

## שימוש בחיידקים כיטינווליטיים להדברה ביולוגית של נמטודות עפצים

### שותפים:

משה אלבז, מייקל לופטהאוס, ליאנה גנות, חיים לינרס, מירון סופר - מו"פ דרום.  
סיגל הורוביץ, רחל אוזולבו, איציק שפיגל – מנהל המחקר החקלאי.  
אביתר איתאל - שה"מ.

### תקציר:

בעיית נמטודות יוצרות עפצים הולכת וגדלה בגידולים שונים בבתי צמיחה כמו עגבנייה ופלפל ובמיוחד באזור הבשור כאשר הגידול מתבצע בקרקעות עם תכולת חול גבוה שמועדפות על נמטודות. אחת האפשרויות לטיפול בנמטודות עפצים היא העשרה של הקרקע במדביר ביולוגי שניתן לשמר את נוכחותו לאורך הגידול כחלופה לחומר חיטוי שפעילותו קצרת טווח. חיידקים כיטינווליטיים נמצאו בעבר כבעלי יכולת להפחית אוכלוסיות של נמטודות עפצים מהמין *Meloidigyne javonica* שגורמות נזקים משמעותיים בגידולי מפתח כמו עגבניות. מנגנון הפעולה של החיידקים קשור כפי הנראה להפרעה או פגיעה ביכולתה של הנמטודה לאתר את הצמח הפונדקאי ובאמצעות פעילות אנזימטית שמשפיעה על כיטין. חיידקים כיטינווליטיים בודדו בעבר מקרקעות שהועשרו בקלנדוזון, תערובת שמכילה כיטין-חלבון. נמצא כי תערובת זו חשובה בבניית הפאונה של חיידקים כיטינווליטיים בקרקע, הפחתת הנגיעות בנמטודות עפצים, ואף בעלת יכולת השפעה חיובית על המשקל הטרי של נוף הצמח. **מטרת המחקר**: לאמוד את יעילותם של חיידקים כיטינווליטיים במצע המועשר בקלנדוזון כאמצעי למניעה של נגיעות בפלפל בנמטודות עפצים. לצורך בדיקת יעילותם של חיידקים כיטינווליטיים הועמדו בניסוי 4 ביקורות וטיפול מטרות אחד: 1. בקורת ללא נמטודות 2. נמטודות בלבד 3. נמטודות + קלנדוזון 4. קלנדוזון בלבד 5. נמטודות + חיידקים + קלנדוזון. במהלך הניסוי נבדקו שורשי הדליים לנוכחות נמטודות: אינדקס עפצים (כמדד גס לאמידת אוכלוסיית הנמטודות) ומספר ביצים לגרם שורש (כמדד מדויק יותר). בנוסף נבדקו: משקל הנוף, וכמות הפרי. נמצא כי נוכחות הקלנדוזון הפחיתה את גודל אוכלוסיית הנמטודות בצורה משמעותית (אינדקס עפצים ומספר ביצים לגרם שורש) אולם טיפול החיידקים לא הפחית בנוסף לקלנדוזון את אוכלוסיית הנמטודות בצורה משמעותית. יתכן ולחיידקים היה אפקט שלילי על משקל הנוף. לא היה הבדל במשקל היבול הכללי בין הטיפולים. נראה כי לקלנדוזון יש פוטנציאל בהפחתת הנגיעות בנמטודות עפצים אולם לחיידקים כיטינווליטיים מהמין הנבדק לא הייתה כל השפעה שלילית על אוכלוסיית הנמטודות. יש לחזור על הניסוי בקרקע ולא בדליים ולבדוק מינים נוספים של חיידקים בעלי פעילות כיטינווליטית.

### הצגת הבעיה:

בעיית נמטודות יוצרות עפצים הולכת וגדלה בגידולים שונים בבתי צמיחה כמו עגבנייה ופלפל ובמיוחד באזור הבשור כאשר הגידול מתבצע בקרקעות עם תכולת חול גבוהה שמועדפות על נמטודות (Lopez perez et al. 2006). הנמטודה הינה פרוזיט אובליגטורי שמשלים את מחזור חייו תוך ארבעה עד שמונה שבועות כתלות בתנאי האקלים. מזיק זה פוגע בתפקוד מערכות ההובלה של הצמח הפונדקאי דבר שמוביל לעיכוב משמעותי בגדילה, פחיתה ניכרת ביבול, ולהפסדים עצומים. אכלוס השורשים בעומק מאפשר את הישרדותן של הנמטודות בין העונות ומדגיש את הקושי בהתמודדות השוטפת בבקרה של אוכלוסיותיהן. בנוסף לקושי זה, חיטוי קרקע במתיל ברומיד ונמטוצידים סיסטמיים שהיוו גישה יעילה להדברה בעבר אינם זמינים עוד שכן נאסרו לשימוש בגלל הנזק לאדם ולסביבה. כל אלו מדגישים את הצורך במציאת חלופות ידידותיות לאדם ולסביבה המותאמות למערכת הדברה משולבת (IPM) Integrated Pest Management. אחת האפשרויות היא העשרה של הקרקע במדביר ביולוגי שניתן לשמר את נוכחותו לאורך הגידול כחלופה לחומר חיטוי שפעילותו קצרת טווח.

חיידקים כיטינווליטיים מהמין *Pseudomonas chitinolytica* נמצאו בעבר כבעלי יכולת להפחית אוכלוסיות של נמטודות עפצים מהמין *Meloidigyne javonica* שגורמות נזקים משמעותיים בגידולי מפתח כמו עגבניות. (Spigel et al. (1991 הראו כי בקרקע שאוכלסה בנמטודות יחד עם החיידקים הייתה ירידה משמעותית במספר הזחלים בשלב J2 שחדרו לשורשי הצמח הפונדקאי. שני הפרמטרים שנמדדו: אינדקס העפצים, וכמות הביצים לגרם שורש היו נמוכים בצורה משמעותית בטיפולים שהכילו חיידקים כיטינווליטיים. מנגנון הפעולה של החיידקים קשור כפי הנראה להפרעה או פגיעה ביכולתה של הנמטודה לאתר את הצמח הפונדקאי ובאמצעות פעילות אנזימטית שמשפיעה על כיטין. כיטין הינו פולימר של N- acetyl - D- glucosamine והצורה הנפוצה שלו בטבע ( $\alpha$ -chitin) מהווה מרכיב חשוב בדופן תאים של פטריות, ביצים של נמטודות והשלד החיצוני של חסרי חוליות רבים (Jeuniaux, 1982). מלבד ההשפעה של נוכחות כיטין על

התבססותן של מיקרואורגניזמים בקרקע, בתהליך פירוקו משתחררת אמוניה שתורמת להדברה של פטריות פתוגניות (Schippers and palm, 1973). חיידקים כיטינוליטיים בודדו בעבר מקרקעות שהועשרו בקלנדוזן, תערובת שמכילה כיטין-חלבון (שברי סרטנים 25%) ואוריאה (75%). נמצא כי תערובת זו חשובה בבניית הפאונה של חיידקים כיטינוליטיים בקרקע, הפחתת הנגיעות בנמטודות עפצים, ואף בעלת יכולת השפעה חיובית על המשקל הטרי של נוף הצמח ( Spiegel al. 1988).

**מטרת המחקר:** לאמוד את יעילותם של חיידקים כיטינוליטיים במצע המועשר בקלנדוזן כאמצעי למניעה של נגיעות פלפל בנמטודות עפצים.

## 2. שיטות וחומרים:

### 2.1 כללי:

הניסוי בוצע במנהרה בשטח 100 מ"ר בחלקת הסגר ובמרכזה שתי תעלות לניקוז והמתה של נמטודות שנשטפו מהדליים. הדליים בניסוי היו בנפח 10 ליטר, נצבעו בלבן והכילו 11 ק"ג קרקע מקומית והשאר טוף גס שמוקם בתחתית הדלי לשיפור הניקוז. בטיפולים בהם הייתה נוכחות של נמטודות עורבבו פרטים מהמין *Meloidigyne incognita* שנלקחו מקרקע שנדגמה קודם לניסוי ובה צפיפות הנמטודות הייתה ידועה מראש. הצפיפות הסופית שהתקבלה בטיפולי הנמטודות הייתה בקרוב נמטודה לכל גרם קרקע (כ- 11,000 נמטודות לדלי). בטיפולים בהם הייתה דרושה נוכחות של כיטין, עורבב קלנדוזן בכמות של 0.7% (W/W). בטיפול שבו נבדקה יעילות החיידקים עורבבו עם הקרקע  $10^6$ - $10^7$  חיידקים לכל גרם קרקע (*Microbacterium spp.*) אשר גודלו על מצע נוזלי LB Broth Lennox (Difco<sup>TM</sup>) Catalog 240230. בטמפרטורה של 27 מ"צ למשך 48 שעות.

### 2.2 טיפולי הניסוי:

לצורך בדיקת יעילותם של חיידקים כיטינוליטיים הועמדו בניסוי 4 ביקורות וטיפול מטרה אחד: 1. בקורת ללא נמטודות 2. נמטודות בלבד 3. נמטודות + קלנדוזן 4. קלנדוזן בלבד 5. נמטודות + חיידקים + קלנדוזן. לכל אחד מהטיפולים שמוקמו בצורה אקראית במבנה הועמדו 12 דליים שמחציתם נבדק באמצע הניסוי לאחר 45 ימים ומחציתם בסוף הניסוי לאחר 100 ימים.

### 2.3 המשתנים הנבדקים:

במהלך הניסוי נבדקו שורשי הדליים לנוכחות נמטודות: אינדקס עפצים (כמדד גס לאמידת אוכלוסיית הנמטודות) ומספר ביצים לגרם שורש (כמדד מדויק יותר). בנוסף נבדקו שני מדדים צמחיים והם: משקל הנוף, וכמות הפרי. כל המדדים מלבד כמות הפרי נבדקו בשני עיתויי הבדיקה.

### 2.4 העמדת הניסוי:

כל הטיפולים הועמדו שבועיים קודם לשתילה ובתאריך 22.4.12. באותו היום הוכנו טיפולי הביקורת ואחריהם הטיפולים המכילים את הנמטודות. ערבוב הקרקע עם התוסף (קלנדוזן), נמטודות או חיידקים בוצע באמצעות מערבול בטון. בשבועיים שלאחר העמדת הדליים הורטבו הדליים בכמות של כ- 600 מ"ל לדלי שחולקו ל 3 השקיות במשך היום. בתאריך 6.5.12 נישתל הניסוי בפלפל זן "רומנס" ושתילי טיפול החיידקים נטבלו למשך דקה בתמיסה המכילה כ-  $10^6$ /ml חיידקים. בסה"כ בטיפול בו נכחו חיידקים בוצעו שני אכלוסים: האחד בערבוב עם הקרקע והשני בזמן השתילה.

### ניתוח סטטיסטי:

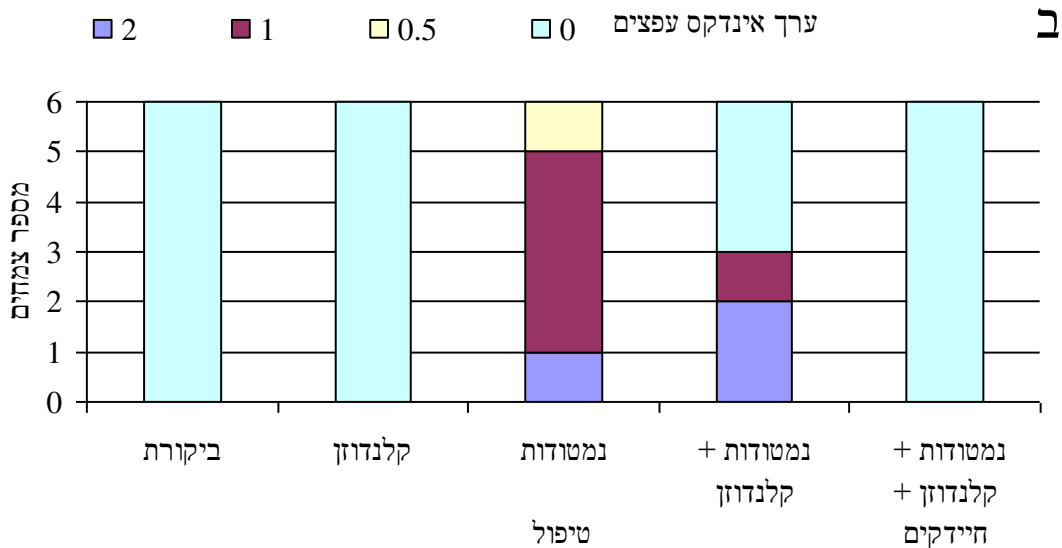
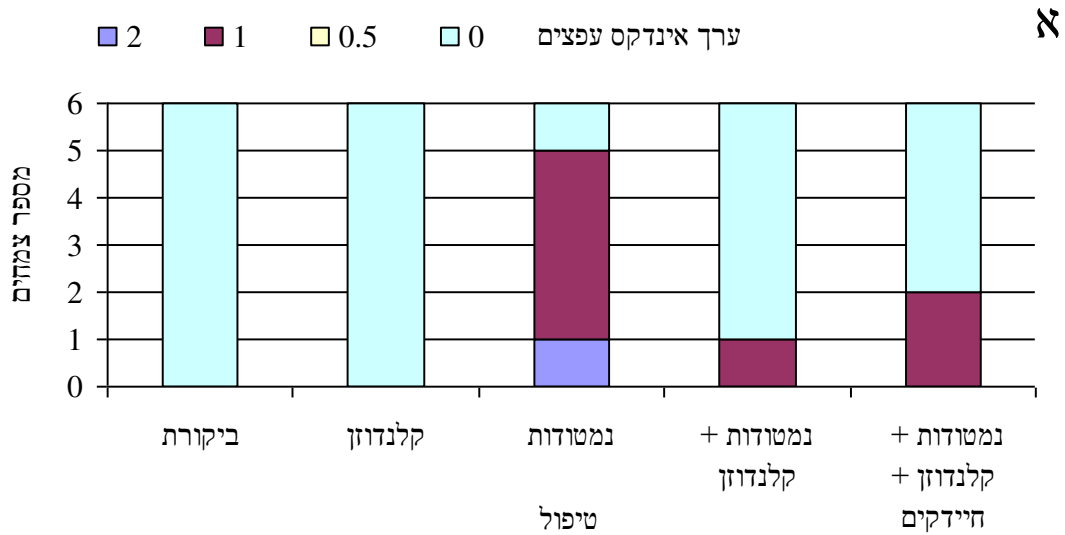
על כל המשתנים בוצעה אנאליזה של שונות (One Way ANOVA). בחלק מהמקרים כדי להשיג הומוגניות של שונויות בוצעה טרנספורמציה לוגריתמית לתונים. הניתוחים בוצעו באמצעות JMP5.0.1.

## 3. תוצאות:

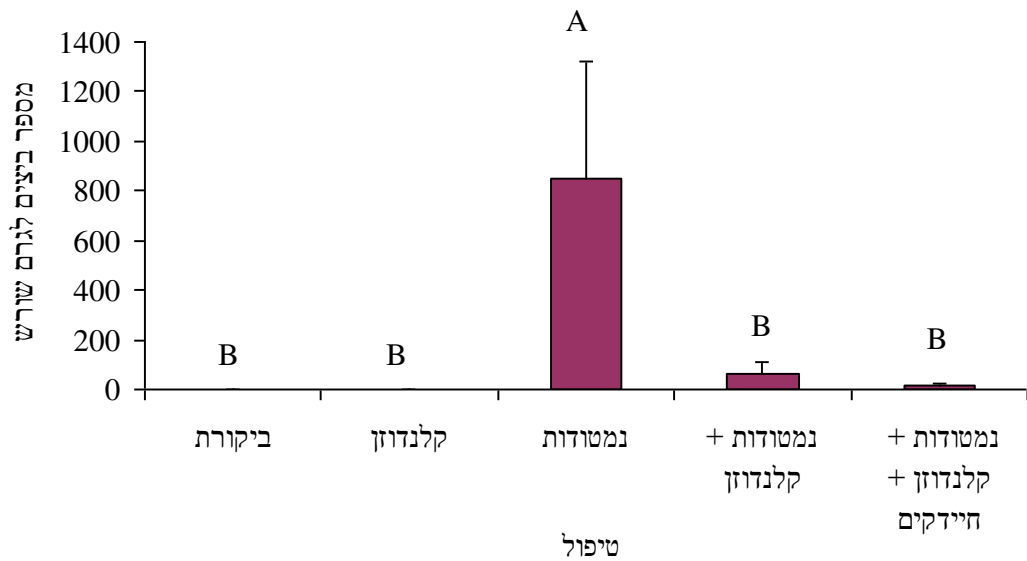
### 3.1 השפעת הטיפולים על אוכלוסיית הנמטודות בשורשי הצמחים

בבדיקת אינדקס העפצים לאחר 45 ימים נמצא כי רוב הצמחים בטיפול עם נמטודות בלבד (5/6) נוצרו בשורשיהם עפצים. לעומתם בטיפול הנמטודות + קלנדוזן או נמטודות + חיידקים + קלנדוזן נמצאו עפצים בצמח אחד או שניים בהתאמה. דליי הביקורות (קלנדוזן בלבד, ביקורת ללא נמטודות) היו נקיים מעפצים (איור 1 א). למרות נוכחות העפצים לא נמצאו ביצים בשורשי

הצמחים לאחר 45 ימים. בחזרות הניסוי שנבדקו לאחר 100 ימים נמצא כי ערכי הנגיעות בעפצים היו שוב הגבוהים ביותר בטיפול הנמטודות בלבד או נמטודות בתוספת קלנדוזן. בטיפול נמטודות + חיידקים + קלנדוזן לא נראו עפצים (איור 1). בהתאמה לתוצאות שהתקבלו לגבי העפצים מספר הביצים לגרם שורש היה שונה בצורה משמעותית בין הטיפולים ( One Way ANOVA,  $P < 0.05$ ) מספר הביצים לגרם שורש הגבוה ביותר התקבל בביקורת המכילה נמטודות בלבד לאחר מיכן בהבדל מובהק (Tukey Kramer,  $P < 0.05$ ) בביקורת הנמטודות עם קלנדוזן ולבסוף כמות ביצים מועטה בטיפול המכיל קלנדוזן + חיידקים + נמטודות. למרות שכמות הנמטודות הממוצעת הייתה הנמוכה ביותר בטיפול שהכיל חיידקים כיטינוליטים טיפול זה לא נבדל בצורה משמעותית מהטיפול של קלנדוזן עם נמטודות (איור 2).



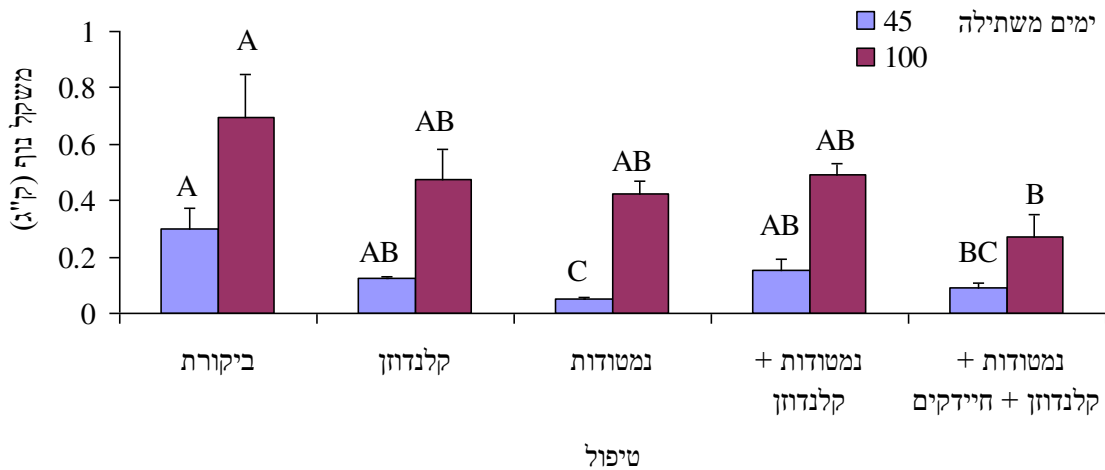
איור 1: התפלגות ערכי אינדקס העפצים (0-5) כפי שהתקבלו בטיפולים השונים לאחר 45 ימים (א) ולאחר 100 ימים (ב).



איור 2: מספר ביצים ממוצע לגרם שורש שנמצאו בטיפולים השונים 100 ימים. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים (Tukey Kramer,  $P < 0.05$ ) על העמודות מצוינת שגיאת התקן.

3.2 השפעת הטיפולים על משקל הנוף.

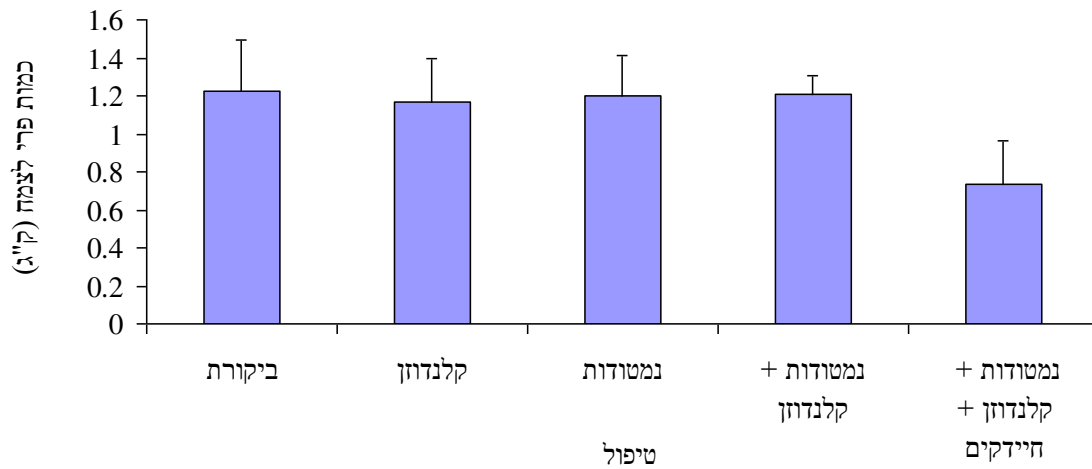
נמצא בשני תאריכי הבדיקה כי משקל הנוף היה מושפע בצורה משמעותית מהטיפול. לאחר 45 ימים נמצאה ירידה משמעותית במשקל הנוף בטיפול נמטודות בלבד בהשוואה לביקורת ולטיפולים שהכילו קלנדוזן אולם ללא הבדל משמעותי מהטיפול בו נכחו חיידקים כיטינוליטים. לאחר 100 ימים המגמות היו דומות אולם ההבדל המשמעותי היחיד היה בין הביקורת הנקייה ובין הטיפול של נמטודות בשילוב חיידקים וקלנדוזן.



איור 3: משקל הנוף הממוצע לאחר 45 ו 100 ימים משתילה. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים (Tukey Kramer,  $P < 0.05$ ).

### 3.3 השפעת הטיפולים על כמות הפרי.

למרות שכמות הפרי הממוצעת הייתה הנמוכה ביותר בטיפול שמכיל נמטודות + חיידקים + קלנדוזן לא נמצא הבדל מובהק בכמות הפרי בין הטיפולים השונים (איור 4)



איור 4: משקל הפרי הממוצע לצמח שהתקבל בכל אחד מטיפולי הניסוי. לא התקבלו הבדלים מובהקים בין טיפולי הניסוי.

#### 4. מסקנות ודיון:

4.1 השפעת הטיפול על אוכלוסיית הנמטודות  
תוצאות הניסוי מראות כי לנוכחות קלנדוזן בקרקע ישנה השפעה על אכלוס השורשים בנמטודות עפצים. ערכי אינדקס העפצים, ומספר הביצים לגרם שורש היו נמוכים בהשוואה לטיפול הנמטודות ללא תוסף המכיל כיטין. למרות שערכי אינדקס העפצים ומספר הביצים לגרם שורש היו נמוכים יותר בטיפול שכלל גם חיידקים בנוסף לקלנדוזן הפחתה זו לא הייתה משמעותית דיה. באופן כללי רמת הנגיעות וגודל אוכלוסיית הנמטודות שהתפתחה בדליי הניסוי הייתה נמוכה.

#### 4.2 השפעת הטיפול על משקל הנוף

היה ניתן לראות בברור כי נוכחות הנמטודות בדליים הפחיתה את משקל הנוף הממוצע לאחר 45 ימים וגם לאחר 100 ימים. אולם, גם בטיפולים נוספים, כאלו שהכילו נמטודות עם חיידקים וקלנדוזן הייתה הפחתה במשקל הנוף. לכן יתכן שגם נוכחות של חיידקים הפחיתה את קצב ההתפתחות של הצמחים.

תוצאות הניסוי מעודדות את הבדיקה של השפעת תוספים המכילים כיטין על אוכלוסיות של נמטודות עפצים ובנוסף בחינה מחודשת של יעילותם של חיידקים כיטינוליטיים ממגוון מינים על נמטודות עפצים לאחר סריקה מקיפה של יעילותם בתנאי מעבדה.

#### מקורות ספרותיים:

Jeuniaux, C., Dandrifosse, G., Micha, J.C. (1982) Characterization and evolution of chitinolytic enzymes in lower Vertebrates. *Biochemical Systematics and Ecology*, 10: 365-372.

López-Pérez, J., Le Strange, M., Kaloshian, I., Ploeg, A. (2006) Differential response of *Mi* gene-resistant tomato rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *Crop Protection*, 25, 382-388.

Spigel, Y., Chet, I., Cohn, E., Galper, S. and Sharon, E. (1988) Use of chitin for controlling plant- parasitic nematodes. *Plant and Soil*, 109, 251-256.

Spigel, Y., Cohn, E., Galper, S. Sharon, E., and Chet, I. (1991) Evaluation of newly isolated bacterium, *Pseudomonas chitinolytica* sp. for controlling the Root –Knot Nematode *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Science and Technology*, 1, 115-125.

Schippers, B., and L.C. Palm. " Ammonia, a fungistatic volatile in chitin – amended soil. *Netherlandes Jornal of Plant Pathology*. 79, 1973, 279-281.

**תודות :** ברצוני להודות למועצת הצמחים על התמיכה במחקר.