

29/04/2018

Agricultural Research Organization
Volcani Center
 Israel / Ministry of Agriculture and Rural Development
 430067417

מינהל המחקר החקלאי
מרכז וולקני
 מדינת ישראל / משרד החקלאות ופיתוח כפר

דו"ח דיווח מדעי

קוד זיהוי: 430067417

מס' תיק מקור מימון:

נושא המחקר: לימוד נושא רקבונח לאחר קטיף בפירות מגו

סוג דו"ח: מותנה בדו"ח מסכם

מינהל המחקר החקלאי

חוקר ראשי: אלקן נועם

חוקרים משניים:

מקורות מימון עבורם מועד הדו"ח:

60000

מועצת הצמחים ענף פירות

תקציר הדו"ח:

עונת המגו 2014 חשפה בפנינו תופעה מדאיגה של ריבוי רקבונות עוקץ וזקקים משמעותיים ביותר בפירות מגו לאחר קטיף. נראה כי פטריה 'שנה-חדשה' לסינדיפלודיה (בוטריוספרה) והפטרייה אלטרנריה הינן מחוללות המחלה העיקריות. נמצא כי רקמת העוקץ מכילה מגוון עשיר של מיקרואורגניזמים הכוללים פתוגנים שונים הגורמים לרקבונות עוקץ, כגון: *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*. בנוסף, בודדו חיידקי בצילוס ידיותיים מעוקצי פירות. נמצא כי לחיידקים אלו יש פעילות הדברה ביולוגית טובה כנגד פטריות פתוגניות אשר תוקפות פירות מגו באחסון וגורמות לרקבונות. כך טיפולים בחיידקים הפחיתו רקבונות באחסון של פירות מגו. נמצא גם כי קטיף מגו עם עוקץ קצר (0.5 ס"מ) מיתן את השינוי לאורך זמן באוכלוסיית המיקרואורגניזמים בעוקצי הפירות. כך האוכלוסייה הייתה בריאה יותר ופתוגנית פחות דבר שהוביל לפחית משמעותית ביותר בהצטברות רקבונות העוקץ אשר מתפתחים באחסון. כך הוכח כי טיפולים שונים יכולים לשנות את הרכב האוכלוסייה בעוקצי הפירות, ככה אולי נוכל בעתיד לשנות את האוכלוסייה כדי להפחית פתוגנים ולהגביר את השכיחות של מיקרואורגניזמים ידידותיים. בנוסף מצאנו במחקר זה כי טבילה ב'סקולר' לאחר קטיף הייתה יעילה יותר מהטבילה הנהוגה כיום ב'ספורטק' בהפחתת רקבונות בפירות מגו הנגרמים ע"י הפתוגנים השכיחים בארץ ישראל (אלטרנריה ולסינדיפלודיה). לסיכום, מחקר זה הראה כי ניתן להפחית את השכיחות והעוצמה של רקבונות העוקץ בפירות מגו ע"י טיפולים לאחר קטיף אשר קוטלים את הפטריות הפתוגניות בדרכים ביולוגיות או כימיות או ע"י שינוי האוכלוסייה המיקרוביאלית.

חתימות ואישורים:

היחידה לתכניות
 עבודה ותקציר


אמכלות

אבנ

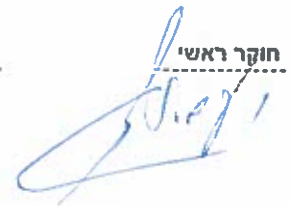
מנהל המכון



מנהל המחלקה



חוקר ראשי



תאריך

שם התכנית: טיפול ברקבונות עוקץ בפרי המנגו לאחר קטיף
Studying postharvest pathology of stem-end rot in mango fruit

חוקר אחראי: נועם אלקן, המחלקה לחקר תוצרת טרייה לאחר הקטיף, מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, ראשון לציון. noamal@agri.gov.il, 03-9683605, 0506220566.

תקציר

עונת המנגו 2014 חשפה בפנינו תופעה מדאיגה של ריבוי רקבונות עוקץ ונזקים משמעותיים ביותר בפירות מנגו לאחר קטיף. נראה כי פטריה 'ישנה-חדשה' לסיודיפלודיה (בוטריוספרה) והפטרייה אלטרנריה הינן מחוללות המחלה העיקריות. נמצא כי רקמת העוקץ מכילה מגוון עשיר של מיקרואורגניזמים הכוללים פתוגנים שונים הגורמים לרקבונות עוקץ, כגון: *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*. בנוסף, בודדו חיידקי בצילוס ידיותיים מעוקצי פירות. נמצא כי לחיידקים אלו יש פעילות הדברה ביולוגית טובה כנגד פטריות פתוגניות אשר תוקפות פירות מנגו באחסון וגורמות לרקבונות. כך טיפולים בחיידקים הפחיתו רקבונות באחסון של פירות מנגו. נמצא גם כי קטיף מנגו עם עוקץ קצר (0.5 ס"מ) מיתן את השינוי לאורך זמן באוכלוסיית המיקרואורגניזמים בעוקצי הפירות. כך האוכלוסייה הייתה בריאה יותר ופתוגנית פחות דבר שהוביל לפחית משמעותית ביותר בהצטברות רקבונות העוקץ אשר מתפתחים באחסון. כך הוכח כי טיפולים שונים יכולים לשנות את הרכב האוכלוסייה בעוקצי הפירות, ככה אולי נוכל בעתיד לשנות את האוכלוסייה כדי להפחית פתוגנים ולהגביר את השכיחות של מיקרואורגניזמים ידיותיים. בנוסף מצאנו במחקר זה כי טבילה ב'סקולר' לאחר קטיף הייתה יעילה יותר מהטבילה הנהוגה כיום ב'ספורטק' בהפחתת רקבונות בפירות מנגו הנגרמים ע"י הפתוגנים השכיחים בארץ ישראל (אלטרנריה ולסיודיפלודיה). לסיכום, מחקר זה הראה כי ניתן להפחית את השכיחות והעוצמה של רקבונות העוקץ בפירות מנגו ע"י טיפולים לאחר קטיף אשר קוטלים את הפטריות הפתוגניות בדרכים ביולוגיות או כימיות או ע"י שינוי האוכלוסייה המיקרוביאלית.

מבוא

עונת המנגו 2014 חשפה בפנינו תופעה מדאיגה של ריבוי רקבונות עוקץ ונזקים משמעותיים ביותר בפירות מנגו לאחר קטיף. נראה כי פטריה 'ישנה-חדשה' לסיודיפלודיה (בוטריוספרה) והפטרייה אלטרנריה הינן מחוללות המחלה העיקריות. בבידוד של פטריות *Lasiodiplodia* רבות נמצא כי קיימות שונות רבה ברמת התוקפנות של התבדידים השונים על גבי ענפים ופירות מנגו. נמצא כי אלטרנריה,

בוטריוספרה ופטריות נוספות מאכלסות את השיפה של עוקץ הפרי עוד במטע וגדלות כאנדופיטיות ואינן גורמות לסימפטומים נראים לעין. בזמן הבשלת הפרי הפתוגנים האלה מתעוררים ומתחילים לאכלס את רקמת הפרנכימה של הפרי וגורמים לריקבון עוקץ בפירות המגנו. נמצא כי רקמת העוקץ מכילה מגוון עשיר של מיקרואורגניזמים הכוללים פתוגנים שונים הגורמים לרקבנות עוקץ, כגון: *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*.

תוך ריצוף עמוק במעבדתנו של כלל החיידקים והפטריות האנדופיטיים בעוקצי פירות מגנו אופיינה אוכלוסיית המיקרואורגניזמים (Diskin et al., 2017). האוכלוסייה שנמצאה מכילה מגוון רחב של פטריות, שמרים וחיידקים שונים החיים באופן אנדופיטי בעוקצי פרי המגנו. חלק מאותן פטריות הינן פתוגניות, בעוד שאר החיידקים השמרים וחלק מהפטריות האחרות אינם פתוגנים. בנוסף, נמצא כי אוכלוסיית המיקרואורגניזמים בעוקץ פירות מגנו משתנה באופן דינמי בתגובה לטמפרטורת האחסון, משך האחסון והתפתחות הפרי בחלק החיצוני או הפנימי של העץ (Diskin et al., 2017). שינויים אלה באוכלוסייה משפיעים על כמות ושכיחות רקבנות העוקץ. מתוצאות מחקר זה הועלתה היפותזה כי החיידקים האנדופיטיים המתקיימים בעוקצי פירות שונים יכולים להוות מדבירים ביולוגיים אופטימאליים כנגד פטריות פתוגניות הגורמות לרקבנות עוקץ. חיידקים רבים בודדו מעוקצי פירות מגנו, אבוקדו ופירות הדר ונבחנו כמדבירים ביולוגיים (חלק שני של הצעת המחקר).

בשנתיים האחרונות נרשמה פחיתה של כמות רקבנות העוקץ, זאת לאחר יישום של המלצות ישנות הכוללות טיפול בפרי לאחר קטיף במים חמים ובחומר ההדברה ספורטק (דו"ח 2015-2016). מעבודה של השנתיים האחרונות נמצא כי טבילה של פירות מגנו 'שלי' ו'יקיטי' ב'סקולר' הייתה יעילה יותר מהטיפול המסחרי בחומר ההדברה 'ספורטק' בהפחתת רקבנות טבעיים (צד ועוקץ) בפירות מגנו לאחר קטיף ואף לאחר אילוח ב *Lasiodeplodia* (על בסיס התוצאות הוגש לאחרונה מאמר ל Crop Protection ; חלק ראשון של הדו"ח). בנוסף, נמצא כי הפטריות הפתוגניות חודרות בעיקר דרך הפרחים. ואכן, שני ריסוסי פריחה עם 'סוויץ' או 'לונה' אקספריאנסי' או במדביר הביולוגי 'סרנייד' הפחיתו רקבנות עוקץ בפירות מגנו לאחר הקטיף (אלקן ושותפים, עלון הנוטע, 2018). בנוסף נמצא כי קטיף של פירות מגנו 'שלי' ו'יקיטי' עם עוקץ קצר (5 מ"מ) הפחית באופן משמעותי את כמות רקבנות העוקץ ושינה את אוכלוסיית המיקרואורגניזמים החיים בעוקצי הפרי (חלק שלישי של הדו"ח).

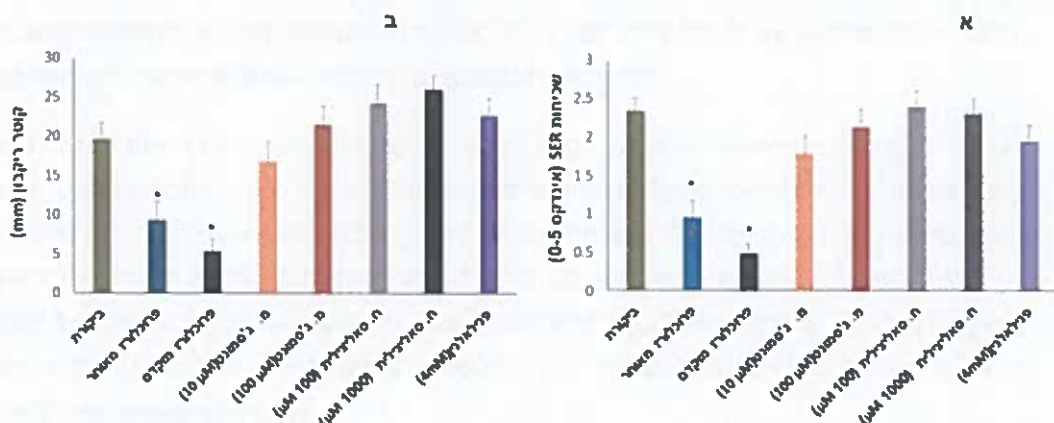
תוצאות המחקר:

חלק ראשון: בחינת יעילות הטיפול בפונגצידים לאחר קטיף למניעת ריקבנות

בחינת השפעת חומרים משרי תגובות הגנה על פירות מגנו בהשוואה לפונגצידים:

נוכח מגמה עולה לעבור ליישום טכנולוגיות בעלות אופי בטוח ואקולוגי יותר לשימוש, קיים צורך למצוא אלטרנטיבות ליישום פונגצידים כימיים לאחר-קטיף. בניסוי זה, הטבילה בחומרים נערכה

בפירות קטופים יום לפני אילוח בפטרייה *L. theobromae*, לאחר שהוסרו עוקצי פירות המנגו מהזן 'קיטי'. בבחינת השפעת יעילות הטיפולים משרי העמידות לעומת טיפול בפונגצידים נראה בבירור שחומר ההדברה פרוכלורז עיכב באופן מובהק את התפתחות הריקבונות בטיפול מוקדם (יום לפני אילוח) וגם בטיפול מאוחר (יום לאחר אילוח) כפי שנראה ממדד קוטר הריקבון (איור 1). ההבדלים ניכרים גם כשבוחנים את חומרת הריקבונות שהוערכו על פי אינדקס (0-5). ניתן לראות כי שני טיפולי הפרוכלורז עיכבו באופן מובהק את חומרת הריקבונות (איור 1א) לעומת טיפולים בפנילאלנין ובהורמוני ההגנה (חומצה סליצילית וחומצה ג'יסמונית). ניסוי זה מראה כי חומרים להשראת עמידות לא היו בעלי יכולת עיכוב של ריקבונות העוקץ באופן מספק. לכן, עולה כי הטיפול האפקטיבי ביותר לעיכוב ריקבונות העוקץ עדיין כוללים יישום של פונגצידים כימיים.



איור 1. בחינת יעילות יישומם של חומרים משרי תגובת הגנה לאחר קטיף בפירות מנגו מאולחים בלסידופלודיה. א. קוטר הריקבון הממוצע במילימטר שנרשם ארבעה ימים ממועד האילוח וחמישה ימים לאחר טבילה בחומרי הגנה שונים. ב. עוצמת ריקבונות העוקץ שהוערכו בטיפולים השונים לאחר ארבעה ימים ממועד האילוח וחמישה ימים ממועד הטיפול (אינדקס 0-5).

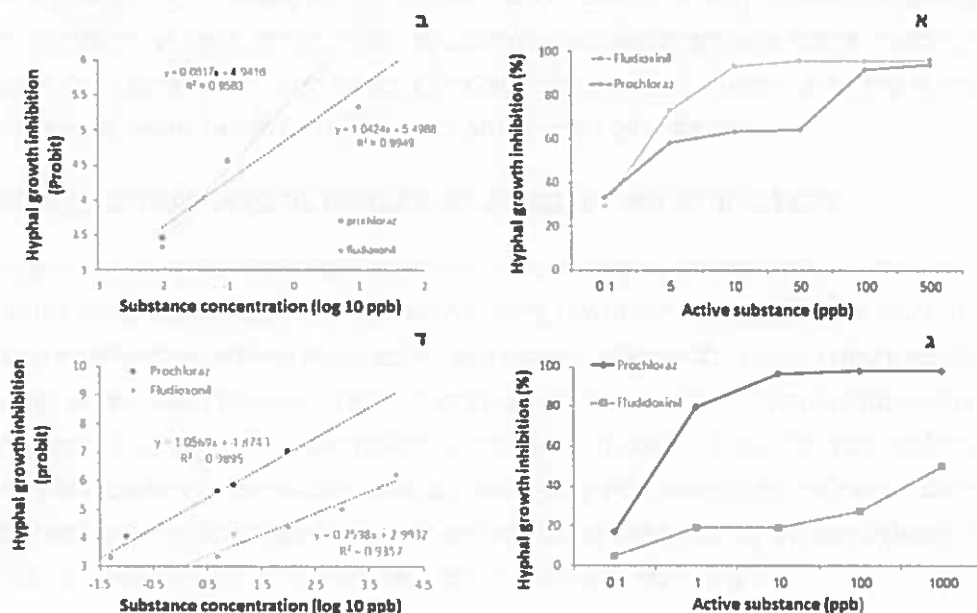
השפעת חומרי הדברה על עיכוב התפתחותן של פטריות הגורמות לריקבונות עוקץ

פרוכלורז הינו הפונגציד היחיד המיושם כיום כטיפול לאחר קטיף בפירות מנגו בישראל. בעת האחרונה, הסף המותר לשימוש הופחת בצורה ניכרת, ובעתיד הנראה לעין, כתוצאה מהרביזיה בסל תכשירי ההדברה באיחוד האירופי התכשיר ספורטק צפוי לצאת מכלל שימוש. בהמשך לעבודה קודמת שבוצעה במעבדה, אשר הראתה כי מתוך מספר תכשירי הדברה, הסקולאר (Fludioxonil) נמצא כמעכב את התפתחות הפטריות הפתוגניות המרכזיות במנגו - אלטרנריה ולסידופלודיה, בצורה יעילה יותר מאשר הטיפול המקובל כיום בפרוכלורז. נערך ניסוי השוואה בין שני החומרים פרוכלורז (ספורטק) ופולודיאוקסוניל (סקולר) כדי לראות את רמת יעילותם כנגד הפתוגן *L. theobromae* אשר מהווה את הגורם המרכזי לריקבונות עוקץ בפירות מנגו לאחר קטיף בישראל.

קביעת עקום רעילות לעיכוב גידול הפטיר בפטריות הגורמות לריקבונות עוקץ

תכשירי ההדברה עורבבו במינונים שונים במצע מזון PDA מוצק ולאחר מכן הונחה במרכז כל צלחת דסקית תפטיר. הצלחות הודגרו בטמפרטורה 25 מ"צ למשך מספר ימים, עד להגעת התפטיר בצלחות הביקורת לכ-0.5 ס"מ מקצה הצלחת, ולאחר מכן נמדד רדיוס המושבה וחושב שטחה. עיכוב גידול המושבה חושב כאחוז שטח המושבה במצע המורעל משטח המושבה בטיפול ההיקש. כל ריכוז נבחן בארבע חזרות. עקומי הרעילות והשיפועים של כל עקומי הרעילות מוצגים באיור 2. על פי עקום הרעילות לכל תכשיר חושבו ערכי ה-ED98 ED (Effective Dose). מבין שני התכשירים שנבדקו, "פלודיאוקסוניל" ו"פרוכלורז", פלודיאוקסוניל הראה יעילות רבה יותר בעיכוב גידול התפטיר של הפטרייה לסידופלודיה. העיכוב המקסימלי שנמדד הושג ב 10ppb עם 93 אחוז עיכוב, בעוד שפרוכלורז הראה 63% עיכוב באותו ריכוז (איור 2). מניתוח אנליזת הלוג-פרוביט עולה כי ED98 פלודיאוקסוניל התקבל ב 88.77 ppb לעומת ED98 של 140.78 בפרוכלורז (איור 2). כך, ניתן להסיק כי פלודיאוקסוניל יעיל יותר באופן מובהק מפרוכלורז כנגד גידול תפטיר של פטריית לסידופלודיה שמהוות את הפתוגן המשמעותי הגורם לרקבנות עוקץ בישראל.

היפוך מגמה נצפה כאשר נוסו החומרים בעיכוב של תפטיר הפטרייה *C. gloeosporioides* שמהווה פתוגן משמעותי בפירות מגו באזורים טרופיים. בריכוז של 10ppb פרוכלורז סיפק עיכוב מקסימלי של 96% בעוד שפלודיאוקסוניל עיכב רק 19% בריכוז זה (איור 2). לפי חישובי לוג-פרוביט, נראה שפרוכלורז בריכוז 88.18ppb ופלודיאוקסוניל בריכוז 125.17ppb נדרשים על מנת להגיע ל ED98 (איור 2). חישוב הריכוז האפקטיבי מתבסס על משוואות הקו הישר שהתקבלו מאנליזת הפרוביט לעיכוב גידול תפטיר. כך, ניתן להסיק כי פרוכלורז יעיל יותר מפלודיאוקסוניל כנגד גידול תפטיר של פטריית *C. gloeosporioides*.

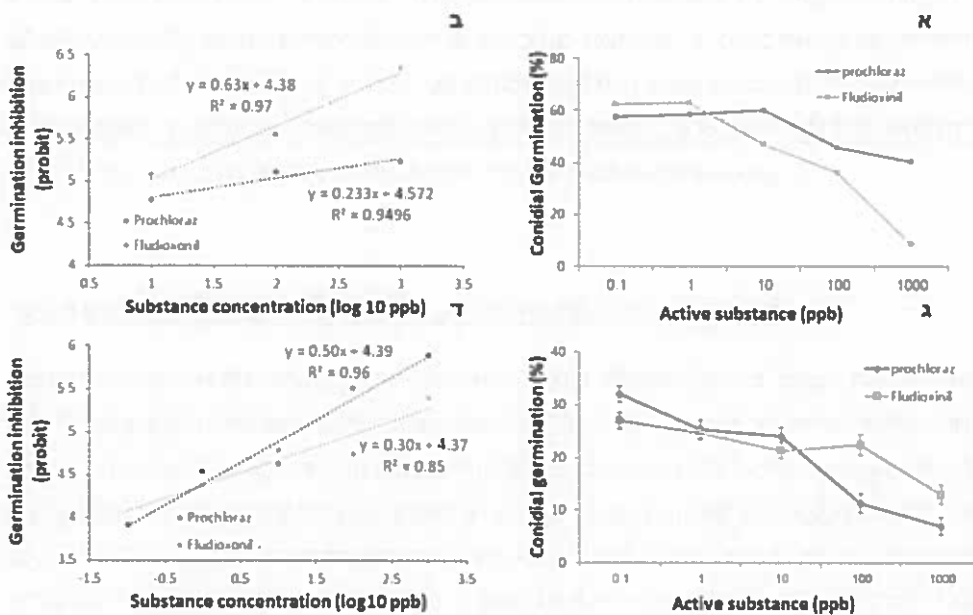


איור 2. עיכוב גידול תפטיר של הפטריות *Lasiodiplodia theobromae* ו-*Colletotrichum gloeosporioides* בעקבות יישום פונגצידים בריכוזים משתנים. א. גידול קורים של הפטרייה *L. theobromae* על מצע PDA. ב. אנליזת לוג-פרוביט למציאת עקום רעילות לגידול תפטיר הפטרייה *L. theobromae*. ג. גידול קורים של הפטרייה *C. gloeosporioides* על מצע PDA. ד. אנליזת לוג-פרוביט למציאת עקום רעילות לגידול תפטיר הפטרייה *C. gloeosporioides*.

קביעת עקום רעילות לעיכוב נביטת נבגי פטריות הגורמות לריקבונות עוקץ

תכשירי ההדברה "פלודיאוקסוניל" ו"פרוכלורז" נמהלו למינונים שונים. חומרי ההדברה טופטפו על גבי זכוכית ואחר כך הוספה תמיסת הנבגים בריכוז $5 \cdot 10^5$ נבגים למ"ל. לאחר 24 שעות באווירה לחה בטמפרטורת החדר נקבע אחוז הנביטה במיקרוסקופ. נביטת נבגי הפטרייה *L. theobromae* עוכבה באופן משמעותי כאשר הנבגים הא-מיניים נחשפו לגרדיאנט ריכוזים של חומרי ההדברה הכימיים. ב 1000 ppb נראה כי החומר פלודיאוקסוניל עיכב את הנביטה ב 90%, באותו הריכוז של פרוכלורז נרשם עיכוב של 60% (איור 3א). כך התקבל מדד ה ED98 לעיכוב נביטה בפלודיאוקסוניל היה 146.51 ppb בהשוואה ל 400.98 ppb בפרוכלורז (איור 3ב). חישוב הריכוז האפקטיבי מתבסס על משוואות הקו הישר שהתקבלו מאנליזת הלוג-פרוביט לעיכוב נביטת נבגי *L. theobromae*. לפי נתונים אלו, נראה כי פלודיאוקסוניל פעילות אנטיפונגלית עדיפה לעומת פרוכלורז כנגד הפטרייה *Lasiodiplodia*. כך, ניתן להסיק כי פלודיאוקסוניל יעיל יותר באופן מובהק מפרוכלורז כנגד נביטת נבגים של פטריית לסיודיפלודיה שמהוות את הפתוגן המשמעותי הגורם לריקבונות עוקץ בישראל.

עיכוב הנביטה נבחן גם לגבי הפטרייה *Colletotrichum gloeosporioides* ונראה היה כי לאחר 24 שעות נביטת הנבגים הייתה פחותה בהשוואה ל *L. theobromae* (איור 3ג). כך, ב 100 ppb אחוז העיכוב עמד על 88% בפרוכלורז בעוד שבפלודיאוקסוניל נרשם 77% עיכוב נביטת הנבגים. ריכוז של 187.22 ppb של פרוכלורז היה המינון הדרוש כדי להגיע ל ED98, מנגד 312.1 ppb של פלודיאוקסוניל נדרשו בשביל לקטול 98% מהנבגים הנובטים (איור 3ד). חישוב הריכוז האפקטיבי מתבסס על משוואות הקו הישר שהתקבלו מאנליזת הלוג-פרוביט לעיכוב נביטת הקונידיות.

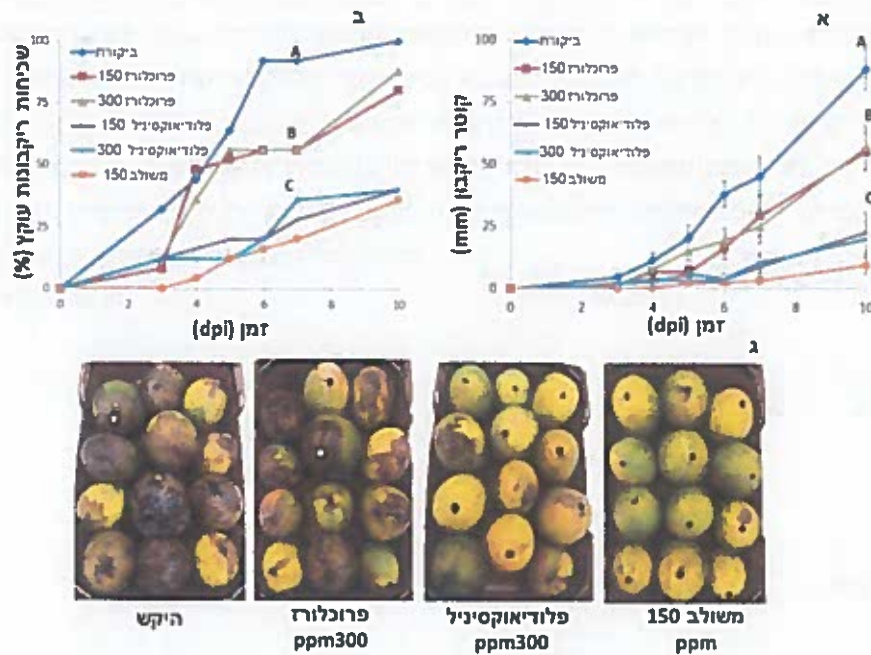


איור 3. עיכוב נביטת נבגי הפטריות *Lasiodiplodia theobromae* ו-*Colletotrichum* על זכוכית לאחר 24 שעות. א. נביטת נבגי הפטרייה *L. theobromae* על זכוכית לאחר 24 שעות. ב. אנליזת לוג-פרוביט למציאת עקום רעילות לנביטת נבגי הפטרייה *L. theobromae*. ג. נביטת נבגי הפטרייה *C. gloeosporioides* על זכוכית לאחר 24 שעות. ד. אנליזת לוג-פרוביט למציאת עקום רעילות לנביטת נבגי הפטרייה *C. gloeosporioides*.

השפעת יישום חומרי הדברה כימיים בפירות מגנו לאחר קטיף על התפתחות ריקבנות לאחר הדבקה בלסיודיפלודיה

פירות מגנו ישלי הודבקו בנבגים של תבדיד *L. theobromae* Av062. לאחר 24 שעות, הפירות נטבלו שלושים שניות בשני חומרי הדברה בריכוזים שונים (סקולר עם החומר הפעיל פלודיאוקסוניל, או ספורטק עם החומר הפעיל פרוכלורז). הפירות אוחסנו באווירה לחה (95%) ב 22 מעלות צלזיוס. במשך 10 ימים ממועד האילוח נמדד קוטר הריקבון והוערכה חומרתו (איור 4). בטיפול הפרוכלורז שכיחות הריקבנות הופחתה ב 40%, שבעה ימים לאחר הדבקה לעומת טיפול הביקורת. בעוד שטיפול הפלודיאוקסוניל נבדלו באופן מובהק והפחיתו את שכיחות הריקבנות ב 79% וב 70% בריכוזים של 150 ו 300 מקק בהתאמה.. קוטר ריקבנות העוקף הפחתו בשיעור של 77 ו 75 אחוזים בריכוזים של 150 ו 300 מקק בהתאמה (איור 4). בעוד שהקוטר שנמדד בטיפול הפרוכלורז היה גבוה משמעותית והראה הפחתה של 37% בלבד לעומת טיפול הביקורת. כך, פלודיאוקסוניל נראה כפונגציד יעיל יותר באופן מובהק מפרוכלורז. בנוסף, מוצגות תמונות מייצגות של כל אחד מהטיפולים שיושמו בניסוי (איור 4). ראוי לציין, כי עיכוב ריקבנות העוקף המוצלח ביותר נרשם

בטיפול המשולב של שני חומרי הדברה, שם נרשמה ירידה של 90% בקוטר הריקבון לעומת הביקורת. ניתן לראות שהשימוש בפלודיאוקסוניל עשוי לשמש כאמצעי הדברה מוצלח יותר מאשר הפרוכלורז בכל הקשור להפחתת ריקבונות העוקץ בפירות מגנו הנגרמים ע"י הפטרייה *L. theobromae*.



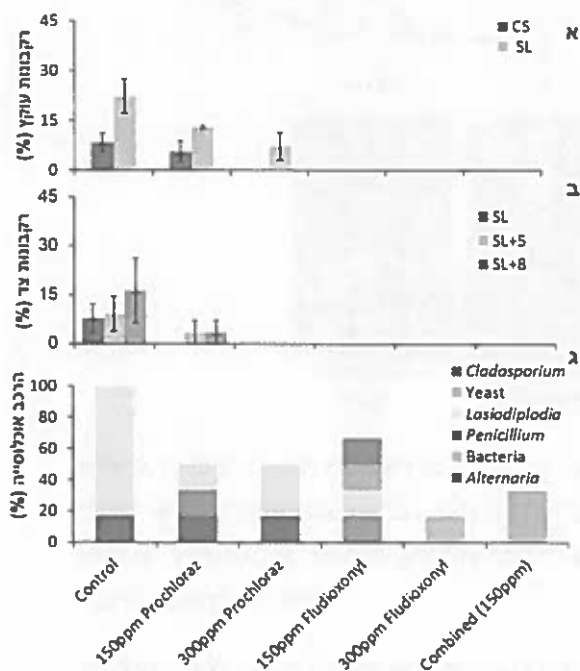
איור 4. השפעת טבילה בפונגצידים של פירות מגנו 'קיטי' לאחר קטיף, על התפתחות ריקבון העוקץ לאחר אילוח ב *L. theobromae*. א. קוטר הריקבון במילימטר שנמדד לאורך 10 ימים מהדבקה בטיפולים השונים. ב. הערכת שכיחות המחלה באחוזים מכלל הפירות בטיפול. ג. תמונות מייצגות עשרה ימים לאחר אילוח.

השפעת יישום חומרי הדברה על הפחתת ריקבונות בפירות מגנו 'קיטי' לא מאולחים

תוצאות מוקדמות, מניסוי שנעשה במעבדה בהובלתה של סוניה דיסקין, נערך על פירות מגנו מהזן 'קיטי' אשר נטבלו בחומרים פרוכלורז ופלודיאוקסוניל בריכוזים שונים למשך חצי דקה ואוחסנו למשך 21 ימים בקור (12מ"צ) והועברו לשבוע חיי מדף (20מ"צ). הפירות לא אולחו בפתוגניים. הריקבונות הטבעיים שהופיעו על גבי הפרי הוערכו בשני מועדים (לאחר אחסון בקור ולאחר אחסון בתנאי חיי מדף). בעוד ששני הפונגצידים הראו יעילות בהפחתת שכיחות ריקבונות העוקץ לעומת הביקורת, פלודיאוקסוניל נמצא כיעיל ביותר במניעת ריקבונות עוקץ לעומת פרוכלורז (איור 5). כך, פלודיאוקסוניל בריכוז של 150 ppm ו 300 ppm הוריד את שכיחות ריקבונות העוקץ באופן מובהק ל 0, לעומת הטיפול בפרוכלורז אשר הוריד את שכיחות ריקבונות עוקץ באופן תלוי ריכוז (איור 5). שני החומרים הפחיתו את ריקבונות הצד לרמה אפסית (איור 5). בבדיקת הרכב האוכלוסייה המיקרוביאלית, נמצא כי כל העוקצים מטיפול הביקורת היו מאוכלסים בפטריות פתוגניות (אלטרנריה או לסידופלודיה) כאשר טיפול בפרוכלורז בריכוז של 150 ppm הפחית את כמות

הפתוגנים ב 50% וטיפול בפלודיאוקסוניל בריכוז של 300 ppm הפחית ל 0 את הפטריות הפתוגניות אשר בודדו מעוקצי הפירות על גבי מצעי מזון PDA (איור 5).

איור 5. השפעת טבילה בפונגצידים על שכיחות ריקבונות טבעיים המתפתחים לאחר אחסון ועל אוכלוסייה מיקרוביאלית בעוקצי פירות מגו 'קיטי'. א. אחוז ריקבונות העוקץ שהתפתחו לאחר אחסון בקור (CS) למשך 21 יום ב 12 מ"צ ולאחר שבוע נוסף בתנאי חיי מדף ב (SL) 20 מ"צ. ב. אחוז הפירות עם ריקבונות צד שהתפתחו לאחר 21 ימי אחסון בקור (CS) ולאחר שבוע בחיי מדף (SL) ולאחר 8 ימים נוספים בתנאי חיי מדף (SL+8) ג. הרכב האוכלוסייה המיקרוביאלית בעוקצי מגו 'קיטי' לאחר שבוע בחיי-מדף, אשר בודדה וזוהתה לאחר גידול על PDA.



השפעת יישום חומרי הדברה באופן שיטת יישום

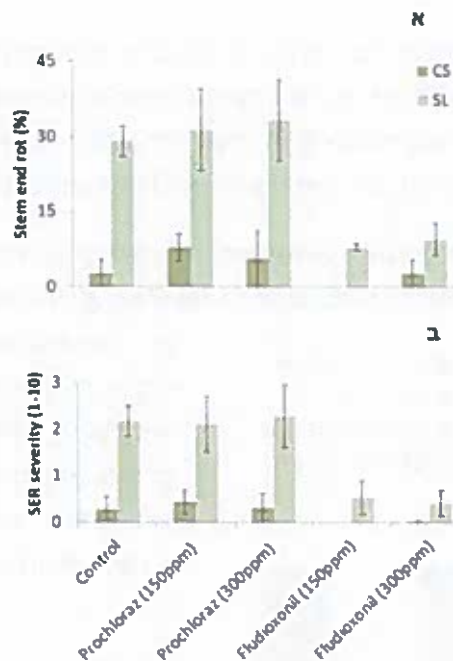
מסחרית על הופעת ריקבונות טבעיים בפירות מגו 'קיטי' לא מאולחים

פרוכלורז מיושם בארץ בסביבה חומצית (Prusky et al., 2006) בעוד שפלודיאוקסוניל נהוג ליישם בשטיפה חמה ב 50°C (Schirra et al., 2005).

בכדי לבחון האם לשיטת היישום יש השפעה על יעילות הפונגצידים יושומו הפעם הפונגצידים בצורת כפרוכלורז-חומצי וכפלודיאוקסוניל-חם בריכוזים שונים בפירות מגו 'קיטי'. לאחר טבילה, הפירות אוחסנו בקור למשך שלושה שבועות בדומה למקובל בתעשייה (12 מ"צ).

לאחר הוצאה מקירור, המשך הטיפול כלל אחסון לשבוע בתנאי חיי מדף (20°C). בעוד שבטיפול הביקורת הופיעו ריקבונות צד ב 15% מהמקרים, בכל הטיפולים שנערכו עם הפונגצידים לא נמצאו פירות עם ריקבונות צד (תוצאות לא מוצגות). בניסוי זה נצפה כי לאחר האחסון, בטיפול הביקורת ובטיפולי בפרוכלורז, התגלו כ 30 אחוזים של פירות עם ריקבונות עוקץ (איור 6). אולם, נראה כי

פלודיאוקסוניל-חם בשני הריכוזים שנבדקו עיכב באופן משמעותי את שכיחות רקבונות העוקץ לכעשרה אחוזים מהפירות בהשוואה לטיפול הביקורת והפרוכלורז (איור 6). בנוסף, פלודיאקסיניל סייע בעיכוב חומרת ריקבונות העוקץ באופן מובהק לעומת הטיפול בפרוכלורז והביקורת לאחר אחסון וחי-מדף (איור 6ב). חשוב לציין, ששני הפונגצידים עיכבו באופן מוצלח מאוד עד כדי 0% את הופעת ריקבונות הצד הנגרמים בעיקר על ידי הפטרייה *Alternaria*. ההבדלים המשמעותיים מוצגים גם בתמונות מייצגות להמחשה (איור 6ג).



איור 6. השפעת פרוכלורז-חומצי ופלודיאוקסוניל-חם לאחר קטיף על רקבונות עוקץ טבעיים בפירות מנגו 'קיטי'. א. שכיחות ריקבונות העוקץ (באחוזים) לאחר טבילה בפלודיאוקסוניל-חם ובפרוכלורז-חומצי בריכוזים של 150 ו 300 ppm לאחר אחסון בקור (CS) ולאחר שבוע בחי-מדף (SL). ב. חומרת ריקבונות העוקץ (אינדקס 0-10) לאחר אחסון בקור ולאחר תוספת חי מדף. ג. תמונות מייצגות של פירות ביקורת שאוחסנו בקור ובחי מדף (תמונה עליונה), פירות אשר טופלו בפרוכלורז 150 ppm (תמונה אמצעית) ופירות אשר טופלו בפלודיאוקסוניל 150 ppm (תמונה תחתונה).

סיכום חלק א:

חומרים להשראת עמידות אינם בעלי יכולת עיכוב של רקבונות העוקץ הנובעים מהדבקה בלסיודיפלודיה באופן מספק. לכן, הטיפול האפקטיבי צריך עדיין לכלול יישום של פונגצידים כימיים. פלודיאוקסוניל הינו אמצעי הדברה מוצלח ביותר להפחתת רקבונות עוקץ בפירות מנגו, הנגרמים ע"י הפטרייה *L. theobromae*, שמהווה את הפתוגן המשמעותי הגורם לרקבונות עוקץ בישראל. אך כנגד הפטרייה *C. gloeosporioides* שמהווה פתוגן משמעותי בפירות מנגו באזורים טרופיים נמצא פרוכלורז כיעיל ביותר. טיפול לאחר קטיף בפלודיאקסיניל נמצא כחומר היעיל ביותר בעיכוב חומרת ושכיחות ריקבונות עוקץ מאילוח טבעי במטע.

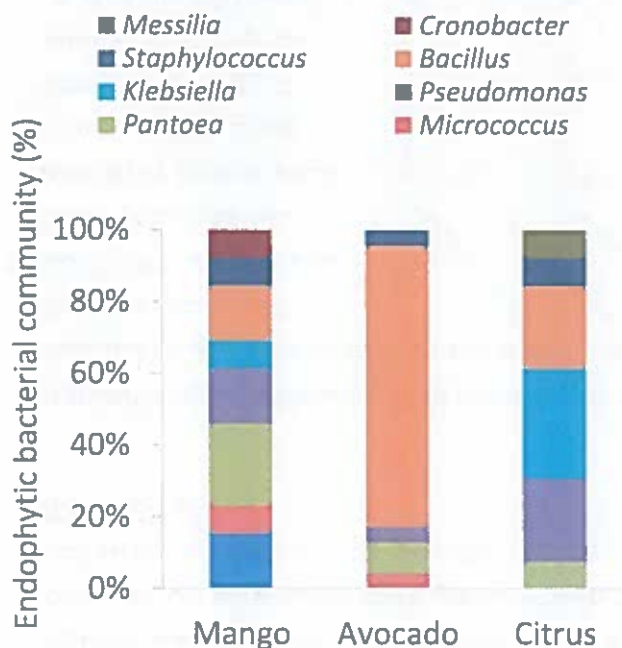
חלק שני: הדברה ביולוגית

בידוד ואפיון חיידקים מעוקצי פירות

מחקרים קודמים שנערכו במטרה למצוא מיקרואורגניזמים בעלי פעילות אנטגוניסטית לפטריות פתוגניות באחסון התמקדו במיקרואורגניזמים אפיפיטיים. משמע, מיקרואורגניזמים המאכלסים את פני שטח הצמח והפרי. מחקרים אחרים התמקדו במיקרואורגניזמים אשר מאכלסים את אזור בית השורשים. במחקר הנוכחי ההתמקדות חלה במיקרואורגניזמים אנדופיטיים אשר מאכלסים את רקמת עוקצי פירות המנגו, האבוקדו וההדרים.

תחילה בודדו כ-127 חיידקים אנדופיטיים מעוקצי פירות מנגו, אבוקדו והדרים. עוקצי הפירות חוטאו חיצונית ונטחנו במים מעוקרים, הרקמה הטחונה פוזרה על גבי מצע LB. חיידקים אנדופיטיים אשר הצליחו לגדול על גבי צלחות עם מצע מזון עשיר (LB) הוגדרו באופן פנוטיפי ובאופן מולקולרי תוך שימוש ב-Polymerase Chain Reaction (PCR) עם תחלי 16S (איור 7).

סוגי החיידקים אשר בודדו מעוקצי הפירות סווגו לתשעה סוגים עיקריים, כאשר הסוגים העיקריים שבודדו היו: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea* ו-*Pseudomonas*. ניתן לראות כי קיים שוני משמעותי



באוכלוסייה שבודדה מהעוקצים של הפירות השונים (איור 7). ניתן לראות כי בעוקצי אבוקדו, החיידקים השולטים המבודדים השתייכו לסוג ה-*Bacillus*. גם בעוקצי המנגו וההדרים אחוז נכבד מהחיידקים המבודדים השתייכו לסוג ה-*Bacillus*.

איור 7. התפלגות סוגי חיידקים בעוקצי פירות. אפיון מולקולרי של חיידקים אשר בודדו ממיצוי עוקצי פירות של מנגו, אבוקדו והדרים לאחר גידול החיידקים על צלחות פטרי עם מצע עשיר (LB) המעודד גידול חיידקים.

בחינת פעילות אנטגוניסטית של חיידקים כנגד פטריות פתוגניות

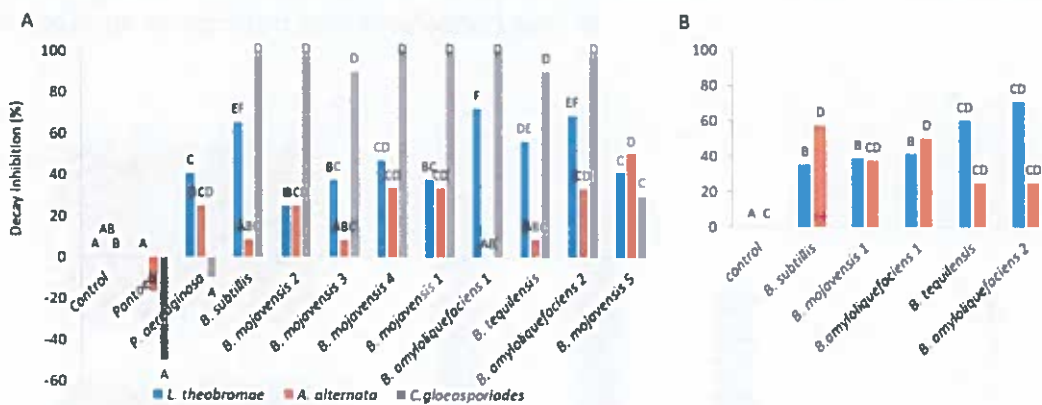
לאחר בידוד ואפיון החיידקים האנדופיטיים מעוקצי הפירות, נבחנה פעילותם האנטגוניסטית של החיידקים השונים (מעל מאה חיידקים) כנגד פטריות פתוגניות מרכזיות הגורמות לרקבנות לאחר קטיפה, על גבי צלחות פטרי (*in vitro*). בהמשך, נבחנה פעילות החיידקים המצטיינים כנגד הפטריות

הפתוגניות המשמעותיות לכל פרי (*in vivo*). מנגו- *Lasiodiplodia theobromae* או *Alternaria alternata*. אבוקדו- *Colletotrichum gloeosporioides*. הדריס- *Penicillium digitatum*.

בחינת פעילות אנטגוניסטית של חיידקים כנגד פטריות פתוגניות על גבי צלחות *in vitro*

רקבונות על גבי פירות באחסון יכולים לבוא לידי ביטוי בעוקץ הפרי ועל פני שטח הפרי. תחילה נבחנו פעילות החיידקים האנדופיטיים שבודדו מעוקצי פירות כנגד פטריות פתוגניות אשר בדרך כלל גורמות לרקבונות בעוקצי פירות כגון *Lasiodiplodia theobromae* וכנגד פטריות אשר לרוב, באות לידי ביטוי על פני שטח הפרי כגון *Colletotrichum gloeosporioides* ו- *Alternaria alternata*, *Phomopsis mangiferae*. עיכוב הפטריות הפתוגניות על ידי החיידקים נבחן על גבי צלחות אשר הכילו מצע עשיר. לבחינת עיכוב הפטריות נמדד קוטר מושבת הפטרייה. בהמשך נערכה השוואה בין קוטר מושבת הפטרייה בטיפול החיידק לעומת קוטר מושבת הפטרייה בטיפול הביקורת, ללא נוכחות חיידק.

מעניין לציין, כי רוב החיידקים אשר בודדו לא הראו פעילות עיכוב משמעותית כנגד הפתוגניים הפטרייתיים. עם זאת, כעשרה חיידקים מהסוג בצילוס הראו פעילות טובה בעיכוב הפתוגניים (איור 8).



איור 8. אחוז עיכוב התפתחות פטריות פתוגניות על ידי חיידקים אנדופיטיים על גבי מצע עשיר. A. 13 החיידקים (מתוך 48) אשר היו בעלי הפעילות האנטגוניסטית המשמעותית ביותר כנגד הפטריות הפתוגניות, *Lasiodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*. B. אחוז עיכוב גידול תפטריות הפתוגניות *L. theobromae*, *A. alternata*, על ידי חמשת החיידקים המצטיינים. אותיות שונות מייצגות מובחנות (p < 0.05).

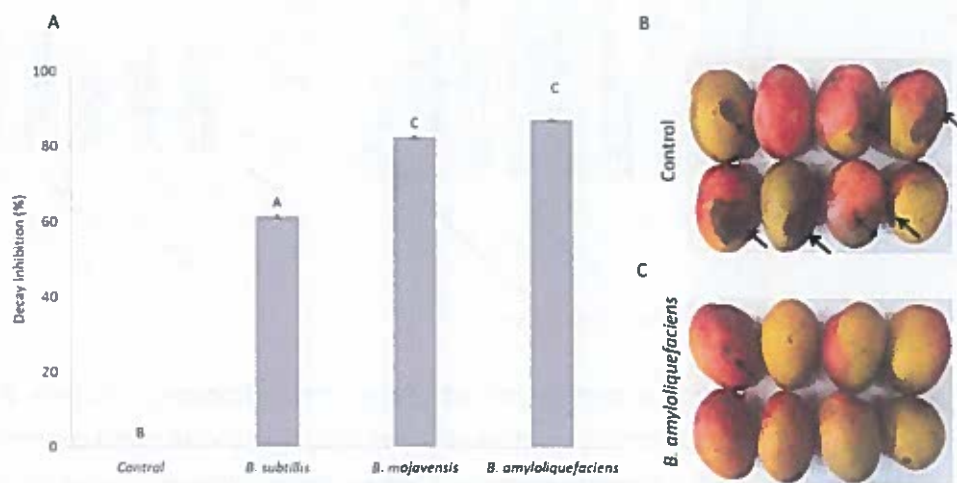
פעילות החיידקים הנבחרים כנגד הפטריות הפתוגניות המרכזיות בפירות מנגו

לאחר שיכלול התוצאות, נבחרו שלושה חיידקים אשר היו בעלי פעילות אנטגוניסטית משמעותית כנגד שתי הפטריות: *L. theobromae*, *A. alternata*. החיידקים שנבחרו היו: *B. subtilis*, *B. mojavensis* 1 ו- *B. amyloliquefaciens* 1.

פעילותם האנטגוניסטית של שלושת החיידקים נבחנה על גבי פירות מנגו כנגד פטריות פתוגניות מרכזיות באחסון: *L. theobromae* ו-*A. alternata*. מבחנים אלו נערכו באמצעות פציעת הפירות באופן מבוקר והדבקתם בתמיסת נבגי חיידקים ולאחר יום בתמיסת נבגי פטריות. פעילות החיידקים נבחנה עם וללא החומרים המופרשים מהם. פעילותם האנטגוניסטית של החיידקים נמדדה על ידי עיכוב קוטר הרקבון והוגדרה כאחוז ביחס לביקורת (איורים 9-10).

בחינת פעילותם האנטגוניסטית של חיידקי הבצילוס המצטיינים כנגד הפטרייה לסיודיפלודיה (*Lasiodiplodia theobromae*) בפירות מנגו

בבחינת האנטגוניזם של חיידקי הבצילוס הנבחרים כנגד הפטרייה *Lasiodiplodia theobromae* בפירות מנגו 'שלי' בשל בהדבקת צד, פירות המנגו חוררו בשלוש נקודות בהיקף הפרי וטופלו ב 10^8 CFU של נבגי חיידקים בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל. תוצאות הניסוי הוצגו בצורת אחוז עיכוב הטיפול מיקרוליטר של נבגי פטרייה בריכוז של 10^8 CFU. לאחר כ-24 שעות הודבקו הפצעים ב 10^6 מיקרוליטר של נבגי פטרייה בריכוז של 10^6 נבגים למ"ל. תוצאות הניסוי הוצגו בצורת אחוז עיכוב הטיפול מהביקורת. ניתן לראות כי שלושת חיידקי הבצילוס שנבחנו היו בעלי פעילות אנטגוניסטית מובהקת כנגד הפטרייה (איור 9). החיידקים *B. amyloliquefaciens* ו-*B. mojavensis* הראו את פעילות העיכוב הטובה ביותר של הפתוגניות של *L. theobromae* (איור 9).

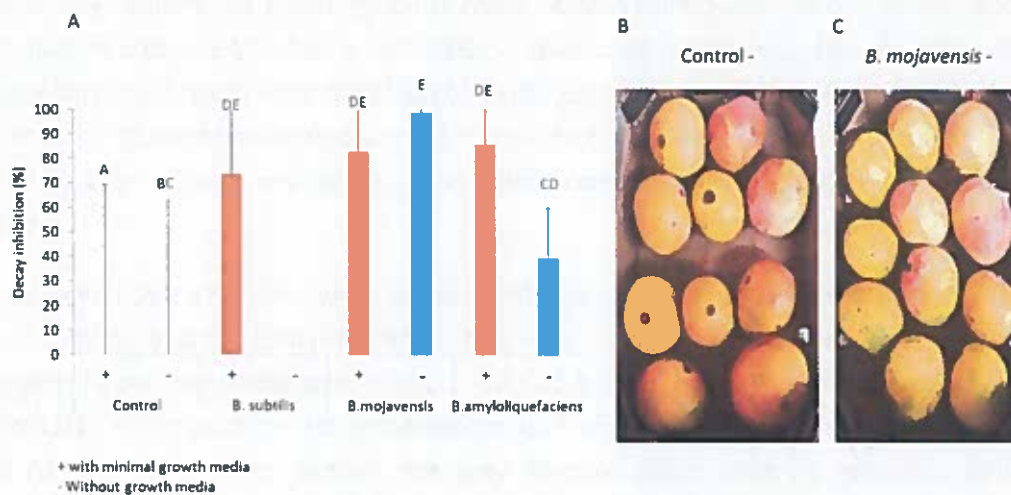


איור 9. עיכוב התפשטות הריקבון אשר נגרם על ידי הפטרייה *L. theobromae* במנגו באמצעות שלושת חיידקי בצילוס מצטיינים. A. עיכוב ריקבון ביחס לביקורת. B. תמונה מייצגת של פירות מקבוצת הביקורת. C. תמונה מייצגת של פירות אשר טופלו בחיידק *B. amyloliquefaciens*. אותיות שונות מייצגות מובהקות ($p < 0.05$).

בחינת פעילותם האנטגוניסטית של חיידקי הבצילוס המצטיינים כנגד הפטרייה אלטרנריה (*Alternaria alternata*) בפירות מנגו

פעילותם האנטגוניסטית של חיידקי הבצילוס נבחנה כנגד הפתוגן הפטרייתי *A. alternata* עם (+) וללא (-) החומרים המופרשים מהחיידקים. פירות המנגו חוררו בשלוש נקודות בהיקף הפרי וטופלו ב 20

מיקרוליטר של נבגי חיידקים בריכוז של $CFU=10^8$ למייל ללא מצע (-) או עם מצע הגידול שלהם (החומרים המופרשים; +). לאחר כ-24 שעות הודבקו הפצעים ב 10 מיקרוליטר של תמיסת נבגי פטריה בריכוז 10^6 למייל. ניתן לראות כי החיידקים *B. mojavensis* ו-*B. amyloliquefaciens* הראו פעילות אנטגוניסטית משמעותית כנגד הפתוגן הפטרייתי, עם וללא חומרים מופרשים (איור 10). *B. subtilis* הראה פעילות אנטגוניסטית מובהקת בנוכחות חומרים מופרשים בלבד. כמו כן, חשוב לציין כי מלבד החיידק *B. mojavensis* אשר הראה פעילות טובה מעט יותר ללא החומרים המופרשים, בשאר המקרים הפעילות האנטגוניסטית הטובה יותר הייתה בנוכחות החומרים המופרשים מהחיידק במצע הגידול (איור 10). בנוסף, ניתן לראות כי לא הייתה שונות רבה בין פעילותם של שלושת החיידקים כאשר יושמו יחד עם החומרים המופרשים מהם (+).



איור 10. עיכוב התפשטות הריקבון אשר נגרם על ידי הפטרייה *A. alternata* בפירות מנגו ישלי באמצעות שלושה חיידקי בצילוס ללא מצע (-) או עם מצע הגידול שלהם (החומרים המופרשים; +). **A.** עיכוב ריקבון כאחוז מהביקורת. **B.** תמונה מייצגת של פירות מקבוצת הביקורת, ללא טיפול בחיידקים. **C.** תמונה מייצגת של פירות אשר טופלו בחיידק *B. mojavensis* ללא החומרים המופרשים. אותיות שונות מייצגות מובהקות ($p < 0.05$).

סיכום פרק ב:

מבין אוכלוסיית החיידקים שבדדו בעוקצי המנגו, נימצא אחוז גדול של חיידקים המשתייכים לסוג ה *Bacillus*. כעשרה חיידקים מהסוג בצילוס הראו פעילות ביולוגית טובה בעיכוב הפתוגנים הנפוצים במנגו- *Lasiodiplodia theobromae* או *Alternaria alternata* ו-*Colletotrichum gloeosporioides*. שלושה חיידקי בצילוס (*B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. amyloliquefaciens*) נמצאו כיעילים ביותר כנגד הפתוגנים פטרייתיים בפירות מנגו *A. alternata* ו *L. theobromae*.

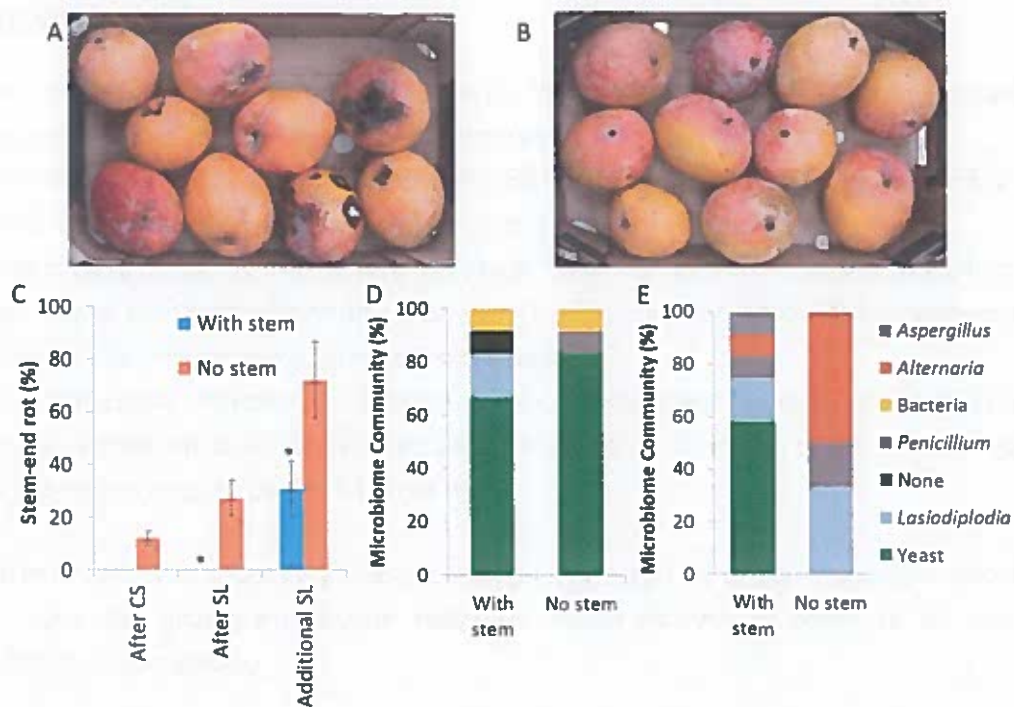
פרק שלישי: בחינת יעילות הקטיף עם עוקץ קצר.

כיום נהוג לתלוש את הפרי בקטיף, ולכן רוב פירות המנגו נשארים ללא עוקץ. תוצאות ראשוניות הראו כי פירות יקיטי וישלי אשר נקטפו עם עוקץ קצר (0.5 ס"מ) הראו פחיתה משמעותית בכמות רקבונות העוקץ.

לאחרונה אופיין במעבדתנו מגוון המיקרואורגניזמים (פטריות וחידקים) החיים בעוקץ פרי מנגו ישלי אשר נקטף עם עוקץ קצר או ללא עוקץ על גבי צלחות המכילות מצע עשיר. הפירות לא אולחו בפתוגניים (חמישה ארגזי ייצוא לטיפול), אחרי אחסון ב 12 מ"צ למשך שלושה שבועות ותוספת חיי מדף. הפירות נבחנו למדדי הבשלה של קושי ושינוי צבע ולא נראה הבדל בין הפירות (תוצאות לא מוצגות).

כבר בהוצאה מאחסון נמצא רקבון קל באזור העוקץ כבעשרה אחוזים מהפירות ללא העוקץ, ומספרם עלה בשהייה ב 20 מ"צ (חיי המדף), בעוד שבפירות שנקטפו עם העוקץ הקצר לא נראה רקבון לאחר אחסון בקור וחיי מדף ורק אחרי תוספת ימים בחיי מדף נצפה רקבון עוקץ קל (אחרי 10 ימים ב- 20 מ"צ) (איור 11C). תוצאות דומות התקבלו בבדיקת רקבונות הצד (תמונות באיור 11A,B). כך ניתן להסיק כי קטיף עם עוקץ של מספר מילימטרים, משרה עמידות בפרי ומעכב רקבון צד ועוקץ במהלך האחסון והשיווק.

לאחר קטיף ולאחר חיי מדף - עוקצי פירות מהקטיף עם וללא העוקץ נשטפו חיזונית ועברו חיטוי חיזוני. מעוקצים בודדו מיקרואורגניזמים על גבי מצע עשיר. התוצאות מראות כי לאחר קטיף האוכלוסיות בשני סוגי העוקצים היו דומות ובריאות עם ריבוי של שמרים אשר אינם גורמים לרקבונות (איור 11D). יחס דומה נמצאה גם בפירות שאוחסנו עם העוקצים לאחר שלושה שבועות אחסון ותוספת של חיי מדף, אך בפירות שנקטפו ללא עוקץ השתלטו בעיקר הפטריות הפתוגניות למנגו - *Lasiodiplodia theobromae* ו *Alternaria alternata* (איור 11E). תוצאה שנמצאה בקורלציה עם עליה משמעותית בכמות רקבונות העוקץ באחסון.



איור 11. השפעת קטיף עם או ללא עוקץ על אחוזי רקבונות העוקץ שהתפתחו לאורך שלושה שבועות אחסון בקור (12°C) ותוספת של שבוע או עשרה ימים בחיי מדף (20°C). A-B תמונה מייצגת של פירות ללא עוקץ (A) או עם עוקץ (B) אחרי חיי מדף. C אחוזי הפירות עם רקבון עוקץ אחרי האחסון (After CS) אחרי חיי מדף (After SL) ולאחר מספר ימים נוסף בתנאי חיי מדף (Additional SL). D. התפלגות אוכלוסיית המיקרואורגניזמים באזור העוקץ מיד לאחר הקטיף, E. התפלגות אוכלוסיית המיקרואורגניזמים באזור העוקץ אחרי אחסון וחיי מדף.

סיכום חלק ג:

קטיף של פרי עם עוקץ, משרה עמידות בפני פתוגנים. אוכלוסיית מיקרואורגניזמים בעוקץ המנגו מושפעת מאורך העוקץ ועי"י השארת עוקץ באורך של מספר מ"מ ניתן להפחית באופן משמעותי ביותר את הרקבונות אשר מתפתחים באחסון גם בצד הפרי וגם בעוקץ.

סיכום כללי

1. טבילה ב'סקולר' לאחר קטיף הייתה יעילה יותר מהטבילה הנהוגה כיום ב'ספורטק' בהפחתת רקבונות בפירות מנגו הנגרמים ע"י הפתוגנים השכיחים בארץ ישראל (אלטרנריה ולסיודיפלודיה).
2. טיפולים שונים יכולים לשנות את הרכב האוכלוסייה בעוקצי הפירות, ככה אולי נוכל בעתיד לשנות את האוכלוסייה כדי להפחית פתוגנים ולהגביר את השכיחות של מיקרואורגניזמים ידידותיים.
3. קטיף מנגו עם עוקץ קצר (0.5 ס"מ) מיתן את השינוי לאורך זמן באוכלוסיית המיקרואורגניזמים בעוקצי הפירות. כך האוכלוסייה הייתה בריאה יותר ופתוגנית פחות דבר שהוביל לפחית משמעותית ביותר בהצטברות רקבונות העוקץ אשר מתפתחים באחסון.
4. בדדו חיידקי בצילוס ידידותיים מעוקצי פירות. נמצא כי לחיידקים אלו יש פעילות הדברה ביולוגית טובה כנגד פטריות פתוגניות אשר תוקפות פירות מנגו באחסון וגורמות לרקבונות. כך טיפולים בחיידקים הפחיתו רקבונות באחסון של פירות מנגו.

מחקר זה הראה כי ניתן להפחית את השכיחות והעוצמה של רקבונות העוקץ בפירות מנגו ע"י טיפולים לאחר קטיף אשר קוטלים את הפטריות הפתוגניות בדרכים ביולוגיות או כימיות או ע"י שינוי האוכלוסייה המיקרוביאלית.