

אפיון משק המים של פסילת האגס והמנגנונים המעורבים בתהליך הפרשת טל הדבש

חיים ראובני¹ ואפרים כהן²

¹ המרכז להדברה משולבת, מו"פ צפון.

² המחלקה לאנטומולוגיה, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה.

תקציר

פסילת האגס היא מזיק מפתח במטעי האגס בארץ. דרגות הנימפה מפרישות כמויות גדולות של טל-דבש עליו מתפתחת פייחת המכערת את הפירות ומפחיתה מערכם המסחרי. הדברת המזיק עם קוטלי חרקים מוגבלת ומעמיסה מאוד על הוצאות המגדל. מטרות המחקר העיקריות היו לפתח שיטה למדידה כמותית של טל הדבש ולאפיין את פעילות האנזים α -glucosidase עם וללא מעכבים כאמצעי לפיתוח קבוצה חדשה של תכשירים היכולים להשפיע על מערכת הפרשת טל הדבש על ידי החרק. הוקמה תשתית לגידול הפסילה על הצמח הפונדקאי כדי לספק חרקים לצרכי המחקר. פותחה שיטה למדידה כמותית של טל הדבש שהופרש מנימפות בדרגה וגיל ידועים, פותחה שיטה לאיפיון האנזים α -glucosidase ונערכו ניסויים עם וללא מעכבים. נמצא שהשיטה היעילה ביותר למדידה כמותית של טל הדבש היא על ידי שקילה במאזניים אנליטיים. בבדיקה in-vitro של הפעילות המעכבת של חומרים אימינוסוכרים השונים ברמת ההידרופוביות שלהם נמצא שככל שהחומר הידרופובי יותר יש ירידה בפרוטנציאל העיכוב. לא ניתן היה לקבל את השפעתם של המעכבים על החרק in-vivo בגלל תגובה פיטוטוקסית בצמח הפונדקאי. כדי לבדוק את השפעת המעכבים על החרק יש צורך לפתח מערכת להזנה מלאכותית של נימפות הפסילה ללא תלות בצמח הפונדקאי.

מבוא

פסילת האגס *Cacopsylla bidens* (Sulc) היא מזיק מפתח במטעי האגס בארץ. דרגות הנימפה מפרישות כמויות גדולות של טל-דבש עליו מתפתחת פייחת המכערת את הפירות ומפחיתה מערכם המסחרי. יעילות הדברת המזיק עם תכשירים כימיים מוגבלת ואין בה כדי למנוע לגמרי את הנזק המצטבר כתוצאה מטל הדבש על הפירות. הפרשת טל הדבש היא אחד הפתרונות של חרקים מוצצים כדי להיפטר מהעקה האוסמוטית הנגרמת כתוצאה ממציצת מוהל הפלואם בעלים שבו יש ריכוז גבוה ביותר של הדיסכריד סוכרוז. במחקר הנוכחי נבדקה האפשרות להשפיע על הפרשת טל הדבש על ידי עיכוב המערכת האנזימטית המעורבת בתהליך זה.

מטרות המחקר

1. פיתוח שיטה למדידה כמותית של טל הדבש המופרש על ידי פסילת האגס וקביעת ההרכב וכמות הסוכרים בטל הדבש.
2. איפיון האנזים α -glucosidase והשפעת מעכבים על פעילותו in vitro ו- in vivo

פרוט עיקרי הניסויים והתוצאות

א. ביסוס גידול המוני ומבוקר של פסילת האגס

כדי להשיג את מטרות המחקר היה צורך בהקמת מערך לגידול המוני של פסילת האגס על עצי האגס מהזן ספדונה שהוחזקו בעציצים בנפח של 50 ליטר בתנאי טמפרטורה קבועה של 25 מ"צ ותאורת יום טבעית. בוגרים של החרק נאספו בעזרת מגש הכאות ואספירטור ממטעים מסחריים והועברו אל עצי האגס. ברוב המקרים הבוגרים התבססו והטילו ביצים שמהן בקעו נימפות חיוניות. בשיטה זאת ניתן היה לבצע ניסויים על פרטים של פסילת האגס שגילם ידוע ושלא נחשפו לתכשירי הדברה. הקושי העיקרי במערכת זאת היה בריסון התפתחות הפסילה על עצי האגס והגבלת התפתחותם של מזיקים נוספים (בעיקר אקריות ועשי מנהרות). כדי למנוע אכלוס מופרז של הפסילה על העץ הוסרו חלק מהעלים שעליהם התפתחו נימפות. חלקן הועבר למערך הניסויים למדידה כמותית של טל הדבש והנותר הושמד. כך ניתן היה לווסת את רמת האוכלוסייה המתפתחת על הצמח הפונדקאי. כדי להתגבר על בעיית האכלוס של מזיקי עלווה אחרים הוסרו והושמדו באופן מחזורי חלקי צמח נגועים במזיקים שונים. כמו כן, עצי האגס חודשו בעצים אחרים שהוחזקו בתנאים דומים ולא היו מאוכלסים בפסילה ובמזיקים אחרים. כך, שלמרות הקשיים באחזקת מערכת הגידול ניתן היה לקבל בתקופות שונות עודף של נימפות הפסילה לצרכי המחקר.

ב. פיתוח שיטה למדידה כמותית של טל הדבש

כדי למדוד את כמות טל הדבש המופרשת על ידי פסילת האגס הוחזקו נימפות בודדות בגיל ידוע על עלה מנותקים עם פטוטרת (נימפה אחת לעלה בודד) שהוכנסו למבחנות סגורות בנפח 50 מ"ל. עלים עם פטוטרת במבחנות סגורות נשמרים חיוניים לתקופה ממושכת ושיטה זאת ניתן היה לעקוב אחר התפתחות הנימפה עד המעבר לדרגה הבאה (כארבעה ימים עבור המעבר מנימפה בדרגה ראשונה לשנייה וכיומיים עבור המעבר של יתר הדרגות) תוך שמירה על חיוניות העלה והחרק. לרוב, נערך המעבד אחר נימפה בדרגה שנייה עד התפתחותה לדרגה השלישית. לצורך זה הועברו נימפות בדרגה ראשונה מיד עם בקיעתן מהביצים בגידול ההמוני אל עלים מנותקים בודדים שהוחזקו במבחנות סגורות כמפורט לעיל. כדי להבטיח שהנימפות לא תיפגענה בתהליך ההעברה (למשל כתוצאה מניתוק גפי הפה הנעוצים ברקמה הצמחית), הועברו רק נימפות שנמצאו בתנועה או שגרמנו להן לנוע על העלה על ידי נגיעה עדינה במכחול דק. לאחר התפתחות הנימפה מדרגה ראשונה לדרגה שנייה סולקה מהעלה שארית הנשל וטל הדבש שהופרש ונערך מעקב אחר התפתחות הדרגה השנייה לדרגה השלישית. שלבי ההתפתחות של הדרגות השונות נקבעו לפי סימני הנשל, וזיהוי הדרגה השלישית נעשה לפי התפתחות ניצני הכנפיים החסרים בדרגה השנייה.

בשלב ראשון נבדקו שתי שיטות למדידה כמותית של טל הדבש: האחת, על ידי שאיבת טל הדבש לטיפ אפנדורף בעזרת אספירטור, והשנייה על ידי ניתוח גודל הטיפה בצילום דיגיטלי בעזרת התוכנה Image-Pro.

בשאיבה של טל הדבש לטיפ אפנדורף בעזרת אספירטור התקבל בחלק מהמקרים מקטע לא רציף, והיה קושי לקבוע את נפח הדוגמא שנשאבה. הסיבה העיקרית לכך הייתה צמיגות הדוגמא שהרכבה העיקרי כלל בנוסף לסוכרים המופרשים גם חומר המכונה lerp שהרכבו עמילני (תמונה

1). בנוסף, היו מקרים שפעולת השאיבה גרמה לנימפה לזוז ממקומה ולהתיישב במקום חדש על העלה, והדבר פגע ברמת הדיוק של תהליך איסוף טל הדבש.

בשיטת המדידה בעזרת צילום של טיפות טל הדבש ועיבוד עם תוכנת Image Pro התקבלו נתונים שהתייחסו לשטח הטיפה והיקפה בלבד והיה קושי לשנות את זווית הצילום כדי לקבל את מימד העומק לצורך חישוב הנפח.

כדי להתגבר על הבעיות שהתקבלו במדידה הכמותית של טל הדבש בשיטות של שאיבה וצילום (לעיל) ערכנו ניסויים למדידה כמותית של טל הדבש על ידי שקילה במאזניים אנליטיים. במערכת זאת נערך מעקב אחר התפתחות נימפה בדרגה שנייה עד המעבר לדרגה השלישית (לרוב במשך יומיים) על עלים מנותקים בודדים. בתקופה זאת שהתה הנימפה באותו אזור כך, שכל טל הדבש שהופרש מדרגה זאת היה מרוכז באזור אחד בעלה והדבר הקל על תהליך הכימות. מיד לאחר מעבר הנימפה לדרגה השלישית סולקו הנימפה והנשל מהעלה. כדי לשקול את טל הדבש גזרנו את דסקית העלה בה היה תחום טל הדבש ושקלנו באמצעות מאזניים אנליטיים. לאחר השקילה ניגבנו וייבשנו את דסקית העלה משאריות טל הדבש ושקלנו שוב. כך, ניתן היה לקבל את משקל דסקית העלה עם ובלי טל הדבש ולחשב את כמות טל הדבש שהופרשה. תוצאות השקילה מתוארות בטבלה 1. כמות טל הדבש הממוצעת שהופרשה מנימפה בדרגה שנייה הייתה 0.9 מ"ג (± 0.3). הכמות המינימאלית שנמדדה הייתה 0.5 מ"ג והכמות המקסימאלית 1.3 מ"ג. מערכת זאת, למרות מורכבותה, פותחה כדי לבדוק בהמשך את השפעת מעכבי α -glucosidase על הפרשת טל הדבש של פסילת האגס in-vivo.

תמונה 1. תאור טיפת טל הדבש שהופרשה על ידי נימפה של פסילת האגס בדרגה שנייה.

(מלבד טל הדבש, ניתן להבחין בשובל הלבן הנפרש בחלקה האחורי של הנימפה המכונה lerp שהרכבו עמילני).



טבלה 1. משקל ממוצע (\pm SD מ"ג) של טל הדבש שהופרש על ידי נימפה בדרגה השנייה של פסילת האגס שהוחזקה בתנאים מבוקרים על עלה בודד של אגס.

משקל טל הדבש (\pm SD מ"ג) [מקסימום-מינימום]	משקל דסקית העלה ללא טל הדבש (\pm SD מ"ג) [מקסימום-מינימום]	משקל דסקית העלה עם טל הדבש (\pm SD מ"ג) [מקסימום-מינימום]	מספר הפרטים
0.9 \pm 0.3 [1.3-0.5]	353.4 \pm 131.5 [623.9-121.5]	354.3 \pm 131.6 [624.5-122.4]	55

ג. איפיון פעילות האנזים α -glucosidase

איפיון הפעילות in vitro נערכה באנזים α -glucosidase שמוצה מפרטים בוגרים של פסילת האגס שנאספו ממטעים מסחריים ונשמרו בהקפאה בטמפרטורה של מינוס 80 מ"צ. בוצעו ניסויים הקדמיים לקביעת הבודרים המתאימים לריסוק החרקים והכנת ההומוגנטים וכן, תנאי הריאקציה בהתייחס לטמפרטורה המתאימה, ריכוז הסובסטרט ומשך הריאקציה האנזימטית. בניסויים אלו נמצא שההומוגנט שהתקבל לאחר ריסוק הפסילות הבוגרות בבופר פוספאט ללא דטרגנט לא אפשר קריאה אנזימטית מהימנה מאחר וגם לאחר הסינון הוא היה עכור כתוצאה מנוכחותם של ליפידים שמקורם, כפי הנראה, בגוף השומן של החרק. לפיכך, הוספנו לבופר הפוספאט את הדטרגנט Triton X-100 בריכוזים החל ב-0.25% ועד ל-2%. כמו כן, הוספנו לבופר, ללא נוכחות הדטרגנט, KCl בריכוזים שונים. בתנאים אלו נמצא כי פעילות האנזים α -glucosidase בפסילת האגס ניתנת לכימות והיא בסדר גודל של 700-800mOD לדקה למ"ג חלבון בשלב הלינארי של הריאקציה. הוספת הדטרגנט Triton X-100 לבופר ההומוגנציה בריכוז

של 0.5% v/v שיפרה את הפעילות האנזימטית אך, רמה גבוהה יותר גרמה לפעילות נמוכה באופן משמעותי. רמות גבוהות של אשלגן כלורי (1%-2%) גרמו אף הן לירידה בפעילות האנזים. ריכוז מלח נמוך יותר היה היעיל ביותר (תמונה 2). כדי להתגבר על התופעה של עכירות ההומוגנט הוסף פחם פעיל אך, טיפול זה לא שיפר את פעילות האנזים ואף עיכב אותו באופן ניכר (תמונה 3D).

בתהליך המיצוי שנמצא כמתאים נעשה שימוש בבופר ריסוק המכיל potassium phosphate (50mM, pH 6.8) ו-0.5% Triton X-100. יחס חרק/בופר היה 500 בוגרי פסילה ל-1 מ"ל. לאחר פעולת הריסוק ההומוגנט סורכז במהירות של 11,000 rpm למשך 20 דקות והנוזל העליון שהתקבל סורכז פעם נוספת למשך 5 דקות באותה מהירות סירכוז. הנוזל העליון שהתקבל לאחר פעולה זו שימש כמקור לאנזים.

הריאקציות האנזימטיות בוצעו בפלטות פלסטיק עם 96 בארות בנפח סופי של 200 מיקרוליטרים בכל באר. לכל באר הוספו 50 מיקרוליטרים של האנזים ו-50 מיקרוליטרים של בופר פוספאט ללא הדטרגנט Triton X-100. לאחר תקופת אינקובציה של 4 דקות בטמפרטורה של 30 מ"צ הוספו 100 מיקרוליטרים של הסובסטר *p*-nitrophenyl- α -glucoside המומס בבופר פוספאט בריכוז סופי של 5mM. הריאקציה האנזימטית נמשכה 5 דקות ב-30 מ"צ ועוצמת הצבע שהתפתח נקראה באורך גל של 405nm במכשיר Thermomax Microplate Reader. רמת החלבון נקבעה באופן קולורימטרי לפי שיטת Bradford.

המערכת האנזימטית נבדקה לאפשרות העיכוב על ידי מעכבים תחרותיים מהדגם של DNJ, מולקולה בה החמצן בטבעת הגלוקוז הותמר באטום החנקן. נמצא כי DNJ הוא מעכב חזק ביותר וכבר בריכוז של 0.1 μ M פעילות האנזים מעוכבת בלמעלה מ-50% וברמה גבוהה של 2 μ M פעילות האנזים מעוכבת לחלוטין (תמונה 3).

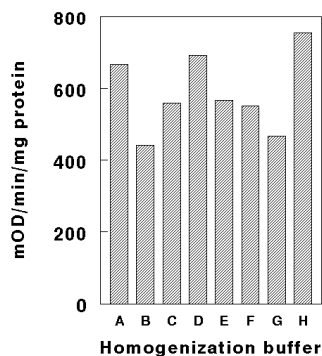
תמונה 2. השפעת בופרים של הומוגניזציה על פעילות α -glucosidase של פסילת האגס.

A- בופר פוספאט

B-E - בופר פוספאט בתוספת Triton X-100 בריכוזים של 2%, 1%, 0.5% ו-0.25% בהתאמה.

H-F - בופר פוספאט בתוספת KCl בריכוזים של 2%, 1% ו-0.5% בהתאמה.

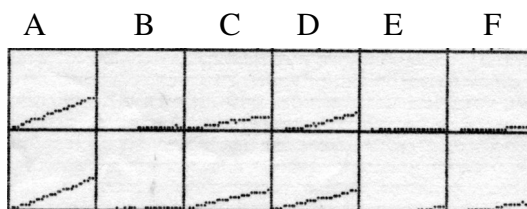
רמת החלבון ב-50 מיקרוגרם של ההומוגנאט בריאקציה האנזימטית היה $25\mu\text{g}$. הפעילות האנזימטית של α -glucosidase מבוטאת כ-mOD/min/mg protein וחושבה על פי הפזה הלינארית של הריאקציה.



תמונה 3. תרשים הפעילות הרציפה של α -glucosidase במשך 5 הדקות הראשונות של הריאקציה האנזימטית.

בופר ההומוגניזציה ב-A-F הכיל Triton X-100 בריכוז של 0.5%.

A- בקורת; B- נוכחות המעכב DNJ (N-deoxynojirimycin) בריכוז של $10\mu\text{M}$; C- $2\mu\text{M}$ DNJ; D- הומוגנט + פחם פעיל; E- כמו D בתוספת $10\mu\text{M}$ DNJ; F- כמו D בתוספת $2\mu\text{M}$ DNJ.

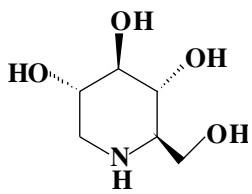


בניסויים לבדיקת יעילות העיכוב של האימינוסוכרים נבדק תחילה טווח ריכוזי המעכב שיאפשרו מדידה של עיכוב ברמות שבין 20%-80%. בהמשך לניסויים אלה בוצעו הניסויים הקובעים בריכוז סופי של המעכבים במערכת הריאקציה האנזימטית. לצורך קביעת הריכוז המעכב את

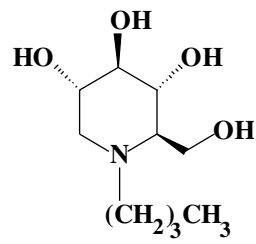
50% מפעילות האנזים (IC_{50}) נבדקו 5-6 רמות שונות של המעכב בטווחים של 0.1-10 μM ל-DNJ ושל 0.5-100 μM לשאר המעכבים: NB-DNJ, NN-DNJ, N7-OD. המעכבים הוכנסו בהתאם לריכוזים השונים למערכת הריאקציה לאחר פרה-אינקובציה של 5 דקות ב- $30^{\circ}C$. הריאקציה האנזימטית החלה עם הכנסת הסובסטרט.

תאור המבנה הכימי של המעכבים מפורט באיור 1. ההבדל ביניהם הוא באורך שרשרת הפחמנים הקשורה לחנקן בטבעת הסוכר. ככל שהשרשרת ארוכה יותר היא מקנה למולקולה הידרופוביות גבוהה יותר אך, הם עדיין מסיסים במים ומאפשרים הכנת ריכוזים סופיים בטווחים הגבוהים מ- $100\mu M$. בבדיקת הפעילות בהשפעת המעכבים התקבל יחס הפוך בין רמת ההידרופוביות של החומר לבין רמת העיכוב (איור 2a,b). ניתן לחלק באופן גס את עוצמת העיכוב של 9 המעכבים שנבדקו ל-3 קטגוריות (טבלה 1). SP-1508 ו-DNJ מעכבים חזקים שלהם ערכי IC_{50} ברמה של $0.1\mu M$ ומטה. מעכבים שערכי 50% עיכוב הם בסדר גודל אחד נמוך מהקודמים (SP-146, SP-112, DNJ-NB), ומעכבים חלשים הנמוכים בכמעט שני סדרי גודל (SP-142, NN-DNJ, N7-OD). OD-DNJ באופן כללי, יש קשר בין המבנה הכימי של המעכב לבין רמת העיכוב שלו. ככל שעולה רמת ההידרופוביות של החומר כך יורד פוטנציאל העיכוב. עם המעכב ההידרופילי, DNJ, התקבל 50% עיכוב בריכוז של $0.1\mu M$. עם המעכב NB-DNJ, בעל שרשרת פחמנית ארוכה של בוטיל התקבל 50% עיכוב ברמה של $2\mu M$ ואילו עם NN-DNJ בעל שרשרת של 9 פחמנים התקבל 50% עיכוב בריכוז גבוה יותר של המעכב ($6\mu M$). המעכבים SP-1058 ו-SP-146 למרות השייר ההידרופובי הקשור לטבעת הסוכר, הן מולקולות טעונות בגלל שהחנקן הוא רביעוני ותורם להידרופיליות. המעכבים ההידרופוביים SP-140, SP-142 ו-N7-OD-DNJ עם שרשרת צדדית אתרית הם מעכבים חלשים (IC_{50} , 4-8 μM). בסיכום, SP-1058 ו-DNJ ההידרופיליים מבין המעכבים שנבדקו הם היעילים ביותר בהשוואה לאחרים ומתחרים היטב עם הסובסטרט באתר הקטליטי של האנזים.

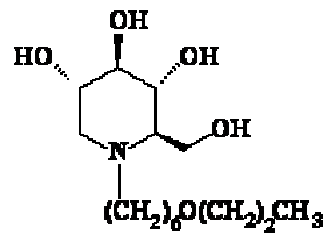
כדי לבדוק את השפעת המעכבים על החרק עצמו (in-vivo) גידלנו נימפה בודדה של פסילת האגס בדרגה ראשונה על עלה בודד הצמוד לפטוטרת שקצהו טבול במים. לאחר התפתחות הנימפה לדרגה שנייה ניקינו את שאריות הנשל וטל הדבש והעברנו את העלה למבחנת אפנדרוף המכילה 500 מיקרוליטרים מים בלבד. את פתח המבחנה אטמנו בעזרת נייר פארפילים וכך הצלחנו להשאיר את העלה והחרק חיוניים למשך 48 שעות (כמות קטנה יותר של מים לא הספיקה לתקופה זאת) עד המעבר לנימפה בדרגה שלישית (ראה פרוט זיהוי הדרגות וההעברה לעלה בודד לעיל). ברוב המקרים הנימפה נשארה במיקום קבוע על העלה והפרישה טל דבש. בשיטה זאת ניסינו לבדוק את השפעת המעכב NB-DNJ המומס במים (בריכוזים 5mM-20mM). קיבלנו תגובה פיטוטוקסית בעלה שהתבטאה בכתמים אדומים עד שחורים בהיקפו, ולא ניתן היה לבדוק את השפעת המעכבים in-vivo. כמו כן, נראה שכושר היניקה של העלה נפגע כיוון שלאחר 48 שעות נותרה מעל 50% מכמות המים במבחנות בהשוואה למבחנות עם מים בלבד שבהם נותרה לרוב פחות מ-25% מהכמות הכללית. להערכתנו המערכת אינה מתאימה לבדיקה של המעכב ויש איפה צורך בפיתוח שיטה נפרדת לבדיקת השפעת העיכוב על החרק במערכת הזנה מלאכותית או בתמיסה שאינה גורמת לתגובה פיטוטוקסית בצמח הפונדקאי.



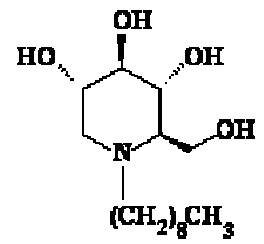
DNJ



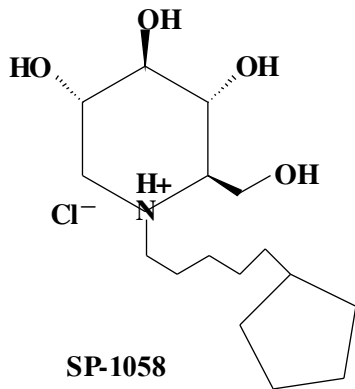
NB-DNJ



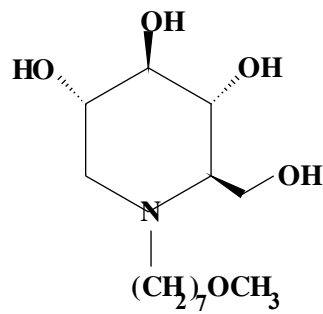
N7-OD-DNJ



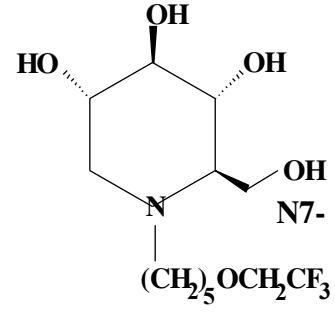
NN-DNJ



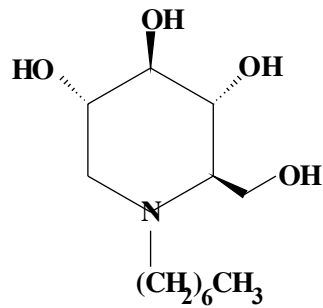
SP-1058



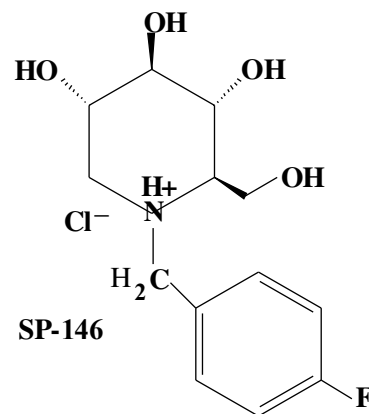
SP-140



SP-142

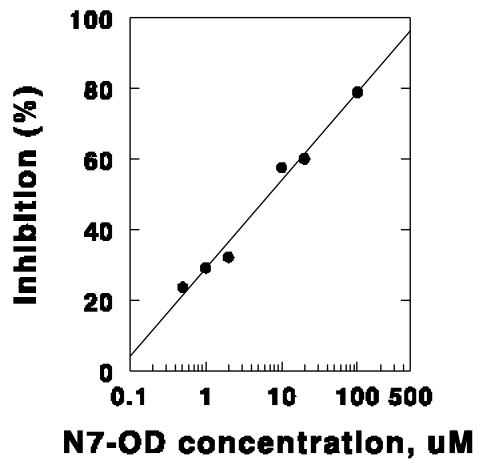
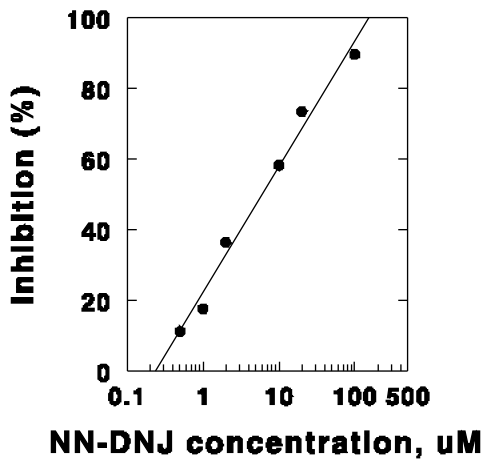
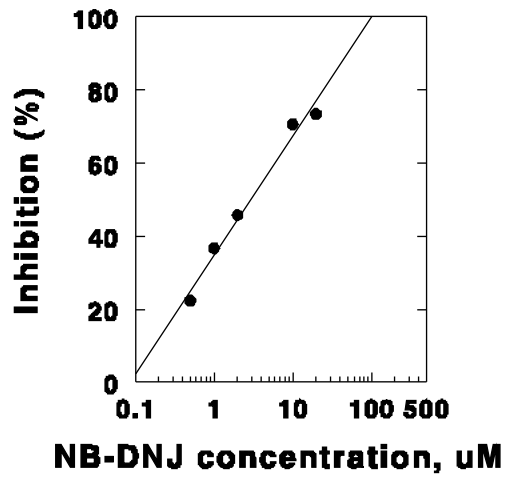
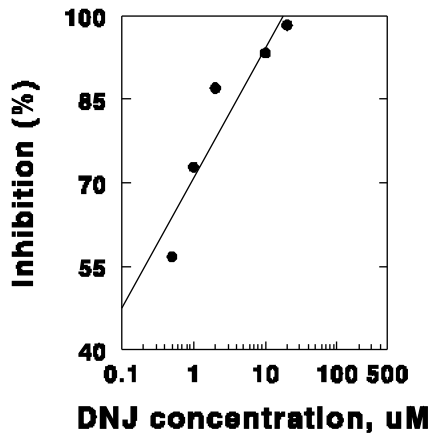


SP-112

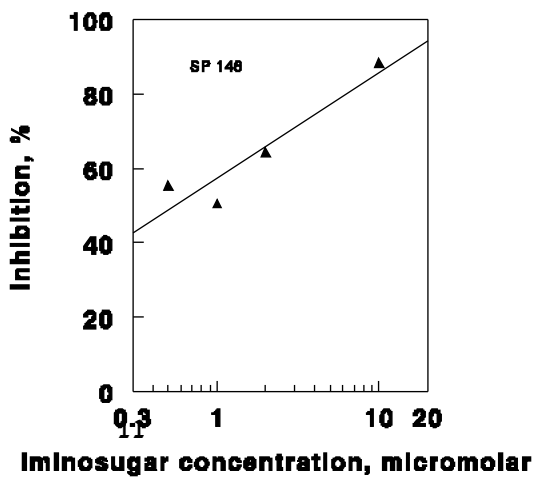
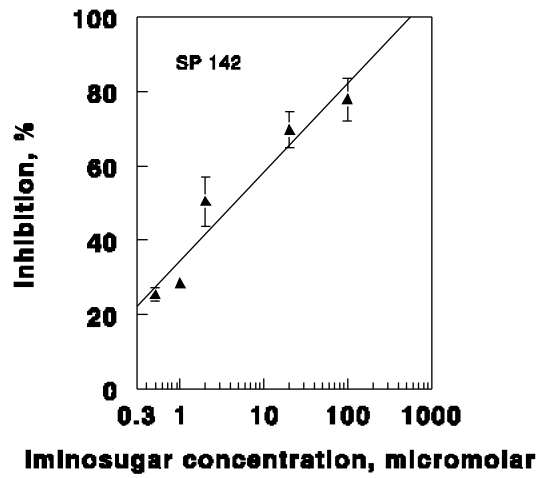
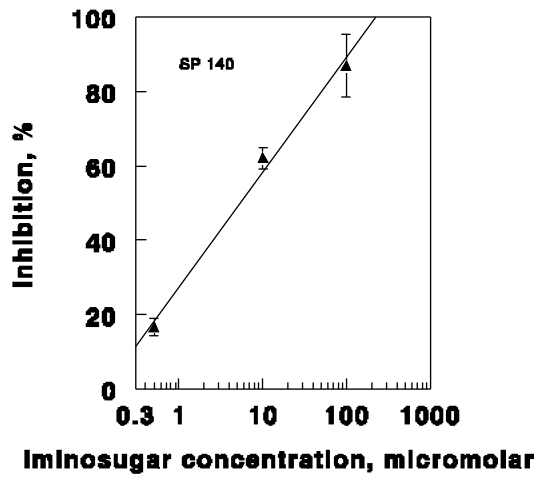
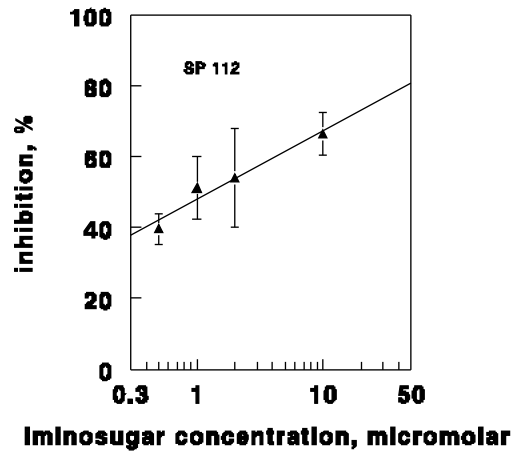
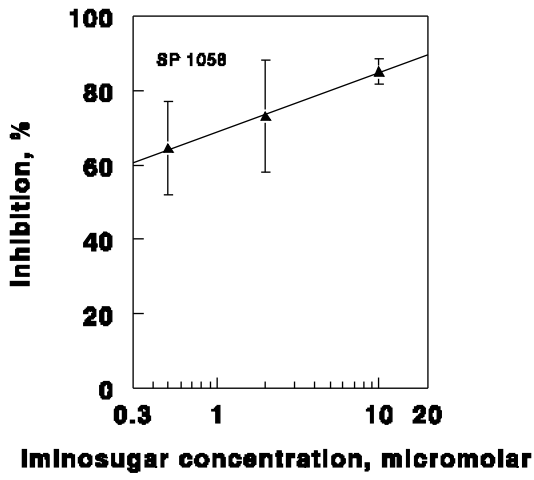


SP-146

איור 1. המבנה הכימי של מעכבי α -glucosidase שנבדקו בפסילת האגס.



איור 2a. עיכוב האנזים α -glucosidase בהשפעת ריכוזים שונים של המעכבים.



איור 2b. עיכוב האנזים α -glucosidase בהשפעת ריכוזים שונים של המעכבים.

טבלה 1. 50% עיכוב האנזים α -glucosidase ע"י מעכבים אימינוסוכריים

Iminosugar	IC ₅₀ , μ M
SP-1058	<0.1
DNJ	0.1
SP-146	0.7
SP-112	1.2
NB-DNJ	2.0
SP-142	4.0
NN-DNJ	6.0
SP-140	6.0
N7-OD-DNJ	8.0

דיון וסיכום

מטרות המחקר העיקריות היו לפתח שיטה למדידה כמותית של טל הדבש ולאפיין את פעילות האנזים α -glucosidase עם וללא מעכבים. היה לפיכך צורך להקים מערך גידול של הפסילה שישמש כמקור לאספקה שוטפת של חרקים למחקר. כיוון שלא ידועה מערכת הזנה מלאכותית לפסילת האגס גידול החרק היה על עצי אגס שהם הפונדקאי הבלעדי למין זה. הקושי העיקרי באחזקת הגידול היה בוויסות אוכלוסיית הפסילה כך שלא תגרום להתמוטטות הצמח הפונדקאי, והגבלת התפתחותם של מזיקים אחרים (בעיקר אקרית צהובה). באופן כללי, ניתן היה להתגבר על קשיים אלה על ידי סילוק פיסי של חלקי צמח נגועים ורענון מערכת הגידול בצמחים חדשים שאינם מאוכלסים במזיקים. אך למרות זאת, הגידול לא היה יציב והיו תקופות שבהן היה צורך להמתין להתחדשות האוכלוסייה, דבר שהשפיע על רציפות הניסויים והמחקר.

בבדיקת ההשפעה (in-vitro) של מעכבים אימינוסוכריים הנבדלים באורכה ובאופייה של השרשרת הצדדית נמצא שככל שהיא ארוכה יותר (חומר הידרופובי יותר) יש ירידה בפוטנציאל העיכוב. זאת למעט ממולקולות טעונות עם שייר הידרופובי (ולפיכך הידרופיליות בגלל החנקן הרביעוני) שהן בעלות פוטנציאל עיכוב חזק ביותר. יש להדגיש עם זאת כי מאחר והניסויים

שבוצעו הם ניסויי *in vitro*, אין להסיק מהם על פעילות *in vivo* של המעכבים מאחר ותכונת ההידרופוביות מאפשרת נגישות לאנזים הממוקם ככל הנראה בדופן המעי התיכון של פסילת האגס. יתכן כי בניסויי *in vivo*, תתקבל תמונה הפוכה ובה המעכבים ההידרופוביים יהיו יעילים יותר.

כדי ללמוד על השפעת המעכבים *in-vivo* היה צורך לפתח שיטה למדידת כמות טל הדבש המופרשת מנימפות הפסילה. בשיטה שפיתחנו הצלחנו לבדוד בהצלחה נימפות בדרגה ובגיל ידועים שהתפתחו על עלה בודד שהוחזק במים. במערכת זאת ניתן היה לעקוב אחר התפתחות של נימפה מדרגה שנייה לדרגה שלישית באזור מוגדר בעלה. את כמות טל הדבש שהופרשה באותו אזור ניתן היה לחשב לאחר שקילת דסקית העלה עם ובלי טל הדבש. למרות השונות בכמות טל הדבש שנמדדה (כתוצאה מחפיפה במעבר מנימפה שנייה לשלישית), נראה שמכלל השיטות שבדקנו שיטה זאת היא היעילה ביותר והמתאימה למדידת כמות טל הדבש עם וללא מעכבים של α -glucosidase. המגבלה העיקרית הייתה בתגובה פיטוטוקסית שהתקבלה בעלים בהשפעת המעכב NB-DNJ שלו שרשרת פחמנית ארוכה של בוטיל.

לסיכום, הצלחנו לפתח שיטה מתאימה לכימות טל הדבש המופרש מפסילת האגס ולאפיין את פעילות האנזים עם מעכבים אימינוסוכרים שונים במערכת *in-vitro*, אך לא הצלחנו לכמת את פעילותם על החרק *in-vivo*. כדי להשלים פעילות זאת אנו מציעים לפתח בשלב ראשון מערכת מתאימה לבדיקת המעכבים על החרק הניזון על דיאטה מלאכותית ללא תלות בפונדקאי הצמחי. בהמשך צריך לפתח מערכת לבדיקה על החרק המתפתח על הפונדקאי הצמחי ולמנוע תגובה פיטוטוקסית בצמח. פיתוח מערכת כזאת יאפשר סינון ובחירת מעכבים פוטנציאליים היכולים להשתלב בעתיד כתכשירים מסחריים מקבוצה חדשה. לקבוצה זו אופן פעולה חדש המשפיע על משק המים ותהליך הפרשת טל הדבש בפסילת האגס ובחרקים מוצצים אחרים הגורמים לנזק דומה בגידולים חקלאיים.