

ניסויים לזיהוי פרומון המין של עש התמר הקטן

Identification of the sex pheromone of the lesser date moth *Batrachedra amydraula*

מוגש לקרן מדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ויקטוריה סורוקר, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
ענת זאדה, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
גלינה גינדין, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
פפר דניאלה, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
רנה סעדיה, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
לאוניד אנשלביץ, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
אינה גולדינברג, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
אנה ליטובסקי, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
דני בלומברג, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
שלומית לבסקי, המחלקה לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי  
יעקוב נקש, חוות עדן.

גיו ניסים מטע קיבוץ סמר, ערבה דרומית  
דפנה כרמלי מחקר קיבוץ סמר, ערבה דרומית  
נרית קטנר מטע קיבוץ סמר, ערבה דרומית

Victoria Soroker: sorokerv@volcani.agri.gov.il

Anat Zada: [anatzada@volcani.agri.gov.il](mailto:anatzada@volcani.agri.gov.il)

Gindin Galina: [gindin@volcani.agri.gov.il](mailto:gindin@volcani.agri.gov.il)

Anshelevich Leonid: [leanshel@agri.gov.il](mailto:leanshel@agri.gov.il)

Shlomit Levski: [slevski@volcani.agri.gov.il](mailto:slevski@volcani.agri.gov.il)

<sup>1</sup>ARO, Institute of plant protection, Department of Entomology, P.O.B 6

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר

## תקציר

הצגת הבעיה: עש התמר הקטן *Batrachedra amydraula*, הינו מזיק קשה של חנטים והפרי הירוק של התמר. אחת הבעיות המרכזיות בממשק מזיק זה הוא העדר אמצעי ניטור יעילים.

מטרת המחקר: זיהוי פרומון המין של נקבות עש התמר הקטן.

מהלך ושיטות עבודה: במהלך המחקר הנוכחי פותחה שיטת גידול לעש במעבדה על קרקע מזון ייחודית לעש. בעזרת אוכלוסית העשים במעבדה נלמדה התנהגות האיתות המיני. לצורך זיהוי הפרומון יושמו מספר שיטות: אלקטרו פיסיולוגיות, איסופי אוריה ומיצוי בלוטות מנקבות, ניסויי התנהגות באולפקטומטר וניסויי משיכה במלכודות שניתלו במטעי תמרים.

תוצאות עיקריות: בשנתיים הראשונות של המחקר זוהו מספר מרכיבים בעלי פעילות במחשוי זכרים, אך כל החומרים שנבדקו כבודדים ובשילובים שונים שנתגלו עד סוף 2010 לא משכו זכרים באופן משמעותי. שימוש בטכניקת איסוף חדשנית, GCMS וסינתזות של מספר חומרים עם פוטנציאל התאמה לספקטרום ה-MS למרכיב אחד לא מוכר שהתגלה, שהתברר בדיעבד שהוא מרכיב המפתח של הפרומון של המזיק Z4Z7 Decadienyl acetate. גילוי הביא לפריצת הדרך במחקר. מרכיב הפרומון שהתגלה טרם זוהה בעשים. לאחר הזיהוי נבדקה משיכת הזכרים אל המרכיב עם או בלי המרכיבים שזוהו בעבר בשני מטעי תמר מרוחקים זה מזה. נמצא כי תערובת של Z4Z7-decadienyl acetate עם המרכיב העיקרי Z5-decenyl acetate מושכת באופן אפקטיבי את הזכרים בשדה. הלכידה היא ספציפית לזכרים של מין אחד בלבד עש תמר הקטן *Batrachedra amydraula*.

מסקנות והמלצות:

מחקר זה השיג את מטרותיו. לראשונה זוהה פרומון המין של עש תמר הקטן וכושר משיכתו היחודי לזכרים של עש זה הוכח בתנאי שדה. יחד עם זאת, על מנת להפכו לכלי ממשקי במטעי תמר, יש להמשיך ולבדוק פרמטרים נוספים בפרומון וכלי ניטור שיביאו לניטור יעיל של המזיק וכן לבדוק שילובו בממשק ההדברה בשיטת בילבול זכרים.

## 1.2 מבוא

### 1.2.1 הצגת הבעיה

עש התמר הקטן *Batrachedra amydraula* (Batrahedridae) מהווה מזיק קשה של תמר במזרח התיכון בכלל ובארץ בפרט. מקובל לחשוב כי המזיק מקים בתנאי הארץ כ- 3 דורות בשנה. הזחלים תוקפים את תפרחות התמר מראשית הופעתן. הדור הראשון מופיע בחודש מרץ עם הטלת הביצים על התפרחות הנקביות של התמר. לקראת סוף הקיץ נכנסים הזחלים בדרגתם האחרונה לתרדמה בתוך פקעות קורים אותם הם טווים בבסיסי הכפות ובמקומות מסתור נוספים בעץ התמר. הבוגרים מגיחים במרץ ואז מתחיל דור חדש. הזחל, שהוא הדרגה המזיקה, מכרסם חור קטן סמוך לעוקץ הפרי, דרכו הוא חודר פנימה וניזון מציפת הפרי ומהזרע הצעיר. עיקר הנזק נגרם לחנטים הצעירים ומתבטא בכך שהפירות שנפגעו ניתקים מהסנסן בשלבי הבשלה ראשונים. במיקרים של שיווק פרי על סנסנים (זני דקל נור וברהי) הנזק נגרם גם לאיכות המוצר ולכמותו מאחר והוא פוגע ברצף הפרי על הסנסן. בזן חיאתי הנזק הוא רב במיוחד מאחר התפתחות הפרי באשכולות מדוללים אינה תקינה. כמו כן, פגיעת הזחל בפרי מלווה לעיתים בריקבון המושך חיפושיות תסיסה (Nitidulidae). עד כה, לא נמצאה עמידות למזיק זה באף זן תמר (1). שיעור הנזק עלול להגיע ל-80%, ואף דווח על מקרה של הפסד כולל במטע של מחולה. משמעות הדבר הינה פגיעה כלכלית קשה לענף התמר.

ישנן כמה דרכי התמודדות עם המזיק: הדברה כימית באמצעות תכשירי כלורפריפוס ותכשירים אחדים מקבוצת מעכבי גידול, שהבולט ביניהם הוא אלסיסטיין (Triflumuron), הניתנים בזמן ההאבקה ; במטעים

אורגניזמים מיושמים תכשיר החיידק *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), ולאחרונה טרייסר (Spinosad). דרך נוספת היא הדברה ביולוגית ע"י שימוש בצרעות טפיליות. אפשרות זו נבחנה מספר פעמים ולאחרונה מסתמנת הצלחה מסוימת בישום טפיל ביצים מהסוג *Trichogramma*. למרות כל אלה, אחת הבעיות המרכזיות בממשק מזיק זה הוא העדר אמצעי ניטור יעילים. פרומון המין של עש תמר הקטן לא היה ידוע עד היום ולכן לא ניתן היה לנטר את האוכלוסיה כמו שעושים בעשים אחרים- ע"י שימוש במלכודות טעונות בפרומון המין של הנקבות המושך את הזכרים.

מניסויים שביצענו בעבר (2), ראינו שנקבות עש תמר הקטן מבצעות התנהגות אופיינית של איתות מיני שבמהלכה מופרש הפרומון. כמות הפרומון בנקבה אחת במין קטן זה הנה מתחת לרגישות גלאי FID של גז כרומטוגרף. אולם בגלאי מחוש (EAD) נראה סיגנל חשמלי לאווירת נקבות. בניסויים הראשונים זוהה באיסופי אוירה דודקנאל, אך חומר זה לא משך את נקבות העש למלכודות שהוצבו במטע תמרים.

מסקירת ספרות עולה שעד היום טרם זוהה פרומון מין בעשים ממשפחת *Batrachedridae*, אולם בניסויי שדה בהם נסרקו מגוון פרומונים סינתטיים הרגילים בעשים, זוהתה משיכה של כמה מיני עשים מהסוג *Batrachedra*. בכל המיקרים המשיכה היתה לאצטטים בלתי רוויים: מין אירופאי המתפתח על עץ האשוח *B. pinicolella* נמשך בשדה ל- Z5-10Ac (10), בעוד שבמחקר אחר המשיכה האופטימלית היתה דוקא לתערובת של אותו אצטט Z-5-10:Ac ולאכולהול שלו Z-5-10:OH (ביחס 1:1) (9). במחקר שדה נוסף שנערך בוייטנאם בו התבצעה סריקת פרומונים למשיכת עשים, נמשך מין בלתי ידוע של *Batrachedra*, שהוא כנראה שונה משלנו, באופן מיוחד לתערובת של Z-7-12:Ac ו-Z-9-14:Ac ביחס 9:1 (8). ממצאים אלה רמזו כי יתכן וגם במין המזיק בארץ תערובת הפרומון הנקבי מכילה אצטטים באורך של 10-14 פחמנים. אחד הקשיים במחקר במזיק זה הוא הצורך באספקה של נקבות בתולות וזכרים בכמויות גדולות לשם בידוד הפרומון ולאפיונו. איסוף המזיק בשדה בכמויות הנדרשות ברוב חודשי השנה הוא בעייתי ביותר. בהעדר קרקעות מזון המתאימות לגידול העש, ידע לגבי שיטות גידול לא ובהעדר מכשירים אנליטיים מתקדמים מחקרים שנעשו בארץ בעבר לא הצליחו ל"פצח" את מבנה הפרומון.

### 1.2.3 מטרות המחקר

מטרת המחקר העיקרית: זיהוי פרומון המין של נקבות עש תמר הקטן.  
מטרות המשנה:

- א. פיתוח שיטה לגידול המזיק במעבדה.
- ב. לימוד התנהגות איתות מינית בנקבות העש.
- ג. בידוד פרומון המין מבלוטות הנקבות.
- ד. זיהוי נדיפי נקבות בעלות פעילות על מחוש זכרים.
- ה. בחינת פעילות הנדיפים שיזוהו בתנאי מטע.

### 1.3 שיטות כלליות

#### 1.3.1 פיתוח קרקע מזון

במהלך שנתיים הראשונות של המחקר פותחה קרקע מזון ייחודית עבור העש. המזון מבוסס במהלך השנה הראשונה נוסו כמה קרקעות מזון, ששלוש מתוכן 1-2; 1-1 ו-8 הסתמנו כמבטיחות להתפתחות העש. בשנה השנייה השונו בין השתיים הראשונות. ולקראת השנה השלישית נבחרה קרקע מזון אחת עליו התקיים הגידול במשך למעלה משנה. זהו מקרה ראשון של גידול עש תמר הקטן על קרקע מזון מלאכותי. קרקעות

המזון התבססו על מרכיבי קרקע מזון בסיסית לחרקים אוכלי פירות בתוספת חומר צמחי מסנסי תמר בתוספת מרכיבים המונעים התפתחות חיידקים ופטריות (טבלה 1). קרקע המזון הורכבה משלוש מנות. כל המרכיבים עורבבו ב- 3/4 מנפח המים הכולל, הועברו לאוטוקלב למשך 15 דקות ב-120 מעלות וקוררו ל-60 70 מעלות. המנה השלישית הורכבה מאבקת סנסי תמר מיובשים בתנור (ב-80 מעלות למשך לילה) וטחונים.

### 1.3.2 החוקים

מקור הזחלים לגידול היה מחנטים נגועים שהובאו למעבדה ממטעים אורגניים של סמר, מטעי צפון ים המלח ומשדה אליהו. הזחלים מהמטע הועברו לקרקעות המזון, והוחזקו בצלחת פטרי בקוטר 5 ס"מ באינקובטור ב- $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  במשטר יום ארוך (14 שעות אור ו-10 שעות חושך). גלמים הועברו אחד אחד למבחנות זכוכית. הפרפרים הבוגרים מוינו לפי זוויגים והוכנסו לכלובי הטלה (צנצנות פלסטיק 200 סמ"ק). כמזון לבוגרים שימשה תמיסת סוכרוז 20%. כלי ההטלה הוחזקו באינקובטור בתנאים שתוארו לעיל. מידי יומיים הועברו הביצים ע"ג חתיכת פלסטיק לצלחות פטרי בקוטר 5 ס"מ עם מצע מזון מלאכותי (כ 10-15 ביצים לצלחת). להתאמת המזון להתפתחות הצלחות נבדקו מידי יומיים שלושה לבדיקת בקיעה והתפתחות. הזחלים שגמרו את שלב ההזנה והגלמים הועברו למבחנות זכוכית ( פרט אחד למבחנה) לסיום ההתפתחות. הבוגרים שהגיחו מוינו באמצעות בינוקולור (בהגדלה  $\times 7$ ) לזכרים ונקבות לפי צורת קצה הבטן. התפתחות העשים השוותה על לפחות 200 צלחות קרקע מזון מכל סוג.

### טבלה 1: הרכב קרקעות מזון שנמצא כמתאים ביותר

| מנות מהן הורכב קרקע המזון | מרכיבים                  | כמויות |
|---------------------------|--------------------------|--------|
| חלק 1<br>לפני סטריליזציה  | Water                    | 75 ml  |
|                           | Sucrose                  | 4 g    |
|                           | Wesson's salt mix        | 0.96 g |
|                           | Yeast dry                | 7.5 g  |
|                           | Methyl paraben           | 3.0 g  |
|                           | Agar                     | 3.0 g  |
|                           | Stone powder             | -      |
|                           | Stone extract            | -      |
| חלק 2<br>אחרי סטריליזציה  | Water                    | 25 ml  |
|                           | Casein                   | 4.4 g  |
|                           | Sorbic acid              | 0.2 g  |
|                           | Vanderzant vitamin mix   | 1.2 g  |
|                           | Dates dried and grounded | 20 g   |
| חלק 3<br>אחרי סטריליזציה  | Cellulose                | 15 g   |

### 1.3.2 מעקב אחר התנהגות הבוגרים

**איתות מיני calling של הנקבות:** שחרור פרומון המין מתבצע בעשים כרגיל תוך התנהגות "האיתות" המיני, עמידה עם קצה הבטן שלופה מחוץ לגוף. מאחר ומדובר בחרקים בעלי פעילות לילית, לצורך מעקב אחר התנהגות הנקבות בשעות העבודה במעבדה, הוחזקו החרקים משלב הגולם ואילך בתנאי יום הפוך. תקופת החושך החלה ב-00:08. כל נקבה הוחזקה במבחנה נפרדת, והתנהגותה נבחנה תחת תאורה אדומה מידי שעה בתקופת החושך.

### 1.3.3 איסוף פרומונים מעשים בוגרים

**מיצוי בלוטות:** למיצוי בלוטות פרומון שמשו נקבות בתולות מאותתות בנות 1-2 ימים. קצה הבטן של הנקבות נותח ומוצא ב 50-100 מיקרוליטר פנתאן. בכל דוגמא מיצינו בין 1 ל-40 נקבות.

**איסוף האווירה:** נדיפים מנקבות או זכרים (לביקורת) נאספו במערכת איסוף. בכלי בנפח 100-20 מ"ל (תלוי בכמות הפרטים שהוכנסו לכלי) שהכיל את העשים הנבדקים (45-5 פרטים לרוב בגיל 1-4 ימים) הוזרם אויר מנוקה בנפח פעיל במהירות 0.1-0.5 ליטר לדקה דרך כלי ובו מים לפרקי זמן שונים (5-96 שעות). הנדיפים נלכדו בחומר סופח SuperQ ומוצו מהקולונה באמצעות 4 מ"ל הקסאן. לאחר מכן התמיסה רוכזה לנפח 200 מיקרוליטר תחת זרם עדין של חנקן. בטבלה 2 מפורטים מיצויי אוירה העיקריים אשר נבדקו באחד או בשני מבחנים הביולוגיים במהלך המחקר.

**טבלה 2:** סיכום תגובות מחושי הזכרים ב-GC-EAD בתוכניות 1-3 ובאולפקטומטר.

| EXT No. | No. Virgin Females | Age (days) | Collection time (hours) | EAD |                | Olfactometer with males |                  |
|---------|--------------------|------------|-------------------------|-----|----------------|-------------------------|------------------|
|         |                    |            |                         | (n) | response (+/-) | % response              | % attracted* (n) |
| 1       | 18                 | 1-3        | 2h photo                | 3   | +              | 93                      | 50 (15)          |
| 2       | 19                 | 1-2        | 5.5 h scot              | 4   | +              | 83                      | 60 (18)          |
| 3       | 18                 | 1-3        | 6-10 h scot             | 3   | +              | 90                      | 67 (10)          |
| 4       | 11                 | 3          | 24 h                    | 3   | +              | NT                      | NT               |
| 5       | 12                 | 2          | 29 h                    | 2   | +              | 68                      | 43 (31)          |
| 6       | 4                  | 1-5        | 48 h                    | NT  | NT             | 80                      | 81 (20)          |
| 7       | 4                  | 3-6        | 48 h                    | NT  | NT             | 85                      | 76 (20)          |
| 8       | 9                  | 1-4        | 48 h                    | 5   | +              | 100                     | 100 (10)         |
| 9       | 18                 | 1-2        | 48 h                    | 2   | ?              | 67                      | 17 (9)           |
| 10      | 22                 | 1-3        | 48 h                    | 2   | ?              | 100                     | 50 (10)          |
| 11      | 8                  | 1          | 48 h                    | 2   | ?              | 83                      | 80 (18)          |
| 12      | 7                  | 1-2        | 48 h                    | 3   | +              | 84                      | 44 (19)          |
| 13      | 31                 | 1-3        | 48 h                    | 2   | +              | 75                      | 86 (28)          |
| 14      | 20                 | 1-5        | 48 h                    | 2   | +              | NT                      | NT               |
| 15      | 16                 | 1-2        | 56 h                    | 5   | +              | 57                      | 88 (28)          |
| 16      | 5                  | 1-5        | 72 h                    | NT  | NT             | 100                     | 83 (23)          |
| 17      | 25                 | 2-7        | 72 h                    | 2   | ?              | NT                      | NT               |
| 18      | 10                 | 1-4        | 72 h                    | 2   | ?              | NT                      | NT               |
| 19      | 30                 | 1-3        | 72 h                    | 3   | +              | 94                      | 57 (54)          |
| 20      | 45                 | 1          | 72 h                    | 10  | +              | 68                      | 54 (19)          |
| 21      | 12                 | 1-6        | 96 h                    | NT  | NT             | 78                      | 86 (9)           |
| 22      | 15                 | 1-3        | 96 h                    | 2   | ?              | 80                      | 75 (10)          |
| 23      | 22                 | 1-3        | 96 h                    | 2   | +              | 70                      | 43 (10)          |
| 24      | 13                 | 1          | 96 h                    | 3   | +              | 86                      | 61 (21)          |
| 25      | 4                  | 1-5        | 120 h                   | NT  | NT             | 100                     | 85 (20)          |
| 26      | 10                 | 1-7        | 120 h                   | NT  | NT             | 77                      | 80 (26)          |
| 27      | 21                 | 1-8        | 120 h                   | 2   | ?              | NT                      | NT               |
| total   | 429                |            |                         |     |                |                         |                  |

שיעורי בחירת זכרילנקבות בטרנדורה בין זרוע האולפקטומטר עם מיצויי אווירת הנקבות או הזכרים לעומת זרוע הביקורת; NT -לא נבדק; ?- התגובה ב-EAD לא הייתה ברורה; \*\*-% מתוך כלל מספר החרקים שבחרו המצוין בסוגריים.

### זיהוי מרכיבים בעלי פעילות ביולוגית

המיצויים עברו אנליזה באמצעות גז כרומטוגרף Thermo Finnigan (Chrom-Card Trace-Focus GC) בשילוב עם Syntech (IDAC-232, The Netherlands) electroantennogram detector system. ה-GC צוייד בקולונה קפילרית (Restek) Rsi-5ms column ( $30 \times 0.25 \text{ mm ID} \times 0.25 \mu\text{m film thickness}$ ). הליום הוזרם כגז נשא בזרם של 2 מ"ל לדקה. האינג'קטור והגלאי FID הוחזקו בטמפרטורות  $230^\circ\text{C}$  ו-  $270^\circ\text{C}$  בהתאמה. במהלך המחקר השתמשנו בשלוש תוכניות גז כרומטוגרף השונות במשטרי טמפרטורה (טבלה 3).

### **טבלה 3: תנאי הרצה שונים של GC TRACE**

| ג   | ב   | א   | תוכנית גז כרומטוגרף                  |
|-----|-----|-----|--------------------------------------|
| 60  | 60  | 60  | טמפרטורה ראשונית (מעלות צלסיוס)      |
| 1   | 1   | 2   | זמן בטמפרטורה ראשונה (דקות)          |
| 3   | 5   | 10  | קצב עליית טמפרטורה (מעלות לדקה)      |
| 200 | 250 | 230 | טמפרטורה במדרגה שנייה (מעלות צלסיוס) |
| 0   | 0   | 10  | זמן במדרגת טמפרטורה שנייה (דקות)     |

### חישת המרכיבים ברמת מחוש

רישום תגובת המחוש ב-GC-EAD נעשה משני מחושים המחוברים לראש הזכר. קפילרה מלאה ב- KCl (0.1N) עם אלקטרודת הייחוס הוחדרה לראש בעוד הקצה הדיסטלי של שני המחושים הוחדר לקפילרה שניה המכילה גיל מוליך או תמיסת KCL עם אלקטרודת הרישום. נבדקו מחושים של זכרים בני 1-3 ימים. אוויר לח במהירות זרימה של 0.8 ליטר לדקה שימש כגז נשא לנדיפים היוצאים מה-GC. האות המיוצר על ידי המחוש עובד והוגבר באמצעות מגבר ותוכנה יעודית Syntech IDAC-232 – Syntech GC-EAD2000. software version 1.00. לבירור ספציפיות ורגישות מחושי הזכרים למרכיבים השונים בדקנו את תגובתם למינונים השונים של החומרים הסינתטיים בריכוזים בין 0.1 ננוגרם עד 100 ננוגרם ב-EAG.

### אנליזה כימית

המרכיבים שהראו פעילות אלקטרופיסיולוגית נבדקו באמצעות GC-MS. מיצויי הנקבות ואיסופי האווירה של נקבות בתולות הוזרקו למכשיר GC מדגם 6890 Agilent שהורכבה בו קולונה א-פולרית RTX-5 Sil MS עם מימדים  $30\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ . במכשיר זה מותקן גלאי MS מדגם Agilent 5973N. התנור הוחזק ב-  $50^\circ\text{C}$  למשך 3' והטמפר' הועלתה בקצב  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  ל-  $230^\circ\text{C}$  והוחזקה כך למשך 20'. אנליזות על גבי קולונה פולארית J&W DB-23 עם מימדים דומים נעשתה על מכשיר FID-GCMS מסוג Agilent 7890A וגלאי MS 5975. התנור הוחזק ב-  $50^\circ\text{C}$  למשך 3' והטמפר' הועלתה בקצב  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  ל-  $220^\circ\text{C}$  והוחזקה כך למשך 10'. בשני המכשירים ה-MS תוכנת לסרוק יונים בטווח 300-40, יחידת ההזרקה חוממה ל-  $250^\circ\text{C}$  במצב Splitless וה- transfer line הוחזק ב-  $280^\circ\text{C}$ . קצב זרימת גז הנשא (הליום) בתנור עמד על 1.5 ml/min. ההזרקה ל- GCMS עם הקולונה הא-פולארית (הראשון) נעשתה תוך שימוש במערכת הזרקה ודגימה אוטומטית מיוחדת מסוג MPS2-Twister של חברת Gerstel. שלושת אופני ההזרקה היו כדלקמן:

1. הזרקה של 1ul מתמיסות המיצויים ואיסופי האוירה במערכות האיסוף שתוארו לעיל.

2. הזרקה ישירה ל- GCMS של אוירה מנקבות חיות בנות 1-3 ימים שנאספה במערכת ITEX (In-Tube Extraction). נקבות חיות בודדות הוכנסו לתוך צנצנת בנפח 10ml עטופה בנייר אלומיניום ובסיסה רופד בנייר סינון שהושמה על גבי מגש ההזרקה שמורכב על ה- GCMS. במתקן קיים מזרק שאסף את הנדיפים מהנקבות על גבי קולונת Tenax בפרקי זמן של שעתיים למשך 24 שעות שנקבעו בעזרת תוכנת Maestro של חברת Gerstel גירסה 1.3.9.13. בתום זמן האיסוף המזרק עבר ליחידת ההזרקה שם חומם במהירות ותוך הזרמת הליום בוצעה ד-ספיחה מהירה מה- Tenax שספח את האוירה ישירות לתוך ה- GCMS. לאחר ההזרקה הדוגם חזר לספוח את האוירה שבאותה צנצנת לפרק הזמן הבא אחריו. כל הפעולות בוצעו באופן סימולטני על מנת לא לפספס זמן איסוף.

3. הזרקה של אוירה מנקבות חיות בנות 1-3 ימים שנאספה ע"י הדוגם במזרק SPME (Solid-Phase-MicroExtraction) ובו סיב ספיחה עם ציפי PDMS 100µm, עובי המחט 23 ga. נקבות חיות בודדות הוכנסו לתוך צנצנת בנפח 20ml עטופה מבפנים בנייר אלומיניום שבסיסה רופד בנייר סינון והיא הושמה על גבי מגש ההזרקה שמורכב על ה- GCMS. הסיב במזרק אסף את הנדיפים מהנקבות בפרקי זמן של שעתיים למשך 24 שעות כפי שתואר לעיל.

הפיקים של החומרים שנראו בשלוש אופני ההזרקה זוהו על ידי ספריות GCMS והזרקת סטנדרטים. לצורך האנליזה ב- GCMS של חומרים מעוררי תגובת מחושב ב- EAD (שנבדק בקולונה א-פולארית) חושב אינדקסי Kovats של הפיקים שהראו תגובה ב- 6-8 חזרות ולפי החישוב התמקדנו בזמני היציאה של חומרים אלה בקולונת ה- GCMS הא-פולארית.

סינתזות חומרים שונים שהביאו לזיהוי מרכיב הפרומון החדש

כדי להגיע לזיהוי מבנה הסופי של הפרומון סונתזו ראשית ארבעת האיזומרים הגאומטריים של 2,5-decadienyl acetate וכן ארבעת האיזומרים של 5,8-decadienyl acetate בדרכים דומות לאלה שנמצאות בספרות (8). לאחר מכן סונתז החומר Z4,Z7-decadienyl acetate ראשית באופן שיכולנו לקבל את ארבעת האיזומרים (ע"י שימוש בקטליזטור לינדלר) ולקבלת איזומר גאומטרי אחד נקי לשם ניסויי השדה סיימנו עם קטליזטור דיציקלוהקסיל בורן. עבדנו לפי פרוצדורה ספרותית להכנת הכוהל המתאים (9) אך את השלב האחרון שינינו כדי לדלג על שלב ולקבל מיידית את האצטט (10).

החומרים שהתקבלו זוהו ע"י MS-GC על גבי קולונה-פולארית והגאומטריה ע"י פולארית זאת בהשוואה לנתוני ה-RI של הנעלם באיסופי האוירה מהנקבות. מכיון שהמרכיב העיקרי הוא חומר חדש למדע, החומר שסונתז עבור נסיונות השדה נשלח גם באנליזה אלמנטרית (מעבדה למיקרואנליזה, האוניברסיטה העברית, גבעת רם) וגם ב- NMR (היחידה לתמ"ג מכון ויצמן).

#### ניסויים לבדיקת הפרומון במטע:

נדיפיות עם מרכיבי פרומון שזוהו הושמו במלכודות דלתא שהותקנו על ידנו מחומר פוליגל לבן. בבסיס המלכודת הוכנס לוח פוליגל נוסף מרוח בדבק חרקים רמיפוט. ניסוי מטע ראשון הוצב ב23 למרץ 2010 ונמשך עד יוני. המלכודות ניתלו במטע של תמר צעיר מסוג מגיהל סמוך לאשכולות הפרי בעצים בגובה 2-4 מטר. בשלב זה עוד לא זיהינו את מרכיב המפתח והטענו נדיפיות בחומרים שכבר זוהו ביחסים וכמויות שונות כפי שמפורט בטבלה 4. מידי שבוע נאספו לוחות הדבק ונבדקו תחת סטראו-מיקרוסקופ לנוכחות עשים. הנדיפיות הוחלפו כעבור שבועיים. סה"כ הועמדו 7 בדיקות בכ-7 חזרות לכל טיפול.

ב-2011, לאחר בידוד וסינתזה של המרכיב החסר Z4, Z7Dodecenyl acetate, נבדקו נדיפיות עם תערובות חדשות (טבלה 5). בשלב זה למעשה כל המרכיבים שנמצאו באיסופים האוטומטיים מהנקבות זוהו. בניסוי ראשוני נבדקה תערובת של שלושה מרכיבים: Z4,Z7-10:Ac, Z4-10:Ac, Z5-10:Ac ביחסים שווים כנגד מלכודת דלתא ללא נדיפית כבקורת. הניסוי נערך במטע מבוגר של זאידי וחיאני בקיבוץ שדה אליהו. בהמשך הוצבו 2 ניסויים נוספים באותו המטע וניסויים במטעי קיבוץ סמר מטע צעיר יחסית של מג'הל. בנוסף, בדקנו נדיפיות "פרומון" מסחריות חדשות מחברת Alpha Scents, Inc, OR.USA שפורסמו באתר החברה כמכילות פרומון המין של העש תמר הקטן. בבדיקה כימית שערכנו נמצא שהנדיפית מכילה: 95% Z510Ac ו-4% Z510OH.

בכל הניסויים השתמשנו במלכודות דלתא בדומה לשנה שעברה. בעצים הבוגרים המלכודות נתלו מטרים אחדים מתחת לצמרת באמצעות כלי גובה. בעצים צעירים ניטלו המלכודות בין האשכולות. הרכב הנדיפיות מתואר בטבלה 5.

לשם בחינת התכונות שימוש במלכודות לניטור נוח מהקרקע, נבדקו מלכודות דלתא ו-2 מלכודות-IPS המוצבות על הגזע בגובה של כ-1.5 מטר. למניעת בריחת העשים ממלכודת IPS הוספה לתוכה טבלית דיופאן.

דוגמת הפרטים שנתפסו במלכודת נלקחה לזיהוי טקסונומי אצל דר' ואלריה ספליארסקי בשירותים להגנת הצומח של משרד החקלאות, אשר לאחר אישור ראשוני כ- *Batrachedra amydraula* העבירה אותם להמשך הזיהוי אצל מומחה בין-לאומי לקבוצה פרופ' סרגי סיניב במכון לזואולוגיה, סנקט פטרבורג רוסיה.

#### טבלה 4: הרכב החומר בנדיפיות שנבדקו במטע סמר בניסוי 2010.

| ניסוי מספר          | מספר מלכודות לטיפול | החומרים וכמותם (µg)        |         |         |         |           | מספר הטיפול |
|---------------------|---------------------|----------------------------|---------|---------|---------|-----------|-------------|
|                     |                     | Z4-10OH                    | Z5-10OH | Z4-10Ac | Z5-10Ac | 1-octanol |             |
| 7, 6, 5             | 7                   | 100                        |         |         |         |           | 1           |
| 7, 6, 5             | 7                   |                            | 100     |         |         |           | 2           |
| 7, 6, 5             | 7                   |                            |         | 100     |         |           | 3           |
| 7, 6, 5             | 7                   |                            |         |         | 100     |           | 4           |
| 4, 3, 2, 1          | 7                   | 100                        |         | 100     |         |           | 5           |
| 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 | 7                   |                            | 100     |         | 100     |           | 6           |
| 4, 3, 2, 1          | 7                   |                            |         | 100     | 100     |           | 7           |
| 7, 6, 5             | 7                   |                            | 100     | 100     | 100     |           | 8           |
| 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 | 7                   | 100                        | 100     | 100     | 100     |           | 9           |
| 4, 3, 2, 1          | 7                   | 1000                       | 1000    | 1000    | 1000    |           | 10          |
| 4, 3, 2, 1          | 7                   | 10                         | 100     | 10      | 10      |           | 11          |
| 4, 3, 2, 1          | 7                   | 100                        | 100     | 100     | 100     | 100       | 12          |
| 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 | 7                   | ביקורת (מלכודת ללא נדיפית) |         |         |         |           | 13          |

ניסוי 1: 23 מרץ-31 מרץ; ניסוי 2: 31 מרץ-7 אפריל; ניסוי 3: 7 אפריל-17 אפריל; ניסוי 4: 17 אפריל-25 אפריל; ניסוי 5: 25 אפריל-7 מאי; ניסוי 6: 7 מאי-17 מאי; ניסוי 7: 17 מאי-2 יוני

**טבלה 5: הרכב החומר הנדיפיות שנבדקו במטע סמר בניסוי 2011.**

| מספר הטיפול | החומרים וכמותם (µg) |                                      |          |              |     | מספר הטיפול |
|-------------|---------------------|--------------------------------------|----------|--------------|-----|-------------|
|             | 10:Ac               | Z5-10:Ac                             | Z4-10:Ac | Z4, Z7-10:Ac |     |             |
| 1           | 2                   | 100                                  | 100      | 100          | 100 | 1           |
| 3           | 5 ,6                | 100                                  | 200      | 100          | 100 | 2           |
| 4 ,3        | 7 ,5                |                                      | 200      | 100          | 100 | 3           |
| 3           | 5                   |                                      | 200      | 100          |     | 4           |
| 4 ,3        | 7 ,5                |                                      | 200      |              | 100 | 5           |
| 3           | 5                   |                                      |          | 100          | 100 | 6           |
| 2 ,1        | 6 ,2                |                                      |          |              | 100 | 7           |
| 4 ,2        | 6 ,8                | נדיפית "פרומון" מסחרי של Alpha Scent |          |              |     | 8           |
| 4 ,2 ,1     | 6 ,8 ,2             | ביקורת (מלכודת ללא נדיפית)           |          |              |     | 9           |

\*רשימת הניסויים 2011: 1- שדה אליהו 1, 2- סמר 1, 3- שדה אליהו 2, 4- שדה אליהו 3.

## תוצאות

1. גידול מעבדה: הצלחנו לפתח קרקע מזון להחזיק בו גידול לאורך במשך למעלה משנה. מהשוואת הישרדות/התפתחות הזחלים על שתי הדיאטות רואים כי שבשתי הדיאטות אחוז התפתחות הבוגרים מהביצים הוא עד 30%. כאשר יחס הזוויגים הוא 1:1. הבעיה המרכזית של הגידול הן האקריות הספרופיטיות החודרות לקרקע מזון ובגלל גודלם הקטן של זחלי העש פוגעים גם בהם.

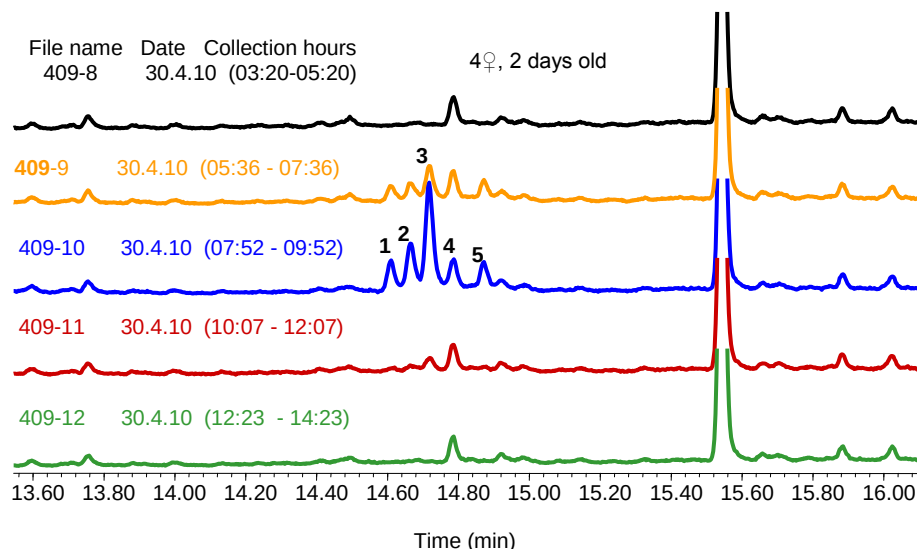
2. התנהגות האיתות המיני מרבית הנקבות הבתולות שגודלו על קרקע מזון (כ-70%) מראות התנהגות איתות המבוטא בהבלטת קצה הבטן החוצה. התנהגות הזאת מתפתחת כבר ביום הראשון לחייהן הבוגרות של הנקבות במחצית השנייה של תקופת החושך ומגיעה לשיאה בשלוש שעות האחרונות בכל מחזור חושך. חשוב לציין, שהזכרים, שנבדקו בשעות אלה באולפקטומטר נמשכו באופן בולט לנקבות (סורוקר וחוב', דוח 2009). ממצא זה מאשש את הטענה כי בשעות אלה משחררות הנקבות פרומון מין המושך את הזכרים. חיזוק נוסף לטענה זו התקבל ממשיכה של הזכרים לחומרים שנאספו מאווירת נקבות בשעות החושך (טבלה 3). כן נראתה בשעות אלה עליה בולטת של מרכיבי הפרומון במערכות האיסוף האוטומטיות שתוארו בסעיף שיטות (איור 1).

3. אנליזות של איסופי אוירה ב-EAD-GC. רוב איסופי האווירה עוררו תגובה משמעותית במחושי הזכרים ב-GCEAD טבלה 2. תגובה זאת הייתה ספציפית ולרוב מחושי זכרים לא הגיבו לאווירת הזכרים גם איסופי האווירה של הזכרים לא עוררו תגובה במחושי הנקבות (סורוקר וחוב', דוח 2009). בהתאם לתנאי ההפרדה של GC התקבלו מספר שונה של שיאים פעילים. בתוכנית ג' ההפרדה הייתה הטובה ביותר ואפשרה קבלת של כ-4 שיאים במחושי זכרים. חלקם היו רחבים. מה שהעיד שמסתתרים בתוכם מרכיבים נוספים. סה"כ נראה כי יש תגובה EAD לפחות ל-6 מרכיבים שונים במיצוי אווירת הנקבות ושזוהו גם במערכת האיסוף כפי שיפורט בהמשך. חשוב לציין שכמות החומר המשוחררת על ידי הנקבות היא זעירה ביותר הרבה פחות ממה שיכולים להרגיש המכשירים האנליטיים- דבר שהקשה מאד על השלבים הבאים של הבידוד והזיהוי. בשלב ראשון נתגלו שני מרכיבים Z5-10:OH; Z5-10:Ac. במקביל נראה ב-GCMS חומר נוסף, 1-octanol, רגישות מחושי הזכרים נבדקה לשלושה מרכיבים אלה. בכמויות של 10 ננוגרם הזכרים מגיבים באופן מובהק גם ל-1-octanol וגם ל-Z5-10:OH (איור 5). התברר כי רגישות הזכרים ל-Z5-10: Ac תלויה ריכוז והיא גבוהה

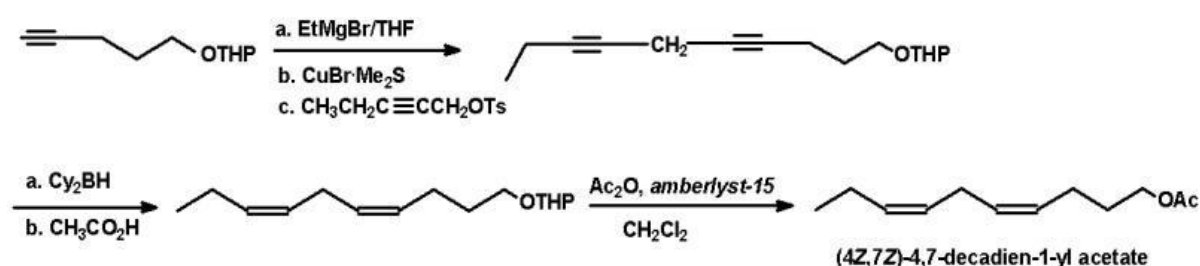
במיוחד והם מגיבים ל- $10^{-15}$  גרם של חומר לעומת זאת, בניסוי האולפקטומטר תגובת הזכרים לצירופים שונים של שני המרכיבים Z5-10:OH; Z5-10:Ac לא היתה גבוהה (איור 5), ואף ביחס 1:1 בו המשיכה לתערובת היתה מירבית, היא עדיין לא היתה מובהקת.

4. זיהוי מרכיבי הפרומון וסינתזה של מרכיב המפתח. מכיוון שאנליזות של מיצויי בלוטות ודוגם ITEX לא הועילו בפענוח הרכב הפרומון עברנו להשתמש במערכת ההזרקה האוטומטית ב-GCMS-SPME. בעזרת מערכת זאת התגלו לראשונה בתחום זיהוי הפרומונים 4 מרכיבים שמופיעים ונעלמים בשעות מסוימות ביום ולמחרת באותן שעות בערך מופיעים שוב. המרכיבים היו: decan-1-yl acetate, 4Z-decen-1-yl acetate, 5Z-decen-1-yl acetate ועוד מרכיב אחד שלפי חישובי RI וה-MS שלו נראה שהוא דיאן אצטט לא מצומד עם שרשרת של 10 פחמנים. במערכת איסוף זו לא נראו הכוהלים המתאימים. כדי להגיע למסקנות לגבי זהות המרכיב הנעלם נעזרנו בחומרים שנשלחו אלינו מקבוצות מחקר אחרות ברחבי העולם שבעזרתם קיבלנו מושג התחלתי מה אנו מחפשים. נעזרנו רבות במאגר SciFinder שנרכש בשנה האחרונה ע"י ספריית מינהל המחקר החקלאי, שבעזרתו גם איתרנו את קבוצות המחקר המחזיקות בסטנדרטים דומים וגם קיבלנו נתונים על חומרים דומים שעזרו לנו לצמצם את האפשרויות הרבות לסינתזה. היות שחומרים כאלה אינם נמצא והם נדירים מאד, גם בעשים, התחלנו בסינתזה של חומרים שעל פי כל הממצאים שהיו בידנו ידענו שיש סיכוי גבוה שאחד מהם יכול להיות המרכיב הנעלם. הבחירה בסדר הסינתזות של החומרים היתה בין היתר מבוססת שילוב המסקנות שהתקבלו מהספרות ומהזרקת סטנדרטים דומים והממצא שהמרכיב העקרי של הפרומון הוא Z5-decenyl acetate. ולכן סונתזו ארבעת האיזומרים הגאומטריים של 2,5-decadienyl acetate וכן ארבעת האיזומרים של 5,8-decadienyl acetate שהם דיאנים לא מצומדים עם קשר כפול אחד בעמדה 5. כל אלה סונתזו בדרכים דומות לאלה שנמצאות בספרות (6). בסיום הסינתזות התברר שאין התאמה בין שמות החומרים האלה ל-RI של הנעלם שנמצא באיסופים האוטומטיים מהנקבות. בהתאם לזאת נערכנו לסנתז את הדיאנים הלא מצומדים המתאימים שלהם קשר כפול אחד בעמדה 4 כמו במרכיב המשני השלישי שזוהה באיסופים Z4-decenyl acetate. לפי חישובים והשוואות לממצאים אחרים בספרות, בחרנו לסנתז את החומר שזוהה לבסוף כפרומון Z4,Z7-decadienyl acetate. עבדנו לפי פרוצדורה ספרותית להכנת הכוהל המתאים (4) אך את השלב האחרון שינינו כדי לדלג על שלב ולקבל מיידית את האצטט (7).

כאשר מתבוננים בהרצה של מערכת הדיגום האוטומטי במצב SPME עם נקבות חיות במרווחי זמן של שעותיים אפשר להבחין בפעם הראשונה במחקר מסוג זה של זיהוי מרכיבי פרומון בהופעת הפיקים החשודים כפרומון במשך מספר ימים כל כ-20 שעות ובדעיכתם לאחר 3-4 שעות. ברור שבשיא שחרור הפרומון עולים שלושה מרכיבים: Z4-10:Ac=1, Z4, Z7 Decadienyl acetate=2, Z5-10:Ac=3, ו-10:Ac=5 כאשר המרכיב בעיקר הוא הפיק השלישי וכמותו בהפרשה גדולה בערך כפליים מזו של המרכיבים האחרים (איור 4). אי התאמה של מחזור הפעילות לריתמוס של 24 שעות נבע כנראה מתנאי הניסוי; הנקבות הוחזקו בחושך בכל שעות האיסוף משום שהיתה בעיה טכנית להעביר אותן מהגידול שהיה כאמור בתנאי יום:לילה הפוכים לאלה שבמעבדה לכימיה בה בוצעו האיסופים הנ"ל ולא רצינו שזה יפגע ביכולת הנקבות להפריש פרומון.



איור 1: הרצות בדוגם SPME אוטומטי על גבי GCMS במירווחי זמן של שעותיים המבטאות הופעה והעלמות הפיקים שזוהו כמרכיבי הפרומון בזמן ה-calling. Z4-10:Ac=1, 2 מרכיב המפתח הנעלם זוהה לבסוף כ- Z4, Z7 10:Ac=5, C14=4, Z5-10:Ac=3, decadienyl acetate



איור 2: מסלול סינתטי לקבלת (4Z, 7Z)-4,7-decadien-1-yl acetate

אפיון פיזיקלי של החומר הסינתטי: (4Z,7Z)-4,7-decadien-1-yl acetate  
מאס ספקטרא:

MS (70 eV) [m/z (%): 136 (M<sup>+</sup>- AcH, 21%), 121 (11), 108 (19), 107 (32), 93 (47), 79 (100), 67 (35), 55 (13), 43 (44).

NMR מימנים

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.00 (s, 3H, 7.4 Hz), 1.73 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.09 (m, 2H), 2.17 (q, 7.3 Hz, 2H), 2.80 (t, 6.4 Hz, 2H), 4.09 (t, 6.86 Hz, 2H), 5.33 (m, 1H), 5.41 (m, 2H), 5.44 (m, 1H).

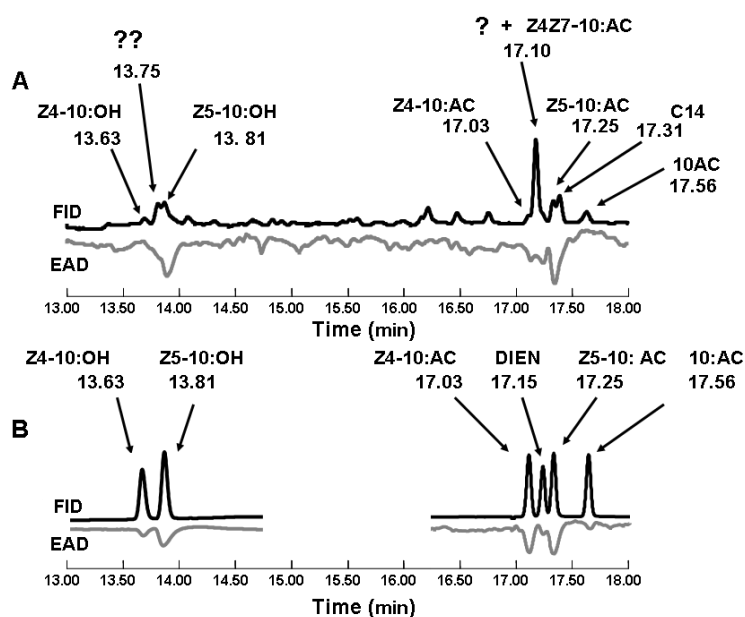
NMR פחמנים

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 14.29, 20.57, 21.03, 23.62, 25.49, 28.52, 63.98, 127.06, 128.46, 129.29, 132.02, 171.19.

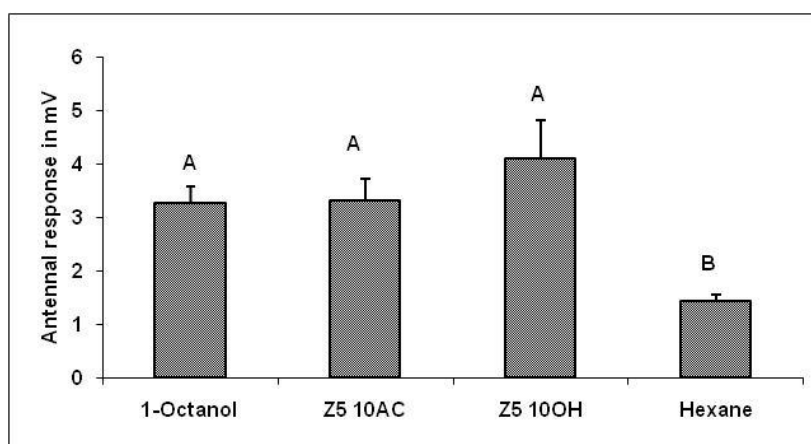
אנליזה אלמנטרית

calcd for C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>: C 73.43%, H 10.27%. Found: C 73.31%, H 10.49%.

5. אימות מרכיבי הפרומון שזוהו באלקטרואנטוגרם ואולפקטומטר. תוצאות EAD-GC המציגות את תגובת הזכר למיצוי אווירית נקבות בתולות וסטנדרטים סינתטיים מאמתות את זיהוי 6 מרכיבי הפרומון המעוררים את מחוש הזכר (איור 3).



איור 3. אנליזה ב-GC-EAD של איסוף אוירה מ-45 נקבות (A) וסטנדרטים (B) בתוכנית 2 (ראה פרק שיטות). ? – מרבית הפיק הוא חומר לא מוגדר כנראה זיהום שתחתיו מסתתר המרכיב "הנעלם" (Z4Z7 decadienyl). ?? – אי נקיון שתחתיו מסתתר כנראה הכוהל של הדיאן.



איור 4: תגובות מחושי זכרים ב-EAG לשלושה מרכיבים סינטטיים שווהו: Z-5-10:OH ו-1-octanol. במינון של 0.001 ננוגרם. התוצאות הם ממוצע + שגיאת תקן של חמישה זוגות מחושים כל אחד.

טבלה 6: תגובות אלקטרו פיסיולוגיות והתנהגותיות של זכרים כלפי החומרים הסינטטיים. באותיות השונות מסמנות קבוצות השונות באופן מובהק:

Oneway Anova followed by Tukey-Kremer HSD  $p < 0.05$

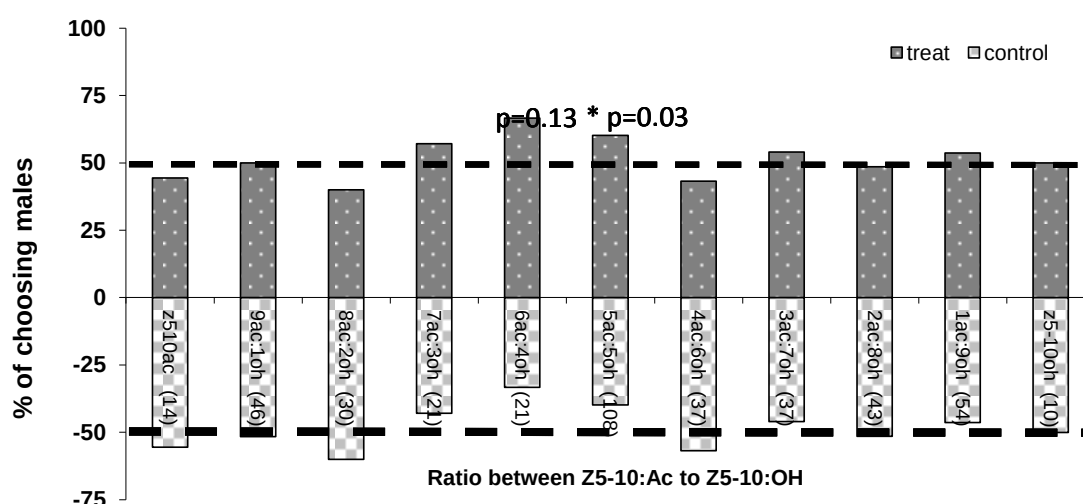
| Compounds (10 ng) | EAD (n) | Response (%) | Olfactometer (n) | Attraction in Olfactometer % of responding males |
|-------------------|---------|--------------|------------------|--------------------------------------------------|
| Octanol           | 3       | 100          | 44               | 53                                               |
| Dodecanal         | 3       | 0            | NT               | NT                                               |
| Z3 8AC            | NT      | NT           | 25               | 47                                               |
| Z4 10OH           | 4       | 100          | NT               | NT                                               |
| Z5 10OH           | 12      | 100          | 13               | 50                                               |
| Z4 10AC *         | 4       | 100          | 10*              | 25*                                              |

|         |    |     |    |    |
|---------|----|-----|----|----|
| Z5 10Ac | 20 | 100 | 44 | 37 |
|---------|----|-----|----|----|

\*-החומר נבדק באולפקטומטר בכמות של 1 ng.

למרות שמחוי הזכר מגיבים לשלושת החומרים באופן שונה מהביקורת, רגישותם לשלושת החומרים שונה. בעוד ל- Z5-10:Ac יש תגובה תלוית ריכוז ברורה עם סף חשה מתחת ל-10 ננוגרם (איור 9). התגובה ל- Z5-10:OH מראה עליה מתונה יותר עם סף חשה גבוהה פי 1000 מזו של Z5-10:Ac. לגבי ה-1-octanol לא נמצא עליה בתגובה בטווח עד 10-5 ולא נבדקה הרגישות בריכוזים נמוכים יותר. כמו כן, רגישותם של הזכרים לריכוזים השונים של ארבעת המרכיבים הנוספים Z4-10:Ac, 10:Ac, Z4-10OH ו- Z4Z7 10:Ac ב- EAG טרם נבדקה.

בנוסף למבחני חשה באלקטרואנטנוגרם למרכיבים שזוהו בוצעו מבחני התנהגות באולפקטומטר (טבלה 6). אך אף אחד מהחומרים הבודדים שעוררו תגובה במחוש לא עורר משיכה משמעותית. גם כאשר נבדקה תגובת הזכרים לשני מרכיבי הפרומון הראשונים שזוהו Z5-10:Ac ו- Z5-10:OH (איור 6) המשיכה לא היתה רבה. אל אף שנראה שמשיכת הזכרים למרכיבי הפרומון עלתה כאשר כמות היחסית של Z5-10Ac היתה בין 50-70%. רק ביחסים של אחד לאחד המשיכה היתה משמעותית סטטיסטית והיא לא עברה את 65%. וזאת למרות שבתגובה למיצויי אוירה הביאה למשיכה גם מעל 80%.

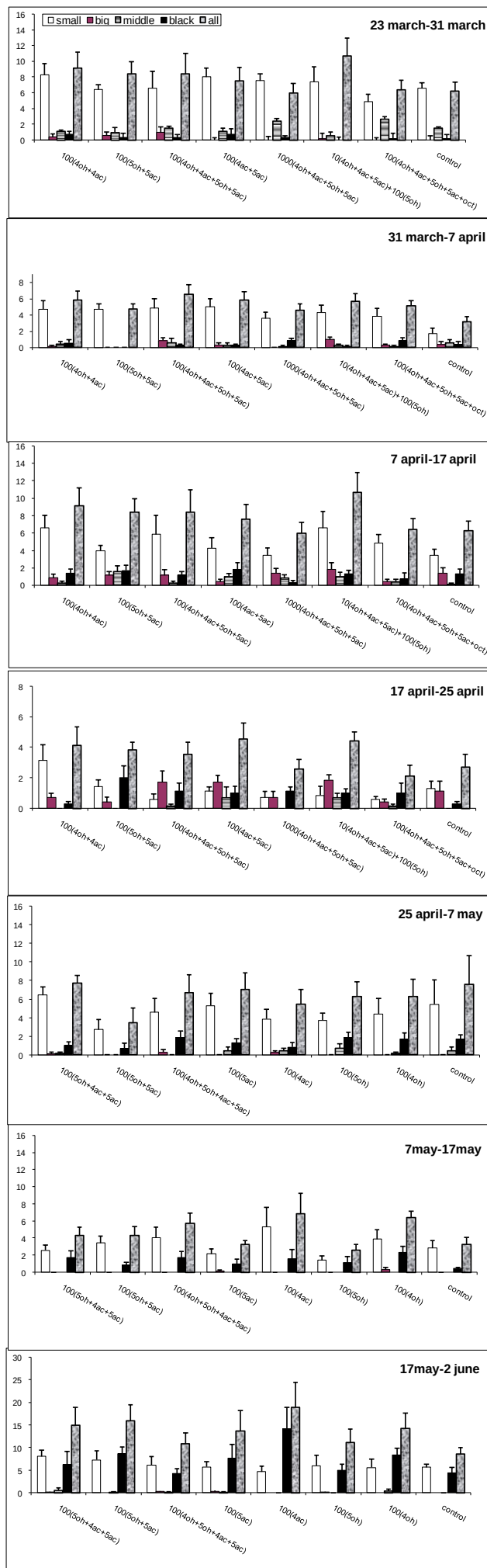


**איור 5:** תגובת הזכרים באולפקטומטר לתערובות של שני מרכיבי הפרומון: Z5-10:Ac ו- Z5-10:OH. ביחסים שונים.

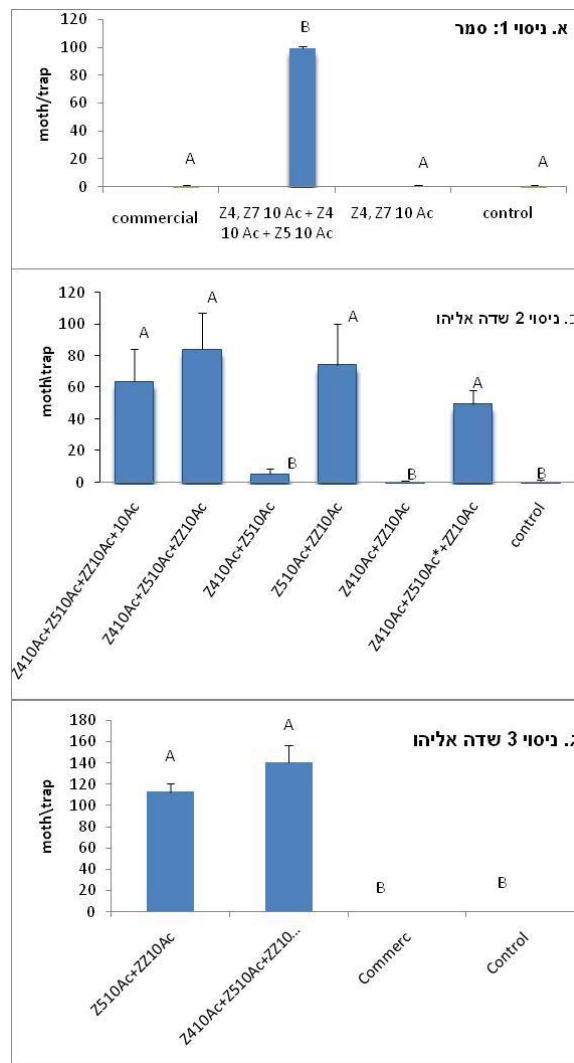
## תוצאות ניסויי שדה

בגלל מגבלות זמן של פעילות עשים בשדה בין מרץ ליוני. התחלנו בניסויי שדה כבר באביב 2010 עם קבלת נתונים ראשוניים על מרכיבי הפרומון שהיו קלים יותר לזיהוי. ניסינו מרכיבים בודדים וצירופים, כפי שמוצג באיור 6. בניסויים השונים נלכדו עד 30 עשים למלכודת לשבועיים. ממצאים אלה רמזו, שהזכרים נמשכים למרכיבים שזוהו, למשל מעט יותר לנדיפיות המכילות מרכיבים עם קשר כפול בעמדה 4. אך סה"כ הלכידות היו נמוכות ולא עיקביות. במלכודות נראה מספר גדלים של עשים מה- Microlepidoptera שנראו דומים לעש

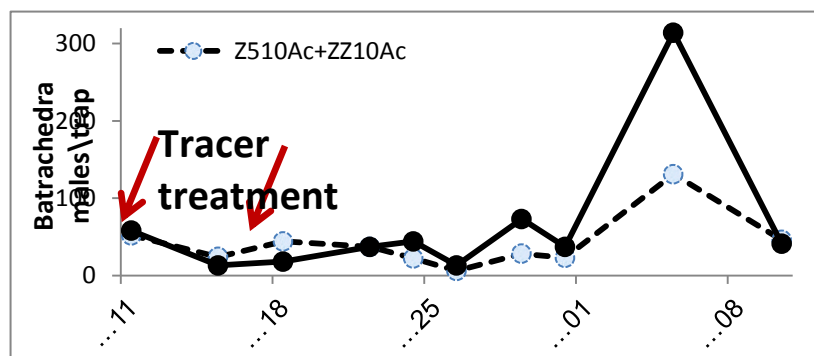
התמר הקטן וזיהוי העשים בדבק היה בעייתי. עם גילוי החומר החשוד כמרכיב מפתח בחודש ינואר 2011 ולאחר שסונתו בדרגת נקיון איזומרי ובכמות שתספיק לניסויי השדה חודשו ניסויי שדה החל מסוף חודש מרץ 2011. בניסוי שדה הפרלימינארי בשדה אליהו שנערך בין 24.3 ל- 13.4 עם 6 מלכודות בלבד, נמצא, כי בשתי המלכודות של תערובת של שלושה מרכיבים: Z5-10:Ac, Z4, Z7-decadienyl acetate, Z4-10:Ac נתפסו 254 זכרי בטרנדורה, בעוד שבשתי מלכודות שהכילה את ה- Z4, Z7 Decadienyl acetate נלכדו 6 ובשתי מלכודות ביקורת (ריקה) 3 זכרים. בעקבות ניסוי זה המשכנו בניסויי השדה גם בסמר בנוסף לשדה אליהו. בסמר השוונו נדיפיות שבהן הוספגו שלושה מרכיבים ביחסים טבעיים יותר בין המרכיבים (כפליים Z5-10:Ac) כנגד נדיפית "פרומון" בטרנדורה מסחרית וביקורת ריקה. התוצאות מראים בבירור שהנדיפית המסחרית כלל אינה יעילה, ומושכת בדומה לביקורת בעוד הנדיפית עם התערובת שלנו יעילה מאד. כישלון הנדיפיות המסחריות אינו מפתיע ותואם ממצאים קודמים שנערכו בעבר בארץ עם החומרים שהיא מכילה וכן את ממצאינו מניסויי שדה 2010 וניסויי מעבדה באולפקטומטר, מאחר והרכבו אינו כולל את המרכיב המפתח Z4, Z7-10:Ac אלא רק את Z5-10:Ac והכוהל שלו בלבד. בניסויי שדה נוספים (איור 9), ראינו שהתמונה חוזרת על עצמה, ה"פרומון" המסחרי מתפקד בדומה לביקורת בעוד כל הנדיפיות המכילות את מרכיב המפתח שזיהינו לוכדות. הלכידה המירבית קיימת במלכודות עם נדיפית של 3 המרכיבים Z4-10:Ac, Z5-10:Ac, Z4, Z7-decadienyl acetate שני מרכיבים Z5-10:Ac, Z4, Z7-decadienyl acetate נותנים מעט פחות לכידות, אך ההבדל בין השניים אינו סטטיסטי. הפרומון מושכת זכרי העש גם בגובה האדם וכאשר היא מוצבת במלכודת IPS רגילה. כאשר משווים את הלכידות בשתי מלכודות IPS לאורך זמן לא רואים מגמה ברורה, למרות שבמצטבר המלכודת עם 2 מרכיבים לכדה באופן משמעותי פחות זכרים מזו המכילה 3 מרכיבים ( $X^2; p < 0.05$ ). העשים שנלכדו במלכודות היבשות היו כולם זכרים הועברו להגדרה וזוהו כעש התמר הקטן.



איור 6: לכידות עשים החשודים כעש התמר הקטן במטע קיבוץ סמר ב-2010 במלכודות דלתא טעונות בנדיפיות המכילות הרכבים וכמויות שונות של המרכיבים שזוהו. הנתונים הם ממוצע העשים למלכודת + שגיאת תקן.



איור 7: בדיקת תערובות מרכיבי הפרומון בניסויי שדה 2011. א. ניסוי סמר 1 ב-8-6 חזרות לטיפול. ב. ניסוי שדה אליהו 2 (5 חזרות לטיפול). \*היחס הכמותי בין המרכיבים בתערובת הוא 1:1:1 למעט Z5-10:Ac שכמותו היא כפולה. ג. ניסוי בשדה אליהו בו כל המלכודות ניתלו בגובה של 3-7 מטר. באותיות השונות מסמנות קבוצות השונות באופן מובהק Oneway Anova followed by Tukey-Kramer HSD  $p < 0.05$



איור 8: השוואת לכידות בשתי מלכודות IPS המוצבות בגובה של כ-1.5 מטר בשדה אליהו במשך כחודש ימים.

#### 1.4 דיון ומסקנות

בתום המחקר הושגו מטרותיו: הצלחנו לזהות את הרכב פרומון המין של עש התמר הקטן ולהוכיח כושר משיכתו בשדה. לשם כך העמדנו גידול של העש במעבדה תוך פיתוח קרקע מזון ייחודי לעש. למדנו את שעות שיחרור הפרומון וביססנו מבחנים ביולוגיים לעזר בזיהוי הפרומון (EAD ואולפקטומטר). באווירת הנקבות זוהו 6 מרכיבים בעלי פעילות במחשבי הזכרים אולם רק ארבעה מהם הראו מחזור השתנות יומימה שמרמז על חשיבותם, בהרכב פרומון המין של נקבות עש תמר הקטן. לשם ברור זהותו של המרכיב המפתח היה צורך בסקירות ספרותיות מרובות והשגת סטנדרטים דומים על מנת שיצמצמו את מספר האפשרויות. מאחר וחומרים מסוג זה אינם מסחריים וכמות החומר הנעלם בדוגמא קרובה לרמת "עקבות" ולמעשה נצפתה רק באיסוף SPME, שאותו לא ניתן לשחזר לאחר הזרקה, הרי שמלאכת הזיהוי למיקום הקשרים הכפולים לאורך השרשרת הפחמנית והגאומטריה שלהם (ציס או טרנס) היתה מורכבת מאד. מתוך נתוני RI ו-MS ידענו כי מדובר בחומר בן 10 פחמימנים עם שני קשרים כפולים לא מצומדים וקבוצת אצטט. לאחר שסנתזנו 8 חומרים בעלי פוטנציאל התאמה גבוה לנעלם, התברר כי החומר החסר הוא Z4, Z7-10:Ac. המרכיבים עם קשר כפול בעמדה 5 משכו בעבר ממין אחר בסוג בטרנדרה *B. pinicolella* (6). "פרומון" מסחרי של עש תמר הקטן המשווק ע"י חברת Alfa Scents לא מושך בכלל את העשים באוכלוסייה שלנו. החברה עצמה טענה בעקבות הבדיקה הכימית שלנו לשאלתנו אם יש להם נתוני לכידה, כי יחסים שונים של החומרים הללו נבדקו באופן נסיוני באיחוד האמירויות והיחס 5:95 היה הטוב ביותר אך למעשה עוצמת המשיכה אינה חזקה כפי שמצופה מפרומון. בכל אופן, הרכב הפרומון שנמצא במחקר זה הוא ייחודי וחדש בספרות. חומר זה טרם נמצא כפרומון בעשים.

מניסויי שדה בודדים שהספקנו לבצע השנה עולה שהחומר יעיל ולכוד עשרות רבות של זכרי העש שלנו בלבד תוך פחות משבוע ימים. מכל מרכיבי הפרומון שזוהו, 2 מרכיבים בעלי משמעות ודאית לאיתור הנקבות. למרכיבים נוספים, עשויים להיות תפקידים נוספים בהתנהגות העש. ניתן ליישם את הפרומון במלכודת דלתא ונראה שגם ב-IPS, גם בגובה אדם, וכך לנטר את נוכחות המזיק מבלי הצורך לעלות על כלי גובה, אם כי כל הנושאים האלו חייבים להבדק בעתיד יותר לעומק. לממצאי עבודה זו חשיבות חקלאית רבה בישראל ובכל איזורי גידול התמר הנגועים במזיק זה. עם זיהוי הפרומון נפתחת האפשרות לפתח שיטת ממשק ידידותית לסביבה המבוססת על ניטור ובלבול זכרים באמצעות הפרומון.

#### תודות

ברצוננו להודות לתמר יוצר, על העזרה הטכנית, לשי אלקין, מרכז מטע בשדה אליהו על העזרה בניסויי מטע, לד"ר ואלריה ספליארסקי על זיהוי הטקסונומי הראשוני של עש תמר הקטן והכנת הפרפרטים להמשך הזיהוי בחו"ל. תודה לד"ר טלי שרף מהמעבדה לתהודה מגנטית גרעינית במכון ויצמן על עזרתה בקבלת נתוני NMR ואינטרפרטציה של מרכיב הפרומון החדש. תודה לד"ר קרינה חזן מהמעבדה למיקרואנליזה באוניברסיטה העברית על האנליזה האלמנטרית למרכיב זה.

1. בלומברג, ד. (2004) מזיקי תמר וממשק הדברתם. התמר בערכת צבי ברנשטיין, תירוש הוצאה לאור.
2. נקש י, בלומברג, ד, דונקלבלום ע., זאדה ע., סורוקר ו., אליהו מ. דו"ח לתוכנית מחקר 895-0114-03.
3. Al-Hooti, S., Sidhu, J.S. and Qabazard, H. (1998). Chemical composition of seeds date fruit cultivars of United Arab Emirates. *J. Food Sci. Technol.* 35, 44–46.
4. Attygalle, A. B., Jham, G. N.; Svatoš, A., Frighetto, R. T. S., Ferrara, F. A., Vilela, E. F., Uchôa-Fernandes M. A., Meinwald J. (1996) *Bioorg. Med. Chem.*, 4, 305-314.
5. Blumberg, D. (1975). Preliminary notes on the phenology and biology of *Batrachedra amydraula meyrick* (lepidoptera: cosmopterygidae), a new pest of date palms in Israel. *Phytoparasitica* 3, 55-57.
6. Bengtsson, M., Liljefors, T., Hansson, B. S. (1987) *Bioorg. Chem.*, 15, 409-422.
7. Das, B.; Reddy, M. R.; Reddy, K. R.; Ramu, R.; Thirupathi, P. (2006), *J. Mol. Catal. A. Chem.* 248, 185–188.
8. Hai T. V., Vang, L. V., Son, P. K., Inomata, S-I., Ando T. (2002). Sex attractants for moths of Vietnam: field attraction by synthetic lures baited with known Lepidopteran pheromones. *J. Chem. Ecol.* 28, 1473-1481.
9. Priesner, E. (1989). Two components sexual attractant for male *Batrachedra pinicolella* (Zell) Lepidoptera: Batrachedridae). *Z. Naturforsch.* 44, 1061-1062.
10. Wullemse L. P. M., Booij, C. J. H. and S. Voerman (1987). New sex attractants for male Lepidoptera (Colephorinae, Gelechiidae, Momphidae, Oecophoridae, and Yponomeutidae) found by field screening in the Netherlands. *J. Appl. Ent.* 103, 508-515.

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

1. פיתוח שיטה לגידול המזיק במעבדה.
2. לימוד התנהגות איתות מינית בנקבות העש.
3. זיהוי פרומון המין של נקבות עש התמר הקטן.

### **עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.**

- א) פותחה שיטה לגידול עשים במעבדה.
- ב) נלמדה התנהגות האיתות המיני של נקבות העש.
- ג) נבדקה משיכת הזכרים לנדיפי הנקבות ומרכיביהן באולפקטומטר.
- ד) זוהו מרכיבי פרומון המין של נקבת העש באמצעות שיטה אוטומטית חדשה לגילוי הפרומון.
- ה) מרכיב המפתח בפרומון סונתז ואופיין כחומר טבעי חדש.
- ו) נערכו ניסויי שדה לבחינת המשיכה של הזכרים לרכיבים שזוהו במטעי תמר בשני אזורי גידול: ערבה ובקעת בית שאן.

### **המסקנות המדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדוח**

- א. ניתן לגדל את זחלי הבטרקדורה על קרקע מזון במעבדה, אם כי חשוב עדיין לבצע אופטימיזציה לקרקע מזון ולשיטת תחזוקת הזחלים.
- ב. במערכת התקשורת של עש התמר הקטן הזכרים נמשכים אל חומרים נדיפים שהנקבות משחררות.
- ג. פרומון המין של נקבות עש תמר הקטן מורכב מתערובת של נגזרות ח. שומן, הם ברובם אצטטים עם שלד של עשרה פחמנים, לא רוויים, וקבוצות פונקציונליות אצטט, מרכיב המפתח  $Z4,Z7-10Ac$  הוא בעוד המרכיב העיקרי הוא  $Z5-10Ac$ . תפקידם של הכוהלים שנמצאו במיצוי האווירה אינו ברור ויתכן ומדובר בפרקורסורים של הפרומון או בחומרים בעלי חשיבות ביולוגית אחרת.

### **הבעיות שנותרו לפתרון ואם השינויים שחלו במהלך עבודה (טכנולוגיים, שיווקיים, ואחרים): התייחסות המשך המחקר לגביהן.**

- א. יש למצוא יחסים ומינונים של המרכיבים המושך את הזכרים באופן מיטבי בתנאי שדה.
- ב. גם אם אין סבירות גבוהה שלכוהלים הנגזרים ממרכיבי הפרומון המושכים כושר משיכה למזיק, אין להתעלם מנוכחות עקבות  $Z4-10OH$  ו-  $Z5-10OH$  במספר דוגמאות של איסופי אוירה. יש לבדוק גם את הכוהל הנגזר מהדיאן ולבדוק גם את תפקידו בשדה, לבד ויחד עם שאר החומרים.
- ג. יש לפתח ממשק ניטור ולבחון אפשרות ל"בלבל" מזיק חשוב זה על מנת להפוך את ממשק ההדברה שלו לידידותי.

### **האם הוחל בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:**

מאמר המסכם את זיהוי וסינתזת פרומון התקבל לפרסום במערכת העיתון Tetrahedron Letters.

### **פרסום הדו"ח:**

אנו ממליצים לא פרסם את תוכן הדוח בשלב זה.