



יערה דיני

אפיין המיקרוביום בפרי 'מג'הול' ופיתוח שיטות ביולוגיות לעיכוב התפתחות של פתוגנים

יערה דיני / מו"פ ערבה (yaaradan@gmail.com)
סמיר דרובי / המחלקה לאחסון וטיפול בפרי, מינהל
המחקר החקלאי

רבות על המגוון של אוכלוסיית המיקרואורגניזמים הנמצאת בקי
ליפה וציפת פרי המג'הול בשלבי התפתחות והבשלה שונים ועל
היתרונות והחסרונות של כל שיטה.

מבוא

עד היום לא נערך בארץ מחקר מקיף בנושא המיקרוביום (מכ"ל
לול המיקרואורגניזמים) של פרי המג'הול. מעיון בספרות בנוי
שא אין נתונים על רמת הנגיעות ב-*Aspergillus niger* במטעי
תמרים בארץ או בעולם. ידוע על הבדלים גדולים ברמת הנ
גיעות בין המטעים בצפון הארץ, שם יכולה זו להגיע לכדי 30%
מהפרי, לבין מטעים בדרום, בהם הנגיעות נמוכה הרבה יותר
ומגיעה בדרך כלל 'רק' לכדי 5%. הבדלים גדולים נמצאו הן בין
מטעים באותו אזור והן בתוך כל מטע ועדיין אין לכך הסבר
מניח על הדעת. לפני שיווקו מאוחסן הפרי בקירור לפרקי זמן
ממושכים ונשטף קלות לפני האריזה והשיווק. בהגיעו לחנויות
הוא שוהה על המדף ללא קירור ואכל כמות שהוא על קליפ
תו. אין כיום חומר כימי או ביולוגי מורשה לטיפול בגורמי זיהום
וריקבון בפרי תמר בשלבי הגידול ולאחר גידול. היעדר חומר
חיטוי מורשה מקשה על שיווק המג'הול העסיסי ועוד יותר על
שיווק הפרי הלח, היסופר עסיסי. שיווק של זה האחרון מותנה



צלמים: יערה דיני

תקציר

מר 'מג'הול' סובל מזיהומים מיקרוביאליים הפוגעים באיכות הפרי ושיווקו. שתי הפטריות הפתוגניות העיקריות המעורבות בזיהומים הן *Aspergillus niger*, הפוגעת בפרי בשלבי הפריחה והחנטה וגורמת בו למחלת העובש השחור, ו-*Penicillium expansum* הפוגעת בפרי לאחר הגידול ובאחסון. מטרת המחקר היא ראיית לאפיין את המיקרוביום של פרי המג'הול בשלבי פירות בשלבי התפתחות והבשלה שונים, וכן לבדוד מתוך המיקרוביום מיני שמרים וחיידקים בעלי יכולת הדברה ביולוגית, לצורך הפחתת הרקבנות בפרי.

אפיין המיקרוביום נעשה בשתי שיטות, האחת קלאסית - באמצעות בידודים על מצעי מזון סלקטיביים וזיהוי בשיטות מורפולוגיות ומולקולריות, והשנייה בשיטת מטאגנומיקה, הכוללת הפקת דנ"א כללי מרקמת הפרי, ריצוף עמוק וניתוח התוצאות בעזרת ביואינפורמטיקה (ביולוגיה ממוחשבת). מתוצאות המחקר נלמד

בתמונה למעלה: במסגרת העבודה נחתכו פירות 'מג'הול' בשלב בוסר צהוב לשניים, הוטבלו בתמיסת שמרים והונחו במגשי 'בובנוירה' לעשרה ימים ב-25 מ"צ. התוצאות בעמ' 37.

אקראית כ-50 תבדידים של חיידקים שגדלו על מצע מזון LB (=Luria broth), מצע הגידול הנפוץ בשימוש מעבדה) על פי צורת גידול, צבע ומורפולוגיה וזוהו על פי רצף המקטע 16S (לכל מין של חיידק יש רצף משלו, ולכל הזנים של אותו מין יש את אותו גן, 16S). נמצא שסוג החיידק הנפוץ ביותר בכל שלבי ההתפתחות והבשלה הוא בצילוס (*Bacillus*). בחנוטים, בפרי בוסר ירוק ובפרי בשל עמדה שכיחותו על 91 ו-50%, בהתאמה. מיני הבצילוס הנפוצים ביותר היו *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. Subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*

לזיהוי הפטריות החוטיות נדגמו כ-30 תבדידים שגדלו על מצע אגר תפוחי אדמה (PDA) בתוספת כלורמפניקול (=אנטיביוטיקה הפיכה, שכאשר מוציאים אותה מסביבת החיידקים אלה מתאוששים), משלושה שלבי ההתפתחות הפרי (חנוטים, פרי בוסר ירוק ופרי צהוב). הסוג הנפוץ ביותר בכל השלבים היה *Penicillium*, הכולל שני מינים, *P. expansum* ו-*P. Chrysogenum* - כ-39% בפרי הירוק וכ-38% בצהוב. אוכ' לסיית הפטריות בפרי הירוק מוגנות מזו שבפרי הצהוב ובפרי הבשל. אספרגילוס בפרי הבשל גדל ב-100% מהבידודים שנערכו ובשל קצב גידול מהיר של פטריה זו לא ניתן היה לראות גדילה של פטריות נוספות על מצע המזון. בנוסף בוצע זיהוי של תבדידי השמרים בבידודים שנלקחו מציפת פרי בוחל בלבד (פרי בשל לפני שהתייבש), בו זוהו שלושה סוגי שמרים עיקריים - מעל ל-60% מכלל הסוגים: *Hanseniaspora* sp. 15.1%, *Candida* sp. 15.1%, *Zygosaccharomyces* sp. 30.2%

■ **אפיון המיקרוביום של הקליפה וציפת הפרי:** לשם כך בוצעו שתי בדיקות. בראשונה נדגמו הקליפה והציפה של פרי בשל בלבד (12 דגימות מהקליפה ושש מהציפה); תוצאות הריצוף העמוק מראות שמתוך 12 סוגי הפטריות שזוהו בפרי היה ה-*Penicillium* הנפוץ ביותר. בנוסף נרשמה נוכחות מינים שונים של שמרים באחוזים בודדים. חשוב לציון שסוגי הפטריות בקליפה מוגנים מאלה שבציפה.

מניתוח תוצאות הבדיקה בפרי בשל נמצא שמתוך 14 סוגי החיידקים שאותרו המין הנפוץ ביותר היה *Lactococcus lac-tis*. גם כאן נמצא שהקליפה מכילה מגוון רחב של חיידקים בהשוואה לציפה. סוגי חיידקים נוספים הנפוצים בקליפה הם *Acinetobacter* sp.-*Bradyrhizobium* sp., *Erwnia* sp. התוצאות התקבלו מניתוח דוגמאות דנ"א של קליפה וציפה בשיטת אפיון המיקרוביום. מניתוח תוצאות של כלל המיקרוביוארגניזמים בשלבי ההתפתחות שונים של הפרי נמצא ש-99% מהמיקרוביום הפטרייתי הכיל שתי משפחות עיקריות, *Ascomy-* *Basidiomycota* 8.7% ו-*cota* 91.2%. מניתוח הרצפים של 16S עלה שמשפחות החיידקים הנפוצות היו *Proteobacteria* 46.60%, *Firmicutes* 41.20%, *Actinobacteria* 8.60% ו-*Bacteroidetes* 1.80%.

בטיפול מניעה ובעיכוב התפתחות של מיקרואורגניזמים לפני האחסון ואחריו. מטרת המחקר הייתה פיתוח ויישום שיטות להדברה ביולוגית של המזהמים המיקרוביאליים הנפוצים בפרי 'מג'הול', שיבטיחו עמידות של תמר עסיסי וסופר עסיסי.

חומרים ושיטות

בשלב ראשון של המחקר אופיינו מגוון המיקרואורגניזמים (חיידקים, פטריות חוטיות ושמרים) בקליפה ובציפת פרי 'מג'הול'. בהמשך נבדקו פירות נוספים מארבעה שלבי ההתפתחות והבשלה. האפיונים בוצעו בשיטות קלאסיות של בידודים על מצעי מזון סלקטיביים וזיהוי באמצעות ריצוף מקינטיים שמורים ב-DNA, כמו גם בשיטות מטאגנומיות (=על פי ההרכב של כל המטען הגנטי ברקמה) בעזרת ריצוף עמוק של דנ"א שהופק מרקמות הפרי השונות. בשלב שני בודדו וזוהו מתוך המיקרוביום מיני חיידקים ושמרים בעלי פוטנציאל להדברה ביולוגית ובחנה, במעבדה בצלחות פטרי, במטע ובפרי הגדוד, יכולתם בעיכוב גידול של פטריות פתוגניות וצמיצום הריקבון בפרי.



תמונה 1:
פירות 'מג'הול' בשלבים שונים של ההתפתחות והבשלה

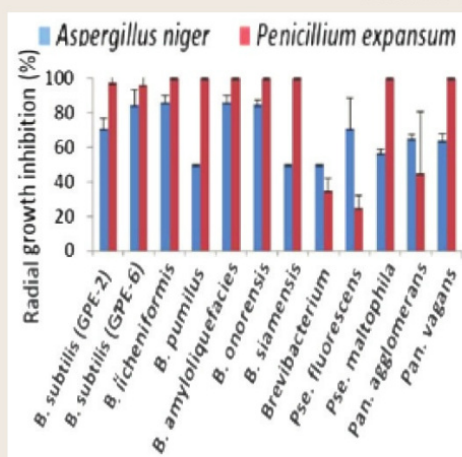
מלמעלה למטה:
חנטי,
פרי בוסר ירוק,
פרי בוסר צהוב,
פרי בשל

תוצאות

■ **בידוד ואפיון מיקרואורגניזמים מפירות תמר בשלבים שונים של ההתפתחות והבשלה:** סך כל תבדידי המיקרואורגניזמים שהתקבלו עלה על 600, ביניהם חיידקים, שמרים ופטריות חוטיות. מכל שלבי ההתפתחות וההבשלה של הפרי נבחרו

Aspergillus niger ו-*expansum*, הגורמות לעובשים בפירות תמר לפני ואחרי גידול. חיידקים שהראו פעילות עיכוב בגידול הפטריות הפתוגניות של לפחות 50% במבחנים בתרבית נבחרו להמשך המחקר של הפעילות האנטגוניסטית בפרי. נבדקו יכולות עיכוב גידול של 11 מיני חיידקים. ארבעה ממיני ה-*Bacillus sp.* הראו יכולות עיכוב גבוהות ביותר כנגד שתי הפטריות הפתוגניות. כל השמרים שבדדו לא הראו פעילות עיכוב כלשהי נגד שתי הפטריות הנ"ל בתנאי תרבית. עיכוב הפטריה הפתוגנית באמצעות החיידקים המבודדים בריכוז 10^9 וביום/מ"ל נבחן על מצע PDA לאחר אינקובציה של חמישה עד עשרה ימים ב-28 מ"צ (איור 2).

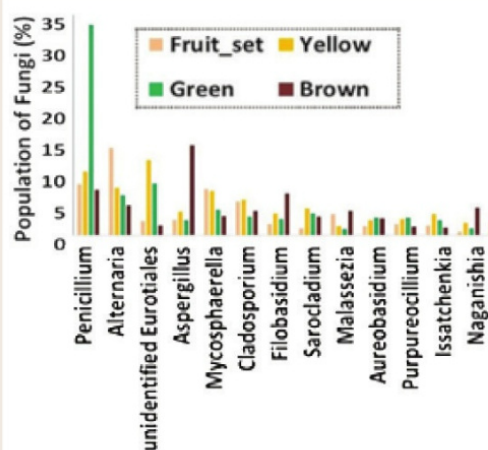
איור 2: עיכוב גידול של שתי פטריות פתוגניות, *Aspergillus niger* ו-*Penicillium expansum* באמצעות חיידקים שבדדו מהפרי



■ **פעילות שמרים כנגד פטריות עובש בפירות:** כאשר נבדקה יכולתם של החיידקים בפירות בוסר צהובים להתנגד להדבקה בפניציליום ואספרגילוס לא נמצא שום עיכוב לאחר חמישה ימי אינקובציה ועל כן התרכז המחקר הבדיקה בפעילות אנטי-גונוסטית של תבדידי השמרים שהתקבלו. ניסויים באספרגילוס הראו רמות עיכוב שונות של הדבקה. חשוב לציין שפרי משלב בוחל לא נדבק בפטריה זו למרות שימוש בריכוזים גבוהים יחסית של תרחיף הנבגים. תבדידי השמרים שנבחנו היו *Clavispora lusitanae*, *Cryptococcus albidus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Meyerozyma caribbica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida apicola* בריכוזים של 10^6 - 10^8 , זאת בוסף לשמר *Metschnikowia fructicola*, שפותח לתכשיר מסחרי בשם

בניתוח מעמיק יותר לקביעת סוגי הפטריות נמצא ש-*Penicillium* היה הסוג הנפוץ ביותר בפרי - 68.2% מכלל הפטריות, אחריו *Cutaneotricho* 4%, *Saccharomycetales* 3.3%, *Issatchenkia* 3.1%, *Altenaria-1 sporon* 2.2%. בבדיקת סוגי החיידקים נמצא שהחיידק הנפוץ בכלל הדוגמאות של הציפה היה *Lactococcus* המהווה 33.8% ואחריו בסדר יורד *Lacto-14.2%*, *Streptococcus* 9.3%, *Acinetobacter* 4.5% ו-*bacillus* 4.5%.

■ **אפיון המיקרוביום הפטרייתי בפרי 'מלהול':** נלקחו 30 דוגמאות מהקליפה וציפת הפרי בארבעה שלבי הבשלה, כאשר כל דגימה כללה שלוש עד שש חזרות ביולוגיות. ניתן היה להבחין שבכל שלבי ההתפתחות וההבשלה נמצאה אותה אוכלוסייה של סוגי פטריות, כאשר בכל השלבים כמות הפטריות החוטיות עלה על זו של השמרים. השוני היה בכמות האכלוס בכל שלב. לדוגמה, פניציליום איכלס באופן ניכר (33.4%) את הפרי בשלב הירוק, לעומת שאר השלבים (7-10%). אספרגילוס איכלס את הפרי הבשל ברמה גבוהה (14.3%) לעומת שאר השלבים (2.4-3.7%) (איור 1).



איור 1: אוכלוסיית הפטריות בפרי 'מלהול' בארבעה שלבי ההתפתחות, על פי ניתוח המיקרוביום

בנוסף, פטריית *Penicillium* מאכלסת באופן ניכר את ציפת הפרי בהשוואה לקליפה בשאר השלבים, בעיקר בפרי הירוק, שם היא מהווה 52%, בפרי הצהוב 12.8% ובפרי הבשל 10.5% - לעומת 11.4%, 7.2%, 6.1% בציפה בהתאמה. פטריית *Aspergillus* נמצאת בכמויות קטנות בפרי הירוק והצהוב, הן בקליפה והן בציפה (1.5-4.4%), לעומת קליפת הפרי הבשל בו היא מהווה 17.1% מכלל הפטריות.

לאחר בחינה של פעילות אנטגוניסטית של חיידקים כנגד פטריות פתוגניות *in vitro* לאחר בידוד ואפיון החיידקים האפיפיטים והאנדופיטים מפירות בשלבי הבשלה שונים, נבחנו פעילותם האנטגוניסטית של 240 חיידקים (נבחרו לאחר וידוא שאין להם קשר למחלות בני אדם) על גבי צלחות פטרי נגד שתי הפטריות העיקריות בתמרים, *Penicillium*

ומועדה המדויקת עדיין אין הבנה מלאה ונדרשים מחקרים נוספים כדי לבסס את המידע שהתקבל בעבודה זו.

תודה

תודה לשולחן תמר, משרד החקלאות וק"ל על העזרה במימון המחקר.

ספרות מצוטטת

1. Al-Bulushi I.M., Bani-Uraba M.S., Guizani N.S., Al-Khusaibi M.K., Al-Sadi A.M. (2017): Illumina miSeq sequencing analysis of fungal diversity in stored dates, BMC microbiology 17: 27.
2. Aleid S.M., Hassan B.H., Almainan S.A., Al-Kahtani S.H., Ismail S.M. (2014): Microbial Loads and Physicochemical Characteristics of Fruits from Four Saudi Date Palm Tree. Cultivars, Food and Nutrition Sciences 5: 316-327.
3. Al-Hazzani A.A., Shehata A.I., Rizwana H., Moubayed N.M.S., Alshatwi A.A., Munshi A., Elgaaly G. (2014): Postharvest fruit spoilage bacteria and fungi associated with date palm from Saudi Arabia. African journal of microbiology research 8(11): 1228-1236.
4. Droby S., Wisniewski M. (2018): The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology. Postharvest Biology and Technology 140: 107-112.
5. EL-Morsi M.E.A., Abdel-Monaim M.F., Ahmad E.F.S. (2015): Management of root rot and wilt diseases of date palm offshoots using certain biological control agents and its effect on growth parameters in the New Valley Governorate, Egypt. Journal of phytopathology and pest management 2(1): 1-11.
6. Glam-Matana N. (2016): Mycotoxin patulin during pathogenicity of *Penicillium expansum* in fruits, M.Sc. Thesis 10-15.
7. Haider M.S., Khan I.A., Jaskani M.J., Naqvi S.A., Khan M.M. (2014): Biochemical attributes of dates at three maturation stages. Emir. J. Food Agric 26 (11): 953-962.
8. Lobo M.G., Yahia E.M., Kader A.A. (2013): Biology and postharvest. Physiology of date fruit, dates: Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits. First Edition.
9. Palou L., Rosales R., Taberner V., Vilella-espla J. (2016): Incidence and etiology of postharvest diseases of fresh fruit of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the grove of Elx (Spain) Laboratori de Patologia. Phytopathologia Mediterranea 55(3): 391-400. ■

שמר (משווק באמצעות חב' Koppert). לשם כך נחתכו לשניים פירות בוסר צהובים בתנאים סטריליים, הוטבלו לשתי שניות בריכוזים שונים של תמיסה מימית של תאי השמרים והונחו במגשי פלסטיק, בשקעים ייעודיים בתוך קופסאות אטומות (ראה תמונה פותחת). לאחר עשרה ימים ב-25 מ"צ נבדק שיעור ההדבק הטבעית של רקמות הפרי הפנימיות באספרגילוס. תבדידי השמרים *Cryp- Zygosaccharomyces rouxii* ו-*Meyerozyma caribbica*, *tococcalbidus* באופן מוחלט את התפתחות תפסיר הפטריה על הפרי גם בריכוזים נמוכים יותר (10^6 תאים/מ"ל).

בבדיקת עלי הגביע של הפרי (החלק המקשר בין הפרי לסנון, קרוי כוד) במי טע יטבתה נמצא שגם רקמתם של אלה מאוכלסת באספרגילוס, כאשר שיעור האכלוס גדל עם הליך ההבשלה והגיע לכדי 90% בפרי הצהוב ול-100% בפרי הבשל. בבדיקת עלי גביע בפרי בשל שחוטאו נמצאה רמת אכלוס של כ-89%. ■ **זיהוי מועד ואופן ההידבקות של הפרי באספרגילוס:** מאילוח אשכולות במטע בשלבי התפתחות שונים נבנו אספרגילוס לא נמצא הבדל ניכר בין הטיפולים. בעקבות דקירה של פירות בוסר צהובים במטע באמצעות מחט הנושאת נבנו אספרגילוס, הן בקליפה והן בעלי הגביע, נראה בבירור שפגיעה של עלי הגביע מעלה את שיעור הנגיעות בפרי בשל לעומת פגיעה של קליפה או פגיעה ללא החדרת הפתון, 70.7% ו-30% בהתאמה.

סיכום ומסקנות

בעבודה זו נערך לראשונה זיהוי מיקרוביאלי של כלל המיקרואורגניזמים המאכלסים את הקליפה והציפה של פרי 'מג'הול' בשלבי התפתחות שונים. נמצא שאוכלוסיית החיידקים והפטריות המאכלסת את החנוטים שונה באופן מובהק מהאוכלוסיות בפירות בוסר צהובים ופירות בשלים. הזיהוי בשיטה המטאגנומית (חקר של כלל החומר הגנטי שנאסף מדגימות הפרי) חשפה בפרי מיקרואורגניזמים רבים שלא היו ידועים עד כה בתמר ולא התגלו בשיטות הקלאסיות, כאשר לחלקם משמעות רבה בזיהום הפרי או ביכולת ההגנה שלו כנגד פתוגנים. לדוגמה, פטריות המייצרות מיקוטוקסינים (רעלים) שעלולים לפגוע בבריאות האדם או מיני שמרים המגנים על רקמות הפרי מפני התפתחות של פטריות פתוגניות. זיהוי והבנת תפקידן של אוכלוסיות המיקרואורגניזמים האפיפיתיים (=הגדלים על הצמח) והאנדופיטיות (=הגדלים בתוך הצמח) בפרי והאינטראקציה ביניהם, כמו גם לימוד השפעתם על הפיזיולוגיה של הפרי ועל עמידותו כנגד מחלות, תסייע בעתיד בפיתוח שיטות עיכוב, מניעה וגם הדברה ביולוגית.

בבדיקת עלי הגביע של הפרי נמצא שפטריית האספרגילוס מאכלסת כאנדופיט גם את הרקמה של אלה באחוזים גבוהים. נבנו האספרגילוס כך נראה, מדביקים את עלי הגביע בשלבי ההתהוות הראשונים, כאשר התפסיר מתקדם לתוך חלל הפרי בשלב בוסר צהוב או עם תחילת ההבשלה, מתבסס שם וגורם למחלת העובש השחור בפרי הבשל. למרות רמת האכלוס הגבוהה באספרגילוס תסמיני המחלה מופיעים בחלק קטן של הפירות הבשלים רק בשלבי ההבשלה המתקדמים. כפי שנמצא ביוסיום, ההדבקה אינה מתרחשת בשלבי ההבשלה אלא מוקדם יותר, בפריחה ובחנטה, כך שמשלב הבוחל ואילך אין חשיבות להדברה כלשהי, גם לא ביולוגית. יש אם כן לספל בפרי בשלבי ההתפתחות הראשונים. מיני שמרים שזוהו מתוך המיקרוביום שנבדק בעבודה זו הראו תוצאות טובות בעיכוב הגידול של הפטריה ויכולים להביא לפריצת דרך במונעת האילוח וההדבקה המוקדמים. לגבי אופן ההדבקה