<u>דו"ח לתכנית מחקר מספר 21-35-0003</u>

שנת המחקר: 2 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* ואמצעי ההתמודדות היחיד כנגדה הוא שימוש בזנים עמידים. בשנה זו הושגה התקדמות משמעותית בכל היעדים: 1) שיפור ופיתוח שיטה מולקולארית לאיתור הפתוגן. השיטה המבוססת qPCR, שפותחה בשנה הראשונה, הוטמעה ויושמה ואפשרה רגישות והבחנה כמותית בין הטיפולים. 2) הגנה על זרעים ומניעה. בניסוי לבחינת 4 תכשירי הדברה כימיים שיושמו בעיטוי זרעים, בעציצים, גרם Carbendazim (בויסטין), לירידה בכמות DNA הפטרייה ברקמות הצמחים ואילו Prochloraz (ספורטק) הביא לשיפור במשקל הממוצע לקלח. עיטוי זרעים בתכשיר ההדברה Azoxystrobin (עמיסטר) לא מנע את נזקי המחלה בעציצים אולם הראה יעילות בניסוי השדה, בהפחתת ה-DNA של הפתוגן בצמחים, בדומה לעיטוי בפטריית מיקוריזה. נראה כי בטיפול משולב עם יישום חומר ההדברה בהגמעה, העיטוי הכימי עשוי לתת שכבת הגנה נוספת לצמחים. 3) לימוד הגורמים המאפשרים שרידות הפתוגן. במבחן בשורשים מנותקים חדר הפתוגן לשורשי שעורה, אבטיח וכותנה. בניסוי בעציצים אותר DNA של הפתוגן ברקמות של תירס, סטריה (דגן מספוא), ואבטיח.

2. מבוא

מחלת הנבילה המאוחרת (late wilt) בתירס נפוצה מזה כ- 30 שנה 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, 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]. 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* אינה מסוגלת להדביק צמחים שגילם עולה על 50 יום מהזריעה [11]. היא מופיעה לראשונה בצינורות העצה 21 יום לאחר הזריעה ומתפשטת באיטיות מעלה. במצריים בודדו החוקרים, מצמחים נגועים, 4 קווים שונים של הפטרייה השונים משמעותית בכושרם לגרום מחלה [12,2]. אחד מזנים אלו נחשב לאלים וגורם למחלה גם בקווי צמחים שנחשבים עמידים למחלה [13]. בקיץ 2010 החלו להופיע בעמק החולה סימני מחלה גם בזן רויאלטי ('Royalty', Pop Vriend Seeds B.V., Andijk, The Netherlands, משווק על ידי עדן זרעים, חצב, ישראל) שעד כה נחשב לעמיד (ווינברג ועמיתיו 2010, נתונים שלא פורסמו). בעבר נעשו ניסיונות להדביר את הפתוגן בדרכים כימיות וביולוגיות. חלק מהפונגיצידים שנוסו, פעלו היטב בעציצים אך נכשלו בניסויי שדה [14]. 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 [15]. 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 [14]. 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 [16]. במקביל 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 [17]. אנו התאמנו שיטה מבוססת PCR [18] תוך שימוש במקטע DNA ספציפי ל- *H. maydis* [19] ויישמנו אותו בניסוי שדה (נאות מרדכי, קיץ 2008), לבחינת ההבדלים בפתוגנזה בין זן תירס רגיש למחלה, ג'ובילי, וזן תירס בעל רגישות מופחתת, רויאלטי [19]. 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. סריקה בצלחות תרבית הצביעה על מספר תכשירים בעלי השפעה

מעכבת על התפתחות הפתוגן העשויים לסייע בהתמודדות עם המחלה [20]. בניסוי בשדה נגוע (נאות מרדכי, 2010), יישום תכשיר Azoxystrobin (עמיסטר, מכתשים), במינון 112.5 ג' ח.פ. לדונם וביישום משולש בהגמעה, עיכב באופן משמעותי את התפתחות המחלה, והביא לעליה של 100% ביבול, בהשוואה לביקורת לא מטופלת. [21]. עיטוי זרעים בפונגיצידים, בעיקר נגד מחלות נישאות בזרעים (seed born) ושורדות קרקע (soil born), מהווה טכנולוגיה מקובלת בגידולי שדה רבים והינו המוקד של המחקר הנוכחי.

בשנה הראשונה למחקר פיתחנו שיטה לאיתור ומעקב אחר הפתוגן המבוססת על Real Time PCR (qPCR). שיטה זו אפשרה לנו איתור עקבי ורגיש של הפתוגן גם ברקמות בהן הוא נמצא בשלבי התבססות ראשוניים, או שכמות ה- DNA שלו בהן הייתה נמוכה מאוד, דוגמת זרעים מאולחים או נבטים. בניסיונות לאיתור הפתוגן בפונדקאים נוספים מלבד תירס (דוגמת כותנה וגידולי שדה אחרים), אותר DNA של הפתוגן רק בדוגמת כותנה אחת, מתוך כ- 30 דוגמאות שנאספו. היות והפתוגן *H. maydis* מופץ גם על ידי זרעים [25], השתמשנו במבחן לזרעים שפותח קודם לכן [19] כדי לבחון את יעילות העיטוי ב- Azoxystrobin כנגד החדירה של הפתוגן והתבססותו בזרע, במערכת *in vitro*. ציפוי בחומר ההדברה מנעו לחלוטין הופעת DNA של הפתוגן בזרעים המאולחים. במבחן לפתוגניות בנבטים (עד גיל 40, מצב פנולוגי של עלה רביעי), יישום הפונגיציד Azoxystrobin 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 ($p<0.05$) ונתמכו על ידי מבחן ה- qPCR. בשנים האחרונות נפוץ מאד ברב גידולי השדה כמו גם בגידול תירס מתוק ומספוא שימוש במרסס מכוון מוגן המאפשר גם לרסס חומרים קוטלי פטריות על בסיסי הגבעולים ולהצניעם בהשקיה בקונוע. הפונגיצידים שרוססו יכולים להיקלט מהקרקע על ידי מערכת השורשים ולנוע בצמח. בקיץ 2015 (בגד"ש שמ"ש) נבדקה האפשרות לרסס Azoxystrobin על בסיסי הגבעולים ולהצניעם בשיטה זו. בניסוי זה הייתה הצלחה מוגבלת ונראה שיש מקום לשפר ו/או לבחון אפשרויות יישום שונה של החומר. בישראל, בחברת Groundwork BioAg (מושב מזור) פותחה תוארית (פורמולציה) של פטריית מיקוריזה המיושמת בעיטוי זרעים. הפטרייה בדרך כלל מסייעת לצמחים לקלוט זרחן מהקרקע אך יתכן ובנוסף היא עשויה לעזור לצמח להתמודד עם מחלות קרקע והעקות המלוות אותן. בשנת 2015 נבדקה השערה זאת בניסוי שדה בגד"ש שמ"ש. עיטוי זרעי זן המספוא הרגיש למחלה, 32w86 (תוצרת חברת Pioneer-DuPon, Iowa, USA, משווק על יד מרחב-אגרו, הרצליה, ישראל) בפטריית המיקוריזה עיכב באופן מתון את הופעת מחלת הנבילה המאוחרת. הפוטנציאל של שימוש בזרעים מעוטים אלו נבחן בצורה רחבה ומעמיקה יותר בשנה השנייה למחקר.

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 התבססותו 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 התבססות 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. פיתוח שיטה מבוססת על Real time PCR ויישומה לאפיון הפתוגנזה (יעד בשנים 2+1 למחקר)
השיטה מבוססת ה- qPCR שפותחה בשנה הראשונה למחקר, החליפה בשנת המחקר השנייה כליל את שיטת ה- PCR המסורתית ויושמה במבחנים לאיתור פונדקאים משניים ובניסויים לבחינת היעילות של עיטוי זרעים כימי/ביולוגי, בתנאי *in vitro* (בקבוקי ארלנמייר), בניסוי בעציצים בחוות אבני איתן (סתיו 2016) ובניסוי שדה בחוות גד"ש שמ"ש (קיץ 2016). תוצאות מבחנים אלו יפורטו בהמשך. הפונגצידים, שישמשו בניסויים בעיטוי זרעים כנגד הפתוגן מפורטים **בטבלה 1** (**נספח 1**). בכל הניסויים שבצענו, שיטת ה- qPCR נמצאה כרגישה בהרבה משיטת ה- PCR המסורתית ואפשרה לנו להבחין ברמת פירוט גבוהה בין הטיפולים השונים. כך לדוגמה שיטת ה- qPCR שימשה אותנו במבחן אילוח *in vitro* לזרעים מזן פרלוד ('Prelude'), זן מכלוא מתוק רגיש למחלת הנבילה המאוחרת מתוצרת חברת SRS - snowy river seeds האוסטרלית, משווק על ידי "ירוק 2000", ישראל) המצופים בפטריית מיקוריזה, המשווקת על ידי חברת Groundwork BioAg (מושב מזור, ישראל). הזרעים העטויים בפטרייה הודגרו למשך 6 ימים עם הפתוגן *H. maydis*, בבקבוקי ארלנמייר, אל מול טיפול זהה בזרעים לא מעוטים, ואל מול ביקורות של זרעים שלא אולחו בפתוגן. העיטוי במיקוריזה, במערכת זו, שיפר את אחוז הנביטה וביומסת הזרעים, ובד בבד גם הפחית באופן ניכר את כמות ה- DNA של הפתוגן בזרעים נגועים ומנע את הפגיעה שלו בנביטה (**נספח 1, איור 1**).

4.2 ניסוי שדה בזרעים מעוטים בחוות גד"ש שמ"ש (קיץ 2016) (יעד בשנים 3+2+1 למחקר)
זני התירס המתוק - פרלוד (זן רגיש למחלת הנבילה המאוחרת) ורויאלטי ('Royalty', זן מכלוא בעל רגישות מופחתת למחלה, מתוצרת חברת Pop Vriend Seeds B.V., Andijk, The Netherlands, משווק על ידי עדן זרעים, חצב, ישראל), וזני תירס המספוא - p32w86 (זן מכלוא רגיש למחלה) ו- 32d99 (שניהם מתוצרת חברת Pioneer-DuPon, Iowa, USA ומשווקים על יד מרחב-אגרו, הרצליה, ישראל), נזרעו בשדה ב- 25/05/16 (גד"ש שמ"ש, חלקת "מחוגי 5"), הנגוע במחלת הנבילה המאוחרת, ואשר ממוקם מדרום מרדכי לקיבוץ עמיר. תיאור הניסוי **באיור 2** (**נספח 1**). עיטוי כימי של הזרעים בוצע בחברת גדות אגרו, על פי הסטנדרט המקובל של חברת Syngenta, עם Azoxystrobin (עמיסטר, מכיל: 250 גרם חומר פעיל בליטר, כמות תכשיר לזרע 0.002 סמ"ק, **נספח 1, טבלה 1**). הניסוי כלל גם זרעים עטויים בפטריית מיקוריזה המסופקים על ידי חברת Groundwork BioAg. ההפריה בזני התירס המתוק, הייתה ב- 14/07 (50 ימים מזריעה).

העיטוי הכימי והביולוגי של הזרעים הביא לשיפור מסוים בביומסת הנבטים, בזני התירס הרגישים, פרלוד ו- p32w86 (**נספח 1, איור 3**). הבדל מובהק נמצא רק בהשפעת הטיפול במיקוריזה על ביומסת השורש של צמחי הזן p32w86. ב- 2 זני התירס שלהם עמידות יחסית למחלה, המגמה הייתה הפוכה ובטיפולי עיטוי הזרעים נגרמה ירידה (לרוב לא מובהקת) בביומסה (**נספח 1, איור 3**). בניטור ההתייבשויות על פי מראה עיין שבוצע ב- 2.08 (כשבוע לפני ההבשלה, 19 ימים מההפריה, 69 יום מהזריעה) לזני התירס המתוק, נראה שהזן

פרלוד החל להתייבש. ב- 8.08 (כ- 3 ימים מהבשלה, 25 ימים מההפריה, 75 יום מהזריעה) הוחמרה ההתייבשות (**נספח 1, טבלה 2**). העיטוי הכימי והביולוגי צמצם את מידת ההתייבשות של צמחים אלו בשני המועדים שנבדקו (**נספח 1, טבלה 2**), אולם בזן פרלוד הרגיש למחלה, השפעת העיטוי במועד הניטור המאוחר יותר כבר כמעט לא ניכרת. בזני תירס המספוא שפורחים מאוחר יותר (58 יום מהזריעה בממוצע, לעומת 50 יום בזנים המתוקים), בוצע ניטור לקביעה חזותית של התייבשות – ב- 17/08 וב- 1/09 (34 ו- 49 ימים מההפריה, 84 ו- 99 יום מהזריעה, בהתאמה). התוצאות שהתקבלו בזני המספוא דומות לאלו של הזנים המתוקים (**נספח 1, טבלה 3**). גם כאן הזן הרגיש למחלה p32w86 התייבש באופן חמור ואילו בזן 32d99, העמיד למחלה, נמצאו תסמיני התייבשות מתונים. תופעת ההתייבשות אינה מפוזרת אחיד בשדה וכדי להדגיש את מידת הרגישות השונה של הזנים נספרו סה"כ החלקות בהן הייתה 100% התייבשות מסך החלקות שנדגמו (**נספח 1, טבלה 4**). גם כאן ניתן להבחין ברגישות הרבה של הזן פרלוד שברוב החלקות התמוטט מהמחלה ובמיגון מסוים שהקנו הטיפולים בעיטוי הזרעים כנגד המחלה. באומדן התייבשות מעמיק יותר (4/08, 71 יום מהזריעה) שכלל אבחון של כלל הצמחים בשדה על פי חומרת התסמינים שהופיעו בעלה שבחיקו ממוקם הקלח (מתחל), כפי שתואר קודם לכן [21], ניכר ההבדל בין הזנים פרלוד ורויאלטי (**נספח 1, איור 11**), אך טיפולי עיטוי הזרעים לא הביאו לשינוי מהביקורת. צילום מהאוויר של חלקת הניסוי, כשבועיים לאחר מכן, מראה את התמוטטות זני התירס המתוק. בזני המספוא בשלב זה המחלה עוד לא ניכרת (**נספח 1, איור 12**).

בקטיף שבוצע ב- 10.08 בזני התירס המתוק, מוינו האשבולים על פי גודלם לקטנים וגדולים. לא ניתן היה למיין על פי משקל בגלל דרגת ההתייבשות השונה וגם דרגת ההבשלה השונה. גודל הקלחים היה מדד טוב למידת אפשרות הצמח להטמיע ולמלאות את הגרעינים. הזן פרלוד לא נקטף בגלל נזקים שונים ואחוז ההתייבשות הגבוה, שלא אפשרו לקטוף קטע רציף של 5 מטר. בזן התירס המתוק רויאלטי (בעל רגישות מופחתת למחלה) עיטוי הזרעים ב- Azoxystrobin או בפטריית מיקוריזה לא תרם לשיפור היבולים (**נספח 1, טבלה 5**). בזני תירס המספוא בוצע קטיף לקביעת היבול ב- 4/09 (52 ימים מההפריה, 102 יום מהזריעה). מידת השפעת המחלה ניכרה בעיקר במידת התייבשות הנוף בסוף הגידול. בזן 32d99 תכולת החומר יבש בנוף הייתה נמוכה (לא במובהק) מהזן הרגיש p32w86 (**נספח 1, טבלה 6**). יבול החומר יבש בקלחים ובנוף וכלל היבול חומר יבש היה גבוה במובהק בזן העמיד 32d99 ללא טיפול ועם עיטוי זרעים במיקוריזה מאשר בזן הרגיש p32w86 בכל הטיפולים (**נספח 1, טבלה 7**). בזן 32d99 עם עיטוי בעמיסטר היבול היה גבוה מאשר בזן הרגיש p32w86, אך לא במובהק. יחס היבול בין הקלחים לנוף לא היה שונה במובהק בין הטיפולים. בזן הרגיש p32w86 הצטבר יחסית יותר יבול בקלחים בתגובה לעיטוי הזרעים במיקוריזה ובעמיסטר (לא מובהק, **נספח 1, טבלה 7**).

כדי ללמוד על התפתחות המחלה (הפתוגנזה) נדגמו צמחים מכל הטיפולים, בכל 10 ימים לאורך עונת הגידול ונבדקו לנוכחות DNA של גורם המחלה במכשיר qPCR (**נספח 1, איורים 2, 4**). המבחן איתר את ה-DNA של הפתוגן *H. maydis*, בשורשי הצמחים, בכל הטיפולים, כבר לאחר 20 יום מהזריעה, כעשרה ימים עד חודש לפני האיתור הראשון של DNA בצמחים בשיטת ה-PCR [19]. מעניין לראות כי שיא בכמות ה- DNA הפטרייתי בשורש התקבל ביום 30 לגידול בכל הטיפולים (**נספח 1, איור 4**). בזני התירס הרגישים, פרלוד ו-p32w86, נראתה הופעה של DNA פטרייתי בגבעול, 50 (לא מוצג) ו- 60 יום לאחר הגידול, אך ביום 70 לגידול ירדה כמות ה- DNA לרמות קרובות לאפס. בזן העמיד רויאלטי, כמויות ה- DNA הפטרייתי שהופיעו בשורש היו

נמוכות יותר בהשוואה לזן הרגיש פרלוד, ובשני הזנים העמידים (רויאלטי ו- 32d99) רמות ה- DNA הפטרייתי שנמדדו בגבעולים, מיום 50 לזריעה ואילך, היו אפסיות (**נספח 1, איור 4**). טיפולי עיטוי הזרעים ב- Azoxystrobin ובפטריית מיקוריזה גרמו לאפקט דומה בזן המתוק פרלוד – ירידה בכמות ה- DNA של הפטרייה בהשוואה לזרעים שלא טופלו (**נספח 1, איור 5**). ביום 50 בשורש התהפכה המגמה וכמות ה- DNA הייתה גבוהה יותר בטיפולי עיטוי הזרעים. בזן התירס המתוק רויאלטי, טיפולי עיטוי הזרעים, הכימי והביולוגי, הגבירו את כמות ה- DNA הפטרייתי ברקמות השורש. ברקמות הגבעול של זן זה, בכל הטיפולים, הערכים היו נמוכים מאוד. בזני המספוא, התמונה שהתקבלה מורכבת יותר (**נספח 1, איור 6**). בזן הרגיש p32w86 פטריית המיקוריזה דכאה את הופעת ה- DNA הפטרייתי בשורש ובגבעול, למעט ערך גבוה מאוד (שסביר שאינו מייצג) ביום 70 בגבעול. העיטוי הכימי ב- Azoxystrobin הניב תוצאות דומות בזן זה אך ביום 30 לגידול המגמה התהפכה (כמות ה- DNA בזרעים המעוטים הייתה רבה יותר). בזן המספוא העמיד 32d99 עיטוי הזרעים גרם לירידה בכמות ה- DNA הפטרייתי (במיוחד ה- Axoxystrobin), למעט היפוך מגמה ביום 50 בשורש בעיטוי המיקוריזה (**נספח 1, איור 6**). השוואה של תוצאות ה- qPCR אל מול תוצאות השיטה המסורתית ב- PCR, בדיגומים שנעשו ביום 30 בשורש וביום 60 בגבעול (ימי שיא מבחינת כמות ה- DNA), מראה תמונה דומה בשתי השיטות (**נספח 1, איורים 7-10**). כצפוי שיטת ה- qPCR הוכחה כרגישה בהרבה.

4.3 ניסוי עציצים בזרעים מעוטים בחוות אבני איתן (סתיו 2016) (יעד בשנים 1+2+3 למחקר)

ניסוי לבחינת 4 תכשירי הדברה כימיים שיושמו בעיטוי זרעים, בעציצים עם קרקע מאולחת, נערך בחווה החקלאית של מו"פ צפון באבני איתן. ההשפעה המעכבת של חומרי ההדברה על התפתחות הפטרייה בצלחות תרבית נבחנה קודם לכן (**נספח 1, איור 13**). הזרעים עוטו בחומר ההדברה על ידי ערבוב הזרעים עד כיסוי מלא, על פי המלצת היצרן. החומרים שנבחנו (מפורטים ב**נספח 1, טבלה 1**): עמיסטר (ח.פ. Azoxystrobin 250g/l חברת מכתשים), ספורטק (ח.פ. Prochloraz 450g/l אגרו גדות), אוהיו (ח.פ. fluazinam 500g/l לוקסמבורג), בויסטין (ח.פ. Carbendazim 500g/l אגן). כמות תכשיר לזרע הייתה 0.002 סמ"ק, למעט אוהיו 0.001 סמ"ק לזרע. עם הזריעה מחצית מכל עציצי הטיפול אולחו באמצעות גרעיני חיטה מעוקרים (באוטוקלאב) המאולחים ב- *H. maydis* כמתואר קודם לכן [19], אשר הוטמנו בשכבה העליונה של אדמת העציצים ועורבבו עם הקרקע. לאחר 8 ימים מזריעה בוצע אילוח נוסף באמצעות דסקיות תפטיר בקוטר 0.5 ס"מ. כביקורת שימשו זרעים לא מעוטים. ביקורת נוספת הכילה עציצים עם אדמה מהאזור בו בוצע ניסוי השדה (גד"ש שמ"ש) שלו היסטוריה רבת שנים של נגיעות במחלה. גם במחצית מעציצי טיפול זה הוספנו מדבק באמצעות גרעינים מאולחים ודסקיות תפטיר. בטיפול עם קרקע זו נזרעו רק זרעים שעוטו ב- Azoxystrobin. עיטוי הזרעים לא שיפר מהותית את אחוזי הנביטה שהיו דומים בקרקע מאולחת ובקרקע לא מאולחת (**נספח 1, איור 14**). יחד עם זאת אחוז הנביטה ירד מאוד באדמה שנלקחה מהשדה בגד"ש שמ"ש. מדידות אורך מפרק ראשון ומספר העלים הירוקים (**נספח 1, איור 14**) מראות שאין הבדל מובהק בין טיפולי העיטוי לבין הביקורת עם זרעים לא מעוטים ובין העציצים המאולחים לעציצי הביקורת. כמקודם, גם כאן נמצא הבדל מובהק בין הטיפולים באדמת אבני איתן לטיפולים באדמת גד"ש שמ"ש. בתום הניסוי, ב- 25.10.16 (23 ימים לאחר ההפריה, 77 יום מהזריעה), לא נצפתה השפעה מהותית לאילוח או לעיטוי הזרעים על משקל הנצר הרטוב והיבש או על גובה המפרק הראשון. באדמת גד"ש שמ"ש, התקבלו תוצאות נמוכות בשלושת מדדים אלו ותוספת אילוח גרמה לירידה נוספת בערכים

הללו (**נספח 1, איור 15 B-D**). בהערכת התייבשות בסיום הניסוי נצפה שיעור גבוה יותר של התייבשות דווקא בזרעים שטופלו ב- Prochloraz, Carbendazim ו- Azoxystrobin (**נספח 1, איור 15A**) בהשוואה לקרקע לא מאולחת. כאן צמחי הטיפול שכלל אדמת גד"ש שמ"ש הראו סימני התייבשות רבים. למעשה כמעט כל עציצי הניסוי בטיפול זה התמוטטו ולא יצרו קלחים. בשאר הטיפולים העיטוי הכימי לא השיג שינוי משמעותי מהביקורת (**נספח 1, איור 15A**). באומדן יבולים שבוצע בתום הניסוי (**נספח 1, טבלה 8**), התקבל משקל קלח נמוך פי 3 מהביקורת בטיפול האילוח של זרעים מעוטים ב- Carbendazim. הטיפול ב- Prochloraz הניב תוצאות הפוכות - משקל הקלח הממוצע בצמחים המאולחים היה גבוה כמעט פי 2 מאשר בצמחים הלא מאולחים. בשאר הטיפולים לא נצפה הבדל מהותי מהביקורת (**נספח 1, טבלה 8**). במעקב אחר ה- DNA של הפתוגן, ב- qPCR, אילוח הקרקע גרם להופעת DNA של הפתוגן ברקמות הצמחים, אולם לעיטוי הכימי בתכשירים השונים לא נצפתה השפעה כלשהי. כצפוי בהתאם לתסמינים, כמות DNA הפטרייה בצמחי הניסוי אשר גדלו באדמת גד"ש שמ"ש הייתה גבוהה בהרבה בהשוואה לקרקע שאולחה באופן מלאכותי (שם נצפתה רמת מדבק נמוכה).

4.4. איתור פונדקאים משניים של הפטרייה *H. maydis* (יעד בשנים 1+2 למחקר)

בהיבט זה בצענו בשנת המחקר השנייה מבחן בשורשים מנותקים (תואר קודם לכן [20]) לשורת מיני צמחים בעלי פוטנציאל לשאת את גורם המחלה וניסוי בעציצים עם אדמה נגועה לאיתור DNA של הפתוגן בשורשי צמחים אלו. בניסויים אלו בוצע אבחון מבוסס qPCR, שיטה רגישה שלא עמדה לרשותנו בשנה הראשונה למחקר. המבחן בשורשים מנותקים אפשר לאתר, חוטי תפטיר, בתוך צינורות ההובלה של שורשים צעירים, הן בזן התירס הרגיש למחלה, פרלוד, והן בשורשים של מיני צמחים אחרים, המשמשים כגידולי שדה בעמק החולה (**נספח 1, איור 17**). במינים שנבחנו מצאנו הופעת חוטי תפטיר בסדר היורד הבא: שעורה (שבה אותר חוט ההדבקה הארוך ביותר), אבטיח, תירס, כותנה ובוטנים (באחרון לא אותר חוט הדבקה כלל) (**נספח 1, איור 17**). אמנם אין להסיק מכך שצמחים אלו הם פונדקאים משניים לפתוגן, אך מבחן מהיר זה עשוי ללמד על הפוטנציאל של הפטרייה לחדור ולהתבסס בשורשי צמחים אלו. בניסוי האילוח בעציצים (**נספח 1, איור 18 A**), אותר DNA של הפתוגן ברקמות של תירס, סטריה (דגן מספוא), ואבטיח (ברמות נמוכות מאוד). מעניין לראות כיצד תירס שגדל בקרקע ביקורת מעוקרת, התפתח בצורה טובה בהרבה מהתירס שגדל בקרקע נגועה (**נספח 1, איור 18 B, C**). עוד מצאנו ששורשי שעורה מעודדים את גדילת הפטרייה במצע נוזלי (**נספח 1, איור 19 A, B**). השורשים של גידולי שדה שונים השרו הפרשת לקאז חוץ תאי על ידי הפטרייה, ומהם השפעת שורשי כותנה ובוטנים הייתה הרבה ביותר בהיבט זה (**נספח 1, איור 19 C**).

5. דיון

אחד האתגרים המרכזיים שעמדו בפנינו בשנת המחקר השנייה היה יישום שיטת האיתור המולקולארית, מבוססת ה- qPCR, לאיתור הפתוגן ברקמות צמחיות. שיטה זו אפשרה לנו איתור עקבי ורגיש של הפתוגן בכל הניסויים שבוצעו. יתרה מכך, רגישות השיטה מאפשרת לנו להשתמש בה היום כאמצעי לאבחון אדמות החשודות כנגועות. ניתן לעשות זאת באמצעות בוחן ביולוגי (bio-assay) - גידול צמחי תירס בעציצים, בקרקע החשודה כנגועה ואיתור DNA של הפתוגן ברקמות הצמחים כבר לאחר שלושה שבועות מהזריעה. בדרך זו משמש הצמח כאמצעי

לבידוד והעשרת הפתוגן מהקרקע. הערכת מידת האילוח בקרקע הינה אמצעי חשוב לקבלת החלטות על ידי המגדלים בנוגע לבחירת החלקות והזנים לגידול. יש זני תירס בעלי רגישות מופחתת (דוגמת הזן רויאלטי) שניתן לזרוע בחלקות עם היסטוריה של המחלה אך רצוי לא בחלקות בהן היה אילוח כבד והתמוטטות גם של זנים בעלי רגישות מופחתת (כפי שהודגם בניסוי השדה, **נספח 1, איורים 2, 4**). בנוסף, הגילוי המוקדם של המחלה, בזכות שיטת ה- qPCR, מאפשר איתור גורם המחלה בזרעים נגועים, אמצעי חשוב למניעת הכנסת חומר ריבוי נגוע ממדינות החשודות כנגועות במחלת הנבילה המאוחרת.

למרות ש- Azoxystrobin עיכב את המחלה בצורה משמעותית במעבדה וצלח גם בשדה כאשר הצמחים הוגמעו בחומר זה בשלוחת טיפטוף על גבי השורה [21], עיטוי זרעים בתכשיר זה לא מנע את הידבקות הצמחים במחלה, ועל רקע של אילוח כבד בקרקע לא סיפק הגנה לצמחים הרגישים כנגד המחלה. יתכן ושיטת עיטוי הזרעים לא מאפשרת שמירת ריכוז מספק של הפונגיציד בתוך הצמח להגנתו בשלבי הגידול הראשונים בשדה. סביר להניח שעם גדילת הצמח נמהל החומר לריכוז נמוך, מתחת לריכוז הנדרש לעיכוב הנדרש של המחלה. יתכן גם שהריכוז האפקטיבי של התכשיר מושפע מספיחתו לקרקע ומפריצת שורשים החדשים מהשכבה המטופלת, שאינם מוגנים. היתרון בעיטוי הזרעים במיקוריזה הוא שפטרייה זו מתפתחת יחד עם התפתחות הצמח. עיטוי כזה עשוי להיות יעיל להתפתחותו של הצמח בתנאי מחסור בזרחן, אבל יעילותו במקרה של אילוח כבד במחלת הנבילה המאוחרת מוגבלת.

הודות לשיטת ה- qPCR הושג שיפור ניכר ביכולת המעקב אחר התפתחות הפטרייה בתוך רקמות הצמח. התוצאות מלמדות כי בקרקעות שבהן יש אילוח כבד בגורם המחלה, מצליח הפתוגן לחדור לשורשי צמחים, ללא קשר לחוסן שהם מגלים בפני מחלת הנבילה המאוחרת. ההבדל כנראה בין הצמחים הרגישים לאילו שרגישותם פחותה היא במידת התפתחות והתפשטות המחלה בתוך צינורות ההובלה, ומידת סתימתם ובכך מידת פגיעתם בצמח. עדות להשערה זו היא ההעלמות הכמעט מוחלטת של DNA הפתוגן בגבעולי הצמחים העמידים רויאלטי ו- 32d99. במבחנים לזני תירס שנערכו בעבר (און רבינוביץ, נתונים שלא פורסמו) דווח שזני תירס סופר מתוק רגישים פחות למחלת הנבילה המאוחרת. בעבודה זו הוכח שלא כך הדבר לגבי זני תירס מספוא. זנים מסוימים (למשל הזן p32w86) רגישים למחלה לא פחות מזני תירס מתוק. הבדיקה הכמותית של ה- DNA של הפתוגן, במכשיר qPCR, מאפשרת הבחנה טובה בין הצמחים העמידים לרגישים.

ניסוי האילוח בעציצים עם קרקע מאבני איתן, לא הניב כמות מדבק זהה לרמת האילוח של הקרקע שנלקחה מהשדה הנגוע מגד"ש שמ"ש. סביר שהאילוח בתבדיד אחד אינו משתווה לקרקע נגועה העשויה להכיל תערובת של כמה קווי פטרייה בעלי אלימות שונה, כפי שדווח במצריים [12,2]. יתכן גם שלתכונות הקרקע השפעה על תפוצת הפתוגן, חיוניותו וחומרת המחלה. משתנים אלו מחזקים את הצורך בעריכת סקר למיפוי האוכלוסייה של הפתוגן בארץ. תוצאות הערכת ההתייבשות, משקל היבול, ואיתור ה- DNA (מבוסס ה- qPCR) שנאספו בניסוי אבני איתן, אינן מאפשרות להצביע באופן חד משמעי על תכשיר מומלץ כנגד המחלה. יחד עם זאת Carbendazim (שם מסחרי בויסטין), הוריד את כמות DNA הפטרייה ברקמות הצמחים ואילו Prochloraz (שם מסחרי ספורטק) גרם לשיפור במשקל הממוצע לקלח. העיטוי של הזרעים בתכשיר ההדברה Azoxystrobin (שם מסחרי עמיסטר) לא מנע את נזקי המחלה בעציצים עם אדמת גד"ש שמ"ש ובעציצים עם אדמת אבני איתן מאולחת. יחד עם זאת, כאמור מעלה, העיטוי ב- Azoxystrobin היה יעיל בניסוי השדה, בהפחתת ה- DNA של הפתוגן בצמחים, ונראה כי בטיפול משולב עם יישום חומר ההדברה בהגמעה, הוא עשוי לתת שכבת הגנה נוספת

לצמחים. בכוונתנו לבחון את התכשירים האחרים שהראו יעילות מסוימת ביישום בעיטוי כנגד הפתוגן, Prochloraz ו- Carbendazim, יחד עם תכשירים נוספים, בניסוי שדה בקיץ הקרוב (2017).

למרות מאמץ דו-שנתי לבחון את נוכחות הפתוגן *H. maydis* ברקמות צמחים שאינם תירס ועשויים לשמש כפונדקאים משניים המאפשרים את שרידות הפתוגן, העדויות שהצטברו מועטות ונקודתיות (הפתוגן אותר רק בצמחים בודדים מתוך עשרות שנבדקו). יחד עם זאת ניתן לומר שהעדויות מרמזות על יכולת הפתוגן להתבסס ברקמות מיני צמחים דוגמת כותנה, שעורה, סטריה ואבטיח.

6. ביבליוגרפיה

1 Sabet, K. A., Samra, A. S., Hingorani, M. K. & Mansour, I. M. Stalk and root rots of maize in the United Arab Republic. *FAO Plant Prot. Bull.* **9**, 121-125 (1961).

2 El-Assiuty, E. M., El-Shafey, H. A., Ismael, A.-S. & Fahmy, Z. M. Pathogenic variation in *Cephalosporium maydis*. *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.* Risk maps for targeting exotic plant pest detection programs in the United States. *EPPO Bulletin* **41**, 46-56 (2011).

5 Galal, A. A., El-Rouby, M. M. & Gad, A. M. Genetic analysis of resistance to late wilt (*Cephalosporium maydis*) in variety crosses of maize. *Zeitschrift fur Planzenzuchtung* **83**, 176-183 (1979).

6 Sabet, K. A., Samra, A. S. & Dawood, N. A. in *nvestigations on stalk-rot disease of maize in U.A.R.* 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. A new wilt disease of maize in Egypt. *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. Carry-over of maize stalk-rot fungi in seed. *Egypt. Agric. Res. Rev.* **54**, 29-42 (1976).

10 Payak, M. M., Lal, S., Lilaramani, J. & Renfro, B. L. *Cephalosporium maydis* - A new threat to maize in India. *Indian Phytopathol.* **23**, 562-569 (1970).

11 Sabet, K. A., Zaher, A. M., Samra, A. S. & Mansour, I. M. Pathogenic behaviour of *Cephalosporium maydis* and *C. acremonium*. *Ann. Appl. Biol.* **66**, 257-263 (1970).

12 Saleh, A. A. *et al.* Amplified Fragment Length Polymorphism Diversity in *Cephalosporium maydis* from Egypt. *Phytopathology* **93**, 853-859 (2003).

13 Zeller, K. A. *et al.* Relative competitiveness and virulence of four clonal lineages of *Cephalosporium maydis* from Egypt toward greenhouse-grown maize. *Plant Dis.* **86**, 373-378 (2002).

14 Abd-el-Rahim, M. F., Sabet, K. A., El-Shafey, H. A. & El-Assiuty, E. M. Chemical control of the late-wilt disease of maize caused by *Cephalosporium maydis*. *Agric. Res. Rev.* **60**, 31-49 (1982).

15 K. A. Sabet, A. S. S. M. F. A.-R. Systemic action of benomyl against late-wilt disease of maize. *Ann. Appl. Biol.* **71**, 211-218 (1972).

16 Dawood, N. A. & Sabet, K. A .Effect of organic amendment and fungicidal application on the population of soil microflora and infection with the late-wilt disease of maize. *Annals of Agric. Sc., Moshtohor (Egypt)* **11**, 217-226 (1979).

17 Abdel-Hamid, M. S., Abdel-Momeim, M. F., El-Shafey, H. A. & El-Deeb, S. T. Biological control of late-wilt disease of maize caused by *Cephalosporium maydis*. *Agric. Res. Rev.* **59**, 253-260 (1981).

18 Saleh, A. A. & Leslie, J. F. *Cephalosporium maydis* is a distinct species in the Gaeumannomyces-Harpophora species complex. *Mycologia* **96**, 1294-1305 (2004).

19 Drori, R. *et al.* Molecular diagnosis for *Harpophora maydis*, the cause of maize late wilt in Israel. *Phytopathologia Mediterranea* **52**, 16-29 (2012).

20 Degani, O. & Cernica, G. Diagnosis and Control of Harpophora maydis, the Cause of Late Wilt in Maize. *Advances in Microbiology* **4**, 94-105 (2014).

21 Degani, O., Weinberg, T. & Graph, S. Chemical control of maize late wilt in the field. *Phytoparasitica* **42**, 559-570 (2014).

22 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).

23 Saleh ,A. A. *et al.* Amplified Fragment Length Polymorphism Diversity in Cephalosporium maydis from Egypt. *Phytopathology* **93**, 853-859 (2003).

24 Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. & Stewart, N. C. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7**, 1-12 (2006).

25 Michail, S. H., Abou-Elseoud, M. S. & Nour Eldin, M. S. Seed health testing of corn for *Cephalosporium maydis*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **34**, 35-42 (1999).

26 Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. & Fasiolo, F. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**, 17-42 (2003).

נספח 1 – טבלאות ואיורים

טבלאות

טבלה 1. פונגצידים, ששימשו בניסויים בעיטוי זרעים כנגד הפתוגן *Harpophora maydis* *

Fungicide	Manufacturer, Supplier	Active Ingredient (common name)	Group Name	Chemical Group	Target Site of Action	Active Ingredient Concentration (g/l)
Amistar®	Syngenta (Basel, Switzerland), Makhteshim Agan (Airport City, Israel)	Azoxystrobin	QoI-fungicides (quinone outside inhibitors)	Methoxy-acrylates	Complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) at Qo site (*cyt b gene*) (inhibition of mitochondrial respiration)	250
Signum W.G.®	BASF (Ludwigshafen, Germany), Agan (Ashdod, Israel)	26.7% Boscalid, 6.7% Pyraclostrobin	SDHI (Succinate dehydrogenase inhibitors) QoI-fungicides (Quinone outside Inhibitors)	Pyridine-carboxamides Methoxy-carbamates	Complex II: succinate-dehydro-genase Complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) at Qo site (*cyt b gene*)	267 67
Hosen	Cheminova (Lemvig, Denmark), Makhteshim Agan (Airport City, Israel)	Flutriafol	DMI-fungicides (demethylation inhibitors)	Triazoles	Disrupt C14-demethylation in sterol biosynthesis (*erg11/cyp51*)	125
Sportec	Merhav Agro Ltd. (Herzliah Israel) Israel)	Prochloraz	DMI-fungicides (demethylation inhibitors)	Imidazoles	C14-demethylation in sterol biosynthesis (*erg11/cyp51*)	450
Ortiva top ® +azoxystrobin) difenoconazole)	Makhteshim (Ber sheva, Israel)	Azoxystrobin	QoI-fungicides (quinone outside inhibitors)	Methoxy-acrylates	Complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) at Qo site (*cyt b gene*) (inhibition of mitochondrial respiration)	250
		difenoconazole	DMI-fungicides (DeMethylation Inhibitors)	triazoles	C14- demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)	125
Ohayo	Luxsembourg® (Israel)	fluazinam	DeMethylation Inhibitors	2,6-dinitro- 29 anilines	erg11/cyp51)	500
Bavistin	BASF Germany Agan (Airport City, Israel)	Carbendazim	MBC - fungicides (Methyl Benzimidazole Carbamates)	benzimidazoles	B1: ß-tubuline assembly in mitosis	500
Lunaexpirance (Velum+Folicur)	Buyer (Cyprus) (Lidor Israel)	Fluopyram (Velum)	SDHI (Succinate dehydrogenase inhibitors)	pyridinyl-ethylbenzamides	C2: complex II: succinate-dehydrogenase	200
		Tebuconazole (Folicur)	DMI-fungicides (DeMethylation Inhibitors) (SBI: Class I)	triazoles	C14- demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)	200
Velum+Flint	Buyer (Cyprus) (Lidor Israel)	Fluopyram (Velum)	SDHI (Succinate dehydrogenase inhibitors)	pyridinyl-ethylbenzamides	C2: complex II: succinate-dehydrogenase	200
		Trifloxystrobin (Flint)	QoI-fungicides (Quinone outside Inhibitors)	oximino acetates	C3: complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) at Qo site (cyt b gene)	500
Proline+Folicur	Buyer (Cyprus) (Lidor Israel)	Prothioconazole (Proline)	DMI-fungicides (DeMethylation Inhibitors) (SBI: Class I)	triazolinthiones	C14- demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)	275
		Tebuconazole (Folicur)	DMI-fungicides (DeMethylation Inhibitors) (SBI: Class I)	triazoles	C14- demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)	200

* This information is based on the funguicides data sheet published by the manufactor and on the Fungicide resistance action committee (FRAC) Code List.

טבלה 2. אומדן התייבשויות (הערכה ויזואלית) בזני התירס המתוק בניסוי בשדה נגוע (2016)*

שם זן	טיפול	ממוצע התייבשות (%) 2/8/16	מובהקות	ממוצע התייבשות (%) 8/8/16	מובהקות
פרלוד	ביקורת	60.0	A	100.0	A
פרלוד	מיקוריזה	40.3	A B	97.1	A
פרלוד	עמיסטר	48.6	A	93.3	A
רויאלטי	ביקורת	3.7	B C	26.7	B C
רויאלטי	מיקוריזה	1.7	B C	9.3	B C
רויאלטי	עמיסטר	1.2	B C	41.9	B

* אחוז ההתייבשויות הוערך ב- 2/08/16, 19 ימים מהפריה (69 יום מהזריעה), וב- 8/08/16, 25 ימים מהפריה (75 יום מהזריעה), לפי חלקם היחסי (%) בכל חלקת ניסוי, של הצמחים שהראו סימני ההתייבשות חיצוניים אופייניים למחלה, בעיקר הכספת העלים העליונים וכמישתם. בניסוי הייתה שונות גדולה בין החלקות בשטח, שונות בתוך הטיפולים וחלק מהחלקות נפגעו מדריסה וחזירים. עקב כך בוצע ניתוח סטטיסטי לפי מבנה ניסוי חד גורמי. כל זן עם אחד מהטיפולים בזרעים וללא טיפול נחשב טיפול נפרד. ניתוח סטטיסטי של התוצאות בוצע בתוכנת jmp12. המובהקות מצוינת באותיות – שונות באותיות מציינת הבדל מובהק בין ערכים אלה לפי מבחן תחום מרובה (Tukey-Kramer, HSD, P ≤ 0.05).

טבלה 3. אומדן התייבשויות (הערכה ויזואלית) בזני תירס המספוא בניסוי בשדה נגוע (2016)*

שם זן	טיפול	ממוצע התייבשות (%) 17/8/16	מובהקות	ממוצע התייבשות (%) 1/9/16	מובהקות
p32w86	ביקורת	42.9	B C D E	84.3	A B
p32w86	מיקוריזה	27.1	D E F G	85.0	A B
p32w86	עמיסטר	32.5	C D E F	93.0	A
32D99	ביקורת	2.5	G	31.3	F G H I J
32D99	מיקוריזה	0.0	G	24.5	G H I J K
32D99	עמיסטר	0.0	F G	2.5	I J K

* אחוז ההתייבשויות הוערך ב- 17/08/16, 34 ימים מהפריה (84 יום מהזריעה), וב- 1/9/16, 49 ימים מהפריה (99 יום מהזריעה) שאר ההסברים כמתואר בטבלה 2.

טבלה 4. אומדן התייבשויות (כמות חלקות) בזני תירס מתוק בניסוי בשדה נגוע (2016)*

שם זן	טיפול	חלקות עם 100% התייבשות	מספר החלקות שנדגמו להתייבשויות 8/8/16
פרלוד	ביקורת	6	7
פרלוד	מיקוריזה	6	8
פרלוד	עמיסטר	3	7
רויאלטי	ביקורת	1	7
רויאלטי	מיקוריזה	1	8
רויאלטי	עמיסטר	2	8

* ספירת החלקות שבהן הייתה 100% התייבשות מסך החלקות שנדגמו.

טבלה 5. אומדן יבולים בזן התירס המתוק רויאלטי בניסוי בשדה נגוע (2016)*

שם זן	טיפול		ממוצע	מובהקות
רויאלטי	ביקורת	מס' קלחים קטנים לחלקה	19.9	A B
רויאלטי	מיקוריזה		13.0	B
רויאלטי	עמיסטר		22.0	A B
רויאלטי	ביקורת	מס' קלחים גדולים לחלקה	16.4	A
רויאלטי	מיקוריזה		15.7	A
רויאלטי	עמיסטר		14.0	A
רויאלטי	ביקורת	יבול הזנים (ק"ג למ"ר)	1.651	A
רויאלטי	מיקוריזה		1.556	A
רויאלטי	עמיסטר		1.555	A

* אומדן יבולים בוצע 27 ימים לאחר ההפריה (77 יום מהזריעה). לצורך ההערכה, בכל אחת מחלקות הניסוי נקטף מקטע באורך 5 מטר מהשורה. כל האשבולים נספרו ונשקלו לקביעת היבול ברוטו. האשבולים מוינו על פי גודלם לקטנים וגדולים. לא ניתן היה למיין את האשבולים על פי משקל בגלל דרגת ההתייבשות השונה וגם דרגת ההבשלה השונה. גודל הקלחים היווה מדד טוב לכושרו של הצמח להטמיע ולמלאות הגרעינים. ניתוח סטטיסטי של התוצאות בוצע בתוכנת jmp12. המובהקות מצוינת באותיות – שונות באותיות מציינת הבדל מובהק בין ערכים אלה לפי מבחן תחום מרובה (Tukey-Kramer, HSD, P ≤ 0.05).

טבלה 6. אומדן יבולים בזני תירס מספוא בניסוי בשדה נגוע (2016)*

שם זן	טיפול	חומר יבש צמח (%)	מובהקות	חומר יבש קלח (%)	מובהקות
p32w86	ביקורת	68.9%	A	78.4%	A
p32w86	מיקוריזה	65.8%	A	83.7%	A
p32w86	עמיסטר	69.6%	A	76.6%	A
32D99	ביקורת	53.6%	AB	75.9%	A
32D99	מיקוריזה	43.3%	AB	72.8%	A
32D99	עמיסטר	34.5%	AB	64.1%	A

* קטיף בזני תירס המספוא לקביעת היבול בוצע ב- 4/09 (52 ימים מההפריה, 102 יום מהזריעה). בכל חלקת ניסוי בזנים אלו נבחר קטע באורך 5 מטר שורה. בקטע זה בוצעה ספירה של כל הצמחים והאשבולים. לאחר מכן בוצע קטיף של כל הקלחים וקציר של כל הצמחים, לצורך קביעת יבול הנוף והקלחים. בכל חלקת ניסוי נדגמו 2 צמחים לקביעת תכולת חומר יבש בקלחים ובנוף לאחר ייבוש בתנור בטמפרטורה של 65 °C למשך 48 שעות.

טבלה 7. התפלגות היבול בחלקי הצמח וכלל יבול החומר יבש בזני תירס מספוא בניסוי בשדה נגוע (2016)*

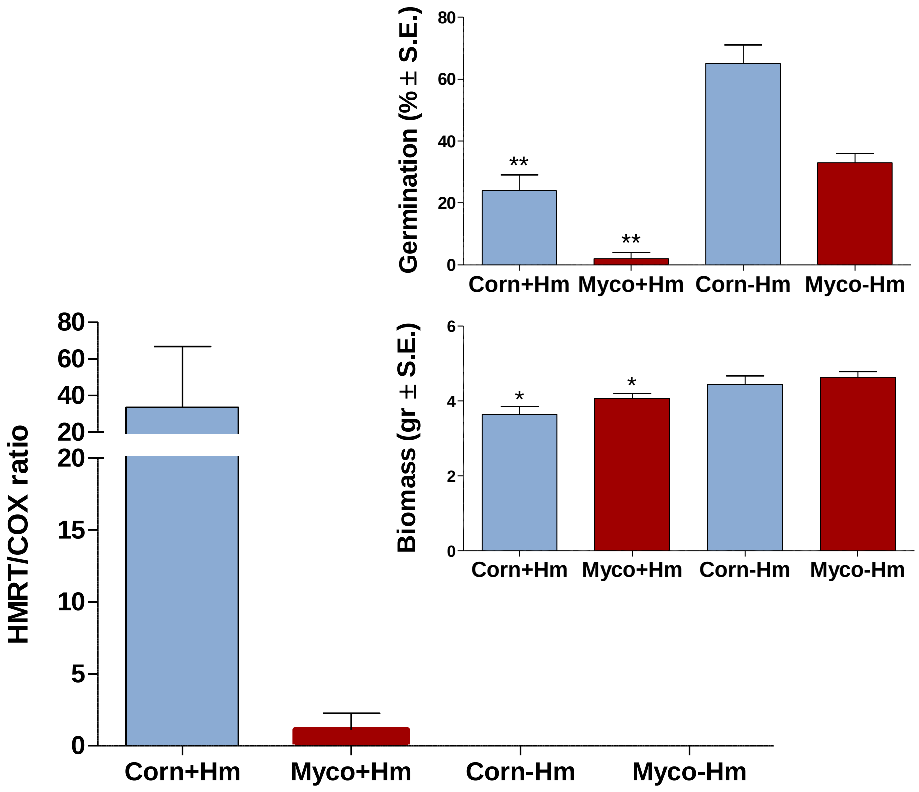
שם זן	טיפול	יבול יבש קלחים (ק"ג למ"ר)	יבול יבש נוף (ק"ג למ"ר)	סה"כ יבול יבש (ק"ג למ"ר)	יחס קלח נוף	מספר קלחים למטר שורה
p32w86	ביקורת	0.763	0.682	1.445	1.14	5.9
p32w86	מיקוריזה	0.857	0.626	1.483	1.42	5.6
p32w86	עמיסטר	0.754	0.623	1.377	1.44	6.1
32D99	ביקורת	1.135	1.050	2.185	1.13	5.8
32D99	מיקוריזה	1.305	1.113	2.418	1.17	7.0
32D99	עמיסטר	1.074	0.916	1.989	1.17	5.7

טבלה 8. התפלגות היבול בניסוי אבני איתן *

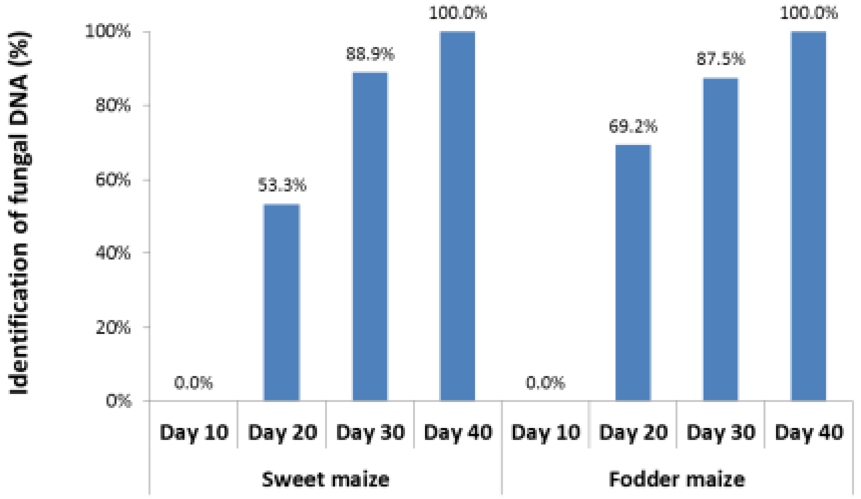
טיפול (תכשיר)	שם מסחרי	משקל קלחים לטיפול (ק"ג)		משקל ממוצע לקלח (ק"ג)		מספר קלחים לטיפול	
		ללא טיפול	אילוח	ללא טיפול	אילוח	ללא טיפול	אילוח
Control		0.17	0.15	0.17	0.15	10	10
Fluazinam	אוהיו	0.16	0.16	0.16	0.16	10	10
Prochloraz	ספורטק	0.13	0.20	0.13	0.20	10	7
Carbendazim	בויסטין	0.16	0.05	0.16	0.05	10	9
Azoxystrobin	עמיסטר	0.18	0.17	0.18	0.17	10	10
AS (Field)	עמיסטר (שדה)	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0

* אומדן יבולים בוצע 23 ימים לאחר ההפריה (77 יום מהזריעה).

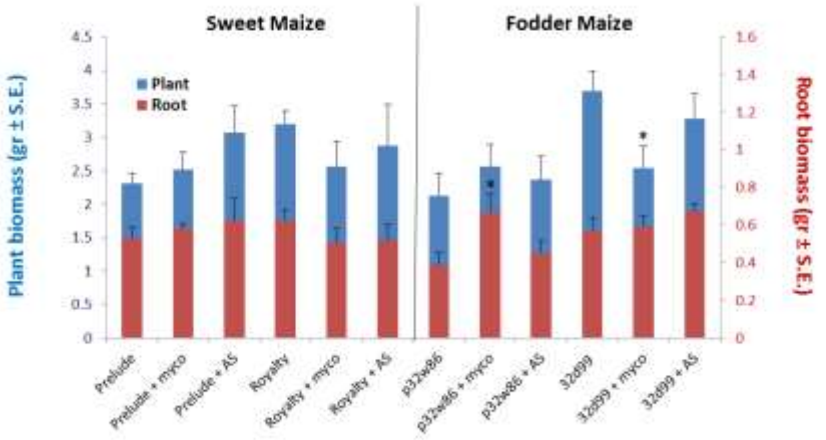
איורים



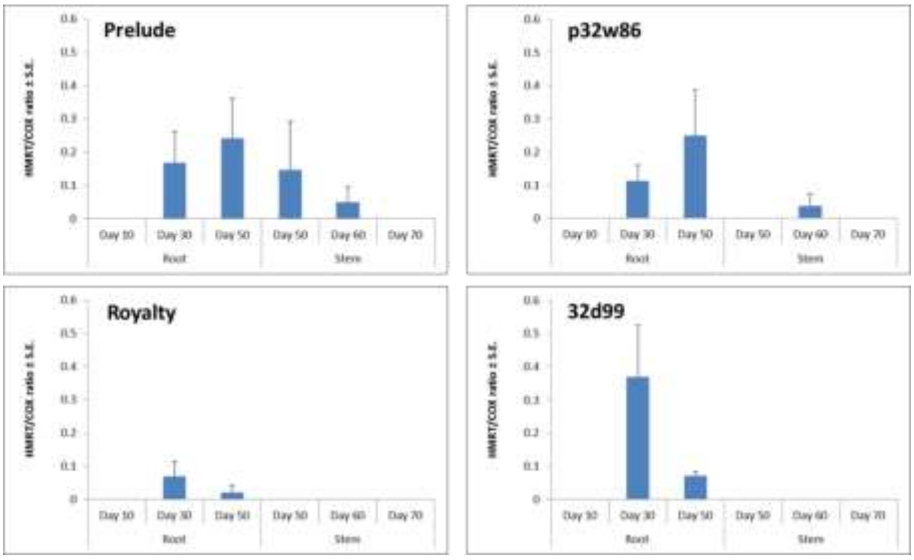
איור 1 - כל טיפול - זרעים מאולחים (+Hm) וביקורות ללא אילוח (-Hm) כלל 5-6 חזרות (כל חזרה היא בקבוק ארלנמייר אחד ובו 10 זרעים ב- 150 מ"ל מים מזוקקים ומעוקרים). האילוח בפתוגן *Harpophora maydis* בוצע על ידי הוספה לכל בקבוק 10 דסקיות תפטיר (בקוטר 6 מ"מ של אחת) שנלקחו משולי מושבה בת 3 ימים, שגדלה קודם לכן בחושך ב- 28±1˚C. הטיפולים הודגרו למשך 6 ימים בטמפרטורה זו. כל עמודה מייצגת ממוצע, קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. כוכבית מסמנת הבדל משמעותי ($*p<0.05$, $**P<5*10^{-4}$), במבחן t-Test, של כל קבוצת זרעים - מצופים במיקוריזה (Myco) או לא מצופים (Corn), מאולחים, בהשוואה לביקורת של זרעים לא מאולחים.



<u>איור 2</u> – אחוזי האיתור של DNA הפתוגן *H. maydis*, ברקמות צמחי תירס בניסוי בשדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת (קיץ 2016). זני התירס המתוק (Sweet maize) - פרלוד (הרגיש למחלה) ורויאלטי ('Royalty', זן מכלוא בעל רגישות מופחתת למחלה, מתוצרת חברת Pop Vriend Seeds B.V., Andijk, The Netherlands, משווק על ידי עדן זרעים, רעות, ישראל), וזני תירס המספוא (Fodder maize) - p32w86 (זן מכלוא רגיש למחלה, ו- 32d99 (שניהם מתוצרת חברת Pioneer-DuPon, Iowa, USA ומשווקים על יד מרחב-אגרו, הרצליה, ישראל), נזרעו בשדה גידולי שדה (גד"ש שמ"ש - גידולי שדה שהינם שותפות של הקיבוצים שמיר, עמיר, כפר סאלד ושדה נחמיה) הנגוע במחלת הנבילה המאוחרת, ואשר ממוקם מדרום לנאות מרדכי. הניסוי (בוצע כחלק ממבחן זנים שנתי) נזרע על כרב עכובית הגלגל. להכנת החלקה לקראת זריעת תירס, בוצעו דיסוק ואגז מחליק. החלקה נזרעה ב- 25.5.2016 במזרעת מונוסם. לאחר הזריעה החלקה רוססה בקוטלי העשבים דואל גולד במינון – 130 סמ"ק לדונם בשילוב אטרנקס במינון - 100 סמ"ק לדונם. קוטלי העשבים הוצנעו בהשקיית ההנבטה בקונוע במנת מים של 30 מ"מ. בהמשך הגידול בוצע ריסוס במרסס מוגן בחומר בסטה במינון 350 סמ"ק לדונם בין שורות הגידול להדברת עשבייה קיימת. בחלקה בוצעו שני ריסוסים להדברת נובר התירס האירופי ונובר התירס המנוקד, ב- 27.7.2016 בתכשיר לאנט במינון 100 סמ"ק לדונם בשילוב קורגן במינון 20 סמ"ק לדונם וב- 2.8.2016 בתכשיר טאקומי במינון 20 סמ"ק לדונם. הניסוי בוצע במתכונת של בלוקים באקראי ב- 8 חזרות. בכל חלקת ניסוי נזרעה שורה מכל זן באורך 12 מטר, שהכילה כ- 40 צמחים. החלקה הושקתה בקונוע במנת מים כוללת של 200 מ"מ, ובטפטוף ב- 400 מ"מ נוספים (סה"כ 600 מ"מ בכל תקופת הגידול). תירס המספוא נקצר מאוחר יותר ולכן קיבל תוספת טפטוף של 450 מ"מ נוספים (סה"כ 650 מ"מ בכל תקופת הגידול). עד שליפת הפריחה הזכרית הוספו לחלקה כ- 30 יחידות חנקן בדשן אוראן דרך מערכת ההשקיה. ההפריה בזני התירס המתוק, הייתה ב- 14/07 (50 ימים מזריעה) ובזני תירס המספוא בין ה- 20-23/7 (58 ימים מהזריעה בממוצע). זיהוי הפתוגן *H. maydis* בשורשי הצמחים בוצע באמצעות איתור DNA בשיטת qPCR (Real-time PCR). הערכים מייצגים ממוצע של 13-24 חזרות בכל אחת מקבוצות הזנים, תירס מתוק או מספוא.

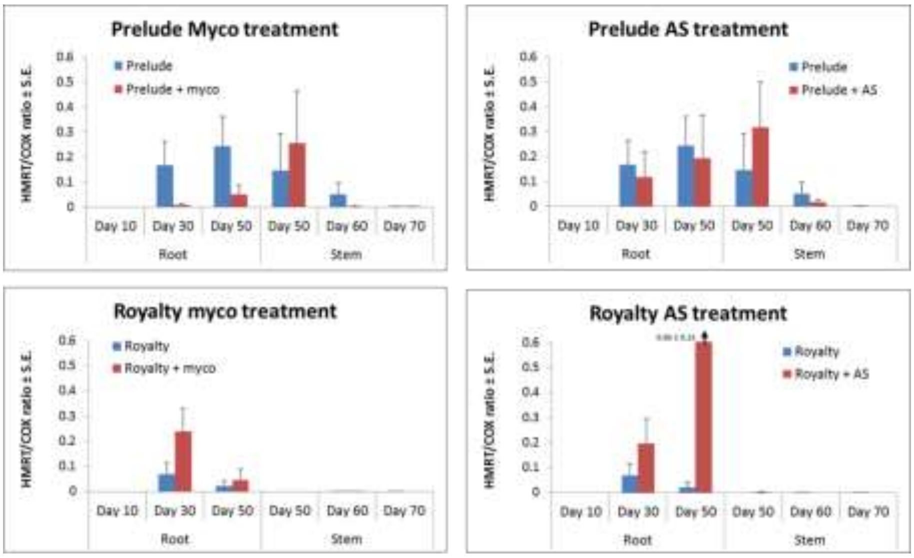


<u>איור 3</u> – ביומסת הנבטים ביום 10 לגידול, בניסוי בשדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת (קיץ 2016). צמחי זני התירס המתוק פרלוד (הרגיש למחלה) ורויאלטי (זן בעל רגישות מופחתת למחלה), וזני תירס המספוא p32w86 (זן רגיש למחלה) ו- 32d99 (זן עמיד למחלה), נזרעו בשדה נגוע במחלה מדרום לנאות מרדכי (2016, תיאור הגידול באיור 2). הזרעים עברו עיטוי בפטריית מיקוריזה (myco +) על ידי חברת Groundwork BioAg (מושב מזור, ישראל) או לחילופין עוטו בתכשיר Azoxystrobin (AS +) בחברת גדות אגרו על פי הסטנדרט המקובל של חברת Syngenta, בריכוז חומר פעיל של 0.0025 מ"ג חומר פעיל לזרע. הנבטים נדגמו שרירותית משדה הניסוי לאחר 10 ימים מהזריעה (4.6.16) והביומסה הרטובה שלהם נמדדה. כל עמודה היא ממוצע של 5 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. כוכבית (*) מסמנת הבדל משמעותי ($p<0.05$), במבחן t-Test, בהשוואה לביקורת של זרעים לא מטופלים.

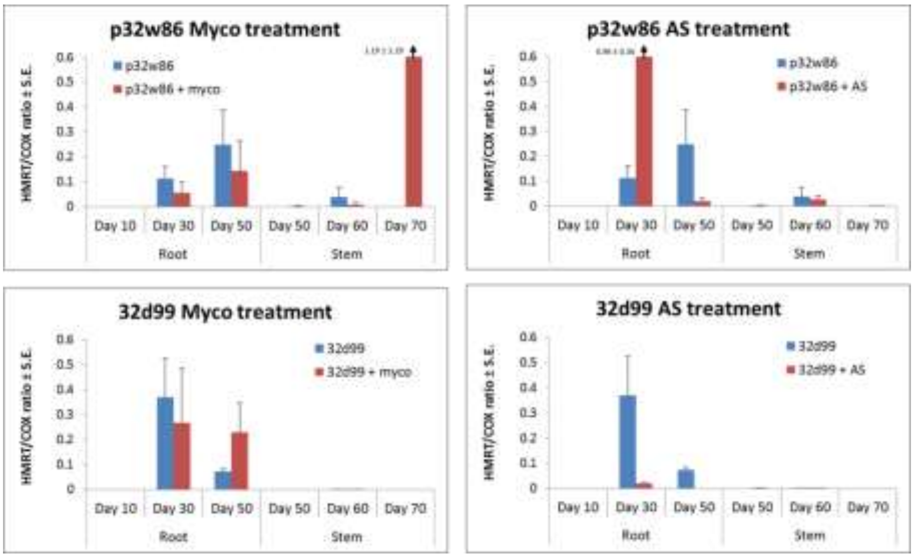


<u>איור 4</u> – מעקב אחר ה- DNA הפטרייתי של *H. maydis* בעת התפתחות המחלה בצמחי שדה נגועים. זני התירס המתוק פרלוד (הרגיש למחלה) ורויאלטי (זן בעל רגישות מופחתת למחלה), וזני תירס המספוא p32w86 (זן רגיש למחלה) ו- 32d99 (זן עמיד למחלה מתוצרת), נזרעו בשדה נגוע במחלה מדרום לנאות

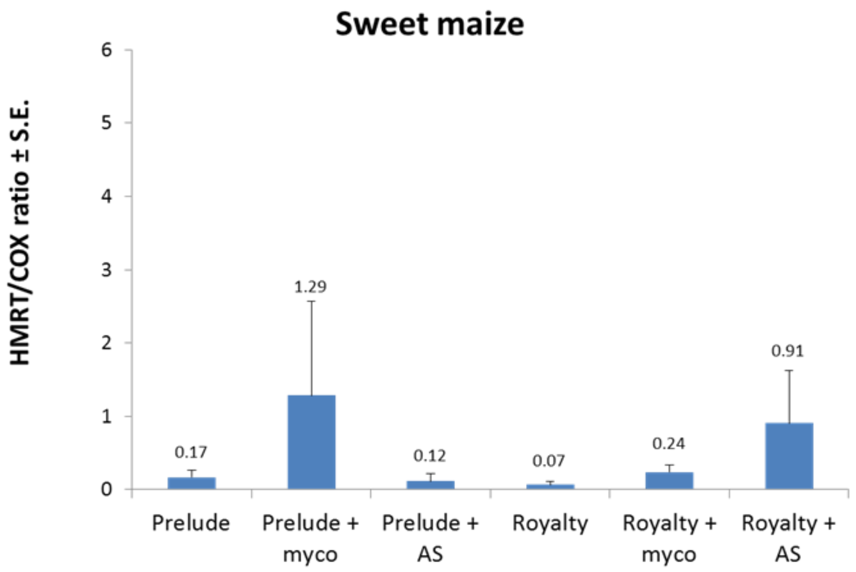
מרדכי (2016, תיאור הגידול באיור 2). דיגום התבצע במועדים המצוינים ו- DNA הופק מהשורש (בצמחים מגיל 0 עד גיל 50) ומהגבעול (בצמחים מגיל 50 ועד 70) לצורך בצוע qPCR לנוכחות הפתוגן *H. maydis*. הגן COX המקודד לאנזים Cytochrome c oxidase (האנזים האחרון בשרשרת הנשימה התאית במיטוכונדריה) שימש כגן ייחוס ("housekeeping") לנרמול כמות ה- DNA של הפתוגן *H. maydis* שאותר באמצעות פריימרים מתוך מקטע ה- DNA הייחודי לפטרייה זו. כמות ה- DNA היחסית חושבה לפי ה- ΔΔCt model. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.

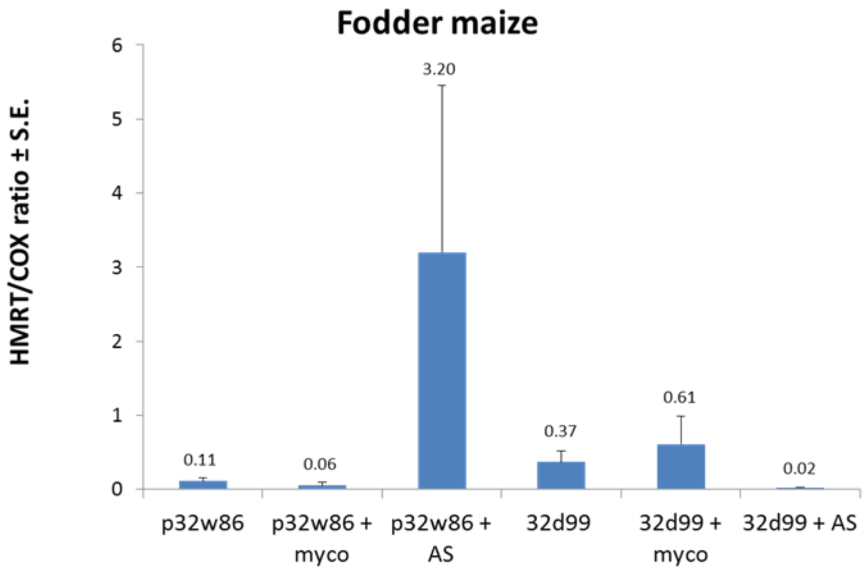


איור 5 – השפעת עיטוי זרעים בפטריית מיקוריזה וב- Azoxystrobin על הופעת DNA הפתוגן בזני תירס מתוק בניסוי שדה. זרעים של זני התירס המתוק, פרלוד ורויאלטי, עברו עיטוי בפטריית מיקוריזה (Myco) או לחילופין עוטו בתכשיר Azoxystrobin (AS). כל שאר התנאים כמו באיור 4. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.

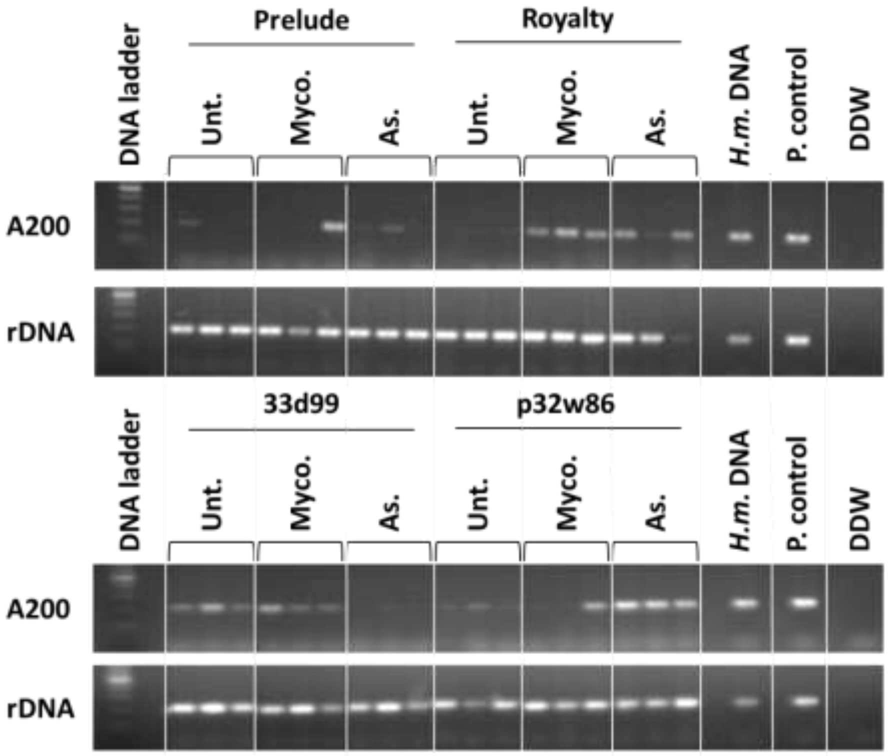


<u>איור 6</u> – השפעת עיטוי זרעים בפטריית מיקוריזה וב- Azoxystrobin על הופעת DNA הפתוגן <u>בזני תירס מספוא</u> בניסוי שדה. זרעים של זני תירס המספוא, p32w86 ו - 32d99, עברו עיטוי בפטריית מיקוריזה (Myco) או לחילופין עוטו בתכשיר Azoxystrobin (AS). כל שאר התנאים כמו באיור 4. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.

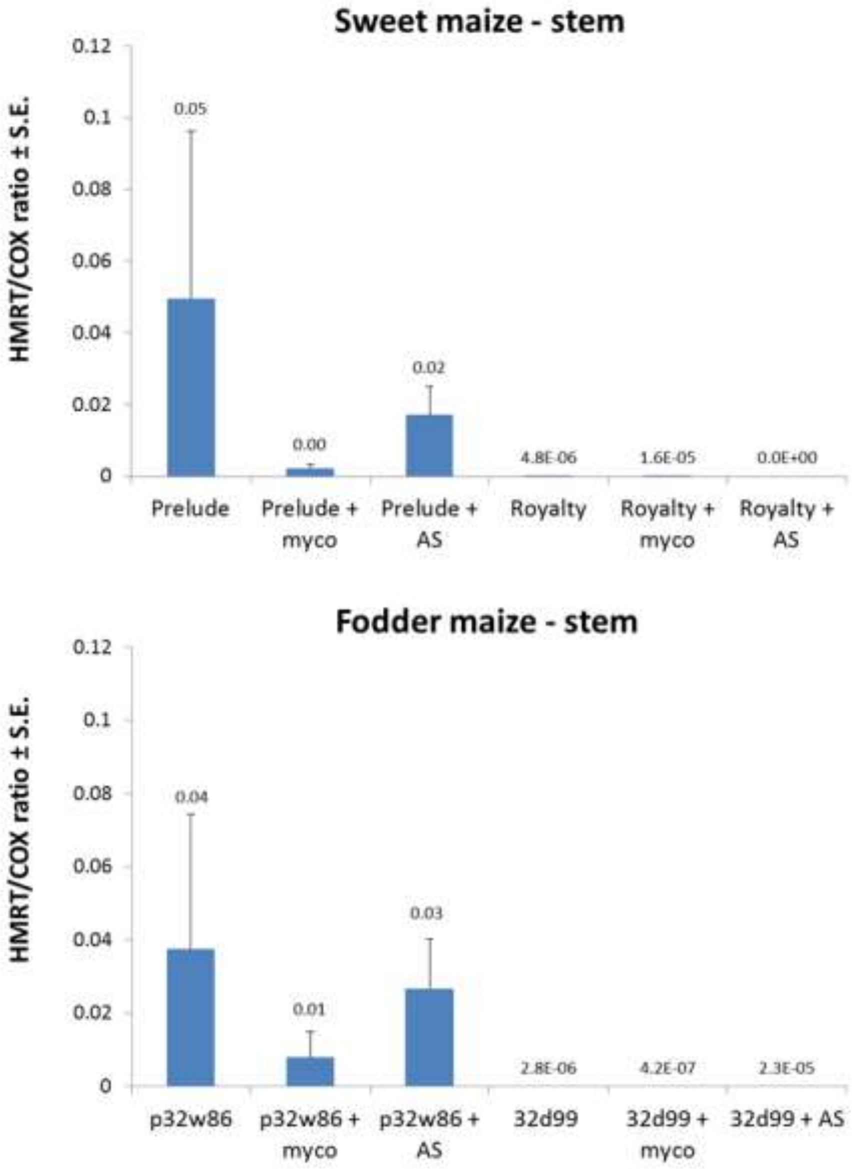




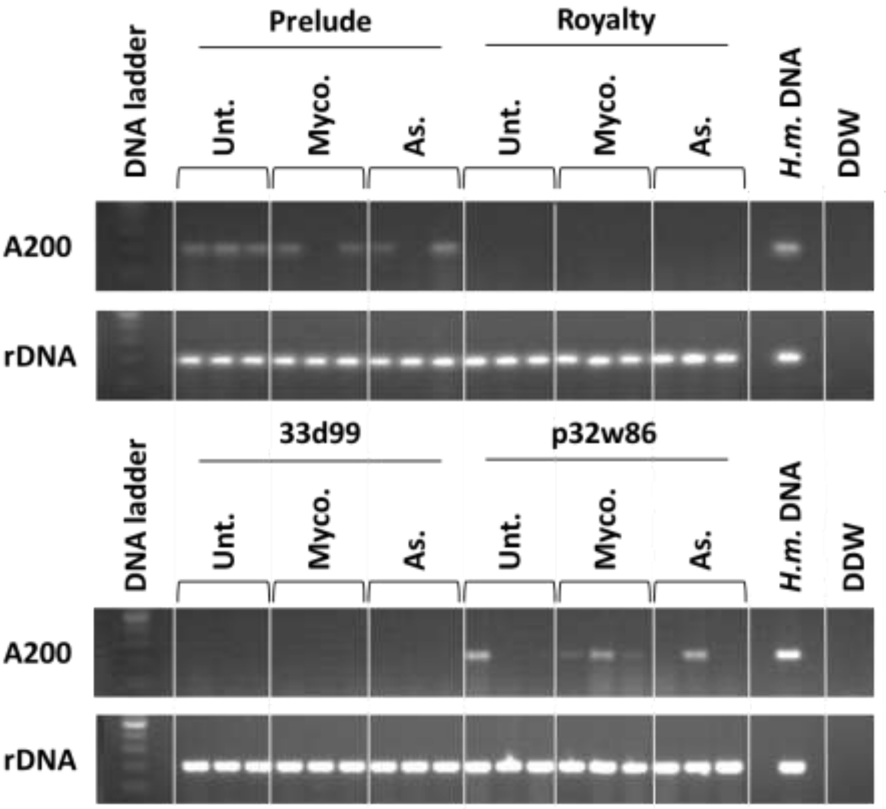
<u>איור 7</u> – איתור <u>qPCR</u> של DNA הפתוגן *H. maydis*, בזני תירס מטופלים, בניסוי שדה, ביום 30 לגידול, בשורש. תיאור הניסוי כמפורט באיור 4. צמחי תירס מעוטים/לא מעוטים בתכשיר Azoxystrobin (AS) או בפטריית מיקוריזה (Myco), נדגמו שרירותית, ביום 30 לגידול (24.6.16). הפקת ה- DNA בוצעה מהשורש, משורשים צדדים שבאזור צוואר השורש, ל- 3 צמחים מכל זן. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.



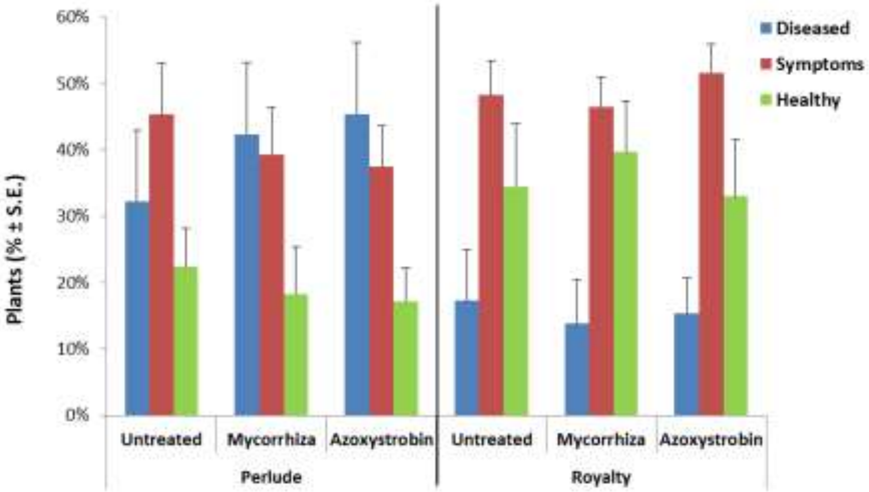
<u>איור 8</u> – איתור PCR של DNA הפתוגן *H. maydis*, בזני תירס מטופלים, בניסוי שדה, ביום 30 לגידול, בשורש. תיאור הניסוי כמפורט באיורים 2,3. צמחי תירס מעוטים בתכשיר Azoxystrobin (AS.) או בפטריית מיקוריזה (Myco.), נדגמו שרירותית, ביום 30 לגידול. הביקורת היא זרעי תירס לא מטופלים (Unt.). הפקת ה-DNA בוצעה מהשורש, משורשים צדדים שבאזור צוואר השורש, ל- 3 צמחים מכל זן. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.



איור 9 – איתור qPCR של DNA הפתוגן ***H. maydis*****, בזני תירס מטופלים, בניסוי שדה, ביום 60 לגידול, בגבעול.** תיאור הניסוי כמפורט באיור 4. צמחי תירס מעוטים/לא מעוטים בתכשיר Azoxystrobin (AS) או בפטריית מיקוריזה (Myco), נדגמו שרירותית, ביום 60 לגידול. הפקת ה- DNA בוצעה מהגבעול באזור המפרק הראשון מעל הקרקע, ל- 3 צמחים מכל זן. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.

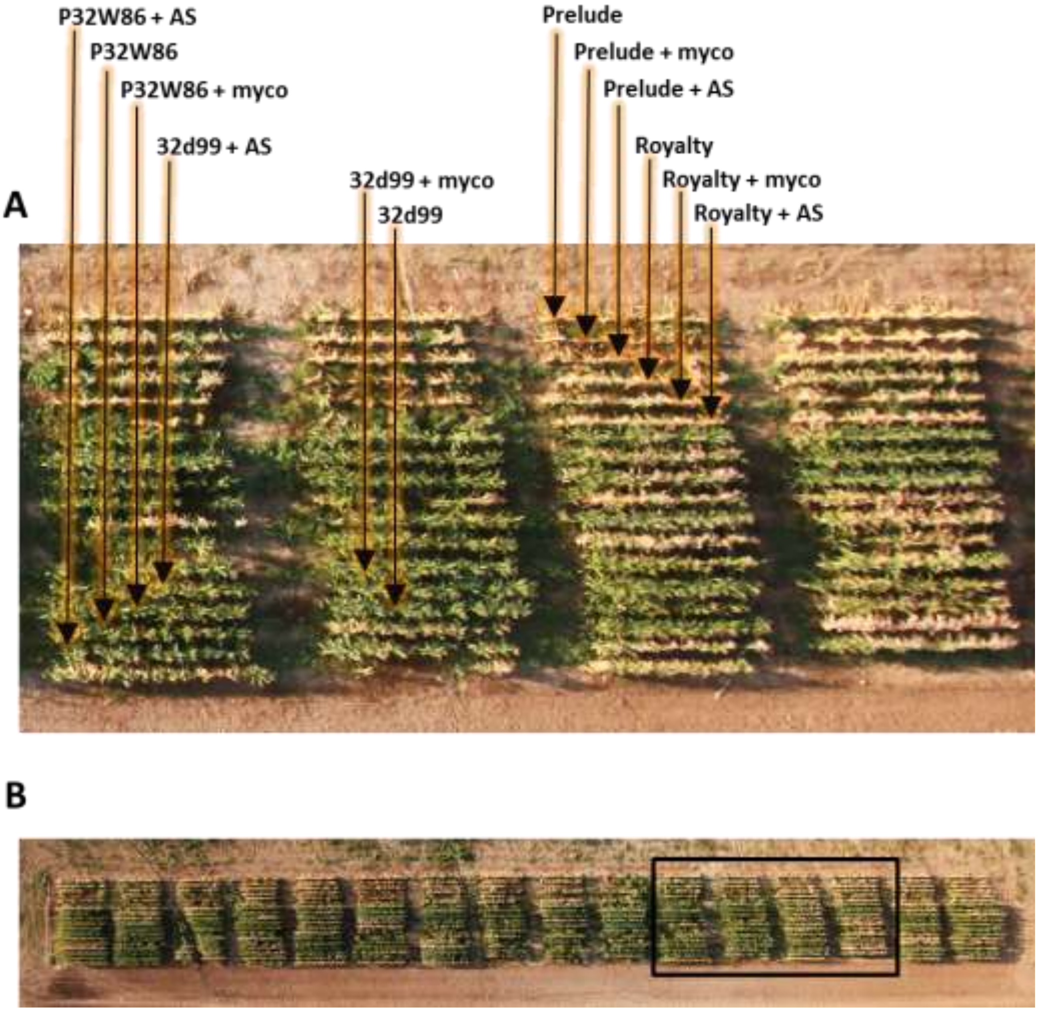


<u>איור 10</u> **– איתור PCR של DNA הפתוגן *H. maydis*, בזני תירס מטופלים, בניסוי שדה, ביום 60 לגידול, בגבעול.** תיאור הניסוי כמפורט באיורים 2,3. צמחי תירס מעוטים בתכשיר Azoxystrobin (AS.) או בפטריית מיקוריזה (Myco.), נדגמו שרירותית, ביום 60 לגידול. הביקורת היא זרעי תירס לא מטופלים (Unt.). הפקת ה-DNA בוצעה מהגבעול באזור המפרק הראשון מעל הקרקע, ל- 3 צמחים מכל זן. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות. קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.

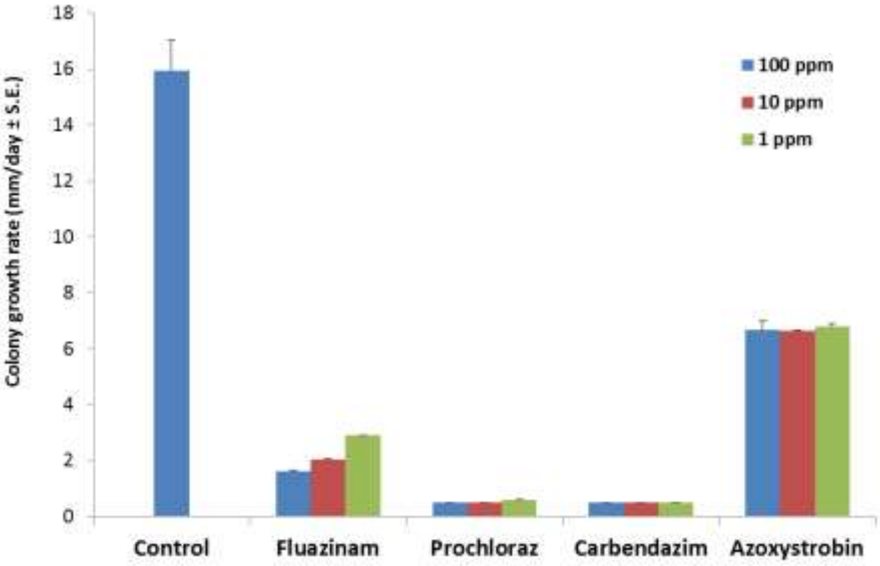


<u>איור 11</u> **– אומדן התייבשויות (ספירה) בזני התירס המתוק בניסוי בשדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת (קיץ 2016).** תיאור הניסוי כמפורט באיורים 2,3. הערכת התייבשות בוצעה ב- 04.08.16, 21 ימים מההפריה

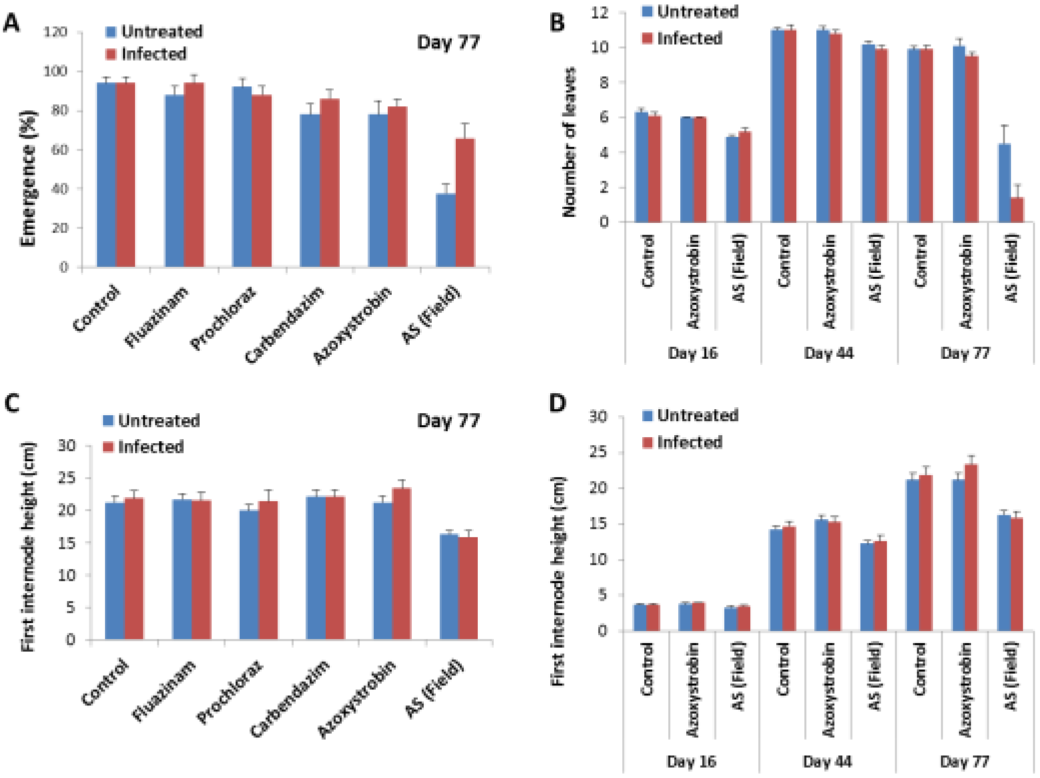
(71 יום מהזריעה), לכל הצמחים בכל טיפול. חזרה היא כל שורת צמחים (באורך 12 מטר) של זן תירס (פרלוד או רויאלטי) המטופל בפטריית מיקורזה או ב- Azoxystrobin או לא מטופל (Untreated). הצמחים הוגדרו כבעלי תסמינים (Symptoms) כאשר סימני התייבשות חלקיים הופיעו בעלה שבחיקו ממוקם הקלח (מתחל), אך העלה נשאר ברובו ירוק. בצמחים שהוגדרו חולים (Diseased) התפשטו התסמינים אל מרבית חלקי עלה המתחל שהיה צהוב ויבש. צמחים בריאים (Healthy) לא הראו תסמינים כלל. הערכים מייצגים ממוצע של שבע חזרות (שורות בניסוי). קווי השגיאה מייצגים שגיאת תקן.



<u>**איור 12**</u> **– תמונת החלקות בניסוי בשדה נגוע במחלת הנבילה המאוחרת (קיץ 2016).** תמונה מהאוויר (צולם ע"י אסף סלומון) של השדה ב- 20.8.2016 (37 ימים מההפריה, 87 יום מהזריעה).

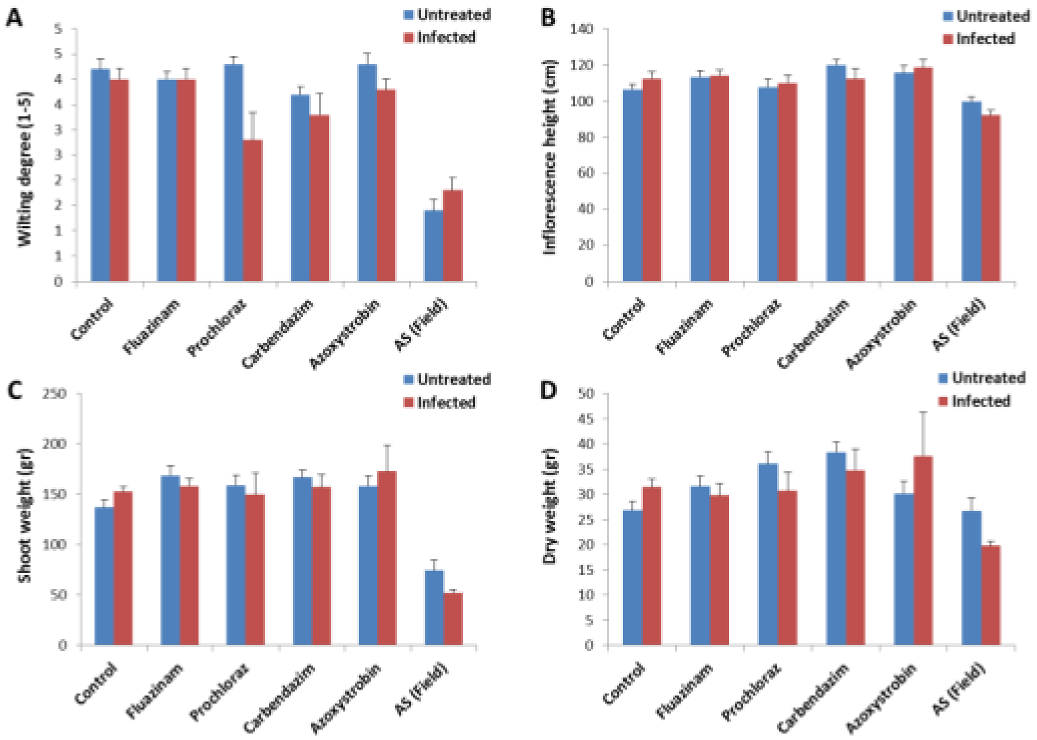


<u>איור 13</u> – השפעת פונגצידים נבחרים על גדילת מושבת הפתוגן. הניסוי כלל 4 פונגיצידים (טבלה 1): עמיסטר (ח.פ. 250g/l Azoxystrobin חברת מכתשים), ספורטק (ח.פ. 450g/l Prochloraz אגרו גדות), אוהיו (ח.פ. 500g/l fluazinam לוקסנבורג), בויסטין (ח.פ. 500g/l Carbendazim אגן). התכשירים יויושמו בריכוז חומר פעיל סופי בצלחת של 1-100 ppm. הביקורת הכילה מצע ללא פונגיציד. כל עמודה היא ממוצע של 3 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.



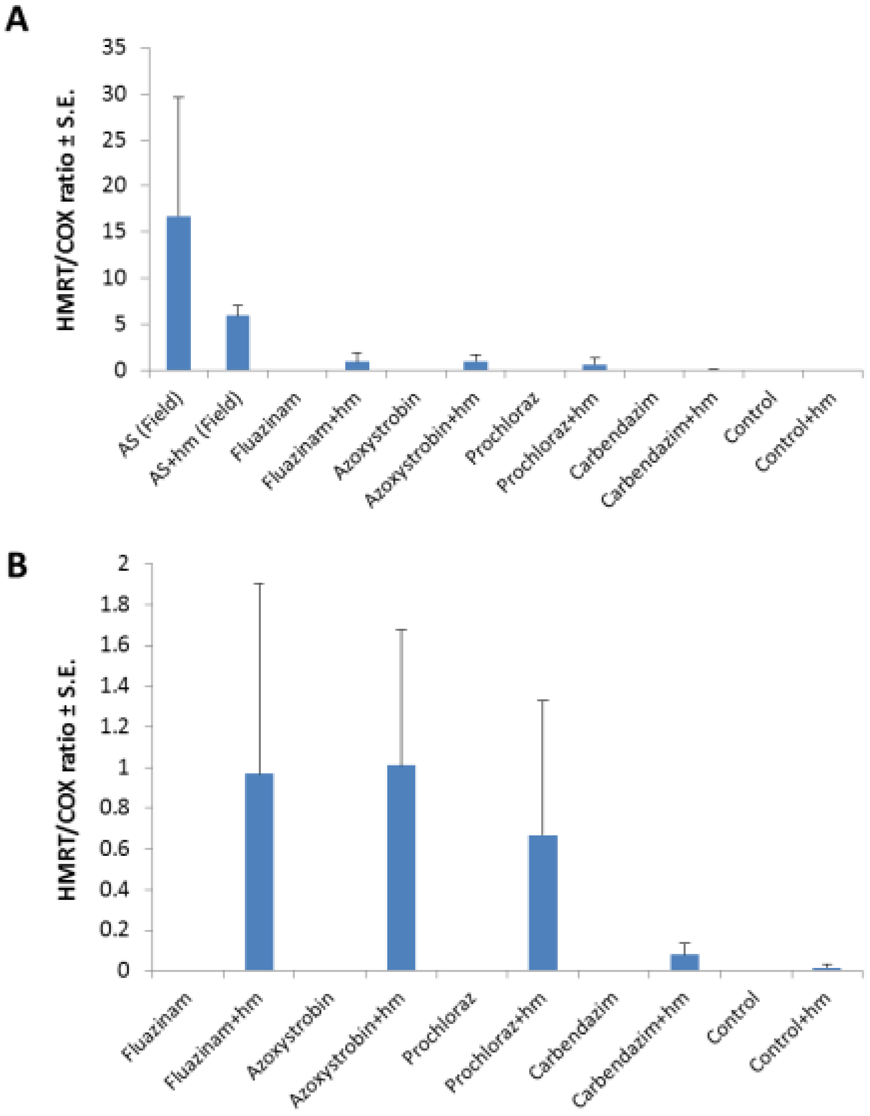
<u>איור 14</u> – ניסוי אבני איתן, אחוז הצצה, מספר עלים וגובה מפרק ראשון. הניסוי התבצע בחווה החקלאית של מו"פ צפון באבני איתן. נבחנו 4 תכשירי הדברה בעיטוי זרעים. הזרעים עוטו בחומר ההדברה על ידי ערבוב הזרעים עד כיסוי מלא, על פי המלצת היצרן. החומרים שנבחנו: עמיסטר (ח.פ. 250g/l Azoxystrobin חברת

מכתשים), ספורטק (ח.פ. Prochloraz 450g/l אגרו גדות), אוהיו (ח.פ. fluazinam 500g/l לוקסנבורג), בויסטין (ח.פ. Carbendazim 500g/l אגן). כמות תכשיר לזרע 0.002 סמ"ק, למעט אוהיו 0.001 סמ"ק לזרע. הזרעים יובשו, ונזרעו יום אחרי העיטוי, בעציצים של 10 ליטר שהכילו אדמה כבדה מאזור אבני איתן ושעורבבה ביחס של 1:2 פרלייט גס מס' 4 לצורך אוורור. בכל עציץ נזרעו 5 זרעים. עם הזריעה מחצית מכל עציצי הטיפול אולחו באמצעות גרעיני חיטה מעוקרים (באוטוקלאב) המאולחים ב- *H. maydis* כמתואר קודם לכן [19], אשר הוטמנו בשכבה העליונה של אדמת העציצים ועורבבו עם הקרקע. בכל עציץ מאולח הוטמנו כ- 25 גרם גרעינים מאולחים. לאחר 8 ימים מזריעה בוצע אילוח נוסף באמצעות דסקיות תפטיר בקוטר 0.5 ס"מ. הניסוי בוצע ב- 20 חזרות לטיפול, 10 חזרות אולחו ואילו 10 שימשו ביקורת שלילית. כביקורת שימשו זרעים לא מעוטים, ביקורת חיובית נוספת שימשו עציצים אשר מולאו באדמת גד"ש שמ"ש שלה היסטוריה רבת שנים של נגיעות במחלה. גם במחצית מעציצי טיפול זה הוספנו מדבק באמצעות גרעינים מאולחים ודסקיות תפטיר. בקרקע זו נזרעו זרעים שעוטו בעמיסטר ((AS (field). דילול הטיפולים לצמח אחד לעציץ נעשה 30 יום מאילוח. העציצים הושקו באמצעות טפטפות בהספק של 1 ליטר שעה כ- 1.5 ליטר בממוצע כל יומיים. דשן ניתן החל משבועיים מזריעה עד פריחה זכרית, 44 ימים מזריעה. מליחות נבדקה לאורך כל תקופת הדישון. ממוצע בנגר של העציצים 0.618 sm/dm. פריחה נקבית, הפריה 2/10/16. **A**. לאחר 7 ימים נבדק אחוז הצצה. פעם בשבוע נערך מעקב ונבדקו: שלב פנולוגי (**B**, מספר העלים), וגובה המפרק ראשון (**C**, מתאר את התוצאה ביום 77 לגידול, **D**, מתאר את התוצאות שנאספו לאורך ימי הגידול בטיפולי ה- Azoxystrobin). ממוצעים מיצגים 10 חזרות, קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.

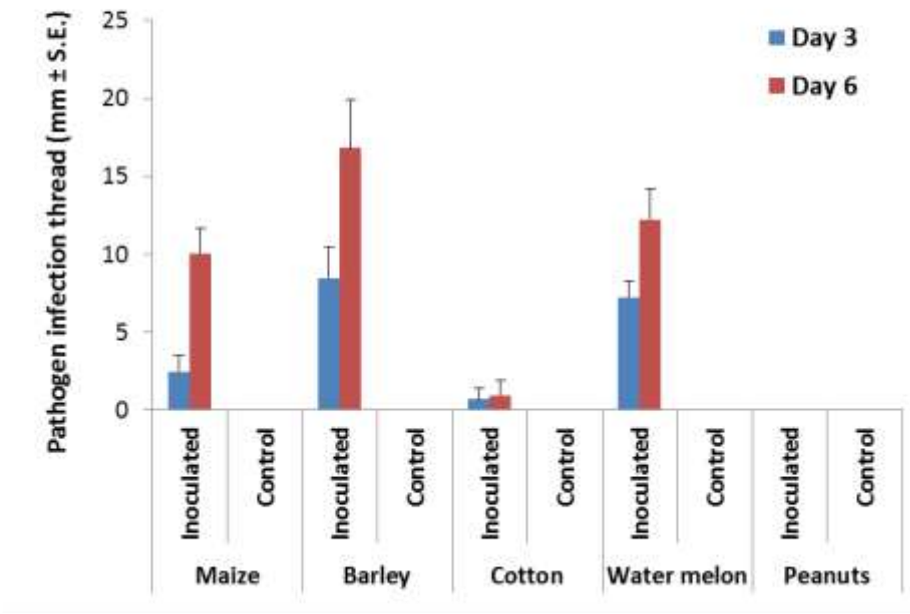


<u>איור 15</u> – ניסוי אבני איתן, הערכת התייבשויות, גובה תפרחת, משקל הנצר ומשקל נצר יבש.

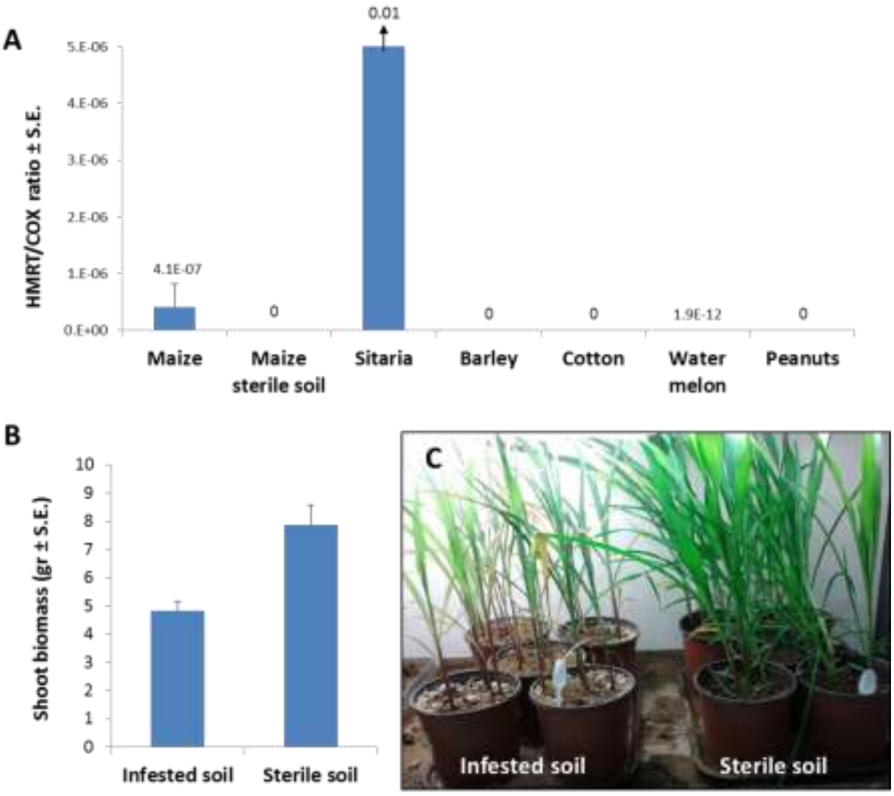
תיאור הניסוי כמפורט באיור 14. הבדיקות בניסוי כללו הערכת התייבשות, מדידת גובה הצמח עד קצה תפרחת, מדידת משקל נצר רטוב ומשקל נצר יבש. הערכת התייבשות התבצעה בסיום הניסוי ב- 25.10.16 (23 ימים לאחר ההפריה, 77 יום מהזריעה), לכל הצמחים בניסוי. מידת ההתייבשות דורגה בסקלה של 1-5, כאשר 1 מציין צמח מיובש ומת ו- 5 צמח בריא ללא סימני התייבשות. Untreated - טיפולי ביקורת ללא אילוח. Infected - טיפולים אשר אולחו ב- *H. maydis*. הממוצעים מיצגים 10 חזרות, קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.



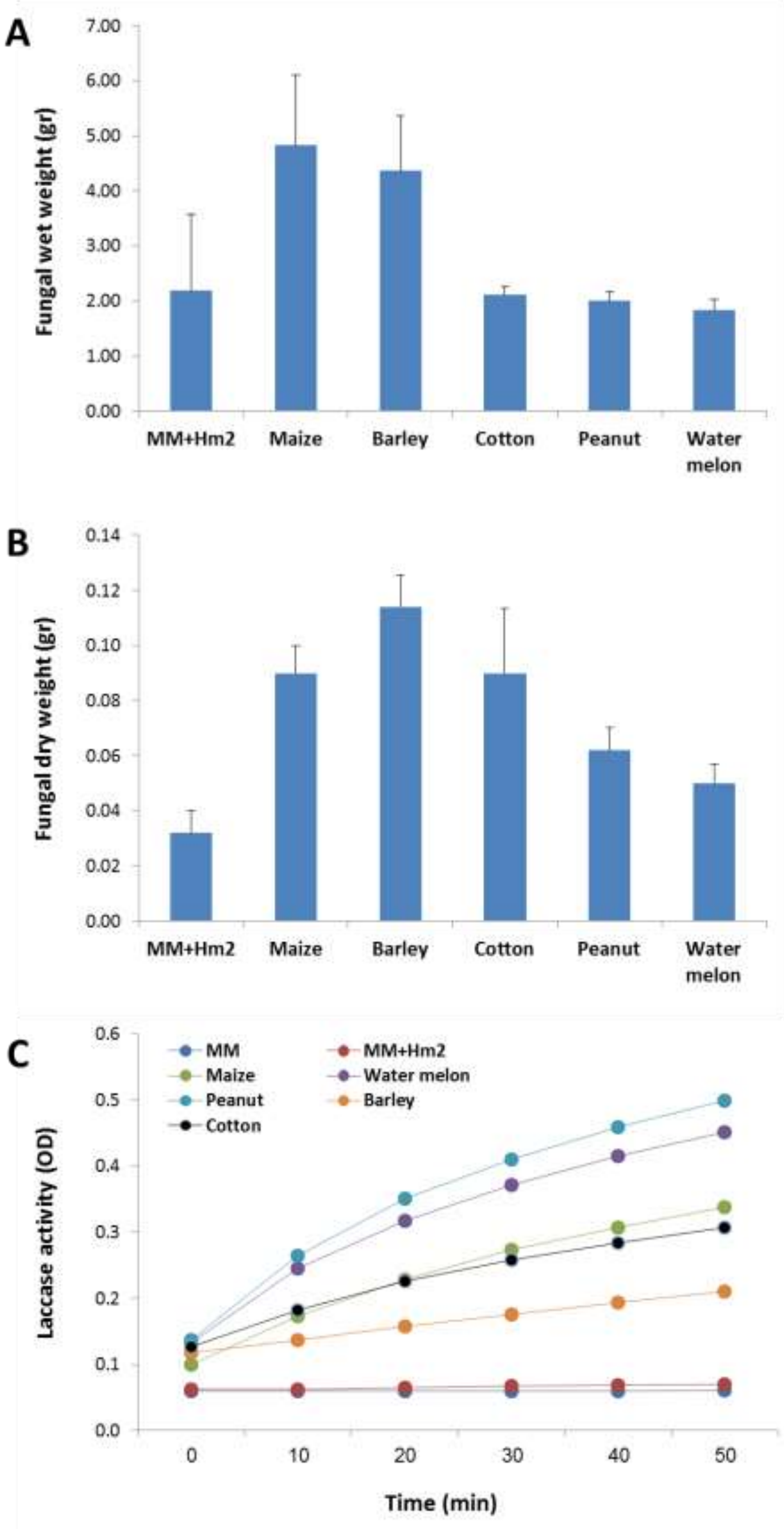
__איור 16__ **– ניסוי אבני איתן, איתור qPCR לנוכחות DNA של הפטרייה *H. maydis* בשורשי הצמחים.** תיאור הניסוי כמפורט באיור 14. qPCR לבדיקת נוכחות גורם המחלה בשורשי הצמחים בוצע בסיום הניסוי ב- 25.10.16 (23 ימים לאחר ההפריה, 77 יום מהזריעה). ממוצעים מיצגים 10 חזרות, קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.



<u>איור 17</u> – מבחן לפתוגניות בשורשים מנותקים לנבטים ממיני צמחים שונים המשמשים כגידולי שדה. שורשים צעירים (באורך של כ- 30 מ"מ) מנבטים של זן התירס פרלוד (הרגיש למחלה), שגודלו בבית צמיחה (ב- 1 ± 27˚C, 38% לחות, במשטר של 16 שעות אור) במשך 20 יום, נותקו והונחו בצלחת פטרי, על גבי נייר ווטמן לח. הנייר הורטב ב- DDW סטריליים. דסקית תפטיר (בקוטר 6 מ"מ) מתרבית של *H. maydis* בת 6 ימים הונחה על גבי הקצה החתוך של השורש. השורשים המאולחים הודגרו ב- 28±1˚C, בחושך למשכי זמן המתוארים באיור. מדידת פס ההדבקה בשורשים המנותקים בוצעה לאחר 3 ו- 6 ימים מהאילוח. כל עמודה היא ממוצע של 5 חזרות. קווי השגיאה מיצגים שגיאת תקן.



<u>איור 18</u> – מבחן לאילוח פונדקאים משניים בעציצים. זריעה בוצעה ב- 22/111/16. עציצים בנפח של 2 ליטר אדמה מולאו באדמת גד"ש שמ"ש הידועה כנגועה בהרפופורה ולה הוסף פרלייט גס מספר 4 ביחס של 1:2. האדמה נלקחה ממספר מקומות בשדה, מעומק של עד 15 ס"מ. לביקורת שימשה אדמה שעברה עיקור באוטוקלב 120°C למשך 20 דקות, ולאחר יומיים עיקור נוסף בתנאים דומים. בכל עציץ נזרעו לפחות 5 זרעים, בעציצים עם סיתריה ושעורה נזרעו 20 זרעים לעציץ בעומק מתאים על פי הזרע, כל גידול בוצע ב- 5 חזרות (עציצים). הצמחים הושקו בהשקית רוויה עד הצצה. לאחר הצצה התבצעה פעם ביומיים השקיה בנפח 100 מ"ל לעציץ. הגידול בוצע בחדר גידול, בטמפרטורה ממוצעת 26°C, בתנאי תאורה של 16 שעות אור ו- 8 שעות חושך. פעם בשבוע ניבדק מצב הצמחים. לאחר 37 יום, בתום הניסוי (29/12/16), נערך qPCR לבדיקת נוכחות גורם המחלה בשורשי הצמחים (A) ונבדק משקל הנצר (B, מוצגות התוצאות לגבי תירס בלבד). (C) תמונת הטיפולים בצמחי התירס בתום הניסוי. ערכים מיצגים ממוצע של 5 חזרות, קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן.



<u>איור 19</u> – גידול הפטרייה *H. maydis* והפרשת לקאז חוץ תאי בנוכחות שורשים של מיני גידולי שדה שונים. כל קבוצת טיפול כללה 5 בקבוקי ארלנמייר ובהם 50 מ"ל מצע מינימלי. לכל בקבוק ארלנמייר הוספו 750 מ"ג שורש גרוס (בחנקן נוזלי) מאחד מגידולי השדה המתוארים באיור. למחצית מהטיפולים הוספו 5 דסקיות

תפטיר (בקוטר 6 מ"מ) של תבדיד הפטרייה *Hm2* שנלקחו משולי משובה בת 5 ימים. הניסוי הבקבוקים הודגרו ב- 28 °C, בחושך. (A) לאחר שבוע סונן התפטיר באמצעות נייר ווטמן ונבדק משקל רטוב. (B) משקל יבש נבדק לאחר 4 ימי ייבוש בטמפ' החדר. הנוזל מכל טיפול סונן בפילטר 0.2 מיקרון ומתוך התסנין נלקחו 237.5 µl למגש 96 באריות. לכל בארית הוסף 12.5 µl ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) מומס בבופר ציטראט 0.1M PH=5, בריכוז 50 mM. (C) הצפיפות האופטית (OD) נבדקה באורך גל של 450 nm באמצעות מונוכרומטור Infinite m200 pro, במרווחים של 10 דקות עד שעה לאחר הוספת ה- ABTS .

שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדוח בהתאם לתכנית העבודה

1) פיתוח פורמולות יעילות לעיטוי זרעים כנגד הגורם למחלת הנבילה המאוחרת בתירס. 2) איתור פונדקאים משניים של הפטרייה *H. maydis*. 3) פיתוח שיטה מבוססת על Real time PCR ויישומה לאפיון הפתוגנזה ובחינת פריימרים נוספים. 4) בחינת טיפולים מונעים לצמחים נגועים בשלבי ההתפתחות הראשונית של הצמח.

עיקרי התוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדוח, בהתאם למטרות

בשנה זו הושגה התקדמות משמעותית בכל היעדים: 1) שיפור ופיתוח שיטה מולקולארית לאיתור הפתוגן. השיטה המבוססת qPCR, שפותחה בשנה הראשונה, הוטמעה ויושמה ואפשרה רגישות והבחנה כמותית בין הטיפולים. 2) הגנה על זרעים ומניעה. בניסוי לבחינת 4 תכשירי הדברה כימיים שיושמו בעיטוי זרעים, בעציצים, גרם Carbendazim (בויסטין), לירידה בכמות DNA הפטרייה ברקמות הצמחים ואילו Prochloraz (ספורטק) הביא לשיפור במשקל הממוצע לקלח. עיטוי זרעים בתכשיר ההדברה Azoxystrobin (עמיסטר) לא מנע את נזקי המחלה בעציצים אולם הראה יעילות בניסוי השדה, בהפחתת ה- DNA של הפתוגן בצמחים, בדומה לעיטוי בפטריית מיקוריזה. נראה כי בטיפול משולב עם יישום חומר ההדברה בהגמעה, העיטוי הכימי עשוי לתת שכבת הגנה נוספת לצמחים. 3) לימוד הגורמים המאפשרים שרידות הפתוגן. במבחן בשורשים מנותקים חדר הפתוגן לשורשי שעורה, אבטיח וכותנה. בניסוי בעציצים אותר DNA של הפתוגן ברקמות של תירס, סטריה (דגן מספוא), ואבטיח. עוד מצאנו ששורשי שעורה מעודדים את גדילת הפטרייה במצע נוזלי. השורשים של גידולי שדה שונים השרו הפרשת לקאז חוץ תאי על ידי הפטרייה, ומהם השפעת שורשי כותנה ובוטנים הייתה הרבה ביותר בהיבט זה.

המסקנות המדעיות וההשלכות על יישום המחקר

יישום שיטת האיתור המולקולארית, מבוססת ה- qPCR, לאיתור הפתוגן ברקמות צמחיות משנה מהותית את יכולת המחקר ומאפשרת לנו כיום איתור עקבי ורגיש של הפתוגן גם כאשר כמות ה- DNA שלו מזערית (למשל לאחר 20 ימים מהאילוח). יתרה מכך, רגישות השיטה מאפשרת לנו להשתמש בה היום כאמצעי לאבחון אדמות החשודות כנגועות. ניתן לעשות זאת באמצעות בוחן ביולוגי (bio-assay) - גידול צמחי תירס בעציצים, בקרקע החשודה כנגועה ואיתור DNA של הפתוגן ברקמות הצמחים כבר לאחר שלושה שבועות מהזריעה. בדרך זו משמש הצמח כאמצעי לבידוד והעשרת הפתוגן מהקרקע. הערכת מידת האילוח בקרקע הינה אמצעי חשוב לקבלת החלטות על ידי המגדלים בנוגע לבחירת החלקות והזנים לגידול. יש זני תירס בעלי רגישות מופחתת (דוגמת הזן רויאלטי) שניתן לזרוע בחלקות עם היסטוריה של המחלה אך רצוי לא בחלקות בהן היה אילוח כבד והתמוטטות גם של זנים בעלי רגישות מופחתת. בנוסף, הגילוי המוקדם של המחלה, בזכות שיטת ה- qPCR, מאפשר איתור גורם המחלה בזרעים נגועים, אמצעי חשוב למניעת הכנסת חומר ריבוי נגוע ממדינות החשודות כנגועות במחלת הנבילה המאוחרת. עיטוי זרעים בתכשיר Azoxystrobin לא מנע את הידבקות הצמחים במחלה, ועל רקע של אילוח כבד בקרקע לא סיפק הגנה לצמחים הרגישים כנגד המחלה. יתכן ושיטת עיטוי הזרעים לא מאפשרת שמירת ריכוז מספק של הפונגיציד בתוך הצמח להגנתו בשלבי הגידול הראשונים בשדה. סביר להניח שעם גדילת הצמח נמהל החומר לריכוז נמוך, מתחת לריכוז הנדרש לעיכוב הנדרש של המחלה. יתכן גם שהריכוז האפקטיבי של התכשיר מושפע מספיחתו לקרקע ומפריצת שורשים החדשים מהשכבה המטופלת, שאינם מוגנים. היתרון בעיטוי הזרעים במיקוריזה הוא שפטרייה זו מתפתחת יחד עם התפתחות הצמח. עיטוי כזה עשוי להיות יעיל להתפתחותו של הצמח בתנאי מחסור בזרחן, אבל יעילותו במקרה של אילוח כבד במחלת הנבילה המאוחרת מוגבלת. הודות לשיטת ה- qPCR הושג שיפור ניכר ביכולת המעקב אחר התפתחות הפטרייה בתוך רקמות הצמח. התוצאות מלמדות כי בקרקעות

שבהן יש אילוח כבד בגורם המחלה, מצליח הפתוגן לחדור לשורשי צמחים, ללא קשר לחוסן שהם מגלים בפני מחלת הנבילה המאוחרת. ההבדל כנראה בין הצמחים הרגישים לאילו שרגישותם פחותה היא במידת התפתחות והתפשטות המחלה בתוך צינורות ההובלה, ומידת סתימתם ובכך מידת פגיעתם בצמח. עדות להשערה זו היא ההעלמות הכמעט מוחלטת של DNA הפתוגן בגבעולי הצמחים העמידים רויאלטי ו- 32d99. הבדיקה הכמותית של ה- DNA של הפתוגן, במכשיר qPCR, מאפשרת הבחנה טובה בין הצמחים העמידים לרגישים. ניסוי האילוח בעציצים עם קרקע מאבני איתן, לא הניב כמות מדבק זהה לרמת האילוח של הקרקע שנלקחה מהשדה הנגוע מגד"ש שמ"ש. סביר שהאילוח בתבדיד אחד אינו משתווה לקרקע נגועה העשויה להכיל תערובת של כמה קווי פטרייה בעלי אלימות שונה, כפי שדווח במצריים. יתכן גם שלתכונות הקרקע השפעה על תפוצת הפתוגן, חיוניותו וחומרת המחלה. משתנים אלו מחזקים את הצורך בעריכת סקר למיפוי האוכלוסייה של הפתוגן בארץ. תוצאות הערכת ההתייבשות, משקל היבול, ואיתור ה- DNA (מבוסס ה- qPCR) שנאספו בניסוי אבני איתן, אינן מאפשרות להצביע באופן חד משמעי על תכשיר מומלץ כנגד המחלה. יחד עם זאת Carbendazim (שם מסחרי בויסטין), הוריד את כמות DNA הפטרייה ברקמות הצמחים ואילו Prochloraz (שם מסחרי ספורטק) גרם לשיפור במשקל הממוצע לקלח. העיטוי של הזרעים בתכשיר ההדברה Azoxystrobin (שם מסחרי עמיסטר) לא מנע את נזקי המחלה בעציצים עם אדמת גד"ש שמ"ש ובעציצים עם אדמת אבני איתן מאולחת. יחד עם זאת, כאמור מעלה, העיטוי ב- Azoxystrobin היה יעיל בניסוי השדה, בהפחתת ה- DNA של הפתוגן בצמחים, ונראה כי בטיפול משולב עם יישום חומר ההדברה בהגמעה, הוא עשוי לתת שכבת הגנה נוספת לצמחים. בכוונתנו לבחון את התכשירים האחרים שהראו יעילות מסוימת ביישום בעיטוי כנגד הפתוגן, Carbendazim ו- Prochloraz, יחד עם תכשירים נוספים, בניסוי שדה בקיץ הקרוב (2017). למרות מאמץ דו-שנתי לבחון את נוכחות הפתוגן *H. maydis* ברקמות צמחים שאינם תירס ועשויים לשמש כפונדקאים משניים המאפשרים את שרידות הפתוגן, העדויות שהצטברו מועטות ונקודתיות (הפתוגן אותר רק בצמחים בודדים מתוך עשרות שנבדקו). יחד עם זאת ניתן לומר שהעדויות מרמזות על יכולת הפתוגן להתבסס ברקמות מיני צמחים דוגמת כותנה, שעורה, סטריה ואבטיח.

הבעיות שנותרו לפתרון ויעדים לשנת המחקר השנייה (בהתאם למטרות בתכנית העבודה)

1) בהמשך להצלחות שהושגו בשנת המחקר השנייה, יש לבחון בשנת המחקר השלישית, בשדה, יישום תכשירי הדברה נוספים שאותרו כבעלי פוטנציאל מעשי כנגד המחלה, תוך שילוב שיטת ה- qPCR לאיתור DNA של הפתוגן. 2) איתור הפתוגן בפונדקאים משניים, אינו פשוט עקב תקופת הזמן המוגבלת בה הוא מתבסס בהם (בכותנה למשל רק בנבטים) וכמות ה- DNA המעטה של הפטרייה ברקמות הצמח. בסריקה של שורת מיני גידולי שדה הנפוצים בעמק החולה וגם צמחי בר הגדלים בשדות חקלאיים באזור, אותר DNA של הפתוגן רק בדוגמת כותנה אחת מתוך עשרות דוגמאות צמחים שנאספו בשדות. בניסוי עציצים בחממה בתנאים מבוקרים, אותר DNA של הפתוגן *H. maydis* ברקמות השורש של סטריה ובכמויות מזעריות באבטיח. בנוסף ניסינו לבחון שיטות מעבדה לסריקת פונדקאים משניים פוטנציאלים על מנת לצמצם את רשימת האפשרויות . שיטות אלו כללו: מבחן לפתוגניות בשורשים מנותקים, גידול הפטרייה על רסק שורשים של צמחים ממינים שונים במצע נוזלי והפרשת לקאז חוץ תאי על ידי הפטרייה בתגובה לשורשי מינים שונים. בשנה השלישית נמקד את המחקר במספר מינים מצומצם שבהם אותרו סימנים להתבססות הפתוגן – כותנה, סטריה ושעורה ונבצע ניסוי מבוקר בעציצים ודיגום ובחינת מינים אלו משדות נגועים. 3) בנוסף לבחינת היעילות של עיטויי זרעים בתכשירי הדברה נוספים, בשנה השלישית נמקד את המחקר בניסויי שדה וחממה שיבחנו טיפול משולב כנגד המחלה – יישום תכשירי הדברה נבחרים בהגמעה, תוך ניסיון לבחון את היעילות של שלוחה לשורה כנגד שלוחה לשתי שורות, ובשילוב עיטוי זרעים שעשוי להעניק שכבת הגנה נוספת.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר

העבודה הוצגה בכינוס:

2016 – Israel Molecular Mycology Meeting (MMM), Israel.

היא תוצג בחודשיים הקרובים בשני כנסים נוספים:

2017 - Israel Phytopathology Society (IPS), Israel.

2017 - Tel-Hay Research Conference, Israel.

בקרוב נתחיל בכתיבת המאמרים שמתבססים על העבודה.

פרסום הדוח

ניתן לפרסם את הדו"ח **ללא הנספח**.

את חלק הנספח אנו מבקשים לא לפרסם על מנת שנוכל לצאת בפרסום מדעי מסודר.

האם בכוונתך להגיש תכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי ? כן