

**שימוש בצמחי מלכודת ונדיפי צמח להקטנת האוכלוסיה של
Hyalesthes obsoletus הוקטור של מחלת הצהבון לגפנים.**

Use of trap plant and plants volatiles to reduce the *Hyalesthes obsoletus* population,
the vector of yellows disease in vines.

מוגשת לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות.

ע"י

מ״פ צפון
אנטומולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
הגנת הצומח, שרות הדרכה ומקצוע
אנטומולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן

שרון רקפת
סורוקר ויקטוריה
זהבי תרצה
זאדה ענת

Rakefet Sharon, northern R&D, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016, Email:

rakefetsh@bezeqint.net

Victoria Soroker, Department of Entomology, ARO, Bet Dagan, Email:

sorokerv@volcani.agri.gov.il

Tirtza Zahavi, Extension Service, Ministry of Agriculture, Kiryat Sh'mona, Email:

tirtzaz@yahoo.com

Anat Zada, Department of Entomology, ARO, Bet Dagan, Email:

anatzada@volcani.agri.gov.il

מרץ 2010

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.

Rakefet

חתימת החוקר: רקפת שרון

תקציר:

מחלות הצהבון בכרמים הן בעלות חשיבות כלכלית בעולם כולו. הגפנים הניטעות כיום בארץ נקיות מהפתוגן וההדבקה מתרחשת בכרם ע"י וקטור(ים) המחלה. החרק היחיד הקיים בכרמים בישראל ונמצא מעביר פיטופלסמה לגפן בעולם היא הציקדה *Hyalesthes obsoletus* (להלן Ho). בתוכנית הנוכחית נבנית התשתית לפיתוח מלכודות לוקטור Ho המבוססות על שיח אברהם או על מיצוי נדיפים שלו, כאמצעי למשיכתו ובכך לשיבוש הגעתו אל הצמח.

מטרות המחקר: 1) בחינת ההשפעה של פיזור צמחי מלכודת בעציצים על פיזור המזיק והנזק בכרם - השפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסייה של הוקטור בכרם. 2) בחינת המיצויים בניסוי מעבדה: פיתוח מבחן ביולוגי לזיהוי המיצוי. התחלת בידוד וזיהוי מרכיבי המיצוי הפעילים ב-GC\EAD.

מהלך המחקר: בשנת המחקר השניה בחנו את יעילות שתילי שיח אברהם נטועים ועטופים ברשת כאמצעי לחסימת כניסת הציקדות אל הכרם. מרבית הציקדות נמצאו על השיחים. בתחילת שנת המחקר שתילי שיח אברהם היו קטנים ולכן כמות הציקדות היחסית שזלגה לכרם היתה גדולה יחסית (13%-21%). בדור הסתוי אחוז הציקדות שהגיע לכרם היה קטן יחסית למספר הציקדות שנמצאו על שיחי אברהם (0.3%-1%). מופו גפנים נגועות בצהבון ומספרן ישווה למספר הגפנים הנגועות בשנת המחקר הבאה.

אותרו שני מרכיבים החשודים כפעילים באמצעות EAG. מרכיב אחד שפעל יותר על הזכרים ואחד שפעל יותר על הנקבות. מרכיבים פעילים שאותרו באמצעות EAG זהו. החלה בדיקת תגובת אנטנות של הציקדות ב- GC-EAD למרכיבים נדיפים ממיצוי שיח אברהם. בשנת המחקר הבאה נחזור על ניסוי השטח ונבחן את יעילות החומרים שזוהו במשיכת הציקדות באולפסטומטר ו-EAG.

מבוא

מחלות הצהבון בכרמים הן בעלות חשיבות כלכלית בעולם כולו. מחלות אלה גורמות להתנוונות של האשכולות ובין סימניהן: הצהבה או האדמה של העלים, התקפלות אופינית של העלים והשריגים אינם משלימים את התפתחות הפרידרם (Periderm) ומפתחים מירקם דמוי גומי. בחלק מהמקרים מתוארים שריגים מתנוונים, לבלוב מאוחר ובמקרים אחרים תמותה של הגפן. הסימפטומים מופיעים לעתים על שריגים בודדים ולעתים בכל הגפן. מחלה מסוג זה זוהתה לראשונה בכרמים בישראל בשנות ה-80 ומאז נגרם בעטייה נזק רב לכרמים באזורים שונים. הזנים שונים ברגישותם למחלה, אך הזן שרדונה ידוע בכל העולם כרגיש ביותר (Curkovic) Perica et al., 2001. בארץ נעקרו בשנים האחרונות למעלה מ-500 דונם מזן זה כתוצאה מהמחלה.

הגפנים הניטעות כיום בארץ נקיות מהפתוגן וההדבקה מתרחשת בכרם ע"י וקטור(ים) המחלה. החרק היחיד הקיים בכרמים בישראל ונמצא מעביר פיטופלסמה לגפן בעולם היא הציקדה *Hyalesthes obsoletus* (להלן Ho).

תוכנית זו היא תוכנית המשך למחקר שהראה כי שיח אברהם הינו הפונדקאי המועדף על הוקטור מתוך מגוון פונדקאי בר שנבדקו בעוד הגפן הינה הפונדקאי הפחות מועדף. בתוכנית הנוכחית תוכן התשתית לפיתוח מלכודות לוקטור Ho המבוססות על שיח אברהם או על מיצוי נדיפים שלו, כאמצעי למשיכתו ובכך לשיבוש הגעתו אל הצמח.

מטרת המחקר: פיתוח מלכודות לוקטור Ho המבוססות על שיח אברהם או על מיצוי מעליו.

- א. בחינת ההשפעה של פיזור מלכודות עם צמחי מלכודת על הפחתת אוכלוסיית הוקטור בכרם.
- ב. בחינת כושר המשיכה של מיצוי עלים של שיח אברהם למשיכת Ho בכרם.
- ג. ניסויים ראשוניים לבידוד וזיהוי המרכיבים המושכים את ה-Ho מעלי שיח אברהם.

מטרות בשנת המחקר השניה:

א. ניסויי שטח- בחינת ההשפעה של פיזור צמחי מלכודת בעציצים על פיזור המזיק והנזק בכרם-

א. השפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסייה של הוקטור בכרם

א. השפעת המלכודות על מספר הגפנים הנגועות בצהבון

ב. זיהוי החומרים הפעילים במיצוי שיח אברהם-

א. התחלת בידוד וזיהוי מרכיבי המיצוי הפעילים ב-EAD\GC

א. זיהוי המרכיבים הכימיים

שיטות וחומרים

א. ניסויי שטח- בחינת ההשפעה של פיזור צמחי מלכודת בעציצים על פיזור

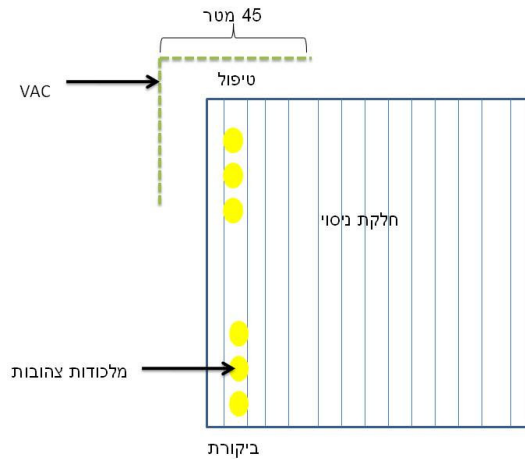
המזיק והנזק בכרם והשפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסייה של הוקטור בכרם

אתרי המחקר:

הניסוי נערך בשני כרמים – בכרם גשור ובכרם מבוא תמה.

מבנה הניסוי בשטח:

שתילי שיח אברהם (להלן *Vac – Vitex agnus castus*) נשתלו בקרקע בפינה אחת של הכרם וכוסו ברשת. מחוץ לרשת חוברו מלכודות דבק צהובות. השתילים מוצבו במרחק של כעשרה מטרים מקצה שורת הגפנים כך שחסמו 10 שורות גפנים ו- 30 גפנים. הקצה הנגדי של החלקה שימש כביקורת. מלכודות צהובות ניתלו בתוך שורות הגפנים.



דיגום:

אחת לשבועיים נאספו המלכודות הצהובות, הציקדות נספרו. בסוף העונה מופו הגפנים לנגיעות במחלת הצהבון במקטע הטיפול ובמקטע הביקורת בכל כרם.

ב. זיהוי המרכיבים הפעילים במיצוי שיח אברהם

א. המשך זיהוי מרכיבי המיצוי הפעילים ב-EAD\GC במעבדתה של ויקטוריה סורוקר

הכנת מיצוי-

20 גרם עלים בגודל בינוני נאספו משתילי Vac הגדלים בעציצים. העלים ניתחנו לאבקה בחנקן נוזלי באמצעות מכתש ועלי ומוצו ב-200 מ"ל פנתן במשך שעה אחת תוך נייעור. למיצוי הוספו 15 גרם מגנזיום סולפט. המיצוי עבר פילטרציה ונשמר ב-20°C עד לביצוע ניסויים. לאנאליזה רוכז המיצוי 2X תחת חנקן.

אנאליזה ב-GC-EAD:

האנאליזה נעשתה על מיצויים באמצעות גז כרומטוגרף (Chrom-Card) Thermo Finnigan (Trace-Focus GC) בשילוב עם Syntech (IDAC-232, The Netherlands) electroantennogram detector system. ה-GC צוייד בקולונה קפילרית (30 a ZB-5 column (0.25 mm ID × 0.25 μm film thickness). הליום הוזרם כגז נשא בזרם של 2 מ"ל לדקה. האינגיקטור והגלאי FID הוחזקו בטמפרטורות 230°C ו-275°C בהתאמה. טמפרטורת התנור תוכננה ל-60 מעלות במשך דקה ומכאן עלתה בקצב 10 מעלות לדקה עד 230 ונשמרה שם במשך 10 דקות.

רישום תגובת המחוש ב-EAD נעשה ממחוש המחובר לראש. קפילרה עם אלקטרודת הייחוס מלאה ב-0.1N KCl הוחדרה לראש בעוד הקצה הדיסטלי של אחד המחושים הוחדר לקפילרה שניה עם אלקטרודת הרישום. נבדקו מחושים של שני זוויגי הציקדות. כל מחוש נבדק רק פעם אחת. אויר לח במהירות זרימה של 0.8 ליטר לדקה שימש כגז נסע לנדיפים היוצאים מה-GC.

האות המיוצר על ידי המחוש והגלאי FID עובד באמצעות Syntech IDAC-232 high-impedance amplifier and analyzed using Syntech GC-EAD2000 software version 1.00.

II. זיהוי המרכיבים הכימיים

האנליזה נעשתה במכשיר GC Agilent 6890N אליו מחובר Agilent 5973N Mass Selective Detector (70eV). הקולונה הקפילרית בה השתמשנו הייתה RTX-5SilMS (Resteck) עם מימדים 0.25mm X 0.25mm X 0.30 m. טווח המאסות שנסרקו היה 40-400 amu. תכנית החימום של התנור היתה כדלקמן: 60°C במשך 2 דקות, חימום בקצב 5 מעלות לדקה עד 230°C למשך 10 דקות. קצב זרימת ההליום 1.5 ml min⁻¹. האינגיקטור הוחזק במצב Splitless בטמפי 250°C. הזיהוי הכימי של המרכיבים הפעילים ב-EAD התבצע באמצעות GCMS תוך שימוש בחישובי אינדקס השהיה (Retention Index), שימוש בספריות ה-NIST 5, Wiley 7 and MS (Adams), הזרקת סטנדרטים והשוואת הנתונים המתקבלים לאלה הידועים בספרות.

תוצאות

א. ניסויי שטח-בחינת פיזור צמחי מלכודת בעציצים על פיזור המזיק והנזק בכרם

השפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסיה של הוקטור בכרם

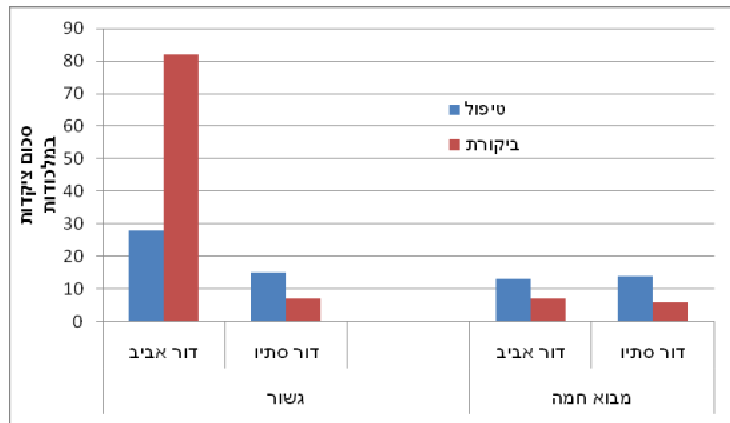
הדור האביבי של הציקדות נמשך כחודשיים (מאי יוני) והדור הסתוי נמשך כשלושה חודשים (ספטמבר- נובמבר). מרבית הציקדות נלכדות במלכודות על שיחי אברהם מחוץ לשורות הכרם- בגשור נלכדו בדור האביבי 514 ציקדות (ממוצע למלכודת 1.3) ובדור הסתוי 2112 ציקדות (ממוצע

למלכודת 3.4). במבוא חמה נלכדו בדור האביבי 149 ציקדות (ממוצע למלכודת 0.4) ובדור הסתוי 3506 ציקדות (ממוצע למלכודת 5.5).

לתוך שורות הכרם מגיעות ציקדות מעטות יותר (איור 1) - בדור האביבי נלכדו בגשור יותר ציקדות (110) לעומת הדור הסתוי (22) ואילו במבוא חמה לא היה הבדל במספר הציקדות בין הדורות (20 בכל דור).

בגשור - בדור האביבי מספר הציקדות היחסי שנלכדו בתוך השורות בטיפול ובביקורת לעומת מספרן על שיחי אברהם היה 21% ובדור הסתוי 1%. במבוא חמה בדור האביבי מספר הציקדות היחסי שנלכדו בתוך השורות בטיפול ובביקורת לעומת מספרן על שיחי אברהם היה 13% ובדור הסתוי 0.3%. בתחילת האביב גובה השתילים היה כ- 20 ס"מ ובסתיו הגיעו לגובה של כמטר. יתכן שעוצמת השפעתם גדלה בסתיו לעומת האביב.

מספר הציקדות שנלכדו בדור האביבי בשורות הביקורת לעומת שורות הטיפול היה גדול יותר בגשור (82 לעומת 28) ונמוך יותר במבוא חמה (7 לעומת 13). בדור הסתוי בגשור ובמבוא חמה מספר הציקדות שנלכדו בתוך השורות היה גבוה יותר בטיפול לעומת הביקורת (7 לעומת 15 ו- 6 לעומת 14 בהתאמה) (איור 1).



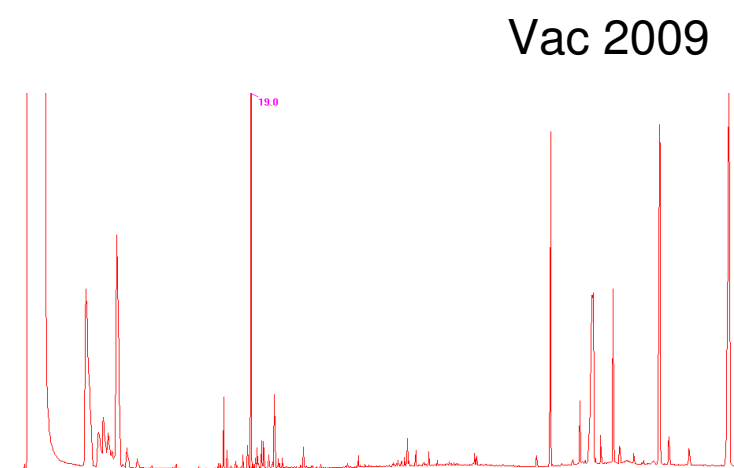
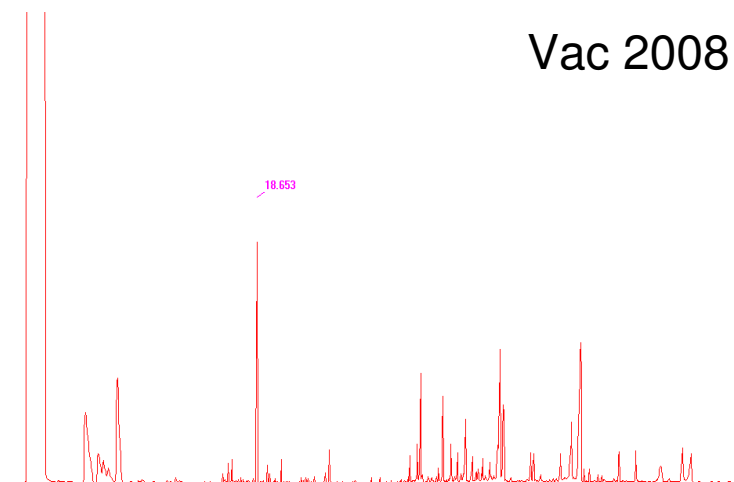
איור 1: מספר הציקדות שנלכדו במלכודות בתוך השורות (טיפול - מול שיחי אברהם, ביקורת - ללא שיחי אברהם) בשני אתרי הניסוי (גשור, מבוא חמה), בשני דורות הציקדות הבוגרות (דור אביב, דור סתיו).

באוגוסט מופו הגפנים הנגועות בצהבון בתוך שורות הניסוי – 10 שורות ובכל שורה 30 גפנים. תוצאות אלו יהוו בסיס לבדיקת יעילות השימוש בשיחי אברהם כאמצעי להקטנת הנגיעות בשנת המחקר הבאה - 2010. בגשור, בחלקת הטיפול נמצאו 27 גפנים נגועות ובחלקת הטיפול 9 גפנים נגועות. במבוא חמה נמצאו 2 גפנים נגועות בחלקת הטיפול וגפן אחת נגועה בחלקת הביקורת.

ב. זיהוי המרכיבים

1. המשך זיהוי מרכיבי המיצוי הפעילים ב-EAD\GC

למרות שהמיצוי השנה הוכן באופן זהה לזה של שנה שעברה כפי שרואים באיור 2, הרכבו שונה משנה הקודמת והשיא של 19.05 השנה מגביל לשיא 18.63 משנה שעברה. סך הכול נבדקה תגובה של מחושי 25 זכרים ו-21 נקבות למיצוי שיח אברהם בדיכלורמתאן שהוכנו השנה. מתוך כל המחושים שנבדקו רק 12 מחושי זכרים ו-12 מחושי נקבות הגיבו לנדיפים. בטבלה 1 מוצגים שיעורי התגובה של זכרים ונקבות לשיאים שונים. כפי שניתן לראות שני הזוויגים מגיבים באופן שונה לנדיפי שיח אברהם. בעוד יש כמה מרבית הנקבות מגיבות לפיק היוצא ב- 19.05 דקות לגבי הזכרים הפיק החשוב ביותר הוא ב- 20.89.



איור 2. השוואת מיצוי נדיפי שיח אברהם משנת 2008 ו-2009.

טבלה 1: תגובת מחושי שני הזוויגים של Ho למיצויי ה-Vac ב-EAD-GC.

Retention time (min)	Females		Males	
	n	%	n	%
8.45±0.04	0	-	3	25
10.01	0	-	2	17
12.76	0	-	2	17
14.56±0.07	0	-	2	17
15.23	2	17	0	-
16.84±0.06	2	17	0	-
17.60±0.06	2	17	0	-
18.65	2	17	0	-
19.05±0.06	8	67	2	17
20.89±0.05	0	-	6	50
21.32±0.02	0	-	2	-
21.53±0.03	2	17	0	-
27.73±0.09	2	17	0	-
28.28±0.03	2	17	0	-
33.10±0.06	2		0	-
41.76±0.03	2	17	0	-

II. זיהוי המרכיבים הכימיים

לפי תוצאות ה-EAD בזמן 19.05 דקות היה פיק שעורר תגובה ב-67% מהנקבות ובזמן 20.89 דקות היה פיק שעורר תגובה ב-50% מהזכרים. לאחר הזרקת סדרת פחמנים הן ב-EAD-GC והן ב-GCMS חושבו ה-retention indexes (RI) של שני החומרים הנ"ל וכן ה-retention times הצפויים במכשיר ה-GCMS. בזמנים אלה נראו שני פיקים שזוהו על ידי הספריות והתאמת RI's ספרותיים ולסטנדרטים. החומר הפעיל שיוצא ראשון ומעורר את הנקבות הוא (-)-trans-Caryophyllene ואילו החומר שיוצא שני ומפעיל את האנטנות של הזכרים הוא Bicyclgermacrene. החומר (-)-trans-Caryophyllene הוא חומר מסחרי (Fluka) ואילו החומר השני אינו מסחרי, אך הוא מרכיב עיקרי בכמה שמנים אתריים של צמחים מאזור דרום אמריקה, שלמרות מאמצו לא הצלחנו להשיגם. כוונתנו היתה לנסות לבודד את החומר מהשמן האתרי שיתקבל.