

השפעת המצב האללי והרקע הגנטי על תופעת שבירת העמידות לנמטודות עפצים מהמין *Meloidogyne javanica* בעגבנייה

חוקרים שותפים:

סיגל בראון-הורביץ רחל אוזולבו - מנהל המחקר החקלאי.
משה אלבו, מייקל לופטהאוס, מירון סופר, ליאנה גנות, הדר פדידה, אלק סולפוי-מו"פ דרום
בוזו קפלן- "נירית זרעים".

תקציר:

נמטודות עפצים הינן אחד ממזיקי המפתח במגוון גידולים חקלאיים ובניהם גם בגידול עגבנייה. השלב ההתפתחותי J2 חודר לשורש ובהמשך בונה הנמטודה אתר הזנה. הנזק לצמח מתבטא באיבוד טורגור לצמח, הצהבה, ופחיתה ביבול. העמידות לנמטודות עפצים בזני עגבניות מאכל מוקנית לרוב ע"י גן דומיננטי יחיד הנקרא Mi. המנגנון פועל כך שלאחר חדירת הנמטודה לצמח מתרחשת שרשרת של תגובות מטבוליות ובסופן התאים סביב הנמטודה מתים ונמנעת היצירה של אתר הזנה ע"י הנמטודה. בשנים האחרונות עם ההישענות על מקורות עמידות מצומצמים התפתחו אוכלוסיות שוברות עמידות אשר מצליחות להתמודד עם מנגנון ה-Mi, להתפתח, ולהשלים מספר מחזורי חיים. מחקרים הראו כי למצב האללי של הגן (הומוזיגוט או הטרוזיגוט ל-Mi) יש השפעה על רמת הנגיעות וההתמודדות עם אוכלוסיות "רגילות" (אוירולנטיות) ואוכלוסיות שוברות עמידות (וירולנטיות). מטרת המחקר: לבחון את השפעה של המצב האללי והרקע הגנטי (מין הבר) ממנו הוחדר הגן על מידת האכלוס של צמחי עגבנייה בנמטודות עפצים. לבדיקת שאלת המחקר נבחרו שישה זנים אשר מקור ה-Mi שבהם משני רקעים גנטיים שונים ועבור כל רקע גנטי נבדקו מצבים אללים שונים. התוצאות הראו כי הרקע הגנטי והמצב האללי ל-Mi השפיעו על רמת האכלוס של השורשים בנמטודות. כמו כן האוכלוסייה המאלחת (רגילה או שוברת עמידות) השפיעה גם היא על גודל אוכלוסיית הנמטודות בשורשים. תוצאות אלו מסייעות בבחירת מקורות עמידות בהתמודדות עם נמטודות עפצים.

הצגת הבעיה: נושא זה עוסק בהתמודדות עם נמטודות יוצרות העפצים מהסוג *Meloidogyne* spp. נמטודות אילו הן אנדופרזיטיות שתוקפות שורשים של צמחים ממגוון רב של משפחות בוטניות ובכללם גידולים חקלאיים רבים כיום נמטודות עפצים נמנות עם פגעי הקרקע הקשים ביותר בגידול ירקות בארץ ובעולם. הנמטודה, לאחר חדירתה לשורש יוצרת תאי הזנה שמסייעים בהתפתחותה ובהשלמת מחזור חייה (Agrios, 1997). הנזק לרוב מתבטא בהאטת צימוח, הצהבת קודקודים ולעתים גם בתופעות איבוד טורגור ונבילה המובילים להפסדי יבול עצומים (Abad and Williamson, 2010). מניעה של נגיעות בנמטודות (מניעת ההגעה של הנמטודה לצמח) או עמידות צמחים לפגעי קרקע ובמיוחד לנמטודות יוצרות עפצים הן הגישות המקובלות להתמודד עם מזיק חשוב זה.

העמידות לנמטודת העפצים בזני עגבניות תעשייה ומאכל מוקנית לרוב ע"י גן דומיננטי יחיד הנקרא *Mi gene*. מנגנון העמידות פועל כך שלאחר חדירת הנמטודה לשורש נגרמת בצמח תגובת רגישות שמביאה לתמותת התאים סביב הנמטודה ומניעת ההיווצרות של אתר הזנה (Roberts, 2002). עמידות זו מוקנית כנגד שלושת מיני ה-*Meloidogyne* הפתוגניים ביותר *M. javanica*, *M. incognita*, ו-*M. arenaria*. למרות מנגנון עמידות זה בשנים האחרונות אנו עדים למקרים

רבים של אוכלוסיות נמטודות "שוברות עמידות" שמצליחות להתפתח על צמחים עמידים וגם כאשר מתקיימים התנאים הסביבתיים הדרושים לפעילותו של החלבון שנוצר מה- Mi. מחקרים אחרונים מראים כי אחד הגורמים העיקריים המעורבים בביררה והתפרצות הביוטיפים הוירולנטים של הנמטודות (שוברי העמידות) אשר מצליחים להתמודד עם מנגנון ה- Mi, הוא הרקע הגנטי של זן ו/או הכנה והמצב האללי של Mi gene: הומוזיגוט (Mi/Mi) לעומת הטרזיגוט (Mi/mi), כאשר על פי רוב בקווים הטרזיגוטים כושר התרבות הנמטודה גבוה יותר. (Djian-Caporalino et al., 2011) למצב האללי והרקע הגנטי מקור העמידות ל- Mi (L. peruvianum או L. chilense) ישנה השפעה על ברירת ביוטיפים וירולנטים ולכן עשויה להיות השפעה מכרעת על הנזק הנגרם מנמטודות עפצים בעגבנייה. חבל הבשור מהווה קרקע פורייה להתפתחות נמטודות בכלל ולאוכלוסיות שוברות עמידות בפרט. א. הוא אחד מאזורי הגידול העיקריים של עגבניות מאכל בישראל (כ-50%). ב. מתקיים בו רצף גידולים של פונדקאים פוטנציאליים שמבטיחים את שימורן של אוכלוסיות גדולות של נמטודות עפצים. ג. האזור מאופיין בקרקע בעלת תכולת חול גבוהה שמועדפת על נמטודות עפצים (Lopez perez et al. 2006).

מטרות הניסוי:

1. בחינת השפעה כמותית ("dosage effect") של ה- Mi gene (הומוזיגוט בהשוואה לטרזיגוט) על ביטוי עמידות כנגד אוכלוסיות אוירולנטים ווירולנטים ל- Mi.
2. בחינת השפעת מקור הגן (Mi (Solanum spp.) על ביטוי העמידות Mi כנגד ביוטיפים אוירולנטים ווירולנטים ל- Mi.

מבנה הניסוי: הניסוי הכיל 6 קוים שמקורם בשני רקעים גנטיים שונים (Lycopersicum peruvianum, Lycopersicum chilensis) ובעלי מצב אללי שונה, פרטים אודות הקווים שסופקו ע"י "נירית זרעים" יחד עם המידע הגנטי מובאים בטבלה 1. מידע גנטי זה נבדק ואומת במעבדה באמצעות סמנים גנטיים. בכל קו נבדקות שתי אוכלוסיות של המין M. javanica אחת שנמצאה במעבדה כשוברת עמידות (Mi virulent) ואוכלוסייה נוספת שאינה שוברת עמידות (Mi avirulent). כל זן אולח בשתי צפיפויות של ביצים, 5000 ו 25000 לכל דלי. בסה"כ התקבלו בניסוי 24 טיפולים שונים (2 אוכלוסיות X 2 צפיפויות X 6 זני עגבנייה). לכל טיפול הועמדו 8 דליים צבועים בלבן בנפח 10 ליטר שמולאו כך שתחתיתם 5 ס"מ טוף לשיפור הניקוז והשאר (כ- 11 ק"ג) קרקע מקומית. בכל טיפול פוצלו הדליים לשתי חלקות קטיף של 4 דליים שמוקמו באופן אקראי במבנה עם תעלות לניקוז המים בגודל 100 מ"ר. במהלך הניסוי נאסף הפרי מכל טיפול כך שכל ארבעה דליים מהווים חלקת קטיף נפרדת, סה"כ 2 חלקות קטיף לכל טיפול. בסוף הניסוי נחתך כל צמח בצוואר השורש, השורשים הוצאו מהדליים, נישטפו נשקלו ונבדקו בצורה פרטנית להערכה של אינדקס עפצים (0-5). לאחר מכן נטחנו השורשים בעזרת מערבול תעשייתי Waring commercial blender (Waring, Torrington, CT, USA) בתמיסה של 1% כלור שסוננה לאחר מיכן למיצוי ביצי הנמטודות מסך החומר הצמחי. לאחר מכן רוכזו הביצים באמצעות צנטריפוגה ומספר מדגמים נלקחו מהתמיסה להערכת כמות הביצים לגרם שורש תחת בינקולר. השתילה בוצעה ב- 22/4/12. והסיום - 2/8/2012.

זן	גנוטיפ
72592	Mi-1 ^{LC} /mi-1
72593	Mi-1 ^{LP} /Mi-1 ^{LC}
79300	Mi-1 ^{LP} /mi-1
NETTA	mi-1/mi-1
PL-5	Mi-1 ^{LP} /Mi-1 ^{LP}
PL-6	Mi-1 ^{LC} /Mi-1 ^{LC}

טבלה 1: קווי הזנים הנבדקים בניסוי,

מצב אללי לגן Mi והרקע הגנטי.

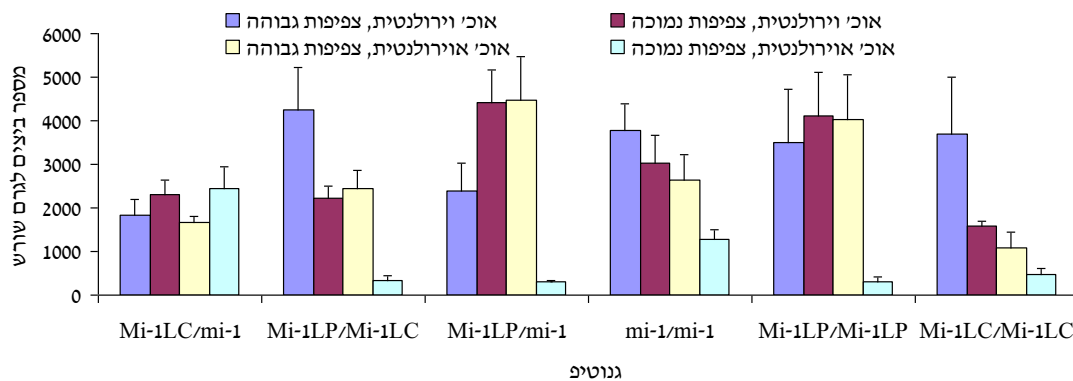
LP - *Lycopersicum peruvianum*

LC- *Lycopersicum chiliensis*

תוצאות:

השפעת הרקע הגנטי והמצב האללי על אוכלוסיית הנמטודות:

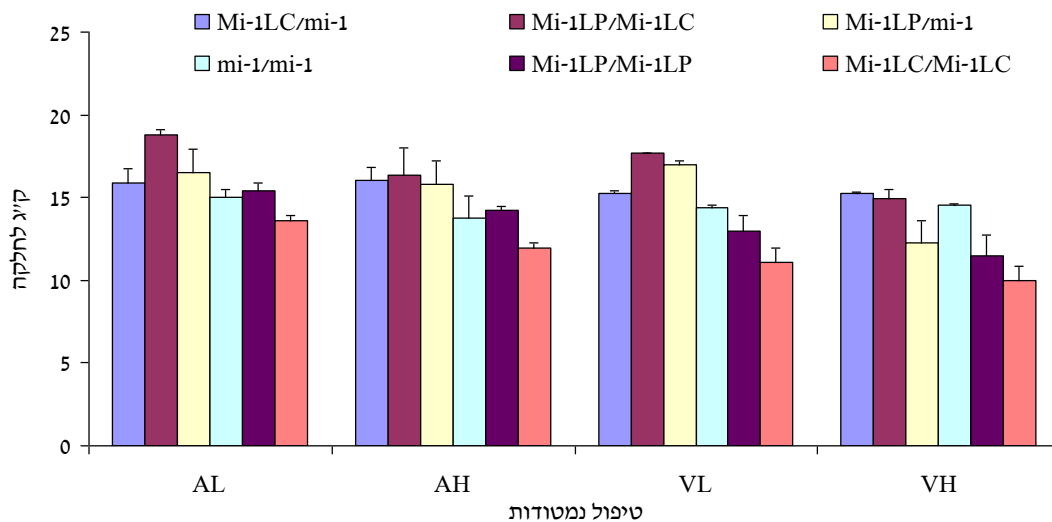
בהשוואת מספר הביצים לגרם שורש בטיפולים השונים היה ניתן לראות כי עבור רוב הגנוטיפים קצב הגידול של האוכלוסייה הממוצע היה הנמוך ביותר כאשר הצמחים אולחו באוכלוסייה אוירולנטית של 5000 ביצים. בשאר הטיפולים כל אחד מהגנוטיפים השפיע בצורה שונה על קצב גידול האוכלוסיות הוירולנטיות או האוירולנטיות. (וירולנטית – "שוברת עמידות" או אוירולנטית – "לא שוברת עמידות"). בהשוואת השפעת המצב האללי על קצב הגידול ניתן לראות כי האוכלוסייה האוירולנטית בצפיפות נמוכה התפתחה בקצב הגבוה ביותר בזן ללא מנגנון העמידות (mi/mi) בהשוואה לרוב הזנים האחרים. בזנים בעלי מצב הומוזיגוט דומיננטי ל-Mi קצב הגידול באותו טיפול היה הנמוך ביותר. נראה כי בזן שבו המצב האללי ל- Mi היה הומוזיגוט דומיננטי והרקע הגנטי היה *L. chiliensis* התקבלה ההפחתה הגדולה ביותר של האוכלוסיות האוירולנטיות בהשוואה לזן הביקורת ללא Mi (איור 1). בנוסף ניתן לראות כי קיים אפקט כמותי של הגן *Mi* שמקורו מ- *L. chiliensis*, שכן הגנוטיפ ההטרוזיגוט תמך בכושר ריבוי גבוה יותר לעומת הגנוטיפ ההומוזיגוט כנגד האוכלוסייה האוירולנטית הן בצפיפות הנמוכה והן בגבוהה.



איור 1. השפעת המצב האללי והרקע הגנטי על עמידות / רגישות לנמטודות. כושר ההתרבות של נמטודות וירולנטיות ואוירולנטיות על כל אחד מהקווים חושב עפ"י מספר ביצים לגרם שורש. מערכת שורשים של כל גנוטיפ הנכלל בניסוי ובכל טיפול נשטפה היטב, וממנה הופקו ביצי הנמטודות. שישה גנוטיפים ששימשו בניסויים כוללים את: $Mi1^{LC}/mi1$, $Mi1^{LP}/Mi1^{LC}$, $Mi1^{LP}/mi1$, $mi1/mi1$, $Mi1^{LP}/Mi1^{LP}$, $Mi1^{LC}/Mi1$

כמות הפרי בכל אחד מטיפולי הניסוי:

כמות הפרי שנקטפה במהלך חודשי הניסוי הייתה דומה עבור כל זן בכל אחד מארבעת הטיפולים. ניתן לראות כי ברוב הזנים האילוח בצפיפות גבוהה של אוכלוסייה וירולנטית (איור 2, VH) התקבלה במוצע ההפחתה הגדולה ביותר בכמות הפרי הממוצעת לחלקה. בזנים ההומוזיגוטים הדומיננטים חלה הפחתה מסוימת בכמות הפרי שנקטפה בעיקר כאשר הצמחים אולחו בצפיפות גבוהה של אוכלוסייה שוברת עמידות.



איור 2: כמות הפרי הממוצעת שהתקבלה בכל אחד מטיפולי הניסוי ועבור כל אחד מהזנים. כל עמודה מציגת ממוצע של שתי חלקות קטיפי ומעליה שגיאת התקן. האותיות בציר X מתייחסות לטיפול הנמטודות (וירולנטי צפיפות נמוכה-VL, וירולנטי צפיפות גבוהה-VH, אוירולנטי צפיפות נמוכה-AL, אוירולנטי צפיפות גבוהה-AH).

מסקנות והצעות להמשך:

ניתן לראות כי סבילותו של הזן מושפעת מרמת המדבק ההתחלתית, מידת האלימות של האוכלוסייה, המצב האללי לגן Mi והרקע הגנטי. כפי הנראה שימוש במקור עמידות שמקורו מעגבניית הבר *Lycopersicum chilensis* יכול להעניק יתרון מסוים כנגד נמטודות וירולנטיות שהתפתחו על קווים נושאי עמידות Mi1 שמקורו מעגבניית הבר *Lycopersicum peruvianum*. יתכן כי בשלב הבא כדאי יהיה לבחון מקור העמידות הזה ברקעים גנטיים נוספים. תוצאות שקילת היבול מצביעות גם שגישת ה "gene pyramiding" יכולה להעניק יתרון כנגד

האוכלוסיות, שכן הגנוטיפ אשר בו שני מקורות העמידות ($Mi1^{LP}/Mi1^{LC}$) באופן עקבי הוביל לממוצע שקילות גבוה יותר.

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.

Abad, P and Williamson, V. 2010. Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Advances in Botanical Research* 53:147-192.

Roberts, P. A. 2002. Concepts and consequences of resistance. In: Plant resistance to parasitic nematodes. Eds. Starr, J. L., Cook, R., Bridge, J. Cabi Publishing. Pp: 23-41.

Djian-Caporalino, C., Molinari, S., Palloix, A., Ciancio, A., Fazari, A., Marteu, N., Ris, N. & Castagnone-Sereno, P. (2011) The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. *Eur J Plant Pathol*, **131**:431-440.

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*). *CropProtection* 25:382-388.