

משרד החקלאות  
ופיתוח הכפר



## מו"פ ערבה דרומית דו"ח מסכם לשנת 2018

מספר מחקר: 94-12-0001

**שם התוכנית:** לימוד ואפיון המיקרוביום של פרי תמר מג'הול לאחר גדיד ובמהלך אחסון וחיי מדף, ופיתוח אמצעים להדברה ביולוגית של גורמי זיהום וריקבון.

מספר מוקד פנימי: 82349

חוקר ראשי: יערה דנינו

סטטוס התכנית: נמשכת

מועד התחלה וסיום התוכנית: 2017-2019

תוכן עניינים:

- א. מבוא ..... 2
- ב. מהלך העבודה ושיטות עבודה ..... 2-4
- 1.1 מבחני עיכוב גידול פטריות פתוגניות ע"י חיידקים ושמרים בצלחות ..... 2-3
- 1.2 מבחני עיכוב הדבקה והתפתחות הפטריה *Aspergillus niger* בפירות בוסר צהובים על ידי שמרים וחיידקים ..... 3
- 1.3 השפעת הריסוס בשמר *Metschnikowia fructicola* בזמן הפריחה על אכלוס ונגיעות פרי התמר ב- *Aspergillus niger* ..... 3-4
- ג. תוצאות ביניים ..... 4-8
- 2.1 בחינת פעילות אנטגוניסטית של חיידקים כנגד פטריות פתוגניות *in vitro* ..... 4-5
- 2.2 בחינת פעילות אנטגוניסטית של שמרים כנגד פטריות פתוגניות בפירות בוסר צהובים *in vivo* ..... 5-6
- 2.3 השפעת הריסוס בשמר *Metschnikowia fructicola* בזמן הפריחה על נגיעות פרי התמר ב- *Aspergillus niger* ..... 6-8

ד. ההתקדמות במחקר שחלה ממועד כתיבת הדו"ח האחרון.....8

ה. פעילויות שנעשו במו"פ במהלך התקופה.....8

ו. מסקנות, בעיות שהתעוררו והמלצות להמשך המחקר או שינוי במחקר.....8-9

**א. רקע קצר, תיאור הבעיה ומטרות המחקר:** ענף התמר הינו מענפי המטע החשובים בארץ; היקף ייצור התמרים עומד על 50,000 טון בשנה ומגלגל מעל 800 מיליון ש"ח. הענף מרכזי מדרום הכנרת לאורך עמק הירדן, בקעת הירדן והערבה. זן התמר המוביל ביצוא הינו 'מג'הול'. ישראל מחזיקה ב-75% מהשוק העולמי של תמר מג'הול.

נכון להיום לא נערך בארץ מחקר מקיף בנושא המיקרוביום של פרי מג'הול. הפרי מאוחסן בקירור לפרקי זמן ארוכים לפני שיווקו, ובהגיעו לחנויות שוהה על המדף ללא קירור. הפרי נאכל כמות שהוא עם הקליפה, אינו נשטף כלל או נשטף קלות לפני האריזה והשיווק. כיום אין חומר כימי או ביולוגי מורשה לשימוש לטיפול בגורמי זיהום וריקבון של הפרי לאחר גדיד. העדר חומר חיטוי מורשה מקשה על שיווק המג'הול העסיסי, ועוד יותר על האפשרות לשווק מוצר פרי מג'הול לח (סופר עסיסי) המותנית בטיפול מניעתי ובעיכוב התפתחות של מיקרואורגניזמים (מ"א) לפני האחסון ואחריו. עד היום לא נמצא פתרון משביע רצון, ובטמפרטורת החדר משך חיי המדף של פרי זה הוא ימים בודדים. זמינות של תכשירים אנטי מיקרוביאליים טבעיים ויעילים המאושרים לשימוש במזון הנצרך כמות שהוא תתרום משמעותית לרווחיות הענף. מטרת התכנית המוצעת היא פיתוח ויישום שיטות להדברה ביולוגית של המזהמים המיקרוביאליים הנפוצים בפירות המג'הול לאחר הגדיד שיבטיחו עמידות של מוצרי הפרי השונים ('מג'הול' עסיסי ולח) באחסון וחיי מדף.

## **ב. מהלך המחקר ושיטות העבודה (תכנון לעומת ביצוע):**

שתי מטרות המחקר לשנת 2018 הן-

1. איתור מדביר/ים ביולוג/ים מתוך המיקרופלורה הטבעית של הפרי מג'הול למניעת התפתחות פתוגנים.

2. בדיקת שיטות שונות ליישום הדברה ביולוגית בפרי מג'הול.

### **1.1 מבחני עיכוב גידול פטריות פתוגניות ע"י חיידקים ושמרים בצלחות**

לאחר בידוד כלל המקרוביום של הפרי בשלבי התפתחות והבשלה שונים בשיטות קלאסיות ואיפיונם בשיטות מולקולריות (עבודה שנעשתה בשנה א') נבדקה היכולת האנטגוניסטית של חיידקים ושמרים שבודדו מהמיקרוביום של הפרי כנגד שתי הפטריות הפתוגניות *Aspergillus niger* (*A.niger*) ו-*Penicillium expensum* (*P.expensum*) בצלחות. בבדיקה מקדימה נמצא שמיני השמרים השונים אינם מראים תגובה אנטגוניסטית כלשהי

כנגד הפטריות בצלחות ולכן המחקר בהמשך התמקד רק בחיידקים בעלי יכולת אנטגוניסטית. עיכובה של הפטרייה הפתוגנית על ידי החיידקים המבודדים בריכוז  $10^9$  נבחן בעזרת שתי דיסקיות עליהן נזרעו 100 מיקרוליטר של תרחיף נבגי פטריה ו-100 מיקרוליטר של תרחיף חיידקים אשר הונחו על גבי מצע PDA והועברו לאינקובציה של 5-10 ימים ב-28 מ"צ. לבחינת עיכוב הפטרייה נמדד גודל הפטרייה מחצי הקוטר של דיסקית הפטרייה עד סיום צמיחת התפטיר לכיוון דיסקית החיידק. בהמשך נערכה השוואה בין קוטר מושבת הפטרייה בנוכחות החיידק לעומת קוטר מושבת הפטרייה בטיפול הביקורת (ללא נוכחות חיידק).

### **1.2 מבחני עיכוב הדבקה והתפתחות הפטרייה *Aspergillus niger* בפירות בוסר צהובים על ידי שמרים וחיידקים**

בבדיקות הקדמיות בפרי בשל נמצא שהפירות אינם מתנגעים בפטרייה *A. niger* גם בתנאים מיטביים ואילו פירות בוסר (צהובים) מתנגעים בקלות ב-*A. niger* כאשר מאחסנים אותם בתנאי לחות וטמפרטורה מתאימים גם ללא הדבקה. לכן בניסוי עצמו לא היה צורך לאלח את פירות הבוסר לפני הטיפול בשמרים וחיידקים בעלי פוטנציאל הדברה. הניסויים בפירות מג'הול נעשו בשתי עונות גדיד 2017 ו-2018. הפירות נחצו לשניים בעזרת סכין סטרילי, הגרעין הוצא והם הונחו במגש עם 12 שקעים כך שפני הפרי מופנים כלפי מעלה. הפירות החתוכים הוטבלו למספר שניות בתמיסות חיידקים ושמרים בריכוזים שונים ( $10^5$ - $10^9$  תאים/מ"מ). בטיפול הביקורת הוטבלו הפירות במים מזוקקים סטריליים בלבד. הפירות במגשיות יובשו במנדף ואח"כ הוכנסו לקופסאות פלסטיק והונחו בחדר בטמפרטורה של 28 מ"צ. מידי יום נבדק מספר הפירות הנגועים בפטרייה הפתוגנית.

### **1.3 השפעת הריסוס בשמר *Metschnikowia fructicola* בזמן הפריחה על אכלוס ונגיעות פרי התמר ב-*Aspergillus niger***

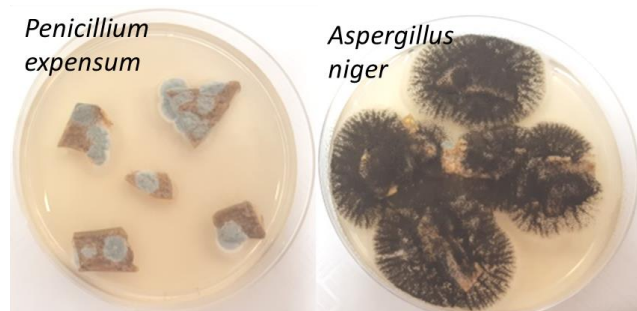
הניסוי במטע התקיים במקביל בארבעה מטעים: חוות-עדן, גלגל, חצבה ויטבתה. הניסוי היה דו-גורמי כשהגורם הראשוני היה אילוח בנבגי אספרגילוס בשלב הפריחה. חלק מהאשכולות אולחו בריסוס תרחיף נבגים בריכוז  $10^5$  עד נגירה וחלק רוססו במים מזוקקים. הגורם השני היה הדבקה בתאי שמר *Metschnikowia fructicola*. לאחר 12 שעות ממועד האילוח רוססו חלק מהאשכולות בתאי השמר בריכוז  $10^8$  (למעט מטע יטבתה). כך קיבלנו 4 טיפולים: פרי מאולח ומודבק, פרי מאולח לא מודבק, פרי מודבק ולא מאולח, פרי ללא טיפול (היקש). בכל מטע נבחרו 10 עצים בוגרים. לכל טיפול היו 10 חזרות (אשכולות). הבחירה לאלח ולהדביק בשלב הפריחה נבעה מהידיעה שבמטע יש נבגי אספרגילוס בכל השנה ואבקת התמרים עצמה מכילה נבגי אספרגילוס. מטרת הניסוי בפרי אם כן הייתה כפולה, ראשית לבחון את ההשערה שהפרי נדבק בפטרייה *Aspergillus niger* כבר בשלב הפריחה

ושנית לבדוק האם טיפול בשמר המסחרי *Mschnikowia fructicola* יכול להפחית את שיעור האכלוס והנגיעות בפתוגן בשלבי התפתחות שונים של הפרי. נלקחו דוגמאות פרי בארבעה שלבי התפתחות (חנט, ירוק, צהוב, בשל) ומארבעה מטעים (חוות עדן, גלגל, חצבה ויטבתה). דוגמאות של פירות הובאו למעבדה, חלקי הפרי הופרדו, נחתכו לחתיכות קטנות של 1 סמ"ר והונחו בצלחות פטרי על מצע PDA ו-0.025 גר' כרומפניקול. התוצאות נותחו באמצעות תוכנות אקסל ו-JMP. מבחני מובהקות סטטיסטית נעשו בעזרת שיטת Tukey HSD.

ג. תוצאות ביניים :

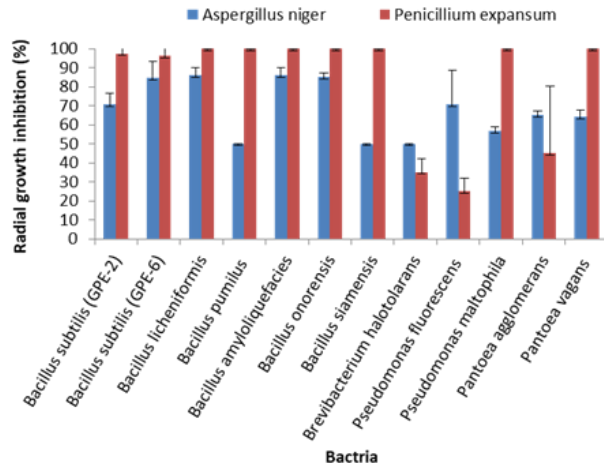
## 2.1 בחינת פעילות אנטגוניסטית של חיידקים כנגד פטריות פתוגניות *in vitro*

לאחר בידוד ואפיון החיידקים האפיפיטים והאנדופיטיים מפירות בשלבי הבשלה שונים נבחנה על גבי צלחות פטרי פעילותם האנטגוניסטית של 240 חיידקים (שוודא שאינם קשורים למחלות בני אדם) נגד שתי פטריות פתוגניות מרכזיות בתמרים: *Penicillium expansum* ו-*Aspergillus niger* (תמונה מס' 1), הגורמות לרקבונות לאחר קטיף בתמר.



תמונה מס' 1. שתי הפטריות הפתוגניות *Penicillium expansum* ו-*Aspergillus niger* שבודדו מקליפת פרי תמר מזן מג'הול על גבי מצע PDA

חיידקים שהראו פעילות אנטגוניסטית גבוהה במבחנים בתרבית נבחרו להמשך המחקר של הפעילות אנטגוניסטית בפרי. באיור מס' 1 מוצגות יכולות העיכוב של 11 סוגי חיידקים. ארבעה ממיני ה-*Bacillus sp.* הראו יכולות עיכוב גבוהות כנגד שתי הפטריות הפתוגניות. כאשר נבדקה יכולתם האנטגוניסטית של אותם חיידקים בפירות, לא נצפה כל עיכוב לאחר חמישה ימי אינקובציה. אי לכך לא תוצג בדו"ח הפעילות של חיידקים על פטריות פתוגניות בפרי.

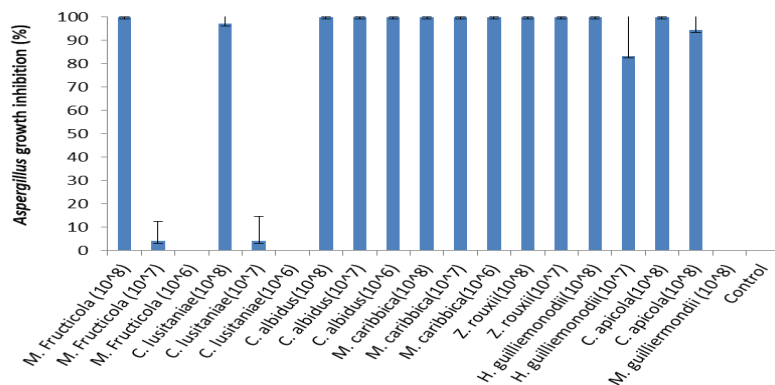


**איור מס' 1:** עיכוב בגידול שתי פטריות פתוגניות *Aspergillus niger* ו- *Penicillium expansum* על ידי חיידקים שבודדו מהפרי. הבדיקות נעשו כמפורט בסעיף 1.1. עיכובה של הפטרייה הפתוגנית על ידי החיידקים המבודדים בריכוז  $10^9$  נבחן על גבי מצע PDA לאחר אינקובציה של 5-10 ימים ב-28 מ"צ. לבחינת עיכוב הפטרייה נמדד גודל הפטרייה מחצי הקוטר של דיסקית הפטרייה עד סיום צמיחת התפטיר לכיוון דיסקית החיידק. בהמשך נערכה השוואה בין קוטר מושבת הפטרייה בנוכחות החיידק לעומת קוטר מושבת הפטרייה בטיפול הביקורת, ללא נוכחות חיידק. הערכים המוצגים הם ממוצע של אחוז עיכוב גידול תפטיר הפטריות הפתוגניות בשלוש חזרות על ידי 11 החיידקים.

## 2.2 בחינת פעילות אנטגוניסטית של שמרים כנגד פטריות פתוגניות בפירות בוסר צהובים *in vivo*

בבדיקה של פעילות שמרים כנגד *P. expansum* ו-*A. niger* על גבי מצע מזון PDA לא נראה כל עיכוב. כך גם בעיכוב הפטריות מהפרשת חומרים נדיפים המופרשים מהשמרים. בניסויים שנעשו לבחינת פעילות אנטגוניסטית של תבדידי השמרים נגד הדבקת פירות התמר ב-*P. expansum* ו-*A. niger* התקבלו רמות שונות של עיכוב (איור מס' 2). נבדקו שבעה מינים של שמרים שבודדו מפירות בשלבי הבשלה שונים והם: *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus albidus*, *Meyerozyma guilliemondii*, *Meyerozyma caribbica*, *Hanseniaspora guilliemondii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida apicola* בכמה ריכוזים והשמר *Metschnikowia fructicola* שפותח לתכשיר מסחרי בשם "שמר". לשם כך, הפירות הצהובים נחתכו לשני חצאים בתנאים סטריליים והוטבלו למשך שתי שניות בתמיסה מימית של תאי השמרים והונחו במגשיות עם שקעים. לאחר הדגרה של 10 ימים ב-25 מ"צ נבדק שיעור ההדבקה הטבעית בפטריית העובש השחור של רקמות הפרי הפנימיות. השמר *Meyerozyma guilliemondii* לא הראה יכולות עיכוב כלשהן גם בריכוז  $10^8$  תאים למ"ל. השמרים *Metschnikowia fructicola*, *Candida apicola*, *Hanseniaspora guilliemondii*, *Clavispora lusitaniae* בריכוז גבוה של  $10^8$  עכבו את ההדבקה של פטריית העובש השחור בכ-100%. בריכוזים נמוכים יותר העיכוב פחת; בריכוז  $10^7$  אחוז העיכוב ירד משמעותית בשמרים *Metschnikowia*

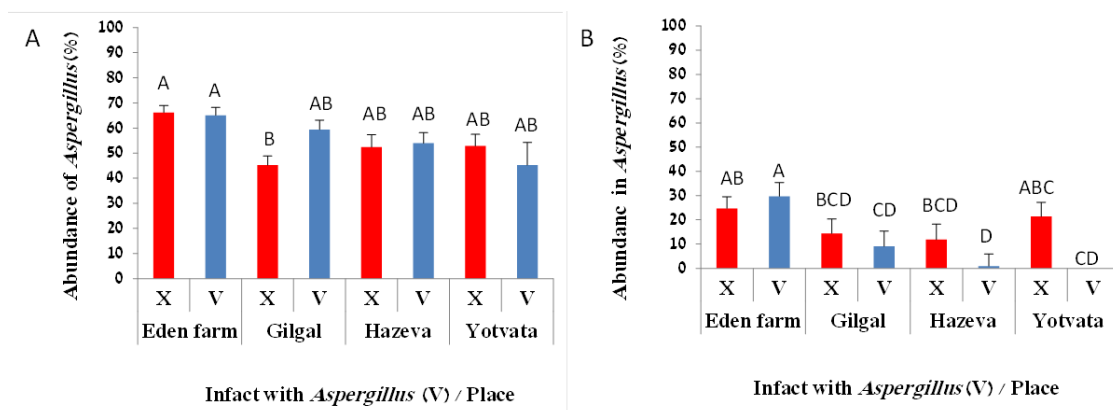
*Hanseniaspora clavispora lusitaniae, fructicola* ובשמרים ל-4.2%,  
*Candida apicola, guilliemonodii* ל-83.3% ו-94.4% בהתאמה. לעומתם  
*Zygosaccharomyces rouxii* ו-*Cryptococcus albidus*, *Meyerozyma caribbica*  
מנעו באופן מוחלט את ההתפתחות של תפטיר הפטרייה גם בריכוזים נמוכים יותר שנבדקו  
(10<sup>6</sup>).



**איור מס. 2:** עיכוב צמיחת תפטיר של פטריית *Aspergillus niger* בפרי תמר בוסר צהוב מזן מג'הול לאחר טיפול בשמונה סוגי שמרים בכמה ריכוזים. כל פרי שהתנגע בעובש שחור סומן כנגוע. הערכים המוצגים הם ממוצעים וסטיית התקן של 4-10 חזרות לכל טיפול, בכל חזרה 6 חצאי פרי.

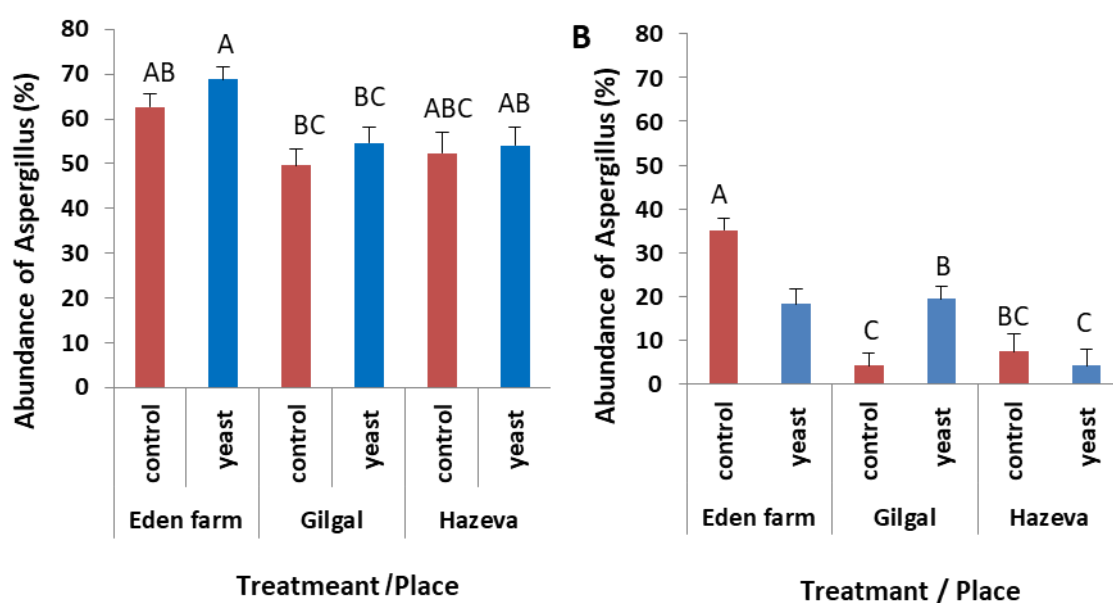
### 2.3 השפעת אילוח ב- *Aspergillus niger* וריסוס בשמר *Metschnikowia fructicola* בזמן הפריחה על נגיעות פרי התמר ב- *Aspergillus niger*

השפעת אילוח - איור מס. 3 מציג את רמות האכלוס של *A. niger* בקליפה (A) ובציפה (B) בפירות מארבעת המטעים שנבחנו. מהשוואה בין פרי שאולח *A. niger* בזמן הפריחה וטיפול ההיקש לא התקבל הבדל משמעותי באכלוס בקליפה בכל אחד מהמטעים. נמדדו הבדלים בין המטעים. האכלוס ב- *A. niger* בצפת הפרי היה נמוך באופן משמעותי מזה שבקליפת הפרי. גם בציפה לא העלה האילוח את האכלוס ב- *A. niger*; להיפך, במטעי יטבתה, חצבה וגלגל פרי שלא אולח היה מאוכלס יותר בפטרייה.



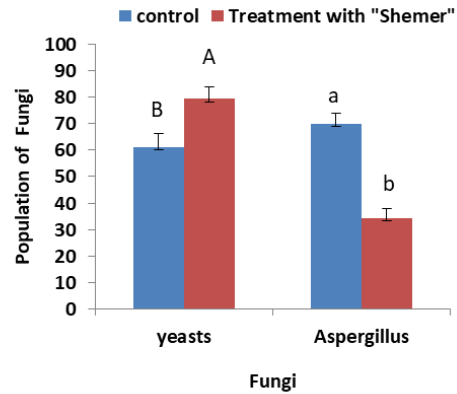
איור מס. 3 רמת האכלוס ב-*A. niger* בקליפה (A) ובציפה (B) של פרי מאולח ב-*A. niger* (כחול V) ושל פרי היקש (אדום X) בארבעה מטעים. הערכים מוצגים כממוצע וסטיית התקן. אותיות שונות מייצגות הבדלים מובהקים ( $p < 0.05$ ).

טיפול בשמר - חלק מהאשכולות של הפרי בשלושה מטעים הודבקו בשמר מסחרי *Mschnikowia fructicola* בנוסף לאילוח בפתוגן. התוצאות מוצגות באיור מס. 4. בשני מטעים, גלגל וחצבה, לא נמצא הבדל בין פרי שטופל בשמר לבין טיפול היקש על רמת אוכלוסיית הפתוגן *A. niger* בקליפה (A) ובציפת הפרי (B). מנגד, בחוות עדן נמדדה רמת אכלוס נמוכה יותר בציפת הפרי שטופל בשמר בהשוואה לטיפול היקש, 18.3% ו-35.2% בהתאמה. גם במטע זה לא נראתה השפעה כלשהי ליישום השמר על אכלוס הפרי באספרגילוס בקליפת הפרי.



איור מס. 4 רמת האכלוס באספרגילוס בקליפה (A) ובציפה (B) של פרי מטופל בשמר *M. fructicola* (כחול V) ושל פרי לא מטופל (אדום X) בארבעה מטעים בבדיקה בצלחות פטרי עם מצע PDA וכרומופניקול. הערכים מוצגים כממוצע וסטיית התקן. אותיות שונות מייצגות הבדלים מובהקים ( $p < 0.05$ ).

כמו כן, נמצא שכמות השמרים הכללית בציפת הפרי הבשל בשני הגדידים האחרונים בחוות עדן הייתה גבוהה יותר בטיפול בשמר מאשר בהיקש, 79.4% ו-61.3% בהתאמה, ובמקביל, הטיפול בשמר הוריד בכ-50% את אכלוס הפרי ב-*A. niger* בהשוואה לטיפול ההיקש, 34.4% ו-70% בהתאמה (איור מס. 5). בקליפת הפרי לא נמצאו הבדלים.



איור 5.05 רמת האכלוס (%) של פטריית *A. niger* וכלל מיני השמרים בציפת פרי בשל מגדידים מאוחרים בחוות עדן בטיפול ב'שמר' ובהיקש. הערכים מוצגים כממוצע וסטיית התקן. אותיות שונות מייצגות הבדלים מובהקים ( $p < 0.05$ ).

#### ד. ההתקדמות במחקר שחלה ממועד כתיבת הדו"ח האחרון :

בודדו ונבחנו כמה סוגי שמרים בעלי הדברה ביולוגית כנגד פטריית *Aspergillus niger* בפרי בוסר. נבדקה רמת האכלוס והנגיעות של פירות בשלבי הבשלה שונים מניסוי אילוח ב-*Aspergillus niger* של פירות בשלב הפריחה על העץ במספר מטעים בארץ. נבדקה השפעת הדבקה בשמר מסחרי *Mschnikowia fructicola* על אכלוס ונגיעות ב-*Aspergillus niger* של פירות בשלבי הבשלה שונים.

ה. פעילויות שנעשו במו"פ במהלך התקופה : התוצאות הוצגו בישיבות חוקרים ומול נציגי קק"ל ומכון וולקני במסגרת המו"פ.

ו. מסקנות, בעיות שהתעוררו והמלצות להמשך המחקר או שינוי במחקר: מאחר ונמצא שפרי תמר מזן מג'הול בשל, בשלבי בוחל וצמל (עסיסי ויבש). אינו נדבק בפטרייה *A. niger* גם בתנאים מיטיביים (טמפרטורה של 30 מ"צ ולחות גבוהה 90% >) אין בעיה של הדבקה בפתוגן באחסון ובחיי מדף. בעבודה זו נבדקו מועד האכלוס ומועד הופעת תסמיני המחלה בפטרייה בשלבי הבשלה שונים על גבי צלחות פטרי וע"י אילוח ב-*A. niger* והדברה בשמר מסחרי *M. fructicola* כבר בשלב הפריחה על העץ. המסקנה העיקרית היא שפרי מג'הול לא מתאלח בשלב הפריחה אלא בשלב מאוחר יותר, וכן שהפרי מפתח תסמיני מחלה רק בשלב התפתחות מאוחר יחסית, מראשית ההבחלה (שינוי צבע מצהוב לחום) עד סיום ההבחלה. בשנה הקרובה ננסה לזהות את המוקד ואת מועד ההדבקה באספרגילוס במהלך הגידול. מסקנות נוספות מתוצאות הניסויים עד כה מראות שהחידקים שערכו ברמת *in vitro* לא היו יעילים במידה מספקת בעיכוב התפתחות העובש של הפטרייה בפירות שנגדדו בוסר מהעץ. לעומתם נמצאו כמה סוגי שמרים בעלי יכולת הדברה טובה בפרי בוסר צהוב. השמר המסחרי *M. fructicola* שאינו מהווה חלק מהמיקרוביום של הפרי רוסס במטע בשלב



הפריחה ונמצא יעיל חלקית. נראה שיש מקום לבחון שוב את יעילות השמר המסחרי ושמרים נוספים שבודדו מהמיקרוביום של הפרי במסגרת מחקר זה בריסוס במטע בשלבי התפתחות או הבשלה מאוחרים יותר. נראה שיש הבדלים ברגישות לפתוגן בין המטעים השונים. בדיקות הקדמיות בשימוש במי אוזון לצמצום המ"א על גבי הפרי הבשל בבית האריזה הצביעו על שיפור באיכות הפרי בחיי מדף. התוצאות לא היו עקביות ולכן יש צורך בהגדלת היקף הפרי והקפדה על ריכוז מי האוזון בניסויים על מנת לברר את יעילות הטיפול. השנה נאספו ונשמרו דוגמאות פרי מהניסוי במטעים ובכוונתנו לאפיין את המיקרוביום של הפרי במטעים נוספים מלבד יטבתה (עבודה שנעשתה בשנה א') על מנת לברר אם יש הבדלים משמעותיים בין המיקרוביום של פירות ממטעים מאתרי גידול שונים.