

אפיון רגישות זני גזר שונים לפסילת הגזר ולמחלת הצהבון לשיפור התמודדות עם מחלת הצהבון בגזר

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ד"ר מופק אבדאח : המחלקה למדעי הצמח. mwafaq@volcani.agri.gov.il
ד"ר ליאורה שאלתיאל-הרפז : מו"פ צפון, אקו-אנטמולוגית. liora@migal.org.il
ד"ר אופיר בהר : המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים. ofirb@volcani.agri.gov.il
שאול גרף : מו"פ צפון. shaoulgraph@gmail.com

דצמבר 2019

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : כן

חתימת החוקר



תקציר

הצגת הבעיה - פסילת הגזר היא מזיק ספציפי הגורם לנזק בגזר. הפסילה מקיימת בשדה הגזר כמה דורות בשנה במהלך הגידול. עיקר נזקה נובע מהיותה הווקטור של גורם מחלת הצהבון בגזר. כתוצאה מכך, נפגעת רמת היבול המשווק ואיכותו באותה עונה, ואם אין טיפול מתאים - נפגעות חלקות נוספות באזור בעונות העוקבות. בשנים האחרונות מתרבות התפרצויות פסילת הגזר בישראל. בשל היותה וקטור של צהבון הגזר, החקלאים מרבים לרסס כנגדה, ומתגלים קשיים רבים בהדברתה. זאת מכיוון שהיא מפתחת עמידות לקבוצות שונות של תכשירי הדברה. בנוסף, בגלל תכשירי ההדברה נגרמים נזקים לסביבה כמו פגיעה בדבורים. כיוון שכך יש צורך לבדוק שיטות נוספות לבקרת אוכלוסיית הפסילה, כמקובל במסגרת הגישה המשולבת לבקרת מזיקים (IPM), כגון זנים עמידים לפסילה או למחלה ו/או מציאת חומרים שיגרמו לדחיתה מהצמחים או חומרים מושכים שיאפשרו את השימוש במלכודות ללכידת יתר או פיתוח זנים עמידים.. ידוע לנו שיכולות להיות אפשרויות שונות להבדלים במידת הדחייה או הקטילה וגם הרגישות של זני גזר שונים לפסילות הנובעים מיצירת מגוון רחב של חומרים נדיפים ולא נדיפים..

לפיכך יעז המחקר - לזהות זני גזר העמידים לפסילה ולגורם מחלת הצהבון, כמקור עתידי לזנים חלופיים לזנים הרגישים וכמקור גנים לעמידות למחלה וגם כמקור לחומרי דחיה או קטילה טבעיים של פסילת הגזר.

מטרות המחקר הן:

- א. איפיון רגישות זני גזר שונים לפסילת הגזר
- ב. איפיון רגישות זני גזר שונים למחלת הצהבון
- ג. זיהוי חומרים טבעיים הגורמים לדחיה או קטילה של פסילת הגזר שמקורם, בזני גזר שונים.

שיטות עבודה:

1. גידול במעבדה של צמחי גזר מהזנים השונים: 9 זני גזר צבעוניים ו- 5 מינים גזר בר: גזר מצוי (*Daucus bortei* Ten), גזר קיפח (*Daucus carota* L.), גזר החוף, (*Daucus glaber* (Forssk.) Thell) וגזר זהוב (*Daucus aureus* Desf)
2. גדול מעבדתי של פסילות הגזר הנושאות את מחלת הצהבון.
3. קביעת רמת ההעדפה של פסילת הגזר לזני הגזר השונים בניסויי בחירה וללא בחירה
4. קביעת רמת ההתפתחות של הפסילה על הזנים השונים.
5. בדיקת את פרופיל הנדיפים המשוחרר מהעלים של כל הזנים בעזרת GC-MS
6. בחינת מידת רגישות זני הגזר השונים למחלת הצהבון

תוצאות עיקריות:

1. נמצאו הבדלים ברורים ברמת ההעדפה של פסילת הגזר לזני הגזר השונים כאשר הזן המסחרי הכתום הנפוץ ביותר- נירובי (orange) נימצא כזן הכי פחות מועדף על הפסילה- לא היתה עליו כלל הטלה בעוד שזן הבר 21793 היה המועדף ביותר. בניסויי הטלה ללא בחירה לא נימצאו הבדלים בין הזנים
2. נמצאו הבדלים מובהקים בשיעור ההישרדות של הפסילות על זני הגזר השונים. כאשר שיעור ההישרדות הגבוה ביותר נימצא בזן המסחרי הכתום בו כ-50% מהביצים בקעו והתפתחו והגיעו לדרגת בוגר ושיעור ההישרדות הנמוך ביותר בזן 21793 בו שיעור ההישרדות עמד על פחות מ 1%
3. לא נמצאו הבדלים ברמת רגישות זני הגזר למחלת הצהבון.
4. ייצרנו פרופילים מטבולומיים מפורטים לחומרים נדיפים מהעלים של זנים שונים של גזר תוך שימוש בשיטת ה SPME-GC-MS ומצאנו ש elemicin ו-sabinene נמצאים ברמה גבוהה יותר בזנים המועדפים ע"י הפסילה.

מסקנות והמלצות:

פסילת הגזר הראתה העדפה לזן הבר 21793 בניסויי בחירה. בניסויים ללא בחירה לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמת העדפה אך נמצאו הבדלים מובהקים במידת ההתפתחות של הפסילות על הזנים השונים, כאשר שיעור ההישרדות הגבוה ביותר נימצא בזן המסחרי הכתום ושיעור ההישרדות הנמוך ביותר בזן 21793. תוצאות אלו מפתיעות בהשוואה לניסויי הבחירה מכיוון שעולה שדווקא שני הזנים המועדפים ע"י הפסילות 21793 ו-20497 הם אלו שההישרדות הפסילות עליהם היא הנמוכה ביותר. יתכן שתוצאות אלו שמצביעות על אפשרות להשתמש בצמחים אלו כצמחי מלכודת שהפסילות תעדפנה אותם ע"פ הזן המסחרי אך ההישרדות שלהם עליהן תהיה הנמוכה ביותר כאשר אולי עלינו על צמחים שהם מהסוג של dead end

trap. מתוצאות של אנליזה לחומרים שהופקו מהעלים נמצאו מספר חומרים החשודים כמעורבים במשיכה של פסלת הגזר, להלן: המונוטרפן sabinene והפנול פרופאנויד elemicin. בנוסף נמצאו שחומרים אלו עולים בצמחי גזר שאולחו בפסילות- כנראה כתגובה של הגזר וכנראה גם הם מעורבים במשיכת פסילת הגזר. חומרים החשודים כמעורבים במשיכה ייבדקו במסגרת המחקר, באולפקטומטר במטרה לבחון את מעורבותם במשיכת פסילת הגזר על מנת שישמשו בהמשך כמושכנים.

מבוא

ענף הגזר הוא אחד הענפים הרווחיים והחשובים בישראל ובעולם. היקף הייצור העולמי של גזר היה יותר מ 38 מיליון טון בשנת 2014 (<http://faostat.fao.org>). בישראל גידול הגזר הגיע ל כ-40000 דונם עם יבול של יותר מ 300 אלף טון לשנת (נתוני FAOSTAT 2014). בשנים האחרונות עולה הביקוש בישראל וכן הביקוש המקומי והעולמי לגזר לרמה גבוהה, שבה הייצור העולמי אינו מדביק את הביקוש. כתוצאה מכך מחיר הגזר בארץ ובעולם עולה בהתמדה ואינו צפוי לרדת בעשור הקרוב. הביקוש הרב איננו רק לצריכת השורש למאכל אלא גם למוצרים השונים שמפיקים ממנו, למשל חומרים בריאותיים כדוגמת קרטנואידים ומעכבי חימצון כגון אנטוציאנינים הנוצרים בגזרים צבעוניים שונים ומהווים בנוסף מקור לאשלגן ולויטמינים שונים. כתוצאה מכך סביב גידול הגזר מתפתחת תעשייה נרחבת של הגזר ומוצרים. לפיכך, צפוי שענף הגזר בעולם ילך ויתרחב תוך שימת דגש על מוצר בעל ערך בריאותי גבוה ונטול רעלים. אחד החסמים בגידול הגזר ובעיקר בניסיון להגיע לגידול מופחת רעלים היא פסילת הגזר המהווה מזיק מפתח בגידול.

פסילת הגזר- ישנם מספר מינים של פסילות (Hemiptera: Psyllidae) הניזונות מגזר בעולם *Trioza apicalis* Foerster בצפון אירופה והמינים *Bactericera trigonica* (Hodkinson) ו- *Bactericera nigricornis* (Foerster). באיזור הים התיכון. ([Nehlin et al., 1996](#); [Nissinen et al., 2005](#); [Seljåsen et al., 2013](#); [Nissinen et al., 2012](#)). *B. trigonica* הינה המין הנפוץ בארץ והיא ניזונה באופן בלעדי ממינים של סוככים. עיקר נזקה לגזר נובע מהיותה הוקטור של גורם מחלת הצהבון בגזר, העלולה לגרום נזקים קשים ליבול ולפסילתו. ([Seljåsen et al., 2013](#)) הפסילה מקיימת בשדה הגזר כמה דורות בשנה במהלך הגידול. כך, נפגעת רמת היבול המשוק באותה עונה ואם אין טיפול מתאים נפגעות חלקות נוספות באיזור בעונות העוקבות. הביולוגיה של מזיק זה נלמדה בארץ ובעולם ביסודיות ([Nehlin et al., 1996](#); [Gera et al., 2011](#); [Nissinen et al., 2012](#); [Seljåsen et al., 2013](#)). והיא מוכרת כמזיק ספציפי לגזר, גם במדינות נוספות באגן הים התיכון ואירופה. ([Seljåsen et al., 2013](#)) בשנים האחרונות מתרבות התפרצויות פסילת הגזר בישראל בפרט ובמזרח התיכון בכלל. בשל היותה וקטור של צהבון הגזר **החקלאים מרביתם לרסס כנגדה וברחבי הארץ יש המרססים גם 20 פעמים בעונה (500/ריסוס/דונם)**, ועם זאת מתגלים קשיים רבים בהדברתה כיוון, שהיא מפתחת עמידות לקבוצות שונות של תכשירי הדברה. ([Pree et al., 1990](#)) במקביל הולכת וגוברת המודעות למחירם האקולוגי והכלכלי הכבד של השימוש בתכשירים אלו. כיוון שכך יש צורך לבדוק שיטות נוספות לבקרת אוכלוסיית הפסילה, כמקובל במסגרת הגישה המשולבת לבקרת מזיקים (IPM), כגון זנים עמידים לפסילה או למחלה ו/או מציאת חומרים שיגרמו לדחיתה מהצמחים או חומרים מושכים שיאפשרו את השימוש במלכודות ללכידת יתר או פיתוח זנים עמידים. למרות חשיבותה הרבה של פסילה זו כמזיק לגזר בארץ ובארצות נוספות, נכון להיום הידע על גורמי המשיכה או הדחייה שלה לגזר מועט מאוד ולא ידוע האם קיימים הבדלים במידת המשיכה והרגישות של זני גזר שונים לפסילה.

ידוע לנו שיכולות להיות אפשרויות שונות להבדלים במידת המשיכה והרגישות של זני גזר שונים לפסילות הנובעים מיצירת מגוון רחב של חומרים נדיפים ולא נדיפים. ([Nehlin et al., 1996](#); [Nissinen et al., 2005](#)) למשל Seljåsen וחבריו ([Seljåsen et al., 2013](#)) מצאו עליה ביצירת חומרים בגזר אחרי תקיפת פסילת הגזר ששייכים לטרפינים כולל מרכבים נדיפים ארומטים.

ישנם חומרים ארומטים רבים הידועים בספרות כחומרים הגורמים לדחייה או משיכה של חרקים. ([De Moraes et al., 2001](#); [Dudareva et al., 2004](#); [War et al., 2011](#); [McCormick et al., 2012](#); [Seljåsen et al., 2013](#)) נדיפים שונים (מונוטרפנים וססקוויטרפנים) הראו פעילות הגנה של צמחים כנגד חרקים צמחוניים. בטבק למשל מצאו כי חומרים השייכים לססקוויטרפנים α -humulene ו- E - β -caryophyllene, דחו את העש המזיק *Heliothis virescens*. ([De Moraes et al., 2001](#)) (E,E) - α -Farnesin הגן על צמחי

מלפפון *Cucumis sativus* מפני אקרית הקורים *Tetranychus urticae* (Mercke et al., 2004) (E)-6- Ocimene מ-*Lotus japonicas* שהגן על קיטנית מפני אקרית הקורים, (Arimura et al., 2004) ו- (E)-6- caryophyllene שהגן על התירס (*Zea mays*) מפני עש הלפיגמה *Spodoptera exigua* Hübner (Degen et al., 2004). ישנם גם חומרים ארומטיים נדיפים הגורמים לדחיה של חרקים מהצמחים כגון methylsalicylic acid שגרם לדחיית העש, *Mamestra brassicae* הגורם לנזק בכרוב, (De Boer and Dicke, 2004) אבל גם למשיכת אויביו הטבעיים כגון הארי נמל *Chrysopa nigricornis* (James, 2003). הנדיפים הללו יכולים להגן על הצמח כהגנה ישירה המופנית כנגד תוקפי הצמח, (Dicke and Loon, 2000) או בהגנה עקיפה בה הצמח מעודד אויבים טבעיים כנגד ההריביוורים הניזונים ממנו. (De Moraes et al., 2001; Vancanneyt et al., 2001)

לפיכך יעד המחקר- לזהות זני גזר העמידים לפסילה ולגורם מחלת הצהבון, כמקור עתידי לזנים חלופיים לזנים הרגילים וכמקור גנים לעמידות למחלה וגם כמקור לחומרי דחיה או קטילה טבעיים של פסילת הגזר. **מטרות המחקר הן:**

- ד. איפיון רגישות זני גזר שונים לפסילת הגזר
- ה. איפיון רגישות זני גזר שונים למחלת הצהבון
- ו. זיהוי חומרים טבעיים הגורמים לדחיה או קטילה של פסילת הגזר שמקורם, בזני גזר שונים.

עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

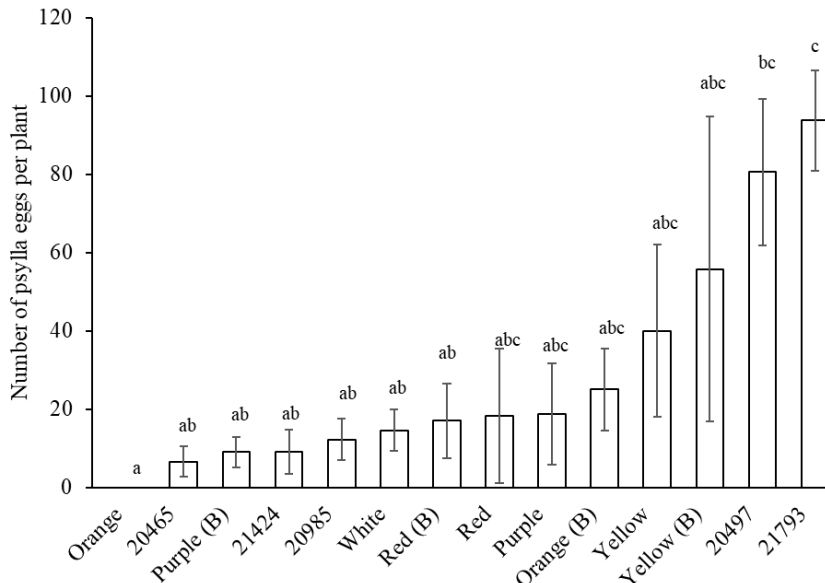
למימוש מטרה א' איפיון רגישות זני גזר שונים לפסילת הגזר זני גזר גודלו מזרעים במעבדה של ד"ר איבדאח 9 זני גזר צבעוניים ו- 5 מינים גזר בר: גזר מצוי (*Daucus bortei* Ten), גזר קיפח (*Daucus carota* L. Thell), גזר החוף, (*Daucus glaber* Forssk.) וגזר זהוב (*Daucus aureus* Desf). הגזרים גודלו בבית רשת (למניעת כניסת פסילות) בעציצים בנפח חצי ליטר בתערובת שתילה סטנדרטית (10 עציצים לכל זן). כדי לבדוק את ההבדלים בהעדפה של פסילת הגזר לזנים השונים בוצעו שני ניסויים: ניסוי בחירה וניסוי ללא בחירה.

בניסוי הבחירה שנערך בפברואר 2019 בבית הרשת בנווה יער הוכנסו פסילות לכלובי רשת בגודל 80X150 סמ"ר (איור 1). בכל כלוב הוצבו 14 עציצים שווי גודל של הזנים השונים (הצמחים נגזמו כך ששטח העלווה יהיה אחיד ככל הניתן) וסודרו באקראיות מלאה במבנה של 5 שורות. הניסוי נערך ב-5 חזרות כך שבכל כלוב היו צירופים שונים של מיקום הזנים השונים בכלוב. 60 פסילות (30 זוגות) ששהו במשך כ-3 ימים על גזרים נגועים במחלת הצהבון פוזרו בכל כלוב ב-3 מבחנות של 20 פסילות בכל אחת. המבחנות הונחו במרכז של כל שורה שניה להבטיח מרחק שווה מכל העציצים. הפסילות הושארו בכלובים למשך שבוע שאחריהם העציצים נלקחו למעבדה ובעזרת בינוקולאר נספרו כל הביצים שהוטלו על כל עציץ. ניתוח נתוני ההטלה נעשה בעזרת מבחן ANOVA חד כיווני, וההשוואה בין הטיפולים נערכה בעזרת מבחן Tukey HSD. ניתוח זה נעשה בעזרת תוכנת JMP13 SAS Inst.

מתוצאות ניסוי הבחירה נימצא כי יש הבדל מובהק בהעדפת ההטלה של פסילת הגזר בין הזנים השונים ($F_{13,56}=3.49$ p=0.0005) כאשר הזן המסחרי הכתום הנפוץ ביותר-orange (נירובי) נימצא כזן הכי פחות מועדף על הפסילה- לא היתה עליו כלל הטלה בעוד שזן הבר 21793 היה המועדף ביותר (איור 2).



איור 1- מערך הצבת ניסוי הבחירה של פסילות הגזר בין הזנים השונים.



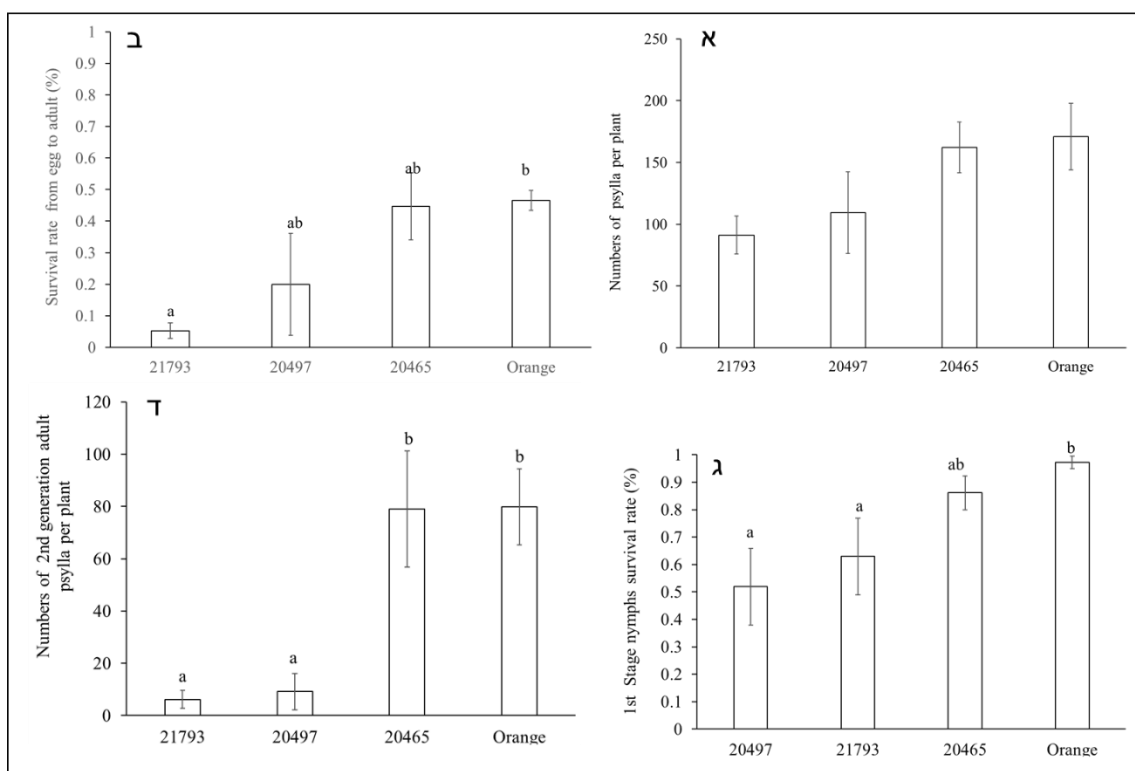
איור 2. מספר ביצי הפסילה הממוצע שהוטלו בכל זן בניסוי בחירה. (ממוצע ושגיאת תקן). עמודות עם אותיות שונות נבדלות זו מזו ברמת מובהקות $p < 0.05$ ע"פ מבחן Tukey HSD.

ניסוי העדפה ללא בחירה בעקבות תוצאות ניסוי הבחירה, בו נימצאו הבדלים כה גדולים בהעדפה ובידיעה שבד"כ בחרקים יש קשר ישיר בין העדפה לתיפקוד (preference- performance) (Gripenberg et al., 2010) המשכנו לניסוי העדפת הטלה ללא בחירה והתפתחות עם ארבעת זני הקצה- שני אלו שהפסילות העדיפו הכי פחות- הזן המסחרי נירובי (orange) וזן הבר 20465 ושני הזנים אותן הפסילות העדיפו הכי הרבה והטילו עליהם את רוב הביצים: זני הבר 20497 ו21793.

בניסוי זה (שהוצב ב14.3.19) חמישה עציצים מכל אחד מ-4 הזנים הללו נלקחו למעבדה ובכל שתיל נבחרו שני ענפים כאשר בחרנו בענפים שווי גודל בכל העציצים השונים. כל אחד מהענפים כוסה בכלוב עלים העשוי רשת אורגנזה באורך 35 ס"מ ולתוכו הוכנסו 2 נקבות וזכר שהתקבלו מגידול המעבדה של אופיר בהר אחרי שניזונו על צמחים נגועים בצהובון. כעבור שבוע כל הכלובים נפתחו, הבוגרים הוצאו ונספרו מספר הביצים שהוטלו בכל ענף ולאחר מכן הכלובים נקשרו מחדש ואחת לשבוע נספרו כל שבוע מספר הנימפות שהגידו ודרגתן. הספירה נמשכה עד שמכל הנימפות ששרדו הגידו הבוגרים או שהן מתו (16.5.19). בסוף ניסוי זה השוונו את מספר הביצים שהוטלו בכל צמח ולאחר מכן את שיעור הבקיעה, קצב ההתפתחות, שיעור ההישרדות ומספר הבוגרים שהגידו מכל שתיל.

ניתוח נתוני ההטלה ואחוז ההישרדות נעשה בעזרת מבחן ANOVA חד כיווני וההשוואה בין הטיפולים נערכה בעזרת מבחן Tukey HSD. במיקרה של אחוז ההישרדות הנתונים עברו טרנספורמציה Arcsin לשם התאמתם לדרישות המבחן. ניתוח זה נעשה בעזרת תוכנת JMP13 SAS Inst.

מתוצאות הניסוי עולה שלא נמצאו הבדלים מובהקים בשיעור ההטלה של הפסילות בזנים השונים (איור 3 א'). למרות שבזן 21793 הוטלו כמחצית ממספר הביצים אשר הוטלו בזן המסחרי הכתום (איור 3 א'). לעומת זאת כאשר נבחן שיעור ההישרדות מביצה עד בוגר נימצא הבדל מובהק בין הטיפולים $F_{3,16}=4.37$ $p=0.019$, כאשר שיעור ההישרדות הגבוה ביותר נימצא בזן המסחרי הכתום בו כ-50% מהביצים בקעו והתפתחו והגיעו לדרגת בוגר ושיעור ההישרדות הנמוך ביותר בזן 21793 בו שיעור ההישרדות עמד על פחות מ-1% (איור 3 ב'). בניסיון להבין היכן מתרחשת עיקר התמותה מצאנו הבדלים מובהקים בין הזנים בשיעור הבקיעה וההישרדות בדרגה ראשונה- כלומר היחס בין מספר הביצים למספר הנימפות מדרגה ראשונה ושניה על כל צמח בו נימצא הבדל מובהק $F_{3,16}=5.68$ $p=0.0076$ בין הזנים (איור 3 ג'). לעומת זאת בבחינת הישרדות הנימפות במעבר מהדרגות הצעירות לבוגרות לא נימצא הבדל מובהק בין הזנים (איור 3 ד') $F_{3,16}=2.58$ $p=0.086$ כלומר בזן 21793 יש כנראה חומר הפוגע בהישרדות הנימפות הצעירות. הבדלים אלו בהישרדות הנימפות הצעירות הובילו להבדלים מובהקים במספר הפסילות הבוגרות (דור 2) שהגידו בכל צמח $F_{3,16}=8.93$ $p=0.001$ כאשר שוב בזן המסחרי הכתום הגידו הכי הרבה בוגרים ובזן 21793 הכי מעט



איור 3- הטלה הישרדות והתפתחות הפסילות על 4 זני גזר בניסוי ללא בחירה. א. מספר ביצי הפסילה הממוצע שהוטלו בכל זן. ב. שיעור הישרדות הפסילות מביצה ועד בוגר ג. שיעור הישרדות הנימפות בדרגה ראשונה ד. מספר הבוגרים מדור שני שהגיעו בכל צמח (ממוצע ושגיאת תקן). עמודות עם אותיות שונות נבדלות זו מזו ברמת מובהקות $p < 0.05$ ע"פ מבחן Tukey HSD.

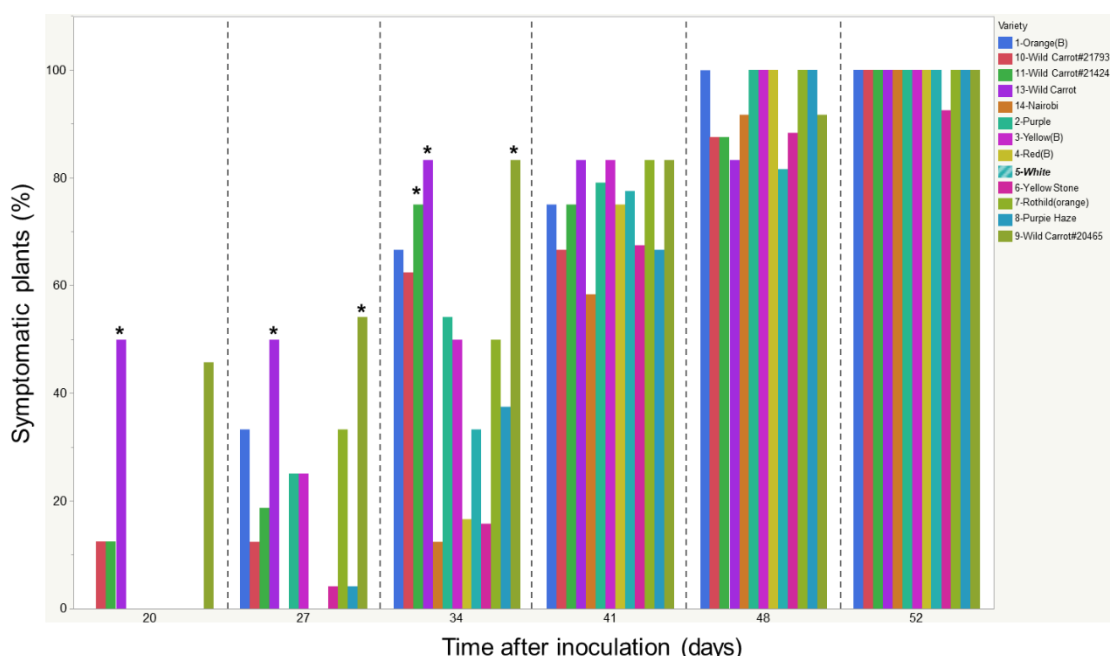
תוצאות אלו מפתיעות בהשוואה לניסוי הבחירה מכיוון שעולה שדווקא שני הזנים המועדפים ע"י הפסילות 21793 ו-20497 הם אלו שהישרדות הפסילות עליהם היא הנמוכה יותר. יתכן שתוצאות אלו שמצביעות על אפשרות להשתמש בצמחים אלו כצמחי מלכודת שהפסילות תעדפנה אותם ע"פ הזן המסחרי אך ההישרדות שלהם עליהן תהיה הנמוכה ביותר כאשר אולי עלינו על צמחים שהם מהסוג של dead end trap crop (Shelton and Nault, 2004).

מטרה ב': איפיון רגישות זני גזר שונים למחלת הצהבון

בניסוי זה נבחנה תגובתם של זני הגזר השונים בהשוואה לזן מסחרי מקובל (ניירובי) לאילוח בחיידק *Candidatus Liberibacter solanacearum* (ליבריקטר), המועבר על ידי פסילת הגזר (*Bactericera trigonica*).

לשם כך, נזרעו זני הגזר השונים המפורטים במטרה א' והזן המסחרי ניירובי (4 צמחים בעציץ, 6 עציצים לכל זן) וגודלו בתא מבוקר טמפרטורה (22°C) עד לשלב בו ישנם 4-5 עלים אמיתיים (6-8 שבועות). בשלב זה, הוכנסו העציצים עם הזנים השונים לתוך שישה כלובים, כאשר בכל כלוב ייצוג של כל זן, ומיקום הזן בכלוב נקבע באקראי. אל הכלובים הוכנסו כ-400 פסילות אשר גודלו קודם לכן על צמחי גזר נגועים בליבריקטר ולכן הינן נשאות של החיידק. ממועד הכנסת הפסילות, נערך מעקב על הופעת צמחים סימפטומטיים (תסמיני איבוד שלטון קודקודי, "מטאטא מכשפה") בכל הכלובים החל מ-20 יום לאחר הכנסת הפסילות וכל 7 ימים מנקודת זמן זו ועד להופעת 100% נגיעות בזן המסחרי (52 ימים לאחר הכנסת הפסילות).

בכל הזנים הנבדקים נראו תסמיני איבוד שלטון קודקודי כ-34 יום לאחר החשיפה לפסילות (איור מס' 4). בנקודות הזמן המוקדמות (20 עד 34 יום לאחר אילוח) נצפתה דיפרנציאליות בתגובת הזנים לגורם המחלה, אם כי, לא נמצא זן שהראה פחות תסמיניים באופן מובהק מהזן המסחרי (Dunnett's method, compared with control $p < 0.05$) (איור מס' 5). במועד הערכת התסמינים האחרון, שנערך 52 יום לאחר הכנסת הפסילות, כלל הזנים הראו 100% נגיעות (להוציא זן אחד, 3-yellows, שהיה עם 75% נגיעות).



איור מס' 4: צמחי גזר סימפטומטיים עם תסמיני איבוד שלטון קודקודי. צמחי גזר מזנים שונים אולחו בפסילות נגועות בלבריקטר ולאחר מכן נערך מעקב אחר הופעת תסמיני מחלה. באיור מובאים שלושה זנים לדוגמא, כולל הזן המסחרי ניירובי (נגוע ובריא לשם השוואה), המראים את תסמיני המחלה האופייניים (חץ אדום) המתבטאים בפריצות צדדיות של עלים רבים מבסיס השורש. התמונות צולמו ביום חיסול הניסוי, 52 ימים לאחר האילוח בפסילות.



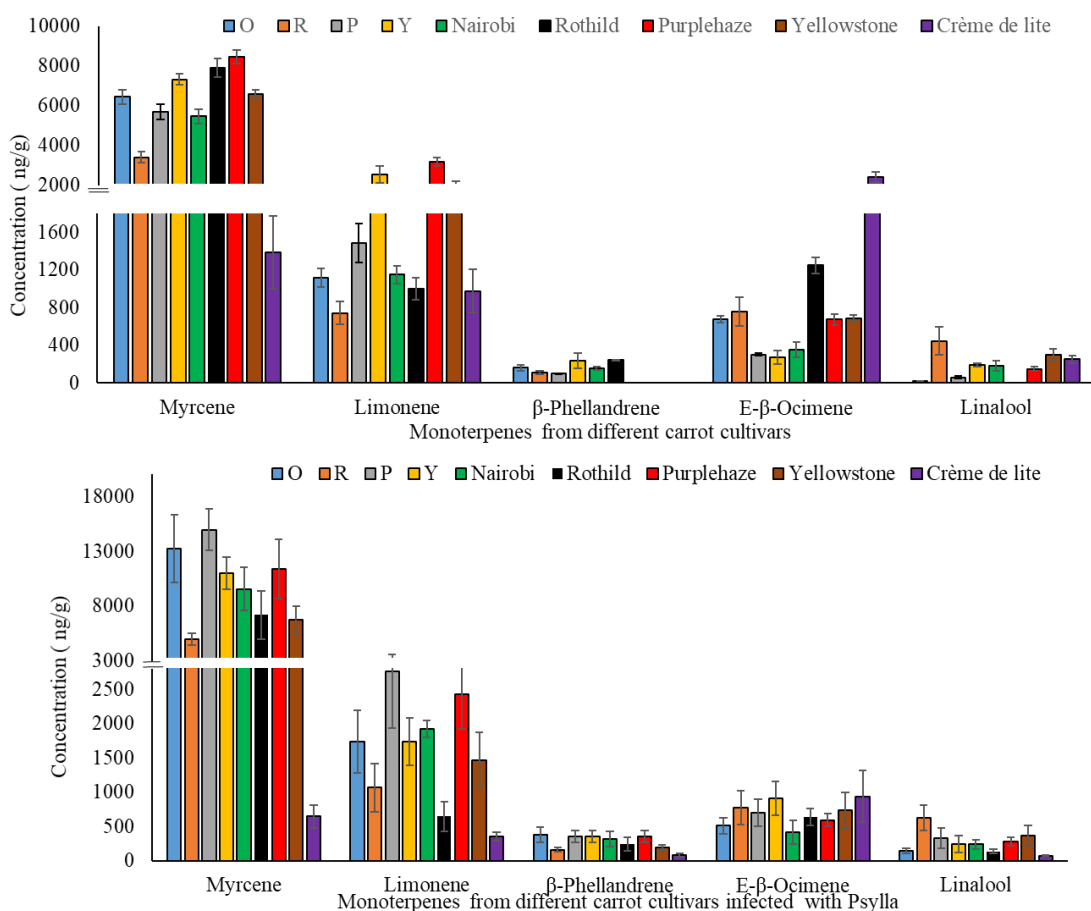
איור מס' 5: אחוז צמחי הגזר הסימפטומטיים לאורך זמן בניסוי זנים. צמחי גזר מזנים שונים אולחו בפסילות נגועות בלבריקטר ולאחר מכן נערך מעקב אחר הופעת תסמיני מחלה לאורך זמן. המעקב התבצע החל מ- 20 לאחר הכנסת הפסילות אחת לשבוע עד למועד בו נראו 100% נגיעות בזן המסחרי, ניירובי. כוכביות מסמנת מובהקות סטטיסטית בהשוואה לזן הביקורת ניירובי (Nairobi) על פי Dunnett's test ($p < 0.05$).

לסיכום, בניסוי זה נראתה דיפרנציאליות בתגובת הזנים לגורם המחלה, יחד עם זאת, לא נמצא זן בו נראתה הפחתה משמעותית של תסמיני מחלה לעומת הזן המסחרי. היות שבניסוי זה כלל הזנים חלקו את אותו הכלוב, ולפסילות ניתנה ההזדמנות להמשיך ולהתרבות בתוך הכלוב, יתכן כי סבילותם של זנים מסויימים לא נחשפה בעקבות שגשוג הפסילות על זנים אחרים שהיו באותו הכלוב. אפשרות זו נתמכת גם על ידי התוצאות שהושגו במטרה א', שם נמצא כי ישנם זנים בהם אחוז המעבר מביצה לפסילה היה נמוך ביותר. בהמשך התכנית, בכוונתנו לחזור על ניסוי זה פעם אחת נוספת בחודשי החורף (הניסוי החל בחודש נובמבר ועתיד להסתיים בחודש מרץ 2020). כמו כן, בשנה ב' של התכנית יתבצע ניסוי עם זנים נבחרים, בו הזנים יאולחו בנפרד אחד מהשני ותבדק האינטראקציה הישירה של כל זן עם גורם המחלה.

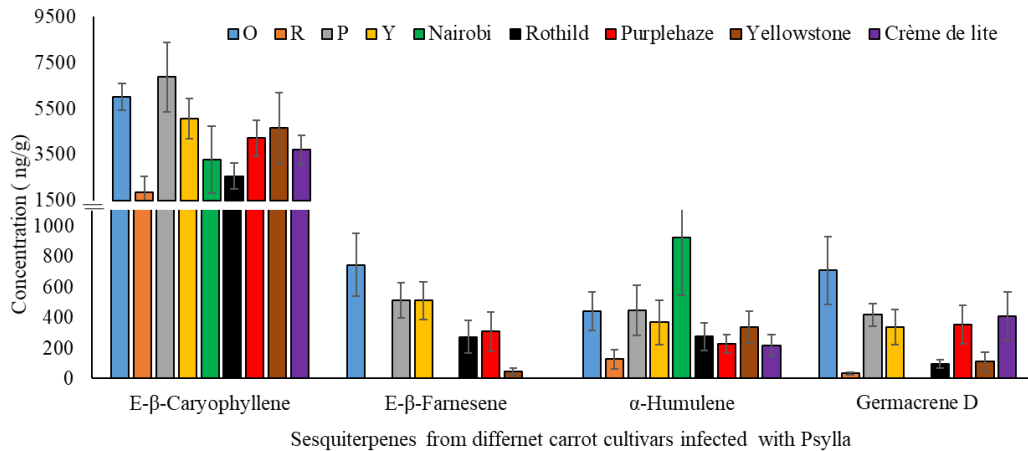
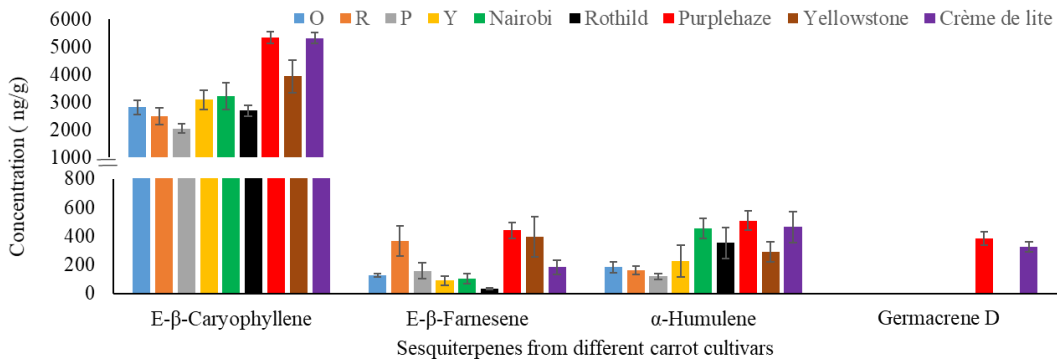
למימוש מטרה ג' - מיצוי וזיהוי נדיפים מזנים שונים של גזר

כדי לזהות את מגוון הנדיפים בזני הגזר השונים ולבחון את תגובת הצמחים לפסילות יצרנו פרופילים מטבולומיים מפורטים לחומרים נדיפים מהעלים של כל הזנים כאשר הם היו נקיים מפסילות וגם כאשר הם מאולחים בפסילות (infested and non-infested with psylla) תוך שימוש בשיטת ה-SPME-GC-MS (איורים 6-13). עלים (בחמש חזרות ביולוגיות), נטחנו והוכנסו לתוך מיכל אטום עם פקק שכולל אטם סליקון הכולל 1g NaCl ו-7ml 20% NaCl, עם תוסף כמות ידועה של 2-hepatone 1mg/kg כסטנדרט. מחט ה-SPME נחדרה דרך האטם. המיכל הוחזק ב-50°C לעידוד הנידוף, למשך 30 דקות. מחט ה-SPME נשלפה ותכולת הנדיפים נבדקה על מכשיר ה-GC-MS (Agilent) Technologies, CA, USA. מכשיר ה-GC-MS מצויד בקולונה קפילרית מסוג RtX-5SIL 30m x 0.25 mm x 0.25µm. זיהוי הנדיפים העיקריים נעשה ע"י השוואת ספקטרום מסות וזמן יציאה מהקולונה (Retention Index) לאלו של דוגמאות ידועות ודוגמאות מספריית wiley10 Nest14 של מכשיר ה-GC-MS. הניתוח נערך בתוכנת Chemstation ולאחר מכן בוצע וידוא של כל חומר וכימותו בצמח.

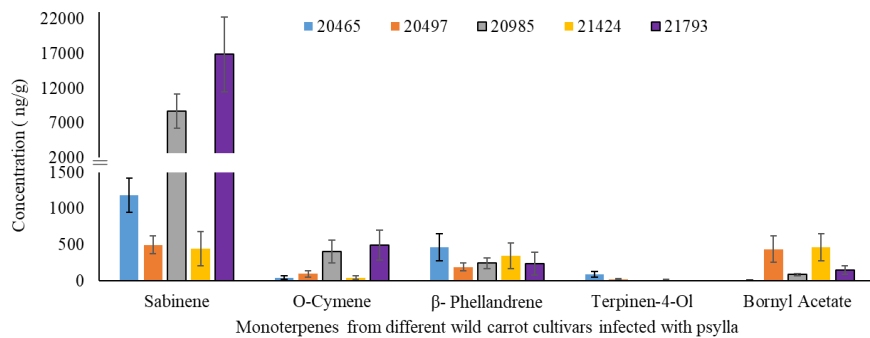
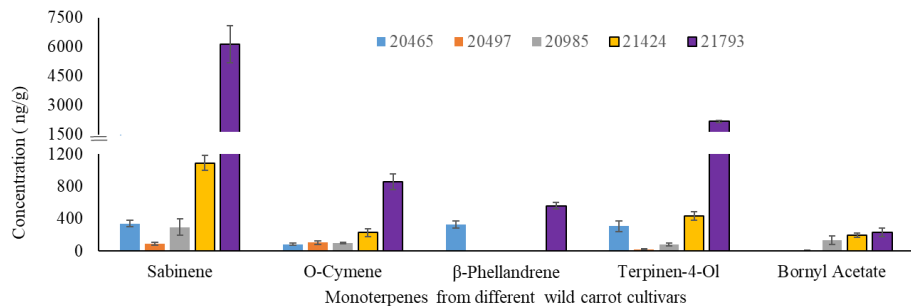
מניתוח תוצאות הנדיפים, נמצאו מעל 150 חומרים נדיפים השייכים למונו-טרפנים וסקווי-טרפנים, ולמרכיבים נדיפים ארומטיים ולחומצות שומן ונגזרותיהם. מתוך כל החומרים שהתקבלו נבחרו הנדיפים בעלי אחוז השכיחות הגדול ביותר יחסית (איורים 6-13).



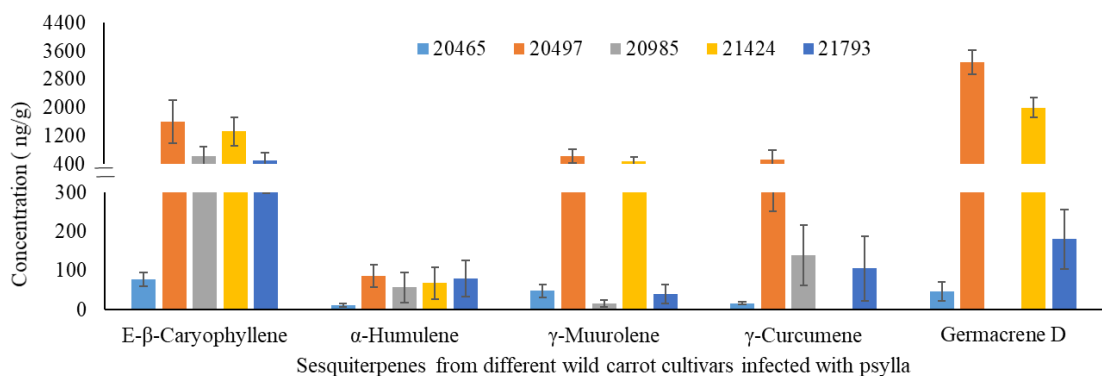
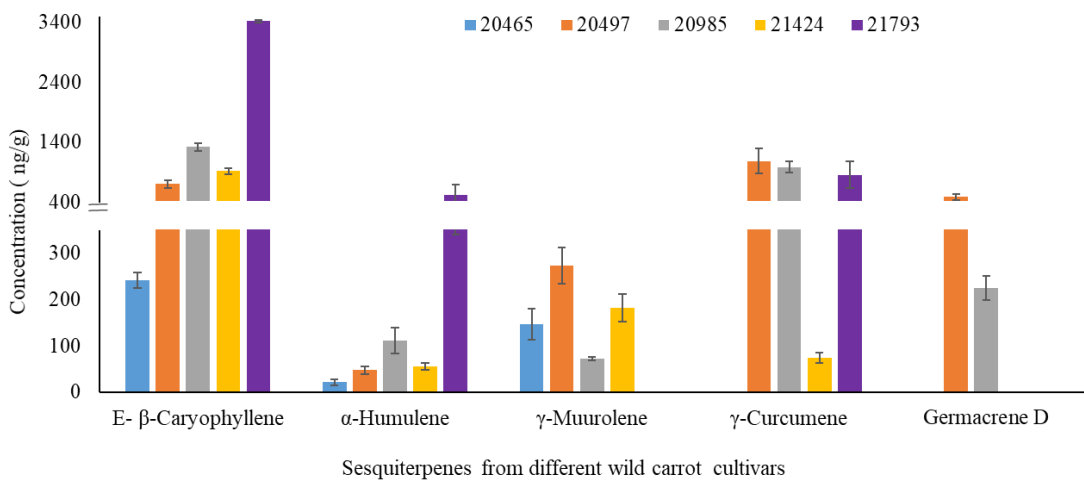
איור 6: ריכוז המונוטרפנים בעלים של גזרים צבעונים לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר בעלי אחוז השכיחות הגדול ביותר יחסית.



איור 7: ריכוז הסיסכורפנים בעלים של גזרים צבעונים לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר בעלי אחוז השכיחות הגדול ביותר יחסית.

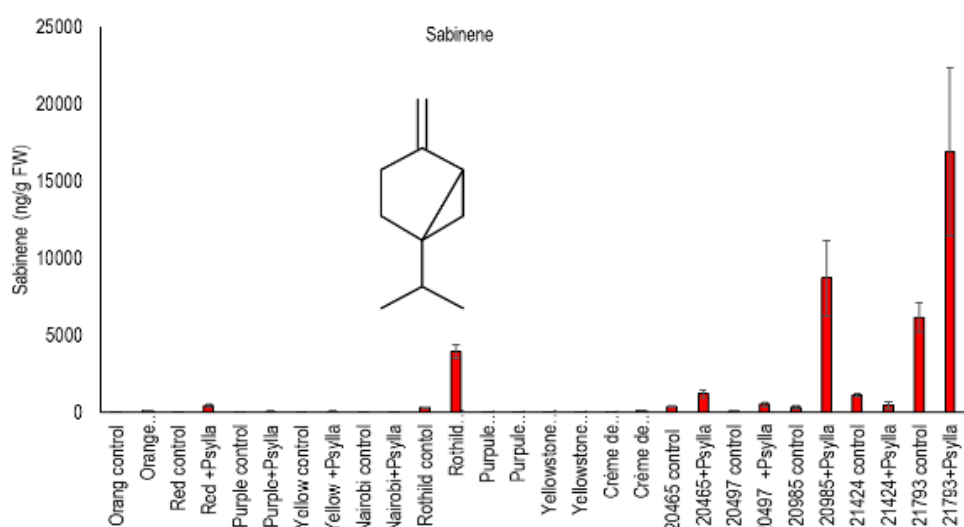


איור 8: ריכוז המונוטרפנים בעלים של גזר בר לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר בעלי אחוז השכיחות הגדול ביותר יחסית.

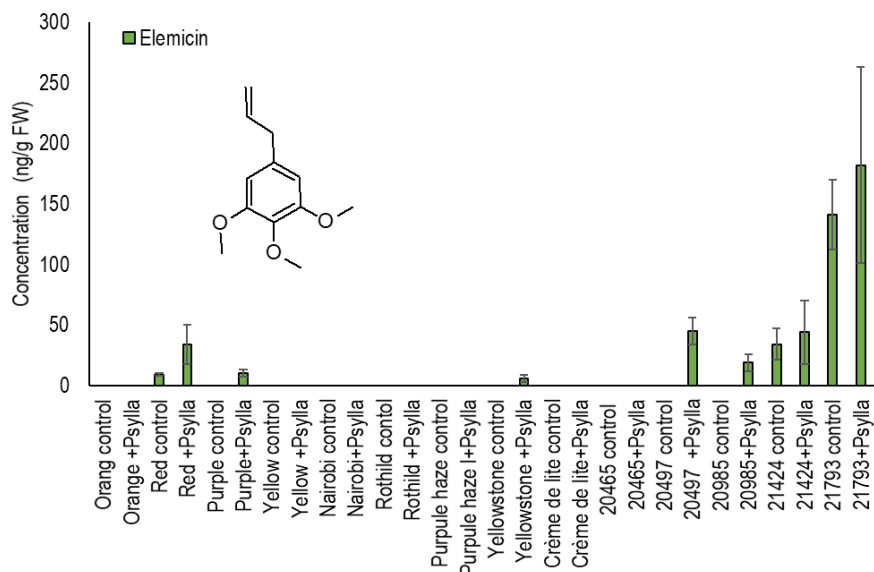


איור 9: ריכוז הסיסכורפנים בעלים של גזרים צבעונים לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר בעלי אחוז השכיחות הגדול ביותר יחסית.

מתוכם זיהינו המונוטרפן sabinene וה elemicin phenylpropanoid שקיימים או שרמתם עולה ביותר אחרי אילוח הצמח עם פסילת הגזר בעלים של גזר בר "21793" (איור 10-11), אותו הזן שפסילת הגזר הראתה אליו העדפה בניסוי בחירה (איור 2) ומצד שני הישרדותה עליו היתה הנמוכה ביותר (איור 3), שהן חומרי דחיה או קטילה פוטנציאלים.

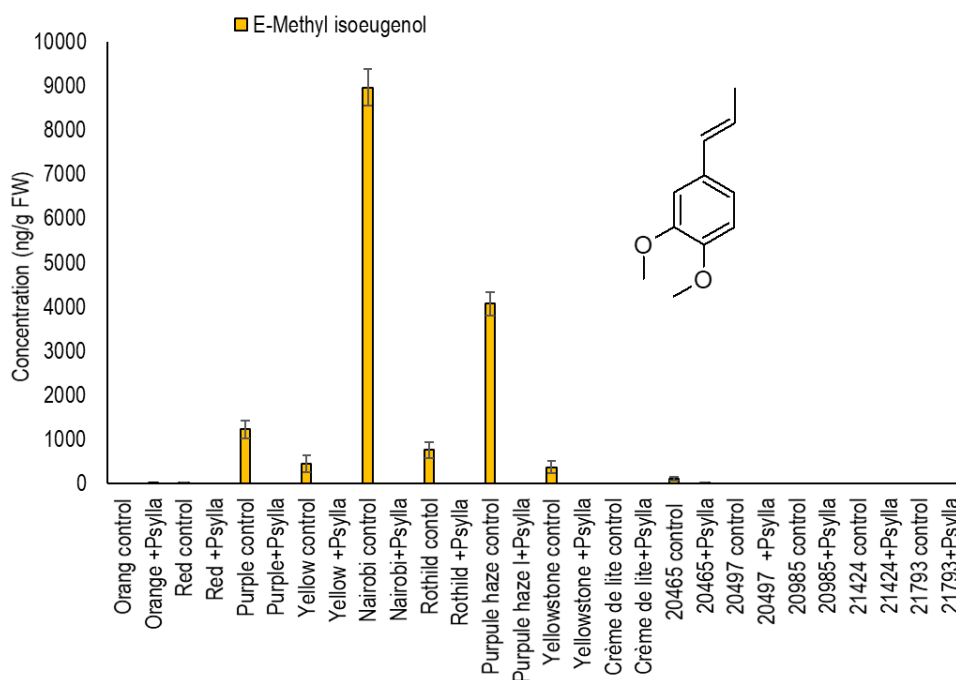


איור 10: ריכוז המונוטרפן sabinene בעלים של זני גזר צבעונים שונים וזני גזר בר לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר



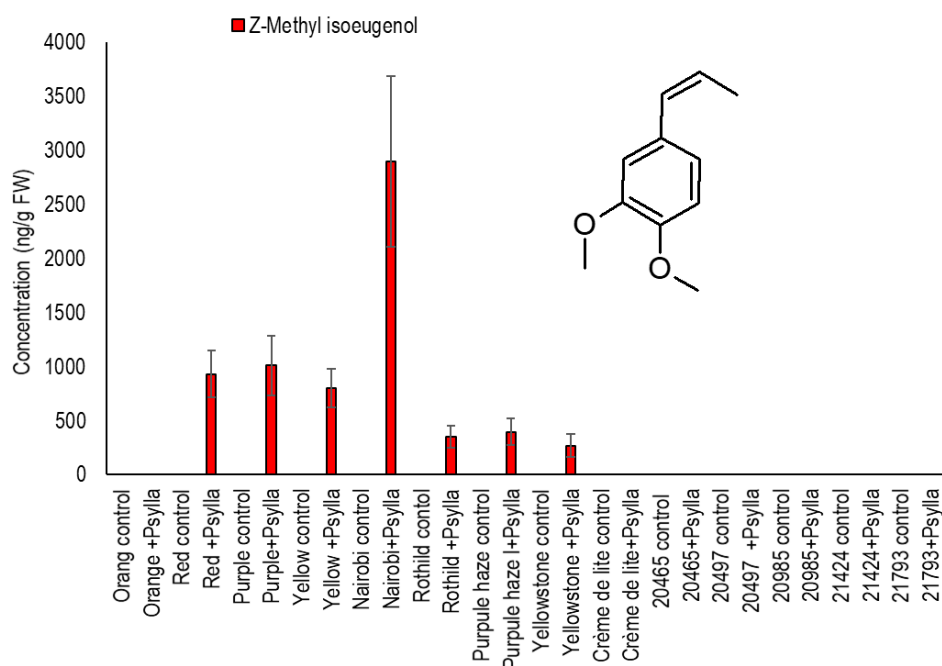
איור 11: ריכוז elemicin בעלים של זני גזר צבעוניים שונים וגזר בר לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר

לדוגמא נימצא שהפניל-פרופנואידים E-methyl isoeugenol קיים בעלים של חלק מזני הגזר (ללא נוכחות פסילה) אותם זנים שפסילת הגזר הראתה העדפה אליהם – כלומר זהו חומר משיכה פוטנציאלי (איור 12).



איור 12: ריכוז E-methyl isoeugenol בעלים של זני גזר צבעוניים שונים וגזר בר לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר

לעומת זאת נימצא שהפנילפרופנואיד Z-methyl isoeugenol קיים בעלים של חלק מזני גזר עם פסילה ואינו מופיע בעלים של הזנים האחרים, אותם זנים שפסילת הגזר הראתה אי העדפה אליהם – כלומר אילו חומרי דחיה פוטנציאליים (איור 13).



איור 13: ריכוז *Z-methyl isoeugenol* בעלים של זני גזר צבעוניים שונים וגזר בר לפני ואחרי האילוח עם פסילת הגזר

דיון

מטרת עבודה זו היא לזהות זני גזר העמידים לפסילה ולגורם מחלת הצהבון, כמקור עתידי לזנים חלופיים לזנים הרגילים וכמקור גנים לעמידות למחלה וגם כמקור לחומרי דחיה או קטילה טבעיים של פסילת הגזר במהלך העבודה מצאנו כי יש הבדל מובהק בהעדפת ההטלה של פסילת הגזר בין הזנים כאשר הזן המסחרי הכתום הנפוץ ביותר- נירובי נימצא כזן הכי פחות מועדף על הפסילה- לא היתה עליו כלל הטלה בעוד שזן הבר 21793 היה המועדף ביותר. כאשר נבחן שיעור ההישרדות מביצה עד בוגר נימצא הבדל מובהק בין הטיפולים, כאשר שיעור ההישרדות הגבוה ביותר נימצא בזן המסחרי הכתום בו כ-50% מהביצים בקעו והתפתחו והגיעו לדרגת בוגר ושיעור ההישרדות הנמוך ביותר בזן 21793 בו שיעור ההישרדות עמד על פחות מ-1% בנסיון להבין היכן מתרחשת עיקר התמותה מצאנו הבדלים מובהקים בין הזנים בשיעור הבקיעה וההישרדות בדרגה ראשונה, לעומת זאת בבחינת הישרדות הנימפות במעבר מהדרגות הצעירות לבוגרות לא נימצא הבדל מובהק בין הזנים כלומר בזן 21793 יש כנראה חומר הפוגע בהישרדות הנימפות הצעירות. תוצאות אלו מפתיעות בהשוואה לניסוי הבחירה מכיוון שעולה שדווקא שני הזנים המועדפים ע"י הפסילות 21793 ו-20497 הם אלו שההישרדות הפסילות עליהם היא הנמוכה יותר. יתכן שתוצאות אלו שמצביעות על אפשרות להשתמש בצמחים אלו כצמחי מלכודת שהפסילות תעדפנה אותם ע"פ הזן המסחרי אך ההישרדות שלהם עליהן תהיה הנמוכה ביותר כאשר אולי עלינו על צמחים שהם מהסוג של dead end trap crop (Shelton and Nault, 2004).

בנוסף עבודה זו דנה בזיהוי הגורמים הכימיים להבדלים ברמת ההעדפה וההישרדות של פסילת הגזר בזני הגזר השונים. לשם כך, בדקנו בעזרת מכשיר ה-GC-MS את מהות המרכיבים הנדיפים בעלים עבור 9 זני גזר צבעוניים ו-5 מינים גזר בר. נמצאו שינויים בריכוזי החומרים הנדיפים שכוללים מונוטרפנים, ססקוטרפנים ופניפנואידים (phenylpropanoid) ועוד תרכובות אחרות בעלי הגזר לאחר הדגרה עם וללא פסילת הגזר. כך שהתקבלו חומרים שריכוזם עלה בדוגמה המטופלת וחומרים שריכוזם ירד, בנוסף לחומרים שהתבטאו בדוגמה המטופלת ולא התבטאו בביקורת, וחומרים אחרים שלא התבטאו בכלל בדוגמה המטופלת עם פסילה אך התבטאו בדוגמת הביקורת.

החומרים הנדיפים בצמחים נחשבים למטאבוליטים שניוניים במגנזון ההגנה הישירה אשר מאפשרת לצמח להתמודד עם התוקף ע"י דחייתו ו/או פגיעה בתפקודו או ע"י משיכת אויב טבעי למזיק. מתוצאות ה-GC-MS מצאנו לאחר הדגרה עם פסילת הגזר חומרים השייכים מונוטרפנים, ססקוטרפנים ו-phenylpropanoid הראו עליה בעלים של זנים שמשכו ביותר את פסילת הגזר.

כך חומרים השייכים למונו- ולססקוויטרפנים, כגון myrcen ו- β -caryophellene הראו עליה בעלים של הגזר הכתום המסחרי לאחר הדגרה עם פסילת הגזר (איור 6 ו 7) . לעומת זאת β -caryophellene הראה ירידה בעלים בזן הבר 21793 לאחר הדגרה עם פסילה (איור 9). בנוסף, הססקוויטרפן geramgren D הראה עליה בעלים של רוב הגזרים לאחר הדגרה עם פסילה (איור 9-7).

יתר על כן, מצאנו שמרכיבים הנדיפים השכיחים ביותר היו elemicin ו-sabinene שנמצאו בזן הגזר הבר 21793 לאחר הדגרה עם פסילת הגזר (איור 10 ו 11). מכאן אנו מסיקים שייתכן וה- elemicin ו-sabinene אינן מקנים עמידות לזני גזר אלא יש להן אפקט הפוך והן גורמים לרגישות הזן על ידי כך שהן מושכות את פסילת הגזר ויכולים אולי להוות מושך במלכודות לכידה.

בנוסף לזה, כאן אנו מסיקים שייתכן ששינויים אלו נגרמים כתוצאה מתקיפת הפסילה ואולי מהדבקת הצמח בחיידקי ה- *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLS), דבר הגורם לצמח להגיב לפגיעת הפסילה ע"י הגברה בייצור חלק מהחומרים הנדיפים כאמצעי הגנה לדחיית הפסילה או משיכה של אויבים טבעיים שתוקפים את הפסילה. או ייתכן שברגע שהפסילה מעבירה את החיידק לעלים, החיידק מדביק את כל הצמח וגורם לחסימת תהליכים מטבוליים חשובים לייצור חומרים נדיפים מסוימים כמו החומרים שלא התבטאו בדוגמה המטופלת.

המסקנות שאנו מסיקים אינן חד משמעיות ולכן יש צורך לאמת אותן בהמשך המחקר ע"י ביצוע ניסוי ביולוגי במכשיר האולפקטומטר לבדיקת ההשפעה של אותם נדיפים על התנהגות פסילת הגזר ובכך נוכל לקבוע האם החומרים האלה המיוצרים בגזר גורמים לדחייה או למשיכה של פסילת הגזר או שהם בכלל לא משפיעים עליה. בנוסף לזה יש צורך בדיקת נוכחות חיידקי ה- CLS בעלי הגזר והשפעתם על משיכת הפסילה. אנו נמשיך לבדוק נקודות אלו ע"פ תוכנית המחקר.

רשימת ספרות מצוטטת

- Arimura, G.-i., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J., Bohlmann, J., 2004. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)- β -ocimene and transcript accumulation of (E)- β -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. Plant Physiology 135, 1976-1983.
- De Boer, J. G., Dicke, M., 2004. Experience with methyl salicylate affects behavioural responses of a predatory mite to blends of herbivore-induced plant volatiles. Entomologia Experimentalis et Applicata 110, 181-189.
- De Moraes, C. M., Mescher, M. C., Tumlinson, J. H., 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. Nature 410, 577-580.
- Degen, T., Dillmann, C., Marion-Poll, F., Turlings, T. C., 2004. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. Plant physiology 135, 1928-1938.
- Dicke, M., Loon, J. J., 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. Entomologia experimentalis et applicata 97, 237-249.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J., 2004. Biochemistry of plant volatiles. Plant physiology 135, 1893-1902.
- Gera, A., Maslennin, L., Weintraub, P. G., Mawassi, M., 2011. Phytoplasma and spiroplasma diseases in open-field crops in Israel. Bulletin of Insectology 64.
- Gripenberg, S., Mayhew, P. J., Parnell, M., Roslin, T., 2010. A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. Ecology letters 13, 383-393.
- James, D. G., 2003. Field evaluation of herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects: methyl salicylate and the green lacewing, *Chrysopa nigricornis*. Journal of chemical ecology 29, 1601-1609.
- McCormick, A. C., Unsicker, S. B., Gershenzon, J., 2012. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. Trends in plant science 17, 303-310.

- Mercke, P., Kappers, I. F., Verstappen, F. W., Vorst, O., Dicke, M., Bouwmeester, H. J., 2004. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiology* 135, 2012-2024.
- Nehlin, G., Valterová, I., Borg-Karlson, A. K., 1996. Monoterpenes released from Apiaceae and the egg-laying preferences of the carrot psyllid, *Trioza apicalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80, 83-86.
- Nissinen, A., Ibrahim, M., Kainulainen, P., Tiilikkala, K., Holopainen, J. K., 2005. Influence of carrot psyllid (*Trioza apicalis*) feeding or exogenous limonene or methyl jasmonate treatment on composition of carrot (*Daucus carota*) leaf essential oil and headspace volatiles. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 8631-8638.
- Nissinen, A., Lemmetty, A., Pihlava, J. M., Jauhiainen, L., Munyaneza, J., Vanhala, P., 2012. Effects of carrot psyllid (*Trioza apicalis*) feeding on carrot yield and content of sugars and phenolic compounds. *Annals of Applied Biology* 161, 68-80.
- Pree, D., Archibald, D., Ker, K., Cole, K., 1990. Occurrence of pyrethroid resistance in pear psylla (Homoptera: Psyllidae) populations from southern Ontario. *Journal of economic entomology* 83, 2159-2163.
- Seljåsen, R., Vogt, G., Olsen, E., Lea, P., Høgetveit, L. A., Tajet, T., Meadow, R., Bengtsson, G. B., 2013. Influence of field attack by carrot psyllid (*Trioza apicalis* Forster) on sensory quality, antioxidant capacity and content of terpenes, falcarindiol and 6-methoxymellein of carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 2831-2838.
- Shelton, A., Nault, B., 2004. Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection* 23, 497-503.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castañera, P., Sánchez-Serrano, J. J., 2001. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the national academy of sciences* 98, 8139-8144.
- War, A. R., Sharma, H. C., Paulraj, M. G., War, M. Y., Ignacimuthu, S., 2011. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant signaling & behavior* 6, 1973-1978.