

מציאת ביו-נמטוציידים להדברת נמטודות טפילות לצמחים המבוססים

על מיצויים מצמחי מדבר

חיים חזן¹, אוין טוי הונג וו¹, טל גור¹, טולווימי אדה-אג'אי¹, יעל בר לבן^{1,2}

¹מו"פ ערבה תיכונה וצפונית תמר, ²מו"פ מדבר וים המלח

כתובת המחברת: barlavan@adssc.org

תקציר

נמטודות יוצרות עפצים מהסוג *Meloidogyne spp.* גורמות לנזקים כבדים בגידולי חקלאות וכיום מהוות "גורם מגביל" בגידולי ירקות ופרחים. נמטודות יוצרות העפצים הן טפילים אובליגטורים ולכן חייבות צמח חי לצורך התפתחותן והתרבותן. עד לשנת 2004, ניתן היה להדביר נמטודות קרקע ע"י חיטוי הקרקע לפני השתילה במתיל ברומיד. אולם, החל משנת 2005, נאסר השימוש בחומר זה ברוב המדינות המפותחות כולל מדינת ישראל. כיום, עדיין לא נמצא חומר יעיל לקטילת נמטודות, כימי או ביולוגי.

בשוק חומרי ההדברה מצויים היום מספר נמטוציידים אשר מבוססים על זרחנים אורגנים. שימוש בהם עלול לגרום לשאריתיות חומרים מסוכנים בפירות ומכאן, לפגיעה בבריאות האדם. מעבר לשימוש בנמטוציידים אורגנים, טבעיים וידידותיים לסביבה חיוני לצורך שמירת בטיחות המזון. "ספריית הערבה" הינה אוסף של יותר מ-200 צמחים שנאספו וקוטלגו ממדבר הערבה, ומדרום הארץ. הספרייה משמשת כמקור תרכובות ותמציות טבעיות לסריקה (high throughput screening) על מנת לזהות חומרים פעילים עבור תחומי מחקר שונים. בסדרת ניסוי מעבדה שנערכו בתחנת יאיר בשנים 2017-2019 נבדקו מיצויים צמחיים שונים על התפתחות ועיכוב גידול נמטודות בצלחות מצע ובצמחי בוחן.

מתוצאות הניסויים עולה כי קיים פוטנציאל שימוש במיצי הצמח G20 כנגד נמטודות עפצים. המיצי אינו טוקסי לצמחי הפלפל וניתן יהיה ליישמו באופן סיסטמי דרך מערכת ההשקיה. בעתיד תיבחן אפשרות לגידול מסחרי של צמח זה לצורך הפקת זרעים אשר ישמשו להדברה.

מבוא

נמטודות יוצרות עפצים מהסוג *Meloidogyne spp.* גורמות לנזקים כבדים בגידולי חקלאות וכיום מהוות 'גורם מגביל' בגידולי ירקות ופרחים (Agrios, 1997). נמטודות יוצרות העפצים הן טפילים אובליגטורים ולכן חייבות צמח חי לצורך התפתחותן והתרבותן (Iberkleid et al, 2015). תסמיני המחלה המופיעים על הצמח דומים לסימפטומים של מחסור במזון או מחסור במים. בארץ, נפוצים שני מינים עיקריים של נמטודות עפצים, *M. javanica* ו-*M. incognita* שני מינים אלו תוקפים מספר רב של גידולי ירקות בארץ כגון: פלפל, עגבנייה, מלפפון ועוד רבים, כך שמחזור גידולים אינו מהווה פתרון מעשי לחלקות נגועות.

עד לשנת 2004, ניתן היה להדביר נמטודות קרקע ע"י חיטוי הקרקע לפני השתילה במתיל ברומיד. אולם, החל משנת 2005, נאסר השימוש בחומר זה ברוב המדינות המפותחות כולל מדינת ישראל. כיום, עדיין לא נמצא חומר יעיל לקטילת נמטודות, כימי או ביולוגי.

בשוק חומרי ההדברה מצויים היום מספר נמטוצידים אשר מבוססים על זרחנים אורגניים. שימוש בהם עלול לגרום לשאריות חומרים מסוכנים בפירות ומכאן, לפגיעה בבריאות האדם. מעבר לשימוש בנמטוצידים אורגניים, טבעיים וידידותיים לסביבה חיוני לצורך שמירת בטיחות המזון. "ספריית הערבה" הינה אוסף של יותר מ- 200 צמחים שנאספו וקוטלגו ממדבר הערבה, ומדרום הארץ. הספרייה משמשת כמקור תרכובות ותמציות טבעיות לסריקה (high throughput screening) על מנת לזהות חומרים פעילים עבור תחומי מחקר שונים (Amiel *et al.*, 2012; Elmann *et al.*, 2011; Elmann *et al.*, 2013; Elmann *et al.*, 2016). שימוש בנמטודה *C. elegans* המהווה "אורגניזם מודל" למחקרים רבים בעולם ובארץ מציע שפע של כלי מחקר מתקדמים בהם ניתן לעשות שימוש להבנת מסלולים גנטיים, גנומיקה מקיפה ומגוון כלים ושיטות ביו-אינפורמטיות, וכן גנטיקה התפתחותית. השימוש בכלים אלו אשר פותחו למגוון מחקרים בתחומים שונים מהווה יתרון לשימוש ב-*C. elegans* כמערכת מודל חשובה. נוסף על כך, הנמטודה המחקרית *C. elegans* דורשת טכניקות טיפול פשוטות ועלות נמוכה של גידול ותחזוקה, המאפשרת יישום של סריקת חומרים וכן מחקרים גנטיים ביוכימיים מעמיקים של המסלולים המולקולריים המושפעים מחומרים ספציפיים. לכן, שימוש ב-*C. elegans* מספק פלטפורמה אטרקטיבית לצורך תכנון וייעול גילוי חומרים ומתודולוגיות לזיהוי אתרי המטרה של החומר הפעיל (Helmcke 2010, Hutter 2006).

כיום, הדברת הנמטודות נעשית באמצעות חומרים כימיים, שיטות אגרוטכניות ושימוש בזנים עמידים. אך המודעות הגוברת לאיכות הסביבה ובטיחות המזון מאלצת להפחית את השימוש בנמטוצידים בעלי שאריות מזיקה לבני אדם. זאת ועוד, שלילת רישיון ו/או צמצום התוויות של חומרי אידוי ונמטוצידים קיימים מותירה את ממשק ההדברה כנגד נמטודות עפצים עם מעט מאוד אמצעים יעילים ומכאן ה"רעב" של שוק זה לפתרונות יעילים הינו חזק ומתמיד. סדרת ניסויים שנערכה במסגרת המו"פ המדעי ומו"פ ערבה בתחנת יאיר בשנים 2017-2019 נערכה במטרה לבחון מיצויים צמחיים כבסיס לפיתוח תכשירים חדשים כנגד נמטודות עפצים טפילות לצמחים.

שיטות

הניסויים נערכו במעבדות תחנת יאיר בשנים 2017-2019.

הקמת ספרייה - הכנת מיצויים בממסים שונים - הצמחים מוצו בשלושה ממסים. 1. מיצוי במתנול: 1 גר' חומר יבש ו-5 מ"ל מתנול (70%), טילטול עדין במשך שלושה שבועות. 2. מיצוי מיימי (DDW): ריכוזים כנ"ל. א. הרתחה. ב. חימום ב-40°C למשך ארבע שעות. מיצוי באתיל אצטט: ריכוזים כנ"ל. טילטול עדין למשך שבועיים. המיצויים סוננו בנייר ווטמן ונשמרו ב-20°C. לפני השימוש, המיצויים עורבבו בתמיסת *E. coli* עם M9 מועשר. (M9 10 µg/ml, כולסטרול ו-50 µg/ml אמפיצילין).

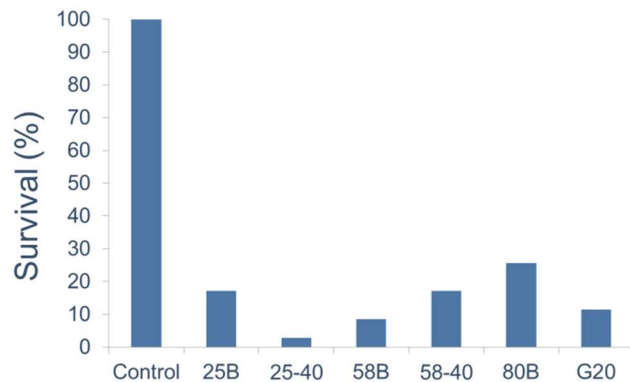
סריקה ראשונית בצלחות ע"י שימוש ב-*C. elegans* - סריקת ספריית הערבה תבוצע על ידי הוספת המיצויים לצלחות 96 בתרבית נוזלית. הניסויים יבוצעו בטריפליקטים. זחלים מסונכרנים בשלב תפתחותי L1 (סינכרון באמצעות NaOCl ובקיעה במשך הלילה בבופר M9) הונחו בבאריות (-10 15 נמטודות לכל בארית) המכילים תרכובות מ"הספרייה ערבה" בריכוזים 0.2%, 2% ו-20%. הנמטודות גודלו ב 25 מעלות צלזיוס בטילטול עדין. מדי יום נוטרו תנועה וחיות. בוצעה סריקה

של הספרייה באמצעות SYTOX green על מנת להעריך רעילות. SYTOX green הוסף לבאריות וחיות הנמטודות ניבחנה תחת מיקרוסקופ פלורסנטי. נמטודות פלורסנטיות נספרו כמתות. הכנת מיהולים למיצויים שהראו פעילות נמטוצידית לאיתור המיהול הפעיל הנמוך ביותר הדרוש-מיצוי שהראה פעילות נמטוצידית בריכוז הנמוך (0.2%), דולל לריכוזים נמוכים עוד יותר, עד לריכוז בו לא נמצאה פעילות נמטוצידית כלל, ויעילותו נבדקה בשנית. בחינת יעילות החומרים בצלחת על חיות נמטודות עפצים-בוצע בפלטות 96. לכל בארית הועברו כ-10-15 זחלי נמטודות עפצים, עליהן הוסף החומר הפעיל בריכוז שנמצא יעיל. חיות הנמטודות נבדקה לאחר 24 שעות, 48 שעות ו-72 שעות.

בחינת יעילות החומרים בקרקע מאולחת עם צמח בוחן - הניסוי בוצע בעציצים, בחדרי גידול מבוקרי טמפרטורה. עציצים מולאו בקרקע מקומית. הקרקע הכילה ביצים או זחלים במספר ידוע של שני סוגי נמטודות יוצרות העפצים *Meloidogyne*. Spp. בכל עציץ נשתלו שתילי עגבניה רגישים לנמטודות (קו אביגיל) עבור נמטודת *M. javanica*, ושתילי פלפל עבור נמטודת *M. incognita*. לכל עציץ הוסף החומר הפעיל. ארבעה שבועות לאחר השתילה, נוטרו מדדי צימוח. מערכת השורשים נשטפה ואינדקס העפצים נקבע.

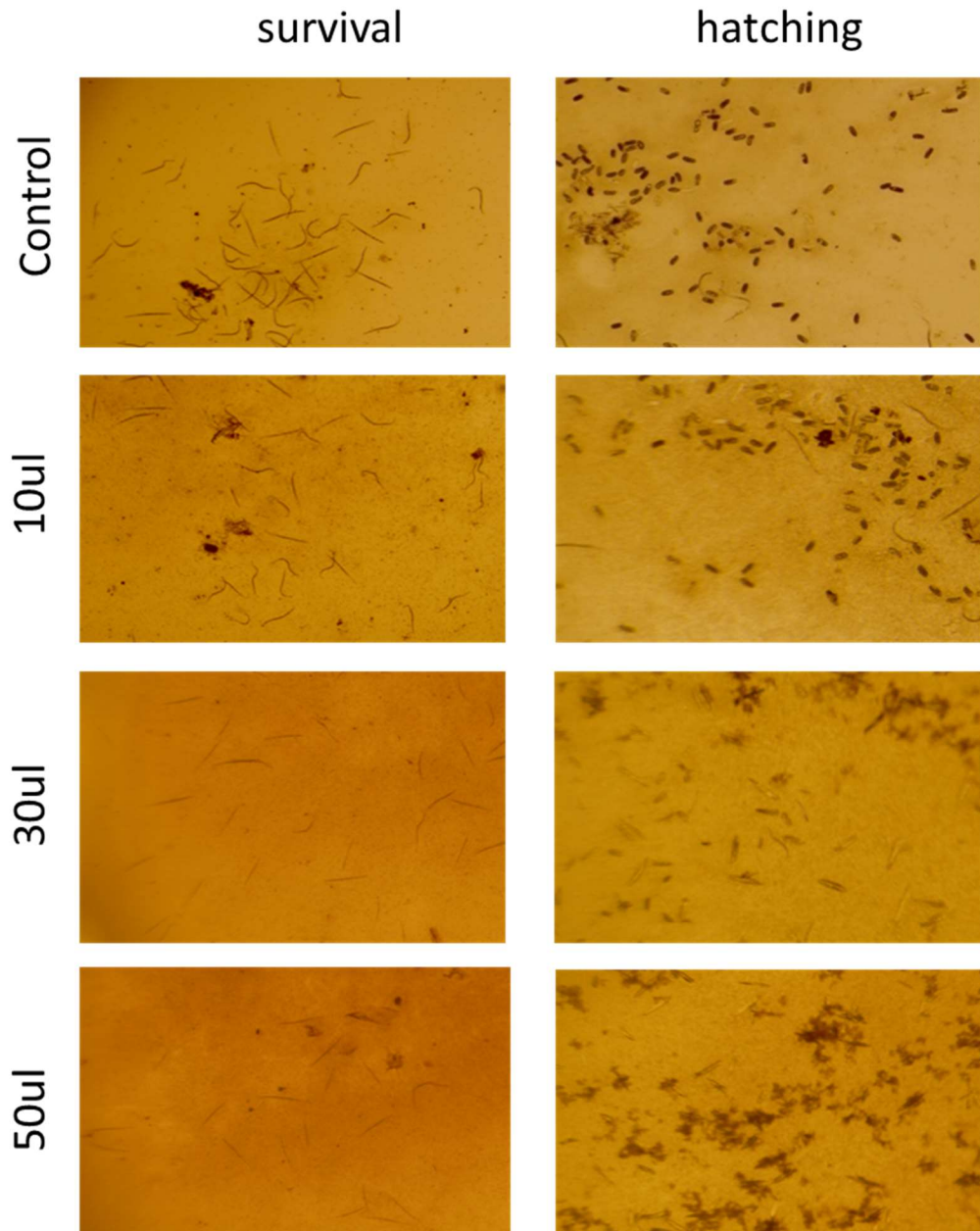
תוצאות

בחינת יעילות החומרים בצלחת על חיות נמטודות עפצים - התבצע בפלטות 96. לכל בארית הועברו כ-10-15 זחלי נמטודות עפצים, עליהן נוסף החומר הפעיל בריכוזים שונים. חיות הנמטודות נבדקה לאחר 24 שעות, 48 שעות ו-72 שעות.



איור 1: חיות נמטודות (%) לאחר טיפול במיצוי צמחי

בחינת יעילות החומרים בצלחת על יכולת נמטודות העפצים לבקוע מביצה - התבצע בפלטות 96.
לכל בארית הועברו כ- 150 ביצי נמטודות עפצים, עליהן נוסף החומר הפעיל בריכוזים שונים.
בקיעת הנמטודות נבדקה לאחר 24 שעות ו- 48 שעות.



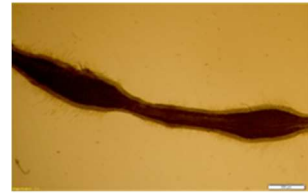
תמונה 1 : השפעת מיצויים צמחיים על בקיעת נמטודות

בחינת יעילות החומרים על הנמטודות בצלחת פטרי עם צמח בוחן - הניסוי התבצע בצלחות פטרי.
צלחת הוסף החומר הפעיל בריכוזים שונים (צילום 2). ארבעה שבועות לאחר השתילה, נקבע אינדקס העפצים.

לאחר 8 ימים



לאחר 14 ימים



לאחר 16 ימים



לאחר 20 ימים

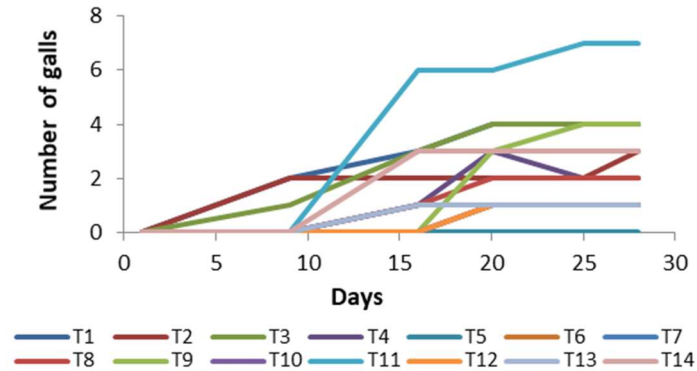


לאחר 30 ימים



תמונה 2 : השפעת מיצויים צמחיים על נמטודות בצלחות פטרי עם צמח בוחן

בחינת יעילות החומרים על הנמטודות בצלחת פטרי עם צמח בוחן - הניסוי התבצע בצלחות פטרי המכילות מצע גידול, בחדרי גידול מבוקרי טמפרטורה. בכל צלחת נזרעו זרעי חסה רגישים לנמטודות *M. javanica* ו-*M. incognita*. לכל צלחת הוסף החומר הפעיל בריכוזים שונים. ארבעה שבועות לאחר השתילה, נקבע אינדקס העפצים (איור 2).



איור 2: בחינת יעילות מיצויים צמחיים על נמטודות עם צמח בוחן. אינדקס עפצים 4 שבועות משתילה

בחינת השפעת החומרים, בקרקע ללא אילוח, על הצמח - הניסוי מתבצע בעציצים קטנים, בחדרי גידול מבוקרי טמפרטורה. המיצויים הצמחיים הפעילים, B25, G20 ו- 25-40 במספר ריכוזים אפקטיביים הוספו לקרקע מקומית עם צמח בוחן (חסה/ עגבנייה). נוטרו מדדים בצמח כקצב גידול, גובה, מספר עלים לצמח על מנת לוודא כי המיצוי אינו פיטוטוקסי לצמח (טבלה 1).

טבלה 1: בחינת השפעת החומרים, בקרקע ללא אילוח, על הצמח

מספר עלים	גובה צמח (ס"מ)	ריכוז (ח"מ)	מיצוי
11.2	19.3	250	B25
12.1	25.5	500	
11.7	27.1	750	
16	15.1	1000	
10.5	24.1	250	G29
14.2	23.6	500	
18.3	18.3	750	
11.2	21.2	1000	
9.6	20.4	250	25-40
11.4	24.1	500	
14.4	28.3	750	
15.7	19.3	1000	

בחינת יעילות החומרים בקרקע מאולחת עם צמח בוחן - הניסוי התבצע בעציצים, בחדרי גידול מבוקרי טמפרטורה. לקרקע הוספו ביצים ו/או זחלים במספר ידוע של שני סוגי נמטודות יוצרות

העפצים *Meloidogyne* Spp. בכל עציץ נשתלו שתילי עגבנייה רגישים לנמטודות (זן אביגיל, הזרע) עבור נמטודת *M. javanica*, ושתילי פלפל עבור נמטודת *M. incognita*. לכל עציץ הוסף החומר הפעיל. ארבעה שבועות לאחר השתילה, מערכת השורשים נשטפה (תמונה 3) ואינדקס העפצים נקבע. בבדיקה חיצונית נמצא כי מספר העפצים בביקורת היה גדול באופן משמעותי ממספר העפצים בטיפולים השונים.

בבדיקת השורשים (תמונה 3) נספרו מספר הביצים בכל טיפול: בטיפולי הביקורת נספרו במוצע 115 ביצי נמטודות, בטיפול בתוספת מיצוי G20 נספרו 27 ביצים. בטיפול בו הצמחים קיבלו מנה נוספת של מיצוי, לאחר שבוע, נספרו במוצע 2 ביצים.

בספירה נמצא משמעותית מספר קטן יותר של ביצים בכל הטיפולים, עם עדיפות לטיפול נוסף (איור 3).

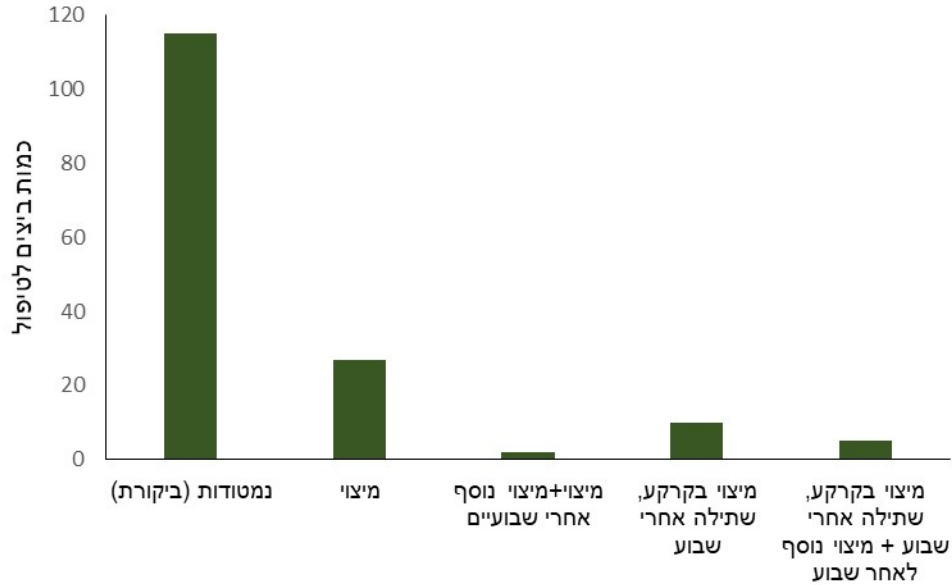


Plant

Plant + Nematodes

Plant + Nematodes
+ Extract

תמונה 3: שורשי עגבנייה לאחר 4 שבועות בהשפעת מיצויים צמחיים.



איור 3: השפעת מיצוי צמחי 20G על ביצי נמטודות בשורשים

סיכום ומסקנות

מהתוצאות עולה כי מיצוי שהפקנו מחלקי הצמח 20G הוא בעל פוטנציאל לשמש להדברת נמטודות עפצים. כאשר שימוש נוסף בחומר לאחר שבוע או שבועיים מציג תוצאות טובות אף יותר. כמו כן מצאנו, כי ניתן לטפל בקרקע במיצוי זה כטיפול מונע לפני השתילה. המיצוי מוריד את כמות הנמטודות ואת כמות הביצים ביותר מ-90%. מבדיקות שערכנו עולה כי המיצוי אינו טוקסי לצמח ואינו פוגע בצמיחתו. ניתן יהיה ליישם את החומר דרך מערכת ההשקיה. הצמח 20G הוא צמח שאינו גדל בארץ באופן טבעי (היה בשנות ה-50 "פליט תרבות"). מתוצאות הפרקציונציה אנו למדים כי הזרע מכיל קרבקרוול וטימול. נמצא כי החומרים הפעילים הנדיפים מצויים בזרעים בכמות גדולה בהרבה מאשר בעלים. (הזרע מכיל קליפה שמגינה על החומרים הנדיפים, וכך, מכיל מאליו שמן שמייצב חומרים אלה). לאור זאת, הנבטנו זרעים של צמח זה וכעת אנו לומדים את התנאים הדרושים לגידול זה.

הבעת תודה

תודה לקרן המדען הראשי על מימון תוכנית מחקר מספר 93-16-0001. תודתנו נתונה לקק"ל על התמיכה במערך הניסויים של מו"פ ערבה.

מקורות

Agrios, G. N. 1997. Plant diseases caused by nematodes. In: Agrios, G.N. Plant Pathology. Academic Press, San Diego, cap.15, p. 565-597.

Helmcke, K. J., Avila, D. S., and Aschner, M. (2010) Neurotoxicol Teratol 32, 62-67

Amiel, E., Ofir, R., Dudai, N., Soloway, E., Rabinsky, T., Rachmilevitch, S., 2012. β -Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM 2012, 872394

Das, Sukalpa, and Roland Perry. Survival of Juveniles of Meloidogyne Spp. In the Absence of a Host Plant. Diss. master.

Elmann, A., Mordechay, S., Erlank, H., Telerman, A., Rindner, M., Ofir, R., 2011. Anti-Neuroinflammatory effects of the extract of *Achillea fragrantissima*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11, 98-98.

Elmann, A., Telerman, A., Erlank, H., Mordechay, S., Rindner, M., Ofir, R., Kashman, Y., 2013. Protective and Antioxidant Effects of a Chalconoid from *Pulicaria incisa* on Brain Astrocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 694398.

Elmann, A., Telerman, A., Erlank, H., Ofir, R., Kashman, Y., Beit-Yannai, E., 2016. Achillolide A Protects Astrocytes against Oxidative Stress by Reducing Intracellular Reactive Oxygen Species and Interfering with Cell Signaling. *Molecules* 21, 301.

Hutter, H. (2006) *Methods Mol Biol* 351, 155-173

Iberkleid, I., Yeheskel, A., Belausov, E. and Horowitz Brown, S. (2015). Structural Characterization and Localization Analysis of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* Fatty Acid and Retinol Binding Protein (Mj-FAR-1).. *EJPP*.