

דו"ח התקדמות מקצועי לשנת 2009

1.1 שם הפרוייקט: אמצעים חליפיים להתמודדות עם פסילת האגס.

החוקר האחראי: ליאורה שאלתיאל-הרפז

שותפים: ריקה קדושים, דורון הולנד, רפי שטרן, ויקי סורוקר, מתי מצוינים, כאמל חאטיב ועירית בר יעקב.

רקע ותיאור הבעיה: פסילת האגס, *Cacopsylla bidens* (Sulc), מהווה מזיק ספציפי, חשוב ביותר של גידול האגס בארץ. המזיק גורם להפחתה משמעותית באיכות וכמות הפרי, ולנוון המטע. בארץ יש כיום שני תכשירי הדברה בלבד שעדיין יעילים, אך מחירם האקולוגי והכלכלי כבד. יש צורך למצוא שיטות נוספות, שטרם נוסו בארץ לבקרת אוכלוסיית הפסילה. במסגרת הגישה המשולבת לבקרת מזיקים (IPM) בחרנו באיתור זני אגס עמידים למזיקי מפתח ובאיתור טכניקות עיבוד כדי להפכם לעמידים יותר למזיק. שימוש מושכל בגישות אלו מחייב הבנה של המנגנונים המכתיבים את משיכת הפסילה לצמח הפונדקאי ואת רגישות הצמח לפסילה הן ברמה ההתנהגותית והן ברמה ההתפתחותית.

מטרות המחקר:

1. בחינת אפשרות השימוש המעשי בטיפוסי אגס עמידים שהתגלו בנווה יער כמקור לחומרי דחיה או קטילה לפסילה ו/או כמקור לכנות עמידות.
2. בחינת אפשרות השימוש המעשי במעכבי צימוח כאמצעי להפחתת ניזקי הפסילה במשולב עם תפקידם המקורי לבקרת צימוח וגטיבי באגסים מהזן ספדונה.
3. לימוד המנגנונים המעורבים.

פירוט מהלך המחקר בשנת 2009:

חומרים ושיטות

הצמחים ששמשו לניסויים במחקר זה היו מארבעה סוגים-

א. שתילוני אגס מהזן ספדונה והטיפוסים Py.701-202 ו-Py.760-261 - המורכבים כולם על כנות של בטוליפוליה (*Pyrus betulipholia*) ומגודלים בעציצים של 10 ליטר בנווה יער בבית רשת כדי למנוע אילוח ע"י פסילות.

ב. עצי אגס בוגרים (בני 8 שנים) בחלקת הזנים בנווה יער מהטיפוסים Py.701-202 ו Py.760-261 המורכבים על כנת בטוליפוליה זריעה. על עצים מטיפוסים אלה, בני 11, לפני 3 שנים הורכבו על חלק

מענפיהם רוכבים של הזן 'ספדונה' באופן כזה שחלק מהענפים הם של הזן המקורי וחלק הוא של 'ספדונה'.

ג. 40 שתילי אגס מהזן 'ספדונה' השתולים בחוות המטעים בעציצי 25 ליטר על מצע של פרלייט ומדושנים באמון חנקתי לרמת חנקן בינונית 35 PPM + דשן שרית + בר קורט (חברת דשנים).

ד. ד. עצי אגס מהזן ספדונה במטע אגס מסחרי בן 3 שנים בחוות מתיתיה שלא טופל בקוטלי מזיקים בתקופת המחקר.

הפסילות - הפסילות ששמשו בניסויים נאספו במטעים בחוות מתיתיהו ובחוות פיכמן שלא טופלו בקוטלי מזיקים.

להשגת מטרה 1 - בחינת אפשרות השימוש המעשי בטיפוסי אגס עמידים שהתגלו בנווה יער כמקור לחומרי דחיה או קטילה לפסילה ו/או כמקור לכנות עמידות נערכו הניסויים הבאים:

ניסוי א. מטרת הניסוי: השוואת האילוח הטבעי ע"י הפסילה בין הזנים השונים בתנאי שדה (בבחירה).
מהלך הניסוי: 10 ענפים נילקחו למעבדה מכל אחד מהטיפוסים העמידים ומעצי ספדונה מחלקת הזנים בנווה יער לבחינת האילוח הטבעי בפסילות והשוואת מספר הביצים והנימפות.

ניסוי ב. מטרת הניסוי: בדיקת מעבר העמידות מהרוכב העמיד לכנת ספדונה.
מהלך הניסוי: רוכבי ספדונה הורכבו על הכנות עמידות Py.701-202 Py.760-261 (כסנדויץ על כנת בטוליפוליה) וגודלו בעציצים בנווה יער בבית רשת כדי למנוע אילוח ע"י פסילות (5-10 שתילונים מכל זן) וניבדקה דחיית ההטלה בבוגרים והישרדות הנימפות.

להשגת מטרה 2 - בחינת אפשרות השימוש המעשי במעכבי צימוח כאמצעי להפחתת ניזקי הפסילה במשולב עם תפקידם המקורי לבקרת צימוח וגטטיבי באגסים מהזן ספדונה. בוצעו הניסויים הבאים:

ניסוי ג. מטרת הניסוי: בחינת השפעת היישום של מעכבי צימוח על השריית עמידות באגס כנגד הפסילה.
מהלך הניסוי: שתילי אגס בני חמש מהזן ספדונה המוחזקים בעציצים טופלו בשני מעכבי צימוח הידועים כמעכבי סינטזת גיברלין: CCC (Clormequat chlorid) במינון 1% ורגליס המכיל 10% ח"פ של Prohexadion Calcium (PCa) במינון של 200 ח"מ. שבועיים לאחר הטיפול במעכב הצימוח ניבחר מכל שתיל ענף חד שנתי והעלה החמישי נוקה בעזרת מכחול מכל פרוקי הרגליים הוכנס למבחנת 50 מ"ל ביחד עם 2 זכרים ושתי נקבות של פסילה. כעבור שבוע הבוגרים הוצאו מהמבחנה ונבדק שיעור ההישרדות שלהם, בנוסף נספרו מספר הביצים שהוטלו והנימפות שבקעו. חזרנו על בדיקה זו גם כעבור שבוע להעריך את שיעור ההישרדות וקצב הגידול של הנימפות.

ניסוי ד. מטרת הניסוי - לבדוק מהו המינון המינימאלי של מעכב הצימוח רגליס הגורם להפחתה משמעותית באוכלוסיית הפסילה.

מהלך הניסוי: באוגוסט המינונים הבאים של רגליס 200, 150, 100, 50 ו-0 ח"מ רוססו על עצי ספדונה במטע בחוות מתתיהו. שבועיים לאחר היישום נבחנה הנגיעות הטבעית בעצים ע"י קיטום ענף חד שנתי בן 10 עלים מכל עץ ובמעבדה בעזרת בינקולאר נספרו הביצים, הנימפות ודרגתן. בנוסף העלה החמישי מכל ענף נוקה והוכנס למבחנה עם 2 זוגות פסילות בוגרות וכעבור שבוע הבוגרים הוצאו, מספר הביצים מספר הנימפות ודרגתן בכל טיפול נספרו כעבור שבוע וכעבור שבועיים. חזרנו על ניסוי זה פעם נוספת בספטמבר במינונים של 0 ו-400 ח"מ של רגליס.

להשגת מטרה 3 – הבנת המנגנונים המעורבים בעמידות הטבעית והמושרית כנגד הפסילה.

נערך ניסוי ה': מטרת הניסוי- אפיון האנדוסימביונטים המצויים בפסילה בשיטות מולקולאריות במסגרת עבודת המאסטר של מתי מצוינס בשיתוף פרופ' מרטין גולגוי ודר' עינת צחורי פייך.

סידרת ניסויים ו': מטרת הניסויים אפיון העמידות מבחינה ביוכימית ע"י חיפוש חומרים המצויים בעצים העמידים ואינם מצויים בספדונה וכאלו המצויים גם בענפי הספדונה המורכבים על העמידים. במעבדתו של ד"ר יגאל בר אילן ובהנחיה משותפת עם ליאורה שאלתיאל ביצעה הסטודנטית מלי גדסי מהמכללה האקדמית תל-חי סידרה של אנליזות ביוכימות לאפיון העצים העמידים והמורכבים עליהם. השיטות בהן השתמשו במחקר זה היו:

הפקת מוהל מענפי העצים מהטיפוסים השונים בעזרת צנטרפוגה 4 מעלות צלזיוס, 4000RPM, ל-10 דקות לאחר מכן נערכו בדיקות לזיהוי החומרים המאפיינים את הטיפוסים השונים בשיטות אנליטיות שונות.

1. בדיקת חומרים חצי נדיפים בשיטת ה-EPA-8270

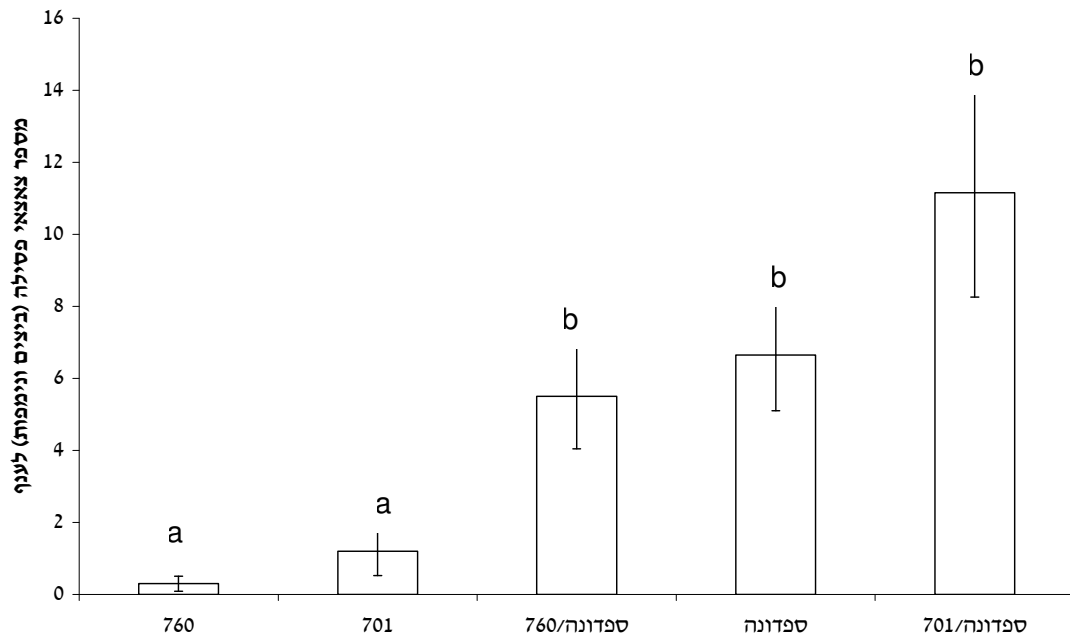
2. בדיקת נדיפים ב-GCMS ב-SCAN על גבי קולונה HP-5- מיצוי LLE

3. בדיקת VOC

תוצאות:

בניסוי א שבדק את הנגיעות הטבעית על הזנים העמידים לעומת הספדונה, והספדונה המורכבת על העמידים, נימצא שמספר הצאצאים על העצים העמידים היה נמוך בהרבה מאשר על עצי הספדונה הסמוכים (תרשים 1).

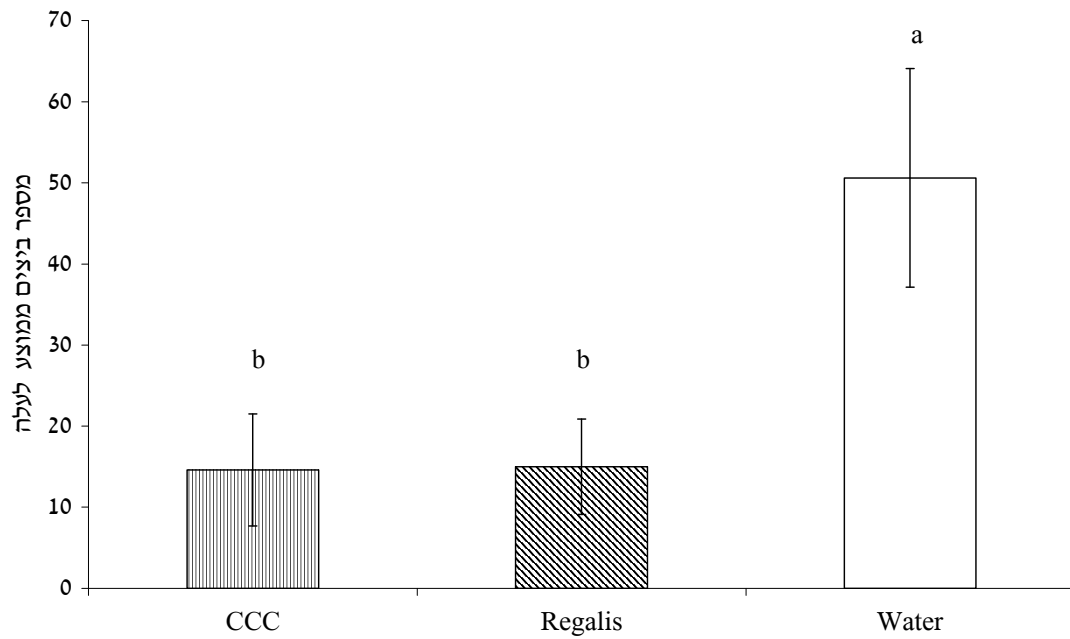
כמו כן קימת מגמה שאיננה מובהקת המצביעה על נגיעות נמוכה יותר על ענפי הספדונה המורכבים על הטיפוס העמיד 760.



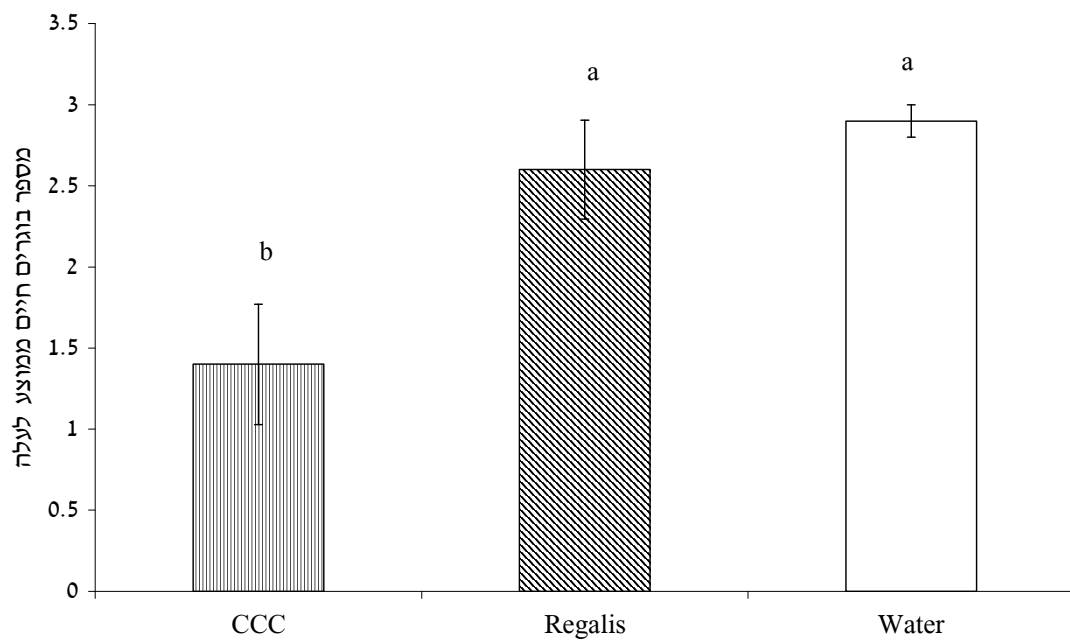
תרשים מס 1: מספר הצאצאים (ביצים + נימפות) הממוצע לענף, על טיפוס האגס השונים בנגיעות טבעיות בחלקת הזנים בנווה יער (ממוצע \pm שגיאת תקן, N=20). עמודות עם אותיות שונות נבדלות זו מזו ברמת מובהקות $p < 0.05$ ע"פ מבחן Tukey HSD.

בניסוי ב שבו התכוננו לבחון הטלה והתפתחות של הנימפות על עלים מהשתילונים מהטיפוסים העמידים ומהרכבות הסנדויץ של ספדונה על הטיפוסים העמידים לא התקבלה כמעט בכלל הטלה (רק ב-8 מתוך 35 חזרות ולכן לא יכולנו להמשיך בניסוי). בבירור מאוחר יותר הסתבר שבשל נגיעות רבה באקריות שסיכנו את השתילונים במנהרת הגידול הם טופלו בתכשיר ההדברה פלורומייט (bifenazate) שלא אמור היה לפגוע בפסילות, אך יתכן שבכל זאת פגע (מידע זה הועבר למדריכים והשנה נערך ניסוי שבו נבדקה השפעתו של הפלורומייט על הפסילה והתברר שהוא אכן פוגע).

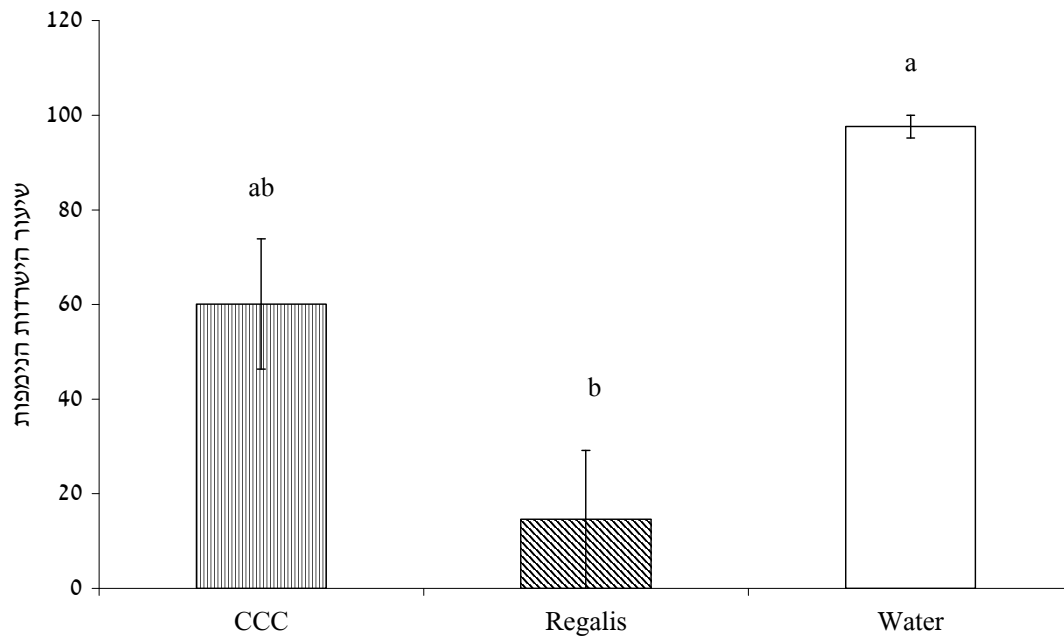
בניסוי ג בו בדקנו את את השפעת הטיפול במעכבי צימוח על שיעור ההטלה והתפתחות הנימפות על עלי אגס במעבדה נימצאו הבדלים בהטלה כאשר בעצים שטפלו ב-CCC וברגליס שיעור ההטלה היה נמוך יותר מאשר בביקורת (תרשים 2. $F_{2,27}=4.85$; $p=0.0158$). כמו כן נימצא שבעלים מעצים שטפלו ב-CCC שיעור הישרדות הבוגרים היה נמוך יותר מאשר בביקורת (תרשים 3. $F_{2,27}=7.8$; $p=0.021$). בחינת הישרדות הנימפות שבקעו מצביעה על כך ששיעור הישרדות הנימפות נמוך יותר בצמחים שטפלו ברגליס וב-CCC מאשר בביקורת (תרשים 4. $F_{2,27}=8.83$; $p=0.001$).



תרשים מס 2: מספר הביצים הממוצע לעלה לשבוע, שהוטלו על עלי ספדונה משתילים שטופלו במעכבי צימוח שונים (ממוצע ± שגיאת תקן, N=10). עמודות עם אותיות שונות נבדלות זו מזו ברמת מובהקות $p < 0.05$ ע"פ מבחן Tukey HSD.



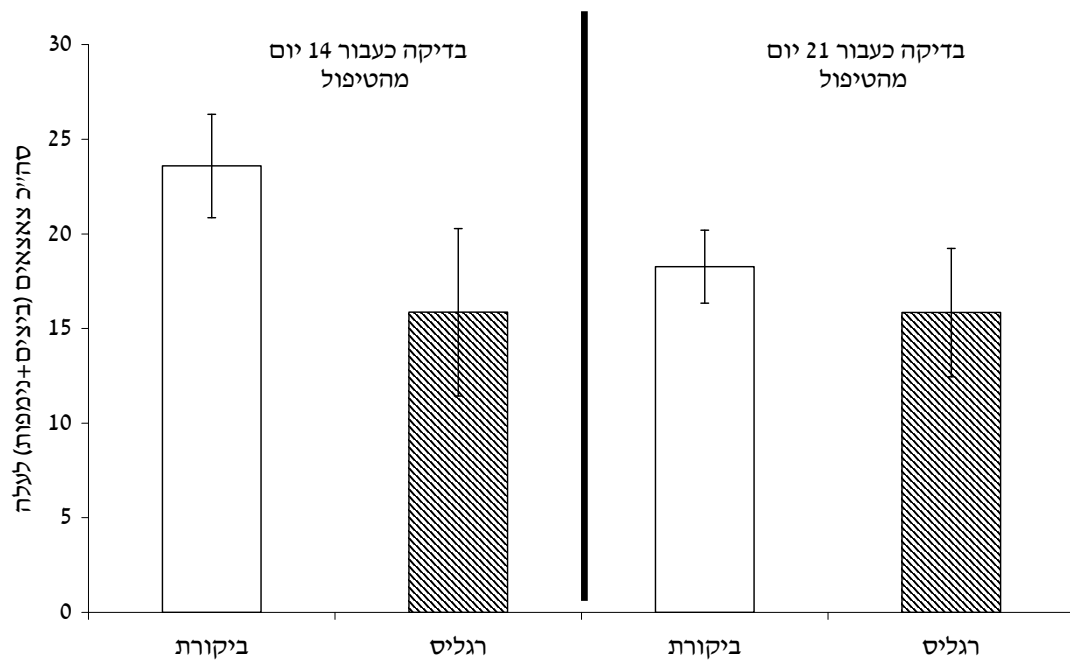
תרשים מס 3: מספר הבוגרים ששרדו כעבור שבוע על עלי ספדונה משתילים שטופלו במעכבי צימוח שונים (ממוצע ± שגיאת תקן, N=10). עמודות עם אותיות שונות נבדלות זו מזו ברמת מובהקות $p < 0.05$ ע"פ מבחן Tukey HSD.



תרשים מס 4: אחוז הנימפות ששרדו כעבור שבועים מהצבת הניסוי מקרב אלו שבקעו על עלי ספדונה משתילים שטופלו במעכבי צימוח שונים (ממוצע \pm שגיאת תקן, N=10). עמודות עם אותיות שונות נבדלות זו מזו ברמת מובהקות $p < 0.05$ ע"פ מבחן Tukey HSD.

בניסוי ד' שבו התכוונו לבדוק את השפעת מינוני ההרגליס השונים על הנגיעות הטבעית בפסילה ועל אילוח מכוון במעבדה וכן את משך הפעילות של טיפולי הרגליס, לא נימצאו הבדלים בין הטיפולים השונים לביקורת במהלך כל הניסוי. לפיכך חיכינו להתעוררות הסתוית וחזרנו על הניסוי שנית והפעם בדקנו את השפעת הטיפול ברגליס 400 ח"מ על פסילת האגס ונימצא ששיעור ההטלה היה נמוך יותר בטיפול רגליס לעומת הביקורת (1.9 ± 3.8 , 9.4 ± 22 בהתאמה $F_{1,18}=9.78$; Welch Anova $p=0.006$) כך גם מספר הבוגרים ששרדו ברגליס היה נמוך יותר מאשר בביקורת (1.49 ± 0.47 , 0.1 ± 0.1 בהתאמה $F_{1,18}=9.78$; Welch Anova $p=0.0058$) וסה"כ הצאצאים גם הוא היה נמוך יותר בטיפול הרגליס מאשר בביקורת (1.9 ± 3.8 , 9.4 ± 22 בהתאמה $F_{1,18}=9.73$; Welch Anova $p=0.0059$).

כאשר השוינו את האילוח הטבעי בטיפולים אלו שבועים ושלושה אחרי הטיפול במעכב הצימוח נימצאו 48% פחות צאצאים לעלה שבועים אחרי הטיפול אך הבדל זה לא היה מובהק. 3 שבועות אחרי יישום הרגליס ההבדל בין הטיפולים הצטמצם ל-20% בלבד (תרשים 5).



תרשים 5: מספר הצאצאים (ביצים + נימפות) ממוצע לעלה בענף חד שנתי שטופל בסתיו ברגליס 400 ח"מ וניבדק במועדים שונים (ממוצע \pm שגיאת תקן, N=10).

בניסוי ה' בו נבדקו האנדוסימביונטים המאכלסים את פסילת האגס *C. bidens* נמצאו הסוגים:

1. ***Carsonella*** – שהינו אנדוסימביונט ראשוני
2. ***Arsenophonus*** - שהינו אנדוסימביונט שניוני
3. ***Wolbachia*** - שהינו אנדוסימביונט שניוני

בסידרת ניסוי ו' נימצא בGCMS לאחר סליצילציה הבדלים בין החומרים במוהל מטיפוסי האגס השונים. הסוכר לקטוז ($C_{36}H_{86}O_{11}Si_8$) הינו חומר חשוד כסמן לעמידותמאחר והוא נמצא גם ב-760 גם בהרכבה של ספדונה על 760 וגם ב-701 אך לא נמצא בהרכבה של ספדונה על 701 (טבלה 1).

טבלה 1. החומרים שנימצאו ב-GCMS במוהל בטיפוסי האגס השונים והספדונה המורכבת עליהם

ספדונה על 760	ספדונה על 701	760	701	ספדונה	החומר
			3,370,463		C15H25NOSi2
	544,095				C16H38O5Si3
2,242,196					C21H50O7Si5
			891,456		C36H86O11Si8
4,391,818					C29H38O5Si
2,909,723					C29H38O5Si
261,245,783	12,355,018	194,348,911	112,416,154	105,363,749	C27H56O7Si5
740,649					C27H46O3Si2
	1,192,236				C27H56O7Si5
1,841,661		2,847,194		1,399,156	C36H86O11Si
578,742,445	495,043,556	594,527,647	65,117,468	225,161,511	C36H86O11Si
	1,383,169	1,009,226			C11H22Si
2,772,985		1,548,932			C16H12O5
1,989,912					C36H86O11Si
2,980,368		1,576,273			C16H12O5
	4,902,021				C36H86O11Si
1,052,742		2,838,777	10,993,219		C36H86O11Si8
1,918,334					C36H86O11Si

מסקנות ודין

עמידות טבעית-הנגיעות הטבעית הנמוכה בפסילה שנימצאה בטיפוסים Py.701-202 ו- Py.760-261 מצביעה על כך שטיפוסים אלו אכן עמידים כנגד הפסילה. תוצאות אלו תומכות בתוצאות הניסויים שנערכו בשנים קודמות עם אילוח מכוו, אך זו היתה הפעם הראשונה בה יכולנו לבחון את האילוח הטבעי. כמו כן תוצאות השדה הצביעו על מגמה של מעבר של עמידות מהכנה לרכב בטיפוס – תוצאה שהיתה מובהקת בניסויים עם אילוח מכוון בניסויים בשנים קודמות ושתיבדק בצורה מסודרת השנה.

העובדה שהשימוש בפלורומייט פגע ביכולתו להסיק מסקנות מניסויי העברת העמידות היתה מצערת אך מצד שני פתחה פתח לבדיקת יעילותו של חומר נוסף כנגד הפסילות.

באנליזות הביוכימיות של הטיפוסים העמידים נערכה פריצת דרך כאשר התגלה שנימצא סמן לעמידות- הסוכר לקטוז הנימצא בשני הטיפוסים העמידים ובספדונה המורכבת על 760 אך לא בספדונה הרגילה ולא בספדונה המורכבת על 701. בהמשך ננסה לגלות מה החשיבות של הלקטוז בעמידות.

מעכבי צימוח - בניסויים שערכנו השנה עם מעכבי הצימוח למדנו מספר דברים חשובים: השימוש במעכבי הצימוח רגליס ו-CCG גורם להפחתה בהטלה של הפסילות ובנוסף לכך מעכב הצימוח רגליס גורם בהמשך גם לפגיעה בהתפתחות הנימפות שבקעו מהביצים.

מכשולן הניסוי באוגוסט למדנו שהפעילות כנגד הפסילה הנגרמת ע"י השימוש במעכבי הצימוח מתרחשת רק כאשר הצמחים נימצאים בצימוח ולכן המחשבה המקורית שניתן יהיה להשתמש במעכבי הצימוח כחומרים המעוררים עמידות כנגד הפסילה בכל מהלך עונת הגידול כנראה מוטית. בכל מיקרה למדנו שאת הניסויים עם חומרים אלו יש לבצע רק כאשר העצים נימצאים בצימוח. בתקופת הסתיו כאשר היה צימוח סתוי נהשימוש ברגליס במינון של 400 ח"מ הפחית את שיעור ההטלה, פגע בהישרדות של הבוגרים וכן פגע בהישרדות הנימפות. אך פעולה זו נימשכה רק כ-3 שבועות מהטיפול ולאחר מכן דעכה. את משך הפעילות המדויק נצטרך לברר בניסויים נוספים שנערוך השנה.

זיהוי האנדוסימביונטים המצויים במין הפסילה המזיק באגסים בארץ הינו תגלית מדעית חדשה. בנוסף תגלית זו תאפשר לנו לבחון את המנגנונים האחראיים לעמידות כנגד הפסילה- הן הטבעית והן המושרית.