

דו"ח לתכנית מחקר מספר 131172613

שימוש בשמרים סימביונטיים להפחתת נזקי קמחיות בגפן

Usage of symbiotic yeasts for reducing mealybug damage in vineyards

הדו"ח מסכם את שתי שנות המחקר (ינואר 2013-דצמבר 2014), והוא מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות, צוות היגוי: מחקרי היתכנות

על ידי:

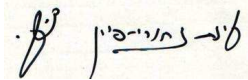
עינת צחורי-פיין, המחלקה לאנטומולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער סמיר דרובי, המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, המכון לחקר אחסון ואיכות תוצרת חקלאית ומזון, מינהל המחקר החקלאי ומרכז ולקני, בית דגן

Einat Zchori-Fein, Department of Entomology, ARO, Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. Email: einat@agri.gov.il
Samir Droby, Dep. of Postharvest Science, Institute of Postharvest and Food Sciences, ARO, the Volcani Center, Bet Dagan, 50250

תקציר

חרקים, כמו רוב האורגאניזמים, חולקים מערכת הדוקה של יחסי גומלין עם מספר רב של מיקרואורגאניזמים (כגון וירוסים, חיידקים ופטריות). למיקרואורגניזמים אלה השפעות מגוונות על הביולוגיה של פונדקאיהם, לרבות השפעה על שרידות וכשירות החרק ועמידותו לחומרי הדברה. מידע המתקבל מזהו ואפיון הרכב אוכלוסיות המיקרואורגניזמים של חרקים המזיקים לחקלאות, יכול לשמש כבסיס להבנת הביולוגיה שלהם ולפיתוח שיטות הדברה ידידותיות לסביבה. היפותזת המחקר היתה שקמחית הגפן, מזיק מפתח בענבי יין, נושאת שמרים המשפיעים על כשירותה. מסיבה זו, נלמדה אוכלוסיית השמרים הנמצאת ביחסי גומלין עם קמחית הגפן הן בתנאי שדה - בכרם, והן בתנאי מעבדה - בגידול על תפוחי אדמה. בחינת הרכב אוכלוסיות השמרים בשיטות מולקולאריות ובשיטות של מיקרוביולוגיה קלאסית הראתה כי סוג השמרים הדומיננטי בקמחיות הגפן מהכרם הוא *Metschnikowia* בעוד שבגידול המעבדה זוהו *Debaryomyces*, *Rodotorula* ו-*Cryptococcus*. כמויות וסוגי השמרים בגוף הכנימות השתנו אף הן בקמחיות גפן שגודלו בתנאי מעבדה לעומת אלו שנאספו מהכרם. ניסיונות חוזרים ונשנים להעמיד קווי כנימות קמחיות הנושאים באופן יציב אוכלוסיות שמרים ספציפיות, נכשלו, ולא ניתן היה לאשר את היפותזת המחקר. ניתן להסיק עם זאת כי השמרים נרכשים מהסביבה תוך כדי תזונה או באופן אחר, ולא ניתן להצביע על יחסי גומלין הכרחיים בין הפונדקאי לסוג שמר מסוים.

הצהרת החוקרת הראשית:
הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

תאריך 28.12.14 חתימת החוקרת 

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר

1. lasur-Kruh, L., Taha-Salaime, L., Robinson, W. E., Sharon, R., Droby, S., Perlman, S. J., & Zchori-Fein, E. (2014). Microbial associates of the vine mealybug *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) under different rearing conditions. *Microbial Ecology*, 1-11.

2. יסעור-קרוח, ל., טאהא-סלאימה, ל., שרון, ר., זהבי, ת., דרובי, ס. וצחורי-פיין, ע. (2013) מי מסתתר בכנימה הקמחית של הגפן? עלון הנוטע, 67: 41-43.

הרצאות

יסעור-קרוח, ל., שרון, ר., מוזס-דאובה, נ. וצחורי-פיין, ע. (2012). זיהוי מגוון השותפים הסמויים של חרקים מזיקים בגפן – צעד ראשון לקראת פיתוח ממשק הדברה ירוק. כנס החברה האנטומולוגית בישראל, הוועידה ה-31.

Perlman S.T., Galka B., lasur-Kruh, L., Maghodia A. B., Mozes-Daube, N., Peixoto L.E., Robinson W., Sharon R., Olivier C.Y., & Zchori-Fein, E. (2012). Evolution and ecology of symbionts of insect grape pests. *International Symbiosis Society, Krakov, Poland* (oral).

יסעור קרוח, ל. (2013). המשולש חרק-צמח-חיידק כמקור לפתרונות כנגד מחלות צמחים. סמינר נווה יער.

תוכן העניינים

מספר עמוד	פרק
2	תקציר
5	מבוא
6	מטרות
6	שיטות
8	עיקרי הניסוי ותוצאותיהם
8	איסוף חרקים
8	כיול מערכת
8	גידול קמחיות במעבדה
8	בידוד וזיהוי שמרים
10	אפיון הרכב אוכלוסיות הפטריות בקמחיות
12	השפעת קוטל פטריות על שמרים ועל כשירות הקמחיות
13	דיון
13	ביבליוגרפיה
15	סיכום עם שאלות מנחות
16,3	רשימת פרסומים מדעיים

1. מבוא

תעשיית היין בישראל מוערכת ברחבי העולם כאיכותית ביותר ומגלגלת כ-140 מיליון דולר בשנה (Perman, 2008). מזיקים ומחלות עלולים לגרום לירידה בכמות יבול הגפן ובאיכותו. מבין מזיקים אלה, קמחית הגפן (*Planococcus ficus*), כנימה ממשפחת הקמחיתיים, נפוצה בכרמים בישראל ומזיקה ליבול ישירות על ידי מציצה מצינורות ההובלה והפרשת טל דבש, עליו מתפתחת פייחת. בנוסף, קמחית הגפן מעבירה וירוס הגורם למחלת קיפול עלים, אחת המחלות הוירליות המזיקות ביותר לגפני יין בישראל ובעולם כולו. בכרמים ליין, קמחית הגפן גורמת לירידות ביבול של עד 15%, ופגיעה באיכות הפרי של כ-30%. מכיוון שאורך דור של קמחית הגפן נע בין שלושה שבועות לחודשיים בהתאם לתנאי מזג האוויר, היא יכולה להעמיד 4-6 דורות בשנה. קצב הריבוי המהיר ופוטנציאל הנזק הרב מציבים את הקמחית כאחד המזיקים העיקריים לכרמים בישראל ובעולם. כיום מרססים את הכרמים בקוטלי מזיקים על מנת להתמודד עם המזיק אולם עלייה בעמידות החרקים, בד בבד עם העלייה במודעות שחומרים אלו מזיקים לסביבה, מעודדים חיפוש פתרונות חדשים כגון הדברה ביולוגית ידידותית לסביבה ולאדם.

חיידקים סימביונטיים מצויים בתוך גופם של מיני חרקים רבים בעלי חשיבות חקלאית וכלכלית. מיקרואורגניזמים אלו נחלקים לשתי קבוצות: (1) סימביונטיים ראשוניים, ההכרחיים להתפתחות ולהישרדות החרק - נמצאים באברונים מיוחדים הקרויים "בקטריומים" ומספקים לפונדקאיהם רכיבי מזון חיוניים; ו-2) סימביונטיים שניוניים, השוכנים בחרק בתדירויות משתנות, בדרך כלל אינם הכרחיים להישרדותו, ומשפיעים עליו באופן שמגביר את כשירותו (*fitness*) ושרידותו. מחקרים שנערכו בשנים האחרונות הראו שלסימביונטיים שניוניים השפעות מרחיקות לכת על פונדקאיהם. כך למשל, הסימביונט המילטונלה (*Hamiltonella*) מקנה לכנימת העלה אפיד האפון עמידות לצרעה טפילית התוקפת אותה, הסימביונט סרציה (*Serratia*) משפר את עמידות הכנימה לחום, והסימביונט רג'ילה (*Regiella*) משפיע על יכולתה להיזון מצמחים שונים. משמע, סימביונטיים אלו משפיעים על כל אורחות חיי החרק, ובכללן על יכולתו להתרבות ולהסתגל לתנאי סביבה שונים (Zchori-Fein and Bourtzis, 2010). בנוסף לחיידקים, עשויים מיקרואורגניזמים אאוקריוטים אחרים לתפקד כסימביונטיים בחרקים. לדוגמה, זוהו פטריות ומיקרואורגניזמים דמויי-שמרים בחיפושיות, צרעות, צרצרים וכנימות עלה אך המידע על יחסי הגומלין בין קבוצות אלו מוגבל מאד (Gibson & Hunter, 2010).

העובדה שהן דיירים חיידקיים והן פטרייתיים יכולים להשפיע על כשירות החרק מדגישה את הצורך במידע מפורט על סוגי הסימביונטיים השונים המאכלסים את קמחית הגפן. מידע כזה הינו שלב ראשון והכרחי בפיתוח אסטרטגיות חדשניות להדברה של מזיק זה.

הדברה מבוססת-סימביונטיים (symbiotic control) היא תחום שהחל להתפתח בעשור האחרון ומוגדר כשימוש בסימביונטיים להדברת מזיקים ומניעת העברת מחלות על ידם (גוטליב וצחורי-פיין, 2007). הדברה כזו הינה ידידותית לסביבה מאחר והיא מבוססת על מיקרואורגניזמים השוכנים באופן טבעי בגוף החרק ולכן בעלת טווח השפעה ספציפי שאינו פוגע בחרקים אחרים ובמארג האקולוגי של הסביבה. המחקר הנוכחי נעשה לאפיין את אוכלוסיית הפטריות (בעיקר שמרים) בכנימה קמחית הגפן ובחינת השפעתם על הביולוגיה של הכנימה.

2. מטרות

המטרה הכללית של המחקר היתה לפתח טכנולוגיה המתבססת על שימוש בשמרים סימביוטיים להדברה ביולוגית של קמחית הגפן. על מנת להגיע למטרה זו נקבעו לו המטרות הבאות: (1) בידוד, זיהוי ואפיין השמרים שמקורם בקמחית הגפן; (2) הערכת שכיחותם של שמרים בקמחיות הגפן; (3) השפעת השמרים על כשירות קמחית הגפן.

3. שיטות

3.1 איסוף חרקים (מטרות 2&1). בין החודשים מרץ לספטמבר 2013 נאספו דרגות שונות של קמחיות הגפן מגפני שרדונה מהכרם האורגני של מושב אודם. חלק מהפרטים נאספו ישירות לאתנול הופק מהם DNA והם נסרקו לזיהוי הרכב אוכלוסיות השמרים שלהם. פרטים נוספים נאספו חיים, עברו חיטוי חיצוני, רוסקו ונזרעו על צלחות פטרי המכילות מצע PDA על מנת לאפיין את השמרים שהם נושאים, או שימשו להקמת גידול במעבדה על תפוח אדמה.

3.2 כיוול מערכת (מטרה 1). טכניקת החיטוי של קמחיות הגפן דרשה כיוול רב מחשש לזיהום חיצוני מחד ולחדירת חומר החיטוי לתוך גוף החרק מאידך. מסיבה זו, נבחנו שיטות רבות של חיטוי חיצוני בשילוב בין חומרים שונים ובין זמני אינקובציה שונים של הדוגמא בכל חומר, ועל בסיס התוצאות נערכו כל הניסויים בהמשך בטכניקה מספר 2 (טבלה 1).

3.3 גידול קמחיות הגפן במעבדה (מטרות 3&2). גידול אוכלוסיית קמחיות שמקורה מאם אחת, מאפשר בחינה של יכולת השמרים לעבור בתורשה מהאם לצאצאים. מסיבה זו הוקם גידול מעבדתי; 28 קמחיות גפן בוגרות הושמו על תפוח אדמה, כל אחת בנפרד, בקופסא מרושתת ומבודדת. נערך מעקב על הכנימה עצמה, על הטלת ביצים ועל התפתחות הצאצאים. במקביל, נבחנה השפעת התזונה (גידול על תפוחי אדמה) על הרכב אוכלוסיות השמרים של קמחיות הגפן; הופק DNA מקמחיות גפן שמקורן בגידול מעבדה ונעשתה הערכה של אוכלוסיית

המיקרואורגניזמים האאוקריוטיים באמצעות "next generation" sequencing (454), DGGE, וכן בודדו שמרים מכנימות אלו.

3.4 בידוד זיהוי שמרים (מטרות 2&1). על מנת לבדוד שמרים מקמחית הגפן, נכתשו ביצים (חמישה פריטים לדוגמא), דרגות צעירות וכנימות בוגרות במים סטריליים לאחר חיטוי חיצוני ונזרעו בכל צלחת של מצע PDA המכיל את האנטיביוטיקה כלורמפניקול בארבע חזרות. בנוסף, כנימות בוגרות נותחו והאיברים הפנימיים שלהן נזרעו אף הם על צלחת PDA. השמרים שהתקבלו זוהו ונשמרו באוסף של המעבדה בצלחות ומבחנות המכילות מצע מזון מתאים (איור 1). זיהוי השמרים שגדלו על הצלחות נעשה בשיטות מולקולאריות על ידי ריצוף אזורים שמורים שונים בגנום השמר 26S rRNA gene (D2/D1) ו internal transcribed spacer (ITS) (NCBI). והשוואתם לרצפים ידועים במאגר המידע העולמי (NCBI).

3.5 אפיון הרכב אוכלוסיות הפטריות בקמחיות הגפן (מטרה 2). על מנת לזהות את הרכב האוכלוסיות בשיטות שאינן תלויות בבידוד הופק DNA מכנימות בדרגות שונות, אזור ITS פטרייתי הוגבר על ידי פריימרים כלליים ותוצר ההגברה הופרד בשיטת ה (DGGE) Denaturing gradient gel electrophoresis על מנת לזהות את שכיחות השמרים בקמחיות הגפן. במקביל, נשלחו מקבצי DNA של 20 כנימות לריצוף עמוק (454) של אזור ה ITS הפטרייתי.

3.6 השפעת קוטל פטריות (בנומיל) על גידול שמרים בתרבית (מטרה 3). שמרים הודגרו עם ריכוזי בנומיל שונים (0,1,3,5 ppm) על מנת לזהות את הריכוז האופטימאלי שישמש לניסוי ההאכלה של הכנימות.

3.7 השפעת השמרים על כשירות קמחיות הגפן (מטרות 3). על מנת לייצר שני קווים של קמחיות הגפן עם וללא שמרים גודלו הכנימות עם ריכוזי בנומיל שונים (0, 1 ו-5). נערך מעקב אחר מדדי כשירות שונים של הכנימות במקביל ל-PCR המגביר ITS של פטריות ושמרים.

4. תוצאות

4.1 איסוף חרקים. בסך הכל נאספו 114 פרטים לצרכי סקירה מולקולרית ו-80 פרטים מהם

בודדו שמרים (איור 1).

טבלה 1: כיוול טכניקת חיטוי חיצוני

מספר	טכניקת החיטוי	תוצאות זריעת מי השטיפה לזיהוי זיהום חיצוני
1	מי חמצן 1% - 30 שניות אתנול 70% - דקה אקונומיקה 1% - 30 שניות מים סטריליים - שתי שטיפות של דקה	זיהום של פטריות
2	מי חמצן 1% - דקה אתנול 70% - דקה אקונומיקה 1% - דקה מים סטריליים - שתי שטיפות של דקה	נקי. השיטה שנבחרה להמשך
3	מי חמצן 1% - 30 שניות אתנול 70% - דקה אקונומיקה 10% - 30 שניות מים סטריליים - שתי שטיפות של דקה	נקי, אך הרקמה התעוותה
4	מי חמצן 1% - 5 דקות אתנול 70% - 5 דקות אקונומיקה 1% - 5 דקות מים סטריליים - שתי שטיפות של דקה	נקי

4.2 כיוול מערכת. תוצאות שיטות החיטוי השונות מתוארות בטבלה 1. שיטה 2 נבחרה להמשך

עבודה בכל הניסויים שיתוארו בהמשך.

4.3 גידול קמחיות הגפן במעבדה. מתוך 28 קמחיות הגפן שהושמו להקמת קווים, 17 הטילו

ביצים ומתוך 15 הראו התפתחות של צעירים. חמישה קווים נדגמו – האם והצאצאים עברו חיטוי

חיצוני ונזרעו על צלחות. התקבלו שמרים מסוג *Debaryomyces*.

4.4 בידוד זיהוי שמרים. נמצא שוני גדול בהרכב אוכלוסיות הפטריות והשמרים המבודדים (איור

1) של קמחיות גפן שנדגמו מהכרם בהשוואה לאלו שגודלו במעבדה למשך ארבעה דורות

(טבלה 2); בעוד שהשמר *Metchnikowia* היה הדומיננטי באכלוס קמחיות גפן שנאספו מהכרם,

השמרים *Debaryomyces*, *Rhodotorula* ו *Cryptococcus* היו דומיננטיים באכלוס כנימות

שגודלו במעבדה. בנוסף, בכנימות בוגרות שגודלו על תפוח אדמה לא נראו שמרים כלל בעוד

שבכנימות צעירות זוהו מאות שמרים. היחסים הנ"ל הפוכים כשבוחנים כנימות בוגרות וצעירות

שנאספו מגפני יין.

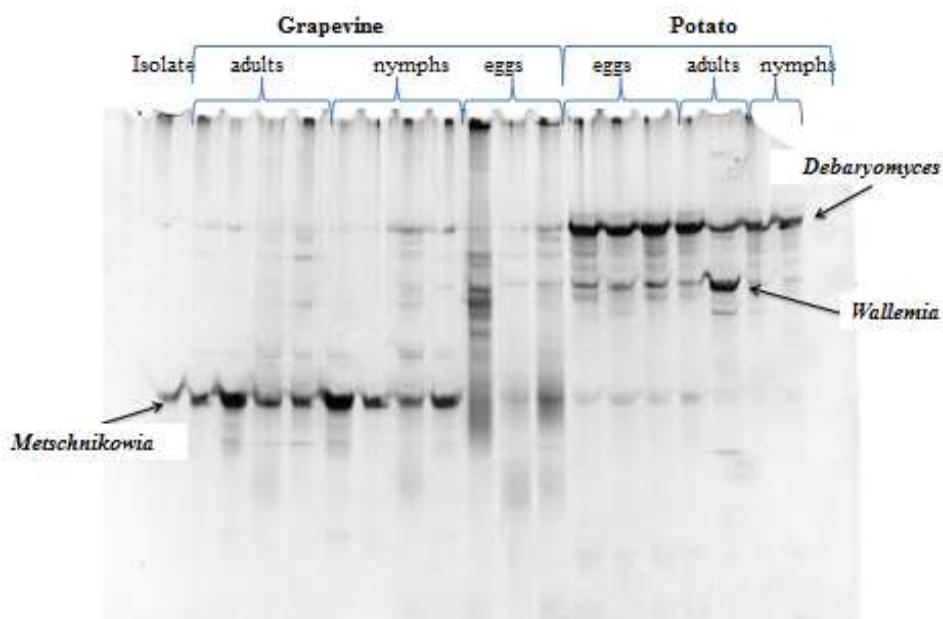
טבלה 2: השמרים שבודדו מדרגות שונות של קמחית הגפן שנאספו מהכרם ומגידול על תפוחי אדמה

Mealybug stage	Obtained from	No. of repeats (No. of individual s per replicate)	Average no. of colony forming units (\pm s.e)	Isolate closest match in NCBI	% similarity and accession No.	
					ITS	D1/D2
Adults (whole body)	Grapevine	4 (1)	80.5 \pm 41	<i>Metschnikowia</i> <i>Meyerozyma</i>	97% KC865296 99% JX188192	96% KC878451 99% KJ506736
	Potato	8 (1)	0	-		
Adults (internal organs)	Grapevine	4 (1)	23.75 \pm 19.5	<i>Metschnikowia</i>		
	Potato	5 (1)	4 \pm 1.4	<i>Rhodotorula</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Cryptococcus</i>	99% AM901759 99% JN942654 99% JX164069	97% GU373763 98% KC783402 99% KC442255
Immature stages	Grapevine	4 (3)	3 \pm 1.4	<i>Metschnikowia</i>		
	Potato	6 (3)	2 \pm 2.7	<i>Rhodotorula</i>		
Eggs	Grapevine	4 (5-10)	2 \pm 0	<i>Metschnikowia</i> <i>Meyerozyma</i>		
	Potato	11 (5-10)	2 \pm 0.12	<i>Rhodotorula</i>		



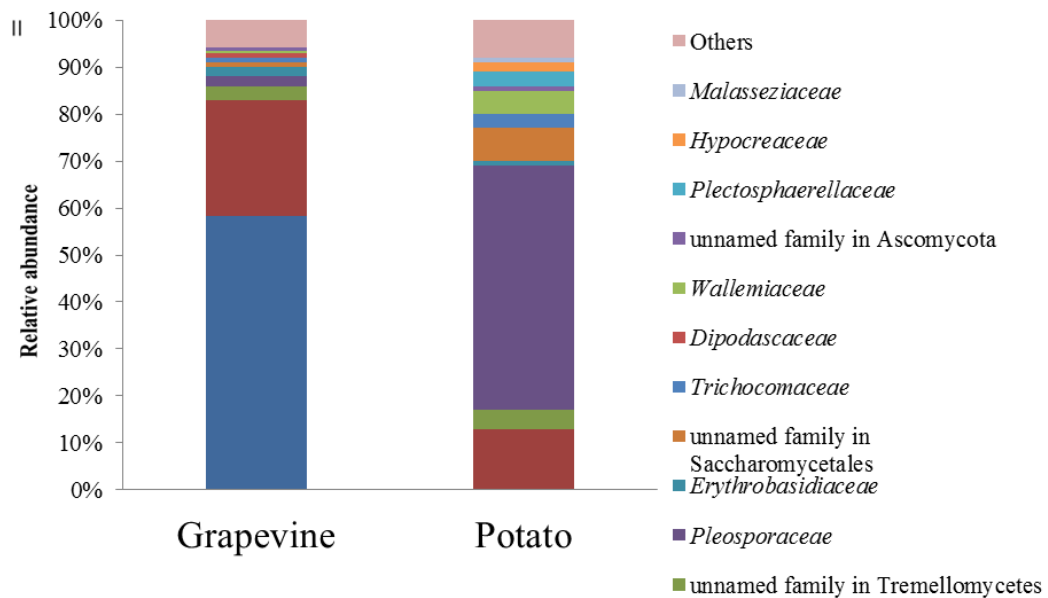
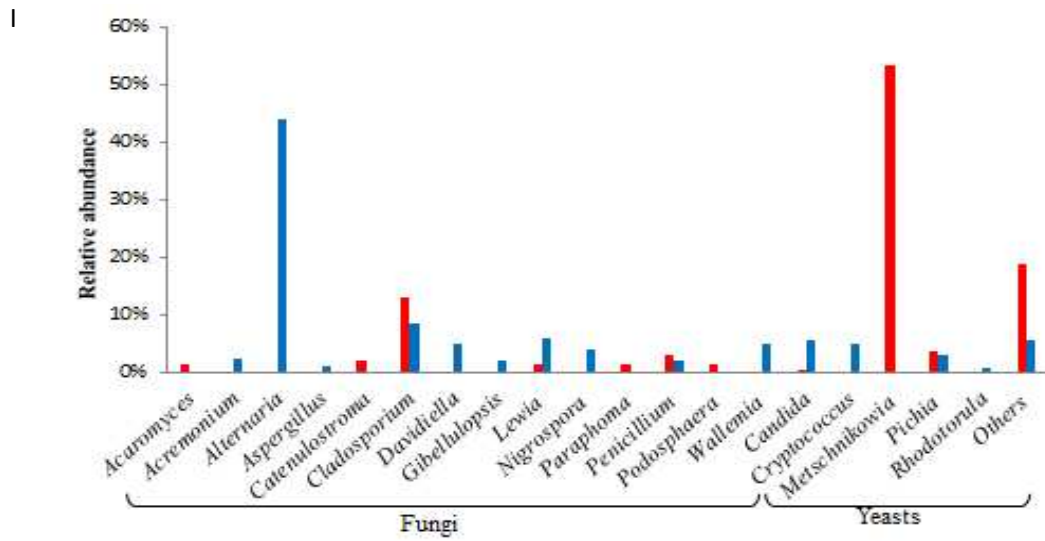
איור 1: שמרים שונים שמקורם מקמחית הגפן בצלחות ומבחנות PDA.

4.5 איפיון הרכב אוכלוסיות הפטריות בקמחיות הגפן. בחינת הרכב אוכלוסיית הפטריות הכללית נבחנה גם בשיטות מולקולאריות; אנליזת DGGE של אזור ה-ITS הפטרייתי נעשתה בכל פרט בנפרד על מנת להעריך את שכיחות השמרים בקמחיות. נמצא כי שבכל הפרטים שנדגמו מגפני יין, הכוללים דרגות צעירות, בוגרות וביצים, סוג השמרים הדומיננטי הינו מצ'ניקוביה. לעומת זאת, הפטריות הדומיננטיות שזוהו באנליזת DGGE לקמחיות הגפן שגודלו על תפוח אדמה היו הפטריה *Wallmeia* והשמר *Debaryomyces* (איור 2, ג'ל מייצג).



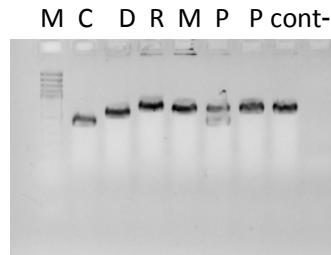
איור 2: אנליזת DGGE של אזור ה-ITS הפטרייתי המדגימה את הרכב אוכלוסיות השמרים והפטריות בשלבי התפתחות שונים של קמחית הגפן שנאספו מגפני יין ומגידול מעבדתי.

שינויים קיצוניים בהרכב הפטריות בכלל והשמרים בפרט נראים גם באנליזת ריצוף עמוק שנעשתה על מקבצים של כנימות מהכרם ומגידול המעבדה: השמר הדומיננטי ביותר בכנימות שנאספו מהכרם – *Metschnikowia*, לא מופיע כלל בכנימות שגודלו למשך ארבעה דורות בגידול מעבדתי (איור 11+13).



איור 3: התפלגות חברת המיקרואורגניזמים האוקריוטים בקמחיות הגפן שנאספו מגפני יין או גודלו בתנאי מעבדה על תפוחי אדמה, כפי שנקבעה על ידי ריצוף עמוק בטכניקת 454. I. ברמה הסוג; אדום- כנימות שנאספו מהכרם, כחול- כנימות מגידול המעבדה על תפוחי אדמה. II. ברמת המשפחה.

מכיוון שהשמר *Metchnikowia* נמצא כדומיננטי בכרם, המערכת הטבעית, תוכננו לו פריימרים ספציפיים על מנת להקל על סריקת נוכחותו בחרקים. למרות נסיונות חוזרים, הפריימרים הגבירו גם שמרים מסוגים אחרים ולכן לא ניתן היה להשתמש באנליזה זו (איור 4).



איור 4: PCR עם פריימרים שעוצבו להגביר רק את איזור הITS של השמר מצ'ניקוביה. נראה כי גם שמרים נוספים: *Metschnikowia* - M, *Cryptococcus* - C, *Debaryomyces* - D, *Rhodotorula* - P, *Meyerozyma* - P מוגברים על ידי הפריימרים.

4.6 השפעת קוטל פטריות על קמחיות הגפן. 5ppm של בנומיל מנעו בצורה מוחלטת גדילה של תרביות השמרים שנבחנו (*Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces and Cryptococcus*) בעוד ש-1 ו-3 ppm האטו את קצב הגדילה של שמרים אלו. מסיבה זו נבחרו הריכוזים 1 ו-5 ppm להמשך ניסוי.

4.7 השפעת השמרים על כשירות קמחיות. קמחיות הגפן גודלו בנוכחות בנומיל לאורך זמן ותוצאות כשירותן מוצגות בטבלה 3. כפי שניתן לראות שרידות קמחיות הגפן ירדה מאד בנוכחות הבנומיל גם בריכוז נמוך מאד (שכמעט ולא השפיע על השמרים בתרבית) ולכן הסקנו שחומר זה רעיל גם לחרקים ולא יכולנו להמשיך ולבדוק את השפעתו על הכנימות בהקשר לשמרים.

טבלה 3: השפעת קוטל פטריות על השרדות קמחיות גפן בגידול מעבדה

ריכוז בנומיל	אחוזי הישרדות (לאחר 3 ימים)	אחוזי הישרדות (לאחר שבועיים)
0	0.67	0.42
1	0.50	0.06
5	0.20	0.21

5. דיון ומסקנות

קמחית הגפן מזיקה לגידול ענבי היין בארץ ובעולם כולו. בחינת הרכב אוכלוסיות המיקרואורגניזמים המאכלסים את הקמחית יכולה להוות צעד ראשון בפיתוח שיטות הדברה חדשניות שיהיו ידידותיות לסביבה. במחקר הנוכחי נמצא כי הכנימה מאוכלסת הן על ידי חיידקים והן על ידי פטריות (ברובן שמרים). שלא כמו חיידקים סימביונטיים שאינם ניתנים לגידול, שמרים שמקורם בקמחית בודדו על צלחות זוהו ומוחזקים באוסף של המעבדה. העובדה ששמרים הנמצאים ביחסי גומלין עם החרק זמינים לניסויים מבוקרים, מאפשרת בחינת השפעתם על קמחית הגפן בדגש על השמר הדומיננטי במערכת – *Metschnikowia*. שמר זה מעניין במיוחד מאחר והוא ידוע ביכולת ההדברה ביולוגית של מספר פטריות וחיידקים שונים על תוצרת חקלאית (Wisniewski and Droby, 2011, Kurtzman and Droby, 2001) אך דבר אינו ידוע על השפעתו על המזיק. שינוי הרכב אוכלוסיות השמרים שנבע מהעברת קמחיות הגפן לגידול מעבדתי על תפוחי אדמה מערער את הנחת הבסיס של המחקר ולא, תומך בהשערה כי קיימים יחסי גומלין הכרחיים בין הפונדקאי לסוג שמר מסוים. ניסיונות חוזרים ונשנים להעמיד קווי כנימות קמחיות הנושאים באופן יציב אוכלוסיות שמרים ספציפיות, נכשלו, ולא ניתן היה לבדוק את היפותזת המחקר לאשורה. ניתן להסיק עם זאת כי מסיבה זו עולה ההשערה שהשמרים נרכשים מהסביבה תוך כדי תזונה מהסביבה והיחסים עימם אינרטיים, ובכך נסתרת היפותזת המחקר.

עם זאת, בספרות ידוע על סמביונטים המושפעים מתזונת חרקים (Chandler *et al.*, 2011) ונחוצים רק בתנאים מסוימים (Oliver *et al.*, 2008). יתכן שגם בקמחית הגפן השמר *Metschnikowia* דרוש לחיים בתנאי שדה על צמח מעוצה (גפן) ולא בגידול מעבדה בתנאים נוחים אך, לצערנו, לא הצלחנו לאשש אף אחת מהתאוריות מפאת חוסר יכולת להקים קוים של קמחיות גפן ללא שמרים.

6. ביבליוגרפיה

Chandler JA, Lang JM, Bhatnagar S, Eisen JA, Kopp A (2011) Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. PLoS Ggenet. 7: e1002272.

Gibson CM, Hunter MS. 2010. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. Ecol Lett. 13:223-234.

- Kurtzman CP, Droby S. 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Syst Appl Microbiol.* 24:395-399.
- McCutcheon JP, von Dohlen CD. 2011. An interdependent metabolic patchwork in the nested three-way symbiosis of mealybugs. *Curr Biol.* 21:1366–1372.
- Oliver KM, Campos J, Moran NA, Hunter MS (2008) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *P Roy Soc B: Biol Sci.* 275: 293-299.
- Perman S. 2008. Israel wine making revolution. *BusinessWeek – Smallbiz.* p. 2.
- Wisniewski ME, Droby S. (2011). Biopreservation of food and feed by postharvest biocontrol with microorganisms. In: *Microbes and the Law - Safety Assessment and Regulation of Beneficial Organisms.* (I. Sundh, A. Wilcks, and M. S. Goettel, eds). CABI press.
- Zchori-Fein E, Bourtzis K. (eds) 2010. *Manipulative Tenants: Bacteria Associated with Arthropods.* CRC Press.
- גוטליב י, צחורי-פיין ע. (2007): הדברה סימביוטית – שיטה חדשנית להדברת פגעים באמצעות חידקים סמביונטיים. 'עלון הנוטע', כרך 61, עמ' 8-10.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
על מנת לפתח טכנולוגיה המתבססת על שימוש בשמרים סימביוטיים להדברה ביולוגית של קמחית הגפן, נקבעו למחקר המטרות הבאות: (1) בידוד, זיהוי ואפיון השמרים שמקורם בקמחית הגפן בעזרת שיטות מולקולריות; (2) הערכת שכיחותם של שמרים בקמחיות הגפן בעזרת פרימרים ספציפיים; (3) השפעת השמרים על כשירות קמחית הגפן ע"י האכלה בפונגיצידיים.
עיקרי התוצאות
(1) כויל אופן החיטוי המיטבי של כנימות, המונע זיהומים אך אינו פוגע במיקרואורגניזמים
(2) קמחיות בוגרות, שנאספו מגפני יין, מכילות כמות גבוהה יותר של שמרים בהשוואה לדרגות הצעירות יותר. קמחיות גפן שגודלו על תפוח אדמה הראו מגמה הפוכה
(3) שמרים מהסוג <i>Metschnikowia</i> בודדו מכל דרגות ההתפתחות של קמחית הגפן שנאספו מגפני יין (ביצים, צעירות ובוגרות)
(4) שמרים מהסוג <i>Rodotorula</i> ו <i>Debaryomyces</i> בודדו מקמחיות הגפן שגודלו על תפוחי אדמה (ביצים, נימפות ובוגרות)
(5) שמרים נפוצים מאוד בקמחיות הגפן אך יתכן שנוכחותם הינה סביבתית- הכנימות רוכשות אותם עם ההזנה ולכן הרכב אוכלוסיות השמרים משתנה בהתאם לתנאי הסביבה של הכנימה
(6) בנומיל הינו חומר קוטל פטריות אך גם בריכוזים נמוכים הוא מפריע לשרידות הכנימות ולכן לא ניתן להקים קווים של קמחיות גפן ללא שמרים בטכנולוגיה זו
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו
בשנת המחקר הראשונה נאספו חרקים ובודד מהם מספר רב של שמרים. שמרים אלו זוהו והוקם אוסף השמור במעבדה.
בשנה השנייה למחקר הועמדו קווים של קמחיות הגפן ונבחנו אם וצאצאיה לזיהוי השמרים המאכלסים אותם. חל שינוי בהרכב אוכלוסיות השמרים בקמחיות עם ההעברה לגידול תפוח אדמה ומכך ניתן להסיק שאין העברה אנכית של שמרים מאם לצאצאים שלה.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה
לא הצלחנו לתכנן פריימרים ספציפיים לשמרים מסוגים שונים, כך שסקר הנפוצות נעשה בשיטת DGGE.
האכלת הכנימות בפונגיצידיים כוילה במעבדתנו אך לא ניתן היה להקים קווים של קמחיות גפן ללא שמרים ולכן לא הוגדרו תוצאות חד משמעיות לגבי השפעת השמרים על הכנימות
פרסומים בכתב
יסעור-קרוח, ל., טאהא-סלאימה, ל., שרון, ר., זהבי, ת., דרובי, ס. וצחורי-פיין, ע. 2013. מי מסתתר בכנימה הקמחית של הגפן? עלון הנוטע, 67: 41-43.

lasur-Kruh, L., Taha-Salaime, L., Robinson, W. E., Sharon, R., Droby, S., Perlman, S. J., & Zchori-Fein, E. (2014). Microbial associates of the vine Mealybug *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) under different rearing conditions. *Microbial ecology*, 1-11

◀ פרסום הדו"ח: אפשר לפרסם את הדו"ח