

זיהוי מרכיבי הפרומון של המין המקומי של סס הנמר *Zeuzera pyrina*

The identification of the pheromone of the local species of the Leopard moth, *Zeuzera pyrina*

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ענת זאדה, המח' לאנטומולוגיה-כימיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.
חיים ראובני, המרכז להדברה משולבת, מו"פ צפון.
ויקי סורוקר, המח' לאנטומולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.
לאוניד אנשליץ, המח' לאנטומולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.
שלומית לבסקי, המח' לאנטומולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.
דניאלה דרגושיץ, המח' לאנטומולוגיה-כימיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.

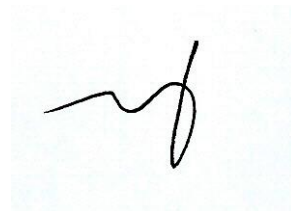
בשיתוף
ליאת גיטגרץ, המחלקה לאנטומולוגיה-כימיה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

דצמבר 2009

טבת תש"ע

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר:



תקציר

1. הצגת הבעיה- סס הנמר הוא מזיק קשה בעצי גרעיניים. המרכיבים העיקריים של פרומון המין של נקבות סס הנמר *E2, Z13- octadecadienyl acetate*, 95% וכן *E3, Z13- octadecadienyl acetate* 5% זהו בשנות השמונים ומאז דווח בספרות על מרכיבים נוספים בהם לא נעשה שימוש מעשי. בניסויים שנערכו בארץ עם מלכודות ונדיפיות שונות, המכילות את הפרומון הסינתטי, הלכידה הייתה מזערית גם במטעים הנגועים קשות במזיק. יתר על כן, מעבודות קודמות שנעשו בארץ עולה, כי יעילות הלכידה של מלכודות הפרומון נמוכה בהרבה מזו של מלכודות הטעונות בנקבות.

2. מטרות המחקר- מטרת המחקר הייתה לברר מדוע פרומון הסס לא מושך את הזכרים ואם הסיבה היא בקיום מרכיב פרומון חיוני במין המקומי שלא ידוע עליו בספרות.

3. שיטות העבודה- לשם הפקת פרומון היה צורך בבוגרים משני הזוויגים. נאספו ענפים נגועים מהמטעים שהוצמדו לשתילי תפוח. הזחלים יצאו מהענפים המתייבשים וחדרו לשתילים ובטרים גיחת הבוגרים הועברו הגלמים לכלובי הטלה. בשיטת גידול נוספת זחלים שהוצאו מענפים הועברו לשלושה סוגים של מצעי מזון מלאכותי והוחזקו בתנאים מבוקרים עד להתגלמות. הגלמים, ממויינים לפי הזוויגים, שימשו בחלקם להפקת הפרומון וחלקם הושאר בכלובי ההטלה לצורך שמירה על רצף הגידול. הפקת הפרומון נעשתה מיד לאחר גיחת הנקבות הן ע"י מיצוי בלוטות הפרומון מנקבות בשלב ה- calling וכן נאספו נדיפים מנקבות שהושמו במערכת איסוף מזכוכית אליה מחוברת מלכודת חומר סופח. התמיסות שהתקבלו מן המיצויים עברו בדיקות EAG ו-EAD בניסיון לגלות חומרים שיעוררו תגובת מחוש בזכרים. בכוונה לפתח מבחן ביולוגי, שיבחן את מידת המשיכה של הזכרים למקור הפרומון במנהרת רוח הצבנו נקבות ולחילופין גם את מרכיבי הפרומון הסינתטיים כמקור הריח. בוצעו אנליזות כימיות ב-GC וב-GCMS על מנת לאתר חומרים העשויים להוות את הפרומון.

4. תוצאות עיקריות- קרקעות המזון שנבדקו נטו לפתח זיהום פטרייתי הפוגע בזחלים וכתוצאה מכך מספר הפרטים שהגיעו לשלב ההתפתחות הסופי היה נמוך. רבים מהזחלים היו קטנים ומעוותים ולא נראה כלל כי הם ניזונים מהמזון שהוגש להם. העברת הזחלים למצע טרי לעיתים תכופות לא שיפרה בהרבה את המצב. הבדיקות הביולוגיות שנעשו לא צלחו עקב מחסור מתמיד בפרטים בני אותו הגיל. במספר מועט מאד של מיצויי בלוטות זהו שני המרכיבים הספרותיים. בחלק מדוגמאות המיצויים זוהה חומר בעל שרשרת עם 18 פחמנים ושני קשרים כפולים וקבוצת אצטט, אך הגיאומטריה או מיקום הקשר הכפול לא הייתה זהה לזו של אף אחד מהמרכיבים שזוהו בספרות.

5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות- קיים קושי רב בגידול סס הנמר בתנאי מעבדה לשם אספקת נקבות להפקת פרומון. נראה כי לשיטת אילוח שתילים ע"י זחלים יש יתרון על מצע גידול בנוגע למצב הבוגרים המתקבלים. במצב של המשך אספקת פרטים בודדים יש לשנות את הגישות המקובלות ולפתח שיטות איסוף שונות ויותר רגישות.

מבוא-

1. רקע מדעי-

סס הנמר הוא מזיק חשוב במטעים נשירים (בעיקר תפוח, אגס וזית). תפוצתו של העש היא בעיקר באזור אגן התיכון. אוכלוסיית המזיק עולה במטעים שבהם נעשה שימוש מופחת בתכשירים. מחקר זה נועד למצוא פתרון לבעיית הסס במטעים בהם מתבצעת הדברה משולבת באמצעות בלבול ע"י פרומונים.

המרכיבים העיקריים של הפרומון של סס הנמר *Z13-octadecadienyl acetate*, *E2*, 95% וכן *E3*, *Z13-octadecadienyl acetate* 5% זהו בשנות השמונים (Tonini et al. 1986). מאז דווח בספרות על מרכיבים נוספים כמו *Z2,Z13-octadecadienyl acetate*, *E13-octadecenyl acetate*, *E2-octadecenyl acetate*, *octadecanyl acetate*, *Z13-octadecenyl acetate*, בהם לא נעשה שימוש מעשי. בניסויים שנערכו בארץ עם סוגים שונים של מלכודות ונדיפיות שונות, המכילות אותו פרומון סינתטי של הסס, המשמשות באירופה לניטור וללכידה המונית של סס הנמר, לא התקבל דפוס לכידה ברור והלכידה היתה מזערית גם במטעים הנגועים קשות במזיק (ראובני חובריו 2003-2006). בעבודות קודמות שנעשו בארץ (נבון וחובריו 1997) נמצא, כי יעילות הלכידה של מלכודות הטעונות בפרומון הסינתטי נמוכה בהרבה מזו של מלכודות הטעונות בנקבות.

גם בקרב העוסקים בישום הפרומון באירופה רווחת הדיעה, שלעיתים החומר עובד ולעיתים לא ושהלכידות אינן מספקות, אף כשלוקחים בחשבון את הדרישות המיוחדות של המזיק, כגון סוג וגובה המלכודת. לכן סברנו שיתכן והפרומון שמפרישה נקבת המין המקומי של סס הנמר שונה במהותו או ביחסי המרכיבים מהפרומון הידוע בספרות. במחקר הנוכחי ערכנו השוואה בין הפרומון של המין המקומי שהופק מנקבות שגודלו בתנאי מבוקרים במעבדה לבין הפרומון הסינתטי. כמו כן, נבדקה תגובת הזכרים למיצוי פרומון שהופק מנקבות.

2. מטרת המחקר-

מטרת המחקר היו לבחון הרכב הפרומון של האוכלוסייה המקומית של סס הנמר לצורך פיתוח פיתיון משופר שיתאים לניטור והדברת סס הנמר בישראל.

2. עיקרי הניסויים שבוצעו ותוצאותיהם-

ביסוס גידול מלאכותי של סס הנמר:

כדי להפיק פרומון מבלוטות של נקבות סס הנמר היה צורך להקים גידול המוני של החרק בתנאים מבוקרים. לצורך זה נבדקו מספר שיטות גידול כמפורט להלן. בשלב ראשון, כדי להימנע מגידול בתנאי מעבדה, נעשה ניסיון להקים גידול טבעי על שתילי תפוח שהוחזקו בבית רשת. לצורך זה אספנו ממשעים מסחריים ענפים נגועים עם זחלים והצמדנו אותם לשתילי התפוח. לאחר שהענף מתייבש יוצא הזחל לחפש מקור מזון חדש ונכנס לענפי השתיל. בדרך זאת הצלחנו לקבל מעל 300 שתילים מאוכלסים בזחלי סס הנמר. בתחילת האביב, לקראת מועד גיחת הבוגרים, הלבשנו כלובי רשת על השתילים כדי ללכוד את הבוגרים. זכרים ונקבות שהגיוחו באותו המועד הועברו לכלובי הטלה במטרה לקבל צאצאים להמשך התפתחות הדור הבא. חסרונה

העיקרי של השיטה היה בהופעה לא אחידה של בוגרים וברוב המקרים נקבות וזכרים הופיעו בנפרד ולא ניתן היה לבסס את הגידול מצאצאים של אוכלוסייה זאת. כדי לפתור את הבעיה עברנו לשיטת גידול של סס הנמר על קרקע מזון מלאכותי המבוססת על דיאטה שפותחה בארץ על ידי דר' עמוס נבון (Navon, A. Phytoparasitica 1977). במקרה זה, בדומה לשיטה לעיל, הוצאו זחלים מענפים והעברנו אותם כבודדים למבחנות שהכילו קרקע מזון מלאכותי והוחזקו בתנאים מבוקרים וקבועים בחדרי הגידול עד שלב ההתגלמות. לאחר ההתגלמות מויינו הפרטים לזוויגים וחלק מהנקבות הועברו לכלובי גיחה במעבדה לכימיה במינהל המחקר החקלאי במטרה להפיק פרומון מיד עם גיחת הנקבות הבוגרות. חלק אחר של הפרטים הושאר בכלובי הטלה בחדרי הגידול במטרה לשמור על רצף הגידול. הבעיה העיקרית שהיתה בשיטת הגידול היא התפתחות זיהום פטרייתי בקרקע המזון. כיוון שקרקע המזון עברה חיטוי באוטוקלאב נראה שהסיבה להתפתחות הזיהום היא העברת חומר חי ישירות מענפים שהובאו מהשדה למבחנות המזון. כתוצאה מכך מספר הפרטים שהתפתח לגלמים ובוגרים במערכת זאת היה קטן מאוד והדבר הגביל את האפשרות לבסס את הגידול בתנאים אלו.

כדי לפתור את הבעיה ולהפחית את רמת הזיהום נבדקה האפשרות להעביר לקרקע המזון זחלים צעירים שבקעו ישירות מביצים. מקור הביצים העיקרי היה מפרטים שנאספו במלכודות ביצים שהצבנו בשדה ובמקרים בודדים מבוגרים שהתפתחו והזדווגו במערכת הגידול. בשיטה זאת זחלים שבקעו מהביצים הועברו ישירות למבחנות עם קרקע מזון והוחזקו בגידול במשך שלושה חודשים עד שלב ההתגלמות. גם במקרה זה לא הצלחנו למנוע את התפתחות הזיהום במבחנות ומספר הפרטים שהגיע לשלב ההתפתחות הסופי היה עדיין קטן. כדי למנוע מצב שהזחלים יוחזקו תקופה של שלושה חודשים בקרקע מזון מזהמת העברנו אחת לחודש חלק מהזחלים במערכת לקרקע מזון חדשה אך, גם במקרה זה לא הצלחנו לשפר את שיעור ההישרדות בגידול ולא הצלחנו להפחית את רמת הזיהום במערכת. יתרה מכך, חלק גדול מהזחלים שהעברנו כלל לא ניזון במבחנות החדשות; חלקם מתו וחלקם התגלמו לפני שהשלימו את כל מחזורי הזחל. פרטים בודדים שהצליחו להגיע לבגרות היו לרוב קטנים יותר ופגומים. עיקר הפגם התבטא בכנפיים קצרות יותר ולעיתים גם במחסור של כנף אחת וגוף מעוות. ראוי לציין, שגם כאשר העברנו לקרקע המזון זחלים מאוכלוסייה רב-גילית שהוצאו מענפים היו מקרים שהזחלים היו בעקה, לא ניזונו כלל ונכנסו מוקדם יותר לשלב הגולם שממנו יצאו כבוגרים שאינם חיוניים.

בשלב המחקר המתקדמים נבדקה האפשרות לגדל את סס הנמר על שתי דיאטות נוספות מלבד הדיאטה שפותחה, כאמור, בארץ על ידי דר' נבון (להלן "דיאטה ישראלית", נספח 1). דיאטה נוספת שנבדקה התקבלה מחוקרים מספרד (Dolors Bosch) (להלן "דיאטה ספרדית", נספח 2) וכן, נבדקה הדיאטה עליה אנו מגדלים בהצלחה את עש התפוח (להלן "דיאטת Premix", נספח 3). בנוסף, אימצנו את פרוטוקול הגידול הספרדי שבו נוהגים להעביר את הזחלים למזון נקי מיד עם התפתחות זיהום ותכיפות ההעברה צפופה יותר (אחת לשבועיים) בהשוואה לשיטת הגידול שלנו. בהתאם לפרוטוקול זה ניסינו לבסס מחדש את הגידול עם זחלים מאוכלוסייה רב-גילית שהוצאו מענפים והועברו לשלוש דיאטות שונות כמפורט לעיל. לפי ניסיוננו הוצאה של זחלים מענפים היתה עדיפה על גידול של זחלים שבקעו מהביצים שכן, זחלים מפותחים שרדו טוב יותר במערכת

הגידול ואלו שהיו חיוניים התפתחו לדרגת הגולם לאחר כחודש וחצי – מחצית מהזמן הנדרש לזחלים שבקעו מביצים. אחזקת מערכת הגידול למשך חודש וחצי תוך כדי העברת זחלים למבחנות חדשות עם מזון טרי בשלבים שבהם החל להתפתח זיהום שיפריה במידה מסוימת את מערכת הגידול. אם כי, גם במקרה זה שיעור הפרטים שהגיעו לשלב הגולם והבוגר היה נמוך מאוד (טבלה 1).

טבלה 1: אחוז הפרטים של סס הנמר שהתפתחו לדרגת הגולם והבוגר על סוגי דיאטת שונות.

סוג הדיאטה	ס"ה זחלים	גלמים %		בוגרים %	
		זכר	נקבה	זכר	נקבה
ספרדית	321	28.0	22.4	5.6	9.0
Premix (עש תפוח)	256	8.6	9.0	3.5	6.3
נבון	567	14.1	6.0	3.4	2.6

מיצוי בלוטות מין של נקבות סס הנמר

גלמים של נקבות העש אשר גודלו על שלוש דיאטות שונות; דיאטה ספרדית (1), דיאטת עש תפוח (Premix) (2) ודיאטת נבון (3); הועברו מהמהד"ם של מו"פ צפון לחדר חושך במח' לאנטומולוגיה במינהל המחקר החקלאי. הגלמים הוכנסו לקופסאות פלסטיק מאווררות המכוסות בתחתיתן בנייר סינון לפי סוג הדיאטה. בנוסף הוכנסה מבחנה קטנה מלאה מים וסגורה בצמר גפן לשם הוספת לחות. לאחר ההגחה, נקבת העש הוכנסה בשעה השנייה של החושך אל תוך מבחנה נקייה. המבחנה נפקקה בצמר גפן, נעטפה בנייר אלומיניום והוכנסה למקפיא ב -18°C . על המבחנה צוינו תאריך ושעת הגחה, הדיאטה, האם נצפתה התנהגות Calling (נפנוך כנפיים והוצאת בלוטת המין החוצה), תאריך ההתגלמות והערות נוספות. לאחר 24 שעות בוצעה נתיחת בלוטת המין ע"י לחיצה קלה על בטן העש לשם הוצאת הבלוטה, חיתוך הבלוטה, ניקוי הבלוטה ככל האפשר תוך שמירה על שלמותה ומיצוי הבלוטה ב-100 מיקרוליטר הקסאן 99%. במקרה של מיצוי מסי' בלוטות יחד, נפח הממס נשאר 100 מיקרוליטר לבלוטה.

מהמיצוי נלקחת דוגמית לאנליזה ב GC-MS שמותקנת בו קולונת RTX-5MS בתוכנית: $15^{\circ}/\text{min}..240^{\circ}(15\text{min})..60^{\circ}(2\text{min})$ 1.5ml/min זרימת גז הנשא (He). במקרה וזוהו החומרים E2,Z13-18:Ac (מרכיב עיקרי של פרומון) ו/או E3,Z13-18:Ac (מרכיב משני), נלקחת דוגמית לאנליזה ב GC (HP) בקולונה פולרית DB-23 בתכנית $10^{\circ}/\text{min}..180^{\circ}(15\text{min})$, He flow 1.5ml/min לשם השוואה הוזרקו בנוסף לכך 4 האיזומרים הגיאומטריים של כל אחד מהחומרים לעיל, על מנת לזהות בוודאות את האיזומר במיצוי.

איסוף אווירה של נקבות עש סס הנמר

לאחר הגחה, הוכנסה נקבת העש (אחת או יותר) מדיאטה מסויימת למערכת איסוף בנפח 120 מ"ל. מערכת האיסוף הכילה רשת צפופה ממתכת אשר שימשה כמקור אחיזה לעש ואפנדורף או מבחנה קטנה מלאה מים, לשם הוספת לחות. למערכת איסוף היתה מחוברת קולונת פחם 10 cm X 2 (10-18mesh), לסינון האוויר הנכנס למערכת מצד אחד. מהצד האחר חוברת למערכת

קולונת SQ 2 X 0.6 cm ומשאבת אוויר. האיסוף נמשך 9 שעות חושך לפחות. לאחר האיסוף, מוצתה קולונת ה SQ ב 1 מ"ל הקסאן 99% ו- 1 מ"ל דיכלורומתאן 99%. לצורך הכנתה לניסוי הבא הקולונה נוקתה ויובשה באמצעות הזרמת גז חנקן. דוגמית מהמיצוי נלקחה לאנליזה ב GC-MS בתכנית כני"ל.

תוצאות

מיצוי בלוטות –

1. בסה"כ מוצו 51 בלוטות: 12 מדיאטת נבון, 24 מדיאטה ספרדית ו 15 מדיאטת עש תפוח.
2. מתוכם רק ב 7 מיצויים זוהו שני מרכיבי הפרומון ע"י חפיפה מלאה עם סטנדרטים של האיזומרים המתאימים בקולונת DB-23 (חמישה מיצויים של דיאטת עש, מיצוי אחד של דיאטת נבון ומיצוי אחד מדיאטה ספרדית) (טבלה 1 חלק שחור).
3. בשלושה מיצויים זוהו בוודאות רק המרכיב העיקרי (מיצוי אחד מדיאטת עש, מיצוי אחד מדיאטת נבון ומיצוי אחד מדיאטה ספרדית). המרכיב המשני לא נמצא כנראה משום שהוא מצוי בכמות מועטה מאד (טבלה 1 חלק כחול).
4. בשני מיצויים נצפתה חפיפה לסטנדרט בקולונה לא פולרית והתאמה לספקטרום ב GC-MS של המרכיב העיקרי בלבד, אבל לא היתה חפיפה כלל או חלקית בלבד לסטנדרט ב DB-23 (מסומן בטבלה 1 באפור), מה שמעיד כנראה על נוכחות מרכיב דומה בעל שרשרת פחמנית 18C עם שני קשרים כפולים בעמדות אחרות מהידוע בספרות וכן אצטט בקצה השרשרת.

טבלה 1: דוגמאות בהן נמצא מרכיב פרומון העיקרי E2,Z13-18:Ac על פי התאמה לספריות MS,

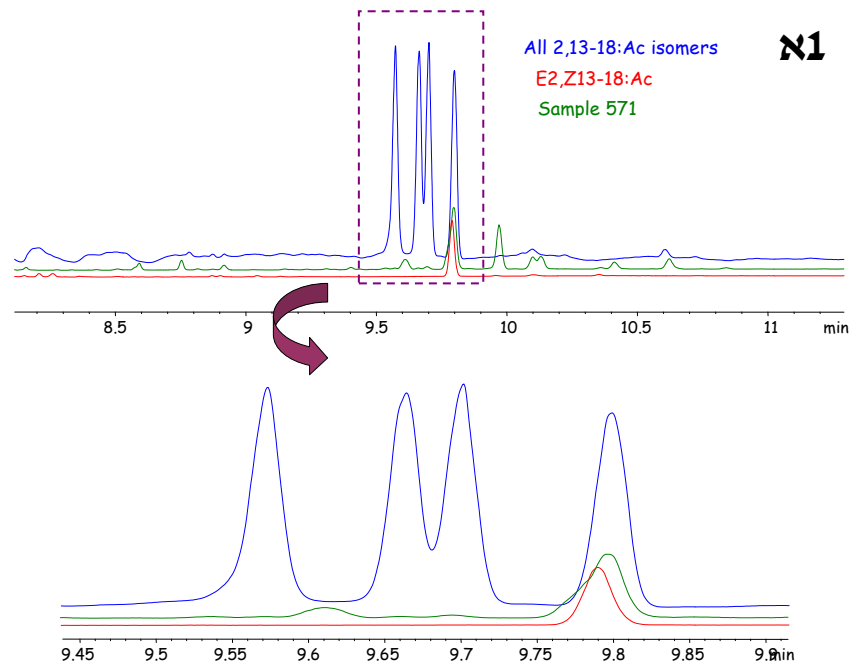
RI על קולונה א-פולרית והזרקות סטנדרטים לקולונת GC פולרית

Sample	Diet	fit to MS		fit to Std. on GC-MS (RTX-5MS)		fit to Std. on GC (DB-23)	
		E3,Z13-18:Ac	E2,Z13-18:Ac	E3,Z13-18:Ac	E2,Z13-18:Ac	E3,Z13-18:Ac	E2,Z13-18:Ac
571	Premix	90%	90%	√	√	√	√
577	Premix	58%	90%	√	√	√	√
581	Navon	43%	91%	√	√	√	√
583	Premix	49%	94%	√	√	√	√
592	Premix	43%	90%	√	√	√	√
594	Spanish	-	53%	√	√	√	√
608	Premix	-	91%	√	√	√	√
597	Navon	-	91%	-	√	-	√
599	Premix	-	91%	-	√	-	√
610	Spanish	43%	94%	√	√	-	√
582	Premix	-	83%	-	√	-	√-
589	Spanish	53%	90%	√	√	√-	√-
600	Premix	-	58%	-	√	-	-
607	Premix	-	86%	-	√	-	-

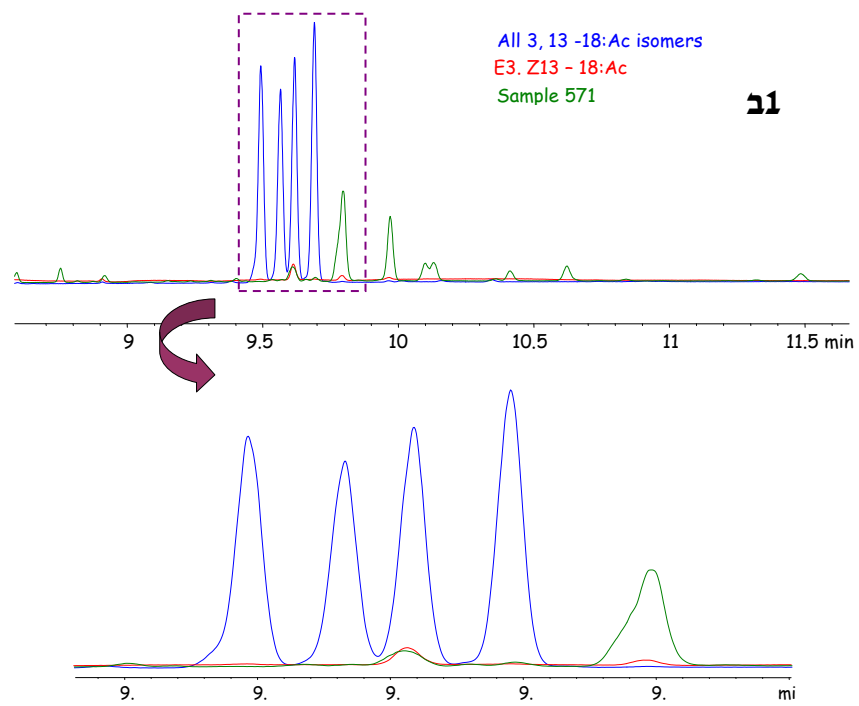
מקרא: √ חפיפה מלאה, - אין חפיפה או אין זיהוי לפי ספריית MS, √ חפיפה חלקית

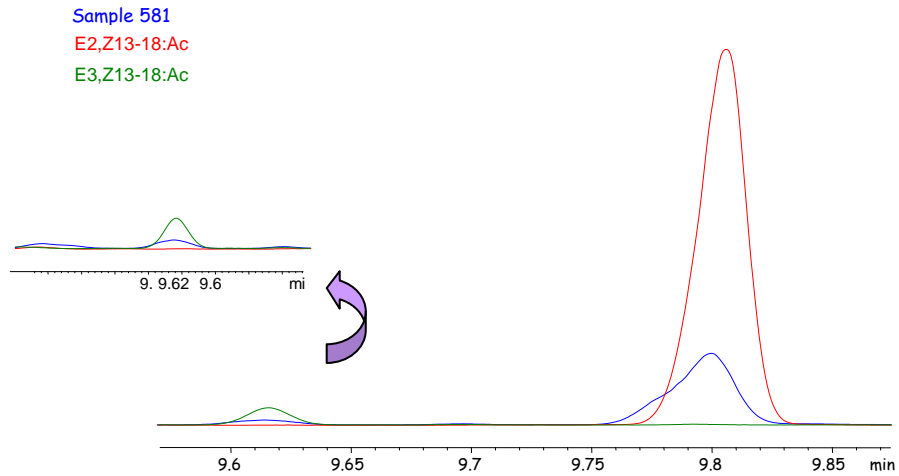
איור 1: כרומטוגרמות FID-GC על גבי קולונה פולרית, של דוגמאות שנבדקו ב- GCMS ונמצאה התאמה בין הספקטרום ל- RI בקולונה א-פולרית, שאישרו את נוכחות מרכיבי פרומון ספרותיים

Sample 571 (Ash Diet) Vs. Standard (GC, DB-23 column)



Sample 571 Vs. Standard (GC, DB-23 column)





טבלה 2: הקשר בין סוג מצע המזון לנוכחות מרכיבי הפרומון הספרותיים

דיאטת עש	דיאטה ספרדית	דיאטת נבון	
16 (15+1 air)	29 (24+5 air)	15 (12+3 air)	מס' עשים שנותחו (כולל עשים מאיסוף אווירה)
5 (31.25%)	1(3.4%)	1 (6.67%)	מס' עשים שנמצאו בהם שני מרכיבי פרומון מסחרי
3 (18.75%)	1 (3.4%)	0	מס' עשים שנמצאים בהם איזומרים אחרים כנראה (בעלי אותו MS אבל לא חופפים בקולונת DB-23)

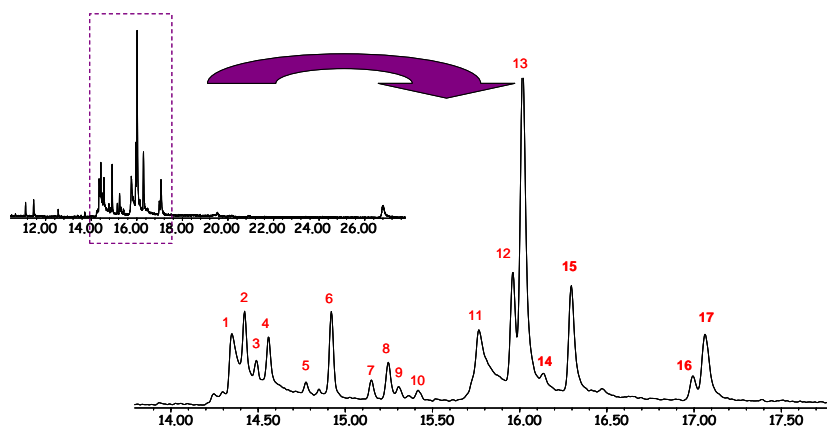
חומרים נוספים שזוהו במיצויים הינם:

Δ^9 -16:Acid ; חומצה הקסדקנואית, מתיל אסטר של חומצה הקסדקנואית (לא רוויה), פרופיל אסטר של חומצה הקסדקנואית, חומצה לינולאית ; חומצה אולאית ופחמנים ישרים : C23 ; C24 ; C25 ; C26 ו C27.

איור 2: דוגמא המכילה את שני מרכיבי הפרומון

2. כרומטוגרמה באנליזת GCMS על גבי קולונה א-פולרית

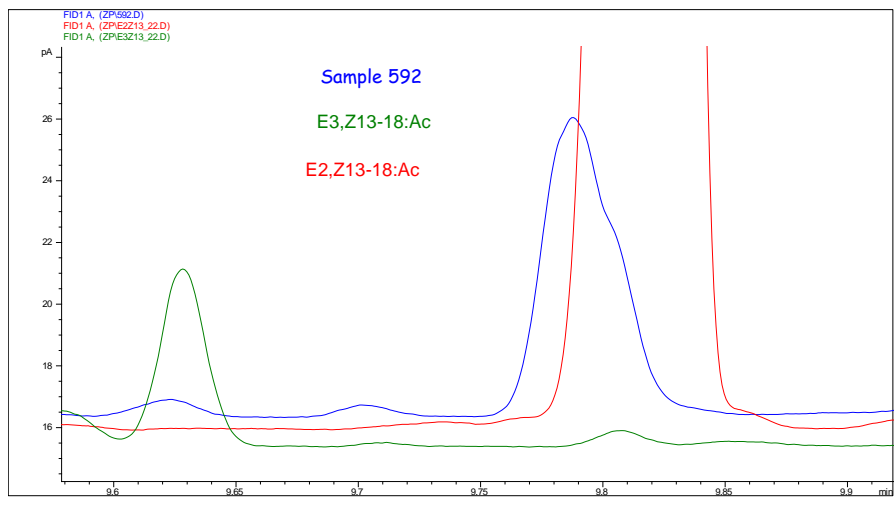
Sample 592 (GC-MS, RTX-5MS)



- | | | |
|---------------------------|--------------------------------|------------------|
| 1. 16:Acid | 9. 16 : Acid, propyl ester | 15. E2,Z13-18:Ac |
| 2. Ethyl -9 –hexanoate | 10. Unknown | 16+17. Unknown |
| 3. Ethyl 9-hexadecenoate | 11. Oleic acid | |
| 4. 16 : Acid, ethyl ester | 12. Linoleic acid, ethyl ester | |
| 5+6. Silane | 13. ethyl oleate | |
| 7+8. Unknown | 14. E3, Z13 - 18:Ac | |

2. אותה דוגמא בהרצה ב- FID-GC בהשוואה לסטנדרטים מסחריים של מרכיבי הפרומון

הספרותיים.



איסוף אווירה-

נעשו 9 איסופי אווירה : 3 של נקבות עש מדיאטת נבון, 5 מדיאטה ספרדית ו 1 מדיאטת עש. לא נמצאו פיקים של מרכיבי הפרומון מהספרות באנליזות של מיצוי קולונות ה SQ מאיסופי האווירה.

דיון ומסקנות

בשל מגבלות הגידול, לא היו בידנו מספיק חרקים לאיסוף נדיפים במערכת איסוף המונית רגילה. למערכת זו חסרונות גם בשל הנפח הגדול שלה וגם בצורך לעבוד עם תמיסות שעוברות ריכוז לפני האנליזות הכימיות, דבר המגביר את הסיכוי לאבד בתהליך את החומר המבוקש הנעלם. גם לאיסוף פרומון ע"י חיתוך בלוטות מגבלות הקשורות באי-ידיעה מספקת של הביולוגיה של המזיק, הווה אומר שלא ידענו בדיוק אם חיתוך הבלוטה נעשה בזמן שחרור הפרומון והערכת הזמן הזה נעשה יותר לפי הכתוב בספרות ומעט לפי ניסיונו. במספר מועט של מיצויי בלוטות זוהו שני המרכיבים הספרותיים. בחלק מדוגמאות המיצויים זוהה חומר בעל שרשרת עם 18 אטומי פחמן ושני קשרים כפולים וקבוצת אצטט, אך הגיאומטריה או מיקום הקשר הכפול לא הייתה זהה לזו של אף אחד מהמרכיבים שזוהו בספרות. מידע זה מבסס במידה מסוימת את חשדותינו הראשוניים שהתגובה של סס הנמר לפרומונים המסחריים בשדה מוגבלת בגלל אי דיוק מסויים בזיהוי מרכיבי הפרומון. מהבדיקות הביולוגיות שנעשו במערכת EAD ובמנהרת רוח, התקבל מידע מוגבל עקב מחסור מתמיד בפרטים בני אותו הגיל.

כאמור, מערכת לגידול המונית היא חיונית לשם אספקת נקבות להפקת פרומון. קרקעות המזון שנבדקו נטו לפתח זיהום פטרייתי הפוגע בזחלים וכתוצאה מכך מספר הפרטים שהגיעו לשלב ההתפתחות הסופי היה נמוך. נראה ששיטת הגידול הראשונה שניסונו, על ידי אילוח שתילים בענפים נגועים בזחלים היתה מוצלחת יותר משיטת הגידול על קרקע מזון מלאכותית. הבוגרים שהתפתחו היו חיוניים אם כי, ביום הגיחה הופיעו כיחידים או במספר קטן של פרטים.

מסקנתנו היא, שבמצב של המשך אספקת פרטים בודדים יש לשנות את הגישות המקובלות ולפתח שיטות שונות ויותר רגישות לאיסוף הפרומון. נוכח חשיבותו של המזיק במערכת החקלאית בכוונתנו להמשיך במאמצים לזהות את פרומון המין במטרה לפתח ממשק הדברה יעיל יותר בעתיד. לאחרונה התקבלה במעבדה לכימיה שבמינהל המחקר החקלאי מערכת הזרקה אוטומטית ייחודית MP2 Multi-Purpose-Sampler מתוצרת Gerstel, עליה מורכב ראש הזרקה מסוג (ITEX-In-Tube Extraction) מתוצרת CTC. בעזרת מערכת זו ניתן לאסוף נדיפים לאורך פרקי זמן ולבצע pre-concentration ללא ממש על גבי חומר סופח ולבסוף להזריקם ישירות למכשיר GCMS. למיטב ידיעתנו זו הפעם הראשונה שמשתמשים במערכת זו על מנת לאסוף פרומונים מחרקים. היתרון במערכת זאת שניתן להפעילה על פרטים בודדים והתכוונו לאסוף נקבות של סס הנמר בשלב הגיחה מהגולם ולהעבירן במערכת זאת. לצורך זה בכוונתנו בעתיד לחזור לשיטת הגידול הראשונה שבה איכלסנו שתילי תפוח עם זחלים שנאספו מענפים נגועים בשדה (ראה לעיל). בשיטה זאת הזחלים יוצאים מהענף המנותק וחודרים לענפי השתיל. לקראת האביב ניתן יהיה לזהות מחילות חתומות בענפי השתיל המסמנות את שלב ההתגלמות וניתן להרכיב כלוב לכידה על הענף באזור החתימה וללכוד את הבוגרים המגיחים. נקבות שיגיוחו במערכת זאת יועברו מיידית למערכת איסוף הנדיפים המתוארת לעיל.

סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה
 הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה. מטרת המחקר העיקרית היתה לבחון את הרכב הפרומון של המין המקומי של סס הנמר בהשוואה למרכיבים הספרותיים והסטנדרטים המצויים במוצרים המסחריים לניטור והדברה.</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות. נבדקו שיטות שונות לגידול סס הנמר במערכת צמחית טבעית ועל קרקעות עם מזון מלאכותי. מספר הפרטים שהתפתח במערכת המלאכותית היה נמוך והגביל את הפעילות המחקרית. במיצויי בלוטות זוהו שני המרכיבים הספרותיים. בחלק מדוגמאות המיצויים זוהה חומר נוסף בעל שרשרת עם 18 פחמנים ושני קשרים כפולים וקבוצת אצטט, שאינם תואמים למרכיבים בספרות.</p>
<p>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח. למרות המידע המוגבל שהתקבל נראה ששאלת המחקר שהצגנו רלוונטית, שהמשיכה של הפרומונים המסחריים, שהשימוש בהם מתבסס על הזיהויים בספרות, אינה מספיק טובה כנראה בשל העובדה שהפרומון הטבעי מכיל מרכיב נוסף שאין בפרומון המסחרי.</p>
<p>הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר. יש לקבוע האם הבעיה בתקשורת בין הזויגים נובעת רק מהבדלים בהרכב הפרומון או שיש גורמי משיכה נוספים. בהתאם, צריך לבסס את המחקר בהמשך על מערכת איסוף נדיפים מפרטים בודדים.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח :</p>
<p>טרים</p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח:</p>
<p>רק בספריות <input type="checkbox"/></p>
<p>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) <input type="checkbox"/></p>
<p>חסוי – לא לפרסם X <input checked="" type="checkbox"/></p>

נספח 1: פרוט המרכיבים ופרוטוקול ההכנה של הדיאטה הישראלית המתאימה לגידול סס הנמר.

חומרים (גר' למנה)

- 45 גר' פולי סויה מגידול אורגני.
- 35 גר' שמרים יבשים - Saf-instant לבצק רגיל.
- 35 גר' אבקת חלב מלא.
- 18 גר' סוכרוז.
- 6 גר' אגר בקטרילוגי.
- 100 גר' פולפה של סלק סוכר טחון.
- 1.2 גר' Nipagin (Methyl-Paraben).
- 0.112 גר' Synthomycine.
- 415 סמ"ק מים מסוננים (מי זליון).

תהליך הכנת קרקע המזון

- התפחת פולי הסויה במים ל- 24 שעות.
- ריכוך הסויה באוטוקלאב, 127°C ל- 20 דק'.
- טחינת פולי הסויה המרוככים עם חלק מהמים, בבלנדר.
- ערבוב החומר היבש בנפרד (שמרים, אבקת חלב, סוכרוז, אגר, פולפה, ניפגין וסיטומציטין).
- ערבוב בבלנדר את הסויה עם החומר היבש ושארית המים.
- הכנסת את התערובת לעיקור באוטוקלאב, 121°C ל- 20 דק'.

נספח 2: פרוט המרכיבים ופרוטוקול ההכנה של הדיאטה הספרדית המתאימה לגידול סס הנמר.

Ingredient	Quantity 3 dishes	Procedimiento
water	1700 cc	Boiling the mixture.
agar-agar	50 g	Left the temperature of the agar felt till 55-60° C and mix the 4 next products of the list.
Wheat germ	120 g	Mix all the ingredients with an electric mixer. It's better to add the ingredients and mix them in small quantities.
Maize flour	100 g	Left the temperature of the mix fall till 45-50 °C and add the acids and the Nipagin
Beer yeast	100 g	
Dehydrated apple	90 g	
Ascorbic acid	10 g	Mix all the ingredients the most homogeneous possible. Distribute the pap in the dishes that you pretend to conserve it. Left the mix gets the ambient temperature and store in the fridge. To preserve of the condensation you can use filter paper. (we use to store the diet glass dishes, like petri dishes, but of 18 cm of diameter and 2 cm high)
Benzoic acid	3 g	
Nipagin	3 g	

Nipagin = Methyl *p*-hydroxybenzoate or Methyl Paraben.

נספח 3: פרוט המרכיבים ופרוטוקול ההכנה של הדיאטה המתאימה לגידול עש התפוח.

מצע המזון התבסס על אבקה יבשה מסוג Stonefly Manduca Premix-Heliothis Premix

(Industries,) Inc. Bryan TX, USA המכילה את המרכיבים הבאים:

.Plant Fiber, Toasted Nutrsoy (Soy Flour), Toasted Wheat Germ - 93.7%

.Vitamin Mix (LaRoche Chemical) - 4.6%

.Methyl Paraben - 0.8%

.Sorbic Acid - 0.5%

.Aurcomycin (5.5% active ingredient) - 0.5%

לצורך הכנת סופית של הדיאטה מערבבים 25% של האבקה עם 75% מים. כדי למנוע את

התפתחותם של פטריות, חידקים ווירוסים מוסיפים למים חומצה אצטית ופורמלין

(37% formaldehyde)