

לימוד ושיבוש התקשורת הכימית של אקרית הוורואה
Varroa destructor Anderson and Trueman

עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה על שם רוברט ה. סמית של
האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'

מגישה:
נורית אליאש

עבודה זו נעשתה בהדרכתן של:
ד"ר ויקטוריה סורוקר ופרופ' עדה רפאלי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.

עבודה זו מוקדשת להורי היקרים שתומכים בי תמיד בכל אשר אעשה.

ברצוני להודות מעומק הלב למנחה הראשית שלי, ד"ר ויקטוריה סורוקר מהמחלקה לאנטומולוגיה, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן; על עצותיה הפיקחיות, הערותיה מאירות העיניים, סובלנותה ונכונותה הבלתי מתפשרת לעזור בכל תחום, גם מעבר לתחומי המחקר הנוכחי. היא לי אמה שנייה במעבדה.

למנחה פרופ' עדה רפאלי, המחלקה לאיחסון, מנהל המחקר החקלאי, על הכוונתה המקצועית והערותיה שאיפשרו לי לראות דברים מזוויות חדשות.

לד"ר לאוניד אנשילביץ, המחלקה לאנטומולוגיה, על רעיונותיו הפיקחיים, אילתוריו וחוש ההומור שאינו מכזיב. לטכנאית אנה מחלין, המחלקה לאנטומולוגיה, על פתרונות בירוקרטיים וטכניים, ותמיכתה הנפשית והפיסיוולוגית, החל מאוזן קשבת וכלה בפרחים ודגים מלוחים.

לטכנאי המחלקה לאנטומולוגיה, סעדיה רנה, על הסיוע הרב במכוורת, שתמיד נעשה באורך רוח ובחיוך, מתוך כבוד והערכה לכל דבורה ודבורה.

לדבוראים יוסי קמר ואיליה זיידמן ממכוורת צריפין על התמיכה והעזרה המקצועית שאין לה ערוך.

לד"ר דבורית אבני, המחלקה לאנטומולוגיה, על הידע המיקצועי והמעשי הרב, על האוזן הקשבת והחיבוק האימהי. לכל חברי המעבדה בעבר ובהווה: דיקלה כתבי, טויבא חדד, שלומית לבסקי, אמיר דקל, שי כהן ושי ברקן.

לד"ר אריקה פלטנר, Dr Erika Plettner, Simon Fraser University Canada, על שיתוף הפעולה ועל החומרים המשבשים ששימשו בעבודה זו.

לד"ר מירה ויסברג, המרכז להפרדה וזיהוי מטבוליים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן; על העזרה המקצועית הלבבית, והידע הכימי הנחוץ.

לד"ר אוחניה קליין, היחידה למיקרוסקופיה, מכון ויצמן, רחובות; על ההדרכה המקצועית והסיוע המודרך בחלל החיצון בחברתן של האקריות.

לנעמי בהט, היחידה לציוד בין מחלקתי, הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות; על העזרה המקצועית והלבבית.

לד"ר הילרי פוט, המחלקה לכלכלה חקלאית ומינהל, הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות; על הכוונתה בנושאי סטטיסטיקה בסבלנות אין קץ.

לנרי

אקרית הוורואה *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) טפילה חיצונית של דבורת הדבש, מטפילה במקור את דבורת הדבש האסייתית *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). מעבר הוורואה באמצע המאה ה-20 אל דבורת הדבש האירופית *A. mellifera* הוביל לפגיעה הרסנית בדבורים אלה. כיום הוורואה, הנפוצה ברוב מדינות העולם, הינה המזיק הראשון בחשיבותו בענף גידול הדבורים, ומהווה אחד החשודים העיקריים בגרימת תופעת קריסת הכוורות. בישראל האקרית הופיעה לראשונה בשנת 1984 ומאז היא מהווה האיום העיקרי לקיום ענף הדבורים בארץ.

דרך ההזנה של הוורואה על ידי מציצת ההמולימפה של הדבורה המתפתחת גורמת לירידה במשקל הדבורה הבוגרת המגיחה ולקיצור אורך חייה, בנוסף נגרמות לדבורה פגיעות נוירולוגיות המתבטאות בירידה ביכולות התעופה והלמידה שאינה אסוציאטיבית. מעבר לפגיעות ישירות אלה, הוורואה פוגעת בדבורים גם באופן עקיף בהיותה וקטור של וירוסים שונים, ולמעשה עיקר הנזק המוביל בסופו של דבר לקריסת הכוורת מקורו כנראה בוירוסים המועברים על ידי הוורואה. נוכחות הוורואה בכוורת מחייבת טיפול בתכשירי הדברה אולם לכך יש מגבלות וחסרונות רבים. הקירבה הסיסטמית שבין הדבורה והאקרית מקשה על מציאת תכשירים סלקטיביים, ולמעשה התכשירים שבשימוש היום (זרחנים אורגניים ופירותרואידים) פוגעים גם בדבורים. בנוסף, הם עלולים להיספח למוצרי המכוורת, המשמשים בין השאר בתעשיית המזון והקוסמטיקה, וניתן למצוא שאריות של חומרי הדברה אלו אפילו מספר שנים לאחר השימוש בהם. על כל אלה מתווסף החיסרון הבולט של היווצרות עמידות מהירה של אוכלוסיית הוורואה כנגד תכשירי הדברה, ודיווחים רבים שהצטברו לאחרונה מעידים על ירידה ביעילותם של התכשירים. דרכי התמודדות אחרות כגון שימוש בתכשירים "רכים", אוכלוסיות דבורים סבילה, הדברה אגרוטכנית והדברה ביולוגית נמצאו כלא יעילות דיין עד כה, ולפיכך קיימת חשיבות רבה לאיתור אמצעים אלטרנטיביים וסלקטיביים להתמודדות עם האקרית.

מחזור חיי הוורואה מתוזמן היטב עם זה של דבורת הדבש וכולל שני שלבים עיקריים: שלב פורטי, בו הנקבה נטפלת לדבורה בוגרת; ושלב רבייתי, בו היא מתרבה בתא הוולד החתום. בין השלב הרבייתי והפורטי ישנם מצבים בהם הוורואה "חופשייה" ונעה על פני החלה בחיפוש אחר פונדקאי. כניסתה של נקבת הוורואה המופרית לתא הוולד מתוזמנת עם מצבו של הוולד המתפתח; הוורואה מטילה ביצים בהפרשי זמן קבועים, הצאצאים מזדווגים בתא החתום, ניזונים מההמולימפה של הדבורה המתפתחת, ועם הגחת הדבורה הבוגרת מן התא יוצאות עימה האקרית המייסדת ובנותיה שהגיעו לבגרות. לאור הסכרון הרב שבין מחזורי החיים של הוורואה והדבורה עולה החשיבות של הבנת התנהגות הוורואה, התמצאותה בכוורת ויכולתה לאתר פונדקאי. ניתן לשער שהפרת סנכרון זה הינה פתח לאמצעי התמודדות אלטרנטיבי עם האקרית.

חישה של אותות כימיים היא ככל הנראה הערוץ המרכזי המשמש להתמצאות הוורואה בכוורת ולאיתור הפונדקאי. במבחני התנהגות במעבדה הוורואה מבחינה בין דבורים בוגרות וזחלים ובין דבורים בוגרות בעלות תפקידים שונים, והיא מעדיפה דבורה מטפלת על פני משחרת. להעדפה זו כאמור יש יתרון ברור מכיוון שעל גבי הדבורה המטפלת לוורואה יש סיכוי גבוה יותר להגיע אל תאי הוולד בהם היא מתרבה. ההבחנה בין דבורה מטפלת ומשחרת נעשית ככל הנראה על סמך הבדלים בהרכב הפחמימנים בפרופיל הקוטיקולרי של הדבורה, כמו גם על סמך אותות כימיים אחרים כגון הפרשה מבלוטת סנוב בדבורה הבוגרת. בעבודות קודמות תואר ברגל הקדמית של הוורואה שקע ובו שערות חישה; חוסר עקביות בספרות

בתיאור איבר זה העלה את הצורך לבחינה מחדש של הנושא. שיטה מקובלת לחקר חישת אותות כימיים בפרוקי רגליים היא בדיקת התגובה האלקטרו-פיסילוגית לאותות כימיים, בדרך כלל של מחושי החרק. עבור הוורואה לעומת זאת, קיימים בספרות אזכורים לא מפורטים לניסיונות רישום תגובה אלקטרו-פיסילוגית לחומרים נדיפים. לאור החשיבות הרבה של החישה הכימית בוורואה לאיתור הפונדקאי, נבחנה האפשרות להדברת האקרית תוך ניצול הידע אודות מחזור חייה והאותות המשמשים אותה בבחירת הפונדקאי. לשם כך נבדק השימוש בחומרים משבשי חישה שפותחו לעבודה זו, ופועלים רק בנוכחות אות כימי רלוונטי.

מטרת המחקר העיקרית הייתה פיתוח שיטה לאיתור ובדיקת חומרים המשבשים את חישת הפונדקאי על ידי אקרית הוורואה. ראשית נבדק מבנה איברי החישה הכימית של הוורואה באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק- Scanning electron microscope (SEM). לאחר מכן נבחן תפקוד איברי החישה הכימית של הוורואה במטרה לפתח שיטה לבחינת תגובה אלקטרו-פיסילוגית של איבר החישה לאותות כימיים באמצעות מכשיר אלקטרו-אנטנוגרם (EAG) Electroantennogram. שיטה זו שימשה בהמשך לבדיקת תגובה לחומרים נדיפים סינטטיים שידוע כי מצויים בסביבת הכוורת (Geraniol, Benzaldehyde, Methyl salicylate, Octanoic acid ו-9-ODA), ולנדיפי דבורה. במקביל פותחו מבחני התנהגות אשר באמצעותם נבחנה התנהגות העדפת הפונדקאי של הוורואה בין דבורה משחרת ומטפלת. במסגרת מבחני הבחירה נבדקה העדפת הוורואה בשלבים פיסילוגיים שונים של האקרית, וכאשר מקור הדבורים היה מכוורת זהה או שונה לזו של האקרית. מבחנים אלה אפשרו בהמשך את בדיקת השפעתם של החומרים המשבשים הפוטנציאלים על התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה.

באמצעות SEM זהו אברי חוש כימיים ברגל הקדמית של נקבת וורואה בוגרת שעל פניהם נקבים. בנוסף, בעבודה זו תוארו לראשונה שערות חישה נוספות באזור איבר החישה. פותחה שיטה לבדיקת תגובה אלקטרו-פיסילוגית של רגל קדמית מנותקת, ומבין החומרים הנדיפים שנבדקו Geraniol הביא לתגובה החזקה ביותר בכל הריכוזים שנבדקו. כמו כן התקבלה לראשונה תגובה לנדיפי דבורה משחרת ומטפלת, ונמצא כי אין הבדל משמעותי בעוצמת התגובה של הוורואה אל שתיהן. תוצאות העבודה מציעות שלפחות חלק משערות החישה שנראו באמצעות ה-SEM הם אכן שערות חישה הקולטות את האותות הכימיים שנבדקו, אולם רק על סמך תוצאות אלה לא ניתן לקבוע איזו תגובה התנהגותית מעוררת חישת האותות. לשם כך נערכו מבחני התנהגות-בחירה בהם נבדקה העדפת הפונדקאי של וורואה בין דבורה משחרת ומטפלת. בניסויים מקדימים לקביעת מבנה מערכת הניסוי נערכה השוואה של העדפת וורואה משני שלבים פיסילוגיים שונים, שלב רבייתי ושלב פורטי, ונמצא כי אין הבדל בהעדפת הוורואה בשני השלבים. בסכימת כלל תוצאות הניסויים נמצא שלוורואה העדפה מובהקת לדבורה מטפלת על פני משחרת. יחד עם זאת העדפה זו אינה הדירה; כלומר, בחלק מהמועדים לא נמצאה העדפה למטפלת. בניסיון לאתר את מקור השונות בין הניסויים נבדקו שני גורמים, ונמצא כי העדפת הפונדקאי של הוורואה תלויה בין השאר בזהות כוורת מקור הוורואה והדבורים וכן במועד בו נערכו הניסויים. בניסויים שנערכו באותם מועדים, העדפת הוורואה למטפלת הייתה עקבית יותר כאשר הוורואה והדבורים היו מכוורות שונות, לעומת העדפתה כאשר הוורואה והדבורים היו מאותה כוורת. בנוסף נמצא שבניסויים בהם הוורואה והדבורים היו מאותה כוורת, העדפת הפונדקאי השתנתה במועדים השונים. בניסיון להסביר את השפעת גורמים אלה הוצעו שתי השערות.

הסבר אפשרי להשפעת גורם זהות הכוורת על העדפת הפונדקאי של הוורואה הוא בהשערה שמנגנון ההיכרות של הוורואה מבוסס על "היכרות עקיפה" (Indirect familiarization) בו הפרט מזהה פרטים הדומים לו ולסביבתו. בעבודות קודמות נמצא שהפרופיל הקוטיקולרי של הוורואה דומה לזה של דבורה מטפלת ואף משתנה בהתאם לפרופיל של הזחל המתפתח. את התמריץ האבולוציוני להופעת (או לאי היעלמות) מאפיין זה ניתן להסביר באמצעות יתרון ההסוואה שהוא מקנה לוורואה. אולם שימור אותו מאפיין אפשרי הודות ליתרון חיוני נוסף שהוא מקנה לאקריות אשר מזהות ומעדיפות דבורה מטפלת, משום שאקריות אלה מגיעות אל תאי הוולד בהן הן מתרבות. במערכת הניסוי בעבודה זו בה הוורואה בוחרת בין פונדקאים מכוורת זרה לה, הוורואה ממוקמת בסיטואציה שהינה נדירה באופן טבעי בכוורת. בסיטואציה לא מוכרת זו היא מחפשת אחר אותות מוכרים, דומים לה ולסביבתה המקורית. במבחן הבחירה המלאכותי הדבורה המטפלת היא הגורם המוכר ביותר, כיוון שלדבורים מטפלות מכוורות שונות יש פרופיל ריח אופייני. ייתכן ורכיב משותף זה בפרופיל הריח של הדבורה המטפלת הוא זה שמאפשר את זיהויה והעדפתה על ידי הוורואה, אולם השערה זו עודה דרושה בירור.

על מנת לנסות להסביר את השפעת מועד עריכת הניסויים על העדפת הפונדקאי של הוורואה, הוצעו שרמת נגיעות הכוורת בוורואה (המחושבת לפי יחס אוכלוסיית הדבורים והוורואה) עשויה להשפיע על התנהגותה; זאת מכיוון שרמת הנגיעות משתנה לאורך השנה וגם עשויה להיות רלוונטית להתנהגות האקרית. בבדיקת רמת הנגיעות בכוורות הניסוי אכן נמצא כי במועדים בניהם היה הבדל בהעדפת הפונדקאי של הוורואה רמת הנגיעות הייתה שונה. יחד עם זאת, לא נמצא קשר קבוע בין רמת הנגיעות והעדפת הוורואה. העדפת פונדקאי גמישה עשויה להקנות יתרון לוורואה משום שכך עולים סיכוייה להגיע לדבורה משחרת, שזו דרך ההפצה היחידה בין כוורות, ועל ידי כך להימנע מתמותה ביחד עם הכוורת הקורסת. אבל כיצד הוורואה מזהה שהגיע הזמן לנטוש את הספינה הטובעת? בניסיון להתחיל ולבדוק סוגיה זו הועלתה ההשערה שהוורואה מסוגלת לחוש ברמת מחלות ופתוגנים גבוהה בכוורת. נבדק ונמצא שהוורואה מבחינה בין דבורה עם סימפטומים של מחלה (עיוות כנפיים) ודבורה ללא סימפטומים, אלא שנמצאה דווקא העדפה גבולית לדבורה עם סימפטומים של מחלה. בהשוואת הפרופיל הקוטיקולרי של דבורים משני הסוגים נמצא הבדל בכמות היחסית של הפחמימנים בקוטיקולה ומתעוררות שאלות למחקר עתידי: האם זהו המנגנון שמאפשר את יכולת הבחנתה של הוורואה? ואיזה יתרון יש לוורואה/דבורה/פתוגן בהבחנה זו?

בבדיקת השפעת החומרים המשבשים על העדפת הפונדקאי של הוורואה, בנוכחות שניים מהחומרים נצפתה ירידה בבחירת הוורואה בדבורה מטפלת לעומת הביקורת, ללא תלות במועד בו נערכו הניסויים.

לסיכום, בעבודה זו נמצאו חומרים אשר נוכחותם פגעה ביכולת ההבחנה של הוורואה בין פונדקאים. פגיעה זו עשויה להפר את הצימוד שבין מחזור חיי הוורואה והדבורה, ובכך להגביר את יכולת הדבורים להתמודד עם האקרית. גישה זו תומכת בפיתוח שיטת הדברה ידידותית לסביבה, אשר בשילוב עם שיטות הדברה נוספות יכולה להטות את כפות המאזניים לטובת הדבורה. בנוסף פותחה שיטה לרישום תגובה אלקטרו-פיסיולוגית מרגל האקרית, היכולה לשפוך אור על מנגנון שיבוש זיהוי פונדקאי ולהוות מערכת לסריקת חומרים משבשים נוספים, כמו גם לחקר איבר החישה. עבודה זו פותחה פתח לשאלות רבות לגבי גורמים נוספים שעשויים להשפיע על העדפת הפונדקאי של הוורואה, החל ממצבן התזונתי והבריאותי של הדבורים, וכלה בגורמים בוורואה עצמה (כגון נוכחות וירוסים).

9	1 מבוא
9	1.1 אקרית הוורואה
9	1.1.1 טקסונומיה
9	1.1.2 תפוצה
9	1.1.3 מחזור חיים
12	1.1.4 השפעת הוורואה על הדבורה
13	1.1.5 התמצאות הוורואה והתנהגות איתור הפונדקאי
13	1.1.5.1 חישת אותות כימיים בוורואה
14	1.1.5.2 אותות כימיים המשפיעים על התנהגות איתור הפונדקאי
16	1.1.6 דרכי התמודדות עם המזיק
18	1.2 מטרת העבודה
19	2 חומרים ושיטות
19	2.1 בעלי החיים (דבורי הדבש ואקרית הוורואה), גידול ואיסוף
20	2.2 מבנה אברי החישה הכימיים של הוורואה
20	2.3 תפקוד אברי חישה, בדיקות אלקטרו פיסילוגיות
22	2.4 אנליזה כימית, גז כרומטוגרף
22	2.5 התנהגות איתור הפונדקאי, מבחני התנהגות
23	2.6 חומרים המשבשים את התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה
24	2.7 ניתוח סטטיסטי
25	3 תוצאות
25	3.1 מבנה אברי החישה הכימיים של נקבת הוורואה
29	3.2 תפקוד אברי החישה
34	3.3 התנהגות איתור הפונדקאי
44	3.4 חומרים המשבשים את התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה
49	4 דיון
57	5 רשימת ספרות
62	נספחים

EAG- Electroantennogram

SEM- Scanning electron microscope

GC MS- Gas chromatogram Mass spectrometer

VFN- Varroa, Forager, Nurse

הערה: לכל אורך העבודה, כאשר נעשה שימוש במילים "וורואה" או "האקרית" הכוונה היא לאקרית הוורואה *Varroa destructor* Anderson and Trueman

1 מבוא

1.1 אקרית הוורואה

אקרית הוורואה *Varroa destructor* Anderson & Trueman טפיל חיצוני על דבורים מהסוג *Apis* הינה המזיק הראשון בחשיבותו בענף הדבורים בעולם. הדבורים ובריאותן הינן נושאים שההכרה בחשיבותם גוברת בשנים האחרונות בעיקר עקב תפקידן המרכזי בהאבקת גידולים חקלאיים. למרות שעדיין מתקיים דיון בנוגע לשאלה האם העולם באמת עומד בפני "משבר האבקה עולמי", אין ספק כי מינים רבים של דבורים (סוליטריות וחברתיות) הולכים ומתמעטים (Allsopp *et al.* 2008; Ghazoul 2005; Steffan-Dewenter *et al.* 2005). בארצות שונות באירופה וארצות הברית קיימים דיווחים על ירידה חריגה במספר הכוורות בשנים האחרונות (Van Engelsdorp & Meixner 2010). נתונים אלה מדאיגים לאור העובדה שהאבקת גידולים חקלאיים בארצות אלה תלויה ברובה בדבורי דבש. בין הגורמים הרבים לירידה במספר הכוורות אקרית הוורואה מסתמנת כגורם מרכזי המחייב טיפול והדברה, לקבלת יכולת דבש והאבקה סבירים ולמניעת קריסתה של הכוורת תוך מספר עונות (Rosenkranz *et al.* 2009). לפיכך, חקר הוורואה ויחסי הגומלין שלה עם הפונדקאי הינם נדבך מרכזי במאמץ העולמי לשימור דבורי הדבש ואבטחת האבקת גידולים.

1.1.1 טקסונומיה

המין *V. destructor* (להלן "וורואה") שייך לסוג המונה 4 מיני אקריות טפיליות חיצוניות: *Varroa destructor*, *Varroa jacobsoni* (שעד שנת 2000 נחשבו לאותו מין (Anderson & Trueman 2000)), *Varroa underwoodi* ו- *Varroa rindereri*. סוג זה שייך למשפחה Varroidae, תת סדרה Mesostigmata, סדרת האקריות Acari, מחלקת העכבישניים Arachnida.

1.1.2 תפוצה

מקורה של הוורואה במזרח אסיה שם היא טפילה מקורית של דבורת הדבש האסייתית *Apis cerana*. בין שני אורגניזמים אלו מתקיימים יחסי טפיל-פונדקאי יציבים שהתפתחו במהלך תקופה ארוכה של קו-אבולוציה. העברת כוורות של הדבורה האירופית *Apis mellifera* למזרח רוסיה בשנות החמישים של המאה ה-20 הובילה כנראה למעבר של הוורואה להטפיל גם את מין זה (Rosenkranz *et al.* 2009). דרך מזרח אירופה המשיכה הוורואה להתפשט במהירות יחסית וכיום היא נפוצה בכל העולם למעט אוסטרליה. מכיוון שהדבורה האירופית חסרה את מאפייני הדבורה האסייתית אשר מאפשרים יחסי שיווי משקל עם אוכלוסיית הוורואה פגיעתה בכוורת הינה הרסנית ומחייבת טיפול. האקרית הופיעה לראשונה בישראל בשנת 1984 ומאז היא מהווה האיום העיקרי לקיום ענף הדבורים בארץ (גוטוויין 2005).

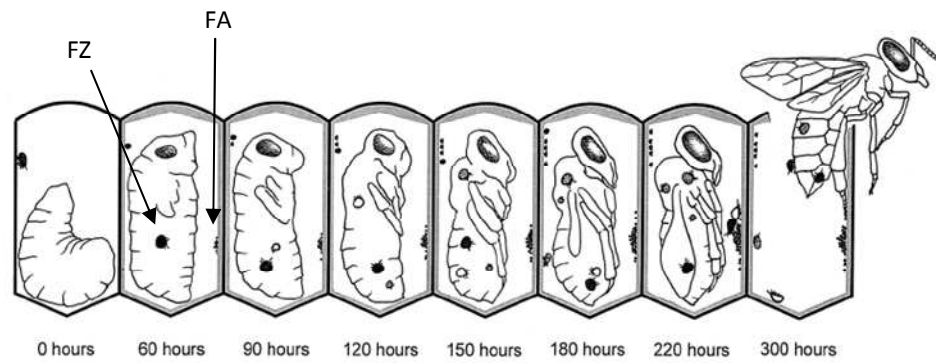
1.1.3 מחזור חיים

מחזור חיי הוורואה מתוזמן היטב עם זה של דבורת הדבש. במחזור חייה שני שלבים עיקריים: שלב פורטי, בו הנקבה נטפלת לדבורה בוגרת; ושלב רבייתי, בו היא מתרבה בתא הוולד החתום. בתום התפתחות הדבורה, עוזבות את התא עם האקרית המייסדת גם בנותיה שהופרו על ידי אחיהן. דרגות הנימפות והזכרים הינן קצרות חיים, וניתן למצוא אותן רק בתוך תא הדבורה החתום. לפיכך, הדרגה העיקרית המזיקה והנראית בכוורת הינה נקבת הוורואה הבוגרת, ובה מתמקדים רוב

המחקרים ומאמצי ההדברה (Martin 2001). בין השלב הרבייתי והפורטי ישנם מצבים בהם הוורואה "חופשייה", נעה על פני החלה בחיפוש אחר פונדקאי. השפעת השלב בו מצויה הוורואה על התנהגותה ויכולת ההבחנה בין פונדקאים אינו ידוע. הכניסה לתא הוולד מתוזמנת היטב עם מצבו של הזחל המתפתח ומתרחשת זמן קצר לפני חתימת התא (איור 1). פונדקאי זה ישמש אותה בשלב הרבייתי (Rosenkranz et al. 2009).

השלב הרבייתי של הוורואה מתחיל כאשר וורואה בוגרת מופרית מגיעה אל תא זחל בשלב המתאים (דרגה חמישית, הווי יום 8 מהטלת הביצה) על גבי דבורה מטפלת, או באופן עצמאי. אז נדחקת הוורואה אל מתחת לזחל, צוללת אל תוך מזונו ונושמת באמצעות צינוריות נשימה (peritreme) המתפקדים כמעין שנורקלים. משך הזמן בו הוורואה יכולה להיכנס אל התא הינו קצוב ונמשך למעשה מהדרגה החמישית של הזחל ועד לחתימת התא על ידי דבורה בוגרת (אורך בין 40-50 שעות בתא זכר, ובין 15-20 שעות בתא עמלה של המין *A. mellifera*) (Martin 2001). אם הוורואה תיכנס מוקדם מידי, הזחל עודו קטן יחסית והדבורים המטפלות יכולות להבחין בה ולסלק אותה מן התא. זחל בדרגה חמישית, לפני חתימת התא מכסה לחלוטין את תחתית התא, והוורואה המצויה מתחתיו איננה נגישה לדבורים המטפלות. אם הוורואה תגיע מאוחר מידי, התא כבר נחתם והיא לא תוכל להיכנס. כ-5 שעות לאחר חתימת התא הזחל מסיים את כל מזונו וחושף על ידי כך את הוורואה. בעוד הזחל מתחיל לטוות סביב עצמו את הקורים בשלב הטרומ-גולם, הוורואה נצמדת אליו ומתחילה ליזון מההמולימפה שלו מנקב שהיא יוצרת באמצעות גפי הפה שלה - כליצרה (chelicerae) המותאמים לכך. נקב יחיד זה ישמש את כל צאצאי הוורואה שיתפתחו בהמשך על חשבון זחל הדבורה (Rosenkranz et al. 2009). בתוך כמה שעות מתחילה הוורואה בתהליך היווצרות הביציות (oogenesis) והבשלתן (vitellogenesis), וכ-60-70 שעות מרגע חתימת התא מטילה האם המייסדת ביצה ראשונה. הביצה הראשונה איננה מופרית, ובהתאם למערכת הרבייה ההפלו-דיפלואידית בוורואה ממנה יתפתח צאצא זכר. לוורואה 4 דרגות התפתחות: ביצה, נימפה ראשונה-פרוטונימה, נימפה שנייה – דאוטונימפה ולאחריה הדרגה הבוגרת. בין הדרגות השונות ישנה התנשלות, כאשר לפני ההתנשלות יש שלב בו הוורואה איננה נעה (שלבים אלה נקראים proto/deutochrysalis). לאחר הטלת הביצה הראשונה הנקבה המייסדת ממשיכה להטיל ביצים מופרות, מהן יתפתחו נקבות בהפרשי זמן של 25-30 שעות בין הטלה להטלה. סדר יומה של הוורואה וצאצאיה נע בין הזנה מן הנקב שעל הזחל- "איזור האכילה" (feeding zone) ו"איזור הפרשות" (fecal accumulation site) המצוי בדרך כלל על קיר תא הוולד באיזור קצה הבטן של הזחל, ובו הן שוהות בין הזנה להזנה והצאצאים נפגשים להזדווגות (Donze & Guerin 1997). משך ההתפתחות מביצה ועד לבוגר הוא 5.8 יום לנקבה, ו-6.6 לזכר. מכאן שכשהזכר מגיע לבגרות, הנקבה הראשונה כבר מוכנה להזדווגות. הזכר הבוגר מזדווג עם כל אחיותיו מייד בהגיען לדרגת בוגר. ההזדווגות מתווכת כנראה על ידי אותות כימיים המופרשים מן הנקבה ומעוררים את הזכר להזדווגות (Ziegelmann et al. 2008).

הזכר מעביר באמצעות גפי הפה המותאמים לכך את שקי הזרע (spermatophore) מפתח המין שלו אל פתח המין של הנקבה (gonopore), הממוקם בבסיס הרגל השלישית. מספר הזדווגויות נחוצות על מנת למלא את כיס הזרע (spermatheca) במערכת הרבייה של הנקבה. במשך כל הזמן הזה הדבורה משלימה את התפתחותה, ועם הגחת הדבורה הבוגרת מן התא יוצאות עימה האקרית המייסדת וכל הבנות שהספיקו להזדווג. הדרגות הצעירות והזכר ישארו למות בתא החתום. ממוצע שרידות נקבות מופרות לנקבה מייסדת הוא 1 בתא של עמלה, ו-2-2.2 בתא זכר. כל נקבה יכולה לעבור בין 2 עד 3 מחזורים במהלך חייה (Martin & Kemp 1997).



איור 1. מחזור החיים של אקרית הוורואה *Varroa destructor* על פועלת של דבורת הדבש *Apis mellifera*. שעת 0, דבורה בדרגת זחל-טרומ גולם, 8 יום מהטלת הביצה: נקבת וורואה פורטית מייסדת נכנסת לתא הוולד רגע לפני חתימת התא. 5 שעות לאחר מכן מתחילה האם המייסדת לזון מנקב שהיא יוצרת בזחל (FZ-feeding zone). 60-70 שעות, דבורה בשלב גולם: ביצה בלתי מופרית מוטלת בחלק העליון של התא, מביצה זו יבקע צאצא הזכר היחיד. 90 שעות, דבורה בשלב גולם: זכר בדרגת פרוטונימפה בוקע מן הביצה והנקבה המייסדת מטילה ביצה מופרית ראשונה ממנה תבקע נקבה. 120 שעות, דבורה בשלב גולם: נקבה ראשונה בדרגת פרוטונימפה בוקעת וביצה מופרית שנייה מוטלת. 150 שעות, דבורה בשלב גולם: ביצה מופרית שלישית מוטלת, הזכר והבת הראשונה בדרגת דאוטונימפה, והבת השנייה בוקעת בדרגת פרוטונימפה. 180 שעות, דבורה בשלב גולם: ביצה מופרית רביעית מוטלת, הנקבה השלישית בוקעת, וערמת הפרשות מצטברת בתחתית התא. 220 שעות, דבורה בשלב גולם: הזכר ובת הראשונים הגיעו לדרגת בוגר והם מזדווגים באיזור ההפרשות (FA-fecal accumulation site), הנקבה השנייה, השלישית והרביעית עשויות להגיע לבגרות ולהזדווג. 300 שעות, הדבורה הבוגרת סיימה את התפתחותה: הנקבה המייסדת וכל הבנות המזווגות יוצאות מן התא ביחד עם הדבורה הבוגרת, הנקבות בדרגות נימפה והזכר מתים בתא. אויר על ידי ג'ניפר בוירר, מתוך (Oldroyd 1999).

עם יציאת הוורואה הבוגרת והמזווגת מן התא מתחיל למעשה השלב הפורטי במחזור חייה. האקרית בשלב הפורטי מותאמת לתנאי המחיה ולפונדקאי שלה. צורתה הרחבה והשטוחה של הוורואה הבוגרת (השונה מצורתן האופיינית של רוב האקריות) מאפשרת לה להיצמד בין לוחות בטן הדבורה הבוגרת. כמו כן לוורואה טפרים בקצה רגליה לאחיזת שערות הדבורה. מיקומה של הוורואה הוא בד"כ בין לוחות 3-4 בבטן הדבורה הבוגרת. מיקום זה מקשה על סילוקה גם על ידי הפונדקאי המקורי שלה – הדבורה האסייתית *A. cerana*. מיקומה מאפשר בנוסף הזנה מהפונדקאי על ידי נקיבת חור בממברנה הרכה המחברת בין הלוחות בבטנה של הדבורה. כל ההתאמות המורפולוגיות הללו מאפשרות לוורואה לזון באין מפריע מן ההמולימפה של הדבורה באמצעות גפי הפה המחודדים המותאמים בדיוק למטרה זו. כך הוורואה יכולה לשרוד לאורך זמן בכורת (134-55 יום) על דבורים בוגרות, ללא נוכחות וולד, כפי שקורה באיזורים ממוזגים בהם הדבורה האירופית, *A. mellifera*, לא מגדלת וולד בחודשי החורף הקרים (Martin 2001). ככלל, תוחלת החיים של הוורואה בתנאים טבעיים בכורת של המין *A. mellifera* עם וולד עמדה על ממוצע של 27 יום (Calatayud & Verdu 1995). נקבה בוגרת בשלב הפורטי הינה הדרגה היחידה המופצת בין כוורות. למרות תלותן בהפצה על ידי דבורים בוגרות ותוחלת חיים מוגבלת בנימוק מדבורה, תפוצת הוורואה בין כוורות הינה אפקטיבית ומהירה מאוד (Martin 2001). עם הגיעה לאיזור חדש אוכלוסיית הוורואה מתפשטת במהירות אל כל הכוורות באיזור בקצב של 3 ק"מ בשנה, או 6-11 ק"מ ב-3 חודשים (Sakofski 1990). הפצה בין כוורות יכולה להתרחש בשלוש דרכים שונות- שוד, תעייה והתנחלות. כוורת מוחלשת ונגועה בוורואה מצויה בסיכון גבוה להישדד על ידי כוורת חזקה ממנה. (Sakofski et al. 1990) הראו כי 35% מן האקריות יכולות לעבור אל הכוורת השודדת מן הכוורת הנגועה במהלך שוד, על גבי הדבורים השודדות או עם דבורים הנוטשות את הכוורת הנגועה אל הכוורת החזקה. ידוע כי דבורים נוטות לתעות בין כוורות. (Kralj J & Fuchs 2006) הראו כי נגיעות בוורואה במהלך ההתפתחות מורידה את יכולת התעופה והחזרה אל הכוורת של הדבורה הבוגרת. Kralj et

al. (2007). הראו ירידה בלמידה שאינה אסוציאטיבית בדבורים משחרות. ייתכן שהשפעות אלה תורמות לתעייה של דבורים בין כוורות והפצתה של הוורואה. למרות החשיבות הקטנה יחסית שיש להתנחלות בגידול דבורים מודרני, כנראה שזו דרך ההפצה העיקרית של הוורואה בין כוורות בדבורה האסייתית *A. cerana* בטבע (Peng et al. 1987). יחד עם זאת, (Wilde et al. 2005) הראו שכ-25% מאוכלוסיית הוורואה עוזבת את כוורת האם עם הנחיל, בעוד שכ-75% מהאוכלוסייה נשארת בכוורת האם (כ-39% על הדבורים הבוגרות וכ-36% בתוך תאים חתומים). התנחלות, אם כן זוהי דרך הפצה נוספת של הוורואה בין כוורות.

1.1.4 השפעת הוורואה על הדבורה

השפעה ישירה: דרך ההזנה של הוורואה על ידי מציצת ההמולימפה של הזחל והגולם המתפתח מובילה באופן ישיר לירידה משמעותית במשקל הדבורה הבוגרת המגיחה, ולקיצור אורח חייה (Rosenkranz et al. 2009). בנוסף תועדה פגיעה נוירולוגית המתבטאת בירידה ביכולת התעופה וירידה ביכולת הלמידה שאינה אסוציאטיבית (Kralj et al. 2007), וייתכן שבשל השפעות אלה דבורים נגועות בוורואה מתקשות לחזור אל הכוורת (Kralja & Fuchs 2006). ברמת הדבורית כאורגניזם-על, הוורואה משפיעה בשתי דרכים עיקריות. ראשית, זכרים שהוטפלו במהלך התפתחותם הם בעלי סיכויי התרבות נמוכים יותר (Duay et al. 2002). שנית, כיוון שהדבורים עצמן נחלשות הכוורת הנגועה מייצרת פחות נחילים.

השפעה עקיפה: עיקר הנזק שמוביל בסופו של דבר לקריסת הכוורת מקורו כנראה בוירוסים המועברים על ידי הוורואה (Highfield et al. 2009; Berthoud et al. 2010). מתוך 20 הוירוסים הידועים בדבורים הוורואה הוכחה כווקטור לוירוסים פתוגניים משמעותיים כגון DWV ממשפחת Dicistroviridae. כמו כן הוורואה חשודה כווקטור של וירוסים נוספים כ-SBV ו-ABPV (Chen et al. 2007) KBV, IAPV ו-Di Prisco (et al. 2011) ממשפחת Dicistroviridae. רוב הוירוסים בדבורים זהו עוד לפני מעבר הוורואה לפונדקאי החדש – הדבורה האירופית, ורובם התקיימו בכוורת ללא פגיעה ממשית. עם הופעת הוורואה באירופה, במהלך מחצית המאה ה-20, אותם וירוסים שעד כה לא היו איום ממשי לכוורת, הפכו נפוצים ואלים יותר (De Miranda et al. 2011). כווקטור, ההעברה האופקית בין דבורים בהזרקה הישירה של הוירוס אל המולימפת הדבורה מאפשרת מעקף מנגנונים מגבילים (כגון תאי האפיתל במעי), פיזור יעיל ומהיר בחלל גוף הדבורה והגעה לאיברים שאינם נגישים בדרכי העברה אחרות (בחלקם הוירוס מסב יותר נזק, למשל בראש). בנוסף, חלק מן הוירוסים מתרבים בוורואה וכך כמות הוירוס ההתחלתית המוזרקת לדבורה עולה (Gisder et al. 2009). מאפיינים אלה של הוורואה כווקטור מגדילים את כמות הוירוס בדבורה הבוודדת ואת שכיחות הוירוס בכוורת בכלל. מקרה פרטי מעניין של העצמת הפגיעה על ידי שילוב של הוורואה ווירוסים תואר בכוורת בישראל, בעקבות מקרים רבים בהם נכחו שני וירוסים המועברים על ידי הוורואה (Deformed wing virus (DWV ו-Varroa destructor-1 virus (VDV-1). בבדיקת הפרטים הסימפטומטיים נמצא וירוס רקומביננטי שהכיל רצפים משני הוירוסים (Zioni et al. 2011). אותו וירוס רקומביננטי השתכפל בכמויות גדולות בראש הדבורה ובכך איפשר את ההתפרצות האלימה של המחלה והופעת סימפטומים משמעותיים. החוקרים העלו את ההשערה שנוכחות הוירוס VDV-1 שהפתוגניות שלו לא הייתה ברורה עד כה (Zhang et al. 2007), ביחד עם DWV מעלה את עוצמת הסימפטומים של עיוות הכנפיים. נוכחות שני הוירוסים בו זמנית בדבורה מתאפשרת הודות להעברה היעילה על ידי הוורואה. בנוסף להעברה של וירוסים

ההטפלה על ידי האקרית עצמה מחלישה את המערכת החיסונית של הדבורים וכך מעלה את פגיעותם של הדבורים לפגעים משניים על ידי פתוגנים (Yang & Cox-Foster 2007). לסיכום, ההשפעות הישירות והעקיפות של הוורואה פוגעות הן בדבורה הבודדת והן בדבורית, ומתבטאות בסופו של דבר בירידה דרמטית בתפוקת הדבש עד לחיסולה של הכוורת (Rosenkranz *et al.* 2009). בשל כך ובשל כל הגורמים שהוזכרו לעיל הוורואה היא אחד הגורמים החשובים בתסמונת קריסת הכוורות (Van Engelsdorp *et al.* 2009).

1.1.5 התמצאות הוורואה והתנהגות איתור הפונדקאי

בפרק אודות מחזור החיים של הוורואה הובהר שעל מנת להשלים את מחזור החיים על הוורואה לאתר את הפונדקאי המתאים בתזמון הנכון, שאם לא כן היא לא תוכל להעמיד צאצאים ואף מסתכנת בסילוק על ידי הדבורים הבוגרות. אילו חושים משמשים את הוורואה להתמצאות בכוורת?

לאקרית הוורואה אין עיניים, אך היא מסוגלת להבחין בנוכחות אור. כמו כן נמצא שהוורואה מסוגלת לחוש ויברציות אך ברגישות נמוכה ודומה לזו של דבורת הדבש (Kirchner 1993). (Kuenen & Calderone 1998) הראו שהוורואה רגישה גם לתנודות אוויר, כנראה באמצעות קולטנים לחישה מכנית המצויים על כל גופה. בניסוי מעבדה שונים נמצא שהוורואה יכולה להבחין בהבדלים של מעלה אחת ומעדיפה טמפרטורה שבין 26-33°C (Pätzold & Ritter 1989; Dillier *et al.* 2006). טמפרטורה זו נמוכה מהטמפרטורה בכוורת באיזור הוולד (34.5-35°C), וכנראה שאין מדובר בהעדפת טמפרטורות נמוכות, אלא דווקא בהעדפה לשילוב של טמפרטורה ואחוז לחות גבוה (Dillier *et al.* 2006). למרות זאת, אף אחד מן האותות הנ"ל לא תועד כמשמש את הוורואה באיתור הפונדקאי.

1.1.5.1 חישת אותות כימיים בוורואה

עוויות רבות מרמזות על כך שחישה של אותות כימיים היא הערוץ המרכזי להתמצאות הוורואה בכוורת ולאיתור הפונדקאי. כאשר הוורואה מחפשת אחר פונדקאי היא נצפתה (Le Conte & Arnold 1986 ועל ידינו) מרימה את רגליה הקידמיות ונראה כי אלה משמשות לה כמעין מחושים. בעת החיפוש החלק הגבי של הרגל הקידמית מופנה קדימה כלפי כיוון הליכתה, מה שהוביל לחשד שבאזור זה מצויים אברי חישה כימיים. בתוך מחלקת העכבישניים Arachnida, הקרציות (סדרה Acari, תת סדרה Metastigmata) קיבלו את מירב תשומת הלב במחקר, בכל מה שקשור לחישה כימית. "איבר הלר", Haller's organ איבר החישה העיקרי של הקרציייה, ממוקם ברגל הקידמית ומהווה מקבץ שערות חישה (Axtell 1971). איבר זה, בו מצויות רוב שערות החישה הכימיות של הקרציייה, מורכב למעשה משני איזורים ובהם צפיפות גדולה של שערות חישה: איזור השקע, המרוחק מן הגוף; ואיזור קרוב יותר לגוף בצורת קפסולה capsule או שלפוחית vesicle. בין שני האיזורים מחבר סדק לאורך הרגל. הן השקע והן השלפוחית מכילים מספר שערות חישה קבוע למין, וסביבן מספר שערות ארוכות שכנראה גם כן משמשות לחישה כימית (Klompfen & Oliver 1993). בספרות ניתן למצוא תאור אברי חישה כימיים הדומים לאיבר הלר ברגל הקידמית של פרוקי רגליים נוספים ואקריות ממשפחות קרובות לאקרית הוורואה, כגון האקרית הטורפת *Phytoseiulus persimilis* (Van Wijk *et al.* 2006). לשערות חישה כימיות בפרוקי רגליים מבנה שמור יחסית לשאר שערות החישה (Hallberg & Hansson 1999); במחלקת העכבישניים תוארו שלושה סוגי שערות לחישה כימית (Tichy & Barth 1992):

1. *Single-walled sensilla with plugged pores* -SW pp.1. שיערה באורכים משתנים. הנקבים בשיערה מסוג זה גדולים יחסית וניתנים להבחנה בקלות במיקרוסקופ אלקטרוני סורק. פתחי הנקבים חתומים בממברנה מתחת לפני שטח השיערה. צינוריות מובילות לנקבים מתחת לממברנה, וכל שיערה מעוצבת על ידי 14-5 תאי עצב בעלי דנדריטים מסועפים.

2. *Double-walled sensilla with spoke canals* -DW sc.2. בשיערה מסוג זה הנקבים מצויים בתוך תעלות החורשות את שטח פני השיערה לאורכה. כל שיערה מעוצבת על ידי 2-1 תאי עצב.

3. *Single-walled sensilla with pore-openings* -SW po.3. שיערה דקה וארוכה, בד"כ בעלת קצה מחודד. שטח פני השיערה חרוץ תעלות דקיקות ובהן נקבים. השיערה מעוצבת על ידי 45-40 תאי עצב.

מחקר יחיד על אקרית הוורואה שפורסם בשפה האנגלית נעשה באמצעות SEM (מיקרוסקופ אלקטרוני סורק) בסוף שנות השמונים. במחקר זה נמצא שקע ובו שערות חישה, בדומה לאיבר הלר בקרציות אם כי פחות מפותח (Milani & Nannelli 1988). מחקר נוסף פורסם בגרמנית על ידי Ramm & Bockeler (1989) ותוצאותיו תוארו במאמר הסקירה של Dillier et al. 2006. האיבר המתואר בשני המחקרים הינו בעל מבנה כללי דומה, אולם מתוך פירוט שערות החישה בתוך האיבר עולים ניגודים בין שני המחקרים. בנוסף, בצילומים שנעשו במכשיר מדגם ישן קשה להבחין בפרטים העדינים יותר של האיבר.

על מנת לחקור ולאמת את תפקיד איבר החישה ניתן ונהוג לבדוק את התגובה האלקטרו-פיסיולוגית של האיבר, בתגובה לגירוי של אותות כימיים שונים בעלי תפקיד ביולוגי משוער. שיטה זו משמשת לחקר חישת אותות כימיים בפרוקי רגליים, בד"כ של המחוש (Bjostad 2000). תגובה לחומר מסויים מעידה על נוכחות קולטנים לחומר זה באיבר החישה של החרק. בדיקות אלקטרו פיסיולוגיות באמצעות EAG נעשו בהצלחה עבור אקריות אחרות, ועבור פרוקי רגליים ממשפחת העכבישניים. (Hebets & Chapman (2000) ביצעו בדיקת EAG עבור *Phrynus parvulus* מסדרת העקרבישאים (Amblypygi). נמצאה תגובה עבור חומרים שונים בניהם גם Methyl salicylate ו-Benzaldehyde. עבור הוורואה לעומת זאת, ניתן למצוא בספרות אזכורים לא מפורטים לניסיונות רישום תגובה אלקטרו פיסיולוגית לאותות כימיים. המקור היחיד בנושא זה באנגלית פורסם כתקציר בלבד (Endris & Baker 1993), ומצויין בו כי נרשמה תגובה אלקטרו פיסיולוגית מהרגליים הקדמיות של וורואה שלמה לחומרים Octyl acetate, Citronellol ו-Geraniol (שני הראשונים מצויים בפרומון האזעקה של הדבורה, והאחרון הוא רכיב מרכזי בהפרשת בלוטת נסנוב המופרשת לכינוס דבורים משחרות (Blum 2008)), אולם לא מתוארות אופי התגובות ועוצמתן. בסקירה אודות החישה הכימית של הוורואה (Dillier 2006) מוזכרות שתי עבודות נוספות, שאחת מהן מתארת רישום תגובה לחומרים Benzaldehyde ו-Methylsalicylate של שיערת חישה בודדת בשיטת single-cell-recording (שני החומרים מצויים בפרחים ובדבש, הראשון מצוי גם במזון מלכות) (Dillier et al. 2001).

1.1.5.2 אותות כימיים המשפיעים על התנהגות איתור הפונדקאי

כטפיל מוחלט הוורואה נצמדת לדבורה בוגרת או לזחל בתא החתום. להצלחה הרבייתית של הוורואה נחוצים פונדקאים בשני שלבי התפתחות: הדבורה הבוגרת המתאימה שתעביר את הוורואה אל תא ובו הזחל המתאים, רגע לפני חתימת התא. הוורואה בהחלט מבחינה בין דבורים בוגרות בשלבי התפתחות/תפקידים שונים. כאשר הוורואה עוזבת את התא עם דבורה צעירה-מגיחה, נמצא בניסוי מעבדה שהיא מעדיפה דבורה מטפלת על פני דבורים צעירות ודבורים משחרות (Kraus 1997; Kuenen & Calderone 1993). העדפה זו יכולה להיות אסטרטגיה אדפטיבית להגדלת סיכויי הרבייה של

הוורואה. דבורה מטפלת מצוייה לרוב על חלת הוולד ובתצפיות שונות נראו וורואה שירדו מדבורה מטפלת בעת האכלת הוולד – אל תא זחל (Beetsma *et al.* 1999). יחד עם זאת, תצפיות אחרות (Kuenen & Calderone 2000) ומבחני התנהגות במעבדה מעידים על התנהגות חיפוש אקטיבית לאורך מספר ס"מ (Del Piccolo *et al.* 2010; Pernal *et al.* 2005). ההבחנה בין דבורים נעשית ככל הנראה על סמך הבדלים בהרכב הפחמימנים בפרופיל הקוטיקולרי של הדבורה הבוגרת או הזחל (Del Piccolo *et al.* 2010), כמו גם על סמך הפרשת אותות כימיים אחרים, כגון הפרשה מבלוטת נסנוב (Hoppe & Ritter 1988). מספר מחקרים מעידים על משיכה של הוורואה לחלק מהחומרים במיצוי קוטיקולה של זחל דבורה, במבחני התנהגות. (Le Conte *et al.* 1989) תיאר לראשונה משיכה של הוורואה לשלוש חומצות שומן ממיצוי קוטיקולה של זחל דבורה (Methyl palmitate, Methyl linoleate, Palmitic acid) שמתפקדות כקירומונים, וריכוזן במיצוי קוטיקולה של זחל דבורה מגיע לשיא בין יום 8-9 בהתפתחות הזחל, רגע לפני חתימת התא (Trouiller *et al.* 1991). חומצות שומן אלו מתפקדות בדבורים כפרומון וולד ומעוררות התנהגות של חתימת תאים אצל המטפלות (Le Conte *et al.* 1990). וולד זכרי מייצר יותר מחומצות אלו, גורם שיכול להסביר את ההעדפה של הוורואה להטפיל תאי וולד זכרי פי 8-10 מוולד נקבי (Calderone & Lin 2001; Le Conte *et al.* 1989). למרות זאת, ניסויי מעבדה הראו תוצאות מנוגדות לגבי המשיכה של הוורואה לחומצות אלה (Le Conte *et al.* 1994; Pernal *et al.* 2005; Rickli *et al.* 1992), ולפי Boot 1994 ישנו ספק בכלל לגבי שכיחות נוכחותן בזחלים. יתכן והשוונות הגדולה שנמצאה בין תוצאות מבחני ההתנהגות וריכוז החומרים במיצויים מקורה בשיטות מיצוי וממסים שונים ששימשו במחקרים השונים. גם למזון הזחל ולגולם נמצאה השפעה מושכת כלשהי על הוורואה, ויישום חומר ממזון זחלים (2-Hydroxyhexanoic acid) העלה את שיעור הוורואה שנכנסו לתאי וולד בכורת (Nazzi *et al.* 2004). כמו כן ישנם גורמים אחרים בכורת אשר להם השפעה דוחה על הוורואה. זחל של מלכה ומיצוי של זחל מלכה נמצאו פחות מושכים לעומת זחל נקבי או זכרי, ומזון המלכות נמצא אף דוחה (Calderone & Lin 2001). חיזוק לכך נמצא על ידי Nazzi *et al.* (2009) שמצא השפעה דוחה של חומצה אוקטנואית Octanoic acid המצוייה בריכוזים גבוהים יותר במזון מלכות לעומת מזון זחלים. תוצאות אלה יכולות להסביר את הטפילות הנמוכה בתאי מלכונים (Harizanis 1991). גם להפרשות מבלוטת נסנוב של הדבורה (פרומון התקהלות המושך את הדבורה) נמצאה השפעה דוחה על הוורואה. Geraniol שמהווה רכיב עיקרי בהפרשת בלוטת נסנוב (Trhlin & Rajchard 2011), גרם אף לבדו לאותה השפעה דוחה (Hoppe & Ritter 1988). בלוטת נסנוב מפותחת יותר בדבורה משחרת מאשר דבורה מטפלת (Slessor *et al.* 2005) ו Pernal *et al.* (2005) הציעו שכמויות Geraniol גבוהות יותר בדבורה המשחרת הן אלו שגורמות לוורואה להידחות מעליה ולהעדיף דבורה מטפלת, ולא דווקא ההשפעה המושכת של הדבורה המטפלת. גם רכיב בפרומון האזעקה של הדבורה, 1-Octanol נמצא דוחה מאוד לוורואה במבחני התנהגות במעבדה (Kraus 1990). בנוסף, ישנם גורמים נוספים שאינם כימיים המשפיעים על כניסת הוורואה אל תא הוולד. השפעה גדולה נמצאה לגודל וגובה תא הזחל ממנו נגזר המרחק שבין הזחל ודפנות התא. נמצא שישנו מרחק קריטי, בו תא הזחל מושך את הוורואה להיכנס (Boot *et al.* 1995). למרות זאת, גם בנושא זה ישנם מחקרים עם תוצאות מנוגדות (Dillier *et al.* 2006). לסיכום, התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה מושפעת ממגוון גורמים, אך ניתן לומר שהפונדקאי המתאים נבחר בעיקר על סמך אותות כימיים של זחל הדבורה והדבורה הבוגרת. השפעתם הביולוגית של אותות כימיים ממקורות שונים בכורת

הודגמה במבחני התנהגות במעבדה, אולם לא נמצא חומר שניתן לכנותו "ריח הפונדקאי" (Dillier et al. 2006; Rosenkranz et al. 2009).

1.1.6 דרכי התמודדות עם המזיק

הדברה כימית: ב-15 השנים האחרונות עיקר קבוצות התכשירים הסינטטיים בשימוש הם זרחנים אורגניים (Comophous), פריתרואידים (Tau-fluvalinate), פלומתרין ופורממידין (Amitraz). רוב התכשירים הללו יעילים, נוחים, זולים וקלים לשימוש; אך יחד עם זאת הם בעלי חסרונות רבים. התכשירים הכימיים נספחים אל מוצרי המכוורת ומזהמים אותם; הם פוגעים בהתפתחות דבורים, ובנוסף מתגברות העדויות להתפתחות עמידות כנגדם (Milani 1999; Sammataro et al. 2005). בכנס מגדלי הדבורים האחרון שנערך בישראל נמסר רשמית כי Comophous, התכשיר היחיד המומלץ בישראל, נשבר ועמידות התגלתה במספר מכוורות (כנס דבורים והאבקה ה-19, 2011). במקביל לתכשירים הסינטטיים ה"קשים" ישנם גם תכשירים "רכים" יותר שמקורם בתרכובות טבעיות, הכוללים חומצות אורגניות (חומצה פורמית, חומצה אוקסאלית וחומצה לקטית) ושמןים אתריים (תימול). למרות יתרונותיהם הכוללים יעילות בתוך התאים החתומים, שאריות נמוכה וסיכוי נמוך להופעת עמידות; לתכשירים הללו יש גם הרבה חסרונות מאחר ויעילותם תלויה באקלים ובלחץ האדים בכוורת (Calderone 2010). חלק מן התכשירים אף פוגעים בוולד ובדבורים הבוגרות בתנאי טמפרטורה מסויימים (Floris et al. 2004).

אוכלוסיית דבורים סבילה: כחלק מן הנסיונות להדברת הוורואה נעשו מאמצים למציאת אוכלוסיית דבורים שתקיים שיווי משקל מאוזן עם אוכלוסיית הוורואה בכוורת. מאמצים אלה מוקדו בשתי גישות, באחת נעשה שימוש באוכלוסיות דבורים שידועות כסבילות לוורואה מאיזורים שונים בעולם (כגון ה"דבורה הרוסית" - "Russian (Primorski) bees", או דבורת הדבש האפריקאית *A. mellifera scutellata*). הגישה השנייה מתמקדת בטיפוח של אוכלוסיות דבורים לתכונות בעלות חשיבות להתמודדות עם הוורואה: התנהגות הגיינית אקטיבית של הדבורים הכוללת סירוק (grooming) עצמי והדדי לסילוק האקרית והוצאת וולד/גולם מתאים המכילים וורואה; כמו כן הטיפוח מכון כלפי תכונות אשר מפרות את האיזון בין אוכלוסיית הוורואה והדבורה כמו נטייה להתנחלות (אשר מורידה את אוכלוסיית הוורואה), וקיצור משך התפתחות הדבורה בתא החתום אשר יוריד את מספר הוורואה המגיעות לבגרות (Rosenkranz et al. 2009; Carreck 2011). תכונה נוספת לטיפוח היא לאוכלוסיות דבורים בהן יש ירידה ביכולת הרבייתית של הוורואה בתאי הוולד (Rosenkranz et al. 1999).

הדברה אגרוטכנית: מספר שיטות אגרוטכניות ידועות בספרות, חלקן נמצאות בשימוש: יישום רשת בתחתית הכוורת אשר אינה מאפשרת חזרה של וורואה שנפלו לרצפת הכוורת, "חלת מלכודת" - הכנסת חלה עם תאים גדולים בהם יוטלו ביצי זכרים וסילוקה לאחר חתימתם יחד עם הוורואה שנכנסו, או איבוק באבקת סוכר (גורם לנפילת הוורואה מעל גבי הדבורים הבוגרות). רוב השיטות האגרוטכניות אינן פוגעות בדבורים, אך יחד עם זאת הן אינן יעילות דיין עבור כוורות בנגיעות גבוהה, ודורשות ידע מיקצועי.

הדברה ביולוגית: עד כה הצלחות של שימוש בפטריות אנטמופאגניות מן הסוג *Metarhizium*, *Beauveria* או *Verticillium* כנגד וורואה נרשמו בניסויי מעבדה בלבד (Shaw et al. 2002). ניסויי שדה הראו תוצאות לא עקביות ונכון להיום, לא קיימת הדברה ביולוגית יעילה כנגד הוורואה (Chandler et al. 2011). בניסיון למצוא וירוס הפתוגני לוורואה אך לא לדבורה נעשו מספר עבודות לסריקת וירוסים נוספים הנוכחים בוורואה. (Kleespies et al. 2000)

לראשונה נוכחות של חלקיקים דמויי וירוס VDV-1, ככל הנראה ממשפחת *Picornaviridae*, וקישרו אותו לנוכחות כתמים כהים על גבה של הוורואה, תוחלת חיים נמוכה ב- 48% וירידה בפוריות. בניגוד לממצאים אלה Zhang *et al.* (2007) לא מצאו קשר בין הימצאות הכתמים על גבה של הוורואה ונוכחות הוירוס, ואף לא נמצאה פתוגניות של הוירוס עבור הוורואה ו/או הדבורה.

אמצעי הדברה נוסף בפיתוח עושה שימוש במעבר אופקי של רנ"א דו גדילי מדבורת הדבש לאקרית הוורואה כאמצעי להשתקת גנים באקרית (גרביאן, ידע אישי).

ניצול אקולוגיה כימית להדברת הוורואה. כפי שפורט בפרק אודות התנהגות איתור הפונדקאי, עד כה נחקרו מספר אותות כימיים שמקורם בכוורת והם בעלי השפעה מושכת על הוורואה. במספר מחקרים נעשה צעד נוסף בניסיון לפתח "מלכודת" שתמשוך את הוורואה באמצעות אותם אותות כימיים ובכך תמנע את השלמת מחזור החיים של הוורואה (Yoder & Sammataro 2003; Pernal *et al.* 2005). מחקרים אחרים ניסו את הכיוון של שימוש בחומרים דוחים אשר ימנעו את כניסת הוורואה אל תאי הוולד (Drijfhout *et al.* 2005; Nazzi *et al.* 2009). אולם הן החומרים המושכים והן הדוחים הביאו לתוצאות לא עקביות במעבדה, ברוב המחקרים חסרים ניסויי שדה; ובאלה שנעשו, יעילותם אינה ברורה. לסיכום, עד כה לא נמצאה שיטה יעילה ועקבית דיה לניצול אקולוגיה כימית להדברת הוורואה (Rosenkranz *et al.* 2009). כיוון נוסף לשיטת הדברה בגישה זו הוא שימוש בחומרים משבשי חישה. שיטה זו מבוססת על חומרים המחקים רכיבים ספציפיים במערכת החישה. על ידי כך החומרים מעלים באופן משמעותי את סף הגירוי של החרק לחומר הנדיף (Plettner 2003). שיבוש מערכת החישה הפריפריאלית בפרוקי רגליים יכול להיעשות בשלושה מנגנונים אפשריים שמשבשים שלושה שלבים מוקדמים של החישה. בשלב הראשון, החומרים המשבשים יכולים להיקשר בתאי החישה אל החלבונים קושרי הריח – Odorant binding proteins-OBP המצויים בנוזל העוטף את תא העצב בתוך שערת החישה. בשלב הבא החומרים יכולים להתחרות על הקישור לקולטנים טרנס-ממברנאליים על פני תא העצב ולמנוע את שרשרת האותות - signal transduction. במנגנון האחרון שיכול להשפיע לטווח ארוך יותר, החומרים יכולים לשבש את מערכת הניקוי - clearance system, המנקה את החומר הנדיף לאחר קישורו והעברת האותות (Plettner 2003). החומרים אינם מראים תכונות רעילות לכשעצמם, והם ספציפיים עבור שערות החישה עליהן הם פועלים באופן מקומי. לדוגמא, נעשה שימוש בחומר נדיף הדומה במבנהו לפרומון-מין ונקשר באפיניות גבוהה אל חלבונים קושרי ריח OBP בשערות החישה של העש המזיק *Lymantria dispar*. בכך נמנעה קשירה של הפרומון-מין אל הקולטנים (Gong & Plettner 2011). מבחינה אלקטרו-פיסולוגית, הביטוי של השיבוש מתבטא בירידה בדה-פולריזציה של התאים בשילוב חישת החומר הנדיף עם החומר המשבש, לעומת חישת החומר הנדיף לבדו.

לאחרונה במעבדה של ד"ר אריקה פלטנר (Dr Erika Plettner, Simon Fraser University Canada), פותחו חומרים משבשי חישה כימית בחרקים (אשר פועלים רק בנוכחות אות כימי רלוונטי), ובהם בעלי פוטנציאל השפעה על הוורואה. יחד עם זאת, השפעתם על הוורואה ברמת איבר החישה וברמת האורגניזם השלם אינה ידועה (פלטנר, ידע אישי). ניתן לשער כי אפשר לנצל חומרים אלו לשיבוש איתור הפונדקאי על ידי הוורואה.

השערת העבודה

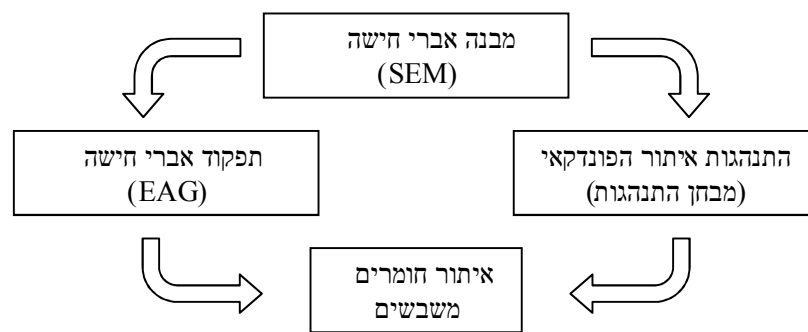
לאקרית הוורואה יכולת חישה כימית אשר מאפשרת הבחנה ובחירה בין פונדקאים. לפיכך, ניתן יהיה לשבש יכולת זו באמצעות חומרים משבשי חישה וכך לפגוע בשרידות והתרבות הוורואה בכוורת.

1.2 מטרת העבודה

פיתוח שיטה לאיתור ובדיקת חומרים המשבשים את חישת הפונדקאי על ידי אקרית הוורואה.

מטרות משנה:

- לימוד מבנה אברי החישה הכימיים של הוורואה - באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק חדיש (Scanning electron microscope, SEM).
- לימוד תפקוד אברי חישה תוך פיתוח שיטה ואפיון תגובה אלקטרו-פסיולוגית של איבר החישה (Electroantennogram, EAG).
- לימוד התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה תוך פיתוח מבחן התנהגות.
- בחינת השפעת חומרים משבשי חישה פוטנציאלים על התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה - באמצעות מבחני התנהגות.



איור 2. סכמת העבודה ובה שלבי העבודה ויחסי הגומלין בניהם.

2 חומרים ושיטות

2.1 בעלי החיים (דבורי הדבש ואקרית הוורואה), גידול ואיסוף

הוורואה והדבורים גודלו בכוורות הממוקמות ליד בניין המחלקה לאנטומולוגיה שבמכון וולקני, בית דגן (להלן "הכוורות"). הכוורות קיבלו טיפולים עונתיים מקובלים, ללא טיפול נגד וורואה. בנוסף חוזקו הכוורות בעוגות אבקה (70% אבקת פרחים, 30% אבקת סוכר) לפי הצורך.

בניסויים נעשה שימוש בדבורים מקבוצות תפקודיות וגילאים שונים: דבורים משחרות, מטפלות ודבורים מגיחות עם סימפטומים של עיוות כנפיים וללא סימפטומים. דבורים משחרות זהו כדבורים בוגרות אשר חוזרות אל הכוורת עם צמידות אבקה על רגליהן (Kather et al. 2011). לשם איסופן נחסם פתח הכוורת ולאחר כמחצית השעה נאספו הדבורים שהתגודדו בפתח הכוורת וצמידות אבקה על רגליהן. דבורים מטפלות זהו כדבורים אשר גחנו אל תוך תאי וולד (Kather et al. 2011). מכיוון שהדבורים הרלוונטיות ביותר לוורואה הן אלה שמטפלות בזחלים בני 8 יום (בתאים העומדים להיחתם), מתוך הדבורים המטפלות נאספו הדבורים שגחנו אל תוך תאי וולד בגיל זה לערך. דבורים מגיחות עם סימפטומים של עיוות כנפיים וללא סימפטומים נאספו באמצעות הכנסת חלת וולד עם דבורים שעומדות להגיח לתוך כלובית (הכלובית מרושת בצורה שתאפשר מעבר של אויר לחלה אך ללא מעבר של דבורים מחוץ לכלובית). סימפטום עיוות הכנפיים נבחר על שום הזיהוי הפשוט והברור של סימפטום וירוס עיוות הכנפיים DWV. כל הדבורים ששימשו בניסוי נאספו מספר שעות לאחר הגחתן על מנת שגילן ותפקידן בכוורת לא יהווה גורם נוסף במערכת העלול להשפיע על העדפת הפונדקאי של הוורואה. הכלובית ובתוכה החלה הוכנסה אחר הצהריים לאינקובאטור בתנאי לחות וטמפ' זהים לאלה אשר במרכז הכוורת - 34-35 °C ; 60-70% RH. בשעות הבוקר שלמחרת החלה הוצאה מן האינקובאטור והדבורים שהגיחו במהלך הלילה נאספו. כל הדבורים ששימשו לניסוי הוכנסו מייד לאחר איסופן למקפיא בטמפרטורה של 20°C- למשך כשעה עד להריגתן.

במחקר זה נבחנו שני שלבים פיסיוולוגיים של הוורואה, וורואה בשלב "חופשי" וורואה בשלב רבייתי. וורואה בשלב "חופשי" נאספו ממגש שהונח כשעתיים לפני כן מתחת לרשת בתחתית הכוורת. הוורואה אשר נפלו אל המגש נאספו אל צלחת פטרי עם נייר פילטר לח לשמירה על חיוניותן, עד לתחילת הניסוי (לא יותר מ-4 שעות). וורואה ב"שלב רבייתי" נאספו מתוך תאי וולד שנחתמו לאחרונה והועברו אל צלחת פטרי עם נייר פילטר לח לשמירה על חיוניותן, עד לתחילת הניסוי (לא יותר מ-4 שעות).

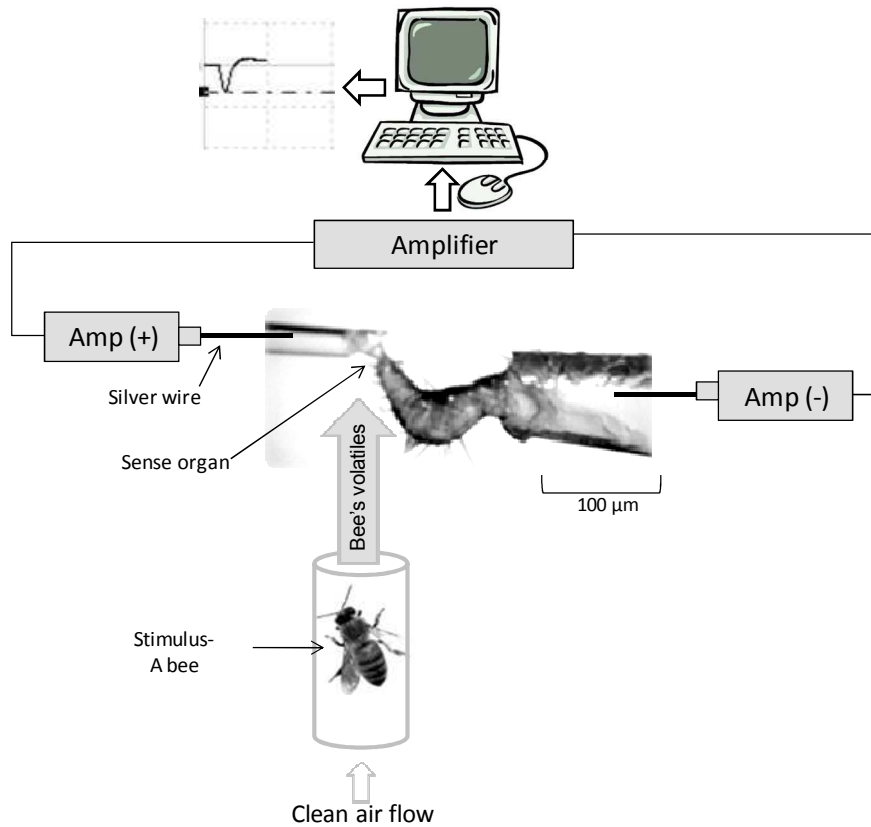
מצב כוורות הניסוי נותר אחת לחודש לפרמטרים הבאים: מספר קומות, מספר מסגרות מאוכלסות, נוכחות מלכה, ביצים ווולד פתוח. שטח תאים המכילים וולד החתום, דבש ואבקה הוערך בדצימטר. כמו כן נרשמה נוכחות סימפטומים לפתוגנים בדבורים הבוגרות- נוכחות דבורים עם כנפיים מעוותות, מפרכסות, מכריקות או קרחות; ונוכחות גלמים פתוחים ורקובים. בנוסף נספרו מספר הוורואה שנפלו למגש מצופה שכבה דקה של שמן בתחתית הכוורת, מהצהריים עד הבוקר למחרת. רמת הנגיעות של הכוורת חושבה לפי היחס בין אוכלוסיית הדבורים (שטח וולד חתום בדצימטר) ואוכלוסיית הוורואה (מספר נפילות).

2.2 מבנה אברי החישה הכימיים של הוורואה

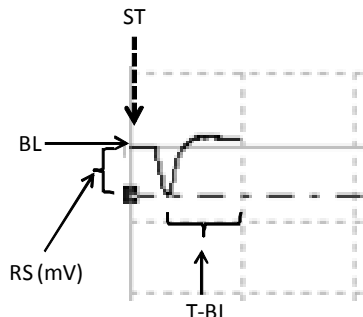
הוורואה משתמשת ברגליה הקידמיות כבמחושים. לשם לימוד מבנה אברי החישה ברגלי נקבות הוורואה נעשה שימוש במיקרוסקופ אלקטרוני סורק (SEM). 18 פרטים של נקבות וורואה בוגרות נאספו וקובעו באמצעות השרייה ב- Glutaraldehyde 5% in phosphate buffer 0.1 M pH 7.2 - למשך שעתיים בטמפרטורת החדר. לאחר מכן הדוגמאות עברו הדידראציה הדרגתית בריכוזים עולים של אתאנול (25, 50, 75, 95, 100%). אז יובשו ונעשתה החלפה של האתאנול בפחמן דו חמצני, באמצעות BAL-TEC 030, CPD- Critical point dryer. לאחר מכן הודבקו הדוגמאות על גבי משטחי "מטבעות" מתכת באמצעות סרט הדבקה דו-צדדי, בתנוחה הרצויה לצילום. הדוגמאות והמשטח צופו זהב בעובי 2 Ang בתנאי ואקום, במכשיר (Holywell) (E5150 sputter coater (POLARON Equipment Ltd.) Industrial Estate, Watford Hertfordshire WD1, UK). בחינת הדוגמאות נעשתה תחילה ביחידה לציווד בין-מחלקתי בפקולטה להקלאות ברחובות באמצעות מכשיר JSM-5410 SEM (JEOL TOKYO), JAPAN, ובהמשך ביחידה למיקרוסקופיה במכון ויצמן באמצעות מכשיר ESEM XL-30 (FEI company), USA.

2.3 תפקוד אברי חישה, בדיקות אלקטרו פיסיולוגיות

הבדיקות האלקטרו-פיסיולוגיות נעשו על הרגל הקידמית של הוורואה באמצעות מכשיר Electroantennogram (EAG) (SYNTECH, IDAC-232, Netherlands). באמצעות מכשיר זה נמדדה תגובת הוורואה לאותות כימיים מסביבת הכוורת והוורואה: נדיפים נקיים ודבורים שלמות. נבחנו שתי אפשרויות שונות לביצוע הבדיקה: רגל מנותקת או רגל מוורואה שלמה במטרה לקבוע איזו מהן נוחה יותר ליישום ובעלת תוצאות הדירות יותר. במקרה של הוורואה השלמה אלקטרודה אחת חוברת לגבה של הוורואה והאלקטרודה השנייה חוברת לקצה הרגל הקדמית. במקרה הרגל המנותקת, הורכבה בסיס הרגל הקדמית אל האלקטרודה האחת וקצה הרגל חובר אל האלקטרודה השנייה. בשתי השיטות נבדקה בכל פעם רגל של וורואה חדשה. האלקטרודות בנויות חוט כסף הנתון בקפילרת זכוכית מלאה בתמיסה מוליכה 0.1 N KCl. לאחר קבלת אות יציב נמדדה תגובת הרגל להזרקת פעימות של אויר מועשר בלחות בספיקה של 700 מ"ל לדקה, דרך פיפטת פסטר אשר הכילה את הגורם הנבדק (להלן "גירוי"). תגובת הקולטנים אל הגירוי התקבלה בגרף על צג המחשב, ועוצמת התגובה נרשמה במילי-וולט (תרשים המערכת מוצג באיור 3). בין גירוי לגירוי נבדקו זמני המתנה שונים במטרה למצוא זמן המתנה מינימאלי כך שהתגובה לגירוי הבא לא תהיה מושפעת מהגירוי הקודם. מערך התגובה במיליוולט הוחסרה התגובה לגירוי של אוויר דרך חתיכת טפלון אינרטי (במקרה של תגובה לדבורה שלמה) או של הממס (במקרה של תגובה לחומרים נדיפים). כך שהערך הסופי מייצג את התגובה של הקולטנים ברגל הקדמית של הוורואה לחומר בלבד (ללא תגובה לאוויר או לממס). החומרים הנדיפים שנבדקו: Geraniol, Benzaldehyde, Octanoic Acid, Methyl Salicylate ו-9-ODA מומסים בהקסאן (99% n-hexane ultra resi analyzed Baker) בריכוזים 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. בחינת תגובת הוורואה לנדיפי דבורים נבדקה לגירוי של דבורים בוגרות מומתות בהקפאה. הדבורה הוכנסה אל תוך פיפטת פסטר שקצהה הדק מנוסר כך שראשה מופנה קדימה ונדחפה עד לאיזור הצר של הפיפטת. לאחר מכן פתחי הפיפטת נאטמו בסרט טפלון אינרטי, והדבורים חוממו ($35-40^{\circ}\text{C}$) למשך כשעה עד לשימושן במכשיר ה-EAG. מטרת חימום הדבורים היא העלאת נדיפות חומרי הריח, והצבת תנאים הדומים לתנאים בכוורת ובניסויי ההתנהגות.



איור 3. תרשים מהלך רישום התגובה האלקטרו-פיסיולוגית של הרגל הקידמית של הוורואה לגירוי של דבורה שלמה. הרגל המנותקת מונחת בין שתי קפילרות זכוכית המכילות נוזל מוליך ובהן אלקטרודות כסף המחוברות אל אמפליטודות, וכך נסגר המעגל החשמלי. אוויר מועשר בלחות מזרם דרך פיפטת פסטר המכילה את הגורם הנבדק (באיור מוצגת דבורה שלמה) אל רגל הוורואה. באם מתן הגירוי גורם לתגובה (שינוי בפוטנציאל הממברנה של כלל התאים ברגל) נראה שינוי פוטנציאל על מסך המחשב הנמדד במילי וולט. זוהי "עוצמת התגובה".



איור 4. דוגמא לתגובה אלקטרו פיסיולוגית של הרגל הקידמית של אקרית הוורואה ל- $1 \mu\text{l}$ Geraniol בריכוז $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. סימונים נגד כיוון השעון: מסומן בחץ מקוטע זמן מתן הגירוי (ST). בחיצים מלאים מסומנים מאפייני התגובה. Base line (BL) – מצב מנוחה, (RS) Response amplitude – עוצמת התגובה במילי וולט, (T-BL) Time back to base-line – זמן חזרה למנוחה בשניות. בציר x יחידות זמן בשניות (כל יחידה 5 שניות). בציר y יחידות עוצמה (כל יחידה 0.2 מילי וולט)

אפיון תפקוד אברי החישה. אפיון תגובת הרגל הקידמית של הוורואה נעשה לגירוי של החומר הנדיף - Geraniol $0.1 \mu\text{g}$ מומס ב- $1 \mu\text{l}$ הקסאן. להלן מתוארים המאפיינים שנראים באיור 4: מצב מנוחה, Base-line, פוטנציאל סך התאים המצויים בין 2 האלקטרודות המודדות, ללא גירוי יזום. מצב המנוחה צריך להיות קבוע יחסית על מנת לאפשר בחינת תגובת קולטני הריח לחומרים שונים.

עוצמת התגובה, *Response amplitude (mV)*, שינוי בפוטנציאל (דה פולריזציה) של סך התאים המצויים בין 2 האלקטרודות המודדות, לאחר מתן גירוי (*stimulus*), ביחס למצב מנוחה. עוצמת התגובה נמדדת על ידי מדידת ההפרש בין הפוטנציאל במצב מנוחה (לפני מתן הגירוי) והפוטנציאל בשיא התגובה (לאחר מתן הגירוי) (Krieger & Breer 2003; Ryan 2002).

זמן חזרה למנוחה, *Time back to base-line (second)*, פרק הזמן שעובר משיא התגובה ועד לחזרה למצב מנוחה.

2.4 אנליזה כימית של פרופיל קוטיקולרי, גז כרומטוגרף

הכנת מיצוי דבורים: דבורים בוגרות נאספו והומתו בהקפאה. אל כל כלי שהכיל דבורה יחידה הוכנס 0.5 ml ממס, והמיצוי נערך במשך 10 דקות בטמפ' החדר. כל דבורה נאספה ומוצתה בנפרד. בהכנת המיצויים שימשו הממסים הקסאן (n-99% עם סטנדרט פנימי, 51578 - analytical standard FLUKA Pentadecane C17. לאחר מכן המיצוי סונן דרך צמר זכוכית (Alltech 4037, USA). על מנת לספוח מים שאינם רצויים במיצוי (בהזרקה לגז כרומטוגרף) אל הכלי הוסף מגנזיום-פוספאט (MgSO₄ Riedel-de Haen). לאחר מכן המיצוי סונן שוב דרך צמר זכוכית, ורוכז תחת זרם חנקן לכ- 300 µl. סה"כ הוכנו 4 סוגי מיצויים מסוגי דבורים מקבוצות תפקודיות וגילאים שונים: דבורים משחרות, מטפלות ודבורים מגיחות עם סימפטומים של עיוות כנפיים וללא סימפטומים. מיצוי הדבורים נבדק במכשיר גז כרומטוגרף Trace GC קולונה-2000, ThermoQuest, Milan Italy, USA, 30m*0.25mm*0.25 µm, Restec rsi-5 ms; ובמכשיר גז כרומטוגרף ספקטרומטר מסות-USA (5975C) Agilent GC/MS קולונה- Agilent ultra inert capillary GC-Column, HP-5ms Ultra Inert 30m*0.25mm*0.25 µm.

תכנית הפרדה ב-GC: 1 µl מן הדוגמא הוזרק במצב split-less mode, טמפ' הזרקה- 260°C. טמפ' התחלתית של 150°C, לאחר 2 דקות עלייה בקצב של 15°C לדקה עד ל- 250°C, עלייה נוספת בקצב של 5°C לדקה עד ל- 300°C והישארות בטמפרטורה זו ל- 20 דקות נוספות. טמפ' דטקציה-270°C. התכנית מבוססת על (Richard et al. 2008). נעשתה אינטגרציה ידנית וחושב אחוז השטח היחסי של כל פיק באמצעות תכנת GC Chrom Card. בנוסף לדוגמאות הזרקה סידרת סטנדרטים היצוניים של שרשראות פחמימנים רוויים באורך 20-33 פחמימנים (C20-C33) Sigma, Aldrich, וסטנדרט פחמימנים בלתי רוויים C17:1, C21:1, C23:1. זיהוי הפיקים נעשה על פי סטנדרט הפחמימנים החיצוני, פרגמנטים דיאגנוסטיים ופרגמנטציה של פחמימנים כפי שמתוארת בספרות (Jurenka et al. 1989; Blomquist 2010).

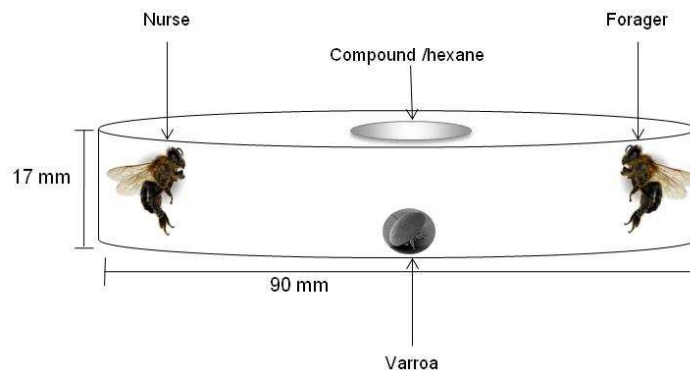
2.5 התנהגות איתור הפונדקאי, מבחני התנהגות

לשם לימוד התנהגות איתור הפונדקאי פותח מבחן ביולוגי אשר בהמשך איפשר את בדיקת השפעת חומרים משבשים פוטנציאליים על התנהגות איתור הפונדקאי. השיטה מבוססת על ניסויי התנהגות בוורואה שנערכו על ידי חוקרים שונים (Del piccolo et al. 2010; Kraus 1990). מבחן התנהגות זה הינו מבחן בחירה של וורואה אחת בין שני סוגי פונדקאי- דבורה משחרת ודבורה מטפלת. הניסוי נערך בזירה המורכבת מצלחת פטרי מזכוכית, ובה רצועה של נייר פילטר לח (20x80 mm) לשמירה על הלחות במהלך הניסוי. שני הפונדקאים הושמו בקצות הזירה במרחק קבוע מוורואה יחידה שהושמה במרכז הזירה (איור 5). מיקום הוורואה יחסית לדבורים (דבורה משחרת, מטפלת או על הצלחת) נקבע בפרקי זמן קבועים ובתום הניסוי, זמנים אלה נבדקו במהלך פיתוח השיטה ופורטו בפרק התוצאות. כמו כן, במהלך פיתוח השיטה נערכה השוואה בין שני שלבים במחזור החיים של הוורואה ("וורואה חופשייה" ווורואה "בשלב רבייתי"), ובין שני גדלים של זירת המבחן הביולוגי בקטרים שונים ("זירה קטנה"- 55 mm, ו"זירה גדולה"- 90 mm). כמו כן נערכה הפרדה בין הניסויים על פי כוורת מקור הדבורים והוורואה בניסוי. הסימון הוא לפי מספר הכוורת, כאשר כל אות מסמנת את כוורת

המקור של כל אחד מהאורגניזמים בסימון הבא: Varroa, Forager, Nurse, לפי ראשי התיבות: VFN. אם ברשותנו 3 כוורות שונות – A, B ו-C, נבדקו בסך הכל שלוש אפשרויות: בראשונה כל האורגניזמים מכוורות שונות, טיפול זה סומן – ABC (כלומר וורואה מכוורת A, משחרת מכוורת B ומטפלת מכוורת C). בשנייה הוורואה והדבורים מכוורות זרות, טיפול זה סומן – ABB (כלומר וורואה מכוורת A, ומשחרת ומטפלת מכוורת B). באפשרות השלישית כל האורגניזמים מאותה כוורת, טיפול זה סומן – AAA (כלומר וורואה, משחרת ומטפלת מכוורת A). בעבודה מוצגות תוצאות העדפת הפונדקאי של הוורואה באחוזים מתוך כלל הוורואה שהגיעו אל פונדקאי, וכן מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי (n). חיוניות הוורואה נבדקה באמצעות נגיעה במכחול ובדיקת תנועה עצמאית של הוורואה. וורואה שלא נראו חיוניות ("רקדו"), היו הפוכות על גבן, או לא זזו כלל) לא נחשבו בחישוב התוצאות הסופי. במהלך הניסוי הצלחות שהו באינקובטור בתנאים קבועים אשר מדמים את התנאים בכוורת: חושך, לחות בטווח 60–70% RH וטמפרטורה בטווח 34–35 °C.

2.6 חומרים המשבשים את התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה

מבחן ההתנהגות שימש לאיתור חומרים משבשי חישה פוטנציאליים שפותחו במיוחד לבדיקות אלו (Dr Erika Plettner, Simon Fraser University Canada). פעילות החומרים המשבשים הינה אך ורק בנוכחות אות מן הפונדקאי (Plettner 2003). לפיכך, על מנת לבדוק את השפעת החומרים הנבדקים הושם $1\mu\text{l}$ מן החומר או הממס (הקסאן בביקורת) בגג הזירה על גבי חתיכה של נייר פרפילם Parafilm M® 5x5 mm, באמצעות פיפטור Transferpettor BRAND 10- μl מעל הוורואה. בפרקי זמן קבועים נקבע אחוז הוורואה שהגיעו לדבורה משחרת/מטפלת בטיפול ובביקורת, כמו כן הושווה אחוז ההגעה לפונדקאי מכלל הוורואה החיוניות בין הטיפול והביקורת, בתום הניסוי. בעבודה זו נבדקו שלושה חומרים משבשי חישה פוטנציאליים: HCO 2169, 3C(1,3) ו-3C(2,3). כל החומרים נבדקו בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$, חומר HCO2169 נבדק גם בריכוז $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$.



איור 5. תרשים זירת מבחן ההתנהגות, "זירה גדולה" בקוטר של 90mm. שתי דבורים (משחרת ומטפלת) הושמו בקצות הזירה במרחק שווה מוורואה יחידה שהושמה במרכז הזירה. מעל לוורואה, בגג הזירה הושם $1\mu\text{l}$ מהחומר הנבדק, או של הממס (ביקורת).

מבחני התנהגות: עבור כל ניסוי נערכו לפחות 3 חזרות. בכל חזרה נרשמו מספר הוורואה שהגיעו אל אחד משני הפונדקאים (לפחות 4) והתפלגות המספרים נבחנה מול ההשערה שההתפלגות מתחלקת באופן שווה- 1:1 בין שני הפונדקאים. אלא אם כן צויין אחרת, התוצאות המשותפות (סכימת סך החזרות- pooled) נותחו במבחן Replicated test of Goodness of fit. כמו כן נבדק האם ישנה הטרוגניות מובהקת בין החזרות. בתום הניסוי חלק מן הוורואה לא היו חיוניות, ומתוך החיוניות חלק מן הוורואה לא הגיעו אל פונדקאי. על כן בתום כל ניסוי חושב אחוז הוורואה שהגיעו לפונדקאי, מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי. במבחן T-test הושוו אחוזי ההגעה בין שני טיפולים (המבחן נעשה על ערכי הפרופורציה שעברו טרנספורמציה Arc-sinus). העדפת הפונדקאי חושבה לפי אחוז הוורואה שהגיעו לדבורה משחרת או מטפלת, מתוך סך הוורואה שהגיעו לפונדקאי, בכל החזרות. עבור כל איור מצויינים מספר החזרות- exp, וכן סך הפרטים שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי- n. בניסויים בהם נעשתה השוואה בין שני טיפולים נערך ניתוח נוסף במבחן Fisher's exact propability test לבדיקת השפעת גורמים שונים על העדפת הפונדקאי של הוורואה (Sokal & Rohlf 1980).

מבחנים אלקטרו-פיסיולוגיים: להשוואת עוצמת התגובה האלקטרו פיסיולוגית של הוורואה לחומרים שונים נערך מבחן Paired t-test, בו עוצמת התגובה במילי וולט לחומר הושוותה לעוצמת התגובה לחומר הממס, באותה הוורואה. **השוואת פרופיל קוטיקולרי:** הרכב החומרים שבמיצוי קוטיקולת הדבורה כפי שהתקבל בגז כרומטוגרף וכמותם היחסית באחוזים נותחו בשיטת PCA- Principle component analysis, לבדיקת הבדלים כמותיים ואיכותיים בין שתי קבוצות. מטרת ניתוח PCA היא הפחתת מספר רב של משתנים p , למספר מצומצם של מרכיבים (PC) m ; תוך שמירת מירב השונות המקורית של p המשתנים המקוריים (Jolliffe 2002). השערות האפס הייתה שלא קיים הבדל בפרופיל הקוטיקולרי של הדבורים בין שתי הקבוצות. מכיוון שכמותם היחסית של מרכיבים הייתה זניחה, ונראה שחלקם לא תרמו לשונות בין הקבוצות, נעשה סינון ורק חומרים אשר ענו על הפרמטרים הבאים נכללו בניתוח הסופי:

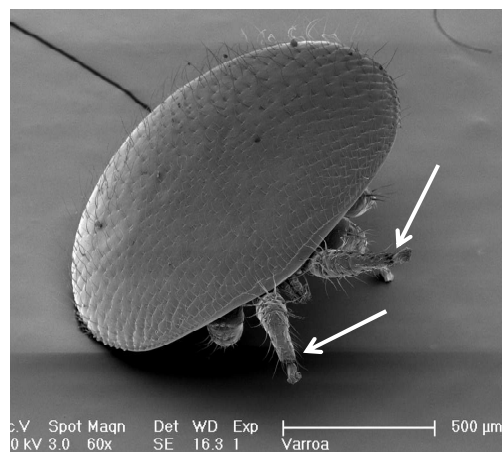
1. חומרים שכמותם היחסית שווה או עולה על 0.5%.
 2. חומרים אשר תרמו באופן מובהק לשונות בין הקבוצות. לפי מבחן א-פרמטרי לניתוח שונות Wilcoxon-Mann and Whitney ברמת מובהקות של 0.05.
- לניתוח הסטטיסטי נעשה שימוש בתוכנה JMP 7.0.2.

3 תוצאות

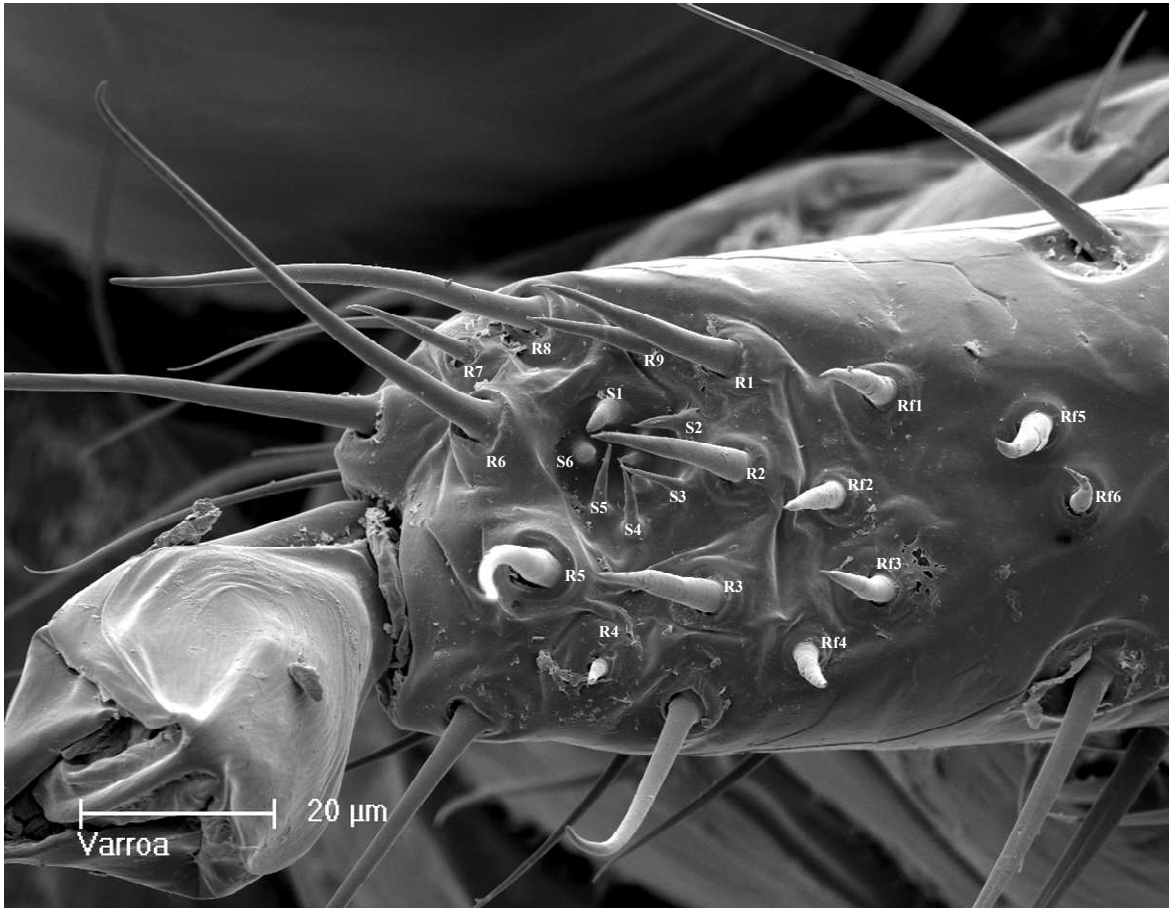
3.1 מבנה אברי החישה הכימיים של נקבת הוורואה

במיקרוסקופ אלקטרוני סורק נראה מיבנה באיזור הגבי מרוחק (דורסאלי- דיסטאלי) של הרגל הקדמית של נקבת אקרית בוגרת (איור 6). איזור זה ניתן להבדלה בבירור משאר חלקי הרגל והוא מאופיין בשקע במרכזו ובצפיפות גבוהה של שערות בעלות תכונות אופייניות (איור 7). באזור זה נצפו מספר סוגים של שערות חישה שלא נראו בשאר חלקי הגוף. מבנה, מיקום ותכונות השערות המתוארים להלן חזרו בכל 18 הפרטים שנצפו, עם שונות קלה. השערות סומנו באותיות גדולות ומוספרו לפי מיקומן בהמשך לעבודה קודמת. שערות מחוץ לשקע סומנו R ו-Rf, כל שיערה ישובה בתוך גומחה ועל פניהן לא נראים נקבים (איור 7):

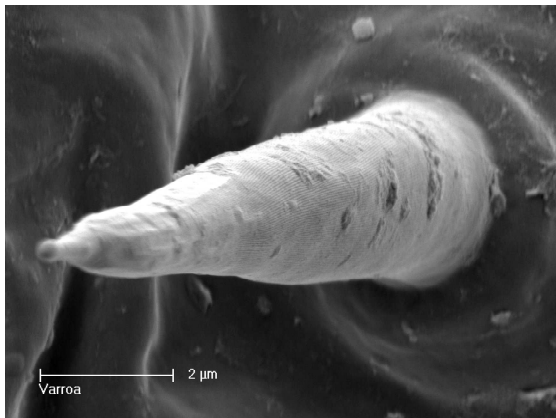
- 9 שערות ארוכות היקפיות - R: מקיפות ככתר את האזור השקוע. בעלות שטח פנים חלק, ללא נקבים (איור 8). השערות נבדלות באורכן. שערות R1-R4, R7, R9 כ-20 μ m. שערות R5, R6, R8 ארוכות יותר ואורכן נע בטווח של 50-60 μ m.
- 6 שערות קצרות - Rf: שערות באורך של כ-10 μ m ממקומות בצד הקרוב יותר לגוף האקרית. על פני השערות לא נראים נקבים, פני השטח מחורצים חריצים דקיקים לאורך השיערה. (איור 9). שערות בתוך השקע - S (איור 10):
- S2-S5, שערות קצרות בעלות קצה מחודד. על פני שטחן מפוזרים נקבים ללא סדר נראה לעין (איור 11). חלק מהשערות בעלות קצה מחודד ושטח פנים חרוץ תעלות דקיקות ובהן נקבים, וחלק מן השערות בעלי שטח פנים חלק, נקבים מפוזרים אקראית וקצה השיערה נעשה מחודד ונמשך כמו חוט (איור 12).
- S6, שיערה קצרה ועבה בעלת קצה כהה. על פני שטחה מפוזרים נקבים גדולים יחסית בדוגמא חוזרת (איור 13).
- S1, שיערה קצרה בעלת קצה כהה. על פני שטחה חריצים עבים (כמעין "ספגטי") בניהן פזורים נקבים (איור 14).
- S7-S9, שערות קצרות ועבות, המצויות במרכז השקע (איור 15). על פני שטחן לא נראים נקבים. בנוסף לשערות שנצפו על הרגל הקדמית, נצפו שערות ארוכות על כל גופה של הוורואה. על פני שערות אלה לא נצפו נקבים. על גב האקרית נצפו שערות "מנוצות" באורך של כ-40 μ m אשר שטח פניהן חלק, ללא נקבים. ה"ניצוי" מתחיל 1/2-2/3 מגובה השיערה והוא מסודר במעין סידור כשל ענף עץ. מכל "פרק" יוצאים 2-3 פיצולים מקבילים (איור 16).



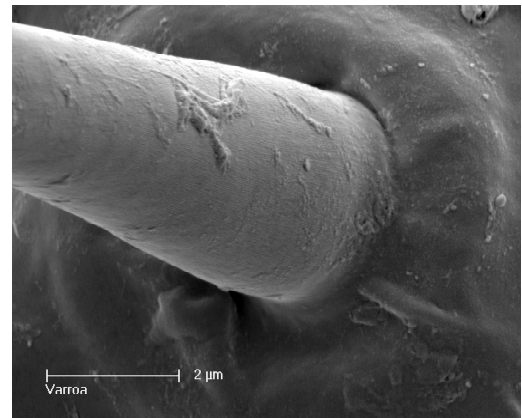
איור 6. נקבת וורואה בוגרת במבט מקדימה. החיצים מסמנים את איזור אברי החישה המשוער.



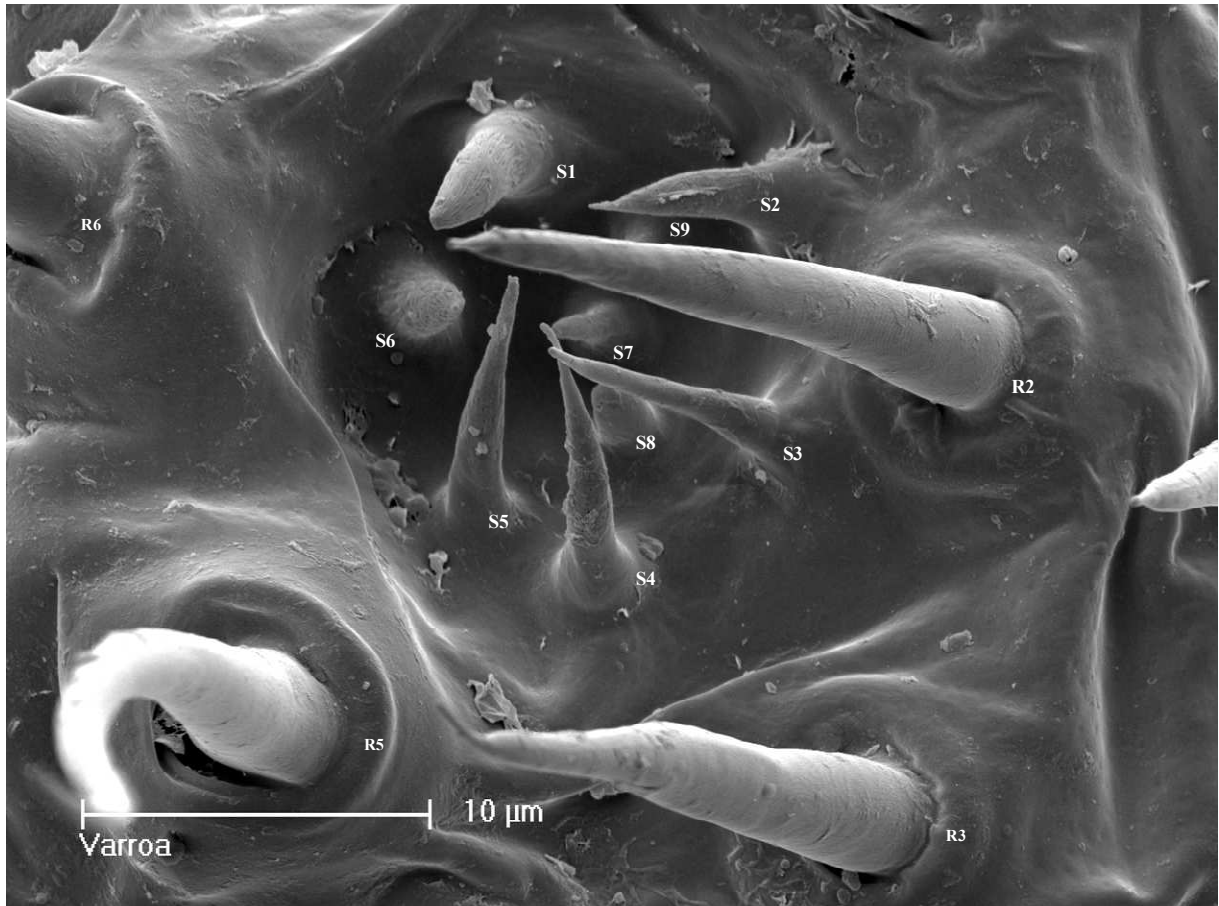
איור 7. איזור איבר החישה בחלק הגבי המרוחק של הרגל הראשונה של האקרית. שערות חישה היקפיות מחוץ לשקע מסומנות באות R. שערות חישה מחוץ לשקע הקרובות לגוף האקרית מסומנות באות Rf. שערות חישה בתוך השקע מסומנות באות S.



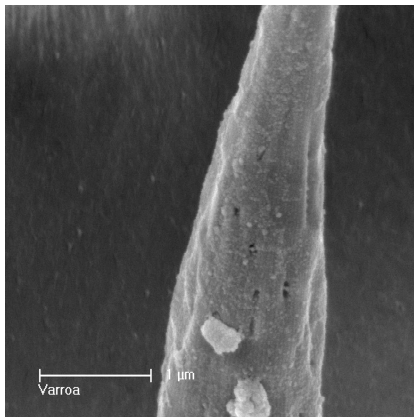
איור 9. שערות חישה קצרה מחוץ לשקע, על שטח פניה חריצים דקים ללא נקבים. Rf2



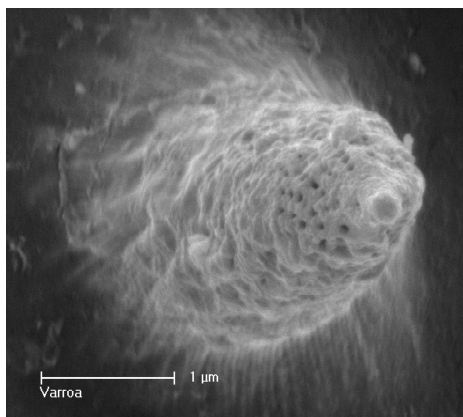
איור 8. בסיס שערות חישה היקפית בעלת שטח פנים חלק. R2



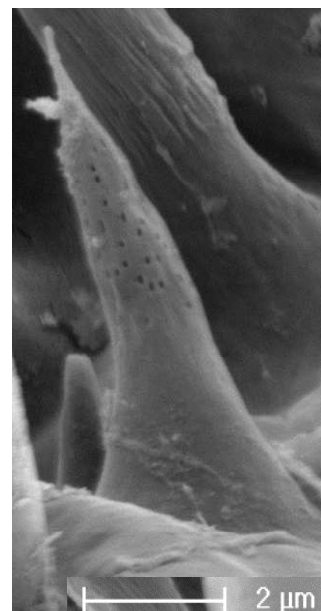
איור 10. השקע שבאיבר החישה של האקרית. שערות חישה מחוץ לשקע מסומנות באות R. שערות חישה מתוך השקע מסומנות באות S.



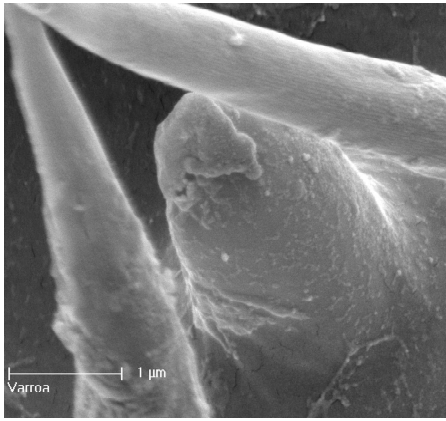
איור 11. שערת חישה קצרה ומחודדת, בעלת נקבים בדגם פיזור אקראי. S5



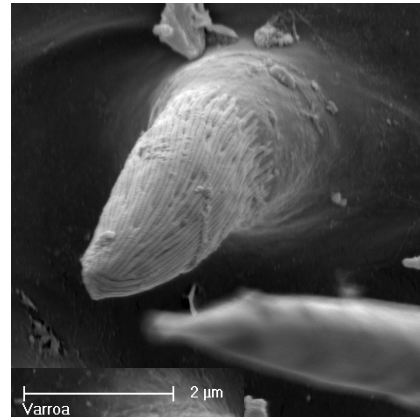
איור 13. שערת חישה כימית בצורת "פיטמה", בעלת נקבים בדוגמת פיזור מעגלית. S6



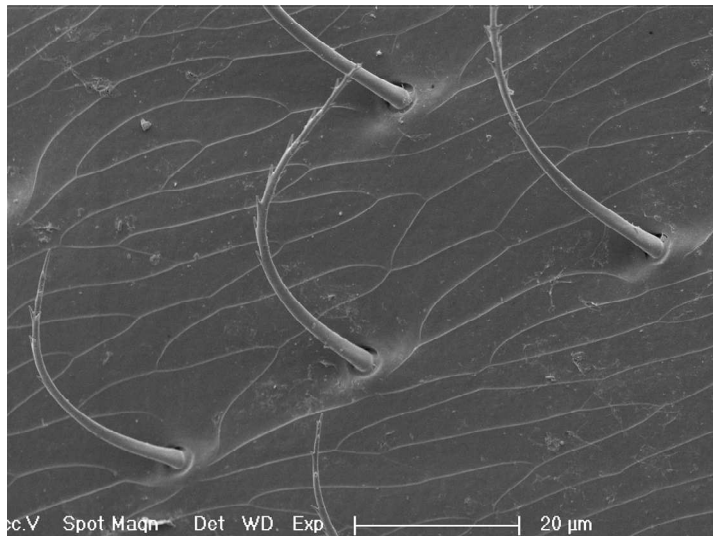
איור 12. שערת חישה כימית בתוך השקע, על פניה נקבים, ללא חריצים. S2



איור 15. שערת חישה קצרה ללא נקבים S8.



איור 14. שערת חישה כימית בתוך השקע, על שטח פניה חריצים עבים. S1

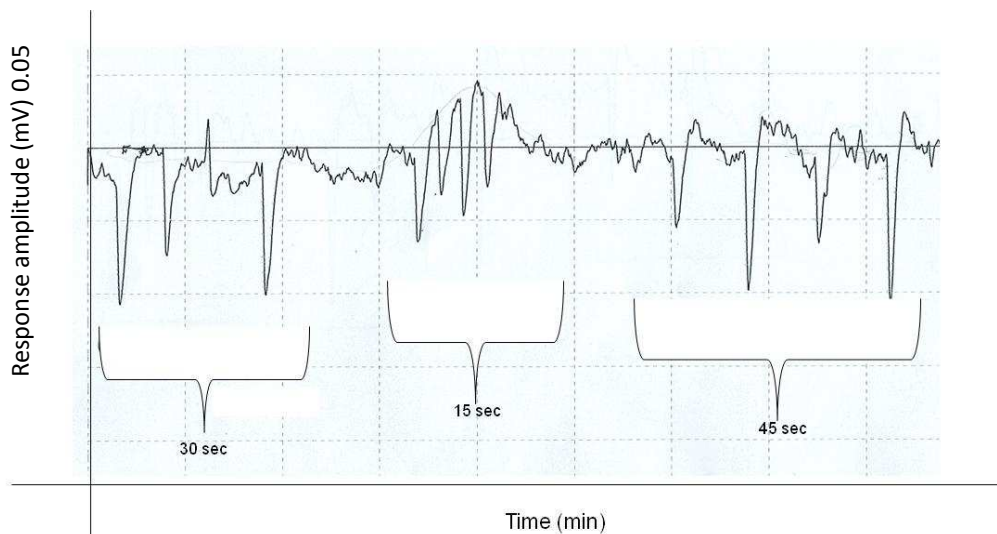


איור 16. שערות מנוצות על גב האקרית.

3.2 תפקוד אברי החישה

תפקוד אברי החישה שזוהו בפרק הקודם נבדק על ידי בדיקת התגובה האלקטרו פיסיולוגית לגירוי של אותות כימיים. מכיוון שלא הרבה ידוע אודות התגובה האלקטרו פיסיולוגית של הוורואה בתור התחלה נדרשו פיתוח השיטה ואפיון התגובה. הגירוי הרצוי לבדיקה הוא כאמור ריח דבורה שלמה. אלא שגירוי זה אינו הדיר ולכן לא ניתן באמצעותו לפתח את השיטה המיטבית לבדיקת תפקוד איבר החישה. לפיכך, נערכו הבדיקות הראשוניות לגירויים של חומרים נדיפים סינטטיים.

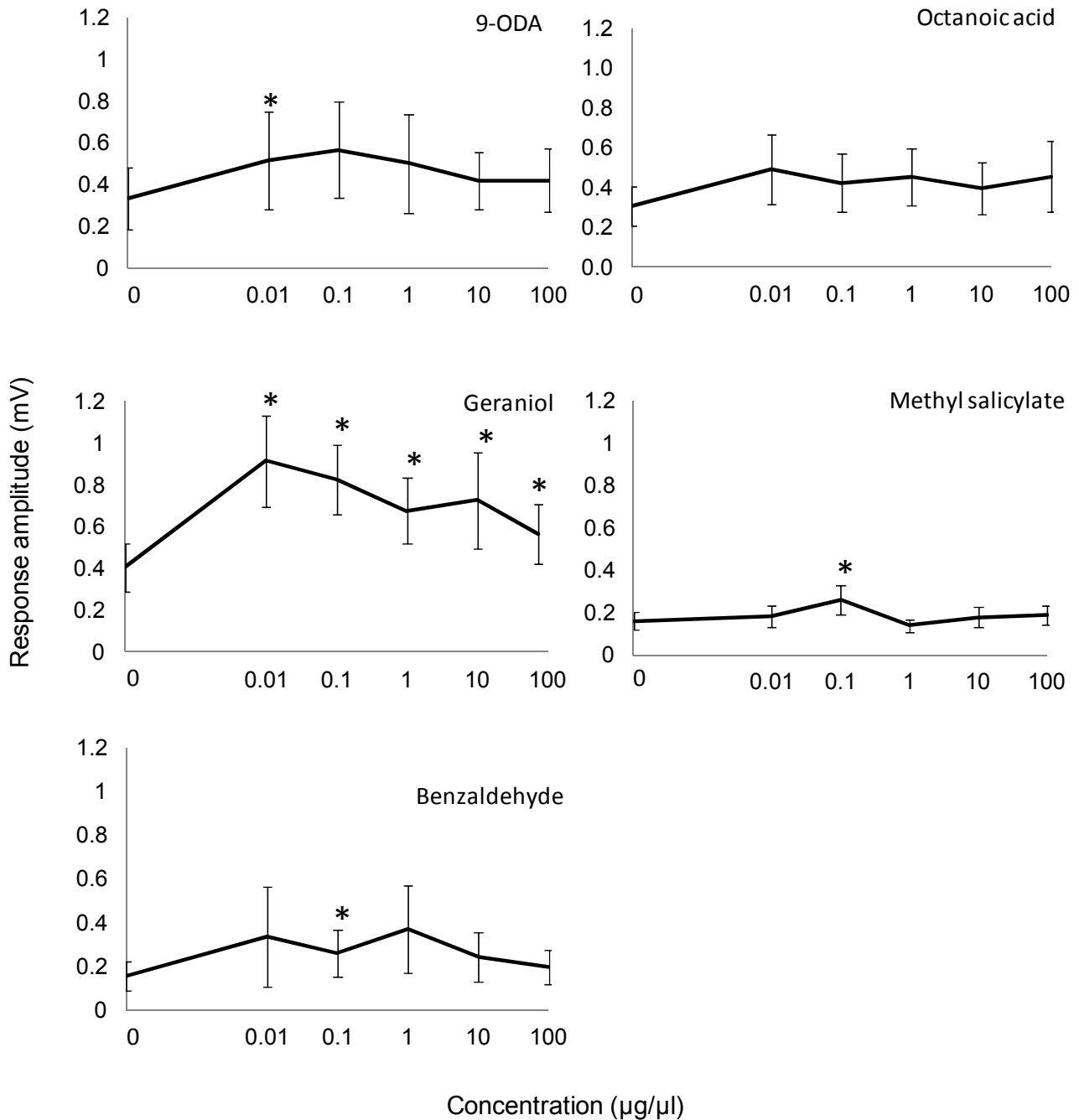
בדיקת זמני המתנה שונים – 15, 30 ו-45 שניות. האם משך זמן ההמתנה בין גירויים משפיע על התגובה?



איור 17. דוגמא לתגובה אלקטרו פיסיולוגית של הרגל הקידמית של אקרית הוורואה ל- $1\mu\text{l}$ הקסאן. זמני המתנה שונים בין גירוי לגירוי (15, 30 ו-45 שניות). ציר x זמן ביחידות של שניות (כל יחידה 60 שניות), ציר y ביחידות של מילי וולט (כל יחידה 0.05 מילי וולט).

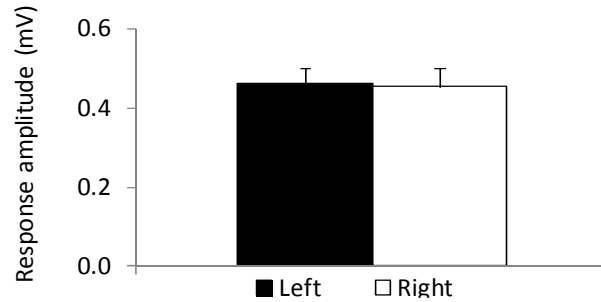
בהתאם למאפייני התגובה שתוארו בפרק השיטות, נבחנו זמני המתנה שונים בין גירוי לגירוי של $1\mu\text{l}$ הקסאן. ניתן לראות באיור 17 שקיימים הבדלים איכותיים בין התגובות בזמני המתנה שונים. 15 שניות בין גירוי לגירוי אינן זמן המתנה מספיק, משום שנראה כי אין זמן חזרה למנוחה בין תגובה לתגובה. לעומת זאת, בזמני המתנה של 30 ו-45 שניות כן ניתן לזהות זמן חזרה למנוחה. תוצאות אלה חזרו על עצמן ב-9 פרטים. לפיכך הוחלט כי זמן ההמתנה יארך בין 1-2 דקות בין גירוי לגירוי על מנת לקבל תגובה עקבית יחסית שתאפשר השוואה בין תגובות לגירויים עוקבים.

לבחירת החומר ששימש בהמשך הניסויים לפיתוח השיטה, נבדקה עוצמת התגובה לחומרים שונים בריכוזים שונים לעומת התגובה לממס. כל החומרים שנבדקו הם חומרים שמצויים בכוורת, עבור חלקם קיים תיעוד חלקי בספרות (Geraniol, Benzaldehyde ו-Methyl Salicylate). המטרה העיקרית של בדיקה זו הייתה לאתר את החומר והריכוז שמעוררים את התגובה ההדירה והחזקה ביותר, לעומת הממס. מתוך כל החומרים שנבדקו עוצמת התגובה לחומר Geraniol הייתה גבוהה באופן מובהק מהתגובה לממס, בכל הריכוזים. מתוך כל הריכוזים שנבדקו בחומר Geraniol, התגובה לריכוז $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ הייתה גבוהה באופן המובהק ביותר מהתגובה לממס (Paired t-test, $p=0.005$, $n=5$) (איור 18). על סמך ממצאים אלה נערכו הבדיקות הבאות בחומר Geraniol בריכוז $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.



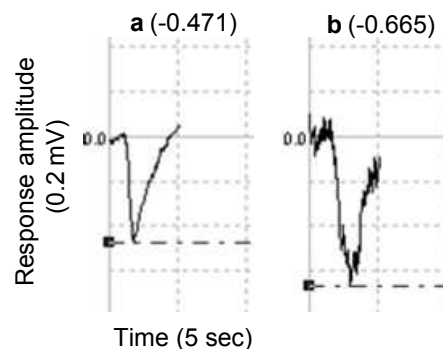
איור 18. עוצמת תגובת הרגל הקידמית של נקבת וורואה לחומרים שונים מומסים בהקסאן בריכוזים: $0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. ריכוז "0" הוא הקסאן בלבד. הערכים הם ממוצעים ושגיאת התקן במילי-וולט של 5-7 פרטים. ריכוזים המסומנים ב-* עוררו תגובה גבוהה באופן מובהק מהתגובה להקסאן. Paired t-test, $p<0.05$.

בדיקת תגובת וורואה שלמה – האם קיים הבדל בעוצמת התגובה בין ימין ושמאל? על מנת לבדוק אם קיים הבדל בין התגובה של שתי הרגליים הקידמיות של הוורואה נעשתה השוואה בין עוצמת התגובה המתקבלת ברגל ימין ושמאל של הוורואה השלמה. לשם כך הושוותה עוצמת התגובה במילי-וולט לגירוי של $0.1 \mu\text{g}$ Geraniol מומס ב- $1 \mu\text{l}$ הקסאן, בין שתי הרגליים. באיור 19 ניתן לראות כי לא נרשם הבדל מובהק בעוצמת התגובה של שתי הרגליים הקידמיות של הוורואה. (Paired t-test, $p=0.94$, $n=9$). על סמך ממצאים אלה הוחלט לערוך את הבדיקות הבאות ברגל ימין ושמאל ללא הבחנה.



איור 19. עוצמת התגובה במילי וולט לגירוי של $0.1 \mu\text{g}$ Geraniol מומס ב- $1 \mu\text{l}$ הקסאן. הערכים במילי וולט הם ממוצעים של 9 פרטים. לא נמצא הבדל בין עוצמת התגובה ברגל ימין לעומת שמאל. Paired t-test, $p=0.94$.

בדיקת רגל מנותקת מול וורואה שלמה- האם קיים הבדל בין התגובה של וורואה שלמה ורגל מנותקת? בבדיקות אלקטרו פיסיולוגיות של חרקים קטנים נהוג לעיתים לבדוק את איבר החישה כאשר הוא מחובר אל החרק השלם, או אל איבר גדול יותר (באקרית הטורפת *Phytoseiulus persimilis*, נערכו בדיקות על הרגל הקידמית בעודה מחוברת אל גוף האקרית (de Bruyne et al. 1991), בפסילת האגס *Cacopsylla bidens*, נמצאה עדיפות לבדיקת מחושי החרק בעודם מחוברים לראש, תצפיות אישיות). מכיוון שלא ידוע מהי השיטה הטובה ביותר לבדיקת הוורואה, הושוּו בעבודה זו שתי שיטות לבדיקת תגובה של הרגל הקידמית של הוורואה: רגל מנותקת, או רגל מוורואה שלמה. לשם כך נעשתה השוואה איכותית בין התגובה לגירוי של $0.1 \mu\text{g}$ Geraniol מומס ב- $1 \mu\text{l}$ הקסאן. ניתן לראות באיור 20 שעיקר ההבדל בין שתי השיטות הוא בנוכחות "רעש" גדול יותר בתגובה של הרגל מוורואה שלמה. תצפית זו חזרה ב-14 פרטים.



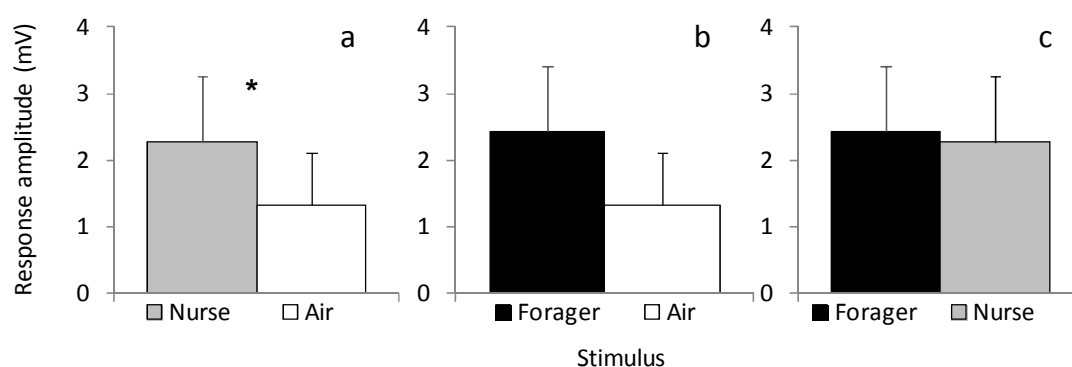
איור 20. דוגמא לתגובה של רגל קידמית מנותקת (a) וורואה שלמה (b) ל- $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Geraniol. ערכים בסוגריים הם עוצמת התגובה במילי וולט. זמן "0" הוא זמן מתן הגירוי.

טבלה 1. יתרונות וחסרונות לשתי השיטות שנבדקו בבדיקת התגובה האלקטרו פיסיולוגית של הוורואה לגירוי. "רגל מנותקת" מול "וורואה שלמה".

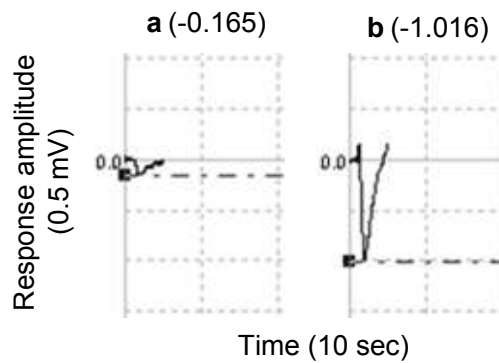
שיטה	רגל מנותקת	וורואה שלמה
יתרונות	ניטרול גורמים שעלולים להשפיע על התגובה: קולטנים נוספים על הגוף ותנועה של הוורואה.	פעולה פשוטה ומהירה יחסית.
	בדיקה פרטנית של הרגל הקדמית בלבד. ללא רישום תגובה של קולטנים המצויים על שאר גופה של הוורואה.	בדיקה כללית של תגובת כלל הקולטנים על גוף הוורואה. הוורואה מתפקדת במכוורת כיחידה שלמה – ולא כרגל בודדת. מבחינה זו בדיקת הוורואה השלמה יותר נאמנה למציאות.
חסרונות	פעולה מסובכת יחסית הדורשת מיומנות.	תנועת הוורואה מקשה על הכנתה והעמסתה על המתקן לבדיקה.
		כתוצאה מתנועת הוורואה ונוכחות קולטנים רבים נוספים מתקבל "רעש" רב המקשה על קריאת התגובה.

לאור כל היתרונות המתוארים בטבלה 1 ובאיור 20 הוחלט להשתמש ברגל קידמית מנותקת של הוורואה. הגורם שהכריע את הכף לטובת הרגל המנותקת היה האפשרות לבדוק באופן פרטני את איבר החישה שזוהה קודם לכן באמצעות ה-SEM. בשיטה זו ניתן לומר באופן המקורב ביותר, שהתגובה שהתקבלה לגירויי ריחות שונים היא בעיקרה של קולטני ריח (שהרי כולם מצויים על הרגל הקדמית של הוורואה), ומקצתה של קולטנים נוספים (כגון קולטנים לחישה מכנית, המצויים גם הם על הרגל הקדמית). לאחר פיתוח השיטה ואפיון התגובה של רגל הוורואה על פי תגובה לחומר ספציפי (Geraniol), ניתן היה לעבור לשלב הבא של הניסוי, הוא בדיקת תגובת הוורואה לדבורה.

בדיקת תגובה לגירוי של אווירה של דבורה שלמה. בבדיקת תגובת הרגל הקדמית של הוורואה לאווירה של דבורה שלמה נמצאו הבדלים בעוצמת התגובה לעומת תגובה לאוויר (איורים 21,22). עוצמת התגובה לדבורה משחרת (2.4 ± 1 mV) הייתה גבוהה מהתגובה לאוויר אך לא מובהקת (Paired t-test, $p=0.08$, $n=6$). עוצמת התגובה לדבורה מטפלת (2.3 ± 1) הייתה גבוהה מעוצמת התגובה לאוויר (Paired t-test, $p=0.03$, $n=6$). יחד עם זאת, לא נמצא הבדל בין עוצמת התגובה של דבורה משחרת ומטפלת (Paired t-test, $p=0.67$, $n=6$).



איור 21. עוצמת תגובת הרגל הקדמית של הוורואה לדבורה מטפלת (a) ומשחרת (b) לעומת תגובה לאוויר. השוואה בין תגובה לדבורה מטפלת ומשחרת (c). ממוצע עוצמת התגובה ושגיאת התקן במילי וולט. Paired t-test, $p<0.05^*$, $n=6$.

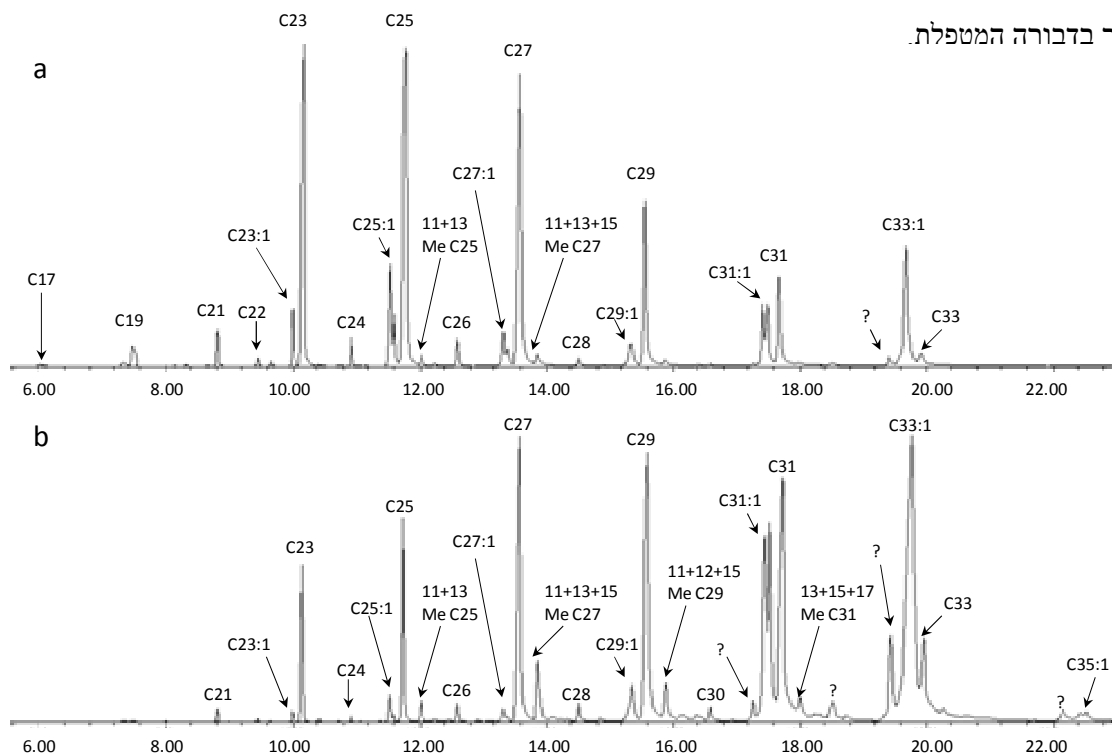


איור 22. דוגמא לתגובה של רגל קידמית מנותקת, בשיטה החדשה לגירוי של (a) אוויר, (b) אווירה של דבורה משחרת שלמה. ערכים בסוגריים הם עוצמת התגובה במייל וולט. זמן "0" הוא זמן מתן הגירוי.

התגובה האלקטרו-פיסיולוגית של הרגל הקידמית של הוורואה לאווירה של דבורה מעידה על נוכחות קולטנים ברגל, שיכולים לחוש בנדיפי דבורים. ריח הדבורה מורכב, בין השאר, מחומרים המופרשים אל פני הקוטיקולה שלה. לפיכך נערכה השוואה בין הפרופיל הקוטיקולרי של דבורה משחרת ומטפלת.

פרופיל קוטיקולרי של דבורה משחרת ומטפלת.

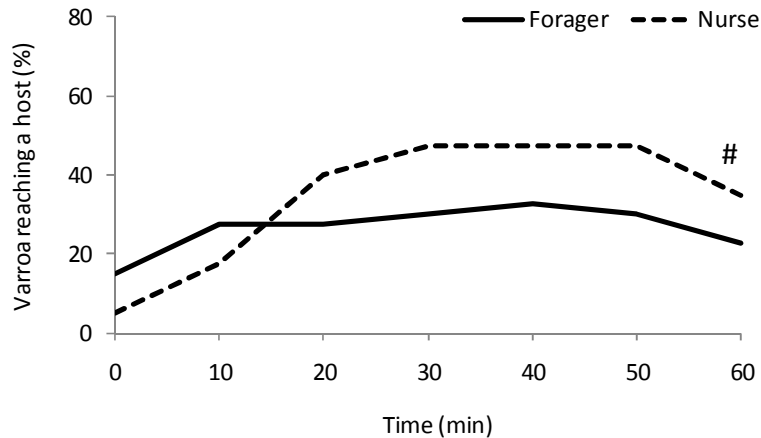
לבחינת הבדלים כמותיים ואיכותיים בין הפרופיל הקוטיקולרי של דבורה משחרת ומטפלת, נעשתה אנליזה כימית והשוואה בין מיצויי הקוטיקולה של הדבורים. בהזרקה מיצויי הקוטיקולה למכשיר גז כרומוגרף המצומד לספקטרומטר מסות (GC-MS) התקבל פרופיל הפרדה של החומרים שמוצו בדוגמא וחושבה כמותם היחסית באחוזים. נדגמו שתי דבורים מאותה כוורת, דבורה משחרת ומטפלת. בפרופיל גז כרומוגרף התקבלו סה"כ 31 פיקים שכמותו היחסית של כל אחד מהם הייתה גדולה מ-0.5% (נספח 1). באמצעות מכשיר GC-MS, זוהו שלוש קבוצות חומרים: פחמימנים רוויים (אלקאנים), פחמימנים שאינם רוויים, עם קשר כפול אחד (אלקנים) ופחמימנים מסועפים (מתיל-אלקאנים). מבחינה איכותית, מרבית החומרים זוהו הן במיצוי הדבורה המשחרת והן במטפלת. על אף המדגם הקטן, ניתן לומר שבאופן כללי כמות האלקאנים הייתה גבוהה יותר בדבורה המשחרת מאשר במטפלת (איור 23). כמות האלקנים והאלקאנים המסועפים לעומת זאת, הייתה גבוהה יותר בדבורה המטפלת.



איור 23. פרופיל הפרדה של מיצוי דבורה משחרת (a) ומטפלת (b) בהקסאן, מסומנים בחיצים פיקים שווה.

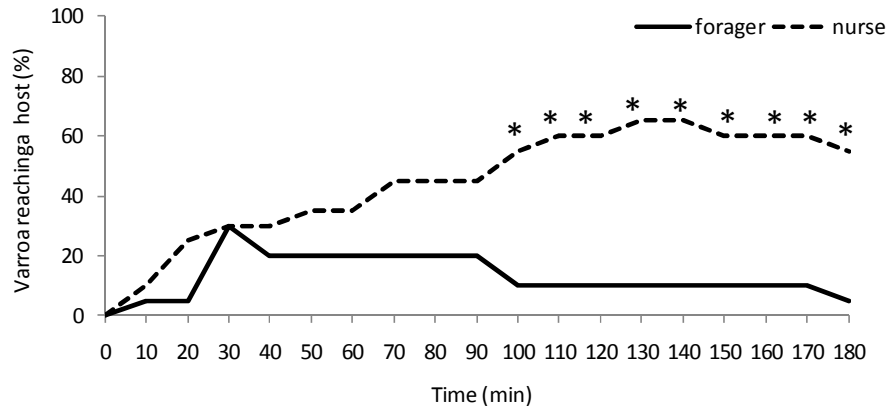
3.3 התנהגות איתור הפונדקאי

לימוד התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה נעשה במבחני בחירה, בהם נבדקה העדפת הוורואה בין שני פונדקאים (דבורה משחרת ומטפלת) לאורך זמן. בהסתמך על ניסויי בחירה דומים, תחילה נערכו ניסויים ראשוניים בזירה בקוטר 55mm (להלן "זירה קטנה") ומיקום הוורואה (דבורה משחרת, מטפלת או על הצלחת) נבדק בכל 10 דקות.



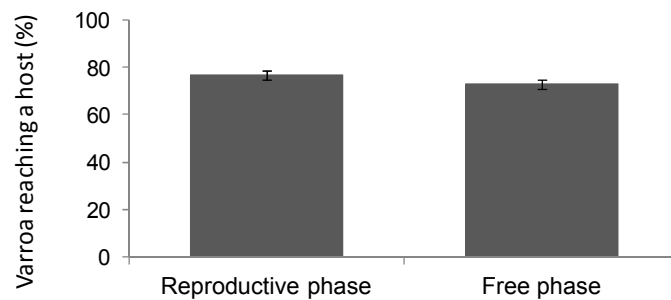
איור 24. העדפת הוורואה לדבורה משחרת או מטפלת לאורך זמן (n=36, exp=4). התוצאות הן אחוזים מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי (60 דקות), בזירה קטנה. #p<0.05 Heterogeneity.

בניסויים שנערכו בזירה קטנה, בנוכחות הקסאן נראתה העדפה שאיננה מובהקת לדבורה מטפלת על פני משחרת במשך רוב זמן הניסוי (איור 24). בתום הניסוי (60 דקות), לא נמצאה העדפה אל אחד משני הפונדקאים ($p=0.29$) וההטרוגניות בין ארבע ניסויים שנערכו נמצאה מובהקת ($p<0.05$). לאור תוצאות אלה הועלתה ההשערה שגודל הזירה הוא קטן מכדי שהוורואה תוכל להבחין בין שני הפונדקאים. על כן נערכו ניסויים בזירה גדולה יותר - בקוטר של 90 mm. מכיוון שניסויים בזירה בגודל זה לא תועדו בספרות, היה צורך לבדוק ולקבוע את משך זמן הניסוי ופרק זמן בין בדיקות האופטימלים בזירה הגדולה. ככל שמתארך משך הניסוי עולה הסיכון לכך שוורואה רבות לא יהיו חיוניות בתום הניסוי עקב התייבשות. כמו כן, בטמפרטורה בה נערך הניסוי הדבורים המתות עלולות להירקב ולהפריש ריחות נוספים. ככל שמתקצר משך הניסוי וורואה רבות עלולות לא להספיק להגיע אל פונדקאי עד תום הניסוי. גם פרק זמן בין קביעת מיקום הוורואה צריך להיות אופטימלי, בתדירות שלא תשפיע על התנהגות הוורואה, אך תספיק על מנת להבחין אם הוורואה החליפה פונדקאי. ניסוי ראשוני נערך במשך 180 דקות ומיקום הוורואה נבדק כל 10 דקות מתחילת הניסוי. מתוך 20 וורואה חיוניות בתחילת הניסוי, 80% (16 וורואה) נותרו חיוניות בתום 180 דקות. מתוך 16 הוורואה החיוניות, 75% הגיעו לאחד משני הפונדקאים בתום הניסוי. ניתן לראות באיור 25, שהחל מ-100 דקות לאחר תחילת הניסוי ועד לתום הניסוי (180 דקות) הייתה בחירה מובהקת בדבורה מטפלת עלפני דבורה משחרת. 120 דקות מתחילת הניסוי לא נצפה שינוי משמעותי בבחירה של הוורואה. לסיכום, מתוך התוצאות המוצגות באיור 25 הוחלט לערוך את הניסויים בזירה גדולה בקוטר 90mm, למשך 120 דקות; ולבדוק את מיקום הוורואה בכל 30 דקות.



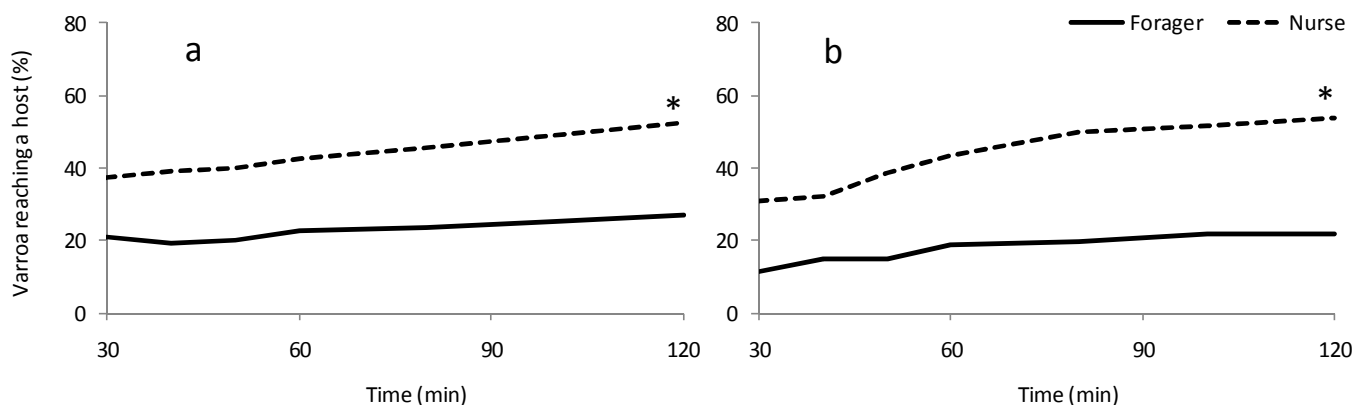
איור 25. העדפת הוורואה לדבורה משחרת או מטפלת לאורך זמן. התוצאות הן אחוזים מתוך 16 הוורואה החיוניות בתום 180 דקות בזירה גדולה. $p < 0.05$, Goodness of fit.

בהמשך נערכה השוואה בין שני שלבים פיסיולוגיים שונים של הוורואה: שלב "חופשי" ושלב רבייתי. בהשוואת שני השלבים נמדדו שני ערכים החשובים למבחן ההתנהגות: אחוז הגעת הוורואה לאחד משני הפונדקאים בתום הניסוי, והעדפת הפונדקאי. בתום הניסוי לא נמצא הבדל מובהק בין ממוצע אחוז ההגעה של וורואה בשלב רבייתי ($77 \pm 1.9\%$) ווורואה "חופשייה" ($73 \pm 2.2\%$) (T-test, $df=27$, $p=0.6$). כמו כן, וורואה משני השלבים העדיפו באופן מובהק דבורה מטפלת על פני משחרת ($p < 0.001$) (איור 27) ולא נמצאה הטרוגניות בין הניסויים בשני השלבים $p < 0.05$. בהתבסס על תוצאות אלה, נמצא שהשלב הפיסיולוגי של הוורואה לא השפיע על העדפת הפונדקאי שלה (Fisher's exact test, $p=0.62$, $n=174$). נתון חשוב נוסף הוא שמתוך סך הוורואה החיוניות בכלל הניסויים, רק 3% החליפו פונדקאי במהלך הניסוי, מתוכם 2% החליפו פונדקאי מדבורה משחרת למטפלת, ו-1% ממטפלת למשחרת.



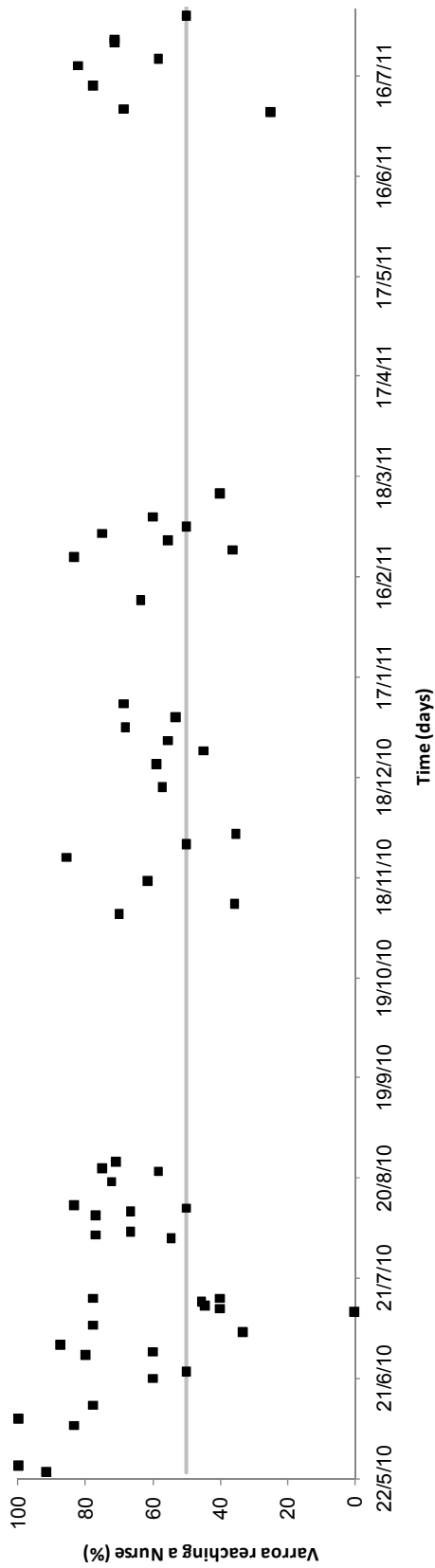
Varroa's physiological phase

איור 26. אחוז הגעת הוורואה לפונדקאי. השוואה בין שני שלבים שונים במחזור החיים של הוורואה: וורואה בשלב "רבייתי", שנאספה מתא דבורה חתום ($n=110$, $exp=15$), או וורואה "חופשייה", שנאספה ממגש ($n=106$, $exp=15$). תוצאות הן אחוז ממוצע מתוך סך הוורואה החיוניות בתום 120 דקות בזירה גדולה. T-test, $p=0.6$.

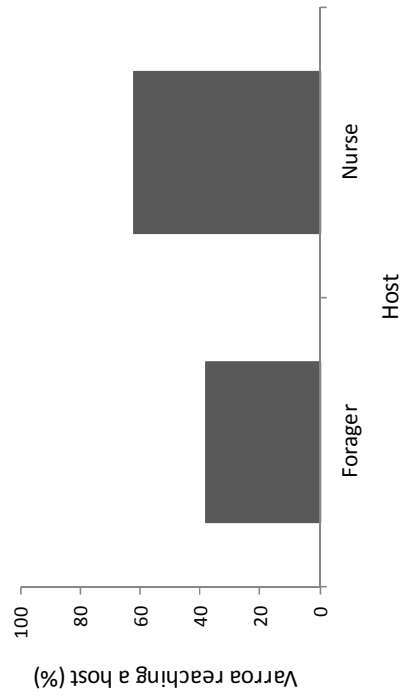


איור 27. העדפת וורואה בשלבים שונים במחזור החיים לדבורה משחרת או מטפלת. השוואה בין שני שלבים במחזור החיים של הוורואה: וורואה בשלב "רבייתי", (a, n=110, exp=15), או וורואה "חופשייה" (b, n=106, exp=15). התוצאות הן אחוז מתוך סך הוורואה החיוניות בתום 120 דקות בזירה גדולה. *p<0.05, Goodness of fit.

מכיוון שלא נמצא הבדל בין שני השלבים, נבדקו בניסויים בהמשך וורואה בשלב ה"חופשי" שהוא מתאים יותר למבנה מבחני ההתנהגות, משום שזהו השלב בו היא מחפשת אחר פונדקאי באופן פעיל. וורואה בשלב רבייתי פחות מתאימה, משום שהיא כבר מצויה בתא החתום. בנוסף, וורואה "חופשייה" נאספה ממגש בשיטה פחות פולשנית אשר מסבה פגיעה מינימלית לכוורת; וזוהי גם השיטה המהירה והפשוטה מבין השתיים.



איור 28. אחוז הוורואה שהגיעו לדבורה מטפלת בתום הניסוי, ב-61 ניסויים שנערכו לאורך כשנה וחצי. התוצאות הן אחוז מתוך סך הוורואה שהגיעו לפונקאי בתום הניסוי (לפחות 4). הקו האפור הרציף מסמן 50% בחירה (n=755, exp=61).



איור 29. העדפת הוורואה לדבורה משרתת או מטפלת בתום 120 דקות מתחילת הניסוי. התוצאות הן אחוזים מתוך סך הוורואה שבחרו בתום הניסוי (n=755, exp=61, Goodness of fit, *p<0.05, #p<0.05 Heterogeneity).
 #p<0.05 Heterogeneity.

במבנה הסופי של מערכת הניסוי (זירה גדולה, 120 דקות, וורואה "חופשייה") נערכו במהלך שנה וחצי של מחקר 61 ניסויי התנהגות, בהם השתתפו 755 אקריות. באיור 28 ניתן לראות שבניסויי הבחירה אחוז הוורואה שבחרו בדבורה מטפלת על פני דבורה משחרת היה גבוה מ-50% ברוב הניסויים. מגמה זו באה לידי ביטוי בסכימה הכללית של כלל ניסויי הבחירה, בה נמצאה העדפה מובהקת של הוורואה לדבורה מטפלת על פני דבורה משחרת (איור 29. Goodness of fit, $p < 0.001$). יחד עם זאת, נמצאה הטרוגניות מובהקת בהעדפת הפונדקאי בין הניסויים (איור 29. Heterogeneity $p < 0.05$). הטרוגניות זו מבטאת את חוסר ההדירות בהעדפת הפונדקאי של הוורואה. תוצאות אלה הובילו להשערת מחקר חדשה:

העדפת הפונדקאי של הוורואה איננה קבועה, כפי שנהוג לחשוב, אלא משתנה במצבים שונים.

בניסיון להתחקות אחר מקור חוסר העקביות הזו נבדקו בעבודה זו שני גורמים אפשריים: המועד בו בוצעו הניסויים, וכוורת מקור הוורואה והדבורים, או הקקשר (Context) בו הוורואה פוגשת בפונדקאים שלה. לפי גורמים אלה נוסחו ונבדקו שתי ההשערות הבאות:

1. השערה. העדפת הפונדקאי של הוורואה משתנה בהקשרים השונים בהם היא פוגשת בפונדקאי שלה.

2. השערה. העדפת הפונדקאי של הוורואה משתנה במועדים השונים.

1. השערה. העדפת הפונדקאי של הוורואה משתנה בהקשרים השונים בהם היא פוגשת בפונדקאי שלה. על מנת לבדוק

השערה זו נבדקה העדפת הפונדקאי של הוורואה בהקשרים שונים באותו המועד. סימון ההקשר הוא לפי מספר הכוורת של כל אחד מן האורגניזמים, כפי שהוסבר בפרק השיטות. עבור כל אחד מההקשרים נבדקה העדפת הפונדקאי של הוורואה בתום הניסוי (משחרת או מטפלת לאחר 120 דקות), ועד כמה העדפה זו הייתה הדירה (הטרוגניות בין הניסויים). בכל מועד שארך בין שבועיים לחודש נערכו ניסויים ל-2 כוורות בהצלבה בהקשרים AAA ו-ABB. בקיץ 2010 (8/25-9/8) נבדקו כוורות 8 ו-4 בהקשרים 444,888,844 ו-488. בסתיו 2011 (12/15-10/11) נבדקו כוורות 17 ו-4 בהקשרים 171717 ו-1744. ככלל, בסכימת כלל הניסויים של שלושת הכוורות בקיץ וסתיו 2010 העדפה מובהקת לדבורה מטפלת נמצאה רק כאשר הוורואה והדבורים היו מכוורות זרות-ABB (קרי- 1744,488,844) (ללא הטרוגניות מובהקת $p < 0.05$) (טבלה 2). בהסתכלות פרטנית ניתן לראות שהעדפה זו נבעה כנראה מההעדפה המובהקת לדבורה מטפלת בקיץ 2010 בהקשר ABB (ללא הטרוגניות מובהקת $p < 0.05$), משום שבסתיו 2010 לא נמצאה העדפה מובהקת לפונדקאי, בשני ההקשרים (ללא הטרוגניות מובהקת $p < 0.05$). השפעת ההקשר על העדפת הפונדקאי נמצאה מובהקת רק בקיץ 2010 (Fisher's exact test, $p < 0.05$).

טבלה 2. העדפת הפונדקאי של הוורואה בהקשרים שונים, באותו מועד. בכל הקשר (AAA - כל האורגניזמים מאותה כוורת, ABB - דבורים וורואה מכוורות שונות), מצויינים מספר הפרטים שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי (n) ומספר הניסויים (exp), הפונדקאי שמרבית הוורואה הגיעו אליו (משחרת/מטפלת) ורמת המובהקת $p < 0.05$. G-test, שני ההקשרים נבדקו במועדים שונים בכוורות שונות (כוורות 17 ו-4 בסתיו 2010, וכוורות 4 ו-8 בקיץ 2010). כמו כן מצויינת השפעת ההקשר על העדפת הפונדקאי של הוורואה, $p > 0.05$. Fisher's exact test.

דעומ תורוכו	תפדעה יאקדנופ)G-test(תעפשה רשקהה לע תפדעה יאקדנופה)Fisher's test(
	AAA	ABB	
ויתס 2010 , תורוכ 17 ו-4	תרחסמ n=36, p=0.5	תלפטמ n=28, p=0.45	הריחבה תלפטמב ההובג רתוי רשקהב ABB, n=64, exp=4 p=0.22
זיק 2010 , תורוכ 4 ו-8	תלפטמ n=86, p=0.08	תלפטמ n=78*	הריחבה תלפטמב ההובג רתוי רשקהב ABB, * n=164, exp=13 p=0.012

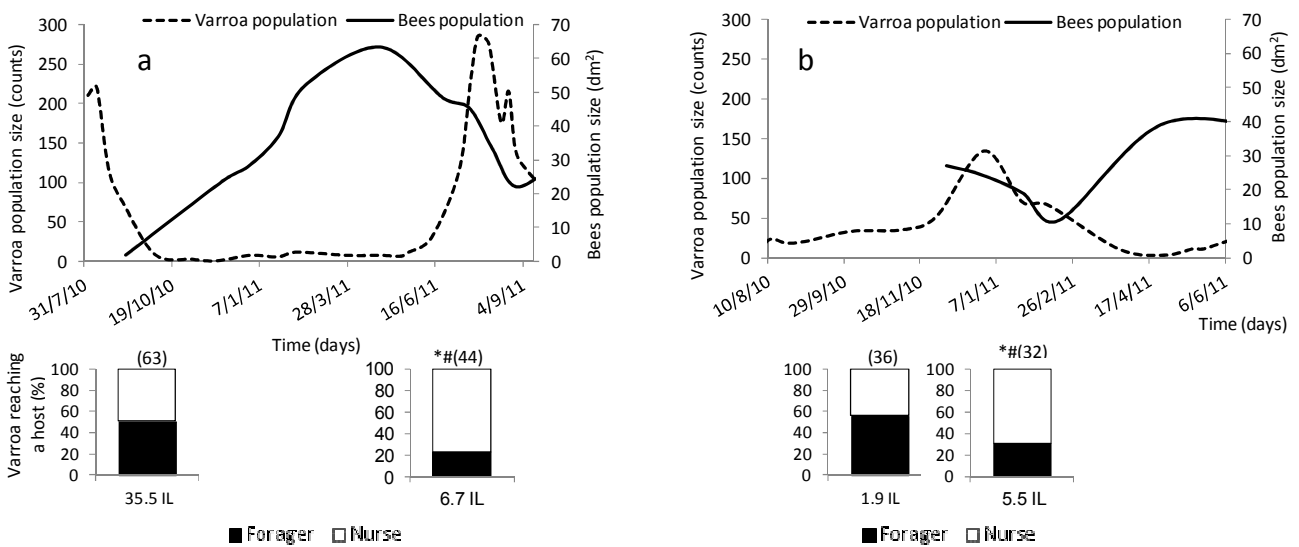
השערה 2. העדפת הפונדקאי של הוורואה משתנה במועדים שונים. על מנת לבדוק השערה זו נבדקה העדפת הפונדקאי של הוורואה במועדים שונים באותו ההקשר (AAA, כל האורגניזמים מאותה כוורת). העדפת הפונדקאי של וורואה מכוורת 17 בין דבורים מכוורת 17 נבדקה בסתיו 2010 (10/11-15/12) ובחורף 2011 (22/12-9/1). העדפת הפונדקאי של וורואה מכוורת 8 בין דבורים מכוורת 8 נבדקה בקיץ 2010 (12/7-25/8) ושנה לאחר מכן בקיץ 2011 (13/7-18/8). נמצא כי העדפת הפונדקאי של הוורואה השתנתה במועדים השונים, בשתי הכוורות (טבלה 3). בסתיו 2010 לא נמצאה העדפה לאחד משני הפונדקאים, אך בסדרת ניסויים שנערכה שבועיים לאחר מכן בחורף 2011 הוורואה העדיפה באופן מובהק דבורה מטפלת (הטרונגניות מובהקת $p < 0.05$). גם בכוורת 8 נמצאה השפעה לגורם המועד, כאשר בקיץ 2010 לא נמצאה העדפה לאחד משני הפונדקאים, ואילו שנה לאחר מכן הוורואה העדיפה באופן מובהק דבורה מטפלת (הטרונגניות מובהקת $p < 0.05$). בשני המקרים השפעת המועד על העדפת הפונדקאי נמצאה מובהקת (Fisher's exact test, $p < 0.05$).

טבלה 3. העדפת הפונדקאי של הוורואה במועדים שונים, באותו ההקשר AAA (כל האורגניזמים מאותה כוורת). נבדקו שתי כוורות, כל אחת בשני מועדים. מצויינים מספר הפרטים שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי (n) ומספר הניסויים (exp), הפונדקאי שמרבית הוורואה הגיעו אליו (משחרת/מטפלת) ורמת המובהקת $p < 0.05$. G-test, כמו כן מצויינת השפעת המועד על העדפת הפונדקאי של הוורואה, ע"פ Fisher's exact test, $p > 0.05$.

תעפשה דעומה לע תפדעה יאקדנופה)Fisher's test(תפדעה יאקדנופ)G-test(תרווכ רשקהו
	ויתס 2010	פריח 2011	
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי פרוחב n=68, p=0.04*, 2010	תרחשמ n=36, exp=4 p=0.5	* # תלפטמ n=32, exp=4, p=0.03	17, AAA
תעפשה דעומה לע תפדעה יאקדנופה)Fisher's test(תפדעה יאקדנופ)G-test(תרווכ רשקהו
	פיק 2010	פיק 2011	
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי פיקב n=107, p=0.003*, 2011	תרחשמ n=63, exp=9, p=0.1	* # תלפטמ n=44, exp=6, p=0.001	8, AAA

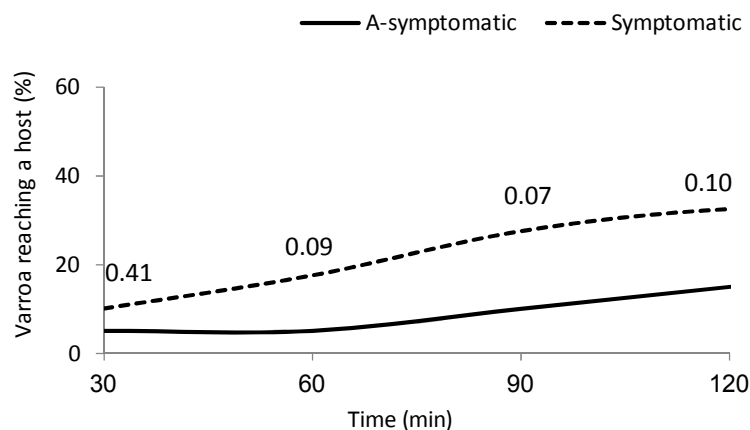
מה יכול להיות הגורם שמשנתה באותה כוורת לאורך זמן ויש לו משמעות לגבי הוורואה? גורם כזה עשוי להיות רמת נגיעות הכוורות בוורואה, שמשנתה לאורך זמן בהתאם לשינוי בגודל אוכלוסיית הדבורים והוורואה בכוורת. רמת הנגיעות של הכוורת חושבה לפי היחס בין אוכלוסיית הדבורים (שטח וולד בתום בדצימטר) ואוכלוסיית הוורואה (מספר נפילות), ומסומנת IL - Infestation Level.

בשתי הכוורות נצפתה תנודתיות חזקה ברמת הנגיעות לאורך תקופה של יותר משנה, עם עלייה לרמת נגיעות הגבוהה מ-IL 6. זאת יחסית לכוורות אחרות שלא התמוטטו, שם רמת הנגיעות נעה סביב IL 1 ולא עלתה על IL 2 לאורך תקופה של שנה וחצי (תצפיות אישיות). ברמות נגיעות קיצוניות – גבוהה מאוד (IL 35.5, בכוורת 8) או נמוכה מאוד (IL 1.9 בכוורת 17), לא הייתה העדפה לפונדקאי כלשהו (איור 30).



איור 30. גודל אוכלוסיית הדבורים והוורואה (גרף רציף) והעדפת הפונדקאי של הוורואה (גרף עמודות) בתקופות שונות לאורך השנה, בכוורת 8 (a) וכוורת 17 (b). אוכלוסיית הדבורים הוערכה לפי דצימטר תאי וולד חתום, אוכלוסיית הוורואה הוערכה לפי מספר וורואה שנפלו לתחתית הכוורת למשך כ-20 שעות. מתחת לכל גרף המציג את העדפת הוורואה למועד מצויינת רמת הנגיעות, IL – Infestation level, אשר חושבה לפי אוכלוסיית וורואה חלקי אוכלוסיית הדבורים, באותה המועד. העדפת הפונדקאי מוצגת בעמודות באחוזים, וחושבה מתוך סך הוורואה שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי (מסומן בסוגריים מעל לכל עמודה). #p<0.05 Heterogeneity. *p<0.05, Goodness of fit.

אם אכן העדפת הוורואה משתנה בין מועדים בהן רמת נגיעות הכוורת שונה, מהו בדיוק האות לפיו הוורואה יכולה "להעריך" את רמת הנגיעות? אות שכזה יכול להגיע מהכוורת, או מהדבורה כפרט. לפיכך עלה הצורך הטבעי לבדוק אם הוורואה יכולה להבחין בין דבורה חולה ובריאה, ואם כן – האם יש לה העדפה לאחת מהן? לשם כך נבדקה העדפת הפונדקאי של הוורואה בין דבורה מגיחה עם סימפטומים של עיוות כנפיים ודבורה המגיחה ללא סימפטומים. ככלל, לאורך כל משך הניסוי הייתה העדפה שאיננה מובהקת, אך גבולית ($p < 0.1$) לדבורה מגיחה עם סימפטומים של עיוות כנפיים על פני דבורה מגיחה ללא סימפטומים. (ללא הטרוגניות מובהקת בין הניסויים, איור 31).



איור 31. העדפת הוורואה לדבורה מגיחה עם סימפטומים של עיוות כנפיים, או לדבורה מגיחה ללא סימפטומים. התוצאות הן אחוזים מסך 29 הוורואה שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי, 3 ניסויים בסך הכל. מעל לכל זמן מצויין p-value של ההבדל בין מספר הוורואה שבחרו באחד משני הפונדקאים לפי מבחן Goodness of fit.

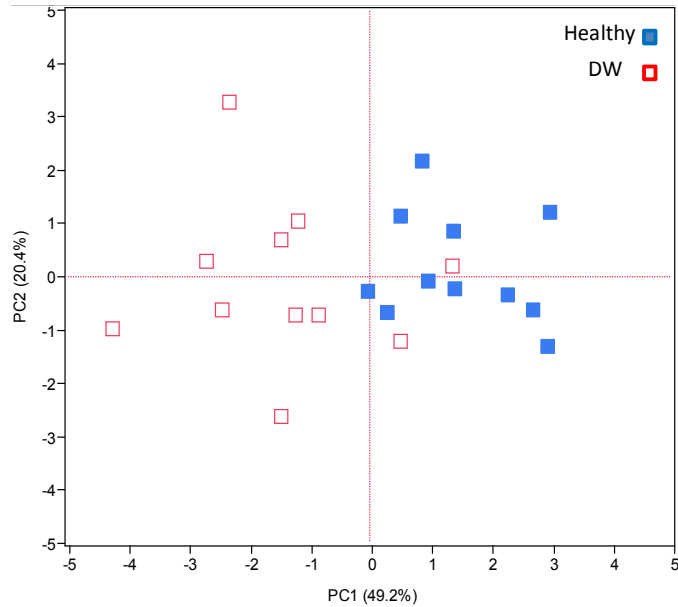
פרופיל קוטיקולרי של דבורים סימפטומטיות וא-סימפטומטיות.

במקביל לניסויי ההתנהגות נעשה ניסיון לאתר מנגנון שעשוי לאפשר את ההבחנה של הוורואה בין דבורה עם סימפטומים לדבורה ללא סימפטומים. מכיוון שהוורואה משתמשת בפחמימנים המרכיבים את הפרופיל הקוטיקולרי של הדבורה על מנת להבחין בין פונדקאים, נבדק האם ישנם הבדלים כמותיים ואיכותיים בפרופיל הקוטיקולרי של מיצוי קוטיקולה של דבורים משתי הקבוצות. סך הכל נדגמו 22 דבורים מגיחות שהומתו בהקפאה מאותה הכוורת: 11 דבורים עם סימפטומים של עיוות כנפיים—"DW", ו-11 דבורים ללא סימפטומים—"Healthy". בפרופיל גז הכרומוטוגרף התקבלו 49 פיקים שכמותו היחסית של כל אחד מהם הייתה גדולה מ-0.5%. מתוכם זוהו 23 חומרים (פחמימנים רוויים, בלתי רוויים ומסועפים) שמהווים כ-91% מכלל החומרים בדוגמא (טבלה 4).

טבלה 4. החומרים אשר זוהו בדגימות משתי הקבוצות (Healthy, DW), וממוצע כמותם היחסית באחוזים. כל דגימה היא pool של כל 11 הפרטים מאותה קבוצה. חומרים שתרמו לשונות בין שתי הקבוצות באופן מובהק סומנו ב-* $p < 0.05$ Wilcoxon test.

Compound	Healthy, n=11	DW, n=11	Wilcoxon, n=22	P value
Alkanes				
Heneicosane	2.45±0.21	1.52±0.17	*	<0.01
Docosane	0.18±0.06	0.12±0.06	ns	0.44
Tricosane	11.14±0.5	9.85±0.6	ns	0.13
Hexacosane	0.56±0.02	0.56±0.02	ns	0.90
Heptacosane	18.88±0.4	19.88±0.88	ns	0.38
Octocosane	0.71±0.03	0.9±0.06	*	0.03
Nonacosane	6.51±0.34	8.34±0.55	*	0.02
Hentriacosane	2.15±0.2	2.64±0.24	ns	0.16
Alkenes				
Tricosene	1.05±0.08	0.94±0.07	ns	0.32
Pentacosene	0.54±0.06	0.68±0.06	ns	0.16
Pentacosane	6.43±0.18	5.99±0.17	ns	0.13
Nonacosene	0.5±0.12	0.55±0.07	ns	0.76
Hentriacontene	1.07±0.18	1.24±0.15	ns	0.45
Tritriacontene	4.71±0.49	6.31±0.7	ns	0.17
Methylalkanes				
11+13 Methylpentacosane	1.82±0.11	1.68±0.11	ns	0.35
11+13 Methylheptacosane	10.93±0.34	9.86±0.4	*	0.05
13+15 Methyl octacosane	1.01±0.13	0.72±0.11	*	0.04
11+13+15 Methylnonacosane	10.22±0.24	9.15±0.36	*	0.03
13+15 Mthylhentriacontane	4.95±0.11	4.44±0.19	ns	0.07
13+15+17 Methyltritriacontene	2.07±0.07	1.87±0.07	ns	0.06
Dimethylalkanes				
11+17 dimethylnonacosane	1.68±0.05	1.25±0.11	*	<0.01
13,17 dimethylhentriacontane	0.95±0.03	0.72±0.03	*	<0.01

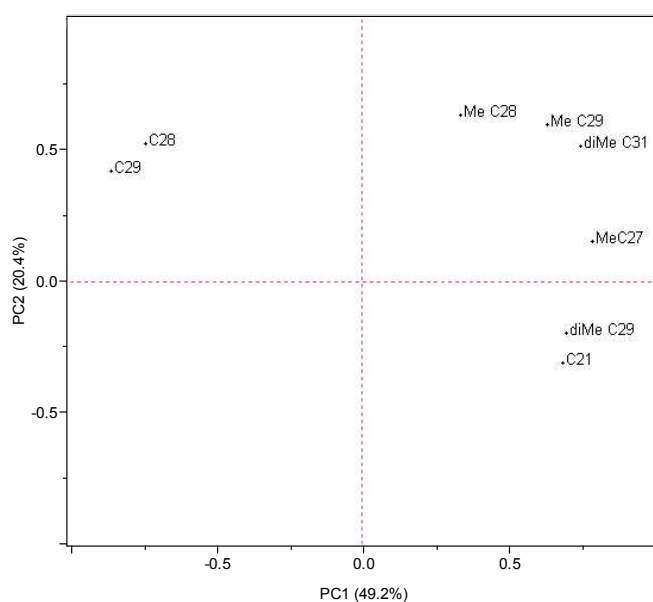
מתוך כלל החומרים שנראים בפרופיל ההפרדה, 8 חומרים תרמו באופן מובהק לשונות בין שתי הקבוצות ($p < 0.05$), עבור אותם חומרים נערך ניתוח סטטיסטי בשיטת PCA. לפי השונות בין חומרים אלה 22 דוגמאות הפרופיל הקוטיקולרי של הדבורים הופרדו לשתי קבוצות, "Healthy" ו-"DW" (איור 32). מקור ההבדל בין שתי הקבוצות הוא ביחסים שונים בין החומרים שמצויים במיצוי הקוטיקולה, ולא בהיעדר/נוכחות חומרים.



איור 32. הפרדת הדוגמאות של שתי הקבוצות (דבורים סימפטומטיות - DW, ודבורים א-סימפטומטיות Healthy) ע"פ שני המרכיבים העיקריים.

על פי ניתוח זה ההפרדה היא בעיקר לפי המרכיב הראשון שמסביר 49.2% מן השונות. המרכיב השני והשלישי מוסיפים עוד 20.4% ו-11.7% בהתאמה, בסה"כ 81.3% מן השונות מוסברת על ידי שלושת המרכיבים העיקריים (טבלה 5). המקדמים המופיעים בטבלה 5 (ערכים מהופכים Rotated factors לפי varimax), הם הקורלציה בין המשתנה (החומר) למרכיב וערכם המוחלט מבטא את מידת תרומתם למרכיב ולפיכך לשונות המוסברת על ידי אותו מרכיב. בטבלה מודגשים מקדמים מעל לערך סף של 0.5 (ערך מוחלט) והם התורמים העיקריים לשונות. באיור 33 ניתן לראות את פיזורם של 8 החומרים העיקריים שתורמים לשונות, לפי המקדמים של שתי המרכיבים העיקריים.

החומרים העיקריים שתורמים למרכיב הראשון הם הפחמימנים הרוויים: C28 (Heptacosane), C21 (Heneicosane), C29 (Nonacosane) ופחמימן מסועף בעל שתי קבוצות מתיל- 11, 17 diMe C29 (11,17 dimethylnonacosane). החומרים העיקריים שתורמו למרכיב השני הם הפחמימנים המסועפים: 11+13 MC27 (11+13 Methylheptacosane), 11+13+15 MC29 (11+13+15 Methylnonacosane) ו- 11, 17 diMe C29 (11+17 dimethylnonacosane), 13,17 diMe C31 (13,17 dimethylhentriacontane). החומרים העיקריים שתורמים למרכיב השלישי- הם הפחמימנים המסועפים 13+15 Me C28 (13+15 Methylheptacosane).



טבלה 5. ערכי המקדמים של שלוש המרכיבים העיקריים, ואחוז השונות המוסבר על ידי 8 החומרים העיקריים שתורמו לשונות. ערכים מהופכים (Rotated factors) לפי Varimax. מודגשים מקדמים שערכם גדול מ-0.5.

Principle Components			
Compound	PC1	PC2	PC3
Heneicosane	-0.82	0.01	0.36
11+13 Methylheptacosane	-0.47	0.64	0.16
Octocosane	0.88	-0.17	0.13
13+15 Methylheptacosane		0.24	0.9
Nonacosane	0.92	-0.27	0
11+13+15 Methylnonacosane	0	0.95	0.13
11+17 Dimethylnonacosane	-0.54	0.55	-0.29
13,17 Dimethylhentriacontane	-0.24	0.77	0.43
Explained variance (%)	49.2	20.4	11.7
Cumulative % of variance	49.2	69.6	81.3

איור 33. הפרדת 8 החומרים העיקריים שתורמו לשונות, ע"פ המקדמים של שני המרכיבים העיקריים. ערכי המקדמים מהופכים (Rotated factors) לפי Varimax.

נציין עוד שפיזור הפרטים הסימפטומטיים (DW) הוא פחות ממוקד מאשר פיזור הפרטים הא-סימפטומטיים (Healthy). כמו כן ישנם מספר פרטים משתי הקבוצות שמצויים באיזורים החופפים לשתי הקבוצות (איור 32).

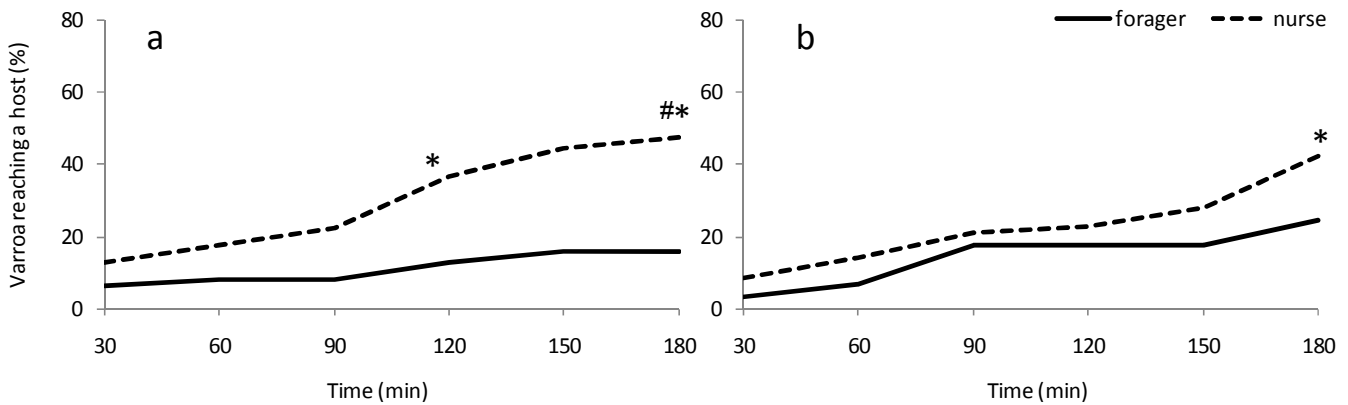
3.4 חומרים המשבשים את התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה

מבחן הבחירה הסופי שגיבושו תואר בתחילת פרק זה, שימש לבדיקת השפעת החומרים המשבשים הפוטנציאליים על התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה. נבדקו שלושה חומרים: HCO 2169, 3C(1,3) ו-3C(2,3) מומסים בהקסאן. העדפת הפונדקאי של הוורואה נבדקה בנוכחות $1 \mu\text{l}$ מהחומר בריכוז $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ מומס בהקסאן, לעומת העדפת הפונדקאי בנוכחות $1 \mu\text{l}$ הקסאן. נציין שאחוזי ההגעה לפונדקאי נמצאו שונים בין תקופות שונות בהן נערכו הניסויים, יחד עם זאת עבור כל החומרים, לא נמצאה השפעה של החומר על אחוזי ההגעה לאחד משני הפונדקאים (משחרת או מטפלת) בתום הניסוי (טבלה 6).

טבלה 6. השפעת נוכחות החומרים על אחוזי הגעה לפונדקאי, מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי. השוואת אחוזי ההגעה בין הטיפול לביקורת לפי מבחן T-test.

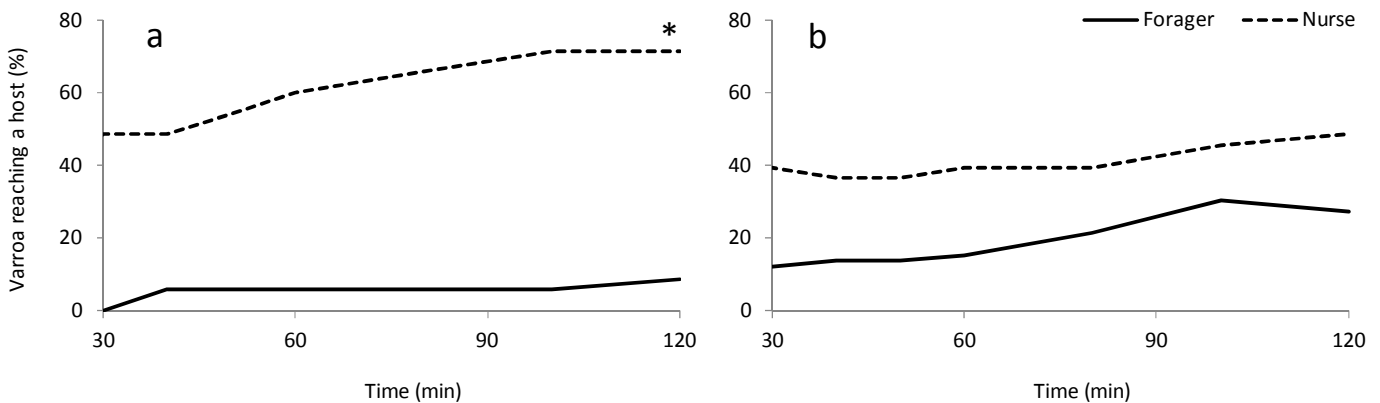
קדבנ רמוח	יוסינ ןמז (תוקד)	תוגרד שפוח	לופיט	העגה עצוממ יאקדנופל(%)	(T-test) Prob > t
HCO 2169, $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	120	14	אסקה רמוח	56 ± 5 51 ± 4	0.66
HCO 2169, $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	120	6	אסקה רמוח	81 ± 7 75 ± 5	0.6
HCO 2169, $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	180	20	אסקה רמוח	65 ± 4 66 ± 3	0.98
3C(1,3), $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	120	4	אסקה רמוח	81 ± 10 86 ± 8	0.93
3C(2,3), $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	120	8	אסקה רמוח	76 ± 7 87 ± 10	0.45

חומר HCO 2169. נוכחות חומר HCO 2169 בריכוז $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ הפחיתה את העדפת הוורואה לדבורה מטפלת על פני דבורה משחרת. לכל אורך הניסוי בטיפול הביקורת נראתה העדפה לדבורה מטפלת על פני משחרת, הן בטיפול והן בביקורת (איור 34). בתום 120 דקות מתחילת הניסוי נמצאה העדפה מובהקת של הוורואה לדבורה מטפלת בביקורת ($p=0.03$), ואילו בנוכחות חומר HCO 2169, בתום 120 דקות מתחילת הניסוי לא הייתה העדפה בין פונדקאים ($p=0.30$), ללא הטרוגניות מובהקת ($p<0.05$). בהתבסס על תוצאות אלה, נמצא שנוכחות החומר הורידה באופן גבולי את העדפת הוורואה לדבורה מטפלת, לעומת הביקורת (Fisher's exact test, $p=0.1$, $n=100$). בבדיקת העדפת הפונדקאי לאורך זמן ממושך יותר נמצא שבנוכחות חומר HCO 2169 בריכוז $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ חוסר ההעדפה של הוורואה כפי שנצפה בדקה 120, התפוגג לאחר 60 דקות נוספות אז הוורואה העדיפה באופן מובהק דבורה מטפלת ($p=0.03$), הטרוגניות מובהקת ($p<0.05$). בהתבסס על תוצאות אלה, נמצא שנוכחות החומר הורידה באופן גבולי את העדפת הוורואה לדבורה מטפלת, לעומת הביקורת (Fisher's exact test, $p=0.1$, $n=100$). לאחר 60 דקות נוספות (דקה 180 מתחילת הניסוי), השפעת החומר התמעטה (Fisher's exact test, $p=0.42$, $n=156$).



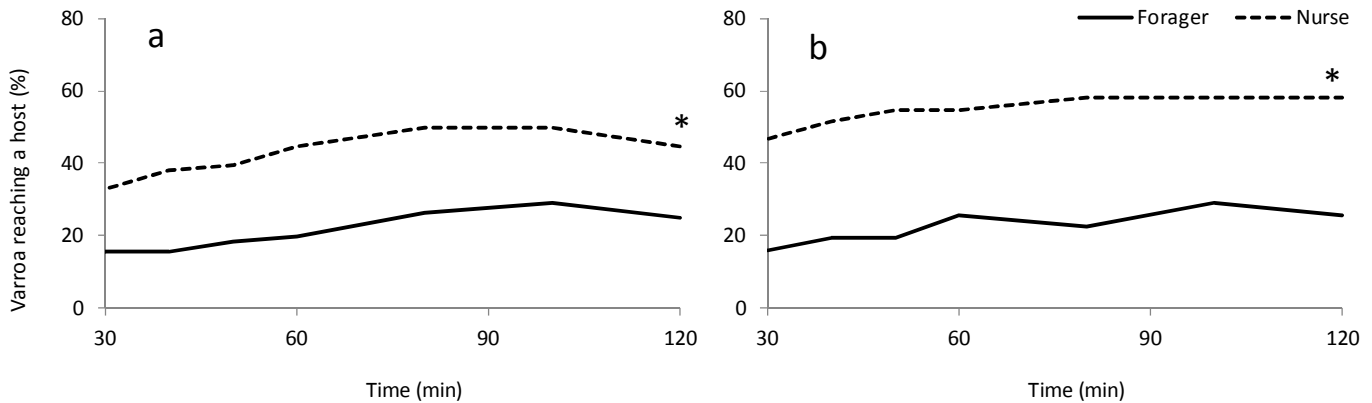
איור 34. העדפת הוורואה לדבורה משחרת או מטפלת לאורך זמן בנוכחות הקסאן (a, n=63), ובנוכחות חומר HCO 2169 בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (b, n=57). התוצאות הן אחוזים מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי (180 דקות) בזירה גדולה, 7 ניסויים. Heterogeneity. * $p<0.05$, Goodness of fit. # $p<0.05$.

בהמשך נבדקה השפעת חומר HCO 2169 בריכוז גבוה פי 10 לראות אם השפעת החומר הינה תלויית ריכוז. בנוכחות חומר HCO 2169 בריכוז $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ההעדפה של הוורואה אל דבורה מטפלת פחתה באופן משמעותי, לעומת הביקורת (איור 35). בנוכחות חומר HCO 2169 בריכוז $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ נראית העדפה שאיננה מובהקת אל דבורה מטפלת על פני דבורה משחרת ($p=0.16$), ואילו בנוכחות הממס נראית העדפה מובהקת אל דבורה מטפלת ($p<0.0001$), ללא הטרוגניות מובהקת ($p<0.05$). בהתבסס על תוצאות אלה, נמצא שנוכחות החומר הורידה באופן מובהק את העדפת הוורואה לדבורה מטפלת, לעומת הביקורת (Fisher's exact test, $p=0.03$, $n=107$).



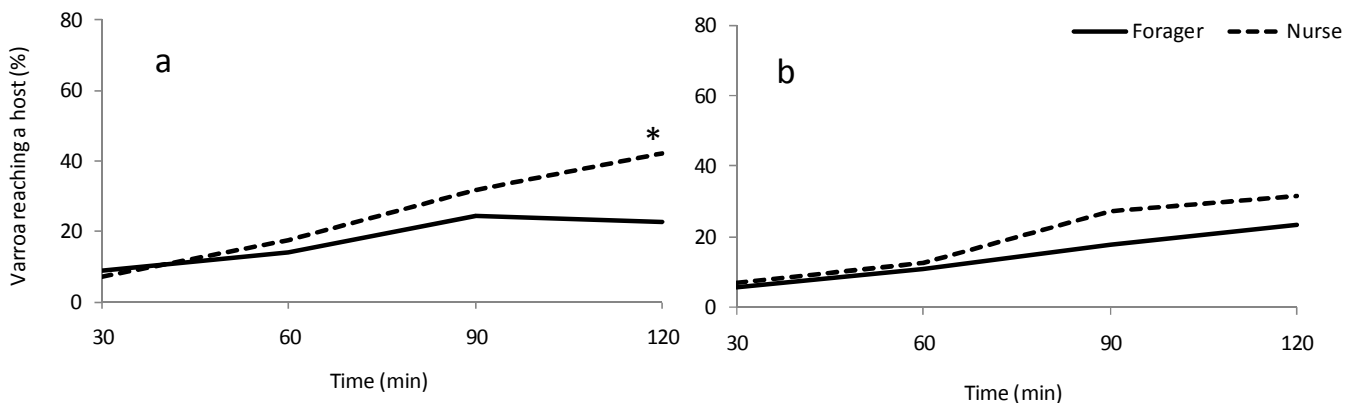
איור 35. העדפת הוורואה לדבורה משחרת או מטפלת לאורך זמן בנוכחות הקסאן (a, n=35), ובנוכחות חומר HCO 2169 בריכוז $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (b, n=33). התוצאות הן אחוזים מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי (120 דקות) בזירה גדולה, 4 ניסויים. * $p<0.05$, Goodness of fit.

חומר 3C(2,3). לא נמצאה השפעה של חומר 3C(2,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ על העדפת הפונדקאי של הוורואה לכל אורך הניסוי. בתום 120 דקות מתחילת הניסוי נמצאה העדפה מובהקת של הוורואה לדבורה מטפלת הן בביקורת ($p=0.04$), והן בנוכחות חומר 3C(2,3) ($p=0.05$). ללא הטרוגניות מובהקת ($p<0.05$) בשני הניסויים (איור 36). בהתבסס על תוצאות אלה, נמצא שנוכחות החומר לא השפיעה על העדפת הפונדקאי של הוורואה, לעומת הביקורת (Fisher's exact test, $p=1$, $n=55$).



איור 36. העדפת הוורואה לדבורה או מטפלת לאורך זמן בנוכחות חומר 3C(2,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (a, $n=29$), ובנוכחות חומר 3C(1,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (b, $n=26$). התוצאות הן אחוזים מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי (120 דקות) בזירה גדולה, 5 ניסויים. $*p<0.05$, Goodness of fit.

חומר 3C(1,3). נוכחות חומר 3C(1,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ הפחיתה את העדפת הוורואה לדבורה מטפלת על פני דבורה משחרת. בתום 120 דקות מתחילת הניסוי נמצאה העדפה מובהקת של הוורואה לדבורה מטפלת בביקורת ($p=0.04$), ואילו בנוכחות החומר 3C(1,3) לא נמצאה העדפה מובהקת ($p=0.34$), ללא הטרוגניות מובהקת בשני הניסויים ($p<0.05$) (איור 37). בהתבסס על תוצאות אלה, נמצא שנוכחות החומר הפחיתה באופן שאינו מובהק את העדפת הוורואה לדבורה מטפלת, לעומת הביקורת (Fisher's exact test, $p=0.27$, $n=76$).



איור 37. העדפת הוורואה לדבורה או מטפלת לאורך זמן בנוכחות חומר 3C(1,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (a, $n=36$), ובנוכחות חומר 3C(2,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (b, $n=40$). התוצאות הן אחוזים מתוך סך הוורואה החיוניות בתום הניסוי (120 דקות) בזירה גדולה, 5 ניסויים. $*p<0.05$, Goodness of fit.

תוצאות השפעת החומרים על העדפת הפונדקאי של הוורואה לעומת הביקורת בתום הניסוי מסוכמות בטבלה 7. ככלל, נוכחות חומר HCO 2169 בשני הריכוזים שנבדקו (100, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) וחומר 3C(1,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ הורידה את אחוז הוורואה שבחרו בדבורה מטפלת על פני משחרת, לעומת הביקורת. לעומת זאת, נוכחות חומר 3C(2,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ לא השפיעה על העדפת הפונדקאי של הוורואה, בהשוואה לביקורת.

טבלה 7. סיכום השפעת שלושת החומרים שנבדקו על העדפת הפונדקאי של הוורואה לעומת הביקורת בתום הניסוי. מצויינים מספר הפרטים שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי (n), הפונדקאי שמרבית הוורואה הגיעו אליו (משחרת/מטפלת) ורמת המובהקות G-test, $p<0.05$. כמו כן מצויינת השפעת החומר על העדפת הפונדקאי של הוורואה, ע"פ Fisher's exact test, $p>0.05$.

תעפשה רמוחה לע תפדעה יאקדנופה)Fisher's test()G-test(תפדעה יאקדנופ		רמוח קדבנ
	תוחכונב ואסקה	תוחכונב רמוחה	
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=100, exp=7, p=0.12, ואסקה *	n=55, p=0.002	n=45, p=0.3	HCO 2169, $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=53, exp=4 p=0.03*, ואסקה *	n=28, p=0.001	n=25, p=0.16	HCO 2169, $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=76, exp=5, p=0.27, ואסקה *	n=36, p=0.04	n=40, p=0.34	3C (1,3), $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=55, exp=5, p=0.62, ואסקה *	n=29, p=0.05	n=26, p=0.04	3C (2,3), $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$

תוצאות ניסויים אלה הן סיכום של מספר ניסויים שנערכו לאורך תקופה של כשנתיים, במועדים שונים ובהקשרים שונים. מכיוון שנמצאה השפעה של גורמים אלה (כפי שהודגם בתחילת פרק זה), נבדקה ההשפעה של החומרים במועדים שונים ובהקשרים שונים. ההשפעה נבדקה עבור החומרים HCO 2169 ו- 3C(1,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ בלבד, משום שחומרים 3C(2,3) בריכוז $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ו- HCO 2169 בריכוז $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$, נבדקו רק בהקשר ומועד אחד. נמצא שבהקשר AAA, בנוכחות חומר HCO 2169 פחות וורואה בחרו בדבורה מטפלת לעומת הביקורת באופן מובהק, ואילו בהקשר ABB לא נמצאה השפעה מובהקת של החומר (טבלה 8). עבור חומר 3C(1,3) בהקשר AAA נמצא שבנוכחות החומר פחות וורואה בחרו בדבורה מטפלת על פני משחרת לעומת הביקורת באופן מובהק. ואילו בהקשר ABB לא הייתה בחירה מובהקת הן בנוכחות החומר והן בביקורת.

טבלה 8. השפעת החומרים על העדפת הפונדקאי של הוורואה לעומת הביקורת בתום הניסוי, בהקשרים שונים. מצויינים מספר הפרטים שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי (n) ומספר הניסויים (exp), הפונדקאי שמרבית הוורואה הגיעו אליו (משחרת/מטפלת) ורמת המובהקות G-test, $p<0.05$. כמו כן מצויינת השפעת החומר על העדפת הפונדקאי של הוורואה, ע"פ Fisher's exact test, $p>0.05$.

תעפשה רמוחה לע תפדעה יאקדנופה)Fisher's test()G-test(תפדעה יאקדנופ		רשקה	רמוח קדבנ
	תוחכונב ואסקה	תוחכונב רמוחה		
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=56, exp=4, p=0.007*, ואסקה *	n=27, p=0.001	n=29, p=0.85	AAA	HCO 2169, $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=44, exp=4, p=0.86, ואסקה *	n=28, p=0.45	n=16, p=0.13	ABB	
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=34, exp=3, p=0.32, ואסקה *	n=23, p=0.06	n=11, p=0.76	AAA	3C (1,3), $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=42, exp=3, p=0.56, ואסקה *	n=13, p=0.43	n=29, p=0.35	ABB	

השפעת חומר HCO 2169 הייתה משמעותית יותר בתחילת קיץ 2011 (חודש יולי), ואילו בסוף אותו קיץ (חודש אוגוסט) לא נמצאה השפעה (טבלה 9). נוכחות חומר 3C(1,3) לא השפיעה על העדפת הפונדקאי באביב 2011, ואילו בקיץ באותה השנה נוכחותו הורידה את אחוז הוורואה שבחרו בדבורה מטפלת, לעומת הביקורת.

טבלה 9. השפעת החומרים על העדפת הפונדקאי של הוורואה לעומת הביקורת בתום הניסוי, בתקופות שונות. מצויינים מספר הפרטים שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי (n) ומספר הניסויים (exp), הפונדקאי שמרבית הוורואה הגיעו אליו (משחרת/מטפלת) ורמת המובהקת, G-test, $p < 0.05$. כמו כן מצויינת השפעת החומר על העדפת הפונדקאי של הוורואה, ע"פ Fisher's exact test, $p > 0.05$.

תעפשה רמוחה לע תפדעה יאקדנופה)Fisher's test()G-test(תפדעה יאקדנופ		דעומ	רמוח קדבנ
	תוחכונב ואסקה	תוחכונב רמוחה		
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=48, exp=4, p=0.09, ואסקה *	תלפטמ n=24, p=0.006	תלפטמ n=24, p=0.22	תליחת זיק 2011	HCO 2169, 10µg/µl
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=37, exp=3, p=0.54, ואסקה	תלפטמ n=16, p=0.62	תלפטמ n=21, p=0.83	פוס זיק 2011	
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=20, exp=2, p=0.5, רמוחה *	תרחשמ n=11, p=0.36	תרחשמ n=9, p=0.74	ביבא 2011	3C (1,3), 10µg/µl
הריחבה תלפטמב ההובג רתוי תוחכונב n=56, exp=3, p=0.11, ואסקה	תלפטמ n=25, p=0.002	תלפטמ n=31, p=0.2	זיק 2011	

השערת עבודה זו הייתה שלאקרית הוורואה יכולת חישה כימית אשר מאפשרת הבחנה ובחירה בין פונדקאים; לפיכך, ניתן יהיה לשבש יכולת זו באמצעות חומרים משבשי חישה וכך לפגוע בשרידות והתרבות הוורואה בכורת. נכון להיום, הוורואה היא האיום העיקרי לענף הדבוראות בעולם (Rosenkranz et al. 2009). כחלק מהמאמץ הבינלאומי להתמודדות עם הוורואה, דרושה ראייה כוללת ויישום אסטרטגית התמודדות ארוכת טווח המשלבת בתוכה מספר שיטות. ממצאי עבודה זו מניחים את הבסיס לפיתוח שיטה העושה שימוש בידע אודות מחזור החיים של הוורואה, התנהגות איתור הפונדקאי שלה ואותות המשמשים אותה בבחירת הפונדקאי המתאים; ומנצלת ידע זה על מנת להטות את כפות המאזניים לטובת הדבורה. התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה מבוססת בעיקר על חישת אותות כימיים (Dillier et al. 2006). על מנת לנסות ולשבש התנהגות זו נחוץ ללמוד את חישת האותות הכימיים של הוורואה, כאשר בתור התחלה יש לאתר ולאפיין את איבר החישה של האקרית.

בעבודה הנוכחית נמצא איבר חישה המאופיין בצפיפות שערות גבוהה בקצה הרגל הקדמית של הוורואה, זאת בדומה לאקריות ממשפחות קרובות בתת הסדרה Mesostigmata ומינים נוספים ממחלקת העכבישניים (Arachnida). איבר זה דומה לחלק השקוע של איבר הלר Haller's organ בקרציות, בעוד החלק השני של איבר הלר-"השלפוחית", חסר. המבנה הכללי של איבר החישה כולל קבוצת שערות חישה בתוך השקע וקבוצה נוספת מסביב לשקע. בתוך השקע נצפו שערות בעלות מאפיינים מורפולוגיים חיצוניים התואמים לאלה של שלושה סוגי שערות לחישה כימית: DWsc, SWpp ו-SWpo. בנוסף נצפה סוג נוסף של שערות בעלות קצה ארוך וצר, שלא תואם לתיאורן של שערות החישה הנפוצות (Tichy & Barth 1992), אבל נוכחות נקבים על פני השערה מרמזת על תפקידה כשערה לחישה כימית. בנוסף לשערות לחישה כימית נמצאו שערות קצרות ועבות במרכז השקע ללא נקבים על פניהן, ייתכן ומדובר בשערות לחישת לחות או טמפרטורה (French & Torkkeli 2003). מחוץ לשקע, כל אחת מן השערות ישובה בתוך גומחה ושטח פניהן חלק, ללא נקבים. שני מאפיינים מורפולוגיים אלה מרמזים על תפקידן לחישה מכנית (French & Torkkeli 2003). יחד עם זאת, נראו חריצים דקיקים לאורך השערות הקצרות יותר, המתאימים לתיאור של שערה לחישה כימית מסוג SWpo (Tichy & Barth 1992) וייתכן שקשה להבחין בנקבים.

המבנה הכללי של האיבר תואם לממצאיהם של עבודות אחרות על הוורואה, אלא שבעבודה הנוכחית נמצאה עדות לשערות חישה נוספות מחוץ לשקע שלא תוארו (Milani & Nannelli 1988; Dillier et al. 2006). בעבודתם של Milani & Nannelli (1988) חלק מהשערות במרכז השקע וזהו כשערות לחישת טעם על פי הנקב שבקודקודן (מסוג TP Chaetic, Hallberg & Hansson 1999), שערות מסוג זה לא זוהו בעבודה הנוכחית. שערות דומות לשערות בתוך השקע בעלות קצה ארוך וצר שאינן מתאימות לתיאור של שערות החישה הנפוצות תוארו גם בעבודתם של Milani & Nannelli (1988) באותו האיזור. לטענתם שערה בעלת מורפולוגיה דומה נצפתה על ידי Hess & Vilmant (1982) בקרצייה *Amblyomma variegatum* (Aacari: Ixodidae). בניגוד לממצאי העבודה הנוכחית ועבודתם של Milani & Nannelli (1988), שערות לחישת טעם מתוארות גם מחוץ לשקע (לפי מאמר הסקירה Dillier et al. (2006) אשר מתאר את עבודתם של Ramm & Bockeler (1989) (פורסם בגרמנית)). יחד עם זאת, תפקידן המשוער של השערות המתוארות אינו מגובה בספרות מתאימה, ובחלק מהתיאורים לא ברור לפי איזה נתון מורפולוגי סווגו השערות כפי שסווגו.

לזיהוי וסיווג שערות החישה באופן מפורט יותר רצוי לערוך צילומים במיקרוסקופ אלקטרוניים חודר (TEM-)

Transmission electron microscope). כך ניתן יהיה לעמוד על תכונות מורפולוגיות ופיסיולוגיות פנימיות המאפיינות שערות חישה מסוג מסויים, כגון מספר הנוירונים המעצבבים את השערה, נוכחות צינוריות המובילות לנקבים ומעטפת השערה (Tichy & Barth 1992).

לבדיקת תפקוד איבר החישה שזוהה באמצעות SEM נערכו בדיקות במכשיר EAG, ופוחתה שיטה לרישום תגובה אלקטרו-פיסיולוגית של הרגל הקדמית של הוורואה לאותות כימיים. במסגרת פיתוח השיטה נבדקו מספר אפשרויות לבדיקת איבר החישה (וורואה שלמה, רגל ימין/שמאל ורגל מנותקת), ונמצא שהשיטה המיטבית היא רגל קדמית מנותקת, ללא הבדל בין רגל ימין ושמאל. מתוך החומרים הנדיפים שנבדקו Geraniol עורר את התגובה החזקה ביותר בכל הריכוזים שנבדקו. חומר זה הוא הרכיב העיקרי בהפרשת בלוטת נסנוב בדבורים (Schmitt *et al.* 2007), ובמחקרים קודמים נמצא שהוורואה נדחית ממנו במידת מה (Hoppe & Ritter 1988; Pernal *et al.* 2005). כמו כן התקבלה לראשונה תגובה לנדיפי דבורה משחרת ומטפלת, ונמצא כי אין הבדל משמעותי בעוצמת התגובה של הוורואה אל שתיהן. בספרות ניתן למצוא אזכורים לא מפורטים לניסיונות לרישום תגובה אלקטרו פיסיולוגית של הוורואה לאותות כימיים. במאמר הסקירה העדכני מאת Rosenkranz *et al.* (2009), מוזכרת בנושא זה עבודתם של Endris & Baker (1993) בלבד. בעבודה שפורסמה כתקציר, מצויין כי נעשתה בדיקה אלקטרו פיסיולוגית לרגליים הקדמיות של הוורואה ונמצאה תגובה לחומרים Geraniol, Citronellol ו-Octylacetate. אולם לא מתוארת השיטה, אופי התגובות ועוצמתן. כמו כן פורסם מאמר בגרמנית ובו מה שנראה כתגובה של שערה בודדת בשיטת Single Cell Recording מאיזור השקע שבאיבר החישה לחומרים Beznaldehyde ו-Methylsalicylate (Dillier *et al.* 2001).

נוכחות שערות לחישה כימית באיבר החישה ותפקודו של איבר זה בחישה נדיפי דבורה מתיישבים עם תצפיות ומחקרים רבים שהראו כי חישה של אותות כימיים היא הערוץ המרכזי להתמצאות הוורואה בכורת, איתור והבחנה בין פונדקאים (Dillier *et al.* 2006). ריחה של הדבורה מורכב בין השאר מחומרים המופרשים אל פני הקוטיקולה, ונמצא כי הוורואה מבחינה בין פונדקאים גם על סמך הבדלים בהרכב הפחמימנים הקוטיקולרי שלהם (Del Piccolo *et al.* 2010).

בעבודה זו נמצאו הבדלים בין פרופיל ההפרדה בגז כרומטוגרף של מיצוי דבורה משחרת ומטפלת, המתבטאים בכמות גדולה יותר של אלקאנים במשחרת לעומת מטפלת. תוצאות אלה תואמות את ממצאיהם של מחקרים קודמים לפיהם ההפרדה בין שתי הקבוצות (משחרת ומטפלת) מתבססת על פי הבדלים בכמותם היחסית של הפחמימנים המצויים בקוטיקולה (Dani *et al.* 2005; Del Piccolo *et al.* 2010; Kather *et al.* 2011). ייתכן והמקור ההבדל זה הוא בתנאי טמפרטורה ולחות משתנים מחוץ לכורת בה מצויה הדבורה המשחרת, לעומת תנאי הסביבה הקבועים בכורת, בה מצויה המטפלת. באופן כללי, כמות גדולה יחסית של אלקאנים מאפיינת מינים שחיים באיזורים צחיחים וחמים, ומאפשרת שמירת נוזלים ומניעת התייבשות (Hadley & Schultz 1987). כנראה שההבדל בפרופיל הקוטיקולרי של דבורים משתי הקבוצות מהווה את הבסיס להבחנה בין פונדקאים, כאשר על פי הספרות לוורואה יש העדפה לדבורה מטפלת על פני דבורה משחרת Kraus (1993; Kuenen & Calderone 1997; Pernal *et al.* 2005). יכולתה של הוורואה לחוש בנדיפי הדבורה, כפי שבוצע בבדיקות האלקטרו-פיסיולוגיות, אינה מעידה בהכרח על המשמעות הביולוגית-אקולוגית של יכולת זו (התנהגות משיכה/דחייה). לשם כך נערכו מבחני ההתנהגות המאפשרים את בדיקת התנהגות האורגניזם השלם, הוורואה, בנוכחות הדבורה.

בעבודה זו נמצא שככלל לוורואה העדפה לדבורה מטפלת על פני משחרת. יחד עם זאת, נמצא שהעדפה זו איננה עיקבית וישנם מועדים בהם הבחירה במטפלת איננה מובהקת, או שכלל אין העדפה לאחד משני הפונדקאים. הועלתה ההשערה שרמת נגיעות הכוורת בוורואה עשויה להשפיע על העדפת הפונדקאי של הוורואה, משום שידוע שרמת נגיעות הכוורת בוירוסים ובוורואה משתנה לאורך השנה (Soroker et al. 2011). בבדיקת רמת הנגיעות בכוורת הניסוי אכן נמצא כי במועדים בניהם היה הבדל בהעדפת הפונדקאי של הוורואה רמת הנגיעות הייתה שונה, אלא שלא נמצא קשר קבוע בין רמת הנגיעות והעדפת הוורואה. יכולת ההבחנה של הוורואה בין פונדקאים והיצמדות מהירה לפונדקאי המתאים חיונית לשרידותה והתרבותה בכוורת. הבחנה והיצמדות לדבורה מטפלת תבטיח לוורואה מפגש בטווח הזמן הקצר עם זחל המהווה עבורה פונדקאי לשלב הרבייתי. מאידך, היצמדות לדבורה משחרת היא האפשרות הפעילה היחידה של הוורואה להפצה בין כוורת והמנעות מתמותה ביחד עם הכוורת הקורסת. (Sakofsi et al. (1990 מצאו שדבורים מכוורת בנגיעות גבוהה נוטות לתעות בין כוורת לעיתים קרובות יותר מאשר דבורים מכוורת בנגיעות נמוכה. לטענתם, פרופיל מעבר הוורואה בין כוורת הינו עונתי ודומה בכוורת שונות. מעבר הוורואה בין כוורת עלה בתקופת אגירת הצוף, בה יש תנועה רבה של דבורים משחרות, וירד כאשר הפריחה התמעטה ואיתה תנועת הדבורים. בניגוד לממצאים אלה, (Neumann et al. (2000 ו- (Goodwin et al. (2006 לא מצאו קשר בין רמת נגיעות הכוורת ומספר הדבורים שתועות לכוורת זרה. נציין ששיטת קביעת רמת הנגיעות בכל אחד מן המחקרים כולל המחקר הנוכחי, הייתה שונה ועל כן קשה להשוות בין תוצאותיהם.

אבל כיצד הוורואה עשויה "לדעת" שהגיע הזמן לנטוש את הספינה הטובעת? מהו האות לפיו הוורואה יכולה "להעריך" את רמת הנגיעות בכוורת? בניסיון להתחיל ולבדוק את סוגיה זו הועלתה ההשערה שהוורואה מסוגלת לחוש ברמת מחלות ופתוגנים גבוהה בכוורת, ובמבנה מבחני ההתנהגות כפי שנערכו בעבודה זו אות שכזה יכול היה להגיע באופן ישיר מהדבורה כפרט. גורם נוסף שמשתנה לאורך העונה והיה עשוי להשפיע על העדפת הפונדקאי של הוורואה הוא נוכחות גרגרי אבקה על גופה של הדבורה המשחרת. מכיוון שאבקת הפרחים מכילה ריחות, ובניסויי ההתנהגות בעבודה זו לא הוסרו צמידות האבקה מרגליהן של הדבורים המשחרות, אין לשלול את האפשרות שהייתה לכך השפעה. יחד עם זאת, בניסויים שנערכו באותו מועד נמצאה העדפת הפונדקאי של הוורואה הייתה שונה בין כוורת, כך שבהתחשב בכך שכל הכוורת עמדו באותו מיקום במשך השנתיים בהן נערכו הניסויים, האפשרות שהפריחה השתנתה לאורך העונות היא זו שהשפיעה על ההעדפה המשתנה של הוורואה, נראית פחות סבירה.

תוצאות עבודה זו מרמזות שהוורואה יכולה להבחין בין דבורה מגיחה עם סימפטומים של עיוות כנפיים ודבורה המגיחה ללא סימפטומים, ושלוורואה העדפה שאיננה מובהקת דווקא לדבורה עם סימפטומים. עוד נמצא שמיצוי הפרופיל הקוטיקולרי של דבורים מגיחות בעלות סימפטומים של עיוות כנפיים, שונה מזה של דבורים ללא סימפטומים. מקור ההבדל בין שתי הקבוצות הוא ביחס כמותי שונה בין הפחמימנים שמצויים במיצוי הקוטיקולה, ולא בהיעדר/נוכחות חומרים. שלושת החומרים העיקריים אשר על פי השונות בכמותם היחסית הופרדו שתי הקבוצות, הם הפחמימנים הרוויים Heneicosane, Octacosane ו- Nonacosane. ייתכן שאותו שינוי בפרופיל הקוטיקולרי של הדבורה, משמש את הוורואה בהבחנה בין פונדקאים במצב בריאותי שונה.

יש לציין שבפרופיל ההפרדה זהו מספר פרטים שלא הופרדו באופן ברור לשתי הקבוצות (דבורים סימפטומטיות ושאינן סימפטומטיות), על פי ניתוח PCA. הסבר אפשרי לכך הוא שכל הדבורים ששימשו להפקת המיצויים מקורם בכוורת נגועה

ברמות גבוהות של וורואה ובנוסף נראו בה דבורים עם סימפטומים ידועים של וירוסים נוספים (עיוות כנפיים – DWV, דבורים מבריקות ו/או מפרכסות – וירוסים מקבוצת השיטוק, תצפיות אישיות). מכאן שייתכן שרבות מן הדבורים ה"בריאות" לכאורה, היו למעשה דבורים נשאות של רמות שונות של וירוסים שונים, ואין לשלול גם את האפשרות שהן הוטפלו בוורואה במהלך התפתחותן.

ככלל, החומרים שזוהו בעבודה זו תואמים לחומרים שזוהו בעבודות דומות של מיצוי פרופיל קוטיקולרי של דבורי דבש (Del Piccolo *et al.* 2010; Kather *et al.* 2011). בספרות ניתן למצוא מחקרים ספורים שבחנו שינוי בפרופיל הקוטיקולרי של דבורי דבש בהשפעת גורם פתולוגי. בעבודה שנעשתה על ידי Salvy *et al.* (2000) נמצא שבקוטיקולה של דבורים שהוטפלו על ידי האקרית במהלך התפתחותן הייתה עלייה ביחס הפחמימנים, בעיקר פחמימנים שאינם רוויים ובעלי סיעוף של קבוצת מתיל. Richard *et al.* (2008) הראו שהזרקה של ליפו פולי-סוכרים ממקור חידקי לדבורים גרמה להפעלה של מערכת החיסון של הדבורה, ולוותה בשינוי בפרופיל הקוטיקולרי שלה. בכל אחת מהעבודות הללו זוהו שתי קבוצות פחמימנים אחרות שתרמו באופן מובהק לשונות בין שתי קבוצות הטיפול, מתוכם רק פחמימן אחד C21 (Heneicosane) תרם לשונות גם לפי תוצאות העבודה הנוכחית. Richard *et al.* (2008) מציינים שבכוורות נוספות נמצאו הבדלים ביחס הפחמימנים בין שתי הקבוצות, אלא שיחס הפחמימנים היה שונה בכוורות שונות. מכאן שהשינוי ביחס הפחמימנים בפרופיל הקוטיקולרי איננו קבוע ליחס מסויים או לחומרים ספציפיים, אלא אופייני כנראה לכוורת ספציפית. בעבודה הנוכחית נבדקה כוורת יחידה. כמו כן, הדבורים בניסוי היו נגועות לפחות בוירוס אחד (DWV), אך סביר שהיו נגועות בוירוסים נוספים (Soroker *et al.* 2011). כמו כן ידוע שדפוס השינוי של הפרופיל תלוי גם בגורמי סביבה נוספים, כגון לחות וטמפרטורה (Wagner *et al.* 2001). נוכל לומר אם כן, שהן בעבודות המוזכרות לעיל והן בעבודה הנוכחית שינוי פתולוגי (דבורים שהוטפלו במהלך התפתחותן, דבורים שמערכת החיסון שלהן הופעלה באופן מלאכותי ודבורים עם סימפטומים של מחלה) הוביל לשינוי פיסיוולוגי בפרופיל הקוטיקולה, היא "תעודת הזהות" של הדבורה. כיצד מתרחש שינוי זה? במהלך ההזנה של הוורואה מההמולימפה של הדבורה יש מעבר של רכיבים שונים (בעיקר חלבונים) בין שני האורגניזמים (Tewarson & Engels 1982); כמו כן ההטפלה על ידי הוורואה משנה באופן משמעותי את הרכב החלבונים בהמולימפה של הדבורה (Weinberg & Madel 1985). השפעת טפילות על גודל הפונדקאי ועל הרכב וכמות הפחמימנים נצפתה כבר בנמלים (Trabalon *et al.* 1999). הפחמימנים מיוצרים על ידי תאים מפרישים (oenocytes), המצויים מתחת לאפידרמיס ומובלים על ידי חלבונים גדולים (Lipophorins) אל הקוטיקולה. לחלבונים אלה תפקיד חיוני בהעברת הפחמימנים מאיזור איחסונם דרך ההמולימפה אל הקוטיקולה והטמעתה בה (Bagneres & Blomquist 2010). בנוסף, אנזימים מעורבים בתהליך יצירת הפחמימנים עצמו, ועל כן מחסור בחלבונים או שינוי בהרכבם עלול להשפיע על ייצור, הובלת והטמעת הפחמימנים בקוטיקולה של הדבורה. מחקר שיכול לתמוך בהשערה זו מצא ביטוי גנים שונה בדבורה בעקבות הטפלה בוורואה, כאשר חלק מהגנים מעורבים במטבוליזם של חלבונים (Navajas *et al.* 2008). Richard *et al.* (2008) הציעו שהשינוי בפחמימנים מקורו בהפעלה של מערכת החיסון משום שהם מצאו במקביל לשינוי בפחמימנים גם עלייה בביטוי גנים המעורבים במערכת החיסון של הדבורה. מצד שני, Yang & Cox-Foster (2005) הראו שהטפלה על ידי וורואה במהלך התפתחות הדבורה דווקא גורמת לדיכוי של מערכת החיסון, על כן סוגייה זו נשארת פתוחה. מה עשויה להיות המשמעות של אותו שינוי ב"תעודת הזהות" של הדבורה עבור חברותיה לכוורת ועבור הוורואה? השינוי בפרופיל הקוטיקולרי לווה בשינוי ביחסן של דבורים אחרות מאותה הכוורת, כלפי הדבורה ה"חולה", והפך לאגרסיבי יותר

(Richard *et al.* 2008). במחקר נוסף שנעשה בנמלים נמצא שנמלים שהוטפלו על ידי טפיל פנימי ועברו שינוי בהרכב הפחמימנים הקוטיקולריים הותקפו על ידי חברותיהן לקן (Trabalon *et al.* 1999). בהיבט זה שינוי בזהות הדבורה "חולה" יכול לשרת את אוכלוסיית הדבורים משום שזיהוי פרט נגוע הכרחי להתנהגות היגינית וסילוקן מהכוורת, והוא חלק ממערכת החיסון החברתית של הדבורים כאורגניזם-על (Evans & Spivak 2010). יחד עם זאת, אותו שינוי בזהות הדבורה עשוי לשרת גם את הוירוס ולתרום להפצתו בכוורת, על ידי משיכה של הווקטור אל הפונדקאי הנגוע. בצורה כזו וורואה שנמשכת אל דבורה הנגועה בוירוס, ניזונה ממנה ועל ידי כך רוכשת את הוירוס ועוזרת בהפצתו אל דבורים אחרות. באופן תיאורטי, ייתכן והוירוס מבצע מניפולציה על הפונדקאי שלו (הדבורה) על מנת למשוך אליו את הווקטור שלו (הוורואה). בספרות ניתן למצוא תיעוד של מספר מקרים באורגניזמים שונים בהם הטפיל מבצע מניפולציה על המאחסן שלו על מנת לתרום להפצתו (Adamo 2002). בנוסף, בניסויים שנערכו לא ידוע אם הוורואה עצמה הייתה נגועה אף היא בוירוסים ואת השפעה זו יש לבדוק בניסויים עתידיים.

חוסר העקביות בהעדפת הפונדקאי של הוורואה כפי שתואר בעבודה זו עומד לכאורה בניגוד לידוע בספרות (Rosenkranz *et al.* 2009). אבל כאשר בוחנים זאת לעומק מסתבר שרבים מניסויי הבחירה במחקרים קודמים נערכו בסיטואציה היותר נדירה בה הוורואה והדבורים היו מכוורות שונות (Pernal *et al.* 2005), או שלא צויין (Del Piccolo *et al.* 2010; Kraus 1994; Kraus 1990; Nazzi *et al.* 2009; Nazzi *et al.* 2001; Calderone & Lin 2001). בעבודה הנוכחית נבדקו 3 כוורות בהצלבה ונמצא שההעדפה של הוורואה הייתה בולטת ועקבית יותר כאשר הדבורים היו מכוורת אחת והוורואה מכוורת שנייה. בעבודה זו מוצעת היפותזה שעשויה לשפוך אור על תופעה זו, ועל פיה הכרת הפונדקאי של הוורואה מתבססת על מנגנון "היכרות עקיפה" (Indirect familiarization). על פי מנגנון זה המוכר בחוקרים חברתיים, הפרט מזהה פרטים הדומים לו ולסביבתו (Wyatt 2003). פרופיל הריח של הדבורה הוא "תעודת הזהות" שלה, והרכבו משמש את הדבורים בתקשורת כאורגניזם חברתי. פרופיל הריח מכיל בתוכו רכיבים המשותפים לדבורה ולחברותיה לכוורת ומשמש את הדבורים להבדיל האם פרט מסויים הוא מאותה כוורת או מכוורת זרה, Nestmate recognition (Dani *et al.* 2005). בו בזמן פרופיל הריח מכיל גם רכיבים המשותפים לדבורים בעלות אותו תפקיד, כגון מטפלות או משחרות, ומאפיין דבורים בעלות תפקיד דומה מכוורות שונות, Task group recognition (Kather *et al.* 2011). למעשה כל דבורה נושאת ב"תעודת הזהות" שלה את שני הרכיבים הללו: האחד שמעיד על כוורת המקור שלה והוא משותף לה ולחברותיה לכוורת; והשני שמעיד על תפקידה, והוא משותף לה ולדבורים בעלות אותו תפקיד מכוורות שונות. כאשר הוורואה פוגשת בשתי דבורים בעלות תפקידים שונים (משחרת ומטפלת) על פי המנגנון של היכרות עקיפה היא תעדיף את הפונדקאי הדומה לה בפרופיל הקוטיקולרי- הדבורה המטפלת. מכיוון שהדבורה נושאת את שני רכיבי הריח שדובר בהם קודם, יתכן והיכרות זו מתחדדת כאשר שתי הדבורים הן מכוורת זרה לזו של הוורואה, אז רכיב הריח של "התפקיד" בולט בהיכרותו, נוכח חוסר ההיכרות עם "רכיב כוורת". לעומת זאת, כאשר הוורואה והדבורים מאותה כוורת "רכיב הכוורת" המשותף לוורואה ולשתי הדבורים עשוי למסך על ההבדלים הקיימים ב"רכיב התפקיד" שבין הדבורה משחרת והמטפלת. השערה זו עשויה להסביר את תוצאות עבודה זו, לפיהן העדפת הוורואה לדבורה מטפלת הייתה בולטת ועקבית יותר כאשר הדבורים היו מכוורת אחת והוורואה מכוורת זרה, אולם דרוש מחקר נוסף לבחינת השערה זו. התייחסות יחידה בספרות לחוסר עקביות בהעדפת הפונדקאי של הוורואה נמצאה בעבודתו של Kraus (1993). החוקר ערך מבחני התנהגות בדומה לאלה שנערכו בעבודה זו ומצא שהעדפתה של הוורואה תלויה בפונדקאי עליו שהתה לפני הניסוי. וורואה שהוחזקה על

דבורה מטפלת או מגיחה לפני הניסוי העדיפה דבורה מטפלת, ואילו וורואה שהוחזקה על דבורה משחרת לא העדיפה אחד משני הפונדקאים. Kraus (1993) העלה השערה שהעדפה זו נובעת מנוכחות של הורמון הנעורים JH3 המצוי בכמות גדולה יותר בדבורה המשחרת והוצע בעבר שהוא משפיע על התנהגות הוורואה (Hanel & Koeniger 1986), אולם השערה זו הופרכה מאוחר יותר (Rosenkranz *et al.* 1993; Garrido & Rosenkranz 2004). לעומת זאת, ההיפותזה המוצעת בעבודה הנוכחית עשויה להסביר את ממצאי העבודה כמו גם את ממצאיו של Kraus (1993). בעבודתו של Kraus (1993) הדבורים עליהן שהו הוורואה לפני תחילת הניסוי והדבורים והוורואה בניסוי עצמו היו מאותה כוורת. בשל כך רכיב זהות הכוורת בניסוי נטרל. על פי מנגנון ההיכרות העקיפה המוצע בעבודה זו, מכיוון שהוורואה מצויה רוב הזמן על דבורה מטפלת העדפתה המקורית היא לדבורים מקבוצה זו. השהות הממושכת של הוורואה על דבורה מגיחה לא אמור להשפיע על ההעדפה של הוורואה, משום שהדבורה המגיחה היא בעלת מעין פרופיל קוטיקולרי "שקוף" (Karter *et al.* 2011). על כן העדפתה של הוורואה בניסוי הבחירה שלאחר מכן נותרה דבורה מטפלת. השהות על דבורה מטפלת לפני ניסויי הבחירה השרתה את הכרת והעדפת ריח המטפלת, שהיה גם כך, ואילו השהייה על דבורה משחרת לפני הניסוי השרתה את העדפת ריח המשחרת וערערה את הכרת ריח הדבורה המטפלת. כך שבניסוי ההתנהגות הוורואה "התבלבלה" ולא העדיפה אחד משני הפונדקאים. (Martin *et al.* 2001) הראו שהוורואה משנה את הפרופיל הקוטיקולרי שלה בהתאם להתפתחות הדבורה אותה היא מטפלה. החוקרים העלו את ההשערה שחיקוי זה מקנה לה הסוואה והגנה מפני הדבורים בכוורת, כפי שתועד בצירעה הטפילה בקיני נמלים (*Polistes atrimandibularis* Bagnères *et al.* 1996). את התמריץ האבולוציוני להופעת (או לאי היעלמות) מאפיין זה ניתן להסביר באמצעות יתרון ההסוואה, מכיוון שהוורואה שוהה רוב חייה על דבורים מטפלות בסביבת תאי הוולד. אולם שימור אותו מאפיין אפשרי הודות ליתרון חיוני נוסף שהוא מקנה לאקריות אשר מזוהות ומעדיפות דבורה מטפלת, משום שהן מגיעות באמצעותן אל תאי הוולד בהן הן מתרבות.

ניסויי ההתנהגות שפותחו בשלב הראשון של העבודה שימשו לבדיקת השפעת החומרים המשבשים הפוטנציאליים על התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה. השפעתם נבדקה לאורך מספר שעות לעומת הביקורת בהתייחסות לשני פרמטרים: אחוז הגעה לפונדקאי מתוך סך הוורואה החיוניות והעדפת הפונדקאי של הוורואה (דבורה משחרת או מטפלת). שלושת החומרים המשבשים הפוטנציאליים שנבדקו בעבודה זו לא השפיעו על אחוז הוורואה שהגיעו לפונדקאי בתום הניסוי. יחד עם זאת נמצא שנוכחותם של שני חומרים השפיעה על העדפת הפונדקאי של הוורואה. נוכחות חומר HCO 2169 בשני הריכוזים שנבדקו ($100, 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) והן נוכחות חומר 3C(1,3) בריכוז $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ הורידה את אחוז הוורואה שבחרו בדבורה מטפלת על פני משחרת לעומת הביקורת. בניגוד להשפעת שני החומרים הראשונים, נוכחות חומר 3C(1,3) בריכוז $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ לא השפיעה על העדפת הפונדקאי של הוורואה. בנוסף נמצא כי לפחות השפעת חומר HCO 2169 הינה מוגבלת בזמן. ניתן לשער כי התפוגגות השפעת חומר זה לאחר 180 דקות התרחשה בשל התנדפות החומר והגעה לריכוז שהינו נמוך מהריכוז האפקטיבי לשיבוש. עוד נמצא כי חומר HCO 2169 בריכוז גבוה פי 10 "חיזק" את השפעת החומר, כפי שנצפתה בריכוז הנמוך יותר. יחד עם זאת, על מנת לטעון כי מדובר בהשפעה תלויית ריכוז יש לערוך את הניסויים במקביל, ובמספר ריכוזים עוקבים.

מכיוון שנמצא שהעדפת הפונדקאי של הוורואה כפי שנבדקה במערכת ניסוי זו איננה עקבית ותלויה לפחות בשני הגורמים שנבדקו בעבודה זו (מועד והקשר), היה הכרח לבדוק את השפעת גורמים אלה על החומרים המשבשים הפוטנציאליים. נמצא

שבנוכחות כל החומרים שנבדקו לא הייתה העדפה לאחד משני הפונדקאים, זאת מבלי להתחשב במועד בו נערכו מבחני ההתנהגות וזהות כוורת הדבורים והוורואה. יחד עם זאת, בחלק מהמועדים בוצעו מספר מועט של חזרות ועל כן קשה להסיק מתוך התוצאות על השפעת האינטראקציה שבין שני הגורמים על העדפת הפונדקאי של הוורואה, ועל מנת לקבל תמונה ברורה יותר של השפעה זו רצוי לערוך ניסויים נוספים. חשוב לציין שכאשר הוורואה והדבורים היו מאותה כוורת, נוכחות שני החומרים השפיעה באופן מובהק על העדפת הפונדקאי של הוורואה לעומת הביקורת, וזהו למעשה המקרה הרלוונטי משום שזהו המצב הנפוץ בו הוורואה עשויה לפגוש בדבורים באופן טבעי בכוורת. תוצאות הניסוי מציעות כי נוכחות החומרים השפיעה על יכולת ההבחנה של הוורואה בין משחרת ומטפלת, דבר המרמז על היותם חומרים בעלי פוטנציאל לשיבוש התנהגות הוורואה.

יחסי קואבולוציה בין טפיל ופונדקאי חיוניים לשרידות שני האורגניזמים גם יחד. הפונדקאי מפתח מנגנוני הגנה אשר מעכבים עלייה בלתי מרוסנת של אוכלוסיית הטפיל, ואילו הטפיל מצד שני מפתח אסטרטגיות להתמודדות או התחמקות ממנגנונים אלה. תוך היזון מתמיד מתפתחת מערכת עדינה של שיווי משקל בין הפרטים ובסופו של דבר בין האוכלוסיות, אשר בלעדיה אחד מהפרטים או שניהם- יכחדו (Price 1975). מצד הטפיל, התוצר של הקואבולוציה הוא בהתמחות הולכת וגוברת. המכשולים הרווחים בהם נתקלים טפילים מקבוצות טקסונומיות שונות נפתרים שוב ושוב באמצעות אסטרטגיות דומות. תופעה זו, שהיא דוגמא לאבולוציה מתכנסת (Convergent evolution), מערבת בין השאר את התנהגות איתור ובחירת פונדקאי, מערכת הרבייה של הטפיל והגנה על צאצאים (Price 1975; Anderson & May 1982). קואבולוציה כזו התפתחה בין האקרית הטפילה *V. destructor* ודבורת הדבש האסייתית *A. cerana* כאשר בין האוכלוסיות יחסים של שיווי משקל המאפשרים קיום רמות בלתי הרסניות של וורואה במקביל להתפתחות תקינה של אוכלוסיית הדבורים בכוורת לאורך זמן (Rosenkranz et al. 2009). מעבר הוורואה אל מחוץ לאיזור הגיאוגרפי המקורי שלה (דרום- מזרח אסיה) הפגיש אותה עם המין *A. mellifera* הוא הדבורה האירופית ולה תכונות רבות הדומות לפונדקאי המקורי שאיפשרו את ההטפלה המוצלחת. אולם, הדבורה האירופית חסרה את אותן תכונות ספציפיות שנרכשו במשך מיליוני שנים של קואבולוציה עם הדבורה האסייתית. יתרה מזאת, הדבורה האירופית טופחה במשך אלפי שנים לתכונות אחרות בעלות ערך מסחרי כגון יכול דבש גבוה, נטייה נמוכה להתנחלות ומזג נוח (Carreck 2011). התוצאה היא היעדר אותו שיווי משקל בין האוכלוסיות שמוביל כאמור להדרדרות אוכלוסיית הדבורים עד לקריסת הכוורת. במשקי דבורים רבים בעולם, עם הופעת הוורואה ועד השנים האחרונות אוזנו יחסי הכוחות בין השאר באמצעות חומרי הדברה "קשים" (זרחנים אורגניים ופירותרואידים), אלא שתוך מספר שנים הופיעו עדויות להיווצרות עמידות כנגד כל תכשיר הדברה "קשה" שיצא אל השוק, כאשר בנוסף החומרים נספחים אל מוצרי הכוורת ופוגעים בדבורים עצמן (Rosenkranz et al. 2009). כך שהיום אנו שוב עומדים אל מול מצב של חוסר שיווי משקל ביחסי הטפיל-פונדקאי. פניה של ענף הדבוראות היום, לאור נסיונות העבר, היא לעבר אסטרטגיית הדברה משולבת המאפשרת קיום בר קיימא של שתי האוכלוסיות בכוורת במקביל. השגת שיווי המשקל הרצוי תיתכן באמצעות "זירוז" הקואבולוציה הטבעית (על ידי טיפוח דבורים סבילות לוורואה), במקביל לפעולות של התערבות חיצונית נקודתית. התערבות חיצונית נקודתית יכולה להיעשות הן לחיזוק הדבורה (האכלה בתוספי אבקה וסוכר, נטיעות צופניות וכדומה) והן להחלשת הוורואה. השיטה שמציעה עבודה זו היא התערבות נקודתית לרעת הוורואה תוך ניצול הידע אודות מחזור החיים של הוורואה, התנהגות איתור הפונדקאי שלה ואותות המשמשים אותה בבחירת הפונדקאי המתאים. בנוכחות שני החומרים שנמצאו בעבודה זו הוורואה עשתה בחירה הפוכה מן הבחירה שנעשתה

בביקורת. על פי הידוע אודות מחזור החיים של הוורואה ניתן לשער כי יכולת ההבחנה של הוורואה בין פונדקאים והיצמדות מהירה לפונדקאי ה"מתאים" (בהתאם לגורמים השונים שהוזכרו), חיונית לשרידותה והתרבותה בכוורת. כל שיבוש של התמצאות הוורואה בכוורת הינו פתח להפרת הסינכרון העדין שבין הטפיל והפונדקאי ולהטיית כפות המאזניים לטובת הדבורה.

לסיכום, מטרת עבודה זו הייתה פיתוח שיטה לאיתור ובדיקת חומרים המשבשים את חישת הפונדקאי על ידי אקרית הוורואה. לשם כך תואר מבנה אברי החישה של הוורואה, ופותחה שיטה לבדיקת תגובה אלקטרו-פיסיולוגית של איבר החישה לאותות כימיים. בהמשך נלמדה התנהגות איתור הפונדקאי של הוורואה במבחני התנהגות, ופותח מבחן התנהגות המאפשר את בדיקת החומרים משבשי החישה הפוטנציאלים. נמצאו שני חומרים ששיבשו את העדפת הפונדקאי של הוורואה לעומת הביקורת והם בעלי פוטנציאל לשימוש בהדברה של הוורואה בשילוב עם שיטות הדברה נוספות (כגון חומרי הדברה "רכים"). השיטה לרישום תגובה אלקטרו-פיסיולוגית תאפשר בעתיד את בדיקת קיומם ותפקודם של קולטנים לאותות כימיים נוספים, כמו גם לחקירת איבר החישה ומנגנון קליטת האותות. בהמשך כדאי לבדוק את מידת הספציפיות של התגובה אל נדיפי דבורה שלמה באמצעות בדיקת תגובה תלויית מנה (Dose response). כמו כן מעניין לבחון את השפעת החומרים המשבשים שנמצאו בעבודה זו, על התגובה האלקטרו-פיסיולוגית של הוורואה ועל ידי כך לנסות ולברר את מנגנון פעולתם. בעבודה זו נמצא כי העדפת הפונדקאי של הוורואה בין דבורה מטפלת ומשחרת (כפי שנבדק במערכת הניסוי הזו), איננה קבועה אלא תלויה בין השאר בזהות כוורת הוורואה והדבורים, ובמועד בו נערך הניסוי. אולם השונות בתוצאות העבודה מרמזת שישנם גורמים נוספים שעוד לא נחשפו, ולמעשה אנו עומדים רק בתחילתו של תהליך התרת פקעת סבוכה זו. העבודה פתחה פתח לשאלות רבות נוספות בנוגע לגורמים המשפיעים על העדפת הפונדקאי של הוורואה, למשל נוכחות וירוסים בוורואה (כגון IAPV, DWV, VDV), ומצב הרעב של הוורואה. כמו כן כדאי יהיה לבדוק בניסויים עתידיים את העדפת הוורואה בין דבורים "חולות" ו"בריאות" שהודבקו בוירוסים ספציפיים. כמו כן מעניין יהיה לברר את מנגנון הכרת והעדפת הפונדקאי של הוורואה שהוצע בעבודה זו, על ידי השוואה בין הפרופיל הקוטיקולרי של וורואה ודבורים (משחרות ומטפלות) מכוורות שונות, ולבדוק האם וורואה ששווה על גבי דבורה משחרת/מטפלת למשך זמן משנה את הפרופיל הקוטיקולרי שלה.

אפרת ח, סלוצקי י, דג א וקצב ת, גידול דבורים, מתוך הלכה ומעשה בגידול בעלי חיים במשק ההקלאי כרך ג', עמודים: 293-294, בעריכת גוטויין א, הוצאת מערכת קיבוץ דליה, ישראל (2005).

- Adamo SA, Modulating the modulators: parasites, neuromodulators and host behavioural change, *Brain, Behaviour and Evolution* 60: 370–377 (2002).
- Allsopp MH, de Lange WJ & Veldtman R, Valuing insect pollination services with cost of replacement, *PLoS ONE* 3:e3128 (2008).
- Anderson RM & May RM, Coevolution of hosts and parasites, *Parasitology* 85: 411-426 (1982).
- Axtell RC, Foelix R, Coons LB & Roshday MA, Sensory receptors in ticks and mites. *In Proceedings of the 3rd International Congress of Acarology*, held in Prague (Czechoslovakia), 35-40 (1971).
- Bagne`res AG, Lorenzi MC, Dusticier G, Turillazzi S & Cle`ment JL, Chemical usurpation of a nest by paper wasp parasites, *Science* 272: 889–892 (1996).
- Bagneres AG & Blomquist GJ, Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons, *in Insect Hydrocarbons, Biology, Biochemistry and Chemical ecology*, Ed. Blomquist GJ & Bagneres AG, *Cambridge University Press*, New York, USA (2010).
- Beetsma J, Boot WJ & Calis JNM, Invasion behaviour of *Varroa jacobsoni* (Oud.): from bees into brood cells, *Apidologie* 30: 125–140 (1999).
- Berthoud H, Imdorf A, Haueter M, Radloff, S & Neumann P, Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*), *Journal of Apicultural Research* 49: 60-65 (2010).
- Bjostad LB, Electrophysiological methods, *in Methods in chemical ecology, chemical methods*, Ed. Millar JG & Haynes KF, *Kluwer academic publishers*, Boston/Dordrecht/London pp. 339-369 (2000).
- Blomquist GJ, Structure and analysis of insect hydrocarbons, *in Insect Hydrocarbons, Biology, Biochemistry and Chemical ecology*, Ed. Blomquist GJ & Bagneres AG, *Cambridge University Press*, New York, USA (2010).
- Blum MS, Honey bee pheromones, In: Graham JM (Ed.), *The hive and honey bee*, Dadant, Sons, Hamilton, USA, pp. 241–250 (2008).
- Boot WJ, Methyl Palmitate does not elicit invasion of Honeybee brood cell by *Varroa* mite, *Experimental & Applied Acarology* 18: 587-592 (1994).
- Boot WJ, Driessen RG, Calis JNM & Beetsma J, Further observations on the correlation between attractiveness of honey bee brood cells to *Varroa jacobsoni* and the distance from larva to cell rim, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 76: 223–232 (1995).
- Calderone NW, Evaluation of Mite-Away-II (TM) for fall control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern USA, *Experimental & Applied Acarology*: 50: 123-132 (2010).
- Calderone NW & Lin S, Behavioural responses of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Physiological Entomology* 26: 341-350 (2001).

- Calderone NW & Kuenen LPS, Differential tending of worker and drone larvae of the honey bee, *Apis mellifera*, during the 60 hours prior to cell capping, *Apidologie* 34: 543–552 (2003).
- Calatayud F & Verdú MJ Survival of the mite *Varroa jacobsoni* Oud (Mesostigmata: Varroidae) in broodless colonies of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), *Experimental & Applied Acarology* 18: 603-612 (1994).
- Carreck NL, Breeding honey bees for Varroa tolerance pp 63-70, in *Varroa, Still a problem in the 21st century?* By Carreck NL Ed, The International Bee Research Association (2011).
- Chandler D, Prince G & Pell JK, Biological control of Varroa pp. 53-62, in *Varroa, Still a problem in the 21st century?* By Carreck NL Ed, The International Bee Research Association (2011).
- Chen YP & Siede R, Honey bee viruses, *Advances in Virus Research* 70: 33-80 (2007).
- Dani FR, Jones GR, Corsi S, Beard R, Pradella D & Turillazzi S, Nestmate recognition cues in the honey bee: Differential importance of cuticular alkanes and alkenes, *Chemical Senses* 30: 477–489 (2005).
- Del piccolo F, Nazzi F, Della Vaedova G & Milani N, Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons, *Parasitology* 137: 967-73 (2010).
- De Miranda JR, Chen Y, Ribiere M & Gauthier L, Varroa and viruses, in *Varroa, Still a problem in the 21st century?* pp. 11-32, By Carreck NL Ed, The International Bee Research Association (2011).
- Dillier FX, Fluri P & Guerin P, Die Varroamilbe riecht mit den Beinen, *Schweizerische Bienen-Zeitung* 124: 28-31 (2001).
- Dillier FX, Fluri P & Imdorf A, Review of the orientation behaviour in the bee parasitic mite *Varroa destructor*: sensory equipment and cell invasion behavior, *Revue suisse de zoologie* 113: 857–877 (2006).
- Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani Jr HF, Evans JD & Chen Y, *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*, *Journal of general virology* 92: 151-155 (2011).
- Donze G & PM Guerin Time-Activity Budgets and Space Structuring by the Different Life Stages of *Varroa jacobsoni* in Capped Brood of the Honey Bee, *Apis mellifera*, *Journal of Insect Behavior* 10: 371-393 (1997).
- Donzé G, Schnyder-Candrian S, Bogdanov S, Diehl PA, Guerin PM, Kilchenman V & Monachon F, Aliphatic alcohols and aldehydes of the honey bee cocoon induce arrestment behavior in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of *Apis mellifera*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 37: 129–145 (1998).
- Duay P, de Jong D & Engels W, Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development, *Genetics and Molecular Research* 1: 227–232 (2002).
- Evans JD, Spivak M, Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 62–72 (2010).
- Floris I, Satta A, Cabras P, Garau VL & Angioni A, Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues, *Journal of Economical Entomology* 97: 187–191 (2004).
- French AS & Torkkeli PH, Mechanoreceptors, in *Encyclopedia of Insects*, pp. 689-690, Ed Resh VH & Carde RT, *Academic press Elsevier* (2003).
- Garrido C & Rosenkranz P, Volatiles of the honey bee larva initiate oogenesis in the parasitic mite *Varroa destructor*, *Chemoecology* 14: 193–197 (2004).

- Ghazoul J, Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis, *Trends in Ecology & Evolution* 20:367–373 (2005).
- Gisdler S, Aumeier P & Genersch E, Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*), *Journal of general virology* 90: 463–467 (2009).
- Gong Y & Plettner E, Effects of Aromatic Compounds on Antennal Responses and on the Pheromone-Binding Proteins of the Gypsy Moth (*Lymantria dispar*), *Chemical senses* 36(3):291–300 (2011).
- Goodwin RM, Taylor MA, McBrydie & Cox HM, Drift of *Varroa destructor* –infested worker honey bees to neighboring colonies, *Journal of apicultural research* 45: 155–156 (2006)
- Hadley NF & Schultz TD, Water-loss in 3 species of tiger beetles (*Cicindela*)—Correlations with epicuticular hydrocarbons, *Journal of Insect Physiology* 33: 677–682 (1987).
- Hallberg E & Hansson B, Arthropod Sensilla: Morphology and Phylogenetic Considerations, *Microscopy Research and Technique* 47:428–439 (1999).
- Hanel, H & Koeniger N, Possible regulation of the reproduction of the honey bee mite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Acari) by a host's hormone: juvenile hormone III, *Journal of Insect Physiology* 32: 791–798 (1986).
- Harizanis PC, Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*, *Apidologie* 22: 533–538 (1991).
- Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LCM, Noel LMLJ, Hall MJ, Martin SJ, Stephen J & Schroeder DC, Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses, *Applied and environmental microbiology* 75: 7212–7220 (2009).
- Hoppe H & Ritter W, The influence of Nasonov pheromone on the recognition of house bees and foragers by *Varroa Jacobson*, *Apidologie* 19: 165–172 (1988).
- Jolliffe IT, Principal Component Analysis, second edition, New York: Springer-Verlag New York, Inc. (2002).
- Jurenka RA, Schal C, Burns E, Chase J & Blomquist GJ, Structural correlation between cuticular hydrocarbons and female contact sex pheromone of German cockroach *Blattella germanica* (L.), *Journal of Chemical Ecology* 15: 939–949 (1989).
- Kather R, Drijfhout FP & Martin SJ, Task Group Differences in Cuticular Lipids in the Honey Bee *Apis mellifera*, *Journal of Chemical Ecology* 37:205–212 (2011).
- Kleespies RG, Radtke J & Bienefeld K, Virus-like Particles Found in the Ectoparasitic Bee Mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 87–90 (2000).
- Kuenen LPS & Calderone NW, Transfers of Varroa mites from newly emerged bees: preferences for age- and function-specific adult bees, *Journal of Insect Behaviour* 10: 213–228 (1997).
- Kuenen LPS & Calderone NW, Positive anemotaxis by Varroa mites: responses to bee odour plumes and single clean-air puffs, *Physiological Entomology* 23: 255–264 (1998).
- Kuenen LPS & Calderone NW, Varroa mite infestations in elevated honey bee brood cells: effects of context and caste, *Journal of Insect Behaviour* 13: 201–215 (2000).
- Kralj J & Fuchs S, Parasitic Varroa destructor mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers, *Apidologie* 37: 577– 587 (2006).

- Kralj J, Brockmann A, Fuchs S & Tautz J, The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L., *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 193: 363–370 (2007).
- Krieger J & Breer H, Transduction mechanisms of olfactory sensory neurons, in *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*, pp. 593–608, Ed. Blomquist GJ & Richard GV, *Elsevier*, London (2003)
- Klompen JSH & Oliver JH, Haller's organ in the tick family Argasidae (Acari: Parasitiformes: Ixodida), *Journal of Parasitology* 79(4): 591–603 (1993).
- Kraus B, Effects of honey-bee alarm pheromone compounds on the behaviour of *Varroa jacobsoni*, *Apidologie* 21: 127–134 (1990).
- Kraus B, Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees *Apis mellifera* L. of different ages. *Journal of Apicultural Research*, 32: 57–64 (1993).
- Le Conte Y & Arnold G, Implied sensory signals in the honeybee-Varroa relationships, *European research on Varroa control, Proceedings of a Meeting* (1986).
- Le Conte, Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chappe B & Ourisson G, Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters, *Science* 245: 638–639 (1989).
- Le Conte, Y, Arnold G, Trouiller J & Masson C, Identification of a brood pheromone in honeybees, *Naturwissenschaften* 77: 334–336 (1990).
- Le Conte Y, Sreng L & Trouiller J, The recognition of larvae by worker honeybees, *Naturwissenschaften* 81: 462–465 (1994).
- Martin SJ, Biology and life history of *Varroa* mites, In: Delaplane KS & Webster T (Eds.), *Mites of the Honey Bee*. Dadant, Sons, Hamilton, USA, pp. 131–148 (2001).
- Martin SJ & Kemp D, Average number of reproductive cycles performed by *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *Journal of Apicultural Research* 36: 113–123 (1997).
- Martin C, Salvy M, Provost ÉM, Bagnères AG, Roux M, Crauser D, Clement JL & Le Conte Y, Variations in chemical mimicry by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* according to the developmental stage of the host honey bee *Apis mellifera*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 365–379 (2001).
- Milani N, The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides, *Apidologie* 30: 229–234 (1999).
- Milani N & Nannelli R, The tarsal sense organ in *Varroa jacobsoni* Oud.: SEM observations. In: *Proceedings of a Meeting of EC-Experts' Group*, Udine, Italy, 71–82 (1988).
- Navajas M, Migeon A, Alaux C, Martin-Magniette ML, Robinson GE, Evans JD, Cros-Arteil S, Crauser D & Le Conte Y, Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection, *BMC Genomics* 9: 1471–2164 (2008).
- Nazzi F, Bortolomeazzi R, Della Vedova G, Del Piccolo F, Annoscia D & Milani N, Octanoic acid confers to royal jelly varroa-repellent properties, *Naturwissenschaften* 96:309–314 (2009).
- Nazzi F, Milani N & della Vedova G, A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells, *Apidologie* 35: 403–410 (2004).
- Neumann P, Morits RFA & Mautz D, Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honeybees (*Apis mellifera* L) at a performance testing apiary, *Apidologie* 31: 67–79 (2000)

- Oldroyd BP, Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees, *Trends in Ecology & Evolution* 14: 312-315 (1999).
- Pätzold S & Ritter W, Studies on the behaviour of the honey-bee mite *Varroa jacobsoni* O., in a temperature gradient, *Journal of Applied Entomology*, 107, 46–51 (1989).
- Peng CYS, Fang YZ, Xu SY & Ge LS, The resistance mechanism of the Asian honey bee *Apis cerana* Fabr. to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oud- emans, *journal of invertebrate pathology*, 49:54–60 (1987).
- Pernal SF, Baird DS, Birmingham AL, Higo HA, Slessor KN & Winston ML, Semiochemicals influencing the host-finding behavior of *Varroa destructor*, *Experimental and Applied Acarology* 37:1–26 (2005) .
- Plettner E, the peripheral pheromone olfactory system in insect: targets for species-selective insect control agents, inhibition of pheromone olfaction pp 497-501, in *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*, Ed. Blomquist GJ & Vogt RG, *Elsevier*, London (2003)
- Price PW, Evolutionary strategies of parasitic insects and mites, New York, *Plenum Press* (1975).
- Rickli M, Palmitic Acid Released from Honeybee Worker Larvae Attracts the Parasitic Mite *Varroa jacobsoni* on a Servosphere, *Naturwissenschaften* 79: 320- 322 (1992).
- Rosenkranz P, Tewarson NC, Rachinsky A, Strambi A, Strambi C & Engels W, Juvenile hormone titer and reproduction of *Varroa jacobsoni* in capped brood stages of *Apis cerana indica* in comparison to *Apis mellifera ligustica*, *Apidologie* 24: 375–382 (1993).
- Rosenkranz P, Aumeier P & Ziegelmann B, Biology and control of *Varroa destructor*, *journal of invertebrate pathology*, 103: 96-119 (2009).
- Ryan MF, Electrophysiology of chemoreception, in *Insect chemoreception: fundamental and applied* pp. 140-171 *Kluwer academic publishers*, Dordrecht (2002).
- Sakofski F, Koeniger N & Fuchs S, Seasonality of honey-bee colony invasion by *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 21: 547–550 (1990).
- Salvy M, Martin C, Bagnères AG, Provost E, Roux M, Le Conte Y & Clement JL, Modifications of the cuticular hydrocarbon profile of *Apis mellifera* worker bees in the presence of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in brood cells, *Parasitology* 122: 145-159 (2001).
- Sammataro D, Untalan P, Guerrero F & Finley J, The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase, *International Journal of Acarology* 31: 67–74 (2005).
- Schmitt T, Herzner G, Weckerle B, Schreier P & Strohm E, Volatiles of foraging honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and their potential roles as semiochemicals, *Apidologie* 38: 164–170 (2007).
- Shaw KE, Davidson G, Clark SJ, Ball BV, Pell JK, Chandler D & Sunderland KD, Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*, *Journal of biological control*. 24: 266–276 (2002).
- Sokal RR & Rohlf FJ, *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, second edition. W. H. Freeman and Co.: New York (1980).
- Sonenshine DE, *Biology of Ticks* pp. 30-40, *Oxford University Press*, England (1993).

- Soroker V, Hetzroni A, Yakobson, B, David D, David, A, Voet H, Slabezki Y, Efrat H, Levski S, Kamer Y, Klinberg E, Zioni N, Inbar S & Chejanovsky N, Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests, *Apidologie* 42: 192-199 (2011).
- Steffan-Dewenter I, Potts SG & Packer L, Pollinator diversity and crop pollination services are at risk, *Trends Ecol Evol* 20:651–652 (2005).
- Trhlin M & Rajchard J, Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.): a review *Veterinarni Medicina* 56: 265-273 (2011).
- Trabalon M, Plateaux L, Peru L, Bagneres AG & Hartmann N, Modification of morphological characters and cuticular compounds in worker ants *Leptothorax nylanderi* induced by endoparasites *Anomotaenia brevis*, *Journal of Insect Physiology* 46: 169-178 (2000).
- Trouiller J, Arnold G, Le Conte Y, Masson C & Chappe B, Temporal pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees, *Naturwissenschaften* 78: 368–370 (1991).
- Tewarson NC & Engels W, Undigested uptake of non-host proteins by *Varroa jacobsoni*, *Journal of Apicultural Research* 21: 222-225 (1982).
- Van Engelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood, RM, Tarry DR & Pettis J, Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study, *Plos One* 4: 1-16 (2009).
- Van Engelsdorp D & Meixner MD, A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them, *Journal of invertebrate pathology* 103: 80-95 (2010).
- Van Wijk M, Wadman WJ & Sabelis MW, Morphology of the olfactory system in the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*, *Experimental and Applied Acarology* 40: 217–229 (2006).
- Wagner D, Tissot M & Gordon D, Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Journal of Chemical Ecology* 27: 1805–1819 (2001).
- Weinberg KP & Madel G, The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. on the protein concentration and the haemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honey bee *Apis mellifera* L., *Apidologie* 16: 421-436 (1985).
- Wilde J, Fuchs S, Bratkowski J & Siuda M, Distribution of *Varroa destructor* between swarms and colonies, *Journal of Apicultural Research* 44 (4): 190–194 (2005).
- Wyatt TD, Pheromones and social organization, in *Pheromones and animal behavior, communication by smell and taste*, pp. 102-128, *Cambridge University Press*, UK (2003).
- Yang X & Cox-Foster DL, Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification, *PNAS* 102: 7470–7475 (2005).
- Yang X & Cox-Foster D, Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge, *Parasitology* 134: 405–412 (2007).
- Zhang Q, Ongus JR, Boot WJ, Calis J, Bonmatin JM, Bengsch E & Peters D, Detection and localisation of picorna-like virus particles in tissues of *Varroa destructor*, an ectoparasite of the honey bee, *Apis mellifera*, *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 97–105 (2007)
- Ziegelmann B, Steidle H, Lindenmayer A & Rosenkranz P, Sex pheromones trigger the mating behaviour of *Varroa destructor*, *Apidologie* 39:598 (2008).

Zioni N, Soroker V & Chejanovsky N, Replication of *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee, *Virology* 417: 106-112 (2011).

נספחים.

נספח 1. החומרים שזוהו במיצויי הקוטיקולה של דבורה משחרת ומטפלת, וכמותם היחסית באחוזים.

Compound	Forager	Nurse
Alkanes		
Heptadecane	0.00	0.00
Nonadecane	1.14	0.00
Heneicosane	1.19	0.25
Docosane	0.25	0.00
Tricosane	14.95	2.66
Tetracosane	0.81	0.12
Pentacosane	20.44	4.59
Hexacosane	0.91	0.40
Heptacosane	19.02	11.42
Octocosane	0.33	0.55
Nonacosane	8.10	11.91
Tritriacosane	0.00	0.47
Hentriacosane	4.37	12.30
Alkenes		
Tricosene	2.02	0.21
Pentacosene	5.11	0.73
Heptacosene	2.21	0.50
Nonacosene	1.79	1.69
Hentriacontene	2.59	7.32
Tritriacontene	8.34	22.72
Pentatriacontene	0.00	0.38
Methylalkanes		
11+13 Methylpentacosane	0.49	0.49
11+13 Methylheptacosane	0.73	2.22
11+12+15 Methylnonacosane	0.43	1.71
13+15+17 Methylhentriacont	0.00	1.30

Learning and disrupting the chemical communication of *Varroa*
 destructor Anderson and Trueman

M.Sc. Thesis submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and
Environment of the Hebrew University of Jerusalem for The Degree of 'Master in
Agricultural Sciences'

By
Nurit Eliash

Summary

Varroa destructor Anderson & Trueman (Acari: Varroidae) is an ectoparasitic mite of honey bees, originally found in the Eastern honey bee *Apis cerana*. A shift to the European honey bee *Apis mellifera*, which lacks the characteristics of its original host, has led to an unbalanced host-parasite relationship and to devastating damage to the hive. Today, the Varroa has spread almost all over the world and is considered to be the most significant threats to apiculture, and one of the causes of the Colony Collapse Disorder syndrome. The mite first appeared in Israel in 1984 and has been the main threat to apiculture, requiring regular treatments against the mite.

The mite is harmful in many ways. It feeds upon the hemolymph of the bee, leading to a reduced weight and life span of the emerging adult bee. In addition it causes neurological damage that result in reduction in flight ability and non-associative learning and increases the bee's sensitivity to pathogens. Still, the main damage that eventually leads to the collapse of the hive is probably due to the viruses that are transmitted by the Varroa. The presence of the mite in the hive necessitates treatment. Chemical pesticides currently in use (e.g., Organophosphorus and Pyrethroid based) are absorbed by the hive products, damage the bees and have the tendency of evoking resistance in the Varroa population thereby losing their effectiveness. Other means of control such as "soft" pesticides, tolerant bee population, agrotechnical and biological control have not yet been found effective enough. Therefore, it is of crucial importance to find alternative selective methods to cope with the mite.

The Varroa life cycle is well synchronized with that of the honey bee, and can be generally divided into two main phases: a phoretic phase in which the Varroa is parasitizing an adult bee, and a reproductive phase in which the Varroa is reproducing within the sealed brood cell. Between these phases there are states in which the Varroa moves freely on the surface of the comb. The entrance of the fertilized Varroa female into the brood cell is synchronized with the developmental stage of the larvae, and occurs just before the cell is sealed. The mite then lays eggs at fixed intervals and the siblings mate within the sealed cell. The Varroa and its offspring feeds upon the hemolymph of the developing bee and when the adult bee emerges the founder mother mite and all of its mature daughters depart as well. The synchronization between the Varroa's and the bee's life cycles underscores the importance of understanding the Varroa host finding behaviour. It can be assumed that violation of this synchronization is a possible alternative mean of dealing with the mite.

Chemical orientation by the perception of volatiles plays the main role in the host-finding behavior of Varroa. Laboratory bioassays have shown that Varroa can distinguish between bees at

different developmental stages and different task groups, and prefers a nurse bee to a forager bee. This preference is of obvious advantage for the mite, as being on a nurse bee elevates the mite's chances of reaching a brood cell in which it reproduces. The distinction is probably based upon differences in the hydrocarbons composition of the cuticular profile of the adult/larva bee, as well as on other secreted volatiles. In earlier studies a pit sensory organ was described in the Varroa's first leg, analogous to a sensory pit organ that can be found in ticks, yet less developed. Inconsistency in the description of the sensilla in different studies has raised the need to reinvestigate the subject. To explore and confirm the function of the sensory organ, a stimulus of presumed biologically functional volatiles can be introduced, allowing for measurement of the electro-physiological response of the insect antenna. Electro-physiological tests were successfully done for other mites and related arthropods, yet for the Varroa mite only a few attempts have been mentioned in the literature, prompting this more detailed analysis. Considering the importance of the chemical orientation of the mite, this current study suggests a chemoecological approach that exploits the knowledge of the a) Varroa life cycle, b) host-finding behavior, and c) host-distinguishing cues, in order to control the mite. Addressing previous limitations, the use of disruptive compounds was examined. Those compounds were developed for this study, and take effect in the presence of a relevant chemical signal. The main goal of this study was to develop a method which allows us to identify potentially disruptive compounds of the Varroa's behaviour. First, the chemical sensory organ structure was examined by means of a Scanning electron microscope (SEM). Then the function of the chemical sensory organ was examined using an Electroantennogram (EAG), while developing a method to measure the response evoked by chemical cues. Later on, this method allowed for the examination of the electro-physiological response of the Varroa to synthetic volatiles that are known to be hive originated (e.g., Geraniol, Benzaldehyde, Methyl salicylate, Octanoic acid and 9-ODA) and to honey bee volatiles. Simultaneously, behavioral bioassays were developed by which the Varroa host preference between Nurse and Forager bee was studied. These bioassays enabled an investigation of the effect of the potential disruptive compounds on the Varroa host finding behavior.

By means of a SEM, pored chemical sensilla were identified on the distal part of the first leg of the adult female Varroa. In addition, several sensilla were found that have yet to be described. A method was developed that allowed for the examination of the electro-physiological response of the Varroa's first leg to volatiles, and among the examined compounds, the response amplitude to Geraniol was the highest in all concentrations. Also, for the first time, a response for whole bee volatiles was obtained, and it was found that there is no significant difference between the Varroa response amplitude to nurse and forager bee. These results suggest that at least some of the sensilla

that were seen by the SEM are indeed able to perceive volatiles that originate from the hive. However, based upon these results alone, one cannot draw conclusions about the behavioural response provoked by these cues. For that purpose a series of behavioural choice-test bioassays were conducted in which the Varroa host preference between nurse and forager bee was examined. In preliminary experiments that were performed in order to establish the parameters of the experiment, the host preference of two different physiological phases of the mite, phoretic and reproductive, were compared; it was found that there is no difference in the Varroa preference for either phase. Summarizing the experimental results, it was found that the Varroa significantly prefers a nurse to a forager bee. Nonetheless, this preference was not consistent; that is to say, in part of the periods there was no nurse preference. In an attempt to locate the origin of this variance two factors were examined, and it was found that the Varroa host preference is dependent on the hive origin of the bees and the Varroa, and also on the period in which the experiments were conducted. In experiments that were performed during the same period, the Varroa preference to a nurse bee was more consistent when the Varroa and the bees were from different hives, compared to the Varroa preference when the mite and the bees were from the same hive. In addition, it was found that when the Varroa and bees were from the same hive, the Varroa host preference was different during different periods. Two hypotheses were suggested in order to try and explain these factors.

As a possible explanation for the effect of the hive origin on the Varroa host preference, it can be hypothesized that Varroa recognition mechanism is based on “Indirect familiarization” in which the individual recognizes other individuals that are similar to him and to his environment. In earlier studies it was found that the cuticular profile of the Varroa is similar to that of the nurse bee, and even changes according to the profile of the developing brood. The evolutionary incentive to the appearance of this characteristic – or the lack of disappearance – can be understood by the advantage of camouflage that it provides to the mite. But the preservation of this characterization can be explained by another vital advantage for mites that recognize and prefer a nurse bee, because those mites are more likely to arrive to a brood cell where they reproduce. The experimental setting in this study, where the Varroa is choosing between bees from a foreign hive, places the Varroa in a situation rarely encountered naturally. In this unfamiliar situation the Varroa searches for familiar cues that are similar to itself and to its original environment. In the artificial bioassay the nurse bee is the most familiar element, since nurse bees from different hives have a characteristic odor profile. It is possible that this shared component in the odor profile of the nurse bee enables it to be recognized and preferred by the Varroa. This hypothesis still needs further investigation.

In order to try and explain the effect of the period in which the experiments were performed on the Varroa host preference, it was suggested that the hive infestation level, calculated as the ratio between the bee and the mite population, can affect its behaviour; the infestation level changes during the year and also can be relevant to the mite behaviour. Testing the infestation level of the experiment hives it was found that indeed in the periods in which the Varroa preference was different, the infestation level changed as well. However, no consistent relation was found between the level of infestation and the mite preference. A flexible host preference can grant some advantages to the mite, elevating its chances of encountering a forager bee, which is the only way of spreading to another hive to escape death with the collapsing hive. But how does the mite recognize the right time to abandon the sinking ship? To investigate this issue, it was suggested that the mite can sense high levels of diseases and pathogens in the hive. Examination found that the Varroa can distinguish between a symptomatic bee (with deformed wings) and a non-symptomatic bee, however the mite has non-significant preference to the symptomatic bee. Comparing the cuticular profile of both bee types it was found that they can be separated by the hydrocarbons ratio. These results present questions for future research: is the hydrocarbons ratio the mechanism that enables the mite's distinguishing ability? And what kind of advantage does this ability provide to the bee/mite/pathogen?

In testing the effect of the disruptive compounds on the Varroa host preference it was found that in the presence of two of the compounds there was a reduction in the Varroa preference for a nurse bee, compared with the control. No consistent effect (of infestation levels) was found in the period in which the experiments were performed.

In summary, in the present study behavior disruptive compounds that harm the ability of the Varroa to distinguish between hosts were found. It can be assumed that this disruption might break the synchronization of the Varroa and the bee, and thereby increases the ability of the bees to cope with the mite. This approach promotes the development of an environmentally friendly control method, that combined with other methods can tilt the balance to an equal state in which the Varroa and the bees can survive side by side. In addition, in this study a method was developed by which one can obtain an electro-physiological response from the Varroa front leg. This method can shed some light on the disruptive mechanism and be used as a scanning system for other disruptive compounds and for the investigation of the sense organ. The current study has opened the door to many other questions regarding other factors that might affect the Varroa host finding behaviour, from the nutritional and health condition of the bee up to factors in the Varroa itself, such as presence of viruses.