

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 15-11832-131

שנת המחקר: ראשונה מתוך שנה אחת

בחינת השפעת תערובות נדיפות מהפטרייה *Daldinia* sp. להדברת נמטודה יוצרת עפצים

Examination of volatile organic compounds mixtures from the endophytic fungus *Daldinia* sp. for the control of the root knot nematode

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

סיגל בראון-מיארה	אנטמולוגיה, היחידה לנמטולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
דוד עזרא	פתולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
אורנה ליארזי	פתולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
פטריסיה בוקי	אנטמולוגיה, היחידה לנמטולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
אברהם גמליאל	המחלקה ליישום חומרי הדברה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Sigal Brown Miyara, Department of Entomology the Unit of Nematology

Plant Protection Institute, Agricultural Research Organization; Volcani Center, Beit Dagan
50250. E-mail: sigalhor@volcani.agri.gov.il

David Ezra, Plant Pathology and weed research, P.O.Box 6, ARO, The Volcani Center, Bet-
Dagan, 50250. E-mail: dezra@volcani.agri.gov.il

Orna Liarzi, Plant Pathology and weed research, P.O.Box 6, ARO, The Volcani Center, Bet-
Dagan, 50250. E-mail: ornal@volcani.agri.gov.il

Patricia Bucki, Department of Entomology the Unit of Nematology

Plant Protection Institute, Agricultural Research Organization; Volcani Center, Beit Dagan
50250. E-mail: pbucki@volcani.agri.gov.il

Abraham Gamliel, Agricultural Engineering, Growing, Production and Environmental
Engineering , Agricultural Research Organization; Volcani Center, Beit Dagan 50250. E-
mail: agamliel@volcani.agri.gov.il

תקציר

נמטודות טפילות לצמחים הינן טפיל הגורם להפסדים כלכליים. תכשירי ההדברה נמטוצידיים נמצאים תחת לחץ רישוי עקב השפעתם השלילית על המשתמש והסביבה. מטרת המחקר היא לנצל את הפוטנציאל הבינומטוצידי הגלום בפטריית *Daldinia* spp. לפיתוח מוצר שיושם בממשק הדברה משולב כנגד נמטודות בבתי צמיחה תוך ניצול כלים ביוכימיים, מולקולאריים, מיקרוביאליים ונמטולוגיים בסיסיים. מצאנו שחשיפת זחלי *Meloidogyne javanica* מדרגה J2 לנדיפים של הפטרייה גרמה ל – 67% תמותה של זחלים ואילו חשיפה לתערובת סינטטית של הנדיפים העלתה את תמותת הזחלים ל – 90%. כל אחד מארבעת מרכיבי התערובת

הסינטטית פגע בחיוניות הזחלים, אולם חומר אחד הציג שיעור תמותה זהה לתערובת השלמה ופעולתו אופיינה כנמטוצידית. הוספת תערובת הנדיפים לקרקע מאולחת בנמטודות גרמה ל- 99% תמותה של הזחלים ובצמחים הייתה הפחתה מובהקת של אינדקס העפצים ומספר הביצים לגרם שורש יחסית לביקורת, ללא השפעה על משקל השורשים. לתערובת הנדיפים השפעה שלילית על בקיעת הביצים של נמטודה זו. מכיוון שזוהי תוכנית חד שנתית, אין עדיין מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות. אולם תוצאות אלו מהוות בסיס מחקר חשוב להמשך פיתוח יישום התערובת.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. ברוך סנה baruchs@tauex.tau.ac.il

2. יגאל אלעד elady@volcani.agri.gov.il

3. יצחק שפיגל spiegely@volcani.agri.gov.il

4. איתמר גלזר glazerit@volcani.agri.gov.il

.....
הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)

*במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)

תאריך: 8.3.16

חתימת החוקר: סיגל בראון

פרסומים בכתב

1. P. Bucki, O. Liarzi, D. Ezra and S. Brown Horwitz (2015) The activity of *Daldinia concentrica*, an endophytic fungus, and its bioactive volatiles against the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytoparasitica* **43**: 375-376. Abstracts of presentations at the 36th Congress of the Israeli Phytopathological Society.

פרסומים בעל פה

1. פעילות הפטרייה האנדופיטית *Daldinia concentrica* ותוצריה הנדיפים כנגד נימית עפצים *Meloidogyne javanica*. בוקי פ. ליארזי א. עזרא ד ובראון הורוביץ ס. הרצאה במסגרת הועידה ה- 36 של העמותה הישראלית למחלות צמחים, 10-11.2.2015, מכון וולקני, בית דגן.
2. שימוש בפטרייה האנדופיטית *Daldinia concentrica* ובתוצריה הנדיפים נגד נמטודות. ליארזי א. בוקי פ. גימיר ב. בראון מיארה ס ועזרא ד. הרצאה במסגרת הועידה ה- 37 של העמותה הישראלית למחלות צמחים, 8-9.2.2016, מכון וולקני, בית דגן.

פטנט

1. USE OF THE FUNGUS *DALDINIA CONCENTRICA* FOR BIOLOGICAL CONTROL – Provisional patent.

תוכן עניינים

2-3	מבוא
3-4	מטרות
4-7	תוצאות עיקריות לשנת הדיווח
7	דיון
8	רשימה מלאה של פרסומים מדעיים
9-10	ביבליוגרפיה
10-11	סיכום עם שאלות מנחות

מבוא

נמטודות טפילות לצמחים, פגע מאיים בבתי צמיחה. בין הפגעים הביולוגיים התוקפים צמחים, נמטודות טפילות לצמחים נחשבות פגע קשה מאוד להדברה באמצעים קונבנציונאליים, דבר המוביל לאיבודי יבול ולהפסדים כספיים המסתכמים במאות מיליארדי דולרים בשנה ברחבי העולם [1,2]. נמטודות טפילות לצמחים השייכות לסדרת ה-Tylenchida ובעיקר מספר מינים בסוג *Meloidogyne*, הידועים כנמטודות יוצרת העפצים (RKN) *Root Knot Nematode*, נחשבות לגורם הנזק העיקרי בחקלאות. נמטודה זו בעלת תחום פונדקאים רחב הכולל את החד פסיגיים, דו פסיגיים, עשבוניים וצמחים מעוצים [3]. נמטודה מסוג זה הינה נמטודה ישובה, שאת רוב מחזור חייה מקיימת כטפיל מוחלט בתוך צינורות ההובלה של השורש. תהליך ההדבקה נעשה באמצעות דיאלוג מתוחכם עם תאי קסילים פרנכימיטיים תוך אינדוקציה ליצירת תאי הזנה ייחודיים המבטיחים את השלמת מחזור חיי הנמטודה (איור 1A). התפתחות תאי ההזנה מלווה בחלוקות נמרצות באזור הקורטקס האחראיות למופע העפצים האופייני הנגרם בעקבות ההדבקה [3,4]. מחזור החיים של הנמטודה הינו חודש עד



איור 1. נמטודת יוצרת העפצים ביולוגיה, סמפטומים ונזק. A. תאי הזנה מפותחים בצינורות ההובלה מספקים לנמטודה המתפתחת את חומרי ההזנה הדרושים. N נמטודה, * תא ענק. B. הנזק הנגרם ע"י נמטודת העפצים כפי שנראה בגידול פלפל (פארן, 2014), צמחים נגועים בנמטודות נראים מעוכבים, קודקודיהם נבולים ומצהיבים ופירותיהם קטנים. C. מופע עפצים כבד בבית שורשים של צמחי פלפל נגועים בנמטודת העפצים *Meloidogyne incognita*.

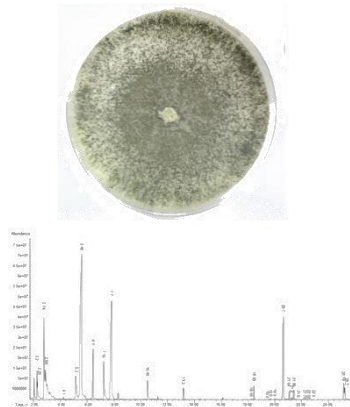
חודשיים (כתלות בתנאי האקלים) כאשר הדבקה בנמטודת העפצים תוצאתה בריבוי עצום בכל עונת גידול. גידול מספרי זה מוביל לעיכוב משמעותי בגדילת הצמח

הפונדקאי וזאת ע"י פגיעה ישירה בתפקוד מערכת ההובלה בשורשים וכתוצאה, פחיתה ניכרת ביבול ולהפסדים כספיים

עצומים (איור 1B, C). אכלוס הקרקע והשורשים בעומק מאפשר את הישרדותן בין העונות ומסייע בחיוניותן חודשים רבים לאחר סיום מחזור הגידול של הפונדקאי. זחלי הנמטודות ששרדו בעומק בתוך שקי הביצים בוקעים מהביצים ונוודים אנכית כלפי מעלה ומנגעים את שורשי השתילים או הזריעים של הגידול החדש, מציאות המדגישה את היותן קשות הדברה [1,5]. קרקעות קלות, מאווררות ולחות יוצרות את התנאים האידיאליים להדבקות מחודשות, להתפשטות והתרבות של אוכלוסיות נמטודות בשיעורים גבוהים תוך חודשים ספורים [3]. מאז הפסקת השימוש במתיל ברומיד לחיטוי קרקע רחב טווח, הפכו נמטודות טפילות לצמחים, ביניהן הנמטודה יוצרת העפצים, לגורם מגביל בגידולי ירקות בבתי צמיחה ובשטח פתוח. דרכים

חדשות להדברה יעילה של נמטודות, הינן הכרח קיומי בחקלאות העכשווית [6-8]. הגישות הזמינות כיום להדברת נמטודות אינן יעילות. נקיטה במחזור גידולים הינה גישה בעייתית, בעיקר בגלל תחום הפונדקאים הרחב של הנמטודות וההתמחות הגידולית של החקלאים. הצורך במציאת פתרונות יעילים דחוף שכן השימוש הנרחב הקיים היום בתכשירים המותרים לחיטוי קרקע כדוגמת 1,3 דיכלורופרופן והשימוש בנמטוצידים כימיים, מהווים פתרון חלקי בחקלאות הקונבנציונאלית. ברם, השפעתם השלילית של חומרים אלו, הן על המשתמש והן על הסביבה, גוררים למכשלות בשימוש או הגבלות חמורות בהיקף יישומם [9,10].

הדברה ביולוגית של נמטודות ע"י פטריות אנדופיטיות. פטריות אנדופיטיות הינן פטריות המקיימות את מרבית או כל מחזור חייהן בתוך הצמח המאחסן מבלי לגרום לתסמינים הנראים לעין. אנדופיטים מקיימים עם הצמח המאחסן יחסים מוטוליסטים (סימביונטיים) בהם הצמח מספק לאנדופיט נישת מחייה ומקור מזון בעוד האנדופיט תורם לצמח במגוון דרכים ביניהן הענקת עמידות כנגד עקות אביוטיות (יובש, חום, מלח ועוד) או נגד עקות ביוטיות (טריפה, מזיקים וגורמי מחלות), עמידות כנגד גורמי מחלות מתרחשת בצורה עקיפה על ידי הפעלת מערכות ההגנה של הצמח על ידי האנדופיט מבלי לגרום לתסמיני מחלה. באופן ישיר, העמידות



איור 2. פטרייה ה *Daldinia sp.* והחומרים הנדיפים המופרשים על ידה כפי שהופרדו ע"י אנליזת GC/MS.

מתקיימת על ידי מספר מנגנונים ביניהם הפרשת חומרים פעילים נגד אורגניזמים אחרים (אנטגוניזם), חומרים אלה פוגעים ישירות בפתוגן או מפעילים את מערכות ההגנה של הצמח ועל ידי כך משפיעים על שמירת מוכנות הצמח כנגד התקפות פתוגנים [11-13]. במסגרת פרויקט שבוצע במעבדתו של ד"ר דוד עזרא, התגלתה פטרייה אנדופיטית ייחודית שהפרישה לסביבתה ריח פירותי חזק. הפטרייה הוגדרה כשייכת למשפחת פטריות רחבה מאוד *Daldinia sp.*, חלקם ידועות כמפרקות עצים מתים [14]. בבחינת האפשרות שהריח נובע מהפרשת חומרים נדיפים בעלי פעילות ביולוגית, התברר לנו שלפטרייה ולחומרים המופרשים ממנה פעילות מרשימה נגד פטריות פתוגניות לצמחים, עד כדי דיכוי גדילתן לחלוטין (Liarzi and Ezra under preparation), מופע הפטרייה ופרופיל החומרים המופרשים ממנה באנליזת GC/MS של חלל האוויר שמעל

הפטרייה מוצגים באיור 2. במהלך פרויקט שמומן על ידי משרד המסחר והתעשייה (קמין) אפיינו את החומרים הנדיפים מהפטרייה ויותר מכך הרכבנו על פי אנליזה זו תערובות נדיפים סינטטיות בעלות פעילות ביולוגית משופרת משל הפטרייה עצמה. השימוש בתערובות נדיפים אלה כמדבירים טבעיים לגורמי מחלות פטרייתיות באחסון, איסום ושימושים נוספים נרשם כפטנט (פטנט מספר US61/989146).

מטרות המחקר

מטרת העל של מחקר זה הינה לנצל את הפוטנציאל הבינומטוצידי הגלום בפטרייה *Daldinia sp.* לפיתוח מוצר שייושם בממשק הדברה משולב כנגד נמטודות בבתי צמיחה תוך ניצול כלים ביוכימיים, מולקולאריים, מיקרוביאליים ונמטולוגיים בסיסיים. מטרת העבודה של שנת הדיווח היחידה של מחקר זה:

1. לימוד השפעת תערובות הנדיפים של *Daldinia sp.* על חיוניות זחלי J2 וביצי נמטודת העפצים.

א. לימוד השפעת זמן חשיפת הזחלים והביצים לתערובות ולמרכיביה על יעילות הקטילה.

ב. לימוד השפעת הרכב החומרים והיחסים ביניהם בתערובת על יעילות הקטילה.

2. קביעת התנאים הדרושים לפעילות נמטוצידיית אופטימאלית של התערובות בקרקע.

א. לימוד השפעת סוג הקרקע על יעילות קטילת נמטודות ע"י התערובות הנדיפות.

ב. קביעת אופן היישום בקרקע להשגת פעילות נמטוצידית אופטימלית של התערובות.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר הרלוונטיות לשנת המחקר

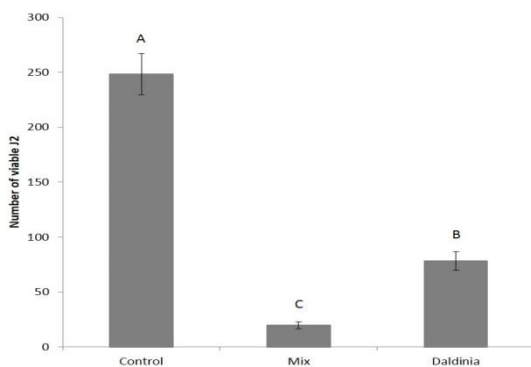
1. לימוד השפעת תערובות הנדיפים של *Daldinia* sp. על חיוניות זחלי J2 וביצי נמטודת העפצים.

לימוד השפעת זמן חשיפת הזחלים והביצים לתערובות על יעילות הקטילה של כל אחת מהתערובות. כל הניסויים בוצעו במשך זמן חשיפה קבוע בן 48 שעות וזאת מכיוון שבתוצאות מוקדמות שהתקבלו נראה שבפרק זמן זה הושגה קטילה של 99% מהנמטודות בניסוי קרקע עם תערובת סינטטית. מכאן, משך זמן של יומיים חשיפה של הנמטודות לנדיפים הינו פרק זמן מספיק לבחינת השפעת הנדיפים על הנמטודות.

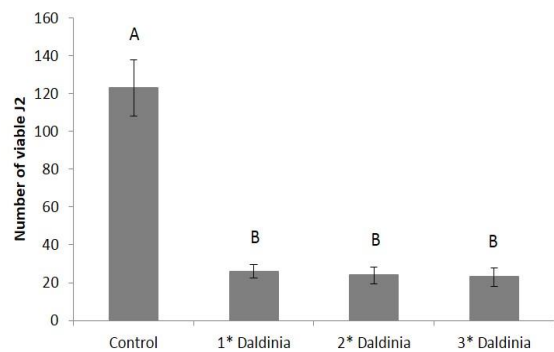
לימוד השפעת הרכב החומרים והיחסים ביניהם בתערובות על יעילות הקטילה.

על מנת לבחון את השפעת הפטרייה עצמה על זחלים בדרגת J2 של הנמטודה *M. javanica* חשפנו את הזחלים לנדיפים של הפטרייה במשך יומיים ולאחר מכן הפרדנו במשך 3 שעות את הזחלים החיים והמתים בעזרת רשת ($25 \mu\text{m}$) המאפשרת מעבר אקטיבי רק של הזחלים החיוניים אותם ספרנו תחת מיקרוסקופ. כפי שניתן לראות באיור 3, חיוניות הזחלים ירדה בשיעור ממוצע של 67% ללא תלות במספר צלחות תרבית הפטרייה.

לשימוש בתערובות נדיפים ישנם יתרונות על פני שימוש באורגניזם השלם כדוגמת: העדר תנאים מגבילים לקיום חיים (טמפרטורה אופטימלית, אספקת חומרי מזון וכ"ו) וכן שליטה מדויקת יותר בריכוזים הרצויים של החומרים הפעילים ללא נוכחות חומרים אחרים העלולים לעכב את הפעולה הרצויה. לכן, בחנו את השפעת תערובת סינטטית, המורכבת מארבעה חומרים אורגנים נדיפים ממקור פטרייתי. יש לציין כי לתערובות זו פעילות ביולוגית חזקה כנגד פטריות פתוגניות לצמחים והינה בעלת יכולת להגן על מוצרי מזון מפני פטריות עובש באחסון (ראה פטנט). כמו כן, ארבעת חומרים אלו אינם מסרטנים ומשמשים בתעשיית המזון. כאשר חשפנו את זחלי הנמטודות הן לפטרייה והן לתערובת הסינטטית למשך יומיים וספרנו את מספר הזחלים החיוניים מצאנו כי התערובת הסינטטית יעילה יותר מהפטרייה – כאשר החשיפה לתערובת העלתה את אחוז התמותה ל – 90% (איור 4).

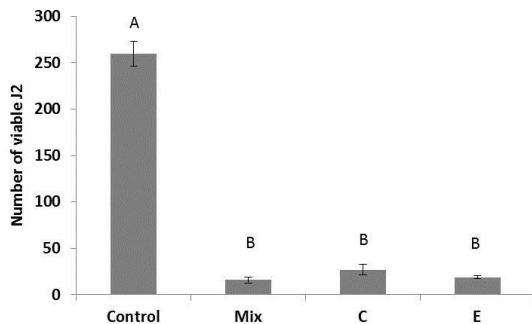


איור 4. השפעת תערובת סינטטית לעומת הפטרייה עצמה על חיוניות זחלים בשלב J2. הניסוי בוצע בשלוש חזרות ביולוגיות שהראו תוצאות דומות, תוצאות מניסוי בודד מוצגות. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים $p < 0.05$.

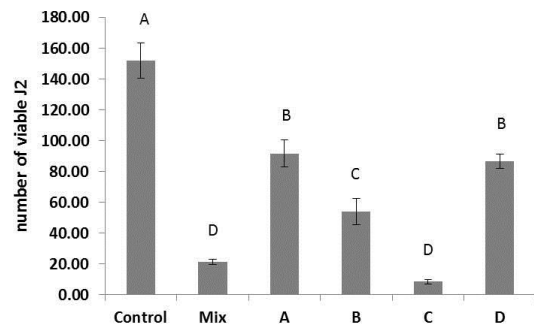


איור 3. השפעת חשיפת זחלי נמטודות J2 לפטרייה *Daldinia* sp. הניסוי בוצע בשלוש חזרות ביולוגיות שהראו תוצאות דומות, תוצאות מניסוי בודד מוצגות. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים $p < 0.05$.

כאמור לעיל, התערובת הסינטטית מורכבת מארבעה חומרים אורגניים נדיפים (A-D). על כן, בכדי ללמוד על התרומה של כל מרכיב לפעילות התערובת, חשפנו את הזחלים במשך יומיים לכל מרכיב מהתערובת בנפרד והשווינו את מספר הזחלים החיים שהתקבלו יחסית לביקורות (זחלים שלא נחשפו לנדיפים וזחלים שנחשפו לתערובת הסינטטית). כפי שניתן לראות באיור 5, כל אחד מארבעת מרכיבי התערובת הפחית באופן מובהק את חיוניות הזחלים, אולם רק חומר C הציג קטילה במידה דומה לתערובת השלמה. בנוסף, בחנו באופן דומה את השפעת תערובת נוספת (תערובת 2), המורכבת משני חומרים נדיפים – חומר C וחומר נוסף (E). על חיוניות הזחלים. כפי שניתן לראות באיור 6, כל מרכיב הפחית את חיוניות הזחלים בצורה דומה לתערובת השלמה.

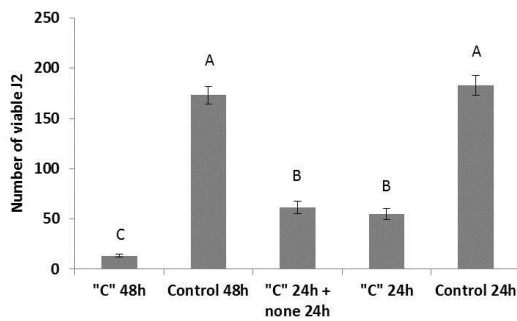


איור 6. השפעת חשיפת זחלי נמטודות J2 לכל אחד משני מרכיבי תערובת סינטטית 2. הניסוי בוצע בשלוש חזרות ביולוגיות שהראו תוצאות דומות, תוצאות מניסוי בודד מוצגות. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים $p < 0.05$.



איור 5. השפעת חשיפת זחלי נמטודות J2 לכל אחד מארבעת מרכיבי התערובת הסינטטית. הניסוי בוצע בשלוש חזרות ביולוגיות שהראו תוצאות דומות, תוצאות מניסוי בודד מוצגות. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים $p < 0.05$.

היות ולחומר C יש את ההשפעה הרבה ביותר על תמותת הזחלים מבין שאר מרכיבי התערובות (איורים 5,6), בחנו האם אופן הפעולה של החומר מדמה נמטוציד או נמטוסטט. לשם כך, חשפנו את הזחלים



איור 7. בחינת סוג ההשפעה נמטוצידי או נמטוסטטית של חומר C על זחלי נמטודה.

לחומר C לפרק זמן של 24 שעות ולאחר מכן העברנו את הזחלים להתאוששות ללא חומר C למשך 24 שעות נוספות וספירת הזחלים החיוניים. כביקורת, הזחלים הודגרו בנוכחות או בהעדר חומר C למשך 24 או 48 שעות לפני ספירת הזחלים החיים. כפי שניתן לראות באיור 7, מספר הזחלים החיים שנחשפו לחומר C במשך 24 שעות היה דומה למספר הזחלים החיים שהתקבלו לאחר 24 שעות חשיפה לחומר C והועברו להתאוששות למשך 24 שעות נוספות בהעדר החומר. תוצאה זו מעידה כי

לא הייתה התאוששות של הזחלים לאחר החשיפה לחומר C. מכאן ניתן להסיק כי חומר C הינו נמטוציד. כצפוי, חשיפה של הזחלים לחומר C למשך 24 או 48 שעות גרמה לירידה מובהקת במספר הזחלים החיים יחסית לביקורות המתאימות, אולם השפעה זו הייתה הרבה יותר משמעותית לאחר חשיפה ל – 48 שעות.

בנוסף, בחנו את השפעת הפטרייה והתערובת הסינטטית על בקיעת ביצים של הנמטודה. לשם כך, חשפנו ביצים למשך יומיים לפטרייה או לתערובת הנדיפים, לאחר מכן הושם התרחיף המכיל ביצים וזחלים על מסננים למשך 3 שעות כך שהזחלים החיים יצאו מהמסנן והביצים יישארו על המסנן. לאחר מכן הדגרנו

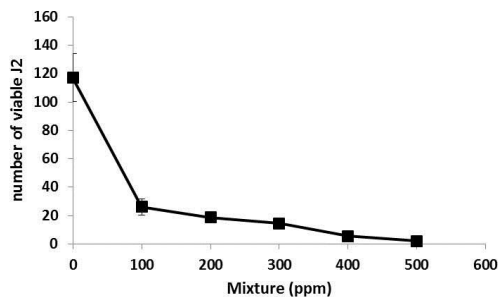
את המסנן עם הביצים למשך יומיים נוספים עבור בקיעה. בתום הזמן ספרנו את מספר הזחלים החיים שבקעו מביצים שנחשפו למשך כל התקופה (יומיים) לנדיפים. שיטה זו מאפשרת למעשה לבודד את ההשפעה של התערובת על תהליכי הבקיעה בלבד. כפי שניתן לראות באיור 8, מספר הזחלים החיים שבקעו מביצים שנחשפו לפטרייה לא היה שונה מהביקורת, אולם בנוכחות התערובת הסינטטית הייתה ירידה של 87% במספר הזחלים החיים שהתקבלו. מכאן ניתן להסיק כי בדומה לתוצאות הקודמות, לתערובת הסינטטית, אך לא לפטרייה, השפעה מובהקת על בקיעת הביציים של *M. javanica*.

2. קביעת התנאים הדרושים לפעילות נמוצידיית אופטימלית של התערובות בקרקע

לימוד השפעת סוג הקרקע על יעילות קטילת נמוטודות ע"י התערובות הנדיפות

במסגרת המחקר הנוכחי, הסתמכנו על תוצאות שהתקבלו במחקר מקביל, וכל הניסויים בוצעו באדמת חמרה מכיוון שבאדמה זו נישאות הנדיפים הינה הרבה ביותר, כפי שנמצא בניסויים מקדימים שבוצעו על פטריית קרקע (Liarzi and Ezra under preparation).

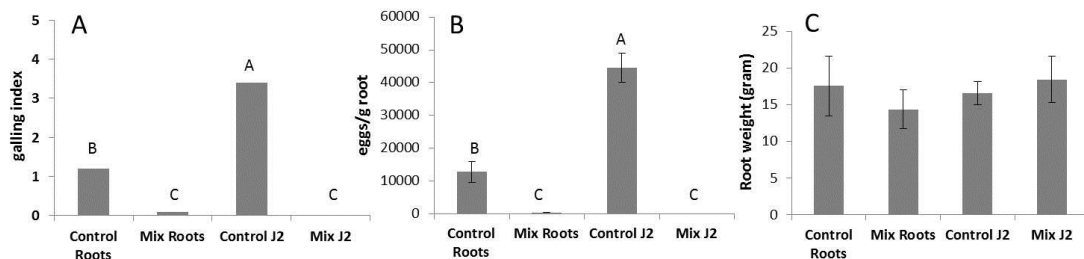
קביעת אופן היישום בקרקע להשגת פעילות נמוצידיית אופטימלית של התערובות



איור 9. השפעת חשיפת זחלי נמוטודות J2 לריכוזים שונים של תערובת סינטטית בקרקע.

בכדי לבחון את אופן היישום של התערובת הסינטטית למניעת התפתחות מחלה, בדקנו תחילה האם התערובת הסינטטית משפיעה על חיות הזחלים בקרקע. לשם כך, ערבבנו אדמת חמרה עם ריכוזים עולים של תערובת, שהוטענה על חלקיקי פרלייט (perlite), בנוכחות זחלי J2 של הנמוטודה. כפי שניתן לראות באיור 9, יישום התערובת הפחית באופן מובהק את חיוניות הזחלים כבר מריכוז של 100 ppm. תוצאה זו מעידה כי התערובת הסינטטית יעילה כנגד נמוטודות גם בקרקע, וכן כי יישום באמצעות פרלייט אינו גורע מפעילות זו.

בשלב הבא, בחנו את יכולת התערובת הסינטטית למנוע סימני מחלה בצמחים רגישים. לשם כך, ערבבנו אדמת חמרה, תערובת סינטטית ונמוטודות (בשני סוגי אילוח: זחלים או תערובת שורשים המכילה ביצים של נמוטודות) ולאחר 3 ימים שתלנו שתילי עגבנייה רגישים. לאחר 8 שבועות מופע נוף הצמחים הוערך ויזואלית ומערכת השורשים נחשפה לצורך לקיחת מדדי נגיעות בשורשים שכללו קביעת אינדקס עפצים, חישוב מספר ביצים לגרם שורש ושקילת השורשים. מצאנו כי נוכחות התערובת הסינטטית הפחיתה באופן מובהק את אינדקס העפצים ואת מספר הביצים לגרם שורש יחסית לצמחי ביקורת שלא נחשפו לנדיפים, ללא השפעה מובהקת על משקל השורשים (איור 10).



איור 10. השפעת התערובת הסינטטית על התפתחות מחלה בצמחי עגבניות מאולחים. A. אינדקס עפצים. B. מספר ביצים לגרם שורש. C. משקל השורשים. Control roots – אדמה מאולחת עם תרחיף שורשים הנושאים כ- 4000 ביצים של *M. javanica* – Mix roots. אדמה מאולחת עם תרחיף השורשים בנוכחות תערובת הנדיפים הסינטטית. Control J2 – אדמה מאולחת ע"י הוספה ישירה של 4000 זחלים בדרגה J2. Mix J2 – אדמה מאולחת עם זחלים בנוכחות התערובת הסינטטית. האותיות על העמודות מייצגות שונות סטטיסטית על פי מבחן 1-way Anova עם Tukey-Kramer post-test ($F < 0.0001$). עבור משקל השורשים לא התקבלה שונות סטטיסטית מובהקת בין הטיפולים ($p > 0.01$).

המבוססת על ארבעה חומרים אורגניים נדיפים שמפרישה הפטרייה *Daldinia spp.*, יכולים לשמש ככלי נוסף במרוץ החימוש כנגד נמטודה יוצרת העפצים.

דיון

במהלך שנת המחקר מצאנו כי הן לפטרייה והן לשתי תערובות סינטטיות של חומרים נדיפים המופרשים ע"י הפטרייה השפעה שלילית על חיוניות זחלים בדרגה J2 של נמטודת יוצרת העפצים *M. javanica* (איורים 3-4, 6). כמו כן, הראנו עבור התערובת הסינטטית כי: (a) כל אחד מארבעת מרכיביה מוביל לתמותה של הזחלים (איור 5), (b) אחד ממרכיביה (חומר C) הינו בעל פעילות נמטוצידית (איור 7), (c) התערובת פעילה גם על שלב הביצים של הנמטודה (איור 8), (d) התערובת פעילה גם באדמת חמרה (איור 9) ו- (e) יישום התערובת באדמה מאולחת בנוכחות צמחי עגבניות רגישים הפחית התפתחות המחלה כפי שנבחן באינדקס עפצים ומספר ביצים לגרם שורש (איור 10). אולם, בהתחשב בעובדה כי הצעה זו מומנה רק לשנה אחת לבחינת היתכנות, ניתן להסיק כי תוצאות אלו תומכות בהתכנות של השימוש בפטרייה ו/או בחומרים כמדביר אך יש צורך בקיום ניסויים נוספים (כפי שפורטו בהצעה המלאה) בכדי לנסח הצעות ליישום מעשי של תוצאות המחקר.

שימוש בפטריות כמדבר ביולוגי של נמטודות טפילות לצמחים הינו ידוע בספרות (15-18). פורסמו גם עדויות לפטריות אנדופיטיות בעלות פעילות נמטוצידית (19-20). בנוסף, יושמו תערובת נדיפים ממקור פטרייתי כנגד נמטודות יוצרות עפצים בניסויי חממה (20, 21). המנגנון שבאמצעותו *Daldinia sp.* גורמת לתמותה של הזחלים אינו ידוע. למידה על מנגנון זה, תוך שימוש בנמטודת המודל *Caenorhabditis elegans* לזיהוי מוטנטים עמידים לנדיפי הפטרייה והתערובת הסינטטית (מטרה 3 בהצעה המלאה), ייסייעו בפיצוח מנגנון הפעולה וביישום נכון ויעיל יותר של התכשיר.

תמותת הזחלים לאחר חשיפה לתערובת הסינטטית היה גדול יותר יחסית לפטרייה עצמה (איור 4). תופעה זו נצפתה גם בספרות (20). הסבר אפשרי הוא שהתערובת הסינטטית מכילה ריכוזים גבוהים יותר של הנדיפים מאשר אלו המופרשים באופן טבעי ע"י הפטרייה. אפשרות נוספת היא שתערובת הנדיפים אינה מכילה חומרים אחרים אשר יכולים להפריע לפעילות הנמטוצידית וקיימים בפטרייה. לתערובת הסינטטית יש יתרון נוסף ביישום מכיוון שריכוזי החומרים הינם קבועים ואילו ייצור מטבוליטים שניוניים בפטרייה הינו משתנה ומבוקר כחלק מתהליכי התפתחות הפטרייה (22). בנוסף, כאמור לעיל, שימוש בפטרייה הינו כפוף בשמירה על תנאים תומכי חיים, דבר העלול להוות מגבלה.

לסיכום, תוצאות עבודה זו מוכיחות כי קיים בסיס חזק לשימוש בתערובת הסינטטית ליישום בחקלאות. ניסויים נוספים (כפי שהוצעו בהצעה המלאה) יחד עם שימוש במוטנטים של נמטודת המודל *C. elegans*, הפגועים במסלולים עצביים שונים, יאפשרו קביעת שיטת היישום המתאימה לקבלת תוצאות מיטביות.

רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים

פרסומים בכתב

2. P. Bucki, O. Liarzi, D. Ezra and S. Brown Horwitz (2015) The activity of *Daldinia concentrica*, an endophytic fungus, and its bioactive volatiles against the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytoparasitica* **43**: 375-376. Abstracts of presentations at the 36th Congress of the Israeli Phytopathological Society.

פרסומים בעל פה

3. פעילות הפטרייה האנדופיטית *Daldinia concentrica* ותוצריה הנדיפים כנגד נימית עפצים *Meloidogyne javanica*. בוקי פ. ליארזי א. עזרא ד ובראון הורוביץ ס. הרצאה במסגרת הועידה ה – 36 של העמותה הישראלית למחלות צמחים, 10-11.2.2015, מכון וולקני, בית דגן.
4. שימוש בפטרייה האנדופיטית *Daldinia concentrica* ובתוצריה הנדיפים נגד נמטודות. ליארזי א. בוקי פ. גימיר ב. בראון מיארה ס ועזרא ד. הרצאה במסגרת הועידה ה – 37 של העמותה הישראלית למחלות צמחים, 8-9.2.2016, מכון וולקני, בית דגן.

פטנט

2. USE OF THE FUNGUS *DALDINIA CONCENTRICA* FOR BIOLOGICAL CONTROL – Provisional patent.

1. Huang X, McGiffen M, Kaloshian I (2004) Reproduction of *Mi*-Virulent *Meloidogyne incognita* Isolates on *Lycopersicon* spp. *Journal of Nematology* 36: 69-75.
2. Koenning SR, Overstreet C, Noling JW, Donald PA, Becker JO, et al. (1999) Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. *Journal of Nematology* 31: 587-618.
3. Agrios G (2005) Plant diseases caused by nematodes. *Plant pathology*. pp. 825-874.
4. Abad P, Williamson V (2010) Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Advances in Botanical Research* 53: 147-192.
5. Djian-Caporalino C, Molinari S, Palloix A, Ciancio A, Fazari A, et al. (2011) The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. *Eur J Plant Pathol* 131: 431-440.
6. Hussey RS, Janssen GJWPI, eds., (2002) Root-knot nematodes: *Meloidogyne species*. In: Starr JL, Cook R, Bridge J, editors. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
7. Taylor AL, Sasser JN (1978) *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*: Raleigh: North Carolina State University Graphics.
8. Wyss U, (1997) Root parasitic nematodes: an overview. In: Fenoll C, Grundler FMW, Ohl SA, editors. *Cellular and molecular aspects of plant-nematode interaction*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 5-22.
9. Agrios GN (1997) Plant diseases caused by nematodes. In: Agrios GN, editor. *Plant Pathology*. San Diego cap.15: Academic Press. pp. 565-597.
10. Oka Y, Offenbach R, Pivonia S (2004) Pepper Rootstock Graft Compatibility and Response to *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. *Journal of Nematology* 36: 137-141.
11. Anke H, Stadler M, Mayer A, Sterner O (1995) Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Canadian Journal of Botany* 73: 932.
12. Lirazi O, Ezra D (2013) Endophyte-mediated biocontrol of herbaceous and non-herbaceous plants. In: Verma VC, Gange AC, editors. *Advances in Endophytic Research*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag (Pvt.) Ltd. pp. 1-51.
13. McAfee BJ, Taylor A (1999) A review of the volatile metabolites of fungi found on wood substrates. *Nat Toxins* 7: 283-303.
14. Quang DN, Lam DM, Hanh NT, Que do D (2013) Cytotoxic constituents from the fungus *Daldinia concentrica* (Xylariaceae). *Nat Prod Res* 27: 486-490.
15. AgbeNiN NO (2011) Biological control of plant parasitic nematodes: Prospects and Challenges for the Poor Africa Farmer. *Plant Protection Science* 47: 62-67.
16. Lamovšek J, Urek G, Trdan S (2013) Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): microbes against the pests. *Acta agriculturae Slovenica* 101: 263-275.
17. Moosavi MR, Zare R (2012) Fungi as biological control agents of plant-parasitic nematodes. *Plant Defence: Biological Control: Springer*. pp. 67-107.
18. Siddiqui ZA, Mahmood I (1996) Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technology* 58: 229-239.
19. Riga E, Lacey LA, Guerra N (2008) *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biological Control* 45: 380-385.

20. Grimme E, Zidack N, Sikora R, Strobel G, Jacobsen B (2007) Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant disease* 91: 220-225.
21. Freire E, Campos V, Pinho R, Oliveira D, Faria M, et al. (2012) Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. *Journal of nematology* 44: 321.
22. Bayram Ö, Braus GH (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS microbiology reviews* 36: 1-24.

טופס סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. מטרת העל של מחקר זה הינה לנצל את הפוטנציאל הבינומטוצידי הגלום בפטרייה *Daldinia* sp. לפיתוח מוצר שייושם בממשק הדברה משולב כנגד נמטודות בבתי צמיחה תוך ניצול כלים ביוכימיים, מולקולאריים, מיקרוביאליים ונמטולוגיים בסיסיים. מטרת העבודה של שנת הדיווח היחידה של מחקר זה: 1. לימוד השפעת תערובות הנדיפים של *Daldinia* sp. על חיוניות זחלי J2 וביצי נמטודת העפצים זאת ע"י: א. לימוד השפעת זמן חשיפת הזחלים והביצים לתערובות ולמרכיביה על יעילות הקטילה. ב. לימוד השפעת הרכב החומרים והיחסים ביניהם בתערובות על יעילות הקטילה. 2. קביעת התנאים הדרושים לפעילות נמטוצידיות אופטימאלית של התערובות בקרקע זאת ע"י: א. לימוד השפעת סוג הקרקע על יעילות קטילת נמטודות ע"י התערובות הנדיפות. ב. קביעת אופן היישום בקרקע להשגת פעילות נמטוצידית אופטימלית של התערובות.

עיקרי התוצאות

במהלך שנת המחקר מצאנו כי הן לפטרייה והן לשתי תערובות סינטטיות של חומרים נדיפים המופרשים ע"י הפטרייה השפעה שלילית על חיוניות זחלים בדרגה J2 של נמטודת יוצרת העפצים *M. javanica*. כמו כן, הראנו עבור התערובת הסינטטית כי: (a) כל אחד מארבעת מרכיביה מוביל לתמותה של הזחלים, (b) אחד ממרכיביה (חומר C) הינו בעל פעילות נמטוצידית, (c) התערובת פעילה גם על שלב הביצים של הנמטודה (d) התערובת פעילה גם באדמת חמרה (1 – e) יישום התערובת באדמה מאולחת בנוכחות צמחי עגבניות רגישים הפחית התפתחות המחלה כפי שנבחן באינדקס עפצים ומספר ביצים לגרם שורש.

מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח ?

בהתחשב בעובדה כי הצעה זו מומנה רק לשנה אחת לבחינת היתכנות, ניתן להסיק כי תוצאות אלו תומכות בהתכנות של השימוש בפטרייה ו/או בחומרים כמדביר אך יש צורך בקיום ניסויים נוספים (כפי שפורטו בהצעה המלאה) בכדי לנסח הצעות ליישום מעשי של תוצאות המחקר.

בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה, התייחסות המשך המחקר

תוצאות עבודה זו מוכיחות כי קיים בסיס חזק לשימוש בתערובת הסינטטית ליישום בחקלאות. ניסויים נוספים (כפי שהוצעו בהצעה המלאה) יחד עם שימוש במוטנטים של נמטודת המודל *C. elegans*, הפגועים במסלולים עצביים שונים, יאפשרו קביעת שיטת היישום המתאימה לקבלת תוצאות מיטביות.

בנוסף מעורבותו של פרופ' אברהם גמליאל מחדדת היבטים הקשורים ליישום התערובת בחלקות נגועות.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: בשלב זה מידע אודות מרכיבי התערובת הפעילה חסוי. במצגות שניתנו בכנסים בתחום לא ניתן פירוט לגבי מרכיבי התערובת. פרסום מדעי שיישלח בקרוב וכן במסגרת הדוח מותנה באישור קידום

פרסום הדו"ח: אני ממליצה לא לפרסם את הדו"ח כל עוד לא התקבל provisional patent

האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי תוכנית הוגשה והתקבלה למימון