

דוח לתכנית מחקר מספר 10-1443-131

פיתוח מערכת ניטור והדברה של הסס הזכוכי, *Synanthedon vespiformis* באמצעות פרומון המין של המזיק ובחינת הקשר להעברת החיידק אגרובקטריום

Development of monitoring and control system for the clearwing *Synanthedon vespiformis* using the sex pheromone of the pest and its association with *Agrobacterium tumefaciens*

מוגש לקרן המדען צוות היגוי: דחיקת חומרי הדברה בחקלאות

ע"י

ענת זאדה¹, עזרא דונקלבלום¹, צבי מנדל¹, גלינה גינדין¹, שולמית מנוליס², אלכס פרוטסוב¹, שאול בן יהודה³

¹המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי

²המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי

³האגף להגנת הצומח, שה"ם

בשיתוף עם דניאלה פפר, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי

מאי 2011

אייר תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

*

תקציר

1. הצגת הבעיה. אוכלוסיית הסס הזכוכי, *Synanthedon vespiformis*, מופיעה בעשור האחרון בצפיפות גבוהה במטעי עצי פרי גלעיניים וגורמת נזק לעצים. הדברת הסס אינה יעילה ופעילותו מתחדשת זמן קצר לאחר הריסוסים. קיים חשש שהסס מעורב בהפצת החיידק האגרובקטריום הגורם לגידולי אגרובקטריום.

2. מטרות המחקר. (1) לגדל את הסס במעבדה על קרקע מזון, (2) לזהות את הפרומון המין של הסס וזאת באמצעות איסוף הפרומון, ברור מרכיבי הפרומון הטבעי והיחס הטבעי בין שני האיזומרים שזוהו, באמצעות GCMS (3) פיתוח מערכת לניטור והדברה של המזיק באמצעות פיתיונות פרומון (4) בחינת אפשרות 'בלבול' של אוכלוסיית הסס (5) בחינת ההתאמה בין לכידת הסס לנגיעות העצים באגרובקטריום.

3. שיטות העבודה. מלכודות עם נדיפיות בהן הוספו הרכבים ומינונים שונים של פרומונים של שני מיני ססי זכוכי אחרים המושכים את המזיק הוצבו במטעים באזורים שונים ונבדקה לכידת העשים באמצעותן. כמו כן נבדקה ההשפעה של התיישנות הנדיפיות על הלכידה והתעופה העונתית של המזיק בחלקות הנטועות במינים אחדים של גלעיניים נלמדה באמצעות לכידה במלכודות הפרומון. בנוסף בדקנו את התכונות הבלבול באמצעות תליית נדיפיות פרומון מסחריות במטע. לצורך זה השונו בין לכידת מלכודות פרומון מתוגברות-מינון בחלקות המבולבלות ובחלקות ביקורת. במקביל בדקנו את קצב השחרור של הפרומון מהנדיפיות לבלבול על מנת לקבוע את משך הפעילות של הנדיפיות וכן כדי לאשר שבזמן הפעלת הניסוי הנדיפיות שחררו פרומון הכמות הנדרשת. לשם גידול הסס התנאי מעבדה פותחה קרקע מזון מיוחדת לו. זחלי הסס הובאו למעבדה ממטע בכפר תבור, גודלו על מצע המזון ועם הגחתם הנקבות הופרדו מהזכרים. בלוטות הפרומון של הנקבות נחתכו בשעת ה-calling ומוצו בתוך ממס. התמיסה עברה אנליזה ב-MS על גבי שני סוגי קולונות והפרומון זוהה על פי הספקטרום שלו וע"י השוואה לסטנדרטים. על מנת לבחון האם הסס נושא את החיידק אגרובקטריום נאספו במטעים זחלים ובוגרים של המזיק ונוכחות החיידק נבדקה בעזרת PCR. הזיקה שבין הנגיעות בחיידק לפני פעילות של הסס הזכוכי נבחנה ע"י דגימה נגיעות העצים באגרובקטריום ובסס. הערכת הנגיעות באגרובקטריום נקבעה על פי מידת הפגיעה סביב צוואר השורש, ועל פי הופעת גידולים של החיידק על נוף. הערכת צפיפות האכלוס ממוצע לעץ ע"י זחלי הסס הזכוכי נקבעה על סמך מספר נקודות הפעילות של הזחלים סביב היקף הגזע.

4. תוצאות עיקריות. פותחה קרקע מזון מתאימה לסס. החומרים שזוהו בבלוטות הפרומון של הנקבות מהגידול היו E3,Z13-18:Ac ו-Z3,Z13-18:Ac. יחס האיזומרים שנמצא הוא 2:8 בקרוב, 83% E3,Z13-18:Ac ו-17% של Z3,Z13-18:Ac. מינון של 1 מ"ג בפיתיון פעיל למעלה מ-10 חודשים ומלכודת IPS טובה יותר ממלכודת דבק משולשת בניטור הסס. נדיפיות מסחריות לבלבול עם יחס מרכיבים 2:1 גרמו למיסוך מוחלט של מלכודות לניטור. נמצאה התאמה בין הסס לחיידק האגרובקטריום שהתבטאה בלכידת זכרים ונזק בעצים בחלקות נגועות. החיידק אגרובקטריום נמצא

במטעים צעירים וותיקים בכל חלקי העץ. החיידק בודד מזחלי הסס ונמצא גם על זכרים בוגרים. נקבות בוגרות טרם נבדקו, השאלה האם העש מעביר את החיידק נותרה פתוחה.

5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות.

המחקר הנוכחי יצר כלי ממשקי חדש לניטור הסס הזכוכי הכולל פיתיון המבוסס על פרומון המין של הסס הזכוכי, כפי שנמצא מניתוח נקבות שהתפתחו על קרקע מזון מלאכותי. הזיקה בין הסס לאגרובקטריום היא דוגמא ראשונה לזיקה בין מזיק לחיידק ולכן לכידה של הסס הזכוכי יכולה לשמש כאינדיקציה לפגיעה ע"י החיידק.

מבוא ורקע מדעי

בשנים האחרונות נפגעו מטעי גלעין בגליל התחתון, בחוף כרמל ובשפלה הפנימית, ע"י זחלי סס זכוכי, *Synanthedon vespiformis* הנוברים בסות (קורטקס) של השורשים העליונים ובבסיס הגזע (1). הנזק נצפה בעיקר במטעי אפרסק, נקטרינה ושקד, לעיתים קרובות נמצאו הזחלים בתוך גידולי עפץ שנגרמו ע"י החיידק אגרובקטריום (*Agrobacterium tumefaciens*). נבירות זחלי העש היו לעיתים שטחיות ולעיתים עמוקות ולו בהפרשות של גללים חומים-שחורים, לעיתים בצרוף הפרשת גומי ("שרף") במוקדי הנגיעות. עצים שניזוקו קשה איבדו חלק ניכר מנפח העלווה כתוצאה מהחלשת העץ. חלק מהמגדלים יישמו בחלקות שנפגעו על ידי הסס תכשירי הדברה חריפים. למרות זאת, נצפתה התחדשות הפעילות של המזיק זמן לא רב לאחר הטיפול. הזיקה בין הסס לחיידק האגרובקטריום מוכרת, ונרשמה גם באזורים אחרים באגן הים התיכון (2). חיידק זה הוא שוכן קרקע וגורם למחלת עפצים (crown gall) בגלעיניים שונים. לעיתים קרובות נגרמים נזקים כלכליים ניכרים כתוצאה מפתוגן זה (3). בישראל המחלה גורמת לעיתים נזקים רציניים במשתלות ובמטעים של גלעיניים בעיקר על אלה המורכבים על כנות שקד. השאלה האם העשים מעורבים בהפצה ואילוח בעצים בחיידק טרם נבדקה.

למרות שעש זה היה ידוע בארץ זה מכבר (4), רק בעשור האחרון הפך הסס הזכוכי מזיק קשה במטעי גלעין. פרומון המין של הסס הזכוכי לא זוהה עד היום. זוהו פרמוני מין של מינים אחרים מהסוג *Synanthedon* הכוללים יחד מספר קטן של מרכיבים – בעיקר אצטטים בלתי רוויים של 18 פחמונים (5, 6). המרכיבים אלו לכדו במטעים זכרים של מיני *Synanthedon* אחדים וביניהם גם את העש הזכוכי, מין סס זה נלכד בעיקר באמצעות תערובת של E3,Z13-18:AC ו-Z3,Z13-18:AC ביחס של 1:9 (7,8). בניסויים הקדמיים שבוצעו בקיץ 2006 מצאנו שבאמצעות תערובת של שני המרכיבים הנ"ל ביחס של 1:9 או 2:8 במלכודת יבשה מטיפוס IPS מתקבלת לכידה רבה של הזכרים של העש הזכוכי בישראל (1). שני המרכיבים חיוניים ללכידה, כל מרכיב בנפרד אינו מושך.

בשנת המחקר הראשונה עסקנו באופטימיזציה של הפיתיון ומלכודות הפרומון. מצאנו שמלכודת IPS טובה יותר ממלכודת דבק משולשת בניטור הסס. אמנם תערובת הפרומון המיטבית בניטור הסס הזכוכי היא זו של שני המרכיבים E3,Z13-18:Ac ו-Z3,Z13-18Ac ביחס 1:9, אך היות שהיחס הזה

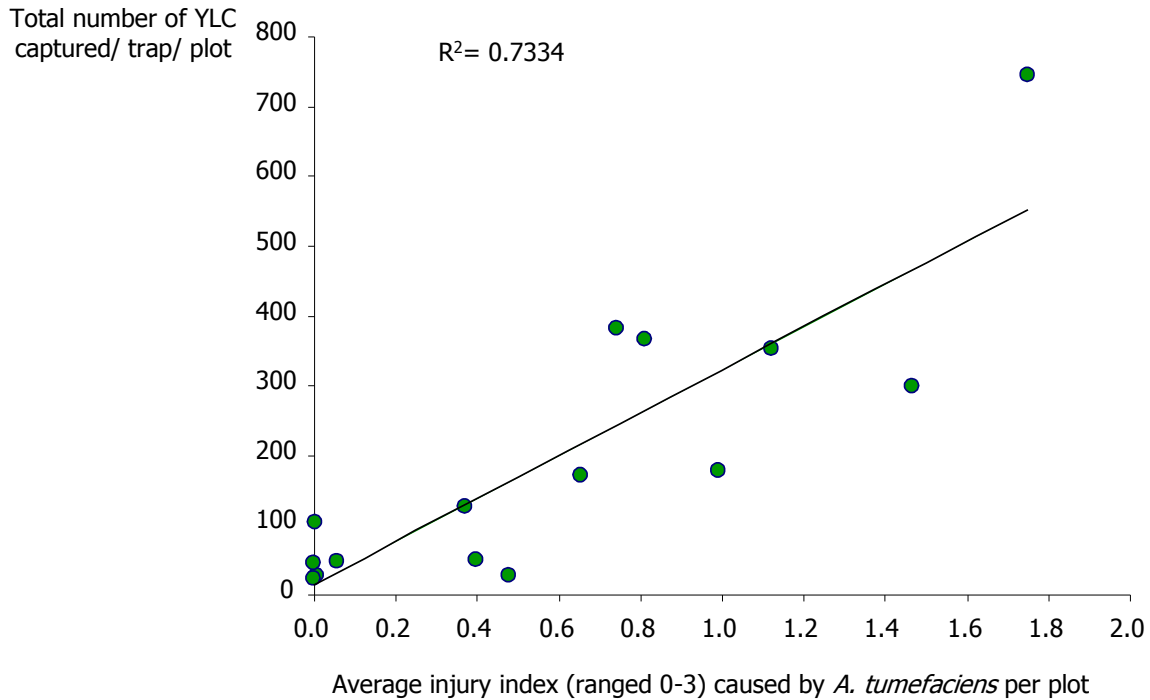
אינו קיים בתערובות המסחריות, מצאנו כי ניתן ללכוד באמצעות תערובת 8:2 שהיא טובה למעשה באותה מידה. בהתאם לכך התערובת המסחרית של החומרים שימשה אותנו בניסויים הבאים. הלכידה עלתה עם הגדלת המינון מ 0.2 ועד 4 מ"ג פרומון בנדיפית, כאשר המינון של 4 מ"ג נתן את הלכידה הגבוהה ביותר. בניסיון לברר מה גובה המינון הנדרש להדגמת דחייה, לא הגענו לגבול הלכידה העליון כאשר המינון הגבוה ביותר שנבחן היה 16 מ"ג, והלכידה עלתה עם הגדלת המינון גם בניסוי זה. מינון של 16 מ"ג פרומון בנדיפית הוא קרוב לזה של מינון המשמש לבלבול בעשים (עשרות מ"ג). אנו מניחים שהיות ומרכיבי הפרומון של הסס הם כבדים מאד ביחס לפרומונים אחרים וכן מינון גבוה יותר של הפרומון המוספג בנדיפיות הגומי "הרגילות" אינו מפריע על מנת לקבל את שובל הריח של הפרומון אליו מתכוונים הזכרים. ההסבר מתאים גם לתוצאות בדיקת ההתיישנות של נדיפיות הגומי שהכילו 1 מ"ג של תערובת 4:1; לא היו הבדלים מובהקים בין הנדיפיות בגילאים השונים. כלומר, קצב שחרור הפרומון לא הושפע מגיל הנדיפית, לפחות בטווח של 10 שבועות של התיישנות, בשל מרכיבי הפרומון הכבדים וקצב שחרורם האיטי.

נבדקה גם הפעילות העונתית של המזיק בשני אזורים - כפר תבור וכרם מהר"ל. בכפר תבור נצפו שני שיאים של לכידה, האחד בתחילת יוני והשני בתחילת אוגוסט. בכרם מהר"ל שיא הלכידה היה בסוף יוני ובסוף אוגוסט עם חפיפה רבה יותר של הגלים. נתוני הלכידות מוינו לפי הזן הגלעיני הנטוע: בכפר תבור נרשמה לכידה רבה יותר בחלקות שזיף ובחלקות נקטרינה. בכרם מהר"ל נרשמה הלכידה הרבה ביותר בחלקות השזיף והאפרסק.

כ"כ בוצעו בדיקות להבנת הקשר בין האגרובקטריום לסס. מתוך 15 בוגרים לא זוהו חיידקי אגרובקטריום באף לא אחד מהבוגרים בעוד שמתוך 10 זחלים, רק בשניים נמצאו חיידקים. למרות גודל הדגימה הקטן, נראה היה שהחיידקים לא נישאים על הזכרים הבוגרים אלא רק על הזחלים. במידה ויקבע שהבוגרים אינם נושאים את חיידקי האגרובקטריום, הרי שאין הסס קשור להפצת מחלת העפצים. בהקשר לכך, ראוי לציין שבחלקות תצפית אחדות נצפו מוקדים נגועים בזחלי הסס גם ללא סימנים אופייניים של גידולים שנגרמים מאגרובקטריום.

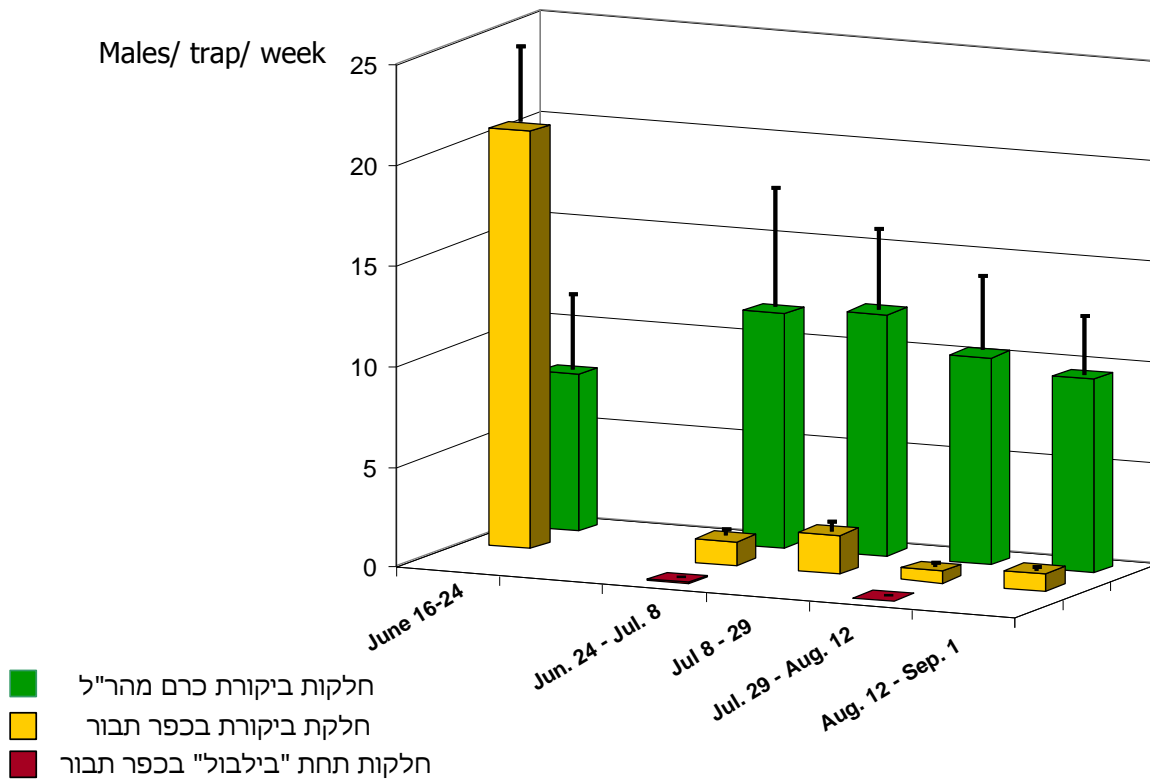
במהלך השנה השנייה הניסויים התמקדו בביסוס הקשר בין נגיעות האגרובקטריום לנגיעות בסס בהיבט של מיני וזני גלעיניים, בבידוד החיידקים מחלקי הגוף של הסס הבוגר, בלימוד התעופה העונתית ובביצוע ניסויים לבדיקת התכונות הבלבול באמצעות נדיפיות שהכילו הרכב פרומון שנמצא מושך את הזכרים במלכודות לניטור בשנת המחקר הראשונה. בניסוי לבדיקת שכיחות העצים הנגועים בסס או באגרובקטריום החלקות הנגועות ביותר היו חלקות הנקטרינה, בהן למעלה מ-40% מהעצים היו נגועים בסס. בחלקות אלה שעור הנגיעות ע"י אגרובקטריום עלה על 60%. כ"כ נמצאה קורלציה גבוהה בין הנגיעות בסס לחיידק (ציור 1). ברב הדגימות של זחלים והגידולים זוהו חיידקי אגרובקטריום. פעילות התעופה העונתית של הסס הזכוכי נקבעה באמצעות לכידה במלכודות הפרומון, באמצעותן נראו תנודות במהלך הגיחה והפעילות של הסס תוך דגש על ארבעת שיאי פעילות שהתקבלו בשתי שנות הדגימה.

ציור 1: הקורלציה בין דרגת הנגיעות ע"י החיידק לבין לכידות הסס



בנוסף בדקנו את התכנות הבלבול לאחר תליית נדיפיות פרומון במטע. תוצאות הניסוי מצביעות, כי בזמן בו נתלו המלכודות לא נראתה כל לכידה של הססים בחלקות המבולבלות וגם לאחר הסרת החוטים נשמרה רמת לכידה נמוכה, כנראה בשל השארות הפרומון על הצמחייה (ציור 2). קצב השחרור של 2 מרכיבי הפרומון שנמדד בנדיפית לאורך 160 יום הוא לינארי (0.33 מ"ג ליום), יחס האיזומרים שנמצא בנדיפיות המסחריות הוא 1:2. נמצא שניתן לבלבל את הסס באמצעות נדיפיות פרומון אלה.

ציור 2: השפעת ה"בלבול" על לכידת הסס (100 חוטים לדונם, ~ 2 חוטים לעץ)



מטרות המחקר בשנה III- לפתח מצע מזון מלאכותי לסס הזכוכי על מנת שניתן יהיה לקבל נקבות בוגרות לשם זיהוי המרכיבים הטבעיים של הפרומון בנקבות.

עיקרי הניסויים שבוצעו ותוצאותיהם-

1. פיתוח קרקע מזון לגידול זחלים במעבדה עד למצב בוגר

1.1 שיטות

זחלי הסס הוצאו מעצים נגועים בגידולי אגרוסקטרום בכפר תבור. הזחלים הובאו למעבדה וגודלו על שבעה גרסאות של מצע גידול מלאכותי, שפותחו במקור עבור זחלי הקפנודיס (9) והותאמו להתפתחות הסס.

המצעים הורכבו מהחומרים המופיעים בטבלה 1 ע"י ערבוב של שלוש מנות באופן הבא: המנה הראשונה הכילה את המרכיבים התזונתיים: סוכרוז, שמרים יבשים, תערובת מלח, מתיל פאראבן, אגר, אבקת קורטס-אפרסק יבשה וכמה מרכיבים חלבוניים. תערובת המרכיבים עורבבה ב- $\frac{3}{4}$ הכמות הנדרשת של המים, הועברה לאוטוקלאב למשך 15 דקות ב- 121°C בתוך כלי נירוסטה אטום (למניעת אידוי מים) ואח"כ קוררה ל- $60-70^{\circ}\text{C}$. המנה השנייה של אותה דיאטה (טבלה 1) הכילה

קזאין, ויטמינים וחומצה סורבית שעורבבו ב- $\frac{1}{4}$ מכמות המים הנדרשת והוספו לתערובת המנה הראשונה שיצאה מהאוטוקלאב. שתי המנות עורבבו בבלנדר 2-3 דקות והוספו למה השלישית. מנה זו הכילה צלולוזה או תערובת של צלולוזה עם אבקת קורטטס-אפרסק יבשה. שלוש המנות עורבבו, קוררו לטמפי' החדר ופוררו במגררת (פומפיה). הדיאטה המפוררת הושמה בצלחת פטרי (קוטר 5 ס"מ) בשכבה בעובי 3-4 מ"מ (כ- 6 גרם מזון לכל צלחת).

בסבב הראשון והשני של איסוף זחלים שנערכו בין התאריכים 2010 15-23.3 הזחלים שהובאו כאמור מהשדה הושמו בצלחת פטרי (זחל אחד לצלחת) ועברו לאינקובטור ב- 24°C בחושך. בכל דיאטה גודלו 4-5 זחלים. המשקל ההתחלתי של כל זחל נע בין 17 ל-200 מ"ג. נעשתה תצפית על הצלחות בכל יום והערכת טיב הדיאטה נקבעה על פי תמותת הזחלים והגלמים.

בסבב שלישי של איסוף זחלים במטע, ב- 28.4.10 נאספו 77 זחלים עם משקל ההתחלתי שנע בין 50 ל-174 מ"ג. אלה גודלו כבר על שלוש גרסאות של מצע מספר 2 שנמצאה הטובה ביותר עד לאותו זמן (טבלה 2). כל מצע הוכן משלוש מנות כפי שתואר לעיל. בשלב זה שימור הגולם נעשה באופן שונה משום שבגידול הראשון הרבה מהזחלים יצרו את הפקעות מחלקיקי המצע ועברו התגלמות בתוכה. בשל נוקשות דופן הפקעת, הבוגרים התקשו להגיח ממנה ומתו. על מנת למנוע זאת הגלמים הונחו על נייר סינון יבש בצלחת פטרי קטנה ויצרנו פתח קטן ממנו הבוגרים יוכלו להגיח. האינקובציה של הגלמים נעשתה באופן הנ"ל.

1.2 תוצאות ודיון בפיתוח קרקע המזון לסס הזכוכי

הזחלים מהאיסוף הראשון במטע (33 זחלים) גודלו על 7 מיני דיאטות כ- 30% מהזחלים מתו בתוך 1-3 ימים. התמותה נגרמה עקב זיהומים בקטריאליים או פטרייתיים בפצעים פתוחים שנוצרו בזחלים בעת הוצאתם מרקמת העץ. תמותה זו נצפתה בכל הדיאטה ואין היא מעידה על איכות המצע. יתר הזחלים באותו משלוח התפתחו בכל המצעים במשך 4-5 שבועות והתגלמו. משקל הגולם נע בין 56-120 מ"ג. 3 זחלים גדולים בדיאטות 1, 6 ו-7 מתו בטרם התגלמו.

במשלוח השני של הזחלים הובאו 17 זחלים חיים וכ- 60% מהם מתו תוך 3 ימים מאז שהועברו לדיאטות 2 ו-5. כל הזחלים ששרדו התפתחו על שני מצעים עד להתגלמות, משקל הגולם נע בין 53 ל-110 מ"ג. אולם, במצע 2 הזחלים התגלמו מהר יותר, תוך 4 שבועות, בעוד במצע 5 הזחלים התגלמו רק לאחר 5-6 שבועות. לכן בחרנו להמשיך עם דיאטה 2 ולהוסיף לה עוד שתי ווריאציות בסבב הבא.

טבלה 1: מרכיבי המצע (diet) לגידול מלאכותי של הסס הזכוכי

המנה	מרכיבים	diet 1	diet 2	diet 3	diet 4	diet 5	diet 6	diet 7
I portion	Water	75 ml	75 ml	75 ml	75 ml	75 ml	75 ml	75 ml
	Sucrose	4 g	4 g	4 g	4 g	4 g	4 g	4 g
	Wesson's salt mix	0.96 g	0.96 g	0.96 g	0.96 g	0.96 g	0.96 g	0.96 g
	Dry Torula yeast	7.5 g	7.5 g	7.5 g	-	7.5 g	7.5 g	7.5 g
	Dry Brewers yeast	-	-	-	7.5 g	-	-	-
	Methyl paraben	0.16 g	0.16 g	0.16 g	0.16 g	0.16 g	0.16 g	0.16 g
	Agar	2.6 g	2.6 g	3.5 g	2.6 g	2.6 g	2.6 g	2.6 g
	Dry peach cortex	8 g	-	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g
	Soybean flour	-	-	-	-	10 g	10 g	-
	Wheat germ	-	-	-	-	5 g	5 g	-
	II portion	Water	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
Casein		4.4 g	4.4 g	4.4 g	4.4 g	4.4 g		4.4 g
Sorbic acid		0.26 g	0.26 g	0.26 g	0.26 g	0.26 g	0.26 g	0.26 g
Vanderzant vitamin mix		1.2 g	1.2 g	1.2 g	1.2 g	1.2 g	1.2 g	1.2 g
Ascorbic acid		-	-	-	-	-	-	0.2 g
III portion	Cellulose	35 g	35 g	35 g	35 g	20 g	24.5 g	35 g
	Dry peach cortex	-	8 g	-	-	-	-	-

טבלה 2: ווריאציות של מצעים (דיאטות) מספר 2 ומרכיביהן

המנה	מרכיבים	diet 2	diet 2-1	diet 2-2
I portion	Water	75 ml	75 ml	75 ml
	Sucrose	4 g	4 g	8 g
	Wesson's salt mix	0.96 g	0.96 g	0.96 g
	Yeast dry (Torula)	7.5 g	7.5 g	7.5 g
	Methyl paraben	0.16 g	0.16 g	0.16 g
	Agar	2.6 g	3.5 g	2.6 g
	Wheat germ	-	-	5 g
II portion	Water	25 ml	25 ml	25 ml
	Casein	4.4 g	4.4 g	4.4 g
	Sorbic acid	0.26 g	0.26 g	0.26 g
	Vanderzant vitamin mix	1.2 g	1.2 g	1.2 g
	Ascorbic acid	-	-	-
III portion	Cellulose	35 g	27 g	33 g
	Cortex	8 g	16 g	8 g

כמה מהגלמים שהתפתחו על מצעים 3 ו-4 מתו מזיהום פטרייתי. לכן דיאטות 2 ו-5 (טבלה 1) נבחרו לשלב הבא של העבודה משום שבהן לא הייתה תמותה מסיבה דומה.

כאמור, 10% מהזחלים (סה"כ 77) מתו תוך 6 ימים ראשונים על גבי כל המצעים. 70 הזחלים ששרדו התפתחו על מצע הגידול עד להתגלמות. הבוגרים הגיחו תוך 2-3 שבועות. הערכת איכות המצעים מתוארת בטבלה 3 על פי אחוזי התמותה של הזחלים והגלמים, משקל הגלמים ואחוזי הגחה לבוגר.

טבלה 3: מדדים לקביעת איכות הדיאטות שפותחו עבור הסס הזכוכי

Rearing			
parameters	diet 2	diet 2-1	diet 2-2
Larvae mortality,%	16.7	10	20
Pupae mortality,%	20	0	30
Pupae weight, mg	68.9 ± 24.3	74.0 ± 15.8	78.1 ± 15.4
Adult emerging,%	63.3	90	50

תמותת הזחלים בכל הדיאטות נצפתה בין 2 ל-4 שבועות מתחילת העברתם למצע הגידול ונעה בין 10 ל-20%. תמותה זו לא התחוללה כתוצאה מחתכים על גב הזחל שנגרמו בזמן איסופם בשדה והיו הנמוכים ביותר בדיאטה 2-1. ביתר המצעים הזחלים עברו התגלמות תוך 2-6 שבועות אך חלקם מתו תוך כדי התגלמות. בדיטה 2-1 אף גולם לא מת, אך משקל ממוצע של גולם לא היה שונה מיתר הדיאטות. אחוזי הגיחה נעו בין 50% במצע 2-2 לבין 90% במצע 2-1. כמות הבוגרים הכללית שהתקבלה הייתה 47 כשמתוכם 24 נקבות.

לסיכום, המצע 2-1 נמצאה מתאימה לגידול הסס הזכוכי ובעת הצורך יכולה לשמש לגידול מעבדה עתידי של מזיק זה.

2. זיהוי הפרומון של נקבות הסס הזכוכי

2.1 שיטות לזיהוי הפרומון.

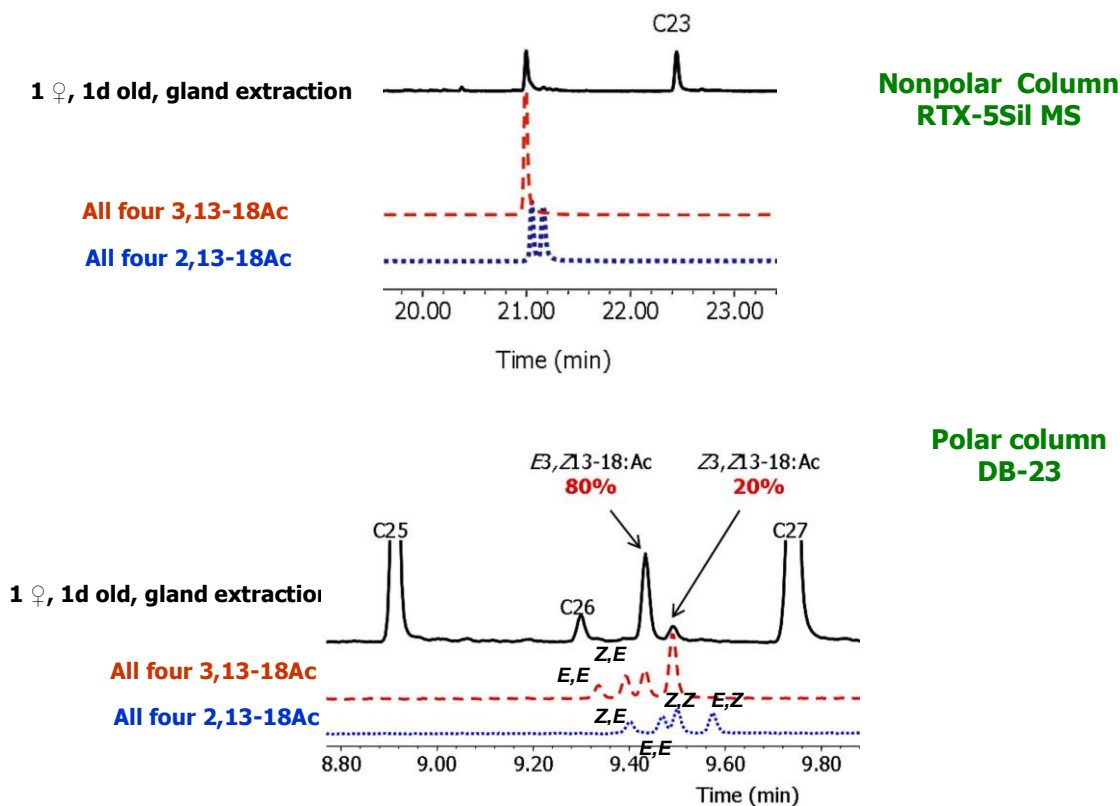
לאחר הגיחה הבוגרים עברו מיון על פי הזוויג. הנקבות נלקחו ובשעת ה-calling ובלוטת הפרומון שלהם נחתכה תחת בינוקולר ומוצתה ב-20 מיקרוליטר הקסאן. הבלוטה הושארה בממס למשך 15 דקות ולאחר מכן העברה התמיסה לאינסרט נקי ונשמרה במקפוא עד לאנליזה. מיצויי הבלוטות עברו אנליזה ראשית במכשיר Agilent 6890N/5973N GC-MS שבו מותקנת קולונה א-פולרית מסוג (30m × RTX-5 Sil MS capillary column (Restek, Bellefonte, PA) תכנית החימום של התנור הייתה החל מ-60°C למשך 2 דקות וחימום ל-240°C בקצב 10⁰/min. זרימת ההליום 1.5 מ"ל לדקה. אנליזה כמותית ואיכותית של הפרומון הטבעי

בוצעה לאחר מכן במכשיר Agilent 7890A/5975C GC-MS-FID שבו הזרימה בקולונה הפולרית DB-23 capillary column (J & W Scientific, Folsom, CA), (30m × 0.25mm × 0.25μm) מפוצלת לשני הגלאים. תכנית החימום של התנור הייתה החל מ-90°C למשך 2 דקות וחימום ל-220°C למשך 10 דקות בקצב 10⁰/min. זרימת ההליום 1.5 מ"ל לדקה והאינגיקטור בספליט 1:5. כמות הפרומון חושבה ע"י הזרקה 1 מיקרוליטר ממצוי בלוטה אחת של נקבה וחישוב תגובת גלאי ה-FID עם גרף כיול של המרכיב הראשי E3,Z13-18:Ac.

2.2. תוצאות

אנליזת GC-MS של 15 מיצויי בלוטות הפרומון הראתה נוכחות של החומרים E3,Z13-18:Ac ו-Z3,Z13-18:Ac ביחס 83:17 (ציור 3). כמותם 14.0±6.2 ng ו-2.9±1.3 ng בהתאמה (ממוצע 24 נקבות). לא נמצאו עקבות של נגזרות דומות של אוקטדיאניל אצטטים או הכוהלים המתאימים. הזיהוי התבסס על ממצאי ה-MS ואינדקסי השהיה בשני סוגי הקולונות (linear retention index) כפי שמודגם בטבלה 4 להלן.

ציור 3: הפרדת מיצוי בלוטות הפרומון על קולונות שונות ב-FID-MS-GC



טבלה 4: מדדי שהיה בקולונה של מיצוי בלוטות הפרומון וסטנדרטים של 3,13 ושל 2,13-
 octadecadienyl acetate על קולונות RTX-5 Sil MS ו-DB-23 (30m × 0.25mm × 0.25µm)

הדוגמא	Linear Retention index		
	RTX-5 Sil MS	DB-23	
Female gland	2178	2622, 2635	
		Standards	Lit. (10)
E3,E13-18:Ac	2177	2600	2606
Z3,E13-18:Ac	2176	2613	2618
E3,Z13-18:Ac	2175	2622	2627
Z3,Z13-18:Ac	2177	2636	2639
E2,E13-18:Ac	2193	2631	2636
Z2,E13-18:Ac	2182	2615	2619
E2,Z13-18:Ac	2184	2656	2658
Z2,Z13-18:Ac	2195	2637	2640

3. ניסיון ללכידת נקבות סס זכוכי בפיתיונות עם נדיפי אגס וחומצה אצטית על מנת לברר אם הן נושאות את חיידק האגרובקטריום

3.1 שיטות 1.5

מ"ל חומצה אצטית הוספו בצמר גפן דנטלי שנאטם ביריעת פוליאיתילן בעובי 0.11 מ"מ. במקביל הוכנו נדיפיות גומי שהכילו 2 מ"ג ethyl-(2E,4Z)-decadienoate, שהוא חומר ריח מאגסים (יקרא PE) ונדיפיות ובהן 1 מ"ג פרומון. במטע בכפר תבור ניתלו במלכודות 5 IPS הטיפולים הבאים, כל אחד עם 5 חזרות: 1. PE 2. PE וחומצה אצטית 3. פרומון 4. חומצה אצטית 5. PE, חומצה אצטית ופרומון. קצב השחרור של החומצה האצטית משקית הפוליאיתילן נבדק תחת סככה בבית דגן והיה לינארי למשך כ- 80 יום.

3.2 תוצאות ודיון

לאחר שבוע מלכודות שהכילו פרומון לכדו זכרים, כך שניכר שהתקיימה תעופה של הסס במטע בזמן הניסוי. גם המלכודות ללא פרומון לכדו זכרים, אם כי במידה פחותה מאד. לגבי הנקבות, רק במלכודות שהכילו חומצה אצטית הייתה לכידה אך מועטה ביותר- של 2-4 נקבות בלבד. בשבוע השני לכידת הזכרים פחתה ולא נלכדה אף נקבה.

4. ניסוי לבחינת המשיכה של נקבות הסס הזכוכי לעצים עם גידולי החיידק

4.1 שיטות בשנת המחקר השנייה חשפנו בכפר תבור 104 שתילי שזיף שהוצבו ברביעיות בתוך שורות של עצי נקטרינה נוגעים במידת מה בסס ובאגרובקטריום. טיפול A' כלל שתילים מאולחים באגרובקטריום שהתפתח בהם גידול כתוצאה מהאילוח, טיפול B' שתילים בריאים לאחר פגיעה פיזית, טיפול C' כלל שתילים בריאים ללא טיפול, טיפול D היה ברירת מחדל של שתילים מודבקים ללא התפתחות גידול. השתילים נחשפו באחד בספטמבר 2009 ונבדקו ב- 7 ביולי 2010.

4.2 תוצאות ודיון

מתוך 104 השתילים רק שלושה אוכלסו בסס, אך כל השלושה היו מטיפול A. כלומר הסס מעדיף להטיל את הביצים בעצים נוגעים באופן פעיל ע"י אגרובקטריום. חשוב לציין שעצי הניסוי היו צעירים מאד ויתכן שאינם מתאימים להתפתחות נאותה של הזחלים. זאת ככל הנראה הסיבה שרק 3, כלומר רק כ- 8% משתילי הטיפול, אוכלסו ע"י הסס.

דיון ומסקנות

פותח מצע מזון מלאכותי מתאים לגידול הסס הזכוכי ובעת הצורך עשוי לשמש לגידול מעבדה עתידי של מזיק זה. המצע אפשר לגדל נקבות ששמשו לאנליזה של הרכב בלוטת הפרומון. נמצאו שני החומרים $E3,Z13-18:Ac$ ו- $Z3,Z13-18:Ac$ ביחס 8:2 בהתאמה. יחד עם היחס 9:1, יחס 8:2 היה המיטבי גם ללכידת הזכרים במלכודות הניטור. בנדיפיות מסחריות לבלבול העש היה קיים יחס של 2:1 והוא נמצא מתאים על מנת למסך באופן מוחלט מלכודות הניטור. דבר זה מעיד שכנראה שבמקרה של הסס הזכוכי היחסים שונים בין שני המרכיבים של הפרומון רחב עשויים לשבש את תעופת הזכרים לעבר מקור פרומון. הרכב הפרומון הטבעי זוהה במדויק והותאם לשימוש מבחינת סוג הנדיפית, המלכודות והמינון הדרוש לניטור.

לא יכולנו לענות על השאלה אם הבוגרים קשורים להעברת החיידקים במטע. יתכן שהזכרים נושאים ריכוז חיידקים נמוך מאד וזאת הסיבה שלא ניתן היה לבודד את החיידק מהם. לא בדקנו נוכחות החיידקים בנקבות. הנקבות באות במגע עם העץ עם מוקדים נוגעים לקראת ובעת הטלת הביצים יותר מהזכרים, ולכן יתכן שהן נושאות יותר חיידקים. ואמנם ניסינו ללכוד נקבות של הסס הזכוכי ע"י שימוש בקיירומון וחומצה אצטית, שמקורו בנדיף אגסים ונמצא בהונגריה כי הוא מושך נקבות של Synanthedon ממין אחר (Toth et al 2009), אך ללא הצלחה. ממצאים שהתקבלו בניסוי המשיכה של נקבות לעצים מאולחים מצביעים על כך שהסס נוטה להטיל בעצים שנוגעו ע"י אגרובקטריום.

סיכום עם שאלות מנחות

<p>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>מטרות העבודה היו: א. אופטימיזציה של הפיתיון. ב. לימוד הפעילות העונתית של הסס במטעי גלעין. ג. בחינת הקשר בין לכידת זכרים במלכודת הפרומון לבין הנגיעות במטע. ד. בחינת היתכנות של הדברת המזיק ע"י "בלבול" הזכרים באמצעות חוטי פרומון. ה. בחינת נוכחות חיידקי האגרובקטריום על העשים והאם העשים מעבירים את מחולל מחלת העפצים במטעים. במהלך התכנית גודל הסס במעבדה על קרקע מזון מלאכותי לגידול נקבות כדי לזהות באופן סופי את מרכיב הפרומון הטבעי.</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות. בשנת המחקר הראשונות עסקנו באופטימיזציה של הפיתיון ומלכודות הפרומון בניסויים במטעי גלעיניים בכפר תבור וכרם מהר"ל. מצאנו שמלכודת IPS טובה יותר ממלכודת דבק משולשת בניטור הסס ושתערובת הפרומון המיטבית בניטור הסס הזכוכי היא זו של שני המרכיבים E3,Z13-18:Ac ו- Z3,Z13-18Ac ביחס 2:8. בבדיקת ההתיישנות של נדיפיות הגומי שהכילו 1 מ"ג של תערובת זו לא היו הבדלים מובהקים בין הנדיפיות בגילאים השונים. מלימוד התעופה העונתית נמצא שהסס מעמיד כ- 4 דורות. בוצעו שני ניסויים לבדיקת התכנות הבלבול באמצעות תליית חוטי בלבול מסחריים שהביאה למיסוך מלכודות הניטור. נבדק הקשר בין נגיעות האגרובקטריום לנגיעות בסס בהיבט של מיני וזני גלעיניים על פי מידת הפגיעה סביב צוואר השורש, ועל פי הופעת גידולים של החיידק על נוף. נמצאה קורלציה בין הסס לחיידק. פעלנו לבדוד החיידקים מחלקי הגוף של הסס הבוגר ופרסנו ניסוי שמטרתו לבחון את אכלוס שתילים בסס לאחר שאולחו באופן מבוקר בחיידק על מנת לבחון את משיכת בוגרי הסס לגידולים שהתפתחו עליהם. הסס נוטה להטיל בעצים נגיעים ע"י אגרובקטריום. בשנת המחקר האחרונה פותח מצע מזון לגידול הסס בתנאי מעבדה וזוהה הרכב הפרומון הטבעי מבלוטות הפרומון מנקבות שהתפתחו על המצע.</p>
<p>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח. מטרות המחקר הושגו. בנוסף למטרות הראשוניות בעבודה זו זוהה פרומון המין הטבעי של הסס הזכוכי שהופק מנקבות מגידול מלאכותי. לפרומון שזוהה הותאמו פיתיון ומלכודת לניטור וכן נבדקה האפשרות ל"בלבול" את הסס באמצעות פיתיונות מסחריים.</p>
<p>הבעיות שנתרו לפתרון /או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.</p> <p>אין</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח :</p>
<p>מאמר בעיתון <i>Chemoecology</i> (התקבל לפרסום); תקציר לכנס החברה האמריקאית לאנטומולוגיה, סניף הפסיפיק, תקציר לכנס השנתי של האגודה הישראלית לאקולוגיה ומדעי הסביבה.</p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח:</p>
<p>רק בספריות <input type="checkbox"/></p>
<p>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) X <input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>חסוי – לא לפרסם <input type="checkbox"/></p>

רשימת מקורות:

1. בן יהודה ש., דונקלבלום ע., פרוטסוב א., זאדה ע., מנדל צ., קוזליצקי ו., 2007. מזיק חדש בישראל: הסס הזכוכי ופיתוח מלכודת פרומון לניטורו. עלון הנוטע 61, 483-479.

2. Audemard, H. and Vigouroux, A. 1982. A curious parasitic association on peach trees--*Synanthedon vespiformis* and bacterial tumor of the fruit top caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytoma Mar.* (336) p. 28-29.

3. Clare, B.G., and McClure, N. C. 1995. *Agrobacterium*. In "Pathogenesis and host specificity in plant diseases, Volume I: Prokaryotes. Edited by Singh, U. S., Singh, R.P., Kohmoto, K. Pergamon, G. Britain
4. Halperin, J. and Sauter, W. (1991-92). An annotated list with new records of Lepidoptera associated with forest and ornamental trees and shrubs in Israel. *Isr. J. Entom.* 25-26: 105-147.
5. Arn, H., Toth, M. and Priesner, E. 1992. List of sex pheromones of Lepidoptera and related attractants. OILB publication, 2nd edition, 78-81.
6. Tumlinson, J.H., Yonce, C.E., Doolittle, R.E., Heath, R.R., Gentry, C.R. and Mitchell, E.R. 1974. Sex pheromones and reproductive isolation of the lesser peachtree borer and the peachtree borer. *Science*, 185, 614-616.
7. Voerman, S., Audemard, H. and Priesner, E. (1983) Sex attractants for clearwing moths: *Synanthedon vespiformis* and *Chamaesphecia tenthrediniformis* (and/or *C. empiformis*). *Entomol. Exp. & Appl.* 34, 203-205.
8. Buda, V., Maeorg, U., Karalius, V., Rothschild, G.H.L., Kolonistova, S., Ivinskis, P. and Mozuraitis, R. (1993): C₁₈ Dienes as attractants for eighteen clearwing (Sesidae), tineid (Tineidae), and choreutid (Choreutidae) moth species. *J. Chem. Ecol.* 19, 799-813.
9. Gindin, G., Kuznetsova, T., Protasov, A., Ben Yehuda, S., and Mendel, Z. (2009). Artificial diet for two flat-headed borers *Capnodis* spp., (Coleoptera: Buprestidae). *J. Eur. Entomol.* 106, 573-581.
10. Naka H, Nakazawa T, Sugie M, Yamamoto M, Horie Y, Wakasugi R, Arita Y, Tsuchida K, Ando T (2006). Synthesis and characterization of 3,13- and 2,13-ocatdecadienyl compounds for identification of the sex pheromone secreted by a clearwing moth, *Nokona pernix*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:508-516.

11. Tóth, M. Landolt, P. Szarukán, I. Szólláth, I. Vitányi, I. Péntzes, B. Hári, K. Koczor, S. 2009. Testing Pear Ester-Based Lures in Hungary Iii. *Synanthedon Myopaeformis* (Lepidoptera, Sesiidae) Presented on „Semio-chemicals without Borders”, a Joint Conference of the Pheromone Groups of IOBC WPRS and IOBC EPRS, 15 - 20 November 2009, Budapest, Hungary