

## בחינת הקשר בין מדדים ויזואלים של עץ הרימון ומחלת הריקבון הפנימי

### בפירות

מוגש למועצת הצמחים ענף רימון

על ידי

דוד עזרא ודני שטיינברג המחלקה למחלות צמחים וחקר העשבים, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, בית דגן.

David Ezra Department of Plant Pathology and Weed Research, ARO, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet-Dagan Israel 50250

E-mail: [dezra@volcani.agri.gov.il](mailto:dezra@volcani.agri.gov.il)

יצחק קוסטו שה"מ.

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.**

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא / לא**

חתימת החוקר \_\_\_\_\_ תאריך: שבת התשע"ז, ינואר 2017

## הצגת הבעיה:

בשנים האחרונות חלה עלייה בהיקף הפגיעה בפירות רימון ממחלת הריקבון השחור הפנימי (Heart rot) הנגרמת על ידי הפטרייה *Alternaria alternata* במטע, בכל הזנים. ההפסד הכספי העלול להיגרם כתוצאה מאיבוד הפרי חשוב, אך גם הפגיעה במוניטין האיכותי של המוצר הישראלי נפגע. בשל הנזק ארוך הטווח יש לפתח בהקדם דרכים שיאפשרו להתמודד ביעילות עם הבעיה. בעבודה שביצענו במימון המדען בשנים 2010 עד 2013 הגדרנו את גורם המחלה ואת האפדימיאולוגיה שלו במטע. נמצא כי גורם המחלה הפטרייה *Alternaria alternata* חודרת לפרחים מיד עם פתיחתם, אך נשארת במצב רדום במגורה התחתונה של הפרי עד לתחילת הבשלת הפרי אז היא מתפתחת וגורמת לריקבון בכל הפרי. בנוסף, ממצאים ראשוניים הראו קשר בין מצב דרגת הצימוח של העצים, עומס היבול וגודל הפרי לשכיחות הפירות עם הריקבון הפנימי. הנחת העבודה: העומדת בבסיס הצעת מחקר זו היא שהמצב הפיזיולוגי של העצים הוא הגורם המרכזי המשפיע על התפתחות מחלת הריקבון הפנימי בפירות. הנחה זו מתבססת על העובדה שניתן לבודד את גורם המחלה ממרבית הפרחים/הפירות המתפתחים על העצים. מכאן עולה שתנאי הסביבה ונוכחות מידבק לא הגבילו את עצם התרחשות ההדבקה ואת איכלוס הפירות. אנו מניחים שהמצב הפיזיולוגי של העצים ושל הפירות המתפתחים עליהם הם אלה הקובעים אם הפוטנציאל להתפתחות הריקבון. יעדי המחקר לשנת הדיווח: 1. פיתוח מבחני מעבדה (*in vitro*) להערכת הרגישות של גרגרי הרימון מפירות בריאים להדבקה על ידי נבגי הפטרייה 2. פיתוח מבחן מעבדה (*in vitro*) להערכת יכולת נביטה של נבגי הפטרייה בנוכחות מיץ מגרגרי רימון לאחר טיפולים שונים כמדד להשפעתו על התפתחות המחלה.

## מבוא

הרימון (*Punica granatum* L.) נמנה על משפחת הרימוניים (Punicaceae) הכוללת סוג זה בלבד. הרימון הינו עץ עתיק מאוקלם היטב באזורנו, הוא מצוי בארץ כגידול תרבותי יותר מ 5000 שנה. רוב הפגעים במטע נגרמים על ידי חרקים. עם זאת, ישנן מחלות פטריות בעלות השפעה במטע לפני הקטיף, ביניהן מחלת הנקודות השחורות ברימון שהוגדרה ונמצאת בישראל. מחלה זו נגרמת על ידי הפטרייה *A. alternata*, האחראית גם למחלת הריקבון הפנימי ברימון, אך אינה פוגעת בפנים הפרי וברקמה הנאכלת. ריקבון פנימי (Heart rot) כתוצאה *Alternaria* sp. הינה מחלה המופיעה הן במטע והן באחסון שלאחר קטיף. פירות נגועים מראים שינוי קל בצבע הקליפה והשחרה מאסיבית של פנים הפרי. המחלה מתפתחת עוד בהיות הפרי על העץ. בריקבון פנימי המתפתח כתוצאה מהדבקה בפטריית ה *Alternaria* הריקבון מתפתח על הגרגירים ואינו פוגע במזוקארפ (תמונה 1).



תמונה מספר 1. ריקבון שחור הנגרם על ידי *Alternaria alternata* בפרי רימון. א. התבטאות המחלה על פני הפרי. ב. הריקבון בתוך הפרי

במחלה זו הפטרייה מתפתחת על הגרגירים בתוך הפרי כשבסופו של דבר כל פנים הפרי נרקב אך אין פריצה אל מחוץ לקליפת הפרי והפרי נראה מבחוץ בריא לעין לא מאומנת. ישנם תסמינים חיצוניים למחלה זו כדוגמת צבע פרי מודגש, משקל חסר של הפרי ועיוותים מסוימים של הפרי המרמזים על כך שהפרי נגוע בפנים. מחלת הריקבון השחור ברימון אינה מהווה, בדרך כלל, בעיה קשה במטעים ומוערך כי היא פוגעת רק ב 1-5% מהתוצרת הכללית. נהוג לסווגה כמחלה של לאחר קטיף שכן באחסון הפרי לאורך זמן יש עליה בפגיעתה בפירות המאוחסנים. המגדלים והעובדים בקטיף יודעים בדרך כלל לזהות פירות נגועים יחסית בקלות ולכן רק מעט מפירות אלה מגיעים לבתי האריזה. עם זאת, בשנים האחרונות ישנה עלייה בהיקף הפגיעה ממחלה זו בפרי, במטע. היות והרימון הינו פרי המיועד לייצוא, ההפסד הכספי העלול להיגרם כתוצאה מאיבוד פרי הינו גדול. עד היום לא נמצא פתרון הדברתי יעיל למחלה לא בהתפתחותה במטע ולא באחסון. היות ומקובל היה בארץ כי מחלת הריקבון הפנימי ברימון נגרמת על ידי קומפלקס פטריות המורכב מ *Alternaria* sp. ו- *Aspergillus* sp. חשוב היה להגדיר מיהו גורם המחלה ולכן בעבודה שבוצעה במימון המדען (2010-2013) בדקנו מיהו גורם המחלה. על פי הממצאים שלנו *Alternaria alternata* הינה גורם המחלה הגורם לריקבון פנימי של הגרגירים. בנוסף נלמדה האפידמיולוגיה של המחלה והוגדרה הדרך בה מתרחשת ההדבקה והמחלה מתפתחת בפרי. במהלך

העבודה הועלתה ההשערה שבשל העובדה שמרבית הפירות במטע מאולחים ומאוכלסים על ידי הפטרייה כבר בפריחה אך רק באחוז יחסית קטן שלהם נמצאת הפטרייה במגורות התחתונות ויותר מכך באחוז עוד יותר קטן מתפתחת בסופו של דבר המחלה, כנראה שישנה מעורבות של הצמח בקביעת מי מבין הפירות יפתח את המחלה ואיזה מהם יישארו בריאים. בנוסף בחנו את ההשפעה של גודל הפרי לסבירות שיתפתח בו ריקבון פנימי ומצאנו שהפירות הקטנים פגיעים פחות מאשר הפירות הגדולים. ממצאי מחקר זה הצביעו על קשר אפשרי בין מצב דרגת הצימוח של העצים לשכיחות הפירות עם הריקבון הפנימי: בעצים עם צימוח נמרץ שכיחו הפירות עם הריקבון הפנימי הייתה גבוהה במובהק משכיחותם בעצים עם צימוח בינוני או צימוח מוגבל. בהצעת מחקר זו אנו מבקשים לבחון את האפשרות שהמצב הפיזיולוגי של העצים (המאופיינים על ידי עוצמת הצימוח שלהם ועומס היבול המתפתח עליהם) וגודל הפירות הינם גורמים מרכזיים בהתפתחות ריקבון פנימי בפירות.

הנחות היסוד ויעדי המחקר: ההנחה העומדת בבסיס הצעת מחקר זו היא שהמצב הפיזיולוגי של העצים הוא הגורם המרכזי המשפיע על התפתחות מחלת הריקבון הפנימי בפירות. הנחה זו מתבססת על העובדה שניתן היה לבודד את גורם המחלה ממרבית הפרחים/הפירות המתפתחים על העצים. מכאן עולה שתנאי הסביבה ונוכחות מידבק לא הגבילו את עצם התרחשות ההדבקה ואת איכלוס הפירות. אנו מניחים שהמצב הפיזיולוגי של העצים ושל הפירות המתפתחים עליהם הם אילה הקובעים אם הפוטנציאל להתפתחות הריקבון (=נוכחות הפטרייה בתוך הפירות) יתממש בפועל (=יתפתח ריקבון פנימי). למיטב הבנתנו יחסי המקור-מבלע בעצים משפיעים על התגובה הפיזיולוגית של העצים לגורם המחלה: בעצים הנמצאים בצימוח נמרץ (ושיש עליהם עומס יבול נמוך) הסבירות להתפרצות המחלה בפירות גבוהה יותר מאשר בעצים הנמצאים בצימוח מוגבל (ושיש עליהם עומס יבול רב). כמובן ששתי תכונות אלה (עוצמת צימוח ועומס יבול) מנוגדות זו לזו. מכאן עולה שבשנים עוקבות התגובה של עצים בודדים למחלה עלולה להשתנות ממצב של עמידות למצב של רגישות, בהתאם לסירוטיות בעוצמת הצימוח ובעומס הפרי.

### **יעדי שנת המחקר הנוכחית:**

בכדי שנוכל באופן איכותי וכמותי לקבוע מדדים הקשורים ביכולת המחלה להתפתח בפירות התרכזנו השנה בפיתוח 1. מבחני מעבדה (*in vitro*) להערכת הרגישות של גרגירי הרימון מפירות בריאים להדבקה על ידי נבגי הפטרייה 2. פיתוח מבחן מעבדה (*in vitro*) להערכת יכולת נביטה של נבגי הפטרייה בנוכחות מיץ מגרגירי רימון לאחר טיפולים שונים כמדד להשפעתו על התפתחות המחלה.

**מבחני מעבדה (*in vitro*) להערכת הרגישות של גרגירי הרימון מפירות בריאים להדבקה על ידי נבגי הפטרייה**

בכדי שנוכל לבחון את השפעתם של גורמים שונים וליצור מדד מעבדתי לרגישותם של פירות לגורם המחלה פיתחנו מבחן המתבסס על הדבקת גרגירים שנלקחו מפירות בריאים בתנאי מעבדה

והערכת התפתחות המחלה על גרגרים אלה. הרעיון נובע מכך שהרקמה הנדבקת בפרי במחלה הינה הגרגירים בלבד. מבחן כזה יאפשר לנו לבחון את מידת הקשר בין מדדים שונים של הטיפול בעצים (חשיפה לשמש, רמת השקיה, צורת גידול, שיטות גיזום, מתן תוספת אלמנטים שונים, ועוד) לרגישות הפירות במבחן המבוסס על פירות בריאים!

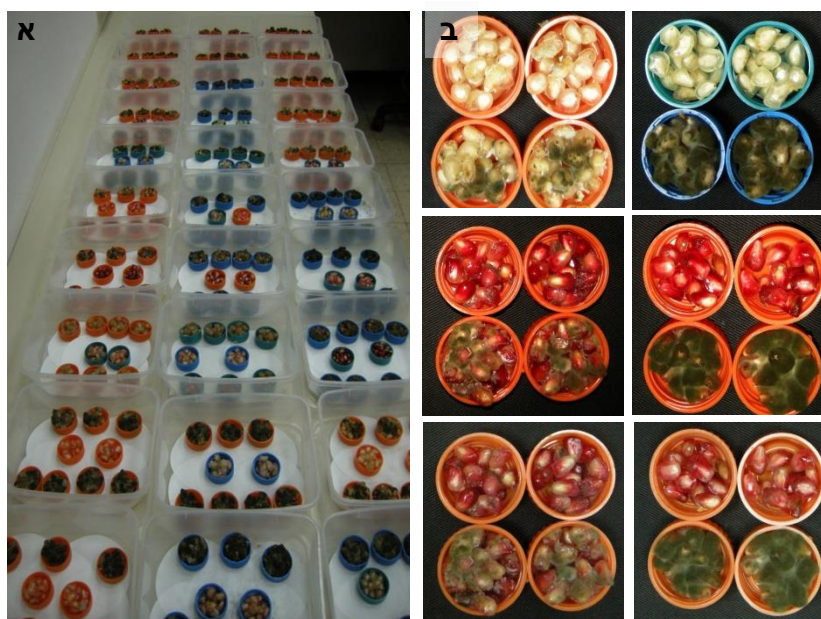
במבחן זה פירות בריאים נאספו מהמטע והובאו למעבדה במכון וולקני. הפירות הוכנסו לכלי עם תמיסת כלור 3% למשך שלוש עד חמש דקות ומיד לאחר מכן נשטפו פעמיים במים מזוקקים על ידי הכנסתם לכלי עם מים מזוקקים למשך חמש דקות. הפירות הסטרילים נחתכו לאורכם וגרגרי הפרי השלמים הועברו לצלחות עד לשימוש. גרגרי רימון שמקורם מפרי בודד הושמו בכלי בעל נפח מוגדר ואולחו בנבגי הפטרייה. הפטרייה שהינה תרבית מנבג בודד של פטרייה שמקורה ברקבון שחור מפרי נגוע גודלה על גבי מצע מזון מסוג PDA (מצע תפוח אדמה) למשך כשבועיים לפני שהנבגים גורדו מהתפטיר. גירוד הנבגים בוצע על ידי הוספת נפח ידוע של מים סטרילים (כחמישה מ"ל) גירוד התפטיר בעזרת קיסם אוזניים סטרילי, איסוף תרחיף הנבגים וסינונו דרך שלוש שכבות של גאזה סטרילית ולאחר מכן קביעת מספר הנבגים למ"ל תרחיף. כמות הנבגים הותאמה על ידי מיהול בעזרת מים לרמה של  $5 \times 10^3$  ורוססה על הגרגירים. שיעור הריקבון בוצע כל יום לאחר האילוח, תוך שימוש בסולם בעל שש דרגות (איור מספר 1).



איור מספר 1. מבחן ביולוגי לקביעת התגובה של פירות רימון לגורם מחלת הריקבון השחור הפנימי.

גרגרי רימון שנלקחו מפרי בודד הוכנסו לכלי בעל נפח מוגדר. הגרגרים אולחו עם נבגי הפטרייה *A. alternata* ונשמרו בתנאי לחות בטמפרטורה של 20 מעלות למשך 4-6 ימים. ההתפתחות של תפטיר הפטרייה על הגרגירים נקבעה באמצעות סולם הערכה בן שש דרגות כאשר: דרגה 1 = לא התפתח כלל תפטיר על הגרגרים; דרגה 6 = הגרגרים היו מכוסים בתפטיר סבוך של הפטרייה.

לאחר פיתוח ראשוני של שיטה זו בחנו את תגובתם של גרגירי רימון מקוים שונים לפטרייה (תמונה 2).



**איור מספר 2. הבדלים בתגובה של פירות רימון מקוים/זנים שונים לפטרייה *A. alternata***  
 א. מראה כללי של הניסוי.

ב. תגובה של ששה קווים/זנים שונים לגורם המחלה. שני הכלים העליונים בכל תמונה לא אולחו בנבגי הפטרייה (היקש) ושני הכלים התחתונים אולחו בגורם המחלה. שלושת הקווים שהתמונות שלהם בצד שמאל עמידים יחסית לגורם המחלה בעוד ששלושת הקווים שהתמונות שלהם בצד ימין רגישים לגורם המחלה.

מהתוצאות ראינו שאפשר להשתמש בשיטה זו בכדי לבחון את תגובת הגרגירים, כלומר הפירות, וללמוד על הסבילות שלהם לגורם המחלה וההשפעה על התפתחותו על הגרגירים.

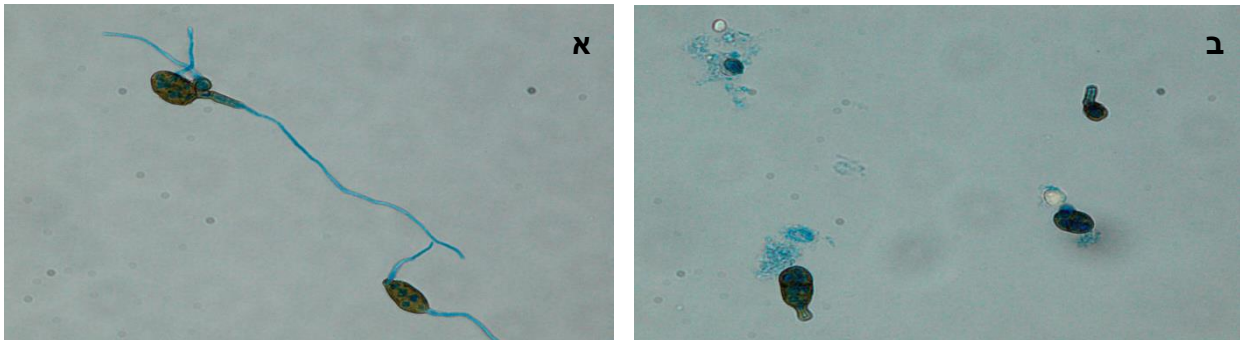
**2. פיתוח מבחן מעבדה (*in vitro*) להערכת יכולת נביטה של נבגי הפטרייה בנוכחות מיץ מגרגירי רימון לאחר טיפולים שונים כמדד להשפעתו על התפתחות המחלה.**

למרות הצלחת השיטה הראשונה שתוארה החלטנו שאנו רוצים לפתח שיטה שתהיה יותר כמותית ולכן עלה הרעיון להשתמש במיץ מגרגירי הרימון כבסיס להנבטת נבגי הפטרייה ולבחינת השפעת המיץ מפירות שונים מקוים/זנים שונים על מספר הנבגים הנובטים.

בשיטה זו בדומה לשיטה הראשונה שתוארה פירות בריאים שהובאו ממטעים למעבדה בוולקני עברו סטריליזציה (כפי שתואר למעלה). לאחר מכן גרגירים הועברו לגאזה סטרילית ונסחטו על ידי הפעלת כח סיבובי על הגאזה. המיץ הועבר למבחנות 50 מ"ל ונשמר בהקפאה לאורך זמן או שימש באופן מידי למבחנים שיתוארו לעיל.

על זכוכית נושא של מיקרוסקופ הושמו 10 מיקרוליטרים של מיץ שנסחט מרימון בודד ולצידם 10 מיקרוליטרים מים סטרילים. אל שתי הטיפות הוספו 10 מיקרוליטר תרחיף נבגים שהוכן בדומה למה שתואר למעלה. הטיפות כוסו בזכוכית מכסה והזכוכיות הועברו לקופסת פלסטיק בנפח 1

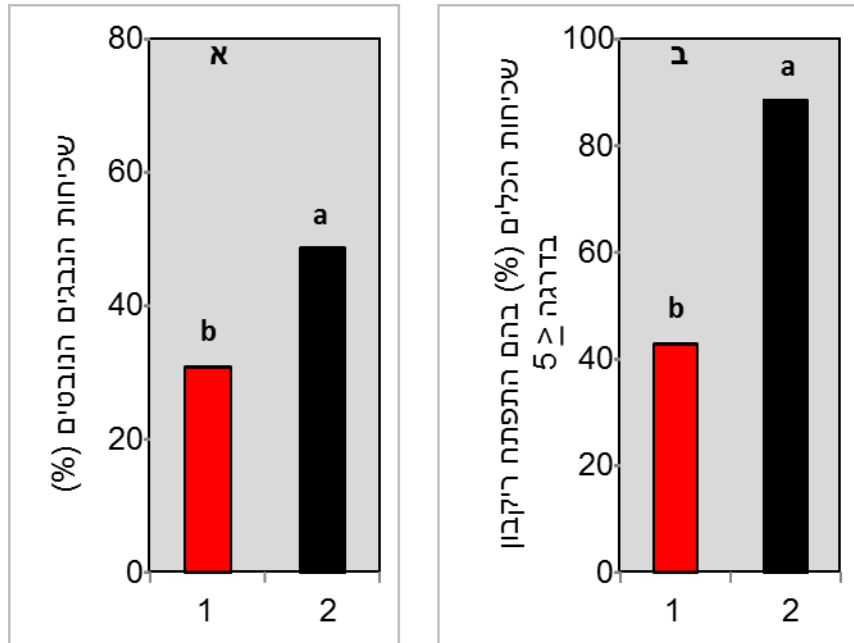
ליטר סגורה שבתוכה נייר ספוג במים ליצירת לחות. הזכוכיות נשמרו בצורה זו למשך 6 שעות שמיד לאחריהן הוסף לכל טיפה צבע (cotton blue) שתפקידו לעצור את המשך תהליך הנביטה של הנבגים ולצבוע את הרקמה הפטרייתית בדוגמא. מספר הנבגים שנבטו תועד בכל דוגמא (איור 3)



**איור מספר 3. מבחן ביולוגי לקביעת התגובה של פירות רימון לגורם מחלת הריקבון השחור הפנימי.**

מיץ נסחט מפרי רימון בודד. נבגי הפטרייה *A. alternata* הוספו למיץ ולאחר 6 שעות הוסף cotton blue. שכיחות הנבגים הנובטים נקבעה תחת מיקרוסקופ (בהגדלה של  $\times 100$ ) א. נבגים נובטים. ב. נבגים לא נובטים.

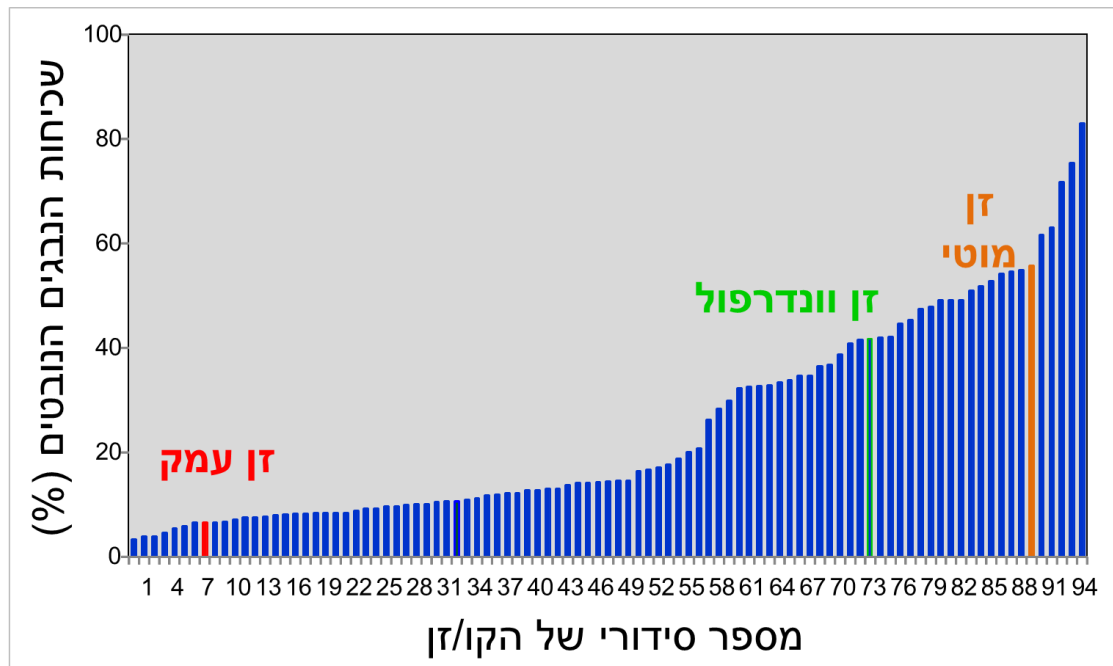
כדי לבחון האם ניתן להשתמש במבחנים אלה לאיתור הבדלים ברגישות בין עצים מאותו רקע גנטי דגמנו פירות **בריאים** מענפים שהיו עליהם רק פירות בריאים ומענפים שהיו עליהם גם פירות נגועים. באמצעות שני המבחנים הביולוגיים שפיתחנו הצלחנו לאפיין הבדלים בין שתי קבוצות הענפים. היו הבדלים בשכיחות נביטת נבגים בין מיץ שנסחט מפירות שמקורם בענפים שגדלו עליהם רק פירות בריאים לבין מיץ שנסחט מפירות שמקורם בענפים שגדלו עליהם פירות נגועים (איור מספר 4א). היו גם הבדלים במידת ההתפתחות של תפטיר הפטרייה על הגרגירים של הפירות משתי הקבוצות (איור מספר 4ב).



**איור מספר 4. רגישות פירות שנקטפו ממתע מסחרי של מושבי הנגב מענפים בהם היו רק פירות בריאים (טיפול 1, עמודות אדומות) ומענפים בהם היו פירות נגועים (טיפול 2, עמודות שחורות). רגישות הגרגרים לגורם המחלה נקבעה בניסוי מעבדה בשיטת נביטת הנבגים (איור א) ובהערכת הריקבון של הגרגרים (איור ב). ערכי עמודות שלידן אותיות שונות שונים זה מזה במובהק ברמת מובהקות  $P < 0.05$ .**

בנוסף, השתמשנו במבחן הנבגים שפיתחנו כדי לבחון האם יש הבדלים בתגובה של פירות רימון בריאים מקוים זנים שונים לגורם המחלה. לשם כך דגמנו פירות רימון מעצים הגדלים באוסף הגנטי הנמצא במרכז מחקר נווה יער. נדגמו פירות מ-95 זנים וקווי רימון שונים הכלולים באוסף. הקווים/זנים שונים זה מזה בתכונות שונות ובכלל זה צבע הפרי והגרגרים, מועד ההבשלה, גודל הפירות, ועוד ועוד. באמצעות המבחן הביולוגיים שפיתחנו הצלחנו לאפיין הבדלים בתגובת הקווים/זנים לנביטת נבגים של הפטרייה במיץ שנסחט מהפירות (איור מספר 5)





**איור מספר 5.** הבדלים בתגובה של פירות רימון שנדגמו מקווים/זנים הגדלים באוסף הגנטי בנווה יער לפטרייה *Alternaria alternata*. נבגי הפטרייה הוספו למיץ שנסחט מפרי בודד ולאחר מכן נקבעה שכיחות הנבגים הנובטים. הקווים/זנים מסודרים לפי סדר הנביטה מהעמיד ביותר (בצד שמאל) לרגיש ביותר (בצד ימין).

## דיון

מתוצאות הניסויים אנו רואים כי שתי השיטות שפיתחנו לבחינת הערכת הרגישות של גרגרי הרימון מפירות בריאים להדבקה על ידי נבגי הפטרייה ולהערכת יכולת נביטה של נבגי הפטרייה בנוכחות מיץ מגרגרי רימון עובדות. שיטות אלה יאפשרו לנו בהמשך לבחון האם טיפולים שונים או שוניים הקיימים בפרדסים/עצים שונים מהווים גורם משפיע על התפתחות המחלה בפירות. שני המבחנים שפיתחנו מאפשרים לאפיין את התגובה של פירות רימון לפטרייה המחוללת את מחלת הריקבון השחור הפנימי. היתרון הגדול של המבחנים הוא השימוש **בפירות בריאים**. אנו רואים מהניסויים הראשוניים שביצענו ומתוארים בדוח זה שקיימים הבדלים ברגישות של פירות רימון של קווים/זנים שונים לפטרייה *A. alternata*. נראה שהבסיס להבדלים אלה הוא גנטי. כמו כן אנו רואים שקיימים הבדלים ברגישות של פירות רימון שגדלו על ענפים שונים של אותו העץ לפטרייה *A. alternata*. נראה שהבסיס להבדלים אלה הוא פיזיולוגי.