

הפקולטה למדעים  
תכנית מוסמך מחקרי בביוטכנולוגיה

פיתוח שיטה מולקולרית לזיהוי פטריות קומפלקס האסקה בגפנים בישראל, ובהינתן הדינמיקה של פיזור הנבגים בזמן ובמרחב בכרם

Developing a molecular tool to detect Esca associated fungi in Israeli grapevines and understanding spatial and temporal spore dispersal in the vineyard

עבודת גמר לשם מילוי חלקי של הדרישות לקבלת התואר "מוסמך מחקרי בביוטכנולוגיה"

מאת

שם משפחה בעברית:  
פייקוב  
שם משפחה באנגלית:  
Paikov

שם פרטי בעברית:  
וסבולוד  
שם פרטי באנגלית:  
Vsevolod

בהנחיית:

ד"ר ורד נאור, מכון שמיר לחקר הגולן, קצרין  
פרופ' סגולה מוצפי, מיג"ל, קריית שמונה

מחלקה

חתימת מנחה

שם המנחה

הוגשה לוועדת עבודות גמר בתאריך:  
תאריך :

חתימת הסטודנט: \_\_\_\_\_ תאריך: \_\_\_\_\_  
חתימת המנחה: \_\_\_\_\_ תאריך: 28.7.21  
חתימת ראש החוג: \_\_\_\_\_ תאריך: \_\_\_\_\_



## תודות

תודה על תהליך הלמידה המשמעותי שעבר לא רק דרך הכרמים, החממה, המעבדה וספסל הלימודים, אלא גם דרך הקשרים הנפלאים עם האנשים בדרך. האנשים שתמיד היה להם חיוך, ידע רב, רצון אמיתי לחלוק ולהתעניין.

תודה מיוחדת למנחות ד"ר ורד נאור ופרופ' סגולה מוצפי על ההזרחה בכל שלבי העבודה, על התשובות לשאלות, על תשומת הלב הרבה והמעורבות. תודה לצוות המעבדה רוני ברקאי נטע וייס ורימה ברודליי, ד"ר דוד עזרא ממכון וולקני, ד"ר ליאור גור ממכון שמיר, גלית בוט מיקבי רמת הגולן וד"ר תרצה זהבי.

7.....	רשימת איורים וטבלאות
8.....	רשימת קיצורים
9.....	תקציר
10.....	1. מבוא
11.....	2. רקע
11.....	2.1 מחלת האסקה – היקף הבעיה בעולם ובישראל
12.....	2.1.1 תסמיני המחלה
12.....	2.1.1.1 תסמינים חיצוניים
14.....	2.1.1.2 תסמיני גזע
14.....	2.2 בעיות בניטור המחלה
15.....	2.3 הפטריות המעורבות בקומפלקס
15.....	2.3.1 <i>Phaeoacremonium minimum</i> (Pmi)
16.....	2.3.2 <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (Pch)
16.....	2.3.3 <i>Fomitiporia mediterranea</i> (Fom)
17.....	2.3.4 יחסי גומלין בין הפתוגנים
17.....	2.4 הפצת המחלה ומקורות מידבק
17.....	2.5 תגובת הצמח לפתוגנים
18.....	2.6 השפעת תנאי האקלים על המחלה
18.....	2.7 הדברת המחלה
20.....	2.8 ניטור המחלה בכלים מולקולריים
21.....	3. מטרת מחקר
22.....	4. שיטות וחומרים
22.....	4.1 מקור התבדידים
22.....	4.2 זיהוי התבדידים ששמשו במחקר
22.....	4.2.1 מורפולוגיה של התפטיר
22.....	4.2.2 שיטה מולקולרית – ריצוף מקטעי ברקוד
23.....	4.2.3 השוואת מקטעי ה-ITS של התבדידים
25.....	4.3 תנאי גידול התבדידים
25.....	4.3.1 אוסף תבדידי הביקורת
25.....	4.3.2 גידול מושבות מנבגים
25.....	4.4 בידוד פטריות אסקה
25.....	4.4.1 בידוד מגזע גפן
25.....	4.4.2 בידוד ממלכודות נבגים
26.....	4.4.3 בידוד מושבות מנבג אחד - (SCC – Single cell colonies)
26.....	4.5. הפקת DNA
26.....	4.5.1 תפטיר
26.....	4.5.2 רקמת גפן מעוצה
27.....	4.5.3 נבגים
27.....	4.6 הגברה ב-PCR
28.....	4.7. זיהוי תוצרי ההגברה
28.....	4.7.1 זיהוי תוצרי ה-PCR בוצע בשתי שיטות: QIAxcel
28.....	4.7.2 אלקטרופורזה בג'ל אגרוז
28.....	4.8. התחלים ששימשו לביצוע המחקר
28.....	4.8.1 תחלים אוניברסליים
29.....	4.8.2 תכנון תחלים ספציפיים לזיהוי פטריות האסקה
29.....	4.9 תאור חלקות הניסוי
29.....	4.9.1 חלקה מבוגרת עם נגיעות גבוהה

29.....	4.9.2 חלקות נוספות עם תסמיני עלווה
30.....	4.9.3 חלקה צעירה ללא תסמיני עלווה
31.....	5. המהלך הניסויי
31.....	5.1 תכנון התחלים הספציפיים והתאמת תנאי ה-PCR
31.....	5.1.1 רצפי המטרה
31.....	5.1.2 מציאת רצפי הפריימרים
	5.2 בדיקת הספציפיות והרגישות של התחלים שתוכננו לזיהוי מיני האסקה על DNA ממקורות
32.....	שונים
32.....	5.2.1 DNA מתבדדים
32.....	5.2.2 תערובת DNA של פטריות אסקה
33.....	5.2.3 כלל ה-DNA מצמחים שהודבקו בפטריות אסקה באופן מלאכותי
33.....	5.2.4 כלל ה-DNA מגפנים סימפטומטיות וא-סימפטומטיות בכרמים
33.....	5.2.5 בדיקת ספציפיות ברמת הרצף
34.....	5.2.6.1 קביעת כמות הנבגים המינימלית
34.....	5.2.6.2 קביעת ריכוז ה-DNA המינימלי לזיהוי
34.....	5.3 מקור החומר הצמחי בניסויי הדבקה בחממה
34.....	5.4 דינמיקת פיזור הנבגים בזמן ובמרחב
35.....	5.4.1 פיזור נבגי פטריות האסקה לאורך עונות השנה
35.....	5.4.2 השפעת גשמי קיץ על פיזור הנבגים
36.....	5.4.3 דינמיקה של פיזור הנבגים במרחב
36.....	5.4.3.1 פיזור הנבגים סביב הגפן בתוך החלקה
37.....	5.4.4 פיזור נבגים למרחק בהיקף החלקה
37.....	5.4.5 פיזור הנבגים בחלקה צעירה ללא תסמינים מול חלקה מבוגרת
38.....	5.5 הדבקה טבעית בכרם דרך פצעי הזמירה
38.....	5.6 ניתוח סטטיסטי
40.....	6. תוצאות
40.....	6.1 זיהוי התבדדים
40.....	6.1.1 זיהוי מורפולוגי
41.....	6.1.2 זיהוי מולקולרי
42.....	6.2 תכנון התחלים
43.....	6.3 בדיקת הספציפיות והרגישות של התחלים שתוכננו לזיהוי מיני האסקה
43.....	6.3.1 בחינת הספציפיות בהשוואה לתבדדים אחרים
44.....	6.3.2 ספציפיות התחלים בזיהוי מתוך תערובות DNA
44.....	6.3.3 ספציפיות התחלים בזיהוי מיני אסקה ישירות מרקמת העצה של גפן
46.....	6.3.4 מגפנים סימפטומטיות וא-סימפטומטיות בכרמים
48.....	6.3.5 ספציפיות התחלים ברמת הרצף
49.....	6.4 בחינת רגישות התחלים
49.....	6.4.1 קביעת ריכוז הנבגים המינימלי
49.....	6.4.2 ריכוז DNA מינימלי
50.....	6.5 הדינמיקה של פיזור הנבגים
50.....	6.5.1 השפעת תנאי הסביבה על הפצת נבגי אסקה לאורך השנה
52.....	6.5.2 השפעת גשמי קיץ מלאכותיים על הפצת נבגי פטריות אסקה
53.....	6.6 פיזור הנבגים במרחב
53.....	6.6.1 פיזור הנבגים קרוב לגפן בתוך השורות
54.....	6.6.2 פיזור הנבגים רחוק מגפן נגועה
55.....	6.7 לכידת נבגים בחלקה מבוגרת מול חלקה צעירה
55.....	6.8 הדבקה טבעית בכרם דרך פצעי הזמירה
57.....	7. דיון ומסקנות
63.....	8. רשימת מקורות
77.....	9. נספחים



איורים

- איור 1 : אזורי השונות במקטע ITS בהם בוצע חיפוש הרצפים המתאימים ביותר של הפריימרים הספציפיים.....31
- איור 2: צילום של מערכת ההתזה כפי שהוצבה מעל אחת הגפנים בחלקה באלרום.....33
- איור 3: אופן הצבת מלכודות הנבגים בתוך השורה סביב הגפן.....33
- איור 4: אופן הצבת המלכודות בהיקף החלקה.....34
- איור 5: צילומים של נבגי פטריות האסקה תחת הגדלה.....36
- איור 6: צילומים של מושבות אסקה על צלחות ותחת הגדלה.....37
- איור 7: רצפי ה-DNA באזורי ה-ITS של פטריות האסקה עם רצפי הפריימרים.....38
- איור 8: תמונת תוצרי ההגברה של מיני אסקה בנוכחות תחלים אוניברסליים ותחלים ספציפיים מתוכננים בהשוואה למיני פטריות נוספים שנמצאו בכרמים בישראל.....39
- איור 9: תמונת ג'ל (QIAXCEL) של תוצרי ההגברה בתערובות שונות של של תבדידי אסקה בנוכחות פריימרים ספציפיים לכל מין בנפרד.....40
- איור 10: תוצרי ההגברה עם פריימרים ספציפיים על DNA מזמורות שהודבקו באופן מלאכותי.....41
- איור 11: זיהוי פטריות אסקה באמצעות פריימרים ספציפיים בדוגמאות של קידוחי גזע בגפנים סימפטומטיות בכרם אלרום.....42
- איור 12: בדיקת ריכוז הנבגים המינימלי הנדרש לזיהוי PCH ו-PMI, בנוכחות (או ללא) נבגים של פטריות אחרות.....45
- איור 13: רגישות התגובה לזיהוי ריכוזי DNA יורדים.....46
- איור 14: הקשר בין נוכחות נבגי אסקה לבין מדדים אקלימיים לאורך עונות השנה.....47
- איור 15: השפעת הדמיית גשם קיץ על פיזור נבגי אסקה – זיהוי נבגים באנליזת NESTEDPCR עם פריימרים ספציפיים לכל פטריית אסקה.....48
- איור 16: השפעת המרחק מגפן נגועה על לכידת נבגי אסקה בתוך שורות החלקה.....49
- איור 17: השפעת המרחק מגפן נגועה על לכידת נבגי אסקה סביב החלקה במרחקים גדולים.....50
- איור 18: השפעת משך חשיפת פצעי הזמירה בחלקת כרם נגועה על אחוזי חדירת פטריות האסקה דרך הפצעים.....52
- טבלאות
- טבלה 1: רשימת התבדידים שנשלחו לריצוף בארבעה מקטעים גנומיים: ITS, LSU, EF1-A ו-B-TUB לצורך זיהוי מולקולרי ולתכנון תגובת ה-PCR הספציפית לכל מין.....21
- טבלה 2: רשימת התבדידים ששימשו לבדיקת הספציפיות של הפריימרים שתוכננו למקטע ITS.....22
- טבלה 3: רשימת התחלים האוניברסליים ששימשו לצורך ביצוע המחקר.....26
- טבלה 4: תחלים ספציפיים לפטריות ESCA כפי שתוכננו למטרת העבודה.....27
- טבלה 5: סיכום תאריכי הזמירה והדיגום בניסוי ההדבקה הטבעית.....35
- טבלה 6: זיהוי מינים המעורבים במחלות גזע בשיטה מולקלרית על פי מידת ההתאמה של רצפי התבדידים לרצפים במאגר המידע BLAST במקטעים: ITS, LSU, β-TUB, EF-1.....37
- טבלה 7: זיהוי פטריות האסקה בגפנים עם תסמיני עלווה ובגפנים ללא תסמינים מכרמים ברמת הגולן.....43
- טבלה 8: זיהוי מין הפטרייה על פי השוואת הרצפים שהוגברו למידע במאגר NCBI.....44
- טבלה 9: אחוז התוצאות החיוביות במלכודות בחלקה צעירה מול חלקה מבוגרת לפי מין הפתוגן.....51
- טבלה 10: סיכום תוצאות מבחן  $\chi^2$  עבור שלושת מיני פטריות האסקה: הדבקה טבעית.....52

Ch: Chloramphenicol  
CTAB: Cetrimonium ammonium bromide  
DNA: Deoxyribonucleic Acid  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
EF1- $\alpha$ : Elongation factor 1- $\alpha$   
Fom: *Fomitiporia mediterranea*  
GTD : Grapevine trunk disease  
ITS : Internal transcribed spacer  
LSU: Large subunit  
LW: Leaf-Wetness  
MCP: Protein Precipitation reagent  
NTC: No Template Control  
PC: Positive control  
Pch: *Phaeoconiella chlamydospora*  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PDA : Potato dextrose agar  
Pmi: *Phaeoacremonium minimum*  
RH: Relative Humidity  
RNA: Ribonucleic acid  
TAE: Tris base, acetic acid and EDTA solution  
UV: Ultra Violet  
YCL: Yeast cell lysis solution  
 $\beta$ -tub :  $\beta$ -tubulin



מחלת האסקה בגפנים גורמת לאבדן היבול, ירידה באיכות הענבים, קיצור משמעותי בחיי הגפן ולהפסדים כלכליים לכורמים בעולם ובישראל. המחלה מוגדרת כמכלול (קומפלקס) המורכב משלוש פטריות שוכנות עצה: *Phaeoacremonium minimum*, *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fom). הקומפלקס מזוהה עם הופעת תסמינים חיצוניים המתבטאים על נוף הצמח: "מופע פסי הנמר" על העלים ואפופלקסיה שהיא תמותה של זמורות חד שנתיות. בנוסף לכך, קומפלקס האסקה גורם להופעת תסמינים פנימיים בתוך הגזע כאשר הרקבנות הכהים מזוהים עם הפטריות Pch ו-Pmi והרקבון הלבן (שנקרא לעתים הרקבון הספוגי) מזוהה עם פעילות המין Fom. נביטת הנבגים של פטריות קומפלקס האסקה ופיזורם מושפעים גם מתנאי הסביבה. מספר מחקרים דיווחו על הקשר בין הפצת הנבגים של מינים אלה בכרמים לארועי גשם ונטען כי הנבגים מופצים ע"י הרוח. כמו כן, הדעה הרווחת היא שפצעי הזמירה הם פתח החדירה העיקרי של פתוגנים אלה כאשר מדובר בהדבקה משנית בכרמים. עם זאת, קיימים מספר קשיים בזיהוי המחלה: א. הפטריות מאכלסות את רקמות ההובלה של הגפן במשך זמן רב לפני שתסמיני העלווה החיצוניים והאופייניים יתבטאו. ב. התסמינים החיצוניים אינם מופיעים בצורה עקבית בגפנים הנגועות מידי שנה. ג. בידוד הפטריות הפתוגניות מהגזע בתנאי מעבדה או זיהוי נבגים של המינים המעורבים בשיטת הזריעות על מצעי מזון לבידוד, הוא תהליך שדורש השקעת זמן ועבודה מרובים, עקב קצב גדילה איטי של פטריות האסקה ביחס לפטריות מזהמות. על-מנת להתגבר על הקשיים בזיהוי מוקדם וספציפי, נדרשת שיטה יעילה המבוססת על כלים מולקולריים פשוטים ומספיק רגישים לאבחון הפתוגנים מתוך דוגמאות עם כמויות קטנות של דנ"א המטרה. במספר עבודות קודמות, הוצעו תחלים (primers) ספציפיים וסמנים שונים לזיהוי פטריות האסקה באנליזת Polymerase (PCR) chain reaction. אבל, פריימרים אלה התגלו כלא ספציפיים לפטריות אסקה בלבד כאשר ערכנו בדיקות לחומר שנדגם בישראל. בעקבות כך, תכננו פריימרים לזיהוי בהתאם למגוון תבדידי פטריות מקומיים והתאמנו שיטה לזיהוי ה-DNA באמצעות הגברה של חלק מאזור ה-ITS הפטרייתי של הפתוגנים בצורה סלקטיבית. מטרת המחקר הייתה לתכנן את הפריימרים להגברה ספציפית, להתאים את השיטה לסוג הדגימה וללמוד באמצעותה, על דינמיקת פיזור נבגי פטריות האסקה לאורך זמן, במרחב החלקה, סביבה וכן, לבדוק האם פצעי הזמירה בכרם הם פתח החדירה העיקרי של הפתוגנים לרקמות ההובלה של הגפן. בהתבסס על רצפים של תבדידי פטריות מקומיים במקטע ה-ITS, תכננו פריימרים עם ספציפיות ורגישות גבוהה לזיהוי שלושת הפתוגנים של קומפלקס האסקה. הפריימרים נבדקו בדגובות עם DNA גנומי מתבדידים, מצמחים בהדבקה מלאכותית ותרחיפי נבגים שהוכנו במעבדה. לבסוף, ריצוף תוצרי התגובות ווידא כי המקטעים המוגברים הם אכן מקטעי המטרה. דוגמאות ה-DNA העיקריות שנבדקו לנוכחות הפתוגנים, הופקו ממלכודות נבגים או רקמות צמחיות מהתוצאות עלה כי אחוזי ההדבקה הטבעית דרך פצעים בכרם עם נגיעות גבוהה, אינם עולים על 17% בתנאי שדה. המין Pch הופיע בשכיחות הגבוהה מתחת לפצעי הזמירה בתוך רקמות הגפן בהשוואה לשני המינים האחרים. כמו כן, הנבגים של שלושת מיני האסקה נישאים ע"י הרוח והפצתם קשורה לשינויים בתנאי הסביבה. בהסתכלות רחבה על כלל התוצאות מהתקופות השונות

בשנה, כל מין הראה מגמה שונה בהתאם למדדים שנבדקו. חלק מהמצאים היו דומים למה שנצפה במקומות אחרים ברחבי העולם. באמצעות השיטה בה עבדנו, ניתן לזהות נוכחות DNA של פטריות אסקה בחומר צמחי ומלכודות נבגים המכילות DNA זר (מאורגניזמים אחרים) בריכוז גבוה. הזיהוי בדרך זו מאפשר לקבל מידע על פוטנציאל ההדבקה בכרמים צעירים, לתמוך בקבלת החלטות בנוגע למועד הזמירה ולקבל תמונת מצב יותר מהימנה על רמת הנגיעות באסקה בהשוואה לניטור על פי תסמינים חיצוניים.

## 1. מבוא

גידול הגפן (*Vitis vinifera* L.) בעולם נפרש ב-2019 על כ-74 מיליון דונם וכולל כרמי יין, ענבי מאכל או ענבים לצימוקים. שוק הייצוא העולמי של התוצרת מגידול זה מוערך ב-30.4 מיליארד אירו (OIV, 2019). בישראל, שטח הכרמים הכולל הוא כ-70 אלף דונם מהם, כ-50 אלף דונם גפן יין והשאר גפן מאכל (Raban, 2020). בשנים האחרונות חלה עלייה בגידול זני איכות וייצור יין איכותי ביקבים המקומיים. עם זאת, דווח על ירידה בהיקף הנטיעות החדשות של כרמים עקב מחסור בחומר ריבוי נקי וזמין (הרכבי, 2018). תופעת האסקה בגפנים (*esca proper*) היא מחלת גזע הגורמת לפגיעה ביבול, ירידה באיכות הפרי, ומקצרת משך חיי הגפנים בכ-40%. כתוצאה מכך, נגרמים הפסדים כלכליים כבדים לכורמים בעולם ובישראל. בשנים האחרונות עלו שיעורי הנגיעות באסקה בכרמים בוגרים וצעירים כאחד. המחלה מוגדרת כיום כקומפלקס של פטריות שוכנות עצה. שלושת המינים העיקריים הם: *Phaeomoniella* ופטריית הבסיסה *Fomitiporia mediterranea* (Basidiomycota). אך ידועים גם מינים פתוגנים נוספים, שנמצאים בקטגוריה של מחלות גזע בגפן (GTD's – Grapevine trunk diseases). מינים אלו זוהו גם כן בתוך רקמות ההובלה, ולכן חלק מהחוקרים משייכים אותן לקומפלקס האסקה או מתייחסים ל-GTD's כאל תופעה רחבה הכוללת מספר מינים של פטריות פתוגניות כולל את פטריות האסקה (Mondello et al., 2018b; Surico, 2009).

התבטאות התסמינים החיצוניים האופייניים לתופעה מושפעת מגיל הגפנים הנגועות, זן הגפן, הפרמטרים הפיזיולוגיים שלו, אילו פטריות מתקיימות בגפן הספציפית ובאילו תנאי סביבה הגפן מתקיימת (Surico, 2009). זיהוי הקומפלקס והגורמים המעורבים על סמך תסמינים חיצוניים, כמעט ואינם מתאפשרים בגפנים צעירות כיוון שהתסמינים החיצוניים לא מופיעים מיד עם הדבקה הצמח בפתוגנים ולרוב מתבטאים בשלב מתקדם של התפתחות הפטריות המעורבות בתוך צמח נגוע (Mugnai et al., 1999). השיטה המקובלת לזיהוי הפטריות היא על-ידי בידוד הפטריה מתוך רקמת העצה של זמורות או גזע הגפן וגידול על מצע מזון. שיטה זו עתירת עבודה ולוקחת זמן רב (Schaad et al., 2002). בנוסף, קצב הגדילה האיטי של פטריות האסקה בהשוואה למינים אנדופיטיים אחרים, גורם לטעויות בזיהוי פטריות האסקה בגלל שהפתוגנים תופסים את המרחב לאט יותר באברי הצמח השונים (Aroca et al., 2007; Ridgway et al., 2002; Romanazzi et al., 2009).

מבין מחלות הגזע, (GTD – Grapevine trunk disease), קומפלקס האסקה נחשב למחלה הקשה ביותר להדברה בכרם (Gramaje et al., 2018). הסיבה לכך היא שמדובר בשלושה פתוגנים שנמצאים

בתוך הרקמות הפנימיות של הצמח ולכן, קיים קושי רב להתאים חומר אוניברסלי לקטילה של שלושת המינים וגם שיהיה מסוגל לחדור לרקמה הנגועה ביעילות. סיבה נוספת לקושי היא חוסר בחומרי הדברה יעילים ומאשרים לשימוש נגד אסקה מאז שחומרי הדברה מבוססי ארסן, הוצאו משימוש עקב פגיעה בסביבה ורעילות גבוהה לאדם (Gramaje et al., 2018). הפעולות שמוצעות כיום במטרה להתמודד עם אסקה, כוללות טיפולי מים חמים בחומר ריבוי במשתלות, ריבוי יחורים משריגים צעירים חד שנתיים (ירוקים), יישום חומרים כימיים וביולוגיים, עקירת גפנים נגועות, תזמון מועדי הזמירה להימנעות מחשיפה לרמות מידבק גבוהות בכרם, יישום חומרים פרוטקטנטיים על פצעי הזמירה, פינוי גזם וחיטוי כלי עבודה. פעולות אלה מצריכות השקעת עבודה ומשאבים רבים ולא מונעות בהכרח את התפשטות המחלה בכרם. קיימים שני מקורות להתפשטות המחלה בכרם: א. שתילת חומר ריבוי נגוע. ב. הדבקה משנית בכרם מגפנים נגועות וגזם. מקובל להגיד כי ההדבקה מתרחשת על ידי חדירת נבגים לסדקים ופצעים. הנבגים מופצים באמצעות רוח, מים, בעלי חיים, קרקע וסניטציה גרועה, לכן עבודות רבות מעידות על כך שהדבקה ע"י פטריות אסקה בכרם מתרחשת בעיקר דרך פצעי הזמירה. הכשירות של הגפן להידבק מושפעת מתנאי אקלים, מקצב ההגלדה של הפצעים ויכולת ערור מערכות ההגנה של הצמח. כמו כן, חלק מהפתוגנים מתקיימים בקרקע או בתוך מינים אחרים בכרם ובסביבתו (Retief et al., 2006; Saccà et al., 2018; Surico et al., 2006). התפתחות הנבגים והפצתם על ידי פטריות האסקה מושפעת מתנאי האקלים, בעיקר טמפרטורות ומשקעים (Eskalen et al., 2001; Van Niekerk et al., 2011a). הקשיים בזיהוי מוקדם של פטריות המשוויכות לתופעת האסקה יצרו צורך לפתח שיטה (מולקולרית) מהירה ורגישה לזיהוי הפטריות לפני הופעת התסמינים. שיטה זו תהווה גם כלי נוח יותר להבנת האטיולוגיה של הפצת הנבגים בכרם בזמן ובמרחב ותשמש בסיס להבנת תבנית התפשטות המחלה בכרם בתנאי ישראל. לפיכך, מטרת העבודה הן: א. פיתוח שיטה מולקולרית לזיהוי מהיר של שלושת המינים העיקריים המשוויכים לתופעת האסקה; ב. לבחון באמצעות שיטה זו, את פיזור הנבגים של מינים אלו במרחב ולאורך עונות השנה; ג. לבחון האם הדבקה משנית בכרם מתבצעת בעיקר דרך פצעי זמירה ועד כמה גבוהה הסכנה לצורת הדבקה זו בכרמים בישראל.

## 2. רקע

### 2.1 מחלת האסקה – היקף הבעיה בעולם ובישראל

מחלת האסקה (esca complex) בגפנים היא נחשבת כיום לאחת המחלות הקשות ביותר להדברה בענף הגפן בעולם (Mugnai et al., 1999). המחלה, גורמת לפגיעה ביבול, ירידה באיכות הפירות, ומקצרת משמעותית את אורך חיי הגפנים הנגועות. כתוצאה מכך, נגרמים הפסדים כלכליים לכורמים בעולם ובישראל. בצרפת, בשנת 2014, 12% מהכרמים לא נבצרו בגלל שהגפנים נפגעו מאסקה וממחלות גזע שוכנות עצה אחרות. רמת הנזק הכלכלי לענף הגפן שנגרם ע"י אסקה ומחלות גזע אחרות, הגיעה להיקף של כ-1 מיליארד יורו בשנה (Lorch, 2014). הנזקים כוללים אובדן יבול בגלל הצטמקות הגרגרים או כתמים על הפרי המונעים את שיווקו (זני מאכל) וכן, קיצור חיי הגפן בכרם. (Rumbos et al., 2001a). כמו כן, חלה ירידה בכמות התרכובות הפנוליות וחומרי הארומה בגרגרים, מה שמוביל לירידה באיכות היין

(Lorrain et al., 2012). התופעה גורמת לנזקים כבדים במדינות רבות בכל העולם: באיטליה (Quaglia et al., 2009a; Romanazzi et al., 2009; Serra et al., 2000; Sidoti et al., 2000; Surico et al., 2000a) צרפת (Kuntzmann et al., 2010; Larignon et al., 2000; Maher et al., 2012), ארה"ב (Scheck et al., 1998), ספרד (Giménez-Jaime et al., 2006), ניו-זילנד (Ridgway et al., 2002), אוסטרליה (Pascoe et al., 2004), דרום אפריקה (Fourie et al., 2004), יוון (Rumbos et al., 2001b), פורטוגל (Sofia et al., 2015), קנדה (Úrbez-Torres et al., 2014), וסין (Yan et al., 2013). באיטליה נמצא כי שיעור הנגיעות באסקה בחלקות כרם מבוגרות מגיע עד 80% (Romanazzi et al., 2009). בישראל, נמדד שיעור נגיעות ממוצע של 5.3% ב-6 חלקות מבוגרות (Zahavi et al., 2015).

#### 2.1.1 תסמיני המחלה

את תסמיני המחלה ניתן לחלק לתסמינים חיצוניים המופיעים על העלווה והפרי ותסמינים פנימיים בגזע ובזמורה (נספחים איור 1).

##### 2.1.1.1 תסמינים חיצוניים

##### 2.1.1.1.1 תסמיני עלווה

תסמיני העלווה האופייניים הם כתמים כלורוטיים/נקרוטיים המתפתחים בין העורקים של הטרף המוקפים ב"הילה" צהובה (בזנים לבנים) או אדומה בזני ענבים אדומים (Gramaje et al., 2018). אזורים אלה, מזכירים בצורתם פסים של נמר ולכן, נקראים בשם מופע "פסי הנמר" ("tiger-stripe" pattern). תחילה, הכתמים מופיעים כנקודות כלורוטיות מבודדות על העלה ועם הזמן, הם הופכים נקרוטיים. שטחם של האזורים הנקרוטיים גדל ליצירת כתמים גדולים שממוקמים בין עורקי העלה ובשוליו. הגוון החום של אזורים אלה תלוי בזן הענבים (Mugnai et al., 1999). תסמין זה הוא תוצאה של תגובת הגפן להימצאות הפתוגנים ברקמות המעוצות (Pouzoulet et al., 2014). תסמיני העלווה מופיעים בסוף הקיץ ותחילת הסתיו לאחר שהעלווה מסיימת את הגדילה ולפני שהיא מתחילה להזדקן ולנשור באופן טבעי לקראת התרדמה (Mugnai et al., 1999). תסמיני עלווה נצפים לרוב בגפנים בוגרות מעל 7 שנים (Mondello et al., 2018a), אבל גם בגפנים צעירות יותר (Edwards et al., 2001; Serra et al., 2000). תסמינים אלה מופיעים בצורה לא עקבית מידי שנה על אותה הגפן כי הופעתם מושפעת מגורמי סביבה וגורמים פנימיים הקשורים לתגובת הגפן הנגועה- (Mugnai et al., 1999; Surico et al., 2000b; Torres et al., 2012). תסמינים אלה הם תוצאה של פעילות מיקוטוקסינים המופרשים ע"י התפטירים המאכלסים את הגזעים והענפים ונעים לכיוון העלים (Andolfi et al., 2011). התסמינים לא בהכרח יופיעו על כל העלים וקריסת הזמורות יכולה להיות חלקית באזורים מסויימים על הגפן (Mugnai et al., 1999).

#### 2.1.1.1.2. תסמיני פרי

על הפרי מתפתחות נקודות שחורות, חומות, אדמדמות או סגולות שזכו לשם "חצבת-שחורה" ("black-measles"). הופעת נקודות אלה, הופכת את הפירות לבלתי ראויים לשיווק. הניקוד מתפזר באופן אקראי וא-סימטרי בשכבות האפידרמיס והאנדודרמיס של הפרי סמוך לקצה צינור העצה ובד"כ אינו מופיע ברקמות הפנימיות. הניקוד יכול להופיע על מספר פירות באשכול או על כל האשכולות שנמצאים על אותו ענף או מספר ענפים. בנוסף, המחלה יכולה לגרום לירידה במוצקות הפירות עד להתייבשות כל האשכול, לסדקים בפרי, לעיכוב הבשלה עד כדי מצב שבו הפירות לא מבשילים כלל ולפיכך לפגיעה ברמת הסוכר, חומציות וחומרי ארומה. בדומה לתסמיני העלווה, גם הופעת התסמינים על פירות אינה עקבית (Mugnai et al., 1999). בזני יין נצפית פגיעה ניכרת באיכות היין המיוצר מפירות ששנבצרו מגפנים נגועות באסקה (Lorrain et al., 2012).

#### 2.1.1.1.3. אפופלקסיה

התייבשות ותמותה מהירה ופתאומית של כל העלווה והפרי. התופעה יכולה להתרחש בשריג אחד ועד כל השריגים בגפן. אפופלקסיה בד"כ מתרחשת בעקבות חשיפת גפן נגועה לארוע עקת יובש וחום במהלך תקופת הצימוח וגורמת באותה שנה לאבדן יכול מוחלט באותם חלקי גפן שנפגעו. אולם, הצימוח בד"כ מתחדש בעונה הבאה (Andolfi et al., 2011; White et al., 2011). אפופלקסיה נגרמת כתוצאה של חסימת הובלת המים בצינורות העצה בגפן. החסימות נגרמות ע"י טילויות- הפרשת חומרים ג'ליים וקאלוז על ידי הצמח לצינורות ההובלה כתגובה לאכלוס הגפן בפתוגנים. בעקבות כך, נפגע מאזן המים בתנאי טמפרטורה קיצוניים ונוצרת למעשה עקה א-ביוטית המתבטאת בקמילה והתמוטטות עלים וענפים חד-שנתיים (Bortolami et al., 2019).

## 2.1.1.2. תסמיני גזע

### 2.1.1.2.1. השחרה והחמה של צינורות הובלה

מופעי השחרה והחמה של צינורות ההובלה בגפן, ניתן לראות כאשר מבצעים חתכים או קידוח בתוך הגזע. מופעים אלה, מזוהים עם פעילות הפתוגנים *Pmi* ו-*Pch* ותגובת הגפן הפונדקאית לפעילותם (White et al., 2011). הצבעים הכהים שמופיעים במקבצים קטנים או אזורים גדולים לרוחב הגזע, הם תוצאה של הפרשת תרכובות פנוליות לתוך צינורות העצה ע"י הגפן בתגובה לפעילות הפתוגנים (Lima et al., 2012). בחתכי גזע של גפנים מבוגרות בדרגת נגיעות גבוהה, שטח האזורים הנקרטיים השחורים גדול כתוצאה מפעילות של פתוגנים אלה ונמצא כי האזורים גדלים עם הזמן (Bruez et al., 2014). מהאזורים הנקרטיים בודדו גם מספר מיני פטריות נוספים, הידועים כגורמי מחלות גזע בגפנים: *Eutypa lata*, *Diplodia seriata* ו-*Neofusicoccum parvum* (Luque et al., 2009). חתכי אורך בגזעים שהודבקו בצורה מלאכותית הראו כי ההחמה מתקדמת מנקודת האילוח לשני הכיוונים בצינורות ההובלה של הגזע וקצב ההתקדמות של *Pch* ו-*Pmi* הוא כ-5 ו-2 מ"מ בחודש בהתאמה (Laveau et al., 2009; Mugnai et al., 1999).

### 2.1.1.2.2. רקבון לבן (רקבון רך)

התסמין מזוהה עם פעילות הפטריה הפתוגנית *Fomitiporia mediterranea* (Fom) שבודדה מהאזורים עם הריקבון הרך בתוך הגזע (Fischer, 2002; Surico et al., 2000b). הריקבון הרך מכונה גם "הרקבון הלבן" (למרות שצבע העץ הרקוב הוא בד"כ צהוב) מתרכז לרוב באיזור ליבת הגזע. לעתים הריקבון הרך מוקף בפס כהה בצבע חום אדמדם (White et al., 2011). תסמין זה הוא תוצאה של פעילות לינגוליטית של *Fom* והריסה מאסיבית של צינורות הובלה. מינים נוספים של פטריות בסיסה בעלות יכולת לינגוליטית בודדו מאזור הריקבון הלבן והרך, אבל *Fom* הוא המין הכי מזוהה עם תסמין זה באירופה ובאזורי אקלים ים תיכוניים (Fischer, 2006b).

## 2.2. בעיות בניטור המחלה

המחלה קשורה למעורבות של שלושה מיני פטריות המתקיימים זה לצד זה בתוך רקמת העצה של הגפן. הסיבות לכך שקשה לזהות את המחלה היא קצב ההתבססות האיטי של פטריות האסקה בתוך רקמות ההובלה ביחס למינים אחרים של פטריות אנדופיטיות, הקשר של תנאי הסביבה להופעת התסמינים, השפעת המצב הפיזיולוגי של הגפן וגילה. פטריות האסקה מסוגלות לחדור לרקמות ההובלה ולהתבסס באטיות מבלי לגרום להופעת תסמינים חיצוניים על הצמח בשנים הראשונות לאחר ההדבקה, במיוחד, אם מדובר בשתילים צעירים. בבדיקת מספר גורמים סביבתיים שיוצרים מצב עקה עבור הצמח, בצמח נגוע, נמצא קשר בין עקה א-ביוטית (לדוגמא עקת יובש) לבין הופעת תסמינים האופייניים לקומפלקס האסקה. ההסבר שהוצע לתופעה הוא שיבוש פעילות מערכות ההגנה של הצמח כנגד הפטריות הפתוגניות בעת חשיפה לתנאי עקה (Ferreira et al., 1999; Mondello et al., 2017). בנוסף לכך, הופעת התסמינים אינה נצפית מידי שנה באופן עקבי על אותן הגפנים. הסיבה לכך היא ככל הנראה המנגנון המורכב להופעתם. המנגנון כולל פעילות

רעלנים שונים המופרשים ע"י פטריות האסקה, תגובת הצמח נגד רעלנים אלה (חסימה של הגעתם לעלים) וגם השפעה של תנאי סביבה משתנים והמצב הפיזיולוגי של הצמח (Calzarano et al., 2007; Marchi et al., 2006; Serra et al., 2000).

בעיה נוספת שעולה עם הצורך לנטר את המחלה בשלבים מוקדמים היא שבדיקת השתילים לנוכחות פטריות אסקה היא בד"כ הרסנית בגלל שיש צורך בביצוע חתכים או דגימה של חתיכת רקמה מצמחים קטנים (Gramaje et al., 2018). יתר על כן, קיים קושי בזיהוי גופי הפרי של הפטריות הפתוגניות השייכות לקומפלקס האסקה בשל היותם קטנים מדי לזיהוי חזותי ללא הגדלה. לדוגמא, אורכם של גופי הפרי המיניים (Perithecia) במקרה של Pmi, הוא כ-  $500\mu\text{m}$  ונושאי הנבגים האל-מיניים הם הסתעפויות תפטר בגודל של פחות מ-  $100\mu\text{m}$ . כמו כן, נושאי הנבגים (אל-מיניים) של Pch ו Pmi גם הם מיקרוסקופיים ולכן, חומקים בקלות מן העין. את גופי הפרי של Fom ניתן לזהות בצורה ויזואלית ללא הגדלה, אבל הופעתם בכרמים יחסית נדירה וניתן למצוא אותם על חלקי צמחים מתים בעיקר (Fischer, 2006b; Gatica et al., 2004; Mugnai et al., 1999). בנוסף לכך, שיטת הזיהוי המקובלת ביותר שנמצאת בשימוש נרחב היא בידוד באמצעות זריעה על צלחות פטרי עם מצע מזון סלקטיבי לפטריות וביצוע מבחן קוך לקשירת התסמינים לגורם המחלה. אבל, הבעיה בשיטה זו קשורה גם היא לקצב ההתפתחות האיטי של פטריות האסקה ביחס למינים אחרים בתוך הגפן ועל הצלחות בתנאי מעבדה. בתוך הגפן, לוקח למחלה חודשים עד שנים להתבטא כתסמיני עלווה, מה שהופך את המבחן ללא יעיל מבחינת זמן עבודה. בנוסף לכך, בבידוד בצלחות, במקרים רבים נוצר מיסוך מושבות של פטריות אסקה ע"י מושבות של מינים אחרים, שמפתחים תפטיר על צלחת בקצב יותר מהיר (Gramaje et al., 2011).

### 2.3 הפטריות המעורבות בקומפלקס

הפטריות הפתוגניות השייכות לקומפלקס האסקה נמצאות בכל מקום בעולם בו קיים גידול גפנים (Bertsch et al., 2013).

#### 2.3.1 *(Pmi) Phaeoacremonium minimum*

לשעבר *P. aleophyllum*, מערכת פטריית שק. בתנאי מעבדה, על מצע Potato Dextrose Agar (PDA) המושבה מתפתחת לתפטיר קורי בצורה עגולה, לעתים לא סימטרית, בצבע חום. במהלך הגידול, הפטריה מפרישה חומר שגורם לפיגמנטציה ולקבלת הילה צהובה סביב המושבה (Mostert et al., 2005). צורת הנבגים האל-מיניים (conidia) היא אובאלית, מימדיהם  $1.5-2 \times 3-4 \mu\text{m}$  צבעם חום והם מתפתחים במרכז המושבה בתוך פיקנידיה (pycnidia) לאחר ימים בודדים. מחזור החיים המיני של הפטריה *Togninia minima* הוא הטרוטאלי בי-אללי (Arzanlou et al., 2014; Pascoe et al., 2004; Rooney-Latham et al., 2005). הפצת הנבגים יכולה להתרחש לאורך כל השנה ללא תלות בארועי גשם. גופי הפרי המיניים הם Perithecia, בעלי מבנה עגול וצוואר עם פתח בקצה המכילים את שקי הנבגים (asci). מבנה זה מגיע לאורך של כ-  $500\mu\text{m}$ . בתוך ה-asci נמצאים שמונה נבגים אובליים שאורכם כ-  $3-4\mu\text{m}$  (Pascoe et al., 2004). הנבגים המיניים והא-מיניים מסוגלים להשתמר בקרקע ולהיות מופצים ע"י זרמי אוויר (Eskalen et al., 2001);

(Pmi. Rooney et al., 2001) תוקפת גם מיני עצים אחרים כמו קיווי (*Actinidia chinensis*), זית אירופי (*Olea europaea*), *Prunus sp.*, ומיני עץ ערבה (*Salix sp.*) (Spies et al., 2018). הפצת הנבגים מתרחשת גם באמצעות פרוקי רגליים (Moyo et al., 2014).

### 2.3.2 (*Pch*) *Phaeomoniella chlamydospora*

מערכת פטריית שק. הפטריה מסוגלת לגדול בתנאי מעבדה על מגוון מצעים מלאכותיים, הטמפרטורה האופטימלית לגדילת התפטיר היא 25°C (Valtaud et al., 2009). מושבה מנבג בודד מתאפיינת בתפטיר קורי בצבעים ירוק כהה-חום ובפס דק בגוונים בהירים בהיקפה. נושאי הנבגים (*conidiophores*) מתרכזים במרכז המושבה ועליהם מקובצים הנבגים האל-מינים. צבעם של ה-*conidia* כהה בגוונים של ירוק, חום ושחור (לעתים קיימת שונות בצבעי המושבות של נבגים מאותו תבדוד אם), צורתם אליפסה מוארכת וגדלם 1.5-2 X 1-1.5 μm מחזור החיים המיני של הפטריה אינו ידוע. הפצת הנבגים של *Pch* מתרחשת סמוך לארועי גשם. הכלמידוספורות (הנבגים האל-מיניים) של *Pch* מופצות באמצעות הרוח ומסוגלות להשתמר בקרקע לאורך 17 שבועות (Eskalen et al., 2001; Ridgway et al., 2002).

### 2.3.3 (*Fom*) *Fomitiporia mediterranea*

מערכת פטריות הבסיסה. בתנאי מעבדה, התפטיר מתפתח על מצעי *potato dextrose agar* ו-*malt agar* כאשר טמפרטורת האופטימום לגדילתה היא 30°C. התפטיר קורי וצפוף, מזכיר צמר גפן בצבע לבן וגוונים של צהוב – כתום. ברקמה המעוצה, הפטריה מפרקת את הליגנין שבדופן התאים וגורמת לרקבון רך בגוונים בהירים. בניגוד למינים אחרים בסוג *Fomitiporia*, *Fom* היא הפטריה היא הטרותאלית (*heterothallic*) בעלת ריבוי מיני בלבד (Fischer, 2002). גופי הפרי מתפתחים על חלקי עץ מתים, שאריות גזם ולעתים יותר נדירות על עצים חיים (Mugnai et al., 1999). גוף הפרי נוצר על פני השטח של גזע העץ כך שרקמת ה-*hymenium* פונה כלפי חוץ. גוף הפרי דומה לספוג קשיח עם חרירים (*pores*), צבעו צהוב בגוונים שונים. נבגי *Fom* הם אובליים בגודל 6-7 μm x 5-6 μm והם מופצים באמצעות הרוח (Jamaux-Despréaux et al., 2003). בתנאי מעבדה, הנביטה מתרחשת ב 30°C, אך בשיעור נמוך ביחס למינים אחרים (Fischer, 2002). הפטריה *Fom* מסוגלת מתקיימת באזור הליבה של עצים פונדקאים ממינים שונים כמו קיווי, אגוזי לוז ודולב והיא נמצאה במספר מדינות באירופה ובאזור הים-התיכון (מכאן שמה) (Di Marco et al., 2004; Elena et al., 2006; Markakis et al., 2019; Pilotti et al., 2005, 2019).



#### 2.3.4. יחסי גומלין בין הפתוגנים

תופעת האסקה (*esca proper*) מוגדרת כאשר באותה גפן נמצאים שלשת המינים Pch, Pmi ו-Fom. שני המינים Pch ו-Pmi מסוגלים להדביק גפנים כל אחת בנפרד. עם זאת, נוכחות פתוגנים אלה ביחד גורמת למחלת פטרי בגפנים (*petri disease*), מחלה המזוהה עם גפנים צעירות. המינים Pch ו-Pmi נחשבים כמינים חלוצים בעוד שחידרת Fom מתרחשת לאחר מכן (Larignon et al., 1997). אולם, נמצא כי גם Fom מסוגלת לאכלס את רקמות ההובלה של הגפן כפתוגן ראשוני ועצמאי (Arzanlou et al., 2014; Sparapano et al., 2001) ולגרום לרקבון אופייני בגזע ללא הופעת תסימיני עלווה ופרי (Graniti et al., 2000).

#### 2.4. הפצת המחלה ומקורות מידבק

אחת הסיבות המרכזיות לעלייה בשיעור מחלת פטרי ואסקה בגפנים צעירות במדינות רבות באירופה ובעולם שגידול הגפן בהן הוא גידול משמעותי, היא העלייה בהיקף יצור חומרי ריבוי נגועים במשתלות שהתגלו כנגועים לאחר השתילה (Gramaje et al., 2018; Graniti et al., 2000). פתח החדירה העיקרי של נבגי פטריות האסקה לתוך רקמות ההובלה הוא פצעים ברקמה (Mondello et al., 2017). באופן בלתי נמנע, פצעים – נוצרים בגפנים לאורך כל מחזור חייהם החל מהיותם שתילים במשתלה ועד ימיהם האחרונים בכרם ופצעי הגיזום נחשבים כאתר העיקרי להדבקה (Van Niekerk et al., 2011c). בכרם, הנבגים של שלשת גורמי המחלה מופצים ע"י רוח ומים ומקורם יכול להיות מצמח נגוע בתוך החלקה או מחוץ לה (Surico et al., 2000b). כל אחד מהמינים מסוגל להנביג בתנאים יחודיים לו, לאחר הגעה לשלב המתאים במחזור חייו (White et al., 2011). דרך נוספת שבה המחלה מתפשטת בחלקת כרם, היא באמצעות כלי עבודה שבאים במגע פיזי עם מקור המדבק ומיד לאחר-מכן, עם גפן בריאה (Agustí-Brisach et al., 2015). מקור מדבק נוסף בפטריות אסקה, מחלות גזע ומינים פתוגניים אחרים הוא חומר צמחי מת לאחר זמירה שנותר בתוך השורות או בסמוך לחלקות. כמו כן, מיני צמחים אחרים בסביבת הכרם יכולים להיות נשאים ופונדקאים של פטריות האסקה (Fischer, 2006b). בנוסף דווח כי בקרקע ניתן למצוא את הפטריה Pch (Saccà et al., 2018) וגם כי פרוקי רגליים מסויימים שמצויים בכרם באופן טבעי, יכולים לשאת על עצמם נבגים של Pmi לצד גורמי מחלות אחרים (Moyo et al., 2014). הכרת מקורות המדבק האפשריים, מניעת הימצאותם בסמוך לכרם, ניטור גורמי המחלה ויחידות הריבוי שלהם בשלבים מוקדמים, תזמון מועדי זמירה וסניטציה לאורך כל שלבי הגידול יכולים לסייע בהורדת רמות מדבק והתפשטות המחלה (Gramaje et al., 2018).

#### 2.5. תגובת הצמח לפתוגנים

שתי משפחות חומרים נקשרו לפעילות הפתוגנית של Pch ו-Pmi: pentaketides ו- $\alpha$ -glucans. חומרים אלה מופרשים ע"י הפטריות הפתוגניות ונמצא כי הם רעילים לצמחים. הם מופרשים למוהל צינורות העצה ומצטברים בעלים של הגפנים הנגועות (Bruno et al., 2007). הפרשת התרכובות הנ"ל והימצאות הגורמים הפתוגניים בצמחים מעוררת את מנגנוני ההגנה של הצמחים במטרה לנטרל את

מגננוני האלימות, ולעכב את גדילת הפתוגן ואת התפשטותו (Bruno et al., 2007; Magnin-Robert et al., 2016). ידוע כי פתוגנים שוכני צינורות הובלה גורמים לצמח לייצר מחסומים פיזיים כמו טילויות ("tyloses"), במטרה למנוע את התפשטות אותם פתוגנים בתוך הרקמה (Del Rio et al., 2001). בנוסף, הצמח מפעיל גנים הקשורים להתגוננות ומפריש חומרים לתוך צינורות הובלה במטרה לעכב את גדילת הפתוגן, להתמודד עם גורמי האלימות שלו ונזקיהם (Lima et al., 2012). חומרים אלו הם פנולים כמו catechol, protocatechuic acid chlorogenic acid ופלבנואידים שונים (Del Río et al., 1998; Kuc, 1995). הצטברותם בצינורות העצה, גורמת למופעי ההחמאה ההשחרה של צינורות הובלה.

## 2.6. השפעת תנאי האקלים על המחלה

שכיחות הופעת תסמיני העלווה של מחלת האסקה בכרמים, נקשרה לעלייה בכמות ארועי גשם (Marchi et al., 2006). כמו כן, תופעת האפופלקסיה נקשרה לתקופה של טמפרטורות גבוהות המלוות בארוע גשם (גשם קיץ) (Péros et al., 2008). בנוסף לכך, לתנאי הסביבה השפעות שונות על שלבים שונים במחזורי החיים של הפטריות (Van Niekerk et al., 2011a). לכידת נבגים של Pch בכרמים מזהה עם ארועי גשם והסבירות ללכידתם גבוהה אחרי גשם קיץ כאשר טמפרטורות הסביבה יחסית גבוהות (Eskalen et al., 2001; Larignon et al., 2000; Quaglia et al., 2009a). אולם, נבגים של Pch נלכדו בחלקות נגועות בצרפת לאורך כל השנה ולא ניתן היה לקשור אותם לארועי גשם או טמפרטורות (Larignon et al., 2000).

## 2.7. הדברת המחלה

קומפלקס האסקה ומחלות גזע אחרות בגפנים (GTD – Grapevine trunk disease), נחשבות למחלות הקשות ביותר להדברה בכרם, ובין מחלות הגזע- אסקה נחשבת הקשה ביותר להדברה (Gramaje, 2018). האתגר הרב בהדברת קומפלקס זה נובע מהקשיים בזיהוי מוקדם של המחלה ומחוסר בחומרי הדברה יעילים המותרים לשימוש חקלאי. ריסוס בחומרי הדברה מבוססי סודיום-ארסנט (חומר סיסטמי), נמצא יעיל במניעת תסמיני עלווה המזוהים עם האסקה, אבל ב-2001 חומרים אלה נאסרו לשימוש באירופה (ב-2003 ברוב מדינות העולם) עקב היותם חומרים שאריתיים, רעילים לאדם וגורמים נזק לסביבה (Mondello et al., 2017). אחד החומרים שנבדק והוצע כחלופה, מבוסס על פורמולציה של נחושת (Di Marco et al., 2011), אך למרות התוצאות המבטיחות, עדיין לא ניתן למצוא את החומר בתור תכשיר מסחרי. חומר נוסף שנמצא כמעכב יעיל של פטריות האסקה במספר עבודות הוא thiophanate-methyl (Mutawila et al., 2015; Rolshausen et al., 2010). בישראל ובעולם, משווק תכשיר הדברה המבוסס על חומר פעיל זה (שם מסחרי "טופז") אבל, הוא לא מורשה לשימוש בכרם עקב שארתיות גבוהה של החומר הפעיל..

בשנים האחרונות, פותחו פרוטוקולים של ממשקי הדברה משולבים Integrated pest management (IPM– management) להדברת מחלות שונות (Gramaje et al., 2018; Hillis et al., 2016).

(Roblin et al., 2019). ממשקים אלה, מבוססים על ניטור וקביעת ספים של רמות מחלה לביצוע פעולות לדברת הפתוגנים. בגישה זו, מקובל לשלב חומרים שונים, סינטטיים או טבעיים, במטרה ליצר פגיעה במספר מנגנוני מטרה של גורם המחלה ובכך, להפחית את הסיכוי לפיתוח עמידות, להוריד את הריכוזים של התרכובות הפעילות ע"י ניצול תופעות של סינרגיזם בין תרכובות פעילות, לעורר את מנגנוני ההגנה הטבעיים של הצמח במטרה למזער את הנזק הסביבתי ולהגדיל את יעילות ההדברה בכלים המותרים לשימוש (Bertsch et al., 2013; Gramaje et al., 2018). אחד השילובים שנמצאו יעילים בהדברת המחלה בניסויי *in-vitro* ובניסויי עציצים, הוא תערובת של cysteine, iron sulfate, salicylic acid ו-fosetyl aluminum שיושמה על פצעי הזמירה. חומרים אלה נבדקו כיוון שהם ידועים כבעלי פעילות נגד פטריות ומעוררים את מערכת ההגנה הטבעית של צמחים במצבי עקה. תערובת זו הראתה תוצאות מספקות בעיכוב הפטריות, הוצע לשפר אותה ע"י הוספת תרכובות נוספות ולהתאים את הפורמולציה לשימוש מסחרי (Roblin et al., 2019).

בנוסף לכך, גורמים ביולוגיים שונים הוצעו כחלופה לחומרים הכימיים שהוצאו משימוש. לדוגמה, מספר מיני פטריות מהסוג *Trichoderma* התבררו כטפילות לפטריות אסקה ופתוגנים אחרים בגפנים. בעקבות כך, מספר תכשירים (של החברות Biotricho®, Vinevax® ו-ECO 77®) מבוססי *Trichoderma* יצאו לשוק והוצע ליישם אותם בריסוס על פצעי זמירה סמוך למועד הזמירה כדי להקטין את הסיכוי לחדירת פטריות פתוגניות לתוך רקמות ההובלה (Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011). פעולה זו יכולה למנוע בצורה חלקית הדבקה משנית והגנה על חומר ריבוי במשתלות אבל, לא יכולה להדביר את גורמי המחלה לאחר התבססותם בצמח. הפטריה *Epicoccum layuense*, פטריה אנדופיטית שנמצאת באופן טבעי בגפנים ומיני צמחים אחרים, הצליחה לעכב ב-50-80% את פטריות האסקה במבחני צלחות ולהקטין את אורך ההחמות בשתילים ב-67-79% (Frari et al., 2019). החיידקים *Bacillus subtilis* ו-*B. amyloliquefaciens* הם אנדופיטים נוספים בעלי פעילות אנטי פטרייתית המסוגלים להגן על פצעי הזמירה מחדירת Pch ו-*Eutypa lata* (eutypa dieback – GTD) ופתוגנים אחרים ביעילות דומה לחומרים פרוטקטנטיים אחרים שלא מבוססים על גורם ביולוגי. פעילות זו מתאפשרת הודות לרעלנים שמופרשים ע"י החיידקים כתגובה להימצאות פטריות פתוגניות בסביבתם (Alfonzo et al., 2012; Kotze et al., 2011; Rezgui et al., 2016).

עם זאת, התכשירים הביולוגיים הקיימים בשוק והגורמים שנבדקו במעבדות מחקר, לא מסוגלים לקטול את הפטריות הפתוגניות בתוך צינורות ההובלה באותה יעילות שהושגה ע"י שימוש בחומרים מבוססי ארסן (Bertsch et al., 2013; Gramaje et al., 2018). לפיכך, במטרה לייצר במשתלות חומר ריבוי נקי, נהוג/מומלץ? כיום במשתלות לבצע בחומר הריבוי טיפולי טבילה בקוטלי-פטריות שונים, טבילה במים חמים ולדאוג לסניטציה של המתקנים והכלים במערך ייצור השתילים (Edwards et al., 2003; Gramaje et al., 2009). בנוסף לכך, במהלך גידול הגפנים בכרם, מומלץ לערוך פעולות למניעת התפשטות במחלה בין חלקות סמוכות והדבקה משנית באותה החלקה. הפעולות אלו כוללות חיטוי כלי עבודה, סניטציה, סילוק חומר צמחי מת מהחלקות, תזמון מועדי זמירה לתקופות עם סיכוי נמוך להדבקה

ויישום משחות גיזום על פצעי הזמירה. פעולות אלה, כרוכות בהשקעה של שעות עבודה רבות ולא תמיד מביאות לתוצאות מספקות (De la Fuente et al., 2016; Mondello et al., 2018b).

## 2.8. ניטור המחלה בכלים מולקולריים

במטרה להתגבר על הקשיים שצוינו, נוצר הצורך לפתח בדיקה לזיהוי מוקדם יעילה ורגישה. שימוש בכלים מולקולריים יכול לספק מענה מספק לקשיים באבחון מוקדם של המחלה ולסייע למגדלים להימנע מחומר ריבוי נגוע ולהאט את קצב ההדבקה המשנית (Lawrence et al., 2017). אחד הכלים שהוצע במטרה להתגבר על בעיית ההרסניות הוא שימוש בנוגדנים לטוקסינים שמיוצרים ע"י Pch. בשיטה זו, הדגימה נעשית מענפים חד-שנתיים ופטוטרות, זיהוי הטוקסינים נעשה בשיטת western blot ואת הדגימה ניתן לקחת מעלים שטרם נראו עם תסמינים (Fleurat-Lessard et al., 2010). בנוסף לכך, אנליזת PCR המבוססת על סמנים מולקולריים יחודיים בגנום של כל אחד מהמינים המעורבים עשויה לשמש כשיטה מהירה לזיהוי הפתוגנים ולספק מידע אובייקטיבי על הימצאותם בגפנים ללא תסמינים, גם בשלבים מוקדמים (Romanazzi et al., 2009). ביצוע RT-PCR עם דוגמאות DNA שהופקו מקרקעות בכרם ודוגמאות עץ, הראו את נוכחות גורמי המחלה בקרקע וסיפקו אומדן כמותי יחסי לרמת הפתוגן בדגימות, מה שיכול לאפשר הערכה כמותית של רמות המדבק בכרם (Martín et al., 2012; Saccà et al., 2018). ניתן להתגבר על הקשיים בזיהוי של נבגים השייכים למיני קומפלקס האסקה ע"י שימוש ב-PCR המבוססת על סמנים יחודיים ברצפי ה-DNA של הפטריות המעורבות. מקטע ה-ITS בגנום הפטריות, מורכב משני אזורי שונות לא מקודדים: *ITS1* ו-*ITS2* (spacers) וביניהם מקטע שמור המקודד לתת יחידה 5.8S של ה-RNA הריבוזומלי. בשנים האחרונות, אזור ה-ITS בגנומים של פטריות משמש כמקטע הברקוד האוניברסלי לזיהוי של מיני פטריות (Schoch et al., 2012). מבנה המקטע ואורך רצפי ה-spacers (אזורי השונות בין המינים), עושים את המקטע הזה למוצלח ביחס למקטעים גנומיים אחרים, בהקשר של שיוך טקסונומי של מיני פטריות (Ihrmark et al., 2012). פריימרים ספציפיים לזיהוי פטריות מחלת האסקה תוכננו על ידי Fischer (2006), Pollastro et al., (2001), Tegli et al., (2000), Overton et al., (2008), Aroca et al., (2011), White et al., (2009), Romanazzie et al., ו-Overton et al., (2004) ונבדקו אצלינו במעבדה. אולם, בניסויים המקדימים, הראו הגברה למינים אחרים: *Aulicularia*, *Scatylidium*, *Alternaria sp.*, *Pleosporales sp.*, ו-*Acremonium sp.* (התוצאות לא מוצגות). בעקבות כך, נוצר הצורך לתכנן זוג תחלים יחודיים לכל פטריה במטרה ליישם את השיטה ולהתאים אותה לגנום הפטריות הקיימות כרמי ישראל.

3. מטרת המחקר: פיתוח שיטה פשוטה ומהירה, המבוססת על סמנים מולקולריים, לזיהוי פטריות המשוייכות לקומפלקס האסקה ברקמת גפן נגועה כבסיס להבנת הדינמיקה של הפצת הנבגים וההדבקה המשנית בכרמים.

מטרות ממוקדות:

3.1 לתכנן פריימרים ספציפיים המתאימים לתבדידים שנמצאו בישראל לזיהוי שלושת המינים העיקריים בקומפלקס האסקה.

3.2 לבחון ספציפיות התחלים על DNA מתבדיד, מנבגים ומרקמת צמח נגוע.

3.3 ללמוד באמצעות השיטה המולקולרית על הדינמיקה של הפצת הנבגים בכרם בזמן ובמרחב

3.4 לבדוק האם הדבקה דרך פצעי זמירה בכרם, תורמת משמעותית להדבקה המשנית.

4. שיטות וחומרים

4.1. מקור התבדידים

תבדידי פטריות משלושים וארבעה מינים פתוגניים שימשו לביצוע המחקר (טבלה 1). התבדידים נבחרו מתוך אוסף תבדידי אסקה ו-GTD אחרות, שפרטיו נדגמו בין השנים 2012 – 2018 בכרמים ברהבי הארץ, ע"י צוות המעבדה של ד"ר ורד נאור ממכון שמיר למחקר בקצרין. התבדידים באוסף זה, בודדו במעבדה מזמורות או מנבגים (סעיף 4.3). שבעה תבדידים של פטריות אסקה (שני תבדידים מכל אחד מהמינים Fom ו-Pmi ושלושה תבדידי Pch) נבחרו לשמש כמיני המטרה אליהם תוכננו התחלים הספציפיים לזיהוי ב-PCR. כמו כן מאותו האוסף, נבחרו עשרים תבדידים נוספים ממינים שונים הגורמים ל-GTD אחרות. שישה תבדידים ממינים פתוגניים אחרים (5 לגפן ו-1 לאפרסמון) התקבלו מהמעבדה של ד"ר דוד עזרא המחלקה למחלות צמחים וחקר העשבים במינהל המחקר החקלאי (מכון וולקני), בית דגן. המיקום בו נאספו דגימות של תבדידים אלה, אינו ידוע. וכן, נעשה שימוש ב-DNA מתבדיד של קימחון הגפן (*Erysiphe necator*) שהתקבל מהמעבדה של פרופ' משה ראובני במכון שמיר למחקר בקצרין. כל התבדידים, זוהן ברמת המין כמתואר בסעיף 4.4 וייצגו את המגוון הגנטי של פטריות פתוגניות שוכנות גזע ואחרות שהסיכוי למצוא אותן בדגימות מכרם בישראל הוא הוערך כגבוה. בתהליך תכנון התחלים הספציפיים, רצפי ה-ITS של תבדידים אלה שימשו כרצפים שאינם רצפי המטרה (non-target DNA).

4.2. זיהוי התבדידים ששמשו במחקר

4.2.1. מורפולוגיה של התפטיר

הזיהוי הראשוני נעשה על פי צורת המושבה של הפטריה על צלחת פטרי עם מצע PDA שגודלה בתנאי מעבדה. לאחר מכן, בחנו את התבדידים תחת הגדלה (מיקרוסקופ: Olympus BX43, בניקולר: Olympus SZX16) לקביעת המאפיינים המורפולוגיים שלהם, כולל צורת הכורים, גופי הפרי, נושאי הנבגים והנבגים. מושבות של Pmi ו-Pch שהנביגו בתנאי מעבדה, נדגמו באמצעות גירוד המושבה עם מחט ביולוגית באזור מנביג, הועברו לזכוכית נושאת ונצבעו בצביעת (Rodriguez- Cotton blue) (Tudela et al., 1991). נבגי Fom, נדגמו מתוך גופים פרי שהופיעו על חתיכות גזעים מתים לאחר כשנתיים מאיסופם. חתיכות גופי פרי נצבעו בריאגנט מלצר (Melzers reagent) לצביעה סלקטיבית של נבגי פטריות בסיסה באדום (Leonard, 2006). לבסוף, השונו את המופעים לתאורים ולתמונות הקיימות בספרות.

4.2.2. שיטה מולקולרית – ריצוף מקטעי ברקוד

ה-DNA הגנומי של התבדידי אסקה יחד עם 9 מינים נוספים שבודדו בישראל (טבלה 1) נשלח לריצוף בארבעה מקטעי רצף גנטי המשמשים "ברקודים מולקולריים" מקובלים לזיהוי פטריות:  $\beta$ -tubulin, Large subunit (LSU), Elongation factor 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tub) ו-ITS. כהכנה לפני הריצוף, בבוצעה הגברה ב-PCR עם זוגות תחלים בהתאם לכל מין ו-DNA הנ"ל. הדוגמאות נבחנו לנוכחות התוצרים הרצויים באמצעות הרצה בג'ל אגרוז לפי המתואר בסעיף 4.6. דוגמאות חיוביות נוקו באמצעות הערכה המסחרית (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up) בהתאם לפרוטוקול ורוצפו ב

730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems™, בחברת Macrogen, הולנד). הרצפים שהתקבלו הושוו לרצפים קיימים במאגרי המידע באמצעות BLAST (Altschuls et al., 1990). מין הפטריה הוגדר על פי התאמה בין לפחות שלושה מהמקטעים שרוצפו לבין המידע הקיים במאגרי המידע (מעל 90% התאמה) ובהתאמה לזיהוי המורפולוגי.

#### 4.2.3. השוואת מקטעי ה-ITS של התבדידים

לאחר בחירת מקטע ה-ITS כמקטע המטרה לתכנון התחלים (התהליך מתואר בהמשך בסעיף 5.1.2), היה עלינו לאמוד את השונות ברצפים בין התבדידים שברשותנו: תבדידי אסקה והתבדידים האחרים מהאוסף המקומי. לצורך כך, הרצפים הושוו אחד לשני ליצירת מטריצת מרחקים גנטיים של התבדידים (במקטעי השונות של ITS) באמצעות באמצעות Pairwise Distance (Thompson et al., 1994) בתוכנה MEGA X.

טבלה 1: רשימת התבדידים שנשלחו לריצוף בארבעה מקטעים גנומיים: ITS, LSU, EF1- $\alpha$  ו- $\beta$ -tub. לצורך זיהוי מולקולרי ולתכנון תגובת ה-PCR הספציפית לכל מין.

שם המחלה	זיהוי המין על פי מורפולוגיה	שם התבדיד באוסף
ESCA	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Pch5
ESCA	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	Pmi8
ESCA	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Fom3
Botryosphaeria Dieback	<i>Diplodia seriata</i>	t24
Botryosphaeria Dieback	<i>Neofusicoccum parvum</i>	t40
Botryosphaeria Dieback	<i>Diplodia mutila</i>	BOT4
Phomopsis Dieback	<i>Phomopsis viticola</i>	t177
Eutypa Dieback	<i>Eutypa lata</i>	t232
GTD	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	t88
GTD	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	t172
פתוגני למיני צמחים אחרים	<i>Fusarium sp.</i>	t189
פתוגני למיני צמחים אחרים	<i>Diaporthe ampelina</i>	t191

טבלה 2: רשימת התבדידים ששימשו לבדיקת הספציפיות של הפריימרים שתוכננו למקטע ה-ITS.

מקור התבדיד	שם המחלה	סוג ומין	סימון התבדיד
כרם מהדרין, רמות נפתלי כרם אלרום, צפון רמת הגולן בנימינה כרם אלרום, צפון רמת הגולן חוות פיכמן, צפון רמת הגולן בנימינה כרם אלרום, צפון רמת הגולן	ESCA	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Fom3
		<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Fom23
		<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Pmi8
		<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Pmi20
		<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Pch5
		<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Pch3
לא ידוע לא ידוע כרם אלרום, צפון רמת הגולן אלקוש כרם מהדרין, רמות נפתלי כרם מהדרין, רמות נפתלי	Botryosphaeria dieback	<i>Neoscytalidium sp.</i>	t233*
		<i>Lasiodiplodia sp.</i>	t234*
		<i>Botryosphaeria stevensi</i>	BOT3
		<i>Diplodia mutila</i>	BOT4
		<i>Diplodia seriata</i>	t24
		<i>Neofusicoccum parvum</i>	t40
כרם אלרום, צפון רמת הגולן ענב טלי, מושב איתן, לכיש כרם אלרום, צפון רמת הגולן ענב טלי, מושב איתן, לכיש	Phomopsis dieback	<i>Phomopsis viticola</i>	t177
		<i>Diaporthe ampelina</i>	t191
		<i>Diaporthe neoviticola</i>	t206
		<i>Phomopsis samarorum</i>	t114
כרם אלרום, צפון רמת הגולן חוות פיכמן, צפון רמת הגולן	Eutypa dieback	<i>Eutypa leptoplaca</i>	t192
		<i>Eutypa lata</i>	t232
כרם מהדרין, רמות נפתלי בנימינה בנימינה חוות פיכמן, צפון רמת הגולן כרם אלרום, צפון רמת הגולן עמיקם לא ידוע לא ידוע	GTD	<i>Phaeoacremonium cinereum</i>	t47
		<i>Acremonium sp.</i>	t81
		<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	t88
		<i>Acremonium sclerotigenum</i>	t172
		<i>Fomitiporella sp.</i>	t180
		<i>Acremonium citrinum</i>	t187
		<i>Phoma sp.</i>	t237*
		<i>Colletotrichum sp.</i>	t238*
לא ידוע	Persimmon fruits pathogenic	<i>Alternaria sp.</i>	t235*
לא ידוע	Powdery mildew	<i>Erysiphe necator</i>	Ery**
לא ידוע		<i>Verticillium sp.</i>	t236*
כרם אלרום, צפון רמת הגולן		<i>Penicillium sp.</i>	t223
כרם אלרום, צפון רמת הגולן		<i>Aspergillus sp.</i>	t219
חוות פיכמן, צפון רמת הגולן		<i>Scytalidium cuboideum</i>	t167
ענב טלי, מושב איתן, לכיש		<i>Fusarium sp.</i>	t189

\* תבדידים של פטריות אחרות שוכנות גזע, התקבלו מהמעבדה של ד"ר דוד עזרא, המחלקה למחלות צמחים וחקר העשבים במינהל המחקר החקלאי (מכון וולקני), בית דגן.

\*\* תבדיד של קמחון הגפן שגודל בתנאי מעבדה, התקבל מהאוסף של פרופ' משה ראובני, מכון שמיר למחקר, קצרין.



#### 4.3. תנאי גידול התבדידים

##### 4.3.1. אוסף תבדידי הביקורת

כל תבדיד הודגר במשך 2-4 שבועות ב  $25^{\circ}\text{C}$  בחושך במצע PDA סטרילי בתוספת chloramphenicol ( $250\text{mg/L}$ ) ולאחר התפשטות התפטיר על מעל 80% משטח הצלחת, אוחסן ב-  $4^{\circ}\text{C}$  עד להפקת DNA או ריבוי מחדש. חידוש התבדיד נעשה אחת ל-2-3 חודשים על ידי העברת מקטע מהתפטיר למצע סטרילי חדש.

##### 4.3.2. גידול מושבות מנבגים

במהלך המחקר הנוכחי בוצעו זריעות לבידוד מתוך תרחיפי נבגים וגם, בודדו מושבות מנבג אחד (SCC) לאחר הגדרת התבדידים. אם תרחיף הנבגים הגיע מדיגום בשטח, נזרעו  $100\mu\text{l}$  תרחיף על צלחות עם מצע PDA+ch  $\frac{1}{4}$  סטרילי בצלחות פטרי מפלסטיק בקוטר 9mm. לאחר גידול של מספר ימים (עד נביטת הנבגים על המצע) בתנאי חושך ב  $25^{\circ}\text{C}$ , מושבות רצויות הועברו למצע PDA+ch והודגרו באותם תנאים. במקרה בו מקור תרחיף הנבגים היה בתבדיד מזוהה על צלחת (בידוד SCC), התרחיף נזרע על מצע PDA+ch ישירות וגודל באותם תנאי אינקובציה.

#### 4.4. בידוד פטריות אסקה

##### 4.4.1. בידוד מגזע גפן

צילינדר של רקמת העצה באורך 5cm בעובי 5mm נלקח משלושה מקומות בגזע הגפן באמצעות קידוח עם מקדח עצים. מקטעים בקוטר 5 מ"מ נזרעו על מצע PDA+ch  $\frac{1}{4}$  לאחר חיטוי חיצוני גס באמצעות טבילה באתנול (99%) ושריפה בלהבה גלויה למשך מספר שניות. מעקב יומי בוצע אחרי גדילת המושבות ומושבות שנחשדו כפטריות אסקה (על פי צורת התפטיר), הועברו לצלחות פטרי חדשות עם מצע PDA+ch סטרילי ונוקו ע"י העברת חלקי תפטיר לצלחות חדשות.

##### 4.4.2. בידוד ממלכודות נבגים

נבגים המופצים באויר נדגמו בשטח באמצעות מלכודת נבגים שהוכנה מזכוכית נושא מרוחה בשכבה דקה של וזלין (Eskalen et al., 2001). המלכודות נתלו על הגזע ועל הקורדון של גפנים בעלות תסמינים בכרם או סביבן במרחקים שונים. לאחר 7-14 יום המלכודות נאספו, נשטפו ב-20 מ"ל מים סטריליים והתרחיף סונן פעמיים: פעם ראשונה במסנן גס ( $10\mu\text{m}$ ) לסילוק החלקיקים הגסים מהתרחיף ופעם שניה במסנן עדין ( $0.45\mu\text{m}$ ) עליו נתפסים נבגי פטריות האסקה ונבגי פטריות אחרים בשל גודלם. המשקע שנאסף מעל המסנן העדין, נשטף בטלטול ב-2 מ"ל מים סטריליים במשך שעה לקבלת תרחיף נבגים. במטרה לרכז את הנבגים, התרחיף סורכו במהירות 13kRPM במשך 10 דק' להשקעת הנבגים בתחתית המבחנה. לאחר מכן, נפח הנוזל במבחנה צומצם לנפח של  $500\mu\text{l}$  ע"י הסרת הנוזל העליון באמצעות פיפטור עם טיפים סטריליים. משקע הנבגים הורחף באמצעות נייעור בוורטקס ו- $10\mu\text{l}$  נדגמו

לצורך וידוא הימצאות הנבגים בדוגמא תחת הגדלה של Ph2 X400 100µl. תרחיף בנפח, 100µl נזרע והודגר על מצע. לאחר 14-28 ימים, מושבות חשודות כאסקה או GTD בודדו לצלחות חדשות.

#### 4.4.3. בידוד מושבות מנבג אחד - (SCC – Single cell colonies)

על מנת לקבל מושבות הומוגניות גנטית, בודדו מושבות SCC למיני הפטריות שהנביגו בתנאי המעבדה. הנבגים נדגמו מהתבדידים בתנאים סטריליים לתוך מבחנה עם 1 מ"ל מים, נספרו בהמיציטומטר תחת הגדלה של מיקרוסקופ פאזות Ph2 X400 ונמהלו בסדרת מיהולים לריכוז שלא יעלה על 100 נבגים ל-100µl. לאחר מכן, 100µl מתרחיף זה נזרע על מצע PDA + ch. כ 3-4 ימים מהנביטה, נבחרה בצורה אקראית מושבה שמקורה בנבג אחד והועתקה למצע חדש.

#### 4.5. הפקת DNA

במחקר זה בוצעו הפקות DNA משלושה סוגים של דוגמאות: ישירות מתפטירים שהתפתחו על צלחות פטרי בתנאי מעבדה, מתוך רקמות עץ שנדגמו בקידוח או חיתוך מקטעי זמורה ותרחיפי נבגים. בסיום כל הפקה, ה-DNA נשטף באמצעות אתנול 70%, הורחף במים סטריליים ומזוקקים פעמיים בנפחים המתאימים לכל סוג הפקה ואוחסן בהקפאה (20 °C –) עד לשימוש.

##### 4.5.1. תפטיר

ה-DNA הופק מתפטיר שמקורו בנבג יחיד. חתיכת תפטיר קטנה, אך נראית לעין על קצה של לולאה סטרילית, נלקחה למבחנה עם 300µl תמיסת "yeast cell lysis" (YCL) מהערכה המסחרית: MasterPure™ yeast DNA purification kit (Lucigen). הדוגמא הודגרה באמבט חימום ב-65°C במשך 15 דק' לעצירת הפעילות החלבונית ופרוק הדפנות. לאחר הפרדה של חומצות גרעין מחלבונים ושברי תאים נעשתה באמצעות ריאגנט MPC Protein Precipitation וחומצות הגרעין הושקעו ב-500µl איזופרופנול (100%) קר, והמשקע נשטף ב-500µl אתנול אנליטי 70%. המשקע הורחף במים מזוקקים וסטריליים ואוחסן ב 20 °C – עד לשימוש.

##### 4.5.2. רקמת גפן מעוצה

הפקת DNA מהרקמות המעוצות של הגפן בוצעה ע"פ Retief et al. (2005), עם מספר התאמות. ה-DNA הופק מרקמת העצה בגזע גפן בוגרת, מזמורות מעוצות בגיל שנה ומייחורי גפן שהוכנו מזמורות חד-שנתיות שנאספו בשטח והודבקו באופן מבוקר בניסויי חממה. בדוגמאות שנאספו בכרמים באמצעות קידוח, אזור הדיגום להפקה (על הצילינדר) נבחר על פי הופעת סימני ריקבון לכן או השחרה בצינורות ההובלה. במקרים בהם סימנים אלה לא נצפו על הצילינדר, הדוגמא להפקה הורכבה משלושה מקומות לאורך הצילינדר. כאשר הופק DNA מצמחים שהודבקו בצורה מלאכותית בחממה, החיתוך בוצע

5 מ"מ מתחת לאזור ההדבקה. להפקת DNA מפצעי הזמירה בכרם נלקחה רקמה שכללה פצע הזמירה והרקמה שמתחת לפצע.

רקמה מעוצה במשקל 0.3g, רוסקה בתוך שקית כתישה באמצעות פטיש ונכתשה בחנקן נוזלי למרקם אבקתי בעזרת מכתש ועלי. לאחר מכן, הדגימה הועברה לשקית עם דופן כפולה בתוספת בופר הפעילות החלבונים. הפרדת החלבונים ושברי התאים מחומצות הגרעין נעשתה על ידי הוספת 400µl isoamyl-alcohol:(24) chloroform (1) ל 550µl מהתסנין וסרכוז המבחנה במשך 15 דקות במהירות 5800rpm ב-4°C. נוזל מהפאזה העליונה הועברו למבחנות חדשות בתוספת 50µl sodium acetate (3M pH=5.5) ו-600µl איזופרופנול. לאחר הדגרה ב-20°C למשך שעה להשקעת ה-DNA, הדוגמא סורכזה ב-13,000rpm במשך 10 דקות, המשקע נשטף ב-1ml אתנול אנליטי 70%, הורחף ב-100µL ddH<sub>2</sub>O סטריליים והדוגמאות אוחסנו ב-4°C עד לשימוש.

#### 4.5.3. נבגים

הפקת DNA מנבגים בוצעה באמצעות ערכה מסחרית MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Lucigen) בהתאם לפרוטוקול. תרחיף בנפח 100 µl הועבר למבחנת אפנדורף בתוספת כ-300mg כדורי זכוכית בגודל 0.2mm – 0.6 ו-300µl תמיסת (YCL) Yeast cell lysis. התרחיף נוער פעמיים בהומוגניזר "כדורים" (BeadBug™ Microtube Homogenizer) במהירות 3400rpm במשך 90 sec לפני הדגרה באמבט מים ב-65°C במשך שעה. המשך הפקת ה-DNA נעשה על פי הפרוטוקול של הערכה כמפורט בסעיף 4.5.1. לאחר ההפקה, הדוגמאות אוחסנו ב-4°C.

#### 4.6. הגברה ב-PCR

ההגברה בוצעה בשלב אחד (PCR רגילה) כאשר הדוגמאות הכילו רק את ה-DNA של תבדידי המטרה. כאשר הדוגמאות הכילו non-target DNA, התגובה בוצעה בשני שלבים (nested PCR): בשלב הראשון, עם פריימרים ITS1 ו-ITS4 ובשלב השני, תוצרי ה-ITS שנמהלו ביחס של 1:50 (v/v) הוגברו עם פריימרים ספציפיים לכל מין בנפרד.

בתגובות לקבלת תשובה חיובית/שלילית לגבי נוכחות מקטע ספציפי נפח מבחנת הראקציה היה 10 µl או 25µl בתגובות לריצוף. כל מבחנת תגובה הכילה: תמיסת מסחרית Taq Ready Mix(2X) של חברת Hy-Labs (5 או 12.5µl בהתאמה לנפח הסופי), פריימרים (forward ו-reverse) בריכוז 0.5µM (0.25 או 0.625µl בהתאמה לנפח הסופי) לכל פריימר ו-DNA הנבדק בכמות בין 1µg – 5pg (1 או 2.5µl). מים סטריליים מזוקקים פעמיים ללא נוקלאזות שימשו להשלמת הנפח הסופי בהתאם לכל תגובה. תכנית ההגברה: -94°C למשך 3 דקות (Initial Denaturation), לאחר מכן, 35 מחזורים: 94°C למשך 30 שניות (Denaturation step), טמפרטורת annealing והזמן בהתאם לכל זוג פריימרים (Primers annealing (טבלה 3), 72°C למשך 1 דקה (Extention step) ולבסוף, 72°C למשך 10 דק' (Final extention).

#### 4.7. זיהוי תוצרי ההגברה

##### 4.7.1. זיהוי תוצרי ה-PCR בוצע בשתי שיטות: QIAxcel

בחלק מהניסויים, תוצרי התגובה נסרקו באמצעות מכשיר QIAxcell של חברת QIAGEN. מכשיר זה דוגם באופן אוטומטי מתמיסות התוצרים ומבצע אלקטרופורזה בתוך מיקרוקפילרות. לבסוף מתקבל פלט ממוחשב הכולל את גדלי התוצרים ביחס לסולם גודל המסופק עם הערכה להפעלת המכשיר וריכוזם.

##### 4.7.2. אלקטרופורזה בג'ל אגרוז

4µl מכל דוגמא הוטענו לתוך בארית בג'ל אגרוז 1.2% עם תמיסת TAE0.5 (Tris base SafeView™ Classic 20mM, Acetic acid 10mM, EDTA) 0.5mM גרעין חומצות גרעין (abm®) שהוסף לתוך תמיסת הג'ל ולתוך בופר ההרצה (בנפח 5µl צבען לכל 100ml). לצד הדוגמאות הוטען סולם גודל היה GenDireX, 100bp DNA Ladder H3 RTU (Ready-to-Use) של חברת, Inc. לאחר מכן, הפרדת התוצרים נעשתה בשדה חשמלי במתח של 100V למשך 40 דקות. בסיום ההרצה, הג'ל צולם במצלמה ENDURO™ GDS Gel Documentation System עם חשיפה לתאורת UV. זיהוי התוצר המבוקש נעשה ע"י השוואת אורך התוצר שהתקבל לאורך הצפוי על סמך הגובה ביחס לסולם הגודל בכל הרצת ג'ל או Qia

#### 4.8. התחלים ששימשו לביצוע המחקר

##### 4.8.1. תחלים אוניברסליים

רצפי התחלים האוניברסליים להגברת מקטעים גנומיים של פטריות והתכניות הטרמינות המתאימות, נלקחו מעבודות קודמות (טבלה 3). תחלים אלה משמשים לברקודינג וזיהוי עד לרמת המין בממלכת הפטריות.

טבלה 3: רשימת התחלים האוניברסליים ששימשו לצורך ביצוע המחקר.

מקור	אורך התוצר (bp)	Ta(°C)	אורך התחל (bp)	רצף (5'→3')	שם התחל
תחלים כלליים מהספרות					
(Rehner et al., 2005)	~1000	56	23	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	EF1-983F
			23	AT GAC ACC RAC RGC RAC RGT YTG	EF1-2218R
(Glass et al., 1995)	~500	55	24	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Bt2a
			24	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Bt2b
(White et al., 1990)	~450-800	55	22	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	ITS1F
			20	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	ITS4
(White et al., 1990)	~1200	52	17	ACC CGC TGA ACT TAA GC	LROR
			17	CGC CAG TTC TGC TTA CC	LR6

#### 4.8.2. תכנון תחלים ספציפיים לזיהוי פטריות האסקה

על מנת לזהות את מיני הפטריות המעורבות במחלת האסקה בישראל תוכננו תחלים ספציפיים למיני המטרה Fom, Pmi ו-Pch על בסיס רצפים של תבדידים מאוסף התבדידים שברשותנו. התחלים תוכננו כך שהראשון (forward primer) ישלים לאזור ה-ITS1 והשני (reverse primer) לאזור ה-ITS2 בגנום הפטריות, מכיוון שאלו הם אזורי השונות השמורים בתוך המין והם תחומים ברצפים שמורים בתוך הממלכה (מקודדים לתת היחידות הריבוזומליות של הפטריות). המקטע המוגבר (מקטע המטרה) תוכנן בהתאם לרצף של כל מין והוא כולל חלקים מאזורי השונות ואת תת היחידה 5.8S של ה-RNA הריבוזומלי ביניהם. פרוט תהליך התכנון מתואר בסעיף 5.1.2.

טבלה 4: תחלים ספציפיים לפטריות ESCA כפי שתוכננו למטרת העבודה

מקור	אורך התוצר (bp)	Ta(°C)	אורך התחל (bp)	רצף (5'→3')	שם התחל
תכנון תחלים	522	62.6	22	AGCGGGGTAACACTTTCTAGC	Fom2F
			22	AGTACCTGTCCGACATATAGGC	Fom2R
	431		24	TGTGAACATACTGTTTTCGTTGC	Pmi3F
			21	AGCGAGGTGTAAACTACTGCG	Pmi3R
	421		24	TTATCATACTTTGTTGCTTTGGC	Pch3F
			22	TCAGTGTATGCTTGATTGCTCG	Pch3R

#### 4.9. תאור חלקות הניסוי

##### 4.9.1. חלקה מבוגרת עם נגיעות גבוהה

הניסויים נערכו בכרם סמוך לאלרום בצפון רמת הגולן (33°10'03.5"N 35°47'55.3"E) בחלקה מזן סוביניון בלאן שניטעה ב-1993. כיוון הנטיעה של השורות מדרום לצפון, מרחק הנטיעה הגפנים הוא 1.5m בתוך השורה ו-3m בין השורות עם 65 גפנים בשורה וצורת ההדליה היא שילוב שריגים אנכי. על פי תסמיני עלווה, שיעור הנגיעות באסקה באוגוסט 2019, נאמד בכ-35%. הצבת המלכודות על הגפנים בחלקה בוצעה בצורה זהה למתואר בסעיף והדיגום נמשך 66 ימים בין ה-27/2/20 ל-3/5/20.

##### 4.9.2. חלקות נוספות עם תסמיני עלווה

חלקות נוספות בצפון רמת הגולן ששימשו לאיסוף דגימות לצורך המחקר היו: אלרום – לוע (32°47'59.0"N 33°07'29.4"E), זן קברנה סוביניון, נטיעת 2005, גשור (33°07'25.9"N 35°48'14.1"E), זן קברנה סוביניון, נטיעת 2003, חוות פיכמן (35°43'24.4"E), זן קברנה סוביניון נטיעת 2015, וכרם הרוח (33°08'03.3"N 35°48'25.6"E), זנים שיראז וקברנה פרנק נטיעת 2005.

4.9.3. חלקה צעירה ללא תסמיני עלווה – חלקה מזן שרדונה, שנת נטיעה 2013, סמוך לאלרום, צפון רמת הגולן (33°10'46.7"N 35°46'34.6"E). כיוון הנטיעה של השורות ממזרח למערב, וצורת ההדליה היא שילוב שריגים אנכי, מרחק הנטיעה בין הגפנים הוא 1.5m בתוך השורה ו-3m בין השורות, עם 30-65 גפנים בשורה. באוגוסט 2020 לא נצפו בחלקה תסמיני עלווה של אסקה.

5. המהלך הניסויי

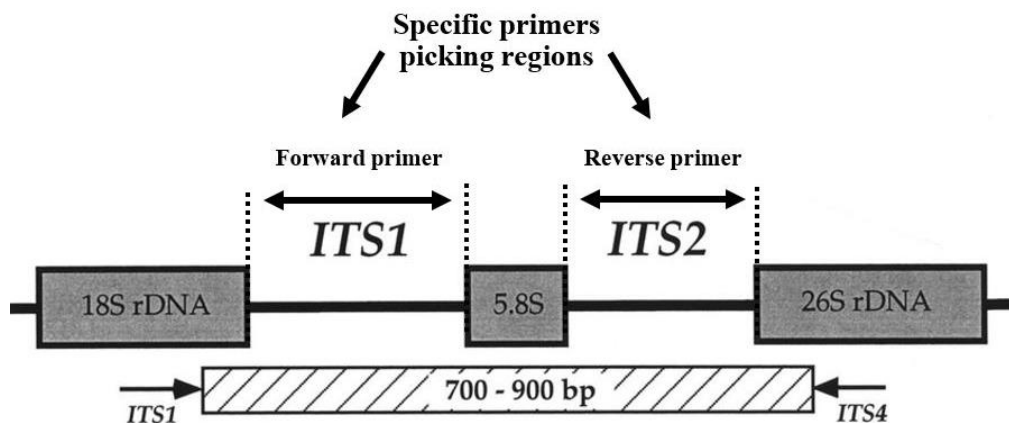
5.1. תכנון התחלים הספציפיים והתאמת תנאי ה-PCR

5.1.1. רצפי המטרה

על מנת לבחור ולסמן את האזורים הרצויים לחיפוש רצפי הפריימרים להגברת מקטעי המטרה, נבדקו ארבעה מקטעים גנומיים המשמשים לזיהוי ספציפי של פטריות במחקרים שונים:  $\beta$ -tub, EF1- $\alpha$ , LSU ו-ITS (סעיף 4.2.2). מקורו ה-DNA הגנומי שרוצף במקטעים אלה – מהתבדידים המפורטים בטבלה 1. הרצפים שהתקבלו בריצוף, הושוו ביניהם (השוואה נפרדת לכל מקטע) באמצעות האלוגריתם במאגרי המידע באמצעות BLAST. בהתבסס על השוואה זו ותוצאות החיפוש (טבלה 2 וטבלה 3 נספחים בהתאמה), בחרנו להתמקד במקטע ה-ITS1-ITS4. בתוך רצפי המקטע ITS1-ITS4 של כל מין, סומנו גבולות מקטעי השונות ITS1 ו-ITS2. תיחום הרצפים נקבע על סמך ביצוע השוואה של הרצפים השמורים של תת היחידות הריבוזומליות מהספרות (קישורי accession לרצפי ההשוואה: Pch: [KX881594.1](#), Pmi8: [DQ404355.1](#), Fom3: [AF515578.1](#)) לרצפים השלמים במקטע זה של תבדידי Pmi8 ו-Pch5 מהאוסף הקיים במעבדה של דר' נאור במכון שמיר.

5.1.2. מציאת רצפי הפריימרים

חיפוש רצפים פוטנציאליים נעשה באמצעות התוכנה Primer3Plus (Rozen et al., 2000) במקטעי השונות ITS1 ו-ITS2 בלבד (איור 1). הגדרות נוספות הוגדרו לפני הרצת האלוגריתם: אורך התחלים בין 22-24bp, אורך תוצרי ההגברה בין 400-550bp, התחלים בעלי פוטנציאל נמוך לדימריזציה במהלך התגובה, ללא רצפים חוזרניים, ללא אזורים משלימים בשני הקצוות (כדי להימנע מהתקפלות לצורת "סיכת-שיער" – hairpin) והפרש טמפרטורות ההיצמדות (Ta) לא עולה על 2°C. בתום ההרצה, הוצעו 4 זוגות תחלים פוטנציאליים לכל מין של פטריית אסקה (טבלה 4 נספחים). זוגות תחלים אלה, נבדקו בתגובות PCR עם DNA מתבדידי פטריות שונות (טבלה 5 נספחים) מול תבדידי אסקה מייצגים (Pch5 ו-Fom3).



איור 1: אזורי השונות במקטע ITS בהם בוצע חיפוש הרצפים המתאימים ביותר של הפריימרים הספציפיים. האיור נלקח מהעבודה של Shaw et al. (2002) ועליו סומנו באופן סכמטי גבולות אזורי החיפוש.

5.2. בדיקת הספציפיות והרגישות של התחלים שתוכננו לזיהוי מיני האסקה על DNA ממקורות שונים. במטרה לבדוק את התחלים שתוכננו ולוודא כי הם נצמדים באופן ספציפי למקטעי המטרה ללא הגברה של מקטעים אחרים (off-targets), נערכו מספר ניסויים על DNA ממקורות שונים. ההבדל בין הניסויים היה מקור הדוגמאות שקבע את רמת ה"ניקיון" של DNA המטרה, שילוב DNA מתבדידים שונים וריכוז ה-DNA הנבדק. על מנת לאמת את זיהוי המין הנבדק, מקטעי DNA נבחרים בגדלים המתאימים שעלו במהלך הניסויים הנ"ל, בודדו מתוך הג'ל ונשלחו לריצוף במעבדה חיצונית.

### 5.2.1 DNA מתבדידים

DNA שהופק מתפטיר של 34 תבדידים שכללו 6 תבדידי אסקה (2 מכל מין) שמשו כביקורות חיוביות, עשרים מינים אחרים שבודדו מגזעים של גפנים וידועים כפתוגנים של מחלות גזע בגפנים ומיני פטריות נפוצות אחרות שמשו כביקורת שלילית (טבלה 1) בנוסף, למבחנת ביקורת ללא DNA. בחינת רגישות התחלים בוצעה באנליזת ה-PCR יחידה לכל זוג תחלים בנפרד לפי המפורט בטבלה 3.

### 5.2.2 תערובת DNA של פטריות אסקה

הבחינה נערכה על תערובת של DNA שהופק מתפטיר משלושה תבדידים של פטריות האסקה בכל הצרופים האפשריים. ריכוזי ה-DNA נמדדו באמצעות ננודורופ ולאחר מכן, כל הדוגמאות נמהלו לריכוז של 30ng לתגובה. כל צירוף DNA הוגבר בנוכחות כל אחד מזוגות התחלים בנפרד ה-PCR בוצעה בשלב אחד.



### 5.2.3. כלל ה-DNA מצמחים שהודבקו בפטריות אסקה באופן מלאכותי

יחורים מזמורות גפן נלקחו מחלקה צעירה (חוות פיכמן) מגפנים בריאות. היחורים הושרשו וכל יחור אולח באחד ממיני פטריות האסקה בנפרד. האילוח נעשה בפצע הזמירה העליון על ידי טיפת תרחיף (בנפח 20µl) שהכילה כ- 100 או 1000 נבגים של Pmi ו-Pch או באמצעות הנחת חתיכת תפטיר של Fom, כיוון שמין זה אינו מנביג בתנאי מעבדה. למניעת התייבשות, והגדלת הסיכוי לחזירת הפתוגנים, איזור ההדבקה נעטף בפרפילם. כלל ה-DNA הופק מרקמת העצה לאחר 26 חודשי גידול עבור Fom ו-13 חודשים עבור Pmi ו-Pch. צמחי הביקורת בניסוי זה היו יחורים לא מאולחים. ה-DNA הוגבר ב-PCR nested כמתואר בסעיף 4.6 כיוון שהדוגמאות בניסוי זה הכילו non-target DNA. ניסוי נוסף בהדבקת יחורים נערך עם חומר צמחי מאותה חלקת גפנים (חוות פיכמן) בשנה העוקבת (2019). ניסוי זה בוצע עם 5 חזרות לכל קבוצת טיפול (הדבקה בפטריות אסקה מול הדבקה במים כביקורת) מול חזרה אחת לכל מין בניסוי הקודם.

### 5.2.4. כלל ה-DNA מגפנים סימפטומטיות וא-סימפטומטיות בכרמים

דגימות עצה נאספו בשיטת הקידוח משלוש גפנים בעלות תסמינים ומשלוש גפנים ללא תסמינים. הדגימות נאספו בארבעה כרמים בהם נצפו תסמיני עלווה המזוהים עם אסקה ברמת הגולן: חוות פיכמן (קברנה-סוביניון, 2015-2016), כרם הרוח (שיראז וקברנה פרנק, 2005), כרם אלרום – לוע (קברנה סוביניון, 2005) וכרם גשור (קברנה סוביניון, 2003). ה-DNA הוגבר באנליזת nested PCR כמתואר בסעיף 4.6.

### 5.2.5. בדיקת ספציפיות ברמת הרצף

במטרה לוודא כי התוצר המוגבר הוא התוצר הרצוי, תוצרי ההגברה נוקו מהג'ל ונשלחו לריצוף עם התחלים הספציפיים לחברת Macrogen, הולנד. תוצאות הריצוף שהתקבלו, הושוו עם רצפים של פטריות אסקה מהאוסף המעבדתי. מספר מקטעים נבחרו לצורך ביצוע בדיקה זו (טבלה 4): מקטעי מטרה שהוגברו בתגובות עם DNA מתרחיפי נבגים ופריימרים בפציפיים לאחת פטריות האסקה וגם, תוצר PCR בגודל 500bp שהוגבר עם תחלים לזיהוי Pmi ו-DNA מתפטיר של *Scytalidium cuboideum*, במטרה לזהות off-target ברמת הרצף אם התגובה אינה ספציפית. עבור כל דוגמת DNA שנבחרה, בוצעה תגובת nestedPCR, בהתאם למין המטרה. התגובה של השלב השני בוצעה ב-3 חזרות טכניות של אותה התבנית במטרה להגדיל את ריכוז ה-DNA בדוגמאות שישלחו לריצוף (מינימום נדרש 100ng/µl). כל המקטעים נחתכו עם סקלפל סטרילי על משטח UV, שלוש החזרות הטכניות אוחדו למבחנה אחת ו-DNA נוקה באמצעות קיט NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up לפי פרוטוקול החברה. שלבי הניקוי כללו התכת הג'ל, קשירת ה-DNA לקולונה, שטיפתה והרחפת ה-DNA. ריכוז ה-DNA נמדד באמצעות ננודרופ.

### 5.2.6. בדיקת רגישות התגובה לזיהוי פטריות האסקה

במטרה למצוא את ספי הרגישות של ה-PCR כפי שתוכננה מבחינת ריכוז מינימלי של DNA המטרה בתגובה וריכוז מינימלי של נבגי מטרה במבחנה נערכו שני ניסויים למציאת כל אחד מהמדדים בנפרד.

#### 5.2.6.1 קביעת כמות הנבגים המינימלית

על מנת לאמוד את כמות הנבגים המינימלית של נבגי המטרה שיזוהו באמצעות הבדיקה, נערכה על DNA שהופק מתרחיפי נבגים של Pch ו-Pmi בנוכחות נבגים השייכים למיני פטריות אחרות (להלן "רעש") ובהשוואה לתרחיפים נקיים של מיני המטרה. כל תרחיף הוכן, בתנאים סטריליים, על ידי גרוד התפטיר שהנביג באמצעות לולאה סטרילית, והעברת הגרוד למבחנה עם *Iml* מים. על פי ריכוז הנבגים בתרחיף הראשוני הוכנו בנפרד ל Pmi ו-Pch, 6 מיהולים עשורוניים יורדים החל מ-  $10^7$  spore/ml. תרחיף "רעש" נמהל לריכוז של  $10^6$  spore/ml. ריכוז הנבגים נמדד בהמוציטומטר. להפקת DNA נלקחו  $100\mu l$  מכל ריכוז. רגישות התגובה נבחנה באנליזת nestedPCR עם זוג תחלים ספציפיים לכל מין בנפרד.

#### 5.2.6.2 קביעת ריכוז ה-DNA המינימלי

במטרה למצוא מהו ריכוז ה-DNA המינימלי שיגביר תוצר מתאים, בוצעה אנליזת PCR לריכוזים יורדים של DNA שהופק מתפטיר של כל אחד ממיני האסקה. ריכוז ה-DNA שהתקבל נמהל לסדרה של 7 ריכוזים עשורוניים. מכל נלקח  $1\mu$  למבחנת הראקציה. רגישות התגובה נבחנה באנליזת PCR לכל מין בנפרד. בדיקת תוצרי ההגברה התבצעה במכשיר QIAxcell (סעיף 4.7.1).

### 5.3 מקור החומר הצמחי בניסויי הדבקה בחממה

חומר הריבוי להכנת יחורים נלקח מחלקה צעירה מזן קברנה סוביניון, מנסיעת ב-2015, בחוות פייכמן, צפון רמת הגולן. חומר הריבוי נלקח מזמורות רדומות של גפנים בריאות ללא תסמיני עלווה בעונת הבלבול האחרונה. להכנת היחורים שמשו מקטעים בני שלושה פרקים מבסיס הזמורה. לעידוד ההשרשה החתך התחתון בוצע דרך הניצן התחתון והקצה התחתון נטבל באבקת הורמוריל T-3 (מרחב אגרו) המכילה חומצה אינדולבוטירית (IBA) בריכוז 0.3%. היחורים נשתלו בחממה לא מחוממת במכון שמיר למחקר בקצרין בתוך מגשי השרשה במצע זוהר 4 (טוף מרום גולן) רווי במים ולאחר ההשרשה, כל יחור הועתק לעציץ 9. ההשקיה עד להשרשה במתזים ולאחר מכן בטיפטוף. הדישון עם דשן שחרור מבוקר, אוסמוקוט ICL (Specialty Fertilizers) בכמות של כחצי גרם לעציץ.

### 5.4 דינמיקת פיזור הנבגים בזמן ובמרחב

במטרה ללמוד על נוכחות של נבגי פטריות אסקה והיכולת שלהם להתפשט בחלקת כרם נגועה, נבדק הקשר של נוכחות הנבגים בחלקה לתנאי האקלים המקומיים הטבעיים לאורך השנה וגם, בוצע ניסוי מבוקר שמטרתו הייתה לבדוק האם אירוע נדיר של גשם מחוץ לעונה יתרום להפצת הנבגים של מיני האסקה.

בנוסף לכך, נערכו נסיונות ללכידת נבגים במרחקים שונים ממקורות המדבק (גפנים נגועות באסקה). בניסויים ותצפיות אלה, יושמה שיטה של לכידת נבגים על מלכודות לפי המתואר בסעיף 4.2.2 ובדיקה לנוכחות DNA של הפתוגנים בתשטיף של המלכודות באמצעות nested-PCR.

#### 5.4.1. פיזור נבגי פטריות האסקה לאורך עונות השנה

במטרה לבדוק האם וכיצד שינויים בתנאי הסביבה משפיעים על הפצת הנבגים של שלוש פטריות האסקה, הוצבו מלכודות ללכידת נבגים על גפנים בחלקה עם שיעור נגיעות גבוה (סעיף 4.2.2). המלכודות נתלו על 5 – 11 גפנים בעלות תסמיני עלווה. על כל גפן נתלו 5 – 6 מלכודות צמוד לזרוע, לגזע ובתוך סדק (אם נמצא). המלכודות הוחלפו אחת לשבוע – שבועיים במשך 28 חודשים מנובמבר 2017 עד אפריל 2019. המלכודות שהורדו נשטפו לפי המתואר בסעיף 4.3.2,  $100\mu\text{l}$  מהתרחיף נזרעו במצע  $\frac{1}{4}$  PDA + ch ו-  $100\mu\text{l}$  נוספים שימשו להפקות DNA. כלל ה-DNA נבחן בשיטת nestedPCR ע"פ המתואר בסעיף 4.6. מדדי האקלים לאורך תקופת הדיגום, נלקחו מתחנה מטאורולוגית הממוקמת בסמוך לחלקה. המדדים כללו: טמפרטורה, גשם מצטבר לתקופה, לחות יחסית ורטיבות עלה בגלל שהם מזוהים עם ההשפעה על פיזור הנבגים של קומפלקס האסקה (Van Niekerk et al., 2011b).

#### 5.4.2. השפעת גשמי קיץ על פיזור הנבגים

הבדיקה נערכה על מנת לבחון השפעת ארועי גשם בקיץ על הפצת הנבגים. כסימולציה לגשם מלאכותי נתלו מעל לגפן בעלת תסמינים 2 מתזים (Netafim VibroNet™ ספיקה:  $40\text{lh}^{-1}$ ) בגובה כ- 1.5m מעל הקרקע, במרחק של 120cm זה מזה (איור 2). קבוצת טיפול הגשם המלאכותי בניסוי כללה 5 גפנים עם תסמינים שנבחרו באקראי וקבוצת הביקורת (ללא מתזים) כללה 5 גפנים נוספות עם תסמינים השתולות רחוק מהגפנים שקיבלו "גשם". על כל גפן נתלו 5-6 מלכודות. על מנת לבדוק האם ישנה נוכחות של נבגי פטריות אסקה על הגפנים או/ו סביבן גם לפני רדת הגשם וגם, תקופה קצרה אחרי ארוע הגשם הראשון, הדיגום נערך בשני שלבים שמייצגים מרווחי זמן מארוע הגשם. בשלב ראשון הגפנים נשטפו במשך 4 שעות בכמות השווה ל-44mm גשם, המלכודות ומי השטיפה נאספו לאחר 4 ימים. בשלב שני הגפנים נשטפו באותו אופן במשך שלושה ימים עוקבים נוספים בכמות השווה ל-44mm ביום והמלכודות הוסרו 7 ימים לאחר מכן. בניגוד למתוכנן, טיפול הביקורת קיבל כ- 0.1mm גשם טבעי שירד באזור בתאריך 06/06/2019. כל גפן שמשם כחזרה ולכן כלל ה-DNA הופק לאחר איחוד התשטיף של כל המלכודות לכל גפן בנפרד.



איור 2 : צילום של מערכת ההתזה כפי שהוצבה מעל אחת הגפנים בחלקה באלרום (צילום: 28/05/2019). הגפן בתמונה שייכות לקבוצת הטיפול של הדמיית הגשם מחוץ לעונה.

#### 5.4.3 דינמיקה של פיזור הנבגים במרחב

##### 5.4.3.1 פיזור הנבגים סביב הגפן בתוך החלקה

במטרה לבחון מה מרחק הפיזור של נבגים מגפן נגועה, מלכודות נבגים נתלו סביב עשר גפנים שביטאו תסמיני עלווה ב-2017 ונמצאו כחיוביות לפטריות אסקה. המלכודות הוצבו על הגפן עצמה (מרחק 0), במרחק 75cm מהגפן ו-150cm משני צדי הגפן (איור 3). בכל מרחק הוצבו שלוש מלכודות נבגים מכל צד שנאספו לאחר שבוע. המלכודות לכל מרחק אוחדו, נשטפו וכלל ה-DNA בכל גפן הופק בנפרד מכל מרחק. הימצאות הנבגים נקבעה באנליזת nestedPCR. הימצאות נבגי אסקה במרחקים השונים הוצגה על פי אחוז הנבגים עם מוצאה הנורמל לנורמות כל אחת מפטריות האסקה.



איור 3: אופן הצבת מלכודות הנבגים בתוך השורה סביב הגפן. המלכודות (מסומנות כנקודות אדומות) נתלו על חוטים שנמתחו בין השורות בשלושה מרחקים סביב הגפנים הסימפטומטיות. שש מלכודות נתלו על זרועות הגפן (מרחק 0), 6 מלכודות במרחק 0.75m מהגפן לשני הצדדים (3 מלכודות בכל צד) ו-6 נוספות במרחק של 1.5m מהגפן לשני הצדדים. המלכודות נשטפו במקבצים של 6 מלכודות בהתאם לגפן ולמרחק.

#### 5.4.4. פיזור נבגים למרחק בהיקף החלקה

במטרה לבדוק האם הנבגים מופצים מהגפן גם למרחק גדול מהמרחק בין השורות הוצבו מלכודות נבגים על גפנים בעלות תסמינים בהיקף חלקה עם שיעור נגיעות גבוה (סעיף 5.3.1): על הגפן עצמה (מרחק 0), במרחק 1m מהגפן ו-8m מהגפן. המלכודות הוצבו על שלוש גפנים בכל אחד מארבעת כיווני הרוח (איור 4). המלכודות הוצבו בשלושה מועדים למשך 9 – 11 ימים: א. 11 – 20 באוקטובר 2019, לפני ארועי הגשם, ב. 20 – 31 באוקטובר 2019 לאחר שני ארועי גשם (10mm במצטבר לתקופת הדיגום), ג. 6 – 15 בדצמבר 2019 לאחר מספר ארועי גשם (72.5mm במצטבר לתקופת הדיגום). בכל מרחק הוצבו 5 מלכודות שנשטפו כמקבץ אחד (סעיף 4.3.1). כלל ה-DNA הופק כפי שתואר בסעיף 4.5.3 ושימש כתבנית לביצוע nestedPCR לפי המפורט בסעיף 4.6. הימצאות נבגי אסקה במרחקים השונים ובכיוונים השונים חושבה על פי אחוז הגפנים עם תוצאה חיובית לנוכחות כל אחת מפטריות האסקה.



איור 4 : אופן הצבת המלכודות בהיקף החלקה: מלכודות הנבגים (מסומנות בירוק) הוצבו בהיקף החלקה סביב גפנים בעלות תסמיני עלווה (מסומנות באדום). בכל כיוון הוצבו מלכודות סביב שלוש גפנים (שלוש חזרות) בשלושה מרחקים (0, 1m ו-8m מהגפן).

#### 5.4.5. פיזור הנבגים בחלקה צעירה ללא תסמינים מול חלקה מבוגרת

מטרת הניסוי לבדוק האם חלקת כרם צעירה ללא תסמיני עלווה של אסקה (סעיף 5.3.2), חשופה להדבקה משנית על ידי נבגים ממקור מדבק חיצוני. לשם כך, הוצבו מלכודות נבגים סביב שתי החלקות באלרום (צעירה ניטעה ב-2013, מבוגרת ניטעה ב-1993). הוצבו על 3 גפנים בשורות החיצוניות, בכל כיוון רוח. על כל אחת מ-12 הגפנים נתלו 5 מלכודות נבגים שאוחדו כמקבץ. תקופת הדיגום הייתה בין 3 – 11 במאי 2020. ה-DNA מתשטיף המלכודות הופק לפי המתואר בסעיף 4.5.3 והוא שימש כתבנית לביצוע nestedPCR לפי המפורט בסעיף 4.6. הימצאות הנבגים חושבה על פי אחוז הגפנים עם תוצאה חיובית לנוכחות כל אחת מפטריות האסקה.

### 5.5. הדבקה טבעית בכרם דרך פצעי הזמירה

הניסוי נערך במטרה לאמוד את הסיכוי להדבקה טבעית דרך פצעי זמירה בחלקה עם שיעור נגיעות גבוה (סעיף 5.3.2). הזמירה נעשתה בשני מועדים: ב-23 לינואר 2020 וב-26 לאפריל 2020. פצעי הזמירה נשארו חשופים ללא טיפול עד לדגימה. הדיגום בוצע בשלושה מועדים שונים ממועד הזמירה: 8 ימים (n=88), 31 ימים (n=90) ו-102 ימים (n=97) ממועד הזמירה, בתאריכים שונים: 03/05/2020 ו-04/05/2020 וב-27/05/2020 כך שהתקבלו שלושה טיפולים הנבדלים במשך חשיפת פצעי הזמירה (טבלה 5). בקבוצת הטיפול של הצמחים שנדגמו 102 ימים לאחר הזמירה, נבחרו 10 שורות בצורה אקראית (מלבד שורות 15 ו-16) מתוך שתי החלקות בכרם אלרום. מכל גפן עשירית בשורה נלקחה דוגמא אחת. בשני מועדי הדיגום האחרים, שבוצעו בשורות 15 ו-16 בחלקה הדרומית ב-04/05/2020 וב-27/05/2020, מכל גפן שישית נאספו 10 דגימות. הדוגמאות נחתכו מהקצוות של הזמורות באמצעות מזמרה, כל חתיכה באורך כ-1-2cm כללה את פצע הזמירה החשוף (למעלה) ואת המקטע שמתחת לפני שטח החתך של הפצע (למטה). מכל דוגמא נלקחו 0.5g מהחלק התחתון של פצע הזמירה (כ-5mm מתחת לפצע הזמירה) להפקת DNA (סעיף 4.5.3). זיהוי הפתוגנים נערך בשיטת nestedPCR עם הפריימרים הספציפיים (סעיף 4.6). הביקורות החיוביות לכל מין בתגובת ה-PCR היו דוגמאות DNA שהופקו מתבדידי פטריות אסקה. הביקורות השליליות היו: א. גפן שאולחה במים בתאריך 13/02/2019 כביקורת בניסוי הדבקה מלאכותית; ב. ביקורת ללא תבנית DNA. שיעור ההדבקה הטבעית לכל מין פטריה בנפרד חושב על פי מספר הדוגמאות החיוביות מכלל המדגם.

טבלה 5: סיכום תאריכי הזמירה והדיגום בניסוי ההדבקה הטבעית.

תאריך זמירה	תאריך דיגום	משך חשיפת הפצעים (ימים)	חלקה	n – מספר דגימות
26/04/2020	04/05/2020	8	דרומית	88
26/04/2020	27/05/2020	31	דרומית	90
22/01/2020	03/05/2020	102	צפונית ודרומית	97

### 5.6. ניתוח סטטיסטי

כל האנליזות הסטטיסטיות ובניית הגרפים בוצעו בסביבת R (R Core Team, 2016), באמצעות התוכנה R Studio (R Studio Team, 2017). בתצפיות וניסויים בהם נאספו נתונים וחושבו אחוזי התוצאות החיוביות (מול המשלים ל-1 תוצאות שליליות). שגיאת התקן ( $SE_p$ ) חושבה ע"פ חישוב שגיאת התקן של הפרופורציה  $SE_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$ . בניסויים בהם הנחנו חוסר תלות בין התצפיות והטיפוליים השונים בבדיקות PCR – נתונים בינאריים תלויים, בוצע מבחן Chi-Squared שיושם באמצעות חבילת חבילת בסיס בתוכנת R. נתונים בינאריים שנאספו מתצפיות שטח במועדים שונים מאותם גפנים, נותחו

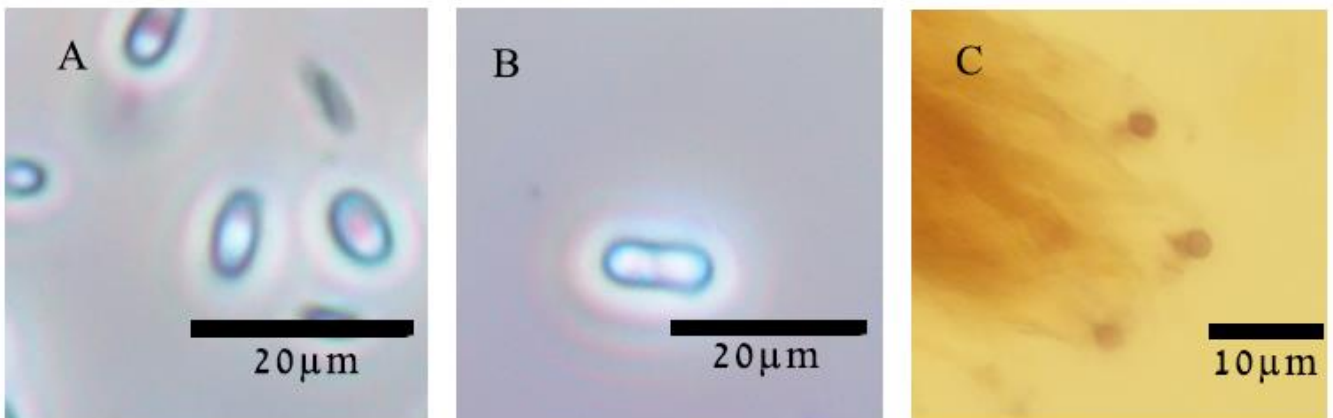
באמצעות מבחן Cochran's Q (Tarone, 1982) שיושם באמצעות חבילת ההרחבה Sweet, nonpar (2020). הוחלט כי,  $p\text{-Value} < 0.05$  ייחשב מובהק סטטיסטית. תוצאות שעלו מובהקות במבחן Cochran's Q נבדדו להשוואות מרובות באמצעות מבחן McNemar עם ביצוע תיקון בונפרוני לערכי ה-p-Value.

## 6. תוצאות

### 6.1. זיהוי התבדידים

#### 6.1.1. זיהוי מורפולוגי

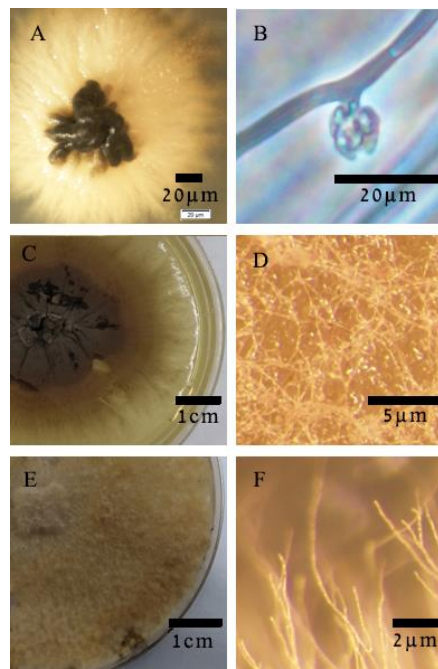
תבדידי פטריות האסקה זוהו באמצעות השוואה של מופעי המושבות כפי שנצפו בהגדלה וללא הגדלה לתאורים ולתמונות בספרות. מושבות של Pch מהאוסף המעבדתי זוהו על סמך המופע הכהה המבריק (נושאי נבגים) במרכז המושבה, שמוקף בכורים בהירים של תפטיר. בנוסף לכך, העובדה שמין זה מנביג בתנאי מעבדה, איפשרה לזהות את נושאי הנבגים והנבגים עצמם שצורתם אליפטית בהתאם לתאורים המופיעים בספרות. מושבות של Pmi זוהו על צלחות פטרי עם מצע PDA על פי ההילה הצהובה המקיפה את המושבה. המושבות שנצפו הורכבו מתפטיר כורי צפוף בצבע בהיר. גם מין זה הנביג בתנאים אליהם הוא נחשף במהלך הגידול במעבדה, מה שאיפשר לזהות את הנבגים הא-מיניים של Pmi תחת הגדלה. גופי פרי מיניים (peritecia) לא נצפו על מושבות שגודלו על צלחת פטרי. המין Fom זוהה על פי הצורה האופיינית של התפטיר הספוגי הבהיר שמתפשט על מצע הגידול וגם ממלא את חלל האוויר בצלחת בגלל נפחו. גופי פרי של Fom אותרו על חלקי גזעים מתים של גפנים שהיו חולות באסקה אחרי כ- 4 שנים לאחר עקירת הגפנים. הנבגים העגולים בצורתם, זוהו באמצעות צביעה עם ריאגנט מלצר לצביעת נבגים של פטריות בסיסה שאינם נראים תחת מיקרוסקופ אור ללא צביעה.



איור 5א: נבגי פטריות אסקה : A - Pch נבגים אל מיניים (כלמידוספורות) תחת הגדלה של X400 שנצבעו בצביעת cotton blue  
B - Pmi נבגים אל מיניים תחת הגדלה של X400 שנצבעו בצביעת cotton blue. C - Fom בסידיוספורות (נבגים מיניים) תחת הגדלה של X1000 שנצבעו בצביעת Meltzer's reagent.



איור 5: מושבות פטריות אסקה בצלחות ותחת הגדלה. Pch-A-B, A מושבה בצלחת שמתפתחת מנבג יחיד, B נושא הנבגים של Pch על קור של התפטיר, C-D, Pmi C-D, מושבה מנביגה בצלחת, D קורי התפטיר. E-F, Fom - E-F, תפטיר על צלחת, F קורי התפטיר בצלחת פטרי. צילומים A, D ו-F צולמו תחת הגדלה של בינקולר: 40X, 70X, ו-80X בהתאמה. F צולמה תחת הגדלה של 400X במיקרוסקופ פאזות Ph2 עם צביעה ב-cotton blue. F צולם תחת הגדלה 1000X עם צביעה ב-Meltzer's reagent. C ו-E ללא הגדלה.



### 6.1.2. זיהוי מולקולרי

תבדידי פטריות מהאוסף המעבדתי רוצפו בארבעה מקטעים גנומיים לצורך זיהוי ברמת המין ולאחר מכן, רצפי ה-ITS שלהם שימשו כבסיס לתכנון התחלים. הרצפים של שלושת תבדידי האסקה העלו תוצאות שתאמו למין החשוד לפחות בשלושה מקטעים (מתוך ארבעה) באחוזי דמיון מעל 99% (טבלה 6). מקטע ה-EF1 העלה אחוזי ההתאמה נמוכים ברצף, ביחס לשאר המקטעים שנבדקו, עבור רוב המינים בטבלה.

טבלה 6: זיהוי מינים המעורבים במחלות גזע בשיטה מולקולרית על פי מידת ההתאמה של רצפי התבדידים לרצפים במאגר המידע BLAST במקטעים: ITS, LSU,  $\beta$ -Tub, EF-1.

% ההתאמה לגנים ממאגרי מידע				שם המחלה	סוג ומין	שם התבדיד באוסף
EF-1	$\beta$ -Tub	LSU	ITS			
89.0	100	99.9	99	ESCA	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Pch5
99.1	99.3	96.1	99	ESCA	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	Pmi8
98.9	100	*	99	ESCA	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Fom3
96.5	99.2	97.6	99	Botryosphaeria Dieback	<i>Diplodia seriata</i>	t24
*	99.02	90.3	99	Botryosphaeria Dieback	<i>Neofusicoccum parvum</i>	t40
97.1	100	99.5	98	Botryosphaeria Dieback	<i>Diplodia mutila</i>	BOT4
95.8	99.78	99.8	99	Phomopsis Dieback	<i>Phomopsis viticola</i>	t177
93	93	93	100	Eutypa Dieback	<i>Eutypa lata</i>	t232
97.0	97.7	100	99	GTD	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	t88
85.2	100	92.9	99	GTD	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	t172
98.7	98.9	93.9	99	פתוגני למיני צמחים אחרים	<i>Fusarium sp.</i>	t189
96.2	99.3	98.7	99	פתוגני למיני צמחים אחרים	<i>Diaporthe ampelina</i>	t191

\*מקטעים שעבורם לא התקבלה תוצאה בריצוף

## 6.2. תכנון התחלים

לאחר ביצוע הבדיקה של כל התחלים, נבחר זוג תחלים אחד לכל מין מקומפלקס האסקה (טבלה 4). זוגות אלה נבחרו כי הם היו מסוגלים להגביר את תוצרי המטרה בביקורת החיובית לכל פטריה וגם, בתגובות איתם, עלו הכי פחות תוצרי off-target (טבלה 5 נספחים). עם זאת, DNA של תבדיד הפטריה *Auricularia sp.* העלה תוצר בתגובת PCR עם זוגות התחלים שנבחרו. רצפי התחלים שנבחרו מהרצף המוגדר באזורי ה-ITS של פטריות האסקה, לכל מין בנפרד נצמדו למקטעי השונות באופן ייחודי והגבירו מקטעים בגדלים ידועים בהתאם לכל מין (טבלה 4). המקטעים המוגברים כוללים חלקים מאזורי השונות ITS1 ו-ITS2 ותת היחידה הריבוזומלית 5.8S ביניהן (איור 6).

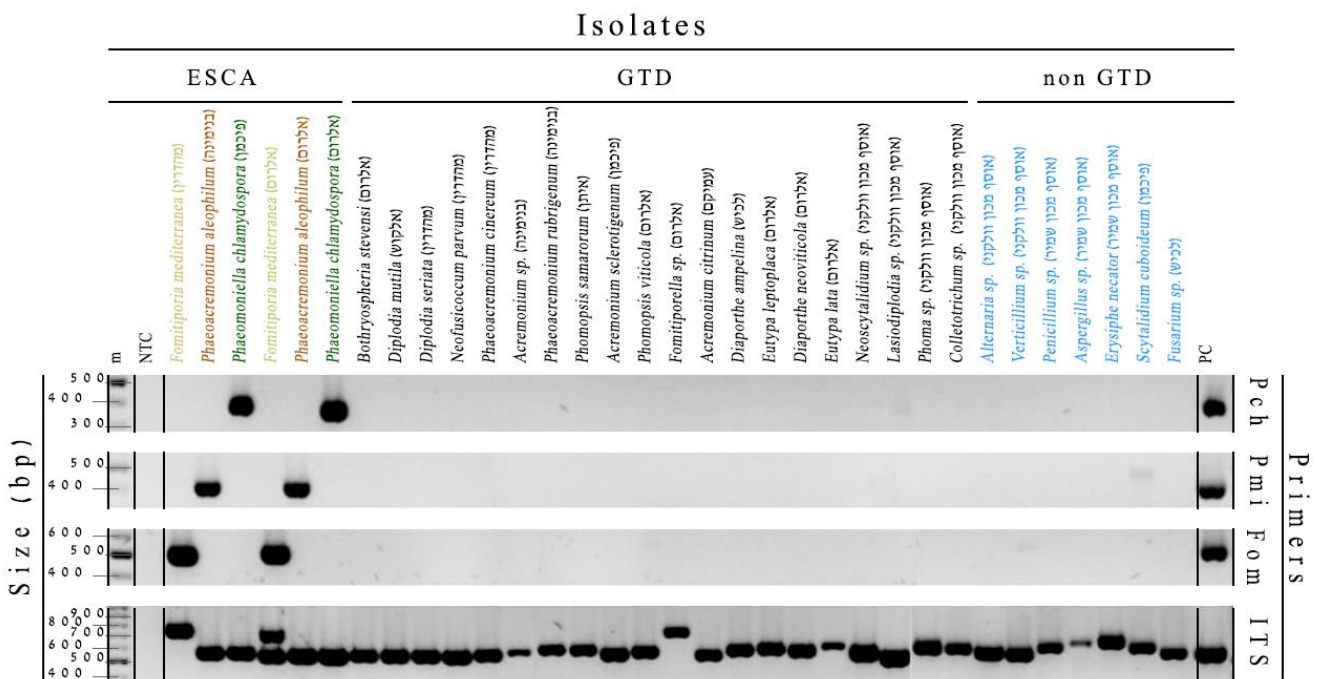


איור 6: רצפי ה-DNA באזורי ה-ITS של פטריות האסקה עם רצפי הפריימרים. מקטעי רצף ה-DNA (5'→3') של שלושת הפטריות: Peh - A, Pmi - B, Fom - C שכוללים מקטעים מתת היחידה 28S של ה-rRNA אזור השונות ITS1, תת היחידה 5.8S, אזור השונות ITS2, ומקטע של תת היחידה הגדולה 28S של ה-rRNA. האזורים השמורים של תת היחידות הריבוזומליות מסומנים בטקסט אדום ואזורי השונות מופיעים בטקסט שחור. רצפי התחלים מודגשים בהדגשה צהובה.

6.3. בדיקת הספציפיות והרגישות של התחלים שתוכננו לזיהוי מיני האסקה.

6.3.1. בחינת הספציפיות בהשוואה לתבדידים אחרים

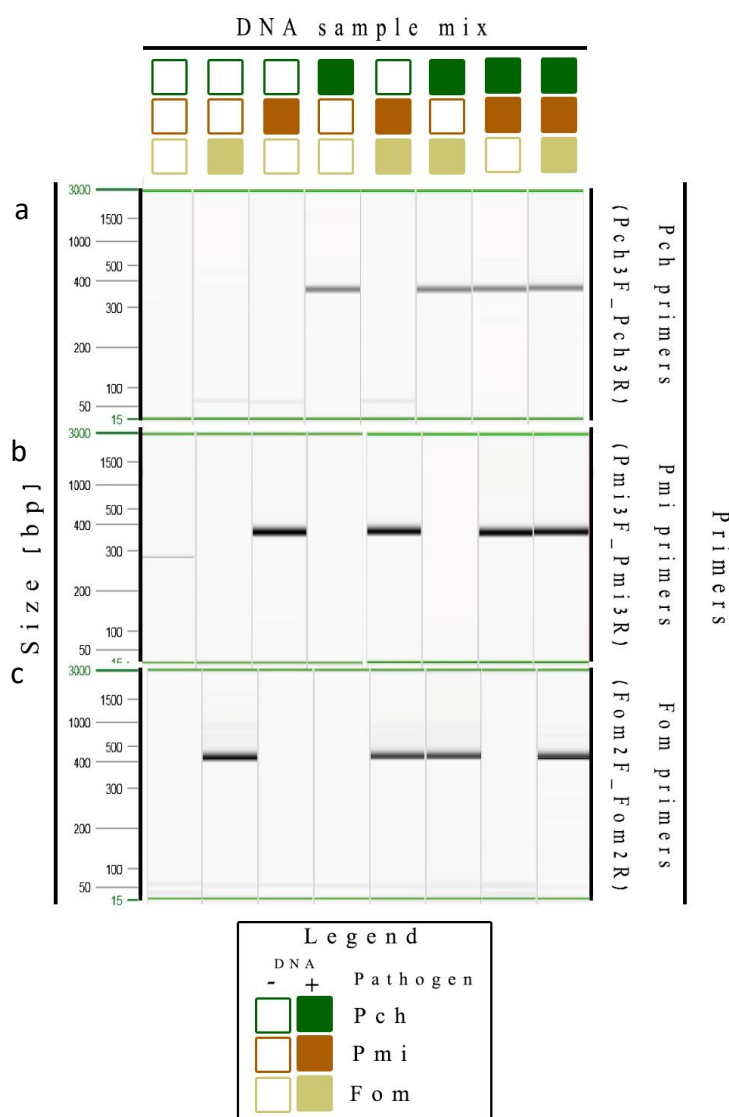
במטרה לבדוק את יחודיות התחלים ויעילות השיטה שתשמש לזיהוי המינים השייכים לקומפלקס האסקה על פי DNA, נבחנו דוגמאות DNA משני תבדידים מכל מין של פטרית אסקה: Fom3, Fom23, Pmi8, Pmi14, Pch5, Pch3, 20 מיני פטריות פתוגניות למחלות גזע אחרות ו-7 מינים פתוגניים נוספים (איור 7). הבחינה נערכה לכל דוגמת DNA בנפרד. הבחינה נערכה באמצעות תגובה דו-שלבית (nested PCR) לכל מין אסקה בנפרד בנוכחות התחלים שתוכננו לאותו מין: שלב א- הגברת מקטע באיזור ITS עם פריימרים כלליים לפטריות ובשלב שני הגברה עם הפריימרים שתוכננו ספציפית לכל מין על בסיס אותו איזור בגנום. תוצרי ההגברה בשלב הראשון הראו שונות בגדלי התוצרים בהתאם לתבדיד שנבדק. בשלב השני התקבלו תוצרי הגברה רק לששת תבדידי פטריות האסקה. התוצרים שהתקבלו היו בגדלים הצפויים: Fom 522bp, Pmi 431bp, Pch 421bp. יחד עם זאת, בנוכחות תחלים ל-ITS הוגברו שני מקטעים בגדלים שונים באחת החזרות של תבדיד Fom 23 ובנוכחות תחלים ספציפיים ל- Pmi נמצא תוצר חלש של *Scytalidium cuboideum* בגודל המתאים למקטע המטרה האמיתי (431bp).



איור 7: תמונת תוצרי ההגברה של מיני אסקה בנוכחות תחלים אוניברסליים ותחלים ספציפיים מתוכננים בהשוואה למיני פטריות נוספים שנמצאו בכרמים בישראל. תוצרי תגובות ה-PCR עם DNA שמקורו בשישה תבדידי אסקה (שני תבדידים מכל מין: Pmi, Pch, Fom), פטריות הגורמות למחלות גזע בגפנים אחרות (שחור - GTD) ופטריות אחרות שנמצאו בכרמים וסביבתם (כחול - Non GTD) עם פריימרים ספציפיים Fom, Pmi ו-Pch (בסדר יורד מלמעלה למטה) ופריימרים אוניברסליים למקטע ה-ITS (ג'ל תחתון). NTC (משמאל) - ביקורת השלילית הכוללת את מרכיבי תמיסת הראקציה ללא DNA. PC (מימין) ביקורת חיוביות - DNA שהופק מתבדידי אסקה בנפרד, רצוף במקטע ה-ITS והעלה את מיני המטרה (Pch, Pmi ו-Fom) בחיפוש הרצפים באמצעות BLAST. הביקורת החיובית ל-ITS הכילה את אותה תבנית ה-DNA של *Fusarium* sp. מהאוסף המעבדתי.

### 6.3.2 ספציפיות התחלים בזיהוי מתוך תערובות DNA

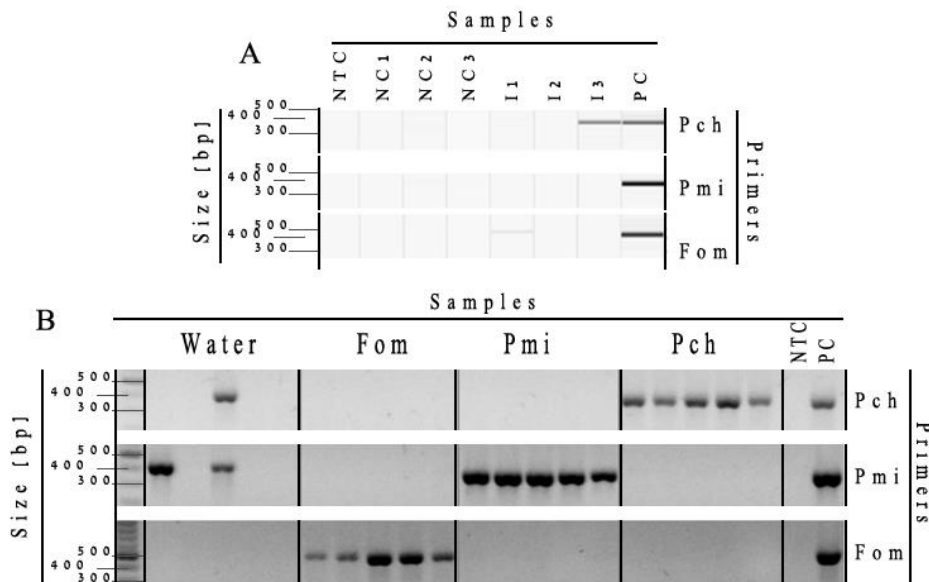
ספציפיות התחלים שתוכננו נבחנה בתערובת שהכילה DNA המטרה של שלושת מיני האסקה בתוספת DNA שאינו המטרה (non target DNA). התערובות הוכנו בכל השילובים האפשריים ונבחנו באנליזת nested PCR עם כל זוג תחלים בנפרד. נמצא שהתחלים נצמדו באופן ספציפי לכל מין על פי המצופה ולכן הוגברו והוגברו רק מקטעי DNA המטרה. גדלי התוצרים תאמו את הגדלים הצפויים (איור 8). בתגובה ללא תבנית DNA (ביקורת שלילית) עם תחלים ספציפיים ל-Pmi הוגבר תוצר PCR בגודל 290bp.



איור 8: תמונת ג'ל (QIAxcel) של תוצרי ההגברה בתערובות שונות של של תבדידי אסקה בנוכחות פריימרים ספציפיים לכל מין בנפרד (a-c). משמאל, זוגות הפריימרים ששימשו להגברה: a. Pch3F/Pch3R, b. Pmi3F/Pmi3R, c. Fom2F/Fom2R. מימין, גודל התוצר (bp). תערובת ה DNA הכילה DNA מכל הצרופים האפשריים משלושת מיני האסקה: ריבוע מלא מייצג DNA של פטריית אסקה מסויימת בתערובת ה-DNA: ירוק – Pch, חום – Pmi, צהוב – Fom. ספציפיות התחלים בזיהוי מיני אסקה ישירות מרקמת העצה של גפן

6.3.3.1 זיהוי מגפנים בהדבקה מכוונת

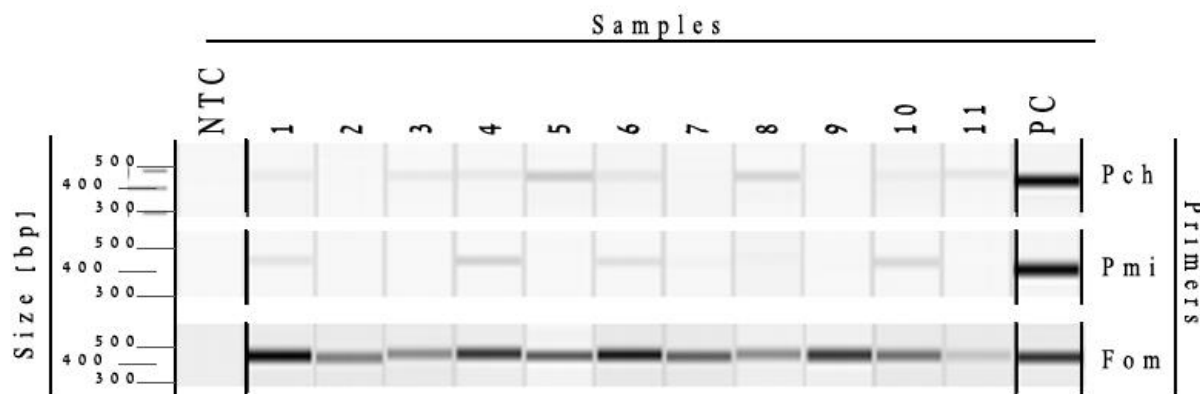
במטרה לבדוק האם ניתן לזהות DNA של פטריות אסקה ישירות מרקמות מעוצות, נערכה אנליזת nested PCR על כלל ה-DNA שהופק מרקמת העצה משלושה שתילים שכל אחד מהם הודבק בנפרד באחת מפטריות האסקה (איור 9A, I1 – I3) : I1 – הדבקה ב-Fom; I2 – הדבקה ב-Pmi; I3 – הדבקה ב-Pch; שלושה שתילים נוספים, שימשו כביקורת שלילית ללא הדבקה (איור 9A, NC1 – NC3) וכן, ביקורת שלילית ללא DNA (NTC) וביקורת חיובית (PC) לפי המתואר בסעיף 5.1.3. נמצא כי בתגובות עם DNA שהופק משלושת הזמורות שלא הודבקו בפטריות אסקה (NC 1-3), לא עלו תוצרים. בתגובות עם DNA מזמורות מודבקות ב-Pch ו-Fom, (I1 ו-I3) הוגברו תוצרים שתאמו בגדלם לגדלים הצפויים של מקטעי המטרה והביקורות החיוביות (איור 9A, PC). תוצרי התגובה הספציפית ל-Pch (I3), נראו באופן ברור ביחס לתוצר של התגובה עם הפריימרים ל-Fom (I1). עם זאת, התגובה עם DNA שהופק מזמורה שהודבקה ב-Pmi ותחלים ספציפיים ל-Pmi (I2) לא העלתה תוצרים בניגוד למצופה. בנוסף, נערך ניסוי זה עם 5 צמחים בכל טיפול הדבקה לצד 5 צמחי ביקורת שלילית שכללה פציעת הצמח ואילוח במים סטריליים לפי המתואר בסעיף 5.1.3. מתמונת הג'ל בו הורצו תוצרי תגובות ה-nested PCR עם DNA הצמחים והביקורות (איור 9B) עולה כי תוצאות חיוביות התקבלו ב-5 מתוך 5 צמחים בטיפולים של ההדבקה המלאכותית בפטריות אסקה. תוצרים אלה תואמים את גובה התוצרים בביקורת החיובית. אולם, בתגובות עם זוגות התחלים Pch3F\_Pch3R ו-Pmi3F\_Pmi3R עלו תוצאות חיוביות בקבוצת הביקורת (אילוח במים): תוצאה אחת עבור Pch ו-2 תוצאות עבור Pmi מתוך 5 צמחים בכל טיפול.



איור 9: תוצרי ההגברה עם פריימרים ספציפיים על DNA מזמורות שהודבקו באופן מלאכותי. A. תמונת QIAxcel של תוצרי nestedPCR עם פריימרים ספציפיים לפטריות אסקה, DNA מצמח אחד בכל טיפול הדבקה: Fom—I1; Pmi—I2; Pch—I3; שלוש ביקורות של זמורות ללא הדבקה: NC1-3; ביקורת שלילית ללא DNA – NTC; וביקורת חיובית עם DNA נקי של כל אחת מפטריות האסקה בנפרד – PC; B. תמונת ג'ל של תוצרי nestedPCR עם פריימרים ספציפיים לפטריות אסקה, ו-DNA מחמישה צמחים בכל טיפול הדבקה: Fom; Pmi; Pch; שלוש ביקורות של זמורות ללא הדבקה: Water; ביקורת שלילית ללא DNA –

### 6.2.3.2. ספציפיות התחלים בזיהוי פטריות אסקה ישירות מגפנים נגועות בשטח

הבדיקה נערכה על דוגמאות שנלקחו (באמצעות קידוח) בכרם אלרום, מגזעים של 11 גפנים שהראו תסמיני עלווה ומיני פטריות האסקה בודדו באמצעות זריעות לבידוד של קידוחי גזע שנדגמו בין השנים 2016-2019. בכל הגפנים שנדגמו במסגרת דיגום זה, נמצאה לפחות פטריית אסקה אחת. המין Fom נמצא בכל 11 הדוגמאות, Pmi נמצא ב-4 מתוך 11 הגפנים ו-Pch ב-8 מתוך 11 הגפנים שנבדקו (איור 10).



איור 10: זיהוי פטריות אסקה באמצעות פריימרים ספציפיים בדוגמאות של קידוחי גזע בגפנים סימפטומטיות בכרם אלרום. תמונת ג'ל (QIAxcel) של תוצרי תגובת nestedPCR עם פריימרים ספציפיים לפטריות האסקה (למעלה Pch, באמצע Pmi ולמטה Fom). הדוגמאות נלקחו באמצעות קידוחי גזע בגפנים סימפטומטיות בכרם אלרום, חלקת סוביניון בלאן נטיעת 1993. PC - ביקורת חיובית לכל זוג תחלים נלקח DNA מתבדיד מאותו מין. NTC - ביקורת שלילית - מבחנת ראקציה ללא DNA.

### 6.3.4. מגפנים סימפטומטיות וא-סימפטומטיות בכרמים

במטרה לבדוק את הקשר בין הופעת תסמיני העלווה לנוכחות הפתוגנים בגזע בשיטה מולקולרית, נדגמה רקמת עצה משלוש גפנים בעלות תסמינים שולוש גפנים חסרות תסמיני אסקה ב-4 חלקות כרם ברמת הגולן (לפי המתואר בסעיף 4.9). ב-20 גפנים מתוך 24 הגפנים שנדגמו, נמצאה לפחות אחת ממיני הפטריות השייכות לקומפלקס (טבלה 7). מין אחד לפחות מבין שלוש פטריות האסקה זוהה ב-92% מכלל הגפנים בעלות התסמינים וב-75% מכלל הגפנים הא-סימפטומטיות. ב-4 גפנים בלבד לא נמצאה אף אחת ממיני האסקה. בנוסף, לא נמצא קשר בין הנגיעות באסקה לבין התבטאות תסמיני  $(X^2_{(1,N=24)}=1.2, p=0.27)$ .

טבלה 7: זיהוי פטריות האסקה בגפנים עם תסמיני עלווה ובגפנים ללא תסמינים מכרמים ברמת הגולן. סיכום תוצאות הבדיקות המולקולריות (סה"כ תוצאות שליליות מול חיוביות) שבוצעו על DNA שמקורו בגפנים סימפטוטיות וא-סימפטוטיות בכרמים לכל אחד מהמינים בנפרד. בטבלה מוצגים מספרי הגפנים שנמצאו חיוביות מכלל הגפנים שנדגמו בכל מדגם.

<b>Fom</b>	<b>Pmi</b>	<b>Pch</b>	
83.33 ± 10.76	58.33 ± 14.23	41.67 ± 14.23	סימפטוטיים
58.33 ± 14.23	75 ± 12.5	66.67 ± 13.61	א-סימפטוטיים

ספרה אחת אחרי הנקודה. מספר עגול לעגל הכל ל-0.

### 6.3.5. ספציפיות התחלים ברמת הרצף

על מנת לוודא כי התחלים אכן מזהים את מין המטרה רוצפו עשרה מקטעים שהוגברו על ידי פריימרים שונים והושוו לרצפים המופקדים במאגרי המידע באמצעות BLAST. המקטעים שהתקבלו מתבדידי פטריות אסקה היו בגודל המצופה בעוד שהמקטע מתבדיד *S. cuboideum* היה בגודל 500 bp. תוצאות הריצוף מראות התאמה בזיהוי ב-8 מתוך 9 מינים השייכים לפטריות האסקה בהתאם לכל זוג פריימרים (טבלה 6). רמת ההתאמה נעה בין 72-92%. בריצוף המקטע מתבדיד של *S. cuboideum* שהוגבר עם תחלים ספציפיים ל-Pmi לא נמצאה התאמה למין פטריה כלשהו. ממצא זה מחזק את הממצאים עד כה המדגימים את רמת הספציפיות של התחלים.

טבלה 8 : זיהוי מין הפטריה על פי השוואת הרצפים שהוגברו למידע במאגר NCBI. המקטעים שהוגברו נבחרו מתרחיפי נבגים המכילים non-target DNA. המקטעים בודדו ורוצפו במטרה לוודא את הספציפיות של כל אחד משלושת זוגות התחלים שתוכננו. הרצפים שהתקבלו, הוצלבו באמצעות BLAST עם הרצפים הקיימים במאגר המידע של NCBI.

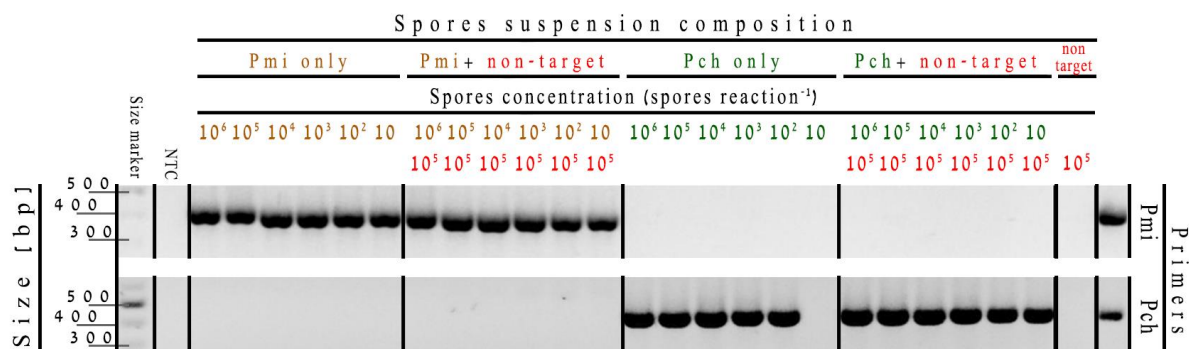
E-Value	% התאמה	Accession	סוג ומין ע"פ BLAST	גודל התוצר שעלה (bp)	פריימרים ספציפיים ל-	מקור הדוגמא
3.14E-31	72.101	KX881637.1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	522	Fom	תרחיף נבגים - ניסוי לכידת נבגים לאורך חודשי השנה
2.00E-20	83.96	AF197995.1	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	431	Pmi	"
6.46E-78	74.454	AY529690.1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	522	Fom	תרחיף נבגים -ניסוי הדמיית גשם מלאכותי
4.36E-23	87.234	AF197995.1	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	431	Pmi	"
0.79	93.333	MN101166.1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	421	Pch	"
1.52E-22	90.698	AF197995.1	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	431	Pmi	תרחיף נבגים - הצבת מלכודות בסביבה ללא גפנים
5.66E-85	89.024	MK817062.1	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	431	Pmi	"
3.35E-18	90.789	AF197995.1	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	431	Pmi	"
			NA	500	Pmi	<i>S. cuboideum</i>



## 6.4. בחינת רגישות התחלים

### 6.4.1. קביעת ריכוז הנבגים המינימלי

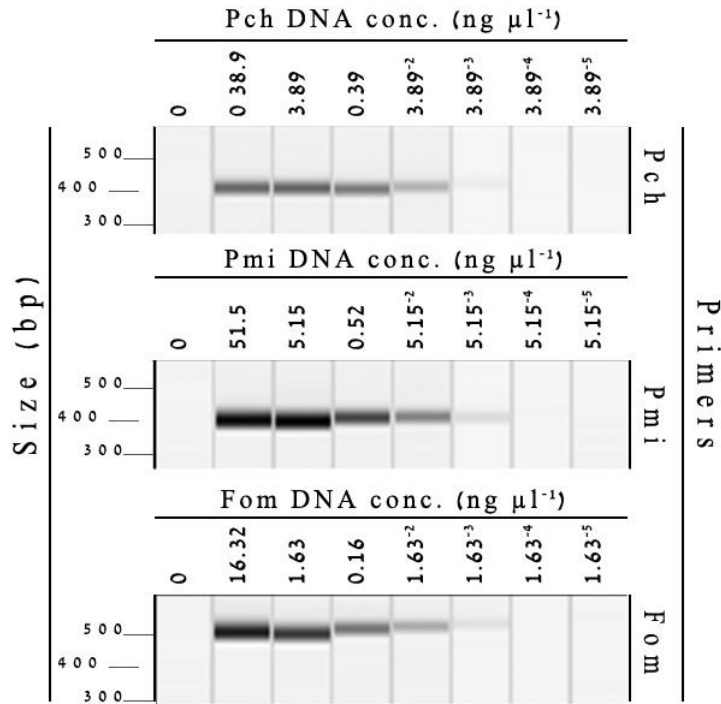
הבחינה נערכה במטרה לבדוק האם ניתן לזהות נבגים של הפטריות Pch ו-Pmi בתרחיפי נבגים ומהו הריכוז המינימלי אותו ניתן לזהות בשיטה זו. לשם כך, נערכה אנליזת nestedPCR לדוגמאות בריכוזים ידועים עם או ללא DNA זר שהופק מתרחיף נבגים שלא הכיל נבגי פטריות אסקה (איור 11). התוצאות הראו כי ניתן לזהות נבגי מטרה של Pmi או Pch בריכוז עד כ-10 נבגים ל-100µl תרחיף, גם בנוכחות DNA מ<sup>5</sup> 10 נבגים שלא שייכים לפטריות האסקה (Non target).



איור 11: בדיקת ריכוז הנבגים המינימלי הנדרש לזיהוי Pch ו-Pmi, בנוכחות (או ללא) נבגים של פטריות אחרות - תמונת ג'ל אלקטרופורזה של תוצרי nestedPCR עם פריימרים ספציפיים ל-Pch ו-Pmi. מבחנות הראקציה הכילו 1µl DNA שהופק מתרחיפי נבגים בריכוזים יורדים בטווח 10<sup>6</sup>-10 spores reaction<sup>-1</sup> (סדרת מיהולים עשרוניים). ריכוז הנבגים נבדק ללא נוכחות DNA זר - "Pmi only/ Pch only" וגם בנוכחות DNA מתרחיף נבגים של מיני פטריות אחרות "non-target+". בריכוז 10<sup>5</sup> spores reaction<sup>-1</sup>. PC - ביקורת חיובית לכל מין בהתאם: DNA נקי מתבדידי Pch ו-Pmi. NTC - ביקורת שלילית: ללא DNA.

### 6.4.2. ריכוז DNA מינימלי

במטרה לבדוק מהו ריכוז ה-DNA המינימלי שיגביר תוצר מתאים, בוצעה אנליזת PCR לריכוזים עשרוניים יורדים של DNA המטרה (איור 12). התוצאות הראו כי הריכוזים המינימליים של-DNA המאפשרים הגברת מקטעים וזיהוי שלושת המינים הם: 3.89 pg µl<sup>-1</sup> עבור Pch, 5.15 pg µl<sup>-1</sup> עבור Pmi ו-1.63 pg µl<sup>-1</sup> עבור Fom.



איור 12: רגישות התגובה לזיהוי ריכוזי DNA יורדים. תמונת ג'ל (QIAxcel) תוצרי PCR עם פריימרים ספציפיים לפטריות האסקה ודוגמאות DNA בריכוזים יורדים. הריכוז ההתחלתי של ה-DNA הגנומי בכל סדרה, נמדד באמצעות ננודרופ לכל מין בנפרד. הריכוזים של הדוגמאות האחרות בכל סדרה מחושבים. ריכוז 0 מייצג ביקורת שלילית ללא תבנית לכל זוג תחלים.

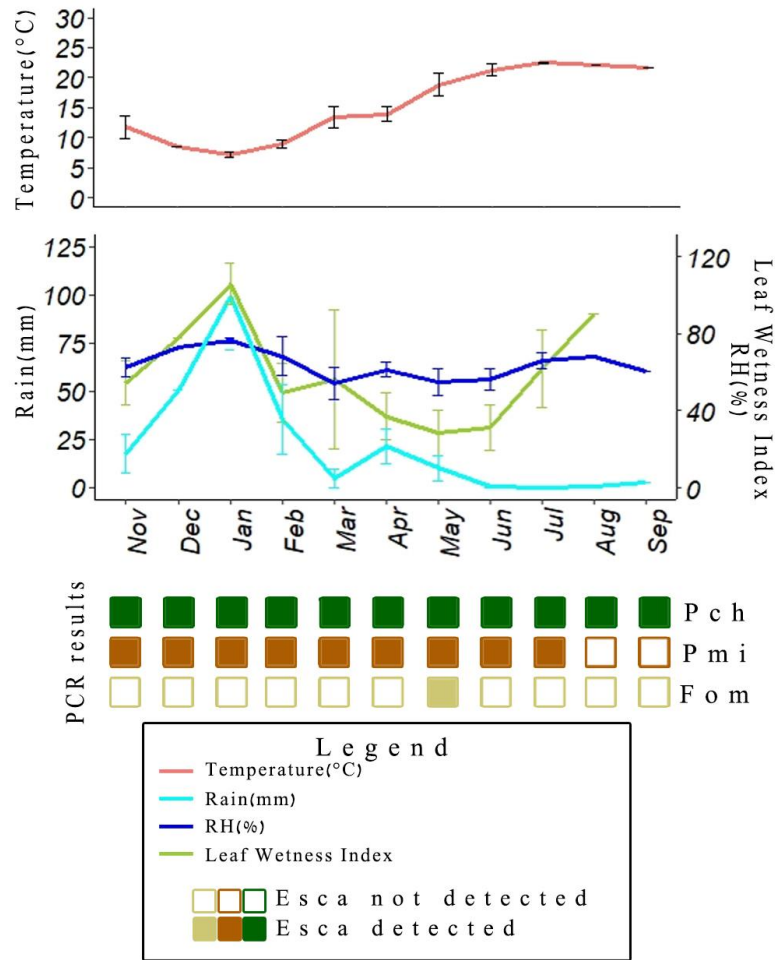
#### הדינמיקה של פיזור הנבגים

#### 6.4.3. השפעת תנאי הסביבה על הפצת נבגי אסקה לאורך השנה

במטרה ללמוד על הפצת הנבגים של פטריות האסקה לאורך חודשי השנה ולהבין האם תנאי סביבה מסויימים מעודדים את ההפצה, נבדקו תרחיפי נבגים שנאספו במלכודות נבגים במשך 28 חודשים בחלקה נגועה באסקה בכרם אלרום ( זן סוביניון-בלאן מנטיעת ב-1993). הבהינה נערכה בשיטה מולקולרית באמצעות הפריימרים שתוכננו, לאחר שלא נמצאו נבגים בתרחיף בשיטת זריעת בידוד (איור 13). נתוני האקלים היומיים נאספו מתחנה מטאורולוגית המוצבת בסמוך לחלקה ושימשו לחישוב ממוצעים של כל מדד לתקופת דיגום המלכודת באותו חודש. רטיבות העלה הגבוהה נעה בין 49% ל-90% באינדקס רטיבות העלה. במהלך הדיגום, כמות המשקעים החודשית בחודש ינואר בצפון רמת הגולן, היתה 105.7 מ"מ (ממוצע של שנתיים).

נמצא כי נבגי Pch נלכדו לאורך כל חודשי השנה ללא קשר לכמויות המשקעים, טמפרטורה או רמת רטיבות העלים. הפטריה Fom זוהתה בחודש מאי - חודש לא גשום עם טמפרטורה ממוצעת של  $18.8^{\circ}\pm 1.9^{\circ}\text{C}$  (ממוצע יום ולילה C). נבגי Pch נלכדו במלכודות הנבגים בעיקר בחודשי החורף והאביב. במהלך הדיגום, כמות המשקעים החודשית בחודש ינואר בצפון רמת הגולן, היתה 105.7 מ"מ (ממוצע של

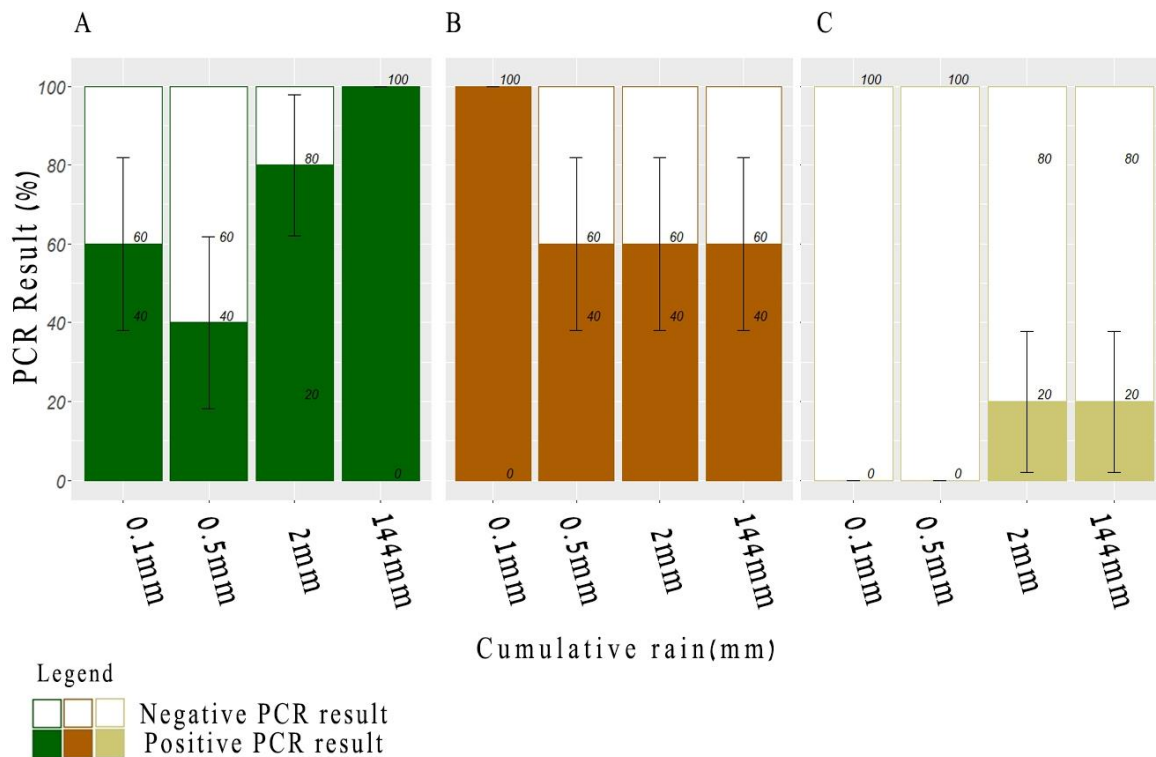
שנתיים). הלחות היחסית היתה בין 50% ל 80% בממוצע לאורך כל השנה. הטמפרטורות בקיץ הגיעו ל 23°C ובחורף ל  $7.2 \pm 0.39^\circ\text{C}$  (ינואר) בממוצע.



איור 13: הקשר בין נוכחות נבגי אסקה לבין מדדים אקלימיים לאורך עונות השנה. A - גרף ממוצעי הטמפרטורות (°C) היומיים של 3 שנים (קו אדום). B - מדדים אקלימיים בתקופת הצבת המלכודות: תכלת - גשם (mm), כחול - לחות יחסית (%), ירוק - אינדקס רטיבות עלה (%). C - ריבועים המייצגים את זיהוי מין הפטריה על פי הנבגים במלכודת: ירוק - Pch; חום - Pmi; צהוב - Fom. ריבוע מלא - זיהוי נבגים בחודש ספציפי וריבוע ריק לא זיהו נבגים באותו חודש.

#### 6.4.4. השפעת גשמי קיץ מלאכותיים על הפצת נבגי פטריות אסקה

הדמיית גשמי קיץ בחלקה נגועה נערכה במטרה לבחון האם יש קשר בין גשמי קיץ לבין הפצת הנבגים. מהנתונים עולה כי במלכודות שהוצבו על גפנים שנחשפו ל- 144 מ"מ נמצאו שלושת מיני פטריות האסקה (איור 14). אחוזי המלכודות החיוביות מכלל הטיפולים (n=20) עמדו על 70 עבור הפטריות Pch ו- Pmi, ו- 10 אחוזים עבור Fom. נבגי Pmi נמצאו לפחות 4 מתוך 5 מלכודות בכל הטיפולים. בטיפול הביקורת (גשם טבעי קל מאוד - 0.1mm במשך 11 ימים), התקבלה תוצאה חיובית ל-Pmi על כל המלכודות שהוצבו 5/5. לפי מבחן Cochran's Q, לא נמצאו הבדלים מובהקים בין כמות המשקעים לנוכחות נבגים במלכודות (Pch עבור Q=3.75, p-Value=0.290, Pmi עבור Q=3.6, p-Value=0.3, Fom עבור Q=2, p-Value=0.57, DF=3,  $\alpha=0.05$ ). בנוסף לכך, נבגי Pch ו-Pmi זוהו במי הנגר (שנאספו מתחת לגפנים) של 5 מתוך 5 הגפנים שנשטפו בגשם מלאכותי (התוצאות אינן מוצגות).

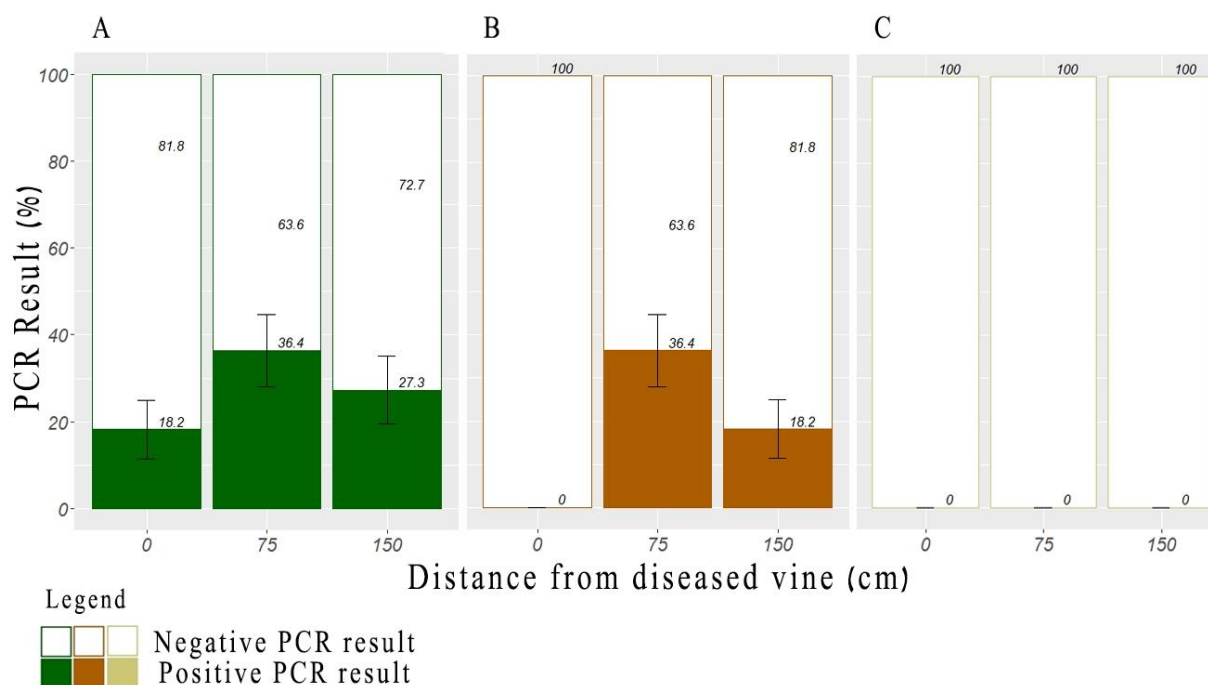


איור 14: השפעת הדמיית גשם קיץ על פיזור נבגי אסקה – זיהוי נבגים באנליזת nestedPCR עם פריימרים ספציפיים לכל פטריית אסקה: A – Pch, B – Pmi, C – Fom. לפי מנות הגשם המצטברות שקיבלו במשך תקופת דיגום. כמות המשקעים מתייחסת למשך התקופה שבה נתלו המלכודות על הגפן: 0.1mm גשם טבעי ב- 11 ימים, 0.5mm גשם טבעי ב- 7 ימים, 2.5mm גשם מלאכותי ב- 7 ימים, 144mm גשם מלאכותי ב- 3 ימים.

## 6.5. פיזור הנבגים במרחב

### 6.5.1. פיזור הנבגים קרוב לגפן בתוך השורות

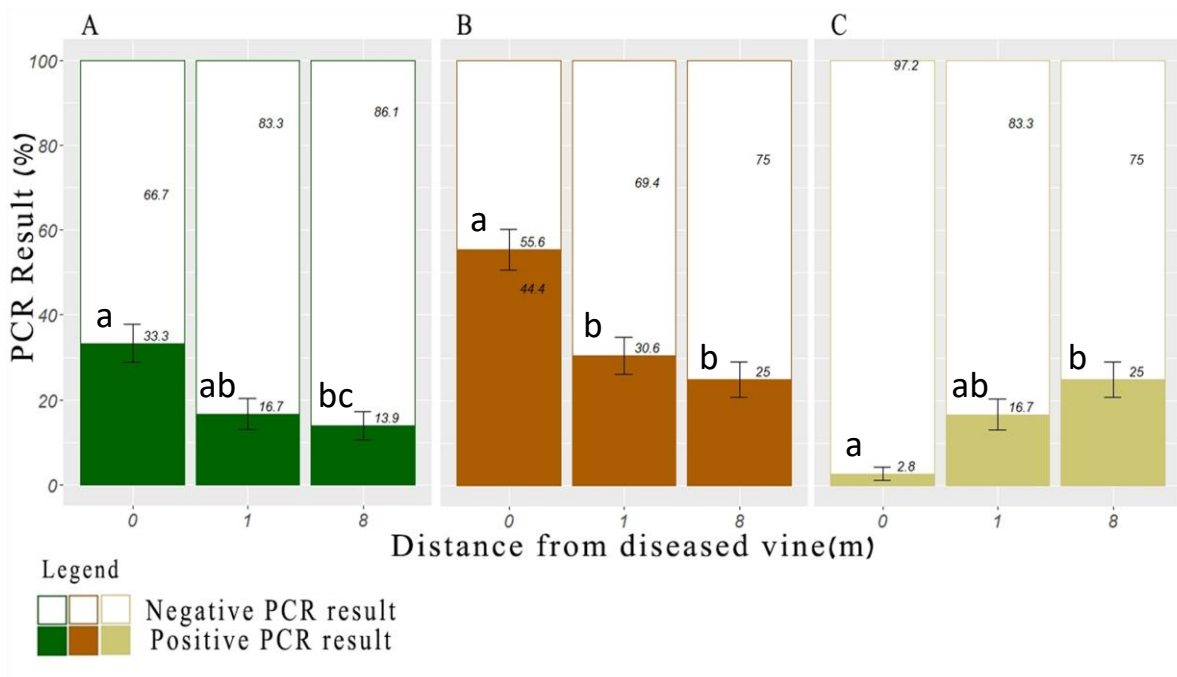
במטרה לבחון לאיזה מרחק מתפזרים נבגי הפטריות מגפן נגועה בתוך השורות, בוצע ניסוי לפי המתואר בסעיף 5.4.3.1. מהתוצאות (איור 15) עולה כי המינים Pmi ו-Pch נתפסו בתוך המלכודות לעומת זאת, Fom לא הייתה נוכחת בתוך המלכודות שהוצבו. אוחזי המלכודות שנתנו תוצאה חיובית עבור Pch היו בין 18.2-36.4% ועבור Pmi נעו בטווח 0-36% (n=11) וכן, לא התקבלו תוצאות חיוביות במלכודות במרחק 0 (על הגפן) עבור Pmi. נבגי Pch ו-Pmi נלכדו הכי הרבה פעמים במרחק 75cm מהגפן והכי מעט פעמים במרחק 0. במבחן סטטיסטי Cochran's Q לכלל כל מין לא נמצא הבדל מובהק באחוז התוצאות החיוביות בין המרחקים השונים באף אחד מהמקרים (Pch עבור p-Value=0.55, Pmi עבור p-Value=0.13, Fom עבור p-Value=0.37,  $\alpha=0.05$ , DF=2).



איור 15: השפעת המרחק מגפן נגועה על לכידת נבגי אסקה בתוך שורות החלקה. אחוזי התוצאות החיוביות בתגובת nestedPCR עם פריימרים ספציפיים לכל פטריית אסקה בנפרד: Pch – ירוק; Pmi – חום; Fom – צהוב. האחוזים חושבו מתוך 11 דגימות של מלכודות שהוצבו במרחקים: 0, 75cm ו-150cm מגפנים בחלקה עם נגיעות גבוהה באסקה.

## 6.5.2. פיזור הנבגים רחוק מגפן נגועה

במטרה לבדוק האם נבגי הפטריות נישאים למרחק יותר גדול 150cm מחוץ לשורות החלקה, מלכודות נבגים הוצבו מול גפנים בעלות תסמינים ב שלושה מרחקים שונים: 0, 1m, 8m למשך 10 ימים. מניתוח הנתונים עלה כי נבגי הפטריה Pmi נתפסו במלכודות הנבגים (במרחק 0 ו-1m מהגפן) יותר מ-Pch ו-Fom. המבחן נערך לכל כל מין בנפרד ובדק האם קיים הבדל מובהק בין אחוזי התוצאות החיוביות בשלושת קבוצות הטיפול: 0, 1 ו- 8 מ' מגפן נגועה. נמצא כי קיים הבדל מובהק בסיכויים ללכוד את נבגי שלושת הפטריות במרחקים השונים (Pmi עבור p-Value=0.009, Pch עבור p-Value=0.068, Fom עבור Value=0.03,  $\alpha=0.05$ , DF=2). מהנתונים עלה כי, עבור המינים Pmi ו-Pch רוב התוצאות החיוביות בבדיקה עלו ממלכודות שנתלו על הגפן עצמה (מרחק 0) ונצפתה מגמת ירידה עם ההתרחקות מהגפן הנגועה. לעומת זאת, הסיכויים ללכוד נבגי Fom מעידים על מגמה הפוכה (אחוז התוצאות החיוביות עולה) ככל שמתרחקים מהגפן (איור 16).



איור 16: השפעת המרחק מגפן נגועה על לכידת נבגי אסקה סביב החלקה במרחקים גדולים. אחוזי התוצאות החיוביות בתגובת nestedPCR עם פריימרים ספציפיים לכל פטריית אסקה בנפרד: **Pch** – ירוק; **Pmi** – חום; **Fom** – צהוב. האחוזים חושבו מתוך 36 דגימות של מלכודות שהוצבו במרחקים: 0, 1m ו- 8m מגפנים מסביב לחלקה עם נגיעות גבוהה באסקה. אותיות שונות מעל העמודות בגרף מייצגות הבדל מובהק בהשוואות מרובות בהשוואה נפרדת בין במרחקים באותו מין.

## 6.6. לכידת נבגים בחלקה מבוגרת מול חלקה צעירה

הרכב הנבגים במלכודות שהוצבו בהיקף חלקה צעירה שונה מהרכב הנבגים שנלכדו במלכודות שהוצבו סביב חלקה בוגרת עם שיעור נגיעות של 33% לפחות (טבלה 9) ב- 12 מלכודות שהוצבו על גפנים בהיקף חלקה צעירה, וזהו נבגי Pch ו Pmi אך באחוזים נמוכים בהשוואה לחלקה הבוגרת. נבגי Pmi וזהו ב- 83.3±1.16% מכלל המלכודות בחלקה הבוגרת ורק ב- 16.67±1.16% מכלל המלכודות בחלקה הצעירה. אחוז המלכודות בחלקה הבוגרת בהן נבגי Pmi, גבוה באופן מובהק בהשוואה לחלקה הצעירה ( $X^2 = 8.1667, df = 1, p\text{-Value} = 0.004$ ). נבגי Pch וזהו ב- 33.3±1.85% מכלל המלכודות בחלקה הבוגרת לעומת 8.33±0.64% (מלכודת אחת) בחלקה הצעירה, אך ההבדל אינו מובהק (p- $X^2 = 1.0105, Value = 0.315$ ). המין Fom לא נמצא על המלכודות בשתי החלקות.

טבלה 9 : אחוז התוצאות החיוביות (ממוצע ± שת) במלכודות בחלקה צעירה מול חלקה מבוגרת לפי מין הפתוגן.

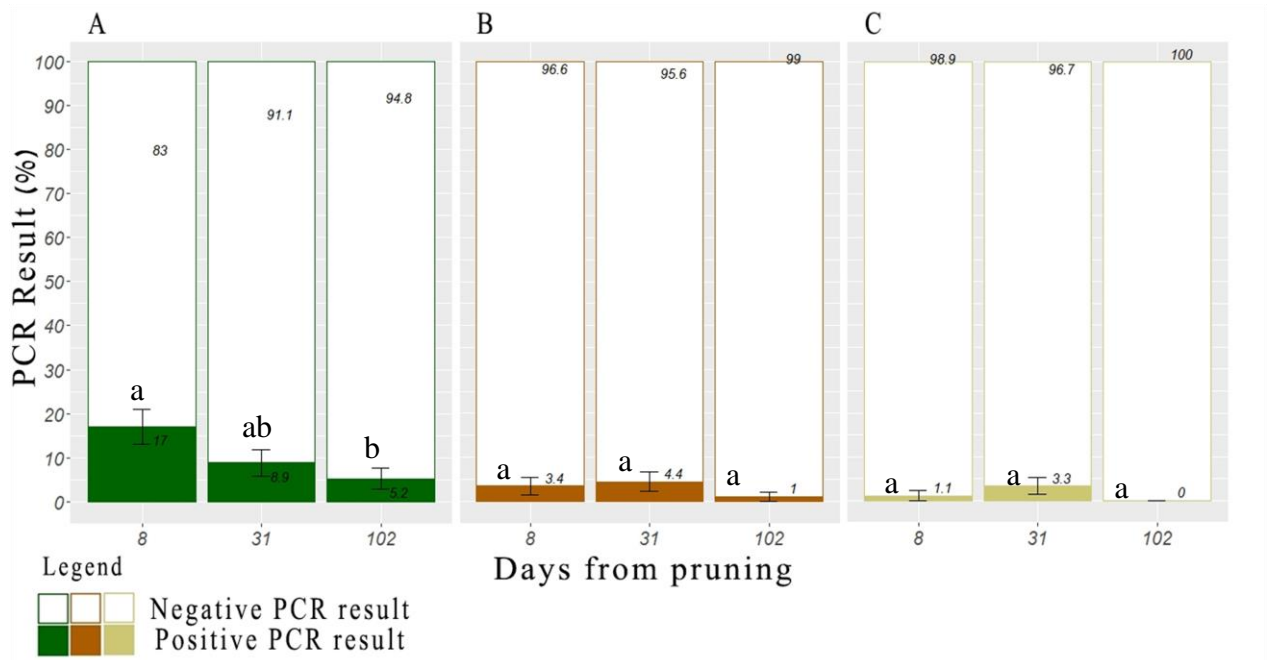
פתוגן	גיל החלקה (שנים מנטיעה)	% תוצאות חיוביות	p-value (בין חלקות)*
Fom	27	0	-
	7	0	
Pmi	27	83.33±1.16	0.004
	7	16.67±1.16	
Pch	27	33.33±1.85	0.31
	7	8.33±0.64	

\*מבחני כי בריבוע נערכו לכל מין בנפרד

## 6.8. הדבקה טבעית בכרם דרך פצעי הזמירה

במטרה לאמוד את הסיכוי להדבקה טבעית דרך פצעי זמירה ולבדוק האם הארכת משך חשיפת הפצעים מעלה את הסיכוי לחדירת הפתוגן לתוך רקמת הצמח דרך פצע הזמירה, נערך ניסוי בו נדגמו פצעי זמירה שנחשפו למשך פרקי זמן משתנים בחלקה עם שעור נגיעות גבוה על פי המתואר בסעיף 5.6. תקופת החשיפה הארוכה של פצעי הזמירה (במשך 102 ימים) התקיימה בעונת החורף. לעומת זאת, שתי התקופות האחרות התקיימו באביב. מתוצאות עולה כי המין Pch נמצא בזמורות בשעור מרבי של 17% מכלל המקרים שנבדקו בניסוי זה לאחר 8 ימים מחשיפת הפצעים (איור 17). ניתן לראות כי שעור התוצאות החיוביות להימצאות Pch ברקמות מתחת לפצעים יורד עם העלייה במשך חשיפת הפצעים והקשר נמצא מובהק במבחן  $\chi^2$  ( $p\text{-Value} = 0.02638, df=2$ ). במבחן McNemar להשוואות מרובות על נתונים השייכים לבדיקת Pch (המין היחיד בו יצא הבדל מובהק בין הקבוצות) נמצא הבדלים מובהק בשיעור התוצאות החיוביות בין פצעי הזמירה שנחשפו 8 ימים לבין פצעי הזמירה שנחשפו במשך 102 ימים). המין

Pmi זוהה ברקמות מתחת לפצעים בשעור נמוך מ-4.4% בכל המקרים. המין Fom זוהה ברקמות מתחת לפצעי הזמירה לאחר 8 ו-31 ימי חשיפה בלבד. לאחר 102 ימים של חשיפת הפצעים, המין Fom לא זוהה באף אחת מהדוגמאות. כמו כן, ניתן לראות שלאחר 102 ימי חשיפה של פצעי הזמירה אחוז התוצאות החיוביות ב-PCR היה הנמוך ביותר עבור שלושת מיני הפטריות.



איור 17: השפעת משך חשיפת פצעי הזמירה בחלקת כרם נגועה על אחוזי חדירת פטריות האסקה דרך הפצעים. אחוזי התוצאות החיוביות בתגובת nestedPCR עם פריימרים ספציפיים לכל פטריית אסקה בנפרד: **ירוק – Pch**; **חום – Pmi**; **צהוב – Fom** ו-DNA שהופק מדוגמאות גפנים שנלקחו מתחת לפצעי הזמירה במרווחי זמן שונים ממועד הזמירה: 8, 31 ו-102 ימים ממועד הזמירה. אותיות שונות מעל העמודות בגרף מייצגות הבדל מובהק בהשוואות מרובות בהשוואה נפרדת בין במרחקים באותו מין. המבחן להשוואות מרובות נערך עבור המין Pch בלבד בגלל שבמין זה בלבד התקבלה תוצאה מובהקת להבדלים בין קבוצות הטיפול.



מחלת האסקה בגפנים היא מחלה מורכבת מאד המבוססת על פעילותם של שלושה פתוגנים התוקפים את רקמות הצמח הפנימיות. המחלה קשה מאד לזיהוי מוקדם גם ברמה הפנוטיפית בצמח, לפני הופעת הסימפטומים, וגם ברמת הניטור הסביבתי לפני התבססותם בצמחים. העבודה הנוכחית עסקה בניסיון למצוא שיטה מהירה לזיהוי גורמי המחלה ולימוד השפעת תנאי סביבה מסויימים על הפצת הפטריות המעורבות בביטויה.

האתגר בזיהוי גורמי המחלה השייכים לקומפלקס האסקה בשלב מוקדם ללא הופעת תסמינים והקושי בזיהוי גורמי המחלה בשיטת הזריעה לבידוד הובילו לבחירת שימוש באנליזת ב-PCR המבוססת על הגברה ספציפית של מקטעים מגנום הפטריות הפתוגניות. השיטה נבחרה לשמש במחקר זה כי היא מאפשרת לזהות את הפתוגנים ישירות מדגימות מתוך העץ וממלכודות נבגים בזמן קצר וברגישות גדולה יותר ביחס לשיטה המסורתית המבוססת על זריעות בידוד. לפיכך, היא מאפשרת ללמוד על הביולוגיה של הפצת הנבגים והתפשטות המחלה בכרם וזיהוי הפתוגנים בגפנים שלא מבטאות תסמיני אסקה חיצוניים. זיהוי המינים בעבודה זו, מתבסס על רצפים יחודיים של כל אחת משלושת פטריות קומפלקס האסקה שמקורן בכרמים בישראל. רצפי התחלים שנבחרו ל-PCR, מתאימים לאזורי השונות בין המינים ITS1 ו-ITS2 שהם אזורים שמורים (ברצף) בתוך המין (Groenewald et al., 2001; Tegli et al., 2000).

מקובל להשתמש בגנים  $\beta$ -tub, EF1- $\alpha$  ו-LSU לזיהוי ספציפי של מיני פטריות (Billones-Baaijens et al., 2018; Gubler Douglas et al., n.d.; Pilotti et al., 2005; Rehner et al., 2005; Stielow et al., 2015; Williams et al., 2001), בעבודה זו, מקטע ה-ITS נבחר לתכנון הפריימרים בגלל השונות הגבוהה ברצף ה-ITS בין המינים והדמיון של הרצפים בהשוואת תבדידים שונים. בנוסף לכך, ידוע כי מקטע ה-ITS הוא חלק מה-rDNA (DNA ריבוזומלי) ולכן, הוא זמין להיצמדות תחלים ופעילות פולימראזות לאורך כל מחזור החיים של הפטריה ואף נמצא בכמות גבוהה ביחס לכלל ה-DNA הגנומי (Ihrmark et al., 2012; Op De Beeck et al., 2014).

יחודיות התחלים לזהות את פטריות המטרה נבחנה בשלבים החל מביצוע תגובות על DNA נקי מתבדידים דרך זיהוי המינים מתוך דוגמאות צמח ומלכודות ווידוא ברמת הרצף של מקטעי המטרה המוגברים. רגישות התחלים לזהות באופן ספציפי את פטריות האסקה נבדקה על תערובת של שלושת מיני האסקה ובהשוואה לתבדידי פטריות אחרות מהאוסף המקומי. מינים אלו, כללו מיני פתוגניים המזוהים עם מחלות גזע בגפנים ומינים מייצגים נוספים. אישור הזיהוי נבחן באמצעות ריצוף תוצרי ה-PCR הספציפיים ואכן, התוצאות העידו על הגברת ממקטעי המטרה הצפויים, גם ברמת הרצף (Toju et al., 2012). ממצאים אלה מלמדים שהשיטה מתאימה לזיהוי מיני קומפלקס האסקה בישראל. עם זאת, בשלבי הבדיקה הראשונים לבדיקת התחלים, עלה תוצר בגודל מתאים בתגובת PCR עם DNA של הפטריות *Auricularia* sp. ו-*Acremonium sclerotigenum*. ייתכן והתבדיד ששימש לצורך בדיקה זו לא היה נקי כיוון שמינים אלה אכן מסוגלים לאכלס יחד רקמות הובלה של צמחים (Markakis et al., 2017). אבל קיימת אפשרות גם להיצמדות לא ספציפית חלקית או מלאה

ברצפים שתוביל להגברה חלשה של תוצרים (Nelson et al., 2017). סיבה אפשרית לכך היא שתהליך תכנון התחלים התבצע בצורה ממוקדת לרצפים קצרים (אורך רצפי הפריימרים: 17-24bp) מכלל ה-DNA הגנומי של פטריות האסקה ומיני הביקורת. אורך הרצף הגנומי של פטריות הוא באורך ממוצע של 37Mb וקיימים בו אזורי שונות רבים (Hijri et al., 2005) שיכולים להתאים ברצפם לרצף המטרה של כל אחד הפריימרים באופן מקרי (בצורה חלקית או מלאה). הרכב כלל ה-DNA בדוגמאות מכיל מקטעים רבים ומגוונים בגלל המגוון המשתנה של האורגניזמים שיכול להשתנות בין סוגי דוגמאות שונים ומקורן בעולם (Weber et al., 2004; Stensrud et al., 2005; Fischer et al., 2016). לכן, מקטעי off-targets יכולים להיות מוגברים כתוצאה להיצמדות לא ספציפית ויהיה צורך לתכנן את רצפי התחלים מחדש על פי מגוון התבדידים באזור הנבדק (Úrbez-Torres et al., 2006). הפריימרים החדשים תוכננו בהתאמה לרצפים של תבדידים מקומיים ונבדלו ברצפם מהפריימרים שהוצעו בעבודות קודמות בעקבות זאת, המשכנו לעבוד עם זוגות התחלים האלה לאחר התאמת הפרוטוקול והכנסת שינויים בתנאי הטמפ' (העלאת ה-Ta ל-62.2 עבור שלושת זוגות התחלים שתוכננו) להגברת הספציפיות (Kolmodin et al., 2002). ייתכן ותחלים אלה לא יתאימו לתבדידים ממקום אחר בעולם, כפי שקרה בעבודה המקדימה שנעשתה לפני המחקר הנוכחי.

בדיקת רגישות השיטה על DNA גנומי של מין יחיד, העלתה כי ניתן לזהות מיני האסקה כאשר כמויות DNA בתגובות ה-PCR נמוכות נמוכות (16-50 pg). תוצאת דומות נמצאו בעבודה של Tegli et al., (2000), שזיהה את המין Pch כאשר הכמות המינימלית של ה-DNA בתגובה היתה 10pg. אבל, השיטה אינה יעילה בנוכחות ריכוזים גבוהים של DNA גנומי שאינו DNA המטרה (non-target DNA) (Edwards et al., 2007). יחד עם זאת, הגברה בשני שלבים (nested PCR), בהתחלה עם תחלים כללים ולאחר מכן תחלים יחודיים, איפשרה להגביר את רגישות הבדיקה ולקבל תוצאות מהימנות ומייצגות לנוכחות הפתוגנים בדומה ל- Williams et al. (2001) שיטת ההגברה הכפולה איפשרה, איפוא, לזהות מיני פטריות המעורבות בתופעת האסקה מתוך כלל הנבגים שנלכדו במלכודות. מגבלת השיטה היא האפשרות לטעות מסוג false-negative כפי שהתקבל במקרה בו הורחפו 10 נבגים של Pch ללא נבגי רעש. טעות מסוג זה נגרמה ככל הנראה בגלל דיגום אקראי של מאית מנפח הנוזל (100µl מתוך 1ml). ניתן להתגבר על הבעיה על ידי הגדלת ריכוז הנבגים בתרחיף על ידי והשקעת הנבגים באמצעות סרוז במהירות גבוהה (13kRPM) ואיחזור לנפח קטן יותר. זיהוי מיני אסקה ישירות מרקמת העצה בגזע הגפן התאפשר בגפנים ללא תסמיני עלווה מצד אחד, אך רמת הדיוק בזיהוי היתה חלקית. הקושי יתכן ונובע מריכוז נמוך של DNA הפטרייה ברקמה הנדגמת, מאחר ופיזור הפטרייה ברקמת העצה אינו אחיד (Péros et al., 2008). הניסוי לבדיקת חומר צמחי שעבר הדבקה מלאכותית וגודל בתנאי חממה, העלה מספר תוצאות שליליות בצמחים מודבקים בהן ציפינו לקבל תוצאה חיובית. ייתכן לא הצלחנו לזהות את הפטרייה כי היא לא התבססה ברקמות הצמח ולא חדרה לאזור ממנו התבצע הדיגום. בבדיקה נוספת על צמחים מודבקים, עלו תוצאות חיוביות בקבוצת הביקורת השלילית בניגוד למצופה (צמחים שנפצעו והודבקו בטיפת מים ללא פטריות) בתגובות לזיהוי Pch ו-Pmi. התוצאה הבלתי צפויה יכולה להיות מוסברת בכך שנעשה שימוש בחומר ריבוי לא נקי שנדגם מחלקה צעירה (חוות פיקמן, קברנה סוביניון, 2015) במחשבה כי אין

בה נוכחות של פטריות אסקה, מה שהתברר כהנחה שגויה לאחר זיהוי גפנים סימפטומטיות בחלקה זו בדיעבד. החשד לנוכחות DNA של פטריות האסקה אומת על ידי ביצוע בדיקה על קידוחי גזע מגפנים שהראו תסמיני עלווה המזוהים עם אסקה בשנה העוקבת לאחר איסוף החומר לצורך ביצוע ניסויי חממה. יש לחזור על הניסוי עם חומר נקי מפטריות אסקה. בסקר שנערך לבדיקת הקשר בין הופעת תסמינים והימצאות גורמי מחלת האסקה, Fom נמצאה בכל הגפנים שנדגמו בקידוחי גזע מגפנים סימפטומטיות. לעומת זאת, Pmi ו-Pch נמצאו רק בחלק מהדוגמאות. תוצאה זו מוסברת בכך ש Fom מסוגלת לאכלס את מרכז הגזע ולגרום לריקבון המתפרש על שטח יותר גדול ביחס ל Pmi ו-Pch שמתרכזות בצורות דקים או סקטורים קטנים ביחס לריקבון הספוגי של Fom ולכן, יש סיכוי לדגום חתך לא מייצג מתוך הגזע (Maher et al., 2012; Sánchez-Torres et al., 2008). כמו כן, תוצאות אלה מתיישבות עם הטענה כי כל פטרייה יכולה לאכלס את הרקמות של הצמח בצורה בלתי תלויה במינים האחרים, אבל שילוב של שלושתם יגרום לנזק חמור יותר והופעה של תסמינים חיצוניים על הגפנים החולות בקומפלקס (Sparapano et al., 2001) בדיקה נוספת לנוכחות אסקה בגפנים סימפטומטיות וא-סימפטומטיות, העלתה כי ב- 20 מתוך 24 מהבדיקות, לפחות אחד מהמינים נמצא בגפנים עם או ללא תסמיני עלווה. ממצאים אלה מתיישבים עם הטענה כי הפתוגנים יכולים להימצא ברקמות הגפן ללא הופעת תסמיני עלווה על הצמח, בדומה למה שעלה במחקרים נוספים (Fischer et al., 2012; Maher et al., 2012; White et al., 2011). ולכן, נוכל לתמוך בטענה כי שיעור הנגיעות על פי תסמיני עלווה נמוך משיעור הנגיעות האמיתית (Mugnai et al., 1999).

הביולוגיה של הפצת נבגי פטריות האסקה, נלמדה באמצעות ביצוע דיגום בחלקה נגועה לאורך זמן ונקודות שונות במרחב. ניטור נבגים בחלקה נגועה, שארך למעלה משנתיים, העלה כי נבגי Pch נוכחים בחלקה לאורך כל חודשי השנה ללא תלות בטמפרטורה או תנאי גשם. תוצאות אלה, מתיישבות עם הממצאים של (Larignon et al., 2000) שהתקשה לקשור את נוכחות נבגי Pch בכרם, לתנאי סביבה לאורך השנה בצרפת, אבל, כן הצליח לחזות בעלייה של מספר נבגיה בחודש מאי (טמ' ממוצעת  $7-15^{\circ}\text{C}$ ) בעקבות ארוע גשם. באופן מעניין, באותה עבודה אותרו מעט נבגי Pmi במשך החורף ונטען כי שחרור נבגיה מתרחש בעיקר בעונת הצימוח. בצפון רמת הגולן, נוכחות של נבגי Pmi נצפתה ברוב חודשי השנה מלבד חודשי הקיץ החמים והיבשים. כמו כן, בדיגום שנערך במסגרת המחקר הנוכחי בחודשים ספטמבר – אוקטובר, אחוזי התוצאות החיוביות הגבוהים ביותר היו שייכים ל-Pmi ויחד עם תוצאות ניסוי הגשם המלאכותי באותה חלקה, ראינו שהפצת הנבגים של Pch ו-Pmi מתרחשת בעקבות ירידת משקעים, בטמפרטורות  $15-18^{\circ}\text{C}$  בדומה למה שעלה במחקרים מארה"ב קליפורניה, המתאפיינת באקלים יבש בקיץ בדומה לתנאים בישראל, כאשר הבדיקות במחקר זה נערכו לאורך כל השנה (Eskalen et al., 2001) ודרום אפריקה כאשר הבדיקות נערכו בתקופה הגשומה בין מאי לספטמבר (Van Niekerk et al., 2010). הפטריה Fom נתפסה פעמיים: במהלך תחילת החורף ופעם נוספת במאי, חודשים המתאפיינים בטמפרטורות מתונות עם ירידת משקעים באזורינו ( $18.6\pm 1.9^{\circ}\text{C}$ ) בכממוצע במאי ו- $11.8\pm 1.9^{\circ}\text{C}$  (נובמבר), מה שמתיישב עם הדיווח של (Fischer, 2006a) שמצא כי Fom מפיצה נבגים בעקבות ארועי גשם וכאשר הטמפרטורה עולה מעל  $10^{\circ}\text{C}$  בדומה לתנאים באותה תקופה בגולן. ופעם

נוספת בתחילת החורף עם זאת, על הגפנים בחלקה לא נצפו גופי פרי של Fom. ייתכן ומקור המדבק בפטרייה זו היה מחוץ לחלקה בדומה למה שממצאו Surico et al. (2001). ידוע כי מין זה הוא בעל טווח הפונדקאים הרחב ביותר משלושת פטריות האסקה, ולכן, יכול להתפתח על מיני עצים רבים סביב הכרם (Elena et al., 2006; Fischer et al., 2004). טענה זו התחזקה בעקבות תוצאות הניסוי שבו התרחקנו מהחלקה הנגועה וגילינו מגמת עלייה בשכיחות המלכודות החיוביות ככל שהמרחק גדל בדומה ל Sofia et al. (2006).

הדמיית הגשם במהלך הקיץ העלתה תוצאות חיוביות לנוכחות Pch ו-Pmi באחוזים גבוהים ביחס לניסויים אחרים שבוצעו במסגרת המחקר (60-100%). אבל לא נמצא הבדל משמעותי באחוזי התוצאות החיוביות לנבגי אסקה בין קבוצות הטיפול של הגשם (מנות שונות) בניגוד למצופה. תוצאות אלה יכולות להיות לרמז על עידוד הפצת הנבגים של Pch בעקבות אירוע גשם בדומה ל-Larignon et al. (2000). אבל, הן סותרות את הממצאים בהקשר של המין Pmi, שהפצת נבגיו נחשבת לבלתי תלויה באירועי גשם לפי אותה עבודה. מבדיקת מי הנגר (איסוף מי הגשם מתחת לנוף הצמחים) לנוכחות פטריות האסקה, עלו תוצאות חיוביות עבור שני המינים Pmi ו-Pch בכל הדוגמאות. תוצאה זו יכולה לרמז על כך שנבגי הפטריות מסוגלים להימצא על נוף הצמח וסביבו לאורך זמן רב, ולחדור פנימה לרקמות דרך פצע בתנאי הסביבה המתאימים עבור כל אחד מהפתוגנים (Ridgway et al., 2005). ייתכן ותוצאות ניסוי זה הוטו, בגלל שמספר הגפנים בכל קבוצה היה נמוך (n=5) בעקבות הקושי לפרוס מערכת התזה מעל השורות ולדמות גשם בחלקת כרם מסחרית בה מתבצעת פעילות. לכן, נציע לערוך ניסוי דומה בקבוצות מדגם גדולות יותר בחלקות כרם שמיועדות לניסויים.

בתצפיות שנערכה כדי לבדוק האם נבגי פטריות האסקה מופצים למרחק מהגפן או נשארים בסביבתה הקרובה, עלה כי הנבגים של Pmi ו-Pch ונלכדים גם באמצע השורה, כ-1.5m מהגפנים הנגועות והם נישאים למרחק של לפחות 8m ממקור המדבק והסיכוי ללכוד אותם יורד עם המרחק, מה שתומך בסברה כי הפטריות הנ"ל מופצות ע"י הרוח (Eskalen et al., 2001; González-Domínguez et al., 2020; Quaglia et al., 2009b; Surico et al., 2000b). מגמה הפוכה, של עליית השכיחות במלכודות עם העלייה במרחק מהגפנים בחלקה נצפתה עבור המין Fom. מה מה שיכול להיות מוסבר על ידי נוכחות מקור מדבק חיצוני של מין זה שנמצא סמוך לחלקת הניסוי (Markakis et al., 2017; Sofia et al., 2006). בעקבות כך, כדאי להתחשב במרחקים מחלקות נגועות באסקה כאשר מחליטים על מיקום של חלקה חדשה למניעת התפשטות. בנוסף לכך, תוצאות תצפית הלכידה שנערכה במשך תקופה של כחודשיים במטרה להשוות שתי חלקות שנבדלות בגילן (צעירה מול בוגרת) הראתה כי נבגי Fom לא נמצאו על מלכודות בשתי החלקות. תוצאה זו לא מתיישבת עם כך שבניסוי קודם, התקבלה תוצאה חיובית לנוכחות DNA של Fom ממלכודת שהייתה תלויה על גפן בדיוק באותה צורה במסגרת דיגום בחלקה הנגועה. התוצאה יכולה להיות מוסברת בכך שה-DNA שזוהה בתגובה מקורו מחתיכת תפטיר השנדבקה למלכודת. הסבר נוסף הוא ההבדל בתקופת הדיגום בשני המקרים הנ"ל. הניסוי בו נלכדו נבגי Fom חל בתחילת החורף, עם העלייה במשקעים ובתנאי טמפרטורה דומים לאלה שדווחו ע"י Fischer כמועדפים להפצת הנבגים (Fischer, 2006a). לעומת זאת, הניסוי השני נערך בסוף החורף ותחילת האביב עם ירידה ברמת

המשקעים ועלייה בטמפרטורות שאלה ככל הנראה תנאים פחות מתאימים להפצת הנבגים. בניסוי המשך ניתן לבדוק נוכחות של פטריות אסקה במרחקים גדולים יותר מגפנים נגועות במטרה להגדיר את המרחק הבטוח ממקור המדבק. ניתן לבחון את נוכחות הפטריות על צמחים אחרים בסביבת הכרם ומקורות מדבק פוטנציאליים נוספים (Sofia et al., 2006).

בתצפית מבוקרת שהתבצעה בחלקה עם אחוז נגיעות גבוה, במטרה להעריך את אחוזי ההדבקה הטבעית דרך פצעי זמירה בפטריות אסקה, התברר כי אחוז הפצעים אליהם חדר פתוגן, אינו עולה על 17% והמין הכי שכיח ביותר הוא Pch. ידוע כי זמירה מוקדמת בחורף מעלה את פגיעות פצעי הזמירה לחדירת פתוגנים והפצעים נשארים חיוניים לחדירה במשך תקופה ארוכה של 3-4 חודשים (Serra et al., 2008) לכן, ציפינו לקבל אחוז גבוה של הדבקה דרך פצעים בדוגמאות מפצעים שנחשפו למשך הכי הרבה זמן (102 ימים) אבל, התוצאות הציגו מגמה הפוכה. ירידה באחוז הפצעים החיוביים ל-Pch נבעה ככל הנראה מהבדל ברמת המדבק במהלך תקופות הדיגום והשפעתה על הסיכויים להדבקה: חשיפת הפצעים למשך 102 ימים מזמירה התרחשה מ-22 בינואר עד תחילת עד 3 במאי - תקופה שבתחילתה (סמוך לחשיפת הפצעים), רמת הנבגים של Pch בסביבה לא מאוד גבוהה ביחס לחודש מאי, כפי שעלה בתצפיות אחרות במסגרת עבודה זו וגם נתמך על ידי הממצאים של (Larignon et al., 2000; Martínez-Diz et al., 2020). ככל הנראה, הפצעים הספיקו להגליד ולהיחסם לפני שהם נחשפו לנבגי הפתוגן. הזמירה המאוחרת שהתרחשה בסוף אפריל במסגרת הניסוי, ככל הנראה העלתה את הסיכוי לאילוח הפצעים ע"י נבגי הפתוגנים ובעקבות כך, את הסיכוי לחדירה בדומה לתוצאות שהתקבלו בספרד בשתי עבודות (Luque et al., 2014; Martínez-Diz et al., 2020). בהשוואת אחוז התוצאות החיוביות ל-Pmi ו-Fom לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הקבוצות (ימים מזמירה), ואחוזי ההדבקה של הפתוגנים הנ"ל נעו בין 0.4-4%. תוצאות אלה מתיישבות עם כך שלרוב, נבגי Pmi לא מדביקים פצעי זמירה בחורף כי אינם מופצים בעונה זו (Larignon et al., 2000). בנוגע לנבגי Fom, קיימות מספר עבודות המעידות על ההנבגה של מין זה כמקרה לא שכיח באופן טבעי שנקשר לתנאי סביבה ותלוי בצרוף זוויתי (mating-type) מתאים (Fischer, 2002). כמו כן, באירופה גופי הפרי (בסידוקרפ) של הפטריה התפתחו על גפנים מתות (Fischer et al., 2003; Mugnai et al., 1999) ובנוסף לכך, ידוע כי הפצת נבגי הפטריה מתרחשת בבתנאים של לחות יחסית גבוהה (80%) וטמפ' מעל 10°C בעיקר בחודשי הסתיו והאביב בגרמניה (Fischer, 2009). לאור הסיבות הנ"ל, סביר להניח כי נוכחות נבגי Fom לא הייתה משמעותית במהלך חשיפת הפצעים. לסיכום ממצאים אלה, ניתן להגיד שאחוזי ההדבקה באסקה דרך פצעי זמירה יותר נמוכים סמוך לגיזום בעונת החורף, בה מקובל לזמור זני יין באזורינו. דיווחים קודמים שעסקו בשאלת התזמון של הזמירה בהקשר של הימנעות מ-Pch הציגו דעות חלוקות לאור הממצאים שקיבלו. בדרום-אפריקה, נמצא כי זמירה מאוחרת גורמת לעלייה ברגישות להדבקה דרך פצעים (Van Niekerk et al., 2011a). מנגד בצרפת, נמצא כי הקדמת הזמירה לתחילת החורף (דצמבר-ינואר) יצרה מצב בו הפתוגן היה מסוגל להדביק את הפצעים לאורך יותר זמן (Larignon et al., 2000). באיטליה, תועדו מקרי חדירה של פתוגנים לאחר 4 חודשים מזמירה (Serra et al., 2008). בקליפורניה, נמצא כי פצעי הזמירה היו רגישים דווקא במהלך

הקיץ. ובספרד, לא נצפו הבדלים משמעותיים ברגישות הפצעים לחדירה בין עונות השנה (Elena et al., 2016).

בישראל, הזמן המיטבי לביצוע זמירה הוא בתחילת החורף, לאחר כניסת הגפן לתרדמה מלאה. עם זאת, למועד הזמירה השלכות על מועד התעוררות הניצנים, טיב הצימוח, כמות ואיכות היבול. לעתים, נהוג לדחות את מועד הזמירה בכדי להשפיע על מדדים אלה (Jackson, 2008; Zheng et al., 2017). עם זאת, על פי התוצאות בעבודה זו, המהלך עלול להעלות את הסיכויים להדבקה באסקה ולהתפשטות המחלה בחלקה. כפי שעולה ממחקר זה, נראה שלא כדאי לדחות את מועד הזמירה כיוון בעונת הזמירה בחורף, קיימות רמות נמוכות יותר של נבגי אסקה בהשוואה לתקופות אחרות במהלך השנה בדומה ל (Martínez-Diz et al., 2020). עם זאת, יש להמשיך לבחון בתנאי ישראל את התנאים המיטביים ליצירת גופי הפרי, הנבגה, הפצת הנבגים, אילוח והדבקה של כל מין המעורב במחלת האסקה בגפנים. מסיכום התוצאות של התצפיות וניסויים שתארו, עולה כי המין Pch מופיע בשכיחות גבוהה ברקמות הגפן בהשוואה לשני המינים האחרים השייכים לקומפלקס האסקה. ממצא זה מתיישב עם כך ש-Pch נחשב למין הכי אלים בעל קצב הגדילה הכי מהיר בהשוואה ל-Pmi ו-Fom (Halleen et al., 2007).

לסיכום, עבודה זו מציעה בדיקה מולקולרית רגישה, באמצעותה ניתן להעריך בצורה יותר מהירה ומהימנה את רמת הנגיעות באסקה בחלקות, ביחס לשיטות אחרות. אבל, השיטה מוגבלת לזיהוי איכותי (יש או אין) של הימצאות פתוגן מסויים בדוגמא. כמו כן, מכיוון שהשיטה מבוססת על הגברת מקטעי DNA היא אינה מבחינה בין יחידות ריבוי חיוניות של פתוגנים מול יחידות מתות שלא מהוות סכנה להדבקה. לימוד דינמיקת פיזור הנבגים בכרם הצביעה על כך שקיימת נוכחות של נבגים של לפחות אחת מפטריות האסקה לאורך כל השנה, אבל התנאים המיטביים להפצה ולהדבקה של כל אחד מהפתוגנים נבדלים זה מזה. לפיכך, על מנת להקטין את סכנות להתפשטות מיני קומפלקס האסקה, נתמוך בהצעתם של Tegli et al. (2000), לבצע בדיקות מולקולריות לחומר ריבוי צמחי, לעשות סניטציה של הכלים (Agustí-Brisach et al., 2015) בבמהלך הזמירה ולסלק את החומר הצמחי המת בסיומה הרחוק מהחלקה כיוון שהוא מקור מדבק פוטנציאלי למיני האסקה ומינים פתוגנים אחרים (Halleen et al., 2003). יתר על כן, תצפית המרחקים ממקור המדבק שנערכה במסגרת מחקר זה בחלקה גועה באסקה, מספקת מידע חדש על התפשטות נבגי הפטריות במרחב ויכולה להיות מיושמת לצורך ניטור וקביעת טווחי בטחון סביב מקורות מדבק. יישום השיטה בה דגמנו וניטרנו לצורך תצפית זו, יכול לשמש מגדלים וחוקרים ברחבי העולם. במחקר המשך, נציע לבדוק את רמות המדבק באמצעות מדד כמותי שיכול להתאפשר הודות לשימוש בתגובות qPCR ספציפיות לזיהוי וכימות יחסי. בנוסף, מעקב אחרי מדדים כמותיים של רמות המדבק ובחינת הקשר שלהם לתנאי האקלים במהלך השנה, יכולות לייצר בסיס טוב לפיתוח כלי שיאפשר לחזות את התנאים בהם קיימת סכנה משמעותית להדבקה משנית והתפרצות של קומפלקס האסקה.

- Agustí-Brisach, C., León, M., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2015). Detection of Grapevine Fungal Trunk Pathogens on Pruning Shears and Evaluation of Their Potential for Spread of Infection. *Plant Disease*, 99(7), 976–981.
- Alfonzo, A., Lo Piccolo, S., Conigliaro, G., Ventorino, V., Burruano, S., & Moschetti, G. (2012). Antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1593–1599.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., & Evidente, A. (2011). Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. In *Toxins* (Vol. 3, Issue 12).
- Aroca, A., & Raposo, R. (2007). PCR-based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2911–2918.
- Arzanlou, M., & Narmani, A. (2014). Multiplex PCR for specific identification and determination of mating type in *Togninia minima* (anamorph *Phaeoacremonium aleophilum*), a causal agent of esca disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2), 240–249.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., & Fontaine, F. (2013). Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62(2), 243–265.
- Billones-Baaijens, R., Úrbez-Torres, J. R., Liu, M., Ayres, M., Sosnowski, M., & Savocchia, S. (2018). Molecular methods to detect and quantify botryosphaeriaceae inocula associated with grapevine dieback in Australia. *Plant Disease*, 102(8), 1489–1499.
- Bortolami, G., Gambetta, G. A., Delzon, S., Lamarque, L. J., Pouzoulet, J., Badel, E., Burlett, R., Charrier, G., Cochard, H., Dayer, S., Jansen, S., King, A., Lecomte, P., Lens, F., Torres-Ruiz, J. M., & Delmas\*, C. E. L. (2019). Exploring the Hydraulic Failure Hypothesis of Esca Leaf Symptom Formation. *Plant Physiology*.
- Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J. P., Guerin-Dubrana, L., & Rey, P. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic

- vines. *PLoS ONE*, 9(5).
- Bruno, G., & Sparapano, L. (2007). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4–6), 210–229.
- Calzarano, F., & Di Marco, S. (2007). Wood discoloration and decay in grapevines with esca proper and their relationship with foliar symptoms. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(1), 96–101.
- De la Fuente, M., Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., Rego, C., & Corio-Costet, M. F. (2016). Grapevine Trunk Diseases. A review. *OIV Publications*, 1–24.
- Del Río, J. A., Arcas, M. C., Benavente-García, O., & Ortuño, A. (1998). Citrus Polymethoxylated Flavones Can Confer Resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4423–4428.
- Del Rio, J. A., Gonzalez, A., Fuster, M. D., Botia, J. M., Gomez, P., Frias, V., & Ortuño, A. (2001). Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, 394–399.
- Di Marco, S., Calzarano, F., Osti, F., & Mazzullo, A. (2004). Pathogenicity of fungi associated with a decay of kiwifruit. *Australasian Plant Pathology*, 33(3), 337–342.
- Di Marco, S., Osti, F., & Mugnai, L. (2011). First studies on the potential of a copper formulation for the control of leaf stripe disease within esca complex in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), 300–309.
- Edwards, J., Constable, F., Wiechel, T., & Salib, S. (2007). Comparison of the molecular tests - single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR® Green and TaqMan®) - for detection of *Phaeoemoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(1), 58–72.
- Edwards, J., Marchi, G., & Pascoe, I. G. (2001). Young esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), 303–310.
- Edwards, J., Pascoe, I., Pirvic, D. J., Cottral, E., & Taylor, P. (2003). Managing Grapevine Trunk Diseases (Petri Disease , Esca , *Eutypa Dieback* and others ) that Threaten the Sustainability of Australian Viticulture. *Cooprative Research*



*Centre for Viticulture, September, 1–55.*

- Elena, G., & Luque, J. (2016). Seasonal Susceptibility of Grapevine Pruning Wounds and Cane Colonization in Catalonia, Spain Following Artificial Infection with *Diplodia seriata* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease, 100*(8), 1651–1659.
- Elena, K., Fischer, M., Dimou, D., & Dimou, D. M. (2006). Fomitiporia mediterranea infecting citrus trees in Greece. *Phytopathologia Mediterranea, 45*(1), 35–39.
- Eskalen, A., & Gubler, W. D. (2001). Association of spores of Phaeomoniella chlamydospora, Phaeoacremonium inflatipes, and Pm. aleophilum with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea, 40*(3), 429–431.
- Ferreira, J. H. S., van Wyk, P. S., & Calitz, F. J. (1999). Slow dieback of grapevine in South Africa: stress related predisposition of young vines for infection by Phaeoacremonium chlamydosporum. *South African Journal of Enology and Viticulture, 20*(2), 43–46.
- Fischer, J., Compant, S., Pierron, R. J. G., Gorfer, M., Jacques, A., Thines, E., & Berger, H. (2016). Differing alterations of two esca associated fungi, phaeoacremonium aleophilum and phaeomoniella chlamydospora on transcriptomic level, to co-cultured Vitis Vinifera L Calli. *PLoS ONE, 11*(9), 1–21.
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: Fomitiporia mediterranea (Hymenochaetales). *Mycological Progress, 1*(3), 315–324.
- Fischer, M. (2006a). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes as causal agents of esca associated white rot in grapevine : worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea, 45*, 30–42.
- Fischer, M. (2006b). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: A worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea, 45*(SUPPL. 1), 30–42.
- Fischer, M. (2009). Fomitiporia mediterranea as a white rotter in esca-diseased grapevine: spores are produced in relation to temperature and humidity and are able to colonize young wood. *Phytopathologia Mediterranea, 48*(1), 174.
- Fischer, M., & Binder, M. (2004). Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships: A case study in a group of lignicolous basidiomycetes, Phellinus s.l. *Mycologia, 96*(4), 799–811.

- Fischer, M., & Kassemeyer, H. H. (2003). Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*, *42*(3), 109–116.
- Fischer, M., & Kassemeyer, H. H. (2012). Water regime and its possible impact on expression of Esca symptoms in *Vitis vinifera*: Growth characters and symptoms in the greenhouse after artificial infection with *Phaeomoniella chlamydospora*. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, *51*(3), 129–135.
- Fleurat-Lessard, P., Luini, E., Berjeaud, J. M., & Roblin, G. (2010). Diagnosis of grapevine esca disease by immunological detection of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *16*(3), 455–463.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, *33*(2), 313–315.
- Frari, G. Del, Cabral, A., Nascimento, T., Ferreira, R. B., & Oliveira, H. (2019). *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLoS ONE*, *14*(3), 1–22.
- Gatica, M., Césari, C., & Escoriza, G. (2004). *Phellinus* species inducing hoja de malvón symptoms on leaves and wood decay in mature field-grown grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, *43*(1), 59–65.
- Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2006). Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology*, *154*(10), 598–602.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(4), 1323–1330.
- González-Domínguez, E., Berlanas, C., Gramaje, D., Armengol, J., Rossi, V., & Berbegal, M. (2020). Temporal dispersal patterns of *Phaeomoniella chlamydospora*, causal agent of petri disease and Esca, in vineyards. *Phytopathology*, *110*(6), 1216–1225.
- Gramaje, D., Alaniz, S., & Armengol, J. (2009). Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Annals of Applied Biology*, 231–242.
- Gramaje, D., & Armengol, J. (2011). Importance and Impact of Fungal Trunk

- Pathogens in Young Vineyards. *Plant Disease*, 95(9), 1040–1065.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R., & Sosnowski, M. R. (2018). Managing Grapevine Trunk Diseases With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant Disease*, 102, 12–39.
- Graniti, A., Surico, G., & Mugnai, L. (2000). Esca of grapevine: A disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 16–20.
- Groenewald, M., Kang, J. C., Crous, P. W., & Gams, W. (2001). ITS and  $\beta$ -tubulin phylogeny of Phaeoacremonium and Phaeomoniella species. *Mycological Research*, 105(6), 651–657.
- Gubler Douglas, Urbes-Torres J.R., D. W., Dr.Trouillas, F. P., Herche, R., Keith, S., Cartright, D. R. D., Kreiddy, J., & Rupe, D. J. C. (n.d.). *Grapevine Trunk Diseases: Etiology, Epidemiology and Control*.
- Halleen, F., Crous, P. W., & Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology*, 32(1), 47–52.
- Halleen, F., Mostert, L., & Crous, P. W. (2007). Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 36(3), 277–285.
- Hijri, M., & Sanders, I. R. (2005). Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature*, 433(7022), 160–163.
- Hillis, V., Lubell, M., Kaplan, J., Doll, D., & Baumgartner, K. (2016). The Role of Pest Control Advisers in Preventative Management of Grapevine Trunk Diseases. *Phytopathology*, 106(4), 339–347.
- Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 666–677.
- Jackson, R. S. (2008). *Wine Science. Principles and Practices*. Academic Press.
- Jamaux-Despréaux, I., & Péros, J. P. (2003). Genetic structure in populations of the fungus *Fomitiporia punctata* associated with the esca syndrome in grapevine. *Vitis*, 42(1), 43–51.
- Kolmodin, L. A., & Birch, D. E. (2002). Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 192, 3–18.

- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F., & Fourie, P. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), 247–263.
- Kuc, J. (1995). Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 33(1), 275–297.
- Kuntzmann, P., Villaume, S., Larignon, P., & Bertsch, C. (2010). Esca, BDA and Eutypiosis: Foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 49(2), 71–76.
- Larignon, P., & Dubos, B. (1997). Fungi associated with Esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103(3), 147–157.
- Larignon, P., & Dubos, B. (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 184–189.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S., & Guérin-Dubrana, L. (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 32–46.
- Lawrence, D. P., Travadon, R., Nita, M., & Baumgartner, K. (2017). TrunkDiseaseID.org: A molecular database for fast and accurate identification of fungi commonly isolated from grapevine wood. *Crop Protection*, 102(August), 110–117.
- Leonard, L. M. (2006). Melzer's, Lugol's or iodine for identification of white-spored Agaricales? *McIlvainea*, 16(1), 43–51.
- Lima, M. R. M., Ferreres, F., & Dias, A. C. P. (2012). Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeomoniella chlamydospora*: Changes in phenolic production, oxidative state and expression of defence-related genes. *European Journal of Plant Pathology*, 132(1), 133–146.
- Lorch, W. (2014). Fatal Wood Diseases Affect 12 Percent of French Vineyards  
Recent Stories Never Miss Out Amazon is Not Bigger Than the Law Amazon  
Above the Law in California Super Tuscan Trinoro Now Comes in White The  
Best Value Wines in California Canned Wine : The Great. *Www.Wine-  
Searcher.Com*, 12–13.
- Lorrain, B., Ky, I., Pasquier, G., Jourdes, M., Dubrana, L. G., Gény, L., Rey, P., Donèche, B., & Teissedre, P. L. (2012). Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines.

- Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(1), 64–72.
- Luque, J., Elena, G., Garcia-Figueres, F., Reyes, J., Barrios, G., & Legorburu, F. J. (2014). Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), 134–143.
- Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R., & Garcia-Figueres, F. (2009). Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology*, 91(2), 381–390.
- Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., Boulanger, A., Joyeux, C., Clément, C., & Abou-Mansour, E. F. F. (2016). Changes in plant metabolism and accumulation of fungal metabolites in response to Esca proper and apoplexy expression in the whole grapevine. *Phytopathology*, September, 1–47.
- Maher, N., Piot, J., Bastien, S., Vallance, J., Rey, P., & Guérin-Dubrana, L. (2012). Wood necrosis in ESCA-affected vines: Types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 46(1), 15–27.
- Marchi, G., Peduto, F., Mugnai, L., di Marco, S., Calzarano, F., & Surico, G. (2006). Some observations on the relationship of manifest and hidden esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(SUPPL. 1).
- Markakis, E. A., Kavroulakis, N., Ntougias, S., Koubouris, G. C., Sergentani, C. K., & Ligoigakis, E. K. (2017). Characterization of fungi associated with wood decay of tree species and grapevine in Greece. *Plant Disease*, 101(11), 1929–1940.
- Markakis, E. A., Ligoigakis, E. K., Roussos, P. A., Sergentani, C. K., Kavroulakis, N., Roditakis, E. N., & Koubouris, G. C. (2019). Differential susceptibility responses of Greek olive cultivars to *Fomitiporia mediterranea*. *European Journal of Plant Pathology*, 153(4), 1055–1066.
- Martín, M. T., Cobos, R., Martín, L., & López-Enríquez, L. (2012). Real-Time PCR Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3985–3991.
- Martínez-Diz, M. del P., Eichmeier, A., Spetik, M., Bujanda, R., Díaz-Fernández, Á., Díaz-Losada, E., & Gramaje, D. (2020). Grapevine pruning time affects natural wound colonization by wood-invading fungi. *Fungal Ecology*, 48.
- Mondello, V., Larignon, P., Armengol, J., Kortekamp, A., Vaczy, K., Prezman, F.,

- Serrano, E., Rego, C., Mugnai, L., Laura, & Florence, F. (2018a). Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe Vincenzo. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(3), 369–383.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., & Florence, F. (2017). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease “First Look,”* 57–60.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., & Fontaine, F. (2018b). Grapevine Trunk Diseases: A Review of Fifteen Years of Trials for Their Control with Chemicals and Biocontrol Agents. *Plant Disease*, 102(July), 1189–1217.
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Robert, V., Sutton, D. A., Padhye, A. A., & Crous, P. W. (2005). Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1752–1767.
- Moyo, P., Allsopp, E., Roets, F., Mostert, L., & Halleen, F. (2014). Arthropods Vector Grapevine Trunk Disease Pathogens. *Phytopathology*, 104(10), 1063–1069.
- Mugnai, L., Graniti, A., & Surico, G. (1999). Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. *Plant Disease*, 83(5), 404–418.
- Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., & Mostert, L. (2011). Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), 46–60.
- Mutawila, C., Halleen, F., & Mostert, L. (2015). Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl*, 60(3), 387–399.
- Nelson, E. J. H., Holden, J., Eves, R., & Tufts, B. (2017). Comparison of diets for Largemouth and Smallmouth Bass in Eastern Lake Ontario using DNA barcoding and stable isotope analysis. *PLoS ONE*, 12(8), 1–21.
- OIV. (2019). OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. *International Organisation of Vine and Wine*, 27.

- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE*, 9(6).
- Pascoe, I. G., Edwards, J., Cunnington, J. H., & Cottral, E. H. (2004). Detection of the Togninia teleomorph of Phaeoacremonium aleophilum in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), 49–58.
- Péros, J. P., Berger, G., & Jamaux-Despréaux, I. (2008). Symptoms, wood lesions and fungi associated with esca in organic vineyards in Languedoc-Roussillon (France). *Journal of Phytopathology*, 156(5), 297–303.
- Pilotti, M., Gervasi, F., & Brunetti, A. (2005). Molecular identification of Fomitiporia mediterranea and Eutypa lata/Libertella blepharis in Platanus x acerifolia. *Journal of Phytopathology*, 153(4), 193–202.
- Pilotti, M., Tizzani, L., A., B., F., G., G. Di Lernia, & Lumia, V. (2019). Molecular identification of Fomitiporia mediterranea on declining and decayed hazelnut. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 115–129.
- Pouzoulet, J., Pivovarov, A. L., Santiago, L. S., & Rolshausen, P. E. (2014). Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 5(June), 1–11.
- Quaglia, M., Covarelli, L., & Zizzerini, A. (2009a). Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 84–91.
- Quaglia, M., Covarelli, L., & Zizzerini, A. (2009b). Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 84–91.
- Raban, E. (2020). Grapevine Growing in Israel: Situation Report. *Alon Hanotea (in Hebrew)*, 74, 16–19.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs Stephen. *Mycologia*, 97(1), 84–98.
- Retief, E., McLeod, A., & Fourie, P. H. (2006). Potential inoculum sources of Phaeoacremonium chlamydospora in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 115(3), 331–339.
- Rezgui, A., Ben Ghnaya-Chakroun, A., Vallance, J., Bruez, E., Hajlaoui, M. R., Sadfi-Zouaoui, N., & Rey, P. (2016). Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biological*

*Control*, 99, 28–37.

- Ridgway, H. J., Sleight, B. E., & Stewart, A. (2002). Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology*, 31(3), 267–271.
- Ridgway, H. J., Steyaert, J. M., Pottinger, B. M., Carpenter, M., Nicol, D., & Stewart, A. (2005). Development of an isolate-specific marker for tracking *Phaeomoniella chlamydospora* infection in grapevines. *Mycologia*, 97(5), 1093–1101.
- Roblin, G., Luini, E., Fleurat-lessard, P., Larignon, P., & Berjeaud, J. (2019). Towards a preventive and / or curative treatment of esca in grapevine trunk disease : General basis in the elaboration of treatments to control plant pathogen attacks. *Crop Protection*, 116(October 2017), 156–169.
- Rodriguez-Tudela, J. L., & Aviles, P. (1991). Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(11), 2604–2605.
- Rolshausen, P. E., Urbez-Torres, J. R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2010). Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1), 113–119.
- Romanazzi, G., Murolo, S., Pizzichini, L., & Nardi, S. (2009). Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 277–290.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A., & Gubler, W. D. (2005). Teleomorph Formation of *Phaeoacremonium aleophilum*, Cause of Esca and Grapevine Decline in California. *Plant Disease*, 89(2), 177–184.
- Rooney, S. N., Eskalen, A., & Douglas Gubler, W. (2001). Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), 351–356.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers In: Krawetz S, Misener S (eds) *Methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, NJ. Humana Press, 132, 365–386.
- Rumbos, I., & Rumbou, A. (2001a). Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathol. Mediter*, 40, S330–S335.
- Rumbos, I., & Rumbou, A. (2001b). Fungi associated with esca and young grapevine

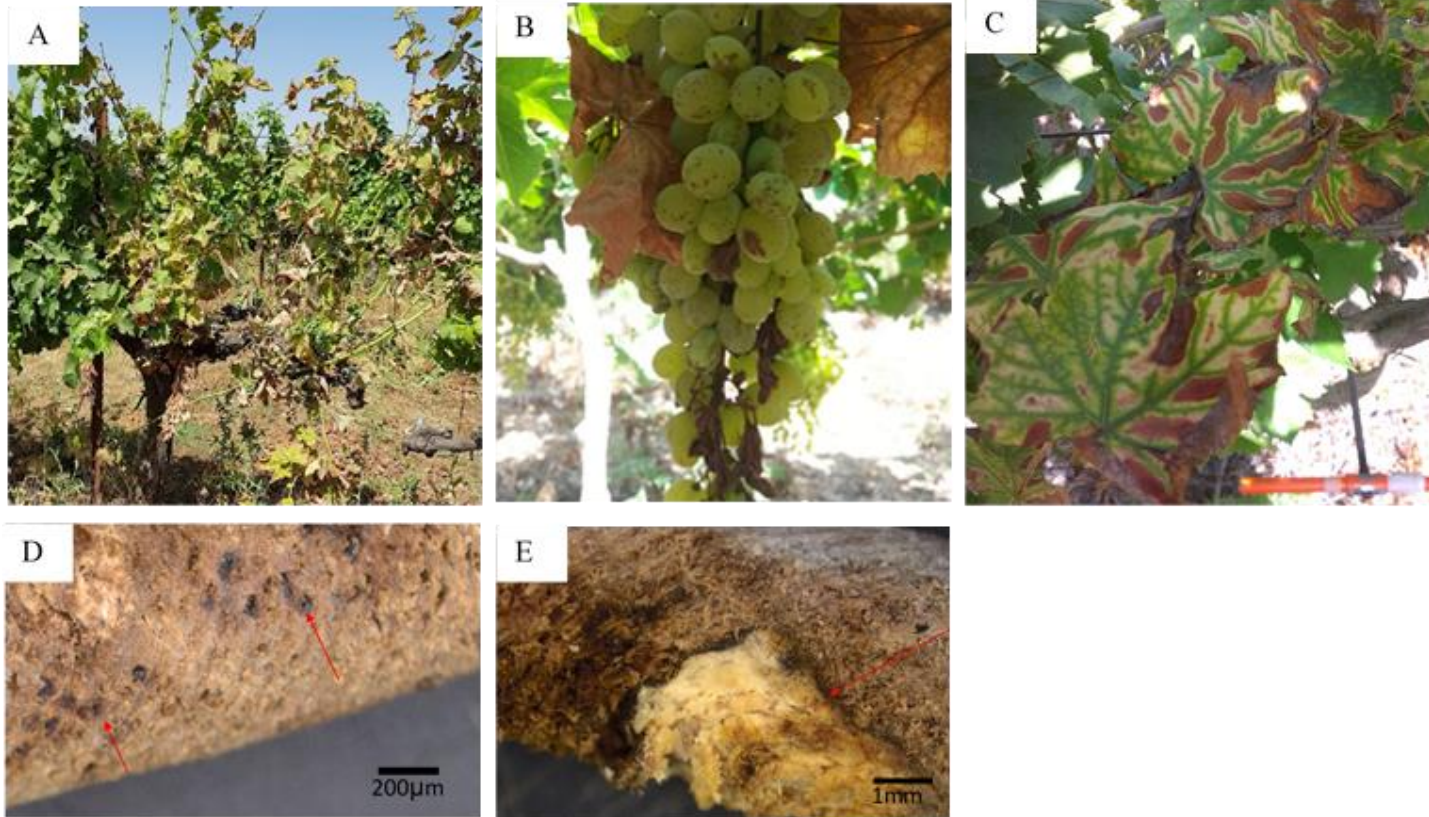


- decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), 330–335.
- Saccà, M. L., Frisullo, S., Manici, L. M., & Caputo, F. (2018). Qualitative and quantitative molecular analysis indicate the presence of *Phaeoconiella chlamydospora* in vineyard soils. *Journal of Phytopathology*, 166, 821–831.
- Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R., González, V., & Tuset, J. J. (2008). Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(4), 650–660.
- Schaad, N. W., & Frederick, R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3), 250–258.
- Scheck, H., Vasquez, S., Fogle, D., & Gubler, W. D. (1998). Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. *California Agriculture*, 52(4), 19–23.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.
- Serra, S., Borgo, M., & Zanzotto, A. (2000). Investigation into the presence of fungi associated with esca of young vines. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 21–25.
- Serra, S., Mannoni, M. A., & Ligios, V. (2008). Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(3), 234–246.
- Shaw, A. J., McDaniel, S. F., Werner, O., & Ros, R. M. (2002). Invited essay: New frontiers in bryology and lichenology. Phylogeography and phylodemography. *Bryologist*, 105(3), 373–383.
- Sidoti, A., Buonocore, E., Serges, T., & Mugnai, L. (2000). Decline of young grapevines associated with *Phaeoacremonium chlamydosporum* in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 87–91.
- Sofia, J., Gonçalves, M. T., & Oliveira, H. (2006). Spatial Distribution of Esca Symptomatic Plants in Dão Vineyards (Centre Portugal) and Isolation of Associated Fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(2), S87–S92.
- Sofia, J., Trovão, J., Portugal, A., de Carvalho, H. P., Mesquita, N., Nascimento, T., Rego, C., & Gonçalves, M. T. (2015). Molecular and phenotypic characterisation

- of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates from the demarcated wine region of Dão (Portugal). *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 403–413.
- Sparapano, L., Bruno, G., & Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), 376–386.
- Spies, C. F. J., Moyo, P., Halleen, F., & Mostert, L. (2018). *Phaeoacremonium* species diversity on woody hosts in the Western Cape Province of South Africa. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 40(June), 26–62.
- Stensrud, Ø., Hywel-Jones, N. L., & Schumacher, T. (2005). Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly. *Mycological Research*, 109(1), 41–56.
- Stielow, J. B., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G. J. M., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A. M. S., Damm, U., Yilmaz, N., Houbraken, J., Lombard, L., ... Robert, V. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 242–263.
- Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 5–10.
- Surico, G., Marchi, G., Braccini, P., & Mugnai, L. (2000a). Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 190–205.
- Surico, G., Marchi, G., Ferrandino, F. J., Braccini, P., & Mugnai, L. (2000b). Analysis of the spatial spread of esca in some Tuscan vineyards (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 211–224.
- Surico, G., Mugnai, L., & Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(SUPPL. 1), 68–86.
- Sweet, D. L. (2020). *A Collection of Nonparametric Hypothesis Tests (Package “nonpar”)*. 1–7.
- Tarone, R. E. (1982). The Use of Historical Control Information in Testing for a Trend in Proportions. *International Biometric Society*, 38(1), 215–220.
- Tegli, S., Bertelli, E., & Surico, G. (2000). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the

- detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 134–149.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7).
- Úrbez-Torres, J. R., Haag, P., Bowen, P., & O’Gorman, D. T. (2014). Grapevine Trunk Diseases in British Columbia: Incidence and Characterization of the Fungal Pathogens Associated with Black Foot Disease of Grapevine. *Plant Disease*, 98(4), 456–468.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., & Gubler, W. D. (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90(12), 1490–1503.
- Urbez-Torres, J. R., Peduto, F., Striegler, R. K., Urrea-Romero, K. E., Rupe, J. C., Cartwright, R. D., & Gubler, W. D. (2012). Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity*, 52, 169–189.
- Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., & Fleurat-Lessard, P. (2009). Developmental and ultrastructural features of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 37–51.
- Van Niekerk, J., Bester, W., Halleen, F., Crous, P., & Fourie, P. (2011a). The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), 98–111.
- Van Niekerk, J. M., Bester, W., Halleen, F., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2011b). *The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate*. 50, 98–111.
- Van Niekerk, J. M., Calitz, F. J., Halleen, F., & Fourie, P. H. (2010). Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 127(3), 375–390.
- Van Niekerk, J. M., Halleen, F., & Fourie, P. H. (2011c). Temporal susceptibility of

- grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South African grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), 139–150.
- Weber, R. W. S., Stenger, E., Meffert, A., & Hahn, M. (2004). Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: A strategy for habitat conquest? *Mycological Research*, 108(6), 662–671.
- White, C. L., Halleen, F., & Mostert, L. (2011). Symptoms and fungi associated with esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), 236–246.
- White, T. ., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* (Vol. 150, Issue 3, pp. 315–320).
- Williams, R. H., Ward, E., & McCartney, H. A. (2001). Methods for Integrated Air Sampling and DNA Analysis for Detection of Airborne Fungal Spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2453–2459.
- Yan, J. Y., Xie, Y., Zhang, W., Wang, Y., Liu, J. K., Hyde, K. D., Seem, R. C., Zhang, G. Z., Wang, Z. Y., Yao, S. W., Bai, X. J., Dissanayake, A. J., Peng, Y. L., & Li, X. H. (2013). Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity*, 61(1), 221–236.
- Zahavi, T., & Naor, V. (2015). Trunk disease in the vineyard. *Alon Hanotea (in Hebrew)*, 69, 19–21.
- Zheng, W., García, J., Balda, P., & De Toda, F. M. (2017). Effects of late winter pruning at different phenological stages on vine yield components and berry composition in La Rioja, north-central Spain. *Oeno One*, 51(4), 363–372.



איור 1: צילומים של תסמינים חיצוניים ופנימיים הנגרמים על ידי קומפלקס האסקה.

תסמינים המזוהים עם פטריות קומפלקס האסקה A-C, תסמינים חיצוניים, D-E תסמינים פנימיים

A – אפופלקסיה התמותות פתאומית של זמורות חד שנתיים בחלק מהגפן סוביניון בלאן נטענת 1993 (צילום: ורד נאור, אלרום, יוני, 2018)

B – ניקוד שחור על פירות של ענבי מאכל לבנים מזן תומפסון (צילום: תרצה זהבי, בנימינה, יולי, 2014)

C – מופע פסי הנמר על עלוות גפן (מעל 20 שנה) מזן תומפסון (צילום: ורד נאור, בנימינה, יולי, 2014)

D – ניקוד שחור בתוך צינורות העצה המזוהה עם פעילות הפטריה Peh צילום של חתיכת מקטע צילינדר מגפן נגועה תחת הגדלה X10

E – רקבון לבן המזוהה עם פעילות הפטריה Fom צילום של חתיכת מקטע צילינדר מגפן נגועה תחת הגדלה X40

טבלה 1: תוצרי התגובות כפי שהתקבלו בהגברה ב-PCR עם פריימרים ספציפיים שרצפם נלקח מעבודות קודמות. בטבלה מוצגים גדלי התוצרים שעלו בתגובת PCR רגילה ו-nestedPCR. NA מייצג תוצאה שלילית. תא ריק מייצג תגובה שלא נבדקה.

Primer set and amplicon size (bp)								PCR protocol	Species
Fpunc1/2	Pamch1/2	Pmo1/2	Pm1/2	Pch1/2	Pal1N/2	Fmed1/2	Bt1/2		
NA	NA	NA	350/415	NA	400/450	NA/550	NA/115	Direct PCR	<i>Phaeoacremonium minimum</i>
NA	NA	300	550	350	NA	NA/150	NA		<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
NA	NA	NA/300	NA/400	350	NA	NA/650	NA		<i>Fomitiporia mediterranea</i>
			NA						<i>Botryosphaeria sp.</i>
NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		<i>Diplodia seriata</i>
		NA	400	350	NA	550			<i>Scytalidium cuboideum</i>
			NA						<i>Acremonium citrinum</i>
		300	1200	350	450	NA/650	NA		<i>Acremonium sclerotigenum</i>
		NA	1500	NA	NA	650	NA		<i>Alternaria sp.</i>
		300	1050	350	450	NA/600			<i>Aulicularia sp.</i>
			400						<i>Cladosporium sp.</i>
		NA	400	NA	NA	NA	NA		<i>Pleosporales sp.</i>
		NA					250		<i>Xylariales sp.</i>
			NA						<i>Penicilium sp.</i>
		0	400	0	400	600		Nested PCR	<i>Phaeoacremonium minimum</i>
		350		350	0	0			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
		350	400	350	400	550			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
					400				<i>Acremonium citrinum</i>
		350		350	400	550			<i>Acremonium sclerotigenum</i>
		0	400	350		550			<i>Alternaria sp.</i>
		350		350	400	550			<i>Aulicularia sp.</i>
					0				<i>Botryosphaeria sp.</i>
			400					<i>Cladosporium sp.</i>	

טבלה 2: מספר תוצאות החיפוש (BLAST) שעלו בחיפוש רצפי המקטעים השונים במאגרי המידע. תוצאות החיפוש הנ"ל כוללות גם רצפי unplaced genomic scaffolds

Species	Locus			
	EF-1	$\beta$ -Tub	ITS	LR0R
Fom	10	2	186	715
Pmi	27	326	116	8
Pch	20	99	191	162

טבלה 3 (המשך בעמוד הבא): מטריצות מרחקים גנטיים המיוצגים ע"י השוואת הרצפים בארבעה גנים המקובלים לזיהוי של פטריות.

בטבלה מספר הבסיסים הנבדלים הממוצע לאתר – ככל שההבדל גדול יותר, המספר גדול יותר (יש יותר אתרים עם הבדלים). המבחן להשוואה נערך באמצעות MegaX. ההשוואה בוצעה לצורך בחירת רצף המטרה עם השונות הגבוהה ביותר בין התבדידים השונים לצורך לתכנון התחלים הספציפיים.

		Fom3	Pmi8	Pch5	BOT1	T24	T40	T92	T160	T167	T172	T177
ITS	Fom3											
	Pmi8	6.19										
	Pch5	6.32	4.81									
	Bot1	6.04	8.54	3.52								
	T24	4.58	5.62	5.15	5.70							
	T40	5.93	4.02	4.51	5.80	5.25						
	T92	6.35	4.72	6.26	8.71	5.89	4.36					
	T160	4.75	6.42	6.50	8.62	8.55	8.98	4.93				
	T167	4.87	7.52	6.77	5.01	6.90	6.18	4.66	4.25			
	T172	6.62	4.87	7.29	5.70	6.43	4.18	5.09	4.39	3.80		
	T177	6.74	5.19	6.50	4.82	6.69	6.16	5.76	4.75	4.74	7.84	

		M148	T81	T191	Bot4	Pch5	T192	T177	T24
LR0R	M148								
	T81	0.74							
	T191	1.76	1.50						
	Bot4	2.20	2.53	3.90					
	Pch5	1.74	1.68	1.83	2.39				
	T192	0.51	0.57	2.97	2.62	2.49			
	T177	1.61	1.50	1.37	2.59	1.68	2.31		
	T24	3.91	2.62	2.80	3.11	2.98	3.72	3.05	



המשך טבלה 3: מטריצות מרחקים גנטיים המיוצגים ע"י השוואת הרצפים בארבעה גנים המקובלים לזיהוי של פטריות (EF-1- $\beta$ -Tub).

		T206	M148	T81	T191	Bot4	T189	T232	T172	T87	Fom3	Pch5	T192	T177	T167	T40	T24	Pmi8
Beta-Tub	T206																	
	M148	0.12																
	T81	0.14	0.17															
	T191	0.01	0.13	0.15														
	Bot4	0.19	0.13	0.19	0.19													
	T189	0.13	0.16	0.07	0.15	0.17												
	T232	0.17	0.21	0.17	0.17	0.20	0.18											
	T172	0.11	0.18	0.15	0.12	0.20	0.14	0.14										
	T87	0.14	0.21	0.16	0.14	0.24	0.19	0.16	0.12									
	Fom3	0.66	0.64	0.69	0.66	0.60	0.70	0.68	0.60	0.67								
	Pch5	0.18	0.21	0.16	0.19	0.24	0.13	0.22	0.23	0.21	0.77							
	T192	0.14	0.18	0.16	0.14	0.18	0.15	0.07	0.13	0.14	0.68	0.18						
	T177	0.02	0.12	0.14	0.01	0.18	0.14	0.17	0.12	0.15	0.63	0.19	0.15					
	T167	0.21	0.27	0.21	0.23	0.27	0.20	0.24	0.23	0.22	0.66	0.20	0.26	0.24				
	T40	0.19	0.17	0.20	0.19	0.06	0.18	0.19	0.20	0.24	0.61	0.23	0.16	0.18	0.29			
	T24	0.19	0.13	0.19	0.20	0.03	0.17	0.21	0.21	0.25	0.60	0.23	0.18	0.20	0.28	0.07		
	Pmi8	0.12	0.17	0.15	0.12	0.20	0.12	0.17	0.14	0.13	0.67	0.16	0.11	0.13	0.20	0.21	0.22	

		T191	Bot4	T189	T232	Fom3	Pch5	T192	T177	T167	T24	Pmi8
EF1	T191											
	Bot4	0.51										
	T189	2.77	3.43									
	T232	3.65	4.82	3.26								
	Fom3	1.73	3.53	3.13	5.04							
	Pch5	5.05	5.03	3.43	2.48	4.55						
	T192	3.48	3.43	0.48	2.53	2.72	3.30					
	T177	2.65	3.37	0.16	3.48	3.20	3.45	0.45				
	T167	3.09	4.21	0.17	3.57	2.92	3.17	0.51	0.19			
	T24	0.82	1.84	3.51	3.72	1.95	4.95	4.88	3.34	3.51		
	Pmi8	3.12	3.32	0.18	4.27	3.05	3.10	0.51	0.13	0.18	3.08	

טבלה 4: נתוני כל ארבעת זוגות התחלים הספציפיים כפי שהוצעו ע"י האלוגריתם Primer3Plus.  
 הרצפים שנבחרו מודגשים.

Name	Forward /Reverse	Sequence (5'→3')	Template strand	Start	Length	Tm(°C)	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	Template Mispripping	Hairpin	3' stability	Penalty	Product length (bp)	Pair complementarity	Pair 3' complementarity	Pair Template Mispripping	Pair Penalty	number of A	number of T	Sum AT	number of C	number of G	Sum GC	Tm(°C)
Pch1F	Forward	GTCTGCCAGTAGCCAACC	Plus	100	19	60.4	63.2	0	0	5	42.7	3.8	1.377	261	0	0	13	1.56	4	3	7	8	4	12	57
Pch1R	Reverse	TGGACCCAATATCAAGCCGG	Minus	360	20	59.8	55	0	0	7	0	6.1	0.183	261	0	0	13	1.56	6	3	9	6	5	11	57
Pch2F	Forward	CAGCGTCTGCCAGTAGCC	Plus	96	18	60.5	66.7	9.7	0	6	44.3	3.9	2.51	310	5.8	10.5	14	2.743	3	3	6	7	5	12	55
Pch2R	Reverse	GACGCCCCATTATCTTTTCG	Minus	405	20	59.8	55	0	0	7	0	3.5	0.232	310	5.8	10.5	14	2.743	3	6	9	7	4	11	57
<b>Pch3F</b>	Forward	TTATCATACCTTTGTGCTTTGGC	Plus	27	24	58.3	37.5	0	0	7	39.3	4.5	5.719	421	0	0	13	8.6951	3	12	15	5	4	9	61
<b>Pch3R</b>	Reverse	TCAGTGTATGCTTGATTGCTCG	Minus	447	22	59.1	45.5	0	0	6	0	5	2.932	421	0	0	13	8.6951	3	9	12	4	6	10	59
Pch4F	Forward	CTGGGCCCGATCTCCAACC	Plus	2	19	62.4	68.4	19.4	0	8	0	3.8	3.407	406	0.6	0	15	7.279	3	3	6	9	4	13	59
Pch4R	Reverse	TTGACGCCCCATTATCTTTTCG	Minus	407	22	61.9	50	0	0	7	0	3.5	3.873	406	0.6	0	15	7.279	3	8	11	7	4	11	61
Pmi1F	Forward	ATACCTGTTTTCGTTGCTTCGG	Plus	28	22	59.5	45.5	1.9	0	6	0	4.3	2.483	471	0	0	11	5.436	2	10	12	5	5	10	59
Pmi1R	Reverse	AGAAGTTTGGGGTGTTTACGG	Minus	498	22	59	45.5	0	0	5	0	4	2.954	471	0	0	11	5.436	4	8	12	1	9	10	59
Pmi2F	Forward	CTCCAACCCCTTTGTGAACATACC	Plus	10	23	59.5	47.8	0	0	8	0	2.7	3.506	438	0	0	14	4.909	6	6	12	9	2	11	63
Pmi2R	Reverse	AGGTGTAAACTACTGCGCTCG	Minus	447	21	60.4	52.4	9.7	1.7	6	0	5	1.402	438	0	0	14	4.909	5	5	10	5	6	11	59
<b>Pmi3F</b>	Forward	TGTGAACATACTGTTTTCGTTGC	Plus	21	24	60.5	41.7	0	0	7	45.6	4.2	4.497	431	0	0.2	12	5.899	4	10	14	5	5	10	63
<b>Pmi3R</b>	Reverse	AGCGAGGTGTAACACTACTGCG	Minus	451	21	60.4	52.4	0	0	5	0	5.2	1.402	431	0	0.2	12	5.899	6	4	10	4	7	11	59
Pmi4F	Forward	CCTTTGTGAACATACCTGTTTTCG	Plus	17	24	58.8	41.7	0	0	7	45.6	5.4	5.212	124	2.5	0.6	15	8.877	4	10	14	6	4	10	63
Pmi4R	Reverse	TTTGAATACAGAGTCTGTGCC	Minus	140	22	58.3	45.5	31.7	20.4	8	45	5.4	3.675	124	2.5	0.6	15	8.877	5	7	12	5	5	10	59
Fom1F	Forward	ACACTCTTCATCCACTCAACCC	Plus	42	22	60	50	0	0	6	0	4.1	2.039	510	0	0	12	4.9	6	5	11	11	0	11	61
Fom1R	Reverse	CGAACTACAGTCCAGTAATGC	Minus	551	22	59.1	50	0	0	6	40	3.6	2.861	510	0	0	12	4.9	7	4	11	7	4	11	61
<b>Fom2F</b>	Forward	AGCGGGGTAACACTTTCTAGC	Plus	128	22	59.6	50	0	0	8	0	3.4	2.43	522	0	0	17	5.585	5	6	11	5	6	11	61
<b>Fom2R</b>	Reverse	AGTACCTGCCGACATATAGGC	Minus	649	22	58.8	50	0.6	0	6	31.7	3.9	3.156	522	0	0	17	5.585	6	5	11	6	5	11	61
Fom3F	Forward	CTCGCCTTCACACTTTCATCC	Plus	33	22	61	54.5	0	0	7	0	3.5	3.059	505	0	0	14	6.052	3	7	10	11	1	12	63
Fom3R	Reverse	GCTAATGCATTTAGAGGAGCCG	Minus	537	23	60.1	47.8	18.8	0	9	39.4	5.5	3.059	505	0	0	14	6.052	6	6	12	4	7	11	63
Fom4F	Forward	CATCCACTCAACCCCTGTGC	Plus	50	20	61	60	0	0	6	0	4.6	0.962	508	0	0	14	4.15	4	4	8	10	2	12	59
Fom4R	Reverse	ACAATGCGAACTACAGTCCAGC	Minus	557	22	61.2	50	0	0	8	0	4.8	3.188	508	0	0	14	4.15	8	3	11	7	4	11	61

טבלה 5: תוצאות ה-PCR עם כל זוגות התחלים שנבדקו במהלך התכנון התחלים הספציפיים. זוגות התחלים שנבדקו מפורטים בטבלה 4 נספחים, 0- תוצאה שלילית ב-PCR, 1- תוצאה חיובית ב-PCR.

Primers Pair	Isolate DNA	Genus species	PCR Result (Positive/Negative)	Primers Pair	Isolate DNA	Genus species	PCR Result (Positive/Negative)	Primers Pair	Isolate DNA	Genus species	PCR Result (Positive/Negative)
Fom1F_Fom1R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0	Pal1P_Pal1R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0	Pch1P_Pch1R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0
	T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	0		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	1		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	1
	T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	1
	T24	<i>Diplodia seriata</i>	1		T24	<i>Diplodia seriata</i>	0		T24	<i>Diplodia seriata</i>	1
	T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	0		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	1		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	1
	T160	<i>Auricularia sp.</i>	1		T160	<i>Auricularia sp.</i>	1		T160	<i>Auricularia sp.</i>	0
	Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	0		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1
	Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	1		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	1		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0
	Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	1
Fom2F_Fom2R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0	Pal2P_Pal2R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0	Pch2P_Pch2R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	1
	T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	0		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	1		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	0
	T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	1
	T24	<i>Diplodia seriata</i>	0		T24	<i>Diplodia seriata</i>	0		T24	<i>Diplodia seriata</i>	1
	T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	0		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	1		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	0
	T160	<i>Auricularia sp.</i>	1		T160	<i>Auricularia sp.</i>	1		T160	<i>Auricularia sp.</i>	1
	Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	0
	Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0
	Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	1		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	1
Fom3F_Fom3R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0	Pal3P_Pal3R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0	Pch3P_Pch3R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	1
	T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	1		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	0		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	0
	T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0
	T24	<i>Diplodia seriata</i>	0		T24	<i>Diplodia seriata</i>	0		T24	<i>Diplodia seriata</i>	0
	T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	1		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	0		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	0
	T160	<i>Auricularia sp.</i>	0		T160	<i>Auricularia sp.</i>	1		T160	<i>Auricularia sp.</i>	1
	Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	0		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	0
	Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	1		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	1		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0
	Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	1
Fom4F_Fom4R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	1	Pal4P_Pal4R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0	Pch4P_Pch4R	T172	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	1
	T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	0		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	0		T167	<i>Scytalidium cuboideum</i>	1
	T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0		T40	<i>Neofusicoccum parvum</i>	0
	T24	<i>Diplodia seriata</i>	0		T24	<i>Diplodia seriata</i>	0		T24	<i>Diplodia seriata</i>	1
	T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	0		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	0		T92	<i>Diaporthe neoviticola</i>	1
	T160	<i>Auricularia sp.</i>	1		T160	<i>Auricularia sp.</i>	0		T160	<i>Auricularia sp.</i>	1
	Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	0		Fom3	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1
	Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0		Pmi8	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	0
	Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0		Pch5	<i>Phaeomoniella chlamyospora</i>	0

## Abstract

Esca disease in grapevine leads to yield losses, decrease in its' quality, a significant shortening of the vine's life and economic losses to grape growers around the world and in Israel. The disease is defined as a complex of three fungi that reside in the xylem vessels: *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) and *Fomitiporia mediterranea* (*Fom*). The complex is associated with the appearance of external symptoms that expressed on the foliage: "tiger-stripe" pattern on the leaves, apoplexy - death of annual spurs and berries symptoms. In addition, esca complex causes internal symptoms within the trunk forming dark rots that is associated with *Pch* and *Pmi* and white rot (sometimes called the spongy rot) that associated with *Fom*. It's known that esca pathogens spores formation germination and dispersal are affected by environmental conditions. Several studies linked the spread of spores of these species to rainfall events and it's believed that these spores are water splashed and airborne. The main consensus about secondary infection is that pruning wounds are the major opening for penetration of these pathogens. However, there are some difficulties in identifying the disease: a. The pathogens inhabit the inner tissues of the vine for a long time before the foliar symptoms can be expressed, b. These external symptoms aren't consistently expressed in the same vine every year, c. Isolation of the pathogenic fungus from environmental samples by plating under laboratory conditions, is a large time and work consuming method due to the slow growth rate of esca fungi relative to other contaminating species. In order to overcome the difficulties in detection, an effective simple method based on molecular tool, is required for detecting these pathogens from samples with small amounts of target DNA. In previous studies, specific primers and different molecular markers have been proposed for esca identification in the Polymerase chain reaction (PCR) analysis. However, these primers were found to be non-specific for esca pathogens when we conducted tests for material that was sampled in Israel. For this reason, we designed primers for identification based on the variety of local fungal isolates. Specific DNA amplification is targeted to internal transcribed spacers (ITS) regions of the pathogens.

The aim of the study was to design primers for specific amplification, adapt the method and use it to explore the dynamics of temporal and spatial spore dispersal of esca pathogens and to test whether pruning wounds are the main penetration opening for

these pathogens. Specific primers were designed and tested for sensitivity and specificity with DNA from various local isolates, samples from artificially inoculated plants and from previously esca diagnosed vines. Finally, to verify the reliability of the method, amplified products were isolated, cleaned and sequenced.

Mostly during this study, the DNA template for the PCR originated in spore traps or plant tissues and tested for the presence of pathogens separately. The results showed that the percentage of natural infection through wounds in a vineyard with high infestation, does not exceed 17% in field conditions. It seems that spores of esca fungi are airborne and their distribution is related to changes in environmental conditions. In total, each species showed a different trend in spore dispersal according periods of the year and different climate. The methods presented in this work enables to detect the presence of esca fungi DNA in plant material or spore traps that contain non-target DNA (from other organisms) in high concentration. The molecular method can be used to detect infection in young vineyards and it seems to be more sensitive compared to monitoring according to external symptoms. Thus, it can be used to support decision-making regarding the timing of pruning and get a more reliable picture when evaluating the disease incidence in vineyards.

Keywords: esca , molecular detection , spore dispersal , temporal , spatial , pruning wounds.



**THE FACULTY OF SCIENCES**

**MASTER IN BIOTECHNOLOGY**

**Developing a molecular tool to detect Esca associated fungi in Israeli  
grapevines and understanding spatial and temporal spore dispersal  
in the vineyard**

**Vsevolod Paikov**

**UNDER THE SUPERVISION OF  
PhD Vered Naor and Prof. Segula Masaphy**

THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR  
MASTER DEGREE IN BIOTECHNOLOGY

**Apr 2021**

Signature of student: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

Signature of supervisor: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

Signature of chairperson for graduate studies: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_