

לימוד השפעת מערכת השורשים והנצר על מטבוליזם של פרי הגפן בתנאי עקת יובש

The effect of roots and shoots on fruit metabolism of grape in drought stress

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

גיא בן-ארי	עצי פרי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
אהרון פייט	המכון לחקר המדבר, אוניברסיטת בן-גוריון, שדה בוקר
אמנון שוורץ	הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית, רחובות
איריס ביטון	עצי פרי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Giora Ben-Ari Institute of Plant Science, Volcani center, ARO, Bet-Dagan, Israel. E-mail: giora@agri.gov.il

Aaron Fait, French Associates Institute for Agriculture & Biotechnology of Drylands, Jacob Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Israel. E-mail: fait@bgu.ac.il

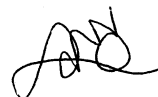
Amnon Schwartz, Institute of Plant Science, Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel. E-mail: schwartz@agri.huji.ac.il

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

תאריך: 1.8.2014

חתימת החוקר: 

תקציר

הצגת הבעיה - מכיוון שגם למערכת השורשים וגם לנצר ישנה השפעה משמעותית על ביצועי הגפן ובכללם התגובה ליובש והתבטאותה באיכות הפרי והיין, ישנה חשיבות מכרעת להפרדה של התרומה של שני חלקי הצמח ולהבנת מרכיביה בכל איבר בנפרד עבור שליטה עתידית טובה יותר בביצועי הגפן.

מטרת המחקר - במחקר הנוכחי הוצע לרתום את הזנים גרנאז' ושיראז' לפיתוח מערכת מודולרית ומקורית שתשפר את יכולתנו להפריד את ההשפעות ולהבין את השפעת מערכת השורשים והנצר על מטבוליזם הפרי בתנאי עקת יובש המושרית באופן יזום בשלב טרום הבשלה ובשלב ההבשלה.

שיטות העבודה - הוצעה בזאת השוואה של גפנים מהזן גרנאז' על שורשיהם, גפנים מהזן שיראז' על שורשיהם, רוכב גרנאז' על כנת שיראז' ורוכב שיראז' על כנת גרנאז'. ההשוואה נעשתה ברמה הפיזיולוגית והמטבולית.

הטיפוסים השונים קיבלו 2 רמות השקייה – 100% ו- 20%.

תוצאות עיקריות – נראה כי זהות הרוכב הינה הגורם העיקרי המשפיע על רמת האיזוהידריות של הצמח ועל רב המדדים הפיזיולוגיים שנמדדו בניסוי זה. נראה כי ישנה השפעה מובהקת של אינטרקציה בין כנה לרמת השקיה ובין כנה לרוכב רמת השקיה על מוליכות הפיוניות. האפיון המטבולי והגנומי מראים הבדל תהומי בין הרוכבים השונים ואפקט קטן לכנה. אולם, נראה מהניתוח הגנומי שאפקט זה נראה קטן מכיוון שבצמחים שבהם הרוכב היה שיראז', סטרס היובש לא ממש הורגש. בצמחי הרוכב גרנאז' ניתן לראות שכ- 90% מהגנים שעברו רגולציה בעקבות היובש שונים בין צמחים בהם הכנה היא גרנאז' לבין אלה בהם הכנה היא שיראז'. כלומר בצמחים אלו נראה שהיתה השפעה גדולה מאוד לזהות הכנה. בנוסף, ניתן לראות מהאפיון הגנומי שברוכב גרנאז' כנת גרנאז' וכנת שיראז' גורמים לאפקט הפוך כאשר גנים הביטויים מעודד בעקבות היובש בכנה אחת, מדוכאים בכנה שניה. בהסתכלות על גנים אלה עולה ההשערה כי יתכן שבחלקם לפחות ישנם גנים הקשורים לפוטוסינטזה שכנת שיראז' מעודדת את ביטויים בעקבות יובש וכנת גרנאז' מדכאת אותם. חומר בולט וחשוב מאוד בגפן יין מסחרית הינו הפנילאלנין המשמש כפרקורסר לאנטוציאנינים ונראה שכמותו תלויה באינטראקציה בין הכנה לרוכב.

מסקנות והמלצות

מכיוון שהרוכב הינו הקובע את רמת האיזוהידריות, על מנת לבחון את אפקט הכנה, יש לתת לצמחי הרוכב שיראז' (שהינו זן אנאיזוהידרי) טיפול יובש יותר אגרסיבי. בעונה הבאה נבחן גם טיפול ב- 10% השקיה, שבשאיפה, יכניס את צמחי השיראז' לעקה ונוכל לראות האם יש הבדלים בין הכנות השונות. יש לחקור לעומק את התופעה שנצפתה שברוכב גרנאז' כנה אחת גרמה לאקטיבציה של הרבה מאוד גנים שהכנה השנייה גרמה לרפרסיה של אותם גנים. תופעה זו לא מוכרת מהספרות. פנילאלנין הינו מרכיב חשוב בגפן היין ומכיוון שנמצא שכמותו מושפעת מהשפעת גומלין בין הכנה לרוכב, יש למפות את כמותו על יותר השילובים של כנות ורוכבים מסחריים.

יש לבחון את אפקט הרוכב, הכנה והשפעת הגומלין על מרכיבי הפרי שהם החשובים ביותר המביאים לאיכות התוצר הסופי (יין).

מבוא ותאור הבעיה

המחסור החריף במים הכתיב לאחרונה שינויים ועדכונים בהקצאת המים לחקלאות. על מנת להמשיך ולקיים את החקלאות בארץ ישנו הכרח ליעל את השימוש במי השקיה בחקלאות. הבנה ולימוד של התגובה לעקת יובש בעצי פרי הינו בבחינת תשתית הכרחית לפיתוח עתידי מושכל של אסטרטגיות שיאפשרו ניצול יעיל יותר של המים על ידי הצמח ויאפשרו חסכון בהשקיה. הבנת תגובת הצמח ליובש דורשת אינטגרציה של מידע ברמה המולקולארית ומידע ברמת הצמח השלם (Chaves, et al. 2003).

גפן יין גדלה בתנאי עקת יובש קבועים לשם שיפור איכות היין, ולכן מנגנוני התגובה ליובש בעץ פרי זה מפותחים וחשובים מאוד. משטר ההשקיה בגפן יין משתנה על פי שלב הגידול. בשלב הראשון, מההתעוררות ועד החנטה, יש להרבות בהשקיה כדי לאפשר צימוח וגטיבי. בשלב השני, מחנטה ועד לבוחל, מצמצמים את ההשקיה כדי להאט את הצימוח. משלב הבוחל ועד ההבשלה מקובל לשמור על משטר השקיה שמונע צימוח כמעט לחלוטין. איכות היין מושפעת ממספר רב של גורמים. בין הגורמים העיקריים יוזכרו גודל הגרגר אשר משפיע על היחס בין משקל הציפה לשטח הקליפה המהווה מקור לחומרי צבע, טעם וארומה; מידת התאורה באזור האשכולות, אשר מושפעת מגודל האשכול, מיקומו בנוף וצפיפות העלווה באזור האשכול וכן אספקת סוכרים ופרקורסורים של חומרי טעם וריח. עקת מים משפיעה על גודל הגרגר, גודל הנוף ומידת החשיפה של האשכולות וכן על קצב אספקת סוכרים ופרקורסורים של חומרי טעם וריח. בנוסף, משפיעה עקת היובש על מסלולים מטבולים רבים התורמים לאיכות היין כגון פוליפנולים, פנילפרופאנואידים, איזופראנואידים, קרטנואידים, ומטבוליים של חומצות אמינו וחומצות שומן (Deluc, et al. 2007). לפיכך, למשטר ההשקיה ולתגובת הגפן ליובש תפקיד מרכזי בקבלת יינות איכותיים.

מחסור מים בקרקע מורגש על ידי השורשים וגורם ליצירת אותות כימיים והידראוליים ולמעברם לשאר חלקי הצמח. האותות ההידראוליים נשלטים על ידי פיזיולוגית צינורות העצה והאותות הכימיים (בעיקר הורמונים) מוסעים דרך צינורות העצה, השיפה והפרנכימה (Schachtman and Goodger 2008). האותות הכימיים המיוצרים בשורשים דומיננטיים בשלבי העקה הראשונים לפני יצירת האותות ההידראוליים (Goodger, et al. 2005). האותות ההידראוליים דומיננטיים בשלבים מאוחרים יותר של העקה כאשר היא גוברת וככל הנראה אחראים על ייצור החומצה האבסיסית בעלים והתגובה לטווח רחוק (Christmann, et al. 2007).

בתגובת הצמחים ליובש ישנן שתי גישות. הצמחים בעלי הגישה הפסימיסטית, משנים את גדילתם ואת הפיזיולוגיה בזמן עקה, על מנת לשמר את המקורות הזמינים ולשלוט על מקורות אנרגיה אלו בהמשך. לעומתם, הצמחים בעלי הגישה האופטימיסטית (אלו שבטוחים שגם אם היום קשה, מחר יהיה טוב), משקיעים את כל המקורות הזמינים להם בציפייה למקורות חדשים בהמשך. ישנם צמחים איזו-הידרים (פסימיסטים), כגון אפונה, תירס וצפצפה, ששומרים על פוטנציאל מים קבוע בעלה לאורך היום וערכו אינו משתנה בהתאם לזמינות המים בקרקע (לא יורד מתחת 1.5 MPa-). לעומתם, צמחים שאינם איזו-הידרים (אופטימיסטים), כגון שעורה או חמנית, משנים את פוטנציאל המים בעלה בהתאם לרמת האיזו-וזמינות המים.

גפן הינו צמח ייחודי אשר בו נצפתה שונות בין זנים. גנוטיפים מסוימים בגפן שולטים בפתיחת וסגירת הפיוניות בעקת יובש טוב יותר מגנוטיפים אחרים. מחקר של קבוצה אוסטרלית, שבחן את התגובה ליובש של מספר גדול של זני גפן ליין שגודלו על שורשיהם, מצא שונות גבוהה בין זני גפן שונים בעמידותם ותגובתם לעקת יובש. בשני הצדדים הקיצוניים של יעילות ומהירות התגובה ליובש נמצא כי גפן מזן גרנאז' הינה בעלת עמידות גבוהה מאוד ליובש והגיבה בצורה יעילה מאוד לעקת יובש, ע"י סגירת פיוניות מהירה וייצור חומצה אבסיסית ברמה גבוהה יחסית לזני גפן אחרים. לעומתה, גפן מזן שיראז הראתה את העמידות הנמוכה ביותר ליובש ותגובת זן זה לעקת יובש איטית וחלשה (Soar, et al. 2006) and unpublished data). גפן מזן גרנאז' מתנהגת כצמח איזו- הידרי לעומת גפן מזן שיראז אשר מתנהגת כצמח שאינו איזו-הידרי (Schultz 2003). בנוסף, מאפיינים נוספים שבהם נמצאו הבדלים בין זני גפן וככל הנראה מעורבים בהתאמת צמחים לתנאי יובש, כוללים את אנטומית העלה והמרכיבים הביוכימיים של העלה כגון הרכב השעוה המכסה את הקוטיקולה, הרכב הליפידים, עובי המזופיל ועוד (Cameron, et al. 2007; Moutinho-Pereira, et al. 2006).

גידול גפן מתבסס ברובו על הרכבה אשר בה מותאמת כנה, המכילה את בית השורשים, לרוכב, המכיל את נוף העץ. בחירת הכנה המתאימה מתבססת על מבחני כנות אשר בהם מאופיינת כל כנה במספר גדול של פרמטרים כגון עמידות למזיקים ומחלות, התאמה לסביבות שונות, השפעת הכנה על צימוח, על הפרי ועוד. במחקר שבחן מספר כנות של גפן ליין (דו"ח מדען 203-0627), נמצאו השפעות מובהקות של כנות מסוימות על מדדים כגון גודל גרגר ואשכול, זירוז קצב הבשלה, איכות פרי ואיכות יין. רוכבים זהים שהורכבו על כנות שונות, נתנו ביצועים שונים. מזה אנו למדים שלמרכיב השורשים השפעה מכרעת על ביצועי העצים ובכללם איכות היין המופק מהפרי. עקת היובש משפיעה על ביצועי הצמח בכלל ועל איכות היין בגפן בפרט. תגובת הצמח לעקת יובש בנצר לעומת מערכת השורשים, לא נעשתה עד כה לעומק. היפותזת העבודה במחקר זה הינה שלמרכיב השורשים (הכנה) ישנה חשיבות מכרעת לגבי תגובת הצמח ליובש בכלל ואיכות הפרי בגפן בפרט.

מטרת המחקר

מכיוון שגם למערכת השורשים וגם לנצר ישנה השפעה משמעותית על ביצועי הגפן ובכללם התגובה ליובש והתבטאותה באיכות הפרי והיין, ישנה חשיבות מכרעת להפרדה של התרומה של שני חלקי הצמח ולהבנת מרכיביה בכל איבר בנפרד עבור שליטה עתידית טובה יותר בביצועי הגפן. במחקר הנוכחי הוצע לרתום את הזנים גרנאז' ושיראז לפיתוח מערכת מודולרית ומקורית שתשפר את יכולתנו להפריד את ההשפעות ולהבין את השפעת מערכת השורשים והנצר על מטבוליזם הפרי בתנאי עקת יובש המושרית באופן יזום בשלב טרום הבשלה ובשלב ההבשלה. הוצעה בזאת השוואה של גפנים מהזן גרנאז' על שורשיהם, גפנים מהזן שיראז על שורשיהם, רוכב גרנאז' על כנת שיראז ורוכב שיראז על כנת גרנאז'. הצמחים גדלים בדליים על מנת לאפשר שליטה קרקעית מלאה על עקת היובש. משטר ההשקייה כולל השקייה מלאה (ביקורת) למול השקית חסר (25% מכמות המים). בשנת המחקר השניה נבחנו פרמטרים פיזיולוגיים ומטבוליים בין הגנוטיפים השונים במשטרי ההשקייה השונים.

תוצאות

בעקבות תמותת הצמחים במשתלה לפני שנת הניסוי הראשונה, בשנתיים הראשונות בחנו את תגובת היובש של שני הזנים, גרנאז' ושיראז' על גבי כנות מסחריות, ריכטר ופולסן. תוצאות עבודה זו פורסמו במאמר בעלון הנוטע (2012, volume 66, pages 50-55) ובמאמר שכרגע נמצא

בתהליך review בעיתון Journal of plant physiology.

הצמחים המורכבים הכוללים כל אחד משני הזנים מורכב על שורשיו ועל שורשי הזן השני, נבחנו בשנות המחקר השנייה והשלישית, כאשר עקב בעיות אקלים בבית הרשת בשנת הניסוי השנייה, תוצאות שנת הניסוי השלישית הן האינפורמטיביות ביותר ולפיכך יוצגו במלואן בדוח זה. יש לציין כי מגמה דומה נצפתה גם בשנת הניסוי השנייה אך תוצאות השנה השנייה (שכבר הוצגו בדוח הקודם) לא יוצגו בדוח זה.

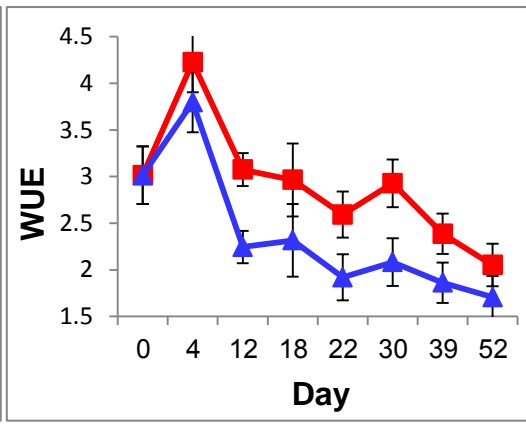
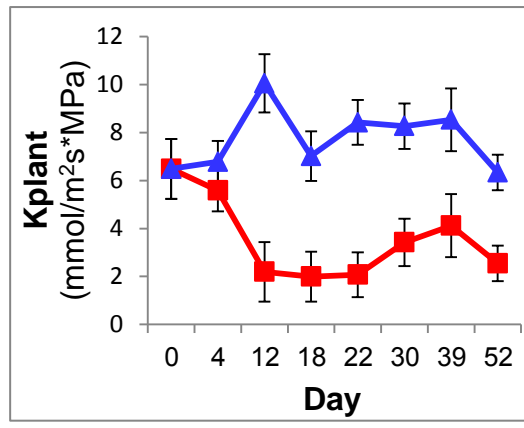
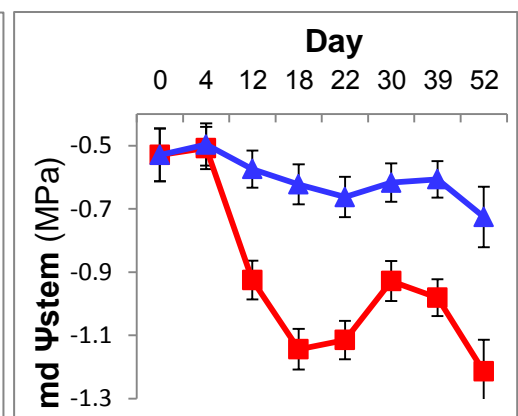
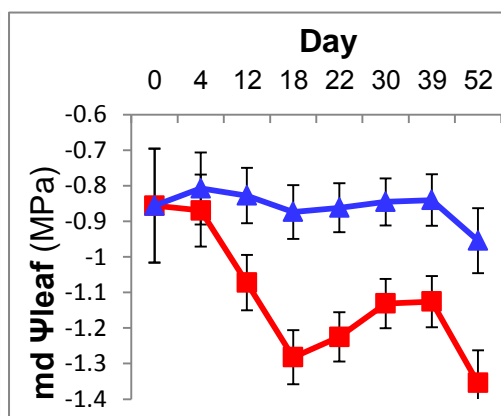
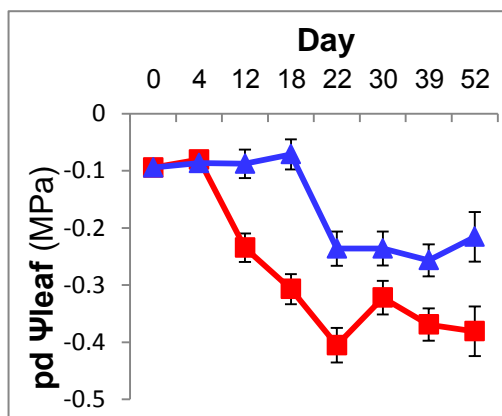
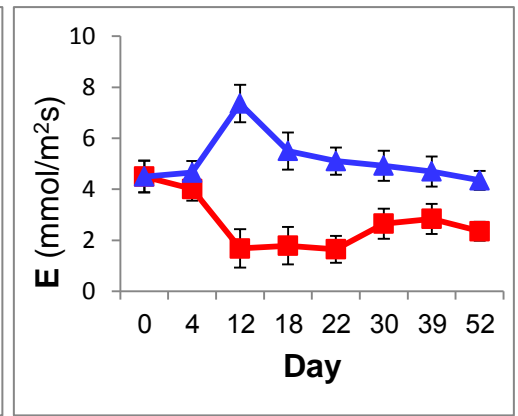
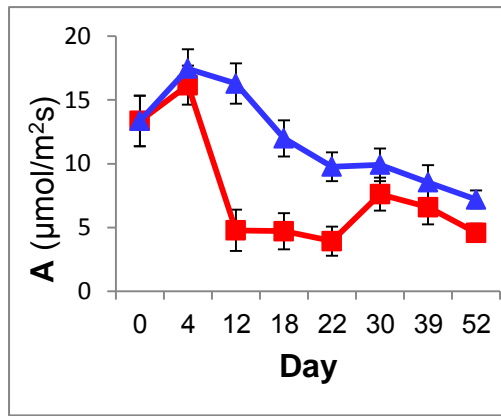
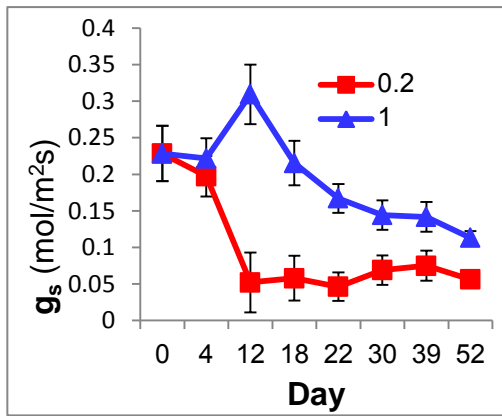
אפיון פיזיולוגי:

160 גפנים בני שלוש גודלו בעציצים של 25 ליטר. ארבעה גנוטיפים – שיראז מורכב על שיראז, שיראז על גרנאז', גרנאז' על גרנאז' ו גרנאז' על שיראז, שימשו כצמחי הניסוי. מכל גנוטיפ נבחנו 40 צמחים, מחציתם קיבלו השקיה מלאה (שחושבה לפי הצריכה היומית של הצמח) ומחציתם קיבלו השקיה של 20% מרמת ההשקיה המלאה. הניסוי נערך במשך חודשיים (יולי-אוגוסט, 2013) ובמהלכו, אחת לשבוע נמדדו המדדים הפיזיולוגיים הבאים: פוטנציאל מים בעלה לפנות בוקר ($pd\Psi_{leaf}$), פוטנציאל מים בעלה בצהריים ($md\Psi_{leaf}$), פוטנציאל מים בגזע ($md\Psi_{stem}$), מוליכות פיוניות (g_s), פוטוסינטזה (A) וטרנספירציה (E).

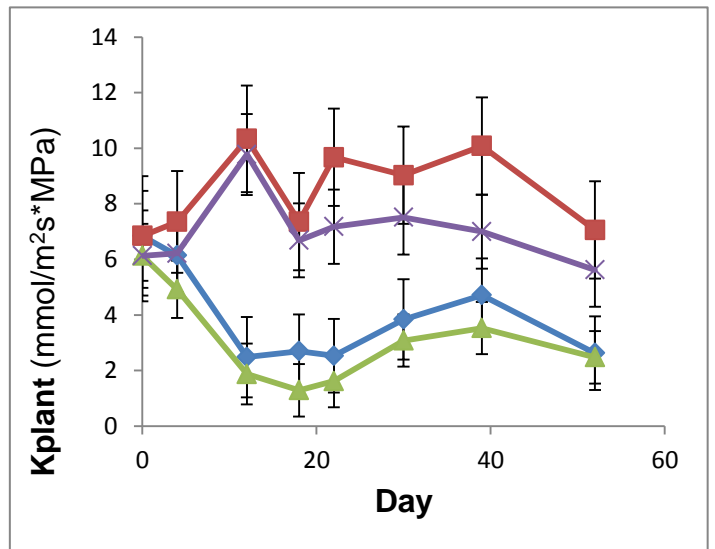
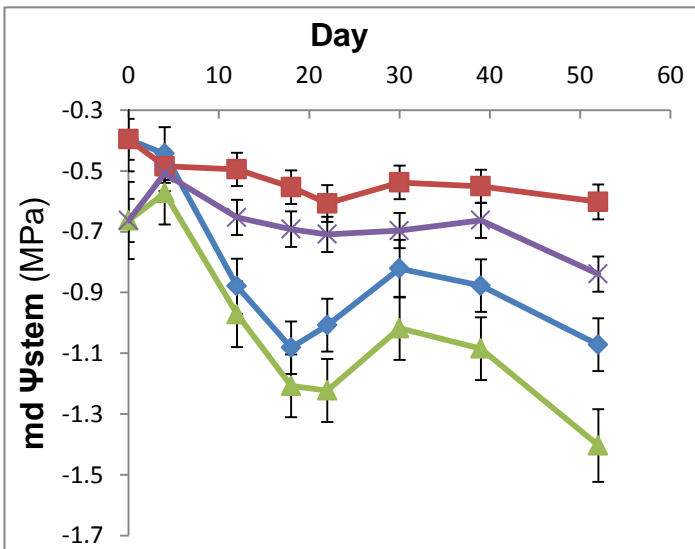
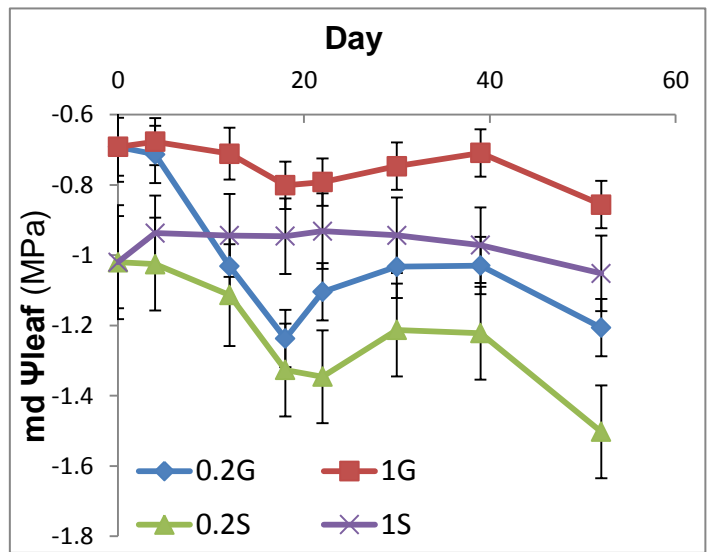
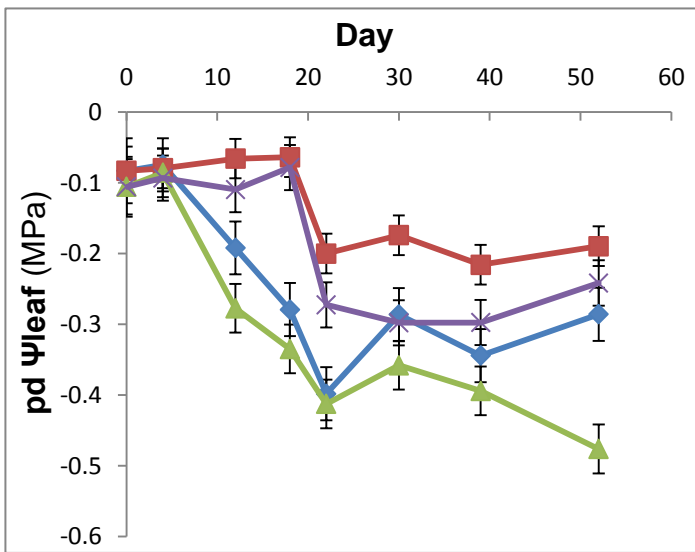
תחילה בחנו את השפעת הכנה, הרכב והשפעת הגומלין על המדדים הפיזיולוגיים שנלקחו. בנוסף, חושבה המוליכות ההידראולית (K_{plant}) על פי הנוסחה $K=E/(\Psi_{pd}-\Psi_{md})$ וחושבה יעילות השימוש במים – Water Use Efficiency (WUE). גם על מדדים אלו נבחנה השפעת כל גורם. טבלה 1 מתארת את רמת המובהקות הסטטיסטית של מבחן ANOVA תלת גורמי שבחן את השפעת הרכב, הכנה, ההשקיה והאינטראקציות ביניהם. ניתן לראות שרמת ההשקיה השפיעה על כלל המדדים שנלקחו (איור 1). בנוסף, זהות הרכב היא הגורם היחיד שהשפיע על פוטנציאל המים ועל המוליכות ההידראולית (איור 2). מוליכות הפיוניות הושפעה גם מהאינטראקציה בין ההשקיה לשאר הגורמים (איור 3).

P_f	g_s	A	E	$pd\Psi_{leaf}$	$md\Psi_{leaf}$	$md\Psi_{stem}$	K_{plant}	WUE
Shoot	0.35	0.54	0.87	1.47E-05	4.13E-15	1.01E-07	0.001148	0.06
Root	0.98	0.36	0.80	0.76	0.85	0.67	0.21	0.62
Shoot*Root	0.52	0.85	0.57	0.44	0.15	0.18	0.52	0.99
Irrigation	6.23E-21	3.84E-13	8.15E-35	7.24E-18	2.24E-22	4.95E-30	4.09E-37	2.04E-08
Shoot*Irrigation	3.29E-01	0.27	0.30	0.71	0.95	0.33	0.33	0.78
Root*Irrigation	3.72E-01	0.68	0.49	0.06	0.73	0.76	0.11	0.64
Shoot*Root*Irrigation	8.97E-01	0.95	0.66	0.30	0.21	0.43	0.69	0.45

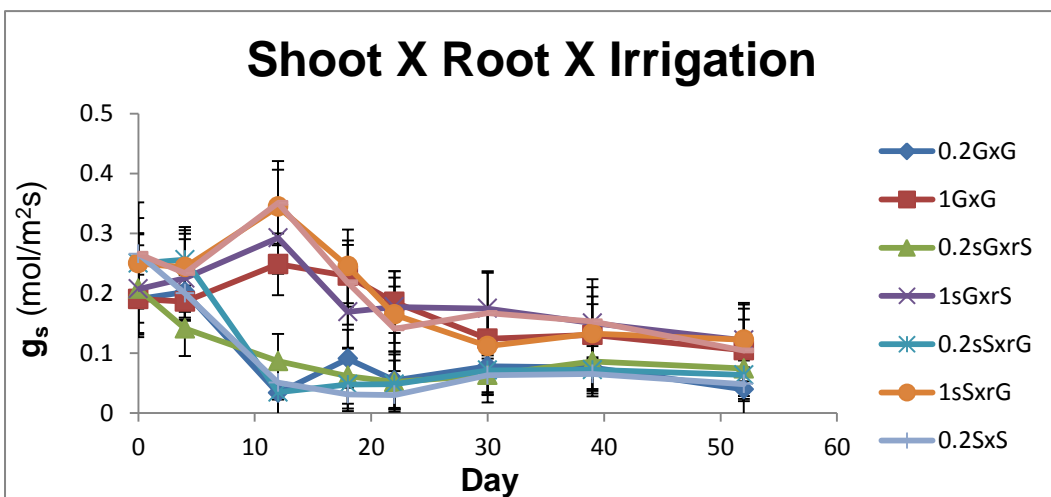
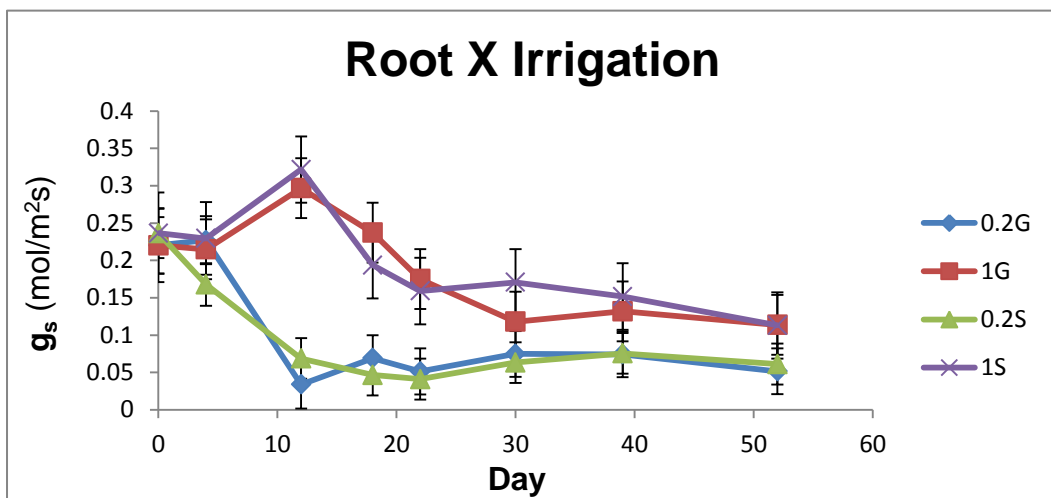
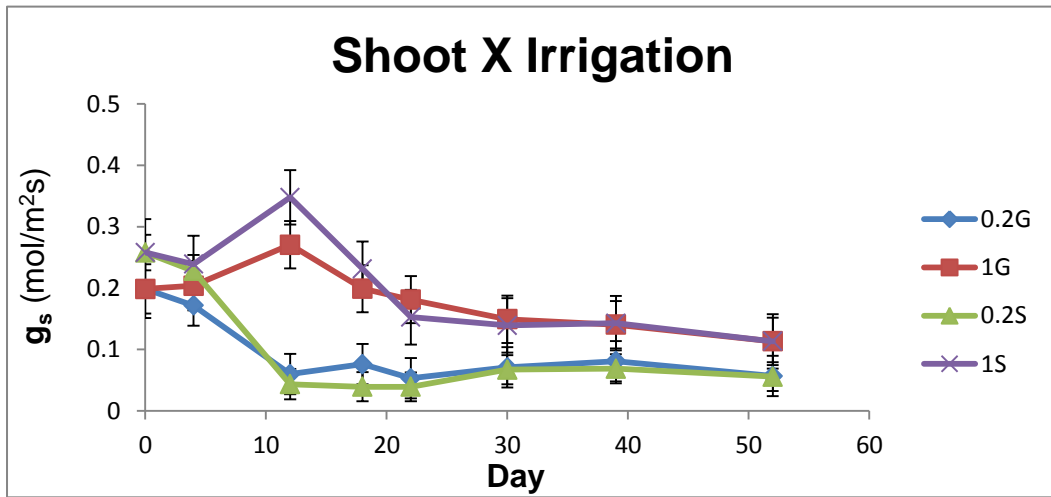
טבלה 1: ערכי המובהקות הסטטיסטית במבחן דו גורמי הבוחן את השפעת הרכב, הכנה והשפעת הגומלין ביניהם על כל אחד מהמדדים הפיזיולוגיים שנמדדו. ערך מובהקות הגדול מ-0.05 מעיד על השפעה שאינה מובהקת.



איור 1: השפעת רמת ההשקיה על כל המדדים הפיזיולוגיים שנמדדו. שתי רמות השקיה נבחנו – 100% - השקיה מלאה (קו כחול) והשקית חסר של 20% (קו אדום). הגרפים השונים מתארים את המדדים השונים כפונקציה של ימים מתחילת טיפול (ציר ה-X). המדדים שנבחנו כוללים מוליכות פיוניות (g_s), פוטוסינטזה (A), טרנספירציה (E), פוטנציאל מים בעלה לפני הזריחה (pd ψ_{leaf}), פוטנציאל המים בעלה בצהריים (md ψ_{leaf}), פוטנציאל הגזע בצהריים (md ψ_{stem}), המוליכות ההידראולית (Kplant) ויעילות השימוש במים (WUE).



איור 2: ערכי המדדים הפיזיולוגיים שהושפעו באופן מובהק מהרוכב. ארבעה קוים מייצגים את שני הרוכבים, גרנאז' (G) ושיראז (S), כאשר רמות ההשקיה מתארות את ההשקיה המלאה (1) והשקית החסר (0.2).



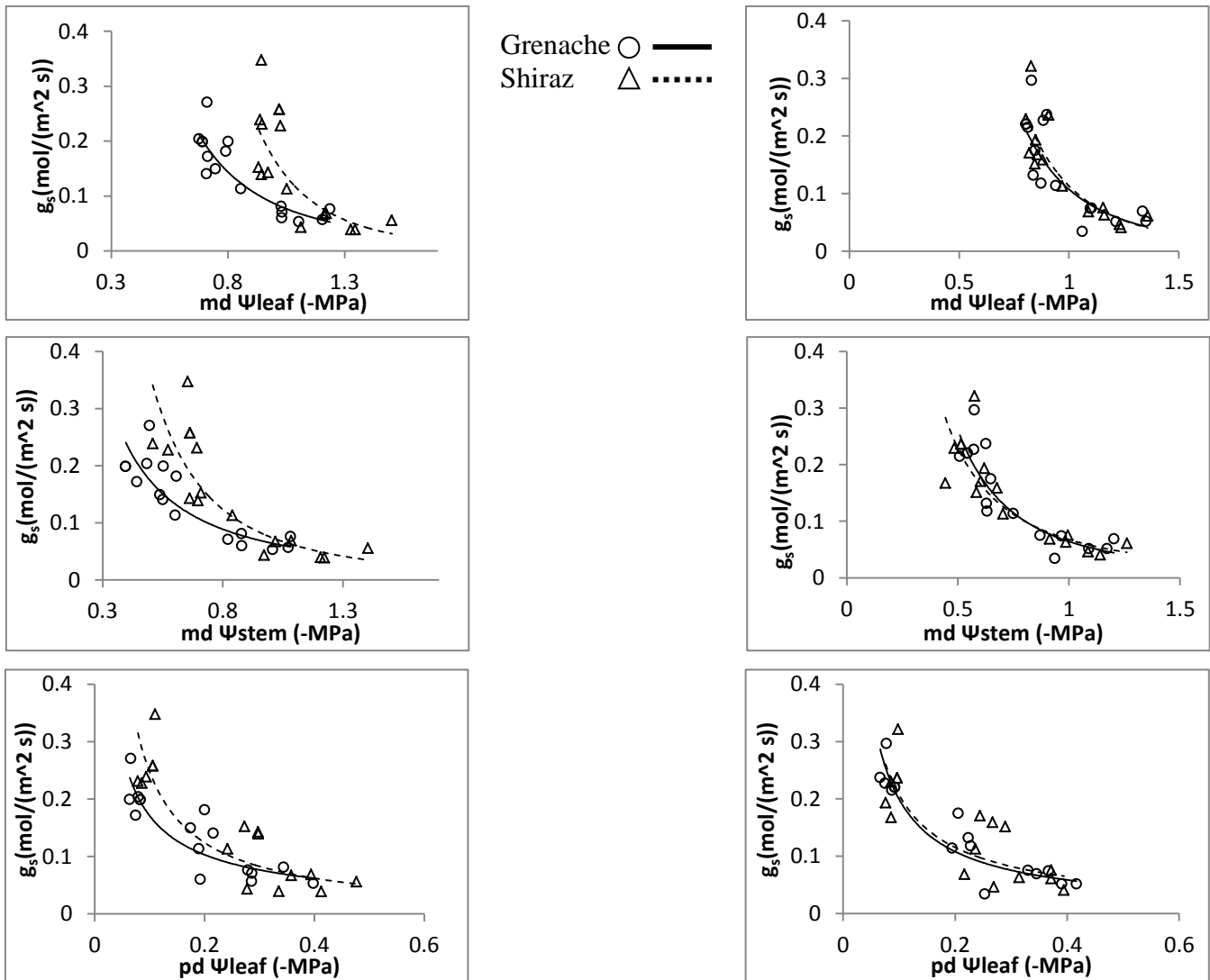
איור 3: מוליכות הפיוניות לאורך הניסוי. למעלה גרף המתאר את מוליכות הפיוניות בצמחים שבהם הרכב היה גרנאז' (G) לעומת אלו שבהם הרכב היה שיראז' (S). הגרף האמצעי מתאר את מוליכות הפיוניות בצמחים שבהם הכנה היתה גרנאז' (G) לעומת אלו שבהם הכנה היתה שיראז' (S). הגרף התחתון מתאר את מוליכות הפיוניות של כל הגנוטיפים בשתי רמות ההשקיה (0.2 ו-1). הגנוטיפים הנבחנים היו גרנאז' מורכב על עצמו (GXG) ועל שיראז' (sGXrS) ושיראז' מורכב על עצמו (SXS) ועל גרנאז' (sSXRg).

את תכונת האיזוהידריות והשוואת איזוהידריות של צמחים שונים מקובל לתאר בעקומה של מוליכות פיוניות כנגד פוטנציאל מים. בתחילת מחקר זה, בהתאמה למחקרים אחרים, הראנו שבכל ערך של פוטנציאל מים, מוליכות הפיוניות היתה קטנה יותר בזן האיזוהידרי (הגרנאז') בהשוואה לזן האנאיזוהידרי (שיראז) כאשר גודלו על כנות מסחריות (בתהליך review בעיתון (Journal of plant physiology).

בשנת הניסוי הנוכחית, ניתן לראות כי כאשר משווים את רוכבי הצמחים, נראית תופאה דומה. לעומת זאת, כאשר משווים בין צמחים שהכנות שלהם שונות ישנו דמיון בין הצמחים. כלומר, את מידת האיזוהידריות קובע הרכב ולא הכנה (איור 4).

Isohydric by shoot

Isohydric by root



איור 4: רמת האיזוהידריות המבוטאת בעקום מוליכות הפיוניות (ציר ה-Y) כפונקציה של פוטנציאל המים (ציר ה-X). בגרפים משמאל ניתן לראות השוואת רמת האיזוהידריות בין הצמחים שבהם הרכב היה שיראז לבין אלו שבהם הרכב היה גרנאז'. בגרפים מימין ניתן לראות השוואת רמת האיזוהידריות בין הצמחים שבהם הכנה היתה שיראז לבין אלו שבהם הכנה היתה גרנאז'. בכל צד ישנם שלושה גרפים המתארים את מוליכות הפיוניות כפונקציה של פוטנציאל המים בעלה בצהריים (גרף עליון), בגזע בצהריים (גרף אמצעי) ובעלה לפני זריחה (גרף תחתון).

אפיון מולקולארי:

מהמדדים הפיזיולוגיים ניתן לראות ששנים עשר יום מתחילת הניסוי, הצמחים החלו להגיב לעקת היובש. ביום זה ניתן לראות כי מתחיל הבדל בפוטנציאל מים בין הצמחים שקיבלו השקיה מלאה לאלו שקיבלו השקיה חסר. בנוסף, ביום זה נראה ההבדל הגדול ביותר בין הצמחים שקיבלו משטרי השקיה שונים, במדדים רבים כגון מוליכות פיוניות, פוטוסינטזה, טרנספירציה ומוליכות הדראולית. לפיכך הוחלט על היום ה-12 כמייצג תגובה מוקדמת של הצמחים לעקת היובש ועלים שנדגמו ביום זה שימשו לאפיון גנומי ומטבולי. תשעה עלים מתשעה צמחים מכל גנוטיפ X השקיה נאספו. כל שלושה עלים משלושה צמחים אוחדו ונטחנו בחנקן נוזלי. בתום הטחינה, חולקה כל דוגמא לשתיים כאשר אחת משמשת לאפיון מטבולי ואחת לאפיון גנומי. כל הדוגמאות הוקפאו ונשמרו ב- 80°C .

אפיון גנומי:

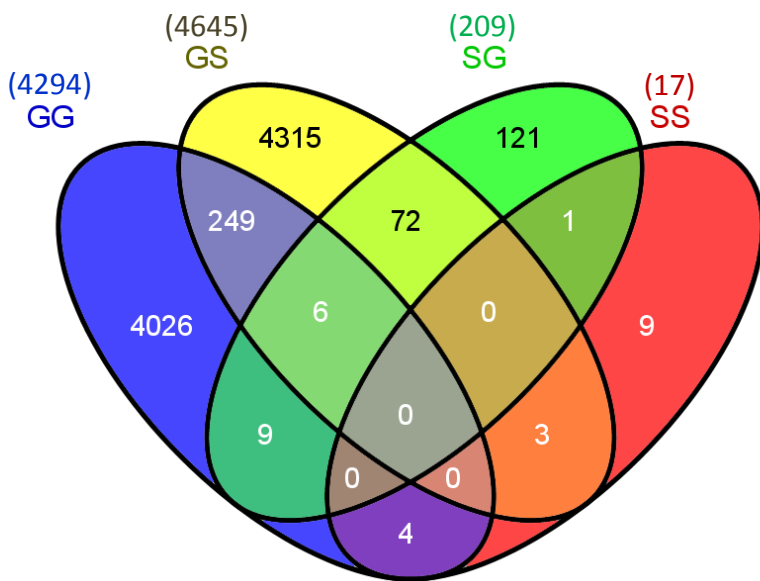
שלוש חזרות מכל שורש X כנה X השקיה שימשו לצורך האפיון הגנומי כאשר כל חזרה מורכבת מעלים משלושה צמחים. רנ"א הופק מעשרים וארבע הדוגמאות בקיט של QIAGEN ו-15 מיקרוגרם Total RNA נשלח להיברידיזציה באיטליה במעבדתו של פרופסור מריו פזוטי. ההיברידיזציה נערכה על גבי צ'יפים המכילים כ-30000 גנים מגנום הגפן. ניתוח תוצאות ראשוני נערך על ידי צוות הביואינפורמטיקאים באיטליה, כשירות, וניתוח מעמיק יותר נמשך במעבדתנו באמצעות תוכנת expander ותוכנת MeV הזמינות ברשת. בחינת קורלציות בין רמת ביטוי כלל הגנים בכל ההיברידיזציות מראה שיש התאמה טובה בין שלוש החזרות הביולוגיות בכל גנוטיפ X השקיה. בנוסף, ניתן לראות שבאופן גס, יש התאמה טובה בין ביטוי הגנים בין כל ארבעת הגנוטיפים בהשקיה מלאה. לעומת זאת, בהשקיה חסר, גרנאז' על גרנאז' נראה שונה במקצת משאר שלושת הגנוטיפים שמראים התאמה טובה בניהם (גרנאז' על שיראז, שיראז על גרנאז' ושיראז על שיראז (איור 5)).

כאשר מנתחים את הגנים שעברו רגולציה בעקבות טיפול היובש, ניתן לראות שבצמחי גרנאז' על גרנאז' 4294 גנים עברו אינדוקציה ו-4980 גנים עברו רפרסיה בעקבות עקת היובש. צמחי הגרנאז' על כנת שיראז הגיבו ליובש בעליה ברמת הביטוי של 4645 גנים וירידה ברמת הביטוי של 4029 גנים. לעומתם, הצמחים שבהם הרוכב היה שיראז הגיבו לעקת היובש במספר מאוד מצומצם של גנים שעברו רגולציה. בצמחי שיראז על כנת גרנאז' ביטויים של 209 גנים עלה ושל 110 גנים ירד בלבד. שיראז על שיראז הגיב לעקת היובש בניסוי בעליה בביטוי של 17 גנים וירידה בביטוי של 13 גנים. החפיפה בין הגנים שעברו רגולציה בגנוטיפים השונים אינה גדולה. יחד עם זאת בולט לעין שמתוך הגנים שעברו רגולציה בצמחי השיראז על גרנאז', כשליש נמצאים בחפיפה עם אלה שעברו רגולציה בצמחי הגרנאז' על שיראז (איור 6).

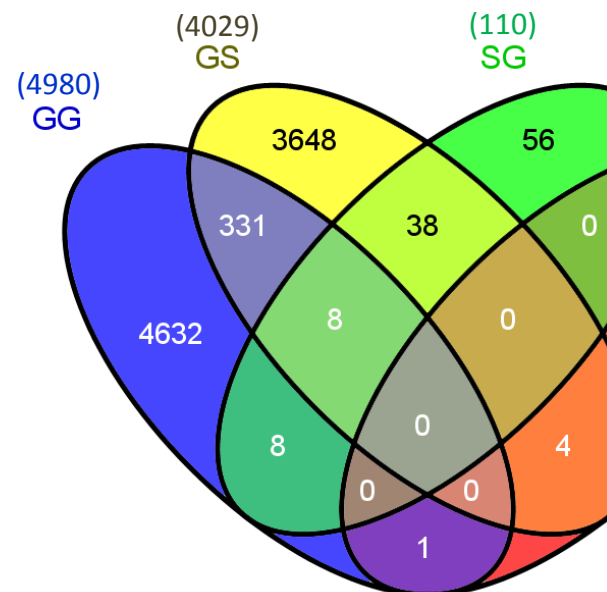
איור 5: מקדמי קורלציה בין ערכי הביטוי של כלל הגנים (לאחר נורמליזציה) בכל אחת מ-24 ההיברידיזציות. הטור השמאלי מתאר את הגנוטיפ X השקיה. בכל שורה בטור השמאלי מתואר תחילה הרכב (S – שיראז, G – גרנאז'), לאחר מכן הכנה ולאחר מכן רמת ההשקיה (100 – השקיה מלאה, 20 – השקיה חסר). ולאחר המקף, מספר החזרה הביולוגית (1-3). כך SG20-3 מתאר היברידיזציה של עלים שנלקחו מרוכב שיראז מורכב על כנת גרנאז' שקיבל השקיה חסר וזו החזרה הביולוגית מספר 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
GG20-1	1.00	0.98	0.97	0.94	0.92	0.93	0.94	0.94	0.94	0.95	0.95	0.95	0.98	0.97	0.97	0.96	0.95	0.96	0.97	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96
GG20-2	0.98	1.00	0.98	0.89	0.87	0.88	0.90	0.89	0.90	0.92	0.92	0.92	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96	0.96
GG20-3	0.97	0.98	1.00	0.87	0.85	0.85	0.89	0.88	0.89	0.90	0.90	0.90	0.96	0.97	0.96	0.95	0.96	0.96	0.97	0.96	0.97	0.96	0.95	0.95
GS20-1	0.94	0.89	0.87	1.00	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.97	0.96	0.96	0.91	0.89	0.89	0.89	0.86	0.88	0.89	0.90	0.88	0.89	0.90	0.90
GS20-2	0.92	0.87	0.85	0.98	1.00	0.98	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.89	0.88	0.87	0.87	0.86	0.87	0.88	0.89	0.86	0.88	0.90	0.89
GS20-3	0.93	0.88	0.85	0.99	0.98	1.00	0.98	0.98	0.98	0.97	0.96	0.97	0.90	0.88	0.88	0.88	0.86	0.87	0.88	0.89	0.86	0.88	0.90	0.90
SG20-1	0.94	0.90	0.89	0.99	0.97	0.98	1.00	0.99	1.00	0.97	0.97	0.97	0.92	0.91	0.90	0.90	0.87	0.89	0.91	0.91	0.89	0.90	0.91	0.91
SG20-2	0.94	0.89	0.88	0.99	0.97	0.98	0.99	1.00	1.00	0.96	0.96	0.96	0.91	0.90	0.90	0.89	0.86	0.88	0.89	0.90	0.88	0.89	0.90	0.90
SG20-3	0.94	0.90	0.89	0.99	0.97	0.98	1.00	1.00	1.00	0.97	0.96	0.97	0.92	0.90	0.90	0.89	0.87	0.89	0.90	0.91	0.89	0.90	0.91	0.91
SS20-1	0.95	0.92	0.90	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97	1.00	0.99	0.99	0.92	0.92	0.91	0.91	0.90	0.91	0.91	0.92	0.90	0.91	0.92	0.92
SS20-2	0.95	0.92	0.90	0.96	0.97	0.96	0.97	0.96	0.96	0.99	1.00	0.99	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.92
SS20-3	0.95	0.92	0.90	0.96	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97	0.99	0.99	1.00	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.92
GG100-1	0.98	0.97	0.96	0.91	0.89	0.90	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	1.00	0.99	0.99	0.98	0.97	0.98	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98	0.99
GG100-2	0.97	0.97	0.97	0.89	0.88	0.88	0.91	0.90	0.90	0.92	0.92	0.92	0.99	1.00	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99
GG100-3	0.97	0.97	0.96	0.89	0.87	0.88	0.90	0.90	0.90	0.91	0.91	0.91	0.99	0.99	1.00	0.97	0.98	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98	0.98
GS100-1	0.96	0.97	0.95	0.89	0.87	0.88	0.90	0.89	0.89	0.91	0.91	0.91	0.98	0.98	0.97	1.00	0.98	0.99	0.98	0.98	0.97	0.98	0.97	0.98
GS100-2	0.95	0.96	0.96	0.86	0.86	0.86	0.87	0.86	0.87	0.86	0.87	0.90	0.91	0.91	0.97	0.98	0.98	0.98	1.00	0.99	0.98	0.97	0.98	0.98
GS100-3	0.96	0.97	0.96	0.88	0.87	0.87	0.89	0.88	0.89	0.91	0.92	0.92	0.98	0.99	0.98	0.99	0.99	1.00	0.98	0.98	0.98	0.99	0.98	0.98
SG100-1	0.97	0.97	0.97	0.89	0.88	0.88	0.91	0.89	0.90	0.91	0.92	0.92	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	1.00	0.99	0.98	0.99
SG100-2	0.97	0.97	0.96	0.90	0.89	0.89	0.91	0.90	0.91	0.92	0.92	0.92	0.99	0.99	0.99	0.98	0.97	0.98	1.00	1.00	0.98	0.99	0.98	0.99
SG100-3	0.96	0.97	0.97	0.88	0.86	0.86	0.89	0.88	0.89	0.90	0.91	0.91	0.98	0.99	0.98	0.97	0.98	0.98	1.00	0.98	1.00	0.98	0.97	0.98
SS100-1	0.96	0.97	0.96	0.89	0.88	0.88	0.90	0.89	0.90	0.91	0.92	0.92	0.98	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.98	1.00	0.98	0.98
SS100-2	0.96	0.96	0.95	0.90	0.90	0.90	0.91	0.90	0.91	0.92	0.93	0.93	0.98	0.98	0.98	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.98	1.00	0.99
SS100-3	0.96	0.96	0.95	0.90	0.89	0.90	0.91	0.90	0.91	0.92	0.92	0.92	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98	0.98	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	1.00

Up regulated in a response to drought



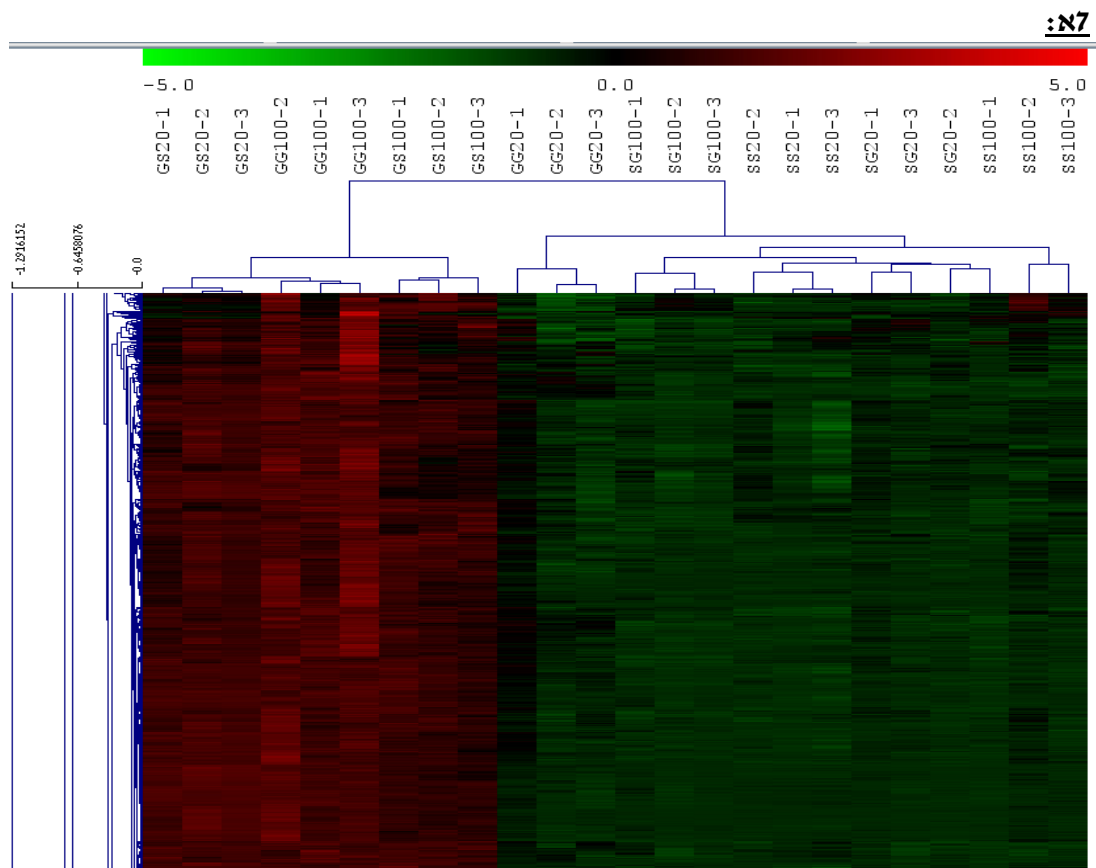
Down regulated in a response to drought



איור 6: Venn diagrams של הגנים שעברו שינוי מובהק ברמת ביטויים בתגובה לעקת היובש. מימין גנים שביטויים ירד ומשמאל גנים שביטויים עלה בתגובה ליובש.

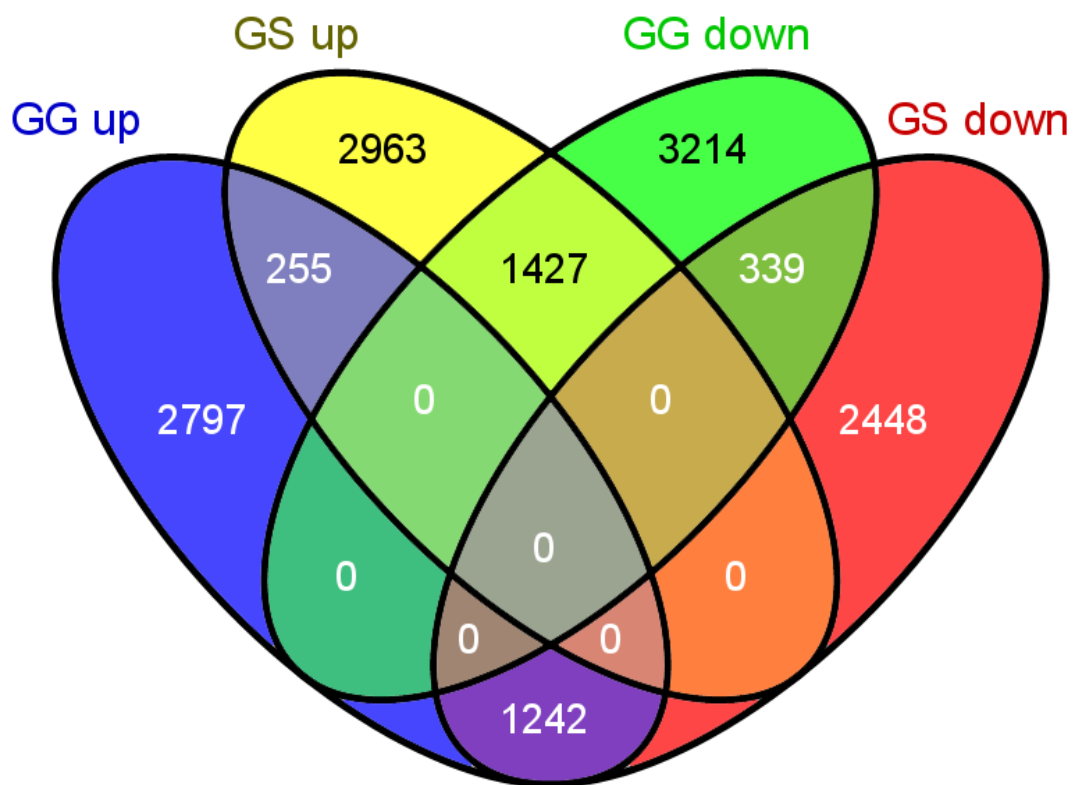
אנליזת ביטוי כלל הגנים נערכה גם בתוכנת MeV (<http://www.tm4.org/mev.html>). Hirarichal clustering של כלל הגנים וכל ההיברידיזציות מראה, בדומה לקורלציות, שכל ההיברידיזציות של צמחים שבהם הרוכב הוא שיראז עברו clustering לאותה קבוצה. הצמחים שבהם הרוכב גרנאז' והכנה שיראז שהיו תחת עקת יובש (GS20) נמצאים באותה קבוצה עם צמחי גרנאז' על גרנאז' שקבלו השקיה מלאה (GG100) וקרוב לצמחים שבהם הרוכב גרנאז' והכנה שיראז שהיו בהשקיה מלאה (GS100). לעומתם, צמחי גרנאז' על גרנאז' שהיו בעקת יובש (GG20) קובצו באותה קבוצה עם הצמחים שבהם הרוכב היה שיראז (איור 7א). בנוסף, מהסתכלות על הגנים שבהם נראה ביטוי דיפרנציאלי בצמחים שבהם הרוכב גרנאז' נראה דמיון בין GS20 ו-GG100 שהפוך לתבנית הביטוי בצמחי GG20 (איור 7ב). כאשר בוחנים את הגנים שעברו רגולציה ב-GG וב-GS נראית תופעה מעניינת. כשליש מהגנים שעלו ב-GG בעקבות היובש, ירדו ב-GS ולהיפך (איור 8).

איור 7: Hierarchical clustering של כלל ההיברידיזציות. א. ה-clustering של ההיברידיזציות עצמם. ב. חלק מהגנים שבהם את הדמיון בין GS20 ו-GG100 וההופכי ב-GG20. התמונות מתארות את ביטוי הגנים כאשר הטורים מתארים את ההיברידיזציות והשורות את הגנים. לכל גן, שורה ובה מתואר ביטוי בהיברידיזציות השונות בסקאלה של ביטוי גבוה באדום וביטוי נמוך בירוק.



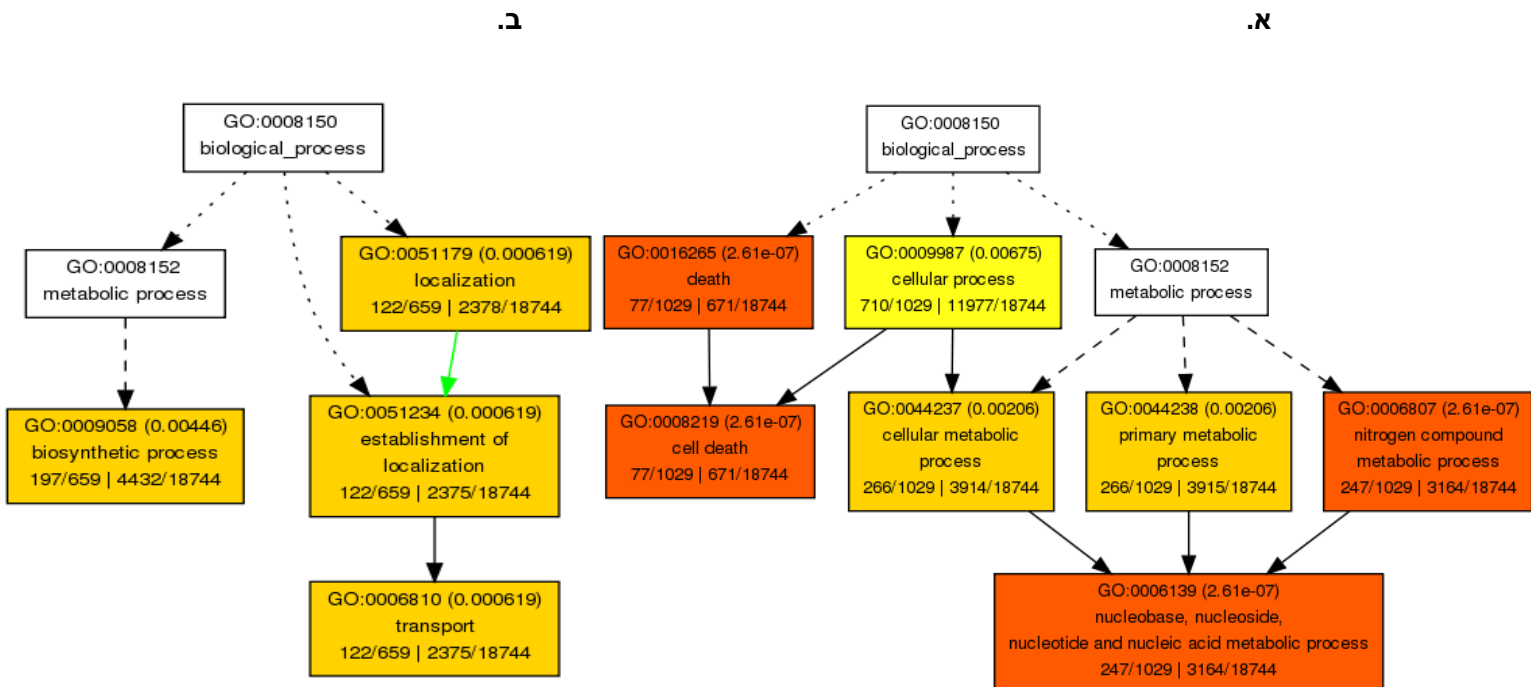


איור 8 : Venn diagram של הגנים שעברו שינוי מובהק ברמת ביטויים בתגובה לעקת היובש.



התופעה שנראית באיור 8 מאוד מוזרה ובעצם אומרת שהכנות השונות גורמות לא רק לתבנית ביטוי גנים שונה אלא לעיתים אף גורמת להפיכת התגובה ליובש כאשר גנים שעולים בתגובה ליובש בכנה אחת, יורדים בתגובה לאותו סטרס בכנה השניה. אחת הדרכים לבחון את זהות הגנים שמתנהגים הפוך בכנות שונות היא לבחון העשרה בפונקציות מסוימות (GO enrichment test). ערכנו מבחן כזה לשתי קבוצות הגנים, אלא שעולים ב-GS ויורדים ב-GG בתגובה ליובש (איור 9א) ואלו שעולים ב-GG ויורדים ב-GS בתגובה ליובש (איור 9ב). קיבלנו בעיקר שישנה העשרה בגנים הקשורים למוות תאים ולתהליך מטבולי של חנקן ושל חומצות אמינו בין אלו שעולים ב-GS ויורדים ב-GG בתגובה ליובש.

איור 9: קבוצות פונקציונאליות של גנים שבהם יש העשרה בגנים שעלו ב-GS וירדו ב-GG בעקבות היובש (א) או שירדו ב-GS ועלו ב-GG בתגובה ליובש (ב).



על מנת להבין את המהות של היפוך ביטוי הגנים בין ה-GS ל-GG לקחנו את הגנים הקיצוניים ביותר בביטויים הדיפרנציאלי בין GS ל-GG ובחנו את הפונקציות שלהם. ניתן לראות שבגנים שקשורים לפוטוסינטזה, יש ירידה ב-GG בעקבות היובש ועליה ב-GS. לעומת זאת, ובהתאמה, יש עליה ב-GG בגנים הקשורים לנשימה בתגובה ליובש וירידה בגנים אלו ב-GS (איור 10). תוצאה זו יכולה לרמז שההבדל הנעוץ בזהות הכנה נטוע בכך שבכנת השיראז, היובש גורם לאינדוקציה בפוטוסינטזה ובכנת הגרנאז' הפוטוסינטזה מעוכבת. ממצא זה נמצא בהתאמה עם כך שהמשתנה היחיד שבו נמצא אפקט מובהק לאינטראקציה בין כנה להשקיה הוא מוליכות הפיוניות.

איור 10 : רמת הביטוי של גנים שהתבטאו דיפרנציאלית בין GG ו-GS וקשורים לפוטוסינטזה, הורמונים או זרחון כימצוני, בסקאלה מירוק (ביטוי נמוך) לאדום (ביטוי גבוה).



Hormones
 Photosynthesis
 Oxidative phosphorylation

תוצאות האפיון המטבולי מובאים באנגלית בשם אהרון פייט:

Metabolomics and metabolic regulation

Metabolite and transcript analysis were conducted to investigate the response of metabolism and its regulation to water deficit.

Metabolite profiling, Methods

The method used for extraction and analysis is similar to that described in Hochberg et. al 2013 with minor modifications.

Immediately following leaf excision, the tissue was snap- frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further analysis. Ahead of extraction samples were freeze dried in a lyophilizer (VIRTIS GARDINER, N.Y. R525, Model 10-MR- TR). The freeze-dried samples were extracted for metabolite profiling using a slightly modified version of the method described previously (Weckwerth et al. 2004). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich if not indicated otherwise. Berry skin tissue was ground using a RETCH-mill (Retsch GmbH, 42787 Haan, Germany) with pre-chilled steel holders and grinding beads. For metabolite extraction, 70 mg of frozen powder were weighed and extracted in a pre-chilled methanol:chloroform:water extraction solution (2.5:1:1 v/v). Internal standards, (i.e. 0.2 mg/ml ribitol in water, 1 mg/ml ampicillin in water and 1 mg/ml corticosterone in methanol), were subsequently added. The mixture was then briefly vortexed, centrifuged for 2 min at 14000 RPM (microcentrifuge 5417R) and the supernatant was decanted into the new tubes. The supernatant was mixed with 300 μl of chloroform (LC/MS grade) and 300 μl of UPLC-grade water and then centrifuged at 14,000 RPM for 2 min. After that, 100 μl of the water/methanol phase was dried in a vacuum concentrator (Eppendorf Concentrator Plus) for derivatization (Lisec et al. 2006) for GC-MS analysis. The remaining water/methanol phase was transferred to UPLC vials for LC-MS analysis.

GC-MS derivatization and data processing

GC-MS samples from the above extraction were re-dissolved and derivatized. Eight microliters of a retention time standard mixture (0.029% v/v *n*-dodecane, *n*-pentadecane, *n*-nonadecane, *n*-docosane, *n*-octacosane, *n*-dotracontane, and *n*-hexatriacontane dissolved in pyridine) was added. The sample set also included a reference quality control of authentic metabolite standards (1 mg ml⁻¹ each) (Additional file 2: Table S1A). Volumes of 1 μL were then injected onto 30-m VF-5

ms GC column with 0.25 mm i.d., film thickness of 0.25 μ m, and + 10 m EZ-Guard (Agilent) in splitless and split mode (32:1) allowing a more accurate comparison of highly abundant metabolites (e.g. tartarate, sugars, and inositol). The GC-MS system consisted of an AS 3000 autosampler, a TRACE GC ULTRA gas chromatograph, and a DSQII quadrupole mass spectrometer (Thermo-Fisher ltd). The parameters of the machine were exactly as described in [69]. Spectral searching was done by consulting the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA) algorithm incorporated in the Xcalibur® data software (version 2.0.7) against RI libraries from the Max-Planck Institute for Plant Physiology in Golm, Germany (<http://www.mpimp-golm.mpg.de/mms-library/>) and finally normalized by the total metabolites and corrected for the dilution factor.

Results

Metabolite profiling of leaf samples of the second year of research was conducted to study the impact of presence or absence of a rootstock on the metabolites of the leaf and its response to water deficit.

The raw data was normalized to median values and log transformed for the heatmap visualization to emphasize the differences in metabolite profiles between conditions. The data is given in details in Table 1. Principle Component Analysis was implemented on the entire dataset to show the effect of the experimental conditions on global changes in metabolism and p value calculation. P-values were calculated using R scripts and applying the Bonferroni correction. Fold-change was calculated on normalized data prior to log-transformation.

Evidently, as shown in the PC plot the main component (PC1) explaining the more than 50% of the variance within the dataset separated the samples according to the scion affiliation. The significant changes are given in the Table as well as in the heatmap visualization.

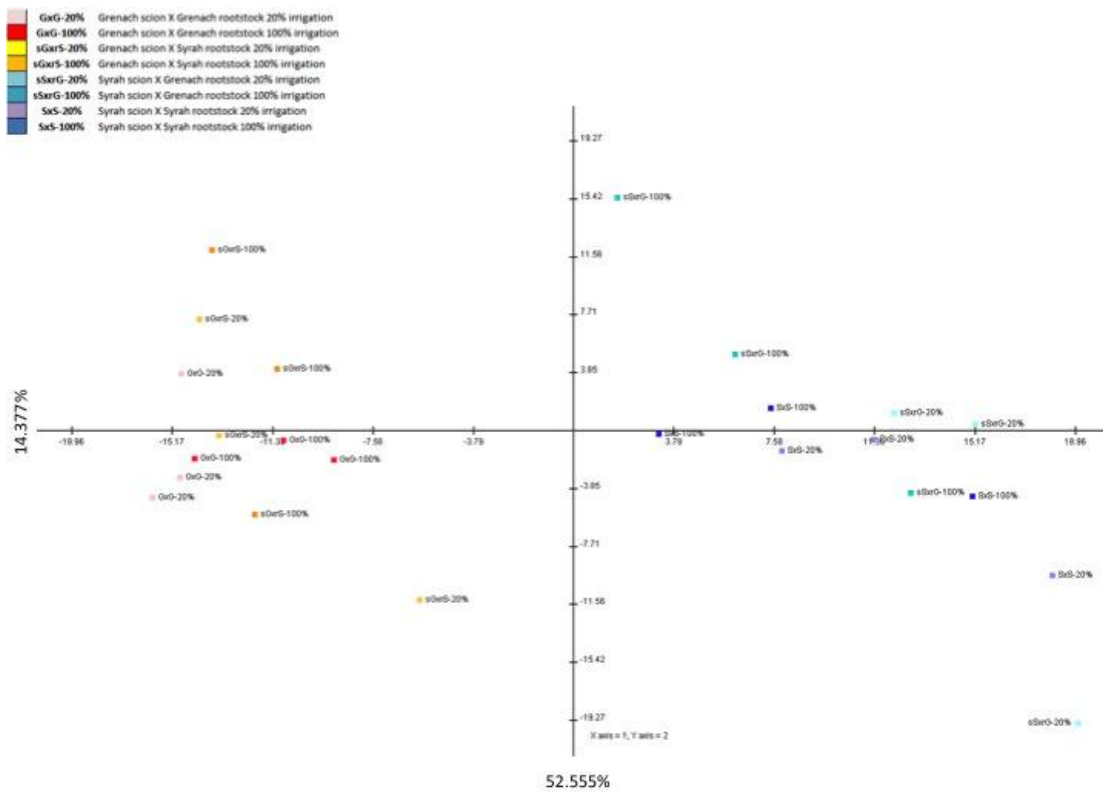


Figure 1. Principle component analysis of metabolite profiling data.

When data were analyzed using Two-way ANOVA to investigate the source of the statistical differences, the effect of the scion was prominent and evidently contributed due to a shift in Carbon and Nitrogen metabolism between the Syrah and the Grenache. In the first there was a general increased level of metabolites particularly amino acids, and among them outstanding Phe with a fold change of 24.74. Smaller changes though significant characterized the sugars. Also interesting that stress related GABA, shikimate related quinic acid showed moderate and significant changes accumulating in Syrah.

Unexpectedly irrigation did not show to have a wide change on metabolism when its effect was investigated with the combined analysis of the two varieties. Having said that, the effect of scion-rootstock interaction with drought response was significant for shikimate related quinate and Phe.

Scion genotype effect:

Metabolite	P-value (corrected)	Fold change (Syrah/Grenache)
Amino Acids		
Aspartic	0.0014	<i>2.52</i>
Isoleucine	2.56 e-07	<i>6.97</i>
Leucine	3.62 e-05	<i>3.04</i>
Phenylalanine	6.43 e-09	<i>24.74</i>
Serine	1.22 e-06	<i>2.79</i>
Threonine	5.49 e-05	<i>2.38</i>
Valine	0.0023	<i>1.8</i>
Organic acids		
3,4-dihydroxy benzoic acid	7.30 e-05	<i>1.18</i>
4-amino butanoic acid	0.001	<i>3.58</i>
Gluconic acid	0.0001	<i>-2.55</i>
Phosphoric acid	9.71 e-08	<i>2.68</i>
Quinic acid	3.68 e-11	<i>5.8</i>
Succinic acid	0.0003	<i>1.37</i>
Threonic acid	1.65 e-05	<i>-3.02</i>
Epigallocatechin	0.0003	<i>-1.97</i>
Sugars		
1,6-anhydro beta-glucose	5.72 e-06	<i>1.7</i>
Arabitol	0.0006	<i>1.54</i>
Erythritol	0.0002	<i>-1.75</i>
Glucopyranose	2.47e-06	<i>1.78</i>
Glycerol-3-phosphate	0.0017	<i>1.52</i>
Lyxonic	0.0016	<i>-1.62</i>
Lyxose	0.0038	<i>-1.5</i>
Raffinose	0.0001	<i>2.17</i>

Irrigation effect:

Metabolite	P-value (corrected)	Fold change (20%/100%)
Fucose	0.0002	<i>1.65</i>

Scion-rootstock interaction:

Metabolite	P-value (corrected)	Fold change (reciprocal/singular)
Phenylalanine	0.0009	<i>2.08</i>
Quinic acid	0.0056	<i>1.36</i>

Table 1. List of metabolites significantly changing in respect to scion-rootstock association, water deficit and the interaction between the two factors.

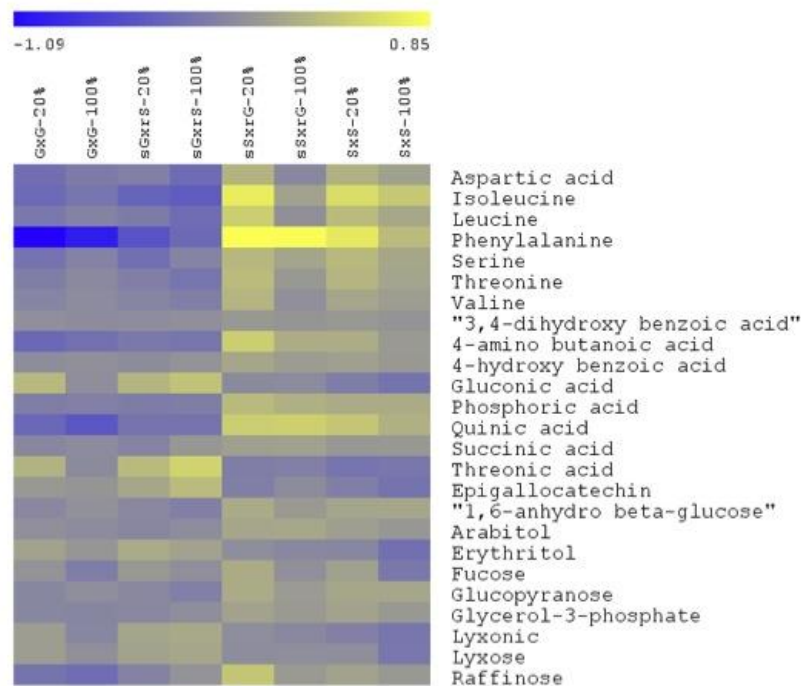


Fig 2. Heatmap visualization of normalized relative content of metabolites significantly changing in respect to either scion-rootstock interaction, drought or the interaction between the two factors.

RNAseq analysis

Methods

To facilitate parallel comparisons to the metabolite data, frozen, ground skin tissues from the same samples used for metabolite extraction were used. Total RNA was extracted from three biological replicates of 70 mg of berry skin tissue at veraison as described by Japelaghi et al. (2011). The quality and concentration of extracted RNA was determined using Bioanalyzer Chip RNA 7500 series II (Agilent, Santa Clara, CA) and a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Following quality assessment, poly (A) mRNA preparation and sequencing with an Illumina HiSeq 1000 sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) were performed as described previously in Venturini et al. (2013). The resultant reads were aligned to the reference *Vitis vinifera* genome using TopHat software (version 2.0.6), which received as input the *Vitis vinifera* GTF file (option “-G”) and also using the following parameters: “-b2-very-sensitive -r 150 -mate-std-dev 50” (Surget-Groba et al., 2010). Subsequently, the Cufflinks software (Trapnell et al., 2010); version 2.0.2)

was used to assemble aligned RNA-seq reads into transcripts with the parameters “--min-intron-length 10”; these assemblies were processed into a full transcriptome set by CuffMerge (Roberts et al., 2011).

Results

RNAseq analysis was performed to examine the effect of irrigation and different rootstock-scion combination on berry skin transcript at genome-wide level. There were 19291 genes (65% of the total) differentially expressed in the rootstock-scion combination whereas 8908 genes (30% of the total) were differentially expressed in the irrigation treatments. The significantly ($P < 0.01$) expressed genes were further categorized into different biosynthetic pathways (Table 1) according to VitisNet data base. As it is shown in table 1, more number of genes were differentially expressed in the rootstock-scion combination compared to the irrigation treatments and the interaction effect.

To understand gene expression in the phenylpropanoid pathway, the transcript profile in the berry skin of control and deficit irrigation as well as the different rootstock-scion combination under the two irrigation regimes (100% and 20%) were compared. In response to the 20% irrigation most of the phenylpropanoid pathway genes showed downregulation (Fig. 1). A gene coding for phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (VIT_16s0039g01710) significantly induced in deficit irrigation treatment compared to the control in all the four rootstock-scion combination. In contrast, the other genes coding for the same enzyme showed a down regulation under deficit irrigation particularly in GG and GS rootstock-scion combination. Transcripts putatively encoding for 4CL (4-coumarate-CoA ligase) were generally higher in the 20% irrigation than the control. In the subsequent biosynthetic step, most of the genes encoding for CHS (Naringenin-chalcone synthase) and STS (Stilbene synthase) were significantly lower in the deficit irrigation treatment compared to the control. Genes putatively encoding for FLS (Flavonol synthase) showed higher expression in the deficit irrigation than the control treatment. The expression of transcripts coding for the parallel biosynthesis pathway, flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H) and flavonoid 3' hydroxylase (F3'H), were downregulated in GG and GS rootstock-scion combination under deficit irrigation compared to the control while the genes coding for the subsequent anthocyanin biosynthesis pathway, dihydroflavanol 4-reductase

(DFR), showed a general upregulation in the deficit treatment compared to the control.

To ease the comparison and visualization of the effect of rootstock-scion combination, the data were normalized to the average of the rootstock-scion combinations in each irrigation regimes (Figure 2 and 3). The genes coding for PAL showed both up- and downregulation in both the 20% and 100% irrigation. GS and GG rootstock-scion combination showed upregulation in the deficit and control irrigation treatments, respectively, for the genes coding for 4CL. SS rootstock-scion combination showed an upregulation in the genes coding for stilbene (STS) and anthocyanin biosynthesis (UFGT, OMT and AC). In the control treatment, both SG and SS rootstock-scion combination showed an upregulation in the genes coding for STS, OMT and AC. There were an upregulation in genes coding for F3'H in GG & GS rootstock-scion combination while genes coding for F3'5'H upregulated in GS rootstock-scion combination in the control treatment.

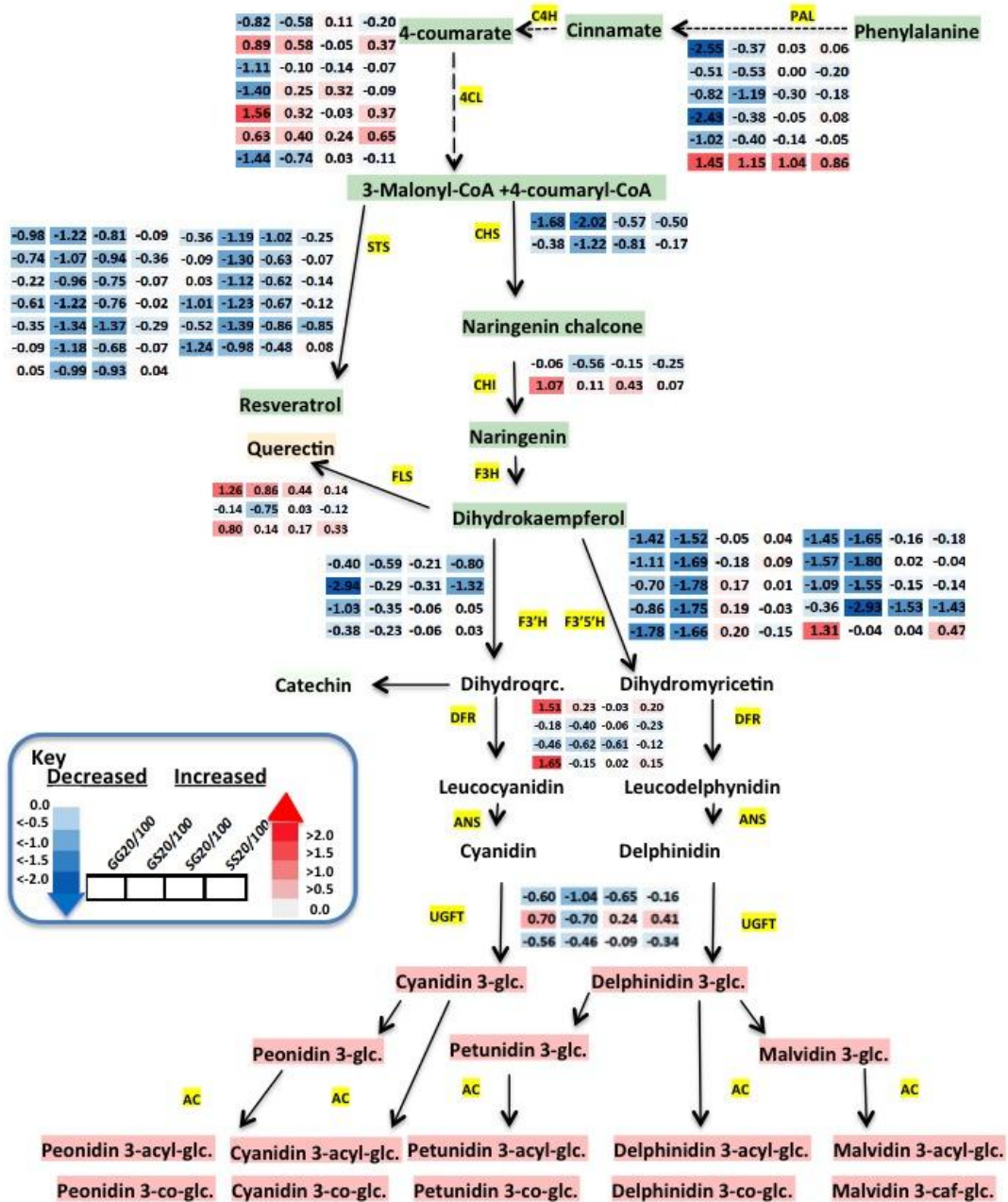


Fig. 1 Log2 fold change (20% vs 100% irrigation) Significantly different berry skin transcripts involved in the specialized metabolism. The numbers in each box indicates log2 fold changes with up (red) and down (blue) regulated in the tissue sample. Each row represent individual genes and each column represents rootstock-scion combination as indicated in the key.

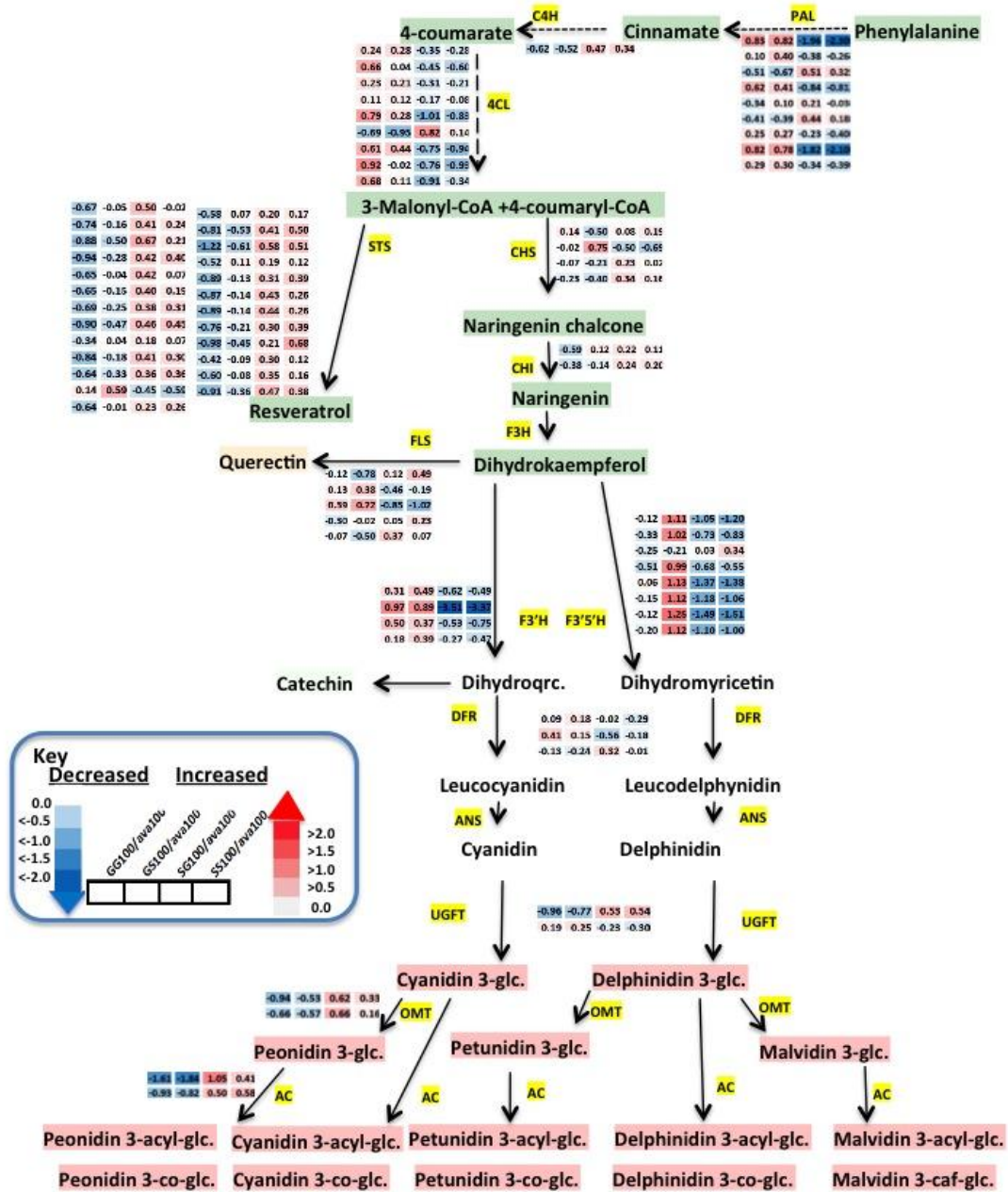


Fig. 3 Log2 fold change (1000% RS combination/Ava 1000% RS combination) Significantly different berry skin transcripts involved in the specialized metabolism. The numbers in each box indicates log2 fold changes with up (red) and down (blue) regulated in the tissue sample. Each row represent individual genes and each column represents rootstock-scion combination as indicated in the key.

Number of differentially expressed genes in different Metabolic Pathways.

VVID	Network Name	Total number of annotated genes in VitisNet (as per 25.06.14 update) http://www.sdstate.edu/ps/research/vitis/pathways.cfm	Number of differentially expressed genes (p<0.01)		
			Irrigation	Rootstock	Interaction
1	Carbohydrate Metabolism				
10010	Glycolysis / Gluconeogenesis	223	71	137	108
10020	Citrate cycle (TCA cycle)	79	25	39	31
10030	Pentose phosphate pathway	89	22	36	30
10040	Pentose/glucuron. interconv.	62	25	35	24
10051	Fructose and mannose met.	117	11	31	18
10052	Galactose metabolism	176	30	67	40
10053	Ascorbate and aldarate met.	53	24	28	20
10500	Starch and sucrose met.	373	85	147	111
10530	Aminosugars metabolism	108	20	43	30
10520	Nucleotide sugars met.	72	5	11	6
10620	Pyruvate metabolism	230	14	32	26
10630	Glyoxyl., dicarboxyl. met.	88	24	35	24
10640	Propanoate metabolism	71	8	15	14
10650	Butanoate metabolism	88	1	4	3
10562	Inositol phosphate met.	70	28	36	35
2	Energy Metabolism				
10190	Oxidative phosphorylation	383	47	157	119
10195	Photosynthesis	223	33	63	55
10196	Photosynthesis - antenna prot.	38	3	9	2
10710	Carbon fixation	182	5	12	6
10680	Methane metabolism	133	2	7	4
10910	Nitrogen metabolism	117	7	20	8
10920	Sulfur metabolism	48	1	3	3
3	Lipid Metabolism				
10061	Fatty acid biosynthesis	86	27	48	36
10062	Fatty acid elongation in mitoc.	28	8	18	12
10071	Fatty acid metabolism	111	12	30	26
10072	Synth. / degr. of ketone bodies	20	3	6	4
10100	Biosynthesis of steroids	150	46	88	63
10140	C21-Steroid hormone met.	18	5	8	3
10561	Glycerolipid met.	159	38	67	44
10564	Glycerophospholipid met.	150	19	37	28
10565	Ether lipid metabolism	53			
10600	Sphingolipid metabolism	77	11	17	15
10592	alpha-Linolenic acid met.	106	16	44	23
11040	Biosynth. unsat. fatty ac.	54			
4	Nucleotide Metabolism				
10230	Purine metabolism	154	34	83	62
10240	Pyrimidine metabolism	113	23	61	46
5	Amino Acid Metabolism				
10251	Glutamate metabolism	97	21	41	24
10252	Alanine and aspartate met.	117	22	45	30
10260	Gly, ser and thr met.	116	36	65	47
10271	Methionine metabolism	135	42	67	47
10272	Cysteine metabolism	84	13	30	23
10280	Val, leu and Ile degr.	92	10	23	21
10290	Val, leu and Ile biosynth.	73	10	25	21
10300	Lysine biosynthesis	85	23	40	38
10330	Arginine and proline met.	65	9	13	12
10340	Histidine metabolism	65	10	15	12
10350	Tyrosine metabolism	165	11	43	28
10360	Phenylalanine metabolism	224	24	55	22
10400	Phe, tyr and try biosynth.	159	37	72	62
10220	Urea cyc., met. amino grp	134	34	76	63
6	Met. of Other Amino Acids				
10410	beta-Alanine met.	59	1	2	2
10450	Selenoamino acid met.	82	1	4	4
10460	Cyanoamino acid met.	39	3	19	13
10480	Glutathione met.	159	42	79	66
7	Glycan Biosynth. And Met.				
10510	N-Glycan biosynthesis	56	12	36	29
10511	N-Glycan degradation	780	12	19	15
10540	Lipopolysac. Biosynth.	11	4	5	5
10550	Peptidoglycan biosynth.	20	1	1	1
10563	GPI-anchor biosynthesis	22	1	17	14
10602	Glycosphingolip. biosynth.	17	4	8	4
11030	Glycan struct. biosynth. 1	101	17	39	29
8	Met. of Cofactors and Vit.				
10730	Thiamine metabolism	22	5	11	8
10740	Riboflavin metabolism	70	14	34	24
10750	Vitamin B6 metabolism	19	1	8	4
10760	Nicotinate, nicotinamide met	28	7	9	9
10770	Pantothenate, CoA biosynth.	56	5	5	5
10780	Biotin metabolism	8	1	2	2
10790	Folate biosynthesis	40	8	14	13
10670	One carbon pool by folate	49	4	5	4
10860	Porph. and chloroph. met.	75	16	41	34
10130	Ubiquinone biosynthesis	36			
9	Biosynth. of Secondary Met.				
10900	Terpenoid biosynthesis	192	37	74	36
10904	Diterpenoid biosynthesis	78	20	38	19
10902	Monoterpenoid biosynth.	217	32	90	46
10908	Zeatin biosynthesis	61	10	27	12
10906	Carotenoid biosynth.	49	13	27	20
10905	Brassinosteroid biosynth.	21	5	7	7
10940	Phenylpropanoid biosynth.	243	49	112	59
11013	ABA biosynthesis	18	2	1	1
10941	Flavonoid biosynthesis	190	44	95	53
10942	Anthocyanin biosynthesis	72	12	30	19
10943	Isoflavonoid biosynthesis	68	14	37	15
10950	Alkaloid biosynthesis I	65	6	21	12
10311	Penicillin/cephalosp. bioS.	13	3	7	5
11002	Auxin biosynthesis	99	19	29	25
11012	IBA metabolism	21	2	4	4

References

Japelaghi RH, Haddad R, Garoosi G: **Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides.** *Mol Biotechnol* 2011, **49**(2):129–137.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR: **Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants.** *Nat Protoc* 2006, **1**(1):387–396.

Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn JL, Pachter L: **Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias.** *Genome Biol* 2011, **12**(3):R22.

Surget-Groba Y, Montoya-Burgos JI: **Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data.** *Genome Res* 2010, **20**(10):1432–1440.

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L: **Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation.** *Nat Biotechnol* 2010, **28**(5):511–515.

Venturini L, Ferrarini A, Zenoni S, Tornielli GB, Fasoli M, Dal Santo S, Minio A, Buson G, Tononi P, Zago ED: **De novo transcriptome characterization of *Vitis vinifera* cv. Corvina unveils varietal diversity.** *BMC Genomics* 2013, **14**(1):41.

Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O: **Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co- regulation in biochemical networks.** *Proteomics* 2004, **4**(1):78–83.

דין ומסקנות

במחקר זה ביקשנו להפריד בין תרומת הנצר לשורשים בתגובת הגפן ליובש. מערכת הרכבות רצפרוקליות תוך כדי שימוש בשני זנים המגיבים באופן שונה ליובש, שימשה לצורך מענה על שאלת המחקר. נבחרו שני זנים הידועים מהספרות כשני זני הגפן הקיצוניים בתגובתם ליובש, הגרנאז² והשיראז. גפן השיראז נחשבת לגפן המשתמשת באסטרטגיה אנאיזוהידרית בתגובתה ליובש. מהות אסטרטגיה זו היא אפשרות ירידה בפוטנציאל המים בצמח והפעלה מאוחרת יחסית של מנגנוני התגובה לעקת יובש. כלומר, גם כאשר הצמח מרגיש חוסר במים, הוא אינו ממחר לסגור פיוניות. לעומתו, זן הגרנאז² נחשב כזן איזוהידרי הממחר להפעיל את מנגנוני התגובה ליובש על מנת לשמור על מאזן מים יחסית יציב בצמח. במחקר זה השתמשנו בשתי רמות השקיה אשר נגזרו מרמת השקיה מיטבית שחושבה על פי צרכי הצמח כאשר ניתנים לו מים ללא הגבלה. רמות ההשקיה שנבחנו הן 100% כביקורת והשקיה גרעונית של 20% שתגרום לעקת יובש מתונה.

התוצאות הפיזיולוגיות מראות כי את רב מדדי ממשק המים בצמח קובע הרוכב. אולם, מוליכות פיוניות קשורה גם בכנה ובמיוחד באינטראקציה בין הכנה למשטר ההשקיה.

ניתוח ביטוי הגנים מרמז על כך שעל אף ההבדלים הפיזיולוגיים בין רמות ההשקיה שנראו בכל ארבעת הגנוטיפים, הצמחים שבהם הרוכב היה שיראז, לא הגיעו למצב של עקה ולפיכך השינוי ברמת ביטוי הגנים בצמחים אלו בין השקיה מלאה להשקית חסר הינו מינורי.

בצמחים בהם הרוכב היה גרנאז², נראה שעקת היובש גרמה לשינוי ברמת הביטוי של מספר גנים רב. החפיפה בין הגנים ששינו את ביטויים כתגובה ליובש בין צמחי ה-GS לצמחי ה-GG קטנה מאוד ורב הגנים שעברו רגולציה בעקבות היובש ייחודיים. כלומר, במקרה זה, שבו הצמחים היו בעקה, בהחלט נראית השפעה רבה לזהות השורשים. ניתן לומר שלזהות הרוכב, ככל הנראה השפעה גדולה מאוד על כניסה לעקה ובגלל שבחרנו זנים השונים מאוד באופיים האיזוהידרי, הגענו למצב שבו בעצם הצמחים שבהם הרוכב היה שיראז לא נכנסו כלל למצב עקה ועקב כך לא ראינו השפעה מובהקת של הכנה על המדדים הפיזיולוגיים. בצמחים שבהם הרוכב היה גרנאז² לכנה בהחלט היתה השפעה גדולה מאוד על תגובת הצמח ליובש. ככל הנראה השפעת הכנה על המדדים הפיזיולוגיים "מוסכה" על ידי צמחי הרוכב שיראז ולכן לא נראתה.

על מנת לבחון את השפעת הכנה בצורה מדויקת יותר יש להכניס גם את צמחי הרוכב שיראז גם לעקת יובש על ידי השקית חסר רבה יותר. במחקר המשך, נבחן גם הקית חסר גדולה יותר בצמחי הרוכב שיראז על מנת לנתח בצורה מדויקת את השפעת הכנה.

תופעה מעניינת נוספת שהתגלתה בעזרת האפיון הגנומי היא שבעקת יובש לאינטראקציה בין כנה לרוכב יש אפקט הופכי כשליש מהגנים שעברו רגולציה בעקבות היובש, עברו רגולציה הפוכה בהשוואה בין GG ל-GS. כלומר, עלו ב-GG וירדו ב-GS ולהיפך. כבחנו את זהות הגנים האלו מצאנו כי יש בניהם העשרה לגנים הקורים לתמותת תאים ובבחינה מדוקדקת של הגנים הקיצוניים, נראה כי ב-GS יש עליה בגנים הקשורים לפוטוסינטזה בעקבות היובש וב-GG ירידה בגנים אלו. יתכן וכנת השיראז, בעת עקה, מעודדת פוטוסינטזה (שיראז הוא זן אנאיזוהידרי). זה ממצא מעניין מאוד שמחייב מחקר המשך בו נבחן את הגנים האלו בבחינה יותר מדוקדקת ובצירופים נוספים של זן-כנה.

בניתוח המטבוליטים, נראה כי זהות הרוכב הינה בעלת ההשפעה העיקרית על הרכב המטבוליטים הראשוניים בעלים. פניאלנין שהינו חומר המוצא לאנטוציאנין, מרכיב עיקרי בענבי יין וביין עצמו, כן מושפע מהאינטראקציה בין כנה לרוכב. גם חומר זה יהיה מעניין לבחון בצירופים נוספים של כנה-רוכב. כמובן שבמסגרת מחקר זה, בעיקר כי העצים היו צעירים, לא נבחנה השפעת כנה-רוכב-יובש על פרי. לשם כך, נדרש המשך מחקר.

יישום תוצאות המחקר, הבעיות שנותרו לפתרון והמשך המחקר

מחקר זה הינו מחקר לטווח ארוך ומטרתו להבין את השפעת חלקי הצמח השונים על תגובת הצמח ליובש. הבנה זו תעזור בבחירת אסטרטגיות גידול שיביאו בהמשך לפרי רב יותר ואיכותי יותר. בשלב זה של המחקר, תוצאותיו אינן יישומיות. ללא ספק, על מנת לאפשר יישום התוצאות בשלב מאוחר יותר יש להמשיך ולחקור את ההשפעות על הפרי ואיכות היין. על אף שכרגע אין מימון, בכוונתנו להמשיך ולחקור את השפעות הרוכב והכנה על פרי הגפן.

פרסומים מדעיים של המחקר

Einat Gerzon, Iris Biton, Yossi Yaniv, Aaron Fait and **Giora Ben-Ari** (2012) Drought stress response strategies of grape cultivars. *Alon Hanotea*. 66:40-45 (Hebrew).

מאמר נוסף:

Plant anatomy as a determinant of isohydric or anisohydric behavior

Einat Gerzon, Iris Biton, Yossi Yaniv, Hanita Zemach, Yishai Netzer, Amnon Schwartz, Aaron Fait and Giora Ben-Ari

נשלח לעיתון *Sientia Horticulturae*.

מאמר נוסף וגדול יותר מתחיל להיכתב בימים אלו וישלח ל- *Journal of Experimental Botany*

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

ביבליוגרפיה

Cameron KD, Teece MA, Smart LB (2006) Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. *Plant Physiol* 140:176-183

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30:239-264

Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* 52:167-174

Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8:429

Goodger JQ, Sharp RE, Marsh EL, Schachtman DP (2005) Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques. *J Exp Bot* 56:2389-2400

Moutinho-Pereira J, Magalhães N, Gonçalves B, Bacelar E, Brito M, Correia C (2007) Gas exchange and water relations of three *Vitis vinifera* L. cultivars growing under Mediterranean climate. *Photosynthetica* 45:202-207

Schachtman DP, Goodger JQ (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci* 13:281-287

Schultz HR (2003) Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell & Environment* 26:1393-1405

Soar CJ, Speirs J, Maffei SM, Penrose AB, McCarthy MG, Loveys BR (2006) Grape vine varieties Shiraz and Grenache differ in their stomatal response to VPD: apparent links with ABA physiology and gene expression in leaf tissue. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12:212-

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מכיוון שגם למערכת השורשים וגם לנצר ישנה השפעה משמעותית על ביצועי הגפן ובכללם התגובה ליובש והתבטאותה באיכות הפרי והיין, ישנה חשיבות מכרעת להפרדה של התרומה של שני חלקי הצמח ולהבנת מרכיביה מרכיביה בכל איבר בנפרד עבור שליטה עתידית טובה יותר בביצועי הגפן.
עיקרי התוצאות.
רב התגובות הפיזיולוגיות ליובש מושפעות בעיקר מזהות הרוכב. פנילאלין מושפע מאינטראקציה בין הכנה לרוכב. יתכן וצמחי הרוכב שיראז לא היו בעקה מספקת ועקב כך יש "מיסוך" של השפעת הכנה. כשליש מהגנים שעברו רגולציה ברוכב גרנאז' הושפעו הפוך מהיובש כאשר הכנה היתה שיראז לעומת גרנאז'.
מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
הצלחנו להפריד לפחות חלק מהתגובה ליובש למרכיביה. יש להמשיך ולבחון את הדברים ברמת הפרי. יש לבחון את רמת הפנילאלין בשילובים שונים של כנה ורוכב מסחריים.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר
נדרש מחקר המשך שיבחן את הפרי וישבו נדאג להכניס גם את צמחי הרוכב שיראז לעקת יובש משמעותית.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; ראה פרסומים מדעיים לפני הביבליוגרפיה.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
← חסוי – לא לפרסום
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים