

דו"ח לתכנית מחקר מספר 20-01-0085 / 203-1139-17

שנת המחקר: 1 מתוך 1 שנים

בחינת מניעת נזקי קרה באבוקדו בעזרת גישה חדשנית

**Priming as an innovative means to prevent chilling-associated damage in
avocado**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

דנה חרובי, ורד יריחמוביץ, נבין ג'ושי, קירה רטנר, אורלי אידלמן, יוספה שחק – המכון למדעי הצמח, מנהל
המחקר החקלאי; מיכאל נוי – שה"מ; הדר כהן – מילופרי

Dana Charuvi (charuvi@agri.gov.il), Vered Irihimovitch (veredi@agri.gov.il), Naveen
Joshi (naveen.arovolcani@gmail.com), Kira Ratner (kiratner@agri.gov.il), Orly Eidelman
(orlyeid@agri.gov.il), Yosepha Shahak (shahaky@agri.gov.il) – Institute of Plant Sciences,
Agricultural Research Organization, Rishon LeZion 7528809; Michael Noy
(mazoknoi@gmail.com) – Agricultural Extension Service of Israel; Hadar Cohen
(hadpa@bezeqint.net) – Milupri

דצמבר 2017

תוכן העניינים

1	תקציר.....
2	מבוא.....
2	מטרות המחקר.....
3	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות.....
3	1. הקמת מערכת להדמיית קרה בשתילי אבוקדו.....
3	1.1. מיפוי קצב הפוטוסינתזה של שתילי אבוקדו 'האס'.....
3	1.2. השפעת לילות קור (1°C) עוקבים על הפוטוסינתזה.....
4	1.3. השפעת לילות קור (-3°C) על הפוטוסינתזה.....
5	1.4. שינויים בתכולת פיגמנטים והצטברות נזקי חמצון.....
6	2. בחינת טיפולים מקדימים - priming לתנאי קרה.....
6	2.1. טיפול במי חמצן.....
7	2.2. טיפול בסידן כלוריד.....
8	דיון וסיכום.....
9	ביבליוגרפיה.....

תקציר

הצגת הבעיה - עצי פרי ממקור טרופי/סובטרופי, כגון אבוקדו ומנגו, ניזוקים באופן משמעותי מאירועי קרה בחורף הישראלי. לעיתים הנזקים כה חמורים עד כדי אבדן של חלק משמעותי של נוף העץ המצריך גיזום רדיקלי, הרכבה מחדש, או עקירה ונטיעה חדשה. כיום, אין פתרון המיושם באופן נרחב בכל אתר ואתר; מספר שיטות להתמודדות עם אירועי קרה מיושמות או נבחנות, ביניהן מתזי מים, רשתות צל, ומערבלי אוויר/ארובות רוח. בעבודה הנוכחית, הצענו לבחון גישה חדשנית המבוססת על טיפולים חיצוניים מקדימים – priming, אשר משפיעים את מנגנוני ההתמודדות הטבעיים של הצמח עם תנאי עקה, ועל ידי כך עשויים לשפר את עמידותם של עצי אבוקדו מזן 'האס' בתנאי קרה. **שיטות העבודה** - העבודה מתבצעת בשתילי אבוקדו 'האס'; הדמיית תנאי קרה נעשית ע"י חשיפת השתילים לטמפרטורות לילה נמוכות ועוצמות שונות של קרינת שמש ביום. על מנת לאפיין את התגובה הפיזיולוגית של השתילים לתנאים הנ"ל, נעשה מעקב אחר פרמטרים שונים, כולל תכולת כלורופיל של עלים, מדדי פלואורסנציית כלורופיל, קצב הפוטוסינתזה ומוליכות הפיוניות. טיפולים מקדימים ניתנים באמצעות ריסוס העלווה לפני החשיפה לתנאי קור. **תוצאות עיקריות** - טמפרטורות נמוכות בלילה הובילו לירידה משמעותית בקצב הפוטוסינתזה במהלך היום כתוצאה מסגירת הפיוניות, אך בהיעדר עוצמת קרינה חזקה בימים העוקבים, לא נגרם נזק מצטבר והשתילים התאוששו. לעומת זאת, קרינה חזקה בימים העוקבים ללילות הקור מדמים את נזקי הקרה הנגרמים במטע וכוללים צריבה של העלווה ונזק בלתי הפיך לשתילים. עדויות ראשוניות מבחינה של טיפולים מקדימים עם חומרים שונים, ביניהם סידן כלוריד ומי חמצן, מראות כי לחלקם ישנה השפעה על מוליכות הפיוניות ו/או על קצב הפוטוסינתזה, וכעת אנו ממשיכים בבחינה של הטיפולים ואופן מתנם. **מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות** - נדרש מחקר נוסף לפני קבלת החלטות לגבי התועלת ואופן היישום של טיפול מקדים לפני אירוע קרה.

מבוא

עצי פרי ממקור טרופי או סוב-טרופי, כגון אבוקדו ומגנו, חשופים לנזקים קשים בחורף כאשר ישנם לילות צינה/קרה. נזקי הקרה באים לידי ביטוי בצריבה של העלווה והענפים, בפגיעה בפרי לפני קטיף, ובפגיעה בהתמיינות פקעי הפריחה של העונה הבאה. מתוקף כך, נזקם הכלכלי של אירועי קרה הוא אדיר; בענף האבוקדו נזקים אלו מסתכמים בעשרות ואף כמאה מיליוני ש"ח בחורף עם אירועי קרה. נזקי הקרה (קרינתית) נגרמים מהשילוב של קור בלילה וחשיפה לאור ביום המחרת. בהתאם לזאת, כיסוי המטע עם רשתות המפחיתות את עוצמת האור עשוי להפחית את נזקי הקרה. כיום, שיטה זו וכן שיטות נוספות נבחנות כאמצעים להגנה על המטע. מבחינה פיזיולוגית תנאי קרה בצמחים טרופים/סוב-טרופים גורמים לשיבושים בפעילות המערכת הפוטוסינתטית^{1,2} הנובעים מסגירה אבנורמלית של הפיוניות במשך היום^{3,4}, לפגיעה בפעילות אנזימי מעגל קיבוע הפחמן, או לשיבוש הריתמוס הצירקדי אשר מוביל, בין היתר, לשינויים בדגם ביטוי גנים הקשורים במטבוליזם של פחמן. חוסר האיזון בין תהליכי ריאקציות האור ותהליכי קיבוע הפחמן גורם לייצור מוגבר של מולקולות חמצן פעילות – reactive oxygen species (ROS), אשר פוגעות בממברנות, חלבונים, ו-DNA. אחת ההשלכות היא הצטברות נזקים ב- photosystem II (PSII) – פוטואינהיביציה (photoinhibition). כאשר מנגנוני ההתמודדות של הצמח עם הפוטואינהיביציה אינם מספקים, הצטברות מולקולות ROS עשויה להוביל לנזקים בלתי הפיכים אשר מתבטאים בכלורוזה, נקרזה ואף נשירה של העלים ו/או הפירות⁵. במקרים חמורים, הנזקים החמצוניים עשויים להוליך למות העץ כולו.

שיפור עמידותם או התמודדותם של צמחים עם עקות ביוטיות ואביוטיות באמצעות טיפול מקדים – priming – הנו נושא הצובר תאוצה בשנים האחרונות⁶. מגוון חומרים הודגמו ככאלו המאפשרים לצמחים ממינים שונים להגיב מהר יותר ובעוצמה גבוהה יותר (או שניהם) בעת החשיפה לתנאי עקה או לשילוב של מספר עקות. דוגמא אחת לכך הנה מי חמצן (H_2O_2), אשר ברמות גבוהות גורמת לנזקי חמצון, אך במינונים נמוכים משמשת בתור סיגנל הגורם להעלאת הפעילות של המערכות נוגדות החמצון הטבעיות של הצמח, הכוללות מנגנוני קישור ונטרול של מולקולות ROS. באופן מעניין קיימים מספר מחקרים המראים כי ישנן השפעות חיוביות של H_2O_2 על המערכת הפוטוסינתטית, הן מבחינת תכולת כלורופיל וקרונואידים והן מבחינת פעילות המערכת⁷. טיפול כימי מקדים לתנאי קרה, המשלב ריסוס ב- H_2O_2 , טרם נבחן בעצי פרי.

מטרות המחקר

בחינת השפעת טיפולים חיצוניים מקדימים על נזקי קרה בשתילי ועצי אבוקדו, ואפיון המנגנונים המשרים עמידות ע"י טיפולים שימצאו כמועילים. מטרות המחקר כפי שהוגדרו בהצעה המקורית*:

(1) אפיון התגובה הפיזיולוגית ועצמת הנזק בעקבות חשיפה לרצף לילות קור-ימי אור במערכת שתילי אבוקדו מזן 'האס'.

(2) בחינת טיפולים מקדימים במי חמצן (H_2O_2), מימן גופרתי (H_2S), וסידן ($CaCl_2$) והשפעתם על התגובה הפיזיולוגית ועצמת הנזק בתנאי לילות קור-ימי אור במערכת שתילי אבוקדו מזן 'האס'.

(3) אפיון מערך הגנים המשופעלים בעקבות טיפול מקדים אשר ימצא כמועיל.

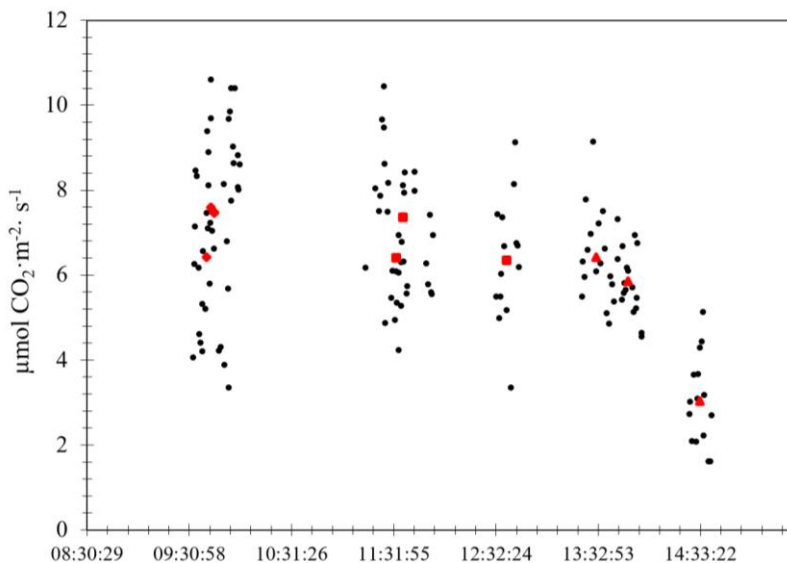
(4) בחינת טיפול מקדים ברמת המטע לפני אירוע קרה או צינה צפוי, בעצי אבוקדו מזן 'האס' במצב שפע ושפל. *המחקר אושר רק **לשנה אחת** ולכן בדו"ח זה מוצגות תוצאות של שנת המחקר הראשונה – [מטרות (1), (2)].

1. הקמת מערכת להדמיית קרה בשתילי אבוקדו

אחד מזני האבוקדו הרגישים לקור הנו 'האס', זן האבוקדו המוביל. על מנת לדמות את מצב עצי 'האס' במטע, העבודה התבצעה בשתילי האס אשר הרכבנו על גבי כנות זריעות (דגניה 117). הדמיית לילות קור נעשתה בחדר קור (טמפ' לילה של 1°C) או במקפיא ייעודי הניתן לכיוון בין 0°C ל- 8°C . במהלך היום העוקב השתילים נחשפו לאור השמש הטבעי בבית רשת, עם או בלי רשת צל שחורה (50%) נוספת. כביקורת, בכל ניסוי נכללו שתילים אשר לא נחשפו לקור בלילה (טמפ' לילה של $18-20^{\circ}\text{C}$). חלק ניכר של העבודה (בשנת מחקר אחת) הוקדש לכיול התנאים, מבחינת טמפ' הלילה ועוצמת הקרינה ביום, לצורך הדמיית קרה ואפיון הפיזיולוגיה והנזקים של העלווה כדלקמן.

1.1. מיפוי קצב הפוטוסינתזה של שתילי אבוקדו 'האס'

על מנת לאפיין את תגובת המערכת הפוטוסינתטית לתנאי קרה, תחילה אופיינו קצב הפוטוסינתזה בעלים של שתילי האס תחת קרינת השמש הטבעית בשעות שונות של היום (איור 1). המדידות בוצעו בימים שמשיים בסוף חודש נובמבר (תנאי חורף מבחינת אורך היום). ניתן לראות כי ישנה שונות רבה בקצב הפוטוסינתזה בין עלים שונים, וזאת על אף שחלקם משתייכים לאותו השתיל. עד השעה 14:00 לערך לא ניכר שינוי משמעותי בקצב הפוטוסינתזה הממוצע (סימונים אדומים באיור 1). הירידה בקצב הפוטוסינתזה שנצפתה בין 14:30 ל- 15:00 תואמת את הדעיכה בעוצמת האור הטבעי.

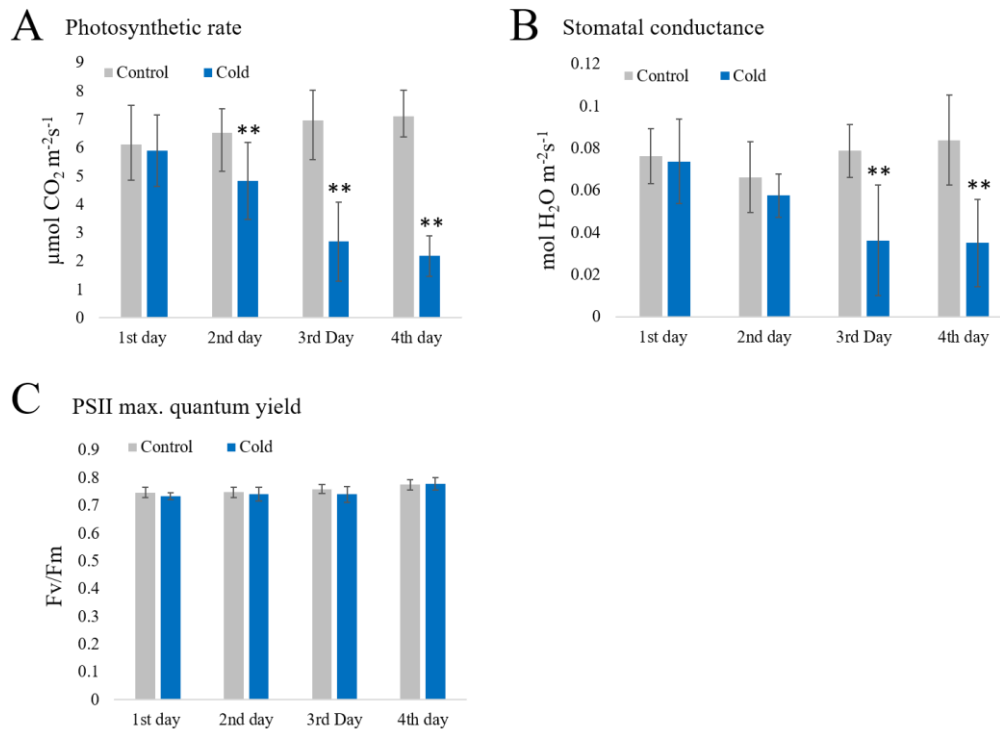


איור 1. קצב הפוטוסינתזה של שתילי אבוקדו 'האס' תחת קרינת שמש טבעית. כל נקודה שחורה בגרף מייצגת מדידה של קצב הפוטוסינתזה בעלה בודד (עלים בוגרים). המדידות בוצעו באמצעות מד שחלוף גזים נייד (ADC, UK) בחשיפה לאור השמש הטבעי בשלושה ימים נפרדים בחודש נובמבר. בכל יום נמדדו כ- 15 עלים בשלושה פרקי זמן שונים. סימונים אדומים מייצגים את קצבי הפוטוסינתזה הממוצעים.

1.2. השפעת לילות קור (1°C) עוקבים על הפוטוסינתזה

בתנאי החורף המקומיים, המטע לרוב נתון למספר לילות קור ברצף. לצורך סימולציה של התופעה, שתילי האס נחשפו לרצף של ארבעה מחזורי לילות קור – ימי אור במתכונת הבאה: ליל קור בטמפ' של 1°C בחדר קור [תחילה חשפנו את השתילים לטמפ' בין $4-1^{\circ}\text{C}$ כיוון שלרוב מקובל כי שתילים יותר רגישים מעצים בוגרים]. בבוקר, השתילים עברו הסתגלות לטמפ' החדר בעוצמת אור נמוכה במשך שעתיים, ואח"כ הועברו לבית הרשת ושהו בעוצמת קרינה של $1300-1400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. המדידות שבוצעו בניסוי זה מוצגות באיור 2. כפי שניתן לראות, בשתילים אשר נחשפו לקור ניכרת ירידה בקצב הפוטוסינתזה (קיבוע CO_2) בשיעור של כ- 25%, 50% ו- 65%

בימים שלאחר ליל הקור השני, השלישי והרביעי, בהתאמה, בהשוואה לשיתלי ביקורת שלא נחשפו לקור (איור 2A). הירידה בקצב קיבוע ה- CO_2 נבעה מירידה במוליכות הפיוניות (איור 2B). לעומת זאת, מדד ה- Fv/Fm של פלואורסנציית הכלורופיל, המספק מידע אודות פוטואינהיביציה של PSII, הראה כי לא הצטבר נזק במערכת הפוטוסינתטית (איור 2C). ערכי ה- Fv/Fm של הצמחים שהיו נתונים בתנאי ליל קור היו בדומה לביקורת לאורך כל ארבעת הימים שלאחר לילות הקור. בהתאם לזאת, השתילים התאוששו ולא ניכרו נזקים חזותיים של העלווה.

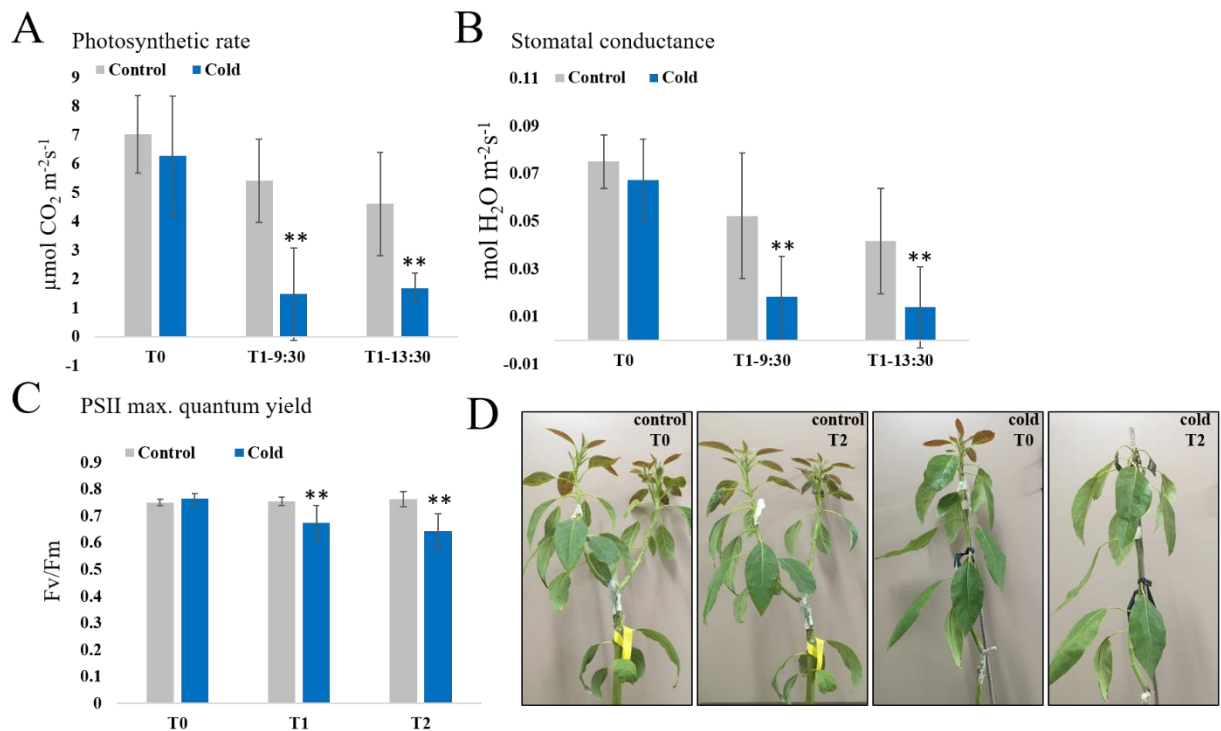


איור 2. לילות קור (1°C) עוקבים גורמים לירידה בקצב הפוטוסינתזה ללא נזק מצטבר. שיתלי 'האס' נחשפו לארבעה מחזורים של לילה קר (1°C) וקרינה טבעית ביום ($1300\text{-}1400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). קצב הפוטוסינתזה (קיבוע CO_2 , (A) ומוליכות הפיוניות (B) נמדדו באמצעות מד פוטוסינתזה נייד (ADC) תחת עוצמת התאורה הטבעית. (C) פרמטר ה- Fv/Fm של פלואורסנציית כלורופיל a, כמדד להצטברות נזקים ב-photosystem II (Walz) PAM-2000 לאחר הסתגלות של העלים לחושך במשך 20 דקות. המדידות בוצעו בין 10:00 ל-12:00 בצהריים. שיתלי ביקורת שהו בטמפ' לילה של 18-20°C. העמודות מייצגות ממוצע \pm סטיית תקן עבור 8 עלים (A, B) או 10 עלים (C). **הבדלים מובהקים סטטיסטית בהשוואה לביקורת ($p < 0.01$).

1.3 השפעת לילות קור (-3°C) על הפוטוסינתזה

לאור העובדה שלא היו נזקים מצטברים או חזותיים בעלים של שתילים שנחשפו לרצפי לילות קור של 1°C, בחנו את תגובת השתילים לאחר החשיפה לטמפרטורות לילה שונות בין 1°C ל-5°C. המטרה הייתה לאתר תנאים שייגרמו לנזק משמעותי אך לא יהרגו את השתילים באופן מידי על מנת שנוכל להעריך את השפעתם של טיפולים מקדימים על התגובה הפיזיולוגית והנזק בהמשך. מצאנו כי השילוב של טמפ' לילה של 3°C עם עוצמת קרינה מינימלית של כ- $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ מתאימים לעבודה (איור 3). בתנאים אלו, נמצא כי קצב הפוטוסינתזה יורד ב-60-70% לאחר ליל קור אחד וחשיפה לאור במשך היום (איור 3A). מקורה של ירידה זו גם מירידה במוליכות הפיוניות (איור 3B). בנוסף, ניכרת ירידה ב- Fv/Fm , המעידה על פוטואינהיביציה של PSII ביום הראשון לאחר ליל הקור, ולא נצפתה התאוששות ביום השני (איור 3C). סימני נבילה ניכרים בצמחים ששהו בליל קור של 3°C (איור 3D). חשיפה לשני לילות קור הובילה, ברוב המקרים, לכך שהעלווה של השתילים תצרב לאחר מספר ימים של חשיפה לתנאי קרינה טבעית (דוגמא באיור 6C/D). לעומת זאת, השילוב של 3°C בלילה עם עוצמות אור

נמוכות יותר ($600-700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), לא הוביל לנזק בלתי הפיך לשתילים, בדומה לתוצאות שהתקבלו לאחר החשיפה לטמפ' לילה של 1°C (ועוצמת קרינה גבוהה). תוצאות אלו מדגישות את העובדה שזנקי הקרה הנם תוצאה של החשיפה לשילוב של קור בלילה/לפנות בוקר וקרינה חזקה ביום.



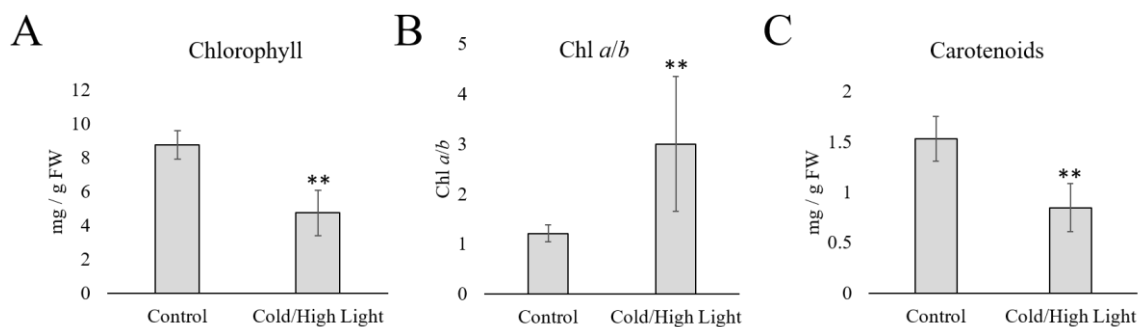
איור 3. חשיפה ללילות קור (-3°C) גורמת לירידה משמעותית בקצב הפוטוסינתזה ולנזקי קרינה. שתילי 'האס' נחשפו לליל קור (- 3°C) וקרינה טבעית ביום ($1200-1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). ביום המחרת (T1) קצב הפוטוסינתזה (קיבוע CO_2 , **A**) ומוליכות הפיוניות (**B**) נמדדו בבוקר ולאחר 4 שעות חשיפה לאור באמצעות מכשיר ה-LI-COR 6800 בעוצמת תאורה $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (**C**) פרמטר ה- F_v/F_m של פלואורסנציית כלורופיל a, נמדד ביום המחרת (T1) וכן ביום לאחר מכן (T2), באמצעות PAM-2000 לאחר הסתגלות של העלים לחושך במשך 20 דקות. T0 - מדידות ביום שלפני החשיפה לקור. שתילי ביקורת שהו בטמפ' לילה של $18-20^\circ\text{C}$. העמודות מייצגות ממוצע \pm סטיית תקן עבור 5 עלים (T0 - B,A), 8 עלים (T1 - B,A) או 7 עלים (C). **הבדלים מובהקים סטטיסטית בהשוואה לביקורת ($p < 0.01$). (D) דוגמא לשתיל מהביקורת וטיפול הקור ב-T0 (לפני הקור) ו-T2 (ביום השני שלאחר ליל הקור) של ניסוי זה.

1.4 שינויים בתכולת פיגמנטים והצטברות נזקי חמצון

לצורך השלמת התמונה של השפעת החשיפה לקור וקרינה חזקה על המערכת הפוטוסינתטית, המדידות הנ"ל לוו בכימות של פיגמנטים ומולקולות חמצן פעילות בעלים. לאחר החשיפה לקור בלילה (-3°C) ולכ-5 שעות של קרינה, נצפתה ירידה משמעותית בתכולת הכלורופיל - של כ-45% (איור 4A). ירידה זו לוותה בעליה ממוצעת של פי 2.5 ביחס בין כלורופיל a ל-b (איור 4B), דבר המעיד על פירוק סלקטיבי של האנטנת של PSII - light harvesting complex II (LHCII). בנוסף, גם בתכולת הקרוטנואידים הכוללת הייתה ירידה של כ-45% (איור 4C).

רוב רובן של העקות האביוטיות גורמות לשיבושים בתפקודה של המערכת הפוטוסינתטית הגוררים ייצור מוגבר של מולקולות חמצן פעילות (ROS). בהיעדר מנגנוני התמודדות מספקים ובמיוחד בעת החשיפה לקרינה חזקה, הצטברות של ROS תוביל לנזקי חמצן קשים ואף למוות של רקמת הצמח, כפי שמתרחש בתנאי קרה. אחת ממולקולות ה-ROS שעשויות להצטבר הנה מי חמצן. על מנת לאמוד את רמת מי החמצן בעלים משתילים שנחשפו לקור בלילה וקרינה חזקה ביום בוצעה צביעה ייעודית למי חמצן (איור 5). כפי שניתן לראות, בעלים

שנחשפו לקור ואור הייתה הצטברות של מי חמצן פי כמעט 3.5 יותר מעלים של שתילי הביקורת. בנוסף, צביעה ראשונית לכימות של רדיקל הסופר-אוקסיד (O_2^-) הראתה כי הייתה עלייה של 60% ב- O_2^- בשתילים שהיו חשופים לקור בלילה בהשוואה לשתילי הביקורת (נתון זה אינו מוצג כאן).



איור 4. שינויים בתכולת הכלורופיל וקרוטנואידים לאחר החשיפה לליל קור וקרינה ביום. לאחר ליל קור ($-3^{\circ}C$) וחשיפה לקרינת שמש (שימוש ב- $1300-1400 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 5 שעות) נדגמו דיסקיות עלים במשקל ~ 25 g. הרקמה נכתשה ומיצוי הפיגמנטים התבצע ב- 80% אצטון וכומת כמקובל^{8,9}. העמודות מייצגות ממוצע \pm סטיית תקן עבור 6 דגימות (מ- 3 שתילים שונים של הביקורת או הקור). שתילי הביקורת שהו בטמפ' לילה של $18-20^{\circ}C$. **הבדלים מובהקים סטטיסטית בהשוואה לביקורת ($p < 0.01$).



איור 5. הצטברות של מי חמצן (H_2O_2) כתוצאה מהחשיפה לתנאי קור וקרינה חזקה ביום. לאחר ליל קור אחד ($-3^{\circ}C$) וחשיפה לקרינת שמש במשך יומיים (עוצמת הקרינה המקסימלית ביום $\sim 1200 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) נדגמו דיסקיות עלים. שתילי ביקורת שהו בטמפ' לילה של $18-20^{\circ}C$. התבצעה צביעה באמצעות 3,3'-diaminobenzidine (DAB) לפי^{10,11}. עוצמת הצבע כומתה ביחס לדיסקיות עלים שהושרו בבופר בלבד באמצעות תוכנת ImageJ. העמודות מייצגות ממוצע \pm סטיית תקן עבור 4 דגימות עלים (ביקורת או טיפול קור/אור). **ההבדל נמצא מובהק בהשוואה לביקורת ($p < 0.001$).

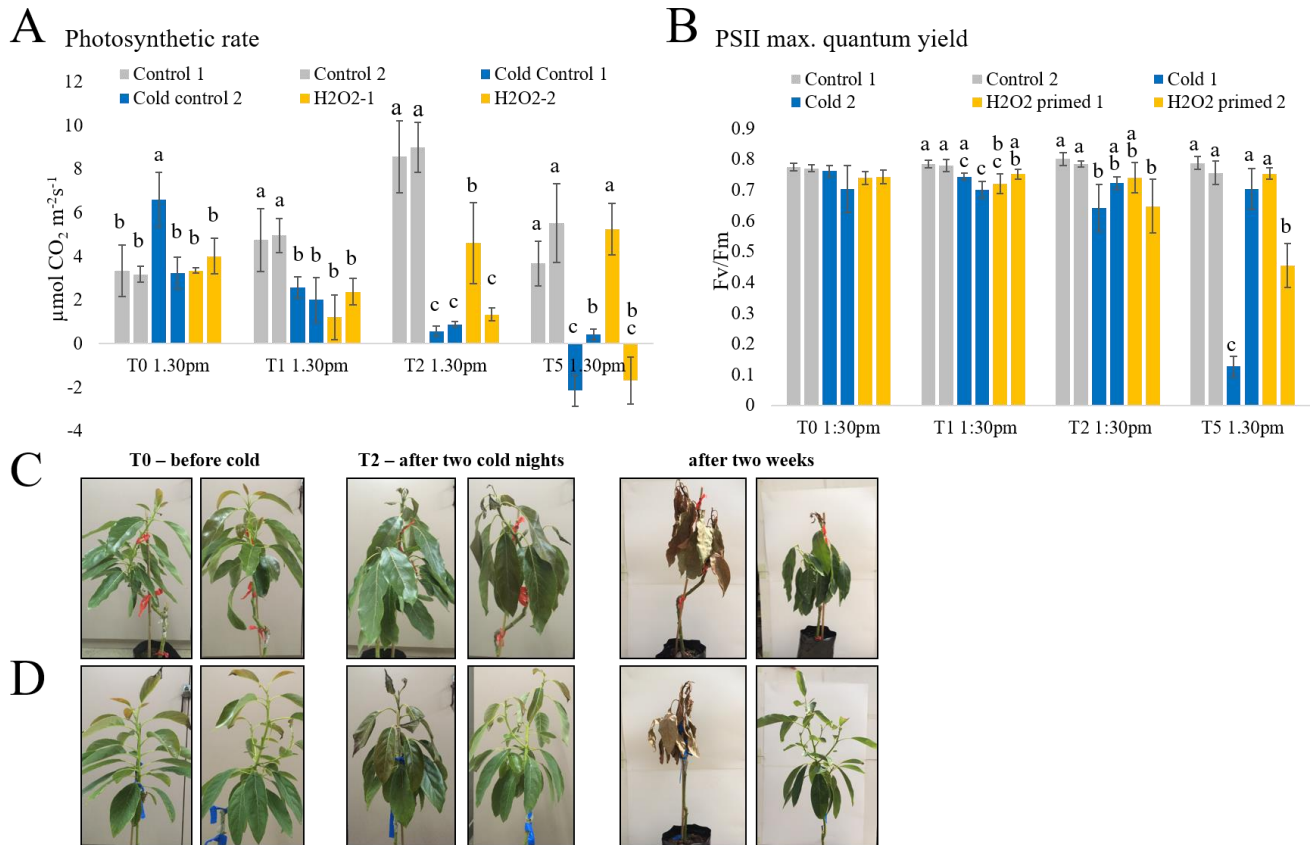
2. בחינת טיפולים מקדימים - priming לתנאי קרה

לאחר אפיון התגובה הפיזיולוגית של שתילי האס לסימולציה של תנאי קרה, התחלנו בבחינה של טיפולים מקדימים לתנאים אלו על מנת לברר האם יועילו להתמודדות הצמחים עם העקה והנזקים. מוצגות כאן תוצאות ראשוניות של בחינת הטיפולים במי חמצן וסידן כלוריד ($CaCl_2$). כל הטיפולים ניתנו כריסוס עלוותי.

2.1 טיפול במי חמצן

בהתבסס על דיווחים מהספרות^{7,12}, נבחנו טיפולים בריכוזים שונים של מי חמצן (10, 100, 200 mM). לא נמצא כל הבדל בין שתילים שהיו בקור וטופלו לפני כן ב- 10 mM H_2O_2 לבין שתילים שלא טופלו (לא מוצג). טיפול מקדים ב- 100 mM H_2O_2 לא השפיע על קצב הפוטוסינתזה טרם החשיפה לקור (איור 6A, T0). לאחר החשיפה לליל קור אחד, קצב הפוטוסינתזה בכל השתילים שנחשפו לקור היה כ- 50% נמוך יותר משתילי הביקורת בשעות הצהריים (איור 6A, T1). ביום שלאחר ליל הקור השני, נראתה גם ירידה משמעותית ב- F_v/F_m בצמחי הקור לעומת הביקורת, קרי פוטואינהיביציה (איור 6B, T2). קצבי הפוטוסינתזה בשתילים שהיו בקור ביום זה ירדו עוד

יותר לשתילי הביקורת (T2, איור 6A), אך שתיל אחד שעבר טיפול מקדים הראה סימני התאוששות (איור 6A) ולמעשה שרד בסופו של דבר את טיפול הקור/אור. ביום החמישי, ניתן לראות כי קצב הפוטוסינתזה ומדד הפלואורסנציה של שתיל זה דומים לשתילי הביקורת (T5, איור 6A, 6B). בשלב זה מוקדם להסיק האם הטיפול הוא זה שגרם להתאוששות, שכן נדרש לחזור על הניסוי עם מס' יותר גדול של שתילים, ובנוסף לבחון אופנים שונים של מתן הטיפול (מס' טיפולים, משך הזמן בין הטיפול לחשיפה לקור) אשר סביר להניח ישפיעו גם הם על התוצאה.

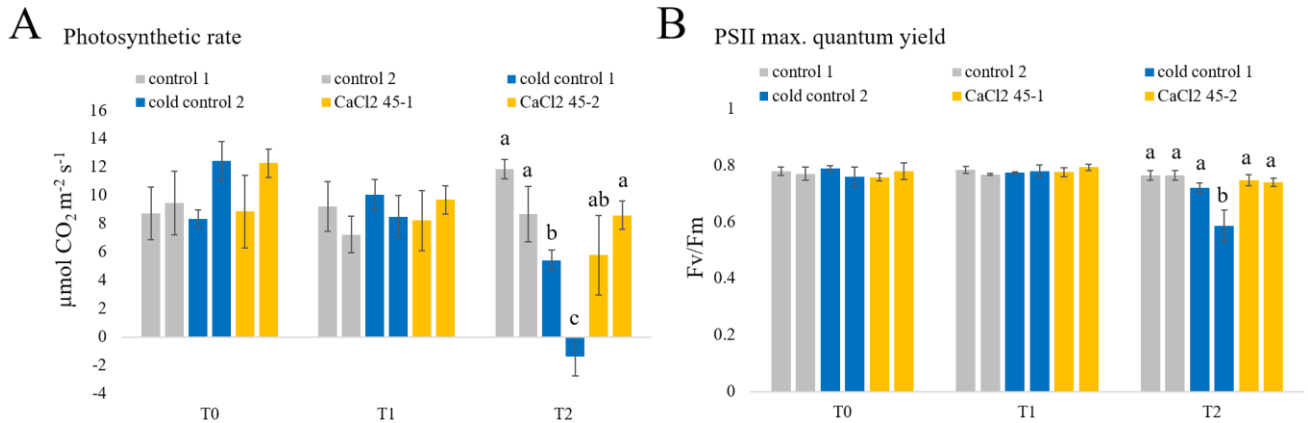


איור 6. השפעת טיפול מקדים במי חמצן (H₂O₂) על הפוטוסינתזה לאחר החשיפה לקור וקרינה. 2 שתילים (H₂O₂-1, H₂O₂-2) טופלו ב-100 mM H₂O₂, ולאחר מכן נחשפו לשני לילות קור (-3°C) וקרינת שמש ביום. (A) קצב הפוטוסינתזה (קיבוע CO₂) ו-(B) פרמטר ה-Fv/Fm של פלואורסנציית הכלורופיל נמדדו כפי שצוין באיור 3. המדידות בוצעו בזמן T0- לאחר הטיפול במי חמצן ולפני החשיפה לקור, ביום שלאחר ליל הקור הראשון (T1), ביום שלאחר ליל הקור השני (T2), וביום החמישי לאחר ליל הקור הראשון (T5). שתילי ביקורת (Control-1, -2) שהו בטמפ' לילה של 18-20°C. שתילי קור (Cold control-1, -2) נחשפו לקור ללא טיפול מקדים. לאור השונות בין השתילים, כל עמודה מייצגת 4 או 5 עלים ± סטיית תקן משתיל בודד. אותיות שונות זו מזו מסמנות הבדלים מובהקים (ANOVA + Tukey post-hoc, p<0.05). (C) שתילים שטופלו בקור ו-(D) ושתילים שטופלו לפני הקור במי חמצן, לאחר הטיפול ולפני הקור (שמאל, T0), לאחר שני לילות קור (אמצע, T2), וכעבור שבועיים (מימין).

2.2. טיפול בסיידן כלוריד

סידן הנה מולקולת סיגנל מרכזית בתא המתווכת מספר רב של תהליכים. קיימות עדויות רבות לכך שטיפולים חיצוניים בסיידן [CaCl₂/Ca(NO₃)₂] משפרים את עמידותם של צמחים לעקות אביוטיות שונות^{13,14}, בין היתר ע"י שיפור את תפקודה של המערכת הפוטוסינתטית. מצאנו כי מתן של סידן כלוריד כריסוס עלוותי השפיע לחיוב על הפוטוסינתזה (לפני החשיפה לקור) בחלק מהריכוזים שנבדקו. השפעתם של טיפולים אלו נבחנה גם לאחר לילות קור וחשיפה לקרינת השמש. טיפול מקדים ב-100 mM CaCl₂ גרם לעלייה של 45% בקצב הפוטוסינתזה, אך לאחר החשיפה לקור לא נמצא יתרון לעומת שתילים שחוו לילות קור ולא טופלו. לעומת זאת,

בטיפול מקדים עם 45 mM CaCl₂, אשר לא שינה משמעותית את קצב הפוטוסינתזה לפני החשיפה לקור (T1), נמצא יתרון במדדי הפוטוסינתזה לאחר החשיפה לקור לעומת שתילים שלא טופלו (איור 7A, T2). תוצאות אלו מעידות על הפוטנציאל של טיפול מקדים עם סידן כלוריד להיטיב עם הצמח בהתמודדותו עם תנאי קרה, אך יש צורך לערוך עוד חזרות על מנת להגיע למסקנות סופיות.



איור 7. השפעת טיפול מקדים בסידן כלוריד (CaCl₂) על הפוטוסינתזה לאחר החשיפה לקור וקרירה. שני שתילים טופלו ב-45mM סידן כלוריד, ולאחר מכן נחשפו לליל קור (-3°C) וקרירת שמש ביום. (A) קצב הפוטוסינתזה (קיבוע CO₂) ו- (B) פרמטר ה-Fv/Fm של פלואורסנציית הכלורופיל נמדדו כפי שצוין באיור 3. המדידות בוצעו בזמן T0- לפני הטיפול, T1- לאחר הטיפול ולפני החשיפה הקור, ביום שלאחר ליל הקור (T2). שתילי ביקורת (control-1, -2) שהו בטמפ' לילה של 18-20°C. שתילי קור (cold control 1, 2) לא טופלו לפני הקור. לאור השונות בין השתילים כל עמודה מייצגת 4 עלים ± סטיית תקן משתיל בודד. אותיות שונות זו מזו מסמנות הבדלים מובהקים (ANOVA + Tukey post-hoc, p<0.05).

דין וסיכום

בעבודה שערכנו במהלך שנה זו הצלחנו לבסס מערכת מודל בשתילי 'האס' מורכבים לצורך לימוד התגובה הפיזיולוגית לתנאי קרה ולבחינת טיפולים מקדימים העשויים להיטיב את ההתמודדות עם נזקי קרה הנגרמים כתוצאה של שילוב של קור (בלילה) וקרירה (ביום). מצאנו כי חשיפה של שתילים ללילות קור של -3°C ולאחר מכן לעוצמות אור של לפחות 1000 μmol·m⁻²·s⁻¹ למספר שעות גורמת לירידה משמעותית בקצב הפוטוסינתזה (קיבוע CO₂). שתילים אשר פלטו CO₂ באמצע היום (תהליך נשימה העולה על שיעור קיבוע CO₂) לא שרדו. ירידה בממד ה-Fv/Fm, העיד על הצטברותם של נזקי קרינה במערכת הפוטוסינתטית. בנוסף, נמצאה ירידה בתכולת הפיגמנטים בעלים, עם עדות לפירוק של אנטנת ה-LHCII, כפי שמתרחש בתנאי קרינה חזקה¹⁵. דבר זה יאושש בהמשך המחקר באמצעים ביוכימיים. הצטברות של נזקי חמצון בסופו של דבר הובילה לשריפה של העלווה בימים העוקבים לליל הקור, בדומה למתרחש בעצי האס במטע. בחינה ראשונית של טיפולים מקדימים במי חמצן וסידן כלוריד לתנאי קרה מעידה על פוטנציאל של טיפולים מסוג זה לשיפור ההתמודדות של 'האס' עם תנאי קרה. נדרש מחקר נוסף על מנת לבסס את השפעתם של הטיפולים עם מספר רב יותר של שתילים, וכן לבחון את מתכונת הטיפול מבחינת מינון (ריכוז), מספר הטיפולים וזמן הטיפול לפני העקה. אחת המגבלות של העבודה הנה השונות הרבה יחסית בין שתילים שונים (המורכבים על כנות זרעיות). לכן, בהמשך נבחן את המודל והטיפולים גם בשתילי 'האס' מורכבים על כנה וגטטיבית (VC66). באם תתקבל התנהגות יותר אחידה, נשקול להמשיך את העבודה עם כנה זו.

1. Feng, Y. L. & Cao, K. F. Photosynthesis and photoinhibition after night chilling in seedlings of two tropical tree species grown under three irradiances. *Photosynthetica* **43**, 567–574 (2005).
2. Allen, D. J. & Ort, D. R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* **6**, 36–42 (2001).
3. Allen, D. J. *et al.* An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). *J. Exp. Bot.* **51**, 1893–1902 (2000).
4. Nir, G., Ratner, K., Gussakovsky, E. E. & Shahak, Y. Photoinhibition of photosynthesis in mango leaves: Effect of chilly nights. in *Acta Horticulturae* **455**, 228–235 (1997).
5. Michaeli, R. *et al.* Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants . III . Enhancement by high light via increased oxidative processes. *Physiol. Plant.* **113**, 338–345 (2001).
6. Savvides, A., Ali, S., Tester, M. & Fotopoulos, V. Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible? *Trends in Plant Science* (2015). doi:10.1016/j.tplants.2015.11.003
7. Gondim, F. A., Miranda, R. de S., Gomes-Filho, E. & Prisco, J. T. Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H₂O₂ leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **25**, 251–260 (2013).
8. Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous-Equations for Assaying Chlorophyll-a and Chlorophyll-B Extracted with 4 Different Solvents - Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic-Absorption Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384–394 (1989).
9. Wellburn, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol.* **144**, 307–313 (1994).
10. Daudi, A. & O'Brien, J. A. Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves. *Bio-protocol* **2**, 1–5 (2012).
11. Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**, 1187–1194 (1997).
12. Shu, H. H., Chun, C. W., Ivanov, S. V., Alexieva, V. & Chih, W. Y. Repetition of hydrogen peroxide treatment induces a chilling tolerance comparable to cold acclimation in mung bean. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **132**, 770–776 (2007).
13. Yang, S. *et al.* Calcium contributes to photoprotection and repair of photosystem II in peanut leaves during heat and high irradiance. *J. Integr. Plant Biol.* **57**, 486–495 (2015).
14. Zhang, G. *et al.* Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves. *PLoS One* **9**, (2014).
15. Lindahl, M., Yang, D. H. & Andersson, B. Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur. J. Biochem.* **231**, 503–509 (1995).