יחסי גומלין בין אקרית הקרקע *Rhizoglyphus robini* וגורמי מחלות בבצל

טל אופק

עבודת גמר מחקרית (תיזה) המוגשת כמילוי חלק מהדרישות

לקבלת התואר "מוסמך האוניברסיטה"

אוניברסיטת חיפה

הפקולטה למדעי הטבע

החוג לביולוגיה אבולוציונית וסביבתית

אוקטובר, 2010

מוקדש באהבה רבה למשפחתי היקרה

יחסי גומלין בין אקרית הקרקע *Rhizoglyphus robini* וגורמי מחלות בבצל

מאת : טל אופק

בהנחיית : ד"ר אריק פלבסקי

פרופ' משה ענבר

עבודת גמר מחקרית (תיזה) המוגשת כמילוי חלק מהדרישות

לקבלת התואר "מוסמך האוניברסיטה"

אוניברסיטת חיפה

הפקולטה למדעי הטבע

החוג לביולוגיה אבולוציונית וסביבתית

אוקטובר, 2010

מאושר על ידי _____ **תאריך** 10/10/2010

(מנחה העבודה)

מאושר על ידי _____ **תאריך** 10/10/2010

(מנחה העבודה)

מאושר על ידי _____ **תאריך** 10/10/2010

(יו"ר הוועדה החוגית למ"א)

תודות

תודה והערכה גדולה למנחים שלי ולחוקרים השותפים על הלמידה, העזרה, התמיכה והסובלנות.

ד"ר אריק פלבסקי, המחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר נווה יער.

פרופ' משה ענבר, החוג לביולוגיה אבולוציונית וסביבתית, אוניברסיטת חיפה.

ד"ר עינת צחורי פיין, המחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר נווה יער.

ד"ר לאה צרור, מנהלת מרכז מחקר גילת ,המחלקה למחלות צמחים, מרכז מחקר גילת.

תודה גדולה :

שירה גל, מחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר נווה יער.

נטע מוזס דאובה ,מחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר נווה יער.

שרה לביוש מרדכי, המחלקה למחלות צמחים, מרכז מחקר גילת.

אלון לוטן, החוג לביולוגיה אבולוציונית וסביבתית, אוניברסיטת חיפה.

יונתן מעוז, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית.

פרופ' פאדל מנסור, מחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר נווה יער.

פאוזי אבו מוח, מחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר נווה יער.

עאיישה סעדיה, מחלקה לאנטומולוגיה, מרכז מחקר נווה יער.

ד"ר רוני כהן, מחלקה למחלות צמחים, מרכז מחקר נווה יער.

כרמלה חורב, מחלקה למחלות צמחים, מרכז מחקר נווה יער.

ד"ר סטנלי פרימן, מחלקה למחלות צמחים, מכון וולקני, בית דגן.

פרופ' אורי גרזון, המחלקה לאנטומולוגיה, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית.

ד"ר צלילה בן דויד, תחום אבחון נגעי צמחים, השירותים להגנת הצומח ולביקורת, בית דגן.

נביל עומרי, שרות ההדרכה והמקצוע, מחוז עמקים.

פרופ' עידו יצחקי, החוג לביולוגיה אבולוציונית וסביבתית, אוניברסיטת חיפה.

תודה למדריכי שה"מ **תמר אלון ויפתח גלע די** ולפקחית האזורית **רבקה רביב** על שיתוף הפעולה והעזרה בתכנון וביצוע ניסוי השדה בתחנת הניסיונות חוות עדן , מו"פ חקלאי , מועצה אזורית עמק המעיינות . כמו-כן, ברצוני להודות **לתמר פיליפ** על העזרה בניסוח והגהה **ולקרן המדען הראשי במשרד החקלאות** על המלגה הכספית לה זכיתי.

תוכן העניינים

עמוד

תקציר VI

רשימת טבלאות VII

רשימת איורים VIII

1 מבוא 1

1.1 הקדמה 1

1.2 אקרית הקרקע *Rhizoglyphus robini* 1

1.2.1 סקירה כללית 1

1.2.2 הביולוגיה של אקרית הקרקע 1

1.2.3 נזקי אקרית הקרקע 2

1.2.4 הדברה כימית של אקרית הקרקע 3

1.3 יחסי הגומלין בין אקרית הקרקע וגורמי מחלות בשושניים 3

1.3.1 מחלות בשושניים 3

1.3.2 אינטראקציות בין אקריות לפטריות 4

1.3.3 אינטראקציה בין אקרית הקרקע ופטריות, כגורם מרכזי להחמרת הנזק לפונדקאי 4

1.4 אינטראקציות בין אקריות לסימביונטים 6

1.5 מטרות המחקר והשערותיו 8

1.5.1 מטרות 8

1.5.2 השערת המחקר 8

1.5.3 שאלות המחקר 8

1.5.4 חשיבות המחקר 8

2 שיטות וחומרים 9

2.1 מערכות הניסוי: אקרית הקרקע פטריות קרקע פתוגניות לשושניים, ונבטי בצל 9

2.1.1 הטיפול באקריות בפטריות ואחזקתם 9

2.1.1.1 אחזקת מושבת אקריות 9

2.1.1.2 אחזקת הפטריות 9

2.1.2 מערכת הניסויים בפטריות קרקע פתוגניות לשושניים 9

2.1.2.1 השפעת פטריות על גדילת נבטי בצל והתפתחותם 9

2.1.3 מערכת הניסויים באקרית הקרקע 11

2.1.3.1 השפעת אקרית הקרקע על גדילת נבטי בצל והתפתחותם 11

2.1.4 מערכות ניסויים משולבות בין אקרית הקרקע לפטריות קרקע פתוגניות לשושניים 13

2.1.4.1 משיכה בין הפטריות לאקריות במערכת ללא נבטי בצל 13

2.1.4.2 פוריות אקרית הקרקע על נבטי בצל בנוכחות פטריות ובהעדרן.....14
2.1.4.3 השפעה משולבת של אקריות ופטריות על עיכוב התפתחותם של נבטי בצל.....14
2.2 סימביונטים באקרית הקרקע.....15
2.2.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים באקריות בוגרות 16
2.2.1.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים בנקבות וזכרים.....16
2.2.1.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בנקבות בהרעבה.....17
2.2.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בביצי נקבות 17
2.2.3 ריצוף מלא לגן המקודד ל-16S rDNA לסימביונטים נבחרים.....17

3 תוצאות.....18
3.1 מערכות הניסוי: אקרית הקרקע פטריות קרקע פתוגניות לשושניים, ונבטי בצל.....18
3.1.1 השפעת פטריות על גדילת נבטי בצל והתפתחותם.....18
3.1.2 השפעת אקרית הקרקע על גדילת נבטי בצל והתפתחותם.....19
3.1.3 בדיקת יחסי הגומלין בין פטריות לאקריות והשפעתם על נבטי בצל.....20
3.1.3.1 משיכה בין פטריות לאקריות במערכת ללא נבטי בצל.....20
3.1.3.2 פוריות אקרית הקרקע הניזונה מנבטי בצל בנוכחות פטריות ובהעדרן.....22
3.1.3.3 השפעה משולבת של אקריות ופטריות על עיכוב התפתחותם של נבטי בצל.....22
3.2 מיקרואורגניזמים סימביונטים באקרית הקרקע.....25
3.2.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים באקריות בוגרות.....25
3.2.1.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים בנקבות וזכרים.....25
3.2.1.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בנקבות בהרעבה.....28
3.2.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בביצי נקבות.....29
3.2.3 ריצוף מלא לגן המקודד ל-16S rDNA לסימביונטים נבחרים.....30

4 דיון.....31
4.1 השפעת פטריות על גדילת נבטי בצל והתפתחותם.....31
4.2 השפעת אקרית הקרקע על גדילת נבטי בצל והתפתחותם.....31
4.3 בדיקת יחסי הגומלין בין פטריות לאקריות והשפעתם על נבטי בצל.....31
4.3.1 משיכה בין פטריות לאקריות במערכת ללא נבטי בצל.....31
4.4 פוריות אקרית הקרקע בהזנה על בצל זרוע.....32
4.5 השפעה משולבת של אקריות ופטריות על עיכוב התפתחותם של נבטי בצל.....32
4.6 סימביונטים באקרית הקרקע 34
4.6.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים באקריות בוגרות..... ...34
4.6.1.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים בנקבות וזכרים.....34
4.6.1.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בנקבות בהרעבה.....35

4.6.2 ריצוף מלא לגן המקודד ל-16S rDNA לסימביונטים נבחרים.....35
4.6.3 סיכום סימביונטים.....36
4.7 סיכום 36

5 ספרות.....37

6 נספחים.....45
נספח א': טבלה 7 : פרטי החיידקים שזוהו בהפרדה על DGGE באקרית הקרקע *R. robini*.....45
נספח א': תמונה 17 : פרופיל החיידקים ב-*R. robini* כפי שהתקבל בהפרדה על DGGE.....45
נספח א': טבלה 8 : פריימרים ספציפיים לגן המקודד ל-16S rDNA עבור כל חיידק שהתקבל בהפרדה על DGGE 46
נספח ב': ריצוף לגן המקודד ל- 16S rDNA בחיידקי המטרה שזוהו בהפרדה על DGGE.....47-48
נספח ג': ריצוף מלא לגן המקודד ל- 16S rDNA לחיידק מהסוג *Defluvibacter sp.*.....48-49

יחסי גומלין בין אקרית הקרקע *Rhizoglyphus robini* וגורמי מחלות בבצל

טל אופק

תקציר

אקרית הקרקע ריזוגליפוס רוביני , *Rhizoglyphus robini* (Acaridae: Astigmata), נפוצה בקרקעות ישראל על מגוון גידולים ממשפחת השושניים (Liliaceae) כגון: בצל, שום ושושן. בשילוב עם פטריות שוכנות קרקע , פתוגניות לשושניים, האקרית עלולה לגרום נזק רב לאברים תת-קרקעיים של גידולים אלה.

מטרות המחקר כללו: א) אפיון הפטריות הפתוגניות הנפוצות על נבטי בצל הנמצאות באסוציאציה עם אקריות ב) בחינת השפעת הפטריות הפתוגנית על אקריות ג) הכרת יחסי הגומלין בין אקרית הקרקע לפטריות והשפעתם על נבטי בצל ד) זיהוי חיידקים סימביונטים, העשויים לתרום לתזונת האקרית ואפיונם. במבחני פתוגניות מצאתי כי מידת האגרסיביות לנבטי בצל הייתה שונה בין מינים וגם בין תת- מינים של הפטריות הנבדקות. ללא פטריות, רק אילוח אקריות בצפיפויות גבוהות גרם נזק משמעותי לנבטי הבצל . נצפתה משיכה מובהקת של האקריות לפטריות שונות ללא קשר למידת הפתוגניות שלהן . נמצא כי השילוב בין אקרית הקרקע לתבדיד הפטרייה *Fusarium oxysporum* I-3 הסב לנבטי הבצל נזק הגדול באופן מובהק יותר מכל אחד מהגורמים בנפרד . מכאן עולה כי: 1) פטריות ללא אקריות מסוגלות לגרום נזקים לבצל ברמות שונות תלוי במין הפ טרייה 2) אקריות ללא פטריות מסוגלות לגרום נזקים לבצל רק במספרים גדולים של אקריות במערכת 3) אקריות נמשכות לפטריות באופן מובהק, בין אם הן על בצל , או על מצע PDA 4) שילוב בין אקריות לפטריות , ללא קשר לרמת הפתוגניות של הפטרייה, גרם לנזק הגדול ביותר לבצל.

בנוסף אופיינו חיידקים סימביונטים העשויים לתרום לתזונת הפונדקאי באמצעות PCR עם פרימרים הנקשרים לגן המקודד ל- 16S הריבוזומלי של החיידקים ומזהים את מרבית החיידקים מקבוצת ה-Bacteria. באנליזה זו נמצא כי שני חיידקים מהמערכה Proteobacteria נמצאים גם בביצים וגם בבוגרים של כל האקריות שנבדקו.

מחקר זה מדגים את מורכבות האינטראקציות התת- קרקעיות בין צמחים, אקריות קרקע ואורגניזמים נלווים, ועשוי לשפוך אור על ממשקי הדברה עתידיים במטרה למנוע את נזקי אקרית הקרקע על ידי שימוש מושכל בקוטלי פטריות ידידותיים לסביבה וללא שימוש בקוטלי חרקים חריפים המקובלים כיום.

רשימת טבלאות

עמוד

טבלה 1: מבנה הניסויים לבדיקת פתוגניות של טיפוסי פטריות שונים לבצל (סבב ראשון)..... **10**

טבלה 2: מבנה הניסויים לבדיקת פתוגניות של טיפוסי פטריות שונים לבצל (סבב שני)..... **11**

טבלה 3: מבנה הניסוי בו נבדקה השפעת צפיפות האקריות על שרידות נבטי בצל..... **12**

טבלה 4: מבנה ניסוי העציצים המשולב לבדיקת השפעת נוכחות אקריות ופטריות על גדיל ת נבטי הבצל והתפתחותם..... **15**

טבלה 5: מבנה ניסוי צלחות הפטרי המשולב לבדיקת השפעת אקריות ופטריות על גדיל ת נבטי בצל והתפתחותם..... **15**

טבלה 6: ערכי P ו-F של מבחן Repeated Measures ANOVA שהתקבלו בבדיקת העדפת סוג מצע מזון ע "י האקריות..... **21**

רשימת איורים

עמוד

תמונה 1: משיכת אקריות לנבט מודבק לעומת נבט בריא.....**5**

תמונה 2: נזקי אקרית הקרקע *R. robini* בשדה בצל זרוע בבית אלפא (סתיו 2003).....**5**

תמונה 3: עציץ מולחם למכסה פלסטיק שבשוליו תעלה המכילה שמן קיק למניעת מעבר אקריות בין העציצים.....**11**

תמונה 4: משפך ברלזי – חימום הבצלים ע "י מנורת להט גורם לנפילת האקריות דרך המשפך לצנצנת האתנול.....**12**

תמונה 5: מערכת ניסוי משיכת אקריות לפטריות.....**13**

תמונה 6: מערכת ניסוי צלחות פטרי משולב.....**23**

תמונה 7 : זיהוי סימביונט ממשפחת ה- Brucellaceae.....**25**

תמונה 8 : זיהוי סימביונט מהסוג- *Defluvibacter sp.*.....**26**

תמונה 9 : זיהוי סימביונט מהסוג – *Alcanivorax sp.*.....**26**

תמונה 10: זיהוי סימביונט מהסוג – *Clostridium sp.*.....**26**

תמונה 11: זיהוי סימביונט Uncultured bacterium.....**27**

תמונה 12: זיהוי סימביונט מהסוג –*Providencia sp.* **27**

תמונה 13: זיהוי סימביונט מתת המערכה- ά -proteobacterium……...……**28**

תמונה 14: בדיקת נוכחות סימביונטים בשלוש נקבות בוגרות מורעבות.....**28**

תמונות 16-15: בדיקת נוכחות סימביונטים בביצים של עשר נקבות.....**30-29**

איור 1: מידת הפתוגניות של פטריות לנבטי בצל בסבב הניסויים הראשון.....**18**

איור 2: מידת הפתוגניות של פטריות לנבטי בצל בסבב הניסויים שני.....**18**

איור 3: השפעת רמות אוכלוסייה שונות של אקרית הקרקע על שרידות נבטי בצל.....**19**

איור 4: מספרן הממוצע האקריות ששרדו בעציצים בתום ניסוי השפעת האקריות על שרידות נבטי בצל ומוצו ממצע הגידול בעזרת משפכי ברלזי.....**20**

איור 5: משיכת אקריות בוגרות של *Rhizoglyphus robini* למצע מזון ה- PDA המודבק בפטרייה לעומת מצע מזון ה-PDA נקי לאורך ארבע שעות הניסוי.....**21**

איור 6: ההשפעות של אקריות הקרקע , הפטרייה I-3 *F.oxysporum*, ושניהם יחד על הישרדות נבטי בצל.....**22**

איור 7: ממוצע האקריות שמוצו בעזרת משפך ברלזי בתום ניסוי העציצים לאחר 8 שבועות.....**23**

איור 8: מספר אקריות ממוצע על נבטי בצל בריאים ונגועים בפטרייה I-3 *F. oxysporum*.....**24**

איור 9: ממוצע אורך השורשונים של נבטי בצל לאורך ארבעת ימי הניסוי.....**24**

1 מבוא

1.1 הקדמה

על-סדרת האקריות (Acari) משתייכת למחלקת העכבישניים (Arachnida) שהיא בעלת היסטוריה אבולוציונית בת למעלה מ- 400 מיליון שנים. על-סדרה זו כוללת מינים רבים של אקריות שחלקן מקיימות מגוון אינטראקציות עם מיקרואורגניזמים, פטריות, צמחים ובעלי חיים (Poinar & Poinar 1998; Evans 2003). מחקר זה עוסק באקרית *Rhizoglyphus robini* להלן, אקרית הקרקע. המחקר ברובו בחן יחסי גומלין בין אקרית הקר קע לפטריות קרקע והשפעתם על רמת הנזק הנגרם לנבטי בצל *Allium cepa*. מספר מחקרים עסקו בקשרי הגומלין בין פטריות לאקרית הקרקע (Noble & Poe 1972; Okabe & Amano 1991), אולם במחקר זה ביקשתי לחדד את הנזקים הנגרמים לנבטי הבצל כתוצאה מהקשר אקריות פטריות. בנוסף המחקר עסק באפיון הקשר בין אקרית הקרקע למיקרואורגניזמים סימביונטים המתפתחים בגופה. הבנה מעמיקה של מערך יחסי הגומלין בין אקרית הקרקע לאורגניזמים אחרים עשויה לשנות ממשקי הדברה קיימים, המבוססים על חומרי הדברה חריפים, המזיקים לסביבה ולנסות לסייע בפיתוח ממשקי הדברה עתידיים ידידותיים לסביבה.

1.2 אקרית הקרקע *Rhizoglyphus robini*

1.2.1 סקירה כללית

אקריות הן קבוצה מגוונת המונה כ- 45 אלף מינים מוגדרים (Walter & Proctor 1999). תפוצתן העולמית רחבה והן מאכלסות בצפיפות שפע בתי גידול הכוללים : יערות, חורשים, כרי מרעה, מדבריות במגוון קרקעות ומקווי מים מלוחים ומתוקים (Evans 2003). לאקריות, בדומה לעכבישניים אחרים, ארבע זוגות רגליי הליכה, זוג בחנינים (פדיפלפי) וכליצרות. גופן מחולק לשתי חטיבות ; הקדמית (Gnathosoma) הנושאת את פדיפלפי והכליצרות, והאחורית (Idiosoma) הנושאת את שאר הגוף (Gerson *et al.*, 2003; Zhang 2003). לפי Gerson וחוב' (2003) על-סדרת האקריות מתחלקת לשתי סדרות Parasitiformes ו- Acariformes. סדרת ה- Acariformes מחולקת לשלוש תת סדרות Astigmata, Cryptostigmata, Prostigmata. אקריות בנות תת הסדרות Astigmata ו- Cryptostigmata חסרות פתחי נשימה או בעלות פתחי נשימה מוסתרים , בהתאמה, ולמינים בתת הסדרה Prostigmata פתחי נשימה הממוקמים על קדמת הגוף או בסמוך לה (Gnathosoma). אקרית הקרקע *R. robini* משתייכת לתת הסדרה Astigmata הכוללת 69 משפחות ו-785 סוגים O'Connor (1982). הסוג *Rhizoglyphus*, (Acaridae) כולל 52 מינים מתוארים. החוקר Claparède תאר לראשונה את הסוג *Rhizoglyphus* בשנת 1869 והציע, כמין מאפיין (type species), לסוג *Rhizoglyphus* את אקרית הקרקע (Bulb mite) *R. robini*, המכונה גם אקרית הבצל (Díaz *et al.*, 2000).

1.2.2 הביולוגיה של אקרית הקרקע

אקרית הקרקע היא זעירת מימדים (0.5-1 mm). רבייתה מינית בלבד, קצב התפתחותה ואורך חייה משתנים על פי טיב המזון ותנאי הסביבה (Díaz *et al.*, 2000). Gerson & Thorens (1982) הראו כי תדירות ההזדווגויות, הטלת הביצים וכן מספר הביצים המוטלות עולה כשהמזון עשיר. נקבה הניזונה משום בתנאי סביבה של כ- 27 ^{o}C מטילה כ- 400 ביצים במשך שישה שבועות, בעוד ש נקבה הניזונה מרסק בוטנים בתנאים זהים מטילה כ-690 ביצים. משך התפתחות מביצה לבוגר הנו כ- 13 ימים, ומשך חיי הבוגרים והבוגרות 31 ו-62 ימים בהתאמה (Gerson *et al.*, 1983). לאקרית מספר דרג ות התפתחות הפעיל ות כל השנה: ביצה ,לרווה (Larva), נימפה ראשונה (Protonymph), נימפה שנייה (Deutonymph), נימפה שלישית (Tritonymph) ובוגר. בתנאי סביבה

נוחים מחזור החיים של האקרית מתקיים ישירות מנימפה ראשונה לנימפה שלישית, כשחלה הרעה בתנאי הסביבה מתפתחת האקרית מנימפה ראשונה לשנייה . שלב זה קרוי גם Facultative heteromorphic deutonymph (נימפה נודדת) מותאם מורפולוגית למעבר לסביבת חיים אחרת באמצעות הצמדות לפרוקי רגליים שונים למשל חיפושיות הזבל (Díaz *et al.*, 2000). שלב זה מחוסר כליצרות (O'Connor 1982), פאסיבי לחלוטין (הוצאת אנרגיה מינימאלית לקיום בסיסי) ובעל כיסוי שלדי חיצוני מוקשה (Exoskeleton), המקנה לאקרית עמידות פיזית והגנה מפני יובש (Rhoades *et al.*, 1989).

1.2.3 נזקי אקרית הקרקע

אקרית הקרקע נחשבת למזיק חקלאות ומחסן שתפוצתו העולמית נרחבת והכוללת את ישראל . נזקיה נת גלו לראשונה בעמק בית שאן בשנת 1964, ומאז התפשטו לאזורים נרחבים בעמק יזרעאל, הגליל, חבל לכיש והנגב (יתום וחוב'., 1980). בישראל דווחו על נזקים קשים בשנות השמונים בעיקר בסתיו, על רקע טמפרטורות גבוהות (Gerson *et al.*, 1985). בשדות ובחממות אקרית הקרקע גורמת לנזקים כבדים לצמחים ממשפחת השושניים (Gerson *et al.*, 1985; Díaz *et al.*, 2000) עיקר הנזק הוא בשום , בצל, עצבונית, שושן ובמספר גיאופיטים נוספים (Ben David *et al.*, 2005; בן-דוד וחוב'., 2002). באחסון נפגע ים בעיקר בצלי שושן מכל הזנים (Lesna *et al.*, 1996). בן-דוד וחוב' (2002) מצאו כי בצלי שושן לריבוי עלולים לשמש כמקור אילוח מאחר ואקרית הקרקע שורדת בתוך הבצלים למשך תקופת האחסון הנמשכת לפחות חודשיים, בטמפרטורה 2° C ומגיעה עם הבצלים לחממה . לא נמצאו אקריות בשום המאוחסן בקיץ (Gerson *et al.*, 1985). בגידול הרב-שנתי עצבונית, בו משתמשים בצמחים מבוגרים כחומר ריבוי על ידי חלוקתם, טוענים בן-דוד וחוב' (2002), כי האקרית עוברת עם חומר הריבוי לשטחים חדשים . בספרות מדווח ג ם על נזקים ליבולים אחרים כמו תפו"א, גזר, בוטנים ודגניים שונים (Díaz *et al.*, 2000; Woody & Fashing 1993). הנזק מתב טא בהזנת אקרית הקרקע על האיברים התת-קרקעיים של הצמח ובכללם שורשים , קני שורש, עוגת הבצל, גבעולים, בצלים ופקעות. כתוצאה מכך נפגעת צמיחתו והתפתחותו של הצמח עד למותו (Latta 1939; Díaz *et al.*, 2000). הפגיעה בנבטים קשה אף יותר מהפגיעה ב צמחים הבוגרים. האקריות ניזונות בתחילה משורשי הנבט הצעירים ו מנתקות את ק שר ההזנה של הנבט לקרקע . לאחר מכן חודרות האקריות ל צוואר שורש הנבט וגורמות להתייבשותו והתמוטטותו המיידית (Gerson *et al.*, 1985).

לאקרית הקרקע שתי תכונות המקשות על המגדלים : **1)** פעילות כל השנה בכל דרגות ההתפתחות , המצליחות להתגבר על ה תנודות השנתיות בטמפרטורת הקרקע (Gerson *et al.*, 1985; Díaz *et al.*, 2000).בחורף כשטמפרטורת הקרקע צונחת (11° C>) אקרית הקרקע פעילה פחות ולא מתפתחת. באביב ובקיץ, כשהטמפרטורה בשכבות העליונות עולה (35° C<) חודרת אקרית הקרקע לשכבות הקרקע התחתונות ונוכחותה לא מורגשת למעט מקרים של עליה בלחות הקרקע על ידי השקיה מוגברת או הצפ ה. במקרה כזה תעלה אקרית הקרקע לשכבות הקרקע העליונות. עיקר הנזק מתרחש בזריעות סתיו ובחורף מוקדם הודות לטמפרטורות אופטימאליות לפעילות האקרית (25°-28° C) ולחות קרקע גבוהה (70% Rh<) (Gerson *et al.*, 1985) **2)** אקרית הקרקע ג'נרליסטית ומתפתחת על מגוון צמחים , מספוא, זבל בקר , רקב אורגני , פטריות ואפילו מצע מזון דל ביותר כנייר סינון (Gerson *et al.*, 1983). פוליפגיות זו מאפשרת לאקרית לשהות בקרקע לאורך כל השנה , ולהתקיים על רקב אורגני גם לאחר הוצאת היבול.

1.2.4 הדברה כימית של אקרית הקרקע

קוטלי חרקים ואקריות מקבוצת הזרחנים-אורגניים וקרבמטים משבשים את העברת המסרים העצביים בגוף על ידי חסימת תפקוד האנזים אצטילכולין אסטראז (Acetylcholine esterase), אשר באופן רגיל מווסת את פעילות הנוירוטרנסמיטר אצטילכולין (Stephens *et al.,* 1995). תכשירים אלה הם היחידים שנמצאו יעילים בהדברת אקרית הקרקע (Knowles *et al.,* 1988; Chen & Lo 1989). למרות יע ילותם של הזרחנים האורגניים והקרבמטים בהדברת אקרית הקרקע יש להם מס פר חסרונות עיקריים: **1)** נזק סביבתי העלול להיגרם כתוצאה משימוש רשלני (הרעלות לבע"ח ובני אדם) **2)** טיפול בחלקם (כגון טמיק) מונע ייצוא תוצרת (בן-דוד וחוב'.., 2002) **3)** יישום מופרז וארוך בתכשירים הללו (מעל שני עשורים) עלול לפתח באקריות עמידות (Kuwahara 1988). לאחרונה, מתלוננים מגדלים בישראל כי טיפולי הטמיק אינם יעילים כשהיו , ואכן בניסויים מצאו בן-דוד וחוב' (2002) כי לטמיק, לנמקור (Fenamiphos), לדורסבן גרגרי ומיקרוקפסולרי (Chlorpyrifos) לא הייתה השפעה על אוכלוסיית האקרית . נמצא שהם מדבירים אקריות בשכבת הקרקע העליונה בלבד (עד עומק של 30cm). בתנאי יובש עשויות האקריות לרדת לשכבות עמוקות יותר , ולהזיק שוב בעונה הבאה (בן-דוד וחוב'.., 2002). לאור זאת קיים צורך לפתח כיווני הדברה חלופיים תוך אפיון התנאים בהם האקרית הופכת למזיק. הרעיון העומד מאחורי עבודה זו מתבסס על יחסי הגומלין בין האקריות לגורמי מחלה נוספים (פטריות). יתכן והאקרית לבדה לא תגרום נזק לגידולים אלא בשיתוף עם גורמי המחלה כמו פטריות , ולכן שיטות הדברה חדשות יחייבו התייחסות ליחסי הגומלין אלה.

1.3 יחסי הגומלין בין אקרית הקרקע וגורמי מחלות בשושניים

1.3.1 מחלות בשושניים- משפחת השושניים כוללת כ 4000 מינים הכוללים צמחי מאכל, נוי ומרפא בעלי חשיבות מסחרית וכלכלית רבה. בסוג -שום (*Allium* spp.) כ-600 מינים הצוברים חומרי תשמורת בבצל (ארנון 1982). בצל הגינה-*Allium cepa cepa* L. תורבת לפני אלפי שנים וכיום ייצורו העולמי נאמד בחמישה מיליארד דולר בשנה (ארנון 1982). לפי Schwartz ו- Mohan (1996) קיימות לפחות 50 מחלות בשום ובצל אשר 34 מתוכן נגרמות ע "י פטריות . רוב הפטריות מיקרוסקופיות ובנויות מקורים (Hyphae) בעלי דופן מוגדר ללא כלורופיל המוגדרות כטפיליות, וכסימביוטיות עם אורגניזמים אחרים , או כסאפרופיטיות על חומרים אורגניים (רותם וחוב', 1998). גופי הרבייה וההפצה (Spores), מאפשרים לפטרייה להתקיים גם בהעדר הפונדקאי , והם מועברים ע"י רוח, קרקע ומים לפונדקאים חדשים. הם חודרים לאברי המטרה דרך פתחים טבעיים בפונדקאי כגון פיוניות או פציעות מכאניות (Schwartz & Mohan 1996). בישראל נמצאה אקרית הקרקע בשושניים באסוציאציה עם מספר פטריות קרקע פתוגניות: *Rhizoctonia AG-A, Pythium oligandrum* , *2Nuclei* , *Fusarium* sp. , *F. oxysporum*. (לאה צרור, טרם פורסם).

הסוג- *Fusarium* sp. (Hyphomycetes: Moniliales: Tuberculiceae) כולל מינים בעלי תפוצה עולמית הנחשבים למזיקים קשים ביותר בחקלאות. המינים המזיקים בסוג -*Fusarium* sp. גורמים לריקבונות או נבילות בצמחים בוגרים, נבטים וזרעים. מרביתם שורדים בקרקע בעזרת גופי קיימא (Chlamydospores) או בעזרת תפטיר המאכלס שאריות צמחים . תקיפת הפונדקאי נעשית באמצעות מידבק בקרקע או מנבגים הנישאים ברוח (רותם וחוב', 1998). למין *F. oxysporum* מס' גזעים וטווח פונדקאים. הפטרייה מזיקה לטווח רחב של צמחים מסדרות שונות (רותם וחוב', 1998). בבצל גורמת הפטרייה *F. oxysporum* לריקבון הזרעים או הנבטים בטרם נביטתם וכן לתופעת חולי נופל (Damping off) (יוניס וזוהר 2002).

הסוג- *Pythium* sp. (Oomycetes: Peronosporales: Pythiaceae), תוקף בצל בכל הדרגות ויכול לגרום לריקבון בזרעים, חולי טרום- הצצה, חולי בתר- הצצה ו חולי נופל לנבטים (Mohan & Schwartz 1996). הפטרייה שורדת בעזרת גופי קיימא - אאוספורות (Oospores) על פונדקאים, המתפתחים לגופי רבייה בעלי שוטונים (Zoospores) הנעים בשכבת המים בקרקע ונובטים על שורשים וגבעולים של פונדקאי חדש (יוניס וזוהר, Schwartz & Mohan 1996; 2002).

הסוג- *Rhizoctonia* sp. (Hyphomycetes: Mycelia Sterilia: Agonomycetaceae) פוגע בנבטים, בשורשי השתילים ועלול לגרום להצהבת העלים. אופטימום התפתחות הפטרייה 25-23° C ולכן עיקר הפגיעה על ידי הפטרייה *Rhizoctonia* מתרחש על רקע של זריעות סתיו. הפטרייה נשמרת כ תפטיר או כקשיונות צעירות ברקמות הפונדקאים או בחלקי צמחים ועוברות בין צמחים בעיקר בגידולים צפופים בשדה (יוניס וזוהר, 2002 ; Schwartz & Mohan 1996).

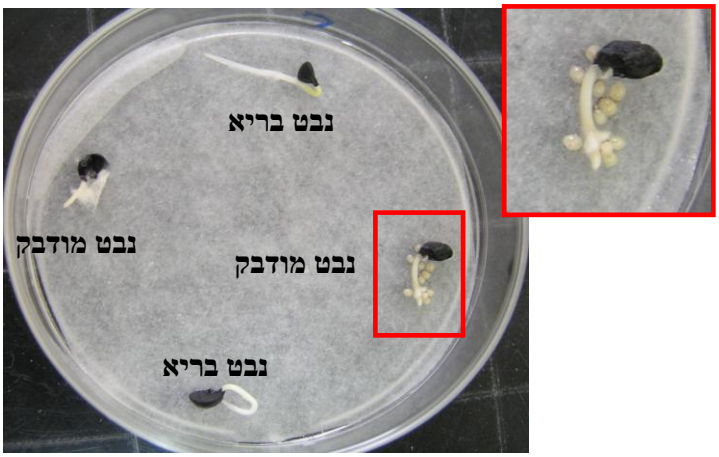
1.3.2 אינטראקציות בין אקריות לפטריות

תנאי הסביבה המועדפים על אקריות הקרקע והפטריות דומים - לחות גבוהה (>70% Rh) וטמפרטורה מתונה (28-25° C). לכן קיימת סבירות גבוהה ששתיהן תימצאנה באותו בית גידול. סביר להניח שהקרבה הפיזית ביניהן הולידה מערכות יחסים אינטימיות ומורכבות. כך, אקרית הקרקע מקיימת מערכות יחסים ענפות עם פטריות המתבטאות בהימשכות האקריות לפטריות, אכילתן והפ צת גופי הרבייה של הן על הגוף ודרך מערכת העיכול (Hubert *et al.*, 2003; Armitage & George 1985) תופעה הנפוצה ב Astigmata. מרבית האקריות בתת סדרה זו הן שוכנות קרקע פונגיבוריות למרות שהן מאכלסות גם בתי גידול אחרים כגון : מחסני תבואה, קיני בעלי חיים ומכרסמים (Hubert *et al.*, 2004). אקריות ממשפחת ה-Acaridae מזיקות לגידולי בשדה וליבולים באחסון ומקיימות יחסים שונים עם פטריות (Díaz *et al.*, 2000). אקריות אלה מאופיינות ביחסיהן עם פטריות שוכנות קרקע וצמחים (O'Connor 1982). מערכות היחסים בין האקריות לפטריות מוצלחות מכמה סיבות: **1)** פטריות מהוות מקור מזון עשיר בסוכרים לאקריות (Hubert *et al.*, 2003). כתוצאה מכך משך התפתחות האקריות התקצר, וקצב הזדווגותן ופוריותן של הנקבות גדלים (Diaz *et al.*, 2000). **2)** האקריות מפיצות במרחב את גופי רביית הפטרייה (נבגים, קונידיות) הנמצאים על גופן (Ramírez-Suárez *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2004), דרך הפצה נוספת הנגרמת כתוצאה ישירה מאכילת הפטרייה על ידי האקרית היא דרך מערכת העיכול של האקרית (Hubert *et al.*, 2004). **3)** אכילת תפטיר הפטרייה ע"י האקרית גורמת לו לגדול מהר יותר (אפקט פיצוי) (Hubert *et al.*, 2004). מסיבות אלה ניתן להבין מדוע תופעות יחסי הגומלין בין האקריות לפטריות נפוצות כל-כך ויתכן ויש לכך השלכות על מידת הנזק לגידולים.

1.3.3 אינטראקציה בין אקרית הקרקע ופטריות,כגורם מרכזי להחמרת הנזק לפונדקאי

בעבודה בחנתי את ההנחה בגישה חדשה "המסירה" לכאורה את תווית המזיק מאקרית הקרקע (ראה מטרות המחקר). הנחתי שהאקרית לא תגרום נזק בשושניים בריאים מאחר שאינה נמשכת ל צמח בריא. לעומת זאת, האקרית נמשכת לשושניים הנגועים בפטריות (תמונה 1), ניזונה מה ם ופוגעת תוך כדי כך ברקמות הצמח הפונדקאי. יש מספר עדויות נסיבתיות התומכו ת בהשערה זו. נמצא כי אילוח מלאכותי של בצל שום ושושן באקריות קרקע בחורף לא פגע ביבול ואקריות רבות שרדו ואף התרבו בעציצים. בסוף העונה נמצאו אקריות הקרקע במצע האורגני ולא בבצל. ניתן להסיק מתצפית זו שהאקריות לא בחרו בחומר הצמחי כמקור מזון ע יקרי (Ben David *et al.*, 2005). אקריות הקרקע נמשכו לבצל מודבק בפטרייה ואף היטיבו לחדור מבעד ל רקמות

הבצל הנגועות (Abdel-Sater & Eraky 2001). Van Asselt (1999) מוסיף שאקריות (Acaridae) יטיבו לחדור לזרעים נגועים ורקובים באחסון מאשר לזרעים בריאים בעלי ציפוי קשיח . בשושן פסחא נגוע בפתוגנים *Rhizoctonia solani* ו- *Pythium ultimum* התפתחה אוכלוסיית *R. robini* במהירות גבוהה יותר בהשוואה לאלה שניזונו על בצלים לא נגועים (Ascerno *et al.*, 1981). עוד נמצא שבעציצי שושן שאולחו באותם פתוגנים אך טופלו בקוטלי פטירות לא הייתה פגיעה בפרחים למרות שנמצאו בהם כ - 350 אקריות לבצל. כשפגיעת הפטריות מתרחשת בדרגות ההתפתחות הצעירות בזרעים ונבטים, התוצאה לרוב מתבטאת ב מות הצמח, משום שרקמות הקליפה של הנבטים רכות וחסרות חומרי שעם או עצה , והאפידרמיס המחפה על הקליפה מוגן בקוטיקולה דקיקה בלבד (רותם י וחוב', 1998). חשוב להבין כי הפטריות לבדן מסוגלות לפגוע באופן חמור בדרגות ההתפתחות הצעירות של הבצל (סעיף 1.3.1) לכן יתכן ו הוספת אקריות למשוואה מאיצה את הפגיעה בצמח גם בשדה (תמונות 2).



תמונה 1 : משיכת אקריות לנבט בצל מודבק לעומת נבט בריא . בהגדלה (מימין) נראות אקריות הקרקע כשהן מתקבצות סביב נבט מודבק בפטרייה *F. oxysporum* I-3 וניזונות מהתפטיר שעוטף אותו. לפני הנחת האקריות נבט זה כוסה בתפטיר בדומה לנבט המודבק משמאל.

תמונה 2 :נזקי אקרית הקרקע *R. robini* בשדה בצל זרוע בבית אלפא (סתיו 2003). בשדה מימין ניתן לר אות חלקים נרחבים לאחר תמותה מסיבית של נבטים (ערוגות חומות), בתמונה משמאל נתן לראות את תמותת הנבטים מקרוב. בחלק המרוחק של השדה ניתן לראות "איים" ירוקים של אזורי נבטים שטרם נפגעו (צילום אריק פלבסקי).

1.4 אינטראקציות בין אקריות לסימביונטים

יחסי גומלין בין פרו קריוטים סימביונטים לאאוקריוטים נפוצים מאד. הפרוקריוטים הסימביונטים יכולים להימצא בתאים סומאטיים, תאי מין וחללי גוף. נוכחותם משפיעה על הביולוגיה של פונדקאיהם החל מפתוגניות ועד למוטואליזם (הדדיות) אובליגטורי (Dillon & Dillon 2004). רוב המחקר העוסק בפרוקי הרגליים וסימביונטים מתמקד בחרקים. (Moran & Baumann 2000) והערכה היא ש-20-15% מהחרקים מקיימים קשרי גומלין עם מיקרואורגניזמים סימביונטים (Gil *et al.*, 2004) העדויות על קשרי גומלין בין סימביונטים לעכבישניים, מועטות ביותר (Goodacre *et al.*, 2006). מרבית הסימביונטים שזוהו בפרוקי רגליים משתייכים למערכה Proteobacteria, כמו כן נמצאו סימביונטים בתת המערכ ות α-Proteobacteria ,β-Proteobacteria ובמחלקות Firmicutes, Sphingobacteria ו- Flavobacteria המשתייכות למערכה Bacteroidetes (Gil *et al.*, 2004). ניתן לסווג את הסימביונטים עפ"י טיב הקשר שלהם עם הפונדקאים:

סימביונטים ראשוניים (אובליגטוריים)- סימביונטים החיוניים לגדילה ולרבייה של הפונדקאי מועברים לדורות הבאים בצורה אנכית בלבד, מהאם לצאצאים. סימביונטיים אלה מעורבים בהשלמת התזונה של פונדקאיהם, למשל ע"י סינתזה של חומצות אמיניות חיוניות (Thao *et al.*, 2002).

סימביונטים שניוניים (פקולטטיביים)- אינם חיוניים ברוב המקרים לגדילה ולרבייה של הפונדקאי, והעברתם לדורות הבאים יכולה להיות אנכית או אופקית, בין ובתוך מינים (Moran & Baumann 2000). סימביונטים אלו יעלו את תפוצתם באוכלוסיה בצורה ישירה או עקיפה על ידי שינויים מכוונים במערכת הרבייה של הנקבה כך שיוגבר המעבר שלהם לדורות הבאים. הם יכולים להשפיע ישירות על הפונדקאי ע"י הגדלת עמידותו לתנאי סביבה קיצוניים (Montllor *et al.*, 2002), עמידות בפני טפילים (Oliver *et al.*, 2003) וסיוע בהשלמת התזונה כשהסימביונט הראשוני נפגע (Koga *et al.*, 2003).

השפעות סימביונטים על מערכת הרבייה - השפעות של הסימביונטים על מערכת הרבייה של הפונדקאי נחקרו ת לרוב. דוגמא בולטת לסימביונט כזה היא החיידק מהסוג *Wolbachia* השייך למחלקה α-Proteobacteria. חיידק זה מעורב במספר תה ליכים המשפעים על מערכות הרבייה בפרוקי רגליים: **1)** השריית **רביית בתולין (parthenogenesis)-** החיידק משרה יצירת נקבות בעיקר בסדרת הדבוראים. **2) אי התאמה ציטופלסמטית (cytoplasmatic incompatability)–** זכר נשא מזדווג עם נקבה שאינה נשאית של החיידק או נקבה הנושאת זן שונה של חיידק זה וכתוצאה מכך נכשלת הפריית הביצה. **3) פמיניזציה (feminization)-** הפיכת עוברים זכרים לנקבות הנגרמת על ידי החיידק **4) קטילת זכרים (male killing)-** השפעה על מערכת הרבייה הגורמת לקטילת הזכר בתהליך ההתפתחות העוברי.

כאמור, מעט מאוד ידוע על יחסי הגומלין של סימביונטים עם עכבישניים ובכללם אקריות. ניתן למצוא דוגמאות מהספרות לחיידק *Wolbachia* (הוזכר לעיל) המשרה אי התאמה ציטופלסמטית באקרית הקורים *Tetranychus urticae* (Vala *et al.*, 2003). החיידק *Cardinium* השייך למערכה Bacteroidetes והנחשב כגורם לפמיניזציה זוהה בחמש משפחות של אקריות (Oppoidae, Erythraeidae, Tenuipalpidae, Tetranychidae, Phytoseiidae) (Weeks *et al.*, 2001). Weeks ו- Stouthamer (2004) מצאו באקרית הטורפת *Metaseiulus occidentalis* כי כמות הצאצאים הוכפלה בנקבות הנושאות את החיידק- *Cardinium*. כמו כן הכלאות בין נקבות וזכרים נושאי החיידק לפרטים שאינם נשאים התאפיינו במספר ביצים נמוך. לפי Zchori-Fein ו- Perlman (2004) נמצא החיידק *Cardinium* ב-6% מקרב פרוקי הרגליים, אך חיידק זה וכן החיידק

Wolbachia לא זוהו באקרית הקרקע *R. robini*. ידוע מהספרות כי אקרית הקרקע *R. robini* מסוגלת להתקיים על מגוון רחב של מצעי מזון: צמחים (Diaz *et al.*, 2000) פטריות (Okabe & Amano 1991) ולעיתים אף מצעי מזון דלים מאוד כגון נייר סינון (Gerson *et al.*, 1983). יתכן ויכולתה של אקרית הקרקע להתקיים על מקורות מזון רבים שחלקם בעלי הרכב תזונתי דל כל כך מתאפשרת בעזרת חיידקים סימביונטים המסייעים לה בהשלמת תזונתה.

1.5 מטרות המחקר והשערותיו

1.5.1 מטרות

1) לימוד יחסי הגומלין בין אקרית הקרקע *Rhizoglyphus robini* ופטריות שוכנות קרקע פתוגניות לבצל והשפעתם על מידת הנזק לצמח.

2) זיהוי חיידקים סימביונטים באקריות ואפיונם ובחינת הקשר בינם לבין המגוון הרחב של מזונות אותם מסוגלת האקרית לנצל.

1.5.2 השערת המחקר

הנזק הנגרם לבצל על ידי אקרית הקרקע תלוי ב עיקר בפטריות שוכנות קרקע, פתוגניות לשושניים, המושכות את אקרית הקרקע לבצלים נגועים בפטריות. האקרית נמשכת לפטרייה ניזונה ממנה ופוגעת תוך כדי אכילתה ברקמות הבצל. בצלים בריאים לעומתם, הנקיים ממחלות, לא ימשכו אקריות ולא יפגעו מהן . יכולתה של אקרית הקרקע להתקיים על מגוון רחב של מצעי מזון שחלקם עניים מבחינת הרכבם התזונתי , מתבססת על חיידקים סימביונטים המסייעים לה בהשלמת תזונתה .

1.5.3 שאלות המחקר

אפיון נזקי פטריות ואקריות (בנפרד) לנבטי בצל

1) מהי מידת הפתוגניות של פטריות שוכנות קרקע לנבטי הבצל?

2) האם אקרית הקרקע מזיקה לנבטי הבצל? והאם הנזק הוא תלוי צפיפויות?

מהות יחסי הגומלין בין אקריות ופטריות קרקע פתוגניות והשפעתם על הנזק הנגרם לבצל

1) האם האקריות נמשכות לפטריות שונות גם ללא הצמח הפונדקאי?

2) האם הקשר אקרית ופטריות שוכנות הקרקע משפיע על הנזק הנגרם לבצל?

סימביונטים באקרית הקרקע

1) האם קיימים חיידקים סימביונטים באקרית הקרקע, והאם הם מועברים אנכית מהאם לצאצאים?

2) מה מאפיין את החיידקים ומהי תרומתם לאקרית הקרקע?

1.5.4 חשיבות המחקר

התמודדות המגדלים בטיפול ומניעת נזקי אקריות לבצל היא בעייתית (זיהום הסביבה, הגבלות שימוש בזרחנים אורגניים, עלויות) בעיקר בתקופות בהן הנזק כבד. יתכן והקשיים במניעת הנזקים הנגרמים לגידולי הבצל, נובעים מגישה מוטעית הרואה באקרית גורם נזק מרכזי לבצל. הבנה מעמיקה של הגורמים המעורבים בגרימת הנזק תפנה את עיקר המשאבים לטיפול כנגד פטריות, המושכות את האקרית לבצל , ובכך תשנה את ממשק ההדברה הקיים . שינוי זה יגביר את יעילות ההדברה, יפחית את הזיהום הסביבתי ויוזיל עלויות למגדלים.

2 שיטות וחומרים

2.1 מערכות הניסוי: אקרית הקרקע, פטריות קרקע פתוגניות לשושניים, ונבטי בצל

2.1.1 הטיפול באקריות בפטריות ואחזקתם

2.1.1.1 אחזקת מושבת האקריות

מקור אקרית הקרקע באוכלוסייה שנאספ ה בשנת 2004 מגידולי שושן בחלקות מסחריות בשרון, וגודלה במעבדה לאנטומולוגיה בנווה יער. *אחת לשבוע, עשר אקריות בוגרות הועברו מהמושבות הוותיקות (בנות 5-3 שבועות) המונות אלפי פרטים מכל דרגות, לצלחת פטרי (קוטר 90 mm). הצלחת מכילה נייר סינון תלת שכבתי לח וכף בוטנים כתושים כמקור מזון. מושבות הגידול החדשות אוכסנו בטמפ' של 25±1° C במשטר חושך קבוע ולח. אחסון צלחות הפטרי נעשה בקופסאות פלסטיק אטומות כשבתקרתן מולחמת רשת אוורור המונעת חדירת זבובים לצלחות הפטרי.

*חשוב להבהיר כי ש יטת גידול זו גרמה לכך שאוכלוסיית האקריות, שמקורה בשדה, גודלה במעבדה קרוב לשנתיים ולכן היא לא הייתה מגוונת ועברה סלקציה באופן קבוע.

2.1.1.2 אחזקת הפטריות

מקור הפטריות מבצלים ושורשים של שושן ובצל שנאספו בחלקות מסחריות (באזור בית שאן ובארותיים). הפטריות בודדו ונשמרו בתרביות טהורות מאז שנת 2005 במעבדתה של ד"ר לאה צרור במרכז מחקר גילת. זיהוי הפטריות נעשה בשיתוף עם ד"ר סטנלי פרימן המחלקה למחלות צמחים במכון וולקני בבית דגן. תבדידים מפטריות אלה הועברו על ידי ל מעבדה לאנטמולוגיה ב נווה יער ואוחסנו בקירור ב- 4° C. אחת לחודשיים הועברה קוביית מצע מזון PDA (Difco™ 500 g Potato Dextrose Agar PDA) בגודל $10\ mm^3$ המודבקת בפטרייה, לצלחת פטרי חדשה, בקוטר 90 mm שהכילה מצע PDA נקי בעובי ~ 5 mm. הכנת הצלחות בתנאים סטרילייים והדבקתם על ידי פטריות נעשתה במעבדתו של ד"ר רוני כהן בנווה יער. הצלחת הודגרה ב- 25° C למשך 15 יום עד לכיסוי מלא של צלחת הפטר י החדשה בפטרייה והועברה לאחסון ב- 4° C. המחקר נעשה עם פטריות שוכנות קרקע שבודדו בשכיחות גבוהה מהבצלים והשורשים של השושנים והבצלים שנאספו בחלקות, להלן הפטריות: שני מיני *Fusarium* שמתוכם למין *F. oxysporum* שלושה תבדידים (Isolates) בעלי מופעים שונים. תבדידים אלה טרם הוגדרו מעבר לרמת המין ולכן נרשמו לאורך העבודה באופן הבא: <u>תבדיד מס' 1</u>- *F. oxysporum* I-1 בעל צבע לבן ומקורו מבצל באזור בית שאן, <u>תבדיד מס' 2</u>– *F. oxysporum* I-2 בעל צבע סגול ומקורו משושן באזור בארותיים, <u>תבדיד מס' 3</u>- *F. oxysporum* I-3 בעל צבע סגול כ הה ומקורו מבצל באזור בית שאן. מין הפוזריום השני, טרם הוגדר ולכן ירשם כ- *Fusarium sp.* צבעו לבן ומקורו מבצל באזור בית שאן. הפטריות הנוספות בעבודה זו הן: *Pythium oligandrum*, *2-nuclei Rhizoctonia AG-A*. לניסויי משיכת אקריות לפטרייה שאינה פתוגנית לשושניים (להלן) שימשה *Verticillium dahliae*.

2.1.2 מערכת הניסויים בפטריות קרקע פתוגניות לשושניים

2.1.2.1 השפעת פטריות על גדילת נבטי בצל והתפתחותם

חלק זה של המחקר בוצע במעבדתה של ד"ר לאה צרור במרכז מחקר גילת.

רמת פתוגניות של הפטריות נבדקה על פי עקרונות קוך. בצלים (מזרעים) הודבקו בתרביות טהורות של הפטריות עד לקבלת סימני מחלה, ולאחר מכן בודדו הפתוגנים שוב לצורך זיהוי. ריכוז הפטרייה הנבחר תוכנן גם הוא במעבדתה של ד"ר לאה צרור בהתאם למידת האגרסיביות לבצל, ותכונות הקשורות בגופי הריבוי וההפצה של כל

אחת מהפטריות. אילוח הבצל נעשה באמצעות גירוד הפטריות מתוך צלחות הפטרי, בעזרת 10 ml מים מעוקרים ומקל דריגלסקי, סינון דרך פד גזה, לקבלת תרחיף המכיל יחידות ריבוי בלבד ללא תפטיר. 4 ml מריכוז זה הוזרקו לכל עציץ זרוע בבצל . אילוח בפטרייה *P. oligandrum* בוצע באופן שונה, מאחר והפטרייה לא שורדת לרוב אילוח בהזרקה. במקרה זה צלחת הפטרי שהכילה את הפטרייה על מצע ה- PDA חולקה באופן שווה לשמונה חלקים, שכל אחד מהם נחתך לקוביות קטנות שפוזרו באופן אחיד על פני העציץ ומעליהם הונחה שכבת אדמה דקה. חישוב ריכוז הפטרייה בתרחיף נעשה בשיטה המקובלת, ספירה חיה- Colony Forming Units (CFU)- מספר יחידות של מיקרואורגניזמים שיכולים ליצור מושבות המתפתחות בצלחות הדגימה . מספר המושבות יהווה אינדיקציה למספר האורגניזמים בדגימה הקיימת , מאחר וכל יחידה יצרה מושבה בריבוי אק ספוננציאלי (Prescott *et al.,* 1993). המדד לרמת הפתוגניות של הפטריות השונות היה ממוצע הישרדות נבטי הבצל. בסבב הניסויים הראשון נבדקה רמת הפתוגניות של ארבע פטריות (טבלה 1) לנבטי בצל בארבע חזרות . הוחלט שרירותית לעבוד עם שני המופעים הלבנים של הסוג פוזריום- *F. oxysporum* I-1 ו- *Fusarium sp.*. תריסר זרעי בצל *זן עדה 781 ללא ציפוי פונגיצידי נזרעו בעומק של סנטימטר בעציצי פלסטיק עגולים (360 ml), המכילים מצע גן לא מעוקר לשתילה (שחם- גבעת עדה). לאחר האילוח העציצים הוצבו בחממה ב- 25±2° C לאחר 40 יום נספרו הנבטים השורדים. זיהוי הפטרייה כגורם המחלה בוצע ע "י הנחת מקטעי גבעול ושורש מחוטאים (5 דקות ב-10% אקונומיקה) על מצע PDA בתנאים סטרילים (תא למינארי) והדגרתם במשך מספר ימים ב- 25° C, בחושך. הפטרייה שהתפתחה על המצע זוהתה לפי מורפולוגית התפטיר ו\או יחידות הריבוי שלה באמצעות מיקרוסקופ (ZEISS דגם 93028). הנתונים נותחו במבחני שונות חד כיווני One Way ANOVA , והפרדת הממוצעים על פי Tukey HSD. הניתוחים הסטטיסטיים נעשו בתוכנת JMP ver 5.01 **.**SAS Institute, Inc.). בסבב הניסויים השני נבדקה מידת הפתוגניות לנבטי בצל של חמש פטריות שוכנות קרקע אחרות, בשמונה חזרות לכל פטרייה (טבלה 2). תנאי הניסוי ובדיקת התוצאות נעשו כפי שתואר לעיל עבור סבב הניסויים הראשון.

*עדה 781 (הזרע גנטיקס בע"מ) – זן בצל זה שימש בכל הניסויים מאחר והוא מותאם לזריעת סתיו מאוחרת , בעונה זו נגרם עיקר הנזק כתוצאה מפעילות האקרית (פרק 1.2.3). הזרעים סופקו על ידי מדריכי גידולי ירקות בשרות ההדרכה והמקצוע (שה"מ) משרד החקלאות ופיתוח הכפר.

טבלה 1: מבנה הניסויים לבדיקת פתוגניות של טיפוסי פטריות שונים לבצל (סבב ראשון).

טיפולים	**מס' גופי הריבוי שנספרו ב- CFU ספירה חיה במ"ל תרחיף (רמת אילוח)**
ביקורת	0
Pythium oligandrum	16
2-nuclei Rhizoctonia AG-A	45
Fusarium oxysporum I-1	$2.5X10^4$
Fusarium sp.	$1.1X10^4$

טבלה 2: מבנה הניסויים לבדיקת פתוגניות של טיפוסי פטריות שונים לבצל (סבב שני).

	מס' גופי הריבוי שנספרו ב- CFU ספירה חיה במ"ל תרחיף (רמת אילוח)
טיפולים	**מקור**
ביקורת	0
Pythium oligandrum	$1.8x10^3$
Fusarium oxysporum I-2	$3.2X10^6$
Fusarium oxysporum I-1	$2.4X10^7$
Fusarium oxysporum I-3	$4.9X10^6$
Fusarium sp.	$2.1X10^7$

2.1.3 מערכת הניסויים באקרית הקרקע

2.1.3.1 השפעת אקרית הקרקע על גדילת נבטי בצל והתפתחותם

בחינת השפעת צפיפויות האקריות על גדילת נבטי בצל והתפתחותם התבצעה באינקובאטור במשטר תאורה של 11 שעות אור, 13 חושך, בטמפרטורת יום של $28^o\pm2^o$ C ובלילה של $17^o\pm2^o$ C ו- 68±9% לחות יחסית. התנאים הללו מקבילים לסתיו המאוחר בו נזק י האקרית הם החמורים ביותר. בעציצים מרובעים (250 ml) נזרעו 16 זרעי בצל (כמתואר בפיסקה 2.1.2.1). בבסיסו של כל עציץ הולחם מכסה פלסטיק עגול הפוך בעל תעלה שהכילה שמן קיק לאורכה למניעת מעבר של אקריות בין עציצים (תמונה 3).

תמונה 3 : עציץ מולחם למכסה פלסטיק שבשוליו תעלה המכילה שמן קיק למניעת מעבר אקריות בין העציצים.

העציצים הושקו בכל שלושה ימים ב 100 ml מים מזוקקים. אילוח העציצים נעשה באמצעות השקיה בתרחיף המכיל מים ואקריות בכל דרגות ההתפתחות . לקבלת תרחיף נקי נשטפו האקריות מצלחת הפטרי (כולל מחית הבוטנים) דרך שתי מסננות מתכת (ארי י. לוי – בני ברק) המורכבות אחת מעל גב השנייה בשני גדלי חורים - 710 µm ו-180 µm . מחית הבוטנים הוסרה בעזרת המסננת העליונה (µm710) ודרכה נשטפו האקריות למסננת התחתונה. האקריות נשטפו מספר פעמים לתוך צנצנת פלסטיק (500 ml) עד לקבלת תרחיף אקריות נקי .צפיפות האקריות חושבה כממוצע של 10 ספירות של- 1ml תרחיף (1ml=70 אקריות בממוצע) באמצעות מיקרוסקופ סטריאוסקופי (Zeiss Stemi 2000-C). צפיפות אילוח האקריות היה בכפולות של עשר (0, 10, 100, 1000), כל עציץ אולח בנפח תרחיף שונה ותוספת מים בהתאם לטיפול (טבלה 3), כך שכל העציצים ק יבלו נפח נוזלים כללי זהה של 100 ml. כל טיפול נערך בשש חזרות (עציצים). מידת הנזק חושבה כמתואר בפרק 2.1.2 (ממוצע שרידות נבטים). צפיפות האקריות הסופית נקבעה ע"י מיצוין מהעציצים לאחר 30 יום באמצעות משפכי "ברלזי", המבוססים על דחיית אקריות ממנורת להט הדולקת במשך 5 ימים ברציפות, ונפילתן דרך משפך חלק לצנצנת עם אתנול 70% (תמונה 4). הנתונים נותחו במבחני שונות חד כיווני One Way ANOVA והפרדת הממוצעים על פי Tukey HSD. הניתוחים הסטטיסטיים נעשו בתוכנת JMP ver 5.01 (SAS Institute, Inc.).

תמונה 4: משפך ברלזי – חימום הבצלים ע"י מנורת להט גורם לנפילת האקריות דרך המשפך לצנצנת האתנול (צילום אריק פלבסקי).

טבלה 3 : מבנה הניסוי בו נבדקה השפעת צפיפות האקריות על שרידות נבטי בצל.

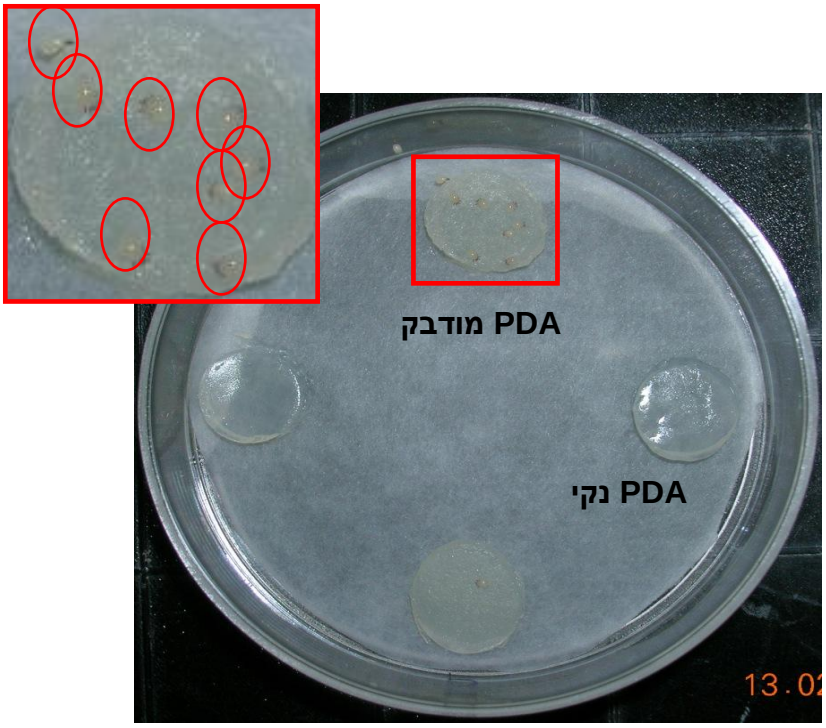
טיפול	**תרחיף אקריות (ml) / לעציץ**
בקורת	0 ml
10 אקריות	0.14 ml
100 אקריות	1.4 ml
1000 אקריות	14 ml

2.1.4 מערכות ניסויים משולבות בין אקרית הקרקע לפטריות קרקע פתוגניות לשושניים

2.1.4.1 משיכה בין פטריות לאקריות במערכת ללא נבטי בצל

נבדקה משיכת אקריות לכל הפטריות המצוינות בפרק 2.1.1 ללא נוכחות הצמח הפונדקאי. בנוסף, כדי לברר האם הימשכות האקרית ספציפית לפטריות פתוגניות לשושניים , נבחנה גם המשיכה ל פטרייה לא פתוגנית לבצל *Verticillium dahliae*. הניסוי נערך בצלחות פטרי בקוטר של 50 mm כשבתחתיתן נייר סינון לח בטמפרטורה של 25°±1° C. ארבע דסקיות PDA (עגולות) הונחו במרחקים שווים בבסיס צלחת הפטרי, על נייר הסינון, קרוב לשוליים. זוג דסקיות עם PDA ללא פטרייה וזוג שני שהכיל פטרייה (שש חזרות לכל פטרייה). במרכז כל צלחת פטרי הונחו בעזרת מכחול עשר נקבות בוגרות של אקרית הקרקע (תמונה 5), אחת לשעה נרשמו מספרי האקריות שנמצאו על הדסקיות השונות במשך ארבע שעות.

הניתוחים הסטטיסטיים נחלקו לשניים: 1) ניתוח כללי לשבעת הפטריות, בניתוח זה המשתנה הוא ה-PDA המודבק בפטרייה. ההבדלים בין הפטריות נבחנו במבחני שונות חד כיווני One Way ANOVA והפרדת הממוצעים על פי Tukey HSD בתוכנה JMP 5.01 (SAS Institute, Inc.) 2) ניתוח לכל פטרייה בנפרד, הבוחן מדידות חוזרות לאותם מצעי מזון בפרקי זמן שונים , המשתנה הוא סוג מצע מזון (PDA מודבק מול PDA נקי). ההבדלים בתוך הפטריות נבחנו בעזרת המבחן Repeated Measures ANOVA בתוכנת SPSS 14 (SPSS, Inc.).



תמונה 5: מערכת ניסוי משיכת אקריות לפטריות. בהגדלה נראות אקריות הקרקע כשהן ניזונות מ- PDA מודבק בפטרייה *F. oxysporum* I-3 לעומת PDA נקי - החופשי מאקריות.

2.1.4.2 פוריות אקרית הקרקע על נבטי בצל בנוכחות פטריות ובהעדרן

נבדקה פוריות אקרית הקרקע הגדלים על נבטי בצל בריאים ובכאלה המודבקים בפטריית הקרקע *F. oxysporum* I-3. פטרייה זו נבחרה לעבודה בניסויי השילוב מאחר ונמצא כי היא איננה אלימה לבצל (להלן) ואקריות נמשכות אליה. כך יכולתי לבחון את גודל הנזק במשולב לנבטי הבצל מאחר והם מצליחים לשרוד לאחר שלב ההדבקה . עשרים נקבות בוגרות הונחו בתוך צלחת פטרי קוטר 90mm שהכילה רסק בוטנים בטמפרטורה של 25 ±1° C. לאחר יממה הוצאו הבוגרות כך שבצלחת נותרו ביצים בלבד בשלב התפתחותי אחיד (± 12 שעות). לאחר חמישה עשר יום (זמן התפתחות משוער מביצה לבוגר בתנאים הללו), הועברו הבוגרים לעשרים בארות גידול בקוטר 16mm (Greiner Bio one - Cellstar), כשבתחתיתן נייר סינון לח ללא מזון. בכל באר הונחו חמישה זכרים וחמש נקבות בכדי לאפשר הזדווגות. לכל באר הוזלפו 60µl מים מזוקקים אחת ליומיים. לאחר חמישה ימים (עם מים וללא מזון) הועברו נקבות בלבד לצלחות פטרי 50mm לחמישה ימים נוספים. כל צלחת הכילה נבט בצל אחד (הרחבה בהמשך) ואקרית בוגרת אחת. מקור הנבטים בזרעים שהונבטו בצלחות פטרי 90mm על גבי נייר סינון לח ומים מזוקקים בטמפרטורה של 25±1° C. לאחר שבוע של הנבטה הועברו בתנאים סטרילים מחצית מהנבטים לשתי צלחות פטרי, שהכילו מצע PDA מודבק בפטרייה *F. oxysporum* I-3 (אילוח המצע התבצע שמונה ימים קודם כמתואר בפסקה 2.1.1.2). מחצית הנבטים הנותרים (שלא הודבקו בפטרייה) נשארו בצלחות הפטרי. לאחר שלושה ימים הועברו כל הנבטים ל- 30 צלחות פטרי בגודל 90mm המכילות נייר סינון לח. ב-15 צלחות הונחו הנבטים מודבקים בפטרייה וב-15 הצלחות הנותרות הונחו הנבטים בריאים. בכל צלחת הונחה נקבה בוגרת למשך חמישה ימים. בתום חמשת הימים נספרו הביצים שהוטל ו בצלחות הפטרי בעזרת מיקרוסקופ סטריאוסקופי . הנתונים נותחו במבחן t להשוואת שני ממוצעים.

2.1.4.3 השפעה משולבת של אקריות ופטריות על עיכוב התפתחותם של נבטי בצל

ההשפעה המשולבת של האקריות והפטרייה *F. oxysporum* I-3 על נבטי הבצל נבדקה בשתי מערכות ניסוי , בצלחות פטרי ובעציצים.

ניסוי בעציצים- נבחנו ארבעה טיפולים לבדיקת השפעת יחסי הגומלין בין האקרית והפטרייה על נבטי הבצל (טבלה 4). כל טיפול נערך בשמונה חזרות בעציצי 360 ml, כשבכל עציץ נזרעו 12 זרעי בצל על מצע שעוקר כשעה באוטוקלאב (121° C). העציצים אולחו באקריות באופן הבא: מתוך מושבות האקריות הוצאה אקרית (בוגרת) בודדת בעזרת מכחול ציירים (מידה- 0000) לצלחת פטרי ריקה המכילה נייר סינון לח . בצלחת נבדקה האקרית באמצעות מיקרוסקופ סטריאוסקופי שהיא אינה נושאת על גופה ביצים או דרגות צעירות . לאחר מכן הועברה האקרית לעציצים (100 אקריות / עציץ). אילוח העציצים בפטרייה *F. oxysporum* I-3 נעשה כפי שמתואר ב פרק 2.1.2. העציצים הונחו באינקובאטור במשטר תאורה של 11 שעות אור 13 שעות חושך (סתיו מאוחר) בטמפרטורת יום 28°±3° C ולילה 17°±3° C בלחות יחסית של 75%±15 Rh. העציצים הושקו אחת לשלושה ימים ב 100 ml מים מזוקקים. בתום הניסוי, כעבור 8 שבועות, נבדקה שרידות הנבטים וכן נספרו האקריות לאחר מיצויין במשפך ברלזי. הפטריות זוהו כפי שמתואר בפסקה 2.1.2.1. הנתונים נותחו במבחני שונות חד כיווני One Way ANOVA והפרדת הממוצעים על פי Tukey HSD.

ניסוי צלחות פטרי (50mm)- ניסוי זה בדק את הנזק הנגרם לשורשי הנבטים במהלך 4 ימים. נבדקה השפעה משולבת של אקרית הקרקע והפטרייה *F. oxysporum* I-3 על גידול השורשונים של הבצל ב- 25°±1° C גידול הנבטים כמתואר בניסוי הפוריות (סעיף 2.1.4.2). בכל צלחת המכילה נייר סינון לח הוצב נבט בצל צעיר , ו-20

אקריות בוגרות שהועברו בעזרת מכחול דק. כל טיפול (טבלה 5) נערך ב-10 חזרות במשך ארבעה ימים. אחת ליום צולמו הנבטים במצלמה דיגיטלית לצד סרגל (פונקצית macro mode במצלמת Nikon 5600 Coolpix), ואורכם נמדד בתמונה באמצעות התוכנה Olympus Soft Imaging System (http://www.olympus-sis.com). הנתונים נותחו במבחני שונות Repeated Measures ANOVA בתוכנת SPSS 14. (SPSS, Inc.).

טבלה 4: מבנה ניסוי העציצים המשולב לבדיקת השפעת נוכחות אקריות ופטריות על גדילת נבטי בצל והתפתחותם.

טיפול	פטרייה	מספר אקריות לעציץ	מס' גופי הריבוי שנספרו ב- CFU ספירה חיה במ"ל תרחיף (רמת אילוח)
ביקורת	ללא פטרייה	ללא אקריות	0
פטרייה בלבד	*F. oxysporum* I-3	ללא אקריות	$4x10^5$
פטרייה ואקריות	*F. oxysporum* I-3	100	$4x10^5$
אקריות בלבד	ללא פטרייה	100	0

טבלה 5 : מבנה ניסוי צלחות הפטרי המשולב לבדיקת השפעת אקריות ופטריות על גדילת נבטי הבצל והתפתחותם.

טיפול	פטרייה	מספר אקריות לנבט
ביקורת	ללא פטרייה	ללא אקריות
אקריות בלבד	ללא פטרייה	20
פטרייה בלבד	*F. oxysporum* I-3	ללא אקריות
אקריות ופטריות	*F. oxysporum* I-3	20

2.2 סימביונטים באקרית הקרקע

איתור החיידקים הסימביונטים בוצע במעבדתה של ד "ר עינת צחורי- פיין בנווה יער . לרוב מתבסס זיהוי הסימביונטים על PCR עם פר יימרים כלליים הנקשרים לגן המקודד ל- 16S rDNA המאפשר זיהוי חי ידקים מקבוצת ה-Bacteria. אם נמצאים חיידקים בתוך האורגניזם הנבדק , הפריימרים "מתיישבים" על הרצף השמור ומגבירים אותו. בנוסף ניתן לזהות חיידקים באמצעות אנליזת Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). שיטת זו מבוססת על ג'ל אלקטרופורזה בעל גראדיאנט של Urea ו- Formamide. כך ניתן להפריד תוצרי PCR בעלי אורך זהה השונים בריכוז הנוקליאוטידים G ו-C וליצור פרופיל של החיידקים הנמצאים בסביבה מסוימת (Muyzer *et al*,. 1993). במהלך האלקטרופורזה מקטעי ה- DNA נודדים בתוך הג'ל לכיוון של ריכוזי Urea ו- Formamid הגורמים לדנטורציה של סליל ה- DNA, להאטתם עד לעצירתם המוחלטת . זיהוי החיידקים יכול להתבצע ע"י בידוד המקטעים (band) מהג'ל וריצופם או ע"י יצירת ספריות של הגן 16S rDNA והרצתם על הג'ל כסמנים. הרצפים של הגנים שמתקבלים מושווים לרצפים במאגרי המידע הגנטיים . עד השנים האחרונות שיט ה זאת שימשה בעיקר לאפיון חיידקי סביבה (Muyzer *et al.*, 1993; Gillan *et al.*, 1998). בעבודה מקדימה שנעשתה במעבדתה של ד "ר עינת צחורי- פיין בנווה יער , ע"י נטע מוזס דאובה אותרו בעזרת

DGGE שבעה רצפי 16SrDNA באקרית הקרקע *R. robini* (טבלה 7, תמונה 17 נספחים). לאחר זי הויים הראשוני, תוכננו לכל אחד מהחיידקים פריימרים ספציפיים שיאפשרו הן את זיהויו בהן את הארכת הגן 16SrDNA. לעיתים קרובות חרקים נושאים יותר מחיידק סימביונט אחד ולכן נעשה שימוש בטכניקה זאת בכדי ליצור פרופיל של החיידקים הסימביונטים הקיימים בחרקים (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2003).

2.2.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים באקריות בוגרות

2.2.1.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים בנקבות וזכרים

סקירת נוכחות החיידקים התבצעה על 20 פרטים בוגרים של אקרית הקרקע, זכרים ונקבות שמקורם במושבה שגודלה במעבדה (סעיף 2.1.1.1) בעזרת פריימרים ספציפיים לכל חיידק (טבלה 8 נספחים).

1) הפקת DNA מאקרית הקרקע - מכיוון שהאקריות הנבדקות קטנות מאוד, הן נכתשו בבופר הגורם לפירוק התאים ונטרול האנזימים, וע"י כך ה- DNA זמין להגברה ב- PCR. האקריות הונחו על פרפילם ו נמעכו בעזרת מבחנה של 0.5 ml בתוך 40µl של lyses buffer על קרח עפ"י ריכוז החומרים הבא:

,5 µl\ml IGEPAL SIGMA®, 0.5mM Tris-HCL pH 8.0 SIGMA®

SIGMA®1mg/ml Proteinase K-ו,0.5mM EDTA MERCK®. התרחיף עבר אינקובציה של 15 דקות בטמפרטורה של 65° C לאחר מכן 10 דקות ב- 95° C ולבסוף סרכוז קצר במהירות של 15000 rpm שרכז את כל שאריות האקריות בתחתית המבחנה (Frohlich *et al.*, 1999).

2) PCR עם פרימרים ספציפים על מנת להעריך את אחוזי האוכלוסיה הנושאים את החיידקים השונים שזוהו ב- DGGE. בנוסף ל-20 האקריות הבוגרות צורפו לדוגמאות: ביקורת חיובית (האקרית *R. robini* המקורית שנשאה את כל שבעת הרצפים שלוש שנים קודם לכן, נספח 1), ביקורת שלילית (אקרית הקורים *Tetranychus urticae*) ומים כביקורת לתקינות התהליך (תוצר שמופיע במים מעיד על זיהום הדוגמא). ה- PCR בוצע עפ"י התנאים הבאים:

שלב 1- 2 דקות ב- 95° C דנטורציה ופתיחת הגדילים

35 מחזורים של:

שלב 2- 30 שניות ב- 92° C

שלב 3- 30 שניות ב- 5° C או 59°* C — הגברת מקטעים ע"י RedTaq DNA polymerase

שלב 4- 30 שניות ב- 72° C

שלב 5- 5 דקות 72° C פרק זמן נוסף לסיום פעילות ה- RedTaq DNA polymerase

הריאקציות בוצעו בנפח של 25 µl עם 3 µl של DNA, בריכוז פריימרים של 400 mM,

SIGMA® 1 unit RedTaq DNA -ו 0.2mM SIGMA® RedTaq buffer1× dNTP LAROVA® polymerase. תוצרי האנליזה הוטענו על ג'ל אגרוז SeaKem® LE Agarose 1.2%.

לכל זוג פריימרים מתוך שבעת הזוגות טמפ' קישור אופטימלית לגדיל המשוכפל (Annealing temperature) החיידקים נחלקו לשתי טמפ' קישור:

Brucellaceae, *Defluvibacter sp.* (54° C)

Clostridium sp., Uncultured bacterium, ά- proteobacterium, *Providencia sp.*, *Alcanivorax sp.* (59° C)

2.2.1.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בנקבות בהרעבה

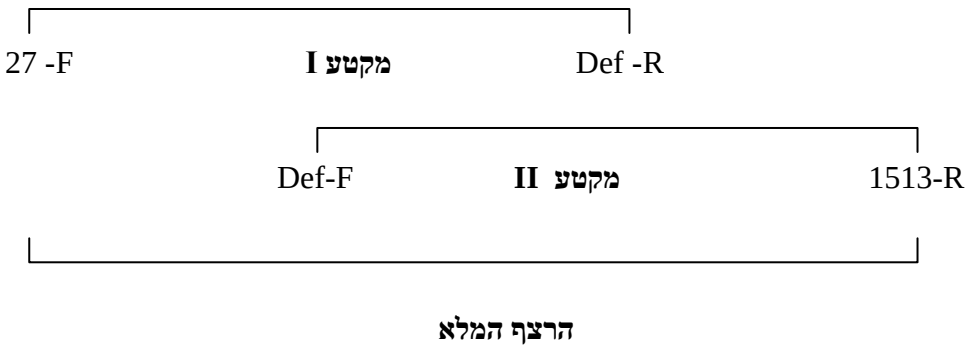
בכדי לבחון האם נוכחות החיידקים נובעת מהמזון, הועמדו נקבות בתנאי רעב למשך ארבעה ימים (התקיימו על מים בלבד). בפרק זמן זה מערכת העיכול התרוקנה מכל שאריות מזון . לאחר מכן באמצעות PCR ושימוש ב שבעת זוגות הפריימרים, נבדקה נוכחותם של החיידקים בשלוש נקבות. ביקורות בדומה לטיפול באקריות הבוגרות (סעיף 2.2.1.1).

2.2.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בביצי נקבות

בכדי לבחון האם החיידקים מועברים מהאם לצאצאים נבדקו עשר ביצים של אקרית הקרקע מעשר נקבות. הפקת ה-DNA למעט שלב מעיכת הביצים שנעשה בעזרת מחט עבה (ולא מבחנת 0.5 ml) ושלב ה- PCR זהה לטיפול שתואר למעלה (סעיף 2.2.1.1).

2.2.3 ריצוף מלא לגן המקודד ל-16S rDNA לסימביונטים נבחרים

על מנת לאשש את זהות החיידקים שנתנו תוצר , בכל האקריות (לאורך כל הטיפולים) רוצף הגן לכל אורכו . הריצוף נעשה ע "י שילוב פריימרים הכלליים לגן (1513R, 27F) שנמצאים בקצוות ה גן, ומאפשרים הגברה של כל החיידקים מקבוצת ה- Bacteria, בשילוב עם הפריימרים הספציפיים לכל חיידק . לדוגמא: ריצוף מלא לגן השייך לחיידק הדומה ל- *Defluvibacter sp.* ריצוף מקטע I Def-R → 27F וריצוף מקטע II 1513 → Def-F



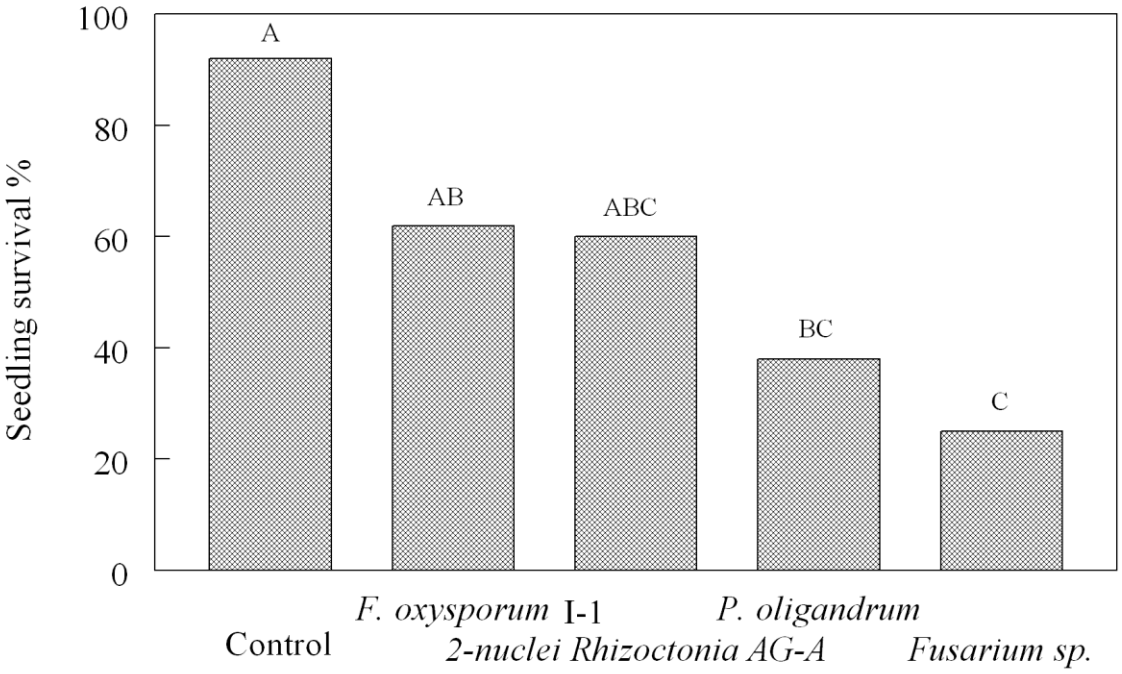
המקטעים נחתכו מהג 'ל, ונוקו בעזרת הקיט GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit Amersham Biosciences, UK Ltd. בשלב הבא עברו שיבוט בעזרת הקיט InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit, Fermentas, ותוצרי הליגציה עברו טרנספורמציה לתאי *E. coli* באמצעות אלקטרופורציה. התאים הטרנספורמנטיים נזרעו על צלחות אגר LB שהכילו 100µg/ml אמפיצילין והודגרו למשך לילה ב- 37° C. שתי מושבות מכל צלחת גודלו למשך לילה ב- 37° C בטלטול בתוך 3ml מדיום LB נוזלי המכיל 100 µg/ml אמפיצילין. הפקת הפלסמידים מהתאים בוצעה בעזרת הקיט HiYield™ Plasmid Mini Kit, RBC, Taiwan. הפלסמידים נשלחו לריצוף בחברה המסחרית (Macrogen Inc. Korea), והרצפים שהתקבלו הושוו לרצפים ידועים במאגרי הנתונים הגנטיים בעזרת תוכנת Blast של NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

3 תוצאות

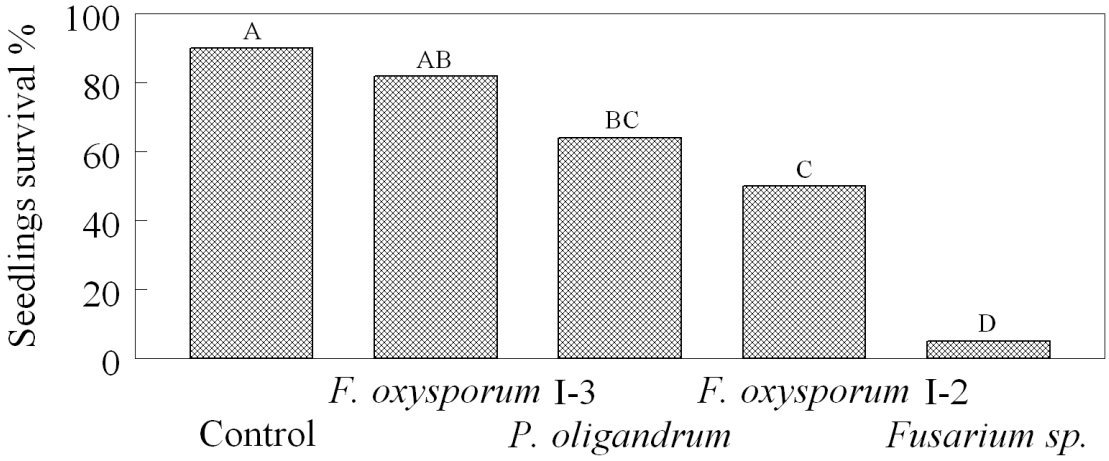
3.1 מערכות הניסוי: אקרית הקרקע, פטריות קרקע פתוגניות לשושניים, ונבטי בצל

3.1.1 השפעת פטריות על גדילת נבטי בצל והתפתחותם

כללית, בסבב הניסוי הראשון, שתי פטריות פגעו קשה בשרידות נבטי הבצל ונבדלו מהבקורת. הנזקים החמורים ביותר נגרמו על ידי הפטריות *P. oligandrum* ובמיוחד, *Fusarium sp* ($F_{4,19}$=9.81; p<0.01, איור 1). תוצאות סבב הניסויים השני היו דומות ובתום הניסויים מרבית הנבטים היו נגועים בפטריות (p<0.01 ; $F_{4,35}$=57.01, איור 2).גם בניסוי זה נמצא שהפטרייה הפתוגנית ביותר לנבטים הייתה *Fusarium sp.* (איור 2) שהפחיתה ב 86% את שרידות הבצל, בעוד ש *F. oxysporum* I-3 הנחשבת לתת מין שלה לא גרמה לנזק משמעותי.



איור 1: מידת הפתוגניות של פטריות לנבטי בצל בסבב הניסויים הראשון . עמודות עם אותיות שונות מייצגות הבדלים ברמת מובהקות של α=0.05 במבחני הפרדת ממוצעים.

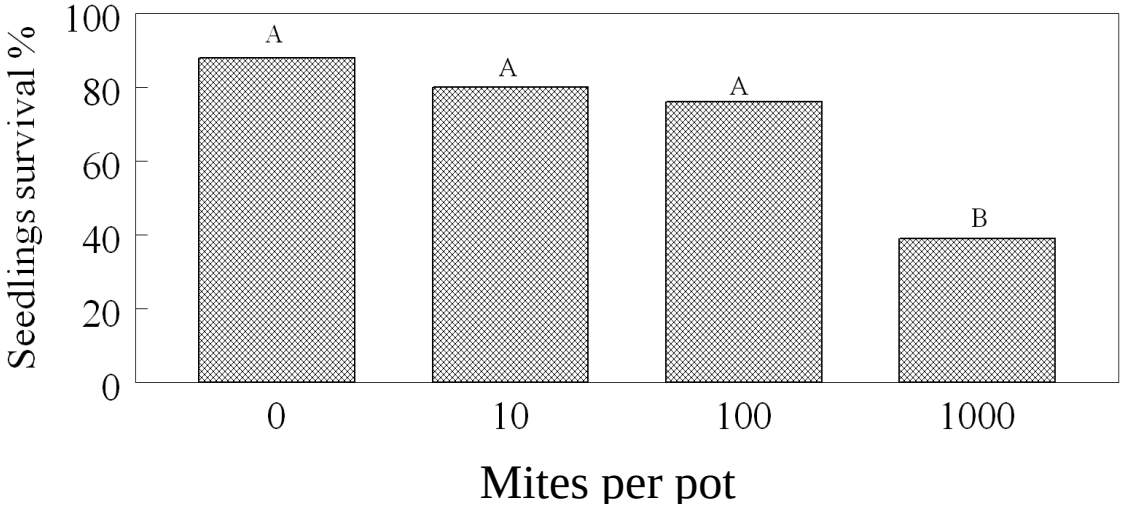


איור 2: מידת הפתוגניות של פטריות לנבטי בצל בסבב הניסויים שני. עמודות עם אותיות שונות מייצגות הבדלים ברמת מובהקות של α=0.05 במבחני הפרדת ממוצעים.

מרבית הנבטים בשני הסבבים שעברו חיטוי באקונומיקה והונחו על מצע PDA היו נגועים בתבדידים השונים בהתאמה. בסבב ראשון לא ניתן היה לאבחן את מידת הנגיעות בפטריות *P. oligandrum 2- nuclei R. AG-A* משום שפטריית הטריכודרמה (*Trichoderma sp.*) השתלטה על צלחות הפטרי וקשה היה לזהות את הפתוגנים.

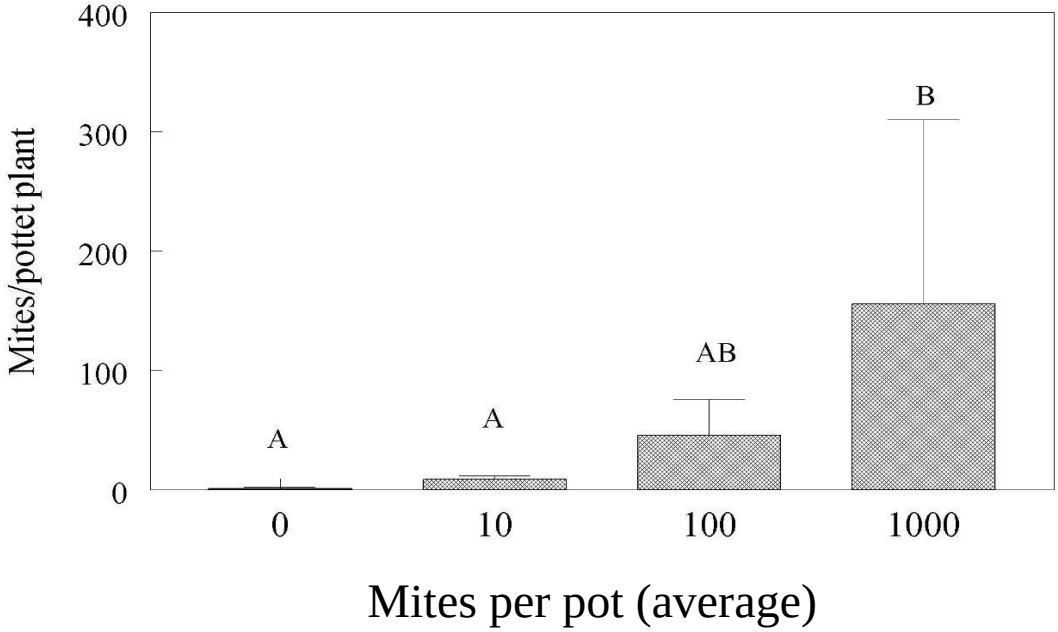
3.1.2 השפעת אקרית הקרקע על גדילת נבטי בצל והתפתחותם

האקריות פגעו בשרידות נבטי הבצל רק ברמה הגבוהה של אלף אקריות לעציץ ($F_{3, 20}$= 13.41; P<0.0001), איור 3). בבדיקת משפכי הברלזי בתום הניסוי לא נמצא הבדל במספרן הממוצע של האקריות במרבית הטיפולים, למעט בצפיפות הגבוהה ביותר ($F_{3, 20}$ = 4.93; P=0.01; איור 3).



איור 3: השפעת רמות אוכלוסייה שונות של אקרית הקרקע על שר ידות נבטי בצל. אותיות גדולות שונות מסמלות הבדל מובהק (α=0.05) בין הטיפולים.

בספירת האקריות במשפכי הברלזי בתום הניסוי נמצא שבטיפול 1000 אקריות לעציץ נמצאה אוכלוסיית האקריות הגבוהה ביותר יחד עם שיעורי התמותה הגבוהים ביותר (80%) ($F_{3, 20}$= 4.93; P=0.0101, איור 4).



איור 4: מספרן הממוצע (±SE) של האקריות ששרדו בעציצים בתום ניסוי השפעת האקריות על שרידות נבטי בצל (איור 3) ומוצו ממצע הגידול בעזרת משפכי ברלזי . אותיות גדולות שונות מסמלות הבדל מובהק (α=0.05) בין הטיפולים.

3.1.3 בדיקת יחסי הגומלין בין פטריות לאקריות והשפעתן על נבטי בצל

3.1.3.1 משיכה בין פטריות לאקריות במערכת ללא נבטי בצל

בראשית פרק זה אתייחס לבחינת משיכת אקריות לכל הפטריות יחדיו ולאחר מכן לבחינת משיכת אקריות לכל פטרייה לחוד (סעיף 2.1.4.1).

מספר אקריות שנמצא על מצעי מזון מודבקים (מבחן בין הפטריות)

אקריות מעדיפות את מצע מזון ה-PDA המודבק בפטרייה, על פני מצע מזון ה- PDA ביקורת. מגמת כזו נמצאה ברוב הפטריות והיא מגיעה לשיאה ארבע שעות לאחר תחילת הניסוי (איור 5). על פטריית ה-*2 nuclei R. AG-A*, נמצא כי מספר האקריות גדל מהשעה השנייה לניסוי אך ירד בשעה הרביעית עד למספר הדומה לזה שבמצע מזון הביקורת. במבחן One way ANOVA (איור 5), נמצאו הבדלים מובהקים ביכולת משיכת האקריות בין הפטריות *F. oxysporum* I-2, I-1 לפטריית הריזוקטוניה *2-nuclei R. AG-A* ($F_{6,35}$=2.77; P≤0.02)

מספר אקריות שנמצא על מצעי מזון מודבק (מבחן עבור כל פטרייה בנפרד)

בכל הטיפולים רוב האקריות נמצאו על מצע מזון ה-PDA המודבק בפטרייה (איור 5). ברוב הפטריות אף ניתן לראות כי התנהגות זו די קבועה לאורך ארבע שעות הניסוי . האקריות העדיפו באופן מובהק מצע המזון PDA מודבק בפטרייה על פני PDA ביקורת ($F_{1, 35}$= 123.54; P<0.0001 ;substrate, טבלה 6, איור 5)

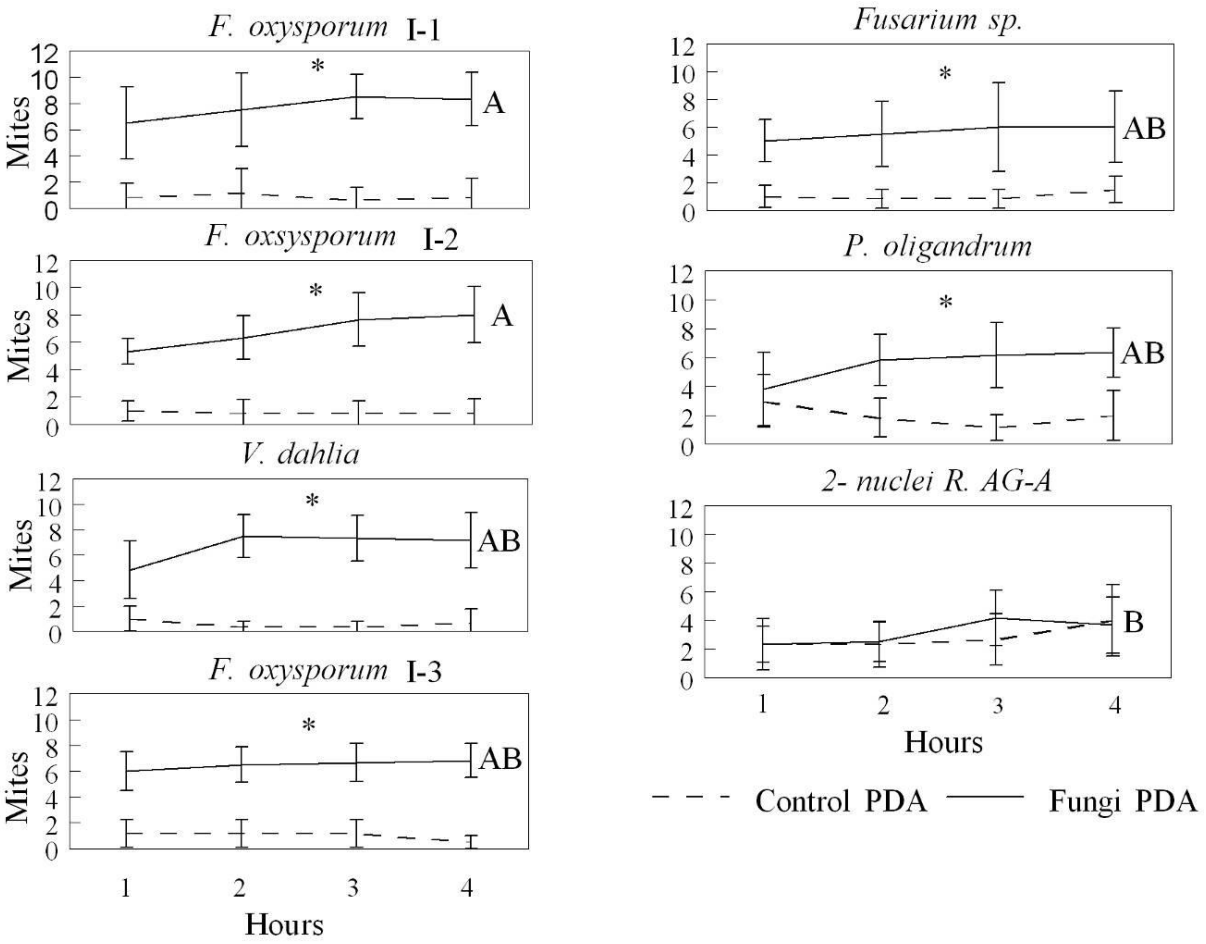
טבלה 6 : ערכי P ו-F של מבחן Repeated Measures ANOVA שהתקבלו בבדיקת העדפת סוג מצע מזון (מודבק בפטרייה מול נקי) ע"י האקריות

Treatment	*F. oxysporum* I-1		*F. oxysporum* I-2		*V. dahlia*	
	F F ratio	PProb >F	F F ratio	PProb >F	F ratio	Prob >FP
Substrate	21.732	0.006***	42.05	<.0001***	37.399	0.002***

Treatment	*F. oxysporum* I-3		*Fusarium sp.*		*P. oligandrum*		2-nuclei *R.* AG-A	
	F F ratio	PProb >F	F F ratio	PProb >F	F F ratio	PProb >F	F F ratio	PProb >F
Substrate	48.4	<.0001	14.93	0.012	7.462	0.041*	0.118	NS0.745

דרגות החופש עבור שגיאת הניסוי, סוג מצע מזון:

Substrate df =1, 35 P<0.05, *** P<0.001, NS non significant



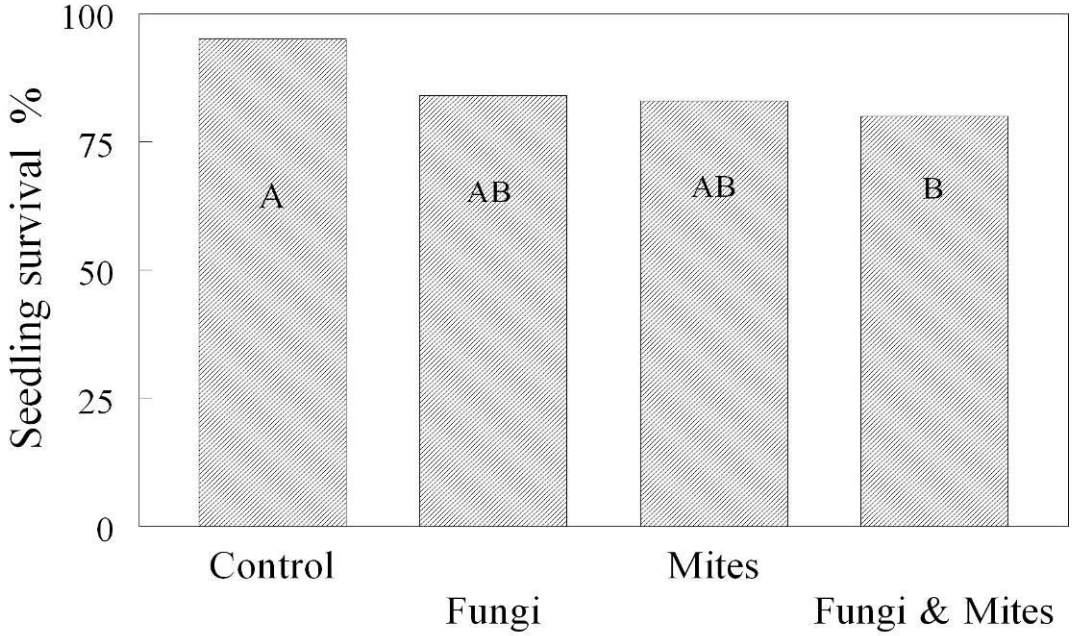
איור 5 :משיכת אקריות בוגרות של *Rhizoglyphus robini* (±SE) למצע מזון ה- PDA המודבק בפטרייה (שבע פטריות) לעומת מצע מזון ה- PDA נקי (ביקורת) לאורך ארבע שעות הניסוי. הפטרייה *V. dahlia* אינה פתוגנית לבצל והיא משמשת ביקורת חיובית. סימן * מצביע על הבדל מובהק בין מצע מזון מודבק בפטרייה למצע מזון הביקורת . אותיות לטיניות גדולות מצביעות על הבדל מובהק במשיכת האקריות בין מצעי מזון ה- PDA המודבקים בלבד בטיפולים השונים.

3.1.3.2 פוריות אקרית הקרקע הניזונה מנבטי בצל בנוכחות פטריות ובעדרן

פוריותן (מספר ביצים מוטלות ליום) של נקבות אקריות קרקע הניזונות על נבטים מודבקים בפטרייה גבוהה באופן מובהק מאלה שניזונו על נבטי בצל בריאים – 39.7 ביצים ליום לעומת 6.6 ביצים ליום בהתאמה ($p<0.001$; $F_{1,28}=34.3$).

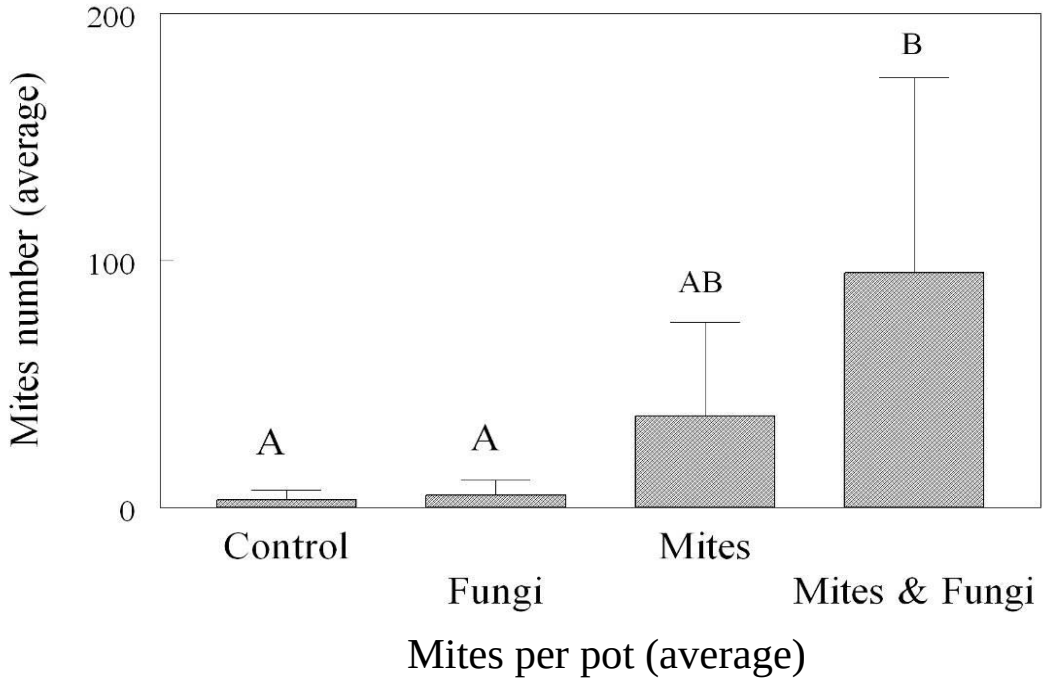
3.1.3.3 השפעה משולבת של אקריות ופטריות על עיכוב התפתחותם של נבטי בצל

בתום הניסוי בעציצים (8 שבועות) נמצא שהשפעת הפטרייה על התפתחות נבטי הבצל לא הייתה מובהקת ($F_{1,27}=3.82;P=0.061NS$) גם הטיפול המשולב של האקריות והפטריות לא השפיע באופן מובהק יותר מטיפול האקריות או הפטריות בנפרד. הטיפול המשולב של אקריות ופטריות יחד הפחית באופן מובהק מהביקורת את שרידות הנבטים (איור 6).



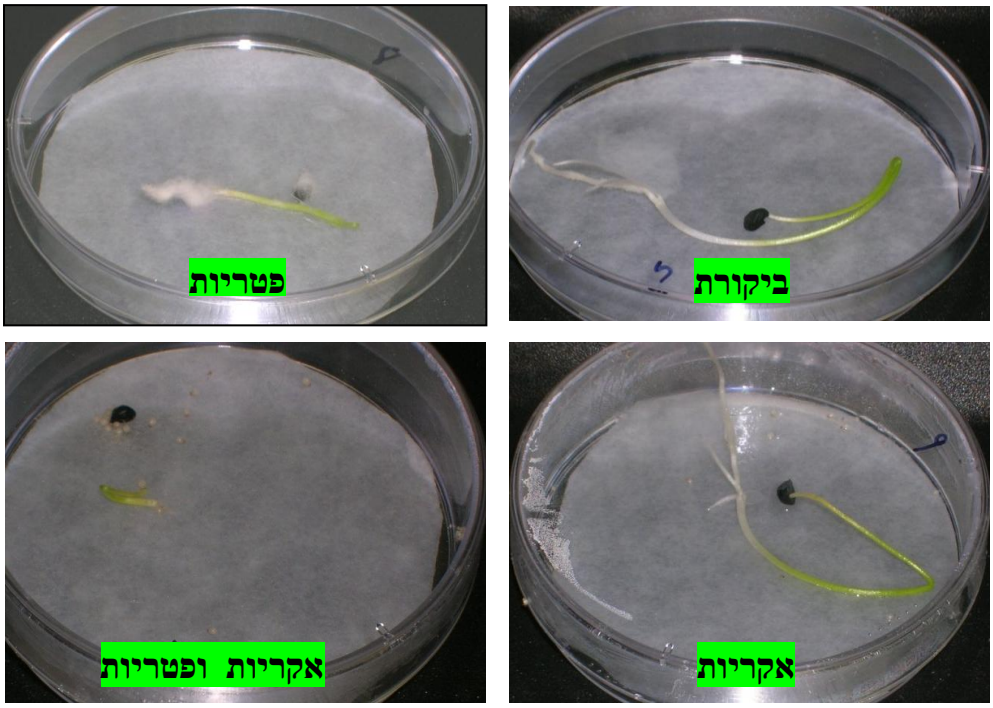
איור 6: ההשפעות של אקריות הקרקע, הפטרייה *F.oxysporum* I-3, ושניהם יחד על הישרדות נבטי בצל. אותיות גדולות שונות מסמלות הבדל מובהק ($\alpha=0.05$) בין הטיפולים.

בתום הניסוי לא נמצאו מספרים גבוהים של אקריות בעציצים, ומספרן היה גבוה באופן מובהק רק בין הטיפול המשולב ל אקריות בלבד (איור 7) ($F_{3,28}=3.03$; $P\leq0.046$). אקריות בודדות בלבד מוצו מהביקורת ומטיפול הפטריות, למרות שבפועל לא אמורות להימצ א כלל אקריות בטיפולים אלה. יתכן שלמרות מחסום תעלות השמן הצליחו לעבור פרטים בודדים בין העציצים אך לא נראה שהם השפיעו מהותית על תוצאות הניסוי. בתבדידים שעברו חיטוי באקונומיקה והונחו על מצע PDA היה אחוז נגיעות של 33% בפטרייה *F. oxysporum* I-3 בטיפול המשולב ו 38% נגיעות בטיפול הפטריות בלבד.

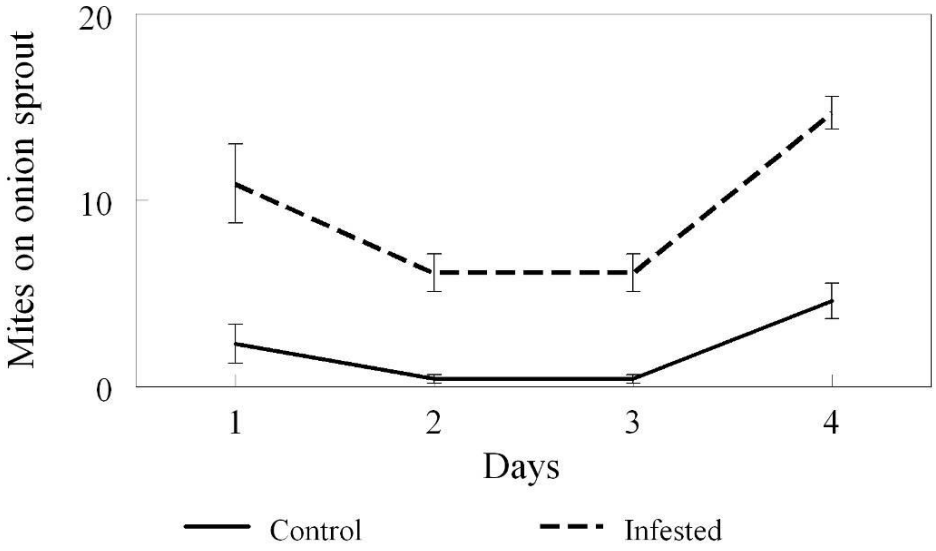


איור 7: ממוצע (±SE) האקריות ש מוצו בעזרת משפך ברלזי בתום ניסוי העציצים לאחר 8 שבועות. אותיות גדולות שונות מסמלות הבדל מובהק (α=0.05) בין הטיפולים.

ניסוי בצלחות פטרי- מגמת השינוי בהתנהגות האקריות לאורך זמן הייתה זהה בשני סוגי מצעי המזון (נבט מודבק מול נבט בריא) (איור 8). סוג מצע המזון השפיע באופן מובהק על צפיפות האקריות ($F_{1,77}$=95.88; P<0.0001), מרבית האקריות נמצאו על נבטים מודבקים.

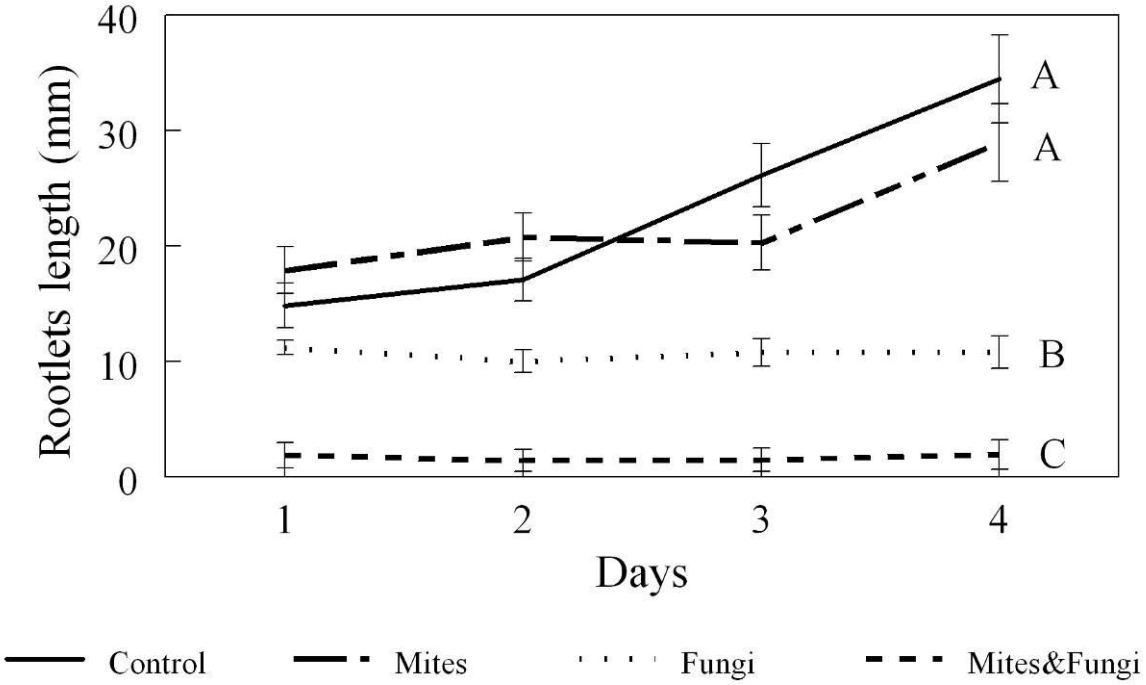


תמונה 6: מערכת ניסוי צלחות פטרי משולב. האקריות בטיפול האקריות בלבד "אדישות" לנבט הבצל שצומח ללא הפרעה בדומה לביקורת. לעומתן האקריות בטיפול המשולב (אקריות ופטריות) ניזונות מהנבט המודבק עד לתומו.



איור 8 : מספר אקריות ממוצע (±SE) על נבטי בצל בריאים (קו רציף) ונגועים בפטרייה *F. oxysporum* I-3 (קו מקוקו).

הנבטים שהודבקו באקריות בלבד צמחו בדומה לביקורת כשנוכחות האקריות בצלחת הפטרי לא השפיעה כלל על אורך הנבטים והשורשונים. טיפול הפטריות ($F_{1,36}$=86.01; p<0.0001) והטיפול המשולב של אקריות ופטריות ($F_{1,36}$=4.96; p<0.05) קיצרו באופן מובהק את אורך שורשוני הנבטים ועכבו את גדילתם. השורשונים כמעט ולא התפתחו בטיפול של הנבטים הנגועים בפטריות ואקריות יחד (איור 9).



איור 9: ממוצע אורך השורשונים (±SE) של נבטי בצל לאורך ארבע ת ימי הניסוי. קו רציף (Control) מסמל נבטים בריאים, קו מקוקו לא אחיד (Mites) מסמל נבטים נגועים באקריות קרקע בוגרות, קו מקוקו אחיד דק (Fungi) מסמל נבטים מודבקים בפטרייה *F. oxysporum* I-3, קו מקוקו אחיד עבה (Fungi & Mites) מסמל נבטים מודבקים בפטרייה ונגועים באקריות. אותיות גדולות שונות מסמלות הבדל מובהק (α=0.05) בין הטיפולים.

3.2 סימביונטים באקרית הקרקע

3.2.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים באקריות בוגרות

3.2.1.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים בנקבות וזכרים

זיהוי סימביונטים ספציפיים בעשר נקבות ועשרה זכרים בוגרים של אקרית הקרקע *R. robini*. בפועל בשני חיידקים *Providencia sp.* ו- ά-proteobacterium נפח הדגימה של זכרים 1 ו-2 ושל נקבה 2 אזל ולכן הבדיקה נעשתה על שמונה זכרים ותשע נקבות.

מקרא תמונות כללי

H_2O = מים (ביקורת שלילית)

+ = אקרית *R. robini* המקורית (ביקורת חיובית)

– = אקרית הקורים *T. urticae* (ביקורת שלילית)

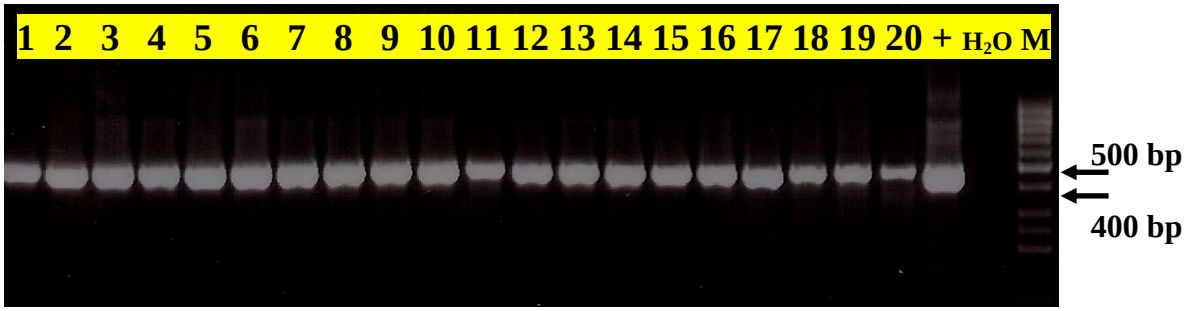
M = סרגל בסיסים Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Fermentas Inc.

נקבות בוגרות = 11-20♀

זכרים בוגרים = 1-10♂

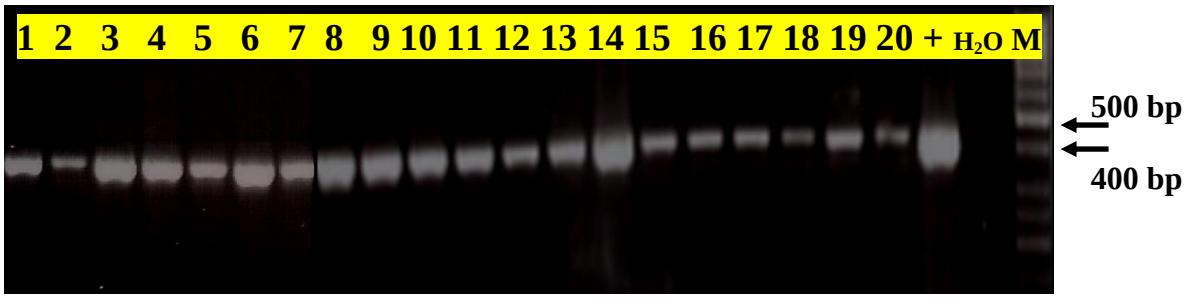
המקטע הנבדק בכל האקריות והביצים מתייחס לרצף הבסיסים שבין שני הפריימרים (ספציפיים לכל סימביונט, טבלה 8 נספחים) השייך לגן המקודד ל- 16S rDNA ומזהה את החיידק . יצוין שבכל הג'לים (תמונות 7 - 16) המים נמצאו נקיים (ביקורת שלילית), הביקורת החיובית הראתה נוכחות של הסימביונטים הנבחרים (למעט בבדיקת נוכחות הסימביונט מהסוג *Clostridium sp.* בביצי נקבות האקרית), הביקורת השלילית הנוספת (אקרית הקורים) אשר נבדקה רק בחלק מהדגימות לא הראתה נוכחות של הסימביונטים.

זיהוי סימביונט ממשפחת ה- Brucellaceae (תמונה 7) מראה כי כל עשרים הפרטים (זכרים ונקבות) מכילים את המקטע, כלומר בכל הפרטים הנבדקים נמצא החיידק. בדוגמא זו לא הייתה ביקורת שלילית . סרגל הבסיסים בעל אורך קטע המכיל מעל 400 bp (טבלה 8 נספחים).



תמונה 7 : זיהוי סימביונט ממשפחת Brucellaceae באמצעות פריימרים ספציפיים. M סרגל בסיסים, H_2O מים, + ביקורת חיובית, נקבות בוגרות 11-20♀, זכרים בוגרים 1-10♂

זיהוי סימביונט מהסוג *Defluvibacter sp.* (תמונה 8) מראה כי כל עשרים הפרטים מכילים את המקטע, כלומר בכל הפרטים הנבדקים נמצא החיידק. בדוגמא זו לא הייתה ביקורת שלילית. סרגל הבסיסים בעל אורך קטע המכיל מעל 400 bp (טבלה 8 נספחים).



תמונה 8 : זיהוי סימביונט מהסוג *Defluvibacter sp.* M סרגל בסיסים, H_2O מים, + ביקורת חיובית, נקבות בוגרות 11-20♀, זכרים בוגרים 1-10♂

זיהוי סימביונט מהסוג *Alcanivorax sp.* (תמונה 9) מראה כי 1♀, 12-13♀ אינם מכילים את המקטע, כלומר בפרטים אלה לא נמצא החיידק . הפרטים 4♂, 11♀ מראים תוצר חלש כלומר קיימת סבירות להמצאות החיידק . בכל שאר הפרטים נמצא החיידק. סרגל הבסיסים בעל אורך קטע המכיל מעל 500 bp (טבלה 8 נספחים).

תמונה 9 : זיהוי סימביונט מהסוג *Alcanivorax sp.* M סרגל בסיסים, H_2O מים, + ביקורת חיובית, - ביקורת שלילית, נקבות בוגרות 11-20♀, זכרים בוגרים 1-10♂

זיהוי סימביונט מ הסוג *Clostridium sp.* (תמונה 10) מראה כי 8-9♂, 4-6♂, 1-2♂, 16-20♀, 12♀ אינם מכילים את המקטע, כלומר בפרטים אלה לא נמצא החיידק . 10♂, 11♀ מראים תוצר חלש כלומר קיימת סבירות להמצאות החיידק. בכל שאר הפרטים נמצא החיידק. סרגל הבסיסים בעל אורך קטע המכיל מעל 400 bp (טבלה 8 נספחים).

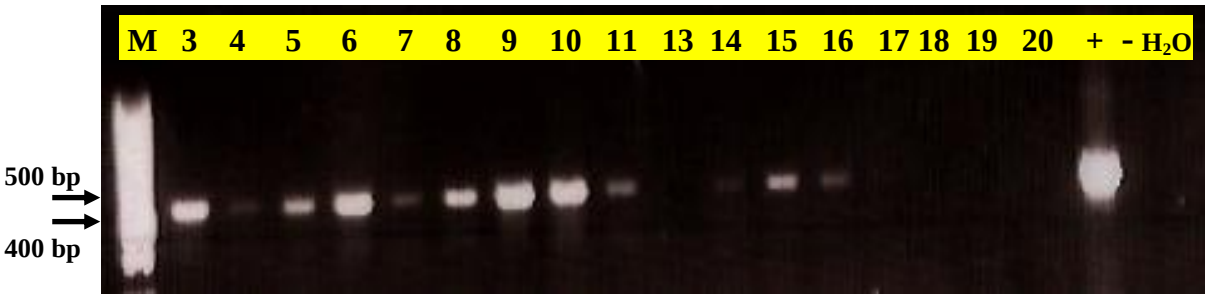
תמונה 10: זיהוי סימביונט מהסוג *Clostridium sp.* M סרגל בסיסים, H_2O מים, + ביקורת חיובית, - ביקורת שלילית, נקבות בוגרות 11-20♀, זכרים בוגרים 1-10♂.

זיהוי סימביונט Uncultured bacterium (תמונה 11) מראה כי ♂2-4 , ♀12-13, ♀15-16, ♀18 אינם מכילים את המקטע, כלומר בפרטים אלה לא נמצא החיידק . בכל שאר הפרטים נמצא החיידק . סרגל הבסיסים בעל אורך קטע המכיל מעל 500 bp (טבלה 8 נספחים).

תמונה 11: זיהוי סימביונט Uncultured bacterium . M סרגל בסיסים, H_2O מים, + ביקורת חיובית, - ביקורת שלילית, נקבות בוגרות ♀11-20, זכרים בוגרים ♂1-10.

זיהוי סימביונט מהסוג *Providencia sp.* לתשע נקבות ושמונה זכרים* בוגרים (תמונה 12). מראה כי כל שמונת הזכרים מכילים את המקטע, כלומר בפרטים אלה נמצא החיידק. ♀13, ♀17-20 אינן מכילות את המקטע כלומר בפרטים אלה לא נמצא החיידק. סרגל הבסיסים בעל אורך קטע המכיל מעל 400 bp (טבלה 8 נספחים).

*נפח הדגימה של זכרים 1 ו-2 ושל נקבה 12 אזל בבדיקת הסימביונטים הבאים: *Providencia sp.* ו- ά- Proteobacterium.



תמונה 12: זיהוי סימביונט מהסוג *Providencia sp.* M. סרגל בסיסים, H_2O מים, + ביקורת חיובית, - ביקורת שלילית, נקבות בוגרות ♀11, ♀13-20, זכרים בוגרים ♂3-10.

זיהוי סימביונט מתת המערכה ά- proteobacterium לתשע נקבות ושמונה זכרים* בוגרים (תמונה 13). מראה כי ♂8, ♀20, ♀11 אינם מכילים את המקטע , כלומר בפרטים אלה לא נמצא החיידק . בכל שאר הפרטים נמצא החיידק. סרגל הבסיסים בעל אורך קטע המכיל מעל 500 bp (טבלה 8 נספחים).

תמונה 13: זיהוי סימביונט מתת המערכה ά- proteobacterium. M סרגל בסיסים, H_2O מים, + ביקורת חיובית, - ביקורת שלילית, נקבות בוגרות ♀11, ♀13-20, זכרים בוגרים ♂3-10

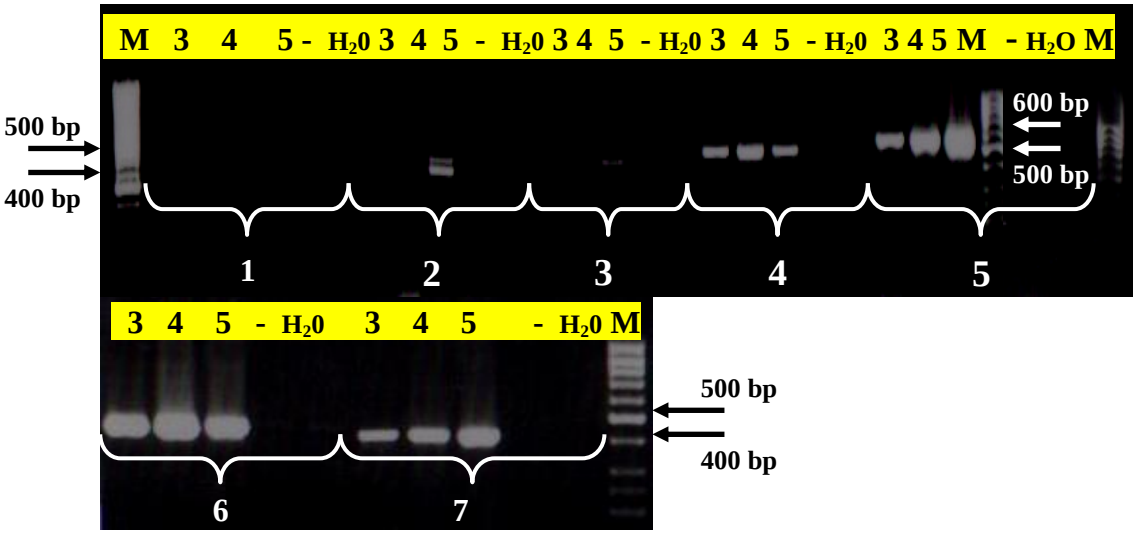
3.2.1.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בנקבות בהרעבה

בדיקת נוכחות סימביונטים בשלוש נקבות בוגרות בצום של אקרית הקרקע *R. robini* נעשתה לכל שבעת החיידקים. בכל הבדיקות נבדקו מים ואקרית הקורים *Tetranychus urticae* (ביקורות שליליות). (תמונה 14) מראה כי כל הבוגרות בהרעבה מכילות את המקטע, כלומר בפרטים אלה נמצא ו החיידקים הבאים*: 4, 5, 6, 7. תוצר מהחיידקים 2 ו- 3 נמצא רק ב- 5♀ כלומר רק נקבה מס' 5 הכילה את החיידקים 2 ו- 3, המקטע של חיידק 1 לא נמצא כלל באקריות כלומר לא היו כלל החיידק 1.

*מקרא סימון סיפרתי לחיידקים (תמונות 14-16):

1= *Clostridium sp.* 2=Uncultured bacterium 3=*Providencia sp.* 7=Brucellaceae

4=*Alcanivorax sp.* 5=ά- proteobacterium 6= *Defluvibacter sp.*



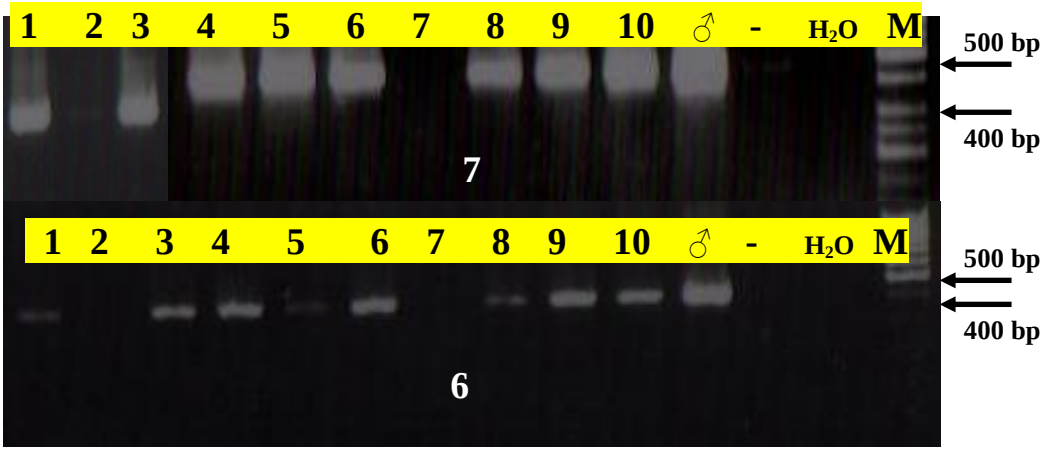
תמונה 14: בדיקת נוכחות סימביונטים בשלוש נקבות בוגרות בהרעבה. M סרגל בסיסים, H_2O מים, - ביקורת שלילית, נקבות בוגרות 3-5♀.

3.2.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בביצי נקבות

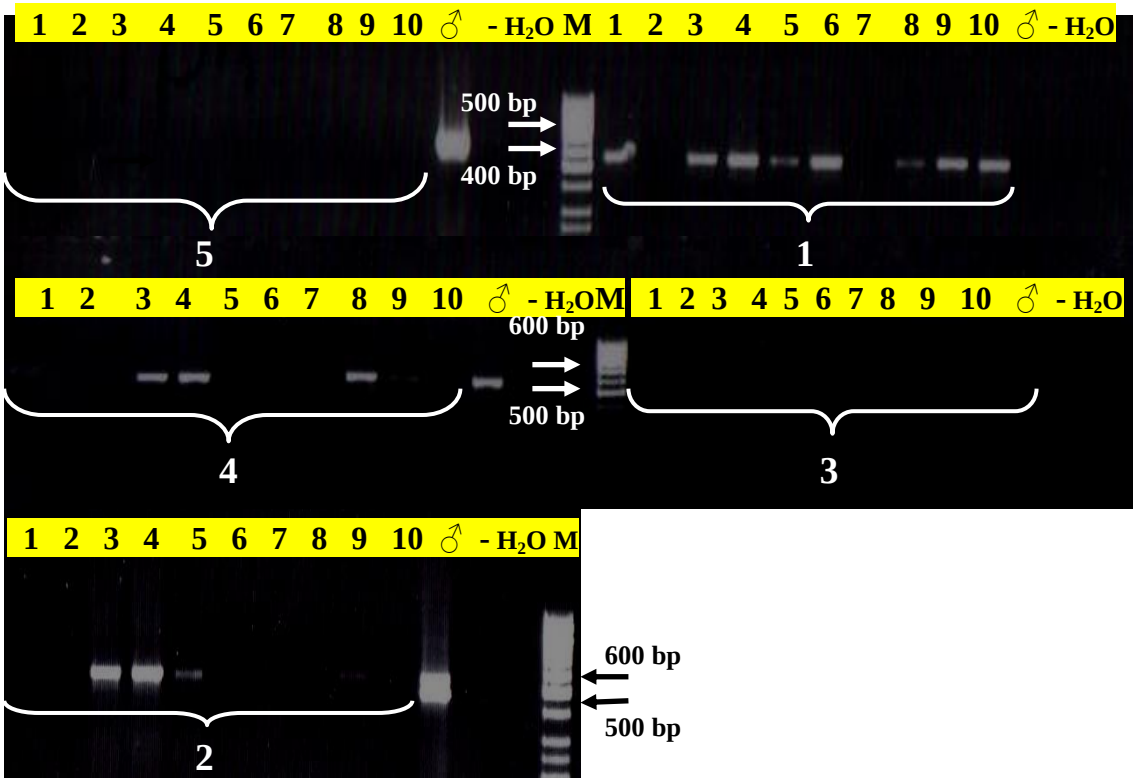
בחלק זה נערכה בדיקת נוכחות סימביונטים בביצים מעשר נקבות של אקרית הקרקע *R. robini* . בכל הבדיקות נבדק תוצר במים (ביקורת שליל ית), זכר בוגר של אקרית הקרקע (ביקורת חיובית), ואקרית הקורים *Tetranychus urticae* (ביקורת שלילית). בכל בדוגמאות לא נמצאו סימביונטים בביצים 2 ו- 7.

בדיקת נוכחות הסימביונטים 6 ו- 7 (ראה מקרא סעיף 3.2.1.2), מראה כי כל הביצים למעט 2 ו-7 מכילות את הסימביונטים 6 ו-7 (תמונה 15). בדיקת נוכחות הסימביונט 1 מראה כי כל ביצים אינן מכילות את המקטע ואינן נושאות את חיידק 1. עם זאת המקטע לא נמצא בביקורת החיובית ♂ (מעיד על בעיה בדגימה או בפריימרים , תמונה 16). בדיקה לנוכחות הסימביונט 5 מראה כי כל הביצים אינן מכילות את המקטע ואינן נושאות את חיידק 5 (תמונה 16). תוצאות דומות מתקבלות גם בבדיקת ה סימביונט 3 (תמונה 16), כל הביצים אינן מכילות את המקטע ואינן נושאות חיידק זה. בדיקת נוכחות הסימביונט 4 מראה כי ביצים מספר 3,4,8,9 (9 חלש) מכילות את המקטע, כלומר הן נושאות את חיידק 4 (תמונה 16). בדיקת נוכחות הסימביונט 2 מראה כי ביצים מספר 3,4,5,9 מכילות את המקטע כלומר הן נושאות את החיידק (תמונה 16).

תמונות 15-16: בדיקת נוכחות סימביונטים בביצים של עשר נקבות . M סרגל בסיסים, H_2O מים, - ביקורת שלילית, ♂ זכר בוגר (ביקורת חיובית), Eggs 1-10.



תמונה 15



תמונה 16

3.2.3 ריצוף מלא לגן המקודד ל-16S rDNA לסימביונטים נבחרים

מניתוח הרצפים למושבות החיידקים במקטעים I ו- II (סעיף 2.2.3) לחיידק מהסוג *Defluvibacter sp.* לא התקבלה ספציפיות מהריצוף המלא לגן, כלומר לא קיבלנו זהות לחיידק הנבדק. למרות זאת קטע אחד נמצא מתאים לרצף ה- DGGE מלפני שנה (קטע I-1 באורך 546bp). מקטע הקונצנזוס שהתקבל מהוספת קטע I-1 לרצף הקיים (ניספח ג') נמצא דומה לחיידק מהסוג *Rhizobium sp.*

מניתוח מקטע I-1 של החיידק הדומה ל משפחה Brucellaceae נמצאה זהות לרצף ה- DGGE של החיידק מ תת המערכה- ά-proteobacterium מלפני שנה (באורך 860bp) ולכן ההנחה היא כי מדובר באותו החיידק. חיידק זה דומה ב- 97% לסימביונטים שתוארו בכינים (Chewing Lice) השוכנות על פרוותם של יונקים נוברי קרקע Pocket Gophers (Reed & Hafner 2001).

4 דיון

4.1 השפעת פטריות על גדילה נבטי בצל והתפתחותם

בסדרת הניסויים בהם נבדקה השפעת הפטריות על התפתחות נבטי הבצל אובחנו פטריות הקרקע *Fusarim sp.* ו-*P. oligandrum* כאגרסיביות ביותר לנבטי הבצל. הפטרייה שטרם הוגדרה *Fusairum sp.* התגלתה כפתוגן החזק ביותר, לעומתה שלוש הפטריות האחרות מסוג זה אשר גרמו לנזק קטן יותר שהתבטא בהתמוטטותם של פחות ממחצית הנבטים. נכון לזמן כתיבת שורות אלה נמצאים כל תבדידי ה- *Fusarium sp.* בשלבי הגדרה מולקולאריים ולכן קשה להסביר את מהות ההבדלים בפגיעתם בנבטים. פגיעות קשות בזרעים ונבטים של בצל ושום על ידי הסוגים שנבחנו בעבודה זו ע"י הפטריות *Pythium* sp. ו-*Fusarium* sp. מתוארות בישראל ובעולם (יוניס וזוהר, 2002; Mohan & Schwartz,1996). השוואה בין אחוזי נגיעות של זרעי בצל בפטריות קרקע שונות מראה כי *Fusarium sp.* ו- *Pythium sp.* תקפו יותר זרעים בהשוואה לפטריית הקרקע *Rhizoctonia sp.* (El-Nagerabi & Abdalla, 2004). מחקר נוסף הראה תוצאות דומות ואף חיזק את תוצאותי בכך שבהשוואה ל-*Fusarium sp* ו- *Pythium sp.* הפטרייה *Rhizoctonia sp.* לא השפיע ה כלל על הנבטים (Sumner *et al.*, 1997). בדומה למדווח בספרות, נראה כי רמת הפגיעה של הפטריות השונות בנבטי בצל מגוונת למינים וזנים שונים יש השפעה שונה על הנבטים.

4.2 השפעת אקרית הקרקע על גדילת נבטי בצל והתפתחותם

אקריות לבדן גורמות נזק משמעותי לנבטי הבצל רק בצפיפות גבוהה של 1000 אקריות לעציץ. צפיפויות של 10 ו-100 אקריות לעציץ לא נבדלו סטטיסטי ת מהביקורת ולא השפיעו כלל על הנבטים. יתרה מזו, בכל הצפיפויות לא נרשם גידול במספר האקריות בתום הניסוי. יתכן ו האקריות בצפיפויות הנמוכות לא נמשכו כלל לנבטי הבצל והעדיפו להתקיים על הרקב האורגני, הסבר המחזק את השערת המחקר לפיה נבטי בצל בריאים לא מהווים מזון מועדף המושך האקריות. בטיפול של 1000 אקריות לעציץ נראה כי נפח עציץ הניסוי (250 ml) היה קטן מלהכיל כמות גדולה של אקריות וייתכן כי נוצרה תחרות על מקור מזון אפשרי אחד - מצע הגידול. בסיום הניסוי נמצאו בכל זאת אקריות על נבטי הבצל כנראה בעקבות המחסור במקורות מזון מועדפים על האקריות. הנחת זו אף מקבלת חיזוק מעבודה על האקרית *Tyrophagus similis* שאינה מעדיפה בצל נקי מפתוגנים, כמקור מזון ואתר הטלה (Kasuga & Honda, 2006). Ben-David וחוב' (2005) הראו שבהעדר נגיעות הבצלים בפטריות, אקרית הקרקע *R. robini* העדיפה באופן מובהק את מצע הגידול על פני הבצלים הבריאים (בצל, שום ושושן). מחקרים נוספים של Ascerno וחוב' (1981) Okabe ו- Amano (1991) מתייחסים גם הם לעובדה שבצלים נקיים מפאתוגנים לא הושפעו כמעט מנוכחות אקריות בסמיכות להן לעומת בצלים נגועים בפאתוגנים, שנפגעו קשה מאוד ע"י פעילות משולבת של אקריות ופאתוגנים. תוצאות אלה מחזקות את הנחת המחקר לפיה גידולי בצל חופשיים מפטריות לא ימשכו אליהם את אקרית הקרקע *R. robini* ולא יפגעו ממנה.

4.3 בדיקת יחסי הגומלין בין פטריות לאקריות והשפעתן על נבטי בצל

4.3.1 משיכה בין פטריות לאקריות במערכת ללא נבטי בצל

האקריות נמשכו למצע מזון ה-PDA המודבק ב פטרייה לעומת מצע מזון ה- PDA החופשי מפטריות אך רמת משיכתה לא הושפעה מרמת הפתוגניות של הפטריות. מטרת המחקר בחלק זה הייתה לבדוק האם אקריות נמשכות לפטריות, ללא הצמח הפונדקאי ואכן כך נמצא לאחר שהתקבלה מובהקות ברוב הפטריות מבחינת יכולת משיכת האקריות למצע מזון ה- PDA המודבק בפטריות השונות בהשוואה למצע מזון ה-PDA החופשי מפטריות.

מהתוצאות מתקבל שהאקריות נמשכו לסביבת הפטרייה על פי סימנים כימיים ללא קשר לפונדקאי. סימנים כימיים אלה הם בעיקר הפרשות כהלים כחלק מהמטבוליזם של הפטריות. הסיבה למשיכה נובעת מכך שהפטרייה משמשת מקור מזון איכותי לאקריות . תקשורת כימית נפוצה בקרב אקרית הקרקע *R. robini* ומשמשת למטרות מגוונות כמו רבייה, אגרגציה, והגנה מאויבים טבעיים התקשורת הכימית מתבצעת על ידי פרומונים שונים המופרשים מ זוג בלוטות שומניות (Kuwahara *et al.*, 1991). בזמן רבייה, הזכרים נמשכים לנקבות על ידי פרומוני מין. פרומוני אגרגציה גורמים לאקריות הקרקע להתקבץ יחדיו בסיטואציות שונות כמו למשל בעת סכנה או בעת מציאת מקורות מזון (Kuwahara *et al.*, 1991). אקרית הקרקע *R. robini* מסוגלת לזהות גם סימנים כימיים של אורגניזמים אחרים כגון פטריות ובעבודה זו הצלחתי להראות משיכה ברורה של אקרי ות קרקע לפטריות בעיקר לסוג *Fusarium* sp. בדומה נמצא שאקרית הקרקע נמשכת לא רק לבצלים נגועים בפטרייה *Fusarium* sp. אלא גם למיצוי חומרים המופרשים ממנה אתנול ופרופנול (Shinkaji *et al.*, 1988a). עוד נמצא כי קיים הבדל בין תערובת הכהלים ביחסים בהם הם מצויים בטבע, לעומת תערובת של אותם הכהלים ביחסים שווים, שאינה מושכת אקריות כלל (Shinkaji *et al.*, 1988b). מחקר אחר חיזק את העובדה שכהלים גורמים למשיכת האק ריות לאחר שתוצאותיו הראו משיכ ה של אקריות לבצלים בריאים שנטבלו בכהלים ממיצוי של הפטרייה *F. oxysporum* (Okabe & Amano 1990).

4.4 פוריות אקרית הקרקע בהזנה על בצל זרוע

תזונת אקרית הקרקע על נבט י בצל מודבקים בפטרייה *F. oxysporum* I-3 העלתה את פוריות הנקבות . מספר מחקרים בתחום מראים כי פוריותה של אקרית הקרקע מושפעת בעיקר משני גורמים : 1) איכות המזון 2) תנאי סביבה (Eraky & Abdel-Sater 2001; Díaz *et al.*, 2000; Kheradmand *et al.*, 2007). בנוסף מצאו החוקרים Kasuga & Honda (2006) כי הזנת האקרית *Tyrophagus similes* במגוון מזונות השפיעה באופן שונה על פוריות ן וכי הזנה על פטרייה העלתה את פוריותן בהשוואה להזנה על בצל בריא. אקריות ממשפחת ה- Acaridae מסוגלות לעכל את תפטיר הפטרייה העשיר בדו סוכר טרהלוז (Trehalose). הודות לאנזים טרהלאז (Trehalase) המאפשר לאקריות לנצל את הפטריות כמקור מזון . פעילות האנזים שונה בין מיני אקריות , היא מוגברת למשל באקרית *Tyrophagus putrecentina* הנחשבת כ"מתמחה" יותר (באופן יחסי) בהזנה על פטריות (Hubert *et al.*, 2004). הפטרייה שנבחרה לעבודה בניסויי הפוריות הייתה *F. oxysporum* המועדפת על אקריות ממשפחת ה- Acaridae. לדוגמא Kasuga ו- Honda (2006) האכילו את האקרית *Tyrophagus similes* בשלוש פטריות, *F. oxysporum* , *Pythium aphandirematum* ו- *Rhizoctonia solani* ומספר ההטלות הגבוה היה בהזנה על *F. oxysporum*. נראה כי פטריות באופן כללי מהוות מקור מזון עשיר לאקריות ממשפחת ה- Acaridae בזכות יכולתן לפרק מרכיבים בפטריות כדוגמת הדו סוכר טרהלוז. יכולת ניצול מרכיבים אלה תורם לעלייה בפוריות הנקבות.

4.5 השפעה משולבת של אקריות ופטריות פתוגניות על עיכוב התפתחותם של נבטי בצל

בנפרד, רמת הנזק לנבטי הבצל תלויה במין הפטרייה וצפיפות האקריות. כשהם יחד ה אקריות נמשכו ת למרבית הפטריות והזנתן על נבטי בצל נגועים גדלה. מניסוי העציצים המשולב עולה שהחיבור בין אקרית הקרקע לפטרייה *F. oxysporum* I-3 לא גרם לנזק חמור ובלתי הפיך לבצל. יתכן והסיבה לכך היא שאילוח הנבטים ע"י הפטריות לא היה מוצלח לכן אוכלוסיית האקריות לא נמשכה לנבטים וניזונה מהרקב האורגני שבמצע. הסבר זה נתמך בכך שמספר האקריו ת בניסוי לא השתנה וב עובדה ש אקרית הקרקע ידועה כאוכלת כל , כולל רקב אורגני בקרקע

(Gerson *et al.*, 1983). הניסוי צלחות הפטרי לעומת זאת, תמך בהשערת המחקר. טיפול האקריות בלבד לא קיצר את אורך השורשונים הבריאים והאקריות לא תקפו את הנבטים. תופעה זו של חוסר "התעניינות" האקריות בנבטים בריאים נצפתה גם בניסוי העציצים. תאור דומה של "אדישות וחוסר עניין" בבצלים בוגרים ובריאים דווח בספרות (Okabe & Amano, 1991). בטיפול המשולב בצלחות הפטרי כבר ביום הראשון חוסלו השורשונים המודבקים כמעט עד תום ללא התאוששות. מצאתי שבשני הטיפולים (פטריות לבד ופטריות משולב באקריות), הנבטים נפגעו ע"י הפטרייה שתקפה אותם בעיקר בשורשון ובחיבור הנבט לזרע. בטיפול שכלל פטריות בלבד, אמנם נפגעו אזורי ההזנה של הנבט וצמיחתם נבלמה, אך הם המשיכו לתפקד במקצת עד לריקבונם המוחלט כעבור ארבעה ימים. בטיפול המשולב, כבר ביום הראשון לניסוי נאכלו השורשונים עד לניתוק הזרע ע"י האקריות שניזונו למעשה מהפטרייה שהתבססה תחילה באזורי ההזנה של הנבט. האינטראקציה בין אקריות לפטריות מדווחת בספרות בעיקר בהקשר לנזק לבצלים בוגרים אך מוזכרת גם בהקשר לזרעים ונבטים. הדיווחים על פגיעה בנבטים מתייחסים בעיקר על פגיעה באזור השורשים (Köycü & Özer,1997). בישראל, דווחו בעבר על פגיעה ראשונית בשורשוני הנבטים של הבצל ע "י אקריות אשר התבטאה בחוסר צימוח כבר מהיום הראשון לניסוי (גרזון וחוב' 1981; Gerson *et al.*, 1985). למעשה, קיים יסוד סביר להניח שנבטים א לה היו נגועים ע "י פטריות אך הדבר לא דווח מאחר ובעבר לא שיערו שהנזק הנגרם ע"י האקריות קשור לפטריות.

מדוע אם כך אקריות אדישות ולא מזיקות לבצל בריא ומדוע שילוב שלהן עם פטריות פוגע בו קשות?

סביר להניח ש הפטרייה מסייעת לאקריות בפגיעה בבצל בשלושה אופנים: 1) משיכת אקריות לבצל 2) שיפור תזונה בכך שהיא עצמה מהווה מקור מזון איכותי לאקרית 3) פגיעה ברקמות הבצל משפרת את יכולת חדירת האקריות לבצל.

משיכה- הפטרייה הנבדקת *F. oxysporum* I-3 לא נבחרה באקראי, אלא בשל היותה פתוגנית חלשה יחסית לבצל והעובדה שה פטרייה עצמה מושכת אליה אקריות בעזרת הכהלים שהיא מפרישה (Okabe & Amano 1990). תכונות אלה אכן גרמו למשיכת אקרית לבצל אך הרסו את הנבט קודם לכן.

שיפור תזונה- הפטריות מהוות מקור מזון איכותי לאקרית הקרקע. הן מספקות סוכרים (Hubert *et al.*, 2004) ובכך מסייעות להגברת פוריות של הנקבות ואף גורמות ל קיצור שלבי התפתחות האקרית (Diaz *et al.*, 2000). שיפור חדירות - ידוע מהספרות כי הפטרייה *F. oxysporum* מסוגלת לפגוע בבצל (יוניס וזהר 2002). היא תוקפת גם זרעים ונבטים וגורמת לריקבונם (Schwartz & Mohan, 1996). גם זרעים נגועים באחסון היטיבו לחדור טוב מבעד למעטה הרקוב (Van Asselt, 1999). למעשה בכל שלבי התפתחות הבצל יכולת חדירת האקריות לצמח הפונדקאי הייתה טובה יותר ברקמות פגועות גם מבעד לגלדים הפנימיים ביותר בבצלים הבוגרים (Díaz *et al.*, 2000). במספר מחקרים אף מדווח כי הדבקת בצלים בוגרים בפטרייה *F. oxysporum* (הפטרייה הנחקרת בניסויי השילוב) גרמה לאקריות לחדור טוב יותר מבעד לגלדים הפנימיים של הבצלים הבוגרים (Amano, 1991 ;Okabe & Shinkaji *et al.*, 1988a). נוכחות פטריות פתוגנית נוספות כגון: *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. הביאה לריקבון הרקמות של ה צמח פונדקאי, ובכך סייעו לאקריות בחדירתן מבעד לרקמות הצמח (Eraky & Abdel-Sater, 2001). גם הפטריות נהנות מהקשר עם אקריות דבר העלול להחמיר את הנזק לצמח. יתכן והאקריות מפיצות את גופי ריבוי הפטרייה הנדבקים לגופן תוך כדי הזנה Ramírez-Suárez *et al.*, (Hubert *et al.*, 2003; 2002), או בהפרשת נבגים ממערכת העיכול (Hubert *et al.*, 2003). הפצת הפטרייה

ע"י האקרית יכולה להביא להתבססות מהירה יותר של הפטרייה בפונדקאי והאצת תהליכי ריקבון ו. כמו כן הזנת האקרית על התפטיר יכולה לגרום לאפקט פיצוי בפטרייה וגדילה מהירה של התפטיר (Hubert *et al*., 2004).

לסיכום: הדעה הרווחת כיום בשירות הדרכה ומקצוע של משרד שהחקלאות ובקרב החקלאים היא שהנזק הנגרם לצמחים ממשפחת השושניים תלוי באקריות וקשור אליהן בלבד. תוצאות מחקר זה מייחסות לעומת זאת את הנזק דווקא לקשר אקרית-פטרייה. האקריות נמשכות לפטריות על הבצל הנגוע והרקוב, ניזונות מהפטריות ופוגעות תוך כדי הזנה ברקמות הבצל פגיעה נוספת (פגיעה ראשונה נגרמה ע "י הפטריות), הודות לריקבון הרקמות ולאכילת הפטרייה חודרות האקריות לרוב חלקי הבצל וממשיכות להפיץ את הפטרייה, אכילת הפטרייה משפרת את תזונת האקריות קצב התרבותן גדל והנזק המשולב לבצל בשלב זה קשה ובלתי הפיך. שניהם מעדיפים תנאי הסביבה דומים הכוללים לחות גבוהה 70% < וטמפרטורות של $28\text{-}25\ C^{\circ}$. קיימת בין האקריות לפטריות מערכת קשרים מורכבת והדדית הגורמת לנזקים קשים לצמחים ממשפחת השושניים. הנזק הנגרם כתוצאה מקשר זה בעל אופי סינרגיסטי בעל פוטנציאל נזק במיוחד במקרים בהם הפטריות פחות "אלימות" לפונדקאי אך "מצטיינות" ברמת המשיכה לאקריות. אחת ממטרותיו של מחקר זה היה לנסות להעמיד את הדברים באור שונה משום שיתכן מאוד שללא פטריות במערכת לא תחשבנה האקריות כמזיקות לבצלים. משמעות הדבר שינוי בתפיסות ההדברה הקיימות והמכוונות לאקרית הקרקע דבר המצריך, נכון להיום, שימוש בחומרי הדברה חריפים מאוד כגון קרבמטים וזרחנים אורגניים ומעבר לתכנון ממשקי הדברה פחות חריפים לבעלי החיים, ידידותיים יותר לסביבה ויעילים יותר בטיפול פגיעת הבצל. חשוב לציין כי תוצאות מחקר זה מתייחסות לאוכלוסיית אקריות שגודלה במעבדה לאנטומולוגיה בנווה יער. אוכלוסייה זו, שמקורה בשדה, גודלה במעבדה קרוב לשנתיים ולכן היא לא הייתה מגוונת ועברה סלקציה באופן קבוע.

4.6 סימביונטים באקרית הקרקע

בנוסף ליחסי הגומלין עם פטריות משערים יתכן ואקרית הקרקע *R. robini* מקיימת מערכת נוספת של יחסי גומלין עם מיקרואורגניזמים סימביונטים התורמים ליכולות האקרית להתקיים על מגוון רב של מקורות מזון.

4.6.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים באקריות בוגרות

4.6.1.1 זיהוי סימביונטים ספציפיים בנקבות וזכרים

בבדיקת שבעת הרצפים נמצאו שני סימביונטים בכל הבוגרים, עשרת הזכרים ועשר הנקבות. הסימביונט הראשון דומה ב-98% לחיידקים מהמשפחה Brucellaceae והשני דומה ב-99% לחיידקים מהסוג *Defluvibacter sp.*. שני הסימביונטים הללו משתייכים לסדרת ה- Rhizobiales בתת המערכה –ά-proteobacterium. חיידקים המשתייכים לס דרת ה- Rhizobiales מזוהים בעיקר כסימביונטים במשפחת הקטניות החיים בשורשי הצמח והמסוגלים לקבע חנקן אטמוספרי, אך לצידם ישנם גם חיידקים (שאינם סימביונטים) ממינים פתוגניים לצמחים ובעלי חיים המשתייכים לסוגים: *Brucella* (Guerrero *et al*., 2005), *Rhizobium, Agrobacterium*. העובדה שרמת הזיהוי בשלב זה מקרבת אותנו לסדרה ולסוג עדיין לא מאפשרת התייחסות מדוקדקת ל מין החיידק וטווח פעילותו. לצד ההנחה הראשונית שהחיידקים מעורבים בהשלמת התזונה של אקרית הקרקע *R. robini* הועלתה, לאור הממצאים האחרונים, גם האפשרות שייתכן ואקרית הקרקע משמשת וקטור למיקרואורגניזמים פתוגניים לצמחים המחלישים את הצמח ו משפרים את יכולות החדירה של האקרית לפונדקאי. ישנם דיווחים בספרות הקושרים בין אקרית הקרקע וחיידקים פתוגניים. Poe ו- Noble (1979) הראו כיצד אקרית הקרקע *R.*

robini מפיצה את החיידק הפתוגני *Pseudomonas marginata* שעבר את מערכת העיכול של האקרית. ההבדל הבסיסי בין המקרה של Poe ו- Noble למצאים שלנו הוא שהחיידק *P. marginata* חדרה לאקרית בעקבות הזנת האקרית על פקעות סיפן שהיו נגועות בחיידק . במקרה שלנו הסימביונט שוכן בגוף האקרית באופן קבוע ומועבר אנכית מהאם לצאצאים.

4.6.1.2 בדיקת נוכחות סימביונטים בנקבות בהרעבה

מערכת העיכול של פרוקי הרגליים עלולה להכיל בנוסף לחיידקים סימביונטיים גם חיידקים אחרים שמקורם במזון וחלקם אף יכולים להיות פתוגניים (Dillon & Dillon 2004). מאחר ונמצאו שני חיידקים בכל הזכרים והנקבות שנבדקו האחד מהמשפחה Brucellaceae והשני מהסוג *Defluvibacter sp.* רציתי לחזק את הממצאים על ידי הרעבת האקריות "וניקוי" מערכת העיכול מחיידקים שמקורם במזון ושעלולים להפריע במהלך זיהוי הרצפים . התוצאות מעידות על נוכחות הסימביונטים הבאים: Brucellaceae *Defluvibacter sp.* *Alcanivorax sp.* תוצאות אלה מחזקות את האפשרות ששני הסימביונטים שנמצאו בכל הפרטים (Brucellaceae ו- *Defluvibacter sp.*) נמצאים באופן קבוע בגוף האקרית ולא חודרים דרך המזון או מופרשים החוצה דרך מערכת העיכול. לגבי נוכחותם של החיידקים הנותרים קשה לקבוע כי הם שוכני קבע בשל העובדה שנבדקו שלוש אקריות בלבד.

בדיקת נוכחות סימביונטים בביצי נקבות

בדיקת נוכחות הסימביונטי ם בביצי אקרית הקרקע נועדה לברר האם הסימביונטים מקורם באם או בסביבה החיצונית. העברה כזו מוגדרת כהעברה אנכית מהאם לצאצאים . מעבר שכזה יכול להעיד על חשי בות פעילות הסימביונט, אך לא על אופיו של הסימביונט כראשוני או שניוני , משום ששניהם יכולים לעבור בצורה אנכית (Moran & Baumann 2000; Thao *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2003). בבדיקת הביצים נמצאו סימביונטים מהסוג *Defluvibacter sp.* ומהמשפחה Brucellaceae בשמונה מתוך עשר הביצים שנבדקו. כלומר הביצים הכילו את המקטע, השייך לגן המקודד ל-16S rDNA. הדגימות מאקריות 2 ו-7 לא הראו תוצר ולכן אני מניח שיש בעיה בדגימות ולא בנוכחות הסימביונט . שני החיידקים הנותרים שנמצאו באקריות המורעבות *Alcanivorax sp.*, ά-proteobacterium לא נמצאו בביצים. ά-proteobacterium לא נמצא כלל בביצים למרות שהוא נמצא זהה לחיידק ממשפחת ה- Brucellaceae וזה האחרון דווקא נמצא בכל הביצים שנבדקו גם במקרה זה ייתכן והדגימה נפגמה . החיידק *Alcanivorax sp.* נמצא בארבע בלבד . נראה שקיימים לפחות שני סימביונטים בגוף האקרית אך קביעת זהותם עדיין לא הושלמה . סביר להניח שהתפקיד שממלאים הסימביונטים הללו חיוני לאקרית ולכן הם עוברים אנכית.

4.6.2 ריצוף מלא לגן המקודד ל-16S rDNA לסימביונטים נבחרים

על מנת להתקדם בזיהויים של שני החיידקים שנמצאו עוברים באופן מלא בין דורות ה אקרית, רוצף במלואו הגן המקודד ל- 16S rDNA לחיידק מהמשפחה Brucellaceae ולחיידק מהסוג *Defluvibacter sp.* ניתוח הרצפים המלא לא הוסיף מידע חדש במקרה של החיידק מהסוג *Defluvibacter sp.* משום שהוא דמה לחיידק מהסוג *Rhizobium sp.* בנוסף מצאנו כי הסימביונט מהמשפחה Brucellaceae ומתת המערכה ά-proteobacterium זהים ויתכן כי סימביונט זה מסייע לאקרית הקרקע בעיכול חלבונים שאינם מסיסים ואינם ניתנים לעיכול כדוגמת החלבון קרטין(Reed & Hafner 2001). לפי Reed ו- Hafner (2001) סימביונט זה נמצא בכינים השוכנות על פרוותם של יונקים נוב רי קרקע. כינים אלה ניזונות משיער נשיר וחלקי עור יבשים נשירים המכילים כמויות רבות של

קרטין. השערתנו היא כי שני החיידקים הסימביונטים שנמצאו באקרית הקרקע לוקחים חלק חשוב בעיכול סוכרים או חלבונים ולכן אקרית הקרקע יכולה להתקיים על מגוון מצעי מזון כולל דלים ביותר כגון נייר סינון.

4.6.3 סיכום סימביונטים

בבדיקות בזכרים, בנקבות, בנקבות בהרעבה ובביצים נמצאו בעקביות שני סימביונטים מתוך שבעה שזוהו בהפרדה על DGGE (טבלה 7 נספחים) :הסימביונט האחד מהמשפחה Brucellaceae (נמצא זהה לסימביונט אחר שזוהה בהפרדה על DDGE המשתייך לתת ה מערכה ά-proteobacterium) הסימביונט השני שזוהה שייך ל סוג *Defluvibacter sp.* שניהם זוהו בקרבה של 99% ו- 98% בהתאמה. שניהם משתייכים לסדרת ה-Rhizobiales שניהם מועברים אנכית מהאם לצאצאים . ומאחר והם שוכני קבע קיימת סבירות גבוהה כי הם חיוניים לתפקוד האקרית וההנחה לגבי תפקוד שניהם היא בסיוע בהשלמת תזונת האקרית.

4.7 סיכום

הדעה הרווחת כיום היא שהנזק הנגרם ל שושניים שהותקפו על ידי אקרית הקרקע תלוי באקריות בלבד. תוצאות מחקר זה מייחסות את הנזק דווקא לקשר אקרית-פטרייה. שניהם מעדיפים תנאי סביבה דומים לחות גבוהה 70% < וטמפרטורות של 25°-28° C המזמנים אותם יחד בשדה. קיימת ביניהם מערכת קשרים מורכבת והדדית הגורמת לנזקים קשים לצמחים ממשפחת השושניים . הנזק הנגרם כתוצאה מקשר זה בעל אופי סינרגיסטי ופוטנציאל נזק גדול במיוחד במקרים בהם הפטריות פחות אלימות לצמח אך מושכות אקריות. המחקר תומך בהשערה שללא פטריות במערכת לא תחשבנה האקריות כמזיקות לבצלים ו שאת עיקר מאמצי ההדברה כדאי להפנות להדברת הפטריות ולא לאקריות . משמעות הדבר שינוי בתפיסות ההדברה הקיימות המזיקות לסביבה. במחקר זה זוהו באקרית הקרקע שני סימביונטים האחד מהמשפחה Brucellaceae והשני מהסוג *Defluvibacter sp.* שניהם משתייכים לסדרת ה- Rhizobiales ושניהם מועברים אנכית מהאם לצאצאים . קיימת סבירות גבוהה כי לסימביונטים אלה חשיבות בסיוע בהשלמת תזונת האקרית.

5 ספרות

ארנון י. 1982. האנציקלופדיה לחקלאות . הוצאת האנציקלופדיה לחקלאות, תל אביב.

בן-דוד צ, א פלבסקי, ת להב וש וגוטמן. 2002. הפנולוגיה של אקרית הריזוגליפוס בשושן הפסחא ונץ-חלב דוביום והדברתה בחומר הריבוי. גן שדה ומשק, תשס"ב 12: 56-61.

גרזון א, יתום ש, קטן י, גרינברג א, רוזליו ד, תם ש ומ חן .1981. הדברת אקרית הקרקע ריזוגליפוס באמצעות חיטוי סולרי של הקרקע. השדה כרך ס"א, י' :1752-1753.

יוניס ה וזוהר ר . 2002. פגעי בצל ושום . משרד החקלאות ופיתוח הכפר , שירות הדרכה ומקצוע , האגף להגנת הצומח, האגף לירקות, 43 דפים.

יתום ש, גרזון א, חן מ, תם ש, רוזליו ד וקפואה ש. 1980. תצפיות באקרית הקרקע ריזוגליפוס. השדה כרך ס, יב': 2267-2270.

פלבסקי א , צ בן- דוד, ת להב, ש גוטמן , ה יוניס ונ עומרי. 2002. ביולוגיה והדברה של אקרית הקרקע, *Rhizoglyphus robini*, בשום ושושן (תוכנית מס' 02 -31-1164). דו"ח שנתי למועצות ירקות ופרחים.

רותם י, פלטי י וי בן יפת. 1998. מחלות צמחים בישראל. הוצאת מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.

Abdel-Sater MA and SA Eraky. 2001. Bulb mycoflora and their relation with three stored product mites. Mycopathologia 153: 33-39.

Armitage DM and CL George. 1985. The effect of mites upon fungal growth on wheat. Experimental and Applied Acarology 2: 111-124.

Ascerno ME, FL Pfleger and HF Wilkins. 1981. Effect of root rot and *Rhizoglyphus robini* on greenhouse-forced Easter lily development. Environmental Entomology 10: 947-949.

Ben–David T, L Tsror and E Palevsky. 2005. Developing an action threshold for the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* on lily, onion and garlic. Integrated Control in Protected Crops, Temperate Climate, IOBC/wprs Bulletin 28: 11-14.

Chen JS and KC Lo. 1989. Susceptibility of two bulb mites, *Rhizoglyphus robini* and *R. setosus* (Acari: Acaridae), to some acaricides and insecticides. Experimental and Applied Acarology 6: 55-66.

Díaz A, K Okabe, CJ Eckenrode, MG Villani and BM Oconnor. 2000. Biology, ecology, and management of the bulb mites of the genus *Rhizoglyphus* (Acari: Acaridae). Experimental and Applied Acarology 24: 85-113.

Dillon R J and VM Dillon. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. Annual Review of Entomology 49: 71-92.

El-Nagerabi SAF and RMO Abdalla. 2004 . Survey of seedburne fungi of Sudanese cultivars of onion, with new records. Phytoparasitica 32: 413-416.

Evans GO. 2003. Principles of Acarology. C·A·B International. Wallingford.

Frohlich D, Torres-Jerez I, Bedford I, Markham P and J Brown 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. Molecular Ecology 8: 1683-1691.

Gerson U and D Thorens. 1982. Mating frequency as an indication of food quality for the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparède. International Journal of Invertebrate Reproduction 5: 201-206.

Gerson U, RL Smiley and R Ochoa. 2003. Mites (Acari) for pest control. Blackwell Publishing. Oxford.

Gerson U, S Yathom, S Capua and D Thorens. 1983. Life history and life tables of *Rhizoglyphus robini* Claparède. (Acari: Astigmata: Acaridae) as a soil mite. Acarologia 24: 339-448.

Gerson U, S Yathom, S Capua and D Thorens. 1985. *Rhizoglyphus robini* Claparède. (Acari: Astigmata: Acaridae) as a soil mite. Acarologia 26: 371-380.

Gil R, A Latorre and A Moya. 2004. Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. Environmental Microbiology 6: 1109-1122.

Gillan D, Speksnijder A, Zwart G and CD Ridder. 1998. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 64: 3464-3472.

Goodacre SL, Martin, OY, Thomas, CFG and GM Hewitt. 2006. *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. Molecular Ecology 15: 517-527.

Guerrero G, H Peralta, A Aguilar, R Diaz, MA Villalobos, A Medrano-Soto and J Mora. 2005. Evolutionary, structural and functional relationship revealed by comparative analysis of syntenic genes in *Rhizobiales*. BMC Evolutionary Biology 5: 1-19.

Hubert J, V Garošík, J Mourek, A Kubátová and E Ždárková. 2004. Astigmatid mite growth and fungi preference (Acari: Acaridida): Comparisons in laboratory experiments. Pedobiologia 48: 205-214.

Hubert J, V Stejskal, A Kubátová, Z Munzbergová, M Váňová and E Ždárková. 2003. Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. Experimental and Applied Acarology 29: 69-87.

Kheradmand K, K Kamali, Y Fathipour and E Mohammadi Goltapeh. 2007. Development, life table and thermal requirement of *Tyrophagus putrescentiae* (Astigmata: Acaridae) on mushrooms. Journal of Stored Products Research 43: 276-281.

Kasuga S and KI HONDA. 2006. Suitability of organic matter, fungi and vegetables as food for *Tyrophagus similis* (Acari: Acaridae). Applied Entomology and Zoology 41: 227-231.

Knowles CO, DD Errampalli and GN El-Sayed. 1988. Comparative toxicities of selected pesticides to bulb mite (Acari: Acaridae) and twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology 81: 1586-1591.

Koga R, T Tsuchida and T Fukatsu. 2003. Changing partners in an obligatesymbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270: 2543-2550.

Köycü ND and N Özer. 1997. Determination of seedborne fungi in onion and their transmission to onion sets. Phytoparasitica 25: 25-31.

Kuwahara M. 1988. Resistance of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparède, to organophosphorus insecticides. Japan Agricultural Research Quarterly 22: 96-100.

Kuwahara Y. 1991. Pheromone studies on astigmatid mites- alarm, aggregation and sex. Modern Acarology. Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague 1: 43-52.

Latta R.1939. Observation on the nature of bulb mite attack on Easter lilies. Journal of Economic Entomology 32: 125-128.

Lesna I, CGM Conijn and MW Sabelis. 1996. Biological control of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*, by the predatory mite, *Hypoaspis aculeifer*, on lilies: predator-prey interactions at various spatial scales. Journal of Applied Ecology 33: 369-376.

Montllor CB, A Maxmen, AH Purcell. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. Ecological Entomology 27: 189-195.

Moran NA and P Baumann. 2000. Bacterial endosymbionts in animals. Current Opinion in Microbiology 3: 270-274.

Muyzer G, EC Dewaal and AG Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial-populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis analysis of polymerase chain

reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. Applied and Environmental Microbiology 59: 695-700.

Noble WE and SL Poe. 1972. Attractancy of several fungi and bacteria for bulb and soil mites frequenting diseased gladiolus corms. Proceeding of the Florida State Horticultural Society 85: 401-404.

O'Connor BM. 1982. Evolutionary ecology of astigmatid mites. Annual Review of Entomology 27: 385-409.

Okabe K and H Amano. 1990. Attractancy of alcohols isolated from culture filtrates of *Fusarium* fungi for the robine bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparède (Acari: Acaridae), in sand. Applied Entomology and Zoology 25: 397-404.

Okabe K and H Amano. 1991. Penetration and population growth of the robine bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparède (Acari: Acaridae), on healthy and *Fusarium*-infected rakkyo bulbs. Applied Entomology and Zoology 26: 129-136.

Oliver KM, JA Russell, NA Moran and MS Hunter. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 1803-1807.

Poe SL, WE Noble and RE Stall. 1979. Acquisition and retention of *Pseudomonas marginata* by *Anoetus feroniarum* and *Rhizoglyphus robini*, In: JG Rodriguez (ed), Recent Advances in Acarology. Academic Press. 1: 119-124.

Poinar J Jr and R Poinar. 1998. Parasites and pathogen of mites. Annual Review of Entomology 43: 449-469.

Prescott LM, JP Harly and DA Klein. 1993. Microbiology. Second edition. WCR Wm. C. Brown Publishers. Dubugue, Iowa. Melbourne, Australia. Oxford, England.

Ramírez-Suárez A, E Savaleta-Mejía, S Osada Kawasoe, MDC Sánchez Gálvez and J Valdéz Carrasco. 2002. A possible role for *Rhizoglyphus robustus* Nesbitt (Astigmata: Acaridae) in transmission of *Sclerotium cepivorum* Brek. (Deuteromycetes: Mycelia-Sterilia). Applied Entomology and Zoology 37: 663-669.

Reed DL and MS Hafner. 2001. Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with ectoparasitic chewing lice of pocket gophers: a culture- independent approach. Microbial Ecology 44:78-93.

Rhoades MH, SL Poe and RJ Stipes. 1989. Transformation of hypopodes of *Rhizoglyphus robini* (Acari: Astigmata: Acaridae) on cultures of three soil fungi. Experimental and Applied Acarology 6: 91-94.

Russell JA, Latorre A, B Sabater-Munoz, A Moya. and NA Moran. 2003. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. Molecular Ecology 12: 1061-1075.

Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W and S Rolleke 2003. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. Journal of Microbiological Methods 52: 251-260.

Schwartz HF and Mohan SK. 1996. Compendium of onion and garlic diseases. APS PRESS The American Phytopathology Society.

Shinkaji N, K Okabe and H Amano. 1988a. Reaction of rhizoglyphine mites (Acarina: Acaridae) infesting rakkyo (*Allium chinense* G. Don) plants infested with *Fusarium* fungi as well as to the culture medium and filtrate of the fungi. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology 32: 37-42.

Shinkaji N, K Okabe, H Amano and Y Kuwahara. 1988b. Attractants isolated from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *allii* for the robine bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparede (Acarina: Acaridae. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology 32: 55-59.

Stephens R, A Spurgeon, IA Calvert, J Beach, LS Levy, JM Harrington and H Berry. 1995. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. The Lancet 345: 1135-1139.

Sumner DR, RD Gitaitis, JD Gay, DA Smittle, BW Maw, EW Tollner and YC Hung. 1997. Control of soilborne pathogenic fungi in fields of sweet onion. Plant Disease 81: 885-891.

Thao ML, PJ Gullan and P Bauman. 2002. Secondary (gamma- Proteobacteria) endosymbionts infect the primary (beta-Proteobacteria) endosymbionts of mealybugs multiple times and coevolve with their hosts. Applied and Environmental Microbiology 68: 3190-3197.

Vala F, JAJ Breeuwer and MW Sabelis. 2003. No variation for Wolbachia-induced hybrid breakdown in two populations of a spider mite. Experimental and Applied Acarology 29: 1-12.

Van Asselt L. 1999. Interaction between domestic mites and fungi. Indoor Built Environment 8: 216-220.

Walter DE and HC Proctor. 1999. Mites: Ecology, Evolution and Behavior. University of New South Wales Press and CAB International.

Weeks AR, F Marec and JAJ Breeuwer. 2001. A mite species that consists entirely of haploid females. Science 292: 2479-2482.

Weeks, A. R. and Breeuwer, J. A. J. 2003. A new bacterium from the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum that causes sex-ratio distortion. *In* Bourtzis, K. and T. A. Miller editors. Insect Symbiosis. New York, CRC Press. 165-176

Weeks AR and R Stouthamer. 2004. Increased fecundity associated with infection by a *Cytophaga*-like intracellular bacterium in the predatory mite, *Metaseiulus occidentalis*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 271: 193-195.

Woody MW and NJ Fashing. 1993. The ability of *Rhizoglyphus robini* Claparède (Astigmata: Acaridae) to subsist solely on a diet of filter paper. International Journal of Acarology 19: 345-348.

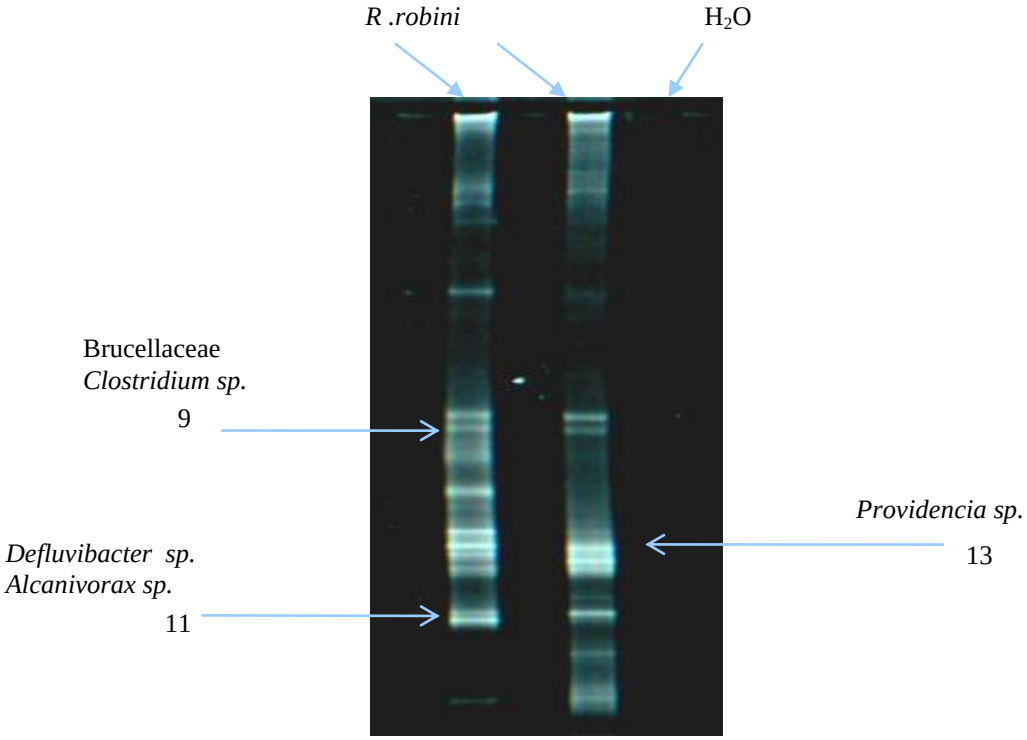
Zchori-Fein E and SJ Perlman. 2004. Distribution of the bacterial Symbiont *Cardinium* in arthropods. Molecular Ecology 13: 2009-2016.

Zhang QZ. 2003. Mites of Greenhouses: Identification, Biology and Control**.** CABI Publishing. Wallingford.

6 נספחים

נספח א': טבלה 7: פרטי החיידקים שזוהו בהפרדה על DGGE באקרית הקרקע *R. robini*

מספר בנד (תמונה 17)	מספר הרצף ב- NBCI ואחוז הדמיון (bp)	חיידק	הערות
-	AF467383 681/699 (97%)	ά proteobacterium	נמצא בכיני מכרסמים
-	AB241579 580/599 (96%)	Uncultured bacterium	Unknown
11	EU621895 548/572 (95%)	*Alcanivorax* sp.	Unknown
9	AF443595 529/532 (98%)	*Clostridium* sp.	Unknown
9	AY353698 531/538 (99%)	Brucellaceae	Unknown
11	EU870446.1 539/542 (99%)	*Defluvibacter sp.*	Unknown
13	EU660316 516/523 (98%)	*Providencia sp.*	Unknown



תמונה 17 : פרופיל החיידקים ב-*R. robini* כפי שהתקבל בהפרדה על DGGE (עבודה מקדימה זו נעשתה במעבדתה של ד"ר עינת צחורי פיין - צולם ע"י נטע מוזס דאובה)

טבלה 8: פריימרים ספציפיים לגן המקודד ל- 16S rDNA עבור כל חיידק שהתקבל בהפרדה על DGGE

שם הפריימר*	חיידק המטרה (סוג)	רצף הפריימרים	גודל בנד צפוי
Alp F **Alp R**	ά proteobacterium	**F-** CAATCCGCTTTGAGATGAG **R-** CCAACCTTTAGCGATCATC	598bp
Unknown	Uncultured bacterium	**F-** CAGCAGTGAGGAATATTGGTC **R-** CTTATCACTTTCGCTTGGTC	514bp
Alc F **Alc R**	*Alcanivorax* sp.	**F-** GGGAATCTTGGACAATGG **R-** GTCTACTTATCGCGTTAGCTG	520bp
Clo F **Clo R**	*Clostridium* sp.	**F-** CACATGGAGGAAACTCTG **R-** GAGTTTCATACTTGCGTACG	495bp
Bru F **Bru R**	Brucellaceae	**F-** GAAGATAATGACGGTAACC **R-** AGTTTTAATCTTGCGACC	439bp
Def F **Def R**	*Defluvibacter sp.*	**F-** CCTAGGGTTGTAAAGCTC **R-** CCACCGAACAGTAAACTG	411bp
Pro F **Pro R**	*Providencia sp.*	**F-** GTCTATGAAGAAGGCCCTAG **R-** GGTCGATTTAACGCGTTAG	476bp

***שמות הפריימרים מורכבים משלושת האותיות הראשונות של חיידק המטרה**

נספח ב': ריצוף לגן המקודד ל- 16S rDNA בחיידקי המטרה שזוהו בהפרדה על DGGE

Defluvibacter sp.

AGGGGGGAATATTGGACGATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAAC
CGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGG
GCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGT
TAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAACTGCCTCTAATACTGTCGATCTC
GAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATAT
TCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGG
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGGAAGCTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGTTCGGTGGCGCAGTTAACGCATT
AAGCTTCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAATGAGTTGACG
GA

Brucellaceae (=ά proteobacterium)

GAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGTGCTTAACACATGCAAGTCGA
ACGAGAGAAGCATTCTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTGCCT
CAAAGTGTGGGATAACTTTTGGAAACGAAAGGTAATAGCACATACGCCCTACGG
GGGAAAGGAGCAATCCGCTTTGAGATGAGCCTAGCCGATTAGCTAGTTGGTAGG
GTAATGGCCTACCAAGGCGATGACCGGTAGCTGTTCTTAGAGGAAGATCAGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATT
GGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGCTCTTTTGCAGGTGAAGATAATGACGGTAACCTGAGAATAAGCC
CCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGGGGCTAGCGTTGTTCG
GAATTACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGTTGTTTGGTAAGTTAGGTGTGAAATCC
TCGATTTCAAGTTGAGAACTGCACTTAAAACTGCCAAACTAGAGAGTAGTAGAGG
ATAGTGGAATTCCAAGTGTAGGGGTAAAATCCGTAGATATTTGGAGGAACACCA
GAGGCGAAGGCGGCTATCTGGGCTATTTCTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCGCTAA
AGGTTGGTAGTTAAGTATCGGCCTCAAGCTAACGCGTTAAGCGATCCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGATTAAAACTTCAAAKGAGTTGACGGA

Uncultured bacterium

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAG
CCATGCCGCGTGCAGGAAGACGGTCCTATGGATTGTAAACTGCTTTTATTCGGGG
ATAAACCTCCTTACGTGTAGGGAGCTGAAGGTACCGAAAGAATAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATC
ATTGGGTTTAAAGGGTCCGCAGGCGGGATTGTAAGTCAGTGGTGAAAAGCGGCA
GCTCAACTGTCGTCGTGCCGTTGATACTGCAGTTCTTGAATTTGATTGGAGTGGGC
GGAATATGTCATGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATGACATAGAACACCGATCGCG
AAGGCAGCTCACTAAGTCTGAATTGACGCTCATGGACGAAAGCGCGGGTAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCGCGCCGTAAACGATGATTCTCGTTGCCGGC
CTTTCGGGGTCGGTGACCAAGCGAAAGTGATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACG
ATCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGARTTG ACGGA

Clostridium sp.

GGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAACGATG
AAGGCTTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTCCTTGGGGACGATAATGACGGTACCCAAG
GAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA
GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCATTTAAGTCAGA
TGTGAAAGATCACGGCTCAACCGTGGTAAGCATTTGAAACTGAAAGGCTTGAGTT
AAGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATACTAGGA
GGAATACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACTTATACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAGGTGTTGGGGGTCAAACCTCGGTGCCGCGGCAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGTACGCAAGTATGAAACTCAAAGGTAGTT GACGGA

Alcanivorax sp.

GGGGAATCTTGGACAATGGGGGAGACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA
GAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAGGCTCTGGGTTAAT
ACCCTGGAGTACTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCGGCTAATTTCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGAAAGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGTTGGGAGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ATTGCTTTCAAAACTGCCAGGCTAGAGTGCGGTAGAGGGAGGTGGAATTTCCGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTC
CTGGACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
T ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTCGGCGATCTTGTAT
TGTTGGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGCCGCAAG
GTTAGAAACTCAAAGGAGTTGACGGA

Providencia sp.

GTGTATGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGGGAGGAAGGCGTT
AATGCTAATATCATTAACGATTGACGTTACCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTC
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGT AAAGCGCACGCAGGCGGTTAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTTA
ACCTGGGAATGGCACTAAAACTGGTTAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAA
GGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGAAGGTTGTT
CCCTTGAGGAGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTTA AAACTCAAAGGAGTTGACGGA

נספח ג': ריצוף מלא לגן המקודד ל- 16S rDNA בחיידק מהסוג *Defluvibacter sp.*

AGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCCGGCTTAACACATGCAAGT
CGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACC
TTTTGCTACGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGG
GGGAAAGATTTATCGGCAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGYCCT
AGGGTTGTAAAGCTCTTTCMMSGSYGAAGATAATGACGGTAACCGKAGAAGAAG
CCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGARGGGGGCTAGCGTTGTT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGRTMKWTMAGTYAGGGGTGAA
ATCCCAGRGCTCAACYCTGGAACTGCCTYTRATACTGKSKAYCTMGAGTWYGRR

AGAGGTRAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTYACTGGYYCRWTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGRAW
GYTAGCCGTCGGSMWGYWTRCWKKTCGGKGGMGCAGCTAACGCATTAAACATT
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA
GCCCTTGACATGTCGGTCGCGGTTTCCAGAGATGGATTCCTTCAGTTAGGCTGGA
CCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCATTTGGGCCC
TCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAAAAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCCTACAATGGTGGGTGACAGT
G

Interactions between the bulb mite *Rhizoglyphus Robini* and fungal plant pathogens on onion

Tal Ofek

Abstract

The soil bulb mite, *Rhizoglyphus Robini*, (Acaridae: Astigmata) is frequently found on various species of Liliaceae in Israel. Severe damage to underground plant parts is associated with high populations of the mite and fungal pathogens.

In a series of laboratory experiments with onion seedlings, we addressed the following topics: 1) to characterize the major fungal pathogens 2) to examine the influence of the fungi on the mites 3) to study the interactions between the mites and the fungi 4) To identify and characterize bacterial symbionts present in the bulb mite that may facilitate the digestion of fungi.

Different levels of pathogenicity between fungal species, and between isolates of the same fungus were detected. Mites were attracted to most tested fungal species and strains. The degree of attraction was not related to pathogenicity. The combination of *F. oxysporum* and mites was more detrimental to onion seedlings than each factor alone.

To identify and characterize bacterial symbionts present in the bulb mite, PCR was conducted with specific primers to the 16S rDNA gene. Two species of bacteria belonging to the class Proteobacteria were found in parents and eggs.

The major conclusions from this work are: 1) Fungi without mites can cause varying degrees of damage to the onion depending on the species and strain of fungus 2) Mites only cause damage to onions at high densities 3) Mites are attracted to fungi regardless of the substrate (similar results were obtained on potato dextrose agar and onion) 4) The combination of mites and a weakly pathogenic fungus cause more severe damage than each causal agent separately.

The novel outcomes of this study on fungal mite interactions should help develop future integrated management programs for the control of *R. robini*. Our results suggest that highly toxic insecticides could be avoided and that fungal control could be a more effective and environmentally friendly method to prevent the damage inflicted by these two causal agents.

Interactions between the bulb mite *Rhizoglyphus Robini* and fungal plant pathogens on onion

By: Tal Ofek
Supervised by: Dr Eric Palevsky
Prof Moshe Inbar

THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE MASTER DEGREE

University of Haifa
Faculty of Natural Sciences
Department of Evolutionary & Environmental Biology

October, 2010

Interactions between the bulb mite *Rhizoglyphus Robini* and fungal plant pathogens on onion

Tal Ofek

THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE MASTER DEGREE

University of Haifa
Faculty of Natural Sciences
Department of Evolutionary & Environmental Biology

October, 2010