

הדינאמיקה, המשמעות הביולוגית והקשר לתנגודת לתכשירי הדברה

של תת המינים של כנימת עש הטבק

דו"ח מחקר לשנת 2003 מוגש לענף כותנה

131-1156-03

רמי הורביץ¹, סבטלנה קונצדלוב², ודים חסדן¹, סופיה קלייטמן¹, רפי מורי¹

אריה רוזנר³, אילן לוי⁴ ויצחק ישעיה²

המחלקה לאנטומולוגיה, מינהל המחקר החקלאי; ¹תחנת הניסיונות גילת, ²מרכז וולקני, בית דגן
³המחלקה לוירולוגיה, מרכז וולקני; ⁴המחלקה לגנטיקה, מרכז וולקני

מבוא ותיאור הבעיה

כנימת עש הטבק (כע"ט) היא מזיק מפתח כלל עולמי הגורם נזקים כלכליים בגידולים חקלאיים רבים כמו כותנה, ירקות ופרחים. כע"ט מזיקה באופן ישיר לצמחים ע"י מציצת מוהל העלים והחלשת הצמחים, ואוכלוסיות גבוהות עלולה לפגוע ביבול. היא פוגעת באיכות היבולים כתוצאה מהפרשת נוזל דביק סוכרי, "טל דבש", שעליו מתפתחות פטריות שחורות, "פייחת". נזק חמור במיוחד נובע כתוצאה של העברת וירוסים ופגיעה בגידולים שונים, ביבול ובאיכות. מחלת וירוס חמורה במיוחד בעגבניות היא וירוס צהבון האמיר שהתגלתה בישראל בשנות השישים, מחלה זו עדיין נפוצה בכל רחבי הארץ והיא עשויה לגרום לאבדן מוחלט של היבול.

בסוף שנות ה-80 ובשנות ה-90 המוקדמות חדר לארה"ב גזע חדש של כע"ט (biotype B) שגרם נזקים חמורים לגידולים שונים כולל כותנה (הנזק בשנת 1991 הוערך בחצי מיליארד דולר). הגזע החדש אופייני בחיוניות גבוהה יותר והתפתחות רבה על צמחים פונדקאים שלא היו מועדפים בעבר. כן יוחסה לגזע B עמידות גבוהה יותר לתכשירי הדברה, ובייחוד פירתרואידים. מקורו של גזע B לא ברור, אך קיימת השערה שגזע זה הועבר מהעולם הישן לארה"ב (אחת ההשערות שהגיע מישראל). בשנת 1994, לאחר מחקר מקיף, הגדירה קבוצה אמריקאית מריברסייד (קליפורניה) את גזע B כמין חדש למדע, *Bemisia argentifolii*. הגדרת המין החדש לוותה בביקורת חריפה מצד קבוצות שונות וכיום, למרות שהיכוח לא הסתיים, מקובל לראות את המין כע"ט (*Bemisia tabaci*) כאסופת גזעים או תת מינים.

לאחרונה נמצא בישראל גזע נוסף (Q) שהוגדר לראשונה בספרד. הגזע Q, שיש לו מחיצה רבייתית ברורה לגזע B, נמצא שונה בתכונותיו מהאחרון, וביניהם החשד שהוא פחות רגיש לתכשירים החדשים מקבוצת הניקוטנינים החדשים (כמו קונפידור ומוספילן). מכיוון שנמצאים כיום בארץ שני גזעים של כע"ט השונים לכאורה זה מזה בתכונות הביולוגיות שלהם ובתגובה לתכשירי הדברה החדשניים, הדבר יכול להשפיע על הדינאמיקה של האוכלוסיות בשדות ובאזורי הארץ השונים ועל ההתפתחות של תת המין 'העמיד יותר' לאחר טיפולים בתכשירי הדברה. לשם כך ראוי למפות את תפוצתם של תת המינים של כע"ט באזורי הגידול השונים. מנתונים אלו יהיה ניתן אולי להתוות מדיניות הדברה שתיקח בחשבון את פוטנציאל הנזק של כל גזע ותתרום בכך להפחתת השימוש בחומרי הדברה.

מטרות המחקר:

1. ברור המשמעות הביולוגיות והדינאמיקה של תת המינים של כע"ט בארץ בשדות כותנה
2. לבחון האם יש קשר בין עמידות לתכשירי הדברה עיקריים כמו טייגר ומוספילן ובין הגזע של כע"ט
3. להשוות שיטות מולקולאריות מתקדמות כדי לאבחן את אוכלוסיות הגזעים השונים.

שיטות וחומרים

להלן מתוארות שיטות העבודה בקצרה. בניסויים יותר ספציפיים יתוארו השיטות ביתר הרחבה בהמשך.

1. פיתוח והשוואה של השיטות המולקולאריות

השוו שיטות מולקולאריות שונות בעזרת PCR.

2. ניסויי הכלאות (הצלבות) של תת המינים Q ו-B

בניסויים נלקחו כ-20 נקבות בתולות מכל תת מין והוכנסו לשבוע בכלוב עם מספר כפול של זכרים מתת-המין האחר. כביקורת נלקחו נקבות שהוכנסו לכלוב עם זכרים מאותו תת-המין. בסדרה זו של הכלאות נוסו שתי אוכלוסיות מעבדה ($Pyri-S = B$; $Pyri-R = Q$), ושתי אוכלוסיות שדה ($Neg = B$; $HC = Q$). בכל האוכלוסיות, ההכלאות נעשו משני הכיוונים (reciprocal crosses), כלומר: נקבות X Q זכרים B; ונקבות X B זכרים Q. מכיוון שנקבות כע"ט ללא הפריה מטילות ביצי זכרים, הרי יחס הזויגים של הצאצאים יראה על הצלחה בהזדווגות/הפריה בין תת המינים.

3. דינאמיקה של הגזעים בשדה והקשר לעמידות לטייגר

נבדקה ע"י אסוף של כע"ט מאזורי הארץ השונים ובעונות שונות, בעיקר בשלושת האזורים: חוף הכרמל, עמק איילון והנגב המערבי. בוגרי כע"ט נאספו באמצעות שואב ידני לתוך כלובים קטנים והועברו למעבדה לניסויים. אוכלוסיות שדה שנאספו מאזורים שונים בארץ נבחנו לעמידות לתכשירים טייגר, מוספילן, אקטרה ופגסוס. במקביל למבחן הרגישות נבדק תת המין של כל אוכלוסייה שנבחנה לניטור העמידות.

4. דינאמיקה במעבדה

אוכלוסיות שדה שונות הוחזקו במעבדה בתנאים סטנדרטיים, ללא טיפול בתכשירי הדברה לעומת סלקציה מכוונת בניקוטין חדש (כמו מוספילן או אקטרה). התנגודת לטייגר ולמוספילן נבחנה מדי מספר דורות. במקביל נלקחו דגימות של האוכלוסיות לאבחנה של תת המין.

תוצאות ודיון

1. פיתוח והשוואה של השיטות המולקולאריות; הושוו השיטות הבאות בעזרת PCR:
 - א. RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA).
 - ב. SCAR (Sequences Characterized Amplified Regions) על בסיס תוצרי RAPD-PCR עם AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism).
 - ג. AFLP על בסיס PCR של גן לתעלת הנתרן (*para sodium-channel*).
 - ד. PCR על בסיס סמנים מיטוכונדריאליים ל-COI (cytochrome oxidase I).

2. ניסויי הכלאות (הצלבות) של תת המינים Q ו-B

בטבלה 1 מובאות התוצאות של ההכלאות בין האוכלוסיות השונות. בהכלאות של אותו תת מין התקבלו יחס זוויגים של 1:1; בהכלאות של B X B (Pyri-S) התקבלו מספר צאצאים גבוה בהרבה מהצאצאים שנתקבלו מההכלאות של Q X Q (Pyri-R). יחס הזוויגים של האחרונים היה 1:1.7 לטובת הנקבות. לעומת זאת, למרות שנראו הזדווגויות או ניסיונות חיזור של הזכרים מתת-מין אחד לנקבות של תת המין השונה, לא התקבלו כלל נקבות מכל ההכלאות בין שני תת המינים (הערה: לפי הספרות העולמית ידוע שישנה הצלחה מסוימת של כ-15% בהכלאות בין שני תת המינים). לא ברור מה הגורמים לחוסר ההתאמה בין שני תת המינים; האם זה קשור בחיידקים שמפילים את הצאצאים הנקביים או בחוסר התאמה אחר - יש לברר זאת בהמשך המחקר. אנו מתכננים לזווג נקבות מאוכלוסיות שדה אחרות עם זכרים בשיעור של פי 5 ממספר הנקבות.

טבלה 1. ניסויי הכלאות בין שני תת המינים, Q x B

יחס זוויגים נקבות:זכרים	צאצאים		הורים (תת המין)	
	זכרים	נקבות	40 זכרים	20 נקבות
1:1.1 1:0.9	153 302	*164 263	(B) Pyri-S	(B) Pyri-S
1:1.7	36	62	(Q) Pyri-R	(Q) Pyri-R
1:0	266	0	(Q) Pyri-R	(B) Pyri-S
1:0	173	0	(B) Pyri-S	(Q) Pyri-R
1:0	337	0	(Q) HC-02	(B) Neg-02
1:0	608	0	(B) Neg-02	(Q) HC-02

*נעשו שתי חזרות של אותן האוכלוסיות

3. הדינאמיקה של הגזעים בשדה והקשר לעמידות לטייגר

בטבלה 2 מובאת רשימת האוכלוסיות השונות שנבדקו בשנת 2003 משדות ואזורים שונים בארץ והגדרת תת המינים בהם. בנוסף, בחלק מהאוכלוסיות נעשה מבחן לעמידות לטייגר ורמת העמידות ניתנת אף היא.

באוגוסט נעשה סיור כותנה באזור עמק יזרעאל והוגדרו לראשונה תת המינים בשדות שונים של העמק. מחוץ משדה של גניגר שבו נמצאו רק אוכלוסיית B, ביתר השדות נמצאה תערובת של שני תת המינים, Q ו-B. עדיין לא נבדקו מספיק פרטים על מנת לקבוע את היחסים המספריים בין תת המינים.

בד"כ קבלנו התאמה בין תת המינים שנמצאו באזורים השונים השנה לאלו של השנה שעברה, אך במפתיע נמצאה ביולי 2003 אוכלוסייה של B באזור חוף הכרמל (מעין צבי) שאף הייתה רגישה לטייגר בדומה לגזע הסטנדרט הרגיש. זוהי פעם ראשונה שאנו מוצאים אוכלוסיית B באזור זה ולא ברור איך התפתחה שם אוכלוסייה זו. לעומת זאת, באיסוף יותר מאוחר (ספטמבר 2003) נמצאה שם אוכלוסייה של Q (לא ברמה גבוהה) שהייתה גם עמידה לטייגר. נראה לנו שהריסוסים במוספילן/פגסוס שניתנו ביולי-אוגוסט באזור מעין צבי עשו סלקציה לגזע Q - ע"י קטילת רב הפרטים הרגישים מתת-מין B והשאירו בשדה פרטים (שלא היו רבים) של Q.

טבלה 2. אוכלוסיות תת המינים של כע"ט בישראל שנאספו בשנת 2003

מוצא	גידול	תאריך איסוף	הגדרת תת-המין	עמידות לטייגר
חצבה	בזיל	6/03	Q, b*	בינונית
כפר מסריק	כותנה	7/03	Q	-
גניגר	כותנה	8/03	B	-
שריד	כותנה	8/03	Q, B	-
אזור תענך	כותנה	8/03	Q, B	-
יזרעאל	כותנה	8/03	Q, B	-
עין חרוד	כותנה	8/03	Q, B	-
נחל עוז	תפ"א	8/03	B	נמוכה
עמק איילון	כותנה	7/03	Q	בינונית
עמק איילון	כותנה	9/03	Q	בינונית
מעין צבי	כותנה	7/03	B	נמוכה
מעין צבי	כותנה	9/03	Q	גבוהה
עין כרמל	כותנה	9/03	Q	גבוהה
עין צורים	כותנה	9/03	Q	-
חוות יאיר	מרווה	12/03	Q	-

*תערובת של שני תת המינים עם יותר פרטים של Q

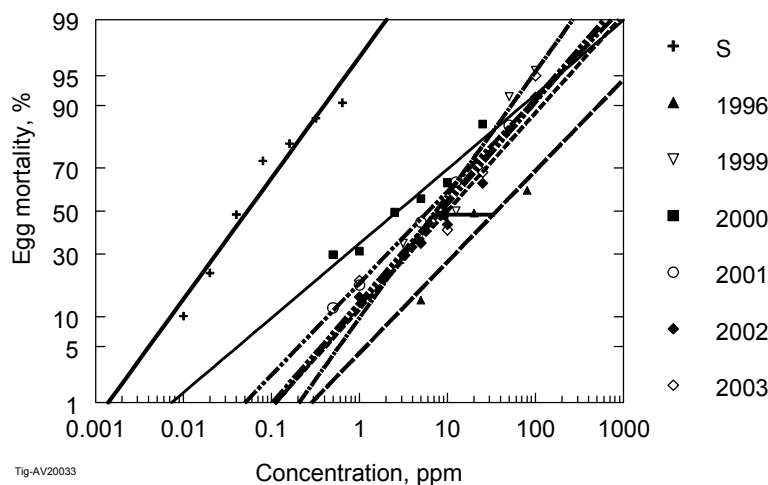
יציבות התנגודת לטייגר בתנאי שדה ובתנאים מבוקרים – הקשר לתת המינים של כע"ט

בשנים האחרונות מסתמנת פחיתה בתנגודת לטייגר בכע"ט בשדות הכותנה באזורים השונים בארץ. באזורים כמו עמק איילון וחוץ הכרמל שהגיעו עד לעמידות של פי כ- 1000 ויותר (לפי אינדקס העמידות) הפסיקו המגדלים לטפל בתכשיר זה ועברו לטפל בתכשירים ידידותיים אחרים מקבוצת הניאו-ניקוטינואידים (בעיקר מוספילן) ופגסוס.

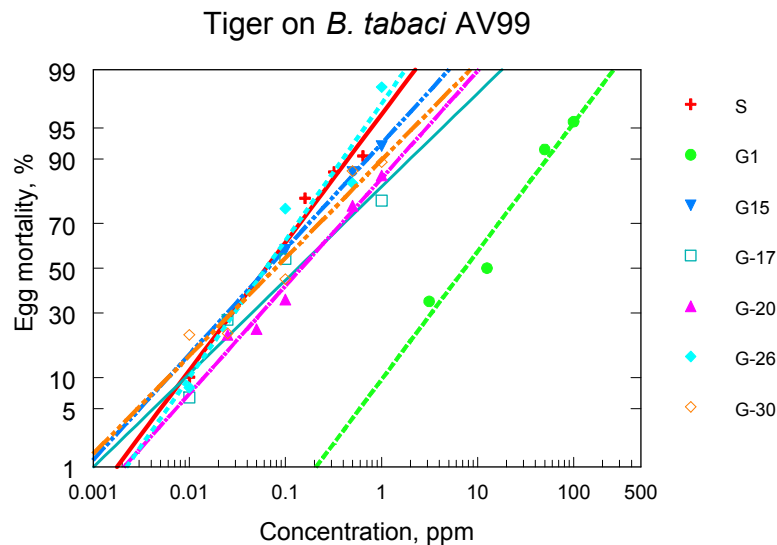
בעמק איילון הובחנה עמידות גבוהה ב- 1995 עם עמידות של כמעט פי 500 ויותר מ- 1000 (לפי LC-50 ו- LC-90 בהתאמה). בעונת 1996 עדיין טפלו באזור בטייגר וכתוצאה מכך עלתה העמידות לכפי 10,000 (LC-90). בעונת 1997 הפסיקו לטפל בטייגר באזור זה ובעקבות כך ניתן לראות ירידה מובהקת ברמת העמידות עד שנת 2001, והתייצבות העמידות ב- 2002-3 (ציור 1). נשאלת השאלה האם התנגודת היא יציבה ומה הסיבה לכך? והאם אוכלוסיות כע"ט מאזור עמק איילון תהיינה רגישות לטייגר בשנים הבאות?

כדי ללמוד נקודה זו, נבדקה אוכלוסיית שדה עמידה שנאספה מעמק איילון בסוף עונת 1999, ומאז היא נמצאת בחדר גידול בתנאים מבוקרים (תנאי קיץ), ללא טיפול בתכשירי הדברה. עד היום נבדקה אוכלוסייה זו לרגישות לטייגר מדור 15 עד לדור 30. בדורות שנבדקו לאחר כשנתיים מאיסוף האוכלוסייה בשדה נמצאה עליה רבה ברגישות לתכשיר, בדומה לגזע הסטנדרט הרגיש (ציור 2). יתכן שדבר זה גם יקרה בתנאי שדה ללא חשיפה של אוכלוסיות השדה לטייגר, אך מכיוון שבשדה מתפתחים בקיץ כ- 3-4 דורות של כע"ט, ייתכן שמהלך זה של פחיתה בתנגודת הוא ארוך בהרבה ממה שהושג במעבדה. אבל גם לאחר 7 שנים מהפסקת השימוש בטייגר לא התקבלה ירידה בתנגודת בשדות בשיעור כה חד כמו שקבלנו בתנאי מעבדה (ציור 1).

ציור 1. הרגישות לטייגר של כע"ט שנאספו מאזור עמק איילון בשנים 1996 – 2003. החץ מצביע על הפחיתה בתנגודת שהתייצבה משנת 2001.



ציור 2. הירידה בתנגודת לטייגר ככע"ט בתנאי מעבדה עד דור 30 (G-30). האוכלוסייה הנבחנת נאספה בסוף עונת הכותנה בעמק איילון ב-1999 ומאז מוחזקת במעבדה ללא טיפול בתכשירי הדברה.

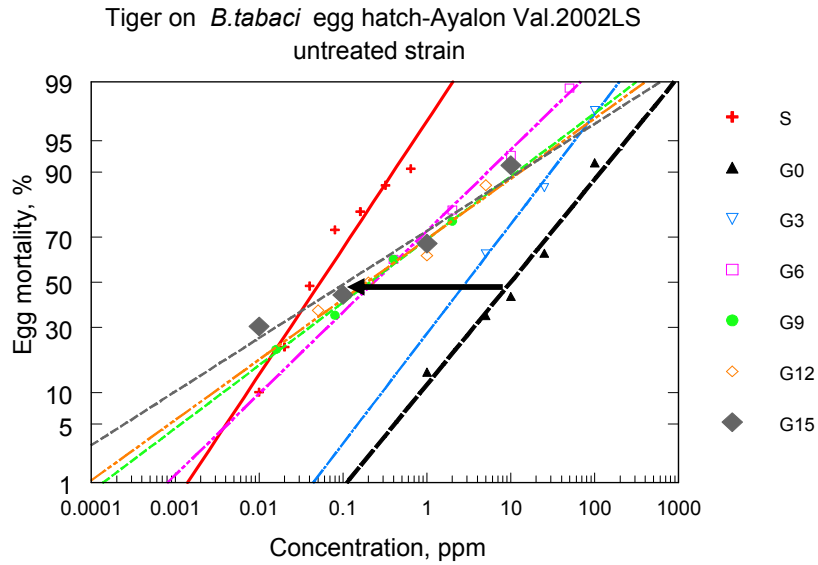


כדי לראות את מהלך הירידה בעמידות במעבדה והקשר לתת המינים, נלקחה אוכלוסייה כע"ט משדה כותנה בעמק איילון בסוף עונת 2002, שהכילה גם Q (בעיקר) וגם B. באוכלוסייה זו נבדקו העמידות לטייגר והרכב תת המינים כל שלושה דורות. בנוסף לכך, חלק מאותה אוכלוסייה השדה שנמצאה עם עמידות קלה לקבוצת הניאו-ניקוטינואידים, עברה סלקציה מכוונת למוספילן או לאקטרה. אוכלוסיות הסלקציה נבחנו לעמידות כלפי התכשירים איתם נעשתה הסלקציה, כלומר למוספילן ולאקטרה; ובנוסף גם לטייגר. גם כאן הבדיקה לתכשירים ולהרכב תת המינים נעשתה כל שלושה דורות.

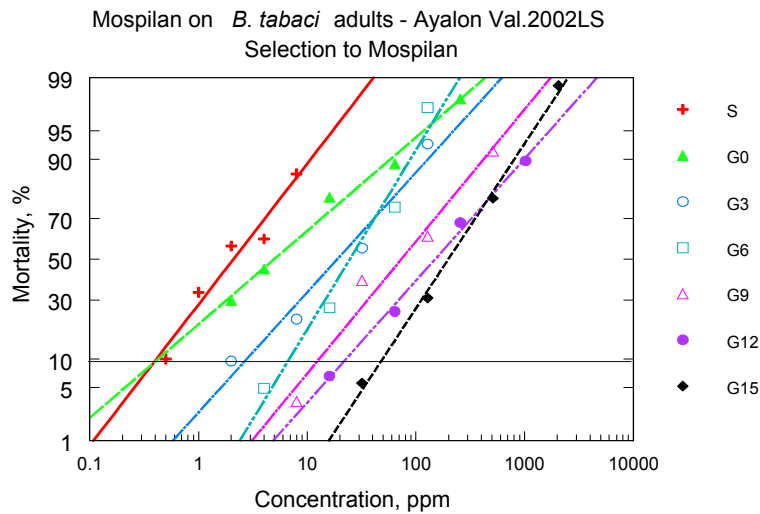
בציור 3 מתוארת מהלך הירידה בעמידות לטייגר - מדי שלושה דורות - של אוכלוסייה כע"ט שנאספה בעמק איילון בסוף עונת 2002 והוחזקה בתנאי מעבדה סטנדרטים עד לדור 15. בדור 15 נתקבלה אוכלוסייה די רגישה לטייגר למרות שעדיין לא רגישה כמו הגזע הסטנדרטי. בציור 4 מתואר מהלך הסלקציה למוספילן של אותה אוכלוסייה שהגיעה לעמידות לתכשיר זה של כפי-80 מהגזע הרגיש. ציור 5 מראה את התגובה לטייגר של האוכלוסייה שעברה סלקציה למוספילן. נראה שבאוכלוסייה זו לא קרתה ירידה בעמידות לטייגר בדומה לאותה האוכלוסייה שהוחזקה ללא טיפול בתכשירי הדברה. ציור 6 מסכם את כל הניסויים לבחינת העמידות לטייגר עד דור 15 של אותה האוכלוסייה. נראה שללא טיפול חלה ירידה ניכרת בעמידות לטייגר ואילו סלקציה או למוספילן או לאקטרה (אותה קבוצה) מנעה את הירידה בעמידות לטייגר. בבדיקה של תת המין של אוכלוסיות אלו מצאנו את הממצאים הבאים: 1. האוכלוסייה שנאספה מהשדה בסוף 2002 הכילה בעיקר Q אבל גם מעט B; 2. האוכלוסייה שהוחזקה ללא טיפול במעבדה עברה לאחר כשנה להיות רק B (הרגיש לטייגר); 3. האוכלוסיות שעברה סלקציה או למוספילן או לאקטרה ולא ירדה ברמת התנגודת לטייגר הוגדרו כ-Q.

מהלך דומה כנראה התרחש גם בשדה והשימוש בניקוטנינים החדשים יצר סלקציה ל- תת המין Q ומנע את הירידה בעמידות לטייגר.

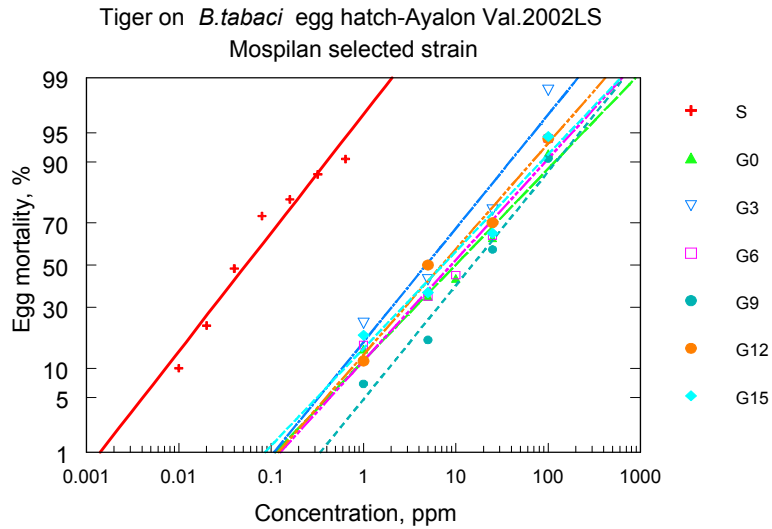
ציור 3. הירידה בתנגודת לטייגר באוכלוסיית עמק איילון 2002 שהוחזקה בתנאי מעבדה עד לדור 15, ללא כל טיפול בתכשירי הדברה. S = גזע סטנדרט רגיש; G0 - הדור שנאסף מהשדה; G15 - G0 - דורות שנבדקו לעמידות לטייגר.



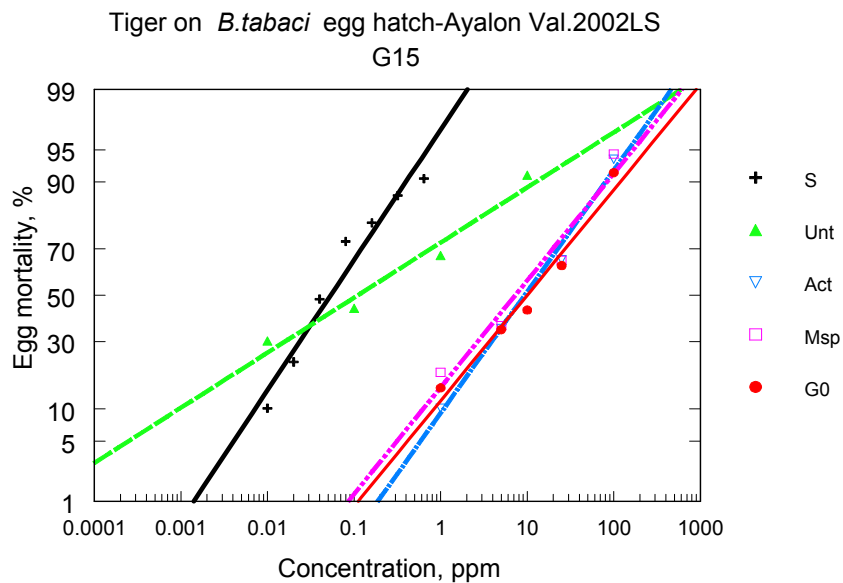
ציור 4. הסלקציה למוספילן של אוכלוסיית עמק איילון 2002 (G-0) שטופלה בתנאי מעבדה בריכוזים הולכים ועולים של מוספילן - עד לדור 15 (G-1); S = גזע סטנדרט רגיש; G0 - הדור שנאסף מהשדה; G15 - G0 - דורות שנבדקו לעמידות למוספילן.



ציור 5. היציבות בעמידות לטייגר של אוכלוסיית עמק איילון 2002 (G-0) שעברה סלקציה למוספילן
 ונבדקה עד לדור 15 לרגישות לטייגר. S = גזע סטנדרט רגיש; G0 - הדור שנאסף מהשדה; G15 - G0 -
 דורות שנבדקו לעמידות לטייגר.



ציור 6. היציבות של העמידות לטייגר בכע"ט מעמק איילון 2002 - דור 15 - בתנאי מעבדה
 סטנדרטיים. S = גזע סטנדרט רגיש; G0 - הדור שנאסף מהשדה; Unt - אוכלוסייה שלא טופלה
 בתכשירי הדברה; Act - אוכלוסייה שעברה סלקציה לאקטרה; Msp - אוכלוסייה שעברה סלקציה
 למוספילן.



1. ברור המשמעות הביולוגיות והדינאמיקה של תת המינים של כע"ט בארץ בשדות כותנה. בשנת 2003 נעשה סקר מקיף של אוכלוסיות שונות בשדות כותנה מאזורי הארץ השונים. בחלק מהאזורים נלקחו דגימות לבדיקה בתאריכים שונים. זוהו אזורים ששם נמצא תת המין B או Q' או שנמצאו בהם שני תת המינים ביחסים מספריים שונים. בחלק מהמקרים נמצא בתחילת העונה תת המין B; ובסוף העונה, לאחר מספר ריסוסים במוספילן ופגסוס נמצאה אוכלוסייה שהוגדרה כ-Q. יתכן שהטיפולים גרמו לסלקציה לגזע Q.
2. בחינת הקשר בין עמידות לתכשירי הדברה עיקריים כמו טייגר ומוספילן ובין הגזע של כע"ט; גם בשנת 2003 נמצא קשר ברור בין העמידות לטייגר ובין גזע Q בין אוכלוסיות השדה שנדגמו. עדיין יש מספר אזורים שלא נתגלתה בהם עמידות גבוהה לטייגר ובהם הגזע השולט הוא B. מכיוון שיש מחיצה רבייתית בין שני הגזעים, יתכן שניתן להגדיר אזורים שטיפול בטייגר יהיה יעיל.
3. השוואת שיטות מולקולאריות מתקדמות - לאבחון את אוכלוסיות הגזעים השונים. לאחר עבודה מולקולארית מאומצת שבה נבחנו מספר שיטות, הצלחנו למצוא שיטה אמינה ייחודית שאפשר בקלות להגדיר את גזע B או Q : PCR על בסיס סמנים מיטוכונדריאליים ל-COI (cytochrome oxidase I).
4. בניסויי מעבדה הוכח שאוכלוסייה מהשדה שכוללת את שני תת המינים, עוברת במעבדה - לאחר יותר מ-10 דורות - תהליך שבו משתלטת האוכלוסייה של "B", ונעשית רגישה לטייגר; מכך נראה לנו שתת המין B יהיה יציב יותר בתנאי שדה - ללא טיפולים בתכשירי הדברה. ברגע שהאוכלוסייה מהשדה עוברת סלקציה (ע"י מספר טיפולים רצופים) למוספילן או אקטרה (ניקוטינים חדשים), שורד בשדה תת המין Q (והירידה בעמידות לתכשיר טייגר נמנעת).