

## מנגנון יצירת הצבע בפירות תפוח מזן דלישס אדום 2004

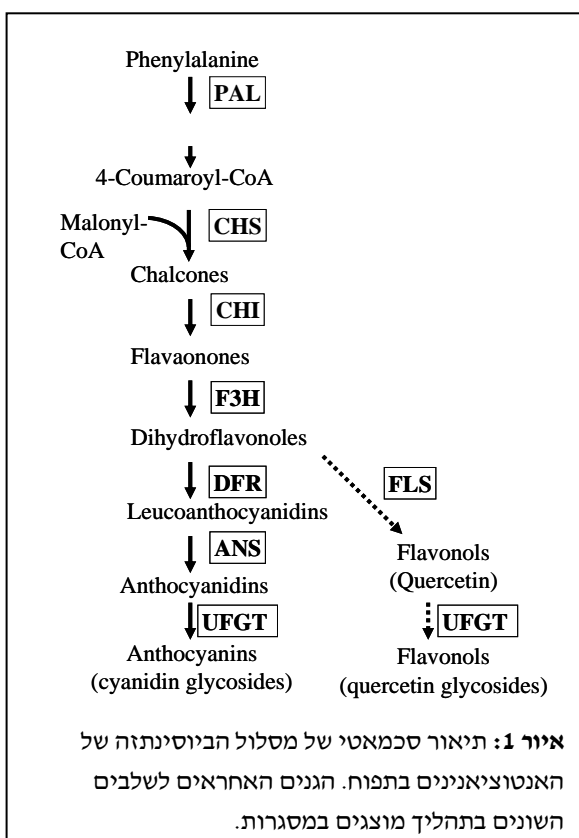
יובל כהן – המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן  
רעיה קוריצינסקי - המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן  
גלעד בן-יהודה - המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן  
עודד דגני – המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן  
מיכל אורן-שמיר - המחלקה לפרחים, המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן  
רינת עובדיה - המחלקה לפרחים, המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן  
גלית רדל - מו"פ צפון  
רפי שטרן - מו"פ צפון

### תקציר

תפוח 'דלישס אדום' הינו אחד מהזנים העיקריים הגדלים בארץ. פירות איכותיים של תפוחים אלה הינם בעלי צבע אדום, אך בארץ מרביתם אינם מממשים את פוטנציאל הצבע שלהם. מטרת המחקר היא לבחון את תהליכי יצירת הצבע האדום בקליפת התפוח, ולאחר את השלבים המגבילים את יצירתו, מתוך כוונה לפתח טיפולים הורטיקולטוריים לשיפורו. תהליכי התפתחות הצבע נבחנו בארבעה ואריאנטים של 'דלישס אדום' המאופיינים ביצירת רמות צבע שונות בקליפת הפרי. נבחנו עצים שגודלו בתנאים שונים בגליל העליון ובגולן. השפעת הטמפרטורה על תהליכי יצירת הצבע נבדקה גם בפירות עצי תפוח הגדלים בתנאים מבוקרים. במהלך התפתחות הפירות נבחנו מידת כיסויו ועצמתו של הצבע האדום, הצטברות האנטוציאנינים והפרקורסורים שלהם, ורמת הביטוי של הגנים הסטרוקטורליים במסלול הביוסנתזה שלהם. תהליכי יצירת הצבע מתרחשים בוואריאנטים השונים בעוצמה ובקצב שונה. בעוד בוואריאנטים מסוימים החלה הצטברות הצבע בשלב מוקדם בהתפתחות הפירות, באחרים הצבע הופיע רק בשלבים המאוחרים של ההבשלה. נמצאו הבדלים לא רק ברמת הפיגמנטים עצמם אלא גם ברמת תוצרי הביניים במסלול. רמות הביטוי למרבית הגנים הסטרוקטורליים הייתה גבוהה יותר ומוקדמת יותר בוואריאנטים האדומים יותר. תוצאות אלה מצביעות על הבדלים במנגנוני בקרת יצירת הצבע בוואריאנטים השונים. בעונת המחקר האחרונה נבחנו מספר טיפולים בהורמונים צמחיים ובטיפולים הורטיקולטוריים לשיפור רמות הצבע בתפוחי 'דלישס אדום'. שילוב של טיפולים מזרזי הבשלה בעזרת "אתרל", ומעכבי הבשלה ב"ריטיין" הובילו לעליה ברמות הצבע אך גם לנשירת פרי. לעומת זאת, טיפול בהורמון הצמחי Methyl Jasmonate (מתיל ג'סמונאט, MJ) הוביל להשראת יצירת צבע עז, אך לא הוביל להבשלת פרי מוגברת. תוצאות דומות התקבלו בשני זנים שונים של תפוח בגליל העליון. הבנה של מנגנון הפעולה של MJ וכיול של הטיפול ההורמונאלי הניתן יוכלו לשמש בעתיד ככלי הורטיקולטורי לעידוד יצירת הצבע בפירות זנים שונים של תפוח.

## מבוא:

התפוח הינו עץ המותאם לגידול בתנאים ממוזגים. למרבית זני התפוח המסחריים, ישראל מהווה את גבול התפוצה הדרומי, וגידולם בארץ מוגבל לאזורים קרירים יותר, בעיקר בגליל ובגולן. תפוח 'דליש' אדום' הינו זן עיקרי בארץ המגודל במטעי הגליל והגולן. פירות איכותיים של תפוחים אלה ושם זני תפוח אחרים, הינם בעלי צבע אדום. צבע זה הינו בעל חשיבות מכרעת למחירו בשווקים. במטעי הארץ, מרבית היבול אינו מממש את פוטנציאל הצבע שלו. למרות שמחקרים שונים הציעו פתרונות הורטיקולטוריים שיעודדו יצירת צבע, עדיין מהווה הצבע בעיה מרכזית באיכות הפרי בארץ. הצבע האדום נוצר מהצטברות אנטוציאנינים בתאי הקליפה. מנגנון יצירת האנטוציאנינים מוכר ונחקר רבות במערכות מודל כמו פרחי פטוניה ולוע הארי. תיאור סכמטי של מסלול יצירת האנטוציאנינים בתפוח מוצג באיור 1.



הצורך החקלאי בזני תפוח אדומים יותר, הביא למציאת ואריאנטים רבים שהינם מוטציות (טבעיות או מושרות) או הכלאות של זנים מוכרים. עד היום תוארו לפחות 200 ואריאנטים של תפוחי 'דליש' אדום', שרבים מהם נבדלים ברמות הצבע של הפרי. כך, הואריאנט 'Martina', שבודד בארץ במטע בגולן, הינו מוטציה של הואריאנט 'Top Red' שצבע קליפתו הוא אדום חזק. במחקר הנוכחי בחנו את תהליכי יצירת הצבע בפירות מארבעה ואריאנטים שונים של 'דליש' אדום' בצפון הארץ, ובפירות המגודלים בתנאי טמפרטורה מבוקרים.

## מטרת הניסוי:

אנליזה של תהליכי התפתחות הצבע בוואריאנטים שונים של תפוח דליש אדום הממוקמים בחוות מתתיהו בגליל וחוות פיכמן בגולן, ובתנאי טמפרטורה מבוקרים בפיטוטרון בבית דגן. מטרת

המחקר הספציפיות היו לאפיין את תהליכי יצירת הצבע ברמות שונות: (1) הערכות ומדידות של אחוז כיסוי הצבע האדום ושל עצמתו, (2) אנליזה של הפיגמנטים היוצרים את הצבע, (3) ואנליזה מולקולרית של הגנים המשתתפים בתהליכי יצירתם. (4) בשנת המחקר האחרונה בחננו גם שיטות שונות לשיפור רמות הצבע באמצעות טיפולים בחומרים צמיחה.

## הניסויים והתוצאות בתקופת הדוח

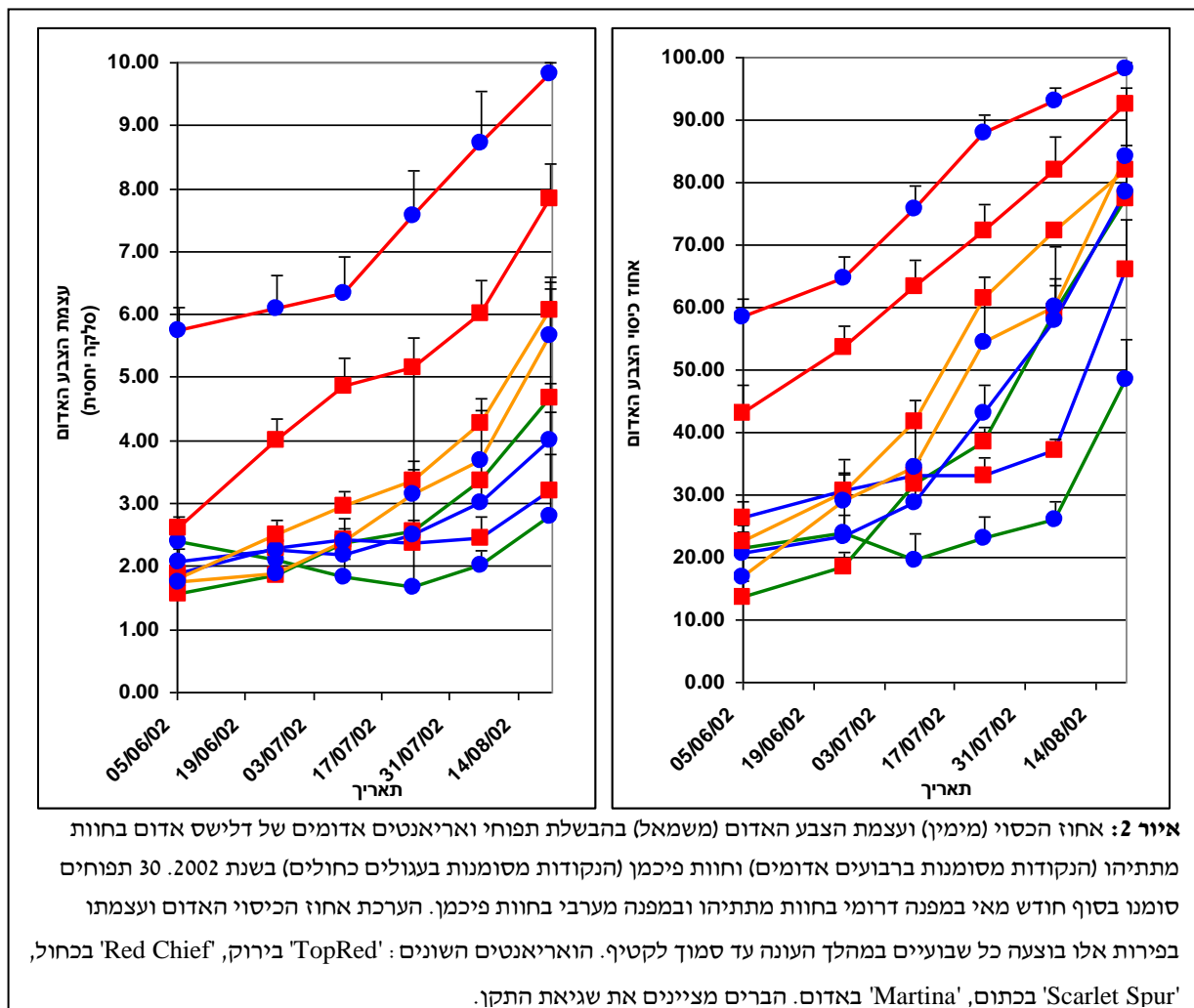
### 1. בחינת יצירת הצבע בוואריאנטים שונים של תפוחי דליש אדום בחוות בגליל ובגולן:

ניסוי השדה בוצע בעונות 2001-2003 בארבעה ואריאנטים של תפוחי 'דליש' אדום' ('Top Red', 'Red Chief', 'Scarlet Spur' ו-'Martina'), בשנים 2002-2003 נבחן גם ואריאנט נוסף אדום יותר של 'Top Red' (בחוות מתתיהו). בחוות מתתיהו בגליל העליון ובחוות פיכמן בגולן נבחרו כ-10 עצים מכל ואריאנט בכל חווה. בכל עץ בניסוי סומנו פירות (במרכז העץ, 3 פירות במפנה דרומי או צפוני בחוות מתתיהו ובמפנה מערבי או מזרחי בחוות פיכמן) ולאילו הוערכו עוצמת הצבע ואחוז הכיסוי במהלך התפתחות

הצבע. בנוסף, נלקחו דוגמאות למעבדה (כ-15 פירות מייצגים מאותו מפנה מכל ואריאנט בכל ביקור וביקור). בעת הקטיף (דרגת עמילן של כ-5) נאספו דוגמאות נוספות של פירות לבדיקה במעבדה. במעבדה הוערך אחוז הכיסוי של הצבע האדום ונבחנו איכות הצבע ועצמתו (בנקודות האדומה ביותר בכל פרי) בעזרת מכשיר למדידת צבע מסוג Color Guide של חברת Gardner BYK. בשלבים מתקדמים בהבשלה נמדדו גם משקל התפוחים, אחוז הסוכר ומידת הקושי של הפרי. דוגמאות של קליפה (3 דסקיות בקוטר של כ-1.2 ס"מ בחמש חזרות מתפוחים שונים) מהאזורים האדומים ביותר בפרי, הוקפאו בחנקן נוזלי ולאחר מכן שימשו לאנליזת HPLC. שאר הקליפה קולפה ושמרה, ושמשה מאוחר יותר לאנליזה מולקולרית של הגנים המשתתפים במסלול הביוסנתזה של האנטוציאנינים.

## 2. הבדלים בין הוואריאנטים השונים במידת הכיסוי של הצבע האדום ועוצמתו

במהלך הניסוי הוערכה עצמת הצבע בפירות (30 פירות לטיפול) שסומנו על העץ. התפתחות כיסוי הצבע האדום בשנת 2002 מתוארת באיור 2. במקביל, נלקחו פירות אחרים למעבדה וגם אלה הוערכו מבחינת רמת הכיסוי שלהם. תוצאות הפירות שנבחנו במעבדה היו דומות לתוצאות הפירות המסומנים שנבדקו בחוות. כיסוי הפרי בצבע האדום בוואריאנטים השונים מתרחש בעוצמה ובקצב שונה. בזן ה-'Martina' התקבל אחוז הכיסוי הגדול ביותר בצבע האדום, אחריו 'Scarlet Spur', 'Red Chief', ואילו בזן 'Top Red' התקבל צבע חלש ובכיסוי הקטן יותר. בזן 'Martina' הופיע כיסוי גבוה של צבע אדום כבר בשלבים

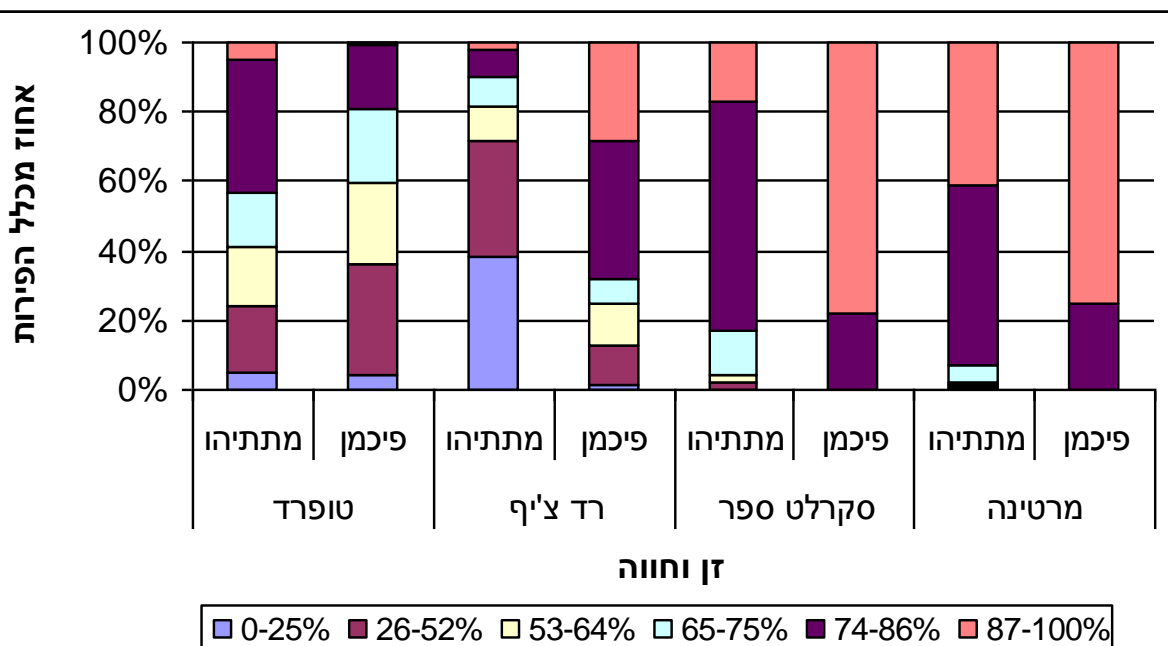


מוקדמים של גדילת הפרי, כחודשיים ויותר לפני ההבשלה. לעומת זאת בזן 'Top Red' עלה אחוז הכיסוי רק בשלבים המאוחרים של ההבשלה.

במקביל להערכת אחוז הכיסוי, הערכנו גם את עצמת הצבע האדום בנקודה האדומה ביותר בפירות במהלך הבשלתם (בסקלה יחסית של 1-10) (איור 2). צבע הפירות שדגמנו במעבדה נמדד (בנקודה האדומה ביותר) גם במכשיר למדידת צבע מסוג Color Guide של חברת Gardner BYK (בשיטת  $L, a^*, b^*$ ). העלייה בעצמת הצבע האדום תאמה את העלייה בערכי  $a^*$  במכשיר. בכל הזנים נצפתה עליה מתמדת בעצמת הצבע המכסימלית של הפירות. גם כאן הייתה עצמת הצבע של הוואריאנט 'Martina' גבוהה כבר תקופה ארוכה לפני ההבשלה, בעוד בזן ה-'Top Red' התפתח הצבע רק במקביל לשלבים המאוחרים בהבשלת הפרי. יתכן שתופעה זו מצביעה על בקרה שונה של תהליכי יצירת הצבע בין שני הוואריאנטים. עם סיום הקטיף הועברו מדגמים (2 ארגזי פירות מכל וואריאנט וחווה) למיון בבית האריזה של פירות גולן. הפירות חולקו ל-6 רמות צבע המבוססות על שכלול של אחוז הכיסוי והעצמה של הצבע האדום בפרי. בעוד פרי ה-'Martina' ממוין לדרגת הצבע האדומה ביותר, כמעט כל פירות ה-'Top Red' נקטפו בדרגת הצבע הנמוכות יותר (איור 3). תוצאות דומות התקבלו במרבית שנות הניסוי (תוצאות שאינן מוצגות)

### 3. הבדלים בין אתרי הניסוי השונים

אתרי הניסוי נמצאים באיזורים טופוגרפיים שונים, ועל כן בתנאי סביבה שונים. חוות פיכמן גבוהה בכ-300 מטר מעל חוות מתתיהו. תנאי מזג האוויר בחוות פיכמן קרים יותר. על כן מתקבל בהם צבע חזק יותר אם כי הבשלת הפירות מתאחרת. במהלך העונה היה אחוז הכיסוי של הפירות מחלק מהוואריאנטים מחוות מתתיהו גבוה מזה של פירות מחוות פיכמן. גם לפי נתוני הקטיף הפירות (שנעשו לפי מדדי הבשלה), היו הפירות מחוות פיכמן אדומים יותר (פרט לפירות ה-'Top Red'). הפירות בפיכמן מייצגים פירות צעירים יותר, בשלים פחות, ועל כן אדומים פחות מאשר בחוות מתתיהו. יחד עם זאת, התנאים

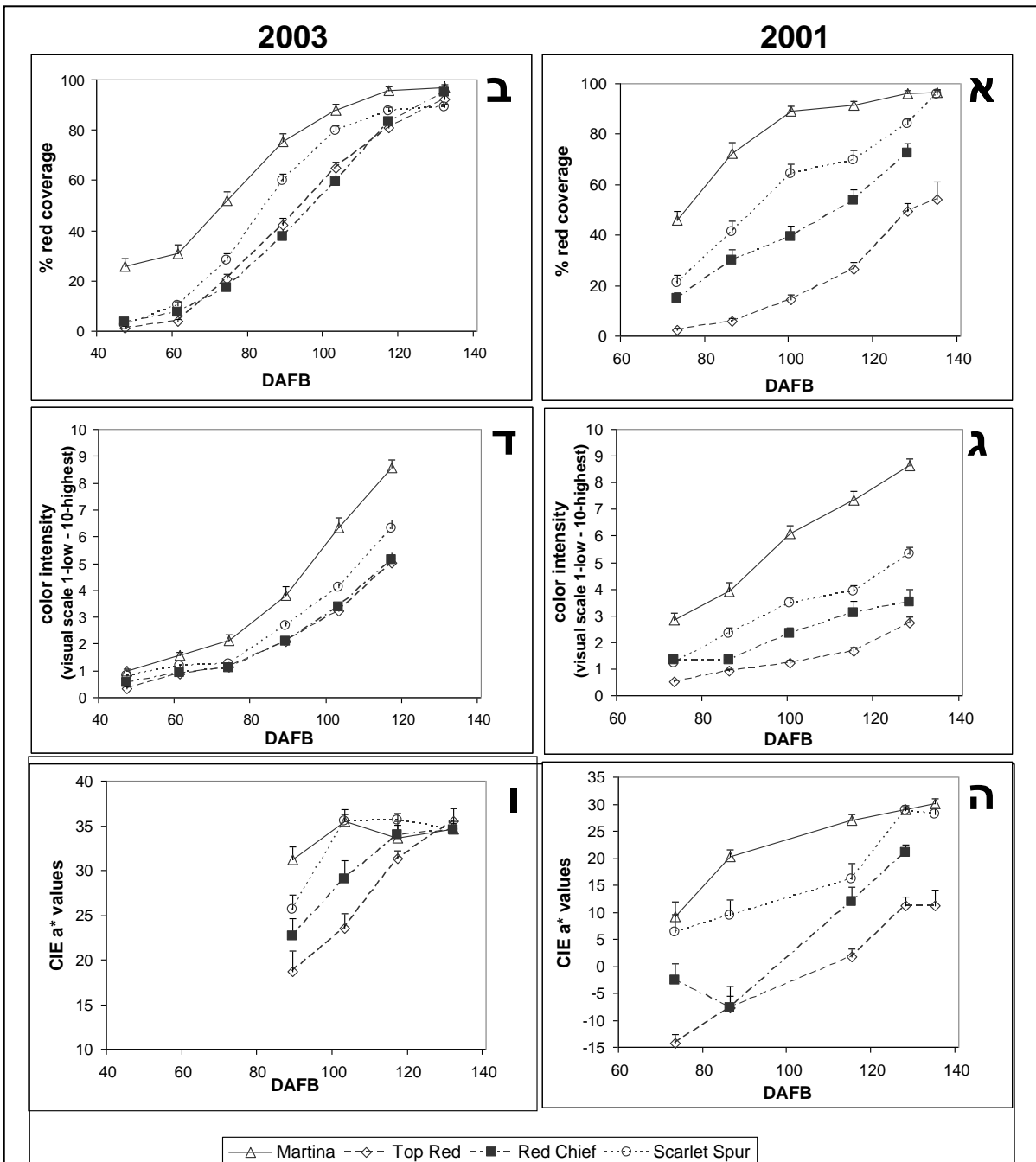


איור 3: התפלגות רמות הצבע של התפוחים בקטיף כפי שנבחנה במדגם בן 2 ארגזים בבית האריזה של תפוחי הגולן בשנת 2002. התפוחים מווינו לרמות לפי אחוז הכיסוי של הצבע האדום כמפורט בגרף.

בחות פיכמן מעודדים יותר את יצירת הצבע האדום. הפירות בחוות פיכמן מבשילים מאוחר יותר. השוואת הנתונים משנות המחקר השונות מאשרים את התוצאות הללו.

**4. השוואת תהליכי יצירת הצבע בשנת "שיא צבע" לעומת תהליכי יצירתם ב"שנה רגילה"**

בעבודה זו עקבנו אחר תהליכי יצירת הצבע ב-3 שנים עוקבות (2001-2003). באופן כללי, תהליכי יצירת הצבע בשנים 2001-2002 היו דומים. לעומת זאת, שנת 2003 הייתה בולטת כ"שנת צבע", בה מרבית התפוחים הגיעו לרמות צבע חריגות. איור 4 משווה את רמות הצבע בשנים 2001 ו-2003 בארבעת הוואריאנטים בחוות מתתיהו.

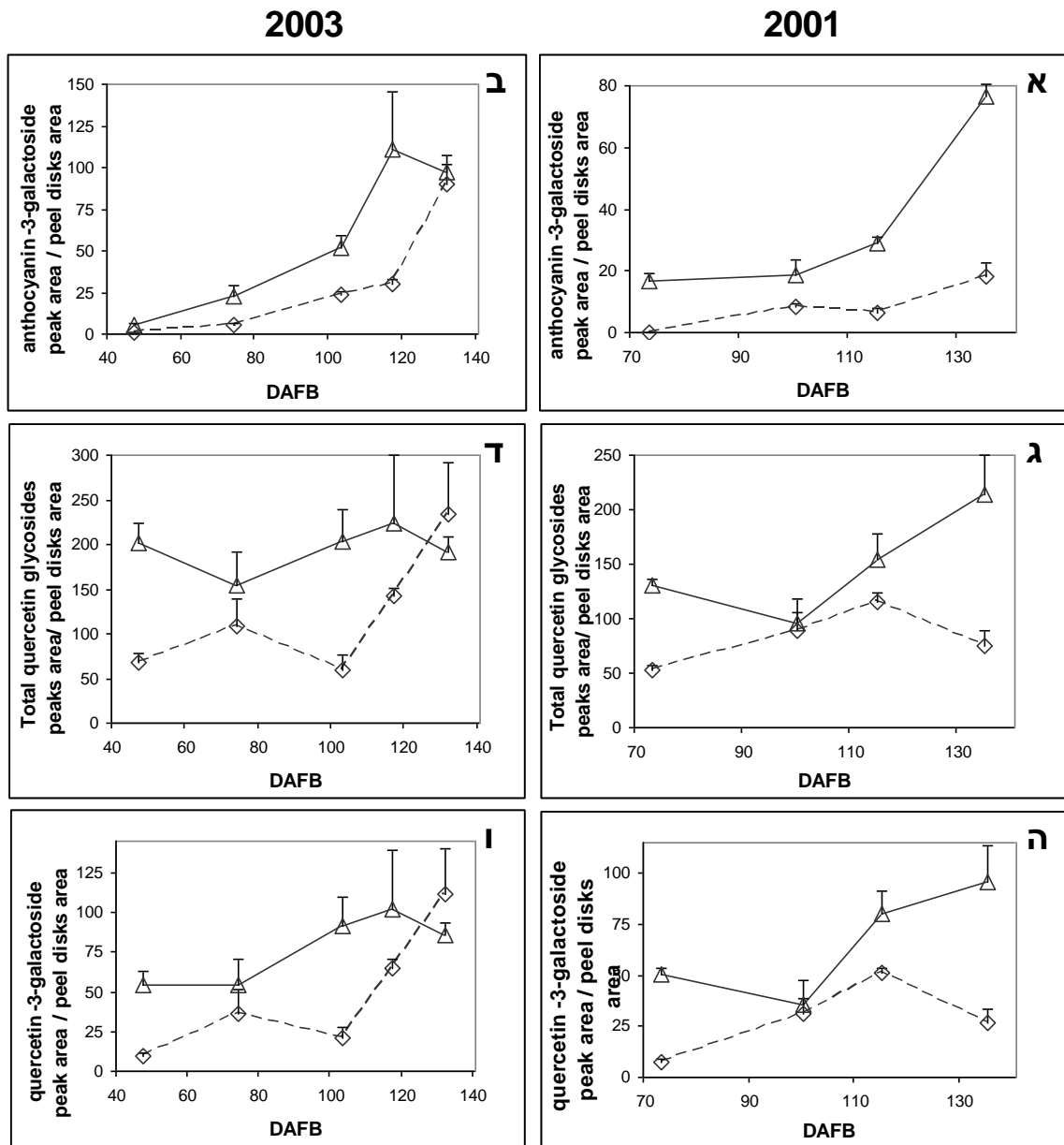


**איור 4:** השוואת התפלגות רמות הצבע של התפוחים בארבעה וואריאנטים שונים של תפוחי 'דליש אדום' בחוות מתתיהו בשנה ממוצעת (במהלך 2001) (א', ג' ה') ובשנת שיא לצבע (שנת 2003) (ב', ד', ו') מוצגים אחוז הכיסוי של הצבע האדום (א', ב') ועוצמת הצבע בסקלה יחסית (ג' ו-ד') בפירות שסומנו על העץ ונבחנו כל שבועיים במהלך הבשלתם, ועל פי ערכי  $a^*$  במדגמי פירות שנבחנו במעבדה (ה' ו-ו'). (DAFB – ימים משיא הפריחה. הברים מייצגים את שגיאת התקן  $N=40$ .)

התוצאות מצביעות על כך שכל הוואריאנטים של 'דליש אדום' שנבחנו, יכולים בתנאים מיטביים להביא לרמות צבע גבוהות, אולם בתנאי הארץ במרבית השנים רק הוואריאנטים האדומים ביותר מגיעים למימוש של רמות הצבע. כמו כן אנליזה זו מדגישה שבואריאנטים מסוימים ('Martina') יצירת הצבע מתחילה בשלבים מוקדמים בהבשלת הפירות בעוד בואריאנטים אחרים היא מתחילה מאוחר הרבה יותר, בתלות ברמות ההבשלה ובתנאי מזג האוויר.

#### 5. אפיון נגזרות סוכריות שונות של אנטוציאנינים וקוורצטינים בקליפות תפוחי 'Top Red' ו-'Martina'

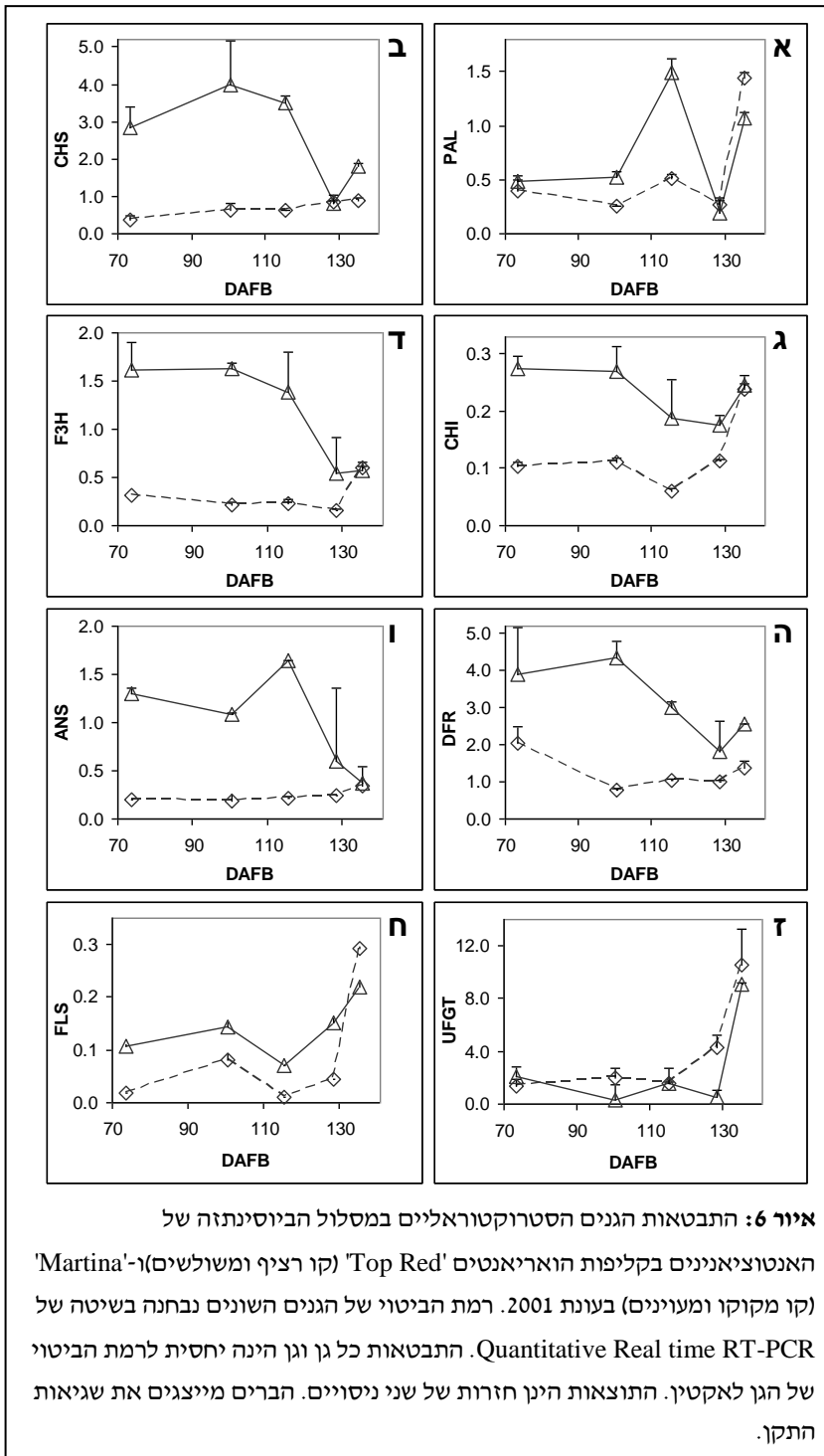
הוואריאנטים 'TopRed' ו-'Martina' היו השונים ביותר ברמות הצבע שלהם. מכיוון שהוואריאנט 'Martina', הינו מוטציה טבעית של הוואריאנט 'Top Red' שצבע קליפתו הוא אדום חזק, ואריאנטים אלה צפויים להיות דומים מאוד גנטית. על כן, בחרנו אותם לצורך האנליזה הביוכימית והמולקולרית של תהליכי יצירת הצבע. בצענו אנליזה של הפיגמנטים השונים מפירות של 'TopRed' ו-'Martina' בשלבים שונים במהלך הבשלת הפירות. הפרדת הפיגמנטים והפרקורסורים שלהם ב-HPLC הראתה שני תוצרים עיקריים, Cyanidin ו-Quercetin. שני מרכיבים אלה מופיעים מוקדם יותר ובמידה רבה יותר בקליפות מהוואריאנט האדום יותר 'Martina' (איור 5, א'-ד'). הרצת הדוגמאות ב-HPLC ללא שלב ההידרוליזה של השייר הסוכרי זיהתה אנטוציאנין יחיד (Cyanidin Galactoside) המהווה את הכמות העיקרית של האנטוציאנינים בקליפה. ההבדלים ברמת הצבע שהתקבלה (אחוזי כיסוי, עוצמת צבע) תאמו לתוצאות שהתקבלו מהפרדת הפיגמנטים. בשנה הממוצעת לצבע לא הגיעה רמת האנטוציאנינים בקליפה של 'Top Red' לרמה גבוהה (איור 5, א') אולם קרוב לקטיף ב"שנת הצבע" (2003) היו רמות ה- Cyanidin Galactoside באיזור האדום בפירות שני הוואריאנטים דומות (איור 5, ב'). בניגוד ל-Cyanidin Galactoside שהינו האנטוציאנין היחיד הנאגר ברמות משמעותיות בקליפה, זוהו מספר תוצרים בעלי ספקטרום בליעה הדומה ל-Quercetin. אלו מולקולות Quercetin הקשורות לשיירים סוכריים שונים. בשני הזנים ה-Quercetin היחידי שרמתו עלתה במקביל לעליה ברמת הצבע היה Quercetin-3-Galactoside. מעניין לציין הבדלים בין הוואריאנטים 'Top Red' ו-'Martina' בהתפלגות נגזרות ה-Quercetin השונות בשלבים השונים בהתפתחות הפרי. בשלבים המוקדמים נמצאה רמה נמוכה של Quercetin-3-Galactoside בקליפות תפוחי ה-'Top Red' (איור 5, ה' ו-ו'). תופעה זו חזרה על עצמה בשתי עונות 2001 ו-2003. אולם בדומה לעליה המשמעותית ביצירת הצבע האדום וב-Cyanidin Galactoside בקליפות 'Top Red' בעונת 2003 הייתה גם עליה ב-Quercetin-3-Galactoside שהגיעה לרמה דומה לזו המתקבלת בתפוחי הוואריאנט 'Martina' (איור 5, ו').



**איור 5:** הופעת הפיגמנט ציאנידין (א' ו-ב') תוצר הביניים במסלול שאינו אדום - קוארצטין (ג' ו-ד') והנגזרת של קוארצטין Quarcetin-3-Galactoside (ה' ו-ו') בקליפות תפוחי 'Top Red' (קו רציף ומשולשים) ו-'Martina' (קו מקוקו ומעוינים), במהלך הבשלתם בעונות 2001 (א', ג' ו-ה') ו-2003 (ב', ד' ו-ו'). בחוות מתתיהו. דסקיות פרי בקוטר 1.2 ס"מ, מהנקודה האדומה ביותר בפרי נלקחו והפיגמנטים מהן מוצו ללא הידרוליזה של השייר הסוכרי. הפיגמנטים הופרדו בשיטת HPLC על קולונת RP-18. הפיגמנטים זוהו בהתאם לזמן יציאתם מהקולונה ולתכונות הספקטרליות שלהם. התוצאות המוצגות הן ממוצע של 5 חזרות שנלקחו מדסקיות מתפוחים שונים. הברים מציינים את שגיאת התקן.

**6. מערכת מולקולרית לאנליזת הגנים המשתתפים בסינתזת אנטוציאנינים**

בעבודה זו בחנו את התבטאות הגנים הסטרוקטורליים במסלול הביוסנתזה של האנטוציאנינים. בניסוי זה נבחנו רמות הביטוי של הגנים השונים: UFGT, ANS, FLS, DFR, F3H, CHI, CHS, PAL. בקליפות התפוח (ראה איור 1 במבוא). RNA הופק מקליפות תפוחים מהואריאנטים 'Martina' ו-'Top'



Red' במהלך הבשלתם בעונת 2001 בחוות מתתיהו. ביצענו ריאקציות RT-PCR, בשימוש בפריימרים ספציפיים באיזורים שמורים בגנים הסטרוקטורליים. כבקורת נבחנה גם רמת ההתבטאות של הגן לאקטין (ACT). אנליזה זו בוצעה גם בשיטה חצי כמותית, וגם באמצעות Real Time Quantitative RT-PCR. לכל גן וגן כוילו תנאי הריאקציה ומספר מחזורי האמפליפיקציה ב-PCR. באופן זה, כמות התוצר שמתקבלת בכל ריאקציה מקבילה למידת התבטאות הגן ברקמה הנבדקת. השוואת הנתונים למידת הביטוי של הגן הקונסטיטוטיבי אקטין אפשרה נרמול של רמות הביטוי היחסיות של הגנים השונים בוואריאנטים השונים ובמהלך התפתחות הפרי. תוצאות ה-Quantitative RT-PCR בהתבטאות הגנים השונים בזנים 'Martina' ו-

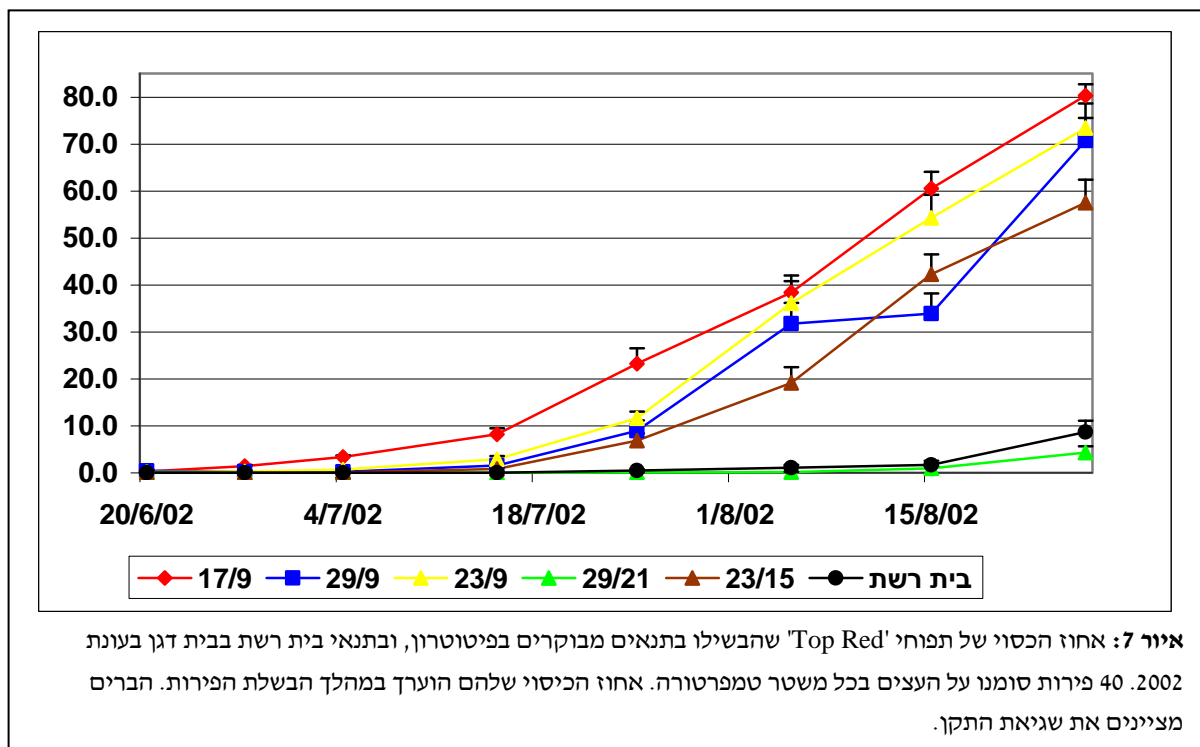
'Top Red' מוצגת באיור 6. תוצאות דומות התקבלו גם בהשוואת רמות הביטוי בעונת 2002. מהתוצאות עולה שבתפוחי ה-'Martina' הרמה ההתחלתית של רוב הגנים הסטרוקטורליים הינה גבוהה יותר, והיא נשמרת ברמה גבוהה יותר במשך רוב תקופת ההבשלה.



## 7. בחינת התפתחות הצבע בתפוחי Top Red שגודלו במשטרי טמפרטורה שונים בתנאים מבוקרים

### בפיטורון

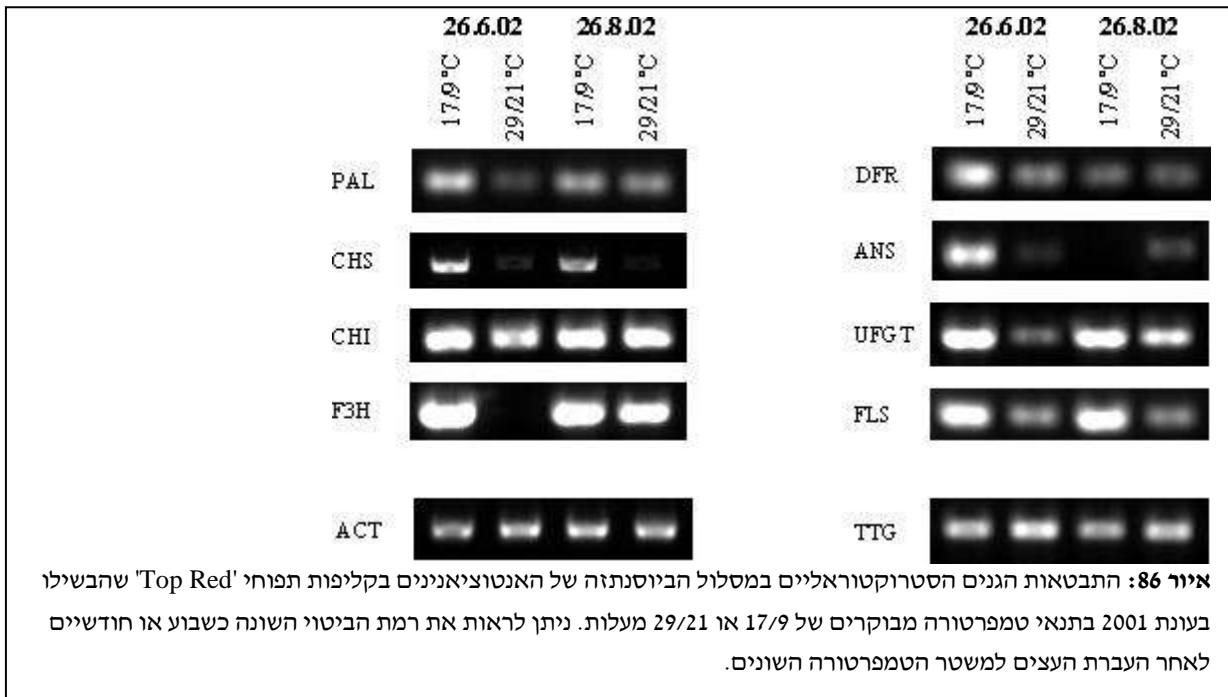
כדי לבדוד את השפעת תנאי הסביבה, בחנו את הופעת הצבע בתפוחי 'Top Red' שפירותיהם הבשילו בתנאי טמפרטורה שונים. עצים מהזן 'Top Red' הגדלים במכלים בבית דגן, הועברו לקירור למשך 70 יום. במהלך הפריחה הוספו לבית הרשת עצים פורחים של הזן 'זהוב' וכוורת דבורים להפריה. כחודשיים וחצי לאחר החנטה הועברו העצים אל תאי פיטורון לגידול בתנאים מבוקרים במשטרי טמפרטורה שונים (בעונת 2003 נבחנו תנאי הטמפרטורה הבאים: 17/9, 23/15, 29/21; בשנת 2002 נבחנו בנוסף גם משטרי טמפרטורה של 23/9 ו-29/9) עד להבשלת הפירות. פירות סומנו על העצים ובמהלך התפתחותם והבשלתם נבחנו רמת ועצמת הצבע שלהם. בנוסף, נלקחו דוגמאות קליפה מתפוחים נוספים כמפורט לעיל. הופעת הכיסוי האדום בתפוחים אלה במהלך הבשלתם בשנת 2002 מתוארת באיור 7. בשנת 2003 היו פירות מועטים על העצים. כנראה שגורם זה הביא לעליה כללית בעצמת הצבע של הפירות. אולם באופן כללי, התוצאות שהתקבלו בעונת 2003 דומות לאלו שהתקבלו במהלך הניסוי של 2002.



בניסוי זה נמצאו תנאים בהם הייתה יצירת צבע אדום מועטה מאוד עד לשלבים מאוחרים בהבשלה של הפירות (בבית הרשת ובמשטר טמפרטורה של 29/21 מעלות), ותנאים אחרים שעודדו יצירת צבע אדום (17/9 מעלות). תוצאות אלה מדגישות את החשיבות של תנאי הטמפרטורה על יצירת הצבע. התוצאות מדגישות שעיקר השפעת הטמפרטורה נובע מטמפרטורת מינימום נמוכות.

רמת הביטוי של הגנים השונים במסלול הביוסנתזה של האנטוציאנינים נבחנה בשיטה של Semi-Quantitative RT-PCR גם בפירות שהתפתחו בתנאי טמפרטורה גבוהים (29/21 מעלות) או נמוכים (17/9 מעלות) בפיטורון בשנת 2002. RNA הופק מתפוחים מייצגים כשבוע לאחר העברתם למשטרי הטמפרטורה הקבועים (26.6.02), או קרוב להבשלתם (26.8.02). תוצאות הניסוי מוצגות באיור 8. בתנאי טמפרטורה נמוכים, המעודדים את יצירת הצבע, חלק ניכר מהגנים המעורבים במסלול

הביוסנתזה של האנטוציאנינים עברו השראה מהירה ליצירת צבע. בתנאי הטמפרטורה החמים הייתה רמת ההתבטאות של גנים אלה נמוכה בהרבה. גם בשלב המאוחר בהבשלת הפירות, עדיין הייתה רמתם של חלק מגנים אלה גבוהה באופן ניכר בתנאי הגידול הקרים יותר המעודדים את יצירת הצבע.



#### 8. השראת יצירת הצבע באמצעות הורמונים צמחיים

בעונת המחקר האחרונה התחלנו להרחיב את המחקר לכיוונים מעשיים יותר, במטרה לאתר טיפולים הורטיקולטוריים שיעודדו יצירת צבע. להורמון הצמחי אתילן יש השפעה רבה על יצירת הצבע האדום, אולם, בדרך-כלל הוא מביא גם להבשלת פרי מהירה, לירידה באיכות הפרי וביכולת לאחסונו. בניסוי זה נבחנו השפעות של שילוב טיפולים בחומרים מעודדי יצירת אתילן (Ethrel), המכיל 48% חומר פעיל: Ettephon (המשחרר אתילן), ומעכבי סנתזת אתילן והבשלה (ReTain), 15% חומר פעיל: (aminoethoxyvinylglycine hydrochloride – AVG), הטיפולים נעשו בריסוס (בתוספת משטח Triton x100 0.025%, כשלושה שבועות לפני הקטיף על עצי 'Top Red' בחוות מתתיהו בשש חזרות בנות עץ בודד כמפורט בטבלה 1.

כצפוי, טיפול ב-0.12% Ethrel, המזרז את הליכי ההבשלה, גרם לעליה ברמת הצבע אך גם להבשלה מהירה, נשירה גבוהה, ואיכות פרי ירודה. טיפול ב-0.2% ReTain, המעכב את סנתזת האתילן, הביאה לעיכוב ההבשלה ובהתאם גם לעיכוב ברמות הצבע המתקבלות. לעומת זאת שילוב של ריסוס מוקדם ב-Ethrel ולאחריו טיפול ב-ReTain לא הוביל לשיפור ניכר בפרי, אך גרמו לנשירת פרי מואצת. גם טיפול ב-ReTain ולאחריו Ethrel לא הוביל לעידוד משמעותי ביצירת הצבע. רמות ההבשלה של הפרי ומידת הנשירה שלו מפורטות בטבלה I.

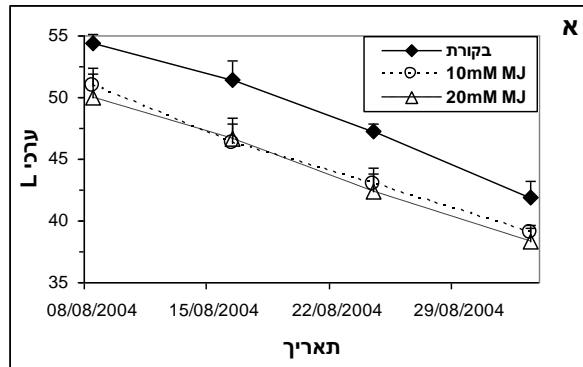
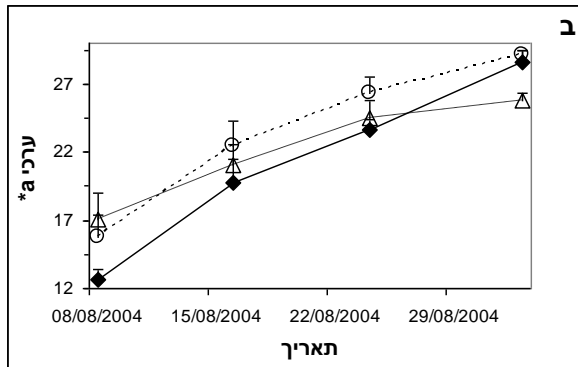
אנטוציאנינים מופיעים במערכות רבות כתוצאה מפגיעה או מתנאי עקה. להורמונים צמחיים כמו חומצה ג'סמונית (Jasmonic Acid) ונגזרות שלה (כמו (MJ) Methyl Jasmonate) או חומצה סליצילית (Salicylic Acid), הקשורים לתגובת הצמח לתנאי עקה, יש השפעה על יצירת הצבע בקליפת הפרי בתנאי

מעבדה. בשנת 2004 בחננו בניסוי ראשוני גם את השפעתו של ההורמון MJ על רמת הצבע בפירות הזן 'Top Red' בחוות מתתיהו. בדומה לניסוי הקודם, נבחנו השפעתם של ריסוסים בשני ריכוזים של ההורמון (10mM ו-20mM, בתוספת משטח Triton x100 0.025%) כשלושה שבועות לפני הקטיף. הניסוי נעשה ב-6 חזרות בנות עץ בודד.

מדדי הבשלת פרי בתאריך 23/8/04			רמת נשירת פירות ב- 16/8/04	תאריך ריסוס	טיפול
עמילן	לחץ	כמ"מ			
5.7	14.5	12.4	1.17	8/8/04	0.2% ReTain
8.0	14.2	14.2	3.33	5/8/04	0.12% Ethrel
6.3	14.5	13.8	4.33	5/8/04 +	0.12% Ethrel +
				8/8/04	0.2% ReTain
6.2	14.4	13.0	1.17	8/8/04 +	0.2% ReTain +
				15/8/04	0.12% Ethrel
5.5	15.1	12.7		8/8/04	10mM MJ
4.8	16.0	12.1		8/8/04	20mM MJ
6.3	14.8	13.1			ביקורת

**טבלה I:** השפעות הורמונים צמחיים על הבשלת הפרי ועל רמת נשירתו. בתאריך 16.8.04 הוערכו מספר הפירות שנשרו מתחת לכל עץ בניסוי ודורגו לחמש קבוצות: 1 - אין נשירה, 2 - נשירת פירות בודדים, 3 - נשירת 10-20 פירות לעץ, 4 - נשירת 20-30 פירות לעץ, 5 - נשירת למעלה מ-30 פירות לעץ. תוצאות נשירת הפירות המוצגות הינן ממוצע של 6 חזרות בנות עץ בודד. מדדי הבשלת הפירות - רמות הכמ"מ (נבחנה ברפרקטומטר), קשיות הפרי (לחץ, באמצעות פנטרומטר) ורמת העמילן (בחינה ויזואלית לאחר צביעה בתמיסת יוד), נבחנו בתאריך 23.8.04 ב-8 פירות מייצגים מכל טפול וטיפול.

לעומת הטיפולים ב-Ethrel, ריסוס ב-MJ על תפוחי 'Top Red' לא הביא להבשלה מהירה של הפירות או לנשירתם (ראה טבלה I). גם אחסון שלהם במקרר במשך כ-3 חודשים לא גרם להתרככות מהירה של הפירות. יחד עם זאת, הטיפול ההורמונאלי העלה את רמות הצבע המתקבלות (איור 9). השפעת הטיפולים על רמת הצבע הייתה ניכרת גם במבט על כלל הפירות על העץ וגם במדגמי פירות במעבדה. שנת 2004 התגלתה כ"שנת שיא" ברמות הצבע, וגם בתפוחים לא מטופלים היו רמות צבע (אחוז כיסוי ועצמת צבע) גבוהות יחסית. אולם, המדדים כמותיים וההתרשמות בשדה הצביעו על ההשאה החיובית של הטיפול.



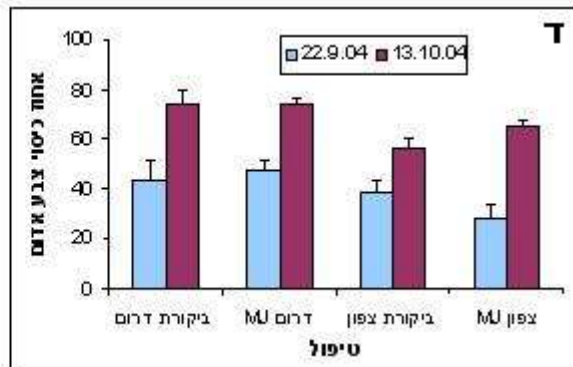
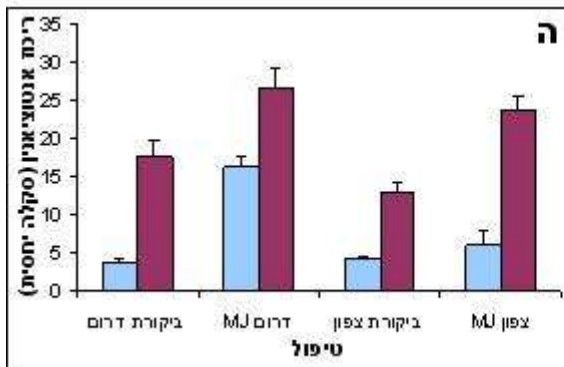
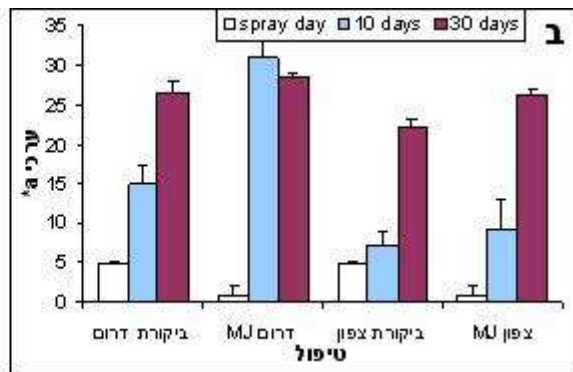
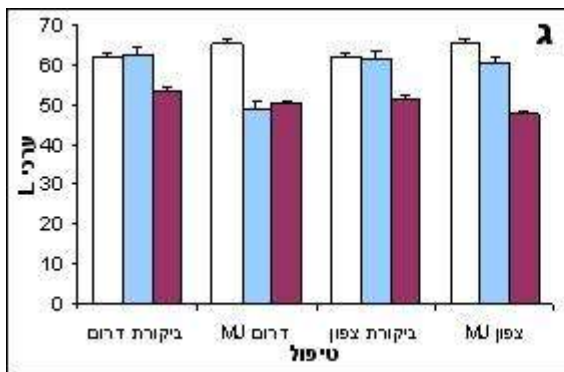
**איור 9:** אפיון הצבע בתפוחי 'Top Red' שטופלו בריכוזים שונים של MJ... 3 תפוחים מייצגים (ובקטף ב-2.9.04, 10 תפוחים מייצגים) מכל עץ נדגמו במעבדה ואיכות הצבע שלהם נבחנו באמצעות מכשיר למדידת צבע מסוג Color Guide. (א) ערכי L (מייצגים את רמת הכהות של הפרי – ככל שערכים אלה נמוכים יותר הפרי כהה יותר). (ב) ערכי a\* – ככל שערכים אלה גבוהים יותר הפרי אדום יותר). שני הפרמטרים מצביעים על פירות אדומים יותר בעקבות הטפולים בריכוזים השונים של ההורמון MJ.

כדי לאפיין טוב יותר את השפעת ההורמון MJ על השראת צבע אדום בתפוח, טופלו גם פירות של זן אחר, הזן 'Pink Lady' בהורמון. בזן זה הפרי הינו ירוק ברובו ומקבל לקראת הבשלתו לחי ורודה. גם בו, ליצירת צבע אדום יש חשיבות כלכלית רבה. בתאריך 13.9.04 רוססו 4 עצים ב-10mM MJ. פירות ממפנה צפוני ודרומי נדגמו בתאריכים 22.9.04 ו-13.10.04 לתפוחים נבדק הצבע בנקודה האדומה ביותר ובנקודה הירוקה ביותר, וכן הוערך גודלה (באחוזי כיסוי) של הלחי האדומה. מדדים נוספים שנבחנו הם משקל הפרי, רמות הסוכר והקושי של הפרי. מקליפות תפוחים 10 ימים או 30 ימים ממועד הטיפול מוצו האנטוציאנינים (מהנקודה האדומה ביותר ב-53 פירות מייצגים) וריכוזם נקבע. תוצאות הניסוי מפורטות באיור 10. בפירות הזן 'Pink Lady' הייתה השראת צבע חזקה מאוד, שהתבטאה בלחי אדומה. תוצאות אלה היו בולטות מאוד על העץ ובמדגמי הפירות, והתבטאו גם במרבית הפרמטרים של הצבע ובריכוז האנטוציאנינים. יחד עם זאת, בנקודות מסוימות בפרי הייתה ההשראה ליצירת צבע כה חזקה עד שיצרה כתמים כהים מדי על הפרי.

בשני הזנים, קבלת הצבע הייתה תלויה גם בחשיפה של הפירות לאור, והשפעת ההורמון הייתה נמוכה יחסית בהיעדר קרינה ישירה. בעצי ה-'Pink Lady' הנטועים בשורות ממזרח למערב, בלטה ההשראה הנמוכה בהרבה של ההורמון במפנה צפוני של העץ. בשני הזנים, בחלקי פרי שהיו מכוסים בעלים ולא נחשפו לקרינה ישירה לא התקבלה השראת צבע חזקה, והקליפה נותרה ירקרקה. חשוב לציין שבשני הזנים הטיפול לא הביא להבשלה מוקדמת או לירידה ניכרת באיכויות הפרי.

### מסקנות והשלכותיהן על המשך המחקר

במהלך המחקר, פיתחנו וכיילנו שיטות לאנליזת הצבע בקליפת התפוח ברמות שונות. אלה כוללות איפיון רמות הצבע של הקליפה, הפיגמנטים השונים היוצרים את הצבע, והביטוי של הגנים המקודדים לאנזימים המשתתפים בתהליך הביוסינתזה של הפיגמנטים. בכוונתנו להמשיך לאפיין את תהליכי יצירת הצבע ברמות השונות בקליפות של הואריאנטים השונים של תפוח אדום, ובתנאי סביבה שונים. בהמשך, ברצוננו לגלות ולאפיין את מנגנוני הבקרה השולטים במסלולי יצירת הצבע.



**איור 10:** השפעת ההורמון MJ על רמות הצבע בתפוחי 'Pink Lady' במפנה דרומי וצפוני של העצים. פירות תפוח נדגמו ביום הריסוס, 10 ימים (בתאריך 22.9.04) ו-30 ימים (13.10.04) אחריו. (א) תפוחים מייצגים מכל אחד מארבעת עצי הביקורת (מימין) לעומת ארבעת עצי הניסוי המטופלים ב-10mM MJ (משמאל) ביום הקטיף. במדגמי הפירות נבחנו גם מדדי הצבע a\* (ב), L-ו (ג) המצביעים על מידת הצבע האדום וכמותו בהתאמה בנקודה האדומה ביותר בפרי, וכן אחוז כסוי הצבע (ה) המצביע על רמת הירוק. הצפון והדרום מייצגים תפוחים מניסויים נפרדים בהתאמה ובחן (ה). הרבה

אנליזת הצבע ברמות השונות מצביעה על רמת פעילות שונה של המסלול בואריאנטים השונים. התוצאות מצביעות על כך שבואריאנטים אדומים מכלול הגנים במסלול מתבטאים ברמה גבוהה יותר מאשר בואריאנטים אדומים פחות. על כן, נראה שההבדל בין הוואריאנטים אינו בגנים הסטרוקטורליים המשתתפים בתהליך, אלא בשינוי במנגנוני הבקרה על המסלול. בהמשך המחקר אנו מעוניינים לפתח מערכת לזיהוי ואפיון מנגנוני בקרה אלו.

קיימת שונות רבה מאוד בין התפוחים השונים המבשילים על העץ. גם האפיון של פירות במפנה וגובה אחיד בעצים מותר שונות רבה מאוד בתנאי המיקרו-סביבה ולכן ברמת הצבע שנוצר. תופעה זו מהווה מכשול המקשה על קבלת תוצאות מובהקות בחלק מהניסויים, ובמיוחד בניסויים המולקולריים.

בעיה אחרת שהתגלתה היא שבמרבית הוואריאנטים מתקבלת מידה מסוימת (גם אם מעטה) של צבע אדום בשלבים מוקדמים יחסית. לצורך אנליזה מולקולרית, ולזיהוי ואפיון הגנים המבקרים את תהליכי יצירת הצבע, דרושים תנאי גידול בהם לא מופיע צבע כלל, ובהם המערכת אינה מופעלת. תנאים כאלה, ללא כל יצירת צבע אדום התקבלו בניסוי הפיטוטרון. אנו מתכננים לנצל מערכת זו לצורך הזיהוי של מרכיבי הבקרה של מסלול סינתזת הצבע.

בשנת המחקר האחרונה בחננו מספר טיפולים הורטיקולטוריים לעידוד יצירת הצבע. טיפולים בשילובים של חומרים מעודדי ומעכבי הפרשת אתילן לא נמצאו יעילים, ופגעו באיכויות הפרי. יתכן ששילובים כאלו יכולים להביא לעליה ברמות הצבע תוך פגיעה מינימלית באיכויות הפרי, אך נראה שגישה זו הינה מסוכנת לחקלאי. לעומת זאת, השימוש בהורמון MJ נראה מבטיח. טיפול בחומר זה, בשני זנים שונים הביא לעליה ניכרת ברמות הצבע, אך לא פגע, ולעיתים אפילו עיכב במקצת את מידת ההבשלה. בהמשך המחקר, בכוונתנו לכייל את הטיפול המיטבי ב-MJ מבחינת (1) ריכוז החומר המרוסס (2) מועד הריסוס המיטבי, (3) אפיון רמת ותקופת ההשראה של יצירת הצבע בעקבות הטיפול, (4) השפעות הטיפול על יכולת האחסון של הפרי ו-(5) בחינה של השפעות לוואי ארוכות טווח שעלולות להיגרם לעץ עצמו בהשראת ההורמון. אנו מאמינים שתוצאות אלה יאפשרו לפתח כלי הורטיקולטורי יעיל לעידוד יצירת הצבע בתפוח, שיושם בעתיד גם בעצי פרי אחרים.