

By:

Jehudith Clara Kohavi Moy

301077541

מאת:

יהודית קלרה כוכבי מוי

301077541

"חילון מוקדם בגפן ופיתוח עמידות כנגד מחלות הנוף קמחון וכשותית הגפן"

"Early leaf removal in vines and potential resistant development towards foliage diseases: *Powdery mildew and Downy mildew*"

Advisor:

Dr. Tirtza Zahavi

Dr. Omer Crane

Professor Martin Goldway

מנחים:

דר' תרצה זהבי

דר' עומר קריין

פרופסור מרטין גולדווי

partners:

Dr. Mery Yalin

Dr. Meir Shlissel

שותפים:

דר' מרי דפני ילין

דר' מאיר שליסל

08/2021

התשפ"א

תודות:

ברצוני להודות בראש ובראשונה למנחים הראשיים שלי דר' תרצה זהבי ודר' עומר קריין על שותפות למסע וגילויים מרתקים. על סבלנות מרשימה והסברים מעמיקים. על מקצועיות ואנושיות בתוך ומחוץ למחקר. המון תודה לדר' מרי דפני ילין על למידה הובלה ואכפתיות של שנים מעבר לתחומי תזה זו כחלק מעבודה משתופת יחד בתחומים שונים בפיתופתלוגיה. תודה לדר' מאיר שליסל ורון שוויצר ממעבדות היין של תל חי שתמכו ונתנו ייעוץ מקצועי בתחום המטבוליטיים. תודה לבר צברי, יהודה יהודה וכפיר על איסוף וארגון הנתונים בשמש הקופחת. תודה לכרם גשור ועידו בר כורם מרום גולן שנתנו לי לבצע את המחקר בכרמים שלהם ולהפוך אותו למגרש המשחקים הפרטי שלי. תודה לג'אמיל פרחאת על עזרה ושיתוף הפעולה בניסיונות שבצעתי בכרם פיכמן. תודה לליאור כהן-מאייר על לימוד הסבר ושותפות בפרוטוקולי המעבדה. תודה למו"פ צפון ומכללת תל חי אשר אפשרו לבצע מחקר זה דרכם.

תוכן עניינים

5.....	1. תקציר.....
9.....	2. קיצורים.....
10.....	3. רשימת טבלאות ואיורים.....
11.....	4. מבוא.....
11.....	4.1 גידול הגפן.....
11.....	4.2 שוק היין בישראל ובעולם.....
11.....	4.3 פעולת החילון.....
12.....	4.4 מיקרו אקלים.....
12.....	4.5 התפתחות הגרגר.....
13.....	4.5.1 חילון והשפעות קרינה מוגברת בשלבים הראשונים בהתפתחות הגרגר.....
14.....	4.5.2 פעילות פנולית בגרגר בשלב ראשון.....
15.....	4.6 חילון מוקדם.....
15.....	4.7 מחלות נוף -כשותית וקמחון.....
16.....	4.8 השפעת חילון על התפתחות מחלות.....
16.....	5. היפותזה.....
16.....	6. שיטות וחומרים.....
16.....	6.1 ניסויי השטח.....
17.....	6.1.2 טיפולי הניסוי:.....
19.....	6.2 דיגום אשכולות לאילוח.....
19.....	6.2.1 מטרות הדיגום.....
19.....	6.2.2 מועדי דיגום.....
19.....	6.2.3 שיטות דיגום.....
20.....	6.3 מקור המידבק להדבקות מכוונות במעבדה.....
20.....	6.4 אילוח אשכולות במעבדה בכשותית וקמחון.....
20.....	6.4.1 הכנת חומר צמחי להדבקה.....
22.....	6.4.2 הכנת המדבק.....
22.....	6.5 ספירת נגיעות טבעית של מחלות.....
22.....	6.6 מדידות מטאורולוגיות.....
22.....	6.7 ספירת מכות שמש (ניסוי גדול).....
23.....	6.8 דיגום גרגרים ביום הבציר (ניסוי גדול).....
23.....	6.9 משקל אשכול (ניסוי גדול).....
23.....	6.10 הפקת RNA.....
24.....	6.11 הכנת C-DNA.....
24.....	6.12 כיול פריימרים.....

24.....	6.13 מיצוי וזיהוי חומרים ב-LC-MS/MS
24.....	6.14 ניתוח סטטיסטי
24.....	7. תוצאות
24.....	7.1 נתוני יבול 2017-2019 -חילון מוקדם הקטין את משקל האשכול אך לא את גודל הגרגר בזן קברנה סובניון
26.....	7.2 חילון מוקדם הפחית את עוצמת הנגיעות במחלת הקמחון בכרם
26.....	7.2.1 נגיעות טבעית בניסוי הגדול (מרום גולן) SB 2018
27.....	7.2.2 נגיעות טבעית בניסויים הקטנים (ללא ריסוסים) קברנה סובניון וסובניון בלאן פכמן וגשור 2019
28.....	7.2.3 נגיעות טבעית בזני קברנה סובניון ושיראז בכרמים פכמן, גשור 2020
29.....	7.3 אילוח מכוון במעבדה 2018-2020 - גרגירים מטיפול החילון נדבקו פחות בכשותית וקמחון
30.....	7.4 חילון מוקדם השפיע באופן מובהק על מדדי מיקרו-אקלים של קרינה וטמפרטורה באזור האשכולות ב2018-2020
31.....	7.4.1 נתוני קרינה וטמפ' יומיים לחודשים יוני יולי בכרם מרום גולן 2018-2019
32.....	7.4.2 נתוני קרינה וטמפ' גשור בקברנה סובניון ושיראז 2019-2020
34.....	7.4.3 נתונים מטאורולוגיים סביבתיים בגשור ומרום גולן 2018-2020
34.....	7.5 פגיעות שמש 2019, 2018, 2017 מרום גולן- חילון מאוחר סבל יותר ממכות שמש על גרגרי האשכול
35.....	7.6 LC-MS/MS 2019 - זיהוי חומרים מטבוליים
36.....	7.6.1 שבוע מהחילון (שלב א) החילון בכרם גשור העלה משמעותית את רמת המטבוליטים בגרגר
36.....	7.6.2 חומרים שעלו מובהק כתוצאה מטיפול החילון המוקדם בשלב פנולוגי א (שבוע מחילון) וב (שבועיים מחילון)
38.....	7.6.3 סינתזת פולי-פנולים מוגברת באופן מובהק בעקבות טיפול החילון
39.....	7.7 הגברת ביטוי גנים במסלול סינתזת פוליפנולים
40.....	7.7.1 מטריצת ביטוי גנים לפי שנים, אתרים, זנים, שלבים פנולוגיים וטיפול
40.....	7.7.2 ביטוי גנים 2018 פכמן
41.....	7.7.2.1 ביטוי גנים PAL,STG,UFGT – פכמן 2018
41.....	7.7.2.2 ביטוי גנים CHS, FLS – פכמן 2018
42.....	7.7.3 ביטוי גנים 2019 פכמן וגשור
42.....	7.7.3.1 ביטוי גנים PAL,STG,UFGT פכמן וגשור 2019
44.....	7.7.3.2 ביטוי גנים CHS, FLS פכמן גשור 2019
44.....	8. דיון
48.....	9. מסקנות
49.....	10. ביבליוגרפיה
54.....	11. נספחים

1. תקציר

מחקר פיזיולוגי ומולקולרי על השפעות שיטות אגרוטכניות בגידול גפן יין נותן מבט מעמיק בתחום היין הפופולארי כל כך בקרב אוכלוסייה רבה בעולם. מאחר ושוק היין תורם ערך תזונתי, כלכלי ותרבותי כבר אלפי שנים, לא פלא שחוקרים רבים מתעסקים בו. הרבה מסוגיות איכות וסגנון היין מוגדרים כסובייקטיביים, מה שהופך את השיח והפיתוח בתחום למעניין יותר. גידול כרמי יין נחשב להתמחות ודורש ידע וניסיון על מנת לייצר תוצר יין סופי רצוי. ישראל מגדלת בתוכה תעשיית יין מתפתחת ורווחית ואף מצליחה לבסס ייצוא יין ההולך ומתרחב, באיכות גבוהה, למדינות שונות בעולם. חלק נרחב בגידול מושקע ב"טיפול נוף" הנחלקים לשלושה מרכיבים עיקריים: הדליה של השריגים החד שנתיים, דילול שריגים ואשכולות, וחילון. עלות טיפולי הנוף כל עונה עולה לכורמים כסף רב ויש צורך לבצע אותם בצורה מושכלת המותאמת לכל כרם על פי פרמטרים ביולוגים וגאוגרפים האופייניים לו. פעולת החילון בגפן באה מהמילה חלון, בו מסירים עלים בצורה ידנית או מכנית מאזור האשכולות על מנת לחשוף את האזור לתנאי קרינה ואורור גבוהים יותר. פעולת החילון משפיעה על תנאי המיקרו-אקלים בסביבת האשכולות ובכך מעוררת מנגנונים פיזיקליים וביולוגיים שונים. חלק מהשפעות אילו תועדו כמפחיתות משמעותית נגיעות במחלות נוף, איתם נאלצים הכורמים להתמודד לאורך העונה דרך ריסוסים של חומרי הדברה יקרים ולא תמיד אפקטיביים. חילון ניתן לבצע בשיטות שונות הנחלקות לשלוש גישות עיקריות: עוצמה- כמות העלים המוסרים, מיקום- אזור הסרת העלים ותזמון- השלב הפנולוגי בו מתבצע החילון בגפן. בארץ כיום לא מקובל לבצע חילון מוקדם בתחילה הפריחה הכוללת הסרת עלים עוצמתית משני צדי השורה, החל מתחתית השריג עד שלושה עלים מעל גובה האשכולות. מחקרים אחרונים בתחום, מראים השפעות של חילון מסוג זה על הפחתה משמעותית ברקבונות והופעת מחלת "העובש האפור" הנוצרת על ידי הפטרייה *Botrytis cinerea*. לאור ממצאים אילו, **שיטת החילון המוקדם והחזק יכולה לשמש כטכניקה להתמודדות עם מחלות נוף** קשות נוספות הפוגעות דרמטית ביבול. מחלת הקימחון (*Powdery Mildew*) ובעיקר כשותית הגפן (*Downy Mildew*) הנגרמות על ידי מחוללות המחלה *Erysiphe necator* ו *Plasmopara viticola* בהתאמה, טרם קיבלו דגש בהקשר זה ורצוי לבחון אם ובאיזה מנגנון יש פיתוח להגברת עמידות הגפן כנגד מחלות הנוף. מחלות אילו תוקפות את הגפן לאורך כל העונה אבל פוגעות באשכולות בשלבים המוקדמים של זמן הפריחה ותחילת חנטה. ידוע שקרינה משפיעה רבות על מנגנונים בצמח ואף על פתוגניים צמחיים. על מנת לחקור פוטנציאל עמידות כנגד מחלות הכשותית והקימחון ביצענו ניסוי חילון מסוג זה בכרמי יין במשך שלוש שנים. יישום הניסוי התבצע בשני אזורים גאוגרפים בגבולות רמת הגולן, כרם גשור הנמצא 364 מ' מעל פני הים וכרם מרום גולן 947 מ' מעל פני הים. הניסוי בוצע על זני קברנה סובניון (CS), שיראז (SH) וסובניון בלאן (SB). לאורך הפריחה והחנטה בחנו את תנאי המיקרו-אקלים באזור האשכולות, עמידות הגרגירים **לאילוח מכוון במעבדה** על ידי הפתוגנים וביצוע ספירה לנגיעות טבעית ופגיעות שמש בשטח. במקביל ניסינו למצוא מנגנוני הגנה ביולוגיים ומטבוליים המופעלים באשכולות, כתוצאה מטיפול החילון המוקדם והחזק, בהשוואה לביקורת בה לא מבוצע חילון כלל. אנליזת המנגנונים התבצעה באמצעות **qRT-PCR**. זאת על מנת לכמת ביטוי גנים פוטנציאליים ידועים, הפועלים במערכת ההגנה הצמחית. בנוסף, ערכנו סריקה ואפיון למטבוליטים משניים בשיטת Untrargeted במכשיר ה- **LC-MS/MS**. **תוצאות עיקריות:** נמצא שטיפול החילון בשטח הראה מגמה ברורה ובחלק מהשנים אף מובהקת ($p < 0.05$) של הפחתת נגיעות קמחון באשכולות בטיפול החילון המוקדם. אילוח פתוגנים מכוון בתנאי מעבדה בשנת 2020, הראה הבדל מובהק של נגיעות גבוהה במחלת כשותית הגפן בטיפול הביקורת לעומת טיפול החילון המוקדם. בשנים בהן הופיעו פגיעות שמש בגרגירים, טיפול החילון המוקדם הפחית נזקים באופן מובהק, בשיעור של פי שתיים בזנים שיראז וסובניון בלאן בהשוואה לטיפול סטנדרטי מאוחר יותר. בבחינת המעבדה בשיטת מיצוי חומרים

אורגניים, הוצגו הבדלים מובהקים בכמות החומרים בין טיפול לביקורת. ההשפעה הברורה ביותר נצפתה באתר גשור בזן קברנה סובניון כשבוע לאחר חילון ($p < 0.05$). עיקר ההבדלים באו לידי ביטוי בחומרי הגנה צמחיים מקבוצת Flavonols. מטבוליט משני ייחודי שעלה מובהק בין כלל ההשוואות השונות בהקשר של השפעת אתר, זן ומועד האיסוף, שייך גם הוא למשפחת ה Flavonols ונקרא 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-methyl-4H-chromen-4-one. בניית הגנים הידועים במנגנוני ההגנה הצמחית, לא מצאנו הבדלים מובהקים שיכלו להצביע על השפעה בכיוון ברור כתוצאה מטיפול החילון המוקדם. הבנת השפעת ה"חילון המוקדם" ותהליך פיתוח עמידות באשכולות הגפן כנגד מחלות הנוף כשותית וקמחון, נושא בחובו בשורה כלכלית לציבור החקלאים והיקבים המשקיעים כסף רב בטיפולים אגרוטכניים וריסוסי מזיקים כל שנה לאורך העונה.

מילות מפתח: טיפולי נוף, חילון מוקדם, כשותית הגפן, קמחון הגפן, עמידות, מטבוליטים משניים.

Abstract

Molecular and physiological research on the impact of agro-technical methods in viticulture gives us interesting insights on the globally popular field of wine industry. For thousands of years the wine industry has significant nutritional, economic and cultural value; therefore, it is not surprising that so many researchers are interested in it. Many aspects of wine quality and style are subjective, which makes the discussion and development in the field so interesting. The growth and management of vineyards, is an expertise and knowledge and experience are required to create an attractive final wine product. Israel has developed a profitable wine industry and has even succeeded in exporting high quality wine to various countries, a market which is continuing to grow and develop. An important aspect of vineyard management focuses on 'Canopy management' which include three major facets: positioning the shoots, thinning shoots and clusters, and leaf removal. The annual cost of these 'Canopy practices' is very high. It is necessary to perform these procedures correctly, according to each vineyard's phenological and geographical parameters. In Hebrew, leaf removal-"Chilun" comes from the word window, where leaves are removed manually or mechanically, usually from the cluster area in order to improve of radiation and ventilation conditions. Leaf removal affects the micro-climatic conditions around the clusters zone and trigger different physiological and biological mechanisms. One of the results of leaf removal, is a significant reduction in disease development, which otherwise force the growers to treat the canopy expensive and sometimes ineffective fungicides during the season. There are three parameters in leaf removal: Intensity- the amount of removed leaves, location- selected zone around the clusters and timing- the cluster's phenological stage. In Israel, it is common to apply leaf removal after fruit-set while here we suggest to do it at the beginning of flowering, from both sides of the row, starting from the base of the shoot up to three leaves above cluster zones. Recent studies show that this type of early leaf removal significantly reduce cluster

rotting and incidence of "Grey mold" caused by the fungi "*Botrytis cinerea*". In light of this finding, **early and intense leaf removal could be practiced as technique for reducing other severe foliage diseases**, which dramatically harm the yield and quality. *Powdery mildew* and especially *Downey mildew*, caused by the pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopora viticola*, respectively, have yet to be focused on in that aspect and it's necessary to see if and which resistance mechanism is triggered against them. Those diseases attack the vine all season long, but harm the clusters at early phenological stages, from flowering to a little after fruit set. It is known that radiation affects the plant development but also the plant's pathogens. In order to investigate the resistance/tolerance potential against *Powdery* and *Downey mildew*, we performed a three-year experiment in the vineyard. The experiment was conducted in two geographical areas in the *Golan Heights*. One at *Gshur* vineyard located 364m above sea level and the other at *Merom-Golan* vineyard, located 947m above sea level. The experiment contained three cultivars: Cabernet sauvignon (CS), Shiraz (SH) and Sauvignon Blanc (SB). Through flowering till after fruit set, we recorded the micro-climate conditions around the cluster zone, berries resistance to **artificial inoculation** in the lab and evaluated the incidence and severity of natural infections and sunburns in the vineyard. In parallel, we tried to find the biological and metabolic mechanisms which are activated in the clusters, as a result of early intense leaf removal as compared to control (non-defoliated vines). The mechanism analysis was performed through **qRT-PCR**, in order to quantify expression of potential genes which are known to be part of the plant defense mechanism. In addition, we scanned and characterized secondary metabolites using "Untargeted" **LC-MS/MS**. **Main results:** We found that early leaf removal in the vineyard showed a clear trend and sometimes significant ($p < 0.05$) of *Powdery mildew* reduction on clusters. Artificial lab inoculation in 2020, showed a significant difference in *Downey mildew* incidence between early leaf removal treatment and control, in favor to early leaf removal. Cluster sunburns were significantly reduced by early leaf removal, two folds in Shiraz and Sauvignon Blanc cultivars, as compared to the results of standard treatment later in the season. Significant differences were found in the number and amount of secondary metabolites as detected by untargeted LCMS between berries from early leaf removal and control. The most significant difference was observed in *Gshur* site in CS, one week after early leaf removal ($p < 0.05$). Most differences were found in the Flavonols group, a known group of plant defense compounds. A unique secondary metabolite which showed a consistent increase among all different comparisons: site, cultivar and phonologic stage, also belong to the Flavonols group name: *5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-methyl-4H-chromen-4-one*. We did not find significant differences in defense related gene expression that could indicate any clear influence due to early leaf removal treatment. Understanding the impact of "early leaf removal" on the mechanism of the vine's cluster pathogens resistance towards *Powdery* and *Downey mildew* can have a financial

impact on wineries and growers who invest good money in agrotechnical practices and fungicides spraying every year.

Keywords: Canopy management, early leaf removal, Powdery mildew, Downey mildew, Resistance, Secondary metabolites.

2. קיצורים

קברנה סובניון - CS

סובניון בלאן - SB

שיראז - SH

שלבי פריחה:

שלב א – שבוע מפריחה

שלב ב- שבועיים מפריחה

C - ביקורת

T - חילון

Phenylalanine synthase - PAL

Chalcone synthase - CHS

Stilbene synthase - STS

Flavonols synthase - FLS

Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase - UFGT

3. רשימת טבלאות איורים וגרפים

- 13..... איור מס' 1 - התפתחות גרגר מפריחה
- 37..... איור מס' 2 - חומרים שעלו מובהק כתוצאה מטיפול החילון בשלב פנולוגי א(שבוע מחילון) וב(שבועיים מחילון)
- 15..... תרשים מס' 1 - מסלול אנזימי מפתח ליצירת פוליפנולים
- 39..... תרשים מס' 2 - מיקום חומרים מטבוליטים מובהקים בתוך מסלול הסינתזה העיקרי שלהם
- 18..... תמונה מס' 1 - מפת הניסוי
- 19..... תמונה מס' 2 - טיפולי הניסוי
- 21..... תמונה מס' 3 - ניסוי המעבדה
- 40..... מטריצה מס' 1 - מטריצת ביטוי גנים לפי שנים, אתרים, זנים, שלבים פונולוגיים וטיפול
- 25..... גרף מס' 1 - ממוצע משקל גרגר גר' מרום גולן 2017-2019
- 26..... גרף מס' 2 - משקל אשכול ממוצע 2017-2019 מרום גולן
- 27..... גרף מס' 3 - שיעור נגיעות קמחון באשכולות- מרום גולן SB 2018
- 28..... גרף מס' 4 - שכיחות נגיעות שטח קמחון 2019
- 29..... גרף מס' 5 - חומרת נגיעות בקמחון 2020
- 30..... גרף מס' 6 - אילוח מעבדה - סכום כתפיים מאולחות קמחון 2018 זן שיראז
- 30..... גרף מס' 7 - אילוח מעבדה - כשותית וקמחון 2020
- 31..... גרף מס' 8 - ממוצע קרינה וטמפ' יומית הזן CS מרום גולן 2018
- 31..... גרף מס' 9 - ממוצע קרינה וטמפ' יומית בזן CS מרום גולן 2019
- 32..... גרף מס' 10 - ממוצע קרינה וטמפ' CS גשור 2019
- 33..... גרף מס' 11 - ממוצע קרינה יומי CS וSH גשור 2020
- 33..... גרף מס' 12 - ממוצע טמפ' CS וSH גשור 2020
- 35..... גרף מס' 13 - ממוצע שיעור רמת מכות שמש באשכול מרום גולן 2017
- 35..... גרף מס' 14 - חומרת מכות שמש צד מזרח 2019
- 41..... גרף מס' 15 - ביטוי גנים פיכמן 2018 - PAL,STS,UFGT
- 42..... גרף מס' 16 - ביטוי גנים פיכמן 2018 - CHS,FLS
- 43..... גרף מס' 17 - ביטוי גנים פיכמן גשור 2019 - PAL,STS,UFGT
- 44..... גרף מס' 18 - ביטוי גנים פיכמן גשור 2019 - CHS,FLS
- 34..... טבלה מס' 1 - נתוני טמפ' 2018-2020 C°
- 34..... טבלה מס' 2 - נתוני קרינה 2018-2020 (W/m²)
- 36..... טבלה מס' 3 - עליה וירידה בכמות המטבוליטים לפי אתר זן ושלב פנולוגי
- 38..... טבלה מס' 4 - מקרא מטבוליטים לפי שיוך מספרי

4. מבוא

4.1 גידול הגפן

גפן היין כהגדרה בוטנית היא מטפס ממשפחת הגפניים (vitacea), גפני יין אירופאיות שייכות לסוג גפן (vitis) למין (*Vitis vinifera*) שתורבתה במקור מגפן הבר (*Vitis sylvestris*). ישנם מינים נוספים המגודלים היום לתעשיית היין באמריקה ואסיה שחלקם בעלי תכונות איכותיות של עמידות כנגד מחלות ועקות. גפן הבר הינה טיפוס דו ביתי לעומת הגפן המתורבתת שהיא חד ביתית ואינה זקוקה להאבקה חיצונית (Keller 2015). תיעוד שימוש האדם בענבים קיים מכ - 5000 שנה לפני הספירה וההערכה היא שהתירבות החל לפני כ - 8000 שנה. בפארוז באירן נמצאו כדי חרס שהכילו מלח סינדי של חומצה טרטארית הייחודית לגפן (Neolithic resinated wine 1996)). דר' אלישיב דרורי, שחקר את זני הגפנים המתורבתות בארץ ישראל, הראה שכבר בעת העתיקה המקרא וחז"ל הזכירו רבות את גידול הגפן ודיברו בכתבים על זן בשם "שורק". מסוף התקופה הקלאסית ועד העת החדשה הייתה נסיגה בתרבות גפני היין עקב שלטון אסלמי באזורינו שאסר לפי דתם צריכת אלכוהול (זהר 2014). כך זנים רבים וייחודיים של גפני יין בארצנו נעלמו וכיום מנסים לשחזר אותם על ידי איסוף ואפיון גפנים הגדלות כבר כפליטות תרבות (Drori et al. 2017, זהר 2014).

4.2 שוק היין בישראל ובעולם

שוק היין בישראל מציג נתונים כלכליים בהתפתחות מתמדת בשוק המקומי ובייצוא. בשנים 2010 – 2017 הייצור המקומי של ענבי יין עמד בממוצע על 52,000 טון בשנה. בתקופה זו, ערך התוצרת עלה מ-121 לכ-195 מיליון ₪ (Industry and Total 2017). בשנים אילו היקף היצוא מישראל הוכפל - מ-23 ל-47 מיליון דולר. שווקי היצוא העיקריים של ישראל הם: 55% לארה"ב וקנדה, ו-35% לאיחוד האירופי (ITC calculation, 2017). בנוסף, ניתן לראות גם בעשור האחרון, מגמה של עלייה בייבוא יינות מבחוץ (OIV 2010-2017)

4.3 פעולת החילון

בכל עונה ועונה בכרם יין על הכורמים לבצע פעולות אגרוטכניות הכרחיות לגידול מיטבי של הגפנים. עיקר פעולות הגידול המבוצעות בכרם במהלך העונה מתרכזות ב"טיפול נוף" המסווגים לשלוש פעולות עיקריות: הדליה של השריגים החד שנתיים, דילול שריגים ואשכולות, וחילון (הסרת עלים). השקעת הזמן הממוצעת בטיפול נוף נעה בין יומיים עד שבעה ימי עבודה לדונם (מידע אישי, דר' תרצה זהבי). זהו זמן עבודה יקר הדורש הבנה מעמיקה ככל האפשר בכל פעולה אגרוטכנית להצדקתה, זאת על מנת ליישמה בצורה הטובה והמשתלמת ביותר.

פעולת החילון בגפן באה מהמילה חלון ומתבצעת על ידי הסרת עלים מאזור האשכולות וחיפיתם לאורור וקרינה גבוהה יותר. פעולות החילון נחלקות לשיטות שונות הנבדלות ב (i) **עוצמה-כמה** עלים מורידים מתחתית השריג עד מעל קו האשכולות, (ii) **מפנה הסרת העלים בשורה-מזרח**, מערב, צפון דרום ו(iii) **תזמון** החילון מבחינת השלב הפנולוגי של הגפן. על כל חקלאי או יקב לדעת לבחור בשיטה המתאימה ביותר עבורו על פי פרמטרים רבים, ביניהם: מיקום גיאוגרפי של הכרם, תנאי תא שטח, אוריינטציה שתילת הכרם, זן, היסטורית מחלות נוף ומזיקים שכן החלון ישפיע על חדירת חומרי הדברה, סגנון יין עתידי ועוד. חשיפת האשכולות יכולה להשפיע רבות על התפתחות הגפן ותכולת הגרגירים לאורך העונה

(Jordan 2011), אבל ישנם גם מקרים שתועדו בהם החילון אינו משפיע כלל על מדדי הפרי לאורך ההתפתחות הפנולוגית וזה לעיתים תלוי בזן או באזור גיאוגרפי (Young et al. 2016).

4.4 מיקרו אקלים

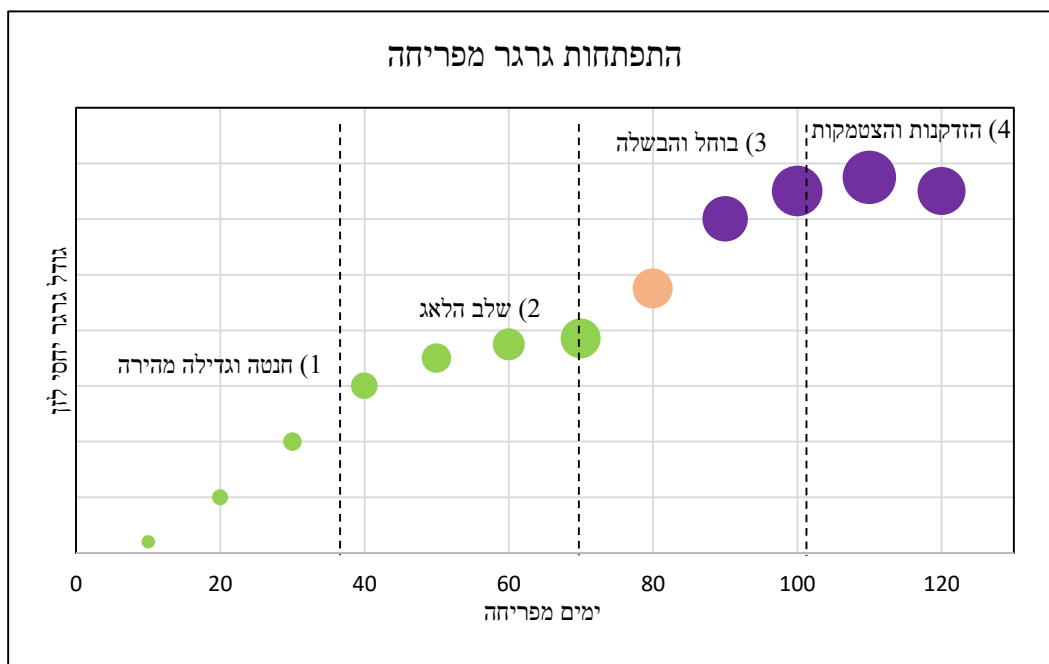
כאשר מתארים מיקרו-אקלים (תנאי אקלים באזור האשכולות) חשוב לציין שלאקלים המתאר את תנאי מזג האוויר השוררים באזור גידול גיאוגרפי (ממוצעי טמפ', קרינה, ולחות רב- שנתיים), יש השפעה מכרעת על המיקרו-אקלים השורר בפנים הגפן. כמו כן, גם למזו-אקלים המוגדר בחלקת הגידול הספציפית המכילה משתנים של מפנה, שיפוע, קירבה למקווי מים, צל גשם ועוד. אך שלא כמו המאקרו ומזו אקלים, לכורם יש מעט יותר יכולת להשפיע על המיקרו-אקלים בטווח המיידני של רמת נוף הגפן, היבול וההשלכות הנגזרות מכך. מיקרו-אקלים מוגדר כאקלים השורר בתוך הגפן עצמה (Keller 2015) ועל פי רוב מגיב לפעולות האגרו טכניות שמיישם הכורם לאורך עונת הצימוח. לחילון יש השפעה מכריעה על המיקרו-אקלים באזור האשכולות ומכך על דינמיקת תוצרי הפוטוסינתזה בין עלוות הנוף לאשכול (Poni et al. 2006). כתוצאה מפעולת החילון נוצרים סביב אזור האשכולות תנאי מיקרו-אקלים ייחודיים של קרינה גבוהה ונגזר מכך גם שינויים בטמפרטורה. כמו כן, נוצרים סביב האשכולות תנאי אוורור גבוהים הגורמים לאידוי מוגבר של מים מהאשכול וסביבתו והחשיפה גם משפרת את יכולת החדירה של תכשירי הדברה לאשכולות. גורם חשוב שיש להתייחס אליו בהשפעת המיקרו-אקלים הוא יכולת ההסתגלות של צמחים. כיום מכירים בכך שצמחים המתפתחים בתנאים של קרינה חזקה כמעט ואינם נפגעים מקרינת השמש, זאת כתוצאה מהסתגלות ברמה התאית, המעניקה הגנה דרך מגננונים שונים ביניהם: תיקון DNA, יצור אנטיאוקסידנטים וסנתוז רכיבים המסוגלים לספוח קרינה (Wargent and Jordan 2013). קרינת UV-B וטמפרטורה משפיעות רבות על קליפת הענב וריכוז המטבוליטים השונים בתוכו (Berli, Fanzone, and Piccoli 2011). קרינת UV יכולה גם להשפיע ישירות על פתוגנים צמחיים בדרכים שונות, למשל על התפתחות תפטיר (Fourtouni, Manetas, and Christias 1998) והנבגה בפטריות מסוג ה- *Phycomyces* הנפגעות ביכולת ההנבגה שלהן כתוצאה מקרינת UV-B (Ensminger 1993). ככל הנראה, קרינת UV משפיעה באופן שונה על פתוגנים שונים, והצורך להבין את השפעתה על האינטרקציה פתוגן-צמח ברמת המיקרו-אקלים הופכת מעניינת יותר ויותר.

4.5 התפתחות הגרגר

התפתחות הגרגר היא בצורת סיגמואיד כפול ומתחלקת ל-4 שלבים עיקריים. 1. גדילה מהירה מחנטה עד 3-7 שבועות לאחר מכן, 2. שלב הלאג/עצירה (עד בוחל) 3. הבשלה, לאחר בוחל 4. הזדקנות והצטמקות. (איור מס' 1) (Keller 2015). בכל שלב פועלות מערכות ביולוגיות שונות ודומות בתוך הגרגר. שלב ראשון: השקעה רבה בבניה וגדילה מהירה של נפח גרגר-עליה בג'יברלין (Böttcher, Boss, and Davies 2013), התמיינות וחלוקת התאים (Böttcher, Boss, and Davies 2013; Petrášek and Friml 2009). בתקופה זו יש גם עליה גדולה בחומצות האורגניות, בעיקר חומצה טארטרית ומאלית (Keller 2015). שלב שני: בזרע-התפתחות והגעה לגודל וריכוז טאנינים מקסימלי, קפיצה וירידה חדה בביטוי הורמון האוקסין (Ristic and Iland 2005) (Nitsch et al. 1960) (Nimi and Torikata 1979). בגרגר- עליה בריכוז הורמון ABA. המוביל ככל הנראה לשינוי בביטוי עתידי בגנים שאחראים בשלב הבא להבשלת הגרגר (Gambetta et al. 2010); Pattison and Catalá 2012; (Koyama, Sadamatsu, and Goto-Yamamoto 2010) שלב שלישי: בזרע -הקשחה והשחמה. הצטברות מאגרי אנרגיה של עמילן, חלבון, ליפידים ומינרלים- (Cadot, Miñana-

(Castelló, and Chevalier 2006; Rogiers et al. 2006). בגרגר- גדילה ע"י עלייה בנפח התאים והתרככות הגרגר, עליה נוספת בריכוז הורמוני ABA ואתילן, הצטברות סוכרים(גלוקוז ופרוקטוז), שינוי צבע בקליפה על ידי הצטברות פיגמנטים אנטוציאנינים, מעבר מים לגרגר בעיקר דרך השיפה, ריכוז חומצות אורגניות וכלורופיל יורדים דרמטית; (Rogiers et al. 2006; Huang and Huang 2001; Jia et al. 2011) שלב רביעי: הקטנת דופן התא ואדהיזה בין-תאית המובילה להתפרקות רקמות שלמות ואף תאים (Considine and Knox 1979a).

איור מס' 1

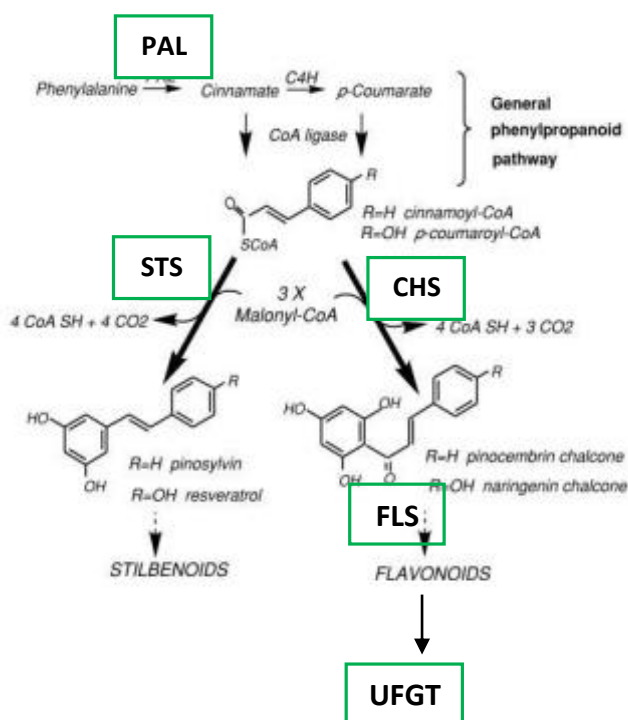


4.5.1 חילון והשפעות קרינה מוגברת בשלבים הראשונים בהתפתחות הגרגר

הרכב הפנולים בקליפה משתנה כתוצאה מחשיפה לקרינה, בעיקר בגלל שינוי בריכוז ה-Flavonols- נוגדי חמצון הידועים בתפקידם במערכת ההגנה של הצמח כנגד פתוגנים ועקות סביבה (Harborne and Williams 2000). קרינת השמש מובילה לעיבוי קליפת הגרגר ומכך להגדלת היחס קליפה-ציפה (Palliotti, Gatti, and Poni 2011) ככל הנראה עקב השפעה על חלוקת התאים בגרגר הענב (Palliotti, Gatti, and Poni 2011). החילון מוביל בתוך הגרגר לשינוי בריכוז חומצות האמינו, ב *Methoxypyrazine* - רכיב ריח חשוב בתוצר היין המוגמר (Jordan 2011) ועלייה ברמות הקרטנואידים והטרפנואידים (Young et al. 2016). חנקן מגיע לגרגר בשלב הראשון להתפתחותו דרך השיפה והעצה, בעיקר בצורת גלוטמין וניטרט. מאגר החנקן בשלב זה משמש בעיקר לבניית חומצות אמינו (Keller 2015). חומצת אמינו מרכזית בשלב הראשון של התפתחות הגרגר היא טריפטופאן המשמש כפורקסור לאוקסין החשוב בשלב זה של התפתחות הגרגר (Petrášek and Friml 2009)(Zhao 2012);

4.5.2 פעילות פנולית בגרגר בשלב ראשון

אחת הקבוצות המרכזיות והמשפיעות במגוון תהליכים מכלל המטבוליטיים המשניים בגרגר הינה קבוצת הפנולים. מאחר והכמות היחסית של פנולים בגרגר קטנה, כל שינוי קטן בהרכב והכמות, גורר השפעה נרחבת על ההתפתחות והיכולת שלו להתמודד עם מגוון תנאי סביבה (Keller 2015; Ros Barceló et al. 2003). כמו כן, בשלבים פנולוגיים מאוחרים יותר הפנולים תורמים מרכזיים לצבע ואיכות היין (Singleton 1992). סינתזת פנול בתא מתרחשת בשני מסלולים בדרך כלל, כשהעיקרי ביניהם הוא מסלול חומצה שיקימית והשני והפחות נפוץ הוא מסלול סינתזת חומצה מלנואית (Weaver and Herrmann 1997). סינתזת פנולים במסלול חומצה מלנואית, ידוע יותר בהקשר של בקטריות ופטריות (P. H. Li 1989). המבנה הטבעי והארומטי עם קבוצת ההידרוקסיל של מולקולות הפנול, מעניק לה תכונות אנטיאוקסידנטיות החשובות בהתמודדות עם תנאי עקה שונים. 30-40% מסך הפחמן המקובע בתא הצמחי עובר במסלול פנילפרופנואיד המכיל תחתיו בין השאר את מסלולי סינתזת הפנולים (איור מס' 2) (Humphreys and Chapple 2002). לפני מסלול זה קיימת צומת מטבולית חשובה הבוררת לפי צורך, בין סינתזת חומצות אמינו לסינתזת פנולים ואנזים המפתח העומד בצומת זו נקרא פנילאלנין אמוניה ליאז (Heldt and Piechulla 2011) (PAL) (תרשים מס' 1). קבוצת הפנולים נחלקת לשתי קבוצות בעלות מבנה מולקולרי דומה, Non Flavonoids ו Flavonoids (Singla et al. 2019), הנחלקות לשבע תת-קבוצות עיקריות. תת קבוצת הפנולים Non Flavonoid מצטברת לרוב בתאי קליפת הגרגר ומוגברת בדרך כלל כתגובה לפגיעה מכנית, פתוגנית וכדומה. תת הקבוצה העיקרית הפועלת במנגנון תיקון זה נקראת Stilbene (Roupe et al. 2008), ומופעלת על ידי האנזים Stilbene synthase (STS) (Yu et al. 2005). קבוצת ה Flavonoids מכילה בתוכה קבוצה פנולית בשם Flavonols, אשר בראשה עומד האנזים FLS. קבוצה זו משמשת כחוסם קרינת UV-B בתקופת התפתחות הגרגר הראשונית (Kolb et al. 2003). בין קבוצת ה Non Flavonoids ו Flavonoids עומד אנזים מפתח נוסף הראשון של הגרגר, לכיוון הקבוצה העיקרית Flavonoid אלא אם כן מתעורר צורך להגביר את יצור קבוצת ה Non Flavonoids כתגובה לתנאי עקה שונים (Schröder and Schröder 1990). בהמשך למסלול הסינתזה של האנזים FLS עומד האנזים flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) האחראי בין השאר לסינתזת האנטוציאנינים שמעניקים לפרי את צבעו האדום (X. J. Li et al. 2016).



מסלול אנזימי מפתח ליצירת פוליפנולים.

4.6 חילון מוקדם

אחת משיטות החילון המעניינות בהשפעתה על התפתחות הענבים היא חילון מוקדם בתחילתה של הפריחה ובעוצמה חזקה. חילון מסוג זה כולל הסרת עלים החל מתחתית השריג עד לגובה של שני עלים מעל קו האשכולות. שיטה זו מבוצעת משני צדי השורה וכך מייצרת תנאים של אוורור וחשיפה גבוהה לקרינה עוד לפני שגרגירי האשכול חנטו ולפני שנוף הגפן התעבה משמעותית בצפיפות עלים גבוהה. מחקרים דיווחו שחילון חזק בתקופה מוקדמת של תחילת פריחה משפיע על כמות הגרגירים לאשכול בזן מרלו והקטנה יחסית של גודל גרגר בתוך האשכול בזן קברנה סובניון. (Koundouras 2012). כתוצאה מהקטנת גודל הגרגירים ומספרם, התפתח אשכול מאורר עם הפחתה בשעור הרקבנות יחד עם שיפור ההבשלה ואיכות היבול (Intrieri et al. 2004)(Poni et al. 2006). במחקר שנעשה בפולין מצאו שחילון מוקדם הגביר משמעותית את ריכוז הפוליפנולים הכללי, כמות האנטוציאנינים הכללית, ספציפית את המולקולה flavan-3-ols, flavonol, ועוד (Kamila M. et.al 2016).

4.7 מחלות נוף - כשותית וקמחון

עיבוד הומוגני ואינטנסיבי על תא שטח מצומצם, מביא עמו את אחת הבעיות הקשות של האנושות בהקשר של מזון. צרה זו באה לידי ביטוי במגוון רחב והרסני של פתוגנים חזקים המאלצים אותנו להשתמש בחומרי הדברה רבים. חומרי ההדברה ידועים ביתרונותיהם בטיפול חלקי כנגד מחוללי המחלות והעלאת יבול, במקביל לחסרונותיהם הקשורים לפגיעה בסביבה, בבריאות האדם ועלותם הגבוהה. בין המחלות הרבות התוקפות את הכרם, נמנות מחלות הקמחון (Powdry mildew) וכשותית הגפן (Downy mildew) הנגרמות על ידי הפטריה *Erysiphe necator* והאאומיצט *Plasmopara viticola* בהתאמה. שני האורגניזמים הללו ביוטרופים אובליגטורים התלויים ברקמה הירוקה של הגפן על מנת להתקיים

ולהשלים מחזור חיים (Armijo et al. 2016). עיקר הנזק ממחלות אילו נגרם בתקופת הצימוח הראשונה ועד שבועיים עד ארבעה שבועות אחר שלב החנטה (Gadoury et al. 2003). שתי המחלות מתבססות בעיקר על עלים צעירים, תפרחות וגרגירים צעירים (Gabaston et al. 2017) (Rumbolz et al. 2002). מחלת הכשותית יכולה לגרום להתייבשות של קטעי אשכול ואשכולות שלמים ואילו הקמחון פוגע בדרך כלל בגרגרים ומונע את התפתחותם התקינה.

4.8 השפעת חילון על התפתחות מחלות

מחלות נוף פטרייתיות מעדיפות תנאי אקלים לחים במידה כזו או אחרת המתגברים בצל העלים ובתוך נוף הגפן (Daniel O. Chellemi and J.J. Marios 1992). לדוגמא, *Plasmopora viticola* מקבוצת האאומיקוטה מצליחה לחדור לפונדקאי רק בתנאים של 100 אחוז רטיבות עלה (מים חופשיים) (Cesare G. et.al 2011). לעומת הפתוגן *Erysiphe necator* מקבוצת האסקומיקוטה אשר מעדיף תנאי לחות פחותים מכך עם העדפה לתנאי צל (Willoquet et al. 1996). התרומה המוכרת של חילון בהפחתת נזקי פתוגנים אלו, מבוססת על כמה מנגנונים המשפיעים על גורמי המחלה עצמם: א. החילון מאפשר לחומרי הריסוס להגיע טוב יותר אל אזור האשכולות ב. העלאת הטמפרטורה על הרקמה בגרגר החשוף והקרינה הגבוהה עצמה, פוגעות בהתפתחות מחלת הקימחון (Austin et al. 2011). זהו מנגנון עדין של משחק בין תנאי לחות משתנים לצל. בנוסף למנגנונים אלה, חילון החושף את האשכולות לקרינה וטמפרטורה גבוהה יותר, יכול לעודד תהליכי הגנה מטאבוליים וכימיים בגרגירים (Harborne and Williams 2000). עבודות רבות נעשו בהקשר של השפעת חילון על ריקבונות כתוצאה מהאיזוי המוגבר של הלחות סביב אזור האשכולות אך מעט מאוד נעשו בהקשר של השפעות חילון על מחלות הקימחון ומעט יותר בהקשר של מחלת הכשותית.

5. היפותזה

חילון חזק-מוקדם, יגביר את עמידות הענבים כנגד מחלות הנוף כשותית וקימחון כתוצאה מעקה קרינתית מכוונת המפעילה תהליכים מטבוליים הידועים בפעולתם במנגנון ההגנה הצמחי. בנוסף תהיה לו השפעה על היכול ברמת גודל הגרגר והאשכולות, כתוצאה משינוי מאזן המוטמעים בצמח בזמן החנטה.

מטרות ספציפיות

לבחון את ההשפעה של חילון חזק בתקופה של תחילת פריחה על הגורמים הבאים:

- a. תנאי מיקרו-אקלים סביב האשכולות.
- b. רגישות הגרגירים למחלות הכשותית והקימחון.
- c. ביטוי של גנים הפועלים במערכת ההגנה של גרגירי הגפן.
- d. שינויים ברמת המטבוליטים על ידי שימוש ב GC-MS/MS ו LC.
- e. שינויים בגודל ומשקל אשכול.

6. שיטות וחומרים

6.1 ניסוי השטח

תוצאות המחקר מבוססות על שתי סדרות ניסויים: ניסוי "גדול" נערך בכרם של מרום גולן בעמק קוניטרה כלל מספר טיפולי חילון ובדק את השפעתם על המיקרו-אקלים וביצועי הגפן (גובה ואיכות היבול) הטיפולים כללו: 1) עם תחילת

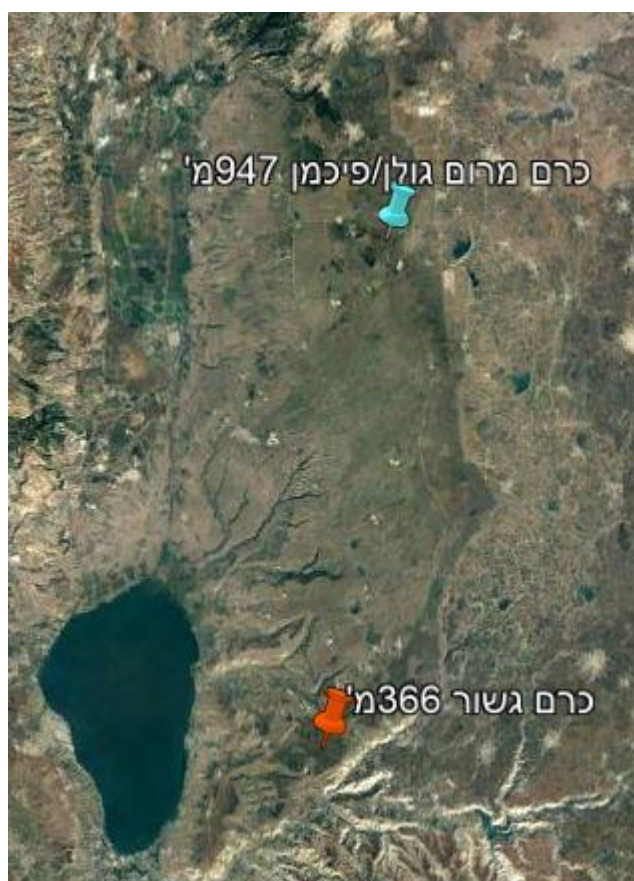
הפריחה - חילון חזק בו הוסרו כל העלים מתחתית השריג ועד שני עלים מעל האשכול העליון משני צידי השורה. שאר הטיפולים בוצעו אחר חנטה בגודל גרגר של 4-6 מ"מ בצד המזרחי של השורות: (2) חילון חזק, עד מעל גובה האשכולות, (3) הסרת עלים מבסיס השריג ועד גובה האשכולות, (4) הסרת 2-4 עלים לשריג מעל גובה האשכולות, (5) הסרת עלים פנימיים בגובה האשכולות. הניסוי הגדול בוצע במרום גולן על שני זנים אדומים: קברנה סובניון ושיראז ועל שני זנים לבנים: סובניון בלאן ווינייה. ניסויים "קטנים" נערכו בשני אתרים ברמת הגולן, האחד בכרם גשור בדרום הרמה, (35.740, 32.774 364m OSL) נטיעה 343° ושני בצפון רמת הגולן בחוות הניסיונות פיכמן של מו"פ צפון, חלקת כרם בצמוד לכרמי מרום גולן החולקים תנאים מטאורולוגיים זהים (35.803, 33.124 947m OSL). נטיעה 40° (תמונה 1) שני הניסויים בוצעו בשני הזנים האדומים המובילים: קברנה סובניון ושיראז. כיוון הנטיעה בגשור צפון מערב לדרום מזרח ופיכמן צפון-מזרח לדרום מערב. הניסוי באתר גשור הועמד ב-6 בלוקים וב-6 חזרות פנימיות של גפנים. באתר פיכמן הוצבו ארבעה בלוקים עם ארבע גפנים לחזרה.

6.1.2 טיפולי הניסוי:

בניסוי ה"קטן": בכל אתר ובכל זן, בוצע חילון בתחילת הפריחה ע"י הסרת כל העלים, (כשישה לשריג) החל מתחתית השריגים הצעירים ועד שני עלים מעל התפרחות (תמונה 2). החילון התבצע משני צדי השורה. כביקורת שימשו גפנים ללא חילון כלל. ביקורת הוגדרה כ"לא מחולן" על מנת לשמש מדד להשוואה יחסית לחילון הסטנדרטי שבאותו שלב פנולוגי טרם עובר חילון. חילון סטנדרטי מאופיין כחילון חזק עד מעל גובה האשכולות בגודל גרגר אפונה (טיפול 2 בניסוי ה"גדול"). בנוסף, אופי החילון הסטנדרטי הוא הדומה ביותר בשלב פנולוגי מאוחר יותר בעונה לחילון בזמן פריחה. בשורות הניסוי הקטן נמנענו מריסוס משקי נגד הפתוגנים קימחון וכשותית אך בניסוי הגדול התבצע ריסוס משקי כמקובל. מועדי פריחה וביצוע החילון לפי שנים ואתר:

מרום גולן (פיכמן)-26/5/20, 5/19/29, 21/5/18.

גשור- 14/5/19, 14/5/20





ביקורת קברנה סובניון



חילון קברנה סובניון

6.2 דיגום אשכולות לאילוח

6.2.1 מטרות הדיגום

הדיגום התבצע לשלוש מטרות: 1. אילוח בשני הפתוגנים במעבדה לבחינת הבדלים ברגישות להדבקה 2. הפקת mRNA לבחינה של התבטאות דיפרנציאלית של גנים 3. הפקת מטבוליטים משניים וזיהוי שלהם.

6.2.2 מועדי דיגום

החל משבוע לאחר פעולת החילון, הגענו לשטח לדיגום האשכולות מארבעה שלבים פנולוגיים שונים: סוף פריחה, סוף חנטה, גרגר בגודל 4-6 מ"מ וגרגר גדול מ 6 מ"מ. למטרת אנליזות מטבוליות וגנטיות, נאספו דוגמאות מסוף חנטה וגרגר בגודל 4-6 מ"מ.

6.2.3 שיטות דיגום

לאנליזות גנומיות ומטבוליות נאספו גרגרים (כ 3 גרם מכל חזרה לכל אנליזה). לתוך שתי מבחנות שונות, האחת שימשה לבחינת ביטוי גנים - והוכנסה ישירות לתוך חנקן נוזלי, ואילו השנייה שימשה לבחינת מטבוליטים משניים והונחה בקרח. הגרגירים נאספו משני צידי השורה ובאופן אחיד מארבעה אשכולות מייצגים, את חיתוך הגרגירים ביצענו באמצעות

מספריים עדינים. בנוסף, לשם אילוח במעבדה נאספו מכל חזרה 2 שריגים, כל אחד עם שני אשכולות (סה"כ 4 חזרות), שהוחזקו עד ההגעה למעבדה בכלי קיבול בתנאים צוננים ולחים.

6.3 מקור המידבק להדבקות מכוונות במעבדה

עלים מנביגים בכשותית נאספו מידי שבוע ממקבץ של 4 גפנים הגדלות בשאר יישוב. עלים עם קימחון נלקחו מעציצי גפנים מהזנים קברנה סובניון וסוביניון בלאן שהוחזקו בחדר גידול, בטמפרטורה של 22 מעלות צלזיוס בתנאי אור-חושך 8/16 שעות.

6.4 אילוח אשכולות במעבדה בכשותית וקמחון

6.4.1 הכנת חומר צמחי להדבקה

2018-2020 אשכולות טריים הובאו אל המעבדה בימים בהם התבצע דיגום מהשטח. בשנים 2018-19 כל אשכול חולק למקטעים קטנים (כתפיים). מכל חזרה בשטח נילקחו כתפיים (חזרות פנימיות). את הכתפיים ייצבנו בתוך צלחת פטרי שהכילה 10% אגר-אגר (תמונה א3). מכל חזרה מהשטח הוכנה צלחת אחת להדבקה בקימחון, שנייה להדבקה בכשותית ושלישית נשמרה כביקורת. ב2020 ננקטה שיטה שונה: מכל חזרה, טיפול וזן הובאו שישה שריגים עם שני אשכולות. זוג שריגים מכל חזרה הוכנס לבקבוק בנפח 0.5 ליטר עם מי ברז ואקונומיקה 0.03%(תמונה ב3), בקבוק אחד שימש להדבקה בקמחון, בקבוק שני להדבקה בכשותית ובקבוק שלישי כביקורת. השריגים הוחזקו על מדפים סגורים בניילון בחדר הגידול. בכדי לשפר את שרידות האשכולות, במועד האילוח האחרון (10/6/20), נקטנו בשיטה מעט אחרת, בה השריגים קובעו בתוך ספוגים לחים שמוקמו בתוך ארגז פלסטיק סגור בנפח 50 ליטר (תמונה ג3).

א



ב



ג



ד



ה



6.4.2 הכנת המדבק

לאילוח פתוגנים בשנים 2018-19, שטפנו מנבגי *Plasmopara viticola* ונבגי *Erysiphe necator* טריים מעלים מאולחים. את העלים שטפנו לתוך משפך ביכנר דרך נייר סינון סטרילי של 0.45 מיקרון. את הנבגים/מנבגים שנשארו על נייר הסינון שטפנו במים מזוקקים לתוך מבחנת 50 מל והבאנו את ריכוז הנבגים/מנבגים בתוכה ל- 7×10^4 . את התרחיף ריססנו על גבי מקטעי האשכולות. הצלחות או הכלים עם האשכולות הונחו בתוך קופסאות סגורות בחדר גידול בטמפ' של 21 מעלות צלזיוס ומעל 90% לחות.

החל מחמישה ימים לאחר אילוח, בצענו ספירה מידי יומיים שלושה. התחלנו לחפש הנבגה חדשה של שני הפתוגנים (תמונה 3ד'-*Erysiphe necator* ו-3ה'-*Plasmopara viticola*) על הגרגירים והשיזרות. את ספירת הקמחון (תמונה 3ד') ביצענו תחת בינקולר ואילו ספירת גרגרים עם כשותית(תמונה 3ה') בוצעה ללא אמצעי עזר.

אילוח כשותית 2020 התבצע באופן זהה ל-2018-19. אילוח קמחון התבצע בשתי שיטות: 1) באופן דומה לאילוח כשותית אך בריכוז 8×10^4 . 2) נייעור עלים מכוסים בנבגים ישירות מעל האשכולות. במועד האילוח האחרון 10/6/20 בכרם פיכמן ננקטה רק שיטה מס' 1. הגרגרים מכל שיטות האינקובציה לאורך השנים הוחזקו בחדר עם טמפ' של 21 מעלות בתנאי אור-חושך 8/16. במקביל לכל אירוע אילוח, נשמרו אשכולות ביקורת מכל טיפול, על מנת לוודא שהפתוגנים לא הגיעו מהכרם.

6.5 ספירת נגיעות טבעית של מחלות

לקראת הבוחל הגענו לספור נגיעות טבעית של כשותית וקמחון בשטחי המחקר(ניסוי גדול וקטן). הספירה התבצעה בכל חזרה על 15 אשכולות מכל צד בצורה אקראית (סה"כ 30 אשכולות לחזרה). ב 2019, הספירה בניסוי הקטן בגשור התבצעה על 48 אשכולות לחזרה שסומנו מראש בתחילת הניסוי. הספירה ציינה את חומרת הנגיעות באחוזים בתוך האשכולות הנגועים בכשותית וקמחון. ב 2018 ביצענו גם ספירה בניסוי הגדול בכרם מרום גולן על 4 זנים: קברנה סובניון, שיראז, סובניון בלאן וויוניה. כל הזנים והטיפולים בניסוי הגדול קיבלו את אותם הטיפולים נגד מחלות.

6.6 מדידות מטאורולוגיות

ביום החילון הצבנו בכל חזרה אוגרי נתונים (מסוג HOB0) שתיעדו את הקרינה והטמפ' באזור האשכולות כל חצי שעה למשך 6 שבועות. בנוסף השתמשנו בנתונים מהתחנה המטאורולוגית של יקבי רמת הגולן הנמצאת בקרבת חלקות הניסוי.

6.7 ספירת מכות שמש (ניסוי גדול)

בשנים 2017-2019 נספרו נזקי השמש באשכולות בזנים קברנה סובניון, שיראז וסובניון בלאן. הספירה התבצעה ב 2017 מצד אחד של השורה על 25 אשכולות אקראיים בכל חזרה וצוינה חומרת הנגיעות בכל אשכול בסולם של שלוש דרגות (עד 3 גרגירים באשכול, עד 10 גרגירים באשכול, עד חצי אשכול). ב 2018 לא היו כלל פגיעות שמש. ב 2019 התבצעה ספירה משני צידי השורה בחמש גפנים לחזרה על 3 אשכולות מכל צד וצוין מס' הגרגירים הפגועים בכל אשכול. הנתונים נאספו משלושה טיפולים: חילון מוקדם, חילון מאוחר וביקורת לא מחולנת.

6.11 הכנת C-DNA

שימוש בקיט Verso cDNA synthesis. לכל דוגמת RNA מכינים מיקס של אנזים הוורסו יחד עם הבופרים שלו מהקיט. כנגד כל דוגמא מכניסים 4 מק"ל של cDNA synthesis buffer, 2 μ l של dNTP, 1 μ l של RNA primer, random Hexamer, 1 μ l של RT enhancer ו-1 μ l של RT enzyme. מוסיפים כמות RNA לפי ריכוז הדוגמא שהתקבל (בחישוב של נ"ג ל-1000 μ l) ומשלימים ל-20 μ l מים עם DEPC. לאחר מכן מכניסים לתוך מכשיר ה-PCR לבניית ה-DNA המשלים.

6.12 כיוול פריימרים

מוהלים את הפריימרים (forward,reverse) יחד לריכוז של 2 פיקומול. במקביל, מוהלים את אחת מדוגמאות ה-cDNA אל 4 מבחנות חדשות בריכוזים של 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 ו-1. מכל דוגמה כזו עושים 3 חזרות לבחינת הפריימרים. לכל דוגמא מוסיפים 9.96 μ l אנזים taq מהקיט SYBR green mix מריצים כל פריימר עם כל המיהולים של ה-cDNA ב-3 חזרות (טרפליקאז). את הדוגמאות הטענו לתוך פלטה ייעודית והכנסנו למכשיר RT-PCR. את התוצאות (CT) הצבנו בתוך טבלת אקסל ובגרף פיזור (לכל פריימר בנפרד) על הגרף מרכיבים קו לינארי עם משוואת קו ישר אשר ישמש למדידת ביטוי הגן בדוגמאות הניסוי.

6.13 מיצוי וזיהוי חומרים ב-LC-MS/MS

דוגמאות נטחנו לידי אבקה דקה עם מכתש ועלי באמצעות חנקן נוזלי והוכנסו לייבוש בהקפאה בתוך לופלייזר למשך 4 ימים, לאחר מכן נשקל 50 מ"ג לכל דוגמא והוספנו 10 מל Methanol LCMS. את הדוגמאות טחנו בתוך הומוגנייזר ל-30 שניות והכנסנו לאינקובציה וטלטול ב-4 מעלות למשך 20 דקות. לאחר מכן ביצענו סירכוז ב-4000rpm ל-10 דקות והעברנו את הנוזל לתוך מבחנות אפנדורף עם מזרק פילטר דרך סביבון NS syringe PTFE 22 מיקרומטר. מהלבו את הדוגמאות לתוך ווילים של HPLC פי 2 ב-Methanol LCMS לריכוז של 25000ppm. על כל 10 דוגמאות עשינו pool של דוגמאות ו-blank של Methanol LCMS. את הדוגמאות המוכנות הרצנו בתוך מכשיר LC/MS/MS Q EXACTUVE PLUS. THERMO FISHER-Orbit trap.

6.14 ניתוח סטטיסטי

הניתוחים הסטטיסטיים נעשו באמצעות תוכנת JMP וכללו את המבחנים LSD, t.test, pooled t.test. מובהקות הוגדרה כ- $p < 0.05$.

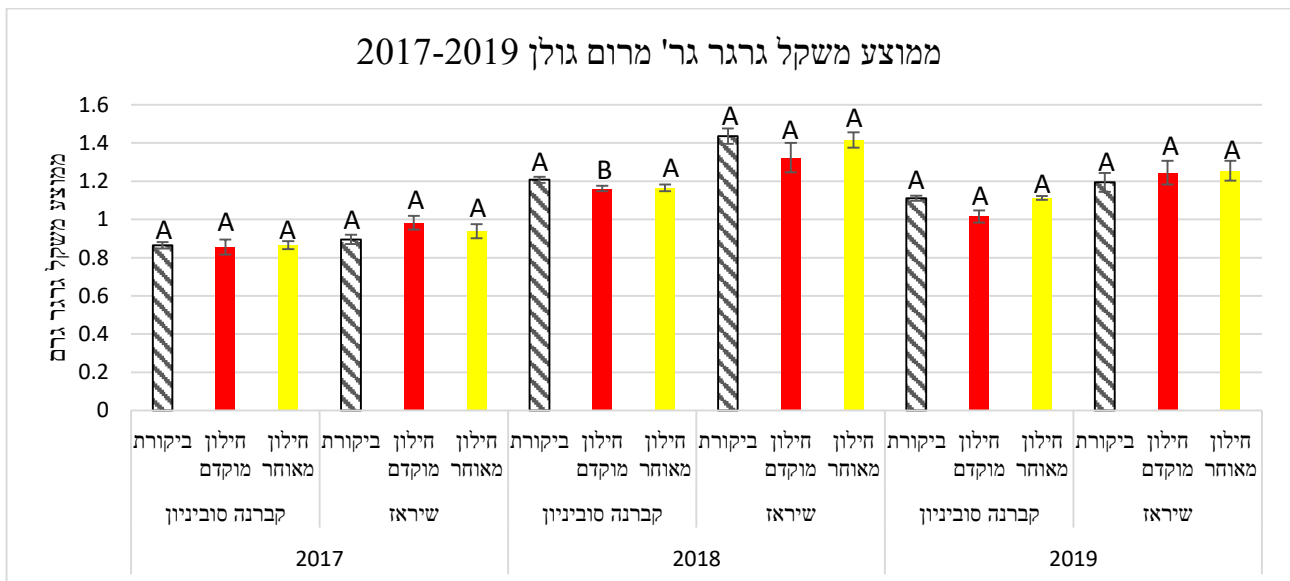
7. תוצאות

7.1 נתוני יבול 2017-2019 -חילון מוקדם הקטין את משקל האשכול אך לא את גודל הגרגר בזן קברנה סובניון

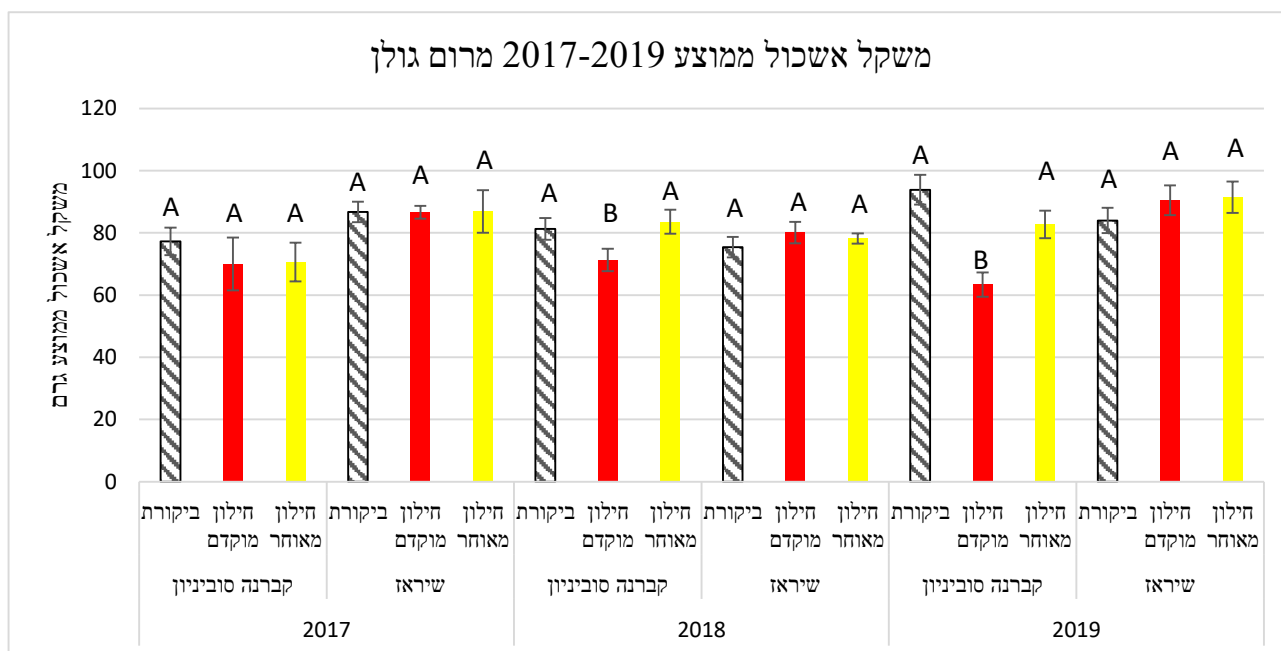
חשיפת האשכולות לקרינה בזמן רגיש של פריחה, יכולה להשפיע על מדדי חנטה ברמת הגרגר והאשכולות. השפעה זו בדקנו באמצעות נתוני יבול ביום הבציר כחלק מהניסוי הגדול. בין השנים 2017-2019 נמדדו מידי שנה מדדי גרגירים ואשכולות בחלקת הניסוי במרום גולן בזנים קברנה סובניון ושיראז. ניתן לראות שברמת הגרגר הבודד לא נצפתה השפעה

עקבית לאורך שנות המחקר (גרף מס' 1), אך בהסתכלות על ההשפעה על משקל האשכול ניתן לראות מגמה (מובהקת בחלק מהשנים) של הקטנת משקל אשכול בזן קברנה סוביניון (גרף מס' 2). זן שיראז לא הושפע באף אחד מהמדדים.

גרף מס' 1



ממוצע משקלי גרגר - ההשפעה של חילון מוקדם על משקל הגרגר בקברנה סוביניון ושיראז ביום הבציר בשנים 2017-2019. הנתונים מתייחסים לשלושה הטיפולים של חילון מוקדם חילון מאוחר וביקורת לא מחולנת. הניסוי כלל 5 חזרות מכל טיפול כאשר בכל חזרה נדגמו 100 גרגרים מ 20 אשכולות (מכל חלקי האשכול). HSD $p < 0.05$.



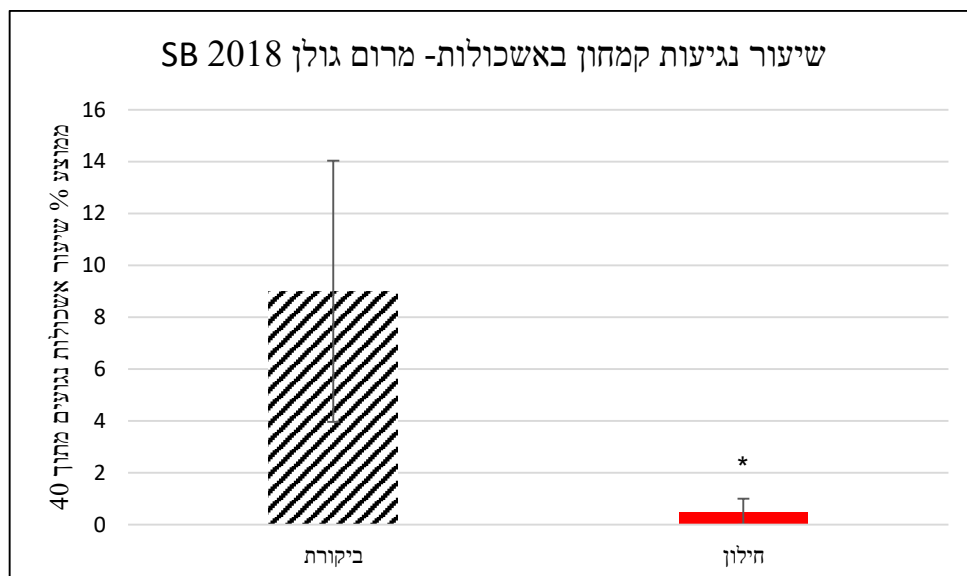
ממוצע משקל אשכול בגרם ביום הבציר בין השנים 2017-2019. הנתונים מתייחסים לזנים קברנה סובניון ושיראז בשלושה סוגי הטיפולים של חילון מוקדם חילון מאוחר וביקורת לא מחולנת. ביום הבציר ניספרו ונשקלו כל האשכולות בחמש גפנים בכל חזרה וחושב משקל האשכול. הניתוח זה לגרף מס' 1.

7.2 חילון מוקדם הפחית את עוצמת הנגיעות במחלת הקמחון בכרם

בכל עונה לקראת הבוחל, הגענו לספור נגיעות טבעית של כשותית וקמחון בשטח. ספירות בניסוי הגדול שנעשה על הזנים קברנה סובניון, שיראז, ויוניה וסובניון בלאן (2018). ובניסוי הקטן בזנים קברנה סובניון ושיראז (2019-2020). ספרנו את שיעור וחומרת הנגיעות באשכולות הגפנים כדי להראות אם יש השפעה לטיפול החילון המוקדם על הפחתת נגיעות מחלות הנוף. חשוב לציין שהנגיעות הטבעית באופן כללי הייתה נמוכה בכל הזנים לאורך שנות הניסוי למעט 2020 בה הייתה נגיעות גבוהה של קמחון. הספירה התבצעה ב-15-20 אשכולות אקראיים מכל צד של השורה. הספירה ציינה את שיעור האשכולות הנגועים ואת וחומרת הנגיעות בתוך האשכול. בכל שנה בשני הזנים מצאנו הבדלים מובהקים בהשפעת הטיפול על הפחתת מחלות הנוף.

7.2.1 נגיעות טבעית בניסוי הגדול (מרום גולן) 2018 SB

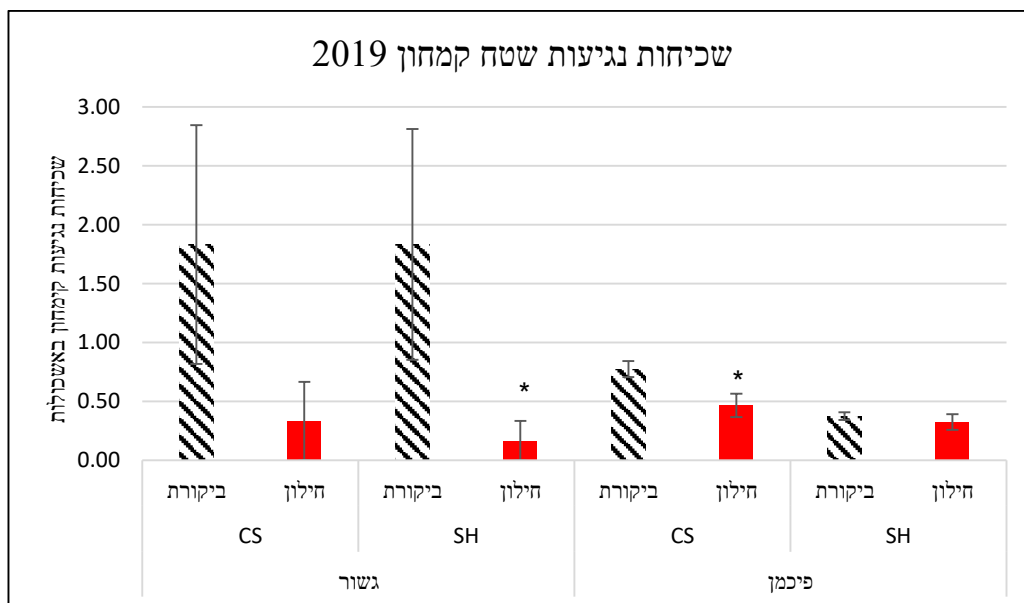
ספירות התבצעו ב-2018 בניסוי הגדול (חלקות שרוססו נגד המחלות) בזנים קברנה סובניון, שיראז, ויוניה וסובניון בלאן (23/8/18). באותה שנה רק בזן סובניון בלאן נמצאה נגיעות נמוכה בקמחון (גרף מס' 3). הנתונים מתארים את חומרת הנגיעות ומציגים הבדל מובהק בין הטיפול לביקורת. כמו כן, לא הופיעה כשותית בשטח.



שיעור נגיעות בקמחון בזן סובניון בלאן בין טיפול החילון המוקדם לביקורת לא מחולנת בכרם מרום גולן ב-23/8/2018. הניסוי כלל 5 חזרות מכל טיפול כאשר בכל טיפול נספרו 40 אשכולות. $t.test p < 0.05$

7.2.2 נגיעות טבעית בניסויים הקטנים (ללא ריסוסים) קברנה סובניון ושיראז בפיכמן וגשור 2019

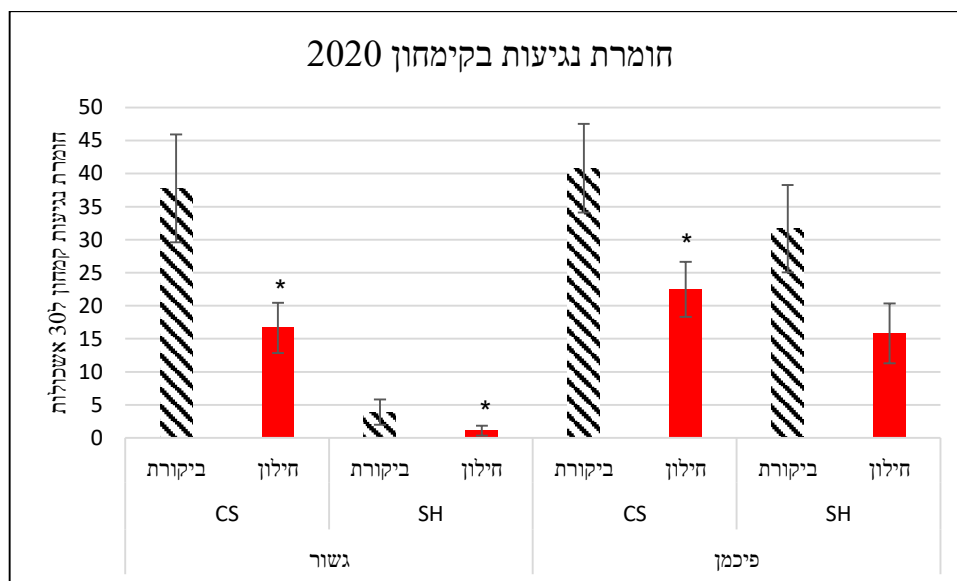
במגמה דומה לתוצאות נגיעות השטח 2018 בזן סובניון בלאן שבניסוי בגדול (גרף מס' 3), ב-2019 ספרנו בניסוי הקטן, שלא רוסס נגד מחלות, נגיעות טבעית בזנים קברנה סובניון ושיראז. יש לציין כי תקופת דיגום הניסוי היא לפני מועד החילון המסחרי ובהתאם כביקרות שימשו גפנים לא מחולנות. הספירה התקיימה בתקופה שלקראת הבוחל בשני אתרי הניסוי של אותה שנה (גשור-8/7/2019 ופיכמן-4/7/2019). נגיעות משמעותית נמצאה שוב רק במחלת הקמחון, בגשור עומס המחלה היה גבוה יותר מאשר בפיכמן. שכיחות הנגיעות בקמחון בטיפולי הביקורת הייתה גבוהה מטיפולי החילון הבדלים מובהקים בין הטיפולים נצפו בזן קברנה סובניון בפיכמן ובזן שיראז בגשור (גרף מס' 4). באף אחת מהשנים לא הופיעה כשותית בשטח.



שיעור הנגיעות בקמחון בטיפול החילון המוקדם ובביקורת לא מחולנת. הספירה נערכה לקראת תחילת הבוחל באתרים פיכמן וגשור בזנים קברנה סובניון ושיראז. הטיפולים בגשור כללו 6 חזרות ובכל חזרה נספרו 15 אשכולות והטיפולים באתר פיכמן כללו 4 חזרות כאשר בכל חזרה נספרו 30 אשכולות. $p < 0.05$ t.test.

7.2.3 נגיעות טבעית בזני קברנה סובניון ושיראז בכרמים פיכמן, גשור 2020

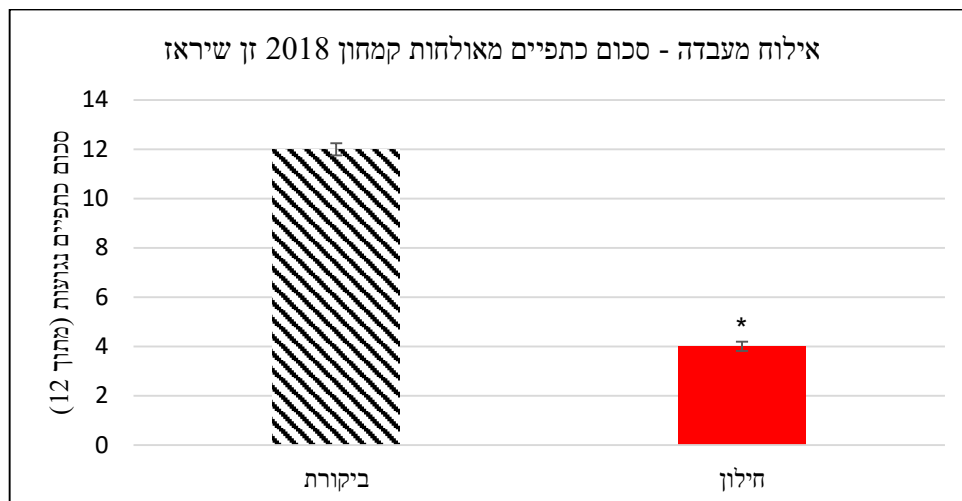
בשנת 2020 חזרנו על הניסוי בשני הזנים ובשני הכרמים גשור ופיכמן. נגיעות קמחון בשני הכרמים באותה שנה הייתה גבוהה יחסית בהשוואה לשנות המחקר 2018-2019. בדומה לתוצאות של שנים קודמות לא הייתה נגיעות של כשותית בכלל וטיפול הביקורת הראו נגיעות גבוהה יותר מאשר טיפולי החילון. ניתן לראות שזן קברנה סובניון, סבל יותר מקמחון לעומת שיראז בשני האתרים (גרף מס' 5). זן שיראז באתר גשור הראה נגיעות נמוכה מאוד בקמחון ביום הספירה.



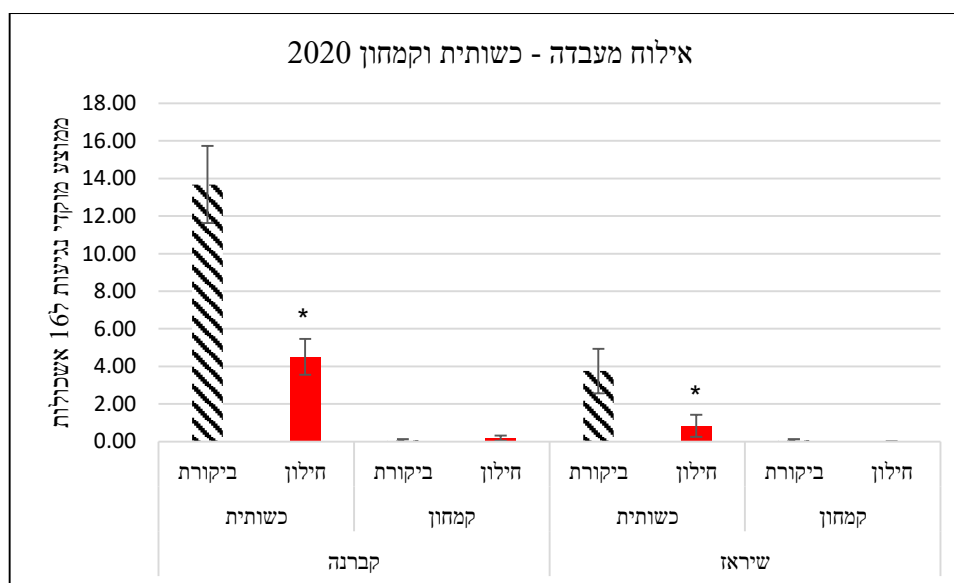
שיעור נגיעות בקמחון בזנים קברנה סובניון ושיראז בין טיפול החילון המוקדם לביקורת לא מחולנת בשני כרמי הניסוי ב-20/7/2020. הטיפולים בגשור כללו 6 חזרות ובאתר פיכמן 4 חזרות. בכל חזרה נספרו 30 אשכולות. $t.test p < 0.05$.

7.3 אילוח מכוון במעבדה 2018-2020 - גרגרים מטיפול החילון נדבקו פחות בכשותית וקמחון

רצינו לבודד את השפעת טיפול החילון על האשכול מההשפעה הישירה על הפטריה ולשם כך ביצענו הדבקות מבוקרות על אשכולות מנותקים בתנאים זהים במעבדה. אחת לשבוע ממועד טיפול החילון נאספו אשכולות מכל חזרה, בכל טיפול בכל זן, עד הגעת גרגר לקוטר 6 מ"מ. ב-2018-2019 הניסוי בוצע על מקטעי אשכולות של קברנה סובניון ושיראז שאולחו בכשותית וקמחון והוכנסו לאינקובציה בחדר גידול (תמונה 3א). מקור האשכולות לניסוי ב-2018 היה משני הזנים מכרם פיכמן וב-2019 גם מכרם גשור. במעבדה נספרו מס' מוקדי נגיעות למקטע אשכול (2018-2019) או לאשכול (2020). בשנת 2018 ניתן לראות במועד איסוף 29/5/18 בזן שיראז (מועדי חילון פרק 6.1), שההידבקות בקימחון היתה גבוהה יותר בגרגרים שמקורם מטיפול הביקורת לעומת גרגרים מטיפול החילון המוקדם (גרף מס' 6). בשאר מועדי ההדבקה הנסיונות הסתיימו ללא הצלחה – ללא הדבקות. ב-2020 אולחו שוב אותם הזנים מאותם הכרמים. אך בשנה זו שינינו את שיטת העבודה בגלל כשלונות בשנים הקודמות בהן מקטעי הכתפיים שאולחו לא הצליחו לשמור על חיוניות מספקת עד הופעת הנבגים והמנבגים. בשנה האחרונה ההדבקה נעשתה על אשכולות שלמים שנשמרו במעבדה על שריגיהם (תמונה 3 ב'-ג') ניתן לראות שבמועד איסוף אחד (9/6/20 גרף מס' 7) האילוח בכשותית היה מוצלח מאוד (מועדי חילון פרק 6.1). במועד זה רמות הנגיעות באשכולות שנידגמו מטיפול הביקורת בשני הזנים היו משמעותית גבוהות יותר מאשכולות שמקורם בטיפול החילון. ההדבקה בקימחון במועד זה הייתה אפסית וכך גם ביתר ניסיונות האילוח בשתי הפטריות במועדים האחרים ב-2020.



סכום הכתפיים שהראו הדבקה חיובית בקמחון שבוע לאחר האילוח. ההשוואה נעשתה בין טיפול החילון המוקדם ובין הביקורת הלא מחולנת בון שיראז מכרם פכמן ב-29/5/2018. כל חזרה הכילה 12 כתפיים. $p < 0.05$ t.test.



ממוצע מוקדי נגיעות באשכולות מאולחים בכשותית וקמחון. נספרה נגיעות מאוד נמוכה בקמחון. $p < 0.05$. כל חזרה כילה 16 אשכולות.

7.4 חילון מוקדם השפיע באופן מובהק על מדדי מיקרו-אקלים של קרינה וטמפרטורה באזור האשכולות ב-2018

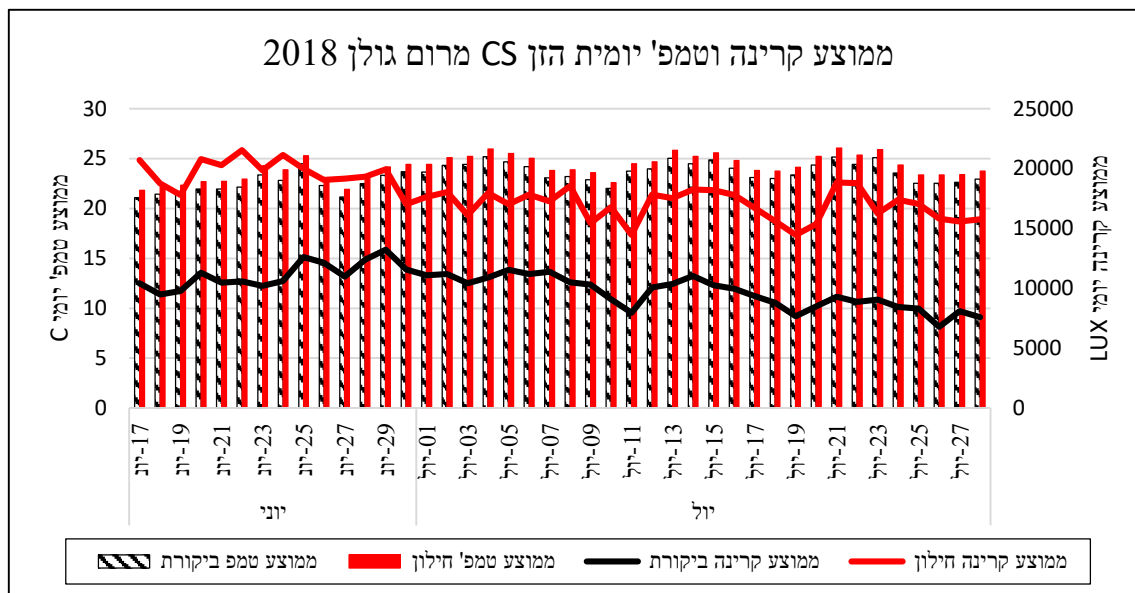
2020

פעולת הסרת עלים, באופן טבעי חושפת את אזור האשכולות לתנאי קרינה וטמפרטורה שונים לעומת גפנים לא מחולנות. כתוצאה מפעולת החילון השתנו תנאי המיקרו-אקלים סביב האשכולות ואופיינו ברמות קרינה וטמפרטורות גבוהות יותר בגפנים של הטיפול המחולן לעומת הביקורת (גרף 8-12).

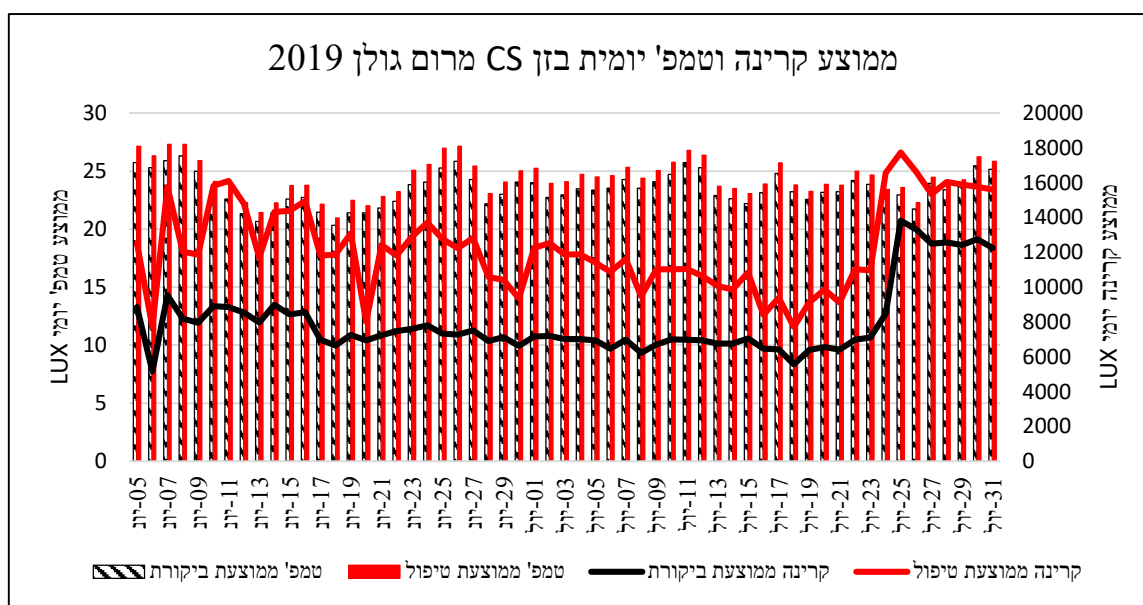
7.4.1 נתוני קרינה וטמפ' יומיים לחודשים יוני יולי בכרם מרום גולן 2018-2019

ב-2018 נמדדו בכרם מרום גולן נתוני מיקרו-אקלים של קרינה וטמפ' בזן קברנה סובניון ותועדו בהם הבדלים מובהקים בין הטיפול לביקורת (גרף מס' 8). רמות הקרינה והטמפרטורה בטיפול החילון היו גבוהות יותר מתחילת פריחה ועד גודל גרגר אפונה. אותה מגמה נצפתה גם בשנת 2019.

גרף מס' 8



גרף מס' 9

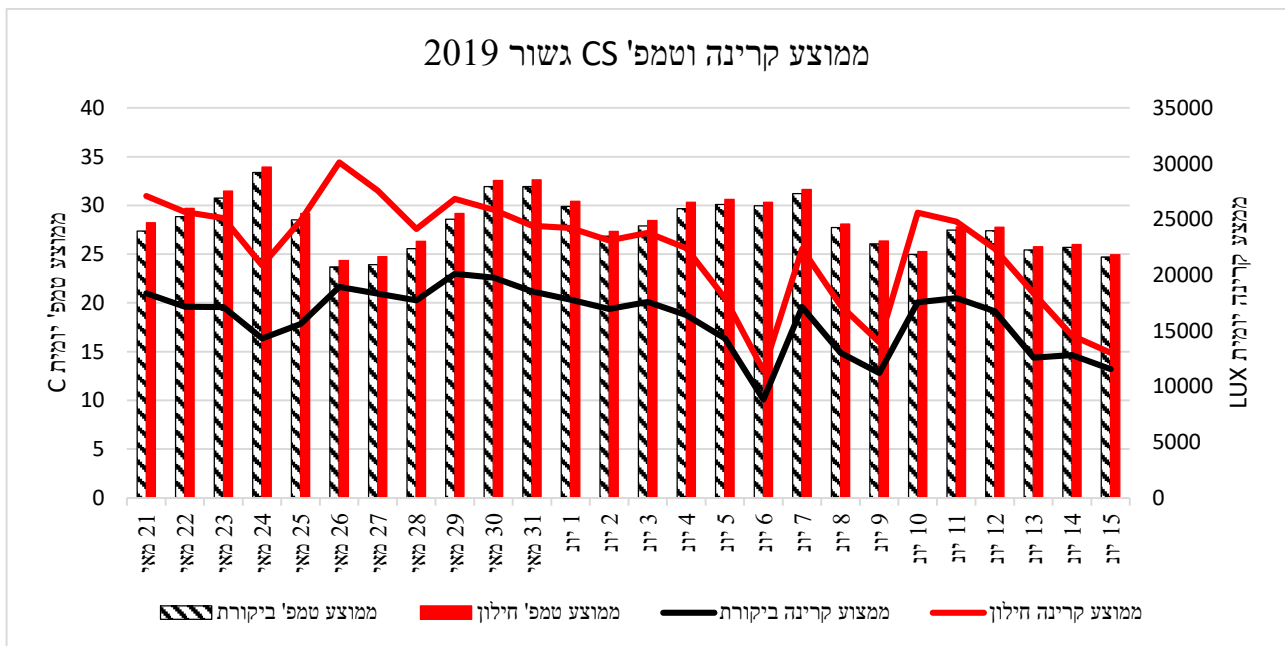


ממוצע קרינה וטמפ' יומית באזור האשכולות בתקופת יוני יולי בזן קברנה סובניון, כרם מרום גולן. כפי שנאספו באמצעות אוגרי נתונים אשר הוצבו באזור האשכולות עם החיישן לכיוון מזרח. הנתונים מוצגים עבור טיפול החילון המוקדם לעומת ביקורת לא מחולנת. מספר החזרות 6 (ממוצע קרינה וטמפ' יומי $p < 0.05$)

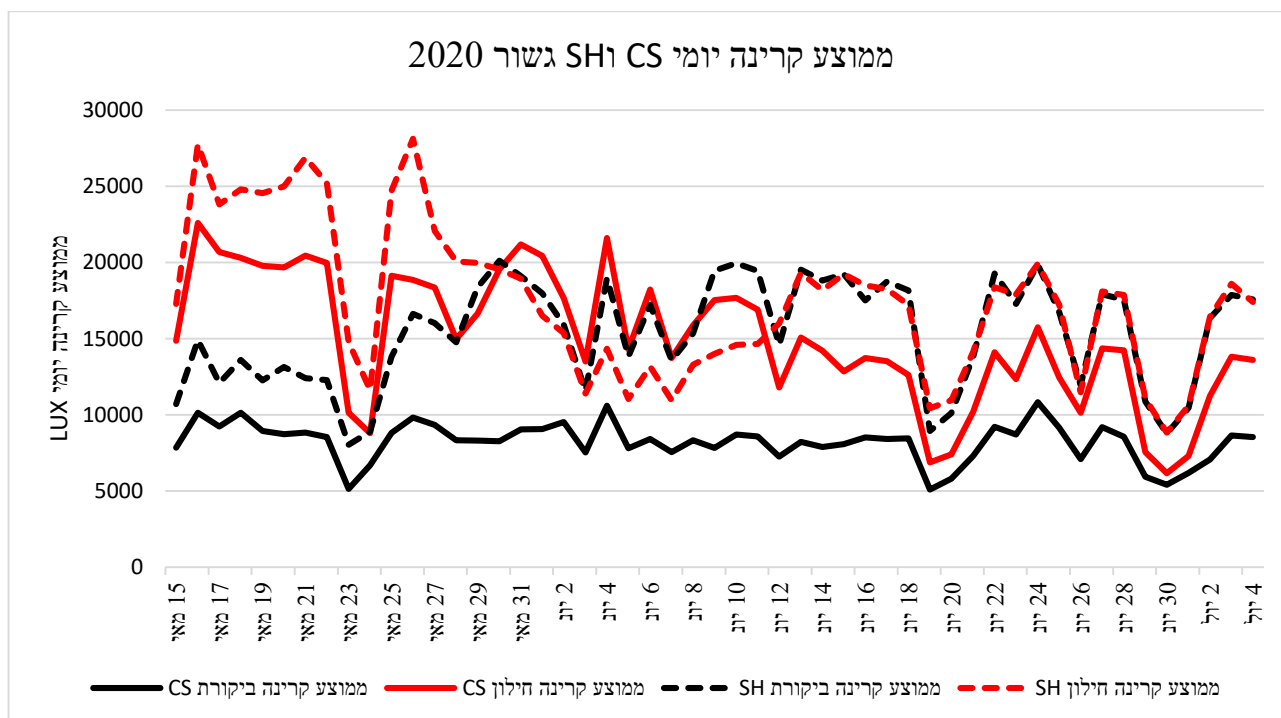
7.4.2 נתוני קרינה וטמפ' גשור בקברנה סובניון ושיראז 2019-2020

כרם גשור, בו התנאים חמים יותר בהשוואה למרום גולן תועדו נתונים קרינה וטמפ' בין השנים 2019-2020. בשנת 2019 טיפול החילון בגשור (14/5/19) בוצע 15 ימים לפני מועד החילון בכרם פיכמן (29/5/19). בדומה לעונת 2018 במרום גולן, גם בכרם גשור נצפו הבדלים בקרינה ובטמפרטורה. ב-2020 תועדו נתונים רק בכרם גשור בשני הזנים CS ו SH (גרף מס' 10-12). ההפרשים במדדי הקרינה בין הטיפולים בזן קברנה סובניון היו גבוהים יותר מבזן שיראז (גרף מס' 11) גם במדדי הטמפ' בין הזנים הראו הבדל מובהק סטטיסטית אך לא בפער גדול כמו במדדי הקרינה בין הזנים (גרף מס' 12). באופן כללי, הנתונים הראו מגמה זהה במדדי הקרינה והטמפרטורה בין הטיפולים השנים והאתרים. ממוצעים מטאורולוגיים של טמפ' וקרינה לכל תקופה ושנה מתוארים בטבלאות מס' 1-2.

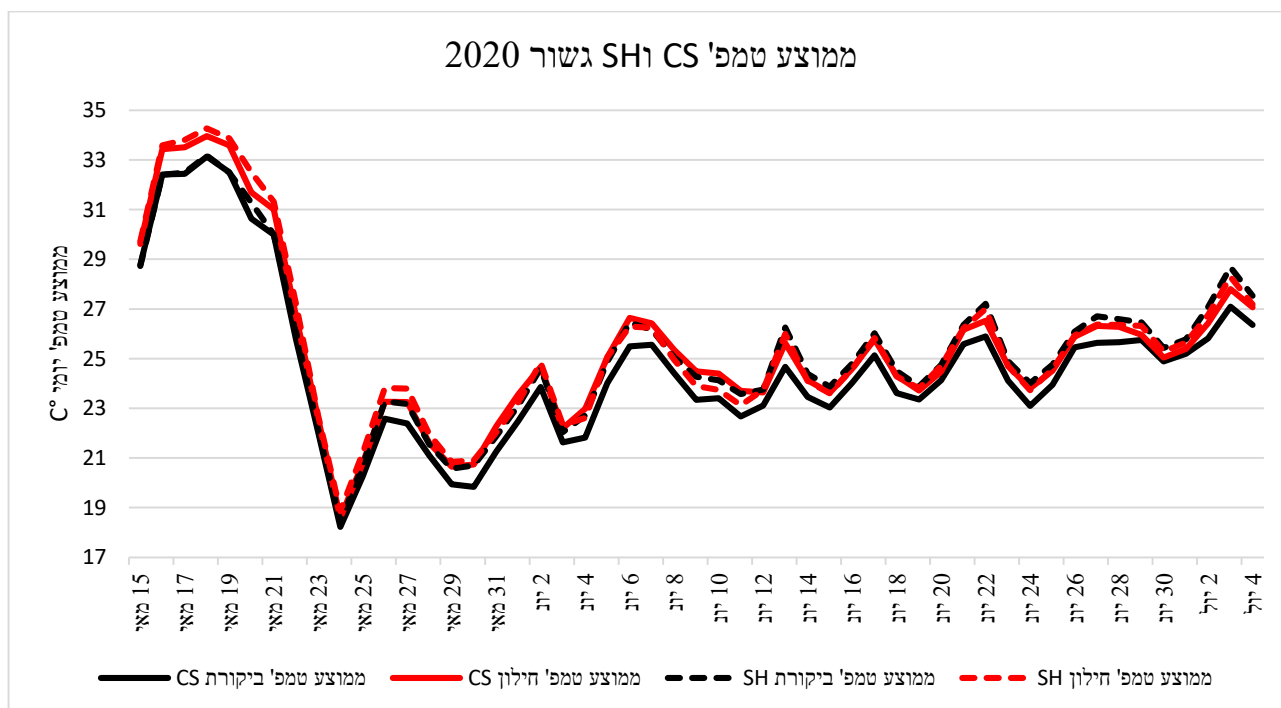
גרף מס' 10



ממוצע קרינה וטמפ' יומית לאורך עונת 2019 בזן קברנה סובניון באזור האשכולות בכרם גשור. נתונים מוצגים עבור טיפול החילון המוקדם לעומת ביקורת לא מחולנת. אוגרי הנתונים מוקמו סביב האשכולות ב-6 חזרות (ממוצע יומי קרינה וטמפ' $p < 0.05$)



ממוצע קרינה יומי לאורך עונת 2020 בזן קברנה סובניון ושיראז באזור האשכולות בכרם גשור. נתונים מוצגים עבור טיפול החילון המוקדם לעומת ביקורת לא מחולנת. אוגרי הנתונים מוקמו סביב האשכולות ב5 חזרות לכל טיפול (ממוצע יומי $p < 0.05$)



ממוצע טמפ' יומי לאורך עונת 2020 בזן קברנה סובניון ושיראז באזור האשכולות בכרם גשור. נתונים מוצגים עבור טיפול החילון המוקדם לעומת ביקורת לא מחולנת. אוגרי הנתונים מוקמו סביב האשכולות ב5 חזרות לכל טיפול. (ממוצע יומי $p < 0.05$)

7.4.3 נתונים מטאורולוגיים סביבתיים בגשור ומרום גולן 2018-2020

מבט על ממוצע נתוני קרינה וטמפ' חודשי בתחנות מטאורולוגיות גשור ומרום גולן (טבלאות 1-2) בשנים 2018-2020 הנתונים מוצגים לתקופת מאי-יולי שזו התקופה בה התרחש הניסוי. מדדים אילו מדגישים את ההבדלים האקלימיים בין שני אתרי הניסוי בתקופת החילון ולאחריה בכל שנה.

טבלה מס' 1

נתוני טמפ' 2018-2020 °C

תחנה מטאורולוגית	שנה	מאי			יוני			יולי		
		טמפ' ממוצעת	טמפ' מינימום	טמפ' מקסימום	טמפ' ממוצעת	טמפ' מינימום	טמפ' מקסימום	טמפ' ממוצעת	טמפ' מינימום	טמפ' מקסימום
גשור	2019	23.6	8.6	40.7	25.6	37	15.5	26.2	38.6	18.1
	2020	22.4	9.2	40.4	23.4	34.4	12.3	26.1	36.7	17.3
מרום גולן	2018	19.4	5.1	33.2	20.7	34.9	8	22.6	34	14.2
	2019	19.6	3.4	35	22.2	34.5	11.6	22.7	33.5	8.5

טבלה מס' 2

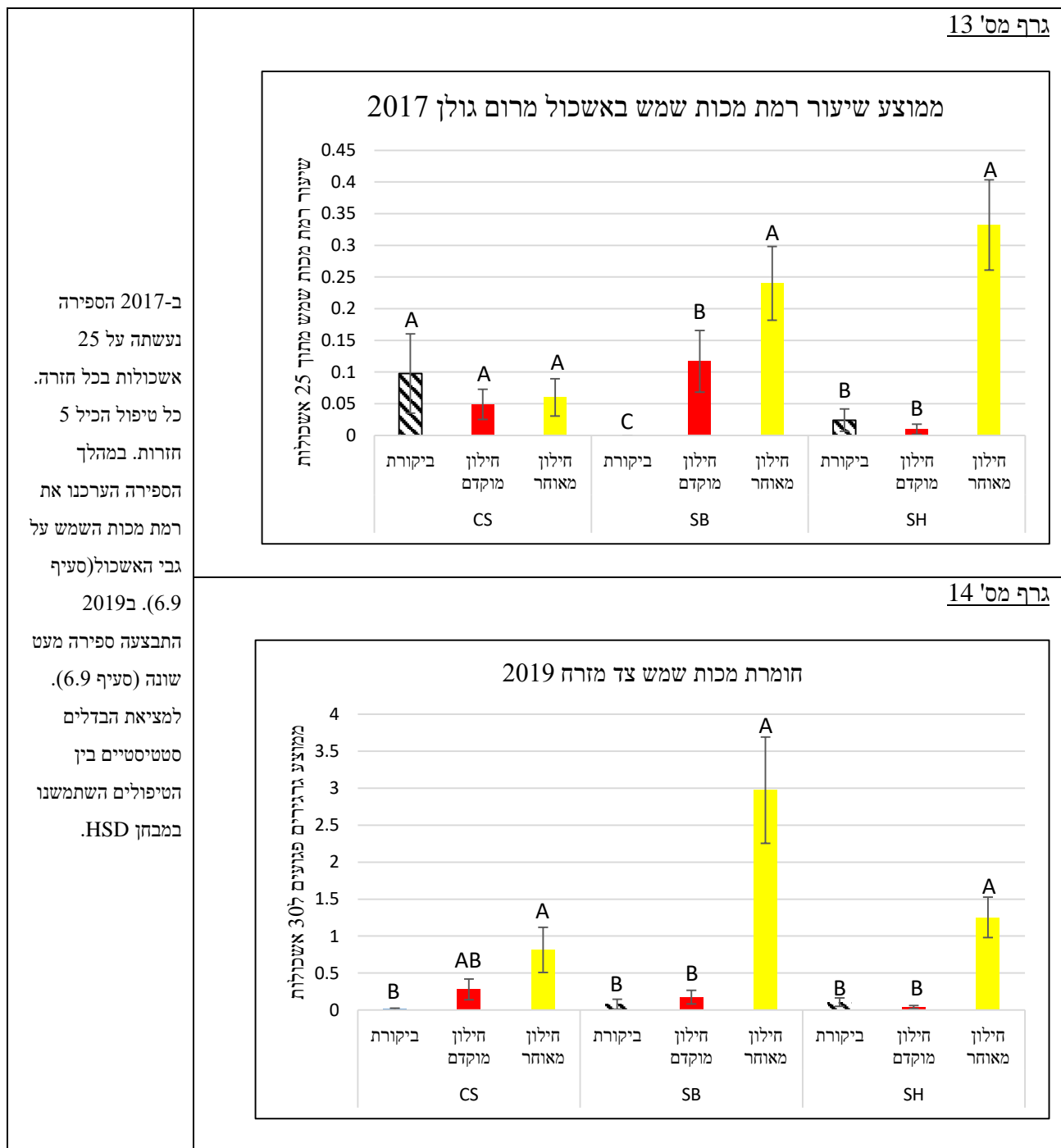
נתוני קרינה 2018-2020 (W/m^2)

תחנה מטאורולוגית	שנה	מאי		יוני		יולי	
		ממוצע קרינה	מקסימום קרינה	ממוצע קרינה	מקסימום קרינה	ממוצע קרינה	מקסימום קרינה
גשור	2019	308.98	1007	309.60	991	317.10	972
	2020	294.61	987	312.39	969	284.68	924
מרום גולן	2018	245.76	956	316.93	1007	308.61	985
	2019	267.59	1012	283.88	983	288.66	965

7.5 פגיעות שמש 2019, 2018, 2017 מרום גולן- חילון מאוחר סבל יותר ממכות שמש על גרגירי האשכול

כתוצאה מחילון חזק יש חשיפה של האשכולות וקיים חשש גדול בקרב המגדלים מפני מכות שמש ופגיעה בכמות ואיכות הענבים. חשוב היה להראות את ההשפעה של חילון מוקדם בהשוואה לטיפול סטנדרטי, של חילון מאוחר שנעשה לאחר החנטה ומבוצע כיום על ידי רוב המגדלים (חומרים ושיטות סעיף 6.1). הנתונים המוצגים נאספו מהניסוי הגדול (בגרפים מס' 15-16) ולכן מראים גם נתונים מהזן סוביינון בלאן.

ספירת מכות שמש התבצעה בתקופת סוף בוחל בניסוי הגדול. ניתן לראות בשתי השנים 2017,2019 שלא היה הבדל מובהק ברמת מכות השמש בין החילון המוקדם (אדום) לביקורת (שחור), בשניהם הרמה הייתה נמוכה לעומת טיפול החילון המאוחר (צהוב) שהראה רמה גבוהה של מכות שמש. בשנת 2018 לא נמצאו מכות שמש.



7.6 LC-MS/MS 2019- זיהוי חומרים מטבוליים

לבחינת ההשפעה של טיפול הסרת העלים על ההרכב הביוכימי של הגרגרים נבדקה הרמה של מטבוליטים שונים בתוך רקמת הגרגר הצעיר. במהלך עונת 2019 נאספו גרגירי ענבים אחת לשבוע מכל טיפול, זן ואתר. גרגירי הניסוי עברו

מיצוי סטנדרטי שהורץ בציוד LC-MS/MS בשיטת Untargeted על מנת לחפש הבדלים בין הטיפולים שבחנו. את המיצוי הרצנו בתוך מכשיר LC-MS/MS הפועל באופן של יוניזציה וחישוב זמני יציאת מולקולות הרכיבים ופועל עם תוכנה תומכת Compound Discoverer 3.1. תוכנה זו מסוגלת לעבד את המידע הרב ולתת זיהוי וכמות לחומר על פי גודלו, מסת האטומים שלו, אופי ומס' הקשרים המצויים בו. התוכנה שואבת מידע רב המצוי בספרות לגבי מספר רב של חומרים, אך רבים נותרים ללא שם כחומרים שטרם הוגדרו ונחקרו. מכשיר זה מעניק מידע רב על המצוי ברקמה ודורש עבודת ניתוח רבה על מנת להבין את מסת המידע המתקבלת. מתוך התוצאות הגולמיות שהתקבלו מהמכשיר התוכנה זיהתה 2242 מולקולות שמתוכם 1096 זוהו כרכיבים עם שם ואיתם המשכנו לעבוד. התוכנה בדקה את ההבדלים בין הטיפולים באתרים גשור (דרום הגולן) ופיכמן (צפון הגולן), בזנים קברנה סובניון ושיראז, בשני מועדי דיגום- שבוע לאחר חילון ושבוועיים לאחר חילון.

7.6.1 שבוע מהחילון (שלב א) החילון בכרם גשור העלה משמעותית את רמת המטבוליטים בגרר

בחינת השפעת הטיפול בשילוב של שלושה משתנים עיקריים: של אתר זן ושלב פנולוגי (טבלה מס' 3) מראה באופן עקבי את השפעת הטיפול על מספר החומרים שכמותם עלתה או ירדה בטיפול החילון לעומת הביקורת. התפלגות כמות החומרים שהושפעו במובהק מהטיפול מראה שיש השפעה יחסית לכל פרמטר. ההשפעה החזקה ביותר נמצאת בשלב א (שבוע מחילון) בקברנה סובניון בגשור. נראית השפעה הן של האתר (גשור לעומת פיכמן בשני הזנים) והן לזן (CS לעומת SH בשני האתרים). בשלב ב' הייתה פחות השפעה על כמות החומרים הן מבחינת זן והן מבחינת אתר.

טבלה מס' 3

עליה וירידה בכמות המטבוליטים לפי אתר זן ושלב פנולוגי

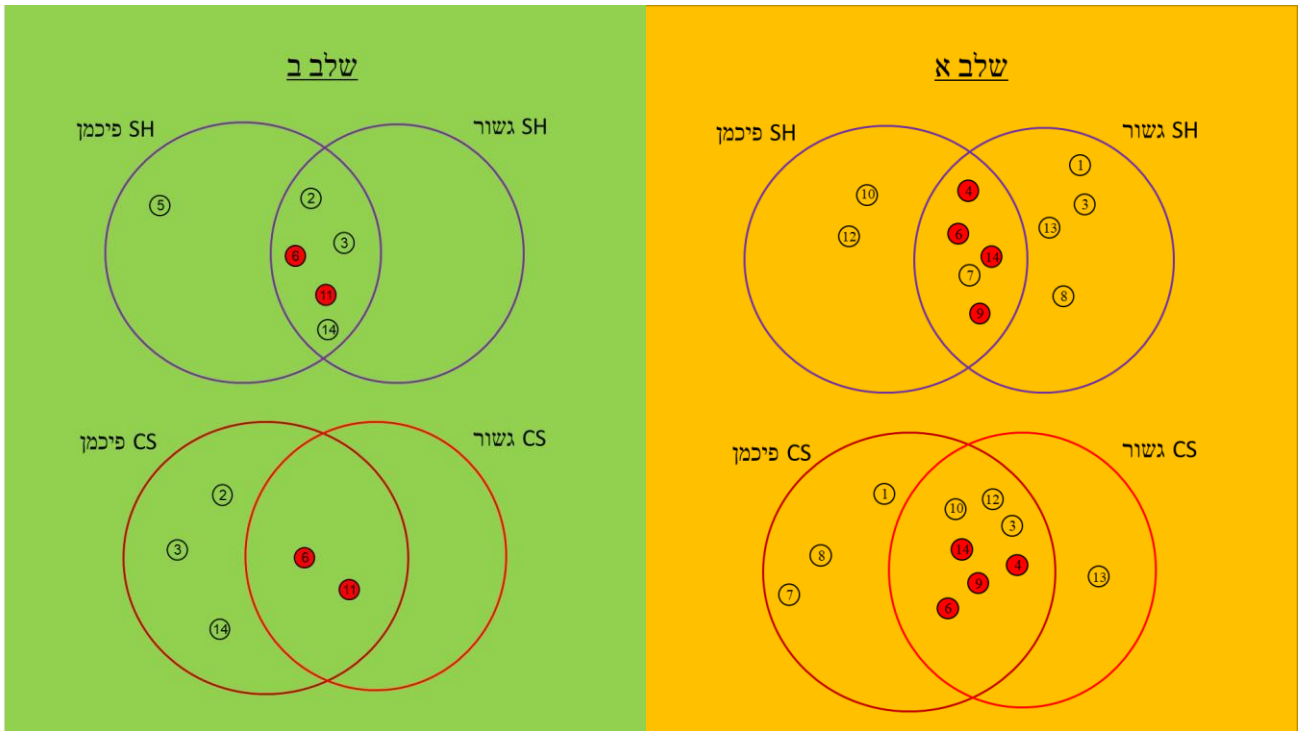
אתר	זן	שלב	מס' חומרים שהושפעו מובהק	מס' חומרים שעלו מובהק(סה"כ החומרים שעלו)	מס' חומרים שירדו מובהק(סה"כ החומרים שירדו)
גשור	CS	א	79	78(144)	1(53)
גשור	CS	ב	15	3(110)	12(151)
גשור	SH	א	72	54(120)	18(84)
גשור	SH	ב	52	47(174)	5(50)
פיכמן	CS	א	49	46(178)	3(49)
פיכמן	CS	ב	22	18(135)	4(119)
פיכמן	SH	א	27	26(196)	1(53)
פיכמן	SH	ב	28	20(131)	8(117)

7.6.2 חומרים שעלו מובהק כתוצאה מטיפול החילון המוקדם בשלב פנולוגי א (שבוע מחילון) וב (שבועיים מחילון)

מטריצת הנתונים אתה עבדנו, מכילה סה"כ שמונה השוואות (שני זנים*שני אתרים*שני מועדים) איור מס' 2 מציג חומרים שכמותם עלתה במובהק בעקבות טיפול החילון ביחס לביקורת בחלוקה לשלבים פנולוגיים- שלב א' שבוע מחילון ושלב ב' שבועיים מחילון בשני אתרי הניסוי, מספר החומרים שעלו בשלב א' בטיפול החילון המוקדם ביחס לביקורת היה

גבוה ממספר החומרים שעלו בשלב ב. ארבעה מהחומרים שרמתם עלתה בשלב א (חומר 4, 6, 9 ו 14 – צבועים באדום באיור 2) הושפעו דומה בשני האתרים ובשני הזנים. בשלב ב' נמצאו שני חומרים בלבד שעלו במובהק בשני הזנים בשני האתרים (חומר 6 ו 11 – צבועים באדום באיור 2). חומר מס' 6 נשאר גבוה במובהק בגרגרים מחולנים גם שבועיים מהחילון וזאת בשני הזנים והאתרים. בכל הקומבינציות האפשריות.

איור מס' 2



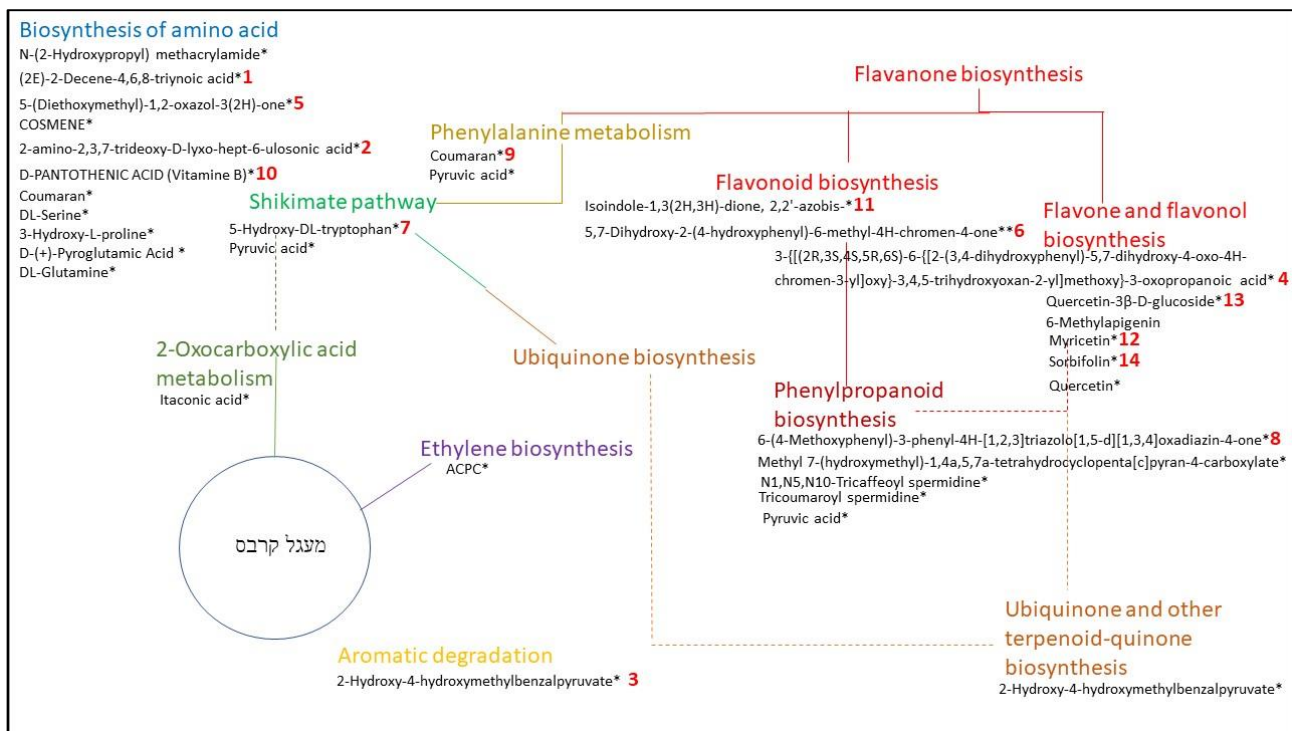
האיור מציג את מספר החומרים שעלו במובהק בהפרדה לשלבים פנולוגיים (שלב א' ריבוע כתום ושלב ב' ריבוע ירוק), זנים (עיגול סגול שיראז ועיגול אדום קברנה סובניון), ואתרים (גשור עיגול ימני פיכמן עיגול שמאלי). מספרים המופיעים בתחום עיגולים חופף הראו תוצאות מובהקות בשני האתרים, מספרים מודגשים באדום נמצאו מובהקים בשני הזנים בשני האתרים. $p < 0.05$. מספר החזרות לכל טיפול בכל זן: גשור N=6 פיכמן N=4 .t.test. חומרים מובהקים מיוצגים כמספר בהתאם לטבלה מס' 4.

מטבוליט	#
(2E)-2-Decene-4,6,8-triynoic acid	1
2-amino-2,3,7-trideoxy-D-lyxo-hept-6-ulosonic acid	2
2-Hydroxy-4-hydroxymethylbenzalpyruvate	3
3-[[[(2R,3S,4S,5R,6S)-6-[[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl]oxy]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methoxy]-3-oxopropanoic acid	4
5-(Diethoxymethyl)-1,2-oxazol-3(2H)-one	5
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-methyl-4H-chromen-4-one	6
5-Hydroxy-DL-tryptophan	7
6-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-d][1,3,4]oxadiazin-4-one	8
Coumaran	9
D-PANTOTHENIC ACID	10
Isoindole-1,3(2H,3H)-dione, 2,2'-azobis-	11
Myricetin	12
Quercetin-3 β -D-glucoside	13
Sorbifolin	14

מקרא חומרים לאיור מס' 2

7.6.3 סינתזת פולי-פנולים מוגברת באופן מובהק בעקבות טיפול החילון.

סיווג כלל החומרים שעלו בטיפול החילון המוקדם ביחס לביקורת נעשה על פי ספריית המידע של אתר KEGG. נמצא כי החומרים השונים מעורבים במסלולים המטבולים הקשורים ליצירת פולי-פנולים (Phenylalanine metabolism), אנרגיה תאית (מעגל קרבס), ובניית תא (Biosynthesis of amino acid) (תרשים מס' 2). החומרים שרמתם עלתה בשני הזנים ובשני האתרים כמצוין לעיל מודגשים בתרשים ובטבלה 4 והם משויכים למסלולים: Biosynthesis of amino acids, Shikimate pathway, Phenylalanine metabolism, Aromatic degradation, Flavonoids biosynthesis, Flavone and flavonol biosynthesis, Phenylpropanoid biosynthesis.



מיקום חומרים מטבוליים שהושפעו באופן מובהק בתוך מסלול הסינתזה העיקרי שלהם. מסלולים המקושרים בקו רציף מסמלים קשר ישיר מסלולים המסומנים בקו מקווקו מייצגים מסלולים הקשורים לא באופן ישיר (עוברים דרך מסלול נוסף) קבוצות סינתזה שאינן מחוברות בקו מקשר מייצגות מסלולי סינתזה רחבים מאוד (Amino acids and Aromatic degradation pathways) ($p < 0.05$).

7.7 הגברת ביטוי גנים במסלול סינתזת פוליפנולים

על מנת לאמוד את השפעת הטיפול על ביטוי גנים במסלולים מטבוליים, בחרנו על פי הידוע בספרות גנים לאנזימי מפתח הידועים בהשתתפותם במסלולי הגנה בגרגר(נספח 4). רצינו לחזק את הממצא של יצירה מוגברת של פולי-פנולים כחלק ממנגנון הגנה צמחי ידוע בענבים. מנגנוני ההגנה שנבחרו קשורים לתגובה לתנאי עקה של טמפרטורה, קרינה והתקפה של פתוגנים. חשוב היה לבחון את כיוון השפעת טיפול החילון לפי אתר זן ושלב פנולוגי, זאת על מנת לנסות ולדייק את התאמת השפעת הטיפול. (איור מס' 2)

7.7.1 מטריצת ביטוי גנים לפי שנים, אתרים, זנים, שלבים פונולוגיים וטיפול

רמת ביטוי הגנים שנבחנו בהשפעת הטיפול מופיעים במטריצה מס' 2. המטריצה מציגה נתונים ממוצעים של ביטוי גנים לפי גוונים, כאשר אדום מייצג רמת ביטוי גן גבוה וכחול רמת ביטוי נמוכה. מספרים **מודגשים באדום** * מציינים הבדל מובהק ($p < 0.05$) ולפחות פי 1.5 בין הטיפול לביקורת.

מטריצה מס' 1

		רמת ביטוי גן													
		0.01	0.04	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	10.00
שלב	זן	אתר	שנה	טיפול	CHS	FLS	PAL	STS	UFGT						
א	קברנה	גשור	2019	ביקורת	0.13	0.05	2.16	5.20	1.85						
				חילון	0.22	0.36	0.72	2.02	1.55						
		פיכמן	2018	ביקורת	0.67	0.30	1.10	2.71	4.34						
				חילון	0.37	0.31	0.84	1.24	3.47						
			2019	ביקורת	0.10	0.02	0.89	2.09	0.46						
				חילון	0.09	0.03	0.36	0.33	0.26						
	שיראז	גשור	2019	ביקורת	0.21	0.06	1.20	2.60	1.25						
				חילון	NA	NA	NA	NA	NA						
		פיכמן	2018	ביקורת	0.34	0.24	2.34	3.80	9.16						
				חילון	0.18	0.30	2.80	4.11	6.50						
			2019	ביקורת	0.16	0.03	1.54	4.04	4.31						
				חילון	0.19	0.01	0.54	1.25	1.74						
ב	קברנה	גשור	2019	ביקורת	0.03	0.06	1.65	5.23	2.02						
				חילון	0.04	0.06	0.38	0.95	1.85						
		פיכמן	2018	ביקורת	NA	NA	NA	NA	NA						
				חילון	NA	NA	NA	NA	NA						
			2019	ביקורת	0.08	0.02	0.33	0.55	0.51						
				חילון	0.11	0.04	0.41	0.63	0.43						
	שיראז	גשור	2019	ביקורת	0.06	0.01	0.41	0.73	0.49						
				חילון	0.03	0.02	0.70	1.74	4.76						
		פיכמן	2018	ביקורת	0.16	0.01	0.49	0.59	1.42						
				חילון	0.33	0.05	0.59	0.67	1.96						
			2019	ביקורת	0.07	0.00	0.33	0.32	0.79						
				חילון	0.10	0.01	0.50	0.61	0.63						

מספר החזרות לכל טיפול בכל זן הייתה בפיכמן $N=4$ ובאתר גשור $N=6$. מבחן t.test היה המבחן הסטטיסטי לניתוח מובהקות.

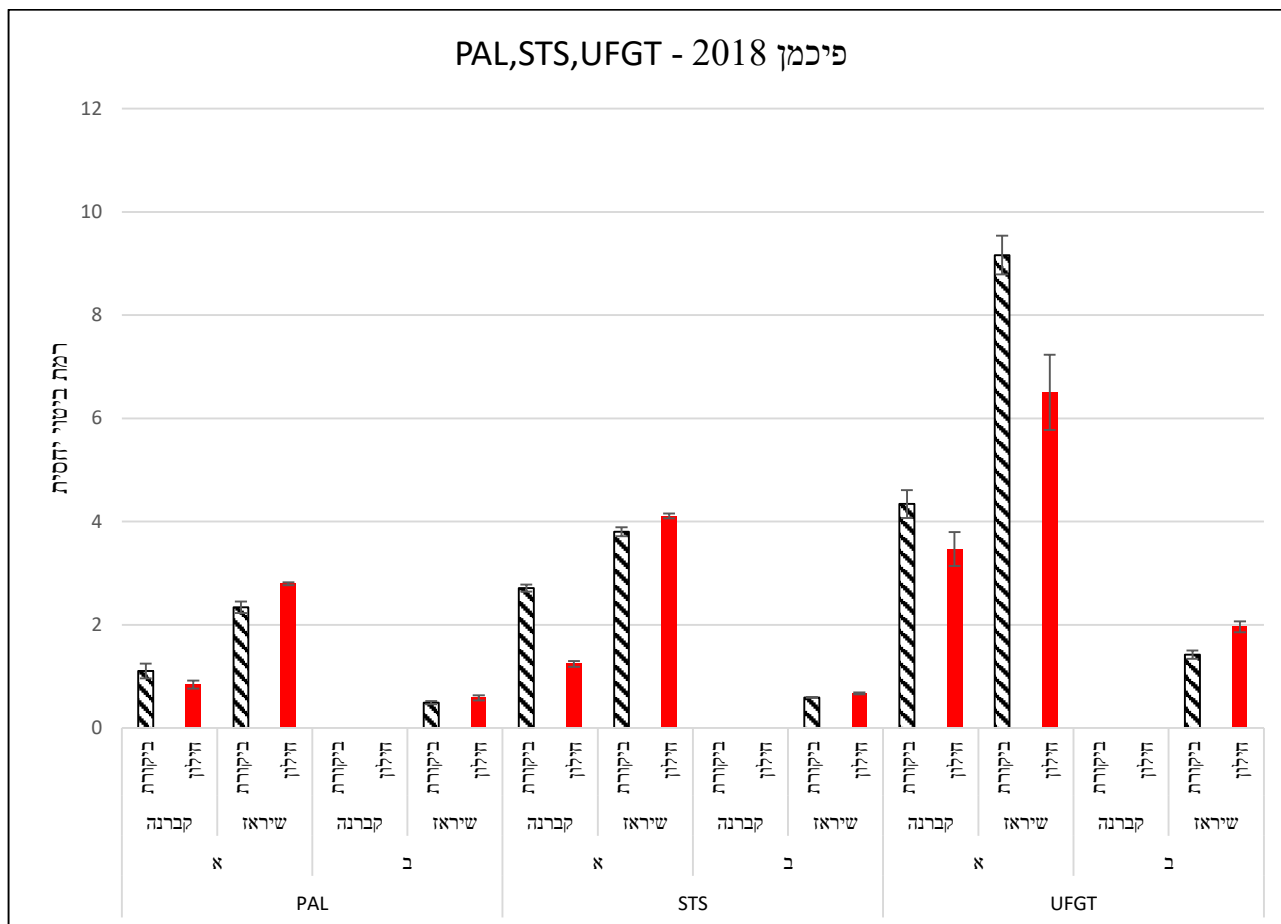
7.7.2 ביטוי גנים 2018 פיכמן

בשנה 2018 נאספו דוגמאות מאתר פיכמן בלבד. הנתונים מוצגים בהפרדה לשני גרפים שהראו ביטוי בשתי סקאלות שונות. קבוצה אחת CHS, FLS, PAL, STS, UFGT וקבוצה שניה CHS, FLS. על ניתוח זה הורצו נתונים לבחינת הבדל של לפחות פי 1.5 בין ממוצע טיפול החילון לממוצע הביקורת**. הנתונים מוצגים בהפרדה לשלבים פנולוגיים, שלב א- שבוע לאחר חילון ושלב ב' שבועיים לאחר חילון. ב-2018 לא הצלחנו לראות הבדלים בין טיפול לביקורת, אם כי נראה שיש הבדלים בביטוי גנים יחסי גבוה יותר בשלב א לעומת ב'.

7.7.2.1 ביטוי גנים UFGT, STS, PAL – פיכמן 2018

תוצאות רמת ביטוי גנים Phnylalanine synthase(PAL), Stilbene Synthase(STS), flavonoid 3-O-glucosyltransferase(UFGT). בשנת 2018 באתר פיכמן. ניתן לראות שלא נצפו הבדלים מובהקים ברמת ביטוי הגנים.

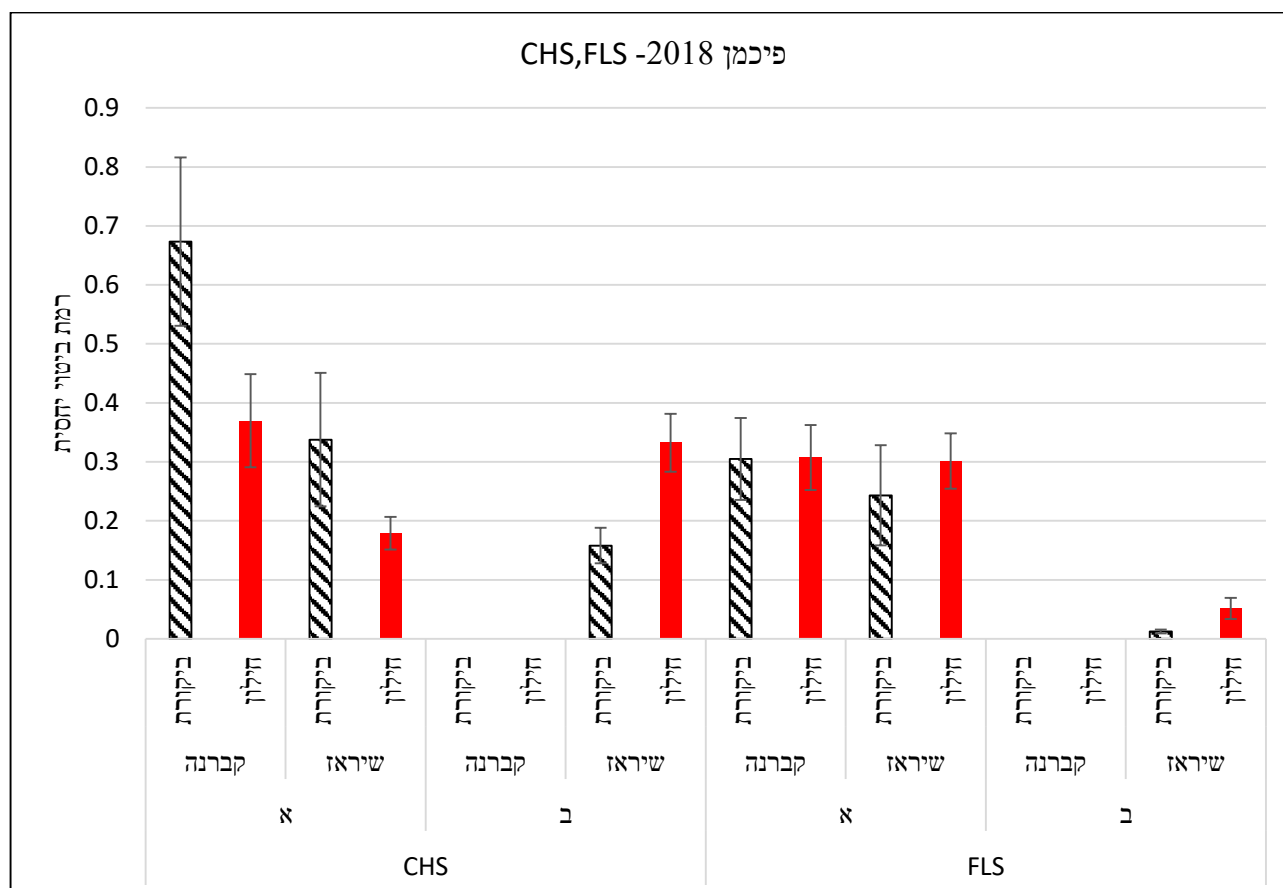
גרף מס' 15



מספר החזרות לכל טיפול בכל זן הייתה 4. N=4. t.test. p<0.05

7.7.2.2 ביטוי גנים FLS, CHS – פיכמן 2018

תוצאות רמת ביטוי גנים Chalcone synthase(CHS) ו Flavanol synthase(FLS) בשנת 2018 באתר פיכמן. הגרף מתאר את רמת הביטוי של כל גן בין הטיפולים השונים בשני זנים ושלבנים פנולוגים. ניתן לראות שלא נצפו הבדלים ברמת ביטוי הגנים בשנה זו.



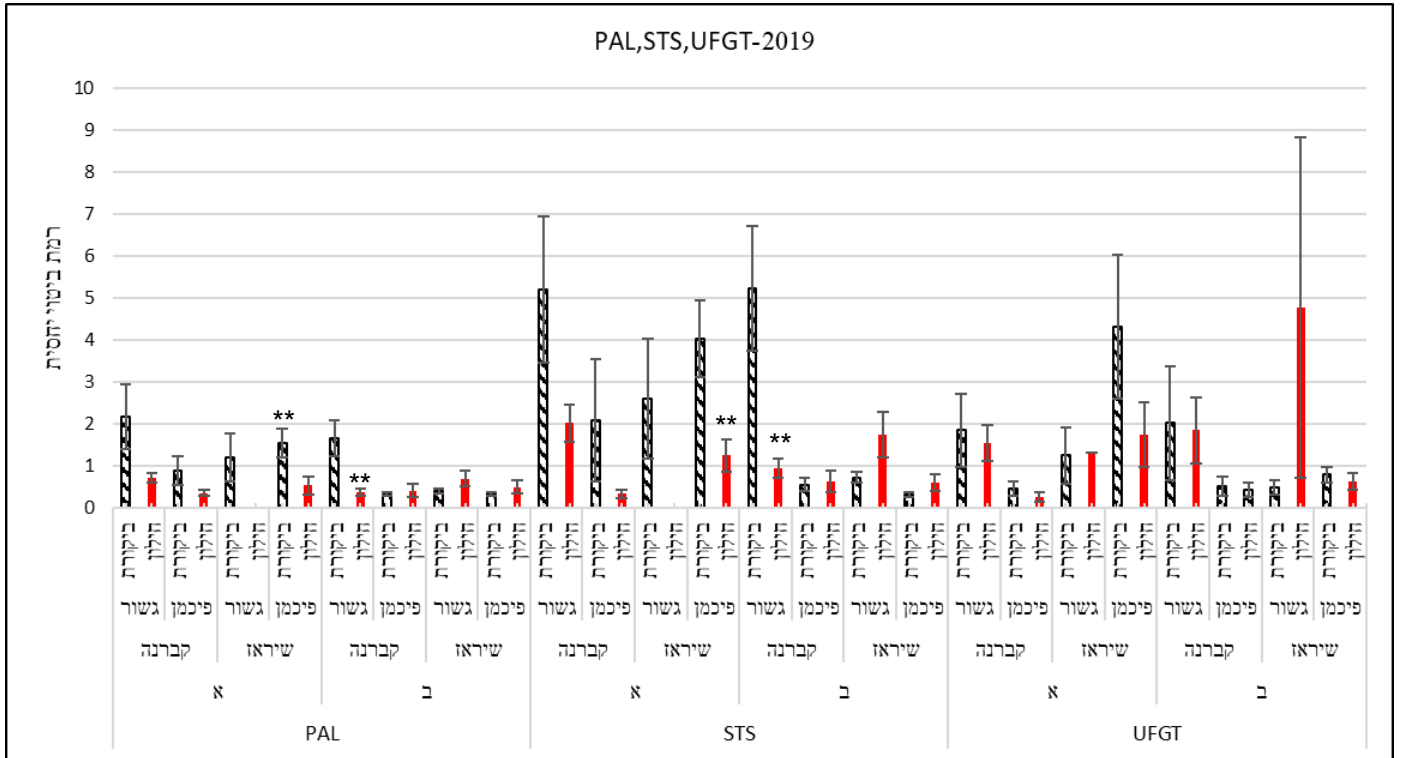
מספר החזרות לכל טיפול בכל זן הייתה $N=4$. $p < 0.05$ t.test.

7.7.3 ביטוי גנים 2019 פיכמן וגשור

בשנה 2019 נאספו דוגמאות משני אתרים פיכמן וגשור שלא כמו בשנת 2018. הנתונים מוצגים בהפרדה לשני גרפים שהראו ביטוי בשתי סקאלות שונות. קבוצה אחת PAL, STS, UFGT וקבוצה שניה CHS, FLS. על ניתוח זה הורצו נתונים לבחינת הבדל של לפחות פי 1.5 בין ממוצע הטיפול לממוצע הביקורת** - בשום מקום לא הצלחנו להראות הבדל מסוג זה. הנתונים מוצגים בהפרדה לשלבים פנולוגיים, שלב א- שבוע לאחר חילון ושלב ב' שבועיים לאחר חילון.

7.7.3.1 ביטוי גנים PAL, STS, UFGT פיכמן וגשור 2019

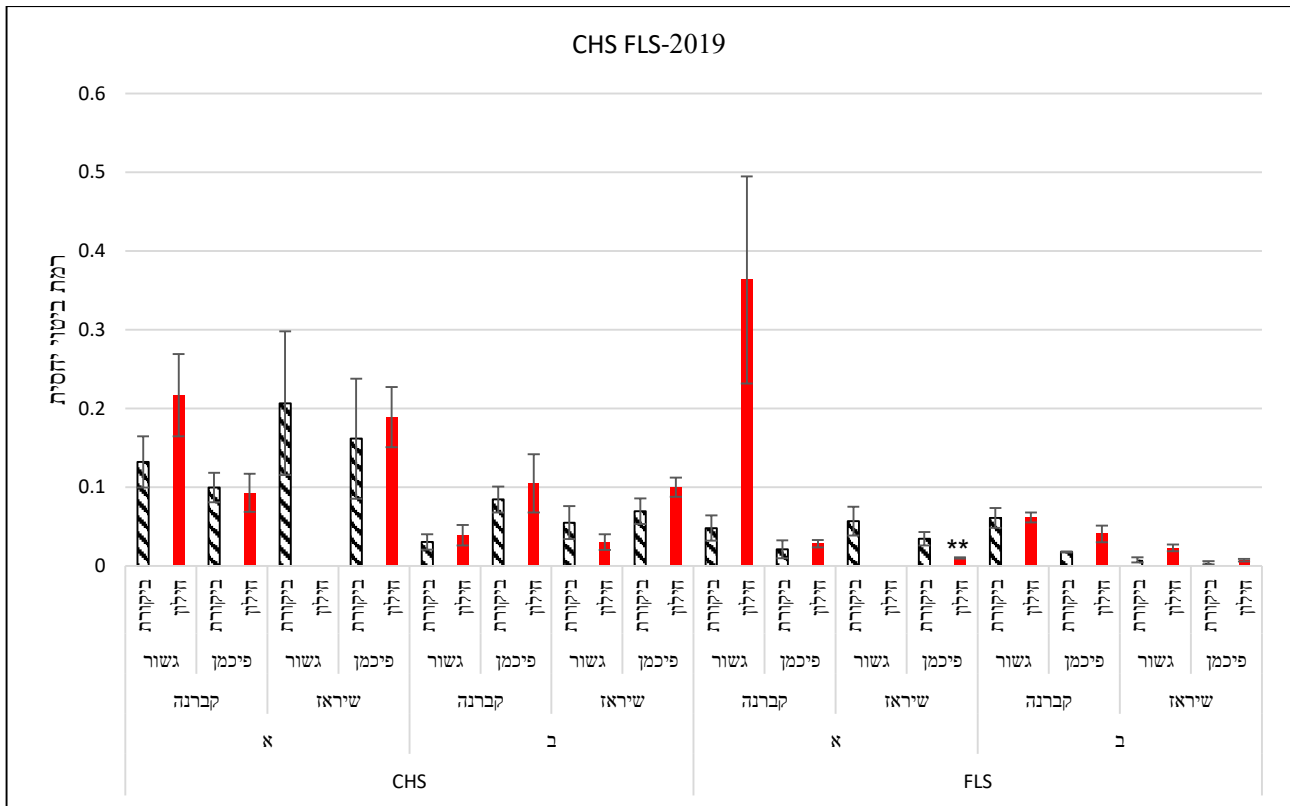
תוצאות רמת ביטוי גנים Phnylalanine synthase(PAL), Stilbene Synthase(STS), flavonoid 3-O-glucosyltransferase(UFGT). בגן UFGT לא נצפו הבדלים בין הטיפול לביקורת. בגן STS נצפו הבדלים מובהקים בין טיפול לביקורת בקברנה סובניון גשור בשלב פנולוגי שני ובזן שיראז באתר פיכמן בשלב פנולוגי ראשון. בגן PAL נצפו הבדלים מובהקים ברמת הביטוי בזן קברנה סובניון באתר גשור בשלב פנולוגי שני ובזן שיראז באתר פיכמן בשלב פנולוגי ראשון.



מספר החזרות לכל טיפול בכל זן הייתה בפיכמן 4 ובאתר גשור 6. $p < 0.05$ t.test.

תוצאות רמת ביטוי גנים Chalcone synthase(CHS) ו Flavanol synthase(FLS). המובהקות היחידה שנצפתה בין טיפול לביקורת הייתה בגן FLS בזן שיראז באתר פיכמן בשלב פנולוגי ראשון.

גרף מס' 18



מספר החזרות לכל טיפול בכל זן הייתה בפיכמן 4 ובאתר גשור 6. t-test. $p < 0.05$

8. דיון

טיפול נוף בכרמים מהווים חלק משמעותי מהעבודות במהלך הגידול העונתי ודורשים משאבים רבים של כח אדם ומיכון המותאם ליישום. טיפול הנוף של הסרת העלים, מכיל בתוכו השלכות רבות על איכות ובריאות היבול. השפעות הסרת עלים בתקופת פריחה על פיתוח עמידות אשכולות כנגד מחלות הנוף כשותית וקמחון מעניק נקודת מבט נוספת למשמעות של התגובה הפיזיולוגית והכימית של גרגירי ענבים צעירים.

קרינת UV וקרינת UV-B בפרט תועדה בצמחים רבים לאורך הספרות בהשפעתה על מסלול סינתזת פלבנואידים (Berli, Fanzone, and Piccoli 2011). בהתאם לכך התקבלו תוצאות דומות גם אצלנו בניסוי. במדידות המיקרו-אקלים הקרינתי סביב האשכולות, לאורך כל השנים, נצפה הבדל משמעותי בין טיפול החילון לביקורת בטווח גבוה מאוד בעוד מדדי טמפ' לא הראו הבדלים חדים בין הטיפולים (גרף 8-12). חשוב לציין שעל אף ההבדלים הקטנים משמעותית בהשוואה להבדלי הקרינה, סטטיסטית גם ההבדלים בנתוני הטמפרטורה היו מובהקים (גרף 8-12). מדדי הקרינה באתר גשור היו גבוהים יותר מאלה שנמדדו באתר פיכמן הצפוני ב2019 (בשנה זו בלבד היו מדידות מקבילות להשוואה). ניתן להסביר זאת במיקום הגיאוגרפי השונה בהתאם להבדלי הגובה והטופוגרפיה (האורך/רוחב) המשפיעים בין השאר גם על פעילות עננים. לאורך

שנות הניסוי שררו תנאי אקלים שונים שהשתקפו במדדים המטאורולוגיים בתקופה בין החילון בתחילת הפריחה לסוף החנטה (טבלה 1-2). במרום גולן שנת 2019 הייתה חמה יותר מאשר 2018. כמו כן מדדי האקלים של טמפ' וקרינה באתר גשור היו גבוהים ב-2019 יותר מאשר ב-2020. מדידות המיקרו-אקלים סביב האשכולות, בזנים השונים, הראו הבדלים גם כן. במדידות שנעשו בזנים קברנה סובניון וסובניון בלאן כחלק מהניסוי הגדול (2018-2019) נצפו מדדי קרינה וטמפרטורה גבוהים יותר בקברנה סובניון. סובניון בלאן הינו זן סבוך יותר עם עוצמת צימוח חזקה לעומת קברנה סובניון. ייתכן וניתן להסביר את ההבדל בין הזן קברנה סובניון לסובניון בלאן במרום גולן גם על ידי מפנה השתילה. שורות הניסוי בצפון הגולן נטועות באופן יחסי צפון מזרח לדרום מערב. במדידות שנעשו בקברנה סובניון ושיראז-ניסוי קטן (2020) נצפו מדדי מיקרו-אקלים גבוהים יותר בשיראז. תוצאות אילו יכולות להיות מוסברות על ידי אופי הצימוח הזני, שיראז מאופיין בצימוח חזק ועלים רחבים לעומת קברנה סובניון המאופיין בעלים קטנים יותר. לכן, כל הסרה של עלה גדול בזן שיראז לעומת עלה קטן בזן קברנה סובניון מושפע יותר מבחינת ניסוי והגנה על האשכולות בתנאי אקלים משתנים.

הבדלים ברמת הקרינה בין השנים התאימו לרמות הנגיעות הטבעית שנראו בחלקות בשנות המעקב (גרף 3-5). בשנת 2020, בה הקרינה הייתה הנמוכה ביותר בתקופת המדידה שבין אמצע מאי לסוף יוני, ניתן היה לראות את נגיעות הקמחון הגבוהה ביותר בשטח ובטיפול הביקורת בפרט (גרף 5). בשנים 2018 ו-2019 בהן באופן יחסי מדדי הקרינה היו גבוהים יותר בשני האתרים, הנגיעות הטבעית בשטח הייתה בהתאם נמוכה יותר. דרושות יותר שנות נתונים כדי לבסס את ההנחה שהתפתחות הקימחון תלויה בעיקר בקרינה העונתית. לעומת זאת, כן ניתן להסיק לגבי ההבדלים בנגיעות שקיבלנו בניסויים שהוצבו עם חזרות של טיפולים שיצרו רמות קרינה שונות בשני זנים, בשני אזורים לאורך שלושת שנות מחקר. גם בשנים בהם הנגיעות הטבעית הייתה נמוכה נראתה השפעה של החילון המוקדם על התפתחות הקימחון (לא תמיד מובהקת) והפער בהתפתחות המחלה בלט אף יותר בין השנים/אתרים/זנים בהם הנגיעות הייתה גבוהה יחסית.

מבחינת ההשפעה על היבול - מדדי האשכולות ביום הבציר ב-2017-2019, במרום גולן, לא הראו הבדלים בזן שיראז בין טיפול לביקורת. לעומת זאת בקברנה סובניון נראה הבדל מגמתי ומובהק במשקל האשכול לאורך שנים. נראה כי טיפול החילון הוביל למשקל נמוך יותר של אשכולות ללא השפעה על גודל גרגר. זאת מאחר והורדה מסיבית של עלים בתקופת הפריחה, שלב בו נוף הגפן עדיין לא מלא, גורמת לשינוי מאזן המוטמעים בגפן ויתכן וחנטה לקויה נובעת מהרעבה כפי שדווח בעבר (Keller 2015). לאורך כל שנות המחקר של הניסוי הגדול (2017-2019) נלקחו גם מדדי יבול מכל טיפול מכלל החזרות (נספח 1). בהתאם לממצאים שראינו על גודל האשכול (גרף מס' 2) כך באו לידי ביטוי גם ההבדלים במשקלי היבולים. ניתן לשער שחשיפה לקרינה גבוהה השפיעה על הצלחת החנטה אך לא על איכותה. זן שיראז לא הראה הבדלים ביבול בין הטיפולים לעומת הזן קברנה סובניון שהראה ירידה מובהקת במשקל היבול בטיפול החילון המוקדם. ממצא זה חשוב מאוד בקבלת ההחלטות בהקשר הטיפול הזני. טיפול חילון מוקדם בתקופת הפריחה יכול להוות שיקול להקטנת אשכול והעלאה אפשרית באיכות היין. בנוסף, ניתן לנסות ליישם טיפול זה על זנים בעלי עומס יבול גבוה (לדוגמה טמפרניו), שיכולים להיות מועמדים טובים להפחתת יבול בהם. ובזנים/אתרים בהם מתקשים להתמודד עם מחלת הקימחון.

כשבחנו את השפעת החילון המוקדם בהקשר של מכות שמש בהשוואה לחילון סטנדרטי המתבצע כשהגרגרים גדולים יותר (10-6 מ"מ), ראינו שגרגרי האשכולות בטיפול הסטנדרטי (חילון בגודל גרגר אפונה) סבלו משמעותית יותר מנזק של מכות שמש (גרף 13-14). ממצא זה נותן גיבוי להשערת המחקר, שטוענת לפיתוח עמידות ביו-כימית מוגברת

בגרגר כתוצאה מיצירת עקה קרינתית בשלב מוקדם כל כך בהתפתחות. על ידי כך מצליחים הגרגרים לפתח עמידות/סבילות גבוהה שמגינה עליהם מנזקי קרינה בשלבים פנולוגיים מאוחרים בעונה.

אילוח אשכולות בתנאי מעבדה היה אתגר גדול עבורנו אך היה חשוב על מנת לבודד את השפעת החילון המוקדם על הפטריות מההשפעה על הגרגרים עצמם. לאורך שנות המחקר ניסינו לייצר פרוטוקול אילוח גרגרים בפתוגנים של מחלות כשותית וקמחון. בספרות אין כמעט עבודות המתארות הדבקה במעבדה של גרגרים מנותקים וכנראה שלא מחוסר עניין. מאחר ורוב המידע הקיים עוסק באילוח עלים נאלצנו בחלון זמן עונתי מאוד קצר לפתח שיטות לשימור חיוניות האשכולות ולאילוח ולמצוא את תנאי האינקובציה המתאימים לגרגרים צעירים. את פרוטוקול שימור חיוניות הגרגרים הצעירים ניסינו לפתח גם מחוץ לעונת הגידול על אשכולות של זן מאכל הגדלים בבקעת הירדן מוקדם יותר בעונה (נספח 2). ב 2018 הצלחנו לייצר הדבקה והנבגה על גבי מקטעי אשכול מזן שיראז. הנתונים שהתקבלו הראו רגישות גבוהה יותר בטיפול הביקורת לעומת החילון. שאר חזרות הניסוי נרקבו מהר מאוד מאחר ושימור חלקי האשכולות הצעירים לאורך זמן עד הופעת מדבק הפתוגנים היה קשה מאוד. מכשול נוסף היה, ששיטת האינקובציה המתאימה להתפתחות של כל פתוגן לא תאמה בהכרח לשיטה המתאימה לשימור חיוניות האשכולות. בשנת 2019 לא הצלחנו לאלח את חומר הניסוי כלל מסיבות דומות לשנת 2018, על אף שניסינו לשכלל את השיטות. בשנת 2020 הצלחנו לפתח במועד האיסוף האחרון שיטת שימור ואינקובציה לאילוח והנבגה של פתוגן הכשותית. מועד זה כלל רק דוגמאות של זן שיראז מכרם פכמן. אינקובציה מיטבית לחיוניות והנבגה של פתוגן הקמחון (המעדיף תנאים יבשים יחסית לכשותית) עד היום לא צלחה. במקרים בהם ראינו אילוח של פתוגן הכשותית על זן שיראז, ספרנו הבדלים מובהקים ברגישות של טיפול הביקורת לעומת טיפול החילון המוקדם (גרף 7). תוצאות מרשימות יותר התקבלו בהשוואה לתוצאות האילוח של 2018 בקמחון (גרף 6). תוצאות אילו מתיישבות גם עם הממצאים המטאורולגיים והנגיעות הטבעית בכרם של אותן שנים.

בשנת 2019 נאספו דוגמאות מהזנים קברנה סובניון ושיראז, לזיהוי מטבוליים במערכת ה LC-MS/MS. המערכת הצליחה לזהות מספר גבוה של חומרים שרק מחצית מהם זוהו על ידי מאגרי הספרות. עומס המידע שהתקבל הוביל אותנו להסתכל ולבחון את הנתונים בהקשר של מסלולי הסינתטזה שהיו רלוונטים להתפתחות הפזיולוגית של הגרגר על סמך הידוע בספרות. בתוך כל מסלול בחנו חומרים שהראו תגובה משמעותית וחוזרת בריכוז שלהם כתגובה לטיפול ולמשתנים השונים (איור 2 - אתר, זן, שלב). בנוסף ניסינו לבחון את המסלולים השונים ברקמת הגרגר ואת הקשר ביניהם (תרשים 2). בחנו את משתני הניסוי (אתר, זן, שלב) ואת ההשפעה שלהם בעקבות הטיפול (טבלה 3). הגורם המשפיע ביותר היה השלב הפנולוגי. ראינו שבשלב הפנולוגי המוקדם יותר בכל אתר כמות החומרים שעלתה הייתה גבוהה יותר מבשלב השני (איור 2). בהפרדה לזנים ראינו שהזן קברנה סובניון הגיב חזק יותר לטיפול לעומת הזן שיראז. תגובתו של הזן קברנה סובניון נצפתה באופן עקבי בשני האתרים. הזן שיראז הראה עליה גבוהה יותר בחומרים בכרם גשור מאשר בכרם פכמן. לפי מה שראינו בשטח, הנגיעות הטבעית בקמחון בזן שיראז בכל השנים, הייתה נמוכה יחסית בהשוואה לזן קברנה סובניון. יכול להיות שהממצאים נובעים מהבדלים התלויים בזן ובמבנה המורפולוגי של כלל איבריו ולא דווקא בהרכב הכימי שלו.

תוצאות הפעילות המטבולית שראינו במסלולי התפתחות הגרגר, הראו פעילות מוגברת של חומרים במסלולים הקשורים לאנרגיה ובניית התא (תרשים מס' 2). לא את כל החומרים המרכזיים שהמערכת זיהתה ידענו לשייך לתפקיד ומסלול סינתזה ברור. ידוע שמסלול סינתזת חומצות האמינו חיוני מאוד לבניית התא ומשמש תחנת ביניים למסלולי סינתזה

רבים. ישנן חומצות אמינו המשמשות גם בתהליכי אנרגיה תאית כמו פרולין ואלנין (O'Leary et al. 2020) וחומצות אמינו ארומטיות המגיבות לעקה קרינתית (Source et al. 2021). מסלול פעיל נוסף בשלב זה קשור גם בסינתזת הורמוני גדילת הצמח במסלול ABC transporter שהראה עליה של המטבוליט 1-Aminocyclopropane carboxylic ACPC (acid) הלוקח חלק בסינתזת האתילן. המסלולים בהם רצינו לבחון את השערת המחקר שלנו היו המסלולים הקשורים במשפחת ה Polyphenols ליצירת Flavonoids ו Non-Flavonoids. בספרות מצוין רבות על יכולתם של מטבוליטים מסוג פלבנולים וסטילבנים לעזור במערכת ההגנה של הגפן כנגד קרינה, טמפ' גבוהה ופתוגנים. בהתאם לכך ראינו פעילות רבה ומשמעותית במסלול יצירת פלבנולים כתוצאה מהסרת העלים מאזור האשכולות וחשיפתם לקרינה גבוהה. דוגמא לכך באה לידי ביטוי בחומרים Quercetin, Quercetin-3 β -D-glucoside, Myricetin. מטבוליטים אילו הראו הבדל מגמתי ומובהק בהגברת הסינתזה שלהם בטיפול החילון בשני הזנים ובעיקר בשלב המוקדם יותר (א) בהתפתחות הגרגר (מטריצה מס' 1). חומר מס' 6 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-methyl-4H-chromen-4-one הראה עליה מובהקת ועקבית בעקבות הטיפול בכל ההשוואות שבחנו. שם נוסף הניתן למטבוליט זה לאורך מאגרי המידע הוא 6-Methylapigenin. ידוע שחומר זה שייך לקבוצת החומרים במסלול Flavone. חומר זה נזכר רבות במחקרים העוסקים במחלת הסרטן בהקשר של תכונות נוגדות סרטן (מולקולות בעלות מבנה טבעתי ארומטי עם קבוצת הידרוקסיל) האופייניות לחומרים ממשפחת Flavone (Shankar et al. 2018).

תוצאות אילו מציגות הבדל תגובה זני אשר יכול לעזור לנו בעתיד בקבלת ההחלטות לגבי פעילות הסרת העלים. באיזו עוצמה נדרש יהיה לחלן, באיזה אזור גאוגרפי תהיה משמעות לחילון המוקדם והאם רצוי או מסוכן לבצע את החילון בשלב מוקדם כל כך.

סינתזת החומרים לאורך הניסוי השתנתה בהתאם לתנאי האקלים השונים לכל מיקום גיאוגרפי של כרם, כמו כן הניסוי בוצע על זנים השונים באופי הצימוח שלהם. ייתכן שהזן שיראז הצליח לייצר צל נרחב יותר על פני האשכולות כתוצאה מצימוח מתחדש ואופי עלים רחבים יותר כפי שהוסבר לעיל בהבדל מדדי הקרינה בין הזנים השונים. בנוסף למדידות המיקרו-אקלים, מבחינה מטבולית הזן שיראז מייצר באופן טבעי כמות גבוהה יותר של חומרים מקבוצת Tefanini and Flavonols (Elasco 2006) מה שהופך אותו כנראה לעמיד יותר כנגד פתוגנים. ייתכן שבגלל שבכל אופן יש לזן שיראז יותר פלבנולים באופן טבעי, הוא מוגן מספיק ולא צריך לייצר עוד בתגובה לחילון. אחת התרומות החשובות של מחקר בנושא זה, מתארת את רמת המטבוליטים השונים ברקמת הגרגר הצעיר, זאת כתוצאה מחילון מוקדם בזמן פריחה. מידע זה מופיע בעבודות מועטות מאוד ולכן בעל ערך חשוב.

כשניגשנו לבחון את רמת ביטוי הגנים ליצירת פוליפנולים כתגובה לעקה קרינתית בגרגרים, חיפשנו לראות את נטיית המערכת הגנטית הידועה בספרות לכיוון פנולים הקשורים במערכת ההגנה. השלב הראשון והמתבקש היה לראות ביטוי מוגבר של הגן המרכזי לאנזים Phenylalanine synthase אנזים זה נמצא בראש מסלול הסינתזה המשמש אבן דרך ליצירת פוליפנולים רבים מקבוצות שונות. בתוצאות שקיבלנו לא ראינו הבדלים מובהקים ב2018 וב2019 לא ניתן היה להסיק מסקנות בתוצאות הבודדות שהראו הבדל מובהק בין טיפול לביקורת. לאחר סינתזת פוליפנולים ישנה צומת חלוקה של שתי קבוצות פנולים שונות Flavonoids ו Non Flavonoids. כפי שהוזכר בתחילת העבודה, תחת קבוצת Flavonoids נמצא האנזים Chalcone synthase (CHS) המשמש אנזים מפתח בדרך למסלול סינתזת קבוצת הפוליפנולים Flavonols אותה מסנתז האנזים FLS. תחת קבוצת ה Non Flavonoids ממוקמת קבוצת Stilbenes אותה מסנתז אנזים STS. כל קבוצה מבין השתיים מכילה בתוכה חומרים מטבוליים המשמשים בין השאר כחלק במנגנוני ההגנה

הצמחיים כנגד עקות שונות (Keller 2015; Ros Barceló et al. 2003). בתוצאות שקיבלנו ברמת הביטוי לאנזים STS לא ראינו הבדלים כלל ב-2018. בשנת 2019 כן ראינו הבדלים מובהקים בשני מקרים שונים ללא מכנה משותף של זן או אתר. לא ראינו הבדלים בהשפעה בביטוי הגן לאנזים CHS כתוצאה מהטיפול. ביטוי מוגבר של אנזים FLS ליצירת חומרים פנולים מקבוצת Flavonols נצפה במקרה אחד בלבד שגם אינו מעיד על השפעה אמיתית של הטיפול על רמת ביטוי הגן. כפי שמתואר לעיל ניתן להבין שברמת ביטוי הגנים לאורך שתי עונות של איסוף חומר צמחי לא היה ניתן להסיק על השפעה מכרעת של טיפול החילון על רמת ביטוי הגנים. דבר אחד שיכולנו להסיק מתוצאות ביטוי הגנים במערכת הראה על יתרון ברמת ביטוי כלל הגנים בשלב הפנולוגי הראשון (שבוע לאחר חילון). על מנת להסביר את ההבדלים בהשפעת הטיפול על סינתזת המטבוליטים (עליה בפנולים) וחוסר התאמה ברמת ביטוי הגנים (FLS), אנחנו יכולים להניח שעל פי תוצאות הפרופיל המטבולי ודגם ביטוי הגנים במסלול הפוליפנולים נראה כי חשיפת האשכול לקרינה בשלב מוקדם אינה מובילה בהכרח לעליה בשיעור RNA ויתכן כי ייצור מוגבר של מטבוליטים משניים במסלול הפוליפנולים ומסלול ההפלבנולים בהתאם לתוצאות, מקורם בפירוק מוגבר של פרוק של חומרים במעלה מסלול הביוסנתזה שרמתם בגרגר אינה נבדלת בין הטיפולים כפי שנמצא בעבר. אפשרות נוספת היא שבשבוע שמיד אחרי החילון הייתה עליה בביטוי הגנים אך עד מועד הבדיקה ההבדלים בביטוי כבר היטשטשו ו"נשארו" ההבדלים במטבוליטים שיוצרו מיד אחרי החילון. ייתכן שמבט מעמיק דרך ספריות RNA היה יכול כנראה לתת תמונה ברורה יותר.

9. מסקנות

בעבודה זו נמצא שהסרת עלים בתקופת הפריחה גורמת לפיתוח סבילות באשכולות כנגד מחלות הנוף כשותית וקמחון. ניתן היה לראות, שחילון מוקדם בתקופת הפריחה מוביל בעיקר למדדי קרינה גבוהים באופן משמעותי. בעוד שהחילון משפיע על חנטה כתוצאה מהרעבת סוכרים במערכת על ידי הסרת העלים המטמיעים נראה כי הסבילות לקמחון וכשותית מקורה בחשיפה לקרינה.

שינוי תנאי המיקרו-אקלים באזור האשכולות הציגו השלכות בטווח הקצר והארוך. בטווח הקצר תועדה השפעה על תנאי האקלים של טמפרטורה וקרינה. לעומת זאת, בטווח הארוך נצפתה השפעה של חסינות קרינתית יחסית במכות שמש לעומת טיפול החילון הקונבנציונאלי (שלב גרגר אפונה), הפחתה בנגיעות טבעית של מחלות נוף ובזן קברנה סובניון גם דילול חנטים באשכולות.

ההשפעה שתועדה בזן קברנה סובניון, פותחת דלת לשיטה אפשרית לדילול תוך-אשכול בזנים מסוימים, באמצעות הסרת עלים בזמן פריחה. ניסוי דומה עם תוצאות חופפות בוצע בכרם יונתן ומרום גולן על ענבים מזן טמפרניו אשר הראו הקטנה של אשכולות ללא שינוי בגודל גרגר. עובדה זו יכולה לחסוך שימוש עתידי יקר בכח אדם וחומרים הורמונליים בהמשך העונה. פעולת החילון המוקדם יכולה להיות נכונה לשימוש בהתאם להגדרות שנקבעו מראש, לדוגמא: הקטנת יכול והפחתת מחלות נוף.

תדירות ועוצמת הופעתן הטבעית של המחלות בשטח הניסוי, ממשיכה לתמוך בהשערת המחקר שלנו שאכן חילון מוקדם יכול להוביל לפיתוח עמידות/סבילות האשכולות כנגד כשותית וקמחון ואף מחלות נוף נוספות. אילוח מעבדתי מכוון של גרגירי הניסוי בפתוגנים של כשותית וקמחון, הראה הגברת עמידות ברמת הגרגירים. שיטת האילוח והאינקובציה להנבגת

הפתוגנים על רקמה רגישה וצעירה כל כך של גרגירים, היה אתגר לאורך שנות הניסוי, אך ניתן לומר שהיום יש בידנו את יכולת טובה לשמר ולא לה גרגירים צעירים בפתוגן הכשותית *Plasmopara viticola*.

10. ביבליוגרפיה

Articles

- Armijo, Grace et al. 2016. "Grapevine Biotechnology : Molecular Approaches Grapevine Underlying Abiotic and Biotic Stress Responses Underlying Abiotic and Biotic Stress Responses." INTECH: World's Largest Science , Technology & Medicine Open Access Book Publisher. 1-47
- Austin, Craig N, Gary G Grove, James M Meyers, and Wayne F Wilcox. 2011. "Powdery Mildew Severity as a Function of Canopy Density : Associated Impacts on Sunlight Penetration and Spray Coverage." The American society for enology and viticulture. 1: 23–31.
- Berli, Federico J, Martín Fanzone, and Patricia Piccoli. 2011. "Solar UV-B and ABA Are Involved in Phenol Metabolism of *Vitis Vinifera* L. Increasing Biosynthesis of Berry Skin Polyphenols." Journal of Agricultural and food chemistry : 4874–84.
- Böttcher, Christine, Paul K. Boss, and Christopher Davies. 2013. "Increase in Cytokinin Levels during Ripening in Developing *Vitis Vinifera* Cv. Shiraz Berries." American Journal of Enology and Viticulture 64(4): 527–31.
- Cadot, Yves, Maria Teresa Miñana-Castelló, and Michel Chevalier. 2006. "Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis Vinifera* L. Cv Cabernet Franc during Fruit Development." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(24): 9206–15.
- Daniel O. Chellemi and J.J. Marios 1992. "Influence of Leaf Removal, Fungicide Applications , and Fruit Maturity on Incidence and Severity of Grape Powdery Mildew." The American society for enology and viticulture Vol 43 no. 1 53:57
- Drori Elyashiv et al. 2017. "Collection and Characterization of Grapevine Genetic Resources (*Vitis Vinifera*) in the Holy Land, towards the Renewal of Ancient Winemaking Practices." Scientific Reports 7(December 2016).
- Ensminger, Peter A. 1993. "Control of Development in Plants and Fungi by Far-UV Radiation." Physiologia Plantarum 88(3): 501–8.
- Fourtouni, Antonia, Yiannis Manetas, and Christos Christias. 1998. "Effects of UV-B Radiation on

Growth , Pigmentation , and Spore Production in the Phytopathogenic Fungus *Alternaria Solani*.” NRC Canada. Vol.76 : 2093-2099.

Gabaston, Julien et al. 2017. “Stilbenes from *Vitis Vinifera* L . Waste : A Sustainable Tool for Controlling *Plasmopara Viticola*.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1-28

Gad et al. 2021. “The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis Thaliana*. The American Society of Plant Biologists” *The Arabidopsis Book* 2010(8).

Gadoury, David M, Robert C Seem, Andrea Ficke, and Wayne F Wilcox. 2003. “Ontogenic Resistance to Powdery Mildew in Grape Berries.” *Ecology and population biology* 93(5): 547–55.

Gambetta, Gregory A. et al. 2010. “Sugar and Abscisic Acid Signaling Orthologs Are Activated at the Onset of Ripening in Grape.” *Planta* 232(1): 219–34.

Harborne, Je B, and Christine A Williams. 2000. “Advances in flavonoid Research since 1992. *Phytochemistry*” 55(2000) 481-504.

Heldt, Hans-Walter, and Birgit Piechulla. 2011. “Phenylpropanoids Comprise a Multitude of Plant Secondary Metabolites and Cell Wall Components.” *Plant Biochemistry*: 431–49.

Huang, Xu Ming, and Hui Bai Huang. 2001. “Early Post-Veraison Growth in Grapes: Evidence for a Two-Step Mode of Berry Enlargement.” *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7(3): 132–36.

Humphreys, John M., and Clint Chapple. 2002. “Rewriting the Lignin Roadmap.” *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 224–29.

Intrieri, C et al. 2004. “Early Defoliation (Hand vs Mechanical) for Improved Crop Control and Grape Composition in Sangiovese (*Vitis Vinifera* L .).” *Austrelian society of viticulture and enology*: 25–32.

Jia, Hai Feng et al. 2011. “Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening.” *Plant Physiology* 157(1): 188–99.

Jordan, B. 2011. “Effects of Solar Ultraviolet Radiation and Canopy Manipulation on the Biochemical Composition of Sauvignon Blanc Grapes.” *Austrelian society of grape and wine research*. 227-238

- Kamila Mijowska, Ireneusz Ochmian and Jan Osmianski 2016. "Impact of Cluster Zone Leaf Removal on Grapes Cv ." *Molecules* 21,1688.1-13
- Keller, Markus. 2015. *The Science of Grapevins - Anatomy and Physiology*. Second edi.
- Kolb, Christiane A., Jiri Kopecký, Markus Riederer, and Erhard E. Pfündel. 2003. "UV Screening by Phenolics in Berries of Grapevine (*Vitis Vinifera*)." *Functional Plant Biology* 30(12): 1177–86.
- Koundouras, Stefanos. 2012. "Effects of Severity of Post- Flowering Leaf Removal on Berry Growth and Composition of Three Red *Vitis Vinifera* L. Cultivars Grown under Semiarid Conditions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 6000-6010.
- Koyama, Kazuya, Keiko Sadamatsu, and Nami Goto-Yamamoto. 2010. "Abscisic Acid Stimulated Ripening and Gene Expression in Berry Skins of the Cabernet Sauvignon Grape." *Functional and Integrative Genomics* 10(3): 367–81.
- Li, Paul H. 1989. "Low Temperature Stress Physiology in Crops." *Research gate* (July 1989): 1–203.
- Li, Xiao Jing et al. 2016. "Functional Characterization of a Glucosyltransferase Gene, LcUFGT1, Involved in the Formation of Cyanidin Glucoside in the Pericarp of Litchi *Chinensis*." *Physiologia Plantarum* 156(2): 139–49.
- Niimi, Yoshiyuki, and Hirotaka Torikata. 1979. "Changes in Photosynthesis and Respiration during Berry Development in Relation to the Ripening of Delaware Grapes." *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 47(4): 448–53.
- Nitsch, J. P., C. Pratt, C. Nitsch, and N. J. Shaulis. 1960. "Natural Growth Substances in Concord and Concord Seedless Grapes in Relation to Berry Development." *American Journal of Botany* 47(7): 566.
- O’Leary, Brendan M., Glenda Guek Khim Oh, Chun Pong Lee, and A. Harvey Millar. 2020. "Metabolite Regulatory Interactions Control Plant Respiratory Metabolism via Target of Rapamycin (TOR) Kinase Activation[Open]." *Plant Cell* 32(3): 666–82.
- Palliotti, Alberto, Matteo Gatti, and Stefano Poni. 2011. "Early Leaf Removal to Improve Vineyard Efficiency : Gas Exchange , Source-to-Sink Balance , and Reserve Storage Responses." *The American Society for enology and viticulture* 62:2. 219-228
- Patrick E.M. Donald L.G. Lawrence A. E. "Neolithic Resinated Wine 1996". *Nature*. Vol.381. 480-

- Pattison, Richard J., and Carmen Catalá. 2012. "Evaluating Auxin Distribution in Tomato (*Solanum Lycopersicum*) through an Analysis of the PIN and AUX/LAX Gene Families." *Plant Journal* 70(4): 585–98.
- Petrášek, Jan, and Jiří Friml. 2009. "Auxin Transport Routes in Plant Development." *Primer*. 136(16): 2675–88.
- Poni, Stefano et al. 2006. "Effects of Early Defoliation on Shoot Photosynthesis , Yield Components , and Grape Composition." *The American society for enology and viticulture* 57:4 397–407.
- Ristic, Renata, and Patrick G. Iland. 2005. "Relationships between Seed and Berry Development of *Vitis Vinifera* L. Cv Shiraz: Developmental Changes in Seed Morphology and Phenolic Composition." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11(1): 43–58.
- Rogiers, S. Y. et al. 2006. "Mineral Sinks within Ripening Grape Berries (*Vitis Vinifera* L.)." *Vitis - Journal of Grapevine Research* 45(3): 115–23.
- Ros Barceló, Alfonso, Federico Pomar, Matías López-Serrano, and Maria Angeles Pedreño. 2003. "Peroxidase: A Multifunctional Enzyme in Grapevines." *Functional Plant Biology* 30(6): 577–91.
- Roupe, Kathryn, Connie Remsberg, Jaime Yanez, and Neal Davies. 2008. "Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic." *Current Clinical Pharmacology* 1(1): 81–101.
- Rumbolz, J et al. 2002. "Formation of Overwintering Structures of *Uncinula Necator* and Colonization of Grapevine under Field Conditions." *Plant pathology*. 51: 322–330.
- Schröder, Joachim, and Gudrun Schröder. 1990. "Stilbene and Chalcone Synthases: Related Enzymes with Key Functions in Plant-Specific Pathways." *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 45(1–2): 1–8.
- Shankar, Eswar et al. 2018. "Plant flavone apigenin: An emerging anticancer agent". *HHS Public Access*." 3(6): 423–46.
- Singla, Rajeev K. et al. 2019. "Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures." *Journal of AOAC International* 102(5): 1397–1400.
- Singleton, Vernon L. 1992. "Tannins and the Qualities of Wines." *Plant Polyphenols*: 859–80.

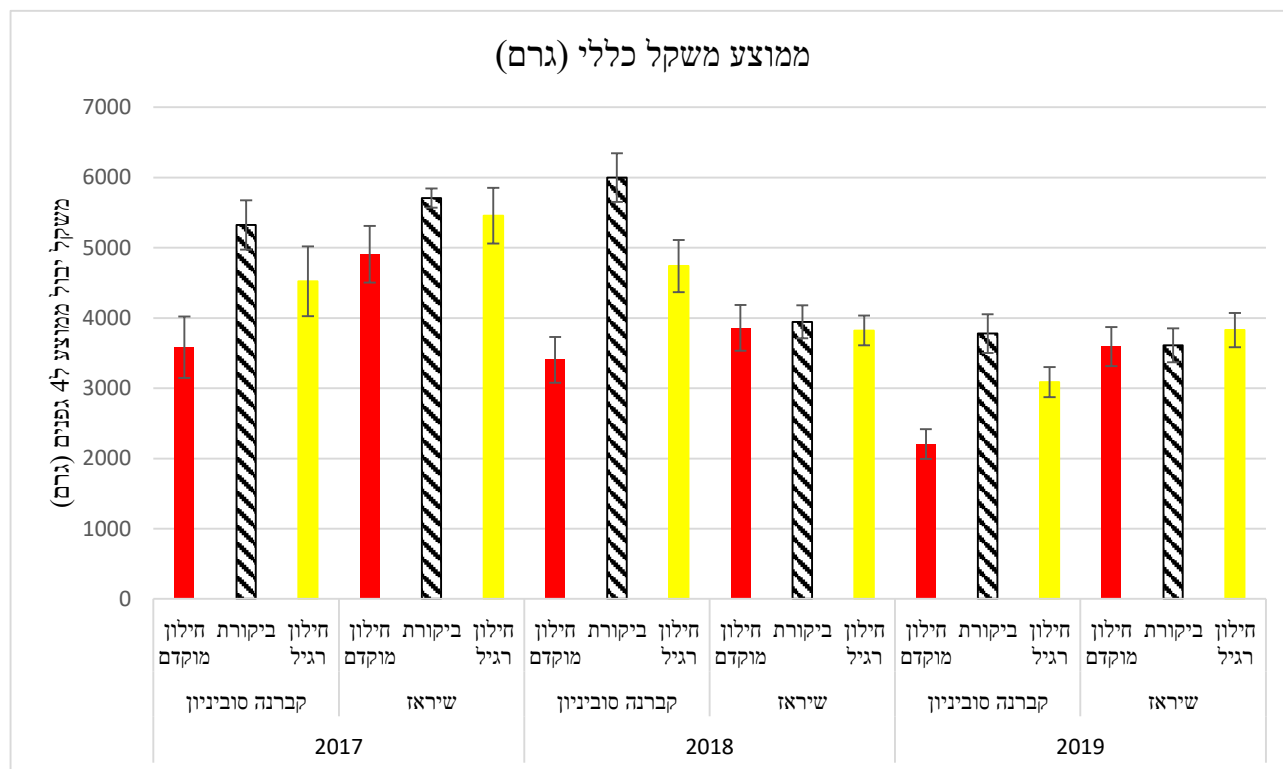
- Tefanini, M Arco S, and R Iccardo V Elasco. 2006. "Metabolite Profiling of Grape : Flavonols and Anthocyanins." *Journal of agriculture and food chemistry*. 54: 7692–7702.
- Vesare Gessler, Ilaria Pertot and michele Perazzolli. 2011. "Plasmopara Viticola : A Review of Knowledge on Downy Mildew of Grapevine and Effective Disease Management." *Phytopathol. Mediterr* : 3–44.
- Wargent, Jason J, and Brian R Jordan. 2013. "Tansley Review: From Ozone Depletion to Agriculture : Understanding the Role of UV Radiation in Sustainable Crop Production", *New phytologist* 197: 1058–1076.
- Weaver, Lisa M., and Klaus M. Herrmann. 1997. "Dynamics of the Shikimate Pathway in Plants." *Trends in Plant Science* 2(9): 346–51.
- Willoquet, L et al. 1996. "Effects of Radiation , Especially Ultraviolet B , on Conidial Germination and Mycelial Growth of Grape Powdery Mildew." *European journal of plant pathology* 102 : 441–49.
- Young, Philip R et al. 2016. "Grapevine Plasticity in Response to an Altered Microclimate : Sauvignon Blanc Modulates Specific Metabolites in Response to Increased Berry Exposure." *Plant physiology*. vol 170: 1235–1254.
- Yu, Christine K.Y. et al. 2005. "A Stilbene Synthase Gene (SbSTS1) Is Involved in Host and Nonhost Defense Responses in Sorghum." *Plant Physiology* 138(1): 393–401.
- Zhao, Yunde. 2012. "Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants." *Molecular Plant* 5(2): 334–38.
- Zohar O.et. al 2014 Gendali and Chamdani- Wine and table grapes varieties in the past and in the present.399-408

Data and statistics

- CBS. 2017. Israel price index of agricultural output, by industry and product. 71-72.
- ITC calculations. 2017. "List of Importing Markets for a Product Exported by Israel 2204 Wine of Fresh Grapes , Incl . Fortified Wines ; Grape Must , Partly Fermented.
- OIV. "2010-2017 " Israel data.

1. ממוצע משקל יבול ל4 גפנים ב5 חזרות בכרם מרום גולן כחלק מהניסוי הגדול. מוצגים הבדלים ביבול בין טיפול החילון המוקדם לחילון סטנדרטי ולטיפול הביקורת שאינה מחולנת.

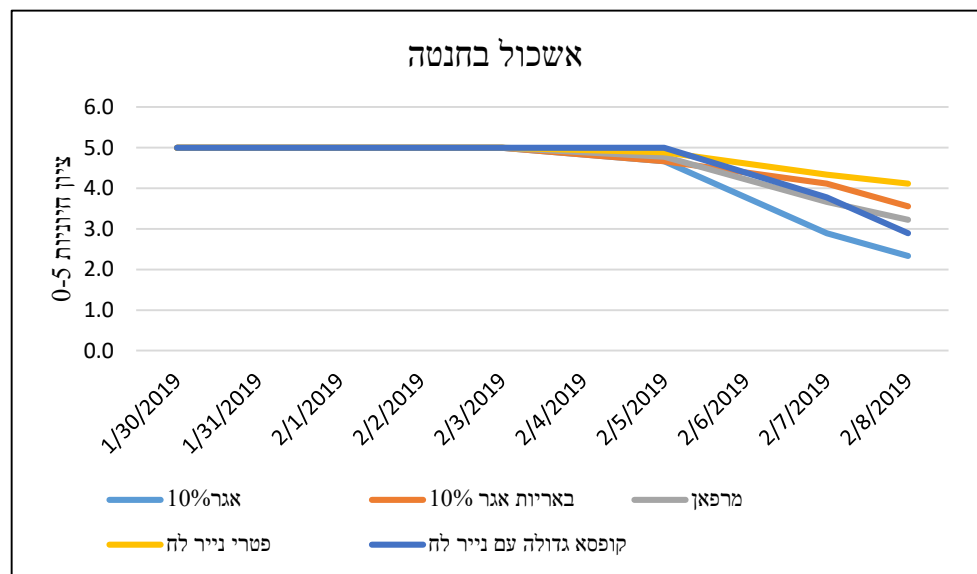
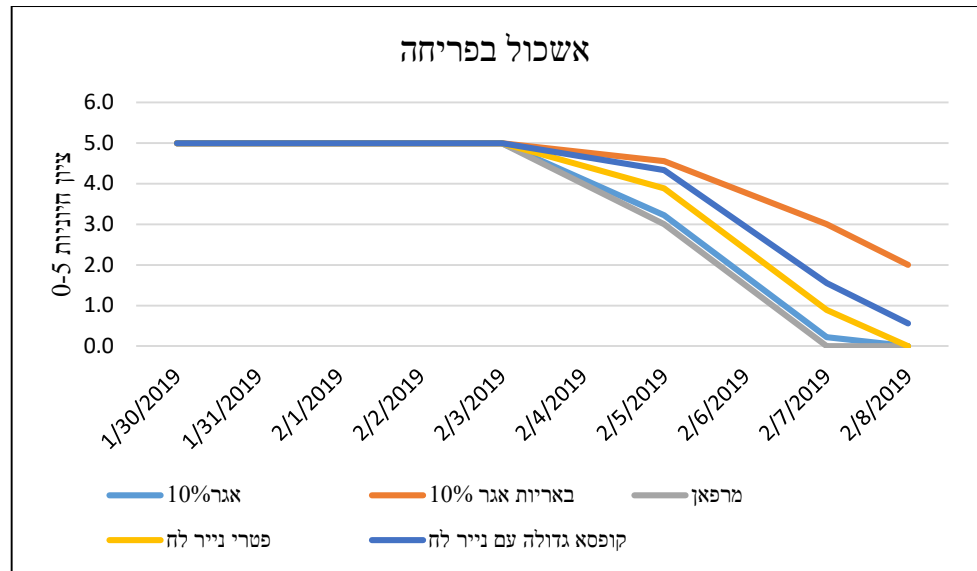
נתוני בציר



2. שימור אשכולות כרם בקעות 2019-2020 חיוניות אשכולות בפריחה וחנטה לאורך זמן 2019 (30/1/19)

בחינת שיטות שונות לשימור חיוניות האשכולות לאורך זמן למטרות הדבקה עתידית בפתוגנים. נלקחו 2 שלבים מאשכולות בתחילת פריחה. האשכולות נחתכו למקטעי כתפיים לאורך כל האשכול והונחו בשלוש חזרות פנימיות בשלוש בלוקים. כל חזרה פנימית הכילה בתוכה את שני השלבים.

מקטעי הכתפיים הוצמדו בנקודת החיתוך שלהם צמוד למצע של כל טיפול ככל הניתן. השיטות שנבדקו כללו: צלחות אגר עם מינון "מרפאן50" כ1/10 (0.025%) מהמינון המומלץ (0.25%), באריות אלייזה ממולאות עם 1% אגר אגר ו0.025% כלורם פניקול, צלחות מעוקרות במצע של 10% אגר אגר קופסאות 2.5 ליטר מחוטאות באתנול 70% ועם נייר לח סטרילי ספוג באגר 1% עם כלורם פניקול 0.025%, צלחות פטרי עם נייר סטרילי ספוג עם 1% אגר אגר ו0.025% כלורם פניקול. הבדיקה נעשתה בתקופת סוף חורף בחממות ענבי מאכל במושב בקעות הממוקם בבקעה ומקדים את הבלבול שלו בהשוואה לאזורי גידול ענבי היין. ב2018 ניתן לראות שאשכולות בשלב פריחה התחילו לאבד את החיוניות שלהם לאחר 7 ימים ואשכולות בשלב חנטה לאחר 9 ימים. ניתן לראות במקרא המצורף מתחת לגרפים את הגדרת החיוניות.

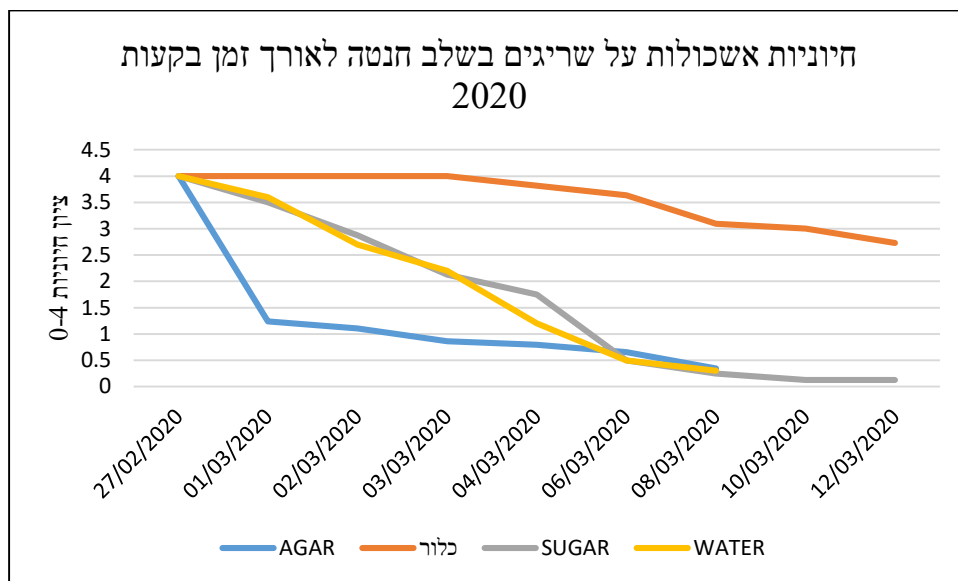


ציון	מקרא
0	רקוב
1	רקמה חומה 80%
2	רקמה חומה 50%
3	פרחים/אגריים מתחילים להשחים 20%
4	שדרה משחימה
5	רקמה ירוקה

חיוניות אשכולות בחנטה לאורך זמן 2020

בחינת שיטות שונות לשימור חיוניות האשכולות לאורך זמן למטרות הדבקה עתידית בפתוגנים. השיטות שנבדקו כללו שריגים שלמים עם 2 אשכולות לשריד שנטבלו בתמיסות שונות בתוך בקבוקים של 0.5 ליטר. התמיסות השונות: מי ברז רגילים, מי סוכר, כלור ואגר. הבדיקה נעשתה בתקופת סוף חורף בחממות ענבי מאכל במושב בקעות הממוקם בבקעה ומקדים את הבלבוב שלו בהשוואה לאזורי גידול ענבי היין. ב-2020 ניתן לראות שאשכולות בשלב חנטה בטיפול הכלור

התחילו החזיקו שמרו על חיוניות סבירה למשך 11 ימים. הניסוי התבצע ב3 חזרות לכל טיפול. ניתן לראות במקרא המצורף מתחת לגרפים את הגדרת החיוניות.



ציון	מקרא
4	בריא
3	איבוד טורגור שזרה
2	איבוד טורגור גרגירים
1	רקבון והתייבשות
0	מת

3. מטריצת חומרים מטבוליים שהראו עליה מובהקת בעקבות טיפול חילון

מטריצה המציגה את ממוצעי שטח החומרים בפונקציית Log (כמות יחסית של החומר) בכל טיפול. ככל שהצבע נוטה לכיוון הגוון האדום כך השטח/הכמות גבוה יותר. הרשימה מייצגת את החומרים המטבוליים שחזרו על עצמם מספר רב של פעמים במסלולים הסינתזה העיקריים (מטריצה מס' 1) כתוצאה מהשפעת טיפול החילון לעומת הביקורת. מספרים אדומים מציינים הבדל מובהק לטובת הטיפול. ($p < 0.05$) גשור N=6 פיכמן N=4

Log Area

5.8 6 6.4 6.8 7 7.4 7.8 8 8.4 8.6 9 9.4 9.8 10

מטריצה מס' 2

חומר	שלב א'								שלב ב'							
	קבוצה סובניון				שיראז				קבוצה סובניון				שיראז			
	גשור		פיכמן		גשור		פיכמן		גשור		פיכמן		גשור		פיכמן	
	חילון	ביקורת	חילון	ביקורת	חילון	ביקורת	חילון	ביקורת	חילון	ביקורת	חילון	ביקורת	חילון	ביקורת	חילון	ביקורת
(2E)-2-Decene-4,6,8-triynoic acid	7.44	6.98	6.59	6.38	7.00	6.72	6.66	6.47	7.28	7.15	6.66	6.28	7.06	6.65	6.34	6.33
2-amino-2,3,7-trideoxy-D-lyxo-hept-6-ulosonic acid	8.06	7.95	8.38	8.27	8.42	8.34	8.25	8.19	8.21	8.18	8.25	8.16	8.45	8.30	8.34	8.23
2-Hydroxy-4-hydroxymethylbenzalpyruvate	7.28	6.93	6.46	6.25	6.90	6.61	6.50	6.36	7.17	7.07	6.47	6.11	6.96	6.53	6.31	6.08
3-(((2R,3S,4S,5R,6S)-6-((2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl)oxy)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)methoxy)-3-oxopropanoic acid	8.29	7.96	7.50	7.26	8.00	7.77	7.69	7.34	7.87	7.68	7.64	7.22	7.49	7.27	7.07	6.94
5-(Diethoxymethyl)-1,2-oxazol-3(2H)-one	7.73	7.70	7.98	7.91	7.88	7.87	7.97	7.88	7.85	7.86	8.04	7.92	7.97	7.88	8.10	7.92
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-methyl-4H-chromen-4-one	7.04	6.76	7.21	6.82	7.07	6.84	6.94	6.60	6.96	6.75	7.01	6.64	7.17	6.88	7.27	6.65
5-Hydroxy-DL-tryptophan	7.86	7.49	7.42	7.25	7.64	7.41	7.51	7.33	7.64	7.52	7.42	7.31	7.53	7.31	7.31	7.21
6-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-d][1,3,4]oxadiazin-4-one	7.89	7.71	7.52	7.35	7.53	7.40	7.43	7.34	7.29	7.23	7.13	6.97	7.26	7.04	7.32	7.19
coumaran	8.67	8.46	8.71	8.39	8.69	8.41	8.65	8.43	8.54	8.49	8.59	8.49	8.61	8.22	8.71	8.60
D-PANTOTHENIC ACID	7.96	7.79	8.03	7.89	8.01	7.88	8.09	7.97	8.00	8.01	8.10	8.06	8.12	7.97	8.04	7.98
Isomdole-1,3(2H,3H)-dione, 2,2'-azobis-	8.59	8.32	7.76	7.20	8.16	8.00	8.16	8.01	8.38	8.17	8.14	7.98	8.35	8.13	7.74	7.41
Myricetin	7.72	7.44	7.04	6.76	7.37	7.26	7.36	7.06	7.63	7.53	7.33	7.00	7.32	7.17	7.01	6.81
Quercetin-β-D-glucoside	9.30	9.02	8.98	8.67	9.44	9.22	8.75	8.43	9.01	8.80	8.75	8.35	9.24	8.95	8.74	8.52
Sorbifolin	7.44	7.23	6.99	6.68	7.08	6.90	7.08	6.88	7.18	7.06	7.15	6.82	6.99	6.75	6.86	6.53

4. רשימת פריימרים

מקור	רצף	פריימר
“Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (<i>Vitis vinifera</i>) (2002)”	F- AGCCAGTGAAGCAGGTAGCC R- GTGATCCGGAAGTAGTAAT	CHS1
“Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates(2008)”	F- TGCTGACTGGTGAAAAGGTG R- CGTCCAAGCACTGAGACAA	PAL1
“Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates(2008)”	F- GTGGGGCTCACCTTTCATT R- CTGGGTGAGCAATCCAAAAT	STS
“The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes(2008)”	F- CAGGGCTTGAG GTTTTTAG R- GGGTCTTCTCCTTGTTTCAG	FLS
“Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates(2008)”	F- AGTTGGGCTTTTGTACAC R- CTGGGTGAGCAATCCAAAAT	UFGT
“Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates(2008)”	F- TCAGCACTTCCAGCAGATG R- TAGGGCAGGGCTTCTTCT	ACTIN

