



1998-2000

תקופת המחקר:

409-0037-00

קוד מחקר:

שם

זיהוי הגורם להתפתחות רקבון רך בפקעות קאלה בזמן האחסון ובחינת שיטות הדברה מתאימות.

המחקר:

IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF SOFT ROT IN CALLA CORMS AND  
EVALUATION OF CONTROL METHODS

חוקר ראשי:

ד"ר סמיר דרובי

מוסד:

מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

חוקרים

מר גדעון לוריא, ד"ר סוניה פילוסוף-הדס, מר  
עוזי לובובסקי

שותפים:

מאמרים:

### תקציר

הצגת הבעייה : עפ"י הדיווחים בספרות נחשב החיידק

*Erwinia carotovora* sub. sp. *carotovora* כגורם דומיננטי לרקבונות רכים במגוון רחב של גידולים חקלאיים, כאשר חלקי הצמח העיקריים הנתקפים ע"י פתוגן זה הם איברי תשמורת וריבוי. בארצות בעלות אקלים ממוזג, כמו ישראל, ההפסדים הנגרמים ע"י חיידק זה יכולים להיות ניכרים, ואף להוות את הגורם המגביל בחלק מהגידולים. בין הגידולים הנתקפים נמנים בצלים ופקעות של מספר גידולי פרחים לקטיפ ולחומר ריבוי.

מטרות המחקר (1) בידוד וזיהוי הפתוגנים האחראי להתפתחות הריקבון הרך הפקעות קאלה במשך אחסון. (2) לימוד התנאים המשפיעים על התפתחות הריקבון במשך האחסון. (3) בחינה ופיתוח של שיטות הדברה יעילות.

מהלך ושיטות העבודה: בשלבים הראשונים של המחקר (שנה ראשונה) נעשה מאמץ לבירור סוגיית זיהוי הגורם האחראי למחלה. לצורך זה נעשו בידודים של חיידקים מחלקים שונים של פקעות קאלה רקובות שהתקבלו ממגדלים שונים. שיטת הבידוד נעשה עפ"י פרוטוקול המקובל לבידוד חיידקים מרקמות צמחיות רקובות. המושבות שגדלו נבחרו באקראיות מהצלחות השונות וחלקם נשלח לזיהוי שוב לאגף לחגנת הצומח. זיהוי זה מבוסס על מיצוי חוצות שומניות מהחיידק והרצתו בגז כרומוטוגרף לקבלת פרופיל שלה חומצות השונות. בנוסף לשיטת הזיהוי הסטנדרטיות, המבוססות על בדיקות כימיות קיימות בדיקות ביולוגיות המבוססות על מבחנים ביולוגיים הנותנים מידע על זהות החיידק לפי יכולת ההדבקה של פרוסות תפוח אדמה. תבדידי החיידקים שנאספו שימשו כמקור להדבקת פרוסות תפוח אדמה לקביעת יכולתם לגרום לרקבון רך. ניסויי הדברה ראשוניים נעשו בסוף שנה ראשונה במטרה לאתר כיווני מחקר לשנה השניה בתחום זה. בשנה השנייה, הניסויים השונים התמקדו בבחינת שיטות וגישות הדברה שונות של רקבון רך בפקעות קאלה. תחילה בחנו שני חומרי חיטוי כימיים (סטרפטומיצין ואנטיסטריס 200) ושני חיידקים אנטגוניסטים (*Bacillus* ו-*Pseudomonas*). ניסוי נוסף נעשה במטרה לבחון אפשרות חיטוי הפקעות באמצעות שילוב של מים חמים ופורמלין. גישה נוספת היתה בחינת השפעת מי כלור, המיוצרים ע"י מכשיר מיוחד שמחולל כלור פעיל ממי ברז רגילים, על התפתחות רקבון רך בבסיסי גבעולים במשך הגידול וכן בחינת הסברה שהורדת האינוקולום הקיים במשך הגידול מביא בעקבותיו הפחתה בשיעור הריקבונות המתפתחים בפקעות לאחר האסיף. לצורך זה הותקן המכשיר בבית רשת במחלקה לאחסון וחוברו אליו מתזים שמוקמו מעל צמחי קאלה שגדלו בעציצים. לבסוף בדקנו את פוטנציאל חיטוי הפקעות ע"י אידויים בשמנים אתריים שהוכחו יעילים בעיכוב התפתחות החיידק ארוויניה בניסויים *in vitro*.

בשנה השלישית התמקדנו על ביסוס הממצאים הקודמים של שיטות ההדברה וכן אפיון הפרמטרים השונים המשפיעים על יעילות ההדברה. נבחנו השפעת השמן האתרי קרבקרול על התפתחות רקבון בפקעות קאלה וממדי שאוחסנו באווירה מבוקרת ומתואמת. בנוסף, בחנו את יעילות חומרי חיטוי שונים על עיכוב התפתחות רקבונות בפקעות קאלה שאוחסנו בטמפרטורות שונות.

תוצאות עיקריות: החיידק *E. carotovora* זוהה בוודאות כגורם האחראי להתפתחות רקבון רך בפקעות קאלה. הזיהוי התבסס על שימוש במצעי מזון ספיציפיים לגידול חיידק זה וגם במבחני פתוגניות על רקמות תפוחי אדמה. בניסויי ההדברה/חיטוי הראשוניים נמצא שטבילה של 30 דקות בתמיסת כלור עיכבה באופן משמעותי התפתחות הרקבון בפקעות. בהמשך, נמצא בשנה השנייה שחיטוי פקעות קאלה בטבילה למשך 30 דקות בתמיסת סטריפטומיצין בריכוז 200 ח"מ או החומר אנטיסטריס הוכח כיעיל במניעת התפתחות רקבון ארוויניה בפקעות מודבקות מלאכותית. השימוש בחיידקים האנטגוניסטים *Pseudomonas* ו- *Bacillus* הוכח כיעיל במניעת הרקבון, תוצאה שחזרה על עצמה גם בשנה זו ומצביעה על כיוון מחקר מעניין לקראת השנה השלישית. בניסוי שבצענו, שימוש במים חמים בשילוב עם פורמלין לחיטוי הפקעות לא מנע התפתחות הרקבון במשך הגידול ואף השפיע לרעה. בטיפול המשולב היתה הגברה בשיעור הצמחים הרקובים בהשוואה לפקעות הלא מטופלות. אידוי הפקעות בשמנים אתריים של אזוב מצוי וקימל הביא להפחתה משמעותית בשיעור הצמחים שנרקבו.

הקרבקרול הוכח כיעיל בעיכוב החיידק ארוויניה בצלחות פטרי וע"ג הפקעת. הטיפול לא פגע במדדי הצימוח והפריחה. השילוב של קרבקרול ואווירה מבוקרת הגביר בצורה משמעותית את יעילות הקרבקרול. בנוסף, נמצאה השפעה חיובית בשילוב קרבקרול עם אווירה מתואמת.

בפקעות קאלה הושגה הדברה טובה של הרקבון בנוכחות חומרי החיטוי השונים רק במשך אחסון ב- 4 מ"צ, אך רב החומרים גרמו לעיכוב בנביטה.

מסקנות והמלצות: התוצאות מצביעות שלחיטוי חיצוני של פקעות קאלה יש חשיבות גדולה מאד במניעת התפתחות רקבון הארוויניה בתקופת אחסון הפקעות ובמשך הגידול. ככל שרמת המידבק נמוכה יותר הסיכוי להתפתחות הרקבון קטן יותר. שימוש בחומרי חיטוי מקובלים עשוי לתת תשובה חלקית לבעיה. המחקר מצביע על כיווני מחקר מבטיחים ביותר בכל הקשור לשימוש בחיידקים אנטגוניסטים להדברה ביולוגית של ארוויניה. לחיטוי הפקעות באידי שמנים אתריים יש פוטנציאל ויש להמשיך לברר אפשרות יישומי המעשי.

דו"ח סופי  
לתוכנית מספר: 409-0037-00

א. נושא המחקר

זיהוי הגורם להתפתחות ריקבון רך בפקעות קאלה בזמן האחסון  
ובחינת שיטות הדברה מתאימות

Identification of the causal agent of the soft rot in calla  
corms and evaluation of control methods

סמיר דרובי<sup>1</sup>, סוניה פילוסוף-הדס<sup>1</sup>, וופא בוכרי<sup>1</sup>, אידה רוזנברגר, לאה כהן<sup>1</sup>,  
אלכסנדרה קובשבניקוב<sup>1</sup>, לוריא גדעון<sup>2</sup>,

Samir Droby<sup>1</sup>, Sonia Philosoph-Hadas<sup>1</sup>, Wafa Buchari<sup>1</sup>, Ida  
Rosenberger<sup>1</sup>, Lea Cohen<sup>1</sup>, Alexandra Kovshevnikov, Gidon  
Luria<sup>2</sup>

<sup>1</sup>המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי,  
מרכז וולקני, בית דגן; <sup>2</sup>שה"מ, משרד החקלאות

<sup>1</sup>Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The  
Volcani Center, Bet Dagan; <sup>2</sup>Extension Service, Ministry of  
Agriculture

E-mail: samird@netvision.net.il

מוגש לקרן מדען ראשי – מו"פ איכות תוצרת חקלאי ולמועצת  
הפרחים – קרן צח"ר

יולי 2001

מכון וולקני

## א. תקציר (דו"ח סופי)

1. הצגת הבעיה (חשיבות ומטרות): עפ"י הדיווחים בספרות נחשב החיידק *Erwinia carotovora sub. sp. carotovora* כגורם דומיננטי לרקבונות רכים במגוון רחב של גידולים חקלאיים, כאשר חלקי הצמח העיקריים הנתקפים ע"י פתוגן זה הם איברי תשמורת וריבוי. בארצות בעלות אקלים ממוזג, כמו ישראל, ההפסדים הנגרמים ע"י חיידק זה יכולים להיות ניכרים, ואף להוות את הגורם המגביל בחלק מהגידולים. בין הגידולים הנתקפים נמנים בצלים ופקעות של מספר גידולי פרחים לקטיפה ולחומר ריבוי. מטרות המחקר (1) בידוד וזיהוי הפתוגן/ים האחראי להתפתחות הריקבון הרך הפקעות קאלה במשך אחסון. (2) לימוד התנאים המשפיעים על התפתחות הריקבון במשך האחסון. (3) בחינה ופיתוח של שיטה/ות הדברה יעילות.

2. מהלך ושיטות העבודה: בשלבים הראשונים של המחקר (שנה ראשונה) נעשה מאמץ לבירור סוגיית זיהוי הגורם האחראי למחלה. לצורך זה נעשו בידודים של חיידקים מחלקים שונים של פקעות קאלה רקובות שהתקבלו ממגדלים שונים. הבידוד נעשה עפ"י פרוטוקול המקובל לבידוד חיידקים מרקמות צמחיות רקובות. המושבות שגדלו נבחרו באקראיות מהצלחות השונות וחלקם נשלח לזיהוי לאגף להגנת הצומח. זיהוי זה מבוסס על מיצוי חומצות שומניות מהחיידק והרצתו בגז כרומטוגרף לקבלת פרופיל החומצות השונות. בנוסף לשיטת הזיהוי הסטנדרטיות, המבוססות על בדיקות כימיות קיימות בדיקות המבוססות על מבחנים ביולוגיים הנותנים מידע על זהות החיידק לפי יכולת ההדבקה וגרימת ריקבון רך בפרוסות תפוח אדמה. ניסויי הדברה ראשוניים נעשו בסוף שנה ראשונה במטרה לאתר כיווני מחקר לשנה השניה בתחום זה. בשנה השנייה, הניסויים השונים התמקדו בבחינת שיטות וגישות הדברה שונות של ריקבון רך בפקעות קאלה. תחילה בחנו שני חומרי חיטוי כימיים (סטרפטומיצין ואנטיסטריס 2000) ושני חיידקים אנטגוניסטים (*Bacillus* ו-*Pseudomonas*). ניסוי נוסף נעשה במטרה לבחון אפשרות חיטוי הפקעות באמצעות שילוב של מים חמים ופורמלין. גישה נוספת היתה בחינת השפעת מי כלור, המיוצרים ע"י מכשיר מיוחד שמחולל כלור פעיל ממי ברז רגילים, על התפתחות ריקבון רך בבסיסי גבעולים במשך הגידול וכן בחינת הסברה שהורדת האינזימולוגיה הקיימת במשך הגידול מביא בעקבותיו הפחתה בשיעור הריקבונות המתפתחות בפקעות לאחר האסיף. לצורך זה הותקן המכשיר בבית רשת במחלה לאחסון וחוברו אליו מתדים שמוקמו מעל צמחי קאלה שגדלו בעציצים. לבסוף בדקנו את פוטנציאל חיטוי הפקעות ע"י אידויים בשמנים אתריים שהוכחו יעילים בעיכוב התפתחות החיידק ארוויניה בניסויים *in vitro*.

בשנה השלישית התמקדנו על ביסוס הממצאים הקודמים של שיטות ההדברה וכן אפיון הפרמטרים השונים המשפיעים על יעילות ההדברה. נבחנו השפעת השמן האתרי קרבקרול על התפתחות ריקבון בפקעות קאלה שאוחסנו באווירה מבוקרת ומתואמת. בנוסף, בחנו את יעילות חומרי חיטוי שונים על עיכוב התפתחות ריקבונות בפקעות קאלה שאוחסנו בטמפרטורות שונות.

3. תוצאות עיקריות: החיידק *E. carotovora* זוהה בוודאות כגורם האחראי להתפתחות ריקבון רך בפקעות קאלה. הזיהוי התבסס על שימוש במצעי מזון ספציפיים לגידול חיידק זה וגם במבחני פתוגניות על רקמות תפוחי אדמה. בניסויי ההדברה/חיטוי הראשוניים נמצא שטבילה של 30 דקות בתמיסת כלור עיכבה באופן משמעותי התפתחות הריקבון בפקעות. בהמשך, נמצא בשנה השניה שחיטוי פקעות קאלה בטבילה למשך 30 דקות בתמיסת סטרפטומיצין בריכוז 200 ח"מ או החומר האנטגוניסטים *Bacillus* ו-*Pseudomonas* הוכחו כיעילים במניעת ריקבון ארוויניה בפקעות מודבקות מלאכותית. החיידקים האנטגוניסטים *Bacillus* ו-*Pseudomonas* הוכחו כיעילים במניעת הריקבון. בניסוי שבצענו, שימוש במים חמים בשילוב עם פורמלין לחיטוי הפקעות לא מנע התפתחות הריקבון במשך הגידול ואף השפיע לרעה. בטיפול המשולב היתה הגברה בשיעור הצמחים הרקובים בהשוואה לפקעות הלא מטופלות. אידוי הפקעות בשמנים אתריים של אזוב מצוי וקימל הביא להפחתה משמעותית בשיעור הצמחים שנרקבו.

הקרבקרול הוכח כיעיל בעיכוב החיידק ארוויניה בצלחות פטרי וע"ג הפקעת. הטיפול לא פגע במדדי הצימוח והפריחה. השילוב של קרבקרול ואווירה מבוקרת הגביר בצורה משמעותית את יעילות הקרבקרול. בנוסף, נמצאה השפעה חיובית בשילוב קרבקרול עם אווירה מתואמת. בפקעות קאלה הושגה הדברה טובה של הריקבון בנוכחות חומרי חיטוי השונים רק במשך אחסון ב-4 מ"צ.

#### 4. מסקנות והמלצות:

התוצאות מצביעות שלחיסוי חיצוני של פקעות קאלה יש חשיבות גדולה מאד במניעת התפתחות רקבון הארוויניה בתקופת אחסון הפקעות ובמשך הגידול. ככל שרמת המידבק נמוכה יותר הסיכוי להתפתחות הרקבון קטן יותר. שימוש בחומרי חיסוי מקובלים עשוי לתת תשובה חלקית לבעיה. המחקר מצביע על כיווני מחקר מבטיחים ביותר בכל הקשור לשימוש בחיידקים אנטגוניסטים להדברה ביולוגית של ארוויניה. לחיסוי הפקעות באידי שמנים אתריים יש פוטנציאל ויש להמשיך לברר אפשרות יישומי המעשי.

#### ב. מבוא, רקע מדעי קצר ומטרות המחקר לתקופת הדו"ח:

אחת הבעיות העיקריות בענף הגיאופיטים היא התפתחות רקבונות רכים בפקעות ובצלים מאוחסנים כתוצאה מנגיעות בחיידקים פתוגנים שונים. בעיה נוספת היא התפתחות הריקבון לאחר הזריעה כתוצאה מהשימוש בחומר ריבוי מזוהם בפתוגנים, דבר שפוגם בנביטה וגורם לתמותה מוקדמת של הצמחים. שימוש חוזר בחומר ריבוי מזוהם מאיץ את זיהום המלאי בפתוגנים ולהפסדים ניכרים בחומר הריבוי וביבול פרחי קטיף.

עפ"י הדיווחים בספרות נחשב החיידק *Erwinia carotovora* sub. sp. *carotovora* כגורם דומיננטי לרקבונות רכים במגוון רחב של גידולים חקלאיים, כאשר חלקי הצמח העיקריים הנתקפים ע"י פתוגן זה הם איברי תשמורת וריבוי. בארצות בעלות אקלים ממוזג, כמו ישראל, ההפסדים הנגרמים ע"י חיידק זה יכולים להיות ניכרים, ואף להוות את הגורם המגביל בחלק מהגידולים. בין הגידולים הנתקפים נמנים בצלים ופקעות של מספר גידולי פרחים לקטיפ ולחומר ריבוי. תחום הפונדקאים של חיידק זה כולל: קאלה, שושן, אקוניטום, סייפן, ביגוניה, יקינטון, פרוזיה, קלדיום, וכרכום. האילוח של איברי הריבוי בפתוגן נעשה, ברוב המקרים, דרך הקרקע בשלבי הגידול השונים וגם בזמן האסיף והמיון. בארץ, לא נעשתה עד כה עבודה ללימוד בעיית הריקבון הרך בפקעות קאלה כדי לפתח פתרונות ניאותים.

הטיפול המקובל כיום כנגד ריקבון רך בפקעות קאלה ניתן באופן שיגירתי ללא מידע כל שהוא על זהות גורם המחלה, רמת הזיהום והגורמים המעורבים בהתפתחות המחלה. הטיפולים כוללים חיסוי חיצוני של איברי הריבוי בחומרים אנטיביוטיים (כמו פורמלין, כלורין וחומרים אנטיביוטיים שונים) וכן טיפול בבקטריוצידים מקובלים כמו קוציד, מיד לאחר האסיף ולפני האחסון. יש לציין, שכל מגדל אימץ לעצמו נוסחת טיפול המבוססת ברוב המקרים על שמעונו וניסוי עצמי.

מטרות המחקר של התוכנית: (1) בידוד וזיהוי הפתוגן/ים האחראי להתפתחות הריקבון הרך הפקעות קאלה במשך אחסון; (2) לימוד התנאים המשפיעים על התפתחות הריקבון במשך האחסון; (3) בחינה ופיתוח שיטה/ות הדברה יעילות.

#### ג. פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו:

##### ג.1. סיכום הניסויים בשנה א'

בשנה הראשונה העבודה התמקדמה בבידוד וזיהוי הגורם האחראי להתפתחות רקבון רך בקאלה. לצורך זה נעשו בידודים של חיידקים מפקעות קאלה רקובות שהתקבלו ממגדלים שונים. שיטת הבידוד נעשתה עפ"י פרוטוקול המקובל לבידוד חיידקים מרקמות צמחיות רקובות. בקצרה: הוצאו דוגמאות של רקמה מהחלק הפנימי של הרקבון, הוכנסו לתמיסת מלח (0.85%) מעוקרת וטולטלו בחוזקה למשך שעה. לאחר מכן, נלקחו דוגמאות של 100 µl מתמיסת המלח ומרעו על מצע מזון כללי המתאים לגידול חיידקים שונים (LB). לאחר תקופת הדגרה של 3 – 4 ימים נעשתה זריעת בידוד של מושבות בודדות לצורך קבלת תרביות נקיות. המושבות נבחרו באקראיות מהצלחות השונות וחלקם נשלח לזיהוי שוב לאגף להגנת הצומח. זיהוי זה מבוסס על מיצוי חומצות שומניות מהחיידק והרצתו בגז

כרומטוגרף לקבלת פרופיל החומצות השונות. הזיהוי ברמת הסוג והמין נעשתה לפי מאגר נתונים ממחשב וכולל פרופילים של חומצות שומן שהתקבלו מחיידקים שונים שכבר זוהו בעבר. תוצאות הזיהוי שהתקבלו היו רחוקות מהצפוי בזה שהם הצביעו על שמות חיידקים שאינם ארוויניה.

בנוסף לשיטת הזיהוי הסטנדרטיות, המבוססות על בדיקות כימיות קיימות בדיקות המבוססות על מבחנים ביולוגיים הנותנים מידע על זהות החיידק לפי יכולת ההדבקה של פרוסות תפוח אדמה. בד"כ רקמת פקעות של תפוח אדמה נתקפות ברקבון רך שנגרם ע"י החיידק *Erwinia carotovora*. תבדידי החיידקים שנאספו שימשו כמקור להדבקת פרוסות תפוח אדמה לקביעת יכולתם לגרום לרקבון רך. הרוב המכריע של התבדידים שנבדקו גרמו לרקבון רך האופייני לרקבונות ארוויניה. בנוסף, השתמשנו במצע מזון סיליקטיבי (CVP) שרק החיידק מהסוג ארוויניה יכול לגדול עליו ותאיו מקבלים גוון בצבע ורדרד. בדיקה זו נעשתה לתבדידים מקאלה ולרובם הייתה חיובית.

כמו כן התבצעו בשנה הראשונה ניסויי הדברה ראשוניים שמטרתם הייתה בחינת כיווני מחקר לשנה השנייה ושלישית של תוכנית זו. ניסוי ראשון נעשה לבחינת יעילותם של טיפולי חיטוי שונים ושני חיידקים הידועים בפעילותם בהדברה ביולוגית של גורמי מחלות. הניסוי נעשה בפקעות קאלה שנפצעו סמוך לאזור הנצר והודבקו בארוויניה ע"י השריה בתרחיף החיידק למשך שניות ספורות. פקעות פצועות שנטבלו במים שימשו כביקורת. בניסוי זה הטיפולים היעילים ביותר בהפחתת שיעור הריקבון הרך בפקעות קאלה הם החיטוי בתמיסת הכלור ושני החיידקים האנטגוניסטים. בטיפולים אלה שיעור הרקבון שהתפתח היה נמוך ב- 40 – 50% משיעור הרקבון שהתפתח בביקורת.

בניסוי נוסף נבחנה השפעת שמנים אתריים שונים על גידול החיידק ארוויניה בתרבית. נבחנה יעילותם של 4 סוגים של שמנים אתריים: A = אזוב מצוי; B = זוטה לבנה; C = עשב לימון; D = קימל. החיידק נזרע בצלחות פטרי המכילות מצע LB. לדופן הפנימית של מכסה צלחת הפטרי הוצמדה בעזרת דבק דיסקית סטרילית של נייר סינון (Whatman) בעלת כושר ספיגה של 100 מיקרוליטר. היישום של השמן האתרי בוצע ע"י הספגת שני נפחים (5 או 10 מיקרוליטר) מכל סוג שמן ע"ג הדיסקית. צלחות הפטרי נאטמו בעזרת סרט בידוד נצמד למנוע נדיף השמן האתרי, והודגרו בטמפ' של 27 מ"צ. רמת העיכוב נקבעה בהשוואה לגידול החיידק בביקורת שכללה דסקיות ניידות ספוגות בכוהל ששימש כממס של השמנים האתריים. השמן האתרי היעיל ביותר היה שמן A שהופק מאזוב מצוי. שמן זה גרם לעיכוב משמעותי בגידול החיידק על מצע המזון. שאר השמנים האתריים גרמו לעיכוב חלקי.

## 2.2. סיכום הניסויים בשנה ב'

בשנה זו, הניסויים השונים התמקדו על בחינת שיטות וגישות הדברה שונות של רקבון רך בפקעות קאלה. תחילה בחנו שני חומרי חיטוי כימיים (סטרפטומיצין ואנטיסטריס 200) ושני חיידקים אנטגוניסטים (*Pseudomonas* ו-*Bacillus*). ניסוי נוסף נעשה במטרה לבחון אפשרות חיטוי הפקעות באמצעות שילוב של מים חמים ופורמלין. ההנחה הייתה ששימוש בתמיסות חמות (52 מ"צ) יכול לקטול את חיידקי הארוויניה הנמצאים על פני ובתוך החלקים הפנימיים של הפקעות. גישה נוספת הייתה בחינת השפעת מי כלור, המיוצרים ע"י מכשיר מיוחד שמחולל כלור פעיל ממי ברז רגילים, על התפתחות רקבון רך בבסיסי גבעולים במשך הגידול וכן בחינת הסברה שהורדת האינזוקולום הקיים במשך הגידול מביא בעקבותיו הפחתה בשיעור הריקבונות המתפתחים בפקעות לאחר האסיף. לצורך זה הותקן המכשיר בבית רשת במחלקה לאחסון וחוברו אליו מתדים שמזקמו מעל צמחי קאלה שגדלו בעציצים. לבסוף בדקנו את פוטנציאל חיטוי הפקעות ע"י אידויים בשמנים אתריים שהוכחו יעילים בעיכוב התפתחות החיידק ארוויניה בניסויים *in vitro*.

חיטוי פקעות קאלה בטבילה למשך 30 דקות בתמיסת סטרפטומיצין בריכוז 200 ח"מ או החומר אנטיסטריס הוכח כיעיל במניעת התפתחות רקבון ארוויניה בפקעות מודבקות מלאכותית. השימוש בחיידקים האנטגוניסטים *Bacillus* ו-*Pseudomonas* הוכח כיעיל במניעת הרקבון. בניסוי שבצענו, שימוש במים חמים בשילוב עם פורמלין לחיטוי הפקעות לא מנע התפתחות הרקבון במשך הגידול ואף השפיע לרעה. בטיפול המשולב הייתה הגברה בשיעור הצמחים הרקובים בהשוואה לפקעות הלא מטופלות. אידיי הפקעות

בשמנים אתריים של אזוב מצוי וקימל הביא להפחתה משמעותית בשיעור הצמחים שנרקבו.

התוצאות שהתקבלו מסדרת הניסויים שנעשו בשנה זו מצביעות שלחיטוי חיצוני של פקעות קאלה יש חשיבות גדולה מאד במניעת התפתחות רקבון הארוויניה בתקופת אחסון הפקעות ובמשך הגידול. ככל שרמת המידבק נמוכה יותר הסיכוי להתפתחות הרקבון קטן יותר. שימוש בחומרי חיטוי מקובלים עשוי לתת תשובה חלקית לבעיה.

### 3.ג. השפעת השמן האתרי קרבקרול בשילוב עם אווירה מבוקרת על התפתחות החיידק *E. carotovora* בתרבית

תרחיף מימי של תאי החיידק *E. carotovora* ( $50 \mu\text{l}$ ), שמקורו בתרבית בת 24 שעות, נזרע על מצע מזון LB בצורה סטירילית. לדופן הפנימית של מכסה צלחת הפטרי הוצמדה בעזרת דבק דסקית סטירילית של נייר סינון, עליה הוסף הקרבקרול לאחר יום של התפתחות בטמפ' 25 מ"צ. צלחות הפטרי נאטמו בעזרת סרט בידוד נצמד כדי למנוע נידוף החומר, והודגרו למשך 24 שעות בטמפ' החדר. בתום החשיפה לקרבקרול, הוסר סרט הבידוד והצלחות נחשפו בתא אטום לאווירה מבוקרת למשך 5 ימים ב- 20 מ"צ. צלחות הביקורת נחשפו במקביל לאוויר באותם תנאים. בתום תקופה זו נקבע מספר המושבות שהתפתחו בכל טיפול וחושב שיעור העיכוב. התוצאות המוצגות בטבלה 1 מראות בבירור ששילוב שתי השיטות הגביר בצורה משמעותית את יעילות הקרבקרול עד כדי עיכוב מלא.

**טבלה 1:** השפעת טיפול משולב בקרבקרול ואווירה מבוקרת על התפתחות החיידק *E. carotovora* בתרבית. הקרבקרול יושם בנפח הגורם לעיכוב של 50% בגידול. הרכב האווירה המבוקרת (CA) אליה נחשף החיידק כלל 22% חמצן ו- 5% פחמן דו חמצני.

הטיפול	% עיכוב
ביקורת	0
קרבקרול $0.5 \mu\text{l}$	60
CA	40
קרבקרול + CA	100

### 4.ג. השפעת טיפול משולב אווירה מתואמת או מבוקרת ואידוי בקרבקרול על התפתחות רקבונות ומדדי צימוח ופריחה

פקעות קאלה אתיופיקה שהודבקו מלאכותית באמצעות פציעה שימשו אותנו לבחינת השפעת שילוב אווירה מבוקרת ואידוי בקרבקרול על התפתחות רקבון רך במשך האחסון. ההדבקה של הפקעות נעשתה ע"י פציעתן וטבילתן בתרבית של חיידק הארוויניה שבודד מפקעות קאלה רקובות. טיפול האידוי בקרבקרול נעשה ע"י חשיפת הפקעות למשך 24 שעות לנייר סינון שהוספג ב- 0.1 מ"ל של קרבקרול במיחול 1:2 בצנצנת אטומה של 1 ליטר. טיפול הביקורת נחשף בצורה דומה לכוהל בלבד (הממס של קרבקרול). הניסוי כלל 6 טיפולים:

1. ביקורת ללא פציעה + הדבקה (ביקורת כהל).
2. ביקורת עם פציעה ללא הדבקה (ביקורת כהל).
3. פציעה + הדבקה (ביקורת כהל).

4. ביקורת ללא פציעה + הדבקה (קרברקול 1:2).
5. ביקורת עם פציעה ללא הדבקה (קרברקול 1:2).
6. פציעה + הדבקה (קרברקול 1:2).

הטיפולים השונים קיבלו את טיפולי האחסון הבאים:

א) ללא אווירה מבוקרת/20 מ"צ; (ב) אווירה מבוקרת - CA - 2% חמצן + 5%  
 פד"ח / 20 מ"צ; ג) אווירה מתואת - MA - שקית PE אטומה / 1 מ"צ.

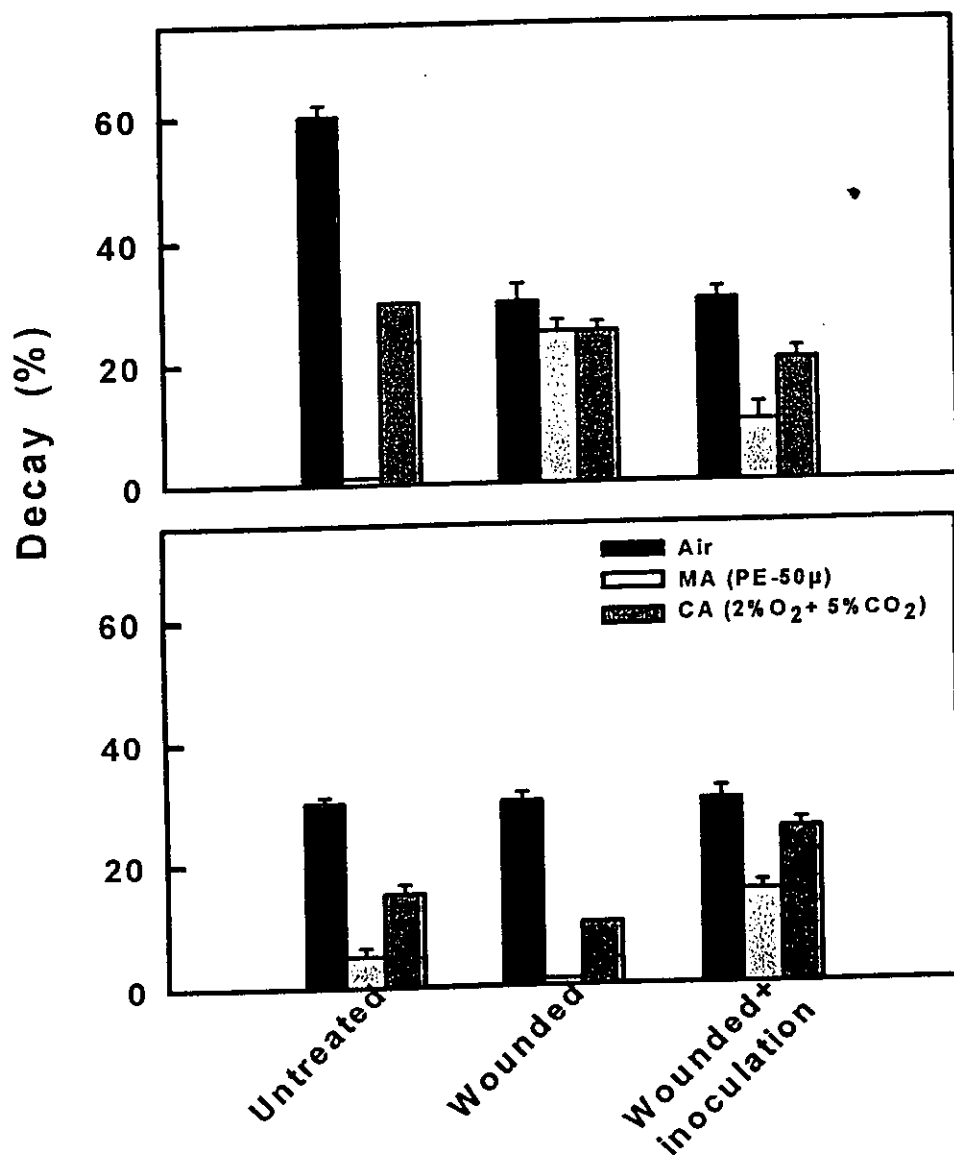
התוצאות המובאות באיור 1A מראות שהנגיעות בפקעות שלא נחשפו לקרברקול היתה נמוכה בפקעות הפצועות והמודבקות (30%) לעומת הפקעות הלא מטופלות (60%). האחסון באווירה מתואמת הפחית לגמרי את הנגיעות הגבוהה שאובחנה בפקעות הלא מטופלות והפחית חלקית ל-10% את הנגיעות בפקעות המודבקות, אך לא השפיע על הנגיעות בפקעות הפצועות. לאחר אחסון באווירה מבוקרת התקבלה רמת נגיעות דומה בכל הפקעות, כך שנראה שאחסון זה היה פחות יעיל בהשוואה לאווירה מתואמת (איור 1 A). הנגיעות בפקעות שנחשפו לקרברקול הייתה דומה בכל הטיפולים והגיעה לרמה של 30% באחסון באוויר (איור 1 B). נראה לכן שקרברקול היה יעיל רק בהפחתת הנגיעות של הפקעות הלא מטופלות מ-60 ל-30%. לעומת זאת השילוב של קרברקול עם אווירה מבוקרת היה פחות יעיל בהשוואה לשילוב עם אווירה מתואמת, אך היה יעיל בהשוואה לטיפול עם אווירה מבוקרת בלבד, שכן הוא גרם להפחתת הנגיעות לרמה של 10% בפקעות הלא מטופלות ופצועות. בפקעות המודבקות שילוב של שתי השיטות לא היה יעיל בהפחתת הנגיעות (איור 1 B).

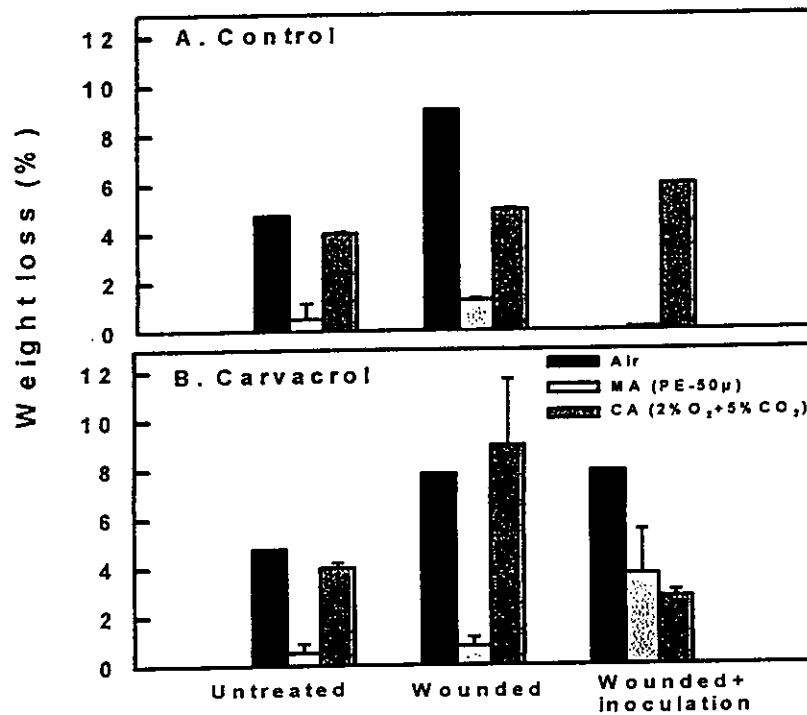
אחסון באווירה מתואמת הפחית כצפוי את איבוד המשקל בצורה משמעותית בכל סוגי הטיפולים, בעוד שאחסון באווירה מבוקרת לא השפיע על איבוד המשקל של פקעות לא מטופלות, הפחית לחצי את איבוד המשקל של פקעות פצועות והגביר את איבוד המשקל של פקעות מודבקות (איור 2 A). האיבוד בקרברקול לא השפיע על איבוד במשקל של הפקעות הלא מטופלות או פצועות, אך הגביר את איבוד המשקל של פקעות מודבקות (איור 2 B). השילוב של קרברקול עם אווירה מתואמת היה יעיל בהפחתת איבוד המשקל בפקעות הלא מטופלות ופקעות פצועות, בדומה להשפעת אווירה מתואמת לבדה, אך גרם לעליה מסויימת באיבוד המשקל של פקעות מודבקות בהשוואה לטיפול של אווירה מתואמת בלבד (איור 2 B). השילוב של קרברקול עם אווירה מבוקרת לא השפיע על איבוד המשקל של פקעות לא מטופלות או פצועות בהשוואה לטיפול של אווירה מבוקרת בלבד, אך הפחית את איבוד המשקל בפקעות המודבקות (איור 2 B).

השפעת הטיפולים על מדדי הצימוח הייתה משמעותית ביותר. מהתוצאות המובאות באיור 3 A ניתן לראות שבעוד שהפציעה לא השפיעה על גובה הגבעול, ההדבקה עיכבה כמעט לגמרי את הצימוח. אחסון באווירה מתואמת או מבוקרת הגביר יותר מפי 2 את צימוח הגבעול בכל סוגי הפקעות (איור 3 A). האיבוד בקרברקול הגביר את צימוח הגבעול פי 2 בהשוואה לביקורת בכל סוגי הפקעות (איור 3 B). השילוב של שתי השיטות שמר באופן כללי על רמת צימוח גבוהה בכל סוגי הפקעות. נראה שלגבי מדדי הצימוח אין יתרון לשילוב של שתי שיטות האחסון, שכן כל שיטה בנפרד תורמת להאצת הצימוח בצורה מקסימלית. תמונה דומה התקבלה בבחינת השפעת הטיפולים על % הפריחה (איור 4). הדבקה עיכבה לגמרי את הפריחה בשל עיכוב הצימוח, ורק האחסון באווירה מתואמת הגביר את הפריחה ל-100% ול-30% בפקעות לא מטופלות או מודבקות, בהתאמה (איור 4 A). השפעת האווירה המבוקרת הייתה פחותה, והתקבלה הגברת פריחה משמעותית של 20% רק בפקעות המודבקות. קרברקול לבדו הגביר את הפריחה רק בפקעות מודבקות. השילוב של קרברקול עם אווירה מתואמת היה יעיל בהגברת הפריחה - 60% בהשוואה לביקורת רק בפקעות המודבקות. נראה לכן ששילוב שתי שיטות האחסון מסייע בהתגברות על הנגיעות דבר המתבטא בשיפור הפריחה.

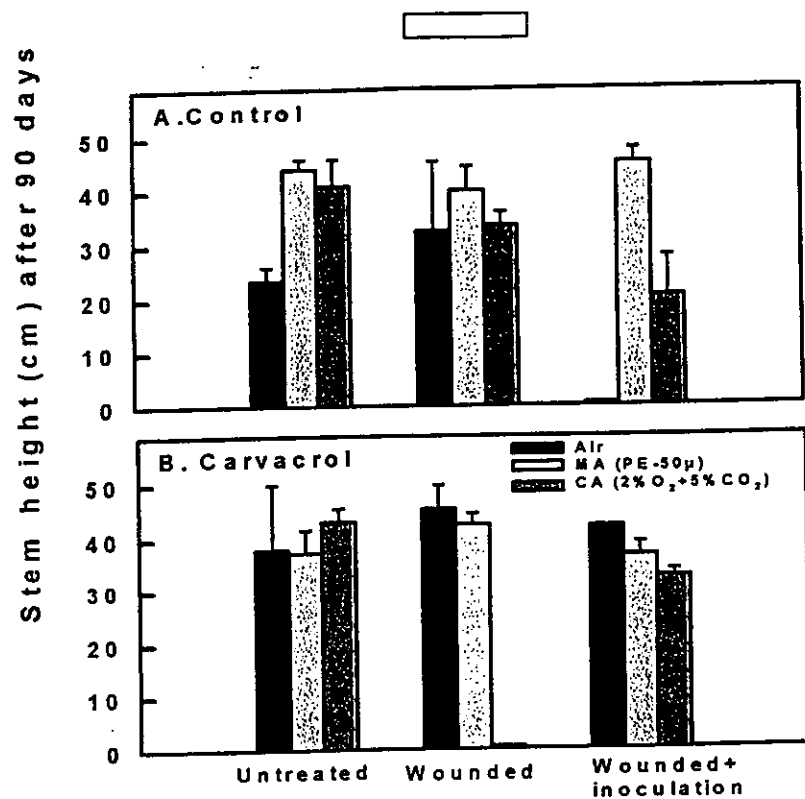


**איור 1:** השפעת אידוד בקרבקרו של פקעות קאלה שניתן בנפרד או במשולב עם אחסון באווירה מבוקרת או מתואמת על שיעור הנגיעות ברקבון כך בתום תקופת האחסון. הפקעות הודבקו מלאכותית בחיידק ארוויניה.

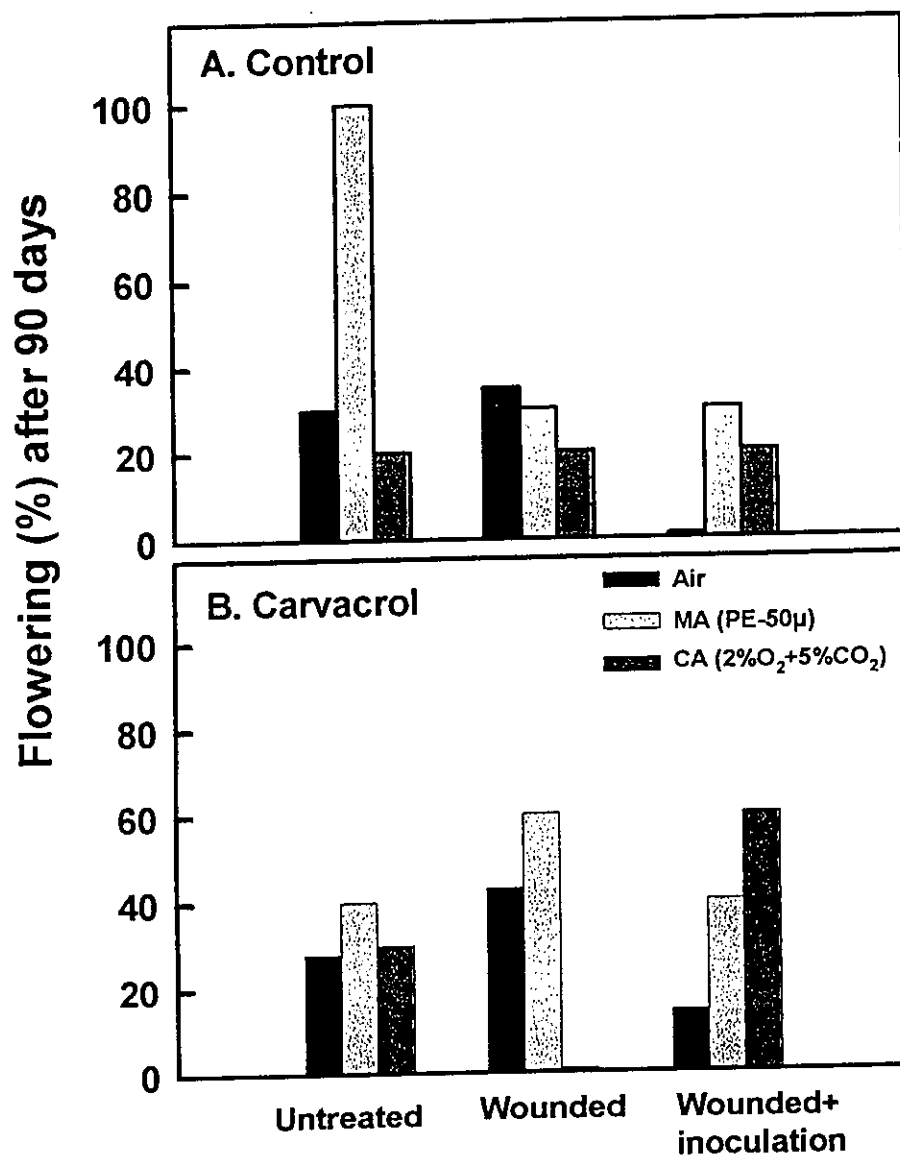




**איור 2:** השפעת איוד בקרבקרוֹל בפקעות קאלה שניתן בנפרד או במשולב עם אחסון באווירה מבוקרת או מתואמת על שיעור איבוד המשקל בתום האחסון. הפקעות הודבקו מלאכותית בחיידק ארוויניה.



**איור 3:** השפעת איוד בקרבקרוול בפקעות קאלה שניתן בנפרד או במשולב עם אחסון באווירה מבוקרת או מתואמת גובה הגבעולים. הפקעות הודבקו מלאכותית בחיידק ארוויניה. גובה הגבעולים נמדד 90 יום לאחר השתילה.



**איור 4:** השפעת טיפול איוד בקרבקרוֹל בפקעות קאלה שניתן בנפרד או בשילוב עם אחסון באווירה מבוקרת או מתואמת על % הפריחה. הפקעות הודבקו מלאכותית בחיידק ארוויניה. % הפריחה חושב עפ"י מספר הפקעות שפרחו 90 יום לאחר השתילה.

### ג.5. יישום קרבקרול על פקעות קאלה באמצעות דונג

לאחר שנמצא שאייד בקרבקרול יעיל בעיכוב התפתחות הרקבון במשך האחסון, נבחן אופן יישום החומר באמצעות דונג, דבר שעשוי להיות יותר מעשי וקל לחקלאים וגם ימנע בנוסף איבוד משקל. יישום זה נבחן שם פקעות קאלה אתיופיקה. הפקעות נטבלו לאחר פציעתן בתמיסות המכילות דונג עם קרבקרול בשני ריכוזים: 0.2% או 0.5%. פקעות הביקורות נטבלו בדונג בלבד לאחר פציעה או הושארו ללא טיפול כלל. הפקעות הוכנסו לתוך ארגז פלסטי על גבי נייר סינון לח. הארגז נעטף בשקית והודגר ב- 20 מ"צ למשך חודש בתנאים המשרים התפתחות רקבון. התוצאות המוסכמות בטבלה 2 מראות את יעילות יישום הקרבקרול בדונג גם בתנאים משרי רקבון, שכן אפילו הריכוז הנמוך יחסית של 0.2% עיכב את הנגיעות בהשוואה לביקורת.

**טבלה 2:** השפעת דינוג פקעות קאלה בנוכחות קרבקרול על שיעור הנגיעות בארזיניה בתום האחסון.

טיפול	% נגיעות
ביקורת יבשה	90
ביקורת מדונגת	90
דינוג + 0.2% קרבקרול	60
דינוג + 0.5% קרבקרול	60

### ג.6. השפעת טיפול חיטוי בכלורין וטמפרטורות אחסון על נגיעות קאלה ברקבון רר

מטרת ניסויי זה הייתה אימות התוצאות שהתקבלו בניסויים בשנה השנייה שהראו שחיטוי הפקעות בתמיסת כלור היה יעיל ביותר במניעת התפתחות הרקבון. ניסוי זה בא לבחון את יעילות הכלורין בעיכוב התפתחות רקבון טבעי במהלך האחסון בטמפרטורות שונות. הניסוי נעשה בפקעות קאלה אתיופיקה שהובאו מחלקה שידועה שנגועה בחיידק ארזיניה. הפקעות נטבלו במשך 20 דקות בתמיסת הכלור ולאחר יבושם באוויר הוכנסו לאחסון בטימפ' השונות. שיעור הרקבון נבדק לאחר חודש אחסון.

התוצאות המוסכמות בטבלה 3 מראות בבירור שטיפול בכלור היה יעיל ביותר בעיכוב התפתחות רקבון כאשר הפקעות אוחסנו בטמפ' של 4 ו- 8 מ"צ. הטיפול לא היה יעיל כאשר הפקעות אוחסנו בטמפ' של 12, 17 ו- 25.

**טבלה 3:** השפעת הטיפול בכלורין וטמפרטורות אחסון על נגיעות פקעות קאלה ברקבון רר.

טמפרטורת אחסון (מ"צ)	% נגיעות
4	0
8	0
12	25
17	36
25	35

## ד. מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר או סיומו:

1. החיידק *Erwinia carotovora* הוכח כגורם האחראי לרקבון רך בפקעות קאלה בישראל. החיידק בודד ממרבית פקעות קאלה רקובות שהתקבלו ממשקים שונים.
2. חיטוי פקעות קאלה בטבילה למשך 30 דקות בתמיסת סטריפטומיצין בריכוז 200 ח"מ או החומר אנטיסטריס הוכח כיעיל במניעת התפתחות רקבון ארוויניה בפקעות מודבקות מלאכותית. השימוש בחיידקים האנטגוניסטים *Pseudomonas* ו-*Bacillus* הוכח כיעיל במניעת הרקבון, תוצאה שחזרה על עצמה גם בשנה זו ומצביעה על כיוון מחקר מעניין.
3. הקרבקרוּל הוכח כיעיל בעיכוב החיידק ארוויניה בצלחות פטרי וע"ג הפקעת. הטיפול לא פגע במדדי הצימוח והפריחה. השילוב של קרבקרוּל ואווירה מבוקרת הגביר בצורה משמעותית את יעילות הקרבקרוּל. בנוסף, נמצאה השפעה חיובית בשילוב קרבקרוּל עם אווירה מתואמת.

## ה. פרוט הפרסומים המדעיים בכתב ובע"פ

חלקים שונים של עבודה זו דווחו בכינוסים השנתיים וימי עיון בפני מגדלי ומדריכים חקלאיים הקשורים בענף. בנוסף, ניתנו הרצאות על הנושא בכינוסים בינלאומיים בכריתים ובירושלים.

### א. סיכום על שאלות מנחות:

1. מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה:  
מטרות המחקר (1) בידוד זיהוי הפתוגנים האחראי להתפתחות הריקבון הרך הפקעות קאלה במשך אחסון. (2) לימוד התנאים המשפיעים על התפתחות הריקבון במשך האחסון. (3) בחינה ופיתוח של שיטה/ות הדברה יעילות.

### 2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:

בשלבים הראשונים של המחקר (שנה ראשונה) נעשה מאמץ לבירור סוגיית זיהוי הגורם האחראי למחלה. לצורך זה נעשו בידודים של חיידקים מחלקים שונים של פקעות קאלה רקובות שהתקבלו ממגדלים שונים. בנוסף לשיטת הזיהוי הסטנדרטיות, המבוססות על בדיקות כימיות קיימות בדיקות המבוססות על מבחנים ביולוגיים הנותנים מידע על זהות החיידק לפי יכולת ההדבקה של פרוסות תפוח אדמה. תבדידי החיידקים שנאספו שימשו כמקור להדבקת פרוסות תפוח אדמה לקביעת יכולתם לגרום לרקבון רך. ניסויי הדברה ראשוניים נעשו בסוף שנה ראשונה במטרה לאתר כיווני מחקר לשנה השניה בתחום זה. בשנה השנייה, הניסויים השונים התמקדו בבחינת שיטות וגישות הדברה שונות של רקבון רך בפקעות קאלה. תחילה בחנו שני חומרי חיטוי כימיים (סטריפטומיצין ואנטיסטריס 200) ושני חיידקים אנטגוניסטים (*Pseudomonas* ו-*Bacillus*). ניסוי נוסף ניעשה במטרה לבחון אפשרות חיטוי הפקעות באמצעות שילוב של מים חמים ופורמלין. גישה נוספת היתה בחינת השפעת מי כלור, המיוצרים ע"י מכשיר מיוחד שמחולל כלור פעיל ממי ברז רגילים, על התפתחות רקבון רך בבסיסי גבעולים במשך הגידול וכן בחינת הסברה שהורדת האינוקולום הקיים במשך הגידול מביא בעקבותיו הפחתה בשיעור הריקבונות המתפתחים בפקעות לאחר האסיף. לצורך זה הותקן המכשיר בבית רשת במחלקה לאחסון וחוברו אליו מתזים שמוקמו מעל צמחי קאלה שגדלו בעציצים. לבסוף בדקנו את פוטנציאל חיטוי הפקעות ע"י אידויים בשמנים אתריים שהוכחו יעילים בעיכוב התפתחות החיידק ארוויניה בניסויים *in vitro*.

בשנה השלישית התמקדנו על ביסוס הממצאים הקודמים של שיטות ההדברה וכן אפיון הפרמטרים השונים המשפיעים על יעילות ההדברה. נבחנה השפעת השמן האתרי קרבקרוּל על התפתחות רקבון

בפקעות קאלה י שאוחסנו באווירה מבוקרת ומתואמת. בנוסף, בחנו את יעילות חומרי חיטוי שונים על עיכוב התפתחות רקבונות בפקעות קאלה שאוחסנו בטמפרטורות שונות.

החיידק *E. carotovora* זוהה בוודאות כגורם האחראי להתפתחות רקבון רך בפקעות קאלה. הזיהוי התבסס על שימוש במצעי מזון ספיציפיים לגידול חיידק זה וגם במבחני פתוגניות על רקמות תפוחי אדמה. בניסויי ההדברה/חיטוי הראשוניים נמצא שטבילה של 30 דקות בתמיסת כלור עיכבה באופן משמעותי התפתחות הרקבון בפקעות. בהמשך, נמצא בשנה השנייה שחיטוי פקעות קאלה בטבילה למשך 30 דקות בתמיסת סטריפטומיצין בריכוז 200 ח"מ או החומר אנטיסטריס הוכח כיעיל במניעת התפתחות רקבון ארוויניה בפקעות מודבקות מלאכותית. השימוש בחיידקים האנטגוניסטים *Bacillus* - *Pseudomonas* הוכח כיעיל במניעת הרקבון. בניסוי שבצענו, שימוש במים חמים בשילוב עם פורמלין לחיטוי הפקעות לא מנע התפתחות הרקבון. במשך הגידול ואף השפיע לרעה. בטיפול המשולב היתה הגברה בשיעור הצמחים הרקובים בהשוואה לפקעות הלא מטופלות. אידיי הפקעות בשמנים אתריים של אזוב מצוי וקימל הביא להפחתה משמעותית בשיעור הצמחים שנרקבו.

הקרבקרו הוכח כיעיל בעיכוב החיידק ארוויניה בצלחות פטרי וע"ג הפקעת. הטיפול לא פגע במדדי הצימוח והפריחה. השילוב של קרבקרו ואווירה מבוקרת הגביר בצורה משמעותית את יעילות הקרבקרו. בנוסף, נמצאה השפעה חיובית בשילוב קרבקרו עם אווירה מתואמת.

בפקעות קאלה הושגה הדברה טובה של הרקבון בנוכחות חומרי החיטוי השונים רק במשך אחסון ב- 4 מ"צ.

### 3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

התוצאות מצביעות שלחיטוי חיצוני של פקעות קאלה יש חשיבות גדולה מאד במניעת התפתחות רקבון הארוויניה בתקופת אחסון הפקעות ובמשך הגידול. ככל שרמת המידבק נמוכה יותר הסיכוי להתפתחות הרקבון קטן יותר. שימוש בחומרי חיטוי מקובלים עשוי לתת תשובה חלקית לבעיה. המחקר מצביע על כיווני מחקר מבטיחים ביותר בכל הקשור לשימוש בחיידקים אנטגוניסטים להדברה ביולוגית של ארוויניה. לחיטוי הפקעות באידי שמנים אתריים יש פוטנציאל ויש להמשיך לברר אפשרות יישומי המעשי.

### 4. הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה:

יש להמשיך לבחון את פוטנציאל היישום החקלאי של טיפולי החיטוי השונים במיוחד הטיפול בקרבקרו והחיידקים האנטגוניסטים.

### 5. האם הוחל כבר בהפצת הידע בנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט פירוט – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים – יש לצצין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון – יש לפרט מקום ותאריך:

חלקים שונים של עבודה זו דווחו בכינוסים השנתיים וימי עיון בפני מגדלי ומדריכים חקלאיים הקשורים בענף. בנוסף, ניתנו הרצאות על הנושא בכינוסים בינלאומיים בכריתים במאי 1999 ובירושלים במרץ 2000 במסגרת כינוס Postharvest 2000.