



מיזם חוס"ן – אספרגילוס: פיתוח גישות למניעת הנזק הנגרם על ידי מחלת העובש השחור בתמרים

דו"ח לסיכום שנת המיזם הראשונה המוגש

למועצת הצמחים

על ידי

דני שטיינברג, ויקי סורוקר, אלי הררי, יובל כהן, דוד עזרא, סמיר דרובי

מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

אמנון גרינברג

מו"פ ערבה דרומית

בהשתתפות:

מינהל המחקר החקלאי: רן שולחני, מנחם בורנשטיין, יהודה (יוקי) רוט, אינה גולדנברג, מעין גרינברג-ברן, חני צמח, גינת רפאל, אדי בלאוסוב

מו"פ ערבה דרומית (יטבתה): אבי סדובסקי, יערה דנינו, תמיר טיקוצ'ינסקי

מו"פ ערבה מרכזית (יאיר): שמעון פיבוני

מו"פ הבקעה (גלגל): אבי סטרומזה, זיו קלימן

מו"פ עמק המעיינות (חוות עדן): דניאל כץ

גרופית: קובי טובול

חברי וועדת ההיגוי של המיזם:

אמנון גרינברג (מרכז אדמיניסטרטיבי), משה ברוקנטל, דני שטיינברג.

חברי הוועדה המקצועית של המיזם:

דני שטיינברג (מרכז מקצועי), אמנון גרינברג. מינהל המחקר התקלאי: ויקי סורוקר, אלי הררי, יובל כהן, סמיר דרובי, דוד עזרא, זאב שמילוביץ; מו"פ ערבה דרומית: אבי סדובסקי, יערה דנינו; מו"פ ערבה תיכונה: שמעון פיבוניה; מו"פ הבקעה: פיני סריג; מו"פ עמק המעינות: נדב ניצן; שה"מ: חיים אורון, סבטלנה דוברינין, שמעון ביטון.

תוכן העיניים

<u>עמוד</u>		
3	תקציר מנהלים	I
5	רקע	II
6	היעד, שאלות המחקר, הפותחות העבודה ומטרות המחקר	III
7	שיטות וחומרים	IV
7	1. כללי	
8	2. המקום והמועד בו מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס	
8	2.1 מעקב אחר איכלוס של פרחים, חנטים ופירות באספרגילוס	
9	2.2 הכנה של תבדיד אספרגילוס מסומן ב – GFP	
9	3. שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור	
10	4. הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות	
10	4.1 קביעת השפעת הטיפולים על התפתחות תסמינים בפירות	
11	4.2 מעורבות של מיקרואורגניזמים המאכלסים את הפירות	
13	4.3 מעורבות של חרקים	
13	4.4 ניתוח ממצאי הניסויים	
14	תוצאות	V
14	1. המקום והמועד בו מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס	
14	1.1 מעקב אחר איכלוס של פרחים, חנטים ופירות באספרגילוס	
17	1.2 הכנה של תבדיד אספרגילוס מסומן ב – GFP	
17	2. שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור	
18	3. הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות	
18	3.1 ממצאים כלליים	
21	3.2 מעורבות של מיקרואורגניזמים המאכלסים את הפירות	
24	3.3 מעורבות של חרקים	
27	דין ומסקנות	VI
27	1. המקום והמועד בו מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס	
28	2. שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור	
28	3. הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות	
30	סיכום	VII
31	ספרות מצוטטת	VIII

א. תקציר מנהלים

מחלת העובש השחור היא המחלה העיקרית הפוגעת בפרי התמר. תסמיני המחלה מתפתחים בחלל הקיים בין זרע הפרי לחלק הפנימי של הציפה. האזור הנגוע מתמלא בנבגים קטנים, שחורים, הנראים כאבק. בשנת 2018 התחיל מיזם ארצי שהיעדים שלו, כפי שהוגדרו על ידי וועדת ההיגוי, הם לפתח גישות למזעור כמות הפירות הסימפטומטיים במטע, לאחר הגדיד ובמהלך האיחסון. את שנת המיזם הראשונה הקדשנו לחקר המערכת הביולוגית תוך הנחה שהבנת התהליכים המתרחשים תאפשר לנו להגיע לתובנות כיצד ניתן להתמודד עם המחלה. לא עסקנו בשאלה מהיכן מגיע גורם המחלה כי בניסויים המקדימים (שבוצעו לפני תחילת המיזם) מצאנו שפטרית האספרגילוס נפוצה מאד במטעי התמר בארץ ולכן חוסר הימצאותו של מידבק לא מהווה גורם המגביל את התפתחות המחלה. בשנת המיזם הראשונה ניסינו לקבוע את המקום ואת המועד בהם מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס ואת שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור. מאחר ומרבית הפירות מאוכלסים בגורם המחלה אבל רק בחלק קטן מהם מתפתחים תסמינים של עובש שחור, ניסינו גם לאפיין את הגורמים המשפיעים על התפתחות התסמינים בפירות. הממצאים שהצטברו מחזקים את ההנחה שגורם המחלה מאכלס את שרידי השחלות המתנוונות. תפטיר של הפטרייה צומח של שרידי השחלות והפטרייה מתבססת בקשקשים הנמצאים בבסיס הכוד של הפירות בסמיכות לצינורות ההובלה החודרים לתוך הפירות. שם הפטרייה שורדת בצורה רדומה. מעקב אחר דינמיקת האיכלוס של הפירות במהלך ההתפתחות וההבשלה שלהם הראה שפירות עלולים להתאכלס באספרגילוס גם בשלבי הבשלה מאוחרים יותר ושקיימת "קפיצה" בשכיחות הפירות המאוכלסים אחרי שהפירות משנים את צבעם. עוד מצאנו שקיים "חלון התפתחות תסמינים": תסמיני עובש שחור לא מתפתחים בשלבי הבשלה מוקדמים, כשהפירות עדיין ירוקים, ותסמינים חדשים לא מתפתחים אחרי שהפירות כבר הבשילו. המשמעות של ממצא זה היא שבמהלך טיפולי ההבחלה שעוברים פירות שנגדדו צהובים בבית האריזה עלולים להתפתח בהם תסמיני עובש שחור. מאחר ובפירות בשלים לא מתפתחים תסמיני מחלה חדשים, מיון קפדני של הפירות מיד עם קבלתם לבית האריזה מספק ואין צורך לחזור ולמיין אותם שוב לאחר הוצאתם מהאיחסון.

התברר שקיימת שונות טבעית גבוהה מאד בנגיעות בעובש שחור בין אשכולות שונים באותו העץ, ובין עצים סמוכים במטע. הגורמים לשונות הגבוהה אינם ידועים כרגע, אבל להבנתם חשיבות רבה. יתכן שהגורמים לשונות בנגיעות קשורים למימד הקשור בזמן ההתרחשות של אירועים שונים: למשל, מועד הפריחה והחנטה של התפרחות או ההבשלה של האשכולות. לחילופין, יתכן שהגורמים לשונות בנגיעות קשורים למימד הקשור במרחב: למשל, המיקום של התפרחות והאשכולות במרחב (צפון, דרום, מזרח מערב) או בגובה (למטה או למעלה). יתכן שהגורמים לשונות בנגיעות בין מטעים סמוכים באותו האזור קשורים למימד הקשור לממשק הגידול. בניסויים שבצענו השנה עולה שקיימת שונות גבוהה בנגיעות בין אזורים. יתכן שהגורמים לשונות בין אזורים קשורה לתנאי הסביבה השוררים בעת התרחשותם של אירועים קריטיים בהתפתחות הפירות (כמו מועד הפריחה, החנטה ו/או ההבשלה).

פירות התמר מאוכלסים במגוון גדול של מינים שונים של חיידקים, שמרים ופטריות. למיקרוביום הטבעי של הפרי יש כנראה תפקיד חשוב בהגנה נגד התפתחות גורמי ריקבון. ריסוס תפרחות בזמן הפריחה בתכשיר 'שמר' (המכיל את השמר *Metschnikowia fructicola*) גרם להדברה ביולוגית של האספרגילוס ולהפחתה בהתפתחות תסמיני עובש שחור בפירות. לריסוס בתכשיר 'שמר' הייתה השפעה בלתי צפויה והיא הפחתה באיכלוס הפירות בחיפושיות תסיסה.

ניתוח ממצאי הניסויים שבצענו הראו שהגנה על הפירות בפני חרקים באמצעות רשת 50 מש הפחיתה את שכיחות המחלה ושקיים קשר חיובי בין שכיחות האיכלוס של פירות בחרקים לשכיחות המחלה. עוד מצאנו ששכיחות הפירות המאוכלסים בחרקים ושהתפתחו בהם תסמיני עובש שחור גבוהה פי 10 ויותר מהשכיחות הצפויה, המחושבת על פי השכיחות של כל פגע בנפרד. מכאן עולה שנוכחות חרקים בפירות מעודדת את התפתחות תסמיני העובש השחור. עלו גם עדויות לכך שקיימת גם ההשפעה הפוכה: חיפושיות התסיסה נמשכות לפירות שכבר נראים עליהם תסמינים של עובש שחור.

בשנת המיזם השנייה נחזור ונאמת את הממצאים שעלו בשנת המיזם הראשונה, נבחן גישות למניעת האילוח של פירות בגורם המחלה במטע, ונבחן גישות להפחתת התפתחות התסמינים בפירות שנגדדו צהובים.

התמר מהווה את גידול המטע העיקרי באזורים השחונים של הארץ לאורך בקע הירדן. ככול שמדרימים הופך ענף התמרים להיות ענף המטעים העיקרי (או אף היחיד) וחשיבותו לכלכלת אותם אזורים גדולה מאוד. מחלת העובש השחור היא המחלה העיקרית הפוגעת בפרי התמר. תסמיני המחלה מתפתחים בחלל הקיים בין זרע הפרי לחלק הפנימי של הציפה. האזור הנגוע מתמלא בנבגים קטנים, שחורים, הנראים כאבק. בשנים 2015 ו- 2016 הייתה בחלק מאזורי הגידול בארץ עליה בכמות הפרי הנגוע במחלה והנזק הגיע עד ל- 15-20% מהפירות. אבל, גם שכיחות נמוכה בהרבה אינה רצויה מפני שלפרי הנגוע טעם רע והוא גורם לבחילה לאוכלים אותו, דבר הפוגע קשות במוניטין שנרכש בעמל רב. בנוסף, החשש מנוכחות רעלנים בפירות נגועים עלול לפגוע קשות ביצוא.

מספר הפרסומים המדעים בספרות המקצועית המבוקרת על מחלת העובש השחור בפירות התמר והגורמים המשפיעים על התפתחותה קטן מאד. המאמר המדעי המקיף היחיד שפורסם בנושא הוא משנת 1940 (Turrell *et al.*) ומרבית הידע הקיים כיום בארץ מבוסס על ניסיונם והתרשמותם של מדריכים ומגדלים שעסקו בנושא במשך הזמן. בגלל שהמחלה לא נחקרה לעומק ישנם מספר נושאים שלגביהם קיים חוסר הסכמה בין העוסקים בתחום וישנם נושאים שלגביהם אין ידע כלל. מקובל להניח שהגורם העיקרי לתסמיני העובש השחור היא הפטרייה *Aspergillus niger*. הסוג אספרגילוס כולל כ- 150 מינים של פטריות הנפוצות מאד; ניתן לבדד אותן בקלות מהסביבה ובכלל זה מהאוויר, מאברי צמחים שונים, מפירות, וכו'. מרבית מיני האספרגילוס הם עובשים המתפתחים על גבי חומר רקב צמחי; חלקם מסוגלים לחדור לפירות התמר ולגרום שם להתפתחות תסמיני עובש שחור אופייניים. חלק מהמינים מפרישים רעלנים ואחרים מסוגלים לגרום למחלה ריאתית הנקראת אספרגילוזיס. במטעי תמר השכיחות של פטריות האספרגילוס רבה במיוחד ובבדיקות שבצענו אנחנו ובצעו אחרים נמצא שכל פירות התמר במטעים מאוכלסים בגורם הפטרייתי בצורה אפיפיטית (=חיצונית). המשמעות היא שהמצאות (או אי-המצאות) הפטרייה במטע לא מהווה גורם המגביל את התפתחות תסמיני המחלה בפירות התמר. מאחר והמחלה מתפתחת גם בערבה הדרומית נראה שפטריות האספרגילוס מסוגלת להתפתח גם בטמפרטורות גבוהות וגם בתנאי יובש יחסי. מכאן עולה לכאורה שתנאי הסביבה לא מהווים גורם המגביל את התפתחותן. נושא זה לא נחקר לעומק ולא ברורים התנאים המעודדים, או המעכבים, את התפתחות המחלה. בכל מקרה - אם כך הדבר - הגורם היחיד המשפיע על התפתחות המחלה בתמרים הוא פרי התמר עצמו (=הפונדקאי). מקובל להניח שפטריות מהסוג אספרגילוס לא מסוגלות לחדור לפירות ישירות ובאופן עצמאי והן עושות זאת רק אם קיימים בפירות פתחים או פצעים. הפתחים או הפצעים עשויים להיגרם על ידי גורמים א-ביוטיים (כמו פצעים הנגרמים כתוצאה משפשוף), גורמים גידוליים (כמו הפתח הנוצר מסביב לצרורות ההובלה ובין שרידי ה"כתר" של עלי הגביע) או גורמים ביוטיים (כמו פרוקי רגליים הפוצעים את הקליפה או זחלי מזיקים החודרים לאזור בית הגרעין). החשיבות היחסית של הגורמים השונים אינה ברורה וקיום של מידע אמין בנושא הוא תנאי לפיתוח ממשק יעיל לצמצום נזקי המחלה. תסמיני עובש שחור לא מתפתחים בהכרח בכל הפירות המאוכלסים בגורם המחלה. ישנם דיווחים שפירות התמר עמידים להתפתחות התסמינים במרבית שלבי התפתחותם ושקיים חלון זמנים קצר יחסית שרק בו מתפתחים התסמינים. מאחר ונזק נגרם רק אם התפתחו תסמינים (עצם איכלוס הפירות בגורם המחלה לא פוסל את הפרי ולכן לא נחשב כנזק), מידע אמין אודות הגורמים המאפשרים את התפתחות תסמיני המחלה בפירות הוא תנאי לפיתוח ממשק יעיל לצמצום נזקי המחלה.

מזיקי פרי התמר כגון עש התמר הקטן, (*Batrachedra amydraula*) (Batrahedridae), חיפושיות תסיסה (Nitidulidae), או הזחלים של פרוקי רגליים אלה, חודרים לפירות ותוך כדי כך גורמים לפצעים המאפשרים לנבגי האספרגילוס לחדור לציפת הפירות. מכאן עולה שמניעת הגעת החרקים אל הפירות בשלב הרגיש להדבקה ימנע בהמשך את התפתחות תסמיני המחלה. חיפושיות תסיסה הן רב פונדקאיות והן מתפתחות על פירות של מיני עצי פרי רבים. ארבעה מינים של חיפושיות תסיסה

מופיעים בקביעות במטעי התמר בארץ, שכיחות המינים כפי שנקבעה במלכודות פרי ובמלכודות פרומון הייתה שונה במטעי תמר באזורי הגידול השונים בארץ, ללא העדפה לזן מסוים. עדיין לא ברור איזה מבין ארבעת מיני חיפושיות התסיסה הוא השכיח ביותר. החיפושיות הבוגרות תוקפות פירות תמר שהבשילו ונשרו (ללא גביע), אך גם פרי בשל המחובר עדיין לאשכול. החיפושיות חודרות לפרי מתחת לעלי הגביע, מכרסמות בציפתו ומטילות בו את ביציהן.

כמות והרכב אוכלוסיית המיקרואורגניזמים (פטריות, שמרים וחיידקים) המתפתחים על פני פירות התמר ובתוך הציפה משתנה בהתאם לשלב ההבשלה של הפירות. בשלב הבוסר האוכלוסייה רבגונית וגבוהה, בשלב הבוחל הכמות עולה במתינות ואילו בפרי הבשל האוכלוסייה קטנה משמעותית בשל תכולת המים הנמוכה ורמת הסוכר הגבוהה. חלק מהפטריות המאכלסות את הפרי מסוגלות לייצר מיקוטוקסינים. בגדיד (הידיני או הממוכן) נאסף פרי בשלבי הבשלה שונים – פירות צהובים, פירות בשלבי הבחלה או פירות בוחל, ובנוסף פירות עסיסיים ופירות יבשים. חלק מפירות אלה הינו על כן רגיש מאוד לנגיעות מיקרוביאלית. עד כה לא אופיינה המיקרופלורה המאכלסת את פרי התמר ולא נערך בארץ מחקר מקיף בנושא. כיום אין חומר כימי או ביולוגי מורשה לשימוש לטיפול בגורמי זיהום וריקבון של הפרי במטע ואחרי הגדיד.

III. היעד, שאלות המחקר, היפותזות העבודה ומטרות המחקר

וועדת ההיגוי של מיזם חוס"ן אספרגילוס הגדירה את היעדים של המיזם כלהלן:

- א. פיתוח גישות למזעור כמות הפירות הסימפטומטיים במטע;
- ב. פיתוח גישות למזעור התפתחות התסמינים לאחר הגדיד ובמהלך האיחסון.

שאלות המחקר והיפותזות העבודה של השנה הראשונה הן:

שאלת מחקר מספר 1: היכן ומתי מתרחשת ההדבקה באספרגילוס?

היפותזה 1: ההדבקה באספרגילוס מתרחשת בזמן הפריחה. הפטרייה חודרת דרך עמוד העלי, מתקדמת בשחלה במסלול מקביל לזה של נחשון האבקה ומאכלסת את אזור הכוד.

שאלת מחקר מספר 2: מתי מתפתחים תסמיני עובש שחור בפירות המאוכלסים?

היפותזה 2: הפטרייה שורדת בצורה רדומה בחנטיים עד לתחילת שלב החלפת צבע מירוק לצהוב (להלן, שלב F_6). אז מתחילים להופיע תסמיני המחלה. תסמיני מחלה לא מתפתחים אחרי סיום שלב ההבחלה (להלן שלב F_8).

שאלת מחקר מספר 3: מהם הגורמים המשפיעים על התפתחות התסמינים?

היפותזה 3א: מיקרואורגניזמים (חיידקים ושמרים) המאכלסים את החלק הפנימי של ציפת הפירות מעכבים את גורם המחלה ומונעים את התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות.

היפותזה 3ב: החרקים לא מחדירים את גורם המחלה לפירות (כי הפירות כבר מאוכלסים באספרגילוס). נוכחות חרקים בפירות מגבירה את רגישות הפירות ומעודדת את התפתחות תסמיני העובש השחור בפירות שכבר מאוכלסים.

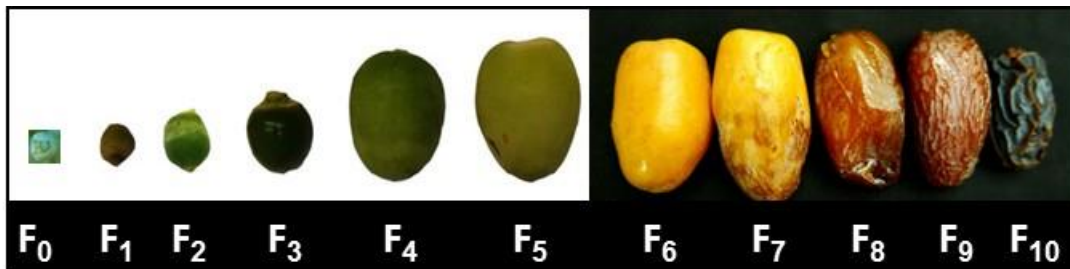
מטרות המחקר בשנת המיזם הראשונה:

1. קביעת המקום והמועד בהם מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס;
2. קביעת שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור;
3. הגדרת הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות.

IV. שיטות וחומרים

1. כללי

בשנת המיזם הראשונה בוצעו ארבעה ניסויים במו"פים האזוריים: מו"פ ערבה דרומית (יטבתה), מו"פ ערבה תיכונה (יאיר), מו"פ הבקעה (גלגל) ומו"פ עמק המעיינות (חוות עדן). הניסויים החלו בשלב הפריחה ובכל ניסוי נכללו 10 עצים (7 בניסוי שהיה ביאיר). העצים גודלו כמקובל באזור ולא רוססו בתכשירי הדברה כנגד מחלות, מלבד אילה שיפורטו בהמשך. במהלך ההתפתחות וההבשלה של הפירות נרשם שלב התפתחותם על פי סקלה ייעודית המתוארת באיור מספר 1.



איור מספר 1. שלבי ההתפתחות וההבשלה של פירות תמר. על פי: Yin et al., (2012)

הניסויים שבוצעו במו"פים האזוריים הוצבו במתכונת של ניסוי דו-גורמי בחלקות מפוצלות. הגורם הראשון בניסויים - בחלקות הראשיות (=עצים) היה אילוח באספרגילוס. גורם זה כלל שתי רמות, כלהלן: א1: היקש - ללא אילוח מלאכותי באספרגילוס; א2: מאולח - תפרחות שהיו על עצים אלה אולחו בשלב הפריחה (שלב F₀) בתרחיף שהכיל 10⁵ נבגי אספרגילוס לסמ"ק. התפרחות רוססו בתרחיף הנבגים עד נגירה. האילוח בוצע בשעות אחר-הצהריים המוקדמות ולאחר מכן התפרחות כוסו בשקיות פוליאאתילן שחורות לשמירה על רטיבותן (איור מספר א2). השקיות הוסרו בבוקר שלמחרת. הגורם השני בניסויים - בחלקות המשנה (=תפרחות) היה ריסוס בתכשירי הדברה. גורם זה כלל ארבע רמות, כלהלן: א2: היקש: תפרחות טיפול זה לא רוססו בתכשירי הדברה; א2: מרית - תפרחות טיפול זה רוססו בתכשיר ההדברה מרית (המכיל diniconazole 12.5%) והמשווק על ידי חברת אגן בריכוז של 0.04%; א2: סיגנום - תפרחות טיפול זה רוססו בתכשיר ההדברה סיגנום (המכיל Pyraclostrobin 6.7%+ boscalid 26.7%) והמשווק על ידי חברת אגן בריכוז של 0.15%; א2: סוויץ' - תפרחות טיפול זה רוססו בתכשיר ההדברה סוויץ' (תכשיר המכיל Fludioxonil 25%+ cyprodinil 37.5%) והמשווק על ידי חברת אגריקה בריכוז של 0.1%. א2: 'שמר' - תפרחות טיפול זה רוססו בתרחיף שהכיל 10⁸ תאים של השמר *Metschnikowia fructicola*. טיפול זה לא יושם בניסוי שבוצע ביטבתה. בסך הכל היו, אם כן 10 טיפולים של אחד מהם חזר 5 פעמים (חזרה = עץ). בשלב F₅, ברשת שחורה 50 מש על כל אחד מהעצים שנכללו בניסויים 2-3 אשכולות כוסו למניעת הגעתם של חרקים, ובמיוחד חיפושיות תסיסה, לפירות. התפרחות האחרות שנכללו בניסויים כוסו ברשת 17 מש, כמקובל.



איור מספר 2. צילום של עצי הניסוי בחוות עדן. א. בשלב F_0 - מיד לאחר האילוח. התפרחות שאולחו באספרגילוס כוסו בשקיות פוליאטילן שחורות לשמירה על לחות יחסית גבוהה. החץ השחור מסמן את קורא הנתונים האלקטרוני (data logger). בשלב F_5 - שני אשכולות מכוסים בשקי רשת 50 מש (שאר האשכולות יכוסו בהמשך בשקי הרשת הסטנדרטיים של 17 מש). החיצים בצבע לבן מציינים את המלכודות ללכידת חרקים: חיפושיות תסיסה; עש התמר הקטן וזבוב הפירות הים תיכוני.

2. המקום והמועד בהם מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס

2.1 מעקב אחר איכלוס של פרחים, חנטים ופירות באספרגילוס

כפי שצויין למעלה היפותזת העבודה הייתה שההדבקה באספרגילוס מתרחשת בזמן הפריחה. הפטרייה חודרת דרך עמוד העלי, מתקדמת בשחלה במסלול מקביל לזה של נחשון האבקה ומאכלסת את אזור הכוד. שם היא שורדת בצורה רדומה עד לשלבים מתקדמים של הבשלת הפרי. התקפות של היפותזה זו נבחנה במספר דרכים, כלהלן. א. מעקב אחר איכלוס של פרחים וחנטים: הינחנו שאם ההדבקה אכן מתרחשת בזמן הפריחה נוכל לבודד את גורם המחלה בפרחים, בחנטים ובפירות במהלך כל שלבי הבשלתם. ב. אילוח מלאכותי של פרחים באספרגילוס: הינחנו שבמידה וההדבקה אכן מתרחשת בזמן הפריחה, חנטים ופירות שיגדלו על אשכולות שאולחו בזמן הפריחה יהיו מאוכלסים בשכיחות גבוהה יותר מאילה שיגדלו על אשכולות שלא אולחו. ג. ריסוס תפרחות בתכשירי הדברה: הינחנו שאם ההדבקה אכן מתרחשת בזמן הפריחה, ריסוס של הפרחים בתכשירי הדברה היעילים כנגד אספרגילוס ימנע את הדבקם בגורם המחלה והחנטים והפירות שיגדלו על האשכולות המרוססים יהיו נגועים בשכיחות נמוכה יותר מאילה שיגדלו על אשכולות שלא רוססו בזמן הפריחה בתכשירי הדברה. תכשירי ההדברה שנכללו בניסויים (מרית, סיגנום וסוויץ) היו התכשירים היעילים ביותר מבין כ- 15 תכשירים שנבחנו בניסויי *in vitro* שבצענו לפני שנת המיזם הראשונה.

במהלך העונה נלקחו מהניסויים דגימות של סנסנים, פרחים, חנטים ופירות לקביעת שיעור האיכלוס שלהם באספרגילוס. הדגימות נלקחו מתפרחות/אשכולות שלא רוססו בתכשירי הדברה (טיפול 2א) מעצים שאולחו ומעצים שלא אולחו באספרגילוס (טיפולים 1א ו- 1ב). קטעי סנסנים, פרחים (שלב F_0) וחנטים צעירים (שלב F_2) חוטאו חיצונית על ידי טבילתם בתמיסת היפוכלוריד 1% למשך 3 דקות ולאחר מכן הם נשטפו פעמים במים מעוקרים פעמיים. בשלבי הבשלה מאוחרים יותר (שלבים F_4 עד F_8) הפירות חוטאו חיצונית כמתואר לעיל ולאחר מכן הם נחתכו באמצעות סכין מחוטאת; מהצד הפנימי של הציפה של כל פרי נלקחו 5 מקטעים בגודל של כמה מילימטרים כל אחד. קטעי הסנסנים, הפרחים, החנטים או מקטעי הציפה הונחו בצלחות פטרי על גבי מצע מזון PDA (3.9%) בתוספת כלורמפניקול (0.25%). בכל צלחת פטרי הונחו 5 קטעי סנסנים, פרחים, חנטים או מקטעי ציפה. הצלחות הונחו להדגרה בחדר גידול בטמפרטורה של 25 מעלות צלזיוס למשך 5-7

ימים שלאחריהם נקבע עבור כל אחד מהם באם התפתחה, או לא התפתחה, מושבה של אספרגילוס על מצע המזון. כל דגימה כללה 33 קטעי סנסנים/פרחים/חנטיים/פירות לפחות. הממצאים שימשו לחישוב השכיחות של האברים המאוכלסים באספרגילוס.

2.2 הכנה של תבדיד אספרגילוס מסומן ב - GFP

תפטיר של תבדיד הפטריה שבודד מתמר נגוע ניזרע על צלחת מצע PDA וגודל עד לכיסוי מלא של הצלחת בנבגי הפטריה (כחמישה ימים באינקובטור ב 25 מ"צ). הצלחת נשטפה בחמישה מ"ל מים מזוקקים סטרילים והנבגים נאספו וסונוו דרך פד גאזה סטרילי (שתי שכבות) אל מבחנה סטרילית. תרחיף הנבגים שימש לביצוע סדרת מיהולים (10^{-1} - 10^{-6}) במים סטריליים מזוקקים. תרחיף נבגים זה שימש לזריעת בידוד מושבה מנבג בודד ששימש להמשך העבודה. הליך זה חשוב בכדי שנדע בוודאות שאנחנו עובדים עם תפטיר הומוגני שמקורו בנבג יחיד בעל תכונות וזהות גנטית אחידה. מספר מושבות בודדות נאספו מהצלחות, ניסינו לגדלן על מצעים המכילים אנטיביוטיקות המשמשות את המעבדה בהליך הסלקציה של מושבות טרנספורמנטיות בכדי לקבוע באם אפשר יהיה להשתמש במושבות אלה ובווקטורים שלנו לביצוע הטרנספורמציה. המושבות נבחנו בריכוזים עולים של האנטיביוטיקה היגרומיצין ונמצא שהן גדלות על כל ריכוז שנבחן. מכאן עולה שהוקטור (פלסמיד) הנושא אנטיביוטיקה זו כסמן סלקציה לטרנספורמציה אינו מתאים. ניסינו גם אנטיביוטיקה בשם G418 sulfate. המושבות עוכבו לגמרי בתחילה אך לאחר שלושה ימים החלו בגדילה. הגדילה על אנטיביוטיקה זו מעוכבת יחסית לביקורת ללא האנטיביוטיקה ולכן התחלנו בהליך של החלפת הגן המקודד בווקטור הטרנספורמציה להיגרומיצין בגן המקודד לעמידות ל - G418 sulfate. הליך זה נעשה בשיטה הנקראת RF cloning שיטה זו עושה שימוש בטכנולוגיית PCR בכדי להחליף גן בגן ברצף ידוע. בימים אלה אנו בודקים באם הפלסמידים שקיבלנו בהליך אכן מכילים את גן העמידות ל - G418 sulfate ושהגן להיגרומיצין הוסר מהפלסמיד. אם התוצאות תהיינה חיוביות ננסה לבצע בשנה הבאה טרנספורמציה בעזרת פלסמיד זה.

3. שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור

היפותזת העבודה שלנו הייתה שהפטרייה, המאלחת את הפרחים, שורדת בצורה רדומה בחנטיים עד לתחילת שלב הבוחל. אז מתחילים להופיע תסמיני המחלה. עוד הינחנו שתסמיני מחלה לא מתפתחים בפירות בשלים. כדי לבחון היפותזה זו וכדי לאפיין בצורה מדוייקת יותר את השלבים בהם מתפתחים התסמינים נקטנו בשתי גישות שונות, משלימות. הראשונה, אילחנו פירות שהיו בשלבי הבשלה שונים בנבגי המחלה ועקבנו אחר הופעת תסמינים בפירות המאולחים. לניסויים שבצענו לפני תחילת המיזם בחנו מספר שיטות לאילוח ובסופו של החלטנו להשתמש בשיטה שהייתה היעילה וההדירה ביותר. השתמשנו במחט דקה כדי להזריק 0.1 סמ"ק של תרחיף נבגי אספרגילוס בריכוז של 10^5 נבגים לסמ"ק לפירות התמר הנבחנים. לאחר האילוח, הפירות הונחו 20 פירות בתבניות פלסטיק סגורות, על נייר סופג לח. התבניות הונחו להדגרה בחדר גידול בטמפרטורה של 25 מעלות צלזיוס למשך 10-14 ימים. לאחריהם, כל אחד מהפירות נחתח לאורכו באמצעות סכין ועבור כל אחד נקבע באם במצעית שלו התפתחו, או לא התפתחו, תסמיני עובש שחור. הנתונים שימשו לחישוב שכיחות הפירות עם תסמיני מחלה. כביקורת, הזרקנו 0.1 סמ"ק של מים מעוקרים ל - 20 פירות אחרים שהיו באותו שלב הבשלה. הפירות ששימשו לניסויי האילוח היו בשלבי התפתחות F_4 עד F_9 והם נקטפו מהניסויים שבצענו במו"פים האזוריים. בסך הכל ביצענו 11 ניסויים שונים. מאחר ועבר זמן ממועד העמדת הניסויים (זמן האילוח) וסיומם (זמן הערכת התסמינים) בחלק מהמקרים היה שינוי בשלב ההבשלה של הפירות. נושא זה נלקח בחשבון בעת ניתוח הממצאים והצגת הנתונים.

הגישה השנייה בה נקטנו לבחינת המועד בו מתפתחים תסמיני עובש שחור בפירות הייתה בחינה וויזואלית של פירות שנקטפו/נגדדו מהניסויים בשלבי הבשלה שונים. פירות נקטפו מארבעת הניסויים שבצענו במו"פים האזוריים משלב הבשלה

F_5 ועד לשלב הבשלה F_9 . כל אחד מהם נחתך לאורכו ונבחן להימצאותם של תסמיני המחלה. במידה וזוהו תסמיני מחלה, נרשם באם הם כיסו את כל פנים הפרי (לתסמין זה קראנו "שטיח") או שהם היו מרוכזים רק באזור הכוד (לתסמין זה קראנו "גרדיאנט"). בדו"ח זה יוצגו תוצאות הבדיקה של 9,050 פירות שנקטפו/נגדדו מהניסוי שבוצע בחוות עדן. תוצאות אלה מייצגות את ממצאי הניסויים האחרים.

4. הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות

4.1 קביעת השפעת הטיפול על התפתחות תסמינים בפירות

בתקופת ההבשלה נגדדו כל הפירות שהיו על האשכולות שנכללו בניסויים שבצענו בארבעת המו"פים. ביטבתה וביאיר הגדיד התבצע בתאריך 27 באוגוסט, בגלגל הגדיד בוצע בתאריך 16 בספטמבר ובחוות עדן היו שני גדידים בתאריכים 16 בספטמבר ו-2 באוקטובר. הפירות שנגדדו הועברו למרכז וולקני וביום שלמחרת הם מויינו לקבוצות על פי שלב ההבשלה שלהם (F_6 עד F_{10} ; איור מספר 1). כל פרי נחתך לאורכו באמצעות סכין והפירות חולקו לקבוצות בהתאם לתסמינים שנראו עליהם, כלהלן (איור מספר 3). בקבוצה הראשונה נכללו הפירות הבריאים - פירות שלא נראו עליהם כל תסמיני מחלה או סימני חרקים (α). בקבוצה השנייה (β) נכללו הפירות שנראו עליהם סימני איכלוס של חרקים (זחלים או סימני אכילה), בלבד. בקבוצות השלישית והרביעית נכללו הפירות שנראו עליהם תסמיני עובש שחור - ולא נראו סימני איכלוס בחרקים - רק באזור הכוד (גרדיאנט, γ) או על פני כל המצעית (שטיח, ϵ). בקבוצות החמישית והשישית נכללו הפירות שנראו עליהם תסמיני גרדיאנט וחרקים ביחד (δ) או תסמיני שטיח וחרקים ביחד (θ). נתונים אלה שימשו לחישוב המשתנים הרשומים באיור מספר 3.

איכלוס בחרקים	תסמיני עובש שחור		
	בלי	"גרדיאנט"	"שטיח"
בלי	α	γ	ϵ
עם	β	δ	θ

כלל הפירות בדגימה	$T = \alpha + \beta + \gamma + \delta + \epsilon + \theta$
שכיחות (%) הפירות <u>רק</u> עם תסמיני מחלה	$D = (\gamma + \epsilon) / T \times 100$
שכיחות (%) הפירות <u>רק</u> עם חרקים	$I = \beta / T \times 100$
שכיחות (%) הפירות <u>עם</u> תסמיני מחלה <u>ועם</u> חרקים	$D_1 \left. \vphantom{D_1} \right\} = (\delta + \theta) / T \times 100$ I_0
שכיחות (%) של <u>כל</u> הפירות עם תסמיני מחלה	$TD = D + D_1 \quad [\gamma + \delta + \epsilon + \theta]$
שכיחות (%) של <u>כל</u> הפירות עם חרקים	$TI = I + I_0 \quad [\beta + \delta + \theta]$

איור מספר 3. מיון פירות התמר שנגדדו על פי התסמינים שנראו עליהם. האותיות ביוונית מתארות את התסמינים על פי הצירופים בטבלה. למשל, γ מציינ פירות שלא נראו עליהם סימני איכלוס בחרקים אבל נראו עליהם תסמיני גרדיאנט של עובש שחור. דרך החישוב של משתנים שונים רשומה מתחת לטבלה.

4.2 מעורבות של מיקרואורגניזמים המאכלסים את הפירות

היפותיזת העבודה שלנו היתה שמיקרואורגניזמים (חיידקים ושמרים) המאכלסים את הפירות משפיעים על יכולת האיכלוס של גורם המחלה (אספרגילוס) ומונעים התפתות תסמיני העובש השחור. על כן, מטרת העבודה שנעשתה בשנה הראשונה היתה אפיון אוכלוסיות מיקרואורגניזמים (מיקרוביוטה) אפיפיטיים (קליפה) ואנדופיטיים (ציפה) בתמר בשלבי התפתחות והבשלה שונים. זיהוי כלל המיקרוביוטה של הפרי ינעשה בשתי שיטות במקביל: 1) מיקרואורגניזמים הניתנים לגידול על מצעי מזון (*in vitro*), ו-2) כלל המיקרוביום (מיקרואורגניזמים אפיפיטיים ואנדופיטיים).

4.2.1 אפיון מיקרואורגניזמים הניתנים לגידול על מצעי מזון

הבידוד נעשה בחדר נקי בתנאים סטריליים בתוך מנדף ביולוגי כ-10 ג"ר מקליפת או ציפת פרי הוסרו ע"י סכין סטרילי הונחו בתוך שקיות סטומכר סטריליות ורוסקו במשך 2 דקות בתוך 90 מ"ל מי פפטון (Pepton Water HIMEDIA) במכשיר סטומכר Lab Blender 400. מהתמיסה שהתקבלה, דגימות של 100 מיקרוליטר ושוטחה בעזרת מקל דרגלסקי סטרילי על צלחות פטרי 90 מ"מ המכילות מצע מזון (LB Luria Agar HIMEDIA) לבידוד חיידקים ו-PDA (Potato) dextrose Agar PDA עם כלורופניקול (Chloramphenicol ≥98 SIGMA) (39 גרם אבקת PDA, 5 גרם אגר, 250 מ"ג כלורמפניקול, 1 ליטר מים) לבידוד שמרים ופטריות חוטיות. הצלחות אוחסנו באינקובטור ב-30 מ"צ למשך 5-1 ימים. לבידוד מיקרואורגניזמים מחלקי הפרי השונים, חלק מהפירות עברו חיטוי בסודיום היפוכלוריד 4% למשך 5 דקות ונשטפו לאחר מכן פעמיים במים מזוקקים. פרי שעבר חיטוי חיצוני ופרי שלא עבר חיטוי ושאינו מחוטא נחתך בסכין סטרילית לריבועים של 1 סמ"ר של קליפה ושל ציפה והונח בצלחות פטרי 90 מ"מ במצעי מזון LB ו-PDA עם כרומופניקול. מושבות המיקרואורגניזמים (מ"א) שגדלו על מצעי המזון השונים נדגמו והועברו למצעים טריים לצורך קבלת מושבות נקיות. לזיהוי המוליקולרי, נבחרו תבדידים באקראיות לפי מאפיינים מורפולוגיים.

אפיון חיידקים: אפיון מולקולרי של תבדידי החיידקים נעשה באמצעות הגברה של מקטע 16S של RNA ריבוזומלי ב-PCR עם הפריימרים, `CS1 515F - -ACACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA`, `CS2 806R -TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT`. מיידגם של תאי חיידקים נלקחו ממושבה בודדת ע"י מחט מיקרוביולוגית סטרילית והורחפו בתוך 100 מיקרוליטר מים סטרילים בתוך מבחנות אפינדורף בנפח 200 מיקרוליטר. המבחנות קוררו בקרח למשך 5 דקות ואח"כ הועברו לחימום במיקרוגל בעוצמה גבוהה למשך דקה. הפעולה חזרה על עצמה שלוש פעמים. לאחר מכן נלקחו 3 מיקרוליטר תמיסת חיידקים והועברו למבחנות PCR. תערובת ה-PCR הכילה החומרים הבאים: 15 מיקרוליטר תמיסת PCR מוכנה לשימוש (red load taq master, Larova, Germany), 1.5 מיקרוליטר מכל פריימר (515F, 806R), 1.5 תמיסת תאי חיידקים ו-10.5 מיקרוליטר מים מזוקקים. תנאי הריאקציה היו להלן: 95°C למשך 10 דקות, 35 סיבובים של 95°C ל-15 שניות, 55°C ל-20 שניות ו-72°C ל-45 שניות ולסיום 10 דקות ב-72°C.

אפיון שמרים: אפיון מולקולרי של שמרים נעשה באמצעות PCR (Polymerase chain reaction) עם הפריימרים:

Forward: D1/D2-NL4 – GGTCCGTGTTCAAGACGG,

Reverse: D1/D2-NL1 – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG

דוגמאות ממושבות שמרים נלקחו ממושבות ע"י מחט סטרילית והוכנסו למבחנות אפינדורף עם 100 מיקרוליטר תמיסת Tris- Breaking buffer (10Mm 2µl Triton x-100, 1µg SDS, 100mMNaCl,)-HCl, 1Mm EDTA). למבחנה הוספו כדוריות זכוכית סטריליים (425-600µm?) ו-100 מיקרוליטר תמיסת פנול-כלורופורם-איזואמיל). (phenol: chloroform: isoamyl alcohol 25: 24: 1) המבחנות טולטלו בוורטקס במהירות גבוהה ל-5 דקות ותוכנס סורכז

בצנטריפוגה (2012 SCANSPEED Denmark) למשך 5 דקות במהירות 13,000 rpm. דגימות של 1.5 מיקרוליטר מכל נבחה נבדקו במכשיר ה-ננו-דרופ (spectrophotometer ND-1000) לקביעת ריכוז ה-DNA, לאחר מכן הועברו 3 מיקרוליטר מכל דוגמא למבחנות PCR. תערובת ה-PCR הכילה החומרים הבאים: 15 מיקרוליטר תמיסת PCR מוכנה לשימוש red load taq master (Larova, Germany) 1.5 מיקרוליטר מכל פריימר (D1/D2-NL4, D1/D2-NL1), 1.5 מיקרוליטר DNA ו-10.5 מיקרוליטר מים מזוקקים. תנאי הריאקציה היו להלן: 94°C למשך דקה. לאחר מכן, 35 סיבובים של 94°C ל-30 שניות, 55°C ל-35 שניות ו-72°C ל-5 דקות.

אפיון פטריות חוטיות: פרוטוקול מיצוי דני"א מפטריות נעשה לפי פרוטוקול Rapid Extraction of Fungal DNA for PCR Amplification, Cenis J.L. Promega Wizard® Genomic DNA. דוגמאות תפטיר ממושבות פטריות נלקחו ע"י מחט סטרילית מצלחות פטרי והוכנסו למבחנות אפנדורף בנפח 2 מ"ל עם 500 מיקרו ליטר תמיסת Potato PDB (Dextrose Broth HIMEDIA). המבחנות הודגרו בטמפ' 28 מ"צ באינקובטור מטלטל (Senova) למשך 48 שעות במהירות של 160 rpm. לאחר מכן, המבחנות הועברו לצנטריפוגה למשך 5 דקות במהירות 13000 rpm לשיקוע תפטיר הפטריות. הנוזל העליון הוצא והמשקע הורחף ב-500 מיקרוליטר בופר TE (1M Tris pH8, 0.5M EDTA Ph8, dH²O) לשטיפת שאריות מצע הגידול. לאחר סירכוז נוסף, הנוזל העליון הוצא והוספו 300 מיקרוליטר (10Mm Tris-HCl, 1MmEDTA, TNES) 150 מיקרוליטר של תמיסת NaOAC(3M) והוכנסו למקפוא (-20) מ"צ למשך 10 דקות. המבחנות הוצאו מהמקפוא והוכנסו לצנטריפוגה למשך 10 דקות במהירות 12000 rpm. הנוזל העליון במבחנות הועבר למבחנות חדשות והוסף להן 350 מיקרוליטר של איזופרופנול. המבחנות הושארו 5 דקות בטמפרטורות החדר והועברו שוב לצנטריפוגה למשך 10 דקות במהירות 12000 rpm. הנוזל העליון במבחנות הוצא הוסף לכל מבחנה 500 מיקרוליטר של אתנול 70% והועברו לצנטריפוגה למשך 10 דקות במהירות 12000 rpm, תוכן המבחנות הוצא שוב, המבחנות יובשו במנדף כ-30 דקות ואח"כ הוסף 50 מיקרו ליטר תמיסת TE. נלקחו דוגמא של 1.5 מיקרוליטר לבדיקה במכשיר ה-ננו-דרופ (BARGAL, ND-100) לכימות הדני"א בדוגמה. בסיום נלקחו 1.5 מיקרוליטר תמיסת דני"א ל-PCR עם פריימרים ITS1-TCCTCCGCTTATTGATATGC, ITS4-TCCTAGGTGAACCTGCGG. תנאי הריאקציה היו זהים לאלו של השמרים.

ריצוף תוצרי ה-PCR: לפני שליחת תוצרי ריאקציות ה-PCR לריצוף נלקחו 5 מיקרוליטר מכל דוגמא והורצו בגיל אלקטרופורזה (GEL XL ULTRA V-2, Labnet) ל-30 דקות לבדיקת נוכחות וגודל תוצר ה-PCR. הריצוף נעשה במעבדת הילאב (Hylab) ברחובות ובמעבדת מיקרוג'ן בהולנד. פיענוח זהות החיידקים נעשה באמצעות הצלבת רצפים שהתקבלו אל מול רצפים קיימים במאגרי מידע באמצעות אלוגריתם BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.2 איפיון המיקרוביום מרקמת הפרי (מטאגנומיקה)

פירות בשלבי התפתחות שונים (ראה 4.2.1) הובאו למעבדה במו"פ ערבה דרומית, ומ-20 פירות בכל שלב הוסרה הקליפה בעזרת סקלפל סטרילית והועברה למבחנות 50 מ"ל סטריליות. קבוצה נוספת של 20 פירות מכל שלב (מלבד החנטים) חוטאו בסודיום היפוכלוריד 4% למשך 5 דקות ונשטפו פעמיים במים מזוקקים. קליפת הפרי הוסרה מהם וחתיכות מציפת הפרי הועברו למבחנות 50 מ"ל. המבחנות הוכנסו למקפוא. המבחנות עם רקמות הפרי השונות עברו ייבוש בהקפאה בלופיליזר (ALPHA I-5) למשך 24 שעות. בתום הייבוש, רקמת הפרי נכתשה במכתש ועלי ובתוספת חנקן נוזלי, ומהאבקה שהתקבלה נשקלו 40 מ"ג במאזניים אנליטיים METTLER (METTLER ME204) (TOLEDO) לתוך מבחנות אפנדורף. מכל טיפול (שלב/רקמת פרי) נלקחו 2-3 דוגמאות, לכל דוגמא 3-4 חזרות ביולוגיות. מיצוי הדני"א נעשה בעזרת הקיט Wizard © Genomic DNA Purification kit (פרוטוקול מחברת Promega (Madison, WI, USA)). למבחנות אפנדורף עם 40 מ"ג אבקה מרקמת הפרי הוסף 600 מיקרוליטר של תמיסת Nuclei Lysis והמבחנות הוכנסו לאינקובציה של 65 מ"צ למשך 15 דקות. אח"כ הוספו 3

מיקרוליטר של RNase Solution ואינקובציה נוספת ב-37 מ"צ למשך 15 דקות. לאחר מכן, המבחנות קוררו למשך 5 דקות בטמפרטורת החדר והוספו לכל מבחנה 200 מיקרוליטר תמיסת Protein Precipitation Solution. המבחנות שוקשקו בוורטקס והוכנסו לצנטריפוגה ל-3 דקות במהירות 13000 rpm. הנוזל העליון הועבר למבחנות חדשות והוסף להן 600 מיקרוליטר של איזופרופנול. המבחנות הושארו 5 דקות בטמפרטורת החדר והועברו שוב לצנטריפוגה למשך 10 דקות במהירות 12000 rpm. הנוזל העליון מכל מבחנה הועבר למבחנות אפינדוף חדשות והוסף לו 500 מיקרוליטר של אתנול, 70% הוכנסו צנטריפוגה למשך דקה במהירות 12,000 rpm, הנוזל העליון הוצא והמשקע יובש במנדף כ-30 דקות, ולבסוף הוסף 50 מיקרוליטר תמיסת TE. נלקחו 1.5 מיקרוליטר מכל דוגמא לבדיקת האיכות וכימות הדנ"א במכשיר ננו-דרופ. המבחנות הוכנסו לייבוש סופי במכשיר ספיד וואק ונשלחו לאחר מכן לריצוף עמוק בארה"ב.

4.3 מעורבות של חרקים

המעורבות של חרקים בהתפתחות תסמיני עובש שחור נבחנה בחמישה ניסויים: בחוות עדן, גילגל, מו"פ חצבה, גרופית וביוטבתה. בשלב של החלפת צבע פרי התמר (טבלה מספר 1) כיסינו 3 אשכולות בכל אחד מ-10 עצי הניסוי (למעט חצבה בה כויסו רק 5 עצים) בשקי רשת של 50 מש שאמורים למנוע מהחרקים להגיע. ואילו שאר האשכולות כוסו בשקים הרגילים של 17 מש. הניסויים הסתיימו עם גמר הגדיד. במטע גרופית ובחוות עדן בוצעו שני גדידים בעוד בחצבה, יוטבתה וגילגל בוצעה גדיד אחד בלבד.

טבלה מס 1. מועדי כיסוי האשכולות וגדידים

מקום הניסוי	מועד הצבת המלכודות	כיסוי אשכולות ברשת 50 מש	מועד הגדיד הראשון	מועד הגדיד השני
חוות עדן	19.06.18	26.06.18	16.09.18	02.10.18
גילגל	19.06.18	26.06.18	16.09.18	-
חצבה	28.06.18	28.06.18	29.08.18	-
גרופית	28.06.18	28.06.18	09.08.18	29.08.18
יוטבתה	לא הוצבו	09.07.18	29.08.18	-

* בחלק מהמטעים לפעמים עפו מלכודות עש תמר הקטן ולכן לא תמיד יש מידע לגבי כל חמשת המלכודות.

לשם ניטור וקטורים חשודים של אספרגילוס (עש תמר הקטן, חיפושיות תסיסה וזבוב פירות ים התיכון) השתמשנו בשלושה סוגי מלכודות: 1. מלכודות דלתא מתוצרת עצמית עם פרומון ייעודי מחברת מכתשים BIOYOME; 2. מלכודות משפך ללכידת חיפושיות תסיסה עם פירות תמר תוססים ופרומון של *Carpophilus mutilates* and *C. hemipterus*; 3. מלכודות סרה-טראפ seratrap עם מילוי מוכן ללכידת זבוב פירות הים התיכון. המלכודות ללכידת חרקים ניתלו בארבעת הניסויים הראשונים. המלכודות אחת מכל סוג נתלתה על 5 עצים בכל מטע. המלכודות נוטרו מידי שבועיים, פרומון חיפושיות תסיסה הוחלף מידי שבועיים וזה של עש התמר הקטן פעם בחודש. עשים במלכודות מוינו לשתי קבוצות: בטרקדרה ועשים קטנים (סוג לא ידוע). חיפושיות התסיסה לא מוינו למינים ונספרו יחד כקבוצה אחת. מלכודות זבוב הפירות נבדקו רק פעם אחד בסוף הניסוי וכלל זבובי הפירות נספרו.

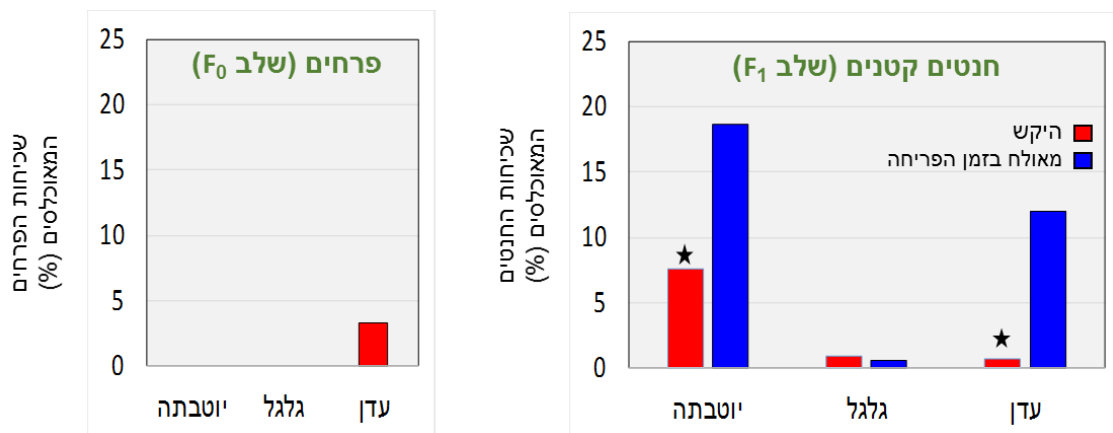
4.4 ניתוח ממצאי הניסויים

התוצאות נותחו בשיטות סטטיסטיות מקובלות. חישבנו את הממוצע \pm סטיית תקן עבור כל הטיפולים בניסויים. במקרים בהם השונות הטבעית הייתה גבוהה ולא ניתן היה לאפיין הבדלים במומצעים בין טיפולים השתמשנו במבחן סטטיסטי מחמיר פחות, מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P = 0.05$. בחלק מהמקרים השתמשנו בחנו את הקשרים בין משתנים שונים באמצעות מבחני רגרסיה (לינארית או לא לינארית). הניתוחים הסטטיסטיים בוצעו באמצעות תוכנות אקסד ו - JUMP.

1. המקום והמועד בהם מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס

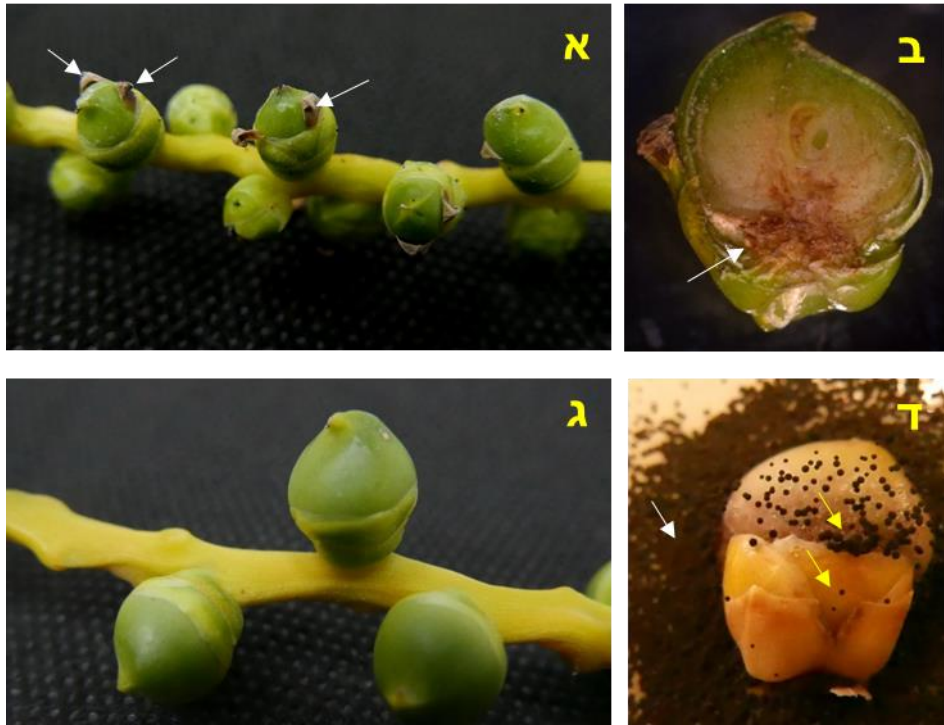
1.1 מעקב אחר איכלוס של פרחים, חנטים ופירות באספרגילוס

כל הפרחים (שלב התפתחות F_0) שנדגמו מהניסויים שבצענו ביטבתה ובגלגל לא היו מאוכלסים כלל באספרגילוס. רק 3% מהפרחים שנדגמו מהניסוי שבצענו בחוות עדן היו מאוכלסים בגורם המחלה (איור מספר 4). בכל הבידודים שבצענו מסנסנים לא התפתחה הפטרייה (תוצאות לא מוצגות). כשנדגמו חנטים (בשלב F_1) מהניסויים שבצענו ביטבתה ובחוות עדן, שכיחות החנטים המאוכלסים באספרגילוס הייתה גבוהה יותר בחנטים שנדגמו מאשכולות שאולחו בזמן הפריחה (12-18% איכלוס), מאשר בחנטים שנדגמו מאשכולות שלא אולחו בזמן הפריחה (0.5-7.5% איכלוס). שכיחות האיכלוס של חנטים שנדגמו מהניסוי שבוצע בגלגל הייתה נמוכה בשני הטיפולים (איור מספר 4).



איור מספר 4. איכלוס של פרחים וחנטים קטנים באספרגילוס בניסויים שבצענו ביטבתה, גלגל וחוות עדן. עמודות אדומות: האיכלוס הטבעי; עמודות כחולות: התפרחות אולחו בצורה מלאכותית בזמן הפריחה (שלב F_0). ערכי עמודות שלידן כוכבית שונים זה מזה במובהק כנקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P < 0.05$.

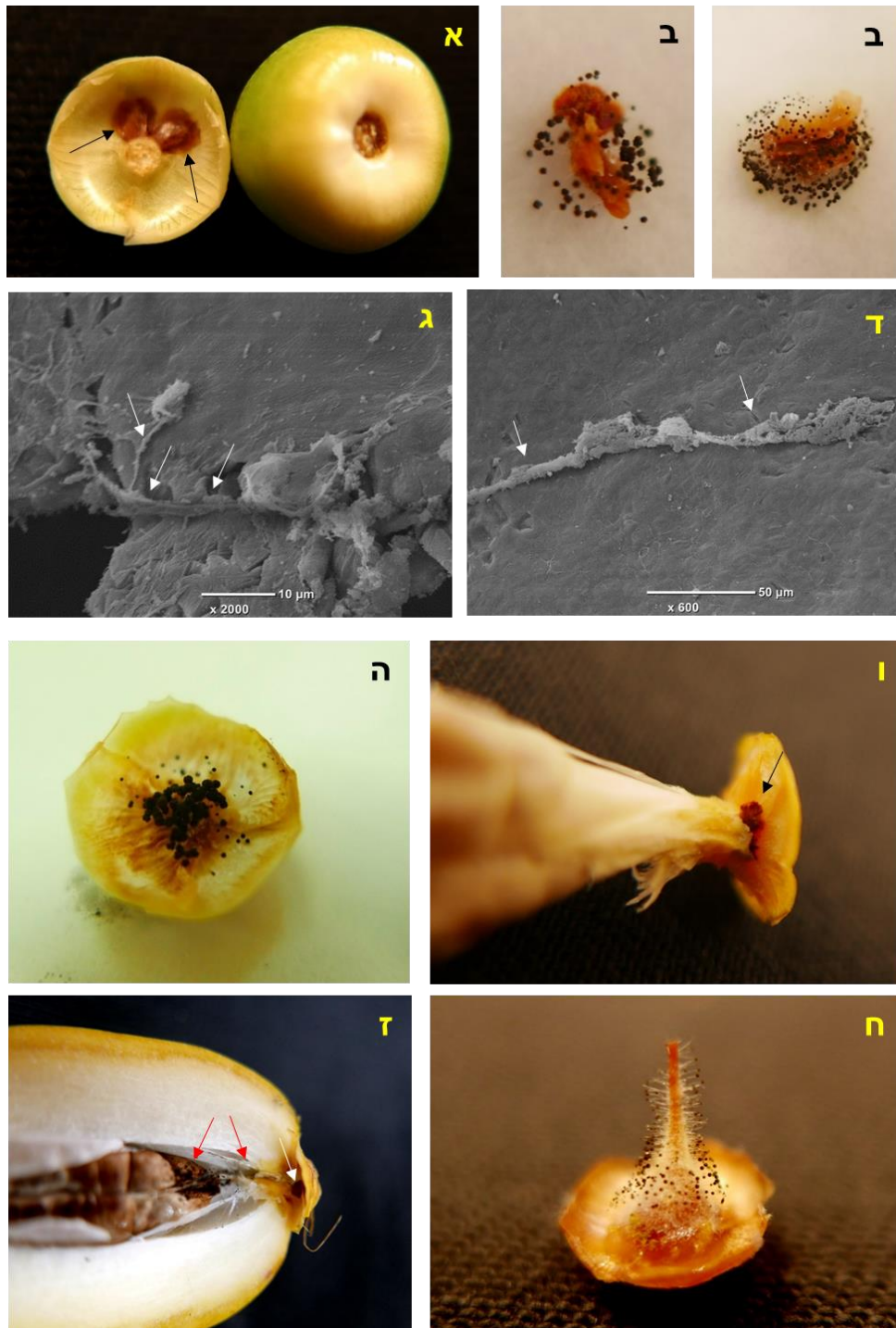
פרחי התמר מכילים שלוש שחלות שרק אחת מהן חונטת ורק ממנה מתפתח פרי. שתי השחלות הנותרות אינן חונטות ובתוך זמן קצר הן מתנוונות. בשלב התפתחות F_1 ניתן לראות את שרידי השחלות המתנוונות מחוברים לעלי החפה (איור מספר 5). בחתך רוחבי של חנט ניתן לראות שרידי שתי השחלות שהתנוונו נמצאים מתחת לעלי החפה ומגיעים עד לבסיס החנט המתפתח (איור מספר 5). בחלוף הזמן, שרידי השחלות המתנוונות המחברים מבחוץ לעלי החפה נושרים ונעלמים (איור מספר 6). כשהונחו חנטים (שחוטאו חיצונית) בצלחות פטרי על גבי מצע מזון התפתח מחלק מהם אספרגילוס. בארבעים ושמונה מתוך 54 החנטים שנבחנו (88.9%) ניתן היה לקבוע, בסבירות רבה, מהיכן התפתח האספרגילוס. ב- 43 חנטים (79.6%) נראה שהאספרגילוס התפתח מתחת לעלי החפה (איור מספר 7) ובחמשת הפירות הנותרים (9.2%) נראה שהמקור היה מאזור הכוד של החנטים.



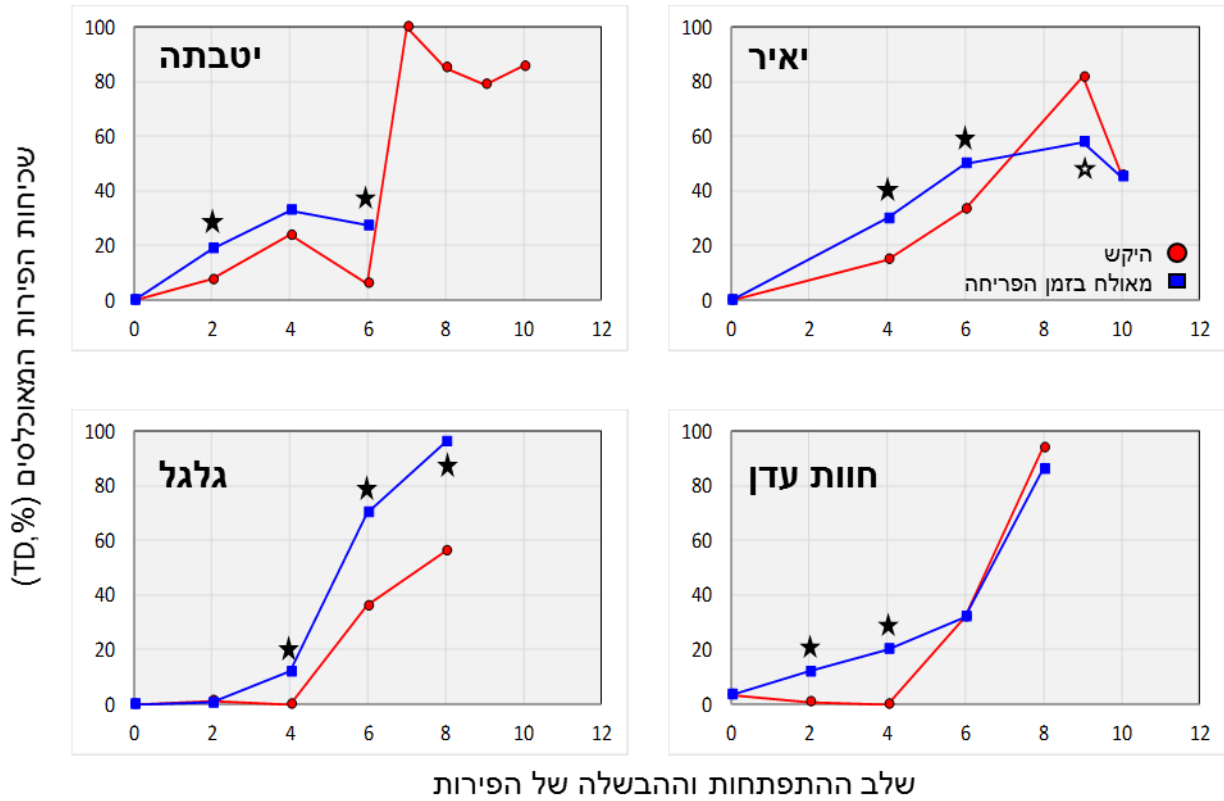
איור מספר 5. צילומים של חנטי תמר בשלבי התפתחות שונים: **א.** חנטים מחוברים לסנסן בשלב F_1 . החצים הלבנים מסמנים השחלות המתנוונות שנשארו מחוברות לעלי החפה. **ב.** חתך בחנט בשלב F_1 . החץ מסמן את מקום החיבור של שחלה מנוונת לכוד של השחלה הפורייה שחנטה; **ג.** חנטים מחוברים לסנסן בשלב F_2 . שרידי השחלות המנוונות נשרו. **ד.** פירות בשלב F_2 שהונחו על מצע מזון. אספרגילוס התפתח מתחת לעלי החפה (חיצים צהובים) והפטרייה גדלה על מצע המזון (חץ לבן).

המשכנו ועקבנו אחר איכלוס הפירות באספרגילוס. שאריות של השחלות המנוונות נשארות מתחת לעלי החפה במשך כל שלבי ההתפתחות וההבשלה של הפירות (איור מספר 6א, ו, ז). כשהסרנו את שאריות השחלות המנוונות (להלן – קשקשים) מעלי החפה והנחנו אותן על גבי נייר סינון לח, התפתח בחלק מהם תפטיר ונבגים של אספרגילוס (איור מספר 6ב). קשקשים שהוסרו מפירות א-סימפאומטיים בשלב הבשלה F_4 נבחנו במיקרוסקופ אלקטרוני סורק. בחלק מהם נראו קורים של פטרייה הגדלים אפיפיטית על גבי הריקמה הצמחית המתה (איור מספר 6ג, ד). כשהנחנו עלי חפה שכללו את הקשקשים בתא לח התפתח תפטיר מנביג של אספרגילוס במרכז עלי החפה (איור מספר 6ה). במעקב יומי אחר התפתחות האספרגילוס באמצעות בינוקולאר ניתן היה לראות שהפטרייה התחילה לצמוח מהקשקשים המנוונים. תסמיני עובש שחור נראו לראשונה בפירות בשלב F_6 . נראה שהתסמינים הראשונים מתפתחים באזור הכוד, על צינורות ההובלה חודרים לפרי בסמיכות לקשקשים המנוונים (איור מספר 6ז). גם כשלוקחים עלי חפה וצינורות הובלה המחוברים אליהם מפירות בשלים בריאים (פירות א-סימפוטומטיים) ומניחים אותם בתא לח מתפתח מאזור הכוד תפטיר מנביג של אספרגילוס (איור מספר 6ח).

המשכנו ועקבנו אחר האיכלוס של פירות תמר בארבעת הניסויים במשך כל העונה. שכיחות הפירות המאוכלסים באספרגילוס הייתה נמוכה מ – 40% עד לשלב F_4 בכל הניסויים, ועלתה בחזות משלב הבשלה F_6 ואילך. בכל הניסויים היו הבדלים מובהקים בשכיחות הפירות המאוכלסים בין פירות שנדגמו מתפרחות שאולחו לבין פירות שנדגמו מתפרחות שלא אולחו בזמן הפריחה עד לשלבי הבשלה F_4 - F_6 . לאחר שלב זה הבדלים מובהקים בין שני הטיפולים נותרו רק בניסוי שבוצע בגלגל (איור מספר 7).



איור מספר 6. צילומים של חנטים ופירות תמר סימפטומטיים בשלבי הבשלה שונים. א. חנט של תמר בשלב F₃ שממנו הוסרו עלי החפה. שאריות של השחלות שהתנוונו נשארו מחוברות לעלי החפה (מסומנות בחיצים). ב. התפתחות של אספרגילוס על שאריות של שחלות שהתנוונו שהוסרו מהוסרו מחנטים בשלב F₃ והונחו בתא לח; ג, ד. צילומים במיקרוסקופ אלקטרוני סורק של שאריות של השחלות שהתנוונו ונשארו מחוברות לעלי החפה שנלקחו מפירות בשלב F₄. בצילומים ניתן לראות קורים של תפטיר של פטריות המאכלסות חיצונית את השחלות (מסומנים בחיצים לבנים); ה. התפתחות של אספרגילוס על עלי חפה שהוסרו מחנט בשלב F₄ והונחו בתא לח; ו. עלי חפה מחוברים לצינורות הובלה החודרים לפרי תמר חתוך. שאריות של השחלות שהתנוונו נשארו מחוברות לעלי החפה (מסומנות בחץ). הפרי נחתך בשלב F₆; ז. התפתחות תסמיני עובש שחור בכוד של פרי תמר חתוך בשלב F₆. זו הדבקה טבעית וזה המועד המוקדם ביותר בו נראו תסמיני עובש שחור בפירות. התסמינים התפתחו על צינורות הובלה החודרים לפרי (מסומנים בחיצים בצבע אדום). שאריות של השחלות שהתנוונו נשארו מחוברות לעלי החפה (מסומנות בחץ בצבע לבן); ח. התפתחות של אספרגילוס על עלי חפה וצינורות הובלה שהוסרו מפרי א-סימפטומטי בשלב F₈ והונחו בתא לח.



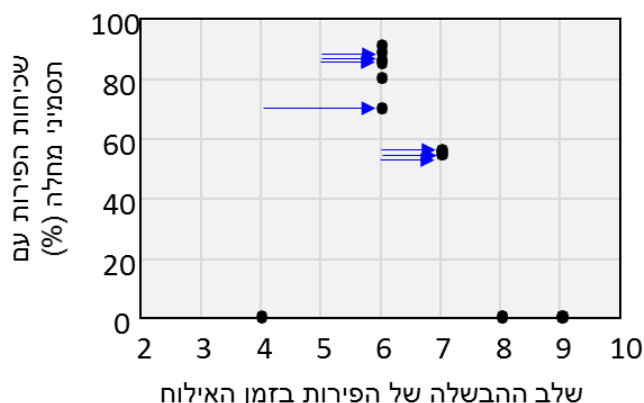
איור מספר 7. דינמיקת האיכלוס של פירות תמר באספרגילוס במהלך ההתפתחות וההבשלה של הפירות בניסויים שבוצעו ביטבתה, חוות יאיר, גלגל וחוות עדן. סימנים וקווים אדומים: האיכלוס הטבעי; סימנים וקווים כחולים: התפתחות אולחו בצורה מלאכותית בזמן הפריחה (שלב F_0). בכל שלב התפתחות, ערכים שלידם כוכבית שונים זה מזה במובהק נקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P < 0.05$.

1.2 הכנה של תבדיד אספרגילוס מסומן ב - GFP

מושבות שבודדו מתמר לצורך טרנספורמציה בעזרת ווקטור (פלסמיד) המכיל את הגן המדווח GFP נמצאו כעמידות לאנטיביוטיקה המשמשת אותנו כסמן סלקציה למושבות טרנספורמנטיות. מכאן עולה שהווקטור המכיל את הגן לעמידות כנגד אנטיביוטיקה זו (היגרומיצין) לא מתאימה לביצוע הטרנספורמציה. בבחינת עמידות המושבות לאנטיביוטיקה אחרת, $G418\ sulfate$, הסתבר שהמושבות מעוכבות במידה יחסית לאלה הגדלות ללא האנטיביוטיקה ולכן החלטנו להחליף את הגן המקודד לעמידות כנגד היגרומיצין בגן המקודד נגד האנטיביוטיקה $G418\ sulfate$. הליך ההחלפה נעשה ואנו נמצאים כיום בשלב הווידוא שהפלסמידים שקיבלנו בהליך אכן מכילים את גן העמידות ל - $G418\ sulfate$ ושהגן להיגרומיצין הוסר מהפלסמיד. הליך זה לוקח מעט זמן אבל יתכן ויאפשר לנו לבצע טרנספורמציה תוך שימוש בסלקציה בהליך הטרנספורמציה דבר שכרגע אינו אפשרי. אפשרות נוספת היא ביצוע טרנספורמציה עם הווקטור הקיים וסריקת אלפי מושבות לביטוי הגן המדווח תחת מיקרוסקופ פלורסנטי. שני הליכים אלה יבוצעו בשנת המחקר הבאה במקביל.

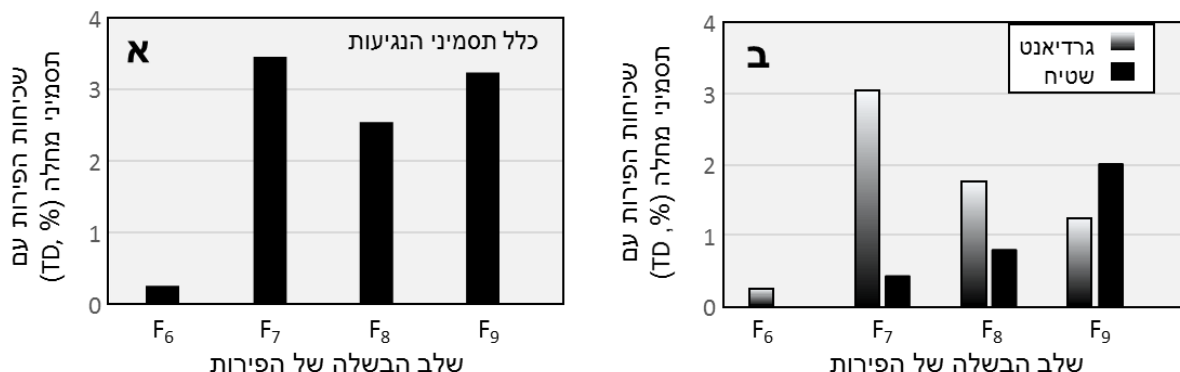
2. שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור

מהניסויים בהם אילחנו פירות באופן מלאכותי עלה ששלב ההבשלה של הפירות קובע באם מתפתחים, או לא מתפתחים, תסמיני עובש שחור בפירות. קיים חלון זמן מוגדר בו מתפתחים תסמינים: בין שלב F_6 לשלב F_7 . בפירות ששלב ההבשלה שלהם מוקדם מ - F_6 או מאוחר מ - F_7 לא מתפתחים תסמיני מחלה חדשים (איור מספר 8).



איור מספר 8. השפעת שלב ההבשלה של פירות תמר בזמן האילוח בבגיי אספרגילוס על התפתחות תסמיני עובש שחור. האילוח בוצע על פירות תמר מנותקים שאולחו בשלבי התפתחות F₄ עד F₉. הופעת התסמינים נקבעה ויזואלית כשבועיים לאחר האילוח. בחלק מהמקרים הפירות הבשילו במהלך הניסוי. מקרים אלה סומנו בחיצים כחולים: תחילת החיצים מסמנים את שלב ההתפתחות של הפירות בעת ההדבקה וקצה החיצים (והעיגול) מסמנים את שלב ההתפתחות בעת הערכת התסמינים. בכל ניסוי היו 20 פירות.

דגמנו מהניסויים פירות בשלבי הבשלה שונים ובחנו באם נראים עליהם תסמיני עובש שחור. תסמיני המחלה האופייניים לא זוהו באף אחד מהפירות שנקטפו בשלב הגידול F₅. בחלק קטן מהפירות שהיו בשלב הבשלה F₆ (0.2%) זוהו תסמיני מחלה ובכל הפירות האלה התסמינים היו מרוכזים באזור הכוד (גרדיאנט). בשלב F₇ הייתה עלייה גדולה בשכיחות הפירות הסימפטומטיים (מ – 0.2% – ל – 3.4%) ומשלב זה ואילך לא היה שינוי בשכיחות הפירות הסימפטומטיים. אבל, עם ההבשלה היה שינוי באופי התסמינים: בעוד שבשלב F₆ ו – F₇ התסמינים התרכזו באזור הכוד (גרדיאנט), עם ההבשלה עלתה השכיחות של הפירות בהם התסמינים היו מפוזרים לאורך כל המצעית (שטיח) (איור מספר 9).



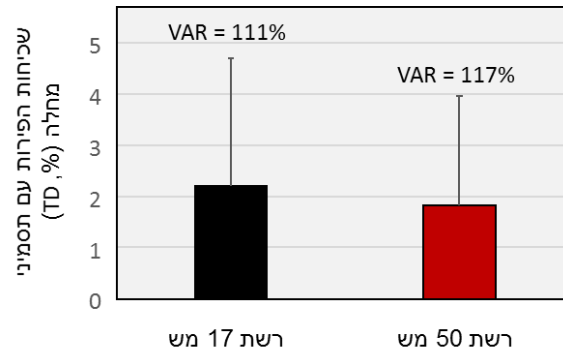
איור מספר 9. הקשר בין שלב ההבשלה של פירות תמר להימצאותם של תסמיני עובש שחור בניסוי שבוצע בחוות עדן. א. כלל תסמיני הנגיעות; ב. חלוקת התסמינים על פי אופיים (גרדיאנט או שטיח). הפירות שנגדדו מיינו לקבוצות על פי שלב ההתפתחות וההבשלה שלהם; כל פרי נחתך ונקבע ויזואלית באם באם נראים עליו תסמיני המחלה ואופיים. מספר הפירות שנבחנו היה 9,050 פירות.

3. הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות

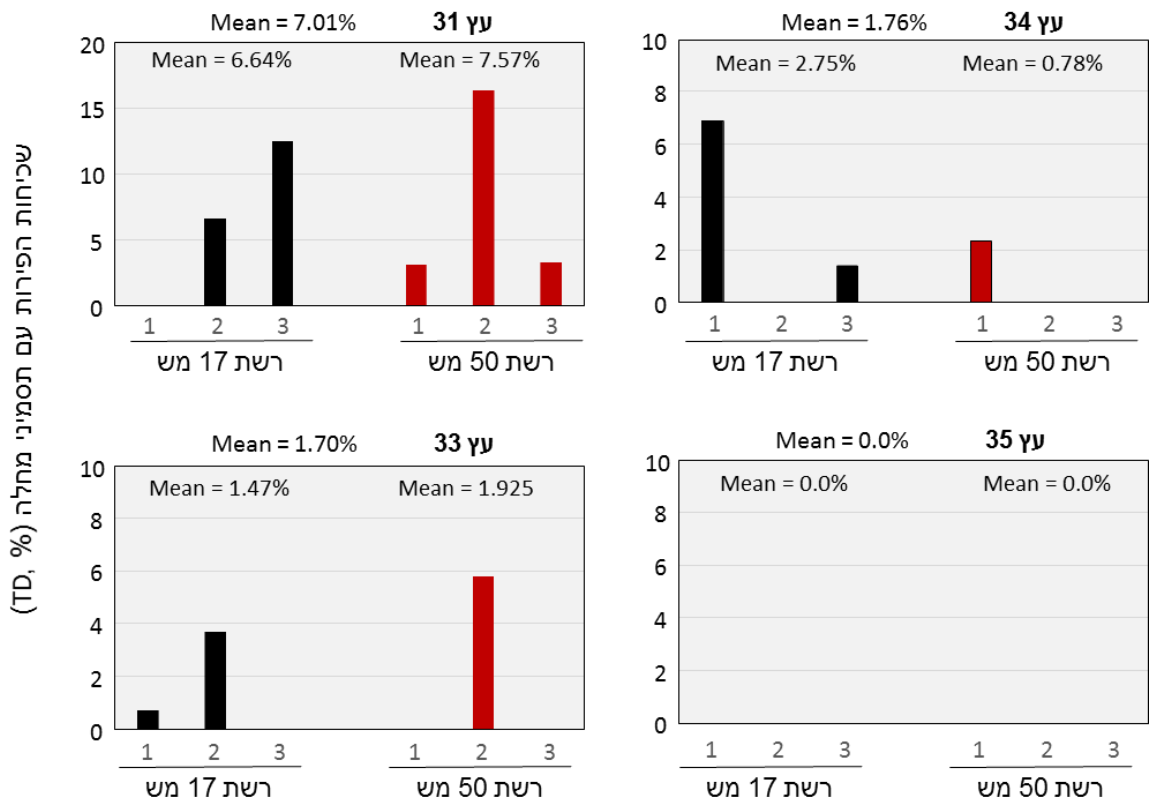
3.1 ממצאים כלליים

בבדיקת הפירות שנגדדו מהניסוי שבצענו בגרופית לא נמצאו כלל פירות שנראו עליהם סימנים של חרקים. אבל, היו פירות שנראו עליהם תסמיני עובש שחור. ההבדלים בשכיחות הפירות עם תסמיני עובש שחור שנגדדו מאשכולות שכוסו ברשתות 50 מש או ברשתות 17 מש לא היו מובהקים. לכן, ניתן היה לבחון את ההבדלים בשכיחות הפירות הסימפטומטיים בין

אשכולות בתוך עץ ובין עצים במטע. מניתוח התוצאות עלה שהשונות בנגיעות בין אשכולות ובין עצים הייתה גבוהה מאד (איור מספר 10). כדי להמחיש נתון זה, מוצגים כאן נתוני הנגיעות של ששה אשכולות שהיו על ארבעה עצים מייצגים (איור מספר 11). בעץ מספר 31 בניסוי היו פירות נוגעים בכל האשכולות שנדגמו והשכיחות הממוצעת של פירות עם עובש שחור הייתה 7.01%. ערך זה הוא ממוצע של אשכולות שהיו עליהם פירות נוגעים ברמות שונות, מ-0% ועד 16.5%. בעץ מספר 35 בניסוי (שהיה במרחק של כ-10 מטרים בלבד מעץ מספר 31) לא היה אפילו פרי אחד עם תסמיני עובש שחור בכל ששת האשכולות שנדגמו (איור מספר 11).

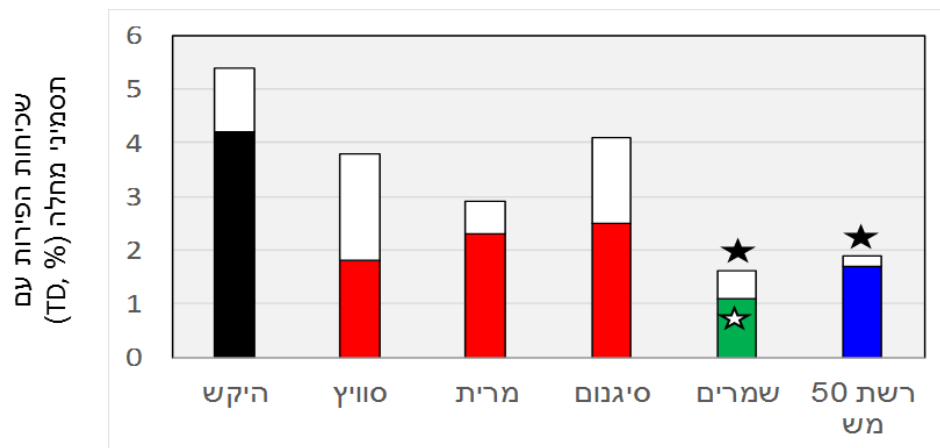


איור מספר 10. השפעת סוג הרשת בה כיסו את האשכולות בניסוי שבוצע בגרופית על שכיחות הפירות שנראו עליהם תסמיני עובש שחור. הקווים האנכיים מייצגים את סטיית התקן (SD). $VAR = (SD) \cdot \text{ערך השונות היחסית (באחוזים) של כל טיפול} \cdot 100 = VAR$.



איור מספר 11. השפעת סוג הרשת בה כיסו את האשכולות על שכיחות פירות התמר שנראו עליהם תסמיני עובש שחור בארבעה עצים מייצגים מהניסוי שבוצע בגרופית. הניסוי כלל שני טיפולים (כיסוי ברשת 50 מש וברשת רגילה של 17 מש) בעשר חזרות (עצים). על כל עץ כוסו שלושה אשכולות ברשת 50 מש (עמודות בצבע אדום) ושלושה אשכולות ברשת 17 מש (עמודות בצבע שחור). ערכי הנגיעות הממוצעת לשלוש האשכולות בטיפול מצויינים מעל העמודות והערכים הממוצעים לעץ רשומים מעל לאיורים.

בבדיקת הפירות שנגדדו מהניסויים שבצענו בחוות יאיר ובגלגל התברר ששכיחות המחלה הייתה נמוכה מאד בכל הטיפולים, ובכלל זה מעצי טיפול ההיקש שאולחו באספרגילוס בזמן הפריחה. בפירות שנגדדו מהניסוי שבצענו ביטבתה התפתחו תסמיני עובש שחור בשכיחות נמוכה מאד (0.6-2.4%) בטיפולים השונים. השונות בין החזרות בכל אחד מהטיפולים הייתה גבוהה מאד ולא ניתן היה להסיק מסקנות מהימנות לגבי ההשפעות של הטיפולים (אם היו). לכן יוצגו בדו"ח זה רק תוצאות הניסוי שבצענו בחוות עדן. ניתוח הממצאים של נתוני הנגיעות מהניסוי שבוצע בחוות עדן העלו שלגורם הראשון בניסוי הדו-גורמי שהיה בחלקות הראשיות – אילוח באספרגילוס לא הייתה השפעה: שכיחות הפירות הסימפטומטיים שנגדדו מעצים שהתפרחו שלהם אולחו בפריחה הייתה 3.5% (ממוצע של כל הטיפולים) בעוד ששכיחות הפירות הסימפטומטיים שנגדדו מעצים שהתפרחו שלהם לא אולחו בפריחה הייתה 4.6% (ממוצע של כל הטיפולים). לעומת זאת, היו הבדלים בין חלק מהטיפולים של הגורם השני בניסוי שהיה בחלקות המשנה - ריסוס בתכשירי הדברה. לכן יוצגו בדו"ח זה רק ההשפעות של טיפולי הגורם השני בניסוי. ריסוס התפרחות בזמן הפריחה בתכשירי ההדברה סוויץ, מרית או סיגנום אמנם הפחית את שכיחות הפירות הסימפטומטיים יחסית להיקש (22-42% הפחתה), אך השפעה זו לא הייתה מובהקת (איור מספר 12). [תוצאות שאר הטיפולים שנכללו בטיפול זה יוצגו בהמשך].



איור מספר 12. השפעת הטיפולים שנכללו בניסוי שבוצע בחוות עדן על שכיחות הפירות שנראו עליהם תסמינים של עובש שחור. עמודות מלאות מציינות את הפירות שנראו עליהם רק תסמינים של עובש שחור (D). עמודות ריקות מציינות את הפירות עליהם נראו תסמינים של עובש שחור ושל חרקים ביחד (Di). ערכי עמודות שלידן כוכבית מציינות הבדל מובהק מטיפול ההיקש כנקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P < 0.05$.

3.2 מעורבות של מיקרואורגניזמים המאכלסים את הפירות

3.2.1 אפיון מיקרואורגניזמים שבודדו על מצעי מזון

נכון לעכשיו בודדו כ-200 מ"א, מתוכם זוהו בשיטות מולקולריות 45 מינים שונים של חיידקים, שמרים ופטריית חוטיות. בהמשך יעשה פילוח נוסף של תוצאות הריצוף ויקבע שיעור הסוגים והמינים השונים מכלל האוכלוסייה של מיקרואורגניזמים שבודדו. התוצאות המוצגות בטבלה מספר 2 מראות מגוון גדול של חיידקים, שמרים ופטריית חוטיות. מבינם נמצא שסוג החיידקים השולטים שזוהו היה *Bacillus* (9 מינים); סוגי הפטריות החוטיות הנפוצים הם: *Penicillium* (6 מינים) ו-*Aspergillus* (6 מינים); סוגי השמרים כללו: *Cryptococcus* (2 מינים), *Hanseniospora* (3 מינים), *Pichia* (4 מינים), *Rodotorula* (2 מינים) ו-*Meyerozyma* (2 מינים).

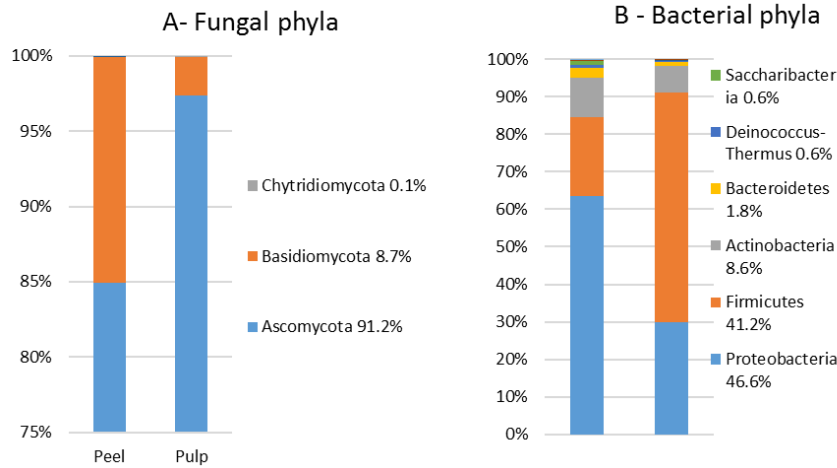
טבלה מספר 2: כלל המינים של המיקרואורגניזמים שבדדו וזוהו עפ"י רצפים שמורים ב-DNA הריבוזומלי

Yeast	Fungi	Bacteria
<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Cryptococcus diffluens</i>	<i>Panicillium expansum</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Cryptococcus terrestris</i>	<i>Aspergillus amstloodami</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Aspergillus chevalieri</i>	<i>Bacillus flexus</i>
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Bacillus kochii</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Aspergillus ruber</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Bacillus tequilensis</i>
<i>Naganishia diffluens</i>	<i>Eurotium intermedium</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Naganishia liquefaciens</i>	<i>Exophiala oligosperma</i>	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>
<i>Pichia caribbica</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Penicillium commune</i>	
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Penicillium flavigenum</i>	
<i>Pichia khuyveri</i>	<i>Penicillium italicum</i>	
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	<i>Penicillium mononematosum</i>	
<i>Rhodotorula babjevae</i>	<i>Rhizopus stolonife</i>	
<i>Rhodotorula glutinis</i>		

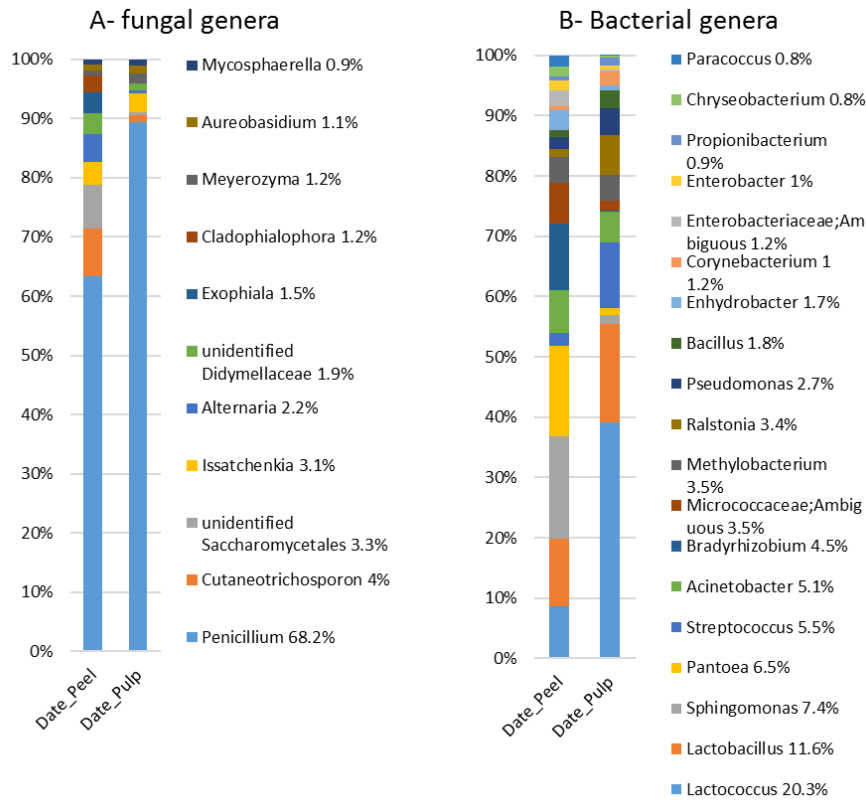
3.2.2 איפיון המיקרוביום מרקמת הפרי (מטאגנומיקה)

מכלל הדוגמאות של חלקי הפרי השונים (קליפה וציפה) שנשלחו לריצוף התקבלו 6169406 רצפים של המקטע ITS (המשוייכים לפטריות) ו-3970590 רצפים של 16S (המשוייכים לחיידקים). לאחר ניקוי התחלתי של הרצפים השונים מרצפים השייכים לצמח נותרו 4054098 רצפים של פטריות, עם ממוצע אורך רצפים של ITS הוא 349bp ו-188481 רצפים של 16S, עם ממוצע אורך רצף של 280bp. מכלל הרצפים של המיקרוביום אותרו 1060 סוגי פטריות ו-5584 סוגי חיידקים עם 97% התאמה לרצפים של חיידקים ופטריות קיימים במאגרי המידע. בניתוח התוצאות של כלל המיקרוביטה נמצא ש-99% מהמיקרוביום הפטרייתי מכיל שתי משפחות עיקריות: *Ascomycota* (91.2%) ו-*Basidiomycota* (8.7%) וכמות קטנה המשפחה *Chytridiomycota* (0.1%), ואחוז נמוך ביותר של המשפחות *Monoblepharomycota* ו-*Mucoromycota* (איור מס. 4). מניתוח הרצפים של 16S עולה שהמשפחות החיידקים הנפוצות הן: *Proteobacteria* 46.60%, *Firmicutes* 41.20%, *Actinobacteria* 8.60% ו-*Bacteroidetes* 1.80% (ממוצע (איור מספר 13). מגוון החיידקים והפטריות נמצא גדול יותר בקליפת הפרי מאשר בציפת הפרי.

בניתוח שנעשה לקביעת סוגי הפטריות נמצא ש-*Penicillium* היא הפטרייה הנפוצה ביותר בפרי ומהווה 84.1% מכלל הפטריות בציפה ו-52.4% בקליפה (איור מספר 14). אחריה הסוג *Cutaneotrichosporon* 1.1% ו-6.8% בהתאמה, *Saccharomycetales* 0.5% ו-6.5% בהתאמה, *Issatchenkia* 3.2% ו-3.0% בהתאמה ו-*Altenaria* 0.5% ו-3.9% בהתאמה ועוד פטריות בשכיחויות קטנות יותר. בבדיקת סוגי החיידקים נמצא שהחיידק הנפוץ בכלל הדוגמאות של הציפה הוא *Lactococcus* ומהווה 33.8% ואחריו בסדר יורד *Lactobacillus* 14.2%, *Streptococcus* 9.3%, *Acinetobacter* 4.5% ואילו בקליפה החיידק הנפוץ הוא *Sphingomonas* המהווה 13.6% ואחריו *Pantoea* 12%, *Lactobacillus* 9%, *Bradyrhizobium* 8.8%, *Lactobacillus* 6.9% וחיידקים נוספים בשכיחויות קטנות יותר. באיור מספר 14 מוצגים כלל סוגי הפטריות והחיידקים המאכלסים את הקליפת ואת הציפה של פירות בשלים.



איור מספר 13: תוצאות האנליזה המיטאגנימות של המיקרואורגניזמים בקליפה ובציפה של פרי תמר מזן מג'הול לפי שיעורם היחסי של משפחות הפטריות (A) והחיידקים (B).

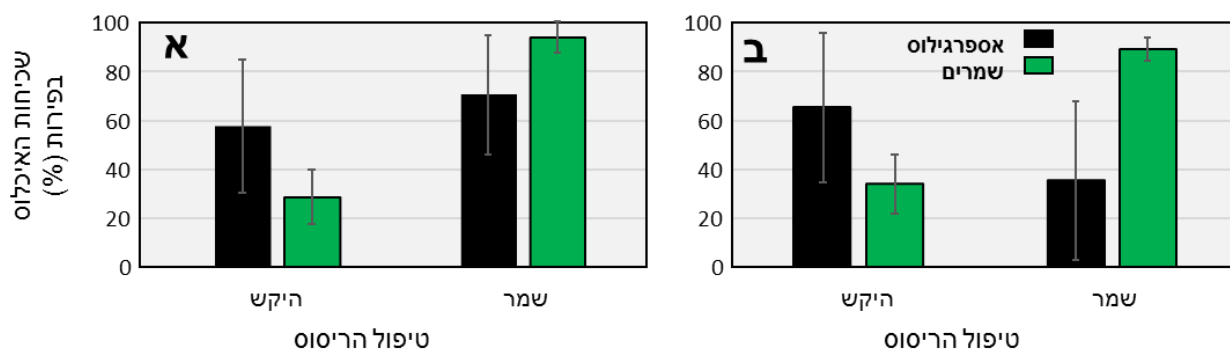


איור מספר 14: תוצאות האנליזה המיטאגניומית המיקרואורגניזמים בקליפה ובציפה של פרי תמר בשל מזן מג'הול לפי סוגי הפטריות (A) והחיידקים (B).

3.2.3 השפעת המיקרואורגניזמים המאכלסים את הפירות על התפתחות תסמיני עובש שחור

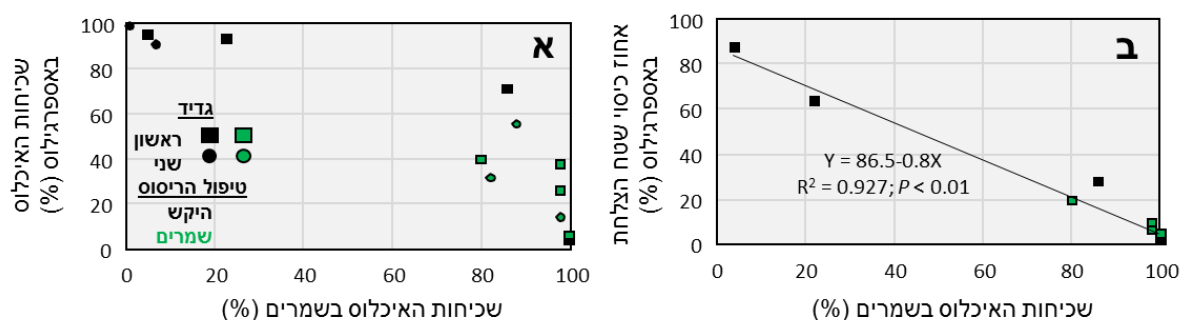
התכשיר 'שמר' רוסס בזמן הפריחה של תפוחות בניסויים שבוצעו בחוות יאיר, בגלגל ובחוות עדן. בבידודים שבצעו מפירות בשלים (בשלים F₇ – F₁₀) שנגדו מטיפול ההיקש (שלא רוסס בתכשירים כל שהם) ומטיפול השמר' של שני הניסויים

הראשונים לא גדלו על צלחות הפטרי שמרים. אבל, בבידודים שבוצעו מפירות בשלים שנגדדו מהניסוי שבוצע בחוות עדן גדלו על צלחות הפטרי שמרים מפירות רבים. לא היו הבדלים בשכיחות הפירות המאוכלסים בשמרים בין הגדיד הראשון לגדיד השני (עמודות ירוקות באיור מספר 15). אבל, שכיחות האיכלוס בשמרים של פירות שנגדדו מאשכולות שרוססו בתכשיר 'שמר' בזמן הפריחה (כ – 90%) הייתה גבוהה יותר מהשכיחות של פירות שנגדדו מאשכולות טיפול היקש, שלא רוססו בתכשיר 'שמר' (כ – 30%). ההבדלים בשכיחות איכלוס הפירות באספרגילוס בין טפול היקש לטיפול 'שמר', בשני הגדידים, לא היו מובהקים עקב שונות גבוהה (עמודות שחורות באיור מספר 15).



איור מספר 15. השפעת טיפול הריסוס (היקש או ריסוס בתכשיר 'שמר') על שכיחות הפירות שאוכלסו באספרגילוס (עמודות שחורות) או בשמרים (עמודות ירוקות) בניסוי שבוצע בחוות עדן. א. גדיד ראשון (18 בספטמבר); ב. גדיד שני (2 באוקטובר). הקווים האנכיים מייצגים את סטיית התקן.

כפי שתואר באיור מספר 7 פירות תמר בשלים מאוכלסים באספרגילוס גם אם לא נראים עליהם תסמיני עובש שחור. בבידודים שבוצעו מפירות בשלים, א-סימפטומטיים, שנדגמו מהניסוי שבוצעו בחוות עדן נמצא מתאם בין איכלוס הפירות בשמרים לאיכלוסם באספרגילוס. המתאם לא היה קשור לטיפול הריסוס ('שמר' או היקש) ולמועד הגדיד (ראשון או שני) (איור מספר 16א). פירות שנגדמו מאשכולות שרוססו בתכשיר 'שמר' בזמן הפריחה היו בכל המקרים מאוכלסים בשמרים בשכיחות גבוהה מפירות שנגדמו מאשכולות טיפול היקש (סימנים ירוקים באיור מספר 16א). אבל, היו מקרים ששמרים בודדו בשכיחות גבוהה גם מפירות שנגדדו מאשכולות טיפול היקש (סימנים שחורים באיור מספר 16א). השמרים שבודדו בצלחות הפטרי משני הטפולים זהו על ידי פרופ' סמיר דרובי והתברר שהם משתייכים למין *Zygosaccharomyces rouxii*. התכשיר 'שמר' מכיל, כזכור, שמרים מהמין *Metschnikowia fructicola*. בנוסף התברר שהנוכחות של שמרים בציפה של פירות התמר הפחיתה את מידת האיכלוס שלהם באספרגילוס. הקשר בין שני המדדים היה לינארי (איור מספר 16ב).



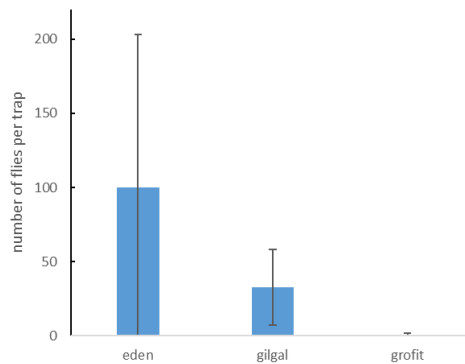
איור מספר 16. הקשר בין איכלוס ציפת הפירות בשמרים לבין איכלוסם באספרגילוס בפירות שנגדמו מהניסוי שבוצע בחוות עדן. כל נקודה באיור מייצגת סיכום של הפירות שנבחנו מעץ אחד בניסוי. סימנים שחורים: פירות שנגדמו מעצי היקש; סימנים ירוקים: פירות שנגדמו מעצים שרוססו בפריחה בתכשיר 'שמר'. עיגולים: פירות שנגדמו בגדיד הראשון (18 בספטמבר); ריבועים: פירות שנגדמו בגדיד השני (2 באוקטובר). א. הקשר בין שכיחות האיכלוס בשני המיקרואורגניזמים בפירות. ב. הקשר בין אכלוס הפירות בשמרים לאחוז הכיסוי של שטח צלחות הפטרי באספרגילוס. הסבר בטקסט.

בניסוי שבצענו בחוות עדן, ריסוס התפרחות בתכשיר 'שמר' בזמן הפריחה הפחית את שכיחות הפירות שהיו נגועים רק בעובש שחור (D), עמודות מלאות באיור מספר 12) וגם את השכיחות של פירות שהיו נגועים בעובש שחור וגם בחרקים (D_i). גם ההפחתה זו הייתה משמעותית (67%) ומובהקת (איור מספר 12).

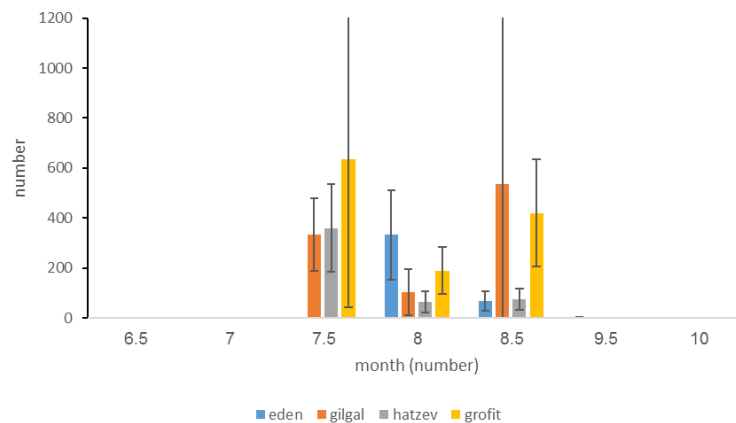
3.3 מעורבות של חרקים

3.3.1 שינויים באוכלוסיות החרקים במטעים עם הזמן

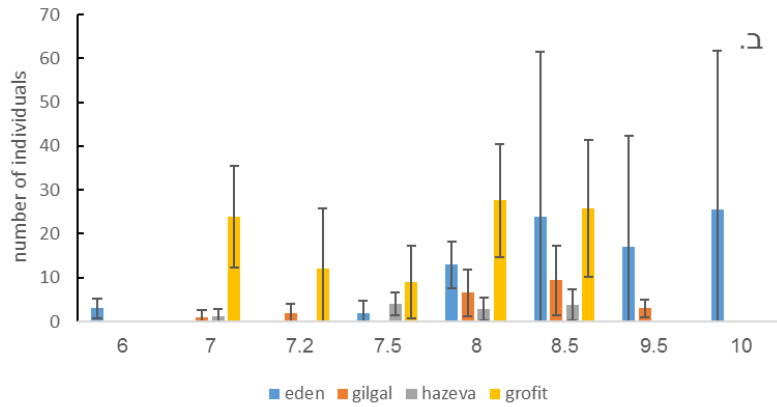
המזיקים שנבדקו נוכחים בארבעת המטעים שנבדקו (איורים מספר 27-29). הייתה שונות גבוהה מאד ברמות הלכידות של המזיקים בין המלכודות במטע. מבחינת לכידות הזבוב נראה הבדל בולט בין המטעים: שכיחות הזבובים במטע גרופית היתה זניחה, בעוד זבובים רבים נלכדו בחוות עדן. One way anova ($F(2,12)=3.44, p=0.066$). Tukey post hoc: Grofit vs. Eden: $p=0.06$. Hatzev: $p=0.06$. חיפושיות תסיסה נלכדו במשך חודש ימים בלבד. הם התחילו להופיע במלכודות רק מאמצע יולי כאשר התמרים התחילו כבר להבשיל והאשכולות היו מכוסים. בגרופית המזיקים הבולטים היו חיפושיות תסיסה, עש תמר הקטן, ועשים לא ידועים.



איור מספר 17. כלל זבובי פירות שנלכדו במהלך הניסויים. הניסויים נמשכו חודשיים בגרופית, 3 חודשים בגלגל ו- 3.5 חודשים בחוות עדן. התוצאה היא ממוצע של לכידות למלכודת עם שגיאת תקן של 5 חזרות. המטע בחצבה היה סמוך למפעל גידול זבובי פירות ולכן המלכודות בו לא נספרו כי היו מלאות בזבובים שחלקם הגדול כנראה הגיע מהמפעל.



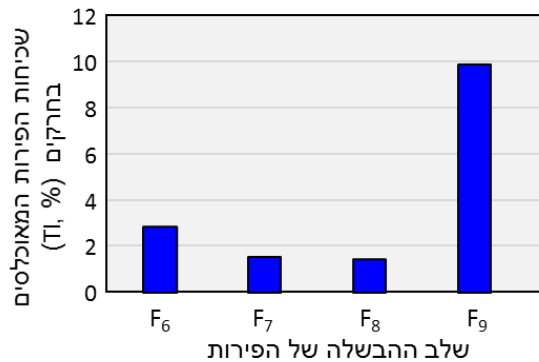
איור מספר 18. כלל חיפושיות תסיסה שנלכדו במהלך הניסוי מאמצע יולי (6.5) עד אוקטובר (10). התוצאה היא ממוצע של לכידות למלכודת עם שגיאת תקן של 5 חזרות. * באמצע ספטמבר (9.5) חיפושיות הקליפה נבדקו רק בחוות עדן וגלגל ואילו באוקטובר (10) נבדקו רק בגלגל. החיפושיות התחילו להופיע רק מאמצע יולי (7.5) ואילו בתחילת יולי הן לא נצפו באף אחד מהמטעים.



איור מספר 19. לכידות העשים (א) עש תמר הקטן (ב) עשים קטנים יותר מסוג לא ידוע שנלכדו במהלך הניסוי מיוני (6) עד אוקטובר (10). התוצאה היא ממוצע של לכידות למלכודת עם שגיאת תקן של 5 חזרות. במלכודות נמצאו בוגרי עש תמר הקטן ועשים קטנים יותר שזיהוים אינו ידוע בשלב זה. * באמצע ספטמבר (9.5) העשים נבדקו רק בחוות עדן וגלגל ואילו באוקטובר (10) נבדקו רק בגלגל. ביולי (6) נבדקו רק בחוות עדן.

3.3.2 השפעת חרקים (חיפושיות תסיסה) המאכלסים את הפירות על התפתחות תסמיני עובש שחור

שכיחות הפירות המאכלסים בחרקים השתנתה עם הזמן ועם ההבשלה של הפירות. באף אחד מהפירות שנקטפו בשלב הגידול F_5 לא זוהו סימני איכלוס בחרקים. בחלק מהפירות שנגדדו בשלבי הבשלה F_6 עד F_8 (1.6-2.8%) זוהו סימני איכלוס בחרקים ולא היו הבדלים משמעותיים באיכלוס בחרקים בין שלבי הבשלה אלה. אבל, בשלב הבשלה F_9 הייתה עלייה גדולה בשכיחות הפירות המאכלסים (מ 2% ל 10%). במרבית המקרים החרקים היו חיפושיות תסיסה (איור מספר 20).

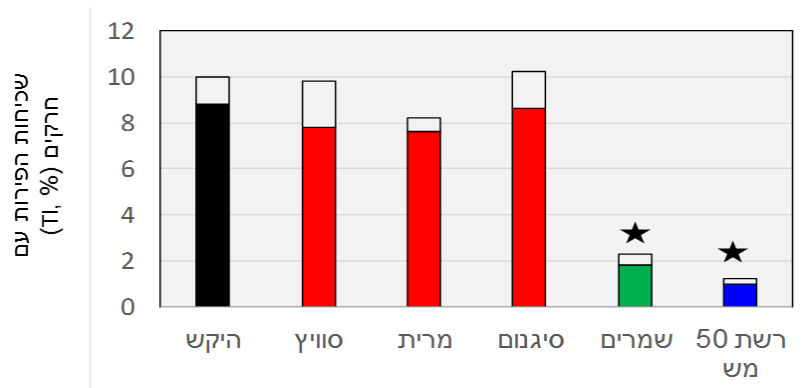


איור מספר 20. הקשר בין שלב ההבשלה של פירות תמר לאיכלוסם בחיפושיות תסיסה בניסוי שבוצע בחוות עדן. הפירות שנגדדו מיינו לקבוצות על פי שלב ההתפתחות וההבשלה שלהם; כל פרי נחתך ונקבע וויזואלית באם באם נראים עליו תסמינים המצביעים על אכלוס בחרקים (זחלים, סימני אכילות, וכו'). מספר הפירות שנבחנו היה 9050 פירות.

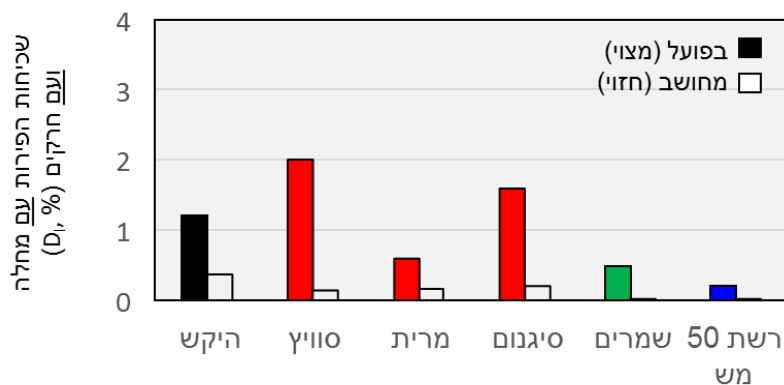
הטיפולים שנכללו בניסוי שבוצע בחוות עדן השפיעו בצורה שונה על איכלוס הפירות בחרקים. בעוד שריסוסי הפריחה בתכשירי ההדברה סוויץ, מרית וסיגנום לא השפיעו (כצפוי) כלל, התברר (שלא כצפוי) שריסוס הפרחים בתכשיר 'שמר' הפחית במובהק את שכיחות הפירות המאכלסים בחרקים – הפחתה של 78%. כיסוי האשכולות ברשת 50 מש בשלב F_5 הפחית גם הוא במובהק את האיכלוס בחרקים ב – 88% (איור מספר 21).

כשמיינו את הפירות שנגדדו מחוות עדן התברר שבחלק מהם נראו סימני חרקים וגם תסמינים של עובש שחור. שכיחות הפירות שהכילו את שני הפגעים נעה בין 0.2% (בטיפול "רשת 50 מש") ל – 2% (בטיפול "ריסוס תפוחות בסוויץ"). השתמשנו בנתוני האיכלוס של כל פגע בנפרד (הנתונים המדודים; איורים מספר 12 ו – 21) לחישוב השכיחות החזויה (הצפויה) של שני

הפגעים. לאחר מכן השווינו את הערכים החזויים לערכים שהיו בפועל (איור מספר 22). התברר, שבכל המקרים הערכים שהתקבלו בפועל היו גבוהים יותר (עד פי 10) מהערכים המחושבים. ממצא זה מרמז על קשר סינרגיסטי בין שני הפגעים.

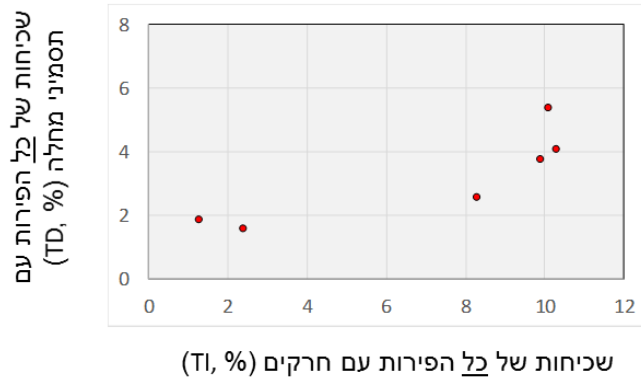


איור מספר 21. השפעת הטיפולם שנכללו בניסוי שבוצע בחוות עדן על שכיחות הפירות שנראו עליהם סימני איכלוס של חרקים. עמודות מלאות מציינות את הפירות שנראו עליהם רק סימני איכלוס של חרקים (I). עמודות ריקות מציינות את הפירות עליהם נראו תסמינים של עובש שחור ושל חרקים ביחד (D). ערכי עמודות שלידן כוכבית מציינות הבדל מובהק מטיפול היקש כנקבע על פי מבחן χ^2 ברמת מובהקות $P < 0.05$.



איור מספר 22. השפעת הטיפולם שנכללו בניסוי שבוצע בחוות עדן על השכיחות של פירות שנראו עליהם תסמינים של עובש שחור ושל חרקים ביחד (D), ועל השכיחות המחושבת של הפירות הללו. השכיחות המחושבת נאמדה על ידי הכפלה של שכיחות הפירות שנראו עליהם רק תסמינים של עובש שחור (D) בשכיחות הפירות שנראו עליהם רק סימני איכלוס של חרקים (I).

לבסוף, בחנו את הקשר בין איכלוס הפירות בחרקים להתפתחות תסמיני עובש שחור בפירות. כיסוי האשכולות בשלב הבשלה F_5 ברשת 50 מש לא השפיע מובהק על שכיחות הפירות שהיו נגועים רק בעובש שחור (D באיור מספר 12) אבל הפחית בצורה מובהקת את שכיחות הפירות עם תסמיני עובש שחור וסימני איכלוס בחרקים, גם יחד (D). הפחתה זו הייתה משמעותית (62.5%) ומובהקת (איור מספר 12). כשניתחנו את תוצאות כל הטיפולים שנכללו בניסוי שבוצע בחוות עדן יחד התברר שקיים מתאם חיובי בין איכלוס הפירות בחרקים להתפתחות תסמיני עובש שחור: עם העליה בשכיחות האיכלוס בחרקים הייתה גם עלייה (לא לינארית) בשכיחות הפירות הנגועים בעובש שחור (איור מספר 23).



איור מספר 23. הקשר בין שכיחות פירות התמר שנראו עליהם סימני איכלוס בחרקים לשכיחות הפירות שנראו עליהם תסמיני עובש שחור בניסוי שבוצע בחוות עדן. כל נקודה באיור מתייחסת לטיפול אחד בניסוי.

VI. דיון ומסקנות

היעדים של המיזם, כפי שהוגדרו על ידי וועדת ההיגוי הם לפתח גישות למזעור כמות הפירות הסימפטומטיים במטע, לאחר הגדיד ובמהלך האיחסון. את שנת המיזם הראשונה הקדשנו לחקר המערכת הביולוגית תוך הנחה שהבנת התהליכים המתרחשים תאפשר לנו להגיע לתובנות כיצד ניתן להתמודד עם המחלה. לא עסקנו בשאלה מהיכן מגיע גורם המחלה כי בניסויים המקדימים (שבוצעו לפני תחילת המיזם) מצאנו שפטריית האספרגילוס נפוצה מאד במטעי התמר בארץ ולכן חוסר הימצאותו של מידבק לא מהווה גורם המגביל את התפתחות המחלה. בשנת המיזם הראשונה ניסינו לקבוע את המקום ואת המועד בהם מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס ואת שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור. מאחר ומרבית הפירות מאוכלסים בגורם המחלה אבל רק בחלק קטן מהם מתפתחים תסמינים של עובש שחור, ניסינו גם לאפיין את הגורמים המשפיעים על התפתחות התסמינים בפירות.

1. המקום והמועד בהם מתרחשת ההדבקה של פירות באספרגילוס

כפי שצויין, פטריית האספרגילוס נפוצה מאד במטעי התמר בארץ. חשוב מאד להגדיר מתי הפטרייה מדביקה ואיך היא חודרת לפרחים, לחנטים או לפירות, מפני שמידע זה חיוני לפיתוח ממשק יעיל למניעת ההדבקה. היפותזת העבודה שלנו הייתה שההדבקה באספרגילוס מתרחשת בזמן הפריחה. חשבנו שהפטרייה חודרת דרך עמוד העלי, מתקדמת בשחלה במסלול מקביל לזה של נחשון האבקה ומאכלסת את אזור הכוד של החנטים. לאחר מכן הפטרייה שורדת כתפטיר רדום עד לתחילת שלב ההבשלה. אז פעילותה מתחדשת ובהמשך מתפתחים במצעית של הפירות התסמינים האופייניים של עובש שחור. היפותזת עבודה זו נסתרה כבר בתחילת הבדיקות והניסויים שבצענו. התברר שפרחים לא מאוכלסים בגורם המחלה, וכך גם הסנסנים, ושהתחלת האיכלוס היא בשלב החנטים F_1 , המאוחר יותר (איור מספר 4). הממצאים שהצטברו מחזקים את ההנחה שגורם המחלה מאכלס את שרידי השחלות המתנוונות. תפטיר של הפטרייה צומח של שרידי השחלות והפטרייה מתבססת בקשקשים הנמצאים בבסיס הכוד של הפירות בסמיכות לצינורות ההובלה החודרים לתוך הפירות (איורים מספר 5, 6). שם הפטרייה שורדת בצורה רדומה עד לשלב הבשלה F_6 , שלאחריו מתחילה הפטרייה להתפתח וצומחת מאזור הכוד אל פנים הפרי, אל האזורים הפנימיים של הציפה. העובדה שבניסויים שבצענו שכיחות האיכלוס הייתה גבוהה יותר בתפרחות

שרוססו בנבגי אספרגילוס בפריחה (איור מספר 7) מחזקת מסקנה זו. ניתן להניח שהנבגים שריססנו בשלב הפריחה שרדו על השחלות והדביקו אותן אחרי שהשחלות התנוונו. באותו האופן, ההשפעה החיובית (אך החלקית והלא-מובהקת) של הריסוס בתכשירי ההדברה בזמן בפריחה (איור מספר 6) והעובדה שבתחילה התסמינים השכיחים יותר הם תסמינים של גרדיאנט ובהמשך תסמינים של שטיח (איור מספר 9) מחזקים מסקנה זו. מעקב אחר דינמיקת האיכלוס של הפירות במהלך ההתפתחות וההבשלה שלהם הראה שפירות עלולים להתאכלס באספרגילוס גם בשלבי הבשלה מאוחרים יותר ושקיימת "קפיצה" בשכיחות הפירות המאוכלסים אחרי שלב F_6 (איור מספר 7). כפי שיוסבר בהמשך אין עדיין מידע לגבי החשיבות של איכלוס הפירות בשלבים מאוחרים של ההבשלה על התפתחות של תסמיני מחלה. בהמשך המיזם בכוונתנו להשקיע זמן ומאמצים נוספים כדי לברר את המועד בו מתרחשת הדבקת הפירות ולבחון את ההנחה שההדבקה הראשונית מתרחשת בשלב החנטים, F_1 .

2. שלבי ההבשלה של הפירות בהם מתפתחים תסמיני עובש שחור

כפי שהיה ידוע מהעבר וכפי שנמצא בניסויים שבצענו במסגרת המיזם השנה (איורים מספר 4-7) חלק מפירות מאוכלסים באספרגילוס כבר משלבי ההתפתחות הראשונים שלהם. אבל, תסמיני המחלה האופייניים מתפתחים רק משלב גידול מסויים ואילך. מאחר ואיכלוס אנדופיטי של פירות (פירות שלא שנראים עליהם תסמיני מחלה) לא מהווה בעיה, חשוב להגדיר את השלבים ה"רגישים", השלבים בהם הפטרייה עוברת מהשלב האנדופיטי לשלב הפתוגני. תוצאות הניסויים שבצענו השנה בהם אילחנו פירות באופן מלאכותי (איור מספר 8) והמעקב שבצענו אחר התפתחות תסמינים בפירות שנדבקו בגורם המחלה באופן טבעי (איור מספר 9) מאוששים ומחזקים את הידוע מהעבר: תסמיני עובש שחור לא מתפתחים בשלבי הבשלה מוקדמים משלב F_6 ותסמינים חדשים לא מתפתחים בשלבי הבשלה מאוחרים משלב F_7 . בספרות המקצועית (Turrell *et al.*, 1940) הועלתה ההנחה שנוכחות טננינים בפירות בשלבי ההבשלה המוקדמים, וריכוזי סוכר גבוהים בשלבי ההבשלה המאוחרים, מעכבים את התפתחות התסמינים. אין בידנו מידע המאושש או המפריך הסברים אלה. אבל, בלי קשר לסיבה הפיזיולוגית לקיומו של "חלון התפתחות תסמינים", למידע אודות קיומו של ה"חלון" חשיבות רבה בהתייחס ליעד השני של המיזם: "פיתוח גישות למזעור התפתחות התסמינים לאחר הגידול ובמהלך האיחסון". המשמעות הראשונה של קיום של "חלון התפתחות תסמינים" היא שבמהלך טיפולי ההבחלה שעוברים פירות שנגדדו בשלב F_6 (פירות צהובים) בבית האריזה עלולים להתפתח בפירות א-סימפטומטיים תסמיני עובש שחור. מכאן עולה שכדאי למיין את הפירות שנגדדו צהובים לאחר סיום טיפולי ההבחלה (ולא לפנייהם) ולסלק את הפירות הסימפטומטיים לפני השיווק או האיחסון של הפירות שהובחלו. המשמעות השנייה של קיום של "חלון התפתחות תסמינים" היא שבפירות שנגדדו בשלב הבשלה F_7 ואילך לא יתפתחו תסמיני מחלה חדשים במהלך הטיפול, המיזם והאיחסון. לכן מיון קפדני של הפירות מיד עם קבלתם לבית האריזה מספק ואין צורך לחזור ולמיין אותם שוב לאחר הוצאתם מהאיחסון. זאת מפני שאין חשש שבמהלך האיחסון יתפתחו תסמיני עובש שחור חדשים בפירות. בהמשך המיזם בכוונתנו להשקיע זמן ומאמצים לפיתוח ממשק להבחלת פירות צהובים שימזער את הסבירות להתפתחות תסמיני עובש שחור בפירות אילה.

3. הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות

כפי שהיה ידוע מהעבר וכמו שנמצא בניסויים שבצענו השנה מרבית הפירות מאוכלסים אנדופיטית באספרגילוס, אבל תסמיני עובש שחור מתפתחים רק בחלק קטן מהפירות, אם בכלל. לדוגמה, בניסויים שבצענו בחוות יאיר ובגלגל מרבית הפירות היו מאוכלסים באספרגילוס (איור מספר 7) אבל תסמיני עובש שחור לא התפתחו בפירות שנגדדו כלל. גם בניסויים האחרים

שבצענו (בגרופית, יטבתה וחוות עדן) שכיחות הפירות הסימפטומטיים הייתה נמוכה עשרות מונים משכיחות הפירות שהיו מאוכלסים באספרגילוס. יש חשיבות רבה בהבנת הגורמים להתפתחות תסמינים בפירות מאוכלסים, ואילה הגורמים לכך שלא יתפתחו תסמינים בפירות מאוכלסים אחרים. הבנת הגורמים המשפיעים עשויה להיות הבסיס ל"פיתוח גישות למזעור כמות הפירות הסימפטומטיים במטע", היעד הראשון של המיזם.

מטרת הניסוי שבצענו בגרופית הייתה לבחון את ההשפעה של איכלוס הפירות בחרקים (ובמיוחד - חיפושיות תסיסה) על התפתחות תסמיני עובש שחור. ניסינו להגן על חלק מהאשכולות באמצעות רשת 50 מש ובכך למנוע את איכלוס הפירות בחרקים ולהשוות את הנגיעות בפירות המוגנים ברשת לפירות שלא הוגנו ברשת. הניסוי נכשל, למעשה, מפני שהפירות של שני הטיפולים לא אוכלסו בחיפושיות תסיסה (איור מספר 10). זאת, למרות שלפי הלכידות במלכודות החיפושיות היו נוכחות במטע. אבל, גודנו את הפירות בכל זאת והערכנו את שכיחות הפירות הסימפטומטיים. התברר שלא הוי הבדלים בנגיעות בין רשת 50 מש לרשת 17 מש ולכן ניתן היה לאמוד את השונות בנגיעות בין אשכולות בתוך עץ ובין עצים במטע. התברר שקיימת שונות טבעית גבוהה מאד בנגיעות בעובש שחור בין אשכולות שונים באותו העץ, ובין עצים סמוכים במטע (איור מספר 11). שונות גבוהה בנגיעות בין אשכולות ובין עצים נצפתה גם בניסויים שבצענו השנה ביטבתה ובחוות עדן (תוצאות לא מוצגות). מעבודות של אחרים (למשל, שימעון פיבוניה) עולה שקיימת שונות גבוהה בנגיעות בין מטעים סמוכים באותו האזור. הגורמים לשונות הגבוהה אינם ידועים כרגע, אבל להבנתם חשיבות רבה. יתכן שהגורמים לשונות בנגיעות קשורים למימד הקשור בזמן ההתרחשות של אירועים שונים: למשל, מועד הפריחה והחנטה של התפרחות או ההבשלה של האשכולות. לחילופין, יתכן שהגורמים לשונות בנגיעות קשורים למימד הקשור במרחב: למשל, המיקום של התפרחות והאשכולות במרחב (צפון, דרום, מזרח מערב) או בגובה (למטה או למעלה). יתכן שהגורמים לשונות בנגיעות בין מטעים סמוכים באותו האזור קשורים למימד הקשור לממשק הגידול. בניסויים שבצענו השנה עולה שקיימת שונות גבוהה בנגיעות בין אזורים. יתכן שהגורמים לשונות בין אזורים קשורה לתנאי הסביבה השוררים בעת התרחשותם של אירועים קריטיים בהתפתחות הפירות (כמו מועד הפריחה, החנטה ו/או ההבשלה). בהמשך המיזם בכוונתנו להשקיע זמן ומאמצים לבחינת הגורמים לשונות בנגיעות בין אשכולות בתוך עץ, בין עצים בתוך מטע, בין מטעים בתוך אזור ובין אזורים גידול בארץ.

כפי שצוין פטריית האספרגילוס מאכלסת את מרבית הפירות בצורה אנדופיטית. זה אינו המיקרואורגניזם היחיד המאכלס את הפרחים, את החנטים ואת הפירות. איברים צמחיים אלה מאוכלסים גם בחיידקים, בשמרים ובפטריית אחרות. היפותזת העבודה שלנו הייתה שמיקרואורגניזמים (חיידקים ושמרים) המאכלסים את ציפת הפירות מעכבים את גורם המחלה ומונעים את התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות. ממצאי העבודה שנעשתה ללימוד איכלוס פרי התמר באוכלוסיות מיקרואורגניזמים (מיקרוביוטה) מראים בבירור שהפרי (בחלקיו השונים) מכיל מגוון גדול של מינים שונים של חיידקים, שמרים ופטריית חוטיות (טבלה מספר 2 ואיורים מספר 13 ו-14). בין הפטריות החוטיות נכלל האספרגילוס שגורם לעובש השחור. בהיקשר זה ניתן לציין שלמיקרוביום הטבעי של הפרי יש כנראה תפקיד חשוב בהגנה נגד התפתחות גורמי ריקבון. אנו משערים שכל פגיעה/הפרה של המאזן הטבעי בין אוכלוסיות המיקרואורגניזמים הטבעיים יכולה להוביל להתפתחות של גורמי מחלה.

כדי ל"תגבר" את המיקרואורגניזמים המועילים כללנו בניסויים שבצענו טיפול בו יושם התכשיר 'שמר' (המכיל את השמר *Metschnikowia fructicola*) בזמן הפריחה. התברר שאוכלוסיית השמרים בפירות שנגדדו מאשכולות שרוססו בזמן הפריחה ב'שמר' הייתה גבוהה במובהק מאוכלוסיית השמרים בפירות שנגדדו מאשכולות טיפול ההיקש (איור מספר 15) ושהאיכלוס המוגבר בשמרים הפחית את האיכלוס באספרגילוס (איור מספר 16). יותר מכך, התברר שריסוס התכשיר 'שמר' בזמן הפריחה הפחית במובהק את שכיחות הפירות הסימפטומטיים (איור מספר 12). ניתוח פרטני של הממצאים העלה שהייתה שונות גבוהה באיכלוס הפירות בשמרים וגם פירות שנגדדו אשכולות טיפול ההיקש (שלא רוססו בתכשיר 'שמר') היו מאוכלסים בשמרים (איור מספר 15). בתחילה הנחנו שהשמר אותו ריססנו (*M. fructicola*) הופץ במרחב אבל להפתעתנו

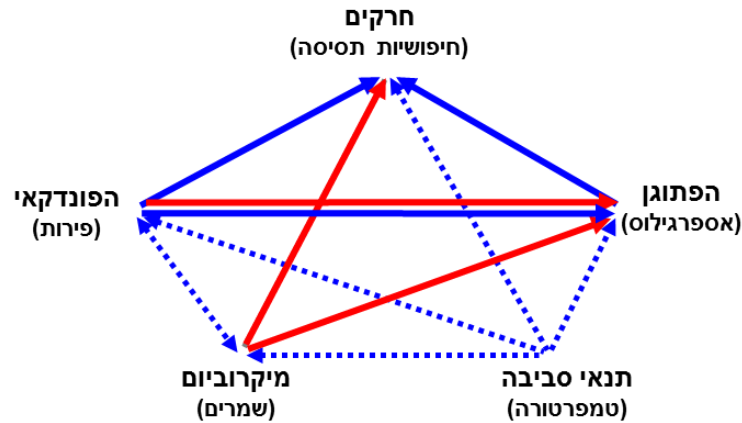
התברר שהשמר שאיכלס את הפירות (בטפול ההיקש ובטיפול הריסוס בתכשיר 'שמר') לא היה השמר שריססנו בפריחה אלא שמר אחר - *Zygosaccharomyces rouxii*. שמר זה מתפתח באופן טבעי במטע והוא היה זה שאיכלס את הפירות. יתכן שריסוס התכשיר 'שמר' בזמן הפריחה גרם לשינוי באוכלוסיית המיקרואורגניזמים המאכלסים באופן טבעי את הפירות ונתן עדיפות לאיכלוס הפירות בשמר *Z. rouxii*. בלי קשר לסיבה של השפעה זו, ריסוס תפרחות בזמן הפריחה בתכשיר 'שמר' גרם להדברה ביולוגית של האספרגילוס ולהפחתה בהתפתחות תסמיני עובש שחור בפירות. תוצאה בלתי צפויה אחרת היא שהריסוס בתכשיר 'שמר' הפחית במובהק את איכלוס הפירות בחיפושיות תסיסה (איור מספר 21). הסיבה להשפעה זו אינה ברורה. יתכן שאיכלוס הפירות בשמרים מהמין *Z. rouxii* גרם להפרשה של חומרים נדיפים שדחו את חיפושיות התסיסה, או לחילופין, למניעת הפרשה של חומרים נדיפים המושכים את חיפושיות התסיסה. הממצאים שתוארו בפיסקה זו מבוססים על הניסוי שבצענו בחוות עדן. חשוב להדגיש שריססנו בתכשיר 'שמר' בזמן הפריחה גם בניסויים שבצענו בחוות יאיר ובגלגל. בשני ניסויים אלה הריסוס לא השפיע על אוכלוסיית המיקרואורגניזמים, לא הפחית את מחלה (שלא הייתה בגלגל) ולא השפיע על האיכלוס חיפושיות התסיסה. הגורמים להשפעות השונות של הריסוס בתכשיר 'שמר' בין הניסויים אינם ברורים. בכל מקרה, בהמשך המיזם בכוונתנו להשקיע זמן ומאמצים לבחינת ההשפעות השונות של ריסוס תפרחות בתכשיר 'שמר' על המיקרואורגניזמים המאכלסים את הפירות המתפתחים והמבשילים, על המחלה ועל חיפושיות התסיסה.

מקובל היה להניח שחרקים (ובמיוחד חיפושיות תסיסה) מחדירים את נבגי האספרגילוס לפירות ובכך מאפשרים את ההדבקה של הפירות בגורם המחלה. מאחר והינחנו שהפירות כבר מאוכלסים בגורם המחלה משלבי ההתפתחות הראשונים, היפותזת העבודה שלנו הייתה שהחרקים לא מחדירים את גורם המחלה לפירות. הינחנו שנוכחות החרקים בפירות מגבירה את רגישות הפירות ומעודדת את התפתחות תסמיני העובש השחור בפירות שכבר מאוכלסים. ניתוח ממצאי הניסויים שבצענו הראו שהגנה על הפירות בפני חרקים באמצעות רשת 50 מש מפחיתה את שכיחות המחלה (איור מספר 12) ושקיים קשר חיובי בין שכיחות האיכלוס של פירות בחרקים לשכיחות המחלה (איור מספר 23). עוד מצאנו ששכיחות הפירות המאוכלסים בחרקים ושהתפתחו בהם תסמיני עובש שחור גבוהה פי 10 ויותר מהשכיחות הצפויה, המחושבת על פי השכיחות של כל פגע בנפרד (איור מספר 22). ממצאים אלה מחזקים לכאורה את ההיפותזה שהעלינו שנוכחות חרקים בפירות מעודדת את התפתחות תסמיני העובש השחור. אבל, בדיקה מדוקדקת יותר של הממצאים מובילה למסקנה הפוכה: מצאנו שלאחר שלב הבשלה F_7 לא נוספו עוד פירות סימפטומטיים חדשים (איור מספר 9) וששכיחות הפירות המאוכלסים בחיפושיות תסיסה עלתה משמעותית רק בשלב הבשלה F_9 (איור מספר 20). מאחר ולא הייתה העלייה בנגיעות במחלה עם העלייה באיכלוס בחרקים, אלא ההפך, נראה לכאורה, שההשפעה היא הפוכה: חיפושיות התסיסה נמשכות לפירות שכבר נראים עליהם תסמינים של עובש שחור. בכל מקרה, בהמשך המיזם בכוונתנו לחזור ולבחון את הקשרים בין חרקים, ובמיוחד חיפושיות תסיסה, לעובש שחור.

VII. סיכום

למיטב שיפוטנו הבנת המערכת הביולוגית, על כל מורכבותה, היא הבסיס להשגת יעדי המיזם כפי שהוגדרו על ידי וועדת ההיגוי. הממצאים שתוארו למעלה שימשו לפיתוח מודל קונספטואלי לתיאור הגורמים המשפיעים על התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות תמר מאוכלסים באספרגילוס. המודל מתואר באיור מספר 24. המערכת הביולוגית כוללת ארבעה גורמים ביוטיים שונים: הפונדקאי (פירות התמר), הפתוגן (אספרגילוס), המיקרוביום (מיקרואורגניזמים המאכלסים את הפירות ובמיוחד שמרים) וחרקים (ובמיוחד חיפושיות תסיסה). על המערכת משפיע גם גורם א-ביוטי – תנאי סביבה (ובמיוחד טמפרטורה). שלב ההבשלה של הפירות קובע למעשה אם יתפתחו, או לא, תסמיני עובש שחור בפירות ("חלון התפתחות תסמינים") ומשפיע גם על האיכלוס בחיפושיות התסיסה; איכלוס הפירות בשמרים מעכב את התפתחות הפתוגן ואת איכלוס הפירות בחיפושיות תסיסה; התפתחות תסמיני עובש שחור בפירות מושכת את חיפושיות התסיסה ומעודדת אותם לאכלס

את הפירות הסימפטומטיים. ההשפעות של הגורם הבייתי - תנאי הסביבה (ובמיוחד הטמפרטורה) לא נבחנו בניסויים שבצענו בשנת המיזם הראשונה. אנו מניחים שהטמפרטורה משפיעה על קצב ההבשלה של הפירות, על התפתחות הפתוגן והמיקרוביום (ובכלל זה השמרים המאכלסים את הפירות) ועל מחזור החיים של חיפושיות התסיסה. אנו גם מניחים שקיימת השפעה הדדית בין קצב ההבשלה של הפירות לאוכלוסיית המיקרוביום בפירות.



איור מספר 24. מודל קונספטואלי המתאר את הקשר בין הגורמים השונים המעורבים בהתפתחות תסמיני עובש שחור בפירות. כיוון החצים מתאר את הגורמים המשפיעים והמושפעים: הגורמים הנמצאים בראשית החיצים משפיעים על הגורמים הנמצאים בסופם. צבע החיצים מתאר את סוג ההשפעה: חיצים כחולים מתארים השפעה חיובית (הגברה) וחיצים אדומים השפעה שלילית (הפחתה). חיצים מלאים מתארים את ההשפעות שנבחנו ותועדו בעבודה זו; חיצים מקווקווים מתארים השפעות שלא נבחנו בעבודה זו.

בשנת המיזם השנייה נחזור ונאמת את הממצאים שעלו בשנת המיזם הראשונה, נבחן גישות למניעת האילוח של פירות בגורם המחלה במטע, ונפתח גישות להפחתת התפתחות התסמינים בפירות שנגדדו כשהם צהובים.

VIII. ספרות מצוטטת

- Turrell, F.M., Sinclair, W.B., and Bliss, D. E. (1940). Structural and chemical factors in relation to fungus spoilage of dates. Date Growers Institute 17: 5-11.
- Yin Y., Zhang X., Fang Y., et al. (2012) High-throughput sequencing-based gene profiling on multi-staged fruit development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Molecular Biology 78: 617–626.