

## **איתור ויישום תכשیر הדבירה אפקטיבי כנגד הגורם למחלת הנבלת המאוחרת בתירס, *Harpophora maydis***

העבודה בוצעה במעבדה לפיטופטולוגיה מולקולרית במיג"ל, בהנחיית ד"ר אופיר דגני ורן דרורי, ע"י ענבל מזל ואסף בלטמן, סטודנטים לתואר ראשון מכללת תל-חי

### **מטרות המחקר:**

1. בחינת ההשפעה של נוגדי פטריות על התפתחות *H. maydis* בקרקע מצון מוצקה ועל יצירת נגגים של הפטריה.
2. בחינת ההשפעה של נוגדי הפטריות שנמצאו אפקטיבים בצלחות על התפתחות הפטוגן *H. maydis* בשורשים מנוקקים.
3. מעקב אחר התפתחות הפטוגן בצמחים לטיפוליים השונים בשדה הניסוי באנות מרדי (קיים 2009).

### **שיטות וחומרים:**

#### **גידול וניסויי הדבירה בצלחות תרבית:**

לפני כל ניסוי גודלה הפטריה *H. maydis* באינקובטור, בתנאים אופטימליים של 28 מעלות צלזיוס, בחושך במשך 7 ימים. בבדיקה נעשה שימוש ב- 9 פונגיצידים (ראה טבלה 1). נוגדי הפטריות מחולקים לתוכירים אבקתיים: אוקטב, אמינובר, סייגנום וטרכלור, ותוכירים נזליים: ספורטיק, סלסט, חוסן, עמיסטר ורודיוון. הכנת הפונגיצידים האבקתיים והנזליים נעשתה ע"י המסה או מיהול במים עמוקים (בהתקאה), לקבלת ריכוז של  $L/100$  המוכנים עברו עיקור בסינון על ידי פילטר ( $\mu m 0.20$ ). לאחר מכון מהלו נוגדי הפטריות מהסתוקים במצע PDA לקבלת ריכוזים סופיים של  $L/10,1,0.1 mg$ . בכל סוג של קווטל פטריות נבחנו 3 ריכוזים:  $L/10,1,0.1 mg$  (רכיב הונגציד, לא החומר הפעיל), לכל ריכוז נעשו 6 חזרות. הכנת הריכוזים נעשתה ע"י ערובה  $\mu m 20/200/2000$  של קווטל מוכן בריכוז של  $L/100 mg$  בהתאם, ב- 20 מ"ל מצע. הביקורת הכליה רק מצע ללא קווטל פטריות. דסקיית (6 מ"מ) של הפטריה בת 7 ימים, נזרעה באמצעות צלסיוס בחושך. קווטר התפשטות המושבה נמדד כל יומיים, עד שהפטריה בצלחת הביקורת מלאה את צלחת התרبية (100%). מתוך כל התכשירים שנבחנו, נבחרו חמישה הפונגיצידים האפקטיבים לבחינה בשורשים מנוקקים.

**טבלה 1:** הפוןגצידים שנבחרו לאיתור השפעה מעכבות כנגד הפטוגן *H. maydis*

שם הקוטל	חברה משווקת	מרכיב פעיל	רכיב אפקטיבי כנגד <i>H. maydis</i>
אוקטב	אתים מילץין	Prochloraz Manganese	>10 mg/L
אלמנדה ישראל	אלמנדה תעשיות	Dimethylamine salt of 2,4-D	
טרכלור	לוכסנברג תעשיות	Pintachloronitrobenzene	> 10 mg/L
סיגנות	างן יצרני כימיים בע"מ	26.7% Boscalid, 6.7% Pyraclostrobin	>10 mg/L
סלסט	אתים מילץין	Fludioxonil	> 10 mg/L
ספורטק	אתים מילץין	Prochloraz	>10 mg/L
רודיון	כצט	Iprodione	
עמייסטר	מכתשים	Azoxystrobin	>10 mg/L
חוון	מכתשים	Flutriafol	>10 mg/L

#### **מבחן שורשים:**

לצורך מבחון זה, נשתלו זרעים של תירס מזן גיבילי בעציים וגודלו בטמפרטורה נוחות אור, עד גיל 10 ימים. הוכנו 7 טיפולים: ביקורת שלילית וחובייה, סיגנות, חוון, עמייסטר, ספורטק ואוקטב. לכל טיפול נעשו 3 חוותות. בכל טיפול נעשה שימוש בריכוז הגבוה ביותר של הפוןגציד שנמצא אפקטיבי במבחן הצלחות (mg/L 10) של הקוטל. בבדיקה החובייה נעשה שימוש במים והנחה דיסקית תפיר על השורש ובביקורת השילילת נעשה שימוש במים והנחה דיסקית אגר על השורש. תמייסות התכשירים שימשו להרטבת נייר ווטמן בצלחת פטרוי, ועל גביו הונח שורש מרכזי של נבט תירס בן עשרה ימים. במרכז השורש הונחה דיסקית תפיר (6 מ"מ) והופעת חותם הדבקה במרכז השורש נבדקה לאחר 3 ו- 6 ימים מהailות.

#### **הפקת DNA ובייצוע PCR (פריאיימרים (AM42+A200)**

DNA הופק באמצעות (sigma, Rehovot, Israel) Extract-N-amp plant PCR kit מפטריות DNA שגדלו 7 ימים באינקובטור ב- 28 מ"ץ בחושך, או מחלקי הצמח השונים שנבדקו לנוחות פטרייתית של *H. maydis* – שורש, גבעול, עלה, גרעינים וזרעים. חלקו הצמח השונים (שורש, גבעול, עלה וזרעים) חוטאו חיצונית בנפרד ע"י אטנול 70% ונשטו במים, לאחר מכן נכתשו במכבש ועילי. מכל דוגמא נלקחה פיסחה קטנה בעורת קיסם עץ.

PCR בוצע במכשור (Idaho Technology, Salt Lake City, Utah 84108, USA) Rapidcycler

: *H. maydis* (Saleh and Leslie, 2004), שהגבירו את המקטע הספציפי (A200 ,

Forward: 5'-CCGACGCCTAAATACAGGA-3' ,

Backward: 5'-GGGCTTTTAGGGCCTTTT-3'

הפריאיימרים, AM42, שהגבירו את מקטע ה-rDNA :

Forward: 5'-CAACTACGAGCTTTAACGTGC-3'

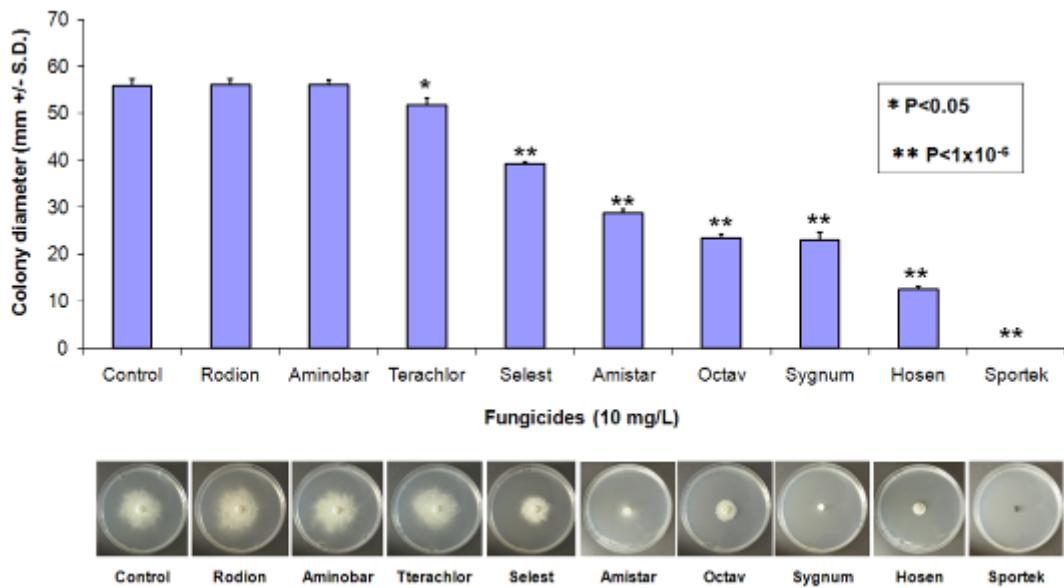
Backward: 5'-CAAATTACCCAATCCCGACAC-3' .

PCR בוצע בנפח כולל של  $\mu$  20 לריϊקציה:  $\mu$  1 מכל פרימר בריכוז  $\mu$  20, $\mu$  4 תערובת ריאקציה מוכנה : (Red Load Taq Master (Larova, Teltow, Germany) 3 של template 11 מים מזוקקים פумיים שעקרו באוטוקלב. תוצרי ה-PCR הורצו בגיל אגארוז DNA .(Lonza, Rockland, USA) 1.5%

### **תוצאות:**

#### **השפעת הפונגיצידים על הפטרייה *H. maydis***

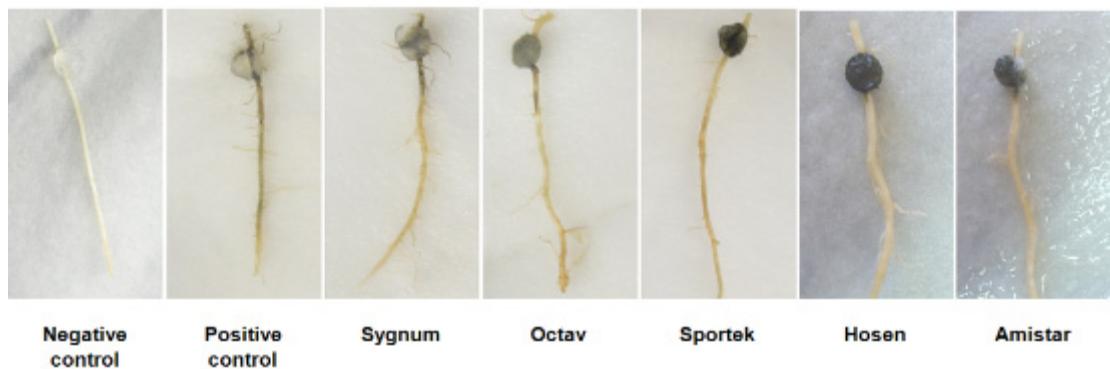
היום החמישי לגדילה והרכיבו הגבוה ביותר ( $10 \text{ mg/L}$ ) נבחרו להשואת ההשפעה של כל הפונגיצידים על התפתחות הפטוגן בקרען מזון. ניתן לראות כי ההשפעה של ספורטק היא הגדולה ביותר מ בין נוגדי הפטריות, וכי בריכוז המوصى של תכשיר זה לא נצפתה גידלה כלל (איור 1).  
סיגנום, חוסן, עמייסטר, טרכלור, סלסט ואוקטב הראו עיקוב משמעותי ( $P < 0.05$ ) בגודילת הפטיריה (איור 1) בהשוואה לביקורת. לא נצפתה השפעה מעכבות כלשהי של אמיסטאר ורודין על התפתחות הפטיריה (איור 1).



**איור 1:** תוצאות השפעת הפונגיצידים שנבדקו על התפתחות *H. maydis*, ברכיבו  $10 \text{ mg/L}$ .

### **תוצאות מבוחן שורשים ו-PCR**

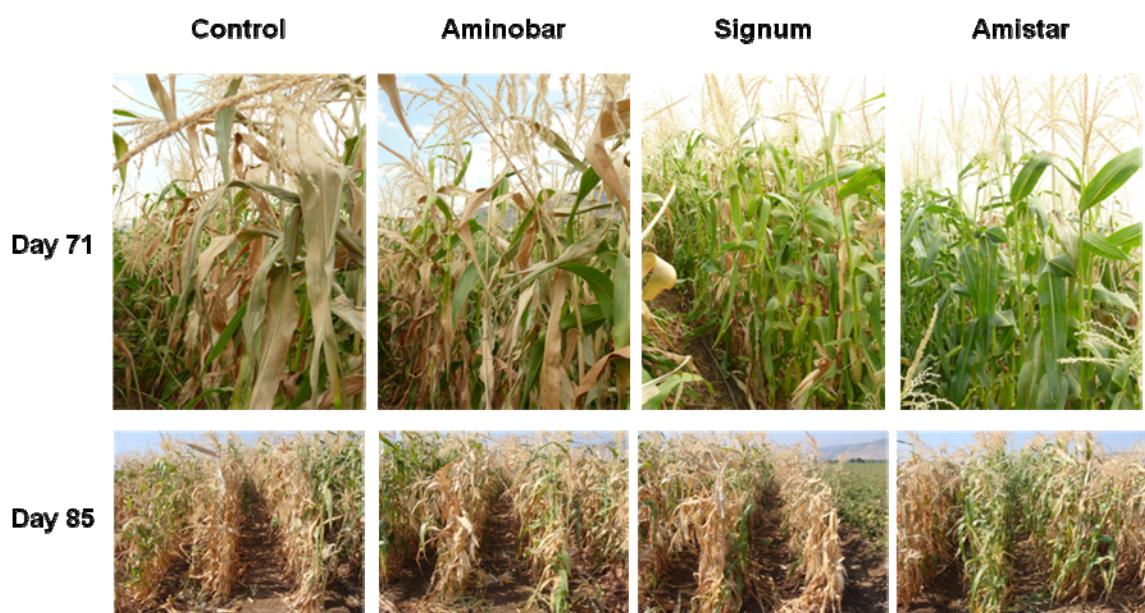
ב מבחון השורשים, ניתן לראות כי, בביוקורת החיוונית קיימים חוט הדבקה לאורך כל השורש המנוקתק (איור 2). לעומת זאת, בטיפוליים : ספורטק, חוסן ועמייסטר נצפתה השפעה מעכבות ולכון לא נראה חוט הדבקה כלל. בטיפוליים סיגנום ואוקטב, נצפתה השפעה מעכבות קטנה יותר וקיים חוט הדבקה בסמוך לאזור האילוח (איור 2).



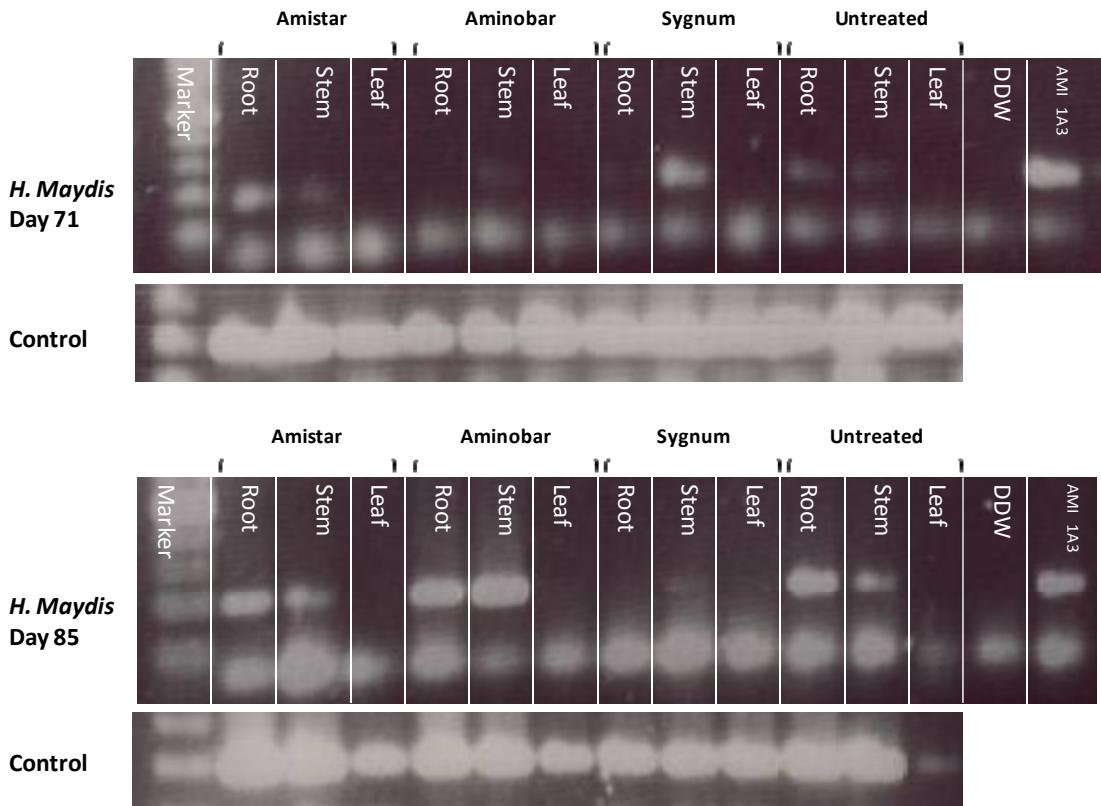
**איור 2:** תוצאות מבחן לפטוגניות בשורשים מנוטקים של נבט תירס צעירים מהזון ג'ובייל.

#### מעקב אחר התפתחות הפטוגן בניסוי שדה בנהרות מרדי (קייז 2009)

צמחים הניסוי נדגו אחת ל- 10 ימים וחלקי הצמח השונים נבדקו לנוכחות DNA של הפטוגן *H. maydis* (איור 4). המבחן המולקולרי זיהה לראשונה DNA פטריטי לאחר 71 יום מהזרעה, בשורש ובגבעול של צמחי הטיפולים השונים. DNA של הפטוגן אותר בכל הטיפולים בשדה הניסוי. לא נמצא קשר בין הופעת הסימפטומים לבין כמות ה-DNA הפטיטית בחלקי הצמח השונים (איור 3).



**איור 3:** בדיקת PCR לمعקב אחר כמות ה-DNA בצמחים הטיפולים, ביום 71 ו- 85 לגידול. פנל תחתון (Control) – ביקורת חיובית עם פרימרים למקטע המקודד ל-RNA ריבוזומאלי.



**איור 4:** בדיקת PCR למעקב אחר כמות ה- DNA בצמחים הטיפולים, ביום 71 ו- 85 לגידול. פנل תחתון (Control) – ביקורת חיובית עם פרימרים למקטע המקודד ל- RNA ריבוזומאלי. DDW – ביקורת שלילית עם מים מזוקקים פעמיים. Ami1A3 – ביקורת חיובית עם DNA של הפטוגן שהופק במעבדה מגידול בתרבית.

#### מסקנות ודיון:

מההתוצאות שהתקבלו בבדיקה הצלחות ובבחן השורשים, ניתן להסיק כי הפונגצידים ספורטק, עמיסטר וחושן הם היעילים ביותר מ בין כל נוגדי הפטריות שנבדקו. בRICTO פונגציד של L/10 גרמו תכשירים אלו לעיכוב מוחלט בגידול הפטרייה. במחקריהם קודמים, נמצא כי החומר הפעיל בפונגציד ספורטק הנקרא Prochloraz, והחומר הפעיל הנמצא בפונגציד חסן הנקרא Flutriafol מעכבים דה מתילציה בסטרולים. העיכוב מתארח על סטרול α-14 דהמטיילאוז (erg11) ועל סטרול ΔLTα, 5,6 דיסטוראו (erg3), שהם חלק מהקומפלקס האנזימי ציטוכרום P450 ויש להם תפקיד חשוב בمسلسل הבiosisינזה של הארגוסטרול שהוא חלק מהםברנה התאית בפטריות ושמרים (10) (11). החומר הפעיל בפונגציד עמיסטר הנקרא Azoxystrobin מעכב את הנשימה התאית, ע"י היקשרות למרכז Q<sub>0</sub> הנמצא בцитוכרום b. ציטוכרום b הוא חלק מהקומפלקס ציטוכרום bc<sub>1</sub>, המקבוע בתוך המembrנה המיטוכונדריאלית בפטריות או אוקריוטיים אחרים. כאשר אחד מהאתרים נחסם, זה מונע את מעבר האלקטרונים בין

ציטוכרים וציטוכרום c. כתוצאה כך, משתמש מעגל האנרגיה ונוצר ייצור ה-ATP בפטרייה (13).

מבחן השורשים תומך בתוצאות השפעת הפונגייצידים בצלחות התרבות לגבי ספורטק וחוסן, אולם עמיסטר, שגרם לעיכוב חלקי בצלחות התרבות, גרם לעיכוב מלא במבחן השורשים.

המבחן המולקולרי שבוצע לצמחי השדה זיהה DNA פטריאתי בשלב מאוחר יחסית של 71 יום לאחר שכבר הופיעו סימפטומים ראשוניים של המחלקה. תוצאות המבחן מראות על עלייה בכמות ה-DNA הפטריאתי בחלקי הצמח (שורש וגבول) עם התבגרות הצמח. לא נמצא קשר בין כמות ה-DNA לבין חומרת תסמיini המחלקה. שלא כבעבר, בניסוי זה, לא זיהה DNA פטריאתי בעליים ובקלחים.

#### **ביבליוגרפיה:**

1. K.A. Sabet, A.S. Samra, M.K. Hingorani et al., *FAO Plant Prot. Bull.* **9** (7), 121 (1961).
2. A. A. Galal, M. M. El-Rouby, and A M. Gad, *Zeitschrift fur Planzenzuchtung* 83, 176 (1979)
3. K. A. Sabet, A. S. Samra, and N. A. Dawood, *Bull. U.A.R. Min. Agric. Dept. plant Prot.*, 195 (1966).
4. A.S. Samra, K.A. Sabet, and M.K. Hingorani, *Plant Dis. Rep.* 46, 481 (1962).
5. H .A. El-Shafey, M.F. Abdel-Rahim, O. Z. Abd-el-Azim et al., *Egypt. Agric. Res. Rev.* 54, 29 (1976).
6. M. M. Payak, S. Lal, J. Lilaramani et al., *Indian Phytopathol.* 23, 562 (1970).
7. A.A. Saleh and J.F. Leslie, *Mycologia* 96 (6), 1294 (2004).
8. K. A. Sabet, A. M. Zaher, A. S. Samra et al., *Ann. Appl. Biol.* 66 (2), 257 (1970).
9. Y. Huang, Y.C. Hung, S.Y. Hsu, Y.W. Huang, D.F. Hwang. *Food control* 19, 329-345 (2008).
10. F.J. Gea, M.J. Navarro and J.C. Tello. 109(6): 741-745 (June 2005).
11. S. Kuret, S. Dervis, S. Sahinler. *Crop Protection* 22, 51-55(2003).
12. K.M. Griffiths and B.J. Howlett. 81-88, 19 November 2002.
13. C. Avila-Adame, W. Köller. *Curr Genet* 42: 332-338 (2003).