

בחינת הפעילות של רעלנים מתת-מינים של החיידק *Bacillus thuringiensis* נגד זחלי חיפושיות הקפנודיס כבסיס לפיתוח כנות גלעיניים חסינות

Biological activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against the apricot and peach flatheaded borers as a basis for developing immune rootstocks to these beetle pests

מוגש ע"י

שם החוקר	מוסד המחקר
גלינה גינדין	המחלקה לאנטומולוגיה, מינהל המחקר החקלאי gindin@volcani.agri.gov.il
צבי מנדל	"
טטיאנהקוזניצוב	"
אלכס פרוטסוב	"
שאולבן יהודה	האגף להגנת הצומח, שה"מ, מחוז העמקים
איתן בן דב	המחלקה להנדסת ביוטכנולוגיה, אוניברסיטת בן-גוריון בנגב
אריה זריצקי	המחלקה למדעי החיים, אוניברסיטת בן-גוריון בנגב
מוניקה עינב	"

Researcher	Institute
Galina Gindin	Department of Entomology, ARO
Zvi Mendel	"
Tatiana Kuznietzuva	"
Alex Protasov	"
Shaul Ben Yehuda	
Eitan Ben-Dov	Department of Biotechnology Engineering Ben Gurion University
Arieh Zaritsky	Department of Life Science Ben Gurion University
Monica Einav	"

תשרי תשע"ד ספטמבר 2013

ממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים. הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים:



חתימת החוקר הראשי : ד"ר גלינה גינדין

בחינת הפעילות של רעלנים מתת-מינים של החיידק *Bacillus thuringiensis* נגד זחלי חיפושיות הקפנודיס כבסיס לפיתוח כנות גלעיניים חסינות

## תקציר

רקע המחקר: מיני קפנודיס *Capnodis* spp. הם מהמזיקים העיקריים של עצי פרי גלעיניים בארצות הים התיכון. מימשקי ההדברה המקובלים כנגד נוברים אלו אינם יעילים מכיוון שכבר לאחר הבקיעה הזחלים חודרים לשורשים שם הם מוגנים מפני קוטלי חרקים וטורפים. הפתרון יעיל להדברת נוברים אלו טמון ביצירת כנות חסינות. חסינות זו ניתנת להשגה באמצעות עצים מותמרים שמייצרים בשורשיהם תרכובות רעילות בעלות ספציפיות גבוהה. תוכנית המחקר מתמקדת בבחינת רעלני *Cry* מחיידקי *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) למטרה זו.

המטרה: איפיון הרעילות של תבדידי *Bt* כנגד זחלי הקפנודיס, וזיהוי גנים המעורבים בביטוי טוקסינים של *Bt* נגד זחלי חיפושיות.

השיטות: אוסף של תבדידי *Bt* מהטבע נסרק וזוהו בו ובודדו ממנו גנים לרעלנים חדשים שעשויים לפעול נגד זחלי קפנודיס האבל *C. tenebrionis*. רעילותם של אחדים מהתבדידים שנבחנו הוכחה באמצעות הטמעת הרעלנים בקרקע מזון מלאכותית המשמשת (כתחליף לצמח) לגידול הזחלים. תבדיד שמקורו בתכשיר מסחרי (של חברת Novodor), *Bt tenebrionis* (*Btt*), וקרקע מזון ללא רעלנים שימשו כביקורות.

תוצאות: תבדיד של *Btt* הראה ערכי  $LC_{50}$  ו- $LC_{95}$  של 3.2 ו- $164 \text{ mg g}^{-1}$  בהתאמה נגד זחלים צעירים של קפנודיס האבל, ואילו ערכי התבדיד הרעיל ביותר שנמצא במחקר המדווח, K-7, היו נמוכים (ויעילים יותר) באופן מובהק, 1.9 ו- $25.6 \text{ mg g}^{-1}$  בהתאמה. משקל הזחלים ששרדו חודש הזנה בריכוזים נמוכים של התבדיד הזה ( $0.1-1.0 \text{ mg g}^{-1}$ ) היה נמוך ממשקל זחלים שהוזנו ב-*Btt* או כאלה שלא עברו טיפול. כמו-כן, K-7 היה רעיל נגד זחלים של מיני קפנודיס אחרים, קפנודיס האלה *C. cariosa* וקפנודיס הצפצפה *C. miliaris*. מצאנו שהתבדיד K-7 נושא גן דמוי-*cry9Ea* וזוג גנים *cry23Aa/cry37Aa* המקודדים לרעלן בינארי.

מסקנות: זחלים משלושה מיני הסוג *Capnodis*, המוגנים בטבע מפני אויבים טבעיים, רגישים לרעלני *Cry* של *Bt*. לכן, ביטוי של גנים *cry* פעילים נגד מזיקים אלה נראה כפתרון בר-ביצוע במסגרת יצירה של כנות עצים מותמרות חסינות לנוברים אלה.

## 1 מבוא

מיני קפנודיס (*Capnodis* spp.), חיפושיות ממשפחת הברקניות (Coleoptera: Buprestidae) הם נוברים הגורמים לנזק קשה לעצי פרי ונוי ברחבי ארצות הים התיכון, אירופה הדרומית ומערב אסיה. שלושה מינים גורמים לנזק חקלאי חמור בארצות הים התיכון: קפנודיס האבל *C. tenebrionis* וקפנודיס השקדים- *C. carbonaria* שתוקפים עצי פרי גלעיניים (שקד, אפרסק, דובדבן, נקטרינה ושזיף) (Ben-Yehuda et al, 2000; Karadag et al. 2006; Farivar-Mehin 1997). קפנודיס האלה *C. cariosa* שפוגע במטעי אלת הבוטנה במערב אסיה, במיוחד בטורקיה ואירן (Karadag et al. 2006; Farivar-Mehin 1997). הבוגרים ניזונים מהסות (הקורטקס) של הענפונים בעוד שהזחלים ניזונים בשורש. כ-2,000 ביצים מוטלות במהלך חיי הנקבה, כולן בקרקע ומיד לאחר הבקיעה הזחלים חודרים לתוך השורשים ונוברים בסות. התפתחות הזחל והגולם עשויה להימשך 6 עד 14

חודשים. הזחלים בתוך רקמת השורש מוגנים מפני קוטלי חרקים וטריפה (Rivnay, 1944; Rivnay, 1946). זחל בודד יכול לקטול עץ צעיר ומספר מועט שלהם יכול לגרום למותו של עץ בוגר (Rivnay 1945). פעילות של אויבים טבעיים נגד הקפנודיס, ובעיקר נגד הזחלים, הוא נדירה ולא יעילה (Marannino, 2007). בעשור האחרון נמטודות ופטריות אנטומו-פאתוגניות נוסו כאמצעי הדברה ביולוגי נגד הזחלים, אך הצלחתם עד כה אינה רבה ( de Altube et al. 2008; Marannino 2004; Marannino et al. 2006; García del Pino and Morton 2005) והשימוש בהן עדיין מוגבל. המגדלים עושים שימוש נרחב בקוטלי חרקים סינתטיים לא ייחודיים כדוגמת האורגנופוספטים וקרובמטים או קוטלי חרקים סיסטמיים כמו ניאוניקוטינואידים ( Ben-Yehuda et al. 1984; Garrido 2000). חשיפה ממושכת לחומרי הדברה הביאה להיווצרותן של אוכלוסיות עמידות (Ben-Yehuda et al. 1997). יתרה מכך, כנות שמשמשות לגידול גלעיניים אינן עמידות דיין לזחלי הקפנודיס ( Salazar et al. 2003; Mendel et al. 1991). למרות השימוש הנרחב בתכשירי הדברה, גידול מסחרי של עצי פרי גלעיניים רושם עדיין הפסדים כלכליים משמעותיים בשל נגיעות המטעים בקפנודיס (Mendel 2002). מכאן הצורך החיוני והדחוף לפתח אמצעי הדברה יעילים ובטיחותיים למזיק זה. תוכנית מחקר זו עסקה בשאלות האם δ-אנדוטוקסינים של *Bacillus thuringiensis* (Bt) רעילים לזחלי קפנודיס, ואם כן, האם הם עשויים להיות מיושמים במסגרת מימשק ההדברה של חיפושיות אלו.

*Bt* הוא חיידק אנטומו-פאתוגני שהתגלה לראשונה לפני יותר ממאה שנים (Ishiwata 1901; Berliner 1911) והפך לקוטל ביולוגי מוביל שמשמש בהיקף מסחרי כאמצעי להדברה של אוכלוסיות חרקים בשדה ובטבע ( de Maagd et al. 2001, 2003). זהו מין גראם-חיובי, א-ארובי, ספרופיט שיוצר אנדו-ספורות. החיידק נמצא בטיפוסי קרקע מגוונים ובסביבות מימיות. תת-מינים רבים שלו מזוהים לפי יכולתם ליצר δ-אנדוטוקסינים קוטלי חרקים בשם Cry (מלשון crystal) ו-Cyt (מלשון cytolytic) שמורכבים כגופים פארא-ספוראליים (parasporal bodies) (Schnepf et al. 1998). חלבונים קוטלי חרקים אלה (ICPs - Insecticidal Proteins) נוצרים במהלך הספורולציה ומקופלים בצפיפות על ידי קשרים הידרופוביים וגשרים די-סולפידיים. הגבישים נבלעים על ידי זחלי החרק, מומסים במערכת העיכול שלו ומופעלים באופן פרוטיאוליטי לרעלנים קוטלי חרקים שחודרים לממברנות של תאי המעי. פעולתם החזקה והייחודית הביאה את השימוש בהם במימשק ההדברה של חרקים מזיקים בחקלאות ויערנות, ושל מעבירי מחלות בבני אדם (Sanahuja et al. 2011).

הסריקה אחר מיקרו-אורגניזמים אנטומו-פאתוגניים שפועלים נגד נוברים כמו מיני קפנודיס היתה מוגבלת כתוצאה ממחסור בשיטה להזנה מלאכותית של הזחלים. כך לדוגמה השימוש בפטריות אנטומו-פאתוגניות *Beauveria bassiana* ו-*Metarhizium anisopliae* נבחן על ידי טבילה של זחלים בני יום (כל זחל בנפרד) במשך 10 שניות בתרחיף נבגים ( $10^8 \text{ ml}^{-1}$ ) ולאחר מכן הועברו הזחלים לתוך חתך של ענף מעץ אפרסק ( Marannino 2006). שיטת תזונה שפותחה לאחרונה מאפשרת גידול תקין של זחלים ובכך מאפשרת ביצוע של בחן ביולוגי (bioassay) מתאים.

## 2 שיטות וחומרים

### 2.1 גידול *B. thuringiensis* ומצעי גידול

כשלב ראשון לקראת יצירה של כנות שורש מותמרות של עצי פרי גלעיניים לשם הדברת זחלי קפנודיס האבל, סרקנו אוסף של תבדידי *Bt* למצוא גנים *cry* ו-*cyt* שמקודדים לרעלנים יעילים. פיזור של גנים בתבדידי שדה של

*Bt* אשר פועלים נגד חיפושיות תלוי בסביבה הגיאוגרפית ומגוון גנטי של התבדידים וכן במספר, איכות ושימוש בתחילי DNA (primers) השונים (Asokan et al. 2013; Ben-Dov et al. 1997; Ben-Dov et al. 2001; Bravo et al. 1998; Jua'rez-Pe'rez et al. 1997; Ejiofor and Johnson, 2002; Nazarian et al. 2009; Tamez-Guerra et al. 2004). תבדידי *Bt* ותבדיד *Btt* (*Bt* subsp. *tenebrionis*) מתכשיר ההדברה של חברת נובודור (Novodor, ValentBioSciences), גודלו על מצע LB : NaCl 5g, Tryptone 10g, Nutrient Broth 8g לליטר עם תוספת של 1 ml מלחי ספורולציה שכוללים 0.14 M CaCl<sub>2</sub>, 0.20 M MgCl<sub>2</sub> ו-0.01 M MnCl<sub>2</sub> (Marquez et al. 1990). החיידקים גודלו ב-30°C בטילטול (250 rpm) במשך 16-18 שעות לצורך הפקת DNA באמצעות Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Solana Beach CA) או במשך 72 שעות לצורך הופעת ספורות וגבישי טוקסין לשם מבחנים ביולוגיים. בחינת מצב הספורות בוצעה ע"י מיקרוסקופ פאזות. כמות חלבון נמדדה לאחר הידרוליזה ומדידת משקל יבש לאחר הדגרת הדוגמאות ב-70°C במשך יממה (Lowry et al, 1951).

## 2.2 אנליזת PCR

צמדי התחילים (טבלה 1) תוכנו בעזרת Amplify 1.0 (Bill Engels, University of Wisconsin, USA) להגברת 14 קבוצות גנים של *cry* ו-*cyt2Ca*. קבוצות אלה הראו זיקה לרעילות נגד חיפושיות PCR (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\_Crickmore/Bt) DNA מכל תבדיד *Bt* הוגבר באמצעות PCR בעזרת TGradientThermocycler (Biometra, Gottingen, Germany). כל ראקציה כללה 12.5 µl ReddyMix PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc, Surrey, UK), התחלים בנפח של 1µl בריכוז של 10 mM כל אחד, 1µl BSA בריכוז של 25 mg ml<sup>-1</sup> ובתוספת של 50-200ng של DNA. תוכנית ה-PCR כללה דנטורציה התחלתית של 4 דקות ב-95°C, 30 מחזורים של 30 s, 94°C, 30 s, 48-54°C והארכה ב-30-60 s, 72°C. כל ניסוי כלל ביקורת שלילית (ללא DNA) וביקורת חיובית הכוללת *cry3* מתכשיר *Btt* של חברת נובודור ו-*cry7* ו-*cry8* מ-*Bt* spp. *kumamotoensis* HD-867.

**טבלה 1.** מאפיינים של תחילים אוניברסאליים לגנים המבטאים טוקסינים של מיני חיפושיות מהקבוצות: *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry14*, *cry18*, *cry22*, *cry23*, *cry26*, *cry28*, *cry34*, *cry35*, *cry36*, *cry38*, *cry43*, and *cyt2Ca*

מקור	גודל החלבון (bp)	הגנים המטרה	רצף הפריימר <sup>a</sup>
Ben-Dov et al. 2001	589-604	<i>cry3Aa</i> , <i>-Ba</i> , <i>-Bb</i> , <i>-Ca</i>	Un3(d) - CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC Un3(r) - CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT
Ben-Dov et al. 2001	420-423	<i>cry7Aa</i> , <i>-Ab</i> ; <i>cry8Aa</i> , <i>-Ba</i> , <i>-Ca</i>	Un7,8(d) - AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC Un7,8(r) - CTTCTAAACCTTGACTACTT
This study	860-878	<i>cry8Aa</i> , <i>-Ba</i> , <i>-Bb</i> , <i>-Bc</i> , <i>-Ca</i> , <i>-Da</i> , <i>-Db</i> , <i>-Ea</i> , <i>-Fa</i> , <i>-Ga</i>	Un8(d) - AACTTAGTGGAATGCCTATC Un8(r) - TTATATACGTAAGGAATGGACTGT
This study	361	<i>cry14Aa</i>	Un14(d) - CCTAAAGGTGGAAGTGATAACGCT Un14(r) - ATTTCCCCGTGCTTCCCTTTAC
This study	410	<i>cry14Aa</i>	Un14(d2) - TGCGTTGGTTGATACAGCTGGAGA Un14(r2) - CAGTACCTGACCACTGTGCATCTA
This study	462	<i>cry18Aa</i> , <i>-Ba</i> , <i>-Ca</i>	Un18(d) - AAGGGAATGGACAGAATGGAAAG Un18(r) - CGTAAAAAAGTTAAATGAAGCGTG

Un18(d) - AAGGGAATGGACAGAATGGAAAG Un18(r2) - CCCTCATTACCTTATTATCCCC	<i>cry18Aa, -Ba, -Ca</i>	762	This study
Un22(d) - TTTCATAGAGGATCAATTGG Un22(r) - ATTGTTTTTTCATCACTTTC	<i>cry22Aa, -Ab, -Ba</i>	698-734	This study
Un23(d) - GTGAAAGCCGGCACCTCAATAAGT Un23(r) - GCTGCAATAAGCGCACCATCT	<i>cry23Aa</i>	293	This study
Un26(d) - CGCGCTGTTCAATTATCAAGTGC Un26(r) - ATATGGAAAGAAAAGGCGTGTGGA	<i>cry26Aa</i>	362	Ejiofor and Johnson 2002
Un28(d) - GTATTGGACCGAGGAGATGAAAGT Un28(r) - GTACGGCAAAGCGACAGAACA	<i>cry28Aa</i>	466	Ejiofor and Johnson 2002
Un34(d) – AGGTTGATATTTATGTCAGC Un34® – ATCAATAGGAAATAAAAACCA	<i>cry34Aa, -Ab, -Ac</i>	649-651	This study
Un35(d) – GATGATTCAGGTGTTAGTTTAATG Un35® – GTGGGAGTTGAATTGTTTGTACAG	<i>cry35Aa, -Ab, -Ac</i>	364	This study
Un36(d) – GATGTGGTTGCCAGCAAGGTAA Un36® – AACTCGACCATTTCTCGATTCCC	<i>cry36Aa</i>	554	This study
Un38(d) – TTCTACTCCCACACGTTCTG Un38® – TCAATGGTTCATCAGCTAACA	<i>cry38Aa</i>	741	This study
Un43(d) – CTTTACAGTCCCAATAAGTATCC Un43® – GTATAAATTCCTCTCGTAAGC	<i>cry43Aa, -Ba</i>	842	This study
cyt2Ca(d) – TCGCAAGAAAGCGAACGATGGA cyt2Ca® – TTCTAGGTAAGTGACGTGGCGATT	<i>cyt2Ca</i>	298	This study

<sup>a</sup> (d) and ®, direct and reverse primers, respectively.

### 2.3 שיבוט *cry23/cry37* לצורך בחינת הטוקסין *Cry23*

הגנים לטוקסין הבינארי *cry23Aa* ו-*cry37Aa* שובטו תחת בקרת הפרומוטר הכפול של *cyt1Aa* (Margalith and Ben-Dov, 2000). האזור המקודד הוגבר מתבדיד *K-7* בעזרת זוג התחילים: *GATCCATGGGAATTATTAATATCCAAGATG* (*cry23Aa-F-NcoI*) ו-*TTATGCTGGAGTCAAGGAATACTTAATTGTC* (*cry37Aa-R*) של 4Q2-72 הפרומוטר בודד מתבדיד של 529bp מ-*GATTGAAAGCTTGAGAAAGGTAATAGAGATG* (*Pcyt-F-HindIII*) ו-*GTTCCATGGATAAACAACCTCCTTAAGTTAATTAG* (*Pcyt-R-NcoI*). שני תוצרי ה-PCR (529bp) מ-*Pcyt1Aa* ו-190bp מ-*cry23/cry37* נחתכו ע"י *NcoI*, *HindIII* ו-*SmaI* לשם החדרה לפלסמיד pHT315. פלסמידים אלה הוכנסו ל-*Escherichia coli* DH5α ע"י אלקטרופורזה בעזרת Bio-Rad mini apparatus set. הפלסמידים הנושאים את הגנים המשובטים הועברו לחיידק מוטנטי *B. JPS7811 AcrySTALLIFEROUS* *thuringiensis* subsp. *israelensis* שלא מייצר רעלנים בעצמו. החיידקים בודדו ממצע LB שמכיל 20μg ml<sup>-1</sup> erythromycin לאחר הדגרה ב-30°C.

החלבון המשוער *Cry23A* בודד מגיל SDS-PAGE והרצפים של הפפטידים שהתקבלו לאחר עיכול טריפטן מלא באמצעות nano-LC-MS/MS עם LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher, Bremen, Germany) זוהו ע"י

## 2.4 גידול הזחלים של שלושה מיני קפנודיס לבחנים ביולוגיים

**2.4.1 קבלת נאונטים:** בוגרי קפנודיס התקבלו מגידולם במעבדה, אך היות ובוגרים אלה מטילים מספר קטן של ביצים (הסתמכנו בעיקר על פרטים מהמטע (בעיקר בעמק החולה). בוגרי קפנודיס האבל נאספו מבוסתני משמש, שזיף או אפרסק, ואילו *C. cariosa* ו-*C. miliaris* נאספו בשטחי נוי שונים בהם נטועים עצי אלה וערבה. במעבדה הוכנסו החיפושיות לכלובי פרספקס מאווררים, שהוחזקו בתאי גידול מוארים, בטמפי של  $28^{\circ}\text{C}$  במהלך החורף ובחממות מאווררות בקיץ, תוך הפרדה בין המינים. בתוך הכלובים הונחו מגשי הטלה עם חול מסונן לאחר חיטוי של שעה ב- $127^{\circ}\text{C}$ , שפוזר על נייר בגודל מתאים בצלחות פטרי בשכבה שעומקה כ-1.5 ס"מ. ענפי מישמש או שזיף הנתונים במיכל מים מתאים שימשו להזנת הבוגרים. הענפים הובאו למעבדה אחת ל-10 ימים מחלקות שאינן מטופלות בתכשירי הדברה חריפים, והם נשמרו בקירור ( $10^{\circ}\text{C}$ ) על לשימוש. הביצים סוננו מתוך החול לפני העברתן להדגרה. צלחות הפטרי נבדקו מידי יום להוצאת הניאונטים לניסויים.

**2.4.2 גידול זחלי הקפנודיס על מצע מזון מלאכותי:** קרקע המזון מהווה את אחד הבסיסים למחקר כולו. במסגרת מחקר שמומן באמצעות המדען הראשי ומועצת הצמחים (גלינה גינדין וחבוריה, מס. 131-1349-08, Gindin et al. 2009) פיתחנו קרקע מזון יעיל שמאפשר התפתחות של זחלי קפנודיס האבל וקפנודיס השקדים. קרקע המזון חיונית לבחינת רגישות זחלי הקפנודיס לרעלנים הנבחנים. מצע ההזנה מבוסס על קורטקס של אפרסק או שזיף ועל הפפטיד קזאין, בתוספת שמרים ותמיסה של סוכר, מלחים, ויטמינים ותכשירים אנטי-מיקרוביאליים. חומר מבנה למצע משמש צלולוז. במצע נשמר איזון קפדני של לחות ומבנה המאפשרים את ההתפתחות התקינה של הזחלים, ומשתנה בהתאם לגיל הזחל. במצעים אלה, בטמפי של  $28^{\circ}\text{C}$ , התפתחות הזחלים נמשכת 10-15 שבועות עד להתגלמות (שנמשכת כשבועיים). הדיאטות המשופרות להישרדות הניאונטים היא כמעט מלאה, ומשך התפתחות הזחלים עד גיחת הבוגרים נמשך 80-90 ימים (במטעים בישראל ההתפתחות נמשכת בין 6 ל-9 חודשים).

## 2.5 ביצוע בחנים ביולוגיים לקביעת רמת רגישות זחלי קפנודיס האבל לטוקסינים

מצע המזון המלאכותי הוכן בשלושה חלקים כמתואר ע"י Gindin et al. 2009, עם 5% של קורטקס מעץ הפונדקאי. סדרה של מיהולים מתרחיף הנבגים עם גבישי הרעלן הוספו למצע מזון מעוקר, לקבלת ערכי  $\text{LC}_{50}$  ו- $\text{LC}_{90}$ . שבוטאו במונחים של ריכוז נבגים (Finney, 1971). ההבדלים נותחו באמצעות רגרסיות פרוביט (SAS Institute 2002). חשוב לציין שניאונטים וזחלים בדרגה הראשונה גדלים על קרקע מזון במרקם אחיד באחוזי לחות גבוהים, ואילו זחלים בדרגות האחרות גדלים על קרקע מזון גרגרית. בחינת התמותה נמשכה עד ארבעה שבועות. כל חזרה כללה כ-20 ניאונטים, או כ-10 זחלים מדרגה שנייה ושלישית. תרחיפי נבגים וגבישים מתבדידי ה-*Bt* הוחדרו לחלק השני של המצע והוספו לחלקים הראשון והשלישי לאחר עיקורם. בכל מבחן, ובכל ריכוז חלבון, 27-30 זחלים צעירים (ניאונטים, שרק בקעו) הוכנסו לצלחות פטרי (5 ס"מ קוטר, 3 זחלים בכל צלחת) עם 10-12 גרם מצע מזון. הצלחות הודגרו ב- $28^{\circ}\text{C}$  ותמותת זחלים נקבעה כל יום. זחלים ששרדו שבוע גודלו בנפרד באותם התנאים ובאותו מצע, אולם במבנה פריך, ומשקלם נמדד לאחר כחודש.

## 3 תוצאות

כדי להצביע על תבדידי שדה בעלי גנים שעשויים לקטול את זחלי הקפנודיס, ניצלנו ספריה בת 215 תבדידים. מתוכם, 28 שנראו ככוללים את הגנים *cry7/cry8* (Ben-Dov et al. 1997) נבחרו לסקירה באמצעות אנליזות PCR בשילוב עם בחנים ביולוגיים.

### 3.1 רעילות של תבדידי *Bt* לזחלי הקפנודיס

סקירה משולבת ראשונית הצביעה על 19 תבדידים ותבדיד *Btt* שנבחנו ביולוגית בנפרד (טבלה 2). השפעתם של שבעת התבדידים הרעילים ביותר ושל הזן המסחרי נבחנה בקפידה באמצעות הוספה של ריכוזי חלבון שונים שנעו בין 0.1 ל-0.5 מ"ג חלבון כולל בגרם אחד של מצע המזון (טבלה 3). הזן המסחרי היחיד (*Btt* של Novodor) הידוע כרעיל לזחלים של מיני חיפושיות מסוימים (Sanahuja et al, 2011) הראה  $LC_{50}$  ו- $LC_{95}$  של 3.2 ו-164 מ"ג לגרם (בהתאמה) נגד זחלים צעירים שלקפנודיס האבל (טבלה 3). במחקר זה נמצאו לראשונה תבדידים חדשים של *Bt* רעילים לזחלי מינים בסוג קפנודיס שעשויים להיות זמינים מסחרית.

**טבלה 2.** בחינה ראשונה של הטוקסיות של תבדידי *Bt* במינון של  $1.0 \times 10^9$  נבגים לגרם מצע מזון מלאכותי (סדר התבדידים מאורגן על פי עוצמת התמותה שהם חוללו בזחלי קפנודיס האבל לאחר שבועיים של הזנה).

	Isolates	Control (water)	U-29	K-11	K-39	U-53	K-3	R-36	U-17	U-3	K-5
% dead larvae	1 week	13.9	47.6	57.1	42.9	47.6	58.3	66.7	40.0	52.4	41.7
	2 weeks	13.9	52.4	60.0	61.9	66.7	66.7	66.7	73.3	74.1	75.0

	Isolates	<i>Btt</i>	K-41	K-10	K-30	U-30	U-12	U-13	U-16	U-40	K-4	K-7
% dead larvae	1 week	70.0	52.4	42.9	77.8	73.3	42.9	76.2	61.9	62.8	85.2	85.7
	2 weeks	76.7	76.9	79.2	80.0	80.1	81.0	100	100	100	100	100

<sup>a</sup> Mortality in control – average of 6 bioassays (total 180 larvae). Each isolate was assayed in 9-10 dishes with 3 larvae per dish.

תבדיד *K-7* הוא תבדיד השדה הרעיל ביותר שנמצא ויעילותו גבוהה באופן משמעותי מזו של תת המין *Btt*, שהוא מסחרי זה מכבר, עם ערכי  $LC_{50}$  ו- $LC_{95}$  של 1.9 ו-25.6 מ"ג חלבון לגרם מצע מזון. הרעילות של תבדידים פוטנטיים אחרים, *U-13* ו-*K-4* היו ברי השוואה ל-*Btt*, בעוד שאלה של התבדידים *K-30* ו-*R-36* היו נמוכים מאוד (טבלה 3).

**טבלה 3.** עוצמת התמותה המבוטאת בערכי  $LC_{50}$  ו- $LC_{95}$  שחוללו שבעת התבדידים האלימים ביותר כלפי זחלי קפנודיס בהשוואה התכשיר המסחרי של *Btt*, תוצרת נובודור,

Isolate	$LC_{50}$ (95% CI)	$LC_{95}$ (95% CI)	Slope $\pm$ SD
U-13	3.2 (1.6 – 6.4)	134.8 (35.6 – 4,924)	1.01 $\pm$ 0.25
U-16	5.1 (2.5 – 16.9)	459.5 (68.0 – 575,228)	0.84 $\pm$ 0.25
U-40	4.0 (2.2 – 8.1)	364.8 (72.6 – 37,381)	0.84 $\pm$ 0.21
K-4	4.7 (2.7 – 8.9)	222.9 (58.2 – 7,165)	0.98 $\pm$ 0.23
K-7	1.9 (1.4 – 2.5)	25.6 (15.1 – 61.0)	1.47 $\pm$ 0.19
K-30	11.5 (4.4 -801)	3,312 (158.8 - $\infty$ )	0.67 $\pm$ 0.26
R-36	37.1 <sup>a</sup>	378,190 <sup>a</sup>	<sup>b</sup>
<i>Btt</i>	3.2 (1.9 – 5.6)	164.3 (49.9 – 2,296)	0.97 $\pm$ 0.19

LC values (mg protein per 1 gram diet) were determined after 1-week rearing on diets containing bacterial isolates.

<sup>a</sup> EC fiducial limits cannot be computed.

<sup>b</sup> Slope is not significantly different from zero.

לאחר חודש הזנה במזון שמכיל ריכוזים נמוכים של חיידקים (0.1 ו-1 מ"ג של חלבון לגרם של מצע מזון) נמדד משקלם של הזחלים ששרדו (טבלה 4; תמונה 1). משקלם הממוצע של זחלים שניזונו ממצע עם K-7 היה נמוך משמעותית ממשקלם של אלה שניזונו ממצע עם *Btt* או ללא תוספת חיידקים (Anova,  $F = 3.07$ ;  $df = 6, 148$ ;  $P = 0.07$ ). משקלם של הזחלים שגדלו על U-16 (בעל רעילות בינונית) היה בינוני.

**טבלה 4.** שיעור ההישרדות ומשקל הזחלים ששרדו בהתפתחות זחלי קפנודיס האבל על מצע המכיל אחד משלושה תבדידים של *Bt* בהשוואה לזחלים שהתפתחו על מצע ללא *Bt*.

isolate	Protein concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Mortality %	Larvae weight, mg ± SD <sup>a</sup>
K-7	0.1	40	103.2 ± 70.9 x
	1.0	43.3	74.5 ± 49.5 x
U-16	0.1	13.3	118.4 ± 56.5 xy
	1.0	16.7	113.5 ± 76.0 xy
<i>Btt</i>	0.1	21	141.4 ± 49.2 y
	1.0	36.7	135.8 ± 48.6 y
Control	0	6.7	145.4 ± 89.1 y

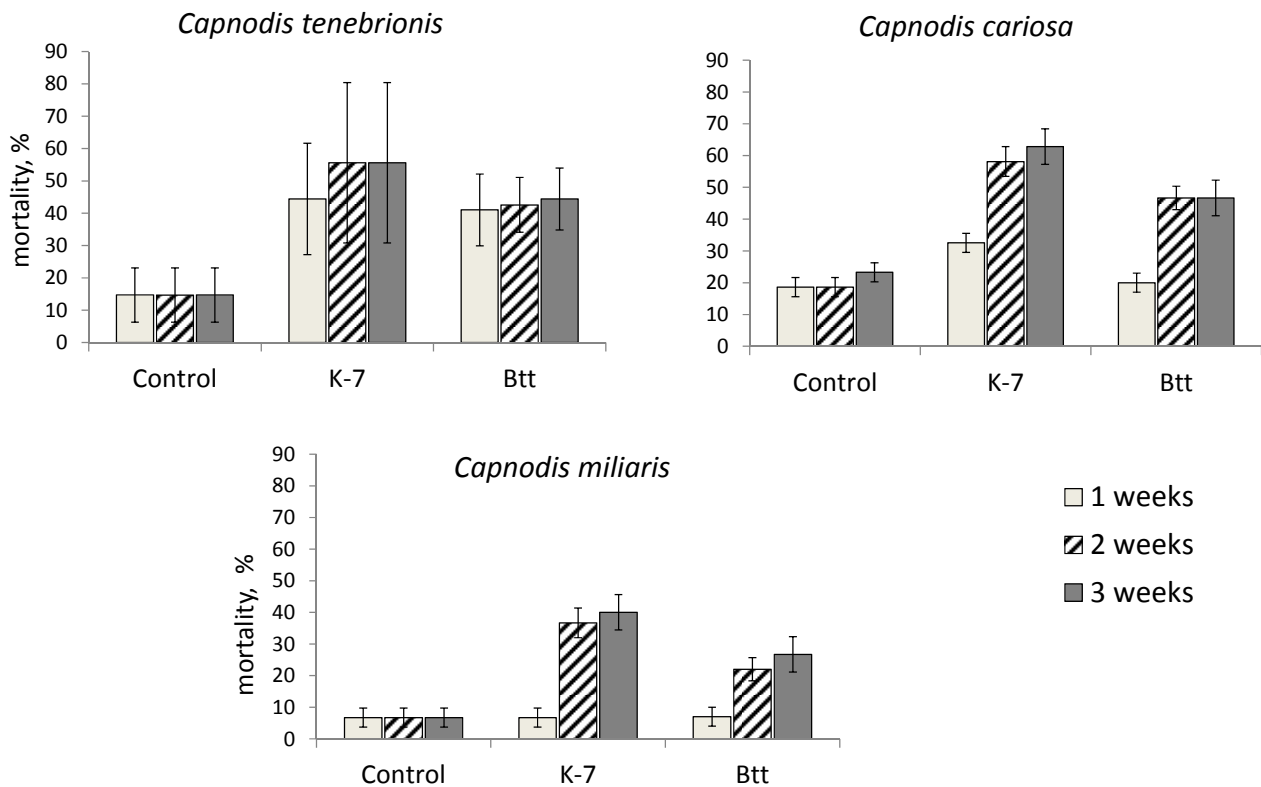
<sup>a</sup> An average from 17 to 30 neonates after 1 month rearing at 28°C.

Different letters within a column indicate significant difference ( $P < 0.01$ ).



**תמונה 1.** השפעת התבדיד K-7 שמקורו בתת מין לא מזוהה של *Bt* על התפתחות זחלי קפנודיס האבל. הניאונטים הועברו להתפתחות (28°C) בתוך מצע מזון מלאכותי שבו חלבון *Cry* שמקורו בתבדיד בריכוז של 1 מ"ג ל 1 גרם מצע. A - זחלים שהתפתחו על מצע בתוספת החלבון ו-B טיפול הביקורת, זחלים ללא תוספת החלבון. כל הזחלים הוצאו מהמצע לצורך הצילום שבועיים לאחר העברת הניאונטים למצע.





**תמונה 2.** השפעה של שני תבדידי *Bt*, *K-7* ו-*Btt* (שמקורו בתכשיר המסחרי נובודור) על שיעור התמותה הממוצע ( $\pm$ SD) של זחלים של שלושה מיני קפנודיס. במהלך שלושה שבועות של התפתחות על מצע מזון מלאכותי עם כל אחד מהתבדידים בהשוואה למצע ביקורת

### 3.2 רעילות של *Btt* ו-*K-7*: השוואה בין שלושה מיני קפנודיס

נמצאו תבניות תמותה דומות של התבדיד הרעיל ביותר *K-7* ו-*Btt* המסחרי נגד *C. cariosa*, *C. tenebrionis* ו-*C. miliaris* (עם מ"ג של חלבון *Bt* כולל לגרם של מזון) (תמונה 2). התמותה המרבית הושגה לאחר שבועיים. זחלי *C. cariosa* היו הרגישים ביותר לתבדידים שנבחנו. זחלי *C. tenebrionis* הראו תוצאות המאופיינות בשונות גבוהה יותר. בכל אחד מתת-המינים שנבחנו, *K-7* היה יעיל יותר מהזן המסחרי *Btt* (תמונה 2).

### 3.3 סריקה ואנליזה באמצעות PCR

מבין 28 התבדידים שנתנו תוצרי הגברה עם תחילי DNA ה-*Un7,8(d)* ו-*Un7,8(r)*, בשבעה הרעילים ביותר (טבלה 2 ו-3) בוצעה סריקה נוספת עם תחילים אוניברסאליים (טבלה 1) על מנת לזהות גנים *cry* ו-*cyt* נוספים הפועלים נגד החיפושיות. בסריקה זו נמצאו חמישה גנים נוספים (טבלה 5). מתוך ה-DNA של התבדיד *K-7* התקבלה הגברה באמצעות שני זוגות של פריימרים: *Un7/8* ו-*Un23* (טבלה 1); תוצר הגברה ראשון הראה הומוולוגיה של 82% לגן *cry9Ea*; השני היה זהה לגן *cry23Aa* (AF038048). הגנים *cry23Aa* ו-*cry37Aa* מאורגנים באופרון ומקודדים לחלבון דמוי-רעלן בינארי *Cry23Aa/Cry37Aa* (במשקל 29 ו-14 kDa בהתאמה) (Arantes and Lereclus 1991); שניהם הוגברו יחד ברצף אחד, הוחדרו לוקטור pHT315 לשם ביטוי תחת שני פרומוטורים חזקים (של *cyt1Aa*) ורוצפו בהמשך (KF501394). הגן

הראשון באופרון זהה ל- *cry23Aa* (AF038048) בעוד שבגן השני נמצא שוני בבסיס אחד לעומת *cry37Aa* (AF038049): C במקום T, הגורם לשינוי ניטרלי של A117V, שתיהן חומצות אמינו ניטרליות וא-פולאריות. שני הגנים מופרדים ברצף של 29 בסיסים (TAAATAACAAAAAAGGAAGGTTGATAAAA) (Donovan et al., 2002) ובו אתר קישור לריבוזום עבור *cry37Aa*.

**טבלה 5.** סריקה של תבדידי שדה של Bt באמצעות תחלים אוניברסליים לזיהוי גנים שמבטאים טוקסינים רעילים לחיפושיות.

<i>Bt</i> field-isolate	<i>cry</i> -type gene profile identified previously <sup>a</sup>	<i>cry</i> gene identified in this study <sup>b</sup>
K7	+	<i>cry23Aa</i> (100%, 259/259), <i>cry9Ea</i> (82%, 93/114)
U16	+, <i>cry1Aa</i> , - <i>Ab</i> , - <i>Ac</i> , - <i>Da</i> , <i>cry2Aa</i> , - <i>Ab</i> , <i>cry9Aa</i> , - <i>Ba</i>	<i>cry1Db</i> (86%, 330/384)
U40	+, <i>cry1Aa</i> , - <i>Ab</i> , - <i>Ca</i> , - <i>Da</i> , <i>cry2Ab</i> , <i>cry9Ea</i>	-
U13	+, <i>cry2Ab</i>	<i>cry9Ea</i> (88%, 328/372)
K4	+	<i>cry9Ea</i> (98%, 328/334)
K30	+	<i>cry8La</i> (89%, 343/385)
R36	+	<i>cry8Ia</i> (94%, 223/236)

<sup>a</sup> From Ben-Dov *et al.*,<sup>36</sup> +, positive with universal primers Un7,8(d) and Un7,8(r).

<sup>b</sup> *cry23Aa* was amplified with Un23 pair of primers; *cry9Ea*, *cry1Db* and *cry8Ia* were amplified with Un7/8; in parenthesis, percent homology to *cry* of sequenced amplicons and absolute number of identical bases); -, no amplicon produced with universal primers used from Table 1

חלבון *Cry23Aa* המשוער (בגודל של 267 חומצות אמינו), שבודד מתוך גיל SDS-PAGE, הועבר עיכול אנזימטי על ידי כימוטריפסין. 9 מתוך 10 פפטידים שהתקבלו (המסתכמים ב- 244 חומצות אמינו) היו זהים לאלה של *Cry23Aa*. הפפטיד החסר (שאורכו 43 חומצות אמינו בעמדות 103-145) ארוך מדי לאנליזה בשיטה זו היות שאינו מכיל אתר חיתוך לכימוטריפסין.

DNA מהתבדידים U-16 ו- U-40 איפשרו הגברה למקטעים מתאימים עם תחילים Un7/8 אך לא עם פריימרים אחרים (טבלה 1). המקטע המוגבר מתוך U-16 הציג הומולוגיה של 86% ל-*cryDb*. שני התבדידים, רעילים במיוחד נגד קפנודיס האבל (טבלאות 2 ו-3), ידועים כמכילים שילובים שונים של קבוצות *cry2*, *cry1*, *cry9* (טבלה 5).

הרצף של המקטע המוגבר מתוך ה-DNA של תבדיד R-36 עם הפריימרים Un7/8 הראה זהות של 94% לגן *cry8Ia*. הגן כולו הוגבר, שובט, רוצף (JX282317), הוגדר כגן חדש ונקרא *cry8Ra1* (Crickmore et al, 1998).

קביעת הרעילות לזחלי קפנודיס של חלבונים קוטלי חרקים מ-*Bt* מוצגת כאן לראשונה והתאפשרה בזכות השימוש מצע מזון מלאכותי שפותח על מנת לגדל את זחלי הקפנודיס (Gindin et al, 2009) ובאמצעות האוסף הזמין של תבדידי שדה של *Bt* (Ben-Dov et al, 1997).

רעלני *Bt* קוטלי חרקים מחולקים בין שלוש רמות של רעילות: גבוהה, כאשר ערכי  $LC_{50}$  נעים בטווח של 0.01-0.10 מ"ג חלבון לגרם מצע מזון; בינונית, בטווח של 0.10-10 מ"ג לגרם; נמוכה, בטווח של 1,000-10 מ"ג לגרם (Frankenhuyzen, 2013 van). רמות הרעילות של חלבוני *Cry* לזחלי חיפושיות בדרך כלל נמוכות מאלה נגד זחלי פרפרים. חלבוני *Cry* בדרך כלל נבחנים על משטחי עלים, בעוד שהבחנים הביולוגיים בעבודה זו שולבו בתוך מצע מזון מלאכותי. לדוגמא,  $LC_{50}$  של *Cry3* מנוקה שפוזר על עלה הוא 0.18 מיקרוגרם לס"מ<sup>2</sup>; כדי לתרגם את הריכוז לנפח המשקל המצע, משתמשים ביחס 1:30 בין פני השטח לבין נפח מצע ולכן מתקבל ערך של 5 מיקרוגרם של רעלן מבודד לגרם מצע (Frankenhuyzen, 2013 van). ערכי  $LC_{50}$  בתבדידים היעילים שנמצאו במחקר זה הם הרבה יותר נמוכים – 1.9 מיליגרם לגרם מצע במקרה של התבדיד K-7 (טבלה 3), אולם ביחידות של 'חלבון כולל' (סה"כ חלבון מהתבדיד). ערך זה נמוך בכ-40% מהערך של *Btt* באותם התנאים (3.2 מ"ג לגרם). כך, זיהינו את K-7 תבדיד *Bt* שהוא קטלני יותר מ *Btt* המסחרי, שמייצר *Cry3Aa* כרעלן העיקרי (Sanahuja, 2011). האופרון *cry23Aa/cry37Aa*, שמקודד לרעלן בינארי (binary toxin) עם 29 הבסיסים שבין שני הגנים, בודד מ-K-7 ורצף בסיסיו הופקד ב-NCBI (בשם KF501394). שני הגנים נמצאו זהים לאלה שפורסמו (AF038048 ו-AF038049) פרט לבסיס אחד ב-*cry37Aa*. זן בר של *Bt* שמבטא את הרעלן הבינארי הזה הינו טוקסי ( $LC_{50} = 258.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) גם לחידקונית *Diaprepes abbreviates*, מזיק שזחליו מתפתחים על שורשי הדריים בפלורידה הפוגע קשות בפרדסים שם (Weathersbee et al, 2006), ויתכן שניתן להדבירו באמצעות כנות מותמות. כך לדוגמא צמחי תירס מותמרים שמבטאים את *cry3Bb1* (Al-Deeb and Wilde, 2005) או את הרעלן הבינארי *cry34Ab/cry35Ab* (Moellenbeck, 2001) מגנים על הצמחים מפני חיפושית העלים *Diabrotica virgifera* שזחליה פוגעים בשורשי צמחי תירס.

רבים מרעלנים אלו מהם סינרגיסטיים ביניהם (van Frankenhuyzen, 2013), מראים לפעמים פעילות נגד מיני חרקים המשתייכים לסדרות שונות. למשל, רעלני *Cry9* פועלים בעיקר נגד פרפרים, אולם *Cry9Da* פועל גם נגד חיפושיות ממשפחת הזבליות (Asano 1996; Iizuka et al. 1996). יתכן שצירופים כאלה, שכוללים *cry9* (טבלה 5), תורמים לרעלניות של 5 תבדידים נגד זחלי קפנודיס האבל (טבלה 3).

רעלנים דמויי-*Cry8* פועלים נגד מספר מיני חיפושיות מזיקות (Ohba 1992; Asano et al. 2003; Yamaguchi et al. 2008; Huang et al. 2007; Yu et al. 2006). בעבודה זו גילינו גן חדש *cry8Ra* (JX282317) בתבדיד R-36 שמראה רעילות נמוכה נגד זחלי קפנודיס האבל (טבלה 3).

ולסיכום, היקף המטעים הגלעיניים עולה והולך במדינות הים התיכון ודרום אירופה. מיני קפנודיס, ובעיקר קפנודיס האבל הם מהמזיקים ההרסניים ביותר של תעשייה זו. מימשקי הדברה המבוססים על שימוש בפרומונים וחומרים אחרים מכווני התנהגות חרקים, או הדברה ביולוגית על גוונה השונים הן הגישות מקובלות בכל הנוגע לגישות ידידותיות לסביבה כנגד מזיקים בחקלאות או ביער. אולם גישות אלו אינן יעילות בד"כ כשמדובר בחרקים הנוברים בעומק רקמות השלד של העץ ובעיקר בשורשים. מבין שיטות ההדברה הידידותיות לסביבה

הבאות בחשבון להדברה יעילה של זחלי הקפנודיס, שימוש בכנות עמידות הוא המבטיח ביותר מהווה את הפתרון האופטימאלי. הרכבת עצי פרי על כנות מיוחדות להשגת עמידות כנגד גורמים ביולוגיים או פיזיקאליים כימיים בקרקע היא גישה חקלאית קלאסית. גישה זו היא בשימוש נרחב בכל הקשור לעמידות עצי פרי גלעיניים כנגד נמטודות (Lu et al, 1998). כנות שקד או כנות מיכלוא עם "דם" שקד יושמו במקומות רבים להשגת עמידות מסוימת כנגד קפנודיס (Mulas 1994). עמידות חלקית זו הושגה בעיקר בשל העמידות ליובש של הכנה, ולא כפי שהיה מקובל לחשוב בשל הרמות הגבוהות יחסית של תרכובות ציאנוגלוקוזידיות שיש בשורשי השקד ( Mendel et al, 2003). שני הגנים שזוהו בעבודת המחקר עשויים לשמש להגברה ביטוי של העמידות משותפת (pyramiding expression) יחד עם גנים אחרים בגלעיניים להקניית עמידות גבוהה ואף חסינות כנגד זחלי הקפנודיס. התוצאות שהושגו מדגימות את הרגישות הגבוהה של זחלי קפנודיס לטוקסינים שמקורם בתת מינים אחדים של Bt. שיבוט של גנים אלו וביטויים בכנות מובחרות של גלעיניים עשויים לקנות חסינות של העצים המורכבים בהן לקפנודיס ובכך להעמיד פתרון לבעיה הקשה שמעמידה קבוצת מזיקים זו לתעשיית הגלעיניים.

## הבעת תודה

אנו מודים לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות על מימון המחקר.

## ספרות מצוטטת

1. Al-Deeb, M. and Wilde, G. (2005). Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin on western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) biology. *J Kansas Entomol Soc* 78:142–152.
2. Arantes, O. and Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108:115–119.
3. Asano, S. (1996). Identification of *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* by PCR and isolation of unique insecticidal bacteria. *Mem Fac Agric Hokkaido Univ* 19:529–563.
4. Asano, S., Yamashita, C., Iizuka, T., Takeuchi, K., Yamanaka, S., Cerf, D. and Yamamoto, T. (2003). A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biol Control* 28:191–196.
5. Asokan, R., Swamy, H., Thimmegowda, G. and Mahmood, R. (2013). Diversity analysis and characterization of Coleoptera-, Hemiptera- and Nematode-active *cry* genes in native isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Ann Microbiol* DOI 10.1007/s13213-013-0636-7.
6. Ben-Dov, E., Manasherob, R., Zaritsky, A., Barak, Z. and Margalith, Y. (2001). PCR analysis of *cry7* genes in *Bacillus thuringiensis* by the five conserved blocks of toxins. *CurrMicrobiol* 42:96–99.

7. Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khameaev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 63:4883–4890.
8. Ben-Yehuda, S., Assael, F. and Mendel, Z. (1997). Recent outbreaks of phloem- and wood-boring insects in deciduous orchards in Israel. *Phytoparasitica* 25:163–164.
9. Ben-Yehuda, S., Assael, F. and Mendel, Z. (2000). Improved chemical control of *Capnodis tenebrionis* L. and *C. carbonaria* Klug (Coleoptera: Buprestidae) in stone-fruit plantations in Israel. *Phytoparasitica* 28:27-41.
10. Berliner, E. (1911). Ueber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe. *Z Gesamte Getreidewesen* 3:63–70.
11. Bonsignore, C. and Vacante, V. (2009). Ilproblema di *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus) neifruttiliferi. *Protezionedelle Colture* 5:18–25.
12. Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lin, L., Villalobos, F., Pena, G., Nunez-Valdez, M., Soberon, M. and Quintero, R. (1998). Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64:4965–4972.
13. Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van-Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* toxin gene nomenclature. Web site [www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).
14. de Altube, M., Strauch, O., de Castro, G. and Pena, A. (2008). Control of the flat-headed root borer *Capnodis tenebrionis* (Linne) (Coleoptera : Buprestidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Nematoda: Steinernematidae) in a chitosan formulation in apricot orchards. *Biocontrol* 53:531-539.
15. de Maagd, R., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* 17:193-199.
16. de Maagd, R., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. and Schnepf, H. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37: 409–433.
17. Donovan, W., Slaney, A. and Donovan, J. (2002). *Bacillus thuringiensis* cryET33 and cryET34 compositions and uses thereof. US Patent No.549839. Monsanto Technology LLC.
18. Ejiofor, A. and Johnson, T. (2002). Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitates in the South Central United States. *J IndMicrobiol Biotechnol* 28:284–290.

19. Farivar-Mehin, H. (1997). Biological study of the pistachio root beetle, *Capnodis cariosa* Hauseri, in *Proceedings of the Second International Symposium on Pistachios and Almonds*, Davis (California, USA), 24-29 August.
20. Finney, D. (1971). The comparison of effectiveness, in *Probit Analysis*, 3rd edition, pp. 100-124. Cambridge: Cambridge University Press.
21. García del Pino, F. and Morton, A. (2005). Efficacy of entomopathogenic nematodes against neonate larvae of *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae) in laboratory trials. *Biocontrol* 50:307-316.
22. Garrido, A. (1984). Bioecology of *Capnodis tenebrionis* L. (Coleop.:Buprestidae) and approaches to its control. *Boletín - Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica* 10:205–221.
23. Gindin, G., Kuznetsowa, T., Protasov, A., Ben Yehuda, S. and Mendel, Z. (2009). Artificial diet for two flat headed borers, *Capnodis* spp. (Coleoptera: Buprestidae). *Eur J Entomol* 106:573-81.
24. Huang, D., Zhang, J., Song, F. and Lang, Z. (2007). Microbial control and biotechnology research on *Bacillus thuringiensis* in China. *J InvertebrPathol* 95:175–180.
25. Iizuka, T., Sasaki, J., Asano, S. and Yamamoto, T. (1996). Screening and cloning of novel toxin genes from *Bacillus thuringiensis* strains encoding a highly scarabecidal protein, in *SIP*, ed. 29th Annual Meeting of the SIP and Third International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*, Cordoba, Spain, p. 38.
26. Ishiwata, S. (1901). On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* 9:1–5. (In Japanese).
27. Jua'rez-Pe'rez, V., Ferrandis, M. and Frutos, R. (1997). PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl Environ Microbiol* 63:2997–3002.
28. Karadag, S., Mart, C. and Can, C. (2006). Species belonging to the family *Buprestidae* in pistachio orchards and some biological properties of *Capnodis cariosa* (Haus.). *Acta Hort (ISHS)* 726:545–550.
29. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J BiolChem* 193:265–275.
30. Lu, Z., Reighard, G., Nyczepir, A., Beckman, T. and Ramming, D. (1998). Inheritance of resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Acta Hort* 465:111-116.
31. Marannino, P. and de Lillo, E. (2007). The peach flatheaded rootborer, *Capnodis tenebrionis* (L.), and its enemies, IOBC/wprs Bulletin 30, pp. 197–200.

32. Marannino, P., Santiago-Álvarez, C., de Lillo, E. and Quesada-Moraga, E. (2006). A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera; Buprestidae). *J Invertebr Pathol* 93:210-213.
33. Marannino, P., Tarasco, E. and de Lillo, E. (2004). Biological notes on larval hatching in *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera:Buprestidae) and evaluation of entomopathogenic nematodes in controlling neonate larvae. *Redia* 86:101-106.
34. Margalith, Y. and Ben-Dov, E. (2000). Biological Control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, in *Insect pest management: techniques for environmental protection*, ed. by Rechcigl JE and Rechcigl NA. CRC Press LLC, Boca Raton, pp 243–301.
35. Marquez, L., Helmann, J., Ferrari, E., Parker, H., Ordal, G. and Chamberlin, M. (1990). Studies of s<sup>D</sup>-dependent functions in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 172:3435–3443.
36. Mendel, Z. (2002). *Capnodis tenebrionis* and *C. carbonaria*, in *Plant Pests of the Middle East*, eds. Appelbaum SW and Gerson UA, (e-book: [www.agric.huji.il/mepests](http://www.agric.huji.il/mepests)). Publication of the Hebrew University of Jerusalem.
37. Mendel, Z., Assael, F. and Ben-Yehuda, S. (2003). Host selection and root colonization by two stone-fruit tree borers (Coleoptera: Buprestidae) and their relation to level of cyanogenic compounds. *Annu J Entomol* 96:127-134.
38. Moellenbeck, D., Peters, M., Bing, J., Rouse, J., Higgins, L., Sims, L., Nevshemal, T., Marshall, L., Ellis, R., Bystrak, P., Lang, B., Stewart, J., Kouba, K., Sondag, V., Gustafson, V., Nour, K., Xu, D., Swenson, J., Zhang, J., Czapla, T., Schwab, G., Jayne, S., Stockhoff, B., Narva, K., Schnepf, H., Stelman, S., Poutre, C., Koziel, M. and Duck, N. (2001). Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. *Nat Biotechnol* 19:668-672.
39. Mulas, M. (1994). Almond genetic resources and resistance to *Capnodis tenebrionis*. *Acta Hort* 373:41-48.
40. Nazarian, A., Jahangiri, R., Jouzani, G., Seifinejad, A., Soheilvand, S., Bagheri, O., Keshavarzi, M. and Alamisaeid, K. (2009). Coleopteran specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. *J Invertebr Pathol* 102:101–109.
41. Ohba, M. (1992). A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serover *japonensis* with a high larvicidal activity specific for scabaeid beetles. *Lett Appl Microbiol* 14:54–57.
42. Rivnay, E. (1944). Physiological and ecological studies on the species of *Capnodis*, in Palestine (Col., Buprestidae): I. Studies on the eggs. *Bull Entomol Res.* 35:235-242.

43. Rivnay, E. (1945). Physiological and ecological studies on the species of *Capnodis*, in Palestine (Col., Buprestidae): II. Studies on the larvae. *Bull Entomol Res.* 36:103-119.
44. Rivnay, E. (1946). Ecological and physiological studies on *Capnodis* spp. (Col., Buprestidae) in Palestine: III. Studies on the adult. *Bull Entomol Res.* 37:273-280.
45. Salazar, D., Miro, M. and Garcia, S. (1991). Rootstocks for dry region apricot tree faced with *Capnodis tenebrionis* L. *ActaHort* 293:401-404.
46. Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R., Capell, T. and Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 9:283–300.
47. Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. and Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775-806.
48. Tamez-Guerra, P., Iracheta, M., Pereyra-Alferez, B., Galán-Wong, L., Gomez- Flores, R., Tamez-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C. (2004). Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and coleopteran larvae. *J Invertebr Pathol* 86:7–18.
49. van Frankenhuyzen, K. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *J Invertebr Pathol* 114:76–85.
50. Weathersbee, A., Lapointe, S. and Shatters, R. (2006). Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates against *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) *Fla Entomol* 89:441-448.
51. Yamaguchi, T., Sahara, K., Bando, H. and Asano, S. (2008). Discovery of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D-class proteins against scarab beetles. *J Invertebr Pathol* 99:257-262.
52. Yu, H., Zhang, J., Huang, D., Gao, J. and Song, F. (2006). Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain 185 toxic to the Asia cockchafer: *Holotrichiapa rallela*. *Curr Microbiol* 53:13-17.



## סיכום עם שאלות מנחות

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b>
מטרות המחקר: איפיון הרעילות של תבדידי Bt כנגד זחלי הקפנודיס, וזיהוי גנים המעורבים בביטוי טוקסינים של Bt כנגד זחלי חיפושיות.
<b>עיקרי הניסויים והתוצאות.</b>
תבדיד של <i>Btt</i> הראה ערכי $LC_{50}$ ו- $LC_{95}$ של 3.2 ו- $164 \text{ mg g}^{-1}$ בהתאמה כנגד זחלים צעירים של קפנודיס האבל. בעוד שערכי התבדיד הרעיל ביותר שנמצא, K-7, היו נמוכים (ויעילים יותר) באופן מובהק, 1.9 ו- $25.6 \text{ mg g}^{-1}$ בהתאמה. משקל הזחלים ששרדו חודש לאחר הזנה בריכוזים נמוכים של התבדיד הזה ( $0.1 \text{ mg g}^{-1}$ ) היה נמוך ממשקל זחלים שהוזנו ב- <i>Btt</i> או כאלה שלא עברו טיפול. כמו-כן, K-7 היה רעיל נגד זחלים של מיני קפנודיס אחרים, קפנודיס האלה <i>C. cariosa</i> וקפנודיס הצפצפה <i>C. miliaris</i> . מצאנו שהתבדיד K-7 נושא גנים דמויי-Cry9Ea ולרעלן הבינארי Cry23Aa/Cry37Aa.
<b>מסכנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</b>
רוב מטרות המחקר לשנה זו הושגו
זחלים שלושה מיני הסוג <i>Capnodis</i> , המוגנים בטבע מפני אויבים טבעיים, רגישים לרעלני Cry של Bt. לכן, ביטוי של גנים cry פעילים נגד מזיקים אלה נראה כפתרון בר-ביצוע במסגרת יצירה של כנות עצים מותמרות עמידות לנוברים אלה.
<b>בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?</b>
בשלב מאוחר יותר גנים אלו ישובטו לצורך ביטויים הספציפי ב- <i>E. coli</i> . זאת על מנת לבחון כל אחד מהם באופן ספציפי.
<b>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח</b>
לא רלוונטי
<b>פרסום הדוח: אני ממליצה בשלב זה</b>
אפשרי 