

מניעת התפתחות מחלת העובש האפור בצמח הריחן

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה
לשם קבלת תואר "מוסמך" במדעי החקלאות

מאת

רועי חגי

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של
ד"ר' נתיב דודאי, היחידה לתבלינים
מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
וד"ר' יגאל אלעד, המחלקה לפתולוגיה של
צמחים וחקר העשבים, מינהל המחקר
החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן

- הבעת תודה -

תודות לאלו שסייעו וליוו אותי במהלך העבודה הזאת :

לדרי נתיב דודאי - על שקיבל אותי בברכה, תמך בשמחה והנחה אותי בעבודה מעניינת, מאתגרת ומהנה, על הידע הרחב והעצות המועילות.

לדרי יגאל אלעד - על שתמך והנחה בסבלנות רבה וחוכמה גדולה, על שהקנה לי ידע וכלים מעשיים שסייעו לי בביצוע העבודה.

לפרופי דני יואל - על ההנחיה המקצועית, ההדרכה והשימוש במיקרוסקופ.

לדויד חיימוביץ - על העזרה והתמיכה ללא היסוס, ההדרכה היעילה ושיתוף הניסיון.

לפרופי אלי פוטיבסקי - על העזרה והנכונות.

לגבי אולגה לרקוב - על הסיוע במעבדה וניתוח אנליזות ה-GC-MS.

לדרי אפרים לוינסון ופרופי עוזי רביד - על העזרה והייעוץ.

לגבי דליה רב דוד על העזרה בענייני בוטריטיס.

לדיא סעדי - על הכוח והרצון לעזור בכל רגע ומקום, על החברה הנעימה והאופטימיות.

להילה טמיר - על התמיכה והלימוד של דרכי ה-GC-MS, על החברה הנעימה ושמחת החיים.

לרווית פישר - על העזרה והלימוד של נפלאות ה-GC-MS, על החברה וההבנה.

לאיתי רבינוביץ' - על הנכונות לעזור ולשתף, על הרעות לאורך כל הדרך.

לדרור קלדס - על העזרה והייעוץ בדרך.

לדויד בחשיאן - על העזרה המקצועית והתכליתית.

לאודי מקיבוץ היוגב, למשק של רפי כהן ברחוב ולחמי מהמשק של קיבוץ קליה,

על העזרה הטכנית ועל שאפשרו את עריכת הניסויים בשטחם.

תודה גדולה להורי - משה ויונה, שחיזקו אותי בדרכים רבות עם עקרונות וערכים אמיתיים,

ושנתנו בביטחון ובאמון את כל מה שיכלו ומעבר בתקופה הזו ובכלל.

לאחיי - עופר ואייל, על ההבנה והמסירות לאין שיעור.

הודיה למעין,

על הנתנה, על הקבלה ועל כל האהבה שבניהן.

- תוכן העניינים -

1	מבוא
2	סקירת ספרות
14	שיטות וחומרים
14	א. שיטות עבודה כלליות
16	ב. הפעילות של שמנים אתרים מצמחי הריחן על הפטרייה <i>B. cinerea</i>
17	ג. האינטראקציה של שמן אתרי עם הפטרייה <i>B. cinerea</i>
19	ד. הגברה בהיווצרות לגנין בעקבות פציעה של גדם גבעול הריחן
20	תוצאות
20	א. שמנים אתריים של ריחן להדברת מחלת העובש האפור בצמחי ריחן
20	א.1. הפעילות הפונגצידית של שמנים אתריים מזני ריחן שונים
22	א.2.1. עיכוב התפתחות תפטיר <i>B. cinerea</i> על ידי רכיבי השמנים מזני הריחן
24	א.2.2. נביטת נבגי <i>B. cinerea</i> בנוכחות רכיבי השמנים מזני הריחן
26	א.3. השפעת מסיסות רכיבים משמנים אתריים על רמת הפונגצידיות שלהם
27	א.4.1. הדברה של העובש האפור ברקמה צמחית בעזרת רכיבים מהריחן
28	א.4.2. הדברה של העובש האפור בריחן בעזרת רכיבים משמנים של הריחן
29	א.5. ביוטרנספורמציה של רכיבים משמן הריחן על ידי הפטרייה <i>B. cinerea</i>
32	ב. אפיון המבנה וההחלמה של רקמות גדם גבעול הריחן
32	ב.1. יצור לגנין בדפנות תאים במהלך ההחלמה של גדם גבעול הריחן
34	ב.2. חדירת נבגי <i>B. cinerea</i> ברקמות הגדם
36	דיון
46	תקציר
48	רשימת ספרות

- מבוא -

ריחן (*Ocimum basilicum* L.) הינו צמח חד שנתי רב קצירי ממשפחת השפתניים המשמש לצרכים רפואיים וכתבלין בתעשיית המזון. הריחן הינו המין המוביל בענף גידול התבלינים לייצוא בישראל, כשעונת היצוא העיקרית היא בין נובמבר לאפריל. בארץ גדל הריחן במשך השנה בחממות ומנהרות עבירות. בשל מוצאו הטרופי, הצמח מעדיף אזורים חמים, אדמה מנוקזת ובית גידול מאוורר. בחורף כאשר חלים שינויים בתנאי הסביבה, הריחן נתקף על ידי פתוגנים.

הריחן נפגע על ידי מחלת העובש האפור הנגרמת על ידי הפטרייה *Botrytis cinerea*. המחלה גורמת לנגיעות בגדמים, לעיפוש הנוף, לתמותת צמחים ואף השמדת הגידול כולו. כיום הטיפול נגד המחלה הוא באמצעות בקרת אקלים, יישום חומרי הדברה לאחר הקציר וסניטציה. לכימיקלים הסינטטיים הנמצאים בשימוש נגד הפטרייה יש השפעות שליליות כמו שאריתיות גבוהה ורעילה בתוצרי המזון, זיהום הסביבה בשל הפירוק האיטי של החומרים וסיכון לפיתוח עמידות ויחס עלות-תועלת גבוה.

מטרות העבודה היו למצוא דרכים אלטרנטיביות למניעת המחלה בגידול הריחן. החלק הראשון בחן דרכים אלטרנטיביות להדברת המחלה בעזרת שמנים אתריים מהריחן ונבחנו ההיפותזות הבאות:

1. קיים הבדל בפעילות הפונגצידית של שמנים אתריים מזני ריחן שונים נגד *B. cinerea*.
2. ריכוז והרכב החומרים בשמנים האתריים של הריחן קובעים את רמת הפונגצידיות שלהם.
3. רמת הפונגצידיות של הרכיבים תלויה בתוסף וברמת המסיסות הטבעית שלהם במים.
4. רכיבים משמנים אתריים של הריחן יכולים להשתתף ביישומי הדברה נגד העובש האפור בגידולי ריחן בחממות.
5. הפטרייה *B. cinerea* משנה את המבנה הכימי של החומרים בשמן האתרי.

החלק השני של העבודה עוסק בתהליך ההחלמה של הגדם הריחן ובחדירת הנבגים בגבעול. נבחנו ההיפותזות הבאות:

1. ישנה הגברה בהיווצרות ליגנין בדפנות תאים במהלך ההחלמה של גדם גבעול הריחן.
2. נבגי *B. cinerea* חודרים בגדם גבעול הריחן ברקמות מועדפות.

- סקירת ספרות -

1. הפונדקאי: הריחן

הריחן המצוי (*Ocimum basilicum* L.) הינו צמח תבלין חד שנתי ממשפחת השפתניים הגדל כצמח עשבוני או כשיח וידוע בריח המיוחד שלו, ממנו נגזר שם הצמח בעברית. הריחן בעל גבעול מרובע ומסועף וגובהו מגיע ל- 70 ס"מ. העלים נגדיים חלקים ובעלי ממדים גדולים ברוב הזנים, רחבים וצורתם אליפטית (לעתים בעלי גוון ארגמני). הפריחה מתרחשת במהלך כל הקיץ והסתיו. התפרחות מופיעות בחיק העלים (בגבעולים טרמינליים), כשהפרחים מסודרים בדורים. הפרח עם ארבעה אבקנים ועמוד עלי אחד ובעל עטיף כפול; בגביע ירוק או אדמדם (תלוי בזן) והכותרת דו-שפתנית, לבנה-כחלחלה, לעתים מגוונת באדום. הזרעים זעירים וצבעם חום שחור. הריבוי בטבע נעשה מזרעים בלבד בחודש אפריל בקרוב.

לסוג ריחן שייכים כ- 50 מינים. אף אחד מהם אינו גדל בר בישראל, אך כצמח גינה או כגידול חקלאי מגדלים בעיקר את הזן המתוק, הריחן המצוי. יש גידולים גם של ריחן קינמון (משמש בטקסי הבדלה), ריחן סגול, ריחן אניס ועוד. מקור הריחן באזור אפריקה ודרום מזרח אסיה ותפוצתו העולמית של הריחן באזורים טרופיים (בעיקר בדרום אמריקה) וסוב-טרופיים (Khosla, 1993).

הריחן הוא צמח חשוב המגודל כתוסף או תבלין בעיקר במאכלי פסטה, סלטים ודגים (Simon *et al.*, 1990). השימוש הביתי העיקרי של הריחן, הינו כתבלין יבש, אשר ניתן לייצרו כמעט בכל חצר. כמו כן בשנים האחרונות נעשה שימוש נרחב של צמחי ריחן מוקפא, בעיקר במדינות אירופה וצפון אמריקה. בייצור תעשייתי עוברים העלים תהליך ייבוש תוך בקרת איכות קפדנית, המקנה למוצר איכות מעולה החשובה לתעשיית המזון (Putievsky and Galambosi, 1999). שימוש נוסף של צמחי ריחן הינו כמקור לשמן אתרי ואולאורוזין לתעשיית המזון והקוסמטיקה. היקף גידול הריחן גדל משנה לשנה. בישראל היקף הגידול מגיע ל- 1000 דונם ומשטח זה מפיקים כ- 3000 טון של ריחן טרי, המיועד ליצוא, בעיקר לארצות מערב אירופה וצפון אמריקה.

בארץ גדל הריחן במשך השנה בחממות ומנהרות עבירות. בשל מוצאו הטרופי, הצמח מעדיף אזורים חמים, אדמה מנוקזת ובית גידול מאוורר. בחורף הצמחים נשתלים בדרך כלל בחודש אוקטובר במצעים מנותקים או ישירות באדמה. כאשר הצמחים מגיעים לגובה 40-60 ס"מ (בדרך כלל חודש עד חודשיים לאחר השתילה) החלק העליון (באורך 20-25 ס"מ) של העלווה נקצר ומאוחסן באריזות של 1 קילוגרם למשלוח. הקציר מתבצע בשיטה הנקראת על ידי החקלאים "חליבה", בה קוצרים בצורה ידנית את החלק המשוק ומכניסים אותו ישירות לאריזה. בחורף לאחר קציר זה קוצרים רוב החקלאים קציר "טכני" בגובה אחיד ולאחר מכן מרססים נגד מחלות. היבול נקצר בדרך כלל כל 3-5 שבועות בהתאם לטמפרטורה ועוצמת הקרינה (Sharabani *et al.*, 1999). ריבוי הריחן נעשה מזרעים הנזרעים ישירות בשטח או משתילים שהוכנו במשתלות. בשנים האחרונות מגדלים זנים אשר טופחו בארץ ובעלי סבילות למחלת הפוזריום

בריון (Dudai *et al.*, 2002; חיימוביץ, 2000). עקב מעבר גידולו של הריחן מגידול בשדה פתוח בקיץ לגידול חסוי בחורף, הוא נתקף על ידי הפטרייה *Botrytis cinerea* הגורמת למחלת העובש האפור.

2. הפתוגן: *Botrytis cinerea*

הפטרייה *B. Cinerea* שייכת למערכת הפטריות האמיתיות Eumycota, לתת מערכת הפטריות הבלתי מושלמות (Fungi imperfecti), סדרת ה Moniliales, משפחת ה-Moniliaceae והינה הצורה האל מינית של הפטרייה *Botryotinia fuckeliana*. הסוג *Botrytis* (אשכול ענבים בלטינית) זוהה לראשונה על ידי Micheli ב-1729, הוגדר על ידי Smith ב-1900 ועל ידי Whetzel ב-1945 (Elad *et al.*, 2004).

מהנבג נובט המרכיב הסומאטי או הוגטטיבי (somatic, vegetative) של העובש: הקורים (hyphae). תאי הקור מופרדים על ידי מחיצות (septa, יחיד septum). הקורים גדלים על ידי התפתחות הקצה שלהם (apical growth) אך קיימת היכולת להתפתח גם בחלקים אחרים. קובץ של קורים יוצר את התפטיר (mycelium, רבים mycelia). התפטיר יכול להתפתח בתוך או על המצע או לצמוח מהמצע ולשאת קורים אוויריים (aerial mycelium), ואף ליצור מבנים מורכבים וקשים הנקראים קשיונות (sclerotia). מושבה של פטריות שמקורה בתא בודד נקראת thalus. השינוי הגנוטיפי והפנוטיפ נפוץ בפטרייה אודות לריבוי הגרעינים בנבג האל-מיני ובקורי הפטרייה. הפטרייה מהווה פתוגן לצמחים רבים בטווח אקלים רחב ברחבי כל העולם ופוגעת בין היתר בגידולי ירקות, פרחים ותבלינים. היא מנגעת בעיקר את החלק העליון של הצמח, לפני ואחרי הקציר. ההדבקה עלולה להיות מוגבלת, מתונה או אגרסיבית. על הרקמות הצמחיות הנגועות מופיע עובש אפור, המכיל תפטיר ונבגים על גבי נושא נבגים. בנוסף לתסמינים אלו מופיעות צלקות מוגבלות בגודלן, ללא עובש הנראה לעין. הנבגים הנוצרים על גבי הרקמה, בתנאי לחות גבוהה, משחררים לאוויר בעת ירידה בלחות היחסית של האוויר (Elad *et al.*, 2004). הפטרייה יכולה להימצא בכל מקום וגורמת לפגעים בהרבה מיני פירות ירקות וצמחי נוי (Schwinn, 1992) בעיקר אלו הגדלים בתוך חממות (Jarvis, 1980). הגבעולים יכולים להידבק לאחר חדירת הפטרייה דרך פטוטרת העלה או דרך פצעים בגבעול לאחר גיזום הצמחים או הקציר. פגיעת הפטרייה בגבעול יכולה לגרום לחיגור הגבעול וכתוצאה מכך לתמותת הצמח. פגיעת הפתוגן בפרחים של גידולים שונים (עגבנייה, חציל, פלפל, תות שדה) גורמת לתמותת הפרח ולעיתים לנשירתו. בגידולים אחרים הפטרייה מתפתחת לאורך הפרי (כמו מלפפון) או לאורך העלה (כמו בעגבנייה) ועלולה להגיע אל הגבעול. בפירות גורם הפתוגן לריקבון אופייני שבדרך כלל מתפתח גם על עוקץ הפרי, גורם לנפילתו ובכך מהווה הפרי המנותק מקור מידבק נוסף בתוך החממה (Elad and Shtienberg, 1995).

בישראל תוקפת מחלת העובש האפור את הריחן המצוי בחודשי החורף, מסוף נובמבר ותחילת דצמבר ועד חודש מרץ באביב. המחלה ממשיכה להתקיים גם בקיץ, אם כי בהיקף מצומצם יותר ללא שנגרם נזק משמעותי. המחלה מתגברת במידה רבה בימי גשם בעונת החורף.

הפטרייה שורדת מעונה לעונה על חלקי צמחים במצב של פעילות מצומצמת ובמצב רדום. מחלת העובש האפור תוקפת את תוצרת הריחן גם לאחר הקציר ויכולה לגרום לעיפוש התוצרת הקטופה גם במהלך השיווק (Aharoni, 1996).

3. מחלת העובש האפור בריחן

מחלת העובש האפור בריחן מתרחשת כאשר קיימים בו זמנית פתוגן אלים, רקמת צמח רגישה, ותנאי סביבה מתאימים. במהלך קציר הריחן, כתוצאה מקיטום ענפי המשלוח המתאימים לשיווק, רקמות הצמח נפצעות ונחשפות לגורם המחלה. תהליך ההדבקה כולל שלושה שלבים: נביטת נבגי הפטרייה על פני הרקמה החשופה, חדירת התפטיר וההתבססות בצמח (Goodman *et al.*, 1986). במהלך שני השלבים הראשונים הנבגים חשופים להשפעות מיקרו-אקלימיות חיצוניות, בעוד שבשלב השלישי התפטיר המתפתח מושפע מהתנאים השוררים בתוך רקמת הפונדקאי. *B. cinerea* היא ביסודה פתוגן נקרותרופי (necrotrophic) בסוגי פונדקאים רבים, החי, מתפתח ומייצר נבגים כספרופיט (saprophytes) מחוץ לרקמה המתה של המארח ומסוגלת ליצור מבנה עם שרידות ארוכת טווח כמו sclerotia. מקור המידבק העיקרי להתפרצות המחלה הוא קרוב לוודאי מתוך הגידול עצמו (Johnson and Powelson, 1983), אך הפוטנציאל להגעת מידבק מגידול אחר הוא גדול יותר מפתוגנים ספציפיים אחרים, שרגישים יותר למעבר בין פונדקאים.

3.א. ההדבקה

בכדי לנבט על פני רקמת הפונדקאי, הנבגים זקוקים ללחות גבוה ($>90\%$), לא בהכרח למים חופשיים (Williamson *et al.*, 1995; Yunis *et al.*, 1994), טמפרטורה נמוכה ($15-25^{\circ}\text{C}$) ולחומרי מזון המסופקים על ידי הפרשות הפונדקאי או ממקור חיצוני כמו ריקבון חומר צמחי. ייבוש הנבגים בזמן הנביטה עוצר את התהליך ההדבקה. כאשר תנאי המיקרו-אקלים מתאימים הזמן הנדרש לנביטה של הנבג הוא כ-6 שעות בקרוב. למים והנוטריאנטים חלק חשוב בנביטה של נבגים והדבקה של הצמח, אך למרות זאת הפטרייה מסוגלת לזהם גם את חלקי הצמח היבשים (Williamson *et al.*, 1995; Elad, 2000). הפטרייה מתפתחת היטב בטמפרטורות מתונות של 10 עד 20 מ"צ, אך הדבקה מתרחשת גם ב-2 ומעל 25 מ"צ (Jarvis, 1980; Marois *et al.*, 1988; Salinas *et al.*, 1989), והיא גם פעילה בטמפרטורה נמוכה של 0 מ"צ (Brooks and Cooley, 1917), לכן היא נחשבת פתוגן בעייתי בעת אחסון התוצרת ומהווה אתגר לפיקוח במשלוח.

3.ב. החדירה

התהליך העוקב לנביטת הנבגים הוא החדירה לפונדקאי שנמשכת ב-*B. cinerea* כ-2-3 שעות. מכאן שבממוצע הפתוגן צריך להיות חשוף לתנאי מיקרו-אקלים מתאימים במשך 9-10 שעות (6 לנביטה ועוד 2-3 חדירה לפונדקאי). בטמפרטורה נמוכה נדרש זמן רב יותר לקור הנבג להשלמת החדירה לרקמת הפונדקאי, לכן גם על אזור החדירה להיות לח לתקופה ארוכה יותר (Salinas *et al.*, 1989). בתנאים מיטביים הזמן מההדבקה ועד הופעת הסימפטומים (תקופת ההתבססות)

נמשכת 2-8 ימים. אופי הסימפטומים הנראים על הצמח משתנה ונע מכתמי זיהום מוגבלים בגבעול להתרככות השורשים, עם או בלי נוכחות בולטת של מושבות נבגים. החדירה יכולה להתבצע על ידי נחשוני הנביטה של הנבגים או על ידי תפטיר שהתבסס על חלקי צמח מתים או חיים. חדירת קורי הנביטה בריחן נעשית בדרך כלל דרך פצעים, אך גם דרך פיוניות, או ישירות מבעד לקוטיקולה. חדירת הפטרייה מתרחשת באברי צמח שונים בהתאם לרגישות הצמח (בגבעולים, בעלים, בפירות ופרחים ואף בשורשים) ודרגת הנגיעות בשטח. רמת המדבק גבוהה ככל שגדל מספר הצמחים המנביגים באזור, עד לרמה שגם עלים וגבעולים נדבקים ללא כל קציר (Sharabani *et al.*, 1996). תהליך החדירה לרקמה הוא אנזימתי. הפטרייה מפרישה אנדו ואקסו 'פקטינזות' שיכולים להיות הידרולאזות, אסטראזות או ליאזות (Ten *et al.*, 2002). לאחר החדירה תפטיר הפטרייה מוגן על ידי רקמת הפונדקאי והטמפרטורה והלחות היחסית החיצוניים משפיעים עליו פחות (Alderman and Lacy, 1983; Salinas *et al.*, 1989), הפטרייה מתקדמת בגבעול, עוברת אל העלים ואל הניצנים המשניים וכאשר היא מגיעה אל הגבעולים המרכזיים היא גורמת לחיגורם וכל הצמח עלול למות (Sharabani *et al.*, 1999).

3.ג. הנבגה והפצה של העובש האפור

הנבגה של *B. cinerea* מתרחשת בטווח רחב של טמפרטורות. הנוכחות של שכבת מים על התפטיר מעכבת הנבגה של הפטרייה. ההנבגה מושפעת מאור, טווחים שונים של אורכי גל מעודדים ומעכבים הנבגה של *B. cinerea* (Elad, 1997a). נבגי הפטרייה מופצים באוויר ולפעמים גם בטיפות מים. שחרור הנבגים מווסת על ידי מנגנון היגרוסקופי בתנאים של שינוי מליחות מגבוהה לנמוכה. הנבגים משתחררים עם שינויי תנועת האוויר המקיף אותם. בחממות משתחררים הנבגים בדרך כלל עם עליית הטמפרטורה וירידת הלחות (Jarvis, 1980). Kerssies (1992) לא מצא מתאם בין עליית הטמפרטורה בחממת גרברה לבין כמות הנבגים באוויר, אך כמות נבגי הפטרייה בחממה הייתה גבוהה עם עליית גיל הצמחים וכמות החומר הצמחי המת. כמו כן הוא מצא כי תזוזות אוויר בתוך החממה ופעילות של פועלים בחממה הגבירו את שחרור הנבגים לאוויר.

3.ד. רמת הנגיעות של העובש האפור בגדולי הריחן

חומרת העובש האפור בריחן תלויה ברגישות הצמח לתנאי הסביבה, זאת מאחר והריחן הוא צמח קיץ מובהק. בצמחי ריחן הגדלים בתנאים שאינם מיטביים להתפתחותם כמו משטר יום קצר וטמפרטורות נמוכות, מתבטאת המחלה בחומרה רבה יותר (Sharabani *et al.*, 1996). בחממות ריחן מחוממות בחורף שוררים בדרך כלל תנאים מיטביים להתפתחות המחלה: טמפרטורה של 20 מ"צ ולחות בסביבות 80%. בעבודתם של Sharabani *et al.* (1999) הוצג מתאם שלילי בין הזמן מהקציר לבין רגישות הצמח להדבקות במחלה, ובעצם נמצא שבגידולי חממות תהליך הדבקות הצמח בפטרייה מתרחש בגדם הגבעול בתוך כחצי יום ממועד הקציר. נמצא גם שקציר הריחן בחממה בזמן ומיד לאחר הגשם מגביר באופן מובהק את שעור המחלה, שרגישות הצמח משתנה גם עם גדילתו, ששכיחות המחלה הייתה גבוהה יותר בקטעי גבעולים מבוגרים מאשר

בקטעי גבעולים צעירים שאולחו בצורה מלאכותית. לעומת זאת עלים בגיל צעיר היו רגישים יותר למחלה מאשר עלים מבוגרים.

3.ה. שרידות העובש האפור

באזורים בהם האקלים קר ולח, הפתוגן פעיל במשך הקיץ בכרמים ובחממות, ובחורף בחממות מחוממות. באזורים אלו הגורם המשפיע ביותר על ההשרדות הוא הטמפרטורה הנמוכה. באזורים אלו *B. cinerea* שורד על שאריות צמחים ובעיקר בתוך שאריות גבעולים (Yunis and Elad, 1989). הנבגים של *B. cinerea* בעלי חיים קצרים בשדה והשרידות שלהם מושפעת מאוד מטמפרטורות קיצוניות, רמת הלחות היחסית, פעילות מיקרוביאלית וחשיפה לאור השמש. כאשר נבגים נחשפו לשמש בישראל הם לא הצליחו לשרוד יותר מכמה דקות (Rotem and Aust, 1991). אפילו בתנאים פחות קיצוניים הנבגים שרדו רק 53 יום (Coley-Smith et al., 1980). Salinas et al. (1989) דיווחו שנבגים שאוחסנו בסביבה יבשה בטמפרטורת החדר הצליחו לשרוד במשך 14 חודשים. לעומת זאת גבעולים נגועים הם נישה אקולוגית מצוינת להשרדות כי הם מספקים הגנה מפני תנאים קיצוניים ומפני מיקרואורגניזמים אחרים. אפשרות נוספת להשרדות הפתוגן בקיץ היא על פונדקאים חלופיים (צמחי בר) ובשאריות צמחים.

5. יחסי צמח פטרייה

האינטראקציה בין פטרייה פתוגנית והצמח הפונדקאי היא מורכבת ורב גונית. בשני הצדדים קיימים מנגנונים מפותחים לשם קיום והתרבות המין. הפטרייה, מסוגלת לחדור ולשכון בצמח המאחסן שלה לתקופות זמן משתנות (Williamson, 1994; Elad, 1997). לעומתה הצמח מנסה למנוע את חדירת הפטרייה בעזרת מספר תגובות הגנה (Collinge and Slusarenko, 1987). ביניהן, ייצור תרכובות אנטי בקטריאליות, פולימרים וחלבוני PR (pathogenesis-related).

5.א. מנגנוני הגנה צמחיים

צמחים נחשפים במהלך חייהם להשפעת מגוון עצום של מיקרואורגניזמים בעלי פוטנציאל פתוגני. אף על פי כן רובם שורדים אחרי התקפות כאלה. ניתן לחלק את הצמחים לשתי קבוצות: בראשונה בעלי עמידות גבוהה, אלה שאינם מאפשרים לפתוגן להתפתח בתוכם או שלא הושפעו מהרעלים של הפתוגן ואינם מגלים סימני מחלה, ובשנייה בעלי רגישות גבוהה, צמחים שהפכו לפונדקאים בפועל, כלומר פתוגן מתקיים בתוכם והם מושפעים ממנו ומגלים סימני מחלה; הם אלו הצמחים הרגישים.

מנגנוני ההגנה המכאניים שמתעוררים כתגובה לחדירת פתוגן:

יצירת תאי שעם - לתאי שעם הדופן מכילה בנוסף לתאית חומר הנקרא סוברין ההופך את דופן התא לבלתי חדיר למים ולגזים (חמצן, פחמן דו חמצני ואחרים) ולעמיד בפני חומצות. השעם מבודד את אזור חדירת הפתוגן, תאי הצמח במקום ימותו ויחד עימם ימות גם הפתוגן.

יצירת טילוזזה - זוהי תופעה שבה הפרוטופלסמה של התאים המקיפים את צינורות העצה חודרת לתוך הצינורות דרך הנקבים שבהם וחוסמת אותם.

יצירת ליגנין - מולקולות גדולות המחזקות את דופן התא ומגבילות את מעבר הפתוגן (Vance, Kirk and Sherwood, 1980; Aist, 1983).

מנגנוני ההגנה הכימיים המתעוררים בתגובה לחדירת פתוגן :

רגישות יתר ויצירת פיטואלקסינים – צמחים מותקפים מגיבים בתופעה של רגישות יתר (hypersensitive response) דבר הגורם דווקא לעמידות גבוהה יותר. התאים המותקפים מאבדים מיד את חדירות הקרום, הטורגור שלהם יורד, קצב הנשימה התאית עולה במהירות עצומה והתאים המותקפים מתים מיד. הפתוגן המתקיף נשאר מבודד באזור המת ולא מתפשט. תגובת רגישות היתר מלווה בהצטברות חומרים (פיטואלקסינים) בצמח המסוגלים לעכב התפתחות מיקרואורגניזמים. בדרך כלל מוצאים מספר פיטואלקסינים הנוצרים בצמח אחד. כאשר פעולה משותפת שלהם היא זו הפוגעת כנראה במיקרואורגניזמים הפתוגנים. סוג החומרים מושפע מסוג הצמח, וכמותם תלויה בתנאים הסביבתיים, במצבו וגילו של הצמח.

חומרים מעכבי יצירת חלבונים, חלבוני PR (pathogenesis-related) - חומרים המופיעים לעיתים כתגובה לחדירת פתוגן ומעכבים את סינתזת החלבונים של הפתוגן, כך מונעים ממנו המשך קיום בצמח. בין היתר אנזימים מפרקים שהורסים את הפתוגן, חומרים בלתי רעילים (לעיתים מובדלים על ידי תחומים משאר חלקי הצמח) ההופכים לרעילים באינטרקציה עם מיקרואורגניזמים.

ב.5. בנייה של לגנין הגנתי כתגובה לפציעה או מחלה

בדרך כלל מתייחסים לגנין כאל מבנה תלת-מימדי הנוצר מפולימריזציה של כהלי hydroxycinnamyl (Lewis and Yamamoto, 1990). אך גם לעיתים גם מונומרים נוספים נכללים במבנה (Halpin *et al.*, 1994; Ralph *et al.*, 1997). המולקולות האלו חשובות מאוד לצמח במספר היבטים. למשל, ההגנה ההידרופובית של תאי העצה והקשיחות והחוזק של רקמות העצה והשיפה. ההרכב הכימי של הלגנין תלוי במספר פרמטרים, כמו הסוג והזן של הצמח, האיבר והרקמה, סוג התא ואפילו הרובד בדופן התא. למרות שנדרש עוד מחקר רב בנושא האנזימטי של התפתחות הלגנין, רוב האנזימים האחראיים למבנה הלגנין והגנום שלהם כבר ידועים (Grima-Pettenati and Goffner 1999). לכן המסלול הכימי הבסיסי מובן היטב, שמתחיל בדיאמינציה של פאנילאלנין ובהמשך מספר פעולות אנזימיות שמובלים לייצור cinnamoyl-coenzyme A-esters. האסטרים האלו הם הפרקוסורים של מגוון רחב של פנולים כמו פלבנואידים ו-coumarins שתופסים תפקיד חשוב בהתפתחות וההגנה של הצמח (Dixon and Paiva, 1995).

אחת התגובות האופייניות של צמחים לפציעה ומחלה היא חיזוק של דופן התאים בסמוך אתר הזיהום/הפציעה עם לגנין, וכמוכן גם סוברין (Vance *et al.*, 1980; Nicholson and Hammerschmidt, 1992). הלגנין הזה קרוי גם 'דמוי-לגנין' (Strange *et al.*, 2001) או 'לגנין הגנתי' בכדי להבדילו מהלגנין ההתפתחותי. החיזוק של דופנות התאים בחומר כזה מביא להיווצרות מחסום בלתי חדיר המגן על הרקמה הבריאה מאובדן מים ומזיהום אופורטוניסטי. גם המחסום מגביל את התפשטות פתוגן המקור (Vance *et al.*, 1980; Walter, 1992).

(Trockenbrodt, 1994). מבנים של 'לגנין הגנתי' הם תגובה גם לעקות אביוטיות של צמחים, כמו אוזון (Sandermann *et al.*, 1998) ומחסור במים (Costa *et al.*, 1998). מידע רב מצביע על שההרכב הכימי של 'לגנין הגנתי' שונה מההרכב של לגנין התפתחותי (Hammerschmidt *et al.*, 1985; Southerton and Deverall, 1990; Messner and Boll, 1993; Lange *et al.*, 1995). בעוד שהאנזימים המשתתפים במסלולי הבנייה דומים, מסלולי הביוסינטזה של שני סוגי הלגנין שונים (Logemann, *et al.* 1995; Jaeck *et al.*, 1992). כפי הנראה, כזאת רגולציה מאפשרת לצמח לכוון של מאגר הפנולים בהתאם לעדיפות – הגנה או התפתחות (Hawkins and Boudet, 1996; Lauvergeat *et al.*, 2001).

6. הדברת מחלת העובש האפור

כבר בשנות ה-80 החל הפיתוח של אסטרטגיות מורכבות שבאות להתמודד עם מחלת העובש האפור (Vincelli and Lorbeer, 1989). בעזרת מחקרים מפורטים על התנאים המדויקים המקטינים את ההדבקה והתפתחות המחלה, פותחו שיטות שנתנו למגדלים מגוון כלים לסיוע במניעת נזקים אפשריים בגידולים. השיטות היעילות ביותר להקטנת מחלת העובש האפור בגידולים הן השיטות המבטיחות אוורור וייבוש של חממות הגידול, רמת סניטציה גבוהה ואספקת מים ומקורות מזון מיטבים לשורשים (Elad and Shtienberg, 1995). כיום עדיין ישנה בעיה רצינית בהדברת *B. cinerea* עם כימיקלים מסחריים בגידולי תבלין בפרט.

6.א. הדברה כימית

מאמצע שנות התשעים נכנסו לשוק קבוצות חומרים חדשים עם פעילות מצוינת כנגד *B. cinerea* כיום מגדלי ירקות, גפנים ועוד מדברים את מחלת העובש האפור הנגרמת על ידי *B. cinerea* בעיקר בעזרת ריסוס בפונגיצידיים כגון: captan, Iprodione, vinclozoline, benzimidazole, pyrimethanil (Zahavi *et al.*, 2000; Latorre *et al.*, 2002). השימוש בחומרים כימיים אלו גורם לזיהום הסביבה ולעיתים גם לפגיעה באורגניזמים אשר אינם מהווים מטרה. לשיירי החומרים הכימיים הנותרים בתוצרת יש השפעות שליליות על בריאותו של האדם ובמינונים גבוהים יכולים לגרום לנזקים חמורים. בנוסף השימוש החוזר והמתמשך בפונגיצידיים לאורך שנים גרם ללחץ סלקציה אשר הקנה יתרון לזני *B. cinerea* פתוגניים העמידים לפונגיצידיים שהוזכרו.

בעבר הדברת *B. cinerea* הייתה בעיקר עם קבוצת benzimidazoles ואחר כך עם ה-dicarboximides. כיום מתקבלת הדברה טובה יותר בעזרת קבוצות פונגיצידיים חדשות יותר (Rosslénbroich and Stuebler, 2000). פונגיצידיים מקבוצת anilinopyrimidines כמו cyprodinil, mepanipyrim ו-pyrimethanil אינם פוגעים בנביטת הנבגים, אך פוגעים בנחשון הנביטה ובצימוח התפטיר. חומרי קבוצה בעלי תכונות הגנה וריפוי (Protective and curative) כנגד המחלה, אולם יעילותם של חומרים אלו היא בעיקר במניעת המחלה. בבחינת הפעילות הביוכימית של קבוצה זו נמצא כי היא מעכבת את תהליך הביוסינטזה של חומצת

האמינו מתיונין (Fritz *et al.*, 1997). כמו כן נמצא כי היא מדכאת הפרשה של אנזימים הידרוליטיים המעורבים בתהליך הפתוגנזה (Milling and Richardson, 1995; Miura *et al.*, 1994).

הפונגציד fludioxonil מקבוצת ה-phenylpyrroles הוא אנלוגי לחומר האנטיביוטי פירולניטרין המופק ממספר מיני החיידק פסאודומנס. זהו חומר פרוטקטנטי המעכב את נביטת הנבגים, התארכות נחשון הנביטה וצמיחת התפטיר. חומר זה משרה שינויים מורפולוגיים בנחשון הנביטה הדומים לשינויים המושרים על ידי חומרים מקבוצת ה-dicarboximides שהיה נהוג להשתמש בהם בעבר: התנפחות, הסתעפות לא נורמאלית ושברית תאים (Leroux, 1996).

הפונגציד fenhexamid מקבוצת ה-hydroxyanilides הוא לוקוסיסטמי (locosystemic) פעיל כנגד *B. cinerea* וכנגד פטריות אחרות כגון *Monilinia* ו-*Sclerotinia* כריסוס מונע. כנגד נביטת נבגי *B. cinerea* חומר זה יעיל רק בריכוזים גבוהים. אולם הוא מעכב גם את התארכות הנחשון וצמיחת התפטיר של הפטרייה. מיד לאחר יישומו מופיעים מבנים גבישיים בציטופלסמה של נחשון הנביטה (Hanbler and Pontzen, 1999). כתוצאה מכך הציטופלסמה מקרישה ומתכווצת ונחשון הנביטה מת לפני שהוא מצליח לחדור לרקמת הצמת. fenhexamid הוא בעל מנגנון פעולה השונה ממנגנוני שאר החומרים, ולא התגלתה עמידות צולבת עם חומרים אחרים כנגד *B. cinerea* (Rosslenbroich *et al.*, 1998).

למגדלי ריחן אושר להדביר את מחלת העובש האפור בעזרת פונגצידים ממשפחת ה-Polyoxins שבודדו לראשונה מ-*Streptomyces cacaoi* (Suzuki *et al.*, 1965) כקבוצה של קוטלי פיטריות טבעיים. השימוש ב-Polyoxins מקובל מאוד מאחר והם אינם פוגעים בסביבה והם מתפרקים במהירות רבה מאוד. הם מונעים את הסינתזה של דופן תא הפיטריות על ידי עיכוב ספציפי של כיטין סינתאז (Endo *et al.*, 1969).

6.3.6. ההדברה הביולוגית

תכשירי הדברה ביולוגים יכולים לשמש כחלופה לחומרי הדברה כימיים נגד *B. cinerea*, במיוחד במקרים בהם התכשירים הכימיים לא יעילים ובתנאי שהם נותנים רמת הדברה מספקת (Elad, 2000). מיקופרזיטיות, תחרות ושחרור אנטיביוטיקה הם חלק מהמנגנונים להדברה ביולוגית של פטריות. מיקופרזיטים (*Trichoderma spp.* ו-*Gliocladium spp.*) מסוגלים לשנות את התכונות הפיזיקאליות של שטח הפנים של הפונדקאי ובאותה מידה להיצמד אל נבג הפתוגן, ולשנות את התכונות הפיזיקאליות והביוכימיות שלו. הם מנצלים אנזימים מפרקי דופן התא של הפטרייה הפונדקאית וחודרים אל התאים שלה (Elad, 1995). בתחרות כהדברה ביולוגית נגד *B. cinerea* מתבססים על תלות הנבגים של הפטרייה בחומרי מזון חיצוניים על מנת לנבט וברגישות שלהם למחסור בחומרים אלו על פני הפילוספרה. תבדוד T39 של הפטרייה *T. harzianum* ששווק בצורה מסחרית (TRICHODEX 20P) על ידי חברת מכתשים ישראל פועל בתחרות כנגד נביטת נבגי *B. cinerea* (Zimand *et al.*, 1995) ונמצא יעיל בגידולים באזורים רבים (Elad, 2000).

מיקרואורגניזמים המייצרים אנטיביוטיקה יכולים גם כן להשפיע על פיטריות פתוגניות (Andrews, 1985). מספר זנים של חיידקי הקרקע מהמין *Bacillus* נמצאו כמעכבים את התפתחות *B. cinerea* בעזרת הפרשת אנטיביוטיקה (Leifert et al., 1995; Seddon and Schmitt, 1999; Paul, 1998). דרך נוספת ומעניינת בהדברה ביולוגית נמצא שניתן להקטין את מחלת העובש האפור בעזרת שימוש במיצוי מימי של קומפוסט (Tranker, 1992; Weltzien, 1992). מיצויים מימיים של קומפוסט מעצמות פגרים, מזבל בקר ועופות וממקורות צמחיים (גפת ענבים) שתססו במשך 10 ימים, הפחיתו את המחלה ב-56%-100 (Elad and Shtienberg, 1994). חומר הדברה ביולוגי צריך להיות בעל יכולת שרידות והסתגלות במקום בו הוא מיושם כולל תחרות עם מיקרואורגניזמים אחרים ולא רק עם פתוגן המטרה. מסיבות אלו ונוספות ייצור ויישום חומרי הדברה ביולוגיים בפטריות אינו פשוט. כיום רק מספר קטן של חומרי הדברה ביולוגיים משווקים באופן מסחרי כנגד פתוגנים של צמחים (Fravel et al., 1999), אך באופן מסחרי עדיין המוצרים הכימיים נגד *B. cinerea* יותר פעילים ונפוצים (Elad and Freeman, 2002).

6.ג. הדברה קולטורלית

אמצעים קולטורליים יכולים להיות יעילים כנגד מחלות צמחים בחממות כאשר ערך היבול הוא גבוה והמגדלים משקיעים מאמצים לבקרת המחלה לאורך כל העונה. מאמצים אלו יכולים לגרום לשינוי המיקרואקלים בעלווה ובאיברים הרגישים של הצמחים, למנוע את כניסת המידבק והתבססותו בחממה ולהפיכת הצמחים לפחות רגישים למחלה. אחד האמצעים לדיכוי המחלה הוא הורדת כמות המידבק ההתחלתי. הוצאת צמחים נגועים וחלקי צמחים במשך ובסוף כל עונת גידול הוא אמצעי חשוב בהפחתת כמות המידבק וגורם לעיכוב התפרצות המגפה בחממה (Shtienberg et al., 1998). מצאו כי הסרת עלים נגועים בעובש האפור פעם בשבוע בחממה מסחרית לא מחוממת של עגבניות הורידה את שכיחות הגבעולים הנגועים באופן ניכר וזאת ללא שימוש בחומרי הדברה. סניטציה יכולה להתבצע באמצעות קיטור או חימום אינטנסיבי, באמצעות כימיקלים או חימום סולארי (Elad and Shtienberg, 1995).

ניתן להפחית את המחלה על ידי צמצום הרטיבות של נבגי *B. cinerea* (Sharabani et al., 1997). מצאו כי קציר ריחן בחממה יומיים לפני ירידת גשם או חמישה ימים לאחר אירוע גשם הפחית את שכיחות המחלה בחממה בצורה משמעותית לעומת קציר בזמן אירוע גשם וזאת עקב הפחתת הרטיבות באזור הקצור. חימום מוגבר ואוורור החממה המיושם בחממות מלפפונים ועגבניות יכול למנוע או לפחות לקצר את משך הרטיבות על גבי העלים. תכנון ומיקום המבנה גם כן יכולים להפחית את המחלה בחממה. בנייה של החממה עדיפה למשל באזור מאוורר מאשר תחת צלו של הר החוסם את הרוח. כיוון פתחי האוורור צריך להיות מכוון למקום בו תתאפשר כניסה של רוח ותחלופת האוויר בתוך החממה תהיה הטובה ביותר. מבנים גבוהים ובעלי חלונות גדולים יפחיתו לחות וחום. חומר הכיסוי יכול גם הוא להפחית רטיבות על גבי העלווה. יריעות פוליאאתילן אטומות לאור אינפרה-אדום ומסכים תרמיים נועדו למנוע בריחת חום מהצמחים

ובכך למנוע מהעלווה להגיע לטמפרטורת נקודת הטל (Elad *et al.*, 1988). תכנון זמן ההשקיה ומניעת דיות בצמח יכולים להפחית את רמת הלחות בחממה. תכנון עומד הצמחים חשוב על מנת לאפשר אוורור בין ובתוך הצמחים (Elad and Shtienberg, 1995).

4.6. אמצעי הדברה פיזיולוגיים

המצב הפיזיולוגי ומשטר הזנה יכול להשפיע על רגישות הצמח למחלות (Goodman *et al.*, 1986). תוספת סידן והפחתת כמות החנקן מפחיתים את העובש האפור בריחן. בחינת קליטת המינרלים בצמחי הריחן הראתה מתאם בין ריכוזי המינרלים בתמיסת הדשן לבין כמותם בצמחי הריחן (Yermiyahu *et al.*, 2006). ריכוזי חומרי הזנה מינרלים בקרקע יכולים להשתנות בצורה משמעותית. הם תלויים בגורמים שונים ובניהם: לחות הקרקע, עומק הקרקע, יכולת המרת היונים, כמות החומר האורגני בקרקע ופעילות מיקרוביאלית, העונה, ויישום הדישון (Asher, 1978). תנועה של תמיסות קרקע אל תא אינדיבידואלי או אל השורשים מונעת על ידי דיפוזיה בתהליך פסיבי. קצב התנועה בצמח של תמיסות מינרליות שונה בין סוגי הצמחים ובין סוגי המינרלים (Marschner, 1997). גידול צמחים בחממות קרוב לגבול קיבולת הייצור שלהם יכולה לחשוף אותם ללחץ פיסיולוגי אשר גורם להם להיות רגישים לפתוגנים.

7. שמנים אתרים

שמן אתרי הינו תערובת חומרים נדיפים בצמח ארומטי, אשר יחדיו מקנים לו את ריחו האופייני. שמנים אתריים מופקים מחלקי הצמח השונים: עלים, פירות, זרעים ושורשים. הם מכילים תערובות שונות ומורכבות של חומרים בעלי מסיסות נמוכה מאוד במים, לרוב נגזרות טרפניות נדיפות כמו מונוטרפנים וססקוויטרפנים, שנוצרות במסלול ביו סינתטי שמקורו בחומצה המבאלונית (Gershenzon, 1994), כמו כן חלק מהחומרים נוצרים במסלולים ביו-סינתטיים שמקורם בחומצה השיקימית (Croteau and Karp, 1991). הטרפנים נוצרים משרשרות איזופרניות בעלות קבוצה זרחנית. שרשרות אלו, באורך של 5, 10 או 15 פחמנים נסגרות לטבעות ועוברות מודיפיקציות חמצון - חיזור תוך כדי פעולתם של אנזימים ספציפיים. הקבוצות הפונקציונאליות המאפיינות את מרכיבי השמנים האתריים הן רבות, עימהן נמנים פחמימנים, כוהלים, קטונים, אלדהידים, אתרים, אסטרים ועוד (Walradt, 1982). כיום ידועים יותר מ-25,000 טרפנים שונים (McGarvey and Croteau, 1995). זוהי קבוצת חומרים חשובה מאוד לתהליכי החיים הצמחיים ובניהם ניתן למצוא מולקולות כמו קרוטנואידים, גיברלינים, חומצה אבסיסית, סטרולים ועוד. למרות השוני הרב בתוך קבוצת הטרפנים אופן הביו-סינתזה שלהם הוא דומה.

כיום נעשה שימוש רחב בשמנים האלו כמקור טבעי לחומרי טעם וריח בתעשיית המזון, התמרוקים והקוסמטיקה וכחומרי מוצא לסינתזת חומרים בתעשיות כימיות. את השמן האתרי ניתן להפיק על ידי סחיטה, מיצוי או זיקוק באדים או במים (Walradt, 1982). הרכב השמן האתרי נקבע בשיטות כרומטוגרפיות, בעיקר בעזרת הפרדה בכרומטוגרף גזי (GLC). בתעשייה מפרידים ומבודדים את מרכיבי השמן על ידי זיקוק פראקציוני (Tyler, 1976).

בצמחי תבלין ובושם שנחקרו נמצא שהשמן האתרי נוצר בתאים ורקמות מיוחדות (Fahn, 1979). השמן האתרי נוצר ונאגר בשכבת תאי האפידרמיס (Croteau, 1977) ומרוכז בבלוטות מיוחדות הנוצרות על גביו, בעיקר בעלים ובתפרחות. מאחר ורבים מחומרי השמן האתרי רעילים אגירתם באיברים חיצוניים מגינה על הצמח מפני הרעלה עצמית. קיימות בלוטות מטיפוסים שונים, וניתן להבחין בצמח הבודד בסוגים שונים של בלוטות (Fahn, 1979; Werker et al., 1985).

מרכיבי השמן האתרי נחשבים כמטבוליטים משניים בצמחים, והיחסים הכמותיים בניהם נקבעים בעיקר על ידי גורמים גנטיים (דודאי וחובי, 1994) ומושפעים על ידי גורמי סביבה וגורמים התפתחותיים בצמח. לכן לעיתים ישנה שונות רבה בהרכב ובכמות השמן האתרי גם בין צמחים מאותו הזן ואף בין החלקים השונים באותו הצמח. קיימות מספר השערות על תפקידם וחשיבותם של החומרים האלו בצמח. הם משתתפים במערכת ההגנה הצמחית נגד פתוגנים וחרקים, מסייעים במשיכה וכאמצעי זיהוי לחרקים מאביקים, ולוקחים חלק בתחרות בבית הגידול הצמח בעזרת היותם אללוקימיקלים המעכבים נביטת זרעי צמחים מתחרים. מכאן נובעת ההשערה המקובלת כיום שתפקידם המרכזי של השמנים האתריים הוא הקניית יתרון אקולוגי לצמח על ידי הגנה מאויבים טבעיים כגון מזיקים, מחלות, הרביוורים וצמחים.

צמחי ריחן מצוי מכילים שמן אתרי עשיר עם טעם וריח מיוחד, עם יכולת לעכב נביטה של זרעים (Dudai et al., 1999) ועם פעילות ביולוגית כנגד נמטודות (Chatterjee et al., 1982), פטריות (Reuveni et al., 1984) וחיידקים (Thoppil et al., 1998). השמנים של צמחי אזובית (*Origanum compactum*) וקורנית (*Thymus glandulosus*) מנעו את צמיחת תפטיר *B. cinerea* לחלוטין כאשר עורבבו במצע הגידול לריכוז סופי של 100 מ"ג/ליטר, כשריכוז IC_{50} היה 35.1 ו-79.2 מ"ג/ליטר, בהתאמה (Chebli et al., 2003). השמן האתרי של חרצית (*Chrysanthemum viscidhirtum*) הצליח לעכב לחלוטין את הצמיחה של תפטיר *B. cinerea*, כאשר עורבבו במצע הגידול לריכוז של 150 מ"ג/ליטר (Chebli et al., 2004). Dimitra et al., 2003 הראו ששמנים של צמח מיורם (*Origanum majorana*) וצמח המנטה (*Mentha pulegium*) הצליחו למנוע את הצמיחה של תפטיר *B. cinerea* כאשר עורבבו במצע הגידול לריכוז של 300 ו-400 מ"ג/ליטר, בהתאמה. הנביטה של הנבגים של *Botrytis fabae* עוכבה במעט, אך באופן מובהק, על ידי שימוש בשמן אזוב (*Hyssopus officinalis*) שהומס לריכוז 1000 ו-4000 מ"ג/ליטר במדיום נוזלי, בעזרת Tween 20. כמוכן שמן האזוב הפחית באופן משמעותי את הנגיעות בקימחון וחילדון בדגניים וקטניות בהתאמה, כשיושם בריכוז של 500 מ"ג/ליטר לאחר ריסוס המדבק (Letessier et al., 2001).

Tsao and Zhou (2000) ו-Dimitra et al. (2003) מצאו כי מרכיבי שמנים אתריים מעכבים התפתחות *B. cinerea* וטענו כי מאחר ולכל שמן אתרי יש הרכב חומרים שונה ולכן יש לכל שמן תכונות אנטימיקרוביאליות שונות המורכבות ממנגנוני הגנה שונים. כמוכן, הם הסיקו שתערובת של שמנים אתריים ממספר צמחים היא ברמת סיכון נמוך להתפתחות עמידות של הפתוגנים כנגדה.

8. ביוטרנספורמציה

ביוטרנספורמציה הוא תהליך השינוי בהרכב הכימי של חומר חיצוני כתוצאה מסינתזה ביולוגית בגוף היצור החי. התהליך מסייע בסילוק ופירוק רעלים חיצוניים. אולם, לעיתים ביוטרנספורמציה עלולה לגרום לביואקטיבציה הכוללת יצור חומרים רעילים, מוטגנים או קרציוגנים, כאלו יותר מאשר מהחומר המקורי. רכיבים של שמנים אתרים עוברים פירוק ומודיפיקציות בתהליכי ביוטרנספורמציה על ידי יונקים, חיידקים וצמחים (Ishida, 2005) וגם על ידי פטריות ושמרים (Duetz *et al.*, 2003; Demyttenaere and Pooter, 1998).

פטריות כמו *Aspergillus niger* ו- *Penicillium* sp. מסוגלות לבצע מודיפיקציות בטרפנים (Linalool, Citral, Limonene) של שמנים אתרים מהריחן (Jan *et al.*, 2000). במספר ניסויים נחקרה גם הפטרייה *B. cinerea* (Farooq and Tahara, 2000; Aleu & Collado, 2001; Collado *et al.*, 1998) וישנם המשתמשים בפטרייה הזו לייצור חומרי משנה מבוקשים בתעשיית המזון והקוסמטיקה (Collado *et al.*, 1995, 1996; Rebordinos *et al.*, 1996). לעיתים הבנת תהליכי ביוטרנספורמציה יכולה לסייע בחקר ובהבנת הפעילות האנטי-פטרייתית של חומרי הדברה (Daoubi *et al.*, 2005).

בחינת הביוטרנספורמציה של רכיבי שמן אתרי בנוכחות הפטרייה מספק מידע חשוב אודות היכולת הטוקסולוגית של השמנים האתריים כנגד הפטרייה. בין היתר ניתן להעריך יכולת הדהטוקסיפקציה של החומרים בנוכחות הפטרייה, רמת היציבות והיכולת של הטרפנים לחדור ולהיספח. כמוכן ניתן לעקוב אחר מנגנוני הפעילות של החומרים כנגד הפטרייה בשלבים שונים בעזרת מציאת התוצרים שהפטרייה מייצרת בתהליך הדהטוקסיפקציה.

- שיטות וחומרים -

א. שיטות עבודה כלליות

א.1. החומר הצמחי

זני הריחן הבאים גודלו בשדה פתוח בנוה יער במהלך שנת 2005 למטרת זיקוק שמן אתרי. שמנים אתריים שנבדקו לפעילות נגד *B. cinerea*: 'לימוני', 'מתוק', 'פטרה', 'קינמוני' ו-'פרי'. הזנים נבחרו על פי רכיב עיקרי שונה בשמן שלהם. תנאי הגידול: קרקע כבדה מקומית, השקיה פעם בשבוע לפי מקדם 0.7 מהתאיידות מגיגית מסוג A. דישון PK ביסוד (סופר פוספאט לפי 80 ק"ג, אשלגן כלורי לפי 60 ק"ג לדונם) ודישון חנקני באמצעות המים לפי 200 גרם חנקן צרוף ליום.

א.2. הפתוגן

תרבית הפטרייה *B. cinerea* בודדה מצמחי ריחן נגועים לאחר שהודבקה בתבדיד B16 שנלקח מהמעבדה של דר' יגאל אלעד מהמחלקה לפתולוגיה של צמחים ומדע העשבים, מרכז וולקני, בית דגן. תרבית בידוד שגרתית נעשתה כל 3 חודשים. התרבית גודלה בחושך ובטמפרטורה של 20 מ"צ על מצע אגר תפוחי אדמה (Potato Dextrose Agar) בריכוז 39 גרם/ליטר (Difco) שהכיל גם 0.25 גרם/ליטר (Sigma) Chloramphenicol.

לשם הכנת תרחיף נבגים, טולטלה תרבית *B. cinerea* בת 12 עד 16 יום שעליה תפטיר מנביג, למשך 10 שניות במבחנה שהכילה מים מזוקקים. התרחיף סונן דרך 4 שכבות של פד גאזה רפואית במשך להסרת כל תפטיר התרחיף סונן מבעד לגוזה. ריכוז הנבגים בתרחיף נקבע בעזרת תא ספירת דם (Haemocytometer) ונמהל לקבלת הריכוז 1×10^5 למ"ל. (Merck) D-glucose ו- (Merck) Potassium dihydrogen phosphate הוספו לתרחיף בריכוז 0.1% כל אחד.

א.3. מיצוי דוגמאות צמחיות

מיצויים נעשו עם הממס האורגני tert-Butyl methyl ether (MTBE) (Sigma) (99.8%) שהכיל סטנדרט פנימי (Aldrich) Isobutyl benzene (IBB) בריכוז 10 µg/ml על מנת לאפשר חישוב כמותי. יחס ממס משקל נקבע לפי 1gr/10ml. בהמשך דוגמאות המיצוי עברו ניקוי על ידי העברתם דרך פיפטת פסטר המכילה: Sodium sulfate anhydrous (Merk) ו-Silica gel 60 (230-400 mesh, Merk) המשמשים לייבוש וסינון חומרים פולאריים ובעלי משקל מולקולארי גבוה בהתאמה. לאחר הניקוי נאספו הדוגמאות בבקבוקי זכוכית בנפח 2ml סגורים במכסה טפלון והוזרקו לאנאליזה במערכת GC-MS.

א.4. הפקת השמן האתרי

דוגמאות של 300 ג' חומר צמחי (עלים וגבעולים) זוקקו במערכת מעבדתית מטיפוס קלוונג'ר (Clevanger, 1928) הדוגמאות הוכנסו לגולת זיקוק בנפח של 2 ליטר. הוספו מים (בגובה של כ- 1/3 מגובה החומר הצמחי). לגולה הוספו אבני רתיחה (על מנת למנוע הקצפה). הדוגמאות חוממו

עד לרתיחה ושהו למשך שעה וחצי בטמפרטורה של 100 מ"צ. השמן שצף על פני המים נאסף בבקבוק הברגה מזכוכית בנפח של 10 מ"ל ונשמר בטמפרטורה של 5 מ"צ. לצורך בדיקת הרכב השמן האתרי בדוגמאות הזיקוק, נלקחה דוגמא של 30 מיקרו-ליטר שמן אתרי לתוך 1 מ"ל (Bio lab) Petroleum ether pesti (40-60), ולאחר מכן הועברה הדגימה ב-GC-MS (סעיף א.6).

5.א. טרפנים נקיים

פרטי המונוטרפנים שנבחנו לפעילות אנטי-פטרייתית בעבודה מפורטים בטבלה 1.

טבלה 1. הטרפנים שנבחנו לפעילות אנטי-פטרייתית בעבודה.

משקל מולקולארי (g/mol)	טוהר החומר (%)	חברה משווקת	CAS number	שם כימי	שם החומר
154.25	97	Fluka	5392-40-5	3,7-dimethyl-2,6-octadienal	Citral, Lemonal
154.25	97	Fluka	106-23-0	3,7-dimethyloct-6-en-1-al	Citronellal (+)/(-), Rhodinal
154.25	95		106-25-2	(Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol	Nerol
154.25	98	Aldrich	106-24-1	3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol	Geraniol
154.25	99	Roth	78-70-6	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	R-Linalool
148.20	95	SCM	140-67-0	1-methoxy-4-(2-propenyl)benzene	Methyl chavicol, Estragole
136.24	85	Roth	5989-27-5	1-methyl-4-prop-1-en-2-yl-cyclohexene	Limonene
150.22	98	Aldrich	499-75-2	2-methyl-5-(1-methylethyl)phenol	Carvacrol, Cymophenol
164.20	99	Roth	97-53-0	2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenol	Eugenol

6.א. (GC-MS) Gas chromatography-mass spectrometry

דוגמאות ה-SPME ודוגמאות של 1 µl מדוגמאות המיצוי והזיקוק המתוארות לעיל נבדקו במכשיר גז כרומוטוגרף ספקטרומטר המסות מטיפוס 6890N GC - המצויד בגלאי מטיפוס Mass selective (MS) -5973 Network (Electron ionization 70eV) של חברת Agilent Technologies (CA,USA). במכשיר הותקנה עמודת סיליקה קפילרית מטיפוס Rtx-5Sil MS (Restek Corporation, state college, PA) (30m x 0.25mm i.d x 0.25µm). הליום, הגז הנושא, הוזרם בזרם קבוע של 1 ml/min. דוגמאות המיצוי הוזרקו במצב "ללא פיצול" (Splitless) ואילו דוגמאות השמן וה-SPME הוזרקו במצב פיצול הדוגמא (Split) ביחס 1:50. טמפרטורת האינג'קטור עמדה על 250 מ"צ, טמפרטורת הטרנספר ליין נקבעה על 280 מ"צ וטמפרטורת הדטקטור נקבעה על 280 מ"צ. גרדיאנט הטמפרטורה בעמודה: 50 מ"צ למשך דקה, תוספת של 5 מ"צ לדקה עד 260 מ"צ, 260 מ"צ למשך 10 דקות. זיהוי המרכיבים נעשה על ידי השוואת אינדקס זמני היציאה (RI) של המרכיבים לסטנדרטים מסחריים ועל ידי השוואת ספקטרום המסות של החומרים מהדוגמא לספריות, GC-MS Adams 2001, NIST 98, ו-QuadLib 1607.

7. ניתוח תוצאות

הנתונים שנאספו בניסויים נותחו בעזרת התוכנות JMP 6 ו-Excel 2003 על פי מתכונת של הניסויים (בלוקים באקראי). הניתוחים הסטטיסטיים שבוצעו: מבחני t, חישוב ערכי L.S.D. לקביעת ההבדלים בין הטיפולים, רגרסיה ליניארית פשוטה ורגרסיה מסדר שני. בעת הצגת התוצאות מצוינים בכל מקרה המבחנים הסטטיסטיים שבוצעו ורמת המובהקות הנבחנת.

ב. הפעילות של שמנים אתרים מצמחי הריחן על הפטרייה *B. cinerea*

ב.1. עיכוב התפתחות תפטיר *B. cinerea* על ידי שמנים אתריים של זני הריחן על גבי מצע מוצק
 דסקיות אגר מאולח בקוטר 10 מ"מ נלקחו מהקצה החיצוני של תרבית בת 4 ימים והונחו במרכז צלחת פטרי כשהתפטיר פונה למצע. החומר הנבדק הונח על נייר פילטר שהוצמד למכסה הצלחת. הצלחת נאטמה מיד אחרי הכנסת נייר הפילטר בעזרת פארפילם והודגרה ב-20 מ"צ בחושך. הוכנו שלוש חזרות לכל ריכוז של כל חומר. בניסוי ה-SPME נמצא שמתרחשת רוויה של כל אחד מהחומרים בנידוף 150 מ"ג/ליטר בחלל הכלי, לכן חושבו 5 ריכוזים בכל טיפול על פי יחס החומר שנוסף ליחס צלחת הפטרי והוחלט על טווחי הריכוזים של 0 עד 125 מ"ג/ליטר לשמן הריחן ולכל אחד מהמרכיבים שנבחרו, לחומרים עם רעילות גבוהה נעשו חזרות עם ריכוזים נמוכים יותר. להערכת פעילות העיכוב של החומר נעשו מדידות לאחר 3 ימים מתחילת ההדגרה. בכל צלחת חושב ממוצע של 3 מדידות של רדיוס התפטיר שממנו הופחת רדיוס דסקית המידבק. בעזרת ממוצע הרדיוסים חושב שטח התפטיר של כל טיפול בכל סידרת ריכוזים בכל שמן ורכיב. עם השטחים של הסדרות נבנה גרף דעיכה שהוזן לתוכנת Origin Pro 7.5 שמחשבת את אקספוננציאל הדעיכה (Exponential decay) עם העלייה בריכוז. בעזרת אקספוננציאל הדעיכה חושב הריכוז שבו עוכב התפטיר ב-50% מהביקורת (ED_{50}), וחושב הריכוז המינימאלי הקטלני לפטרייה *B. cinerea*, בו עוכב התפטיר ב-95% מהביקורת (ED_{95}).

ב.2. נביטת נבגים של *B. cinerea* בנוכחות רכיבים משמנים אתרים של ריחן בתרחיף

בניסוי הזה נבדקה ההשפעה של השמנים ורכיביהם על נביטת נבגים של *B. cinerea*. רכיבי השמנים עורבבו במים מזוקקים ומעוקרים בעזרת (Sigma) Gum arabic בריכוז 50 גרם/ליטר. סדרות מהולים של החומרים נעשו בעזרת תרחיף הנבגים בבקבוקי סינטלציה מעוקרים. 3 טיפות בנפח 10 מיקרוליטר מכל טיפול מיהול-תרחיף הונחו בצלחת פטרי מזכוכית (5 ס"מ בקוטר) שנאטמה בעזרת פארפילם והוכנסה להדגרה ב-20 מ"צ למשך 12 שעות. הנביטה הופסקה על ידי טפטוף Coton blue. ספירת הנבגים הנובטים בוצעה מבעד למיקרוסקופ אור. בכל טיפה נמדדו 33 נבגים להתפתחות נחשון, כשאורך הנבג שימש כיחידת מידה של 10 מיקרון. נבגים הוגדרו כמעוכבים אם גודל נחשון הנביטה שלהם היה קטן מפעמיים אורך הנבג. אחוז הנביטה חושב בעזרת ממוצע שלושת הטיפות בכל טיפול. אורך הנחשון הממוצע חושב מהערכים של 10 נבגים בכל טיפה.

3.ב. הדבקות מקטעי גבעול הריחן במחלת העובש בנוכחות רכיבים משמנים אתרים של ריחן

גבעולי צמחים של זני ריחן מסחריים מזן 'פרי' נחתכו בין הפרקים לאורך 10 ס"מ והוכנסו לעציצים עם מצע פרלייט שהושקה במי ברז ודושן בדשן 20:20:20 בריכוז 0.5%. העציצים רוססו ב-4 מיליליטר תחליב - החומר הנבחן הומס במים בעזרת (Sigma) Gum arabic (L-ריכוז של 2500 ו-5000 מ"ג/ליטר, ולאחר מכן רוססו ב-2 מיליליטר של תרחיף נבגים בריכוז 1×10^4 למ"ל. צמחי ההיקש רוססו במים מזוקקים ומעוקרים. ארבעה עציצים עם 12 קטעי גבעולים בכל טיפול הוכנסו לתאי גידול אטומים נפרדים בנפח 40 ליטר שהוכנסו לחדר מואר בטמפרטורה של 20 מ"צ. שכחות המחלה נמדדה בעזרת שני מדדים: על ידי ספירת הגבעולים שפיתחו סימפטומים של המחלה ועל ידי ספירת הגבעולים הנגועים שהנביגו לאחר 10 ימים מההדבקה.

4.ב. הדברת העובש אפור על ידי רכיבים משמנים אתרים של ריחן בצמחי ריחן בחממה

ניסויי הדברת עובש אפור בצמחי ריחן בחממה התבצעו בצמחי ריחן מזן 'פרי' בתקופת החורף. צמחי ריחן מתוק מסחריים מזן 'פרי' מזרעים שנלקחו ממאגר זרעים הקיים בנווה יער וגודלו בערוגות במצע מנותק (טוף במכלי פוליפרופילן) עם השקיה פעם ביום בטפטוף. הערוגות נקבעו לרוחב 1 מטר, לאורך של 30 מטרים והמרחק בנייה היה 80 ס"מ. בכל ערוגה היו 4 שורות צמחים במרחק של 20 ס"מ בין השורות ו-15 ס"מ בין הצמחים בשורות. השתילה נעשתה בסוף חודש דצמבר בשנת 2006. הקצרים התבצעו ביום השלישי וה-20 בחודש פברואר וביום ה-20 בחודש מרץ. הקציר נעשה ידנית על ידי קיטום הגבעולים המתאימים מהצמח. מיד בתום הקציר רוססו הצמחים בחומר ההדברה שמכיל Citral - הרכיב העיקרי של השמן האתרי מצמח הריחן מזן 'לימון', עבורו פותחה תוארית מסיסה במים (הורכבה בעזרתו של פרופ' שלמה מגדסי מהמכון לכימיה באוניברסיטת ירושלים). בבדיקה בעזרת GC-MS נמצא שחומר ההדברה מכיל בתוכו ~45% מהחומר הפעיל citral, ולאחר שבניסוי רעילות נמצאה רעילות לצמח בריכוז שמעל 1%, הוחלט על מיהול במים לריכוז סופי של 0.5% של חומר ההדברה. בביקורות הניסויי נכללו צמחים שלא רוססו כלל וצמחים שרוססו בחומר הדברה פולאר (POLYOXIN-AL) 150 מ"ג/ליטר. סה"כ 20 ליטר/דונם רוסס מכל חומר הדברה. כל טיפול ניתן בשלוש ערוגות שונות, מתוכן הערוגה המרכזית חולקה ל-14 מקטעים, שהכילו 60 צמחים כל מקטע. הערכת הנגיעות במחלה נעשתה עשרה ימים לאחר הקציר על ידי ספירת הצמחים החולים של 7 מקטעים בערוגה האמצעית.

ג. האינטראקציה של שמן אתרי עם הפטרייה *B. cinerea*

1.ג. ביוטרנספורמציה של טרפנים משמן אתרי של זני הריחן על ידי *B. cinerea*

בניסוי הזה נבחנה האינטראקציה של הפטרייה עם טרפנואידים במצב גאזי. לצורך העניין נעשו אנליזות עם שימוש ב-GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry) של תוצרי הפטרייה שמוצו בעזרת ממס אורגני. גידול הפטרייה נעשה על ידי הנחת דסקית (1 ס"מ בקוטר) מתרבית הפטרייה *B. cinerea* על גבי 3 מ"ל מצע מוצק (PDA) בבקבוקון סינטילציה מעוקר וסגור למחצה בפקק, שהונח בהדרגה ב-20 מ"צ בחושך למשך 6 ימים. ביקורת הניסוי היו בבקבוקונים עם מצע מוצק ללא הפטרייה. 1 מיקרוליטר מהטרפנואיד הנבדק הונח על נייר פילטר

שהוצמד לפקק בקבוק סינטלציה שנסגר והונח בהדגרה בטמפרטורה של 20 מ"צ למשך 6 שעות. כך החומר התנדף ונשמר בחלל הבקבוק תוך כדי מגע עם הפטרייה. בתום ההדגרה נעשה מיצוי עם 3 מ"ל MTBE בטלטול מהיר במשך שעתיים למצע הגידול ולפילטר עליו הונח הטרפנו איד בנפרד. כמוכן נעשה אותו מיצוי לפילטר עם 1 מיקרוליטר מהטרפנואיד בזמן אפס, לצורך הערכת הנידוף של החומר, ספיחתו על ידי הפטרייה, הערכת הניקיון של החומר ולשם חישוב התגובה שלו בהרצה בקולונה של ה-GC-MS. עיבוד הנתונים התייחס בין היתר ליכולת הנידוף של החומר אל הפטרייה, יציבות החומר בנוכחותה והיווצרות חומרים חדשים בעקבות תהליכים ביוטרנספורמטיים. הניסוי נעשה פעמיים לאחר שבפעם הראשונה החומרים שהו 12 שעות עם הפטרייה ולא נמצאו כמעט שרידים לחומרי המקור והתוצרים.

2.2. SPME) Solid Phase Micro Extraction

בשיטה זו נדגמה האווירה בתוך בקבוק אטום המכיל את תרבית הפטרייה *B. cinerea* (Demyttenaere *et al.*, 2004). החומרים בפאזה הגזית נדגמו בשיטה הזו על ידי ספיחתם למצע מוצק המצפה מעין מחט המוחדרת לבקבוק ואחר כך למערכת ה-GC-MS. הבדיקה בוצע עם מחט מסוג PDMS /DVB (DVB-Divinylbenzene) בעלת פולאריות בינונית (בעובי 65 מיקרון) (Supelco PA, USA) (cat: 57310-U). מחט ה-SPME הוחדרה במצב פתוח למשך 5 דקות לתוך הבקבוק לדגימת האווירה, ומיד אחר כך בוצעה הזרקה למכשיר ה-GC-MS (ראה סעיף א.6).

גידול הפטרייה נעשה על ידי הנחת דסקית (1 ס"מ בקוטר) מתרבית הפטרייה *B. cinerea* על גבי 5 מ"ל מצע מוצק (PDA) בבקבוקון SPME מעוקר בנפח 20 מ"ל סגור למחצה בעזרת רדיד אלומיניום, שהונח בהדגרה ב-20 מ"צ בחושך למשך 6 ימים. ביקורת הניסוי היו בקבוקונים עם מצע מוצק ללא הפטרייה. 1 מיקרוליטר מהטרפן הנבדק הונח על נייר פילטר שהוצמד לדופן התחתון של בקבוקון ה-SPME שנסגר באמצעות פקק עם ספטה המאפשרת חדירה של מחט לתוך הבקבוק. והונח בטמפרטורה של 20 מ"צ למשך 4 שעות, שבמהלכן נדגם הגז בבקבוקון כל שעה.

3.3. המסה של טרפנואידים במים מזוקקים

בניסוי שבוצע על מנת לבחון את פעילות רכיבים שמני ריחן על נביטת נבגים, נודפו הרכיבים בצלחת פטרי אטומה שהכילה טיפות תרחיף נבגים. בכל החזרות של הניסוי לא נבטו הנבגים בנידוף עם הרכיבים, מלבד עם החומרים 1-8 Cineole ו-Methyl chavicol שהפחיתו בריכוז נפחי של 1.2 מ"ג/ליטר שעור הנבגים שנבטו ב-32 ו-18% בהתאמה. כשנודפו חומרים אלה בריכוז של 11.8 מ"ג/ליטר הם הפחיתו את שעור הנביטה ב-74 ו-94%, בהתאמה.

בעקבות הניסוי הנחנו שהרכיבים שנודפו לחלל הצלחת התמוססו במים במידה שונה והכמות של החומר שהונח בנייר הפילטר לא בהכרח מייצגת את כמות החומר שהתמוסס בטיפת התרחיף ואת הריכוז הסופי שאליו נחשפו הנבגים. לכן נבחנו רמת המסיסות של החומרים בדומה לפרוטוקול של Weidenhamer *et al.* (1993) שבדקו את המסיסות במים של מונוטרפנים שונים ומצאו שהמסיסים ביותר הם קטונים, אחריהם הכוהלים והפחמימנים ברמה הנמוכה ביותר. הם

גם הציעו שקיים קשר בין רמת הפעילות של המונוטרפנים באינטראקציה עם הפתוגן לבין רמת המסיסות שלהם במים. לשם כך תהליך ההידרציה (hydration) שביצענו בניסוי נועד לצור תמיסה רוויה והוא נעשה בתנאים קבועים ללא יצירת תמיסה רוויה בעודף (supersaturated). השינוי שנעשה בפרוטוקול הניסוי לא אפשר מגע של השמנים במצבם הנוזלי במים, אלא נעשה נידוף של כל אחד מהם אל המים בבקבוק סינטילציה אטום בערבוב איטי כמתואר בסעיף ג.3 בפרק שיטות וחומרים. שיטה זו הבטיחה שלא יוותרו רסיסי שמן שלא פורקו במים והיא דומה יותר לאינטראקציה של הרכיבים עם גדם הגבעול הרטוב בזמן הריסוס.

הערכת מסיסות הטרפנואידים במים מזוקקים נעשתה על ידי נידוף שלהם אל המים במערכת סגורה. מכל טרפנואיד הונחו 5 מיקרוליטר על גבי נייר פילטר שהוצמד לפקק בקבוק סנטילציה מעוקר בנפח 20 מ"ל שהכיל 200 מיקרוליטר מים מזוקקים ומעוקרים. כל בקבוק נסגר הרמטית והונח בטלטול ב-50 RPM, בטמפרטורת החדר (30-25 מ"צ) למשך 48 שעות. בתום הטלטול נעשה מיצוי למים עם 2 מ"ל MTBE בטלטול מהיר במשך 4 שעות. בעזרת Sodium sulfate anhydrous (Merk) סולקו שאריות מים מהדוגמאות שנאספו לבקבוקי זכוכית בנפח 2 מ"ל סגורים במכסה טפלון והוזרקו לאנאליזה במערכת GC-MS.

ד. הגברה בהיווצרות לגנין בעקבות פציעה של גדם גבעול הריחן

ד.1. בחינה מורפולוגית של ליגניפיקציה בתאי החתך של גדם גבעול הריחן
היווצרות ליגנין בדופן תאי גדם גבעול הריחן נבחנה בצמחים מיד לאחר הקציר ובצמחים שנקצרו יום אחד לפני. לכל טיפול נבחרו באופן אקראי 8 צמחי ריחן מהזן 'פרי' מחממת הגידול והועברו לעציצי טוף. במעבדה הצמחים נקצרו בעזרת להב חד במרכז הפרק הרביעי מהניצן האמירי (אורך הגבעול המקובל בקציר המסחר), כאשר הצמחים שנבחנו יום אחרי נשמרו בתאי גידול אטומים בנפח 40 ליטר שהוכנו לחדר מואר בטמפרטורה של 20 מ"צ. לפני הכנת הדוגמות למיקרוסקופ נמרח הגדם בגליצרול (50%) למניעת חדירת בוועיות אויר. החתכים שהוכנו מ-0.25 ס"מ העליונים של הגדם הונחו בטיפת גליצרול שהונחה על גבי זכוכית נושאת. בשלב זה בחלק מהדוגמות נעשו צביעות בעזרת חומר הסלקטיבי לליגנין פלורוגלוצינול מומס ב-20% HCl. לאחר מכן הדוגמות כוסו עם זכוכית מכסה והועברו להסתכלות מבעד לבינקולר או במיקרוסקופ אור.

ד.2. בדיקת כלל פנולים של גדם גבעול הריחן

בכדי לבחון האם מתרחשת הגברה כלשהי בהיווצרות ליגנין בדופן תאי גדם גבעול הריחן, נעשה מעקב כימי אחרי שינויים בריכוז אבני הבנייה של הליגנין בגדם בעזרת בדיקת כלל פנולים על פי הפרוטוקול של Horowitz (1970). דוגמות רקמה נלקחו מגדמי גבעולי ריחן מהזן 'פרי' שנקצרו בעזרת מספריים בחממה, בפרק הרביעי מהניצן האמירי, בזמנים של 0,2,4,6,20 ו-24 שעות. נאספו 5 גרם (בין 20 ל-30 צמחים) רקמת גבעול מקצוות גדמים (0.5 ס"מ מהקצה הקטום). לכל טיפול נעשו שלוש חזרות.

- תוצאות -

א. שמנים אתריים של ריחן להדברת מחלת העובש האפור בצמחי ריחן

שמנים אתריים מזני ריחן שונים נבחנו תחילה לפעילות אנטי-פטרייתית בתנאי מעבדה. לאחר מכן נבחנו הרכיבים עיקריים וכאלו הידועים כאנטי-פטרייתיים מהשמנים נגד התפתחות תפטיר ונביטת הנבגים של *B. cinerea* בצלחות פטרי, ברקמה צמחית ובחממות גידול ריחן. במקביל נבדקו תהליכי הפירוק והמודפיקציה של הרכיבים בעקבות האינטראקציה שלהם עם הפטרייה.

א.1. הפעילות הפונגצידית של שמנים אתריים מזני ריחן שונים

במבחן הראשון נבדקה הפעילות הפונגצידית של שמנים אתריים מחמישה זני ריחן עם תכולת והרכב שמן שונים. תכולת השמן נמדדה בזמן הזיקוק והרכב החומרים בשמן נבדק באמצעות מכשיר ה-GCMS (טבלה 2). בשמן האתרי של ריחן מזן 'מתוק' נמצא הרכיב העיקרי Methyl chavicol בריכוז של מעל ל-67 אחוזים. שמן ריחן מזן 'לימון' הכיל יותר מ-70 אחוזים של החומר Citral (תערובת האיזומרים Neral ו-Geraniol) וקצת יותר מ-6 אחוזים של החומרים Nerol ו-Geraniol. השמן האתרי של ריחן מזן 'פטרה' הכיל 42.7% Linalool, 25.8% Eugenol וכ-4.2% מהחומר 1,8-Cineole. בשמן האתרי של ריחן מזן 'קינמון' נמצא שהשמן מכיל יותר מ-66 אחוז מהחומרים Methyl(E)-cinnamate ו-Methyl(Z)-cinnamate. בשמן של הריחן מהזן המסחרי הנפוץ ביותר 'פרי' נמצא שיש ריכוז גבוה של החומרים Linalool (30.1%) ו-Eugenol (17.5%).

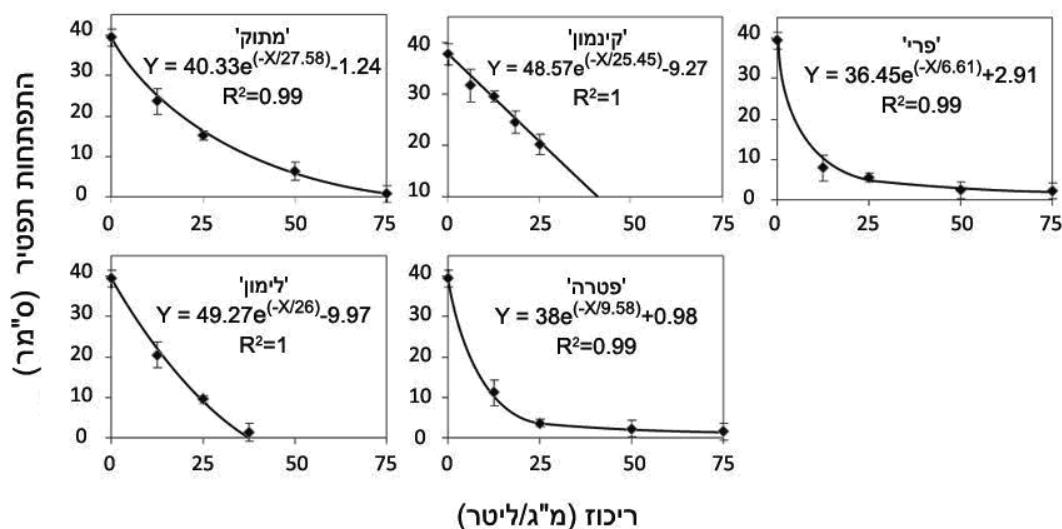
בניסויים מקדימים, כשנעשה הניסוי בטכניקת מצע מורעל (ערבוב מצע PDA עם השמן), נראתה שונות גבוהה מאוד בין החזרות והתקבל עיכוב מוחלט כבר בריכוזים נמוכים. עכב השונות הגדולה הוחלט שבניסוי השמן לא יעורבב במצע אלא ינודף ישירות אל חלל הצלחת לאחר התמצקות המצע ומיקום מדבק הפטרייה.

לאחר שלושה ימי הדגרה, שטח התפטיר של הפטרייה *B. cinerea* היה קטן יותר ככל שהועלה ריכוז כל אחד מחמשת השמנים האתריים (מזני הריחן השונים) הנבדקים, עד לעיכוב מוחלט בשימוש עם השמנים מהזן 'מתוק', 'קינמון' ו-'לימון' בריכוזים 69.8, 37.2 ו-39.9 מ"ג/ליטר, בהתאמה. על פי אקספוננציאל הדעיכה (Exponential decay) נמצא שכל שמן משפיע באופן שונה על התפתחות התפטיר (איור 1). מגמת הפעילות המעכבת של השמנים 'לימון' ו-'קינמון' הייתה גם ליניארית עם שיפוע של -1 ($R^2=0.96$) ושיפוע של -0.67 ($R^2=0.98$), בהתאמה. לעומת זאת, לריכוזים השונים של השמנים של הזנים 'מתוק', 'פרי' ו-'פטרה' הייתה מגמת עיכוב מעריכית והם עכבו בריכוזים נמוכים ומנעו לחלוטין את התפתחות התפטיר רק בריכוזים גבוהים יותר. בנוסף ליכולת העיכוב של השמנים, בשימוש בשמן של הזן 'פטרה' השתנה צבע התפטיר שהתפתח לחום כהה. תפטירים שנחשפו לשמן הזן 'קינמון' לעיתים לא הנביגו, או הנביגו פחות מתפטיר הביקורת, לאחר 12 ימי הדגרה.

טבלה 2. ההרכב כימי של השמנים האתריים של זני *O. basilicum*.

ריכוז החומרים בשמן (w/w %) של כל זן					
שמות החומרים	מתוק (5245)	לימון (1013)	פטרה (1017)	קינמון (1006)	פרי (2006)
Limonene	0.13	-	0.33	0.16	1.09
1,8-Cineole	4.06	-	4.2	2	3.88
Linalool	9.34	3.5	42.68	17	30.11
Methyl chavicol	67.33	0.13	-	1.42	-
Methyl(Z)- cinnamate	-	-	-	11.04	-
Nerol	-	4.18	-	-	-
Neral	-	31.89	-	-	-
Citronelol	-	0.17	-	-	-
Geranllol	-	2.15	-	-	-
Geranial	-	38.84	-	-	-
Eugenol	0.22	0.18	25.77	0.12	17.46
Methyl(E)- cinnamate	-	-	-	55.28	-

בעזרת פונקציות הדעיכה של גידול התפטיר חושב IC_{50} – הריכוז שבו היה עיכוב גידול התפטיר ב-50% (ED_{50}), וחושב הריכוז המינימאלי הקטלני לפטרייה *B. cinerea*, בו היה עיכוב גידול התפטיר ב-95% (ED_{95}). בעזרת חישוב הריכוזים האלו ניתן להעריך את ההבדלים בין הפעילות של השמנים. תוצאות החישובים מפורטות בטבלה 3. השמן של ריחן מזן 'פרי' בריכוז 5.1 מ"ג/ליטר מסוגל לעכב את התפטיר הפטרייה ב-50%, אחריו בהפרש קטן השמן של הזן 'פטרה'. שאר השמנים גם הראו יכולת לעכב את הפטרייה, אך בריכוזים גדולים פי 2. שמן הזן 'פטרה' נמצא כקטלני ביותר בריכוז 34.9 מ"ג/ליטר עם דמיון רב לשאר השמנים, מלבד זה של הזן 'מתוק' שקטל בריכוז 69.8 מ"ג/ליטר.



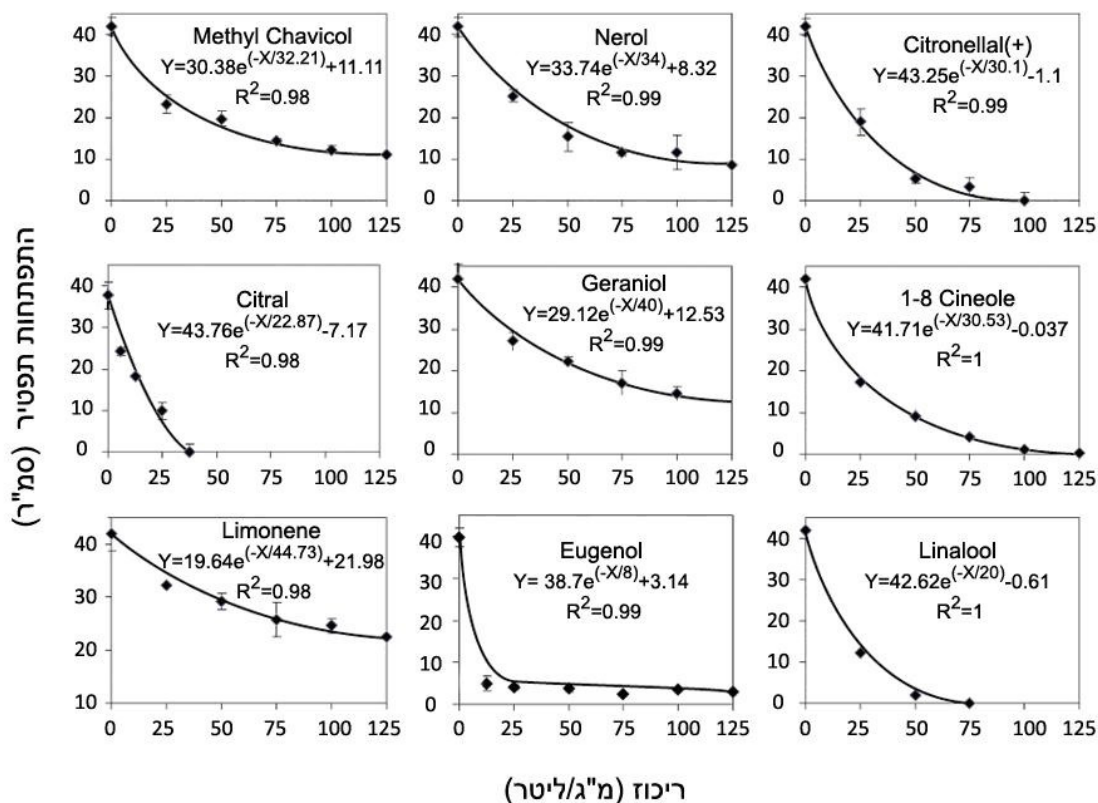
איור 1. ההשפעה של נידוף שמנים אתריים של זני הריחן בריכוזים משתנים על התפתחות תפטיר הפטרייה *B. cinerea*. הערכים הם שטח גידול התפטיר כפי שחושבו משלוש חזרות, לאחר שלושה ימי הדגרה.

טבלה 3. הריכוז המינימאלי לעיכוב והריכוז המינימאלי הקטלני לתפטיר הפטרייה *B. cinerea* על ידי השמנים האתריים של זני *O. Basilicum*.

שם הזן	ED ₅₀ (מ"ג/ליטר)	ED ₉₅ (מ"ג/ליטר)
פטרה	6.8	34.9
לימון	13.2	36.9
קינמון	13.2	37.2
פרי	5.1	42.2
מתוק	18.1	69.8

א.1.2 עיכוב התפתחות תפטיר *B. cinerea* על ידי רכיבי השמנים מזני הריחן

בשלב הבא נבחנו החומרים העיקריים וכאלו הידועים בפעילות האנטי-פטרייתית בשמנים האתריים. ההערכה של פעילות עיכוב התפתחות התפטיר של *B. cinerea* נעשתה בדומה לניסוי בשמנים האתריים, מלבד השינוי בטווח הריכוזים. בניסוי זה, לאחר ניסוי מקדים, נבדקו ריכוזים בין 0 ל-125 מ"ג/ליטר. לפני כן החומרים נבדקו ב-GC-MS ונמצא שכל החומרים נקיים ברמה של 95-99 אחוזים, מלבד Limonene שרמת הניקיון שלו עמדה על 85% (טבלה מספר 1). גם בניסוי הזה שטח התפטיר של הפטרייה היה קטן יותר ככל שהועלה ריכוז כל אחד מהחומרים הנקיים שנבדקו, עד לעיכוב מוחלט בטיפול עם החומרים Citronellal, Linalool, Citral, ו-1-8 Cineole (איור 2). בנידוף החומר Methyl chavicol נראה עיכוב של 45% בהתפשטות התפטיר כבר בריכוז של 25 מ"ג/ליטר, אך עוצמת העיכוב גדלה רק ל-53% כאשר הוכפל הריכוז ל-50 מ"ג/ליטר. נידוף החומרים Nerol ו-Geraniol הביא לעיכוב התפתחות התפטיר ב-40 ו-35% (בהתאמה) בטיפולים עם ריכוז של 25 מ"ג/ליטר, ועיכוב של 63 ו-47%, בהתאמה, בטיפולים עם ריכוז של 50 מ"ג/ליטר. בבדיקה של החומר Limonene שטח התפטיר היה קטן מתפטיר ההיקש רק ב-23% בשימוש בריכוז של 25 מ"ג/ליטר וב-30% בשימוש בריכוז של 50 מ"ג/ליטר. יכולת עיכוב יוצאת מהכלל נמדדה עם השימוש בחומר Eugenol שהפחית את גידול התפטיר ב-88% בטיפול עם ריכוז של 25 מ"ג/ליטר בלבד, אך העיכוב נותר דומה גם ב-125 מ"ג/ליטר. לעומת החומרים שהפעילות שלהם פורטה עד כה, שאר החומרים עכבו לחלוטין את התפתחות התפטיר בטווח הריכוזים שנבחנו. בריכוז של 25 ו-50 מ"ג/ליטר מהחומר Citronellal(+) שטח התפטיר היה קטן ב-55 ו-88%, בהתאמה, מהביקורת. Citral עיכב באופן ליניארי והפחית את גידול התפטיר ב-36% בטיפול עם ריכוז של 6 מ"ג/ליטר, ב-52% בטיפול עם ריכוז של 12.5 מ"ג/ליטר וב-74% בטיפול עם ריכוז של 25 מ"ג/ליטר. גם Linalool בריכוזים השונים עיכבו ליניארית את גידול התפטיר; עיכוב ב-71% בטיפול עם ריכוז של 25 מ"ג/ליטר וב-96% בטיפול עם ריכוז של 50 מ"ג/ליטר. נידוף החומר 1-8 Cineole בריכוזים 25 ו-50 מ"ג/ליטר עיכב את התפתחות התפטיר ב-59 ו-78%, בהתאמה.



איור 2. ההשפעה של נידוף הרכיבים העיקריים בשמנים האתריים של זני הריחן בריכוזים משתנים על התפתחות תפטיר הפטרייה *B. cinerea*. הריכוזים נקבעו בחלל צלחת פטרי אטומה. הערכים הם שטח גידול התפטיר כפי שחושבו משלוש חזרות, לאחר שלושה ימי הדגרה.

בטבלה 4 מוצגים ED_{50} ו- ED_{95} לתפטיר הפטרייה של כל חומר. החומר Citral היה בעל הפעילות הפונגיצידי הגדולה ביותר, אחריו Linalool, Citronellal(+), ו-1-8 Cineole. שאר החומרים לא הצליחו לקטול את הפטרייה בטווח הריכוזים האפשרי לנדוף בתנאי הניסוי הזה.

טבלה 4. הריכוז המינימאלי לעיכוב והריכוז המינימאלי הקטלני לתפטיר הפטרייה *B. cinerea* על ידי הרכיבים של השמנים האתריים של זני *O. Basilicum*.

שם החומר	ED_{50} (מ"ג/ליטר)	ED_{95} (מ"ג/ליטר)
Citral	10.0	36.0
Linalool	13.5	49.6
Citronellal(+)	20.1	78.4
1-8, Cineole	20.8	90.8
Methyl chavicol	35.8	>150.0
Nerol	33.0	>150.0
Geraniol	48.9	>150.0
Limonene	>150.0	>150.0
Eugenol	6.1	>150.0

א.2.2 נביטת נבגי *B. cinerea* בנוכחות רכיבי השמנים מזני הריחן

הפעילות הפונגיצידית של החומרים נבחנה בנביטת הנבגים של הפטרייה *B. cinerea*. תחילה, בוצע ניסוי שבחן מספר תוספים להמסת הרכיבים לתרחיף. בניסוי נבחנה הרעילות של המונוטרפן Citral לנבגים *B. cinerea* בעזרת שימוש בתוספים שונים שמאפשרים להמיס כמות גדולה ומבוקרת של שמנים אתריים לתוך מים. בניסוי השתמשנו ב Citral כי מצאנו בניסויים קודמים שהוא יעיל בריכוזים נמוכים בהפחתת גידול של תפטיר של *B. cinerea*. הניסוי כלל את התוסף Tween 20 (10 גרם/ליטר) שנפוץ כחומר משטח במחקר ובתעשיית הפרמקולוגיה, את הפולימר Gum arabic (50 גרם/ליטר) שנפוץ מאוד בתעשיית המזון ותוארית נוספת שפותחה עבור החומר Citral בעזרתו של פרופ' שלמה מגדסי מהמכון לכימיה באוניברסיטת ירושלים. המונוטרפן יושם בסדרת מהולים כפולים עם כל אחד מהתוספים והוערך אחוז הנביטה של הנבגים (טבלה 4). נוכחות התוספים עשויה להשפיע על הפעילות של Citral כמעכב נביטת הנבגים של *B. cinerea*. Tween 20 אפשר המסה טובה של Citral במים בכל הריכוזים שנבדקו בניסוי (המים נבדקו במיקרוסקופ אור לשאריות צפות של החומר), למרות זאת נצפה עכוב של 10% בלבד בנביטת הנבגים בריכוז של 500 מ"ג/ליטר. לעומת זאת כאשר נעשה שימוש בתוסף Gum arabic לא נבטו נבגים כלל כבר בריכוז Citral של 125 מ"ג/ליטר ועם התוארית לא חלה נביטת נבגים כלל בריכוז הנמוך ביותר של 62.5 מ"ג/ליטר מהחומר הפעיל Citral.

טבלה 4. נביטת נבגי הפטרייה *B. cinerea* בתרחיף עם ריכוזים משתנים של החומר Citral שעורבב במים עם שלושה תוספים שונים.

תוארית	נביטת נבגים (%)		ריכוז Citral (מ"ג/ליטר)
	Tween 20 (1:100)	Gum Arabic (1:20)	
0±0	90±20	0±0	500
0±0	100±0	0±0	250
0±0	100±0	0±0	125
0±0	100±0	20±8	62.5
40±18	100±0	80±24	31.3
100±0	100±0	100±0	15.6
100±0	100±0	100±0	0

ערכי אחוז הנביטה הם הממוצע ± סטיית התקן של שלושה 3 חזרות (33 נבגים בכל חזרה).

החומר Gum arabic נמצא מתאים כתוסף למבחן הפעילות של הרכיבים נגד נביטת הנבגים של הפטרייה *B. cinerea*. במבחן הזה לא חושבה פונקציה הדעיכה של נביטת הנבגים, כי כשנבנו סדרות מהולים של החומרים בעזרת תרחיף נבגים, נמצא שרגישות הנבגים גדולה מאוד בכל חומר, שיש שונות גדולה מאוד בין החזרות של הניסויים ולא הייתה דעיכה עקבית, אלא

הייתה נביטה או מניעה מוחלטת. לכן כדי להציג את הרמה שבה החומרים קוטלים את הנבגים, ערכנו ניסוי שכלל שני ריכוזים עיקריים (250 ו-400 מ"ג/ליטר) שבהם כל החומרים משפיעים על הנביטה (טבלה 6).

בשימוש במדיום מימי רק חלק מהרכיבים הנבחנים הצליחו למנוע נביטה של נבגים של הפטרייה, לעומת עיכוב התפטיר בניסוי הקודם עם כל הרכיבים. ישנם הבדלים משמעותיים בין היכולת האנטי-פטרייתית של הרכיבים מהשמנים האתריים של ריחן. מניעת נביטת נבגים דרשה שימוש בריכוזים גבוהים של החומרים כדי להשפיע על הנביטה, לעומת הריכוזים הנמוכים בניסוי עיכוב תפטיר הפטרייה. ההבדלים בין השימוש בשני ריכוזים 250 ו-400 מ"ג/ליטר היה משמעותי במקרה של Nerol, Citronellal(+), Linalool ו-Citronellal(+). לתוסף Gum arabic בריכוז 1:20 לא הייתה השפעה על נביטת הנבגים אל מול הביקורת. חלק מהחומרים, כמו Eugenol ו-Methyl chavicol, לא מנעו את הנביטה של הנבגים, אך כן הצליחו לעכב את התפתחות נחשון הנביטה. כמוכן, בתרחיף שטופל עם Methyl chavicol היה ניתן לראות בצפייה מבעד למיקרוסקופ שחלק מנחשוני הנביטה שהיו קצרים יחסית לביקורת התעוותו וצורתם הזכירה סליל.

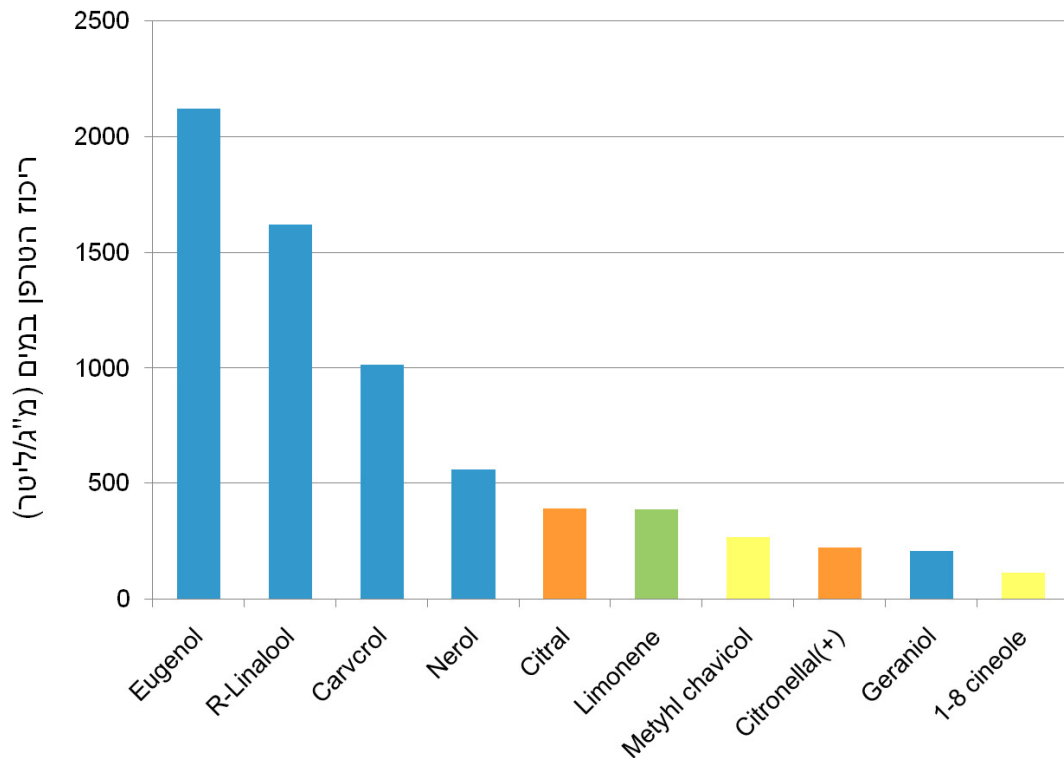
טבלה 6. אחוז הנביטה ואורך הנחשון של נבגי הפטרייה *B. cinerea* בתרחיף לאחר הדגרה של 12 שעות עם ריכוזים משתנים של הרכיבים משמנים אתריים של זני הריחן.

הטיפול	ריכוז החומר (מ"ג/ליטר)	נביטה (%)	אורך נחשון (um)
ביקורת - מים מזוקקים	-	95±1.5	96±13
ביקורת - Arabic Gum (1:20)	-	95±2.3	102±18
Citral	250	0**	0±0**
	400	0**	0±0**
Nerol	250	90±1	51±21**
	400	5±2.1**	10±8**
Geraniol	250	1±0.6**	22±16**
	400	0**	0±0**
R-Linalool	250	40±4.2**	21±14**
	400	5±2.1**	25±11**
Methyl Chavicol	250	95±1.5	70±34*
	400	90±4.4	52±11**
Eugenol	250	90±3	43±19**
	400	90±3.6	47±14**
1-8 cineole	250	95±1.5	62±19**
	400	90±2	53±25**
Citronellal (+)	250	90±1.7	48±11**
	400	0**	0±0**
Citronellal (-)	250	80±3.8*	53±16**
	400	20±1.2**	33±11**
Limonene	250	95±2.3	87±20
	400	80±2.9*	83±15*

ערכי אחוז הנביטה הם הממוצע ± סטיית התקן של שלוש חזרות. ערכי אורך נחשון הנביטה הם הממוצע ± סטיית התקן של 10 נבגים. * - מובהקות ב- $P<0.05$, ** - מובהקות ב- $P<0.01$.

3.א. השפעת מסיסות רכיבים משמנים אתריים על רמת הפונגיצידיה שלהם

נבחנה הפעילות של החומרים מהשמנים האתריים של זני הריחן נגד נביטת נבגי *B. cinerea* בתרחיף על ידי נידופם לחלל צלחת פטרי אטומה בו היו גם טיפות תרחיף נבגים. בניסוי מקדים נודפו הרכיבים בצלחת פטרי אטומה שהכילה טיפות תרחיף נבגים. בכל החזרות של הניסוי לא נבטו הנבגים בנידוף עם הרכיבים, מלבד עם החומרים 1-8 Cineole ו-Methyl chavicol שהפחיתו בריכוז נפחי של 1.2 מ"ג/ליטר שעור הנבגים שנבטו ב- 32 ו-18% בהתאמה. כשנודפו חומרים אלה בריכוז של 11.8 מ"ג/ליטר הם הפחיתו את שעור הנביטה ב- 74 ו-94%, בהתאמה. תוצאות האנליזה של ה-GC-MS מוצגות באיור 3. ניתן לראות שההלים התמוססו במים בכמות הגבוהה ביותר ובריכוזים נמוכים יותר האלדהידים ואחריהם הפחמנים. יש הבדלים משמעותיים בין המסיסויות של הרכיבים במים, כשהחומרים בעלי המסיסות הגבוהה ביותר הם Eugenol, אחריו R-Linalool ו-Carvacrol. שאר החומרים היו בעלי מסיסות נמוכה בסדר גודל פחות.



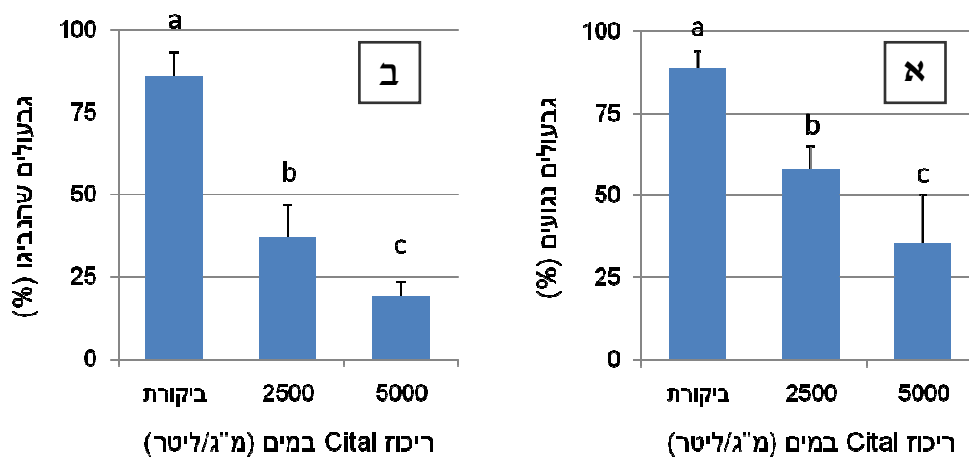
איור 3. מסיסות הרכיבים במים מזוקקים ומעוקרים. הערכים במיליגרם לליטר והם הגבוהים ביותר שהתקבלו, כאשר 5 מיקרוליטרים מכל חומר נבדק נודפו בבקבוק סינטלציה אטום ל-200 מיקרוליטר מים מזוקקים ומעוקרים למשך 3 ימי הדגרה בטלטול ובטמפרטורת החדר. צבעי העמודות מסמלים קבוצות פונקציונאליות ברכיבים כדלקמן: כחול - כהלים, כתום - אלדהידים, ירוק - פחמימנים, צהוב - אתרים.

כשטיפות מתרחיף נבגי *B. cinerea* עורבבו בצלחות פטרי מזכוכית עם טיפות מים שבתוכם הומסו הטרפנואידים (נבחנו יחסים 1:1 עד 1:4 מים רוויים לתרחיף) נצפתה נביטה מלאה של כל הנבגים בשתי חזרות הניסוי, מלבד המים שהומסו לתוכם Eugenol ביחס 1:4, בהם הייתה נביטה של 65 עד 100%.

א.1.4 הדברה של העובש האפור ברקמה צמחית בעזרת רכיבים מהריחן

למבחן הזה נבחר החומר Citral כמודל, מאחר שהצליח לעכב במידה הרבה ביותר נביטת נבגים וגידול תפטיר של הפטרייה *B. cinerea*. החומר הומס במים בעזרת תוארית שפותחה בעזרתו של פרופ' שלמה מגדסי מהמכון לכימיה באוניברסיטת ירושלים. תחליב ה-Citral נבדק תחילה בניסוי *in-situ* לפעילות ההדברה נגד הנגיעות של מקטעי גבעולים של ריחן במחלת העובש. לפני השימוש ברקמות צמחיות נעשה מבחן שקבע את הריכוז הגבולי של החומר בתרסיס שאיננו פוגע בצמח. בצמחים בוגרים וצעירים מזני הריחן 'פרי' ו-'הגר' שרוססו בתחליב בריכוז של 10,000 מ"ג/ליטר מהחומר הפעיל Citral נראו צריבות קלות בלבד בקצוות העלים, מקום היקוות של טיפות תרסיס. לעומת זאת צמחים שרוססו בתחליב בריכוז של 5,000 מ"ג/ליטר ומטה מהחומר הפעיל Citral לא נפגעו כלל. הבדיקה נעשתה מאקרוסקופית ומבעד למיקרוסקופ אור.

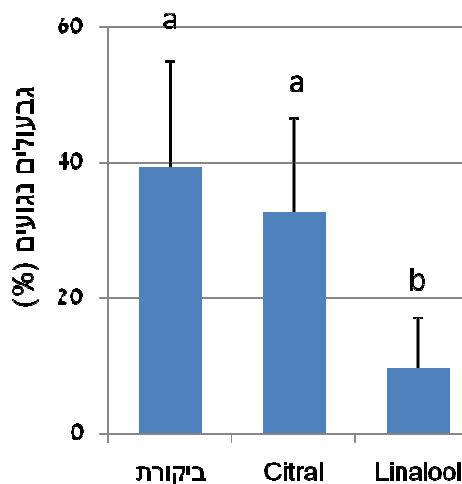
בעקבות התוצאות האלו נקבעו לניסוי ברקמות צמחים הריכוזים 2,500 ו-5,000 מ"ג/ליטר של Citral בתרסיס ההדברה. הערכת המחלה נעשתה 10 ימים לאחר ההדבקה והטיפול (איור 4). נצפתה פחיתה של 35 ו-60.3% ($P < 0.01$) בנגיעות בעובש אפור בגבעולים שרוססו עם תחליב Citral בריכוז 2,500 ו-5,000 מ"ג/ליטר, בהתאמה (איור 4.א). הגבעולים החולים שטופלו בתחליב בריכוז 2,500 ו-5,000 מ"ג/ליטר מהחומר הפעיל הנביגו בשעור 32.9 ו-42.8% (בהתאמה) פחות מצמחי הביקורת ($P < 0.05$) (איור 4.ב). הגבעולים שלא חלו בניסוי לא הראו סימני צריבות או מחלה ואף החלו ללבלב כעבור שבוע.



איור 4. אחוז הנגיעות (א) ואחוז ההנבגה (ב) של עובש האפור בגבעולי ריחן מזן 'פרי' שרוססו בתחליב Citral (התוארית פותחה בעזרתו של פרופ' שלמה מגדסי מהמכון לכימיה באוניברסיטת ירושלים) והודבקו בעזרת ריסוס תרחיף *B. cinerea*. ריכוז החומר הפעיל במים נקבע ל-2,500 ו-5,000 מ"ג/ליטר. הגבעולים הוערכו לנגיעות לאחר עשרה ימי הדגרה. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P < 0.05$) לפי מבחן LSD.

באיור 5 מוצגים הממצאים של ניסוי דומה לזה הקודם, אלא שהפעם מלבד Citral נבחן גם Linalool. מקטעי הגבעולים רוססו בתחליבים של החומרים שהומסו במים בעזרת Gum arabic לריכוז סופי של 2,500 מ"ג/ליטר ואחר כך אולחו בתרחיף נבגים של *B. cinerea*. מקטעי

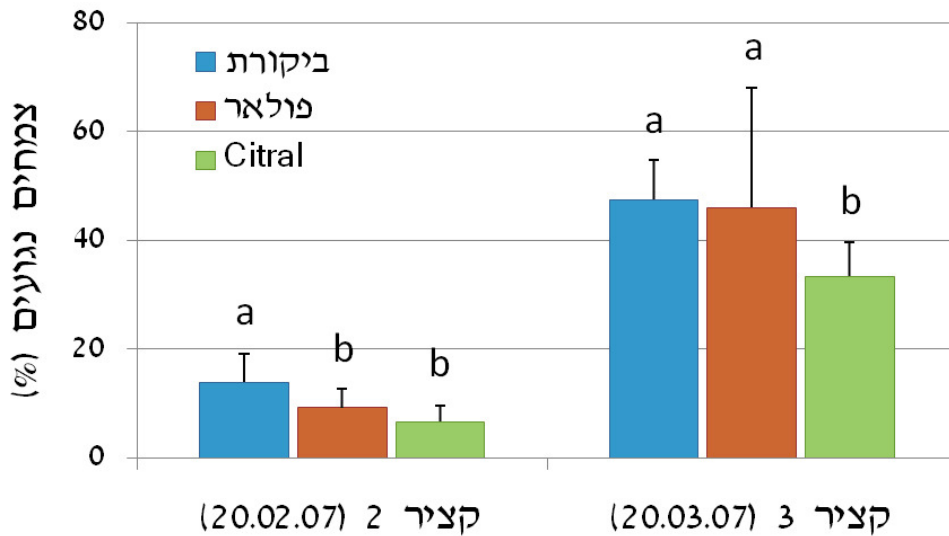
הגבעולים בטיפול הביקורת רוססו במים עם Gum arabic (50 גרם/ליטר) בלבד. נגיעות הגבעולים שרוססו בתחליב Citral פחתה ב- 16.9% בלבד, בעוד שהנגיעות של אלו שרוססו בתחליב Linalool פחתה באופן מובהק בכ- 75.5%.



איור 5. נגיעות בעובש האפור בגבעולי ריחן מזן 'פרי' שרוססו בחומרים Citral ו-Linalool מומסים במים בעזרת Gum arabic והודבקו בעזרת ריסוס תרחיף נבגים של *B. cinerea*. ריכוז החומר הפעיל נקבע ל-2,500 מ"ג/ליטר. הגבעולים הוערכו לנגיעות לאחר 10 ימי הדגרה. אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$) לפי מבחן LSD.

א.2.4 הדברה של העובש האפור בריחן בעזרת רכיבים משמנים של הריחן

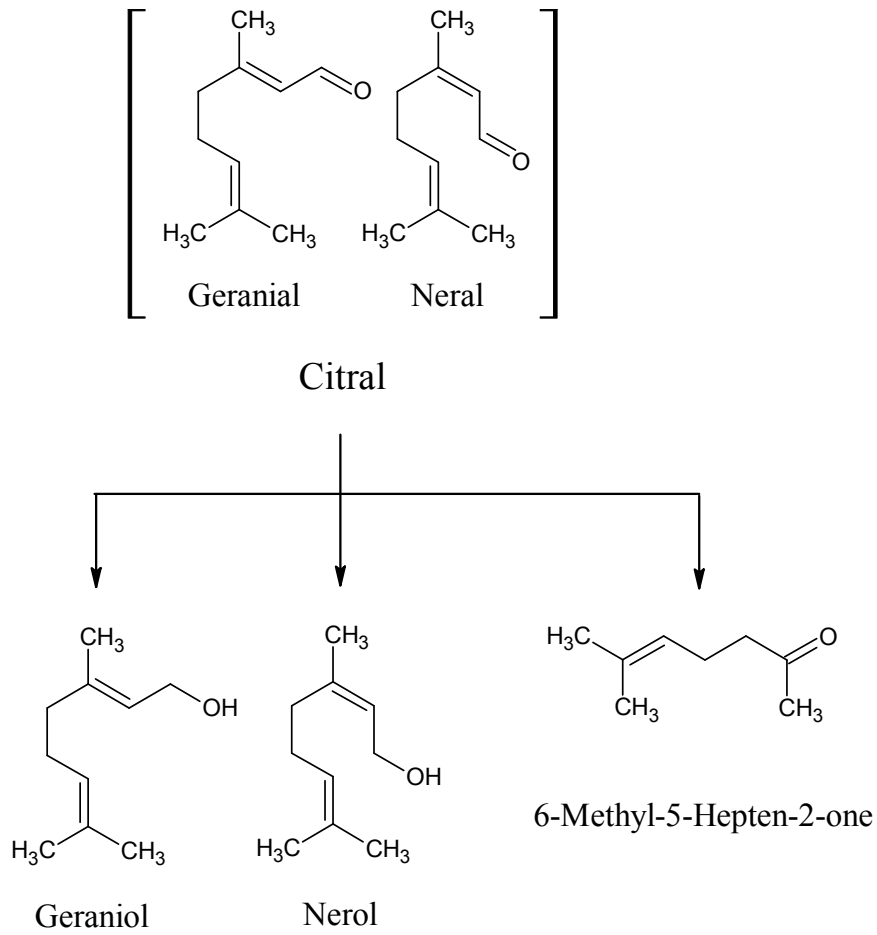
תחליב ה-Citral נבחן בניסוי בחממות של גידולי ריחן כחומר הדברה נגד מחלת העובש האפור בחודשים ינואר עד אפריל 2007. הטיפולים מיד לאחר הקציר היו מים כביקורת שלילית והחומר פולאר (POLYOXIN-AL) כביקורת חיובית. בבדיקה שנעשתה באמצע חודש ינואר כ-10 ימים לאחר הקציר הראשון, שהתבצע 6 שבועות מהזריעה, לא נמצאו צמחים עם סימפטומים של המחלה. באיור 6 מוצגים ממצאי הבדיקות שנעשו 10 ימים לאחר הקציר השני והשלישי, בחודש פברואר ובחודש מרץ בהתאמה. בהערכה שהתבצעה לאחר הקציר השני נמצא שאחוז הצמחים החולים בחלקות שטופלו בתחליב ה-Citral היה נמוך ב-52% מהביקורת וחלקות שטופלו בפולאר נמצאה הפחתה של 33.3% במחלה לעומת הביקורת. לעומת זאת, במדידה שהתבצעה לאחר הקציר השלישי נמצא שהנגיעות בחלקות שטופלו בתחליב ה-Citral הייתה נמוכה ב-29.7% מהביקורת ובחלקות שטופלו בפולאר לא נמצאה הפחתה יחסית מהביקורת. לא נצפו סימנים שהעידו על רעילות של החומר הנבחן בקרב צמחי הריחן בחממה. הריח האופייני של התרסיס נעלם כעבור יום על פי דברי העובדים של החממה. בעקבות רמת המחלה הגבוהה הניסוי נגמר לאחר הקציר השלישי, הגידול נעקר והחל מחזור גידול חדש.



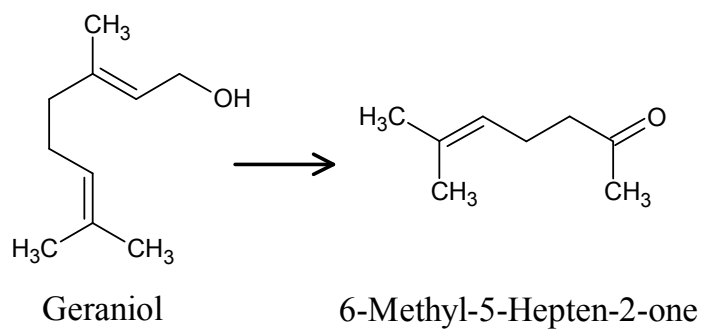
איור 6. נגיעות 10 ימים לאחר הקציר במחלת העובש האפור בצמחי ריחן מזן 'הגר' שרוססו בתחליב Citral (התוארית פותחה בעזרתו של פרופ' שלמה מגדסי מהמכון לכימיה באוניברסיטת ירושלים) מיד לאחר הקציר. ריכוז החומר הפעיל במים נקבע ל-2,500 מ"ג/ליטר. הצמחים הוערכו לנגיעות לאחר 10 ימים מהקציר. אותיות שונות מציינות הבדלים סטטיסטיים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$) לפי מבחן LSD.

א.5. ביוטרנספורמציה של רכיבים משמן הריחן על ידי הפטרייה *B. cinerea*

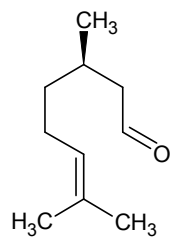
בחלק הזה של העבודה בדקנו את יציבות רכיבי השמנים האתריים כחומרי הדברה ואת האינטראקציה שלהם עם *B. cinerea*. תוצאות הניסוי הבאות מציגות את הנגזרות (derivative) שזוהו בעקבות האינטראקציה של הרכיבים עם הפטרייה. במטבוליזם של Citral ב *B. cinerea* (איור 7) נמצאו שלושה מטאבוליטים חדשים: Geraniol, Nerol ו-Methyl-5-Hepten-2-one. בהדגרה של הפטרייה עם Geraniol (איור 8) נמצא מטאבוליט חדש אחד: Methyl-5-Hepten-2-one. בטרנספורמציה של (+)-Citronellal על ידי *B. cinerea* (איור 9) זוהו ארבעה חומרים חדשים, ובטרנספורמציה של 1,8-Cineole על ידי *B. cinerea* (איור 10) זוהו שלושה חומרים חדשים. ביקורות הניסוי הראתה שלא נוצרו חומרים חדשים בבקבוקים ללא הפטרייה ושמצע הגידול של הפטרייה איננו משפיע על החומרים הנבדקים.



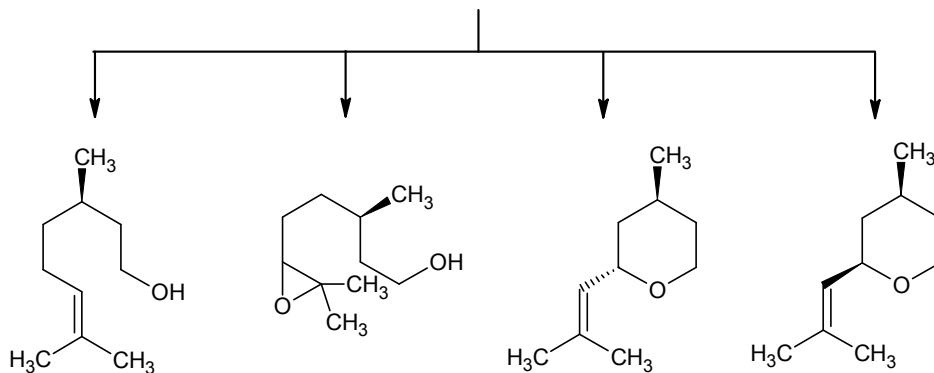
איור 7. טרנספורמציה של Citral על ידי *B. cinerea*.



איור 8. טרנספורמציה של Geraniol על ידי *B. cinerea*.

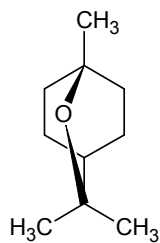


(+)-Citronellal

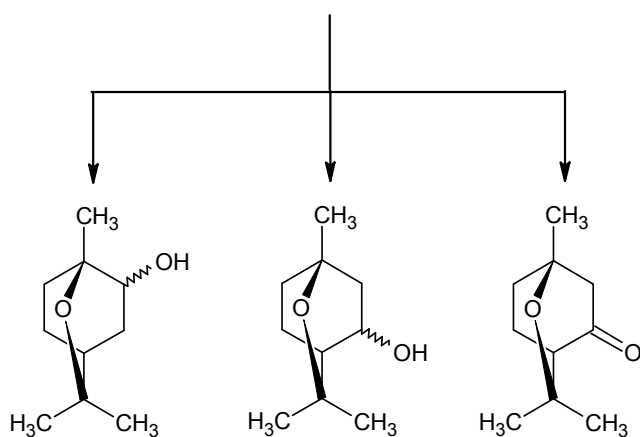


(+)-Citronellol (+)-Citronellol epoxide (+)-cis-rose oxide (+)-trans-rose oxide

איור 9. טרנספורמציה של (+)-Citronellal על ידי *B. cinerea*



1,8-Cineole

2-hydroxycineole 3-hydroxycineole 3-oxo-cineole
endo or exo endo or exo

איור 10. טרנספורמציה של 1,8-Cineole על ידי *B. cinerea*

ב. אפיון המבנה וההחלמה של רקמות גדם גבעול הריחן

ב.1. יצור לגנין בדפנות תאים במהלך ההחלמה של גדם גבעול הריחן

בשלב הראשון של אפיון שלבי ההחלמה נעשו חתכים מורפולוגיים בצמחים משני זני ריחן מסחריים. תחילה נבדקו סוגי רקמה בצמח השלם, בכדי למצוא את השונות לאורך הצמח ולשם קביעת אזור חתך קבוע לניסוי. מאחר ובקציר גידול הריחן נדרש הגבעול הצעיר למשלוח, נבחנו הרקמות הנחתכות בגדם, בסמוך לפרקים השלישי והרביעי מהניצן האמירי. בין הפרקים נצפו הבדלים בהתפתחות בדופן המשנית בתאי הטרכאות ברקמת העצה, כפי שניתן להבחין בין החתכים הווסקולריים לאחר צביעה בפלורוגלוצינול (איור 11). בריחן מהזנים 'פרי' מזן 'הגרי' נראתה הצביעה אחידה בפרק הרביעי, לכן המשך הניסוי התבצע בחלק זה של הגבעול (איור 11.ב).



איור 11. צילומים של חתכים בגדמי גבעולי ריחן מזן 'פרי' שנצבעו על ידי פלורוגלוצינול (לצבע אדום) לזיהוי לגנין. א ו-ב: חתכים שנעשו בסמוך לתחילת הפרק השלישי והרביעי, בהתאמה מהנצר האמירי, ג: סכמת קווי החיתוך הרחבי שבוצעו בגבעולים.

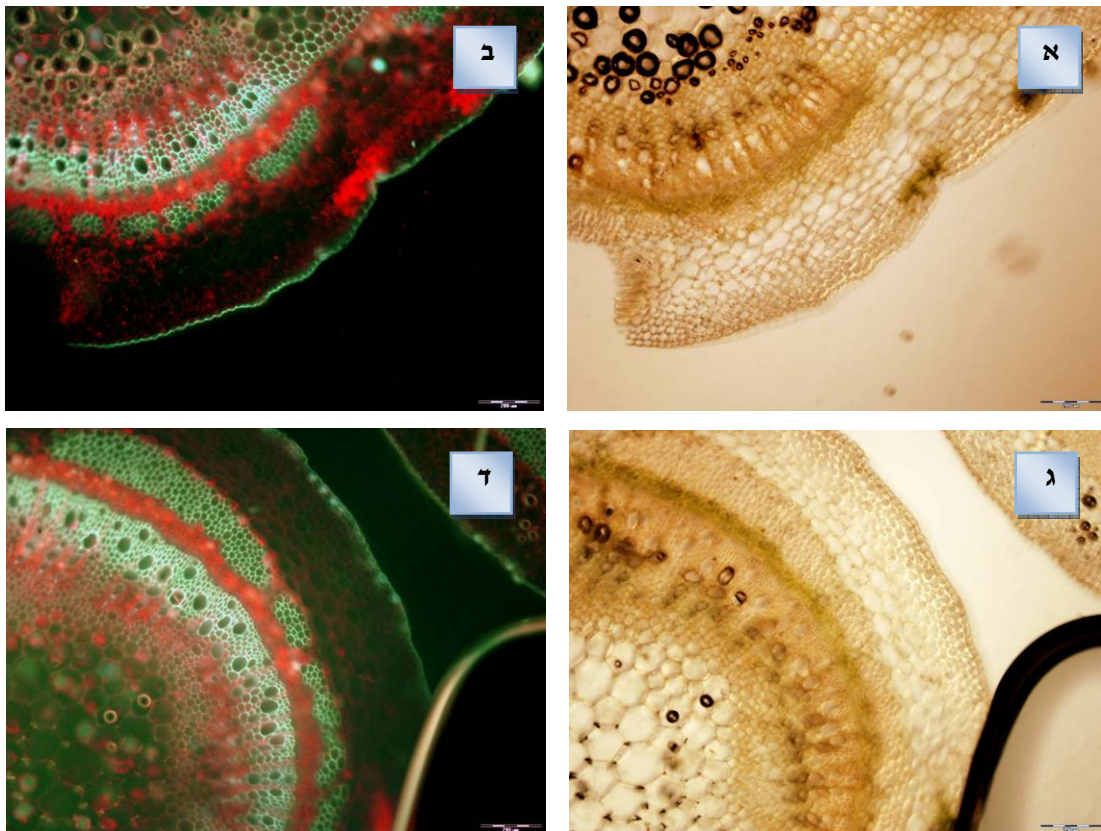
הרקמות שבחתכי הגדמים של גבעולי ריחן הוגדרו על פי מיקומן, צבען ועל פי המבנה המורפולוגי והצפיפות של התאים (איור 12).



איור 12. חתך רוחבי בגבעול צמח הריחן.

לאחר מכן נבדקו צמחים שנגדמו בזמנים שונים ונבחן תהליך היווצרות הלגנין על פני הגדם. בצפייה בעין לא מזוינת ברקמת גדם בת יום, נראה ששטח הגדם התכווץ ודפנות קצוות הקורטקס החלו להתקמר אל תוך הליבה. כשביצענו צביעה בעזרת פלורוגלוצינול לזיהוי לגנין ברקמות של גבעולים שנקטמו בזמנים שונים נמצא שלגדם בן יום נדרשת שהות של 3 דקות בנוזל הצביעה לעומת 10 דקות של רקמת גדם טרי. הונח שההבדל נעוץ בלחות הרקמה, שרקמת גדם יבש סופחת אליה מהר יותר את נוזל הצביעה כנגד זו הרטובה. משמע שהרקמה מאבדת לחות בסמוך לשטח הפציעה, בתאים שנמצאים על פני שטח.

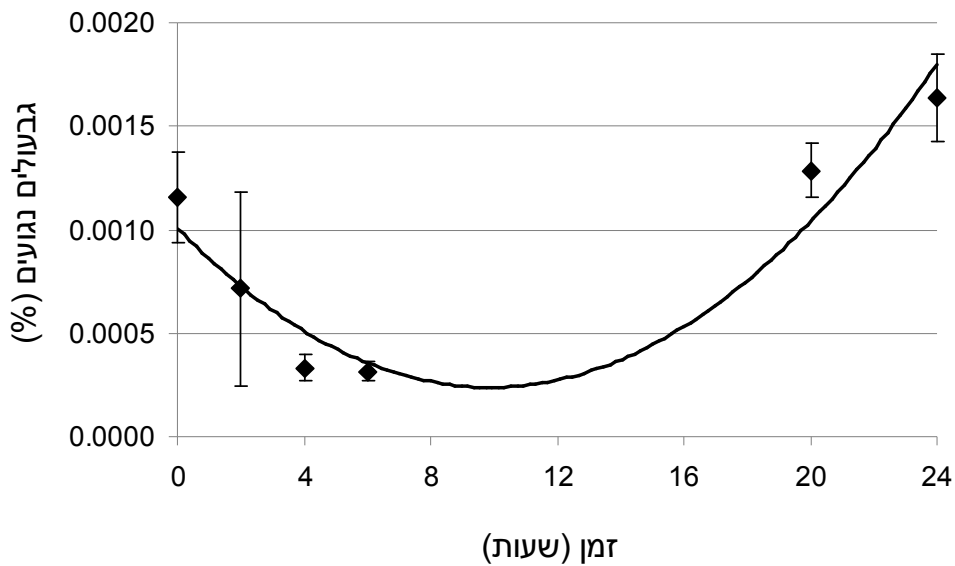
בהמשך פנינו לבדיקה שאיננה כוללת צביעה כימית, אלא בעזרת שימוש בעדשות פלורוסנטיות במיקרוסקופ האור. מבעד העדשות תועדו חתכים שנלקחו כ-1 עד 5 מילימטר מתחת גדם בן 48 שעות (איור 13) וחתכים מגדם טרי מאותו הצמח (גבעול מישני מקביל). לא נראו הבדלים בתאי הליבה, תאי השיפה ותאי הקורטקס בין שני סוגי הטיפולים בגדמים, באותו צמח בפרק הרביעי; לא נראו התווספות ליגנין בדפנות, שינוי בגודל וצורת התאים. כן נצפו במספר חתכים בני 48 שעות התפצלות של הקורטקס מתאי העצה, כנראה כתוצאה מהתייבשות הרקמות. הניסוי נעשה בשני זני הריחן 'פרי' ו-'הגר', בשבעה צמחים בכל זן.



איור 13. חתכי רוחב של גדמי גבעול הריחן. א, ב 48 שעות ממועד הקציר. ג, ד גבעול סמוך ללא חיתוך מוקדם. הקציר נעשה בפרק הרביעי מקודקוד הצמיחה. א, ג: ללא צביעה (Bright filed). ב, ד: צביעה פלורוסנטית (תכלת - לגנין, אדום - כלורופלאסטים).

בשיטה אחרת בדקנו את רמות הפנולים בגדם הצמח, שהינם אבני הבנייה של הליגנין. תוצאות בדיקת כלל פנולים שהתבצעו בגדמי גבעולים ממועדים שונים, לא היו חד משמעיות. התוצאות המוצגות להלן הן האיחוד הממצאים של שני ניסויים בהם נבדקו רמת כלל הפנולים

בטווח הקצר של 6 שעות ובטווח הארוך של יממה שלמה (איור 15). לא נמצאו הבדלים משמעותיים בכמות הפנולים שנמדדה בגדם.

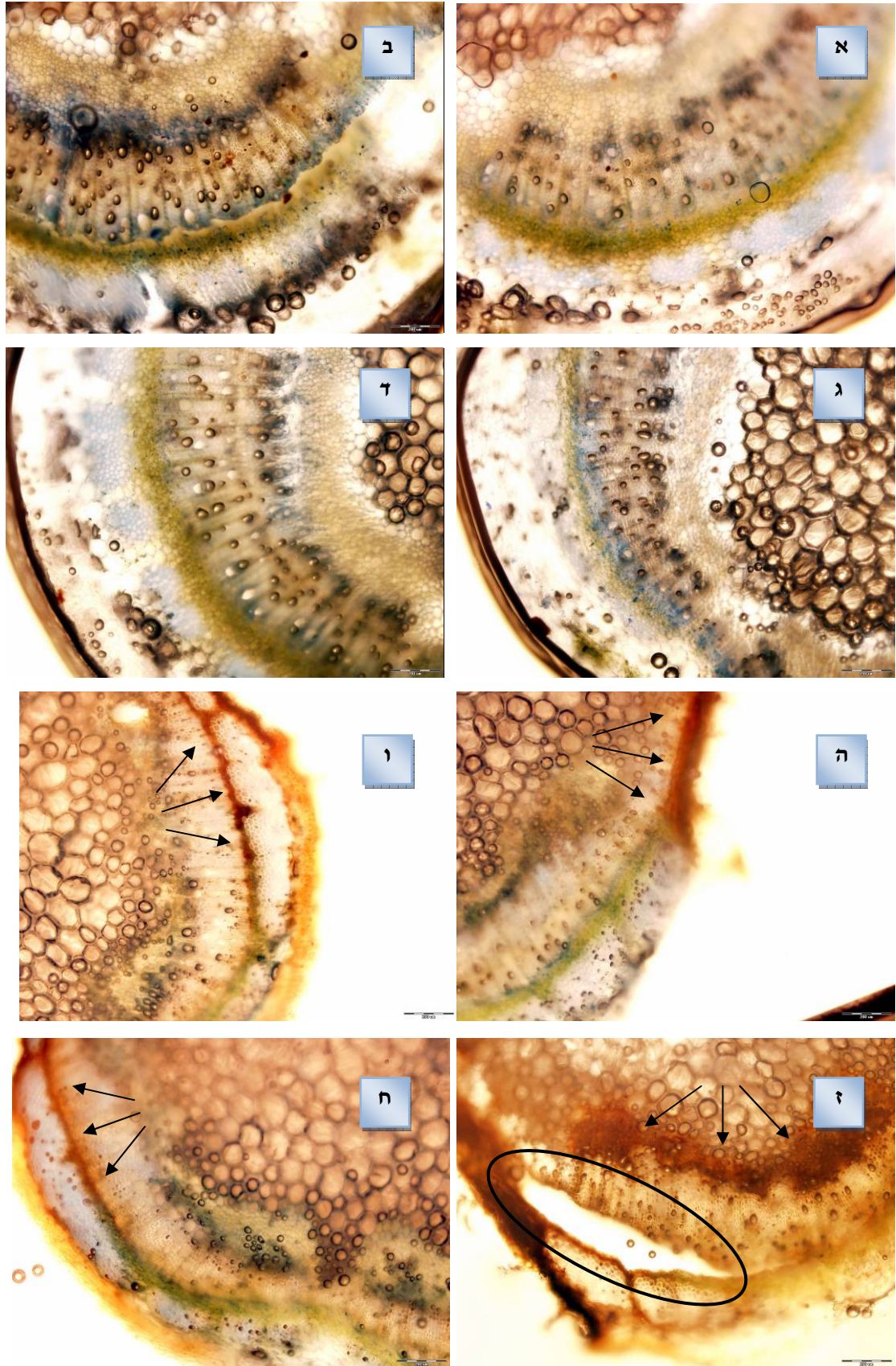


איור 14. ריכוז כלל הפנולים שנמדדו בגדמי ריחן במהלך יממה.

2.2. חדירת נבגי *B. cinerea* ברקמות הגדם

בכדי לבחון האם קיימת רקמה מועדפת להתפתחות התפטיר בגבעול הריחן, נעשו חיתוכים של גדם נגוע, שנצבעו בעזרת cotton blue לזיהוי תפטיר הפטרייה לאחר הדבקה. נמצא שישנן רקמות שנצבעות באופן טבעי על ידי cotton blue, ללא קשר לנוכחות הפטרייה. ניתן לראות הצביעה בצינורות השיפה ובקמביום. בגדם שהתייבש במשך 3 ימים ישנן רקמות הנוטות להתפרקות וניתן לראות את התנתקות העצה במעגל באיור 15: ז. ישנו קושי ביצירת חתכים יפים בגבעול נגוע. תאי הגבעול החולה מצטמקים והופכים רכים ודביקים בזמן העבודה עם הגבעול.

בצביעה שביצענו לא נראתה צביעה בכחול באופן משמעותי באזורים היותר נגועים (מצומקים). בתמונות 15: ה-ח שנלקחו במיקרוסקופ מסומנים בעזרת חצים האזורים שבהם נתרשש ריקבון ומזה הונח שדרכם התפטיר. ללא קשר לצביעה, חדירת התפטיר נפוצה יותר באזור הקורטקס (15: ו,ח), אך גם נראתה חדירה של תפטיר באזור השיפה והקמביום (15: ז). קשה למצוא צביעה ספציפית של תפטיר בגבעול הזה.



איור 15. חתכי רוחב של גדמי גבעול הריחן. א-ד: היקש, חתכי גדמים שנצבעו ב-Cotton blue 72 שעות מזמן הקציר. ה-ח: חתכי גדמים שהודבקו בנבגי פטרייה *B. cinerea*.

- דיון -

בעבודה זו פעלנו בשני תחומים הקשורים לטיפול במחלת העובש האפור התוקפת את גידולי הריחן. התחום הראשון עוסק בשימוש בשמנים אתריים שהופקו ממספר זני ריחן נגד *B. cinerea*, בעוד שהתחום השני מתמקד במחקר של תהליך ההחלמה של הגדם של צמח הריחן.

א. שמנים אתריים מריחן כפונגיצידיים נגד מחלת העובש האפור בצמחי ריחן

בתחום הזה של העבודה נבדקו מספר שמנים אתריים מכמה זני ריחן (*O. basilicum*) וכמה רכיבים עיקריים לפעילות נגד הפטרייה *B. cinerea* התקפת את גידולי הריחן. העבודה נעשתה כדי להעריך את האפשרות לשימוש בשמנים ורכיביהם להדברה של מחלת העובש האפור שפוגעת בגידולי ריחן בישראל. בסדרת ניסויים במעבדה נבדקה פעילות של שמנים מזני ריחן נגד הפטרייה ולאחר מכן נבדקו חומרים נבחרים בחממות בתנאים מסחריים של גידול הריחן.

א.1. הפעילות הפונגיצידי של שמנים אתריים מזני ריחן שונים

בבדיקת GC-MS נמצאה שונות גדולה בתכולת הרכיבים של השמנים מזני ריחן שונים, בדומה לתוצאות של עבודות קודמות שנעשו בשמנים של זני ריחן (Marotti *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1997; Grayer *et al.*, 1996). כל שמן התאפיין ברכיב אחד או שניים עיקריים, יחד עם עוד מספר רכיבים שנכחו בריכוזים נמוכים עד נוכחות כמעט אפסית (טבלה 1). הרכב השמן האתרי שמופק מצמחים מושפע מעונת השנה, מתנאי הגידול של הצמח וגם מתנאי ההפקה של השמן. כאשר אנו ניגשים לבחון את ההשפעה של הרכב השמן על כושרו בקטילת פטריות עלינו גם להתחשב בשיטת הבדיקה שמשפיעה מבחינה כמותית על תוצאות. במחקרים קודמים שבחנו שמנים אתריים השתמשו בעיקר בטכניקת מצע מורעל (Oxenham *et al.*, 2005; Dimitra *et al.*, 2003), אך גם בטכניקת דיפוסיה של השמן במצע מוצק (Suppakul *et al.*, 1997), במדיום נוזלי על נבגים (Letessier *et al.*, 2001) ובדרכים נוספות. אלו בדיקות מגוונות הנבדלות באופן יישום השמן, זמן ותנאי ההדגרה. לפיכך, קשה להשוות את כושר העיכוב והקטילה של שמנים שונים מתוך תוצאות של עבודות שונות.

תחילה כשנבחנה טכניקת מצע רעיל (ערבוב המצע עם השמן) לאחר זיקוק השמנים מזני הריחן (*O. Basilicum* L.), נצפתה שונות גבוהה מאוד בין החזרות ונראה שהפטרייה *B. cinerea* מעוכבת לגמרי כבר בריכוזים נמוכים. החוקרים Noleyan and Narasimham (1986) הבחינו שבזמן התמצקות המצע ובזמן ההדגרה מתנדף השמן אל חלל הצלחת ויוצר אווירה מרוכזת ורעילה מאוד שאיננה משקפת את ריכוז השמן במצע. לכן בחרנו בדרך עבודה שהבטיחה שליטה גבוהה יותר באינטראקציה של השמנים עם הפטרייה. במהלך העבודה הצמחים גדלו בחלקת ניסיונות בתנאים זהים, נקצרו במועד אחד, והשמן הופק בשיטה זהה. לבדיקה כמותית של עיכוב התפתחות התפטיר פיתחנו שיטה מתאימה לחומרים נדיפים שמסירותם במים נמוכה מאוד, אך

נדיפותם גדולה. השיטה אמינה ומהירה שבה השמן נודף ישירות אל חלל הצלחת לאחר התמצקות המצע, היא יושמה גם בהמשך כשנבחנו הרכיבים העיקריים של השמנים בנפרד. כל חמשת השמנים שנבחנו בנידוף עיכבו באופן מובהק את התפתחות התפטיר כבר בריכוז 12.5 מ"ג/ליטר. השמנים של הזנים 'מתוק', 'קינמון' ו-'לימון' מנעו לחלוטין את גדילת התפטיר בריכוז של 40 מ"ג/ליטר בקרוב (איור 1). אך מגמות העיכוב שנצפו עם העלאת ריכוזי השמנים מוכיחות שקיימת שונות בין הפעילות האנטי-פטרייתית של השמנים. ההבדלים האלו מתאימים למסקנות של Dimitra *et al.* (2003) שטענו כי לכל צמח שמן אתרי בעל הרכב שונה ולכן לכל שמן תכונות אנטימיקרוביאליות שונות המורכבות ממנגנוני פעילות שונים. מאחר ורמת העיכוב של מעכב מסוים תלויה במינון ובזמן החשיפה אליו, סביר שבמינון גבוה תהיה קליטה מוגברת וליניארית כפי שנתקבל עם השמנים 'קינמון' ו-'לימון'. אולם את עקומות הדעיכה המעריכית של השמנים 'מתוק', 'פרי' ו-'פטרה' לא ניתן ליחס רק לכמות החשיפה של התפטיר לשמן, אלא גם לתנאים נוספים שהשפיעו על האינטראקציה של הפטרייה עם השמנים הללו. כגון, יכולת החדירות, הנדיפות והמסיסות במים של השמנים ובנוסף גם הרוויה הגזית בחלל צלחת הפטרי כולם פרמטרים הנקבעים על פי התכונות הפיזיקאליות של הרכיבים של כל שמן ומשפיעים על רמת העיכוב. חלק מהפרמטרים האלו נבחנו בעבודה והם יעלו בדיון בהמשך.

א.2.1 עיכוב התפתחות תפטיר *B. cinerea* על ידי רכיבי השמנים מזני הריחן

ההערכה של פעילות עיכוב התפתחות התפטיר של *B. cinerea* על ידי הרכיבים העיקריים של השמנים נעשתה בדומה לניסוי בשמנים האתריים. אך בניסויים המקדימים טווח הריכוזים המקורי נמצא לא מספיק ליצירת עקומות דעיכה ברורות, ולכן הרכיבים נבחנו בטווח ריכוזים שהדגיש את ההבדלים בפעילות העיכוב שלהם. התפטיר של הפטרייה עוכב על ידי כל אחד מהחומרים הנקיים שנבדקו, אך עיכוב מוחלט הושג רק עם החומרים Citral, Linalool, Citronellal, ו-1-8 Cineole (איור 2). הערכים שהתקבלו מעקומות הדעיכה מצביעים על מגמות עיכוב שונות בין החומרים, כפי שהציגו Kordali *et al.* (2007). השוני זה יהיה הבסיס לדיון על החלק שמרכיבי השמן לוקחים בפעילות נגד הפטרייה.

היעילות של החומר Citral (תערובת האיזומרים Neral ו-Geraniol) (36 מ"ג/ליטר) נמצאה דומה מאוד לרמה של השמן האתרי של הריחן מזן 'לימון' (36.9 מ"ג/ליטר). היות וריכוז החומר Citral בשמן 'לימון' הוא 70% ניתן להניח שהפעילות הפונגיצידית של השמן האתרי של הריחן מזן 'לימון' נגד *B. cinerea* מתקיימת בגלל הריכוז הגבוה של החומר Citral. שאר החומרים בשמן 'לימון', כמו Nerol ו-Geraniol נמצאו בריכוז נמוך מאוד (טבלה 1) והפעילות שלהם נגד הפטרייה נמצאה יעילה רק בריכוזים גבוהים יותר (איור 2). השמנים של הריחן מזן 'פטרה' ו-'פרי' הכילו ריכוזים גבוהים של המרכיבים Eugenol ו-Linalool ולשניהם רמת רעילות דומה לפטרייה (איור 1). השמן של הזן 'פטרה' הכיל קרוב ל-68% מהחומרים Eugenol ו-Linalool והוא מנע את התפתחות הפטרייה לחלוטין בריכוז של 34.9 מ"ג/ליטר. עם זאת הטרפן Linalool הצליח לקטול את התפטיר רק בריכוז של 49.6 מ"ג/ליטר והפניל פרופנואיד Eugenol הצליח לעכב את התפתחות התפטיר בכמעט 90% בריכוז של 25 מ"ג/ליטר אך לא הצליח כלל

לקטול לגמרי את הפטרייה בטווחי הריכוזים שנבדקו בניסוי. אם נתייחס רק לרכיבים העיקריים שבשמן האתרי של ריחן מזן 'פטרה' נראה שהחלק היחסי הנפרד של כל רכיב בשמן איננו מספיק בכדי לקטול את הפטרייה. במקרה הזה כנראה עצם הנוכחות של שני החומרים בשמן אפשרה רמת רעילות גבוהה יותר, שפועלת במינון של כ-70% פחות מהמינון ב-Linalool לבדו ובסדר גודל פחות מ-Eugenol לבדו. לעומת זאת השמן האתרי ריחן מזן 'פרי' הכיל רק 48% מהמרכיבים פחות מ-Eugenol ו-Linalool והוא הצליח לקטול את הפטרייה בריכוז של 42.2 מ"ג/ליטר, ריכוז קטלני קטן ב-29% מזה של שמן 'פטרה'. השמן של הריחן מהזן 'מתוק' הכיל יותר מ-67% מהטרפן Methyl chavicol שקטל את הפטרייה *B. cinerea* כשנוסף בריכוז של 69.8 מ"ג/ליטר בלבד. אך כשנוסף Methyl chavicol לבדו הוא לא הצליח למנוע את התפתחות התפטיר לחלוטין בטווח הריכוזים שנבדקו. במקרה הזה ניתן להסיק שהחומר Linalool ושאר החומרים שנמצאים בריכוז זעיר בשמן השפיעו ועיכבו את הפטרייה. השמן של הריחן מהזן 'קינמון' היה רעיל מאוד לפטרייה *B. cinerea*, אך היה קושי בהערכת הפעילות של הרכיבים שלו Methyl(E)-cinnamate ו-Methyl(Z)-cinnamate מאחר והחומר הראשון מתגבש בטמפרטורת החדר והשני איננו זמין במצב נקי.

א.2.2 מניעת נביטת נבגי *B. cinerea* על ידי רכיבי שמנים מזני הריחן

בשלב הזה בחנו כיצד רכיבים משמנים של זני הריחן משפיעים על נביטת הנבגים של *B. cinerea* במדיום נוזלי. הנבגים שמקורם מצמחים נגועים מנביגים הם הגורם העיקרי להתפשטות המחלה בחממות ריחן ובגידולים אחרים. הם נישאים באוויר ומדביקים את הצמח ברקמות צמחים שנגדמו במהלך הקציר או הפציעה (Sharabani *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1997). מגדלי ריחן רבים מבססים את צמצום גודל המדבק בחממות על שיטות סניטציה ובקרת אקלים (Sharabani *et al.*, 1999), מאחר שקיימים מעט פונגיצידיים המותרים לשימוש בבזיל.

בניית השיטה להערכת הפעילות של הרכיבים נגד הנבגים הייתה מורכבת ממספר שלבים. בניסויים הראשוניים בדקנו כיצד לשלוט בריכוז כל חומר בתרחיף הנבגים, באיזה תוסף להשתמש בכדי להמיס את החומר להשתמש והאם התוסף בא באינטראקציה עם הנבגים. לאחר שנמצאו תוספים יעילים שממסים היטב בטווחי ריכוזים שאינם משפיעים על נביטת הנבגים, בנינו סדרות מהולים של החומרים בעזרת תרחיף נבגים. מספר חזרות על הניסוי נמצא שרגישות הנבגים גדולה מאוד בכל חומר, ושיש להשתמש בטווח מהולים ספציפי בכל חומר. כשהחומרים נבחנו בטווחי מהולים ממוקדים גם אז נראתה שונות גדולה מאוד בין החזרות של הניסויים ולא הייתה דעיכה עקבית.

השתמשנו בחומר Gum arabic כתוסף לשיפור המסת הרכיבים במים (טבלה 6). בניסויים מקדימים נמצא שהוא לא משפיע על נביטת הנבגים ושיפור ההמסה של השמנים בעזרתו הייתה גבוהה (Islam *et al.*, 1997). רק בריכוז גבוה של כל הרכיבים, מלבד Citral ו-Geraniol, ניתן למנוע את הנביטה של הנבגים. גם נבגים של *Penicillium digitatum* היו רגישים לטרפנים פי 2.4 פחות מהתפטיר (Wolken *et al.*, 2002). תיתכנה כמה סיבות לכך שרק ריכוזים הגבוהים

של הרכיבים האלה מונעים את נביטת הנבגים. הסיבות לכך הינן אי יכולת החומרים לחדור אל הנבגים דרך הדופן הקשיחה ונוכחות המידיום המימי. בבדיקות עם התפטיר המגע של הרכיבים היה ישירות עם הקורים של הפטרייה, שהם תאים המיועדים בין היתר לספוח מזון ומים מהסביבה. בעוד שתא הנבג מוגן עם דופן עבה, העשויה משכבות רבות המורכבת משלד קשיח של סיבי כיטין המשובץ ברשת גלוקאן (Bartnicki-Garcia, 1968). כמוכן, יש לציין שיתכן והרכיבים מושפעים מנוכחות הממס, או חומרי המזון שהוספו לתרחיף, באופן שפגע בתכונות שלהם. חלק מהחומרים לא מנעו את נביטת הנבגים אך כל החומרים הצליחו באופן משמעותי לעכב את התפתחות נחשון הנביטה (טבלה 6). כלומר פעולת העיכוב של כל הרכיבים עדיין השפיעה על קורי הנביטה והתבטאה באורך נחשון קצר יותר. מידע זה תומך בזה שתפטיר הפטרייה חשוף ורגיש יותר מתא הנבג, כפי שצוין לפני כן.

3.א. מסיסות רכיבים משמנים אתריים משפיעה על רמת הפונגיצידיות שלהם

השלב החשוב להדברה בצמח הריחן הוא לפני חדירת נחשון הנביטה אל רקמת הגדם הטרי בגבעול. בשלב הזה, כשהרקמה הפצועה מהווה מצע נוח להתבססות, הנבג והנחשון המתפתח עדיין חשופים וניתן לפגוע בהם עם חומרי הדברה (Elad, 1997). לכן, שני הקריטריונים להצלחת ההדברה הם בהכרח זמן הרגישות ומקום המטרה. קודם לכן הוזכר שהתכונות הפיזיקאליות של הרכיבים של השמנים אתריים משפיעות גם כן על האינטראקציה שלהם עם הפטרייה. במחקרם של Weidenhamer *et al.* (1993) הועלה שלמרות האופי ההידרופובי של טרפנים, עדיין הם מסיסים בכמויות זעירות במים. כמו כן הם הראו שהמסיסות של טרפנים במים מושפעת בין היתר גם מהקבוצות הכימיות שבמולקולה. לפיכך ובהתאם למה שדנו עד כה, סביר להניח ששמנים אתריים עלולים לפעול נגד הפטרייה *B. cinerea* גם בטווח הריכוזים הזעירים שבהם הם מסיסים במים ושהפעילות שלהם איננה נקבעת רק על פי המנגנון הטוקסי, אלא בגלל תכונות פיזיקאליות שמשפיעות על זמינותם לפטרייה.

בניסוי שביצענו על מנת לבדוק את ההיפותזה הזו, נידפנו את הרכיבים הנבחנים בצלחת פטרי אטומה שהכילה תרחיפי נבגים ובדקנו את נביטת הנבגים. ריכוז החומר הפעיל נקבע על פי נפח הצלחת ולא על פי נפח טיפות התרחיף. בשלוש החזרות של הניסוי לא נבטו הנבגים בנידוף עם הרכיבים, מלבד הטיפולים בריכוז 1.2 מ"ג/ליטר בחומרים 1-8 Cineole ו-Methyl chavicol, שהפחיתו את שיעור הנבגים שנבטו ב- 32 ו-18% בהתאמה והטיפולים בריכוז 11.8 מ"ג/ליטר שהפחיתו את שיעור הנבגים שנבטו ב- 74% ו-94% בהתאמה. תוצאות המבחן הזה הן חיזוק לכך שפעילות הרכיבים מושפעת מגורמים פיזיקאליים. היות שכמות החומר הנבחן שנוסף לחלל הצלחת לא בהכרח מייצגת את כמות החומר שהתמוסס בטיפת התרחיף ואת הריכוז הסופי שאליו נחשפו הנבגים.

בשלב הבא נידפנו באופן מבוקר את הרכיבים אל תוך מים מזוקקים ומעוקרים, עד לרוויה. בתוצאות אנליזת ה-GC-MS של הדוגמאות (איור 3) ניתן להבחין שהרכיבים אכן נמסו בצורה מזערית במים וגם בהבדלים המשמעותיים בין רמת המסיסויות שלהם. כמוכן ניתן לראות שהכהלים התמוססו במים בכמות הגבוהה ביותר ואחריהם האלדהידים והפחממנים. למרות שהניסוי נערך בחומרים שונים מזה שחקרו Weidenhamer *et al.* (1993), התוצאות האלו עולות

בקנה אחד עם מסקנותיהם שמסיסות של רכיבים במים מושפעת בין היתר גם מהקבוצות הכימיות שבמולקולה.

ערכי הריכוזים של הרכיבים בתמיסות הרוויות היו גבוהים מאלו שהצליחו למנוע או לעכב את נביטת הנבגים בתרחיף של הניסוי שדנו בו בחלק הקודם (א.2.2). אולם כשנערכו מבחנים עם התמיסות הרוויות ברכיבים לפעילות נגד הפטרייה *B. cinerea*, נצפתה נביטה מלאה של כל הנבגים ביחס לביקורת בשתי חזרות הניסוי, מלבד המים שהומס לתוכם Eugenol ביחס 1:4 (מים מעושרים:תרחיף), בהם הייתה נביטה בשיעור של 65% עד 100% לעומת הביקורת. לאחר קבלת תוצאות דומות בחזרה השנייה על הניסוי, העלנו השערה המנמקת את הנביטה המלאה על אף הריכוזים הגבוהים חומרים פעילים; במהלך הניסוי שבו עורבב תרחיף נבגים עם מים מועשרים בצלחות הפטרי התנדפו החומרים הנדיפים במהירות גדולה משל המים, תוך שהם מותירים את המים עם ריכוז נמוך בהרבה מתמיסת המקור שחושבה עם המים הרווים.

א.4 הדברה של העובש האפור בגידולי ריחן בעזרת רכיבים משמן הריחן

החומר Citral שבלט בפעילותו נגד הפטרייה *B. cinerea* נבחן בסדרת ניסויים במקטעי גבעולי בתאים אטומים ובחממות מסחריות מתוך מטרה ליישם אותו כחומר הדברה נגד מחלת העובש האפור בגידולי ריחן. תחילה הוא נבחן לרעילות לצמחי הריחן ונקבע הריכוז הגבולי של החומר הפעיל שניתן לרסס. השמנים האתרים לרוב רעילים לצמח וסביר להניח שאגירתם בבלוטות מיוחדות הינה התאמה המונעת הרעלה עצמית (וורקר, 1994). כמוכן, בעזרת ניסויים מקדימים הוחלט להשתמש ב Gum arabic ותוארית ה-Citral.

המבחנים במקטעי גבעולי ריחן בתאים אטומים נעשו בדומה לפרוטוקול של Sharabani *et al.* (1999), אך אנחנו בנוסף ריססנו Citral. ריסוס בתוארית ה-Citral נמצא יעיל בהקטנת ההדבקות של צמחי ריחן כשהיא הפחיתה באופן מובהק של 60.3% את הנגיעות בעובש האפור בגבעולים ריחן שרוססו בנבגים של *B. cinerea* (איור 4). כמו כן, צמחים שחלו בטיפול עם התחליב הנביגו באופן מובהק פחות מצמחי הביקורת החולים. לעומת זאת בניסוי דומה שביצענו בשני מונוטרפנים עם הממס Gum arabic נתקבלו ממצאים שונים (איור 5). רמת הנגיעות לא פחתה באופן מובהק בקטעי הגבעולים שרוססו בתחליב ה-Citral, אך בגבעולים שרוססו עם החומר Linalool הייתה פחיתה מובהקת של כ-75.5% בנגיעות. ממצאי הניסויים במקטעי גבעולים מוכיחים את היעילות שבה המונוטרפנים מסוגלים להפחית את המחלה. עם זאת, בעזרת דיון בשאלות שעולות מתוצאות הניסויים והמורכבות שהייתה בהכנת מערכת הניסוי נסה להבהיר את הבעיות שעוללות להגביל את השימוש בחומרים האלו באופן מסחרי.

ההבדלים בפעילות הפונגיצדית של החומר Citral בין שני הניסויים עלולים לנבוע מההבדל היחיד שהשתנה במערכת והוא השימוש בממסים שונים, שיתכן ושינו את רמת הנדיפות של Citral בתא הגידול. עם זאת Linalool כן הצליח בניסוי שבו Citral ניכשל, תוצאה שמעלה סבירות שמתרחשת דעיכה בזמינות של המונוטרפנים במהלך ההדגרה, או ש-Citral בעצמו פוגע בחיוניות הגבעולים והופך אותם לרגישים יותר למחלה כשהוא מומס בעזרת Gum arabic. כמוכן כאן יש לציין שמערכת הניסוי מאוד רגישה לגורמים רבים, כמו הכיול של ריכוז הנבגים בהדבקה

והשגת חומר צמחי זהה. המידבק שרוסס היווה גורם מכריע להשגת ההבדלים בנגיעות וכשנעשה בריכוז לא מתאים נתקבלה לעיתים הדבקה מלאה של כל המקטעים או לחילופין אף אחד לא נדבק. בנוסף, מקטעי גבעולים שונים, מבחינת גיל הרקמה, רגישים באופן שונה להדבקות. מזה ניתן להסיק שהמערכת של תא הגידול האטום, על כמה שהיא סגורה ומבוקרת, עדיין מורכבת ותלויה בנסיבות קשות לשליטה. בנוסף, יש להדביר את הפטרייה בריחן ב-24 השעות מזמן הקציר (Sharabani *et al*, 1999), דבר שמצריך שמירה על ריכוז גבוה של חומר ההדברה, כפי שנתאפשר בתא הגידול האטום ולא בחממות הגידול. כלומר יש להתחשב בתוצאות האלו כאשר מסירים את האלמנטים הסביבתיים שבהכרח מקשים על ההדברה של הפטרייה בזמן הקריטי של ההדבקה.

בהמשך המחקר רוסס תוארית ה-Citral בחממות מסחריות של ריחן. במדידות הנגיעות שנעשו כעבור 10 ימים מזמן הקצירים נמצא שבצמחים שטופלו בתוארית פחתה נגיעות המחלה ב-52% בקציר השני ו-27% בקציר השלישי בהשוואה לביקורת. בעוד שריסוס החומר פולאר, הנהוג להדברת העובש האפור בקרב מגדלי ריחן, הפחית את המחלה בכ-33% בקציר השני ולא הצליח להפחית כלל את רמת הנגיעות בקציר השלישי. מידת ההפחתה בניסוי הזה הייתה נמוכה מזו שהתקבלה בתאים אטומים. ניתן לייחס את ההבדלים לגורמים סביבתיים ופיזיים שהיו בניסוי הזה; כמו התפזרות והתנדפות החומר, חסימה של התרסיס מלהגיע אל הגדם על ידי העלים, קיטום ידני גס על ידי הפועלים וגם ההבדלים בין הטמפרטורות שבחממה לעומת הטמפרטורה המבוקרת שבתאי הגידול.

על פי התוצאות והדיון עד כה ניתן להסיק שהשימוש בשמנים אתריים או חומרים ספציפיים מהם כחומרי הדברה נגד מחלת העובש איננו יישומי עדיין. פיתוח ומחקר נוסף תוך התחשבות בנקודות שעלו במחקר הזה יתכן שיובילו לאפליקציית הדברה יעילה במניעת המחלה בגידול מסחרי של הריחן. להלן הנקודות העיקריות שיתכן ויתפסו חלק בלתי נפרד בפיתוח ויישום תכשיר הדברה יעיל משמנים אתריים של הריחן:

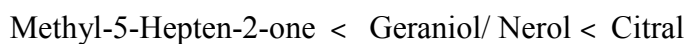
- שילוב מספר רכיבי שמנים מסוגל ליצור הרכב יעיל אף יותר מכל חומר בנפרד, כמו במקרה של שמן הריחן מזן 'פטרה' שהצליח לעכב את התפתחות הפטרייה באופן גבוה מזה שעיקבו רכיביו העיקריים בנפרד. הרכב יעיל יביא לאפקט הדברה גבוה יותר ולכן להפחתת הריכוז של התכשיר בפועל.
- מציאת תוספים להגברת הפעילות של שמנים אתריים תהווה חלק בלתי מבוטל בהרכבת תכשיר הדברה משמנים אתריים. תוסף יעיל יאפשר מסיסות גבוהה במים ונדיפות נמוכה של השמן, כמוכן יהיה עליו לשמר את תוכנתו לקטול פטריות.
- ריסוס חוזר של תכשיר ההדברה לאחר הקציר יבטיח יעילות גבוהה יותר של הדברת הפטרייה מאחר ושמנים אתריים הם נדיפים מאוד ובגלל שהריחן רגיש מאוד להדבקות כיממה לאחר הקציר.

5.א. ביוטרנספורמציה של רכיבים משמן הריחן על ידי הפטרייה *B. cinerea*

ביוטרנספורמציה הוא תהליך השינוי בהרכב הכימי של חומר שמקורו חיצוני כתוצאה מתהליכים ביוכימיים בגוף היצור החי. רוב המחקרים שעסקו עד היום בביוטרנספורמציה של רכיבים

משמנים אתריים התמקדו בהמרה הכימית והביולוגית של חומרי טעם וריח עבור תעשיות המזון והקוסמטיקה (Croteau, 1988). תוצרי הביוטרנספורמציה של פטריות הובילו לעיתים למסלולים ביוכימיים ידועים, כמו שמצאו Demyttenaere & Pooter (1998) ש-Citral, linalool ו-Geraniol הם תוצרי הביוטרנספורמציה של Nerol ו-Geraniol על ידי הפטרייה *Aspergillus niger*. בחלק מהניסויים נחקרה גם הפטרייה *B. cinerea* (Aleu & Farooq and Tahara, 2000; Collado, 2001; Collado et al., 1998). במקרים מסוימים פטרייה זו תורמת לייצור חומרי משנה מבוקשים (Collado et al., 1995, 1996; Rebordinos et al., 1996). כמוכן, לעיתים ביוטרנספורמציה יכולה לסייע בחקר ובהבנת הפעילות האנטי-פטרייתית של חומרי הדברה (Daoubi et al., 2005).

בביוטרנספורמציה של Citral עם *B. cinerea* (איור 7) נמצאו שלושה מטאבוליטים חדשים: Geraniol, Nerol ו-Methyl-5-Hepten-2-one. בהדגרה של הפטרייה עם Geraniol (איור 8) נראה מטאבוליט חדש אחד: Methyl-5-Hepten-2-one. כאשר הפטרייה *B. cinerea* נחשפת אל החומר הרעיל Citral היא מסוגלת לשנות אותו לחומרים פחות רעילים, כפי שמסוגלים הפטרייה *Penicillium digitatum* והחיידק *Pseudomonas incognita* (Wolken et al., 2002; Demyttenaere & De Kimpe, 2001). כאשר סדר הרעילות מהגבוה לנמוך, על פי תוצאות מבחני עיכוב התפטיר והנבגים הוא:



Madyastha (1984) הציע מסלול פירוק ל-Geraniol על ידי *P. incognita*. בשלב הראשון Geraniol עובר חמצון של הקשר הכפול להיווצרות מבנה האפוקסיד, ומתקבל החומר Triol, שמתחמצן והופך ל-Ketodiol, שבתהליך חמצון נוסף הופך ל-Methyl-5-Hepten-2-one. תוצרי הפירוק של Methyl-5-Hepten-2-one הם מים ופחמן דו-חמצני.

בביוטרנספורמציה של (+)-Citronellal על ידי *B. cinerea* (איור 9) זוהו ארבעה חומרים חדשים: (+)-Citronellol epoxide, (+)-Citronellol, (+)-cis-rose oxide ו-(+)-trans-rose oxide. הביוטרנספורמציה של האיזומר (+)-Citronellal ל-(+)-Citronellol על ידי החיידק *Pseudomonas aeruginosa* תועדה על ידי Joglekar and Dhavalikar (1969) ועל ידי השמר *Saccharomyces cerevisia* על ידי Ward & Young (1991) ו-Chatterjee et al. (1999). התוצרים (+)-cis-rose oxide ו-(+)-trans-rose oxide התקבלו בהדגרה של (+)-Citronellol עם *Penicillium roqueforti* ו-*Aspergillus niger* (Demyttenaere et al., 2004). החומר (+)-Citronellal נמצא קטלני למספר מינים של *Aspergillus*, *Penicillium* ו-*Eurotium* לעומת החומר (+)-Citronellol שלא היה קטלני כלל (Nakahara et al., 2003). כשבחנו את ההשפעה של (+)-Citronellal על *B. cinerea*, מצאנו שהוא מעכב את התפתחות התפטיר לגמרי בריכוז של 78.4 מ"ג/ליטר (איור 2) ומנע את נביטת הנבגים בריכוז של 400 מ"ג/ליטר לערך (טבלה 5). בהתאם לנאמר עד כה ניתן להניח שכאשר *B. cinerea* נחשפת אל החומר הרעיל (+)-Citronellal

היא מסוגלת לחמצן ולהפוך אותו לחומרים פחות רעילים. אך את ההנחה הזו יש לאשש בעזרת מחקר נוסף בנושא.

בטרנספורמציה של 1,8-Cineole על ידי *B. cinerea* (איור 10) זוהו שלושה חומרים חדשים: 3-oxo-, 3-hydroxy-cineole (endo or exo), 2-hydroxy-cineole (endo or exo). בניסוי שביצענו נמצא ש-1,8-Cineole קטלני לתפטיר הפטרייה *B. cinerea* בריכוז של 90 מ"ג/ליטר (איור 2) והוא השפיע רק על התארכות הנחשון בניסוי הנבגים (טבלה 5). התוצרים שהתקבלו מראים ש-1,8-Cineole עובר תהליכי חמצון בהדרגה עם הפטרייה. גם בהדרגה של חיידק הקרקע *Rhodococcus* שבודד מהקרקע של יער אקליפטוס, יחד עם 1,8-Cineole נוצרו שלושה חומרים 2-endo-hydroxy-cineole, 2-exo-hydroxy-cineole ו-2-oxo-1,8-cineole (Rodríguez et al., 2006).

מהלך הניסויים האלו בחן באופן איכותי את ההיווצרות של תוצרים חדשים שמצביעים בברור על תהליכי החמצון שמתרחשים בפטרייה. עם זאת, למציאת פרמטרים כגון מהירות התפרקות החומר על ידי הפטרייה, כמות היווצרות חומרים חדשים וכדומה נדרשת מערכת ניסוי שונה שיתכן ותוסיף להבנת הפעילות האנטי-פטרייתית של חומרי הדברה מסוג זה. חשוב לציין שללא התחשבות בפרמטרים האלו יתכן ומסלולי הביוטראנספורמציה שהוצגו הינם שוליים והחומרים שהתקבלו הינם תוצרי ביניים בכמות מזערית.

ב. אפיון המבנה וההחלמה של רקמות גדם גבעול הריחן

בחלק הזה בחנו את תהליך ההחלמה של גדם גבעול הריחן, החלק החשוף שבו מתחילה בדרך כלל ההדבקה במחלת העובש האפור. בשתי טכניקות שונות בחנו האם ישנה הגברה בהיווצרות ליגנין בדפנות תאים במהלך ההחלמה של גדם גבעול הריחן ובטכניקה נוספת בדקנו האם הנבגים הנובטים של *B. cinerea* חודרים ברקמות ספציפיות בגדם גבעול הריחן.

ב.1. יצור ליגנין בדפנות תאים במהלך ההחלמה של גדם גבעול הריחן

בתחילת החלק הראשון של פרק ב' בתוצאות ראינו שעובי רקמת העצה (צבע אדום) משתנה בהתאם לגיל ומיקום החתך (איור 7). עם הירידה בפרקי גבעול הצמח מספר תאי הטרקאות המפותחים גדל, באופן המאפשר הובלת מים גדולה יותר מהשורש ובתמיכה וייצוב הצמח. גם בריחן מזן 'פרי' וגם מזן 'הגר' הצביעה נראתה אחידה בפרק הרביעי, לכן המשך הניסוי התבצע בחלק זה של הגבעול (איור 7ב).

בצעד הבא נבדקו צמחים שנגדמו בזמנים שונים לצורך מעקב אחר תהליך היווצרות מעטה לגנין על פני הגדם וכדי למצוא אופי דינאמי לתהליך. בצפייה בדוגמות גדם גבעול שנחתך יום לפני נמצאו מספר שינויים בולטים לעומת רקמה גדם טרייה. אובדן המים באזור הגדם מביא להתייבשות התאים על פני השטח ובהכרח ממעיט מחיוניותם כמצע נוח להתבוססות נביגי הפטרייה. את השינויים הנגרמים ברקמה עקב ההתייבשות ניתן לראות גם בעין לא מזוינת, והם מלווים בצניחה של הליבה, הלבנה עקב התנקזות נוזל התאים על פני הגדם, התכווצות התאים ולעיתים עקב היווצרות מתח ואובדן אלסטיות של התאים נוצרת גם קריעה של רקמת תאי הקמביום והקורטקס ומתרחשת התפצלות בגבול העצה. אם נתייחס לתופעה הזו כחלק בתהליך

ההדבקות של הגבעול נמצא שזו תמיכה נוספת לחשיבות תנאי הלחות בעת הקציר ובזמן הקרוב שלאחריו. רקמת גדם יבשה ולחות נמוכה הינם תנאים שמונעים מנבגי הפטרייה מלנבוט באופן טבעי, אך גם היווצרות שכבת חיץ של תאים מתים ויבשים. בבדיקות שנעשו במיקרוסקופ נראה שמספר שכבות התאים שמתים משתנה בין סוגי הגדמים, בהתאם למיקום וגסות הקיטום בגבעול. כלומר גודל החיץ איננו פרמטר קבוע המושפע רק מגובה הלחות, והוא גם מהווה חלק נוסף במשוואת הצלחת חדירות הנבג אל רקמת הפונדקאי. בעוד שהפרמטר העיקרי להדבקה אינו מצב (חיה או מתה) רקמת המצע לנבגים אלא האופי והמבנה שלה שאוחזים מים ושומרים על הלחות הגבוהה, כפי שנצפה במקרים שרמות המדבק והלחות היו גבוהות, אז גם עלים וגבעולים בריאים של צמחי ריחן נדבקו (Sharabani *et al*, 1999).

בבדיקה הבאה שאיננה כוללת צביעה כימית, בחנו את אופי היווצרות הלגנין בעזרת שימוש בעדשות פלורוסנטיות במיקרוסקופ האור. מבעד העדשות תועדו חתכים שנדגמו במרחק כ-1 עד 5 מילימטר מתחת לפני הגדם בן 48 שעות (איור 13) וחתכים מגדם טרי מאותו הצמח (גבעול משני מקביל). בבדיקות אלו לא נראו הבדלים בתאי הליבה, תאי השיפה ותאי הקורטקס בין שני סוגי הטיפולים בגדמים, באותו צמח בפרק הרביעי; לא נראתה התווספות לגנין בדפנות, שינוי בגודל וצורת התאים. כן נצפו במספר חתכים בני 48 שעות התפצלות של הקורטקס מתאי העצה, כנראה כתוצאה מהתייבשות הרקמות. בצפייה בפני הגדם דרך בניקולר נראה שינוי מבני בשני סוגי הטיפולים. לרוב, רקמת גדם בריאה נשמרה טוב יותר מכזו חולה, אך עדיין פני הגדם התקמרו כפי שצוין קודם לכן. לעומת זאת בטיפול שבו הודבקו הגבעולים בפטרייה הופיעו כמעט בכל החזרות ריקבון ממוקד על פני משטח הגדם.

בעזרת שתי טכניקות שונות הוכח שברמת התאים החיים החשופים לחדירה הפתוגן, לא מתרחשת יצירת לגנין ב-48 שעות לאחר הקציר בדפנות התאים של רקמת הגדם. מולקולות הלגנין הגדולות מחזקות את דופן התא ומגבילות את המעבר של פתוגנים ברקמות, כפי שניתן לראות את נוכחותם הגבוהה בתאי האפידרמיס המגנים בחתך הגבעול (איור 13.ב). בחינת העלייה ביצור הלגנין בתאים הסמוכים לגדם נעשו בשני זני ריחן מסחריים ('פרי' ו'הגר'), בחתכים בפרקים שונים בגבעולי עשרות פרטי צמחים. בכלם לא נצפו שינויים במהלך ה-48 השעות לאחר הקציר בתוחלת הלגנין בדפנות תאי הליבה, הקורטקס או הקמביום שנתרו חיים בסמוך לגדם.

2.2. חדירת נבגי *B. cinerea* ברקמות הגדם

בחלק הזה של המחקר בחנו האם קיימת רקמה מעודפת להתפתחות התפטיר בגבעול הריחן. בצפייה בחתכים של גדם נגוע, שנצבעו בעזרת cotton blue לזיהוי תפטיר הפטרייה, נמצא שישנן רקמות שנצבעות באופן טבעי על ידי cotton blue, ללא קשר לנוכחות הפטרייה (איור 16). ניתן לראות צביעה בצינורות השיפה ובקמביום. עם זאת, חשוב לציין שהשימוש בצביעה הזאת איננה מבטיחה מסקנות חד משמעיות, לכן נתייחס בעיקר לתופעת הריקבון. בגדם שהתייבש במשך 3 ימים ישנן רקמות מעט נוטות להתפרקות וניתן לראות את התנתקות העיצה בצילום 16 (מסומן במעגל). הקושי שביצירת חתכים יפים בגבול נגוע נובע מתאי הגבעול החולה שמצטמקים והופכים רכים ודביקים ברגע שאוחזים וחותכים את הגבעול. לכן יתכן ויש לחקור את הגבעול על ידי דרכים של קיבוע הרקמה וחיתוך במיקרו-אטום.

בצביעה שביצענו לא נראה צבע כחול משמעותי באזורים היותר נגועים (מכווצים), כן נראה, ללא קשר לצביעה, שחדירת התפטיר נפוצה יותר באזור הקורטקס. התופעה הזו נראתה בשלושה גבעולים חולים אך גם נראתה חדירה של תפטיר באזור השיפה והקמביום. לא ניתן לקבוע בוודאות על אזור חדירה של הנבגים, אבל ניתן להניח שאזורים שמכילים תאים עם דופן דקה יותר כמו הקמביום, יהיו מצע נוח יותר להתבוססות הנבגים.

- תקציר -

ריחן (*Ocimum Basilicum* L.) הינו צמח חד שנתי ממשפחת השפתניים המשמש לצרכים רפואיים וכתבלין בתעשיית המזון. הריחן הינו המין המוביל בענף גידול התבלינים לייצוא בישראל, כשעונת היצוא העיקרית היא בין נובמבר לאפריל. גידול הריחן נפגע על ידי מחלת העובש האפור הנגרמת על ידי הפטרייה *Botrytis cinerea*. במהלך עונת הגידול היבול נקצר מספר פעמים. בעקבות הקציר המחלה גורמת לנגיעות בגדמים, לעיפוש, לתמותת צמחים ואף השמדת הגידול כולו. כיום הטיפול נגד המחלה הוא באמצעות בקרת אקלים, יישום חומרי הדברה לאחר הקציר וסניטיזציה. לכימיקלים הסינטטיים הנמצאים בשימוש נגד הפטרייה יש השפעות שליליות כמו שאריתיות גבוהה ורעילה בתוצרי המזון, זיהום הסביבה בשל הפירוק האיטי של החומרים וסיכון להתפתחות עמידות ויחס עלות-תועלת גבוה.

בעבודה זו אנו חקרנו בשני תחומים שונים, מתוך מטרה למצוא פתרונות שיסייעו בצמצום תופעת מחלת העובש האפור בגידול הריחן. בתחום הראשון בחנו האם שמנים אתריים מריחן יכולים לשמש כחומרי הדברה נגד המחלה. תחילה נבדקו במעבדה, בצלחות פטרי ועל גבי רקמה צמחית, שמנים אתריים מכמה זני ריחן וכמה רכיבים עיקריים שלהם לפעילות נגד גידול התפטיר ונביטת הנבגים של הפטרייה *B. cinerea*. לאחר מכן בחנו את הפעילות של רכיבים נבחרים נגד מחלת העובש האפור בחממות מסחריות של גידול הריחן. בתחום השני בחנו את תהליך ההחלמה של גדם גבעול הריחן, החלק החשוף שבו מתחילה בדרך כלל ההדבקה. בחנו האם ישנה הגברה בהיווצרות ליגנין בדפנות תאים במהלך ההחלמה של גדם גבעול הריחן ובטכניקה נוספת בדקנו האם הנבגים הנובטים של *B. cinerea* חודרים ברקמות ספציפיות בגדם גבעול הריחן.

בין תכולת רכיבי השמנים של זני הריחן קיימת שונות, כמוכן כל חמשת השמנים שנבדקו הצליחו לעכב ולקטול את התפתחות התפטיר, כאשר ההבדלים בין מגמות העיכוב של תפטיר הפטרייה הוכיחו גם שקיימים הבדלים בין שמנים בפעילות נגד הפטרייה, ושרעילות השמנים תלויה גם בתנאים נוספים מלבד הריכוז שאליו נחשף התפטיר. לעומת זאת כאשר נבדקו הרכיבים העיקריים של השמנים נמצא שישנם הבדלים גדולים מאוד בפעילות נגד הפטרייה, ושרק החומרים Citronellal, Linalool, Citral, ו-1-8 Cineole הצליחו לקטול את תפטיר. כשבחנו את השמנים להבדלים ברעילותם כתלות במרכיביהם נמצא שהרכיבים העיקריים בשמנים לעיתים פועלים באופן ישיר כפי שפועלים השמנים נגד תפטיר הפטרייה, ובמקרים אחרים אינם פועלים היטב בנפרד כפי שהם פועלים יחד בשמן. כמוכן, מלבד Citral ו-Geraniol כל הרכיבים פעלו נגד נביטת הנבגים בריכוזים גבוהים מזה שהם פועלו על התפטיר, אך למרות זאת כל הרכיבים עיכבו את התפתחות קורי הנביטה באופן מובהק כפי שנמדד באורכי נחשון קצר יותר. כשבדקנו גורמים נוספים שיתכן ומשפיעים על הפעילות של רכיבי השמנים נגד הפטרייה, מצאנו שהמסיסות של רכיבים במים מושפעת בין היתר גם מהקבוצות הכימיות שבמולקולה, שהחלים התמוססו במים בכמות הגבוהה ביותר ואחריהם האלדהידים והפחממנים.

במבחנים אחרים שביצענו במקטעי גבעולי ריחן בתאים אטומים, מצאנו שריסוס 10 מ"ל תוארית של Citral בריכוז 5000 מ"ג/ליטר הפחית את הנגיעות בעובש האפור בכ-60.3% ($P < 0.01$) בגבעולי ריחן שרוססו בנבגים של *B. cinerea*. כמו כן, צמחים שטופלו עם התוארית וחלו הנביגו

פחות בכ- 42.8% ($P < 0.05$) מצמחי הביקורת החולים. כשהשתמשנו בתוסף Gum arabic בכדי להמיס את הטרפנים, מצאנו שהפעילות של Citral איננה משמעותית כמו עם התוארית, ושריסוס של Linalool בריכוז 2500 מ"ג/ליטר הפחית בכ- 75.5% את רמת הנגיעות בגבעולים. מניסוי זה הסקנו שמערכת הניסוי של תא הגידול האטום, על כמה שהיא סגורה ומבוקרת, עדיין מורכבת ותלויה בנסיבות קשות לשליטה.

בחממות מסחריות של ריחן פחתה הנגיעות במחלה בצמחים שרוססו 20 ליטר/דונם בתוארית Citral בריכוז 2500 מ"ג/ליטר בכ- 52% בקציר השני ו- 27% בקציר השלישי ($P \leq 0.05$). לעומת זה ריסוס 20 ליטר/דונם מהחומר פולאר, הנהוג להדברת העובש האפור בקרב מגדלי ריחן, הפחית את המחלה בכ- 33% בקציר השני ולא הצליח להשפיע על רמת הנגיעות בקציר השלישי. מידת ההפחתה בניסויי החממות היו נמוכים מאלו שהתקבלו בתאים אטומים, וניתן ליחס את ההבדלים לגורמים הסביבתיים והפיזיים.

כשנעזרנו בתהליכי הביוטרנספורמציה בכדי להבין את הפעילות האנטי-פטריויתית של השמנים, מצאנו שכאשר הפטרייה *B. cinerea* נחשפת אל החומר הרעיל Citral היא מסוגלת לחמצן ולהפוך אותו לחומרים פחות רעילים. סדר הרעילות של התוצרים היו במקרה הזה, מהגבוה לנמוך, על פי מבחני עיכוב התפטיר והנבגים הוא: Methyl-5-<Geraniol/Nerol<Citral : Hepten-2-one. בביוטרנספורמציה של (+)-Citronellal ו- 1,8-Cineole גם התקבלו תוצרים מחומצנים, אך יש להמשיך ולבדוק אותם ולאשש את רמת הרעילות שלהם לפטרייה.

בצפייה בדוגמות גדם גבעול שנחתך יום לפני כן נמצאו מספר שינויים בולטים לעומת רקמה גדם טרייה. ניתן היה לראות בעין לא מזוינת ששטח הגדם התכווץ ודפנות קצוות הקורטקס החלו להתקמר אל תוך הליבה. כשבדקנו בעזרת צביעה בפלורוגלוסינול את הלגנין שברקמת הגדם גילינו שקיים ספק באמינות הבדיקה של דינאמיות ההחלמה של הגדם המתייבש ולכן פנינו לבדיקה מבעד למיקרוסקופ פלואורסצנטי. בבדיקות אלו לא נראו הבדלים בתאי הליבה, תאי השיפה ותאי הקורטקס בין שני סוגי הטיפולים בגדמים. כמוכן, לא נראתה התווספות לגנין בדפנות, או שינוי בגודל וצורת התאים. כמוכן נראה בחתכים של גדם נגוע בפטרייה שחדירת התפטיר נפוצה יותר באזור הקורטקס, אך גם נראתה חדירה של תפטיר באזור השיפה והקמביום. כשצבענו את הרקמה בעזרת cotton blue לא נתקבלה צביעה ספציפית של תפטיר בגבעולים ומצאנו שישנן רקמות צמחיות שנצבעות על ידי החומר באופן טבעי.

ממצאי העבודה העלו שניתן לצמצם את חומרת הנגיעות במחלת העובש האפור בגידול הריחן בעזרת שימוש בשמנים או הרכיבים שלהם כחומרי הדברה. אולם יש להמשיך ולחקור את החומרים לשם יישומם המעשי, לחפש ולפתח רכיבים נוספים משמנים, שילובים בינם וגם לנסות ולהשתמש בתוספים אחרים שיבטיחו כושר פעולה רחב וטוב יותר של השמנים. שימוש בחומרים טבעיים אלו, מלבד המענה לבעיית העובש האפור, מבטיח תוצרי מזון בריאים יותר, סביבה נקייה מכימיקלים ופחות סיכון להקניית עמידות לפטרייה. כמוכן יהיה ניתן להתאים שמנים אתריים כחומרי הדברה נגד *B. cinerea* בגידולים אחרים. עם זאת השימוש בחומרי הדברה אלו רק נותן פתרון חלקי. שילוב השימוש בשמנים אתריים יחד עם שיטות קיימות, יתכן ויפחית את מחלת העובש האפור בריחן באופן משמעותי אף יותר.

- רשימת ספרות -

- דודאי, נ., פוטיאבסקי, א., רביד, ע. וורקר, א. (1988). בלוטות ושמן אתרי בצמחים ארומטיים ממשפחת השפתניים. בהוצאת החברה להגנת הטבע. כרך 5, עמ' 18-28.
- רביד, ע. וורקר, א. (1994). השמן האתרי בצמחי ארומה מאגן הים התיכון: שיטות הפקה, הרכב, חומרים כיראליים ואברי הפרשה. מחקר חקלאי בישראל, כרך ז(2) עמ' 85-102.
- Aharoni, N., Dvir, O., Chalupowicz, D. and Aharon, Z. (1996). Modified atmosphere packaging of vegetables and fresh herbs. International conference on Postharvest Science, Conference Handbook. P. 108. (Abstract).
- Aist, J. R. 1983. Structural responses as resistance mechanisms.. In: J.A. Baily and B. J. Deverall (eds). The dynamic host defense. Academic Press, Sidney. Pp. 33-70.
- Alderman, S. C. and Lacy, M. L. (1983). Influence of dew period and temperature on infection of onion leaves by dry conidia of *Botrytis squamosa*. *Phytopathology* 73:1020-1023.
- Aleu, J. and Collado, I. G. (2001). Biotransformations by *Botrytis* species. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 13:77-93.
- Aleu, J., Hanson, J. R., Hernandez-Galan, R. and Collado, I. G. (1999). Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid patchoulol by *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products* 62: 437-440.
- Andrews, J. H. (1985). Strategies for selection antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: Windels, C. E. and Lindow, S. E. (eds). Biological Control on the Phylloplane. American Phytopathological Society, St Paul, MN. USA. Pp. 31-34.
- Arras, G. and Usai, M. (2001). Fungitoxic Activity of 12 Essential Oils against Four Postharvest Citrus Pathogens: Chemical Analysis of *Thymus capitatus* Oil and its Effect in Subatmospheric Pressure Conditions. *Journal of Food Protection* 64, No. 7:1025-1029.
- Asher, C. J. (1978). Natural and synthetic culture media for spermatophytes. In: Rechcigl, M.(ed.). Handbook Series in Nutrition and Food. Section G :Diets, Culture Media, and Food Supplements, 3. CRC Press, Boca Raton, FL. Pp. 575-609.
- Tollier, M. T. and Schuch, W. (1994). Manipulation of lignin quality by down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Journal* 6:339-350.
- Bartnicki-Garcia, S. (1968). *Microbiology* 22:87-108.
- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L. M. and Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. *Journal of Ethnopharmacology* 89:265-269.
- Brooks, C. and Cooley, J. S. (1917). Temperature relations of apple-rot fungi. *Journal of Agricultural Research* 8:139-164.
- Chatterjee, T., DE, B. K. and Bhattachary, D. K. (1999). Bioconversions of citral and (+/-)-citronellal by *Saccharomyces cerevisiae*-2415. *Indian Journal of Chemistry. Section B, Organic including Medicinal* 38, No. 2:1025-1029.

- Chebli, B., Hmamouchi, M., Achouri, M. and Hassani Idrissi, L. M. (2004). Composition and in vitro fungitoxic activity of 19 essential oils against two post-harvest pathogens. *Journal of Essential Oil Research* 16:507-511.
- Chebli, B., Mohamed, A., Achouri, M., Hassani Idrissi, L. M. and Hmamouchi, M. (2004). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology* 89:165-169.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. (1980). Sclerotia and other structures in survival. In: Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R (eds). *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London. UK. Pp. 85-114.
- Collado, I. G., Hanson, J. R., Macias-Sanchez, A. and Naturforsch M. D. (1998). The biotransformation of some clovanones by *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products* 61:1348–1351.
- Collinge, D. B. and Slusarenko, A. J. (1987). Plant gene expression in response to pathogens. *Plants Molecular Biology* 9:389–410
- Costa, P., Bahrman, N., Frigerio J. M., Kremer, A. and Plomion, C. (1998). Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Molecular Biology* 38:587–596.
- Croteau R. B. (1988). Catabolism of monoterpenes in essential oil plants. In: B.M. Lawrence *et al.* *Flavors and Fragrances: A World Perspective*, Elsevier Applied Science, London. Pp. 65–84.
- Croteau, R. (1977). Site of monoterpene biosynthesis in *Majorana hortensis*. *Plant Physiology* 59:519-520.
- Croteau, R. and Karp, F. (1991). Origin of natural odorants In: Muller, P. M. and Lamparsky, D. (Eds) *Perfumes: Art, Science and Technology*. Elsevier Applied Science, London. Pp. 101-126.
- Daoubi, M., Deligeorgopoulou, A., Macías-Sánchez, A. J., Hernández-Galán, R., Hitchcock, P. B., Hanson, J. R. and Collado, I. G. (2005). Antifungal activity and biotransformation of diisophorone by *Botrytis cinerea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53:6035-6039.
- Demyttenaere, J. C .R. and De Kimpe, N. (2001). Biotransformation of terpenes by fungi study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:265–270.
- Demyttenaere, J. C. R. and De Pooter, H. L. (1998). Biotransformation of citral and nerol by spores of *Penicillium digitatum*. *Flavour and Fragrance Journal* 13:173–176.
- Demyttenaere, J. C. R., Vanoverschelde, J. and De Kimpel, N. (2004). Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-Citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography* 1027:137-146.
- Dimitra, J. D., Basil, N. Z. and Moschos, G.P. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22:39-44.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085–1097.
- Dudai, N., Chaimovitsh, D., Reuveni, R., Ravid, U., Larkov, O. and Putievsky, E. (2002). Breeding of sweet basil (*Ocimum basilicum*) resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilicum*. In: Johnson, C. B. and Franz, C. (eds) *Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants*. Haworth Herbal Press. N.Y. USA. Pp. 45-52.

- Dudai, N., Poljakoff-Mayber A., Mayer, A. M., Putievsky, E. and Lerner, H. R. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology* 25:1079-1089.
- Duetz, W. A., Bouwmeester, H., Van Beilen, J. B. and Witholt, B. (2003). Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts and plants. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 61:269-277.
- Duran, R., Corrales, E., Hernandez-Galan, R. and Collado I. G. (1999). Biotransformation of caryophyllene by *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products* 62: 41-44.
- Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102:719-732.
- Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichodema harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709-714.
- Elad, Y. and Freeman, S. (2002). Biological control of fungal plant pathogens. In: The Mycota, A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research, Kempken, F. Agricultural Applications. Springer, Heidelberg, Germany. Pp. 93-109.
- Elad, Y. and Shtienberg, D. (1994). Effect of compost water extract on gray mould (*Botrytis cinerea*). *Crop Protection* 13:109-114.
- Elad, Y. and Shtienberg, D. (1995). *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological control and their integration. *Integrated Pest Management Review* 1:15-29.
- Elad, Y. and Stewart, A. (2004). Microbial control of *Botrytis* spp. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 223-241.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (2004). *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 1-8.
- Elad, Y., Yunis, H. and Mahrer, Y. (1988). Effect of climatic conditions in polyethylene-covered structures on grey mould disease of winter cucumber. *Applied Agriculture Research* 3:243-247.
- Elad, Y. 1997. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews* 72:381-422.
- El-Shazly, A., Dorai, G. and Wink, M. (2002). Composition and antimicrobial activity of essential oil and hexane-ether extract of *Tanacetum santolinoides* (DC.) *Journal of Biosciences* 57: 620-623.
- Endo, A. and Misato, T. (1969). Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa*. *Biochemistry Biophysics Research Community* 37: 718-722.
- Fahn, A. (1979). *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press, New York, NY, USA. Pp. 158-222.
- Farooq, A. and Tahara, S. (2000). Biocatalysis of two toxic terpenes α -santonin and sclareol by *Botrytis cinerea*. *Naturforsch* 55: 713-717.

- Fravel, D. R., Rodes, D. J. and Larkin, P. R. (1999). Production and commercialization of biocontrol products. In: Albajes, R., Gullino, M. L., Van-Lenteren, J. C. and Elad, Y. (eds). *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. Pp. 365-376.
- Fritz, R., Lanen, C., Colas, V. and Leroux, P. (1997). Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* 49:40-46.
- Garibaldi, A., Gullino, M. L. and Minuto, G. (1997). Diseases of basil and their management. *Plant Disease* 81: 124-32.
- Gershenson, J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1281-1328.
- Goodman, R. N., Kiraly, Z. and Wood, K. R. (1986). *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Colombia: Mo. University of Missouri Press. Pp. 430.
- Grayer, R. J., Kite, G. C., Goldstone, J., Bryan, S., Paton, A. and Putievsky, E. (1996). Infrasecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43:1041-1047.
- Grima-Pettenati, J. and Goffner, D. (1999) Lignin genetic engineering revisited. *Plant Science* 145:51-65.
- Halpin, M. Knight, G. Foxon, M. Campbell, A.M. Boudet, J. Boon, B. Chabbert, M. T. Tollier and W. Schuch. (1994). Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Planta* 6 Pp. 339-350.
- Hammerschmidt, R., Bonnen, A. M., Begstrom, G. C. and Baker, K. K. (1985). Association of epidermal lignification with nonhost resistance of cucurbits to fungi. *Botany* 63:2393-2398.
- Hanbler, G. and Pontzen, R. (1999). Wirkung von Fenhexamid auf die Entwicklung von *Botrytis cinerea*. *Pflanzenschutz-Nachr* 52: 162-180.
- Hartmans, K. J., Diepenhorst, P., Bakker, W. and Gorris, L. G. M. (1995). The use of carvone in agriculture-sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato-tuber and other plant-diseases. *Industrial Crops and Products*. 4: 3-13.
- Hasegawa, Y., Tajima, K., Toi, N. and Sugimura, Y. (1997). Characteristic components found in the essential oil of *Ocimum basilicum* L. *Flavors Fragrances* 12:195-200.
- Hawkins, S. W. and Boudet, A. M. (1996). Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunnii* Hook.): histochemistry of early changes in young plants. *Protoplasma* 191:96-104.
- Horowitz, W. (1970). Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. Pp. 154
- Ishida, T. (2005). Biotransformation of terpenoids by mammals, microorganisms, and plant cultured cells. *Chemistry and Biodiversity* 2:569-590.
- Islam, A.M., Phillips, G.O., Sljivo, A., Snowden, M.J., Williams, P.A. (1997). A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*. 11:493-505.
- Jaeck, E., Dumas, B., Geoffrey, P., Favet, N., Inze, D., Van Montagu, M., Fritig, B. and Legrand, M. (1992). Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of O-methyltransferase

- mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant Microbiology* 9:681–688.
- Jan, C. R., Demyttenaere, M. Carmen, H., Norbert, K. (2000). Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry* 55:363-373.
- Jarvis, W. R. (1980). Epidemiology. In: Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. (eds) *The Biology of Botrytis*. Academic Press. London. UK. Pp. 219-250.
- Joglekar, S. S. and Dhavlikar, R. S. (1969). Microbial transformation of terpenoids. I. Identification of metabolites produced by a pseudomonad from citronellal and citral. *Applied Microbiology* 18: 1084 (Abstract).
- Johnson, K. B. and Powelson, M. L. (1983). Analysis of spore dispersal gradients of *Botrytis cinerea* and gray mold disease gradients in snap beans. *Phytopathology* 73:741–746.
- Kerssies, A. (1992). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in gerbera and rose grown in glasshouses. In: Verhoeff, K., Malathrakis, N. R. and Williamson, B. (eds) *Recent Advances in Botrytis Research*. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands. Pp. 159-166.
- Khosla, M. K. (1993). Study on inter-relationship, phylogeny and evolutionary tendencies in genus. *Plant Anatomy and Glossary* 6:93-106.
- Kordali, S., Kotan, R. and Cakir, A. (2007). Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes *in-vitro* as plant disease control agents. *Allelopathy Journal* 19(2):373-392.
- Lachowicz, K. J., Jones, G. P., Briggs, D. R., Bienvenu, F. E., Wan, J., Wilcock, A. and Coventry, M. J. (1998). The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Applied Microbiology* 26:209–214.
- Lange, B. M., Lapierre, C. and Sandermann, H. (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiology* 108:1277–1287.
- Latorre, B. A., Spadaro, I. and Rioja, M. E. (2002). Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to aminopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* 21: 957-961
- Lauvergeat, V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D. and Grima-Pettenati, J. (2001). Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* 57:1187–1195.
- Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigeo, D., Epton, H. A. S. and Harbour, A. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal Applied Bacteriology* 78: 97-108.
- Leroux, P. (1996). Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide Science* 47: 191-197.
- Letessier, M. P., Svoboda, K. P. and Walters D. R. (2001). Antifungal Activity of the Essential Oil of Hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Phytopathology* 149:673-678.
- Lewis, N. G. and Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Plant Molecular Biology* 41:455–496.
- Liu, C. H., Zou, W. X., Lu, H. and Tan, R. X. (2001). Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against plant pathogen fungi. *Journal of Biotechnology* 88: 277-282.

- Logemann, E., Parniske, M. and Hahlbrock, K. (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 92: 5905–5909.
- Madyastha, K. M. (1984). *Indian Academy of Sciences: Journal of Chemical Sciences* 93: 677.
- Marois, J. J., Redmond, J. C. and MacDonald, J. D. (1988). Quantification of the impact of environment on the susceptibility of *Rosa hybrida* flowers to *Botrytis cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113: 842-845.
- Marotti, M., Piccaglia, R. and Giovanelli, E. (1996). Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44: 3926-3929.
- Marschner, H. (1997). Relationships between mineral nutrition and plant diseases and pests. In: Marschner, H. (ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Second Edition. Academic Press, Germany. Pp. 436-448.
- McGarvey, D. J. and Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-1026.
- Messner, B. and Boll, M. (1993). Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Tissue Organization Culture* 34: 261–269.
- Milling, R. J., Richardson, C. J. (1995). Mode of action of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* 45: 43-48.
- Mimica-Dukic, N., Buzin, B., Sokovic, M. and Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2485-2489.
- Miura, I., Kamakura, T., Maeno, S., Hayashi, S., Yamaguchi, I. (1994). Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pesticid Biochemistry Physiology* 48: 222-228.
- Nakahara, K., Alzoreky, N. S., Yoshihashi, T., Nguyen, H. T. T. and Trakoontivakorn, G. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *Japan International Research Center for Agricultural Sciences* . 37: 4.
- Nicholson, R. L. and Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369–389.
- Noleyan, V. and Narasimham P. (1986). Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology*. 3: 331-336.
- O'Neill, T. M., Shtienberg, D. and Elad, Y. (1997). Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81:36-40.
- Oxenham, S. K., Svoboda, K. P. and Walters, D. R. (2005). Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). *Phytopathology* 153:174–180.
- Pathology* 36:483–494.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L., Bonoit, A., (1998). Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 65: 65-70.

- Putievsky, E. and Galambosi, B. (1999). Production systems of Sweet Basil. In: Basil the genus *Ocimum*, R. and Holm, Y. Harwood Academic. Hiltunen, USA. Pp.39-65.
- Reuveni, R., Fleisher, A. and Putievsky, E. (1984). Fungistatic activity of essential oil from *Ocimum basilicum* chemotypes. *Phytopathology* 110: 20-22.
- Rodríguez, P., Sierra, W., Rodríguez, S. and Menéndez, P. (2006). Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of Eucalyptus oils. *Electronic Journal of Biotechnology* 9, No. 3: 232-236.
- Rosslénbroich, H. J. and Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19:557-561.
- Rosslénbroich, H. J., Brandes, W., Kruger, B. W., Kuck, K. H., Pontzen, R., Stenzel, K. and Suty, A. (1998). Fenhexamid (KBR 2738) - A novel fungicide for control of *Botrytis cinerea* and related pathogens. The 1998 Brighton Conference, Pests and Diseases. Pp. 327-334.
- Rotem, J. and Aust, H. J. (1991). The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. *Phytopathology* 133: 76–84.
- Salinas, J., Glandorf, D. C. M., Picavet, F. D. and Verhoeff, K. (1989). Effect of temperature, relative humidity and age of conidia on spotting of gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 95: 51-64.
- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. and Langebartels, C. (1998). Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Plant Science* 3:47–50.
- Schwinn, F. J. (1992). Significance of fungal pathogens in crop production. *Pesticides. Outlook* 3: 18-28.
- Seddon, B., Schmitt, A. (1999). Integrated biological control of fungal plant pathogens using natural products. In: Lyr, H., Russel, P.E., Dehne, H. W. and Sisler, H. D. (eds) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Intercept Ltd, Andover. UK. Pp. 423-428.
- Sharabani, G., Shtienberg, D., Elad, Y. and Dinoor, A. (1999). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in sweet basil and implications for disease management. *Plant Disease* 83: 554-560.
- Sharabani, G., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinoor, A. and Yunis, H. (1996). Development of gray mould in sweet basil. *Phytoparasitica* 24: 140.
- Sharon, A., Elad, Y., Barakat, R. and Tudzynski, P. (2004). Phytohormones in *Botrytis*-plant interactions. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 163-179.
- Shtienberg, D., Elad, Y., Niv, A., Nitzani, Y. and Kirshner, B. (1998). Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 104: 753-763.
- Simon, J. E., Quinn, J. and Murray, R. G. (1990). Basil: A Source of Essential Oils. Purdue University Agricultural Experiment Station, West Lafayette. Journal No. 12017.
- Southerton, S. G. and Deverall, B. J. (1990) Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. *Molecular Plant*
- Stotz, H., Elad, Y., Powell, A. and Labavitch, J. (2004). Innovative biological approaches to *Botrytis* suppression. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 369-392.

- Strange, R. R., Ralph, J., Peng, J., Sims, J. J., Midland, S. L. and McDonald, R. E. (2001). Acidolysis and hot water extraction provide new insights into the composition of the induced 'lignin-like' material from squash fruit. *Phytochemistry* 57:1005–1011.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. and Bigger, S. W. (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3197–3207.
- Suzuki, S., Isono, K., Nagatsu, J., Mizutani, T., Kawashima, Y. and Mizuno, T. (1965). *Journal of Antibiotic* 18: 131.
- Svoboda, K. P., Kyle, S. K., Hampson, J. B., Ruzickova, G. and Brocklehurst, S. (2003). Antimycotic activity of essential oils: the possibility of using new bioactive products derived from plants. In: Rai M. K. (ed.), *Plant-derived Antimycotics: Current Trends and Future Prospects*, Binghamton, NY, USA, The Haworth Press Inc.198-224.
- Ten Have, A., Tenberge, K. B., Benen, J. A. E., Tudzynski, P., Visser, J., and Van Kan, J. A. L. (2002). The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. in: *The Mycota XI, Agricultural Applications*. F. Kempken, ed. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 341-358.
- Thoppil, J. E., Tajo, A., and Minija, J. (1998). Antibacterial and antifungal activity of four varieties of *Ocimum basilicum*. *Fitoterapia* 49: 191-192.
- Tranker, A. (1992). Use of agricultural and municipal organic wastes to develop suppressiveness to plant pathogens. In: Tjamos, E. S., Papaizas, G. C. and Cook, R. J. (eds). *Biological Control of Plant Diseases, Progress and Challenges for Future*. Plenum Press, New York, NY, USA. Pp. 35-42.
- Tsao, R. and Zhou, T. (2000). Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research* 12: 113-121.
- Tyler, V. E., Brody, L. R. and Robbers, J. E. (1976) *Pharmacognosy*. Lea and Febiger, Philadelphia, USA. Pp. 134-173.
- Vance, C. P., Kirk, T. K. and Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review Phytopathology* 18: 259–288.
- Vance, C. P., Kirk, T. K. and Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review Phytopathology* 18:259–288.
- Vincelli, P. C. and Lorbeer, J. W. (1989). BLIGHT-ALERT: a weather-based predictive system for timingfungicide applications on onion before infection periods of *Botrytis squamosa*. *Phytopathology* 79: 493-498.
- Walradt, J. P. (1982). Analysis of fragrance materials in: Theimer, E.T (ed.), *Fragrance Chemistry*, Academic Press, New York USA. Pp. 575-612.
- Walter, M. H. (1992). Regulation of lignification in defence. In: *Plant Gene Research: Genes Involved in Plant Defence*. Ed. by Boller, T. and Meins, F. Vienna: Springer-Verlag. Pp. 327–352.
- Ward, O. P. and Young, C. S. (1991). Studies of the reductive biotransformation of selected carbonyl compounds by whole cells and extracts of Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 38, No. 11: 1280-1284.

- Weidenhamer, J. D., Macias, F. A., Fischer, N. H. and Williamson, G. B. (1993). Just How Insoluble are monoterpenes? *Journal of Chemical Ecology* 19: 1799-1803.
- Weltzien, H. C. (1992). Biocontrol of foliar fungal disease with compost extract. In: Andrews, J.H. and Hirano, S.S. (eds). *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, NY, USA, 430–450.
- Werker, E., Putievsky, E. and Ravid, U. (1985). Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of Labiatae. *Isreal Journal Technology* 34: 35-45.
- Williamson, B., Duncan, G. H., Harrison, J. G., Harding, L. A., Elad, Y and Zimand, G. (1995). Effect of humidity on infection of rose plants by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99: 1303-1310.
- Wolken, W. A. M., Tramper, J. and van der Werf, M. J. (2002). Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *Penicillium digitatum*. *Biotechnology and Bioengineering* 80: 685–690.
- Yermiyahu, U., Shamai, I., Peleg, R., Dudai, N. and Shtienberg, D. (2006). Reduction of *Botrytis cinerea* sporulation in sweet basil by altering the concentrations of nitrogen and calcium in the irrigation solution. *Plant Pathology* 55: 544-552.
- Yunis, H. and Elad, Y. (1989). Survival of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* 17: 13-21.
- Yunis, H., Shtienberg, D., Elad, Y. and Mahrer, Y. (1994). Qualitative approach for modeling outbreaks of gray mould epidemics in non-heated cucumber greenhouses. *Crop Protection* 13: 99-104.
- Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkhi, J., Ben-Arie R. and Droby S. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology* 20: 115–124.
- Zimand G., Elad Y., Gagulashvily, N. and Chet, Y. (1995). Effect of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T39 on the pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Phytoparasitica* 23: 241-242.

Abstract

Basil (*Ocimum basilicum* L.), an annual plant from the Lamiaceae family, is used for medicinal purposes and as a spice in the food industry. Basil is the leading export cultivated spice of Israel, as the main exportation season is between November to April. This crop is threatened by the gray mold disease that is caused by the fungus *Botrytis cinerea*, which is most common in greenhouses in winter and may result in the plant's death and the destruction of the entire yield.

The importance of indigenous products in the control of phytopathogenic fungus is gaining popularity, particularly at culinary herb crops that have strict regulation regarding the existence of pollutive chemical residues. However, the requirement of year-round production of fresh basil with no pesticide residues does not leave additional means to control fungus diseases, except expensive climate control and high sanitation.

The purpose of the present study was to evaluate two approaches to gray mold management in basil. At the first approach we identified potential bio-fungicides, originated from basil essential oil, with high fungicidal activity against mycelium growth and fungal conidia germination as well. We tested essential oils from several basil species and their several main components for activity against *B. cinerea* in series of *in-vitro*, *in-situ* and *in-vivo* examinations. At the second approach we examined recovery process of the stem stump, the sensitive part where the infection starts. We assayed if there is a production reinforcement of lignin in cell wall during the recovery of stem stump tissue, and with another technique we were trying to find if conidia germination occur at a specific tissue at the stem stump.

The GC-MS analysis results of the oils extracted from five common species of basil showed significant variation in the contents of the oils. *In-vitro* studies revealed that the mycelial growth of *B. cinerea* was reduced significantly by evaporation of all the oils, suggesting that basil oils have fungicidal effects and that there are differences in their activity against *B. cinerea*. We assumed by the regression tendency of the mycelia, that the fungicidal activity of the oils depends on other conditions, in addition to concentration of the oil. Moreover, we discovered meaningful differences of the components fungicidal activity. Only Citral, Linalol, Citronellal and 1-8, Cineole entirely succeed to prevent the growing of *B. cinerea* mycelium. Further examination discovered that difference in the activity of basil oils against *B. cinerea* is a result of their components composition. We found that in some cases

the antifungal effect of the whole oil were due primarily to the major components, and in another cases combination of some ingredients led to higher fungicidal effect than assignment of every ingredient separately. In contrast with mycelium inhibition results, higher concentration of all components, except of Citral and Geraniol, was needed to prevent conidia germination, yet lower concentration of all the components significantly reduce the conidia hypha progression. When we examined additional factors that might influenced the activity of the oils main components against *B. cinerea*, we found that the solubility of the components in water is determined among others from the molecule structure, that alcohols dissolved in water at the highest amount, aldehydes at lower amount and hydrocarbons were with the lowest solubility. When basil stem segments were sprayed with Citral formulation at 5000 mg/liter and exposed to the fungus conidia in close environment, the plants disease intensity was reduced considerably, in about 60.3% ($P < 0.01$) less than the control. Also infected stem segments that treated with the Citral formulation sporulated 42.8% less than the control. When we use Gum Arabic to dissolve the oils components in water, we found the Citral didn't reduced the disease intensity as good as with the formulation, and that basil stem segments that were sprayed with Linalool at 2500 mg/liter reduced the infectiousness in about 75.5% less than the control. We conclude from this result that this test environment, although sealed and controlled, it's still complicated and dependent in hard to control externals. Our *in-vivo* studies displayed 52% infectiousness reduction of the gray mold disease in basil plants that were sprayed with 2500 mg/liter Citral formulation after the second harvest and 27% reduction of the disease after the third harvest ($P < 0.05$). Compared with Citarl, the fungicide polar, common among basil farmers, reduce the gray mold disease in basil only in 33% after the second harvest, and didn't change the disease severity at all after the third harvest. The investigation of the biotransformation processes of the essential oils components with *B. cinerea* helped us to understand the fungicidal activity of the oils. When we exposed the fungus to Citral, we were witness of new oxidized less toxic derivatives. Based on the mycelia and conidia assays, the toxicity level of the derivatives was: Citral > Geraniol/Nerol > Methyl-5-Hepten-2-one. Bioconversion of (+)-Citronellal and 1,8-Cineole result in also in new oxidized derivatives, however it is necessary to continue the examination of there toxicity levels.

In the observation at samples from one day old stump stem, we found clear difference compared with to a fresh stump tissue. The stump area shrank and edges of the cortex begin to become arched toward inside the core. Watching through fluorescent microscope of the stumps cuts didn't reveal any morphological differences in core sells, phloem or cortex sells.

There were no sign of lignin supplementation, size or shape change in any sell. Also the exploration of infected stumps cuts demonstrated that penetration of the mycelium was more common at the cortex tissue, but also at the phloem and the cambium. Tissue marking with cotton blue displayed non specific paint of mycelia in the stem.

In conclusion, the results of the present study show that it is possible to reduce gray mold by using essential oils form basil. However, further research is needed before commercial implementation of this approach; tests for more components, combination of some efficient and experiments with anther oil solvents. The use of this natural fungicides promise healthy food products, chemicals free environment and lower risk of fungicides resistance. However, a disadvantage lies in the fact that each approach in itself is not sufficient against the disease. Integration of this method, after further development, with the methods currently used, could markedly improve gray mold management and also decrease the use of chemical fungicides.

PREVENTION OF THE GREY MOULD IN BASIL PLANT

Thesis submitted to the Faculty of Agriculture, Food and
Environment Quality Science
For the degree of Master of Science

By

Roei Haguy