דו"ח לתכנית מחקר מספר **21-35-0003**

שנת המחקר: 1 מתוך 3 שנים

מניעה והדברה של *Harpophora maydis*, הגורם למחלת הנבילה המאוחרת בתירס

Protection and control against *Harpophora maydis*, the causing agent of maize late wilt

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף גד"ש ע"י:

דר' אופיר דגני – ראש המעבדה למחלות צמחים, מיגל - מכון למחקר מדעי בגליל, קריית שמונה (ofird@telhai.ac.il). פיטופתולוגיה והאינטראקציות של הפטרייה עם צמח הפונדקאי, תוך שימוש בשיטות ביוכימיות ומולקולאריות. חוקר ראשי - מרכז מדעי ואחראי לעבודה הפיטופתולוגית.

דר' מרי דפני ילין (merydy@gmail.com**) –** פיטופתולוגיה ופיתוח ממשקים להדברה משולבת. שותפה בניסויי המעבדה, החממה והשדה.

מר שאול גרף (shaoulgraph@gmail.com**) –** דיגום וניטור תבדידי מחלה וניסויי אילוח ובחינת עמידות/סבילות בזני תירס. סיוע בניסויי החממה והשדה, אחראי לקשר עם החקלאים.

<u>שלושה מעריכים שהינם מומחים בתחום המדעי בו עוסק המחקר:</u>

<u>פרופ' בנימין הורביץ</u>

טלפון: 972-4-8293976, פקס: 972-4-8225153

דוא"ל: horwitz@techunix.technion.ac.il

הפקולטה לביולוגיה, הטכניון, מכון טכנולוגי לישראל

<u>פרופ' עמיר שרון</u>

טלפון: 972-3-640-6741, פקס: 972-3-640-5498

דוא"ל: amirsh@tauex.tau.ac.il, amir7734@gmail.com

המחלקה למדעי הצמח, אוניברסיטת תל-אביב

<u>פרופ' דב-ברנרד פרוסקי</u>

טלפון: 972-3-9683610 972-3-9683880, פקס: 972-3-9683622

דוא"ל: dovprusk@volcani.agri.gov.il

מנהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6, בית דגן, 50250

1. תקציר מדעי של תכנית המחקר

מחלת הנבילה המאוחרת בתירס נגרמת על ידי הפטרייה *Harpophora maydis* וכיום אמצעי ההתמודדות היחיד כנגדה הוא שימוש בזנים עמידים. בשנה זו הושגה התקדמות משמעותית ביעדים המרכזיים: 1) הגנה על זרעים ומניעה. ציפוי זרעי הזן הרגיש ג'ובילי, בתכשיר Azoxystrobin, מנע לחלוטין הופעת DNA של הפתוגן בזרעים. בנבטים הביא הטיפול לירידה משמעותית בהופעת DNA של הפטרייה בצמח ומזער את השפעתה המדכאת על הצמיחה. בניסוי שדה עם זרעים מעוטים בזן פרלוד הרגיש למחלה, המחלה לא התפרצה ולכן גם לא אותר DNA של הפתוגן *H. maydis* בצמחים. מנגד ריסוס בית השורשים בתכשיר הפחית את הנזקים, אך לא מנע הופעת DNA פטרייתי בצמחים. 2) שיפור ופיתוח שיטה מולקולארית לאיתור הפתוגן. כאן בוצע מיטוב לשיטת הפקת ה- DNA ופרוטוקול ה- PCR ובחינה השוואתית של שלושה פריימרים שונים לאיתור הפתוגן. פיתוח שיטה רגישה מבוססת qPCR נמצא כעת בשלבים מתקדמים. 3) לימוד הגורמים המאפשרים שרידות הפתוגן. הפתוגן אותר בשדה בצמחי כותנה אך לא בצמחי עכובית הגלגל. התוצאות יאפשרו הרחבה והעמקת המחקר, בהתאם למתוכנן.

2. מבוא

מחלת הנבילה המאוחרת (late wilt) בתירס נפוצה מזה כ- 30 שנה בגליל העליון ובעיקר בעמק החולה. בשנים האחרונות החריפה המחלה והתפשטה לעמק יזרעאל, לבית שאן (2008), לדרום רמת הגולן (2011), ולבית שמש ויבנה שבדרום הארץ (2013). המחלה תוארה לראשונה במצריים ב- 1960 [1] והוגדרה כמחלת התירס החמורה ביותר במצריים [2]. בהמשך דווחה המחלה גם בארצות נוספות והיא מוערכת כגורם סיכון משמעותי לייצור התירס בארה"ב [4,3]. בשדות מסוימים ובצמחי זנים רגישים עלולה המחלה לפגוע ב- 100% מהצמחים [5]. המחלה מאופיינת בנבילה מהירה יחסית של התירס המתרחשת לרוב בגיל 60-80 יום, מלפני שלב הפריחה (tasseling) ועד זמן קצר לפני הבגרות (מכאן השם נבילה מאוחרת – Late wilt). סימני התייבשות ראשונים מופיעים 50 יום לאחר הזריעה [6]. בהמשך מתקדמת ההתייבשות מחלקו התחתון של הצמח כלפי מעלה וכוללת הצהבה והתייבשות של העלים, שינוי צבע לצהוב-חום של צרורות ההובלה, ולאחריהם הופעה של פסים אדומים-חומים על הפרקים [7]. כמות הזרעים נמצאת בקורלציה שלילית עם חומרת המחלה [8]. במקרים חמורים לא נוצרים קלחים. אם נוצרים זרעים הם מכווצים ובעלי התפתחות מועטה. הזרעים המודבקים עשויים להפיץ את המחלה [9]. בנוסף גורמת הפטרייה להפחתה משמעותית בהתפתחות השורשים של צמחים שגדלו במצע מאולח, ולשינוי צבע השורשים לחום. יתכן שזה הגורם לפגיעה באחוז הנביטה ובחוסן הנבטים שגדלים על קרקעות מאולחות [10].

הפטרייה *H. maydis* מדביקה צמחי תירס צעירים בקלות אך יכולת זאת נעלמת עם התבגרות הצמח והפטרייה אינה מסוגלת להדביק צמחים שגילם עולה על 50 יום מהזריעה [11]. אילוח ישיר של הגבעול או העלים אינו גורם למחלה [12]. הפטרייה מופיעה לראשונה בצינורות העצה 21 יום לאחר הזריעה. לאחר החדירה, מתפשטת הפטרייה באיטיות מעלה, בעיקר לאורך העצה, ולאחר 5 שבועות ניתן למצוא קורים ונבגים במרבית צינורות העצה שבקרקע ובמפרק הגבעול הראשון שמעל הקרקע. קצב הגדילה מואץ לאחר 7 שבועות וקורי הפטרייה מגיעים בצינורות ההובלה עד למפרק הרביעי שמעל הקרקע. במצריים בודדו החוקרים, מצמחים נגועים, 4 קווים שונים של הפטרייה השונים משמעותית בכושרם לגרום מחלה [13,2]. אחד מזנים אלו נחשב לאלים וגורם למחלה גם בקווי צמחים שנחשבים עמידים למחלה [14]. בקיץ 2010 החלו להופיע בעמק החולה סימני מחלה גם בזן רויאלטי שעד כה נחשב לעמיד (ווינברג ועמיתיו 2010, נתונים שלא פורסמו) ובשנת 2012 התמוטט שדה של זן זה (רויאלטי) בבית שאן.

בעבר נעשו ניסיונות להדביר את הפתוגן בדרכים כימיות וביולוגיות. חלק מהפונגיצידים שנוסו, פעלו היטב בעציצים אך נכשלו בניסויי שדה [15]. כך למשל נמצא כי: **Benomyl** (methyl 1-(butylcarbamoyl) benzimidazol-2-ylcarbamate) בריכוז 2.5-100 ppm מעכב לחלוטין את מחלת הנבילה המאוחרת בעציצים (הטיפול אינו יעיל בזרעים), אולם בשדה יישום של 10 kg benomyl/4200 m^2 לא הצליח למנוע את המחלה [16]. מנגד Abd-El-Rahim ועמיתיו (1982) מצאו כי הפונגיציד המערכתי **Benylate** (benzyl benzoate) שיושם 4 פעמים במרווחים של 15 יום (10 kg/4200 m^2), החל מהזריעה, הביא לעלייה של 30% ביבולים [15]. כיוון מחקרי אחר הראה כי העשרת הקרקע בחומרים אורגנים עתירי חנקן גרמה לגדילה מואצת של חיידקים, ובמידה פחותה של פטריות, והביאה לירידה של עד 40% בכמות צמחי עציצים החולים

במחלת הנבילה המאוחרת [17]. במקביל למחקרים אלו נעשו גם ניסיונות בפטריות קרקע להדברה ביולוגית. שימוש בפטרייה *Trchurus spiralis*, שאינה פתוגנית לתירס, או במצע הגידול שלה כנגד *H. maydis* בעציצים גרם לירידה משמעותית (20% ו- 40% בהתאמה) במספר הצמחים החולים[18].

אנו התאמנו שיטה מבוססת PCR [19] תוך שימוש במקטע DNA ספציפי ל- *H. maydis* [20] ובצענו אימות מורפולוגי ומולקולארי לפתוגן שבודד מצמחים נגועים מעמק החולה. המבחן המולקולארי המאפשר לאתר DNA פטרייתי ברקמות של צמחים נגועים, שימש אותנו בניסוי שדה (נאות מרדכי, קיץ 2008), לבחינת ההבדלים בפתוגנזה בין זן תירס רגיש למחלה, ג'ובילי, וזן תירס בעל רגישות מופחתת, רויאלטי [20]. יבול הג'ובילי היה נמוך ב- 34% מהיבול שנקטף בשדות בריאים בשנים עברו. יתר על כן, 78% מיבולים אלו סווגו כסוג ב' (משקל קלח פחות מ- 250 גר') [20]. התוצאות הראו לראשונה כי הפתוגן מתבסס גם בצמחי תירס בעלי רגישות מופחתת למחלה, אם כי בעיכוב של כשבועיים בהשוואה להתפתחותו בזנים רגישים. יתר על כן הזרעים של זני תירס עמידים עלולים לסייע בהפצת המחלה. תוצאות דומות התקבלו בניסוי שדה שבוצע שנה לאחר מכן (קיץ 2009) בשדה נגוע בחולתה [20]. סריקה בצלחות תרבית הצביעה על מספר תכשירים בעלי השפעה מעכבת על התפתחות הפתוגן העשויים לסייע בהתמודדות עם המחלה [12]. בניסוי בשדה ניסוי נגוע (נאות מרדכי, 2010), יישום תכשיר מבוסס Azoxystrobin (עמיסטר, מכתשים), במינון 112.5 ג' ח.פ. לדונם עיכב באופן משמעותי את התפתחות המחלה בשדה, והביא לעליה של 100% ביבול, בהשוואה לביקורת לא מטופלת [21].

3. מטרות המחקר

3.1. מטרה כללית. התמודדות עם מחלת הנבילה המאוחרת בתירס על ידי טיפול כימי, פיתוח שיטה מולקולארית לאיתור הפתוגן גורם המחלה ולימוד התבסוסתו בפונדקאים משניים המאפשרים את שרידותו.

3.2. מטרות ספציפיות. **א. התמודדות עם המחלה** - הגנה על זרעי תירס על ידי עיטוי כימי של קוטלי פטריות ודיכוי המחלה בצמחים בשלב הגידול הראשוני של התבסוסות הפתוגן בצמח, לפני הפריחה הזכרית (בחודש הראשון לגידול), באמצעות טיפול כימי. **ב. אמצעים לאיתור וניטור הפתוגן** – שיפור שיטת האיתור המבוססת על PCR ופיתוח ויישום שיטה כמותית ורגישה, מבוססת Real time PCR (qPCR), לאיתור הפתוגן בזרעי יצוא/יבוא וללימוד הפתוגנזה בצמחי תירס עמידים ורגישים. **ג. מניעת שרידות הפתוגן** - לימוד יכולת הפתוגן להתבסס בפונדקאים משניים.

4. פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

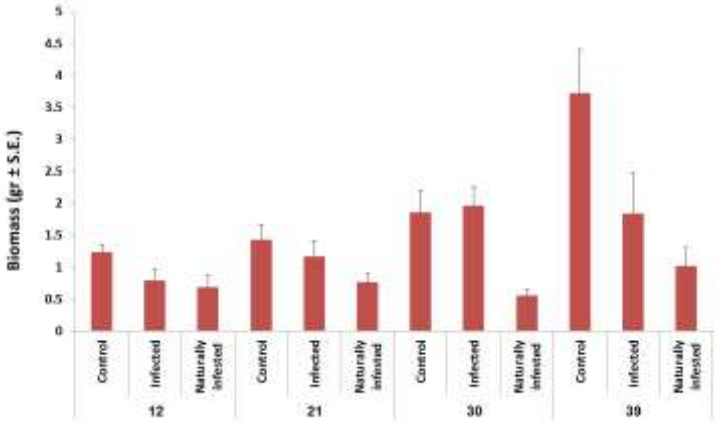
4.1. מבחן *in vitro* לחדירת הפתוגן לזרעי תירס מזן רגיש וזן עמיד למחלה

ניסוי אילוח *in vitro* (בבקבוקי ארלנמייר) בוצע במטרה לבחון את יכולת הפתוגן לחדור לזרע בתנאי הניסוי, את האפשרות לאתר אותו וכשלב מקדים לפני מבחני עיטוי הזרעים. לא נמצא הבדל ביכולת החדירה של הפתוגן

והתבססותו בזרעי שני זני התירס, ג'ובילי ורויאלטי. בזרעים המאולחים נראו בנדים, המעידים על המצאות DNA של הפטרייה, בדומה לביקורות החיוביות – זרעים שעברו עיקור באוטוקלאב (תוצאות לא מוצגות). בקבוצת הביקורת השלילית (ללא אילוח) לא נראו כצפוי בנדים כלל.

4.2. מבחן לפתוגניות בעציצים

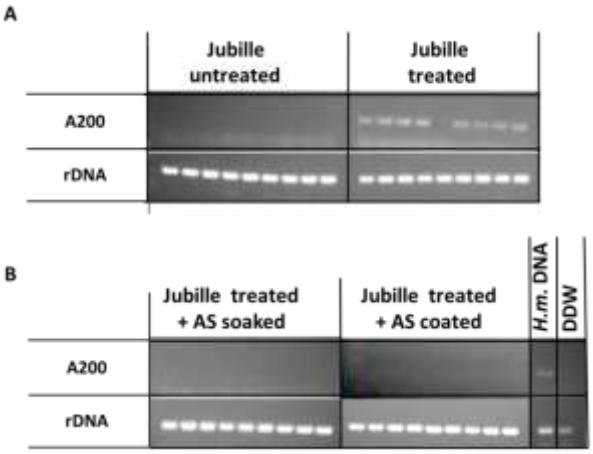
מבחן לפתוגניות בנבטים (עד גיל 40, מצב פנולוגי של עלה רביעי), על ידי אילוח נבטים באמצעות דסקיות תפטיר הוצע בעבר [12]. כאן נבדקה חדירת הפטרייה לצמחי תירס מזן ג'ובילי בנבטים בעציצים. הזרעים אולחו על ידי הוספת דסקיות תפטיר של הפטרייה לקרקע גננית או על ידי זריעה בקרקע נגועה שנלקחה משדה נגוע במחלה מקיבוץ נאות מרדכי [20]. ממוצע הביומסה של השורש או הנצר נמדד בנפרד (איור 1, מוצגות התוצאות עבור הנצר). בבדיקות המולקולריות לא אותר DNA של הפתוגן ברקמות הנבטים. הביומסה של הנבטים (שורש ונצר) שאולחו בשתי השיטות הייתה דומה וקטנה בכל המקרים (למעט במדידה שבוצעה ביום שלושים לגידול) בהשוואה לביקורת. ביום שלושים לגידול, הביומסה של טיפול האילוח בקרקע גננית הייתה זהה לביקורת.



<u>איור 1</u> - מבחן לפתוגניות בעציצים. נבטי תירס מהזן ג'ובילי אולחו בפטרייה *Harpophora maydis* על ידי הוספת דסקיות תפטיר לקרקע גננית (Infected) או על יד שימוש בקרקע נגועה משדה תירס של קיבוץ נאות מרדכי (Naturally infested). ממוצע הביומסה של הנצר נמדד בנפרד בימים המצוינים. כל עמודה היא ממוצע של 4 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.

4.3. מבחן *in vitro* לעיטוי זרעי תירס בפונגיציד Azoxystrobin

כאן נבדק לראשונה עיטוי זרעים באמצעות Azoxystrobin, חומר שנמצא לאחרונה כיעיל ביישום משולש בהגמעה לשורה [21]. מבחן לזרעים שפותח קודם לכן [20] שימש לבחינת יעילות העיטוי כנגד החדירה של הפתוגן והתבססותו בזרע, במערכת *in vitro*. הציפוי (טבילה קצרה) או ההשריה (טבילה ממושכת + שטיפה חיצונית) בחומר ההדברה מנעו לחלוטין הופעת DNA של הפתוגן בזרעים המאולחים (איור 2).



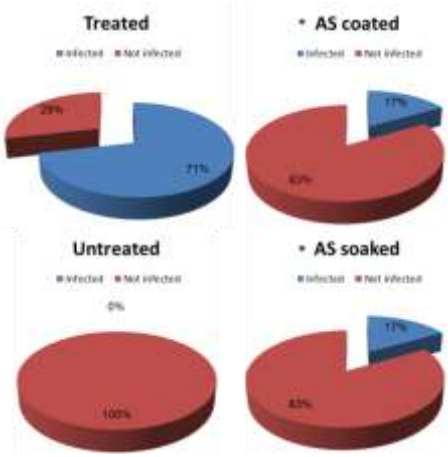
<u>איור 2</u> - מבחן *in vitro* לעיטוי זרעי תירס בפונגיציד Azoxystrobin. זרעי ג'ובילי מצופים ב- 10מ"ג\ליטר Azoxystrobin (AS coated, 10 דקות טבילה בחומר ההדברה ויבוש) או מושרים (AS soaked, 3.5 שעות טבילה בפונגיציד, שטיפה מאסיבית ויבוש), אולחו בפתוגן *H. maydis*, בבקבוקי ארלנמייר והודגרו בחושך ב-

28±1˚C. הביקורת כללו – זרעים ללא אילוח (untreated, ביקורת שלילית) וזרעים מאולחים (treated, ביקורת חיובית). לאחר שבוע נשטפו הזרעים היטב על מנת למנוע נוכחות פטריה הספוחה לזרע מבחוץ ונוכחות DNA של הפטרייה *H. maydis* נבדקה [20]. כל טיפול כלל 3 חזרות (הפקות) בלתי תלויות. *H. m.* DNA - ביקורת חיובית עם DNA מגידול *H. maydis* בתרבית. DDW - ביקורת שלילית עם מים מזוקקים. A200 - פריימרים המגבירים מקטע DNA ייחודי לפתוגן [20], rDNA – (Am43) פריימרים המגבירים מקטע DNA אאוקריוטי של RNA ריבוזומאלי (18S rRNA gene product, rDNA).

זן המודל ג'ובילי אינו משווק בארץ היות והוא רגיש ביותר למחלת הנבילה המאוחרת. לצורך המשך הניסויים בחרנו לעבור לזן תירס מתוק רגיש אחר – פרלוד. במבחן לאלוח *in vitro* בבקבוקי ארלנמייר הראו זרעי פרלוד מאולחים אחוזי נביטה נמוכים יחסית (50%) ועיטוי כימי ב-4 פונגיצידים נבחרים גרם לירידה נוספת בשיעורי הנביטה (תוצאות לא מוצגות). יחד עם זאת לא אותר מקטע ה- DNA הייחודי לפטרייה ברקמות הזרעים, ככל הנראה עקב היותם עמידים יותר (בהשוואה לג'ובילי) למחלה ומגבלת הרגישות של המבחן.

4.4. הדברת *H. maydis* באמצעות זרעים מעוטים בעציצים

המבחן לפתוגניות בנבטים אפשר לנו לבצע בחינה ראשונית של השפעת עיטוי הזרעים בתכשיר ההדברה Azoxystrobin על מניעת המחלה. בדיקת ביומסת שורש ונצר וכן בדיקה לנוכחות DNA הפתוגן ברקמות הצמח, בוצעה בימים 17 ו- 40 מהאילוח. נוכחות DNA של הפתוגן אותרה ב- 5 מתוך 7 צמחי הביקורת (זרעים לא מעוטים מאולחים), לאחר 40 יום מהאילוח. בקבוצות המטופלות ב- Azoxystrobin (זרעים מצופים וזרעים מושרים) אותרו בנדים, המעידים על נוכחות DNA הפתוגן, רק בצמח אחד מתוך 6 צמחים שנבדקו בכל קבוצה. הבדלים אלו נמצאו משמעותיים מהטיפול באילוח ללא עיטוי, במבחן להתפלגות בינומית ($p<0.05$, איור 3).

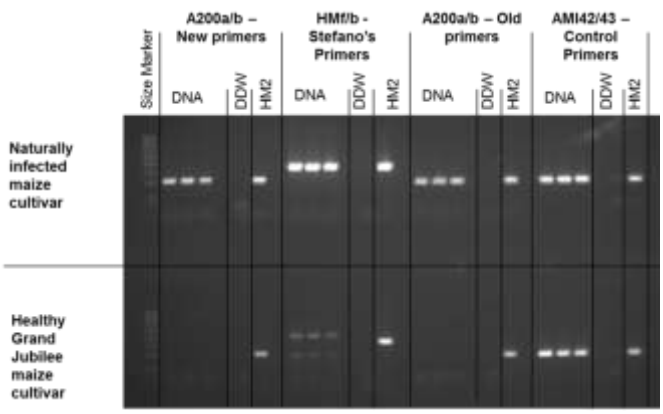


<u>איור 3</u> - מבחן בעציצים לעיטוי זרעי תירס בפונגיציד Azoxystrobin.
זרעי תירס מהזן ג'ובילי, מצופים או מושרים (כמתואר באיור 2 ובסעיף 4.3), שימשו בניסוי אילוח בעציצים. בדיקה לנוכחות DNA של הפתוגן ברקמות הנבטים בוצעה לאחר 40 יום מהאילוח. כוכבית מציינת הבדל משמעותי מהטיפול באילוח ללא עיטוי, במבחן להתפלגות בינומית ($p<0.05$).

תוצאות מדידת הביומסה (אינן מוצגות) תומכות במסקנות אלו – מיגון הזרעים בתכשיר ההדברה מנע את ההשפעה המעכבת של הפתוגן על הגדילה, הבאה לידי ביטוי בירידה בביומסה.

4.5. שיפור השיטה המולקולארית הקיימת

כאן התאמנו שיטה תחליפית לאיתור ה- DNA של *H. maydis* ברקמות צמחים נגועים אשר אינה מבוססת על קיט מסחרי. אנו בוחנים כעת את יעילותה של שיטה זו בהשוואה לשיטה הקודמת [20,12, 21] במבחן לאיתור DNA



של הפתוגן בזרעים נגועים *in vitro* ובניסיונות לאיתור הפתוגן בפונדקאים משניים בבית צמיחה. בנוסף בצענו בחינה השוואתית של שלושה פריימרים (תחלים) שונים לאיתור הפתוגן (איור 4). פריימרים אלו נבחרו מתוך מקטע ה- DNA הייחודי לפתוגן ושלושתם נמצאו יעילים באיתור הפתוגן ברקמות צמחי תירס משדה נגוע. שיטה מבוססת Real time PCR (qPCR) מפותחת בימים אלו בשיתוף פעולה עם מעבדת ד"ר ארי מאירסון במיגל. פיתוח השיטה נמצא בשלבים מתקדמים.

<u>איור 4</u> – PCR השוואתי לבחינת 3 פריימרים ייחודיים שונים לפתוגן *H. maydis*. DNA הופק משורשי צמחי תירס, בני 60 יום, מזן ג'ובילי שגדלו בשדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת, בנאות מרדכי. כביקורת שלילית שימשו צמחי ג'ובילי בני 21 יום שגדלו בחדר גידול על קרקע גננית לא מאולחת. A200a/b – Old primers לפי [20]. שני זוגות הפריימרים האחרים נבחרו אף הם מתוך מקטע ה- DNA שהוכח כי הינו הייחודי לפתוגן [19], האחד שימש אותנו בעבר (A200a/b – New primers [12]) והשני חדש. קיצורים כמתואר באיור 2.

4.6. איתור פונדקאים משניים של הפטרייה *H. maydis*

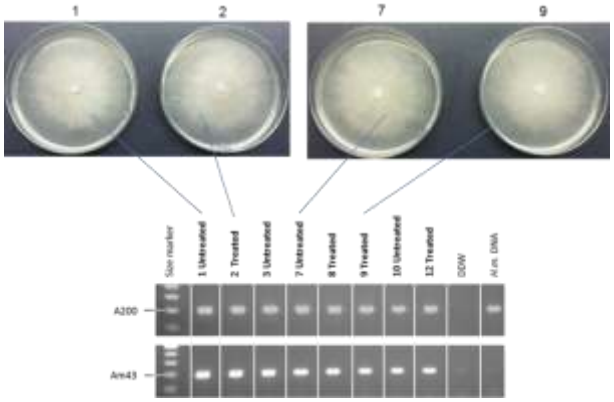
חלק זה כלל דיגום שרירותי של צמחי כותנה ועכובית בשדות נגועים במחלת הנבילה המאוחרת וניסויי אילוח של צמחי כותנה בתנאים מבוקרים בבית צמיחה. שישה צמחי כותנה נדגמו שרירותית משדות נגועים במחלת הנבילה המאוחרת בחולתה (חלקת קו גדול, מזרח) ומנרה (חלקת מחוגי, מערב). הצמחים נבדקו לנוכחות הפתוגן *H. maydis* באמצעות איתור מקטע DNA ייחודי לפתוגן. באחד מהצמחים הנבדקים אותר DNA של הפתוגן (תוצאות לא מוצגות). צמחי עכובית הגלגל נדגמו שרירותית משדה נגוע במחלה בקיבוץ עמיר. בצמחים אלו לא אותר הפתוגן. בנוסף בצענו מספר ניסיונות לאילוח נבטי כותנה מזן פימה בהשוואה לתירס מזן ג'ובלי. בכל עציץ נזרעו 4 זרעים בעומק של 4 ס"מ באדמת עציצים. הניסוי נערך כניסוי דו גורמי: (i) השוואה בין שני תבדידים: תבדיד HM_2 ותבדיד שבודד מתירס משטח נגוע ליד קיבוץ עמיר ב 2015 (HM_X). (ii) מועד ההדבקה: עם הזריעה ולאחר הצצה. לביקורת שימשו עציצים שלא אולחו בפטרייה וגודלו בתנאים זהים. הניסי התבצע בחמש חזרות לטיפול, כל עציץ הווה חזרה. האילוח התבצע באמצעות הטמנה (בסמוך לזרע בעציץ) של 4 דסקיות תפטיר (קוטר 0.5 ס"מ) מתרבית שגודלה על מצע PDA. העציצים גודלו בתנאי חדר גידול ב- $25^{O}C$, 16 שעות אור. הפקות DNA מעציצי הניסוי בוצעו לאחר 10 ו- 20 יום מהצצה. מכל טיפול נדגמו 4 צמחים, כל אחד מעציץ אחר, וכל 2 צמחים שימשו יחדיו להפקת DNA. עציצי הכותנה בכל הטיפולים היו באותו שלב פנולוגי וחיוניים בדומה לצמחי הביקורת. בצמחי הכותנה המאולחים לא אותר DNA של הפתוגן לעומתם ניתן לראות חלק מצמחי התירס הודבקו רק עם תבדיד HM_X באילוח שנעשה מיד עם הזריעה אך לא לאחר הצצה.

בהמשך אנו נבצע בדיקות DNA נוספות 30 ו- 40 ימים לאחר הצצה, נשקול את השורשים והנוף של הצמחים על מנת לבחון הבדלים בצימוח בין הטיפולים השונים לביקורות ונבצע בידוד של הפתוגן מהצמחים.

4.7. בחינת יישומים למניעת המחלה בשדה תירס נגוע במחלה

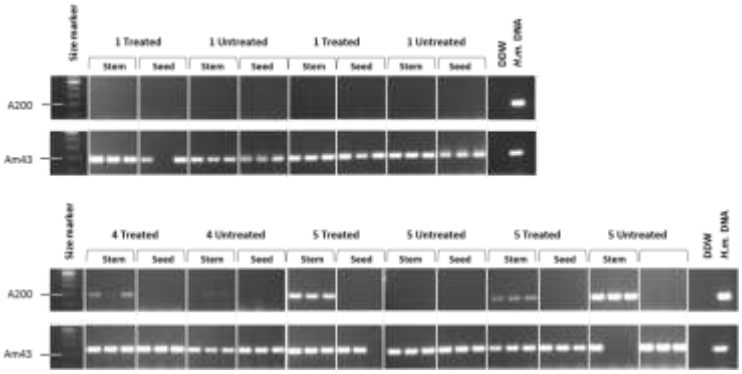
4.7.1. ניסוי שדה בריסוס בתכשיר Azoxystrobin

מטרת חלק זה הייתה לבחון את היעילות של ריסוס מונע בפונגיציד Azoxystrobin לבית השורשים, במניעת התפתחות מחלת הנבילה המאוחרת בחלקת שדה בגד"ש שמש, הידועה כנגועה במחלה (קיץ-סתיו 2015). לניסוי נבחרו 12 זני תירס מספוא, 2 זני תירס מתוק ו- 4 זני תירס סופר מתוק. הניסוי בוצע בקיץ 2015, בשיתוף פעולה עם ד"ר און רבינוביץ (שירות ההדרכה והמקצוע - שה"מ, משרד החקלאות), במסגרת מבחן זנים שנתי. השדה נזרע ב- 19.6.2015 והושקה בקוונוע, סה"כ 500 מ"מ בכל עונת הגידול. כל חלקת ניסוי הייתה שורה אחת באורך 12 מטר מ', במרווח 96.5 ס"מ ובצפיפות של 6-7 צמחי תירס למטר. הניסוי בוצע במתכונת של חלקות מפוצלות בבלוקים באקראי ב- 8 חזרות. כל חלקת ניסוי פוצלה לשני קטעים של 6 מטר כל אחד. קטע אחד רוסס פעמיים בתכשיר עמיסטר ת.ר (מכיל 250 גרם לליטר Azoxystrobin) במינון 200 סמ"ק לדונם. הריסוס בוצע במרסס גב מוטורי בנפח 30 ליטר לדונם בפומית מניפה אחת. התרסיס כוון לבסיס הגבעולים של הצמחים. ריסוס ראשון בוצע 20 ימים מזריעה ב- 9.07, והריסוס השני בוצע ב- 19.07. מיד לאחר הריסוס הושקתה החלקה במנת מים של 30 מ"מ בקונוע לצורך הצנעת החומר במטרה להביאו קרוב ככל האפשר לבית השורשים. הצלחת הטיפול נבחנה בצמחים בשדה בשלבי התפתחות שונים (גיל 27, 40, 68, 78 ו- 97 מהזריעה) לצמחי המספוא או בגיל 73 לצמחי התירס המתוק, באמצעות איתור תסמיני מחלה, בידוד הפתוגן מצמחים החשודים כנגועים על גבי צלחות מצע (איור 5) וביצוע מבחן מולקולארי המבוסס על PCR לאיתור DNA של הפתוגן ברקמות הצמח. הפקת ה- DNA בוצעה מהגבעול התחתון (האזור הסמוך למפרק הראשון מעל הקרקע) או מזרעים ל- 3 צמחים מכל זן שנדגמו בצורה שרירותית.



<u>איור 5</u> – בידוד הפתוגן *H. maydis* מצמחי תירס, מטופלים בתכשיר Azoxystrobin, בשדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת. צמחי תירס מספוא (המספרים מיצגים זנים שונים) שחלקם מטופלים ב- Azoxystrobin נדגמו שרירותית, ביום 27 לגידול (29.7.2015), מחלקת ניסוי נגועה במחלת הנבילה המאוחרת בגד"ש שמש. הפתוגן בודד בהצלחה מ- 8 מתוך 20 הזנים בניסוי. כל התבדידים זוהו מורפולוגית ובאמצעות איתור מקטע ה- DNA הייחודי לפתוגן. דוגמאות לתבדידים מזנים נבחרים (1, 2, 7, ו- 9) מוצגות בפנל העליון.

אנו הצלחנו לבודד את הפתוגן מצמחי הניסוי כבר ביום 27 לגידול. הפתוגן בודד בהצלחה מ- 8 מתוך 20 צמחים שנבחרו באקראי מחלקות הניסוי (איור 5). כל התבדידים זוהו מורפולוגית ובאמצעות איתור מקטע ה-DNA הייחודי לפתוגן. מנגד, במבחן המולקולארי זוהה דנ"א של *H. maydis* בבירור בצמחים השונים, רק מהדיגום השלישי, ביום 60 מהזריעה. נראה כי רגישות המבחן מגבילה את יכולתו לזהות את הפתוגן ברקמות הצמחים לפני יום גידול זה, כפי שדווח בעבר [20]. הן הופעת DNA ברקמות הצמחים והן עוצמת הבנדים שהוגברו ב- PCR, לא נמצאו קשורות ברגישות/סבילות הזן למחלה או להדברה ב-Azoxystrobin. ממצא זה תומך בממצאים שדווחו קודם לכן [12, 21]. האיתור המולקולארי היה יעיל ביותר בין יום 60-80 לגידול. בזן רויאלטי העמיד למחלה, לא אותר DNA של הפתוגן ביום 73 לגידול (איור 6, מציג את התוצאות ליום זה עבור זני התירס המתוק והסופר מתוק).



<u>איור 6</u> – איתור מולקולארי של DNA הפתוגן *H. maydis* DNA בזני תירס מטופלים בתכשיר Azoxystrobin, בשדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת. צמחי תירס מרוססים/לא מרוססים בתכשיר Azoxystrobin (כמתואר בסעיף 4.7.1), נדגמו שרירותית, ביום 73 לגידול (31.8.2015), משדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת בגד"ש שמש. זן 1 – רויאלטי, זן מתוק, זנים 4 – "הרדי 9360" ו- 5 – "רסטלר", זני "סופר מתוק". קיצורים כמתואר באיור 2.

התוצאות המתייחסות לתסמיני המחלה, כמות ואיכות היבולים בטיפולים השונים, מעובדות כעת, אך הממצאים מעידים כי יש בטיפול הריסוס של בית השורשים להפחית את סימני המחלה בזנים הרגישים של תירס מספוא ותירס מתוק.

<u>4.7.2. ניסוי שדה בזרעים מצופים בפטריית מיקוריזה</u>

בחינת ההשפעה של ציפוי זרעים בפטריית מיקוריזה בוצע במסגרת הניסוי בגד"ש שמש (קיץ-סתיו) 2015, המתואר למעלה. לניסוי נבחר זן המספוא 32w86 המיוצר על ידי חברת פיוניר ומשווק בישראל על ידי חברת גדות אגרו. זן זה מוכר כזן רגיש מאד למחלה. זן זה נבחן בניסוי גם ללא עיטוי זרעים במתכונת בה בוצע מבחן הזנים: עם ריסוס בחומר Azoxystrobin וללא החומר. דגימות בוצעו ביום 27, 68 ו- 78 מהזריעה. בדומה לטיפול הכימי בזרעים (ראה סעיף קודם), גם כאן לא נמצא קשר בין יעילות הטיפול להופעת DNA של הפתוגן ברקמות הצמח.

<u>4.7.3. ניסוי שדה בזרעי פרלוד מעוטים בתכשיר Azoxystrobin בחוות עדן</u>

עיטוי הזרעים בתכשיר Azoxystrobin בוצע על ידי חברת "גדות אגרו". זרעי התירס המעוטים נבטו בדומה לזרעי הביקורת. בשדה ניסוי זה לא הופיעו תסמיני מחלת הנבילה המאוחרת בתירס. בהתאם לכך לא אותר הבדל משמעותי ביבול ואיכות הקלחים, בין צמחי תירס מהזן הרגיש למחלה - פרלוד עם עיטוי זרעים וללא עיטוי

בפונגיציד. (טבלה 1). כמו כן לא נצפה DNA של הפתוגן *H. maydis* בדוגמאות צמחים שנאספו משני הטיפולים בתום הגידול.

טבלה 1 – תוצאות ניסוי השדה בזרעי פרלוד מעוטים בתכשיר Azoxystrobin בחוות עדן (סתיו 2015).

שם הזן	ספק	משקל אשבולים סוג א' בק"ג\מ"ר	מספר אשבולים סוג א' למ"ר	יבול אשבולים כללי בק"ג\מ"ר	משקל ברוטו בגרם	משקל נטו בגרם	אורך אשבול-ס"מ	מס' שורות	קוטר אשבול מ"מ	עומק גרגרים מ"מ
פרלוד רגיל	ירוק 2000	0.417	1.49	1.009	287	224.5	16.54	15.6	4.34	10.2
פרלוד מטופל	גדות אגרו	0.413	1.46	1.085	292.5	233.5	15.7	17	4.77	9.9

5. דיון

בעבודה זו הוכח שוב כי הפטרייה *H. maydis* חודרת בהצלחה לזרעים, מתבססת ומתפתחת ברקמות של צמחי תירס מזנים רגישים (דוגמת ג'ובילי ופרלוד) וזנים עמידים דוגמת רויאלטי (אם כי ההתפתחות בצמח מעוכבת). איתור תכשיר הדברה יעיל כנגד הפטרייה *H. maydis* מהווה כיום אתגר מרכזי. מספר חומרי הדברה נמצאו כמדכאים את הפתוגן בצלחות תרבית, אך מיעוטם נמצאו כיעילים בניסויי שדה [21,15]. מיגון זרעים בעיטוי כימי הינה דרך מוכחת למניעת הדבקה במחלות קרקע שונות ועלותה נמוכה. בעבודה זו נבדק לראשונה עיטוי זרעים באמצעות Azoxystrobin, חומר שנמצא כיעיל ביישום בהגמעה לשורה [21]. היות והפתוגן *H. maydis* מופץ גם על ידי זרעים [22] (הפטרייה יכולה להיות מועברת הן בחלק הפנימי של הזרע והן בכיסוי הזרע), השתמשנו במבחן לזרעים שפותח קודם לכן [20] כדי לבחון את יעילות העיטוי כנגד החדירה של הפתוגן והתבססותו בזרע, במערכת *in vitro*. ציפוי (טבילה קצרה) או השריה (טבילה ממושכת + שטיפה חיצונית) בחומר ההדברה מנעו לחלוטין הופעת DNA של הפתוגן בזרעים המאולחים. מבחן לפתוגניות בנבטים (עד גיל 40, מצב פנולוגי של עלה רביעי), על ידי אילוח נבטים באמצעות דסקיות תפטיר הוצע בעבר [12] ומבוצע בשלב בו פולשת הפטרייה לרקמות הצמח [23]. בתנאים אלו נאלץ הפתוגן התוקף להתמודד עם מנגנוני ההגנה של הפונדקאי ולהתפתח ברקמות המשנות את המבנה והמאפיינים שלהן תוך כדי גדילת הצמח והתבגרותו. מבחן זה אפשר לנו לבצע בחינה ראשונית של השפעת עיטוי הזרעים בתכשיר ההדברה Azoxystrobin על מניעת המחלה. הטיפול בפונגיציד גרם לירידת כמות ה- DNA של *H. maydis* אל מתחת לסף הגילוי, ולמניעת הפגיעה של הפתוגן בביומסת הצמח. אחוזי ההצלחה שהושגו היו משמעותיים מבחינה סטטיסטית ($p<0.05$) ועודדו את בחינת הטיפול בשדה. ניסוי שדה בזרעי פרלוד מצופים ב- Azoxystrobin בוצע בסתיו 2015 בחוות עדן, אך המחלה לא התפרצה בשדה ולכן לא ניתן היה להעריך את יעילות הטיפול. מנגד ריסוס בתכשיר בסמוך לבית השורשים בוצע בקיץ-סתיו 2015 בגד"ש שמש במספר רב של זנים (תירס למספוא, תירס מתוק ותירס סופר מתוק) והצליח לצמצם את נזקי המחלה. התוצאות הראשוניות שהושגו בשנת מחקר זו חשובות ומעודדות הרחבה והעמקת המחקר, בהתאם למתוכנן, בכל התחומים שהוצגו פה. אחד האתגרים המרכזיים העומדים בפנינו כעת הוא ביסוס שיטת איתור מולקולארית רגישה לאיתור הפתוגן ברקמות צמחיות. שיטה כזו, מבוססת qPCR, נמצאת בשלבי פיתוח מתקדמים ותאפשר איתור עקבי ורגיש של הפתוגן גם ברקמות בהן הוא נמצא בשלבי התבססות ראשוניים, או שכמות ה- DNA שלו בהן נמוכה מאוד. במקביל ניישם בקרוב שיפורים שהושגו בשיטת ה- PCR הקיימת לאיתור הפתוגן בפונדקאים נוספים מלבד תירס (דוגמת כותנה וגידולי שדה אחרים). לגבי זנים כאלו הידע הקיים מועט מאוד וכולל דיווח (לא מדעי) אחד על איתור הפתוגן בכותנה ובתורמוס [24].

6. ביבליוגרפיה

1 Sabet, K. A., Samra, A. S., Hingorani, M. K. & Mansour, I. M. *FAO Plant Prot. Bull.* **9**, 121-125 (1961).
2 El-Assiuty, E. M., El-Shafey, H. A., Ismael, A.-S. & Fahmy, Z. M. *Phytopathology* **88**, S25 (1988).
3 Magarey, R., Engle, J. & Randall-Schadel, B. Is *Harpophora maydis* (causal agent of late wilt) a threat to US corn production? , (The NCSU/APHIS Plant Pest Forecast (NAPPFAST) System, 2007).
4 Magarey, R. D. *et al. EPPO Bulletin* **41**, 46-56 (2011).
5 Galal, A. A., El-Rouby, M. M. & Gad, A. M. *Zeitschrift fur Planzenzuchtung* **83**, 176-183 (1979).
6 Sabet, K. A., Samra, A. S. & Dawood, N. A. in *Book* Vol. Dept. Plant Prot. (eds A. S. Samra & K. A. Sabet) 195-204, Ministry of Agriculture, Government Printing Offices, Cairo. (1966).
7 Samra, A. S., Sabet, K. A. & Hingorani, M. K. *Plant Dis. Rep.* **46**, 481-483 (1962).
8 Shehata, F. A. *The inheritance of resistence to late wilt caused by Cephalosporium maydis in some corn lines* M. Sc. thesis, Al-Azhar, (1976).
9 El-Shafey, H. A ,.Abdel-Rahim, M. F., Abd-el-Azim, O. Z. & Abd-el-Hamid, M. S. *Egypt. Agric. Res. Rev.* **54**, 29-42 (1976).
10 Payak, M. M., Lal, S., Lilaramani, J. & Renfro, B. L. *Indian Phytopathol.* **23**, 562-569 (1970).
11 Sabet, K. A., Zaher, A. M., Samra, A. S. & Mansour ,I. M. *Ann. Appl. Biol.* **66**, 257-263 (1970).
12 Degani, O. & Cernica, G. *Advances in Microbiology* **4**, 94-105 (2014).
13 Saleh, A. A. *et al. Phytopathology* **93**, 853-859 (2003).
14 Zeller, K. A. *et al. Plant Dis.***86**, 373-378 (2002).
15 Abd-el-Rahim, M. F., Sabet, K. A., El-Shafey, H. A. & El-Assiuty, E. M. *Agric. Res. Rev.* **60**, 31-49 (1982).
16 K. A. Sabet, A. S. S. M. F. A.-R. *Ann. Appl. Biol.* **71**, 211-218 (1972).
17 Dawood, N. A. & Sabet, K. A. *Annals of Agric. Sc ,.Moshtohor (Egypt)* **11**, 217-226 (1979).
18 Abdel-Hamid, M. S., Abdel-Momeim, M. F., El-Shafey, H. A. & El-Deeb, S. T. *Agric. Res. Rev.* **59**, 253-260 (1981).
19 Saleh, A. A. & Leslie, J. F. *Mycologia* **96**, 1294-1305 (2004).
20 Drori, R. *et al. Phytopathologia Mediterranea* **52**, 16-29 (2012).
21 Degani, O., Weinberg, T. & Graph, S. *Phytoparasitica*, **42**, 559-570 (2014).
22 Michail, S .H., Abou-Elseoud, M. S. & Nour Eldin, M. S. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **34**, 35-42 (1999).
23 Samra, A. S., Sabet, K. A. & Hingorani, M. K. *Phytopathology* **53**, 402-406 (1963).
24 Bergstrom, G. *et al.* Recovery plan For late wilt of corn caused by *Harpophora maydis* syn. *Cephalosporium maydis*. (National Plant Disease Recovery System (NPDRS), U.S.A, (2008).