחיידק, רמת האוכלוסייה של השמר Y13 הייתה יציבה במהלך תקופת הניסוי ורמתו נשארה גבוהה (80%) גם לאחר שבוע על גבי עלים בגילים השונים (איור 5). תופעה זו, של ירידה דרסטית בגודל אוכלוסיית החיידק לאחר 24 שעות ולאחר מכן התייצבות ברמת אוכלוסיית החיידק מחד, ומאידך שמירה על רמת אוכלוסייה גבוהה גם לאחר שבוע ימים עבור השמר, התקבלה בניסויים רבים במחקר הנוכחי, ולא רק על עלים בגילים שונים, לכן תפורט בהמשך. תוצאות ניסוי זה מנוגדות למחקרים קודמים (Kinkel, 1997; Ercolani, 1991; Thompson *et al.*, 1993) בהם נמצא כי עלים מבוגרים יותר, של צמחים ממינים שונים, מפרישים יותר חומרי הזנה, עקב גורמים ביוטים וא-ביוטים, ולכן מעודדים התפתחות אוכלוסיות מיקרואורגניזמים שונות. יתכן ובמערכת זו גדילה והישרדות של המדבירים הביולוגים השונים תלויה פחות בכמות חומרי המזון על פני העלה, מאשר בגורמים אחרים.

1.4 השפעת שילוב מדבירים ביולוגים בתמיסת ריסוס על הישרדות המדבירים הביולוגים ועל התפתחות מחלת קימחון העגבנייה

נבדקה השפעת שילוב שני המדבירים הביולוגים (החיידק B52, והשמר Y13) בתרחיף הריסוס, על הישרדות כל אחד מן המדבירים בנפרד (סעיף 1.5), ועל התפתחות מחלת הקימחון בעגבנייה במשך 23 יום (סעיף 1.6). בצמחים שרוססו בתרחיף החיידק מעורב עם השמר ומהול לכדי מחצית הריכוז של כל מקרואורגניזם בודד הייתה רמת אוכלוסיית החיידק, לאחר 5 ימים, גבוהה באופן מובהק מאשר בצמחים שרוססו בתרחיף החיידק בלבד. יתכן ונוכחות של השמר בריכוז נמוך על העלים מעודדת את התפתחות או הישרדות החיידק. בשילוב המיקרואורגניזמים בריכוזם המלא (כמות המיקרואורגניזם כפולה) לא התקבל הבדל משמעותי בהישרדות החיידק (איור 6). ניתן לשער שלריכוז המיקרואורגניזם בתרחיף ישנה השפעה על הישרדות החיידק. יש להמשיך ובדוק השערה זו בניסויים נוספים. הוצע בעבר כי שילוב מדבירים ביולוגים שונים יביא להגברת היעילות של הדברה ביולוגית (Elad *et al.*, 1994). במחקר קודם שבדק שילוב שני מדבירים ביולוגים: חיידק מסוג *Bacillus mycoides*, ושמר מסוג *Pichia guilermondii*, הפחית את חומרת העובש האפור בתות, והקטין את הווריאביליות של יעילות ההדברה, כאשר יושמו כל אחד מן המדבירים בנפרד (Guetsky *et al.*, 2001). שילוב המדבירים הפחית את חומרת המחלה עקב מנגנוני פעולה שונים של כל אחד מן המדבירים (Guetsky *et al.*, 2002). במחקר הנוכחי שילוב המדבירים הביולוגים בתרחיף הפחית באופן משמעותי את חומרת המחלה בהשוואה לביקורת, אולם לא התקבלה הפחתה משמעותית בעוצמת המחלה מאשר כל אחד מן המדבירים בנפרד (איור 7, טבלה 5). כאמור גם בהקשר זה של הפחתת חומרת המחלה על ידי שילוב מדבירים ביולוגים בתרחיף יש להמשיך ולבדוק בניסויים נוספים את השפעת ריכוז כל אחד מן המדבירים בתרחיף על יעילות המדבירים בהפחתת חומרת המחלה.

2. השפעת גורמי מיקרואקלים ונוכחות מחלה על הישרדות המדבירים הביולוגים

השפעת גורמי מקרואקלים (טמפרטורה ולחות יחסית) ונוכחות מחלה על הישרדות המדבירים הביולוגים נבדקה בשלושה שלבים פנולוגים: צמחים צעירים (3-5 עלים), צמחים בגובה בינוני (9-11 עלים), ובצמחים בוגרים (19-21 עלים). הניסויים נערכו באנקובאטורים, חדרי גידול ובתי רשת בהתאם לגודל הצמח.

החיידק B52 הראה רגישות רבה לטמפרטורה, לחות יחסית ונוכחות מחלה על העלים. בניסויים שנערכו באנקובאטורים, נמצאה השפעה מובהקת ללחות היחסית ולטמפרטורה על הישרדות החיידק (סעיף 2.1). בלחות יחסית נמוכה ובטמפרטורות בינוניות (20-30 מ״צ) הישרדות החיידק הייתה מיטבית (טבלה 6). בלחות יחסית גבוהה הישרדות החיידק טובה יותר באופן מובהק בטמפרטורות נמוכות (10, 15 מ״צ) (טבלה 6, 7). בניסויים שנערכו בחדרי גידול נמצא כי לטמפרטורה ולנוכחות קימחון על העלה הייתה השפעה מובהקת על הישרדות החיידק (סעיף 2.2.1). בטמפרטורה נמוכה (15 מ״צ) ועל עלים עם קימחון הישרדות החיידק הייתה מיטבית (89% מהכמות ההתחלתית) (איור 10 א׳), לאחר שבוע ימים. בטווח זמן ארוך יותר (14 יום) לטמפרטורה הייתה השפעה מובהקת על הישרדות החיידק, עם הישרדות טובה יותר בטמפרטורה של 15 מ״צ לעומת 20 מ״צ (איור 11 א׳, טבלה 11). תוצאות אלו עולות בקנה אחד עם מחקרים קודמים שבדקו השפעת לחות יחסית על אוכלוסיות חיידקי *Pseudomonas syringae* על עליי מלפפון (Leben, 1988), ומחקרים נוספים (Beattie and Lindow, 1994, 1995,1999; Lindow and Brandl, 2003), שבדקו השפעת גורמי מיקרואקלים על אוכלוסיות חיידקים על פני העלה ומצאו כי בלחות יחסית גבוהה גדילה והישרדות החיידקים על פני העלה יותר טובה מאשר בלחות יחסית נמוכה.

גורמי האקלים יכולים להשפיע על הישרדות החיידק גם בעקיפין על ידי השפעה על הפונדקאי. בניסוי שנערך בבית רשת בו שררו שתי רמות לחות יחסית ושתי רמות נגיעות בקימחון רוססו המדבירים הביולוגים אחת לשבוע (סעיף 2.3.1). בחלקו הראשון של הניסוי (4 שבועות ראשונים) הישרדות החיידק הייתה טובה יותר בחלק היבש של המבנה, בפרק הזמן של 24 שעות לאחר היישום. בשבוע החמישי לניסוי הייתה עלייה בטמפרטורות במשך 3 ימים, דבר שגרם להתקפלות העלים והקשחתם בצמחים שהיו בחלק היבש של המבנה (איור 13). תופעה זו מוכרת בצמחי עגבנייה ונועדה להקטנת שטח פני העלה על מנת להפחית את איבוד המים מהעלה (Daie and Campbell, 1981). בהמשך הניסוי שררו בחלקו היבש של המבנה תנאים דומים לאלו ששרו בו בחלקו הראשון של הניסוי. לאחר גל החום הישרדות החיידק הייתה טובה יותר בחלק הלח של המבנה בו לא נצפתה תגובה של הצמחים לטמפרטורות גבוהות כמו בחלק היבש של המבנה (איור 14, טבלה 10). במחקרים קודמים הוכח כי למבנה ולטופוגרפיה של פני העלה ישנה השפעה רבה על מיקום, פיזור והתפתחות אוכלוסיות אפיפיטיות. השפעה זו יכולה להיות ישירה- אוכלוסיות גדולות יותר גדלו בצידו התחתון של העלה בגלל ריבוי פיוניות וטריכומות, מאשר על צידו העליון (Mansvelt and Hattingh, 1987; Surico, 1993), או עקיפה- מבנה העלה משפיע על תנאי המיקרואקלים בפני העלה, המשפעים על אוכלוסיות אפיפיטיות (O'Brien and Lindow, 1989; O'Brien et al., 1991; Kinkel et al., 2000; Mariano and McCarter, 1993). במחקר אחר נעשה שימוש בעלי עגבנייה מוטנטים חסרי טריכומות לעומת עלים נורמאלים עם טריכומות. חיידקי *P. syringae* pv. *Tomato* שרדו טוב יותר על עלים עם טריכומות (Schneider and Grogan, 1977). הבדלים בהתפתחות אוכלוסייה מיקרוביאלית על עלים של זנים עמידים ורגישים גם היא נקשרה לעיתים בשילוב בין גורמים חיצוניים ואנדוגנים (Cafti, 1980). שינויים בהתנהגות והרכב האוכלוסייה יכולים להיגרם גם

משינוי גיל העלה המעיד על שינויי מבנה, ויצירת תנאים מועדפים לאוכלוסיות שונות (Kinkel, 1997; Ercolani, 1991; Thompson *et al.*, 1993), אולם שינוי מבנה זה שונה באופיו וברמתו משינוי מבנה הנגרם מעקה. במחקר הנוכחי נמצא כי שינוי מבנה העלה של צמחי עגבנייה כתוצאה מעלייה קיצונית בטמפרטורה הביא להפחתה ביכולת ההישרדות של החיידק B52. יש לסייג ולומר כי יתכן ולגורמי האקלים הייתה השפעה ישירה על הישרדות החיידק בחלק היבש של המבנה, בחלקו השני של הניסוי. על מנת להוכיח באופן ודאי כי ההשפעה היא עקיפה יש לבדוק את הישרדות החיידק בתנאי לחות יחסית גבוהה על צמחים אשר שהו לפני כן במשטר לחות יחסית נמוכה, או אשר עברו עקת חום.

במחקר הנוכחי נבדקה השפעת עקת יובש על הישרדות המדבירים הביולוגים. המדבירים יושמו על צמחים אשר הושקו במשטרי השקיה שונים. לא נמצא הבדל משמעותי בהישרדות החיידק במשטרי השקיה שונים, אולם לא נבדק באופן ודאי כי הצמחים אכן סבלו מעקת יובש ויתכן כי גם משטר ההשקיה הנמוך ביותר (133 מ"ל ליום) היה ברמה מספקת לצמח. יש לבדוק באופן ישיר את פוטנציאל המים בעלה או בצמח על מנת לוודא שאכן הצמחים נמצאים בעקת יובש. במחקר קודם נמצא כי בצמחים ששהו בעקת יובש (-0.2 ל- MPa-2.07 בפני העלה), החיידקים עצמם נחשפו לתנאי יובש שונים (-0.05 ל-0.42- MPa), דבר המעיד על התנאים הייחודיים השוררים בשכבת האוויר הצמודה לפני העלה (Beattie and Axtel, 2002). למרות ההבדלים בין תנאי היובש בתוך העלה לאלו השוררים על פניו, ניתן לשאר כי עקת יובש חזקה יותר כן הייתה גורמת לירידה בגודל אוכלוסיית החיידק, וזאת עקב רגישותו הגדולה ללחות יחסית.

בניסויים רבים בעבודה זאת נרשמה ירידה משמעותית בגודל אוכלוסיית החיידק B52, כ-24 שעות לאחר הריסוס (20-40% מהכמות ההתחלתית), לאחר מכן חלה התייצבות בגודל האוכלוסייה ורמתה נשארה קבועה גם לאחר שבוע. בניגוד לחיידק, רמת האוכלוסייה של השמר Y13 הייתה יציבה יותר במהלך תקופת הניסוי ורמתו נשארה גבוהה (80%) גם לאחר שבוע. תופעה זו, של ירידה דרסטית בגודל אוכלוסיית החיידק לאחר 24 שעות ולאחר מכן התייצבות ברמת אוכלוסיית החיידק מחד, ומאידך שמירה על רמת אוכלוסייה גבוהה גם לאחר שבוע ימים, עבור השמר התקבלה בניסויים רבים, בהם נבחנה השפעת גורמי אקלים שונים (טמפרטורה ולחות יחסית) ונוכחות מחלה על העלים, על הישרדות המדבירים הביולוגים. בטמפרטורות נמוכות (10, 15 מ"צ) ו/או בתנאי לחות יחסית גבוהה רמת אוכלוסיית החיידק נשארה יציבה יותר במספר ניסויים. ניתן להסיק שהירידה הדרסטית ברמת האוכלוסייה בטיפולים האחרים נובעת מהרגישות הרבה של החיידק לטמפרטורות גבוהות (20 מ"צ<) או לתנאי יובש ולאחר היישום שורדת רק אוכלוסיית החיידק הנמצאת על פני העלה במקומות בהם יש תנאים נאותים (בנקודות החיבור בין תאים, בנישות הנוצרות ע"י התפטיר, בסמוך לפיוניות ועוד). בנוסף יתכן וישנם גורמים אחרים המגבילים את אוכלוסיית החיידק כגון יחסי גומלין עם אוכלוסיות אחרות ועוד. מחקרים קודמים שבדקו השפעת גורמים שונים על אוכלוסיות מיקרוביאליות על פני העלה מצאו גם כן ירידה משמעותית באוכלוסיות חיידקים ממינים שונים. ירידה משמעותית ברמת אוכלוסיית חיידקי *Pseudomonas syringae*, מדבירים ביולוגים של *P. syringae* pv. *glycinea*, על עלי סויה, כ- 24 שעות לאחר היישום, הוסברה כהתאמה לתנאי הסביבה (Vöksch and May, 2001). גם עבור החיידק *Bacillus subtilis*, מדביר ביולוגי של *Cercospora beticola* בסלק סוכר, נרשמה ירידה משמעותית בגודל האוכלוסייה כ- 24 שעות לאחר היישום. בשעועית ותפוח אדמה נרשמה ירידה משמעותית בגודל אוכלוסיית חיידקי

Pseudomonas syringae, כתלות בלחות היחסית ולא בזמן כעבור היישום. בלחות יחסית גבוהה לא התקבלה ירידה משמעותית בגודל האוכלוסייה לעומת לחות יחסית נמוכה (Beattie and Lindow, 1994). ירידה משמעותית בגודל אוכלוסיות חיידקים שונות שאולחו על עלים של מינים שונים הייתה שונה בין מיני צמחים ומיני חיידקים, אולם בכולם נרשמה השפעה מובהקת ללחות היחסית (O'Brien and Lindow, 1989).

בניגוד לחיידק, הישרדות השמר Y13 לא הושפעה מתנאי טמפרטורה ולחות יחסית, או מנוכחות מחלה על העלים במרבית הניסויים. במספר ניסויים נמצאה השפעה מובהקת מבחינה סטטיסטית לשילוב בין טמפרטורה ולחות או טמפרטורה ונוכחות מחלה, אך רמת האוכלוסייה נשארה גבוהה (מעל ל- 80% מהכמות ההתחלתית), וזאת בניגוד למחקרים קודמים, שהראו תלות גבוהה בגורמי מיקרואקלים. אוכלוסיות שמרים *Sporobolomyces roseus* גדלו טוב יותר בלחות יחסית 90%< על עלי חיטה, מאשר בלחות נמוכה (Bashi and Fokkema, 1977). אוכלוסיית שמרים לבנים (*Cryptococcus* spp.) וורודים (*Sporobolomyces* spp.), גדלה בצורה מיטבית בטווח הטמפרטורות של 12- 24 מ״צ. בטמפרטורות גבוהות או נמוכות הגדילה לא הייתה מיטבית. התפתחות אוכלוסיית שמרים מסוג *Cryptococcus* spp. הושפעה מגרעון לחץ האדים. הישרדות מיטבית הייתה בגרעון לחץ אדים קבוע של 0.1 KPa או בטווח של 0.1 – 0.61 KPa (Dik et al., 1992). בתנאים מבוקרים, יעלות השמר *Cryptococcus albidus* כנגד *Botrytis cinerea*, בתות שדה, הייתה בטמפרטורה של 10 מ״צ, לעומת טמפרטורות גבוהות יותר (15, 20 מ״צ). בתנאי חממה, תוסף אלגינאט, קסנטן וצלולוז לתרחיף שיפר משמעותית את יעילות ההדברה, ואפשר פעילות בתנאי לחות יחסית נמוכה וטמפרטורה גבוהה (Helbig, 2002).

במחקר הנוכחי נבדקה השפעת גורמי מיקרואקלים על שמר מסוג שונה (*Rhodotorula* sp.), הדבר מלמד על תגובה שונה לגורמי אקלים לסוגים שונים של שמרים, או בין סוגי מדבירים ביולוגים שונים כפי שהתקבל במחקר זה עבור החיידק (*Pseudomonas* sp.) והשמר.

3. השפעת גורמי אקלים ויישום מדבירים ביולוגים על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה

במחקרים שנערכו בעבר נבדקה השפעת הלחות היחסית על התפתחות קימחונות בגידולים שונים (Amsalem et al., 2006; Elad et al., 2007; Carroll and Wilcox, 2003; Te) ועל קימחון העגבנייה (Jacob et al., 2008; Whipps and Budge, 2000; Jarvis et al., 2000). במרבית המקרים מחלה חמורה יותר התפתחה בתנאי לחות יחסית גבוהה (80-90%) לעומת התפתחותה בלחות יחסית נמוכה (60-80%). הפחתת חומרת המחלה ע״י שימוש במדברים ביולוגים והשפעת הלחות היחסית על יחסי גומלין אלו גם נבדקהו בעבר. למרבית המדבירים דרושים תנאים של לחות יחסית גבוהה (85%<) וטמפרטורות מתונות (20-28 מ״צ) המקנים גרעון לחץ אדים נמוך (2.5 mbar>) (Elad et al., 1998). עקב רגישותם הרבה של מדבירים ביולוגים ללחות יחסית הוצע כי הגברת הלחות בבתי צמיחה תשפר את פעילותם (Paulitz and Bélanger, 2001).

במחקר הנוכחי נבחנה פעילות המדבירים הביולוגים בשני משטרי לחות יחסית, גבוהה ונמוכה, ושתי רמות נגיעות התחלתית, גבוהה ונמוכה. בדומה למחקרים קודמים, ללחות היחסית השפעה מובהקת על התפתחות מחלת הקימחון בעגבנייה. בלחות יחסית גבוהה התפתחה מחלה חמורה יותר מאשר בלחות

יחסית נמוכה (טבלה 14). החיידק B52 הפחית את חומרת המחלה, בהשוואה לביקורת, בתנאי לחות יחסית גבוהה, בצמחים בהם הייתה הדבקה טבעית (ללא נגיעות התחלתית) כאשר יושם אחת לשבוע, אולם לא התקבלה הפחתת מחלה בתנאי יובש או בצמחים עם רמת מחלה גבוהה (איור 18). השמר Y13 לא הפחית את חומרת המחלה בניסוי זה (איור 19), אולם ראוי להדגיש כי יישום המדבירים אחת לשבוע ובריכוז שנוסה נועד לבדוק את השפעת הגורמים השונים (לחות יחסית ונגיעות התחלתית) על הישרדות המדבירים ולא את יעילותם בתנאים שונים. יתכן ובמשטר ריסוסים יותר תכוף או בריכוז גבוה יותר של מדבירים בתרחיף הריסוס הייתה מתקבלת הפחתה מובהקת בחומרת המחלה, כפי שהתקבל בעבודות קודמות בהן יישום השמר Y13 פעמיים בשבוע בריכוז דומה לזה שהיה במחקר זה כן הפחית את חומרת המחלה (יעקב, 2008) ובעבודה הנוכחית בניסוי מקדים (איור 7, טבלה 5).

4. סיכום

בכדי להשתמש במיקרואורגניזם להדברה ביולוגית להדברת פתוגנים התוקפים את העלים יש צורך בהבנה עמוקה של יחסיי הגומלין בין הצמח, הפתוגן והמקרואורגניזמים. יחסי גומלין אלו מושפעים מגורמים חיצוניים, כגון מיקרואקלים בפני השטח של העלה, מגורמים הקשורים בצמח עצמו, וגורמים התלויים במיקרואורגניזם על פני העלה (Blakeman, 1985). במחקר הנוכחי אפיינו יחסיי הגומלין המשולשים בין הצמח הפונדקאי (עגבנייה), הפתוגן (קימחון) ושני מדבירים הביולוגים של מחלה זו. בנוסף נבדקה השפעת גורמי מיקרואקלים על מערכת זו, וזאת במסגרת חקר השפעות שינויי אקלים על מחלות צמחים.

לגורמי מיקרואקלים השפעה מובהקת על הישרדות החיידק *Pseudomonas* sp. B52. נראה כי ללחות היחסית השפעה משמעותית יותר מאשר לטמפרטורה על הישרדות החיידק. הישרדות מיטבית התקבלה בלחות יחסית גבוהה. גם לנוכחות המחלה על העלה הייתה השפעה מובהקת על הישרדות החיידק. למרות שהאזור הנגוע הוא הידרופובי, נוכחות התפטיר על העלה יוצרת גישות וגומחות בהן שוררים תנאים טובים יותר להישרדות החיידק. גורמי מיקרואקלים השפיעו על הישרדות החיידק גם באופן עקיף. בצמחיי עגבנייה שהיו בעקת חום הישרדות החיידק הייתה נמוכה מזו על צמחים שלא הראו סימני עקה. בניגוד לחיידק, המדביר הביולוגי שמר מסוג *Rhodoturula* sp. Y13 הראה יציבות רבה בתנאי מיקרואקלים שונים בניסויים רבים במחקר הנוכחי. אוכלוסיית השמר נשארה יציבה וגבוהה גם לאחר 16 יום במשטרי אקלים ונוכחות מחלה שונים. יתכן וניתן לנצל תופעה זו על מנת להגביר את היעלות של הדברה ביולוגית על ידי שימוש במדבירים ביולוגים אשר רגישים במידה מועטה לגורמי אקלים שונים.

ללחות היחסית השפעה מובהקת על התפתחות מחלת קימחון העגבנייה בתנאיי שדה. בלחות יחסית גבוהה חומרת המחלה הייתה גבוהה יותר מאשר בתנאי לחות יחסית נמוכה. המדביר הביולוגי חיידק B52 הפחית את חומרת המחלה רק בצמחים בהם ההדבקה הייתה טבעית וחומרת המחלה הייתה נמוכה יחסית. המדביר הביולוגי Y13 לא הראה יעילות בהפחתת חומרת המחלה בתנאי שדה, אולם שני המדבירים הביולוגים הפחיתו את חומרת המחלה בתנאים מבוקרים בהשוואה לביקורת. לא נמצאה יתרון מובהק לשילוב המדבירים יחדיו בתרחיף בהפחתת חומרת המחלה או בהישרדות כל אחד מן המדבירים, אולם נדרשים ניסויים נוספים בתחום זה.

רשימת ספרות

גנץ, ש׳ 2008. גידול עגבניות בישראל. שדה וירק. גיליון 2: 28-29.

זידאן, ע׳ 2001. גידול עגבניות בבתי צמיחה. הוצאת שה״מ- משרד החקלאות ופיתוח הכפר שירות ההדרכה והמקצוע, האגף לירקות.

יעקב, ד׳ 2007. היבטים אפידמיולוגים והפחתת נזקי מחלת קימחון העגבנייה נגרמת ע״י הפטרייה *Oidium neolycopersici*. עבודת גמר, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה, האוניברסיטה העברית בירושלים. עמודים 33-37.

לשכה מרכזית לסטטיסטיקה (למ״ס). שנתון סטטיסטי לישראל. 2009. שטחי גידול חקלאיים וערך התפוקה החקלאית. http://www.cbs.gov.il/energy/shnatonhnew_site.htm

מנדלסון, ע׳ 2006. יעילות של מיקרואורגניזמים בהדברה של קימחון. עבודת גמר, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה, האוניברסיטה העברית בירושלים. עמודים 22-38.

מסיקה, י׳ 2008. הגנת הצומח בעגבניות- תמונת מצב ומבט לעתיד. שדה וירק. גיליון 2: 55-57.

פלטי, י׳ 1998. נביגה. מתוך: רותם, י׳, פלטי, י׳ ובן יפת, י׳ (עורכים) מחלות צמחים בישראל. ע׳: 45-51. הוצאת מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן.

פלטי, י׳ 1998א. קימחונות. מתוך: רותם, י׳, פלטי, י׳ ובן יפת, י׳ (עורכים) מחלות צמחים בישראל. ע׳: 185-197. הוצאת מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן.

צרור, ל׳, נחמיאס, א׳ וקריקון, ח׳ 1998. מחלות בסולניים. מתוך: רותם, י׳, פלטי, י׳ ובן יפת, י׳ (עורכים) מחלות צמחים בישראל. ע׳: 353-365. הוצאת מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן.

Allen, E.A., Hoch, H.C., Steadman, J.R., and Stavely, R.J. 1991. Influence of leaf surface features on spore deposition and epiphytic growth of phytopathogenic fungi. In: Andrews, J.H., and Hirano, S.S. (eds.) Microbial Ecology of Leaves (pp. 87-110). Springer-Verlag New York Press, NY, USA.

Amsalem, L., Freeman, S., Rav David, D., Nitzani, Y., Sztejnberg, A., Pertot, I. and Elad, Y. 2006. Effect of climatic factors on powdery mildew caused by *Sphaerptheca macularis* sp. *fragariae* on strawberry. Eur. J. Plant Pathol. 114: 283-292.

Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annu. Rev. Phytopathol. 30:603-635.

Andrews, J.H., and R.F. Harris. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annu. Rev. Phytopathol. 38:145–180.

Andrews J.H., Spear R.N., and Nordheim E.V. 2002. Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces, Can. J. Microbiol. 48:500–513.

Arredondo, C.R., Davis, R.M., Rizzo, D.M., and Stahmer, R. 1996. First report of powdery mildew of tomato in California caused by an *Oidium* sp. Plant Dis. 80: 1303.

Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Höfte, M. 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Mol. Plant Microbe Interact.. 15:1147–1156.

Bai, Y., Van der Hulst, R., Bonnema, G., Marcel, T.C., Meijer-Dekens, F., Niks, R.E., and Lindhout, P. 2005. Tomato defense to *Oidium neolycopersici*: dominant Ol genes confer isolate dependent resistance via a different mechanism than recessive. MPMI 18: 354-362.

Bashi, E., and Fokkema, N.J. 1977. Environmental factors limiting growth of *Sporobolomyces roseus*, an antagonist of *Cochliobolus sativus*, on wheat leaves. Trans. Brit. Mycol. Soc. 68: 17-25.

Beattie, G.A. 2002. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. In: Lindow, S.E., Hecht-Poinar, E.I and Elliott, V (eds.). Phyllosphere microbiology. (pp. 3–26). APS Press, St. Paul, MN, USA.

Beattie, G.A., and Axtell. C.A. 2002. The use of *proU-gfp* transcriptional fusion to quantify water stress on the leaf surface. In: Leong, S.A., Allen, C., and Triplett, E.W. (eds.). Biology of plant-microbe interactions. (pp. 235–240). International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN. USA.

Beattie, G.A., and Lindow, S.E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. Phytopathology 89:353–359.

Beattie, G.A., and Lindow, S.E. 1994. Survival, growth and localization of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* on leaves. Appl. Environ. Microbiol. 60:3790-3798.

Beattie, G.A., and Lindow, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Annu. Rev. Phytopathol. 33:145-172.

Bélanger, R.R., and Benyagoub, M. 1997. Challenges and prospects for integrated control of powdery mildews in the greenhouse. Can. J. Plant Pathol. 19: 310-314.

Bélanger, R.R., and Deacon, J.W. 1996. Interaction specificity of the biocontrol agent Sporothrix flocculosa: a video microscopy study. Phytopathology 86:1317–1323.

Bergot, M., Cloppet, E., Pérarnaud, V., D´equ´e, M., Marcais, B., and Desprez-Loustau, M.L. 2004. Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. Glob. Change Biol. 10:1539–1552.

Blakeman, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: Windels, C.E., and Lindow, S.E. (eds.). Biological Control on the Phylloplane. (pp. 6-30). APS Press, St. Paul, MN, USA.

Boller, T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46:189–214.

Braun, U., Cook, R.T.A., Imman, A.J., and Shin, H.D. 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: Bélanger, R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. (eds.). The Powdery Mildews. (pp. 13-55). The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA.

Bunster, L., Fokkema, H.J., and Schippers, B.1989. Effect of surface activity of *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. Appl. Environ. Microbiol. 55:1340–1345.

Burrage, S.W. 1976. Aerial microclimate around plant surfaces. In: Dickinson, C.H., and Preece, T.F., (eds.). Microbiology of Aerial Plant Surfaces. (pp. 173-184). Springer-Verlag New York Press, NY, USA.

Cafati, C.R., and Saettler, A.W. 1980. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. Phytopathology 70:675-79.

Cheng, Y.T, Rodak, D.E, Wong, and C. A. Hayden, C.A. 2006. Effects of micro- and nano-structures on the self-cleaning behaviour of lotus leaves. Nanotechnology. 17: 1359.

Coakley, S.M., Scherm, H., and Chakraborty, S. 1999. Climate change and plant disease management. Annu. Rev. Phytopathology 37:399–426.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49:711–745.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284:1318–1322.

Csonka, L.N., and Hanson A.D., 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. Annu. Rev. Microbiol. 45: 569-606.

Daie, J., and Campbell, W.F. 1981. Response of tomato plants to stress temperatures: increase in abscisic acid concentrations. Plant Physiol. 67:26-29.

Davis, C.L., and Brlansky, R.H. 1991. Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 57:3052-3055.

De Cal, A., Redondo, C., Sztejnberg, A., and Melgarejo, P. 2008. Biocontrol of powdery mildew by *Penicillium oxalicum* in open-field nurseries of strawberries. BioControl. 47:103–107.

Derridj, S. 1996. Nutrients on leaf surface. In: Morris, C.E., Nicot, P.C., and Nguyen, C. (eds.). Aerial Plant Surface Microbiology. (pp. 25-42). Plenum Press, NY, USA.

Dik, A.J., Fokkema, N.J., Van Pelt, J.A. 1992. Influence of climatic and nutritional factors on yeast population dynamics in the phyllosphere of wheat. Microb. Ecol. 23:41–52.

Dik, A.J., Verhaar, M.A., and Bélanger, R.R. 1998. Comparison of three biological control agents against cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in semicommercial-scale glasshouse trials. Eur. J. Plant Pathol. 104:413–423.

Duffy, B., Keel, C., and Défago, G. 2004. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. Appl. Environ. Microbiol. 70:1836-1842.

Eken, C. 2005. A review of biological control of rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) by fungal antagonists. Acta Hort. 690: 193-196.

Elad, Y., Bélanger, R.R., and Köhl, J. 1999. Biological control of diseases in the phyllosphere. In: Albajes, R., Gullino, M.L., Van Lenteren, J.C., and Elad, Y. (eds.). Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. (pp. 338-352). Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherland.

Elad, Y., Kirshner, B., and Sztejnberg, A. 1998. Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10. BioControl 43: 241–251.

Elad, Y., Köhl, J., and Fokkema, N.J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. Eur. J. Plant Pathol. 100:315-336.

Ercolani, G.L. 1991. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. Microb. Ecol. 21:35–48.

Evans, E., Baierl, A., Semenov, M.A., Gladders, P., and Fitt, D.L.B. 2008. Range and severity of a plant disease increased by global warming. J. R. Soc. Interface. 5:525–531.

Fletcher J.T., Smewin, B.J., and Cook, R.T.A. 1988. Tomato powdery mildew. Plant Pathol. 37: 594-598.

Fokkema, N.J., and Schippers, B. 1986. Phyllosphere vs rhizosphere as environments for saprophytic colonization. In: Fokkema, N.J., and Van den Heuvel, J. (eds.). Microbiology of the phyllosphere. (pp. 137–159). Cambridge University Press, London, U.K.

Garrett, K.A., Dendy, S.P., Frank, E.E., Rouse, M.N., and Travers, S.E. 2006. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. Annu. Rev. Phytopathol. 44:489–509.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91:621-627.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., and Dinoor, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. Phytopathology 92:976-985.

Haefele, D.M., and Lindow, S.E. 1987. Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 53:2528-2533.

Hajlaoui, M.R., and Bélanger, R.R. 1991. Comparative effects of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powdery mildew. Neth. J. PL. Path. 97: 203–208.

Harvell, C.D., Mitchell C.E.,Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, S., and Samuel, M.D. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. Science 296:2158–2162.

Helbig, J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. BioControl 47:85–99.

Hendricks, C. W. 1972. Enteric bacterial growth ratesin river water. Appl. Microbiol. 24:168-174.

Hibberd, J.M., Whitbread, R., and Farrar, J.F. 1996. Effect of elevated concentrations of CO_2 on infaction of barley by *Erysiphe graminis*. Physiol. Mol. plant pathol. 48:37-53.

Highland, H.B. 2000. AgraQuests search for Serenade: The isolation and development of a new biopesticide for plant protection. Phytopathology 90: S101(Abst).

Hijwegen, T. 1992 Biological control of cucumber powdery mildew with *Tilletiopsis minor* under greenhouse conditions. Neth. J. Pl. Path.98:211–215.

Holland, M.A., Long, R.L.G., and Polacco, J.C. 2002. *Methylobacterium* spp.: phylloplane bacteria involved in cross-talk with the plant host? In: Lindow, S.E., Hecht-Poinar, E.I., and Elliot, V.J. (eds.). Phyllosphere microbiology. (pp. 125–135). APS Press, St. Paul, MN. USA.

Hollomon, D.W., and Wheeler, I.E. 2002. Controlling powdery mildews with chemistry. In: Bélanger, R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. (eds.). The Powdery Mildews. (pp. 249-267). APS Press, St. Paul, MN, USA.

Horsfall, J.G., and Barratt, R.W. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases (Abst.). Phytopathology 35:655.

Huang, C., Biesheuvel, J., Lindhout, P., and Niks, R.E. 2000. Host range of *Oidium lycopersici* occurring in the Netherlands. Eur. J. Plant Pathol. 106: 465-473.

Hutchison, M.L., Tester, M.A., and Gross, D.C. 1995. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. MPMI. 8:610–620.

IPCC, Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., and Miller, H.L.(eds). Cambridge University Press, Cambridge, U.K and NY, U.S.A.

Jacob, D., Rav David, D., Sztjenberg, A., and Elad, Y. 2008. Conditions for development of powdery mildew of tomato caused by *Oidium neolycopersici*. Phytopathology 98:270-281.

Jacobs, J.L., and Sundin, G.W. 2001. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. Appl. Environ. Microbiol. 67:5488–5496.

Jacobsen, B.J., Zidack, N.K., and Larson, B.J. 2004. The role of Bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems. Phytopathology 94: 1272-1275.

Jarvis, W.R., Gubler, W.D., and Grove, G.G. 2002. Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. In: Bélanger, R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. (eds.). The Powdery Mildews. (pp. 169-199). APS Press, St. Paul, MN, USA.

Jarvis, W.R., Shaw, L.A., and Traquair, J.A. 1989. Factors affecting antagonism of cucumber powdery mildew by *Stephanoascus flocculosus* and *S. rugulosus*. Mycol. Res. 92:162–65.

Jones, H., Whipps, J.M., Thomas, B.J., Caraver, L.W. and Gurr, S.J. 2000. Initial events in the colonization of tomatoes by *Oidium lycopersicon*, a distinct powdery mildew fungus of *Lycopersicon* species. Can. J. Bot. 78: 1361-1366.

Juniper, B.E. 1991. The leaf from the inside and the outside: A microbe's prespective. In: Andrews, J.H., and Hirano, S.S. (eds.). Microbial Ecology of Leaves. (pp. 21-42). Springer-Verlag New York Press, NY, USA.

Kamata, N., Esaki, K., Kato, K., Igeta, Y., and Wada, K. 2002. Potential impact of global warming on deciduous oak dieback caused by ambrosia fungus *Raffaelea* sp. carried by ambrosia beetle *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae) in Japan. Bull. Entomol. Res. 92:119–126.

Kinkel, L.L. 1997. Microbial population dynamics on leaves. Annu. Rev. Phytopathol. 35:327–347.

Kinkel, L.L., Andrews, J.H., and Nordheim, E.V. 1989. Fungal immigration dynamics and community development on apple leaves. Microb. Ecol. 18:45–58.

Kinkel, L.L., Wilson, M., and Lindow, S. E. 2000. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. Microb. Ecol. 39:1–11.

Kiraly, Z., El-Zahaby, H.M., and Klement, Z. 1997. Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime in plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. J. Phytopathol. 145:59–68.

Kiss, L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol. Pest Man. Sci. 59: 475–483.

Kiss, L., Cook, RT.A., Saenz, G.S., Cunnington, J.H., Takamatsu, S., Pascoe, I., Bardin, M., Nicot, P.C., Sato, Y., and Rossman, A.Y. 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. Mycol. Res. 105: 684-697.

Kiss, L., Russell, J.C., Szentiványi, O., Xu, X., and Jeffries, P. 2004. Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi. Bio. Sci. Tech. 14: 635-651.

Kiss, L., Takamatsu, S., and Cunnington, J.H. 2005. Molecular identification of *Oidium neolycopersici* as a casual agent of the recent tomato mildew epidemics in North America. Plant Dis. 89: 491-496.

Ko, W.H., Wang, S.Y., Hsieh, T.F., and Ann, P.J. 2003. Effects of sunflower oil on tomato powdery mildew caused by *Oidiun neolycopersici*. J. Phytopathol. 151: 144-148.

Krimm, U., Abanda-Nkpwatt, D., Schwab, W., and Schreiber L. 2005. Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. FEMS Microbiol. Ecol. 53:483-492.

LaMondia, J.A., Smith, V.L., and Douglas, S.M. 1999. Host range of *Oidium lycopersicum* on selected *Solanaceous* species in Connecticut. Plant Dis. 83: 341-344.

Lebeda, A., Mieslerova, B., Luhova, L., and Mlickova, K. 2002. Resistance mechanisms in *Lycopersicon* spp. to tomato powdery mildew (*Oidium neolycopersici*). Plant Prot. Sci. 38: 141-144.

Leben, C. 1988. Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. Phytopathology 78:179-185.

Lee, S., Kim, S.H., and Breuil, C., 2002. The use of the green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi. For. Pathol. 32:153–161.

Lindhout, P., Gerard, P., and Van der Breek, H. 1994. Screening wild *Lycopersicon* species for resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersici*). Euphytica 72: 43-49.

Lindow, S.E., and Andersen, G.L. 1996. Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. Appl. Environ. Microbiol. 62:2978–2987.

Lindow, S.E., and Brandl, M.T., 2003. Microbiology of the phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol. 69:1875–1883.

Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., and Jansson, J.K. 2004. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fuorescent protein reporter systems. Appl. Environ. Microbiol. 5:3073–3081.

Mansvelt, E.L., and Hattingh, M.J. 1987. Scanning electron microscopy of pear blossom invasion by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Can. J. Bot. 65:2523-2529.

Mansvelt, E.L., and Hattingh, M.J. 1987. Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Can. J. Bot. 65:2517-2522.

Mansvelt, E.L., and Hattingh, M.J. 1989. Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 55:533-538.

Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B.A., and Sharon, A. 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. Mycol. Res. 102:491–496.

Mariano, R.L.R., and McCarter, S.M. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. Microbiol. Ecol. 26:47-58.

Marois, J.J., Momol, M.T., Kimbrough, J.W., Hochmuth, R.C., and Dankers, W. 2001. First report of powdery mildew on greenhouse tomatoes caused by *Oidium neolycopersici* in Florida. Plant Dis. 85: 1292.

Matsuda, Y., Kashimoto, K., Takikawa, Y., Aikami, R., Nonomura, T., and Toyoda, H. 2001. Occurrence of new powdery mildew on greenhouse tomato cultivars. J. Gen. Plant Pathol. 67: 294-298.

McElrone, A.J., Reid, C.D., Hoye, K.A., Hart, E., and Jackson, R.B. 2005. Elevated CO2 reduces disease incidence and severity of a red maple fungal pathogen via changes in host physiology and leaf chemistry. Glob. Change Biol. 11:1828–1836.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and Yang He, S. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell 126:969–980.

Mercer, P.C., Wood, R. K. S., and Greenwood, A. D. 1971. Initial infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Preece, T. F., and Dickinson, C. H. eds., Ecology of Leaf Surface Micro-organisms (pp. 381-389). Academic Press, London.

Mercier, J., and S.E. Lindow. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. Appl. Environ. Microbiol. 66**:**369–374.

Mew, T. W., Mew, I. C., and Huang, J. S. 1984. Scanning electron microscopy of virulent and avirulent strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on rice leaves. Phytopathology 74:635-641.

Mieslerova, B., Lebeda, A., and Kennedy, R. 2004. Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non host plant species and their tissue defense responses. Ann. appl. Biol. 144: 237-248.

Neveu, B., Labbé, C., and Bélanger, R.R. 2006. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: a case study with *Pseudozyma flocculosa*. J. Microbiol. Methods.68:275-281.

Nicot, P.C., Bardin, M., and Dik, A.J. 2002. Basic methods for epidemiological studies of Powdery mildews: Culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. In: Bélanger, R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. (eds.). The Powdery Mildews. (pp. 83-99). The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA.

O’Brien, R.D., Jochimsen, K.N., and Van Bruggen, A.H.C. 1991. Lack of survival of *Rhizomonas suberifaciens* on lettuce and barley leaves. Plant Dis. 75:954-957.

O'Brien, R.D., and Lindow, S.E. 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. Phytopathology 79:619-627.

Oichi, W., Matsuda, Y., Nonomura, T., Toyoda, H., Xu, L., and Kusakari, S. 2006. Formation of conidial pseudochains by tomato powdery mildew *Oidium neolycopersici*. Plant Dis. 90: 915-919.

Paulitz, T.C., and Bélanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Ann. Rev. Phytopathol. 39: 103-133.

Pfender, W.F., and Vollmer, S.S., 1999. Freezing temperature effect on survival of *Puccinia graminis* subsp. *graminicola* in *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. Plant Dis. 83:1058–1062.

Philipp, W.D., Beuther, E., Hermann, D., Klinkert, F., Oberwalder, C., Schmidtke, M., and Straub, B. 1990. Formulation of the powdery mildew hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. *Z. Pflanzenkr. Pflanzensschutz* 97:120–132.

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A., and Van Loon, L.C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. Plant Cell 8:1225–1237.

Plessl, M., Heller, W., Payer, H.D., Elstner, E.F., Habermeyer, J., and Heiser, I. 2005. Growth parameters and resistance against *Drechslera teres* of spring barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Scarlett) grown at elevated ozone and carbon dioxide concentrations. Plant Biol.7:694–705.

Precee, T.F., Barnes,G., and Bayley, J.M. 1967. Junction between epidermal cells as sites of appressoruim formation by plant pathogenic fungi. Plant. Pathol. 16:117-118.

Preston, G.M., Bertrand, N., and Rainey., P. B. 2001. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Mol. Microbiol. 41:999–1014.

Roberson, E.B., and Firestone, M.K. 1992. Relationship between desiccation and exo polysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbioi. 58:1284-1291.

Romero, D., de Vicente, A., Zeriouh, H., Cazorla, F. M., Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., and Pérez-García, A. 2007. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. Plant Pathol. 56: 976–986.

Schneider, R.W., and Grogan, R.G. 1977. Tomato leaf trichomes, a habitat for resident populations of *Pseudomonas tomato*. Phytopathology 67:898-902.

Schönherr, J., and Baur, P. 1996. Cuticle permeability studies: A model for estimating leaching of plant metabolites to leaf surfaces. In: Morris, C.E., Nicot, P.C., and Nguyen-The, C. (eds.). Aerial Plant Surface Microbiology. (pp. 1-24). Plenum Press, NY, USA.

Spear, R.N., Cullen, D., and Andrews, J.H. 1999. Fluorescent labels, confocal microscopy, and quantitative image analysis in the study of fungal biology. Methods Enzymol. 307:607–623.

Spellig, T., Bottin, A., and Kahmann, R., 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus Ustilago maydis. Mol. Gen. Genet. 252:503–509.

Spencer, D.M., and Ebben, M.H. 1983. Biological control of cucumber powdery mildew. In: Annual Report of the Glasshouse Crops Research Institute 1981, Littlehampton, pp. 128–129.

Sundin, G.W., and Jacobs, J.L. 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogeae* L.). Microb. Ecol. 38:27–38.

Surico, G. 1993. Scanning electron microscopy of olive and oleander leaves colonized by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. J. Phytopathol. 138:31-40.

Tapsoba, H., and Wilson, J.P,. 1997. Effects of temperature and light on germination of urediniospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. *indica*. Plant Dis. 81:1049–1052.

Thompson, I.P., Bailey, M.J., Fenlon, J.S., Fermor, T.R, and Lilley, A.K. 1993. Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). Plant Soil 150:177–191.

Thompson, I.P., Bailey, M.J., Fenlon, J.S., Fermor, T.R., Lilley, A.K., Lynch, J.M., McCormack, P.J., McQuilken, M.P., and Purdy, K.J. 1993. Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). Plant Soil 150:177–191.

Urquhart, E.J., Menzies, J.G., and Punja, Z.K. 1994 Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on greenhouse cucumber. Phytopathology 84:341–351.

Verhaar, M.A., Hijwigen, T., and Zadoks, J.C. 1999. Improvement of the efficacy of *Verticillium lecanii* used in biocontrol of *Sphaerotheca fuliginea* by addition of oil formulations. BioControl 44:73–87.

Voelksch, B., and May, R. 2001. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. Microb. Ecol. 41: 132–139.

Whipps, J.M., and Budge, S.P. 2000. Effect of humidity on development of tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in the glasshouse. 1998. Eur. J. Plant Pathol. 106: 395-397.

Whipps, J.M., Budge, S.P., and Fenlon, J.S. 1998. Characteristics and host range of tomato powdery mildew. Plant Pathol. 47: 36-48.

Wilson, M., and Lindow., S.E. 1994. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. Appl. Environ. Microbiol. 60:4468–4477.

Wilson, M., Hirano, S.S., and Lindow, S.E. 1999. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. Phytopathology 65:1435–1443.

Wösten, H.A.B, Schuren, F.H.J., and Wessels, J.G.H. 1994. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. EMBO J. 13:5848–5854.

Wösten, H.A.B., De Vocht, M.L. 2000. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. Biochim. Biophys. Acta. 1469:79–86.

Wright, C.A., and Beattie, G.A. 2004. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cells encounter inhibitory levels of water stress during the hypersensitive response of *Arabidopsis thaliana*. PNAS. 101:3269–3274.

Abstract

Oidium neolycopersici is the causal agent of tomato powdery mildew (TPM). This disease is characterized by powdery white lesions found on leaves, petioles, the stem and the calyx. Severe infections lead to marked reductions in fruit size and quality, and to leaf mortality. Environmental conditions influence the different stages of the disease cycle. Severe disease outbreaks develop under moderate temperature and moderate relative humidity conditions (22-25ºC, 70-85% RH). Repeated applications of chemical fungicides are used to control TPM. There is great interest in alternative methods for controlling TPM, such as biocontrol. Biocontrol agents (BCA) can provide sufficient control, but they are sensitive to environmental conditions. For this reason a better understanding of the influence of environmental factors on plant-pathogen-BCA interactions might help us to improve the efficacy of BCA treatments. Our aim was to evaluate the effects of different environmental conditions on the development and survival of two BCAs applied against TPM. The two microorganisms, a bacterium (*Pseudomonas* sp. B52) and a yeast (*Rhodotorula* sp. Y13), reduced powdery mildew severity on tomato plants when applied individually or in combination (60 and 78% control efficiency, respectively). In the combination treatment, the size of each BCA population was not affected by the presence of the other BCA. Scanning electron microscopy revealed differences in the distribution of the bacteria population on the leaves in the absence and presence of powdery mildew. On symptomless leaves the bacteria concentrated at the epidermal cell wall junctions and in the grooves along the veins, while on infected leaves the bacteria concentrated in niche and recess created by the mycelium. The distribution of the yeast population was not affected by the presence of powdery mildew on the leaf.

The size of the population of the bacterium B52 was greatly affected by microclimate conditions. Population size was examined at six different temperatures (10, 15, 20, 25, 30, 35ºC) and two different RH levels (60-70 or 85-90%). This examination revealed that population size declined significantly at high temperatures (25-35ºC) and under low RH (60-70%) conditions. In growth-room experiments, the size of the bacterial population remained high at 15ºC and on leaves showing disease symptoms. By 24 hours after application and incubation under different environmental conditions the size of the bacterial population had declined significantly (to 50% of the initial level), indicating a high level of sensitivity to microclimate conditions. The

bacterium had a better survival rate under high RH conditions than under less RH conditions. In an experiment performed in a commercial-like net house, the bacterial survival rate was higher on leaves showing disease symptoms than on symptom-less leaves. The size of the bacterial population also declined significantly on plants subjected to heat stress (40ºC).

The yeast Y13 was less affected by microclimate conditions. In experiments carried out under controlled conditions, its population level remained high and stable (80% of the initial population size) after 7 days, under the different temperature and RH conditions. In experiment carried out under net-house conditions, the size of the yeast population was not affected by different RH or disease conditions and survived well for 16 days. The size of the yeast population on adult tomato plants was also unaffected by heat or drought stress.

In the current research, we succeeded in characterizing the plant-pathogen-BCA interaction in the tomato powdery mildew pathosystem, as well as the effect of microclimate on the development and survival of two powdery mildew BCAs. The bacterium B52 was highly affected by microclimate conditions, while the yeast Y13 was less sensitive and survived better under the different climate conditions. We suggest that it may be possible to enhance the efficacy of biocontrol by selecting hardy BCA that thrive under a wide range of environmental conditions. This may become increasingly important in the future, as it is expected that global climate change may affect plant pathogen-BCA interactions.

This research was funded by the Autonomous Province of Trento, Call for Proposal Major Projects 2006, Project ENVIROCHANGE.

Influence of microclimate on plant - pathogen - biocontrol agents interactions in the tomato powdery mildew (*Oidium neolycopersici*) system

M. Sc. Thesis

Submitted to The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food, and Environment

By

Ohad Agra

Rehovot February 2011

This research was carried out
under the supervision of
Prof. Yigal Elad
Department of Plant Pathology
and Weed Research,
Agriculture Research
Organization, the Volcani
Center, Bet Dagan