

## פיתוח ידע לזיהוי מזרז של קווי רימון עדיפים לגידול בתנאי הערבה

ד"ר חמוטל בורוכוב, סילבי יודנשטיין, יערה דנינו, אמנון גרינברג – מו"פ ערבה דרומית  
ד"ר דורון הולנד, זוהר בן-שמחון, עירית בר-יעקב - מטעים, מרכז מחקר נווה יער, מנהל  
המחקר החקלאי

### תקציר:

הביקוש לפרי הרימון (*Punica granatum L.*) גדל מאוד בשנים האחרונות בעקבות הדיווחים המדעיים המצביעים על ערכם התזונתי והבריאותי הגבוה של הפרי ומוצריו. תנאי האקלים, הקרקע והמים בערבה הדרומית מתאימים לגידול רימונים. בזכות תנאי האקלים הנוחים בערבה הדרומית ניתן לקבל פרי איכותי גם בחודשים בהם השווקים חסרים רימונים טריים ואיכותיים (פברואר-יולי). האפשרות לקבל פרי בחודשים אלה מקנה יתרון מובהק לגידול רימונים בערבה. עצמת הצבע האדום החיצוני והפנימי בפירות המתפתחים בערבה הדרומית בסוף האביב ובקיץ נמוכה כתוצאה מפחיתה בהצטברות האנטוציאנינים בתנאי האקלים המקומיים. מטרת המחקר המוצע היא לזהות סמנים מולקולריים שיאפשרו ייעול וזירוז תהליך הטיפול של פנוטיפים בעלי רמת צבע נאותה גם בחודשים מאי-יולי. להשגתה, מתמקד המחקר בזיהוי וכימות של המרכיבים המולקולריים, המבניים והרגולטוריים, הקשורים ישירות להתפתחות הצבע בקליפת פרי הרימון ובארילים, ובבחינת רגישותם לתנאי האקלים. בשנת המחקר 2010 נבדקו דגימות קליפה מפירות משלבי התפתחות והבשלה שונים בשלושה זנים הנבדלים מאוד בתכונות הצבע הפנימי והחיצוני שלהם: P.G. 100-1 (וונדרפול), P.G. 135-36 ו-C 13. בדגימות התבצעה אנליזה של אנטוציאנינים (במו"פ ערבה דרומית) וסמנים מולקולריים (במרכז מחקר נווה יער). התוצאות סוכמו ע"י זוהר בן-שמחון במאמר שנשלח לפרסום בעיתון המדעי *Planta*.

### רקע ותיאור הבעיה:

הביקוש לפרי הרימון (*Punica granatum L.*) גדל מאוד בשנים האחרונות בעקבות הדיווחים המדעיים המצביעים על ערכם התזונתי והבריאותי הגבוה של הפרי ומוצריו. תנאי האקלים, הקרקע והמים בערבה הדרומית מתאימים לגידול רימונים. במחקרים קודמים התקבל שבזכות תנאי האקלים הנוחים בערבה הדרומית ניתן לקבל פרי איכותי גם בחודשים בהם השווקים חסרים רימונים טריים ואיכותיים (פברואר-יולי) מזני רימון ירוקי-עד (הררי וחוב', Borochoy-Neori *et al.*, 2007-9, 2011) ונשירים (טריפלר וחוב' 2005-7; Borochoy-Neori *et al.*, 2009). האפשרות לקבל פרי בחודשים אלה מקנה יתרון מובהק לגידול רימונים בערבה. הדרישה ביעדי השיווק של הרימון היא לפרי איכותי בעל צבע אדום עז (פנימי וחיצוני). מקור הצבע האדום הוא באנטוציאנינים המצטברים בארילים ובקליפה. הפירות המתפתחים בערבה הדרומית בסוף האביב ובקיץ מתאפיינים בעצמת צבע אדום חיצוני ופנימי פחותה מזו המתקבלת באזורים אחרים בארץ. חולשת הצבע נובעת מפחיתה בהצטברות האנטוציאנינים בתנאי האקלים המקומיים (הררי וחוב', 2007-9, הולנד וחוב', 2010; Schwartz *et al.*, 2009).

כלכליות גידול הרימונים בערבה מותנית בזמינות קווים מתאימים לגידול מסחרי המבשילים מוקדם (אמצע החורף עד ראשית הקיץ) ומכילים רמות גבוהות של אנטוציאנינים גם בחודשים החמים יותר (מאי-יולי). מטרת המחקר המוצע היא לזהות סמנים מולקולריים ליישום במבחני סריקה שיאפשרו ייעול וזירוז תהליך הטיפוח של פנוטיפים העונים על צרכים אלה (Bar-Ya'akov *et al.*, 2009). המחקר מתמקד בזיהוי וכימות של המרכיבים המולקולריים, המבניים והרגולטוריים הקשורים ישירות להתפתחות הצבע בקליפת פרי הרימון ובארילים, ובבחינת רגישותם לתנאי האקלים. בשנת המחקר 2010 נבדקו דגימות קליפה מפירות משלבי התפתחות והבשלה שונים בשלושה זנים הנבדלים מאוד בתכונות הצבע הפנימי והחיצוני שלהם: P.G. 100-1 (וונדרפול), P.G. 135-36 ו-C 13. בדגימות התבצעה במקביל אנליזה של אנטוציאנינים (במו"פ ערבה דרומית) וסמנים מולקולריים (במרכז מחקר נווה יער).

#### **מטרת המחקר:**

פיתוח ידע לזיהוי מזורז באמצעות סמנים מולקולריים של קווי רימון בעלי יתרון לגידול בתנאי הערבה.

#### **מהלך המחקר, שיטות וחומרים:**

המחקר מתמקד בקווי רימון הנבדלים בקצב התפתחות הצבע ועוצמתו בקליפה ובגרורים. השפעת הגורמים האקלימיים נבחנת על ידי דיגום פירות מגלי פריחה שונים. פרחים ופירות מכל זן ומועד פריחה נאספים במספר שלבים מוגדרים במהלך ההתפתחות מחנטה עד הבשלה. דגימות מרקמת הקליפה ומן הארילים משמשות במקביל לאנליזה איכותית וכמותית של אנטוציאנינים (במו"פ ערבה דרומית) ולבדיקות של גנים מבניים, תוצרים של פקטורי שיעתוק (transcription) וחלבונים רגולטוריים הקשורים במסלול הביוסניטטי של האנטוציאנינים (במרכז מחקר נווה יער).

**אנליזת אנטוציאנינים- הכנה והרצת דגימות ב-HPLC** – דגימות משלוש חזרות של עלי הגביע של פרחים וקליפות נכתשו וטולטלו בקור בתמיסת 80% מתנול במים המכילה 2 mmol/L של NaF, ביחס של 1:3 (w/v) לפרחים ו-1:3.5 (w/v) לקליפות. תערובת המיזוי סורכזה והנוזל העליון נאסף. לפני ההרצה ב-HPLC סוננו הדוגמאות דרך פילטר 0.45 μm PTFE. התבצעה במערכת LaChrom Merck Hitachi HPLC, הכוללת משאבה מדגם L7100, תנור קולונה מדגם L7350 Mixer-degasser מדגם L7614 ומכשיר הזרקה ידני מתוצרת Rheodyne, ומצוידת בגלאי מערך דיודות, עם יכולת 3D (Multiwavelength Detector, Jasco MD-2010 Plus), מנשק (Jasco LC-Net II / ADC) ותוכנה מדעית (EZChrom Elite™ Client/Server version) (3.1.6 build 3.1.6.2433) לאיסוף ועיבוד נתונים והכנת דו"חות. 20 μl מיזוי הוטענו על קולונה Lichrospher®100 RP-18 עם המאפיינים הבאים: 5 μm particle size, 250x4 mm, LichroCART® cartridge, מצוידת בקולונת הגנה של 4x4 mm באותו הרכב. ההפרדה נעשתה ב-40°C בפאזה נעה המורכבת משתי תערובות ממסים, חומצה זרחתית (0.1%, pH=2.4) (תמיסה A) ואצטוניטריל (תמיסה B) ביחסים וקצבים כמפורט: 10% תמיסה B, 1 ml/min,

0-10 דקות ; 10-20% תמיסה B, 1 ml/min, 10-15 דקות ; 20% תמיסה B, 0.6 ml/min, 1-0.6 ml/min, 15-16 דקות ; 20% תמיסה B, 0.6 ml/min, 16-26 דקות. לאחר ההפרדה נשטפה הקולונה ב- 80% תמיסה B למשך 10 ד' ועברה אקויליברציה ב- 10% תמיסה B למשך 10 ד' נוספות בקצב של 1 ml/min.

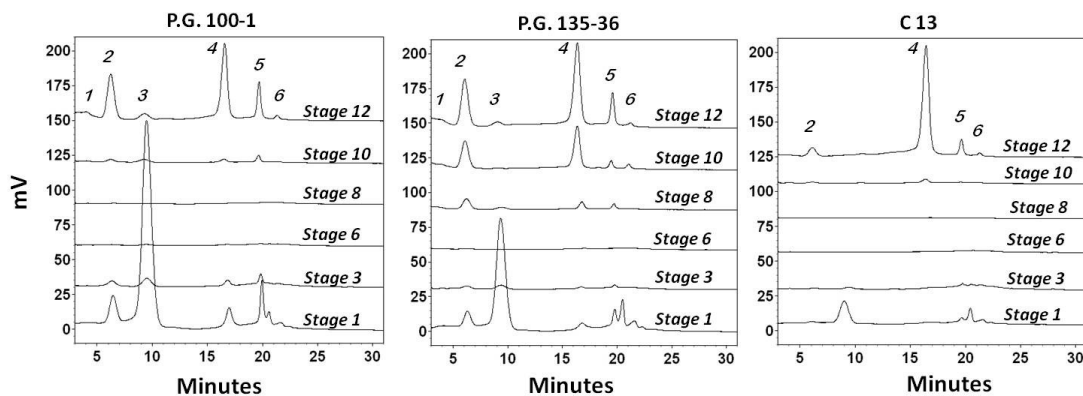
אצטוניטריל היה באיכות HPLC (LiChrosolv Merck); מים מזוקקים פעמיים (קולונה ו- Corning Megapure System- MP-6A) סוננו דרך ממברנת Nylon, 0.20µm. חומצה זרחתית ו-NaF היו באיכות אנליטית.

ספריית סטנדרטים של אנטוציאנינים נבנתה מהחומרים הבאים : דלפינידין 3,5-דיגלוקוזיד, ציאנידין 3,5-דיגלוקוזיד, פלרגונידין 3,5-דיגלוקוזיד, מאלוידין 3-גלוקוזיד כלוריד, מאלוידין כלוריד (Apin Chemicals), דלפינידין 3-גלוקוזיד, ציאנידין 3-גלוקוזיד, פלרגונידין 3-גלוקוזיד (Polyphenols Laboratories AS), פלרגונידין כלוריד (Sigma), דלפינידין כלוריד וציאנידין כלוריד (Fluka).

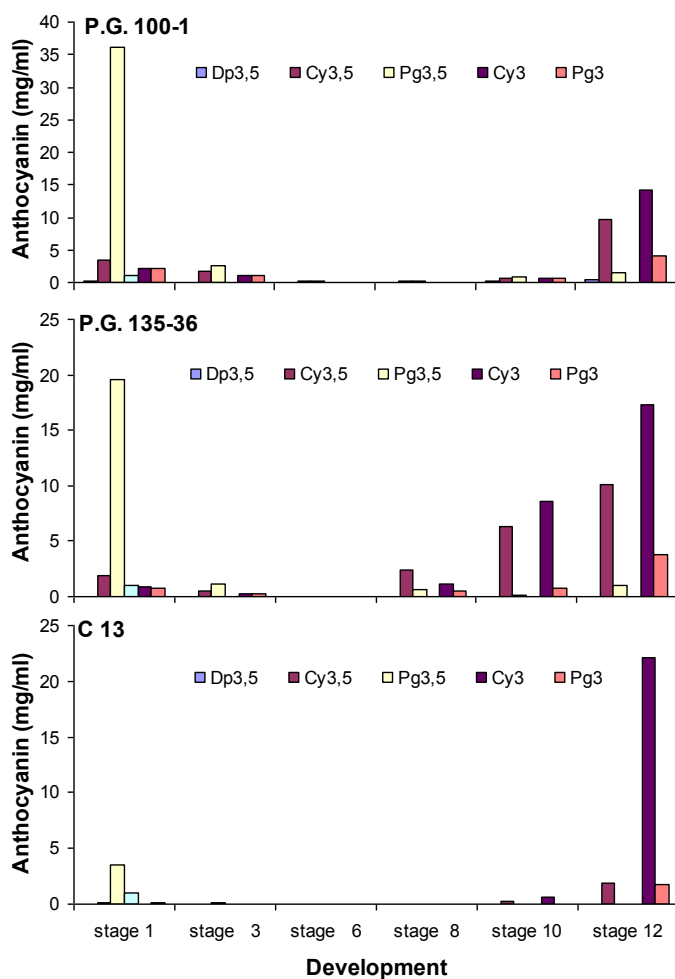
זיהוי האנטוציאנינים נעשה ע"י התוכנה, על בסיס ספקטרום הבליעה וזמן השהיה. השטח מתחת לשיא חושב גם הוא ע"י התוכנה. גבול רגישות המדידה (שטח מינימאלי) נקבע ל- 15,000. בתנאי הניסוי התקיימה קורלציה ליניארית בין השטחים מתחת לשיאים בכרומוטוגרמה לבין ריכוזי האנטוציאנינים התואמים.

#### תוצאות:

פרופיל וריכוזי האנטוציאנינים בדגימות השונות מהזנים P.G. 100-1 (וונדרפול), P.G. 135-36 ו-C 13 מוצגים באיורים מס. 1 (פרופיל) ו-2 (ריכוז). זוהו חמישה אנטוציאנינים האופייניים לרימון: דלפינידין 3,5-דיגלוקוזיד (1; Dp3,5), ציאנידין 3,5-דיגלוקוזיד (2; Cy3,5), פלרגונידין 3,5-דיגלוקוזיד (3; Pg3,5), ציאנידין 3-גלוקוזיד (4; Cy3) ופלרגונידין 3-גלוקוזיד (5; Pg3). פלרגונידינים הם האנטוציאנינים הנפוצים בפרח (Stage 1) כש-Pg3,5 הוא הדומיננטי. בזנים P.G. 100-1 ו-P.G. 135-36 זוהו גם ציאנידינים. בולט ההבדל ברמת האנטוציאנינים בפרח בין הזנים, P.G. 135-36 > P.G. 100-1. בשלבים מוקדמים בהתפתחות הפרי נעלמים האנטוציאנינים שאפיינו את הפרח ואין הצטברות של אנטוציאנינים אחרים. בשלבים מתקדמים יותר מופיעים בקליפה ציאנידינים ופלרגונידינים; הצטברותם בזן P.G. 135-36 מתחילה בשלב מוקדם יותר מאשר בזנים האחרים.



**איור מס. 1:** כרומטוגרמות HPLC ב- 520 נ"מ של אנטוציאנינים בפרח ובקליפות במהלך התפתחות הפרי בשלושה זני רימון. שלבים 1-12 הם שלבי ההתפתחות מפרח ועד פרי בשל. המספרים מתייחסים לדלפינידין 3,5-דיגלוקוזיד (1; Dp3,5), ציאנידין 3,5-דיגלוקוזיד (2; Cy3,5), פלרגונידין 3,5-דיגלוקוזיד (3; Pg3,5), ציאנידין 3-גלוקוזיד (4; Cy3), פלרגונידין 3-גלוקוזיד (5; Pg3) ואנטציאנין לא מזוהה (6).



**איור מס. 2:** הרכב האנטוציאנינים בפרח ובקליפות במהלך התפתחות הפרי בשלושה זני רימון. שלבי ההתפתחות והסימולים לאנטוציאנינים השונים כמפורט במקרא לאיור מס. 1.

## מסקנות והמלצות להמשך המחקר:

השיטות שפתחנו נמצאו יעילות בזיהוי וכימות האנטוציאנינים בפרחים, בקליפה ובגרעיני רימון בשלבי ההתפתחות השונים של הפרי. התוצאות שהושגו במרכז מחקר נווה יער ובמו"פ ערבה דרומית סוכמו במאמר שנשלח לעיתון המדעי *Planta* (Zohar Ben Simhon *et al.*, 2011). יש להרחיב את הלימוד הן ברמת האנטוציאנינים והן ברמת הסמנים המולקולריים לזנים נוספים ולתנאי טמפרטורה שונים במהלך ההתפתחות הפרי. מבחן סטטיסטי של הקשר בין הרכב האנטוציאנינים וביטוי של המרקרים המולקולריים יאפשר זיהוי סמנים רלוונטיים לעצמה ועמידות הצבע לחום.

## ספרות:

- הולנד, ד. וחובי, (2010) "מחקר ופיתוח של תעשית רימונים בנגב ובגליל" דו"ח מסכם לתכנית מחקר 203-0723-09 במימון יק"א.
- הררי, מ. (2007-2009) "ממשק גידול רימון ירוק עד בערבה", דו"חות שנתיים למו"פ ערבה דרומית.
- טריפלר א. וחובי, (2005-7), "רימון, גידול מטע חדש בערבה לשיווק טרי וליצור מוצרי בריאות" דו"חות לקרון המדען הראשי של משרד החקלאות לתכנית מחקר 650-0275-05.
- Bar-Ya'akov I., Hatib K., Nadler-Hasar T., Ben-Simhon Z., Trainin T., Borochov-Neori H. and Holland D. (2009). Breeding for improved cultivars using molecular knowledge on diversity in pomegranate. In: A.N Mokashi, D.P. Biradar, A.K. Rokhade, M.K. Sheikh, S. Lingaraju, R.A. Balikal, R.V. Hegde, C.K. Venugopal (eds.) Souvenir & Abstracts, 2nd International Symposium on Pomegranate and Minor including Mediterranean Fruits, ISHS, University of Agricultural Sciences, Dharwad, Karnataka, India, June 23-27:70.
- Ben-Simhon, Z., Judeinstein, S., Nadler-Hasar, T., Trainin, T., Bar-Yaa'Kov, I., Borochov-Neori, H., Holland, D. (2011). A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40- repeat gene is a functional homologue of Arabidopsis TTG1 and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development. Submitted to *Planta*.
- Borochov-Neori, H., Judeinstein, S., Tripler, E., Harari, M., Greenberg, A., Shomer, I and Holland, D. (2009) Seasonal and cultivar variations in antioxidant content and sensory quality traits of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *J. Food Comp. Anal.* 22: 189-195.
- Borochov-Neori, H., Judeinstein, S., Harari, M., Bar-Ya'akov, I., Patil, B., Lurie, S. and Holland, D. (2011) Climate effects on anthocyanin accumulation and composition in the pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit arils. *J. Agric. Food Chem.* Accepted.
- Schwartz E., Zulker, R., Glazer, I., Bar-Ya'akov, I., Wiesman, Z., Tripler, E., Bar-Ilan, I., Fromm, H., Borochov-Neori, H., Holland, D., Amir, R. (2009) Environmental conditions affect the color, taste and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions fruits. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9197-9209.