

תכנית מספר 256-0719-10

שיפור איכות הפיגמנטציה בענבים למאכל ויין
דוח מסכם

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף פרחים

מיכל שמיר : צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
אבי פרל : מדעי עצי הפרי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
אמנון ליכטר : טיפול בתוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
סוזן לוריא : טיפול בתוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
דוד וייס : המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, רחובות.
רינת עובדיה : צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
ערן הרכבי : שהם
אייל רבן : שהם

Michal Oren-Shamir, Ornamental Horticulture Dept. ARO, Bet Dagan. E-mail:
vhshamir@agri.gov.il

Avi Perl, Department of Fruit Tree Science., ARO, Bet Dagan

Amnon Lichter, Department of Postharvest Science, ARO, Bet Dagan

Susan Lurie, Department of Postharvest Science, ARO, Bet Dagan

David Weiss, Department of Plant Science and Genetics in Agriculture, Agriculture Faculty,
The Hebrew University, Rehovot.

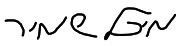
Rinat Ovadia, Ornamental Horticulture Dept. ARO, Bet Dagan.

Eran Harcabi,

Eyal Raban,

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : לא

חתימת החוקר  עייל רבן

רשימת פרסומים :

Lurie S., **Oren-Shamir M.**, Ovadia R., Nissim-Levi A., Kaplunov T., Zutahy Y., Weksler H.,
and Lichter A. (2009) Absciscic acid improves color development of 'Crimson Seedless' grapes
both in the vineyard and on detached berries.

Journal of Horticultural Science & Biotechnology 84, 639-644.

Sinilal B., Ovadia R., Nissim-Levi N., Perl A., Weissberg M. and **Oren-Shamir M.** Increased
accumulation and decreased catabolism of anthocyanins in red grape cell suspension due to
magnesium treatment. Planta, in press.

תקציר

מטרת מחקר זה היא לבחון דרכים להעלאת ריכוז האנטוציאנינים בקליפות ענבים אדומים ושחורים, עם הבשלתם, בתנאי אקלים וגידול בהם הפיגמנטציה אינה מספקת. העבודה התבצעה במקביל במספר מערכות: בחינת טיפולים בכרם, בחינת טיפולים במערכת של חלקי אשכולות או ענבים מנותקים שפותחה בשנת המחקר הראשונה, ובחינת טיפולים בתאי תרבית שמקורם מענבי Gamay Red. עיקר העבודה בכרם ובענבים מנותקים התרכזה בטיפולים ב-ABA בגלל הפורמולציה החדשה שפותחה שתאפשר שימוש חקלאי בהורמון זה. הממצאים העיקריים של המחקר הם: א. ניתן לקבל התפתחות פיתוח מערכת של ענבים מנותקים המאפשרת בחינת השפעת חומרים שונים על הפיגמנטציה של קליפות הפרי. ב. ישנה הגברה של הפיגמנטציה בענבים מנותקים ובכרם כתוצאה מטיפול ב-ABA. ג. בטיפול משולב של ג'יברלין ו-ABA הן בכרם והן בענבים מנותקים, היה דומה מבחינת הפיגמנטציה לטיפול ב-ABA בלבד. ה'גיברלין לא פגע באפקט של ABA על ריכוז האנטוציאנינים. ד. טיפול באתרל, המגביר פיגמנטציה בכרם, לא משפיע על הפיגמנטציה בענבים מנותקים. בשילוב של טיפול באתרל לוב-ABA האפקט על הפיגמנטציה היה כמו בטיפול של ABA בלבד. ה. טיפול ב-ABA לפני עקת חום משפרת פיגמנטציה ביחס לענבים לא מטופלים. במערכת של תאי התרבית, הראינו שמגנזיום מגביר פיגמנטציה באופן ניכר מבלי להגביר את הסינתזה של הפיגמנטים. יוני המגנזיום כנראה מעלים את ריכוז הפיגמנטים על ידי הגברת יציבותם בתאים, הריכוז היחסי של אנטוציאנינים פחות יציבים עלתה בטיפולי מגנזיום.

מבוא (רקע מדעי ומטרות)

עוצמת הפיגמנטציה האדומה בענבים למאכל וליין היא אחת התכונות המרכזיות לקביעת איכות הפרי. צבע חיוור ולא הומוגני בענבים אדומים למאכל, כמו ה-Crimson יפגע במחיר הפרי, וצבע חיוור בענבים שחורים כמו הקברנה סובניון יפגע בצבע היין – מדד חשוב בקביעת איכות. בשני סוגי הגידולים ישנם זנים בהם בעיית הצבע היא אקוטית: באזורי גידול שונים ובתנאי אקלים משתנים משנה לשנה ישנם הבדלים משמעותיים בעוצמת צבע הפירות. הגורמים האפשריים לבעיות הצטברות הפיגמנטים הם תנאי אקלים, כמו טמפרטורות (בעיקר טמפרטורות לילה) ועוצמות אור. גורם נוסף הוא אופן הגידול ובעיקר עומס הפרי לצמח.

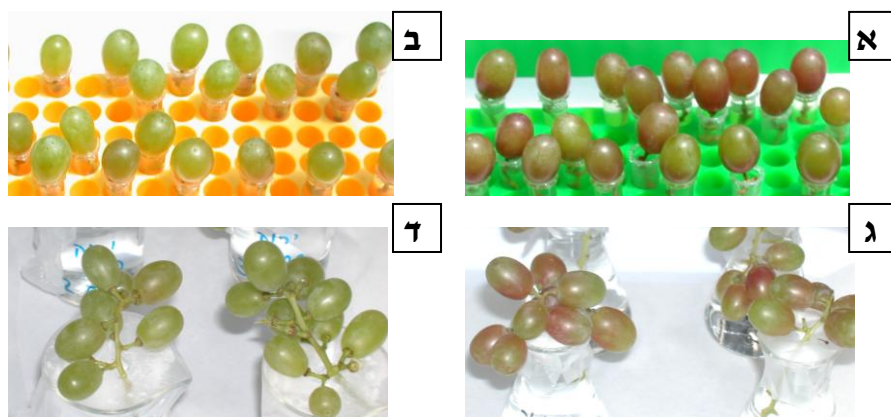
הפיגמנטים האחראיים על הצבע האדום/שחור בקליפות הענבים הם האנטוציאנינים. אנטוציאנינים הם קבוצת הפיגמנטים הגדולה בטבע המעניקה מגוון צבעים בין אדום לסגול וכחול. האנטוציאנינים הם ממשפחת הפלבנואידים והם מצטברים בחלליות תאי האפידרמיס. לרוב, עוצמות אור גבוהות ותנאי טמפרטורה נמוכה מעודדים יצירת אנטוציאנינים בצמחים. ישנן אינדיקציות מהספרות שבתנאי טמפרטורה גבוהים הצטברות האנטוציאנינים בענבים פחותה (1). תנאי טמפרטורה משפיעים לא רק על רמת הפיגמנטים אלא גם על היחס בין האנטוציאנינים השונים הקובעים את גוון העינב (2). עבודות שלנו בפרחים (3) ועבודה בענבים (4) מעידות על כך שטמפרטורות גבוהות משפיעות לא רק על קצב יצירת הפיגמנטים אלא גם מאיצות את קצב

פירוקם. ידוע שמלחים כמו מגנזיום מנגן וברזל יוצרים קומפלקסים עם אנטוציאנינים ומיצבים את הפיגמנטים. מצאנו שטיפולים בצמחי אסטר עם מלחי מגנזיום בריכוזים נמוכים, גרמו להצטברות גבוהה יותר של פיגמנטים בטמפרטורות גידול גבוהות, מבלי להעלות את קצב הסינתזה שלהם (3). אחד הטיפולים המקובלים היום לשיפור פיגמנטציה ענבי מאכל היא ריסוס ב-'אתרל' המשחרר אתילן (5). אתרל מומלץ כיום לטיפול בשלב הבוחל והתחלת שינוי הצבע, אך התוצאות מכרמים שונים מצביעות על שונות עצומה (בין 30% ל-300%) ביעילות הטיפול בהגברת הצבע ובאחידותו. בנוסף לאתרל, ישנם חומרים נוספים כמו מונופוטסיום סולפט ו-BTH שהראו אינדיקציות ראשוניות לכך שהם מגבירים את ריכוז האנטוציאנינים בענבים. מטרת מחקר זה היא לאפיין את תנאי האקלים (טמפרטורה ועוצמת אור) המשפיעים על ריכוז ואיכות (היחס בין המרכיבים השונים) הפיגמנטים בענבי Crimson וקברנה סוביניון הגדלים בארץ, ולבחון דרכים להעלאת ריכוזם. שני זנים אלו נבחרו כנציגים מהזנים למאכל וליין בהם ישנה בעיה משמעותית בצבע הפרי.

פירוט הניסויים והתוצאות

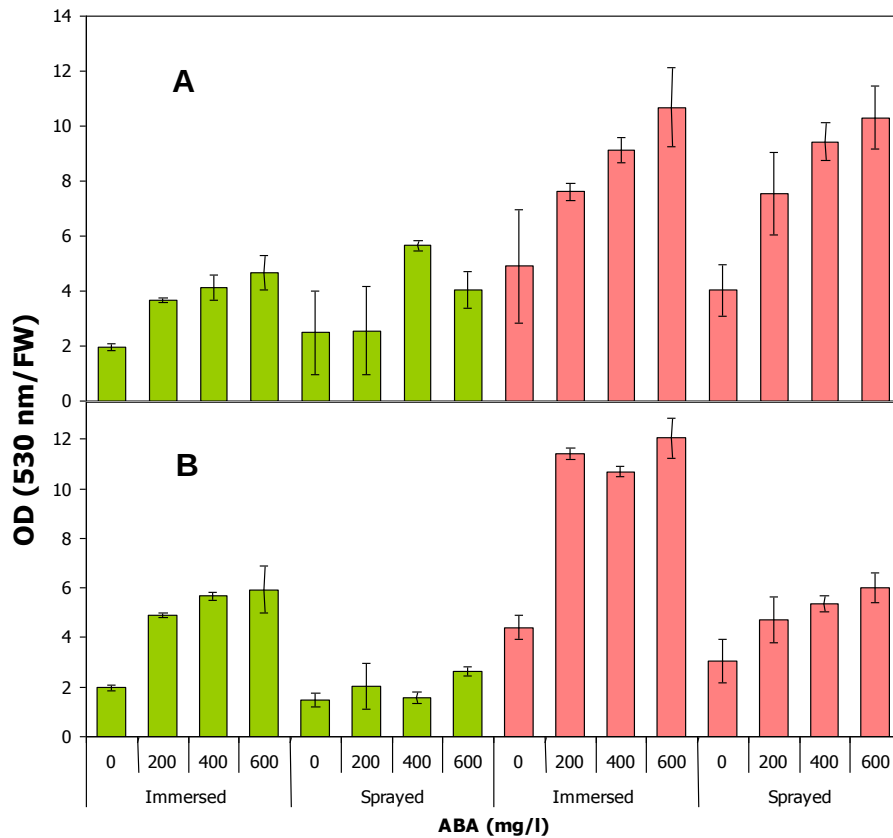
א. בחינת טיפולים לשיפור הפיגמנטציה בענבים מנותקים ובכרם

בהצעת המחקר תארנו תוצאה ראשונית שבה חלקי אשכולות ענבי קרימזון שנקטפו בשלב שבירת הצבע והוגמנו בתמיסת סוכרוז, המשיכו להאדים במשך כשבועיים בתנאים המנותקים. בקיץ 2008 המשכנו בפיתוח מערכות מנותקות שכללו חלקי אשכולות וכן ענבים בודדים. הניסויים התבצעו על ענבי Flame, קרימזון וקברנה ב-8 ניסויים שונים. בחנו תנאי ניסוי שונים שכללו: א. טמפרטורות שונות ($23^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ יום/לילה בפיטורון בפיטורון ו- $22^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ בחדר גידול שבו עוצמות האור נמוכות יותר), ב. חלקי אשכולות וענבים מנותקים (איור 1), ג. שלבי התפתחות צבע שונים של הענבים והאשכולות (צבע ירוק שבו הייתה רק התחלה של האדמה וצבע ברונזה בו הענבים כבר צברו אנטוציאנינים) (איור 1), ד. אופן העמדת האשכולות והענבים (בקופסא סגורה לשימור הלחות או במגשים פתוחים) –ה. והחומר המונע אילוח (PPM, TOG, Preservative for Plant Tissue Culture Media). התנאים המוצלחים ביותר שנבחרו להמשך העבודה הם: העמדה של חלקי האשכולות או הענבים המנותקים (בשתי המערכות קבלנו האדמה משמעותית) בתנאי טמפרטורה של $23^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ בפיטורון, על גבי מגשים פתוחים, עם 2% סוכרוז ו-0.05% PPM למניעת אילוח. אחרי שנת המחקר הראשונה בה עבדנו עם שתי המערכות (חלקי אשכולות וענבים מנותקים) המשכנו בעבודה עם ענבים מנותקים כי התוצאות היו יותר הומוגניות וברורות ובוטלה השפעת מיקום הענב באשכול.

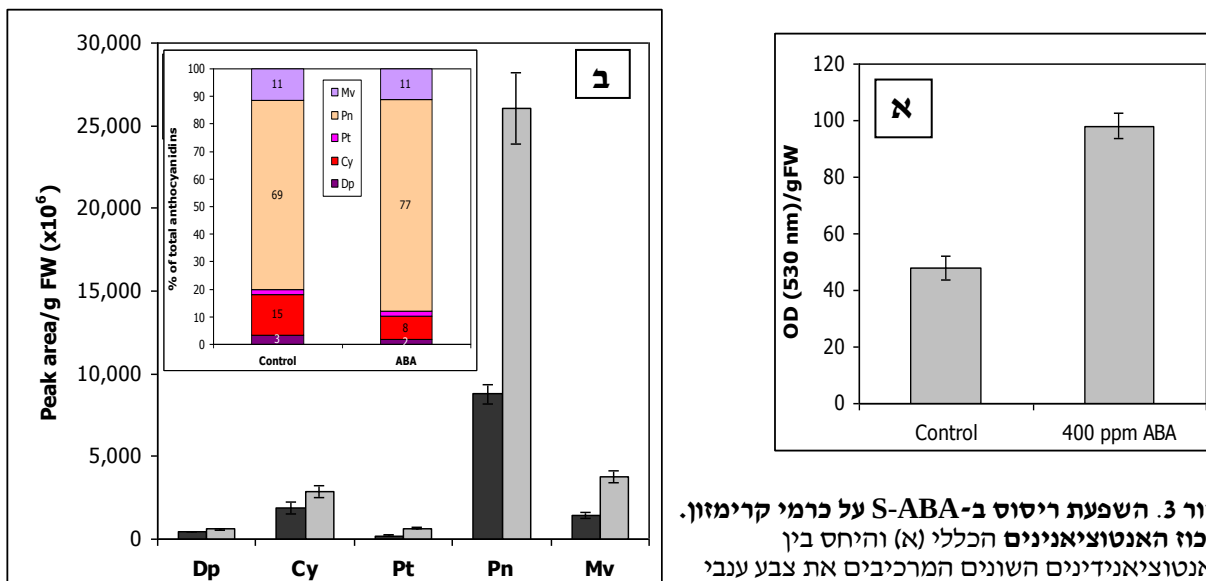


איור 1: ענבים מנותקים בצבע ברונזה (א) וירוק (ב), וחלקי אשכולות מנותקים בצבע ברונזה (ג) וירוק (ד).

בהצעת המחקר תוכנן לעבוד על ענבי קרימסון וקברנה. מכיוון שהיו קשיים טכניים בלתי ניתנים לפיתרון על העבודה עם ענבים בודדים וחלקי אשכולות של ענבי קברנה, העבודה התרכזה בענבי קרימסון. שתי הבעיות העיקריות בענבי קברנה היו חוסר הומוגניות בין הגרגרים באשכולות, וכן בעיה בהעמדת ניסויים של חלקי אשכולות וענבים בודדים בתמיסות בגלל מבנה האשכולות. ידוע כבר מספר שנים ש-ABA מגביר יצירת אנטוציאנינים בענבים בזמן ההבשלה. לאחרונה פותחה פורמולציה של ABA (S-ABA) שתאפשר שימוש חקלאי בעתיד. S-ABA נבחר כטיפול העיקרי אותו בחנו במערכת האשכולות והענבים המנותקים. ידוע כבר מספר שנים ש-ABA מגביר יצירת אנטוציאנינים בענבים בזמן ההבשלה. לאחרונה פותחה פורמולציה של ABA (S-ABA) שתאפשר שימוש חקלאי בעתיד. S-ABA נבחר כטיפול העיקרי אותו בחנו במערכת האשכולות והענבים המנותקים. **איור 2** מסכם את תוצאות הניסוי שבחן השפעת טיפול ב-S-ABA על ריכוז האנטוציאנינים בקליפת ענבים מחלקי אשכולות וענבים מנותקים שטופלו או בהגמעה או בריסוס התכשיר. ניתן לראות שהטיפולים העלו את ריכוז האנטוציאנינים בקליפות באופן משמעותי בשלוש מתוך ארבע הטיפולים. נראית קורלציה ברורה בין ריכוז ה-ABA וריכוז האנטוציאנינים בקליפות. ריסוס החומר על ענבים בודדים לא השפיע באופן משמעותי ויתכן שזה נובע מחוסר אחידות בריסוס. בחלקי אשכולות לא היה הבדל משמעותי בין הטיפול בהגמעה או בריסוס, ובשניהם הטיפול ב-S-ABA העלה באופן משמעותי את ריכוז הפיגמנטים. ריכוז באנטוציאנינים בחלקי האשכולות ברונזה עלה פי 2.5 כתוצאה מהטיפול. תוצאה זו דומה לזו שהתקבלה בשטח, כשאשכולות קרימסון על הגפנים רוסו ב-S-ABA (**איור 3א**). הטיפול גרם לעליה של כול חמש האנטוציאנידינים המרכיבים את צבע הענבים, ושינה רק במעט (תוצאה לא מובהקת) את היחס בין האגליקונים השונים (**איור 3ב**).

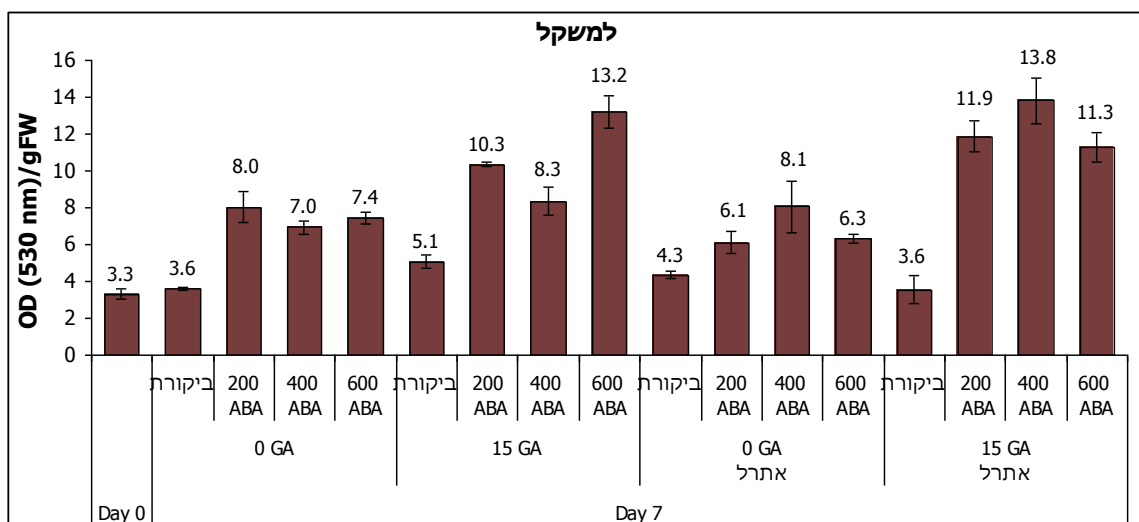
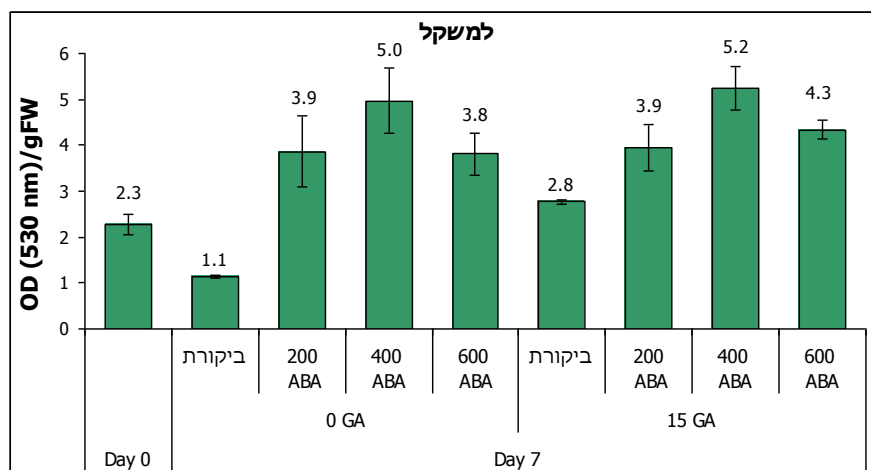


איור 2. השפעת טיפולים ב-S-ABA על ריכוז האנטוציאנינים בקליפת הענבים על חלקי האשכולות (A) והענבים הבודדים (B) שישה ימים לאחר הטיפול. האשכולות או הענבים המנותקים טופלו בתכשיר או על ידי תוספת שלו לתמיסת הסוכרוז (Immersed) או אל ידי ריסוס החומר עם משטח Triton 0.025% (Sprayed). הניסוי נערך במשך שבוע. ריכוז האנטוציאנינים נמדד מהקליפות המבודדות. כול דגימה היא קליפות מ-4-5 ענבים. הפיגמנטים מוצו בתמיסה של בתמיסה של מתנול:מים:חומצה אצטית (11: 5: 1) ב-4°C למשך הלילה וריכוז הפיגמנטים נקבע על ידי קריאה ב-530 nm בספקטרופוטומטר. הקיום האנכיים מייצגים ממוצעים של 3 חזרות $\pm$ סטיית תקן.



איור 3. השפעת ריסוס ב-S-ABA על כרמי קרימזון. ריכוז האנטוציאנינים הכללי (א) והיחס בין האנטוציאנידינים השונים המרכיבים את צבע ענבי הקרימזון (ב). Dp – delphinidin, Cy – cyanidin, Pt – petunidin, Pn – peonidin, Mv – malvidin. הקווים האנכיים מייצגים ממוצע של 3 חזרות.

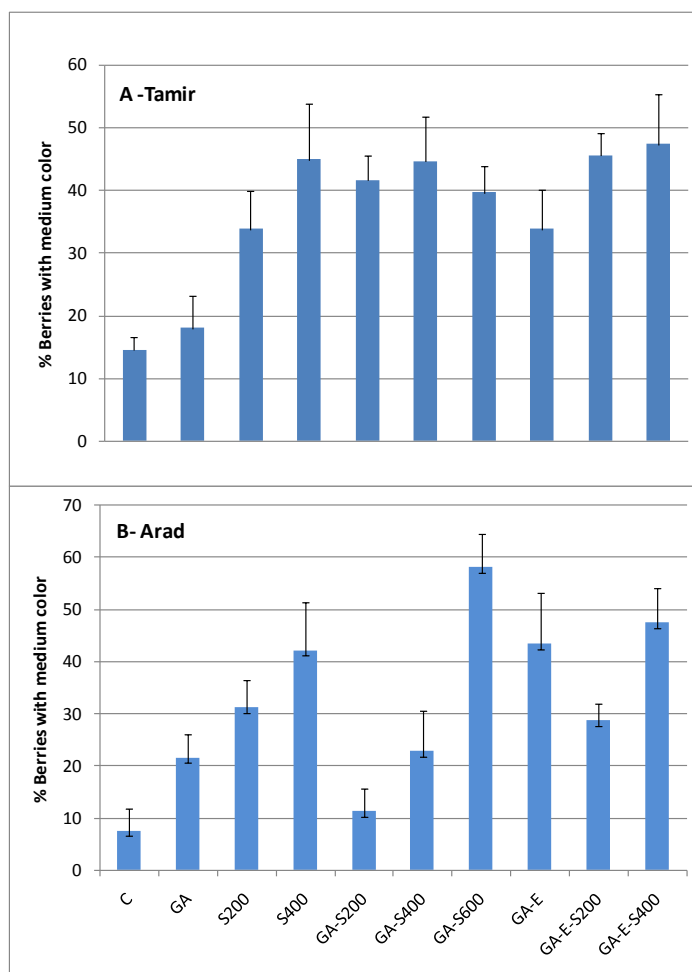
ברוב זני הגפן למאכל מקובל לטפל בגייברלין באשכולות לקבלת גרגרים איכותיים יותר. קיץ 2009 הוקדש לבחינת השפעת ABA על צבע קליפות גרגרי קרימסון על רקע של טיפולים בכרם בגייברלין. הענבים טופלו בשני ריכוזי גייברלין שונים, 7.5, 15 ppm וביקורת של ענבים לא מטופלים בכרם בפתחיה ובמושב לכיש. נערכו שישה ניסויים במשך עונת הבציר, כשבכול ניסוי נבחנו ענבים ירוקים (התחלת שבירת צבע) וענבים בצבע ברוזה. לאחר שבניסוי הראשון לא נראתה השפעה של גייברלין על הצבע, המשכנו את העבודה עם הריכוז הגבוה של גייברלין (15 ppm). בניסוי האחרון, אותו בחרנו להציג (איור 4), עם ענבים ממושב פתחיה שטופלו בגייברלין בזמן התפתחות הגרגרים, הוספנו טיפול נוסף באתרל יחד עם הטיפול ב-ABA. בכול ניסוי, הענבים הבודדים (ירוקים וברוזה) נטבלו בתמיסות השונות במבחנת אפנדורף, והוכנסו לחדר גידול של 23°C/15°C בחדר גידול מבוקר טמפרטורה למשך 7-8 ימים. במהלך תקופה זו נעשה חידוש חתך ומילוי מים במבחנות. לכול טיפול גייברלין נבחנו הגמעת הענבים בארבעה ריכוזי ABA (200, 400, 600, 800 ppm) ובניסוי האחרון גם ריסוס ב- 0.04% אתרל (עם משטח טריטון x100). ריכוז האנטוציאנינים נקבע לגרגר ולמשקל דגימה. כול דוגמא כללה 4-5 קליפות ענבים. המיצוי נעשה ב-20 מ"ל מתנול:מים:ח.אצטית (1:5:11), עם 3 חזרות לכל טיפול. המיצוי נערך בחושך ובקור במשך יומיים ונקרא בספקטרו ב-530 nm.



איור 4. השפעת טיפולים בגייברלין, S-ABA, ואתרל על ריכוז האנטוציאנינים בקליפות ענבי קרימסון בודדים 8 ימים לאחר הטיפול. הקווים האנכיים מייצגים ממוצעים של 3 חזרות $\pm$ סטיית תקן.

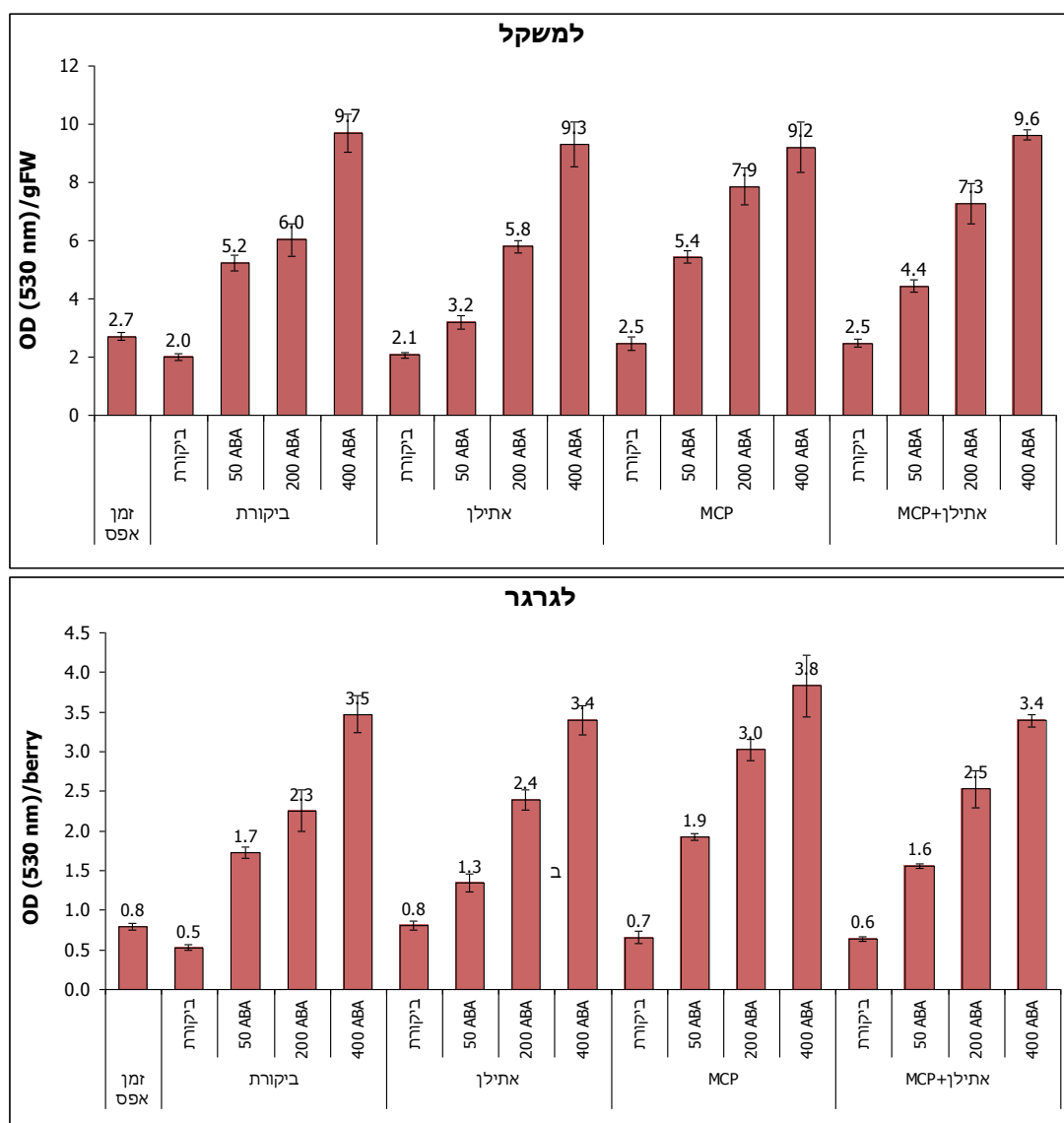
למעשה לא נצפתה השפעה של טיפולי הגיברלין בשטח על צבע הענבים. ניסוי זה הוא מייצג משישה ניסויים שבהם התוצאות לא הראו השפעה מובהקת של גיברלין בענבים ירוקים או אדומים. בנוסף לזה גם הטיפול באתרל לא השפיע על צבע הגרגרים. הטיפול האחר שברור לחלוטין שמשפר צבע הוא ABA. ברוב הניסויים בגרגרים בודדים הריכוז האופטימאלי של ABA היה 400 ppm.

האינטראקציה בין גיברלין (GA) ל-S-ABA נבחנה גם בכרם. התוצאות בכרם מראות כי מרבית הטיפולים הביאו להגברה (מובהקת על פי ANOVA ביחס לביקורת ולטיפול הגיברלין) באחוז הגרגרים בצבע בינוני ללא תלות מובהקת בריכוז S-ABA (איור 5). לא היה הבדל בין פרי מטופל בגיברלין לביקורת. ההשפעה של 200 ח"מ S-ABA או אתרל על רקע טיפול GA לא הייתה מובהקת. התוצאות בכרם ארד מראות כאילו הייתה השפעה חיובית של GA על הצבע ביחס לביקורת אבל השפעה שלילית באינטראקציה עם S-ABA בריכוזים של 200 ו-400 ח"מ אך לא 600 ח"מ. בשילוב עם אתרל לא נראתה השפעה מוגברת על אחוז הגרגרים בצבע בינוני (איור 5). יחד עם זאת יש לציין כי לא היו הבדלים מובהקים עקביים בין הטיפולים בניסוי זה והכרם סבל מבעיה כללית של התפתחות צבע עקב השקיה לא תקינה וחיגור שלא התבצע במועד.



איור 5: השפעת טיפולים בכרם על צבע הגרגרים. הניסוי התבצע בשני אתרים A – כרם תמיר באיזור פתחיה B – כרם ארד באיזור לכיש הכרמים טופלו בגיברלין (GA) בריכוז של 15 ח"מ בשלב 'אפונה' (6-8 מ"מ). הטיפול באתרל (E) וב-S-ABA (S) התבצעו בשלב הבוחל. הטיפולים ניתנו על ידי ריסוס ברובים עד נגירה במינונים של 0.05% לאתרל ו-200 עד 600 ח"מ S-ABA. כל הטיפולים ניתנו ב-4 חזרות אקראיות של 3 גפנים לחזרה. הדגימות נערכו בתחילת עונת הבציר המסחרי והם כללו 15 מקטעי אשכולות מכל חזרה ברצף. הגרגרים הופרדו לפי 4 קטגוריות צבע (ירוק, בהיר, בינוני וכזה). התוצאות המובאות באיור מתייחסות לאחוז הגרגרים בצבע בינוני. אחוז הגרגרים בצבע כזה היה זניח בשני הכרמים.

בשנה השלישית למחקר בחנו השפעת טיפול משולב של S-ABA ואתילן על צבע קליפות ענבים. בחנו השפעה של טיפול באתרל או במעכב יצירת אתילן, MCP, על הצטברות אנטוציאנינים בקליפות ענבי קרימסון. הענבים טופלו לאחר בציר באחד משלושת הטיפולים הבאים: טבילה ב-אתרל וייבוש, טיפול של 24 שעות בחדר של 10 מ"צ עם MCP או טיפול משולב של אתרל ו-MCP. בחנו טיפולים מקדימים אלו על התפתחות צבע הענבים הבודדים, שהוגמעו בריכוזים שונים של ABA. **איור 6** מציג את תוצאות הניסוי לגבי ענבים בצבע ברוזה. תוצאות דומות התקבלו בענבים ירוקים. ניתן לראות בבירור את השפעת הטיפול ב-ABA על הצטברות האנטוציאנינים לכול אורך הניסוי. הטיפולים באתרל וב-MCP לא השפיעו כלל על הצטברות זו. תוצאות אלו מרמזות לכך שהמסלול של השפעת ABA על ריכוז האנטוציאנינים לא תלוי באתילן: ABA מגביר באופן ניכר את הצטברות הפיגמנטים, וטיפולים מקדימים באתילן או במעכב שלו לא השפיעו על הצטברות זו. חשוב לציין שטיפול באתילן בכרם כן מגביר את הפיגמנטציה ולכן השאלה אם יש או אין קשר בין שני המסלולים חשובה ומעניינת. בחינת התופעות בענבים מנותקים, והעובדה שאתרל לא משפיע על הפיגמנטציה במערכת המנותקת אפשרה הפרדה של התהליכים.

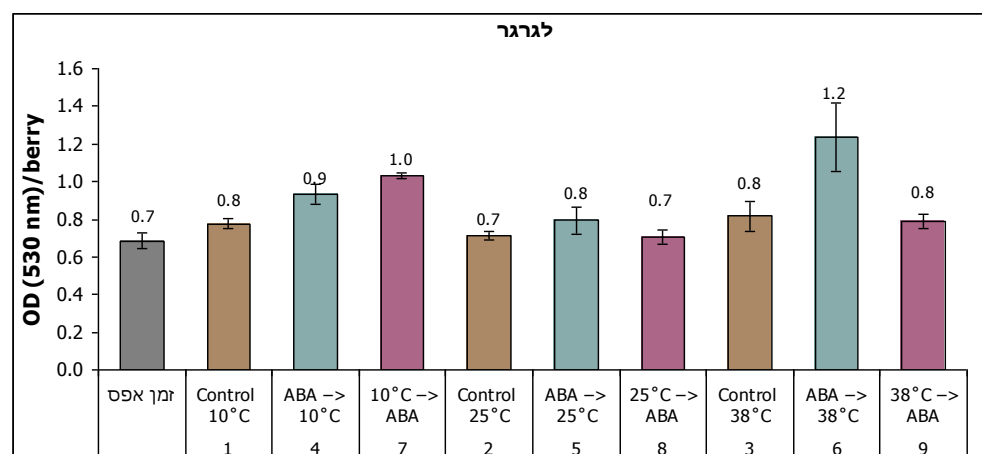
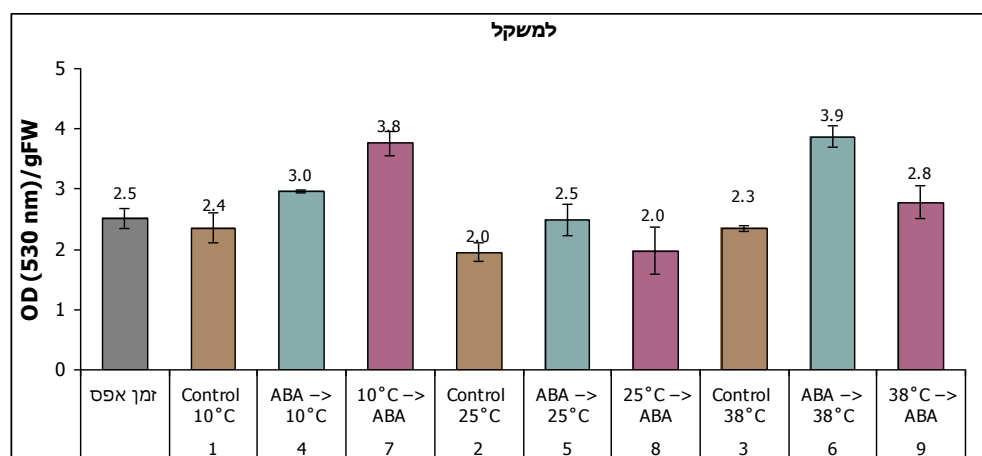


איור 6. בחינת השפעה משולבת של אתרל, MCP ו-ABA על התפתחות צבע בענבי קרימסון במשך 8 ימים. הטיפולים באתרל (2%) ו-MCP (2ppm) בחדר של 10 מ"צ למשך 24 שעות) היו יום לפני העמדת הניסוי. הקווים האנכיים מייצגים ממוצעים של 3 חזרות $\pm$ סטיית תקן.

תוצאות דומות התקבלו בבחינת ריכוזים גבוהים יותר של אתילן, בטיפול באתילן גזי ובבחינת טיפולים שונים של MCP. מכאן ברור שהגברת הצטברות אנטוציאנינים כתוצאה מטיפולים ב-ABA לא מושפעת מאתילן.

בעקבות עבודה עם תאי תרבית ומציאת השפעה דרמטית של יוני מגנזיום על הצטברות אנטוציאנינים, בחנו השפעת מגנזיום גם על הצטברות פיגמנטים בענבים מנותקים. בחנו השפעת טיפולים במגנזיום על הצטברות הפיגמנטים בענבים. לא נמצאה השפעה של טיפולי המגנזיום על הפיגמנטציה של ענבים מנותקים (תוצאות לא מוצגות).

שאלה נוספת שנשאלה היא איך משפיע חמסין על הטיפול ב-ABA להגברת הצבע בענבים? האם עדיף שהטיפול יינתן לפני הימים החמים או אחריהם? לשם כך בחנו השפעת טיפול ב-ABA לפני ואחרי הכנסת אשכולות הענבים לטמפרטורות שונות. הטיפול ב-ABA לפני טיפול הטמפרטורה נעשה על האשכולות השלמים וניתן בתוספת 25% Triton. הטיפול בטמפרטורות השונות נעשה למשך 12 שעות. אשכולות לא מטופלים ב-ABA טופלו ב-Triton לפני ההכנסה לטמפרטורות השונות כביקורת. מאיור 7, המסכם ניסוי זה, ניתן לראות בבירור שישנה עדיפות במתן טיפול ב-ABA לפני תנאי חמסין (טיפול חום של 38°C למשך 12 שעות). מכאן שאם צפוי חמסין, יש טעם לטפל בכרם ב-ABA לקבלת צבע ענבים טוב יותר. בטיפול בטמפרטורה של 25°C רואים מגמה דומה, אם כי פחותה. טיפול של 10°C היה יתרון מסוים במתן ה-ABA אחרי הטיפול.



איור 7. השפעת טיפול ב-ABA על פיגמנטציה של ענבים מנותקים, לפני ואחרי הכנסת הענבים לתנאי טמפרטורה שונים. ריכוז ה-ABA היה 600 ppm, והטיפול ניתן עם 0.25% Triton. אשכולות הענבים הוכנסו לטמפרטורות של 10°C, 25°C, ו-38°C למשך 12 שעות לפני או אחרי הטיפול ב-ABA. משך הניסוי היה שבוע.

ב. הבנת התהליך שבו מגנזיום גורם לעליה בריכוז האנטוציאנינים בתרבית תאי Gamey Red.

הניסויים עם תרבית התאים התבצעו בחדר גידול עם תנאי טמפרטורה ותאורה קבועים. הטמפרטורה בחדר הגידול היא 25°C והתאורה ממקור של נורות פלואורסנטיות הייתה 20-30 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ כתלות במיקום המיכלים בחדר. בשנת המחקר הראשונה הראינו שמגנזיום ניטראט גורם להצטברות גבוהה של אנטוציאנינים בתאי התרבית (**איור 8**) ושהיון הגורם לתופעה זו הוא מגנזיום (**6**). בתמונות מיקרוסקופ של התאים 10 ימים לאחר התחלת הטיפול, נראה שתאים שטופלו ב- 20mM ו-40mM מגנזיום ניטראט היו הרבה יותר אדומים מתאי ביקורת, וריכוז של 50mM כבר גרם להרס התאים (**6**).

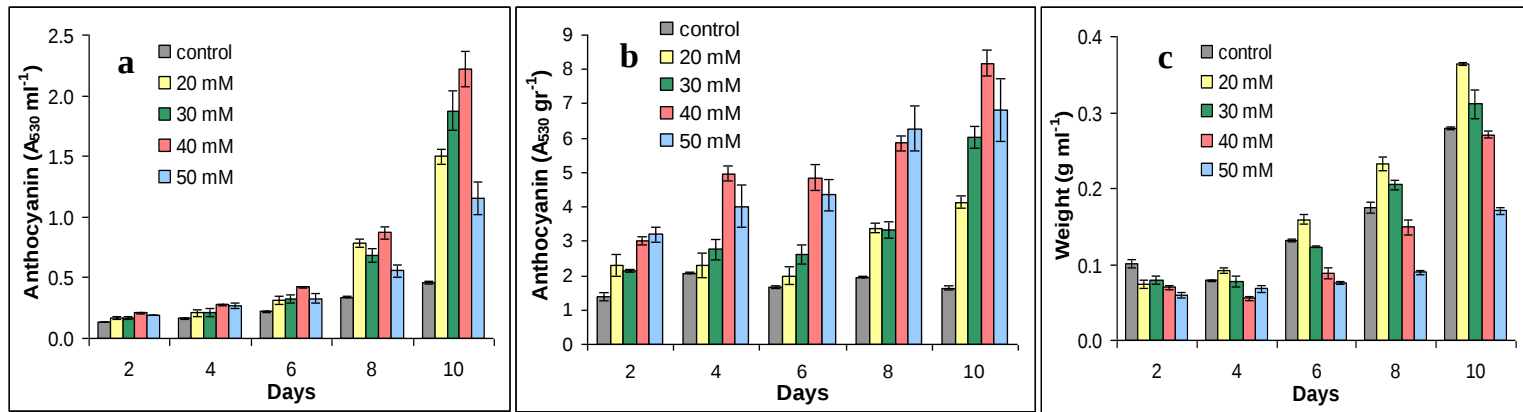
על מנת לקבוע האם יוני מגנזיום גורמים לאינדוקציה של סינתזת אנטוציאנינים או שהיונים רק מייצבים את הפיגמנטים שנוצרו ועל ידי כך מאריכים את זמן מחצית החיים שלהם, ערכנו ניסוי של real time PCR של מספר גנים לאורך מסלול הביוסינתזה, לבחון האם רמתם משתנה כתוצאה מהטיפול במגנזיום. לשם כך תוכננו פריימרים בשנה הראשונה לחמישה גנים, על פי הרצפים ידועים של גנים אלו מגפן. ניסויי ה-real time התבצעו בשנת המחקר השנייה ומסוכמים **באיור 9** ניתן לראות שהעלייה המשמעותית היחידה ברמת תעתיקים היא של הגן CHS, ועליה זו היא רק של 20-30% בימים 6 ו-8 לאחר התחלת הטיפול. שני גנים נוספים בהם נראתה עליה של כ-10% ברמת התעתיקים הם DRR ו-F3'H. עליה מינורית זו ברמות תעתיקי גנים במסלול הביוסינתזה של אנטוציאנינים לא יכולה להסביר ההצטברות הגבוהה (פי 3-5) של הפיגמנטים בעקבות הטיפול. מכאן שכנראה ההשפעה העיקרית של מגנזיום על אנטוציאנינים היא הגברת יציבותם ולא הגברת הסינתזה שלהם.

לבחינה ישירה של השפעת מגנזיום על פירוק אנטוציאנינים בתאי תרבית הגפן, תהליך יצירת הפיגמנטים עוכב על ידי תוספת של מעכב ספציפי לאנזים PAL, S-carvone. מעכב PAL הוסף ביום 7 לאחר התחלת הניסוי (**איור 10**). ניתן לראות באיור שיש ירידה של כ-30% בריכוז האנטוציאנינים מיום 7 ועד לסוף הניסוי ביום 12, כתוצאה מפירוק הפיגמנטים. מכאן שכנראה יש פירוק מתמיד של הפיגמנטים גם בזמן שהם נוצרים, וריכוז הפיגמנטים בתאים נקבע גם מקצב יצירתם וגם מקצב פירוקם. יתכן שתהליך זה של פירוק תלוי בתנאי הגידול, ומושפע מעוצמות אור ומתנאי הטמפרטורה. השפעת מגנזיום על תהליך הפירוק נבחן על ידי תוספת תמיסת מגנזיום יחד עם מעכב האנזים (**איור 10**). הטיפול במגנזיום מנע לחלוטין את תהליך פירוק הפיגמנטים. חשוב לציין שהשפעת S-carvone הייתה חולפת כי חומר זה נדיף ופעילות PAL חזרה לרמות של 30 עד 45% עד ליום 10 של הניסוי (**איור 10**). מעכב PAL עיכב זמנית גם את גדילת התאים, כצפוי, במידה דומה עם ובלי טיפול במגנזיום. העובדה שהשפעת המעכב הייתה זמנית אפשרה שמירה על חיוניות התאים אבל גם צמצמה את ההבדלים בין תאים מטופלים במגנזיום לאלו שלא טופלו.

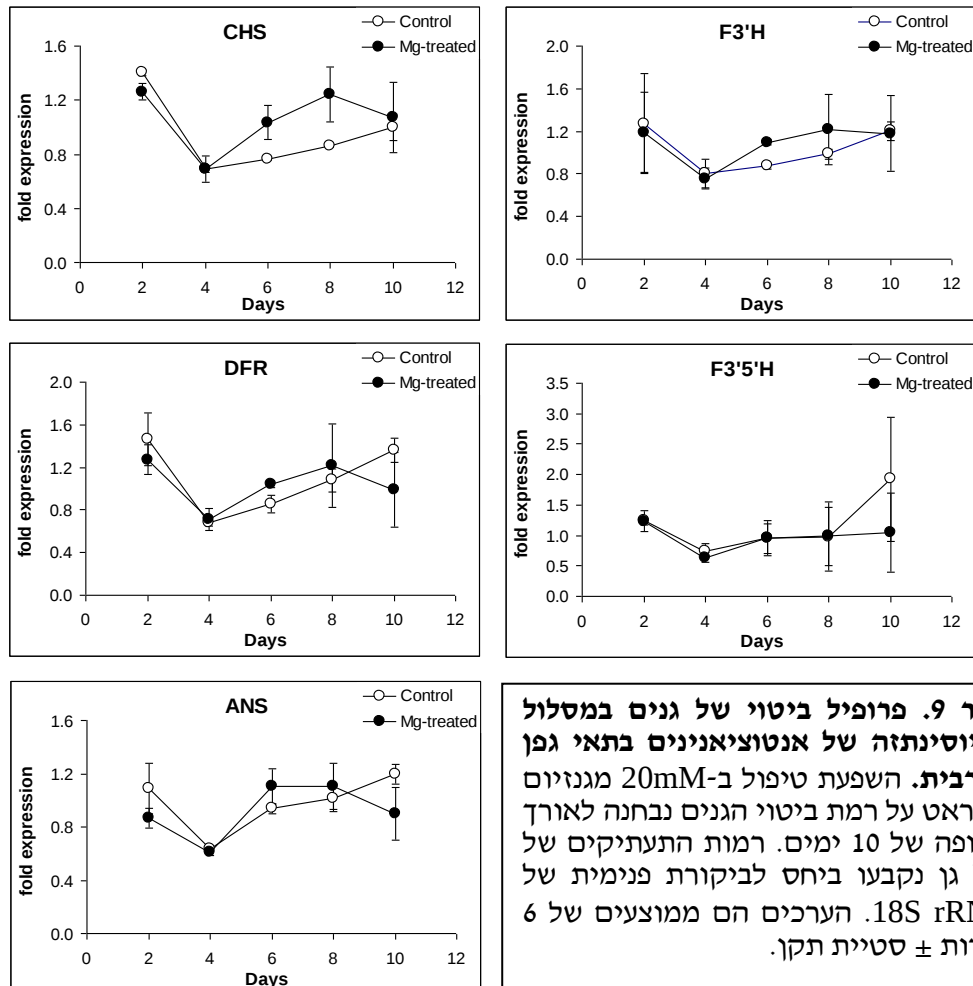
בשנה השלישית בחנו את השפעת הטיפול במגנזיום על הרכב האנטוציאנינים הספציפיים בתרבית. לשם כך אפיינו את האנטוציאנינים השונים בתרבית התאים בעזרת UPLC-QTOF-MS-MS (**טבלה 1**). רשימת האנטוציאנינים הייתה זהה בין תאי הביקורת לתאים מטופלים במגנזיום, עם 14 אנטוציאנינים שונים שנוצרו מ-5 אגליקונים (ציאנידין, פאונידין, דלפינידין, צלבידין ופטונידין). העליה הדרמטית בריכוז האנטוציאנינים כתוצאה מהטיפול במגנזיום גרם להבדל ביחסים בין האנטוציאנינים השונים: הפיגמנטים בעלי המשקל המולקולרי הנמוך יותר (אגליקונים או

אנטוציאנינים עם תוספת של מולקולת סוכר אחת בלבד), עלו בריכוזם היחסי, בזמן שרוב הפיגמנטים עם יותר מתוסף אחד על האגליקון, נשארו בריכוז יחסי דומה או נמוך מתאי הביקורת. מכאן שהמולקולות היציבות יותר הושפעו פחות מהטיפול במגנזיום. תוצאה זו מחזקת את ההיפוטזה שלנו שיוני מגנזיום יוצרים קומפלקסים עם האנטוציאנינים ועל ידי כך מייצבים אותם.

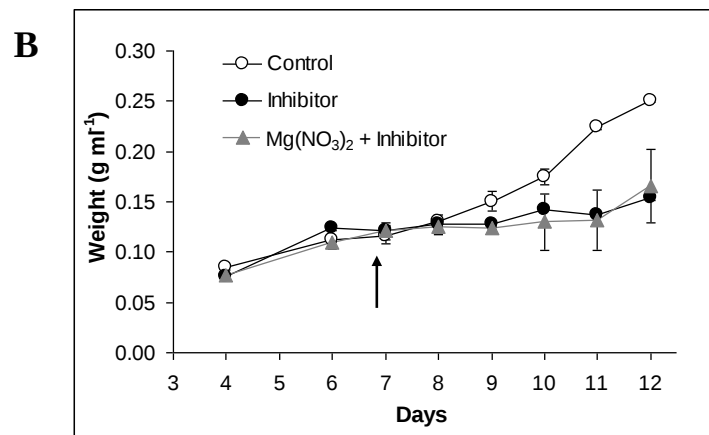
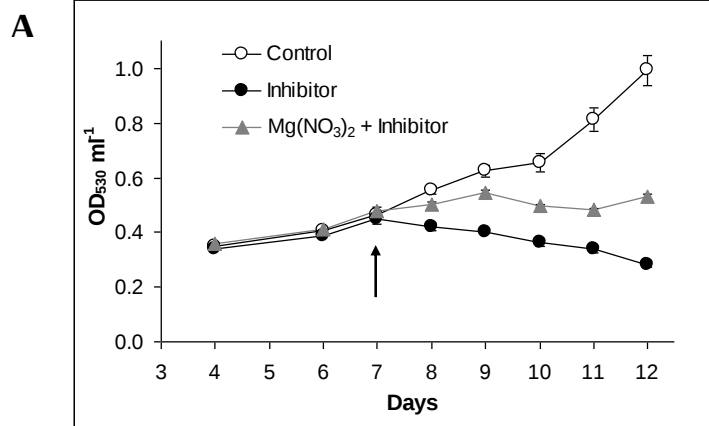
(6).



איור 8 השפעת טיפולים במגנזיום על ריכוז אנטוציאנינים וגידול תאי תרבות Gamay Red. ריכוז האנטוציאנינים נקבע לנפח תמיסה ולמשקל טרי של תאים, קצב גידול התאים נקבע על ידי משקל טרי שלהם. הערכים הם ממוצאים של 4 חזרות $\pm$ סטיית תקן.



איור 9. פרופיל ביטוי של גנים במסלול הביוסינתזה של אנטוציאנינים בתאי גפן בתרבות. השפעת טיפול ב-20mM מגנזיום ניטראט על רמת ביטוי הגנים נבחנה לאורך תקופה של 10 ימים. רמות התעתיקים של כול גן נקבעו ביחס לביקורת פנימית של 18S rRNA. הערכים הם ממוצעים של 6 חזרות $\pm$ סטיית תקן.



Treatment	Days			
	7	8	10	12
Control	1.68	1.52	1.79	1.73
	±0.34	±0.24	±0.32	±0.44
MgNO ₃	1.44	1.37	1.67	1.40
	±0.28	±0.34	±0.27	±0.17
S-carvone	1.67	0	0.51	1.01
	±0.38	±0	±0.26	±0.12
MgNO ₃ + S-carvone	1.40	0	0.61	1.28
	±0.27	±0	±0.33	±0.14

איור 10. השפעת טיפול במגנזיום ועיכוב PAL על הצטברות אנטוציאנינים בתרבית תאי גפן. רמות האנטוציאנינים (A) ומשקל התאים (B) נקבעו לאחר הוספת מעכב PAL, S-carvone עם ובלי 20mM מגנזיום ניטראט, ביום 7 ממהול התאים. השפעה הזמנית של המעכב הנדיף נקבעה על ידי מדידת פעילות PAL ($\mu\text{mol E-cinnamic acid mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) בתאים בזמן הניסוי. הערכים הם ממוצעים של 4 חזרות $\pm$ סטיית תקן.

Anthocyanin / Tentative identification	Retention time	Molecular weight found	Molecular Formula	Level of confidence ^a	Peak area/gFW	
					Control	Magnesium
Cyanidin	2.31	287.0555	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	A	95 ± 8	256 ± 13
Peonidin	2.55	301.0718	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	A	281 ± 29	716 ± 33
Cyanidin-3-O-glucoside	1.74	449.1088	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	A	341 ± 43	1065 ± 39
Peonidin-3-O-glucoside	1.96	463.1239	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	B	1320 ± 140	1953 ± 72
Delphinidin-3-O-glucoside	2.63	465.1035	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	C	21 ± 2	134 ± 6
Malvidin-3-O-glucoside	2.05	493.1367	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	B	8 ± 2	18 ± 1
Cyanidin-3-O-coumaroyl-glucoside	2.79	595.1439	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	B	3850 ± 128	3906 ± 92
Peonidin-3-O-coumaroyl-glucoside	2.99	609.1599	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	B	7361 ± 114	6069 ± 207
Peonidin-3-O-caffeoyl-glucoside	2.72	625.1550	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	C	801 ± 55	359 ± 25
Petunidin-3-O-rutinoside	1.81	625.1784	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₆	C	70 ± 11	20 ± 1
Petunidin-3-O-caffeoyl-glucoside; or Delphinidin-3-O-feruloyl-glucoside	2.68	641.1568	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₅	C	14 ± 2	2.2 ± 0.3
Cyanidin-3-O-coumaroyl-5-diglucoside	2.30	757.1997	C ₃₆ H ₃₇ O ₁₈	B	21 ± 1	48 ± 1
Peonidin-3-O-coumaroyl-5-diglucoside	2.36	771.2147	C ₃₇ H ₃₉ O ₁₈	C	132 ± 5	131 ± 3
Petunidin-3-O-caffeoyl-5-diglucoside; or Delphinidin-3-O-feruloyl-5-diglucoside	1.68	803.2031	C ₃₇ H ₃₉ O ₂₀	C	23 ± 3	2.1 ± 0.4

טבלה 1. השפעת טיפול במגנזיום על הרכב האנטוציאנינים בתאי תרבית. ריכוז האנטוציאנינים היחסי נקבע 10 ימים לאחר הוספת 20 mM Mg(NO₃)₂ לתרבית. ריכוז האנטוציאנינים הכללי עלה בפי שלוש כתוצאה מהטיפול במגנזיום. הערכים הם ממוצעים של 4 חזרות ± סטיית תקן.

מסקנות והשלכותיהן על המשך העבודה

הממצאים העיקריים של המחקר הם: א. ניתן לקבל התפתחות פיתוח מערכת של ענבים מנותקים המאפשרת בחינת השפעת חומרים שונים על הפיגמנטציה של קליפות הפרי. ב. ישנה הגברה של הפיגמנטציה בענבים מנותקים ובכרם כתוצאה מטיפול ב-ABA. ג. בטיפול משולב של גיברלין ו-ABA הן בכרם והן בענבים מנותקים, היה דומה מבחינת הפיגמנטציה לטיפול ב-ABA בלבד. הגיברלין לא פגע באפקט של ABA על ריכוז האנטוציאנינים. ד. טיפול באתרל, המגביר פיגמנטציה בכרם, לא משפיע על הפיגמנטציה בענבים מנותקים. בשילוב של טיפול באתרל לוב-ABA האפקט על הפיגמנטציה היה כמו בטיפול של ABA בלבד. ה. טיפול ב-ABA לפני עקת חום משפרת פיגמנטציה ביחס לענבים לא מטופלים. מערכת זו של ענבים מנותקים עושה לשמש בהמשך לבחינת טיפולים שונים על התפתחות צבע הענבים. מתוצאות המחקר נראה שהמערכת אמינה ומדויקת מאוד ומאפשרת קבלת תוצאות ברורות לגבי ההשפעה הישירה על רקמת הפרי. כמובן שמערכת זו מקדימה בחינה בכרם ושהתוצאות בכרם יכולות להשתנות בגלל אפקטים של הצמח השלם. דוגמא לכך היא הגברת הפיגמנטציה של ענבים בכרם כתוצאה מטיפול באתרל, וחוסר השפעה של אתרל על התפתחות הצבע בענבים מנותקים.

במערכת של תאי התרבית, הראינו שמגנזיום מגביר פיגמנטציה באופן ניכר מבלי להגביר את הסינתזה של הפיגמנטים. יוני המגנזיום כנראה מעלים את ריכוז הפיגמנטים על ידי הגברת

יצבותם בתאים, הריכוז היחסי של אנטוציאנינים פחות יציבים עלתה בטיפול מגנזיום. מסקנה חשובה מעבודה זו היא שיש פירוק של אנטוציאנינים בתאי גפן ושמציאת דרכים לעכב פירוק זה עשויה לשפר באופן ניכר את רמת הפיגמנטים האדומים בענבים. התוצאה חשובה במיוחד לאור התחממות כדור הארץ ובעיה הולכת וגוברת של ריכוז נמוך של אנטוציאנינים במוצרים חקלאיים.

ספרות מצוטטת:

1. Winkler AJ, Cook JA, Kliewer WM and Lider LA (1962). Development and composition of grapes. In: General Votocitire/ Berkeley UC press, 141-196.
2. Yamane T, Jeong ST, Goto-Yamanoto N, Koshita Y and Kobayashi S (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. America J. of Enology and Viticulture 57, 54-59.
3. Shaked-Sachray L., Weiss D., Reuveni M., Nissim-Levi A. and Oren-Shamir M. (2002). Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to Magnesium treatment. Physiol. Plant, 114: 559-565.
4. Mori, k., Goto-Yamamoto, n., Kitayama, M., and Hashizume, k. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. J. Exp. Bot. 58: 1935-1945.
5. ליכטר א., זוטחי י., קפלנוב ט., שמואל-חי ס., שחם ז., ולוריא ס. 2004. יישום אתרל לשיפור הצבע של ענבי המאכל 'פלאם סידלס' ו'רד גלוב'. עלון הנוטע 6, 213-218.
6. Sinilal B., Ovadia R., Nissim-Levi N., Perl A., Weissberg M. and **Oren-Shamir M.** Increased accumulation and decreased catabolism of anthocyanins in red grape cell suspension due to magnesium treatment. Planta, in press.

תשובות לשאלות מנחות

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח

א. בחינת דרכים להעלאת ריכוז האנטוציאנינים בקליפות ענבים אדומים. ב. המשך הבנת התהליך בו מגנזיום גורם לעליה בריכוז האנטוציאנינים בתרבות תאי Gamey Red.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

א. בחינת השפעת טיפול ב-ABA, טיפול משולב של ABA עם גיברלין או אתילן על ענבים מנותקים ועל ענבים בכרם. נמצא שטיפול משולב עם ההורמונים האחרים לא פגע בשיפור עוצמת הפיגמנטציה כתוצאה מטיפול ב-ABA. ב. טיפול ב-ABA לפני עקת חום משפרת את הפיגמנטציה ביחס לענבים לא מטופלים. ג. בחינת השפעת טיפול במגנזיום על תאי תרבות. נמצא שהטיפול גרם להגברת יציבות הפיגמנטים ועל ידי כך לעליה דרמטית בריכוזם.

3. המסקנות המדעיות והשלכותיהן להמשך המחקר.

א. טיפול ב-ABA מגביר את הפיגמנטציה בענבים כן בכרם והן בענבים מנותקים. ב. שילוב של טיפול בגיברלין או אתילן עם הטיפול ב-ABA לא פוגע בהגברת הפיגמנטציה. ג. טיפול מקדים של ABA לפני עקת חום משפר פיגמנטציה. ד. הגברת ריכוז האנטוציאנינים בתאי תרבות כתוצאה מטיפול במגנזיום, היא כתוצאה מעליה ביציבות הפיגמנטים ולא כתוצאה מהגברת הסינטזה שלהם.

4. הבעיות שנתרו לפתרון

מערכת הענבים המנותקים מאפשרת בחינה של טיפולים נוספים שונים על תהליך יצירת הצבע בקליפות ענבים, כשלב מקדים לבחינה בכרם. התהליך שבו ABA מגביר פיגמנטציה עוד לא ברור לחלוטין. הוכחה שאכן מגנזיום יוצר קומפלקסים מייצבים עם האנטוציאנינים דורש הוכחה ישירה של בידוד קומפלקסים כאלו מהתאים.

5. הפצת הידע

Lurie S., **Oren-Shamir M.**, Ovadia R., Nissim-Levi A., Kaplunov T., Zutahy Y., Weksler H., and Lichter A. (2009) Absciscic acid improves color development of 'Crimson Seedless' grapes both in the vineyard and on detached berries. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 84, 639-644.

Sinilal B., Ovadia R., Nissim-Levi N., Perl A., Weissberg M. and **Oren-Shamir M.** Increased accumulation and decreased catabolism of anthocyanins in red grape cell suspension due to magnesium treatment Submitted to Planta.

6. אני ממליץ לפרסם את הדו"ח רק בספריות.