

799

2003-2005

תקופת המחקר:

255-0697-05

קוד מחקר:

Subject: HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
CHARACTERIZATION OF THE DEVELOPMENT OF
BROWN SPOTS ON THE RIND OF GALIA MELONS

Principal investigator: IDIT GINZBERG

Cooperative investigator:

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

שם המחקר: אפיון היסטולוגי וביוכימי של
הופעת נקודות חומות (גיינגיים) בקליפת מלון
מסוג גליה

חוקר ראשי: עידית גינזברג

חוקרים שותפים:

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

תקציר

אחסון של מלון בקירור ($5-6^{\circ}\text{C}$) גורם להופעת נקודות חומות מרובות (גיינגיים) על גבי קליפת הפרי. הבעיה אופיינית למלונים מטיפוס 'גליה' בעונת הסתיו ובשנים האחרונות היא פגעה בענף ייצוא המרכזי של הערבה ורמת הנגב. כתוצאה נבחר זן חלופי לגידול אולם הוא חסר את התכונות האופייניות של מלון מטיפוס 'גליה', שהצליח מאוד בזמנו בשווקי חו"ל. בספרות עדויות רבות על הקשר שבין רמת הביטוי של אנזימים אנטיאוקסידאנטים בקליפות פירות וירקות לחומרת הסימפטומים של נזקי צינה.

תוצאות המחקר מצביעות על פעילות גבוהה של האנזים גלוטטיון רדוקטאז בקליפה של מלון מטיפוס גליה בשנה בה לא מתפתחים גיינגיים באיחסון. טיפול של שטיפה חמה של הפרי טרום אחסון, שבעבר נמצא כי הוא מונע נזקי צינה, גרם לעליה בפעילות של האנזים קטלאז. מוצע כי במהלך השבחה של זני מלון חדשים המתבססים על טיפוס 'גליה' יש לבדוק נוכחות של פעילות גבוהה של שני האנזימים הללו כדי למנוע רגישות לנזקי צינה במהלך אחסון בקור.

דוח סופי לתכנית מספר 255-0697-05

איפיון היסטולוגי וביוכימי של הופעת נקודות חומות (ג'ינ'ים) בקליפת מלון מטיפוס גליה

Histological and biochemical characterization of the development of brown spots on the rind of Galia melons

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

עידית גינזברג	מכון לגד"ש, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני.
אלי פליק	מכון לטכנולוגיה ואיסוסון, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני.
שבתאי כהן	מו"פ רמת הנגב, מפעלי רמת הנגב, ד.ג. חלוצה, 85515.
רמי גולן	מו"פ רמת הנגב, מפעלי רמת הנגב, ד.ג. חלוצה, 85515.
זכריה תנעמי	המחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני.
שמשון עומר	אגף הירקות, שה"ס, משרד החקלאות.

Idit Ginzberg, Field and Garden Crops, ARO, the Volcani Center, P.O.B 6 Bet Dagan 50250. E-mail: iditgin@volcani.agri.gov.il

Eli Falik, Technology and Storage of Agricultural Products, ARO, the Volcani Center, P.O.B 6 Bet Dagan 50250. E-mail: efalik@volcani.agri.gov.il

Shabtai Cohen, R&D Ramat Hanegev, P.O. Haluza, 85515. E-mail: sab@inter.net.il

Golan Rami, R&D Ramat Hanegev, P.O. Haluza, 85515. E-mail: gram@netvision.net.il

Zechariah Tanami, Vegetable Crops, ARO, the Volcani Center, P.O.B 6 Bet Dagan 50250.

Shimshon Omer, Vegetable Growing Department, Shaham, Ministry of Agriculture. E-mail: shiom@shaham.moag.gov.il

יולי 2006

תמוז תשס"ו

הממצאים בדוח זה הינם תוצאות ניסויים
הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר ע'י גינזברג

תקציר

איחסון של מלון בקרור ($5-6^{\circ}\text{C}$) גורם להופעת נקודות חומות מרובות (ג'ינג'ים) על גבי קליפת הפרי. הבעיה אופיינית למלונים מטיפוס 'גליה' בעונת הסתיו ובשנים האחרונות היא פגעה בענף ייצוא המרכזי של הערבה ורמת הנגב. כתוצאה נבחר זן חלופי לגידול אולם הוא חסר את התכונות האופייניות של מלון מטיפוס 'גליה', שהצליח מאוד בזמנו בשווקי חו"ל. בספרות עדויות רבות על הקשר שבין רמת הביטוי של אנזימים אנטיאוקסידאנטיים בקליפות פירות וירקות לחומרת הסימפטומים של נזקי צינה. תוצאות המחקר מצביעות על פעילות גבוהה של האנזים גלוטטיון רדוקטאז בקליפה של מלון מטיפוס גליה בשנה בה לא מתפתחים ג'ינג'ים באיחסון. טיפול של שטיפה חמה של הפרי טרום איחסון, שבעבר נמצא כי הוא מונע נזקי צינה, גרם לעליה בפעילות של האנזים קטלאז. מוצע כי במהלך השבחה של זני מלון חדשים המתבססים על טיפוס 'גליה' יש לבדוק נוכחות של פעילות גבוהה של שני האנזימים הללו כדי למנוע רגישות לנזקי צינה במהלך איחסון בקור.

רשימת פרסומים

סיכום העבודה יפורסם בהמשך

מבוא

איחסון של מלון בקרור ($5-6^{\circ}\text{C}$). הגדרש להובלה ימית, גורם להופעת נקודות חומות מרובות (ג'ינ'ג'ים) על גבי קליפת הפרי. תופעת הג'ינ'ג'ים גורמת להפסדים כלכליים ניכרים מאחר והנזק לפרי מתגלה רק עם הגעת המשלוח לנמל היעד ואז, המשלוח נפסל או מורד לדרגת איכות נמוכה. הבעיה אופיינית למלונים מטיפוס 'גליה' בעונת הסתיו.

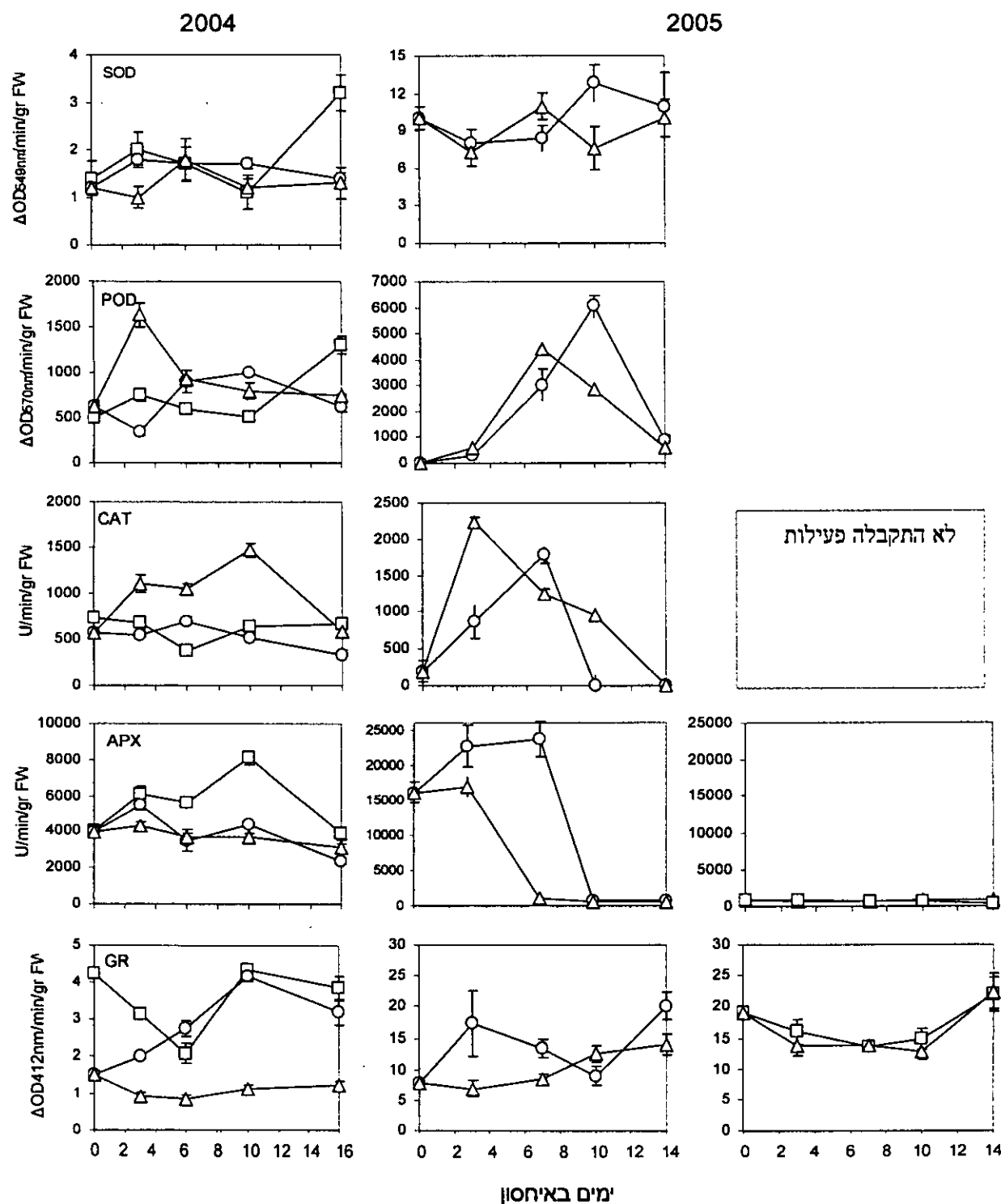
עבודות קודמות קבעו כי הג'ינ'ג'ים הם אמנם נזקי צינה (chilling injury) אך ההשראה לתופעה נובעת משינויים פיסיולוגיים בצמח במהלך הגידול בשדה כאשר טמפרטורות היום והלילה גבוהות. כיום, הפחתת הבעיה מושגת ע"י טיפול בפרי לאחר הקטיפה באמצעות שטיפה חמה ודינוג ומעבר לזנים בעלי רמה נמוכה של ג'ינ'ג'ים. אולם, גם זני מלון חדשים הרגישים פחות לנזקי צינה כמו 'טרופר' (1537) מפתחים לעיתים ג'ינ'ג'ים במהלך האיחסון בקור. חוסר ידע בסיסי על הגורמים המעורבים בהתפתחות הפגם מקשה על נקיטת האמצעים הדרושים לקבל פרי נקי מג'ינ'ג'ים.

נזקי צינה נובעים משיבוש תהליכים פיסיולוגיים בפרי כתוצאה מחשיפה לטמפרטורות נמוכות (אך לא הקפאה). הסימפטומים יכולים להופיע במהלך האיחסון בקירור או עם הוצאת הפרי לתנאים ללא-קרור במרכזי השיווק. עבודתם של בן-אמור וחובריו (1999)¹ מצביעה על הקשר שבין חומרת הסימפטומים של נזקי צינה שהתפתחו על קליפת מלון שרנטה לרמה נמוכה של אנזימים אנטיאוקסידאנטים. בשלוש שנות המחקר קבענו את פרופיל הפעילות האנזימית של Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), Peroxidase (POD), Ascorbate peroxidase (APX) ו-Glutathione reductase (GR), בשני זני מלון, האחד עמיד והשני רגיש לנזקי צינה, במטרה לאבחן לאיזו פעילות אנזימית-אנטיאוקסידאנטית פוטנציאל במניעת התפתחות ג'ינ'ג'ים. כמו כן בדקנו את פרופיל הפעילות של אנזימים אלו במהלך איחסון בקור לאחר שטיפה חמה, ובחנו את היעילות של טיפול במעכב אתילן MCP-1¹ למניעת התפתחות הג'ינ'ג'ים.

פרוט הניסויים והתוצאות

צמחי מלון מהזנים 5080 ו-1537 גודלו במיוחד לניסויים אלו בתחנת זוהר בעין תמר. השתילה בוצעה באמצע חודש ספטמבר והאסיף במהלך נובמבר. הזן 5080 הינו מטיפוס גליה, רגיש לנזקי צינה ומפתח ג'ינ'ג'ים בשיעור של 80% משטח קליפת הפרי; 1537 הינו תוצר הכלאה של טיפוס גליה וסולאר והוא נחשב כעמיד לנזקי צינה. פירות משני הזנים הועברו למכון וולקני ואוחסנו בחדר קרור בטמפרטורה של $4-5^{\circ}\text{C}$ למעקב אחר התפתחות נזקי צינה. סט נוסף של פירות עבר טיפול בשטיפה חמה (59°C) לפני האיחסון בקור. האיחסון נמשך כשלושה שבועות בהם נלקחו דגימות קליפה במרווחים של 3-4 ימים ונשמרו בהקפאה ב- -80°C . עבור כל זן וכל טמפרטורת איחסון נלקחו דגימות מחמישה פירות כל פעם מאחר ובשנת המחקר הראשונה (2003) נמצאה שונות גבוהה בין המלונים של אותה חזרה. חשוב לציין כי בניגוד לשנת 2003, שבה התפתחו ג'ינ'ג'ים, בשנים 2004 ו-2005 לא התפתחו כלל ג'ינ'ג'ים בקליפות הפרי שאוחסן ב- 5°C ; עם זאת המשכנו את הניסוי כדי ללמוד את המאפיינים האנטיאוקסידאנטים בהשוואה בין זן עמיד לנזקי צינה לזה הרגיש. בדוח זה מסוכמות תוצאות שלוש שנות הניסוי.

בגרף 1 (עמ' 4) מובא סיכום כולל של פעילות חמשת האנזימים בקליפת שני הזנים במהלך האיחסון בקור, עם או בלי שטיפה חמה טרום איחסון. פעילויות אנזימיות של POD ו-SOD בזן 1537 עבור שנת 2005 לא נבדקו עד מועד עריכת דוח זה.



גרף 1. פרופיל אנזימטי של חמישה אנזימים אנטיאוקסידאנטים בקליפת הזנים 5080 (עיגול) ו-1537 (ריבוע) בטמפרטורת איחסון של $4-5^{\circ}C$, ובקליפת פירות שעברו טיפול בשטיפה חמה לפני האחסון בקור (משולש); בשנת 2004 רק פרי מזן 5080 עבר טיפול של שטיפה חמה. תוצאות מייצגות סיכום של שתי שנות מחקר. כל נקודה היא ממוצע של חמישה פירות עם $\pm SE$.

בשנתיים 2004-5 לא התפתחו ג'ינג'ים בקליפות הפרי וצפוי היה לקבל תוצאות דומות בקביעת הפעילות האנטיאוקסידנטית. אולם, הערכים המוחלטים של חלק מהפעילויות שהתקבלו היו שונים ונבעו כנראה משונות בין שנות גידול ו/או שונות טכנית הנובעת מכך שהאנליזה האנזימתית נערכה בהפרש של שנה וע"י אנשים שונים. לפיכך, על מנת לבחון את מגמות הפעילות באופן ברור יותר ערכי הפעילות האנזימתית שנמדדו בתקופת האיחסון חושבו ביחס לפעילות שהתקבלה בקליפות טרום איחסון ובוטאו באחוזים בגרף 2 (עמוד 6).

בגרף 2 סיכום תלת שנתי תוך השוואה בין שני הזנים. מאחר והג'ינג'ים מתפתחים בעשרת הימים הראשונים לאיחסון, ניתן להניח שהארועים הראשוניים החלים בקליפה עם הכניסה לצינון הם אלו שיקבעו האם יתפתחו או לא יתפתחו הג'ינג'ים.

כאשר מתבוננים בסדרת העמודות של גרף 2 ובוחרים את השינויים בפעילויות האנזימתיות בעשרת הימים הראשונים לאיחסון ניתן להבחין בתופעות הבאות:

(א) בשנת 2003 (שנה עם ג'ינג'ים בון הרגיש 5080) נמדדה בקליפת הזן העמיד 1537 פעילות גבוהה יחסית של CAT במהלך האיחסון בקור. פעילות זו גבוהה בהשוואה לזו שנמדדה בקליפת הזן הרגיש 5080 באותה שנה, וגבוהה בהשוואה לזו שנמדדה באותו זן (1537) בשנת 2004 (שנה ללא ג'ינג'ים בקליפת הזן הרגיש). מכאן, ניתן להציע שאנזים זה מעורב בעמידות לנזקי צינה בון 1537.

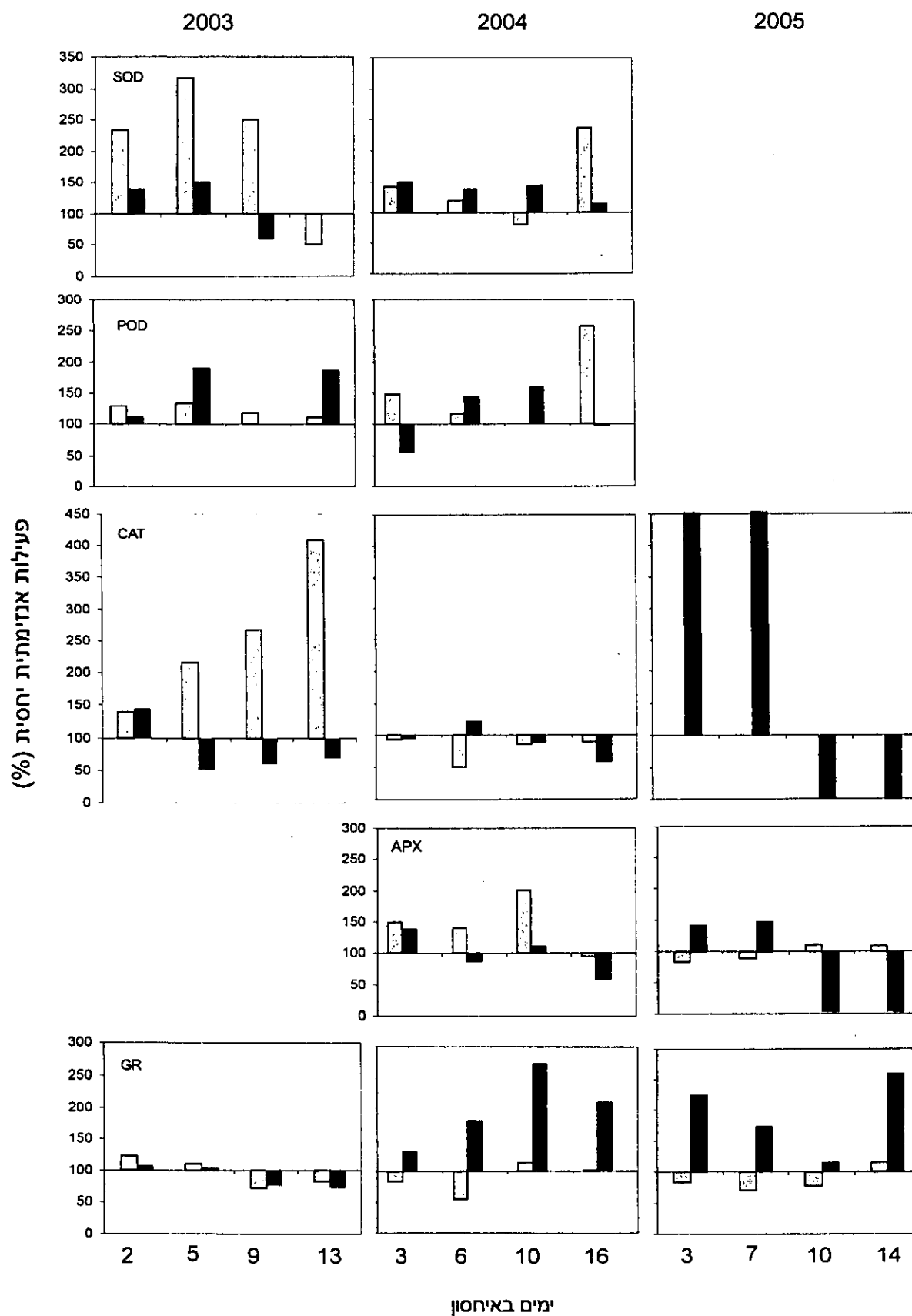
(ב) הפעילויות של POD ו-SOD עולות בקליפת הפרי של שני הזנים עם המעבר לאיחסון בקור בשתי השנים שנבדקו. מוצע שפעילויות אלו עולות בקליפה כתגובה כללית לעקת הקור. יתכן שעלייה גבוהה יותר בפעילות SOD בקליפת הזן העמיד 1537 בשנת 2003, תרמה גם כן לעמידותו בפני התפתחות ג'ינג'ים באותה שנה.

(ג) דגם הפעילות של APX אינו יציב בין השנים ולא מראה פעילות מבודלת משמעותית בין הזנים.

(ד) תופעה מעניינת ביותר רואים עבור דגם הפעילות של GR. לאנזים זה פעילות גבוהה ויציבה בקליפת הזן הרגיש 5080 בשנים בהן לא התפתחו ג'ינג'ים, לעומת אי-שינוי או ירידה בפעילות בשנת 2003 עם התפתחות ג'ינג'ים על הקליפה. בנוסף, מעניין לראות כי כאשר בוחרים את ערכי הפעילות של GR לפני האיחסון ומספר ימים לאחר האיחסון ב-5°C, נראה כי רמת הפעילות בקליפה של 5080 עולה לאותה רמה ראשונית המצויה ב-1537, בעוד שבאחרון (העמיד לנזקי צינה) אין שינוי משמעותי ברמה (טבלה 1). תוצאה זו חזרה בשתי שנות הניסוי 2004-5 בהן לא התפתחו ג'ינג'ים בקליפת הזן הרגיש 5080, והיא מחזקת את ההנחה שפעילות GR מעורבות בהקניית עמידות בפני התפתחות ג'ינג'ים בעקבות חשיפה לקור.

טבלה 1. שינוי בערכי הפעילות של GR בקליפת זן 5080 רגיש לנזקי קור וזן עמיד 1537, במהלך האיחסון ב-5°C.

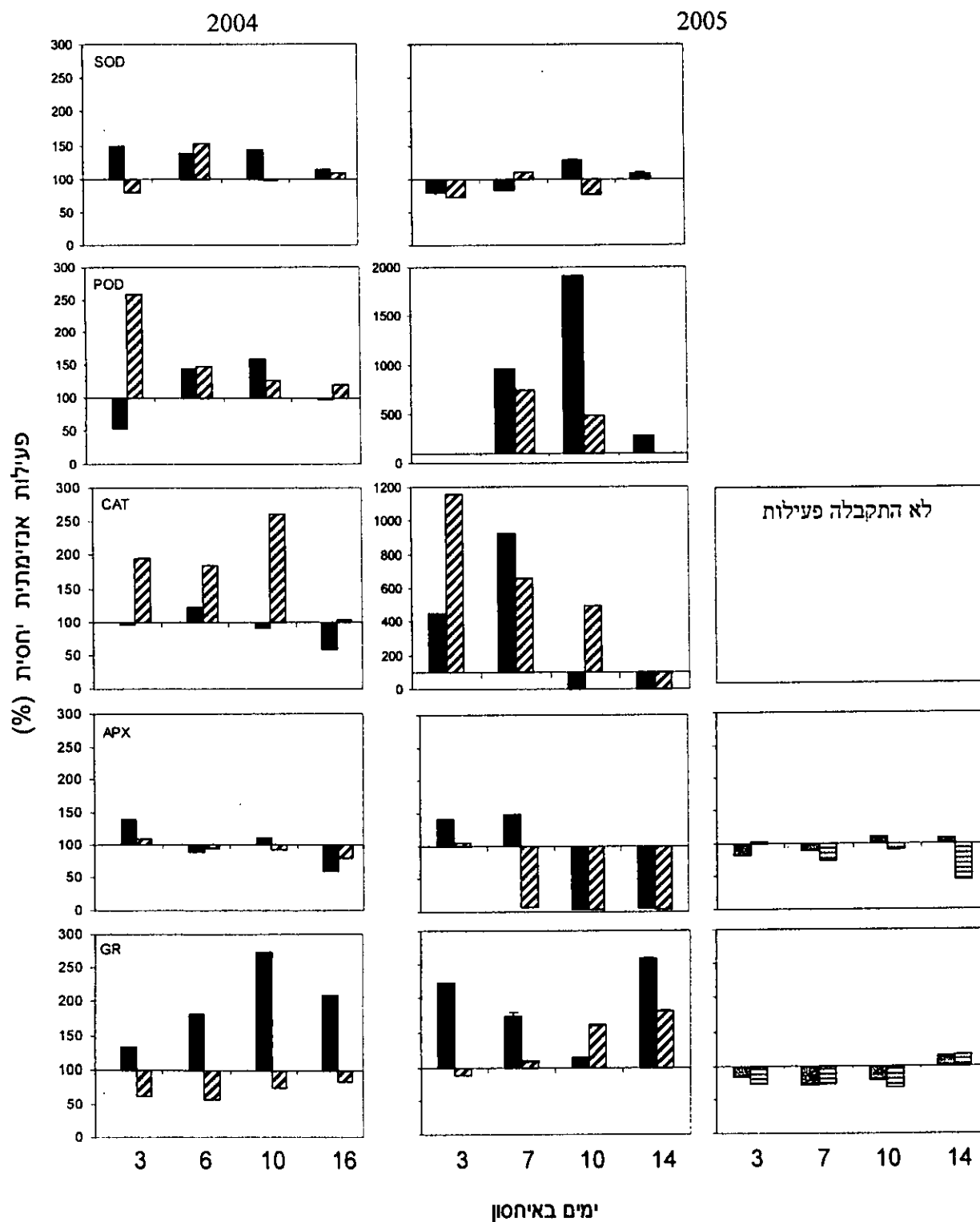
GR activity ($\Delta OD 412 \text{ nm/min/gr FW}$)			
5080	1537		
1.52±0.1	4.16±0.14	טרום איחסון	2004
4.24±0.16	4.33±0.2	לאחר 10 יום	
7.77±0.53	19.13±0.57	טרום איחסון	2005
20.09±2.19	21.94±2.73	לאחר 14 יום	



גרף 2. סיכום תלת שנתי של פרופיל אנזימטי של חמישה אנזימים אנטיאוקסידאנטים בקליפת הזנים 5080 (שחור) ו-1537 (אפור) בטמפרטורת איחסון של $4-5^{\circ}\text{C}$. הערכים מבטאים שינוי באחוזים בפעילות במהלך האיחסון ביחס לערכים שנמדדו בקליפה טרום איחסון.

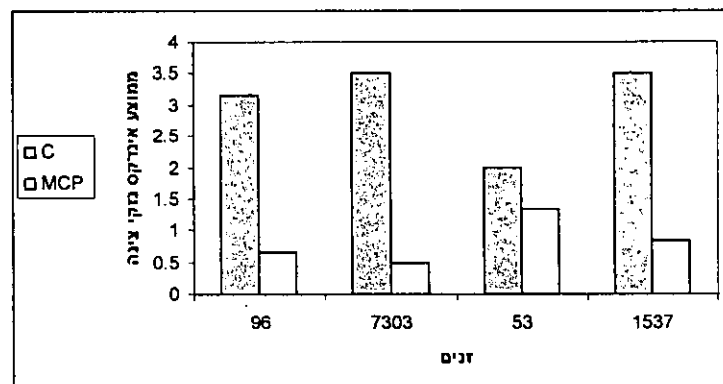
שטיפה בחום (59°C) של מלונים טרום איחסון הוא טיפול מקובל היום למניעת רקבונות. תצפיות הראו כי השטיפה החמה גם מונעת התפתחות של ג'ינג'ים. בכדי לבחון האם השטיפה משנה את פרופיל הפעילות האנטיאוקסידאנטית בקליפה ובכך מקנה הגנה מפני נזקי צינה, נבדקה פעילות חמשת האנזימים במהלך האחסון ולאחר השטיפה בשנים 2004-5 (גרף 1). שיעור השינוי בפעילויות ביחס לערכיה טרום איחסון ובהשוואה לפעילות בקליפה ללא שטיפה חמה מבוטאת בגרף 3 (עמוד 8).

בעקבות השטיפה החמה (עקת חום) התקבלה עלייה משמעותית בפעילות של CAT בקליפה של הזן הרגיש 5080; אולם הפעילות המגנה של GR פחתה. תוצאות אלו חזרו בשתי שנות הניסוי, והן מציעות כי עבור הזן הרגיש 5080, השטיפה החמה משרה פעילות אנטיאוקסידאנטית בקליפה, המגנה בפני נזקי הצינה במנגנון השונה מהפעילות האנדרוגנית האנטיאוקסידאנטית שלה.



גרף 3. השפעת שטיפה חמה (59°C) טרום איחסון ב- 5°C על שינוי בפעילות האנטיאוקסידנטית בקליפה של הזנים 5080 (ביקורת שחור, טיפול שטיפה חמה קווים אלכסוניים), ו-1537 (ביקורת אפור, טיפול שטיפה חמה קווים רוחביים). תוצאות מייצגות סיכום של שתי שנות מחקר.

גישה אחרת שנבחנה להפחתת הג'ינג'ים בקליפת המלון היא טיפול במעכב אתילן-1-MCP. פירות מהזנים הקלימקטריים 96, 7303, ו-1537 ומהזן הלא קלימקטרי 53 נאספו בשדה בשלב של שבירת צבע. הפירות הוצבו במיכלים אטומים ונחשפו ל 600 ח"ב של החומר למשך 24 שעות בטמפרטורה של 20°C . לאחר מכן הועברו המלונים לאיחסון בן שבועיים ב- 5°C ו-3 ימים ב- 20°C להדמיית איחסון/שיווק (גרף 4). בתום הניסוי נבחנו קליפות הפרי לנזקחות ג'ינג'ים ומידת הנזק נקבעה בסקאלה של 0-10, כאשר: 0 = ללא נזק; 5 = כ-50% מהפרי מכוסים בכתמים חומים של 2-3 מ"מ; 10 = 100% מכוסים בכתמים חומים. התוצאות הנן ממוצע לשלושה ניסויים, ועולה מהן כי טיפול ב-1-MCP יכול להפחית את נזקי הצינה במהלך האיחסון.



גרף 4. השפעת 1-MCP (600 ח"ב) על נזקי צינה בארבעה זני מלון, לאחר 14 ימים ב- 5°C + 3 ימים ב- 20°C .

מסקנות וסיכום

מהתוצאות המוצגות בדוח זה עולה כי ישנה קורלציה בין הפעילות של GR בקליפה של זן 5080 לבין עמידותו בפני נזקי צינה. זאת ועוד, בעת איחסון בקור הפעילות של GR בקליפת הזן הרגיש עלתה לערכים הדומים לאלו שנמצאו בקליפת הזן העמיד 1537. בעבר הוצע כי הג'ינג'ים מתפתחים במהלך האיחסון בעיקבות תנאי גידול ששררו בשטח במהלך התפתחות פרי המלון. הוצע כי בעיקר טמפרטורות לילה גבוהות הן אלו המשרות מאוחר יותר את הרגישות לנזקי הצינה באיחסון. העובדה ששטיפה חמה מפחיתה את פעילות ה-GR אולי מרמזת על כך שבתנאי גידול של טמפרטורות גבוהות יורדת פעילות GR בקליפה של הזן הרגיש 5080, כך שעם הכניסה לאיחסון בקור אין עלייה בפעילות ולא הגנה על הקליפה.

עם זאת שטיפה חמה משרה פעילות של קטלאז בקליפה ויתכן וגישה זו מקנה "עמידות" לנזקי צינה באופן שונה מהמנגנון הטבעי של קליפת הפרי. גם הדגרה של הפרי עם מעכב אתילן 1-MCP מפחיתה את מופע הג'ינג'ים במנגנון שאינו ידוע עדיין.

רשימת ספרות

1. Ben-Amor, M., Flores, B., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. and Romojaro, F. 1999. Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase prevents chilling injury in Charantais cantaloupe melons. *Plant Cell and Environment* 22:1579-1586

סיכום עם שאלות מנחות

- מטרת המחקר לתקופת הדוח תוך התייחסות לתכנית העבודה

מטרת המחקר הייתה לבחון באם ישנו קשר בין חוסר בפעילות אנטיאוקסידנטית בקליפה של פרי המלון לבין הופעת נזקי קור (ג'ינג'ים) בקליפה במהלך איחסון ב- 5°C .

- עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדוח

הניסויים כללו קביעת פרופיל פעילות של אנזימים אנטיאוקסידנטים בקליפה של שני זנים, האחד זן רגיש לנזקי צינה 5080, והשני זן הנחשב 'עמיד', 1537, במהלך איחסון בקור ($4-5^{\circ}\text{C}$). מאחר ושטיפה חמה של הפרי לפני האחסון בקור מונעת את הופעת הג'ינג'ים, נבחנה השפעתה על הפרופיל האנזימטי האנטיאוקסידנטי. ניסוי נוסף כלל בחינה של טיפול טרום איחסון של הפרי ב-1-MCP על התפתחות הג'ינג'ים.

- המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרת המחקר בתקופת הדו"ח.

נמצאה קורלציה בין פעילות מוגברת של האנזים גלוטטיון רדוקטאז בקליפה של הזן הרגיש 5080 לבין עמידותו בפני נזקי צינה. כמו כן מוצע כי השטיפה החמה משרה את פעילות האנזים קטלאז ובכך מונעת את התפתחות הג'ינג'ים. יתכן כי הפרופיל האנזימטי האנטיאוקסידנטי המקנה עמידות לפרי מפני נזקי צינה, שונה מזה המושג בעקבות השטיפה החמה. במקביל נמצא כי טיפול ב-1-MCP מונע התפתחות ג'ינג'ים, אולם המנגנון לא ברור עדיין.

- הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים);

מאחר ולא התפתחו ג'ינג'ים במהלך שתי שנות הניסוי האחרונות לא עלה בידנו למצות את הכתמים ולאפיין את החומר הכימי המצוי באזורי ההחמה. גם איפיון היסטולוגי של התפתחות ג'ינג'ים לא עלה יפה, מאחר ובפרי הבשל הקליפה דחוסה מאוד וקשה להבחין במבנה תאי/שיכבתי מסודר שלה.

- הפצת ידע

בקירוב ייכתב מאמר מסכם עבור העיתונות הישראלית והמדעית-בינלאומית

- פרסום הדוח

אבקש לא לפרסם את הדוח עד לכתיבת מאמרים כרשום למעלה.