

נושא: שיטות ורעיונות חדשים לטיפוליים חלופיים במתיל ברומידלהדברת נמטודות יוצרות עפצים בירקות, תבלינים ופרחים בחממות

חוקר ראשי: פרופ' יצחק שפיגל מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

חוקרים שותפים: 5

תקופת מחקר: 1997-1999

מאמרים:

תקציר

הצגת הבעיה: נמטודות טפילות על צמחים גורמות לנזקים כלכליים כבדים ביותר. האמצעי החשוב ביותר להדברת הנמטודה הנו חיטוי מוקדם של הקרקע המאולחת במתיל ברומיד. לפי האמנה האחרונה, שסוכמה בקנדה בנושא דחיקת השימוש במתיל ברומיד, הוחלט כי עד שנת 2005 יופסק השימוש בחומר זה לחלוטין בארצות מתקדמות, וישראל נכללת ברשימה זו. בהתארגנות שנערכת כיום במשרד החקלאות הוחלט לאחרונה כי בשנה הקרובה יש להפחית בכ-25% מהשימוש בחומר זה, ועד שנת אלפיים השימוש יופחת בלמעלה מ-50%. התניה זו מהווה איום כבד על מגדלי הירקות והפרחים, בעיקר באזור השרון (תל מונד), ובאזור הנגב והערבה, הן בחממות והן בשטח הפתוח. באזורים אלה נחשב הטיפול במתיל ברומיד לרוטינה הכרחית.

טיפולים החלופיים בנמטוצידים אינם יעילים דיים, מה גם שהשאיפה הכללית כיום הנה לדחוק, עד כמה שניתן, את השימוש בחומרי ההדברה, בעיקר בגלל סיבות אקולוגיות. מהלך ושיטות עבודה: נערכו ניסויים באשפתונים בקיבול של 50 ליטר, בבית הזכוכית, וכן בחלקות מזעריות במחלקה לנמטולוגיה. הקרקע מאולחת בנמטודות יוצרות עפצים. בניסויים שולבו תכשיר הטריכודרמה שהתקבל מחברת "מייקונטרול" שעורבב בקרקע. לאחר כשבועיים נשתלו שתילי עגבנייה. בתום 2-3 חודשי ניסוי נשקל הנוף, נשקלו הפירות, והוערכה דרגת נגיעות השורשים. בנוסף נערכו 2 ניסוי חממה. האחת בפלפל בערבה בקרקע מאולחת בנמטודה יוצרת העפצים מהמין *M. incognita*, בה שולב טיפול בקרוטלרין וכן יושם תכשיר טריכודרמה על ידי חברת "מייקונטרול", אשר הוצנע בקרקע. בניסוי אחר בשטחי מושב חגלה (שרון), בוצע יישום טריכודרמה לקרקע כחודש לפני השתילה, זריעת טגס פולינמה, כחצי שנה לפני השתילה; היקש; טיפול בחיידקים המהווים חלק מתכשיר ניסיוני של חברת "מינרב" נגד נמטודות; והיקש 'חיובי' – רגבי (הדברה כימית). במקביל התבצעה בחינה מעמיקה של מנגנון פעילות הפטרייה.

תוצאות עיקריות: בניסויי האשפתונים ובחלקות המזעריות, משקל צמחי העגבנייה אשר נחשפו לטריכודרמה, היה גדול פי 2 (משמעותית), ודרגת נגיעות השורשים של הצמחים שטופלו בטריכודרמה היה נמוך (משמעותית) בהשוואה לצמחי ההיקש. בסיום הניסוי שעור הפטרייה בקרקע היה נמוך בשני סדרי גדל בהשוואה לאוכלוסייה ההתחלתית שיושמה לקרקע. הוכח כי החשיפה לפטרייה טריכודרמה, השפיעה בעיקר על חדירת הנמטודות לשורשים ולא על התפתחותם של שלבי החיים השונים בתוך השורש. מיצויי הקרקעות שנחשפו לטריכודרמה עכבו התנועה של זחלי נמטודות ובקיעת זחלים

מביצים שהיו בצברי הביצים. בכל מיצויי הקרקע של התבדידים נמצאה פעילות פרוטיאוליטית חזקה יותר מאשר מיצוי הקרקע שבו לא יושם תכשיר הפטרייה.

מסקנות: לתבדיד התכשיר המכילים את הפטרייה, פעילות נמטוצידית טובה בתנאי מעבדה, כולל בניסויים בכלים גדולים; ברם, עדיין לא ברור פוטנציאל הפעילות בתנאי שדה וייתכן שיידרש פיתוח טכנולוגי מתאים ליישום התכשיר בשדה. יש להניח שבתוך השנה הקרובה תתבהר תמונת מנגנון הפעולה של הטריכודרמה וייתכן ויימצא מרכיב(ים) פעיל במיוחד שבו ניתן יהיה להתרכז בהמשך.

באשר לצמחי הכיסוי שנבחנו: צמח הקרוטלריה, בשלב זה, לא נמצא מתאים במיוחד ליישום כנגד נמטודות בתנאי החממה והשדה בארץ, שכן הוא רגיש ביותר למספר מזיקי מפתח, ועדיין לא נמצאו התנאים לאקלום הצמח בארץ, במיוחד בתנאי חקלאות אורגנית.

**שיטות ורעיונות חדשים לטיפולים חלופיים במתיל ברומיד
להדברת נמטודות יוצרות עפצים בירקות ופרחים**
**New ideas and alternatives to methyl bromide to
control the root-knot nematodes in vegetables & lowers**

תכנית מס' 99-0183-133

דו"ח מדעי סופי

מוגש ל- מדען ראשי, משרד החקלאות, הפחתת השימוש בחומרי הדברה

על-ידי:

יצחק שפיגל – חוקר ראשי – המחלקה לנמטולוגיה, מינהל המרכז החקלאי, מרכז וולקני
Yitzhak Spiegel - Principle investigator- Dept. of Nematology, The Volcani
Center, ARO, Bet Dagan 50250. E-mail:spiegely@volcani.agri.gov. il

אילן חת – המחלקה למחלות צמחים ומיקרוביולוגיה, הפקולטה לחקלאות, רחובות
Ilan Chet - Faculty of Agriculture, Dept. of Plant Pathology & Microbiology, Hebrew
University of Jerusalem, Rehovot 76100

מאירה בר אייל, מישאל מור ועדנה שרון – המחלקה לנמטולוגיה, מרכז וולקני
Meira Bar-Eyal, Mishael Mor and Edna Sharon - Dept. of Nematology, ARO

אמנון קורן – חברת "חישתיל"

Amnon Koren – Hish Shtill Company

תקציר

הצגת הבעיה: נמטודות טפילות על צמחים גורמות לנזקים כלכליים כבדים ביותר. האמצעי החשוב ביותר להדברת הנמטודה הינו חיטוי מוקדם של הקרקע המאולחת במתיל ברומיד. לפי האמנה האחרונה, שסוכמה בקנדה בנושא דחיקת השימוש במתיל ברומיד, הוחלט כי עד שנת 2005 יופסק השימוש בחומר זה לחלוטין בארצות מתקדמות, וישראל נכללת ברשימה זו. בהתארגנות שנערכת כיום במשרד החקלאות הוחלט לאחרונה כי בשנה הקרובה יש להפחית בכ- 25% מהשימוש בחומר זה, ועד שנת אלפיים השימוש יופחת בלמעלה מ- 50%. התניה זו מהווה איום כבד על מגדלי הירקות והפרחים, בעיקר באזור השרון (תל מונד), ובאזור הנגב והערבה, הן בחממות והן בשטח הפתוח. באזורים אלה נחשב הטיפול במתיל ברומיד לרוטינה הכרחית. טיפולים החלופיים בנמצאים אינם יעילים דיים, מה גם שהשאיפה הכללית כיום הינה לדחוק, עד כמה שניתן, את השימוש בחומרי ההדברה, בעיקר בגלל סיבות אקולוגיות.

מהלך ושיטות עבודה: נערכו ניסויים באשפתונים בקיבול של 50 ליטר, בבית הזכוכית, וכן בחלקות מיזעריות במחלקה לנמטולוגיה. הקרקע מאולחת בנמטודות יוצרות עפצים. בניסויים שולבו תכשיר הטריכודרמה שהתקבל מחברת "מייקונטרול" שעורבב בקרקע. לאחר כשבועיים נשתלו שתילי עגבניה. בתום 2-3 חודשי ניסוי נשקל הנוף, נשקלו הפירות, והוערכה דרגת נגיעות השורשים. בנוסף נערכו 2 ניסוי חממה. האחת בפלפל בערבה בקרקע מאולחת בנמטודה יוצרת העפצים מהמין *M. incognita*, בה שולב טיפול בקרוטלרין וכן יושם תכשיר טריכודרמה על ידי חברת "מייקונטרול", אשר הוצנע בקרקע. בניסוי אחר בשטחי מושב חגלה (שרון), בוצע יישום טריכודרמה לקרקע כחודש לפני השתילה, זריעת טגטס פולינמה, כחצי שנה לפני השתילה; היקש; טיפול בחיידקים המהווים חלק מתכשיר ניסיוני של חברת "מינרב" נגד נמטודות; והיקש 'חיובי' - רגבי (הדברה כימית). במקביל התבצעה בחינה מעמיקה של מנגנון פעילות הפטריה.

תוצאות עיקריות: בניסויי האשפתונים ובחלקות המיזעריות, משקל צמחי העגבניה אשר נחשפו לטריכודרמה, היה גדול פי 2 (משמעותית), ודרגת נגיעות השורשים של הצמחים שטופלו בטריכודרמה היה נמוך (משמעותית) בהשוואה לצמחי ההיקש. בסיום הניסוי שיעור הפטריה בקרקע היה נמוך בשני סדרי גדל בהשוואה לאוכלוסיה ההתחלתית שיושמה לקרקע. הוכח כי החשיפה לפטריה טריכודרמה, השפיעה בעיקר על חדירת הנמטודות לשורשים ולא על התפתחותם של שלבי החיים השונים בתוך השורש. מיצויי הקרקעות שנחשפו לטריכודרמה עכבו התנועה של זחלי נמטודות ובקיעת זחלים מביצים שהיו בצברי הביצים. בכל מיצויי הקרקע של התבדידים נמצאה פעילות פרוטיאוליטית חזקה יותר מאשר מיצוי הקרקע שבו לא יושם תכשיר הפטריה.

מסקנות: לתבדיד התכשיר המכילים את הפטריה, פעילות נמטוצידית טובה בתנאי מעבדה, כולל בניסויים בכלים גדולים; ברם, עדיין לא ברור פוטנציאל הפעילות בתנאי שדה וייתכן שיידרש פיתוח טכנולוגי מתאים ליישום התכשיר בשדה. יש להניח שבתוך השנה הקרובה תתבהר תמונת מנגנון הפעולה של הטריכודרמה וייתכן ויימצא מרכיב(ים) פעיל במיוחד שבו ניתן יהיה להתרכז בהמשך. באשר לצמחי הכיסוי שנבחנו: צמח הקרוטלרין, בשלב זה, לא נמצא מתאים במיוחד ליישום כנגד נמטודות בתנאי החממה והשדה בארץ, שכן הוא רגיש ביותר למספר מזיקי מפתח, ועדיין לא נמצאו התנאים לאקלום הצמח בארץ, במיוחד בתנאי חקלאות אורגנית.

מבוא:

נמטודות טפילות על צמחים גורמות לנזקים כלכליים כבדים ביותר: כ-20% מהפסדי היבול הכללי בעולם נגרמים בגין נמטודות טפילות על צמחים. ב-1987 הוערך בעולם ההפסד הכספי השנתי בגין נמטודות בכ-100 ביליון דולר, מתוכם כ-6 ביליון בארה"ב בלבד.

הנמטודה הישובה, יוצרת העפצים מהסוג *מלודוגין* נחשבת בארץ כגורם כלכלי מגביל במעלה ראשונה בגידולי ירקות, פרחים ועצי פרי. האמצעי החשוב ביותר להדברת הנמטודה הינו חיטוי מוקדם של הקרקע המאולחת במתיל ברומיד. לפי האמנה האחרונה, שסוכמה בקנדה בנושא זחיקת השימוש במתיל ברומיד, הוחלט כי עד שנת 2005 יופסק השימוש בחומר זה לחלוטין בארצות מתקדמות, וישראל נכללת ברשימה זו. בהתארגנות שנערכת כיום במשרד החקלאות הוחלט לאחרונה כי בשנה הקרובה יש להפחית בכ-25% מהשימוש בחומר זה, ועד שנת אלפיים השימוש יופחת בלמעלה מ-50%!!

התניה זו מהווה איום כבד על מגדלי הירקות והפרחים, בעיקר באזור השרון (תל מונד), ובאזור הנגב והערבה, הן בחממות והן בשטח הפתוח. באזורים אלה נחשב הטיפול במתיל ברומיד לרוטינה הכרחית.

הטיפולים החלופיים בנמטוצידים אינם יעילים דיים, מה גם שהשאיפה הכללית כיום הינה לדחוק, עד כמה שניתן, את השימוש בחומרי ההדברה, בעיקר בגלל סיבות אקולוגיות.

מטרת העבודה היתה לבחון יעילות שילובן של פטריית הטריכודרמה עם תוספות קרקע בכמות מינימלית, כנגד הנמטודה יוצרת העפצים ובבחינה מעמיקה של מנגנון הפעילות הנמטוצידית של הפטריה. כמו כן, עסקנו בבחינת השילוב של צמח הכיסוי, קרוטלריה, בניסויי אשפתונים ובניסויי שדה. כמו כן, לאחר סיום הניסוי הערכה ההישרדות של הפטריה בקרקע.

פירוט הניסויים:

א. ניסוי אשפתונים

במהלך השנה הראשונה נערכו שני ניסויי אשפתונים, לפי המתכונת שמובאת בפרסום שיצא על ידי קבוצת המחקר שהגישה את ההצעה (ראה פרסום (ב) בהצעת המחקר). הניסויים נערכו באשפתונים בקיבול של 50 ליטר, בבית הזכוכית, במחלקה לנמטולוגיה. הקרקע (ללא עיקור), נאלחה בזחלים וביצים של נמטודות יוצרות עפצים (2000 זחלים לק"ג קרקע). בניסוי אחד שולב תכשיר הטריכודרמה שהתקבל מחברת "מייקונטרול" עורבב בקרקע בשיעור של 1% נפחי. לאחר כשבועיים נשתלו שתילי עגבניה.

בניסוי נוסף, נוסה צמח הכיסוי, קרוטלריה. בשלב זה נתקלנו בבעיות אקלוס הצמח בחממה. חלק גדול מהצמחים שנבטו – לא גדלו היטב, וחלקם נתקף על ידי מזיקים. בשלב זה – ייחסנו לאותם האשפתונים בהם גודלו הקרוטלריות וגידולם לא עלה יפה כטיפול היקש, שכן הערכנו כי תרומת הקרוטלריה לא תהיה משמעותית. בתום 3 חודשי ניסוי נשקל הנוף, נשקלו הפירות, והוערכה דרגת נגיעות השורשים.

ב. חלקות מזעריות:

החלקות המזעריות ממוקמות במחלקה לנמטולוגיה. כל חלקה, בנויה ממכל אזבסט ללא תחתית המקובע בקרקע (עומק 1.5 מטר, רדיוס 1 מטר). באתר 16 "בריקות" המגודרות ומסומנות היטב. ההשקיה בטפטוף. האתר מכוסה ברשת לבנה, 50 מ"ש, כנגד מזיקים. בכל "בריקה" ניתן לשתול 4 שתילים.

הקרקע מאולחת בנמטודות יוצרות עפצים ברמת אילוח זהה, בדרגות נגיעות שבין 4 ל-6 (לפי סולם מקובל של נגיעות בין 0 ל-10). הטריכודרמה מיושמת לקרקע כ-10 ימים לפני השתילה, ועל ידי הטענת שתילים במשתלה. כל טיפול נערך ב-4 חזרות. טיפול נוסף שיישמנו – גידול קרוטלריה בחלקות. הקרוטלריות נזרעו בבית צמיחה, והשתילים הועברו לחלקות. כהשלמה – נזרעו קרוטלריות בחלקות. הצמחים הגיעו לגובה של כ-60 ס"מ בתקופה של כ-4 שבועות. הטיפולים שנבחנו: היקש, טריכודרמה, קרוטלריה, טריכודרמה + קרוטלריה. כל הקרקעות, כאמור, הואלחו בנמטודות.

כחודשיים לאחר שתילת העגבניות, נאלצנו לסיים את הניסוי (חודש ספטמבר) משום שהטמפרטורות ירדו מאוד, והתחלנו לראות סימני פגיעות קור וצריבות ברד בצמחי העגבניה. נבחנו משקל הנוף ודרגת נגיעות השורשים.

פירוט הניסויים שבוצעו בשנה השניה:

א. ניסויים במכלי 50 ליטר:

אשפתונים בנפח של 50 ליטר מולאו בקרקע חולית מאולחת באופן טבעי בנמטודות יוצרות עפצים מהמין *M. javanic* (כ-2000 זחלים לליטר). תכשיר הטריכודרמה (WT) שהתקבל מחברת "מייקונטרול", עורבב עם הקרקע בשיעור של 1%, ארבע שבועות לפני השתילה. אשפתונים שבהם לא יושם התכשיר, שימשו כהיקש. בכל מיכל נשתלו 4 שתילי עגבניה (cv. 144), שהתקבלו מחברת "חישתיל" (נחלים). הניסוי נערך בחודשי הקיץ '98, בבית הצמיחה. במחלקה לנמטולוגיה, כל טיפול בוצע ב-4 חזרות, הצמחים דושנו אחת לשבוע, בתמיסת 20-20-20 (75 mg/l) והושקו בהתאם לצורך. בתום חודשיים נשקל הנוף ודרגת נגיעות השורשים הוערכה בהתאם לסקלה מקובלת מ-אפס עד

חמש. ההישרדות של הפטריה בקרקע הערכה לאחר סיום הניסוי ע"י ערבוב 4 דגימות של 10 גר קרקע, מכל מיכל שהכיל הטריכודרמה, והערכת ה-CFU/gr קרקע נעשתה באמצעות מיהולים סריאליים על מצע סלקטיבי (אלעד וחוב' 1981).

ב. ניסויי שדה:

1. ניסוי בחממת פלפל בערבה. בחממה שבה הקרקע מאולחת בנמטודה יוצרת העפצים מהמין *M. incognita*, נשתלו שתילי קרוטלריה בחודש ספטמבר בטרם שתילת הפלפל. השתילים הוכנו במשתלה אורגנית בדרום הארץ מזרעים שנמסרו על ידי חוקר בתחנת יאיר. כבר בתחילת הגידול, הובחנו קשיים בקליטת השתילים; כעבור שבועיים עד שלושה היה ברור כי חלק גדול מהשתילים לא ייקלטו, או עצמיחת השתילים מעוכבת. בהמשך, אותם שתילים שגדלו והתפתחו סבלו מהתקפות חרקים, ומכיוון שהגידול הינו אורגני, קשה היה להדבירם. בחודש נובמבר הוצאו שתילי הקרוטלריה ונשתלו פלפלים מזן טורקל ו-3548. במספר גמלונים יושם תכשיר טריכודרמה על ידי חברת "מייקוונטרול", אשר הוצנע בקרקע.
2. בשטחי מושב חגלה (שרון), בהם מגדלים פרחי כוכיה (קרקע חולית, השקיה במי-קולחין) נמצא כי השתילים נגועים בנמטודה יוצרת העפצים. בשוליים המזרחיים נעקר 1 דונם מהגידול הקיים. הניסוי נערך בחמש שורות באורך 100 מ' כל שורה. נערך עיבוד מתאים, כולל הכנת תשתית להשקיה במתזים, תיחוח, ערוג, וכן רוסס רונסטאר, דוקטלון וריזולקס בהתאם לצורך. הניסוי הוצב באקראיות גמורה ב-4 חזרות, ברוחב של כ-7 מ' ובאורך 6 מ' כל אחת (כ-42 מ"ר לחלקת חזרה).
הטיפולים: I. יישום טריכודרמה לקרקע כחודש לפני השתילה (1 ליטר /מ' ערוגה) בשילוב שתילים שהוטענו במשתלה עם טריכודרמה מהגזע WT במינון 1%; II. זריעת טגטס פולינמה (זן חדש שהובא מהולנד, 300 גר' זרעים לדונם), כחצי שנה לפני השתילה; III. היקש. IV. טיפול בחיידקים המהווים חלק מתכשיר ניסיוני של חברת "מינרב" נגד נמטודות. V. היקש 'חיובי' – רגבי במינון 3 ליטר לדונם (הדברה כימית).
הטגטס נזרע ב-26.6.98 ואחר כך ב-15.7.98 נעשו מילואים. ב-8.98 נעשה גיזום נוף הטגטס פעמיים, וקציר כללי בסוף חודש ספטמבר.
לפני זריעת הטגטס נלקחו דגימות קרקע שהובאו למעבדה והוכנסו לעציצים בהם נשתלו שתילי עגבנייה. בתום 4 שבועות הוצאו הצמחים לצורך קביעת דרגת נגיעות.
הליך זה נעשה בתום עונת גידול הטגטס (באמצע חודש אוקטובר) במקביל ליישום הטריכודרמה בקרקע.

ההיפריקום נשתל בחדש מרץ לאחר יישום נוסף של טריכודרמה בפברואר.

הערכת הגידול של ההיפריקום נעשתה לפני הקטיפה בתחילת יולי '99. החזרות דורגו (1-5) לפי צבע העלווה והמראה הכללי של הצמחים בשלוש השורות המרכזיות, כאשר דרוג 5 מבטא עלווה ירוקה ומראה טוב בעוד דרוג 1 מבטא עלווה צהובה ומראה עלוב. כמו כן דורגו החזרות למידת צריבות והתייבשויות עלים.

הבחינה הנמטולוגית התבצעה ע"י עקירת 4 צמחים במרכז כל חזרה והערכת דרגת נגיעות שרשיהם בעפצים לפי הסקלה הנמטולוגית המקובלת (). בסוף הקיץ (ספטמבר) נשתלו צמחי עגבניה כצמחי בחן, 4 בכל חזרה. הצמחים נעקרו ב- 14.12.99 ודרגת נגיעות הצמחים הערכה כאמור לעיל.

בחינה מעמיקה של מנגנון פעילות הטריכודרמה (שנה שניה ושלישית):

1. מעקב אחר התפתחות הנמטודות בשורשי צמחים שנחשפו לטיפול טריכודרמה בקרקע. עציצים בנפח 100 מ"ל מולאו בקרקע, עם או בלי תכשיר הטריכודרמה, והודבקו ב - 200 זחלים. כעבור 10 ימים, נשתלו שתילי עגבנייה שהוכנו במחלקתנו. כעבור 28 יום, השורשים נצבעו בחומצה פוקסינית ונעשה מעקב בהסתכלות מיקרוסקופית, אחר שלבי החיים השונים של הנמטודה בשורש.
2. פעילות נמטוצידית של מיצויי-קרקע שנחשפו לטריכודרמה. קרקעות אשר נחשפו לטריכודרמה, וקרקעות אשר לא נחשפו לטריכודרמה (היקש), ואשר הוכנו לניסויי המיכלים (ראה סעיף א'), שימשו כמקור למיצויי הקרקע. תערובת 100 ג"ר קרקע ו - 100 מ"ל מים נוערו היטב בארלנמאייר (500 מ"ל) למשך שעה, והושארו ללא טלטול ל-30 דקות. התרחיף נאסף, עבר ריכוז בצנטריפוגה (10 דקות, $10,000 \times g$), ושוב נאסף ועוקר על ידי העברתו בממברנה (0.22 מיקרון). החומר שנאסף יובש בהקפאה ואחר כך שוב נמהל על ידי מים מזוקקים סטריליים. הפעילות הנמטוצידית נבחנה בפלטות המכילות 96 בארות. בכל בחינה נבדקה הפעילות על זחלי נמטודות (J2) ועל צברי ביצים. לפני הבחינה הופרד המיצוי לשני מקטעים על ידי שימוש בממברנת מיקרוקון 3, המעבירה מרכיבים בעלי משקל מולקולרי של 3 קילודלטון.
3. פעילות פרוטאוליטית של מיצויי קרקע.

תערובת הריאקציה והבדיקה הפרוטאוליטית נעשו בהתאם לבידקות קודמות שנעשו במחלקתנו (עבודת הדוקטורט של ד"ר סרג' גלפר, למשל), תוך שימוש באזוקזאין כסובסטרט. פרוטאז שמקורו בחיידק *סטרופטומיציס מריסאוס*, שימש כסטנדרט לפעילות הפרוטיאוליטית.

4. אינטראקציה ישירה של טריכודרמה עם שלבי חיים שונים של הנמטודה.
 סליידים הבנויים מתאים מולאו בציפוי דק של 1% פִּיטְנָגְל. ביצים בודדות, צברי ביצים וחולים (J2) סטריליים, הוכנסו לסליידים יחד עם פטריית הטריכודרמה - ללא תוספות התכשיר, והוכנסו לאינקובציה למשך מספר ימים בטמפרטורת החדר (27°C). מעקב מיקרוסקופי נעשה אחר אינטראקציית הפטרייה עם השלבים השונים.

תוצאות – שנה א

א. 1. ניסוי אשפתונים שהסתיים ב-4.9.97

טיפול	משקף נוף (ג"ר)	דרגת נגיעות	משקל פירות (ג"ר)
היקש	136.5b	6.9a	4.5b
הטמנת קרוטלריה בקרקע	160.6ab	4.1ab	34.5ab
קרוטלריה (נוכחת באשפתון)	178.4a	3.7b	47.4ab
קרוטלריה - לפני שתילת העגבניות	182.2a	3.4b	80.5a

הנתונים נותחו על פי מבחן סטטיסטי T-Test (P=0.05).

בהשוואה להיקש, הטיפול בקרוטלריה בשתילה באשפתון לפני הגידול, הביאה לעליה של כ-40% במשקל הנוף וירידה משמעותית ביותר בדרגת נגיעות השורשים. יכול הפרי לא היה גדול במיוחד, ולכן, למרות שהעליה ביבול היתה במאות אחוזים הרי שקשה להתייחס לנתון זה לאור היבול הדל.

ב. ניסוי חלקות מזעריות שהסתיים ב-4.9.97

הניתוח הפקטוריאלי נעשה על 16 צמחים (4 צמחים בכל חלקה מזערית). השונות הגדולה בין הצמחים והחזרות הראתה בסיכומו של דבר, חסר הבדל סטטיסטי. הניסוי כאמור סבל ממכות קור, סופות גשמים וברד, שפגעו בצמחים, ולכן יש לחזור על הניסוי בעונת האביב הקרובה.

מסקל נוף (גר)	דרגת נגיעות	טיפול
84.1a	5.3ab	היקש
115.9a	6.4a	טריכודרמה
115.5a	4.5ab	קרוטלריה
105.4	5.7ab	טריכודרמה + קרוטלריה

שנה שניה - תוצאות

א. ניסויי מכלי 50 ליטר. משקל צמחי העגבנייה שהוצאו לאחר חודשיים, ואשר נחשפו לטריכודרמה, היה גדול פי 2 (משמעותית), בהשוואה לצמחים שלא נחשפו (היקש). כמו כן, דרגת נגיעות השורשים של הצמחים שטופלו בטריכודרמה היה נמוך (משמעותית) בהשוואה לצמחי ההיקש (ראה טבלה).
 בסיום הניסוי 7×10^5 CFU/gr קרקע של הפטריה נספרו בהשוואה לאוכלוסיה התחלתית של 10^7 CFU/gr.

טיפול	משקל נוף (גר לצמח)	דרגת נגיעות (סקלה מ-1-5)
טריכודרמה	344.3 a	0.5 b
היקש	169.5 b	3.5 a

ב. ניסויי שדה: נ. ניסוי בחוגלה:

1. מפוי ראשוני לנמטודות.

המפוי המפורט נעשה לאחר קציר הטגטס ב- 22.10.98 . פיזור האילוח לא היה אחיד, בשלב זה.

מפת הפיזור מובאת בטבלה הבאה.

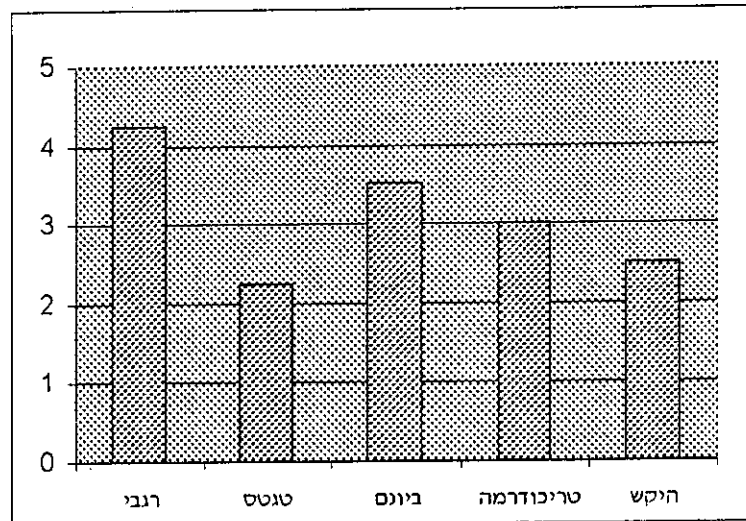
טבלה 1. מפת פיזור הנגיעות בנמטודה יוצרת עפצים בחלקת הנסוי בחוגלה, לפי דרגת הנגיעות של צמחי בוחן (עגבניה) שגודלו בכלים בקרקע שנדגמה מהנסוי.

חזרה	מזרח	מערב
1. טגטס		
2. רגבי		
3. ביונס	4.0	
4. טריכודרמה	0.5	
5. היקש		
6. טגטס	1.0	
7. ביונס		
8. טריכודרמה		
9. טגטס	2:0	
10. היקש	2.0	
11. רגבי		
12. טריכודרמה		
13. היקש	0.025	1.0
14. ביונס		
15. רגבי		
16. טריכודרמה		
17. טגטס		
18. ביונס	4.0	
19. רגבי	4.0	
20. היקש		

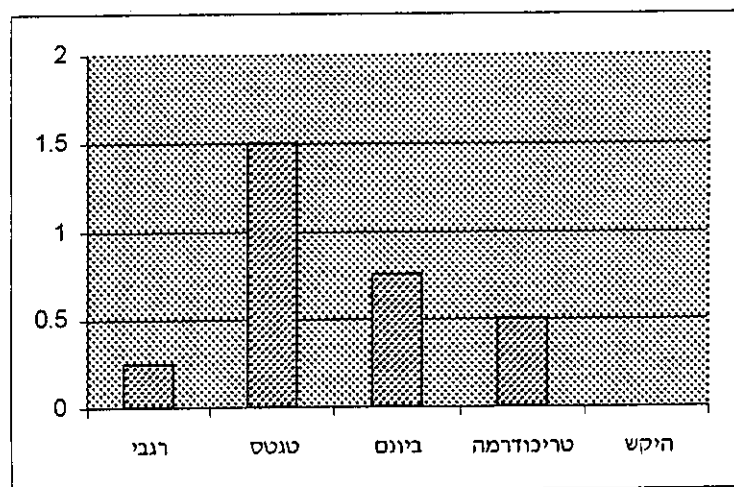
ב. הערכת הגידול

לפני קטיף ההיפריקום, נאספו נתונים של מדדים להתפתחות הגידול בטיפולים השונים. הצמחים בטיפול הסטנדרט (רגבי) קיבלו את הציון הטוב ביותר, מעל 4, שהיה מובהק בניתוח שונות ומבחן תחום מרובה (לפי SNK ברמת מובהקות 0.05) מההיקש ומטיפול כרב טגטס (איור 1). כמו כן בטיפול זה היו מעט צריבות עלים יחסית לטיפול כרב הטגטס (איור 2), אולם היות והיתה שונות רבה בין החזרות, וההיקש היה ללא צריבות כלל, לא נמצאו ההבדלים בין הטיפולים מובהקים.

איור 1: ציון ממוצע להיפריקום בטיפולים השונים לפני הקטיף, יולי 1999 (מת = 0, 5 = מצוין)



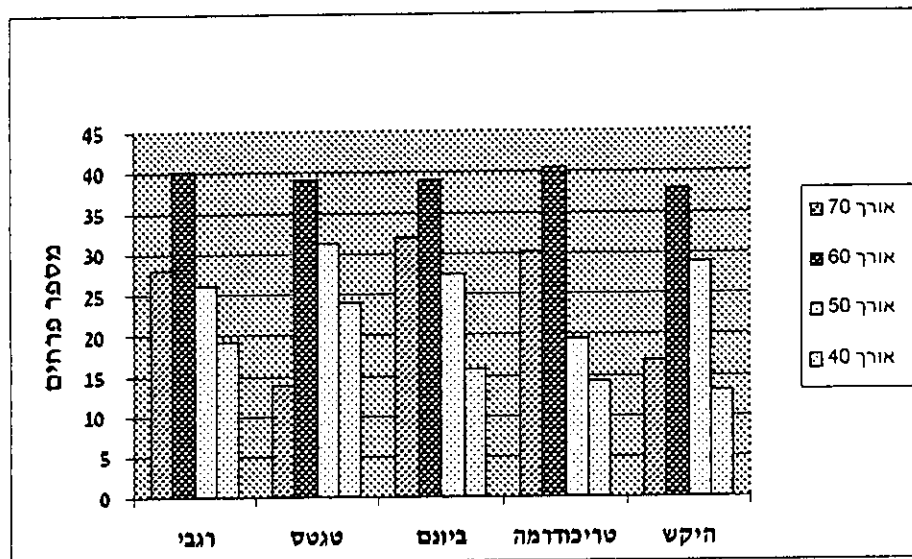
איור 2: מידת צריבות עלים בהיפריקום בטיפולים השונים לפני הקטיף, יולי 1999 (0 = ללא צריבות, 5 = צרוב לחלוטין)



ג. יבול

מספר הפרחים הכללי, כפי שהתקבל מקטיפת הערוגה המרכזית בלבד, אינו נבדל בטיפולים השונים ונע בין 96 ל - 114 ענפים לכ - 4 מ' ערוגה או 16000 - 20000 פרחים לדונם. התפלגות אורכי הענפים מצביעה על כך שבטיפול כרב טגטס יש פחות ענפים ארוכים (70 ס"מ) שערכם הכספי גבוה ויותר ענפים קצרים (40 ס"מ) שערכם הכספי נמוך (איור 3). ואכן, בחישוב התמורה הכספית מן היבול, הטיפולים כרב טגטס וההיקש נופלים מהאחרים (טבלה 2). בטיפול ביונם היו יותר פרחים באורך 70 ס"מ ולכן התמורה ממנו היתה גבוהה. המחירים חושבו לפי: 7,11,19,25 סנט לענף בהתאם לאורכים מ - 70 עד 40 ס"מ.

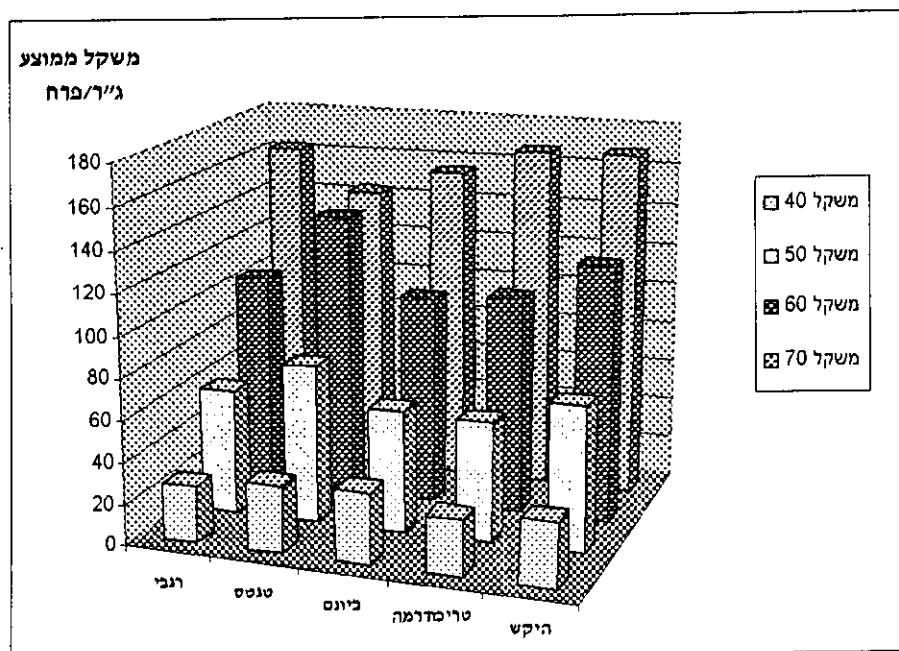
איור 3. התפלגות יבול היפריקום מהערוגה המרכזית לפי אורך הענפים.



טבלה 2. התמורה על היבול בטיפולים השונים, לפי מחירים ממוצעים שהיו בבורסה לאורכי היפריקום שונים באותו שבוע.

טיפול	תמורה בגילדן לדונם
צמח כסוי טגטס פולינמה	2666
ביונם	3253
טריכודרמה WT	3064
סטנדרט - רבגי	3139
היקש ללא טיפול	2577

איור 4. איכות היפריקום (משקל ממוצע של פרחים בג'יר לפרח) באורכים 40-70 ס"מ בטיפולים השונים.

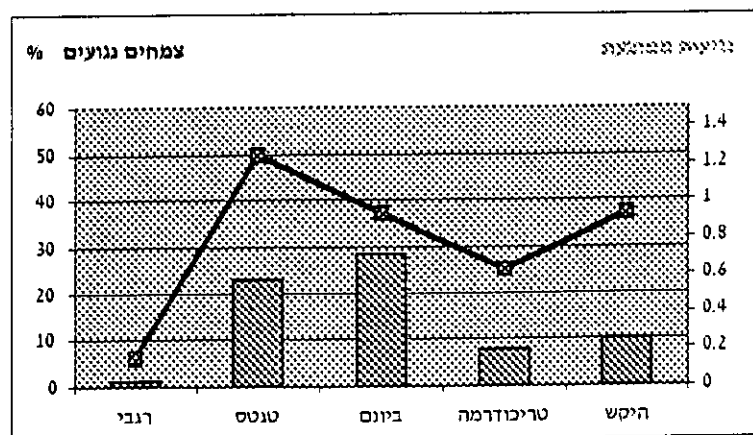


משקל הפרחים שנקטפו, המבטא את איכותם, היה דומה בטיפולים השונים חוץ מאשר משקל הפרחים באורך 60 ו-70 ס"מ בטיפול כרב טגטס. המשקל הממוצע של פרחים באורך 60 ס"מ, היה גבוה יותר מאשר בטיפולים האחרים, ואילו משקלם של הפרחים באורך 70 ס"מ היה נמוך לעומת שאר הטיפולים. דבר זה מצביע על כך שחלק מהענפים שהיו יכולים להגיע לאורך 70 ס"מ "נתקעו" ונשארו באורך 60 ס"מ בטיפול זה (איור 4).

ד. נגיעות בעפצים בזמן הקטיפ

בראשית יולי היתה הנגיעות בעפצים בשורשי ההיפריקום נמוכה יחסית (איור 5). אמנם דרגה נמוכה מ 1 אינה מצביעה על נזק כלכלי, אולם היו בדגימה צמחים בעלי נגיעות רבה יותר לצד צמחים לא נגועים כלל.

איור 5. מידת הנגיעות בעפצים בהיפריקום בעת הקטיפ, במדגם אקראי של 4 צמחים ממרכז כל חזרה.



הטיפול הכימי הסטנדרטי (רגבי) הצטיין בנגיעות הנמוכה ביותר, כאשר רק צמח אחד מ- 16 נמצא נגוע בדרגת נגיעות 0.5, שאינה מתבטאת בנזק לצמח. טיפול כרב הטגטס בולט באחוז גבוה של צמחים נגועים במדגם ובדרגת נגיעות גבוהה יחסית. גם בטיפול ביונס שילוב של נגיעות גבוהה יחסית ואחוז צמחים נגועים גבוה (איור 5). בשתיים מחזרות ההיקש לא נמצאה נגיעות כלל ולכן בממוצע דרגת הנגיעות בהיקש נמוכה.

ה. מיפוי חלקת הניסוי בסתיו

כאשר התברר כי רוב צמחי ההיפריקום בחלקת הניסוי מתו, נשתלו במרכז כל חזרה שתילי עגבניות כדי לבחון את המשך הפעילות של נמטודות בחלקה. נמצא כי בכל הטיפולים התנגעו שתילי העגבניות במשך הסתיו באופן קשה בעפצים.

דיון

בניסוי זה ביקשנו לבחון גישות חלופיות בהדברת נמטודה יוצרת עפצים בגידול היפריקום, שהוא אחד הפרחים הרגישים ביותר למזיק.

לא נצפו הבדלים משמעותיים בהתפתחות, ביבול ובאיכות ההיפריקום בטיפולים השונים. גידול ביניים (כרב) טגטס "פולינמה" נראה מעט גרוע מהאחרים וטיפול הסטנדרט, רגבי, מעט טוב מהם. יתכן וגידול הטגטס גורם לשינויים בקרקע המשפיעים לרעה על הזנת הגידול העוקב. התוצאות שהתקבלו מביקורת השורשים מעידות על חוסר יעילותם של התכשירים להדברה ביולוגית: טריכודרמה WT (פטריה) וביונס (חידק), ועל כך שכרב טגטס היה הכי פחות יעיל. הנגיעות הנמוכה בנמטודה יוצרת עפצים לפני שתילת ההיפריקום, נובעת אולי מהתקופה הארוכה שעברה מעקירת הקוכיה ועד שתילת ההיפריקום, תקופה שבה הושקתה החלקה תכופות ונשמרה נקיה מעשבים. חוסר האחידות בפזורה הנמטודות השפיע על עצמת ההדבקה בחזרות הטיפולים השונים בגל הראשון של ההיפריקום, ונראה כי עד ראשית יולי (מועד הקטיף) טרם נבנתה אוכלוסיה משמעותית של המזיק ולא היתה השפעה על מדדי היבול ועל הנגיעות בשורשים.

היפריקום רגיש מאוד לעפצים ולטמפרטורות גבוהות, הגורמים במשולב לתמותות לאחר הגיזום. בשל התמותה הכללית בניסוי זה לא ניתן היה לעקוב אחר ההיפריקום בהמשך הקיץ, ולהוכיח ביעילות הטיפולים בעונה בה הנמטודות גורמות את עיקר הנזק. לאחר שנשתלו בחלקה עגבניות, לא יושמו שוב התכשירים השונים, ועד לעקירתן עבר זמן ממושך, כך שמיישום המדבירים הביולוגיים לפני שתילת ההיפריקום חלפו 9 חודשים ומהיישום האחרון של התכשיר הכימי - יותר מ- 7 חודשים עד בחינת שורשי העגבניות. אין לצפות מן התכשיר הכימי - רגבי - ומהתכשיר הבקטריאלי - ביונס - להשפעה כה ממושכת. לעומת זאת, הפטריה טריכודרמה, שהיתה צפויה להתרבות בסביבת השורש, וכרב הטגטס שעל פי המטפח משפיע למשך שנתיים, לא הוכיחו את יעילותם לא בתקופת גידול ההיפריקום וכמובן שלא בתקופת גידול העגבניות, שהסתיימה כעבור 9 ו- 14 חודשים מהיישום, בהתאמה. יתכן וחוסר היעילות של כרב הטגטס נבע מהשקיה תכופה, דבר שמנע את העמקת שורשי צמח הכיסי ואת השפעתם הרצויה על נמטודות בשכבת הקרקע אותה אכלסו שורשי ההיפריקום מאוחר יותר. מניעה והדברת נמטודות יוצרות עפצים בשיטות כימיות ובשיטות חלופיות, יש לבחון בשתילות קיץ כדי לתת תשובות חד משמעית לגבי יעילות טיפולים שונים.

שנה שניה ושלישית - תוצאות

- 1. מעקב אחר התפתחות הנמטודות** – שורשי צמחים 28 יום לאחר השתילה, נצבעו, ונמצא כי בצמחי ההיקש – כל הנמטודות התפתחו לנקבות בוגרות, בעוד שבטיפול הטריכודרמה נמצאו פחות נקבות בוגרות, ומעט זחלי J4. לא נמצאו זחלי J2 ו-J3, דבר המעיד כי חשיפה לפטרייה טריכודרמה, השפיעה בעיקר על חדירת הנמטודות לשורשים ולא על התפתחותם של שלבי החיים השונים בתוך השורש.
- 2. פעילות נמטוצידית של מיצוי קרקע שנחשפו לטריכודרמה** – מיצוי הקרקעות שנחשפו לטריכודרמה עכבו התנועה של זחלי נמטודות (J2) ביום עד יומיים לאחר אינקובציה, בהשוואה לתמיסת היקש – שלא השפיעה על תנועת הזחלים. לאחר 3 ימים של חשיפה הנמטודות לא התאוששו מאפקט זה, אפילו לאחר שטיפת הנמטודות ואינקובציה שלהן במים. מיצוי הקרקע גם עכבו בקיעת זחלים מביצים שהיו בצברי הביצים, אשר נחשפו לפטרייה. הפעילות הנמטוצידית הגבוהה נמצאה במקטע אשר משקלו המולקולרי היה נמוך מ-3 קילודלטון.
- 3. פעילות פרוטיאוליטית של מיצוי קרקע.** בעבר מצאנו כי לתבדיל פטרייה P-2 שהושתלו בו גן לפעילות פרוטיאוליטית מוגברת הייתה פעילות נמטוצידית גבוהה יותר, בהשוואה לתבדיל ה (WT) *wild-type* ממנו הוכן התבדיל הטרנסגני, וכן בהשוואה לתבדיל הרגיל בו אנו משתמשים T-203. מיצוי הקרקע של התבדיל הטרנסגני וה-WT, הראו אותה פעילות פרוטיאוליטית, בעוד שבתבדיל T-203 נמצאה פעילות נמוכה יותר. בכל מיצוי הקרקע של התבדילים נמצאה פעילות פרוטיאוליטית חזקה יותר מאשר מיצוי הקרקע שבו לא יושם תכשיר הפטרייה.
- 4. אינטראקציה ישירה של טריכודרמה עם שלבי חיים שונים** – קורי הפטרייה, מכל התבדילים שנבחנו, ליפפו וחדרו לתוך גוף זחלי הנמטודות. התבדיל הטרנסגני היה האלים ביותר בחדירתו. גם ביצי הנמטודות המופרדות מצבר הביצים, אוכלסו על ידי קורי הפטרייה, אך הובחן כי הביצים הצעירות אוכלסו, בעוד שהבוגרים – לא אוכלסו. צברי הביצים אוכלסו על ידי התבדיל הטרנסגני – כולל הביצים בתוך הצבר. שאר התבדילים לא אוכלסו על ידי הפטרייה.
- 5. איפיון החמרים הנוצרים ע"י הפטריה בתסנין הגידול והשפעתם על שלבי החיים השונים של הנמטודה** – נבדקה השפעת תסנין הגידול של תבדילים שונים של הפטריה על זחלים אינפקטיביים של הנמטודה *M. javanica*. נמצא כי התסנינים שמקורם בתבדילים WT ו-P-2 גרמו לשיתוק תנועת הזחלים בתוך כ-12 עד 24 שעות. בפרק זמן זה ניתן היה לגרום להתאוששות של כ-50% ע"י שטיפה במים, אולם לאחר כ-48 עד 72 שעות של חשיפה לתסנין, הזחלים מתו. איפיון ראשוני של פעילות התסנין על הזחלים הראה שהחומר הפעיל הינו בעל משקל מולקולרי קטן מ-3kDa, רגיש לרתיחה, בלתי נדיוף ופעיל בטווח טמפרטורות רחב. התסנין שמקורו בתבדיל

הטרנסגני, p-2, היה יעיל יותר בפגיעה בנמטודות. התסנינים שמקורם בתבדידים T-203 ו-T-44, לא הראו פעילות נמטוצידית. הפעילות התקבלה רק כאשר הפטריות גודלו בטילטול איטי, והתבטלה בגידול בטילטול מהיר. בבדיקות הפעילות הפרוטיאוליטית של מקטעי התסנינים השונים נמצא מתאם בין נוכחות פרוטיאזות במקטע הגבוהה מ-3 kDa לבין הפעילות הנמטוצידית של המקטע הנמוך-מולקולרי. מתאם זה נמצא הן בהשוואת תבדידים שונים והן בצורות גידול שונות (מהירות הטילטול). כמו כן נמצא כי הפעילות הפרוטיאוליטית המיטבית היתה בתחום pH=4.5, תחום המתאים ל-pH הסופי של תסנין הגידול. נבדקה גם השפעת תסניני הגידול על ביצים ובקיעתן ונמצא עיכוב בקיעה בנוכחות התסנינים ולעיתים אף הרס של קליפות הביצים ותוכנן. בקיעה של צברי ביצים עוכבה אף היא. הפעילות על הביצים היתה רגישה להרתחה. בבדיקת המקטע הפעיל לאחר הפרדה בממברנה בעלת cut-off של 3 kDa נמצא כי לשני המקטעים היתה פעילות בעיכוב בקיעת הביצים. לא נמצא מתאם בין הפעילות על ביצים לבין הפעילות הפרוטיאוליטית. בבדיקות על נמטודות נוספות נמצא כי תסנין הגידול שמקורו בתבדיד WT הראה פעילות נמטוצידית על סוגי נמטודות הטפילות על צמחים, אולם לתסנין אין פעילות על נמטודות מועילות התוקפות חרקים. בנמטודות מהסוג *Caenorhabditis elegans* נמצא עיכוב בהתרבות (השרצה), אך לא עיכוב בתנועתן של הנמטודות.

מסקנות והשלכות על המשך ביצוע המחקר:

לתבדיד התכשיר המכילים את הפטרייה, פעילות נמטוצידית טובה בתנאי מעבדה, כולל בניסויים בכלים גדולים; ברם, עדיין לא ברור פוטנציאל הפעילות בתנאי שדה וייתכן שיידרש פיתוח טכנולוגי מתאים ליישום התכשיר בשדה. יש להניח שבתוך השנה הקרובה תתבחר תמונת מנגנון הפעולה של הטריכודרמה וייתכן ויימצא מרכיב(ים) פעיל במיוחד שבו ניתן יהיה להתרכז בהמשך. באשר לצמחי הכיסוי שנבחנו: צמח הקרוטלריה, בשלב זה, לא נמצא מתאים במיוחד ליישום כנגד נמטודות בתנאי החממה והשדה בארץ, שכן הוא רגיש ביותר למספר מזיקי מפתח, ועדיין לא נמצאו התנאים לאקלום הצמח בארץ, במיוחד בתנאי חקלאות אורגנית. בשנה הבאה יושם דגש על צמחים נוספים ממשפחת המורכבים, אשר אינדיקציות ראשונות מראות על פעילות נמטוצידית לאחר הטמנתם בקרקע לפני הגידול.

ה. פרסומים מדעיים:

תוצאות המחקר שהובאו בדו"ח זה הוצגו בשני כינוסים: הכנס של ארגון הנמטולוגים האירופאי, שנערך בקיץ בסקוטלנד, וכנס החברה הפיטופתולוגית הישראלית. ההרצאות ניתנו על ידי הגברת עדנה שרון. מאמר לפרסום בעיתון מבוקר בינלאומי מצוי בשלבי הכנה סופיים.

סיכום עם שאלות מנחות לדוחות מחקר 1999

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא

תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. תודה.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה: א. המשך הניסויים בכלים גדולים לבחינת הטריכודרמה. ב. העמדת ניסויי שדה לבחינת טריכודרמה וצמחי כיסוי. ג. בחינה מעמיקה של מנגנון פעילות הטריכודרמה.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופת אליה מתייחס הדו"ח: א. ניסויים במיכל 50 ליטר: השוואה בין טריכודרמה להיקש, אפקט נמטוצידי ברור לטיפול טריכודרמה המתבטא בהורדה משמעותית בדרגת נגיעות. ב. העמדת ניסויי שדה – ראה בתקציר. ג. בחינת מנגנון פעילות הטריכודרמה – המנגנון נבחן על ידי שילוב בחינת מיצוי קרקע שנחשפו לטריכודרמה על שלבי חיים שונים, וכן פעילות ישירה של הפטרייה על שלבי חיים שונים. למיצויים – אפקט נמטוצידי על זחלי נמטודות ועל ביצי נמטודות. ביצי הנמטודות והזחלים מדרגה שניה אוכלסו על ידי קורי הפטרייה במגע ישיר.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו: תבדיד הפטרייה המשמש אותנו בתכשיר מראה פעילות נמטוצידית יפה בתנאי מעבדה, אך עדיין לא ברורה ההשלכה לתנאי שדה. צמח הקרוטלריה אינו אידיאלי לשימוש כצמח כיסוי בגלל בעיות איקלום בארץ ובעיות הגנת הצומח אחרות. צמחים מורכבים נוספים נבחנים עתה. המרכיב הנמטוצידי בתסנין הפטרייה ובמיצויי הקרקע ייבחן בהמשך.
4. הבעיות שנותרו לפתרון ואו השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן: ראה סעיף 3.
5. האם החל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביליוגרפיה, פטנטים – יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון – יש לפרט מקום ותאריך.

התוצאות בדו"ח זה – פורסמו בכנס החברה הנמטולוגית האירופאית שנערך בקיץ בדנדי, סקוטלנד וכן בכנס החברה הפיטופתולוגית הישראלית שנערך השנה (פברואר). מאמר לפרסום בעיתון מבוקר בינלאומי מצוי בשלבי הכנה סופיים.