

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה)

דו"ח לתכנית מחקר מספר 21-02-0017

שנת המחקר: 1 מתוך 3 שנים

## הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין

Defining the potential damage inflicted by the "green leafhopper" complex as a core protocol in vineyards

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולמועצת גפן היין

ע"י

רקפת שרון, מיגל- מו"פ צפון

מאור תומר, מיגל- מו"פ צפון

תרצה זהבי, שה"מ, משרד החקלאות

עומר קראין, מיגל- מו"פ צפון

Rakefet Sharon, Northern Research & Development, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016. E-mail: [rakefetsh@gmail.com](mailto:rakefetsh@gmail.com)

Maor Tomer, Northern Research & Development, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016. E-mail: [maortomer11@gmail.com](mailto:maortomer11@gmail.com)

Tirtza zahavi, Extension Service, Ministry of Agriculture, P.O.B. 6. E-mail: [tirtzaz@yahoo.com](mailto:tirtzaz@yahoo.com)

Omer Crane, Northern Research & Development, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016. E-mail: [omerc@migal.org.il](mailto:omerc@migal.org.il)

### תקציר

רקע ותיאור הבעיה- בישראל נפוצים מינים שונים של ציקדות (Homoptera:Cicadellidae) הנקראים בשם כללי "ציקדה ירוקה" ומהווים קומפלקס של אוכלוסיות מתת המשפחה Typhlocybiniae. כולם רב פונדקאים ובארץ גורמים לנזק בכרמים וגידולים רבים נוספים. בשטח קיים קושי להבחין מורפולוגית בין מיני הציקדות המזיקות ולכן הציקדות מנוטרות כיום כקומפלקס ולא ברמת הסוג או המין. בכרמים בארץ הופך בשנים האחרונות קומפלקס הציקדות ממשני למרכזי- אוכלוסיות הציקדות הולכות וגדלות כשהן גורמות לנזק מתגבר. עד כה לא ניבחנו או כומת הקשר בין הנזק למין הציקדות. הטיפול בארץ נעשה עם הופעת ציקדות לאורך העונה מתוך הנחה כי: א. כל מין גורם לאותו נזק לעלווה ופוגע באיכות הפרי וב. קטילת ציקדות באוכלוסייה נמוכה תמנע התפתחות של אוכלוסייה גדולה יותר בהמשך העונה. מכאן יתכנו ריסוסים מיותרים ומוגבר הסיכון להתפתחות של עמידות לחומרי הדברה. מטרת המחקר היא הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול לטיפול בכרם.

שיטות העבודה בשנת המחקר הראשונה- ציקדות נאספו בשאיבה מקודקודי צימוח של גפנים והוצבו על שתילי מרלו וקברנה במעבדה ליצירת קווי גידול ואפיון צורת הנזק. במקביל פותחו פריימרים המתאימים לזיהוי מיני הציקדות העיקריים. לצורך קביעת הדינמיקה של כל מין בשטח, נשאבו ציקדות לאורך העונה בשלושה אזורים (מושבות השומרון, גליל וגולן) מהזנים מרלו וקברנה. לקביעת הנזק מהקומפלקס בשטח צולמו קודקודי הצימוח מהם נשאבו הציקדות.

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה) תוצאות משנת המחקר הראשונה- אופיין הנזק ממין אחד במעבדה ואנו ממשיכים בפיתוח גידול הקווים במעבדה. פותחו ואושררו מורפולוגית פריימרים המבחינים בין שלושת המינים העיקריים שנמצאו בכרמים. לאחר זיהוי מדגם מהציקדות נראה כי לכל מין מועד הופעה שונה. הדינמיקה של האוכלוסיות תלויה אזור וזן. הנזק בשטח נראה כתלוי הרכב הקומפלקס והזן. עיבוד התמונות הסופי נמשך ונעשה במקביל להגדרת מירב הציקדות בכל זן בכל אזור.

מסקנות משנת המחקר הראשונה- בפעם הראשונה פותחו כלים מולקולארים להבחנה בין שלושה מיני ציקדות המאפשרים זיהוי המין לא רק על פי אברי המין הזכריים אלא גם זיהוי נקבות ונימפות. קיימים הבדלים בדינמיקה בזמן של המינים והבדלים בקומפלקס המינים בין הכרמים מהאזורים השונים. בהתאם, כדי ליצר קווי גידול לשני המינים הנוספים ישונה מועד האיסוף בשטח. כמו כן על סמך ממצאי השנה הראשונה נשנה את מבנה הניסוי לקביעת פוטנציאל הנזק של הרכב המינים של הציקדות כיוון שהרכב המינים הדומיננטיים משתנה במהלך העונה והוא ישפיע גם על המדד של "ימי ציקדות" וגם על הממשק שיוצע בתום המחקר.

#### מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. דר' אלי הררי
2. דר' עינת צחורי-פיין
3. דר' מיכל סגולי

#### הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא ( מחק את המיותר )

חתימת החוקר תאריך: 

## גוף דו"ח המחקר

### רקע מדעי קצר ומטרות המחקר לתקופת הדו"ח

בישראל נפוצים מינים שונים של ציקדות (Homoptera:Cicadellidae) הנקראים בשם כללי "ציקדה ירוקה" ומהווים קומפלקס של אוכלוסיות מתת המשפחה Typhlocybae. בתת משפחה זו קיימים שלושה שבטים (Tribes): Empoascini, Erythroneurini, Typhlocybini. כולם רב פונדקאים (Poos and Wheeler, 1943; Lenz et al., 2009; Lentini et al., 2000; Serra et al., 2013) ובארץ גורמים לנזק בכרמים (זהבי 2005), וגידולים רבים נוספים. בשטח קיים קושי להבחין מורפולוגית בין מיני הציקדות המזיקות (Avidov, 1961; Papura et al., 2009) ולכן הציקדות מנוטרות כיום כקומפלקס ולא ברמת הסוג או המין.

בכרמים בארץ הופך בשנים האחרונות קומפלקס הציקדות ממשני למרכזי- אוכלוסיות הציקדות הולכות וגדלות כשהן גורמות לנזק מתגבר (דר' תרצה זהבי פרנטית להגנת הצומח בגפן, ערן הרכבי מנהל תחום פירות; שרון וחובריה 2013-15). גם באירופה יש דיווחים על עליה בתקופה האחרונה בנזקים מקומפלקס מזיקים זה לכרמים והעלייה בנזק מיוחסת בין השאר לשינויים האקלימיים (Reineke and Hauck, 2012). בישראל נראה כי העליה בגודל האוכלוסיות והנזק נובעת, מהמדיניות של הפחתת השימוש בחומרי הדברה מחד ומאיך משימוש אינטנסיבי באותם תכשירים שנתרו בשימוש שהוביל להקטנת הרגישות לחומרים (זהבי וחובריה, 2007; שרון וחובריה, 2013, 2014). הציקדות, בוגרות ונימפות, מוצצות את מוהל העלים, מפרישות רעלנים וגורמות לירידה משמעותית ביכולת ההטמעה של הפונדקאי. הנזק יכול להתבטא בעצירת צימוח (כולל קמילה, כלורוזה, עיוות העלה ונשירתו) ובירידה באיכות הפרי (כולל ירידה בצבירת הסוכר ונזק קוסמטי לפרי) (Candolfi, 1993).

בכרמים מתוארים מספר תסמינים בעלוות גפן הקשורים לנוכחות ציקדות. מעבר לסימפטומים הכלליים קיימים סימפטומים ספציפיים המופיעים בזנים שונים בנוכחות מיני ציקדות שונים (Bakus et al., 2005).

התקפלות של עלים לאחור, ככל הנראה בגלל הפרשה של רעלנים: צורת נזק זו נפוצה בישראל בעיקר בענבי מאכל – ובעיקר בזנים תומפסון וזייני. התקפלות העלים מלווה בהצהבה דיפוזית בין עורקי העלה ובמקרים קשים גם בעצירה של הצימוח. התקפלות עלים והצהבה כמו גם עצירת צימוח ואפילו ירידה במסת שורשים נמצאו במתאם עם רמת אוכלוסית ציקדות מהמין *Empoasca fabae* על עלים של גפן (Lenz et al., 2009). ציקדה זו עדיין לא זוהתה על ידינו בכרמים בארץ, אך צורת הנזק נראתה ונזק זה משמעותי במיוחד אם הוא מופיע בתחילת העונה, לפני שהגפן הגיעה למלוא גודל הנוף.

האדמה דיפוזית של היקף העלה לעתים תוך התקפלות עדינה של השוליים: בישראל צורת נזק זו אופיינית בעיקר בזן מרלו, אך באיטליה צורת נזק זו אינה משויכת לזן הגפן אלא לציקדה מהמין *J. lybica* (Lentini et al., 2000). מין זה זוהה על ידינו בכרמים ליין באזורים שונים.

נקודות לבנות על העלים – תמותת תאים שנוצרת כתוצאה מכך שהציקדות מוצצות את מוהל התא: הנזק הנפוץ ביותר בישראל. נזק זה אופייני במספר רב של זנים, אך בולט בעיקר בקברנה סובינון. באיטליה משויך נזק זה לציקדה מהמין *Z. rhamnii* שנמצאה על ידינו בענבי מאכל וענבי יין.

השפעת הרכב המינים בקומפלקס – יתכן שההסבר להבדלים בצורות הנזק לעלווה נעוץ בצורת ההזנה של כל מין ציקדות על פונדקאים שונים (Bakus et al., 2005). חוקרים אלו מצאו כי תנועת גפי-הפה האופיינית לכל אחד

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה) מהמינים בסוג *Empoasca* על פונדקאים שונים בשילוב עם מיקום הפרשת הרוק יוצרים תגובות שונות של הצמח. יתכן גם שציקדות ממינים שונים נמשכות בעוצמה שונה לזנים השונים וכך יוצרות את ההבדלים בתסמינים שמשויכים בארץ לזני הגפן. באיטליה, כאשר נבדק קומפלקס של שלושה מיני ציקדות, *E.vitis*, *J. lybica*, *Z. rhamnii* (שניים מהמינים נמצאים בארץ), נמצא כי כל מין גורם לצורת נזק אופיינית בעוצמה שונה לעלווה ולאיכות הפרי. כמו כן נמצא באותו קומפלקס, כי לכל מין דינמיקה שונה בין כרמים, באזורים שונים, במהלך העונה (תקשורת אישית- ספר שנמצא בהליך פרסומי Pavan et al., 1988; Lentini et al., 2000; Andrea Locci). נמצא גם כי ממשק הגידול משפיע בצורה שונה על מיני הציקדות השונים. כך, כאשר הושרתה עקת מים בגפנים רמת האוכלוסיה של ציקדות מהמין *J. lybica* ירדה ואילו ציקדות מהמין *Z. rhamnii* לא הושפעו (Serra et al., 2013).

עד כה לא יוחס הנזק למין הציקדות ולא כומת הנזק מהמין או מקומפלקס הציקדות הירוקות. הטיפול בארץ נעשה עם הופעת הציקדות לאורך העונה מתוך הנחה כי כל נזק לעלווה פוגע באיכות הפרי, ומכאן יתכנו ריסוסים מיותרים ומוגבר הסיכון להתפתחות של עמידות לחומרי הדברה. פערי הידע: א) בכרמים בארץ, לא ידוע אלו מינים נמצאים בכל אזור, האם יש רגישות שונה לזנים ולא ידועה הדינמיקה של כל אחד מהמינים במהלך העונה ולכן לא ניתן לשייך את צורת הנזק ועוצמתו לכל מין בנפרד. ב) ההדברה היום נעשית בלא הבחנה בין המינים ובהעדר מידע, יתכן ומטפלים ללא צורך כנגד מין ציקדות אשר גורם לנזק לא משמעותי ו/או נמנעים מטיפול כנגד מין ציקדות בעל פוטנציאל לנזק בעוצמה גבוהה. ג) טיפול כימי לא מבוקר, שאינו עושה הבחנה בין מיני הציקדות, עוצמת הנזק ופוטנציאל הנזק בזנים שונים, יכול להיות הגורם לירידה ברגישות הציקדות לחומרי הדברה.

### מטרות המחקר

- הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול לטיפול בכרם:
1. הגדרת מיני הציקדות בקומפלקס בזנים שונים של גפן יין (מרלו וקברנה), וקביעת מועד ההופעה של כל מין ציקדה בתלות בזן ובאזור.
  2. הגדרת התסמינים הנגרמים על ידי כל מין בנפרד בזנים שונים (מרלו וקברנה) ככלי לזיהוי מיני הציקדות בשטח.
  3. הגדרת פוטנציאל הנזק של כל מין בנפרד והקומפלקס (הרכב המינים) במועדים השונים במעבדה ובשטח כתשתית לפרוטוקול טיפול.

### מטרות המחקר לשנת המחקר הראשונה:

יצירת קווי גידול במעבדה, אפיון צורת הנזק ועוצמתו במעבדה, בנית כלים מולקולריים ככלי לזיהוי יעיל של המינים, הגדרת מיני הציקדות וקביעת מועד הופעתם בשטח.

\*בשנת המחקר השנייה ימשך הגידול (משימה 1) ותבצע חזרה בהתאם לצורך על משימות 2-4.

### פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר -

#### יצירת קווי גידול במעבדה

בשלב הראשון (סוף אפריל-תחילת יוני) הוצבו 30 עציצי מרלו + 10 עציצי קברנה בבית רשת- על כל עציץ הוצבו נקבה + זכר שנשאבו באחד משלושת האזורים (מושבות השומרון, גליל וגולן). כל העציץ כוסה בבד עם חלק עליון העשוי משקף. העציצים נבדקו כחודש לאחר הצבה. לא נמצאו ציקדות או נימפות על אף אחד מהעציצים כנראה

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה) כתוצאה מטמפרטורות גבוהות בתוך בית הרשת ולכן בשלב השני (יולי), כדי ליצור גידול מאסיבי של המינים השונים העציצים הוכנסו לחדר גידול מבוקר אקלים ( $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; RH ~60%; L:D 16:8). לארבעה עציצי מרלו הוכנסו ציקדות שנשאבו כל מספר ימים מגפנים מהזן מרלו והזן קברנה. על עציצים נוספים הוכנסו נקבה וזכר לשקיות רשת מבודדות בגודל  $24.5\times 30$  ס"מ שסגרו על שריגים בודדים. בכמה מיקרים הוכנסו מספר זכרים עם נקבה אחת כדי להגדיל את הסיכוי להזדווגות או נקבה ללא זכר אם לא נמצאו מספיק זכרים באותה שאיבה מתוך תקווה שהנקבה מזווגת כבר. ההרכב נקבע בהתאם לפרטים שנשאבו בשטח. סך הכל הוצבו 72 שקיות במהלך חודשיים ובהם 144 ציקדות. בתוך 24 שקיות נצפו לאחר כחודש בוגרות ונימפות. לשקיות בהן הנזק שנגרם לעציץ מהאוכלוסייה שהתפתחה גרם להתמוטטות השתיל, הוכנסו שריגים משתיל נוסף או ענפון מאותו עציץ עם עלים חיוניים. בסוף אוגוסט, מכל שקית בה התפתחה אוכלוסייה הועברו אל עציץ מרלו ועציץ קברנה כ-8 נימפות ו-5 בוגרות בתוך חדרי הגידול. כל עציץ הוצב בתוך כלוב של חברת Bugdorm (מקט BD4F2260). מדגם מכל שקית של ציקדות שהועברו לשתילים, הוגדר מורפולוגית, ולאחר סיום פיתוח הפריימרים למינים השונים, גם מולקולארית וכולם נמצאו כשייכים למין *Zyginia rhamni*. ככל הנראה מועד ההצבה השני בוצע בשלב בו מין זה הינו הדומיננטי בכרמים (ראה ממצאי מטרה 4). בשנת המחקר הבאה ההצבה תבוצע על פי הדינמיקה של האוכלוסיות כפי שנמצאה במטרה 4. העברה לעציץ אחר תעשה מרגע שהאוכלוסייה של הבוגרות תגיע ל-25 פרטים לעציץ כדי למנוע התמוטטות הצמח.

#### אפיון צורת הנזק ועוצמתו במעבדה

אפיון צורת הנזק נעשה על העציצים שהוכנסו לכלובים (סעיף 1 לעיל), שישה עציצים מהזן מרלו ושישה עציצי קברנה. שתילים מאותם זנים אך ללא ציקדות שימשו כביקורת. לכל עציץ הוכנסו זוג ציקדות בוגרות שנלקחו מהשקיות (ראה סעיף קודם). העציצים לא נפתחו במהלך הגידול מחשש לפגיעה בגידול האוכלוסייה. בעציץ אחד, בו ניתן היה, הנימפות נספרו על העלים דרך הרשת (באיור 1). לאפיון הנזק נפתחו כל העציצים ובמועד זה (82-50 ימים ממועד ההצבה) נספרו ציקדות בוגרות ונימפות. נמצאו  $3.1\pm 17$  נימפות ו- $2.2\pm 30$  בוגרות בממוצע לעציץ. העציצים שנפתחו לאחר 82 ימים ממועד ההצבה התמוטטו ואוכלוסיית הציקדות בהן הייתה אפסית. עציצים אלו לא הוכנסו לחישוב ממוצע הפרטים לעציץ ולא שימשו לבדיקת הנזק (3 עציצי מרלו ו-2 עציצי קברנה התמוטטו). לזיהוי המין של הציקדות הועברו מכל עציץ 10 פרטים בוגרים לתוך מבחנת אפנדורף עם אלוהול 70%. מבחנה נלקחו שני זכרים. חלקם התחתון שימש לזיהוי מורפולוגי ואילו מהחלק העליון הופק DNA שנבדק ב-PCR לזיהוי המין (פרוט השיטה בתיאור התוצאות של מטרה 3). כל הפרטים נמצאו כשייכים למין *Zyginia rhamni*. בעציצים ששרדו (4 מהזן קברנה ו-3 מהזן מרלו) נבדקו מדדי נזק (איור 2): הנזק המורפולוגי בכל העציצים היה זהה בצורתו וכלל סימני מציצה לבנים על העלים. בכל עציץ נבדקו 4 עלים, העלים צולמו ועוצמת הנזק נמדדה ע"י

יצירת גריד לכל עלה כאשר בכל גריד נמדד החלק הניזוק.

מסך המדידות חושב אחוז הכיסוי של הנזק בעלה וחושב אחוז הכיסוי של הנזק לכלל העלווה על פי מספר העלים הפגועים מסך העלים בעציץ.



עוצמת נזק נמוכה



עוצמת נזק גבוהה

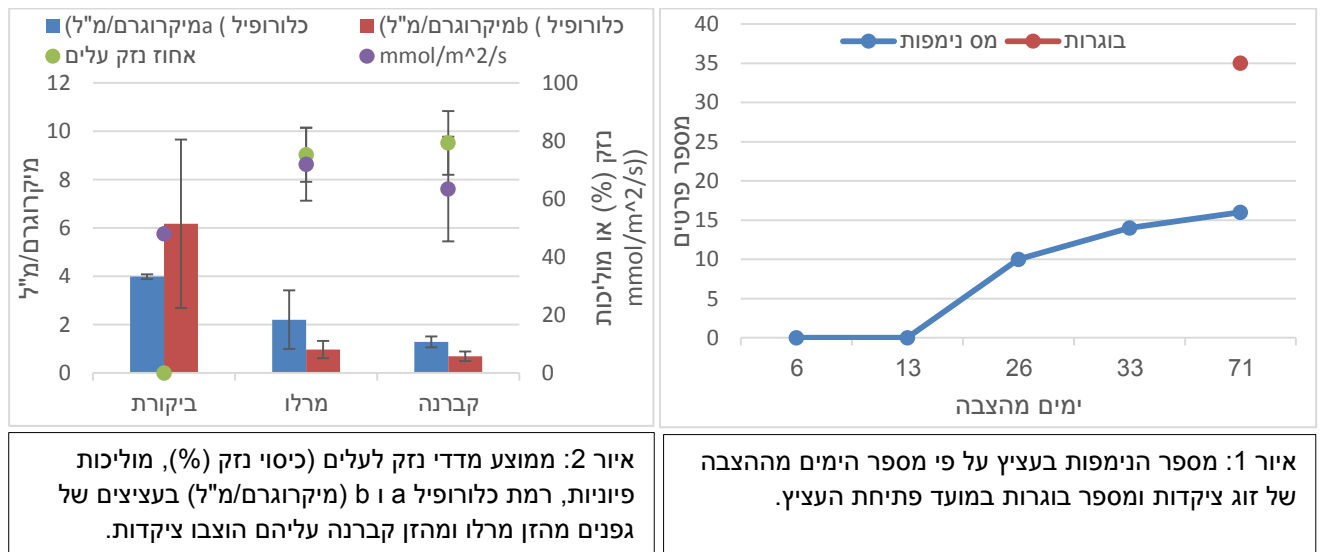
הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה)

מוליכות הפיוניות נמדדה בפורומטר מסוג ap4 של חברת delta-t ביחידות של  $\text{mmol/m}^2/\text{s}$ . לקביעת רמת הכלורופיל בעלים נחתכו באזור אקראי מ 3-4 עלים מכל עציץ 5 דסקיות בקוטר 1.2 ס"מ, אליהם הוספו 5 מ"ל אתנול 95%. המבחנות הוכנסו לאמבט שחומם מראש ל  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  למשך שעתיים. מקדם הבליעה של התמיסה נקבע בעזרת ספקטרופוטומטר (Amersham Biociences ultrospec 2100pro uvqvisible spectrophotometer). ריכוז כלורופיל a וכלורופיל b חושבו לפי הנוסחאות הבאות:

$$\text{כלורופיל a} = 13.36 * A_{664} - 5.19 * A_{648} \quad (\text{מיקרוגרם} / \text{מ}^2 \text{ תמיסת מיצוי מהצמח})$$

$$\text{כלורופיל b} = 27.43 * A_{648} - 8.12 * A_{664} \quad (\text{מיקרוגרם} / \text{מ}^2 \text{ תמיסת מיצוי מהצמח}).$$

לא נמצא הבדל מובהק בין הזנים אך נראית מגמה של מוליכות הפיוניות וכן רמת הכלורופיל נמוכה יותר בזן קברנה לעומת הזן מרלו ואחוז כיסוי הנזק היה מעט גבוה יותר בזן קברנה. נחזור על ניסויים אלו בשנה הבאה במספר עציצים רב יותר.



### בנית כלים מולקולריים ככלי לזיהוי יעיל של המינים

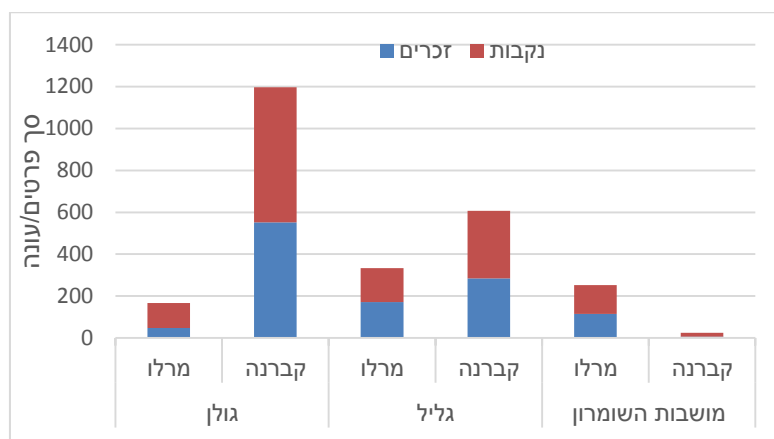
בבדיקות מורפולוגיות שערכנו ב 2016 יחד עם דר' ואלריו מנזוני באיטליה נמצאו ציקדות השייכות לתת משפחה Typhlocybae שהוגדרו לשלושה מינים *Zygina rhamni*, *Jacobiasca lybica*, *Asymmetrasca decedens* ודגימה בודדת בה נמצא המין *Empoasca gr. decipiens*. מכל אחד מהטיפוסים שזוהו מורפולוגית לקחנו 6 ציקדות. מציקדות אלו הופק DNA (Sharon et al., 2015).

במטרה להבדיל בין המינים בתוך הקומפלקס של אוכלוסיות בחרנו לבדיקת הציקדות ב PCR את הפריימרים האוניברסליים HCO2198R, LCO1490F (Folmer et al., 1994) לגן לאנזים 1 cytochrome oxidase subunit מה DNA המיטוכונדריאלי המאפשר זיהוי בין משפחות. התקבל תוצר בגודל 600 bp בכל הדוגמאות. כל התוצרים נשלחו לריצוף. הריצוף שהתקבל נבדק בתוכנה BIOEDIT ובהמשך הוצב ב NCBI blast. התוצאות זיהו את השבט בלבד ולא מין ספציפי. מאחר וזיהוי זה לא איפשר הבחנה בין מינים, לקחנו זכרים שזוהו מורפולוגית בעזרת בדיקת מבנה העורקים בכנף על ידנו במעבדה (זיהוי זה בעייתי מאחר והפרטים נשאבו והושמו באלכוהול אך, מאפשר הפרדה ראשונית אם כי לא ודאית). נבחרו 6 זכרים לכל מבנה עורקים. חלק תחתון נחתך לזיהוי מורפולוגי וחלק עליון נלקח להפקת DNA. בבדיקה זו השתמשנו בפריימרים שונים (L2-N-3014, C1-J-2195) אשר להם אזור מטרה אחר לאורך הגן cytochrome oxidase subunit1 (Simon et al. 1994). התוצר

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה) שהתקבל נשלח לריצוף. בכל 6 הדוגמאות שנחשדו על פי מבנה הכנף כ *Asymmetrasca decedens* התקבלה הומולוגיה ל *Asymmetrasca decedens* (בזהות של 99%-89%). מבין 6 הדוגמאות שנחשדו על פי מבנה הכנף כ *Jacobiasca lybica* זוהו 4 דוגמאות כ *Asymmetrasca decedens* (בזהות של 99%-96%) ובדיקה מורפולוגית של אבר המין הזכרי אישרה את הממצא המולקולרי. בשתי הדוגמאות הנוספות שבבדיקה מורפולוגית של איבר המין הזכרי זוהו כ *Jacobiasca lybica* התקבלה הומולוגיה ל- *Jacobiasca lybica* (בזהות של 94%-95%). 6 דוגמאות שנחשדו כ *Zygina rhamni* נתנו תוצר PCR חלש והריצוף לא הצליח. 6 הדוגמאות הללו הורצו שוב בפריימרים האוניברסליים LCO1490F, HCO2198R (Folmer et al., 1994) והתוצרים נשלחו לריצוף. קיבלנו בכל הדוגמאות זיהוי של השבט *Erythroneura* של *Zygina rhamni* בזהות של בין 84%-86% ובבדיקה של איבר המין הזכרי בפרטים אלו נמצאה התאמה ל *Zygina rhamni*. כדי להבחין בין שלושת המינים ב PCR ללא צורך בריצוף תכננו פריימרים ספציפיים לכל מין. התכנון נעשה לפי הרצפים הטובים ביותר שהתקבלו בעזרת התוכנה BIO EDIT. בחרנו אזור עם לפחות 3 הבדלים בבסיסים בין המינים ולפי אזור זה תכננו פריימר forward. את הפריימר הכנסנו לתוכנה PRIMER 3 ומצאנו פריימר reverse מתאים עפ"י פרמטרים סטנדרטיים של התוכנה. הפריימרים שתוכננו נבדקו על 54 זכרים בשיטה של הצלבה. הפריימרים לזיהוי *J. lybica* זיהו את כל הדוגמאות שזוהו מורפולוגית ובריצוף כ *J. lybica* ולא זיהו את הדוגמאות שידועות לנו כ *A. decedens* ו *Z. rhamni*. הפריימרים לזיהוי *A. decedens* זיהו את כל הדוגמאות שזוהו מורפולוגית ובריצוף כ *A. decedens* ולא זיהו את הדוגמאות שידועות לנו כ *J. lybica* ו *Z. rhamni*. הפריימרים לזיהוי *Z. rhamni* זיהו את כל הדוגמאות שזוהו מורפולוגית ובריצוף כ *Z. rhamni* ולא זיהו את הדוגמאות שידועות לנו כ *J. lybica* ו *A. decedens*.

#### הגדרת מיני הציקדות וקביעת מועד הופעתם בשטח

נבחר כרם בכל אחד משלושה אזורים (גולן, גליל, מושבות השומרון) בו חלקות סמוכות של הזן קברנה ושל הזן מרלו בהן נראה בעבר נזק מציקדות. בכל חלקה התבצעו פעם בחודש 3 שאיבות של דקה בכל נקודת דיגום. כל שאיבה של דקה נעשתה מקודקודי 5 גפנים צמודות בכרם. מיקום השאיבות (נקודות הדיגום) היה סמוך לכל צלע (6 מטר מהשוליים) ובמרכז החלקה. בסה"כ בגליל ובגולן היו יותר לכידות בקברנה לעומת הלכידות במרלו ואילו בקברנה במושבות השומרון כמעט ולא נלכדו ציקדות. בסה"כ נאספו 1,404 נקבות ו 1,178 זכרים (איור 3).

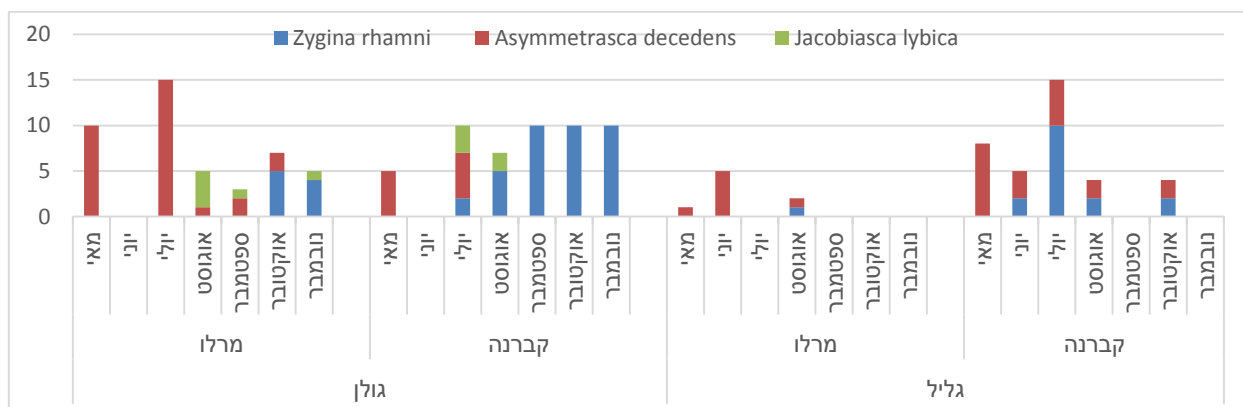


איור 3: סך הזכרים והנקבות שנשאבו בכל אחד מהאזורים, בכל זן במהלך העונה..

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה) במהלך איסוף הציקדות בשטח צולמו התסמינים בכל זן בכל נקודת דיגום/שאיבה. ניתוח הנזק בתמונות נעשה בימים אלו. ממצאים ראשוניים נראו בקברנה בעיקר נקודות מציצה לבנות בשתי צורות ("נקודות" ו"פרח") ואילו במרלו נראה גם נזק של נקודות מציצה וגם האדמת שוליים בחלק מהעלים החל מאמצע העונה.



מהזכרים. בחלק מהחודשים לא נמצאו ציקדות כלל (למשל בגליל במרלו לא נמצאו ציקדות ביולי ובחודשים ספטמבר-נובמבר). על פי המדגם, בשני האזורים נראה כי המין *A. decedens* מופיע בתחילת העונה בשני הזנים. בגולן במרלו ובקברנה בגליל, נוכחות מין זה נמשכת עד אוקטובר ואילו בקברנה בגולן עד יולי. המין *Z. rhamni* הופיע בקברנה בשני האזורים ביוני ואילו במרלו בגולן באוקטובר ובגליל נימצא פרט בודד באוגוסט. המין *J. lybica* מופיע רק בגולן, בשני הזנים באמצע הקיץ (יולי אוגוסט) ופרט אחד נמצא בקברנה בנובמבר. מספר בודד של פרטים לא זוהה באמצעות הפריימרים ומורפולוגית ואנחנו בודקים האם זהו מין נוסף שנמצא במספרים מעטים. בימים אלו נמשך הזיהוי המולקולרי לכלל הציקדות שנאספו בכל שלושת האזורים (במושבות השומרון הופקו הדגימות וה PCR יבוצע במהלך השבועות הקרובים).



איור 5: מדגם מהפרטים מכל מין של הזכרים והנקבות שנשאבו בגולן ובגליל, בכל זן לאורך העונה.

## דין וסיכום

בישראל נפוצים מינים שונים של ציקדות (Homoptera:Cicadellidae) הנקראים בשם כללי "ציקדה ירוקה" ומהווים קומפלקס של אוכלוסיות מתת המשפחה Typhlocybinae. בתת משפחה זו קיימים שלושה שבטים (Tribes): Empoascini, Erythroneurini, Typhlocybini. כולם רב פונדקאים (Poos and Wheeler, 1943; Lenz et al., 2009; Lentini et al., 2000; Serra et al., 2013); אבידוב, (1961). מהציקדות שהוגדרו עד כה נמצאים בכרם שלושה מינים השייכים לשני שבטים: Tribe Empoascini: *A. decedens*, *J. lybica* ו- Tribe Erythroneurini: *Z. rhamni*.

הממצאים העיקריים משנת המחקר הראשונה (הינם 1) נבנו כלים מולקולריים ככלי לזיהוי יעיל של שלושת המינים העיקריים. פיתוח הפריימרים לכל מין עבר מספר אשרורים כולל השוואה מורפולוגית והצלבה בין המינים וכיום מאפשר ודאות גבוהה בזיהוי המינים גם על פי נקבות ונימפות. יתרון נוסף של הזיהוי המולקולרי הינו ביכולת



הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה) לזהות מספר רב של פרטים במשך זמן קצר יחסית לעומת הזיהוי המורפולוגי. פרטים בודדים כנראה ממין נוסף מוגדרים בימים אלו. (2) בעזרת הכלים המולקולריים הוגדר מדגם מהציקדות בכל אזור. (3) מהמדגם שנבדק עד כה נראה כי לכל מין דינמיקה שונה בזמן, בדומה לממצאים מאיטליה (תקשורת אישית- Pavan et Andrea Locci; al., 1988; Lentini et al., 2000), אשר הראו כי כאשר מתקיים קומפלקס של מספר מיני ציקדות, לכל מין דינמיקה שונה בזמן בכרמים באזורים שונים. מרבית הפרטים שנבדקו בתחילת העונה שייכים למין *A. decedens* והחל מאמצע העונה למין *Z. rhamni*. נראה כי לפחות על פי המדגם, *J. lybica* נמצאה בכרם שנבדק בגולן ולא נמצאה בכרם שנבדק בגליל אך, נוכל לקבוע זאת בוודאות רק לאחר שתקבע זהות מירב הציקדות. בימים אלו מסתיימת קביעת מועד הופעתם של הציקדות בשטח. כמו כן, יתכן ויש אוכלוסייה קטנה ממין נוסף שמוגדר בימים אלו. (4) גידול הקווים במעבדה לצורך קביעת קצב התפתחות המין, ואפיון הנזק נעשה על שני זני הגפן רק למין אחד כפי שהתברר בדיעבד. יתכן והגורם לכך הוא שהגידול במעבדה נעשה מהציקדות הרבות שנאספו החל מאמצע העונה, לפני שידענו את התפלגות המינים בזמן, במועד בו המין השולט הינו *Z. rhamni*. הנזק ממין זה אינו שונה בין זני הגפן אם כי יתכן שקיים הבדל בקצב ההתפתחות המתבטא בהבדל בעוצמת הנזק בין הזנים. בשנת המחקר הבאה האיסוף לשני המינים הנוספים יעשה בהתאם למועד הופעתם. נמשיך בגידול הקווים על פי מועד ההופעה במספר שקיות לעציץ ונבדוק את קצב ההתפתחות בשקיות שיפתחו במועדים שונים כדי להימנע מהפרעה לגידול. בכל שלב, לכל שקית שתפתח, ירשמו מאפייני הנזק ויצולמו. במהלך האיסוף של הציקדות צולם הנזק הנגרם בכל שלב בכל אחד מהאזורים והתאמה בין מיני הציקדות המצויים בשטח לצורת הנזק תתבצע בשנת המחקר הבאה. למרות שעדיין לא הושלמה הבדיקה נראה כי בחלק מהעונה מופיעה במרלו צורת נזק שונה מהצורה המופיעה בקברנה. מאחר ונוכחות מיני הציקדות משתנה לאורך העונה, בשנת המחקר הבאה יתוכנן הניסוי ליצור רמות שונות של אוכלוסייה בכל אזור כך שניתן יהיה לייחס את הנזק לעונת ההופעה של כל מין. כמו כן יבחר אזור חליפי במקום צמד החלקות ממושבות השומרון בו נמצאו ציקדות מעטות ונחזור על חלק מהמשימות להשלמת המידע.

\*תודה לדר' גל ספיר על העזרה בפיתוח הפריימרים לציקדות מהמינים השונים.

## מקורות ספרות

- אבידב צ. (1961) "מזיקי צמחים בישראל". הוצאת האוניברסיטה העברית, ירושלים. עמ' 53-59.
- זהבי ת. (2005) הכרת פגעי הגפן והדברתם. משרד החקלאות ופיתוח הכפר, שירות ההדרכה והמקצוע, המחלקה למטעים, האגף להגנת הצומח. עמ' 42-44.
- שרון ר., הררי א., זהבי ת., סוקולסקי ת. (2013-2015) בחינת יעילות תכשירים שונים להדברת הציקדה הירוקה. דו"ח שנתי לשולחן ענבי מאכל.
- Backus, E. A., Serrano, M. S., & Ranger, C. M. (2005). Mechanisms of hopperborn: An Overview of Insect Taxonomy, Behavior, and Physiology. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 125-151.
- Candolfi, M.P., Jermini, M., Carrera, E. & Candolfi-Vasconcelos, M.C. 1993: Grapevine leaf gas exchange, plant growth, yield, fruit quality and carbohydrate reserves influenced by the grape leafhopper, *Empoasca vitis*. – *Entomol. exp. appl.* 69: 289-296

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין (שנה ראשונה)

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299
- Lentini, A., Delrio, G., & Serra, G. (2000). Observations on the infestations of *Jacobiasca lybica* on grapevine in Sardinia. *IOBC wprs Bulletin*, 23(4), 127-130.
- Lenz, M. S., Isaacs, R., Flore, J. A., & Howell, G. S. (2009). Vegetative growth responses of *Pinot gris* (*Vitis vinifera* L.) grapevines to infestation by potato leafhoppers (*Empoasca fabae* Harris). *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(2), 130-137
- Papura, D., Giresse, X., Chauvion, B., Caron H., Delmotte F., van Helden M. (2009) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the green leafhopper *Empoasca vitis* Goethe (Homoptera). *Molecular Ecology Resources* 9(3): 827-829.
- Pavan, F., Pavanetto, E., Duso, C., Girolami, V., Vidano, C., & Arzone, A. (1988). Population dynamics of *Empoasca vitis* (Goethe) and *Zygina rhamni* (Ferr.) on vines in northern Italy. In 6th Auchenorrhyncha Meeting. Turin, Italy, September 7-11, 1987. Proceedings (pp. 517-524).
- Poos F. W. and Wheeler N.H (1943) Studies on Host Plants of the Leafhoppers of the Genus *Empoasca*. Technical Bulletin No. 850.
- Reineke, A. and Hauck, M. (2012), Larval development of *Empoasca vitis* and *Edwardsiana rosae* (Homoptera: Cicadellidae) at different temperatures on grapevine leaves. *Journal of Applied Entomology*, 136: 656–664.
- Serra, G., Cocco, A., Mamei, M. G., Delrio, G., & Lentini, A. (2013). Influence of regulated deficit irrigation and partial rootzone drying on leafhoppers infestations on grapevine. *IOBC-WPRS Bulletin*, 85, 117-120.
- Sharon, R., Harari, A. R., Zahavi, T., Raz, R., Dafny-Yelin, M., Tomer, M., ... & Naor, V. (2015). A yellows disease system with differing principal host plants for the obligatory pathogen and its vector. *Plant pathology*, 64(4), 785-791.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, P. Flook .1994 .Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers *.Ann. Entomol. Soc. Am* .701–651 :87 .