



1999-2001

תקופת המחקר:

256-0532-01

קוד מחקר:

**Subject:** MRI STUDY OF WATER STATUS IN BULBS DURING THEIR TRANSITION FROM "DORMANCY" PERIOD TO ACTIVE GROWTH

**Principal investigator:** RINA KAMENETSKY

**Cooperative investigator:**

**Institute:** Agricultural Research Organization (A.R.O.)

**שם המחקר:** שינויים במאזן המים הקשורים למים החופשיים בבצלים, בשלב המעבר שבין תקופת התרדמה להתעוררות: לימוד באמצעות NMR

**חוקר ראשי:** רינה קמנצקי

**חוקרים שותפים:**

**מוסד:** מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

## תקציר

**הצגת הבעיה** - פיתוח שיטות לגידול גאופיטים בישראל, דורש לימוד מעמיק על הפיזיולוגיה של הפריחה והריבוי בצמחים אלו. במהלך מחזור החיים השנתי, לאחר הפריחה, נכנסים רוב הגאופיטים לתקופה של תרדמה היכולה להמשך עד ששה חודשים. בתקופת התרדמה חלים בגאופיטים תהליכים של התמיינות אברים וגטטיביים וגנרטיביים, העתידים להתפתח בעונה הבאה. בהרבה בצלים ובפקעות, טמפרטורות נמוכות נדרשות לשחרור מתרדמה.

**מטרת המחקר** - לעקוב אחר המעבר בין תקופת התרדמה להתעוררות בבצלי שום אפלטון ובבצלי צבעוני, נבדקה האפשרות לשימוש בשיטות MRI (Magnetic Resonance Imaging) בבצלים תוך מציאת פרמטרים מתאימים ללימוד המצב הפיזיקלי של המים ברקמות הבצל בזמן האחסון.

**תוצאות** - מתצפיות שנערכו במחקר זה באמצעות SEM ו MRI נמצאה התפתחות דומה במהלך האחסון ב-4 או ב-20 מ"צ, אך לאחר שתילה התארכות עמוד התפרחת והפריחה התרחשה רק בבצלים שנחשפו לטמפרטורות נמוכות, בעוד שקבוצת הביקורת הייתה מעוכבת מאוד בתהליכים אלו.

**מסקנות** - שיטת ה-MRI מאפשרת להבחין בשינויים בתכולה ובמצב המים בתוך ובין התאים. שינויים שנמדדו בפרמטרים המקובלים ב-MRI, כמו  $T_1$ ,  $T_2$ , צפיפות הפרוטונים ומקדם הדיפוזיה של המים מצביעים על שינויים במאזן המים אשר מתבטאים באופן בולט יותר בטמפרטורה נמוכה. יישמנו לראשונה במערכת צמחית את שיטת ה-MTC (Magnetization Transfer Contrast) אשר אפשרה לבחון באופן ברור את ההבדל בין בצלים שנחשפו לטיפול קור לאלו שלא קוררו. אחסון בטמפרטורה נמוכה עודד שחרור מים בגלדים, טרנסלוקציה של מים חופשיים בין אברים ומעבר מים לניצן המתפתח. לאור התוצאות הללו, אנו מציעים מחקר עתידי לפיתוח שיטת ה-MTC בבצלים באופן מדויק יותר ומדידת צמח גאופיט בשלבים שונים של התפתחותו במהלך השנה.

1. Zemah, H., Bendel, P., Rabinowitch, H. and R. Kamenetsky (1999). Visualization of morphological structure and water status during storage of *Allium aflatumense* bulbs by NMR imaging. *Plant Science*, 147: 65-73
2. Kamenetsky, R., Zemah, H. and Bendel, P. (1999) Visualization of morphological structure and water status in the bulbs by magnetic resonance imaging (MRI). Israeli Society of Plant Sciences, 1999, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel (unnumbered pages)
3. Zemah, H., Van der Toorn, A., Van As, H., Bendel, P. and Kamenetsky, R. (2000) Physiological changes during storage of tulip bulbs: study by magnetic resonance imaging (MRI). VIII International Symposium on Flower Bulbs, Kirstenbosch, Cape Town, South Africa, p. 75-76
4. Kamenetsky, R., Zemah, H., Van der Toorn, A., Bendel, P. and Van As, H. (2000). Use of Magnetic Resonance Imaging (MRI) for evaluation of physiological status of bulbs during storage. DIARP (The Joint Dutch-Israeli Agricultural Research Program) Bi-national Workshop on Advances in Handling, Transportation and Logistics of Ornamentals, Israel, 2000, p. 12.
5. Zemah, H., Vergeldt, F., Kamenetsky, R., van As, H. and Bendel, P. (2001). MRI monitoring of water status during storage of tulip bulbs: Imaging of relaxation rates, proton density, and magnetization transfer contrast (MTC). 4<sup>th</sup> User Meeting of the European Large-Scale Facilities for NMR, Noordwijkerhout, The Netherlands, p. 84
6. Kamenetsky, R., Zemah, H., van der Toorn, A., Van As, H. and P. Bendel (2000) Morphological structure and water status in bulbs during their transition from dormancy to active growth: visualization of by NMR imaging. *Dormancy in Plants* (J.D. Viemont and J. Crabbe, eds). CAB International, p.121-138
7. Zemah, H., Van der Toorn, A., Van As, H., Bendel, P. and Kamenetsky, R. (2000). Physiological changes during storage of tulip bulbs: study by magnetic resonance imaging (MRI) *Israeli Society of Plant Sciences*, 2000, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel (unnumbered pages)
8. Zemah, H., Vergeldt, F., Kamenetsky, R., van As, H. and Bendel, P. (2001). MRI monitoring of water status during storage of tulip bulbs: Imaging of relaxation rates, proton density, and magnetization transfer contrast (MTC). Annual Conference of the Israeli Society of Plant Sciences. Abstracts of Presentations. *Israel Journal of Plant Sciences*, Vol. 49, p. 171.
9. Bendel, P. Zemah, H., Kamenetsky, R., Vergeldt, F. and van As, H. (2001) Magnetization transfer and double-quantum filtered imaging as probes for motional restricted water in tulip bulbs. *Magnetic Resonance Imaging*, 19: 857-865
10. Kamenetsky, R., H. Zemah, A.P. Ranwala, D. Ranwala, F. Vergeldt, W.B. Miller, H. Van As and P. Bendel. Water relations and carbohydrate balance in tulip bulbs during their transition from dormancy to active growth (Submitted)

## מבוא

גאופיטים מאופיינים באבר אגירה תת קרקעי- בצל, פקעת או קנה שורש, שתפקידו העיקרי להבטיח את הישרדות הצמח בתנאים קשים (De Hertogh and Le Nard 1993). פיתוח שיטות לגידול גאופיטים בישראל, דורש לימוד מעמיק על הפיזיולוגיה של הפריחה והריבוי של צמחים אלו. במהלך מחזור החיים השנתי, לאחר הפריחה, נכנסים רוב הגאופיטים לתקופה של תרדמה היכולה להמשך עד ששה חודשים. בתקופת התרדמה חלים בגאופיטים תהליכים חשובים של התמיינות אברים וגטטיביים וגנרטיביים, העתידים להתפתח בעונה הבאה. בכדי לקבל גידול מוצלח ופריחה במועד המתאים, על הצמח לעבור את כל שלבי ההתמיינות ולהשלים דרישות פיזיולוגיות ספציפיות לכל שלב בהתפתחותו. בהרבה בצלים ובפקעות, ידוע כי שלב ההתמיינות לפריחה מתרחש בתנאים של טמפרטורות גבוהות אך טמפרטורות נמוכות נדרשות להתארכות עלים וגבעולי פריחה. מכיוון שבתנאי החורף השוררים בישראל הטמפרטורות אינן נמוכות דיין כדי למלא את דרישות הקור, יש לאחסן את הבצלים והפקעות בטמפרטורה נמוכה לפרק זמן מסוים לפני השתילה כדי להבטיח קבלת פריחה איכותית.

אברי האגירה של גאופיטים נחשפים לטמפרטורות הסביבה (בשדה או במחסן), וברבים מהם משפיעה החשיפה הזו על התהליכים שיתרחשו בצמחים המתפתחים מהם. עוד ידוע כי גאופיטים רבים שעברו את גיל הנעורים מגיבים להשראת הקור בפריחה. התהליכים הקשורים למעבר לבגרות פיזיולוגית, ועצם קליטת ההשראה של הקור מתרחשים בתוך אברי האגירה, לכן קשה להעריך את השפעותיהם ואת מועד סיומם של התהליכים הללו ולימודם דורש בד"כ שיטות מחקר הרסניות, כך נמנע מעקב רצוף של ההתפתחות ומהלכה בצמחים בודדים. ברוב הגאופיטים, שלבי ההתפתחות המתאימים לתחילת טיפול הקור ולסיומו, אינם ידועים. בצבעוני, שהוא הגאופיט הנחקר ביותר, ידוע שהזמן המתאים לקבלת טיפול הקור הוא בשלב התמיינות השחלות בפרח (שלב G). אך עד כה לא זוהה מדד היכול לשמש זיהוי להשלמת דרישת הקור של הבצל (במינים דורשי קור), שהינה תנאי הכרחי להתארכות גבעול הפריחה ולהתפתחות ניצני התחדשות (Le Nard and De Hertogh, 1993a). לאחרונה הוצעו מדדים שונים כסמנים למילוי דרישות הקור בצבעונים: תכולת העמילן והעמילאז (Gorin and Heidema, 1985; Lambrechts et al., 1994) חלבונים ונשימה (Higuchi and Sisa, 1967; Kannevorff and Van der Plas, 1994) ליפידים של הממברנות (Walch and Van Hasselt, 1991) והורמונים אנדוגניים (Reberes et al., 1979; Aung and De Hertogh, 1979; Rakhimbaev et al., 1978; al., 1995). אך אף אחד מן הפרמטרים האלו לא נתן הסבר על השפעת הטמפרטורה הנמוכה על המשך ההתפתחות ועל יכולת הצמח לפרוח.

הדמיה בלתי הרסנית של רקמות צמחים ע"י תהודה מגנטית גרעינית NMR מהווה כלי רב עצמה המאפשר צפייה באברי הצמח הפנימיים וקביעת מצב המים באורגניזמים חיים. טכניקה זאת שימשה בהצלחה בלימוד מערכות ביולוגיות כמו פיזור מים בפירות (Wang et al., 1988; Mass et al., 1995), אמדן נזקי קפיאה (Ishikawa et al., 1997) ולימוד תנועת מים בצינורות הובלה, שורשים וגבעול (Bottomley et al., 1986; Omasa et al., 1985; Wang et al., 1986).

בשנים האחרונות, הוצע שלמאזן המים יש תפקיד חשוב בהתעוררות פקעים של עצי פרי נשירים מתרדמה.

המים ברקמה הצמחית, יכולים להקשר למולקולות גדולות (סוכרים, חלבונים) או להימצא כמים חופשיים (Faust et al., 1991) המים החופשיים מהווים תווך שבתוכו מתרחשים תהליכים פיזיולוגיים וביוכימיים רבים. מחקרים רבים נערכו בעצי פרי ובגידולים אחרים בכוונה לזהות את מצב המים בזמן התרדמה, וללמוד את השפעת הקור על התפתחות הצמח. החוקרים הציעו כי טמפרטורות החורף הנמוכות מעודדות מעבר ממצב של מים הקשורים למולקולות גדולות למצב של מים חופשיים (Faust et al., 1991; Liu et al., 1993; Millard et al., 1993), המאפשרים קיומם של תהליכים אנדוגניים שונים. לפיכך הסיקו כי שינויי זה במצב המים מעורב בהפסקת התרדמה ובפריחה. חקירת מצבם הפיזיולוגי של ניצני אפרסק העלתה כי תכולה גבוהה של מים קשורים מקנה להם עמידות לקור, והמעבר למצב של מים חופשיים הוא המאפשר את הצימוח האביבי (Sugiura et al., 1995). העבודות הללו הוו בסיס למסקנה לפיה תכולת המים החופשיים ברקמות הצמח עשויה לשמש עדות למצב התרדמה בניצנים המתפתחים (Faust et al., 1991; Liu et al., 1993; Millard et al., 1993). לימוד התהליכים פיזיולוגיים המתרחשים בתוך הבצל במהלך התרדמה נעשה בעיקרו ע"י חיתוך הבצל ומדידת השינויים בחלקים הפנימיים או שימוש ברקמות להסתכלות מיקרוסקופית ולבדיקות ביוכימיות. הבדיקות ההרסניות הללו מונעות מעקב רצוף אחר תהליכים המתרחשים בצמח השלם. בשנים האחרונות פותחו שיטות בלתי הרסניות, כגון הדמיה מגנטית גרעינית (Magnetic Resonance Imaging). באמצעות (Nuclear Magnetic Resonance) NMR. שיטה זו מאפשרת לימוד תהליכים ושינויים המתרחשים *in vivo* ברקמות חיות (צמחיות ואנימליות), ואפיון חזותי של רקמות באופן בלתי פולשני. מדידת זמני הרלקסציה  $T_1$  ו- $T_2$  מאפשרות זיהוי של מצב המים ברקמות כוון שערכם מעיד על יכולת התנועה של המים. זמן רלקסציה קצר מורה על כושר תנועה נמוך של המים ברקמה, ומכאן עדות על קשירתם למולקולות אחרות (Chudek and Hunter, 1997).  $^1\text{H}$ -MRI מספק מידע על מצב המים ופיזורם ברקמה ומאפשר צפיה בלתי הרסנית בצורות מורפולוגיות שונות (Yamazaki, 1995). תהליכים מטבוליים רבים, המתרחשים בזמן התרדמה יכולים להוביל לשינוי בסיגנל ה-MRI של מולקולות המים. שינויים בחלק היחסי של מים קשורים וחופשיים, תכולת סוכרים או שינויי בפרמיאביליות הממברנות יכולים לגרום לשינויים בזמן הרלקסציה  $T_1$  ו- $T_2$  ובמקדם הדיפוזיה של המים, D. טכניקת ה-MRI שימשה ללימוד בלתי הרסני של ההתפתחות של בצלי צבעונים (Okubo et al., 1997). החוקרים עקבו אחר השינויים ברמת המים החופשיים בתוך הבצלים ומצאו, כי באלה שאוחסנו בטמפרטורת החדר המים קשורים בחוזקה לחומרי תשמורת, יותר מאשר בבצלים שאוחסנו בקור שימוש בפרמטרים ספציפיים בהדמיה (צפיפות ספינים,  $T_1$ ,  $T_2$  או ADC) בכדי לאפיין את מצב המים דווחו בעבר ע"י (Okubo (1997), Liu et al., (1993) ו-Ishida et al., (1997).

## מטרות המחקר

1. לימוד התהליכים הפיזיולוגיים המתרחשים בגאופיטים במעבר בין שלב התרדמה לצימוח אקטיבי. בחינת השפעת טמפרטורה נמוכה במהלך האחסון על המורפולוגיה ההתפתחותית.
2. התאמת טכניקות MRI חדשניות ללימוד גאופיטים והשוואתן עם שיטות קונבנציונליות ללימוד אנטומיה של הרקמה ותכולת המים באברים שונים של הבצל.
3. מציאת מדד NMR שיוכל להצביע באופן מהימן על המצב הביופיזיקלי של המים ברקמות.

## פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

הניסויים נערכו במקביל במכון וולקני (המחלקה לפרחים), מכון ויצמן למדע ברחובות ובמרכז ה-NMR ב-Wageningen, הולנד.

### חומר צמחי

#### שום אפלטון *Allium alfatunense*

נחקר בשנה הראשונה של הפרויקט. ב-15 באוגוסט, נבחרו באקראי 50 בצלים, 25 מהם אוחסנו ב-4 מ"צ והאחרים ב-20 מ"צ למשך 16 שבועות עד ה-16 בדצמבר. מכל קבוצת טיפול, נדגמו באקראי 7 בצלים ששמשו לדימות חדשי ב-NMR. ב-19 בדצמבר נשתלו 50 הבצלים בעציצים בקוטר של 12 ס"מ שהכילו מצע טוף כבול ביחס נפחי 20:80. העציצים הועברו לפיטוטרון, והושמו שם בחדר בו נשמרו טמפרטורות של 20/12 מ"צ לילה/יום בהתאמה, ובאורך יום טבעי.

בשנה השנייה והשלישית של הפרויקט נחקרו בצלי צבעוני *Tulipa gesneriana* מהזן Apeldoorn. הבצלים בגודל 11/10 ס"מ (בהיקף) נתקבלו מהמרכז ללימוד בצלים בליסה (Bulb Center, Lisse) שבהולנד. הבצלים נאספו ביוני ואוחסנו ב-20 מ"צ למשך חודשיים. בספטמבר, לאחר שהפרח בבצל הגיע לשלב G חילקנו את אוכלוסיית הבצלים לשנים, 50 בצלים אוחסנו ב-4 מ"צ ו-50 בצלים נשארו בטמפרטורה של 20 מ"צ למשך 12 שבועות. מספר בצלים מכל קבוצה סומנו ונלמדו באמצעות NMR ב-0, 2, 4, 8 ו-12 שבועות מתחילת האחסון. כמו כן נמדדו הבצלים 4 ו-10 ימים לאחר שתילה. בדצמבר נשתלו הבצלים בעציצים בקוטר של 12 ס"מ שהכילו מצע טוף כבול ביחס נפחי 20:80. העציצים הועברו לפיטוטרון, והושמו שם בחדר בו נשמרו טמפרטורות של 20/12 מ"צ לילה/יום בהתאמה, ובאורך יום טבעי.

## שימוש ב-NMR ללימוד המבנה המורפולוגי ולמידת מצב המים ברקמת הבצל

הניסויים נערכו במקביל במכון ויצמן למדע ברחובות ובמרכז ה-NMR ב-Wageningen, הולנד. במכון ויצמן, השתמשנו בספקטרומטר הדמיה בעל מגנט בעוצמה של 4.7 טסלה מסוג Biospec תוצרת Bruker גרמניה.

בהולנד, השתמשנו באלקטרומגנט בעל עוצמה של 0.47 טסלה תוצרת Bruker. גרמניה המקושר לספקטרומטר (SMIS) Surrey Medical Imaging Systems, Guilford, אנגליה.

## הפרמטרים שנמדדו באמצעות MRI

1 אפיון חזותי (ויזואליזציה) של אברי הבצל. הדימויות של המבנה הפנימי של הבצלים נערך באמצעות  $T_1$ -weighted spin echo pulse sequence (Farrar and Becker, 1971) תוך שימוש בפרמטרים הבאים: TE-זמן הופעת ההד  $TE=15$  msec (echo time) ו- $TR=600$  msec (repetition time). עובי פרוסה 0.8 מ"מ. כל עיבודי התמונות נעשו באמצעות התוכנה האינטראקטיבית Paravision תוצרת Bruker, גרמניה.

2 זמני הרלקסציה -זמני הרלקסציה  $T_1$  ו- $T_2$  ייחודיים לתופעת ה-NMR והם מתארים את הקצב בו חוזרים הפרוטונים למצב הבסיסי לאחר הפרעה של שווי המשקל ע"י פולס של גלי רדיו. מדידת זמני הרלקסציה מאפשר להעריך את צפיפות וכמות הפרוטונים ברקמה, ובאמצעותו ניתן לקבל דימויות של המים הניידים (mobile) ברקמה הנבדקת. ערכים גבוהים של  $T_1$  ו- $T_2$  מצביעים על ניידות גבוהה של הפרוטונים ונוכחות מים חופשיים בכמות גדולה יותר מאשר ברקמה בה נמדדים ערכים נמוכים של  $T_1$  ו- $T_2$  (Chudek and Hunter, 1997).

3. מקדם הדיפוזיה של המים (ADC) Apparent Diffusion Coefficient המצביע על קצב מעבר המים ברקמה.

4. צפיפות הפרוטונים (Proton density) מצביע על כמות הפרוטונים ברקמה.

5. MTE-Magnetization Transfer Effect. אפקט ה-Magnetization transfer, שיושם לראשונה על ידו במערכות צמחיות, מהווה מדד ליחס בין מים קשורים ומים חופשיים ברקמות. השיטה מאפשרת השפעה על הפרקציה הנוזלית באופן בלתי ישיר, באמצעות פולס הגורם לרוויה של פרקצית המאקרומוולקולות וכך מאפשר למדוד את המים הקשורים ברקמה (Bendel et al., 2001).

## מיקרוסקופיה

במהלך האחסון נערך מעקב מורפולוגי באמצעות מיקרוסקופ אור ומיקרוסקופ אלקטרוניים סורק. חומר טרי נצבע ביוז IKI על מנת להבחין בגרגרי העמילן ו-Sudan Red לצביעת ליפידים. בנוסף ערכנו פיקסציה ב-FAA וקיבענו בפרפין, הבלוקים נחתכו בעובי של 12 מיקרון ונצבעו ע"י אלציאן גרין/ספרנין (Alcian/Safranin). הבצל הופרד לאבריו השונים ונשמר ב-FAA לאחר קיבוע בפרפין וחיתוך לפרוסות בעובי של 12 מיקרון. והדוגמאות נצבעו ע"י PAS לאיבחון פוליסכרידים.

## מדידת משקל טרי ויבש

לאחר אחסון ב-4 וב-20 מ"צ למשך 12 שבועות, 10 בצלים מכל טיפול הופרדו לאבריהם ונשקלו. לאחר מכן הוכנסו לתנור ייבוש תוצרת Salvis, שוצריה למשך 72 שעות בטמפרטורה של 70 מ"צ ונשקלו שוב.

## תוצאות

### שום אפלטון *Allium aflatunense*

#### מחזור חיים שנתי והתפתחות הפרח

מחזור החיים השנתי של שום אפלטון מוצג באיור 1 מריסטמה בלתי ממוינת של *A. aflatunense* ניתנה להבחנה במרץ, כאשר צמח האם היה בפרחה מלאה. באוגוסט, לפני טיפול הקור נצפתה באופן ברור התמיינות ראשונית של פרימורדיות פרחים על מריסטמת התפרחת באמצעות SEM ברוב הבצלים שנבדקו (איור 2 : A,B). בדצמבר, לפני שתילה, ניתן לראות תפרחת ממוינת הן ב-4°C והן בקבוצת הביקורת (20°C), (איור 2 : C,D) אך קיים הבדל באורכו של עמוד התפרחת: בבצלים מקוררים הגיע עמוד התפרחת לכדי 2 ס"מ בעוד שבבצלים שאוחסנו ב-20 מעלות אורכו של עמוד התפרחת היה 1 ס"מ.

הדמיית התהודה המגנטית של בצלים מאפשרת לצפות בעוגת הבצל, אשר מורכבת מחלק בוגר יותר (חלק תחתון) וחלק צעיר (עליון), פרימורדיות שורשים, ניצן פריחה וגלד תשמורת גדול, נצפו שינויים במבנה הגלדים, התארכות עלים ועמוד התפרחת וגדילת הבצל במתחדש (איור 3).

#### קביעת ערך R ו-T<sub>2</sub> משוער (apparent T<sub>2</sub> values)

בניסוי זה מדדנו ערך משוער של T<sub>2</sub> שנתקבל מתוך תמונות יחס (R) שנוצרו מחלוקת ההדמיה שהתקבלה בשני זמני הופעת הד (echo time) מתוך ערך R חושב ערך T<sub>2</sub> המשוער (T<sub>2app</sub>). עליה בערך R משקפת ירידה בערכי T<sub>2</sub> ומצביעה על נוכחות מים קשורים למאקרומוקולות בתוך הרקמה, ואילו ירידה בערך R מצביעה על נייודת גבוהה יותר של המים, כלומר על כמות גדולה של מים חופשיים ברקמה.

באוגוסט, לפני תחילת האחסון נמדדו ערכי R ו-T<sub>2app</sub> באכלוסיה של בצלים ע"פ אבריהם פרט לעמוד התפרחת שעדיין לא היה מפותח דיו. מדידות נוספות נערכו במהלך האחסון, עד דצמבר, לפני השתילה. התמיינות התפרחת התרחשה כאמור עוד לפני האחסון, אך לא ניתן היה למדוד את התארכות עמוד התפרחת במהלך הניסוי. בשני טיפולי האחסון, נמצאה ירידה משמעותית בערכי T<sub>2app</sub> בין תאריך המדידה הראשון לאחרון בעוגת הבצל ובשני הגלדים אך לא בנצר המתפתח (טבלה 1, איור 4). מתוך השוואת האפקט של שני תנאי האחסון על ערכי R נמצא ערך T<sub>2</sub> נמוך יותר בעוגת הבצל של הבצלים שאוחסנו ב-4°C לעומת אלו שבקבוצת הביקורת.

לא נמצאה הוכחה להשפעת הקור על ערכי R בגלדים ובתפרחת המתפתחת. עליה מתמדת בערכי R נמדדה בעוגת הבצל של שתי קבוצות הטיפול אך ב-4°C נמצאו ערכים הגבוהים באופן מובהק מקבוצת הביקורת כבר בחודש אוקטובר (איור 5).

**טבלה 1.** ערכי R ו-  $T_2$  המשוער באברי הבצל באוגוסט (לפני האחסון) ובדצמבר לאחר ארבעה חדשי אחסון ב-4 וב-20 מ"צ.

האבר הנמדד		אוגוסט		דצמבר	
		אחסון ב-4 מ"צ		אחסון ב-20 מ"צ	
		ערך R	$T_2$ משוער	ערך R	$T_2$ משוער
גלד ראשון		$3.41 \pm 0.15$	$17.47 \pm 0.65$	$4.3 \pm 0.48^y$	$14.57 \pm 1.0$ 5
גלד שני		$3.50 \pm 0.18$	$17.03 \pm 0.59$	$4.74 \pm 0.70^y$	$13.78 \pm 1.3$ 6
עוגת הבצל		$3.61 \pm 0.25$	$16.68 \pm 0.79$	$6.42 \pm 1.14^y$ z	$11.62 \pm 1.3$ 3
עלים		$7.45 \pm 0.52$	$10.51 \pm 0.37$	$5.07 \pm 0.36^y$	$11.08 \pm 0.5$ 9
תפרחת		$3.27 \pm 0.14$	$17.76 \pm 0.59$	$3.77 \pm 0.039$	$14.83 \pm 1.2$ 7
עמוד התפרחת		—	—	$5.175 \pm 0.34$	$11.76 \pm 0.7$ 1
				$12.92 \pm 0.6$ 8	$6.06 \pm 0.69$
				$15.82 \pm 0.1$ 3	$4.22 \pm 0.54$
				$13.07 \pm 0.5$ 4	$6.74 \pm 0.49$
				$10.03 \pm 0.3$ 6	$11.62 \pm 1.3$ 3

y - הבדל מובהק בין ערכי R בשני מועדי האחסון ( $P > 0.01$ ).

z - הבדל מובהק בין הטיפולים ( $P > 0.05$ ).

#### התפתחות הצמח לאחר השתילה

בתחילת ינואר, כשבועיים לאחר השתילה, בצלים שאוחסנו ב  $4^\circ\text{C}$  לבלבו ואורך העלים הגיע לכ- 30 ס"מ. עמוד התפרחת נצפה בסוף ינואר והגיע לאורך של 60 ס"מ בחודש פברואר. הפריחה שהחלה בחודש פברואר נמשכה עד מרץ. בצלי הביקורת שלא חשו בטמפרטורות נמוכות במהלך האחסון לבלבו רק בסוף פברואר והגיעו לאורך עלים של 3-2 ס"מ. עמוד בתפרחת התארך (מעט 2 ס"מ) אך מעולם לא הגיע לפריחה ונשאר בתוך בבצל.

#### **צבעוני מהזן Apeldoorn**

##### מורפולוגיה והיסטולוגיה של הבצל

ביולי- אוגוסט עוד בטרם הוכנסו הבצלים לאחסון נצפו תחיליות שורשים. בחתך האורך של עוגת הבצל נמצאו רקמות שונות: תאי אחסון גדולים, תאים דחוסים קטנים וצרורות הובלה (איור 6 A ו-B). בחודש אוגוסט לפני האחסון שלב G (התפתחות עלי שחלה, שלב המסמן את המועד לתחילת טיפול הקור) נמצא בכל הבצלים שנבדקו. בבדיקות מיקרוסקופיות נמצא שגלדי התשמורת מכילים תאים גדולים (כ- 125 מיקרון), בחלקו המרכזי של הגלד התאים מכילים גרגרי עמילן בצפיפות רבה ובגדלים שונים. בשכבה התת אפידרמלית של הגלדים והתאים צפינו בחומר דמוי גיל שנמצא כפוליסכריד עיי צביעה באלציאן גרין/ ספרנין. בחודש דצמבר, בתום האחסון, צפינו בפירוק של גרגרי העמילן בשני הטיפולים. (איור 7). במהלך האחסון התפתחות והתארכות הניצן המרכזי נצפתה



הן באמצעות חיתוך הבצלים והן באמצעות הדימויות ב-NMR (איור 8). בחודש דצמבר לאחר 12 שבועות באחסון הפקע המרכזי מכיל פרימורדיות עלים על גבי גבעול פריחה ופרח. הפרח המתפתח מורכב מטיפוסי רקמה שונים, תאים קטנים וחללים בין תאיים (איור 5-C). הדמיות NMR שנערכו 10 ימים לאחר השתילה בבצלים לאחר אחסון ב 4 ו-20 מ"צ מוצגות באיור 9. בבצלים מקוררים גבעול הפריחה נמצא מחוץ לאזור הרגיש של הסליל וניתן לראות רק את בסיסו בעוד שבבצלים לא מקוררים הפקע כמעט ולא התארך וניתן לראותו. הגלדים בבצלים שאוחסנו ב 4 מ"צ איבדו כמות מים משמעותית בהשוואה לאלו שאוחסנו ב 20 מ"צ. כשבועיים לאחר השתילה בצלים שאוחסנו ב 4 מ"צ לבלבו והגיעו לגובה של 11-15 ס"מ. עמוד התפרחת והגיע בסוף חודש ינואר לגובה של 45 ס"מ. הפריחה התרחשה במהלך חודש פברואר. בהשוואה בצלים שאוחסנו ב 20 מ"צ לבלבו בסוף פברואר והגיעו לגובה של 2-3 ס"מ. עמוד התפרחת התארך מעט בתוך הבצל והפרח הופל.

#### הערכת המצב הפיזיקלי של המים באמצעות NMR

בניסויים אלו נמדדו זמני הרלקסציה  $T_1$  ו- $T_2$  המוצגים כאן כ  $R_1$  ו- $R_2$  שהם הערכים הרצפרוקלים של  $1/T_1$  ו- $1/T_2$ . השימוש ב  $T$  או  $R$  מתארים באותו האופן את זמני הרלקסציה, והשימוש בכל אחד מהם נובע מטעמי נוחות לחישוב הנתונים המתקבלים.

באיור 8 מוצגות מפות  $R_2$  ( $1/T_2$ ) לשני בצלים מייצגים ב 5 נקודות זמן במהלך האחסון ב 4 ו 20 מ"צ בהתאמה. מפות ה- $R_2$  מצביעות על מגמה כללית של זמן רלקסציה מהיר יותר בגלדים ובעוגת הבצל בסוף תקופת האחסון ב- 4 וב- 20 מ"צ. בהדמיות המציגות את צפיפות הפרוטונים קיים הבדל בין 4 ו- 20 מ"צ וגם הוא בולט באזורים הצדדים של הגלד (תת-אפידרמלי). בבצלים הלא מקוררים אזור זה עשיר יותר במים ביחס לחלק המרכזי של הגלד, היחס הזה לא השתנה באופן משמעותי במהלך האחסון. בהשוואה, בבצלים המקוררים היחס בין החלק המרכזי של הגלד והשכבה התת אפידרמלית גדול יותר. הערך הממוצע של  $R_2$  בגלדים ובעוגת הבצל מוצג באיור 10. בשני הטיפולים זמן הרלקסציה הופך להיות מהיר יותר (מתקצר). בעוגת הבצל שינויי זה גבוהה יותר ב 4 מ"צ. צפיפות הפרוטונים בעוגת הבצל והגלדים כממוצע של כל הבצלים ב 4 ו 20 מ"צ בהתאמה, מוצגות באיור 11. בשני הטיפולים נצפתה ירידה ברורה בתכולת המים בעוגת הבצל במהלך האחסון אך נמצא הבדל מובהק בין 4 ל 20 מ"צ. בגלדים תכולת המים הממוצעת נשארה קבועה והערכים ב 4 וב 20 מ"צ היו דומים. חשוב לציין שערכים אלו מייצגים את כל הגלד ללא הבחנה בין החלקים הצדדים והחלק המרכזי, כך הפיזור המחודש של המים בין חלקי הגלד, אותו ניתן לראות באיור 8 לא בא לידי ביטוי בגרף (איור 11).

היסטוגרמות המראות את פיזור המים בגלדים כממוצע של כל החזרות בטיפול מוצגות באיור 12. ההיסט לכוון ערכי  $R_2$  גבוהים יותר ( $T_2$  קצר יותר) וערכים נמוכים יותר של צפיפות הפרוטונים מוצגים באופן ברור בהיסטוגרמות. בעוגת הבצל נמצא הבדל מובהק בערכי  $R_2$  בין 4 ל 20 מ"צ, אך לא נמצא הבדל בצפיפות הפרוטונים.

מפות  $R_1$  ( $1/T_1$ ) של שני בצלים מייצגים לאחר 12 שבועות אחסון ב 4 או ב 20 מ"צ מוצגים באיור 13. קיימים הבדלים ברורים באזורים הצדדים של הגלדים בהם  $R_1$  נמוך יותר ב 20 מ"צ לעומת 4 מ"צ.

איורים 14-15 מציגים את ערכי הדיפוזיה שנמדדו באמצעות NMR. באיור 14 ניתן לראות בצל מייצג מכל טיפול ב-5 נקודות זמן במהלך האחסון. איור 15 מתאר את הממוצע של כל הבצלים (4 ו-20 מ"צ) באברים השונים. נמצאה נטייה מובהקת לעליה בערכי הדיפוזיה (ADC) ב-20 מ"צ לעומת זאת ב-4 מ"צ ערכי הדיפוזיה נשארו יציבים במהלך תקופת האחסון. בשנה השלישית של הפרויקט בחנו שיטה חדישה למדידת מים קשורים וחופשיים Magnetization Transfer Contrast (MTC). שימוש בטכניקה של MTC למעקב אחר מאזן המים הקשורים והחופשיים בבצל מצביע על תכולה שונה של מים קשורים בגלדים של בצל צבעוני במהלך ובתום האחסון. לאחר אחסון ב-4 מ"צ למשך 8 שבועות, תכולת המים הקשורים הייתה נמוכה יותר בגלדים של בצלים שאוחסנו ב-4 מ"צ לעומת הגלדים של הבצלים שאוחסנו ב-20 מ"צ (טבלה 2). בניצן המתפתח נצפתה מגמה הפוכה ואפקט ה-MT עלה במידה רבה יותר בבצלים שאוחסנו ב-4 מ"צ לעומת אלו שב-20 מ"צ.

## טבלה 2. הערכי אפקט ה-MT Magnetization Transfer בגלדים ובניצן

אוכלוסיית הבצלים (n=10)	MTE (MT effect) גלדים	MTE (MT effect) ניצן
לפני האחסון	$0.533 \pm 0.029$	$0.313 \pm 0.002$
לאחר אחסון ב-20 מ"צ	$0.507 \pm 0.016$	$0.421 \pm 0.022$
לאחר אחסון ב-4 מ"צ	$0.371 \pm 0.036$	$0.562 \pm 0.012$

את ההבדלים בין טיפולי האחסון ניתן לראות גם באיור 16 המציג את הדמיות ה-MRI תוך שימוש בשיטת ה-MTC. ניתן לראות בברור את ההבדלים בין הטיפולים, נמצא שיש יותר מים קשורים בגלדים בטיפול האחסון ב-20 מ"צ לעומת 4 מ"צ. המגמה ההפוכה נצפתה בניצן כאשר יותר מים קשורים נמצאו ב-4 לעומת 20 מ"צ. מדידת משקל טרי ויבש שנערכו לאחר 12 שבועות אחסון ב-4 ו-20 מ"צ מוצגות בטבלה 3.

## טבלה 3. המשקל הטרי והיבש בגלדים ובניצן המרכזי של בצלי צבעוני לאחר אחסון ב-4 וב-20 מ"צ

	גלדים		ניצן	
	4 מ"צ	20 מ"צ	4 מ"צ	20 מ"צ
משקל טרי (גרם)	$3.89 \pm 0.08$	$3.91 \pm 0.2$	$1.09 \pm 0.55$	$1.21 \pm 0.09$
אחוז המשקל היבש	33	37	28	21

מתוך הטבלה ניתן לראות שעל אף שלא קיים הבדל במשקל הטרי של הגלד והניצן ב-4 וב-20 מ"צ נמצא הבדל מובהק באחוז המשקל היבש. בגלדים המשקל היבש גבוה יותר ב-20 מ"צ, ובניצן אחוז המשקל היבש גבוה יותר ב-4 מ"צ. תוצאות אלה מחזקות את הממצאים שנתקבלו במדידות ה-MTC

### מסקנות והשלכתייה

עד כה רוב המחקרים על התפתחויות צמחים נערכו בשיטות הרסניות, אשר אינן מאפשרות לימוד מתמשך של האובייקטים. MRI הנה טכניקה בלתי הרסנית היכולה לשמש כשיטה רבת עוצמה לאפיון של שינויים מורפולוגיים באברים שונים בצמח וברקמותיו ובכדי ללמוד את מצב המים במהלך ההתפתחות הוגטיבית וההתפתחות הרפרודוקטיבית בצמח כולו. גאופיטים מכילים אברים מוגדרים וגדולים יחסית ולכן מתאימים כאובייקט לשימוש ב-MRI. כך התאפשר במחקר זה לעקוב אחר השינויים המורפולוגיים ומצב המים של אברים שונים בבצלי שום אפלטון ובצלי צבעונים בזמן האחסון. בצמחים רב שנתיים השחרור מתרדמה ע"י טמפרטורות נמוכות כולל תהליכים מורכבים ומבוקר כנראה ע"י מספר גורמים. התהליך מלווה בשינויים מורפולוגיים, ביוכימיים, התפתחותיים והיסטולוגיים המושפעים מהאחסון בקור, אך תהליכים אלו מתרחשים ברמות שונות גם בבצלים שלא נחשפים לטמפרטורות נמוכות (Hartsema, 1961; Le Nard et al., 1988; Le Nard and De Hertogh, 1993, Hobson and Davies, 1977; Banasik, et al., 1980; De Hertogh et al., 1983, Lambrechts et al., 1994; Rebers et al., 1995; Walch and Van Hasselt, 1991). בשנים האחרונות נמצא שלמים יש תפקיד חשוב בשחרור מתרדמה (Faust et al., 1991; Liu et al., 1993; Millard et al., 1993). במחקר זה עקבנו אחר השינויים ביחסי המים בבצלים במהלך המעבר לגידול פעיל.

איניציאציה של התפרחת בבצלי שום אפלטון וצבעוני, מתרחשת בזמן הפריחה של צמח האם. מתצפיות שנערכו במחקר זה באמצעות SEM וב-MRI נמצאה התפתחות דומה במהלך האחסון ב-4 או ב-20 מ"צ, אך לאחר שתילה התארכות עמוד התפרחת והפריחה התרחשה רק בבצלים שנחשפו לטמפרטורות נמוכות בעוד שקבוצת הביקורת הייתה מעוקבת מאוד בתהליכים אלו. ההתפתחות הפנימית בבצל (Intrabulb development) הינה תהליך דורש אנרגיה ולכן מלווה בצריכה והעברה של חומרי תשמורת או תוצרי הפרוק שלהם. כפי הנראה דרישת הקור איננה הכרחית לתהליכים של העברת חלבונים תשמורת בגלדים, שינויי בתכולת הפוליאמינים (Kolloffel et al., 1992) או פרוק עמילן (Lambrecht et al., 1994). הוצע שטיפול הקור מוביל לשינויים במצב המים ברקמות הבצל ומעבר של מים ממצב בו הם קשורים למולקולות גדולות למצב חופשי (Okubo et al., 1997; Iwaya et al., 1996). בצלים של שום אפלטון, שאוחסנו ב-4 או 20 מ"צ, נמדדה ירידה מובהקת בערכי  $T_2$  לאחר 4 שבועות של אחסון. התוצאות שנתקבלו בבצלי צבעוני הצביעו על החשיבות של יצירת ההדמיות ע"י המדדים כמו  $R_2$ ,  $R_1$ , או ADC ערכי המדדים האלה אינם שרירותיים ולכן ניתן להשוות את התוצאות למחקרים אחרים כמו כן הפרמטרים האלה יכולים

להוות סמן רגיש למצב הביופיזיקלי של המים ברמה התאית. מקובל שעליה בתכולת המים החופשיים מלווה בירידה בזמן הרלקסציה  $R_1$  ו- $R_2$ . היחס הזה נמצא בתוצאותיו. כך בשכבה התת אפידרמלית בצידי הגלד של בצלים שאוחסנו ב 4 מ"צ ירידה בצפיפות הפרוטונים נצפתה יחד עם עליה ב  $R_2$  ו- $R_1$  ירידה בתכולת המים בעוגת הבצל מלווה בעליה בערכי  $R_2$ . במחקרים שנעשו בעבר פירשו שינויים בתכולת המים כמעבר מקומי ממים קשורים למים חופשיים (Faust et al., 1991; Liu et al., 1993; Millard et al., 1993). מן התוצאות שקיבלנו במחקר זה אנו סוברים שזה אינו ההסבר היחיד. יחס המים החופשיים עשוי להשתנות הודות לטרנסלוקציה של המים החופשיים בין אברים או רקמות, ומנגנון זה קובע במקרים מסוימים את תוצאות ההדמיה. בבצלי צבעוני, הניצן מתפתח, כלומר המסה שלו עולה, והיא בעיקרה מים. מכון שאין הספקת מים חיצונית וזאת היא מערכת סגורה, אפשר להניח שהמים מגיעים מאזורים אחרים של הבצל. בגלדים תכולת המים הממוצעת נשמרת קבועה בשני טיפולי האחסון, אך זה לא מוכיח שאין איבוד מים מן הגלדים. מכון שהנפח הכללי של הגלדים הוא גדול בהרבה מזה של עוגת הבצל או הניצן, איבוד של כמות משמעותית ביחס אליהם יכול להראות מאוד קטן. העלייה בערכי  $R_2$  בגלדים במהלך האחסון יכולה להצביע על כך שגם הגלדים מספקים מים לניצן המתפתח. בהדמיות שנתקבלו לאחר שתילה, איבוד המים מהגלדים מאוד ברור במיוחד בבצלים המקוררים. החומר דמוי הגיל שנמצא בשכבה התת אפידרמלית בגלד של בצל צבעוני, יכול להיות פוליסכריד לא מבני כמו גלוקומן שכנראה משפיע על יחסי המים בתא. נראה שאזורים אלה משמשים כאזורי אחסון למים, אשר מספקים לאזור הפנימי של הגלד במהלך תקופת האחסון. דווח שבשושן האחסון בטמפרטורה נמוכה מעודד פירוק של גלוקומנים בגלדים (Miller and Reid, 1982). כפי הנראה טרנסלוקציה של מים היא בעלת תפקיד מרכזי בהתפתחות בריאה של ניצן הפריחה והיא מעוכבת באופן כשהוא בטמפרטורות נמוכות. בדומה לתוצאות שנתקבלו בבצלים של *Allium* *aflatumense* (Zemah et al., 1999), גם בבצלי צבעוני ערכי  $T_2$  התקצרו במהלך האחסון גם בגלדים וגם בעוגת הבצל של בצלים מקוררים. ערכי הדיפוזיה נשארים קבועים בבצלים המקוררים בעוד שהם עולים באופן משמעותי בבצלים שאוחסנו ב 20 מ"צ. וזה מציע שבמערכת הזאת הערכים בתנאי המדידה שנערכו אינם נמצאים בהתאמה לתכולת המים החופשיים, ויתכן שזו מדידה אמיתית של תנועת המים ברמה התאית. הוכח בפרסומים אחרים ששינוי בזמן הרלקסציה ( $T_1$ ,  $T_2$ ) לא משקפים רק את השינוי בתכולת המים ברקמות אלא גם יכולים לשמש אינדיקציה לשינויי בצורת התא הפנימית (Okubo et al., 1997; Usha et al., 1994) בפקעות של קאלה, בתאים גדולים עם תכולת לחות גבוהה זמן הרלקסציה ארוך יותר בהשוואה לתאים קטנים בעלי תכולת לחות נמוכה יותר (Robinson et al., 2001). בצבעונים תאים גדולים עם כמות גדולה של גרגרי עמילן מרכיבים את תאי הפרנכימה של הגלדים בעוד שהניצן המרכזי בנוי מתאים קטנים בעלי דופן דקה ומכילים פחות גרגרי עמילן ואף גודלם זעיר יותר.

לאור התוצאות שהתקבלו במחקר השיטה המתאימה ביותר לאבחון מצב הפיזיקלי של המים ברקמה היא מדידת אפקט ה-MT (Magnetization Transfer) שנמדד לראשונה במערכות צמחיות במחקר זה (Bendel et al., 2001). אפקט ה-MT הצביע באופן ברור על נוכחות פרוטונים מוצקים (solid protons) או פרוטונים בעלי תנועה מוגבלת (motional restricted protons) ברקמות בצל הצבעוני. קבוצת פרוטונים זו כוללת פרוטונים של מים, אך יכולה לכלול גם פרוטונים של מטריקס

מוצק כמו שרשראות קאלוז, עמילן ופוליסכרידים אחרים. מתוצאות אפקט ה-MT נמצא שינויי מובהק במצב המים בגלדי התשמורת ובניצן המתפתח של בצלי צבעוני לאחר אחסון ב-4 וב-20 מ"צ (איור 16). פרקציה קטנה יותר של פרוטונים מוצקים שאולי מייצגים מים "קשורים" נמדדה בגלדים של בצלים מ-4 מ"צ, כאשר בניצן המתפתח נוכחות הפרוטונים ה"קשורים" עולה. תוצאות אלה נתמכות גם בבדיקות ההרסניות. תכולת המים בגלדים היתה גבוהה יותר ב-4 מ"צ לאחר 12 שבועות באחסון. מאחר שתהליך זה היה גבוה יותר בבצלים שנחשפו לטמפרטורה נמוכה, כמות הפרוטונים בעלי התנועה המוגבלת בגלדים היתה נמוכה יותר בהשוואה לבצלים שאוחסנו ב-20 מ"צ. במהלך אחסון הבצלים הפרקציה של הפרוטונים המוצקים עלתה בניצן המרכזי גם ב-4 וגם ב-20 מ"צ. בבצלים שאוחסנו ב-4 מ"צ התהליך התבטא באופן חזק יותר. ממצאים אלה תומכים בהנחה שצבירת משקל יבש וקשירת מים בתאי הניצן המרכזי מתרחשים באופן מואץ יותר בתנאים של טמפרטורה נמוכה.

מהתוצאות שהתקבלו המחקר זה באמצעות MRI בבצלי שום אפלטון ובבצלי צבעוני, נמצא ששיטה זו מאפשרת להבחין בשינויים בתכולה ובמצב המים בתוך ובין התאים. שינויים אלו היו תלויים בתנאי האחסון של הבצל ובשלב ההתפתחותי שלו. שינויים רבים שמדדנו באמצעות הפרמטרים השונים מצביעים על תהליכים הקשורים בשינויי מצב המים במהלך ההתפתחות שינויים אלו שנמדדו בפרמטרים המקובלים ב-MRI, כמו  $T_1$ ,  $T_2$ , צפיפות הפרוטונים ומקדם הדיפוזיה של המים מצביעים על שינויים התפתחותיים אשר מתבטאים באופן בולט יותר בטמפרטורה נמוכה. יישום של שיטת ה-MTC אפשרה לבחון באופן ברור יותר את ההבדל בין בצלים אשר נחשפו לטיפול קור לאלו שלא קוררו. לאור התוצאות הללו, אנו מציעים מחקר עתידי לפיתוח השימוש בשיטת ה-MTC בבצלים באופן מדויק יותר ומדידת צמח גאופיט בשלבים שונים של התפתחותו במהלך השנה.

#### רשימת ספרות

- Aung LH, De Hertogh AA. 1979. Temperature regulation of growth and endogenous abscisic acid-like content of *Tulipa gesneriana* L. *Plant Physiology* 63, 1111-1116.
- Banasik L, Rudnicki RM, Saniewski M. 1980. The physiology of hyacinth bulbs (*Hyacinthus orientalis* L.), XIII. The distribution of amylase and acid phosphatase activities and starch grain in hyacinth bulbs. *Acta Physiologiae Plantarum* 2, 145-156
- Bendel P., Zemah H., Kamenetsky R., Vergeldt F. and Van As H. 2001 Magnetization transfer and double-quantum filtered imaging as probes for motional restricted water in tulip bulbs. *Magnetic Resonance Imaging* 19, 857-865.
- Bottomley, P.A., H.H. Rogers and T.H. Foster. 1986. NMR imaging shows water distribution and transport in plant root systems *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 87-89
- Chudek, J.A. and Hunter, G. 1997. Magnetic resonance imaging of plants. *Progr. in Nucl. Magn. Reson. Spectr.* 31: 43-62
- De Hertogh AA, Le Nard M. 1993 Physiological and biochemical aspects of flowerbulbs. In: De Hertogh AA, LeNard M, eds. *The Physiology of Flower Bulbs*. Elsevier, Amsterdam. P. 53-69.

- Faust M, Liu D, Millard M M, Stutte GW. 1991. Bound versus free water in dormant apple buds - a theory for endodormancy. *Hort. Science* 26, 887-890
- Gorin N., Heidema FT. 1985. Starch content of freeze-dried anthers and alpha-amylase activity of their extracts as criteria that dried-stored bulbs (*Tulipa gesneriana* L.) 'Apeldoorn' have been exposed to 5°C. *Scientia Horticulturae* 26, 183-189.
- Hartsema AM. 1961. Influence of temperatures on flower formation and flowering of bulbous and tuberous plants. In: Ruhland W, ed. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Vol. 16, Berlin: Springer Verlag, 123-167.
- Hobson GE, Davies JN. 1977. Mitochondrial activity and carbohydrate levels in tulip bulbs in relation to cold treatment. *Journal of Experimental Botany* 28, 559-568.
- Higuchi H, Sisa M. 1967. Serological analysis on the change of protein in scaly leaf tulip bulb caused by low temperature treatment. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 36, 55-60.
- Ishida N, Ogawa H, Koizumi M, Kano H. 1997. Ontogenetic changes of the water status and accumulated soluble compounds in growing cherry fruits studied by NMR imaging. *Magnetic Resonance in Chemistry* 35, 522-528.
- Iwaya-Inoue M, Okubo H, Matsuo E, Motooka K, Ishida N, Koizumi M, Kano H. 1996. Characterizing chilling responses for tulip bulbs by <sup>1</sup>H-NMR imaging in relation to metabolic activity. *Cryo-Letters* 17, 241-248.
- Kanneworff, WA, Van der Plas LHW. 1994. Respiration of bulb scale fragments of tulip after storage at 5°C. *Plant Science* 104, 31-38.
- Kolloffel, C, J. Geuns and Lambrechts, H. 1992. Changes in free polyamine contents in tulip bulbs Apeldoorn during dry-storage. *Acta Hort.*, 325, 247-252.
- Lambrechts H, Rook F, Kolloffel C. 1994. Carbohydrate status of tulip bulbs during cold-induced flower stalk elongation and flowering. *Plant Physiology* 104, 515-520.
- Le Nard M, Fiala V, Querou Y, Jolivet E. 1988. L'arginine, marqueur moléculaire de l'état physiologique du bulbe de *Tulipa gesneriana* L. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie de. Science de France, Serie III* 307, 557-562.
- Le Nard M., De Hertogh AA. 1993. Tulipa. In: De Hertogh AA, Le Nard M, eds. *The physiology of flower bulbs*. Amsterdam: Elsevier, 617-682.
- Liu, D., Faust, M., Millard, M. M., Line, M. J. and Stutte, G. W. 1993. States of water in summer-dormant apple buds determined proton magnetic resonance imaging. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:632-637
- Millard, M. M., Liu, D., Line, M. J. and Faust, M. 1993. Method for imaging the states of water by nuclear magnetic resonance in low-water-containing apple bud and stem tissues. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:628-631
- Miller H, Reid JSG. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Loewus FA, Tanner W, eds. *The Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 13A. Berlin: Springer Verlag, 418-471
- Okubo H, Iwaya-Inoue M, Motooka K, Ishida N, Kano H, Koizumi M. 1997. Monitoring the cold requirements in tulip bulbs by <sup>1</sup>H-NMR imaging. *Acta Horticulturae* 430, 411-417.
- Omassa, K., M. Onoe and H. Yamada. 1985. NMR imaging for measuring root systems and soil water content. *Environ. Control Biol.* 23: 99-102
- Rakhimbaev IR, Syrtanova GA, Solomina VF. 1978. The effect of cold treatment on the level of biological activity of endogenous growth regulators of tulip bulbs. *Plant Physiology (USSR)* 25(2), 249-253 (in Russian).

- Rebers M, Vermeer E, Knecht E, Shelton CJ, Van der Plas HW. 1995. Gibberellin levels and cold-induced floral stalk elongation in tulip. *Physiologia Plantarum* 94, 687-691.
- Robinson A, Clark C.J. and Clemens. 2000 Using  $^1\text{H}$  magnetic resonance imaging and complementary analytical techniques to characterize developmental changes in *Zantedeschia* Spreng. tuber. *Journal of Experimental botany* 353, 2009-2020.
- Sugiura, T., M. Yoshida, J. Magoshi and S. Ono. 1995. Changes in water status of peach flower buds during endodormancy and ecodormancy measured by different scanning calorimetry and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120(2): 134-138
- Usha, K., Gambhir, P. N., Sharma, H. C., Goswami, A. M. and Singh, B. 1994 Relationship of molecular mobility of water with floral malformation in mango as assessed by nuclear magnetic resonance. *Scientia Horticulturae* 59, 291-295.
- Walch K, Van Hasselt P. 1991. The influence of low temperatures on the membrane lipid composition and flowering capacity of Tulip bulbs. *Acta Horticulturae* 298, 345-353
- Wang, S. Y., P. C. Wang and M. Faust. 1988. Non-destructive detection of water stress in apple with nuclear magnetic resonance imaging. *Sci. Hort.*, 35: 227-234.
- Wang, S. Y. and S. J. Chang. 1986. Nuclear magnetic resonance imaging in wood. *Wood fiber Sci.* 18: 308-314
- Yamazaki H, Ishida N, Katsura N, Kano H, Nishijima T, Koshioka M. 1995. Changes in carbohydrate composition and water status during bulb development of *Allium wakegi* Araki. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Japan* A 10-11, 1-11.
- Zemah, H, Bendel, P., Rabinowitch, H. and R. Kamenetsky. 1999. Visualization of morphological structure and water status during storage of *Allium aflatunense* bulbs by NMR imaging. *Plant Science*, 147: 65-73

## סיכום

### 1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה:

מציאת פרוטוקול עבודה מתאים לשימוש ב NMR למחקר בבצלים תוך מציאת פרמטרים מתאימים ללימוד מצב המים בזמן האחסון, בניסיון לפתח שיטה לשימוש במאזן המים כאינדיקציה לסיום טיפול הקור ותחילת התעוררות הבצל מתרדמה. אפיון של צורות מורפולוגיות במהלך ההתפתחות באמצעות MRI ומיקרוסקופ אלקטרוני סורק, SEM.

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

מעקב אחר ההתפתחות של בצלי שום אפלטון ובצלי צבעונים באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק ובמקביל הדמיה באמצעות MRI. מדידת השינויים במאזן המים במהלך האחסון באמצעות הפרמטרים של MRI ( $T_1$ ,  $T_2$ , צפיפות פרוטונים ו-ADC). פיתוח השימוש בשיטת ה-MTC בבצלים. התוצאות הצביעו על שינויים במאזן המים באברי הבצל השונים במהלך האחסון ב-4 וב-20 מ"צ. אחסון בטמפרטורה נמוכה עודד שחרור פרוטונים בגלדים, טרנסלוקציה של מים חופשיים בין אברים ומעבר מים לניצן המתפתח.

### 3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

מתצפיות שנערכו במחקר זה באמצעות SEM וב MRI נמצאה התפתחות דומה במהלך האחסון ב-4 או ב-20 מ"צ, אך לאחר שתילה התארכות עמוד התפרחת והפריחה התרחשה רק בבצלים שנחשפו לטמפרטורות נמוכות בעוד שקבוצת הביקורת הייתה מעוקבת מאוד בתהליכים אלו. שיטה MRI מאפשרת להבחין בשינויים בתכולה ובמצב המים בתוך ובין התאים. שינויים שנמדדו בפרמטרים המקובלים ב-MRI, כמו  $T_1$ ,  $T_2$ , צפיפות הפרוטונים ומקדם הדיפוזיה של המים מצביעים על שינויים התפתחותיים אשר מתבטאים באופן בולט יותר בטמפרטורה נמוכה. יישום של שיטת ה-MTC אפשרה לבחון באופן ברור יותר את ההבדל בין בצלים אשר נחשפו לטיפול קור לאלו שלא קוררו.

### 4. הבעיות שונתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים)

#### התייחסות המשך המחקר לגביהן

ביצוע הפרויקט מתנהל על פי התוכנית המקורית.

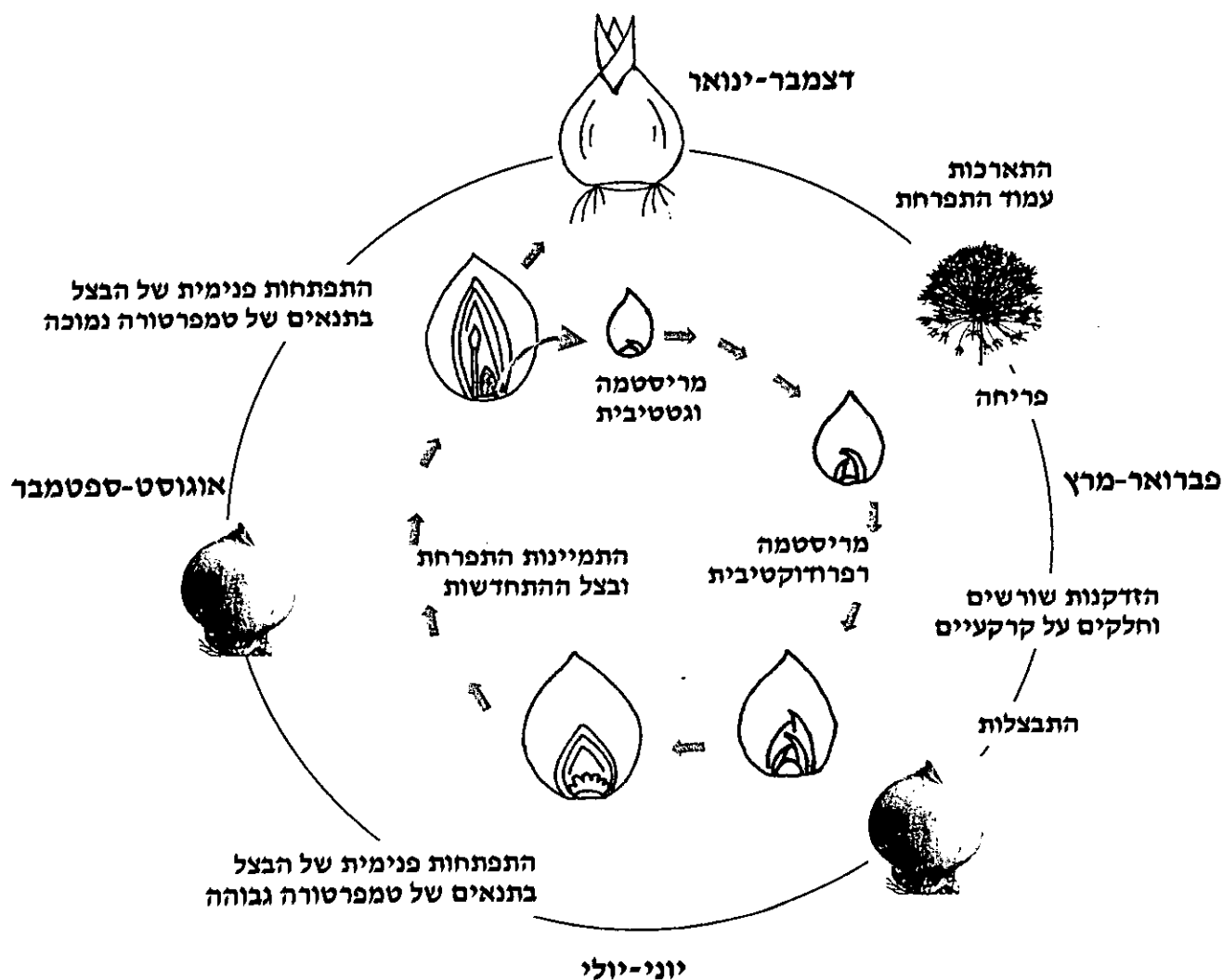
### 5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:

תוצאות המחקר הוצגו בכנס בינלאומי בנושא NMR, באיטליה בספטמבר 1999 (חניתה צמח ופטר בנדל), בסמינרים מדעיים במכון וולקני וימי עיון למגדלים ומדריכים, ובכנס השנתי של החברה הישראלית למדעי הצמח ב-1999, 2000 ו-2001.

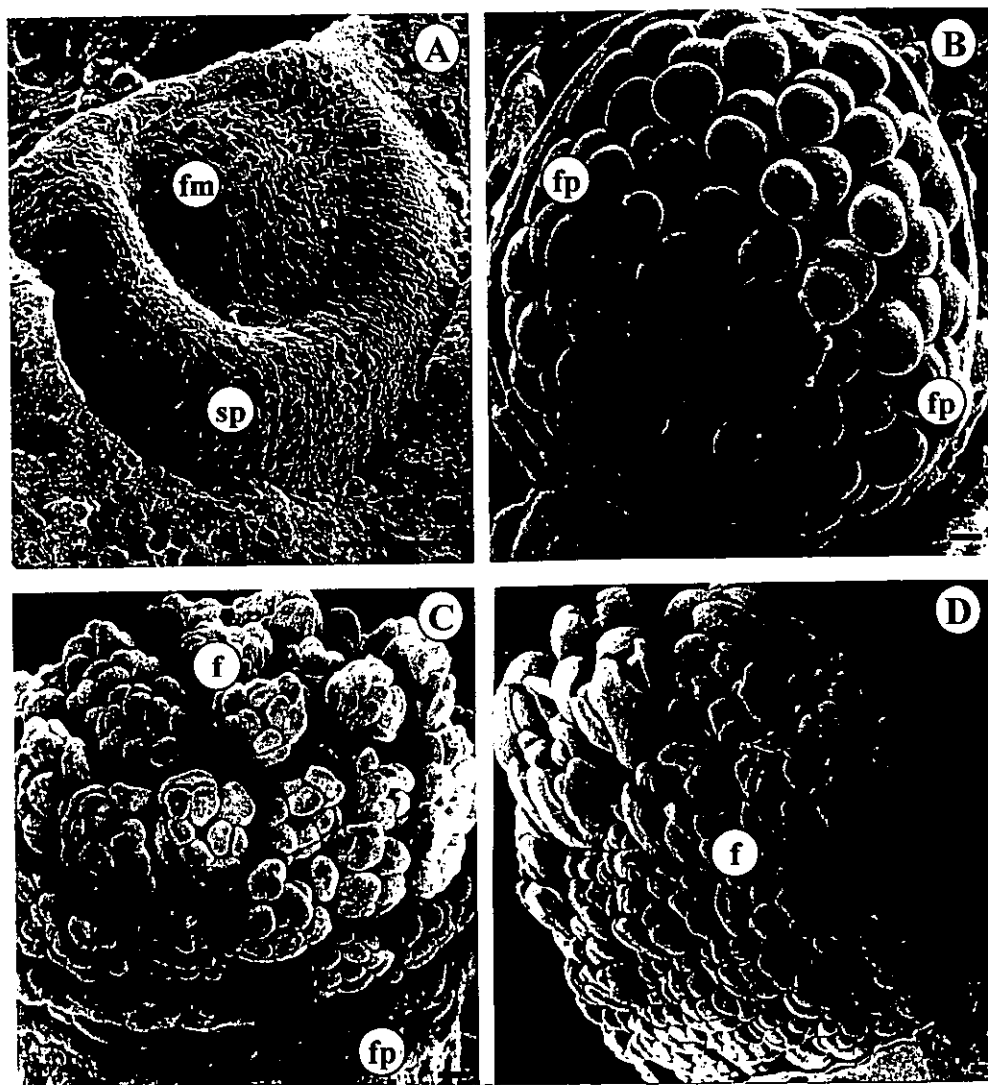


## פרסום בעיתון מדעי:

1. Zemah, H., Bendel, P., Rabinowitch, H. and R. Kamenetsky (1999). Visualization of morphological structure and water status during storage of *Allium aflatunense* bulbs by NMR imaging. *Plant Science*, 147: 65-73
2. Kamenetsky, R., Zemah, H. and Bendel, P. (1999) Visualization of morphological structure and water status in the bulbs by magnetic resonance imaging (MRI). Israeli Society of Plant Sciences, 1999, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel (unnumbered pages)
3. Zemah, H., Van der Toorn, A., Van As, H., Bendel, P. and Kamenetsky, R. (2000) Physiological changes during storage of tulip bulbs: study by magnetic resonance imaging (MRI). VIII International Symposium on Flower Bulbs, Kirstenbosch, Cape Town, South Africa, p. 75-76
4. Kamenetsky, R., Zemah, H., Van der Toorn, A., Bendel, P. and Van As, H. (2000). Use of Magnetic Resonance Imaging (MRI) for evaluation of physiological status of bulbs during storage. DIARP (The Joint Dutch-Israeli Agricultural Research Program) Bi-national Workshop on Advances in Handling, Transportation and Logistics of Ornamentals, Israel, 2000, p. 12.
5. Zemah, H., Vergeldt, F., Kamenetsky, R., van As, H. and Bendel, P. (2001). MRI monitoring of water status during storage of tulip bulbs: Imaging of relaxation rates, proton density, and magnetization transfer contrast (MTC). 4<sup>th</sup> User Meeting of the European Large-Scale Facilities for NMR, Noordwijkerhout, The Netherlands, p. 84
6. Kamenetsky, R., Zemah, H., van der Toorn, A., Van As, H. and P. Bendel (2000) Morphological structure and water status in bulbs during their transition from dormancy to active growth: visualization of by NMR imaging. *Dormancy in Plants* (J.D. Viemont and J. Crabbe, eds). CAB International, p.121-138
7. Zemah, H., Van der Toorn, A., Van As, H., Bendel, P. and Kamenetsky, R. (2000). Physiological changes during storage of tulip bulbs: study by magnetic resonance imaging (MRI) *Israeli Society of Plant Sciences*, 2000, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel (unnumbered pages)
8. Zemah, H., Vergeldt, F., Kamenetsky, R., van As, H. and Bendel, P. (2001). MRI monitoring of water status during storage of tulip bulbs: Imaging of relaxation rates, proton density, and magnetization transfer contrast (MTC). Annual Conference of the Israeli Society of Plant Sciences. Abstracts of Presentations. *Israel Journal of Plant Sciences*, Vol. 49, p. 171.
9. Bendel, P. Zemah, H., Kamenetsky, R., Vergeldt, F. and van As, H. (2001) Magnetization transfer and double-quantum filtered imaging as probes for motional restricted water in tulip bulbs. *Magnetic Resonance Imaging*, 19: 857-865
10. Kamenetsky, R., H. Zemah, A.P. Ranwala, D. Ranwala, F. Vergeldt, W.B. Miller, H. Van As and P. Bendel. Water relations and carbohydrate balance in tulip bulbs during their transition from dormancy to active growth (Submitted)

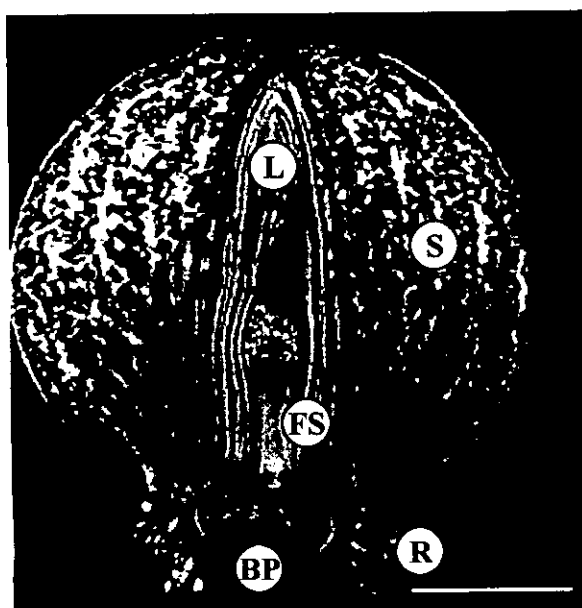


איור 1. מחזור החיים השנתי של שום אפלטון בישראל. המעגל החיצוני מתאר את ההתפתחות הנראית של הבצל השלם. המעגל הפנימי מתאר את ההתפתחות הפנימית של הנצר המונוקרפי.

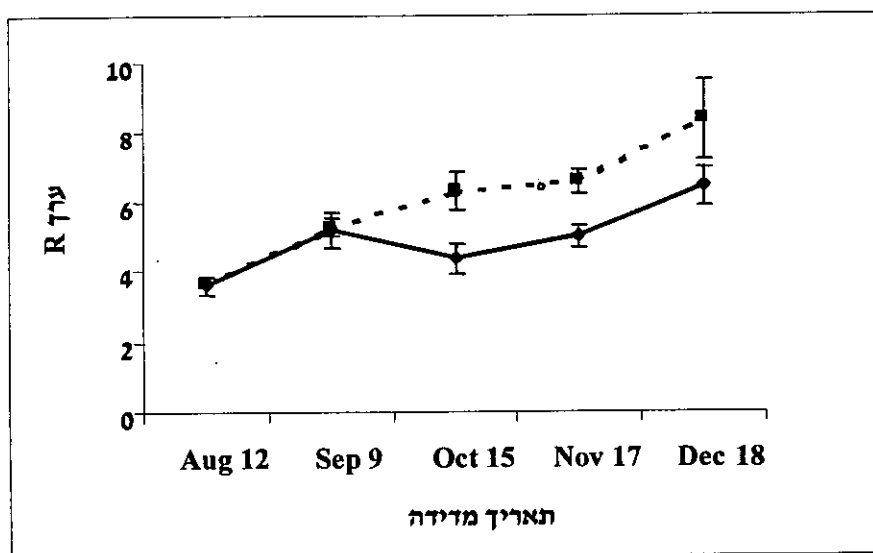


איור 2. התפתחות התפרחת של *Allium aflatunense* כפי שמצולם במקרוסקופ אלקטרוני סורק קנה מידה 0.1 מ"מ

- A – התמיינות המתחל (sp) והמריסטמה הפלורלית (fm) בחודש מרץ
- B – התמיינות פרימורדיות פרחים (fp) במריסטמה הקדקודית
- C – התפתחות התפרחת לאחר ארבעה חודשי אחסון ב 4 מ"צ . ניתן לצפות בהתמיינות אברי הפרח בפרחים (f), ובפרימורדיות פרחים (fp)
- D – התמיינות לפריחה לאחר האחסון ב 20 מ"צ , התמיינות פרחים מלאה (f)



איור 3. תמונת הדמיה מגנטית של בצל שום אפלטון לאחר אחסון ב-4 מ"צ למשך ארבעה חודשים, ניתן להבחין במבנה הפנימי של הבצל: עוגת בצל (BP), שורשים (R), גלד תשמורת (S), עלים מתפתחים (L), עמוד תפרחת (FS)



איור 5. שינויים בערך R בעוגת הבצל של בצלי שום אפלטון במהלך האחסון מאוגוסט ועד דצמבר ב-4 (.....) או ב-20 מ"צ (—)

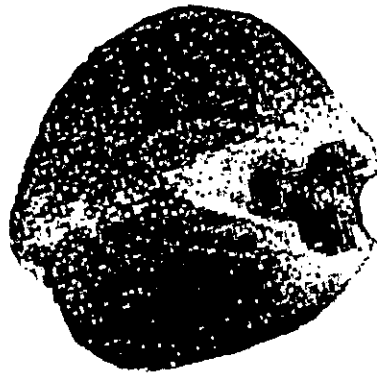
ספטמבר



36.7 mm

20 מ"צ

נובמבר

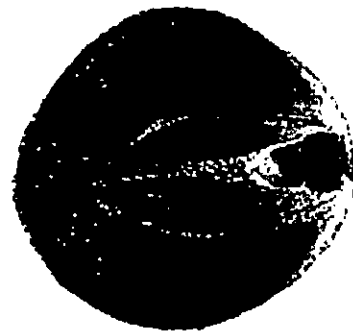


30.6 mm

דצמבר

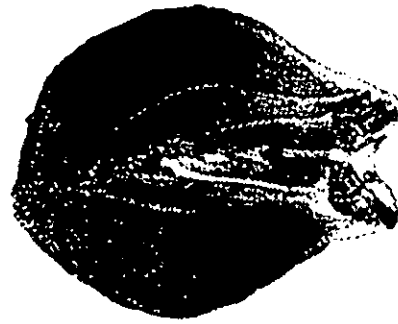


28.7 mm

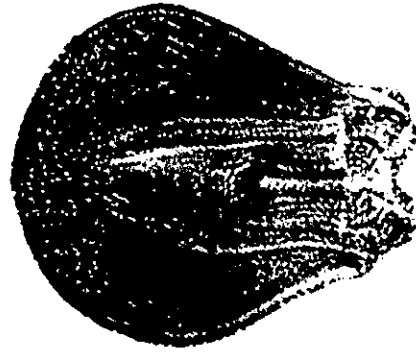


41.4 mm

4 מ"צ

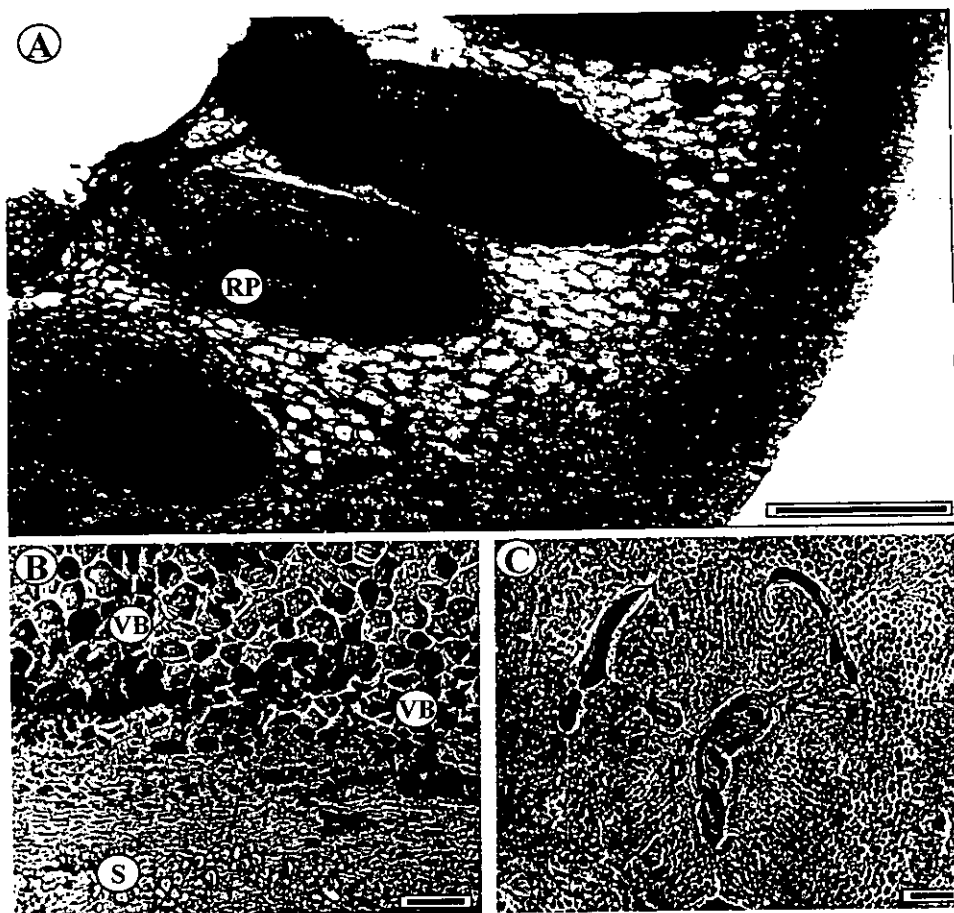


38.8 mm



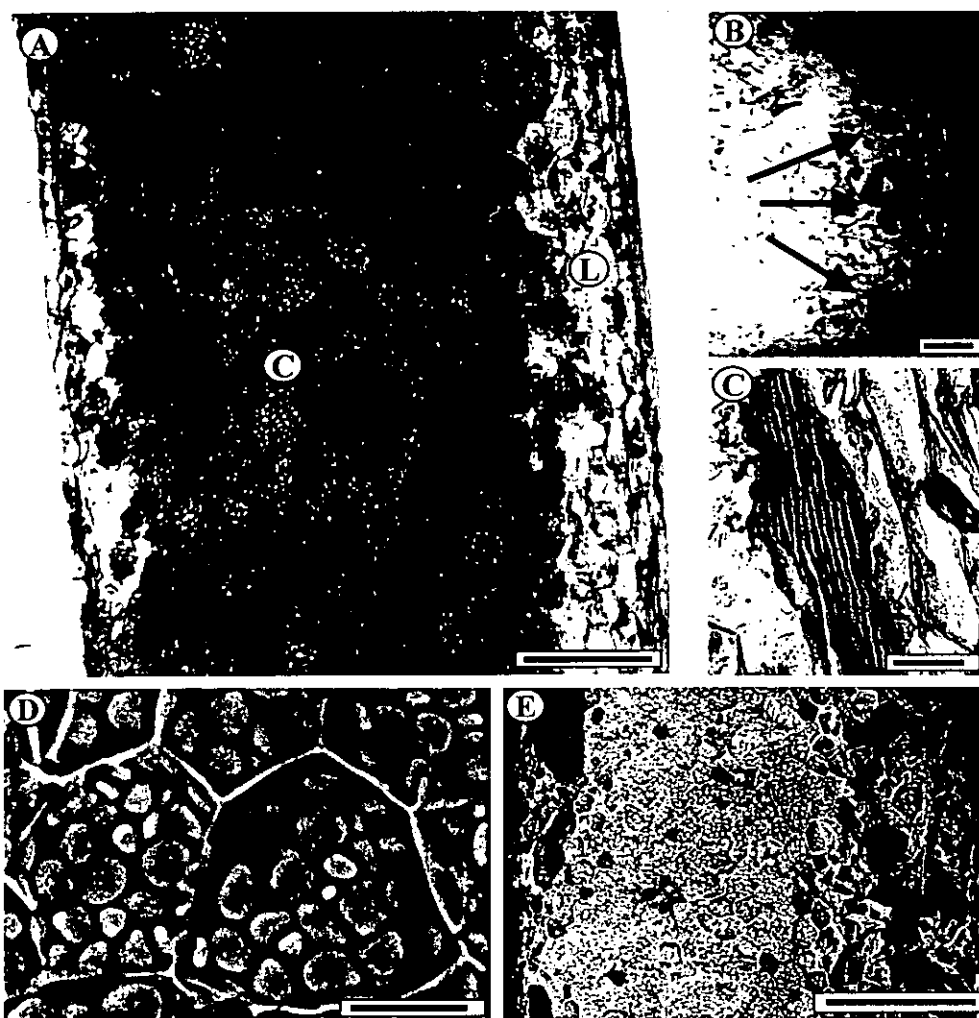
37.5 mm

איור 4. תמונות ההדמיה של בצלי שום אפלטון במהלך האחסון בין אוגוסט לדצמבר בטמפרטורה של 4 או 20 מ"צ.  
ההדמיות מבטאות את ערכי  $R < 2$  שחור  $R > 10$  לבן.



איור 6. חתכים בעוגת הבצל ובניצן המתפתח כפי שנצפו במיקרוסקופ אור ובמיקרוסקופ אלקטרוני סורק

- A- חתך אורך בעוגת הבצל של צבעוני בחודש דצמבר בדוגמא טריה שנצבעה ב Sudan Red כפי שנצפה תחת מיקרוסקופ אור. ניתן לראות את האפידרמיס (E) ופרימורדיות השורשים (RP) בחץ מסומנים טיפות שומן שנצפו בתאי הפרנכימה קנה מידה=400 מיקרון .
- B- חתך רוחב בעוגת הבצל כפי שנצפה במיקרוסקופ אלקטרוני סורק. ניתן לראות תאים גדולים, צורות הובלה (VB) וגרגרי עמילן (S) קנה מידה= 100 מיקרון.
- C- חתך רוחב בניצן המרכזי של בצל צבעוני בחודש דצמבר כפי שנצפה במיקרוסקופ אלקטרוני סורק , ניתן לראות טיפוסי רקמה שונים המורכבים מתאים קטנים וחללים בין תאיים רבים. קנה מידה= 100 מיקרון.



איור 7 . חתכים בגלד צבעוני כפי שנצפו במיקרוסקופ אור ובמיקרוסקופ אלקטרוני סורק

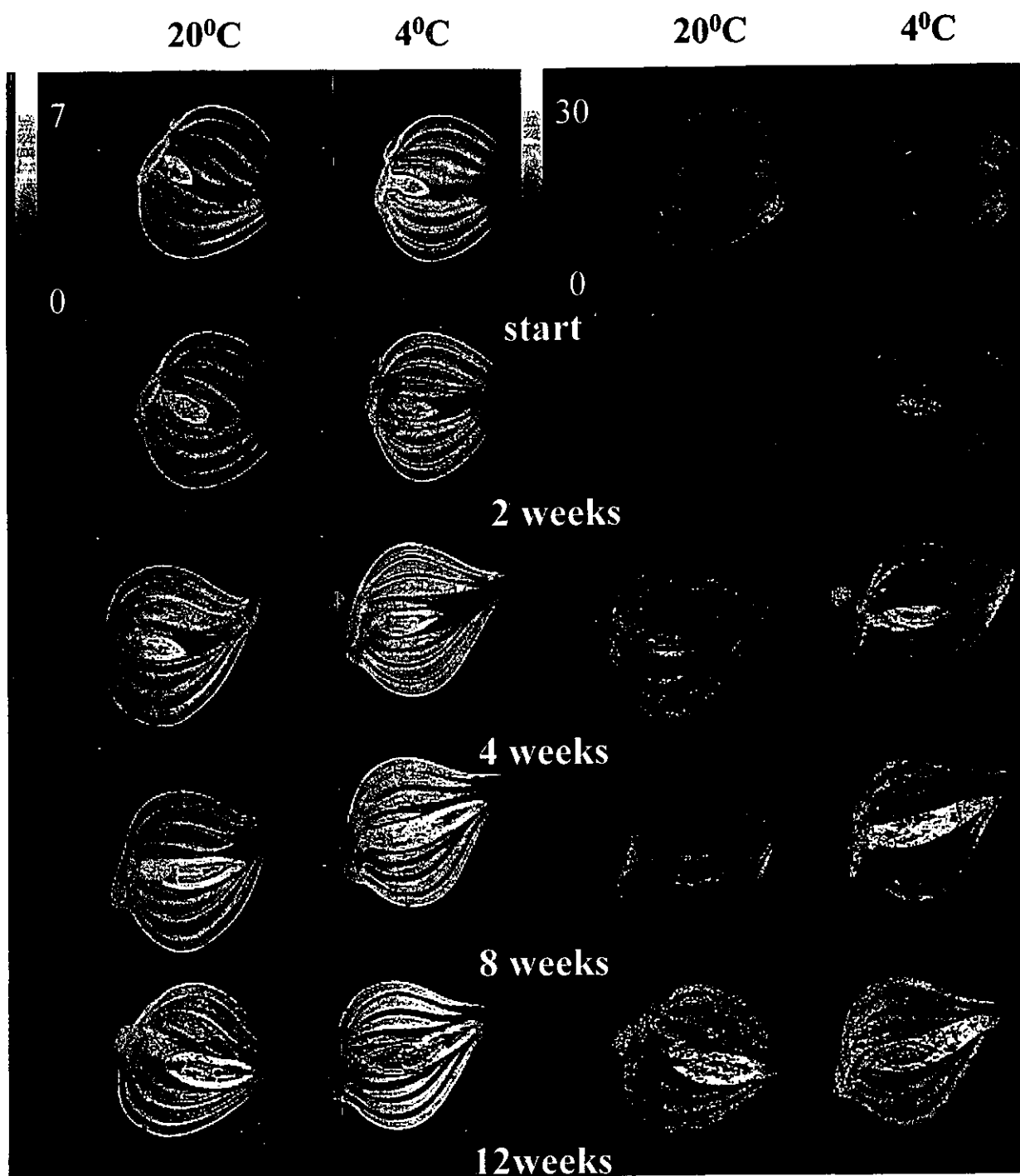
A- חתך אורך בגלד של צבעוני כפי שנצפה במיקרוסקופ אור לאחר צביעה ביוזד I KI : במרכז הגלד (C) מצויים גרגרי עמילן רבים בהשוואה לאזורים הלטרלים (L) בר = 400 מיקרון.

B- מבט במיקרוסקופ אור על החלק הלטרלי של הגלד לאחר קיבוע בפרפין וצביעה ב אלציאן גרין/ ספרנין, החצים מצביעים על מרבצים של פוליסכריד בשכבה התת אפידרמלית בר = 500 מיקרון.

C- מבט מקורב על מרבץ הפוליסכריד בשכבה התת אפידרמלית. בר- 100 מיקרון.

D- תאי תשמורת גדולים מהחלק המרכזי של גלד כפי שנצפו במיקרוסקופ אלקטרוני סורק.

E- חתך בגלד הצבעוני בחודש דצמבר כפי שנצפה במיקרוסקופ אלקטרוני סורק. פירוק עמילן מתרחש גם ב 4 וגם ב 20 מ"צ

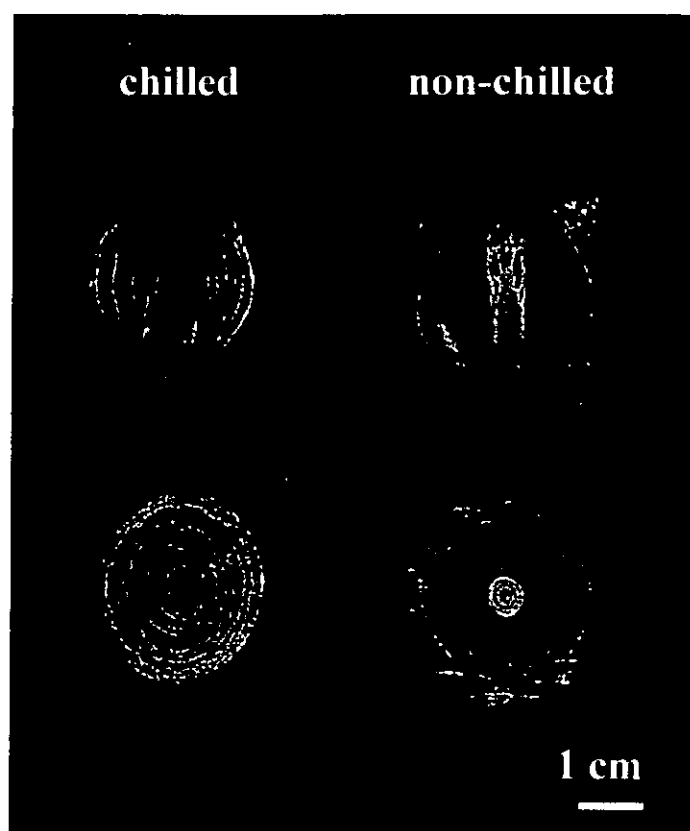


Proton density

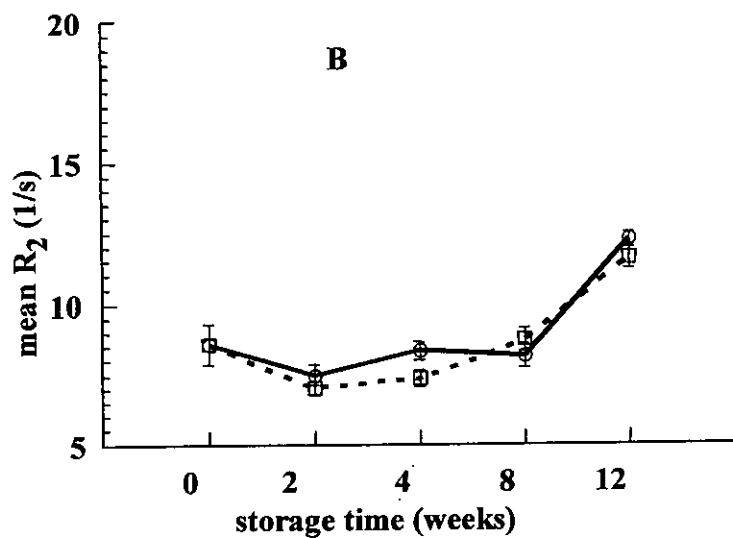
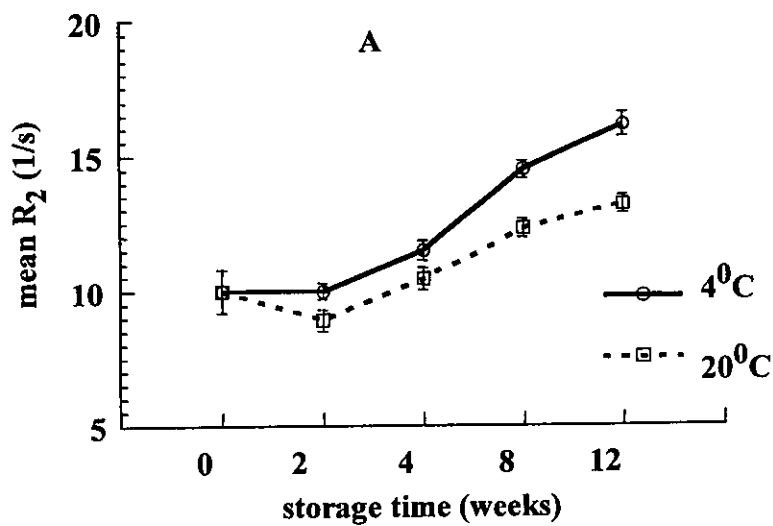
$R_2 (=1/T_2)$

איור 8. צפיפות הפרוטונים (עמודה 1 ו-2) ו- $R_2$  (עמודה 3 ו-4) של בצלי צבעונים במהלך האחסון ב-20 ו-4 מ"צ למשך 12 שבועות.

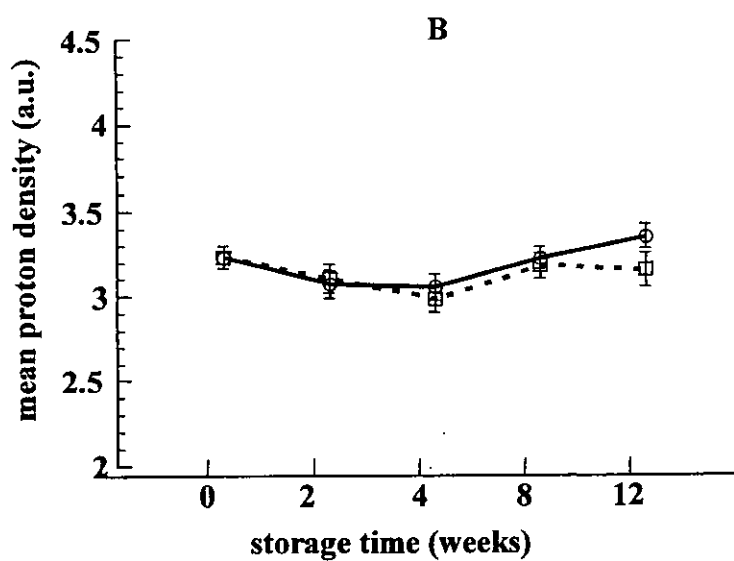
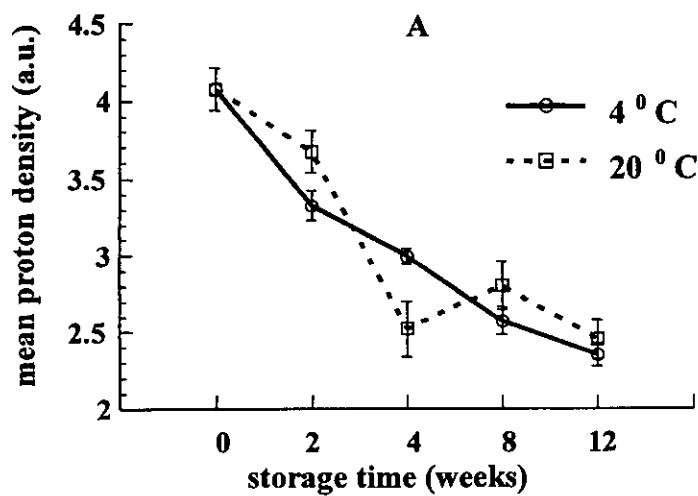




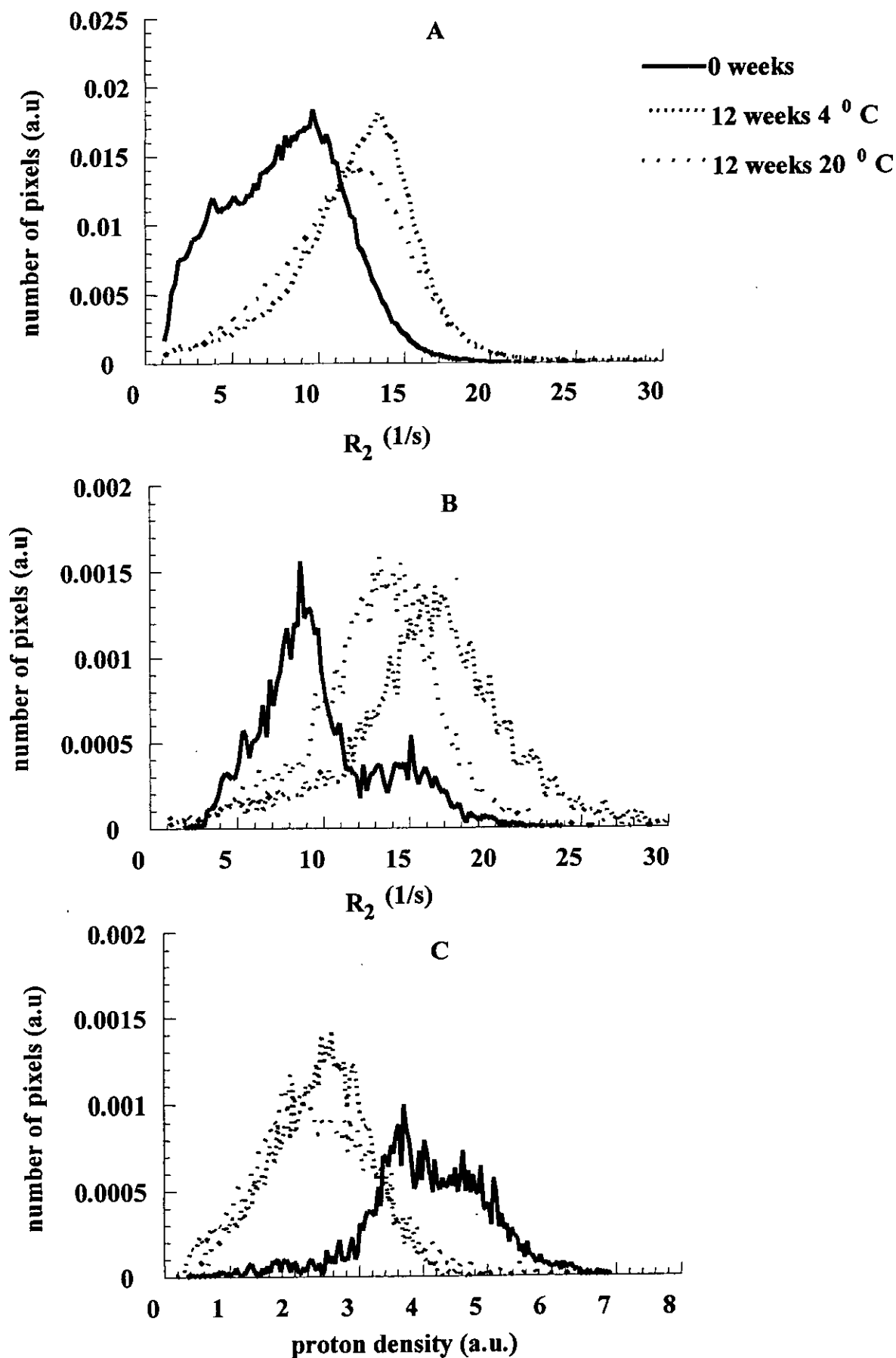
איור 9. הדמיות של בצלי צבעוני 10 ימים לאחר שתילה: חתך אורך ורחב. בבצל לאחר אחסון ב 4 מ"צ עמוד התפרחת נראה במרכז הבצל העוד שהעלים והפרח כבר גדלו ויצאו מהאזור הרגיש של הסליל. בבצל לאחר אחסון ב 20 מ"צ פרימורדיות העלים עדין נראות.



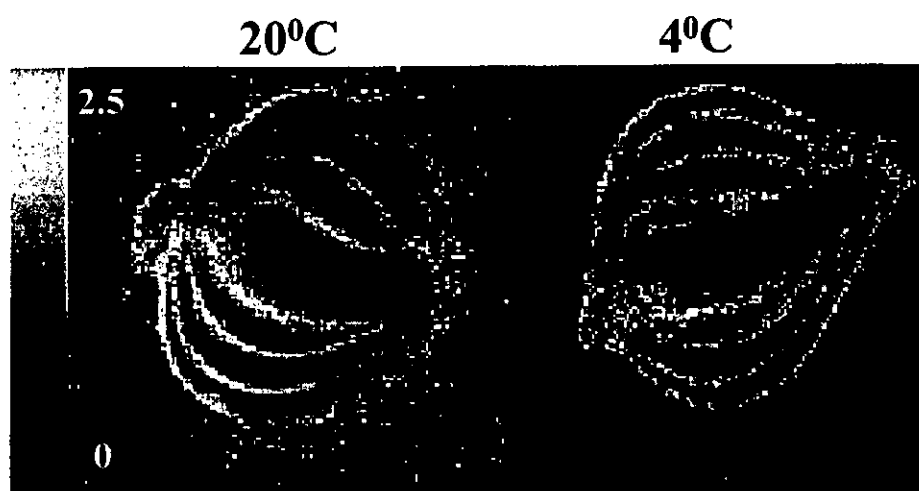
**איור 10.** ערך ממוצע של  $R_2$  בעוגת הבצל (A) והגלדים (B) בבצלים מקוררים (4 מ"צ, קו ישר) ולא מקוררים (20 מ"צ, קו מקוקו) במהלך 12 שבועות אחסון.



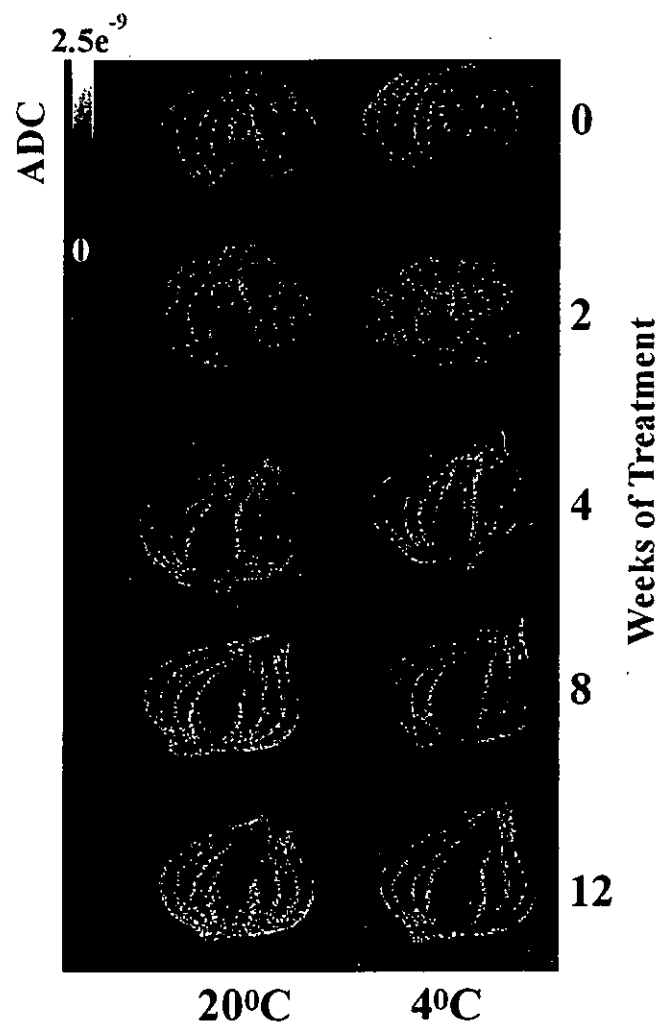
איור 11. ערך ממוצע של צפיפות הפרוטונים בעוגת הבצל (A) והגלים (B) בבצלים מקוררים (4 מ"צ, קו ישר) ולא מקוררים (20 מ"צ, קו מקוקו) במהלך 12 שבועות אחסון.



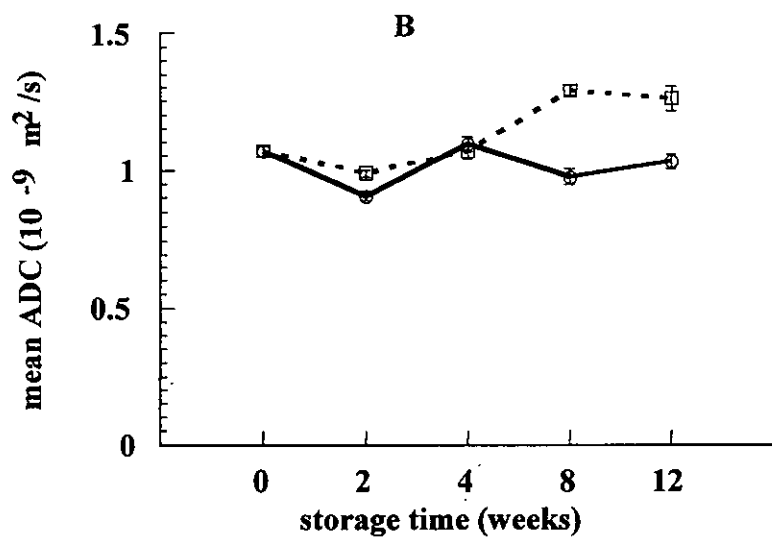
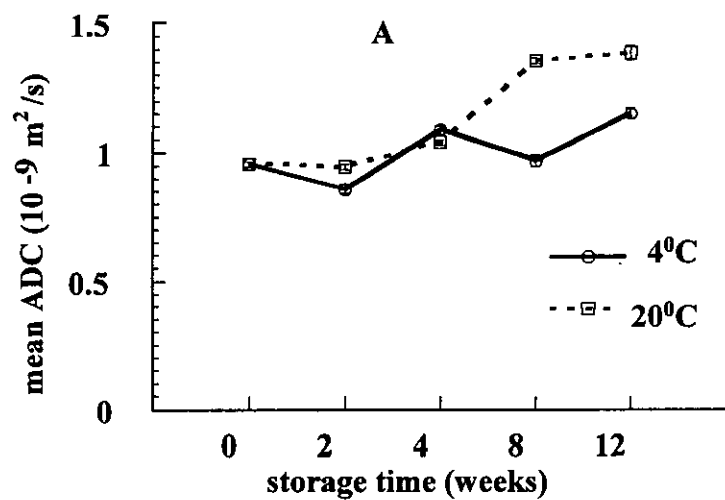
איור 12. היסטוגרמות המייצגות את פיזור ערכי  $R_2$  בגלדים (A) ועוגת הבצל (B) וצפיפות הפרוטונים בעוגת הבצל (C), בכלל הבצלים בניסויי שאוחסנו ב-4 וב-20 מ"צ למשך 12 שבועות. של ה-Y מייצג את מספר הפיקסלים שנמצאו בטווח מסוים של ערכים לאורך ציר ה-X.



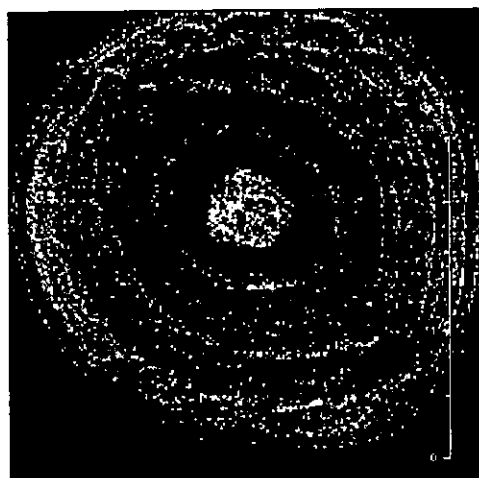
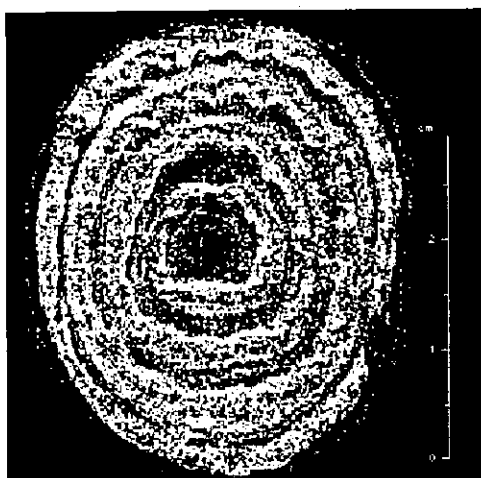
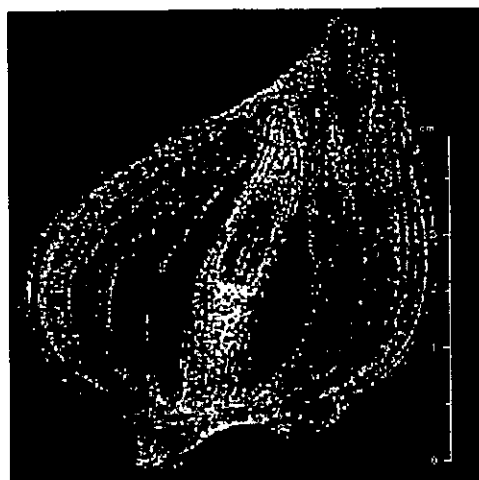
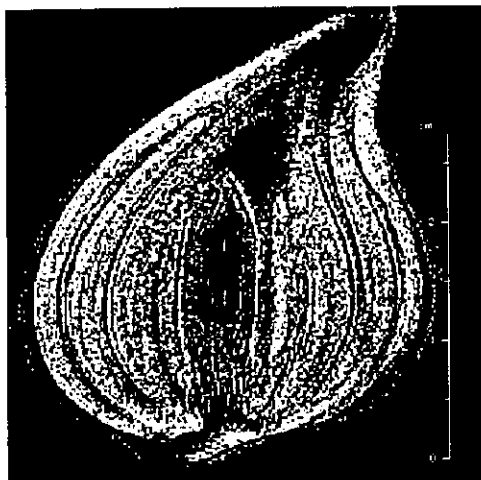
איור 13. מפות  $R_1$  של שני בצלים מייצגים בתום 12 שבועות אחסון ב- 20 וב- 4 מ"צ. התבדלים בין הבצלים בולטים באזורים הלטרלים של הגלד המציגים ערכי  $R_1$  נמוכים יותר ב 20 מ"צ בהשוואה ל 4 מ"צ.



איור 14. הדמיות NMR המראות את ערכי הדיפוזיה (ADC) בבצלים מקוררים ולא מקוררים במשך 12 שבועות באחסון.



**איור 15.** ערכים ממוצעים של דיפוזיית המים בעוגת הבצל (A) והניצן (B) של בצלים מקוררים ולא מקוררים במשך 12 שבועות אחסון.



20°C

4°C

איור 16. אפקט ה MT בבצלים של צבעוני לאחר 8 שבועות של אחסון ב-4 וב-20 מ"צ הסקלה האפורה מציינת ערכים לינארים בין 0.2 ל-0.6.