

**המופע של מחלת קיפול העלים הנגרמת ע"י הווירוס  
GLRaV-3 והשפעתו על מדדים פזיולוגיים ואיכותיים  
בגפנים בצפון ישראל**

**עבודת גמר**

**מוגשת לפקולטה לחקלאות,**

**מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית**

**של האוניברסיטה העברית בירושלים**

**לשם קבלת תואר "מוסמך למדעי החקלאות"**

**מאת**

**רותם נלביצקי**

**עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:**

**ד"ר תרצה זהבי, משרד החקלאות, שה"מ.**

**ד"ר זהר כרם, המחלקה לביוכימיה, מדעי המזון והתזונה, הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה  
ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים**

## תקציר

מחלת קיפול העלים הינה אחת המחלות הוויראליות הנפוצות ביותר בגידול הגפן ברחבי העולם וקשורה לנוכחות וירוסים חוטיים (Closteroviridae). בעולם מוכרים כעשרה וירוסים שנמצאו בקשר עם המחלה (Grapevine Leafroll associated Virus-GLRaV1-9). שניים מהם נפוצים ביותר (מספרים אחד ושלוש) כשבארץ, כמו בארצות רבות וירוס מספר שלוש הוא גורם הנזק העיקרי. בגפנים נגועות במחלה נמצאה פגיעה בכמות הפרי ובאיכותו שבאה לידי ביטוי בירידה ניכרת בקצב הצטברות הסוכר ותכולת הצבע וכתוצאה מכך ירידה באיכות היין המיוצר. כיום מהווה מחלת קיפול העלים איום מרכזי על תעשיית יינות האיכות ברחבי העולם. אין בנמצא טיפול נגד הווירוס ועל כן לא ניתן להבריא גפן חולה. כיום, דרכי ההתמודדות עם המחלה כוללות מניעת הגעתה על ידי יצירת חומר ריבוי נקי מהווירוס והאטת או מניעת הפצתה בכרם על ידי הדברה ובלבול של הווקטור העיקרי המעביר אותה (כנימת קמחית הגפן, *Planococcus ficus*) וכן על ידי עקירת גפנים נגועות. סימני המחלה מוכרים היטב וכוללים שינוי גוון של העלים (בזנים אדומים) ולעתים התקפלות עלים. עם זאת, קיימים הבדלים בהתבטאות הנגיעות בין כרמים ויותר מכך, בין גפנים באותו כרם שנמצאו באותם תנאים. בכרמים הבוגרים, בהם הנגיעות בוורוס היא בין 50%-100% נשאלת השאלה מהי המשמעות של ביטוי נגיעות לא אחיד בין הגפנים השונות בכרם?

מטרת העבודה היא לימוד המופע של מחלת קיפול העלים והשפעתו של מדדים פיזיולוגיים ואיכותיים בגפנים. לימוד זה נערך על ידי 1. בחינת הדינמיקה העונתית והרב שנתית של התבטאות תסמינים בכרמים. 2. בחינת ההשפעה של חומרת התסמינים על מדדי איכות ויבול בגפן. 3. מעקב פרטני לאורך שתי עונות אחר ביצועי גפנים (מדדי איכות, יבול, מדדים פיזיולוגיים) נגועות עם וללא תסמינים וגפנים נקיות כביקורת. 4. בחינת הקשר בין ביטוי תסמיני המחלה לטיטר הווירוס.

נמצא קשר בין מועד הופעת התסמינים לדרגת חומרתם בבציר. נמצא שהקשר הזה לא מושפע מהכרם הספציפי ( $p=0.3$ ) אך מושפע מהשנה ( $p=0.061$ ) הבדל שרומז על השפעה של מזג האוויר בעונת הגידול. שיעור הגפנים המבטאות תסמינים לעומת הגפנים ללא תסמינים ירד בין 2011 ל 2012 בשניים מהכרמים ועלה בשלישי. בין השנים 2012 ל 2013 הייתה עלייה בכל הכרמים בשיעור הגפנים המבטאות תסמינים לעומת גפנים ללא תסמינים. בשלושה כרמים, בשלוש שנות המעקב נמצאו גפנים (5-10%) בהן היו תסמינים באחת מהשנים שלא התבטאו בשנים הבאות. רמת הסוכר, ה pH והצבע בגפנים הייתה ביחס הפוך לחומרת התסמינים. רמת הסוכר בגפנים בדרגת תסמינים נמוכה (23.9%) לא נבדלה במובהק מגפנים ללא תסמינים (25.1%) ושתייהן נבדלו מגפנים עם דרגת תסמינים גבוהה (21.9%). רמת הצבע בענבים מגפנים עם דרגת תסמינים גבוהה נבדלה מגפנים ללא תסמינים ולא נבדלה מגפנים עם התבטאות נמוכה. ניכרת מגמה ליבול נמוך יותר בגפנים המבטאות תסמינים אולם גודל הגרגר בגפנים אלה היה גדול במובהק לעומת גפנים ללא תסמינים. בבדיקות ב Nested-PCR בכרמים שבמעקב התברר שגם הגפנים ללא תסמינים היו נגועות בוורוס. לא נמצא הבדל בבדיקות טיטר הווירוס שנערכו ב qRT PCR בין הגפנים ללא תסמינים לגפנים עם תסמינים קלים והייתה מגמה לטיטר גבוה בגפנים עם התסמינים הקשים. בשני כרמים, (אחד בצפון ואחד בדרום הגולן) נבחרו בסוף כל עונה גפנים למעקב פרטני על סמך התבטאות תסמינים ועל סמך בדיקת נוכחות הווירוס ב Nested-PCR. הגפנים חולקו לשלוש קבוצות אחריהן נערך מעקב בשנה העוקבת: 1. גפנים (0,0) - נקיות מהווירוס. 2. גפנים (1,1) - נגועות עם תסמינים. 3. גפנים (1,0) - נגועות ללא תסמינים. בהסתכלות ממוקדת לאורך העונה נמצא שגפנים נגועות ללא תסמינים (1,0) דומות ברוב המדדים (בוהל, מדדי הבשלה, גודל גרגר, תא לחץ) לגפנים נקיות מהווירוס, יותר מאשר לגפנים נגועות המבטאות תסמינים. שיעור הבוהל עוכב במובהק בגפנים עם תסמינים בהשוואה לגפנים ללא תסמינים (0,0) (1,0). רמת הסוכר לאורך העונות הייתה נמוכה יותר בגפנים (1,1) לעומת גפנים ללא תסמינים. צבע הגרגר בבצירים 2012 ו 2013 בכרם הדרומי, גשור, היה נמוך יותר בגפנים (1,1) ונשמר כך גם

בהפרדת אנטוציאנים ב RP-LC בדגימות תירוש ויין. בממד גודל הגרגר התקבלו מגמות הפוכות בין הכרמים (גשור ומ"ג). לא נמצא קשר בין רמת התסמינים לטיטר הוירוס בין שני הכרמים. בכרם הצפוני, של מרום גולן (מ"ג), טיטר הוירוס נמצא דומה ל NTC ונמוך בהשוואה לטיטר שנמצא בכרם גשור. לעומת זאת עוצמת התסמינים במ"ג הייתה חזקה יותר כפי שבא לביטוי ברמת האנטוציאן בעלים שהייתה גבוהה כמעט פי שתיים ופי תשע לעומת הרמה בגשור ב 2012 ו 2013 בהתאמה. בתוך כרם גשור, בשתי השנים, הקשר בין התבטאות התסמינים לטיטר הוירוס נמצא חלש ולא מובהק. התסמינים נהיים חזקים עם התקדמות העונה בעוד שהטיטר הולך ויורד (מיוני ועד בציר). חשיבות הטיטר לדעתנו באה לידי ביטוי בשלב 'לאחר חנטה' (כלומר בתחילת העונה) ובהמשך, עם העלייה בטמפרטורות הקשר טיטר-תסמינים נחלש והגורם הסביבתי, הופך למשמעותי יותר בהשפעה על התבטאות התסמינים. טמפרטורה גבוהה (חמה) עלולה למסך על הופעת התסמינים ולגרום להיחלשותם בעוד שטמפרטורה נמוכה (קרה) מעודדת היווצרות תסמינים. על סמך תוצאות אלה, לא ניתן להשתמש בטיטר הוירוס כמדד לתסמינים ולהיפך, בתסמינים כמדד לכמות הוירוס. הבדלים במצב המים ובקצב הבוחל בין גפנים מקבוצות הנגיעות השונות נמצאו עוד לפני או בסמוך להופעת התסמינים על העלים. ממצא זה רומז שלא רק התסמינים הנראים הם הגורמים לירידה באיכות. גפנים נגועות עם תסמינים (1,1) מצויות במצב מים טוב יותר (פוטנציאל מים בגזע פחות שלילי) לעומת גפנים ללא תסמינים (1,0) (0,0). להבנתנו הנגיעות בוירוס גורמת כבר בתחילת העונה לעיכוב העברת הסוכר מהעלים לפרי. הצטברות הסוכר בעלה מעודדת מחד היווצרות אנטוציאן בעלים (תסמינים) ומאידך גורמת לעיכוב של המערכת הפוטוסינטטית, על ידי מנגנון משוב שלילי. עיכוב ההטמעה מאפשר סגירת פיוניות וכך שמירה על מצב מים טוב יותר בגפנים עם תסמינים. מכלול הממצאים מעבודתנו מגדיר לראשונה את ההבדלים והקשר בין טיטר הוירוס, התבטאות התסמינים ואיכות הפרי בהשוואה בין כרמים באתרים שונים ובין גפנים נגועות באותו כרם. הגדלות באותם תנאים. עם זאת לא מצאנו את הגורם להתבטאות השונה של התסמינים בגפנים נגועות. הנגיעות הרבה במחלת קיפול העלים בכרמים לא מותירה אפשרויות רבות לטיפול וההתייחסות עד כה הייתה לעצם נוכחות הוירוס. ממצאי העבודה הנוכחית מראים כי קיים קשר בין מועד הופעת התסמינים לחומרתם בבציר וכן כי חומרת הפגיעה בענבים משתנה ונמצאת בקשר טוב עם חומרת התבטאות התסמינים בעלים. ניתן להשתמש במעקב אחר מועד הופעת התסמינים לקביעת איכות הענבים בבציר. דרכים שיפחיתו את התבטאות התסמינים יאפשרו להגיע למדדי איכות ויבול מספקים ליצירת יין טוב גם בכרם נגוע.

## תודות

**לד"ר תרצה זהבי** - המנחה שלי במלוא מובן המילה, תודה ענקית על למידה אינסופית ממך. תודה על שעות רבות של בילוי בכרם, על הסבלנות הבלתי נגמרת, על המקצועיות, על החברות. תודה שלימדת אותי לאהוב את הכרם כמוך..

**לד"ר זהר כרם** - תודה רבה על ההנחיה, על דגשים וכיווני מחשבה חדשים ומקוריים.

**לד"ר עומר קראין** - תודה ענקית על ההנחיה והליווי בעיקר בתחום המעבדתי, תודה על הסבלנות הרבה.

**לד"ר גל ספיר** - תודה שחשפת אותי לעולם הכרם ושגרמת לי לחזור מקצה העולם כדי לעשות עוד עונה ובדיעבד- להתחיל מאסטר..

**לצוות מו"פ צפון** - תודה לכל העובדים המסורים של מו"פ צפון שלקחו חלק בעבודות השונות.

**לפרופ' מרטין גולדווי וכל צוות המעבדה במיג"ל** - תודה על האירוח החם והאווירה הנעימה במעבדתכם. תודה על העזרה, הסבלנות, החברות והיין..

**לפרופ' משה ראובני וצוות המעבדה לחקר הגולן** - ורד, רימה, מרי וליאור - תודה על הזכות לעבוד אתכם ולצדכם.

**לצוות מעבדת ביוכימיה ומזון בראשות ד"ר זהר כרם** - תודה ענקית לכל הצוות הנהדר ובעיקר ללוהי וקרן על סבלנות אין קץ - זה לא היה קורה בלעדיכם.

**לצוות המעבדה של פרופ' אמנון שוורץ** - תודה על הכל וסליחה שגמרתי לכם את כל הקפה שחור.

**לכורמים ומנהלי מחלקות חקלאיות** - עידו (מרום גולן), דוריס (יפתח), נחום (דלתון) ויוסי (גשור) תודה על שיתוף הפעולה המלא, על החיוך והכנסת האורחים הלבבית.

**למכללת אוהל-תודה רבה** על השימוש בכל ציוד הכנת היין. תודה לסטודנט אלון מילר על הכנת היין לעבודה זו.

**להילרי** - תודה על שעות של ישיבה על מבחנים סטטיסטיים ועל הנכונות לעזור.

**לארגון מגדלי הפירות בישראל** על הענקת המלגה ע"ש דני ברונר ז"ל.

**לצליל בראס חברתי הטובה** - שהאמינה בי מההתחלה שאגיע לרגע הסיום. תודה על שעות אינספור של עזרה בכרם ובמעבדה, שעות בוקר מוקדמות וקרות בצ. הרמה וצהריים רותחים באמצע הקיץ בד. הגולן. תודה על כך שעמדת בכל ההתקלות ועל ההצלחות הרבות... תודה על רגעים רבים ונפלאים שלא ישכחו.

**למשפחתי היקרה והתומכת, לחברי הקרובים** - תודה מכל הלב.

המחקר בוצע בתמיכת המדען הראשי של משרד החקלאות ומועצת גפן היין ובמסגרת מו"פ צפון.

## תוכן עניינים

1.	מבוא	1.
1.1	הגפן	1.
1.2	מחלת קיפול העלים	1.
1.2.1	השלכות כלכליות	1.
1.2.2	מחולל המחלה GLRaV-3	2.
1.2.2.1	טקסונומיה	2.
1.2.2.2	גזעים שונים של GLRaV3	2.
1.2.3	הפצה והתפשטות הווירוס	2.
1.2.4	התמודדות עם מחלה	3.
1.2.5	תסמינים	4.
1.2.5.1	תיאור התסמינים	4.
1.2.5.2	הגורמים לחוסר אחידות בתסמינים	4.
1.2.5.3	גפנים נגועות ללא תסמינים	5.
1.2.6	נזקי מחלת קיפול העלים בכרם יין	6.
1.2.6.1	השפעת GLRaV3 על גדילת הגפן	6.
1.2.6.1.1	פוטוסינטזה	6.
1.2.6.1.1.1	השפעת GLRaV3 על פוטוסינטזה בגפנים נגועות ללא תסמינים	6.
1.2.6.1.2	יבול הגפן	7.
1.2.6.1.3	השפעה פנולוגית-בוחל	7.
1.2.6.2	השפעת GLRaV3 על מדדי איכות בגפן	7.
1.2.6.2.1	צבירת סוכר	7.
1.2.6.2.1.1	צבירת סוכר בגפנים נגועות ללא תסמינים	7.
1.2.6.2.2	חומציות	8.
1.2.6.2.3	אנטוציאנים	8.
1.2.6.2.4	הקשר בין צבירת סוכר לאנטוציאן	8.
1.2.6.2.5	איכות היין	8.
1.2.7	אפשרויות לאופן פגיעת הווירוס	9.
1.2.8	זיהוי הווירוס	10.
1.2.9	תנועה וטיטר הווירוס בגפן	10.
1.2.10	תסמינים והקשר לטיטר הווירוס	10.
1.2.11	פערי הידע	11.
2.	חומרים ושיטות	12.
2.1	ניסוי א'	12.
2.1.1	אתרי ניסוי	12.
2.1.2	מבנה הניסוי	12.
2.1.2.1	מעקב הופעת התסמינים	12.
2.1.2.2	דירוג חומרת תסמינים	12.

12	2.1.2.3 מדדים נבדקים לגפנים בדרגות התבטאות השונות
13	2.1.3 ניתוח התוצאות
13	2.1.3.1 שיעור הגפנים בכל דרגות הסתמינים
13	2.1.3.2 בחינת הקשר בין מועד הופעת התסמינים לחומרות הנגיעות בבציר
13	2.1.4 בחינת הקשר בין חומרת התסמינים לכמות ואיכות היבול המתקבל
14	2. ניסוי ב'
14	2.2.1 אתרי הניסוי
14	2.2.2 איתור ומיפוי גפנים נגועות
14	2.2.3 מבנה הניסוי
14	2.2.4 שיטות הדיגום
14	2.2.4.1 בדיקות מדדים עונתיים
14	2.2.4.1.1 התעוררות
14	2.2.4.1.2 התקדמות הבוחל
14	2.2.4.1.3 קצב הבשלה
15	2.2.4.1.4 נתוני בציר
15	2.2.4.2 בדיקת מדדים במועדים פנולוגים מוגדרים
15	2.2.4.2.1 בדיקת ריכוז פיגמנטים
16	2.2.4.2.2 בדיקות פוטנציאל מים בגזע
16	2.2.4.2.3 בדיקות לנוכחות וכימות הווירוס
16	2.2.4.2.3.1 הפקת RNA
17	2.2.4.2.3.2 ריאקציות PCR (RT) Reverse Transcription
17	2.2.4.2.3.3 Nested- PCR and Polymerase chain reaction (PCR)
18	2.2.4.2.3.4 בדיקת ביטוי גנים באמצעות Quantitative Real Time PCR
20	2.2.4.3 בדיקת אנטוציאנים בתירוש וביין
20	2.2.4.3.1 הכנת יין
21	2.2.4.3.2 הפרדה כימות ואפיון פרופיל אנטוציאנים בכרומטוגרפיית RP-LC
21	2.2.4.3.2.1 הכנת הדוגמאות לאנליזה ב RP-LC
21	2.2.4.3.2.2 הפרדת הדוגמאות ב RP-LC
22	3. תוצאות
22	3.1 הדינמיקה העונתית והרב שנתית של התבטאות תסמיני הווירוס בכרמים
22	3.1.1 השפעת חומרת התסמינים על היבול ואיכות התירוש
23	3.1.2 השפעת מועד הופעת התסמינים על דרגת חומרתם
25	3.1.3 שיעור הנגיעות וחומרת התסמינים
26	3.2 השוואת מדדים של גפנים נקיות לגפנים נגועות, עם וללא תסמינים
26	3.2.1 בחירה של גפני הניסוי
28	3.2.2 מדדים עונתיים- איכות הפרי
28	3.2.2.1 בוחל

28.....	3.2.2.2 סוכר
29.....	pH 3.2.2.3
29.....	3.2.2.4 צבע גרגר
29.....	3.2.2.5 אנטוציאנים בתירוש
29.....	3.2.2.6 אנטוציאנים ביין
33.....	3.2.2.7 מדדים עונתיים – יבול הגפן
34.....	3.2.3 מעקב במועדים פנולוגים מוגדרים
34.....	3.2.3.1 פיגמנטים בעלים
37.....	3.2.3.2 פוטנציאל מים בגזע
38.....	3.2.3.3 טיטר הווירוס
39.....	3.2.3.3.1 הקשר בין חומרת התסמינים לטיטר הווירוס
40.....	4. דיון
40.....	4.1 הבדלים בתסמינים בין גפנים הגדלות בתנאים זהים
40.....	4.2 התבטאות תסמינים והקשר לירידה במדדי איכות ויבול בפרי
41.....	4.3 התסמינים בקורלציה חזקה לאופי השנה בהשפעת הטמפרטורה
42.....	4.4 הקשר בין הופעת התסמינים לנוכחות וטיטר הווירוס
44.....	4.5 האם התסמינים משפיעים על האיכות או שיש גורם נוסף להתבטאות התסמינים?
44.....	4.6 השערות לגורמים להופעת תסמינים על העלים
45.....	4.7 סיכום
46-50.....	רשימת ספרות
51.....	נספחים





## 1. מבוא

### 1.1 הגפן

הגפן שייכת למשפחת הגפניים (*Vitaceae*) המונה כ- 15 סוגים, ביניהם הסוג *Vitis* הכולל שני תתי סוגים: *Euvinis* ו- *Muscadinia*. בתת הסוג *Euvinis* המייצג את הגפן קיימים כ- 60 מינים המתחלקים על פי מקורם לקבוצה אמריקאית, קבוצה אסייתית וקבוצה אירופאית. הקבוצה האירופאית כוללת מין יחיד, *Vitis vinifera*, שהוא המין העיקרי המשמש לגידול גפן ליין, למאכל וצימוקים. מיני הגפן האמריקאים משמשים ככנות למניעת נזקים מכנימת הפילוקסרה.

#### גידול גפנים בארץ

ענף כרמי היין עבר פיתוח ב 15 שנים האחרונות מבחינת נטיות רבות של כרמים מזנים איכותיים והגדלת היקף הייצור. רמת הגולן הממוקמת בצפון מזרח מדינת ישראל מהווה בית לגידול נרחב של כרמים (כ- 10 אלף דונם). היקף הייצור של ענבי יין ברמת הגולן הוא כ- 45 מלש"ח לשנה. בישראל כולה קיימים כ- 50 אלף דונם של כרמים אשר היקף ייצורם הוא כ- 145 מלש"ח בשנה. מחזור המכירות של היקבים (מתוצרת מקומית) מגיע לכ- 900 מלש"ח בשנה (אלקנה בן ישר, מנהל מו"פ צפון- תקשורת אישית). כיום, נכון לשנת 2013, קיימת בעיה בשוק של עודף בענבי יין. בעיה זו מעניקה יתרון משמעותי לכרמים המגיעים ליבול ואיכות ענבים גבוהה אשר הם המדדים המשפיעים ישירות על הרווחים לכורם.

#### מחלות ווירוס בגפן

טיפול במחלות הוא מרכיב חשוב בתחזוקת איכות הענבים ליין ושמירה על התעשייה. אחד הגורמים המשפיעים לרעה על איכות וכמות היבול בכרם הוא נגיעות בוורוסים. מאחר וגידול גפן הוא בין העתיקים בגידולים המתורבתים הרב שנתיים, ריבוי וגטטיבי נרחב לאורך שנים והעברת זנים ומינים מאזורים שונים בעולם הוביל לשימור והפצה נרחבת של טיפוס וירוס שונים שחדרו לגידול. עד היום זוהו ברחבי העולם מעל 60 וירוסים שונים בגפן הכוללים וירוסים של DNA ווירוסים של RNA, כאשר חלקם נמצאו כספציפיים לגפן (Martelli, 2012).

### 1.2 מחלת קיפול העלים

מחלת קיפול העלים (Grapevine leafroll disease) נחשבת לאחת המחלות הוויראליות המרכזיות והנפוצות ביותר בגידול הגפן. המחלה גורמת להפחתה בכמות הפרי ובאיכותו שבאה לידי ביטוי בירידה ניכרת בקצב הצטברות הסוכר ותכולת הצבע וכתוצאה מכך ירידה באיכות היין המיוצר (Over de Linden and Chamberlain, 1970). מחלה זו מיוחסת לתשעה או עשרה וירוסים אשר בודדו מגפנים נגועות וקיבלו את השם Grapevine leafroll associated virus (GLRaV) עם מספר סידורי. הקשר וירוס- מחלה (פוסטולטים של קוד) עוד לא הוכח סופית והאות a, קיצור ל associated מציינת שווירוסים אלה נמצאים בדרך כלל בגפנים החולות במחלת קיפול העלים.

#### 1.2.1 השלכות כלכליות

במהלך השנים האחרונות עלתה במידה ניכרת מידת הנגיעות במחלת קיפול העלים בכרמי יין בישראל. נזקי המחלה מתבטאים בירידה משמעותית באיכות הפרי שגורמת לירידה במחיר של כ 500 שח' לדונם לטון פרי, שהמגדל מקבל מהיקב. בחישוב כולל זוהי פחיתה של כ 20% מהרווחים ולעיתים הנזק הוא אף טוטאלי כתוצאה מעקירות כרמים שלמים. הנזק ליקבים מוערך בכ 135 מיליון שח' בשנה שנובעים מכך שהיקבים נאלצים להעביר את הענבים ליצירת יינות מסדרות פחות איכותיות דבר הפוגע הן במוניטין והן בהכנסות הישירות של היקבים (צדוק שלמה, מנהל מחלקה חקלאית יקבי רמה"ג- תקשורת אישית).

## 1.2.2 מחולל המחלה GLRaV-3

### 1.2.2.1 טקסונומיה

ווירוס קיפול העלים משתייך למשפחת *Closteroviridae* משפחה זו כוללת וירוסים בעלי חלקיקים חוטיים באורך 1,250-2,200 nm וחומצות גרעין מסוג RNA חד גדילי חיובי בגודל של (Martelli et al., 2002) kb15.5-19.3. ניתן לסווג משפחה זו על פי מאפיינים מולקולריים וביולוגיים לארבעה סוגי וירוסים *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Crinivirus* ו-*Velarivirus* (Al Rwahnih et al., 2012).

ווירוסים מסוג *Ampelovirus* נבדלים משאר משפחת *Closteroviridae* במספר תחומים: ביולוגית- הם מועברים על ידי כנימות קמחיות, מולקולארית- הם בעלי סדר הפוך של הגנים המקודדים לחלבוני המבנה (בניגוד ל *Closterovirus*) ובנוסף הם בעלי גנום המורכב מחלקיק אחד (monopartite) ושני העתקים של הפרוטאז העיקרי (בניגוד ל *Crinivirus*) (Martelli, 2012).

ווירוסים הקשורים למחלת קיפול העלים (GLRaV) מוספרו מ-1 עד 9 או 10 לפי הסדר בו התגלו Karasev, (2000). -9, -8, -6, -5, -4, -3, -1 GLRaV שויכו לסוג *Ampelovirus* בעוד ש GLRaV-2 שויך ל *Closterovirus* ו GLRaV-7 סווג לאחרונה ל *Velarivirus* (Al Rwahnih et al 2012). ווירוסים אלו נבדלים סרולוגית זה מזה ופרט ל GLRaV-2 אינם מועברים מכנית.

GLRaV-3 הוא הווירוס הנפוץ והחשוב ביותר מבחינה כלכלית בקרב ווירוסים GLRaVs (Maree et al., 2013) וכן מהווה כגורם הנזק העיקרי.

### 1.2.2.2 גזעים שונים של GLRaV3

בישראל, נערך מחקר לאפיון גזעי GLRaV3 במעבדתו של ד"ר מוואסי, מנהל המחקר החקלאי. התוצאות מראות כי בארץ נפוצים שני גזעים של הווירוס- LR3-V1 ו LR3-V2 כאשר LR3-V1 הוא הנפוץ יותר בכרמים (ב 70% מהדגימות שנבדקו). לרוב, הגפן הנגועה מכילה גזע אחד, אם כי ישנם מקרים בהם קיימת תערובת של שני הגזעים (10% מהדגימות). לא נמצאה קרבה של הגזע לאזור גידול של הגפן, לכנה ולמקור החומר הצמחי (חומר צמחי חדש וותיק). כמו כן, לא נמצאה זיקה בין חומרת התסמינים לגזע. (דו"ח מסכם, מיזם הפחתת נזקי וירוסים בכרמי יין, 2013). בנוסף, במסגרת המיזם, קבוצת מחקר זו עסקה באפיון הרצף השלם של הגזע LR3-V1 הקיים בארץ. התוצאות שהתקבלו הראו כי קיים שוני בין הגזע הישראלי לבין האחרים הנמצאים בארצות הברית, צ'ילה ודרום אפריקה.

### 1.2.3 הפצה והתפשטות הווירוס

הפצה והתפשטות הווירוס מתרחשות בשתי דרכים עיקריות, על ידי הרכבת חומר צמחי נגוע או על ידי חרקים המעבירים אותו בגפי הפה, בעיקר כנימות קמחיות אך גם ע"י מספר כנימות רכות (Golino et al., 2002; Martelli, 1997; Petersen and Charles, 2002; et al.). בישראל הכנימה הנפוצה בכרמים היא קמחית הגפן (*Planococcus ficus*). העברת הווירוס על ידי הכנימות הקמחיות יכולה להיות על ידי הדרגה הבוגרת העוברת מגפן לגפן או על ידי הדרגות הצעירות של זחלנים אשר עפים ברוח (Cabaleiro and Segura, 1997). Tsai. וחובריו (2012) מדווחים על כך שקמחית הגפן כווקטור, יעילה מאוד ביחס לקמחיות אחרות שניזונות מהגפן.

#### 1.2.4 התמודדות עם המחלה

לא קיימות הוכחות לריפוי המחלה מרגע שהווירוס עבר לגפן. אופן ההתמודדות המקובל בעולם, הוא מניעת הגעת המחלה מלכתחילה. מדינות רבות ברחבי העולם פועלות למניעת הגעת המחלה על ידי יצירת חומר אם נקי מווירוסים והקמת פרויקטים ומימונם להגברת המודעות לשמירה והפצת גפנים בריאות ונקיות ממקור ריבוי מאושר תוך כדי שימת דגש על אבחון חומר הריבוי בחלקות האם ובמשתלות המסחריות (Charles et al., 2006; Rodrigo et al., 2013). החומר הנקי יכול להתקבל על ידי שילוב של טיפול חום ולקחת החומר הצמחי מהמריסטמה המיוחדת (Savino et al., 1991) עוברים סומטיים (Gambino et al., 2006) ולאחרונה הוכחה בניסוי מעבדתי היעילות של כימוטרפייה (Panattoni et al., 2007). בישראל, קיימת חקיקה האוסרת על נטעת חומר ריבוי שאינו מאושר על ידי משרד החקלאות, דבר המאפשר בקרה גבוהה על מניעת ההתפשטות של חומר ריבוי נגוע. הקפדה על הרחקת כרמים חדשים מוותיקים עשויה לסייע בשמירה מהדבקות הכרם כיוון שישנה נוכחות לא מבוטלת של זחלני קמחיות הנישאים פסיבית ברוח (Sokolsky et al., 2013).

התמודדות נוספת עם המחלה בהנחה שנגיעות קיימת כבר בכרם, היא האטת קצב התפשטותה. בתחום זה, ההתמודדות העיקרית עם מחלת קיפול העלים היא על ידי הדברת הכנימות הקמחיות (Walton and Pringle, 2004) על ידי חומרי הדברה סיסטמיים או מניעת התפשטותם בכרם על ידי שימוש בפרומונים ל"בלבול" (דו"ח מופ צפון, בחינת השימוש בשיטת "הבלבול" להדברת קמחית הגפן בכרם 2012). במחקר שנערך בדרום אפריקה מתוארת שיטה נוספת להאטת קצב התפשטות המחלה בכרם והיא על ידי עקירת גפנים נגועות. במחקר הזה, נמצא שעקירת גפנים נגועות לאורך מספר שנים מפחיתה באופן משמעותי את אחוז הנגיעות בכרם, זאת בהשוואה לחלקה מקבילה בה לא נערך כל טיפול. סוקולסקי וחבוריה (2013) ערכו מעקב אחר התפשטות נגיעות בחלקה קימת במשך עשר שנים וחישבו את רמת הסיכון של גפנים במיקום שונה יחסית לגפן נגועה. במחקר נוסף (Nimmo-Bell, 2006) נערכה השוואה כלכלית בין ארבע אסטרטגיות של עקירת גפנים הנגועות במחלת קיפול העלים בענבי "סוביניון בלאן" ו"מרלו" בניו זילנד. אסטרטגיית הפעולה המיטבית שנמצאה היא עקירה שנתית של גפנים נגועות. במחקר אחר חושב באמצעות הדמיית מחשב כי באחוז נגיעות נמוך עד מתון (1-25%) אסטרטגיית הפעולה שיש לנקוט הינה עקירת כל הגפנים הנגועות והחלפתן. פעולה זו תפחית את נזקי המחלה ב-\$2,399-399 לדונם. כאשר אחוז הנגיעות בכרם גבוה מ-25% לא נותר אלא להחליף את כל הגפנים בכרם (Atallah et al., 2012).

למרות ההמלצות, חלק גדול מהכורמים בעולם עדיין בוחרים לא לפעול כנגד גפנים נגועות. יתכן כי המידע מהספרות אינו מספק תמונה רחבה דיה לגבי ההשלכות הכלכליות של עקירה אל מול השארת גפנים נגועות בכרם. בישראל, אין החלטה גורפת לגבי דרכי הפעולה כנגד גפנים נגועות בכרם. בנוסף, בישראל לא נהוג לבצע תהליך של החלפת גפנים בשל קשיים הנובעים מהקפדה על כשרות הכרם. נוסף על כך, במאמר הסקירה עקירת גפנים נגועות מתוארת כשיטה לא יעילה בכל התנאים (Charles et al., 2006). הסיבה לכך היא שניתן ליישם שיטה זו רק כאשר הנגיעות הראשוניות (נוכחות גפנים נגועות) היא נמוכה וכאשר הנגיעות הלטנטיות אינה מוגזמת. עקירה גם לא תהיה יעילה בזנים עם תקופת נגיעות לטנטית ארוכה בהם לא ניתן לזהות על סמך תסמינים את הגפנים הנגועות בכרם.

בכרמים הבוגרים בהם קיימת נגיעות מרובה, מניעת הגעת והפצת המחלה אינן רלוונטיות ועקירת גפנים כבר לא תהיה יעילה כלכלית. נשאלת השאלה האם הנגיעות בוורוס משפיעה באופן אחיד על הגפנים השונות בכרם ואם לא, מהי המשמעות מכך?

בניסוי שטח, הוסף דישון עלותי של חנקן וזרחן לגפנים נגועות בכדי לבדוק האם רמה גבוהה של חומרי הזנה תמתן את השפעת הזיהום הוויראלי על הפעילות הפוטוסינטטית. תוספת הדישון הקטינה את השפעת מחלת קיפול העלים על הפוטוסינטזה ומוליכות הפיוניות (Sampol et al 2003). תוצאה זו עשויה להיות שיטה יעילה להנמכת ההשפעה של GLRaV-3. עם זאת, בניסוי שנערך בגולן (דו"ח מסכם מיזם הפחתת נזקי הווירוס בכרמי יין 2013) לא נראתה הפחתה בהתבטאות התסמינים או בגובה היבול ואיכותו בעקבות דישון עלותי של חומרי הזנה.

על סמך התרשמות מהשטח, נראה שהתבטאות התסמינים אינה אחידה וכי גפנים נגועות מבטאות יותר או פחות תסמינים. המחקר המוצג בעבודה זו מגדיר את ההשפעה של התבטאות התסמינים על מדדים שונים בגפן.

## 1.2.5 תסמינים

### 1.2.5.1 תיאור התסמינים

נוכחות ווירוס קיפול העלים בגפן והשפעתו על מופע הגפן מדווח שנים רבות. דיווח ראשון על התקפלות עלים הגיע מגרמניה בשנת 1936 (Scheu 1936, 1950). בניו זילנד, בין הדיווחים הראשונים היה הדיווח של החוקר (McKissock, 1964) אשר הצביע על נוכחות תסמינים ויזואלים בכרמים. בזני גפן היין האדומים כגון 'קברנה סוביניון', התסמינים האופייניים הם האדמה-הסגלה במרווחי הטרף, בין העורקים, כאשר העורקים נשארים ירוקים משני צדיהם. הופעת תסמיני המחלה מתחילה בעלים בוגרים בחלק התחתון של השריג ונראית ככתמים על העלה. במהלך העונה (אוגוסט-אוקטובר) התסמינים מתרבים במספרם ובחומרתם ומתפשטים למעלה לעלים נוספים, צעירים יותר. מופע הצבע על העלה הופך מכתמים למופע האופייני שתואר לעיל (Tsai et al., 2012). בשלבים מתקדמים של העונה קצוות העלים הנגועים מתקפלים כלפי מטה ומבטאים את התסמין אשר העניק למחלה את שמה (Tsai et al., 2012). במצבים קשים ניתן להבחין בצבע גרגר בהיר יותר בגפנים נגועות מאשר בגפנים בריאות (Charles et al., 2006; Over de Linden and Chamberlain, 1970).

קיימת ספרות רבה המתארת את הופעת תסמיני המחלה בגפן. לעומת זאת, קיימת ספרות מצומצמת ולא חד משמעית אודות הגורמים השונים העשויים להשפיע על חוסר אחידות בתסמינים או על אי הופעת תסמינים בכלל.

### 1.2.5.2 הגורמים לחוסר אחידות בתסמינים

תסמיני מחלות קיפול העלים בגפן משתנים מאוד בהשפעת שילובים של וירוסים, זנים, כנות, מזג אוויר, קרקע ופעולות בכרם (Ben salem-Fnayou et al., 2006; Kovacs et al., 2001; Maree et al., 2013). במסגרת סקירת ספרות זו לא נמצא מידע מפורט על כל הגורמים המוזכרים לעיל. בספר של (Martelli et al., 1993) מצוין כי קיימים הבדלים בגוון, פיזור ועוצמת התסמינים על פני שטח העלה. הכותב מציין כי עדיין לא ברור מה הגורם לשוני ולמגוון התסמינים אך כנראה שתופעה זו קשורה לסוגים שונים של וירוסים שגורמים לתגובות שונות. ישנן השערות שנוכחות וירוסים שונים ממשפחת *Closteroviridae* קשורה לשינוי בביטוי בתסמינים. השערה זו מקבלת חיזוק במחקרים רבים ובניהם מאמר שבו נטען כי יתכן שנוכחות של מספר וירוסים תגביר את התסמינים ואת התפתחות המחלה (Monis and Bestwick, 1997). בעבודות רבות נפוצה תערובת של הקלוסטרורוסים GLRaV1 ו GLRaV3. העובדה שרוב מחלות הגפנים הם תוצאה של יותר מווירוס אחד מקשה על הגדרת הבעיה ומחוללה ובנוסף תסמינים זהים עלולים להיגרם מווירוסים שונים (Maree et al., 2013). גורם נוסף המשפיע על

הופעת התסמינים הוא גפנים עם עקת יובש. במאמר סקירה מצויין שבגפנים אלה תסמיני המחלה יופיעו מוקדם יותר (Maree et al., 2013) לעומת זאת, ממצאים מניסוי מו"פ צפון מראים תסמינים חזקים יותר בגפנים שקיבלו עודף השקיה (רושנסקי, עבודת גמר, 2013) בעוד שהגפנים עם עקת היובש לא ביטאו תסמינים או שביטאו בדרגת חומרה פחותה. משני מאמרים שנמצאו בסקר ספרות זה, עולה כי לטמפרטורה עשויה להיות השפעה על התבטאות תסמינים. במחקר שנערך באוסטרליה הדביקו גפנים בוורוס ובדקו אותן במהלך שלוש שנים. כעבור שנתיים כל הגפנים נדבקו וביטאו את תסמיני המחלה. בשנה השלישית חלק מהגפנים לא ביטאו תסמינים. הכותבת מצינת שהתבטאות התסמינים משתנה מעונה לעונה ושהתרשמות ויזואלית עלולה להיות בעייתית בזהוי נוכחות הווירוס. הסיבות להשתנות התסמינים לא ידועות, אך במאמר משערים שטמפרטורה חמה באופן קיצוני (40°C) במהלך כמה ימים בפברואר (חצי כדור דרומי) השפיעה על טיטר הווירוס או על תגובת הצמח לווירוס (Constable et al., 2012). במאמר השני מצאו שבטמפרטורות גבוהות (אזור הסהרה) חלה ירידה במספר הגפנים אשר נמצא בהן וירוס באליזה ו PCR (Ben salem-Fnayou et al., 2006). מוצגות שתי אפשרויות לכך והן שטמפרטורה גבוהה משפיעה על זיהוי הווירוס או שגורמת לריפוי. השערת החוקר בהקשר של ריפוי היא שהקיץ החם יעיל בעיכוב הכפלת הווירוס. גורם נוסף העשוי להשפיע על המופע של המחלה על העלים הוא שינוי פיזיולוגי כמו מחסור באשלגן אשר יכול להראות כמו תסמיני המחלה (Ling et al., 2001). כל הגורמים האלה מצביעים על כך שזיהוי מדויק של מחלת קיפול העלים על סמך הופעת התסמינים בלבד הוא בעייתי (Ling et al., 2001).

זנים שונים של גפן הנגועים ב GLRaV3 יכולים ליצור טווח תסמינים מקלים לחמורים (Charles et al., 2006). (Martelli 1986) שמצוטט על ידי (Akbaş et al., 2009) טוען שרק זנים הרגישים לווירוס יראו תסמינים בתחילת העונה. מאמר מתורכייה עוסק בהבדלים בהתבטאות תסמינים בין זנים שונים. בניסוי הרכיבו פקעים מגפן נגועה על גפנים נקיות ממספר זנים והראו שדרגות תסמינים מושפעות מזן הענבים. זהו המאמר היחיד שנמצא בסקר ספרות זה בו קיימת חלוקה ברורה לדרגות התבטאות שונות, החל מגפן ללא תסמינים ועד גפן עם תסמינים קשים (Akbaş et al., 2009). הכותב מציין קשר בין הופעת תסמינים חלשה לכמות וירוס נמוכה (פירוט בסעיף 1.2.10 "תסמינים והקשר לטיטר הווירוס") מעניין היה אילו נבדק במסגרת מחקר זה גם הקשר בין דרגות התבטאות התסמינים לאיכות הפרי וליבול. המאמר היחיד שנמצא בסקר ספרות זה אשר מצביע על הקשר בין חומרת התבטאות תסמינים לחומרת ההשפעה על הגפנים הוא מאמר אשר עוסק בהשפעתם של שני תבדידים מתונים של מחלת קיפול העלים על מדדי איכות. (Wolpert and Vilas, 1992) (פירוט בסעיף 1.2.6.2.1.1 "צבירת סוכר בגפנים נגועות ללא תסמינים").

### 1.2.5.3 גפנים נגועות ללא תסמינים

עוד לא הוכחה עמידות שזוהתה בכנה, בזן או בקלון (Charles et al., 2006). במחקר של (Teliz et al., 1987) מוצגת לראשונה האפשרות של גפנים הנגועות בוירוס קיפול העלים (GLR) בהן חלק מהעלים אינם מבטאים את תסמיני המחלה בעוד שחלק מהעלים באותה גפן מבטאים את התסמינים. במאמר משנת 1993 מצינת הכותבת את המונח לטנטיות (Golino, 1993). שני מחקרים עדכניים יותר עוסקים בגפנים היברידיים (הכלאות של *Vinifera* עם גפנים אמריקאיות) לטנטיות. המאמר הראשון משווה בין שיטות זיהוי מולקולריות בגפנים היברידיים עם תסמינים וללא תסמינים (Ling et al., 2001). במאמר השני נטען שהלטנטיות של גפנים אמריקאיות והיברידיים היא סבילות ל GLRaV3 ולא וירולנטיות נמוכה (אותו הווירוס גרם לתסמינים ברורים בקברנה פרנק) (Kovacs et al., 2001). מחקרים מדווחים על גפנים מזנים לבנים או כנות, נגועות במחלות קיפול עלים ללא תסמיני המחלה

(Golino, 1993; Maree et al., 2013). במחקר שעסק בעיכוב פעילות פוטוסינטטית הנגרמת על ידי וירוס, צוין כי תופעת גפנים ללא תסמינים יכולה להיגרם על ידי אינטראקציה עם גיל הגפן (Sampol et al., 2003).

גפנים המבטאות מעט או אפס תסמינים כשהן למעשה נגועות, מתוארות כגפנים שגורמות לבעיה בניסיון להתמודד עם המחלה. הבעיה נגרמת מהקושי לזהותם בכרם על בסיס תסמינים ואין בחינה יעילה כלכלית לצורך סריקת נוכחות הווירוס. גפנים ללא תסמינים אלה, מהוות מאגר להדבקה שיכול להיות מופץ לגפנים אחרות בכרם ובכרמים שכנים (Ben salem-Fnayou et al., 2006; Charles et al., 2006). לכן, הטענה במאמרים אלו היא שנוכחות גפנים בעלות סבילות תהווה בעיה ולא פתרון. יתכן וניתן למצוא זן עמיד למחלה, אולם הצלחה עם גידול אחד לא בהכרח תהיה טובה בתנאים של כרם אחר. זן עמיד למחלה זו לא יפתור את הבעיה לטווח הרחוק כיוון שהזנים לייצור יין בעולם נבחרו לאורך שנים רבות וקשה יהיה לטפח זן עמיד חדש שיוכל לעמוד בדרישות השוק. בנוסף, יש צורך להרכיב את הזן העמיד על כנה עמידה. (Charles et al., 2006).

## **1.2.6 נזקי מחלת קיפול העלים בכרם יין**

### **1.2.6.1 השפעת GLRaV3 על גדילת הגפן**

#### **1.2.6.1.1 פוטוסינטזה**

ממצאים מעבודות שונות מראים כי הירידה בפוטוסינטזה בהשפעת GLRaV3 נובעת הן מירידה במוליכות הפיוניות, הן מפגיעה במערכת הובלת האלקטרונים בכלורופיל והן מירידה בתכולת הכלורופילים והקרטנואידים בעלים (Moutinho-Pereira et al 2012; Sampol et al., 2003). במהלך השנים האחרונות נחקרה על ידי מספר חוקרים השפעת GLRaV3 על הפעילות הפוטוסינטטית והפיגמנטים. בניסוי מעבדה, גפנים מזן "קברנה סובינון" ו "מלוסיה" הנגועים ב GLRaV-3 הראו תכולת כלורופיל וקרטנואידים נמוכה יותר מגפנים בריאות, בעוד שבגפנים מזן "אלברינו" לא נמצאו הבדלים במדדים אלו (González et al., 1997) לעומת זאת, בניסויי שטח נמצא שיעור פוטוסינטזה נמוך בגפנים נגועות לעומת בריאות בזן "אלברינו" (Cabaleiro et al., 1999).

#### **1.2.6.1.1.1 השפעת GLRaV3 על פוטוסינטזה בגפנים נגועות ללא תסמינים**

Gutha וחבריו (2012) בחנו במחקרם את השפעת GLRaV-3 על פלורנסציה של כלורופיל ופוטוסינטזה בזן מרלו בשני מועדים, טרם הבוחל (במקרה זה גם לפני הופעת תסמינים) ולאחריו, כשקיימים תסמינים. הממצאים של המחקר הראו כי טרם הבוחל אין הבדלים במדדים אלו בין גפנים נגועות לבריאות. לעומת זאת, בבדיקת רמת הכלורופיל, לאחר הבוחל נמצאה הפחתה בשיעור שבין 11-25% בגפנים נגועות. ממצא זה קיבל חיזוק במחקרים בהם בוצע ניסוי על גפנים בנות חמש ללא תסמינים וגפנים בנות עשר עם תסמינים שנערכו על הזנים "אלברינו" ו "מלוסיה". הפוטוסינטזה בגפנים נגועות המבטאות תסמינים ירד ב 48%-59% בהשוואה לגפנים נגועות ללא תסמינים (Cabaleiro et al., 1999; Sampol et al., 2003). עבודות אלה מציעות שלהופעת התסמינים השפעה שלילית על הפעילות הפוטוסינטטית. לעומת זאת, תוצאה משמעותית יותר התקבלה במחקרים אחרים אשר בוצעו על גפן מזן נביולו קלון 415 בהם הפעילות הפוטוסינטטית בגפנים נגועות ללא תסמינים יורדת וכך הגפנים האלה עשויות לצמוח במידה פחותה עוד לפני שהכורם בכלל ראה תסמינים על העלים (Guidoni et al., 1997a; Mannini et al., 1995; Mannini et al., 1997b). לסיכום, בחלק מהמחקרים הפגיעה בפוטוסינטזה קשורה להופעת התסמינים ובחלקם מוצג מצב בו פגיעה בפוטוסינטזה ובצמיחת הגפן יכולה להתרחש כאשר הגפן נגועה אך תסמינים ויזואליים אינם נראים.

#### 1.2.6.1.2 יבול הגפן

מתוך 22 עבודות שנסקרו במאמר הסקירה בהקשר של השפעת וירוס GLRaV3 על היבול, 59% מדווחות על ירידה מובהקת סטטיסטית ביבול. עם זאת, טווח הירידה ביבול משתנה בין המחקרים. לעומת זאת, בשאר המחקרים נטען כי אין הבדל מובהק ביבול בין גפן נגועה לנקייה. ההסבר לכך, לטענתם, יכול להיות למשל גיל הגפן (Charles et al., 2006). בגפנים צעירות, לא קיים הבדל ביבול בין גפן נגועה לנקייה, דבר היכול לנבוע ממספר סיבות: 1. גפן צעירה ממילא מקנה משאבים להתפתחות השורשים והשריגים יותר מאשר לגרגרים. 2. ירידה בסך הפוטוסינטזה בעלים עם תסמינים ישפיע על יבול הגפן רק לטווח הרחוק (Cabaleiro et al., 1999). משקל גרגר- בגפנים היברידיים עם נגיעות לטנטיות משקל הגרגר נמצא נמוך יותר מאשר בגפנים נקיות (Kovacs et al., 2001).

#### 1.2.6.1.3 השפעה פנולוגית- בוחל

ככלל, גפנים נגועות בוורוס קיפול עלים מאחרות בהבשלת הגרגרים. בגפנים הנגועות ב-GLRaV-3 מוזן נבולו הבוחל עוכב בשבוע אחד (Guidoni et al., 1997a). במאמר הסקירה נטען כי הבשלת הגרגרים בגפנים הנגועות יכולה להיות מעוכבת אפילו בחודש (Charles et al., 2006).

#### 1.2.6.2 השפעת GLRaV3 על מדדי איכות בגפן

לוורוס GLRaV3 היכולת להרוס איכות ביינות פרימיום על ידי פגיעה במדדים כמו צבירת סוכר, אנטוציאן בגרגר, pH וחומציות ההכרחיים לייצור יין איכותי (Charles et al., 2006). עיכוב בהבשלה יגרור נזק כלכלי משמעותי ויהווה בעיה במיוחד במדינות קרות. רמת צבירת הסוכר קובעת את פוטנציאל האלכוהול והמתיקות ואילו החומצה אחראית לאיזון הטעם של היין. יחס נכון בין רמת הסוכר לחומצה הינו גורם בעל חשיבות ראשונה במעלה ביצור יינות איכותיים בעלי טעמים מאוזנים. קיים מחסור במידע על השפעת הוורוס על איכות התוצר הסופי, היין (Charles et al., 2006).

#### 1.2.6.2.1 צבירת סוכר (בריקס)

ב 78% מתוך 27 עבודות שנסקרו במאמר סקירה, נמצאה השפעה של וירוס קיפול העלים על הסוכר בגפנים. צבירת הסוכר בפרי של גפנים נגועות נמוכה יותר בהשוואה לגפנים בריאות כאשר ההבדל נע בין  $0.3-5.1^{\circ}$  בריקס. כשהירידה ברמת הסוכר בגפנים נגועות אינה מובהקת, הגורם לכך עשוי להיות הירידה ביבול בגפנים אלה (Charles et al., 2006). חוקרים אחרים מדווחים על ירידה בצבירת הסוכר בגפנים נגועות לעומת גפנים נקיות, אולם, מציינים כי אופן הפגיעה נותר לא ברור (Schoeffling, 1980; Ueno et al., 1985). מחקרים רבים מצביעים על כך שנוכחות הוורוס גורמת לירידה ביכולת הגפן לצבור סוכר ולכן חל עיכוב בהבשלת הפרי ובהתפתחות הצבע.

#### 1.2.6.2.1.1 צבירת סוכר בגפנים נגועות ללא תסמינים

ירידה במוצקים מסיסים זהו מדד לרמת הסוכר. נמצא קשר בין נגיעות ב-GLRaV3 לירידה במוצקים מסיסים בגפנים היברידיים נגועות ללא תסמינים לעומת גפנים נקיות (Kovacs et al., 2001). מידע זה נתמך על ידי המאמר אשר עוסק בהשפעת שני תבדידים מתונים של מחלת קיפול העלים על מדדי איכות. מוצגת ירידה של 1-1.6 יחידות בריקס בגפנים נגועות לטנטיות (ללא תסמינים) מוזן ריזלינג בהשוואה לגפנים נקיות. הירידה הזו בסוכר לא נחשבת



כעיכוב בהבשלה במאמר, כיוון ששאר מדדי ההבשלה לא נפגעו. בגפנים עם תבדיד אלים יותר של המחלה צבירת הסוכר ירדה ב 2-4 יחידות בריקס בגפנים הלטנטיות מאשר בגפנים הנקיות (Wolpert and Vilas, 1992).

#### **1.2.6.2.2 חומציות**

ב 65% מתוך 26 עבודות שנסקרו במאמר סקירה, קיימת עלייה מובהקת בחומציות בגפנים הנגועות. בשאר המחקרים לא היה הבדל ברור בחומצה הכללית (TA) בין גפנים נגועות לנקיות למרות שבחלקם ה TA היה שוב גבוה באופן יחסי בנוכחות הווירוס אך ללא הבדל מובהק. חצי מהעבודות שנסקרו הראו ירידה, לרוב מובהקת, ב pH בגפנים נגועות לעומת גפנים נקיות. בשאר העבודות לא ניכר הבדל (Charles et al., 2006).

#### **1.2.6.2.3 אנטוציאנים**

בשבעה מאמרים שנסקרו במאמר סקירה, אנטוציאן בגרגר ירד משמעותית בגפנים נגועות במחלת קיפול העלים לעומת גפנים נקיות (Charles et al., 2006). במחקר שנערך באוסטרליה הושוו גפנים נגועות בשילובי וריאנטים של קיפול העלים לגפנים נקיות ממספר זנים. הכותב לא מציין ערכי אנטוציאנים בגפנים נגועות ונקיות אלא מסתמך על הערכות ויזואליות ומסכם, שבכל הווריאנטים הצבע ירד משמעותית בגרגרים של גפנים נגועות לעומת נקיות (Krake, 1993). בכל המחקרים שנסקרו נמצא, שרמת צבירת האנטוציאן הייתה מהירה בגפנים הנקיות מאשר בנגועות. שיעור ההבדל בין הגפנים הנקיות לנגועות ניכר כבר משלב הבוחל (Charles et al., 2006). יתרה מכך, במחקר שנערך באיטליה רמת האנטוציאנים בגרגרים מגפנים נגועות לא הגיעה לרמה בגפנים בריאות. זאת על אף שהדגימות מהגפנים הנגועות נלקחו כשבוע לאחר הדגימות מהגפנים הבריאות (Guidoni et al., 1997a).

#### **1.2.6.2.4 הקשר בין צבירת סוכר לאנטוציאן**

בזמן הבשלת הגרגר קיים קשר בין צבירת הסוכר לצבירת אנטוציאנים בפרי (Mullins et al., 1992). לאחרונה פורסמו שני מאמרים בהם נעשתה השוואה בין טרנסקריפטום של גפנים נגועות בוירוס קיפול העלים והמבטאות תסמינים לבין גפנים נקיות. השוואות נעשו הן ברמת הגרגרים והן ברמת העלים. בהשוואת טרנסקריפטום בגרגרים נמצא, כי חלה ירידה בביטוי גנים המעורבים הן במעבר סוכרים לתא והן בביוסנטזה של אנטוציאנים בגפנים הנגועות (Vega et al., 2011). הצטברות סוכר בגרגרים מגבירה שיעתוק גנים המעורבים בביוסנטזה של אנטוציאנים (Castellarin et al., 2011). עיכוב בביטוי גנים אלו, מקורו בירידה בהצטברות הסוכר המסיס בגרגרים בגפנים הנגועות כנראה כתוצאה מפחיתה בפוטוסינטזה כפי שצוין לעיל. הסבר אפשרי נוסף לירידת האנטוציאן בגרגר קשור לשינויים שנגרמים על ידי הווירוס לפעילות אנזימתית (Guidoni et al. 1997).

#### **1.2.6.2.5 איכות היין**

מעט מחקרים עוסקים בהשפעת וירוס קיפול העלים על התוצר הסופי- היין. בהסתמך על אנליזות ספקרוסקופיות (Over de Linden and Chamberlain, 1970) והערכות חושיות (Schoeffling, 1980; Ueno et al., 1985) כל המחקרים הראו שאיכות היין הנוצר מגפנים הנגועות בקיפול העלים יורדת בהשוואה לגפנים הנקיות. בניהם מחקר בו הכותב טוען כי יין הנוצר מגפנים נקיות מזן נבילול מורכב מניחוחות וטעמים כמו גם עצמת צבע טובה יותר בהשוואה ליין מגפנים הנגועות ב GLRaV3 (Mannini et al., 1997a). במאמר אחר מתמקד החוקר בתרכובות הפלבנואידים כמדד לאיכות היין. תרכובות הפלבנואידים נמצאות בקליפת הענב וחשובות מאוד לאיכות היין על ידי תרומתם לעפיצות ולצבע. קבוצות הפלבנואידים הגדולות שמצויות בזנים האדומים הן- פלבנול, פראאנטוציאנידין

ואנטוציאנינים. בגפנים הנקיות יצירת הפלבנואידים גבוהה באופן מובהק מיצירתם בגפנים נגועות עם תסמינים (Gutha et al., 2010).

לסיכום פרק האיכות, ניתן לומר כי וירוס ה-GLRaV-3 גורם לגרגרים לא להבשיל באשכול וכך נגרמת ירידה בסוכר ובאנטוציאנים שמובילה לפרי אשר אינו מגיע לסטנדרטים של יין איכותי (Lee et al., 2009). הסיבה לתסמינים הנראים על העלים נותרת לא לגמרי ברורה.

### 1.2.7 אפשרויות לאופן פגיעת הווירוס

ווירוס קיפול העלים נחשב ל"שוכן שיפה" (Guidoni et al., 1997b). בעבודות מוקדמות נמצא כי לאחר הדבקה בוורוס GLRaV-3, חלה דגרדציה של תאי הפלואם בעלים, נצר, ובעוקצים של פירות ונראה כי פגיעה זו בתאי הפלואם מובילה לעצירה של מעבר סוכרוז מהעלים ולהצטברות עמילן במזופיל (Hoefert & Gifford 1967). במקביל לעליה בתכולת העמילן בעלים חלה ירידה בכמות הסוכרים המסיסים בעלה בהשוואה לגפנים בריאות (Moutinho-Pereira et al., 2012). אנליזה של פחמימנים בעלים בעלי תסמינים מאמתת כי ישנה הצטברות של עמילן בתאי המזופיל וירידה בתכולת הסוכרים המסיסים (נוה, 1987). יתכן והשינוי ביחס עמילן \ סוכרוז נובע מהסתה של סינטזת סוכרים מסיסים לסינטזת עמילן ולא בהכרח מחסימה במעבר סוכרים מסיסים בשיפה. אפשרות מוצעת היא שהצטברות העמילנים יכולה להוות מנגנון פידבק הגורם להפסקת הפעילות הפוטוסינטטית בעלים נגועים (Hoefert & Gifford 1967). הצטברות העמילן בתאי המזופיל אשר גורמת לירידה ביעילות הפוטוסינטטית של העלה מתבטאת הן בירידה ביעילות מערכת העברת האלקטרונים והן בירידה בכמות הכלורופיל (Paul and Foyer, 2001). בהקשר לשאלת הופעת התסמינים בעלים, במאמר של החוקר von der brelie (1982) נטען כי בתאי פרנכימה של גפנים נגועות מלבד הצטברות עמילן קיימת הצטברות של טנינים אשר יוצרים צבע אדום. אפשרות נוספת למנגנון יצירת התסמינים בעלים נמצא במחקר אשר בוחן וויסות בסינטזת פלבנואידים ואנטוציאנינים. במחקר זה נמצא שבעלי גפנים מזנים אדומים אשר נגועות ב-GLRaV3 ובעלות תסמינים, קיים וויסות ביצירת פלבנואידים הכולל שינוי במסלול לכיוון יצירת תוצרי קצה, דבר המוביל לצבע אדום/סגול על העלים (Gutha et al., 2010). עובדות אלו מצביעות על כיוונים אפשריים נוספים להופעת התסמינים על העלים מלבד הקשר בין סוכר לאנטוציאן שצויין לעיל.

הגורם הפתוגני בוורוסים ממשפחת ה-*Closteroviridae* אינו ברור ובעבר דווח כי בנוסף להצטברות גופיפי וירוס במערכת השיפה קיים גיוס מסיבי של הרשת האנדופלסמטית ליצירת בועיות שכפול הגורמות לפגיעה בתפקוד התאים (Dolja et al., 2006). תופעה זו דווחה כגורמת לתסמינים כגון הצהבה וקיפול עלים. בנוסף, באותה עבודה מצויין כי במהלך האבולוציה רכשו הווירוסים ממשפחת ה-*Closteroviridae* יכולת לעכב את מערכת ה-microRNA ובכך למנוע פגיעת הווירוס על ידי הגנה זו של הצמח. יחד עם זאת, ההשתקה אינה ספציפית ולכן פוגעת בתהליכים התפתחותיים רבים בתא.

### 1.2.8 זיהוי הווירוס

#### רקמה צמחית מועדפת לזיהוי הווירוס

במחקר שנערך בחממות ובצמחי תרבות נמצא שטיטר הווירוס GLRaV3 גבוה יותר בפטטרות ובעורק הראשי של העלה מאשר בטרפים (Monis and Bestwick, 1996). GLRaV3 הוא וירוס שוכן שיפה ולפיכך הזמורות והשריגים הם הרקמה העדיפה לזיהוי. זיהוי בעלים אפשרי אך פחות אמין (Teliz et al., 1987). הזיהוי של הווירוס הגורם למחלת קיפול העלים נחשב למאתגר כיוון שלרוב, קיימת נוכחות של יותר מווירוס אחד ובנוסף, הטיטר בגפנים עם הדבקה חדשה נמוך (Maree et al., 2013). אלייזה ו-RT-PCR הן טכניקות ספציפיות ואמינות, אבל, הספציפיות שלהן עלולה לגרום לכך שווירוסים וטיפוסים אחרים המעורבים באטיולוגיה מלבד GLRaV-3 לא יזוהו (Maree et al., 2013). בשנים האחרונות, קיימת בעולם מגמה לעבור לזיהוי בשיטת qRT-PCR אשר זוהי שיטה מדויקת, אמינה ורגישה יותר מאשר אלייזה (Cost Geilweilerhof Germany (2013) action FA1003:).

### 1.2.9 תנועה וטיטר הווירוס בגפן

מערכת יחסי הגומלין בין הגפן לוורירוס משתנה כתלות בגורמים רבים כגון: מין וזן הצמח, התבדיל הספציפי של הווירוס והווירולטיות שלו (Tsai et al., 2012). תנועת הווירוס מושפעת מהכיוון של תנועת הפחממות בשיפה (Hull, 2001). בגפן, סוכר נע מהעלה לפרי המתפתח, לזמורה ומשם לשורשים. לכן, זיהום חדש יכול להתפשט מיד לאחר הדבקה (Charles et al., 2006) אולם יהיה לו טיטר נמוך (Maree et al., 2013). עם תחילת הצימוח באביב, GLRaV-3 נע מהשורשים והגזע אל הענפים והעלים (Monis and Bestwick, 1996; Teliz et al., 1987). ניתן לזהות את הווירוס לראשונה בעלים הבסיסים, המבוגרים יותר ובהמשך העונה, לאחר הפריחה הוא נע אל שאר העלים, שם הוא מצוי ברמה נמוכה (Teliz et al., 1987). כשהעלים והפרי גדלים, הטיטר יורד בשאר הרקמות ועולה בעלים (Charles et al., 2006). בעבודה שפורסמה לאחרונה על ידי Wright וחבוריה (2012) נעשה שימוש ב-qRT-PCR ונמצא כי בגפנים נגועות בוורירוס חלה עליה בטיטר הווירוס בעלים לאורך העונה כאשר עליה זו נראתה בעיקר בעלים צעירים אך מגמה דומה נראתה גם בעלים בוגרים על השריג. אם טיטר הווירוס נמצא בקולרציה עם היכולת לאבחן אותו, המשמעות היא שיש יותר חלקיקי וורירוס בסוף עונת הגידול מאשר בתחילתה (Wright, 2012). לעומת זאת, מחקר עדכני שנערך על ידי Tsai וחבוריו (2012), עסק בכימות תנועת הווירוס לאורך השנה שוב, באמצעות qRT-PCR. נראתה עלייה בריכוז הווירוס ברקמות הצמח מחודש מאי ועד ליוני-יולי ומשם חלה ירידה באוכלוסיית הווירוס עד סוף העונה (ספטמבר). עבודה נוספת בה עשו שימוש ב-qRT-PCR מתארת ירידה בטיטר לקראת סוף העונה (Fiore et al., 2009).

### 1.2.10 תסמינים והקשר לטיטר הווירוס

ניתן לזהות בבדיקה מעבדתית את הווירוס חודשיים לפני הופעת תסמינים (Teliz et al., 1987). לא ברור האם עצמת התסמינים נמצאת ביחס ישר למספר עותקי הווירוס בגפן. בסקר ספרות זה נמצאו מעט מחקרים על טיטר הווירוס בגפנים נגועות שאינן מראות תסמינים כלל. טיטר גבוה נמצא בעלים תחתונים עם תסמינים מאשר בעלים צעירים ללא תסמינים (Monis and Bestwick, 1997). בשימוש באלייזה התגלה וורירוס בגפנים נגועות עם וללא תסמינים בהשוואה לגפנים נקיות (Teliz et al. 1986). בעבודה של (Ling et al., 2001) נבדק טיטר הווירוס

בשתי שיטות- אלייזה ו Nested-PCR בגפנים נגועות עם תסמינים (Vinifera) ובגפנים ללא תסמינים (היברידיים). נמצא שזיהוי הווירוס תלוי בשיטת הבדיקה וברקמת הבדיקה. עם זאת, בבדיקת זיהוי הווירוס בעלים, נמצא שהזיהוי טוב יותר בגפנים עם תסמינים על העלים (במקרה זה לאחר הבוחל) לעומת גפנים ללא תסמינים. החוקר (Akbaş et al., 2009) הוא היחיד שמציין במחקרו קשר בין סקאלה של דרגות התבטאות לטיטר. בהשוואה של תסמינים לטיטר בזנים תורכיים שגודלו בעציצים ואולחו במכוון נמצא קשר בין מופע תסמיני חלש של הווירוס לטיטר נמוך. עם זאת, (Gugerli 2003) שמצוטט על ידיו טוען שלא ניתן לפרש את התסמינים כקביעה למצב הסניטרי של הגפן. בסקר ספרות הזה לא נמצאו עדויות העוסקות בשאלה האם העדר תסמינים בגפנים נגועות נובע מעיכוב בשכפול הווירוס (עמידות) או בהתמודדות של הגפן עם מחלת קיפול העלים (סבילות). התמודדות הגפן עשויה להיות קשורה במצב הפיזיולוגי ועשויה לכן להתבטא במופע תסמינים שונה בין הגפנים בכרם.

### 1.2.11 פערי הידע

לא נמצאה ספרות נוספת ל (Akbaş et al., 2009) העוסקת בדירוג חומרת תסמינים. נמצא מאמר בודד שמציין כי קיימות השלכות של דרגות חומרת התסמינים על יבול ואיכות הפרי אולם לא מפרט מהן ההשלכות (Wolpert and Vilas, 1992). למעט המחקר של Akbaş וחבוריו (2009), חסר מידע אודות הקשר בין דרגות התבטאות לטיטר הווירוס. חסר מידע גם בנושא השפעת מועד הופעת התסמינים על דרגת חומרתם.

במחקר המוצג בעבודה זו גפנים נגועות ללא תסמינים מהוות דרך התמודדות עם המחלה, בדרך לפתרון, יותר מאשר בעיה כפי שהוצג במחקרים שונים. אילו בגפן נגועה ללא תסמינים, מדדי האיכות והיבול יהיו כמו בגפן נקייה מהמחלה, תהיה חשיבות לבחינה עתידית של שיטות מסוימות, למשל אגרוטכניות, במטרה לגרום לגפן לבטא תסמינים ברמה נמוכה או לא לבטא תסמינים בכלל וכך הגפנים תהיינה בעלות ביצועי הבשלה מספיקים לייצור יין איכותי.

### הנחות

הנחות העבודה הן- 1. בכרמים הבוגרים באזור הגליל והגולן הנגיעות ב GLRaV3 היא בין 50-100%. 2. גפנים ללא התבטאות ויזואלית של תסמיני GLRaV3 עשויות להיות נגועות במחלה. 3. התבטאות הווירוס שונה בין כרם לכרם, באזורים השונים בהם ממוקמים כרמי המחקר ויותר מכך, בתוך כל כרם.

### מטרות

1. בחינת דינמיקה עונתית ורב שנתית של התבטאות תסמינים בכרמים.
2. בחינת ההשפעה של חומרת התסמינים על מדדי איכות ויבול בגפן.
3. מעקב אחר ביצועי גפנים (מדדי איכות, יבול, מדדים פיזיולוגיים) בגפנים נגועות ללא תסמינים כנגד גפנים נגועות עם תסמינים וגפנים נקיות.
4. בחינת הקשר בין ביטוי תסמיני המחלה לטיטר הווירוס.

## 2. חומרים ושיטות

המחקר התבסס על שני מערכי ניסוי:

### 2.1 ניסוי א' - הדינמיקה העונתית והרב שנתית של התבטאות תסמיני הווירוס בכרמים.

מטרות הניסוי היו: א) לבחון את הקשר בין מועד הופעת התסמינים לדרגת חומרתם ערב הבציר והשפעת דרגות חומרה שונות על איכות הפרי. ב) לבדוק את ההדירות בין השנים של חומרת התסמינים בכל גפן.

#### 2.1.1 אתרי הניסוי

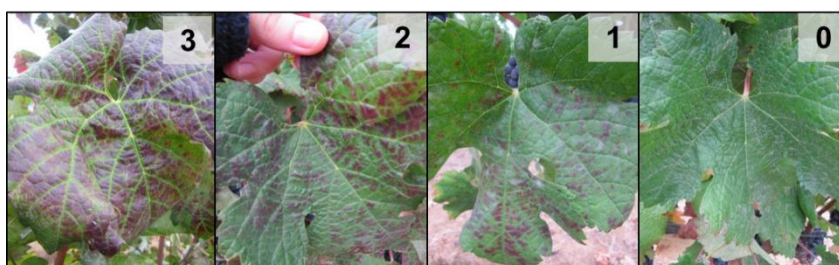
הניסוי נערך במשך שלוש שנים (2011-2013) בשלוש חלקות, שתי חלקות מזן 'קברנה סוביניון', בגשור (רמה"ג) ובדלתון (גליל) ובחלקה מזן 'מרלו' ביפתח (רכס רמים, גליל). החלקות ניטעו בשנת 2002, 2000 ו 1996 בהתאמה, נטועות בקרקעות מסוג חרסית כבדה וממוקמות בגובה 350, 700 ו 420 מ' בהתאמה.

#### 2.1.2 מבנה הניסוי

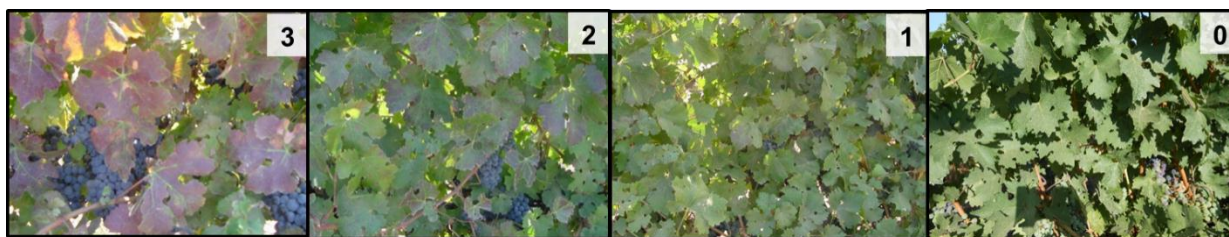
**2.1.2.1 מעקב הופעת תסמינים** - במהלך שלוש שנות מחקר בוצע מיפוי נגיעות על פי תסמינים מראשית הופעת התסמינים (יוני) ועד הבציר. אחת לשבועיים נערכה סריקה של הגפנים בחלקה וכל גפן שהחלה לבטא תסמינים (איור 1 גפן 1) סומנה ושויכה לקבוצת התאריך של אותו יום בדיקה.

**2.1.2.2 דירוג חומרת תסמינים** - דירוג חומרת התסמינים נערך ערב הבציר. כל גפן בכל אחת מהחלקות שצוינו לעיל נבחנה ויזואלית וקיבלה ציון אשר מבטא את דרגת התבטאות התסמינים. הדרגות נעות בין אפס לשלוש (איור 2). 0 - ללא תסמינים, 1 - תסמינים קלים - מעט נקודות סגולות על מעט עלים. 2 - תסמינים ברורים - כתמים ברורים על העלים ו/או מספר רב יותר של עלים המבטאים תסמינים. 3 - תסמינים קשים - רוב העלים בגפן מבטאים תסמינים, כיסוי נרחב על העלה - 50% ומעלה מהעלה סגול לעיתים עם התקפלות של העלים.

**2.1.2.3 מדדים נבדקים לגפנים בדרגות ההתבטאות השונות** - לאחר המיפוי והדרוג נבחרו בכל כרם חמש גפנים (חזרות) משלוש דרגות נגיעות (אפס - נקי, 1 - תסמינים קלים (איחוד דרגות אחת ושתיים לעיל) 2 - תסמינים קשים). הגפנים בכל חזרה נבחרו במקבצים מרחביים - קרובות זו לזו ככל האפשר כדי להקטין ככל האפשר שונות הנובעת ממיקום הגפן. יש לציין שבחלק מהכרמים או השנים לא נמצאו חמש גפנים מכל דרגה. נבדקו איכות הפרי, היבול וטיטר הווירוס בבציר. (פירוט הבדיקות ושיטות הדיגום בניסוי ב').



איור 1 - עלי גפנים מזן מרלו בכרם יפתח מדרגות חומרת התבטאות תסמינים שונות. 0 - ללא תסמינים 1 - תחילת הופעת תסמינים, ניקוד סגול על הטרף 2 - תסמינים ברורים, כתמים וניקוד סגול על הטרף 3 - תסמינים קשים, כתמים על הטרף, התקפלות העלה.



איור 2- גפנים מזן קברנה סוביניון מדרגות חומרת תסמינים שונות בכרם דלתון ערב הבציר.



איור 3- גפנים מזן מרלו מדרגות חומרת תסמינים שונות בכרם יפתח ערב הבציר.

### 2.1.3 ניתוח התוצאות

#### 2.1.3.1 שיעור הגפנים בכל דרגת תסמינים

- I. חושב שיעור הגפנים בכל דרגת חומרה ובעזרת מבחן פרידמן השוותה חומרת הנגיעות הממוצעת לחלקה בכל שנה.
- II. עבור כל גפן נבדקה הדירות חומרת התסמינים בין השנים.

#### 2.1.3.2 בחינת הקשר בין מועד הופעת התסמינים לחומרת הנגיעות בבציר

כדי לנרמל את השנים/כרמים הומר תאריך הבדיקה ל"ימים לפני בציר". הגפנים בכל כרם ושנה קובצו על סמך התאריך בו נראתה בהם נגיעות לראשונה וחושבה החומרה הממוצעת של הקבוצה ביום הבציר. הקשר בין מועד הופעת התסמינים לחומרה בבציר חושב על פי קורלצית ספירמן (Péros et al., 2008). קורלציית ספירמן חזקה היא (0.65).

#### 2.1.4 בחינת הקשר בין חומרת התסמינים לכמות ואיכות היבול המתקבל.

השוואת ממוצעים של מדדי איכות התירוש ומרכיבי היבול נעשתה בפרוצדורת GLM במבחן Tukey (Institute and Publishing, 2009) (JMP8).

ההבדלים נחשבו למובהקים כש  $p < 0.05$  במספר מקרים גבוליים צוין ערך  $p$  שהתקבל.

## **2.2 ניסוי ב' - בחינת ההשפעה של התבטאות תסמיני הווירוס על מדדי איכות, יבול, מדדים פיזיולוגיים וטיטר הווירוס.**

### **2.2.1 אתרי הניסוי**

הניסוי נערך במשך 3 שנים (2011-2013) בשתי חלקות מסחריות מזן 'קברנה סוביניון' ברמת הגולן, בקבוץ מרום גולן (צפון הגולן - 900 מטר מעל פני הים) ובקבוץ גשור (דרום הגולן - 350 מ' מעל פני הים). החלקות ניטעו ב-2007 ו-2002 בהתאמה (בנות חמש ועשר שנים בתחילת הניסוי) ונטועות בקרקע טופית במרום גולן וקרקע חרסיתית כבדה בגשור.

### **2.2.2 איתור ומיפוי גפנים נגועות**

בסתיו של שלוש השנים 2011, 2012 ו-2013 נבחרו גפנים אשר ביטאו תסמיני ווירוס וגפנים ללא תסמינים. מכל גפן נלקחו זמורות מהן הופק RNA ונבדקה המצאות וירוס GLRaV-3 ב-PCR.

### **2.2.3 מבנה הניסוי**

שנת העבודה הראשונה שימשה ללימוד שיטות עבודה ולהכנת יין והחל מהשנה השנייה (2012) בעקבות איתור ומיפוי גפנים נגועות (סעיף 2.2.2) הגפנים חולקו לשלוש קבוצות: 1. גפנים נגועות בוורוס המבטאות תסמינים (1,1). 2. גפנים נגועות בוורוס אשר אינן מבטאות תסמינים (1,0). 3. גפנים נקיות מווירוס (0,0). מאחר ובמהלך העונה גפנים יכולות להידבק בוורוס או להפוך מכאלה שלא מבטאות תסמינים לכאלה שמבטאות תסמינים נבחרו לקבוצות "2" ו "3" עשר גפנים, בתקווה להישאר בסוף העונה עם חמש גפנים לפחות בכל קבוצה. שיוך הגפנים לקבוצות השונות לצורך ניתוח התוצאות נעשה בכל שנה אחרי בדיקה ויזואלית של התסמינים ובדיקה מולקולרית של נוכחות הווירוס בסתיו.

### **2.2.4 שיטות הדיגום (ניסוי ב')**

#### **2.2.4.1 בדיקות מדדים עונתיים**

##### **2.2.4.1.1 התעוררות**

מידת התעוררות נערכה בצימוח של כ-20 ס"מ, נספר מספר האשכולות ומספר השריגים לגפן.

##### **2.2.4.1.2 התקדמות הבוחל**

החל מתחילת שבירת הצבע, נערכה הערכה של אחוז הגרגרים שעברו בוחל באשכול, ב-10 אשכולות מכל צד של הגפן (סה"כ 20 אשכולות לגפן). מאחר ובאשכול יש כמאה גרגרים, בשלבי הקיצון (פחות מ-10% ויותר מ-90%) נספרו הגרגרים החריגים ואילו בשלבי הביניים נערכה הערכה של שיעור הגרגרים שהחליפו צבע. בסקאלה של 10, 25, 50, 75 ו-90 אחוז.

##### **2.2.4.1.3 קצב הבשלה**

לביחנת התקדמות וקצב ההבשלה עד הבציר, נערך מעקב אחת לשבועיים החל מ-95% בוחל ועד למועד הבציר ותועדו רמת סוכר ( $Brix^{\circ}$ ), pH ומשקל גרגר. מכל גפן מדידה נלקחו 50 גרגרים מחלקים שונים באשכול (כתפיים, קצה, מרכז) - גרגר אחד מלמטה ואחד מלמעלה ושני גרגרים מהאמצע, מאשכולות הממוקמים באזורי הגפן השונים. הגרגרים נאספו בשקיות, נשקלו, נסחטו ושימשו למדידות שצוינו לעיל. ב-2012 רמת הסוכר סיעה בקביעת מועד הבציר שתוכנן להתבצע כאשר ערך ה-Brix יהיה בין  $24-25^{\circ}$ .

$Brix^{\circ}$  - רמת הסוכר נבדקה בפרקטומטר TAL-1 של חברת ATAGO

pH - נבדקו במכשיר pH-matic-23 של חברת crison mrc.

#### 2.2.4.1.4 נתוני בצייר

##### 2.2.4.1.4.1 יבול

מדידת היבול נערכה בבציר, נספר מספר האשכולות ונשקל כלל היבול לגפן בשטח במשקל IL-117-02 מרב 4000 , מאזני משקל, עד 70 ק"ג.

##### 2.2.4.1.4.2 בדיקת צבע גרגר

הגרגרים נמעכו קלות והועברו לכלי אליו הוספה כמות אתאנול חומצי (בריכוז 0.82% ) כמשקל הגרגרים. הדוגמאות הוכנסו למקרר  $4^{\circ}\text{C}$  ללילה. ביום למחרת הדוגמאות סוננו והוסף אתנול פי 2.5 ממשקל הגרגרים. הדוגמאות נקראו במכשיר הספקטרוֹפוטומטר ( ultrospec 2100pro Amersham Biociences uvqvisible spectrophotometer ) באורך גל 520 . (הפרוטוקול מבוסס על פרוטוקול מתוך עבודת הגמר של מיכל אקרמן, 2010)

##### 2.2.4.1.4.3 עוצמת הצימוח

עוצמת הצימוח נבדקה ע"י שקילת הגזם בחורף העוקב. כל גפן נזמרה בנפרד (קיצור של כל הזמורות לשתי עיניים), הזמורות נזמרו ונספרו בנפרד זמורות עבות – מעל חמישה מ"מ ודקות (פחות מ 5 מ"מ). אחרי זמירה סופית שכללה דילול של הסעיפים למספר הרצוי נימדד גם הקוטר של הזמורות בין הפקע העליון לתחתון.

#### 2.2.4.2 בדיקות מדדים במועדים פנולוגים מוגדרים

במהלך עונת הגידול נאסף חומר צמחי בשלושה מועדים פנולוגים מוגדרים מכל כרם (סעיף 2.2.4.2.4). כל איסוף כלל שלושה עלים (מכל צד של הגפן) ממרכז הגפן, מעל אזור האשכולות. בשתי עונות המחקר, 2012 ו 2013 הפטוטורות, ששימשו לבדיקת טיטר הווירוס הוכנסו בשטח למבחנה ונשמרו בחנקן נוזלי עד הכנסה ל-  $-80^{\circ}$  הטריפים נשמרו בקרח עד הגעתם למעבדה לצורך בדיקות פיגמנטים.

##### 2.2.4.2.1 בדיקת ריכוז פיגמנטים

ריכוזי כלורופיל a ו b ואנטוציאן מהגפנים בחלקות גשור ומ"ג נבדקו שלוש פעמים במהלך העונה. במעבדה בוצעה בדיקת פיגמנטים על פי פרוטוקול ממאמר (Lichtenthaler, 1987). העלים נחתכו ל 15 דיסקיות בקוטר 1.2 ס"מ אליהם הוסף 15 מ"ל אתאנול 95%. המבחנות הוכנסו לאמבט שחום מראש ל  $85^{\circ}\text{C}$  למשך שעתיים. לפני הקריאה באורך גל 520 (לחישוב אנטוציאן) הוסף למיצוי HCL 10% ביחס של 1/50 וניתן היה לצפות בשינוי צבע המיצוי. הבליעה של התמיסה נקבע בעזרת ספקטרוֹפוטומטר ( ultrospec 2100pro Amersham Biociences uvqvisible spectrophotometer ) ריכוז כלורופיל a וכלורופיל b ואנטוציאן חושבו לפי הנוסחאות הבאות :

$$\text{כלורופיל } a = 13.36 * A_{664} - 5.19 * A_{648} \quad (\text{מיקרוגרם} / \text{מ"ל תמיסת מיצוי מהצמח})$$

$$\text{כלורופיל } b = 27.43 * A_{648} - 8.12 * A_{664} \quad (\text{מיקרוגרם} / \text{מ"ל תמיסת מיצוי מהצמח})$$

$$\text{אנטוציאן} = 0.062 / (A_{520} - 0.071) * 10 \quad (\text{מיליגרם מלבדין} / \text{גרם רקמה})$$



#### 2.2.4.2.2 בדיקות פוטנציאל מים בגזע

המדידות בוצעו בימים ללא עננות בשלושה מועדים פנולוגיים שצוינו לעיל במהלך שנת 2013. בכל מועד בוצעו שלוש בדיקות תא לחץ, בדיקת בוקר בשעה 8:00, בדיקת צהריים בשעה 11:30 ובדיקת אחה"צ ב 15:30. המדידות בוצעו על שני עלים מכל גפן.

תא לחץ - מדידות התא לחץ בוצעו בעזרת מכשיר PMS מודל דגם 600, ארה"ב.

#### 2.2.4.2.3 בדיקות לנוכחות וכימות הווירוס

הרקמה המועדפת לזיהוי נוכחות וירוס הינה השריג או הזמורה המעוצה (Teliz et al., 1987) ולכן חיפוש גפנים חדשות לניסוי בוצע על חלק צמחי זה לפני תחילת העונה. במהלך העונה לא ניתן לחתוך שריגים ולכן הרקמה ששימשה לזיהוי נוכחות וירוס היא הפטוטרת.

#### 2.2.4.2.3.1 RNA הפקת

##### חומרים

חומרים מקיט ZR Plants RNA MiniPrep™ של חברת ZYMO RESEARCH (CA, US):

Binding Buffer, קולונות Zymo Spin, Wash Buffer, Prep Buffer

בופר מיצוי RNA - CTAB המכיל 2%, CTAB, 100ul Tris base pH=8, EDTA pH=8, 1% polyvinyl-β-mercaptoethanol 0.5% לבופר pH=8 NaCl, pyrrolidone מיד לפני השימוש הוסף לבופר

כלל ה-RNA הופק מרקמות שונות בשיטה שהתבססה על (Chang et al., 1993) עם שינויים. הדגימות (2g פטוטרות) רוסקו בתוך חנקן נוזלי ועורבבו עם בופר מיצוי RNA (20 ml) שחומם קודם לכן ל-65°C. התערובת הודגרה למשך 10 דקות ב-65°C. לאחר מיצוי עם נפח שווה של תערובת כלורופורם:איזואמיל אלכוהול (1:24) למשך 5 דקות בטלטול נערך סירכוז למשך 10 דקות ב 10,000 rpm בטמפרטורת החדר להפרדת הפאזות. הפאזה העליונה (מקטע מימי) הועבר לסירכוז חוזר ובסופו הוסף למקטע המימי LiCl לריכוז סופי של 2.5M והמבחנה הודגרה ב-4°C למשך הלילה. למחרת נערך סירכוז ב-4°C ב 10,000 rpm למשך 20 דקות והמשקע נשטף ב-70% אתנול קר. פלט הורחף ב SddH<sub>2</sub>O מטופלים ב DEPC, Binding Buffer ואתאנול 100%. הנוזל הועבר לקולונות Zymo Spin והמשך הפקה נעשה על פי פרוטוקול Quick-RNA™ MiniPrep עם קיט ZR Plants RNA MiniPrep™ של חברת ZYMO RESEARCH.

#### ניקוי RNA מ DNA

הכנסת הקולונות לאינקובציה ל 20 דקות ב 37°C לפירוק DNA עם החומרים RNase Free DNase (10 μl), בופר 10xRQ RNase Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) והשלמה עם RNA Wash Buffer לנפח סופי של 100 μl.

## בדיקת ריכוז RNA

התבצעה קביעה כמותית של ריכוז ה-RNA תוך שימוש בספקטרוֹפוטומטר מסוג (NanoDrop ND-1000) (NanoDrop technologies, Wilmington, USA) ובנוסף הורצה דגימת RNA בנפח של  $3\ \mu\text{L}$  בגיל אגרוז (1%) במתח קבוע של 70 V למשך כשעה. הגיל צולם במצלמת UV ואיכות ה-RNA וכמותו היחסית נקבעו מן התמונה.

### 2.2.4.2.3.2 Reverse Transcription PCR (RT) ריאקציות

להכנת cDNA הוכנה ריאקציה שהכילה Total RNA ( $2.5\ \mu\text{g}$ ) בנפח סופי של  $16.25\ \mu\text{L}$ . לכל דוגמא הוסף  $1.5\ \mu\text{L}$  Random hexamer primer. המבחנה הודגרה 5 דקות ב-  $70^\circ\text{C}$  ו 5 דקות ב-  $4^\circ\text{C}$  להפרדת גדילים. לאחר מכן הוספו למבחנה  $1.25\ \mu\text{L}$  מתמיסת אם בריכוז 10 mM dNTP,  $5\ \mu\text{L}$  בופר MMLV ו  $1\ \mu\text{L}$  אנזים MMLV והוכנס לתגובה המפורטת בטבלה 1.

טבלה 1- שלבי התגובה ריאקציית PCR (RT)

שלב	1	2	3	4
טמפרטורה	$37^\circ\text{C}$	$42^\circ\text{C}$	$75^\circ\text{C}$	$4^\circ\text{C}$
זמן (דקות)	10	50	15	$\infty$

### 2.2.4.2.3.3 Nested-PCR ו Polymerase chain reaction (PCR)

ריאקציות PCR ו Nested-PCR בוצעו בתערובת בנפח  $25\ \mu\text{L}$  אשר כללו :

5ul cDNA (~20 ng)

11 ul DreameTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, US).

1.5 ul primar 10mM (Sigma-Aldrich) of each primer

נפח הריאקציה הושלם ל  $25\ \mu\text{L}$  בעזרת  $6\ \mu\text{L}$  מים מזוקקים פעמיים. המכשיר ששמש לריאקציה היה RoboCycler Gradient 96 (Stratagene). נעשה שימוש בתוכנית אחת בסיסית (טבלה 2) כאשר טמפ' היצמדות הפריימרים הייתה שונה בריאקציות השונות.

#### פריימרים

בריאקציות ה-PCR נעשה שימוש בפריימרים ספציפיים להגברת רצף cDNA של מקטע ספציפי. רשימת הפריימרים ששמשה בעבודה זו מובאת בטבלה 3. ארבעת הפריימרים הראשונים שימשו ל-qRT-PCR -1+2 - גן הווירוס, -3+4 - גן ביקורת) שני הפריימרים הראשונים שימשו לריאקציית PCR רגיל ושני האחרונים בטבלה לריקציית ה- Nested-PCR.

## טבלה 2: תוכנית ה PCR הבסיסית ששמשה בעבודה

No. of cycles – מספר הפעמים בו ה PCR חוזר על אותם תנאי טמפ' וזמן.

Temp (°C) – טמפ' במעלות צלזיוס.

Time (sec.) – זמן בשניות

No. of cycles	Temp (°C)	Time (sec.)
1	95	120
35	94	30
	60*	30
	72	60
1	72	600

\* ראה טבלת צמדי פריימרים לריאקציות ה PCR .

## הפרדת מקטעי DNA בג'ל אלקטרופורזה

הרצת מקטעי DNA נעשתה במכשיר Mini Sub gell GT (Bio-rad), בגילים של 1.5 % Agarose (GibcoBRL) בתוספת 0.5 mg/ml Ethidium bromide (Sigma) לפי (Sambrook, 1989). הגיל הורץ בבופר 40 mM Tris- TAE (acetate, 1 mM EDTA) במתח של 100 V. בתום ההרצה הגיל צולם במכשיר Eagle Eye II (Stratagene). הערכת גודל נעשתה ע"י הרצת מקטעי ה DNA במקביל לסמן גודל Thermo Gene Ruler Express DNA Ladder (Scientific,US).

## 2.2.4.2.3.4 בדיקת ביטוי גנים באמצעות Quantitative Real Time PCR

חומר צמחי ששימש לריאקציות Real Time PCR נאסף כמתואר בסעיף 2.2.4.2 .

קביעה כמותית של טיטר הווירוס התבססה על קביעת רמת הביטוי של הגן HSP70h הוויראלי ברקמת הפטוטר. cDNA שהוכן עבור פטוטרות עלים שנאספו כמצוין למעלה (סעיף 2.2.4.2.3.2) שימש כתבנית לריאקציית Real Time PCR במכשיר Corbett Rotor-Gene 6000 ובהסתמך על תוכנת Rotor-Gene 6000 Version 1.7 על פי הוראות היצרן. הריאקציה נערכה בערכת Syber-green amplification (ABgene,UK) עם KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (חב' Kapa Biosystems) תוך שימוש בפריימרים יחודיים לגן HSP70h של ווירוס קיפול העלים ולגן GAPDH של הגפן. (טבלה 3).

הקשירה של החומר הפלורוסנטי Syber-green ל DNA דו- גדילי שנוצר במהלך ריאקציית ה-PCR מאפשר לבחון את קצב היווצרות ה- DNA במערכת באמצעות מדידת הפלורסנציה. בשלב ראשון נערכו ניסיונות לבחירת ריכוז אופטימלי לכל זוג פריימרים כאשר הפרמטר המנחה הוא קבלת תוצר יחיד שאינו מגביל את התקדמות הריאקציה. על בסיס זה נבחר ריכוז פריימרים של 300nM לכלל ריאקציות ה- Real Time PCR השונות. בשלב הבא נבחנה יעילות (efficiency) כל זוג פריימרים ע"י עקומות כיוול בהן נבדקו ערכי CT שהתקבלו עבור מיהולים שונים של cDNA שמקורו בגפן נגועה בוורוס והמראה תסמינים. הערך CT מייצג את מספר מעגלי ריאקציית ה-

PCR בהם נמדדה כמות התוצר (על ידי מדידת הפלורסנציה) הגבוהה מרמת סף שנקבעה (Threshold). רמת הסף נקבעת כך שעקומת הפלורסנציה (המייצגת את כמות התוצר) של הגן הנבדק וגן הביקורת (ראה בהמשך) יהיו בשלב הלינארי של ריאקציית ה-PCR. לבניית עקומת כיוול לינארית חושבו ערכי log לכל מיהול. גן הביקורת היה הגן GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) כפי שפורסם בעבר (Reid et al., 2006). הגן GAPDH הינו גן צמחי המתבטא בגפן בלבד ושימש לנרמול כפי שמצוין בהמשך. שיפוע עקומות הכיוול עבור גן הביקורת והגן הנבדק היה דומה והוכיח כי ההפרש בין ערכי ה CT של הגן הנבדק ושל הגן הביקורת אינו תלוי בריכוז ה- cDNA.

חישוב ערכי Relative Expression (RE) נעשה על ידי הצבת ערכי CT שהתקבלו בריאקציית ה Real Time PCR בעקומת הכיוול הספציפית לגן הוויראלי וחילוץ הנתון של ריכוז cDNA יחסי. בכל סדרת ריאקציות נעשתה, במקביל לריאקציה עם זוג הפריימרים שמייצג את הגן הוויראלי, גם ריאקציה נוספת עם פריימרים של גן הביקורת ששימש כמקור יחוס. RE חושב על ידי חלוקת הערך של ריכוז ה- cDNA היחסי עבור הגן הוויראלי, בריכוז ה- cDNA היחסי שהתקבל מגן הביקורת (פעולה זו נועדה על מנת לנרמל את רמת ה- RNA). ערך RE מייצג לכן את רמת הביטוי של הגן יחסית לביטוי גן הביקורת, שביטוי קבוע בדוגמאות השונות. נירמול נעשה לגן מהגפן מאחר ונעשתה הפקה לכלל ה- RNA ברקמה שהיה ברובו RNA צמחי.

ריאקציית qRT-PCR בוצעה עם 7 µl cDNA. בתנאי ה- qRT-PCR הבאים: 15 דק' ב 95°C, 30 שניות ב 60°C, 30 שניות ב 72°C, בשלב האחרון התגובה חוממה בקצב של 1°C כל 5 שניות עד ל-99°C. כל אחת מהתגובות נערכה בדופליקטים, כאשר ביקורת שלילית ללא cDNA (non template control- NTC).

#### טבלה 3- פריימרים ל qRT-PCR, PCR ו Nested-PCR.

Name	Sequence (5'-3')	T°C
LRRTFor	GGGTCAAGTGCTCTAGTTAA	60
LRRTRev	ACCTCGTCCGTTAGCGTAT	60
VvGAPDHf	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	60
VvGAPDHr	CCACAGACTTCATCGGTGACA	60
LR3LC1	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT	55
LR3LC2	GTTGTCCCGGGTACCAGATAT	55

#### 2.2.4.2.4 מועדים פנולוגים למדידות פיגמנטים, פוטנציאל מים בגזע וטיטר הווירוס

המועד הפנולוגי הראשון הוא שלב 'אחרי חנטה' והתבצע כשבועיים לאחר החנטה. המועד הפנולוגי השני הוא שלב 'הבוהל' – החלפת צבע הענבים והמועד השלישי הוא ב'זמן הבציר' בו תסמיני הווירוס על העלים ברורים ובדרגת חומרה גבוהה.

**טבלה 4 - בדיקות למדדים פיזיולוגיים, מדדי הבשלה ואיכות התירוש לגפנים מהקבוצות השונות.**

חלק צמחי	מדד	גודל מדגם מכל גפן	מספר פעמים בעונה	מועד דיגום
עלים	פוטנציאל מים	2 עלים	3	לאחר חנטה, בוחל, בציר
	פוטוסינטזה ומוליכות פיוניות	10 עלים 4 עלים	3 ימים פעמים ביום	לאחר חנטה, בוחל, בציר
	תסמינים בעלוה	כל הגפן	5-8	כל שבועיים מרגע הופעת תסמינים.
	פיגמנטים- כלורופיל a, b ואנטוציאן בעלוה	6 עלים	3	לאחר חנטה, בוחל, בציר
ענבים	סוכר חומצה pH	50 גרגרים	4	כל שבוע מ 22 בריקס
	צבע פרי	50 גרגרים	1	בבציר
	מדדי יבול	כל גפן	1	בבציר
בשריגים	משקל גזם	כל גפן	1	בחורף

**2.2.4.3 בדיקת אנטוציאנים בתירוש וביין**

**2.2.4.3.1 הכנת יין**

בסוף עונות 2011 ו 2012 הותססו גרגרים מגפנים מהקבוצות השונות. ב 2011 הגפנים נבצרו במועד בציר אחיד והענבים הוכנסו למקפיא (-20) עד להתססה. להתססתם נבחרו גפנים שהגיעו לרמת בריקס קרובה ל 26 ולגפנים ברמת בריקס נמוכה תוקנה רמת הסוכר. ב 2012 הגפנים נבצרו בתאריכים שונים על פי רמת הבריקס (24-25 אחוז סוכר) והענבים הוכנסו למקפיא (-20) עד להתססה. גרגרים מכל גפן נלקחו לצורך כימות ואפיון פרופיל אנטוציאנים ב- RPLC מתירוש (סעיף 2.2.4.3.2). לצורך הכנת היין נבחרו גפנים שהגיעו לרמת בריקס אחידה מתוך כלל הגפנים. הגרגרים הותססו במכלי פלסטיק בנפח 5 ליטר אליהם הוכנסו גרגרים במשקל 4 קילו. לצורך התססת הגרגרים הענבים מכל גפן הופשרו, נמעכו והופרדו מהשזרות (עיי Crusher enoitalia מדגם Jolly60) והוסף  $SO_2$ . ביום למחרת הוספו שמרי *Saccharomyces cerevisiae* ובשבועיים שלאחר מכן עורבבו הגרגרים במיכל פעמיים ביום (בהתאם לקצב התסיסה). כל יומיים נבדק הסוכר, ה pH ורמת האלכוהול. במהלך התסיסה המכלים שהו בחדר בטמפרטורה של  $22^{\circ}$ - $26^{\circ}$  צלזיוס. בתום התסיסה, נסחטו הגרגרים והופרדה הקליפה מהנוזל בעזרת press. ה free run הועבר לבקבוקים (2011) או דמיז'אנים (2012). ב 2012 התבצעה תסיסה מלולקטית ובתומה התבצעה שפייה והוסף  $SO_2$ . היין יושן כשלושה חודשים. היין אוחסן בטמפרטורה של  $4^{\circ}$  עד לביצוע האנליזות. בין בציר 2011 לבציר 2012 שונה פרוטוקול הכנת היין. טבלה 5 מתארת את עיקרי השלבים בהכנת היין וההבדלים בין בציר 2011 ל- 2012.

טבלה 5 - טיפולים ליין ביקב בשנים 2011 ו 2012

פעולה	בציר 2011	בציר 2012
תיקון סוכר	תיקון ל 26 בריקס	בציר ב 24, 25 בריקס ללא תיקון
תיקון חומצה בבציר	ללא תיקון	ללא תיקון
טמפרטורת אחסון		19-20
סחיטה לאחר	כ- 14 ימים	כ- 14 ימים
תסיסה מלולאקטית	ללא	ע"י חיידקי <i>CH16 Viniflora</i> של CHR HANSEN
הוספת SO <sub>2</sub> בשפיה		(נפח*2*50) / 1000
יישון	בבקבוקים	בדמיג'נים עד ביקבוק

**2.2.4.3.2 הפרדה, כימות ואפיון פרופיל אנטוציאנים בכרומטוגרפיית RP-LC :**

**2.2.4.3.2.1 הכנת הדוגמאות לאנליזה ב- RP-LC**

עבור תירוש - הוספת 5% מתנול ל- 1 מ"ל תירוש, סוניקציה למשך 5 דקות, סירכוז למשך 5 דק' ב 15,000 סל"ד, סינון המקטע הנקי דרך מסנן 0.45μm והזרקה של 10μl.  
עבור יין – מיהול דוגמת יין פי 5, סינון דרך מסנן 0.45μm והזרקה של 50μl.

**2.2.4.3.2.2 הפרדת הדוגמאות ב- RP-LC**

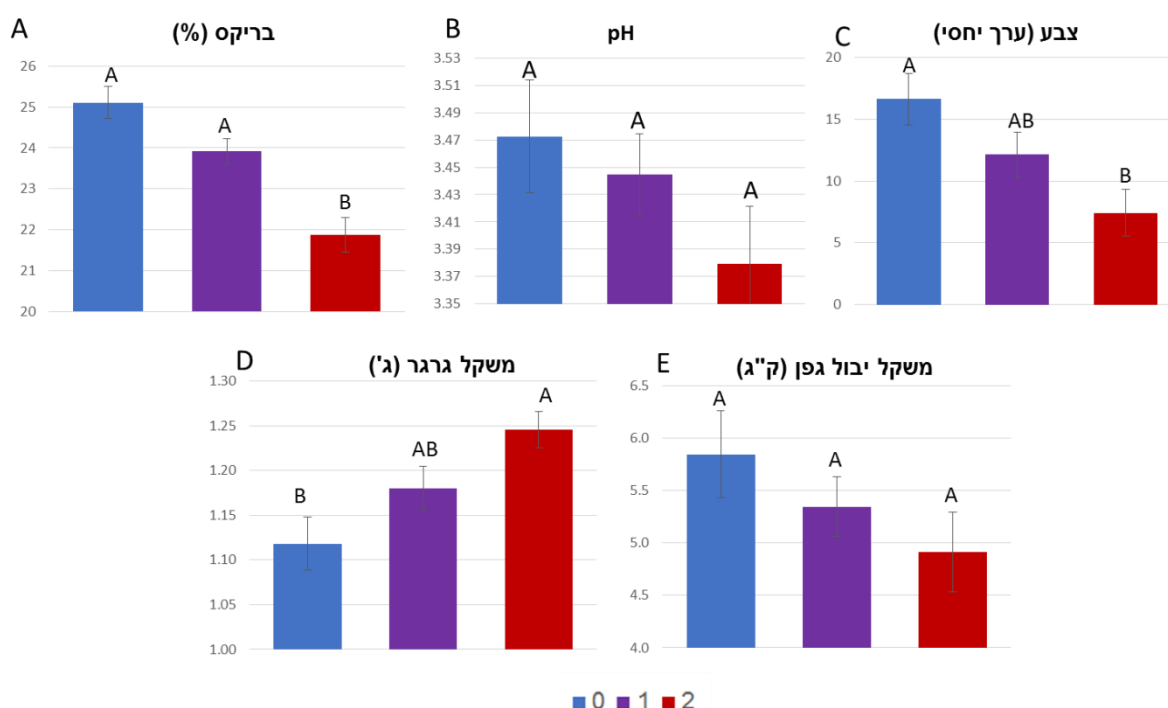
הפרדה באמצעות מערכת HPLC (High pressure liquid chromatography), דגם TSP P4000, גלאי דגם UV 6000LP Diode Array, אוטוסמפלר דגם AS3000 (Thermo Separation Products. Riviera Beach, FL, USA).  
ההרצה שבוצעה הינה הרצת RP (Reversed phase) תוך שימוש בעמודת C18 PHENOMENEX RP-B80A (250cm×4.6mm×5μ, Luna C18(2), Phenomenex, USA), ההפרדה בוצעה על בסיס השיטה הכללית להפרדה ואפיון של אנטוציאנים מתירוש ויין ב-HPLC (Kerem et al., 2004). המריצים: A- מים מזוקקים פעמיים עם TFA (Trifluoroacetic acid, 0.2%) (v), C- אצטוניטריל (הסולבנטים ברמת HPLC Gradient Grade). טמפרטורת הרצה 30 °C וקצב זרימה 1.5 ml/min.

### 3. תוצאות

#### 3.1 הדינמיקה העונתית והרב שנתית של התבטאות תסמיני הווירוס בכרמים.

##### 3.1.1 השפעת חומרת התסמינים על היבול ואיכות התירוש

כמות היבול ואיכות התירוש נבדקו בעת הבציר, במדגם של גפנים מדרגות חומרה שונות של תסמינים שדורגו: ללא תסמינים-0, תסמינים קלים-1 (איחוד דרגות הביניים 1+2 מהמיפוי) ותסמינים קשים-2. בדיקות איכות כללו בדיקת סוכר, pH וצבע גרגר. בדיקות היבול כללו משקל גרגר, מספר אשכולות ומשקל יבול לגפן. התוצאות המוצגות הן ממוצע של הכרמים בשלוש השנים אך בשל בעיות תיאום עם הבציר המסחרי תוצאות האיכות אינן כוללות את כרם דלתון ב 2012. התוצאות של גובה היבול ומרכיביו אינן כוללות את גשור ויפתח 2011. מבחינת מדד צבע הגרגר, בשלושת הכרמים והשנים התקבלו תוצאות עם מגמה דומה אולם קיימת אינטראקציה מובהקת ולכן לא ניתן לאחד את התוצאות לאיור אחד. איור 6 צבע הגרגרים מציג תוצאות מכרם דלתון 2013 ככרם מייצג. ערכי הצבע שהתקבלו בשאר הכרמים והשנים מוצגים בטבלה 6. ניתן לראות שצבירת הסוכר נפגעת עם העלייה בדרגת התסמינים אולם ההפרש מובהק ומשמעותי (מעל 3 יחידות בריקס) קיים רק בחומרת התסמינים הגבוהה (איור 4A). מגמה דומה נראית ברמת ה pH אולם סה"כ ההפרש קטן ואינו מובהק (איור 4B). צבע הגרגרים פוחת אף הוא ככל שהתסמינים מחריפים. הבדל מובהק קיים בין גפנים (0) לגפנים (2) ואילו גפנים (1) לא נבדלות מגפנים (0) אך גם לא מגפנים (2) (איור 4C). בבדיקה של השפעת דרגות חומרת התסמינים על יבול הגפן קיימת מגמה לא מובהקת לפחיתה ביבול הגפן (איור 4E) אם כי במדד מספר האשכולות לגפן לא קיימת מגמה ברורה לכל השנים והכרמים (טבלה 7). משקל הגרגר נמצא הולך ועולה עם ההחמרה בתסמינים וקיים הבדל מובהק בין גפנים בדרגה (0) לגפנים בדרגה (2) (איור 4D).



איור 4- השפעת דרגות חומרת התסמינים (0-2) ללא תסמינים-0, תסמינים קלים-1 (איחוד דרגות הביניים 1+2 מהמיפוי) ותסמינים קשים-2 על מדדי איכות ויבול בגפן בשלושה כרמים- יפתח, גשור ודלתון במהלך 3 שנות מעקב (2011-2013) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן).

טבלה 6- צבע גרגרים בערכים יחסיים בשלושה כרמים- יפתח, גשור ודלתון במהלך 3 שנות מעקב (2011-2013) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן).

צבע גרגרים				
כרם	שנה	0	1	2
גשור	2011	8.2A	6.9AB	5.1B
גשור	2012	9.3A	6.9A	6.2A
דלתון	2011	9.1A	8.6A	7.2A
דלתון	2013	16.6A	12.1AB	7.4B
יפתח	2011	10.1A	10.2A	9.2A
יפתח	2012	6.8A	4.9B	4.2B
יפתח	2013	12A	10.7A	9.7A

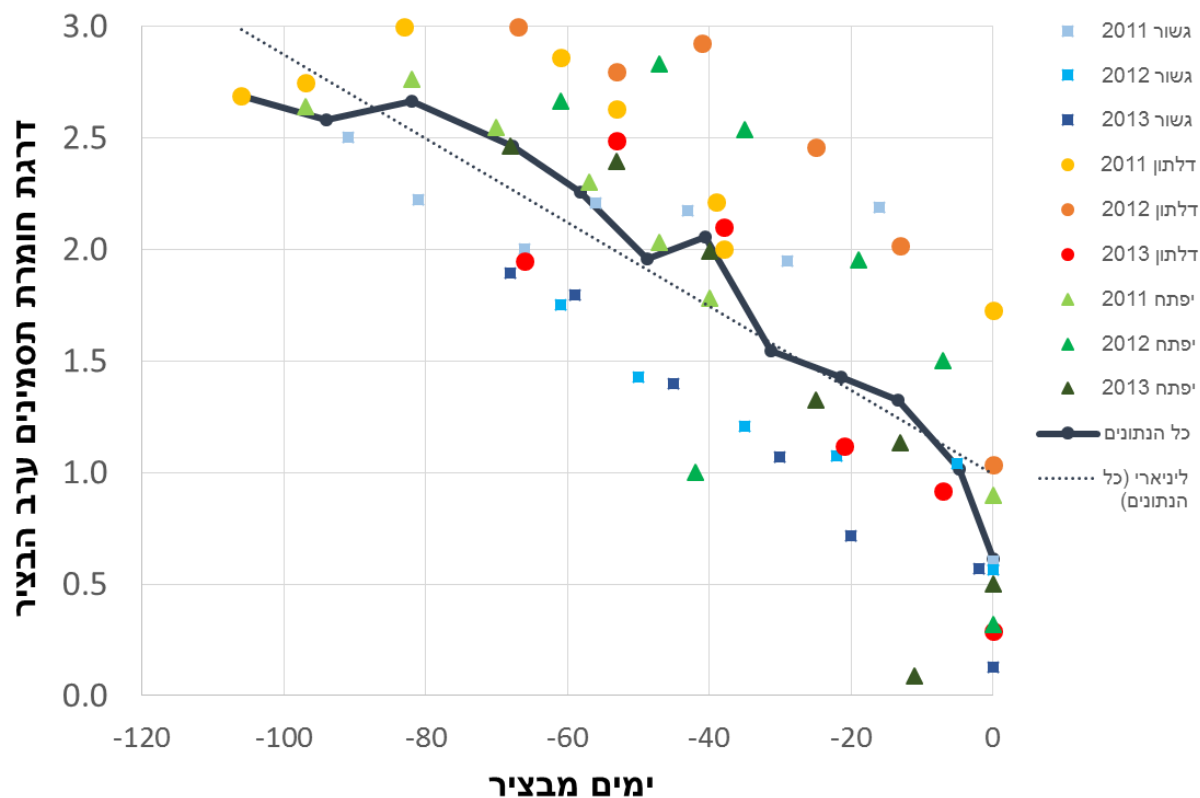
טבלה 7- מספר אשכולות בשלושה כרמים- יפתח, גשור ודלתון במהלך 3 שנות מעקב (2011-2013) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן).

מס' אשכולות				
כרם	שנה	0	1	2
דלתון	2011	41.0	44.1	57.8
גשור	2012	64.2	58.9	40.8
יפתח	2012	50.4	47.8	39.3
גשור	2013	54.2	66.6	57.2
דלתון	2013	52.4	60.8	51.2
יפתח	2013	58.2	56.3	47.0

### 3.1.2 השפעת מועד הופעת התסמינים על דרגת חומרתם

במעקב הופעת התסמינים נמצא ככלל, שככל שהופעת התסמינים מאחרת וקרובה יותר לבציר כך דרגת חומרתם בסוף העונה, ערב הבציר, נמוכה יותר. כל נקודה באיור 5 מייצגת את דרגת התסמינים הממוצעת ערב הבציר של הגפנים שהחלו לבטא תסמינים ביום מסוים המוגדר על פי מרחקו ממועד הבציר של החלקה. בזן מרלו (כרם יפתח) ב 2012 קורלציית ספירמן שהתקבלה היא הטובה ביותר (-0.694) (טבלה 8). בהקבצת וניתוח הנתונים לפי כרמים או שנים ניתן לראות כי קיימות קורלציות ספירמן חזקות יותר לשנים מאשר לכרמים (טבלה 9), בשלושת השנים הקורלציות הן בין -0.57 ל -0.61. בכרם יפתח, בהקבצת הנתונים עבור שלושת השנים מתקבלת קורלציה חזקה גם כן -0.6. לכל הפונקציות  $P < 0.0001$ . השיפועים הלינאריים מייצגים את קצב התפתחות התסמינים בין השנים השונות (בין 2011 ו 2013  $p = 0.0548$ ) לעומת הבדל זניח בהשוואה בין הכרמים ( $p > 0.3$ ).





**איור 5- השפעת מועד הופעת התסמינים על דרגת חומרתם בשלושה כרמים- יפתח, גשור ודלתון במהלך 3 שנות מעקב (2011-2013).** כל נקודה בגרף מייצגת את הקשר בין מועד הופעת התסמינים (שמתורגם למספר ימים מהבציר הספציפי) כנגד דרגת חומרתם ערב הבציר.

**טבלה 8- משוואת קו ליניארי, וקורלציה על פי ספירמן של כל אחת מהפונקציות שמבטאות קשר בין מספר ימים מבציר לדרגת חומרת התבטאות התסמינים ערב הבציר בגפנים משלוש חלקות המעקב בשלוש השנים. לכל הפונקציות  $P < 0.0001$ .**

כרם	שנה	משוואה	Spearman $\rho$
גשור	2011	$y = -0.013X + 1.3576$	-0.4921
גשור	2012	$y = -0.0154X + 0.7329$	-0.3878
גשור	2013	$y = -0.0241X + 0.3101$	-0.5945
דלתון	2011	$y = -0.0108X + 1.8421$	-0.5564
דלתון	2012	$y = -0.0267X + 1.4847$	-0.6529
דלתון	2013	$y = -0.0286X + 0.596$	-0.2294
יפתח	2011	$y = -0.0197X + 1.0286$	-0.6445
יפתח	2012	$y = -0.0297X + 0.9357$	-0.6942
יפתח	2013	$y = -0.0345X + 0.3722$	-0.5535
כל הנתונים		$y = -0.0188X + 0.9913$	

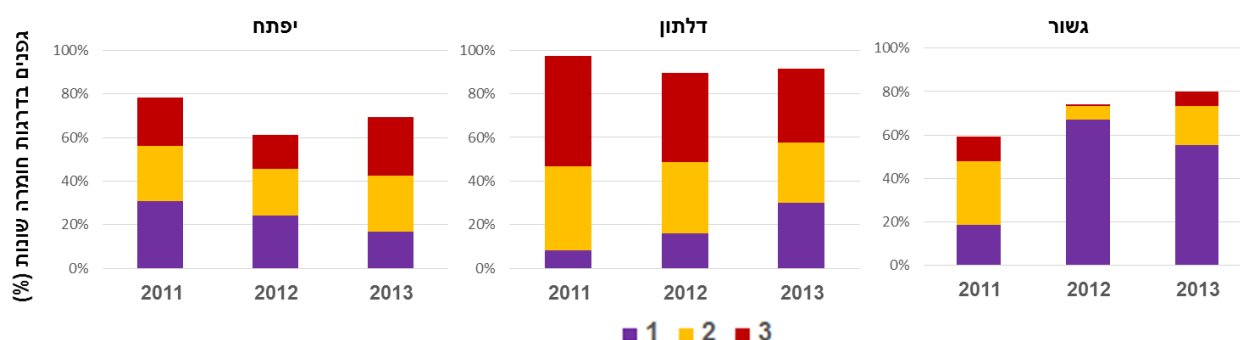
**טבלה 9- קורלציה לפי ספירמן, ניתוח לפי כרם ולפי שנה.** זהו איחוד של הנתונים לפי שנים (א) וכרמים (ב) עליו בוצע מבחן ספירמן על מנת לבחון ולהשוות קורלציות של שנים לעומת כרמים.

כרם	שיפוע ממוצע	שגיאת תקן	spearman p	מובהקות
גשור	-0.018	0.003	-0.3157	<0.0001
דלתון	-0.022	0.006	-0.355	<0.0001
יפתח	-0.028	0.004	-0.608	<0.0001

שנה	שיפוע ממוצע	שגיאת תקן	spearman p	מובהקות
2011	-0.015	0.005	-0.6134	<0.0001
2012	-0.024	0.007	-0.57	<0.0001
2013	-0.029	0.005	-0.598	<0.0001

### 3.1.3 שיעור הנגיעות וחומרת התסמינים

ניתן לראות בגשור כי בשלושת השנים אחוז הגפנים המבטאות תסמינים לא עולה על 80% מכלל הגפנים בכרם וכן דרגת הנגיעות העיקרית אליה מגיעות הגפנים ערב הבציר היא 1. גם ביפתח, אחוז הגפנים המבטאות תסמינים לא עולה על 80% אך הגפנים מגיעות לדרגות התבטאות תסמינים גבוהות יותר. בדלתון כמעט 100% גפנים מהחלקה מבטאות תסמינים ודרגת החומרה גבוהה (איור 6). שיעור הגפנים המבטאות תסמינים (מכל הדרגות) לעומת הגפנים ללא תסמינים (דרגה 0) יורד בין 2011 ל 2012 בכרמים יפתח (79% מבטאות ב 2011 לעומת 62% ב 2012) ודלתון (98% ו 88% בהתאמה) ואילו בגשור בשנים אלה, שיעור הגפנים המבטאות תסמינים עלה (60% ו 72% בהתאמה). בין השנים 2012 ל 2013 הייתה עלייה בכל הכרמים בשיעור הגפנים המבטאות תסמינים לעומת גפנים אשר לא מבטאות. בהסתכלות על הגפן הבודדת, דרגות חומרת התסמינים ערב הבציר אינן קבועות משנה לשנה. יתרה מכך, ישנה תופעה של גפנים המבטאות תסמינים בשנה מסוימת ולא בשנה העוקבת (טבלה 10). בגשור ודלתון 10.3% ו 8.6% (בהתאמה) מכלל הגפנים אשר ביטאו תסמינים ב 2011 לא הראו תסמינים ב 2012. תופעה שחזרה גם בין 2012 ל 2013 7.8% ו 5% (בהתאמה) (טבלה 10).



**איור 6- התפלגות דרגות חומרת התסמינים (0-3) בכל שנה מתוך כלל הכרם בערב הבציר: % הגפנים שהראו תסמינים מתוך כלל הכרם (השלמה ל- 100% התבטאות בכרם עם הגפנים בדרגה 0- ללא תסמינים) בכל כרם ושנה וכן % הגפנים מכלל הכרם בכל דרגות ההתבטאות.**

**טבלה 10- שיעור השינוי בין התבטאות תסמינים או ללא תסמינים בגפן הבודדת על פני שנים בכרמים.** ניתוח הנתונים לפי יש/אין תסמינים (ולא לפי דרגות חומרת התסמינים). הטבלה מסכמת את התבטאות התסמינים לאורך 3 שנים בגפן הבודדת מתוך כלל הכרם. ללא שינוי- גפנים שמבטאות תסמינים או לא מבטאות בשתי השנים, התבטאות חדשה- גפנים שלא ביטאו תסמינים וכן ביטאו בשנה העוקבת, תסמינים נעלמו- גפנים שביטאו תסמינים ובשנה העוקבת לא ביטאו.

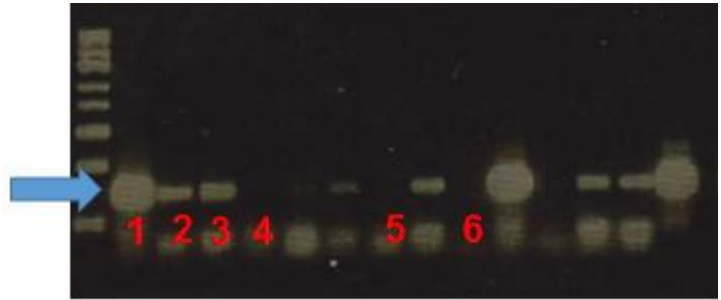
בין השנים	% שינוי	גשור	דלתון
2011-2012	ללא שינוי	67.62%	89.88%
	התבטאות חדשה	22.09%	1.49%
	תסמינים נעלמו	10.29%	8.63%
2012-2013	ללא שינוי	78.25%	88.69%
	התבטאות חדשה	14.00%	6.25%
	תסמינים נעלמו	7.76%	5.06%

### 3.2 השוואת מדדים של גפנים נקיות לגפנים נגועות, עם או ללא תסמינים.

#### 3.2.1 בחירה של גפני הניסוי

בסתיו, בו תסמיני הווירוס ברורים ביותר נערך מיפוי תסמינים בכרמים של קיבוץ גשור (דרום הגולן – 350 מ' מעל פני הים) ומרום גולן (צפון הגולן- 900 מ' מעל פני הים) ונבחרו גפנים עם תסמינים וללא תסמינים. לאחר בדיקת PCR-Nested חולקו הגפנים לשלוש קבוצות על סמך התסמינים והנגיעות המולקולרית (איור 7): גפנים נקיות מהווירוס וללא תסמינים (0,0) גפנים עם תסמינים שנמצאו נגועות (1,1) וגפנים ללא תסמינים שנמצאו נגועות בוורוס (1,0) (טבלה 11). מתוך 25 הגפנים ללא תסמינים שנבדקו מולקולרית ב 2011 מכרם גשור לא נמצאו גפנים נקיות מווירוס ולכן בשנה זו הגפנים חולקו לשתי קבוצות בלבד- (1,1) (1,0). בסתיו 2012, לקראת קיץ 2013, שוב נערכה בדיקה מולקולרית לחיפוש גפנים נקיות נוספות. בבדיקה זו נמצאו בגשור גפנים נקיות (0,0) ולכן ב 2013 ישנן שלוש קבוצות גפנים. התבטאות התסמינים של הגפנים מהקבוצות השונות נבדקו לכל אורך העונה, כאשר בבדיקה האחרונה, בסתיו, נקבעה שייכותם הסופית לקבוצה על סמך התסמינים. כך קרה שבגשור, מתוך 10 גפנים (1,0) שהוגדרו בסתיו 2011 נשארו בסוף עונת 2012 שתי גפנים בלבד. במהלך עונת 2013 בכרם גשור כל גפני (1,0) נשארו ללא תסמינים עד סוף העונה, גפנים (1,1) שנבחרו אכן הראו תסמינים ואילו מתוך עשר גפנים שהיו (0,0) בתחילת העונה, נמצאו ארבע גפנים נגועות בבדיקה האחרונה.

בכרם מ"ג נמצאו בסתיו 2011 תשע גפנים נקיות ללא תסמינים (0,0), עשר גפנים (1,0) וחמש גפנים (1,1). בסוף עונת המחקר 2012 נשארו שלוש גפנים (1,1) על אף נגיעות המולקולרית. שאר הגפנים בכרם מ"ג נשארו באותה קבוצה עד סוף עונת 2012. בשנת 2013 בכרם מ"ג, מתוך עשר גפנים שנבחרו לקבוצת (1,0) שתי גפנים החלו לבטא תסמינים, כל גפני (1,1) הראו תסמינים ברורים ואילו מתוך שבע גפנים שהוגדרו (0,0) בתחילת העונה, נמצאו שתי גפנים נגועות בבדיקה האחרונה.



איור 7 - מקטעי DNA שהתקבלו מריאקציית Nested-PCR לבדיקת הגפנים מכרם מ"ג. על סמך בדיקה זו חולקו הגפנים לקבוצות הטיפול השונות - 1,2,3 - קבוצה (1,0), 4,5,6 - קבוצה (0,0). החץ מראה את גודל המקטע הרצוי.

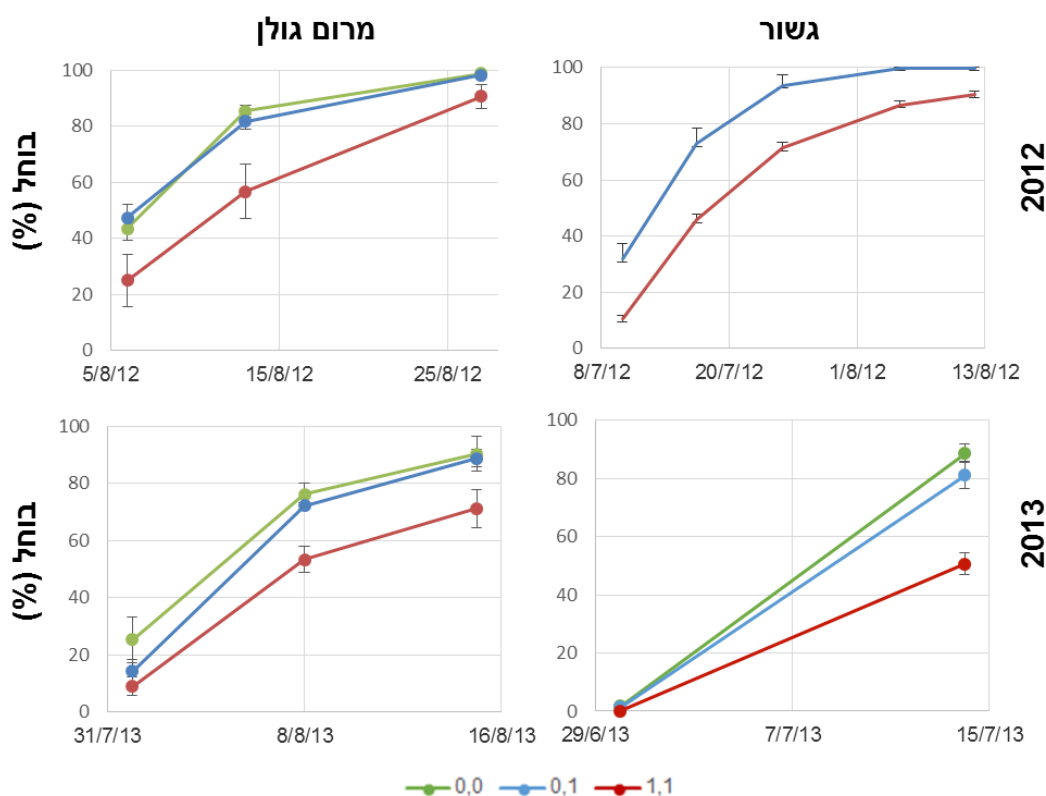
טבלה 11- גפני הניסוי בקבוצות הטיפול השונות. החלוקה התבצעה על פי ביטוי תסמיני המחלה ונוכחות וירוס (Nested-PCR) בבדיקות שנערכו בתחילת ובסוף כל עונה.

כרם	עונה	0,0	0,1	1,1
גשור	תחילת 2012	0	10	10
	סוף 2012	0	2	10
	תחילת 2013	10	11	6
	סוף 2013	6	11	6
מרום גולן	תחילת 2012	9	10	5
	סוף 2012	9	10	3
	תחילת 2013	7	10	5
	סוף 2013	5	8	5

## 3.2.2 מדדים עונתיים- איכות הפרי

### 3.2.2.1 בוחל

מעקב אחר שיעור הבוחל בכרמים גשור ומ"ג בשנים 2012-2013 הראה הבדל מובהק בין גפנים עם תסמינים (1,1) לגפנים ללא תסמינים (1,0) או (0,0) בשתי השנים והכרמים. גפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0) "שוברות צבע" מוקדם מגפנים עם תסמינים (1,1) (איור 8).



איור 8- קצב התקדמות הבוחל בגפנים (1,1) (1,0) (0,0) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן).

### 3.2.2.2 סוכר (BRIX)

בבדיקות הסוכר נמצא בכרמים גשור ומ"ג בשנים 2012-2013 שגפנים ללא תסמינים (1,0) (0,0) הבשילו מוקדם יותר מגפנים (1,1), ללא קשר לנוכחות הווירוס בהם. בכרם מ"ג בשתי השנים קיים הבדל מובהק סטטיסטית לאורך כל תקופת ההבשלה והבציר בין גפנים (1,0) לגפנים (1,1) כאשר צבירת הסוכר בגפנים (1,0) דומה מאוד לגפנים (0,0). הבדל דומה בין גפנים עם וללא תסמינים שכולן נמצאו נגועות בבדיקה מולקולרית נמצא בכרם גשור ב 2012 בשני תאריכי המדידה. בשנה זו מועד הבציר נקבע לכל גפן בנפרד, ותוכנן לרמת סוכר של 24.5 בריקס. בגשור, כל הגפנים מקבוצת (1,0) נבצרו בתאריך 12.9.12 בבריסק 24.5, בעוד ששבע גפני (1,1) נבצרו כעבור 9-12 ימים והגיעו לבריסק ממוצע של 23.6. בשנה זו במ"ג כל הגפנים נבצרו בהפרש של שלושה ימים מפאת צרכי המשק. בגשור 2013 גפנים (1,1) הבשילו מאוחר מגפנים (0,0) ו (0,1) וקיים הבדל מובהק סטטיסטית בשלושה תאריכי מדידה בין גפנים (1,1) (1,0) ו (0,0) כאשר (0,0) תמיד מקדימות ברמת הסוכר (איור 9).

### 3.2.2.3 pH

בגשור בשתי השנים הייתה מגמה, לרוב מובהקת, ל  $\text{pH}$  נמוך יותר בגפנים עם התסמינים (1,1) ולא היה הבדל בין גפנים ללא תסמינים משתי הקבוצות (0,0, 1,0). במ"ג המגמה הפוכה –  $\text{pH}$  גבוה יותר בגפנים עם תסמינים, אך ההפרש היה קטן וברוב מועדי הדגימה גם לא מובהק (איור 10).

### 3.2.2.4 צבע גרגר

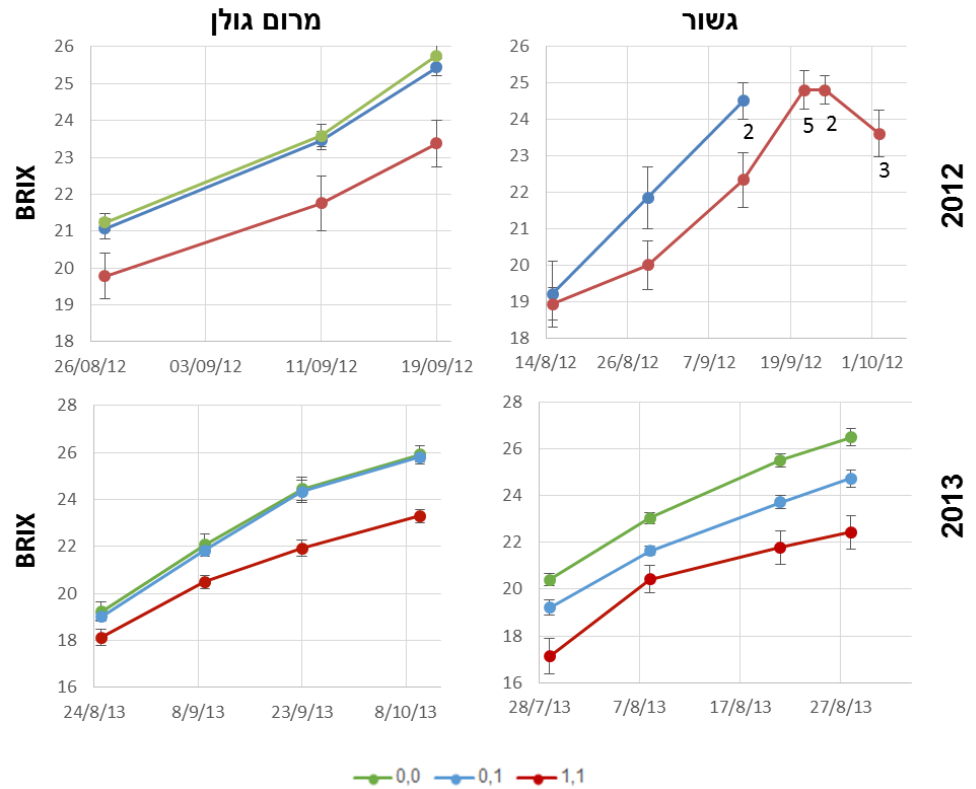
בבדיקות הצבע לגרגרים אשר נעשו במועד הבציר נמצא בגשור, בשתי השנים, שגפנים ללא תסמינים הגיעו לרמת צבע גבוהה באופן מובהק מהגפנים הנגועות עם תסמינים (1,1). בגשור 2012 קיים הבדל מובהק בין גפני (0,1) ל (1,1) ובגשור 2013 קיים הבדל מובהק בין גפנים נקיות מוורירוס (0,0) לגפנים נגועות (1,1) (איור 11). במ"ג בשתי השנים לא נמצא הבדל ברמת הצבע בין הטיפולים ולכן התוצאות אינן מובאות.

### 3.2.2.5 אנטוציאנים בתירוש

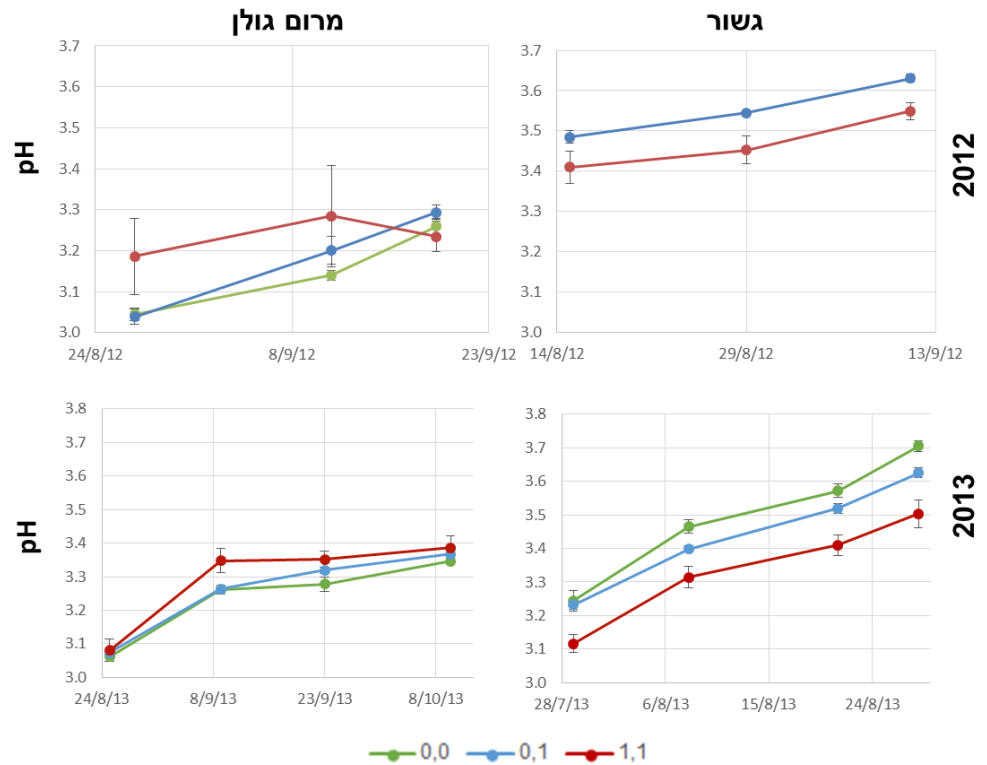
בדיקת אנטוציאן כללי בתירוש נערכה על מנת לבטא את הפגיעה בצבירת צבע בגרגר בהשפעת הוורירוס. הרכב האנטוציאנים שנמצא כולל 15 אנטוציאנים כפי שנמדד בהפרדה כרומטוגרפית RP-LC. האנטוציאנים כונו על פי סדר הופעתם במספור רץ. הערך המוצג הינו השטח תחת העקומה של כל חומר. נמצא כי קיים הבדל גדול בכמות בין אנטוציאנים שונים, לדוגמא, אנטוציאן 4 נמצא גבוה בסדרי גודל משאר האנטוציאנים. בהצגת האיורים קיימים איורים שונים לכמויות אנטוציאנים שונות. לא נמצאו הבדלים מובהקים אך ב 12 מתוך 15 האנטוציאנים המזוהים קיימת מגמה לרמה נמוכה בגפנים (1,1) ביחס לרמתם בגפנים (0,0). גפנים (1,0) במגמה דומה לגפנים (0,0) למעט חמישה אנטוציאנים בהם נמצאה רמה גבוהה בגפנים (1,0) בהשוואה לגפנים (0,0) ו (1,1). מספרי חמשת האנטוציאנים האלו הם: 5,7,8,9,15. לא קיימים הבדלים מובהקים (איור 12).

### 3.2.2.6 אנטוציאנים ביין

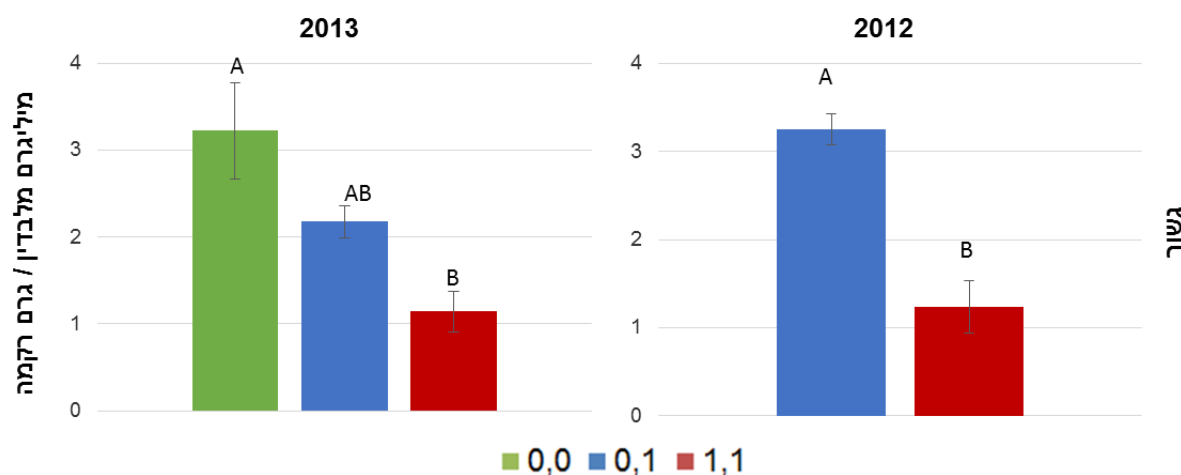
נוסף לבדיקת אנטוציאנים בתירוש, בוצעה בדיקת אנטוציאנים גם ביין, על מנת לעקוב האם השפעת הוורירוס על צבירת הצבע באה לידי ביטוי גם בתוצר הסופי- היין. בבדיקות שנערכו בשנת 2011, הרכב האנטוציאנים שנמצא כולל שבעה אנטוציאנים כפי שנמדד בהפרדה כרומטוגרפית RP-LC. האנטוציאנים כונו על פי סדר הופעתם במספור רץ. בכל האנטוציאנים שנמצאו, קיימת מגמה לרמה נמוכה יותר בגפנים המבטאות תסמינים (1,1) לעומת גפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0) ובשני אנטוציאנים (1,2) הבדל מובהק (איור 13). בבדיקות היין מעונת 2012 נמצא פרופיל של שמונה אנטוציאנים שונים. אנטוציאנים 3,7 נמצאו גבוהים בסדר גודל משאר האנטוציאנים. בשני הכרמים (גשור ומ"ג) קיימת מגמה לאנטוציאן גבוה בגפנים ללא תסמינים (0,0) ו (1,0) מאשר בגפנים עם תסמינים (1,1) למעט אנטוציאן 4 בכרם מ"ג. במ"ג בשלושה אנטוציאנים (1,2,5) קיים הבדל מובהק סטטיסטית התומך בכך. בגשור בארבעה אנטוציאנים (3,4,7,8) ישנו הבדל מובהק סטטיסטית התומך בכך (איור 14). רמת האנטוציאנים שונה בין אנטוציאנים שונים ולכן הם מוצגים באיורים נפרדים.



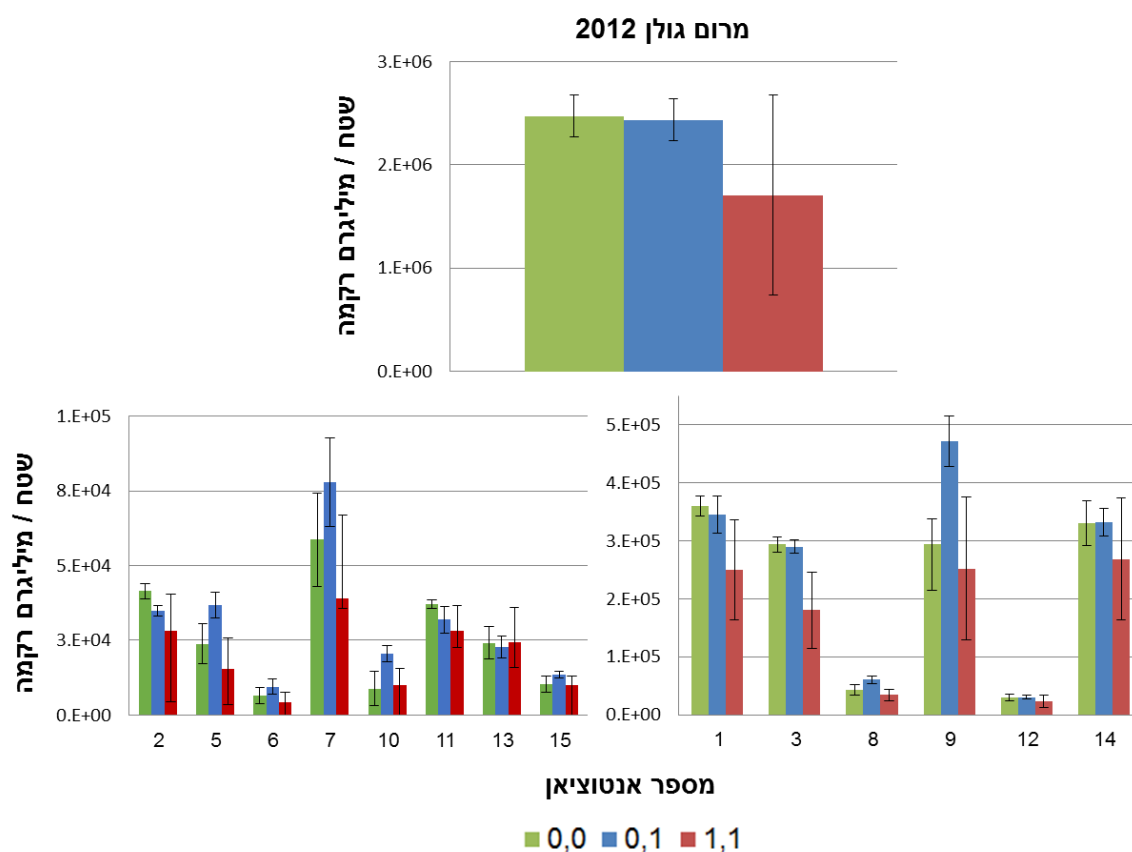
איור 9- צבירת סוכר בגפנים מהקבוצות השונות (0,0) (1,0) (1,1) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן). המספרים בתוך גרף גשור 2012 מציינים את מספר הגפנים שנבצרו בכל תאריך.



איור 10- השוואת pH בגרגרים במהלך תקופת ההבשלה (0,0) (1,0) (1,1) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן).



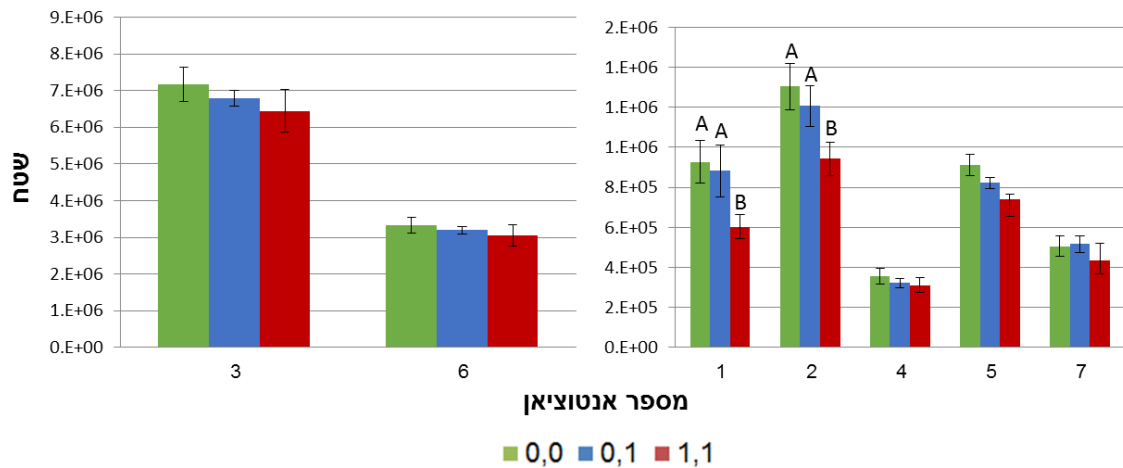
**איור 11- צבע גרגר בגפנים מהקבוצות השונות (0,0) (1,0) (1,1) בגשור במועד הבציר בשתי שנות המחקר (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן). מוצגים ערכים יחסיים על פי קריאה באורך גל 520nm.**



**איור 12- אנטוציאנים שונים מדגימות תירוש של גפנים (0,0) (1,0) ו (1,1) בכרם מ"ג בשנת 2012 (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן). הערך המוצג הינו השטח תחת העקומה של כל חומר. האנטוציאנים כונו על פי סדר ההופעה בהפרדה כרומטוגרפית RP-LC. התרשימים מפוצלים לסולם ערכים שונה של אנטוציאנים.**

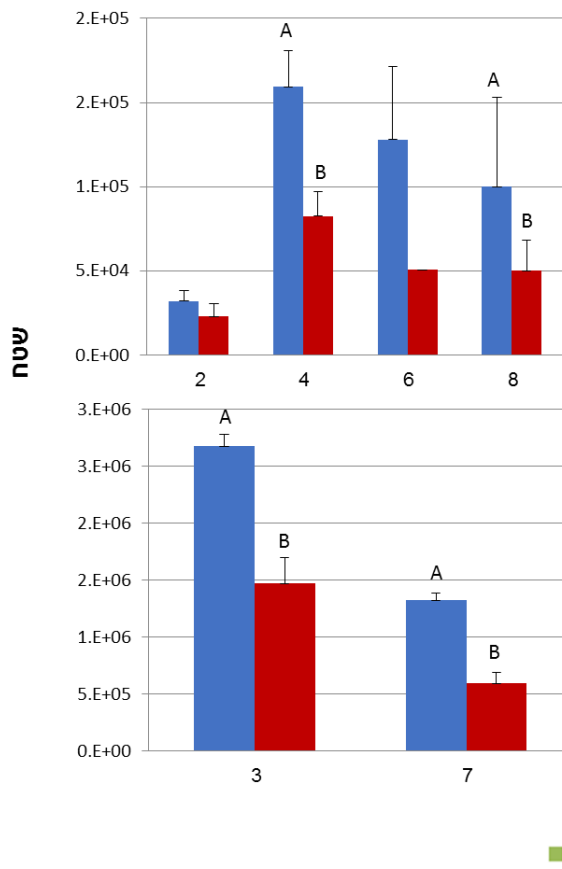


### מרום גולן 2011

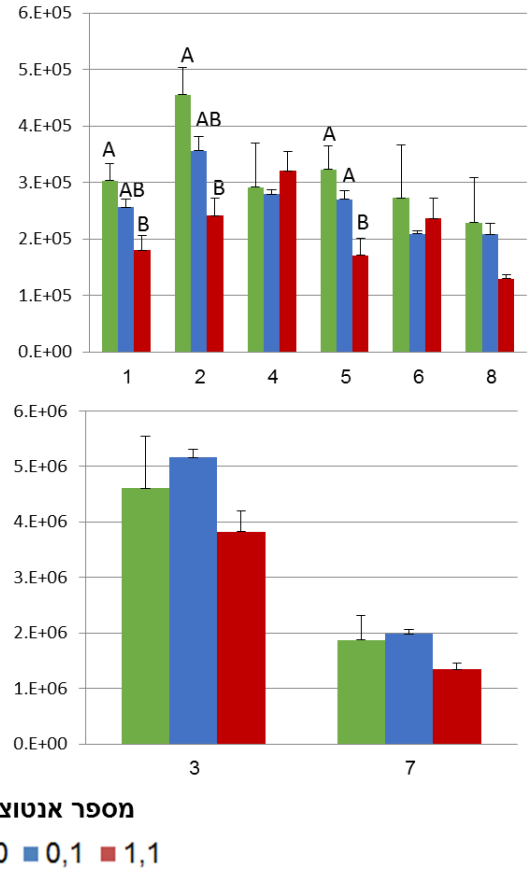


**איור 13- אנטוציאנים שונים מדגימות יין של גפנים (0,0) (1,0) ו (1,1) בכרם מ"ג בשנת 2011 (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן).**  
 הערך המוצג הינו השטח תחת העקומה של כל חומר. האנטוציאנים כונו על פי סדר ההופעה בהפרדה כרומטוגרפית RP-LC. התרשימים מפוצלים לסולם ערכים שונה של אנטוציאנים.

### גשור 2012



### מרום גולן 2012



**איור 14- אנטוציאנים שונים מדגימות יין של גפנים (0,0) (1,0) ו (1,1) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן) בשנת 2012.** הערך המוצג הינו השטח תחת העקומה של כל חומר. האנטוציאנים כונו על פי סדר ההופעה בהפרדה כרומטוגרפית RP-LC. התרשימים מפוצלים לסולם ערכים שונה של אנטוציאנים.

### 3.2.2.7 מדדים עונתיים- יבול הגפן

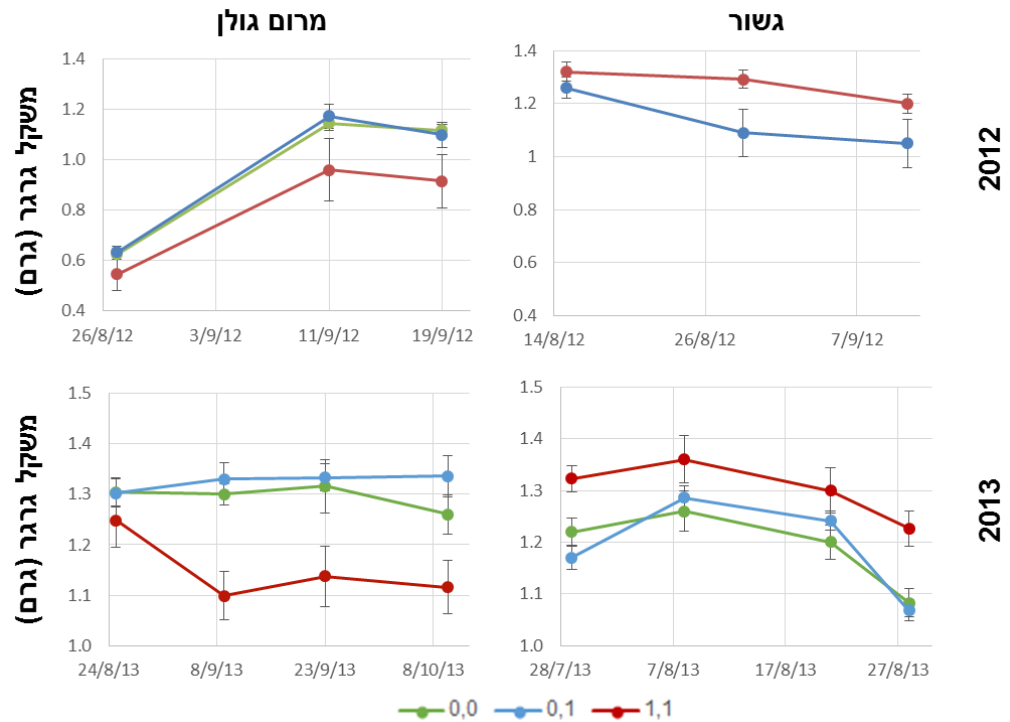
משקל היבול לגפן ומספר האשכולות לגפן בגפנים עם תסמינים (1,1) נמצאו נמוכים מגפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0), במ"ג בשתי השנים כאשר הבדל זה מובהק ב 2013. בגשור 2013 נראה שאין השפעה של נוכחות ו/או התבטאות הווירוס על היבול לגפן ומספר האשכולות ובגשור 2012 נמצא יבול גבוה ומספר אשכולות רב יותר בגפנים המבטאות תסמינים (1,1) לעומת גפנים ללא תסמינים (1,0) (טבלה 12). נוסף על מדידות היבול בבציר, נערכו מדידות בהתעוררות הגפן על מנת לבטל השפעת פעילות הכורם (דילולים וכו') בכדי לבחון את השפעת הווירוס לבדו על מדדים אלה (טבלה 13). במ"ג, מספר האשכולות עוד בהתעוררות היה נמוך בגפנים עם תסמינים (1,1) לעומת גפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0) בשתי השנים כאשר ב 2013 קיים הבדל מובהק בין גפנים (1,1) לבין גפנים (1,0). בגשור בשתי השנים לא נראה כי ישנה השפעה של נוכחות ו/או התבטאות הווירוס על מספר האשכולות. במספר השריגים בהתעוררות נראה כי קיימת מגמה למספר שריגים נמוך יותר בגפנים עם תסמינים (1,1) לעומת גפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0) במ"ג בשתי השנים ובגשור אין הבדל במדד זה בין הגפנים מהקבוצות השונות. גודל הגרגר בכרם גשור בגפני (1,1) גדול יותר מאשר בגפני (1,0). הבדל זה מובהק לאורך כל עונת 2012 וב 2013 בתאריך המדידה הראשון והאחרון. לעומת זאת, בכרם מ"ג גודל הגרגר בגפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0) גדול יותר מאשר בגפנים עם תסמינים (1,1). הבדל זה מובהק במועד הבדיקה האחרון ב 2012 ובשלושת מועדי הבדיקה האחרונים ב 2013 (איור 15). יבול מ"ג 2013 מצוין בטבלה (12) אולם חשוב לציין שקימחון השתלט על חלקת הניסוי ואשכולות רבים הורדו.

**טבלה 12- מדדי יבול בבציר- יבול לגפן, מספר אשכולות ומשקל גרגר בשני הכרמים בשנים 2012 ו 2013 . המספרים בטבלה מייצגים ממוצע של 5 גפנים לטיפול.**

כרם/קבוצה	יבול גפן (ק"ג/גפן)			מספר אשכולות			משקל גרגר (ג')		
	1,1	0,1	0,0	1,1	0,1	0,0	1,1	0,1	0,0
גשור 12	5.2	3.7		71	56		1.2	1.05	
גשור 13	4.9	5.3	5.1	53	58	48	1.23	1.09	1.05
מג 12	3.1	5.9	5.1	48	63	64	0.95	1.15	1.13
מג 13	2.7 B	4.5 A	4.5 A	32 B	48 A	47 A	1.1	1.30	1.3

**טבלה 13- מדדי יבול בהתעוררות- מספר שריגים ומספר אשכולות בשני הכרמים בשנים 2012 ו 2013 . המספרים בטבלה מייצגים ממוצע של 3 גפנים ומעלה לכל טיפול.**

כרם/קבוצה	מספר שריגים			מספר אשכולות			אשכולות לשריג		
	1,1	0,1	0,0	1,1	0,1	0,0	1,1	0,1	0,0
גשור 12	62	61		58	53		0.94	0.87	
גשור 13	70	61	49	73	72	69	1.04	1.18	1.41
מג 12	61	59	63	51	65	68	0.84	1.10	1.08
מג 13	61	68	66	48 B	69 A	61 AB	0.79	1.01	0.92



איור 15- משקל גרגר (גרם) בגפנים (1,1) (1,0) (0,0) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן) לאורך תקופת ההבשלה.

#### עצמת צימוח

מדדי הגזם אינם מצביעים על מגמה ברורה של השפעה על צימוח בין קבוצות הטיפול (טבלה 14).

טבלה 14- מדדי גזם בזמירות- מספר זמירות ועובי זמירות בשני הכרמים בשנת 2013.

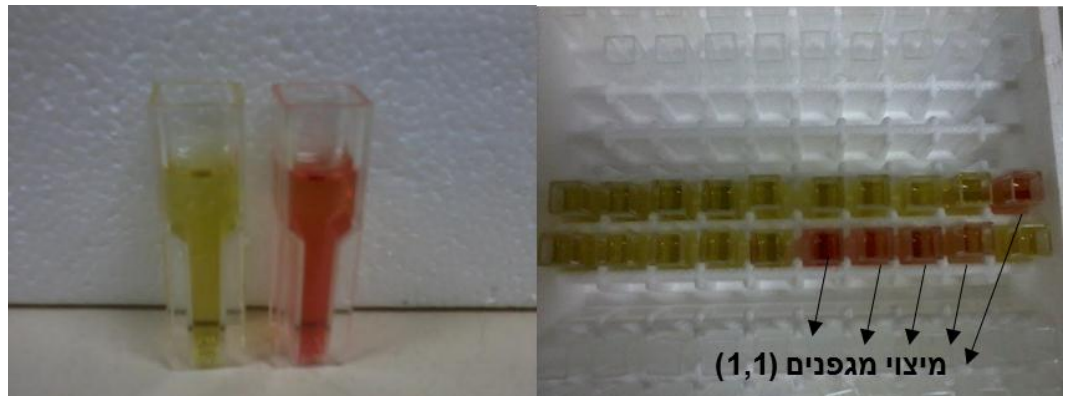
כרם ושנה	מספר זמירות			עובי זמורה		
	0,0	0,1	1,1	0,0	0,1	1,1
מג 13	37	36	38	3.7	4.1	3.8
גשור 13	28	42	36	3.4	3	3.1

### 3.2.3 מעקב במועדים פנולוגיים מוגדרים

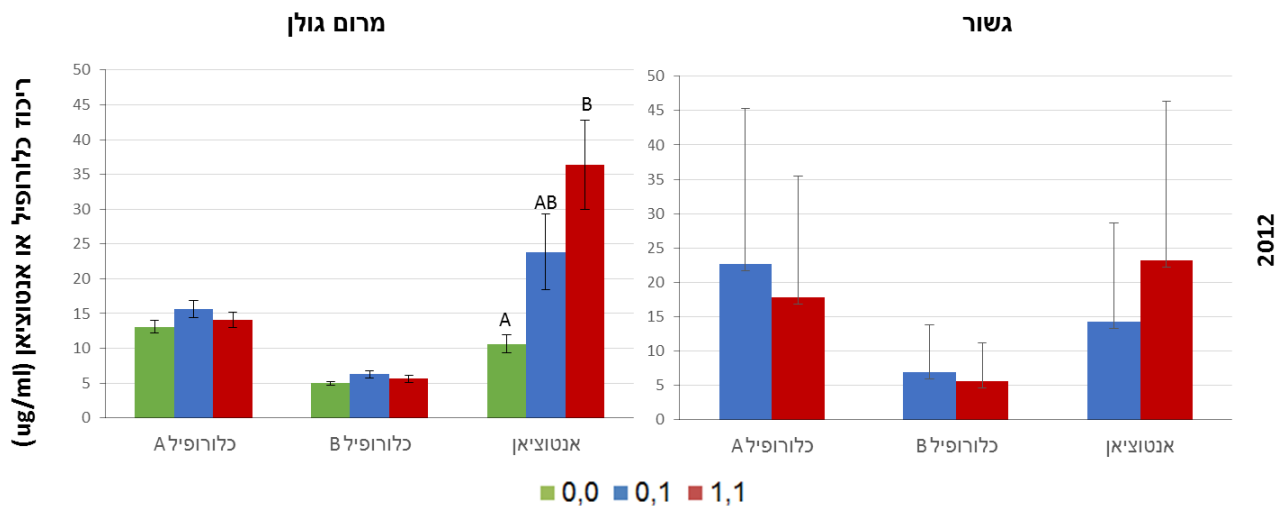
#### 3.2.3.1 פיגמנטים בעלים

גפנים (1,0) נבדקו על מנת לקבוע את השפעת הווירוס על הפיגמנטים בעלים של גפנים נגועות ללא תסמינים נראים בהשוואה לגפנים (1,1) עם תסמינים נראים ולגפנים נקיות (0,0) כביקורת. בבדיקות שנערכו ב 2012 נמצאו הבדלים רק במועד המדידה האחרון, שנערך בסתיו (23.11.12) (איור 17). הרמה של כלורופיל A נטתה להיות נמוכה יותר בגפנים המבטאות תסמינים לעומת גפנים ללא תסמינים משתי הקבוצות. ההבדלים נשמרו לאורך העונה ב 2013 (מובהק בגשור בשני המועדים 'לאחר חנטה' ו'בוכל' ובמועד 'בציר'). מגמה דומה אך לא מובהקת נמצאה עבור כלורופיל B (איור 18). כמות האנטוציאן בעלים של גפנים (1,1) במרום גולן נמצאה גבוהה במובהק בשתי השנים לעומת גפנים (0,0) וב 2013 גם לעומת גפני (0,1), במועד הבדיקה האחרון. בגשור נראתה מגמה דומה ב 2012 אך ב 2013, למרות שלא היו תסמינים בעלים נמצא יותר אנטוציאן בגפנים ללא וירוס (0,0) לעומת גפנים (1,1) כשהגפנים

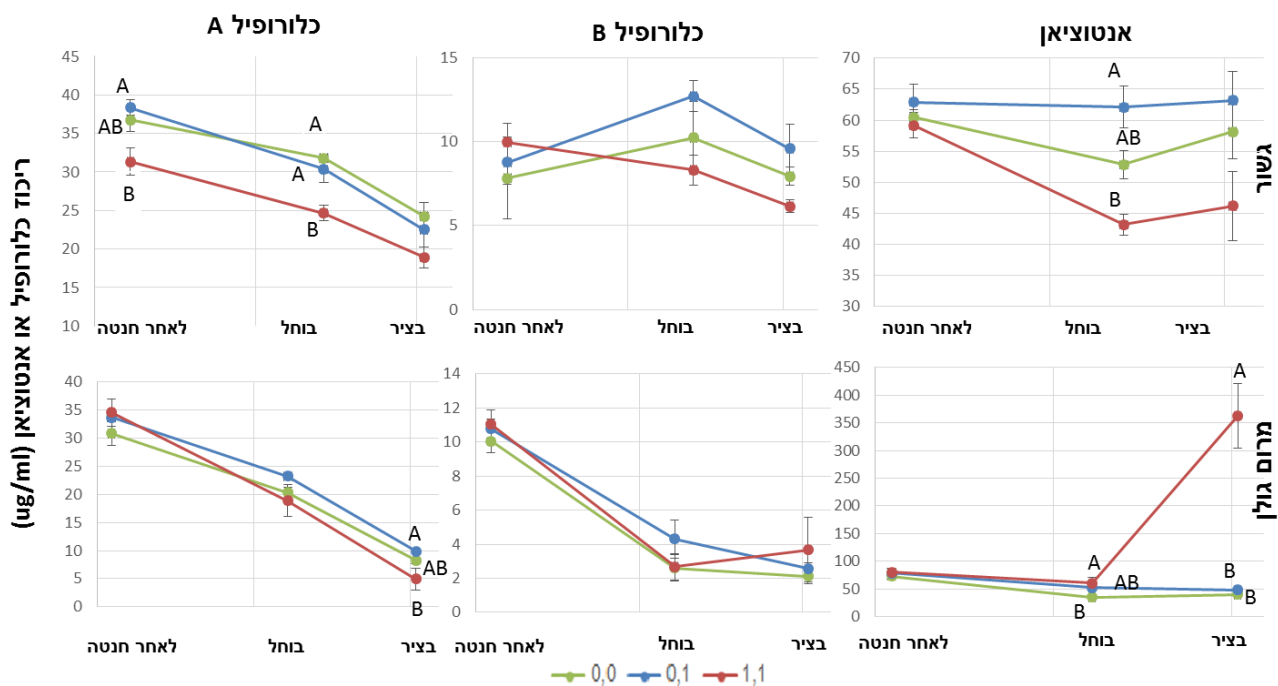
(1,0) לא נבדלות סטטיסטית משתי הקבוצות הקיצוניות (איורים 17,18). הופעת התסמינים על העלים מתרחשת סביב מועד ה'בוחל' (תלוי בשנה). בגשור 2013, בבדיקת כלורופיל B, נמצאה ירידה בגפנים (1,1) מוקדם יותר מזמן הבוחל בהשוואה לגפנים ללא תסמינים בעוד שבמ"ג לא היה שינוי בכלורופיל בין קבוצות הטיפול גם לאחר השינוי הויזואלי. בבדיקת האנטוציאן במ"ג 2013 היה הבדל בין גפני (1,1) לגפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0) רק במועד ה'בציר' (איורים 16,18) כאשר חודשיים לפני, ב'בוחל', תסמינים ויזואלים כבר נראו על העלים אולם לא נמצא הבדל במיצוי.



איור 16- מיצוי פיגמנטים מעלים עם תסמינים (1,1) וללא תסמינים (0,0) ו (1,0) (לאחר הוספת HCL לצורך בדיקת אנטוציאן) במועד הבדיקה האחרון בכרם מ"ג ב 2013. כל המיצויים מגפנים (1,1) נצבעו באדום לאחר הוספת החומצה.



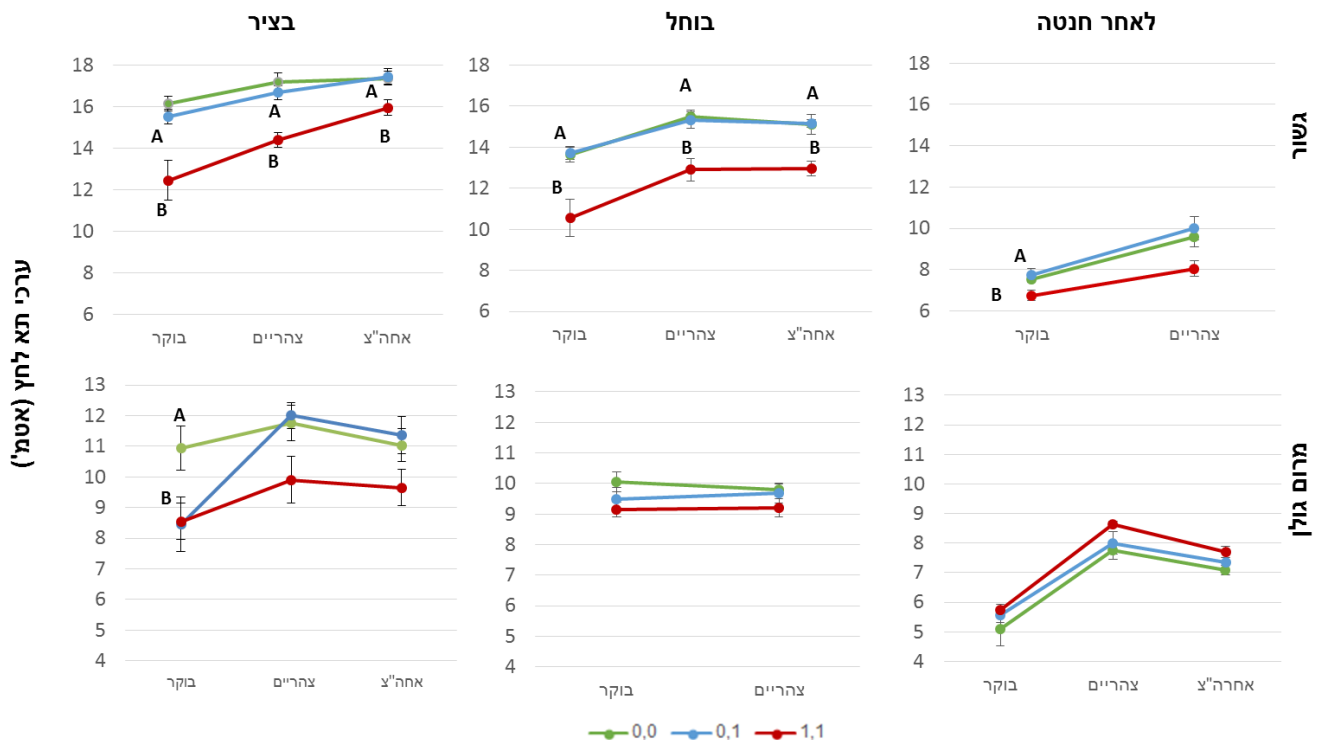
איור 17- פיגמנטים (אנטוציאן, כלורופיל A וכלורופיל B) בעלים מגפנים (1,0) (1,1) ו (0,0) בסתיו (23.11.12) בשנת 2012. (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן). הערכים התקבלו על פי קריאות באורך גל 520nm, 648nm, 664nm.



איור 18- פיגמנטים (אנטוציאן, כלורופיל A וכלורופיל B) בעלים מגפנים (0,0) ו (1,1) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן) בשלושה שלבים פנולוגיים במהלך עונת 2013. הערכים התקבלו על פי קריאות באורכי גל 520nm, 648nm, 664nm.

### 3.2.3.2 פוטנציאל מים בגזע

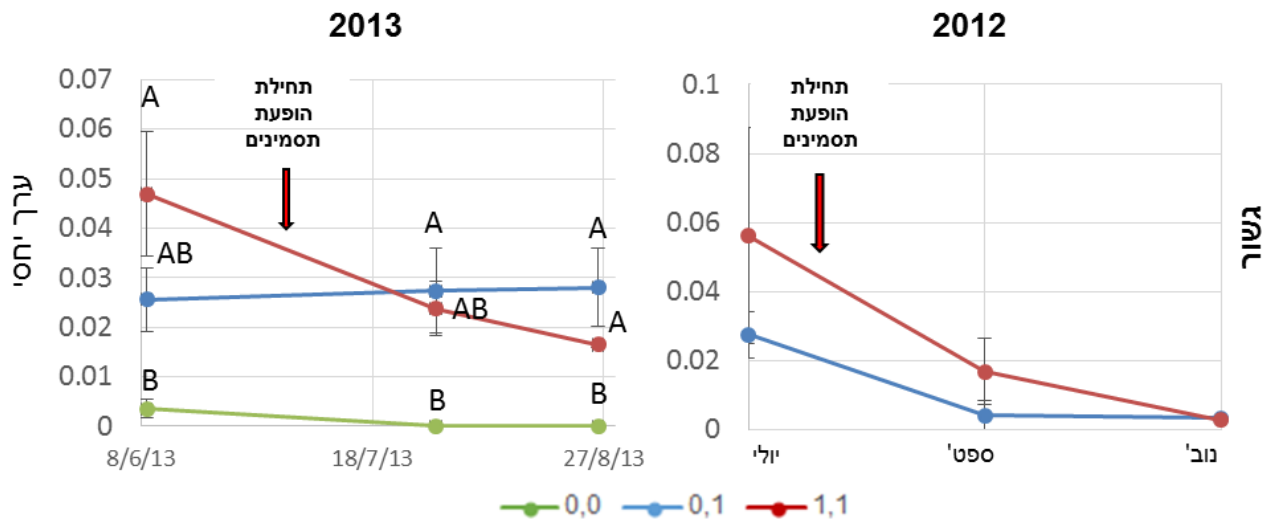
תוצאות תא הלחץ ב 2013 בגשור (בכל השלבים) ובמ"ג (למעט שלב 'לאחר חנטה') מראות מגמה לערכי תא לחץ נמוכים יותר בגפנים (1,1) לעומת גפני (1,0) ו (0,0) (פוטנציאל המים בגזע פחות שלילי- גפני (1,1) במצב מים טוב יותר). בכרם גשור קיים הבדל מובהק סטטיסטית בין גפני (1,1) לבין גפני (1,0) ו (0,0) בשלבים 'בוחל' ו'בציר' ובבוקר השלב 'לאחר חנטה'. בצהריי שלב 'לאחר חנטה', ערכי ה  $p$  שהתקבלו במבחן student's t הם: (1,0)-(1,1) :  $p = 0.09$  , (1,1)-(0,0) :  $p = 0.092$  , (1,0)-(0,0) :  $p = 0.84$  (איור 19). במ"ג בבוקר שלב ה'בציר' קיים הבדל מובהק בין גפנים נגועות (1,1) ו (1,0) לגפנים נקיות (0,0).



איור 19- תא לחץ בגפנים (1,1), (1,0) ו (0,0) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן) בשלושה שלבים פנולוגיים לאורך עונת 2013.

### 3.2.3.3 טיטר הווירוס

במהלך שתי עונות המחקר נבדק טיטר הווירוס בגפנים מהקבוצות השונות בשלושה מועדים לאורך העונה בשני הכרמים. במ"ג בשתי השנים התקבלה כמות ווירוס נמוכה מסף הרגישות של הפרוטוקול ב- PCR (איור 21) וב qRT-PCR ולכן הוחלט להתמקד בטיטר מכרם גשור. בגשור 2012 נמצאה מגמה לירידה בטיטר במהלך העונה. ירידה דומה בטיטר התקבלה בגפנים (1,1) בשנת 2013. בשנה זו, טיטר גפני (0,0) יצא דומה ל NTC. נמצאה מגמה לא מובהקת לטיטר גבוה יותר בגפני (1,1) לעומת גפנים (1,0) בתאריך הבדיקה הראשון (איור 20).



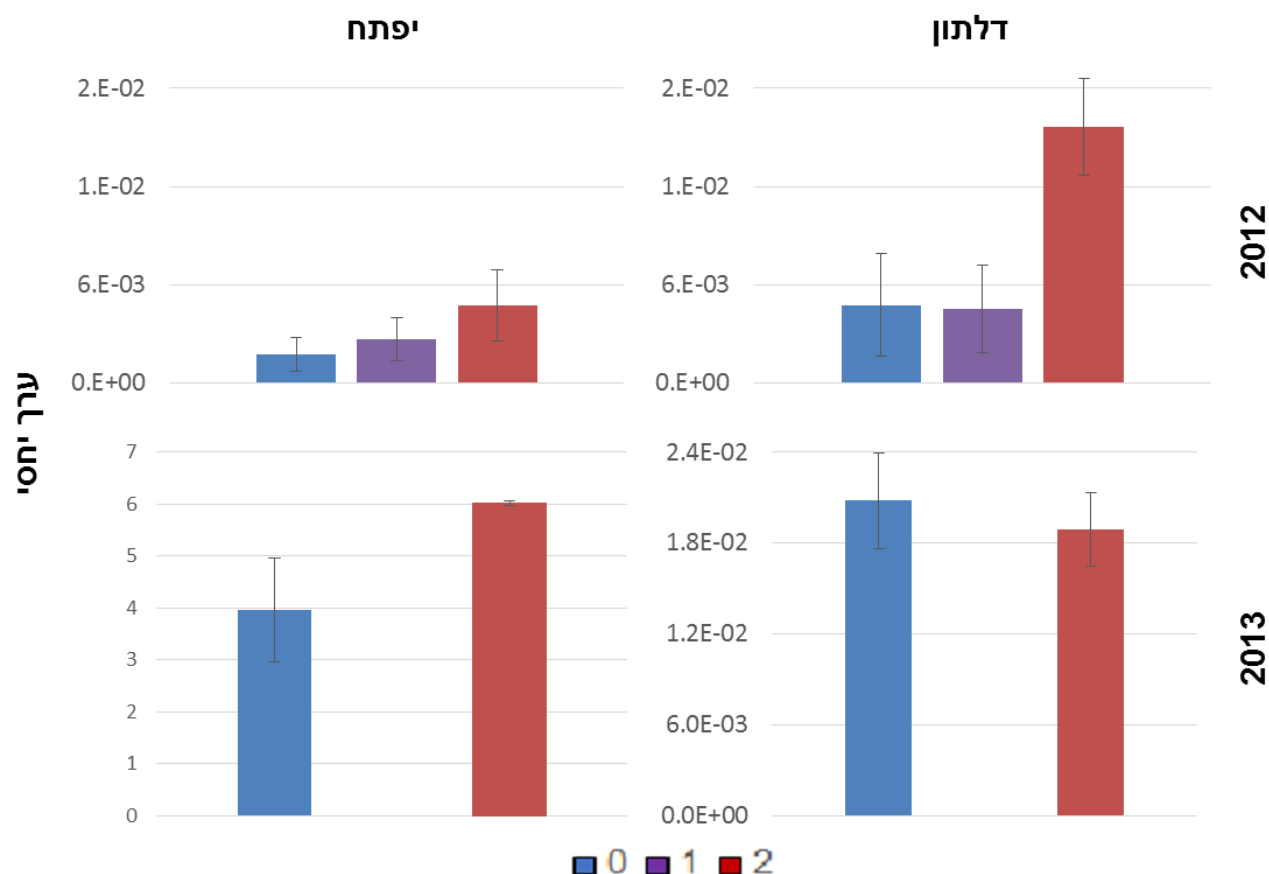
איור 20- טיטר הווירוס לגפנים (1,1), (1,0) ו (0,0) (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן) בכרם גשור בשתי שנות המחקר.



איור 21- מקטעי DNA מריאקציית PCR מגשור לעומת מ"ג שהתקבלו בבדיקה בתחילת עונת 2013. מקטעים 1-8 הם דוגמאות מכרם גשור בהם זריחה ברורה של המקטע בגודל B 187 לעומת שאר המקטעים שהתקבלו מכרם מ"ג בהם מקטעי 9,10 בגודל הרצוי אם כי בזריחה חלשה יותר ומקטעים 11,12,13,14,15 אינם בגודל הרצוי. על מנת לאתר לניסוי גפנים (0,0) ממ"ג נעשתה בהמשך ריאקציית Nested-PCR ל DNA כדוגמת 11,12 (כמתואר בסעיף 3.2.1).

### 3.2.3.3.1 הקשר בין חומרת התסמינים לטיטר הווירוס

בדיקת טיטר הווירוס בוצעה ב 2012 על שלוש דרגות התבטאות התסמינים -0 ללא תסמינים, 1- תסמינים קלים ו 2- תסמינים קשים. ב 2013 הוחלט להתמקד בשתי דרגות ההתבטאות הקיצוניות בלבד (0, 3). ב 2012 נמצאה מגמה לעלייה בטיטר הווירוס בגפנים המבטאות תסמינים בדרגת התבטאות גבוהה. בדלתון 2012 מגמה זו על סף המובהקות כאשר ערכי ה- p במבחן student's t הם  $p=0.0534$  עבור ההשוואה 4-1,  $p=0.0724$  בהשוואת דרגות 0-1 ו  $p=0.958$  בהשוואת 0-2. מגמה דומה התקבלה מבדיקות הטיטר שנערכו ב 2013 לכרם יפתח. בכרם דלתון 2013 לא נראית מגמה ברורה. בכרם יפתח 2013 התקבלה כמות וירוס גבוהה בסדרי גודל משאר התוצאות (איור 22).



איור 22- טיטר הווירוס לגפנים מדרגות התבטאות תסמינים 0,1,2 (ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן) בכרמים דלתון ויפתח בשתי שנות המחקר.



#### 4. דיון

מחלת קיפול העלים מהווה איום לענף גפן היין. איום זה נובע מכך שהמחלה פוגעת במדדי הבשלה בכרמים, דבר המשליך ישירות על איכות היין, הנמצא בקשר ישיר למחיר אותו מקבלים הכורמים. שנת 2013 התאפיינה בעודף של כרמים מניבים, המגדלים נאלצו להוריד את מחירי הענבים ולעיתים אף לא למכור. כתוצאה מכך העדפת היקבים הייתה לענבים שהגיעו למדדי איכות מספקים. עם זאת, חשוב לציין שמרבית היינות הטובים בארץ הוכנו עד כה מכרמים הנגועים ברמה כזו או אחרת במחלת קיפול העלים. בעבודה זו נלמד המופע התסמיני של מחלת קיפול העלים והוגדרה התופעה של גפנים נגועות בוורוס אשר אינן מבטאות את תסמיני המחלה. בכרמים בוגרים בהם המחלה כבר קיימת ומופצת, המופע התסמיני של המחלה נמצא כגורם המשפיע על חומרת הנזק הנגרם לענבים על ידי פגיעה במדדי איכות שונים. לצורך למידת המופע התסמיני של המחלה נסרקו גפנים בחלקות בכל תקופת ההתבטאות של המחלה ונבחן הקשר בין מועד הופעת התסמינים ודרגת חומרתם ערב הבציר. נבדקו מדדי איכות ויבול בבציר בגפנים מדרגות חומרה שונות וכן נבחן הקשר בין רמת התסמינים לטיטר הוורוס. נמצא שקיים קשר ישיר בין מועד הופעת התסמינים להתבטאות תסמיני המחלה בבציר ובין התסמינים למדדי איכות ולמדדי יבול שונים בגפן.

##### 4.1 הבדלים בתסמינים בין גפנים הגדלות בתנאים זהים

בספרות מתוארים הבדלים בהתבטאות התסמינים של המחלה בהשפעה משולבת של ווירוסים שונים, זנים שונים, כנות, מזג אוויר, קרקע, עקת יובש ופעולות בכרם וכן גפנים אשר אינן מבטאות תסמינים כלל בהשפעת גיל הגפן, זנים לבנים או כנות שונות. במחקר של (Teliz et al., 1987) מוצגת האפשרות של גפנים נגועות בוורוס קיפול העלים (GLRaV) בהן חלק מהעלים אינם מבטאים את תסמיני המחלה בעוד שחלק מהעלים באותה גפן מבטאים את התסמינים. תופעה זו מוכרת לנו מהכרמים, אולם, בעבודה הזו, לראשונה, הדגש הוא על הבדלים בתסמינים בין גפנים שונות אשר נמצאו באותם תנאים. שתילי הגפן הם מאותו זן, באותו גיל, מורכבים על אותה כנה, נטועים על קרקע זהה, פעולות המבוצעות על ידי הכורם הינן זהות וכן תנאי מזג האוויר הינם זהים. בהתבסס על דרגת התבטאות תסמיני המחלה, דורגו הגפנים בסקאלה מ-0 ל-3 תסמינים קשים. זאת למרות שבדיקה מולקולרית הראתה שכל הגפנים שנבדקו נגועות בוורוס. תופעה זו, של הבדלים בתסמינים בגפנים או יותר מכך- גפנים נגועות ללא תסמינים כמעט ואינה מוכרת בספרות (למעט מחקר אחד (Constable et al., 2012) בגפני Vinifera שאינן היברידיות וששהו בתנאים וטיפולים זהים. בגפנים היברידיות הלטנטיות נובעת מסבילות של הגפן ולא מוורולנטיות נמוכה (Kovacs et al., 2001).

##### 4.2 התבטאות תסמינים והקשר לירידה במדדי איכות ויבול בפרי

חלוקה לדרגות התבטאות של תסמיני המחלה בגפנים הנגועות בוורוס, התייחסות חדשנית כשלעצמה, הובילה למציאת קשר ברור בין התבטאות תסמיני המחלה בעלווה לירידה באיכות הפרי ולהשפעה על מדדי יבול. הצבע, הסוכר, ה pH ומשקל היבול נמצאו הולכים ויורדים עם העלייה בדרגת חומרת התבטאות התסמינים. במדדי הצבע והסוכר נמצאו הבדלים מובהקים רק בין גפנים ללא תסמינים (0) לבין גפנים עם תסמינים קשים (2) ולא בהשפעת תסמינים קלים (1). משקל הגרגר נמצא הולך ועולה עם העלייה בחומרת ההתבטאות ושוב קיים הבדל מובהק רק בין גפנים (0) לגפנים (2). בהמשך התמקדנו בגפנים ללא תסמינים אשר נמצאו נגועות בבדיקה מולקולרית (1,0) והשווינו אותן לגפנים נגועות עם תסמינים (1,1) ולגפנים נקיות מהוורוס (0,0) במעקב לאורך כל העונה. בין גפנים (1,0) לגפנים (1,1) נמצאו הבדלים לאורך העונה במדדים שונים. החל משלב הבוחל, גפנים (1,0) "שברו צבע" מוקדם

באופן מובהק מגפני (1,1) ובאופן דומה לגפנים נקיות מהווירוס (0,0). תופעה זו חזרה בשני הכרמים ובשתי שנות הבדיקה (איור 8). בספרות שנמצאה מוצגת תופעה של איחור בבוחל בין גפנים נגועות לנקיות. על סמך מאמר הסקירה (Charles et al., 2006) איחור זה יכול להיות כחודש ימים. לא נמצא מידע אודות הבוחל בגפנים נגועות ללא תסמינים. גפני (1,0) המשיכו להבדל מגפני (1,1) בצבירת סוכר בגרגר. בשלוש מתוך ארבע בדיקות שנערכו לאורך העונה, (מ"ג 2012+2013, גשור 2012) גפנים (1,1) פיגרו אחרי גפנים (1,0) ובבציר הגיעו (1,1) לבריקס נמוך בכ- 2.5 יח' לעומת הגפנים הנגועות ללא תסמינים (1,0) אשר צברו סוכר באופן דומה לגפנים (0,0) (איור 9). לעומת זאת, בספרות, גפנים נגועות ללא תסמינים (היברידיים או גפנים מזנים לבנים) הראו ירידה בצבירת סוכר לעומת גפנים נקיות (0,0). בגפנים מזן לבן הירידה בסוכר בגפנים הנגועות ללא תסמינים הייתה בסביבות 2 יחידות בריקס לעומת הגפנים הנקיות. במקרה אחד בעבודה זו (גשור 2013) התקבלה תוצאה דומה לזו כאשר גפנים (1,0) צברו סוכר לאורך העונה ברמה פחותה מאשר גפנים (0,0) ובבציר הגיעו לבריקס נמוך ב- 2 יח' מגפנים ללא ווירוס. גם במקרה זה עדיין נמצא הבדל מובהק בין הגפנים הנגועות עם וללא תסמינים. מדד הצבע הושפע ביותר מהנגיעות וניתן לראות בשתי שנות הניסוי הבדל בין גפנים עם וללא תסמינים. ההבדל בא לידי ביטוי הן בסך הצבע כפי שנימדד אחרי מיצוי באתנול חומצי בענבים מגשור והן בבדיקה המפורטת בכרומטוגרפית RP-LC בענבים בה נמצאה מגמה לאנטוציאן נמוך בגפנים (1,1) לעומת גפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0). מעניין שבבדיקת הצבע בענבים אחרי התססה (יין), בשתי השנים ובשני הכרמים, ההבדלים בין גפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0) לבין גפנים עם תסמינים (1,1) התחדדו והפכו למובהקים בשנים עד ארבעה מהאנטוציאנים. מבחינת מדדים של יכול, למעט משקל גרגר, לא נמצאה ספרות העוסקת בגפנים נגועות ללא תסמינים. בעבודה זו, משקל הגרגר נמצא הולך ועולה עם העלייה בהתבטאות התסמינים בכרמים גשור, דלתון ויפתח. בבדיקה פרטנית בגשור ובמ"ג, נמצא בגשור גרגר גדול יותר בגפנים (1,1) מאשר בגפנים (1,0) ב 2012 וב 2013. ב 2013 גודל הגרגר בגפנים (1,0) דומה לזה של (0,0). הבדלים מובהקים התומכים בכך נמצאו בארבע מתוך שבע מדידות בגשור בשתי השנים. לעומת זאת, במ"ג בגפנים נגועות המבטאות תסמינים (1,1) נמצא גרגר קטן לעומת גפנים נגועות ללא תסמינים (1,0). בגפנים (1,0) גודל הגרגר דומה לזה של גפנים (0,0) (איור 15). בשונה מהתוצאות שלי, בספרות, בגפנים היברידיים עם נגיעות לטנטית (1,0) משקל הגרגר נמצא נמוך יותר מאשר בגפנים הנקיות (0,0) (Kovacs et al., 2001).

#### 4.3 התסמינים בקורלציה חזקה לאופי השנה בהשפעת הטמפרטורה

בבחינת הקשר בין מועד הופעת התסמינים וחומרתם ערב הבציר, נמצא שכל שהגפן מקדימה להראות תסמינים, מספר ימים רב יותר מהבציר, כך חומרת התבטאות התסמינים בזמן הבציר גבוהה יותר (איור 5). בניתוח התוצאות משלוש השנים או הכרמים, נמצאה קורלציית ספירמן חזקה יותר לשנים מאשר לכרמים (טבלה 9). כמו כן נמצא הבדל ברור בין שיפועים לינאריים המייצגים את קצב התפתחות התסמינים בין השנים השונות (בין 2011 ו 2013  $p=0.0548$ ) לעומת הבדל זניח בהשוואה בין הכרמים ( $p > 0.3$ ). תוצאה זו מרמזת על כך שיותר מאשר מאפייני הכרם עצמו הכוללים זן, קלון, כנה, שנת נטיעה, קרקע, גובה הכרם, גורם המאפיין את השנה הנבדקת הוא המשפיע על הקשר בין מועד התבטאות תסמיני המחלה לחומרתם בערב הבציר. השפעת השנה ניכרת גם בדרגת חומרת התסמינים הממוצעת לכלל הכרם בשנה ספציפית. בשלושת הכרמים החומרה הממוצעת ירדה משנת 2011 ל 2012 ואילו בין השנים 2012 ל 2013 דרגת הנגיעות הממוצעת לכרם עלתה בכרמים גשור (קברנה) ויפתח (מרלו) וירדה בכרם דלתון (קברנה) (תוצאות אינן מובאות). מבדיקה רב שנתית של נתונים מטאורולוגים נמצא שימי המעלה מעל  $35^{\circ}\text{C}$  בשנים 2011, 2012 ו 2013 הם 22,48,20 בגשור 3,14,7 בדלתון ו 12,29,14 ביפתח בהתאמה. עובדה זו מסתדרת

עם הירידה בממוצע דרגת התבטאות התסמינים מ 2011 ל 2012 והעלייה בין 2012 ל 2013. שיעור הגפנים המבטאות תסמינים (מכל הדרגות) לעומת הגפנים ללא תסמינים (דרגה 0) יורד בין 2011 ל 2012 בכרמים יפתח ודלתון ואילו בגשור בשנים אלה, שיעור הגפנים המבטאות תסמינים עלה. לעומת זאת בין השנים 2012 ל 2013 הייתה עלייה בכל הכרמים בשיעור הגפנים המבטאות תסמינים (איור 6). העלייה בשיעור הגפנים המבטאות תסמינים בגשור בין 2011 ל 2012 יכולה להיות מוסברת על ידי כך שהנגיעות בוורוס הלכה והתפשטה בחלקה ואיתה גם הביטוי. בהסתכלות על הגפן הבודדת, נמצא שדרגות חומרת התסמינים ערב הבציר אינן קבועות משנה לשנה (אם כי קשה להסיק מסקנות חותכות אודות חוסר אחידות בדרגת התסמינים בין השנים כיוון שהחלוקה לדרגות היא במידה מסוימת סובייקטיבית וספציפית לכרם ולשנה הנבדקים). אולם יתרה מכך, ישנה תופעה של גפנים המבטאות תסמינים בשנה מסוימת ובשנה העוקבת לא מבטאות תסמינים. עובדה זו קלה יותר להגדרה והיא חד משמעית. בגשור ודלתון 10.3% ו 8.6% (בהתאמה) מכלל הגפנים אשר ביטאו תסמינים ב 2011 לא הראו תסמינים ב 2012. תופעה שחזרה גם בין 2012 ל 2013 - 7.8% ו 5% (בהתאמה) (טבלה 10). חיזוק לממצא זה נמצא במעקב הממוקד כשגפנים שנבחרו במ"ג בסוף עונת 2011 לשמש כגפנים (1,1) על סמך תסמינים לא הראו תסמינים בסוף עונת 2012. תופעה דומה נראתה גם בגשור: בסוף עונת 2011 נבחרו גפנים על סמך תסמינים ברורים לקבוצת (1,1) שבסוף עונת 2012 הראו תסמינים חלשים.

במחקר שנערך באוסטרליה בין השנים 2006-2009 הדביקו גפנים מזן שיראז ב GLRaV3 ובדקו את תסמיני הווירוס באופן ויזואלי ואת נוכחותו בשתי שיטות בדיקה (אלייזה ו PCR) בשני אזורי אקלים (קר ו חם). בשנה הראשונה שלאחר ההדבקה, 3/5 מהגפנים באזור החם נמצאו נגועות כאשר רק גפן אחת הראתה את התסמינים ואילו באזור הקר 4/5 גפנים נמצאו נגועות בבדיקות המעבדה ורק שתי גפנים הראו תסמינים. בשנה השנייה, בכל אחת מהחלקות כל הגפנים היו נגועות והראו תסמינים ויזואליים. לעומת זאת, בשנת המדידה השלישית, לא נראו תסמינים על אף אחת מהגפנים בשני האזורים וכולן נמצאו נגועות. הכותבת מציינת שביטוי התסמינים משתנה מעונה לעונה ושהתרשמות ויזואלית בלבד אינה מספיקה בכדי לזהות נגועות. הסיבות לשינוי בתסמינים בשיראז לא ידועים אך הכותבת משערת שטמפרטורה חמה באופן קיצוני ( $40^{\circ}\text{C}$ ) בשני אתרי הבדיקה במהלך כמה ימים בפברואר (חצי כדור דרומי) השפיעו על טיטר הווירוס או על תגובת הצמח לווירוס (Constable et al., 2012). במאמר של Ben salem וחוב' (2006) מציינים הכותבים כי בהשפעת טמפרטורות חמות שיכפול הווירוס עוכב וכך נמנעה הופעת התסמינים על העלים. יש לציין שגורמים כמו חורף חם או כמות משקעים עלולים להשפיע אף הם אולם לא נבדקו במסגרת עבודה זו.

#### 4.4 הקשר בין הופעת תסמינים לנוכחות וטיטר הווירוס

בבדיקת הטיטר של הווירוס בגפנים אשר דורגו לדרגות התבטאות תסמינים שונות באותו כרם (באותם תנאים) שנערכה בעבודה זו (כרמים דלתון ויפתח), נמצא שקיימת, לרוב, מגמה לטיטר גבוה יותר בגפנים בעלות דרגת תסמינים קשה (2) מאשר לגפנים ללא תסמינים (0). בדלתון 2012 מגמה זו על סף המובהקות כאשר ערך ה- $p$  במבחן student t נמוכים בהשוואה בין דרגת התסמינים הגבוהה לנמוכות,  $p=0.0534$  בהשוואה של דרגות אחת ושתיים, ו  $p=0.0724$  בהשוואת שתיים עם אפס ואילו בין שני המופעים הנמוכים (אפס ואחד) לא נמצא כל הבדל ( $p=0.958$ ). בדלתון 2012, בין גפנים נגועות ללא תסמינים (דרגה 0) לגפנים נגועות עם רמת תסמינים חלשה (דרגה 1) לא נמצא הבדל בטיטר. ביפתח 2013 נמצא טיטר גבוה בשני סדרי גודל משאר התוצאות (איור 22) תופעה שאין לנו הסבר לגביה ודורשת איסוף נתונים מכרמים ועונות רבים יותר. בהמשך התמקדנו בגפנים הנקיות (0,0), הנגועות המבטאות

תסמינים (1,1) המקבילות לגפנים בעלות תסמינים בפתח ודלתון והנגועות ללא תסמינים (1,0) (שבדיעבד דומות לגפנים מדרגה אפס בדלתון ופתח) ובחנו את טיטר הווירוס בשני הכרמים הממוקמים בצפון ובדרום רמה"ג. ניתן להתייחס לשלוש השוואות: 1. בין הכרמים 2. שלושת קב' ה'טיפול' בתוך כל כרם 3. בין שלושת המועדים הפנולוגיים של כל גפן בפני עצמה. 1. לא נמצא קשר בין טיטר הווירוס לחומרת התבטאות התסמינים (אשר באה לידי ביטוי בבדיקת אנטוציאנים בעלים) בין הכרמים. בכרם מ"ג הופעת התסמינים ברורה ומשמעותית לעומת כרם גשור (בבציר 2013, כמות אנטוציאן במ"ג פי 9 מאשר בגשור) (איורים 17,18) ואילו טיטר הווירוס, במ"ג נמוך משמעותית לעומת גשור (איורים 20,21). בשתי שנות הניסוי כמות הווירוס הנמוכה במ"ג לא נבדלה מה NTC, כנראה בשל סף הרגישות של הפרוטוקול ב qRT-PCR וב PCR או הפריימרים ששימשו לעבודה. התבטאות התסמינים החלשה בגשור יכולה להיות מוסברת שוב, על ידי גורם הטמפרטורה. בגשור, כפי שצויין, קיימות טמפרטורות גבוהות אשר גורמות, לדעתנו, לביטוי חלש של התסמינים. ממוצעי ימי המעלה מעל 35°C במ"ג וגשור הם שמונה ו 48 ב 2012 ו שלוש ו 20 ב 2013 בהתאמה. מהספרות עולה כי טמפרטורות קרות מעודדות היווצרות אנטוציאנים (Mori et al., 2006; Yamane et al., 2007) ויתכן וזה ההסבר לתסמינים החזקים יותר. גורמים אפשריים נוספים לכמות ווירוס פחותה בכרם מ"ג לעומת גשור יכולים להיות גיל הכרם, הקלון או חומר הריבוי. הכרם במ"ג היה בן ארבע בתחילת הניסוי בעוד שהכרם בגשור היה בן תשע בתחילת הניסוי. במ"ג חומר הריבוי נלקח ממרחביה והקלון הוא "רמה"ג". בגשור חומר הריבוי נלקח מיזרעם והקלון הוא "R22". לבחינה של כל אחד מגורמים אלה דרושה עבודה נוספת. רמזים להשפעה של גיל הכרם על התבטאות תסמינים מופיעים בעבודה של Sampol וחבריו (2013) אך כמו אצלנו, גם שם מדובר בשני כרמים שונים שנבדלו גם במיקום ובטיפול ואין נתונים לגבי מקור חומר הריבוי. 2. בעבודה זו בדיקת הטיטר לאורך העונה נעשתה בכרמים גשור ומ"ג אך ההתייחסות בדיון היא רק לתוצאות מגשור כיוון שבמ"ג הטיטר היה נמוך ואינו נבדל מה NTC. בתוך כרם גשור, נמצאה מגמה לא מובהקת לטיטר גבוה בגפנים המבטאות תסמינים (1,1) לעומת גפנים ללא תסמינים (1,0). מגמה זו באה לידי ביטוי בשני המועדים הראשונים בשנת 2012 ובמועד הראשון בשנת 2013. ב 2012 לא מצאנו בגשור גפנים ללא וירוס ואילו ב 2013 נמצא טיטר גבוה בגפני (1,0) ו (1,1) לעומת (0,0). הבדל זה מובהק סטטיסטית כאשר טיטר גפני (0,0) נמצא דומה ל NTC (איור 20). 3. מהשוואת כל גפן (1,1) מכרם גשור בפני עצמה, בשלושת המועדים הפנולוגיים, ראיתי בעבודתי מגמת ירידה בטיטר ממדידה למדידה. בעבודה בה השתמשו ב qRT-PCR ניתן לראות שטיטר הווירוס הולך ועולה בפטורות (שלקוחות מהחלק התחתון, אמצעי ועליון של הצמח) ממאי ועד ליוני-יולי ואז חלה ירידה בטיטר. (Tsai et al., 2012). בעבודה שלי, המדידה הראשונה מתרחשת רק ביוני (2013) או יולי (2012) ואולי זו הסיבה לכך שאצלי נראית רק ירידה. עבודה נוספת בה עשו שימוש ב qRT-PCR מתארת ירידה בטיטר לקראת סוף העונה (Fiore et al., 2009). לעומת זאת, עבודה אחרת הצביעה רק על עליה בטיטר לאורך העונה (Wright, 2012). הסבר אפשרי נוסף לירידה המוקדמת בטיטר בין מדידת 'לאחר חנטה' למדידת 'בוחל' יכול להיות שוב, השפעת הטמפרטורה. בין החודשים יולי לספטמבר (2012) או בין יוני לספטמבר (2013) הייתה התחממות שגרמה כנראה לעצירת השכפול של הווירוס וכך לירידה בטיטר (Ben salem-Fnayou et al., 2006). הירידה בטיטר הווירוס במהלך העונה מנוגדת לעובדה שתסמיני הווירוס מתפתחים עם הזמן וככל שהבדיקה היוזואלית תיערך במועד מאוחר יותר בעונה כך חומרת התבטאות התסמינים תהיה גבוהה יותר. כלומר, הירידה הנצפית בטיטר באה בקורלציה הפוכה לרמת התסמינים אשר הולכת ועולה עם ההתקדמות בעונה. עובדה זו, יחד עם ההבדלים הלא מובהקים ממדידות דלתון, יפתח וגשור מובילים אותי למסקנה שהקשר טיטר- תסמינים הוא קשר חלש ולא מובהק.

סיכום ביניים- ראינו קשר ברור בין מועד הופעת התסמינים לחומרתם ערב הבציר. ראינו שחומרת התסמינים משליכה על מדדי איכות ויבול בגפן. קשר חזק נראה בין הופעת התסמינים לשנה הנבדקת ובפרט, לטמפרטורה אופיינית לשנה ולכרם. טמפרטורה גבוהה עלולה למסך על הופעת התסמינים ולגרום להיחלשותם. קשר חלש ולא מובהק קיים בין הטיטר והופעת התסמינים אשר בא לידי ביטוי בעיקר בדרגות התבטאות קשות של הווירוס (הטיטר בגפנים עם מעט תסמינים (1) דומה לגפנים ללא תסמינים (0)). חשיבות הטיטר לדעתנו באה לידי ביטוי בשלב 'לאחר חנטה' (כלומר קרוב לתחילת העונה) ובהמשך, עם העלייה בטמפרטורות הקשר טיטר-תסמינים נחלש ובמקומו ההשפעה החיצונית, הגורם הסביבתי, הופך למשמעותי יותר כלומר מתהדק הקשר טמפרטורה- תסמינים. על סמך תוצאות אלה, לא ניתן להשתמש בטיטר הווירוס כמדד לתסמינים ולהיפך, בתסמינים כמדד לכמות הווירוס. ניתן ויש משמעות לבדיקה מוקדמת של טיטר הווירוס שתאפשר לחזות את חומרת התסמינים הצפויים וכך ניתן יהיה להעריך את איכות היבול העתידית. הערכות כאלו יוכלו לסייע בחישוב מידת ההשקעה הכלכלית שהיקב/כרם מוכן להשקיע בחלקה הספציפית ואולי אף להחליט על נטישת הכרם. יש מקום להמשיך ולבדוק באופן מעמיק בתוך אותו כרם את השפעת דרגת התסמינים על הטיטר לאורך העונה.

#### 4.5 האם התסמינים משפיעים על האיכות או שיש גורם נוסף המשפיע על להתבטאות התסמינים ?

בפרקים הקודמים ראינו שדרגת התסמינים משפיעה על מדדי איכות. עם זאת, בעבודה זו בוצעו בדיקות על הגפנים משלוש הקבוצות השונות בשלב 'לאחר חנטה', שהוא שלב הקודם להופעת התסמינים או בסמוך לתחילת הופעת התסמינים כאשר התסמינים עדיין חלשים. הבדיקות שבוצעו בשלב 'לאחר חנטה' הן שיעור הבוחל, בדיקת פיגמנטים ובדיקות תא לחץ. בחלק מהמדדים הללו, כבר ניכרים הבדלים בין גפנים (1,1) לגפנים (1,0). לדוגמא, בבדיקת שיעור הבוחל אשר התרחשה בסמוך לתחילת הופעת התסמינים על העלים, כאשר דרגת ההתבטאות הייתה נמוכה, ניכר הבדל מובהק בשני הכרמים והשנים בין גפנים עם תסמינים (1,1) לגפנים ללא תסמינים (1,0) ו (0,0). בגפנים עם תסמינים שיעור הבוחל תמיד נמצא מאוחר מאשר בגפנים ללא תסמינים. עובדה זו עשויה להצביע על כך שלא בהכרח הופעת התסמינים ו/או חומרתם הם אלה המשפיעים על איכות הפרי. יתכן וקיים גורם נוסף בגפן אשר גורם לעיכוב בהבשלה בין גפנים (1,1) לגפנים (1,0) ובהמשך השפעת גורם זה ניכרת גם בהופעת תסמיני המחלה.

#### 4.6 השערות לגורמים להופעת תסמינים על העלים

אחת ההשערות בהקשר להופעת תסמינים על עלים של גפנים הנגועות במחלת קיפול העלים קשורה למצב המים של הגפן. מעבודתנו עולה כי גפנים נגועות המבטאות תסמינים (1,1) מצויות, במצב מים טוב יותר מאשר גפנים נגועות ללא תסמינים (1,0) או גפנים נקיות מהמחלה (0,0). אמרה זו כוללת את כל המדידות שנערכו בשני הכרמים להוציא את מדידת 'לאחר חנטה' במ"ג בה בשל טעות ניתנה השקיה ביום המדידות. תוצאה זו עולה בקנה אחד עם תוצאות עבודת הגמר של רושנסקי וחובי (2013) אשר בוצעה גם כן במסגרת מיזם הווירוס, במו"פ צפון. בעבודה שלו תסמינים חזקים יותר נראו בגפנים שקיבלו עודף השקיה בעוד שגפנים עם עקת היובש ביטאו תסמינים מאוחר יותר או שביטאו בדרגת חומרה פחותה. לעומת זאת, במאמר סקירה מציינים הכותבים שגפנים עם עקת יובש ביטאו את תסמיני המחלה במועד מוקדם יותר (Maree et al., 2013). השאלה מדוע בגפנים נגועות המבטאות תסמינים (1,1) מצב מים טוב יותר לעומת גפנים נגועות ללא תסמינים (1,0) או גפנים נקיות (0,0) היא כמו שאלת הביצה והתרנגולת: אפשרות אחת היא שכיוון שהגפן במצב מים טוב יותר לוירוס "נוח" יותר להשתלט ולהתבסס עליה. אפשרות שנייה היא שנוכחות הווירוס (או התבטאותו, במקרה שלנו) גורמת בדרך כלשהי למצב מים טוב יותר של הגפן. נוכחות הווירוס גורמת לפירוק תאי שיפה ובעקבות כך סוכר לא מועבר מהמקור (עלים) למבלע (פרי). הצטברות הסוכר בעלה גורמת ליצירת עמילן (Hoefert and Gifford, 1967). נוסף להצטברות העמילן, ישנה הצטברות של טנינים בתאי הפרנכימה של גפנים נגועות (von der brelie 1982). בנוסף, ישנן עדויות לוויסות ביצירת פלבנואידים בגפנים

נגועות המבטאות תסמינים (1,1). דבר המוביל ליצירת צבע אדום/סגול בעלים (Gutha et al., 2010). הסוכרים והעמילן בעלה גורמים לעליית גנים הקשורים ליצירת אנטוציאן (Vega et al., 2011). על ידי מנגנון משוב שלילי (feedback), הצטברות הסוכר גורמת להאטה בתהליך הפוטוסינטזה ובכך להאטה ביצירת סוכר.

השפעת מחלת קיפול העלים על הפוטוסינטזה מוזכרת בספרות אך השפעת הביטוי התסמיני של המחלה על הפוטוסינטזה לא ברורה. חלק מהעבודות מראות שהפגיעה בפוטוסינטזה קשורה להופעת התסמינים ובחלקם מוצג מצב בו פגיעה בפוטוסינטזה ובצמיחת הגפן יכולה להתרחש כאשר הגפן נגועה אך תסמינים ויזואליים אינם נראים. בבדיקה פרלמינרית שבוצעה במסגרת מ"פ צפון, בשנת 2010 בכרם שעל, בזנים מרלו וקברנה סוביניון נבדקה הפוטוסינטזה בעלים מדרגות תסמינים שונות באותה גפן נגועה. הפוטוסינטזה בעלים המבטאים תסמינים (בדרגה נמוכה או גבוהה) ירדה באופן מובהק בהשוואה לעלים ללא תסמינים, בשני הזנים (תוצאות לא מובאות).

#### 4.7 סיכום

הנגיעות הרבה במחלת קיפול העלים בכרמים לא מותירה אפשרויות רבות לטיפול וההתייחסות עד כה הייתה לעצם נוכחות הווירוס. מכלול הממצאים מעבודתנו, מגדיר לראשונה את ההבדלים והקשר בין טיטר הווירוס, התבטאות התסמינים ואיכות הפרי בהשוואה בין כרמים באתרים שונים ובין גפנים נגועות באותו כרם הגדלות באותם תנאים. עם זאת, לא מצאנו את הגורם להתבטאות השונה של התסמינים בגפנים נגועות. אנחנו משערים כי יצירת התסמינים מושפעת מרמת הווירוס בתחילת העונה אשר יוצרת שרשרת תגובות ובעיקרן פירוק תאי שיפה, הצטברות עמילן שמעודדת מחד היווצרות אנטוציאן בעלים (תסמינים) ומאידך גורמת לעיכוב של המערכת הפוטוסינטטית, על ידי מנגנון משוב שלילי. עיכוב ההטמעה מאפשר סגירת פיוניות וכך שמירה על מצב מים טוב יותר בגפנים עם תסמינים.

לחומרת התבטאות התסמינים השפעה על מדדי האיכות בתוך הכרם הבודד. בין כרמים, לא ניתן להשוות את התבטאות התסמינים החזקים או החלשים ולהשליך מכך על האיכות הנגזרת מכל כרם. ראינו שהופעת התסמינים מושפעת מטמפרטורה ובהשפעת טמפרטורות חמות הופעת התסמינים נחלשת. גורמים נוספים כגון השקייה עשויים להפחית את עצמת התסמינים ובדיקה מעמיקה של רמות שונות של השקייה, במועדים שונים והשפעתן על התבטאות התסמינים יכולה לסייע במציאת פתרונות אופרטיביים בהתמודדות עם המחלה. דרכים אלו ונוספות אשר יפחיתו את התבטאות התסמינים יאפשרו להגיע למדדי איכות ויבול מספקים ליצירת יין טוב גם בכרם נגוע. ממצאי העבודה הנוכחית מראים כי קיים קשר בין מועד הופעת התסמינים לחומרתם בבציר וכן כי איכות הענבים משתנה ונמצאת בקשר טוב עם חומרת התבטאות התסמינים בעלים. ניתן להשתמש במעקב אחר מועד הופעת התסמינים כדי להעריך את איכות הענבים בבציר. בעבודה זו לא הצלחנו להראות קשר ישיר בין התסמינים והטיטר, כולל בגפנים בודדות עליהן ביצענו בדיקות שונות ומעקבים לאורך שתי עונות. לצורך בחינת קשר זה נדרשת בדיקה מעמיקה נוספת בכרמים רבים יותר לאורך העונה.

- Akbaş, B., Kunter, B., and Ilhan, D. (2009). Influence of leafroll on local grapevine cultivars in agroecological conditions of Central Anatolia region. *Horticultural Science (Prague)* **36**, 97-104.
- Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Daubert, S., Koonin, E. V., and Rowhani, A. (2012). Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus research* **163**, 302-309.
- Atallah, S. S., Gómez, M. I., Fuchs, M. F., and Martinson, T. E. (2012). Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *American journal of enology and viticulture* **63**, 73-79.
- Ben salem-Fnayou, A., Gugerli, P., Zemni, H., Mliki, A., and Ghorbel, A. (2006). Decreased Detectability of Grapevine Leafroll-associated virus 3 in Sakasly Grapevines Cultivated Under the Sahara Conditions. *Journal of Phytopathology* **154**, 528-533.
- Brelie, D., and F. Nienhaus. (1982). Histological and cytological studies on the infectious leafroll disease of the grapevine. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **89**, 508-517.
- Cabaleiro, C., and Segura, A. (1997). Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 373-378.
- Cabaleiro, C., Segura, A., and García-Berrios, J. J. (1999). Effects of Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 on the Physiology and Must of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño Following Contamination in the Field. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 40-44.
- Chamberlain, E. (1967). Leaf roll virus in the grapevines. *Wine Review* **4**, 29-32.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113-116.
- Charles, J., Cohen, D., Walker, J., Forgie, S., Bell, V., and Breen, K. (2006). A review of Grapevine Leafroll associated Virus type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry. *Report to New Zealand wine growers, HortResearch*.
- Constable, F., Connellan, J., Nicholas, P., and Rodoni, B. (2012). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays and reverse transcription-polymerase chain reaction for the reliable detection of Australian grapevine viruses in two climates during three growing seasons. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **18**, 239-244.
- Dolja, V. V., Kreuze, J. F., and Valkonen, J. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus research* **117**, 38-51.
- Fiore, N., Prodan, S., and Pino, A. (2009). Monitoring grapevine viruses by ELISA and RT-PCR throughout the year. *Journal of Plant Pathology* **91**, 489-493.

- Gambino, G., Bondaz, J., and Gribaudo, I. (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology* **114**, 397-404.
- Golino, D., Sim, S., Gill, R., and Rowhani, A. (2002). California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture* **56**, 196-201.
- Golino, D. A. (1993). Potential interactions between rootstocks and grapevine latent viruses. *American journal of enology and viticulture* **44**, 148-152.
- González, E., Mosquera, M., San José, M., and Diaz, T. (1997). Influence of virus on the chlorophyll, carotenoid and polyamine contents in grapevine microcuttings. *Journal of Phytopathology* **145**, 185-187.
- Guidoni, S., Mannini, F., Ferrandino, A., Argamante, N., and Di Stefano, R. (1997a). The Effect of Grapevine Leafroll and Rugose Wood Sanitation on Agronomic Performance and Berry and Leaf Phenolic Content of a Nebbiolo Clone (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enology and Viticulture* **48**, 438-442.
- Guidoni, S., Mannini, F., Ferrandino, A., Argamante, N., and Di Stefano, R. (1997b). Effect of virus status on leaf and berry phenolic compounds in two wine grapevine *Vitis vinifera* cultivars. In "V International Symposium on Grapevine Physiology 526", pp. 445-452.
- Gutha, L., Casassa, L., Harbertson, J., and Naidu, R. (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology* **10**, 187.
- Hoefert, L. L., and Gifford, E. M. (1967). "Grapevine leafroll virus - history and anatomic effects," [s.n.], Berkeley.
- Hull, R. (2001). "Plant virology," Gulf Professional Publishing.
- Kerem, Z., Bravdo, B.-A., Shoseyov, O., and Tugendhaft, Y. (2004). Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography A* **1052**, 211-215.
- Kovacs, L. G., Hanami, H., Fortenberry, M., and Kaps, M. L. (2001). Latent Infection by Leafroll Agent GLRaV-3 Is Linked to Lower Fruit Quality in French-American Hybrid Grapevines Vidal blanc and St. Vincent. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 254-259.
- Krake, L. (1993). Characterization of grapevine leafroll disease by symptomatology. *Australian & New Zealand Wine Industry Journal* **8**, 40-44.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In "Methods in Enzymology" (R. D. Lester Packer, ed.), Vol. Volume 148, pp. 350-382. Academic Press.
- Ling, K.-S., Zhu, H.-Y., Petrovic, N., and Gonsalves, D. (2001). Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting grapevine leafroll-associated closterovirus-3 in field samples. *American journal of enology and viticulture* **52**, 21-27.



- Mannini, F., Argamante, N., and Credi, R. (1995). Improvements in the quality of grapevine 'Nebbiolo' clones obtained by sanitation. *Strategies to Optimize Wine Grape Quality* 427, 319-324.
- Mannini, F., Gerbi, V., and Credi, R. (1997a). Heat-treated V. Virus-infected grapevine clones: agronomical and enological modifications. In "International Symposium on the Importance of Varieties and Clones in the production of Quality Wine 473", pp. 155-164.
- Mannini, F., Guidoni, S., Ferrandino, A., Argamante, N., and Credi, R. (1997b). Photosynthesis and grape composition of a *Vitis vinifera* clone after virus sanitation. In "12th Meeting of the international council for the study of viruses and virus-like diseases of the grapevine (ICVG), Lisbon, Portugal", pp. 155-156.
- Maree, H. J., Almeida, R. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V., Fuchs, M. F., Golino, D. A., Jooste, A. E., and Martelli, G. P. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in microbiology* 4.
- Martelli, G. (2012). Grapevine virology highlights 2010-2012. In "17 th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, Proceedings... Davis USA", pp. 13-31.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G. C., and Yoshikawa, N. (2002). The family <b>Closteroviridae</b>; revised. *Archives of Virology* 147, 2039-2044.
- Martelli, G. P., Viruses, I. C. f. t. S. o., Grapevine, V. D. o. t., Food, and Nations, A. O. o. t. U. (1993). "Graft-transmissible Diseases of Grapevines: Handbook for Detection and Diagnosis," Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- McKissock, A. (1964). Two important virus diseases of grapevines in New Zealand. *New Zealand Journal of Agriculture* 108, 332-339.
- Monis, J., and Bestwick, R. K. (1996). Detection and localization of grapevine leafroll associated closteroviruses in greenhouse and tissue culture grown plants. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 199-205.
- Monis, J., and Bestwick, R. K. (1997). Serological detection of grapevine associated closteroviruses in infected grapevine cultivars. *Plant disease* 81, 802-808.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., and Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of experimental botany* 58, 1935-1945.
- Moutinho-Pereira J, Correia C.M. Gonçalves B, Bacelar EA, Coutinho JF, Ferreira HF, Lousada JL, Cortez MI (2012) Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and -3) on the physiology of the Portuguese grapevine cultivar 'Touriga Nacional' growing under field conditions. *Ann. App. Biol.* 160: 237-249.
- Mullins, M. G., Bouquet, A., and Williams, L. E. (1992). "Biology of the grapevine," Cambridge University Press.

- Nimmo-Bell (2006) The economic effects and financial impact of GLRaV3. A Nimmo-Bell Publication, March 2006: pp. 1-18. Wellington, New Zealand.
- Over de Linden, A., and Chamberlain, E. (1970). Effect of grapevine leafroll virus on vine growth and fruit yield and quality. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **13**, 689-698.
- Pacifico, D., Caciagli, P., Palmano, S., Mannini, F., and Marzachì, C. (2011). Quantitation of Grapevine leafroll associated virus and Grapevine virus A Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected *Vitis vinifera* L. 'Nebbiolo' by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* **172**, 1-7.
- Panattoni, A., D'Anna, F., and Triolo, E. (2007). Antiviral activity of tiazofurin and mycophenolic acid against Grapevine Leafroll-associated Virus 3 in *Vitis vinifera* explants. *Antiviral research* **73**, 206-211.
- Paul, M. J., and Foyer, C. H. (2001). Sink regulation of photosynthesis. *Journal of experimental botany* **52**, 1383-1400.
- Péros, J. P., Berger, G., and Jamaux-Despréaux, I. (2008). Symptoms, Wood Lesions and Fungi Associated with Esca in Organic Vineyards in Languedoc-Roussillon (France). *Journal of Phytopathology* **156**, 297-303.
- Petersen, C. L., and Charles, J. G. (1997). Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology* **46**, 509-515.
- Rodrigo, P. P. A., Kent, M. D., Vaughn, A. B., Blaisdell, G. K., Monica, L. C., Etienne, H., and Gerhard, P. (2013). Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Sambrook, J. (1989). Fritsch, EF and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY* **267**, 9289-9293.
- Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H., and Flexas, J. (2003). Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* **160**, 403-412.
- Savino, V., Boscia, D., and Onghia, A. (1991). Effect of heat therapy and meristem tip culture on the elimination of grapevine leafroll-associated closterovirus type III. In "10. Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine, Volos (Greece), 3-7 Sep 1990". ORES.
- SAS, J. (2008). JMP Statistics and Graphics Guide, Version 7. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina.
- Schoeffling, H. (1980). First results of a field-trial on the performance of heat-treated and non heat-treated white Riesling clones. In "7th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Niagara Falls, Canada".
- Sokolsky, T., Cohen, Y., Zahavi, T., Sapir, G., and Sharon, R. (2013). Potential efficiency of grapevine leafroll disease management strategies using simulation and real spatio-temporal disease infection data. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **19**, 431-438.

- Teliz, D., Tanne, E., Gonsalves, D., and Zee, F. (1987). Field serological detection of viral antigens associated with grapevine leafroll disease. *Plant disease* **71**, 704-709.
- Tsai, C. W., Daugherty, M. P., and Almeida, R. P. P. (2012). Seasonal dynamics and virus translocation of Grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. *Plant Pathology* **61**, 977-985.
- Ueno, K., Kinoshita, K., Togawa, H., and Iri, M. (1985). Improvement of the wine quality by elimination of grapevine leafroll virus. *Journal of the Brewing Society of Japan* **80**, 490-495.
- Vega, A., Gutiérrez, R., Peña-Neira, A., Cramer, G., and Arce-Johnson, P. (2011). Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Molecular Biology* **77**, 261-274.
- Walton, V., and Pringle, K. (2004). Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), a key pest in South African vineyards. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic* **25**, 54-62.
- Wolpert, J. A., and Vilas, E. P. (1992). Effect of Mild Leafroll Disease on Growth, Yield, and Fruit Maturity Indices of Riesling and Zinfandel. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 367-369.
- Wright, S. K. (2012). Grapevine Leafroll associated Virus-3 (GLRaV-3) Seasonal Titer Changes and Effects on Pinot Noir Fruit in Oregon. *Collections*.
- Yamane, T., Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Koshita, Y., and Kobayashi, S. (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *American journal of enology and viticulture* **57**, 54-59.

דו"ח מופ צפון, בחינת השימוש בשיטת "הבלבול" להדברת קמחית הגפן בכרם, (2012).

דו"ח מסכם, מיזם הפחתת נזקי וירוסים בכרמי יין, (2013).

מיכל אקרמן (2010) השפעת הכנה על מדדי צימוח, הבשלה ואיכות יין בזנים מרלו וקברנה סוביניון. עבודת גמר הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית הואניברסיטה העברית בירושלים רחובות.

ישי רושנסקי (2013) השפעת השקייה על התבטאות וירוס קיפול העלים 3 בגפן ועל איכות הפרי. עבודת גמר הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית הואניברסיטה העברית בירושלים רחובות (טרם הוגשה).

לאה נווה (1987) מעקב אחר וירוסים הקשורים למחלת התקפלות עלים בגפן בעזרת אליזה ובשיטות של היברידיזציה מולקולרית עבודת גמר הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית הואניברסיטה העברית בירושלים רחובות.

## נספחים

פירוט בדיקות לנוכחות וירוס ותסמינים ויזואליים לצורך חלוקת הגפנים לקבוצות הטיפול.

PCR 2013	PCR 2012	PCR 2011	תסמינים 2013	תסמינים 2012	תסמינים 2011	גפן	כרם	T"ס	PCR 2013	PCR 2012	PCR 2011	תסמינים 2013	תסמינים 2012	תסמינים 2011	גפן	כרם	T"ס
	-	-	-	-	-	1	מ"ג	43			+			-	1	גשור	1
	+	+	-	-	-	2	מ"ג	44			+			-	2	גשור	2
		+				3	מ"ג	45			+			-	3	גשור	3
	+	+	-	-	-	6	מ"ג	46			+			-	4	גשור	4
	+	+	-	-	-	7	מ"ג	47			+			-	5	גשור	5
	+	+	+	-	-	8	מ"ג	48			+			-	6	גשור	6
	-	-	-	-	-	9	מ"ג	49			+			-	7	גשור	7
	+	+	-	-	-	10	מ"ג	50		+	+	+	-	-	8	גשור	8
	+	+	-	-	-	12	מ"ג	51		+	+	-	-	-	9	גשור	9
		+			-	13	מ"ג	52			+			-	10	גשור	10
	-	-	-	-	-	14	מ"ג	53			+			+	11	גשור	11
	+	+	-	-	-	15	מ"ג	54			+			+	12	גשור	12
		+			+	16	מ"ג	55		+	+	+	+	+	13	גשור	13
	+	+	+	+	+	17	מ"ג	56			+			+	14	גשור	14
		-	+		-	18	מ"ג	57		+	+	+	+	+	15	גשור	15
	-	-	-	-	-	19	מ"ג	58			+			+	16	גשור	16
		-	-	-	-	20	מ"ג	59			+			+	17	גשור	17
		-	-	-	-	21	מ"ג	60		+	+	+	+	+	18	גשור	18
	-	-	-	-	-	22	מ"ג	61			+			+	19	גשור	19
		-		-	-	23	מ"ג	62			+			+	20	גשור	20
	-	-	-	-	-	24	מ"ג	63		-		-	-		21	גשור	21
		-		-	-	25	מ"ג	64		-		-	-		22	גשור	22
	+	+	+	+	+	26	מ"ג	65		-		-	-		23	גשור	23
		+			+	27	מ"ג	66		-		-	-		24	גשור	24
	+	+	+	+	+	28	מ"ג	67		-		-	-		25	גשור	25
	+		+	+		29	מ"ג	68		-		-	-		26	גשור	26
	+		+	+		30	מ"ג	69		+		-	-		27	גשור	27
	-		-	-		33	מ"ג	70		-		-	-		28	גשור	28
										-		-	-		29	גשור	29
										+		+	+		33	גשור	30
										+		+	+		34	גשור	31
										+		-			42	גשור	32
										+		-			43	גשור	33
										+		-			44	גשור	34
										+		-			45	גשור	35
										+		-			46	גשור	36
										+		+			47	גשור	37
										+		-	-		48	גשור	38
										+		-	-		49	גשור	39
										+		-	-		50	גשור	40
										+		-	-		51	גשור	41
										-		-	-		52	גשור	42
סה"כ גפנים לקבוצה בעונה המחקרית																	
כרם	קבוצה / שנה	תחילת 2012	תחילת 2011	תחילת 2012	תחילת 2013	כרם	קבוצה / שנה	תחילת 2012	תחילת 2011	תחילת 2012	תחילת 2013	כרם	קבוצה / שנה	תחילת 2012	תחילת 2011	תחילת 2012	תחילת 2013
גשור	0,0	0	0	0	6	מ"ג	0,0	0	0	0	6	מ"ג	0,0	0	0	0	5
גשור	0,1	10	2	10	11	מ"ג	0,1	10	2	10	11	מ"ג	0,1	10	2	10	8
גשור	1,1	10	10	6	6	מ"ג	1,1	10	10	6	6	מ"ג	1,1	10	10	6	5

development, while as the temperatures rise, the correlation between titer and symptoms becomes weak and the environmental factors influence the disease development. significant in effecting the symptoms appearance. High temperatures may cause mild symptoms while low temperature induce symptoms appearance. Based on these results, virus titer cannot be used to asses symptom severity and vice versa. Differences in stem water potential and the start of veraison were found before or very close to symptom appearance on the leaves. This suggests that the observed symptoms are not the only cause for fruit quality reduction. Infected symptomatic vines (1,1) have a less negative water potential compared to vines without symptoms (1,0) (0,0). The model we suggest is that virus infection causes a blockage of sugar transport from the leaves and sugar accumulation in leaves encourages biosynthesis of anthocyanin in the leaves (symptom expression). At the same time the accumulation of carbohydrates suppresses the photosynthesis system, by a negative feedback apparatus causing stomatal closure thus improving water status in symptomatic vines. Our results define for the first time the relations between virus titer, symptoms expression and fruit quality both between vineyards in different locations and between vines growing in the same vineyard under similar condition. With that, we did not find the factor causing different expression of symptoms in infected vines. This study relates for the first time to different disease levels and their effect on fruit quality. We show a correlation between the dates of symptoms appearance and their severity at harvest. The date of symptom appearance can help assessing the grape quality at harvest. Methods that will reduce symptoms appearance in infected vines will allow better grape quality and yield for the production of good wine in an infected vineyard.

plays a major role in symptom expression. The percentage of symptomatic vines has decreased from 2011 to 2012 in two vineyards, while from 2012 to 2013, there was a rise in the rate of symptomatic vines in all three inspected vineyards. During three years of research in the above mentioned vineyards 5-10% of the symptomatic vines did not display symptoms in consecutive years. Levels of sugar, pH and berry color were affected by the severity of symptoms. The level of sugar in mild symptom vines (23.9%) was not significantly different from vines without symptoms (25.1%), while the two were significantly different from vines with severe symptoms (21.9%). The level of berry color in vines with severe symptoms was found to be significantly different from vines without symptoms and not significantly different from vines with mild symptoms. The results show a trend of lower yield in vines with symptoms, however, berry size in those vines was significantly big compared with healthy or infected vines without LR symptoms. No difference was found in the virus titer measured by qRT PCR between vines without symptoms to vines with mild symptoms and a trend was found to high titer in vines with severe symptoms. In two vineyards (one in the north and one in the south of the Golan) individual vines were selected at the end of each season, for specific trait measurements during the following season. Vines were selected by symptoms and the presence of the virus as tested with nested PCR. The specific trait measurements were conducted on each vine within the following three groups: 1. (0,0) – healthy vines 2. (1,1) – infected vines with symptoms 3. (1,0) – infected vines without symptoms. It was found that infected vines without symptoms (1,0) are similar in most measurements to healthy vines more than to infected vines with symptoms. The veraison rate was significantly slower in vines with symptoms compared to vines without symptoms (1,0) (0,0). Sugar levels were low in (1,1) vines compared to (1,0) and (0,0). Berry color in 2012 and 2013 harvest in the southern vineyard (Gshur) was lower in (1,1) vines and kept showing low anthocyanin in RPLC chromatographic separation of must and wine samples. In terms of berry size, opposite trends were found between the two vineyards. No correlation was found between the symptoms level and virus titer in the two vineyards. In the northern vineyard of Merom Golan the virus titer was similar to NTC and lower compared to the titer found in Gshur vineyard. In contrast, the symptom in Merom Golan were much stronger than in Gshur as shown by the leaf anthocyanin levels which were two and nine times higher in Merom Golan in 2012 and 2013 respectively. The correlation between symptoms expression and virus titer In Gshur vineyard, in the two years, was weak and not significant. As the season progressed, symptom became stronger while the virus titer became lower (June to harvest). We suggest that the virus titer at the beginning of the season (until fruit set) might correlate with symptom

## **Symptom expression of Grapevine Leafroll disease caused by GLRaV3 and its effects on physiology and quality measures of grapes in the north of Israel.**

### **Summary**

Grapevine Leafroll Disease (GLD) is one of the most widespread viral diseases of grapevine and is associated to the presence of Closteroviridae. Nine viruses related to this disease are known in the world today (Grapevine Leafroll associated Virus-GLRaV1-9). GLRaV1 and GLRaV3 are the more prevalent species and in Israel, as in many countries, number three is considered the most harmful. In infected vines, the yield and quality of the fruit are damaged. The loss of quality is measured in low accumulation of sugar and in the berry color content, which lowers the quality of the wine produced. GLRaV-3 is considered a major threat to the production of premium red wine worldwide. So far, no treatment was found for treating infected vines. Measures of coping with the disease include preventing the disease from reaching the vineyard by creating clean mother plants, preventing or slowing the disease spread within the vineyard by use of pesticides, "male confusing" its vector (*Planococcus ficus*) and last, by uprooting infected vines. Symptoms of the disease are well known and include a change in leaf color (in red cultivars) and sometimes leaf roll. With that, there appears to be a difference in the expression of the infection between vineyards, furthermore, differences were seen between vines which were in the same conditions within one vineyard. In older vineyards, where infection rates reached 50-100%, a question rises as to the meaning of the uneven expression of the infected vines.

The goal of this work is to study the expression of the Grapevine Leafroll Disease and its effects on physiology and quality measures in the vines. In order to achieve this goal, we focus on the following aspects 1. Examination of the seasonal and perennial dynamics of the symptoms performance in the vineyards. 2. Examination of the effects of the symptoms severity on yield and quality. 3. Measurement of the vine traits (quality, yield, physiology) of specific infected vines, with or without symptoms, as compared to healthy vines as a reference. 4. Examination of the relation between symptoms expression and the virus titer. This study found a correlation between the date of the symptoms appearance and their severity level at harvest. The rate (slope) of symptom development is influenced by the year more than by the specific vineyard. This suggests that the weather in the growing season