

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

שם ההצעה: זיהוי פרומון המין של הקמחית הכדורית *Nipaecoccus viridis*

Identification of the sex pheromone of the spherical mealybug *Nipaecoccus viridis*

מוגשת לקרן המדען ראשי של משרד החקלאות - פורום הדורים עצי פרי

יעד משנה: פיתוח שיטות אבחון מוקדם והדברה משולבת של מחלות, מזיקים ועשביה בעצי פרי והדורים

שם החוקר	מוסד המחקר	שטח פעולה והתפקיד בפרויקט
ד"ר ענת זאדה- באיירס	המכון להגה"צ, מינהל המחקר החקלאי	תכנון המחקר וניהולו בנושאי זיהוי וסינתזת הפרומון והמבחנים הביולוגים. עיבוד וניתוח נתונים, כתיבת המאמרים והדו"חות anatzada@volcani.agri.gov.il
ד"ר רועי כספי	"	אחראי על איסוף וגידול החרקים, תכנון, ביצוע ואנליזת תוצאות ניסויי השדה
שרה שטיינר, אורנה בן-עזיז ודניאלה פפר	"	סינתזות מרכיבי הפרומון, ביצוע מבחנים ביולוגים במעבדה, הכנת נדיפיות לניסויי שדה
אלכס פרוטסוב ורעות קרמר	"	גידול הכנימה וביצוע ניסויי שדה
עינת גרזון	שה"מ	מדריכה מחוזית הדורים. איתור חלקות עם נגיעות.

**תקציר:**

- הצגת הבעיה- הקמחית הכדורית (*Nipaecoccus viridis* (Newstead)) היא מזיק קשה התוקף את רוב זני ההדרים. קימת נחיצות למערכת ניטור המבוססת על שימוש בפרומון המין של הנקבה.
- שיטות העבודה- בשנת המחקר הראשונה זוהו שני חומרים נדיפים כירליים המשחררים מהנקבות באופן צירקדי:  $\gamma$ -נקרודול ו- $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט עי שימוש בשיטת האנליזה הרציפה, איסוף אווירת נקבות וזיהוי ב- GCMS ו- NMR. לצורך זיהוי ודאי של מבנה החומרים ולצורך מבחנים התנהגותיים, החומרים סונתזו מחומר מוצא משמן לבנדר,  $\alpha$ -נקרודול, המכיל רק אננטיומר אחד שכירליותו לא הוגדרה בספרות. שני המרכיבים הסינתטים של הפרומון,  $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט ו- $\gamma$ -נקרודול, סונתזו מאותו  $\alpha$ -נקרודול ממקור צמחי ונמצא במבחנים ראשוניים בצלחת פטרי ובתעופה בחדר גידול שרק האסטר מושך והמרכיב הכוהלי אינו מושך ואינו דוחה. כדי להגדיר את קונפיגורציית האננטיומר הטבעי של הפרומון שהנקבות מייצרות ומשחררות, פתחנו בשנה ב' סינתזה מראגנטים כימים מסחריים לשני האננטיומרים של המרכיב המשני בפרומון,  $\gamma$ -נקרודול, שמהם הכנו גם את שני האננטיומרים של המרכיב העיקרי הפעיל  $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט. שני מרכיבי הפרומון שזוהו וסונתזו בשנה הקודמת משמן לבנדר הושוו לחומר סינתטי. כך נמצא שהאננטיומר שסונתז ממקור צמחי הוא בעל אותה כירליות כמו האננטיומר שהנקבה מפרישה. במהלך אפיון החומרים נקבעו ספקטרומי מאסות וסיבובים אופטיים של החומרים הסינתטים בפולרימטר שהראו מיהו איזומר (-) ומי (+). המרכיבים הכירליים שסונתזו נבדקו בשנה ב' בזירת צלחת פטרי. בשנה השלישית הגברנו את יצור

הפרומון שחומר המוצא שלו הופק מהשמן הצמחי וגם סנתזנו כמות מספקת של האננטיומרים הלא טבעיים ובדקנו אותם בזירת הפרדס.

- תוצאות עיקריות לתקופת הדו"ח הנדון- השוואה של ספקטרום זמני שהיה ב-GCMS על קולונה כירלית בין החומרים הסינתטיים לבין החומרים שנאספו מהכנימות, הראתה שהחומר הטבעי המופק מהשמן האתרי והחומר הטבעי בכנימה הוא אננטיומר המינוס (R), גם עבור  $\gamma$ - נקרודול וגם עבור  $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט. בבדיקות בזירת צלחת פטרי לאיזומרים (+) ו- (-) סינתטיים נמצא כי הזכרים מגיעים רק לאיזומר (-). בניסויי שדה נקבע כי החומר  $\gamma$ -R-(-) נקרודיל איזובוטירט (שסונתז בתחילה משמן לבנדר וזווית הסיבוב האופטי שלו נקבעה בהמשך השנה) מושך טוב יותר מהכוחל- (-)  $\gamma$ -R-(-) נקרודול ומתערובת 1:1 של שני החומרים. בבדיקת סוג הנדיפית המיטבית נראה כי נדיפית פוליאטילן טובה מנדיפית גומי, ובשני מיני נדיפיות פוליאטילן שהושוו נראה יתרון מובהק לאחת מהן שעובי הדופן שלה 1.5 מ"מ. מינון של 500 מיקרוגרם פרומון בנדיפית זו מחזיק כחודשיים בתנאי שדה. בצלחת פטרי נראה כי נוכחות איזומר (+) בתערובת רצמית אינה גורמת לאפקט דחיה של הזכרים ותוספת שלו לאיזובוטירט ביחסים שונים אינה משנה (לא מובהק סטטיסטית) את ההגעה של הזכרים אליו. אולם, בניסויי שדה נמצא כי אננטיומר  $\gamma$ -(+)-נקרודיל איזובוטירט הלא-טבעי דוחה את הזכרים ופיתיון עם תערובת רצמית הוא נחות מפתיון כירלי. כ"כ ככל שהמשטח במלכודת דלתא דבק גדול יותר, כך לכידת הזכרים והאוייבים הטבעיים העיקריים, צרעות מהסוג אנגירוס, גבוהים יותר.

- מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות- בעבודה זו זוהה פרומון הקמחית הכדורית ופותח פיתיון לניטור המזיק שצריך להכיל מרכיב כירלי בלבד של  $\gamma$ -R-(-) גמא נקרודיל איזובוטירט בנדיפית פוליאטילן מתוצרת Just Plastic המחזיקה כחודשיים בתנאי שדה. כל נדיפית אחרת צריכה להבדק בנפרד. המלכודת המתאימה היא מלכודת דלתא-דבק עם משטח מה שיותר גדול.

### הצהרת החוקר הראשי:

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

תאריך: 18.8.22

חתימת החוקר:

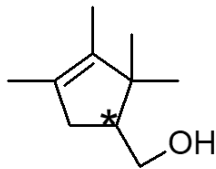


## תוכן עניינים:

עמוד	נושא
	דף פותח ותקציר
3	מבוא
4	מטרת התכנית
4	פירוט הניסויים ותוצאות המחקר:
	1. שנה א
7	2. שנה ב
13	3. שנה ג
17	דין וסיכום
19	פרסומים מדעיים שנבעו מהמחקר
20	ספרות

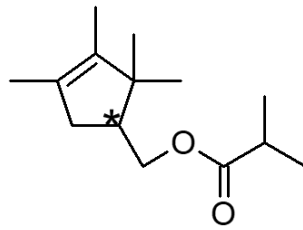
**מבוא:** הקמחית הכדורית (*Nipaecoccus viridis* (Newstead)) היא מזיק קשה התוקף את רוב זני ההדרים ומאכלסת את כל חלקי העץ- גזע, עלווה ופרי. מוצאה של הקמחית הוא בתת היבשת ההודית, משם היא הועברה לאזורים אחרים בעולם. הקמחית מופיעה כמזיק באזור מזרח ודרום הים התיכון, במרבית האזורים החמים של אסיה, אפריקה, אוסטרליה ופלורידה. הקמחית הכדורית התגלתה לראשונה בישראל בדרום בקעת הירדן ב-1984. עיקר פעילות הקמחית הכדורית היא בעונה החמה והיא מעמידה 4-5 דורות בשנה. התפתחותה מהירה מאד, בטמפרטורת הקיץ של ישראל דור נמשך 3-4 שבועות. לקמחית נטייה חזקה להתקבץ ובמהלך התפתחותה היא כמעט ואינה משנה את מקומה, הזחלנים נעים במהירות ומופצים גם ברוח. הקמחית מחוללת בענף הפרדס כמה טיפוסי נזק. אוכלוסיות גדולות גורמות לנשירת פירות ולעיוותים חמורים של הצימוח עד להתנוונות העץ כולו. תחת משטר הדברה המאפשר לאויבים טבעיים לפעול, כגון צרעות טפיליות מסוג *Anagyrus*, הפגיעה העיקרית היא של זחלנים המנסים להיזון מהפרי ובנקודת החדרת גפי הפה מתפתח כתם ירוק המופיע על הפרי הבשל ופוסל את שיווקו. לפיכך הדברת הקמחית היא ברמה של מניעה וזאת הסיבה לנחיצות הרבה של מערכת ניטור המבוססת על השימוש בפרומון המין של הנקבה.

המטרה של התכנית היתה לזהות מבחינה כימית את פרומון המין של הקמחית הכדורית. זיהוי פרומונים של קמחיות לוקח בד"כ מספר שנים, אך במקרה הנוכחי המטרה הושגה באופן כמעט סופי כבר בשנה הראשונה. בעזרת שיטת הדיגום הרציף הצלחנו לפענח את מבנה הפרומון של הקמחית הכדורית במהירות שיא בהתחשב שמדובר בחרק מסדרת הכנימות (Hemiptera). המבחנים הביולוגיים במעבדה הראו שץ-נקרודיל איזובוטירט הוא המרכיב המושך ו-ץ-נקרודול אינו מושך (איור 1). בניסויי התעופה בחדר סגור נלכדו בביקורת באופן אקראי מספר די גבוה של זכרים- כנראה בשל ביצוע הבדיקה בנוכחות הרבה נקבות (ע"ג נבטי תפ"א) שהן עצמן משחררות פרומון. לכן היה צורך לבדוק זאת גם בתנאי שדה.



γ-נקרודול

I



γ-נקרודיל איזובוטירט

II

איור 1: מרכיבי הפרומון של נקבת הקמחית הכדורית. הפחמנים המסומנים בכוכבית הם מרכזים כירליים שהופכים כל מבנה מולקולרי לשני אננטיומרים.

רוב פרמוני הקמחיות שזוהו עד כה הם בעלי מבנה מורכב וקשה לסנתזה ולכן רבים מהם אינם משווקים מסחרית. כדי לקדם את תהליך הזיהוי, מצאנו כי ניתן לסנתז את הפרומון משמן אתרי נפוץ מסחרית, שמן לבנדר ספרדי (Garcia-Vallejo et al, 1994). אולם, היות ולא ידועה הגאומטריה של מרכיב טרנס-אלפא-נקרודול בשמן האתרי הספרדי ממנו הכנו את γ-נקרודול, גם לא ניתן היה לדעת מה הגאומטריה האבסולוטית המתקבלת של המרכיב העיקרי בפרומון, γ-נקרודיל איזובוטירט, שהוא חומר כירלי. ולכן היה צריך לברר האם הפרומון הוא אננטיומר S או אננטיומר R, כלומר בעל סיבוב אופטי + או - בהתאמה. לכירליות של פרומון כחומר טבעי השפעה רבה על פעילותו, כלומר על עוצמת המשיכה לפיתיון (Mori 2007, 2011), לכן כדי להשלים את הליך הזיהוי בברנו מי האננטיומר הטבעי והנמצא שהוא אננטיומר R (-) בשני המרכיבים שזוהו.

**מטרת התכנית:** לזהות את פרומון המין של הקמחית הכדורית ולבחון את אפשרות השימוש בו כאמצעי ניטור והדברה. מטרת התכנית לשנה ג' הייתה לסנתז כמויות מספקות של כל אחד ממרכיבי הפרומון, כולל האננטיומרים הלא טבעיים, שיתאימו לבדיקה בשדה ולהתאים אמצעי ניטור הכולל את הפרומון שזוהה בתנאי שדה, נדיפית ומלכודת מתאימה.

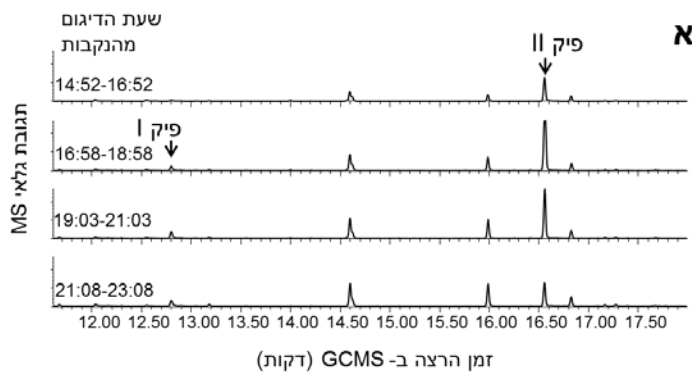
### פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

**מקור החרקים:** הכנימה נאספה משתי חלקות הדורים משני אזורים בארץ- מערב הנגב והגליל. הכנימה הובאה למעבדה ופותח גידול על נבטי תפוא"א *Solanum tuberosum* בחדר גידול בטמ' מבוקרת  $24 \pm$  °C, תנאי לחות 50-60% ומחזורי אור 14L:10D. זחלים מדרגה ראשונה ('זחלנים') הועברו על בסיס יומי לתפוא"א בכלובים חדשים ע"מ לקבל אוכלוסיות בגיל הומוגני וידוע. גלמי הזכרים הוצאו ידנית מדי יום מאוכלוסיית הכנימות עד קבלת אוכלוסיית נקבות בתולות בלבד. הנקבות הבתולות בגילאים לאחר הנשל האחרון הועברו לנבטי תפוא"א נקיים ובהן השתמשנו להמשך הניסויים.

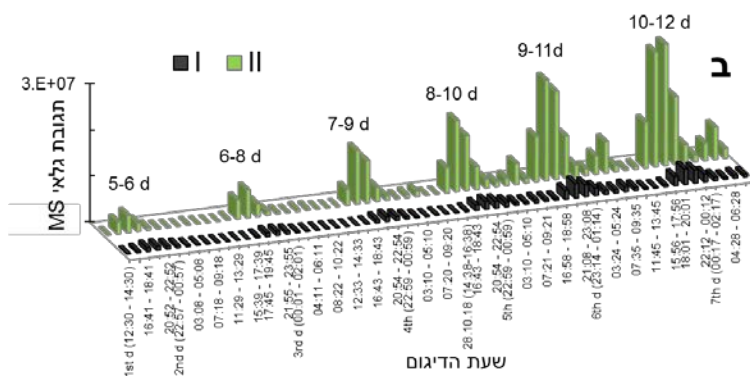
### שנה א:

1. **דיגום הפרומון מנקבות בתולות ע"י מערכת דיגום אוטומטית.** 300-500 נקבות בתולות ע"ג נבטי תפוא"א הושמו בצנצנת בנפח 250 מ"ל חומה ע"ג מגש האוטוסמפלר של מכשיר ה-GCMS. בוצעה אנליזה בשיטת הדיגום הרציף (SSGA). מתוצאות הדיגומים שנעשו (כ"א במשך מספר ימים) מתברר כי נקבות הקמחית הכדורית משחררות באופן מחזורי רק שני חומרים בשעות אחה"צ – הערב (איור

1. (א). כמות החומרים הללו עולה מדי יום ביומו ככל שהנקבות יותר מבוגרות לאחר הנשל האחרון (איור 1.ב).



איור 1: שחרור פרומון ע"י כ-300 נקבות קמחית כדורית כפי שנדגם ע"י אנליזת דיגום רציף: א) 4 דגימות רציפות של נקבות בנות 9-11 יום שבהן החומרים I ו-II נראו עולים רק בשעות אחה"צ; ב) השתנות החומרים I ו-II בדגימות שנלקחו מאותן נקבות במשך 6 ימים רצופים. המספרים מעל העמודות מייצגים את גיל הנקבה באותו יום.

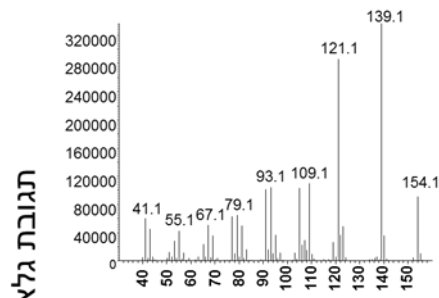


## 2. איסוף הפרומון מנקבות בתולות

במערכות זרימת אויר. באנליזות SSGA נמצא שהפיק שמסומן I ושנדגם ע"י סיב ה-SPME קטן בכמותו מפיק II, אולם, היות ש-SPME לא לוכד חומרים שונים באוסף פרופרציונלי לכמותם, אין הדבר מעיד על כמות בפועל. בנוסף לכך, שיטת SSGA אינה מותירה דוגמא להמשך אנליזה. לכן, כדי שיהיה לנו חומר ביד לאנליזה כמותית וגם להמשך אנליזות שנדרשו, במקביל לדגימת אוירה ע"י מע' הדיגום הרציף בצענו גם איסופים מנקבות בתולות מהגידול. איסופי האווירה בוצעו מקבוצות של 300-1500 נקבות בנות כ-10 ימים מהנשל האחרון, שאילחו נבטי תפוא. מאחר ומאנליזות הדיגום הרציף ידענו כי הנקבות משחררות פרומון רק אחה"צ וגם ידענו מעבודה קודמת שהזכרים עפים לנקבות רק אחה"צ, איסופי האווירה בוצעו בין השעות 15:00-20:00 בלבד, על מנת למנוע זיהום מיותר של החומר הסופח בנדיפים מתפוחי האדמה. אנליזות שנעשו לתמיסות האווירה הראו שהיחס בין שני המרכיבים II/I הוא 56/44 בהתאמה.

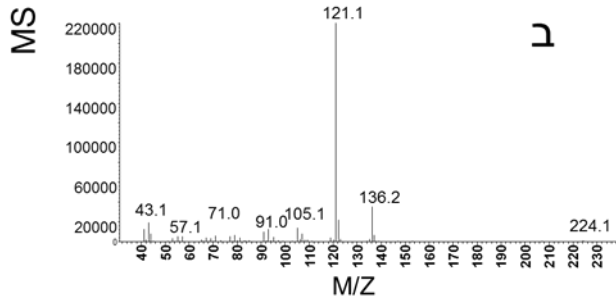
## 3. זיהוי מרכיבי הפרומון

ספריית ה-GCMS זיהתה כי לפי ספקטרום ה-MS של פיק I יש אפשרות כי חומר זה הוא כוהל טרפני עם 10 פחמנים מסוג נקרודול. חומר II, הוא בעל מסה מולקולרית של  $m/z$  224 ולכן סביר שהוא אסטר טרפני עם 15 פחמנים- עשרה שנובעים כנראה ממונוטרפן וחמישה שמגיעים מחומצה עם חמישה פחמנים (איור 2).



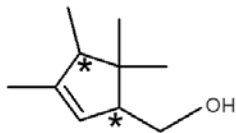
א

איור 2: ספקטרום המאסות של שני החומרים שנקבות קמחית כדורית משחררות באופן צירקדי ושזוהו באנליזת דיגום רציף: א. חומר I ב. חומר II.

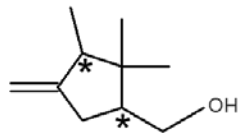


ב

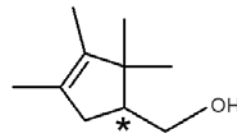
למרות הזיהוי החלקי ע"י הספרייה, הזיהוי הסופי של החומרים עדיין היה מורכב כי לחומר נקרודול קיימים 3 מבנים שונים הידועים בספרות (איור 3) והם חומרים כיראליים. לחומרים אלפא-נקרודול ובטא-נקרודול יש שני מרכזים כיראליים (\* איור 3) ולכן לכל אחד מהם קיימים 4 אננטיומרים. לחומר גמא-נקרודול יש רק מרכז כיראלי אחד ולכן יש לו שני מרכזים כיראליים. כלומר, הנקרודול, מרכיב I (איור 1) שבכנימה, יכול היה להיות כל אחד מעשרה אננטיומרים שונים.



אלפא-נקרודול



בטא-נקרודול



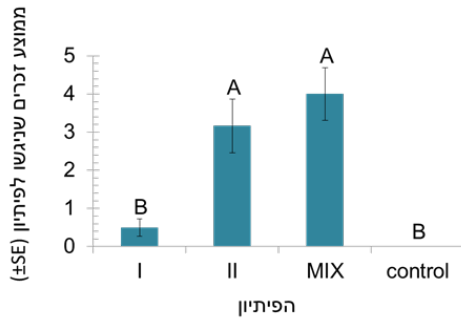
גמא-נקרודול

איור 3: נקרודולים שונים הידועים בספרות

לאחר תהליך זיהוי שתואר במפורט בדוח שנה ראשונה הצלחנו להוכיח את המבנה המולקולרי של שני מרכיבי הפרומון: הכוהל הטרפני I הוא גמא נקרודול (2,2,3,4-tetramethyl-3-cyclopentene-1-) methanol והאסטר II (איור 1) הוא גמא-נקרודיל איזובוטירט. הזיהוי נעשה ע"י השוואה זמני שהייה בקולונות שונות של הדוגמא שהופקה מהנקבות לעומת חומר סנתטי שהפקנו משמן אתרי של לבנדר ספרדי שעבר ראקציה כימית וכלים ספקטראליים וסנתטיים נוספים, אך גם ע"י מבחנים ביולוגיים.

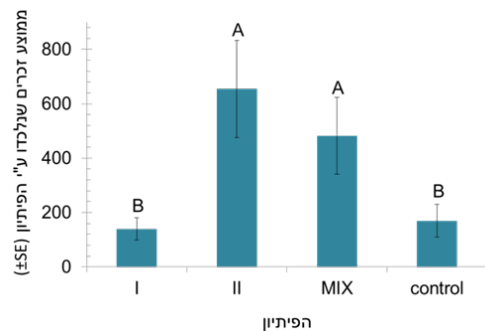
4. מבחנים ביולוגיים בתנאי מעבדה לצורך זיהוי שני מרכיבי הפרומון. בגלל הגודל המזערי של הזכרים המעופפים (כ 1 מ"מ אורך גוף), תהליך זיהוי פרומוני המין של כנימות קמחיות מתחיל בד"כ בבדיקת החומרים הפוטנציאליים במבחנים התנהגותיים בזירת צלחת פטרי מזכוכית. המבחנים המתוארים באיור 4 העלו כי הזכרים העדיפו את הדסקית שהוספה במרכיב II על פני זו שהוספה במרכיב I ובממס, אך המשיכה לדסקית עם תערובת I+II הייתה זהה לזו של Kruskal-Wallis rank sum II

test gave chi-square = 18.62, df = 3,  $P=0.0004$  and Post-hoc pairwise Conover tests with Bonferroni correction for multiple comparisons)



איור 4 : ממוצע זכרים שניגשו לדסקית מטופלת בניסוי בחירה בצלחת פטרי עם הפיתיונות הסנתטיים הבאים: 10ng I, 10ng II, 5ng מכ"א ממרכיבי תערובת I+II, בקורת (ממס). עמודות עם אותה אות אינן שונות באופן מובהק סטטיסטי. (n=6)

בנוסף בדקנו תעופת זכרים בחדר גידול (3x3 מ'²) שבו שמנו מגשים עם תפ"א מאולחים בנקבות זכרים שמגיחים בגלי תעופה. נדיפיות פוליאיתילן הוספו ב- 20 מיקרוגרם (µg) מהחומרים הסנתטיים I, II, I+II, וממס כבקורת ונתלו במלכודת מלבן פוליגיל לבן מרוח בדבק חרקים (18x10 ס"מ²). התוצאות הראו שבפיתיון II נלכדו בממוצע 654 ± 178 (SE ±) זכרים, כמות דומה כמו בפיתיון I+II שלכד 482 ± 142 זכרים, ובאופן מובהק יותר מפיתיון I שלכד 139 ± 41 ומהביקורת שלכדה 61 ± 169 (איור 5). (Kruskal-Wallis  $P=0.001$  and Conover's test above at  $\alpha = 0.05$ ).

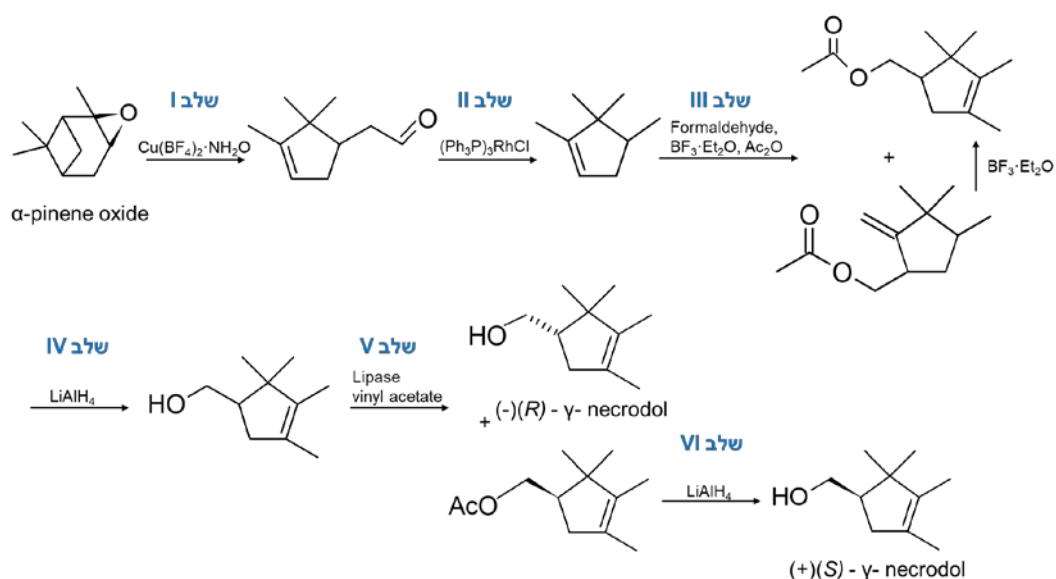


איור 5: ממוצע זכרים שנלכדו במלכודות דבק בחדר הגידול עם הפיתיונות הבאים: 10ng I, 10ng II, 5ng10 תערובת I+II (MIX), בקורת (ממס). עמודות עם אותה אות אינן שונות באופן מובהק סטטיסטי. (n=12)

## שנה ב':

### 5. סינתזה ואנליזה כירליות של מרכיבי הפרומון

א. סינתזה כירלית של +S ו- R-  $\gamma$  נקרודול- בספרות קיימות כמה דרכים לסינתזה של שני האננטיומרים של  $\gamma$ - נקרודול, אולם בד"כ הן ארוכות, מורכבות והניצולות בהן מאד נמוכות. אנו בחרנו באחת הדרכים העושה שימוש בחומרי מוצא זמינים, ידידותיים לסביבה ויחסית זולים;  $\alpha$ -(-) -פינן אוקסיד שממנו התכוונו לקבל את איזומר (+)-S- $\gamma$ -נקרודול ו- (+)- $\alpha$ -פינן אוקסיד שממנו יתקבל האיזומר השני, (-)-R- $\gamma$ -נקרודול (Pamingle et al 1991). היות ומדובר בסנתזה ישנה הצלחנו לשפר אותה בשני השלבים הראשונים שהוצעו, שלב I שופר לפי Robinson et al, 2006 ושלב II לפי Chapuis et al, 1992. מהלך הסנתזה שכלל בדיקות קצבי ראקציה תוך שימוש בליפאזות שונות כקטליזטורים סטריאוספציפיים פורט בהרחבה בדוח שנה ב (איור 2).



איור 2: הליך סנתטי לקבלת (+)-S- $\gamma$ -נקרודול ו-(-)-R- $\gamma$ -נקרודול, הכולל הפרדה אנזימטית ע"י ליפאזות.

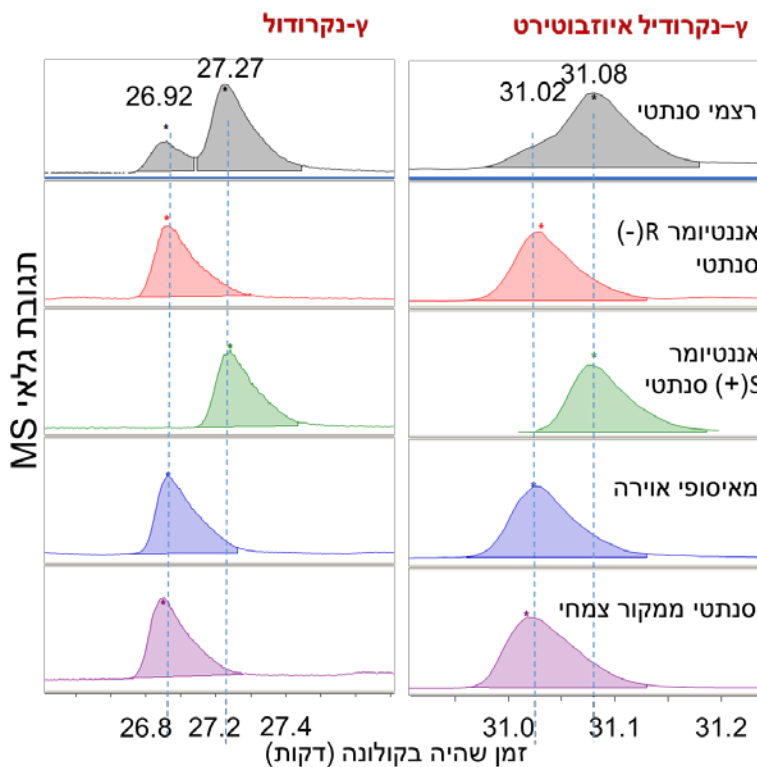
ב. סינתזה של +S (ו- R) נקרודיל איזובוטירט. תמיסה של (+)-S- $\gamma$ -נקרודול (25 מ"ג, 0.16 מילימול), פירידין (14.3 מ"ג, 0.18 מילימול) ואיזובוטיריכ אנהידריד (28.2 מ"ג, 0.18 מילימול) בתוך 1 מ"ל DCM עורבבה ב  $40^{\circ}\text{C}$  במשך שעתיים. לאחר מכן התערובת נמלה ב- 2 מ"ל DCM ונשטפה עם תמיסה HCl (1 מ"ל, 1%), תמיסה רוויה  $\text{NaHCO}_3$  (1 מ"ל), יובשה ע"ג  $\text{MgSO}_4$ , סוננה ונודפה באוופורטור. (+)-S- $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט הופרד בקולונת סיליקה (מש 0.063-0.2, 1 גרם) עם כמות עולה של אתר בהקסן (5-1%). לאחר הנידוף התקבל (+)-S- $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט, 25 מ"ג נצולת 68%, דרגת ניקיון כימי 97%, ניקיון אופטי 100%. סינתזת אננטיומר (-)R-נקרודיל איזובוטירט נעשתה באותה אופן.

ג. נתונים ספקטראליים של כל החומרים שסונתזו ואינדקסי Kovatz של שהיה בקולונה מופיעים בטבלא נ3 בנספח של דוח שנה ב. היות וחלק מהחומרים חדשים למדע לא היו נתונים מהספרות. סיבובים אופטיים של המרכיבים שסונתזו נקבעו במכשיר פולרימטר שנרכש על ידנו במיוחד עבור התכנית (Anton Paar MCP5100, Anton Paar OptoTec GmbH, Seelze-Letter, Germany) בטמפ'  $20^{\circ}\text{C}$  באורך גל 589nm אורך התא 100 מ"מ. זווית הסיבוב האופטית שנמדדה עבור (+)-S- $\gamma$ -נקרודול היא  $[\alpha]^{20} = 21.28 \pm 0.16$  ועבור (-)-R- $\gamma$ -נקרודול ממקור צמחי  $[\alpha]^{20} = -20.4 \pm 0.08$ . בספרות מדווח (-)-R- $\gamma$ -נקרודול  $[\alpha]^{20} = -21.2$  ו- (+)-S- $\gamma$ -נקרודול  $[\alpha]^{20} = +21$  (Pamingle et al, 1991). זווית הסיבוב שנמדדה עבור (+)-S- $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט היא  $[\alpha]^{20} = +6.99 \pm 0.03$  ועבור (-)-R- $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט הזווית שנמדדה היא  $[\alpha]^{20} = -7.04 \pm 0.27$ . ההבדל בזווית שנמדדה בין שני האננטיומרים נעוץ כנראה באי-ניקיונות מינוריים בחומר ממקור צמחי שקשה להפטר מהם והם משפיעים על קריאת זווית הסיבוב אם כי לא את כיוונו. הניקיון האופטי של החומרים נקבע ביתר דיוק ע"י אנליזת GC



על קולונה פולרית, אך המדידה בפולרימטר חשובה כי היא מלמדת על זווית הסיבוב וזהות האננטיומר באופן ודאי.

ד. קביעת הגאומטריה המדוייקת של מרכיבי הפרומון. לאחר שסונתזו התערובת הרצמית וארבעת האננטיומרים של שני מרכיבי הפרומון שזוהו בצענו אנליזה שלהם ע"י הפרדה בקולונת GC כירלית במכשיר GCMS - FID. הקולונה הכירלית בה השתמשנו היא האננטיומרים של  $\gamma$ -נקרודול הרצמי שסינתזנו נפרדו היטב, עד כמעט baseline, על הקולונה הכירלית שנבחרה ולפיכך ניתן לומר כי הכוהל  $\gamma$ -נקרודול שמוצר עי נקבות הקמחית הכדורית כמרכיב משני מכיל רק אננטיומר אחד, אננטיומר R (-), והוא זהה לחומר שסנתזנו בשנה שעברה מהשמן הצמחי. בנוסף, בד"כ כירליות של אסטרים טרפנים נקבעת באופן עקיף (ע"י הידרוליזה של האסטר הנתון לכוהל) ולא באופן ישיר ע"י הפרדה של החומר עצמו. אולם, הקולונה הקפילרית הכירלית שבחרנו הפרידה בין שני האננטיומרים של החומר הרצמי של המרכיב העיקרי בפרומון,  $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט. על פי האנליזה הכירלית המרכיב העיקרי שנקבות הכנימה מייצרות מכיל רק אננטיומר אחד, (-)-R-נקרודיל איזובוטירט. מאחר והמבנה (R) וכיוון זווית הסיבוב האופטי (שניהם מינוס) במרכיב האסטר והכוהל  $\gamma$ -נקרודול בכנימה הם זהים, וכ"כ במבחנים הביולוגים הכוהל אינו מראה יכולת משיכה גבוהה לזכרים ביחס לאסטר (איורים 9 ו-10), ניתן להניח שהכוהל הוא סמן בתהליך הבייוסינתטי של המרכיב האסטרי בפרומון.



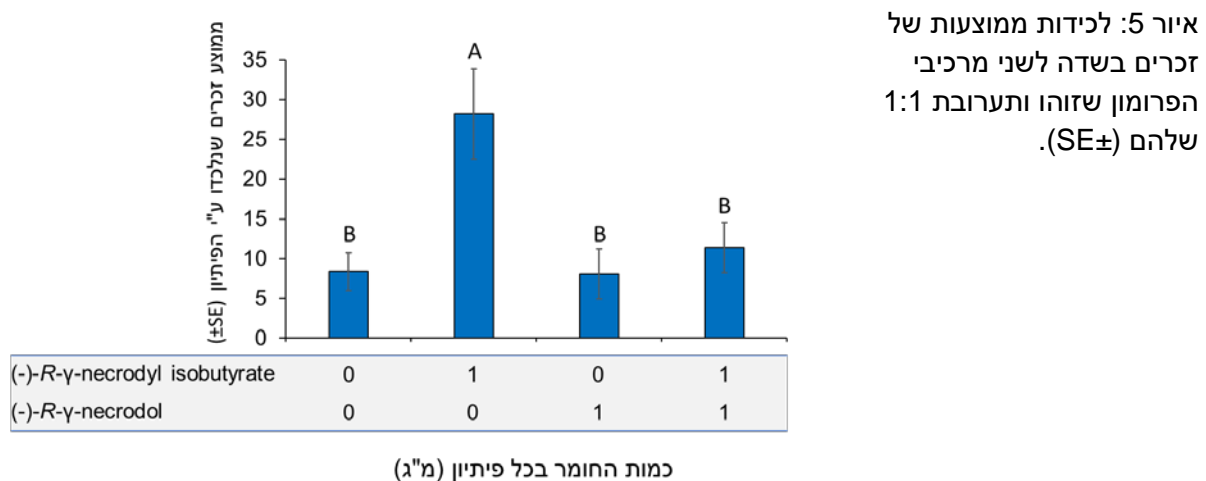
איור 4: הפרדה על קולונה כירלית של האננטיומרים של  $\gamma$ -נקרודול ו- $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט מתוצרי הסינתזה ומחומרים טבעיים שמקורם בכנימות הקמחיות.

## 6. מבחנים ביולוגיים:

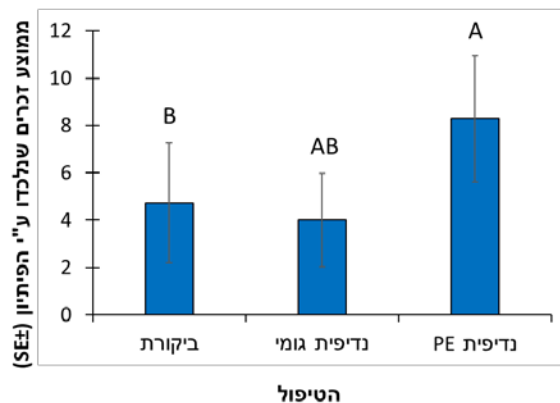
### א. מבחני שדה:

**כללי:** מבחני השדה התבצעו בעזרת מלכודות דלתא (שטח פאה: 10×19 ס"מ, גובה 8.7 ס"מ), עם משטח דביק בבסיסה הניתן להחלפה (דבק חרקים 'רימיפוט', חברת 'רימי' פ"ת, ישראל). המלכודות הוכנו ממשטחי פוליגל בצבע לבן. נדיפית פרומון בודדת מוקמה במרכז כל מלכודת והוחלפה אחת לחודש (אלה אם כן בניסויים ספציפיים נאמר אחרת). המלכודות הוצבו במרחק של 15-16 מטר אחת מהשנייה. אחת לשבוע מיקום המלכודות הוחלף (כדי למזער השפעות מיקום אפשריות), הוכנסה תחתית דביקה חדשה למלכודת, והתחתיות הישנות הועברו למעבדה לבדיקה יסודית בעזרת בינוקולר לנוכחות זכרי קמחית כדורית (הגדלה פי 50-100 לפי הצורך). כל ניסויי השדה התבססו על אוכלוסיות קמחיות כדוריות טבעיות בפרדסים.

1. **משיכת זכרים ע"י מרכיבי הפרומון בשדה- ניסויים אלה בוצעו ב- 2 חלקות הדרים (מנדרינות מזן "אורי") במושב סיתריה בתאריכים 19.4.19-17.7.19, ארבע מלכודות לכל טיפול, 15×30 מ' מרחק בין מלכודת למלכודת. חלקת 'אורי' נוספת שימשה לניסוי ליד קריית שדה התעופה, 5 מלכודות דבק לכל טיפול, בתאריכים 19.7.10-12.6.19. בסה"כ בוצעו 35 חזרות ב-8 בלוקים. כל חומר או תערובת שנבדקה הומסו בממס הקסאן והוטמעו בנדיפיות פוליאתילן (Just plastic). הביקורת הכילה ממס בלבד. מקור החומרים לניסוי זה הוא בסנתזה שחומר הגלם שלה היה שמן לבנדר ספרדי, שבהמשך התברר כאמור לעיל, שמתקבל ממנו אננטיומר אחד בלבד זהה לזה שמיוצר ע"י הקמחיות (-R). תוצאות הניסוי מלמדות שנדיפית המכילה 1 מ"ג (-)-R- $\gamma$ -necrodol איזובוטירט מושכת טוב יותר מנדיפית משולבת עם (-)-R- $\gamma$ -necrodol או (-)-R- $\gamma$ -necrodyl isobutyrate לבד או בקורת (איור 5). יש לציין כי כמה מהניסויים היו כושלים בגלל ריסוסים שבוצעו בחלקה נגד קמחית כדורית מיד עם העלייה בלכידות ולכן לא נכללו בתוצאות.**



2. בדיקת סוג נדיפית מתאימה- לצורך ניסוי זה כמות של 1 מ"ג של החומר (-)R-נקרודיל איזובוטירט (מקורו מבידוד חומר גלם משמן לבנדר ולכן הוא מכיל רק אננטיומר אחד R-) הומסה בהקסאן והוטמעה בנדיפית פוליאיתילן (PE). בבקורת שמנו בנדיפית ממס בלבד, ללא פרומון. הנדיפיות הוצמדו למלכודות הדלתא הלבנות והניסוי בוצע בחלקת תפוזים (ולנסיה) בכפר מונש בתאריכים 24.7-19.8.10 חזרות בשני בלוקים. מהתוצאות באיור 6 מסתמן שלנדיפית פוליאיתילן יש יתרון מסוים על נדיפית גומי, אך הלכידות בניסוי היו מאד נמוכות ממה שמצופה בכנימות קמחיות ולכן חזרנו על הניסוי בשנה ג'.



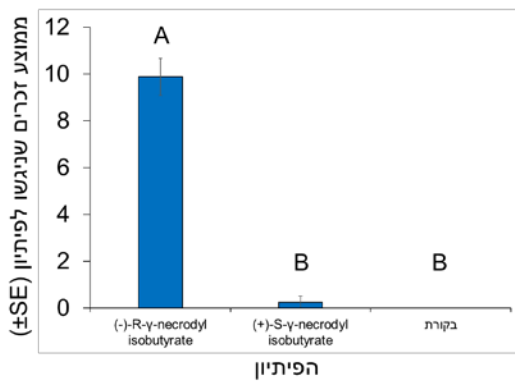
איור 6: ממוצע לכידות זכרים עם 1 מ"ג מרכיב עיקרי של הפרומון ( $\gamma$ -נקרודיל איזובוטירט) בנדיפיות שונות.

סטטיסטיקה: הסטטיסטיקה למבחני השדה בוצעה בתוכנת JMP (גרסה 14). השוואת יעילות הפרומונים על לכידת הזכרים נבחנה בעזרת ניתוח שונות דו-כיווני (ANOVA) עם סוג הפרומון והבלוק כמשתנים בלתי תלויים. מכיוון שהנתונים לא התפלגו באופן נורמלי, הם עברו טרנספורמצית RANK לפני הניתוח הסטטיסטי. השוואות מרובות (Post Hoc Tests) התבצעו בעזרת מבחן Tukey.

### ב. מבחנים בזירת צלחת פטרי

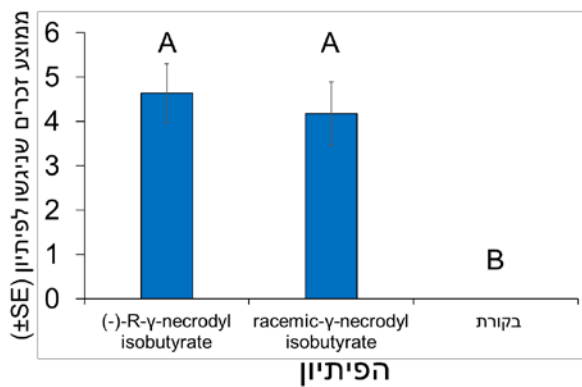
חוקים: הקמחיות מגודלות ע"ג תפוז"א מונבטים בחדר גידול, בתנאי 25 מ"צ ו 14 שעות אור ביממה. שעה לפני כל ניסוי נאספו זכרים בני 2-3 ימים מהגידול. הניסויים: בכל אחת מצלחות פטרי בקוטר 14 ס"מ ( $n=6$ ) הנחנו 3 דסקיות נייר שפוזרו באופן שווה בשולי הצלחת שמתחתיה הוצבה מראה. בדסקיות הוספנו 10 ננוגרם (ng) של החומרים הסינתטיים שנבדקו ודסקית אחת עם הקסאן בלבד לבקורת (הממס). בכל אחת מהצלחות שוחררו 20-30 זכרים ( $n=6$ ) ולאחר 40 דקות ספרנו כמה זכרים ניגשו לכל דיסקית כדי לדעת מה הפיתיון המועדף עליהם.

התוצאות המובאות באיור 7 מראות כי בבדיקת שני האננטיומרים של המרכיב העיקרי של הפרומון הזכרים העדיפו את הדסקית שהוספה במרכיב  $R\text{-}\gamma\text{-necroeryl isobutyrate}$  (-) על פני  $S\text{-}\gamma\text{-necroeryl isobutyrate}$  (+).  
necroeryl isobutyrate שאליו הגיבו כמו לבקורת.



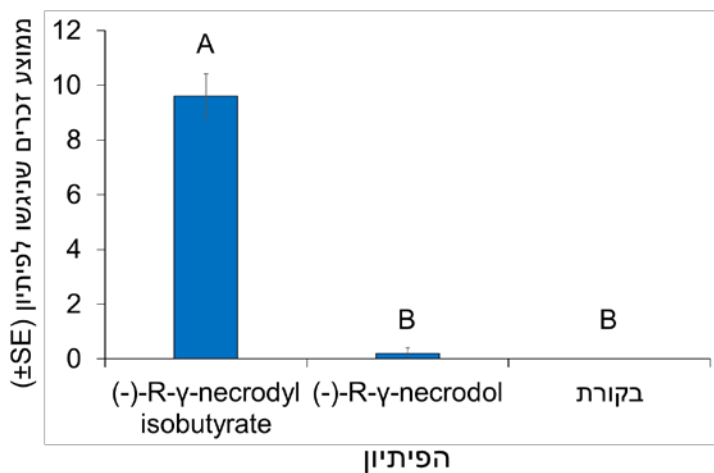
איור 7: ממוצע זכרים שניגשו לדסקית מטופלת בניסוי בחירה בצלחת פטרי עם 10ng מכל אחד מהפיתיונות  $R\text{-}\gamma\text{-necroeryl isobutyrate}$  (-) ופיתיון  $S\text{-}\gamma\text{-necroeryl isobutyrate}$  (+) בקורת (ממס). עמודות עם אות שונה שונות באופן מובהק סטטיסטי (n=8).

מתוצאות הניסוי המתוארות באיור 8 עולה כי אין העדפה לתערובת רצמית ואין דחיה ממנה. גם כשהקטנו את המינונים של החומרים ל-1 ננוגרם ול-0.1 ננוגרם לא נראתה העדפה או דחיה מהתערובת הרצמית (תוצאות לא מובאות).



איור 8: ממוצע זכרים שניגשו לדסקית מטופלת בניסוי בחירה בצלחת פטרי עם 10ng מכל אחד מהפיתיונות  $R\text{-}\gamma\text{-necroeryl isobutyrate}$  (-) , racemic- $\gamma\text{-necroeryl isobutyrate}$  ופיתיון בקורת (ממס). עמודות עם אות שונה שונות באופן מובהק סטטיסטי (n=11).

באיור 9 ניתן לראות, שבמבחן צלחת פטרי  $\gamma\text{-}(-)$  נקרודול מושך זכרים כמו בקורת, כאשר משווים אותו עם  $\gamma\text{-}(-)$  נקרודיל איזובוטירט. מבחן זה הוא למעשה דומה למבחן שבוצע בתהליך הזיהוי בשנה שעברה, אולם אז לא ידענו מה זהות החומר המתקבל מהשמן האתרי. ראינו לנכון להוסיף זאת כאן כי זו הזהות הסופית של החומרים שלא היתה ברורה בדו"ח שנה א'.



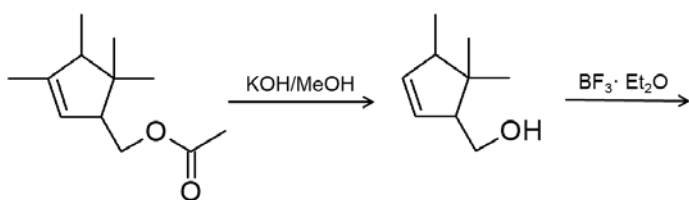
איור 9: ממוצע זכרים שניגשו לדסקית מטופלת בניסוי בחירה בצלחת פטרי עם 10ng מכל אחד מהפתינות  $R\text{-}\gamma\text{-necrodyl}$ ,  $(-)\text{-necrodol}$  ו- $(-)\text{-isobutyrate}$  (ממס). עמודות עם אות שונה שונות באופן מובהק סטטיסטי ( $n=5$ ).

בניסויים נוספים שבצענו בצלחת פטרי נראה כי שילוב של הכוהל והאיזובוטירט ביחסים שונים לא מגביר את המשיכה של הזכרים (איור 11 דו"ח שנה ב).

הסטטיסטיקה למבחני צלחת פטרי בוצעה בתוכנת R. השתמשנו במבחן Exact Multinomial Test, השוואות מרובות (Post Hoc Tests) התבצעו בעזרת מבחני binomial tests עם תיקוני בונפרוני.

### שנה ג':

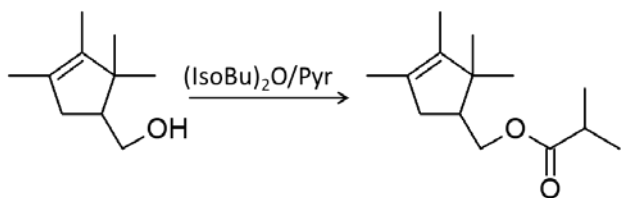
בשנה ג בודדנו, ע"י זיקוק בואקום, כמויות גדולות יותר של  $\alpha\text{-necrodol}$  משמן לבנדר. ממרכיב זה הכנו עוד כמות של  $\gamma\text{-necrodol}$  ו- $\gamma\text{-necrodyl isobutyrate}$  על מנת שימשו לניסויי השדה (תואר בדוח שנה א ואיור 10 להלן).



(-)- $R$ - $\text{trans-}\alpha\text{-necrodyl acetate}$   
(*L. luisieri* essential oil)

(-)- $R$ - $\text{trans-}\alpha\text{-necrodol}$

איור 10: תהליך סינתטי לקבלת גמא-נקרודול וגמא-נקרודיל איזובוטירט משמן לבנדר ספרדי.



(-)- $R$ - $\gamma\text{-necrodol}$

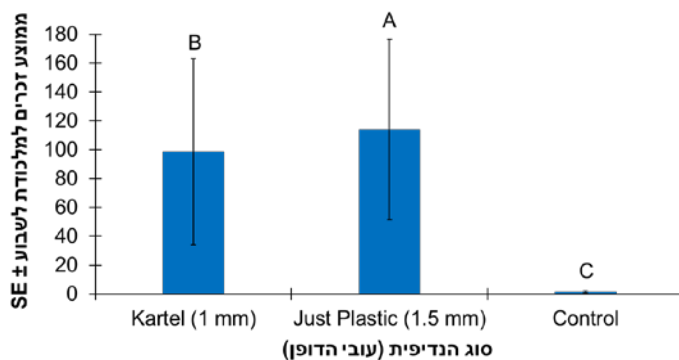
(-)- $R$ - $\gamma\text{-necrodyl isobutyrate}$   
*N. viridis* pheromone

בנוסף חזרנו על סינתזת איזומרי S+ שפורטה בדוח שנה ב' וחלקית באיור 2 על מנת לקבל כמויות מספיקות לניסויי שדה.

כמו בשנה ב', הרבה מניסויי השדה שבוצעו בשנה ג' לא הולידו תוצאות בגלל ריסוסים שמנעו התפתחות אוכלוסייה מרגע שנטרה נגיעות בחלקות. יש לזכור שמבחיני צלחת פטרי שבוצעו נותנים את הכיוון בו צריך ללכת בניסויי השדה, אך בכל אחד משני סוגי המבחנים נמדדים היבטים שונים של משיכה: בצלחת הזכרים ניגשים אל הפיתיון ובשדה הזכרים אמורים לעוף אל הפיתיון. לכן מה שקובע בסופו של דבר איזה חומרים ישמשו לניטור והדברה הן תוצאות ניסויי השדה ולא ניסויי צלחת פטרי.

## 7. ניסויי שדה:

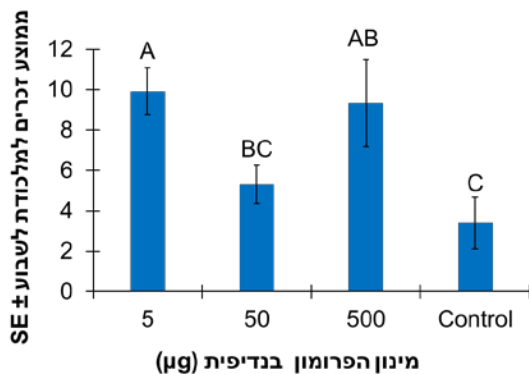
1. *סוג נדיפית*. בניסוי זה בדקנו שני סוגים של נדיפיות פוליאיתילן שההבדל ביניהן הוא עובי הדופן של המבחנה- ככל שהדופן יותר עבה קצב השחרור של הפרומון מהנדיפית איטי יותר. נדיפיות אלה נמצאו עדיפות על נדיפיות גומי בניסויי שנה ב'. לנדיפיות פוליאיתילן יתרון על נדיפיות גומי, מאחר וקצב השחרור מהן הוא כמעט לינארי. לכן ככל ששמים בהן יותר חומר- זמן השחרור מתארך. לעומתן, בנדיפית גומי השחרור הוא אקפוננציאלי, הנדיפיות סופגות לעיתים חלק מהחומר שלא משתחרר או אף מגיבות עמו והשחרור של הפרומון לא קורה בד"כ מעבר ל- 4 שבועות בתנאי שדה. הניסוי התבצע במקביל ב-3 חלקות שונות (חלקת תפוז 'ולנסיה' בכפר מונש, ו-2 חלקות מנדרינות 'אורי' בגת) בין התאריכים 22.6.21-3.8.21. בכל חלקה נתלו 2-3 מלכודות דלתא לכל טיפול: 1. נדיפית PE מתוצרת Kartel (איטליה) עם דופן בעובי 1 מ"מ. 2. נדיפית PE מתוצרת Just Plastic (בריטניה) עם דופן בעובי 1.5 מ"מ. 3. מלכודת דלתא ריקה. התוצאות הראו שמבחינה סטטיסטית (ANOVA on Ranked Data) יש הבדל מבחינת לכידת הזכרים בין שתי הנדיפיות (איור 11). הנדיפית עם הדופן העבה יותר (Just Plastic) נותנת לכידות מעט יותר גבוהות (ANOVA (on Ranked Data):  $F = 8.72$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.0001$ ).



איור 11: לכידות ממוצעות של זכרים במלכודות דלתא עם שני סוגי נדיפיות פוליאיתילן (n=13)

2. *מינון הפרומון בנדיפית*. בניסוי זה בדקנו אם אכן מינונים שונים בנדיפית PE משפיעים על הלכידה ומהו הזמן בו מינון מסויים הופך לא רלוונטי. בתאריכים, בסבבים של שבוע, 10.8.21-14.9.21 נתלו 3 מלכודות דלתא דבק לכל טיפול, שהכילו נדיפיות עם המינונים הבאים של המרכיב גמא-נקרודיל איזובוטירט (במיקרוגרמים): 1. 5. 2. 50. 3. 500. 4. 0 (בקורת). ניסוי זה "סבל" גם הוא מלכידות נמוכות יחסית ובאופן תמוה המינון האמצעי, של 50 מיקרוגרם, לכד

פחות טוב מהמינונים הגבוהים והנמוכים ממנו (ANOVA (on Ranked Data):  $F = 7.74$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.0002$  (איור 12).

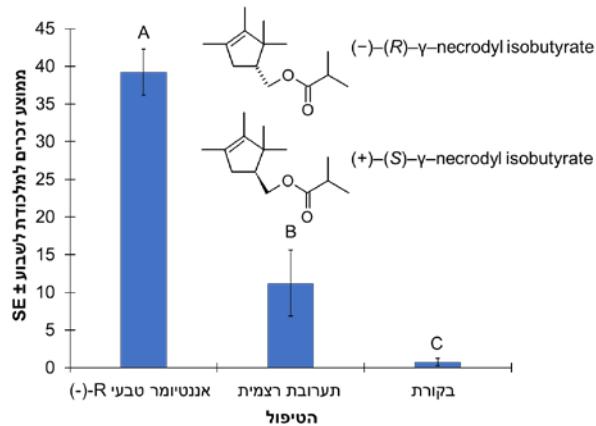


איור 12: השפעת מינון הפרומון במלכודת על ממוצע לכידות זכרים לשבוע למלכודת

אי לכך בצענו אנליזה ב-GC לכמות הפרומון שנותרה בנדיפיות ע"י מיצוין בסולבנט ובעזרת גרף כיוול עם סטנדרט הפרומון. התוצאות מהאנליזה הראו שלאחר כ- 50 יום בתנאי שדה בכל אחד מהטיפולים נותרו: 1.  $0.2 \pm 0.2$ , 2.  $5.6 \pm 2.4$ , 3.  $101 \pm 5$  מיקרוגרם פרומון. התוצאה בטיפול 1 נובעת מכך שבשתי נדיפיות לא נמצא פרומון כלל ובאחת נמצא 0.2 מיקרוגרם- זה קשור לחשיפה של המלכודות לחום ורוח. בנוסף, בשבוע האחרון של הניסוי הלכידות בטיפול 1 היו אפסיות (כמתבקש מהאנליזות) ולכן הוצאנו סבב זה והסבב שלפניו מחישוב ממוצע הלכידות. כלומר, גם במשך 35 ימים נדיפית במינון 5 מיקרוגרם לוכדת זכרים כמו מינון 500 מיקרוגרם. בנוסף, התוצאות מראות שמינון 500 מיקרוגרם (0.5 מיליגרם) יכול להחזיק בתנאי שדה לפחות 50 יום. אם מחשיבים שהנידוף הוא לינארי ונותרו בנדיפית 100 מיקרוגרם, הרי שב- 50 יום התנדפו 400 מיקרוגרם (8 מיקרוגרם ביום) והנדיפית יכולה להחזיק לפחות עוד כ- 12 ימים בתנאי שדה. סה"כ חודשיים. בדקנו מה היה הממוצע היומי של הטמפ' באזור הניסוי בכפר מונש (לפי התחנה המטאורולוגית עין החורש – 5 ק"מ מחלקת כפר מונש) והן נעו בין 22-29 °C והלחות היחסית 55-77%. תוצאה זו מראה יתרון ברור של נדיפיות פלסטיק על נדיפיות גומי מבחינת הצורך בהחלפה בפרקי זמן יותר ארוכים מצד הנטר, אך מנגד לא ניתן לשלוט בקצב השחרור ע"י שינוי מינונים, שכן קצב השחרור מובנה בעובי הדופן וצפיפות החומר (PE) של הנדיפית.

3. נוכחות אננטיומר לא טבעי בפיתון. מאחר והפרומון גמא-נקרודיל איזובוטירט הוא חומר כירלי ולו שני אננטיומרים, בדקנו בתנאי שדה האם האננטיומר הלא-טבעי מפריע כשהוא מצוי בפיתון. נתון זה הוא חשוב לא רק מבחינה מדעית אלא גם מבחינה פרקטית מאחר ולחברות פרומונים יש נטייה לספק חומרים רצמיים ולא כירליים לניטור (כי בד"כ הם יותר זולים לסנתזה). הניסוי נערך בתאריכים 29.7.21-3.8.21 בשתי חלקות הדריים במונש (תפוז ולנסיה) ובגת (מנדרית 'אורי')  $n=4$  תוך שימוש במלכודות דלתא דבק. הטיפולים יושמו בנדיפית Just Plastic הכילו (במיקרוגרמים): 1. האננטיומר הטבעי (-) (R)- $\gamma$ -necrodyl isobutyrate (-) (-).

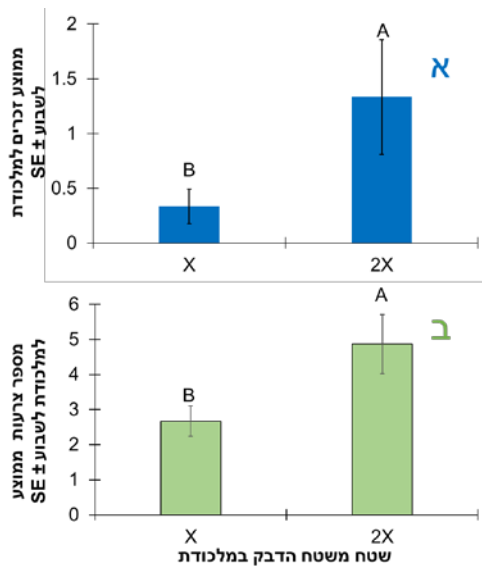
ממקור סינתטי (250) 2. תערובת רצמית סינתטית (250+250 מכל אננטיומר) 3. בקורת פנתאן (ממס). תוצאות הניסוי הראו שמרכיב הפרומון הטבעי (-)R מושך טוב יותר מהתערובת הרצמית ולמעשה האננטיומר הלא-טבעי (+)S הוא חומר דוחה (איור 13). זאת למרות שבניסוי בצלחת פטרי (איור 8) לא נראתה דחיה, אבל יש הבדל בין בדיקה מטווח קרוב לבדיקת תעופה ובסופו של דבר מה שקובע מה הפיתיון בנדיפית הוא ניסוי תעופה.



איור 13: ממוצע לכידות זכרים לשבוע למלכודת של האננטיומר הטבעי ותערובת רצמית סינתטיים של המרכיב הפעיל בפרומון גמא-נקרודיל איזובוטירט. n=4.

4. גודל המלכודת. בעקרון ניתן להכין צורות שונות של מלכודות דבק, ביניהן לוח פשוט, אך ככל שמשטח הדבק חשוף לאווירת המטע, כך הניטור קשה יותר. זאת מאחר ואבק ועלים נצמדים למשטח הדבק ולא ניתן לבצע ספירה של הזכרים הקטנטנים הדבוקים אליו. על כן בניסוי הבא בדקנו אם הגדלת משטח הדבק במלכודת תשפיע על כמות הזכרים הנלכדים. בסיסי הדבק שנבדקו היו בגודל 10×19 ס"מ (X) ו-20×19 ס"מ (2X) וגובה האנך המרכזי במבנה המלכודת היה 10 ו-12 ס"מ בהתאמה. הנדיפיות היו מסוג Just Plastic וכמות הפרומון (-)R-γ- (R) necrodiyl isobutyrate 200 מיקרוגרם. הניסוי התבצע בין 6.9.21 ל-4.10.21 בשתי חלקות בגת, n=15. כפי שנראה באיור 14א, הלכידות בניסוי זה, שהיה האחרון לעונת 2021, היו נמוכות מאד, אך הצביעו על כך שמלכודת 2X לוכדת יותר זכרים ממלכודת X. מעניין לציין שבמלכודות 2X (עם המשטח הגדול יותר) נלכדו יותר צרעות מהסוג אנגירוס (*Anagyrus*) מאשר זכרים (איור 14ב). ההסבר לכך הוא שמאחר והניסוי התקיים בסוף העונה בתקופה בה כנראה לא היו הרבה נקבות, אז יש יותר צרעות אנגירוס מזכרים שמחפשים נקבות.





איור 14: א. ממוצע לכידות זכרים לשבוע במלכודות פרומון בשני גדלים:  $X = 10 \times 19$  סמ"ר ו-  $2X = 20 \times 19$  סמ"ר ב. ממוצע לכידות צרעות אנגירוס למלכודת אלה לשבוע.  $n=15$

הסטטיסטיקה למבחני השדה זהה למבחני שנה ב'.

### דין וסיכום:

שיטת הדיגום הרציף הפתיעה אותנו לטובה ביכולתה לבודד במהירות את שני מרכיבי הפרומון של הקמחית הכדורית ממספר קטן מאד של נקבות. בעבר, כשעבדנו בשיטות המקובלות, ניסינו כמה פעמים לבודד את הפרומון של מזיק זה עם אלפי נקבות ולא הצלחנו לבודד אותו למרות שזכרים נמשכו לתמיסות אלה הן בצלחת פטרי והן בתעופה בבית רשת. תהליך זיהוי פרומוני כנימות קמחיות בד"כ אורך שנים לכן הנחת העבודה בתכנית זו הייתה שנצטרך לפחות 3 שנים על מנת להפיק כמות מספקת של חומר לזיהוי ב- NMR. אולם, בעזרת אנליזת הדיגום הרציף הצלחנו לאתר את מרכיבי הפרומון כבר באיסופים הראשונים.

כאמור, זהות הפרומון של הקמחית הכדורית נקבעה במהירות שיא, תוך שנה. הדבר נבע לדעתנו משימוש באנליזת הדיגום הרציף (SSGA) המבוססת על ניצול המנגנון הצירקדי של הפרומון בתוך מערכת דיגום ישירה של מחט SPME על GCMS. בעזרת SSGA הצלחנו להתמקד בשני חומרים בלבד מתוך ספקטרום שלם של חומרים שהיו נאספים אם היינו מנסים לזהות את הפרומון רק בתוך דוגמאות מאיסופי אוירה. מאחר והשיטה אפשרה לנו לדעת מהי השעה בה הפרומון משוחרר, יכולנו לבצע איסופי אוירה רק בשעות השחרור וכך להפיק חומר יותר נקי לאנליזה. בנוסף היה לנו מזל שמרכיב I הוא למעשה סמן (precursor) של מרכיב II ואלמלא זיהינו אותו, היינו נדרשים לאסוף כמות מאד גדולה (לפחות כמה מיקרוגרמים) כדי לזהות את מרכיב II ב- NMR. לא ניתן היה לזהות את חומר II רק עי GCMS מאחר ויש לו ספקטרום מאסות שדומה להרבה אסטרים של מונוטרפנים. אולם, גורם נוסף שעזר לנו ל"פצח" את מבנה הפרומון במהרה היה העובדה שיכולנו לבודד חומר מוצא לסינתזה מתוך שמן צמחי שהוא זמין מסחרית. כך לא לקח הרבה זמן עד שהיה לנו מספיק חומר לבדיקות ביולוגיות ראשוניות.

לכירליות של פרומון יכולה להיות השפעה על החישה של החרק ובהתאם גם על התנהגותו וגם על מידת משיכתו לפיתיון. על כן, בשנת המחקר השנייה עסקנו בעיקר בפיתוח הסינתזה של הפרומון והוכחת המבנה הגאומטרי המוחלט של המולקולות שזוהו. מאחר ולכל מרכיב פרומון שזוהה יש מרכז כירלי אחד, אזי לכל מרכיב מבין השניים שזוהו קיימים שני אננטיומרים, סה"כ ארבעה חומרים. לאחר ששכללנו מסלול סינתטי המבוסס על חומרי מוצא זמינים, הפרדנו את התערובות של שני מרכיבי הפרומון הכירליים ע"י אנזימי ליפאזה ואישרנו מי מהם מיוצר ע"י נקבות הקמחית הכדורית – אננטיומרי ה-R(-) בשני המרכיבים ע"י אנליזת GCMS עם קרולונה כירלית וע"י מבחנים ביולוגיים בזירה קטנה של צלחת פטרי. בבדיקות שדה ראשונות שנעשו בשנה ב נראה שהמרכיב האסטרי פרומון (-)-R- $\gamma$  נקרודיל איזובוטירט מושך זכרים למלכודת טוב יותר מהמרכיב השני (-)-R- $\gamma$  נקרודול וגם טוב יותר משניהם יחד כשהם ביחס 1:1 בפיתיון. בניסויי שדה נוספים היו רמות אוכלוסייה נמוכות מדי מכדי לקבל תוצאות מובהקות ולכן אלחנו פעמיים פרדס בצריפין באלפי כנימות מהגידול, אך לא התבססה אוכלוסייה מספקת. משום כך החלטנו שבכל ניסוי שדה יהיו פחות טיפולים ויותר חזרות.

בשנה ג' הגברנו את יצור המרכיבים הנדרשים לבדיקות בשדה ובצענו ניסויים בשדה לפיתוח שיטה לניטור המזיק. מהניסויים שהצליחו קבלנו מידע לגבי מה צריך להיות הרכב הנדיפית והוא מרכיב אחד בלבד של גמא-נקרודיל איזובוטירט שהכירליות שלו היא R, מאחר ואננטיומר ה-S+ גורם לדחיה. בנוסף קבענו שסוג הנדיפית הטוב ביותר לניטור היא נדיפית פוליאיתילן מתוצרת Just Plastic והמינון בה משפיע רק על משך החיים של הנדיפית, אך קצב שחרור הפרומון שמשפיע על עוצמת הלכידה שלה ביחס לנדיפיות אחרות הוא קבוע. מינון של 500 מיקרוגרם בנדיפית זו טוב לניטור עד חודשיים בשדה. בניסוי עם שני גדלים של משטחי דבק במלכודת דלתא קבענו שמלכודת דלתא דבק עם משטח גדול יותר לוכדת טוב יותר זכרים, וגם את האויבים הטבעיים של הכנימה, מיני אנגיורוס, שכנראה גם הם נמשכים לפרומון הכנימה (שעבורם הוא קיירומון). לצערנו גם השנה בצענו די הרבה ניסויים שלא נתנו תוצאות מוחלטות, משום שהחקלאים מרססים מיד כשהם מזחים נגיעות, ואז תוצאות הניסוי נחלשות ומפסיקים אותו. חוקרים בפלורידה ששלחנו להם נדיפיות נתקלו באותה בעיה ולא קבלו לכידות גבוהות גם כשהציבו מלכודות עם נקבות. לאור כל זאת בעתיד יש בדעתנו לכוון את המבחנים הביולוגיים של פרומונים חדשים לזירות מלאכותיות בלתי תלויות כמו בתי רשת, אחרת מתבזבזים הרבה משאבים בניסויים המופסקים באמצע.

ניסויי שדה הינם מורכבים מאד שכן אין אנו שולטים ברוב מרכיבי השונות. בצענו ניסויים רבים שכללו בדיקה שבועית בשש חלקות הדרים מכפר מונש ועד גת. בנוסף, היו ניסויים רבים נוספים שכשלו בגלל ריסוסים שבוצעו בחלקה נגד קמחית כדורית מיד עם העלייה בלכידות הזכרים ולכן לא נכללו בתוצאות. השונות בנתוני הלכידות כצפוי הייתה גבוהה מאד: יש שונות בין כל חלקה ובין כל תאריך בדיקה בתקופה הניסוי יש גלי גיחת בוגרים טבעיים, יש שונות בפיזור המזיק בתוך החלקות והשפעות של מזג אוויר ועוד. למרות זאת, הצלחנו בתנאי השדה המורכבים להוכיח באופן מובהק ש:

1. נדיפית המכילה 1 מ"ג  $\gamma$ -R(-) נקרודיל איזובוטירט מושכת טוב יותר מנדיפית זהה משולבת עם  $\gamma$ -R(-) נקרודול או נדיפית עם  $\gamma$ -R(-) נקרודול לבד או בקורת.
  2. לנדיפית פוליאטילן יש יתרון מסויים על נדיפית גומי. זו הייתה מגמה אך היא אינה מובהקת סטטיסטית.
  3. יש הבדל מבחינת לכידת הזכרים בין שתי נדיפיות פוליאטילן שנבדקו. הנדיפית עם הדופן העבה יותר (Just Plastic) נתנה לכידות מעט יותר גבוהות באופן מובהק.
  4. מינון 5 מיקרוגרם בנדיפית היה המוצלח ביותר, אך לא שונה ממינון 500 מיקרוגרם.
  5. במשך 35 ימים נדיפית במינון 5 מיקרוגרם לוכדת זכרים כמו מינון 500 מיקרוגרם, אולם המינון הגבוה 500 מיקרוגרם יכול להחזיק בתנאי שדה יותר זמן, לפחות 50 יום.
  6. מרכיב הפרומון הטבעי  $\gamma$ -R(-) נקרודיל איזובוטירט מושך טוב יותר מהתערובת הרצמית ונוכחות האננטיומר הלא-טבעי (+)S מפחיתה את הלכידה באופן מובהק.
  7. מלכודת גדולות לוכדת כ-50% יותר זכרים וצרעות טפיליות ממלכודת קטנות יותר.
- על אף שתכנית המחקר לא כללה מחקר שדה שיבחן ממשקי הדברה (ניטור, בלבול, לכידה המונית), בכדי לאמוד את תרומת הפיתוח להדברת מזיק המטרה יש צורך להמשיך בכוון זה. אין הגיון ולא נהוג להתחיל במחקר שדה בהיקף כזה עד שזיהוי הפרומון הוא סופי.
- לסיכום, בעבודה זו זיהינו את הפרומון של הקמחית הכדורית ופתחנו מערכת פיתיון-מלכודת מיטבית המתאימה לניטורו בשדה.

#### פרסומים מדעיים שנבעו מהמחקר:

Levi-Zada, A., Steiner, S., Fefer, D. and Kaspi, R. (2019). Identification of the sex pheromone of the spherical mealybug *Nipaeococcus viridis*. *J. Chem. Ecol.* 45: 455–463.

לוי-זאדה א., שטיינר ש., פפר ד., כספי ר. (2019) זיהוי פרומון המין של הקמחית הכדורית *Nipaeococcus viridis*. עלון הנוטע 73(10): 28-32.

Levi-Zada, A., Steiner, S., Fefer, D. and Kaspi, R. (2019). Compositions and methods for mealybug monitoring and control. PCT application number PCT/IL2019/051086 filed on 04/10/2019. The patent is planned to be filed in April 2022 in a national phase of specific filing in each territory: Israel, USA, South Africa etc.

Levi-Zada A., Steiner S., Ben-Aziz O., Protasov A., Fefer D., Kaspi R. (2021) Absolute configuration of the spherical mealybug *Nipaeococcus viridis* sex pheromone,  $\gamma$ -necrotyl isobutyrate: Chemoenzymatic synthesis and bioassays. *J. Agri. Food Chem.* On-Line <https://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-MXUQ9VP2VZ94JQ9Z5D4X>

- Chapuis C, Winter B, Schulte-Elte KH (1992) Rhodium Catalysed Decarbonylation of Optically active Campholenal Analogues. *Tetrahedron Letters*, 33(41): 6135-6138
- Garcia-Vallejo MI, Garcia-Vallejo MC, Sanz J, Bernabe M, Velasco-Negueruela A (1994) Necrodanes derivatives in *Lavandula luisieri*, new compounds to the plant kingdom. *Phytochemistry* 36: 43-45.
- Mori K (2007). Significance of chirality in pheromone science. *Bioorg. Med. Chem.* 15 : 7505-7523.
- Mori K (2011). Bioactive Natural Products and Chirality. *Chirality* 23:449-462.
- Pamingle H, Snowden RL, Schulte-Elk KH (1991) Stereoselective conversion of campholene- to necrodane-type monoterpenes. Novel access to (-)-(R,R)- and (R,S)- $\alpha$ -necrodol and the enantiomeric  $\gamma$ -necrodols. *Helvetica Chimica Acta* 74:543-548.
- Robinson MWC., Pillinger KS, Graham AE (2006). Highly efficient Meinwald rearrangement reactions of epoxides catalyzed by copper tetrafluoroborate. *Tetrahedron Letters* 47:5919-5921.