

דו"ח לתכנית מחקר מספר 21-02-0017

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין

Defining the potential damage inflicted by the "green leafhopper" complex as a core protocol in vineyards

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולמועצת גפן היין

ע"י

רקפת שרון, מיגל- מו"פ צפון

מאור תומר, מיגל- מו"פ צפון

אלמוג אברהם, מיגל- מו"פ צפון

תרצה זהבי, שה"מ, משרד החקלאות

עומר קראין, מיגל- מו"פ צפון

Rakefet Sharon, Northern Research & Development, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016.

E-mail: rakefetsh@gmail.com

Maor Tomer, Northern Research & Development, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016. E-

mail: maortomer11@gmail.com

Almog Avraham, Northern Research & Development, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016.

E-mail: almog17@hotmail.com

Tirtza zahavi, Extension Service, Ministry of Agriculture, P.O.B. 6. E-mail:

tirtzaz@yahoo.com

Omer Crain, Northern Research & Development, P.O.B. 831 Kiryat Shemona 11016. E-

mail: omerc@migal.org.il

1. תקציר

בישראל נפוצים מינים שונים של ציקדות (Homoptera:Cicadellidae) הנקראים בשם כללי "ציקדה ירוקה" ומהווים קומפלקס של אוכלוסיות מתת המשפחה Typhlocybinae. בשטח קיים קושי להבחין מורפולוגית בין מיני הציקדות המזיקות ולכן הציקדות מנוטרות כיום כקומפלקס ולא ברמת הסוג או המין. בכרמים בארץ הופך בשנים האחרונות קומפלקס הציקדות ממשני למרכזי- אוכלוסיות הציקדות הולכות וגדלות כשהן גורמות לנזק מתגבר. עד כה לא ניבחנו או כומת הקשר בין הנזק למין הציקדות. הטיפול בארץ נעשה עם הופעת ציקדות לאורך העונה מתוך הנחה כי כל מין גורם לאותו נזק לעלווה ופוגע באיכות הפרי. מכאן יתכנו ריסוסים מיותרים ומוגבר הסיכון להתפתחות של עמידות לחומרי הדברה.

מטרת המחקר היתה הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול לטיפול בכרם: (1) הגדרת מיני הציקדות בקומפלקס בזנים שונים של גפן יין (מרלו וקברנה), וקביעת מועד ההופעה של כל מין ציקדה בתלות בזן ובאזור. (2) הגדרת התסמינים

הנגרמים על ידי כל מין בנפרד בזנים שונים (מרלו וקברנה) ככלי לזיהוי מיני הציקדות בשטח. (3) הגדרת פוטנציאל הנזק של הקומפלקס והמינים במועדים השונים במעבדה ובשטח כבסיס לפרוטוקול טיפול.

ממטרות אלו נגזרו יעדי המחקר: פיתוח כלים מולקולריים להגדרת מיני הציקדות, זיהוי מיני הציקדות והדינמיקה של האוכלוסיות בכרם בזנים מרלו וקברנה, הגדרת התסמינים הנגרמים על ידי מיני הציקדות שזוהו בזנים מרלו וקברנה במעבדה, הגדרת פוטנציאל הנזק של מיני הציקדות שזוהו בזנים מרלו וקברנה במעבדה וקביעת פוטנציאל הנזק של קומפלקס הציקדות (הרכב המינים) בשטח.

כדי לאפשר הבחנה בין שלושת מיני הציקדות העיקריים בכרמים ליין, לא רק על פי אברי המין של הזכרים אלא גם על פי נקבות ונימפות, וכן כדי לזהות בעילות מספר פרטים רב שנאסף מהשטח, הופק DNA מציקדות שזוהו מורפולוגית. התוצר נשלח לריצוף ופותחו פריימרים ספציפיים לכל מין. פריימרים אלו איפשרו זיהוי לרמת המין של מספר גדול של פרטים שנאספו בשטח לקביעת הדינמיקה של האוכלוסיות ושיוך בין צורת הנזק למין הציקדות.

לצורך איפיון הנזק על שני זני הגפן נבנה גידול לכל מין במעבדה. נמצא כי *Z. rhamni* גורם לתסמינים של כתמים לבנים. שני המינים האחרים *J. lybica* ו *decedens A.* גורמים לתסמינים של האדמה בשולי העלה והתייבשות. במעבדה נקבעו קצב גידול האוכלוסיה ועוצמת הנזק לשני המינים הדומיננטים: נמצא כי למין *Z. rhamni* קצב הגידול הגבוה ביותר ואילו המין *A. decedens* גורם לעוצמת הנזק הגבוהה ביותר.

בעזרת הכלים המולקולריים הוגדר הרכב הציקדות בכרמים מסחריים בגליל ובגולן בזנים מרלו וקברנה. נמצא כי לכל מין דינמיקה שונה בזמן כאשר המין *A. decedens* מופיע מוקדם יותר בעונה מהמין *Z. rhamni* ואילו המין *J. lybica* מופיע באופן ספורדי מאמצע העונה. כמו כן נמצא כי לזן הגפן השפעה על המין הדומיננטי.

לקביעת פוטנציאל הנזק בכרם נבנו, באמצעות טיפולי הדברה בעוצמה שונה, שלוש רמות אוכלוסיה של ציקדות בשני כרמים ובשני זני גפן. נמצא כי השפעת הציקדות הינה בעיקר על רמת האנטוציאנינים ותיתכן השפעה גם על הצימוח שנמדד כמשקל זמורות בחורף. יתכן שישנו הבדל ברגישות לתכשיר ההדברה בו השתמשנו (טיפיקי) בין מיני הציקדות.

מסקנות יישומיות מהמחקר: (1) ניתן לזהות את מיני הציקדות באופן יעיל ומהיר יחסית בכלים מולקולריים, בשטח ניתן לזהות את מיני הציקדות על פי צורת הנזק. (2) כימות עוצמת הנזק הפוטנציאלי בשילוב עם הידע לגבי קצב הריבוי של כל המין מאפשרים להעריך פוטנציאל הנזק. (3) יכול להיות שקיימת רגישות שונה של מיני הציקדות לתכשירי הדברה. (4) בקברנה עיקר הנזק הינו מהמין בו קצב ההתפתחות גבוה אך עוצמת הנזק נמוכה ולכן יתכן שכדאי לשקול טיפול רק ברמת אוכלוסיה גבוהה יחסית (מעל 10 נימפות לקודקוד צימוח), במרלו עיקר הנזק הינו מהמין בו קצב ההתפתחות נמוך אמנם אך עוצמת הנזק גבוהה גם ברמות אוכלוסיה נמוכות ולכן יתכן שכדאי לשקול טיפול מיד עם הופעת ציקדות על העלים.

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין

מסקנות אקולוגיות מהמחקר: לציקדות המהוות מינים סימפטרים בכרם שלוש דרכים להימנע מתחרות: (1) דחיקה תחרותית על ידי קצב גידול גבוה, (2) הימנעות מתחרות על ידי הבדלים במועד ההופעה במהלך העונה, (3) התפתחות/העדפה של פונדקאים שונים (זני גפן).

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)

חתימת החוקר  תאריך: 24/2/2019

2. מבוא

בישראל נפוצים מינים שונים של ציקדות (Homoptera:Cicadellidae) הנקראים בשם כללי "ציקדה ירוקה" ומהווים קומפלקס של אוכלוסיות מתת המשפחה Typhlocybiniae. בתת משפחה זו קיימים שלושה שבטים (Tribes): Empoascini, Erythroneurini, Typhlocybini. כולם רב פונדקאים (Poos and Wheeler, 1943; Lenz et al., 2009; Lentini et al., 2000; Serra et al., 2013) אבידוב, 1961) ובארץ גורמים לנזק בכרמים (זהבי 2005), וגידולים רבים נוספים. בשטח קיים קושי להבחין מורפולוגית בין מיני הציקדות המזיקות (Avidov, 1961; Papura et al., 2009) ולכן הציקדות מנוטרות כיום כקומפלקס ולא ברמת הסוג או המין.

בכרמים בארץ הופך בשנים האחרונות קומפלקס הציקדות ממשני למרכזי- אוכלוסיות הציקדות הולכות וגדלות כשהן גורמות לנזק מתגבר (דר' תרצה זהבי רפרנטית להגנת הצומח בגפן, ערן הרכבי מנהל תחום פירות; שרון וחובריה 2013-15). גם באירופה יש דיווחים על עליה בתקופה האחרונה בנזקים מקומפלקס מזיקים זה לכרמים והעלייה בנזק מיוחסת בין השאר לשינויים האקלימיים (Reineke and Hauck, 2012). בישראל נראה כי העליה בגודל האוכלוסיות והנזק נובעת, מהמדיניות של הפחתת השימוש בחומרי הדברה מחד ומאידך משימוש אינטנסיבי באותם תכשירים שנתרו בשימוש שהוביל להקטנת הרגישות לחומרים (זהבי וחובריה, 2007; שרון וחובריה, 2013, 2014). הציקדות, בוגרות ונימפות, מוצצות את מוהל העלים, מפרישות רעלנים וגורמות לירידה משמעותית ביכולת ההטמעה של הפונדקאי. הנזק יכול להתבטא בעצירת צימוח (כולל קמילה, כלורוזה, עיוות העלה ונשירתו) ובירידה באיכות הפרי (כולל ירידה בצבירת הסוכר ונזק קוסמטי לפרי) (Candolfi, 1993).

בכרמים מתוארים מספר תסמינים בעלוות גפן הקשורים לנוכחות ציקדות. מעבר לסימפטומים הכלליים קיימים סימפטומים ספציפיים המופיעים בזנים שונים בנוכחות מיני ציקדות שונים (Bakus et al., 2005).

התקפלות של עלים לאחור, ככל הנראה בגלל הפרשה של רעלנים: צורת נזק זו נפוצה בישראל בעיקר בענבי מאכל – ובעיקר בזנים תומפסון וזייני. התקפלות העלים מלווה בהצהבה דיפוזית בין עורקי העלה ובמקרים קשים גם בעצירה של הצימוח. התקפלות עלים והצהבה כמו גם עצירת צימוח ואפילו ירידה במסת שורשים נמצאו במתאם עם רמת אוכלוסית ציקדות מהמין *Empoasca fabae* על עלים של גפן (Lenz et al., 2009). ציקדה זו עדיין לא זוהתה על ידינו בכרמים בארץ, אך צורת הנזק נראתה ונזק זה משמעותי במיוחד אם הוא מופיע בתחילת העונה, לפני שהגפן הגיעה למלוא גודל הנוף.

האדמה דיפוזית של היקף העלה לעתים תוך התקפלות עדינה של השוליים: בישראל צורת נזק זו אופיינית בעיקר בזן מרלו אך, באיטליה צורת נזק זו אינה משוייכת לזן הגפן אלא לציקדה מהמין *J. lybica* (Lentini et al., 2000). מין זה זוהה על ידינו בכרמים ליין באזורים שונים. נקודות לבנות על העלים – תמותת תאים שנוצרת כתוצאה מכך שהציקדות מוצצות את מוהל התא: הנזק הנפוץ ביותר בישראל. נזק זה אופייני במספר רב של זנים אך בולט בעיקר בקברנה סוביניו. באיטליה משויך נזק זה לציקדה מהמין *Z. rhamni* שנמצאה על ידינו בענבי מאכל וענבי יין. השפעת הרכב המינים בקומפלקס - יתכן שההסבר להבדלים בצורות הנזק לעלווה נעוץ בצורת ההזנה של כל מין ציקדות על פונדקאים שונים (Bakus et al., 2005). חוקרים אלו מצאו כי תנועת גפי הפה האופיינית לכל אחד מהמינים בסוג *Empoasca* על פונדקאים שונים בשילוב עם מיקום הפרשת הרוק יוצרים תגובות שונות של הצמח. יתכן גם שציקדות ממינים שונים נמשכות בעוצמה שונה לזנים השונים וכך יוצרות את ההבדלים בתסמינים שמשייכים בארץ לזני הגפן. באיטליה, כאשר נבדק קומפלקס של שלושה מיני ציקדות, *E. vitis*, *J. lybica*, *Z. rhamni* (שניים מהמינים נמצאים בארץ), נמצא כי כל מין גורם לצורת נזק אופיינית בעוצמה שונה לעלווה ולאיכות הפרי. כמו כן נמצא באותו קומפלקס, כי לכל מין דינמיקה שונה בין כרמים, באזורים שונים, במהלך העונה (תקשורת אישית-ספר שנמצא בהליך פרסומי Andrea Locci, 2000; Lentini et al., 2000; Pavan et al., 1988). נמצא גם כי ממשק הגידול משפיע בצורה שונה על מיני הציקדות השונים. כך, כאשר הושרתה עקת מים בגפנים רמת האוכלוסיה של ציקדות מהמין *J. lybica* ירדה ואילו ציקדות מהמין *Z. rhamni* לא הושפעו (Serra et al., 2013).

עד כה לא יוחס הנזק למין הציקדות ולא כומת הנזק מהמין או מקומפלקס הציקדות הירוקות. הטיפול בארץ נעשה עם הופעת הציקדות לאורך העונה מתוך הנחה כי כל נזק לעלווה פוגע באיכות הפרי, ומכאן יתכנו ריסוסים מיותרים ומוגבר הסיכון להתפתחות של עמידות לחומרי הדברה.

פערי הידע שהיו לפני המחקר:

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין

בכרמים בארץ, לא היה ידוע אלו מינים נמצאים בכל אזור, האם יש רגישות שונה לזנים ולא ידועה הדינמיקה של כל אחד מהמינים במהלך העונה ולכן לא ניתן לשייך את צורת הנזק ועוצמתו לכל מין בנפרד. ב) ההדברה נעשית בלא הבחנה בין המינים ובהעדר מידע, יתכן ומטפלים ללא צורך כנגד מין ציקדות אשר גורם לנזק לא משמעותי ו/או נמנעים מטיפול כנגד מין ציקדות בעל פוטנציאל לנזק בעוצמה גבוהה. ג) יתכן וקיימת רגישות שונה של כל מין לתכשירי הדברה והטיפול כימי לא מבוקר, שאינו עושה הבחנה בין מיני הציקדות, עוצמת הנזק ופוטנציאל הנזק בזנים שונים, יכול להיות הגורם לירידה ברגישות הציקדות לחומרי הדברה.

השערת המחקר: למינים שונים של ציקדות עלה פוטנציאל נזק שונה בזנים שונים. ניתן ע"י קביעת פוטנציאל הנזק וזיהוי המין באמצעות צורת הנזק לקבל החלטות מושכלות לגבי נחיצות הטיפול במזיק. ההנחות העומדות בבסיס המחקר הינן כי איפיון הנזק הראשוני יאפשר זיהוי מין הציקדות וכי ניתן לקבוע רמת סף על פי פוטנציאל הנזק של מין הציקדות בעזרת חישוב מדד של "ימי ציקדות"- כמות האוכלוסיה ומשך הזמן עד לבציר בהתאמה לזן ופוטנציאל הנזק הצפוי.

מטרות המחקר:

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כבסיס לפרוטוקול טיפול ראשוני:

- א. הגדרת מיני הציקדות בקומפלקס בזנים שונים של גפן יין (מרלו וקברנה), וקביעת מועד ההופעה של כל מין ציקדה בתלות בזן ובאזור.
- ב. הגדרת התסמינים הנגרמים על ידי כל מין בנפרד בזנים שונים (מרלו וקברנה) ככלי לזיהוי מיני הציקדות בשטח.
- ג. הגדרת פוטנציאל הנזק של הקומפלקס והמינים במועדים השונים במעבדה ובשטח כבסיס לפרוטוקול טיפול ממטרות אלו נגזרו יעדי המחקר:

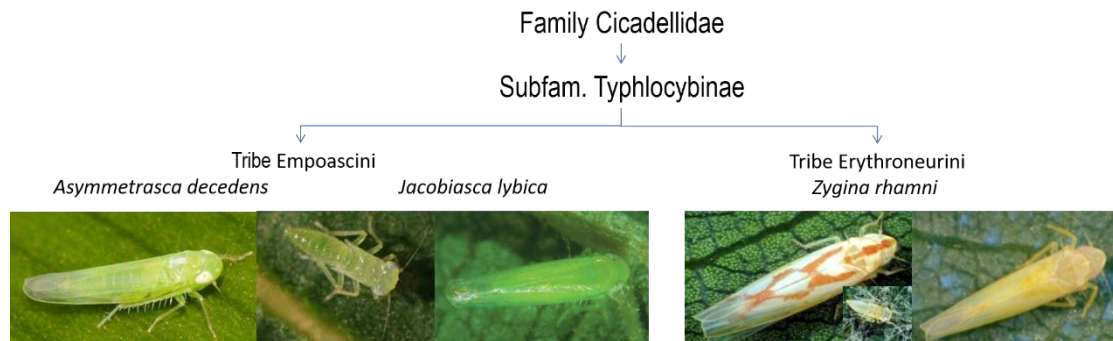
1. פיתוח כלים מולקולריים להגדרת מיני הציקדות.
2. זיהוי מיני הציקדות והדינמיקה של האוכלוסיות בכרם בזנים מרלו וקברנה.
3. הגדרת התסמינים הנגרמים על ידי מיני הציקדות שזוהו בזנים מרלו וקברנה במעבדה.
4. הגדרת פוטנציאל הנזק של מיני הציקדות שזוהו בזנים מרלו וקברנה במעבדה.
5. קביעת פוטנציאל הנזק של קומפלקס הציקדות (הרכב המינים) בשטח.

3. שיטות ותוצאות

3.1. פיתוח כלים מולקולריים להגדרת מיני הציקדות:

כדי לאפשר הבחנה בין שלושת מיני הציקדות העיקריים בכרמים ליין, לא רק על פי אברי המין של הזכרים אלא גם על פי נקבות ונימפות, וכן כדי לזהות ביעילות מספר פרטים רב שנאסף מהשטח, פותחו כלים מולקולאריים. כלים אלו מאפשרים זיהוי המין.

בבדיקות מורפולוגיות שערכנו ב 2016 יחד עם דר' ואלריו מזזוני באיטליה נמצאו ציקדות השייכות לתת משפחה Typhlocybae שהוגדרו לשלושה מינים *Asymmetrasca decedens*, *Jacobiasca lybica*, *Zygina rhamni* ודגימה בודדת בה נמצא המין *Empoasca gr. decipiens*.



מכל אחד ממהטיפוסים שזוהו מורפולוגית לקחנו 6 ציקדות. מציקדות אלו הופק DNA (Sharon et al., 2015). במטרה להבדיל בין המינים בתוך הקומפלקס של אוכלוסיות בחרנו לבדיקת הציקדות ב PCR את הפריימרים האוניברסלים HCO2198R, LCO1490F (Folmer et al., 1994) לגן לאנזים cytochrome oxidase subunit 1 מה DNA המיטוכונדריאלי המאפשר זיהוי בין משפחות. התקבל תוצר בגודל 600 bp בכל הדוגמאות. כל התוצרים נשלחו לריצוף. הריצוף שהתקבל נבדק בתוכנה BIOEDIT ובהמשך הוצב ב NCBI blast. התוצאות זיהו את השבט בלבד ולא מין ספציפי. מאחר וזיהוי זה לא איפשר הבחנה בין מינים, לקחנו זכרים שזוהו מורפולוגית בעזרת בדיקת מבנה העורקים בכנף על ידנו במעבדה (זיהוי זה בעייתי מאחר והפרטים נשאבו והושמו באלכוהול אך, מאפשר הפרדה ראשונית אם כי לא ודאית). נבחרו 6 זכרים לכל מבנה עורקים. חלק תחתון נחתך לזיהוי מורפולוגי וחלק עליון נלקח להפקת DNA. בבדיקה זו השתמשנו בפריימרים שונים, L2-N-3014 (Simon C1-J-2195) אשר להם אזור מטרה אחר לאורך הגן cytochrome oxidase subunit1 (Simon et al. 1994). התוצר שהתקבל נשלח לריצוף. בכל 6 הדוגמאות שנחשדו על פי מבנה הכנף כ *Asymmetrasca decedens* התקבלה הומומולוגיה ל *Asymmetrasca decedens* (בזהות של 89%-99%). מבין 6 הדוגמאות שנחשדו על פי מבנה הכנף כ *Jacobiasca lybica* זוהו 4 דוגמאות כ *Asymmetrasca decedens* (בזהות של 96%-99%) ובדיקה מורפולוגית של אבר המין הזכרי אישרה את הממצא המולקולרי. בשתי הדוגמאות הנוספות שבבדיקה מורפולוגית של איבר המין הזכרי זוהו כ *Jacobiasca lybica* התקבלה הומומולוגיה ל- *Jacobiasca lybica* (בזהות של 94%-95%). 6 דוגמאות שנחשדו כ *Zygina rhamni* נתנו תוצר PCR חלש והריצוף לא הצליח. 6 הדוגמאות הללו הורצו שוב בפריימרים האוניברסלים HCO2198R, LCO1490F (Folmer et al., 1994) והתוצרים נשלחו לריצוף. קיבלנו בכל הדוגמאות זיהוי של השבט Erythroneura של *Zygina rhamni* בזהות של בין 84%-86% ובבדיקה של איבר המין הזכרי בפרטים אלו נמצאה התאמה ל *Zygina rhamni*. כדי להבחין בין שלושת המינים ב PCR ללא צורך בריצוף תיכננו פריימרים ספציפיים לכל מין. התיכנון נעשה לפי הרצפים הטובים ביותר שהתקבלו בעזרת התוכנה BIO EDIT. בחרנו אזור עם לפחות 3 הבדלים בבסיסים בין המינים ולפי אזור זה תיכננו פריימר forward. את

הפריימר הכנסנו לתוכנה PRIMER 3 ומצאנו פריימר reverse מתאים עפ"י פרמטרים סטנדרטיים של התוכנה. הפריימרים שתוכנו נבדקו על 54 זכרים בשיטה של הצלבה. הפריימרים לזיהוי *J. lybica* זיהו את כל הדוגמאות שזוהו מורפולוגית ובריצוף כ *J. lybica* ולא זיהו את הדוגמאות שידועות לנו כ *A. decedens* ו *Z. rhamni*. הפריימרים לזיהוי *A. decedens* זיהו את כל הדוגמאות שזוהו מורפולוגית ובריצוף כ *A. decedens* ולא זיהו את הדוגמאות שידועות לנו כ *J. lybica* ו *Z. rhamni*. הפריימרים לזיהוי *Z. rhamni* זיהו את כל דוגמאות שזוהו מורפולוגית ובריצוף כ *Z. rhamni* ולא זיהו את הדוגמאות שידועות לנו כ *J. lybica* ו *A. decedens*. פריימרים אלו איפשרו זיהוי לרמת המין של מספר גדול של פרטים שנאספו בשטח לקביעת הדינמיקה של האוכלוסיות.

3.2. זיהוי מיני הציקדות והדינמיקה של האוכלוסיות בכרם בזנים מרלו וקברנה.

בכרמים יכולות להתקיים קומבינציות שונות של המינים בתלות בגורמים אביוטים, תכונות של המין (קצב גידול, תחרות על משאבים), מידת רגישות לתכשירי הדברה בשטח ועוד. במהלך שנות המחקר עקבנו אחר קומפלקס המינים בכרמים בגולן ובגליל שבכל אחד חלקות סמוכות של קברנה סוביניון ומרלו (נערך מעקב גם במושבות השומרון אך הריסוסים היו אינטנסיביים ולא ניתן היה לקבל ממצאים רציפים).

לקביעת הדינמיקה של האוכלוסיות בכרם נערך מעקב חודשי. פעם בחודש בוצעו 3 שאיבות של דקה בכל חלקה בחמש נקודות דיגום. כל שאיבה של דקה נעשתה מקודקודי 5 גפנים צמודות בכרם. מיקום השאיבות (נקודות הדיגום) היה סמוך לכל צלע של החלקה (6 מטר מהשוליים) ובמרכז. בעזרת פרוטוקול העבודה המולקולרית שפותח זוהו הציקדות שנאספו ובמקביל נערך אישור מורפולוגי למדגם מהזכרים. מאיסופים אלו נקבעה הדינמיקה של האוכלוסיות במהלך העונה. סך הכל נאספו 1882 ציקדות. נמצא שיחס הזויגים הינו מוטה נקבות בכל המינים ובשני זני הגפן (טבלה 1).

טבלה 1: יחס הזויגים (נקבות/זכרים) במרלו ובקברנה

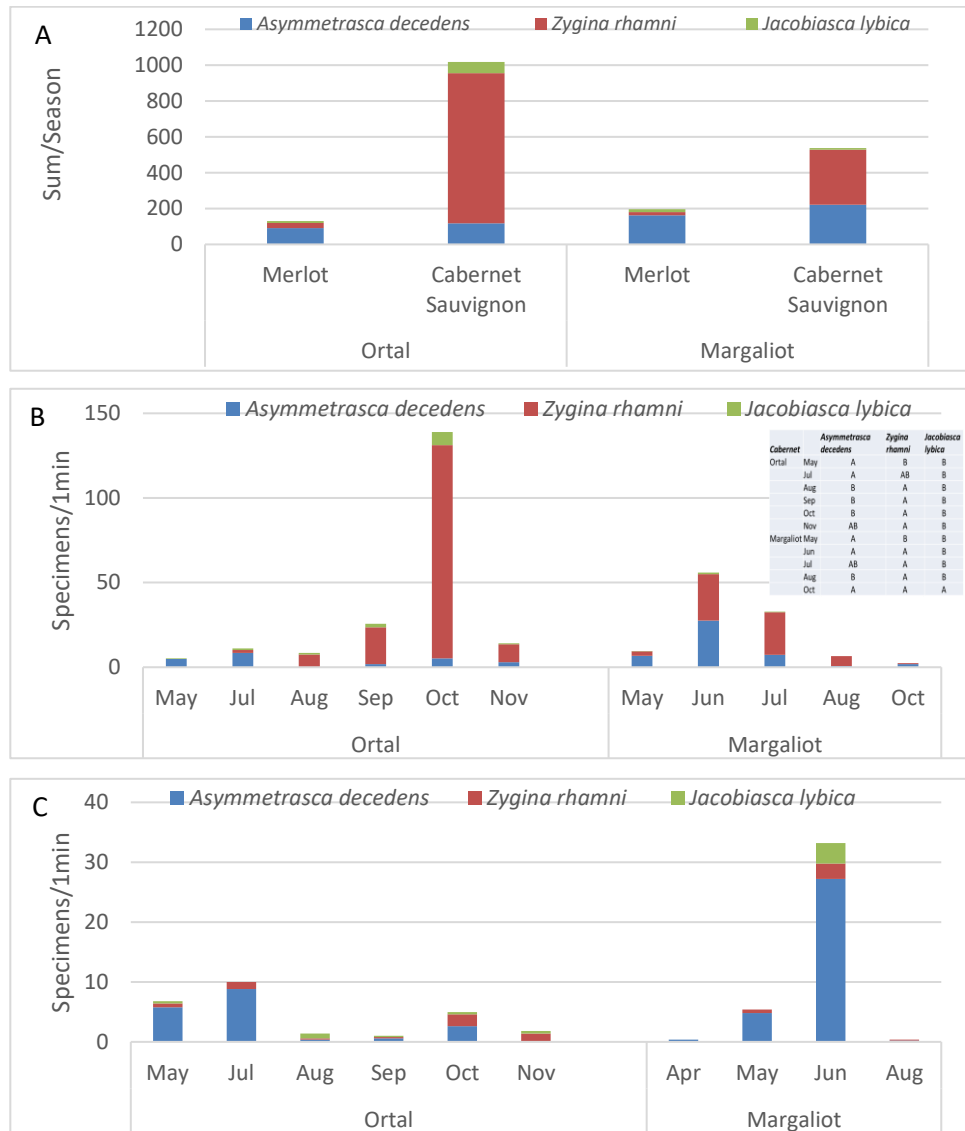
<i>Asymmetrasca decedens</i>	<i>Zygina rhamni</i>	<i>Jacobiasca lybica</i>	יחס זויגים (נקבות:זכרים)
1.23	1.5	1	Merlot
1.78	1.16	1.15	Cabernet Sauvignon
1.51	1.17	1.11	כללי

במעקב במהלך העונה נמצא כי קיימים הבדלים בהרכב המינים של הציקדות בין הכרמים ובין הזנים (איור 1). בשני הכרמים נמצאו יותר ציקדות בקברנה מאשר במרלו (איור A1) כאשר בקברנה המין הדומיננטי הינו *Zygina rhamni* ואילו במרלו המין הדומיננטי הינו *Asymmetrasca decedens*.

כאשר מסתכלים לאורך העונה רואים כי ציקדות מהמין *A. decedens* מופיעות בקברנה (B1) בתחילת העונה ואילו ציקדות מהמין *Z. rhamni* הופכות דומיננטיות מאמצע הקיץ. במרלו (C1)

נראות לאורך כל העונה כמעט רק ציקדות מהמין *A. decedens*. המין השלישי *J. lybica* מופיע כפרטים בודדים החל מהקיץ.

מכאן שלמינים הסימפטרים נישות אקולוגיות בזמן ובין זני הגפן.



איור 1: סך ציקדות בוגרות, (ממוינות לפי המינים) שנאספו כל חודש מכרם ברמת הגולן (אורטל) ומכרם בגליל (מרגליות) מחלקות צמודות של הזנים מרלו וקברנה (A) סך הציקדות שנאספו לפי מינים בשני הזנים בשני הכרמים (B) ממוצע הציקדות לפי מינים שנשאבו בקברנה בשני הכרמים בחודשי העונה (C) ממוצע הציקדות לפי מינים שנשאבו במרלו בשני הכרמים בחודשי העונה.

3.3. הגדרת התסמינים הנגרמים על ידי מיני הציקדות שזוהו בזנים מרלו וקברנה במעבדה



תמונה 1: שקיות רשת על שריגים בעציץ

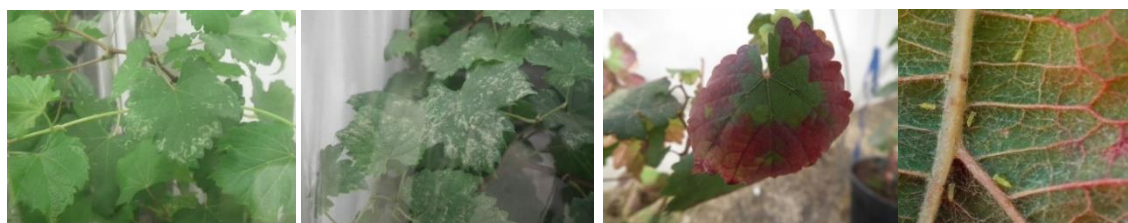
הגדרת התסמינים הנגרמים על ידי מיני הציקדות יכולה להיות כלי לזיהוי מיני הציקדות בשטח. להגדרת התסמינים הנגרמים על ידי כל מין בנפרד בזנים מרלו וקברנה ככלי לזיהוי מיני הציקדות בשטח יצרנו במהלך שנות המחקר קווי גידול נפרדים במעבדה. לשם כך - בשלב הראשון ציקדות שנאספו בכרמים הוצבו על שתילים מהזנים מרלו וקברנה. ברוב המקרים - נקבה וזכר הוכנסו לשקיות רשת מבד טול בגודל 24.5X30 ס"מ שסגרו על שריגים בודדים (טבלה 2). בכמה מיקרים הוכנסו מספר זכרים עם נקבה אחת כדי להגדיל את הסיכוי להזדווגות או נקבה ללא זכר אם לא נמצאו מספיק זכרים

באותה שאיבה מתוך תקווה שהנקבה מזווגת כבר. בסך הכל הוצבו 131 שקיות רשת.

טבלה 2: מספר השקיות שהוצבו על שתילי גפן במעבדה ובהן נקבה בודדת, זכר ונקבה (זוג) או נקבה עם מספר זכרים שנאפו מהכרמים, השקיות בהן היתה הצלחה רבייתית (הופעת נימפות) ואחוז ההצלחה.

חודש	מספר שקיות שהוצבו	נקבה	זוג	נקבה + יותר מזכר אחד	מספר שקיות שנצפו בהן נימפות	הצלחה (%)
אפריל	5	4	1	0	3	60
מאי	20	2	18	0	7	35
יוני	23	9	14	0	0	0
יולי	26	4	16	6	6	23
אוגוסט	47	5	23	19	15	32
ספטמבר	10	3	6	1	4	40
סה"כ	131	27	78	26	35	27

מהנימפות המגיחות נלקחו פרטים בודדים לזיהוי מולקולרי ונקבע מין הציקדה המצוי בשקית. בשקיות אלו נמשך מעקב אחר צורת הנזק המתקבלת כדי לקשר בין מין הציקדה והנזק המתקבל על כל אחד משני הזנים - מרלו וקברנה. צורת הנזק מכל מין היתה זהה בשני זני הגפן. מצאנו שצורת הנזק האופיינית למין *Z. rhamni* מתבטא בהופעת נקודות לבנות על העלה. במינים *A. decedens* ו *J. lybica* הנזק האופייני הינו האדמה משולי העלה למרכזו. במין *J. lybica* יתכן שנראית גם האדמה של העורקים.



תמונה 2: הנזקים האופייניים: האדמה בשוליים והאדמת עורקים במינים *A. decedens* ו *J. lybica*

lybica, נקודות לבנות על העלה במין *Z. rhamni*.

3.4. הגדרת פוטנציאל הנזק של מיני הציקדות שזוהו בזנים מרלו וקברנה במעבדה

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין

פוטנציאל הנזק נובע מקצב הגידול ועוצמת הנזק של האוכלוסיה. שני מדדים אלו חושבו לכל אחד ממיני הציקדות בכל אחד מזני הגפן.

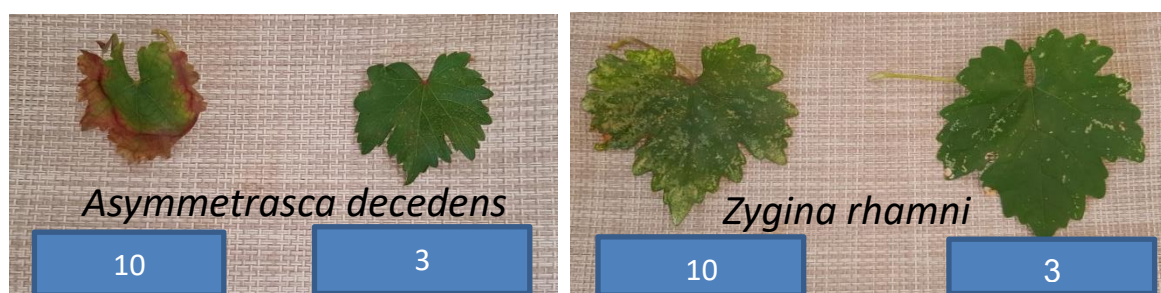
לקביעת קצב הגידול של מיני הציקדות נאספו נתוני התפתחות בשקיות המתוארות לעיל. נערך מעקב אחר שני מדדים: א. מספר הנימפות שהתפתחו מכל נקבה וב. משך הדור מהשלב בו הוכנסו הנקבות ועד להפיכת הנימפות של אותן נקבות לבוגרות (טבלה 3). נמצא שבמין *Z. rhamnii* מספר הנימפות לנקבה היה הגבוה ביותר (7/נקבה/דור) כאשר בשני המינים האחרים מספר הנימפות לנקבה היה נמוך יותר (2-4/נקבה/דור).

במין *Z. rhamnii* משך הדור הקצר ביותר לעומת המין *A. decedens* והמין *J. lybica*. מכאן שקצב הגידול של המין *Z. rhamnii* גדול יותר מקצב הגידול של המין *A. decedens*. לא נמצא הבדל בקצב הגידול על שני זני הגפן.

טבלה 3: קצב הגידול המתבטא במספר נימפות/נקבה ומשך הדור ממועד ההטלה ועד להופעת בוגרים.

המין	מספר חזרות (שקיות)	מספר נימפות בדור I	מספר נימפות בדור II	משך דור (ימים מהטלה עד בוגר)
<i>Asymmetrasca decedens</i>	9	2±0.48	4±0.58	31-35
<i>Jacobiasca lybica</i>	4	3±0.71	4±0.48	36-40
<i>Zygina rhamnii</i>	25	7±0.87	21±2.51	16-20

לקביעת עוצמת הנזק הוצבו על עציצי שתילים מהזן מרלו וקברנה ציקדות שנלקחו מהגידול במעבדה. נבדקו שני המינים הדומיננטיים בכרם: ציקדות מהמין *Z. rhamnii* הוצבו על 11 עציצים של קברנה ו 8 עציצים של מרלו. וציקדות מהמין *A. decedens* הוצבו על 11 עציצים של קברנה ו 6 עציצים של מרלו (איור 2). בכל עציץ נבחרו שני שריגים שנעטפו כל אחד בנפרד בשקית רשת מבד טול. לשקית של שריג אחד הוכנסו 3 פרטים מאותו המין ולשקית של השריג השני הוכנסו 10 פרטים מאותו המין. נערך מעקב פעמיים בשבוע אחר מידת הנזק הנראה ב 3 עלים קבועים בכל שריג. חושב אחוז הכיסוי



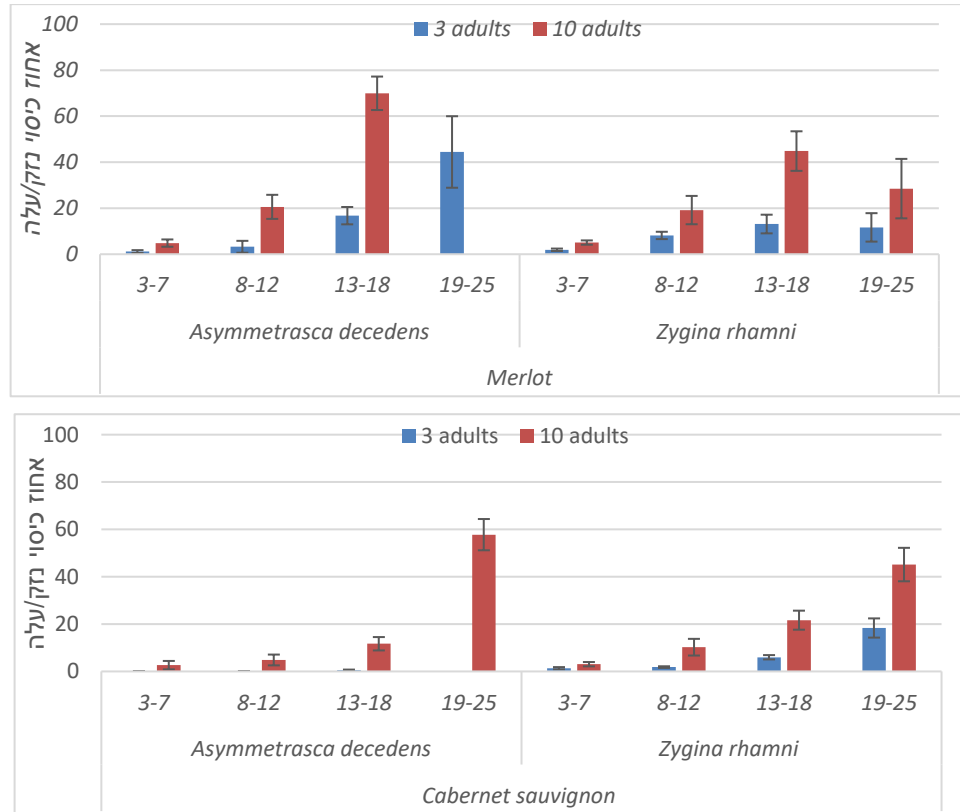
של הנזק לעלה (איור 2).

תמונה 3: צורה ועוצמת נזק של עלים משריגים עטופים בשקית אליהם הוכנסו 3 או 10 ציקדות. במין *Z. rhamnii* הנזק מעשרה פרטים בתום הניסוי במוצע הגיע בשני זני הגפן לכ 45% והנזק משלושה פרטים היה במוצע פחות מ 20% לאחר כשלושה שבועות. במין *A. decedens* נראה הבדל בין שני זני הגפן: במרלו הנזק הממוצע מעשרה פרטים לאחר שבועיים היה של 70% ולאחר שלושה שבועות השריג התמוטט לגמרי בעוד הנזק הממוצע משלושה פרטים הגיע לכ 45%. בזן

הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין

קברנה הנזק מעשרה פרטים לאחר שבועיים היה של 20% ורק לאחר 3 שבועות הגיע לכ 60% ואילו משלושה פרטים כמעט ולא נראה נזק בעלים.

Z. מכאן שעוצמת הנזק הנגרם מהמין *A. decedens* גדולה יותר מעוצמת הנזק הנגרם מהמין *rhamni* ושהזן קברנה פחות רגיש לנזק של המין *A. decedens* מהזן מרלו.



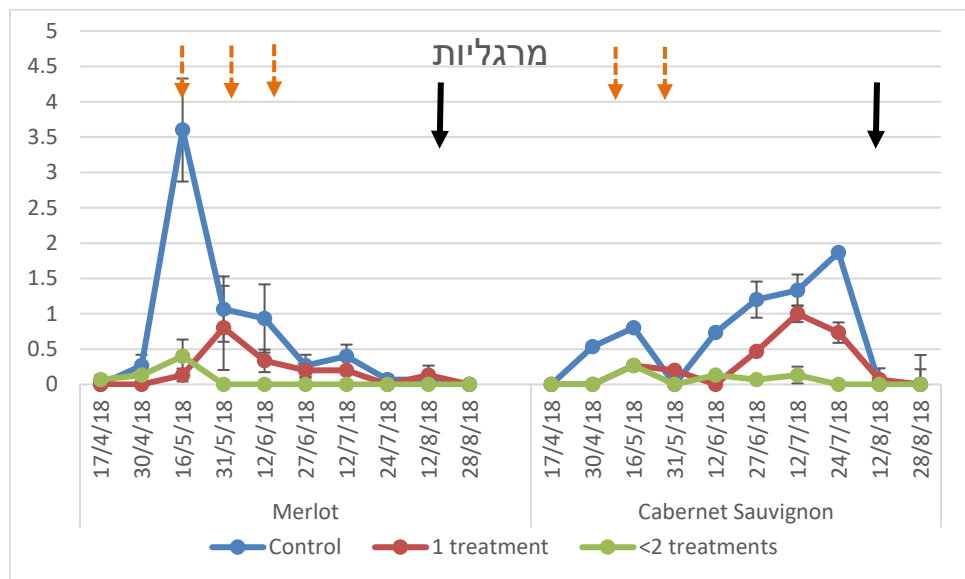
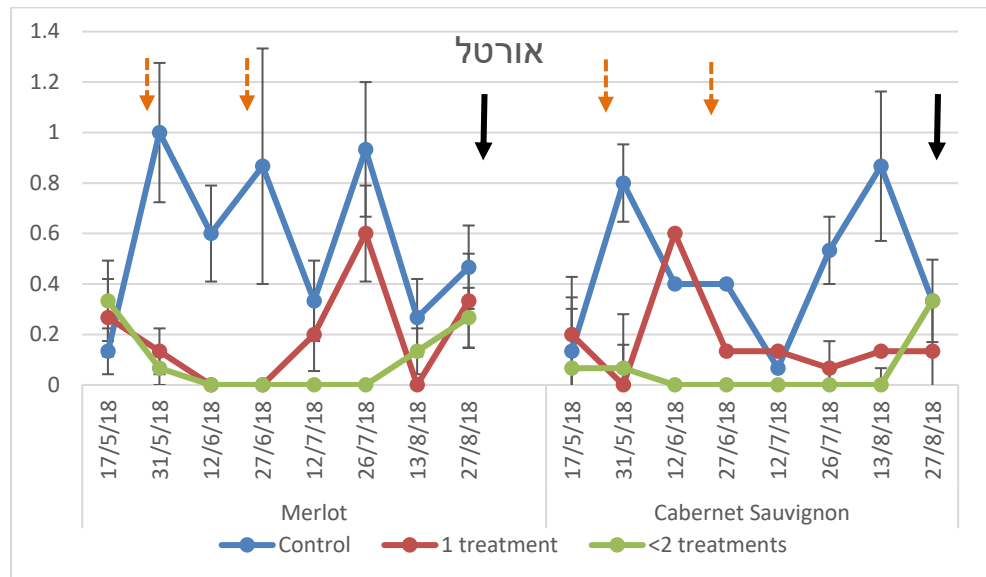
איור 2: אחוז הכיסוי של הנזק (ממוצע±שגיאת תקן) לעלה על פי מספר הפרטים בשקית לכל מין בשני זני הגפן- מרלו וקברנה.

3.5. קביעת פוטנציאל הנזק של קומפלקס הציקדות (הרכב המינים) בשטח.

לקביעת הקשר בין רמת האוכלוסיה והרכבה לרמת הנזק בכרם בוצעו ניסויי הדברה בחלקות סמוכות של קברנה ומרלו בשני כרמים- אורטל ומרגליות. הטיפול נעשה באמצעות ריסוס בטיפיקי (Flonicamid) 0.03% (חברת לוקסמבורג). בכל חלקה ניבדקו שלושה טיפולים לקבלת רמות אוכלוסייה שונות: ביקורת ללא טיפול (רמת אוכלוסייה מירבית), טיפול בודד בתחילת העונה (רמת אוכלוסייה בינונית), טיפול חוזר על פי ניטור במהלך כל העונה (רמת אוכלוסייה נמוכה). מכל טיפול בכל חלקה נאספו ונספרו אחת לחודש נימפות משלושה שריגים, 5 עלים לשריג. הנימפות הופרדו למינים בעזרת PCR. חזרנו בשנה עוקבת על ניסוי זה בכרם עם היסטורית נגיעות בציקדות בו לא ניתנו כמעט ריסוסים כנגד מזיקים. בניסוי זה חלקות הטיפול היו גדולות - (כ 10 דונם). בשנה זו נמצאו בכל הטיפולים ציקדות בודדות בלבד ולכן לא מוצגים ממצאים אלו.

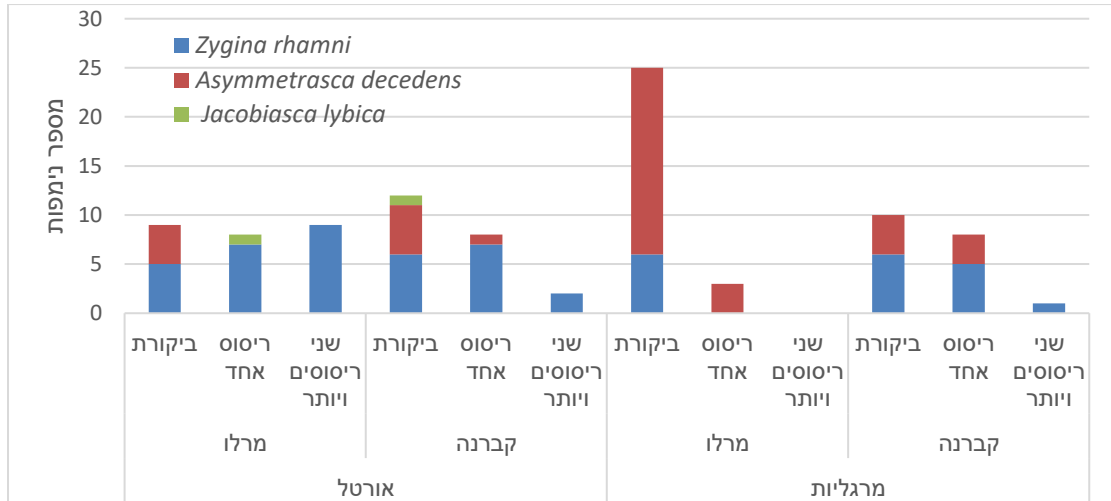
הטיפול עם הריסוס הבודד והטיפול בשני ריסוסים ויותר הפחיתו את כמות הציקדות בשני הכרמים ובשני הזנים ($p < 0.001$) לעומת טיפול הביקורת (איור 3).

A. כאשר מסתכלים על הרכב המינים של הציקדות על פי הטיפולים ניתן לראות (איור 4) כי המין *A. decedens* לא מופיע כלל בטיפול של שני ריסוסים ויותר לעומת המין *Z. rhamni* המופיע בטיפול זה בשלוש מתוך ארבע החלקות הנבדקות. כמו כן, בטיפול של ריסוס בודד, יש ירידה ברמת האוכלוסיה של במין *A. decedens* לעומת הביקורת בעוד שבמין *Z. rhamni* לא נראית ירידה בין הביקורת לטיפול הבודד בשלוש מתוך ארבע החלקות הנבדקות. יתכן שמין זה מושפע פחות מהטיפולים. רמת האוכלוסיה הנמוכה אינה מאפשרת ניתוחים סטטיסטיים.

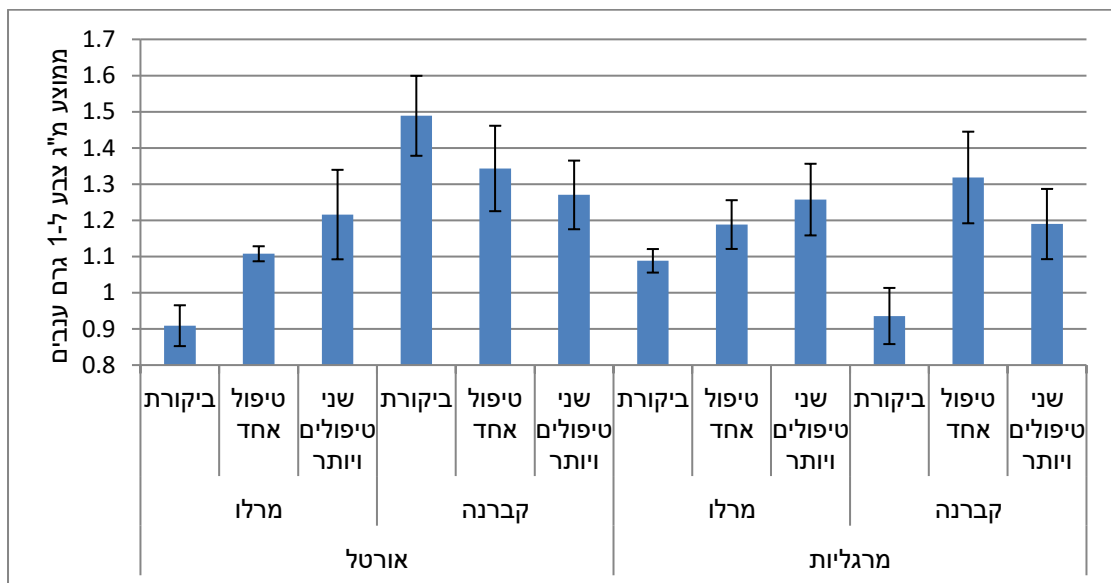


איור 3: מספר הנימפות (ממוצע±שגיאת תקן) במהלך העונה עד מועד הבציר בשני הכרמים בזנים מרלו וקברנה. חץ מקוקו כתום מסמן מועדי ריסוס וחץ שחור מסמן מועד בציר.

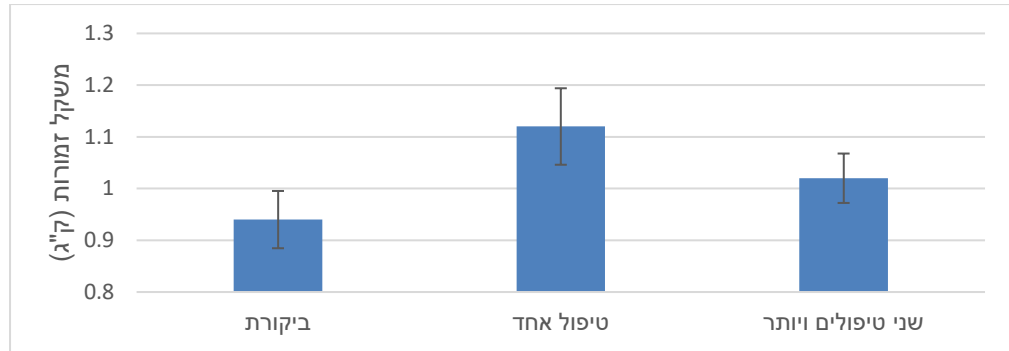
הגדרת פוטנציאל הנזק של קומפלקס המזיקים המכונה "הציקדה הירוקה" כתשתית לפרוטוקול טיפול בכרם יין



איור 4: מספר הנימפות הכולל שנאסף בכל אחת מהחלקות על פי מיני הציקדות בטיפולים השונים. לקביעת השפעת רמת האוכלוסיה על איכות הפרי והתפתחות הגפן - נבדקו מדדי איכות פרי במועד הבציר - משקל האשכול, גודל גרגר, רמת הסוכר, ה PH ורמת אנטוציאנינים. בחורף נזמרו שתי גפנים מכל טיפול מכל חזרה בזן מרלו בכרם אורטל לקביעת מספר ומשקל זמורות כמדד לעוצמת הצימוח. במדדי האיכות לא נמצאו הבדלים מובהקים במשקל הגרגר, ברמת הבריקס וברמת ה PH. אך נמצאו הבדלים ברמת האנטוציאנינים (איור 5). הבדלים אלו נמצאו מובהקים. בזן מרלו ($p < 0.05$). נראית מגמה של השפעת הטיפולים על משקל ומספר הזמורות אך ההבדלים אינם מובהקים (איור 6).



איור 5: רמת אנטוציאנינים (ממוצע ±שגיאת תקן) בכל אחד מהכרמים, בכל אחד מהזנים, בטיפולים השונים (מבוטא כמלבדן).



איור 6: משקל הזמורות (ממוצע \pm שגיאת תקן) בחורף 2018 בכל אחד מהטיפולים באורטל.

4. סיכום ודין

בישראל נפוצים מינים שונים של ציקדות (Homoptera:Cicadellidae) הנקראים בשם כללי "ציקדה ירוקה" ומהווים קומפלקס של אוכלוסיות מתת המשפחה Typhlocybae. בתת משפחה זו קיימים שלושה שבטים (Tribes): Empoascini, Erythroneurini, Typhlocybini. כולם רב פונדקאים (Poos and Wheeler, 1943; Lenz et al., 2009; Lentini et al., 2000; Serra et al., 2013); אבידוב, 1961). מהציקדות שהוגדרו עד כה נמצאים בכרם שלושה מינים השייכים לשני שבטים: *Z. rhamni*: Tribe Erythroneurini ו- *A. decedens*, *J. lybica*: Tribe Empoascini

הממצאים העיקריים מהמחקר:

(1) פיתוח כלים מולקולריים לזיהוי יעיל של שלושת המינים העיקריים. פיתוח הפריימרים לכל מין עבר מספר אישורים כולל השוואה מורפולוגית והצלבה בין המינים וכיום מאפשר ודאות גבוהה בזיהוי המינים גם על פי נקבות ונימפות. יתרון נוסף של הזיהוי המולקולארי הינו ביכולת לזהות מספר רב של פרטים במשך זמן קצר יחסית לעומת הזיהוי המורפולוגי.

(2) איפיון צורת הנזק לפי מין הציקדה. המין *Z. rhamni* גורם לתסמינים של כתמים לבנים. ממצאים אלו תואמים לידוע על צורת ההזנה במינים השייכים ל Typhlocybae אשר רובם ניזונים מתאי פרנכימה בעלה (mesophyll cells). למינים אלו שייכת *Z. rhamni* מהשבט Erythroneurini וכאמור, הנזק הנראה הינו נקודות לבנות (ריקון תאים). שני המינים האחרים *A. decedens* ו *J. lybica* גורמים בזנים שבדקנו לתסמינים של האדמה בשולי העלה והתייבשות שלהם. היוצא מהכלל הינו השבט Empoascini, אליו משתייכות *A. decedens* ו *J. lybica*, ברובם ניזונים גם מהפרנכימה וגם מהשיפה ומהם שניים מהמינים *J. lybica*; *Empoasca vitis* הניזונים רק על השיפה. ההשערה היא שניזוני השיפה מעבירים טוקסינים הגורמים להאדמה בשולי העלה בזנים אדומים והצהבה בשולי העלה בזנים לבנים שלא נבדקו במחקר זה.

(3) זיהוי מיני הציקדות והדינמיקה של האוכלוסיות בכרם בזנים מרלו וקברנה. בעזרת הכלים המולקולריים הוגדר הרכב הציקדות בכל אזור במהלך העונה. נראה כי לכל מין דינמיקה שונה בזמן בתלות בזן הגפן. בקברנה המין *A. decedens* מופיע בעקר בתחילת העונה ולאחר מכן המין *Z.*

ramni הופך להיות המין הדומיננטי. במרלו המין הדומיננטי לאורך כל העונה הינו *A. decedens*. המין השלישי, *J. lybica*, מופיע כפרטים בודדים החל מתחילת הקיץ. (4) פוטנציאל הנזק של מיני הציקדות בזנים מרלו וקברנה. קצב הריבוי (reproduction) אינו מושפע מזן הגפן אבל שונה בין מיני הציקדות- קצב הגידול של המין *Z. ramni* גדול יותר מקצב הגידול של המין *A. decedens*. לעומת זאת, עוצמת הנזק תלויה גם במין הציקדות וגם בזן הגפן. הנזק של האדמת העלים הנגרם מהמין *A. decedens* הביא להתמוטטות העלים ואילו כאשר נגרם הנזק של נקודות לבנות מהמין *Z. ramni*, העלים עדיין נראים חיוניים. כך, 10 פרטים מהמין *A. decedens* גרמו תוך שבועיים-שלושה להתמוטטות העלים בעוד ש 10 פרטים מהמין *Z. ramni* באותו פרק זמן גרמו לנזק של כ 40% לעלה אך ללא התמוטטות העלה. עוצמת ההשפעה משמעותית יותר בזן מרלו ופחות בזן קברנה.

(5) פוטנציאל הנזק של קומפלקס הציקדות (הרכב המינים) בשטח. למרות שחזרנו על הניסוי של יצירת שלוש רמות אוכלוסיה של ציקדות בשני זני גפן, בכל אחת משנות המחקר, באתרים שונים ובגדלים שונים של חלקות ניסוי לא הצלחנו להגיע לרמת נזק משמעותית בטיפול הביקורת. מצאנו כי השפעת הציקדות הינה בעיקר על רמת האנטוציאנינים ותיכנן השפעה גם על הצימוח שנמדד כמספר ומשקל זמורות בחורף. במחקר קודם ב 2003 נמצאה השפעה של הציקדות על רמת הסוכר (אחוז בריקס) ויתכן שהסיבה להיעדר השפעה על רמת הסוכר במחקר שלנו נובעת מכך שרמת הנזק המירבית בביקורות בכל שלושת שנות המחקר לא הייתה גבוהה דיה. בנוסף מצאנו כי יתכן שיש הבדל ברגישות בין מיני הציקדות לתכשיר ההדברה בו השתמשנו (טיפיקי). גם במקרה זה, רמת האוכלוסיה הנמוכה אינה מאפשרת ניתוחים סטטיסטיים ונדרשת בדיקה נוספת.

מסקנות יישומיות מהמחקר: (1) ניתן לזהות את מיני הציקדות באופן יעיל ומהיר יחסית בכלים מולקולריים, בשטח ניתן לזהות את מיני הציקדות על פי צורת הנזק. (2) כימות עוצמת הנזק הפוטנציאלי בשילוב עם הידע לגבי קצב הריבוי של כל המין מאפשרים להעריך פוטנציאל הנזק. (3) יכול להיות שקיימת רגישות שונה של מיני הציקדות לתכשירי הדברה. (4) בקברנה עיקר הנזק הינו מהמין בו קצב ההתפתחות גבוה אך עוצמת הנזק נמוכה ולכן יתכן שכדאי לשקול טיפול רק ברמת אוכלוסיה גבוהה יחסית (מעל 10 נימפות לקודקוד צימוח), במרלו עיקר הנזק הינו מהמין בו קצב ההתפתחות נמוך אמנם אך עוצמת הנזק גבוהה גם ברמות אוכלוסיה נמוכות ולכן יתכן שכדאי לשקול טיפול מיד עם הופעת ציקדות על העלים.

מסקנות אקולוגיות מהמחקר: לציקדות המהוות מינים סימפטריים בכרם שלוש דרכים להימנע מתחרות: (1) דחיקה תחרותית על ידי קצב גידול גבוה, (2) הימנעות מתחרות על ידי הבדלים במועד ההופעה במהלך העונה, (3) התפתחות/העדפה של פונדקאים שונים (זני גפן).

5. הבעת תודה

תודה לד"ר גל ספיר על העזרה בפיתוח הפריימרים לציקדות מהמינים השונים.

6. רשימת ספרות מצוטטת

- אבידב צ. (1961) "מזיקי צמחים בישראל". הוצאת האוניברסיטה העברית, ירושלים. עמ' 53-59.
- זהבי ת. (2005) הכרת פגעי הגפן והדברתם. משרד החקלאות ופיתוח הכפר, שירות ההדרכה והמקצוע, המחלקה למטעים, האגף להגנת הצומח. עמ' 42-44.
- שרון ר., הררי א., זהבי ת., סוקולסקי ת. (2013-2015) בחינת יעילות תכשירים שונים להדברת הציקדה הירוקה. דו"ח שנתי לשולחן ענבי מאכל.
- Backus, E. A., Serrano, M. S., & Ranger, C. M. (2005). Mechanisms of hopperborn: An Overview of Insect Taxonomy, Behavior, and Physiology. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 125-151.
- Candolfi, M.P., Jermini, M., Carrera, E. & Candolfi-Vasconcelos, M.C. 1993: Grapevine leaf gas exchange, plant growth, yield, fruit quality and carbohydrate reserves influenced by the grape leafhopper, *Empoasca vitis*. – *Entomol. exp. appl.* 69: 289-296
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299
- Lentini, A., Delrio, G., & Serra, G. (2000). Observations on the infestations of *Jacobiasca lybica* on grapevine in Sardinia. *IOBC wprs Bulletin*, 23(4), 127-130.
- Lenz, M. S., Isaacs, R., Flore, J. A., & Howell, G. S. (2009). Vegetative growth responses of *Pinot gris* (*Vitis vinifera* L.) grapevines to infestation by potato leafhoppers (*Empoasca fabae* Harris). *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(2), 130-137
- Papura, D., Giresse, X., Chauvion, B., Caron H., Delmotte F., van Helden M. (2009) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the green leafhopper *Empoasca vitis* Goethe (Homoptera). *Molecular Ecology Resources* 9(3): 827-829.
- Pavan, F., Pavanetto, E., Duso, C., Girolami, V., Vidano, C., & Arzone, A. (1988). Population dynamics of *Empoasca vitis* (Goethe) and *Zygina rhamni* (Ferr.) on vines in northern Italy. In 6th Auchenorrhyncha Meeting. Turin, Italy, September 7-11, 1987. *Proceedings* (pp. 517-524).
- Poos F. W. and Wheeler N.H (1943) Studies on Host Plants of the Leafhoppers of the Genus *Empoasca*. Technical Bulletin No. 850.
- Reineke, A. and Hauck, M. (2012), Larval development of *Empoasca vitis* and *Edwardsiana rosae* (Homoptera: Cicadellidae) at different temperatures on grapevine leaves. *Journal of Applied Entomology*, 136: 656–664.
- Serra, G., Cocco, A., Mameli, M. G., Delrio, G., & Lentini, A. (2013). Influence of regulated deficit irrigation and partial rootzone drying on leafhoppers infestations on grapevine. *IOBC-WPRS Bulletin*, 85, 117-120.
- Sharon, R., Harari, A. R., Zahavi, T., Raz, R., Dafny-Yelin, M., Tomer, M., ... & Naor, V. (2015). A yellows disease system with differing principal host plants for the obligatory pathogen and its vector. *Plant pathology*, 64(4), 785-791.
- Simon, C., Frati, A., Beckenbach, B., Crespi, H., Liu, P. Flook.1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved

polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 701–651 :87 .

7. פרסומים שנבעו מהמחקר (כולל הרצאות בכנסים)

R. Sharon, T. Zahavi, M. Tomer, A. Avraham (2018) Definition and population dynamics of "green leafhoppers", a complex of sympatric pests species in Israeli vineyards, XI European Congress of Entomology, Napoli, Italy.

R. Sharon, T. Zahavi, M. Tomer, A. Avraham, Z. Farkash (2019) Characterizing sympatric leafhopper species of the "green leafhopper" complex (Typhlocybinae) by niche choices. Joint IOBC-WPRS Meeting of the Working Group "Integrated Protection in Viticulture", Porto, Portugal.

ר. שרון, מ. תומר, א. אברהם, ז. פרקש (2019) "ציקדות עלים"- מי, איפה ומתי? כנס כרם, מו"פ צפון.