

דוח סופי לתוכנית מחקר 430-0053-07

תהליך החדירה וגרימת הריקבון ע"י הפטרייה *Alternaria alternata* בבית הגרעין של

תפוח ואמצעי הדברה כנגדה

Infection and development of *Alternaria alternata* causing core rot of apples
and its control

מוגש לקרן מדען צוות מוצרים ליצוא: ענף פירות

ומועצת הצמחים (ענף הפירות)

אילנה קובילר, המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף

, דב פרוסקי, המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף

משה פלישמן, המכון למטעים וצמחי נוי

משה ראובני, מכון לחקר הגולן

Ilana Kobiler , Department of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO,

E-mail kobileri@agri.gov.il

Dov Prusky, Department of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO,

dovprusk@agri.gov.il

Moshe Reuveni, Katzerin Center of Research

Moshe Fleishman, Department of Horticulture, ARO

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר

הפטרייה *Alternaria alternata* נמצאה כאחד הגורמים העיקריים לריקבון בבית הגרעין (Moldy-core) בפרי התפוח של הסטאר קינג זני דלישס אדום נוספים המהווים כשליש מכלל זני התפוח המגודלים באיזור הגליל והגולן. הפטרייה התגלתה בשנים האחרונות כפתוגן תוקפני ביותר בזנים אלו המאופיינים בפיטם פתוח. ממצאים מהעבודה זו מצבעים שחדירת הפטרייה מתבצעת בזמן הפריחה ומתפתחת באיור דופן בית הזרעים בהמשך גידול הפרי ובאחסון. איזור זה נמצא כאזור הרגיש ביותר בזן רד דלישס בהשוואה לאותו איזור בזן גולדן דלישס. רגישות זו תלויה ב-pH הגבוה יחסית באיזור בית הזרעים שמעודד הפרשה של אנזימים צלולוליטיים. גם ריכוז של חומצה כלוריגנית, שמעכבת התפתחות הפטרייה בזנים עמידים וריכוזה נמוך בדופן בית הזרעים בזן רד דלישס תורם לרגישות אלטרנריה. ריסוסים בתכשירי הדברה שבוצעו בזמן הפריחה הפחיתו את שעור הנגיעות של הפרי אך לא במידה מספקת ועקבית, על אף שיעילותם הוכחה בתנאי מעבדה.

עבודתנו הוכיחה שלא הפיטם הפתוח הוא הגורם לרגישות הזן, אלא רגישות דופן בית הזרעים שמאפשרת התפתחות ופריצה של הפטרייה לציפה. למרות הבנת תהליך החדירה לא פתרנו את הבעית של ריקבון בית הזרעים ומחקר נוסף על הקשר בין מועד הדבקה ויעילות הדברה ו/או גישות הדברה חדשות חייבם להבחן עדיין.

מבוא

הפטרייה *Alternaria alternata* הינה פתוגן תוקפני ומהווה גורם עיקרי לריקבון בית הזרעים (Moldy-core) בפרי התפוח ובעיקר בזנים המשתייכים ל - "Red Delicious", המאופיינים בפיטם פתוח (Brown and Hendrix, 1978; Ellis and Barrat, 1983). זנים אלו מהווים כשליש מכלל זני התפוח הגדלים בישראל. המחלה גורמת לפסילת פרי ולנזק ישיר של מיליוני שקלים, ולירידה באמינות טיב התפוח הישראלי, דבר שיכול לאפשר בעתיד יבוא מוגבר של תפוחים מחו"ל, כתחליף ליצור המקומי.

הסימפטומים המאפיינים את המחלה הינם, ריקבון יבש באזור בית הזרעים, המתפשט לעבר ציפת התפוח (Mesoderm), ובציפת התפוח הפטרייה גורמת להתפתחות של ריקבון רך וכהה. סימפטומים חיצוניים כמעט ואינם קיימים כך שלא ניתן להבחין במחלה אלא רק לאחר שהפרי נחתך/נאכל (Ellis and Barrat, 1983).

דווח שבמהלך הפריחה או זמן קצר לאחריה, הפטרייה *A. alternata* מאכלסת איברי פרח מזדקנים ולאחר מכן נעה דרך הפיטם הפתוח לאזור השחלה או לאזור בית הזרעים של הפרי. נבגי הפטרייה המגיעים לבית הזרעים, מתפתחים במהלך עונת הגידול של פירות התפוח וכמו כן במהלך האחסון וגורמים להתפתחות הסימפטומים (Miller, 1959; Ellis and Barrat, 1983).

טיפול הדברה שימשו בעבר כאמצעי הן ללימוד התהליך האפידמיולוגי והן ללמוד מועד ההדבקה של גורמי המחלה ודרכי החדירה של הפטרייה. לא ידוע האם העדר הדברה מושלמת בניסויים השונים הוא תוצאה של העדר יישום התכשירים במועד המתאים ביותר למניעת הדבקה במחלה ולא חדירת הפטרייה דרך הפיטם הפתוח גם לאחר הפריחה. בהתחשב בהתפלגות תקופת הפריחה המשתרעת על 7 – 12 ימים, גם ריסוסים שניתנו פעם ביומים לא נתנו אפשרות להגנה ראויה של אתר ההדבקה בפרח. עדין לא ידועות הסיבות המעודדות תחילת חדירת הפטרייה, אכלוס של אזור השחלה ופריחה לתוך ציפת הפרי והתפתחות הריקבון, אולם ברור כי לאחר החדירה הפטרייה מוגנת בפני ריסוסי הדברה (Ellis and Barrat, 1983).

בעוד שריקבון בית הזרעים בתפוחים המשתייכים לזן 'Red Delicious' מאד נפוץ, שעור הריקבון בתפוחים המשתייכים לזן 'Golden Delicious', שאינם בעלי פיטם פתוח, נמוך. ההשערה הרווחת היא כי לפטרייה קל יותר לאכלס את בית הזרעים של תפוחים המשתייכים לזן 'Red Delicious' המאופיינים בפיטם פתוח, אולם בעבודה הקדמית במעבדתנו נמצא כי ההבדל ברגישות בין הזנים 'Red Delicious' ו - 'Golden Delicious' אינו נובע מרמת האכלוס של הפטרייה בזמן הפריחה, אלא הינו תוצאה של יכולת הפטרייה להתפתח ולהתבסס בבית הזרעים של הזן הרגיש אך לא בבית הזרעים של הזן העמיד.

בנוסף נמצא שהרקמה שמגבילה את התפתחות הפטרייה והתבססותה בציפה בזן העמיד הינה רקמת דופן בית הזרעים (locule).

בשנה האחרונה מטרותינו הייתה להמשיך בפיתוח שיטת חיזוי יעילה לחקלאי שתאפשר גילוי מוקדם של מטעים נגועים במחלה, כך שתפוחים מאותם המטעים ישלחו מיד לשוק המקומי ללא חודשי אחסון. מטרה נוספת הייתה להבין את הגורמים המגבילים את התפתחותה והתבססותה של הפטרייה בתפוחים המשתייכים לזן 'Golden Delicious' העמיד ואת אלה המאפשרים את התפתחותה בתפוחים המשתייכים לזן 'Red Delicious' הרגיש.

תוצאות

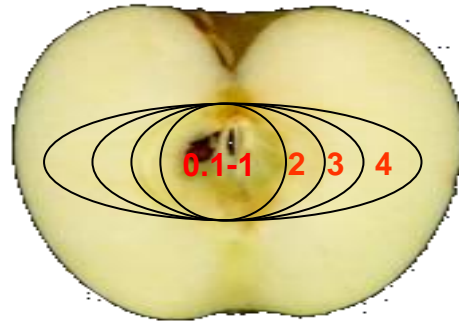
1. פיתוח שיטת חיזוי

פיתוח השיטה להערכת שעור הנגיעות בוצע על ידי ריסוק של בית הזרעים, של תפוחים מזן הרגיש ('Red Delicious') והעמיד ('Golden Delicious') בשלבים פנולוגים שונים ומשני מטעים שונים (עין זיוון ורמת מגשימים). הרסק נזרע בצלחות פטרי המכילות מצע מזון סלקטיבי, ולאחר שבוע גידול נספרו המושבות על גבי כל צלחת, כאשר כל מושבה מייצגת יחידת מדבק של הפטרייה *A. alternata*. כמו כן נבדק הקשר בין מספר יחידות המדבק בשלבים הפנולוגים השונים לבין הנגיעות בשלב הקטיפי והאחסון. כדי לאמת את השיטה שפותחה בעונות הקודמות, בדקנו פרמטר המשפיע על הנגיעות - הדבקה מכוונת בזמן הפריחה.

במהלך העונה הקודמת מצאנו כי בזן הרגיש ישנה התפצלות לשתי אוכלוסיות, אוכלוסיית תפוחים אשר אינה נדבקת במחלה (מספר נמוך של יחידות המדבק באזור בית הזרעים) ולכן גם לא נראה בתפוחים אלו סימפטומים בעתיד, לעומת אוכלוסייה בה מספר יחידות המדבק גבוה. התפצלות האוכלוסיות אינה מאפשרת שימוש במיצוע לשם ניתוחים סטטיסטיים ולכן על מנת לבצע ניתוח נבחר ערך סף של 50 יחידות מדבק. מטרת ערך הסף היא להבדיל בין האוכלוסיות, כלומר כל תפוח אשר מספר יחידות המדבק בו קטן מ- 50 שייך לאוכלוסיית התפוחים אשר לא מפתחת סימפטומים, לעומת זאת כל תפוח אשר מספר יחידות המדבק בו גבוה מ- 50 צפוי לבטא את המחלה ולפתח סימפטומים. לאחר מכן חושב אחוז התפוחים אשר מספר יחידות המדבק בהם היה גבוה מערך הסף. לכל אחד מהטיפולים (ביקורת והדבקה) החישוב בוצע בנפרד. נבדק הקשר בין אחוז התפוחים אשר מספר יחידות המדבק שלהם הייה גבוה מערך הסף לנגיעות בשלב הקטיפי ובנוסף בוצע CHI-TEST לשם השוואה בין הטפולים.

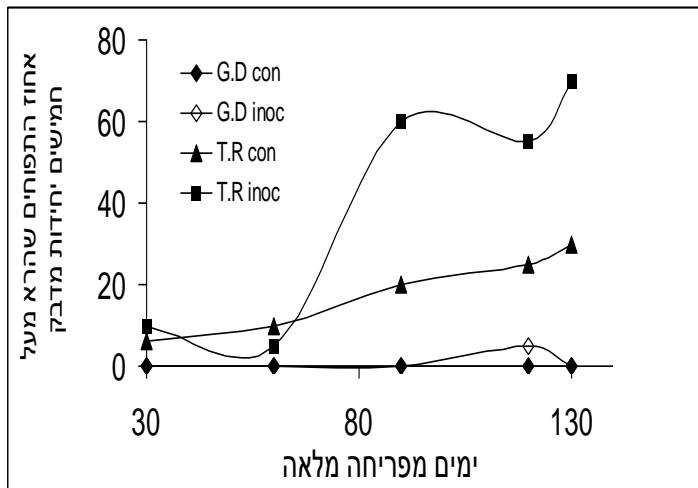
הנגיעות בשלב הקטיפי נבדקה חזותית על ידי חיתוך הפרי והערכה של אחוז הכיסוי של בית הזרעים על ידי הפטרייה ופריצתה לעבר הציפה. הסקאלה להערכה נעה בין 0 ל- 4, הערך

0 מייצג דופן בית זרעים נקי לחלוטין מפטרייה, 0.1 – 1 מתאר אחוז כיסוי של דופן בית הזרעים על ידי תפטיר הפטרייה, 1 מייצג כיסוי מלא של דופן בית הזרעים בתפטיר הפטרייה ללא פריצתה החוצה לעבר הציפה, 4 – 1 מתאר את התקדמות הריקבון בציפה (באורך 1).
איור 1: תאור הבדיקה היוזאלית של רמת הנגיעות בזמן הקטיפ.

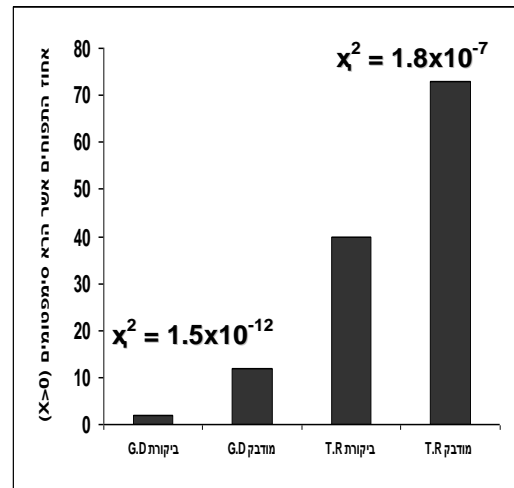


איור 2 - רמת האכלוס של אזור בית הזרעים על ידי הפטרייה *Alternaria alternata* בשלבים פנולוגים שונים של גידול הפרי והנגיעות החזותית בזמן הקטיפ במטע עין זיוון.

A



B



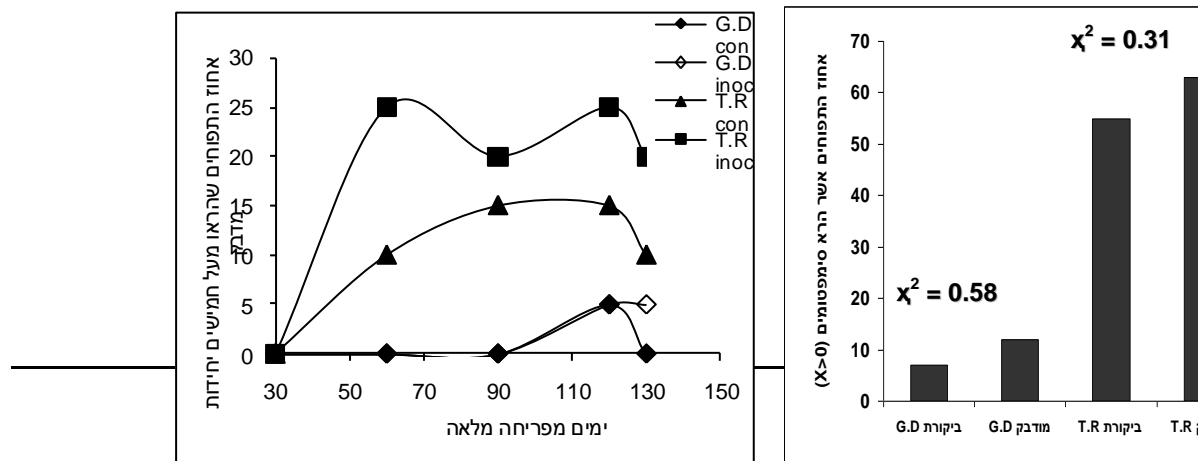
מאיור 2A ניתן לראות כי מספר התפוחים אשר הראו מעל חמישים יחידות מדבק היה אפסי בזן 'Golden Delicious' (G.D), בביקורת ובטיפול ההדבקה. לעומת זאת ניתן לראות כי

בזן 'Red Delicious' (R.D) מספר התפוחים שהראו מעל חמישים יחידות מדבק היה גבוה ועלה עם הגיל הפנולוגי של הפרי. כמו כן ניתן לראות כי העלייה הייתה חדה יותר בטיפול ההדבקה לעומת הביקורת. מאיור 2B ניתן לראות כי אחוז התפוחים אשר הראו סימפטומים חיצוניים ($0 < X$) בזמן הקטיף היה נמוך בזן G.D לעומת הזן R.D, בשני הזנים אחוז התפוחים אשר הראו סימפטומים חיצוניים היה באופן מובהק גבוה יותר בטיפול ההדבקה לעומת הביקורת.

איור 3 – רמת האכלוס של אזור בית הזרעים על ידי הפטרייה *Alternaria alternata* בשלבים פנולוגיים שונים של גידול הפרי והנגיעות החזותית בזמן הקטיף במטע רמת מגשימים.

A

B



מאיור 3A ניתן לראות כי מספר התפוחים אשר הראו מעל חמישים יחידות מדבק היה אפסי בזן G.D, בביקורת ובטיפול ההדבקה. לעומת זאת ניתן לראות כי בזן R.D מספר התפוחים שהראו מעל חמישים יחידות מדבק היה גבוה ועלה עם הגיל הפנולוגי של התפוח. העלייה הייתה חדה יותר בטיפול ההדבקה לעומת הביקורת. מאיור 3B ניתן לראות כי אחוז התפוחים אשר הראו סימפטומים חיצוניים ($0 < X$) היה נמוך בזן G.D לעומת הזן R.D. בשני הזנים אחוז התפוחים אשר הראו סימפטומים חיצוניים היה גבוה יותר בטיפול ההדבקה לעומת הביקורת אם כי באופן לא מובהק.

טבלה 1 – רמת האכלוס של אזור בית הזרעים על ידי הפטרייה *Alternaria alternata* בשלבים פנולוגים שונים של גידול הפרי והנגיעות החזותית בזמן הקטיפה במטעים רמת מגשימים ועין זיוון.

נגיעות חזותית בקטיפה (%)		תפוחים אשר הראו מעל 50 יחידות הדבקה (%)					R.D ביקורת	רמת מגשימים
X \geq 1	X>0	dafb130	dafb120	90 dafb	60 dafb	30 dafb		
16	55	15	15	15	15	0	R.D ביקורת	
20	63	20	25	20	20	0	R.D מודבק	
17	40	30	25	20	10	6	R.D ביקורת	
24	73	70	65	60	10	10	R.D מודבק	

נתונים בטבלה 1 שימשו לניתוח הקורלציה בין רמת האיכלוס במשך התפתחות הפרי לבין הנגיעות החזותית בזמן הקטיפה.

טבלה 2 – הקשר בין רמת האכלוס של דופן בית הזרעים, בשלבים פנולוגים שונים לנגיעות החזותית בזמן הקטיפה.

X \geq 1 כאשר R ²	X>0 כאשר R ²	
0.74	0.33	30 dafb
0.03	0.03	60 dafb
0.83	0.33	90 dafb
0.83	0.33	120 dafb
0.42	0.06	130 dafb

ניתן לראות מטבלה מספר 2 כי הקשר בין רמת האכלוס בזמנים הפנולוגים השונים אינו מראה קורלציה גבוהה, ברוב המקרים, לנגיעות החזותית בזמן הקטיפה.

דין ומסקנות:

בשנה הנוכחית ניסנו לבסס שיטה, שהתחלנו בפיתוחה בעונות הקודמות, המאפשרת חיזוי של רמת הנגיעות במטע. לא הצלחנו למצוא קורלציה מובהקת בין רמת האכלוס של דופן בית הזרעים בשלבים הפנולוגים השונים של התפוח לבין הנגיעות בזמן הקטיפה. ייתכן וקיימים

גורמים נוספים מלבד רמת האכלוס המשפיעים על התפתחות הריקבון, כגון מיקום הפרי על העץ, טמפרטורה, לחות, הדבקות על ידי פתוגנים נוספים וכו', שאינם באים לידי ביטוי במודל שלנו. בנוסף ייתכן כי שיטה זאת הינה רגישה יותר מאשר הגילוי החזותי ולכן אינה מבדילה בין תבדידים פתוגנים לתבדידים שאינם אלימים. על מנת להמשיך ולבסס את שיטת החיזוי יש להגדיל את מדגם התפוחים הנבדקים בכל טיפול בשלבים הפנולוגים השונים, תוך כדי התייחסות ובדיקה של פרמטרים נוספים המוזכרים לעיל.

2 - ההבדלים בין זני התפוחים המאפשרים התפתחות של *Alternaria alternata*

בעבודה הקדמית במעבדתנו נמצא כי רמת ההדבקה בזמן הפריחה איננה הגורם העיקרי להבדל בין התפוחים המשתייכים לזן הרגיש ('Red Delicious') לבין אלו המשתייכים לזן העמיד ('Golden Delicious') (כפי שדווח בעבר (Brown and Hendrix, 1978; Ellis and Barrat, 1983)). עבודתנו מעידה כי הגורם המגביל את התפתחות והתבססות הפטרייה באזור בית הזרעים ובחדירה לציפה בזן העמיד הינו דופן בית הזרעים (locule) (Niem et al, 2007).

בעבודה זאת בדקנו פרמטרים שונים העלולים להשפיע על הבדלים בין דופן בית הזרעים של הזן הרגיש ושל הזן העמיד.

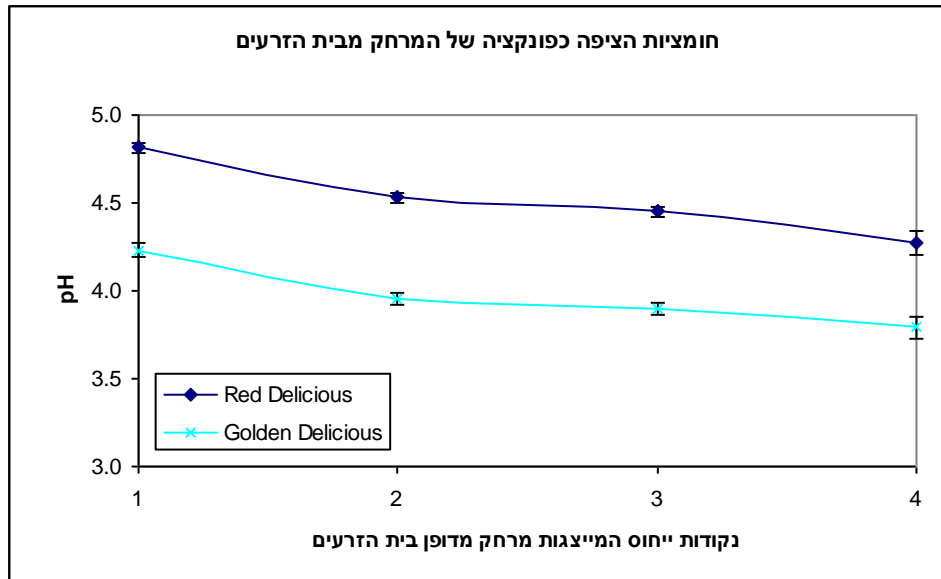
(א) - הבדלי pH

נמצא במעבדתנו כי הפטרייה *A.alternata*, לצורך התקפה, מבסיסה את חזית ההתקדמות של הריקבון (Eshel et al, 2002b). לכן בדקנו האם קיים הבדל בין pH אזור בית הזרעים של הזן הרגיש והעמיד. נמצא כי pH הציפה בסמוך לבית הזרעים בזן הרגיש הוא 4.8 והינו גבוה מ- pH הציפה בסמוך לבית הזרעים בזן העמיד (pH = 4.2) (איור 4).

הועלתה השערה כי הבדלי pH אלו משפיעים על התבססות והתפתחות הפטרייה.

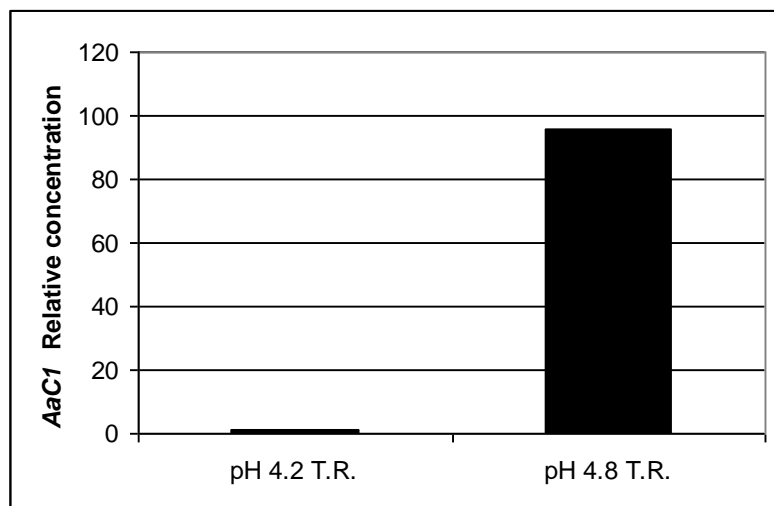
על מנת לבדוק האם הבדלי ה- pH בין זני התפוח תורמים להתבססות הפטרייה בזן הרגיש נבדק ביטוי גנים צלולוליטיים המקודדים לאנזימים endoglucanase ו- exoglucanase (איורים 5 ו- 6) התורמים לפתוגניות של הפטרייה כפי שדווח בעבר על ידי Eshel et al, 2002a. הפטרייה גודלה במצעי מזון סלקטיביים המכילים דפנות תאים של תפוח כמקור פחמן בערכי pH שונים (4.2 ו- 4.8). מתפטיר הפטרייה הופק RNA לבדיקת ביטוי הגנים בשיטת ה- Real Time PCR.

איור 4 - pH הציפה כפונקציה של מרחק מדופן בית הזרעים בזן הרגיש 'Red Delicious' ובזן העמיד 'Golden Delicious':



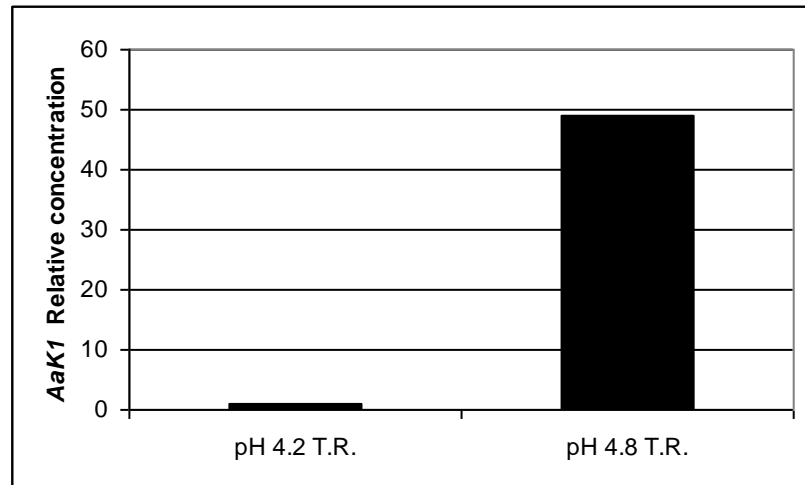
ניתן לראות כי ה - pH בציפה עולה ככל שמתקרבים לאזור בית הזרעים, אולם ה - pH בזן הרגיש גבוה מה - pH בזן העמיד בכל נקודות מדידה.

איור 5 - ביטוי הגן AaC1 המקודד לאנזים exoglucanase בערכי pH שונים:



ניתן לראות כי הגן AaC1 מתבטא פי 90 יותר ב - pH 4.8 מאשר ב - pH 4.2.

איור 6 ביטוי הגן *AaK1* המקודד לאנזים endoglucanase בערכי pH שונים:



ניתן לראות כי הגן *AaK1* מתבטא פי 50 יותר ב- pH 4.8 מאשר ב- pH 4.2.

דיון ומסקנות:

תוצאות שהוצגו מראות ש- pH הציפה סביב דופן בית הזרעים משפיע על ביטוי גנים צלולוליטים בפטרייה *A. alternata*. ייתכן שהפטרייה אינה מצליחה להתפתח ולהתבסס בפירות התפוח המשתייכים לזן 'Golden Delicious' מאחר ואינה מצליחה לבטא גנים לתוקפנות ב- pH 4.2 המאפיין פירות אלה. כתוצאה ממצאים אלה יש לשקול את האפשרות של ריסוס בתמיסות חומציות בזמן הפריחה ולאחריה, שהוכחו כיעילות נגד *A. alternata* באפרסמון ומנגו (Prusky et al, 2006)

(ב) - הרכב הפנולים וכמותם באזור דופן בית הזרעים בזנים G.D ו-R.D:

בעבודה הקדמית במעבדתנו נמצא כי רמת ההדבקה בזמן הפריחה איננה הגורם העיקרי להבדל בין התפוחים המשתייכים לזן הרגיש ('Red Delicious') לבין אלו המשתייכים לזן העמיד ('Golden Delicious') (כפי שדווח בעבר (Brown and Hendrix, 1978; Ellis and Barrat, 1983)). עבודתנו מעידה כי הגורם המגביל את התפתחות והתבססות הפטרייה באזור בית הזרעים ובחדירה לציפה בזן העמיד הינו דופן בית הזרעים (locule) (Niem et al, 2007).

בשנה שעברה ראינו כי כמות ה- Hydroxycinnamic acids בזרעים ובדופן בית הזרעים גבוהה יותר בזן העמיד 'Golden Delicious' מאשר בזן הרגיש 'Red Delicious' אולם

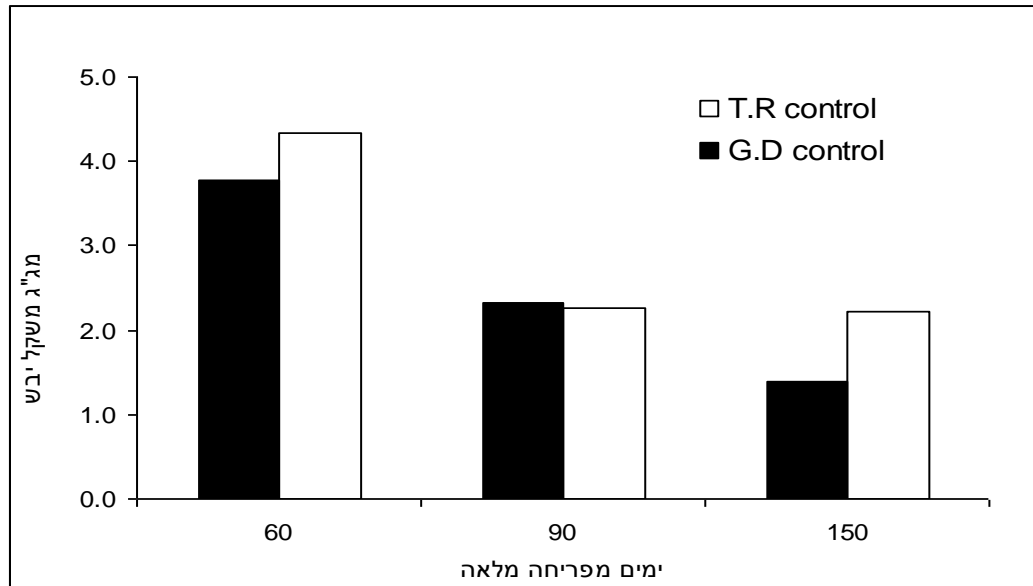
בציפה כמותם דומה. דווח בעבר כי נגזרות של Hydroxycinnamic acids בדופנות תאים של צמחים ופירות מקנות עמידות בפני אנזימים הידרוליטיים המופרשים על ידי הפתוגן לשם חדירתם לתוך התאים ולכן מהוות מחסום פיזיולוגי מפני פתוגנים (Facchini et al, 2002). עוד דווח כי chlorogenic acid מקנה עמידות כנגד מחלת הגרב (apple scab) הנגרמת על ידי הפטרייה הפתוגנית *Venturia inaequalis* בזנים שונים של תפוחי עץ (Petkovsek et al, 2003). בשנה זאת מטרתנו הייתה לחזור ולבדוק את כמות ה-Hydroxycinnamic acids בכלל ואת כמות ה-chlorogenic acid, המהווה את החומר העיקרי מבין ה-Hydroxycinnamic acids, בפרט. בנוסף בדקנו את ההשפעה של ריסוס במוסת הצמיחה (Regalis) Prohexadione Ca. המגביר סינתזה של תרכובות פנוליות בזמן הפריחה ולאחריה, כפי שדווח על ידי Ficher et al (2006), על כמות ה-chlorogenic acid בדופן בית הזרעים ועל הנגיעות על ידי *Alternaria alternata*. תפוחים אשר לא רוסו או שרוסו במוסת הצמיחה Magic, אשר כמו ה-Regalis מעכב סינתזה של ההורמון הצימחי ג'ברלין, אך אינו משפיע על סינטזת פנולים, שימשו כביקורת.

על מנת לבדוק את הרכב הפנולים וכמותם נלקחו דוגמאות מרקמות דופן בית הזרעים, זרעים והציפה שסביב בית הזרעים, מהזן הרגיש ('Red Delicious') והעמיד ('Golden Delicious') ומתפוחים מהזן הרגיש שרוסו בשלב הפריחה בריכוזים שונים של מוּסַת הצמיחה Regalis בשלבים פנולוגים שונים. מיצוי הפנולים נעשה בגרמניה במעבדתו של פרופ' דיאטר טרוטר כפי שתואר על ידי Roemmelt et al (2003). תרכובות הפנוליות השונות וכימותן נבחנו בעזרת HPLC על פי השיטות המקובלות (Roemmelt et al, 2003).

גם השנה כמו בשנה שעברה מכל פרופיל התרכובות הפנוליות שנמצאו הבולטות ביותר הן נגזרות של Hydroxycinnamic acid בכלל ו-Chlorogenic acid בפרט.

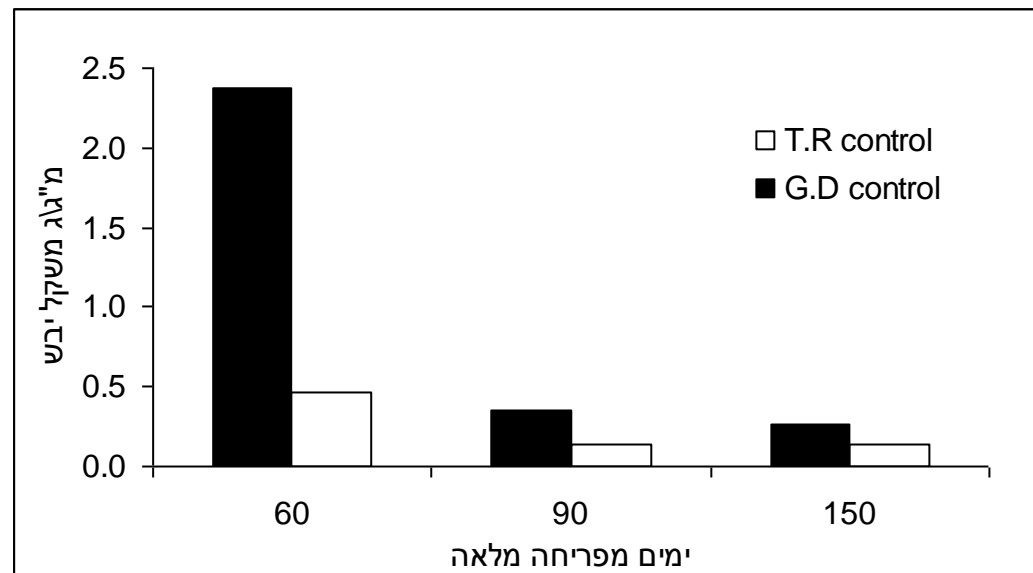
בנוסף נבדקו ריכוזים שונים של חומצה כלורוגנית (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 10 מ"ג/מ"ל) על נביטה ואורך הקור של נבגי *Alternaria alternata*. הפטרייה גודלה על גבי צלחת פטרי המכילה מצע מזון מוצק (PDA) עד ל-80% כיסוי של הצלחת. הנבגים הורחפו במים סטרילים. 10µ מתרחיף הנבגים עורבבו ביחס של 1:1 עם תמיסת Chlorogenic acid בריכוזים השונים על גבי זכוכיות נושא. זכוכיות הנושא הונחו בתא לח, במשך 24 שעות. לאחר 24 שעות אינקובציה נמדדו אחוזי הנביטה ואורך הקור של הנבגים בעזרת מיקרוסקופ אור.

איור 7 Chlorogenic acid בציפה של תפוחים מהזן 'Red Delicious' ו-'Golden Delicious' בזמנים פנולוגים שונים:



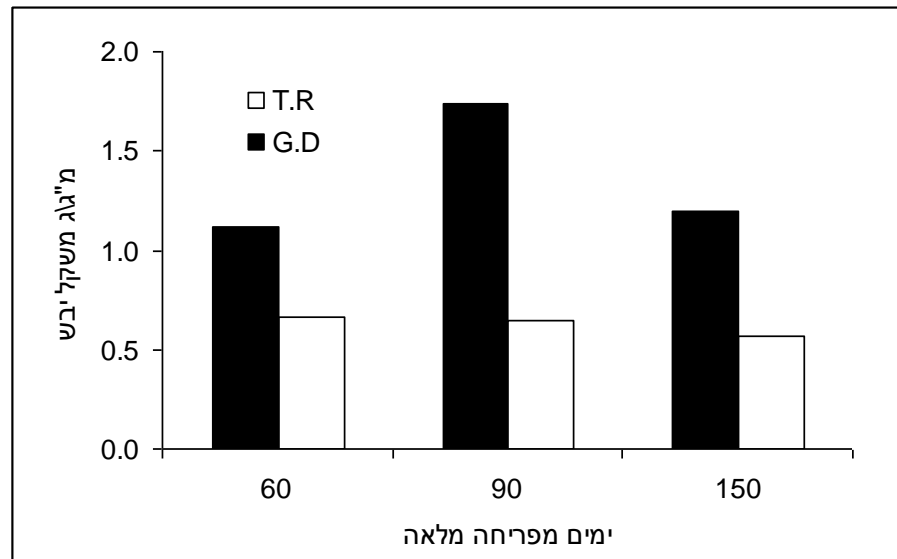
ניתן לראות כי כמות ה-Chlorogenic acid בציפה יורדת עם התבגרות הפרי והינה דומה בשני הזנים.

איור 8 Chlorogenic acid בזרעים של תפוחים השייכים לזנים 'Red Delicious' ו-'Golden Delicious' בזמנים פנולוגים שונים:



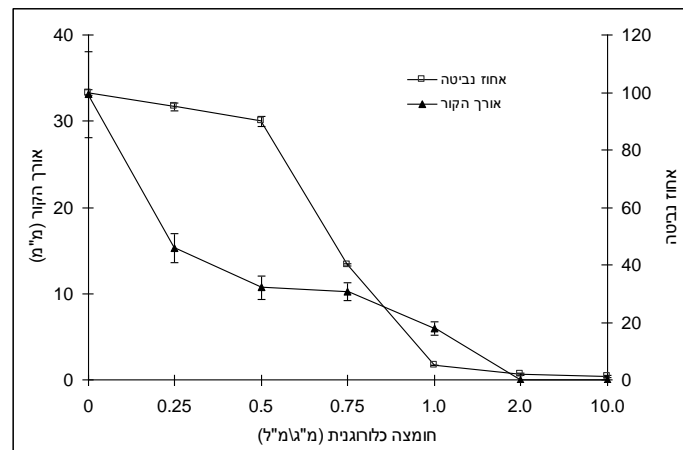
ניתן לראות כי כמות ה-Chlorogenic acid בזרעים יורדת עם התבגרות הפרי בשני הזנים. יחד עם זאת כמות ה-Chlorogenic acid בזן העמיד 'Golden Delicious' גבוהה יותר מאשר בזן הרגיש 'Red Delicious' בכל השלבים הפנולוגים.

איור 9 Chlorogenic acid בדופן בית הזרעים של תפוחים השייכים לזנים 'Red Delicious' ו-'Golden Delicious' בזמנים פנולוגים שונים:



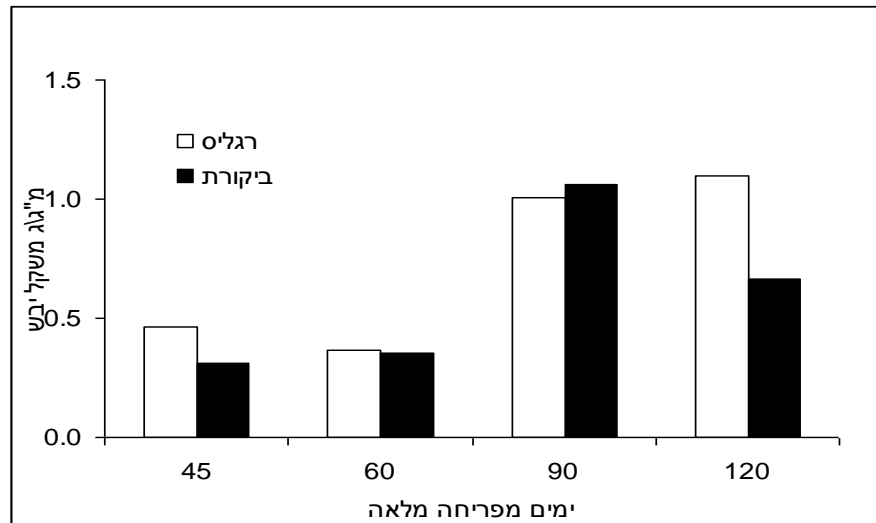
ניתן לראות כי כמות ה-Chlorogenic acid בזן העמיד 'Golden Delicious' גבוהה פי שתיים מאשר בזן הרגיש 'Red Delicious' בכל השלבים הפנולוגים.

איור 10 אחוז הנביטה והתארכות הקור של נבגי הפטרייה *Alternaria alternata* כתלות בריכוז ה-Chlorogenic acid.



ניתן לראות כי ל-Chlorogenic acid יש השפעה על הנביטה ואורך נחשון הנביטה של נבגי הפטרייה *Alternaria alternata*. ככל שריכוז ה-Chlorogenic acid עולה, אחוז הנביטה ואורך הקור יורדים.

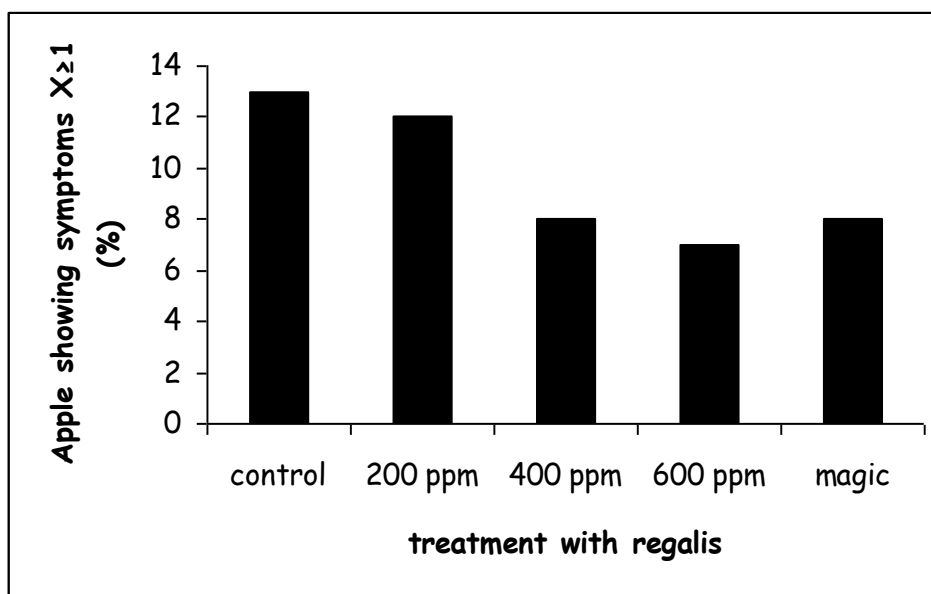
איור 11 Chlorogenic acid בדופן בית הזרעים של תפוחים בזן 'Red Delicious' אשר רוססו ריסוס אחד ב – Regalis (600 ppm) בזמנים פנולוגים שונים:

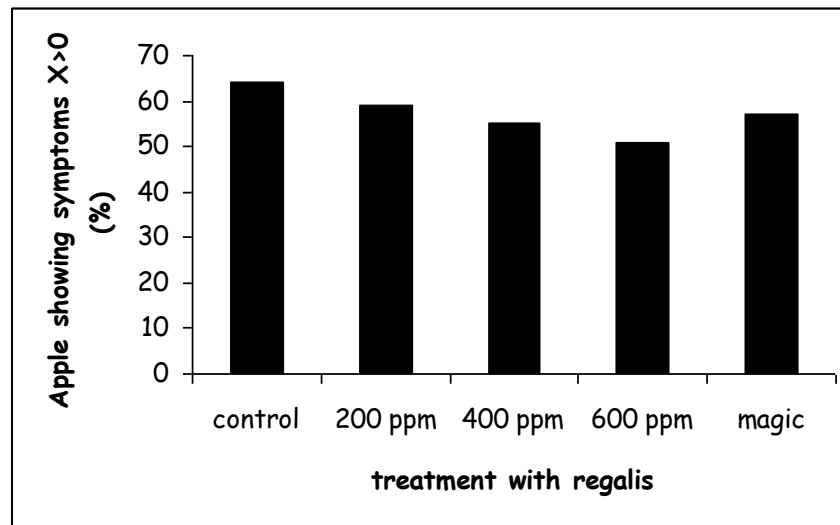


כאשר נבדקה תכולת ה - Chlorogenic acid נמצא כי אין הבדל בכמותה בבית הזרעים של תפוחים אשר רוססו במוסת הצמיחה Regalis לבין הביקורת. אך יחד אם זאת ניתן לראות כי המגמה זזה, כלומר כמות ה - Chlorogenic acid עולה עם הגיל הפנולוגי. ההבדל בריכוז החומצה הכלורוגנית 120 יום לאחר הפריחה מענין, אבל כדי לבדוק האם הוא בעל משמעות יש לחזור על הניסויים שנה נוספת. לא נמצא הבדל בכמות ה - Chlorogenic acid גם בציפה ובגרעינים בין הטיפולים השונים.

איור 12 הנגיעות החזותית בזמן הקטיף כפונקציה של ריכוז ה - Regalis אשר רוסס בשלב הפריחה.

A





כאשר נבחנה הנגיעות החזותית לאחר חיתוך הפרי שטופל ברגליס, נראה כי הטיפול בריכוזים השונים שבין 200 ל- 600 ח"מ אינו משפיע על רמת הנגיעות בשלב הקטיפי, אם כי קיימת מגמת ירידה בנגיעות ככל שריכוז ה- Regalis עולה אך השפעה זאת אינה מובהקת. בנוסף ניתן לראות כי ריסוס ב- magic לא השפיע על רמת נגיעות.

דיון ומסקנות :

ראינו כי כמות ה- Chlorogenic acid בזרעים ובדופן בית הזרעים גבוהה יותר בזן העמיד 'Golden Delicious' מאשר בזן הרגיש 'Red Delicious' כפי שכבר ראינו בשנה הקודמת אולם בציפה כמותם דומה. בנוסף ראינו כי ה- Chlorogenic acid גורמת לעיכוב נביטת הנבגים והתארכות הקור של הפטרייה *Alternaria alternata*, בריכוזים נמוכים המצויים גם בפרי. ל- Regalis לא נמצאה השפעה ברורה על כמות ה- Chlorogenic acid ברקמות התפוח בהשוואה לביקורת וכמו כן לא נראתה השפעה מובהקת שעל שעור הנגיעות של התפוחים שטופלו בריסוס בודד בזמן הפריחה. ייתכן כי השפעת הריסוס שבוצע בשלב הפריחה פגה וכי בשנה הבאה יש לרסס בשלב פנולוגי מאוחר יותר כמו בשלב של חנטים בוגרים.

3 . פיתוח אמצעי הדברה

בעבודות שלנו משנים קודמות נמצא כי שלושה ריסוסים במהלך תקופת הפריחה בתכשירי הדברה מקבוצת מעכבי ארגוסטרול כמו וקטרה או סקור הדבירו באופן חלקי את המחלה. ברם, תערובת של אחד התכשירים עם מהתכשיר מרפאן שיפרה באופן משמעותי את יעילות ההדברה אך עדיין לא סיפקה הדברה מספקת לתעשייה.

בשנה זו נבחנו תערובות של תכשירי הדברה נוספים וכן נבחנה ההשפעה של מספר הריסוסים בתערובת תכשירי ההדברה במהלך תקופת הפריחה.

ניסוי הדברה מס. 1 עין זיוון – יעילות תכשירים ותערובות 2007

הזן: טופ רד,

מתקונת הניסוי: בלוקים באקראי, 9 טיפולים, 4 חזרות לכל טיפול עם 3 עצים לחזרה. מרסו: רובים עד נגירה.

מועדי ריסוס: ניתנו 3 ריסוסים בתאריכים: 19.4.07 (20% פריחה), 21.4. (40-50% פריחה, ו- 23.4 (85% שיא פריחה).

הקטיף בוצע בתאריך 2.9.07. בקטיף נבחנו 25 פירות שנאספו באקראי מכל חזרה בעץ המרכזי (התוצאות הן ממוצע של 100 פירות).

רמת הנגיעות הוערכה בכל אחד מהפירות לאחר חיתוכו לאורך על פי סקאלה שפותחה במעבדתינו המשקללת את רמת הנגיעות בפטרי בבית הזרעים ואת רמת הריקבון בציפת הפרי. התוצאות מציגות את אחוז הפרי עם נגיעות בבית הזרעים או בציפה.

טבלה 3. השפעת ריסוסי תערובות תכשירי הדברה במהלך הפריחה על רמת הנגיעות ויצירת ריקבון בציפת הפרי

הטיפול	% נגועים בבית הזרעים מלא	% נגועים עם ריקבון בציפה
וקטרה+מרפאן 0.25%	28.0 א	5.0 ב
וקטרה + מנצידן 0.25%	17.0 ב	7.1 אב
סקור +0.02% מרפאן 0.25%	30.0 א	6.0 ב
סקור 002% + מנצידן 0.25%	36.3 א	5.0 ב
תערובת מוכנה קנון+מרפאן 0.2%	29.0 א	4.0 ב
מרק בורדו מוכן 1%	26.0 א	10.0 א
פלינט 0.015% +מרפאן 0.25%	25.0 א	12.0 א
רינגו +0.04% מרפאן	21.1 א	8.2 אב
בקרת – עצים לא מטופלים	26.0 א	11.0 א

ניסוי הדברה מס. 2 רמת מגשימים 2007 – תערובות ומס ריסוסים משתנה

הזן: טופ רד, 8

מתקונת הניסוי: בלוקים באקראי, 8 טיפולי, 4 חזרות לכל טיפול עם 3 עצים לחזרה.

מרסס רובים עד נגירה.

מועדי ריסוס: ניתנו ריסוסים בשלבים המפורטים בתאריכים: 11.4.07 (פרח ראשון = מעל

50% מהעצים עם פרח ראשון), 18.4.07 (20% פריחה), 20.4. (75-85% פריחה, ו- 23.4

(שיא פריחה + 3 ימים).

הערה: הריסוס של 40-50% פריחה לא ניתן מסיבה טכנית (עקב טווח ימים קצר בין

הריסוסים שחייב לרסס כל יום)

הקטיף בוצע בתאריך 26.8.07. בקטיף נדגמו ונבדקו 25 פירות לכל חזרה (התוצאות הן

ממוצע של 100 פירות).

רמת הנגיעות והריקבון נקבעה בציפת הפרי.

התוצאות בטבלה 4 מראות כי רק לחלק מהתערובות היתה השפעה בהגברת המחלה, כפי

שהתבטאה בציפת הפרי. לא ברור מדוע בניסוי זה התערובת של סקור עם מרפאן היתה אף

פחות יעילה כאשר רוססה 3 או 4 פעמים במהלך הפריחה, בהשוואה לשני הריסוסים. נראה

כי גורמים נוספים פרט לתכשירי ההדברה עצמם או השלב בו רוססו עשויים להיות קשורים

בכך.

טבלה 4. השפעת ריסוסי תערובות תכשירי הדברה ומס הריסוסים באחת התערובות על

רמת הנגיעות והריקבון בציפת הפרי.

הטיפול	ריסוס בפרח ראשון	ריסוס 20% פריחה	ריסוס ב- 75-85% פריחה	שיא ימים	פריחה+3	אחוז פרי נגוע בציפה
סקור 0.02% + מרפאן 0.25%	—	+	+	—	—	6.0 אב
סקור 0.02% + מרפאן 0.25%	+	+	+	—	—	9.0 א
סקור 0.02% + מרפאן 0.25%	+	+	+	+	—	10.0 א
סקור 0.02% + מרפאן 0.25%	—	+	+	+	—	10.0 א
סקור 0.02% + מנצ'ין 0.25%	—	+	+	—	—	5.0 ב
פלינט 0.015% + מרפאן 0.25%	—	+	+	—	—	4.0 ב
רינגו 0.04% + מרפאן	—	+	+	—	—	7.0 אב
בקרת	—	—	—	—	—	10.0 א

ניסוי הדברה מס. 3 עין זיוון קטיף 2007 – ממשק (מספר משתנה של ריסוסים במהלך

הפריחה)

הזן: טופ רד,

הניסוי: בלוקים באקראי, 7 טיפולים, 4 חזרות עם 3 עצים לחזרה.

מרסס רובים עד נגירה.

מועדי ריסוס: ניתנו מספר ריסוסים משתנה מ-5-2 ריסוסים בתערובת של וקטרה עם מרפאן במינונים המומלצים בשלבים החל מפרח ראשון, ובהמשך בשלב של 20-25% פריחה, 40-50% פריחה, 85% (שיא פריחה) ו-3 ימים לאחר שיא פריחה.

בקטיף נדגמו ונבדקו 25 פירות לכל חזרה (התוצאות הן ממוצע של 100 פירות).

התוצאות: לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמת הנגיעות בקטיף בין כל הטיפולים כאשר אחוז הנגיעות בצפיפה עמד על 6-9%. כמו כן לא נמצאו הבדלים בין הטיפולים ברמת איכלוס הפטריה/יות בתוך בית הזרעים (20-27%) (תוצאות לא מוצגות).

דיון ומסקנות:

בניגוד לשנים קודמות בהן מצאנו כי תערובות תכשירי ההדברה שרוססו במהלך הפריחה היו יעילות באופן מובהק בהפחתת רמת הנגיעות אף עד ל 70-80% בהשוואה לבקורות (ראובני וחובריו, 2007), נמצא באופן בולט בשנה זו כי הריסוסים בתערובות תכשירי ההדברה לא היו יעילים או לא יעילים דיים ולא נמצאה התאמה ברמת ההדברה שהושגה על ידי אותם תכשירים בין ניסויים שונים אפילו באותה חלקה ומטע (עין זיון). כמו כן לא ברור מדוע תערובת של שני תכשירים שהיתה יעילה בעבר כמו וקטרה עם מרפאן לא היתה יעילה בחלק מהניסויים גם כאשר רוססה חמש פעמים במהלך תקופת הפריחה.

יתכן וגורמים נוספים פרט לתכשירי ההדברה עצמם או השלב בו רוססו עשויים להיות קשורים בתופעה. יתכן ולתכשירי ההדברה שהם מאוד יעילים כנגד הפטריה כשנבדקו על פירות מנותקים או בצלחות (ראובני וחובריו, 2002), חסר חומר משטח או מדביק שיסייע בפעילות יעילה יותר על רקמות הפרח. נושא זה יבדק בעונה הקרובה ב 2008.

מאחר ואמצעי ההדברה שפותחו עדיין אינם מספקים נראה שחסר מידע אפידמיולוגי נוסף אודות הגורמים המשפיעים על התפתחות המחלה שעשוי לסייע ולשפר את ההדברה.

References:

1. Brown, E. A., and Hendrix, F. F. (1978) Effect of certain fungicides sprayed during apple bloom on fruit set and fruit rot. Plant Disease Reporter 62: 739 - 741.
2. Ellis, M. A., and Barrat, J. G. (1983) of Delicious apple fruits by *Alternaria* spp. and the effect of fungicide spray on moldy-core. Plant Disease. 67: 150-152.
3. Eshel, D., Lichter, A., Dinoor, A., and Prusky, D. (2002a) Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. Molecular Plant Pathology. 3: 1-12.

4. Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinooor, A., and Prusky, D. (2002b) pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15: 774-779.
5. Facchini, P., Hagel, J., Zulak, K. (2002) Hydrocinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany*. 80: 577-589.
6. Fischer, C. T., Halbwirth, H., Roemmelt, S., Sabatini, E., Schlangen, K., Andreotti, C., Spinelli, F., Costa, G., Forkmann, G., Treutter, D., Stich, K. (2006) Induction of polyphenol gene expression in apple (*Malus x domestica*) after the application of a dioxygenase inhibitor. *Physiologia Plantarum*. 128: 604-617.
7. Kollar, A. (1994) Characterization of specific induction, activity, and isozyme polymorphism of extracellular cellulases from *venturia inaequalis* detected in-vitro and on the host-plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 73: 1109-1118.
8. Miller, P. M. (1959) Open calyx tubes as a factor contributing to carpel discoloration and decay of apples. *Phytopathology*. 49: 520-523.
9. Petkovsek, M. M., Usenik, V., Stampar, F. (2003) The role of chlorogenic acid in the resistance of apple to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.). *Zbornik Biotehniske Fakultete Univerze v Ljubljani Kmetijstvo*. 81: 233-242.
10. Prusky, D., Kobiler, I., Akerman, M., Miyara, I. (2006) Mango: Effect of acids and acidic prochloraz on the decay caused by *Alternaria Alternata*. *Alon Hanotea*. 60: 366-370.
11. Reuveni, M., Sheglov, D., Sheglov, N., Ben-Arie, R. and Prusky, D. 2002. Sensitivity of Red Delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and control of Moldy-Core. *European Journal of Plant Pathology* 108:421-427.
12. Reuveni, M. and Sheglov, D. 2002. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, Polyoxin B (Polar), and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in Red Delicious apple fruit. *Crop Protection* 21:951-955.
13. Reuveni, M. and Prusky, D. 2007. Improved control of moldy-core decay (*Alternaria alternata*) in Red Delicious apple fruit by mixtures of DMI fungicides and captan. *European Journal of Plant Pathology* 118: 349-357.
14. Roemmelt, S., Zimmermann, N., Rademacher, W., Treutter, D. (2003) Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the

2 - oxoglutarate - dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca.
Phytochemistry. 64: 709-716.

15. Skadhauge, B., Thomsen, K., von Wettstein, D. (1997) The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to Fusarium infections. Hereditas. 126: 147-160.

3. סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).
 שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.
 הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרת המחקר היתה הבנת תהליך החדירה ווההתפתחות של הפטריה אלטרנריה אלטרנטה בבית הזרעים של הזן
רד דלישס. כמו כן לנצל ידע זה להדברת המחלה באמצעים כימיים.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
נמצא שחדירת הפטריה מתבצעת בזמן הפריחה, תוך התבססות בדופן בית הזרעים. ריקמה זו, בזנים הרגישים,
מהווה את הגורם המרכזי להתבססות ופריצת הפטריה לציפת הפרי. בוצע מספר רב של ניסויי הדברה, אבל למרות
היעילות השילוב של התכשירים וקטרה+מרפן לא נמצאה עקביות ביעילות ההדברה.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
הושגה הבנב טובה יותר של תהליך ההדברה, ההתבססות והפריצה של הפטריה, אבל עדיין לא מובן חוסר
העקביות של תוצאות ההדברה במטע.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
יש להבין טוב יותר את הסיבה לחוסר העקביות ביעילות ההדברה במטע בתכשירי הדברה כימיים. מצד שני יש
לבחון גישות הדברה חדשות תוך התייחסות לתרומה של ה-pH להתקפת הפטריה.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
התוצאות הוצגו בימי עיון במו"פ צפון ופרסמו במאמר ב- <u>Phytopathology</u> .
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)

רק בספריות	←
X ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)	
חסוי – לא לפרסם	←
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -	

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים

