

שימוש בצמחי מלכודת להקטנת האוכלוסייה של וקטור מחלת הצהבון בגפנים.

ב. צוות החוקרים:

חוקר ראשי: רקפת שרון
חוקרים משניים: פיליס וינטראוב
אלי הררי
ויקי סורוקר
תרצה זהבי
מוניר מואסי

1. 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 הוקטור(ים) של המחלה שהוא אחד ממיני הציקדות leaf hopper או plant-hopper. מאחר וגורם המחלה, פיטופלסמה, לא יכול להתקיים מחוץ לתאים חיים (של הצמח או של הוקטור) יש קושי להדביר באופן ישיר את המחלה, ומן ההכרח הוא למצוא דרכים עוקפות להפחתת שעור ההעברה של גורם המחלה לגפנים. עד היום נסרקו וקטורים פוטנציאליים (Klein et al., 2001; Orenstein et al., 2003) אך לא נבדקו פתרונות אפשריים למניעת הגעתם לכרם. בתוכנית זו אנו מציעים לבחון דרך שתמנע את הגעת הוקטור אל הכרם על ידי השימוש בפונדקאי המועדף כצמח מלכודת ושיטת לכוד והרוג. החרק היחיד המוכר בכרמים בישראל ונמצא כווקטור של פיטופלסמה לגפן בעולם היא הציקדה *Hyalesthes obsoletus* (להלן *Ho*). דרך ההדברה המוצעת מתבססת על תוצאות הקדמיות המראות כי שיח אברהם הינו הפונדקאי המועדף על הוקטור בעוד הגפן הינה הפונדקאי הפחות מועדף מתוך מגוון פונדקאים שנבדקו.

מטרת המחקר-

בחינת האפשרות להשתמש בשיח אברהם כצמח מלכודת לציקדה *H. obsoletus* הנושאת את גורם מחלת הצהבון, ובכך להקטין מספר הגפנים הנגועות במחלה.

מטרות המחקר בתקופת הדו"ח-

- א. ביסוס ההנחה ש *Ho* הוא הווקטור של מחלות פיטופלסמה לגפנים בישראל.
- ב. בדיקת העמידות של שיח אברהם למחלה- ניסיונות הדבקה מכוונים ובדיקת חלקי הצמח לנגיעות במחלה.

ג. בדיקת היעילות של השימוש בשיח אברהם למניעת כניסת הציקדה לכרם: גודל האוכלוסייה על הפונדקאי, מרחק התנועה בין צמח המלכודת לגפנים, השפעת נוכחות צמחי מלכודת על נוכחות ציקדות בכרם ועל הנגיעות במחלה.

ד. הדברת הציקדה על צמחי מלכודת וניסיונות יעילות חומרי הדברה במטע זיתים.

ה. התחלת ניסיונות לגידול ציקדות בבית רשת

2. מהלך הניסויים והתוצאות.

א. ביסוס ההנחה ש- Ho מעביר את הפיטופלסמה לגפן

מהלך הניסוי-

בבית רשת הוצבו 100 ייחורי גפן מהזן שרדונה הרגיש למחלת הצהבון. מדגם מהשתילים נבדק ונמצא נקי מפיטופלסמה. ניסיונות ההדבקה נערכו במספר גדול של מועדים, זאת מאחר ועדיין אין לנו מידע לגבי מועד הרכישה של הפיטופלסמה על ידי Ho ומשך התקופה מהרכישה ועד היותם בעלי יכולת הדבקה (אינפקטיביים). עם הופעת פרטים בוגרים של Ho נאספו בכל שבוע 50-100 ציקדות אשר הופרדו לזוויגים הוכנסו לשקיות רשת בקבוצות של 10-20. השקיות הולבשו על הייחורים על שריגים עם עלים בריאים, נקשרו והושארו על הגפן עד מותן של הציקדות. בסך הכל 40 שתילים בדור ראשון (8 מועדים) ו- 12 שתילים בדור השני (4 מועדים). בדור הראשון נאספו הציקדות מהשקיות לאחר שלא נותרו ציקדות חיות ובדור השני נאספו הציקדות המתות אחת ליומיים. הציקדות הושמו באפנדורף המכיל אלכוהול 95% ונשמרו במקרר. ציקדות אלו יעברו בדיקה לנשאות המחלה ב- PCR. נערך מעקב אחר התפתחות סימפטומים אופייניים לצהבון בשתילים ועלים מהצמחים עליהם הוצבו הציקדות ניבדקו לנגיעות במחלת הצהבון. תוצאות- בחלק מהצמחים נראים סימפטומים של מחלת הצהבון ובדיקות ה- PCR יערכו בהמשך.

ב. בדיקת העמידות של שיח אברהם למחלה

1.1. הרכבות צמחים נגועים על שיח אברהם

מהלך הניסוי-

קטעי גבעול של וינקה נגועה בסטולבור "הורכבו" על שלושה שתילים של שיח אברהם, וזמורות מגפן נגועה "הורכבו" על שני שתילים של שיח אברהם. למרות שכמובן לא היתה קליטה של ההרכבה הקטעים המורכבים נישארו חיוניים במשך יותר משבוע תוך מגע הדוק עם צמחי שיח אברהם. אחת לחודשיים נבדקו השיחים ב- PCR לנוכחות פיטופלסמה. ריכוז הפיטופלסמה בצמח נגוע גבוה ולכן ההעברה ע"י הרכבה היא שיטה אלימה יחסית. במידה ולא תתקבל הדבקה בשיטה זו ניתן יהיה להניח בודאות רבה ששיח אברהם לא יכול להידבק בפיטופלסמה מטיפוס Stolbur. תוצאות- לא נראו סימפטומים של המחלה ובכל בדיקות ה- PCR שנערכו לצמחים לא נמצאו סימנים לנוכחות פיטופלסמה.

ב.2. הדבקה של שיח אברהם ע"י ציקדות

מהלך הניסוי-

בכלובי רשת הוצבו שתילים של שיח אברהם וציקדות שנאספו בשטח במהלך הדור הראשון. נערך מעקב אחר הופעת סימפטומים של המחלה והשיחים נבדקו לנוכחות פיטופלסמה ב-PCR. תוצאות- לא נראו סימפטומים של המחלה ובכל בדיקות ה-PCR שנערכו לצמחים לא נמצאו סימנים לנוכחות פיטופלסמה.

ג. בדיקת היעילות של השימוש בשיח אברהם למניעת כניסת הציקדה לכרם- השפעת

נוכחות צמחי מלכודת על נוכחות ציקדות בכרם ועל הנגיעות במחלה.

ג.1. נבדקה ההשפעה של נוכחות צמחים מועדפים על האוכלוסיה של Ho בכרמים סמוכים

מהלך הניסוי-

נערך מיפוי של שיחי אברהם בקרבת הכרם של יונתן. נבדקה, ע"י שאיבות, אוכלוסית Ho על צמחים אלה, בינם לבין הכרם הסמוך ובתוך הכרם במרחקים שונים משוליו (0-10מ', 20-30מ' ובמרכז הכרם). תוצאות- בכרם ביונתן נאספו רוב הציקדות במרחק של 20מ'-30מ' מקצה הכרם הצפון מזרחי הקרוב לריכוז שיחי אברהם (כ-30מ') (נספח- איור 1).

לעומת המספר הנמוך של ציקדות שנלכד בכרם ריכוז הציקדות באזור זה על שיח אברהם (צמח המלכודת הפוטנציאלי) גבוה. באזור המרוחק כ-1 ק"מ מהכרם נאספו 32 ציקדות במוצע לשאיבה של 1 דקה ובשיחי האברהם המרוחקים כ-30 מטר מכרם יונתן נאספו במוצע 21 ציקדות לשאיבה של 1 דקה.

ג.2. חקר מקרה בכרם גשור בו נשתלה סביב כרם חגורה של צמחים שונים (שיח אברהם, חבלבל

והדס) עליהם נצפו בעבר Ho

מהלך הניסוי-

הצמחים נשתלו במרחק של 5 מטר מהגפנים. כל 10 מטר נשתלו 10 שיחים ממין אחר. שאיבות של 1 דקה בוצעו על שיח אברהם ובמקביל נשאבו גפנים בשולי הכרם ובמרכזו (0-10מ', 20-30מ' ובמרכז הכרם). השאיבות נערכו החל ממועד הופעת הבוגרים ובהמשך מדי שבוע מארבעת כיווני הרוחות אל תוך הכרם. במקביל בוצעו שאיבות במבנה דומה בכרם סמוך (כ-500מ') בו אין חגורת צמחים.

תוצאות- מספר הציקדות בכרם המוקף בחגורת צמחי מלכודת היה גבוה במובהק ממספרם בכרם הביקורת (t-test- df=214; p<0.05) (נספח- איור 2). הציקדות נמצאות קרוב לחגורת צמחי המלכודת בניגוד לתוצאות מכרם יונתן. תוצאה זו מובהקת רק בדור השני (סתיו) (נספח- טבלה 1)

כיוון ההופעה של הציקדות היה שונה בדורות השונים, בדור הראשון הציקדות הופיעו מכיוון צפון בכרם החגורה ומכיוון מזרח בכרם הביקורת (נספח- טבלה 2) בעוד שבדור השני הופיעו הציקדות ממערב ומדרום בכרם החגורה וממזרח ומערב בכרם הביקורת.

ג.3. מיפוי נגיעות נערך בכרם בו נשתלה חגורת הצמחים.

מהלך העבודה-

בשני הכרמים נבדקו על סמך סימפטומים 20 דונם (4500 גפנים) הבדיקה נערכה לקראת מועד הבציר, תקופה בה הסימנים קלים לזיהוי. ניבדק קשר אפשרי בין מיקום הצמח המועדף לאזורי

נגיעות בחלקות הכרם. נבדק מתאם בין פיזור המחלה בכרם למיקום שיחי אברהם. כמו כן נבדקה צורת פיזור הנגיעות וצורת פיזור הנגיעות יחסית לגפנים שהיו נגועות בשנים קודמות. ניתוח התוצאות יעשה בהמשך תוך שימוש ב-GIS.

תוצאות- נמצא כי מספר הגפנים הנגועות היה גדול יותר בכרם בו הוצבו צמחי המלכודת לעומת כרם סמוך ששימש כביקורת (נספח- איור 3). בנוסף שיעור הגפנים הנגועות עלה לעומת השנה הקודמת בכרם המוקף בעוד הוא נשאר יציב בכרם הביקורת. נמצא כי הסיכוי למצוא גפנים נגועות עולה ככל שמתקרבים לחגורה בחלקה האמצעית ($p < 0.005$), דגם דומה אך לא מובהק נמצא בחלקה הצפונית ($p = 0.058$) ובחלקה הדרומית לא נמצא קשר בין מיקום החגורה למיקום גפנים נגועות.

ד. בדיקת יעילות חומרי הדברה במטע זיתים והדברת הציקדה על צמחי מלכודת.

ד.1. בדיקת יעילות חומרי הדברה במטע זיתים

מהלך הניסוי-

נסיונות הדברה של H_0 נעשו במטע זיתים, (הדברה במטע מאפשרת מבנה ניסוי הניתן לניתוח סטטיסטי). מבין הצמחים התרבותיים, הזית הוא מין הצמח התרבותי עליו אוכלוסיה יציבה של H_0 בישראל. הנסיונות נעשו במתכונת של בלוקים באקראי, 5 חזרות עם 8 עצים לחזרה. ניבחנו בעיקר חומרים ארוכי טווח (נאוניקוטינואידים) המיושמים בהגמעה מתחת לטפטפת או בריסוס וכן טלסטאר (פירתרואיד סינטיטי) היעיל בהדברת ציקדות בוגרות. יעילות ההדברה ניבחנה מדי שבוע. הבדיקה נעשת ע"י שאיבה של חצי דקה מארבעת העצים המרכזיים בכל חזרה.

תוצאות- החומרים שנוסו לא היו יעילים במידה מספקת בהדברת הציקדות (נספח- איור 4). סטטיסטית אין הבדל בין החומרים חוץ מב 12/10 אז הקליפסו נבדל מהביקורת ושניהם לא נבדלים מכל האחרים. שבוע מיישום החומרים ירד גשם ולכן הייתה ירידה כללית ברמת הציקדות. רק לאחר חודש מיישום החומרים נראה הבדל ברמת הציקדות בין הטיפולים השונים. החומר היחיד שנראה כיעיל, גם הוא רק לאחר חודש, הוא הקליפסו. בשאר הטיפולים למרות הירידה נמצאה לפחות ציקדה אחת בכל חזרה שניה. יעילות זו אינה מספיקה.

ד.2. שרידות הציקדות על צמחים שטופלו בחומר הדברה (מהירות הקטילה).

מהלך הניסוי-

משך ההישרדות של H_0 על צמחי מלכודת (שיח אברהם) שטופלו בקונפידור נבדק עם פרטים שנילכדו מחוץ לאזור הניסוי והוחזקו בשקיות בד (6 פרטים בשקית) על צמחים מטופלים וצמחי ביקורת. אחרי 3, 6 ו-9 שעות הורדו שלוש שקיות מכל טיפול וניבדק מספר הפרטים ששרד. נספרו הפרטים החיים והמתים בכל שקית וחושבה השרידות. נערך ניסוי נפרד לזכרים ולנקבות וניבחנו ההבדלים בין הזוויגים במידת ההשפעה של הטיפול. כל ניסוי נערך פעמיים.

תוצאות- בהשוואה בין צמחים שטופלו בקונפידור לצמחים שלא קיבלו טיפול נמצאו יותר ציקדות על צמחים שלא טופלו, יותר ציקדות הגיחו מקרקע צמחים שלא טופלו ואחוז השרידות של הציקדות על צמחים שטופלו בקונפידור ירד (נספח- טבלה 3, איור 5). נראה הבדל מהביקורת לאחר 6 שעות והבדל

מובהק מהביקורת לאחר 9 שעות. יחד עם זאת גם לאחר 9 שעות עדיין שרדו למעלה מ-50% מהציקדות.

הזכרים נפגעים מהר יותר מהנקבות- הירידה ל-50% שרידות מתרחשת כבר לאחר 6 שעות ואינה משתנה לאחר 9 שעות.

לא נמצאה השפעה של הטיפול בקונפידור על כושר המשיכה של הצמחים בבדיקה באולפקטומטר.

ה. התחלת ניסיונות לגידול ציקדות בבית רשת

בבית רשת הוצבו 12 שתילים של שיח אברהם. הקרקע כוסתה בפלריג והשתילים הוגבהו מהקרקע באמצעות בלוקים למניעת חדירת שורשים וזחלים לקרקע בית הרשת. בארבעה עציצים ייושם מצע של 1/3 אדמה, 1/3 כבול ו-1/3 טוף ובשמונה עציצים נוספים מצע טוף וכבול בלבד. בשמונה עציצים נשמרת טמפרטורת קרקע קבועה (20-23 מעלות) באמצעות מערכת צינורות מים חמים המלופפים סביב העציץ. המערכת מווסתת ע"י מחשב וטמפרטורת הקרקע נמדדת באמצעות המחשב לאורך כל הזמן. לתוך בית הרשת הוכנסו בוגרות ארבע פעמים במהלך הדור השני בקבוצות של 20-40 פרטים. מערכת הניסוי הורכבה במהלך הניסוי ולכן רק בחורף הבא תעבוד המערכת באופן מלא בקבוצות סטטיסטיות.

3. דיון, מסקנות והשלכותיהן על המשך המחקר:

הציקדה *Hyalesthes obsoletus* נמשכת לשיח אברהם וידועה כווקטור של מחלת הצהבון בגפנים באירופה. כחלק מההתייחסות לשיח אברהם כצמח מלכודת יעיל אנו מנסים בעבודה זו להראות כי הציקדה היא ווקטור משמעותי גם בארץ ומבצעים בעבודה זו ניסיונות הדבקה בבית רשת. בכדי ששיח אברהם יהווה צמח מלכודת יעיל עליו למשוך את הווקטור מעביר המחלה מהגפנים ולמנוע את הפצת המחלה. העבודה במחקר זה בודקת את עמידות הצמח למחלה בכדי שהצמח לא יהווה מאגר להפצת המחלה, במחקר קודם הוכח כי הצמח מהווה מוקד משיכה משמעותי לווקטור לעומת הגפנים בתנאי מעבדה אך בעבודה זו נבדקת יכולת הצמח למשוך את הווקטור בשטח הפתוח מטווח של מאות מטרים לפחות בכדי למנוע נדידה חוזרת אל הגפנים. לאחר שהציקדות נמצאות על הצמח נבדקת בעבודה זו הדרך היעילה ביותר להשמדתן.

ניסיונות הדבקה של גפנים בבית רשת ע"י הציקדה בוצעו במהלך כל השנה. שלא כמו בחלקות מסחריות, הסימפטומים של המחלה בבית רשת אינם ברורים ואנו מחכים לתוצאות PCR שיבדקו את הצלחת ההדבקה.

ניסיונות להדביק שיח אברהם בגורם המחלה נעשו באמצעות הצבת הווקטורים במסות גדולות על השיח ובאמצעות הרכבה של וינקות נגועות וגפנים נגועות. הדבקה בשיטה של הרכבה היא אלימה ולכן באם הצמח לא נדבק בשיטה זו ניתן להניח כי הצמח עמיד למחלה. עד כה, בשתי השיטות, לא נמצאו סימני מחלה ולא התגלו פיטופלסמות בבדיקות PCR. אנו נמשיך בבדיקות אלו אך תוצאות אלו מאששות את ההנחה כי הצמח עמיד למחלה ויכול להוות צמח מלכודת טוב.

נוכחות רבה של ציקדות בכרם בו הוצבו צמחי מלכודת לעומת שנים קודמות ולעומת כרם סמוך בו לא הוצבו צמחי מלכודת מאששת את ההנחה כי הצמח מושך את הווקטור ממרחק מאות מטרים. נוכחות הציקדות בשולי הכרם גם היא מאששת את ההנחה כי הצמח מושך את הווקטור מהגפנים. יחד עם זאת, עדיין נמצאות ציקדות גם במרכז הכרם שהוקף בצמחי מלכודת ובנוסף על כך, בכרם שהוקף בחגורת צמחי מלכודת נראתה עלייה במספר הגפנים הנגועות בפיטופלסמה לעומת כרם סמוך בו לא חל שינוי במספר הגפנים הנגועות. זהו חיזוק נוסף לעוצמת המשיכה של הצמח וחיזוק להיות הציקדה ווקטור של המחלה ולכן בהמשך נבדוק את דגם ההצבה של צמחי המלכודת ואת הטווח הרצוי מכרמים מסחריים למניעת נזק בכרם.

ניסיונות ההדברה של הציקדה על צמחים (שיח אברהם וזית) מראים כי גם קונפידור וגם קליפסו מדבירים את הציקדות אך קצב ההדברה איטי ואינו מספיק יעיל (לפחות 50% שורדות את ההדברה). בהמשך יבחנו חומרים נוספים שיטות יישום וריכוזים גבוהים יותר. אחד הגורמים המגבילים ביותר בעבודה זו הוא העדר גידול מעבדתי של הציקדות אשר יאפשר ניסיונות לאורך כל השנה ויצירת אוכלוסיות נקיות מפיטופלסמה. עד כה לא הצליחו במקומות שונים לגדל אוכלוסיות משמעותיות של הציקדה והצמחים עליהם גודלה הציקדה היוו מאגר של המחלה. בעבודה זו הוחל בניסיונות גידול של ציקדות על שיח אברהם במצעים שונים ובתנאי טמפרטורת קרקע שונים לקיצור זמן התפתחות הזחלים. זהו תהליך מתמשך של התאמת גורמים רבים וכולל. בשנה זו נבנתה מערכת ניסוי אשר תיבדק בחורף השנה ובמהלך השנים הבאות.

נספה- איורים וטבלאות

טבלה 1: הבדלים במספר הציקדות במרחקים שונים מקצה הכרם אל מרכזו.

vineyard	generation	distance	mean	df	t stat	P
belt	1 st	0-10m	0.53	70	1.04	0.15
belt	1 st	20-30m	0.11			
belt	2 nd	0-10m	0.38	46	2.02	0.02
belt	2 nd	20-30m	0.08			
control	1 st	0-10m	0.08	46	0.59	0.28
control	1 st	20-30m	0.04			
control	2 nd	0-10m	0.08	46	1.45	0.08
control	2 nd	20-30m	0			

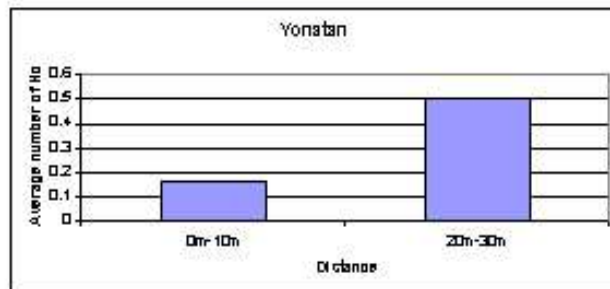
טבלה 2: כיוון הופעת הציקדות בתוך הכרם בדורות השונים.

direction	1st generation		2nd generation	
	Belt	control	Belt	Control
east	0.17	0.17	0.08	0.08
north	1.11	0.00	0.08	0.00
south	0.00	0.08	0.17	0.00
west	0.00	0.00	0.58	0.08

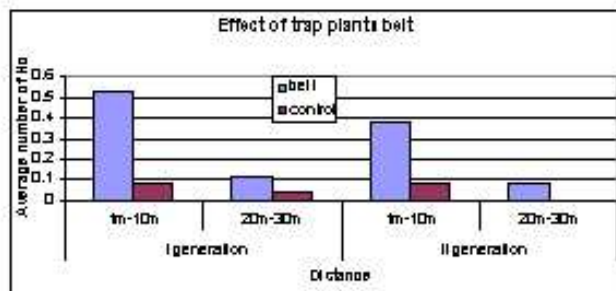
טבלה 3: מבחן סטטיסטי (t-test) לבדיקת ההבדל בין שרידות ציקדות על צמחים שטופלו ב 2 סמ"ק קונפידור (2) לצמחים שלא קיבלו טיפול (0).

ml/plant	hours	mean	Df	t stat	P
0	6	93.33	10	1.66	0.068
2	6	64.29			
0	9	94.29	8	6.88	0.00002
2	9	56.51			

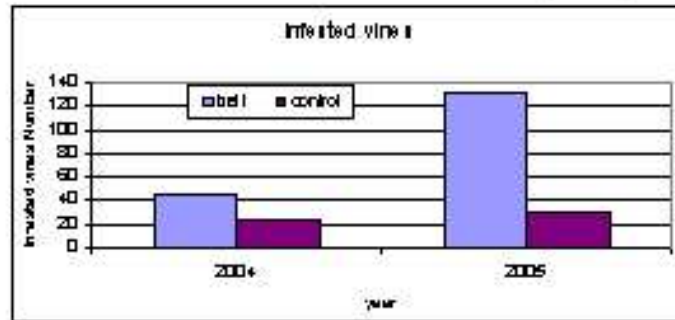
איור 1: שאיבת ציקדות (1 דקה) בכרם דומנו מנורחקים שנים נקצת הכרם



איור 2: שאיבת ציקדות בכרם מוקף הגדרת צמחים (belt) ובכרם סגור ללא הגדרת צמחי מלכודת (control) מנורחקים צדלים נקצת הכרם בשני דורות.



איור 3: מספר הנגיפים הנמצאים במים בנקודת המדידה (belt) לנגיפת סרט (control).



איור 4: תוצאות מדידת הנגיף במים במהלך הזמן.

