

דו"ח לתוכנית מחקר מספר 15-1728-131

דו"ח מסכם שנת מחקר שלישית מתוך שלוש שנים

## גישות חדשות ומשולבות להדברת נמטודות טפילות על צמחים במטעים נשירים ובפלפל

New approaches for developing combined nematode control in Bell Pepper (*Capsicum annuum*) crop and deciduous orchards

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

**סיגל בראון-מיארה** (היחידה לנמטולוגיה, מינהל המחקר החקלאי) – מרכזת המיזם, ([sigalhor@agri.gov.il](mailto:sigalhor@agri.gov.il)), לימוד ואפיון אוכלוסיות של הנמטודות ושילוב עמידויות נגדן. **אילן פארן**, השבחה בפלפל, המחלקה לחקר ירקות, מינהל המחקר החקלאי. **אברהם גמליאל**, חיטוי קרקע וסניטציה, המכון להנדסה חקלאית, מינהל החקר החקלאי. **מרינה בניחיס**, עוזרת מחקר במשרה קבועה, אחראית על אנליזת דגימות תכשירים, המכון להנדסה חקלאית, מינהל החקר החקלאי. **דרור מינץ**, מיקרוביולוגיה של אוכלוסיות חיידקים בקרקע, המכון לקרקע ומים, מינהל המחקר החקלאי. **תמר אלון**, מדריכה אזורית להגנה"צ בבקעת הירדן, שירות ההדרכה והמקצוע, משרד החקלאות. **סבטלנה דוברינין**, מדריכה אזורית להגנה"צ נגב וערבה, שירות ההדרכה והמקצוע, משרד החקלאות. **נטע מור**, מדריכה אזורית להגנה"צ בשרון, שירות ההדרכה והמקצוע, משרד החקלאות. **שפיגל יצחק**, שילוב גישות בהדברה ביולוגית, היחידה לנמטולוגיה, מינהל המחקר החקלאי. **יוג'י אוקה**, שילוב גישות בהדברה ביולוגית, מרכז מחקר גילת, מינהל המחקר החקלאי. **איתמר גלזר**, שילוב גישות בהדברה ביולוגית, היחידה לנמטולוגיה, מינהל המחקר החקלאי. **שולה מנוליס**, לאורה צ'לופוביץ, השפעת גומלין נמטודות-אגרובקטריום, המחלקה לפתולוגיה, מנהל המחקר החקלאי. **דורון הולנד**, השבחת מטעים נשירים, מרכז מחקר נוה יער, מינהל המחקר החקלאי. **שמעון אנטמן**, ממ"ר ארצי נשירים, שירות ההדרכה והמקצוע, משרד החקלאות. **משה אלבז**, ליאנה גנות, הצבת ניסויי הזנה, איסוף וניתוח נתונים, חוות הבשור, מו"פ דרום, החברה הכלכלית לפיתוח אשכול. **אורי ירמיהו**, חגי יסעור, השפעת הזנה על נגיעות בנמטודות, מרכז מחקר גילת, מינהל המחקר החקלאי.

**Sigal Brown Miyara**, Entomology and units of Nematology and Chemistry; ARO, Volcani Center; [sigalhor@agri.gov.il](mailto:sigalhor@agri.gov.il) **Ilan Paran**, Plant Sciences, Vegetable Research; ARO, [iparan@volcani.agri.gov.il](mailto:iparan@volcani.agri.gov.il); **Yuji Oka**, Gilat Center, Nematology, ARO, [okayuji@volcani.agri.gov.il](mailto:okayuji@volcani.agri.gov.il); **Abraham Gamliel**, Agricultural Engineering, Growing,

Production and Environmental Engineering; ARO, [agamliel@volcani.agri.gov.il](mailto:agamliel@volcani.agri.gov.il); **Itzhak Spiegel**, Plant Protection, Entomology and the Nematology and Chemistry units ,ARO, [spiegely@volcani.agri.gov.il](mailto:spiegely@volcani.agri.gov.il); **Itamar Glazer**, Plant Protection, Entomology and the Nematology and Chemistry units ,ARO, [glazerit@volcani.agri.gov.il](mailto:glazerit@volcani.agri.gov.il); **Uri Yermiyahu**, Soil and Water, Gilat Center, ARO, [uri4@volcani.agri.gov.il](mailto:uri4@volcani.agri.gov.il); **Hagai Yasuor**, Vegetables and Field Crops; Gilat Center, ARO, [hagai@volcani.agri.gov.il](mailto:hagai@volcani.agri.gov.il); **Neta Mor**, [netmor56@gmail.com](mailto:netmor56@gmail.com), The Agricultural Extension Service of Israel; **Tamar Alon**, [tamalon@moag.gov.il](mailto:tamalon@moag.gov.il), The Agricultural Extension Service of Israel; **Svetlana Duvrinin** , [svetyd@gmail.com](mailto:svetyd@gmail.com), The Agricultural Extension Service of Israel; **Shulamit Manulis-Sasson**, Plant Protection, Plant Pathology and Weed Research; ARO, [shulam@volcani.agri.gov.il](mailto:shulam@volcani.agri.gov.il); **Laura Chalupowich**, Plant Protection, Plant Pathology and Weed Research, ARO, [laura@volcani.agri.gov.il](mailto:laura@volcani.agri.gov.il); **Marina Benichis**, Agricultural Engineering, Growing, Production and Environmental Engineering; ARO, [marinab@volcani.agri.gov.il](mailto:marinab@volcani.agri.gov.il); Doron Holland, Newe Ya'ar, Research teams- Newe Yaar ,ARO, [yhhollan@volcani.agri.gov.il](mailto:yhhollan@volcani.agri.gov.il); Liana Ganot Mop Darom [lianaaaa@bezeqint.net](mailto:lianaaaa@bezeqint.net); Moshe Elbaz, Mop Darom [elbazmoshe7@gmail.com](mailto:elbazmoshe7@gmail.com)

## תקציר

**הצגת הבעיה.** נמטודות יוצרת העפצים *Meloidogyne spp.*, הן נמטודות אנדופריטיות ביטורפיות התוקפות שורשים של מגוון צמחים רחב ובכללם גידולים חקלאיים רבים ובכך נמנות עם פגעי הקרקע הקשים ביותר בגידול ירקות בארץ ובעולם. אפשרויות השימוש בנמטוצידים כימיים הולכות ומצטמצמות, וזאת בעקבות רגולציה מחמירה של שימוש בחומרים אלו. בשנים האחרונות הבעיה אף מחמירה ביותר וזאת בשל יציאתם משימוש של חומרים יעילים ומאידך תחזיות ליציאתם משימוש של תכשירים נוספים תוך פרקי זמן קצרים, עובדות המחייבות חיפוש פתרונות הולמים לבעיית הנמטודות. המיזם המתואר כאן כלל מחקר בשני גידולים עיקריים האחד בבתי צמיחה – פלפל והשני במטעים - שקדים כאשר המשותף לשניהם הוא התמודדות עם בעיית הנמטודות, בגישה אינטגרטיבית רב-תחומית. **מטרות המחקר א)** פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים **ב)** פיתוח שיטות מתקדמות והדירות לזיהוי וניטור נמטודות בקרקע **ג)** התאמת מקורות עמידות לאוכלוסיות הפתוגן בפלפל המצויות בארץ ושימוש מושכל בהן **ד)** התאמת מקורות עמידות של כנות גלעניים, בדיקת ביצועיהן והערכת

כדאיותן הכלכלית ה) פיתוח ממשק יישומי להתמודדות עם נמטודות עפצים המבוסס על הזנה בגידול פלפל, תוך הבנת חשיבותו של חנקן ביחסי נמטודה צמח פונדקאי. ו) פיתוח תכשירים על בסיס הדברה ביולוגית כנגד נמטודות בחקלאות האורגנית. **שיטות העבודה.** מאופיו של המחקר האינטגרטיבי נכללות בו גישות חקלאיות, שיטות נמטולוגיות מסורתיות ושיטות נמטולוגיות מולקולאריות. **תוצאות עיקריות.** גובש ממשק הדברה משולב המספק מענה לשתילה בחלקות עם רקע של נגיעות גבוהה בנמטודת יוצרת העפצים תוך שילוב יישום אוריאה פוספיט התורם לצמצום הנגיעות בנמטודת העפצים. כוילה מערכת מהימנה, הדירה ומהירה המתבססת על qRT-PCR לזיהוי איכותי וכמותי של נמטודות. נלמדה תגובת כנות שקדים חדשות לנמטודות, כושר ביצוע הכנות עם שני רוכבים שונים ממשיך להיחקר ונלמדה השפעת הגומלין בין נמטודת העפצים והחיידק אגרובקטריום גורם מחלה קשה אף הוא בגלעיניים. נחקרה האינטראקציה של מקורות העמידות בפלפל *Me1*, *Me3* ו-*N* עם אוכלוסיות *M. incognita* מייצגות שנאספו במסגרת המיזם. הוערכה תגובת מקורות העמידות לאוכלוסיות השונות שבודדו ונלמדה מידת השפעת הרקעים הגנטיים עבור הגנים הפוטנציאליים. בנוסף השפעת הזנה חנקנית על נגיעות בנמטודות נלמדה על שני זני פלפל והוכחה כגישה אפשרית לצמצום הנגיעות של בית השורשים. במסגרת פרק הפיתוח של הנמטודה הטורפת כמדביר ביולוגי כנגד נמטודות, נלמד כושר ההישרדות של הנמטודה בקרקעות שונות, השפעת החיידקים הנלווים על הישרדותה ומשיכתה לטרף שקי הביצים של נמטודת העפצים נלמדה, מידע זה סייע בשנה החולפת בהכוונת השימוש בנמטודה *Koernaria sudhausi* כמדביר ביולוגי, וסיפק נתונים שהיוו בסיס לקבלת פרויקט קמין. **מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות.** תוצאות שהצטברו במסגרת המיזם מועברות באופן שוטף במסגרת ימי עיון וימי סיכום ודיווח של שולחנות מגדלי פלפל ושקדים ושל תחום הגנת הצומח. בנוסף המידע מועבר לחקלאים באופן ישיר בתיאום עם מדריכות הגנה"צ ישירות. בנוסף מאמרים בעיתונות המבוקרת הנגזרים מהתוצאות שהושגו נמצאים בשלבי הכנה.

#### מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. פרופ' ברוך סנה
2. פרופ' יעקוב קטן
3. דר סטנלי פרימן

#### הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים

החוקר האחראי: סיגל בראון מיארה



\_\_\_\_\_  
החוקר:

חתימת

**20.3.16** תאריך:

### רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

Brown, S., Bucki, P. and Pharan, I. 2014. Studying the Responses of Pepper Genotypes to Avirulent and Virulent *Meloidogyne incognita* Isolates Occurring in Israel. Journal of Nematology 46:141-141.

Gamliel, A. 2014. Phase-out of methyl bromide and nematode management: achievements and future challenges. Journal of Nematology 46:166.

Fatta Bahadur Gurung. 2013. Master Thesis, Laboratory and field studies on the biocontrol agent the predatory nematode *Koerneria sudhausi* (Nematoda: Diplogastridae), Tutor: Sigal Brown Miyara, Ph. D. & Prof. Yitzhak Spiegel

דניאל שטריקר. 2016. עבודת מחקר לתואר שני, יישום גישה מערכתית להתמודדות עם נמטודות יוצרות עפצים בגידול פלפל. תחת ההנחייה: פרופ' אברהם גמליאל ודר בראון סיגל תוגש בחודש הקרוב

פרסומים נוספים נמצאים בשלבי הכנה מתקדמים

## תוכן עניינים

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. מבוא .....                                                                                            | 5  |
| 2. מטרות שהוצבו במסגרת המיזם .....                                                                       | 9  |
| 3. פירוט עיקרי הניסויים לפי המטרות המקוריות ותתי המטרות הנגזרות בהתאם לכל קבוצת מחקר .....               | 10 |
| 3.1. פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים .....                 | 10 |
| 3.2. התאמת מקורות עמידות לאוכלוסיות הפתוגן בפלפל ופיתוח השימוש בהן .....                                 | 21 |
| 3.3. התאמת מקורות עמידות של כנות גלעיניים, בדיקת ביצועיהן והערכת כדאיותן הכלכלית .....                   | 30 |
| 3.4. השפעת הגומלין בין החיידק <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ונמטודת יוצרת העפצים בכנות גלעיניים ..... | 36 |
| 3.5. הדברה ביולוגית של נמטודות טפילות לצמחים באמצעות הנמטודה הטורפת <i>Koerneria sudhausi</i> .....      | 41 |
| 3.6. פיתוח ממשק יישומי להתמודדות עם נמטודות עפצים המבוסס על הזנה בגידול פלפל .....                       | 47 |
| 4. רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים .....                                                                  | 55 |
| 5. ביבליוגרפיה .....                                                                                     | 55 |
| 6. תוספות נדרשות ממחקרים אינטגרטיביים .....                                                              | 59 |
| 6.1 דיון וסיכום כיצד שילוב התוצאות של קבוצות המחקר הביא את המיזם לקראת מימוש יעדיו .....                 | 59 |
| 6.2 סיכום קצר של תתי הקבוצות .....                                                                       | 59 |
| 7. טופס סיכום עם שאלות מנחות .....                                                                       | 65 |

## 1. מבוא

נמטודות טפילות לצמחים פוגעות במגוון רחב של גידולים ונחשבות לאחד ממזיקי החקלאות החשובים בעולם (Perry et al. 2009; Abad and Williamson, 2010). קצב הריבוי הגבוה של הנמטודה מתבטא בצפיפות אוכלוסייה גבוהה של עד מיליוני פרטים אשר נמצאים באסוציאציה עם השורשים (Melakeberhn, 1997; Perry et al., 2009; Agrios, 1997). רמת טפילות שכזו על מערכת השורשים משפיעה על הובלת מים, קליטת חומרי הזנה, מובילה למניפולציית מסלולים הורמונאליים בצמח, סינתזה של כלורופיל, ותהליכי פוטוסינתזה ונשימה. סימני הנזק הנראים על צמח ששורשיו מאוכלסים בנמטודות עפצים מתבטאים בהצהבת קודקודי הצמיחה, עיכוב בהתפתחות, ירידה בטורגור, נבילה ופחיתה בכמות ואיכות היבול (Melakeberhn 2004). הנזק הכלכלי הנגרם בגין נמטודות טפילות על צמחים רב ביותר: לפי הערכות שעור הנזק הינו כ-20% מסך הנזק הנגרם בגין מחלות צמחים. כיום הדברת נמטודות מבוססת על תכשירים כימיים המשמשים לחיטוי קרקע טרום שתילה וחומרים הניתנים במהלך הגידול. לחיטוי קרקע מקובל כיום שימוש נרחב בתרכובות המבוססות על תכשיר החיטוי Dichloropropane 1,3. חומרים

הניתנים במהלך הגידול משתייכים לקבוצות כימיות כגון: זרחנים אורגנים (Organophosphates), פחמימן כלורים (Organochlorides) וקרבמטים (Carbamates). תכשירים אלה על נגזרותיהן מבוססים על שיבוש מערכות עצביות של התולעת. ההתוויה של שימוש בחומרים אלו מצוייה תחת רגולצייה מחמירה ושוק החומרים הזמינים והמותרים לשימוש מדלדל ומתרוקן. כיום למעשה נותרו תכשירים מועטים, ופיתוח תכשירים חדשים מוגבל ביותר. בארץ נפוצות במיוחד הנמטודות יוצרות העפצים מהסוג *Meloidogyne*, שהן נמטודות רב-פונדקאיות, ישובות בתוך השורשים ולכן הדברתן קשה במיוחד. נמטודות אלו נחשבות בארץ כגורם כלכלי מגביל בגידולי ירקות, פרחים ועצי-פרי. בנוסף, התנאים האקלימיים השוררים בארץ, התאמת הקרקעות, יציאתם המתמדת משימוש של חומרים נמטוצידים רעילים לאדם ולסביבה ומקורות מידבק מגוונים מובילים להתפשטות והתבססות נמטודות מסוג זה בשטחי הגידול. הדבקה בנמטודות העפצים תוצאתה בריבוי עצום של הנמטודות במשך עונת גידול, דבר הפוגע ישירות בתפקוד מערכות ההובלה, ומכאן לעיכוב משמעותי בגדילה, לפחיתה ניכרת ביבול ולהפסדים עצומים. אכלוס השורשים בעומק מאפשר את הישרדותן בין העונות ומדגיש את היותן בלתי ניתנות להדברה. הנזק גדל והולך בשנים האחרונות במיוחד בשל האיסור ההולך וגובר שחל, בחקלאות הקונבנציונאלית, על השימוש בכימיקאלים כנמטוצידים, ומאידך בהופעת אוכלוסיות נמטודות שוברות עמידות הנגרמת בשל שימוש אינטנסיבי במעט מקורות זמינים לעמידות (Williamson et al., 1994, 1998; Castagnone-Sereno, P. 2002; Cortada et al., 2009).

במיזם זה עיקר המחקר הופנה לגידול פלפל (כנציג הירקות ובכירותו כגידול מרכזי לייצוא ולשוק המקומי התופס מקום נכבד) ולעצי פרי גלעיניים (שקד ואפרסק) כגידולים מרכזיים המופנים הן לשוק המקומי והן לייצוא, בעלי רגישות חזקה לנמטודות, בעיקר בשטחים שוליים. פלפל, הינו ענף יצוא מרכזי מבין הגידולים החקלאיים בערבה, למרות שבימים אלו נמצא בתחילת התאוששות ממשבר בעקבות שינויים במטבע הרוסי ותחרות של התוצרת המגיעה מספרד, מקסיקו, מרוקו והולנד, שיפור יעילות הגידול וחסינותו למחלות הנגרמות ע"י נמטודות יוכל למרב את רווחיות הענף. אחד מפגעי הקרקע הקשים ביותר בגידול פלפל בארץ ובעולם הוא נמטודת העפצים *Meloidogyne spp.* כאשר בארץ הנמטודה הגורמת למחלה שייכת למין *M. incognita*. בחקלאות הקונבנציונאלית, הודברו בעבר הנמטודות ביעילות רבה ע"י חיטוי קרקע במתיל ברומיד (מ"ב). אולם העדר חלופות מתאימות מזה מספר שנים מאז יציאתו של מ"ב מהווה מכשול עיקרי כיום בקבלת גידול פלפל חופשי מנמטודות. בנוסף סריקות לעמידות של זנים שונים של פלפל הנמכרים ע"י חברות זרעים כזרעים 'עמידים' לכאורה אינם מציגים עמידות (Oka et al., 2004).

במטעים גלעיניים הנזק הנגרם מזוהה לרוב עם האטה בהתפתחות העץ, הפחתה ניכרת ביבול ובהמשך התהליך אף ניוון ענפים ותמותת העץ. ההשקעה במטע והרווח הנגזר הוא פונקציה של יבול גבוה, ולכן

נגיעות בנמטודות מפחיתה מרווחיותו של המטע באופן ניכר. כיום הכנה המסחרית לשקד GF.677 אינה נותנת מענה לקרקעות נגועות בנמטודות העפצים (Felipe et al., 2009; Marull et al., 1991; Nyczepir et al., 2001). לשם המשך אחזקת ופיתוח הענף, יש צורך דחוף למצוא כנה שתוכל לגדול בקרקעות אלה בתנאי אינטנסיפיקציה, שתעניק עץ בריא ויבולים גבוהים, המקובלים על כנת GF.677 הכנה בה השימוש הנרחב ביותר. לאחרונה הובאו לארץ מספר הכנות 'Garnem' (GN-15), 'Felinem' (GN-22), ו-'GN-9' 'Monegro' ומארה"ב הכנות 'Nickels' ו-'Viking', העמידות למספר מינים של נמטודות העפצים. אולם, מקורות עמידות אלו עדיין לא נבחנו כנגד האוכלוסיות המקומיות של הפתוגן וכן לא הוכחו מבחינת מדדי יבול וכדאיותן הכלכלית. בנוסף, בשל העובדה שענף המטעים מאוד רגיש למחלה הנגרמת ע"י *Agrobacterium tumefaciens* הוחלט לשלב במחקר הנוכחי ניסויים שיבחנו את תגובת הכנות לפתוגן קשה זה וכן את האפשרות להשפעת גומלין אפשרית בין שני הפתוגנים, החידק *A. tumefaciens* ונמטודת יוצרת העפצים *M. javanica*.

**פערי הידע העיקריים המובילים למצב בו נמטודות העפצים אינה מודברת כיאות וממשיכה לגרום לנזקים כבדים: א. גישות לחיטוי קרקע מצומצמות ואינן מראות יעילות גבוהה.** הבעיה העיקרית העומדת בפנינו היא הקניית בריאות לצמח לאורך מספר עונות גידול. חיטוי הקרקע טרם השתילה או הנטיעה נועד להדביר את גופי הקיימא של הפתוגנים בקרקע. פעולה זו אינה מוצלחת במקרים רבים בגלל ביצוע לקוי של פעולת החיטוי או שימוש בתכשיר חיטוי שאינו יעיל במיוחד. מגוון התכשירים שקיים כיום הוא ממילא מצומצם ולכן הסיכוי לקטול את הפגעים בכל אתר בהם נמצאים בקרקע הוא קטן. יתר על כן, נמטודות בקרקע (כאשר אין גידול בשדה) נמצאות בצורת שקי ביצים או ציסטות או שהן שוכנות באופן פעיל בשורשים בעומק. על כן, התמודדות יעילה עם נמטודות מחייבת לגבש גישה מערכתית שמתחשבת בכל הרכיבים במשולש קרקע-נמטודות-פונדקאי, כדי לשלב את מגוון האמצעים על מנת לקטול את גופי ההשתמרות בקרקע ובנוסף לצמצם את התבססותם המחודשת. הטמעת גישות משולבות לצמצום מידבק הנמטודות לפני שתילה. תוך אופטימיזציה של השימוש בתכשירים בנפרד, במשולב או במשולב עם שיטות הדברה נוספות. **ב. הקושי בניטור, אבחון וכימות מדבק הנמטודות בקרקע לפני שתילה ו/או נטיעה** כיום ניטור מידבק נמטודות בקרקע לפני שתילה כמעט ואינו נעשה ע"י חקלאים וזאת משתי סיבות עיקריות: **(1)** עלות גבוהה עבור כל דגימת קרקע לזיהוי וספירה של נמטודות **(2)** דרוש מספר דגימות גבוה על מנת לתת ייצוג הולם לכל חלקה. מכאן קיימת דחיפות רבה בשנים האחרונות לנסות ולשלב שיטות מתקדמות ופשוטות לזיהוי נמטודות שיחליפו את השיטות הטקסונומיות המסורתיות. בשנים האחרונות מופנה מאמץ רב לאימוץ גישות מולקולאריות לזיהוי נמטודות (Subbotin et al., 1999, Siqueira et al., 2009, Hübschen et al., 2004). שימוש ב quantitative real time PCR (qRT-PCR) מאפשר זיהוי איכותי וכמותי של נמטודות

באמצעות תחלים ספציפיים ויכול להוות תחליף לשיטות הזיהוי המסורתיות (Schaad & Frederick, 2002). בנוסף שיטה זו בכוחה לטפל במספר רב של דוגמאות בעלויות פחותות באופן משמעותי. ביסוס שיטה רגישה כזו המשלבת טכניקה לזיהוי שלושת מיני נמטודת העפצים העיקריים *M. incognita*, *M. javanica* ו-*hapla* יוכל להצביע על נוכחות מידבק בקרקע וכן על גודל האוכלוסייה. עפ"י ממצאים שייצטברו נוכל לבנות מסד נתונים באשר לסף הנמטודות הדורש טיפולי קרקע בגידולים הנלמדים כמו כן השיטה שפותחה תשמש להערכת יעילות ממשקי ההדברה המיושמים בחלקות מסחריות. **ג. מקורות עמידות לנמטודות לא קיימים ברוב הגידולים ואם אכן קיימים אינם תמיד מותאמים לאוכלוסייה הרלוונטית** בפלפל מקורות העמידות שתוארו עד כה הינם גנים יחידים דומיננטיים השונים זה מזה (Bleve-Zacheo et al., 1998; Thies, 2011) חלקם זמינים במאגר הקווים שברשותו של אילן פארן במחלקה לגנטיקה. שישה גנים המכונים *Me* מקנים עמידות יציבה בטמפרטורות גבוהות. גנים אחדים אפקטיביים מול מספר מצומצם של מיני נמטודות, אולם גנים כמו *Me1*, *Me3*, *Me7* והגן *N* נמצאו כמקנים עמידות נגד מספר מיני נמטודות *Meloidogyne* spp. הכוללים *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. incognita*. כל הגנים הידועים כיום בפלפל נמצאים בתאחיזה גנטית בכרומוזום 9 ולחלקם יש סמנים מולקולרים בתאחיזה המאפשרים ברירה לצמחים עמידים בתוכניות השבחה. ככל הידוע עד היום גנים אלו לא שובטו. אולם, החדרת העמידויות בפלפל לזנים המסחריים מחייבת שימוש מושכל שיבטיח את קיימותה של העמידות לאורך זמן ומניעת התפרצות של ביוטיפים וירולנטים שוברי עמידות. בנוסף העובדה שזנים מסחריים שכביכול מוצהרים כ"עמידים" ע"י חברות הזרעים, אינם מראים עמידות בבתי הצמיחה, מחדדת את הצורך ללימוד האינטראקציה בין מקור העמידות ואוכלוסיית הפתוגן לעומק. **מקורות עמידות במטעים.** בגלעיניים הכנה GF.677, הכנה המסחרית לשקד בארץ, אינה נותנת מענה לקרקעות נגועות בנמטודת העפצים ומאופיינת ברגישותה הגבוהה לנמטודת העפצים. כך לדוגמה בדרום הארץ, ישנה נגיעות גבוהה בנמטודת העפצים *Meloidogyne incognita* ו-*M. javanica*. ולשם המשך אחזקת ופיתוח הענף, יש צורך דחוף להחדיר כנות שיוכלו לגדול בקרקעות אלה בתנאי אינטנסיפיקציה, שתעניק עץ בריא ויבולים גבוהים, המקובלים על כנת GF.677. בספרד ובארה"ב טופחו כנות (מטיפוס 'GN', 'Nickels' ו-'Viking' בהתאמה) העמידות למספר מיני נמטודות וביניהן נמטודת העפצים. כמו כן יש לציין את הכנה 'Hansen-536' הנמצאת בארץ שנים רבות שהראתה עמידות מסוימת לנמטודות בעבר. אולם למרות האמור לעיל עמידותן של כנות אלו כנגד אוכלוסיות נמטודות מקומיות וכן התאמתן לרוכבים לא נבחנה. בנוסף ביצועיהן של הכנות החדשות עם רוכבים שבשימוש וכן האינטרקציה של הכנות החדשות עם *Agrobacterium tumefaciens* ברקע של נגיעות בנמטודות תילמד. שנטוע מטע הינו תהליך יקר, הבחירה של הכנה והרוכב הינם המפתח להצלחה.

**ד. ממשק גידולי להפחתת הנזק הנגרם ע"י נמטודות במהלך הגידול.** לצורך פיתוח ממשק להפחתת

הנזק הנגרם ע"י נמטודות במהלך הגידול דרושה הרחבת ההבנה של המנגנונים הפיזיולוגיים המעורבים ביחסי נמטודה צמח וביסוס גישה רב תחומית להבנת יחסי הגומלין בין הצמח, נמטודה, והזנה חנקנית. חנקן הינו מוצר מדף זמין לחקלאי, ולכן כל מידע יישומי שיתקבל יוכל להיות מיושם ללא השהייה. לפיכך הממשק שיתקבל יפחית את השימוש בנמטוצידים בעלי דרגת רעילות גבוהה במהלך הגידול. כיצד שינויים בהזנה של הצמח בכלל וההזנה החנקנית בפרט ישפיעו על יחסי צמח נמטודה? כיצד יחסי הגומלין בין הנמטודה והצמח משתנים כתלות ברגישותו של הזן? מחקרים רבים שבוצעו בעבר במספר גידולים (Melakeberhn; 2006), (Melakeberhn; 1997, Melakeberhn; 1998) מראים כי תוספת חנקן להזנה משפיעה בצורה חיובית על סבילותו של הצמח הנגוע בנמטודות ולעיתים אף מצמצמת את קצב התפתחות אוכלוסיית הנמטודות בשורשים. בעבודות אחרות מודגם כיצד נוכחות הנמטודה בצמח, גודל האוכלוסייה, וקצב צבירת הסוכרים בעפץ שהיא יוצרת, שונים בזן רגיש בהשוואה לזן עמיד (Melakeberhn et al. 1990, Ferris 1988, and Melakeberhn). הבדלים אלו מעודדים את למידת השפעת הגומלין בין הנמטודה, זן הצמח וההזנה החנקנית. **ה. העדר תכשירים על בסיס הדברה ביולוגית להדברת נמטודות בחקלאות האורגנית** שימוש במדבירים ביולוגיים להדברת נמטודות הינו תחום שמושך תשומת לב רבה בעידן בו חומרי הדברה יעילים אך רעילים נאסרים לשימוש. במחלקה לנמטולוגיה נמצאו ובודדו נמטודות טורפות בסביבת שורשים נגועים בנמטודות יוצרות עפצים. הנמטודות זוהו והוגדרו כמין חדש מקבוצת *Diplogastridae* והוענק להן השם: *Koerneria sudhausi*. מסתמן כי לנמטודות טורפות אלו היכולת לשמש כמדביר ביולוגי כנגד נמטודות העפצים, ויתכן אף כנגד נמטודות נוספות. המטרה הכללית: ליצור תשתית לבניית תכשיר שישמש כמדביר ביולוגי כנגד נמטודות טפילות על צמחים המבוסס על הנמטודה הטורפת *Koerneria sudhausi* (Bar et al., 2008). אחד המחסומים העיקריים העומדים בפני ביצוע ניסויי שדה הוא חוסר הצלחה בריבוי המוני של הנמטודה הטורפת *Koerneria sudhausi*. שילוב שיטות לריבוי הנמטודה יקדמו את הנושא צעד נוסף במטרה ליצור תכשיר הדברה ביולוגי יעיל שיוכל להשתלב במערך ההדברה הכללי.

## 2. מטרות שהוצבו במסגרת המיזם

פיתוח וגיבוש שיטות חדשות ומשולבות להדברת נמטודות טפילות על צמחים בדגש על גידול פלפל ובעצי פרי נשירים. מטרה זו תושג ע"י מטרות המשנה הבאות ושילוב הפתרונות להשגת ממשק אינטגרטיבי כולל:

(א) פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים

(ב) פיתוח שיטות מתקדמות והדירות לזיהוי וניטור נמטודות בקרקע

(ג) התאמת מקורות עמידות לאוכלוסיות הפתוגן התוקפות פלפל תוך הכוונה לשימוש מושכל בעמידויות

- (ד) התאמת מקורות עמידות של כנות גלעניים, בדיקת ביצועיהן והערכת כדאיותן הכלכלית
- (ה) פיתוח ממשק יישומי להתמודדות עם נמטודות עפצים המבוסס על הזנה בגידול פלפל, תוך הבנת חשיבותו של חנקן ביחסי נמטודה צמח פונדקאי.
- (ו) פיתוח תכשירים על בסיס הדברה ביולוגית כנגד נמטודות בחקלאות האורגנית.

### 3. פירוט עיקרי הניסויים לפי המטרות המקוריות ותתי המטרות הנגזרות בהתאם לכל קבוצת מחקר

#### 3.1. פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים

**שותפים:** פרופ' אברהם גמליאל, ד"ר סיגל בראון ומר דניאל שטריקר

**תקציר.** גידול פלפל הינו גידול יצוא חשוב ומגודל במגוון בתי צמיחה בכל אזורי הארץ. פלפל נתקף על ידי נמטודות יוצרות עפצים ובעיקר נמטודות מהסוג *Meloidogyne incognita*, אשר עלולים להסב נזק רב שמתבטא בניוון הצמחים ופחיתה ניכרת ביבול. התמודדות עם נמטודות היא משימה מאתגרת בעיקר לנוכח האמצעים המוגבלים שזמינים כיום בהדברת נמטודות. מטרת העבודה הנוכחית הייתה לבחון וליישם גישה מערכתית להדברת נמטודות בגידול פלפל אשר כוללת פעולת ביעור בתום הגידול הקודם, חיטוי קרקע באמצעים משולבים לקראת הגידול המיועד, ואמצעים משלימים במהלך הגידול. הניסויים בוצעו במתכונת של תצפיות מסחריות בבתי צמיחה במושבים פארן ותומר, בחלקות שבהם נרשמה נגיעות רבה בנמטודות בגידול פלפל. בכל חלקה נבחנו שלוש רמות של טיפולים שכללו קטילת שורשים, חיטוי קרקע וטיפול הגמעה במהלך הגידול. באביב 2014, בתום גידול הפלפל ולפני עקירתו, הוזרם התכשיר 1,3 dichloropropene כדי לקטול את השורשים ואת הנמטודות ושקי הביצים שנמצאו על פני השורשים ובתוכם, ולמנוע את אילוח הקרקע. פעולה זו הקטינה את כמות המדבק בקרקע באופן משמעותי. חיטוי קרקע סולרי משולב בהזרמת התכשירים 1,3 dichloropropene או פלאדין, בוצע בחודשים יוני-אוגוסט. לאחר החיטוי לא מצאנו מדבק של נמטודות בקרקע עד לעומק 40 ס"מ. במהלך הגידול בוצעה הגמעה של תכשיר פוספיט (קנון) בתדירות של 30 יום. במהלך גידול הצמחים נדגמו שורשים ולא נתגלתה נגיעות בנמטודות עפצים. בתום הגידול נעקרו הצמחים ונבחנה נגיעות השורשים בנמטודות עפצים. בניסוי במושב פארן לא נמצאה נגיעות גם בתום הגידול. לעומת זאת בניסוי במושב תומר נמצאה נגיעות מועטה שהתרכזת בעיקר בצמחים שגדלו סמוך לשולי החלקות ובסמוך לעמודי המבנה. גם בגידול מחזור נוסף של פלפל בסתיו 2015 בחלקה במושב פארן, לא נמצאה נגיעות בשורשים. העבודה הנוכחית מדגישה את הצורך בגישה מערכתית להתמודדות עם

פגעי שורש כגון נמטודות. בגישה זו, כל רכיב בהדברה משתלב במערך הגידול, משפיע על דיכוי התפתחות הנמטודות ומשפר את הגידול ותנובתו.

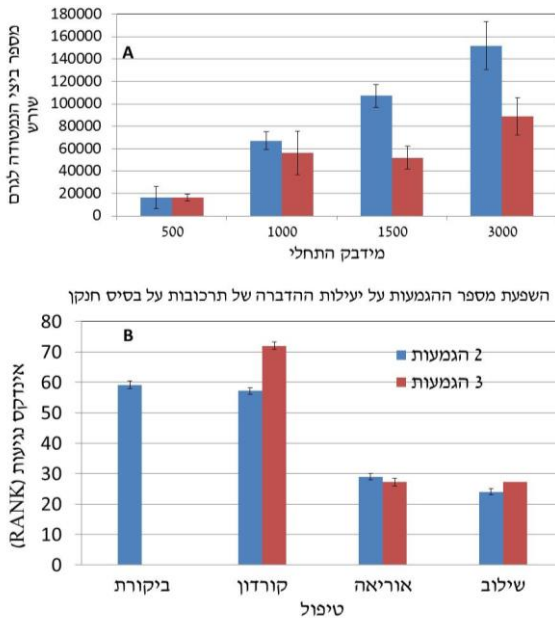
**מבוא.** חיטוי הקרקע טרם השתילה או הזריעה נועד להדביר את גופי הקיימא של הפתוגנים בקרקע. פעולה זו אינה מוצלחת במקרים רבים בגלל ביצוע לקוי של פעולת החיטוי או יישום תכשירי חיטוי שאינם מתאימים. עם יציאתו משימוש של מתיל ברומיד ובמציאות בה יוצאים משימוש חומרים יעילים אחרים חשוב לשלב אמצעים בנוסף לחיטוי הקרקע על מנת לקטול את\_האינוקולום הקיים מחד, ומאידך לצמצם את הבנייה המחודשת של האינוקולום בקרקע.

**שיפור יעילות הדברת פגעים על ידי יישום סניטציה בתום עונת גידול.** במחקרים שנעשו עד היום רואים כי הדברה יעילה מושגת בשילוב חיטוי קרקע וסניטציה כאמצעי הדברה. בסניטציה מושגת קטילה של כל גורמי המחלה הנמצאים באסוציאציה עם מערכת השורשים בעודה חיונית, בצורה זו נמנעת נדידה של גורמי המחלה לשכבות הקרקע הנמוכות יותר. תוצאות שהתקבלו במעבדתו של פרופ' אברהם גמליאל הראו כי שילוב מתאם סודיום לאחר כל גידול הפחית באופן משמעותי את שיעור המחלה למשך שלוש עונות גידול לאחר חיטוי קרקע ללא צורך בחיטוי קרקע לפני כל עונת גידול. תוצאות אלו מציעות לבחון גישה זו להדברת פגעים נוספים כגון נמטודות אשר מתחמקות מאמצעי הדברה רבים לעומק הקרקע.

**שיפור יעילות הדברת פגעים על ידי יישום תכשירים במהלך הגידול.** תכשירים על בסיס תרכובות המכילות חנקות וזרחות משפרים את עמידות הצמחים כנראה באמצעות הפעלת מנגנוני השראת עמידות. תכשירים אלו עשויים לשפר את ההדברה בשילוב אמצעים. הבעיה העיקרית העומדת בפנינו היא הקניית בריאות לצמח לאורך מספר עונות גידול בתנאי חיטוי נחותים. לכן עלינו לשלב אמצעים לפני הגידול, במהלכו ובסופו, על מנת להבטיח גידול בריא. בתחום זה עלינו להתמודד עם מרכיבים נוספים כגון יצירת הואקום הביולוגי ואילוח מחדש של קרקעות מחוטאות בתום החיטוי ובניה מחודשת ומהירה של אינוקולום בתום הגידול. המטרה העיקרית של תחום זה במיזם הינה לפתח ממשק הדברה משולב להדברת נמטודות עפצים בבתי צמיחה. מטרת המחקר הספיציפיות הן כלהלן: **א.** ללמוד על השפעת ההגמעה של צמחי פלפל בתכשירים על בסיס זרחן וחנקן על עמידות כנגד נמטודות העפצים. ראשית נלמדה השפעת רמת האילוח על יעילות התכשירים. נמצא כי הגמעת השתילים בתכשירים הללו הביאה להפחתה ניכרת בכושר הריבוי של הנמטודה וזאת גם כאשר רמת האילוח גבוהה. **ב.** ללמוד על אופן היישום של התכשירים להשגת יעילות מרבית בהדברה. בסדרת ניסויים שנעשתה נבדקה השפעת מספר ההגמעות ונפח בית השורשים בשיפור עמידות הצמחים. בניסויים אלו נמצא כי הגמעת השתילים בתכשירים מביאה להפחתה ניכרת בערך הנגיעות אולם למספר ההגמעות שנבדקו אין השפעה. בחינת השפעת נפח בית השורשים ומספר ההגמעות נמצאת עדיין בבדיקה בניסויים על פלפל.

## פירוט עיקרי הניסויים ותוצאותיהם:

### 1. השפעת הגמעת צמחי פלפל באוריאה פוספיט על תחלואה בנמטודות יוצרות עפצים.



**איור 2.** לימוד השפעת נפח בית השורשים על יעילות ההדברה ע"י אוריאה פוספיט. שתילי פלפל הועתקו למגשי שתילה גדולים ליצירת נפח בית שורשים גדול.

**א. השפעת גודל המידבק התחילי על יעילות ההדברה של אוריאה פוספיט כנגד נמטודת יוצרת העפצים.** ניסוי זה נועד לבחון את יעילות ההגמעות באוריאה פוספיט ברמות אילוח משתנות בין 500-3000 ביצי נמטודת העפצים *M. javanica* לעציץ. הניסוי

**איור 1.** הערכת יעילות יישום אוריאה פוספיט בהדברת נמטודת יוצרת העפצים. **A.** השפעת גודל המידבק על יעילות ההדברה כנגד נמטודת יוצרת העפצים. **B.** הערכת השפעת יישום שתי הגמעות לעומת שלוש הגמעות של אוריאה פוספיט על הדברה. הניסויים הוצבו בתאי גידול מבוקרים. זן הפלפל ששימש בניסויים הינו 7158 של חברת זרעים גדרה.

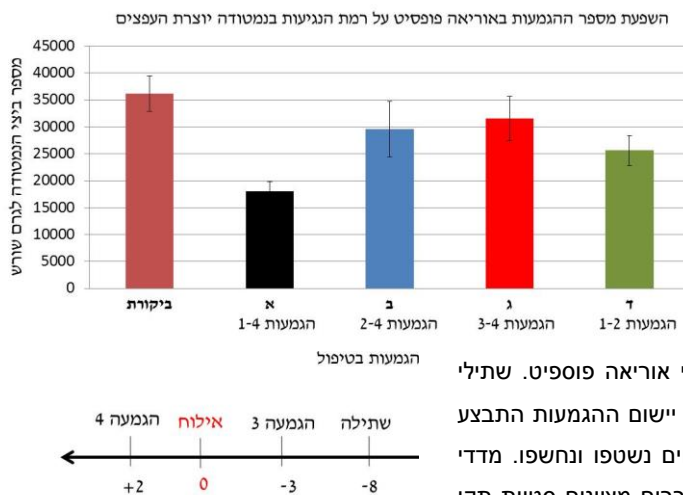
הוצב בתא גידול מבוקר בו עשרים צמחים מכל טיפול הוצבו במבנה של בלוקים באקראי. ארבעה שבועות לאחר האילוח מערכת השורשים של כל צמח נחשפה וחומרת המחלה נקבעה ע"י אינדקס עפצים 0-5 וכושר הריבוי נקבע לפי מספר ביצים לגרם שורש. התוצאות

המובאות באיור 1A מראות כי באילוח ברמת מידבק גבוהה בין 1500-3000 ביצים, מתקבלת השפעה שלילית מובהקת של יישום אוריאה פוספיט על כושר ריבוי הנמטודה כפי שנמדד ע"י הפקת ביצים. **2. השפעת מספר ההגמעות על יעילות ההדברה המושגת ע"י אוריאה פוספיט.** בניסויים קודמים שבוצעו והוצגו בדוח הקודם, יכולנו לראות כי לאחר מתן של שתי הגמעות מתקבלת הפחתה ניכרת ברמת הנגיעות. בניסוי זה רצינו לבדוק האם הגמעה נוספת בתכשיר של אוריאה פוספיט לאחר 21 יום מאילוח תוכל להביא להפחתה נוספת בחומרת המחלה. אולם כפי שניתן לראות באיור 1B, לא נראה הבדל מובהק בהפחתת חומרת המחלה ביישום שתי הגמעות לעומת שלוש הגמעות (איור 1B). אולם השפעת אוריאה או השילוב

אוריאה ופוספיט (תכשיר מסחרי קורדון) על חומרת המחלה נראית בבירור בניסויים אלו. תוצאות אלו מהוות אבני דרך בתכנון שאר הניסויים והתאמתם לתנאים הקיימים בבתי צמיחה. על מנת לפתח אכן ממשק הדברה משולב ביקשנו לבחון גורמים נוספים שיוכלו לשפר את כושר ההדברה של האמצעים הננקטים.

לצורך כך בניסויים הבאים בחרנו ללמוד את השפעת נפח בית השורשים ויישום אוריאה פוספיט על תגובת המחלה הנגרמת ע"י נמטודת העפצים.

**3. השפעת הגמעה באוריאה-פוספיט טרם שתילה ונפח בית השורשים על רמת הנגיעות בצמחי פלפל.** לניסויים הבאים הוכנו שתילי פלפל אשר הועתקו למגשי שתילה גדולים לצורך קבלת שתילים בנפח שורשים גדול יותר (איור 2). ההשערה הינה שצמח גדול יותר המוטען באוריאה פוספיט לפני שתילתו בחלקה יוכל להתגונן טוב יותר בפני מידבק *M. javanica* המצוי בקרקע. השתילים ששימשו בניסוי המתואר הוצבו במבנה של בלוקים באקראי במבנה התא. סה"כ הוצבו בניסוי חמישה טיפולים הנבדלים במספר ההגמעות



(סרגל ההגמעות מתואר בתחתית האיור (איור 3). מתוצאות הניסוי ניתן לראות שבמקרה של נפח בית שורשים גדול הכללת ארבעת ההגמעות (הגמעות 1-4) הובילה לירידה בחומרת המחלה בהשוואה לביקורת כפי שנמדדה ע"י מספר ביצים לגרם שורש. לא נמצא הבדל מובהק בשאר הטיפולים בהם ניתן

**איור 3.** לימוד השפעת נפח בית השורשים על יעילות ההדברה ע"י אוריאה פוספיט. שתילי פלפל הועתקו למגשי שתילה גדולים ליצירת נפח בית שורשים גדול. יישום ההגמעות התבצע במועדים המתוארים. ארבעה שבועות לאחר האילוח שורשי הצמחים נשטפו ונחשפו. מדדי הנגיעות הכוללים אינדקס עפצים, מספר ביצים לגרם שורש נלקחו. ברים מציינים סטיית תקן של ממוצע של 20 צמחים בכל טיפול

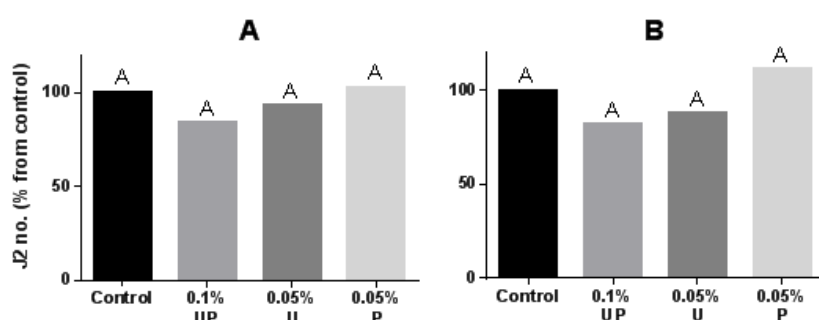
הגמעות במועדים ובתדירות שונות.

#### 4. השפעת מרכיבי האוריאה-פוספיט על בקיעה וחיוניות זחלי הנמטודה (J2) יוצרת העפצים.

מטרת הניסוי הייתה לבחון האם למרכיבי האוריאה פוספיט: 0.05% אוריאה, 0.05% פוספיט ו-0.1% אוריאה פוספיט קיימת השפעה על מידת בקיעת זחלי הנמטודה יוצרת העפצים או על חיוניות זחלי הנמטודות. כ-3000 ביצי הנמטודה יוצרת העפצים נמזגו לכוסיות אליהם נמזגו קודם לכן כ-3 מ"ל 0.05% אוריאה, 0.05% פוספיט ו-0.1% בכ-60 גרם קרקע, בהתאם לטיפול. הכוסיות כוסו באלומיניום ושהו בתנאי חממה למשך חמישה ימים (25-23 °C). לאחר חמישה ימים מוצו הנמטודות שבקעו באמצעות משפכי ברמן ונספרו. לחילופין, 1000 זחלי נמטודה נמזגו לכוסיות ושהו בתנאי חממה (25-23 °C) למשך שלושה ימים. מידת בקיעת הביצים ושרידות זחלי הנמטודות נעשתה על ידי מיצוי הנמטודות בעזרת משפכי ברמן וספירתם. מרכיבי האוריאה פוספיט אינם משפיעים על מידת בקיעת ביצי הנמטודות (איור 4a). לא קיים

הבדל מובהק במידת בקיעת ביצי הנמטודה בכוסיות אליהם נמזגו 0.05% אוריאה לבין כוסיות אליהם נמזגו מים (0%). לא קיים הבדל מובהק במידת בקיעת ביצי הנמטודה בכוסיות אליהם נמזגו 0.05% פוספיט לבין כוסיות אליהם נמזגו מים (0%). לא קיים הבדל מובהק במידת בקיעת ביצי הנמטודה בכוסיות אליהם נמזגו 0.1% אוריאה פוספיט לבין כוסיות אליהם נמזגו מים (0%). מרכיבי האוריאה פוספיט אינם משפיעים על שרידות זחלי הנמטודה יוצרת העפצים (איור 4b). לא קיים הבדל מובהק במידת שרידות זחלי הנמטודה בכוסיות אליהם נמזגו 0.05% אוריאה לבין כוסיות אליהם נמזגו מים (0%). לא קיים הבדל מובהק במידת שרידות זחלי הנמטודה בכוסיות אליהם נמזגו 0.05% פוספיט לבין כוסיות אליהם נמזגו מים (0%). לא קיים הבדל מובהק במידת שרידות זחלי הנמטודה בכוסיות אליהם נמזגו 0.1% אוריאה פוספיט לבין כוסיות אליהם נמזגו מים (0%).

#### 5. יישום גישה מערכתית להדברת הנמטודה יוצרת העפצים בחלקות מסחריות.



**איור 4: השפעת מרכיבי האוריאה-פוספיט על בקיעה וחיוניות זחלי הנמטודה (J2) יוצרת העפצים.** הניסוי בוצע בתנאי חממה (23-25 °C מעלות ו-16 שעות אור) ונמשך 5 או 3 ימים (בקיעה וחיוניות בהתאמה). התוצאות מוצגות כאחוז מספר הזחלים ביחס לטיפול הביקורת (Control). לכוסיות המכילות 60 גרם קרקע הוספו 3000 ביצים (בקיעה, A) או 1000 זחלים (חיוניות B, J2) של הנמטודה יוצרת העפצים. הזחלים הודגרו בקרקע אליה נוספו התמיסות: 0.1% אוריאה פוספיט (UP), 0.05% אוריאה (U) או-0.05% פוספיט (P), להשלמת 6.5% רטיבות משקלית. כוסיות אליהם הוספו מים שימוש כביקורת (Control). בתום תקופת ההדגרה מוצו הזחלים (J2) ונספרו. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק

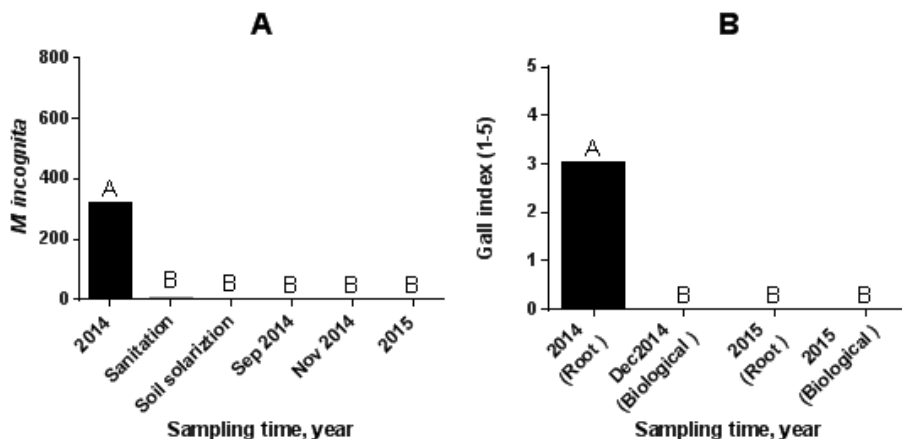
בחנו בשתי חלקות מסחריות לגידול פלפל בתומר (בקעת הירדן) ובפארן (ערבה תיכונה), גישה מערכתית להתמודדות עם נמטודות יוצרות עפצים בגידול פלפל. בשני החלקות נצפתה נגיעות בנמטודה יוצרת העפצים בסוף עונת גידול הפלפל לשנת 2014. טיפולי הקרקע כללו קטילת השורשים בתום הגידול ולפני עקירת הצמחים, חיטוי סולרי משולב בתכשיר חיטוי לפני השתילה, והגמעת

החלקות באוריאה פוספיט (0.1%) אחת לחודש. המעקב אחרי יעילות הטיפולים בכל שלב נעשה באמצעות בדיקת כמות הנמטודות בקרקע ובשורשים. לצורך כך מיפנו שטח בגודל 2.5-3 דונם. בכל משבצת שטח כזו סומנו 150 נקודות דגימה קבועות. מיפוי אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים ורמת הנגיעות בשורשים בוצעה על ידי ספירת זחלי הנמטודה שמוצו מדגימות הקרקע, על ידי הערכתם הוויזואלית של העפצים בשורשים (מדד הנגיעות בעפצים) ועל ידי מבחנים ביולוגיים.

**א. השפעת ממשק ההדברה על אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים *M. Incognita* לאורך תקופת טיפולי הקרקע ועונת הגידול בשנת 2015, פארן.**

באפריל 2014 בוצע מיפוי לקביעת אינדקס הנגיעות בנמטודה יוצרת העפצים בסולם 0-4 (איור 5). מדד הנגיעות בעפצים בשורשי הצמחים בחלקה הינו 3.01 לשורת צמחים וגודל אוכלוסיית זחלי הנמטודות המצויה ב-20 ס"מ העליונים בקרקע עומד על כ- 319 זחלים (J2 זכרים) לשורת צמחים. ממיפוי מדד הנגיעות וגודל אוכלוסיית הנמטודות במוקדי הדיגום עולה כי גודל אוכלוסיית הנמטודות בחלקה איננו אחיד ומשתנה בין מוקד למוקד. טיפולי קטילת השורשים בקונדור גרמו להפחתה משמעותית בגודל אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים (איור 5). למעט מוקדים בודדים (המהווים 14% ממוקדי הדיגום) בהם גודל האוכלוסייה הממוצע הינו 45 זחלים לשורת צמחים, אוכלוסיית הנמטודות ב-20 ס"מ העליונים בקרקע הודברה. לאחר החיטוי

הסולרי,



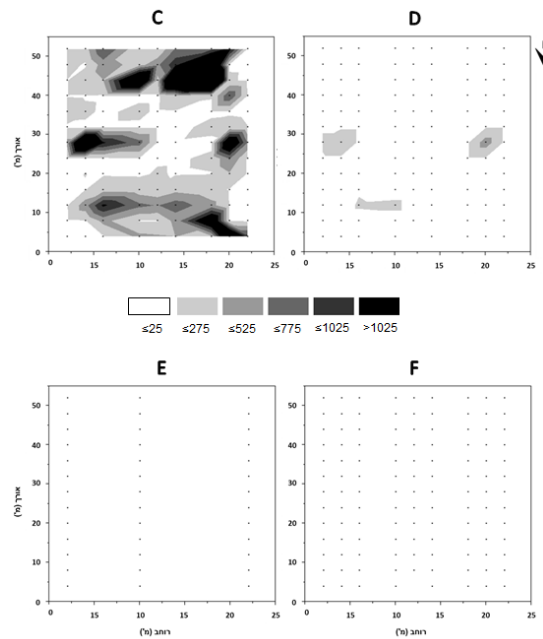
לא אובחנה במוקדי הדיגום אוכלוסייה של הנמטודה יוצרת העפצים ב-20 ו-40 ס"מ העליונים בקרקע (איור 5). מדגימות הקרקע שבוצעו בעונת הגידול של שנת

**איור 5:** השפעת ממשק הדברה על אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים *M. incognita* לאורך תקופת טיפולי הקרקע ועונת הגידול, פארן. הניסוי בוצע בחלקה מסחרית ביישוב פארן, ערבה תיכונה, יוני 2014. ממשק ההדברה נמשך כחודשיים ועונת הגידול כ- 8 חודשים. התוצאות המוצגות הן ממוצע מספר הנמטודות (A) ומדד הנגיעות בעפצים (B) בשורת גידול הצמחים. מועדי הדיגום להערכת גודל אוכלוסיית הנמטודה: סוף עונת הגידול 2014 (2014), לאחר סניטציה (Sanitation), לאחר חיטוי סולרי (Soil solarization), לאורך תקופת הגידול (Sep 2014 and Nov 2014), ובסוף עונת הגידול (2015). מועדי הדיגום להערכת מדד הנגיעות: סוף עונת הגידול 2014 (2014root), דצמבר 2014 (Dec 2014, biological), ובסוף עונת הגידול 2015 (2015 root and 2015 biological). אותיות שונות מציינות הבדל מובהק

2015 (30.9.14),  
20.11.14) עולה כי  
אוכלוסיית הנמטודה  
יוצרת העפצים טרם  
התבססה בקרקע  
(איור 5). כמו כן,  
בסדרת מבחנים  
ביולוגיים בהם

נשתלו שתילי פלפל בדגימות קרקע מחלקת הניסוי לא נמצאה נגיעות בעפצים (איור 5). בסוף עונת הגידול

בוצע סקר מקיף ומסכם להערכת הנגיעות בנמטודה יוצרת העפצים. מהסקר עולה כי שורשי הצמחים נקיים מעפצים (איור 5) ובדגימות הקרקע שניטלו משכבות ה-20 וה-40 ס"מ העליונים לא קיימת אוכלוסייה של הנמטודה יוצרת העפצים (A, 2015). כמו כן בסדרת מבחנים ביולוגיים בהם נשתלו שתילי פלפל בדגימות הקרקע לא נמצאה נגיעות בעפצים גם כן (איור 5). ההבדל בגידול הצמחים לפני תחילת הניסוי בשנת 2014 לעומת הגידול בתום הגידול השני מוצג באיור 7.

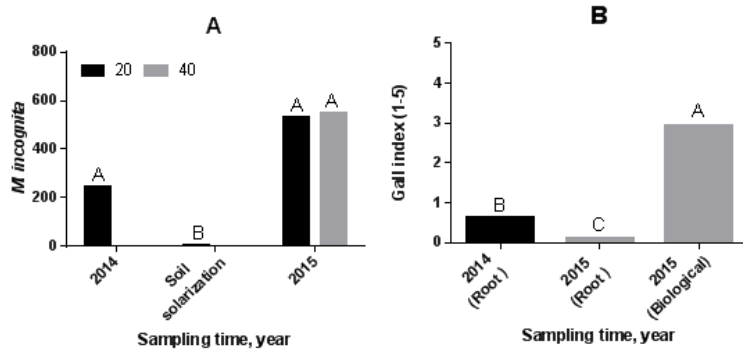


**איור 6:** מיפוי אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים *M. inconita* לאורך תקופת טיפולי הקרקע ובסוף עונת הגידול 2015, פארן. הניסוי בוצע בחלקה מסחרית ביישוב פארן, ערבה תיכונה, יוני 2014. ממשק ההדברה נמשך כחודשיים ועונת הגידול כ-8 חודשים. התוצאות המוצגות כמספר הנמטודות שנמצאו בדגימת הקרקע במוקדי הדיגום (נקודות שחורות). מועדי הדיגום להערכת גודל אוכלוסיית הנמטודה: סוף עונת הגידול 2014 (C), לאחר סניטציה (D), לאחר חיטוי סולרי (E), ובסוף עונת הגידול 2015 (F).



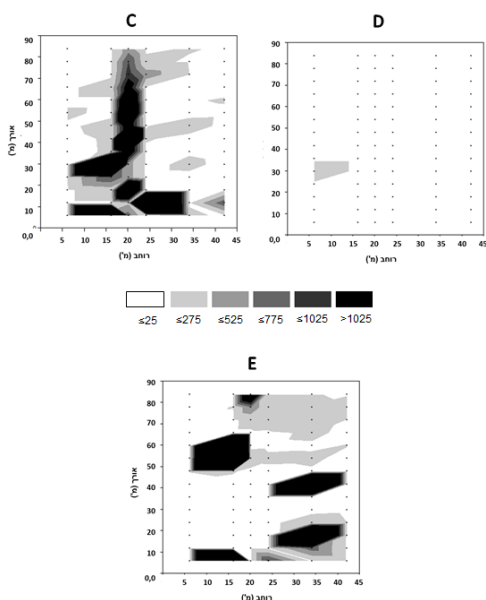
**איור 7.** מופע הצמחים בחלקה בפארן לפני (A) ואחרי (B) יישום הממשק החדש. בתמונה A ניתן לראות את מופע החלקה לפני יישום הממשק, נראים הצהבות עלים, צמחים מעוכבים והופעת מוקדי נגיעות. בתמונה B אותה חלקה לאחר יישום הממשק נראים צמחים אחידים ובריאים.

**ב. השפעת ממשק ההדברה על אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים *M. incognita* לאורך תקופת טיפולי הקרקע ועונת הגידול בשנת 2015, תומר. ביוני 2014 בוצע מיפוי מקיף להערכת שיעור וחומרת**



הנגיעות בנמטודה יוצרת העפצים (איור 9, 8). נראה כי מדד הנגיעות בעפצים בשורשי הצמחים בחלקה הינו 0.23 לשורת צמחים, אולם בשורת הצמחים בשולי החלקה נצפתה נגיעות גבוהה יותר (2.66 לשורת צמחים). גודל אוכלוסיית זחלי הנמטודה יוצרת העפצים המצויה ב-20 ס"מ העליונים

**איור 8:** השפעת ממשק הדברה על אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים *M. incognita* לאורך תקופת טיפולי הקרקע ועונת הגידול, תומר. הניסוי בוצע בחלקה מסחרית ביישוב תומר, בקעת הירדן, יוני 2014. ממשק ההדברה נמשך כחודשיים ועונת הגידול כ-10 חודשים. התוצאות המוצגות הן ממוצע מספר הנמטודות (A) ומדד הנגיעות בעפצים (B) בשורת גידול הצמחים. מועדי הדיגום להערכת גודל אוכלוסיית הנמטודה: סוף עונת הגידול 2014 (2014), לאחר חיטוי סולרי (Soil solarization) ובסוף עונת הגידול (2015). מועדי הדיגום להערכת מדד הנגיעות: סוף עונת הגידול 2014 (2014 root) ובסוף עונת הגידול 2015 (2015 and 2015 biological). בגרף A עמודות שחורות מציינות מדידות לעומק 20 ס"מ ועמודות אפורות מציינות מדידות לעומק 40 ס"מ. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק.



בקרקע (J2 זכרים) עומד כל כ-483 זחלים (J2 זכרים) לשורת צמחים. בדומה למדד הנגיעות גם פה עיקר אוכלוסיית הזחלים שנמצאה הינה בשולי החלקה. לאחר החיטוי הסולרי המשולב בקונדור או פלאדין, למעט 3 מוקדים בהם נמצאו 2,4 ו-123 זחלי נמטודות (J2 זכרים), לא אובחנה בשאר מוקדי הדיגום אוכלוסייה של הנמטודה יוצרת העפצים ב-20 ו-40 ס"מ העליונים של הקרקע (איור 8). בסוף עונת הגידול בוצע שוב סקר מקיף להערכת הנגיעות בנמטודה יוצרת העפצים. מהסקר עולה כי שורשי הצמחים נגועים בעפצים ומדד הנגיעות שנצפה הינו 0.13 בשיעור דומה למדד הנגיעות שנצפתה בסוף עונת הגידול של שנת 2014 (איור 7). ממוצע גודל אוכלוסיית הזחלים (J2 זכרים) ב-20 ו-40 ס"מ

העליונים של הקרקע בשורת הצמחים הינו 533 ו-549 בהתאמה (איור 7). כמו כן בסדרת מבחנים בהם

**איור 9:** מיפוי אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים *M. incognita* לאורך תקופת טיפולי הקרקע ובסוף עונת הגידול 2015. הניסוי בוצע בחלקה מסחרית ביישוב תומר, בקעת הירדן, יוני 2014. ממשק ההדברה נמשך כחודשיים ועונת הגידול כ-10 חודשים. התוצאות המוצגות כמספר הנמטודות שנמצאו בדגימת הקרקע במוקדי הדיגום (נקודות שחורות). מועדי הדיגום להערכת גודל אוכלוסיית הנמטודה: סוף עונת הגידול 2014 (C), לאחר חיטוי סולרי (D), לאחר ובסוף עונת הגידול 2015 (E).

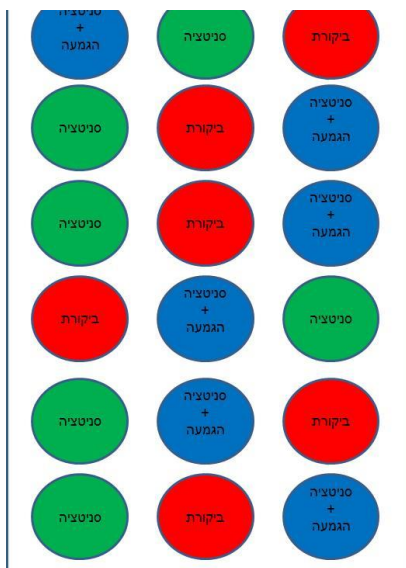
נשתלו שתילי פלפל בדגימות קרקע נצפו שורשים נגועים בעפצים בשיעור של כ-2.9 במדד הנגיעות (איור 8).

### 5. יישום ממשק הדברה משולב לחלקות המיועדות לשנטוע עצי שקד

במקביל למחקר בחלקות פלפל שנגועות קשה בנמטודות, אנו מבצעים מערכת טיפול דומה להתמודדות עם נמטודות בשקדים. מכיוון שלא ניתן היה לאתר (למרות מאמצים רבים) חלקות ניסוי מתאימות הצבנו חלקת ניסוי קטנה במתחם מינהל המחקר החקלאי. החלקה מבוססת על 20 מיכלי קרקע (מייקרופלוטים) בקוטר 120 ס"מ ובעומק 2 מטר בחלקות אלה נשתלו באביב 2014 עצי שקד שהורכבו על כנות רגישות לנמטודות (איור 10). הקרקע אולחה בנמטודות יוצרות עפצים. בדגימות קרקע שבוצעו נמצא מדבק גבוה של נמטודות העפצים (איור 10).



**איור 10.** חלקת הניסוי ששימשה לפיתוח ממשק שינטוע. קרקע מאולחת בנמטודות שימשה לשתילת שקדים. A. מראה שתילי כנות GF677 שנשתלו בקרקע המאולחת. מראה השורשים המעופצים נראה בריבוע הקטן בצד ימין. B. יישום Dichloropropene 1,3 בחלקה. C. סדר הפעולות בחלקה עד שיטוע של הכנות GF677 החדשות.



מעבדה

הטיפולים השונים שנכללו בחלקה מתוארים באיור 11 וכללו טיפול ביקורת ללא יישום כל חומר, שני הטיפולים האחרים כוללים יישום 1,3 Dichloropropene כאשר באחד מהם ישנה הגמעה של אוריאה פוספיט תוך כדי הגידול. בזמן כתיבת הדוח המסכם שתולים במייקרופלוטים כנות שקד מהקו הרגיש GF677, עם תחילת הבלבול אנו נתחיל בהגמעות אוריאה פוספיט בתדירות ובמינון ששימשו בממשק הפלפל. לקראת ספטמבר שורשי הצמחים יחשפו ולכל כנה נקבע את רמת האילוח בנמטודת העפצים ע"י אינדקס עפצים וכושר ייצור הביצים על כל כנה. ניסויים אלו בכוחם לגבש ממשק שינטוע בחלקות שקדים נגועות בנמטודות. מעבר לכך, ייתכן כי אף שימוש

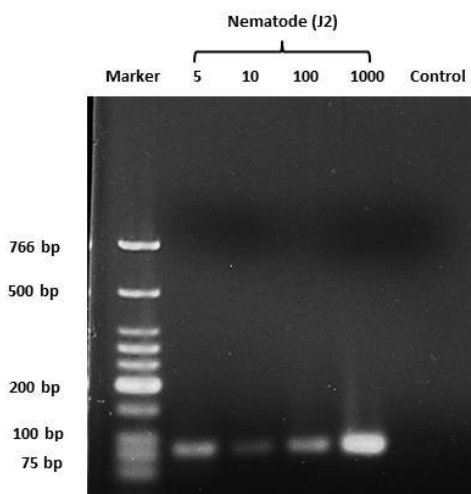
**איור 11:** תיאור הטיפולים הנכללים בחלקה לפי מייקרופלוטים לפי העמדה במבנה. אדום: טיפול ביקורת. ירוק: יישום Dichloropropene 1,3. כחול: יישום 1,3 Dichloropropene + תוספת הגמעת אוריאה פוספיט.

במקורות עמידות כדאי שיגובה

בממשק מעין זה כדי להפחית את פוטנציאל שבירת העמידות.

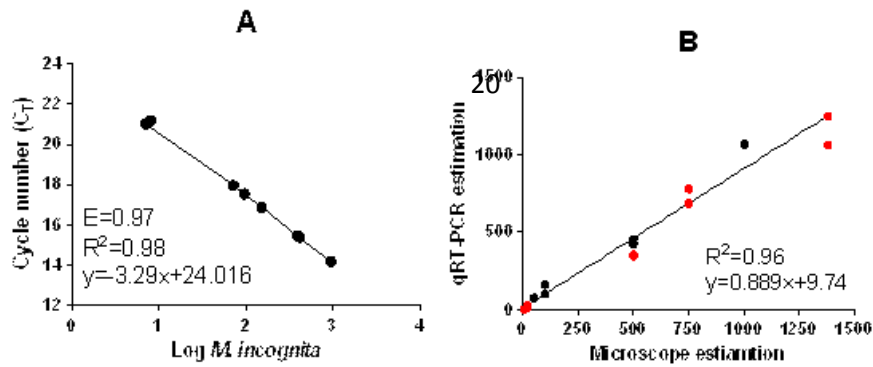
**6. פיתוח שיטות מתקדמות והדירות לזיהוי וניטור נמטודות בקרקע.** מטרת פרק זה של המחקר הייתה לפתח שיטה בה נוכל לנטר ולכמת את אוכלוסיית הנמטודה יוצרת העפצים *Meloidogyne spp.* באמצעות quantitative Real Time PCR. בתחילה נעשה שימוש בתחלים ספציפיים לבדיקת יעילות הפקת ה-DNA מנמטודות יוצרות עפצים תוך איבוד מינימלי של החומר הגנטי. DNA של 5, 10, 100 ו-1000 נמטודות הופק, הוגבר על ידי PCR והורץ על גבי ג'ל אלקטרופורזה. תוצרי ההרצה (איור 12) מצביעים כי פרוטוקול ההפקה באמצעות NaOH יעיל ועוצמת התוצר תואמת את כמות הנמטודות מהם הופק ה-DNA. בהמשך, DNA אשר הופק מ-10, 50, 100, 500 ו-1000 נמטודות הוגבר על ידי Real Time PCR לשם בניית עקומת הכיול (Standard) וכן על מנת לבדוק את התאמת תהליך הפקת ה-DNA למיגבלות ריאקציית ה-qRT-PCR. במקביל, הופק DNA מ-7, 23, 500, 750 ו-1380 נמטודות שנחשבו במערכת כדוגמאות לא ידועות (Unknwon). רמת הפלורוסנטציה של תוצרי הריאקציה מראה כי עקומת הכיול שהתקבלה מהימנה (איור 13) וקיים מתאם בין קריאה הוויזואלית שבוצעה באמצעות סטריאו-מיקרוסקופ לבין זו שנקרא על ידי המכשיר (איור 13). קריאתו המהימנה של המכשיר מסמנת כי תהליך הפקת ה-DNA מתאים לביצוע הריאקציה על

ידי ה-quantitative Real Time PCR. לא נראתה פלורוסנטציה בדגימות הביקורת (Control). התאמה נוספת של מכשיר ה-quantitative Real Time PCR על ידי הפקת ה-DNA מזחלי נמטודות בשילוב מיצוי קרקע שעלול להוביל להטעייה בתוצאות בשל גורמים מעכבים. DNA אשר הופק מ-5, 25, 50, 100 ו-500 בשילוב נוזל ממיצוי הקרקע שימש לשם בניית עקומת הכיול (Standard) ובמקביל אליו הופק DNA מ-88, 60, 20, 12, 6, 4, 1, 0 זחלי נמטודות (Unknwon) שמוצו מעציץ אשר אולח מבעוד מועד. לאחר תהליכי הפקת ה-DNA

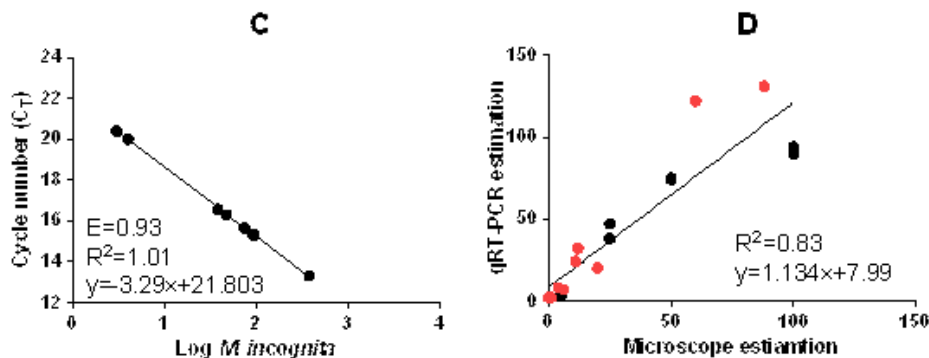


**איור 12: שימוש ב-PCR לבדיקת יעילות הפקת הדנ"א מזחלי הנמטודה יוצרת העפצים.** דנ"א הופק מ-5, 10, 100 ו-1000 זחלי נמטודות על פי Stanton et al. הדנ"א הוגבר ב-PCR באמצעות תחלים ספציפיים ל-ITS1 ותוצריו הורצו בג'ל אלקטרופורזה. גודל התוצר הינו 80 בסיסים. דגימה אליה הוכנסו מים ייעודים במקום DNA שימשה כביקורת (Control).

הוגברו התוצרים ב-qRT PCR ורמת הפלורוסנטציה בהם תועדה. רמת הפלורוסנטציה מראה כי עקומת הכיול שהתקבלה מהימנה (איור 14) וקיים מתאם בין קריאה הוויזואלית שבוצעה באמצעות סטריאו-מיקרוסקופ לבין זו שנקרא על ידי המכשיר (איור 14).



**איור 13.** הרחבת עקומת הכיול לזיהוי נמטודות מ-1000-1 נמטודות. ניתן לראות עלייה ברמת הפלואורסנציה עם העליה במספר הנמטודות. מובהקות הקו ורמת מתאם גבוהה מחזקת את מהימנותה של עקומת הכיול ומאפשרת להסתמך על נתוניו לזיהוי מספר נמטודות מדוגמת DNA שהופקה.



**איור 14.** שימוש ב- quantitative Real Time PCR לניטור זיהוי הנמטודה יוצרת העפצים (in vitro). דנ"א שהופק מ- 10,50,100,500 נמטודות שימש לבניית עקומת הכיול (C). במקביל, דנ"א שהופק מ- 7,23,500,750 נמטודות שימש לבחינת רמת המתאם בזיהוי וכימות הנמטודות בין האבחון הוויזואלי בסטריאו-מיקרוסקופ לבין קריאת המכשיר (D). נקודות שחורות מציינות את קריאת עקומת הכיול (Standard) ונקודות אדומות מציינות את הדנ"א שהופק לבחינת רמת המתאם (Unknown). רמת המתאם נבדקה ברמת מובהקות  $P<0.001$ .

**דין.** לכלי זה משמעות רבה בלימוד השפעת יישום תכשירי הדברה על הישרדות הנמטודות בקרקע, תנועת הנמטודות ומיקום הנמטודות. אפשרות זו לניטור כמותי ואיכותי של נמטודות מאפשרת להעריך את היעילות של טיפולים וממשקים חדשים ומשולבים. השיטה שפותחה נגישה מאוד לשימוש לצרכי ניטור, מחקר וכדו'. יש לציין כי בעולם מסתמנת מגמה בה שיטות כאלו תופשות את מקומן של השיטות הטקסונומיות המסורתיות המשמשות לזיהוי נמטודות.

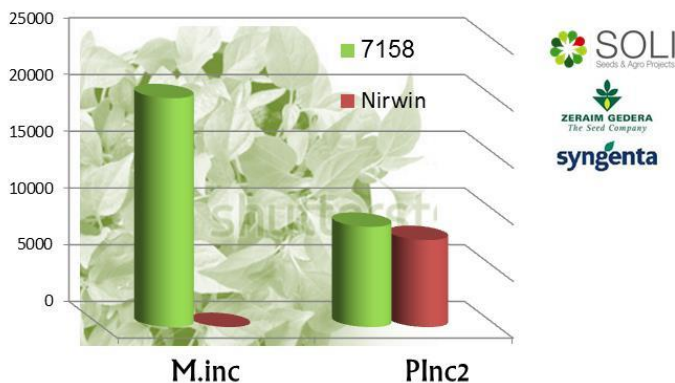
## 3.2. התאמת מקורות עמידות לאוכלוסיות הפתוגן בפלפל ופיתוח השימוש בהן

**שותפים:** אילן פארן, סיגל בראון מיארה, ליאנה גנות, פטריסיה בוקי

**תקציר.** נמטודת יוצרת העפצים *Meloidogyne* spp., נמנות עם פגעי הקרקע הקשים ביותר בגידול ירקות בארץ ובעולם ביניהם גידול פלפל (*Capsicum annum*). במציאות בה השימוש בנמטוצידים כימיים נתון תחת רגולציות מחמירות, לכיווני השבחה הנוגעים בהחדרת עמידויות קיים יתרון מובהק. בפלפל מוכרים מספר גנים לעמידות השייכים לקבוצת ה *Me* וגן נוסף ה *N* אשר מקנים עמידות לטווח רחב של מינים בסוג. אולם שימוש ממושך בכנות או זנים נושאי עמידויות אלו יכול להוביל להתפרצות אוכלוסיות שוברות עמידות. במחקר הנוכחי היציבות וטווח העמידות המוקנה ע"י גנים אלו נלמד כנגד אוכלוסיות *M. incognita*. לייצוג הולם של אוכלוסיות *M. incognita* השכיחות בשטחי גידול פלפל עיקריים בארץ, נאספו 30 אוכלוסיות אשר אופיינו עפ"י מבחן פונדקאים מסורתי לזיהוי הגזע של הנמטודה. תוצאות המבחן הראו שבעוד כל האוכלוסיות מתרבות על הפונדקאים פלפל, עגבנייה, טבק ומלון חלק קטן מהאוכלוסיות מתרבה גם על כותנה עובדה המצביעה על שונות טבעית הקיימת בין האוכלוסיות. בשלב הבא נלמדה תגובת שלושה הקווים נושאי העמידויות *PI1094 (Me1/+)*, *PI1093(Me3/+)* ו *Nirwin (N)* כנגד אוסף האוכלוסיות. שונות גבוהה נצפתה בתגובת הקווים לאוכלוסיות השונות. מבחן העמידות שהתבסס על מופע העפצים (GI) וכושר ריבוי הנמטודה (RI) הראה כי מקור העמידות *Me1* אפקטיבי כנגד כל האוכלוסיות שבודדו זאת לעומת מקור העמידות *N* ו *Me3* אשר אפשרו ריבוי של חלק נכבד מהאוכלוסיות עליהם. כאשר נלמדה יעילותו של מקור הגן *Me1* תחת רקעים גנטיים שונים, נצפה כי *Me1* מקנה עמידות תחת כל הרקעים הגנטיים אשר נבדקו. התוצאות המובאות כאן מצביעות על *Me1* כמקור העמידות היחיד המקנה עמידות רחבה כנגד אוכלוסיות *M. incognita* שבאוסף המייצג. מכאן בפיתוח ממשק חדש בפלפל כנגד נמטודת העפצים רצוי לשלב את השימוש במקור העמידות *Me1* באופן מושכל.

**מבוא.** במציאות בה חומרי הדברה רעילים יורדים מהמדף בצל שיקולי בריאות ואיכות סביבה מגמות בטיפול זנים נושאי עמידות כנגד נמטודות מהווים אתגר בתחום טיפוח הפלפל. בנוסף השימוש בזנים עמידים במחזור גידולים כפרקטיקה גידולית הראה תוצאות טובות בהפחתת המידבק שכלל בין היתר שתילה של זנים רגישים לאחר מחזור גידול של זן עמיד (Thie et al., 1998; 2008). כל האמור לעיל מחדד את החשיבות באיפיון מקורות העמידות וזיהוי מקורות עמידות חדשים. קומפלקס העמידות בפלפל (*Capsicum* L.) annuum כנגד נמטודת יוצרת העפצים *Meloidogyne* spp. כולל חמישה גנים לפחות השייכים

למשפחת הגנים *Me* וגן נוסף הקרוי *N*, כאשר כולם מצויים על כרומוזום P9 בפלפל. בין הגנים שזוהו עד היום שני הגנים *Me1* ו-*Me3* אשר זוהו בשני מכלואים שונים, מקנים עמידות לשלושת המינים *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*. שלושת הגנים האחרים *Me2*, *Me4* ו-*Me5* מקנים עמידות צרה יותר, רק למין נמטודה יחיד או לאוכלוסיות מסויימות (Hendy et al., 1985). למרות ששני הגנים *Me1* ו-*Me3* מדכאים את התפתחות הנמטודה, בשניהם ניתן לצפות בתגובת עמידות שונה. מחקר קודם שנעשה הראה כי שינויים מבניים האופייניים לתמותת תאים מכוונת נצפים בצמחים נושאי העמידות *Me3* מייד לאחר ההדבקה לעומת מנגנון העמידות המוקנה ע"י *Me1* שנראה מעוכב, בו נצפית תמותת תאים מכוונת רק לאחר השראת מספר תאי ענק. בעבודתם, מוסברת ברירה מהירה של אלימות על קווים נושאי *Me3* ביכולת זחלים J2s להתגבר על תגובת העמידות המהירה הנצפית באפידרמיס ובקורטקס של השורש שאמורה לבלום את תנועתם (Bleve-Zacheo et al., 1998). גן (*R gene*) נוסף לעמידות גן ה-*N* מופה אף הוא בקרבת שני הגנים *Me1* ו-*Me3*. בעבודתם Thies and Aris, 2009 הראו בהתבסס על ההתפצלות התכונה בדור F2 כי שני הגנים *N* ו-*Me3* אינם אללים לאותו הגן אולם קיימת תאחיזה גבוהה בין הגן *N* לגנים ממשפחת ה-*Me*. אולם למרות הפוטנציאל הקיים בשימוש במקורות עמידות ישנם חסרונות שצריכים להילקח בחשבון: 1. מקורות עמידות נשברים לרוב בטמפ' קרקע גבוהה. 2. אוכלוסיות וירולנטיות שוברות עמידות עלולות להתפתח על הקווים העמידים (Castagnone Sereno et al., 2001). אחת הגישות להתמודד עם חסרונות אלו היא ע"י שילוב מספר עמידויות בקו מכלוא, גישה המכונה גם 'gene pyramiding' אסטרטגיה להפחתת סיכוי שבירת העמידות. במחקרים קודמים הראו Piedra Buena et al (2005) שאוכלוסייה וירולנטית של *M. incognita* שנדגמה מאורוגוואי גדלה על צמחי פלפל נושאים את הגן *N*. באופן דומה אוכלוסיות וירולנטיות טבעיות או שנבררו הצליחו לגדול על צמחים נושאי *Me3* (Djian-Caporalino et al., 2011). לעומת שני הגנים האחרונים הגן *Me1* נחשב גן המקנה עמידות חסינה יותר כנגד אוכלוסיות וירולנטיות ואוירולנטיות (Castagnone Sereno et al., 2002). אולם לגבי שני הגנים האחרים *Me3* ו-*N* ההופעה של אוכלוסיות וירולנטיות על זנים נושאי גנים אלו מערערת מאוד את יעילותם (Castagnone-Sereno et al., 1996; Thies, 2011). באופן דומה תחת תנאי חממה דווחה הופעה של אוכלוסיות וירולנטיות כאשר כנות עמידות נשתלו באופן חוזר למשך מספר עונות (Ros-Ibañez et al., 2014). תוצאות אלו מצביעות על הצורך להמשיך לסרוק לעמידות, יתר על כן עבודות אחרונות מצביעות שרקעים גנטיים מסויימים יכולים למנוע את תופעת שבירת העמידות (Barbary et al., 2014). למרות כל המידע שהובא עד היום בספרות, עד היום לא ידוע דבר על תגובת מקורות העמידות לאוכלוסיות הפתוגן בארץ.



איור 15. אילוח צמחים נושאי עמידות ושאינים בשתי אוכלוסיות נבדלות M.inc GH ו Pinc2. תוצאות האילוח ממחישות את ההבדל הקיים בין שתי אוכלוסיות M. incognita ששימשו במבחן ומעלה שאלות לגבי התופעה.

**הידע והמצב הקיים בתחילת המחקר.** הרקע למחקר זה שבוצע במסגרת המיזם היה דיווחים חוזרים של שתילות זנים עמידים בחלקות עם נגיעות בנמטודות אשר אינם מראים עמידות. על מנת להתחיל וללמוד על התופעה ביצענו מבחן מקדים שכלל אילוח צולב של שני קווי פלפל: 7158 'קנון' (זרעים גדרה) קו רגיש וכן קו Nirwin (זרעי

סולי) שאמור היה להציג עמידות. שני הקווים אולחו עם שתי אוכלוסיות של *M. incognita*: אוכלוסייה שגדלה על הזן העמיד (Nirwin) שעמידותו הגנטית לא ידועה

ואוכלוסיית *M. incognita* שגודלה על צמחים רגישים במחלקה לנמטולוגיה M.inc GH ששימשה לביקורת. תוצאות הדבקה צולבת הצביעו באופן ישיר כי האוכלוסייה מהחממה שלעולם לא גדלה על צמח עמיד לא התפתחה על הקו העמיד Nirwin אולם כן התפתחה על הזן העמיד. לעומת זאת האוכלוסייה שבודדה מהזן Nirwin הצליחה לגדול על שני הקווים (7158 ו Nirwin). תוצאות אלו מעלות שתי שאלות עיקריות שהיוו בסיס למחקר זה: א. האם מדובר בהתפרצות אוכלוסיות שוברות עמידות? ב. האם מדובר בשונות גנטית הקיימת בין האוכלוסיות. במסגרת המחקר נלמדה האינטראקציה בין מקורות עמידות בפלפל כנגד אוכלוסיות הפתוגן שנבררו מאיזורי גידול פלפל ברחבי הארץ.

### פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

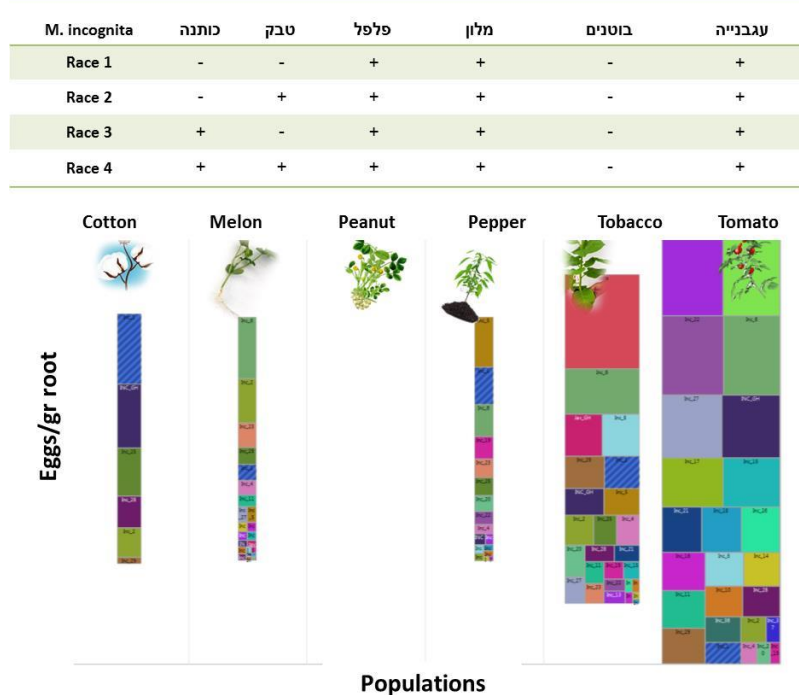
1. אפיון אוכלוסיות *M. incognita* בשטחי גידול פלפל. בשלב הראשון של המחקר עלה הצורך לאפיין את אוכלוסיות הפתוגן הנמצאות בחממות בהם מגדלים פלפל באופן אינטנסיבי. סקר מקיף של אוכלוסיית נמטודת העפצים הגורמת מחלה בפלפל התפרש על פני כל אזורי גידול הפלפל העיקריים במהלך שנת 2013, האיזורים שנדגמו כללו: נגב ערבה, הבשור, רמת נגב, השפלה, חוף כרמל, הרי ירושלים, בקעת הירדן והשרון. בסך הכל 30 אוכלוסיות בודדו ורובו על פלפל משק ביצים בודד. שמירה על אוכלוסיות אלו התבצעה לאורך כל תקופת המחקר ע"י אילוח צמחי פלפל רגישים



איור 16. סקר שנעשה בשנת 2013 לאיסוף אוכלוסיות *M. incognita* מאיזורי גידול פלפל עיקריים. לצורך ביצוע הסקר שורשים מעופצים מקרקעות נדגמו מחממות פלפל נגועות. שק ביצים בודד שימש לריבוי כל אוכלוסייה על צמחי פלפל רגישים.

בכל אחת מהאוכלוסיות. לאחר ריבוי האוכלוסייה בוצעו מבחני אילוח על שישה צמחי בוחן לצורך הגדרת הגזע ואיפיון הפתוגניות, הכוללים: מלון, טבק, כותנה, עגבנייה בוטנים ופלפל (איור 3). חודש לאחר האילוח האוכלוסיות סווגו לגזעים עפ"י המבחן המקובל ב (Sasser and Triantaphyllou, 1977), בו מתבצעת הערכה איכותית וכמותית לגבי היכולת של כל אוכלוסייה להתפתח ולגרום מחלה על כל מין צמח שהוזכר. במקביל, אוכלוסיות שבודדו מ single egg mass נלקחו להפקת DNA ששימש כ template בריאקציות עם תחלים ספציפיים מאזור ה ITS לצורך ניטור השונות ברמת הרצפים ואיפיון מולקולרי של האוכלוסיות. תוצרי ה PCR שהתקבלו שובטו בפלסמיד pGEM-Teasy ונשלחו לריצוף המקטעים. מידע פילוגנטי זה בכוחו לבסס את ההבדלים בכושר ההדבקה על הפונדקאים הנצפים בין האוכלוסיות.

**2. סיווג האוכלוסיות לגזע 2 על פי מבחן פונדקאים.** האוכלוסיות הקיימות באוסף שימשו לאילוח שישה סוגי הצמחים המפורטים באיור 4. כל סוגי הצמחים אולחו ע"י כל אחת מהאוכלוסיות במספר זהה של ביצים ולאחר שמונה שבועות מערכות השורשים נחשפו אינדקס העפצים נקבע ומספר ביצים לגרם שורש נספר



כמדד להתאמתו לשמש פונדקאי. כפי שניתן לראות צמח הבוחן אשר מבדיל בין גזע 2 וגזע 4 הוא כותנה (איור 4), מעניין כי למרות כושר הריבוי הקטן יחסית על כותנה, כן נמצא ריבוי של מספר אוכלוסיות על כותנה. בשלב זה אינינו חושבים שמדובר בהימצאות גזע 4, אולם תוצאה זו מצביעה על שונות גבוהה בכושר הפתוגניות של האוכלוסיות הקיימות באוסף. עוד ניתן לראות מהתוצאות שהאוכלוסיות השונות נבדלות בכושר הריבוי על כל

**איור 17.** איפיון אוכלוסיית *M. incognita*. תוצאות מבחן פונדקאים מסורתי הכולל אילוח צמחי עגבנייה, טבק, פלפל, בוטנים, מלון וכותנה. תוצאות המבחן מצביעות כי רוב האוכלוסיות שייכות לגזע 2 של *M. incognita* אשר אינו בעל כושר ריבוי על כותנה אולם קיימים ביוטיפים שמתרבים על כותנה. זיהוי סימני מחלה על צמחי כותנה מאולחים במספר ביוטיפים מצביע על שונות גבוהה באוכלוסייה. מבחן הפונדקאים התבצע בשלוש חזרות לכל אוכלוסייה שנבדקה. התוצאות המוצגות מצביעות על כושר הריבוי של האוכלוסייה על כל אחד מהצמחים.

אחד מהפונדקאים, תוצאה נוספת המצביעה

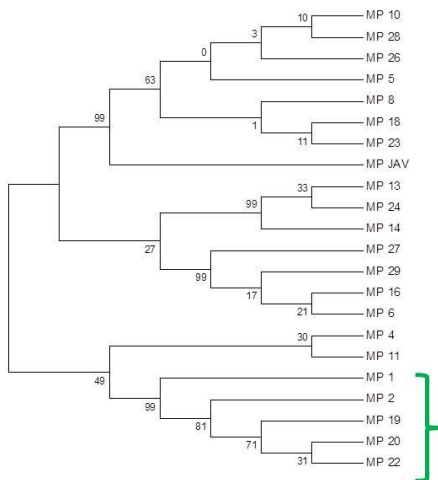
על שונות בין האוכלוסיות. בשלב הבא לאחר איפיון הפתוגניות על

מבחן הפונדקאים המסורתי פנינו לאיפיון רצפי ה ITS הריבזומלי וזאת לצורך זיהוי הבדלים גנטיים בין האוכלוסיות שאולי יוכלו לבסס את ההבדלים שנצפו בכושר הריבוי על הפונדקאים.

### 3. ריצוף מקטעי ITS ריבזומלי לאיפיון גנטי של האוכלוסיות. DNA שהופק מכל אחת

מהאוכלוסיות שימש כ template בריאקציית PCR עם התחלים MP581 ו MITS2 (Hugall A. et al.,

1999). השוואת הרצפים שהתקבלו שימשה לבניית עץ פילוגנטי המתואר באיור 6. ניתן לראות שמרבית האוכלוסיות שהתרבו על כותנה התקבצו תחת אותו ענף, תוצאות אלו תומכות בקיומם של הבדלים בכושר הפתוגניות בין האוכלוסיות. בעתיד יבדקו רצפים נוספים שיוכלו להצביע עוד על מקורות השונות הקיימת בין האוכלוסיות.

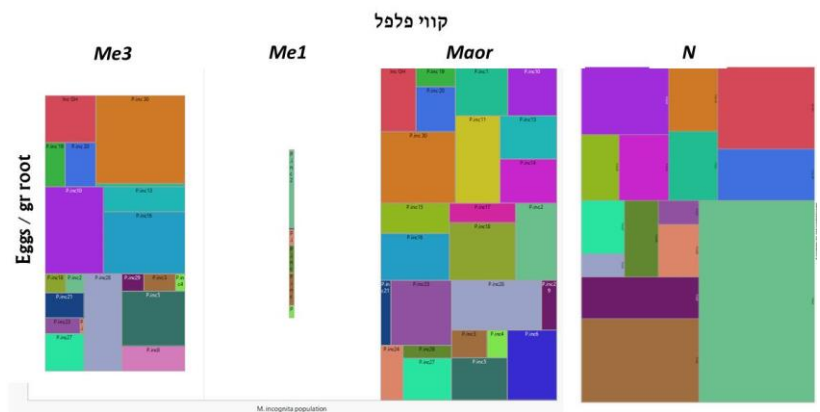


**איור 18.** השוואת רצפי ה ITS הריבזומלי של אוכלוסיות *M. incognita* ששימשו במבחן הפונדקאים. העץ הפילוגנטי שהתקבל מחזק את קיומה של שונות בקרב האוכלוסיות.

### 2. אפיון תגובת מקורות העמידות לאילוח באוכלוסיות שבאוסף.

תגובת מקורות העמידות נלמדה במחקר זה על קווים נושאים את הגנים *Me1*, *Me3* ו *N*. הקווים נושאי עמידות *Me* התקבלו ממעבדתו של פרופ' אילן פארן *Me1* 1094 ו *Me3* 1093 קו נושא *N* התקבל מזרעי סולי

קו Nirwin. בתחילתו של המחקר נלמדה התגובה על מספר מצומצם של האוכלוסיות, אולם על מנת לקבל תמונה משקפת השלמנו את התמונה בכך האוכלוסיות הקיימות באוסף שימשו מאוחר יותר לאילוח שלוש מקורות העמידות כאשר תגובתם השוותה לקו הרגיש *Maor* שאינו נושא עמידות.



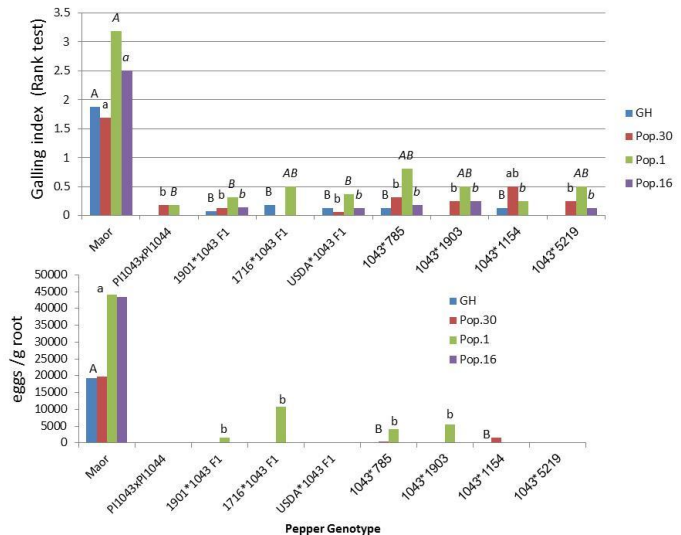
שכל

**איור 19.** לימוד תגובת מקורות העמידות *Me1*, *Me3*, *N* ו *Maor* לכל אוכלוסיות *M. incognita* שבאוסף. כל חמישה צמחים מכל קו שימשו לאילוח כל אחת מהאוכלוסיות. לאחר שמונה שבועות מערכת השורשים נחשפה ואינדקס העפצים ומספר ביצים לגרם שורש חושב. ניתן לראות שהקו נושא *Me1* מציג עמידות רחבה כנגד כל האוכלוסיות.

**5. השפעת הרקעים הגנטיים על ביטוי העמידות המוקנית ע"י *Me1*.** במקביל נלמדה השפעת הרקע הגנטי על ביטוי העמידות כלפי ביוטיפים מייצגים. לצורך כך קווי פלפל (מכלואים) של הקו הנושא *Me1* שהוכנו במעבדתו של פרופ' אילן פארן אולחו ע"י ארבע אוכלוסיות השייכות לאוסף GH, Pinc1, Pinc30, Pinc16 רשימת כל המכלואים ששימשו בניסוי

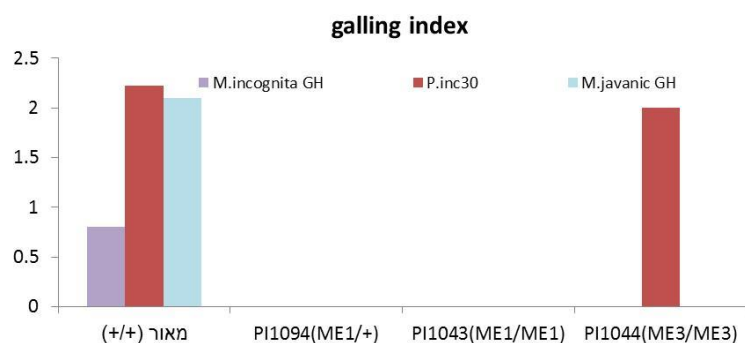
**טבלה 1.** פירוט ההורים ששימשו ליצירת המכלואים

| Parents       |    |
|---------------|----|
| 1901x1043     | F1 |
| 1716x1043     |    |
| USDA65x1043   | F1 |
| 785x1043      | F1 |
| 1903x1043     | F1 |
| 1154x1043     | F1 |
| 5219x1043     | F1 |
| PI1043xPI1044 | F1 |
| Maor          |    |



**איור 20.** אילוח מכלואים הנושאים את הגן *Me1* תחת רקעים גנטיים שונים. ארבעת האוכלוסיות GH, Pop30, Pop1, Pop16 שימשו לאילוח כל הגנוטיפים. ניתן לראות שכל המכלואים נושאי *Me1* מקנים עמידות כנגד האוכלוסיות לעומת הקו הרגיש מאור שאינו נושא עמידות. אולם ניתן לראות שקיימת שונות בין כושר האיכלוס בין האוכלוסיות עם אוכלוסייה Pop1 שמציגה פתוגניות גבוהה יותר, אולם קיימים רקעים גנטיים שמונעים אף ריבוי של אוכלוסייה זו.

זה מפורטת בטבלה 1. בניסוי זה כל המכלואים אולחו ע"י ארבעת האוכלוסיות ובתום שמונה שבועות מערכת השורשים נחשפה נקבע אינדקס העפצים ונספר מספר הביצים לגרם שורש נספר לאחר הפקת הביצים ממערכת השורשים. תוצאות הניסוי שהתקבלו מצביעות כי לרקע הגנטי קיימת השפעה אולם עמידותו הרחבה של הגן *Me1* מספקת עמידות טובה בכל המכלואים שנבדקו (איור 20).

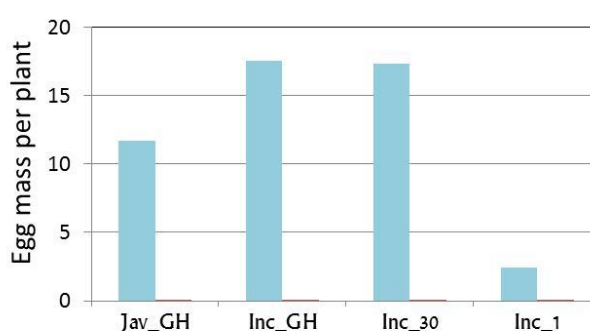
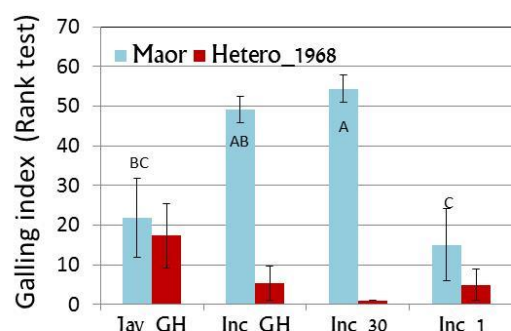


**איור 21.** השפעת המצב האללי של *Me1* ו *Me3* על התגובה לאילוח באוכלוסיות שבמבחן. לצורך מבחן זה ארבעה קווי פלפל הכוללים: קו פלפל הנושא שני אללים של *Me3*, קו פלפל הנושא שני אללים של *Me1*, קו פלפל הנושא אלל *Me1* יחיד לעומת קו פלפל רגיש 'מאור' אולחו בשלוש אוכלוסיות: אוכלוסיית *M. incognita* GH מהחממה, *M. javanica* GH ו *Pinc30*. שמונה שבועות לאחר האילוח מערכות השורשים נחשפו אינדקס העפצים ומספר ביצים לגרם שורש נקבע.

**6. השפעת המצב האללי של הגנים *Me1* או *Me3* על ביטוי העמידות.** מחקרים קודמים במערכות עגבנייה –נמטודה מצביעים שהמצב האללי של הגן לעמידות הטרוזיגוט לעומת הומוזיגוט הינו בעל השפעה על ביטוי העמידות (Iberkleid et al., 2013). על מנת לבחון זאת במחקר זה ארבעה גנוטיפים:

PI1094(*Me1*/+), PI1043(*Me1*/*Me1*), PI1044(*Me3*/*Me3*) לעומת הקוו הרגיש מאור (+/+) אולחו בשלוש אוכלוסיות *Pinc30*, *Minc* GH, *Mjav* GH. לאחר שמונה שבועות מיום האילוח שורשי הצמחים נחשפו ואינדקס העפצים נקבע. אחת האוכלוסיות באוסף *Pinc30* הצליחה להתרבות על קווים הומוזיגוטים *Me3* בעוד לא נצפה כל אילוח ע"י אף אחת מהאוכלוסיות על קווים נושאי *Me1* במצב הטרוזיגוטי *Me1*/+ או הומוזיגוטי *Me1*/*Me1*. תוצאות אלו ממחישות את העמידות הרחבה הניקנית ע"י *Me1* לעומת העמידות *Me3*. כן מוצגת חוסר היעילות של הגן *Me3* לבלום התפתחות של האוכלוסייה *Pinc30* במצב הטרוזיגוטי (*Me3*/+) או במצב הומוזיגוטי (*Me3*/*Me3*).

## 7. השפעת שילוב שני הגנים *Me1* ו *Me3* 'gene pyramiding'



**איור 22.** השפעת שילוב הגנים *Me1* ו *Me3* על התגובה לאילוח באוכלוסיות שבמבחן. לצורך מבחן זה מכלוא הנושא את שתי העמידויות *Me1* ו *Me3* Hetero\_1968 אולחו בארבע אוכלוסיות *M. incognita* GH מהחממה, *M. javanica* GH, *Pinc30* ו *Pinc1*. שמונה שבועות לאחר האילוח מערכות השורשים נחשפו אינדקס העפצים ומספר ביצים לגרם שורש נקבע.

על מנת להבטיח את קיימותה והמשכיותה של העמידות נעשים מאמצים בטיפוח קווים הנושאים

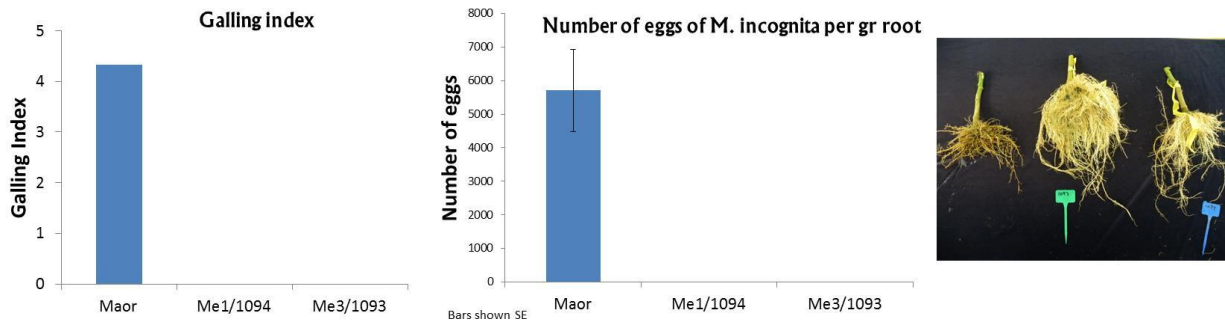
מספר עמידויות. במסגרת המחקר קו מכלוא הנושא את שני הגנים *Me1* ו *Me3* הקו Hetero1968 אולח בשלוש אוכלוסיות: JavGH, Inc GH, Inc 30, Inc 1 ניתן לראות שהקו הנושא את שתי העמידויות לא איפשר ריבוי של אף אחת מהאוכלוסיות. תוצאות אלו מצביעות על פוטנציאל גבוה בשימוש במכלוא הנושא את שתי העמידויות.

### 8. לימוד פוטנציאל שבירת העמידות של קווים נושאי העמידות *Me1* ו *Me3*.

כדי להעריך את פוטנציאל שבירת העמידות בניסויים במו"פ דרום נבנתה תשתית ניסויים בה תאים התחומים ברשת המאפשרת מעבר נמטודות אך לא שורשים, מערכת כזו שימשה ליצירת לחץ סלקציה גבוה. אופן



*Maor*, אוכלוסייה זו יכולה לנוע בחופשיות לתאים המקבילים במשך הסתעפות וגדילת השורש. מבנה כזה מבטיח חשיפה ממושכת של הקווים נושאי העמידות לנמטודות. תיאור המבנה הניסויי מוצג באיור 23. אחר חמישה חודשים מערכות השורשים נחשפו אינדקס העפצים של שורשי הקווים נקבע וכושר הריבוי של אוכלוסיית הביקורת על הקווים נקבע.



**איור 24.** לימוד פוטנציאל שבירת העמידות *Me1* ו *Me3* תחת לחץ סלקצייה גבוה. פוטנציאל שבירת העמידות המוקנית ע"י הגנים *Me1/+*, *Maor*, *Me3/+*, *Maor*, *Me1/+*, *Maor*, *Me3/+* לסירוגים. שתילת הקנים לסירוגים. מבחני סלקצייה מחמירים. *Me3* ו *Me1* מבטיחה את חשיפת מקורות העמידות לנמטודות המתרבות על הקווים הרגשים במשך כל עונת הגידול. תוצאות הניסוי מצביעות שבתקופת הניסוי שנלמדה לא נצפתה שבירת עמידות של הקווים נושאי *Me1* או *Me3* זאת לעומת כושר האיכלוס הגבוה על הקווים הרגשים *Maor*.

תוצאות הניסוי מראות באופן מובהק שהקנים נושאי *Me1* או *Me3* מציגים עמידות במשך כל עונת הגידול זאת למרות לחץ הסלקצייה הגבוה שהופעל במהלך העונה.

## דיון

בסידרת ניסויים מקיפה שבוצעה במסגרת מחקר זה נלמדה תגובת מקורות העמידות הזמינים כיום, *Me1*, *Me3* ו *N* לאוכלוסיות *M. incognita* שנבררו מחלקות פלפל נגועות. מבחני אילוח שבוצעו הראו כי הגן *Me1* בדומה למחקרים קודמים (Castagnone Sereno et al., 2002) מקנה עמידות רחבה וחסונה, אנו הראנו שעמידות זו מונעת מחלה כנגד כל האוכלוסיות שבאוסף והמייצגות חלקות פלפל. בנוסף הראנו כי המצב האללי של *Me3* לא השפיע על ביטוי העמידות, שכן לא המצב ההטרוזיגוטי ולא ההומוזיגוטי הקנה עמידות כנגד כל האוכלוסיות. לעומת זאת הקו נושא *Me1* הקנה עמידות גם במצב הטרוזיגוטי (*Me1/+*) וגם במצב הומוזיגוטי (*Me1/Me1*). יש לציין שבעבודות שנעשו עם R gene אחרים נראה שפוטנציאל השבירה גבוה יותר בקווים הטרוזיגוטים (Iberkleid et al., 2013). כשנלמדה ההשפעה של הרקעים הגנטיים השונים על ביטוי העמידות *Me1*, ניתן לראות באופן כללי שכל המכלואים מקנים עמידות אולם הבדלים הניכרים בכושר האיכלוס של אחת האוכלוסיות *Pinc1* (המציגה אלימות גבוהה) מצביעים על חשיבות הרקע הגנטי. לימוד פוטנציאל שבירת העמידות ע"י בניית המערכת המבטיחה לחץ סלקצייה גבוה בכל עונת הגידול ומדמה חלקות מסחריות הצביעה שבתקופה שנלמדה לא היתה שבירת עמידות המוקנית ע"י הגנים *Me1* ו *Me3*. תוצאות אלו מחזקות את השונות הקיימת בין האוכלוסיות המובילה לתגובה שונה של הקווים לאילוח באוכלוסיות השונות.

### 3.3. התאמת מקורות עמידות של כנות גלעיניים, בדיקת ביצועיהן והערכת כדאיותן הכלכלית

#### התאמת מקורות עמידות של כנות גלעיניים, בדיקת ביצועיהן והערכת כדאיותן הכלכלית

**שותפים:** דורון הולנד, עירית בר יעקוב וכאמל חטיב

**תקציר.** הכנה GF.677, הכנה המסחרית לשקד בארץ, אינה נותנת מענה לקרקעות נגועות בנמטודת העפצים. לשם המשך אחזקת ופיתוח הענף, התחיל ניסוי במטרה למצוא כנה שתוכל לגדול בקרקעות אלה בתנאי אינטנסיפיקציה, שתעניק עץ בריא ויבולים גבוהים, כמקובל על כנת GF.677. הובאו לארץ כנות מספרד 'Garnem' (GN-15), 'Felinem' (GN-22) ו-'Monegro' (GN-9) ומארה"ב 'Nickels', 'Viking' ו-'Hansen 536', העמידות למספר מיני נמטודות. מטרת המחקר היא בחינת ההתאמה של כנות עמידות לנמטודות לגידול זני שקד מסחריים בישראל. ב-2013 ניטעו הכנות הנ"ל מורכבות בזנים 'אום אל פחם' ו'שפע' בהשוואה ל-GF.677 במרכז מחקר נוה יער. העצים מתפתחים יפה ובקיץ 2015 הניבו יבול ראשון.

**מבוא.** נמטודות עפצים התחילו להוות בעיה חמורה במספר הולך וגדל של חלקות שקד, בעיקר בדרום הארץ. חומרי חיטוי קרקע טרום נטיעה דוגמת מתיל ברומיד נאסרו לשימוש והיעילות והכדאיות הכלכלית של נמוצידיים מסחריים קיימים מוטלת בספק. לפיכך, כנה עמידה יכולה להוות פתרון אגרוטכני טוב, ללא שימוש בחומרי הדברה למיניהם. הכנה GF.677, הכנה המסחרית לשקד בארץ, אינה נותנת מענה לקרקעות נגועות בנמטודת העפצים. באזורים שונים בארץ, בעיקר בקרקעות הקלות בדרום, יש נגיעות גבוהה בנמטודת העפצים *Meloidogyne incognita* ו-*M. javanica*. אזורים אלה הינם אזורי גידול של שקד ולשם המשך אחזקת ופיתוח הענף, יש צורך דחוף למצוא כנה, שתוכל לגדול בקרקעות אלה בתנאי אינטנסיפיקציה, ושתעניק עץ בריא ויבולים גבוהים, המקובלים על כנת GF.677. בספרד טופחו שלוש כנות מטיפוס GN ככנות עמידות למספר מיני נמטודות וביניהן נמטודת העפצים. הכנות 'Garnem' (GN-15), 'Felinem' ו-'Monegro' (GN-9) הן מכלואי *Prunus persica* x *Prunus dulcis*. ההורה הזכרי הוא כנת האפרסק 'Nemared', העמידה לנמטודות. הכנות הראשונות נמצאו בניסיונות בעולם כעמידות למספר מיני נמטודות. משתלת זמירי, מיסוד המעלה היא הזכיינית להפצת כנות אלו בארץ. בארה"ב טופחו הכנות 'Hansen 536', 'Nickels' ו-'Viking' ככנות עמידות לנמטודות. הכנה 'Nickels' היא כנת מכלוא *Prunus dulcis* x *Prunus persica* וההורה הנקבי הוא כנת האפרסק 'Nemaguard', העמידה לנמטודות. הכנה עולה בביצועיה בזני השקד המסחריים בארה"ב על ה-'Nemaguard' ועמידה לנמטודת העפצים. משתלת חנני מבית לחם הגלילית היא הזכיינית להפצתה בארץ. הכנה 'Viking' היא כנת מכלוא בין כנת האפרסק

'Nemaguard' לבין כנת מכלוא שבמקורותיה שקד, שזיף ומשמש. הכנה 'Hansen 536' היא מכלוא (interspecies hybrid) Almond B x Sel.1-8-2 ונמצאת בארץ 20 שנה ואף נבחנה בעבר ככנה לשקד. הזן 'אום אל פחם' על 'Hansen 536' נתן במבחן זה תוצאות טובות והתנהגותו היתה דומה מאד לזו של הכנה GF.677. שתי הכנות האחרונות יובאו לארץ לשימוש כלל הציבור.

**מטרות המחקר:** בחינת ההתאמה של כנות עמידות לנמטודות לגידול זני שקד מסחריים בישראל. לבחון האם ביצועי הזנים הישראליים על הכנות הנ"ל מצדיקים את השימוש בהן.

### פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו.

**א. שתילת סידרת הכנות בחלקה בנווה יער.** בקיץ 2012, לאחר שכל הכנות שוחררו מהסגר ונמצאו בכמות מספקת, הועברו לנווה יער הכנות 'Garnem (GN-15)', 'Felinem' (GN-22), ו-'Monegro' (GN-9).

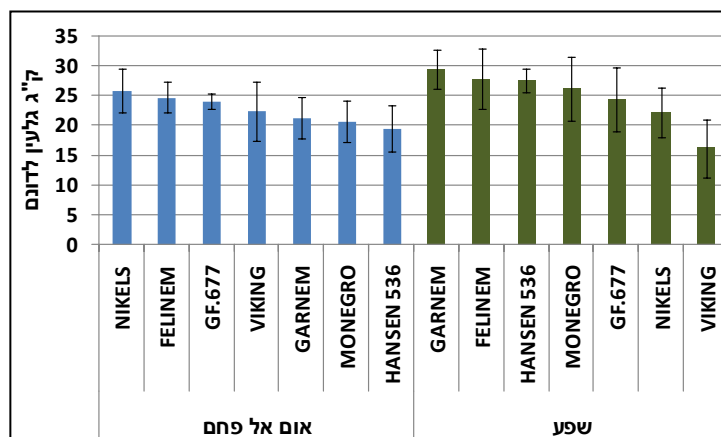


מנמרוד זמירי (זמירי משתלות בע"מ, יסוד המעלה) והכנות 'Nickels', 'Viking', 'Hansen 536' ו-GF.677 מזהר חנני (משק חנני משתלות עצי פרי, בית לחם הגלילית). הכנות היו בעצצים והורכבו ב-29/7/12 בנווה יער בזנים 'אום אל פחם' ו'שפע'. הנטיעה נעשתה ב-20/1/13 על גדודיות, בשלוש חזרות של שלושה עצים, במרווח נטיעה 6 x 7 מטר, שורה לזן לסירוגין. העצים מפותחים יפה ואין עצים חלשים או חסרים (איור). כבר בקיץ 2014 היו פירות בודדים שלא נקטפו ובקיץ 2015 נקטף יבול ראשון.

באיור 26 מובא היבול בק"ג גלעין לדונם. היבולים עדיין נמוכים (כצפוי לגיל זה) ונעים בין 20 ל-30 ק"ג גלעין. יש לציין שבשנה זו בעצים בוגרים במטעים מסחריים היבול עמד על כ-50 ק"ג/ד'. היבול של הזן 'שפע' מעט גבוה משל הזן 'אום אל פחם'. היבול מוצג על פי גובה היבול בכל זן ורואים שיש הבדל בין הכנות ושהסדר שונה בין שני הזנים. ההבדל בין הכנות אינו מובהק סטטיסטית והעצים עדיין צעירים ולכן לא ניתן להסיק מסקנות

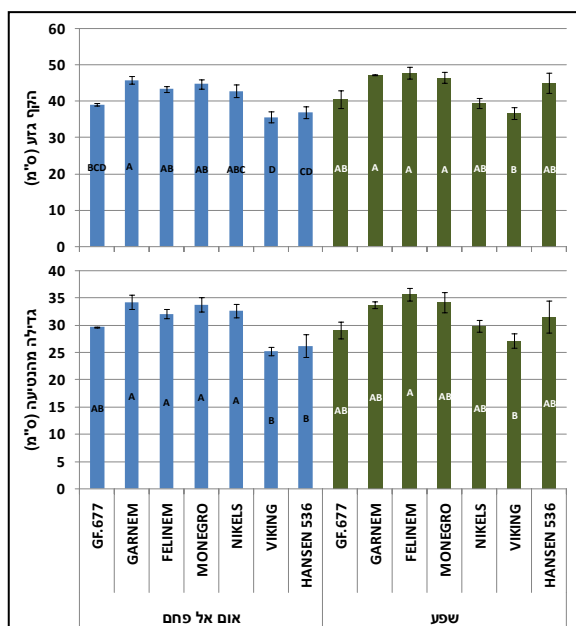
**איור 25.** מראה עצים מהמבחן בינואר 2015: הזנים 'שפע' ו'אום אל פחם' על כנות GN 'גרנם' ו'פלינם'.

כלשהן לגבי הצטיינות הכנות והשוואתן לכנה המסחרית הנהוגה. הגלעין היה גדול בכל הכנות (כ-1.4-1.6), ללא הבדל מובהק סטטיסטית ואיכותו דומה מאד בכל הכנות.



**איור 26.** שקילת היבול של הרכבים 'שפע' ו'אום אלפחם' על הכנות השונות בק"ג גלעין לדונם. כפי שניתן להתרשם היבולים עדיין נמוכים (כצפוי לגיל זה) ונעים בין 20 ל-30 ק"ג גלעין. יש לציין שבשנה זו בעצים בוגרים במטעים מסחריים היבול עמד על כ-50 ק"ג/ד'. היבול של הזן 'שפע' מעט גבוה משל הזן 'אום אל פחם'. היבול מוצג על פי גובה היבול בכל זן ורואים שיש הבדל בין הכנות ושהסדר שונה בין שני הזנים. ההבדל בין הכנות אינו מובהק סטטיסטית והעצים עדיין צעירים ולכן לא ניתן להסיק מסקנות כלשהן לגבי הצטיינות הכנות והשוואתן לכנה המסחרית הנהוגה.

מדידת היקף הגזע נעשתה מדי סתיו מאז הנטיעה. המדידה האחרונה מסתיו 2015 מראה שבשלב זה העצים של הזן 'שפע' מעט גדולים יותר או דומים לעצי הזן 'אום אל פחם' ושהיחס בין גודל העצים על הכנות שונה בכל זן. ממועד הנטיעה גדל היקף הגזע ב-25-35 ס"מ ועומד היום על 35-48 ס"מ. ההבדל בין היקפי הגזע בכל זן מובהק סטטיסטית (איור 27). לכנות ה-GN עץ יותר גדול, אך לא בהכרח יבול יותר גבוה. עדיין מוקדם להסיק מסקנות בנוגע לגודל העצים ולאיכות הכנה.



**איור 27.** הקף הגזע וגדילתו ממועד הנטיעה של הזנים 'אום אל פחם' ו'שפע' על כנות שונות בסתיו 2015.

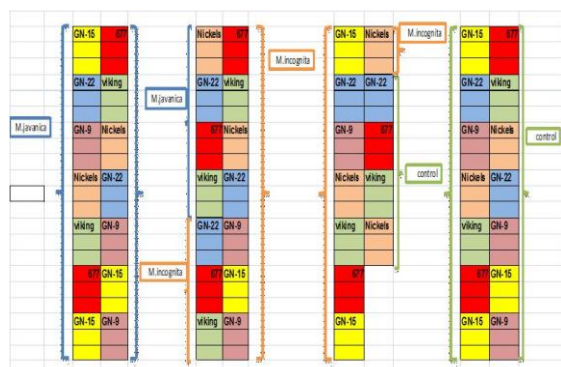
**דיון.** כל הכנות שתוכננו להינטע ניטעו והן מתפתחות היטב. מעקב אחר התפתחות העצים על הכנות השונות וביצועיהן דורש זמן. במשך שנתיים ששני הזנים פרחו היתה חפיפה בין מועדי הפריחה, דבר המאפשר הפריה הדדית בין הזנים. מחנטיים. ב-2015 התקבל יבול ראשון. יש הבדל בין הכנות בקצב הגדילה וביבול. בזן 'שפע' יש מתאם כללי בין גודל העץ לגובה היבול וב' אום אל פחם' אין מתאם כזה בשלב זה. הכנות שבלטו בזן אחד לא בהכרח בלטו גם בזן השני. יש להתאים לכל זן את הכנות בנפרד. העצים מתפתחים היטב ומניבים על כל הכנות, אך הניסוי נמצא בשלבי הראשונים ומוקדם להסיק מסקנות.

## 2. התאמת מקורות עמידות חדשים של כנות גלעיניים לנמטודות במטעים

**שותפים:** סיגל בראון, פטריסיה בוקי, שמעון אנטמן ודורון הולנד

**מבוא.** הכנה GF.677, הכנה המסחרית לשקד בארץ, אינה נותנת מענה לקרקעות נגועות בנמטודות העפצים. באזורים שונים בארץ, בעיקר בקרקעות הקלות בדרום, ישנה נגיעות גבוהה בנמטודות העפצים *Meloidogyne incognita* ו-*M. javanica*, הנובעת מאינטנסיביות גידולים חקלאיים בחלקות וכן תחום הפונדקאים העצום של נמטודות העפצים המאפשר את הישרדותם בקרקע. אזורים אלה הינם אזורי גידול של שקד ולשם המשך אחזקת ופיתוח הענף, יש צורך דחוף למצוא כנה שתוכל לגדול בקרקעות אלה בתנאי אינטנסיפיקציה, שתעניק עץ בריא ויבולים גבוהים, המקובלים על כנת GF.677. במסגרת המיזם החלו להיבדק כנות חדשות אשר טופחו בספרד כנות מטיפוס GN כעמידות למספר מיני נמטודות וביניהן נמטודות העפצים ביניהן הכנות 'Garnem' (GN-15), GN 22 ו-GN 9 וכן הכנות Hansen, Citation, במבחנים אלו הציגו הכנות GN-15 ו-Hansen 536, עמידות לנמטודות. על מנת להרחיב את סידרת הכנות שיכולה לשמש לשינטוע מטעים בעלי נגיעות גבוהה המשכנו במסגרת מיזם זה לבחון את תגובתם של כנות נוספות חדשות גם הן מסדרת GN, (GN-22) 'Felinem', ו-'Monegro' (GN-9) ושתי כנות נוספות שטופחו בארה"ב 'Viking' ו-'Nickel' להדבקה בנמטודות העפצים. לתוצאות מחקר זה חשיבות עליונה, שכן שנטוע מטע הינו תהליך יקר ולבחירת הכנה משקל רב שייקבע את רווחיותו של המטע. מכאן מידע מלא בדבר עמידות/רגישות של הכנות החדשות לשני מיני נמטודות העפצים הנפוצים בארץ הינו מחייב. בשנה הקרובה יצטברו תוצאות נוספות שייתרמו מידע נוסף לגבי כדאיותן הכלכלית של הכנות.

**פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר.** כדי ללמוד לעומק על תגובת הכנות החדשות הועמד מבחן סריקה רחב היקף בבית הרשת שבמחלקה לנמטולוגיה. הכנות מסדרת GN סופקו ע"י משתלת זמירי מיסוד המעלה וכללו את הכנות 'Garnem' (GN-15), 'Felinem' (GN-22), ו-'Monegro' (GN-9). שתי הכנות הנוספות 'Viking' ו-'Nickels' סופקו ע"י משתלת זוהר חנני מבית לחם הגלילית. כביקורת שימשה הכנה הרגישה



GF-677. כל הכנות נשתלו בדליים בנפח של 10 ליטר שמולאו באדמת חמרה (גבעת עדה). הניסוי כלל שלושה טיפולים בכל טיפול נבחנו שש

**איור 28.** מפת הניסוי המתארת את אופן העמדת מבחן סריקת הכנות. במבחן הכנות נכללו שש כנות: 3 כנות מסדרת GN ועוד 2 כנות Nickel ו-Vicking וכנת הביקורת GF-677. הכנות נשתלו באדמת חמרה והונחו להתאקלמות למשך חודש לאחריו אולחו בנמטודות יוצרת העפצים כאשר טיפול 1 ו-2 כלל אילוח במינים *M. incognita* ו-*M. javanica*. בהתאמה וטיפול 3 הינו טיפול ביקורת ללא אילוח. לאחר חמישה חודשים מהאילוח מערכות השורשים נשטפו היטב ונגיעותם בנמטודות הוערכה ע"י מבחן אינדקס עפצים.

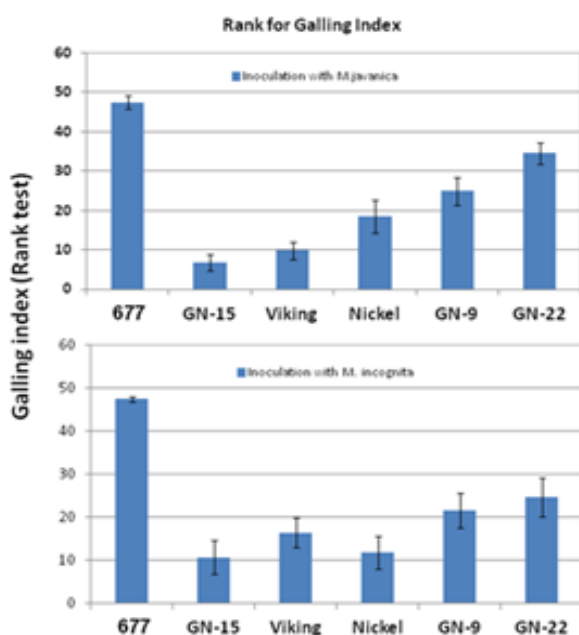
הכנות המוזכרות

מעלה. **טיפול 1:**

אילוח בנמטודות

יוצרת העפצים ממין

*M. javanica*. **טיפול 2:** אילוח בנמטודות יוצרת העפצים *M. incognita* **טיפול 3:** ביקורת ללא אילוח. בכל טיפול נבחנו תשע חזרות לכל כנה שסודרו בשלושה בלוקים (איור 28). חודש לאחר התאקלמות אולחו



העצים ב-25,000 ביצים שהושמו בצורת רסק שורשים טחונים בגומה מסביב לכל כנה. חמישה חודשים לאחר האילוח הוצא בית השורשים של כל עציץ ונשטף היטב והובא להערכת נגיעות בנמטודות על פי הממד האיכותי של אינדקס עפצים וכן נלקחו דוגמאות להפקת ביצים לקביעת כושר התרבות הנמטודה על כל כנה. תוצאות מבחן הכנות מובאות כאן באופן חלקי, שכן הפקת הביצים ממערכת

**איור 29.** אינדקס עפצים של הכנות GF-677, GN-15, GN-9, GN-22, Nickel ו-Viking כפי שחושב ע"י Ranking test. לעומת הכנה הרגישה GF-677 כל חמשת הכנות האחרות מציגות עמידות יחסית לנמטודת העפצים. אולם התעבויות שנראו בשורשים נלקחו להמשך איבחון ולקביעת כושר ההתרבות של הנמטודות על הכנות הנבחנות.

השורשים של כל כנה מתבצעת כעת ועדיין לא הושלמה. סיווג מערכות השורשים של הכנות לפי אינדקס העפצים מוצג באיור 29. התבוננות בתוצאות המנותחות של אינדקס העפצים (איור 29) ובתמונות מערכת השורשים של כל הכנות שתועדו (איור 30) מראה כי חמשת הכנות שנבחנו כאן מול הכנה הרגישה מציגות עמידות יחסית. אולם בסידרת ה GN, לפי התוצאות שהתקבלו עד כה נראה שהכנה GN-15 עמידה יותר מהכנות GN-9 ו GN-22, למרות שהבדל התחלתי בגודל השתיל ששימש במבחן היה שונה מאוד ועלול להשפיע על התוצאות. שתי הכנות האחרות Viking ו Nickel, גם הם הציגו עמידות יחסית אולם התעבויות הנראות כעפצים בודדים שוב נצפו על מערכת השורשים. מכאן העמידות שנצפית בכנות החדשות אינה עמידות מוחלטת. תוצאות נוספות המתארות את מספר הביצים שנוצר על מערכת השורשים יימסרו מידע חשוב לפני הערכה סופית של הכנות.



**איור 30.** מופע עפצים בכנות הנבנות GN-15, GN-9, GN-22 והכנות Nickel ו Viking לעומת הכנה הרגישה GF-677. שורשי הכנות נשטפו היטב ונגיעות מערכת השורשים נקבעה. בתמונות המובאות ניתן לראות מופע עפצים כבד על פני מערכת השורשים של הכנה GF-677, בכנות האחרות מופע העפצים היה מפוזר מאוד ולא אחיד.

**דיון.** כל הכנות שנבדקו במבחנים GN-15, GN-9, GN-22 והכנות Viking מציגות עמידות יחסית. אולם הכנה GN-15 נראה שמשיגה עמידות גבוהה יותר מכל שאר הכנות. אולם התוצאות שהצטברו בתקופת המיזם יוכלו לסייע בבחירת כנה מתאימה למטע בהתחשב בתנאי הקרקע בחלקה, ברוכב בו רוצים להשתמש וכמובן בעובדה אם קיים רקע של נגיעות בנמטודות בחלקה.

### 3.4. השפעת הגומלין בין החיידק *Agrobacterium tumefaciens* ונמטודת יוצרת העפצים בכנות גלעיניים

**שותפים:** סיגל בראון הורוביץ, שולה מנוליס, שולה צ'לופוביץ, פטריסייה בוקי, שמעון אנטמן

**תקציר.** מטרת העבודה הנוכחית הייתה לאפיין את מהות יחסי הגומלין שבין הפתוגן המחולל את מחלת האגרובקטריום בשקדים *Agrobacterium tumefaciens* ובין נמטודת יוצרת העפצים מהסוג *Meloidogyne javanica* והשפעתם של יחסים אלו על התפתחות המחלה בעצי שקד בתנאי הגידול בארץ. הרקע למחקר זה נובע מרגישות גבוהה מאוד של מטעי שקד לשני פתוגנים אלו המהווים אתגר גדול איתו מתמודדים מגדלי המטעים. עובדה זו הובילה לשאלת המחקר הנוכחית תחילה האם בקרקע המאולחת בנמטודות יוצרות עפצים מסוג *Meloidogyne* ובחיידקים הגורמים למחלת האגרובקטריום בשקדים הנזק לעצים חמור יותר? בנוסף, עלתה השאלה כיצד מגיבות הכנות החדשות שנבדקות במסגרת המיזם לאילוח ב *A.tumefaciens* וכן עבור כל אחת מהכנות האם הנזק הנגרם בשילוב שני הפתוגנים חמור יותר מאשר הנזק שנגרם בנזכרות כל פגע בנפרד. התוצאות שהצטברו במשך תקופת המחקר הצביעו באופן ברור כי מבין הכנות GN-15, Hansen ו GF-677 כולן הראו רגישות להדבקה באגרובקטריום. אולם קיומה של השפעת גומלין חיובית נצפתה רק על הכנה הרגישה GF-677. כדי להמשיך וללמוד על תגובת סידרת הכנות להדבקה באגרובקטריום הועמד ניסוי נוסף שכלל את הכנות 'Viking' ו 'Nickels' וכן את הכנה הרגישה GF-677 אולם מאחר שהתפתחות מחלת האגרובקטריום על העצים דורשת זמן ארוך ניסוי זה עדיין לא פורק וזאת כדי לקבל תמונה אמינה ככל שאפשר לגבי רגישות הקווים. כדי ללמוד לעומק את האינטרקציה הקיימת בין החיידק *A.tumefaciens* ונמטודת העפצים צוות המעבדה אצל דר' שולה מנוליס יצר חיידקים הנושאים את הגן המדווח GFP. בסידרת ניסויים המתבצעת כעת נלמד פוטנציאל כושר נישאות החיידק ע"י הנמטודה. לפרק זה של המיזם, למרות שעדיין חלק מממצאיו עדיין נחקרים, חשיבות גדולה ביישום טיפולי קרקע ופעולות הדברה אחרות שנועדו לצמצם את הנגיעות בנמטודות עוד בטרם שתילה וזאת על מנת לצמצם את כושר הפתוגניות של מידבק חיידקי *A.tumefaciens* מהקרקע.

**מבוא.** עבודות קודמות שנעשו מצביעות על פוטנציאל גבוה של נמטודות טפילות לצמחים להגביר רגישות לגורמי מחלה זאת באמצעות יכולת הפציעה שלהם ויצירת פתחים המאפשרים חדירה והתבססות מהירה של גורם המחלה השני. הנמטודה הטפילה יכולה לשמש כנשא לחיידק בקרקע, לסייע בחדירה ולהביא ליתרון בהתבססות ע"י

יצירת פצעים בשורשים. בספרות הצטבר מידע רב לגבי אינטרקציה כזו בין נמטודות טפילות וחיידקי קרקע שונים לדוגמה אינטרקציה כזו תוארה לעומק בין הנמטודה *M. javanica*

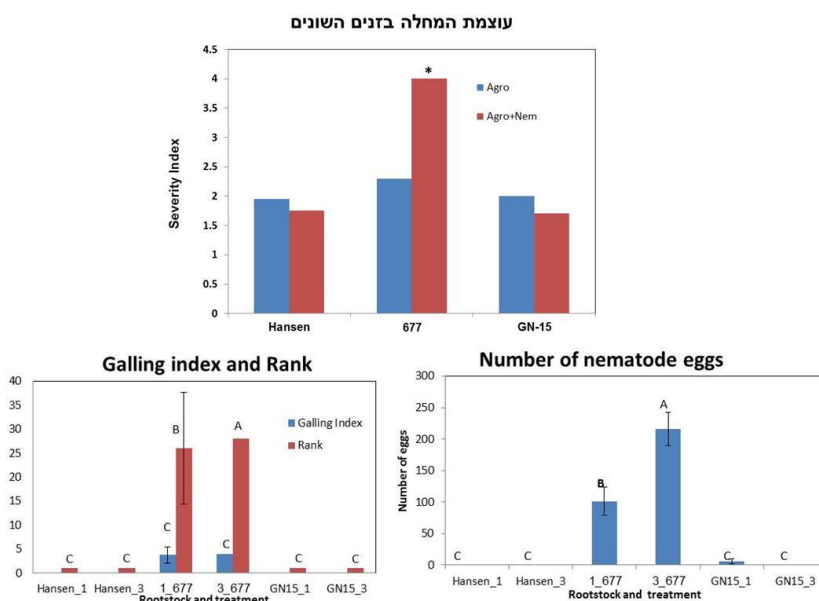


איור 31. מופע עפצים הנגרמים ע"י *A. tumefaciens* בכנת GN-15, מטיפוס Garnem.

והחיידק *Pseudomonas marginata* (El-Goorani et al., 1974) דוגמה נוספת של אינטרקציה כזו תוארה במערכת בין החיידק *Corynebacterium michiganense* ונמטודת יוצרת העפצים *M. incognita* בעגבנייה (de Moura, R.M. 1975).

על מנת ללמוד על תגובת הכנות לשני גורמי המחלה והשפעת הגומלין ביניהן הועמד בשנת המחקר הראשונה ניסוי דו גורמי עם שלוש כנות נבחרות כמתואר: הגורם הראשון היה הכנה כאשר שלוש כנות נבחרו לצורך מבחן הכנה (Garnem) GN-15, הכנה Hansen שהראתה בעבר עמידות לנמטודות וכן הכנה הרגישה מאוד לנמטודות GF-677. הגורם השני בניסוי הינו הפתוגן כאשר כאן נבחן כל פתוגן בנפרד

*A. tumefaciens* ונמטודת העפצים *M. javanica*, שני הפתוגמים יחדיו וכן ביקורת ללא אילוח כלל. הניסוי הוצב בבית הרשת שבמחלקה לפתולוגיה. הכנות GN-15 ו GF-677 סופקו ע"י משתלת זמירי והכנה Hansen ע"י משתלת זוהר חנני. הכנות נשתלו בקרקע חמרה אדומה שאולחה לפני השתילה בכל אחד מהפתוגמים באילוח



איור 32. לימוד השפעת הגומלין בין נמטודת יוצרת העפצים וחיידק *A. tumefaciens*. באיור ניתן לראות את עוצמת המחלה הנגרמת ע"י אגרובקטריום וע"י נמטודת העפצים כשכל אחד מגורמי המחלה שימש לאילוח לבדו לעומת השפעת השילוב של שניהם.

נמטודות לכל דלי הוספו 40,000 ביצי נמטודות ולילוח אגרובקטריום הוסף לקרקע תרחיף חיידקי וכן פציעת גזע השתיל. שמונה חודשים לאחר האילוח נלקחו חמישה עצים מכל טיפול ומכל כנה להערכת הנגיעות בשני גורמי המחלה. לפי התוצאות שהתקבלו הכנה GN-15 ממשיכה להציג עמידות לנמטודות תחת התנאים שנבחנו בדומה לכנת Hansen שאף היא הציגה בעבר עמידות לנמטודות (סיגל בראון וחובריה 2012). באילוח הכנות בחיידק *A. tumefaciens* בלבד, בדומה לתוצאות ולידע שיצטבר בעבר, שתי הכנות Hansen ו GF-677 הציגו רגישות גבוהה לחיידק. בנוסף, גם על הכנה החדשה GN-15 נראו סימני עפצים אופייניים לחיידק, מכאן כנה זו רגישה לחיידק *A. tumefaciens* (איור 31). בשילוב שני הפתוגנים יחדיו נראה כי כושר הריבוי של נמטודת העפצים על הכנה GF-677 דומה לזה שעל הכנה שאולחה בנמטודות בלבד. מכאן אילוח באגרובקטריום כנראה אינו משפיע על כושר הריבוי של הנמטודה בשלב זה. בדומה לכך עצם האילוח באגרובקטריום וההדבקה בו של כנות GN-15 ו Hansen לא השפיע על עמידותן היחסית לנמטודות העפצים (איור 13). בעקבות התוצאות שהצטברו עד כה והעובדה שהחיידק *Agrobacterium tumefaciens* מהווה מזיק חשוב במטעים עלה הצורך בבחינת תגובתם של הכנות

הנוספות מספרד מסידרת ה GN (GN-9, GN-22) וכן הכנות שבמקור מארה"ב Nickels ו Viking לחיידק A. tumefaciens. במהלך השנה השנייה הרחבנו את מבחן תגובת הכנות לנמטודות ולאגרובקטריום בנפרד וכן נלמדה השפעת הגומלין של שני גורמי המחלה על כל אחת מהכנות הבאות: GF-677 כנת הביקורת הרגישה מול הכנות Nickels ו Viking שהראו עמידות יחסית לנמטודות במהלך שנת המחקר הראשונה. מאחר שהתפתחות מחלת האגרובקטריום בעיקר מתרחשת בסתיו ובאביב אנו נרצה לסיים את הניסוי בסוף אביב 2016 על מנת לקבל תסמיני מחלה ברורים בכנות. אופן העמדת הניסוי מתואר באיור 33.

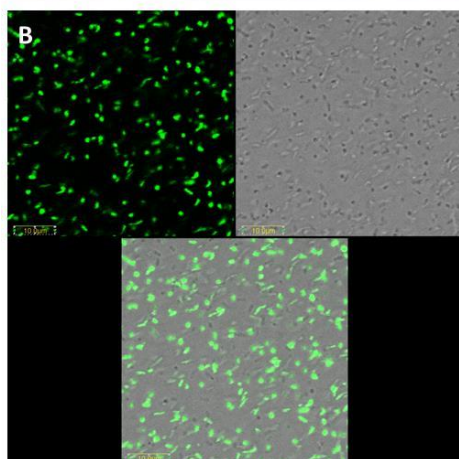
סימני הפריחה והלבלוב הנראים בצמחים הנכללים בניסוי מצביעים על התעוררות בית השורשים אשר יאיץ את תסמיני

**איור 33.** הצבת מבחן השפעת הגומלין *A. tumefaciens* ונמטודות יוצרת העפצים. הניסוי כולל ארבעה טיפולים: א. אילוח בנמטודות בלבד. ב. אילוח באגרובקטריום בלבד. ג. אילוח באגרובקטריום ונמטודות. ד. ביקורת כנות לא מאולחות. שלוש כנות שימשו בניסוי הכנות העמידות לנמטודות Viking ו Nickels והכנה הרגישה GF-677.

[illegible]

המחלה הנגרמים ע"י *A. tumefaciens*.

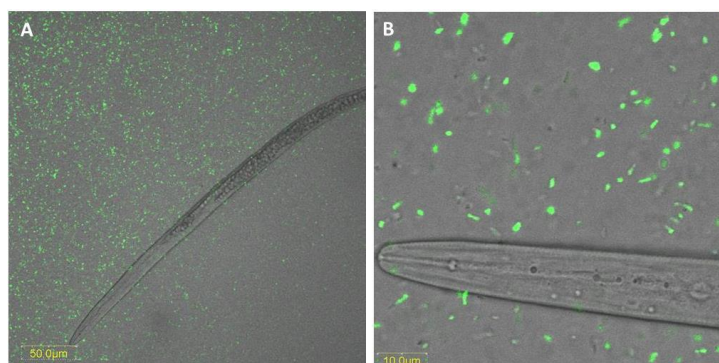
### לימוד פוטנציאל הנמטודה *M. javanica* לשמש כנשאית לחיידק *A. tumefaciens*



כדי ללמוד לעומק על יחסי הגומלין של שני גורמי המחלה נמטודת יוצרת העפצים מסוג *Meloidogyne* והחיידק *Agrobacterium tumefaciens* המסבים נזק רב במטעים גלעניים יצרנו חיידק *A. tumefaciens* המבטא את הגן המדווח GFP. השתמשנו לצורך כך בשני תבדירים של *A. tumefaciens* העמידים לסטרפטומיצין A5 ו-13bs אשר בודדו בארץ ע"י מעבדתה של דר שולה מנוליס. אל תבדירי החיידקים החדרנו באמצעות אלקטרופורזיה פלסמיד הנושא את הגן המדווח המקודד לחלבון GFP (איור 34). בימים אלו מתבצעות עבודות הבאות ללמוד על כושר הנמטודה לשמש נשאית (vector) לחיידקים אלו. סדרת הניסויים כוללת את הדגרת הנמטודות והחיידקים לפרקי זמן שונים אחריהם הנמטודות נשטפות היטב ונצפות במיקרוסקופ הקונפוקאלי על מנת לזהות אתרי היצמדות של החיידקים לשטח פני הנמטודה. תוצאות חלק זה של עבודה יוכלו לחזק את האפשרות שישנה השפעת גומלין בין שני הפתוגנים.

**איור 34.** אינטרקציה בין *A. tumefaciens* ונמטודת יוצרת העפצים. **A.** פוטנציאל הנישאות של החיידק ע"י הנמטודה יכול להגביר את עוצמת המחלה הנגרמת ע"י החיידק זאת ע"י שיפור החדירה לרקמות השורש. **B.** חיידקי *A. tumefaciens* מותמרים בפלסמיד נושא הגן המדווח

בניסויים שבוצעו עד כה במערכות in – vitro הכוללות נמטודות וחיידקי *A. tumefaciens* בתמיסת MES לא נצפתה היצמדות של החיידקים לנמטודה לאחר סידרת שטיפות של הנמטודות בתום פרק זמן ההדגרה (איור 35).



**איור 35.** אינטרקציה בין *A. tumefaciens* ונמטודת יוצרת העפצים. **A.** מראה הנמטודה ומסביבה חיידקים המבטאים את החלבון GFP. **B.** חיידקי *A. tumefaciens* מותמרים בפלסמיד נושא הגן המדווח GFP. תוצאות אלו במתכונת שבוצעו אינן מצביעות על פוטנציאל היצמדות או קשירה בין החיידק והנמטודה.

אולם יש לזכור כי התנאים אשר בהם נבחנה האינטרקציה אינם התנאים הטבעיים הקיימים בקרקע. בסדרת ניסויים אשר נעשית בימים אלו אנו בוחנים את פוטנציאל הנישאות של *A.tumefaciens* על גבי הנמטודה בקרקע כן תילמד האינטרקציה בנוכחות שורשי עגבנייה.

**דיון.** ליחסי גומלין מאפיינים שונים. בעוד שיחסי הגומלין יכולים להיות מועילים לשני הצדדים, יחסי הדדיות (מוטאליזם) הם לעיתים אינם הכרחיים ורק מעלים את כשירותם של שני הפתוגנים או רק אחד מהם לבית הגידול. ממצאי מחקר זה, יחד עם הידוע בספרות, מצביעים כי שני הפתוגנים *A.tumefaciens* ונמטודת העפצים *Meloidogyne javanica* הם בעלי פוטנציאל לגרום למחלה ללא תלות האחד בשני. יתרה על כן, התוצאות המובאות כאן מראות כי שילוב שני הפתוגנים יחדיו משפיעים על כושר הריבוי של הנמטודה על הכנה הרגישה GF-677. יתכן כי הגברת הרגישות הנצפית היא כתוצאה מהיחלשות מערכת ההגנה הצמחית כתוצאה מההדבקה באגרובקטריום. תוצאות ההגברה של תסמיני המחלה שנראים בשילוב שני הפתוגנים יחדיו מהווה את בסיס הסינרגיזם. לסיכום, התוצאות שהצטברו מהניסויים האחרונים מצביעות שטיפולים כנגד נמטודת העפצים יכולים להוות הגנה נוספת בפני התפרצות אגרובקטריום וזאת ע"י צמצום הפוטנציאל של מקור המידבק החיידקי מהקרקע.

### 3.5. הדברה ביולוגית של נמטודות טפילות לצמחים באמצעות הנמטודה הטורפת *Koerneria sudhausi*

**שותפים:** יוז'י אוקה, שפיגל יצחק, סיגל בראון, פטה גורונג

**תקציר.** בפרק זה של המחקר ביקשנו לקדם את השימוש בנמטודה טורפת, שוכנת קרקע, אשר בודדה על ידנו ונחקרת במעבדתנו, ליישום כמדביר ביולוגי של נמטודות טפילות על צמחים. ייחודו של מחקר זה הוא זיהוי נמטודה טורפת אשר נמשכת לצברי ביצים של נמטודה יוצרת העפצים, ניזונה עליהם ובכך בעלת פוטנציאל להוריד את גודל האוכלוסייה של נמטודת העפצים בקרקע. מדביר ביולוגי המבוסס על נמטודה טורפת נמטודות טפילות לא קיים, למיטב ידיעתנו, בשוק. הפרויקט המבוקש התרכז במענה לבעיות טכנולוגיות שפתרון יסלול הדרך להציע תכשיר לתעשייה, קרי: א. כיוול שיטת ייצור המוני והדיר של הנמטודות הטורפות, עם העדפה לשלב העמיד יותר לתנאי-עקה, שלב ה- dauer. ב. פיתוח פרוטוקול היישום היעיל ביותר של הנמטודות הטורפות בתנאי שדה. במשך השנה השנייה של המחקר החל במקביל פרוייקט מטעם משרד התעשייה והמסחר, פרוייקט קמין זאת על סמך תוצאות מבטיחות שהתקבלו במסגרת המיזם.

**מבוא.** בחקלאות האורגנית אין כיום בנמצא פתרון יעיל כנגד נמטודות העפצים וההדברה הביולוגית הניבה עד כה מעט מוצרים שחלקם עדין לא הוכחו כבעלי כדאיות כלכלית. החידוש החקלאי של חלק זה של המאמץ הרב תחומי שבמיזם מתבטא ביכולת הפוטנציאלית הגלומה בנמטודות הטורפות, מושא עבודתנו, שבודדו במחלקה לנמטולוגיה, להדביר את הנמטודה יוצרת העפצים (שכאמור מהווה נזק כלכלי/חקלאי ממדרגה ראשונה) ונמטודות טפילות על צמחים נוספות. הנמטודה *Koerneria sudhausi* השייכת לסידרה Diplogastridae הוגדרה לראשונה ע"י Fürst von Lieven, 2008 לאחר שבודדה כאמור במחלקה לנמטולוגיה שבמינהל המחקר. למרות הידע הספרותי על נמטודות טורפות הקיים כבר זמן רב, החידוש המדעי מתבטא במחקרי ההתאמה שנעשו לנמטודה ספציפית זו אשר מלבד המאמר המביא תיאורים ראשוניים על מחזור החיים של הנמטודה ואינדיקציות ראשוניות לפוטנציאל השימוש בה כמדביר ביולוגי (Bar Eyal et al 2008; Fürst von Lieven, 2008), אין כל מידע נוסף בדבר שיטות ריבוי 'המוניות' של הנמטודות הללו, הישרדותן וריבויין בתנאים שונים ויעילותן כושרן לפעול כטורף. מאפיינים אלו יקבעו את היתכנות ניצול הפוטנציאל הביונמטוצידי של הנמטודות הטורפות לשימוש מקובל בחקלאות האורגנית. בשלב המחקר ההתחלתי הגענו לגידול תרבית נמטודות בה מספר חיידקים מצומצם ופיתחנו פרוטוקול גידול

לרובי הנמטודות. הועמדו שלושה ניסויים עם מספר חזרות שהצביעו על סוג הקרקע בו כושר ההישרדות של נמטודות אלו הוא הגבוה ביותר. המשך הניסויים המתוכנן יסייע בבחירת התנאים שייתמכו בנמטודה וישפרו את כושר יעילותה כמדביר ביולוגי. אנו מצפים כי בסיום מועד המחקר המוצע, יצטברו די נתונים אשר יאפשרו לחברה מסחרית להתאים תכשיר (bio-agent) אשר יבחן בתנאי שדה.

במסגרת המיזם התקבל סטודנט לתואר שני מר פאטה גורונג אשר מחקרו התרכז בלימוד הגורמים המשפיעים על חיוניות והישרדות הנמטודה הטורפת *K. sudhausi*: א. נלמדה השפעת החיידקים שנמצאים באסוציאציה עם הנמטודה על כושר הישרדותה. ב. נלמד כושר המשיכה של הנמטודה לשקי ביצים של נמטודת העפצים. ג. נלמדה השפעת החיידקים הנמצאים באסוציאציה על גידול המוני של הנמטודה (mass production). ד. נלמדה יעילות ההדברה של הנמטודה כנגד נמטודת העפצים (איור 36).



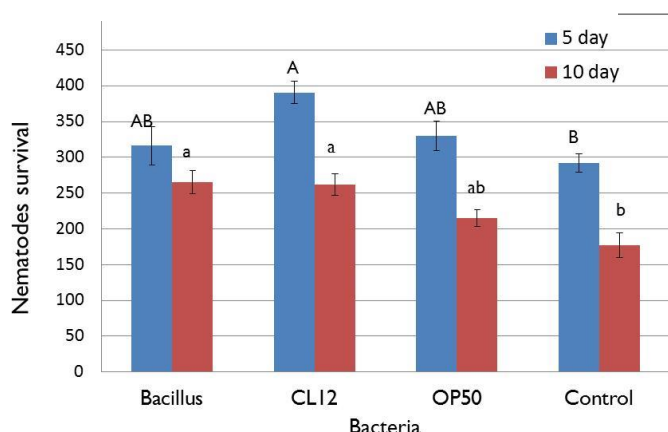
איור 36. משיכה של הנמטודה *K. sudhausi* לעבר שק ביצים של נמטודת העפצים. C, *E. coli* OP50 המשמש מקור מזון לגידול הנמטודה.

### פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר.

#### השפעת החיידקים הנלווים על כושר ההישרדות של הנמטודה

##### *Koernaria sudhausi*

בין הגורמים הבינטיים היכולים להשפיע על הישרדות הנמטודות, לסוג החיידקים הנלווים יכולה להיות חשיבות רבה שכן בהעדר הטרף המועדף מקור מזון חיידקי יכול לשמש לתמיכה באוכלוסייה לתקופה זו. במסגרת המחקר שבוצע בדקנו את ההשפעה של שלושה חיידקים על כושר ההישרדות: החיידק



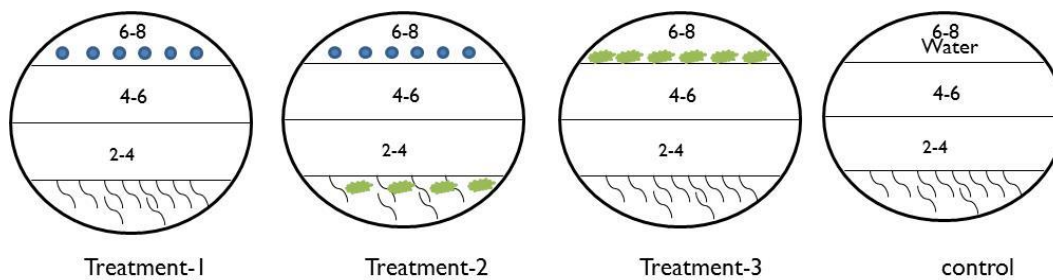
איור 37. השפעת החיידקים הנלווים על כושר ההישרדות של הנמטודה *Koernaria sudhausi*. בכל אחת מהכוסות הוספו 500 נמטודות ותרחיף חיידקים שנבחן, כעבור חמישה ועשרה ימים מוצו הנמטודות, נספרו וכושר הישרדותן נקבע. אותיות שונות מעל העמודות מציינות הבדלים מובהקים כפי שנקבע ע"י Tukey-Kramer multiple comparison tests;  $P \leq 0.05$ .

*elegans* החיידק *Bacillus subtilis* חיידק קרקע המשמש להדברה ביולוגית של מחלות חיידקיות בריזוספירה, והחיידק *Mycobacterium* CL12, שבודד בקרקע עשירה במקור כיטין ומציג פעילות כיטנוליטית גבוהה. כל הניסויים בוצעו בקרקע כבדה. לתוך כוסיות פלסטיק המכילות 60 גרם קרקע

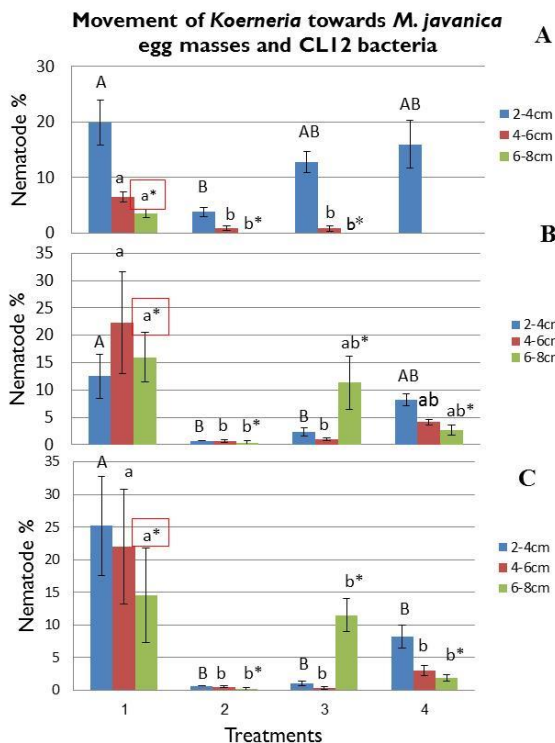
הוספה תרבית חיידקים בצפיפות  $OD_{600} = 0.4$

( $1 \times 10^9$  CFU/ ml) ולכל כוסית הוספו 500 זחלים של *K. sudhausi*. לכל טיפול הוצבו עשר חזרות. הניסוי בשלמותו בוצע שלוש פעמים עם תוצאות דומות, תוצאות מחזרה אחת מוצגות (איור 37). התוצאות שהתקבלו מצביעות שרק החידק CL12 בעל השפעה חיובית על הישרדות הנמטודה בהשוואה לביקורת ללא חיידקים (איור 37).

**השפעת החיידקים הנלווים על כושר המשיכה של *K. sudhausi* לעבר הטרף.** על מנת ללמוד על כושר המשיכה של הנמטודה *K. sudhausi* לטרפה נלמדה השפעת נוכחות החיידקים על המשיכה לטרף שקי הביצים של נמטודת העפצים (איור 36). לצורך כך הוצבו הניסויים במבנה הבא המתואר באיור 38. משיכה attraction של הנמטודה לטרף הינה תנאי חשוב המושפע ממספר פקטורים. מכניזם המשיכה משופעל ע"י כימוטקסיס אשר בו מגורים איברי חישה עצביים של הנמטודה לעבר הטרף. בשלב זה ביקשנו ללמוד על גורמים ביוטיים המשפיעים על כושר המשיכה, נוכחות החיידקים וזמינותם לנמטודות.



T1-nema to eggs; T2-nema+CL12 to eggs; T3-nema to CL12; T4-nema to water



A= after 3hr

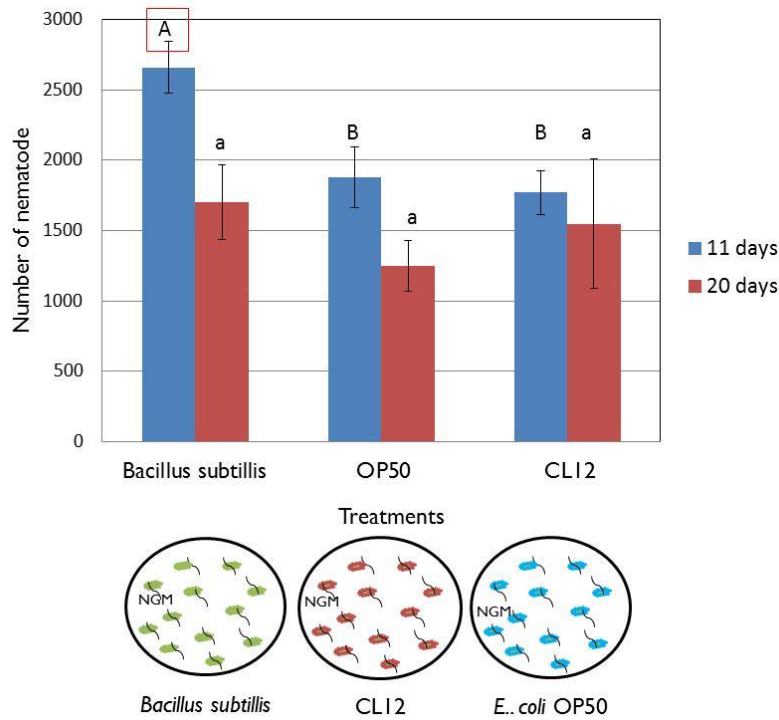
B= after 6hr

C= after 24hr

**איור 38.** השפעת החיידקים הנלווים על כושר ההישרדות של הנמטודות. מבחן המשיכה התבצע בצלחות פטרי המכילות מצע NGM אשר חולק לארבע שדות: בשדה התחתון 150 זחלים של *Koerneria* הושמו ובשדה העליון שקי ביצים של נמטודת העפצים או לחילופין מים. מספר הזחלים אשר נע לכיוון שקי הביצים נקבע במשך שלושה זמנים 3, 6 ו 24 שעות.

תוצאות הניסויים מצביעות בבירור על משיכה חזקה של הנמטודה *K. sudhausi* לעבר שקי ביצים של נמטודת העפצים אולם משיכה זו פוחתת באופן מובהק בנוכחות החיידק (איור 38).

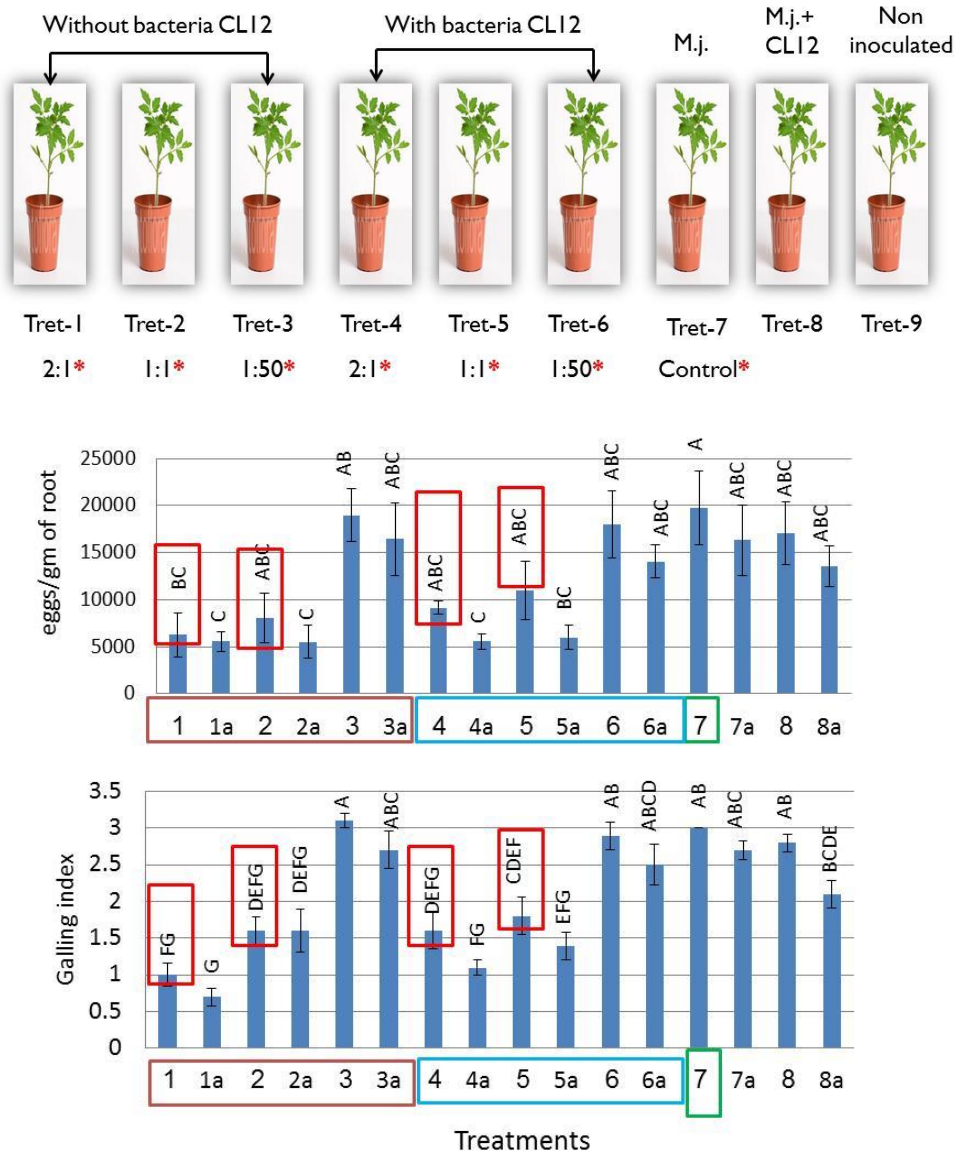
### השפעת החיידקים הנלווים על גידול המוני של הנמטודה *K. sudhausi*.



בסידרת ניסויים זה נלמדה השפעת החיידקים הנלווים על מספר הפרטים שגדל בצלחות לאחר 11 ו 20 ימי גידול. התוצאות מצביעות כי מבין החיידקים שנבדקו החיידק *Bacillus subtilis* מקנה יתרון מסוים בגידול על פני החיידקים האחרים בתקופת הזמן הקצרה.

**איור 39.** השפעת החיידקים הנלווים על גידול המוני של הנמטודה mass production. הנמטודות גודלו על מצע NGM עם החיידקים המצויינים למשך 11 ו 20 ימים. בתום התקופה הנמטודות מוצו מהצלחות ומספר הפרטים נקבע תחת המיקרוסקופ.

## לימוד דרכי היישום של המדביר הביולוגי



**איור 41.** יעילות *Koernaria sudhausi* בהדברת נמטודת העפצים ביישומים שונים **באדמה כבדה**. יעילות הנמטודה נלמדה על צמחי עגבניה בתנאי חממה מבוקרים. שלושה יחסים של טורף:טרף נלמדו 1:100 ו 1:1, 1:50 עם וללא הוספת חיידקים וכן עם יישום שני של המדביר וללא. פירוט הטיפולים הינו כלהלן: 1. *Koernaria*:RKN 1:1. 2a *Koernaria*:RKN 1:50. 2. *Koernaria*:RKN 1:1 יישום שניוני. 3a *Koernaria*:RKN 1:100. 3. *Koernaria*:RKN 1:100 יישום שניוני. 4. *Koernaria*:RKN 1:1 תוספת חיידקים. 4a. *Koernaria*:RKN 1:1 תוספת חיידקים. 5a. *Koernaria*:RKN 1:50 תוספת חיידקים. 5. *Koernaria*:RKN 1:50 יישום שניוני. 6a. *Koernaria*:RKN 1:100 תוספת חיידקים. 6. *Koernaria*:RKN 1:100 תוספת חיידקים, יישום שניוני. 7. ביקורת מאולחת ב RKN. 8. ביקורת מאולחת ב RKN 45 ימים לאחר האילוח נקצר הניסוי.

**דיון.** היבטים הקשורים ליעילות הנמטודות הטורפות להדביר את נמטודת העפצים נחקרו לעומק. נלמד ממשק יישום שיכול להביא להגברת יעילות ההדברה. תוצאות אלו תרמו לקידום הנושא ברמה העסקית/מסחרית.

### 3.6. פיתוח ממשק יישומי להתמודדות עם נמטודות עפצים המבוסס על הזנה בגידול פלפל

**שותפים:** משה אלבז, חנה אלון, ליאנה גנות, שבתאי כהן, אורי ירמיהו, יוג'י אוקה, חגי יסעור

**תקציר.** נמטודות עפצים השייכות לסוג *Meloidogyne* פוגעות במגוון רחב של גידולים כגון: פלפל, ועגבנייה ונחשבות לאחד ממזיקי החקלאות החשובים בעולם. נוכחותה של הנמטודה כגורם מגביל בצמח מעלה שתי שאלות: א. כיצד שינויים בהזנה של הצמח בכלל וההזנה החנקנית בפרט ישפיעו על יחסי צמח נמטודה? והשנייה, כיצד יחסי הגומלין בין הנמטודה והצמח משתנים כתלות ברגישותו של הזן. מחקרים רבים שבוצעו בעבר במספר גידולים מראים כי תוספת חנקן להזנה משפיעה בצורה חיובית על סבילותו של הצמח הנגוע בנמטודות ולעיתים אף מצמצמת את קצב התפתחות אוכלוסיית הנמטודות בשורשים. **מטרת המחקר:** פיתוח ממשק יישומי להתמודדות עם נמטודות עפצים המבוסס על הזנה בגידול פלפל, תוך הבנת חשיבותו של חנקן ביחסי נמטודה צמח פונדקאי. בתקופת המיזם התבצע ניסוי חממה וניסוי דליים כאשר נבחנה שאלת המחקר תוך שימוש במספר זנים, מספר רמות נגיעות בנמטודות וארבעה משטרי הזנה בחנקן. במהלך הניסויים נבדקו מדדים רבים בניהם: כמות הנקז וריכוז יסודות ההזנה שבו, גובה הצמחים, סימני חוסרים כתוצאה מנוכחות נמטודות, ואינדקס עפצים. בסוף הניסוי פורקו הצמחים לכל מרכיביהם למשקל טרי יבש ובוצעה בדיקה של אינדקס עפצים. **תוצאות מבחן הדליים הראו** גם במשקל הפירות הממוצע לצמח וגם בנתוני הנקז (כמות הנקז, ריכוז יסודות הזנה) כי בהזנה חנקנית של 25 ו 50 ח"מ ישנה ירידה במשקל הפרי עם העלייה בצפיפות הנמטודות ובטיפול הזנה של 100 ו 150 ח"מ השפעת הנמטודות חלשה יותר או לא קיימת כלל כתלות בזן הנבדק. בנוסף, נמצא כי משקל הפירות מושפע מערכו של אינדקס עפצים בצורה מובהקת בריכוזי חנקן נמוכים וללא השפעה בריכוזי חנקן גבוהים. בניסוי חממה נצפה שהגורם המשפיע ביותר הל שכיחות הנגיעות הינו חיטוי טרום שתילה בקונדור. השפעות ריכוזי החנקן מינוריות וכך גם השפעת הנמטוצידים. התוצאות מראות כי הטיפול בקונדור הפחית את רמה האוכלוסייה של הנמטודה ל-0 זחלי הנמטודה ל-50 גר' קרקע לפי בדיקת הקרקע. ניסוי החממה הראה שעליה ברמת החנקן של מי ההשקיה גרם לשיפור תגובת הצמחים בפרמטרים שונים של יבול וצימוח, למרות שיפור זה החנקן לא הצליח למנוע את נזקי הנמטודות באופן מוחלט. יש להמשיך ולבדוק וללמוד את מנגנון ההשפעה של החנקן על הצמח בנוכחות נמטודות ולבדוק בניסוי ארוך יותר את האפשרות לשפר את פוטנציאל ההנבה של הצמח באמצעות הזנה חנקנית מוגברת.

**מבוא.** עם הפחתת ואיסור השימוש במתיל ברומיד נמטודות יוצרות עפצים מהסוג *Meloidogyne* הפכו בנגב המערבי למזיק משמעותי במגוון גידולים. בשל יעילות פחותה של החומרים הקיימים לחיטוי קרקע והקושי ביישומם (בהשוואה למתיל ברומיד) כגון קונדור (1,3 Dichloropropene) ופלדין (Dimethyl Disulfide),

חקלאים נאלצים לעיתים ליישם נמטוצידים בלתי נדיפים גם במהלך הגידול. יישום חומרים אלו גורר עלויות נוספות ופוגע ביכולתו של החקלאי לשווק את תוצרתו במועד המיטבי (ימי המתנה). הנמטוצידים הקיימים בשוק שייכים לשתי קבוצות: קרבמטים (וידט), ותכשירים ביולוגיים (ביונם). פעילותם של תכשירים אלו משפיעה על התנהגות הנמטודה, ע"י שיתוק הנמטודה אולם לרוב אינם ממיתים. בנוסף, קיים הבדל במידת יעילותם של החומרים (Oka et al. 2009, 2012). היום קיימים חומרים חדשים הנמצאים לקראת רישוי, ודרגת רעילותם נמוכה יותר ומשך פעילותם ומנגנוני הפעילות שונים נתונים אלו מעודדים את ההשוואה של יעילות כל אחד מהנמטוצידים שהוזכרו על רקע ביקורת של קרקע נגועה בנמטודות ועל רקע של קרקע שקיבלה חיטוי באחד האמצעים הקיימים. תוצאות שהצטברו בניסויים קודמים הצביעו כי דישון בריכוזי חנקן משתנים בעלי פוטנציאל להפחית את חומרת המחלה. כך תוצאות שהובאו בשנה הקודמת הראו הפחתה מובהקת בחומרת המחלה בזן הפלפל 2547 הרגיש מאוד לנמטודת העפצים *M. incognita* והבדלים מובהקים במשקל הפרי נצפו עם השינויים בריכוזי החנקן ששימשו לדישון. יתר על כן, השפעת אינדקס העפצים (נגיעות בשורש) על משקל הפירות הייתה קטנה יותר ככל שהושמו ריכוזי חנקן גבוהים יותר (דוח שנה ראשונה). כל ממצאים אלו הובילו לבחינת ההשערה ששימוש בדישון חנקני יוכל לשמש כגישה התומכת בגידול בו התגלתה נגיעות בנמטודת העפצים. הניסויים שהוצבו בשנה הנוכחית היו בשתי מתכונות: ניסוי חממה הבוחן את יעילות דישון חנקני בהפחתת חומרת נגיעות בקרקעות בעלות רקעי חיטוי שונים וניסוי בדליים שבא ללמוד את השפעת הדישון החנקני על שינויים בהרכב הנקז הנובעים מנגיעות בנמטודות.

### מטרת המחקר, ניסוי חממה וניסויי דליים:

א. ללמוד על השפעת ריכוזי החנקן במי ההשקיה על יבול הפירות והביומסה של צמחי פלפל בדרגות נגיעות שונות בנמטודות עפצים בשלושה זני פלפל.

### פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר.

#### ניסויי עציצים עונות 2013 ו- 2014

| טיפול | K,ppm  | N-NH <sub>4</sub> mg/L | P mg/L | N-NO <sub>3</sub> mg/L | Total N | %N-NH <sub>4</sub> |
|-------|--------|------------------------|--------|------------------------|---------|--------------------|
| 25    | 128.00 | 7.50                   | 15.00  | 17.50                  | 25.00   | 30.00              |
| 50    | 128.00 | 15.00                  | 15.00  | 35.00                  | 50.00   | 30.00              |
| 100   | 128.00 | 30.00                  | 15.00  | 70.00                  | 100.00  | 30.00              |
| 150   | 128.00 | 45.00                  | 15.00  | 105.00                 | 150.00  | 30.00              |

**טבלה 2.** טיפולי ההזנה בניסוי: ריכוזי חנקן על מרכיביו, זרחן, אשלגן ואחוז אמוני צפוי. לתמיסות אלו נוספו 50 מ"מ סידן ומיקרו אלמנטים.

המחקר המתואר מבוסס על ניסויי בדליים מנוקזים בנפח של 18 ליטר במערכת מבוקרת, ניסוי זה היווה תשתית הניסויים העוקבים. הדליים ומערכת הניקוז בנויה כך שבתחתית הדלי משפך עם צמר סלעים שבהמשכו צינור עם אותו מילוי. מבנה שכזה מייעל את הניקוז ומאפשר את איסוף הנקז בצורה נוחה. הדליים אורגנו במתכונת של חמישה בלוקים באקראי המכילים את כל הטיפולים שהתקבלו משילובם של שני זנים בעלי רגישות שונה לנמטודות עפצים (7182 "זרעים גדרה" ו 2547 של "הזרע"), שלוש רמות אילוח בנמטודות מהמין *Meloidogyne incognita* (0,10000,30000) וארבעה משטרי הזנה הנבדלים בריכוז החנקן (25,50,100,150 ח"מ). הדליים מולאו בקרקע מקומית ובתוכם נשתלו הצמחים בתאריך 26.5.13. אילוח הצמחים בוצע ב- 28.5.13, וב- 19.6.13. משתילה ועד תאריך 16.6.13 הצמחים דושנו בצורה אחידה באמצעות שפר 5.7.5 + 3 מיקרו. ולאחר מכן ניתנה הזנה בתמיסות סופיות שהוכנו לפי טיפולי הניסוי (טבלה 2).

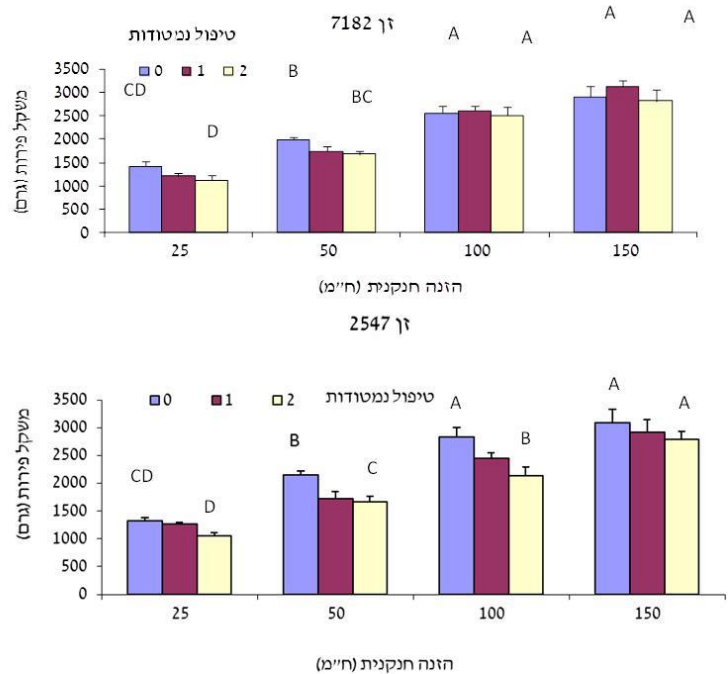
| זן   | טיפול חנקן | כמות נמטודות | כמות נקז ממוצעת (mg/l) | זרחן (ml) | כמות נקז ממוצעת (mg/l) |
|------|------------|--------------|------------------------|-----------|------------------------|
| 2547 | 25         | 0            | 1.18                   | 680       |                        |
|      |            | 1            | 4.04                   | 823       |                        |
|      |            | 2            | 3.5                    | 883       |                        |
|      | 50         | 0            | 2.12                   | 543       |                        |
|      |            | 1            | 2.28                   | 583       |                        |
|      |            | 2            | 2.56                   | 610       |                        |
|      | 100        | 0            | 1.34                   | 376       |                        |
|      |            | 1            | 2.06                   | 600       |                        |
|      |            | 2            | 1.54                   | 713       |                        |
|      | 150        | 0            | 1.99                   | 486       |                        |
|      |            | 1            | 1.82                   | 506       |                        |
|      |            | 2            | 2.19                   | 453       |                        |
| 7182 | 25         | 0            | 1.48                   | 690       |                        |
|      |            | 1            | 1.9                    | 733       |                        |
|      |            | 2            | 2.09                   | 756       |                        |
|      | 50         | 0            | 1.78                   | 460       |                        |
|      |            | 1            | 1.38                   | 583       |                        |
|      |            | 2            | 2.56                   | 630       |                        |
|      | 100        | 0            | 1.79                   | 500       |                        |
|      |            | 1            | 1.7                    | 406       |                        |
|      |            | 2            | 1.35                   | 526       |                        |
|      | 150        | 0            | 1.84                   | 590       |                        |
|      |            | 1            | 0.85                   | 330       |                        |
|      |            | 2            | 1.43                   | 540       |                        |

**טבלה 3.** כמויות המים והזרחן הממוצעות שהתקבלו בנקז שנאסף בתאריך 8-9/7/13 עבור שני הזנים שנבדקו בניסוי בארבעה טיפולים של הזנה חנקנית ובשלוש רמות אילוח בנמטודות. כל ממוצע מורכב משלוש חזרות.

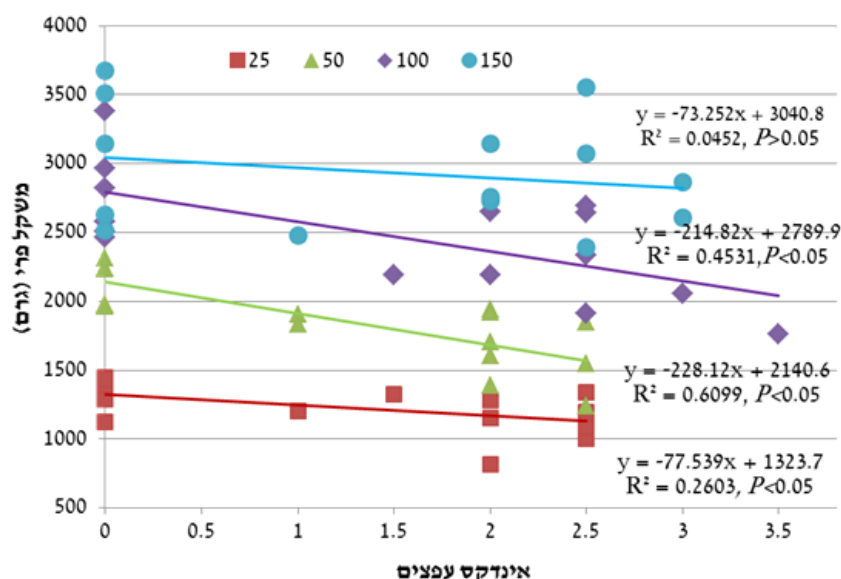
לפני ואחרי פיצול טיפולי הדישון נאסף הנקז במכלים אחת לשבועיים במשך 24 שעות ב 2-3 חזרות לכל טיפול, נפח הנקז נמדד, ונבדק לערכי EC, PH ו-N-NO<sub>3</sub>. בשלושה תאריכים בוצעו גם בדיקות ל-K-P-N. נפח הנקז שהתקבל אפשר לבצע עדכונים בכמויות ההשקיה של הטיפולים במטרה לשמר כמות של 40% נקז בדליים מסך הכמות המושקית. במהלך הניסוי נמדדו הצמחים ובוצעו בדיקות פיזיולוגיות (מערכת פוטוסינטטית וחנקן) ובסוף הניסוי (12.8.13) תועדו סימני ההבהרה בקדקודים כמדד לנזק עקיף של הנמטודות ופורקו הצמחים לכל מרכיביהם: עלים, גבעולים, פירות, ושורשים ונשקלו למשקל טרי ויבש (בפירות טרי בלבד). בנוסף בוצעה הערכה ליניארית של אינדקס עפצים (לדוגמא: ערך 1 בהשוואה ל-0.5 מצביע על

רמת נגיעות כפולה בשורשים) להערכת נגיעות השורשים בנמטודות.

**איור 42.** סה"כ משקל הפרות הממוצע לצמח ( $\pm 1S.E$ ) עבור ארבעה טיפולי הזנה חנקנית שונים ובשלוש רמות אילוח בנמטודות עפצים (0, 1, 10000=2, 30000) עבור הזנים 2547 ו 7182. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים ( $t$ -test comparisons,  $P < 0.05$ ).



**תוצאות עיקריות:** בבחינת ההשפעה של טיפול החנקן והנמטודות (ללא נגיעות) (0) ונגיעות גבוהה בלבד (2)) בתוך כל זן (Two Way ANOVA,  $P < 0.05$ ) על כמות הפרי הכוללת לצמח שנאספה מהצמחים בסוף הניסוי (מחנטים בגודל 2 ס"מ ועד גודל קטיפי) נמצא כי בזן 2547 טיפולי החנקן והנמטודות השפיעו בצורה משמעותית על כמות הפרי ( $P < 0.05$ , איור 42). בהשוואת כמויות הפרי בתוך האינטראקציה נמטודות\* חנקן ( $t$ -test) נמצאה ירידה משמעותית במשקל הפירות בטיפול של 50 ח"מ חנקן ו 100 ח"מ. אולם ללא הבדל מובהק עבור הטיפול של 150 ח"מ (איור 42). עבור הזן 7182, הסביל יותר נמצאה ירידה לא מובהקת במשקל הפירות עם העלייה ברמת הנגיעות בנמטודות בטיפולים של 25, 50 ח"מ אולם ללא שינוי במשקל הפירות הממוצע בטיפול הזנה 100 ו 150 ח"מ חנקן (איור 42). נתוני הנקז הצביעו עבור חלק מהמדדים שנבדקו על מגמות עקביות (טבלה 3). עם העלייה בכמות הנמטודות ישנה עליה בכמות המים שמנוקזת מכל דלי, כמות הזרחן ובנקז האחרון גם בכמות האשלגן עבור טיפולי ההזנה של 25 ו 50 ח"מ. לעומתם בטיפולי ההזנה של 100 ו 150 ח"מ אין השפעה או יש השפעה פחותה בממוצע של נוכחות הנמטודות על כמות המים, הזרחן והאשלגן שמגיעה לנקז.



**איור 43.** הקשר בין משקל הפרות הכולל ואינדקס העפצים עבור כל אחד מטיפולי ההזנה החנקנית בזן 2547. עבור כל קו מצוינת משוואת הרגרסיה, ערכי השונות והמובהקות.

בחינת הקשר בין משקל הפירות לאינדקס העפצים (איור 43) בשני הזנים נמצא כי בזן 2547 ישנה ירידה מובהקת במשקל הפרי עם העלייה ברמת הנגיעות בשורשים בטיפולי ההזנה של 25, 50, 100 ח"מ אולם ללא השפעה בטיפול של 150 ח"מ. עבור הזן 7182 נמצא אותו דגם אולם עם ירידה משמעותית כתלות באינדקס העפצים רק בטיפולים של 25 ו 50 ח"מ וללא השפעה עבור הטיפולים של 100 ו 150 ח"מ (תוצאה לא מוצגת).

#### ניסויי חממה בתנאים חצי מסחריים

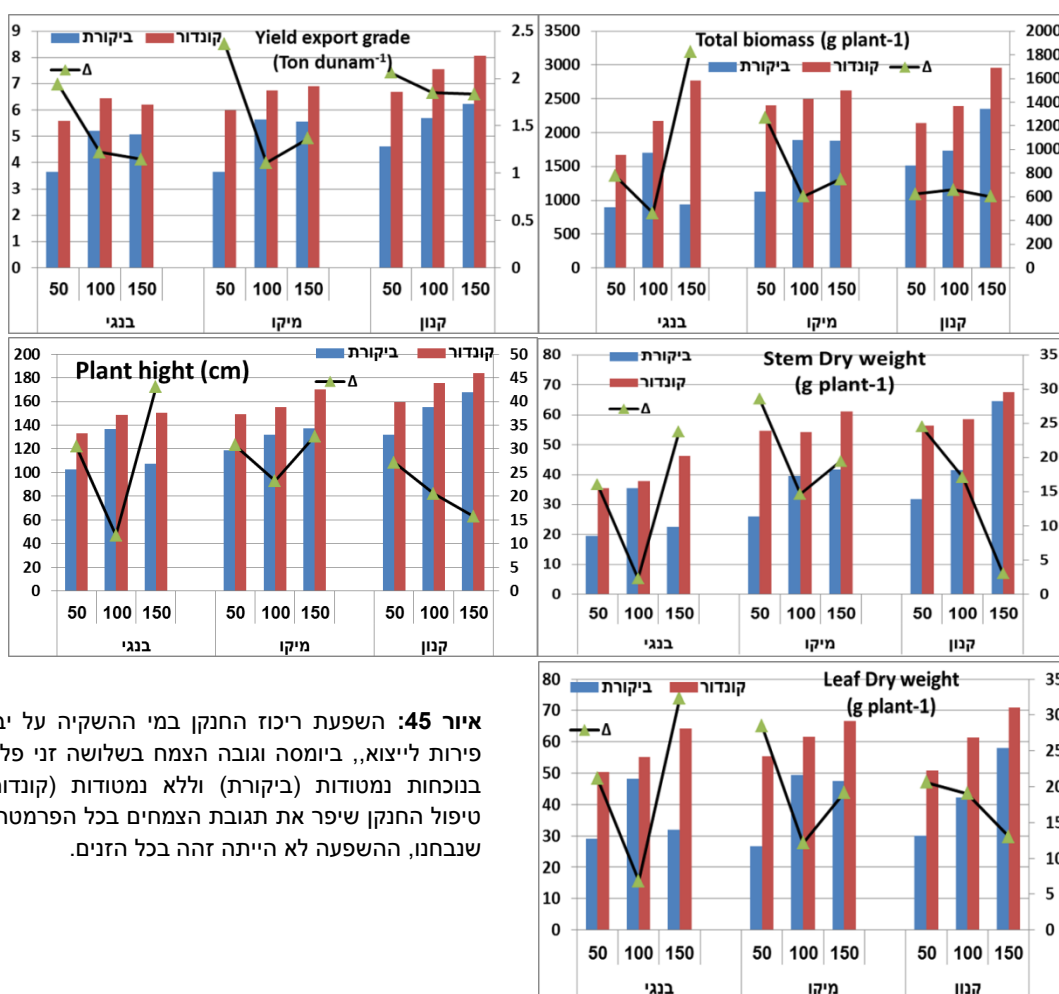
פירוט עיקרי הניסויים. ניסויי חממה. בניסוי שנערך בעונת 2014/2015 נשתלו צמחים ב 17/8/2014 במבנה מאולח בצורה אחידה בנמטודות מהמין *M. incognita* (מאות עד אלפי פרטים לכל יחידת דיגום של 50 גרם קרקע יבשה) בהתבסס על דיגומי קרקע וצמחים. כל גמלון במבנה חולק לשתי חלקות ראשיות בהם יושמו באקראי קונדור, וביקורת ללא חיטוי. בכל טיפול ראשי הוגרלו שלושה טיפולים ראשיים של ריכוזי חנקן בהשקיה: 50, 100, ו 150 ח"מ, ועוד שני טיפולים בהם מושוים שני נמטוצידים בהגמעה בארבע יישומים תוך כדי הגידול: וויאדט AGF-167. מבנה הניסוי בחממה נראה באיור 44.

**איור 44.** מבנה ניסוי השפעת הדישון החנקני על חומרת המחלה בשלושה זני פלפל בנגי, קנון ומיקו ברקעי חיטוי קרקע שונים.

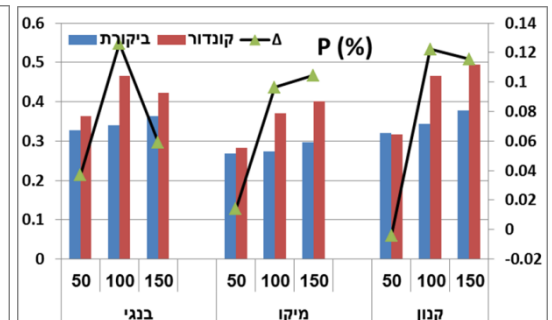
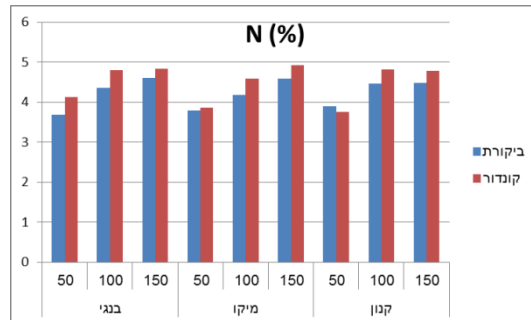
| ביקורת                                                                      | חיטוי קונדור | 50 | 100 | 150 | אגן | וידט |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------|----|-----|-----|-----|------|
| רוחב גמלון 7.5 מ'                                                           |              |    |     |     |     |      |
| אורך שורה שתילה 28.2 מ' (28.2)                                              |              |    |     |     |     |      |
| אורך חלקה                                                                   |              |    |     |     |     |      |
| לחיטוי 14.1 מ' 14                                                           |              |    |     |     |     |      |
| אורך חלקה לזן 4.6 מ', 6 חלקות בשורה, 2 <sup>11</sup> צמחים בחלקה            |              |    |     |     |     |      |
| מרחק ממרכז למרכז ערוגה 1.5 מ', מרחק בין הצמחים 40 ס"מ, 3333 צמחים לדונם     |              |    |     |     |     |      |
| מרחק בין שלוחות הטפטוף בערוגה 20 ס"מ, מרחק בין שורות ההדליה (ברזלים) 40 ס"מ |              |    |     |     |     |      |

**תוצאות:** בהסתמך על התפתחות הצמחים ובדיקות נגיעות בעפצים נראה שהגורם המשפיע ביותר הינו חיטוי טרום שתילה בקונדור. השפעות ריכוזי החנקן מינוריות וכך גם השפעת הנמטוצידים. התוצאות מראות כי הטיפול בקונדור הפחית את רמה האוכלוסייה של הנמטודה ל-0 זחלי הנמטודה ל-50 גר' קרקע לפי בדיקת הקרקע. גם לא נצפו עפצים בשורש בדיגום בחודש נובמבר. בדיגום בחודש דצמבר, נצפו עפצים בודדים בחלק הקטן של צמחים מהחלקות שקיבלו את קונדור. בחלקות שלא קיבלו את קונדור, רמת החנקן והנמטוצידים לא השפיעו על דרגת הנגיעות בשורשים. השפעה מובהקת על חומרת המחלה הנגרמת ע"י נמטודת יוצרת העפצים של הזנים נצפתה בדיגום בחודש דצמבר. רמת הנגיעות של מיקו הייתה נמוכה מזו של בנגי או קנון.

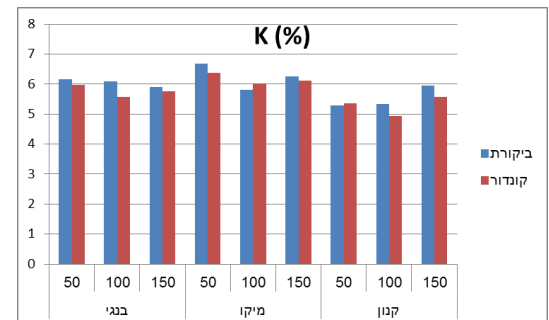
ניסוי החממה הראה שעליה ברמת החנקן של מי ההשקיה גרם לשיפור תגובת הצמחים בפרמטרים שונים של יבול וצימוח (איור 45), למרות שיפור זה החנקן לא הצליח למנוע את נזקי הנמטודות באופן מוחלט, למרות זאת בחלק מהפרמטרים שנבחנו נמצא שבטיפול החנקן הגבוהים תגובת הצמח הייתה דומה בצמחים נגועים בנמטודות בהשוואה לצמחים ללא נמטודות (טיפול קונדור). טיפול החנקן השפיעו על קליטת הזרחן (איור 46), השפעה זו הייתה חזקה יותר בצמחים לא נגועים בנמטודות (טיפול קונדור).



**איור 45:** השפעת ריכוז החנקן במי ההשקיה על יבול פירות לייצוא, ביומסה וגובה הצמח בשלושה זני פלפל בנוכחות נמטודות (ביקורת) וללא נמטודות (קונדור). טיפול החנקן שיפר את תגובת הצמחים בכל הפרמטרים שנבחנו, ההשפעה לא הייתה זהה בכל הזנים.



**איור 46.** השפעת ריכוז החנקן במי ההשקיה על תכולת מינרלים בשלושה זני פלפל בנוכחות נמטודות (ביקורת) וללא נמטודות (קונדור). טיפול החנקן שיפור את קליטת הזרחן, שיפור זה היה גבוה יותר כאשר הצמחים גדלו ללא נמטודות.



## דיון

ניתן לומר שריכוז גבוה של חנקן במי ההשקיה מצמצם את עוצמת נזקי נמטודות העפצים בפלפל, כנראה על ידי שיפור קליטת מינרלים בעיקר זרחן. במקביל לשיפור קליטה זו נמצאה השפעה חיובית על מרבית הפרמטרים של יבול וצימוח וגטטיבי.

#### 4. רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים

Brown, S., Bucki, P. and Pharan, I. 2014. Studying the Responses of Pepper Genotypes to Avirulent and Virulent *Meloidogyne incognita* Isolates Occurring in Israel. *Journal of Nematology* 46:141-141.

Gamliel, A. 2014. Phase-out of methyl bromide and nematode management: achievements and future challenges. *Journal of Nematology* 46:166.

Fatta Bahadur Gurung. 2013. Master Thesis, Laboratory and field studies on the biocontrol agent the predatory nematode *Koerneria sudhausi* (Nematoda: Diplogastridae), Tutor: Sigal Brown Miyara, Ph. D. & Prof. Yitzhak Spiegel

דניאל שטריקר. 2016. עבודת מחקר לתואר שני, יישום גישה מערכתית להתמודדות עם נמטודות יוצרות עפצים בגידול פלפל. תחת ההנחייה: פרופ' אברהם גמליאל ודר בראון סיגל תוגש בחודש הקרוב

פרסומים נוספים נמצאים בשלבי הכנה מתקדמים

#### 5. ביבליוגרפיה

רחל אוזלבו, דורון הולנד, שמעון אנטמן וסיגל בראון הורוביץ. 2012. עמידות כנות גלעיניים לנמטודה יוצרת עפצים *Meloidogyne* spp. עלון הנוטע, מוסף מיוחד לזית, שקד ועוד גפן, גיליון 66: 29-33.

Abad, P. & Williamson, V. (2010) Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Advances in Botanical Research*, 53:147-192.

Agrios, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: Agrios, G. N. (ed), *Plant Pathology*. San Diego cap.15, Academic Press, 1997, pp. 565-597.

Bar, E. M., Sharon, E., Spiegel, Y. & Oka, Y. (2008) Laboratory studies on the biocontrol potential of the predatory nematode *Koerneria sudhausi* (Nematoda: Diplogastridae). *Nematology*, 10:633-637.

Barbary A, Palloix A, Fazari A, Marteu N, Castagnone-Sereno P, Djian-Caporalino C. 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. *Theor Appl Genet* 127:499–507.

Barker, K. R. Nematode extraction and bioassays. 1985. In: K.R. Barker, C. C. C. a. J. N. S. (ed), *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Volume 2. Methodology. North Carolina State University Graphics, pp. 19-35.

Bleve-Zacheo, T., Bongiovanni, M. B., Melillo, T. B. & Castagnone-Sereno, P. B. (1998) The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science*, 133:79-90.

Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? *Euphytica*, 124:193-199.

- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M. & Dalmasso, A. 1993 Stable virulence the tomato resistance *Mi* gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Genetics*, 83:803-805.
- Castagnone-Sereno P, Bongiovanni M, Djian-Caporalino C. 2001. New data on the specificity of the root-knot nematode resistance genes *Mel* and *Me3* in pepper. *Plant Breeding*. 120:429–433.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., Palloix, A., Dalmasso, A. 1996. Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistant determinants. *Eur J Plant Pathol* 1996, 102:585–590.
- Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C., Andrés, M. F. & Verdejo-Lucas, S. 2009. Response of tomato rootstocks carrying the *Mi*-resistance gene to populations of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*. *European Journal of Plant Pathology*, 124:337-343.
- Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C., Kaloshian, I. & Verdejo-Lucas, S. 2008. Variability in infection and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato rootstocks with the *Mi* resistance gene. *Plant Pathology*, 57:1125-1135.
- de Moura, R.M., Echandi, E. and Powell, N. T. 1975. Interaction of *Corynebacterium michiganense* and *Meloidogyne incognita* on Tomato. *Phytopathology* 65:1332-1335.
- Djian-Caporalino, C., S. Molinari, A. Palloix, A. Ciancio, A. Fazari, N. Marteu, N. Ris, and P. Castagnone-Sereno, 2011: Reproductive potential of root-knot nematodes is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 431—440.
- El-Goorani, M.A., Abo-El-Dahab, M.K. and Mehیار, F.F. 1974. Interaction between Root Knot Nematode and *Pseudomonas marginata* on *Gladiolus Corms*. *Phytopathology* 64:271-272.
- Felipe, A. J. 2009. 'Felinem', 'Garnem', and 'Monegro' almond x peach hybrid rootstocks. *HortScience*, 44:196-197.
- Ferris, H., Roberts, P. A. & Thomason, I. J. Nematodes. In, Project, University of California Statewide Integrated Pest Management. Integrated pest management for tomatoes. Division of Agriculture and Natural Resources Publication 3274. 1985, pp. 60-65.
- Hendy, H. Pochard, E., Dalmasso, A. 1985. Inheritance of resistance to *Meloidogyne chitwood* (Tylenchida) in 2 lines of *Capsicum annuum*. Study of homozygous progenies obtained by androgenesis. *Agronomie*. 5:93–100.
- Hendy, H., Dalmasso, A. Cardin, M.C. 1985b. Differences in resistant *Capsicum annuum* attacked by different *Meloidogyne* species, *Nematologica* 31:72-78.
- Hübschen, J., Kling, L., Ipach, U., Zinkernagel, V., Brown, D. J. F. & Neilson, R. (2004) Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. *European Journal of Plant Pathology*, 110:883-891.
- Jansen van Vuuren, R. and Woodward, B. 2001. The response of cassava cultivars to root-knot nematode infestation: An in vitro method. *Euphyrica*, 120, 109-113.
- Marull, J., Pinochet, J., Verdejo, S. & Soler, A. 1991. Reaction of *Prunus* rootstocks to *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* in Spain. *J. Nematol*, 23:564-569.
- Melakeberhan, H. 1997. Plant, nematode and nutrient relations: an overview. *Japanese journal of Nematology*, 27:41-51.
- Melakeberhan, H. 1998. Effects of temperature and nitrogen source on tomato genotypes response to *Meloidogyne incognita* infection. *Fundamental and Applied Nematology*, 2:25-32.

- Melakeberhan, H. 2006. Fertiliser use efficiency of soybean cultivars infected with *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus penetrans*. *Nematology*, 8:129-137.
- Melakeberhan, H. .2007. Effect of starter nitrogen on soybeans under *Heterodera glycines* infestation. *Plant Soil*, 301:111-121.
- Melakeberhan, H. & Ferris, H. .1988. Growth and energy demand of *Meloidogyne incognita* in a susceptible and resistance *vitis vinifera* cultivars. *Journal of Nematology*, 20:545-554.
- Melakeberhan, H., Ferris, H. & Dias, J. .1990. Physiological response of resistant and suitable *vitis vinifera* cultivars to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 22:224-230.
- Melakeberhan, H. P. i. Z. e. Physiological interaction between nematodes and their host plants. In: X. Chen, S. Y. C., and D. W. Dickson (ed), *Nematology, Advances and Perspectives Volume II: Nematode Management and Utilization*. Tsinghua University Press China and CABI Publishing, 2004, pp. 771-794.
- Nyczepir, A. P. & Pinochet, J. 2001. Assessment of Guardian Peach Rootstock for Resistance to Two Isolates of *Pratylenchus vulnus*. *J. Nematol*, 33:302-305.
- 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.
- Oka, Y., Shuker, S. and Tkachi, N. 2009. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyle group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Pest Manag. Sci.* 65: 1082-1089.
- Oka, Y. 2012. Nematicidal activity of *Verbesina encelioides* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and effects on plant growth. *Plant and Soil* 355: 311-322.
- Perry, R. N., Mones, M. & Starr, J. R. *Meloidogyne* species - a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. In: Perry R.N., M., M. and J.R. Starr (ed), *Root-knot Nematodes*. Wallingford, UK, CABI Publishing, 2009, pp. 1-13.
- Piedra Buena A, Díez-Rozo MA, Bello A, Robertson L, López-Pérez JA, Escuer M, De León L. 2005. Comportamiento de *Meloidogyne incognita* sobre tomate pimiento resistente en Uruguay. *Nematropica*. 35:111–120.
- Ros-Ibanez C, Robertson L, del Carmen Martinez-Lluch M, Cano-Garcia A, Lacasa-Plasencia A. 2014. Development of virulence to *Meloidogyne incognita* on resistant pepper rootstocks. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 12:225–232.
- Sasser JN, Triantaphyllou AC. 1977 Identification of *Meloidogyne* species and races. *J. Nematol.* 1977;9:283.
- Schaad, N. W. & Frederick, R. D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie*, 24:250-258.
- Siqueira, K. M. S., Freitas, V. M., Almeida, M. R. A., Santos, M. F. A., Cares, J. A., Tigano, M. S. & Carneiro, R. M. D. G. 2009. Detecção de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e mamoeiro no estado de Goiás, usando marcadores moleculares. *Tropical Plant Pathology*, 34:256-260.
- Subbotin, S. A., Vierstraete, A., De Ley, P., Rowe, J., Waeyenberge, L., Moens, M. & Vanfleteren, J. R. 2001. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21:1- 16.
- Subbotin, S. A., Waeyenberge, L., Malokanova, I. A. & Moens, M. 1999. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLPs. *Nematology*, 1:195-207.
- Taylor, A. L. & Sasser, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978.

- Thies, J. A. 2011. Virulence of *Meloidogyne incognita* to expression of N gene in pepper. *Journal of Nematology*, 43:90-94.
- Thies, J.A, Dickson D.W, Fery R.L. 2008. Stability of resistance to root-knot nematodes in 'Charleston Belle' and 'Carolina Wonder' bell pepper in a sub-tropical environment. *HortScience*. 43:188–190.
- Thies J.A. and Fery, R.L. Modified expression of the N gene for the southern root-knot nematode resistance in pepper at high soil temperatures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1998;123:1012–1015.
- Thies, J. A., and J. Ariss. 2009. Comparison between the N and Me3 genes conferring resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in genetically different pepper lines (*Capsicum annuum*). *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 545—550
- Williamson, V. M. 1998. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology*, 36:277-293.
- Williamson, V. M., Ho, J. Y., Wu, F. F., Miller, N. & Kaloshian, I. (1994) A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 87:757-763.

## 6. תוספות נדרשות ממחקרים אינטגרטיביים

### 6.1 דיון וסיכום כיצד שילוב התוצאות של קבוצות המחקר הביא את המיזם לקראת מימוש יעדיו

המחקר האינטגרטיבי המתואר משלב גישות מחקריות שונות ששולבו במהלך תקופת המחקר כדי להביא לידי קידום בנושא חוסר הפתרונות המוצעים להתמודדות עם נמטודות. המחקר מתייחס בכובד ראש לעובדה שתכשירים נמטוצידיים יוצאים משימוש ובוחן את השתלבותם של תכשירים חדשים. ראשית, שיטת הניטור שפותחה יכולה לשמש ככלי מחקר וכלי דיאגנוסטי חשוב מאוד. הוזלת הוצאות הניטור תעודד ביצוע בדיקות קרקע שלפי תוצאתם יוחלט על ממשק הדברה הולם. גישה מערכתית להדברת נמטודות תוך שימוש באמצעים הקיימים הוכחה הלכה למעשה בחלקות מסחריות. תוצאות אלו מיושמות כעת גם בתחום המטעים במטרה לגבש ממשק שינטוע שיבטיח מטע חופשי מנמטודות. התאמת מקורות העמידות בכנות גלעיניים נלמדה בפן הנמטולוגי אולם עם התייחסות רבה לפתוגן נוסף בגלעיניים החידק *Agrobacterium tumefaciens* מחולל המחלה The crown gall המהווה מטרד קשה לגידול המטעים. התאמת מקורות העמידות בפלפל, נעשתה במקביל לאפיון אוכלוסיות הפתוגן *Meloidogyne incognita* והגדרתן תוך לימוד יסודי של כל מקור עמידות לגופו ושני מקורות עמידות יחדיו. התוצאות שהתקבלו בניסויי ההזנה בפלפל יוכלו להיבדק גם במטעים ומשתלבים עם מטרת המחקר הראשונה של פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים. פיתוח מדבירים ביולוגיים, בשלב זה נעשה כפרוייקט מקביל שאינו מצטלב עם שאר המחקרים, אולם התקדמות במחקר זה הובילה להתעניינות חברות פרטיות בו וכיום ממומן ע"י קרן הון סיכון, המשך תמיכה זה מקרב את פיתוחו של מוצר זה להדברת נמטודות.

### 6.2 סיכום קצר של תתי הקבוצות

#### 1. תת קבוצה: אברהם גמליאל, סיגל בראון ודניאל שטריקר

##### פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים

גידול פלפל הינו גידול יצוא חשוב ומגודל במגוון בתי צמיחה בכל אזורי הארץ. פלפל נתקף על ידי נמטודות יוצרות עפצים ובעיקר נמטודות מהסוג *Meloidogyne incognita*, אשר עלולים להסב נזק רב שמתבטא בניוון הצמחים ופחיתה ניכרת ביבול. התמודדות עם נמטודות היא משימה מאתגרת בעיקר לנוכח האמצעים המוגבלים שזמינים כיום בהדברת נמטודות. מטרת העבודה הנוכחית היתה לבחון וליישם גישה מערכתית להדברת נמטודות בגידול פלפל אשר כוללת פעולת ביעור בתום הגידול הקודם,

חיטוי קרקע באמצעים משולבים לקראת הגידול המיועד, ואמצעים משלימים במהלך הגידול. הניסויים בוצעו במתכונת של תצפיות מסחריות בבתי צמיחה במושבים פארן ותומר, בחלקות שבהם נרשמה נגיעות רבה בנמטודות בגידול פלפל. בכל חלקה נבחנו שלוש רמות של טיפולים שכללו קטילת שורשים, חיטוי קרקע וטיפול הגמעה במהלך הגידול. באביב 2014, בתום גידול הפלפל ולפני עקירתו, הוזרם התכשיר 1,3 dichloropropene כדי לקטול את השורשים ואת הנמטודות ושקי הביצים שנמצאו על פני השורשים ובתוכם, ולמנוע את אילוח הקרקע. פעולה זו הקטינה את כמות המדבק בקרקע באופן משמעותי. חיטוי קרקע סולרי משולב בהזרמת התכשירים 1,3 dichloropropene או פלאדין, בוצע בחודשים יוני-אוגוסט. לאחר החיטוי לא מצאנו מדבק של נמטודות בקרקע עד לעומק 40 ס"מ. במהלך הגידול בוצעה הגמעה של תכשיר פוספיט (קנון) בתדירות של 30 יום. במהלך גידול הצמחים נדגמו שורשים ולא נתגלתה נגיעות בנמטודות עפצים. בתום הגידול נעקרו הצמחים ונבחנה נגיעות השורשים בנמטודות עפצים. בניסוי במושב פארן לא נמצאה נגיעות גם בתום הגידול. לעומת זאת בניסוי במושב תומר נמצאה נגיעות מועטה שהתרכזת בעיקר בצמחים שגדלו סמוך לשולי החלקות ובסמוך לעמודי המבנה. גם בגידול מחזור נוסף של פלפל בסתיו 2015 בחלקה במושב פארן, לא נמצאה נגיעות בשורשים. העבודה הנוכחית מדגישה את הצורך בגישה מערכתית להתמודדות עם פגעי שורש כגון נמטודות. בגישה זו, כל רכיב בהדברה משתלב במערך הגידול, משפיע על דיכוי התפתחות הנמטודות ומשפר את הגידול ותנובתו.

## 2. תת קבוצה: סיגל בראון ודניאל שטריקר

**פיתוח אמצעי לניטור זיהוי איכותי וכמותי של נמטודות יוצרת עפצים באמצעות quantitative real time PCR (qRT-PCR)**

כיום ניטור מידבק נמטודות בקרקע לפני שתילה כמעט ואינו נעשה ע"י חקלאים וזאת משתי סיבות עיקריות: א) עלות גבוהה עבור כל דגימת קרקע לזיהוי וספירה של נמטודות (ב) דרוש מספר דגימות גבוה על מנת לתת ייצוג הולם לכל חלקה. מכאן קיימת דחיפות רבה בשנים האחרונות לנסות ולשלב שיטות מתקדמות ופשוטות לזיהוי נמטודות שיחליפו את השיטות הטקסונומיות המסורתיות. בחלק זה של המחקר נעשה מאמץ להטמיע את השימוש ב Real time PCR לצורך זיהוי כמותי של נמטודות. אומצה שיטה מהימנה להפקת DNA מנמטודות ללא צורך בהפרדת פאזות ובכך מאפשרת זיהוי כמותי מדייק של נמטודות בדוגמת קרקע ללא איבוד חומר גנטי במהלך ההפקה. שיטת ההפקה המהימנה והתחלים המתאימים אפשרו את בנייתה של עקומת (כיוול) סטנדרט ממנה נגזר מספר הנמטודות בכל דוגמה ודוגמה, תוצאות המתקבלות תוך זמן קצר ואין דורשות ידע טקסונומי מקדים. יתרה על כן, זיהוי מדויק של מינים בסוג *Meloidogyne* אינו מתאפשר באמצעות דרגת הזחל J2, אולם פיתוח תחלים

ספציפיים לכל מין בנפרד יעניק לשיטה המתוארת יתרון מובהק נוסף. בשנה החולפת נעשה שימוש בשיטה ללימוד השפעת טיפולי קרקע על הישרדות נמטודות ונדידת נמטודות לעומקים שונים בקרקע. בנוסף הוספו לפרוטוקול נקודות חשובות הדרושות לצורך הצלחתו. המידע שהצטבר עד כה מסייע במעקב אחר חלקות מסחריות והערכת יעילות הממשק המיושם.

### 3. תת קבוצה: אילן פארן, סיגל בראון ופטריסייה בוקי

#### התאמת מקורות העמידות לאוכלוסיות הפתוגן בפלפל

תופעת התמוטטות שתילי פלפל בבתי צמיחה כתוצאה מנגיעות בנמטודות הינה תופעה ידועה ברוב אזורי גידול של פלפל. אולם העובדה שזנים חדשים נושאי עמידות לפלפל נראים נגועים יכולה לנבוע משתי סיבות עיקריות: א. התבססות אוכלוסיות שוברות עמידות. ב. קיומם של גזעים שונים של *M. incognita*, אשר מתרבים על הזנים החדשים. כדי ללמוד את התופעה החלנו במסגרת המיזם בסקר מקיף של שטחי גידול פלפל עיקריים בהם: נגב ערבה, הבשור, רמת נגב, השפלה, חוף כרמל, הרי ירושלים, בקעת הירדן והשרון. מאזורים אלו בודדנו אוכלוסיות שנלקחו לאפיון עפ"י כלים מסורתיים ומולקולריים. אוסף של 30 אוכלוסיות של *Meloidogyne incognita* שימש לאפיון ראשוני ולקביעת הגזע על פי מבחן פונדקאים על כותנה, פלפל, טבק ומלון. תוצאות המבחן מצביעות על שוני באלימות של האוכלוסיות השונות על הפונדקאים השונים ויכולות לרמז על שונות גנטית בין האוכלוסיות השונות. על מנת ללמוד על יעילות הגנים *Me-1*, *Me-3* ו-*N* לעמידות כנגד האוכלוסיות השונות החלנו במבחני הדבקה. תוצאות הניסויים אכן מראות כי מקור הגן *Me-1*, מקנה עמידות לאוכלוסייה שהתפתחה על זן עמיד בבית צמיחה וכן לאוכלוסייה האוירולנטית שמקורה מהמחלקה לנמטולוגיה. לעומת זאת מקור הגן *Me-3* לא מקנה עמידות כנגד האוכלוסייה הוירולנטית. תוצאות אלו מציעות שקיימת שונות גנטית באוכלוסיות הפתוגן שבודדו במסגרת הסקר אולם מרמזות אף שמקור העמידות *Me-1* יכול לתת הגנה גם כנגד האוכלוסייה החדשה. המשך אפיון האוכלוסיות מצביע באופן מדויק על הרכב האוכלוסיות הבולט בארץ ויכול לתרום להכוונה של מקורות עמידות לפי איזור הגידול. בנוסף, תגובתם של מכלואים חדשים נושאי שני הגנים *Me-1* ו-*Me-3* נבחנה מול האוכלוסיות המייצגות. תוצאות עד כה מצביעות שקיים נושאי *Me1* מציגים עמידות כלפי האוכלוסיות אולם לרקע הגנטי ישנה השפעה בהקניית עמידות כנגד מספר אוכלוסיות מסוימות. בשנה הקרובה נמשיך לאפיין את השונות הגנטית באוכלוסייה של *M. incognita*. למידע שיצטבר מעבודה זו משמעות רבה בפיתוח תוכניות השבחה של פלפל.

#### 4. תת קבוצה: סיגל בראון, שמעון אנטמן ודורון הולנד

##### התאמת מקורות עמידות חדשים של כנות גלעיניים לנמטודות במטעים.

הכנה GF.677, הכנה המסחרית לשקד בארץ, אינה נותנת מענה לקרקעות נגועות בנמטודת העפצים. באזורים שונים בארץ, בעיקר בקרקעות הקלות בדרום, ישנה נגיעות גבוהה בנמטודת העפצים *Meloidogyne incognita* ו-*M. javanica*, הנובעת מאינטנסיביות גידולים חקלאיים בחלקות וכן תחום הפונדקאים העצום של נמטודת העפצים המאפשר את הישרדותם בקרקע. אזורים אלה הינם אזורי גידול של שקד ולשם המשך אחזקת ופיתוח הענף, יש צורך דחוף למצוא כנה שתוכל לגדול בקרקעות אלה בתנאי אינטנסיפיקציה, שתעניק עץ בריא ויבולים גבוהים, המקובלים על כנת GF.677. לאחרונה החלו להיבדק כנות חדשות אשר טופחו בספרד כנות מטיפוס GN כעמידות למספר מיני נמטודות וביניהן נמטודת העפצים ביניהן הכנות 'Garnem' (GN-15), Hansen, ו Citation. במבחנים אלו הציגו הכנות GN-15 ו- Hansen, עמידות לנמטודות. על מנת להרחיב את סידרת הכנות שיכולה לשמש לשינטוע מטעים בעלי נגיעות גבוהה המשכנו במסגרת מיזם זה לבחון את תגובתם של כנות נוספות חדשות גם הן מסדרת GN, (GN-22) 'Felinem', ו- (GN-9) 'Monegro' ושתי כנות נוספות שטופחו בארה"ב 'Viking' ו- 'Nickel' להדבקה בנמטודת העפצים. לתוצאות מחקר זה חשיבות עליונה, שכן שנטוע מטע הינו תהליך יקר ולבחירת הכנה משקל רב שייקבע את רווחיותו של המטע. מכאן מידע מלא בדבר עמידות/רגישות של הכנות החדשות לשני מיני נמטודת העפצים הנפוצים בארץ הינו מחייב. בשנה הקרובה יצטברו תוצאות נוספות שייתרמו מידע נוסף לגבי כדאיותן הכלכלית של הכנות.

#### 5. תת קבוצה: סיגל בראון, פטריסיה בוקי, שולה מנוליס לאורה צ'לופוביץ

##### חקר השפעת הגומלין בין החיידק *Agrobacterium tumefaciens* ונמטודת יוצרת העפצים *Meloidogyne javanica* בכנות גלעיניים

הכנה GF.677 הכנה המסחרית לשקד בארץ, אינה נותנת מענה לקרקעות נגועות בנמטודת העפצים. באזורים שונים בארץ, בעיקר בקרקעות הקלות בדרום, ישנה נגיעות גבוהה בנמטודת העפצים *Meloidogyne incognita* ו-*M. javanica*, הנובעת מאינטנסיביות גידולים חקלאיים בחלקות וכן תחום הפונדקאים העצום של נמטודת העפצים המאפשר את הישרדותם בקרקע. אזורים אלה הינם אזורי גידול של שקד ולשם המשך אחזקת ופיתוח הענף, יש צורך דחוף למצוא כנה שתוכל לגדול בקרקעות אלה בתנאי אינטנסיפיקציה, שתעניק עץ בריא ויבולים גבוהים, המקובלים על כנת GF.677. לאחרונה החלו להיבדק כנות חדשות אשר טופחו בספרד כנות מטיפוס GN כעמידות למספר מיני נמטודות

ובניהן נמטודת העפצים ביניהן הכנות 'Garnem' (GN-15), Hansen, ו Citation. במבחנים אלו הציגו הכנות GN-15 ו Hansen, עמידות לנמטודות. בנוסף נבדקות כעת במסגרת מיזם זה כנות חדשות גם הן מסדרת GN, (GN-22) 'Felinem', ו-'Monegro' (GN-9) ושתי כנות נוספות שטופחו בארה"ב 'Viking' ו 'Nickel'. פרט לנזק הנגרם ע"י נמטודת העפצים, עצים גלעיניים רגישים מאוד לחיידק מחולל המחלה Crown gall, *Agrobacterium tumefaciens*. מטרת המחקר הנוכחי במסגרת המיזם היא לימוד תגובת הכנות החדשות הנלמדות לחיידק וכן לימוד השפעת הגומלין של שני גורמי המחלה על עמידות/רגישות של הכנות החדשות. העמידות/רגישות של הכנות החדשות לחיידק *A. tumefaciens*, נבחנת בשילוב עם נמטודת העפצים וללא במבחני הדבקה מבוקרים ומכוונים בבית רשת במחלקה לפתולוגיה במינהל המחקר. לצורך לימוד הנושא חברו שתי המעבדות המתמחות בחיידק *A. tumefaciens* ובנמטודת יוצרת העפצים. תוצאות ראשוניות שהתקבלו בשלב זה של המחקר מצביעות שבכנה הרגישה לנמטודות GF-677 אין השפעה לנגיעות בחיידק על קצב התרבות הנמטודה. אולם הכנה GN-15 שנצפתה לא מזמן בעלת עמידות לנמטודת העפצים הראתה רגישות ל *Agrobacterium*, אך עצם הנגיעות בחיידק לא פגעה בשלב זה בעמידות של כנה זו לנמטודות. אולם על מנת לבחון את תגובת הכנות לאורך זמן הערכת הכנות תתבצע שוב בעוד חצי שנה והשפעת גומלין אם ישנה תילמד לכל כנה. בנוסף החל מבחן נוסף בדומה לזה שנעשה בשנה הקודמת עם הכנות 'Viking' ו 'Nickel' וכנת הביקורת הרגישה GF-677. לתוצאות מחקר זה חשיבות עליונה, שכן שנטוע מטע הינו תהליך יקר ולבחירת הכנה משקל רב שייקבע את רווחיות המטע. מכאן מידע מלא בדבר עמידות/רגישות לשני הפתוגנים העיקריים המהווים בעיה בענף הגלעיניים הינו בעל חשיבות רבה לשתלן ולנוטע.

## 6. תת קבוצה: יצחק שפיגל, סיגל בראון, יוז'י אוקה ופאטה גורונג

**הדברה ביולוגית של נמטודות טפילות לצמחים באמצעות הנמטודה הטורפת *Koerneria sudhausi* n. sp. (Nematoda: Diplogastridae)**

בחקלאות האורגנית אין כיום בנמצא פתרון יעיל כנגד נמטודת העפצים וההדברה הביולוגית הניבה עד כה מעט מוצרים שחלקם עדין לא הוכחו כבעלי כדאיות כלכלית. החידוש החקלאי של חלק זה של המאמץ הרב תחומי שבמיזם מתבטא ביכולת הפוטנציאלית הגלומה בנמטודות הטורפות, מושא עבודתנו, שבודדו במחלקה לנמטולוגיה, להדביר את הנמטודה יוצרת העפצים (שכאמור מהווה נזק כלכלי/חקלאי ממדרגה ראשונה) ונמטודות פרזיטיות על צמחים נוספות. הנמטודה *Koerneria sudhausi* השייכת לסידרה Diplogastridae הוגדרה לראשונה ע"י Fürst von Lieven, 2008 לאחר שבודדה כאמור במחלקה לנמטולוגיה שבמינהל המחקר. למרות הידע הספרותי על נמטודות

טורפות הקיים כבר זמן רב, החידוש המדעי מתבטא במחקרי ההתאמה שייעשו לנמטודה ספציפית זו אשר מלבד המאמר המביא תיאורים ראשוניים על מחזור החיים של הנמטודה ואינדיקציות ראשוניות לפוטנציאל השימוש בה כמדביר ביולוגי (Bar Eyal et al 2008; Fürst von Lieven, 2008), אין כל מידע נוסף בדבר שיטות ריבוי 'המוניות' של הנמטודות הללו, הישרדותן וריבויין בתנאים שונים ויעילות כושרן לפעול כטורף. מאפיינים אלו יקבעו את היתכנות ניצול הפוטנציאל הבינומטוצידי של הנמטודות הטורפות לשימוש מקובל בחקלאות האורגנית. בשלב זה של המחקר הגענו לגידול תרבית נמטודות בה מספר חיידקים מצומצם ופיתחנו פרוטוקול גידול לריבוי הנמטודות. הועמדו שלושה ניסויים עם מספר חזרות שהצביעו על סוג הקרקע בו כושר ההישרדות של נמטודות אלו הוא הגבוה ביותר. המשך הניסויים המתוכנן יסייע בבחירת התנאים שייתמכו בנמטודה וישפרו את כושר יעילותה כמדביר ביולוגי. אנו מצפים כי בסיום מועד המחקר המוצע, יצטברו די נתונים אשר יאפשרו לחברה מסחרית להתאים תכשיר (bio-agent) אשר יבחן בתנאי שדה.

## 7. תת קבוצה: משה אלבז, חנה אלון, ליאנה גנות, שבתאי כהן, אורי ירמיהו, יוג'י אוקה, חגי יסעור

### מעורבותו של חנקן ביחסי נמטודה צמח פונדקאי בגידול פלפל בחבל הבשור

נמטודות עפצים השייכות לסוג *Meloidogyne* פוגעות במגוון רחב של גידולים כגון: פלפל, ועגבנייה ונחשבות לאחד ממזיקי החקלאות החשובים בעולם. נוכחותה של הנמטודה כגורם מגביל בצמח מעלה שתי שאלות: א. כיצד שינויים בהזנה של הצמח בכלל וההזנה החנקנית בפרט ישפיעו על יחסי צמח נמטודה? והשנייה, כיצד יחסי הגומלין בין הנמטודה והצמח משתנים כתלות ברגישותו של הזן. מחקרים רבים שבוצעו בעבר במספר גידולים מראים כי תוספת חנקן להזנה משפיעה בצורה חיובית על סבילותו של הצמח הנגוע בנמטודות ולעיתים אף מצמצמת את קצב התפתחות אוכלוסיית הנמטודות בשורשים. **מטרת המחקר:** פיתוח ממשק יישומי להתמודדות עם נמטודות עפצים המבוסס על הזנה בגידול פלפל, תוך הבנת חשיבותו של חנקן ביחסי נמטודה צמח פונדקאי. בשנה הקודמת בוצע ניסוי בדליים בו נבחנה שאלת המחקר תוך שימוש בשני זנים, שלוש רמות נגיעות בנמטודות וארבעה משטרי הזנה בחנקן. במהלך הניסוי נבדקו מדדים רבים בניהם: כמות הנקז וריכוז יסודות ההזנה שבו, גובה הצמחים, סימני חוסרים כתוצאה מנוכחות נמטודות, ואינדקס עפצים. בסוף הניסוי פורקו הצמחים לכל מרכיביהם למשקל טרי יבש ובוצעה בדיקה של אינדקס עפצים. בניסוי בשנה הנוכחית הוחלט לדגום צמחים בזמנים מוקדמים יותר על מנת לבחון מהו העיתוי בו מתחילים להופיע ההבדלים בהרכב הנקז בצמחים הנגועים ולבחון את השפעת הדישון החנקני על שינויים אלו. התוצאות בשנה הקודמת הראו כי גם במשקל הפירות הממוצע לצמח וגם בנתוני הנקז (כמות הנקז, ריכוז יסודות הזנה) כי בהזנה חנקנית של 25 ו 50 ח"מ ישנה ירידה במשקל הפרי עם העלייה בצפיפות

הנמטודות ובטיפול הזנה של 100 ו 150 ח"מ השפעת הנמטודות חלשה יותר או לא קיימת כלל כתלות בזן הנבדק. בנוסף, נמצא כי משקל הפירות מושפע מערכו של אינדקס עפצים בצורה מובהקת בריכוזי חנקן נמוכים וללא השפעה בריכוזי חנקן גבוהים. נראה כי ההזנה החנקנית בתנאי שני ניסויי הדללים שבוצעו וויסתה את השפעת הנמטודות על הצמח. מנגנון ההשפעה של החנקן על הצמח בנוכחות נמטודות תוך שיפור פוטנציאל ההנבה של הצמח באמצעות הזנה חנקנית מוגברת יצטרך עוד להיחקר.

## 7. טופס סיכום עם שאלות מנחות

**מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.** מטרות המחקר האינטגרטיבי הזה הם: **א.** פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים. **ב.** פיתוח שיטות מתקדמות והדירות לזיהוי וניטור נמטודות בקרקע. **ג.** התאמת מקורות עמידות לאוכלוסיות הפתוגן בפלפל ופיתוח השימוש בהן. **ד.** התאמת מקורות עמידות של כנות גלעיניים, בדיקת ביצועיהן והערכת כדאיותן הכלכלית. **ה.** פיתוח ממשק יישומי להתמודדות עם נמטודות עפצים המבוסס על הזנה בגידול פלפל, תוך הבנת חשיבותו של חנקן ביחסי נמטודה צמח פונדקאי. **ו.** פיתוח תכשירים על בסיס הדברה ביולוגית כנגד נמטודות בחקלאות האורגנית.

### עיקרי התוצאות

גובשה גישה מערכתית להתמודדות בפני חלקות נגועות בנמטודת העפצים, גישה זו מפורסמת בימי עיון וסיכום באופן אינטנסיבי. פותחה שיטה לניטור מידבק נמטודות בקרקע באמצעות qRT-PCR. נלמדה תגובת מקורות העמידות בפלפל *Me1*, *Me3* ו *N*, לאוסף אוכלוסיות *M. incognita* המייצג את נמטודת העפצים המובילה להפסדי יבול בפלפל. נלמדה השפעת המצב האללי והרקע הגנטי של גנים אלו על ביטוי העמידות וכן פוטנציאל שבירת העמידות נבדק. השפעת הזנה חנקנית על נגיעות בנמטודות הוכחה כגישה לצמצום ההשפעה השלילית של הדבקה בנמטודת העפצים על מדדי צימוח ויבול. פיתוח הנמטודה הטורפת כמדביר ביולוגי כנגד נמטודות פסע צעד ניכר, תמיכתה של קרו הון סיכון יביא לידי מוצר תוך זמן קצר.

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

כן מטרות המיזם הושגו, הושגו כמעט כל מטרות תתי הקבוצות, תוצאות ניסויים נוספים שעדיין רצים ישולבו בפרסומים הקשורים למיזם זה.

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

החוסר בחוקר המתמחה בטיפול קרקע כנגד פתוגנים הביא לכך שפרופ' אברהם גמליאל הסכים להצטרף למיזם בשנה השנייה. מחקרו שם דגש על פיתוח גישה מערכתית להדברה ומניעת התפשטות נמטודות בגידול פלפל ובמטע פרי נשירים. שינויים בחברי הצוות של השפעת ההזנה החנקנית כתוצאה מעזיבתו של דר משה אלבז ולאחר מכן דר דני הראל ומאופי מורכבות הניסויים המתוארים אשר הקשו על ניהול הפרוייקט, ולמרות תוצאות חשובות שהתקבלו, בתום השנתיים הוחלט לסיים מחקר זה. חוסר הפעילות של נמטודות אנטומופתוגניות לשמש כמדבירים ביולוגיים אשר נצפה בניסויים בתחילת השנה הראשונה הוביל להפסקתו של תת מחקר זה.

**הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:** נמטודות מהוות כיום מטרד קשה כמעט בכל הגידולים. אופי הגידול האינטנסיבי של פלפל, והשאיפה במיוחד היום למצוינות גידולית שתבטיח רווח גבוה מחייבים את החקלאים לנקוט בגישות יעילות להדברת נמטודות. פרופ' אברהם גמליאל ואנוכי דר סיגל בראון השתתפנו בחצי שנה האחרונה בלמעלה מ 10 ימי עיון, דיווח וסיכום למגדלים, מדריכים, פקחים ועידה פיטופתולוגית זאת חוץ מכנסים בינלאומיים. בנוסף ממצאי הדוח מסוכמים כעת לעיתונות מבוקרת וכן בעלונים מקצועיים.

**פרסום הדו"ח:** אני ממליצה לפרסם את הדו"ח

ללא הגבלה

**האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי** לא