

מעקב רב שנתי אחר מחלות צהבון הנגרמות מפיטופלסמות בגפנים בגולן

תרצה זהבי / שה"מ, משרד החקלאות
רקפת שרון, גל ספיר / מו"פ צפון
ורד נאור / המכון לחקר הגולן



צלמה: ד"ר תרצה זהבי

פיטופלסמות גורמות לנזקים במספר רב של מינים עשבוניים, בהם גזר, תפוז"א, חסה, לבגדר, ובמינים מעוצים, כמו גפן, שקד, זית, תפוח ומשמש (Bertacini, 2007; Foissac, 2010). מספר טיפוסים של פיטופלסמות פוגעים בגפן באזורי גידול שונים בעולם, וכולם גורמים לתסמינים זהים. עיקר הבעיה הגידולית במחלות אלו נובעת מהתנוונות של אשכולות. ההתנוונות יכולה להתרחש מיד לאחר חנטה, בעיקר בזנים אדומים, או סמוך לתקופת הבציר, דבר הנפוץ יותר בזני יין לבנים. ההתנוונות גורמת הן לפגיעה בגובה היבול והן לפגיעה באיכותו אם לא נעשה מיון טוב של האשכולות המנוונים. תסמינים נוספים כוללים גוון צהבהב או כתום בעלים והתקפלות עלים אופיינית לאחור, חוסר התעצות של השריגים ונקודות שחורות, פוסטולות, על השריג. המחלה פוגעת בכל זני היין, כאשר הזן 'שרדונה' נחשב בכל העולם לרגיש ביותר. רק במקרים מעטים דווח על נזק בענבי מאכל.

אחד המאפיינים של מחלות צהבון הוא הבראה ספונטנית מהמחלה (Osler, 2003). גפנים רבות המבטאות תסמיני מחלה בשנה מסוימת יכולות להבריא בשנים הבאות. במצבים אלה, כשהגפנים מבריאות, בדך כלל לא מוצאים את החידקים גורמי המחלה.

חד המאפיינים של מחלות צהבון הוא הבראה ספונטנית. מטרת העבודה הנוכחית היא לכמת את שעורי המחלה וההבראה ולבדוק את כושר הצימוח והיבול של גפנים מדרגות מחלה שונות. מידע זה עשוי לעזור לחקלאי בהחלטות לגבי חלקותיו

מבוא

מחלות צהבון בגפנים גורמות לפגיעה בגובה היבול ואיכותו. מחלות אלו נגרמות מפיטופלסמות - שבעבר נקראו אורגניזמים דמויי מיקופלסמה. הפיטופלסמות הן חידקים פרזיטיים הכרחיים (אובליגטורים). בצמחים מתקיימות הפיטופלסמות רק בתוך תאי צינורות השיפה. בחרקים הנשאים, הווקטורים המעבירים אותן מצמחים נגועים לצמחים בריאים, הפיטופלסמות מתקיימות ומתרבות בבלוטות הרוק.

בתמונה למעלה: צהבון בכרם. פרטים בהמשך

מטרות העבודה הנוכחית הן לכמת את שעורי המחלה וההבראה ולבדוק את כושר הצימוח והיבול של גפנים מדרגות מחלה שונות - גפנים נגועות מבטאות תסמינים בשנת הבדיקה, גפנים שלא ביטאו סימני מחלה בשנות המעקב, כלומר בריאות, בהשוואה לגפנים שהיו נגועות בשנים קודמות אך לא מבטאות תסמינים בשנת הבדיקה, היינו מבריאות. מידע זה עשוי לעזור לחקלאי בהחלטות לגבי חלקותיו.



תמונה 1: גפן נגועה: גוון אופייני לעלים, חוסר התעצות של השריגים, נקודות שחורות על השריגים, התנוונות אשכולות



תמונה 2: גפן נגועה בצהובון

שיטות

■ **הכרמים שנבדקו:** עיקר העבודה נעשה בחלקת 'קברנה סובינון' מנטיעת 2000 בקיבוץ גשור. הגפנים בחלקה מורכבות על הכנה קסטל 216/3. הן מעוצבות לבד דו צדדי, הודלו בשנים הראשונות בשיטת הבלרינה ובהמשך בשילוב שריגים אנכי. שטח החלקה 20 ד' והיא כוללת 40 שורות. דיגום נוסף בגפנים מזן 'שרדונה' נעשה בכרם של מו"פ צפון שניטע ב-1986 בחוות פיכמן. הגפנים בכרם זה עוצבו כבד חד צדדי ומודלות בשילוב שריגים אנכי.

■ **מיפוי תסמיני נגיעות בחלקות הנבדקות:** מיפוי תסמיני הנגיעות נערך בכרם גשור בשנים 2004 עד 2009 ובוצע בכל שנה לקראת הבציר, מועד בו התסמינים ברורים ביותר. המיפוי התבסס על סקר חזותי, וגפן סומנה כנגועה כשנראו בה לפחות שלושה מהתסמינים הבאים: גוון אופייני של העלים, חוסר התעצות של השריגים, נקודות שחורות על השריגים (פוסטולות), התנוונות של אשכולות (ראה תמונה 1). גפנים צוינו כנגועות גם אם נראה בהן רק שריג בודד נגוע, אולם לצורך בדיקת היבול וכושר הצימוח בחרנו רק גפנים בהן לפחות מחצית מהשריגים ביטאו סימני מחלה. בכרם ה'שרדונה' סומנו ב-2008 מספר גפנים נגועות ובריאות. ב-2009 נדגמו מתוכן גפנים לבחינת רמת היבול.

■ **ניתוח נתוני המיפוי:** מיקום הגפנים הנגועות ודרגת המחלה בכל שנה - מספר שורה ומספר הגפן בשורה מכיוון צפון, רוכזו בקובץ אקסל ועובדו על פי שנים, כדי לקבל את מהלך המחלה של כל גפן שהראתה תסמינים בעבר במהלך שנות המעקב. מנתונים אלה חושב שעור הגפנים הנגועות בכל שנה, שעור הגפנים המבריאות ושעור הגפנים הנגועות שהראו גם נגיעות חוזרת בחלק או בכל שנות המעקב.

■ **מדדים צמחיים ומדדי יבול לגפנים בעלות מאפייני תסמינים שונים:** הוגדרו ארבע דרגות למאפייני התסמינים:

1. גפנים בריאות, שלא הראו תסמיני מחלה בכל שנות המעקב;
2. גפנים נגועות, המראות תסמינים לראשונה בשנת הבדיקה;
3. גפנים שהיו נגועות בשנה החולפת ולא מבטאות תסמיני מחלה בשנת הדיגום - מבריאות שנה 1;
4. גפנים שהיו נגועות שנתיים לפני שנת הדיגום ומאז לא ביטאו תסמינים - מבריאות שנה 2.

בשנים 2008 ו-2009 נדגמו תשע גפנים מכל אחת מהדרגות שהוגדרו. בבציר נשקל היבול ונספרו האשכולות של כל גפן בנפרד. ב-2009 הוכן מיץ ממדגם גרגרים מכל גפן ונמדדה רמת הסוכר (כלל מוצקים מומסים, כמ"מ) ורמת החומציות (pH). בעת הגיזום, בחורף, נספרו הזמורות העבות (מעל 5 מ"מ) והדקות, ונשקל הגזם מכל גפן בנפרד. בנוסף, אורך הזמורה ומספר הפרקים נמדדו בארבע זמורות: שתי זמורות הקרובות ביותר לגזע ושתיים הרחוקות ביותר מהגזע. מנתונים אלה חושב עומס היבול כיחס בין משקל היבול ומשקל הגזם. יחס זה מקובל כמדד המבטא את יכולת הגפן להגיע להבשלה.

■ **נוכחות חלקיקי פיטופלסמה באיברי הגפן:** זיהוי DNA פיטופלסמתי המעיד על נוכחות גורם המחלה בוצע בשנים 2008

בשנים 2007, 2008 ו-2009, בהתאמה, הראו תסמינים גם בשנים קודמות. כשליש מהגפנים בהן הייתה נגיעות חוזרת ביטאו תסמינים במשך שלוש שנים לפחות.

■ **גובה היבול ואיכותו:** בשתי שנות הבדיקה, בשני הזנים, היבול הגבוה ביותר התקבל בגפנים הבריאות שלא הראו תסמיני מחלה בשנות המעקב, והיבול הנמוך ביותר התקבל בגפנים שהיו סימפטומטיות בשנת הבדיקה (טבלה 1). עם זאת, בשנה העוקבת לשנת הנגיעות היבול כבר היה גבוה משמעותית ובאופן מובהק מהיבול של גפנים חולות, ושנתיים אחר כך היבול לא נבדל מהיבול שהתקבל בגפנים בריאות שלא ביטאו תסמיני מחלה בכל שנות המעקב (נבדק רק ב'קברנה סובינון'). מגמה דומה התקבלה גם במספר האשכולות לגפן (טבלה 2). לא נמצא הבדל ברמת הסוכר או ה-pH בין גפנים מהטיפוסים השונים.

טבלה 1: משקל היבול לגפן (ק"ג) עם מאפייני מחלה שונים

מאפייני המחלה		הזן והשנה	
		'קברנה סובינון'	'שרדונה'
		2008	2009
גפן עם סימני מחלה	0.8 c	1.9 c	1.1 c
הייתה נגיעה רק בשנה החולפת	4.2 b	3.5 b	5.6 b
הייתה נגיעה רק שנתיים קודם	-	4.7 ab	6.9 ab
גפן בריאה	6.8 a	5.3 a	8.0 a

* אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין דרגות המחלה לכל זן בנפרד (p<0.05) על פי מבחן דנקן

טבלה 2: מספר האשכולות לגפן עם מאפייני מחלה שונים

מאפייני המחלה		הזן והשנה	
		'קברנה סובינון'	'שרדונה'
		2008	2009
גפן עם סימני מחלה	10.0 b	34.7 b	16.2 c
הייתה נגיעה רק בשנה החולפת	32.8 a	44.8 b	55.0 b
הייתה נגיעה רק שנתיים קודם	-	64.3 a	63.8 ab
גפן בריאה	45.0 a	65.9 a	80.8 a

* אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין דרגות המחלה לכל זן בנפרד (p<0.05) על פי מבחן דנקן

■ **מאפייני צימוח ועומס היבול:** מאפייני הצימוח נבדקו רק בזן 'קברנה סובינון'. הנתונים המוצגים בטבלה 3 הם ממוצע של שתי שנות הבדיקה, שכן בשתי השנים התקבלה מגמה זהה ולא הייתה אינטראקציה בין השנים לטיפולים. גפנים חולות וגפנים שהבריאו מהמחלה נבדלו מגפנים בריאות במשקל הגזם, אורך הזמורות ומספר הפרקים לזמורה, וכן במספר הזמורות העבות שיכולות להוות בסיס לזמירה בשנה העוקבת. בכל המדדים האלה נתוני גפנים בריאות היו גבוהים מנתוני גפנים נגיעות או מבריאות. לא נמצא

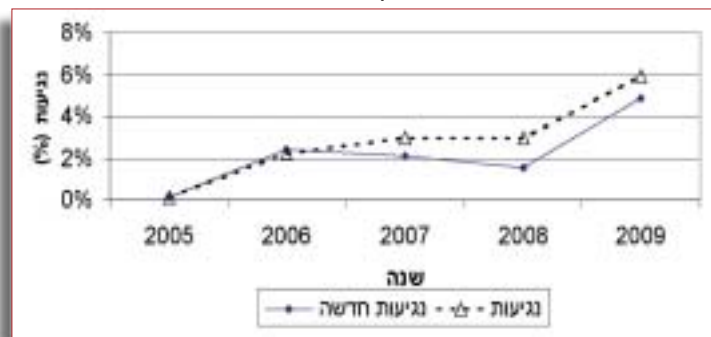
ו-2009 בשש גפנים מכל אחד מארבעת מצבי המחלה שהוגדרו לעיל. בשתי השנים הופק DNA בנפרד מעלים זמורות וב-2009 נבדקו בנוסף גם שורשי הגפנים. ב-2008 הופק ה-DNA בשני מקבצים של שלוש גפנים מכל מצב מחלה, ואילו ב-2009 הופקו חומצות הגרעין מכל גפן בנפרד. נוכחות DNA פיטופלסמתי נבדקה בראקציית PCR מקוננת (nested) עם שני זוגות של תחילים (פריימרים) כלליים המתאימים לכל טיפוס הפיטופלסמה, P1P7 ואחר כך U3U5 (Orenstein, 2001).

■ **ניתוח סטטיסטי:** עיבוד הנתונים נערך בתוכנת SAS. לכל מדד נערך ניתוח שונות פקטוריאלי לפי ארבע דרגות מחלה ושתי שנות בדיקה. הניתוח נערך לכל זן בנפרד. רמת המובהקות ($\alpha = 0.05$) נקבעה במבחן דנקן.

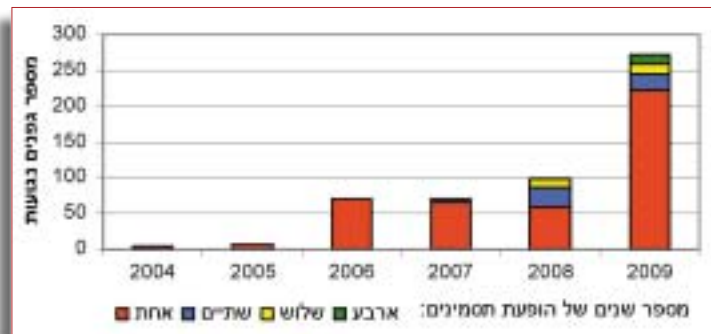
תוצאות

■ **מיפוי נגיעות והבראה:** רמת הנגיעות בחלקה עלתה עם הזמן (איור 1). בכל שנות המעקב עיקר הנגיעות היה נגיעות חדשה, ורק חלק קטן מהגפנים הראה תסמיני נגיעות חוזרת. תוצאות המיפוי מעידות על שעור גבוה יחסית של הבראת גפנים, אך גם על הדבקות חדשות (איור 2). עם זאת, שיעור הנגיעות המירבי הכללי בחלקה עמד ב-2009 על 5.7%. בכל אחת משלוש שנות המעקב הראשונות, 2004 עד 2006, לא הייתה נגיעות חוזרת. מ-2007 חלה עלייה בשעור הנגיעות החוזרת וארבע, 39 ו-49 גפנים שהראו תסמיני מחלה

איור 1: שעור הנגיעות הכללית בחלקה



איור 2: מיפוי רב שנתי של חלקת 'קברנה' בגשור



זיהוי מולקולרי של גורם המחלה בגפנים מדרגות תסמינים שונות

בשתי שנות המחקר נמצא DNA פוטופלסמתי בעלים של כל הגפנים שביטאו סימני מחלה, ולא נמצאו גורמי מחלה בגפנים הבריאות. בשתיים מ-12 גפנים שהבריאו מהמחלה נמצא פס חלש יחסית, היכול להעיד על נוכחות של גורם המחלה (איור 3).

דיון ומסקנות

בעבודה זו עקבנו אחר סימני מחלת הצהובן בכרמים והשוונו את ההתפתחות של גפנים חולות וגפנים שהבריאו מהמחלה לזו של גפנים בריאות. הנגיעות הממוצעת בחלקת המעקב עלתה מ-0.1% לכ-6% במהלך שש שנות המעקב. התוצאות דומות לאלו שנמצאו בעבודות שנעשו במקומות שונים בעולם עם טיפוסים שונים של חיידקי פוטופלסמה (Morone, 2007). בשלוש שנות המעקב הראשונות לא נמצאו גפנים עם נגיעות חוזרת, אך עם העלייה הכללית בשעור הנגיעות מצאנו ש-27% מהגפנים הנגועות ביטאו תסמינים יותר משנה אחת, בעוד שרוב הגפנים המבטאות תסמיני מחלה בשנה מסוימת מבריאות בשנה העוקבת ולא מופיעים בהן סימני נגיעות. היעלמות התסמינים לווה בעלייה מובהקת ברמת היבול ובעומס היבול, ובעלייה הדרגתית לא מובהקת במדדי צימוח. הופעה עוקבת של תסמינים או הופעה נשנית של המחלה אחרי שנה או שנתיים של הפסקה בהתבטאות, יכולות להיגרם בגלל שגורם המחלה נשאר בצמח, אך מדוכא ולא בא לביטוי ורק בתנאים מסוימים הוא מתפתח וגורם להתבטאות חוזרת. אפשרות נוספת היא שגורם המחלה נעלם מהצמח, ורק כשהחרק מעביר המחלה גורם להדבקה מחודשת יש התבטאות חוזרת. הבדיקה המולקולרית העידה שבכל הגפנים הנגועות יש חלקיקי פוטופלסמה, בעוד שבאף אחת מהגפנים הבריאות לא נמצאו חלקיקים כאלה. כמו כן, ברוב המקרים לא נמצא DNA פוטופלסמתי בעלים של גפנים שהבריאו מהמחלה. לימוד הגורמים המשפיעים על התבטאות חוזרת של המחלה, לעומת רוב המקרים בהם יש הבראה, יכול לעזור להעלות את שעור ההבראה ואולי אף להפחית את שעורי ההדבקה.

הקשר בין מדדי יבול לבין דרגות מאפייני המחלה נבדק בעולם בעבודות מעטות בלבד (Morone, 2007) וההשפעה על מדדי הצימוח כלל לא דווחה בעבר. בעבודה זו מצאנו, שהיבול בגפנים שהבריאו מהמחלה גבוה משמעותית מהיבול בגפנים חולות וחוזר לרמת היבול של גפנים בריאות אחרי שנתיים ללא תסמינים. בשתי שנות הבדיקה דמו מאפייני הצימוח בגפנים מבריאות לאלה של גפנים נגועות ולא למאפיינים של גפנים בריאות. משקל הגזם, אורך הזמורות ומספר הזמורות העבות - מעל 5 מ"מ בין הפקע השני לשלישי, עלה בהדרגה בשנים שלאחר הופעת התסמינים, אולם עלייה זו הייתה מובהקת סטטיסטית רק לגבי מספר הזמורות העבות. זמורות אלו נשאו את רוב הפרי בשנת הבדיקה ומהוות בסיס לזמירה לשנה העוקבת. עומס היבול המבוטא כיחס בין משקל היבול והגזם מקובל כמדד המבטא את מידת האיזון בין

הבדל מובהק במספר הזמורות הדקות (טבלה 3). ההבדלים ברמת הצימוח ורמת היבול בגפנים השונות השפיעו על עומס היבול (טבלה 4). לא נמצא הבדל ברמת הסוכר וברמת החומציות (pH) בין גפנים מהטיפוסים השונים.

טבלה 3: אופי הצימוח של גפנים מזן 'קברנה סוביניון' (כרם גשור) עם מאפייני מחלה שונים

מאפייני המחלה	משקל גזם (ק"ג)	אורך זמורה (ס"מ)	זמורות עבות	זמורות דקות	פרקים לזמורה
גפן עם סימני מחלה	0.70 b	80.08 b	11.21 c	24.84	17.79 b
הייתה נגיעות רק בשנה החולפת	0.79 b	93.32 b	13.12b c	24.41	17.71 b
הייתה נגיעות רק שנתיים קודם	0.80 b	92.44 b	15.78 b	25.56	16.00 b
גפן בריאה	1.21 a	109.6 a	22.61 a	22.44	19.87 a
מאפיין	$F_{71,3}=6.69$ $p<0.0005$	$F_{71,3}=6.79$ $p<0.0005$	$F_{71,3}=15.7$ $p<0.0001$	$F_{71,3}=1.11$ $p=0.352$	$F_{71,3}=6.69$ $p<0.0005$
שנה	$F_{71,1}=2.47$ $p=0.121$	$F_{71,1}=0.09$ $p=0.77$	$F_{71,1}=2.91$ $p=0.09$	$F_{71,1}=1.66$ $p=0.201$	$F_{71,1}=2.47$ $p=0.121$
מאפיין/שנה	$F_{71,3}=2.09$ $p=0.11$	$F_{71,3}=2.08$ $p=0.12$	$F_{71,3}=0.36$ $p=0.78$	$F_{71,3}=0.62$ $p=0.605$	$F_{71,3}=2.09$ $p=0.11$

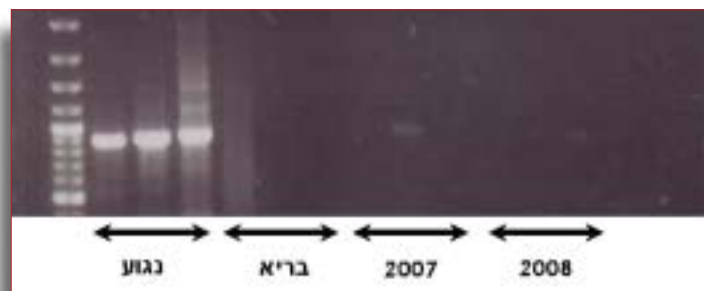
- אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין דרגות המחלה לכל זן בנפרד ($p<0.05$) על פי מבחן דנקן - התוצאות המוצגות הן ממוצע של שתי שנות הבדיקה

טבלה 4: עומס היבול (יחס בין משקל הפרי ומשקל הגזם) ונתוני תירוש בשנת 2009

מאפיין	עומס יבול	כח"מ	pH
גפן עם סימני מחלה	2.26 c	24.36	3.41
הייתה נגועה רק בשנה החולפת	4.67 b	24.56	3.48
הייתה נגועה רק שנתיים קודם	6.15 a	23.26	3.45
גפן בריאה	5.19 ab	23.46	3.48

- אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין דרגות המחלה לכל זן בנפרד ($p<0.05$) על פי מבחן דנקן

איור 3: תוצרי ראקציית PCR מקונן עם DNA שהופק מגפנים בדרגות מחלה שונות ב-2009





ספרות

1. Bertaccini A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
2. Foissac X. & Willson M.R. (2010): Current and Possible Future Distributions of Phytoplasma Diseases and their Vectors. In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Pp 309. Weintraub P. & Jones P eds.
3. Osler R., Carraro L., Loi N., Refatti E. (1993): Symptom expression and disease occurrence of a yellow disease of grapevine in Northern Italy. *Plant Disease* 77: 496-498.
4. Morone C., M. Boveri S., Giosu Y, P. Gotta, V. Rossi, I. Scapin, C. Marzachi (2007): Epidemiology of Flavescence Dor 'e in Vineyards in Northwestern Italy. *Phytopathology* 97: 1422-1427
5. Orenstein S., Zahavi T., Weintraub P.G. (2003): Distribution of phytoplasmas in wine grapes in the Golan Heights, Israel and development of a new universal primer. *Vitis* 40: 219-223. ☒

הצימוח הווגטטיבי והפרי המתפתח עליו. מדד זה מעיד איפוא, על היכולת של הגפן להגיע להבשלה. התוצאות משנת הניסוי הראשונה, שהראו צימוח חלש יחסית בגפנים שהבריאו, גרמו לכך שבשנה השנייה בדקנו את רמת הסוכר והחומצה כמדד להבשלה בגפנים מהטיפוסים השונים. למרות ההבדל המשמעותי בעומס היבול לא נמצא הבדל ברמת הסוכר בין הגפנים הנגועות והגפנים הבריאות או המבריאות.

מקובל בעולם שהמקור לנגיעות במחלת הצהבון מהטיפוס השולט בכרמים בארץ אינו מגפנים נגועות אלא מצמחי בר בסביבה. בעבודה זו מצאנו שחלק ניכר מהגפנים מבריאות מהמחלה ושהיבול בגפנים מבריאות דומה לזה המתקבל בגפנים שלא היו נגועות במחלה. בנוסף, הראינו שגורם המחלה נעלם מגפנים שהבריאו. המסקנה ממצאים אלה היא, שלא כדאי לעקור גפנים המראות סימני מחלה, שכן חלק ניכר מהן יברואו בהמשך ויתרמו ליבול החלקה.