

**דוח מסכם תוכנית מחקר 17-1834-131 (שנה שלישית 2017)**

1. נושא המחקר: קידום אמצעי ממשק הדברה ידידותיים לסביבה כנגד פגע האמברוזיה של האבוקדו

Study on the avocado ambrosia problem with emphasis on the development of environmentally friendly management tools

עמ'	תוכן עניינים
1	שם ההצעה 1
1	טבלת השותפים למחקר והצהרת החוקר הראשי 2
2	תקציר מדעי של הדוח 3
3	חשיבות המחקר 4
3	מטרות כפי שהופיעו בהצעה המקיפה 5
3	מבוא וממצאים שהושגו שתי שנות המחקר הראשונות 6
3	6.1 זהות החיפושיות
4	6.2 אכלוס העץ
5	6.3 תופעת ההחמה
5	6.4 אינטראקציה עם הפטריות הסימביוטיות
6	6.5 ניטור ולכידה של החיפושיות
7	7 מטרות המחקר לשנת 2017
7	8 פרקי הדוח, כולל תוצאות עיקריות ומסקנות
7	8.1 לימוד דפוסי האכלוס של החיפושית האמברוזיה בכל הקשור להצלחת האילוח ולתגובה של עץ האבוקדו (מטרה 1 בתוכנית המקורית)
13	8.2 העמקת הידע אודות יחסי הגומלין בין החיפושית והפטריות הסימביוטיות (מטרה 2 בתוכנית המקורית)
16	8.3 בחינת יישום פטריות אנטומופתוגניות ותכשירים כאמצעי להדברת פגע האמברוזיה במטעי האבוקדו. (מטרה 3 בתוכנית המקורית)
18	8.4 בחינת יישום פטריות אקריות פונגיבוריות כנשאות לפטריות אנטומופתוגניות אל תוך מערכת הגלריות של חיפושית האמברוזיה. (מטרה 4 בתוכנית המקורית)
19	9 הבעת תודה
19	10 סיכום עם שאלות מנחות
21	11 ספרות מצוטטת
22	12 נספח איורים לדוח

2. שותפים למחקר (תוכנית מבוצעת ע"י שתי קבוצות מחקר, אנטומוולוגית (צ.מ.) ופתולוגיה של צמחים (ס.פ.))

Zvi Mendel, Stanley Freeman, Eric Palevsky, Michal Sharon, Alex Protasov, Miriam Eliyahu, Dana Ment, Shira Gal, Department of Entomology, Agricultural Research Organization, Volcani Center, Bet Dagan, 50250	צבי מנדל, סטנלי פרימן, אריק פלבסקי, מיכל שרון, אלכס פרוטסוב, דנה מנט, שירה גל <a href="mailto:zmendel@volcani.agri.gov.il">zmendel@volcani.agri.gov.il</a> המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, משרד החקלאות בית דגן.
Avocado Organization, Israeli Plants Board	יונתן מעוז, גרנות, מועצת הצמחים
Michael Noy, Horticulture division, Extension Service, Ministry of Agriculture	מיכאל נוי, האגף למטעים, שה"מ, משרד החקלאות

**בשיתוף:** גולן מילר, מרסל מימון המכון להגנת הצומח, מרכז וולקני

הצהרת החוקר הראשי: הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים. הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים: בשל העובדה שהניסויים לא בשלו לידי גיבוש המלצות מעשיות)

חתימת החוקר הראשי

פברואר 2018



שבט תשע"ז

הצגת הבעיה: הנזק הנגרם ע"י פגע האמברוזיה מציב אתגר מורכב לענף האבוקדו. החיפושית התגלתה בישראל ב- 2009 ועד 2016 היא התפשטה למעשה בכל שטחי האבוקדו בישראל. הזן האס שהוא המותקף ביותר וניכר בצפיפות הכיבים הגדולה ביותר והוא גם זה שבו הצלחת הרבייה של החיפושית היא הגבוהה מבין הזנים שנבחנו. המחקר העלה שבישראל 10 מיני עצים פונדקאים המשמשים בהצלחה לרביית החיפושית, אבוקדו הוא הפחות רגיש מבניהם. מטרות השנה בשנה השלישית היו: לימוד דפוסי ההתקפה של החיפושית האמברוזיה בכל הקשור להצלחת אכלוס בחיפושיות והאילוח בפטריות, בהקשר לתגובה של עץ האבוקדו, העמקת הידע אודות יחסי הגומלין בין החיפושית ושלוש הפטריות הסימביוטיות (פוזריום, גרפיום ואקרמוניום), בחינת יישום פטריות אנטומופתוגניות ותכשירים כאמצעי להדברת פגע האמברוזיה במטעי האבוקדו, יישום פטריות אקריות פונגיבוריות כנשאות לפטריות אנטומופתוגניות אל תוך מערכת הגלריות של חיפושית האמברוזיה. מהלך ושיטות העבודה העיקריות: בידוד הפטריות מתוך העצה בעקבות האילוח, מעקב אחר הפטריות שהוחדרו לעצה כתוצאה מהתקפות של החיפושית, הכנת פוזריום טרנסגני המבטא חלבון GFP. נבחנה השפעתן של פטריות אנטומופתוגניות על זחלי ובוגרי חיפושית האמברוזיה באמצעות יישום במטע ובחינת הרגישות במעבדה. תוצאות עיקריות: פטריית הפוזריום, התורמת לנבילת הענפים, נותרת בסמוך לגלריות ובמקרי קיצון מתפשטת על מרחק של 10 ס"מ מהגלריה, התבססות הפטריות כתוצאה של התקפות סרק של החיפושיות מראה שתדירות בידוד גבוהה וכמות גדולה של פוזריום התקבלה לאורך כל מהלך הדגימות עד לפחות 292 ימים לאחר ההתקפה. בענפים שאולחו בפוזריום לצורך חיקוי התקפת חיפושיות, החמת העצה ניכרת מאד ומגיעה ברוב המקרים ל 70-80 ס"מ מאיזור האילוח בענף, ואילו בענפי הביקורת (הזרקת מים) ההחמה היא קלה וניכרת רק קרוב לאזור ההזרקה. לא נרשמו הבדלים גדולים בביצועים של הזחלים שניזונו על פוזריום הסימביוטי שהתפתח על מצע מבוסס על עצה מפונדקאים מתאימים ושאינם מתאימים להתפתחות החיפושית. נראה שהמעבר האנכי של הפטרייה מתקיים בשני מסלולים, המסלול העיקרי הוא באמצעות הזנה של הבוגרים הצעירים על הפטריות שגודלו בגלריות ע"י דור האימהות, ומתקיים גם תהליך של מעבר הפטריות הסימביוטיות ישירות באמצעות דרגת הגולם. זחלים ובוגרים של החיפושית הינם רגישים לפטרייה *Metarhizium anisopliae* הבוגרים רגישים גם ל- *Beauveria bassiana* (זחלים לא נבדקו במקרה זה). דיון ומסקנות: דגימות הפוזריום הסימביוטי בעצה מצביעות על כל שהפטרייה אינה מתפשטת בעצה. ניכר בהתפתחות הפוזריום היא מהירה יותר אך רגיש יותר לטמפרטורות גבוהות מאשר מיני הפטריות הסימביוטיות האחרות. הגרפיום והאקרמוניום מציגים תמונה אחרת, התפתחות איטית יחסית ורגישות פחותה לטמפרטורות גבוהות. גם במקרה של התקפות הסרק נותרת הפוזריום לאורך זמן, בשל יכולתה להתמודד ולשרוד ברקמה החיה. שני מיני הפטריות הסימביוטיים האחרים, אינם שורדים בעצת אבוקדו חיה. ניסויי חיקוי התקפה והתבססות של החיפושית העלה את התובנות הבאות. א) ענפים דקי קוטר הם הרגישים ביותר, כפי שניכר ראשית כל בתגובת ההפרשה הסוכרית. ב) ברוב המקרים שתי הפעלות בנפרד בכל טיפול, קידוח והזרקת הפטרייה, וקידוח והזרקת המים, לא גרמו לנזק משמעותי לענף ג) בשתי קבוצות הטיפול עוצמת ההחמה עולה ביחס הפוף לקוטר הענף. הפגיעה שהתקבלה בחיקוי ההתקפה דומה מאד ועוצמתה תואמת את קוטר הענף,

בדומה להתקפה הטבעית של החיפושית. המחקר הוכיח שמתקיים גם תהליך של מעבר הפטריות הסימביוטיות ישירות באמצעות דרגת הגולם. מעבר אופקי גם הוא מתאפשר והדבר הוכח באמצעות הזנה על פוזריום טרנסגני המבטא GFP. הניסוי גם הדגים את האפשרות של נשיאת שני קווים שונים של הפטרייה הסימביוטית (פוזריום, במקרה זה) ומכן גם את האפשרות של היברידיזציה ויצירת טיפוסים גנטיים חדשים. נראה שקיים קושי לאמוד את מספר הפרטים במערכת צלחות הפטרי המשמשות בניסויים, והדבר הקשה על קבלת התוצאות בניסויים עם הפטריות האנטומופתוגניות. רצוי לשקול שדרוג של המערכת לצורך ניסויים נוספים בפטריות אנטומופתוגניות. מתבקש לחזור על בחינת יעילות בוטניגרד על זחלי חיפושית האמברוזיה.

#### 4. חשיבות המחקר

חשיבות המחקר הוא ביצירת תשתית מידע ואמצעים על מנת להתמודד עם פגע האמברוזיה בעיקר במטעי האבוקדו.

#### 5. מטרות כפי שהופיעו בהצעה המקיפה (עד 2000 תווים)

מטרה 1. לימוד דפוסי האכלוס של החיפושית האמברוזיה בכל הקשור להצלחת האילוח ולתגובה של עץ האבוקדו לשני מיני הפטריות האמברוזיה המזוהים. הכוונה לבחון ולהבין את הבדלים בתגובה בתוך כותרת העץ תוך דגש על קטעי גזע וענפים עבים לעומת ענפים דקים, ובין עצים רגישים ושאינם רגישים (זנים רגישים כמו האס פינקרטון וריד, לעומת אטינגר, זן שנפגע במידה מועטה).

מטרה 2. להעמיק את הידע אודות יחסי הגומלין בין החיפושית והפטריות הסימביוטיות. דגש על אפיון מין ה *Graphium* החדש שבודד.

מטרה 3. לבחון כיצד ניתן ליישם בהצלחה פטריות אנטומופתוגניות ותכשירים המבוססים על פטריות אנטומופתוגניות (בעיקר BotaniGard תכשיר מסחרי המבוסס על הפטריה *Beauveria bassiana*) כנגד הפגע במטעי האבוקדו. במסגרת מטרה זו אנו מבקשים לענות על השאלות הבאות, וזאת באמצעות בחינת שתי תואריות, - איבוק בוטניארד אבקתי 1% כאבקה רחיפה BOTANIGARD® WP (22% + Caolin) ו- ריסוס בבוטניגרד BOTANIGARD® ES +Distillates hydro-treated light (11.7%).

מטרה 4. לבחון האם אקריות פונגיבוריות אשר נמצאות באופן טבעי באסוציאציה עם חיפושיות קליפה יכולות לשמש נשא לפטריות אנטומופתוגניות בדגש על העברתן אל תוך מערכת הגלריות בתוכן מתרבה פגע האמברוזיה.

6. מבוא וממצאים שהושגו שתי שנות המחקר הראשונות

#### 6.1 זהות החיפושיות

חיפושית האמברוזיה שזוהתה מורפולוגית כ- *Euwallacea fornicatus* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae: Xyleborini) כוללת למעשה מספר מינים חבויים שהראו שונות רבה בריצוף של גנים גרעיניים ומיטוכונדריאליים. הנזק שמינים אלה גורמים דווח מאזורים אחדים בעיקר בדרום מזרח אסיה, כמו בעץ השמן ומיטוכונדריאליים. הנזק שמינים אלה גורמים דווח מאזורים אחדים בעיקר בדרום מזרח אסיה, כמו בעץ השמן ומיטוכונדריאליים. *Schleichera oleosa* באינדונזיה (Kalshoven, 1958b), מיני שיטה בווייטנאם (Nuhamara, 1993), מטעי תה בסרילנקה (Walgama, 2012) ואבוקדו בישראל ובקליפורניה. יש לציין שבדרום מזרח אסיה נזק דווח ממיני עצים אקזוטיים ולא מקומיים. עדות נוספת לכך שמדובר במיני חיפושיות נפרדים נתמכה בכך ששלושה מהטיפוסים שנחקרו נושאים פטריות סימביוטיות שונות. מבין כל הפרטים שנאספו ונמצאו שייכים באופן ברור לקומפלקס *E. fornicatus* הוגדרו שלושה מינים ברורים, ויתכנו עוד שני מינים, לפי שעה הסטטוס שלהם כמין אינו ברור. שלושת המינים הנ"ל טרם הוגדרו בשל הקושי להבחנה בהבדלים מורפולוגיים, אך כל הפרטים שנאספו ונמצאו שייכים באופן ברור לקומפלקס *E. fornicatus* (טבלה 1). המגוון הגנטי הגדול ביותר בקבוצה שנבדקה נמצא בטאיוון, וייטנאם ותאילנד, מכאן שזה אזור התפוצה הטבעי של קבוצת חיפושיות זו.

טבלה 1. שלושת המינים הוודאיים של הקומפלקס *Euwallacea fornicatus*

הימצאותו כמין פולש	אזור תפוצתו הטבעי	המין (בשם האנגלי)
אוסטרליה, פלורידה והוואי,	תת היבשת ההודית וסרילנקה פפואה, גינאה החדשה ותאילנד	Tea shot hole borer
קליפורניה	אוקינאווה, טאיוואן	Kuroshio shot hole borer
ישראל, קליפורניה, פלורידה, דרום אפריקה	סין, טאיוואן, אוקינאווה, וייטנאם	Polyphagous shot hole borer

## 6.2 אכלוס העץ

חיפושית האמברוזיה של האבוקדו התגלתה בישראל ב- 2009 ועד 2016 היא התפשטה למעשה בכל שטחי האבוקדו בישראל. התסמין הבולט ביותר של התקפת החיפושית על עצי אבוקדו הוא הפרשה של סוכרים לבנים, בעיקר (Liu et al. 1999) mannose and perseitol) בנקודת החדירה של החיפושית. לא כל חדירה מסתיימת בפעילות רבייתית מוצלחת, ובאבוקדו, התקפה על הענפים העבים והגזע, בדרך כלל ניכרת בכיב גדול, המעיד על התגובה החזקה של הרקמה המותקפת, ואך גם על כך שההתקפה למעשה נכשלה. במחקר קודם הראנו שהחיפושיות נוטות לחזור ולתקוף את חלקי הענף שהותקפו לא מכבר. נראה שיש קשר ברור בין מגמת התקפה של חיפושית האמברוזיה בזני אבוקדו השונים לבין הצלחת האכלוס. כך לדוגמה הזן האס שהוא המותקף ביותר וניכר בצפיפות הכיבים הגדולה ביותר הוא גם זה שבו הצלחת הרבייה של החיפושית היא הגבוהה ביותר, בהשוואה לאטינגר צפיפות הכיבים בו היא נמוכה מאד, והדבר ניכר גם בתדירות התייבשות הענפים שהיא מועטה ביותר בזן זה. אכלוס ענפים מוצלח נרשם כמעט תמיד בבסיס הענף, הדבר גורר התייבשות של הענף כולו. כלומר החיפושיות אינן מאכלסות את הענף מעל האיזור הנתקף שסיכויי התייבשותו הם גבוהים. זאת ככל הנראה הסיבה שהמשך אכלוס הענף הוא בכיוון אותם חלקים הנהנים מאספקת מים מהענף או מהגזע הסמוכים. לפיכך הומלץ כבר בדוחות קודמים שהסרת ענפים פגועים במהלך

הגיזום נדרשת להתבצע בנקודת הפיצול של הענף המותקף. הגיחה אינה אחידה והדבר ניכר גם ביכולת של החיפושית להגיח גם חודש לפחות לאחר כריתת הענף והתייבשותו.

### 6.3 תופעת ההחמה

תופעת ההחמה של עצה מאוכלסת ע"י חיפושית האמברוזיה נצפתה בכל הפונדקאים הרגישים לנגע. משמעות ההחמה לא היתה ברורה, לבד מהעובדה שההחמה מתפשטת מעבר למיקום הגלריות. נמצא במחקר שחומרים הצובעים את העצה הם בעיקר שישה פלבנואידים שארבעה מהם זהו. ממצאינו מצביעים על כך שהחמת העצה היא תוצאה של שטיפת חומרים, ככל הנראה בעיקר הפלבנואידים, מאזור הגלריות. אנו מעריכים שתפקידם של הפלבנואידים הוא זהה לזה שנקבע במעורבותם בפתוגניות של פירות אבוקדו כמו במקרה של פעילות הפלבנואידים בפרי האבוקדו (Guetsky et al. 2005) והם נוצרים ככל הנראה ע"י רקמת הצמח עצמה כחלק מהפעילות האנזימטית של העץ כמרכיב במערך התגוננות כנגד פעילות הפוזריום הסימביוטי המוחדר ע"י החיפושית. נראה שהפלבנואידים המשמשים ככל הנראה כנוגדי חימצון להבטחת פעולה אנזימטית תקינה של מערכת ההגנה של הצמח (Vinha et al. 2013).

### 6.4 אינטראקציה עם הפטריות הסימביוטיות

במחקר מצאנו שהחיפושית נושאת שלושה מיני פטריות סימביוטיות, הפוזריום *Fusarium euwallaceae*, *Graphium euwallaceae* (המכונה כאן גרפיום) ו-*Paracemonium pembeum* (המכונה כאן אקרמוניום), כולם הם מינים חדשים למדע. מצאנו שזחלי החיפושית משלימים את התפתחותם על המצע המלאכותי עליו גדלים הפוזריום או הגרפיום, אך לא על אקרמוניום. כל שלושת מיני הפטריות בודדו מענפי אבוקדו, קיקיון, אדר מילני ואלון ארך עוקצים. כמות הפוזריום בחיפושיות הבשלות לפני הגיחה גדולה בין פי 10 עד 100 מזו שבבוגרות הצעירות. להישרדות הפטריות בעצת האבוקדו ובכלל יש חשיבות רבה. האינטראקציה של הפטריות עם העצה יוצרת נדיפים המשפיעים על פעילות החיפושית ומשיכתה לתקיפה. יש עניין רב לדעת כמה זמן פעילות הפטריות ללא נוכחות החיפושית, בענפים חיים בהם נכשלה ההתקפה. הישרדות הפטריות בענפים מסבירה את יכולת ההישרדות הארוכה של החיפושיות גם בענפים שנכרתו. אילוח בפטריות באופן מלאכותי בענפי הזנים האס ואטינגר, הראתה שבחודשים הראשונים לאחר ההזרקה לא ניכרים הבדלים גדולים בתגובת הפרשת הסוכר בכיבים שנוצרו בעקבות אילוח שלושת מיני הפטריות הסימביוטיות ושתי הביקורות (אילוח הפוזריום המחולל את מחלת עיוות התפרחות במנגו *Fusarium mangiferae*, והזרקת מים). בחלוף הזמן, ניכר שבכיבים שנוצרו בעקבות אילוח הפוזריום הסימביוטי נמשכת פעילות ניכרת של הפרשת הסוכר יותר מאשר הכיבים האחרים. מצב זה זהה בשני זני האבוקדו שנבחנו. ניכר ששני מיני הפוזריום שאולחו שורדים ברקמה החיה ללא קושי, והם בודדו כמעט בכל הדגימות לאורך כל תקופת התצפיות שנמשכה כ- 25 חודשים והסתיימה בשנת 2017). שני מיני הפטריות הסימביוטיות האחרים, הגרפיום והאקרמוניום כמעט נעלמים חודשיים לאחר האילוח, אם כי האקרמוניום נותר בחלק קטן מהדגימות תקופות ארוכות. תמונה דומה התקבלה גם באילוח של אלון ארך עוקצים וקיקיון. על פי רוב שני מיני הפוזריום שרדו היטב ברקמה המאולחות, ואילו הגרפיום שרד כחודשיים בלבד. גם במקרה זה נראה שהאקרמוניום שרד תקופה ארוכה, אם כי במידה פחותה

מאשר מיני הפוזריום. הפוזריום סימביוטי הוא למעשה הפתוגן במערכת ותפקידו 'להתעמת' עם הרקמה הבריאה, זו לעיתים קרובות מצליחה לשרוד בעצת אבוקדו (תופעה זו ניכרת גם כאשר מאולחות הפטריות באופן מלאכותי). כצפוי הצלחת הרבייה והתפתחות הזחלים, מתקיימת כאשר הגרפיום משגשג בגלריות. הגרפיום, כפי שהראנו במחקר קודם, היא המזון העיקרי של הזחלים והבוגרים הצעירים. לאחר הגיחה והתייבשות הענף, נרשמת כצפוי דעיכה של הפוזריום שכלל הנראה אינה שורדת היטב ברקמה המתה, לעומת מיני הפטריות הסימביוטיות האחרות המצליחות ככל הנראה לשרוד היטב על רקמה שהוחלשה ומתה גם לאחר גיחת החיפושיות. להישרדות זו יש ככל הנראה השלכה גם על תופעה אחרת חשובה והיא מעבר של חיפושיות האמברוזיה על מוצרי עץ בין מדינות והפצתן באזורים חדשים כמינים פולשים. כלומר, יתכן שיכולתן של חלק מהפטריות הסימביוטיות לשרוד ברקמה המתה היא זו שמאפשרת לחיפושיות לשרוד מסע של משלוחי עצים מהמזרח הרחוק אל נמלי המערב, מסע שאורך שבועות רבים.

### 6.5 ניטור ולכידה של החיפושיות

אחת ממטרות המישנה במחקר היתה להניח את הבסיס לניטור אוכלוסיית החיפושית באמצעות מלכודות. בשל העובדה שפרומני מין או התקהלות אינם רלוונטיים במשיכה של חיפושיות האמברוזיה מתת משפחת Scolytinae, נבחנו במסגרת המחקר פיתיונות אחרים שעשויים למשוך את החיפושיות. מינים רבים של חיפושיות אמברוזיה נמשכים לאתנול. פיתיונות אתנול שנבחנו כבר עם גילוי אוכלוסיית החיפושית בישראל היו למעשה כישלון. לאחר מכן נעשה שימוש בפיתיון המבוסס על שמן מנוקה (Manuka oil), המופק משיח *Leptospermum scoparium* הגדל בניוזילנד), כדי למשוך את בוגרי חיפושית האמברוזיה של האבוקדו. הנימוק לבחינת שמן מנוקה התבסס על לכידה (אם כי בדיעבד לא די יעילה) של מין חיפושית אמברוזיה קרוב, *Xyleborus glabratus*, שהתפשט במזרח ארה"ב במהלך העשור האחרון והיה אחראי להשמדת מינים של עצי יער מהסוג *Persea*. נמצא ששמן מנוקה הוא פיתיון חלש לחיפושית האמברוזיה של האבוקדו, ובהתחשב באוכלוסיית החיפושית הגדולה בשטחים בהם הופעלו המלכודות, פיתיון זה אינו מתאים. נמצא ש-Quercivorol (אחד המרכיבים בפרומון ההתקהלות של חיפושית האמברוזיה *Platypus quercivorus*, מתת המשפחה Platypodinae הפוגעת ביפן בעצי אלון במצב של עקה), מושך את שני מיני חיפושיות האמברוזיה מהקומפלקס *E. fornicatus*. על בסיס מידע זה נבחנה בישראל לאחרונה המשיכה של פיתיונות Quercivorol המיוצרים בחב' 'ChemTica Internacional' מקוסטה ריקה. נמצא שהמשיכה לפיתיון זה של חיפושית האבוקדו המצויה בישראל הינה חזקה. עם זאת נראה שהפיתיון בו נעשה שימוש אינו עוצמתי דיו על מנת להתחרות בעצי האבוקדו כמקור משיכה. אין הבדל של ממש בין מלכודות דבק למלכודות משפך ונראה על כן ששני טיפוסים המלכודות יוכלו לשמש בלכידה למטרת ניטור. הקשר בין מצב נגיעות בחלקת האבוקדו לבין כמות הלכידה במלכודות, מצביע על כך שהזיקה אינה מובנת מאליה ונדרש מחקר נוסף על מנת לגבש פריסה מתאימה במספר מינימאלי של מלכודות, על מנת שגובה הלכידה ישקף את מצב אוכלוסיית החיפושיות בחלקה הנדגמת. משיכה חזקה של חיפושיות דווקא אל עצים נגועים, כבר נרשמה בתוכנית המחקר הקודמת. בתוכנית הקודמת נבחנה ההשפעה של השראת התקפה מלאכותית של הענפים על אכלוסם בשלב מאוחר יותר, בהשוואה לענפים שלא

הותקפו. התוצאות שהושגו השנה מאששות בדרך אחרת את ההעדפה של החיפושיות לענפים מותקפים, ככל הנראה בשל פעילות הפטריות המיוחדות לעצה גם באותם מקרים שההתקפה נכשלת (או במקרים שהפטריות מאולחות באופן מלאכותי). ההשפעה המועטה של הפיתיון במקרה זה מוצאת את ביטויה גם בהבדל הגדול שבין מספר הכיבים שהתווספו על עצי האטינגר לעומת עצי האס, וזאת למרות הכפלת עוצמת הפיתיון והעובדה שכל העצים בניסוי מצויים באותה תת חלקה. הדבר מעיד גם על משיכה מועטה של חיפושיות לעצי האטינגר כפי שהתקבל בניסויים אחרים שבהם בחנו את ההבדל בין שני הזנים בהיבטים אחרים.

## 7. מטרות המחקר לשנת 2017

- (1) סיכום הממצאים הקשורים התפשטות הפוזריום *Fusarium euwallaceae* בעצה כתוצאה לאילוח ע"י החיפושית,
- (2) בחינת השפעת הטמפרטורה על התפתחות שלושת הפטריות הסימביוטיות,
- (3) מהלך ההתבססות של הפטריות הסימביוטיות בעקבות התקפות של החיפושית בענפים בהם היא לא מצליחה להעמיד גלריות רבייה.
- (4) המשמעות של הפוזריום בגרימת הנזק לענפי האבוקדו באמצעות חיקוי הפגיעה הנגרמת ע"י החיפושית, זאת לצורך ברור האם הפגיעה היא התוצאה של נבירת הגלריות בבסיס הענף, התבססות מסיבית של פוזריום הסימביוטי, או שניהם.
- (5) השפעת העצה על ביצועים של הזחלים בהתאמה לביצועים של החיפושית על מין העץ הפונדקאי ממנו נלקחה העצה.
- (6) לבחון האם הזנה של הבוגרת המגיחה בפטרייה באופן מלאכותי עדיין תאפשר לה לשמור על מיני הפטריות עליהם שהתפתחה (כלומר הובאו למערכת הגלריות ע"י האימא).
- (7) האם כתוצאה על הזנה גנוטיפ פטרייה שונה, ייווצר מצב בו הבוגרת החשה נושאת שני גנוטיפים שונים של אותו המין ואז במהלך ביסוס גלריה חדשה תיצור את ההזדמנות להיברידיזציה בניהם.
- (8) בחינת תוארית אבקתית של התכשיר בוטניגארד על אכלוס ענפי אבוקדו ע"י חיפושית האמברוזיה במטע.
- (9) בחינה במעבדה של רגישות זחלים ובוגרים של חיפושית האמברוזיה לשני מיני פטריות אנטומופתוגניות.

## 8. פרקי הדוח, כולל תוצאות עיקריות ומסקנות

8.1 לימוד דפוסי האכלוס של החיפושית האמברוזיה בכל הקשור להצלחת האילוח ולתגובה של עץ האבוקדו (מטרה 1 בתוכנית המקורית)

### מבוא

חיפושית האמברוזיה *Euwallacea nr fornicats* נושאת שלושה מיני פטריות סימביוטיות, הפוזריום *Fusarium euwallaceae*, *Graphium euwallaceae* (המכונה כאן גרפיום) ו-*Paracemonium pembeum* (המכונה כאן אקרמוניום), שגם הם מינים חדשים למדע. מצאנו שזחלי החיפושית משלימים את התפתחותם על המצע המלאכותי עליו גדלים הפוזריום או הגרפיום, אך לא על אקרמוניום. כל שלושת מיני הפטריות בודדו מענפי אבוקדו, קיקיון, אדר מילני ואלון ארך עוקצים. אנו מניחים לפיכך שכל השלושה מופיעים בגלריות של עצים

פונדקאים בהם החיפושית מתפתחת בהצלחה. במערכת מעבדתית החיפושיות נוטות להתחיל בהטלה בסביבה בה מצויה פטריית הפוזריום, ופחות בסביבה בה מצויה הגרפיום מלכתחילה. בראשי החיפושיות הבוגרות הצעירות נמצאו כל שלושת מיני הפטריות הסימביוטיות בכמות נמוכה יחסית. ראשי בוגרות בגיל ביניים הכילו אף הן את כל שלושת מיני הפטריות. הבוגרות הבשלות לגיחה הכילו בעיקר פוזריום, מעט גרפיום וככל הנראה אקרמוניום בכמות קטנה מאד. כמות הפוזריום בחיפושיות הבשלות הייתה גדולה בין פי 10 עד 100 מזו שבבוגרות הצעירות. תבנית זו חזרה על עצמה בכל החיפושיות שנלקחו מאבוקדו, קיקיון ואלון ארך עוקצים.

מחזור ההעברה המשוער של הפטריות בין החיפושית לעץ המאכסן הוא כדלקמן: לקראת תעופה ואכלוס פונדקאי חדש החיפושית הבוגרת טוענת את עצמה בעיקר בפטריית הפוזריום. שתי הפטריות האחרות כמעט שאינן ניכרות בשלב זה. פטריית הפוזריום נדרשת בתהליך ההתבססות בעץ פונדקאי חדש, או בחדירה לאתר חדש, בפונדקאי בו התפתחה החיפושית. הפוזריום משמשת גם מזון לבוגרים בשלבי ההתבססות הראשונים בפונדקאי ויתכן אף לזחלים לאחר הבקיעה. הגרפיום נדרשת כמזון עיקרי להתפתחות הזחלים ולהבשלת הבוגרים הצעירים. התפקיד של פטריית האקרמוניום אינו ברור; יתכן שהיא מהווה תוסף מזון, כאנטגוניסט כנגד פטריות זרות, או מיקרואורגניזמים אחרים שעלולים להשתלט על פני הגלריות ולשבש את התפתחות גני הפטריות הסימביוטיות.

לאחר הגיחה והתייבשות הענף, נרשמת כצפוי דעיכה של הפוזריום שכלל הנראה אינה שורדת היטב ברקמה המתה, לעומת מיני הפטריות הסימביוטיות האחרות המצליחות ככל הנראה לשרוד היטב על רקמה המתה גם לאחר הגיחה. הפעילות של הפטריות ברקמה החיה היא הפוכה, הפוזריום המאולח שורד לפחות שנתיים ברקמה החיה; לעומת שני מיני הפטריות הסימביוטיות האחרות, הגרפיום והאקרמוניום, כמעט נעלמות חודשיים לאחר ההזרקה.

#### **מטרות,**

##### המטרה המרכזית של פרק זה של הדוח היא לברר ארבעה סוגיות הקשורות הפטריות:

- 1) סיכום הממצאים הקשורים התפשטות הפוזריום *Fusarium euwallaceae* בעצה כתוצאה לאילוח ע"י החיפושית,
- 2) השפעת הטמפרטורה על התפתחות שלושת הפטריות הסימביוטיות,
- 3) מהלך ההתבססות של הפטריות הסימביוטיות בעקבות התקפות של החיפושית בענפים בהם היא לא מצליחה להעמיד גלריות רבייה.
- 4) המשמעות של הפוזריום בגרימת הנזק לענפי האבוקדו באמצעות חיקוי הפגיעה הנגרמת ע"י החיפושית, זאת לצורך ברור האם הפגיעה היא התוצאה של נבירת הגלריות בבסיס הענף, התבססות מסיבית של פוזריום הסימביוטי, או שניהם.
- 5) השפעת העצה על ביצועים של הזחלים בהתאמה לביצועים של החיפושית על מין העץ הפונדקאי ממנו נלקחה העצה



## שיטות

בידוד הפטריות מתוך העצה התבצע כדלקמן, הענפים הנגועים הובאו למעבדה, מהעצה נלקחה דגימה של קטעי עצה בעובי של 5 מ"מ. אלה הוכנסו למבחנות אפנדורף עם תמיסה סיליין (0.85 g NaCl, 100 µl tween) PDACI (20, dH<sub>2</sub>O per L) לאחר ערבוב והפרדה בצנטריפוגה, ריכוז התכשיר ומיהולו, 100µL נזרעו על מצע PDACI בשתי חזרות. זיהוי הפטריות התבצע על פי המורפולוגיה האופיינית לכל אחת משלושת מיני הפטריות. ריכוז את הנתונים שהתקבלו משורה של ניסויים שהתקבלו בשנות המחקר הקודמות, וזאת על מנת להציג את מרחק ההתפשטות של הפוזריום מאזור הגלריה אל תוך העצה.

מעקב אחר הפטריות שהוחדרו לעצה כתוצאה מהתקפות של החיפושית התבצעה על עצי אבוקדו מהזנים האס ואטינגר במטע בקיבוץ נחשולים. על מנת להבטיח את בקרת זמן ההתקפה והזמן שעבר מההתקפה ועד ביצוע הדגימה, בחרנו שישה עצים מכל זן, ותלינו נדיפיות quercivorol (תוצרת ChemTica Internacional, Costa Rica) על מנת להבטיח את ההתקפה ע"י החיפושיות. סמנו את מעט הכיבים שהיו על הענפים לפני החשיפה המבוקרת, ואחת לשבוע סימנו את הכיבים החדשים שנוצרו בעקבות החדירות של החיפושית בענפים בקוטר של 6-12 ס"מ. העצים נוטרו משך כל מהלך המחקר. גיל הכיב היה תוצאה של שבוע ההתקפה והזמן שעבר בין ההתקפה לדגימה של העצה שמתחתיו. נבחנו סדרת גילים בין 3 ל 300 ימים. במקרה זה דוגמאות העצה נלקחו באמצעות מקדח עצים (increment borer). נוכחות וכימות הפטריות התבצע כנ"ל.

השפעת הטמפרטורה על התפתחות הפטריות התבצעה כדלקמן. תבדידים של שלושת מיני הפטריות ( *F. euwallaceae* -isolate 3-2, *G. euwallaceae* -isolate G-1, *P. pembeum* -isolate ACR-15, 10, 20, 25, 30, 32, ) בדיסקית ניר סינון והונחו להתפתחות במרכז צלחות פטרי בסדרה של טמפרטורות ( 5, 10, 20, 25, 30, 32, 35, 40 °C). קוטר המושבה שהתפתחה נמדד אחת למספר ימים (3, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 17, 21 ימים) בכל טמפרטורה. קצב הגדילה חושב ע"י חילוף הערכים מעקומה המייצגת הקשר בין גודל המושבה לבין הטמפרטורה.

חיקוי הנזק הנגרם ע"י החיפושיות ובאמצעותו לברר את מעורבות הפוזריום התבצע כדלקמן. עשרים ענפים בעצים מהזן האס, בקוטר ממוצע של  $6.0 \pm 1.9$  ס"מ נבחרו לתצפית, 10 ענפים ממטע בקיבוץ אייל ועשרה אחרים ממטע בקיבוץ נחשולים. בבסיס של כל ענף, בין 10-20 ס"מ מנקודת הפיצול, סומנו 50 נקודות בתבנית של 5 שורות מקבילות לאורך הענף, כאשר המרחק בין השורות היה 14-15 מ"מ והמרחק בין הנקודות בתוך השורה היה כ- 10 מ"מ. כל נקודה נקדחה במקדח שקוטרו שני מ"מ לעומר של 10-12 מ"מ. בחמישה ענפים בכל מטע אולח תרחיף נבגים של הפוזריום בנפח של 10 µl בריכוז של  $10 \times 10^6$  spores/µl. לשאר מחצית הענפים הוזרקו מים מזוקקים סטריליים באותו הנפח כביקורת. הקידוחים התבצעו ב- 20 מרס 2017 התפתחות הכיבים והפרשה הסוכרית כתוצאה מהטיפול נבחנו באותה השנה ב- 3 ביולי וב- 31 באוגוסט, (ביקור ראשון ושני בהתאמה) באייל, ובאחד באוגוסט וב- 12 בספטמבר, (ביקור ראשון ושני, בהתאמה) בנחשולים. ב- 5 בדצמבר כל הענפים נכרתו והובאו למעבדה על מנת לבחון את התפשטות ההחמה לאורך העצה שהיא

התגובה מאפיינת את הענף לפגיעה. כל ענף חולק למקטעים שווים של 20 ס"מ ועוצמת נוכחות ההחמה נקבעה ונרשמה.

השפעת העצה על ביצועים של הזחלים בהתאמה לביצועים של החיפושית על מין העץ הפונדקאי ממנו נלקחה העצה נבדקה כדלקמן. מאה ועשרים זחלים (שמקורם מאדר מילני) עברו חיטוי ב-70% אתנול, והונחו על גבי צלחות פטרי המכילות פטריית פוזריום שגדלה על גבי מצע 2% אגר מים ורקמת עצה מרוסקת, מארבעה פונדקאים שונים של אמברוזיה: האס, אטינגר, אפרסמון ואדר מילני (עשרה זחלים על כל צלחת, שלוש צלחות מכל פונדקאי). לאחר מכן, נבדקו הצלחות בארבע נקודות זמן שונות (שלושה ימים, שבוע, עשרה ימים ושבעיים לאחר תחילת הניסוי) על מנת לבדוק את התפתחות והתבגרות הזחלים, ולמנות את מספר הפרטים מכל שלב התפתחותי.

## תוצאות

### 1א. התפשטות הפוזריום הסימביוטי בעצה

בידוד הפוזריום הסימביוטי מעצה שאוכלסה בהצלחה על ידי חיפושית האמברוזיה הראה שהפטרייה בודדה מכל דגימות העצה שנלקחו מנקודת החדירה של החיפושית. ככל שמתרחקים מנקודת החדירה או הגלריה, שיעור הדגימות מהן בודדה הפטרייה הולך ופוחת ולא עולה גם במקרי קיצון מעטים על מרחק של 10 ס"מ (איור 1 עמ' 22).

### 1ב. השפעת הטמפרטורה על קצב התפתחות הפטריות הסימביוטיות

התוצאות מוצגות באיור 2 (עמ' 22) איור מצביע על כך שקצב ההתפתחות של הפוזריום מהיר יותר, מגיע לשיאו בטמפרטורה של  $26^{\circ}\text{C}$  ~ וההתפתחות נבלמת ב  $34-35^{\circ}\text{C}$ . שיא קצב ההתפתחות של המינים האחרים הוא ב-  $30^{\circ}\text{C}$  ~ והתפתחות נבלמת ב-  $37-38^{\circ}\text{C}$ .

### 1ג. מהלך ההתבססות של הפטריות הסימביוטיות בעקבות התקפות סרק של החיפושית בענפי אבוקדו.

התבססות הפטריות כתוצאה של התקפות סרק של החיפושית כפי שהיא מתבטאת בשיעור (%) הדגימות מהן התקבל בידוד של שלושת מיני הפטריות וכמותן (CFU – יחידות ריבוי) מכיבים שבהם אין התבססות ורבייה של החיפושית, מוצג באיור 3 (עמ' 23). תדירות בידוד גבוהה 60-100% וכמות גדולה של פוזריום התקבלה לאורך כל מהלך הדגימות עד 292 ימים לאחר ההתקפה (לא נבדקה תקופה הארוכה יותר). תדירות בידוד והכמות של הגרפיום, הייתה גבוהה 14 ו-19 ימים לאחר ההתקפה, ומעטה 25 ו-35 ימים לאחר ההתקפה. הגרפיום לא נמצא בימים הראשונים לאחר ההתקפה ומהיום ה-42 והלאה לאחר ההתקפה. גם האקרמוניום הופיע בימים הראשונים עד 15 ימים לאחר ההתקפה, ונעלם בדגימות המועדים רחוקים יותר מיום ההתקפה.

ד1. המשמעות של הפוזריום בגרימת הנזק לענפי האבוקדו באמצעות חיקוי הפגיעה הנגרמת ע"י החיפושית

הפרשה סוכרית רבה נרשמה בכל הענפים, טיפולי אילוח הפוזריום והביקורת כאחד, בביקור הראשון. בביקור השני, הפרשה סוכרית ניכרת נצפתה רק בענפים שקורטם היה קטן מ 5.6 ס"מ, בטיפול וביקורת. מתוך 20 הענפים, השלושה שנקטלו היו ענפים דקי קוטר (פחות מ- 3.6 ס"מ) וכולם בקבוצת האילוח בפוזריום. כל שאר הענפים נותרו חיוניים עד לכריתתם והבאתם לבדיקה במעבדה. מידת ההחמה של העצה מסוכמת בטבלה 1.

טבלה 1. השוואה של עוצמת ההחמה, במסגרת חיקוי הנזק הנגרם לענף, בין ענפים שאולחו (הוזרקו) ב-פוזריום לבין ענפי ביקורת שהוזרקו במים, והתאמה למקטע הענף לעבר למקטע בו התבצעו הקידוחים ואילוחים וההזרקות. אורכן של כל מקטע – 20 ס"מ. קטע A הוא הנמוך והקרוב למקטע המטופל (נקודת האילוח/הזרקה) ואילו מקטע D הוא הגבוה והרחוק ממקטע המטופל בענף.

Examined branch section	Fusarium inoculated branches (n=7)			Water injected branches (n=10)		
	Intensive	light	none	Intensive	light	none
Section A	7	0	0	0	*5	5
Section B	7	0	0	0	0	0
Section C	4	1	2	0	0	0
Section D	0	1	6	0	0	0

\* staining at the lower part of the section alone.

ממצאי טבלה 1 מדגימים בבהירות שבענפים שאולחו בפוזריום, ההחמה ניכרת (Intensive) מאד ומגיעה ברוב המקרים עד המקטע הרביעי (מקטע D מעל איזור האילוח), כלומר כ 70-80 ס"מ מאיזור אילוח בענף, ואילו בענפי הביקורת (הזרקת המים) ההחמה היא קלה (light) וניכרת רק במחצית מהענפים.

ה1. השפעת העצה על ביצועים של הזחלים בהתאמה לביצועים של החיפושית על מין העץ הפונדקאי ממנו נלקחה העצה

התוצאות שהתקבלו מרוכזות בטבלה 2. נראה שלא נרשמו הבדלים גדולים בביצועים של הזחלים שהתפתחו על פוזריום הסימביוטי.

טבלה 2. הצלחת ההתפתחות של זחלי חיפושית האמברוזיה על הפוזריום הסימביוטי שהתפתח על מצע בתוכו נמצאה עצה מרוסקת של עצת הפונדקאי

העץ ממנו נלקחה העצה	התאמת מין העץ להתפתחות החיפושית	סה"כ הזחלים שהחלו את ההתפתחות	סה"כ הזחלים שהשלימו את התפתחותם	אחוז הצלחת ההתפתחות
אדר מילני	גבוהה	28	24	85.7
אבוקדו – אטינגר	נמוכה מאד	28	22	78.6
אבוקדו האס	בינונית-נמוכה	18	11	61.1
אפרסמון	אין התפתחות	28	20	71.4

## דין

דגימות הפוזריום הסימביוטי בעצה מצביעות על כל שהפטרייה אינה מתפשטת בעצה. חשוב לציין שיש להבחין בין ההחמת העצה לבין נוכחות הפטריות. אף לא אחד משלושת מיני הפטריות הופיעו בעצה שאינה מוכתמת, אך מרחק ההחמה שנרשם הוא גדול, ושונה מאד מזה של התפשטות הפוזריום. ניכר שהתפתחות הפוזריום היא מהירה יותר אך הוא רגיש יותר לטמפרטורות גבוהות מאשר מיני הפטריות הסימביוטיות האחרים. הגרפיום והאקרמוניום מציגים תמונה אחרת, התפתחות איטית יחסית ורגישות פחותה לטמפרטורות גבוהות. מצב זה עשוי להיות מוסבר בעובדה שפוזריום מתקיים למעשה ברקמה החיה, ואילו המינים האחרים פועלים ברקמה כמעט או לחלוטין מיתה, שהטמפרטורות בה באופן טבעי גבוהות יותר במהלך העונה החמה מזו של רקמה חיה.

מעקב אחר ההישרדות הפטריות הסימביוטיות בעצת האבוקדו לאחר התקפת הסרק של החיפושיות תואמת היטב את מהלך הישרדות הפטריות בעקבות אילוח מלאכותי שלהן בעצה, כפי שדיווחנו בשנת המחקר הקודמת. תמונת מצב זו מסבירה את הדינמיקה של התפתחות הפטריות בהתאמה לתהליך הרבייה של החיפושית. ה- *mycangia* (כיסוי הנבגים בראש החיפושית) בנקבה הבוגרת הבשלה, מכילים לקראת הגיחה כמות גדולה מאד של פוזריום וכמות קטנה מאד של שתי הפטריות האחרות. נראה שבהתקפה וחדירה לתוך העצה במהלך כרסום העצה לצורך יצירת הגלריה, מחודר קודם כל הפוזריום שהיא הפטרייה הפתוגנית שתפקידה להתגבר על עמידות הרקמה החיה. הפוזריום משמשת גם כמזון הראשון של הזחלים בתחילת התפתחותם. לאחר מכן מתבססת הגרפיום, שהיא המזון העיקרי של הזחלים. כפי שהראנו בדוחות קודמים זו הפטרייה העיקרית במעי הזחלים בדרגות הזחל השני והשלישי. הגרפיום, מתפתחת היטב על רקמה פגועה שאינה חיה למעשה. לכן הגרפיום הופיעה בכמות משמעותית רק בשבוע השני לאחר ההתקפה. היות ובתנאי ניסוי זה (ענפי אבוקדו בעלי קוטר גדול מידי בהם לא מתקיימת בדרך כלל רבייה) לא נמשך תהליך הרבייה, והרקמה סביב נקודת החדירה נותרה חיונית, הגרפיום לא שורדת לאורך זמן, והיא בפועל נעלמה לאחר כחודש. תמונה דומה של התפתחות התקבלה גם לגבי האקרמוניום, המתנהגת באופן דומה. חשוב להזכיר שתוצאה זהה של שתי הפטריות האלה, שהן לא שורדות בעצת אבוקדו חיה, התקבלה באילוחן לענפי האס ואטינגר מעבר לחודשים, מהם הן נעלמו לאחר כחודשיים. כמו במקרה של האילוח (דיווח קודם) גם במקרה של התקפות הסרק נותרת הפוזריום לאורך זמן, בשל יכולתה להתמודד ולשרוד ברקמה החיה. ניתן להניח שבידוד חיובי של הפוזריום היה מתקבל מעבר ל 292 הימים של מעוד הדגימה המאוחר ביותר בניסוי זה.

הניסויי חיקוי התקפה והתבססות של החיפושית התבצע האמצעות ביצוע של כחמישים קידוחים בבסיס הענף, אמור היה לחקות את הנזק הטיפוסי הנגרם ע"י התקפה והתרבות של החיפושית, המתרחשת בעצי אבוקדו בבסיס הענף. תוצאות תצפית מורכבת זו מעלות את התובנות הבאות. א) ענפים דקי קוטר הם הרגישים ביותר

כפי שניכר ראשית כל בתגובת ההפרשה הסוכרית. (ב) ברוב המקרים שתי הפעלות הנפרד, קידוח ואילוח הפטרייה, וקידוח והזרקת המים, לא גרמו לנזק משמעותי לענף כפי שהדבר ניכר באיכות העלווה והפירות שנשאו הענפים שנבחרו לניסוי, פרט לשלושה ענפים דקי קוטר בקבוצת אילוח הפוזריום שנקטלו. (ג) בענפים שאולחו בפוזריום פעילות ההחמה הייתה חזקה ונרשמה לאורך הענף בעוד שללא הפוזריום תגובת ההחמה היא חלשה וממוקדת קרוב לאזור הפגיעה בלבד. התרשמנו (אם כי הניסוי אינו מספק די חזרות לקביעה מובהקת) שבשתי קבוצות הטיפול עוצמת ההחמה עולה ביחס הפוף לקוטר הענף. ממצאים אלה מאששים כמעט במדויק את המסקנות שהתקבלו כבר בפרק קודם של המחקר שהדגים בבהירות את העובדה שקיים קשר ברור וחזק והפוך בין העלייה בקוטר הענף בעצי אבוקדו להצלחת הרבייה של החיפושית. למערכת ניסוי זה עשויה להיות חשיבות רבה בשל האפשרות שכך ניתן להעריך את מידת העמידות של עץ האבוקדו לחיפושית האמברוזיה. מין הראוי לחזור על ניסוי זה בהרחבה תוך הכללת זנים נוספים של אבוקדו, כאלה הנחשבים לרגישים ולצדם כאלה הנחשבים עמידים, כמו אטינגר.

נראה שהפוזריום שהתפתח על מצע על בסיס עצת פונדקאי, שנלקחה לצורך הניסוי ממיני עצים המציגים התאמה שונה לרבייה של חיפושית האמברוזיה, לא גרם להבדלים ניכרים בביצועי הזחלים, כלומר על פניו אין בעצה של פונדקאים שאינם מתאימים להתפתחות החיפושית גורם שעשוי להשפיע באופן ברור האמצעות הפוזריום על הזחלים.

8.2 העמקת הידע אודות יחסי הגומלין בין החיפושית והפטרייות הסימביוטיות (מטרה 2 בתוכנית המקורית)

#### מבוא

ללא ספק, בהיבט החקלאי והביולוגי, מבין שלושה מיני פטריות סימביוטיות שנושאת חיפושית האמברוזיה של האבוקדו המשמעותי ביותר הוא הפוזריום *Fusarium euwallaceae*. הסימביוזה המשותפת למיני החיפושיות מהסוג *Euwallacea* ולמיני הסוג פוזריום הופיעה ככל הנראה, לפני 21 מיליון שנה במיאוקן התחתון (early Miocene) (Jordal and Cognato 2012; Kasson et al. 2013). מבין 11 המופעים של גידול פטריות ע"י פרוקי רגלים, זהו המקרה היחיד בו מיני הסוג פוזריום לוקחים חלק (O'Donnell et al. 2015). עדויות מולקולאריות מצביעות על כך שמיני *Euwallacea* החליפו מספר פעמים את מיני הפוזריום הסימביוטיים שלהם (et al. 2010). ושינויים גנטיים חדשים של הסימביוטיים נקבעים כתוצאה של היברידיזציה תוך מינית (O'Donnell et al. 2015). כך לדוגמה נמצא שהמוצא של הפוזריום *F. ambrosium* המלווה את חיפושית האמברוזיה של התה (מין חבוי של *Euwallacea fornicatus*) מוצאו משלושה הורים שונים (triparental origin) (Kasson et al. 2013). חיפושית האמברוזיה של האבוקדו, בדומה לחיפושיות אמברוזיה אחרות, נטענת בפטריות הסימביוטיות במהלך התבגרותן בחלל הגלריות. כלומר הצאצאים נטענים בפטריות שגדלו בסביבתם שלא בהכרח הובאו ע"י אימם, אלא ע"י נקבה אחרת, שעשויה לשאת טיפוסים גנטיים שונים של הסימביוטיים. בבחינה של נוכחות הפטריות הסימביוטיות, בשלבי ההתפתחות השונים של חיפושית האמברוזיה של האבוקדו, מצאנו שלעיתים שהן בודדו גם מתוך הגולם (Freeman et al. 2016).

## המטרות

1) לבחון האם הזנה של הבוגרת המגיחה בפטרייה באופן מלאכותי עדיין תאפשר לה לשמור על מיני הפטריות עליהם שהתפתחה (כלומר הובאו למערכת הגלריות ע"י אימה).

2) האם כתוצאה על הזנה גנוטיפ שונה (של פוזריום כדוגמא), ייווצר מצב בו הבוגרת החשה נושאת שני גנוטיפים שונים של אותו המין ואז במהלך ביסוס גלריה חדשה תיצור את ההזדמנות להיברידיזציה בניהם.

## שיטות

ארבעים חיפושיות צעירות (callow adults) ושישים גלמים (pupae) (דור I) נאספו מן הטבע מתוך ענפי אדר מילני שאוכלס ע"י החיפושית. הפרטים חוטאו באתנול 70% והונחו על גבי צלחות פטרי המכילות אחד משלושה תבדידים של הסימביונטים: פוזריום מזן בר, פוזריום טרנסגני המבטא GFP וגרפיום מזן בר, ששימשו מקור המזון היחידי עבורם. בכל צלחת היו 10 חיפושיות צעירות או עשרה גלמים). (שתי צלחות מכל תבדיד הכילו 5-6 פרטים). צלחות הפטרי הכילו מצע PDA, 2% אגר ו-0.25g/L כלוראמפניקול שנזרעו בתבדידים השונים כשבוע קודם לכן, על מנת לקבל כיסוי מושלם של הצלחת. כשלושה שבועות לאחר מכן, משבגרו הפרטים (הבוגרים הצעירים או הגלמים שהפכו בינתיים לבוגרים) החיפושיות בשלו (כלומר הפכו חומות- שחורות) הן הועברו, לאחר חיטוי בתמיסת 70% אתנול, לצלחות פטרי נקיות (עם מצע של אגר מים 2% אגר ו-0.25g/L כלוראמפניקול) ופרוסת ענף ברכיטון במרכזן. שם הודגרו למשך חודש נוסף בטמפ' החדר, על מנת שייצרו גלריות ותתרחש הטלה. בתום החודש פורקה הגלריה, ובודדו ממנה החיפושיות הבוגרות והצעירות ובין הצאצאים (דור II). החיפושיות עברו חיטוי 15 שניות באתנול 70% ו-15 שניות ב-1% אקונומיקה, ראשיהן נכתשו בנוכחות 0.5 מ"ל תמיסת סליין ונזרעו על גבי מצע PDA (1.5% אגר ו-0.25g/L כלוראמפניקול) ובמקביל על צלחות עם אותו המצע בתוספת היגרומיציין 50 מ"ג למ"ל, זאת על מנת לבודד מתוכן את הפוזריום הטרנסגני המבטא חלבון ה GFP. כל דגימה שנזרעה הכילה מדגם מ-2-4 ראשי חיפושיות בוגרות (mature) או צעירות (callow). במחזור שני נלקחו שישים חיפושיות צעירות (callow adults) ושישים גלמים (Pupae) (דור I) שנאספו גם הן מאדר מילני. כל הפרטים עברו את אותו התהליך כפי שצוין קודם. בתום החודש פורקו הגלריות בצלחות הפטרי, הוצאו ממנה הזחלים והחיפושיות הבוגרות והצעירות (מדור II). כל הפרטים (דור II) חוטאו כנ"ל. כל דגימה שנזרעה הכילה מדגם מ-2-4 ראשי חיפושיות בוגרות (mature) או צעירות (callow) או 2-4 זחלים (larva). בשני המחזורים, בנוסף לספירה, המושבות נבדקו גם תחת בינקולאר פלאורוסנטי Leica MZFLIII stereomicroscope (Germany) באקסיטציה 460-500nm ואמיסיה באורך גל 510nm על מנת לאשש הימצאותם של תבדידים פלואורסנטים ו/או תבדידי זן בר. התמונות צולמו באמצעות Nikon DS-Fi1 digital camera and NISElements software Japan.

הכנת פוזריום טרנסגני המבטא חלבון GFP התבצעה כדלקמן. טרנספורמציה עם פלסמיד המבטא חלבון GFP לתבדיד 3-2 של *Fusarium euwallaceae* עם הוקטורים ל GFP eGFP pCPXHY1 התקבל מספרד (D. Vela-

PGDP והטרמינטור של הפטרייה (*Aspergillus nidulans* *gpd* (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) והגן eGFP תחת הפרומוטור PGDP). (Corcía and A. Pérez-García, Univ. of Malaga, Spain). הוקטור מכיל את גן ה- eGFP תחת הפרומוטור PGDP. הפטרייה גודלה במצע נוזלי בטלטול ב 100 מ"ל מצע סטנדרטי DVK1 למשך שלושה ימים. הטרנספורמציה נעשתה לפרוטופלסטים עם פלסמיד מעגלי בתחילה. כדי להעלות את יעילות הטרנספורמציה נעשו במקביל גם טרנספורמציות עם פלסמיד מיושר. התפטיר נחשף למשך 16 שעות לאנזימי פרוק (ליזיז) לקבלת הפרוטופלסטים. לאחר מכן, הם נחשפו ל-DNA של הפלסמיד למשך 25 דקות בקרח בבופר PEG. לאחר מכן, הפרוטופלסטים עורבבו במצע רגנרציה ליצירת דופן מחדש ונזרעו בצלחות פטרי למשך הלילה. למחרת נמסכה שכבה חדשה של מצע שהכיל היגרומיצין לבידוד המושבות שהכילו את הפלסמיד עם הגן ל-GFP. כעבור 3-5 ימים, לאחר זריעת השכבה השנייה, הופיעו מושבות עמידות להיגרומיצין שגם הכילו הגן המדווח ל-GFP. פטרייה זו שימשה למעבד אחר הופעתה ברקמות החיפושיות שאכלס.

## תוצאות

איור 4 (עמ' 24) מציג את תוצאות הבידוד של הצאצאים של פרטים (ההורים) שנלקחו מהטבע (אדר מילני) וניתן להורים להיזון מאחת משלושת הפטריות פוזריום מזן בר, פוזריום טרנסגני המבטא חלבון GFP וגרפיום מזן בר. בפונדקאי מהטבע מצויים שלושת הפטריות הסימביוטיות, פוזריום מזן בר, אקרמוניום מזן בר. הפטרייה האחרונה לא בודדה ולא שולבה בניסוי זה. ההורים היו משתי דרגות התפתחות, בוגרים צעירים, המכילים על פי ממצאי מחקרנו הקודם (Freeman et al. 2016), כמות קטנה וזהה (במידה רבה) של שלושת הפטריות הסימביוטיות, וגלמים המכילים ככל הנראה (שוב על פי הפרסום הנ"ל) מעט מאחת או יותר מהפטריות הסימביוטיות, גם במקרה זה בכמות קטנה מאד. צאצאי ההורים משני הגילים הציגו תמונה דומה. הזנת ההורים על פוזריום זן הבר לא מנעה את הופעת הגרפיום בצאצאים. הגרפיום, כצפוי, ניכר במידה רבה בזחלים ובבוגרות הצעירות ופחות או בכלל לא בבוגרות הבשלות. בהזנה על גרפיום מזן הבר, התקבלה תמונה דומה, עם זאת, כאשר ההורים נחשפו למצע הגרפיום כגלמים, לא נרשם כלל פוזריום. כאשר להורים ניתן להיזון על פוזריום טרנסגני המבטא GFP, הוא התבטא באופן דומה ובמקביל לפוזריום הבר, כלומר פרטים רבים שנבדקו נשאו את שני טיפוסים הפוזריום יחד. תופעה זו בלטה יותר כאשר ההורה הועבר בשלב הגולם. תמונה 1 (עמ' 26) מדגימה את הנוכחות של שני טיפוסים הפוזריום בראשי חיפושיות שהתפתחו על מצע בו גדל פוזריום טרנסגני המבטא GFP.

## דין

התוצאות שהתקבלו מאששות את ההנחות שהיו בבסיס הניסוי. נראה שהמעבר האנכי של הפטרייה מתקיים בשני מסלולים, המסלול העיקרי הוא באמצעות הזנה של הבוגרים הצעירים על הפטריות שגודלו בגלריות ע"י דור האימהות, רוב הבימסה הנקלטת ע"י הפרטים הצעירים מקורם בטעינה מתוך הגלריות. המחקר הוכיח שמתקיים גם תהליך של מעבר הפטריות הסימביוטיות ישירות באמצעות דרגת הגולם. מעבר אופקי גם הוא

מתאפשר והדבר הוכח באמצעות הזנה על פוזריום טרנסגני המבטא GFP. הניסוי גם הדגים את האפשרות של נשיאת שני קווים שונים של הפטרייה הסימביוטית (פוזריום, במקרה זה) ומכן גם את האפשרות של היברידיזציה ויצירת טיפוסים גנטיים חדשים. תוצאות מעלות שאלות רבות אחרות שיידרש לבחון אותם במסגרת אחרת.

8.3 בחינת יישום פטריות אנטומופיתוגניות ותכשירים כאמצעי להדברת פגע האמברוזיה במטעי האבוקדו. (מטרה 3 בתוכנית המקורית)

#### מבוא

הכוונה המקורית של פרק זה בתוכנית המחקר לבחון את השימוש בפטריות אנטומופיתוגניות, בשלב ראשון שימוש בתכשיר המסחרי BotaniGard המבוסס על הפטרייה *Beauveria bassiana* בדרך של טיפול בענפים למניעת התבססות חיפושית האמברוזיה. שאלת הטיפול באמצעות פטריות אנטומופיתוגניות עלתה בשל המגבלות של שימוש בתכשירי הדברה במטעי האבוקדו. הפעלת אמצעי זה אינה פשוטה, גם בהיבט הממשיק וגם בהיבט הכלכלי. השיקול לבחון את הסוגיה נבע גם בשל ההנחה שהתואריות של תכשירים אלו הולכות ומשתפרות, ואחד הגורמים המגבילים, קרי, משך הפעילות של התכשיר לאחר היישום, יתארך בעתיד הקרוב במידה מספקת על מנת לספק הגנה כנגד החיפושית. בעקבות חוסר ההצלחה של ניסויי השדה, הוחלט לקחת צעד אחורנית ולבחון את השפעת הפטריות האנטומופיתוגניות בתנאים מבוקרים במעבדה.

#### המטרות

- 1) בחינת תוארית אבקתית של התכשיר בוטיגארד על אכלוס ענפי אבוקדו ע"י חיפושית האמברוזיה,
- 2) בחינה במעבדה של רגישות זחלים ובוגרים של חיפושית האמברוזיה לשני מיני פטריות אנטומופיתוגניות.

#### שיטות

ניסויי שדה במהלך ביצוע הניסויים במטעי האבוקדו, בוצעו שני יישומים של התכשיר הנ"ל בתוארית אבקתית ביישום ידני. היישום הראשון בוצע באביב (אפריל 2016, תקופה מתאימה לפעילות הפטרייה בתכשיר) והשני בסתיו של אותה השנה (ספטמבר 2016, תקופה פחות נוחה, אך מאופיינת בפעילות רבה של חיפושית האמברוזיה). בכל יישום סומנו 40 ענפים, מחציתם טופלו בתכשיר (Caolin BOTANIGARD® WP + 22%).

ניסויי מעבדה בתאריכים: 24.8.17, 28.9.17, 19.10.17 בוצעו שלושה ניסויים הבוחנים השפעתן של פטריות אנטומופיתוגניות על זחלי ובוגרי חיפושית האמברוזיה. ב- 24.8.17 הוכנו 16 צלחות פטרי. 8 צלחות המכילות זחלים ו- 8 צלחות המכילות בוגרי אמברוזיה. המערכת הכילה מצע, פטריה, ובמערכת הבוגרים גם פיסת עץ ברכיטון. הצלחות גורדו מעודף קורי פטרייה, הביקורת לא טופלה, והטיפול רוסס בתמיסה המכילה פטריה *Metarhizium anisopliae*-MAK בריכוז  $10^8$  נבגים/מ"ל. לאחר שלושה ימים בתאריך 27.8.17 נספרו זחלים ולאחר ארבעה ימים 28.8.17 נספרו הבוגרים. ב- 28.9.17 הוכנו 11 צלחות פטרי המכילות 9 בוגרי



אמברוזיה כל אחת. המערכת הכילה מצע, פטריה, ופיסת עץ ברכיטון. הצלחות גורדו מעודף פטרייה, ביקורת לא רוססה בדבר, והטיפול רוסס בתמיסה המכילה BotaniGard בריכוז 1% כלומר בריכוז  $10^8$  נבגים/מ"ל של הפטרייה *Beauveria bassiana*. לאחר ארבעה ימים נספרו הבוגרים. ב- 19.10.17 הוכנו 12 צלחות פטרי. 6 המכילות זחלי אמברוזיה, 6 בוגרי אמברוזיה. המערכת הכילה מצע, פטריה, ובבוגרים גם פיסת עץ ברכיטון. הצלחות גורדו מעודף קורי פטריה, ורוססו בתמיסה המכילה MAK בריכוז  $2.2 \times 10^8$  נבגים/מ"ל. לאחר שישה ימים 25.10.17 נספרו זחלים ובוגרים החיים.

## תוצאות

ניסויי שדה: התוצאות לדאבוננו היו לא מוצלחות. באביב כמעט ולא הייתה פעילות של החיפושיות, ולכן כלל לא ניתן היה להסיק מסקנות של עונה זו. האכלוס של הענפים בטיפול הסתווי נע בין 0-2 כיבים לענף, ללא הבדל של ממש בין הטיפול לביקורת.

ניסויי מעבדה: מהניסויים עולות תוצאות (המרוכזות באיור 5, עמ' 25) מעודדות בסך הכול כי הזחלים הינם רגישים ביותר *Metarhizium anisopliae*-MAK בריכוז שיושם (איור 5 של ה-24.8). לא בחנו את רגישות הזחלים לבוטניגרד, אך הבוגרים (איור 5 של ה-28.9) מראים רגישות שמתאפיינת בשרידות של 15% לעומת 50% בביקורת. בניסוי השלישי (איור 5 של ה-19.10) התקבלה קטילה של 100% במערכת הנ"ל. בנוסף גם הבוגרים מראים רגישות ל-MAK והניסוי מתאפיין בשרידות של 15% לעומת 70% בביקורת.

## דין

ניסויי השדה הדגימו את הקושי למנוע את אכלוס ענפי האבוקדו באמצעות ריסוס התכשיר המסחרי שנוסה. על פי הרגישות המוכחת של אוכלוסיית החיפושית במעבדה, נראה שחוסר ההצלחה נובעת בהישרדות המועטה של התכשיר לאורך זמן. סביר שתוארית משופרת שתאפשר משך הישרדות ארוך יותר ועמידות טובה יותר לטמפרטורות גבוהות, תבטיח ההתמודדות טובה עם אוכלוסיית חיפושית האמברוזיה בסתיו שהיא תקופת השיא של פעילותה.

נראה כי המערכת הניסויים נתונה להשפעות רבות המשתקפות בשונות הרבה בתוצאות. לדוגמה: היכולת להפריד את הבוגרים מפיסת העץ. התפתחות מהירה של קורי הפטריות המוספות למערכת גרמו ככל הנראה לתמותה של פרטים.

נראה שקיים קושי לאמוד את מספר הפרטים במערכת צלחות הפטרי המשמשות בניסויים, ורצוי לשקול שדרוג של המערכת לצורך ניסויים נוספים הפטריות אנטומופתוגניות. מתבקש לחזור על בחינת יעילות בוטניגרד על זחלי חיפושית האמברוזיה, ורצוי לבחון שנית את חשיפת הבוגרים והזחלים ל- Ma-K, כדאי לשקול שימוש של הדברה משולבת של בוטניגרד עם MAK.

8.4 בחינת יישום פטריות אקריות פונגיבוריות כנשאות לפטריות אנטומופתוגניות אל תוך מערכת הגלריות של חיפושית האמברוזיה. (מטרה 4 בתוכנית המקורית)

#### **מבוא**

מסגרת זו באה לבחון את העיקרון האם אקריות פונגיבוריות (הניזונות על הפטריות) אשר נמצאות באופן טבעי באסוציאציה עם חיפושיות האמברוזיה יכולות לשמש נשא לפטריות אנטומופתוגניות. זאת, בדגש על העברה של פטריות האנטומופתוגניות אל תוך מערכת הגלריות בתוכן מתרבות חיפושיות האמברוזיה והפטריות הסימביוטיות. מטרה זו נבעה מהגילוי של אקריות במערכות הגלריות של חיפושית האמברוזיה בעצי אדר מילני בישראל. חשוב לציין, שמין עץ זה רגיש ביותר לפגע, וצפיפות הגלריות בו גדולה לעין שיעור מזו שבענפי האבוקדו.

#### **שיטות**

בשל מגבלות תקציב, הסכום והזמן שהוקדשו לכך היו מוגבלים. כלומר, הרעיון לבחון באופן יסודי את יחסי הגומלין בין האקריות לבין הפטריות האנטומופתוגניות במעבדה לא ניתן היה לביצוע. לכן הכוונה הייתה לבחון את התופעה ישירות במטע. הפעולות שהתבצעו בכיוון זה היו בחינת הנוכחות של האקריות המלוות את חיפושית האמברוזיה, ולהצביע על ביתי גידול בהם ניתן לבצע את תצפיות השדה. נערכו דגימות רבות של אוכלוסיית החיפושית שכללו בעיקר ענפי אבוקדו במטעים שונים, בעיקר, בקיבוצים אייל, נחשולים וכברי, וממקבצי קיקיון, בעיקר באזור בית דגן, מעגן מיכאל, ובנימינה. סה"כ מאות הענפים מאוכלסים של אבוקדו וקיקיון הובאו לבדיקה (יש לציין שענפים אלה גם שימשו על מנת להעשיר את אוכלוסיית המעבדה של החיפושית לצורך ביצוע ניסויים בשאלות מחקר אחרות).

#### **תוצאות**

נוכחותן של האקריות, (בניגוד למה שנצפה באדר מילני) הייתה דלה ביותר באבוקדו, ואפסית בקיקיון (כנראה בשל הרטיבות הרבה המאפיינת את העצה הנגועה של מין צמח זה). בסה"כ נבחנו קרוב לאלף חיפושיות ממטעים ורק אקריות מעטות נצפו (תמונה 2). לפיכך לא ראינו טעם להמשיך את התצפיות בכיוון זה.

#### **דיון**

בשלב זה אנו לא רואים מקום להמשיך ולפעול בתחום זה, בתקציב מוגבל. בשל הסיכויים הקטנים לשפר את הממשק, נושא זה אינו מצוי בעדיפות גבוה במסגרת קידום מממשק ידידותי לסביבה כנגד החיפושית.

## 9. הבעת תודה

אנו מודים לכל הנוטעים הרבים שבחלקותיהם אנו מבצעים את ניסויי השדה ובמיוחד לרוני יזרעאלי, עופרי יונגמן, רוני בוקסבאום (בוקסי), ולשתלנים על אספקת השתילים.

## 10. סיכום עם שאלות מנחות

### מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

(א) לבצע זיהוי מולקולארי של המינים המזיקים בקומפלקס חיפושיות האמברוזיה תחת השם *E. fornicatus* וזאת על מנת לאפיין את המין המצוי בישראל. (ב) לקבוע ולנתח את הבדלי הרגישות זני אבוקדו שונים להתקפת החיפושיות, תוך דגש על ההבדלים בין תקיפת האס לאטינגר. (ג) לאפיין את תבנית התקפה של החיפושיות על פני העץ תוך דגש על מיקום האכלוס לאורך הענף. (ד) ברור מהות ההחמה של העצה מבחינה כימית ומבנית (ה) להניח את הבסיס לניטור אוכלוסיית החיפושית באמצעות מלכודות טעונות הפיתיון, (ו) להשלים את נושא השפעה וההישרדות של כל אחת מהפטריות באבוקדו ובעצים פונדקאים אחרים. (ז) לבחון את החדרת הפטריות ע"י החיפושיות באותם מקרים בהם החיפושית תוקפת, העץ מגיב ע"י יצירת כיבים, אך אין המשך התפתחות, כפי שקורה בתקיפה של גזעים וענפים עבים בעץ האבוקדו, (ח) לבחון את הישרדות הפטריות בעצה הן בהחדרה מלאכותית של כל פטרייה ונפרד והן במצב של אילוח טבעי ע"י החיפושית, וגם לאחר הגיחה של החיפושיות. (ט) העמקת הידע אודות יחסי הגומלין בין החיפושית והפטריות הסימביוטיות והבנת מעבר אופקי ורוחבי של הפטריות באוכלוסיית החיפושית, (י) בחינת יישום פטריות אנטומופתוגניות ותכשירים כאמצעי להדברת פגע האמברוזיה במטעי האבוקדו, (יא) בחינת יישום פטריות אקריות פונגיבוריות כנשאות לפטריות אנטומופתוגניות אל תוך מערכת הגלריות של חיפושית האמברוזיה.

### עיקרי הניסויים והתוצאות.

מהלך ושיטות העבודה העיקריות: נעשה שימוש בכלים מולקולאריים להבחנה בין מיני קומפלקס המינים החבויים תחת השם *E. fornicatus*. ביצוע מערך דגימות לבחינת שכיחות והיווצרות כיבים במקביל להתפתחות וגלריות הרבייה. השוואה כימית ומבנית של עצה בריאה ומוכתמת, באמצעות GCMS ובחינה של האנטומיה של העצה בשני המצבים באמצעות חתכים מיקרוסקופיים. התבצע בידוד פטריות שמקורן מאילוח מלאכותי ומאילוח טבעי בלוחות זמנים שונים. מעקב אחר הפטריות שהוחדרו לעצה כתוצאה מהתקפות של החיפושית, הכנת פוזריום טרנסגני המבטא חלבון GFP. בחינת השפעתן של פטריות אנטומופתוגניות על זחלי ובוגרי חיפושית האמברוזיה. פטריית הפוזריום נותרת בסמוך לגלריות ובמקרי קיצון על מרחק של 10 ס"מ מהגלריה, התבססות הפטריות כתוצאה של התקפות סרק של החיפושיות מראה שתדירות בידוד גבוהה וכמות רבה של פוזריום התקבלה לאורך כל מהלך הדגימות עד לפחות 292 ימים לאחר ההתקפה, שבענפים שאולחו בפוזריום לצורך חיקוי התקפת חיפושיות ההחמה ניכרת מאד ומגיעה ברוב המקרים ל 70-80 ס"מ מאיזור האילוח בענף, ואילו בענפי הביקורת ההחמה היא קלה וניכרת רק קרוב לאזור ההזרקה, לא נרשמו הבדלים גדולים בביצועים של הזחלים שניזונו על פוזריום הסימביוטי שהתפתח על מצע מבוסס על עצה מפונדקאים מתאימים ושאינם מתאימים לרביית החיפושית, נראה שהמעבר האנכי של הפטרייה מתקיים בשני מסלולים, המסלול העיקרי הוא באמצעות הזנה של הבוגרים הצעירים על הפטריות שגודלו בגלריות ע"י דור האימהות, ומתקיים גם תהליך של מעבר הפטריות הסימביוטיות ישירות באמצעות דרגת הגולם. זחלים ובוגרים של החיפושית הינם רגישים לפטרייה *Metarhizium anisopliae* – הבוגרים רגישים גם ל- *Beauveria bassiana*. הופעת אקריות נישאות על חיפושית האמברוזיה היא נדירה במטעי האבוקדו בישראל.

### המסקנות המדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.

המין בישראל הוא אחד מבין 3-5 מינים בקומפלקס. למין זה ייחודיות משלו בטווח הפונדקאים הנתקפים ובפטריות הסימביוטיות שהוא נושא. אמנם החיפושיות נמשכות לפיתיון, אך המשיכה לעצים בהם התפתחו כיבים חזקה הרבה יותר. גם הקורלציה בין גובה הלכידה למצב נגיעות המטע היא חלקית. נמצאה זיקה ברורה בין המשיכה והתקפה של זן אבוקדו מסוים לבין התאמתו לרביית החיפושית ולנוק הנגרם. ההחמה נובעת משישה פלבנואידים שהם תוצאה של תגובת הצמח לפטריית הפוזריום הסימביוטית, והם מומסים במים וצובעים את העצה. חתכים מיקרוסקופיים בעצה מצביעים על האפשרות שמעבר המים בעצה מוכתמת אינה טובה שהשוואה לעצה בריאה. הפוזריום הסימביוטי שורד לאורך זמן בתוך בעצה הבריאה בניגוד לשני מיני הסימביוטים הפטרייתיים האחרים, שדועכים לאחר כחודשים. הסמנים המולקולאריים אפשרו לקבוע את איזור המוצא של

החיפושית, הפוזריום הוא הגורם הפתוגני במערכת. נראה שני מיני הפטריות הסימביוטיות האחרים שורדים, בניגוד לפוזריום, גם בעצה היבשה לאחר גיחת החיפושיות. דגימות הפוזריום הסימביוטי בעצה מצביע על כל שהפטרייה אינה מתפשטת בעצה. ניכר שהתפתחות הפוזריום היא מהירה יותר מהגרפיום והאקרמוניום, שני מיני הפטריות הסימביוטיות האחרות, אך הפוזריום רגיש יותר מהם לטמפרטורות גבוהות. מה גם במקרה של התקפות הסרק נותר הפוזריום לאורך זמן, בשל יכולתו להתמודד ולשרוד ברקמה החיה. שני מיני הפטריות הסימביוטיים האחרים, לא שורדים בעצת אבוקדו חיה. ניסויי המחקה התקפה והתבססות של החיפושית העלה את התובנות הבאות. א) ענפים דקי קוטר הם הרגישים ביותר כפי שניכר ראשית כל בתגובת ההפרשה הסוכרית, ב) ברוב המקרים שתי הפעלות הנפרד, קידוח ואילוח הפטרייה, וקידוח והזרקת המים, לא גרמו לנזק משמעותי לענף, ג) בשתי קבוצות הטיפול עוצמת החממה עולה ביחס הפוף לקוטר הענף. הפגיעה שהתקבלה בחיקוי ההתקפה דומה מאד קשורה לקוטר הענף, בדומה להתקפה הטבעית של החיפושית. המחקר הוכיח שמתקיים גם תהליך של מעבר הפטריות הסימביוטיות ישירות באמצעות דרגת הגולם. מעבר אופקי גם הוא מתאפשר והדבר הוכח באמצעות הזנה על פוזריום טרנסגני המבטא חלבון GFP. הניסוי גם הדגים את האפשרות של נשיאת שני קווים שונים של הפטרייה הסימביוטית (פוזריום, במקרה זה) ומכן גם את האפשרות של היברידיזציה ויצירת טיפוסים גנטיים חדשים. נראה שקיים קושי לאמוד את מספר הפרטים במערכת צלחות הפטרי המשמשות בניסויים, והדבר הקשה גם על קבלת התוצאות בניסויים עם הפטריות האנטומופתוגניות. רצוי לשקול שדרוג של המערכת לצורך ניסויים נוספים הפטריות האנטומופתוגניות. מתבקש לחזור על בחינת יעילות בוטניגרד על זחלי חיפושית האמברוזיה.

**הבעיות שנתרו לפתרון/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרת המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר.**

הבעיות הנתרות לפתרון במסגרת המחקר הן: בפיתוח אמצעים וכלים ליישום יעיל של הפטריות האנטומופתוגניות.

**הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח : פרסומים מדעיים כדלקמן:**

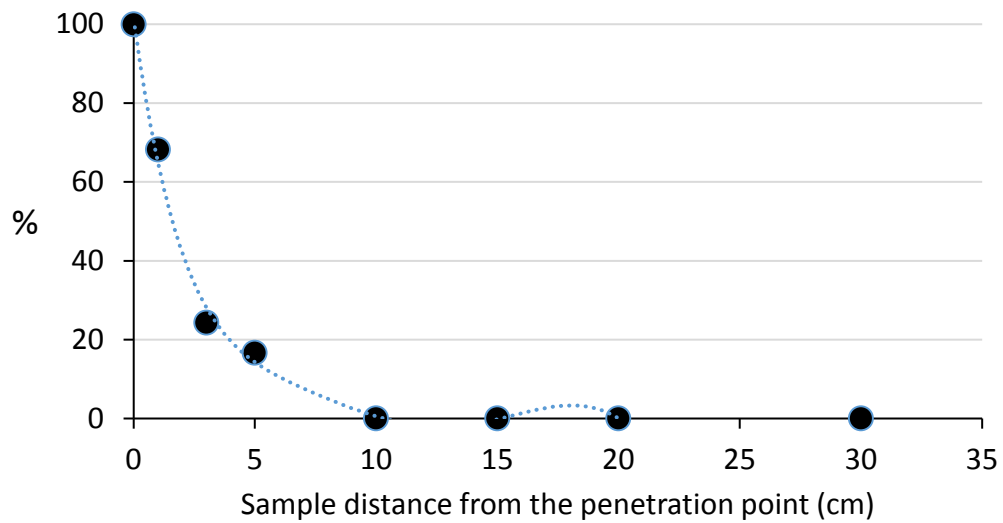
- Freeman, S., Sharon, M., Dori-Bachash, M., Maymon, M., Belausov, E., Margalit, O., Maoz, Y., Protasov, A., Mendel, Z. (2015). Symbiotic association of three fungal species throughout the life cycle of the ambrosia beetle *Euwallacea nr. fornicatus*. *Symbiosis*. DOI:10.1007/s13199-015-0356-9. pp. 1-14.
- O'Donnell, K., Sink, S., Libeskind-Hadas, R., Hulcr, J., Kasson, M., Ploetz, R., Konkol, J., Ploetz, J., Carrillo, D., Campbell, A., Duncan, R., Liyanage, P., Eskalen, A., Na, F., Geiser, D., Bateman, C., Freeman, S., Mendel, Z., Sharon, M., Aoki, T., Cossé, A., & Rooney, A. (2015). Discordant phylogenies suggest repeated host shifts in the *Fusarium* – *Euwallacea* ambrosia beetle mutualism. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 277–290.
- Mendel, Z., Protasov, A., Dori-Bachash, M., Maoz, Y., Margalit, O., Palevsky, E., Maymon, M., Elazar, M., Golan, O. and Freeman, S. 2016. Background and current situation about the ambrosia beetle and its fungal symbionts in avocado plantation in Israel 'Alon Hanotea' 71: 32-37; (in Hebr.)
- O'Donnell, K., ..... Freeman, S. **Mendel, Z.**, et al. 2016. Invasive Asian *Fusarium* – *Euwallacea* ambrosia beetle mutualists pose a serious threat to forests, urban landscapes and the avocado industry. *Phytoparasitica* DOI 10.1007/s12600-016-0543-0
- Mendel, Z., Protasov, A. (2016). Invasive species in Israel. *Gan veNof*. Nov-Dec. pp. 24-30. (in Hebr.)
- Stouthamer, R., Rugman-Jones, P., Thu, P., Eskalen, A., Thibault, T., Hulcr, J., Wang, L., Jordal, B., Chen, C., Cooperband, M., Lin, C., Kamata, N., Lu, S., Masuya, H., Mendel, Z., Rabaglia, R., Sanguansub, S., Shih, H., Sittichaya, W. & Zong, S. (2017). Tracing the origin of a cryptic invader: Phylogeography of the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) species complex. *Agricultural and Forest Entomology*, DOI: 10.1111/afe.12215
- Mendel, Z., Protasov, A., Maoz, Y., Maymon, M., Miller, G., Elazar, M. and Freeman, S. 2017. The role of *Euwallacea nr. fornicatus* (Coleoptera: Scolytinae) in the wilt syndrome of avocado trees in Israel. *Phytoparasitica* 45(3): 341–359.

**הידע נמסר בסדרה של מפגשים עם החקלאים ומדריכים ובכנסים מדעים בישראל**

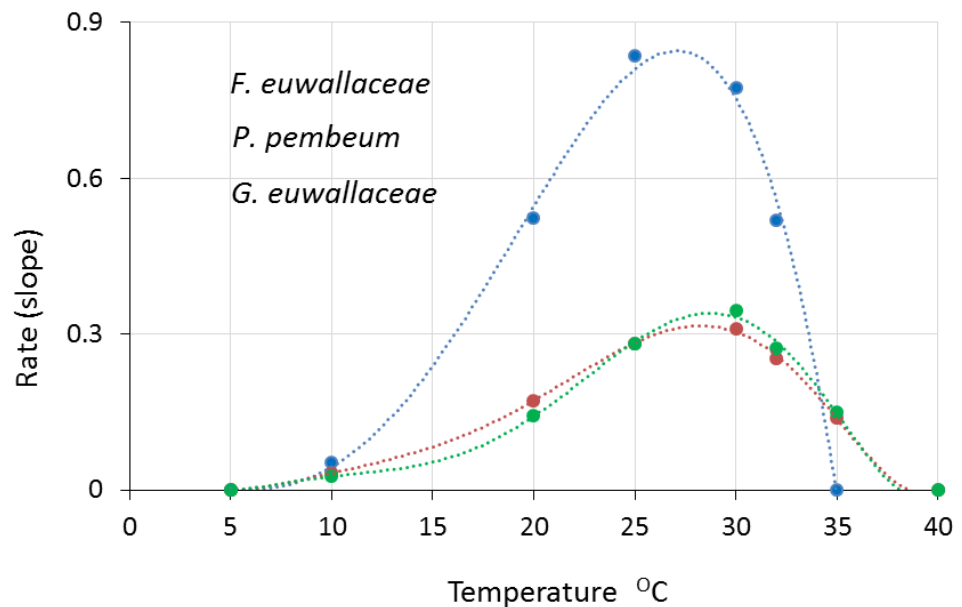
**פרסום הדו"ח: אנו ממליצים לפרסם את הדו"ח: ללא הגבלה**

- Conow, C., Fielder, D., Ovadia, Y., Libeskind-Hadas, R., 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms Mol. Biol.* 5, 16. [http:// dx.doi.org/10.1186/1748-7188-5-16](http://dx.doi.org/10.1186/1748-7188-5-16).
- Freeman, S., Sharon, M., Dori-Bachash, M., Maymon, M., Belausov, E., Maoz, Y., Margalit, O., Protasov, A., & Mendel, Z. (2016). Symbiotic association of three fungal species throughout the life cycle of the ambrosia beetle *Euwallacea nr. fornicatus*. *Symbiosis*, 68, 115–128.
- Guetsky R., Kobiler I., Wang X., Perlman N., Gollop N., Avila-Quezada G., Hadar I., and Prusky D. 2005. Metabolism of the Flavonoid Epicatechin by Laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and Its Effect on Pathogenicity on Avocado Fruits. *Biochemistry and Cell Biology* 95 (11): 1341-1348.
- Jordal, B.H., Cognato, A.I., 2012. Molecular phylogeny of bark and ambrosia beetles reveals multiple origins of fungus farming during periods of global warming. *BMC Evol. Biol.* 12, 133.
- Kalshoven, L.G.E. 1958. Studies on the biology of Indonesian Scolytoidea. 1. *Xyleborus fornicatus* Eichh. as a primary and secondary shot-hole borer in Java and Sumatra. part 2. *Entomologische Berichten* 18: 185-190.
- Kasson, M., O'Donnell, K., Rooney, A., Sink, S., Ploetz, R., Ploetz, J., Konkol, J., Carrillo, D., Freeman, S., Mendel, Z., Smith, J., Black, A., Hulcr, J., Bateman, C., Black, A., Campbell, P., Geering, A., Dann, E., Eskalen, A., Mohotti, K., Short, D., Aoki, T., Fenstermacher, K., Davis, D., & Geiser, D. (2013). Phylogenetic diversity of fusaria cultivated by ambrosia beetles in the genus *Euwallacea* on avocado and other plant hosts. *Fungal Genetics and Biology*, 56, 147–157.
- Liu, X., Robinson, P.W., Madore, M.A., Witney, G.W. and Arpaia, M.L. (1999). 'Hass' avocado carbohydrate fluctuations. I. Growth and phenology. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 124: 671–675.
- Merkle, D., Middendorf, M., Wieseke, N., 2010. A parameter-adaptive dynamic programming approach for inferring cophylogenies. *BMC Bioinform.* 11 (Suppl. 1), 560, doi:1186/1471-2105-11-S1-S60.
- Nuhamara, S.T. 1993. Factors associated with twig decline on *Acacia mangium* plantation at Parung Panjong forest sub-district. (In Indonesian). . p. 73. Bangor Agricultural University, Bangor.
- O'Donnell, K., Sink, S., Libeskind-Hadas, R., Hulcr, J., Kasson, M., Ploetz, R., Konkol, J., Ploetz, J., Carrillo, D., Campbell, A., Duncan, R., Liyanage, P., Eskalen, A., Na, F., Geiser, D., Bateman, C., Freeman, S., Mendel, Z., Sharon, M., Aoki, T., Cossé, A., & Rooney, A. (2015). Discordant phylogenies suggest repeated host shifts in the *Fusarium* – *Euwallacea* ambrosia beetle mutualism. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 277–290.
- Vinha, A. F., Joana Moreira, J. and Sérgio V. P. Barreira, S. B. 2013. Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.) *Journal of Agricultural Science*; 5: 100-109.
- Walgama, R.S. 2012. Ecology and integrated pest management of *Xyleborus fornicatus* (Coleoptera: Scolytidae) in Sri Lanka. *Journal of Integrated Pest Management* 3: A1-A8.

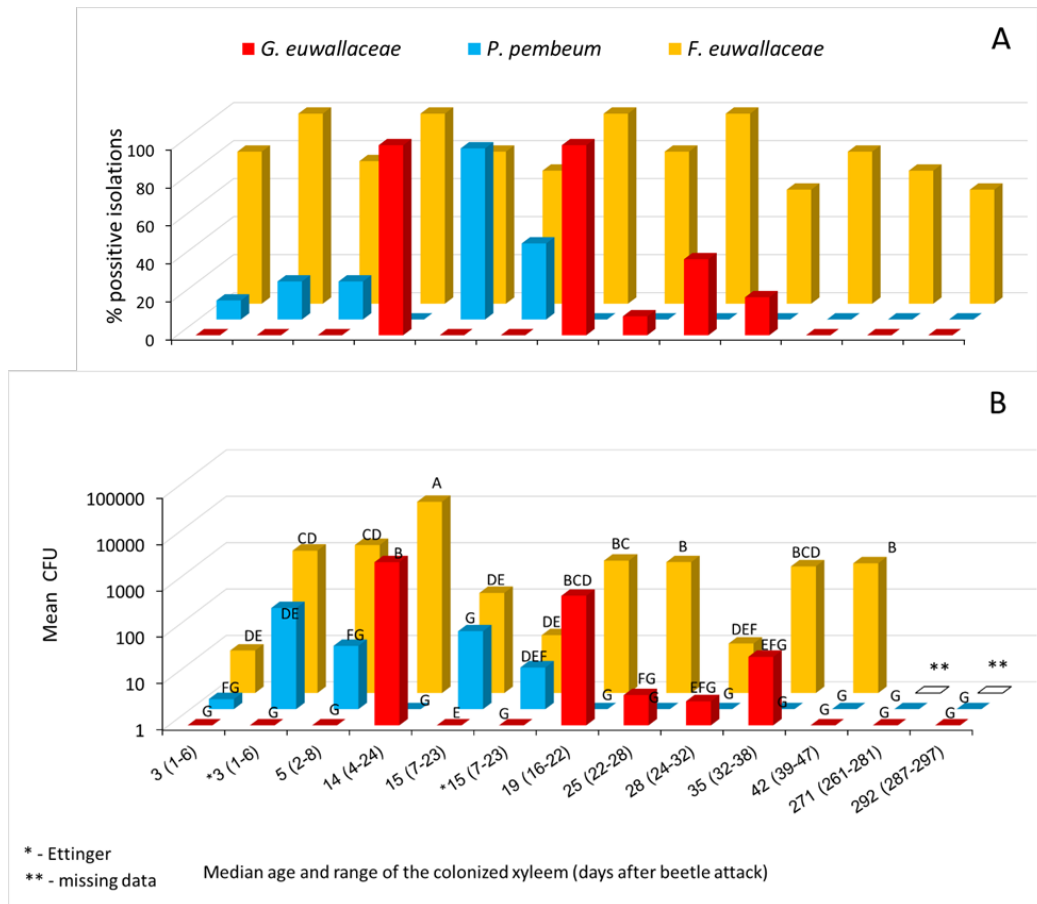
## 12. נספח איורים לדוח



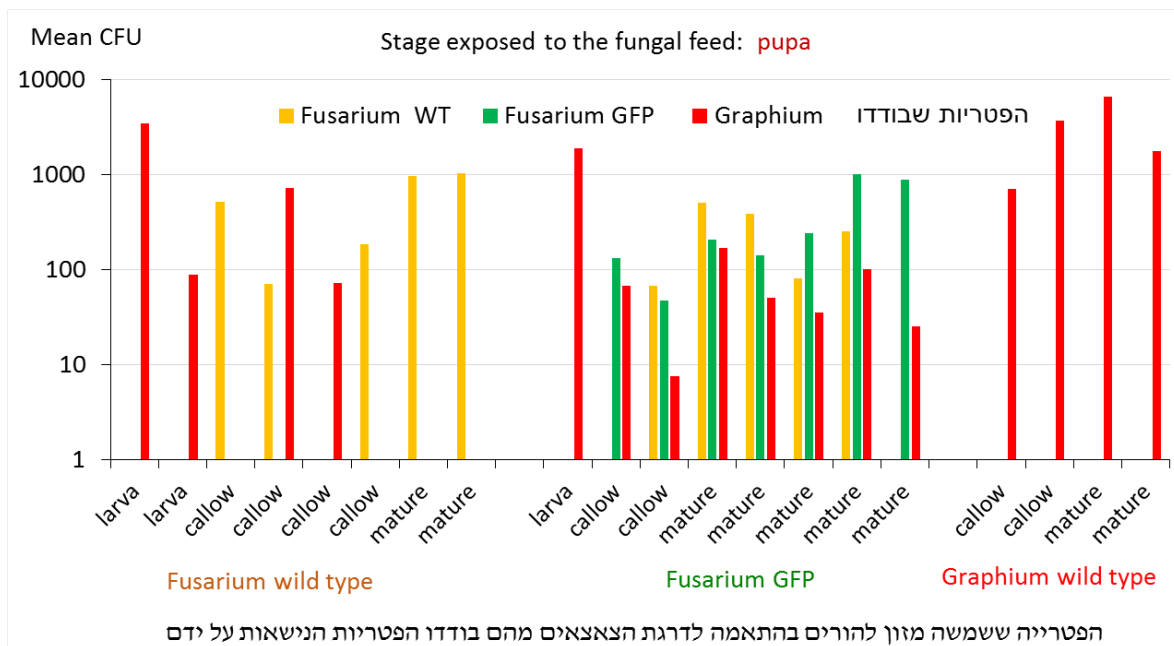
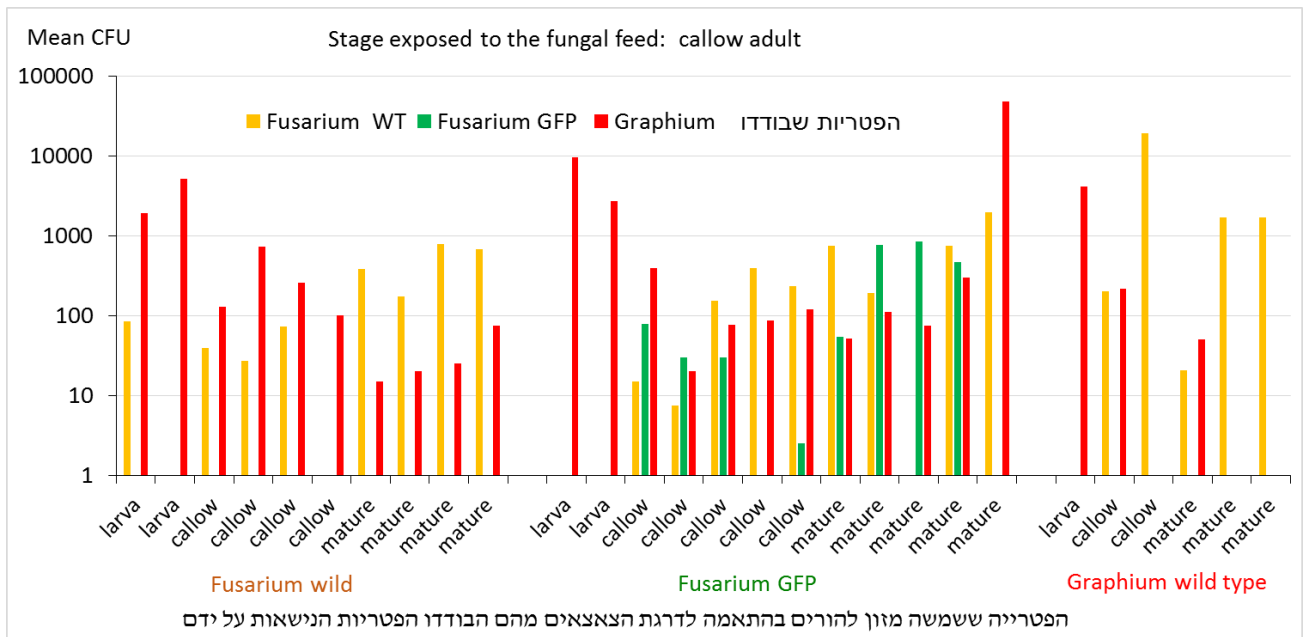
איור 1. סיום מרחק ההתפשטות של הפוזריום הסימביוטי בעצת אבוקדו. הנתונים מציינים את % דגימות העצה בהן התגלתה הפטרייה.



איור 2. קצב התפתחות יחסי של שלושת מיני הפטריות הסימביוטיות של חיפושית האמברוזיה של האבוקדו. האיור מצביע על כך שקצב ההתפתחות של הפוזריום מהיר יותר, מגיע לשיאו בטמפרטורה של  $\sim 26^{\circ}\text{C}$  וההתפתחות נבלמת ב-  $\sim 34-35^{\circ}\text{C}$ . שיא קצב ההתפתחות של המינים האחרים הוא ב-  $\sim 30^{\circ}\text{C}$  והתפתחות נבלמת ב-  $\sim 37-38^{\circ}\text{C}$ .



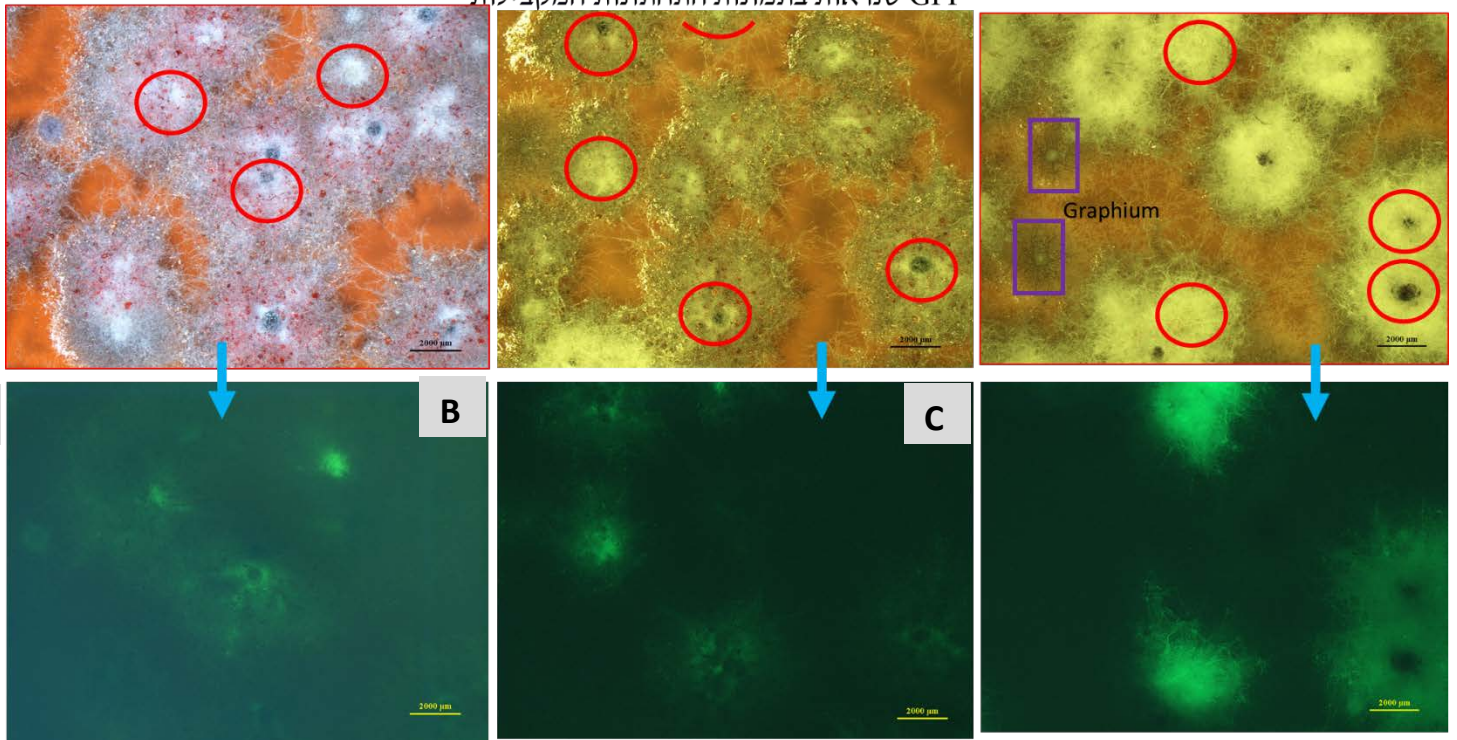
איור 3. בחינת התבססות הפטריות הסימביוטיות *Graphium euwallaceae*, *Fusarium euwallaceae* ו-*Paracremonium pembeum* בעצת אבוקדו והישרדותן לאורך זמן כתוצאה מהתקפות סרק של חיפושית האמברוזיה באמצעות בידודן מהעצה מתחת לכיב הנוצר במהלך ההתקפה. הדגימות לעצי הזן אטינגר מסומנות בכוכבית. הניסוי נערך במטע האבוקדו בנחשולים המספרים בציר ה-X מציינים את ממוצע (והטווח האפשרי) של הזמן שעבר בין ההתקפה לדגימה. ההבדלים בכמות הפטרייה נבחנו ב-LSMeans Differences Student's t  $\alpha=0.05$



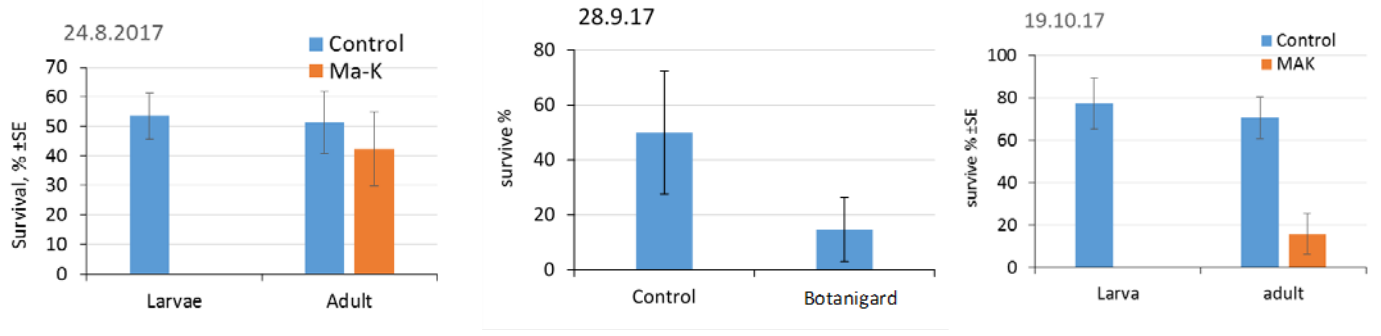
איור 4. תוצאות הבידוד של הצאצאים של פרטים (ההורים) שנלקחו מהטבע (אדר מילני) וניתן להורים להיזון מאחת משלושת הפטריות פוזריום מזן בר, פוזריום טרנסגני המבטא GFP וגרפיום מזן בר. האיור העליון מתייחס להורים שנחשפו לפטרייה ששימשה כמזון בשלב הבוגרת הצעירה, האיור התחתון מציג הורים שנחשפו לפטרייה עליה ונחשפו למצע ההזנה כבר בשלב הגולם.



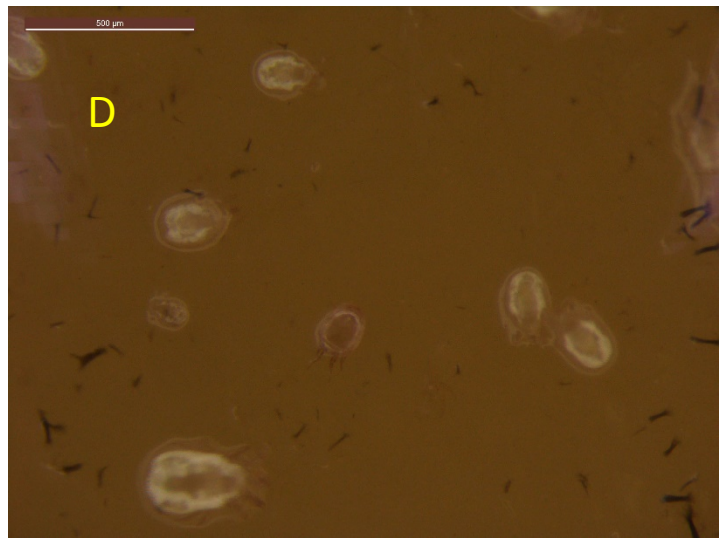
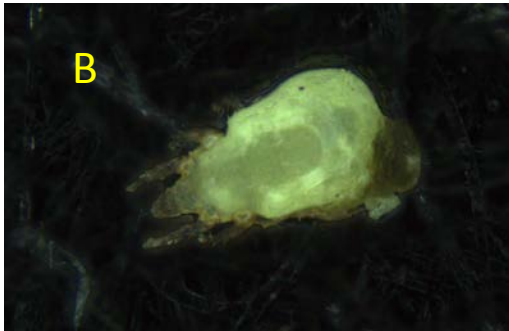
בתמונות העליונות מופיעות מושבות של פוזריום, והמסומנות במעגל אדום הן מושבות התבדיד ה-GFP שנראות בתמונות התחתונות המקבילות



תמונה 1. הבחנה בין הפטרייה הטבעית למסומנת GFP המושבות מראשי שתי חיפושיות בוגרות (A ו-B) וצעירה (C). נבדקו גם תחת בינקולאר פלאורוסנטי (Leica MZFLIII stereomicroscope (Germany)). באקסיטציה 460-500nm ואמיסיה באורך גל 510nm על מנת לאשש הימצאותם של תבדידים פלורוסנטים ו/או תבדדי זן בר. התמונות צולמו באמצעות Nikon DS-Fi1 digital camera and NISElements software, Japan. התמונה מראה בברור את ההימצאות של תבדיד הבר של *Fusarium euwallaceae* יחד עם תבדדי ה-GFP שלו. בחיפושית הצעירה (C) ניתן לזהות גם את תבדדי של *Graphium euwallaceae* הטבעי.



איור 5. רגישות של חיפושית האמברוזיה לחשיפה לפטריות אנטומופתוגניות במערכת מעבדתית בצלחות פטרי כאשר האוכלוסייה מצויה בגלריות בדיסקית ברכיטון. בתאריכים 24.8 ו-19.10 נחשפו זחלים ובוגרים לתכשיר מעבדתי על בסיס *Metarhizium anisopliae* ואילו ב-28.9 נחשפו בוגרים לתכשיר בוטניגארד על בסיס *Beauveria bassiana*.



תמונה 2. אקריות שבודדו ממושבות של חיפושית האמברוזיה : A - deutonymph 1, B - נקבה, C - male, D, venter - מראה כללי במערכת הגידול.