

תכנית 13-0952-203 - דר"ח מסכם

אינטראקציות כנה:רוכב בגפן - אנליזה גנומית ומטבולומית להבנת הבסיס הביוכימי לשונות

צוות המחקר הישראלי: אתי אור (מנהל המחקר החקלאי), אהרון פייט (בן גוריון)

המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250.

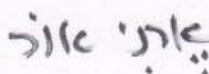
דואר אלקטרוני: [vhettior@agri.gov.il](mailto:vhettior@agri.gov.il)

### Rootstock-scion **IN**teraction in Grape: an Omics perspective (RINGO)

Etti Or, Aaron Fait

Institute of Horticulture, Volcani Center, Bet Dagan, P.O.B. 50250. Email: [vhettior@agri.gov.il](mailto:vhettior@agri.gov.il)

Ben-Gurion University of the Negev, Jacob Blaustein Insts. for Desert Research, French Associates  
Institute for Agriculture & Biotechnology of Drylands, Midreshet Ben-Gurion, P.O.B. 84990.

חתימת החוקר: 

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

#### תקציר

המחקר הנוכחי מבקש לשפוך אור על הבסיס הביוכימי לאופי האינטראקציה בין כנה לרוכב על ידי איתור גורמים ראשוניים שנבדלים בין צרופי כנה:רוכב המציגים קצוות של קשת התנהגויות. המחקר בקבוצה הישראלית מתבסס על הבדל יציב בתנאי אמת של כרם מסחרי שבו תועדו הבדלים רב שנתיים מובהקים בביצועי קברנה סוביניון המורכב על הכנה SO4 ועל הכנה 101-14 שביצועיה עד לרמת היין עולים על זו של חברתה. במסגרת התכנית הנכחית נערכה אנליזה של מדדים פיזיולוגיים על פני כל התקופה שכללה בין היתר מעקב אחר משטר המים בצמח, צימוח וגטיבי, התפתחות הענב ומעקב אחר הבשלתו ומדדי יבול בזמן הבציר. כמו כן נערכה אנליזה כימית של הענב, ציפה בשלב ההתפתחות הראשון וזגים בשלב ההבשלה וכן ביטוי גנים בזוג הענב בבוחל ובבציר. בנוסף בוצעה אנליזה של פרופיל הורמונלי בעלים, פקעים וחנטים ברוכב בכרם וכן בשורשים, עלים ופקעים של הכנות הנבחנות כאשר הן אינן מורכבות, בתנאי מעבדה. גודל הגרגר נמצא כפרמטר הפיזיולוגי היחיד אשר נבדל בין שני צירופי כנה:רוכב באופן מובהק ויציב לאורך מס' שנים. גרגרים אשר גודלו על הכנה SO4 נמצאו גדולים יותר בהשוואה ל 101-14 והבדל זה התבטא לראשונה בסיגמואיד הראשון של התפתחות הפרי. אנליזה כימית של ציפת הפרי בשלב זה הראתה רמות גבוהות יותר של חומרי ביניים בתהליכי הגליקוליזה ומעגל החומצה הציטרית וכן רמות גבוהות יותר של מס' חומצות אמינו על הכנה 101-14. עם זאת, פרולין, אשר צבירתה מזוהה עם תגובה לסטרס, הייתה גבוהה יותר על הכנה SO4. אנליזה הורמונלית של שורשי ועלי גפן SO4 לא מורכבת הראתה רמות גבוהות יותר של חומצה ג'סמונית ונגזרותיה וכן ABA. מגמה זוהי נמצאה בעלים, פקעים וגרגרים אשר נדגמו מהגפנים המורכבות בכרם על הכנה SO4. תוצאות טרנסקריפטומיקה בבוחל נמצאו במתאם עם תוצאות הורמונלים והראו מטבוליזם מוגבר של ABA וכן רמות גבוהות יותר של בקר הסינתיזה של חומצה ג'סמונית על הכנה SO4. התמונה הכללית הצביעה על עקה חזקה יותר על הכנה SO4 תוך ביטוי מוגבר של חלבוני Heat shock ו wounding. בבציר מגמה זו התהפכה ונמצא ביטוי מוגבר של

## תכנית 13-0952-203 - דו"ח מסכם

אינטראקציות כנה: רוכב בגפן - אנליזה גנומית ומטבולומית להבנת הבסיס הביוכימי לשונות

צוות המחקר הישראלי: אתי אור (מנהל המחקר החקלאי), אהרון פייט (בן גוריון)

המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250.

דואר אלקטרוני: [vhettior@agri.gov.il](mailto:vhettior@agri.gov.il)

### Rootstock-scion Interaction in Grape: an Omics perspective (RINGO)

Etti Or, Aaron Fait

Institute of Horticulture, Volcani Center, Bet Dagan, P.O.B. 50250. Email: [vhettior@agri.gov.il](mailto:vhettior@agri.gov.il)

Ben-Gurion University of the Negev, Jacob Blaustein Insts. for Desert Research, French Associates  
Institute for Agriculture & Biotechnology of Drylands, Midreshet Ben-Gurion, P.O.B. 84990.

אתי אור

חתימת החוקר:

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

#### תקציר

המחקר הנוכחי מבקש לשפוך אור על הבסיס הביוכימי לאופי האינטראקציה בין כנה לרוכב על ידי איתור גורמים ראשוניים שנבדלים בין צרופי כנה: רוכב המציגים קצוות של קשת התנהגויות. המחקר בקבוצה הישראלית מתבסס על הבדל יציב בתנאי אמת של כרם מסחרי שבו תועדו הבדלים רב שנתיים מובהקים בביצועי קברנה סוביניון המורכב על הכנה SO<sub>4</sub> ועל הכנה 101-14 שביצועיה עד לרמת היין עולים על זו של חברתה. במסגרת התכנית הנכחית נערכה אנליזה של מדדים פיזיולוגיים על פני כל התקופה שכללה בין היתר מעקב אחר משטר המים בצמח, צימוח וגטטיבי, התפתחות הענב ומעקב אחר הבשלתו ומדדי יבול בזמן הבציר. כמו כן נערכה אנליזה כימית של הענב, ציפה בשלב ההתפתחות הראשון וזגים בשלב ההבשלה וכן ביטוי גנים בזג הענב בבוחל ובבציר. בנוסף בוצעה אנליזה של פרופיל הורמונלי בעלים, פקעים וחנטים ברוכב בכרם וכן בשורשים, עלים ופקעים של הכנות הנבחנו כאשר הן אינן מורכבות, בתנאי מעבדה. גודל הגרגר נמצא כפרמטר הפיזיולוגי היחיד אשר נבדל בין שני צירופי כנה: רוכב באופן מובהק ויציב לאורך מס' שנים. גרגרים אשר גודלו על הכנה SO<sub>4</sub> נמצאו גדולים יותר בהשוואה ל 101-14 והבדל זה התבטא לראשונה בסיגמואיד הראשון של התפתחות הפרי. אנליזה כימית של ציפת הפרי בשלב זה הראתה רמות גבוהות יותר של חומרי ביניים בתהליכי הגליקוליזה ומעגל החומצה הציטרית וכן רמות גבוהות יותר של מס' חומצות אמינו על הכנה 101-14. עם זאת, פרולין, אשר צבירתה מזוהה עם תגובה לסטרס, הייתה גבוהה יותר על הכנה SO<sub>4</sub>. אנליזה הורמונלית של שורשי ועלי גפן SO<sub>4</sub> לא מורכבת הראתה רמות גבוהות יותר של חומצה ג'סמונית ונגזרותיה וכן ABA. מגמה זוהי נמצאה בעלים, פקעים וגרגרים אשר נדגמו מהגפנים המורכבות בכרם על הכנה SO<sub>4</sub>. תוצאות טרנסקריפטומיקה בבוחל נמצאו במתאם עם תוצאות ההורמונים והראו מטבוליזם מוגבר של ABA וכן רמות גבוהות יותר של בקר הסינתיזה של חומצה ג'סמונית על הכנה SO<sub>4</sub>. התמונה הכללית הצביעה על עקה חזקה יותר על הכנה

SO<sub>4</sub> תוך ביטוי מוגבר של חלבוני Heat shock ו wounding. בבציר מגמה זו התהפכה ונמצא ביטוי מוגבר של חלבוני heat shock על הכנה 101-14. עם זאת, גנים הקשורים ליצירת וצבירת פלבנוואידים הראו ביטוי מוגבר על הכנה SO<sub>4</sub>. נמצא מתאם ברור בין הפרופיל הטרנסקריפטומי לתוצאות אנליזת הזגים בבציר, בה 11 פלבנוואידים, בהם 8 אנתוציאנינים נמצאו ברמה גבוהה יותר על SO<sub>4</sub>. בנוסף, צבע הענב והיין נמצא גבוהה יותר בגרמים אלו.

#### **הקדמה מקוצרת (לסקירה מקיפה הקורא מופנה לתכנית המחקר)**

הגורמים הביוכימיים: מולקולריים המבקרים את האינטראקציה כנה: רוכב עדיין לא מובנים וכל צרוף חדש מחייב שנים של בחינה אמפירית. המחקר הנוכחי יועד לשפוך אור על הבסיס הביוכימי לאופי האינטראקציה על ידי איתור גורמים ראשוניים שנבדלים בין צרופי כנה: רוכב המציגים קצוות של קשת התנהגויות. לצורך זה הוצעה אנליזה משווה של פרופיל טרנסקריפטומי, מטבולי והורמונלי של רקמות נבחרות בנקודות זמן נבחרות ברוכב המורכב על כנות שנבדלות באופן מובהק בהשפעתן, כפי שהוכח במערכות מחקר קיימות שהנתונים לגביהן בוססו בתכניות מחקר קודמות. בעוד שלשותפים האיטלקיים זמינה מערכת מחקר מוגבלת של גפנים השתולות בדליים ומגודלות בחממה, בחלקה של הקבוצה הישראלית נפלה הזכות לעבוד בחלקת נסיון מבוססת בתנאי אמת של כרם מסחרי שבו תעדנו הבדלים רב שנתיים מובהקים בביצועי קברנה סוביניון המורכב על הכנה SO<sub>4</sub> ועל הכנה 101-14 שביצועיה עד לרמת היין עולים על זו של חברתה (ועל אלו של כנות נוספות) שהביאו לשינוי המלצות הנטיעה בכרמי יין בישראל. רקע מפורט על מערכת המחקר נמצא בתכנית המחקר ודו"ח מסכם לגבי תכנית המחקר שבה תועדו ההבדלים זמין אף הוא במאגר דיווחי מדען משרד החקלאות (203-0627).

#### **דיווח ביצוע (תאור הנסיונות)**

##### **דגימת חומר צמחי**

על פי תכנית המחקר הוצבו ע"י ד"ר אור בחלקת המחקר בכרם בנס הרים 4 בלוקים הכוללים 20 גפנים לבלוק עבור שני צירופי כנה: רוכב (קברנה: SO<sub>4</sub> וקברנה: 101-14). בשנה הראשונה נדגמו ע"י קבוצתה של ד"ר אור רקמות, בהתאם לתכנית המחקר, בשלושה שלבים פנולוגיים שונים (פריחה מלאה, בוחל ובציר) בארבעה מקבצים-אחד לכל בלוק. בפריחה מלאה נדגמו עלים צעירים ופקעים חיקיים. עשרה ימים לאחר מועד החנטה נדגמו חנטים צעירים. בזמן בוחל נדגמו שוב עלים צעירים ופקעים חיקיים. במועד זה נדגמו גם גרגרים בשלב חילוף הצבע וכצפוי גרגרי קברנה על כנת SO<sub>4</sub> היו גדולים יותר. במקביל לדגימה של גרגרים שלמים, הופרדו גרגרים והוקפאו בנפרד מדגמי ציפה, קליפה וזרעים. דגימת גרגרים נערכה באופן דומה במועד הבציר. בעונת הנסיונות השנייה בכרם בנס הרים הצטרף לצוות ממעבדתה של ד"ר אור צוות משדה בוקר בראשותו של נועם רשף, שהתחיל דוקטורט בנושא בהנחיה משותפת של ד"ר פייט וד"ר אור. תהליך הדגימה שדמה בבסיסו למתואר עבור השנה הראשונה כלל שינויים שיפורטו ובנוסף נערך מעקב אחר מספר מדדים פיזיולוגיים כדי לבחון את ההתנהגות של הרוכב קברנה על שתי הכנות על גפן בשלב של בגרות (10 שנים) שעשויה להיות שונה בהשוואה להתנהגות שדווחה בעבר באותו כרם כאשר הגפן היתה בת 3-5 שנים, עקב התבססות מערכת השורשים. המידע הפיזיולוגי הנאסף בכרם כלל מעקב אחר משטר המים בצמח, צימוח

וגטיבי, פוטוסינתזיה ומוליכות פיוניות, התפתחות הענב, קצב הבשלה, מדדי הבשלה ומדדי יכול בזמן הבציר. המדידות נעשו במועדים שונים ע"פ השלבים הפנולוגיים הרלוונטיים כמתואר בדו"ח השנה שנייה. תהליך הדגימה של חומר צמחי לאנליזות הורמונליות וטרנסקריפטומיות בשנת הנסיונות השניה כלל דגימת פקעים בארבע נקודות זמן: פריחה מלאה, 25 יום ו-45 ימים מפריחה מלאה ובזמן הבוחל. חנטים נדגמו 25 יום ו-45 ימים מפריחה מלאה ובזמן הבוחל. מדידות השנה שלישית חזרו ככלל על מדידת פרמטרים פיזיולוגיים כבשנה השנייה אך הורחבו בשלב ההתפתחות הראשון של הגרגר (כמתואר בטבלת מועדי הדגימה הרצופה בזאת). זאת בהתאם לתוצאות השנתיים הראשונות, בהן נמצאו הבדלים ברורים בגודל הגרגר ובפרופיל ההרמונלי של הצמח כבר במהלך הסיגמואיד הראשון של התפתחות הפרי, לפני הבוחל.

טבלת מועדי דגימה בשנה השלישית של המחקר:

קוד דגימה	תאריך דגימה	תיאור פנולוגי	פוטנציאל מים	LAI	משקל זמורות	נפח ומשקל ענב	הבשלת ענב	דגימות ציפה	דגימות זגים
1	14.5.2014	פריחה מלאה							
2	21.5.2014	חנטה	X						
3	1.6.2014	גרגר גודל אפונה				X		X	
4	5.6.2014	התפתחות 1				X			
5	12.6.2014	התפתחות 2	X			X			
6	23.6.2014	סגירת אשכול	X			X		X	
7	13.7.2014	טרום-בוהל	X			X			
8	23.7.2014	בוהל				X	X		
9	7.8.2014	הבשלה 1	X			X	X		
10	12.8.2014	הבשלה 2					X		X
11	20.8.2014	הבשלה 3	X	X		X	X		X
12	25.8.2014	הבשלה 4					X		X
13	2.9.2014	הבשלה 5	X			X	X		X
14	16.9.2014	בציר		X		X	X		X
15	10.3.2015	זמירה			X				

#### פירוט האנליזות והמדידות הפיזיולוגיות:

1. **משטר המים בצמח** נמדד ע"פ השיטה הקרויה Midday stem water potential (Chone et al. 2000). 4 עלים מגפנים שונות, נקיים מחתכים ומחלות ופתוחים באופן מלא, נבחרו מכל קבוצת טיפול של 10 גפנים, המורכבים על אותה כנה, בכל בלוק בשטח. כל עלה כוסה בשקית פלסטיק שקופה באופן האוטם מעבר אוויר ובשכבה נוספת של נייר אלומיניום באופן המונע מעבר אור, למשך 90 דקות. בצהרי היום, כל עלה נחתך בנפרד ע"י תער במאונך לכיוון הפטוטרות והוכנס ישירות לתא לחץ למדידה. חנקן הוזרם לתא על מנת ליצור לחץ על העלה. הלחץ בו הופיעו לראשונה טיפות על שטח הפטוטרות נקבע כתת לחץ המים בעלה.

#### 2. צימות וגטיבי נמדד בשתי שיטות:

2.1 **אינדקס שטח העלוה (LAI):** במשך עונת הצימוח האינדקס נמדד תוך שימוש במכשיר (Delta T, Sun Scan Cambridge, UK) בקונפיגורציה: SS1-STD3. המדידות נעשו ב 12:00 בזניט? קטנה מ 30 מעלות. בכל מועד

נמדדו 3 גפנים מייצגות הממוקמות בתחילת, אמצע וסוף הבלוק מכל צירוף כנה:רוכב. ב-2014 החלו המדידות רק באוגוסט עקב תקלה טכנית.

**2.2 משקל הזמורות:** הזמירה נערכה בחודש מרץ 2015. הזמורות בין כל שני גזעים הוסרו ונשקלו ונספר מספר הזמורות הכולל. 5 זמורות מייצגות נבחרו מכל גפן, ועבור כל זמורה נמדד אורכה, מס' הפרקים ומס' זמורות המשנה המסתעפות מזמורה ראשית.

**3. מדידות בבציר:** החלקה נבצרה ב- 16 לספטמבר 2014. נבצרו 6 הגפנים הסמוכות לכל בלוק ניסוי (3 הגפנים הסמוכות מצפון ו 3 הגפנים הסמוכות מדרום), שנבחרו לייצג כל בלוק ניסוי. החלטה זו נעשתה ע"מ למנוע שגיאות במשקל היבול ומס' גרגרים לאשכול שעלולות לנבוע מהדגימות התכופות בבבלוק עצמו במהלך העונה. כל גפן (בין שני גזעים) נבצרה במלואה (למעט עוללות אשר מקורן בסעיפי משנה) לארגז אחד. מס' האשכולות לגפן נספר והיבול הכולל נשקל. 10 אשכולות מייצגים נבחרו מכל גפן, הם נשקלו בנפרד ומס' הגרגרים בהן נספר.

**4. התפתחות הענב:** נפח ומשקל הגרגר נוטרו לאורך העונה. בכל נקודת זמן נדגמו מאה גרגרים מעשרה גפנים מכל בלוק ניסוי בצורה מאוזנת תוך ייצוג מיקום האשכולות על הגפנים, מיקום הגרגר על האשכול ושני צדי השורה.

**4.1 מדידת נפח ומשקל:** אורך וקוטר הגרגר נמדדו עבור 30 גרגרים מכל בלוק ונפח גרגר חושב ע"י שימוש בנוסחה לחישוב גוף ספרי אשר אורכו גדול מקוטרו ( $V = (4/3\pi) (a^2) b$ ) כאשר a ו b מייצגים קוטר ואורך, בהתאמה. 50 גרגרים מכל בלוק נשקלו יחדיו על מנת לחשב משקל גרגר ממוצע.

**4.2 מעקב הבשלה:** ענבים נדגמו כמפורט בסעיף 4 מעל. לאחר השקילה, נמעכו הגרגרים כנגד נפה כך שהנוזל (תירוש) הופרד מן הזגים והזרעים. התירוש שימש למדידת ערך בריקס (כלל מוצקים מסיסים) בעזרת רפרקטומטר דיגיטלי, ערך pH ע"י pH-meter וחומצה מטוטרת (TA), המוצגת כגרם לליטר חומצה טרטריט, ע"י טיטרציה של NaOH.

**5. דגימות ציפה לאנליזות פרופיל מטבולי ראשוני:** בכל בלוק ניסוי, נדגמו 5 דגימות זגים (בכל מבחנה דגימה מ-10 גרגרים שנדגמו משתי גפנים לכל מבחנה). עבור כל גרגר, הזג קולף והציפה (יחד עם הזרעים) הוקפאה מיידית ע"י חנקן נוזלי. חמש דגימות הציפה נשמרו ב  $-80^{\circ}\text{C}$  עד לאנליזה.

**6. דגימות זגים לאנליזות פרופיל מטבולי שניוני:** בכל בלוק ניסוי נדגמו חמש דגימות זגים, בדומה למתואר בסעיף 5. אנליזה מטבולית השוואתית בוצעה בין דגימות הזגים מהבלוקים השונים שהציגו ערך Brix זהה. האנליזות עבור 2013 ו-2014 בוצעו עבור ערכי Brix 19, 21 ו 23.

**אנליזה מטבולומית:** דגימות קליפה, ציפה וזרעים שנדגמו בשנה הראשונה ע"י ד"ר אור הועברו למעבדה המטבולומית של ד"ר פאיט בשדה בוקר בקיץ 2013 להמשך האפיון של הפרופיל המטבולי. בשנה השניה והשלישית הורחבה תכנית הדגימות כפי שתואר מעל.

**מיצוי רקמה לאנליזה מטבולית:** פרוטוקול המיצוי לכרומטוגרמת נוזל וגז נעשה כמתואר ב ( Weckwerth et al. 2004). הרקמות נכתשו ע"י מכשיר RETCH-mill מקורר מראש בחנקן נוזלי. 40 מ"ג (משקל יבש) של רקמה מוצתה בשלב ראשון בתמיסת מתנול:כלורופורם:מים (1:1:2.5 ע"פ נפח). סטנדרטים פנימיים הוספו: ריביטול (0.2

Orbital shaker מ"ג/מ"ל), קורטיקוסטרון (1 מ"ג/מ"ל) ואמפיצילין (1 מ"ג/מ"ל). התמיסה עורבבה למשך 10 דקות ב-14000 ולאחר מכן הונחה במכשיר אולטרסאונד ל 10 דקות על מנת לשחרר תכולת התאים. המבחנות עברו סרכוז ב 14000 סל"ד (micro centrifuge 5417R) למשך 10 דקות והתרחיף הופרד מהמשקע. התרחיף עורבב עם כמויות שוות של מים וכלורופורם (300 מיקרו ליטר) ועבר סרכוז נוסף ב 14000 סל"ד למשך 2 דקות. הפאזה העליונה (הפולרית) הפרדה והועברה למבחנות הרצה.

**דריביטיזציה של המיזוי לאנליזה של מטבוליטים ראשוניים בכרומוטוגרמת גז:** נוזל בנפח 100  $\mu$ L הועבר מדוגמאות המיזוי למבחנות 2ml חדשות. דוגמאות אלו יובשו במכשיר speed-vac למשך שעתיים וחצי בטמפ' החדר. לכל דוגמא הוספו 40  $\mu$ L של methoxyaminohydrochloride (20mg/ml in pyridine) בנוסף הוכנו גם דוגמה לבקרת איכות (המכילה סטנדרטים) ודוגמת Blank המכילה אך ורק את חומרי הדריביטיזציה. דוגמאות אלו הודגרו למשך שעתיים ב Orbital shaker ב  $37^{\circ}\text{C}$ . בשלב השני הוספו לכל דוגמה 70  $\mu$ L MSTFA ו-7  $\mu$ L תערובת אלקאנים (להקל על זיהוי הדוגמאות). הדוגמאות עברו טלטול לחצי שעה נוספת ב Orbital shaker ולאחר מכן הועברו בבקבוקונים להפרדה ב GC-MS.

**אנליזה ב-UPLC ועיבוד המידע:** 2 מיקרוליטר מיזוי רקמה הוזרקו למערכת ה UPLC-QTOF-MS המצוידת ב ESI כמתואר ב (Hochberg et al. 2013). בזמן האנליזה הוזרק בכל פעימה לאוצין אנקפאלין על מנת לכייל את ספקטומטר המאסות, בריכוז של 0.4 ננוגרם לליטר בתמיסת 1:1 מים ואצטוניטריל עם 0.1% של חומצה פורמית. תכנת MassLynx (Waters) גרסה 4.1 שימשה לעיבוד המידע. עוצמת היונים עבור כל פיק כוילה ביחס לעוצמת היונים הכוללת בדוגמה. המטבוליטים זהו ע"י שימוש בסטנדרטים שסופקו ע"י פרופ' פולביו מאטיבי מ Fundazion Edmund Mach, בסן מיקלה, איטליה. דפוס השבירה של כל מטבוליט אומת מול מסד הנתונים של Chemspider [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com).

**אנליזה ב GC ועיבוד המידע:** 1 מיקרוליטר של דוגמה הוזרקו למערכת כפי שמתואר ב Hochberg et al., 2013<sup>b</sup>. גז הליום שימש כפאזה הנושאת בספיקה של 1 מ"ל לדקה. התכנית כללה התחלה ב  $70^{\circ}\text{C}$  מלווה בעליה של מעלה 1 לדקה עד ל  $76^{\circ}\text{C}$ , לאחר מכן עליה של 6 מעלות בדקה עד ל  $350^{\circ}\text{C}$  וייצוב בטמפרטורה זאת למשך 5 דקות נוספות. ספקטרום המאסה נמדד ב 8 קריאות לשניה עבור mass/charge מ 70-700. הספקטרום הנמדד נבחן מול מסד הנתונים בתכנת Xcaliber הניזון מה (NIST(National institute of standards and technology), מול ספריות הזמינות להורדה ממכון Max planck, גרמניה.

**אנליזה סטטיסטית:** אנליזה סטטיסטית בוצעה תוך שימוש בתכנת R בביצוע מבחן student's-t בין שני צירופי כנה:רוכב בניסוי,  $\alpha < 0.05$ .

**7. אנליזות הורמונליות:** קואמה אשמפונג, דוקטורנט ממעבדתה של ד"ר אור, נשלח באביב 2013 למעבדתה של ד"ר ונקובה (שותפה של ד"ר אור מפראג) לביצוע אנליזות הורמונליות מעלים, פקעים, וחנטים שנדגמו על יד ד"ר אור וצוותה בעונת הנסיונות הראשונה כמתואר מעל, מגפני קברנה המורכבים על שתי הכנות נשואות המחקר. האנליזה נערכה על רקמות שנדגמו בשני שלבים פנולוגיים בלבד (בזמן פריחה/חנטה ובוחל) כשלב של גישוש לקראת אנליזה

מפורטת יותר בהמשך. נערכה אנליזה השוואתית מקיפה של רמות חומרי צמיחה. נמדדו ג'יברלינים, אוקסינים, ח. ג'אסמונית וסאליצילית, ABA ותוצרי פרוק, ציטוקינינים פעילים פרקורסורים של ציטוקינינים פעילים ודריבטים שלהם. הבדיקה נערכה על פי פרוטוקול שפורסם בעבר (Crane et al. 2012).

בשנה השניה הורחב היקף הדגימות הצמחיות של פקעים וחנטי קברנה המורכב על שתי הכנות על מנת לכסות טווח רחב יותר של מהלך ההתפתחות, ובקיץ 2014 נשלח הסטודנט בשנית למעבדה בפראג על מנת לבצע אנליזות מפורטות.

בנוסף נדגמו בשנה השניה רקמות שורשים, עלים ופקעים של צמחי הכנות SO4 ו-14-101 שגודלו עבור הפרוייקט בכרם דליים בבית דגן על מנת לברר (1) אם קיימת שונות ברמת חומרי צמיחה בין אברים זהים בצמחי הכנות עצמן (2) האם ניתן לאתר קשר בין הבדלים ברמות הורמונים צמחיים ברקמות הרוכב המורכב על כנות אלו לשינויים שנמצאו בצמחי הכנה.

**8. אנליזה טרנסקריפטומית:** מגבלת תקציב לאנליזה טרנסקריפטומית הביאה לבחירה בקליפות כמועמד האינפורמטיבי לאנליזה בשתי הקבוצות וקליפות מ 2 נקודות זמן (בוהל ובציר) מ- 3 בלוקים נבחרים מתוך 4 שימשו לאנליזות. למגינת ליבנו אנליזה בהיקף זה אינה מאפשרת הסתכלות נרחבת על שינויים התפתחותיים במהלך התפתחות הענב במהלך הסיגמואיד הראשון אולם עדיין אינפורמטיבית לגבי שינויים שקיימים במעבר בין סיגמואיד ראשון לשני. ראשית הסתבר שפרוטוקול ההפקה האיכותי שמשמש להפקה מרקמות גפן שונות מזה שנים במעבדה של ד"ר אור לא התאים להפקה מקליפות קברנה בשלבים שנדגמו ונדרש תהליך ממושך שלהתאמת שיטת הפקה אלטרנטיבית. דגימות ה-RNA משתי השנים הועברו ממעבדתה של ד"ר אור למעבדתו של מסימו דלהדונה (שותף בפרוייקט מאוניברסיטה בורונה) לעריכת פרופיל טרנסקריפטומי ולניתוח סטטיסטי. רשימה של גנים שמראים שינוי מובהק בין כנות ו/או בין מועדים הועברה לד"ר אור להמשך ניתוח. הדוקטורנט נועם רשף נסע לורונה בקיץ 2013 (במימון קרן COSTAction FA1106, האיחוד האירופאי) והשתתף באנליזה ראשונית של הפרופיל הטרנסקריפטומי של החומר הצמחי שנשלח מישראל בשנה הראשונה. פרוטוקול האנליזה זהה למתואר ב. Santo et al. (2013). ב-2014 נותח החומר על ידי ד"ר אור.

#### תוצאות ודיון

**פוטנציאל המים בעלה** – פרמטר זה נמדד לאורך שתי עונות (2013-2014) על מנת ללמוד על הבדלים אפשריים במשטר המים בין שתי הכנות. שתי הכנות בהן בחרנו להתמקד מסווגת בתעשייה באותה רמה של יכולת התמודדות עם אדמה יבשה. בהתאם לכך מצאנו הבדלים קטנים בפוטנציאל המים בעלה לאורך שתי העונות (תמונה 1). ב-2013 נמדדו הבדלים קטנים אך קבועים בפוטנציאל המים אשר הראו פוטנציאל גבוה יותר (עקה פחות חזקה) בעלי קברנה המורכב על 101-14 לעומת SO4. בעונת 2014 נמדדו הבדלים בנקודת זמן אחת בלבד ובה מגמה הפוכה, עלי קברנה המורכבים על SO4 הראו פוטנציאל מים גבוה יותר.

**צימוח וגטיבי** – ב- 2013 קברנה המורכב על 14-101 הראה צימוח מוגבר גם במדידות אינדקס הצימוח לאורך העונה (אינו מצורף) וגם במדידות משקל הגזם בעת הזמירה (תמונה 2). תוצאה זו עומדת בהתאמה לפוטנציאל המים בעלה שהיה גבוה יותר על כנה זו. בדומה לתוצאות פוטנציאל המים בעלה גם מדידות הצימוח הוגטיבי לא הראו הבדלים מובהקים בעונת 2014.

**מדדי בציר** – בשנתיים שנמדדו לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמת היבול (ק"ג לגפן) בין שתי צירופי כנה:רוכב הנבחנים. ב- 2013 נמצא כי מס' הגרגרים באשכול היה גבוה יותר על הכנה 14-101. ב- 2014 תועד מצב הפוך לפיו כי מס' הגרגרים באשכול היה גבוה יותר על SO4 (תמונה 2).

**מעקב אחר התפתחות והבשלת הענב** - מעקב אחר צבירת הסוכרים בענב לאורך עונת הגידול 2013 הצביע על הבדלים קטנים אך מובהקים ואלו הופיעו כבר בשלב מוקדם של ההבשלה. גרגרי קברנה אשר גדלו על הכנה SO4 צברו סוכר מהר יותר, כך שבאותה נקודת זמן רמת הסוכר בגרגרים אלו הייתה כ- 5% יותר מגרגרים אשר גדלו על הכנה 14-101 (תמונה 3). הבדלים אלו נתגלו לראשונה 48 ימים לאחר פריחה מלאה ונמשכו עד הבציר. בעונת 2014 נראתה מגמה דומה אך בסדר גודל מצומצם יותר שאינו מובהק. הבדל מובהק נמצא רק סמוך למועד הבוחל ולאחריו ההבדלים ברמת הסוכר הצטמצמו.

נתונים שנאספו במהלך עבודת המוסמך של מיכל אקרמן, אשר הצביעו על הבדל יציב רב שנתי במשקל הגרגר בין שתי הכנות הצביעו על אפשרות להבדלים בנפח הגרגר. בהתאמה, הנתונים שנאספו ב- 2013 ו- 2014 (תמונה 3) תומכים בממצא זה ויחד מצביעים על מגמה יציבה ומובהקת לאורך כ- 7 שנים, לפיה גרגרי קברנה הגדלים על הכנה SO4 הם בעלי נפח גדול יותר בהשוואה לאלו הגדלים על הכנה 14-101. יתרה מזאת, על פי הנתונים שנאספו ב- 2013 ו- 2014 ניכר כי הבדלים מובהקים בנפח הגרגר קיימים כבר בסיגמואיד הראשון להתפתחות הפרי, לפני הבוחל.

נתוני 2013 אשר הראו פוטנציאל מים גבוה יותר, צימוח מוגבר, גרגרים קטנים וצבירת סוכרים איטית יותר על הכנה 14-101 הצביעו לכאורה על הבדלים ביכולת העברת מים לרוכב והשפעת גורם זה על יחסי מקור-מבלע בהשפעת צירוף זן:הכנה. עם זאת, נתוני צימוח ופוטנציאל המים בעונת 2014 אינם תומכים בהבדל שהיה קטן יחסית ממילא. מן הממצאים הפיזיולוגיים שנאספו עבור הגפן הצעירה (7-4 שנים) והבוגרת יותר (10 שנים ויותר) לא נראה כי יש הבדלים מהותיים בפוטנציאל המים ומידת הצימוח של גפני קברנה בתלות בזוהות הכנה. באשר לקצב ההבשלה, שהיה גבוה יותר עבור גפן שהורכבה על כנת 14-101 במשך מספר שנות מעקב אחר הרוכב בצעירותו, נראה כי ההבדל נמחק עם התבגרות הגפן.

הממצא המעניין והעקבי במשך כל שנות המעקב הוא הבדל בנפח הגרגר, המתקיים כבר בסיגמואיד הראשון להתפתחותו. על בסיס כלל האנליזות לא נראה שניתן להתלות בנימוקים פשוטים של הבדלים בתחרות בין צימוח וגטיבי לרפרודוקטיבי, משק מים או קצב הבשלה ולכן מודגשת החשיבות של בחינת השפעת גורמים מולקולריים/הורמונליים בבקרת גודל הגרגר על ידי הכנה.

**אנליזת פרופיל מטבולי ראשוני**–נערך מעקב אחר רמתם של כ- 80 חומרים בהם סוכרים, חומצות אורגניות, חומצות אמינו ופנולים פשוטים בציפת הענב בשתי נקודות זמן במהלך הסיגמואיד הראשון (18 ו 40 ימים לאחר הפריחה)



בחומר צמחי שנדגם בעונת 2014 (תמונה 4). ככלל, ע"י אפיון הבדלים בצבירת חומרים אלו בציפה ניתן להסביר תופעות פנולוגיות כגון גודל גרגר ושונות במועד הבוחל. בנוסף, למרבית חומרים אלו ישנה השפעה ישירה או עקיפה על איכות הענב והיין. הסוכרים כגון גלוקוז ופרוקטוז נצברים כחומרי אנרגיה בגרגר ובנוסף הם חומרי המוצא לתסיסה הכהלית. חומצות אורגניות משפיעות על חומציות היין והיציבות המיקרוביאלית שלו. הרכב חומצות האמינו בגרגר משקף את מטבוליזם החנקן בענב, צבירתן מספקת את החנקן הדרוש לשמר לצורך תסיסה תקינה וכן הן מהוות בחלקן חומרי מוצא ליצירת ארומות בתסיסה (Ali et al. 2010). מתוך סך החומרים שזוהו, 27 חומרים נמצאו נבדלים באופן מובהק בין שני צירופי כנה:רוכב שנבחנו במחקר הנוכחי. תוצאות האנליזה מראות צבירה מוגברת של חומרי ביניים במטבוליזם של פחמן וחנקן בענב. מן התוצאות מתקבלת תמונה של פעילות מוגברת של תהליך הגליקוליזה ומעגל החומצה הציטרית בגרגרים אשר גדלו על הכנה 14-101 (ירוק). במבט ראשון נראה שצבירה נמוכה יותר של חומצה פומארית וחומצה מאלית בגרגרים מ 14-101 לעומת SO4 מהווה יוצא מן הכלל אשר אינו ניתן להסבר ע"פ קביעה זו, אך תהליך מקביל ומואץ של גלוקונאוגנזה באותם הגרגרים עשוי להסביר את התופעה. בעבר צויין (Dai et al. 2013) כי חומצה פומארית ומאלית יכולות לעבור אינקורפורציה לגלוקוז. תהליך זה אשר יוצר סובסטרט לגליקוליזה, צפוי לשפעל גליקוליזה ועלייה ברמתם של חומרי הביניים בתהליך, כפי שנראה בתרשים.

דווח בעבר כי פרולין מצטברת כתגובה לעקה בצמח (Claussen 2005). על פי תוצאות האנליזה, פרולין הצטברה ברמה גבוהה יותר על הכנה SO4, ממצא שעלול להעיד על עקה חזקה יותר על כנה זו בשלב ההתפתחות הראשוני של הענב. ההבדלים המדווחים במטבוליזם של הענב בתלות בזיהוי הכנה עשויים לנבוע מהבדלים באיזון הורמונלי בצירופי כנה:רוכב שונים, שאכן תועדו ומדווחים בהמשך הדו"ח. הבדלים אלו צפויים להשפיע גם על זמינות חומרי המוצא למטבוליזם משני אשר חלקו בא לידי ביטוי בשלבים מאוחרים יותר בהתפתחות הענב ונבחן בהמשך.

**אנליזת פרופיל מטבולי שניוני** – ביצענו זיהוי וניתוח של כ-35 חומרים המהווים חומרי מוצא לפלבנואידים, חומרים ממשפחת הפלבנואידים ופיטואלקסינים (תמונה 5). ככלל, קבוצת חומרים זו נבחרה בשל השפעתה על מאפיינים אורגנולפטיים של היין ולאור ההבדלים באיכות היין שנמצאו בעבודת המוסמך של מיכל אקרמן אשר סימנו את שתי הכנות SO4 ו 14-101 כנבדלות בפרמטר זה על אף הדימיון הפיזיולוגי בין השתיים. מתוצאות אלו ניתן היה לשער שיתגלו הבדלים בפרופיל הפלבנואידים בפרי הגדל על על שתי הכנות המוזכרות. בנוסף, כמה מחומרים אלו הינם בעלי השפעה בריאותית על הצרכן ומתוך כך בעלי חשיבות מסחרית נגזרת.

מתוך 35 החומרים הנבחנים, 11 נמצאו ברמה גבוהה יותר על הכנה SO4 באופן יציב בשתי עונות האנליזה הנרחבת. Pcoumaric acid הינה חומצה הידרוקסיצינאמית במעלה המסלול הביוכימי לסינתזת הפלבנואידים. מהיותה חומצה בעלת קבוצת פנול היא בעלת פעילות נוגדת חמצון. חומצה זו מהווה חומר מוצא לשני חומרי ארומה (4 אתיל-פנול ו 4 ויניל-פנול) לרוב בעלי השפעה אורגנולפטית שלילית, העלולים להווצר ע"י שמר הבר ברטאנומיסיס ביין. Quercetin-3-glucoside הוא פלבנוול נפוץ ביותר בזג הענב, בעל פעילות נוגדת חמצון חזקה, בליעת קרינת UV יעילה ומשתתף באינטראקציה עם אנתוציאנינים ליצירת אפקט הקופיגמנטציה, הגורם להעמקת וייצוב צבע היין

(Costantini et al. 2015). Epigallocatechin הוא קטכין ממשפחת הפלבאנולים המשמשים כאבני בניין לטאנינים. הפלבאנולים (קטכינים) ידועים בהשפעתם על עוצמת המרירות ביין. הם חומרי מוצא לסינתזת הטאנינים המשפיעים על מרקם ועפירות היין (תחושת יובש בחלל הפה) (Gawel, 1998). 8 החומרים הנוספים כולם פיגמנטים ממשפחת האנתוציאנינים. האנתוציאנינים הינם הפיגמנטים האחראים לצבע היין. כמותם הכוללת והיחסים בין החומרים השונים בקבוצה משפיעים על העוצמה וגוון צבע היין. מצאנו התאמה לתוצאות אלו בבדיקות עוצמת צבע (תמונה 6) אשר ביצענו לגרגרים בהגעתם ל 23 בריקס וליין אשר הופק מהם. התוצאות הראו כי גרגרים ויין מקברנה אשר מורכב על הכנה SO4 היו בעלי עוצמת צבע גבוהה יותר.

### אנליזה הורמונלית

נתוני אנליזה הורמונלית בשנה הראשונה הובאו בדו"ח השנה השניה ולא יובאו כאן. ככלל יאמר כי אנליזה של עלי קברנה המורכבים על 101-14 או SO4 הצביעה על רמות גבוהות יותר של פרקורסורים של ציטוקינינים פעילים ב-SO4 בשני המועדים ורמות גבוהות יותר של תוצרי פירוק של ABA (PA, neoPA, 9OHABA) ב-101-14 בבוחל. מתוצאות אנליזה של פקעי קברנה המורכבים על 101-14 או SO4 עולה כי בפקעי SO4 היו רמות גבוהות יותר של JA-ILU, ABA ו-GE-ABA בפריחה ורמות IAA גבוהות יותר גם בפריחה וגם בבוחל. בפקעי 101-14 היו רמות גבוהות יותר של ציטוקינינים פעילים ומולקולות המוצא שלהם ורמות גבוהות יותר של תוצרי פירוק ABA (9OH-ABA, PA) בבוחל בלבד. אנליזה של חנטי קברנה המורכבים על 101-14 או SO4 הראתה כי חנטי SO4 היו בעלי רמות גבוהות יותר של ABA-GE וחומרי מוצא של ציטוקינינים פעילים בשני מועדי הבדיקה. חנטי 101-14 היו בעלי רמות ABA גבוהות יותר בבוחל. על בסיס תוצאות השנה הראשונה הוחלט שלא לערוך אנליזות עלים בשנה השניה ולהפנות משאבים לאנליזה מפורטת יותר של פקעים וחנטים.

### אנליזות ברקמות קברנה על שתי הכנות בשנה השניה:

פקעי קברנה המורכבים על 101-14 או SO4: מן האנליזה המוצגת בתמונה 7 ברור כי (1) כמו בשנה קודמת, בפקעי קברנה המורכב על SO4 היו רמות גבוהות יותר של JA-ILU, ABA ותוצרי פירוק או מודיפיקציה של ABA (9OH ABA, ABA-GE, PA) ממועד הפריחה ובחודש וחצי שלאחר מכן. (2) בניגוד לשנה קודמת, בפקעי קברנה המורכב על SO4 היו רמות גבוהות יותר של ציטוקינינים פעילים (iP, tZ, DZR) בפריחה ובחודש וחצי שלאחריה. (3) בניגוד לממצאים בתקופת ההתפתחות המוקדמת, בשלב הבוחל נמצאו רמות גבוהות יותר של ABA ונגזרותיו הנזכרות בפקעי קברנה המורכב על 101-14. גם בשנה קודמת נמדדו רמות גבוהות יותר של PA ו-9OH-ABA בפקעי 101-14 בבוחל (אם כי הפערים הנמדדים היו קטנים יותר) כך שהממצאים מתיישבים באופן סביר בין שתי המדידות (4) חומצה סליצילית SA היתה גם היא גבוהה יותר בפקעי קברנה המורכב על 101-14 בין 25DAF לבוחל. (5) גם בשנה השניה רמות IAA בין פריחה לבוחל גבוהות יותר על SO4 אולם השנה לא נראה הבדל בבוחל.

**חנטי קברנה המורכבים על 101-14 או SO4:** מן האנליזה (תמונה 8) עולה כי (1) בדומה למתואר בפקעים גם בחנטי קברנה המורכב על SO4 היו רמות גבוהות יותר של JA-ILU ב-DAF25 ובבוחל, ובאופן מעניין גם רמה גבוהה יותר של cisOPDA שהוא אוקסיליפין נוסף במסלול המטבולי של ח. גסמונית (2) בכל מועדי הבדיקה היו בפקעי קברנה המורכב על SO4 גם רמות גבוהות של חומצה בנוזואית (BzA) (3) בחנטי קברנה המורכב על 101-14 נמדדו רמות גבוהות יותר של SA עד בוחל (5) בחנטי קברנה המורכב על 101-14 נמדדו רמות גבוהות יותר של DPA ו-9OH ABA בין DAF25 ל-45DAF.

#### **אנליזות ברקמות שורשים, עלים ופקעים של שתי הכנות בשנה השניה:**

כאמור מעל, בשנה השניה הושוּו בנוסף רמות הורמונים בשורשים, עלים ופקעים שנדגמו מגפנים לא מורכבות משתי הכנות (תמונה 9). האברים נדגמו פעם אחת באביב 2013.

**שורשי הכנות:** רמות JA ו-JAILEU היו גבוהות יותר בשורשי SO4 ואילו רמות ציטוקינינים פעילים (iP, tZ) ו-BzA היו גבוהות יותר בשורשי 101-14.

**עלי הכנות:** רמות JA היו גבוהות יותר גם בעלי SO4. רמות IAA ו-OxIAA היו גבוהות יותר בעלי 101-14 ואילו רמות PAA ו-IAAasp היו גבוהות יותר ב-SO4. לא היה הבדל מובהק ברמות ABA אולם שני תוצרי מודיפיקציה של ABA נמצאו ברמה גבוהה יותר בעלי SO4.

**פקעי הכנות:** רמות ABA, IAA, PAA, tZ, BzA, SA היו גבוהות יותר בפקעי SO4 ורמת OxIAA היתה גבוהה יותר בפקעי 101-14.

על בסיס כלל הנתונים נראה כי (1) ההבדלים בין שורשי הכנות ברמות ח. גסמונית או נגזרותיה עשויים להיות הסיבה להבדלים דומים בפקעי וחנטי קברנה המורכב על הכנות האמורות. הרמה הגבוהה יותר שנמצאה גם בעלי הכנה SO4 תומכת בהנחה זו (2) רמות גבוהות של JA ונגזרותיה בשורשי הכנות נמצאים במתאם עם רמות ABA ונגזרותיו בחלקי הנוף- בכנות (שבהן רמת ABA בעלי ופקעי SO4 גבוהה מזו שנמדדה באותם אברים מ-101-14) ובקברנה המורכב על הכנות (שבהן רמת ABA בפקעי SO4 גבוהה מזו שנמדדה באותם אברים מ-101-14) (3) על פי נתוני השנה השניה (שהם מפורטים יותר ויציבים יותר ולכן אמינים יותר לטעמנו) ישנו יחס הפוך בין רמת ציטוקינינים בשורשי הכנה ופקעי הרוכב קברנה- רמה גבוהה יותר בשורשי 101-14 ונמוכה יותר בפקעי קברנה המורכבים על כנה זו, בהשוואה לפקעי קברנה המורכב על SO4. ממצא המעלה אפשרות של אגירה/הובלה מואטת של ציטוקינינים מהשורשים לנוף בקברנה המורכב על-101-14. אינדיקציה בכיוון זה היא רמה גבוהה יותר של tZ גם בפקעי SO4 לא מורכבת. (4) תסריט דומה ניתן להציע לגבי BzA שרמתה גבוהה יותר בשורשי 101-14 אך נמוכה יותר בפקעי 101-14 ופקעי וחנטי קברנה המורכבים על כנה זו בזמן הבוחל (5) נראה כי בחנטי ופקעי קברנה המורכבים על 101-14 יש רמות גבוהות יותר של SA אולם לא נמצאו הבדלים דומים בהשוואה בין אברי הכנות עצמן. כלל הנתונים מציעים קשר סביר בין שונות בין הכנות לשונות באיברי רוכב המורכב עליהן ומציעים אפשרות של מעורבות הורמונלית בהבדלים בהתנהגות הרוכב על שתי הכנות.

## אנליזה טרנסקריפטומית

### שינויים בדגם ביטוי בזמן הבוחל

מאחר שהאנליזה בשנה השניה לגבי שונות אפשרית בזמן הבוחל היתה עשירה יותר בהבדלים (412 גנים שהראו FC של 1.3 או יותר בהשוואה בין קליפות קברנה מגפנים שהורכבו על שתי הכנות) נתייחס בהמשך לאנליזה זו וכאשר היא מייצגת שינויים דומים במחזור האנליזה הראשון הללו יוזכרו.

על בסיס המוצג בתמונה 10 נראה הבדל בולט ברמת ביטוי של פונקציות הקשורות לדופן התא, לבקרה הורמונלית ולהתמודדות עם עקות, בראש וראשונה, אך גם הבדל ברור בפונקציות הקשורות במטבוליזם של ליפידים ומטבוליזם שניוני והעברת סיגנלים מתווכת קלציום.

נוכח שונות שתועדה בגודל התא, רמות הורמונים ורמת מטבוליטים שניוניים, נתמקד בדווח בפונקציות הקשורות לדופן התא, לבקרה הורמונלית ולמטבוליזם שניוני למרות שברור כי גורמי בקרה שונים עשויים לעמוד בבסיס ההבדל. בטבלאות 1, 2 ו-3 מובאים הגנים ורמת התעתיק היחסית.

**דופן תא (טבלה 1):** למעט שני גנים (ארבינו גלקטון, בתא אקספנסין וגליקוזיד הידרולאז) שהראו ביטוי מוגבר ב-101 14 רב יתר הגנים השייכים לקטגוריה הראו ביטוי מוגבר (בסביבות 2FC) ב-SO<sub>4</sub>, ולמעט גן אחד המקדד לפקטין אסטראז הם בני משפחה בעלי אותה פונקציה של xyloglucan endotransglycosylase. לקסילוגלוקן, המצפה את המיקרופיברילות של הצלולוז, מיוחס תפקיד חשוב בחוזק של המבנה הראשוני של דופן התא. האנזים מעורב ברה-מודלינג של המיצלולאזות בדופן התא והוא מהווה לכן בקר של חוזק הדופן ויכולת מתיחתו הנדרשים לגדילה. ממצא זה נמצא במתאם עם הממצא לפיו גרגר קברנה המורכב על SO<sub>4</sub> גדול באופן מובהק מזה המורכב על 101-14 (Rose et al. 2002).

**הורמונים צמחיים (טבלה 3):** בקליפת הגרגר מקברנה על SO<sub>4</sub> יש עדות לרמה גבוהה יותר של טרנסקריפטים המקדדים ל ABA8ox שהוא הבקר העיקרי בפירוק ABA ונראה סביר שיש הלימה בין רמת ABA גבוהה יותר לרמת המטבוליזם שלו, שהתבטאה גם ברמה גבוהה יותר של תוצרי דגרדציה ומודיפיקציה של ABA באנליזה ההורמונלית. גם הרמה הגבוהה יותר של שלושה בני משפחת 22HVA - גן שביטוי מוגבר על ידי ABA - תומכת בממצאים המציעים רמת ABA גבוהה יותר בגרגרי קברנה מגפנים על כנת SO<sub>4</sub>.

רמה גבוהה יותר של LOX - בקר סינתזה של ח. גסמונית-ו-JAZ - בקר מרכזי של העברת סיגנל JA - נמצאים בהתאמה לרמות גבוהות יותר של JA ו/או נגזרותיה בשורשי SO<sub>4</sub> ובחלקי רוכב שונים המורכבים על כנה זו. לא נמצא הבדל בגנים הקשורים בסינתזת ציטוקינינים פעילים אולם נמצאה רמה גבוהה יותר של שני בני משפחה של בקר פירוק של ציטוקינינים (CKK) בקליפת הגרגר מקברנה על SO<sub>4</sub>. על פי אותו הגיון של עלייה במטבוליזם עם העלייה ברמת ההורמון ברקמה, רמה גבוהה של CKK נמצאת בהתאמה לרמות גבוהות יותר ציטוקינינים בחנטי ופקעי קברנה על SO<sub>4</sub>. ממצא דומה נמצא גם בשנה הראשונה של האנליזה הטרנסקריפטומית.

באופן מעניין נמצאה נציגות בולטת של גנים (16 גנים) ממשפחת בקרי השעתוק ERF/AP2, בקרי מעבר סיגנל של אתילן המעורבים בתהליכים שונים וביניהם תגובה לעקה ואינטראקציה עם ABA, ביניהם 10 גנים מתת משפחת DREB ושלושה ERFs שרמתם גבוהה באופן מובהק על כנת SO<sub>4</sub>, ושלושה נוספים שהראו מגמה הפוכה. נמצאה גם רמה גבוהה יותר של שני גנים המקודדים ל GA2ox, בקר פירוק ג'יברלין על כנת SO<sub>4</sub>. מאחר שאיננו בוטחים במדידות ג'יברלין שנעשו לא ניתן לדון בממצא זה מול מדידת הורמון אולם יש סבירות בהנחה שהוא מבטא מצב מתקדם יותר של הבשלה שכן נהוג להניח כי ג'יברלין יורד ברמתו לקראת בוחל. אם נכון הדבר הרי שמדד החלפת הצבע שבו השתמשנו כדי לדגום גרגרי קברנה באופן אחיד משתי הכנות אינו בהכרח מתואם עם תהליכי מעבר אחרים שקשורים להבשלה.

קשה היה לקבוע מגמה ברורה להבדלים ברמת אוקסינים באנליזה ההורמונלית אולם קבוצה של חמישה בני משפחת הבקר SAUR שידוע כמבוקר על ידי אוקסין היתה ברמה גבוהה יותר ב-14-101 בזמן הבוחל. במדידות השנה השנייה מצאנו בחנטי קברנה על 101-14 רמות גבוהות יותר של אוקסין בהשוואה לחנטי קברנה על 101-14 אולם בזמן הבוחל לא מצאנו הבדל שיסביר באופן פשוט את הביטוי המוגבר של SAUR.

**מטבוליזם שניוני (טבלה 2) :** בשלב הבוחל נמצאו 22 גנים שסווגו כמעורבים במטבוליזם שניוני.

עדות לשונות אפשרית בארומה של הענב בתלות בכנה, שנמצאו לו סימוכין בארבע שנות מבחני טעימת יין שקדמו לפרוייקט הנוכחי, ניתן למצוא בשונות בביטוי של sesquiterpene synthase (שלושה גנים) ו- $\alpha$ -farnesene synthase (שני גנים) – בשני המקרים נמצאו בני משפחה שהתבטאו יותר על SO<sub>4</sub> ואלו שהתבטאו יותר על 101-14. גם גנים המעורבים בסנתזת ליגנין, פנילפרופנואידים ודיהידרופנולים לא הראו דיפרנציאל חד כיווני, בכל אחת מהקטגוריות היו כאלו שהיו גבוהים יותר ב- SO<sub>4</sub> ואחרים גבוהים יותר ב- 101-14. PAL הראה רמות גבוהות יותר ב-SO<sub>4</sub>.

שני גנים שסווגו כמעורבים בסנתזת שעווה (membrane bound O-acyl transferase; ketoacyl-CoA-3 synthase) היו ברמה גבוהה יותר ב-101-14.

אנליזות שפורטו לעיל הצביעו על רמה גבוהה יותר של פוליפנולים ואנתוציאנינים שנמצאה בקליפות ענבי קברנה (בבציר) מגפנים שגדלו על כנת SO<sub>4</sub>. למרות זאת, בשלב הבוחל שלושה גנים שמעורבים בסנתזת אנטוציאנינים (שניים המקודדים UDP גליקוזיל טרנספראז ובקר שעתוק MYB) היו ברמה גבוהה יותר ב-101-14.

בנוסף לנתונים המוצגים, אחד הממצאים שחזרו על עצמם היה עלייה בביטוי של קבוצה גדולה של גנים המעורבים ב-calcium signaling ב-SO<sub>4</sub>- ביניהם גנים המקודדים ל CDPK, חלבונים קושרי קלמודולין וחלבונים אחרים קושרי קלציום. בקבוצה זו לא נמצא אף גן שהראה ביטוי מוגבר ב-101-14.

קבוצה גדולה של גנים המקודדים לחלבוני heat shock (13 גנים), בקרי שעתוק המגיבים לשוק חום (3 גנים) וגנים המתבטאים בתגובה לפציעה (10 גנים) התבטאו יותר ב- SO<sub>4</sub> ואולי יש בכך מתאם עם רמות ABA ו-JA גבוהות יותר (תמונה 10).

באופן מעניין על כנת SO4 נמצא ביטוי מוגבר של TPP ו-TPS, אנזימים מרכזיים בסנתזה ופירוק הסוכר טראלוז פוספאט המשמש בתפקודי sugar signaling ולא כפחמימה מבנית אך רמתו במתאם עם רמת סוכרוז. ממצא זה נמצא במתאם עם הבדלים שדווחו מעל במטבוליזם ראשוני בסמוך לבוחל. התמונה הכללית מצביעה על מצב של עקה גדולה יותר תחת SO4- רמות גבוהות יותר של הורמונים הקשורים לעקה (JA, ABA) ופונקציות הקשורות לסנתזה והעברת סיגנל של הורמונים המקושרים לעקה (JA, ABA, אתילן), ביטוי מוגבר של חלבוני heat shock וwounding proteins, עדויות לעקה נשימתית, עדויות להעברת סיגנל מתווכת קלציום, עליה בולטת בביטוי חלבונים פרוטאוליטים ובקרי שעתוק ממשפחת WRKY ו-ERF. בתמונה 11 ניתן לראות איור גרפי מתכנת MAPMAN המקבץ יחד את הגנים שהשתנו בקטגוריות המזכרות וקל להבחין כי ברובם שולט הצבע הכחול המצביע על רמת הביטוי גבוהה יותר ב-SO4. באופן מעניין נראה כי בבציר חל היפוך והביטוי של גנים המתמיינים לאתילן, עקות אביוטיות גבוה באופן גורף דווקא ב-14-101.

#### שינויים בביטוי בזמן הבציר

בזמן בציר נמצא מספר קטן יותר של גנים שהראו ביטוי דיפרנציאלי בקליפות ענבים מגפנים שהורכבו על שתי הכנות (246 גנים שהראו FC של 1.3 או יותר בהשוואה בין קליפות קברנה מגפנים שהורכבו על שתי הכנות, תמונה 10). הפונקציות שניתן להבחין שהושפעו הינן עקה (18 גנים- רב הגנים הראו ביטוי גבוה יותר ב-14-101) ומטבוליזם משני (15 גנים-רב הגנים הראו ביטוי גבוה יותר ב-SO4).

רב הגנים שסווגו כגנים של עקה היו גנים המקודדים לחלבוני heat shock וגנים המתבטאים בתגובה לפגיעה ובשלב זה כולם הראו ביטוי גבוה יותר ב-14-101. בדומה למתואר מעל, גם בשנת האנליזה הראשונה נמצא כי גנים אשר התבטאו ביתר בהרכבה על הכנה 14-101 בזמן בציר מקודדים ל Heat Shock Proteins.

נמצאו מספר גנים דיפרנציאליים הקשורים למטבוליזם הורמונלי שהראו ביטוי גבוה יותר ב-14-101 וכולם קשורים לסיגנל/תגובה לאתילן למעט רמה גבוהה יותר של אתילן אוקסיד סינתאז המבקר סינתזת JA שעדיין מתבטא ברמה גבוהה יותר ב-SO4. ככלל, נראה כי סממנים לעקה נמצאו בזמן בוחל גבוהים יותר ב-SO4 אולם בזמן בציר התחלפה המגמה והם נראים גבוהים יותר ב-14-101.

גנים המעורבים במטבוליזם שניוני ונמצאו כנבדלים בביטויים בין SO4 ל 14-101 כוללים את: Anthocyanidin-glucosyltransferase, Chalcone synthase ו- Glutathion-S transferase8. Calcone synthase הינו אנזים מפתח המזרז את התגובה הכימית המהווה צומת במעבר ממסלול הפנילפרופנואידים למסלול הפלבנואידים (Winkel-Shirley 2001). Anthocyanidin-glucosyletransferase הינו אנזים המקטלז הוספת קבוצת גלוקוז לאנתוציאנידינים המובילה להפיכתם לאנתוציאנינים מסיסים במים וזמינים לאחסון בוואקואולות בתאי זג הענב (Griesser et al. 2008). הוספת הגלוקוז יוצרת שני סוגי אנתוציאנינים (cyanidin-3-o-glucoside ו delphindin-3-o-glucoside) אשר מהווים את המוצא ל 15 סוגי האנתוציאנינים הנפוצים בענב. Glutathion-S transferase8 הינו אנזים אשר הוצע בספרות כמעורב בתהליך הובלת האנתוציאנינים לוואקואולה לאחסון

(Costantini et al. 2015). רמת התעתיק של שלשת האנזימים הנ"ל המווסתים סינתזת פלבנואידים וצבירת אנתוציאנינים בפרט היתה גבוהה יותר בזגי גרגרי קברנה אשר גדלו על הכנה SO<sub>4</sub>, בהשוואה לאלו שגדלו על הכנה 101-14. בעונת 2013 נמצא מתאם ברור בין ביטוי גבוה יותר של הגנים הנ"ל המעורבים במסלול הביוסינתזה של הפלבנואידים לרמות גבוהות יותר של פלבנואידים, ובהם אנתוציאנינים, שנמדדו באנליזות מטבוליות שנערכו תוך שימוש באותן דוגמאות של זגי הענב בבציר. - מתאם דומה נמצא בין הבדלים ברמות הביטוי של הגנים הנידונים מעל להבדלים בצבע הענב והיין. על בסיס תוצאות אלו מועלית ההשערה כי הכנה מבקרת, במישרין או בעקיפין את פרופיל ביטוי הגנים בגרגר ומובילה להבדלים בהרכבו הכימי של הזג. מצאנו כי הבדלים אלו כוללים את קבוצת הפלבנואידים, בהם האנתוציאנינים האחראים לצבע ומשפיעים על רמת העפיצות ע"י השפעה על דרגת הפולימריזציה של הטנינים, וכן הפלבנוולים והפלבאנוולים האחראים לעפיצות ומרירות היין (Gawel, 1998).

## סיכום תכנית 13-0952-203

### מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

כדי לשפוך אור על הבסיס להבדל שנמצא במחקר קודם בהתנהגות קברנה שהורכב על הכנות SO<sub>4</sub> ו-14-101 הוצע (1) לבצע אפיון פיזיולוגי משווה חוזר של ביצועי קברנה על שתי הכנות על מנת לאשש קיום הבדלים בגפן שהתבגרה והתבססה מאז האנליזה שהיוותה תשתית למחקר. (2) לאסוף חומר צמחי ממספר שלבי התפתחות עבור אנליזות משוות של פרופיל הורמונלי (עלים פקעים וחנטים צעירים) טרנסקריפטומי(קליפות ענבים בבוחל ובזמן בציר) ומטבולי (פירות במועד בוחל והבשלה) (3) לבצע אנליזה הורמונלית, טרנסקריפטומית ומטבולומית של דגימות ממספר חזרות ביולוגיות בשתי עונות גידול.

### עיקרי התוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:

האפיון הפיזיולוגי העלה שונות בין שתי שנות מדידה של מדדים פיזיולוגיים בגפן הבוגרת. בשנה הראשונה נמצא צימוח מוגבר על הכנה 14-101 על בסיס תוצאות LAI ועל בסיס שקילת גזם. על כנה זו תועד מספר פרקים גדול יותר ומספר זמורות משנה גדול יותר. תועדו הבדלים בפוטנציאל המים בעלה משלב הבוחל ועד לבציר, והבדלים בגודל (ל- 14-101 גרגרים קטנים יותר) החל מחודש לאחר פריחה ועד לבציר. בשנה השנייה לא נמצא הבדל ברב הפרמטרים למעט הבדל יציב ומובהק בגודל הגרגר.

נערכו אנליזות משוות של פרופיל הורמונלי של עלים פקעים וחנטים מהכנות עצמן ומרקמות קברנה המורכב על שתייהן, פרופיל טרנסקריפטומי של קליפות מבוחל ובציר, אנליזה מטבולומית של מטבוליטים ראשוניים עד בוחל ואנליזה מטבולומית של מטבוליטים שניוניים שהתמקדה בפנולים ואנטוציאנינים.

### מסקנות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

(1) ענבי קברנה הגדלים על כנת SO<sub>4</sub> גדולים באופן מובהק מאלו הגדלים על 14-101 כבר בסיגמואיד הראשון - למעט הבדל זה אין שימור רב שנתי של הבדלים במדדים פיזיולוגיים. (2) ישנם הבדלים מובהקים בפרופיל ההורמונלי של הכנות ושל פקעי קברנה המורכבים עליהם- הבולטים שבהם הם רמות גבוהות יותר של ABA ונגזרותיו ושל ח. ג'סמוניט או נגזרותיה. יש עדות למתאם בין רמות ח. גסמוניט בשורשי הכנה לרמתה בחלקי רוכב (3) בהתאמה, ישנן עדויות טרנסקריפטומיות ומטבוליות התומכות במצב עקה חריף יותר של הפרי על כנת SO<sub>4</sub> בבוחל והיפוך חלקי בזמן בציר (4) השינויים שנמצאו נמצאים במתאם עם רמה גבוהה יותר של תעתיקים הקשורים ברגולציה הורמונלית, מטבוליזם של פנולים ופלבנואידים ושינויים בדופן התא. קישור מעמיק יותר בין השינויים שנמצאו נדרש על מנת לייצר היפותזות עבודה לאיתור המקורות הראשוניים להבדלים. מטבוליזם של אוקסיליפינים הוא יעד ראשוני סביר להבנתו.

### האם כבר הוחל בהפצת הידע?

לא.

פרסום הדו"ח: אין לפרסם עד לפרסום התוצאות במאמר מדעי.



## כותרות גרפים וטבלאות

- תמונה 1:** השפעת זהות הכנה על פוטנציאל המים בעלה בעונות 2013 ו 2014.
- תמונה 2:** השפעת זהות הכנה על משקל הגזם בתאריך הזמירה, ועל מספר גרגרים לאשכול בזמן הבציר בעונות 2013-2014.
- תמונה 3:** השפעת זהות הכנה על נפח הגרגר וצבירת הסוכרים בעונות 2013-2014.
- תמונה 4:** תוצאות פרופיל מטבוליזם ראשוני של ציפת הגרגר בשתי נקודות זמן לאורך הסיגמואיד הראשון של התפתחות הפרי ב 2014.
- תמונה 5:** סיכום תוצאות פרופיל פלבונואידים בזג הענב במועד הבציר בעונות 2013-2014.
- תמונה 6:** השפעת זהות הכנה על צבע הגרגר והיין בעונת 2013.
- תמונה 7:** השפעת זהות הכנה על רמות הורמונים צמחיים בפקעי קברנה. מובאים שינויים מובהקים שנמצאו בין כנת SO4 לכנת 101-14. פרטי ביצוע בגוף הדו"ח.
- תמונה 8:** השפעת זהות הכנה על רמות הורמונים צמחיים בחנטי קברנה. יתר הפרטים כמתואר בתמונה 7.
- תמונה 9:** הבדלים ברמות הורמונים צמחיים בשורשים, עלים ופקעים של צמחי הכנות 101-14 ו-SO4. יתר הפרטים כמתואר בתמונה 7.
- תמונה 10:** השפעת זהות הכנה על הפרופיל הטרנסקריפטומי של קליפות ענבי קברנה בכוחל (תמונה עליונה) ובציר (תמונה תחתונה). כלל הגנים שביטויים היה שונה פי 1.3 או יותר בהשוואה בין שתי הכנות מיינו לקטגוריות תוך שימוש בכלי Mapman שהותאם לגפן (Rotter et al. 2009).
- תמונה 11:** אינטגרציה של שינויים המיוחסים לעקות בקליפות ענבי קברנה בכוחל ובבציר, תוך שימוש ב-mapman. בכוחל מיוצגים תעתיקים שביטויים על SO4 גבוה יותר מזה שעל-101-14 ובאדום מיוצגים מיוצגים תעתיקים שביטויים על SO4 נמוך יותר מזה שעל-101-14.
- טבלה 1:** גנים בעלי תפקיד בדופן התא שהראו שינויים מובהקים בביטויים במועד הבוחל בזגים מענבים שגדלו על SO4 ועל-101-14. מוצג ערך FOLD CHANGE המייצג חישוב יחס בין ערכי ביטוי שנמדדו SO4/101-14
- טבלה 2:** גנים בעלי תפקיד מטבוליזם שניוני שהראו שינויים מובהקים בביטויים במועד הבוחל בזגים מענבים שגדלו על SO4 ועל-101-14. מוצג ערך FOLD CHANGE המייצג חישוב יחס בין ערכי ביטוי שנמדדו SO4/101-14
- טבלה 3:** גנים בעלי תפקיד במטבוליזם וחישה הורמונלית שהראו שינויים מובהקים בביטויים במועד הבוחל בזגים מענבים שגדלו על SO4 ועל-101-14. מוצג ערך FOLD CHANGE המייצג חישוב יחס בין ערכי ביטוי שנמדדו SO4/101-14

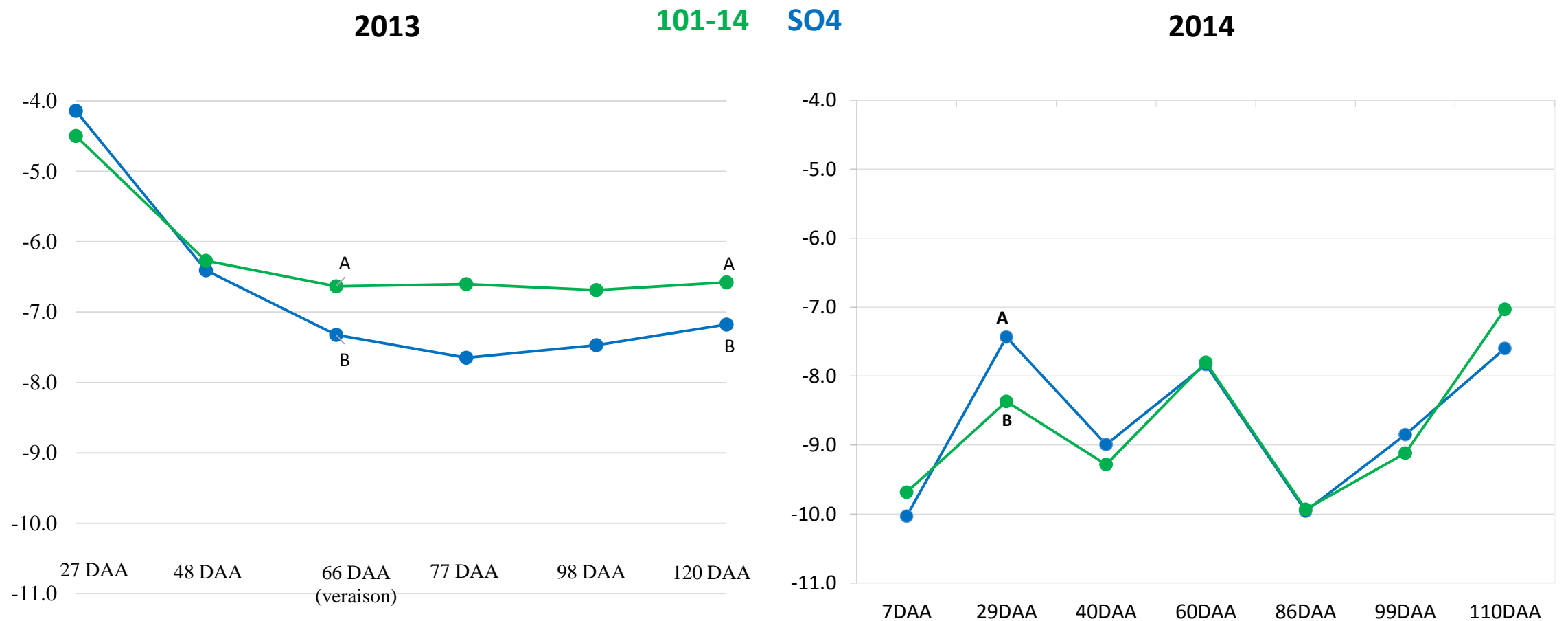
## ספרות

Ali K, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews* 9 (3):357-378. doi:10.1007/s11101-009-9158-0

- Chone X, Tregoat O, Van Leeuwen C, Dubourdieu D (2000) Vine water deficit: Among the 3 applications of pressure chamber, stem water potential is the most sensitive indicator (Deficit hydrique modere de la vigne: Parmi les 3 applications de la chambre a pression, le potentiel tige est l'indicateur le plus precis). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 34 (4):169-176
- Claussen W (2005) Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* 168 (1):241-248. doi:10.1016/j.plantsci.2004.07.039
- Costantini L, Malacarne G, Lorenzi S, Troggio M, Mattivi F, Moser C, Grando MS (2015) New candidate genes for the fine regulation of the colour of grapes. *Journal of experimental botany* 66 (15):4427-4440. doi:10.1093/jxb/erv159
- Crane O, Halaly T, Pang X, Lavee S, Perl A, Vankova R, Or E (2012) Cytokinin-induced VvTFL1A expression may be involved in the control of grapevine fruitfulness. *Planta* 235 (1):181-192. doi:10.1007/s00425-011-1497-6
- Dai ZW, Leon C, Feil R, Lunn JE, Delrot S, Gomes E (2013) Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany* 64 (5):1345-1355. doi:10.1093/jxb/ers396
- Dal Santo S, Torielli GB, Zenoni S, Fasoli M, Farina L, Anesi A, Guzzo F, Delledonne M, Pezzotti M (2013) The plasticity of the grapevine berry transcriptome. *Genome Biology* 14 (6). doi:10.1186/gb-2013-14-6-r54
- Griesser M, Hoffmann T, Bellido ML, Rosati C, Fink B, Kurtzer R, Aharoni A, Munoz-Blanco J, Schwab W (2008) Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* 146 (4):1528-1539. doi:10.1104/pp.107.114280
- Hochberg U, Degu A, Toubiana D, Gendler T, Nikoloski Z, Rachmilevitch S, Fait A (2013) Metabolite profiling and network analysis reveal coordinated changes in grapevine water stress response. *Bmc Plant Biology* 13. doi:10.1186/1471-2229-13-184
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology* 43 (12):1421-1435. doi:10.1093/pcp/pcf171
- Rotter A, Camps C, Lohse M, Kappel C, Pilati S, Hren M, Stitt M, Coutos-Thevenot P, Moser C, Usadel B, Delrot S, Gruden K (2009) Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata*: Extending MapMan ontology for grapevine. *Bmc Plant Biology* 9. doi:10.1186/1471-2229-9-104
- Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O (2004) Process for the integrated extraction identification, and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 4 (1):78-83. doi:10.1002/pmic.200200500
- Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126 (2):485-493. doi:10.1104/pp.126.2.485

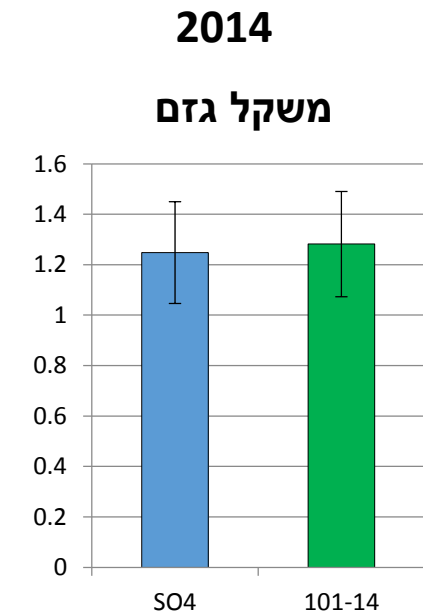
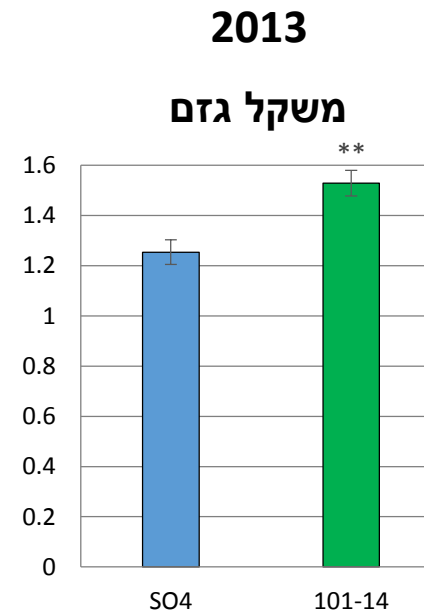
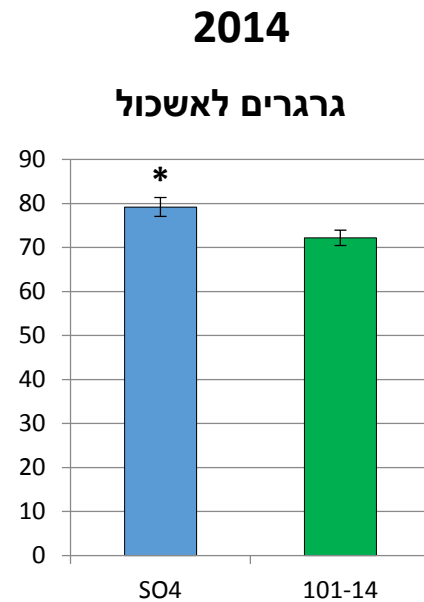
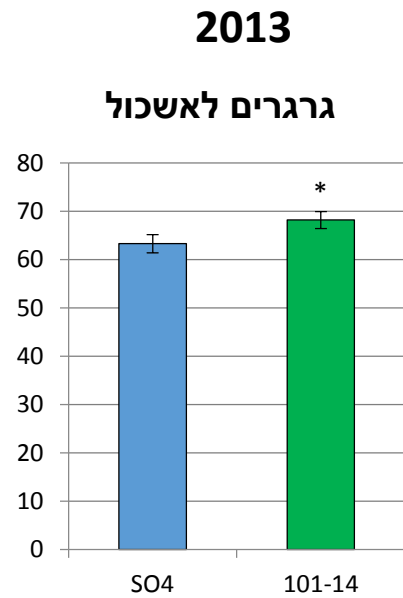
# תוצאות פזיולוגיות

## תמונה 1 – פוטנציאל מים בעלה



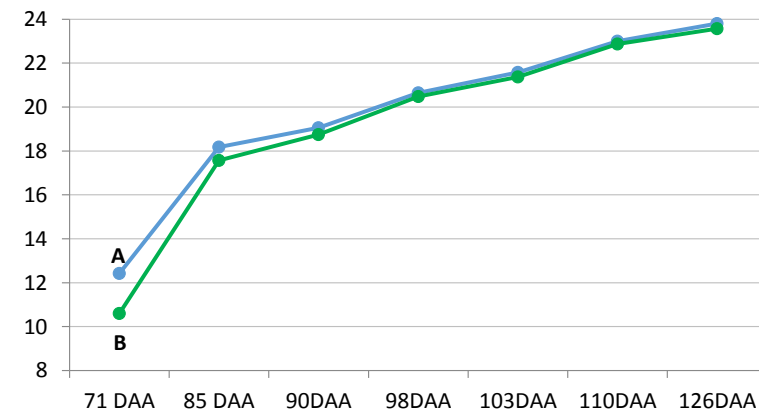
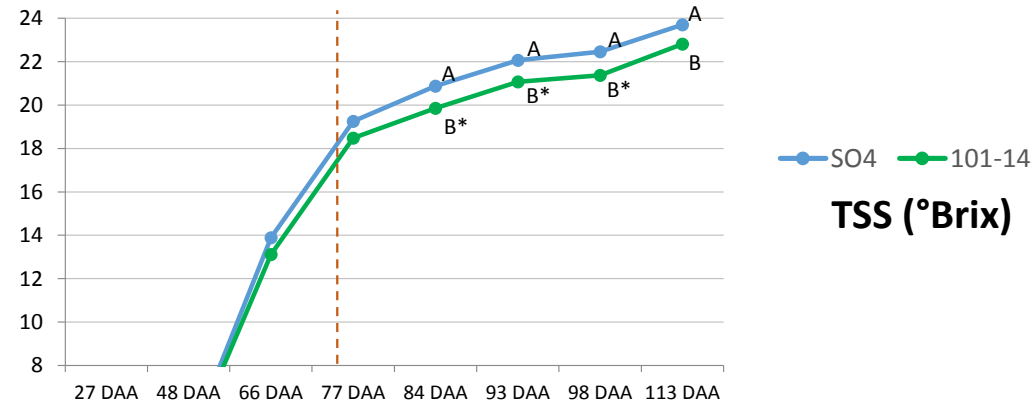
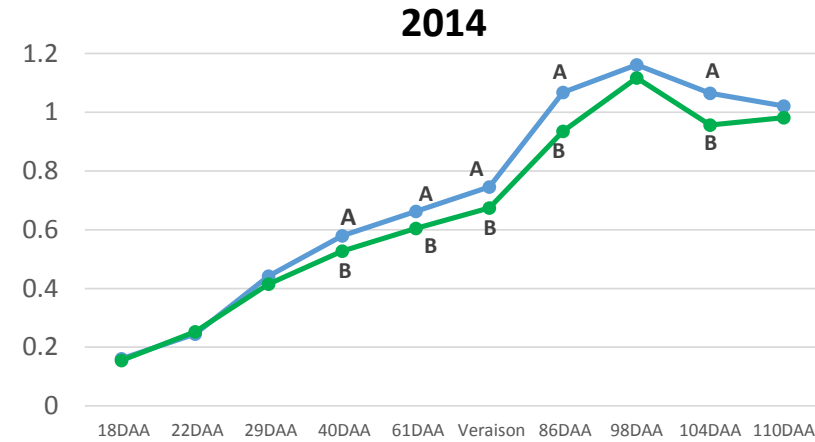
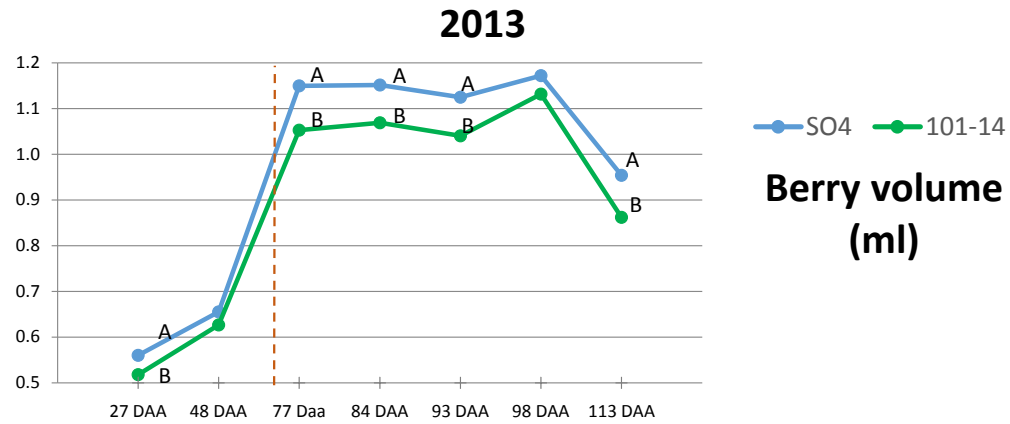
# תוצאות פזיולוגיות

## תמונה 2 – תוצאות מדידות בציר וזמירה



# תוצאות פזיולוגיות

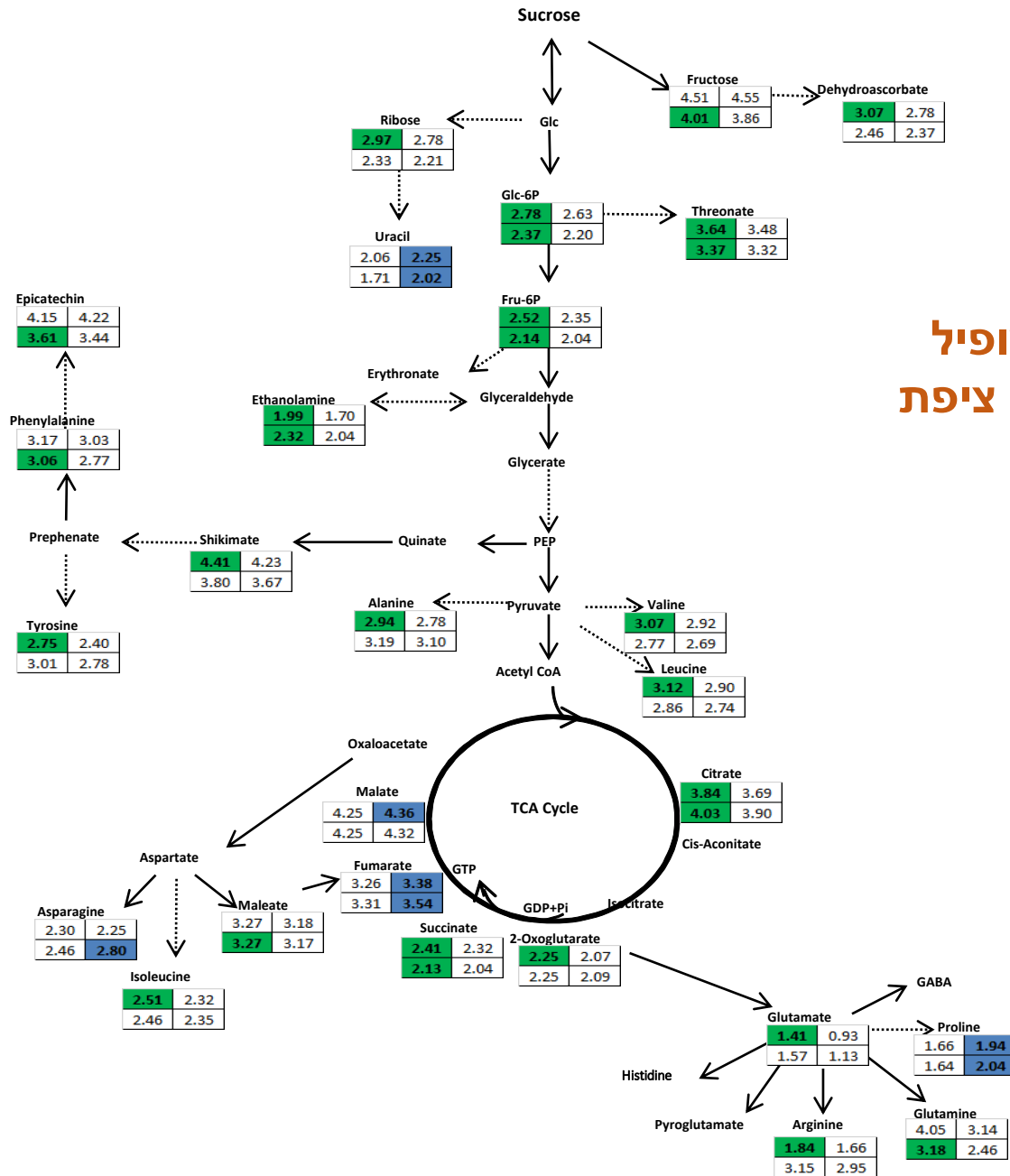
## תמונה 3 – מעקב נפח גרגר וצבירת סוכרים



# תוצאות GC-MS

הנתונים הם לוג של רמה יחסית של החומר ברקמה. ריבועים הצבועים בכחול או ירוק מייצגים חומרים שנמצאו גבוהים באופן מובהק על הכנה SO4 או 101-14, בהתאמה.

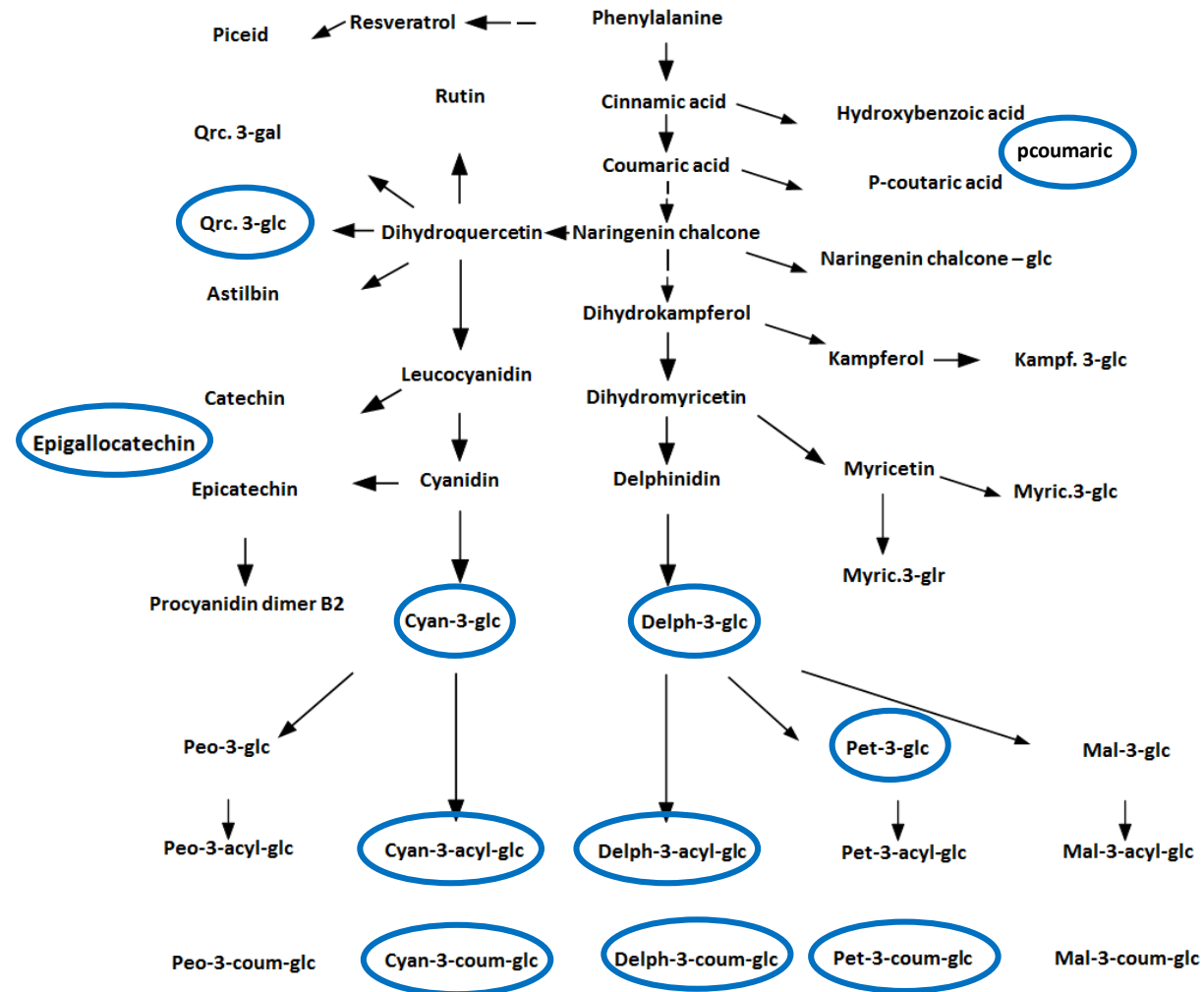
101-14 A	SO4 A	A – 1 <sup>st</sup> June 2015
101-14 B	SO4 B	B – 23 <sup>rd</sup> June 2015



תמונה 4 – ניתוח פרופיל מטבוליזם ראשוני של ציפת גרגר 2014

# תוצאות UPLC-QTOF-MS

תמונה 5 – ניתוח פרופיל פלבנואידים של זג הענב עם 11 המטבולטים שנמצאו גבוהים על S04 מוקפים בכחול במסלול הפלבנואידים



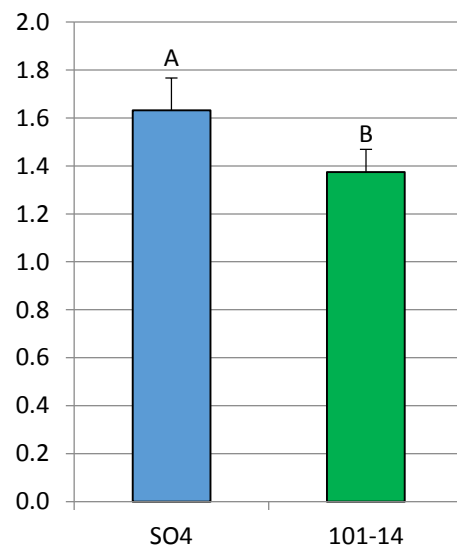
Cyanidin\_3\_O\_glucoside  
 Petuidin\_3\_O\_glucoside  
 Delphinidin\_3\_O\_glucoside  
 Delphinidin\_3\_O\_glucoside\_acetylated  
 Cyanidin\_3\_O\_glucoside\_acetylated  
 Delphinidin\_3\_O\_glucoside\_cumarylated  
 Cyanidin\_3\_O\_glucoside\_p\_coumaroyl  
 Petuidin\_3\_O\_glucoside\_p\_coumaroyl

Epigallocatechin  
 pcoumaric  
 Quercetin3Oglucoside

# תוצאות בדיקות צבע

תמונה 6 – תוצאות מדידות צבע של גרגרים ויין משתי צירופי כנה:רוכב במכשיר ספקטרופוטומטר – בליעה ב 520nm

אתנוציאנינים ב 23 בריקס  
(מ"ג מלבידין לגרם גרגר)



מידת בליעת הצבע  
520nm (מ"מ) ביין

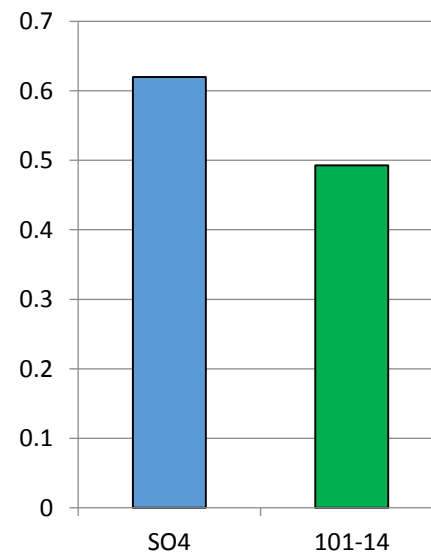
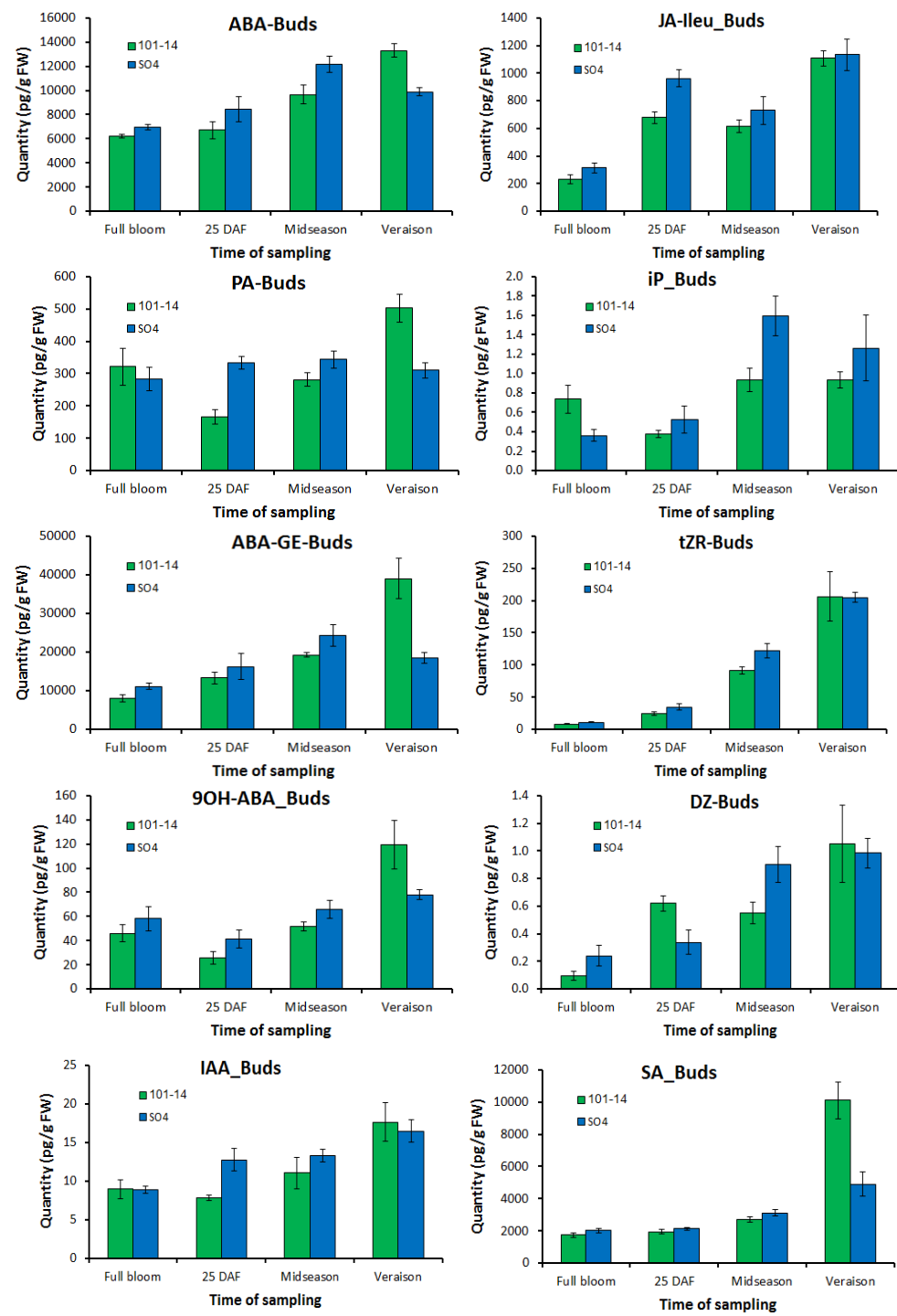
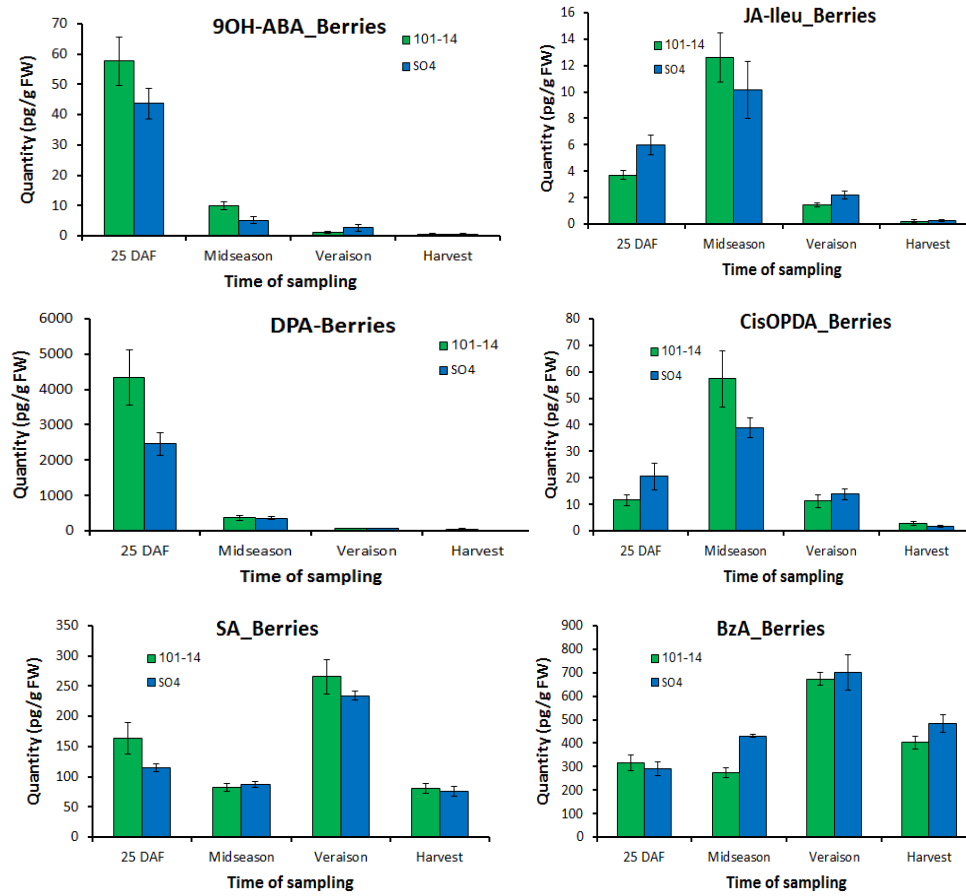




Fig.7



**Fig.8**



**Fig.9**

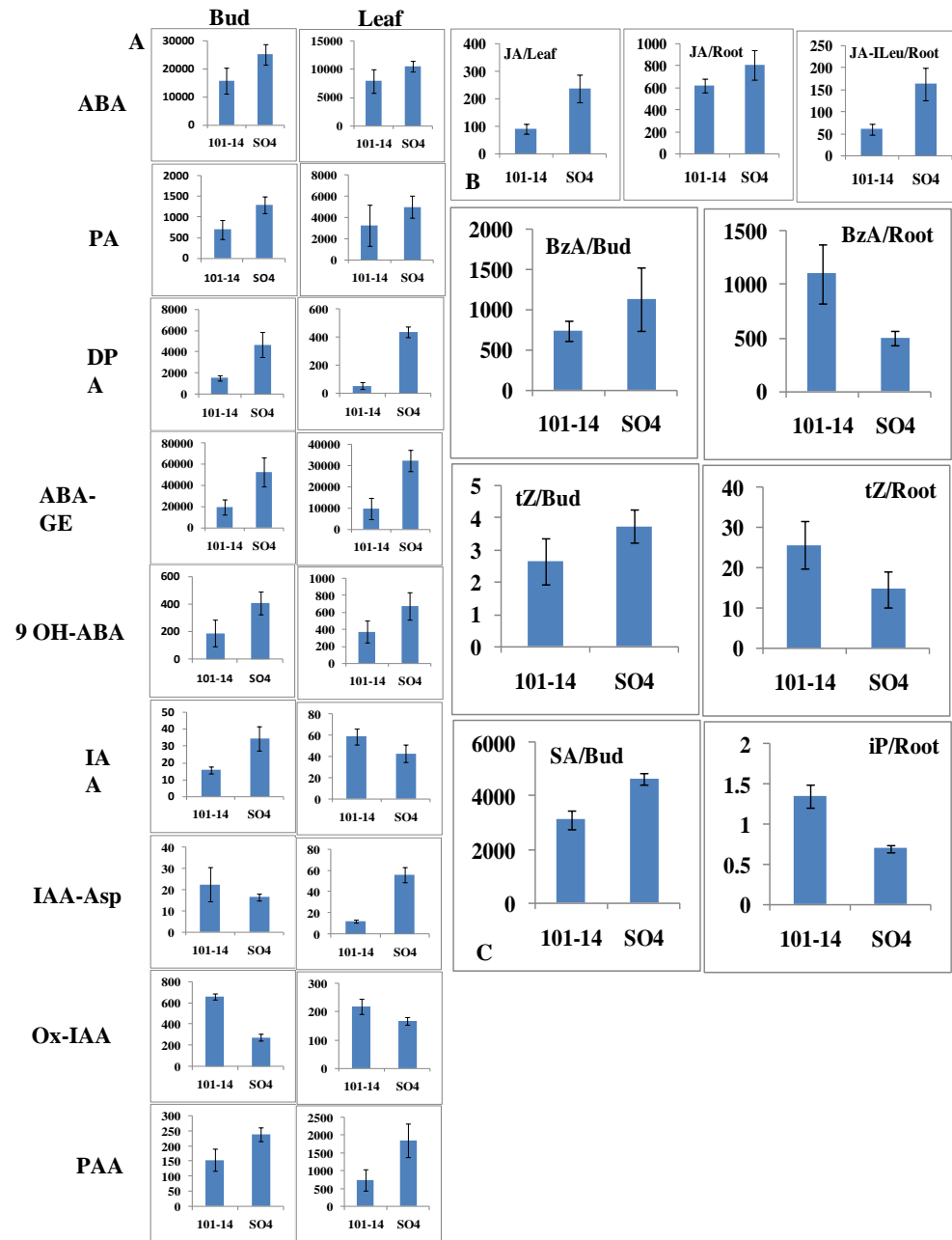


Fig. 10

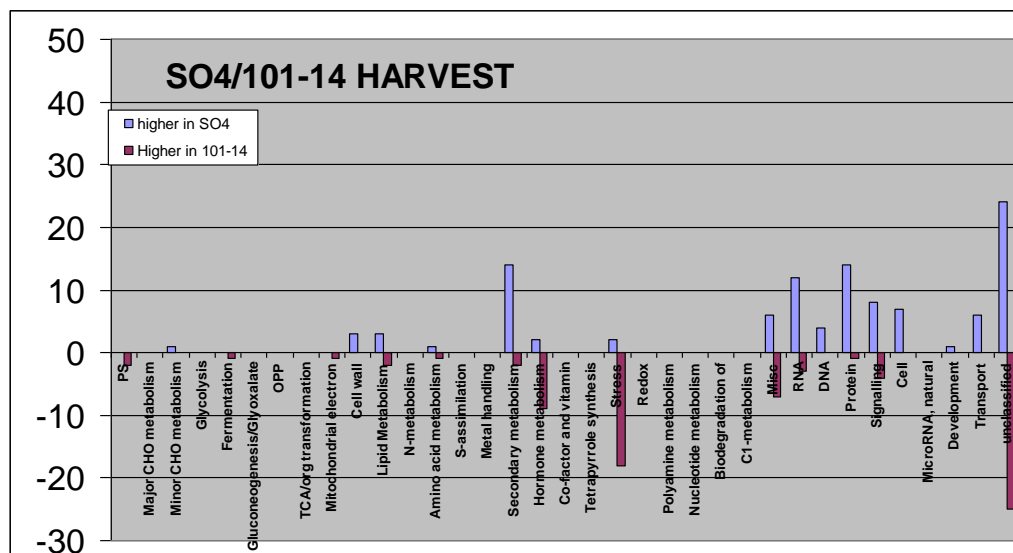
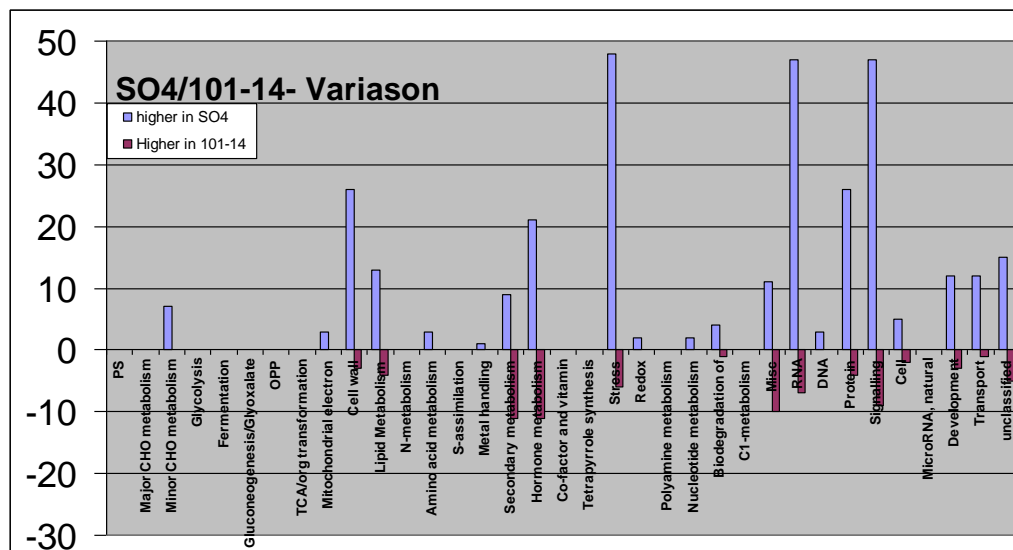
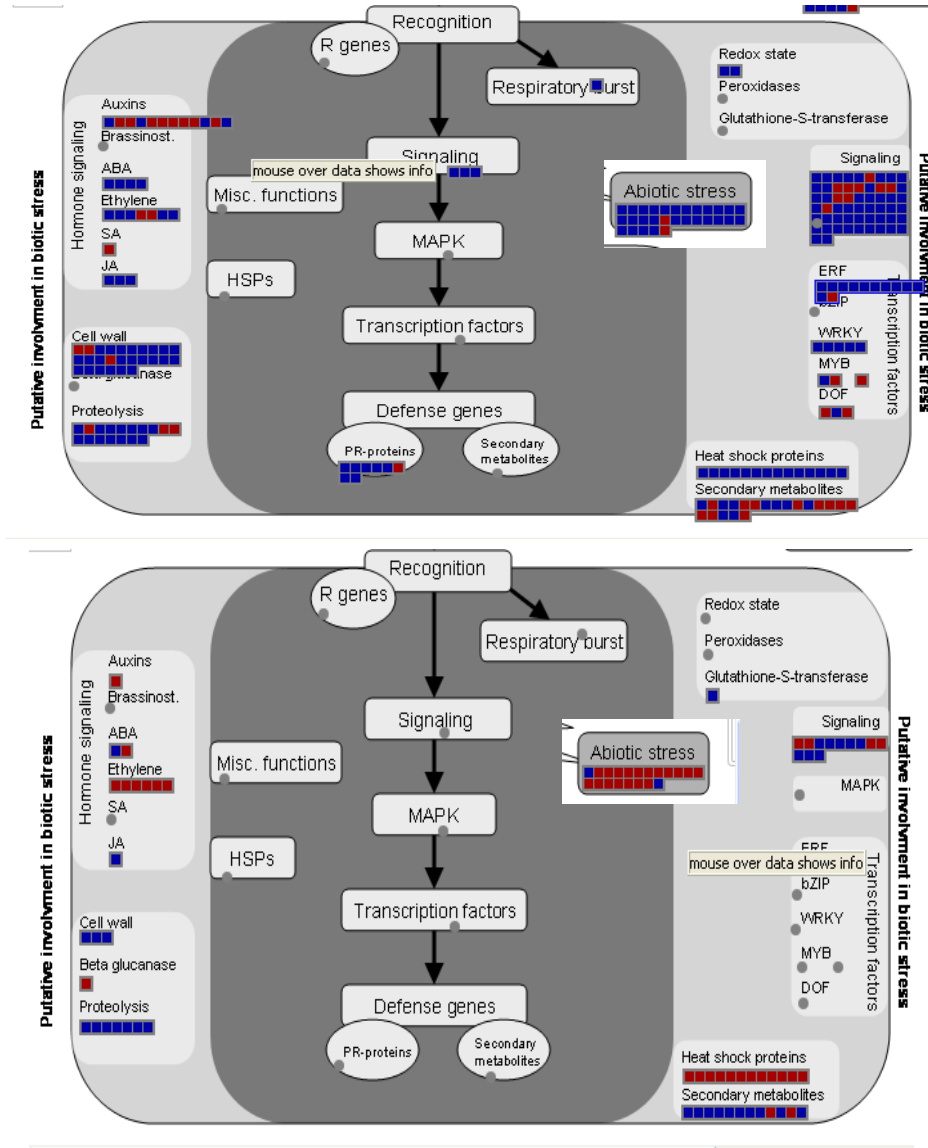


Fig.11



### Table 1: Cell Wall

category	ID	SO4/101 FC	function
cell wall	vv19s0015g00530	-1.4244	arabinogalactan 1
cell wall	vv18s0089g00160	-1.63382	Glycoside hydrolase
cell wall	vv09s0002g08510	-1.66109	beta expansin
cell wall	vv11s0052g01180	1.69064	XTR
cell wall	vv11s0052g01190	2.00966	XTR
cell wall	vv11s0052g01200	2.06126	XTR
cell wall	vv11s0052g01260	1.88642	XTR
cell wall	vv11s0052g01270	1.98111	XTR
cell wall	vv11s0052g01280	2.1442	XTR
cell wall	vv11s0052g01300	1.6937	XTR
cell wall	vv11s0052g01320	1.88164	XTR
cell wall	vv11s0052g01330	2.20374	XTR
cell wall	vv11s0052g01340	1.39465	XTR
cell wall	vv04s0044g01420	2.35441	XTR
cell wall	vv05s0062g00480	1.56715	XTR
cell wall	vv02s0154g00600	1.59625	pectin esterase

### Table 2: Secondary Metabolism

category	ID	SO4/101 FC	function
<b>Secondary metabolism</b>			
isoprenoids.te	vv19s0015g02070	-2.09667	sesquiterpene synthase
isoprenoids.te	vv16s0039g01670	-1.52006	terpene synthase
isoprenoids.te	vv00s0271g00060	1.66452	alpha-farnesene synthase
isoprenoids.te	vv12s0059g02710	2.19312	alpha-farnesene synthase
isoprenoids.te	vv19s0014g04900	2.40779	sesquiterpene synthase
phenylpropano	vv16s0022g01970	-1.6236	lignin metabolism
phenylpropano	vv16s0039g01670	-1.52006	cinnamoyl-CoA reductase activity,
phenylpropano	vv11s0065g00350	1.56822	cinnamate-4-hydroxylase
phenylpropano	vv16s0039g01100	1.69054	Phenylalanine ammonia-lyase
phenylpropano	vv16s0039g01130	2.21527	Phenylalanine ammonia-lyase
	vv17s0000g07670	1.33164	betaine aldehyde dehydrogenase
wax	vv19s0090g01410	-1.78075	Wax synthase
wax	vv14s0006g02990	-1.57412	3-ketoacyl-CoA synthase
	vv01s0026g00630	-2.11258	UDP-glucosyltransferase (
favenoids	vv16s0022g01970	-1.6236	UDP-glucosyltransferase (
favenoids	vv00s0218g00190	-1.5923	UDP-glucosyltransferase (
favenoids	vv00s0218g00190	-1.5923	UDP-glucosyltransferase (
favenoids	vv14s0006g01290	-1.5526	myb
favenoids	vv02s0025g01240	1.4535	2-oxoglutarate -dependent oxygenase
favenoids	vv02s0025g02960	1.90493	2-oxoglutarate -dependent oxygenase

**Table 3: Plant hormones**

category	ID	SO4/101 FC	function
<b>hormons</b>			
ABA	vv02s0087g00710	1.46937	ABA 8'-hydroxylase
ABA	vv03s0038g01650	1.71439	HVA22 homologue
ABA	vv03s0132g00070	2.02744	HVA22 homologue
ABA	vv03s0132g00100	1.61283	HVA22 homologue
Auxin	vv04s0023g00520	-2.54108	SAUR-like
Auxin	vv03s0038g01130	-2.32742	SAUR-like
Auxin	vv01s0026g00630	-2.11258	glucosinolate biosynthesis
Auxin	vv03s0038g01180	-1.91817	SAUR-like
Auxin	vv04s0023g00550	-1.66883	SAUR-like
Auxin	vv03s0038g03450	-1.60658	SAUR-like
Auxin	vv09s0002g00700	-1.38422	Dormancy/auxin associated family
Auxin	vv12s0059g01870	-1.30929	Auxin-responsive
Auxin	vv19s0027g00020	1.45674	Auxin-responsive
Auxin	vv05s0062g00270	1.53158	indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase
Auxin	vv08s0007g01650	1.77522	O-fucosyltransferase
Auxin	vv12s0057g00420	1.95611	Auxin-responsive
CK	vv04s0008g01880	1.58356	cytokinin oxidase 7 (CKX7)
CK	vv13s0019g03040	1.41288	UDP-glucosyl transferase
CK	vv13s0019g03100	1.47341	UDP-glucosyl transferase
ethylen	vv07s0031g00720	2.75618	ERF
ethylen	vv03s0063g00460	1.77743	ERF
ethylen	vv02s0234g00130	1.47935	ERF
ethylen	vv03s0091g00210	1.75369	bHLA
ethylen	vv07s0005g00820	1.45169	AP2/EREBP
ethylen	vv04s0008g02230	2.13796	AP2/EREBP
ethylen	vv02s0025g04440	20	AP2/EREBP
ethylen	vv02s0025g04460	1.71524	AP2/EREBP
ethylen	vv18s0001g13320	2.57024	AP2/EREBP
ethylen	vv18s0072g00260	1.4105	AP2/EREBP
ethylen	vv16s0100g00400	1.40241	AP2/EREBP
ethylen	vv11s0016g00660	1.33147	AP2/EREBP
ethylen	vv11s0016g00670	1.43413	AP2/EREBP
ethylen	vv11s0016g03350	1.31851	AP2/EREBP
ethylen	vv01s0011g03070	1.52147	AP2/EREBP
ethylen	vv01s0150g00120	-1.49606	AP2/EREBP
ethylen	vv16s0013g01060	-2.01911	ERF
ethylen	vv16s0013g01070	-1.44948	ERF
GA	vv19s0140g00120	1.61726	GA2OX
GA	vv10s0003g03490	1.63315	GA2OX
GA	vv01s0011g06140	2.08059	ubiquitin ligase complex
JA	vv09s0002g01080	1.47994	LOX
JA	vv09s0002g00890	1.31269	JAZ
JA	vv11s0016g00710	1.41171	JAZ
SA	vv01s0011g05930	-1.65202	SAM dependent carboxyl methyltransferase