

הדברה מיקרוביאלית באמצעות פטריות אנטומופתוגניות



ניצן בירנבאום^{1,2} ויקטוריה ריינגולד^{1,2}
סבינה מטבייב² ודנה מנט²

¹ הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית
² המכון להגנת הצומח, מנהל המחקר
החקלאי, מכון וולקני

תמונה: ביצה של חדקונית הדקל נגועה
בפטרייה האנטומופתוגנית *Metarhizium*
brunneum. צילם: ד"ר אלכס פרוטסוב

תקציר

גורמי הדברה מיקרוביאליים הם מיקרואורגניזמים פתוגניים (מחוללי מחלה) או תוצרים ישירים שלהם, המסוגלים להפחית אוכלוסיות של פרוקי רגליים מזיקים. מיקרואורגניזמים אלה מהווים חלופה בת קיימה וידידותית לסביבה לתכשירי הדברה כימיים. מיני פטריות אנטומופתוגניות זוהו לראשונה במחצית המאה ה-19 והתגלו כאמצעי הדברה של מזיקים בחקלאות. ממלכת הפטריות אחראית למידה רבה של קטילת פרוקי רגליים, ובה מיני הסוגים *Metarhizium* ו-*Beauveria* קטלניים לדרגות התפתחות שונות של חרקים ואקריות ומצויים בשימוש חקלאי נרחב. שימוש מושכל בתכשירים על בסיס פטריות אנטומופתוגניות יכול לצמצם ולעיתים אף להחליף את השימוש בתכשירים סינתטיים כנגד מזיקי צמחים. בפרק זה מוצגים מאפיינים ביולוגיים ומסחריים של פטריות אנטומופתוגניות מהסוגים הללו והפוטנציאל החשוב הגלום בהן בממשק ההדברה של מזיקי צמחים. הודגמה היתכנות השימוש בתכשירי פטריות אנטומופתוגניות להדברת ארבעה מיני מזיקים בבתי גידול שונים, תוך התייחסות לאתגרים המלווים את המחקר ואת היישום בארץ. מטרת המחקר, המתבצע במעבדה להדברה מיקרוביאלית של מזיקים במכון וולקני, מתמקדת באפיון ההזדמנויות לשילובם של מדברים מיקרוביאליים במערכות בקרת מזיקים בבתי גידול חקלאיים בישראל. המחקר משלב מדע בסיסי בנושא יחסי פונדקאי-פתוגן ומדע יישומי בטכנולוגיות ייצור ופורמולציה של מדברים מיקרוביאליים.

אופן הציטוט: בירנבאום נ', ריינגולד ו', מטבייב ס' ומנט ד' (2021) הדברה מיקרוביאלית

באמצעות פטריות אנטומופתוגניות

בספר תובנות חדשות במחלות צמחים, בעריכת אלעד י', דומברובסקי א', מנוליס-ששון ש' ועזרא ד', הוצאת המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים.

<https://volcaniarchive.agri.gov.il/skn/tu/e55398>

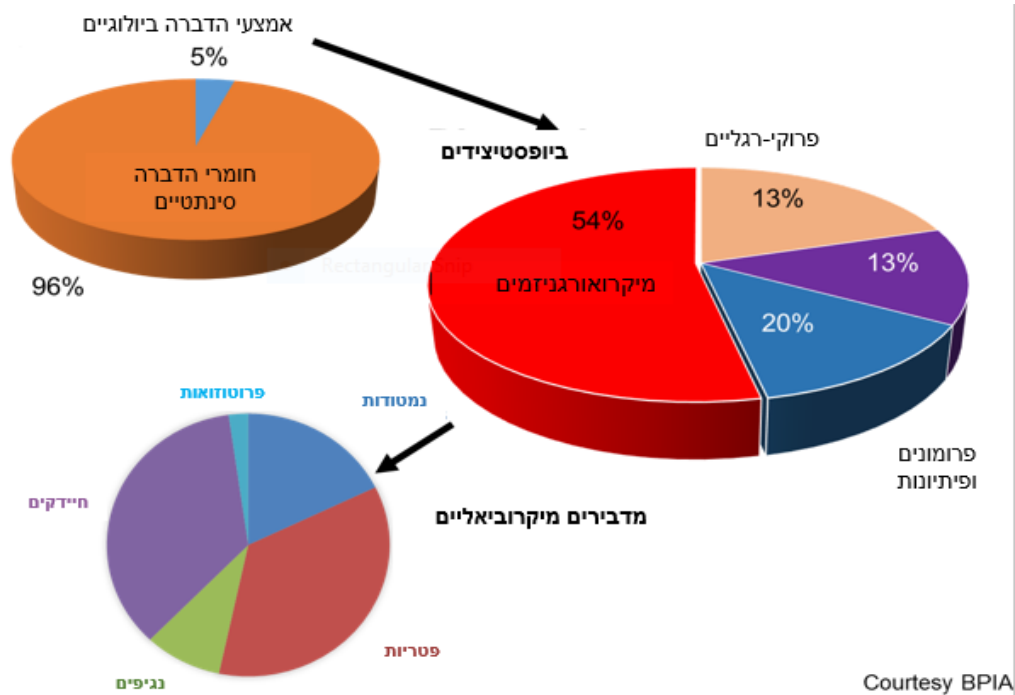


הדברה ביולוגית מיקרוביאלית

מושג ההדברה הביולוגית בחקלאות מתייחס לשימוש באוכלוסייה של יצור חי אחד כדי להפחית אוכלוסייה של יצור חי אחר המוגדר כגורם נזק לתוצרת חקלאית (אלעד, 2021). אחת הדוגמאות המוכרות היא השימוש במושיות להפחתת אוכלוסיות של כנימות עלה בגידולים שונים. אך הדברה ביולוגית אינה עושה שימוש בלעדי בפרוקי רגליים כטורפים או טפילים. חרקים, בדומה לבני אדם ובעלי חיים אחרים, סובלים ממחלות הנגרמות מגורמים אנטומופיתוגניים כגון נגיפים, חיידקים, נמטודות ופטריות. מיקרואורגניזמים אלה נקראים באופן כללי אנטומופיתוגנים - מחוללי מחלה בחרקים. התיעוד המדעי הראשון של מחוללי מחלה בחרקים, כמו גם ציון הדרך הראשון בתחום הפתולוגיה של חרקים, עלו ממחקריהם של האיטלקי אגוסטינו באסי והצרפתי לואי פסטר בדבורי דבש ותולעי משי. תופעה זו נרתמה על ידי מדענים לתועלת המין האנושי, כדי להפחית אוכלוסיות מזיקים בחקלאות. השימוש הראשון בגורם מחלה להדברת מזיקים בחקלאות נעשה בשנות ה-80 של המאה ה-19 על-ידי המדען איליה מטשניקוף (יליד אוקראינה, ממניחי היסודות לחקר המערכת החיסונית, זכה בפרס נובל בשנת 1908), שגידל פטרייה פתוגנית לחרקים, *Metarhizium anisopliae*, ויישם אותה כנגד חיפושית החיטה. ציון דרך משמעותי נוסף היה גילוי החיידק *Bacillus thuringiensis* (Bt) כגורם מחלה של עש הקמח. תרומתה של ישראל בתחום זה תועדה כאשר החוקרים הישראליים, ד"ר לאונרד גולדברג ופרופ' יואל מרגלית, מחלוצי ההדברה הביולוגית, דיווחו בשנת 1977 אודות חיידק הקוטל באופן מהיר במיוחד זחלי יתושים. אותו חיידק הוגדר בשם *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. חיידקי Bt לסוגיהם השונים נמצאים בשימוש רב ברחבי העולם בעיקר להדברת עשים מזיקים בגידול פירות וירקות וכן יתושים וזבובאים.

מאז אותן תגליות גדולות, ובעקבות השימוש ההולך וגובר בגורמי מחלה לניהול אוכלוסיות מזיקים, התפתח שוק סחר דינמי המשיא תמורות אדירות במדד הצמיחה הממוצע. שוק הביופסטיצידים (חומרי ההדברה הטבעיים), המרכיב רק כ-5% משוק ההדברה העולמי, בעל צמיחה שנתית מהירה העומדת על כ-17% (איור 1). שוק הביופסטיצידים כולל אויבים טבעיים, פרומונים, פיתיונות ומיקרואורגניזמים. אלה האחרונים מהווים את החלק הגדול והפעיל ביותר בשוק הביופסטיצידים. המדבירים המיקרוביאליים המשווקים כחלק מתכשירי הדברה כוללים תכשירים המבוססים על חיידקים, פטריות, נגיפים ונמטודות – כולם מחוללי מחלה בפרוקי רגליים.

הדרישה הציבורית להפחתה ואף לביעור מוחלט של שאריות כימיקלים בתוצרת חקלאית, יחד עם ההשפעות השליליות של חומרי הדברה כימיים או סינתטיים על הסביבה, העלו את הצורך לפתח אמצעים חלופיים לניהול אוכלוסיות מזיקים בחקלאות. צורך זה הוביל להתוויית מדיניות ותקנות חדשות, כגון חוק האיחוד האירופי להפחתת השימוש והחלפת חומרי הדברה סינתטיים. מדבירים מיקרוביאליים מהווים אלטרנטיבה טובה לחומרי הדברה כימיים מכמה סיבות: הם בעלי ספציפיות מוגברת; הם מיושמים תוך בטיחות סביבתית ללא שאריות רעילות; עלויות הפיתוח והייצור שלהם נמוכות בהשוואה לתכשירי הדברה סינתטיים ולבסוף, ניתן להשיגם במחיר תחרותי.



איור 1. השוואת גודל שוק חומרי ההדברה העולמי (בדולר אמרקאי) – חומרי הדברה סינתטיים לעומת ביו-פסטיצידים והמדבירים הביולוגים השונים, באדיבות BPIA.

בראייה יישומית ושיווקית, הכדאיות בפיתוח מדבירים מיקרוביאליים נובעת גם מטווח הפונדקאים הרחב שעשוי להיות להם. לדוגמה, מין אחד של פטרייה אנטומופתוגנית עשוי לחולל מחלה שתוביל לתמותה במזיקים שונים ממספר מחלקות וסדרות טקסונומיות של פרוקי רגליים. באיור 2 מודגם טווח הפונדקאים הרחב של שני מיני פטריות אנטומופתוגניות המשמשות כחומר הפעיל בתכשירים מסחריים רבים ברחבי העולם, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.



איור 2. פטריות קוטלות חרקים *Metarhizium brunneum* ו-*Beauveria bassiana* ניחנות בטווח פונדקאים רחב, עובדה המאפשרת להן להדביק ולקטול מזיקים שונים, לרבות קרציות, עשים וחיפושיות.

שילוב תכשירי הדברה מיקרוביאליים בממשק הדברה של מזיקים פרוקי רגליים

ניתן לשלב מדבירים מיקרוביאליים בפרקטיקות ניהול מזיקים קיימות ולשלבם עם טיפולים כימיים או אגרוטכניים. אסטרטגיית היישום העיקרית היא יישום מתגבר, קרי יישום כמות גדולה של המדביר הביולוגי, ללא ציפייה להישרדותו או התבססותו בסביבה. למעלה מ-200 תכשירי הדברה מיקרוביאליים אושרו להדברת מזיקים ברחבי העולם, כ-30 מתוכם מבוססי פטריות. מזיקי המטרה המרכזיים של התכשירים מבוססי הפטריות הם עשים, חיפושיות, כנימות עלה, תריפסים, טרמיטים ואקריות, קבוצות המהוות מזיקי מפתח בחקלאות (Van Lenteren et al., 2018).

מדבירים מיקרוביאליים ניתנים ליישום במגוון אופנים, כתלות בגורם המחלה ובסוג התוארית (פורמולציה). כך למשל תכשירים מבוססי נגיפים וחיידקים על פי רוב מיושמים בעיקר בריסוס כנגד עשים מזיקי עלווה ונוברי פירות. ניתן ליישם גם תכשירי הדברה מבוססי חיידקים כגרנולות המכילות פיתיון המושכות את אוכלוסיית המזיק. תכשירים מבוססי פטריות אנטומופתוגניות ניתנים ליישום במגוון אופנים, החל מריסוס עלוותי, ריסוס קרקע כנגד מזיקים שוכני קרקע, פיזור גרנולות עם פיתיון בקרקע או בפורמולציה אבקתית כנגד מזיקי מחסן (Bateman et al., 1993; Batta, 2004). אולי שיטת היישום הכי שנויה במחלוקת של מדבירים מיקרוביאליים היא זו של שימוש בגן המקודד לרעלן שמקורו מחיידק ה-Bt. גן הרעלן שמשוּבט לצמח מצטבר ברקמת הצמח ובכך גורם לו להיות רעיל כלפי מזיקים הניזונים עליו (Kalha et al., 2014). השיטה משמשת להתמודדות עם הקשים מהמזיקים ברחבי העולם.



איור 3. תיאור השלבים הנחוצים לפיתוח וייצור של מדביר מיקרוביאלי. הפטרייה האנטומופתוגנית, *Metarhizium brunneum*, בודדה מחדקונית דקל אדומה נגועה. התבדיד מגודל באופן רציף על מצע מזון מלאכותי, ומרובה בביוריאקטור ליצירה של מסות תפטיר. נבגים ויחידות אינפקטיביות ממוצים מהמצע ומוכנסים לתוארית לצורך יישום שדה כנגד חדקונית במטעי תמר (בתמונה מיושמת הפטרייה על ידי יערה לבנה). הפטרייה האנטומופתוגנית *Metarhizium brunneum* בודדה מחדקונית דקל אדומה נגועה, התבדיד גודל באופן רציף על מצע מזון מלאכותי ומרובה בביואקטור, ליצירה של מאסות תפטיר. יחידות אינפקטיביות ונבגים מוצו מהמצע, הנבגים הוכנסו לתוארית לצורך יישום שדה כנגד חדקונית במטעי תמר.

צווארי בקבוק ביישום מוצלח של מדבירים מיקרוביאליים

אחד מצווארי הבקבוק ביישום מוצלח ויעיל של מדבירים מיקרוביאליים נובע מהשפעת תנאי הסביבה על גורם המחלה בפרוקי רגלים. לעתים תנאי אקלים קשים יכולים לעכב את התפתחות המחלה או לגרום לאיבוד חיוניות גורם המחלה. אחת הדרכים להתגבר על מכשול זה היא הפיתוח והשימוש בפורמולציות. פורמולציות יכולות לספק מעטפת הגנה לגורם המחלה ולאפשר לו להתפתח באין מפריע גם בהינתן תנאי סביבה קשים, ובכך מושגת יעילות קטילה של המדביר המיקרוביאלי. בנוסף לכך שפורמולציה יכולה לספק

מעטפת הגנה לגורם המחלה, ניתן לתכנן פורמולציות חכמות המאפשרות שחרור איטי של גורם המחלה, כפי שפורסם על ידי ד"ר אננט פאתל (Dr. Anant Patel) וחוב' () Fachhochschule Bielefeld – University of Applied Sciences). במחקר זה פותח תכשיר גרגרי המכיל נבגים של פטרייה אנטומופיתוגנית ונבגי שמר. כאשר תכשיר זה מיושם בקרקע חל תהליך שחרור של דו תחמוצת הפחמן ושחרור של נבגי הפטרייה האנטומופיתוגנית. פורמולציה זו מצד אחד מושכת את חרק המטרה אל עבר גרגרי התכשיר ומאידך חושפת אותו לגורם המחלה, הנבגים (<https://workinggrouppatel.wordpress.com/attracap>). דוגמה נוספת ליחשיבה מחוץ לקופסה' הודגמה לאחרונה במעבדתנו במכון להגנת הצומח במרכז וולקני, כאשר הצמדנו בין שני גורמי מחלה, נמטודה ונבג פטרייה אנטומופיתוגניים. היות שהנמטודה נעה באופן פעיל באיתור אחר חרק פונדקאי, צימוד הנבגים מאפשר הובלה מדויקת של שני מדברים מיקרוביאליים אלה אל מזיקי המטרה. תכשיר שכזה עשוי ליצור אופן פעולה סיסטמי נגד מזיקים, כפי שהודגם כנגד חדקונית הדקל האדומה (Satheeja Santhi et al., 2015).

פטריית אנטומופיתוגנית

פטריית ממלאות בטבע תפקידים רבים ומגוונים. האדם מסווג את הפטריות למזיקות ולמועילות, אך פני הדברים מורכבים יותר ולפטריית תפקידים חשובים עליהם נמנים פירוק חומר אורגני בקרקע. בתווך קרקע זה מצויות באופן טבעי גם הפטריות האנטומופיתוגניות, תוקפות חרקים. בטבע קיימות צורות שונות של יחסים בין פטריות וחרקים. ישנם חרקים המגדלים מושבות של פטריות כמקור הזנה. ישנם כאלה השוכנים בתוך גופי פרי של פטריות. מאידך, ישנן פטריות המתפתחות על גבי גופם של חרקים מבלי לגרום למותם. אך ישנן פטריות שעשויות לקטול חרקים וכך למעשה מווסתות באופן טבעי אוכלוסיות של פרוקי רגליים. אילולא היו קיימים גורמים מווסתים לאוכלוסיות של פרוקי רגליים יש להניח כי בתי הגידול בכל כדור הארץ היו קורסים תחת הנטל של פרוקי רגליים.

פטריית אנטומופיתוגנית הן קבוצה פוליפילטית בממלכת הפטריות הכוללת כ-1,600 מינים המחולקים על פני 5 מערכות: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Microsporidia ומערכת Entomophthoromycota, שהוקמה בשנת 2012 מתוך מערכת Zygomycota. כלל המערכות הללו דומות בכך שכולן תוקפות חרקים (Araújo and Hughes, 2016). המינים הנחקרים ביותר, ואלו המשמשים בהצלחה בדיכוי אוכלוסיות מזיקים, משתייכים לסדרת ה-Hypocreales במערכת ה-Ascomycota ומערכת ה-Entomophthoromycota (Charnley, 2007; Roberts and Hajek, 1992). מערכת ה-Entomophthoromycota, מתאפיינת בכך שפטריית אנטומופיתוגניות ממערכת זו הינן ביטורפיות אובליגטוריות (ניזונות מתאים חיים בלבד). עקב תכונה זו, ועל אף יעילותן בדיכוי אוכלוסיות מזיקים, הקושי בגידולן באופן מסחרי, עקב אופיין הביטורפי, מונע מהן לשמש כמדברים ביולוגיים מסחריים. לעומתן, פטריות אנטומופיתוגניות מסדרת ה-Hypocreales ניחנות במחזור חיים המי-ביטורפי, כלומר, הפטרייה קוטלת את הפונדקאי כחלק ממחזור חייה ועוברת מצורת חיים ביטורפית לספרופיטית (הניזונה על חומר אורגני מת). פטריות אנטומופיתוגניות אלו מסוגלות לגדול גם על מצעים חליפיים כמו אורז או שיבולת שועל. הקטילה המהירה יחסית של הפונדקאי, היכולת לגדלן באופן מסחרי וטווח הפונדקאים

הרחב הפך את הפטריות האנטומופיתוגניות מסדרת ה-Hypocreales למועמדות טובות לשימוש מסחרי. תכונה נוספת ההופכת פטריות אלו למדבירות ביולוגיות טובות, היא יכולתן לשרוד ולשגשג בקרקע, על ידי פירוק חומר אורגני מת, או כאנדופיטיות על צמחים. אכן, הסוגים הנפוצים ביותר בקרב המיקואינסקטיצידיים (תכשירי הדברה כנגד חרקים המבוססים על פטריות) הם הסוגים *Beauveria*, *Metarhizium*, ו-*Isaria* (Araújo and Hughes, 2016; Charnley, 2007; Roberts and Hajek, 1992).

ביולוגיה ואקולוגיה של *Metarhizium* spp.

פטריות מהסוג *Metarhizium* נפוצות בכל העולם (Bischoff et al., 2009a). לפטריות בסוג זה ובסוגים קרובים, סגנונות חיים מגוונים. *Metarhizium* מסוגלת להתקיים באחת משלוש צורות: (1) כטפילה על חרקים, (2) כספרופיטית (St. leger, 2007), או (3) באסוציאציה עם צמחים (Wang and St Leger, 2007). כל אחד ממסלולי החיים האלו דורש את התפתחותם של מסלולי ביוסינתזה ייחודיים. כדי להתחיל את המסלולים הייחודיים הללו, דרושה תחילה הכרה של הפטרייה את המצע אליו הגיעה. העדפתה הראשונית של הפטרייה היא להזנה ספרופיטית. בהתאם, נמצא כי נוכחות סוכרים מועדפים, מגבילה אינטראקציות אנדופיטיות או אנטומופיתוגניות (Barelli et al., 2011; St. Leger et al., 1989). במצבים של מחסור בנוטריינטים, *Metarhizium* יכולה לפנות למסלול אנטומופיתוגני, על ידי התבטאות של חלבון ההיצמדות MAD1, או למסלול האנדופיטי, על ידי התבטאות של חלבון ההיצמדות MAD2 (Wang and St. Leger, 2007). במסלול האנטומופיתוגני, St. Leger מצא כי כדי ליצור מבני הדבקה דרוש שילוב של גירוי פיזי, על ידי מצע קשיח ומחסור בנוטריינטים (St. Leger et al., 1989). תגובה זו להרעבת סוכרים אינה אחידה במיני ה-*Metarhizium* השונים, למשל, גזעים התוקפים פשפשאים ייצרו מבני הדבקה בריכוזי סוכר גבוהים יותר מאשר גזעים התוקפים חיפושיות (St. leger, 2007). גורם עקיף זה מאפשר ספציפיות מסוימת של גזעי הפטרייה, בהתאמה לסביבה הכימית שיוצר החרק, כדוגמת הפרשות טל דבש בפשפשאים. גורם נוסף לספציפיות הוא זהות השומנים הנמצאים בשכבות האפיקוטיקולה והשעווה של החרק, שנמצאו כפקטורים משמעותיים לעידוד או דיכוי גדילה אנטומופיתוגנית. נוכחות סוכרים, כגון גלוקוז ומלטוז, מדכאת את הגדילה במסלול האנדופיטי, בעוד הפרשות שורש ומיצויים צמחיים מעודדים גדילה במסלול זה. נמצא כי האינטראקציה האנדופיטית בין *M. robertsii* לצמחים מעודדת גדילה של שערות שורש ואת סיעוף מערכת השורשים. גם במסלול האנדופיטי, בדומה למסלול האנטומופיתוגני, נמצאה העדפה למיני צמחים מסוימים (Barelli et al., 2011; Sasan and Bidochka, 2012).

לפטריות מהסוג *Metarhizium* גנטיקה טבעית יציבה. אי הימצאותם של גזעים מיניים באזורים הממוזגים, יחד עם אי התאמה בין גרעינים, המונעת רבייה פאראסקסואלית (תהליך רקומבינציה בין גרעינים ללא מיזוג או יצירת זיגוטה), מקלות מאוד להבדיל בין תבדידים הנמצאים באזורים קרובים (Bidochka et al., 2001; St. leger, 2007). מה הם, אם כן, הלחצים המרכזיים, מבין אלו שתוארו מעלה, המשפיעים על האבולוציה של הפטרייה? Bidochka et al. מצאו בבדיקה של גזעי *Metarhizium* באזור אונטריו, קנדה, כי הפיזור המרחבי של גזעים באזור מושפע מיכולתם להתמודד עם תנאי הסביבה, ולא מיכולתם להטפיל חרקים (Bidochka et al., 2001). בבדיקה מאוחרת יותר, מצאו Bischoff et al. כי גזעים

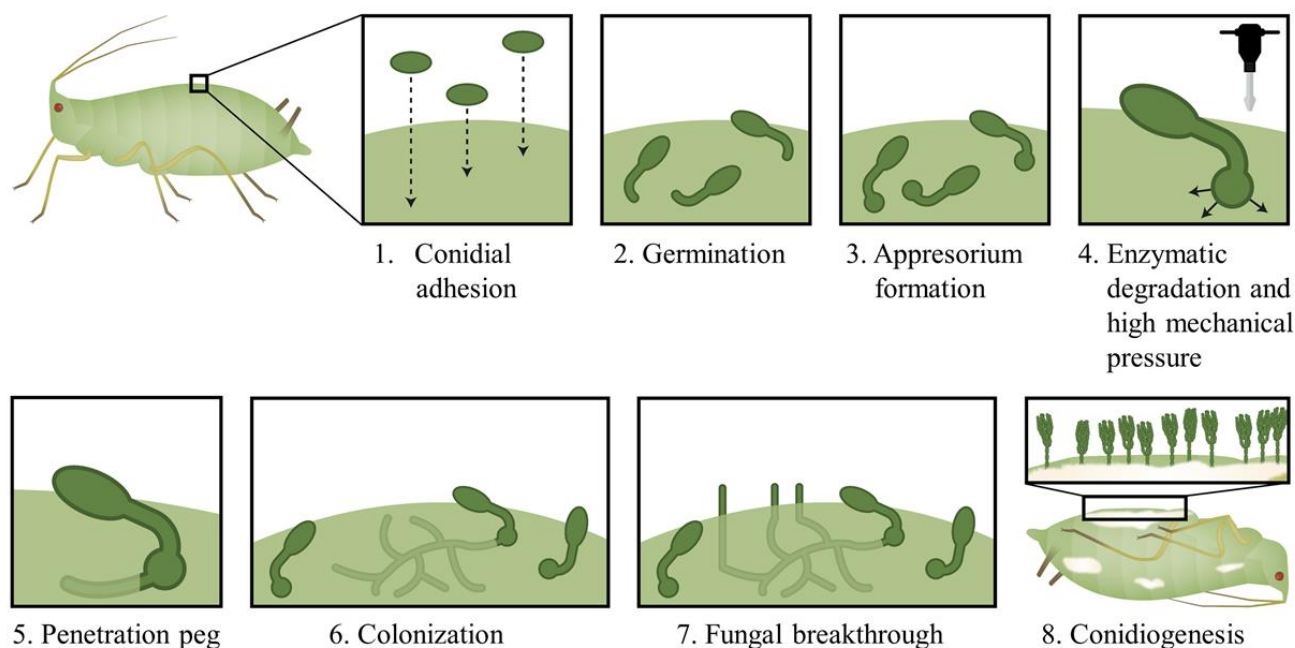
אלו הם למעשה המינים הנפרדים *M. robertsii* ו-*M. brunneum* (Bischoff et al., 2009b). מממצאי עבר אלו, סביר להניח כי התמודדות עם תנאי הסביבה, והיכולת לשרוד בקרקע, הינם גורמים משמעותיים, ואולי אף המרכזיים באבולוציה של הסוג *Metarhizium*.

תהליך התקדמות המחלה ב-*Metarhizium brunneum*

את תהליך התקדמות המחלה ב-*M. brunneum*, ניתן לחלק לחמישה שלבים עיקריים:

1. היצמדות: ההיצמדות בפטריות אנטמופוטוגניות מה-Hypocreales, נגרמת תחילה באופן בלתי ספציפי על ידי משפחת חלבונים הנקראים הידרופובינים. חלבונים אלו מצפים את דופן הנבג ומאפשרים היצמדות חזקה למשטחים הידרופוביים על ידי אינטראקציה פיזיקלית (Holder and Keyhani, 2005). עם התנפחות הנבג לקראת נביטה, נוצרים חלבוני היצמדות חדשים. ב-*M. brunneum*, החלבון MAD1 אחראי להיצמדות ספציפית לקוטיקולת החרק של הנבג המתפתח ושל התפטיר בכלל. נמצא גם כי MAD1 לוקח חלק בתהליך הגדילה וחלוקת התא של הפטרייה (Wang and St. Leger, 2007).
2. נביטה ויצירת אפרסוריום: לאחר הצמדות הנבג, ובתנאי הסביבה הנכונים, הנבג ינבוט וייצר קורים אשר בקצותיהם מבנה דמויי כרית שנקרא אפרסוריום. הסיגנל לנביטה נובע משני גורמים, הראשון הוא קיום לחות מספקת לנביטת הנבג (Luz and Fargues, 1999), והשני הוא הימצאות תרכובות ספציפיות לפונדקאי על הקוטיקולה (Ment et al., 2010b).
3. חדירה: האפרסוריום שנוצר בקצה הקור, מפריש תערובת של פרוטאזות, כיטינאזות, וליפאזות המפרקות את החלבונים, הכיטין, והליפידים המרכיבים את הקוטיקולה, בהתאמה. כמו כן, נמצא כי תערובת החלבונים המופרשת על ידי הפטרייה תלויה בזיהוי הפונדקאי, על ידי זיהוי מרכיבים שומניים באפיקוטיקולה של הפונדקאי (Schrank and Vainstein, 2010). מבין אותם מרכיבים חלבוניים, נמצא כי הסובטיליסין Pr1A (subtlisin), הינו האנזים המרכזי הקשור ביכולת הפטרייה לחדור לחרק ולחולל מחלה (St. Leger et al., 1996).
4. אכלוס חלל הגוף: לאחר החדירה לחלל הגוף של החרק, הפטרייה מתפתחת שם באופן קורי, או על ידי גופים חד-תאיים, דמויי שמר, שנקראים בלסטוספורות. בשלב הראשון, מפרישה הפטרייה את האנזים טרהלאז, המאפשר פירוק של הסוכר טרהאלוז למונומרים וניצולם להזנת הפטרייה. התפטיר מפריש מטבוליטים משניים רבים המשמשים להחלשת מערכת החיסון, פגיעה בפונדקאי והפיכת מקורות מזון לזמינים עבור הפטרייה. הקבוצה המרכזית של אותם מטבוליטים משניים הינם הדסטרוקסינים, חלבונים רעילים לחרקים ולצמחים (Schrank and Vainstein, 2010).
5. הנבגה: כיוון שהסוג *Metarhizium* הינו הצורה האנאמורפית (אל-מינית) של הסוג *Metacordyceps* (Bischoff et al., 2009a), נתייחס בחלק זה לתהליך היצירה של נבגים אל-מיניים בלבד. לאחר קטילת הזחל והתפתחות מספקת של הפטרייה, יתרחש תהליך ההנבגה. ההנבגה יכולה להיות חיצונית, על ידי פריצה של הקוטיקולה בנקודות שונות, בתהליך הדומה לתהליך החדירה (Schrank and Vainstein, 2010). נבגים אלו נקראים קונידיוספורות. במקרים של עקת יובש, ההנבגה תהיה פנימית ליצירה של

כלמידוספורות. מטרתה של הההנבגה הפנימית היא, כנראה, יצירה של הגנה נוספת לנבג מפני תנאי סביבה עוינים (Ment et al., 2010a).



איור 4. התפתחות פטריות אנטומופתוגניות מה-Hypocreales על גבי פונדקאי פרוק רגליים, מתוך Reingold et al., 2021.

השפעת גורמי סביבה אביוטיים על התפתחות פטריות אנטומופתוגניות

גורמי סביבה אביוטיים (טמפרטורה, לחות יחסית, וקרינת UV) משפיעים רבות על ההתפתחות והפתוגניות של פטריות אנטומופתוגניות. למרות שקיימים כללי אצבע עבור השפעתו של כל גורם סביבה, למין הפטרייה, המיקום הגיאוגרפי ממנו נאסף התבדיד, ואף לעונה בה נאסף, ישנה השפעה מכרעת על תגובת התבדיד לשינוי באחד משלושת המשתנים המוזכרים. למען הסדר הטוב, נפריד את השפעתו של כל גורם סביבה.

טמפרטורה: כל חריגה מטמפרטורת האופטימום של התבדיד, לחום או לקור, גוררת עיכוב בנביטת הנבג והתפתחות התפטיר. בבדיקת תגובתם של 21 תבדידים המשתייכים לשישה מינים שונים לטמפרטורות שבין 10 ל-25 מ"צ, מצאו Yeo et al. (2003) כי באופן כללי עלייה בטמפרטורה בטווח זה משפרת את נביטת נבגי הפטרייה, את גדילתם במצע מזון, ואת הפתוגניות שלהם כלפי שני מינים של כנימות עלה. מחקר זה תומך בהשערה כי מינים המגיעים מאקלים טרופי או סאב-טרופי, כמו *M. anisopliae*, יתפקדו טוב יותר תחת טמפרטורות גבוהות מאשר מינים המגיעים מאזורים ממוזגים, ולהיפך. יחד עם זאת, מחקר זה, ומחקרים אחרים חשפו כי גם מינים הנחשבים טרופיים, יכולים להיות מותאמים לאקלים ממוזג במידה ובודדו מאזור ממוזג (Roberts and Campbell, 1976). גם בתגובה לחום ישנו קשר חזק בין יכולתה של הפטרייה להתמודד עם טמפרטורות גבוהות ומקורו הגיאוגרפי של התבדיד, כאשר טמפרטורות העולות על 30-36 מ"צ פוגעות באופן משמעותי גם בהתפתחות תבדידים מאזורים צחיחים

וחמים, כפי שהודגם בניסויי in-vitro ובניסויי in-vivo (Saleem and Ibrahim, 2004; Ouedraogo et al., 2019).

לחות יחסית: לחות הינה פקטור משמעותי לנביטת הנבגים ולהתפתחות קורי הפטרייה, וניתן לקבוע ככלל אצבע כי דרושה לפטריות אנטומופתוגניות לחות גבוהה על מנת לנבט, לצמוח, ולפגוע בחרק (Ment et al., 1984; Searle and Doberski, 2010a). עם זאת, פקטור זה אינו משמעותי לאחר החדירה, שכן אז הפטרייה חשופה לסביבה המימית של ההמולימפה (Luz and Fargues, 1999). למרות כללי האצבע שהוצגו מעלה, ישנה השפעה לחרק המטרה, מין הפטרייה, התוארית, ואף המדיום שבו מבוצעת ההדברה על הלחות האופטימלית לפעילות הפטרייה, כך שהפטרייה עשויה להדביר את מזיק המטרה בצורה יעילה יותר תחת לחות נמוכה מאשר תחת לחות גבוהה (Athanasios et al., 2017; Lord, 2005; Michalaki et al., 2006).

קרינת UV: קרינת UV הינה קרינה באורכי גל קצרים שמעבר לספקטרום האור הנראה, ומאופיינת באורכי גל של 100-400 ננומטר. קרינת UV מחולקת לשלוש תת-קטגוריות:

1. UVA – באורכי גל של 320-400 ננומטר, מהווה את חלק הארי של קרינת ה-UV החודרת את האטמוספירה (כ-95%). עיקר פגיעתה היא על ידי יצירת רדיקלים חופשיים מסוג ROS במים. לכן, פגיעתם מתבטאת בעיקר בפטריות פעילות מטבולית לאחר הנביטה (Braga et al., 2007).
2. UVB – באורכי גל של 280-320 ננומטר, מהווה חלק קטן מהקרינה החודרת את האטמוספירה. UVB פוגע בחומר גנטי באופן ישיר, ועל ידי כך מעכב את צמיחת הפטרייה או קוטל נבגים (Braga et al., 2002).
3. UVC – באורכי גל של 100-280 ננומטר, קרינה זו היא הפוגעת ביותר ביצורים חיים, אך היא מסוננת במלואה על ידי שכבת האוזון, ולכן אינה רלוונטית לבחינת עמידות פטריות אנטומופתוגניות לעקות UV (Alves et al., 1998).

מידת הפגיעה של קרינת UV בכללותה, או הפרקציות השונות שלה, תלויה במין הפטרייה ובתבדיר, ובאה בקורלציה עם קו הרוחב ממנו בודד תבדיר הפטרייה הנבדק (Braga et al., 2002, 2007). דבר זה מחייב שני דברים מחוקר העוסק בעקות UV: הראשון הוא בחינת מידת החשיפה ל-UV הפוגעת בתבדיר הנבדק, על מנת לייצר פגיעה אמיתית. השני הוא סינון קרינת UVC, הגורמת לפגיעה חמורה בפטרייה מחד, אך מהווה מבחן לא מציאותי מאידך.

השפעת תואריות על יישום והתפתחות פטריות אנטומופתוגניות

ביישום של פטריות אנטומופתוגניות, היחידה התפקודית המיושמת, היא על פי רוב, הנבגים האל-מיניים (Conidia), אף על פי שנעשה גם שימוש בנבגים מיניים, בלסטוספורות, וחלקי תפטיר. תכשירים פטרייתיים (מיקואינסקטיצידים) יכולים להיות מיושמים בריסוס של תמיסות מים, שמן, אמולסיה, כאבקה, כחלק מפיתיון ואף על ידי אילוח מוקדם של הצמח (Charnley, 2007). בחלק זה, נתייחס ליישום של קונידיה בתואריות המיושמות בריסוס. דופן התא ההידרופובי של הקונידיה אינו מאפשר את שילובם במים טהורים ודורש חומרים משטחים או שילוב בשמן עם מחליב (אמולסיה), שיאפשרו את הכנסת הנבגים אל תוך המים (Charnley, 2007). שמנים אורגניים ומינרליים, כמו גם מסנני קרינה כימיים, יכולים להפחית או למנוע את הפגיעה הנגרמת מעקת UV. ראוי לציין כי, פרט למסנני קרינה כימיים, המנגנון דרכו שמנים מסייעים

בהתמודדות הנבג עם עקות UV עדיין אינו ברור. כמו כן, Alves et al., מצאו כי גם המחליב משפיע על התמודדות הנבג עם עקת UV, כאשר שתי קבוצות נבגים של *M. anisopliae*, שנחשפו לאותו שמן אורגני יחד עם מחליבים שונים, הגיבו באופן שונה ביחס לביקורת (Alves et al., 1998; Moore et al., 1993).

תואריות שמן, אם כשמן בלבד או כאמולסיה, נמצאו גם כמסייעות לנביטה ופעילות קוטלת החרקים של נבגים תחת תנאי יובש. ביישום של *M. anisopliae* var. *acridum* כנגד ארבה המדבר (*Schistocerca gregaria*), Bateman et al. מצאו כי תוארית שומנית מסייעת בוירולנטיות של הנבגים תחת תנאי יובש (Bateman et al., 1993). במידה והשמן המשמש בתוארית הוא שמן מינרלי, יכולה להיות קטילה מוגברת עקב אפקט משולב בפגיעה בחרק, הן של הנבגים והן של התוארית. שמנים מינרליים משמשים כקוטלי חרקים בחקלאות עוד משלהי המאה ה-19. מחקרים רבים מצאו פגיעה של הפרקציה הפרפינית של שמנים מינרליים, דרך חסימה פיזית של הטרכיאות, פגיעה בממברנות תאים ואיברים שומניים, ודרך דחייה של הטלה ואכילה בסדרות חרקים רבות (Buteler and Stadler, 2011). בתכשירים רבים, נהוג גם לשלב פרקציה מוצקה אינרטית, כגון דיאטומיט, חרסיות ואף פחם (Charnley, 2007). נמצא כי אבקות אינרטיות שונות, משפרות את חיוניות הנבגים לאחר תקופות אחסון ממושכות, כנראה על ידי שליטה בלחות היחסית אליה הנבגים חשופים (Batta, 2004). כמו כן, נמצא כי אבקות אינרטיות אלו מסייעות בפעילות הנבגים, כנראה על ידי גירוד פיזי של קוטיקולת החרק, המאפשרת היצמדות רבה יותר של נבגים (Akbar et al., 2004).

סיכום והסתכלות עתידית

שימוש בגורמי הדברה מיקרוביאליים לניהול מזיקים יכול לספק פתרון ארוך טווח ולהוות חלופה מבטיחה וידידותית לסביבה לתכשירי הדברה כימיים. מדברים מיקרוביאליים הם מיקרואורגניזמים הניחנים בפוטנציאל גדול להדברת מזיקים, אך על מנת לאפשר יישום מוצלח ולהבטיח את ההישרדות של מדברים מיקרוביאליים בשדה יש לפתח פורמולציות חדשניות יחד עם פיתוח גישות יישומיות. אנו צופים כי המגמה העולמית של פיתוח ויישום מדברים מיקרוביאליים תאומץ גם בישראל. השילוב של מחקר בסיסי ויישומי תוך שיתוף פעולה עם מו"פים אזוריים, חברות וחקלאים מקומיים תיצור אינטרס הדדי ושילוב של תכשירי הדברה מיקרוביאליים ויבסס מדברים מיקרוביאליים כאלטרנטיבה חדשנית וידידותית לסביבה לתכשירי הדברה קונבנציונליים. עם זאת, יש לעדכן את התקנות ומסלולי הרישוי עבור תכשירים אלה, עקב ההבדלים היסודיים בינם לבין תכשירי הדברה סינתטיים. ניתן להשיג זאת באמצעות יצירת הליך רישוי מהיר של תכשירי הדברה ידידותיים לסביבה ומתן סובסידיות לחקלאים שבוחרים לשלב או להחליף חומרי הדברה סינתטיים בתכשירים ידידותיים.

הצלחתן של פטריות אנטומופאגניות בדיכוי אוכלוסיות חרקים, במערכות חקלאיות או טבעיות, תלוי בגורמים רבים: בזיהוי האינטימי שבין הפטרייה לפונדקאי, ביכולת הפטרייה לשרוד לאורך זמן במערכת האקולוגית, וביכולתה של הפטרייה להתפתח ולשגשג תחת תנאי הסביבה בנישה. ממחקרים רבים ניתן ללמוד כי השפעתה של התוארית על שרידות הנבגים לאורך זמן, ופעילותם האנטומופאגנית, מכרעת. עובדה זו מתחדדת בחשיבה על תנאי השדה בישראל, החושפים את הנבגים לתנאי קיצון של יובש וקרינה.

הצלחתם של תכשירי הדברה מבוססי פטריות באקלים הישראלי תלויה, ראשית כל, בהבנתנו כיצד משפיעה התוארית על האינטראקציה בין הפטרייה לחרק. במחקר קודם, בשיתוף עם קבוצתנו, נמצא כי הפורמולציה הנחקרת במחקר זה, משפרת את יכולת הקטילה של נבגי *M. brunneum* (Yaakov et al., 2018). מחקר זה בא לבחון את מגוון ההשפעות של תוארית מסוג אמולסיה על מערכת פטרייה-פונדקאי, ולבודד את מידת השפעתה של התוארית על כל גורם במערכת.

תודות

כותבי שורות אלו רוצים להכיר בתרומתם הרבה של ד"ר גלינה גינדין, ד"ר מיכאל סמיש, פרופ' איתמר גלזר, פרופ' צבי מנדל, ד"ר אלכס פרוטסוב, מר מיכאל דוידוביץ', 'ביו-בי' שדה-אליהו ו'רימי' - עבור תמיכתם.

ספרות מצוטטת

אלעד י' (2021) מנגנוני הדברה ביולוגית. בספר תובנות חדשות במחלות צמחים, בעריכת אלעד י', דומברובסקי א', מנוליס-ששון ש' ועזרא ד', הוצאת המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים.

<https://volcaniarchive.agri.gov.il/skn/tu/e51913>

- Akbar, W., Lord, J. C., Nechols, J. R., Howard, R. W. 2004. Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *Journal of Economic Entomology* 97, 273–280. <https://doi.org/10.1093/jee/97.2.273>
- Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C., Leather, S. R. 1998. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection* 17, 675–679. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(98\)00074-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(98)00074-X)
- Araújo, J. P. M., Hughes, D. P. 2016. Diversity of entomopathogenic fungi: Which groups conquered the insect body? *Advances in Genetics* 94, 1–39. <https://doi.org/10.1016/BS.ADGEN.2016.01.001>
- Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Rumbos, C. I., Kontodimas, D. C. 2017. Influence of Temperature and relative humidity on the insecticidal efficacy of *Metarhizium anisopliae* against Larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) on Wheat. *Journal of Insect Science* 17. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew107>
- Barelli, L., Padilla-Guerrero, I. E., Bidochka, M. J. 2011. Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*. *Fungal Biology* 115, 1174–1185. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2011.08.003>
- Bateman, R. P., Carey, M., Moore, D., Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology* 122, 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04022.x>
- Batta, Y. A. 2004. Control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. *Crop Protection* 23, 103–108. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2003.07.001>
- Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J., Croos, J. N. A. De 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus

- Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? Applied and Environmental Microbiology 67, 1335–1342. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1335-1342.2001>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., Humber, R. A. 2009a. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101, 512–530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., Humber, R. A. 2009b. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage . Mycologia 101, 512–530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Braga, G. U. L., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., Roberts, D. W. 2007. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Photochemistry and Photobiology 74, 734–739. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740734BSUAUR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740734BSUAUR2.0.CO2)
- Braga, G. U. L., Rangel, D. E. N., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., Roberts, D. W. 2002. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. Mycologia 94, 912–920. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833149>
- Buteler, M., Stadler, T. 2011. 6 A Review on the mode of action and current use of petroleum distilled spray oils, in: Stoycheva, M. (Ed.), Pesticides in the Modern World. InTech, pp. 119–136.
- Charnley, A. K. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in: Pest Control. Environmental and Microbial Relationships 159–187. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_10
- Holder, D. J., Keyhani, N. O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. Applied and environmental microbiology 71, 5260–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005>
- Kalha, C. S., Singh, P. P., Kang, S. S., Hunjan, M. S., Gupta, V., Sharma, R. 2014. Entomopathogenic viruses and bacteria for insect-pest control, in: Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective. Elsevier Inc., pp. 225–244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00013-0>
- Lord, J. C. 2005. Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). Biological Control 34, 180–186. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2005.05.004>
- Luz, C., Fargues, J. 1999. Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. Mycopathologia 146, 33–41. <https://doi.org/10.1023/A:1007019402490>
- Ment, D., Gindin, G., Glazer, I., Perl, S., Elad, D., Samish, M. 2010a. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. Fungal Biology 114, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.005>
- Ment, D., Gindin, G., Soroker, V., Glazer, I., Rot, A., Samish, M. 2010b. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. Journal of Invertebrate Pathology 103, 132–139. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.12.010>

- Michalaki, M. P. Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Batta, Y. A., Balotis, G. N. 2006. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin applied alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Du Val larvae: Influence of temperature, relative humidity and type of commodity. *Crop Protection* 25, 418–425. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2005.07.003>
- Moore, D., Bridge, P. D., Higgins, P. M., Bateman, R. P., Prior, C. 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology* 122, 605–616. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04061.x>
- Ouedraogo, R. M., Goettel, M. S., Brodeur, J. 2004. Behavioral thermoregulation in the migratory locust: a therapy to overcome fungal infection. *Oecologia* 138, 312–319. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1431-0>
- Reingold V., Kottakota C., Birnbaum N., Goldenberg M., Lebedev G., Ghanim M., Ment D. 2021. Intraspecies variation of *Metarhizium brunneum* against the green peach aphid, *Myzus persicae*, provides insight into the complexity of disease progression. *Pest Management Science*, in press.
- Roberts, D., Campbell, A. 1976. Stability of Entomopathogenic Fungi. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer.* 10 : 19-76.
- Roberts, D. W., Hajek, A. E. 1992. Entomopathogenic fungi as biopesticides, in: Leatham, G.F. (Ed.), *Frontiers in Industrial Mycology*. Routledge, Chapman & Hall Inc., pp. 144–159.
- Saleem, A.-R., Ibrahim, R. A. 2019. Assessment of the virulence and proteolytic activity of three native entomopathogenic fungi against the larvae of *Oryctes agamemnon* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 29, 21. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0120-1>
- Sasan, R. K., Bidochka, M. J. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany* 99, 101–107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>
- Satheeja Santhi, V., Salame, L., Nakache, Y., Koltai, H., Soroker, V., Glazer, I. 2015. Attraction of entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *Biological Control* 83, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.01.003>
- Schrank, A., Vainstein, M. H. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56, 1267–1274. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2010.03.008>
- Searle, T., Doberski, J. 1984. An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *Journal of Stored Products Research* 20, 17–23. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(84\)90031-6](https://doi.org/10.1016/0022-474X(84)90031-6)
- St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J., Roberts, D. W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6349–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349>
- St. leger, R. J. 2007. *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions, in: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biothechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer, pp. 179–204.

- St.Leger, R. J., Butt, T. M., Goettel, M. S., Staples, R. C., Roberts, D. W. 1989. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13, 274–288. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(89\)90049-2](https://doi.org/10.1016/0147-5975(89)90049-2)
- Van Lenteren J. C., Bolckmans K., Köhl J., Ravensberg W. J., Urbaneja A. (2018): Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63: 39-59.
- Wang, C., St Leger, R. J. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic cell* 6, 808–16. <https://doi.org/10.1128/EC.00409-06>
- Yaakov, N., Ananth Mani, K., Felfbaum, R., Lahat, M., Da Costa, N., Belausov, E., Ment, D., Mechrez, G. 2018. Single cell encapsulation via pickering emulsion for biopesticide Applications. *ACS Omega* 3, 14294–14301. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02225>
- Yeo, H., Pell, J. K., Alderson, P. G., Clark, S. J., Pye, B. J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science* 59, 156–165. <https://doi.org/10.1002/ps.622>