

132-0922-98

קוד מחקר:

נושא: השריית עמידות בדלועים נגד פוזריום על ידי פטריה בלתי פתוגנית ובידוד מוטנטים בלתי אלימים של פטריות נוספות

מוסד: מינהל המחקר החקלאי

ד"ר סטנלי פרימן

חוקר ראשי:

1

חוקרים שותפים:

1996-1998

תקופת מחקר:

מאמרים:

תקציר

פטריות פוזריום הנבילה *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ו-*F. o. niveum* גורמות נזקים רבים לצמחי מלון ואבטיח, בהתאמה. חיטוי הקרקע ומצעי הגידול נגד פוזריום השוכן בקרקע מסתמך בעיקר על חומרים כימיים, אולם הנטיה הרווחת כיום היא לצמצם את השימוש בכימיקלים כגון מתיל ברומיד. תכנית זו המציעה לבחון ולפתח שיטה להדברה ביולוגית של מחלות פוזריום בדלועיים באמצעות מוטנט אנדופיטי בלתי-פתוגני שמוצאו מהפטריה *Colletotrichum magna*, ולבודד מוטנטים בלתי פתוגניים מהסוג *Fusarium*, שאמורים להשרות במלונים עמידות למחלות. מטרת המחקר: נבחן היעילות של טיפול מוקדם במוטנט של *Colletotrichum* (תבדיד PATH-1) להגנת צמחי מלון ואבטיח מפני פטריות הפוזריום. לבודד מוטנטים בלתי פתוגניים של *F. o. melonis* לאחר מוטגנזה ע"מ "ליצור" מדבירים ביולוגיים שישירו עמידות בצמחים.

שיטות העבודה: שתילים הונבטו והושרו בתמיסת נבגים של המוטנט ולאחר מכן נבדקה מידת האיכלוס של המוטנטים בזנים השונים. כמו כן, לאחר איכלוס במוטנט הודבקו הצמחים ע"י טיפוס הבר כדי לבחון את שיעור הפחתת מחלה. בודדו מוטנטים בלתי פתוגניים של *F. o. melonis* לאחר מוטגנזה ע"י קרינת UV, ע"מ "ליצור" מדבירים ביולוגיים חדשים.

תוצאות: שתילים מהזן עין דור שהושרו למשך 7-1 ימים בריכוזים של 2×10^6 נבגים/מ"ל של המוטנט (PATH-1), נהנו מהגנה בפני פוזריום פתוגני בריכוז של 10^5 עד 5×10^5 נבגים/מ"ל. נמצא שהמוטנט (PATH-1) מאכלס באופן שונה זנים מסוימים. זני מלונים עין דור, חמד ו-84 מתאכלסים בעיקר באיזור צואר השורש וקיים איכלוס בשיעור נמוך בחלקים העליונים של שתילים מזנים אלה. לעומתם, הזנים האון (מלון) ומללי (אבטיח) מתאכלסים בשיעורים גבוהים יותר מהזנים הקודמים, בחלקים העליונים כולל הפסיגים. מבין 300 המוטנטים הבלתי פתוגניים האפשריים נמצאו 2 תבדידים (תבדיד 15/15 ותבדיד 4/4) שלא גרמו לאף סימפטום ומחלה בזן חמד. תבדיד 15/15 גרם לתמותת הזן עין דור לעומת 4/4 שלא הראה שום סימני פגיעה בצמחים. תבדיד 4/4 איכלס והפחית תמותת שתילי אבטיח לאחר הדבקה בטיפוס הבר.

מסקנות: לאור התוצאות צריך להמשיך בניסויים בזנים נוספים (בעיקר אלה שמתאכלסים היטב כגון, מללי והאון). ניתן להפחית תמותת בזנים נוספים וקיים קשר בין רמת האיכלוס לשיעור התמותה. צריך לבחון את כושר האיכלוס והפחתת המחלה של התבדיד 4/4 הבלתי פתוגני של פוזריום, בזנים שונים.

דווח מסכם לתכנית מחקר 98-0922-132 לשנת 1998

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

הנושא: השריית עמידות בדלועיים נגד פוזריום על ידי פטריה בלתי
פתוגנית ובידוד מוטנטים בלתי אלימים של פטריות אחרות

**Induced resistance of cucurbits to to *Fusarium* by non-pathogenic
mutant fungi and isolation of other mutants**

שם החוקר: דר' סטנלי פרימן איידה צויבל וחיים ויינטל, המח'
מחלות צמחים, מכון וולקני, בית דגן.

Stanley Freeman, Aida Zveibel and Chaim Weintal,
Dept. of Plant Pathology, ARO, Volcani Center, Bet
Dagan

דואר אלקטרוני: FREEMAN@NETVISION.NET.IL

טל: 9683537

א. נושא המחקר:

השריית עמידות בדלועיים נגד פוזריום על ידי פטריה בלתי פתוגנית
ובידוד מוטנטים בלתי אלימים של פטריות אחרות

ב. מבוא ומטרות המחקר:

החיפוש אחר אמצעים חלופיים לחומרי הדברה למניעת מחלות צמחים
הינו אחת המטרות העיקריות של המחקר החקלאי הנוכחי. השימוש הנרחב בחומרי
הדברה סינטטיים גרם לפיתוח עמידות של גורמי מחלות נגדם ולדאגה מפני
תופעות סביבתיות שליליות לאורגניזמים מועילים. בתוכנית מחקר זו אנו מציעים
להשתמש במוטנטים בלתי פתוגנים שמקורם מתבדידים אלימים של
Colletotrichum ופוזריום, ובגזעים מסוימים של פוזריום להדברת פוזריום במלון
ואבטיח. מוטנטים בלתי פתוגניים של פוזריום, שמקורם מתבדידים פתוגניים,
צפויים לאכלס רקמות צמחיות ולהגן מפני גורם פתוגני.

פטריות פוזריום הנבילה *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ו- *F. o.*
niveum גורמות נזקים רבים לצמחי מלון ואבטיח, בהתאמה. באמצעות טיפוח
מיוצרים זני דלועיים נושאי גנים שונים לעמידות נגד פוזריום, אולם קיימים בארץ
גזעי פוזריום אלימים המסוגלים להתגבר על גנים אלה ולתקוף את כל הזנים
הקיימים. חיטוי הקרקע ומצעי הגידול נגד פוזריום השוכן בקרקע מסתמך בעיקר
על חומרים כימיים, אולם הנטיה הרווחת כיום היא לצמצם את השימוש
בכימיקלים כגון מתיל ברומיד. תכנית זו הציעה לבחון ולפתח שיטה להדברה
ביולוגית של מחלות פוזריום בדלועיים באמצעות מוטנט אנדופיטי בלתי-פתוגני
שמוצאו מהפטריה *Colletotrichum magna*. כמוכן, בודדו מוטנטים בלתי פתוגניים
מהסוג *Fusarium*, שאמורים להשרות במלונים עמידות למחלות. במחקר הקדמי
נמצא שהמוטנט של *Colletotrichum* (שאושר לשימוש בשלב זה למטרות מחקר על
ידי השירות להגנת הצומח ולבקורת) איכלס רקמות צמחי אבטיח צעירים מבלי
לגרום לסימני נזק חיצוניים כלשהם והיקנה להם "חיסון" או "תנגודת" נגד פוזריום
ופטריות פתוגניות נוספות.

מטרות המחקר:

(1) במחקר המוצע נבחן היעילות של טיפול מוקדם במוטנט של *Colletotrichum*
(תבדיד PATH-1) להגנת צמחי מלון ואבטיח מפני פטריות הפוזריום.

2) לבדוד מוטנטים בלתי פתוגניים של *F. o. melonis* לאחר מוטגנזה ע"י UV, כימיקלים, ושיטות מולקולריות, ע"מ "ליצור" מדבירים ביולוגיים שישרו עמידות בצמחים, בדומה למוטנט PATH-1.

ג. פירוט הניסויים שבוצעו ותוצאות שהתקבלו:

1. הדברת פחריום 1/2 במלון ע"י המוטנט *C. magna*

קיימים בארץ ארבעה גזעים פיזיולוגיים של פחריום התוקף מלונים כשלגזע 1/2 לא נמצא עדיין קוים עמידים. נבדקה פעילות המוטנט (PATH-1) להדברת גזע 1/2 (FUS 1,2) זנים חמד (רגיש למחצה) ועין דור (רגיש). שתילים הושרו למשך 1-7 ימים בריכוזים של 2×10^6 נבגים/מ"ל של המוטנט (PATH-1), ואח"כ נחשפו ע"י טבילת השורשים בתרחיף נבגי פחריום פתוגני בריכוזים שונים מ- 10^5 עד 10^7 נבגים/מ"ל ונשתלו במצע ורמיקוליט/כבול. נבגי PATH-1 נשטפו שלושה פעמים לפני מתן הטיפול או לא נשטפו כלל. נמצא שהמצע המלווה את הנבגים פוגע במישרין בשורשי השתילים, ולכן חובה לשטופם משאריות מצע לפני כל ניסוי. בריכוז של 10^5 עד 5×10^5 של נבגי פחריום/מ"ל, נמצא הגנה בזן עין דור. שיעור קטילת השתילים בביקורת פחריום לבד היה 46% לעומת 24% בטיפול מוקדם ב- נבגי PATH-1 לפני האילוח בפחרים.

2. בדיקת איכלוס זנים ע"י המוטנט *C. magna*

שתילים מזנים שונים הושרו למשך 10-1 ימים בריכוזים של 2×10^6 נבגים/מ"ל של המוטנט (PATH-1), ואח"כ חלקי השתיל חוטא ונזרע ע"ג מצע לבחון את רמת איכלוסם במוטנט. בטבלה מס' 1:

טבלה מס' 1: בדיקת איכלוס זנים ע"י המוטנט *C. magna*

תקופת ההשרייה					זן
אחוז חלקי הצמח					המאוכלס
ימים	ש	צ.ש.	א.	ע.	
					פ.
2	-	52	14	0	עין דור (מלון)
4	-	89	44	0	
7	-	100	38	0	
10	-	100	25	0	
2	-	60	0	0	חמד (מלון)
4	-	67	0	0	
7	-	73	0	0	
10	-	53	0	0	
2	-	74	20	0	84 (מלון)
4	-	73	13	6	
7	-	60	13	0	
10	-	90	0	0	
2	15	100	100	73	האון (מלון)
5	27	100	100	100	
7	71	100	100	92	85
2	80	100	100	100	אבטיח (מללי)
5	92	100	100	100	
7	87	100	100	100	70

ש. = שורש; צ.ש. = צואר שורש; א. = גבעול אמצעי; ע. = גבעול עליון; פ. = פסיגים.

נמצא שזנים מסוימים מאכלסים באופן שונה את המוטנט (PATH-1).
זני מלונים עין דור, חמד ו-84 מאכלסים בעיקר באיזור צואר השורש וקיים איכלוס בשיעור נמוך בחלקים העליונים של שתילים מזנים אלה. לעומתם, הזנים האון (מלון) ומללי (אבטיח) מתאכלסים שיעורים גבוהים יותר מהזנים הקודמים. בהאון ומללי, החלקים העליונים כולל הפסיגים מאוכלסים שיעור גבוה מאד.

3. יצירת מוטנטים בלתי פתוגניים של פוזריום מלון בשיטת UV

לאחר קרינת UV שקוטלת כ- 99.99% של האוכלוסיה נשרדו ונבדקו 300 תבדידי פוזריום מלון גזע 1/2 לפתוגניות. מבין 300 המוטנטים הבלתי פתוגניים האפשריים נמצאו 2 תבדידים (תבדיד 15/15 ותבדיד 4/4) שלא גרמו לאף סימפטום ומחלה בזן חמד. תבדיד 15/15 גרם לתמותת הזן עין דור לעומת 4/4 שלא הראה שום סימני פגיעה בצמחים.

כמוכן, הוחל ביצירת מוטנטים בלתי פתוגניים של המין *F. o. niveum* בכדי ליצור אוסף תבדידים בלתי פתוגניים כדי לבחון את יעילותם כמדבירים ביולוגים של פוזריום של אבטיח. צעדה חשוב מפני שלא קיים זן מסחרי עמיד לגזע 1,2.

4. בדיקת איכלוס זני אבטיח ע"י מוטנט בלתי פתוגני 4/4 של *F. o. melonis*

המוטנט בלתי פתוגני 4/4 של *F. o. melonis* איכלס זנים שונים של אבטיח ברמות שונות כשצמחים נשתלו בורמיקוליט כבול מאולח במוטנט או בטבילה ממושכת במצע נוזלי (טבלה 2). התקופה האופטימאלית לאיכלוס התרחש לאחר טבילה ממושכת של 96 שעות.

Table 2. Percent colonization of watermelon seedlings (cv. Odem and Malali) by isolate 4/4, mutant of *F. o. melonis* and wildtype *F. o. niveum*, (FON) race 2.

Treatment	Isolate	Hours in continuous dip ¹						
		24	48	72	96	120	144	216
Whole plants dipped								
Malali	FON	68	58	73	100	100	100	100
Malali	4/4	0	55	28	20	20	38	35
Odem	FON	72	66	76	82	100	100	100
Odem	4/4	22	12	16	36	36	22	22
Whole plants in soil								
Odem	FON	72	82	90	93	100	100	100
Odem	4/4	0	0	14	18	2	2	-

¹ Plants were dipped continuously in suspensions of 5×10^6 conidia/ml.

5. הפחתת מחלת פחיריום בתבדיד מלון ע"י תבדיד בלתי פתוגני 4/4 של

F. o. melonis

בטיפול הגנה הדדית, בצמחי מלונים לא נמצאו הבדלים מובהקים בין צמחים מאוכלסים ב-4/4 ומודבקים בפתוגן של פחיריום מלון מאשר פחיריום מלון לחוד. למרות זה, תבדיד 4/4 שמקורו ממלון הפחית תמותת שתילים של אבטיח (זנים מללי ואודס) לאחר הדבקה בתבדיד הבר של פחיריום מלון (טבלה 3). היתה התאמה בין אחוז האיכלוס של 4/4 לבין אחוז ההגנה נגד טיפוס הבר, FON. כמוכן, אחוז האיכלוס היה מירבי לאחר 4 ימי טבילה עם תמותה בטיפול הגנה של 55% לעומת 92% בביקורת. לאחר 7 ימי טבילה אחוז התמותה היתה 68 ו-92, בהתאמה (טבלה 3).

Table 3. Protection of watermelon seedlings (cv. Odem) by nonpathogenic isolate 4/4 of *F. o. melonis* (1.5×10^6 conidia/ml)

Treatment	Plant Mortality (%)		
	Exp #1	Exp #2	Exp #3
Water	0	0	0
Isolate 4/4	0	0	0
wt FON ¹ (Inoculated after 4 days)	100	76	100
wt FON ¹ (Inoculated after 7 days)		88	96
Isolate 4/4 (4 days) + wt FON	43	47	45
Isolate 4/4 (7 days) + wt FON		60	76

¹FON = Wildtype isolate of *F. o. niveum*, race 2.

ד. מסקנות והשלכות לעתיד:

שתילים מהזן עין דור שהושרו למשך 1-7 ימים בריכוזים של 2×10^6 נבגים/מ"ל של המוטנט (PATH-1), נהנו מהגנה בפני פחיריום פתוגני בריכוז של 10^5 עד 5×10^5 נבגים/מ"ל. לאור התוצאות צריך להמשיך בניסויים בזנים נוספים (בעיקר אלה שמתאכלסים היטב כגון, מללי והאון). צריך לנסות לחכות את צורת השתילה המסחרית כגון חישתיל, ולערבב נבגי המוטנט במצע הגידול. נמצא שהמוטנט (PATH-1) מאכלס באופן שונה זנים מסוימים. זני מלונים עין דור, חמד ו-84 מתאכלסים בעיקר באיזור צואר השורש וקיים איכלוס בשיעור נמוך בחלקים העליונים של שתילים מזנים אלה. לעומתם, הזנים האון (מלון)

ומללי (אבטיח) מתאכלסים שיעורים גבוהים יותר מהזנים הקודמים. בהאון ומללי, החלקים העליונים כולל הפטיגים מאוכלסים שיעור גבוה מאד.

לאחר קרינת UV בפטריית פוזריום פתוגני נמצא מוטנט בלתי פתוגני (תבדיד

4/4) שלא הראה שום סימני פגיעה בצמחים. תבדיד 4/4 לא הצליח להגן על שתילי מלונים בפני הדבקה ע"י טיפוס הבר של פוזריום מלון. לעומת זה, 4/4 כן מגן חלקי על ידי הפחתת תמותת שתילי אבטיחים לאחר הדבקה בטיפוס הבר של פוזריום אבטיח, גזע 1,2. קיים קורלציה בין מידה האיכלוס של השתילים לבין מידת הפחתת המחלה לאחר הדבקה בטיפוס הבר. עתיד צריך ללמוד האם תבדיד זה מאכלס שתילים והאם הוא יכול להגן כנגד טיפוס הבר הפתוגני. בעתיד נחכה את צורת השתילה המסחרית כגון חישתיל, ע"י ערבוב נבגי המוטנט במצע הגידול לקבלת השפעה דומה לזה שקיבלנו לאחר טבילה.

ה. פירסומים:

לא הוחל בהפצת הידע.

סיכום לדו"ח

1. מטרת המחקר

1) במחקר המוצע נבחן היעילות של טיפול מוקדם במוטנט של *Colletotrichum* (תבדיד PATH-1) להגנת צמחי מלון ואבטיח מפני פטריות הפחירוס.
 2) לבדוד מוטנטים בלתי פתוגניים של *F. o. melonis* לאחר מוטגנזה ע"י UV, ע"מ "ליצור" מדבירים ביולוגיים שישרו עמידות בצמחים, בדומה למוטנט PATH-1.

2. עיקרי הניסויים ותוצאות

ניתן להגן בעמדת המוטנט (PATH-1) על שתילים מהזן עין דור שאולחו בפחירוס. נמצא שהמוטנט מאכלס באופן שונה זנים מסוימים. "נוצר" תבדיד בלתי פתוגני חדש מפחירוס (תבדיד 4/4) שלא הראה שום סימני פגיעה בצמחים, איכלס והפחית תמותת שתילי אבטיח לאחר הדבקה בטיפול הבר.

3. מסקנות והשלכות

לאור התוצאות צריך להמשיך בניסויים בזנים נוספים (בעיקר אלה שמתאכלסים היטב כגון, מללי והאון). ניתן להפחית תמותה בזנים נוספים וקיים קשר בין רמת האיכלוס לשיעור התמותה. צריך לבחון את כושר האיכלוס והפחתת המחלה של התבדיד 4/4 הבלתי פתוגני של פחירוס, בזנים שונים.

4. בעיות שנותרו לפתרון

צריך לנסות לחכות את צורת השתילה המסחרית כגון חישתיל, ולערבב נבגי המוטנט במצע הגידול. בעתיד צריך ללמוד האם בצורת עבודה זו הבלתי פתוגנים מאכלסים שתילים והאם הם יכולים להגן כנגד טיפוס הבר הפתוגני.

5. הפצת ידע

לא הוחל בהפצת הידע.