	תקופת המחקר: 2001-2001	קוד מחקר: 402-0297-01
	Subject: EVALUATION OF THE PEPTIDE HORMONE SYSTEMIN, AS A MEAN TO IMPROVE THE POST HARVEST QUALITY	שם המחקר: בחינת ההורמון החלבוני סיסטמין כאמצעי לשיפור איכות פירות העגבניה לאחר הקטיף
	Principal investigator: LICHTER AMNON	חוקר ראשי: אמנון ליכטר
	Cooperative investigator: MEIR SHIMON, GALINA GINDIN, ORIT DVIR	חוקרים שותפים: שמעון מאיר, גלינה גינדין, אורית דביר
Institute:	מוסד:	

תקציר

הצגת הבעיה ומטרת המחקר: ההורמון החלבוני סיסטמין המופרש בעגבניות בתגובה לפציעה, דווח בספרות כמפעיל מערכות הקשורות לעמידות הצמח כנגד חרקים ופתוגנים שונים דרך מסלול החומצה הג'יסמונית. נבדקה ההשערה האם יישום אקסוגני של החלבון על עגבניות אשכול מפעיל מערכות אנזימטיות בדומה לממצאים ממערכות מודל וכן שהוא תורם לעמידות הפרי באשכול כנגד חרקים.

תוצאות: הפפטיד סונטז ויושם בהגמעה לאשכולות בהשוואה לטיפול במתיל ג'יסמונאט, פציעה וביקורת. בסדרה של 3 ניסויים, הפרי ניתן כמקור מזון לחרות של הליוטיס ומשקלם נמדד לפני ולאחר ההזנה אך לא נמצא שינוי משמעותי במשקל החרות בטיפולים השונים. הטיפול במתיל ג'יסמונאט, אך לא הטיפול בסיסטמין, הגביר את הנשירה של הפרי מהאשכול ובנוסף ניכרו גם סימני פגיעה בפרי. בחינת השפעת הסיסטמין על אנזימים שונים נעשתה בהתחלה על ידי הגמעת אשכולות שלמים בחומרים ובהמשך על ידי הגמעת פירות בודדים דרך העוקץ. הפעילות של האנזימים פוליפנול אוקסידאז, פראוקסידאז ופוליגלקטורנאז נבחנה בעלי הגביע בזמנים קצרים (4 או 8 ש') או בזמנים ארוכים (24, 48, 96 ש'). בניסויים ובזמנים שונים התקבלו תוצאות שמעידות על הגברה של הפעילות האנזימטית על ידי סיסטמין ומתיל ג'יסמונאט, ובניסויים אחרים לא התקבלו הבדלים או התקבלה הפחתה של הפעילות האנזימטית בעלי הגביע. דיפניל יודוניום (DPI) שניתן כטיפול מקדים, אמור לעכב את מעבר הסיגנל, הגביר את הפעילות האנזימטית בכל הטיפולים.

מסקנות: במהלך הניסויים לא התקבלו אינדיקציות לשיפור איכות הפרי או האשכול עקב יישום סיסטמין. על סמך מכלול התוצאות לא ניתן להמליץ על המשך בחינת החומר במסגרת תכנית מחקר עצמאית, אך ניתן לשלב את הטיפול בחומר במסגרת תכנית מחקר קיימת.

מיינהל המחקר החקלאי

המכון לטכנולוגיה ואחסון של תוצרת חקלאית

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף

ARO

Institute of Technology and Storage of Agricultural Products

Department of Postharvest Science of Fresh Produce

**בחינת ההורמון החלבוני סיסטמין כאמצעי לשיפור איכות פירות העגבנייה לאחר
הקטיף**

דו"ח סופי לשנת 2001

תכנית מס' 402-0297-01

מאת:

אמנון ליכטר, שמעון מאיר, דביר אורית, גלינה גינדין ודלילה בנו-מועלם

Amnon Lichter, Shimon Meir, Orit Dvir, Galina Gindin and Delila Beno-

Mualem

בחינת ההורמון החלבוני סיסטמין כאמצעי לשיפור איכות פירות העגבנייה לאחר הקטיף

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף ירקות

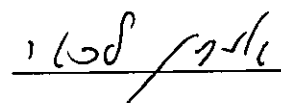
אמנון ליכטר*, שמעון מאיר, דביר אורית, גלינה גינדין¹ ודלילה בנו-מועלם

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית טרייה לאחר הקטיף, ¹המחלקה לפיטופתולוגיה

בית דגן

*Email: vtlicht@volcani.agri.gov.il

האם הנך מאשר את ציון הפסקה הבאה בדף הפתיחה לדו"ח כן/לא מחקר את המיותר*
הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר 

תקציר

ההורמון החלבוני סיסטמין המופרש בעגבניות בתגובה לפציעה, דווח בספרות כמפעיל מערכות הקשורות לעמידות הצמח כנגד חרקים ופתוגנים שונים דרך מסלול החומצה הג'סמונית. בניסויים שנערכו בעונת 2001-2 נבדקה ההשערה האם יישום אקסוגני של החלבון על עגבניות אשכול מפעיל מערכות אנוימטיות בדומה לממצאים ממערכות מודל וכן שהוא תורם לעמידות הפרי באשכול כנגד חרקים. הפפטיד סונטז ויושם בהגמעה לאשכולות בהשוואה לטיפול במתיל ג'סמונאט, פציעה וביקורת. בסדרה של 3 ניסויים, הפרי ניתן כמקור מזון ללריות של הליוטיס ומשקלם נמדד לפני ולאחר ההזנה אך לא נמצא שינוי משמעותי במשקל הלריות בטיפולים השונים. הטיפול במתיל ג'סמונאט, אך לא הטיפול בסיסטמין, הגביר את הנשירה של הפרי מהאשכול ובנוסף ניכרו גם סימני פגיעה בפרי. בחינת השפעת הסיסטמין על אנוימים שונים נעשתה בהתחלה על ידי הגמעת אשכולות שלמים בחומרים ובהמשך על ידי הגמעת פירות בודדים דרך העוקץ. הפעילות של האנוימים פוליפנול אוקסידאז, פראוקסידאז ופוליגלקטורונאז נבחנה בעלי הגביע בזמנים קצרים (4 או 8 ש') או בזמנים ארוכים (24, 48, 96 ש'). בניסויים ובזמנים שונים התקבלו תוצאות שמעידות על הגברה של הפעילות האנוימטית על ידי סיסטמין ומתיל ג'סמונאט, ובניסויים אחרים לא התקבלו הבדלים או התקבלה הפחתה של הפעילות האנוימטית בעלי הגביע. דיפניל

יודוניום (DPI) שניתן כטיפול מקדים, אמור לעכב את מעבר הסיגנל, הגביר את הפעילות האנזימטית בכל הטיפולים. במהלך הניסויים לא התקבלו אינדיקציות לשיפור איכות הפרי או האשכול עקב יישום סיסטמין. על סמך מכלול התוצאות לא ניתן להמליץ על המשך בחינת החומר במסגרת תכנית מחקר עצמאית, אך ניתן לשלב את הטיפול בחומר במסגרת תכנית מחקר קיימת.

מבוא

ההורמון החלבוני סיסטמין בודד מצמחים ממשפחת הסולניים דוגמת עגבנייה, פלפל ותפוז"א (Constabel et al., 1995; Schaller and Ryan, 1995). ההורמון מיוצר על ידי הצמח בכמויות מזעריות בתגובה לפציעה מכנית או פגיעת חרקים והוא עובר לשאר חלקי הצמח דרך מערכת ההובלה ומשרה תגובת עמידות סיסטמית. באתרי המטרה הסיסטמין מפעיל סדרה של גנים הקשורים למערכת ההגנה של הצמח הכוללים מעכבי פרוטאינוזות, פרוטאינוזות, פוליפנול-אוקסידאזות, אנזימים הקשורים למטבוליזם של חומצות שומן וחלבונים הקשורים להובלת סיגנלים (Ryan, 2000). בנוסף גורם הסיסטמין לעליה זמנית בתרכובות חמצן פעיל ובתגובה החימצונית (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999; Stennis et al., 1998). החלבונים המשופעלים והתגובה הפיזיולוגית אחראים ישירות או בעקיפין לעמידות סיסטמית של הצמח כנגד חרקים ועקות שונות (Ryan, 2000). סיסטמין מיוצר בצמח מפרוסיסטמין שהוא חלבון של 200 חומצות אמינו. הפפטיד הבוגר מסוגל לנדוד באפופלסט ולהגיע למטרות מרוחקות תוך שעות בודדות והוא פעיל בריכוזים נמוכים מאד (פיקו-פמטומולר). צמחים טרנסגניים עם רמה מופחתת של פרוסיסטמין הם פחות עמידים להתקפת חרקים בעוד שצמחים עם רמה מוגברת של החלבון יש רמה קונסטיטטיבית גבוהה של מעכבי פרוטאינוזות-חלבונים בעלי פעילות כנגד חרקים שונים (Schaller and Ryan, 1995). מנגנון הפעולה המוצע של סיסטמין מתואר באופן הבא: החלבון הבוגר הכולל 18 חומצות אמינו נקשר לרצפטור ממברנלי שגורם לשפעול תעלות סידן ועליית רמת הסידן בתא מפעילה מצידה קינאז ופוספאטאז שאחראים על עיכוב $H^+-ATPase$ או אקטיבציה של הידרוליזת פוספוליפידים, בהתאמה. כתוצאה מכך יש יצירה מוגברת של חומצה ג'סמונית שגורמת להפעלה של גנים המגבירים את העמידות הסיסטמית של הצמח (Ryan, 2000; Schaller, 1998). מידע רב הצטבר על פעולת סיסטמין מאז גילויו ב-1991 על ידי Ryan וקבוצתו ומידע זה מתייחס בעיקר למנגנון הפעולה ולפעולת ההורמון כנגד חרקים. יחד עם זאת אין מידע שמתייחס לאיכות הפרי מבחינת עמידות כנגד פתוגנים או מבחינת עמידות הפרי לאחסון בקור. יש לציין בהקשר זה מספר מחקרים שדיווחו על הגברת עמידות של עגבנייה לפטריות פוזריום או פיטופטורה (Cohen et al., 1993; Li et al., 1996) ושיפור בכושר האחסון של פירות, ירקות ופרחים (Buta and Moline, 1998; Droby et al., 1999; Meir et al., 1998; Meir et al., 1996) בעקבות טיפול בג'סמונאט. לכן, אחת האפשרויות היא שמתן סיסטמין לפני אחסון הפרי בקירור עשוי לשפר את עמידותו לפתוגנים ולפגעי האחסון.

מטרות המחקר

תכנית המחקר בנושא הסיסטמין אושרה לבדיקת היתכנות במשך שנת מחקר אחת. על כן מטרת התכנית הוגבלה לבחון את האפשרות שיישום חיצוני של הפוליפפטיד סיסטמין מפעיל את המערכות האנזימטיות שעליהן דווח בספרות. במקביל ובדקה השפעת החומר על איכות הפרי כולל נזקי צינה, נשירה ועמידות הפרי לחרקים.

שיטות וחומרים

חומרים

כ- 80 mg של הפפטיד סיסטמין סונתזו על ידי חברת MBC (רחובות, ישראל) בעלות של 8000 ₪. Methyl Jasmonate (MJ) ושאר החומרים ששימשו למחקר זה נרכשו מחברת סיגמה.

חומר צמחי

עגבניות אשכול הוגמאו בתמיסות 0.2mM CaSO_4 לאחר חידוש החתך בגבעול. לתמיסת ההגמאה בנפח 1 מ"ל הוסף MJ בריכוז 1mM או $50\mu\text{M}$ Systemin. טיפולי הפציעה נעשו ע"י שפשוף האפידרמיס העליון לאורך הגבעול. הדגימות שנלקחו היו 10 עלי גביע מפירות שונים לאורך האשכול. בניסוי האחרון (8.5.02) הועמדו עגבניות בודדות בתמיסות השונות ומהם נלקח עלה גביע בודד לדגימה בת 10 עלים. כל ניסוי בוצע בשלוש חזרות שהוקפאו מיידית. הדגימות נכתשו בחנקן נוזלי (-80°C) בנוכחות PVP בלתי מסיס האבקה נשמרה בהקפאה עד לשימוש.

בדיקת PPO

100 מ"ג מהחומר הכתוש נשקל, הורחק ב-100 mM בופר פוספט pH-6.0, לאחר שעה החומר סורכו 7000g משך 10 דקות. החלבון נבדק בשיטת Bradford וכמות של $5\mu\text{g}$ נלקחה לבדיקה אנזימטית. PPO נבדק בשיטת TNB. 30 מ"ג של סודיום בורוהידריד הוספו ל-19 מ"ג (2-nitrobenzoic acid)- $5,5'$ dithio-bis שהומסו ב-10 מ"ל מים, ריכוז 1mM. ריאקציה אנזימטית בנפח סופי של 1 מ"ל הכילה 100mM בופר פוספט pH-6.0 2mM חומצה כלורוגנית וריאגנט TNB בריכוז סופי 0.05mM. הריאקציה נמשכה כ-90 שניות ונקראה באורך גל 412nm.

בדיקת פראוקסידאז

פעילות הפראוקסידאז נבדקה מהמיצוי שהוכן עבור PPO. ריאקציה אנזימטית בנפח סופי של 1 מ"ל הכילה 100mM בופר פוספט pH-6.0, 2.5mM guaiacol, ו- $25\text{mM H}_2\text{O}_2$, $5\mu\text{g}$ מהמיצוי נלקח לריאקציה האנזימטית שנמשכה 90 שניות ונקראה באורך גל 470nm.

בדיקת PG

100 מ"ג מהחומר הכתוש נשקל הורחק ב-100 mM בופר ציטרט pH-6.0, שהכיל 1M NaCl. ascorbic acid 4mM, 5mM DTT. לאחר שעה החומר סורכו במהירות 7000g משך 10 דקות. החלבון נבדק בשיטת Bradford וכמות של $2.5\mu\text{g}$ נלקחה לבדיקה אנזימטית בנפח של 0.5 מ"ל. בופר

הריאקציה הכיל 75mM בופר אצטט pH-5.3, 7.5mM EDTA ו-0.3% PGA מהול ביחס של 4:1 עם 0.6M NaCl. המבחנות עברו אינקובציה משך 2 או 4 שעות ב-37°C. בתום האינקובציה הוספו 0.5 מ"ל ריאגנט נחושת והמבחנות הורתחו למשך 10 דקות. המבחנות קוררו לטמפרטורת החדר והוסף 1 מ"ל ריאגנט ארסנומוליבדט. אורך הגל לבדיקה היה 500nm.

בדיקת אתילן.

ארבעה אשכולות במספר זהה של עגבניות לאשכול הונחו בצנצנת זכוכית בנפח 2 ליטר, כל אחד מהאשכולות הוגמא בתמיסה בנפח 1 מ"ל בטיפולים הבאים MJ 1μmol או Systemin 50nmol. טיפולי הפציעה נעשו ע"י שפשוף האפידרמיס העליון לאורך הגבעול. הצנצנות נסגרו באופן הרמטי ודגימות אתילן נלקחו בזמנים שונים. האתילן נבדק במכשיר GC וקולונת Carbowax. יחידות המדידה הם ב-μ/L.

בדיקת נשירה.

עגבניות אשכול נקטפו ובו ביום טופלו ב- MJ 1μmol או Systemin 10nmol. לאחר ייבוש של כשעתיים באוויר, האשכולות סודרו בספקים ואוחסנו בחדר קור 12°C ו-95% לחות יחסית למשך 14 יום. בתום התקופה נבדק % נשירת העגבניות מהאשכול. התוצאות הם ממוצע של 3 נספקים שהכילו 4-5 אשכולות או 30-40 פירות לאריזה.

תוצאות

א. בחינת השפעת סיסטמין על התפתחות לרוות של הליוטיס.

סיסטמין ידוע כמפעיל מעכבי פרוטאינוזות המשפיעים על ההתפתחות של חרקים הניזונים מהם. המערכת הספציפית של לרוות הליוטיס לא נבחנה בעבר בהקשר זה ומבדיקות הקדמיות שנערכו נמצא שהלרוות ניזונות היטב מפירות עגבניות צ'רי אך לא מעלי הגביע. משקילות של לרוות שהוזנו על פירות עגבניות שהאשכולות שלהם הוגמאו בסיסטמין או ב-MJ לא נמצאה הפחתה במשקל הלרוות באף אחד מהניסויים (טבלה 1), כולל ניסויים שאינם מוצגים. בניסוי 3 נלקח מיצוי מעלי גביע ששימש להכנת מצע מזון ללרוות אך גם בניסוי זה לא הובחן שינוי משמעותי במשקל הלרוות לאחר ההזנה.

טבלה 1: הגמעת אשכולות בסיסטמין ומתיל ג'סמונאט ובדיקת השפעת הטיפול על התפתחות לרוות של הליוטיס. המספרים מתארים את המשקל הממוצע של הלרוות בתום הבדיקה.

ניסוי 1- חצאי פירות	ניסוי 2 – פירות שלמים	ניסוי 3- מיצוי עלי גביע	
0.063 ± 0.036	0.01 ± 0.03	0.068 ± 0.164	Control
0.076 ± 0.013	0.01 ± 0.03	0.018 ± 0.158	Sys
0.064 ± 0.036	0.01 ± 0.04	0.046 ± 0.109	MJ

ב. בחינת השפעת סיסטמין על פעילות פוליפנול אוקסידאז

בסדרה של ניסויים נבדקה פעילות PPO (Constabel et al., 1995) לאחר הגמעת האשכול בסיסטמין, מתיל ג'סמונאט או הגמעה בבופר של אשכולות שעברו פציעה באפידרמיס של עלי הגביע. עלי הגביע נאספו לאחר זמנים שונים כמפורט בטבלאות ופעילות PPO נבדקה במיצויים מעלי הגביע. בניסוי המתואר בטבלה 2 (13.1.02) נראה שיש עלייה בפעילות PPO בעלי גביע מטופלים בסיסטמין או MJ לאחר 48 או 96 ש' ממתן הטיפול. בניסוי שנדגם ב-20.2.02 לא הייתה פעילות מוגברת בהשוואה לביקורת של PPO לאחר 48 שעות ממתן הסיסטמין, אך הייתה פעילות גבוהה של האנזים לאחר 6 שעות ממתן הטיפול. בחזרה 1 של ניסוי שהחל ב-31.1.02 ניכרה פעילות PPO גבוהה בטיפול ה-MJ בכל זמני הדגימה. בחזרה שנייה של ניסוי זה לא נמצא הבדל דומה בהשוואה לשאר הטיפולים.

טבלה 2: השפעת טיפולים בפציעה, מתיל ג'סמונאט וסיסטמין על פעילות פוליפנול אוקסידאז בעלי הגביע של האשכול.

MJ	Sys	Wound	Con	Time
PPO activity (units/mg protein/min)				
13.1.02				
			1.28	0h
1.44	1.54	1.85	1.65	3h
1.79	1.71	1.71	1.47	24h
2.26	2.41	1.43	1.19	48h
2.16	2.42	1.6	1.01	96h
20.2.02				
			8.29	0h
2.81	7.51	10.55	10.39	3h
5.41	17.4	6.41	9.41	6h
6.31	6.59	7.07	7.53	48h
31.1.02				
			חזרה 1	
			2.36	0h
17.6	3.37	4.46	3.85	3h
13.68	4.01	3.09	3.26	24h
10.18	2.81	3.63	3.24	48h
13.78	1.43	1.98	0.94	96h
31.1.02				
			חזרה 2	
			7.09	0h
7.11	8.08	6.06	3.76	3h
6.61	7.34	8.99	7.11	24h
8.59	8.86	7.53	nd	48h
4.35	7.28	8.24	6.7	96h

אחת המסקנות שהתבקשו מהניסויים המתוארים בטבלה 2 הייתה שמערכת המודל של אִשכולות מוגמעים אינה הומוגנית דיה כדי לקבל תשובות מהימנות. בניסיון לשפר את אחידות המדגם, הוגמעו פירות מנותקים מהאשכול שהוצבו עם העוקץ כלפי בור של פלטת דגימה. מהשוואת 3 החזרות שניסוי זה לא ניתן ללמוד על שום הבדלים עקביים בין החזרות.

התרכובת DPI (diphenylene iodonium) הוא מעכב של NADPH Oxidase ועקב כך הוא מעכב פעילות מאוחרת של מספר אנזימים כולל PPO אך אינו אמור לעכב פעילות של גנים המאוקטבים ישירות על ידי סיסטמין (Orozco-Cardenas et al., 2001). בניסוי שבו הוסף DPI לפני סיסטמין ו-MJ לא התקבל עיכוב פעילות PPO בביקורת, אלא להפך, הייתה הגברה ניכרת של הפעילות הן בזמן הדגימה המוקדם והן בזמן הדגימה המאוחר (טבלה 4). הגברת פעילות בטיפול מקדים ב-DPI התקבלה גם בטיפול הסיסטמין ובדגימה המוקדמת של הטיפול ב-MJ. על כן, לא ניתן להסיק שהמערכת תפקדה על פי צפי המודל או באופן עקבי שמאפשר הסקת מסקנות.

טבלה 3: השפעת טיפולים בפציעה, מתיל ג'סמונאט וסיסטמין על פעילות

פוליפנול אוקסידאז בעלי הגביע של פירות בודדים (8.5.02)

MJ	Sys	Wound	Con	Time
PPO activity (units/mg protein/min)				
חזרה 1				
			12.00	0h
12.29	10.37	14.57	16.01	3h
11.33	14.71	11.97	13.42	8h
11.24	11.29	15.79	16.08	24h
14.08	12.97	24.78	20.53	48h
חזרה 2				
			10.14	0h
11.16	14.97	11.06	12.00	3h
5.35	6.05	10.83	10.48	8h
6.92	6.02	8.105	7.21	24h
14.62	5.99	9.07	18.70	48h
חזרה 3				
			10.88	0h
14.75	15.44	17.15	14.21	3h
13.23	11.74	12.01	11.47	8h
8.27	7.51	11.72	11.41	24h
23.37	13.64	21.63	10.68	48h

טבלה 4: השפעת תוספת DPI לפני הטיפול על פעילות פוליפנול אוקסידאז בעלי הגביע של אשכולות מוגמעים (26.2.02).

MJ		Systemin		Control		Time
+DPI	(-) DPI	+DPI	(-) DPI	+DPI	(-) DPI	
					12.67	0h
20.73	14.88	26.76	20.81	21.84	6.33	4h
9.55	10.85	31.96	21.7	74.96	13.06	24h

ג. בחינת השפעת סיסטמין על פעילות פראוקסידאז

למרות שאין דיווחים בספרות על אינטראקציה בין סיסטמין ופראוקסידאז, ידוע שתרכובות חמצן פעיל מתפקדות כסיגנל משני לסיסטמין (Orozco-Cardenas et al., 2001) ופראוקסידאז (PO) מאידך אחראי על ייצור מי חמצן. לכן הפקות החלבון ששימשו לבדיקת PPO, שימשו גם לבדיקת פעילות PO באמצעות גואיקול כסובסטרט. תוצאות 3 החזרות של ניסוי שנערך על פירות מגותקים (טבלה 5), לא מעידות על כיוון השפעה מהותי של סיסטמין על פעילות PO בתחום הזמנים שנבדק.

טבלה 5: פעילות פראוקסידאז בעלי הגביע לאחר הגמעת פירות בודדים.

MJ	Sys	Wound	Con	Time
PO activity (O.D. /mg protein/min)				
חזרה 1				
			25.97	0h
35.65	29.46	39.53	39.78	3h
37.29	39.90	31.00	31.15	8h
41.21	41.00	40.28	42.10	24h
26.85	19.03	55.33	50.48	48h
חזרה 2				
			20.40	0h
25.50	21.59	23.70	23.05	3h
15.13	15.47	24.00	25.45	8h
22.73	25.87	23.90	18.42	24h
18.87	11.56	17.44	15.65	48h
חזרה 3				
			26.70	0h
31.23	27.94	30.79	32.09	3h
26.95	24.10	33.04	27.72	8h
29.10	26.58	23.90	29.39	24h
29.40	24.92	33.72	12.70	48h

7. בחינת השפעת סיסטמין על פעילות פוליגלקטורונאז.

פוליגלקטורונאז (PG) המופעל על ידי סיסטמין בתיווך של MJ אחראי לשחרור של אוליגומרים של חומצה גלקטורונית ואלה מצידם אחראים לאינדוקציה של יצירת מי חמצן המפעילים מצידם את מערכת ההגנה של הצמח (Bergey et al., 1999; Orozco-Cardenas et al., 2001). משום כך, נבדקה פעילות PG ב-3 מהניסויים שנבדקו לפעילות PPO. גם בבדיקות אלו (טבלה 6) לא היו אינדיקציות לפעילות PG המתווכת על ידי סיסטמין או MJ.

טבלה 6: פעילות פוליגלקטורונאז בעלי הגביע של עגבניות אשכול

MJ	Sys	Wound	Con	Time
PG activity ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{h}$)				
20.2.02				
			2.19	0h
0.523	3.15	7.96	2.02	3h
6.27	5.36	5.79	5.71	24h
26.2.02				
			0.77	0h
3.75	3.55	6.73	4.42	4h
6.73	4.23	nd	nd	8h
5.48	4.42	6.73	2.98	24h
8.5.02				
			3.02	0h
4.81	4.2	2.36	2.88	3h
2.03	1.23	2.51	1.04	8h
2.36	2.59	2.12	2.17	24h
2.92	1.89	3.96	2.36	48h

20/26.2.02: פעילות PG נבדקה על עלי גביע של אשכולות מוגמעים.

8.5.02: פעילות PG נבדקה על עלי הגביע של פירות מוגמעים.

ה. בחינת השפעת סיסטמין על שחרור אתילן מאשכולות של עגבניות צ'רי

על פי הידוע מהספרות, היה צפוי שסיסטמין יגרום לשחרור מוגבר של אתילן בצמח (Chao et al., 1999). כדי לבדוק סברה זו, אשכולות של עגבניות צ'רי הוכנסו לצנצנות זוכית שנאטמו לשעתיים או יותר בפרקי זמן שונים לאחר מתן הטיפול בסיסטמין, MJ, ופציעה. דגימות תכולת האתילן של טיפולים אלו מובאות בטבלה 7. בהשוואה לביקורת מס' 1, אך לא לביקורת 2, יש עלייה בשחרור אתילן בעקבות הטיפולים השונים ובזמנים השונים. ללא חזרות נוספות על הניסוי, לא ניתן לקבוע מהי התוצאה הנכונה לביקורת.

טבלה 7: שחרור אתילן מאשכולות לאחר הגמעה של סיסטמין, מתיל ג'סמונאט או פציעה

Weight(g)	33-47	25-31	25-28	21-23	8-10	4-6	0-2	Treatment
Ethylene evolution ($\mu\text{L/L}$) at specified time (h)								
528	0.59	0.71	0.19	0.16	0.13	-	0.28	Control-1
569	1.46	1.68	0.45	0.25	0.36	0.43	0.56	Control-2
581	1.30	1.54	0.41	0.27	0.36	0.45	0.57	Wound -1
587	1.49	1.63	0.45	0.31	0.42	0.47	0.64	Wound -2
538	1.64	1.90	0.42	0.28	0.31	0.42	0.62	Sys-1
491	0.99	1.13	0.40	0.24	0.27	0.35	0.50	Sys-2
524	0.91	0.97	0.39	0.27	0.31	0.46	0.51	MJ-1
516	1.09	1.37	0.32	0.26	0.21	0.35	0.48	MJ -2

1. השפעות פנוטיפיות שונות של הטיפול בסיסטמין

בחירת השפעת סיסטמין על נשירת פרי מהאשכול: במהלך הניסויים עם עגבניות אשכול מטופלות בסיסטמין ו-MJ הוברר ש-MJ מגביר את הנשירה מהאשכול. עדות לכך ניתנת בטבלה 8 שבה ניתן לראות רמות גבוהות של נשירה לאחר הטיפול ב-MJ בהשוואה לביקורת ולסיסטמין. תופעה זו לא דווחה עד כה בספרות, והיא אומתה בניסויים נוספים שלא כללו סיסטמין (בנו-מועלם וליכטר, טרם פורסם).

טבלה 8: נשירה כתוצאה מטיפול בסיסטמין או מתיל ג'סמונאט שבועיים לאחר הטיפול

אחוז נשירה של פירות מהאשכול לאחר 14 יום ב-12 מ"צ		
Red	Red-Green	
47.9 ± 8.8	39.7 ± 7.3	Control
36.8 ± 2.45	49.9 ± 16.70	Sys
59.3 ± 15.3	68.8 ± 4.46	MJ

נזקים לטרי: במהלך הניסויים הובחנה השפעה שלילית של MJ שהתבטאה בהופעת כתמים כהים על קליפת הפרי. תופעה זו לא כומתה אך תועדה עבור הניסוי שנערך ב-8.5.02 (תמונה 1). ההתרשמות בניסוי זה הייתה שהתופעה בולטת יותר בפרי שטופל ב-MJ אך קיימת גם בביקורת ולא הייתה מובחנת בטיפול ב-MCP (ידווח בנפרד עבור תכנית 402-0296-01).

נזקים לעלי הגביע: בחלק מהניסויים, אשכולות שטופלו ב-MJ סבלו מנזקים לעלי הגביע שהתבטאו בקצוות יבשים של טרף עלי הגביע.

רקבובת: באחד הניסויים של הגמעת אשכולות, נבדק % הפירות הנגועים כשבוע לאחר טיפול של 3 ש'.

בביקורת היו 38% פירות נגועים לעומת 25% בטיפול MJ, 9% בטיפול בסיסטמין ו-46% בטיפול

הפציעה. כאשר משך הטיפול היה 24 ש' התוצאות היו: ביקורת-16%, MJ-7%, סיסטמין-11% ו-0%

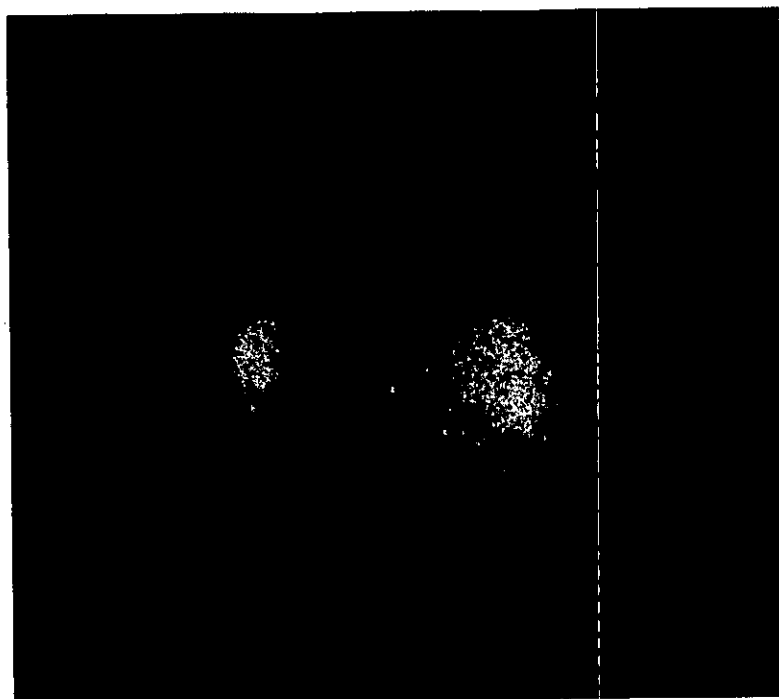
בטיפול הפציעה. המדגם הקטן, אינו מאפשר להסיק מסקנות מתוצאות אלו.

דיון ומסקנות

סיסטמין מופרש בתגובה לפציעה והוא מפעיל גנים המעורבים בהגנה על הצמח בפני חרקים ופתוגנים אחרים. מסלול הולכת האותות מתווך על ידי חומצה ג'סמונית שמפעילה מצדה תרכובות חמצן פעיל כסיגנל משני. מערכת הולכת האותות הזו תוארה בסולניים, ובמשפחות אחרות ידועים האפקטים הכלליים של חומצה ג'סמונית אך לא תוארה מערכת מקבילה לסיסטמין. בניסויים המתוארים במחקר הנוכחי נבדקה האפשרות שסיסטמין פועל על אשכולות עגבניות צ'רי כפי שהוא פועל על הצמח השלם. המטרה שהצבנו בפנינו הוגבלה לבדיקת השפעת סיסטמין על מערכות אנזימטיות ספציפיות דוגמת PG, PPO ו-PO ובאופן מצומצם על תגובת חרקים והשפעות פנוטיפיות כלליות על האשכול. למעשה לא הצלחנו להוכיח תגובה לסיסטמין באף אחת מהמערכות שנבדקו. יתירה מזו, הביקורות החיוביות לניסוי, פציעה ומתיל ג'סמונאט, לא השפיעו באופן הצפוי על המערכות שנבדקו. גם אם היו בחלק מהניסויים הבדלים בין הביקורת לטיפולים בזמנים השונים, לא תמיד הייתה ההשפעה בריון הצפוי ובד"כ לא ניתן היה לחזור על התוצאה בחזרות שונות של אותו ניסוי ובניסויי המשך. האפקט העקבי העיקרי היה נשירת פירות מאשכולות בעקבות הטיפול ב-MJ ולעיתים גם נזק לפרי או לעלי הגביע.

הסיבות לתוצאה זו יכולות להיות מגוונות. למשל שהפפטיד שסונתז עבורנו לא היה פעיל, או שלא הגיע לאתר הפעולה. אפשרויות אלו קיימות אך נשאלת השאלה מדוע לא היו אפקטים צפויים מהטיפולים בפציעה שנמצאת במעלה מערכת הולכת האותות לסיסטמין, או למתיל ג'סמונאט שנמצא במורד מסלול הולכת האותות. ניתן אולי לייחס את העדר התגובה לכשלים טכניים שונים אך אפשרות זו צומצמת על ידי מגוון השיטות שנבחנו. אפשרות נוספת היא שתגובת הסיסטמין מאפיינת קווים גנטיים ספציפיים של עגבנייה והיא לא באה לידי ביטוי מלא בזנים שונים, אך אין לסברה זו שום אינדיקציה בספרות. אפשר גם לייחס את כשלון הוכחת תפקיד הסיסטמין בכך שיש מערכת שונה המפעילה את תגובת הצמח באברים וגטטיביים לעומת אברים רפרודוקטיביים, דוגמת האשכול. יתכן שניתוק האשכול מהצמח השלם גרם בעצמו לריגוש יתר של מערכות ההגנה ועל רקע זה לא ניתן היה להבחין באפקטים של סיסטמין.

תהא התשובה לשאלות אלו אשר תהא, במידה וניתן להשליך מהשפעת MJ על ההשפעה של סיסטמין במערכת של אשכולות מנותקים, המסקנה היא שההשפעות של הטיפול בסיסטמין, עשויות להיות שליליות. העובדה ש-MJ גרם לנשירת פרי מהאשכול אפשרה לפתח מערכת מחקר מעניינת עבור תכנית 402-0296-01 שעוסקת בבעיות איכות של עגבניות אשכול והתוצאות ממחקר זה הן בעלות משמעות רבה. המסקנה המעשית מבחינת המחקר היישומי של סיסטמין היא שאין כעת טעם להמליץ על המשך בדיקת החומר בתכנית מחקר עצמאית. יחד עם זאת ניתן לשלב את הסיסטמין כטיפול נלווה לתכנית העוסקת באיכות עגבניות אשכול, תוך שימת לב לשאלות שהועלו בדיון.



תמונה 1: נזק לפירות עגבנייה בעקבות יישום סיסטמין.

סיכום עם שאלות מנחות

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכניות העבודה. א. השפעת הפפטיד סיסטמין על פעילות אנזימטית במערכת של אשכולות עגבניות צ'רי. ב. בחינת השפעות פנוטיפיות של הפפטיד סיסטמין על אשכולות של עגבניות צ'רי.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. א. השפעת סיסטמין על התפתחות לרוות של הליוטיס: לא הייתה הפחתה במשקל הלרוות. ב. השפעת סיסטמין על הפעילות האנזימטית של PG, PO, PPO בעלי הגביע: לא הייתה השפעה ג. השפעת סיסטמין על ייצור אתילן על ידי האשכולות: לא הייתה השפעה ד. השפעות פנוטיפיות של סיסטמין: לא הייתה השפעה ברורה אך נגרם נזק מיישום MJ 3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגביי יישום המחקר והמשכו.
א. אין עדות להשפעה של סיסטמין או MJ על פעילות אנזימטית בעלי גביע של אשכולות עגבניות צ'רי א. יש אינדיקציות להשפעות שליליות של MJ על הפרי והאשכול. ב. אין תוצאות שמאפשרות להמליץ על המשך המחקר.
4. הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); א. האם הסיסטמין שברשותנו היה פעיל. ב. המחקר על השפעות אפשריות של סיסטמין ימשיך במסגרת תכנית 402-0296-03
5. האם הוחל בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט: פרסומים- כמקובל בביליוגרפיה, א. לא

- Bergey, D. R., Orozco-Cardenas, M., de Moura, D. S., Ryan, C. A., 1999. A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1756-60.
- Buta, J. G., Moline, E. H., 1998. Methyl Jasmonate extends shelf life and reduces microbial contamination of fresh -cut celery and peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1253-1256.
- Chao, W. S., Gu, Y. Q., Pautot, V., Bray, E. A., Walling, L. L., 1999. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiol* 120, 979-92.
- Cohen, Y., Gisi, U., Niderman, T., 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83, 1054-1062.
- Constabel, C. P., Bergey, D. R., Ryan, C. A., 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxydase via the octadecanoid defense signalling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 407-411.
- Droby, S., Porat, R., Cohen, L., Weiss, B., Shapiro, B., Philosoph-Hadas, S., Meir, S., 1999. Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124, 184-188.
- Li, J., Zingen-Sell, I., Buchenauer, H., 1996. *J. Plant Dis. Protect.* 103, 288.
- Meir, S., Droby, S., Davidson, H., Alsevia, S., Cohen, L., Horev, B., Philosoph-Hadas, S., 1998. Suppression of Botrytis rot in cut rose flowers by postharvest application of methyl jasmonate. *Postharvest Biol. Technol.* 13, 235-243.
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Eliahou, C., Fuchs, Y., 1996. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Can. J. Bot.* 74, 870-874.
- Orozco-Cardenas, M., Narvaez-Vasquez, J., Ryan, C., 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13, 179-91.
- Orozco-Cardenas, M., Ryan, C. A., 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6553-7.
- Ryan, C. A., 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* 1477, 112-21.
- Schaller, A., 1998. Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* 40, 763-769.
- Schaller, A., Ryan, C. A., 1995. Systemin-a polypeptide defense signal in plants. *BioAssays* 18, 27-33.
- Stennis, M. J., Chandra, S., Ryan, C. A., Low, P. S., 1998. Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant Physiol* 117, 1031-6.