הפחתת השימוש בחומרי הדברה בגידול פטריות מאכל ע"י שימוש באמצעים פיזיקלים - 2005

Reducing the use of chemicals products in the cultivation of mushroom by using physical means.

עופר דנאי **מו"פ צפון**
נירית אזוב **מו"פ-צפון**

חשוון תשס"ד **דצמבר 2005**

א. תקציר

במרבית מדינות המערב, הוטלו בשנים האחרונות, הגבלות חמורות על השימוש בחומרי הדברה כימיים בגידול זה. עבודות שנעשו מצביעות על כך שיעילותם של חומרי ההדברה פוחתת עקב התפתחות קווים עמידים של *Verticillium fungicola* כנגד מספר חומרים שבשימוש. נמצא כי חלק מחומרי ההדברה הינם פיטוטוקסים לגידול. גורמים אלו, והגדלת המודעות הציבורית למוצרים ולסביבה נקיים מכימיקלים **מחייבים** פיתוח שיטות אלטרנטיביות ומשולבות (IPM) להדברת מחלות אשר יאפשרו למגדלים לגדל פטריות ללא שימוש בחומרי הדברה כימים.

בשנים האחרונות הוכנס השימוש בקומפוסט ומיצויים של קומפוסט לצורך דיכוי של מחלות צמחים, שנגרמות ע"י פטריות קרקע. בגידול פטריות טרם דווח על ניסיונות שימוש בחומרים אלו. **בתוצאות קודמות** שקבלנו בפיתוח השימוש ב"כבוץ", כתחליף לכבול בקרקע כסוי מצאנו הפחתה ניכרת בהתפתחות מחלת המיקוגון (מחלת הבועות הרטובות), שנגרמת ע"י הפטוגן (Mycogone perniciosa, Magan)התפתחות מחלת המיקוגון ע"י כבוץ אומתה בבדיקות שנעשו בעבודה משותפת עם חוקרים באירלנד, במסגרת אותה עבודה נמצא כי העלאת pH המצע הביאה לפגיעה בגידול פתוגן זה. בבחינת הגורמים שעשויים להשפיע על התפתחות המחלה בקרקע הכיסוי נמצא כי רמת ה pH של הכבוץ הייתה גבוהה מהכבול. **מטרת תוכנית מחקר** זאת היא לפתח שיטות אקולוגיות פיסיולוגיות וביולוגיות, שיקטינו את התפתחות מחלת הוורטיציליום, (מחלת הבועות היבשות), שהפכה להיות הפגע המרכזי בגידול, ללא צורך בשימוש בחומרי הדברה

כימיים, שעקרון פעילותם הוא פגיעה באנזימים החוץ תאיים של הפתוגן. **בתוכנית העבודה** נבדקה בשלב הראשון השפעת העלאת ה pH ע"י הוספת מוצרי גיר שונים והשפעת הוספת מיצויי הקומפוסט וטיפולים משולבים על גידול הפתוגן. בשלב השני בחנו את רמת הפיטוטוכסיות של החומרים שנמצאו יעילים על גידול פטריית המאכל ואת השפעתם על הפחתת המחלה.

ב. מבוא

מחלת הבועות היבשות(Dry bubble disease). נגרמת ע"י הפטרייה הפתוגנית *Verticillium fungicola* . המחלה נגרמת ע"י שני זנים של הפתוגן: *V. fungicola* var. *fungicola* ו- *V. fungicola* var. *aleophilum*. זוהי המחלה הנפוצה והמזיקה ביותר בין המחלות הנגרמות ע"י פטריות בגידול פטריית מאכל. היא מתפתחת בקרקע הכיסוי, הפתוגן תוקף את קורי הפטרייה ע"י הפרשת אנזימים חוץ תאיים מקבוצת הכיטינזות (Chitinases) שמפרקות את דופן התאים ומאפשרת את חדירת תפטיר הפתוגן לתוך תפטיר הפטרייה. כאשר לא מטפלים בחדר נגוע, המחלה מתפשטת ותוך שבועיים שלושה היא יכולה להשמיד את כל היבול.

כתוצאה מהתפרצות המחלה נגרמים מידי שנה נזקים כלכלים בהיקף נרחב לענף הפטריות בארץ ובעולם.

לצורך הדברת המחלה משתמשים מגדלי הפטריות בעיקר ב- Prochloraz manganese (שם מסחרי Sporgon 50%WP) שהינו החומר היחיד המאושר לשימוש כיום ב EU להדברת *V. fungicola* .

קימות מספר סיבות המחייבות פיתוח שיטות אלטרנטיביות להדברת המחלה:

- במספר מדינות במערב הוטלו בשנים האחרונות, הגבלות חמורות על השימוש בחומרי הדברה כימיים בגידול פטריות מאכל ובעתיד הקרוב אנו צפויים להחמרה בהגבלות
- עבודה שפורסמה לאחרונה באנגליה מלמדת כי 64% מקווי *V. fungicola* פיתחו דרגות שונות של עמידות ל Prochloraz manganese .
- נמצא כי ריכוז ה Prochloraz בקרקע הכיסוי יורד באופן משמעותי בין הימים 14-21 אחרי היישום הראשון של Prochloraz שנעשה בד"כ ביום 3 או 7 ובין הימים 21-28 כאשר נעשה יישום שני.
- נמצא כי חלק מחומרי ההדברה ששימשו בגידול פטריות הנם פיטוטוקסים וגורמים להפחתה ביבולים.
- הגדלת המודעות הציבורית למוצרים ולסביבה נקיים מכימיקלים.

בעבודות מוקדמות שלנו מצאנו כי כאשר פיתחנו את השימוש ב"כבוץ", כתחליף לכבול בקרקע כסוי, התקבלה הפחתה ניכרת בהתפתחות מחלת המיקוגון (Danai & Levanon 1996)התופעה תחות אומתה בבדיקות ראשוניות שנעשו באירלנד. הוספת מיצוי של "כבוץ" הביאה גם לירידת קצב התפ *V. fungicola* עד ל 54% בהשוואה לביקורת. החוקרים בדקו את האפשרות שרמת ה pH הגבוהה יחסית של ה"כבוץ" היא האחראית לדיכוי ה*V. fungicola*. הם מצאו כי בצלחות פטרי

העלאת pH המצע הביאה לפגיעה בקצב גידול הפתוגן. העבודה לא הושלמה מאחר ויצור "הכבוץ" שהיתקבל מתסיסה מתנוגנית טרמופילית של זבל פרות הופסק .

לאחרונה החל לפעול מתקן תסיסה חדש שעובד בטכנולוגיה מזופילית ומאפשר לנו לבחון את התאמת ה"כבוץ" המזופילי כתוסף לקרקע כיסוי.

תוכנית המחקר הנוכחית מבקשת לפתח פתרונות חילופים להדברה הכימית של מחלת הבועות היבשות בפטריות השמפניון שנגרמת ע"י *V. fungicola* שמתבססים על התוצאות הנ"ל של מחקרינו בעבר ועל ידע חדש שהתפרסם בנוגע לתפקידם של חיידקי *Pseudomonas* ביצירת הסופרסביות כנגד פטריות קרקע. חיידקי *Pseudomonas* מהווים את עיקר אוכלוסיית חיידקי קרקע הכיסוי ויש להם תפקיד מרכזי בהשראת יצירת גופי הריבוי.

הפתרונות שנבדקו הם העלאת pH קרקע הכיסוי ותוספת מיצויים אורגנים שונים לקרקע הכיסוי במטרה לדכא את הישרדות והתפתחות נבגים ותפטיר של *V. fungicola* מבלי לפגוע בפטריית המאכל.

ג. הניסויים שבוצעו

בשנה א' בודדנו תפטיר של מחלת הוורטיציליום וביצענו ניסויים לבדיקת שיטת האילוח המיטבית. במקביל ביצענו סריקה של של ערכי ה pH של מספר אבקות גיר ופסולות אורגניות על-מנת לבחון את התאמתן האפשרית לשימוש בהעלאת רמת ה pH של קרקע הכיסוי והתחלנו בניסויים לבדיקת השפעתם של חומרים אלו על הפתוגן ועל היבול.

בשנה זו, שנה ב' למחקר על-סמך התוצאות משנה א') התרכזנו בבחינת השפעתם של ריכוזי גיר ותוספים אורגניים שונים, על יבול הפטריות, התפתחות מחלת הוורטיציליום וכן על השינויים בריכוז חידקי *Pseudomonas fluorescens* הפעילים בקרקע הכיסוי.

ג.1. **ניסוי 1 – בדיקת השפעת תוספות אורגניות ומינראליות שונות על הפחתת רמת המחלה בריכוזי אינוקולום שונים.**

בניסוי זה ביקשנו למצוא את ריכוז האינוקולום האופטימלי לאילוח. ריכוז אופטימלי יאפשר קבלת יבול מאולח בדרגה כזו, שניתן יהיה להבחין בהבדלים בין הטיפולים השונים.

בניסוי שנערך בשנה הקודמת השתמשנו בריכוז $5x10^5$ נבגים למ"ל. ריכוז זה גרם לאילוח בדרגה גבוהה מהרצוי. ריכוזי האינוקולום שנבדקו בניסוי זה: מ 50 עד $5x10^4$ נבגים למ"ל.

הרכבי הכיסוי שנבדקו היו:

1. ביקורת: 100% כבול הולנדי (תערובת מוכנה של קרקע כיסוי).
2. 10% גיר + 90% כבול הולנדי
3. 50% כבוץ + 50% כבול הולנדי
4. 50% מצע שמפניון משומש + 50% כבול הולנדי

ג.1.1. מהלך הניסוי:

הניסוי נערך בשקיות שתילה שחורות מ - PVC, במידות: גובה 24 ס״מ וקוטר 13 ס״מ. בכל השקיות מילאנו כ 15 ס״מ של קומפוסט מונבט ממפעל טבע פוסט (כ 1.7 ליטר), ומעליו כ - 4 ס״מ קרקע כיסוי ע״פ הטיפול, לכל טיפול 5 חזרות. החומרים האורגנים ששימשו לבדיקה היו:
קומפוסט פטריות משומש בן כשנה . ״כבוץ״ ממתקן תסיסת מיתן מזופילי של זבל פרות בעמק חפר. מאחר שבכבוץ וקומפוסט משומש נמדדו ערכי מוליכות גבוהים, שטפנו אותם מספר פעמים במי ברז כדי להגיע לרמת מוליכות המאפשרת גידול פטריות (כ 1.5 ms/cm^2).
האילוח בוורטיציליום נעשה ע״י טפטוף של 10 מ״ל תמיסת נבגים (בריכוז 50 ו 500 נבגים למ״ל).
על פני הכיסוי, בטיפול ביקורת טופטפו 10 מ״ל מים מזוקקים סטרילים על הכיסוי.
השקיות הועברו לחדר גידול מבוקר, בתחנת המחקר של המו״פ בקומפיט מעלות, בטמפרטורת אויר של 18°c, בחושך. רטיבות המצע נשמרה ע״י השקיה יומית על הכיסוי.
הפטריות שגדלו נקטפו ונשקלו וחושב היבול לכל טיפול, בנוסף נערכו בדיקות pH, מוליכות וריכוז חידקי *P. fluorescens* בכיסוי.
בגופי הפרי שגדלו בשבוע הראשון (גל I) לא נראו סימני מחלה ולכן בסיום גל זה נערך אילוח חוזר בריכוזים $5x10^3$ ו- $5x10^4$ נבגים למ״ל.

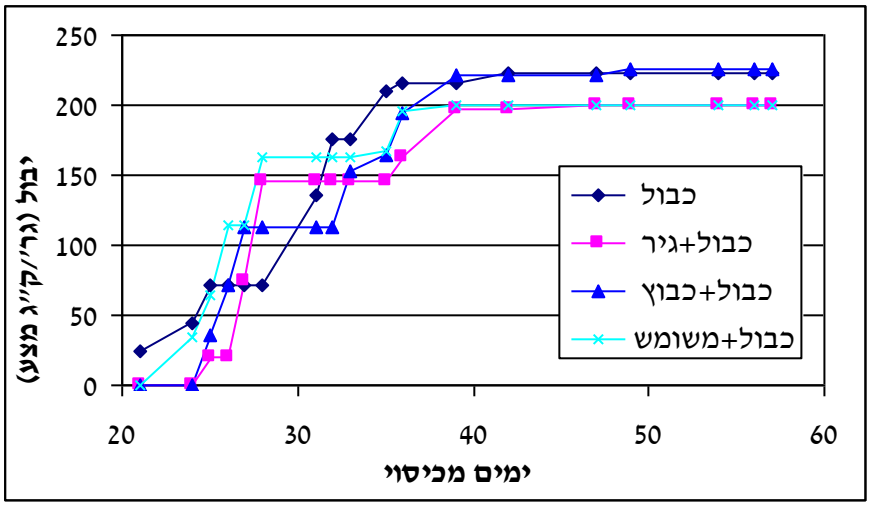
2.1. <u>תוצאות ניסוי 1</u>

<u>טבלה 1. ערכי מוליכות ו pH במצעים השונים</u>

		ביקורת-כבול	כבול+גיר	כבול+כבוץ	כבול+משומש
מוליכות (ms/gr)	תחילת ניסוי	1.48	1.41	1.83	3.98
	סוף ניסוי	6.23	7.195	4.805	9.85
pH	תחילת ניסוי	8.03	8.22	7.68	8.32
	סוף ניסוי	7.73	7.89	7.52	8.02

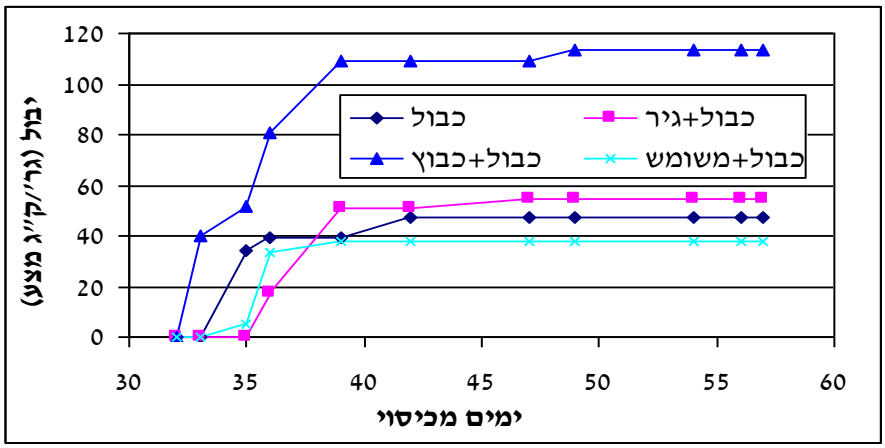
בבדיקת רמת ה pH של הכיסוי בטיפולים השונים ניתן לראות שהטיפולים שבהם הוספו גיר וקומפוסט משומש העלו את רמת ה pH יחסית לביקורת, אם כי לא באופן מאוד משמעותי, ואילו הטיפול שהכיל כבוץ הוריד את רמת ה pH ביחס לביקורת. בשלושה טיפולים ירדה דרגת ה pH במהלך הניסוי בכ 0.3 יחידות (טיפול הביקורת, הגיר והמצע המשומש) לעומת ירידה של 0.16 דרגות בטיפול הכבוץ.
בבחינת מוליכות הכיסוי בטיפולים השונים, ניתן להבחין שהמוליכות בטיפול שהכיל מצע משומש היתה הגבוהה ביותר מתחילת הניסוי ועד לסיומו. לעומת זאת מענינת התוצאה שהתקבלה בטיפול שהכיל כבוץ, שם המוליכות עלתה באופן המתון ביותר מכל הטיפולים (עליה של כ 3 ms/cm^2) לעומת עליה של 5-6 ms/cm^2 בשאר הטיפולים.

איור 1. יבול כולל במצעים לא מאולחים



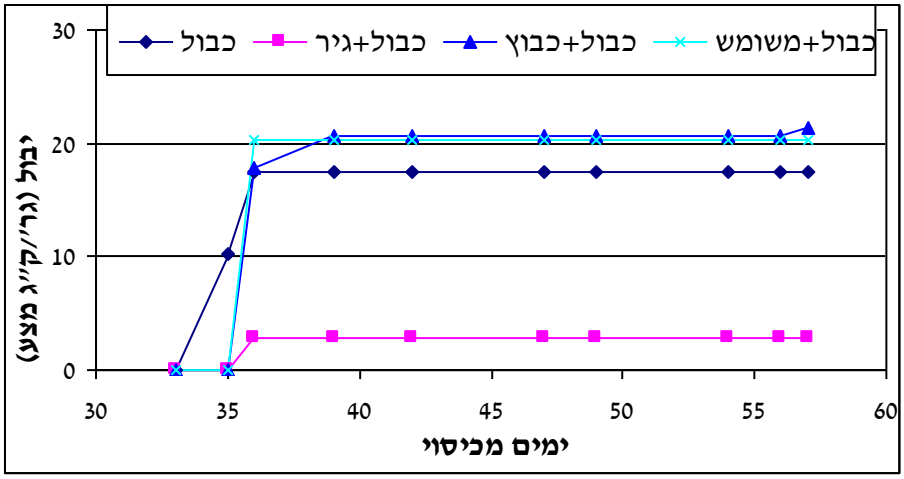
לאחר קטיף ושקילה של שלושה גלי יבול שהתקבלו בניסוי, ניתן לראות שבטיפול שבו הכיסוי הכיל 50% כבוץ + 50% כבול הולנדי, נקטף היבול הגבוה ביותר (340 גר'/ק"ג מצע). טיפול זה וכן הטיפול שהכיל תוספת 10% גיר הביאו לעליה קטנה ביבול יחסית לטיפול הביקורת (בין שלושה טיפולים אלו לא היו הבדלים מובהקים). לעומת זאת הטיפול שהכיל 50% מצע שמפניון משומש + 50% כבול הולנדי גרם להפחתה מובהקת ביבול יחסית לביקורת.

איור 2. יבול פטריות (נקיות ממחלה) במצעים מאולחים בריכוז 5x103



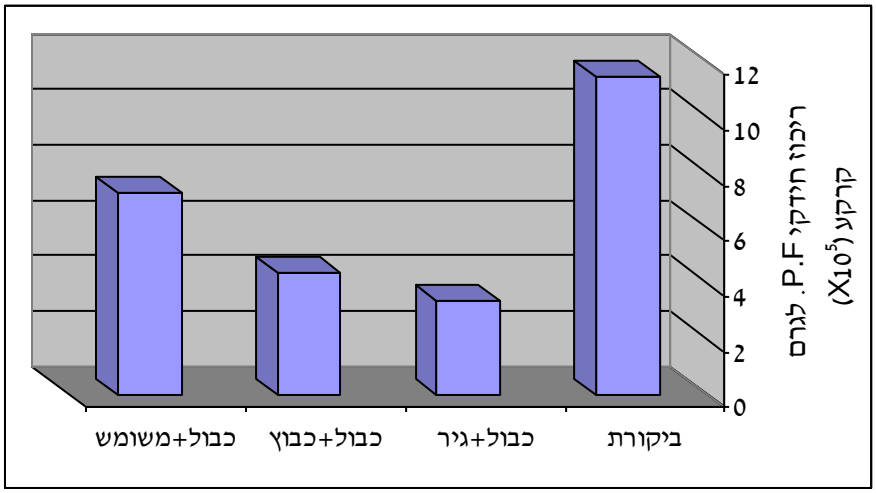
איור 2 מציג את התפלגות היבול של פטריות שלא היו נגועות בוורטיציליום, בטיפולים שאולחו בריכוז $5x10^3$. ניתן לראות שבטיפול שהכיל כבוץ היבול היה גבוה בהרבה מהביקורת. בטיפולים שהכילו גיר ומצע משומש היבול היה דומה לביקורת. (בבדיקת מובהקות לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים).

איור 3. יבול פטריות מאלח (נקיות ממחלה) במצעים מאולחים בריכוז 5x104



איור 3 מציג את התפלגות היבול של הפטריות הבריא, שהתקבל במצעים שאולחו בריכוז $5x10^4$. ניתן לראות שברמת אילוח זאת נקטף רק מעט מאוד יבול בריא בכל הטיפולים (כ 20 גר'/ק"ג מצע). בטיפולי הכבוץ והמצע המשומש היתה עליה מזערית ביבול לעומת הביקורת ובתוספת גיר היתה הפחתה משמעותית ביבול, ולמעשה לא גדלו כמעט גופי פרי בריאים. בבדיקת מובהקות לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

איור 4. ריכוז חידקי *P. fluorescens* בכיסוי, בסוף הניסוי



בבדיקת ריכוז חידקי *P. fluorescens* בטיפולי הכיסוי השונים, נמצא הריכוז הגבוה ביותר בטיפול הביקורת (כבול מסחרי). הריכוז הנמוך ביותר נמצא בטיפול שהכיל תוספת גיר.

ג.2. **ניסוי 2 - השפעת pH המצע על גידול לינארי של וורטיציליום, שמפניון ו *P. fluorescens* בצלחות פטרי**

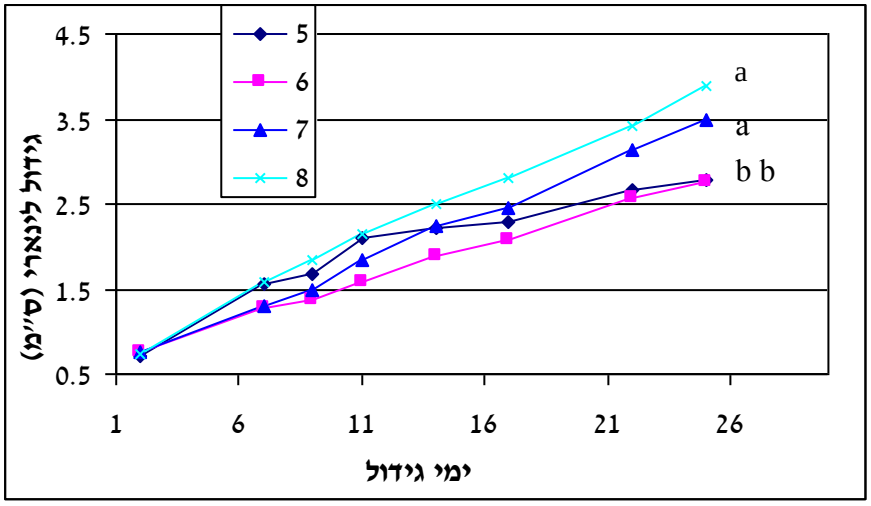
בניסוי זה ביקשנו לאשר תוצאות של עבודות קודמות שקבעו כי pH 8.0 ומעלה מעכב גידול של פטריית הוורטיציליום. כמו כן בדקנו את השפעת pH המצע על: פטרית השמפניון וחידקי הכיסוי *P. fluorescens*.

ג.2.1. מהלך הניסוי

הניסוי נערך בצלחות פטרי בקוטר 5 ס"מ, וורטיציליום ושמפניון גודלו במצע Potato Dextrose Agar (PDA) וחידקי *P. Fluorescens* במצע King B . הצלחות הודגרו באינקובטור ב 25°c ורדיוס הגידול של התפטיר נמדד פעמיים בשבוע

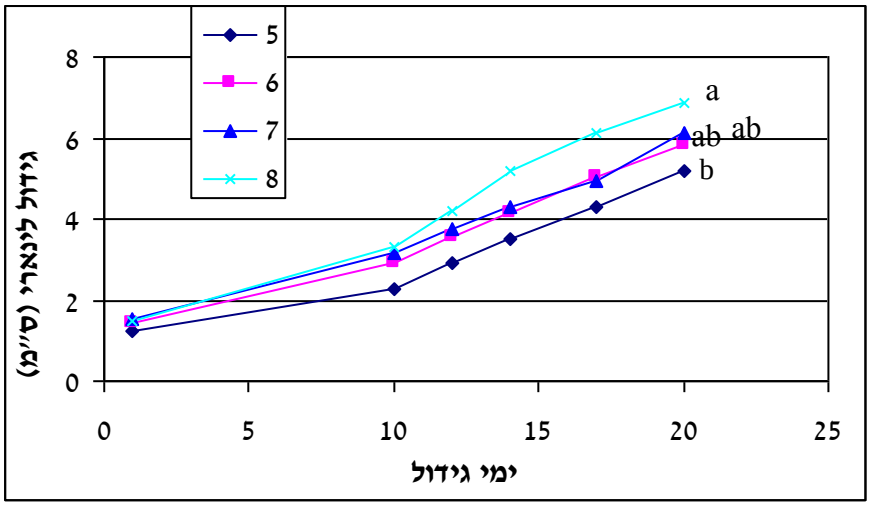
ג.2.2. תוצאות הניסוי

איור 4. השפעת pH המצע על גידול לינארי של וורטיציליום בצלחות פטרי



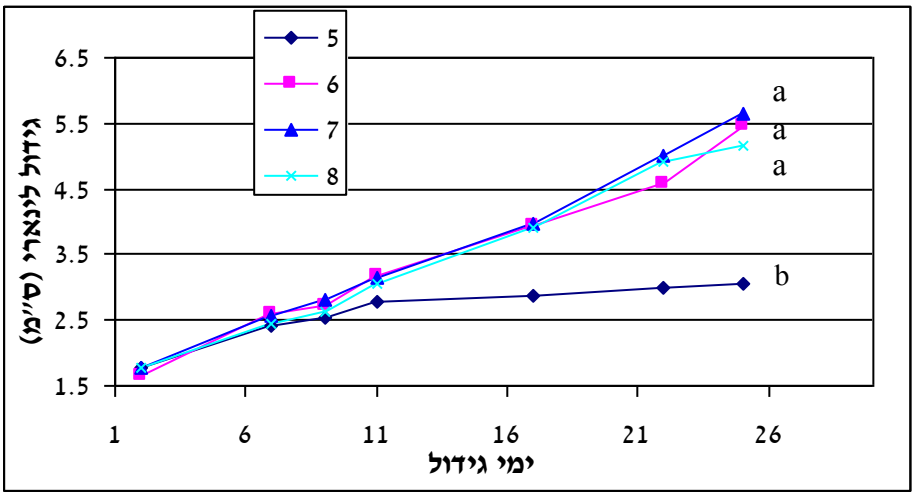
בגידול של תפטיר וורטיציליום ברמות pH שונות ניתן לראות שהפתוגן גדל מהר יותר, בצורה מובהקת, ברמות pH גבוהות (7-8) מאשר ב pH נמוך (5-6).

איור 5. השפעת pH המצע על גידול לינארי של תפטיר שמפניון בצלחות פטרי



מבדיקת קצב הגידול הלינארי של תפטיר שמפניון ברמות pH שונות, נמצא שהפטריה גדלה מהר יותר ככל שה pH עולה מ 5 pH ל 8.

איור 6. השפעת pH המצע על גידול לינארי *P. fluorescens* של בצלחות פטרי



בגידול של *P. fluorescens* במצע King B ניתן לראות שלא היו כלל הבדלים בקצב הגידול של החידק מ pH 6 עד 8. לעומת זה קצב הגידול היה נמוך בהרבה, ובצורה מובהקת, ב pH 5.

ג.3. **ניסוי 3 - השפעת ריכוזים שונים של גיר וכבוץ על יבול השמפניון והפחתת מחלת הוורטיציליום**

בניסוי 1 שנערך השנה, נצפו תוצאות חיוביות לתוספות של גיר וכבוץ לקרקע הכיסוי. בניסוי 3 ביקשנו לבדוק ריכוזים נוספים של חומרים אלו על מנת למצוא את הריכוז האופטימלי לשימוש.

הריכוזים שנבדקו היו:

1.	5% גיר	4.	20% כבוץ
2.	10% גיר	5.	45% כבוץ
3.	15% גיר	6.	70% כבוץ

ג.3.1. מהלך הניסוי

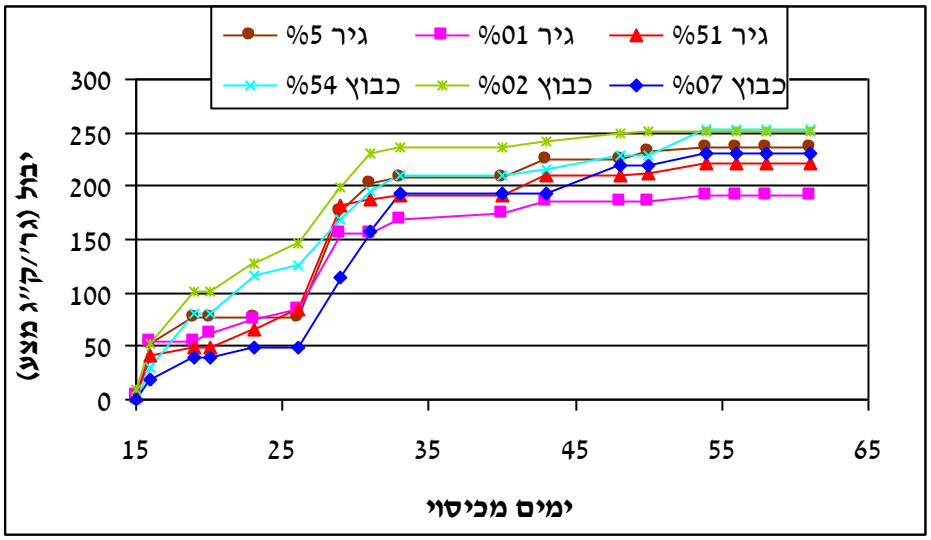
הניסוי נערך בשקיות שתילה באותה שיטה כמו בניסוי 1. הניסוי בוצע בחדר גידול מבוקר, בתחנת המחקר במעלות, בטמפרטורה של 19°c, בחושך.

הטיפולים אולחו בתמיסת נבגים של וורטיציליום בריכוז שנמצא יעיל בניסוי 1: $5x10^3$ נבגים למ"ל X 10 מ"ל לשקית (חזרה).

הפטריות שגדלו, נקטפו ונשקלו וחושב היבול לכל טיפול. בנוסף נערכו בדיקות pH, מוליכות וריכוז חידקי *P. fluorescens* בכיסוי.

ג.3.2. תוצאות הניסוי

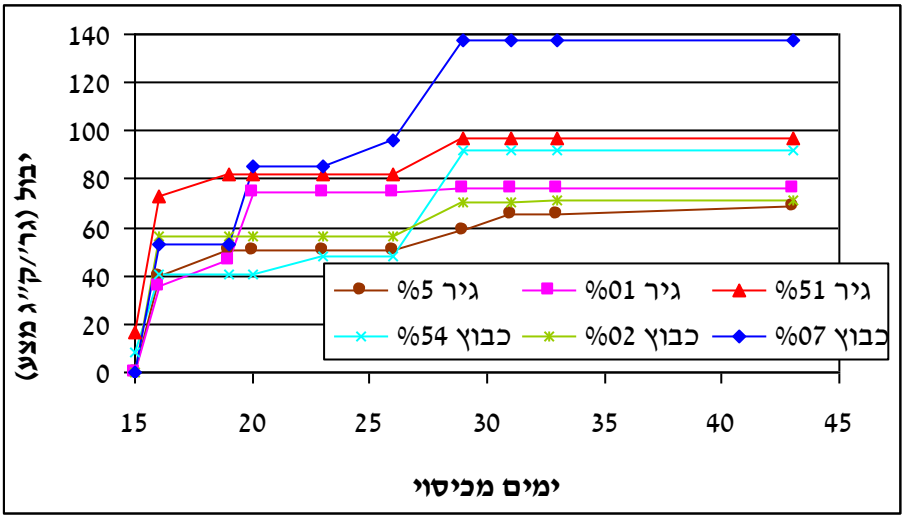
איור 7. השפעת ריכוזים שונים של תוספות לכיסוי, על יבול הפטריות



איור זה מציג את יבול הפטריות הכולל (בריאות וחולות) שנקטף במצעים שלא אולחו במחלה.

האיור ממחיש את ההשפעה של התוספות שהוספו לכיסוי על היבול. הטיפולים שבהם התקבל היבול הגדול ביותר היו הטיפולים שהכילו 20% ו 45% כבוץ והיבול הנמוך התקבל בטיפול שהכיל 10% גיר. בבדיקת מובהקות לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

איור 8. השפעת ריכוזים שונים של תוספות לכיסוי, על יבול פטריות בריא במצעים מאולחים



איור 8 מציג את היבול הבריא שנקטף בטיפולים שאולחו בפתוגן. ניתן לראות שבטיפול שהכיל 70% כבוץ נקטף יבול פטריות שהוא בין 40 ל- 50 אחוז גבוה יותר (גופי פרי בריאים) מאשר בשאר הטיפולים, אך לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים.

ד. מסקנות והמלצות להמשך המחקר

מסיכום הניסויים שנערכו עד כה במחקר זה מסתמן, כי תוספת של כבוץ בריכוז גבוה (50-75%) הפחיתה את רמת מחלת הבועות היבשות והעלתה את רמת היבול הבריא. בהוספת גיר לא נצפתה ירידה ברמת המחלה. הסיבות להפחתה ברמת המחלה עדיין לא ברורות ותוצאות עבודה זאת מראות כי שהפתוגן אינו נפגע בערכי pH גבוהים כפי שדווח בעבודות קודמות . יתכן ומדובר בשינוי גנטי בפטוגן או בוריינט שונה מאלו שהישתמשו בהם בעבודות קודמות . אנו נבקש לבחון אפשרויות אלו בהמשך תקופת המחקר.