

**דו"ח מסכם**

**לתכנית מחקר מספר 430-0199-08**

**בנושא:**

**בחירת אפשרות סלקציית קווי פלפל ובזיל בעלי עמידות משופרת לצינה תוך שימוש בעקת מליחות וחקר מעורבות אנתוציאנינים בעמידות לצינה**

**Use of salt stress selection for improving chilling tolerance in pepper and basil**

**מוגש:**

**לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות**

**מאת:**

**אמנון לרס, אלעזר פליק, דודי קניגסבוך, שאול בורד, ליליאן סונגו וציון אהרון - המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מרכז וולקני, בית דגן  
מיכל שמיר - המחלקה לפרחים, מרכז וולקני, בית דגן  
אילן פארן - המחלקה לירקות, מרכז וולקני, בית דגן**

**Amnon Lers, Elazar Fallik, David Kenigsbuch, Shaul Burd, Lilian Sonogo and Zion Aharon - Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan e-mail: [alers@volcani.agri.gov.il](mailto:alers@volcani.agri.gov.il)**

**Michal Shamir – Dept. of Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan**

**Ilan Paran – Dept. of Vegetable Research, ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan**

**הנני מאשר שהממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים.  
חתימת החוקר \_\_\_\_\_**

**מאי 2011**

**מרכז וולקני, בית-דגן**

תוכן העניינים

<u>עמוד</u>	<u>נושא</u>
3	1. תקציר
3	2. מבוא
4	2.1. מטרת המחקר
4	3. פירוט עיקרי הניסויים כולל דיון
4	3.1. בחינת השונות בעמידות למליחות בעת הגידול בין פרטים של זני בזיל שונים
6	3.2. השפעת טיפולי מלח זמניים על רגישות פלפל לצינה
9	3.3. בחינת השונות בעמידות לעקת מליחות בין זני פלפל שונים
12	3.4. בחינת השונות בעמידות לעקת צינה במהלך אחסון עלים מנותקים בין זני פלפל שונים
13	3.5. בחינת המתאם בין העמידות לעקת צינה במהלך אחסון עלים מנותקים והעמידות לעקת מליחות בעת הגידול בזני פלפל שונים
15	3.6. השפעת תכולת אנטוציאנינים על רגישות עלי עגבנייה לצינה
19	סיכום עם שאלות מנחות לדו"ח המחקר

## תקציר

הצגת הבעיה - נזקי הצינה המתפתחים בעקבות חשיפת רקמות הצמח לטמפרטורה נמוכה מהווים מגבלה משמעותית ביכולת האחסון. בזיל ופלפל הם גידולים חשובים בעלי רגישות גבוהה לקור ונזקי צינה מתפתחים בעת אחסונם בטמפרטורות הנמוכות מסף הרגישות אשר יוצרת מגבלה בשיווקם במיוחד לאור המגמה לעבור למשלוחי ים, בצורך ליישום טיפולי קרנטינה וכן מהווה מגבלה במהלך הגידול.

מטרות המחקר – בחינת אפשרות השימוש בעמידות מוגברת לעקת מליחות כסמן פנוטיפי לברור מוקדם ויעיל של זנים העמידים לצינה וכן לבחון את מידת השפעת תכולת אנטוציאנינים גבוהה על הרגישות לנזקי צינה.

שיטות העבודה – השוואת צמחים בעלי תכולת אנטוציאנינים גבוהה ונמוכה; גידול צמחים בתנאים שונים וברמות מליחות שונות ומעקב אחר מדדי גידול; חשיפת עלים מנותקים לטמפרטורות צינה ומעקב אחר ההשפעה על התפתחות נזקי צינה ויזואליים ומדידת התפתחות הנזקים על ידי מעקב אחר דליפת יונים מרקמת העלים באמצעות מד מוליכות ובחינת פעילות אנזימים אנטי-חמצוניים.

תוצאות עיקריות – הן בבזיל והן בפלפל נמצאה שונות במידת הרגישות לעקת צינה ומליחות ובחלק משמעותי מהזנים נמצאה מתאם חיובי בין שתי התכונות. בפלפל המחקר הורחב והודגם מתאם טוב מאוד בין עמידויות זנים שונים הן למליחות והן לצינה. נמצא גם מתאם גבוהה בין העמידות הגבוהה לעקת לפעילות גבוהה של האנזים האנטיאוקסידטיבי קטאלאז. נמצא קשר ברור בין רמת אנטוציאנינים גבוהה לעמידות טובה יותר לצינה במספר מערכות צמחיות וכן הגנה של האנטוציאנינים כנגד עקה חמצונית.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות – הקשר החיובי בין רמת אנטוציאנינים לעמידות לצינה בעלים תומך בהשערה לגבי הקשר בין שני הגורמים ומעודד את בחינתה גם בפירות. נראה שלפחות חלק ממנגנון הפעולה הוא עמידות טובה יותר כנגד עקה חמצונית. לאור המתאם הגבוה יחסית שנמצא בעמידויות לעקת מליחות וצינה יש מקום לבחון יישום שיטה המתבססת על מתאם זה לזיהוי קווים או זנים בעלי עמידות משופרת לצינה. לאור הידוע לגבי תפקידה המרכזי של המערכת האנטיאוקסידטיבית בצמחים במנגנוני העמידות לעקת קור ומליחות כדאי לבחון את מעורבותה בשונות הנראית ואת אפשרות השימוש בגנים או פעילויות ספציפיות המעורבות בתגובה האנטי-חמצונית ככלי לזיהוי קווים בעלי רגישות נמוכה יותר לעקת הצינה.

## 2. מבוא

האחסון בקור הוא אחד הכלים היעילים והידידותיים ביותר הקיימים לשמירת איכות תוצרת חקלאית טרייה לאחר הקטיפה אולם נזקי הצינה המתפתחים בעקבות חשיפת רקמות הצמח לטמפרטורה הנמוכה מסף הרגישות של הצמח מהווים מגבלה משמעותית ביכולת האחסון לאחר הקטיפה. צמחים שונים רגישים במידה שונה לצינה ונראה שרגישות זו תלויה במרכיבים גנטיים וההתאמה לסביבת הגידול האקלימי הטבעי של הצמח שכן במקרים רבים צמחים חקלאיים ממוצא טרופי או סוב-טרופי רגישים במיוחד לצינה באחסון [1]. נזקי הצינה מתבטאים בצורות שונות בפרי או הירק כולל התמוטטות הרקמה, יצירת פגמים בקליפת הפרי, השחרת הרקמה, תהליך התרככות בלתי מאוזן המוביל לרקמה

קמחית והאצה של תהליכי ניתוק והדבקה על ידי פתוגנים. על כן לשיפור העמידות לצינה של תוצרת חקלאית טרייה באחסון יש חשיבות יישומית גבוהה ביותר. בזיל ופלפל הם גידולים חשובים בעלי רגישות גבוהה יחסית לקור היוצרת מגבלה באחסון ובשיווק. הצורך להפחית רגישות גידולים אלו לצינה אף גובר לאור המגמה לעבור למשלוחי ים, הצורך בישום טיפולי קרנטינה וכן המגבלה הקיימת אף במהלך הגידול בטמפרטורות נמוכות. אחת המגבלות בפיתוח זנים משופרים מבחינת יכולת האחסון בקור היא חוסר האפשרות לזהות ביעילות פרטים בעלי תכונות של עמידות מוגברת לעקת צינה. מחקרים רבים מעידים על קיום חפיפה משמעותית במנגנוני העמידות המופעלים בתגובת הצמח לעקות צינה ומליחות [2, 3].

הקשרים בין עקות סביבתיות שונות הן ברמת התגובות לעקות והן ברמת המנגנונים בצמח המעורבים בהקניית העמידות לעקות אלו מתועדים במחקרים רבים. עמידות מוגברת לעקה סביבתית אחת בצמחים נמצאה במקרים רבים מלווה בעמידות מוגברת כנגד עקה/ות סביבתיות אחרות, כולל עקת צינה, קפיאה, יובש וחום [4]. ממחקרים מולקולאריים שבוצעו להבנת המנגנונים העומדים בבסיס תגובת הצמח לעקות והפעלת הגנים הנחוצים להשראת מנגנוני העמידות נראה שקיימים קשרים, ולעיתים אף חפיפה ושיתוף, גם במנגנוני העמידות עצמם וגם במערכת הבקרה המולקולארית ושרשרת מעבר האותות כתגובה לעקות השונות והגנים הספציפיים המופעלים [5]. בשנים האחרונות דווח על שיפור בו-זמני בעמידות לצינה ובעמידות למליחות בצמחים טרנסגניים כתוצאה משינוי בביטוי של גן יחיד ממצא התומך גם הוא בקיום קשר/חפיפה במנגנוני ההגנה בפני שתי העקות [6-9]. נראה שאחד המנגנונים המרכזיים המופעלים בתגובה גם לעקת מלח וגם לעקת צינה הוא המנגנון האנטי-אוקסידטיבי האחראי לנטרול רדיקלים העולים ברמתם בעקבות החשיפה לעקות ואשר יכול להיות רכיב משותף בעמידות לשתי העקות [10, 11]. על בסיס הידע שהצטבר בספרות ותוצאות הקדמיות שלנו המעידות בבזיל על חפיפה בתגובות לעקת מלח וצינה נערך מחקר זה המיועד לבחון את השימוש בחשיפת צמחים לעקת מלח ככלי לזיהוי קווים בעלי עמידות משופרת לצינה.

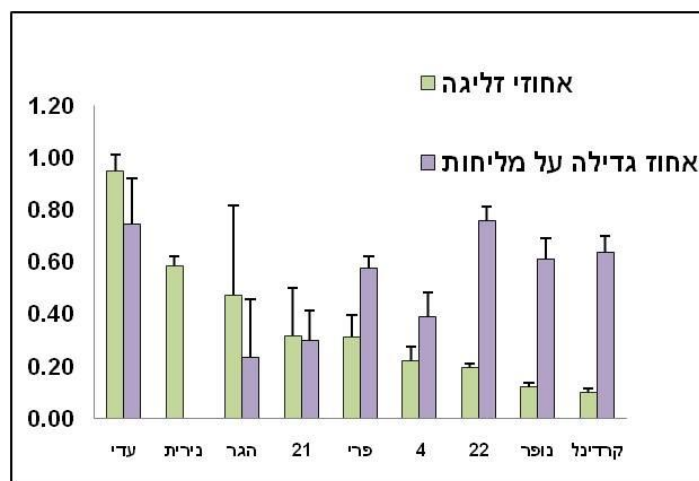
**מטרות המחקר** – המחקר נועד לבחון את אפשרות השימוש בעמידות מוגברת לעקת מליחות כסמן פנוטיפי לבירור מוקדם ויעיל של זנים העמידים לצינה וכן לבחון את מידת השפעת תכולת אנתוציאנינים גבוהה על הרגישות לנזקי צינה.

### **3. פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדוח כולל דיון**

#### **3.1. בחינת השונות בעמידות למליחות בעת הגידול בין פרטים של זני בזיל שונים**

בוצע מחקר לבחינת קיום מתאם בין רגישות הבזיל לצינה בעת האחסון בטמפרטורה נמוכה לבין הרגישות לתנאי מליחות גבוהים מתוך כוונה לנסות ולאשש את ההיפותיזה שלפחות בחלק מהמקרים יהיה מתאם שיכול להוות בסיס לסלקציית זנים בעלי תכונות עדיפות הן מבחינת איכות התוצרת החקלאית לאחר הקטיפה והן מבחינת ההתמודדות עם תנאי גידול בעייתיים מבחינת רמת המלח. תוצאות הניסויים הדגימו, בדומה לתצפיות הראשונות שכבר התקבלו, שבבזיל קיימת שונות גנטית ברמה גבוהה מאוד שהתבטאה בשונות גבוהה בין הזנים הן לגבי מידת הרגישות לצינה,

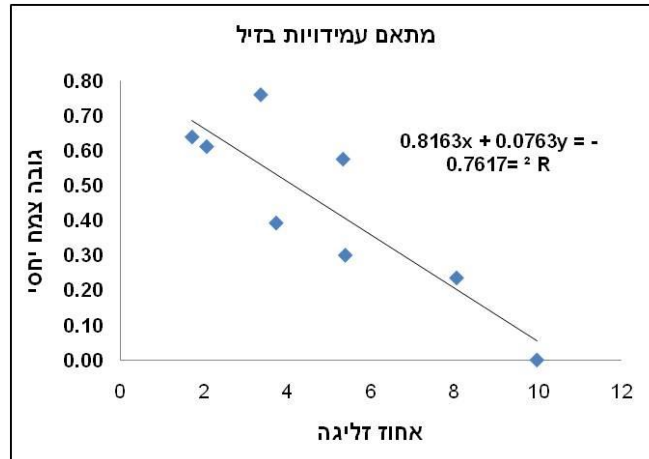
כפי שמתבטאת בקצב זליגת אלקטרוליטים בעלים שנחשפו לצינה המהווה מדד יעיל [12], והן מבחינת הרגישות לתנאי מליחות כפי שהתבטא במדדי גדילה בעת חשיפת הצמחים לתנאי מליחות. הניסויים בוצעו תוך שימוש במערכת גידול הידרופונית שכוילה ומאפשרת ביצוע ניסויים תוך שמירה על תנאי גידול דומים ומובילה להקטנת השונות הנובעת מתנאי גידול והתפתחות של הצמחים. נעשה שימוש ב-10 זני בזיל שהתקבלו מד"ר נתיב דודאי וכללו את הזנים: 4, 9, 21, 22, נופר, נירית, עדי, קרדינל, הגר ופרי. זרעי הבזיל הונבטו על גבי מצע פרלייט המכיל תמיסת דשן מהולה ולאחר התפתחות מלאה של הפסיגים הועברו לגידול הידרופוני תוך הנחת הנבטים במקטעי ספוג המונחים בתוך מגשי שתילה בתוך מיכלי פלסטיק המכילים תמיסת דשן מהולה. לאחר מספר ימים בהם התבססו הנבטים במצע ההידרופוני תמיסת הדשן הוחלפה במצע דשן בתוספת נתון כלוריד (NaCl) בריכוז סופי של 75 mM. ריכוז זה נקבע לאחר מספר ניסויים בהם נבחנו מספר ריכוזים סביב ה-100 mM על מנת לקבל פגיעה מזערית בהתפתחות הצמחים יחד עם קבלת השפעה על קצב הגידול והתפתחות של הצמחים. בזנים הגר עדי ונירית התעוררה בעיה בזמן ביצוע הניסויים המקבילים לבחינת הרגישות לצינה שכן הבחנו באיבוד מים מהיר מאוד ועל כן לא היה ניתן לקבל תוצאות בעלות רמת ודאות גבוהה עבור זנים אלו.



**איור 1. השוואת זני בזיל שונים לרגישותם לצינה באחסון של עלים מנותקים ורגישות התפתחות הצמיחה לתנאי מליחות גבוהים בגידול הידרופוני.** להשוואת השפעת הצינה, עלים מנותקים הודגרו בקור ונמדדו ערכי זליגת האלקטרוליטים בזמן נתון. להשוואת השפעת מליחות על התפתחות הצמחים נערך מעקב אחרי גדילתם כגון גובה. הערכים המוצגים הם יחסיים להשוואתם בין הזנים.

תוצאות הניסויים השונים, ותוצאות מאחד מהם, מובאות באיור 1, מדגימות שוב את השונות ומעידות שבחלק מהזנים, כגון בקרדינל ונופר, יש מתאם חיובי בין מידת הרגישות לצינה בעלים המנותקים לבין מידת הרגישות למליחות במהלך הגידול. באיור 2 מוצגות התוצאות לגבי המתאם הקיים בין שתי התכונות אשר מדגימות מתאם טוב ביניהן. צמחי זנים אשר הראו גידול טוב בתנאי מליחות וגובה הצמח בתנאי מליחות היה דומה לזה שנמדד בתנאי גידול אופטימאליים ללא מליחות נטו להיות פחות רגישים לצינה על פי מדד זליגת היונים שהראה זליגה נמוכה יחסית במדידה שנערכה

לאחר הדגרת העלים המנותקים מזנים אלו בטמפרטורה נמוכה של 8°C בחושך. תוצאות אלו תומכות בהיפותזה הנבחנת במחקר זה לגבי קיום מתאם כזה.



איור 2. מתאם בין מידת ההשפעה של מליחות גבוהה על גדילת זני בזיל שונים לבין רגישותם של זנים אלו לטמפרטורת צינה כפי שהתבטא ברמת זליגת אלקטרוליטים מעלים מנותקים שנחשפו לטמפרטורת צינה של 8 מ"צ.

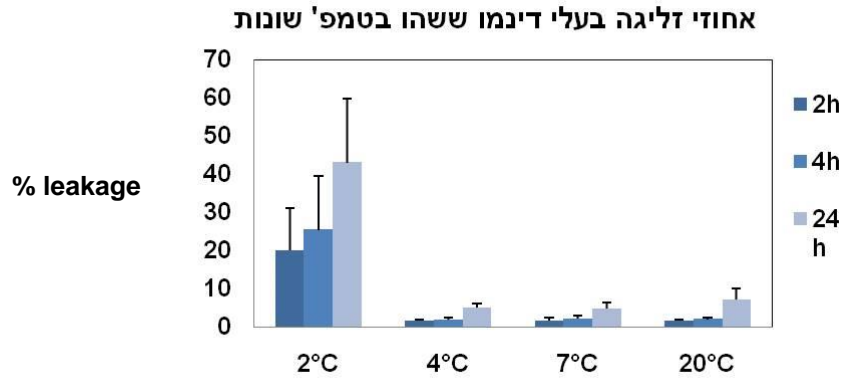
במהלך הניסויים עם קווי הבזיל השונים נמצא שקיימת שונות רבה יחסית בהתנהגותם הפיזיולוגית בניסויים השונים בתגובתם לעקות המליחות והצינה. שונות זו כנראה מקורה בכך שהקווים השונים עדיין אינם יציבים מספיק מהבחינה הגנטית ולכן בניסויים חוזרים התוצאות שהתקבלו לא היו מספיק הדירות. שונות זו נמצאה גם במחקרים קודמים שבוצעו תוך שימוש בקווי בזיל שונים ועל כן החלטנו להתמקד יותר בהמשך המחקר במערכת צמחי הפלפל. יחד עם זאת התוצאות שנמצאו בבזיל בהחלט תומכים בקיום מתאם בין תכונות הרגישות למליחות ולצינה בצמח זה.

### 3.2. השפעת טיפולי מלח זמניים על רגישות פלפל לצינה

בעבר הראינו שטיפולי מלח זמניים, למשך מספר ימים לפני האסיף, הובילו לשיפור עמידות הבזיל לצינה לאחר אחסון העלים בטמפרטורה נמוכה. על מנת לבחון אם האם גם בפלפל ניתן לקבל השפעה של טיפול במלח על הרגישות לצינה בוצעו ניסויים תוך שימוש בשתילי פלפל מסחרי משני זנים עיקריים: 7158, פלפל אדום, דינמו, זן צהוב. השתילים הצעירים הוזמנו ממשלתל חישתיל וגודלו בחממה במכון וולקני בעציצי אדמה תוך חשיפתם להשקיה במים המכילים מלח (NaCl) בריכוזים שונים למשך 7-10 ימים לפני לקיחת דגימות של עלים לבחינת ההשפעה על מידת הרגישות לצינה תוך שימוש במדד זליגת האלקטרוליטים בדומה למה שבוצע בבזיל.

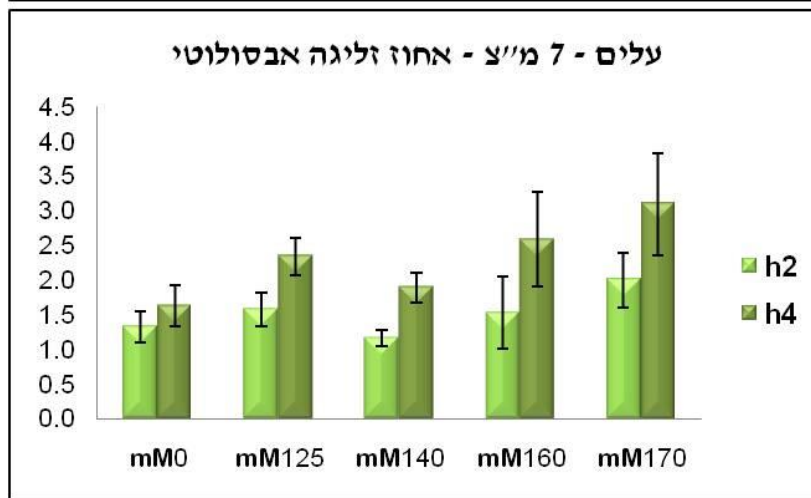
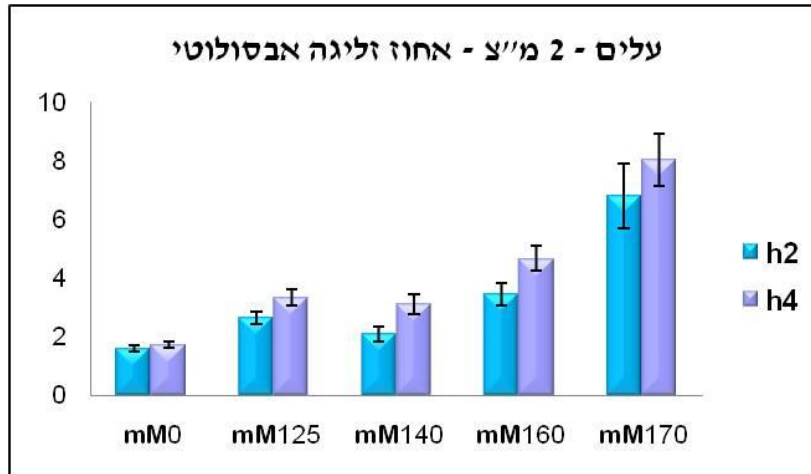
בשלב ראשון בוצעו ניסויי כיוול על מנת לקבוע את טמפרטורות הצינה המתאימות על מנת לאפשר מעקב אחר מידת הרגישות לצינה תוך מדידת קצב זליגת אלקטרוליטים. תוצאות ניסוי כזה לדוגמא מובאות באיור 3 ולפיהן נראה שבתנאי הניסוי יש צורך להדגיר את העלים המנותקים בהם נבחנת השפעת טיפול המלח המקדים בתנאי קור של 2°C למשך 5-7 ימים ולאחר מכן הדגרה נוספת למשך 1-2 ימים בטמפרטורה של 20°C. ניסוי זה הראה על רגישות

בטמפרטורה של 2 מ"צ. יחד עם זאת ניסויים נוספים הראו על רגישות לטמפרטורות קצת יותר גבוהות ועל כן הניסויים לבחינת השפעת טמפרטורה נמוכה בוצעו בדרך כלל תוך הדגרת העלים בטמפרטורות שבין 2-7 מ"צ.



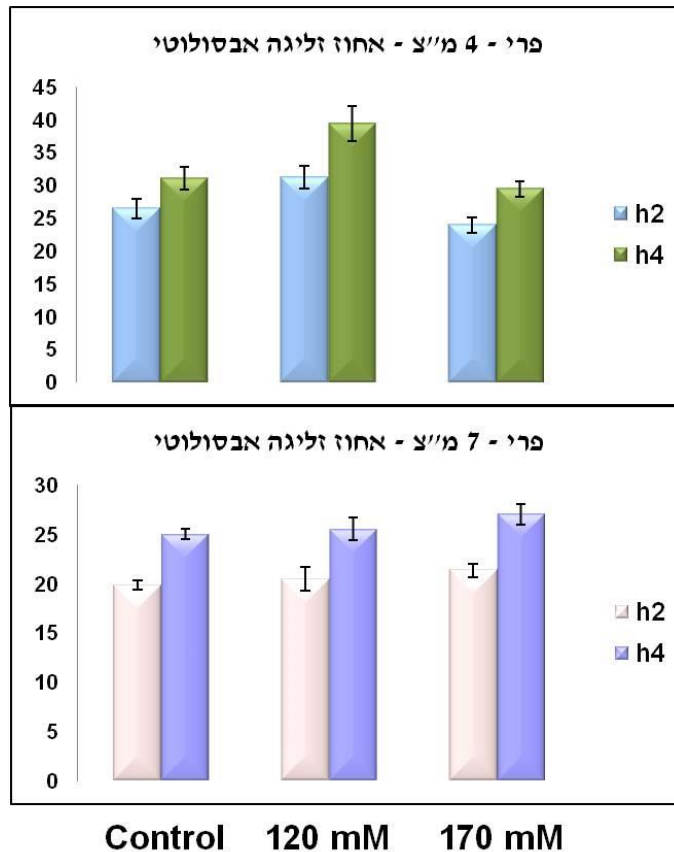
איור 3. השפעת הדגרת עלי פלפל מנותקים מהזון דינמו בטמפרטורות צינה שונות על רמת זליגת אלקטרוליטים.

בוצעו ניסויים בשני הזנים, האדום והצהוב, בהם טופלו צמחים צעירים בעלי כ-8 עלים לאחר שגודלו בחממה במכון וולקני בעציצי אדמה מוכנה בנפח של כ-150 מ"ל והושקו שבוע ימים לפני לקיחת דגימות עלים או פירות פעמיים ביום בנפח של 50 מ"ל מים המכיל ריכוז מלח מתאים. לניסוי השפעה על הרגישות לצינה נלקחו עלים במיקום זהה על הצמח ובשלב התפתחותי דומה או פירות שהיו בשלב התפתחותי דומה. התוצאות שהתקבל עבור הניסויים בזן האדום, 7158, מובאות באיור 4 עבור השפעה על העלים ובאיור 5 עבור השפעה על הפרי. בחלק מהניסויים היתה השפעה קטנה לשיפור העמידות לצינה כשהטיפול במלח היה ברמה של 125 mM בדומה לריכוזים שנמצאו אפקטיביים בניסויים דומים בבזיל. אולם השפעה היתה קטנה יחסית ולא היתה הדירה בצורה ברורה בניסויים שונים. במידה וריכוזי המלח היו גבוהים יחסית, מעל ריכוז של 150 mM מלח, נמדדה כבר השפעה שלילית להגברת מידת זליגת האלקטרוליטים שיתכן מאוד וקשורה להשפעה ישירה של עקת המלח על הממברנות בתאי הצמח (איור 4). במספר ניסויים שבוצעו על מנת לבחון את השפעה על שינויים במידת רגישות פרי הפלפל מהצמחים המטופלים לצינה לא נמצאו השפעות מובהקות (איור 5).



**איור 4. השפעת טיפול מלח לפני הקטיפה על רגישות עלי פלפל לצינה.** הצמחים טופלו בריכוזי המלח למשך שבוע ולאחר מכן נדגמו עלים בשלב התפתחותי דומה בצמחים השונים אשר הודגרו בטמפרטורת צינה של 2 או 7 מ"צ. לאחר יום נוסף בטמפרטורה של 20 מ"צ בוצעה מדידת זליגת האלקטרוליטים. באיור מובאות תוצאות המדידה 2 או 4 שעות מתחילת המדידה עבור הטיפולים השונים.





**איור 5. השפעת טיפול מלח לפני הקטיף על רגישות פירות פלפל לצינה.** הצמחים טופלו בריכוזי המלח למשך שבוע ולאחר מכן נדגמו עלים בשלב התפתחותי דומה בצמחים השונים אשר הודגרו בטמפרטורת צינה של 2 או 7 מ"צ. לאחר יום נוסף בטמפרטורה של 20 מ"צ בוצעה מדידת זליגת האלקטרוליטים. באיור מובאות תוצאות המדידה 2 או 4 שעות מתחילת המדידה עבור הטיפולים השונים.

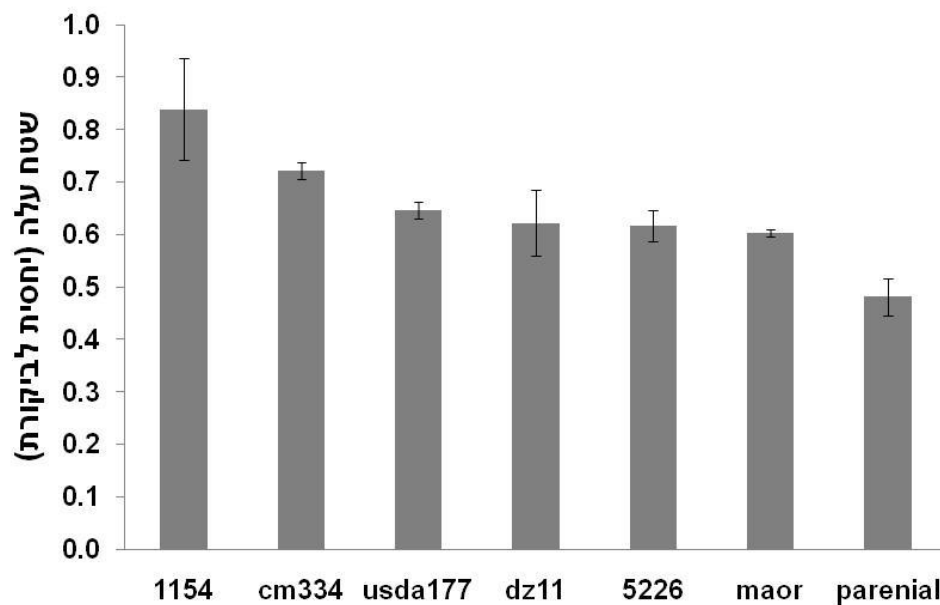
ניסויים דומים בוצעו גם עם זן הפלפל דינמו בעל הפרי הצהוב והתוצאות שאינן מוצגות היו דומות לאלו שהתקבלו בזן 7158.

### 3.3. בחינת השונות בעמידות לעקת מליחות בין זני פלפל שונים

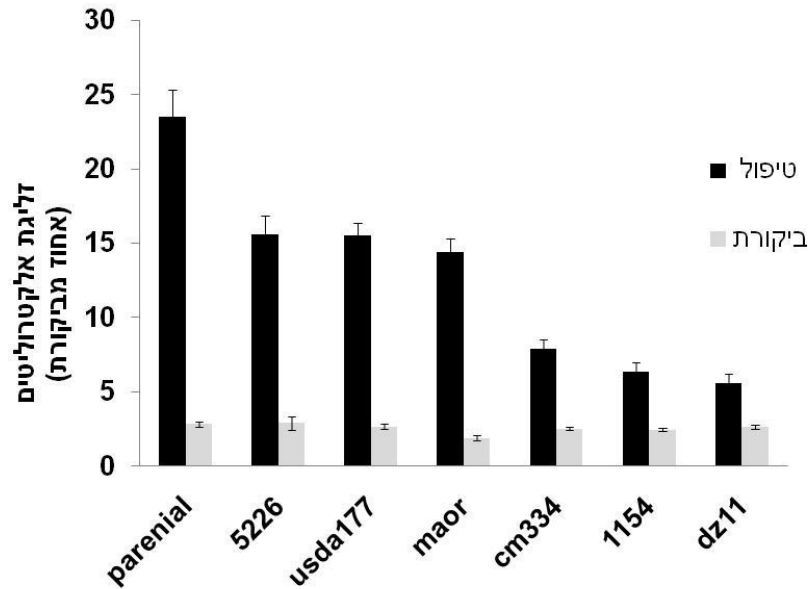
בפלפל המשכנו לבצע את המחקר עם עשרת זני פלפל שהתקבלו מד"ר אילן פארן. הזנים שנכללו במסגרת הניסויים במחקר זה כללו את הזנים: DZ6, PARENIAL, MAOR, CA4, 5226, USDA128, 1154, USDA177, DZ11, CM334. אולם בשלשת הזנים: DZ6, CA4 ו-USDA128 התברר שמתרחש איבוד מים מואץ בניסויים בהם עלים מנותקים נחשפו לאחסון בקור. כיוון שאיבוד מים מואץ זה משפיע על המדדים הנבדקים הוחלט לא לכלול את התוצאות שהתקבלו בניסויים עם זנים אלו.

בוצעו ניסויים בהם עבור כל אחד מהזנים נבחנה בנפרד ההשפעה של עקת מליחות או עקת צינה על מנת לאפיין את ההתנהגות הפיזיולוגית של כל אחד מהם. בהמשך נבדק המתאם בכל אחד מהזנים למידת רגישותו לעקת מליחות או צינה על מנת לבחון על מידת המתאם בין רגישויות אלו. בשלב ראשון נבחנו מדדים שונים על מנת להעריך בצורה טובה את מידת ההשפעה של עקת המליחות כולל משקל רטוב או יבש, גובה הצמח, שטח העלה ומידת זליגת

האלקטרוליטים מרקמת העלים. לצורך ניסויים אלו הצמחים הונבטו וגודלו תחילה בתנאים גידול אופטימאליים בגידול הידרופוני או בגידול על מצע קרקע מוכנה. בניסויים בהם נעשה שימוש בגידול הידרופוני הוסף מלח לריכוז סופי של 120 mM בתוך תמיסת ההזנה בצורה מתמשכת. הצמחים הועברו לגידול הידרופוני לאחר שהתפתחו לנבטים בעלי שני עלים מפותחים בתנאי גידול אופטימאליים ללא עקת מלח. בניסויים בהם הצמחים גודלו במצע קרקע מוכנה, מלח בריכוז 120 mM הוסף לתמיסת מי ההשקיה. לאחר גידול של בין שבוע ל-10 ימים בנוכחות עקת המליחות נבחן השינוי במדדים השונים ביחס לאלו שנמדדו במקביל בצמחים של אותם זני פלפל אשר גדלו בתנאים אופטימאליים, ללא חשיפה לעקת המליחות. מידת ההשפעה של עקת המליחות על המדדים השונים היוותה אינדיקציה למידת רגישותם לעקת המליחות. שני המדדים אשר נמצאו כמייצגים בצורה הטובה וההדירה ביותר את השפעת עקת המליחות היו מדד שטח העלים שקטן ככל שהצמח היה רגיש יותר לעקת המליחות (איור 6) ומדד זליגת האלקטרוליטים מהרקמה שעלה ככל שהצמח היה רגיש יותר לעקה (איור 7).

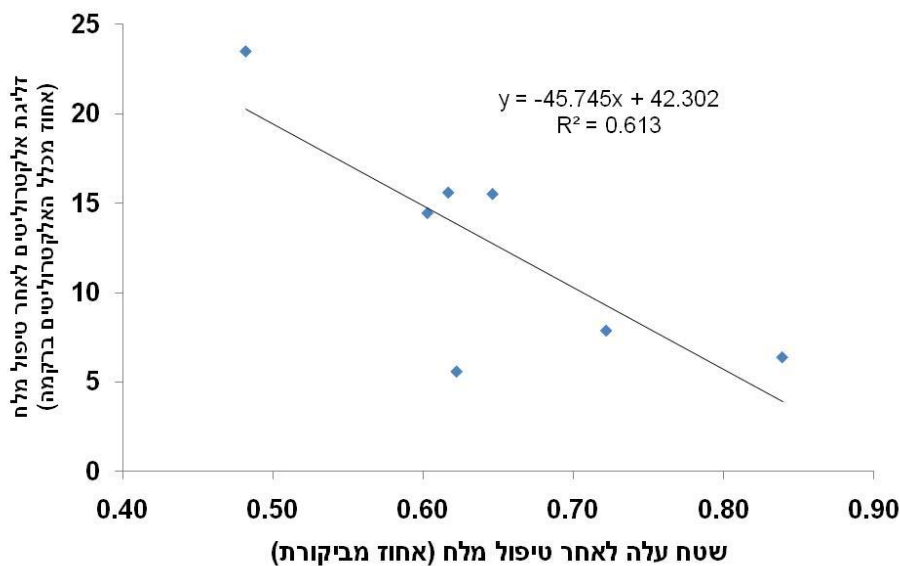


**איור 6. השפעת עקת מליחות על שטח עלי פלפל בזנים שונים.** זני הפלפל השונים גודלו בתנאים אופטימאליים או בחשיפה למליחות (120 mM NaCl) במי ההשקיה. שטח עלים הנמצאים באותה דרגת התפתחות נמדד בצמחים אשר נחשפו לעקת המליחות ובצמחים שגודלו בתנאים אופטימאליים. היחס בין הערכים שנמדדו בזנים השונים מובא.



איור 7. השפעת עקת מליחות על קצב זליגת אלקטרוליטים מרקמת העלים בזני פלפל שונים. זני הפלפל השונים גודלו בתנאים אופטימאליים או בחשיפה למליחות (120 mM NaCl) במי ההשקייה. מדד זליגת האלקטרוליטים נמדד בעלים הנמצאים באותה דרגת התפתחות בצמחים אשר נחשפו לעקת המליחות (טיפול, בשחור) ובצמחים שגודלו בתנאים אופטימאליים (ביקורת, אפור).

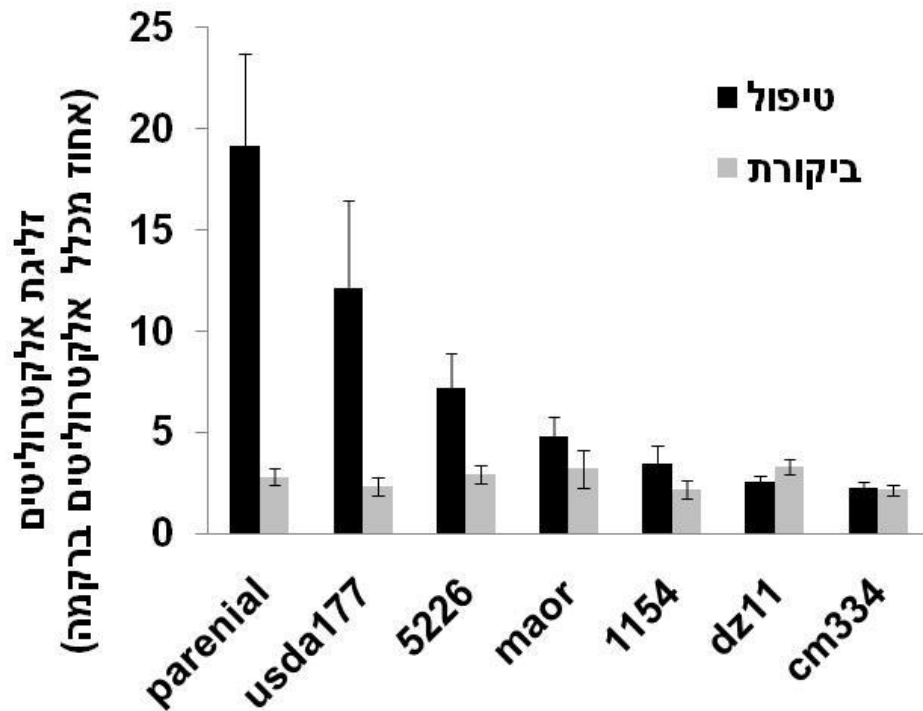
כשני מדדים אלו נבחנים לגבי השתנותם בזני הפלפל השונים נמצא מתאם יחסית גבוה אשר מבסס את היות שני מדדים אלו, שינוי בשטח העלה או מידת קצב זליגת האלקטרוליטים מהרקמה בעקבות החשיפה לעקת המליחות, כמדדים המבטאים בצורה מהימנה את השפעת עקת המליחות על זני הפלפל השונים (איור 8).



איור 8. מתאם בין מדד שינוי בשטח העלים וזליגת האלקטרוליטים מהרקמה בזני הפלפל השונים בעקבות יישום עקת מליחות.

### 3.4. בחינת השונות בעמידות לעקת צינה במהלך אחסון עלים מנותקים בין זני פלפל שונים

בוצעו ניסויים על מנת לקבוע את מידת הרגישות לקור בזני הפלפל השונים שנבדקו למידת רגישותם לעקת מליחות. לצורך זה גודלו זני הפלפל השונים על גבי מצע אדמה מוכנה בתנאי גידול אופטימאליים. מצמחים שהיו בעלי כ-10-8 עלים נלקחו עלים באותו שלב התפתחותי ככל האפשרי (נקבע על פי מיקומם על הגבעול) ועלים מנותקים אלו הודגרו בתנאי צינה בחושך בטמפרטורה של  $6^{\circ}\text{C}$  למשך 8 ימים ולאחר מכן יום נוסף ב-  $20^{\circ}\text{C}$ . רמת זליגת האלקטרוליטים מהרקמה נמדדה עבור עלים אלו לאחר 24 שעות הדגרה במים מזוקקים בטמפרטורה של  $27^{\circ}\text{C}$ . ערכי הנזילות נקבעו כאחוז מתוך סה"כ כלל האלקטרוליטים ברקמה הנמדדת וזאת לאחר קביעת ערך זה באמצעות שחרור כלל האלקטרוליטים על ידי טיפול באוטוקלב של רקמת העלים. אחוז זליגת האלקטרוליטים ידוע כמדד מהימן המבטא את מידת הרגישות לצינה של הרקמה. ערך זליגת האלקטרוליטים גבוה יותר מבטא רגישות גבוהה יותר לצינה. ערכי זליגה גבוהים מבטאים קיום נזק לממבראות של תאי הצמח ואי יכולת לשמור על מידור גם עקב נזקים שניוניים הנובעים משינויים פיזיקאליים במבנה הממבראות וגם כתוצאה מנזקי חימצון אשר גם הם יכולים לפגוע במרכיבי הממבראות ויכולת הטיפולקוד שלהן בשמירה על הומיאוסטזיס בתא.



### איור 9. רגישות זני פלפל שונים לקור כפי שמתבטא במדד זליגת האלקטרוליטים.

עלים מנותקים מזני פלפל שונים אוחסנו בטמפרטורה של  $3^{\circ}\text{C}$  למשך שבוע. לאחר העברה לטמפרטורה של  $20^{\circ}\text{C}$  מ"צ למשך 12 שעות נמדדה רמת זליגת האלקטרוליטים מרקמת התאים. אחוז הזליגה חושב יחסית לסה"כ תכולת האלקטרוליטים ברקמה (טיפול). רמת זליגת האלקטרוליטים מעלים שלא נחשפו לקור נמדדה במקביל (ביקורת). שונות משמעותית נמצאה בין זני הפלפל השונים ברגישותם לקור על פי מדד זה.

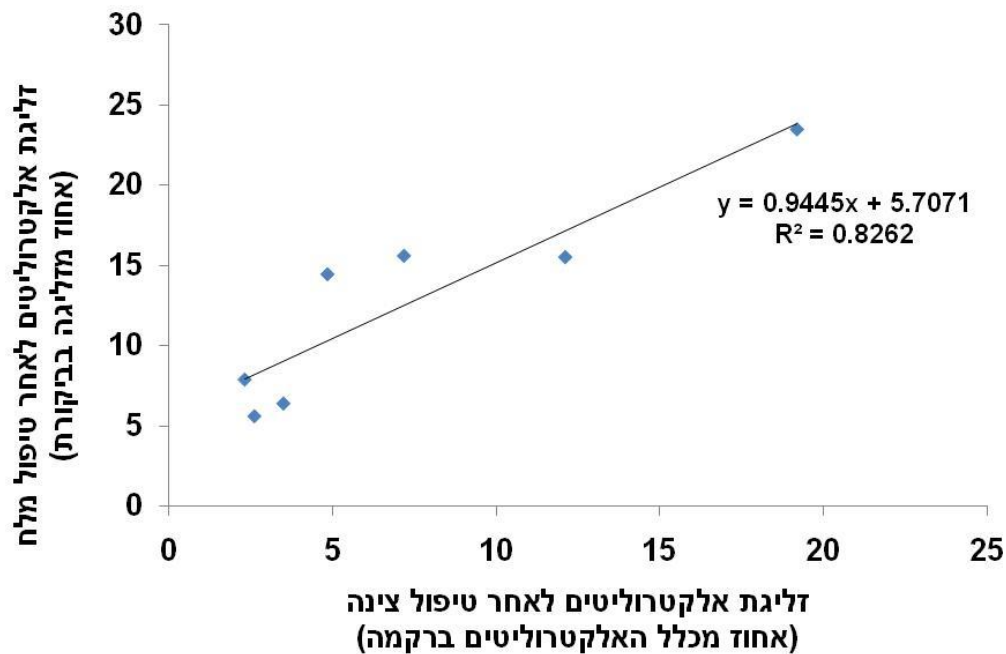
במקביל נערך מעקב אחר התפתחות הצמחים שגדלו תחת עקת מליחות תוך מדידת מספר מדדי התפתחות ותגובה פיזיולוגיים לעקת המליחות. אנליזה זו שימשה על מנת לקבל מדד אמין לקביעת מידת הרגישות של הקווים השונים לעקת המליחות. בניסויים אלו נמצא שלעומת רמה די דומה של זליגת אלקטרוליטים מרקמת העלים בזנים השונים ללא חשיפה לעקת קור החשיפה לטמפרטורת צינה לאורך זמן חשפה הבדלים בין הזנים השונים שכנראה נובעת משונות גנטית (איור 9).

### 3.5. בחינת המתאם בין העמידות לעקת צינה במהלך אחסון עלים מנותקים והעמידות לעקת מליחות בעת הגידול בזני

#### פלפל שונים

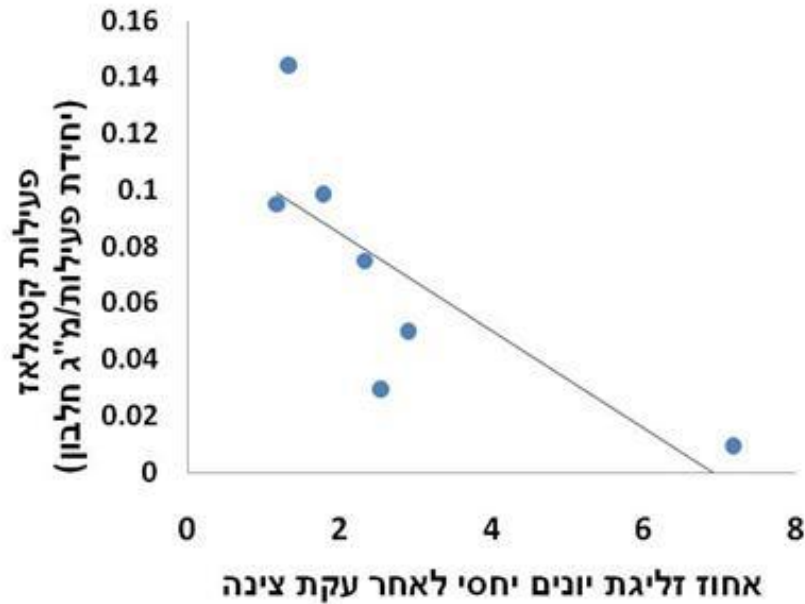
על מנת לבחון את מידת המתאם בין תכונת הרגישות לעקת מליחות לבין הרגישות לצינה השתמשנו במדד זליגת האלקטרוליטים שנמצא כמדד המתאים ביותר למידת הרגישות לשתי עקות שונות אלו. נראה מהתוצאות המובאות באיור 10 שבחלק משמעותי מהזנים הנבדקים יש מתאם גבוה יחסית בין מידת הרגישות לצינה ומידת הרגישות לעקת המליחות. ניתן על כן להניח שקיים יחסית סיכוי גבוה שזנים או קווים של צמחי פלפל בעלי עמידות משופרת לעקת מליחות יהיו גם בעלי תכונת עמידות גבוהה יותר לעקת צינה ויתכן ניתן יהיה לחשוף אותם לטמפרטורות נמוכות יותר במהלך האחסון לאחר הקטיף. ממצא זה נותן גם בסיס לאפשרות להשתמש בעקת מליחות ככלי לזיהוי צמחים בעלי עמידות טובה יותר כנגד עקת הצינה.

כפי שהוזכר בהקדמה מחקרים רבים תומכים בקיום מנגנוני עמידות או חישה משותפים לעקת המליחות והצינה בצמחים ותוצאות מחקרנו זה למעשה גם תומכות בקיום מערכות ביולוגיות או מנגנוני הגנה אשר פועלים כתגובה לעקות אלו ומאפשרות לצמח להתמודד עימן. על מנת לנסות וללמוד על זהות מערכות או מנגנונים אלו בפלפל המשכנו במסגרת מחקר זה לבחון האם ניתן לזהות מרכיבים של המערכת האנטיאוקסידטיבית, שזוהתה בעבר כמערכת המעורבת בתגובה לעקת מלח וצינה, המעורבים בעמידות המוגברת כנגד שתי עקות אלו בזני פלפל מסוימים. הניסויים הראשונים התמקדו בפעילות אנזימים בעלי פעילות נוגדת חימצון. בשלב זה בוצעו ניסויים למדידת פעילות אנזים הקטאלאז בקווי הפלפל השונים על מנת לבחון האם יש קשר בין רמה גבוהה של פעילותו ברקמת הצמח לבין עמידות טובה יותר לעקת הצינה. במערכות צמחיות שונות מצא בעבר מתאם חיובי כזה בין רמת פעילות קטאלאז או ביטוי הגן המקודד לו לבין עמידות טובה יותר כנגד עקת צינה. רמת סה"כ פעילות הקטאלאז נמדדה ברקמת עלי פלפל בזנים השונים בהמלך גידול בתנאים אופטימאליים. סביר שקיימים מספר איזוזימים שונים של אנזים הקטאלאז בפלפל אך בשלב זה אין אנו יכולים להפריד ביניהם.



**איור 10. מתאם בין רגישות לצינה ורגישות למליחות בזני פלפל שונים.** עבור עלים של זני הפלפל השונים נבדקה מידת הרגישות לגידול בתנאי עקת מלח שיושמה באמצעות הוספת NaCl 200 mM למי ההשקיה. מדד זליגת אלקטרוליטים בעלי הצמחים המטופלים שימש להערכת מידת הנזק לתאי העלים. ערכי הזליגה שנבדקו בצורה נפרדת בעקבות חשיפה לצינה או לעקת מליחות מוצגים עבור כל אחד מהזנים בגרף. התוצאות מראות מתאם חיובי גבוה יחסית ברוב הזנים, ככל שעולה הרגישות לצינה יש עליה ברגישות לעקת מליחות.

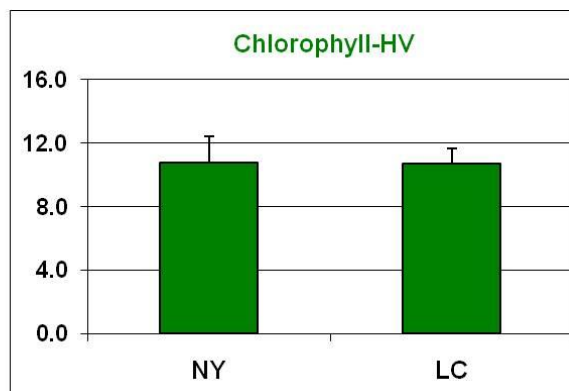
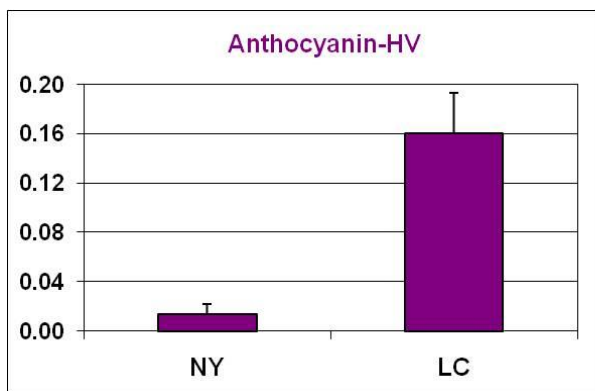
תוצאות ניסויים אלו המובאים באיור 11 מראים מתאם יחסית טוב בין רמה גבוהה של פעילות האנזים האנטיאוקסידטיבי קטאלאז לבין עמידות טובה יותר כנגד עקת הצינה. תוצאה זו תומכת במעורבות אנזים זה בתכונת העמידות כנגד צינה ויתכן מאוד שגם מרכיבים נוספים של המערכת האנטיאוקסידטיבית משתתפים בקביעת רמת הרגישות לעקת הצינה. זיהוי של מרכיבים ספציפיים של המערכת האנטיאוקסידטיבית אשר מעורבים בצורה משמעותית בעמידות הצמח לעקת צינה יכול לעזור בפיתוח סמנים ביוכימיים או מולקולאריים אשר יכולים לשמש בתוכניות השבחה גנטיות לשיפור העמידות לאחסון בתנאי קור של התוצרת הטרייה.



**איור 11. מתאם בין רמת פעילות קטאלאז לבין מידת העמידות לצינה בזני הפלפל השונים.**  
 רמת פעילות קטאלאז בעלי זני הפלפל השונים נמדדה ומובאת ביחס למידת הרגישות לצינה כפי שנמדדה באמצעות זליגת אלקטרוליטים כמתואר באיור 1. התוצאות מראות מתאם טוב חיובי טוב יחסית בין רמת פעילות גבוהה יותר של האנזים קטאלאז לבין עמידות לצינה.

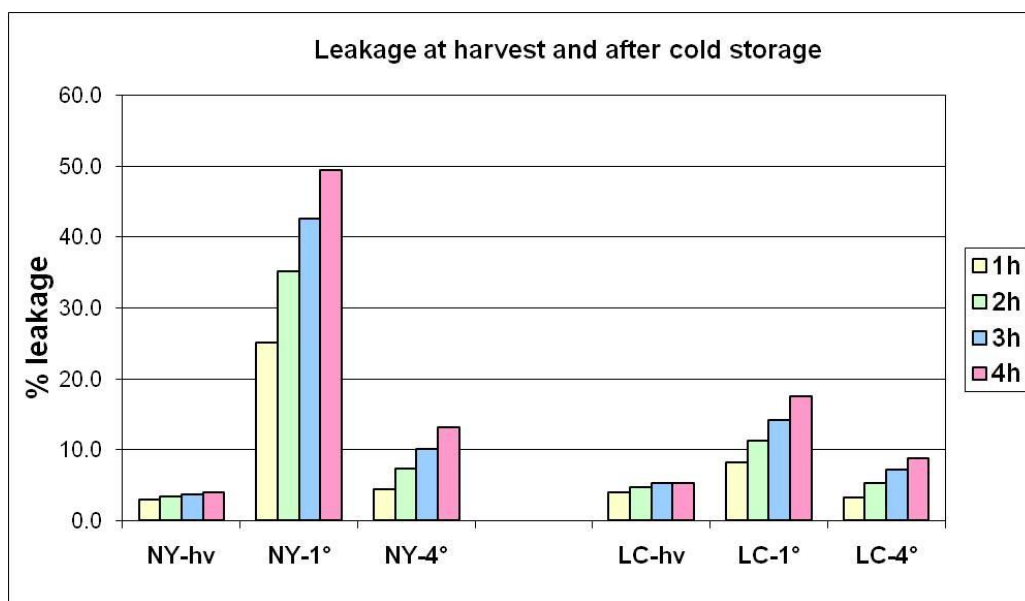
### 3.6. השפעת תכולת אנטוציאנינים על רגישות עלי עגבנייה לצינה

אחת ממטרות מחקר זה היא לבחון את ההשערה שרמת אנטוציאנינים גבוהה יכולה להוביל להפחתת הרגישות לצינה בעלים קטופים בתנאי אחסון בחושך ובקור. מעורבותם של האנטוציאנינים בהגנה בפני עקות אור גבוה וחימצון הועלתה מספר פעמים בספרות אך תמיד בהקשר של עקה המלווה לגדילת צמחים בתנאי אור גבוה וכחלק מהמערכת המונעת נזקים המתפתחים עקב חוסר יכולת המערכת הפוטוסינתטית להתמודד עם עוצמת אור גבוהה [13-15]. בניסויים שערכנו המטרה הייתה לראות האם בתנאי חושך רמת אנטוציאנינים גבוהה תוביל להפחתת נזקי הצינה. לצורך ניסויים אלו עשינו שימוש בצמח עגבנייה טרנסגני *LC* אשר בו כתוצאה מביטוי ביתר של גן בעל השפעה רגולטורית על מסלול יצירת האנטוציאנינים יש יצירת ואסוף כמות גבוהה של אנטוציאנינים בעלים [16]. צמחים אלו וזן הבר המתאים, *New Yorker*, אשר הינו איזוגני לטרנסגן מלבד הגן הרגולטורי המופעל ביתר, גודלו בחממה ורמת האנטוציאנינים והכלורופיל נמדדה בהם. כפי שנראה מאיור 12 בעוד תכולת הכלורופיל דומה, הצמחים הטרנסגניים מכיל רמת אנטוציאנינים גבוהה באופן משמעותי.



איור 12. רמת כלורופיל ואנטוציאנינים בזן הבר NY והקו הטרנסגני LC המבטא ביתר את הגן המבקר את רמת ביוסינטיזת אנטוציאנינים

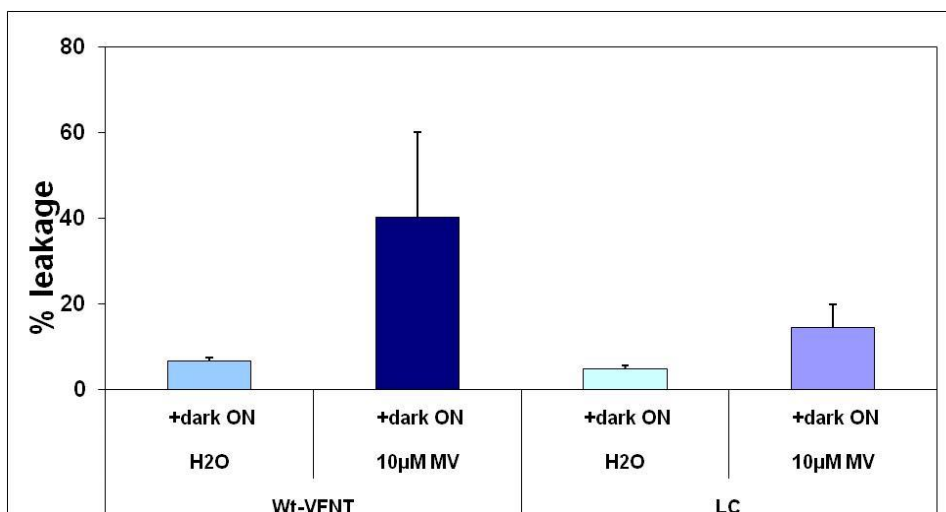
על מנת לבחון אם קיים הבדל בין שני הקווים ברמת הרגישות לצינה בוצעה מדידה של רמת זליגת היונים מהם, כמדד להיווצרות נזקי צינה הפוגעים בממבראנה, לאחר אחסונם בחושך בשתי טמפרטורות, 1 ו- 4 מ"צ. מאיור 13 נראה בבירור שקצב זליגת היונים בטמפרטורה הנמוכה יותר, 1 מ"צ, קצב זליגת היונים מעלי העגבנייה בה תכולה גבוהה יותר של אנטוציאנינים נמוכה ברמה מאוד משמעותית מזו שנמדדה בעלי צמח זן הבר דבר המעיד על רגישות נמוכה יותר בצמחים אלו לטמפרטורת הצינה.



איור 13. רמת זליגת יונים בעלי עגבנייה קטופים שאוחסנו בחושך למשך 7 ימים ב- 1 או 4 מ"צ ואח"כ הוצאו ל 24 שעות ב- 20 מ"צ. NY-hv, עלי זן הבר מייד לאחר הקטיף, LC-hv, עלי הטרנסגן מייד לאחר הקטיף; NY-1, זן הבר לאחר אחסון ב- 1 מ"צ; NY-4, זן הבר לאחר אחסון ב- 4 מ"צ; LC-1, טרנסגן לאחר אחסון ב- 1 מ"צ; LC-4, טרנסגן לאחר אחסון ב- 4 מ"צ.



בעבודות מחקר שונות שבוצעו בצמחים לשם לימוד התפקיד הפיזיולוגי של האנטוציאנינים בהגנה של רקמת הצמח כנגד עקות הועלו אפשרויות שונות. בין היתר שהפיגמנטים מהווים מחסום כנגד קרינה גבוהה ועל ידי כך מונעים נזקים שניוניים כתוצאה מקרינה גבוהה מידי שתאי הצמח אינם מסוגלים להתמודד עימה. היפותיזה נוספת שהועלתה היא שפלונואידיים מהווים מעין מבלע לעודף אנרגיה שיש לסלק וזה מתבצע באמצעות סינתזיה מוגברת שלהם [17]. תפקידם של האנטוציאנינים יכול להיות גם קשור לפעילותם האנטיאוקסידטיבית [18, 19]. אנו בניסויים שבצענו רואים את ההשפעה של הרמה הגבוהה של אנטוציאנינים לעיכוב נזקי הצינה בתנאים של חושך מלא ועל כן לא נראה סביר שמעורבותם במניעת נזקי הצינה קשור לנזקי אור בתנאי טמפרטורה נמוכה כפי שהוצע במערכות אחרות או לסילוק עודפי אנרגיה. אחת האפשרויות היא שפעילותם של האנטוציאנינים להפחתת נזקי הצינה קשורה לפעילותם האנטיאוקסידטיבית. יתכן שבתנאי קור הגורמים לנזקי צינה יש עליה ברמת צורוני חמצן פעילים אשר חוסר היכולת של המערכות התאיות לנטרלם בתנאי טמפרטורה נמוכים מוביל לרמה גבוהה של נזקי צינה כתוצאה גם מפגיעה בממבראות בתא. על מנת לבחון את האפשרות שלאנטוציאנינים יש אפשרות להקטין נזקי צורוני חמצן פעילים בוצעו ניסויים מתאימים. בניסויים אלו עלי הצמחים השונים טופלו בחומר methyl viologen (paraquat) אשר קולט אלקטרונים ומעבירם לחמצן ועל ידי כך גורם לעליה ברמתם של צורוני חמצן פעילים רעילים בתא. עלי עגבנייה של זן הבר NY והקו הטרנסגני LC אשר בו יש יצור בעודף של אנטוציאנינים טופלו בחומר methyl viologen בריכוז של  $10 \mu\text{M}$  ולאחר אינקובציה באור למשך 4 שעות נערך מעקב אחרי רמת זליגת אלקטרוליטים מתאי רקמת העלים כמדד לנזקים כתוצאה מפעולת החומר. כפי שנראה באיור 14 הן בצמחי הביקורת והן בזן הטרנסגני LC שנבדקו לקצב זליגת האלקטרוליטים לאחר אינקובציה של 4 שעות באור והמשך אינקובציה בחושך למשך כ- 12 שעות לא נמדדה רמה גבוהה של זליגת אלקטרוליטים ואין הבדל בין קו זן הבר שאינו צובר אנטוציאנינים לבין הקו הטרנסגני הצובר אותם ברמה גבוהה. לעומת זאת לאחר טיפול בחומר המשרה יצירת צורוני חמצן פעילים, ה- methyl viologen נראה שיש עליה בקצב זליגת האלקטרוליטים מרקמת העלה אשר עוכבה בצורה משמעותית בקו הטרנסגני הצובר אנטוציאנינים. נראה אם כן לפי תוצאות אלו, שתכולה גבוהה של הפיגמנטים מאפשר לתאים להתמודד בצורה יותר טובה עם הנזקים הנגרמים על ידי החומר הרעיל methyl viologen. תוצאות אלו תומכות באפשרות שפעילותם של האנטוציאנינים מנטרלת את צורוני החמצן הפעילים אשר רמתם עולה כתוצאה מפעילות ה- methyl viologen או כתוצאה מעקת הקור אליה נחשפים העלים בעת שמירתם בטמפרטורות הנמוכות מסף הרגישות של הצמח.



איור 14. רמת זליגת אלקטרוליטים מרקמת עלי עגבניה שטופלו בחומר methyl viologen. עלי עגבניה מנותקים מזון הבר NY והקו הטרנסגני בו יש ייצור בעודף של האנטוציאנינים, LC טופלו ב- methyl viologen בריכוז 10 µM והועברו לאינקובציה בחושך למשך 4 שעות ולאחר מכן למשך כ- 12 שעות בחושך. כביקורת עלים עברו אותה הדגרה במים ללא נוכחות החומר (H<sub>2</sub>O).

## סיכום עם שאלות מנחות לדו"ח המחקר

### **1) מטרת המחקר תוך התייחסות לתכנית העבודה:**

בחינת המתאם בין עמידות לעקות מליחות וצינה בין זנים שונים של צמחי בזיל ופלפל; בחינת השפעת רמת אנטוציאנים על רגישות לצינה.

### **2) עיקרי הניסויים והתוצאות:**

נבדקה אפשרות יישום טיפול מלח לפלפל לפני הקטיף להגברת עמידות לצינה לאחר הקטיף. בניסויים אלו לא נמצאה השפעה של טיפול מקדים במלח על רגישות לצינה אחר הקטיף. בוצעו ניסויים לבחינת השפעתן הפיזיולוגית של עקות קור או מליחות על מגוון זנים נרחב של צמחי בזיל ופלפל בעת הגידול. במקביל נבחנו רגישותם לצינה בזמן האחסון בחושך של עלים מנותקים מאותם זני בזיל ופלפל. נמצאה שונות משמעותית במידת הרגישות לעקות צינה ומליחות ובחלק גדול מהזנים נמצא מתאם חיובי בין שתי התכונות. בפלפל נמצא גם מתאם חיובי משמעותי בין עמידות טובה יותר לעקות הצינה והמליחות ופעילות גבוהה יותר של האנזים האנטיאוקסידטיבי קטאלאז. בוצעו ניסויים לבחינת השפעת רמת אנטוציאנים בעגבנייה על הרגישות לצינה באחסון. נמצא קשר ברור בין רמת אנטוציאנים גבוהה לעמידות טובה יותר לצינה. בצמחים נוספים כגון ארבידופסיס וכרוב נמצאו ממצאים דומים לגבי הקשר החיובי בין רמת אנטוציאנים גבוהה לעמידות טובה יותר לצינה.

### **3) מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרת המחקר לתקופת הדוח:**

חלק משמעותי ממטרות המחקר הושגו. גם בבזיל וגם בפלפל נמצא שבמספר משמעותי של זנים עמידות למליחות בגידול נמצאת במתאם טוב וחיובי עם עמידות העלים הקטופים לצינה באחסון. ממצאים אלו מצדיקים המשך מחקר בכיוון זה לביסוס וניצולם ליישום בהשבתה לזיהוי צמחים בעלי עמידות טובה יותר לצינה החשובה מאוד לשמירת האיכות באחסון. המתאם בין פעילות קטאלאז גבוהה לעמידות טובה יותר לצינה תומך במעורבות המערכת האנטיאוקסידטיבית בהקניית עמידות לצינה. כדאי יהיה לבדוק בעתיד שימוש בפעילות אנזים זה אן בגן המקודד לו כסמן לזיהוי קווים בעלי עמידות טובה יותר לצינה. הממצאים לגבי השפעה חיובית של רמת אנטוציאנים בעגבנייה ובצמחים אחרים תומכים במעורבותם בקביעת מידת העמידות לצינה ויתכן שכדאי יהיה לבחון זנים חדשים בהיבט זה גם לאור העובדה שהאנטוציאנים ידועים כבעלי השפעה תזונתית מיטיבה ולכן יש לזיהוי קווים בהם תכולה גבוהה של הפיגמנטים משמעות גדולה יותר מבחינה חקלאית.

### **4) הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים):**

לאור ביסוס קיום המתאם בין עמידות טובה יותר למליחות לבין עמידות טובה יותר לצינה יש מקום לבחון האם ניתן להשתמש בידע שהתקבל לזיהוי פרטים בעלי עמידות טובה יותר לצינה בתוך אוכלוסיות גדולות.

### **5) הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:**

עדיין לא בוצע

### **6) פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)**

~~רק בספריות~~

~~ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)~~

✓ חסוי – לא לפרסם

1. Sevillano, L., et al., (2009) Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *J. Sci. Food and Agric.* 89: 555-573.
2. Zhu, J.K., (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66-71.
3. Zhu, J.K., (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 401-406.
4. Kreps, J.A., et al., (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130: 2129-2141.
5. Seki, M., et al., (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 194-199.
6. Garg, A.K., et al., (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15898-15903.
7. Holmstrom, K.O., et al., (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* 51: 177-185.
8. Roxas, V.P., et al., (1997) Overexpression of glutathione S-transferase glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology*, 15: 988-991.
9. Xiong, L.M., et al., (2001) The *Arabidopsis LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083.
10. Avsian-Kretchmer, O., et al., (1999) Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta* 209: 469-477.
11. Heidarvand, L. and R.M. Amiri, (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiol. Plant.* 32: 419-431.
12. Whitlow, T.H., et al., (1992) An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant-tissues. *Plant Physiol.* 98: 198-205.
13. Steyn, W.J., et al., (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol.* 155: 349-361.
14. Zeng, X.Q., et al., (2010) Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light. *Physiol. Plant.* 138: 215-225.
15. Zhang, K.M., et al., (2010) Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Sci.* 179 : 202-208.
16. Goldsbrough, A.P., Y.S. Tong, and J.I. Yoder, (1996) *Lc* as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato. *Plant J.* 9: 927-933.
17. Hernandez, I. and F. Van Breusegem, (2010) Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: Novel tools for nature's Swiss army knife? *Plant Sci.* 179: 297-301.
18. Hernandez, I., et al., (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci.* 14: 125-132.
19. Gould, K.S., (2004) Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J. Biomed. Biotechnol.* 5: 314-320.