

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

שם החוקר	שם החוקר	מחלקה	מוסד
חוקר ראשי:	רקפת שרון		מ"פ צפון
חוקרים משניים:	סורוקר ויקטוריה		מנהל המחקר החלקאי
	זהבי תרצה		שה"מ
	זאדה ענת		מנהל המחקר החקלאי

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

Israel, Email: [rakefetsh@bezeqint.net](mailto:rakefetsh@bezeqint.net)

מרץ 2009

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהוים המלצות לחקלאים: לא.

#### 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 תוכן התשתית לפיתוח מלכודות לוקטור Ho המבוססות על שיח אברהם או על מיצוי נדיפים שלו, כאמצעי למשיכתו ובכך לשיבוש הגעתו אל הצמח. מטרות בשנת המחקר הראשונה: ניסויי שטח- בחינת השפעה של פיזור צמחי מלכודת בעציצים על פיזור המזיק והנזק בכרם- השפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסיה של הוקטור בכרם. בחינת

המיצויים בניסויי מעבדה- פיתוח מבחן ביולוגי לזיהוי המיצוי בכלובים קטנים, התחלת בידוד וזיהוי מרכיבי המיצוי הפעילים ב-EAD\GC.

**מהלך המחקר:** בשנת המחקר הראשונה בחנו את יעילות כלובים עם שתילי שיח אברהם כאמצעי לחסימת כניסת הציקדות אל הכרם. הכלובים אכן עוצרים את מרבית הציקדות ובשנת ניסוי זו בהשוואה לשנה קודמת פחות ציקדות נכנסו לכרם. מרבית הציקדות מגיעות בדור הראשון. נבנתה מערכת למבחן ביולוגי לבדיקת יעילות המרכיבים הפעילים כאמצעי למשיכת הציקדות. אותרו ארבעה מרכיבים החשודים כפעילים באמצעות EAG.

בשנת המחקר השניה נבדוק השפעת חסימה רצופה באמצעות רצף של שתילי שיח אברהם לאורך 45 מטרים בפינת הכרם כך ש 15 שורות, 30 גפנים לשורה יהיו חסומות. נבדוק את מספר הציקדות הנכנסות ונגיעות הגפנים בתוך שטח זה לעומת שטח בגודל זהה בקצה נגדי של החלקה. המרכיבים שיתגלו כפעילים יועברו לזיהוי כימי בשנת המחקר השניה. בשנת המחקר השניה נמשיך באיתור מרכיבי המיצוי הפעילים ונבחן האם קיימים מרכיבים שונים הפעילים על הציקדות בשלבים שונים (במהלך כל דור ובין שני הדורות). לאחר הזיהוי נבחן מרכיבים אלו במבחן הביולוגי.

#### **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 הראשונה:

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

השפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסיה של הוקטור בכרם

ב. בחינת המיצויים בניסויי מעבדה

I. פיתוח מבחן ביולוגי לזיהוי המיצוי בכלובים קטנים

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

## **שיטות וחומרים**

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

בכרם

השפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסיה של הוקטור בכרם

## אתרי המחקר:

הניסוי נערך בחמש חלקות בשלושה כרמים – בכרם גשור בשתי חלקות (גשור1, גשור 2), בכרם יונתן "ישן" בשתי חלקות (יונתן "ישן" 1, יונתן "ישן" 2) ובכרם יונתן "חדש". יונתן "ישן" הינו הכרם בו נערך הניסוי המקדים ב- 2007.

## מבנה הניסוי בשטח:

שתילי שיח אברהם (להלן *Vitex agnus castus* – Vac) הוצבו בתוך כלובי רשת, שתיל אחד לכלוב. מחוץ לכלוב הרשת חוברו מלכודות דבק צהובות. הכלובים הוצבו בהיקף הכרם במרחק של כעשרה מטרים מקצה שורת הגפנים. מלכודות צהובות ניתלו לאורך שורות גפנים בכרם מול הכלובים ובשורות שאינן מול הכלובים.

## דיגום:

אחת לשבועיים נאספו המלכודות הצהובות מכלובי הרשת ומתוך השורות בכרם.

ב. בחינת המיצויים בניסויי מעבדה:

I. פיתוח מבחן ביולוגי לזיהוי המיצוי בכלובים קטנים

מבנה הזירה (איור 1): כלוב פלסטיק במידות של 40/34/30 ס"מ בעל פתחי אוורור מוגנים ברשת למניעת מעבר חרקים.

במרכז כל אחת מפאות הרוחב של הכלוב הוצבה מבחנה ובה מיצוי משיח אברהם (100µl) או

ממס (100µl).

מעל המבחנה הוצב קונוס המאפשר כניסת הציקדה ומונע יציאה. במרכז הכלוב הונחו 5-6 ציקדות שנאספו מהשטח.

לאחר 24 שעות נספרו הציקדות בתוך המבחנות.

הניסוי נערך בחמש חזרות.

II. התחלת זיהוי מרכיבי המיצוי הפעילים ב-

EAD\GC



איור 1: מבנה הזירה

הכנת מיצוי-

20 גרם עלים בגודל בינוני נאספו משתילי Vac הגדלים בעציצים. העלים ניתחנו לאבקה בחנקן נוזלי באמצעות מכתש ועלי ומצאאו ב-200 מ"ל פנתן במשך שעה אחת תוך ניאור. לאיסוף למיצוי הוסף למיצוי 10 גרם מגנזיום סולפט. המיצוי עבר פילטרציה ונשמר ב-20°C עד לביצוע ניסויים. 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. האינג'קטור 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.

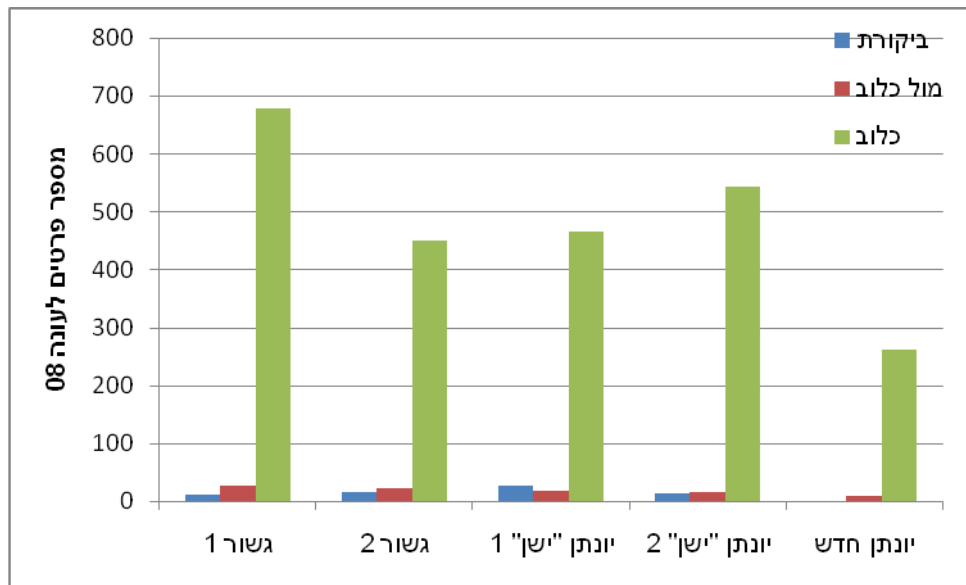
#### תוצאות

**א.** ניסויי שטח- בחינת פיזור צמחי מלכודת בעציצים על פיזור המזיק והנוק בכרם השפעת המלכודת על הפחתת האוכלוסיה של הוקטור בכרם

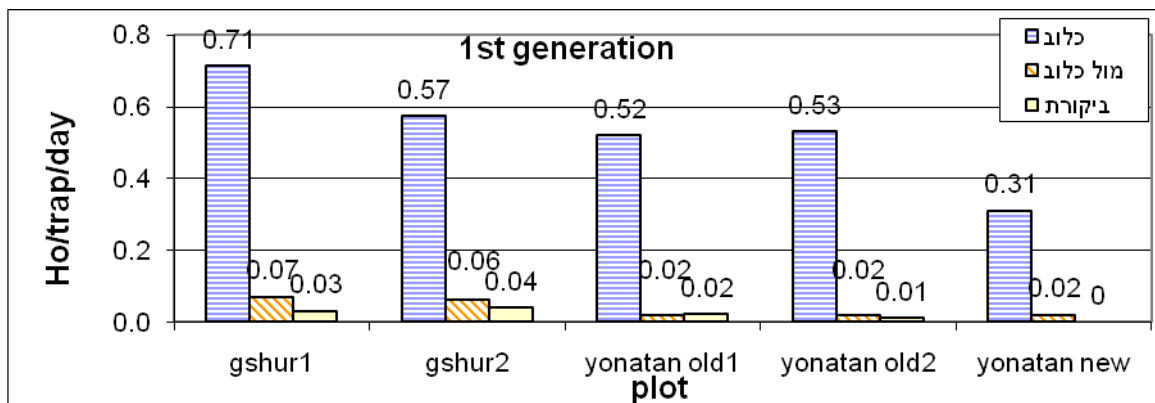
מרבית הציקדות נלכדו בכלובים ומעט מאוד ציקדות מגיעות לכרם (איור 2). ביונתן "ישן" בחלקת ניסוי אחת נלכדו בכלובים 466 ציקדות ובחלקת הניסוי השניה נלכדו 543 ציקדות. בתוך הכרם נלכדו בחלקת ניסוי אחת 44 ציקדות ובחלקת הניסוי השניה 29 ציקדות. ביונתן "חדש" נלכדו בכלובים 262 ציקדות ובתוך הכרם 8 ציקדות. בגשור בחלקת ניסוי אחת נלכדו בכלובים 679 ציקדות ובחלקת הניסוי השניה נלכדו בכלובים 449 ציקדות. בתוך הכרם בגשור נלכדו בחלקת ניסוי אחת 37 ציקדות ובחלקת הניסוי השניה 38 ציקדות. מתוך כלל הציקדות המגיעות לכרם 97-92% נעצרות בכלובים.

מספר הציקדות שנלכדו בכלובים (ציקדות למלכודת ליום בדור אביב 0.52 ובדור סתיו 0.15) היה גבוה ממספרן ב-2007 (ציקדות למלכודת ליום בדור אביב 0.17 ובדור סתיו 0.14). מספר הציקדות שנלכדו בתוך הכרם ב-2008 היה נמוך ממספרן ב-2007. הירידה היתה בעיקר בשורות הביקורת בהן המספר שנלכד ב-2008 היה נמוך לעומת המספר שנלכד ב-2007 (0.06 ב-2007 לעומת 0.01 ב-2008). בשורות מול הכלובים מספר הציקדות שנלכדו בשתי השנים היה דומה (0.03 ב-2007 לעומת 0.02 ב-2008). ב-2008 לא היה הבדל בכמות הציקדות בין השורות "המוגנות" לשורות

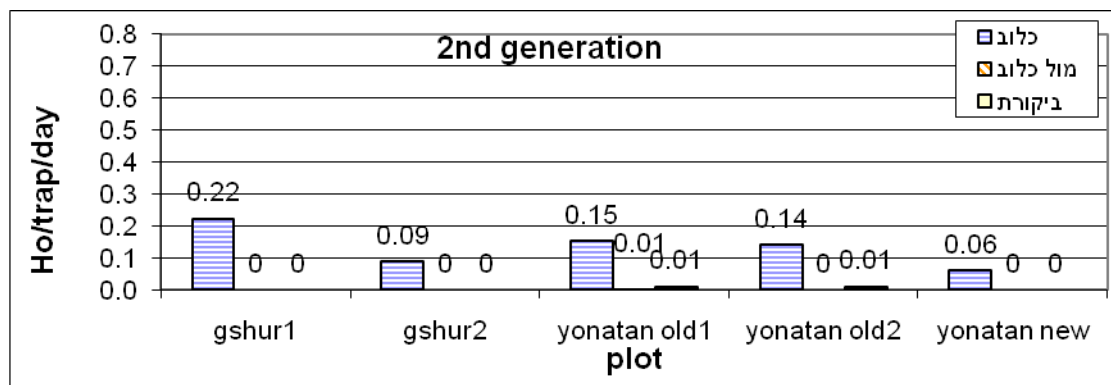
ללא מחסום של שיח אברהם (איורים 3-4). בשתי שנות הניסוי המספר שנלכד בדור הראשון היה גבוה ממספר הציקדות בדור השני.



איור 2: סך כל הציקדות שנלכדו במהלך העונה בחלקות הניסוי (גשור 1, גשור 2, יונתן "ישן" 1, יונתן "ישן" 2, יונתן חדש) במלכודות על הכלובים (כלוב) ובמלכודות בתוך הכרם (ביקורת, מול כלוב) (כלוב)



איור 3: מספר ציקדות ממוצע למלכודת ליום שנלכדו בדור ראשון על הכלובים, בשורות מול הכלובים ובשורות לא מול הכלובים (ביקורת).

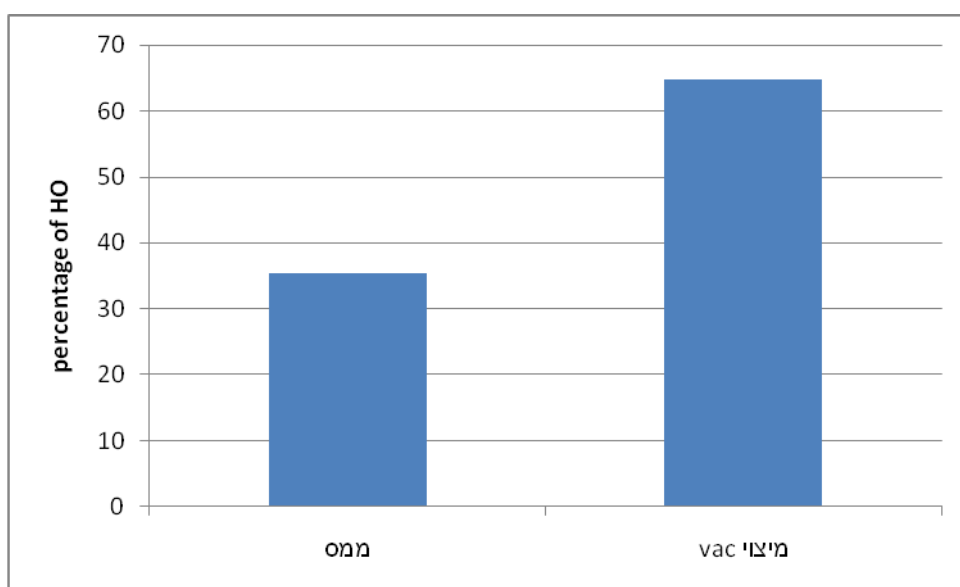


איור 4: מספר ציקדות ממוצע למלכודת ליום שנלכדו בדור שני על הכלובים, בשורות מול הכלובים ובשורות לא מול הכלובים (ביקורת).

ב. בחינת המיצויים בניסוי מעבדה:

### I. פיתוח מבחן ביולוגי לזיהוי המיצוי בכלובים קטנים

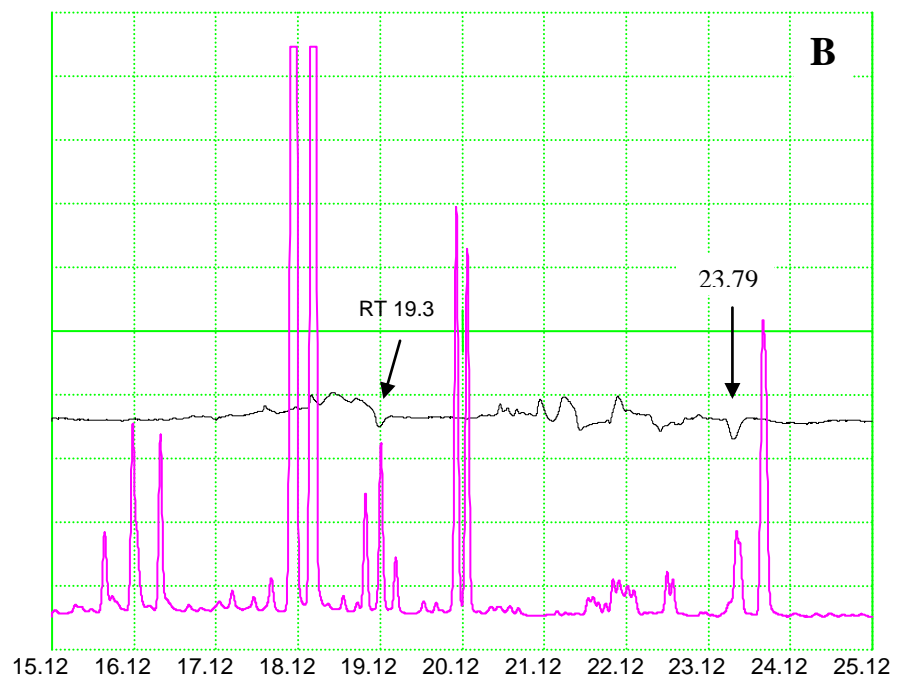
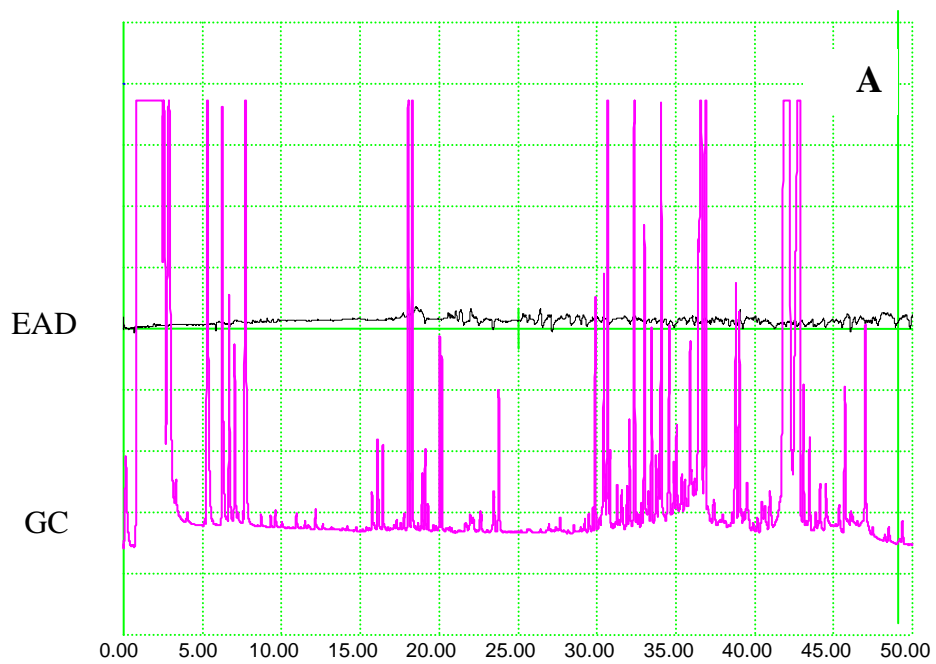
ניסוי זה בדק האם ניתן לזהות משיכה של מיצויים משיח אברהם ובהמשך חומרים שיזוהו כמרכיבים פעילים במיצוי, בכלובים בהם מתאפשרת תעופת הציקדות. מבין הציקדות שהוצבו במרכז הזירה בממוצע 72% נכנסו אל תוך המבחנות. מבין הציקדות שנכנסו למבחנות בממוצע 65% הגיעו אל המבחנות המכילות את מיצוי שיח אברהם (vac) ו-35% הגיעו אל המבחנות המכילות את הממס (איור 5). מבחן ראשוני זה לא בדק את עוצמת המשיכה אלא האם הציקדה יכולה להראות בחירה בתנאי הכלוב. נראה כי כלובים אלו יכולים לשמש למבחן הביולוגי של המיצויים ומרכיבי המיצויים שימצאו כמועדפים.



איור 5: אחוז הציקדות שנמצאו במבחנות שהכילו את מיצוי שיח אברהם (מיצוי vac) ובמבחנות שהכילו את הממס בלבד (ממס)

### II. התחלת זיהוי מרכיבי המיצוי הפעילים ב-EAD\GC

סך הכל נבדקו 15 מחושי נקבות ו-30 מחושי זכרים. שישה מחושי נקבות ו-16 מחושי זכרים הגיבו ב-EAD-GC (טבלה 1 ואיור 5). כמו כן, שונות רבה מאד נתגלתה בתגובתם. מתוך מחושי הנקבות רק שני מחושים לאותו פיק (RT 18.6min). בין מחושי זכרים מתוך 16 רק 6 מחושים הגיבו אך תגובתם לא היתה אחידה. בסה"כ נמצאו שני זכרים ונקבה אחת שהגיבו לאותם שני פיקים (RT 19.4 and 23.79 min).



איור 6: תגובת מחוש זכר *Hob* למרכיבי מיצוי . A. הרצה מלאה . B. הגדלה של איזור הפיקים הפעילים.

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

Peak #	RT (min)	Area (%)	♀ antenna response	♂ antenna response
11	12.52	0.16	0/6	2/16
14	14.23	0.01	0/6	2/16
22	16.46	0.7	0/6	3/16
28	17.6	0.06	0/6	2/16
31	18.34	0.08	0/6	1/16
32	18.6	8.04	2/6	0/16
<b>35</b>	<b>19.4</b>	<b>0.32</b>	<b>1/6</b>	<b>3/16</b>
42	20.69	0.03	1/6	1/16
<b>52</b>	<b>23.79</b>	<b>0.17</b>	<b>1/6</b>	<b>2/16</b>
53	24.1	0.72	0/6	1/16
55	26.05	0.08	1/6	0/16
56	27.12	0.06	1/6	0/16
60	28.78	0.05	0/6	1/16
61	29.27	0.01	1/6	0/16
64	29.78	0.11	1/6	0/16
67	30.31	0.03	1/6	0/16
76	31.56	0.12	0/6	1/16
77	31.82	0.19	1/6	0/16
81	32.63	2.7	0/6	1/16
83	32.95	0.09	0/6	2/16
87	33.73	0.72	1/6	0/16
88	34.03	0.26	1/6	0/16
92	35.16	0.53	1/6	0/16
106	38.5	0.04	0/6	1/16

**דיון ומסקנות**

בשנת המחקר הראשונה בחנו את יעילות כלובים עם שתילי שיח אברהם כאמצעי לחסימת כניסת הציקדות אל הכרם. הכלובים אכן עוצרים את מרבית הציקדות ובשנת ניסוי זו בהשוואה לשנה קודמת פחות ציקדות נכנסו לכרם. יחד עם זאת, מבנה הניסוי בו יש מרווחים גדולים בין הכלובים בכדי לאפשר ביקורת עדיין מאפשר כניסת אחוז קטן של ציקדות אל הכרם.



בשנת המחקר השניה נבדוק השפעת חסימה רצופה באמצעות רצף של שתילי שיח אברהם לאורך 45 מטרים בפינת הכרם כך ש 15 שורות, 30 גפנים לשורה יהיו חסומות . נבדוק את מספר הציקדות הנכנסות ונגיעות הגפנים בתוך שטח זה לעומת שטח בגודל זהה בקצה נגדי של החלקה. בשנת המחקר הראשונה התחלנו באיתור מרכיבים פעילים מתוך מיצוי שיח אברהם . נבנתה מערכת למבחן ביולוגי לבדיקת יעילות המרכיבים הפעילים כאמצעי למשיכת הציקדות . אותרו ארבעה מרכיבים החשודים כפעילים באמצעות EAG. דרושים ניסויים נוספים לבירור תגובתם של הציקדות למרכיבים מנדיפי שיח אברהם. כל המרכיבים שיתגלו כפעילים יועברו לזיהוי כימי בשנת המחקר השניה . בשנת המחקר השניה נמשיך באיתור מרכיבי המיצוי הפעילים ונבחן האם קיימים מרכיבים שונים הפעילים על הציקדות בשלבים שונים (במהלך כל דור וב ין שני הדורות ). לאחר הזיהוי נבחן מרכיבים אלו במבחן הביולוגי.