

**אופטימיזציה של גידול רוזמרין (*Rosmarinus officinalis* L.)
להפקת נוגדי חמצון**

עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה

ע"ש רוברט ה. סמית'

האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר

"מוסמך למדעי החקלאות"

על-ידי

דרור קלדס

דצמבר 2009

רחובות

יד טבת תש"ע

העבודה נעשתה בהדרכתם של :

ד"ר נתיב דודאי ממרכז המחקר נוה יער, מינהל המחקר החקלאי –מרכז וולקני,
ופרופ' יהושע סרנגה מהמכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה
ע"ש ר. ה. סמית, האוניברסיטה העברית בירושלים.

- הבעת תודה -

תודות לאלו שסייעו וליוו אותי במהלך העבודה הזאת :

לדרי נתיב דודאי- על שקיבל אותי בברכה, תמך ברגעים הקשים, הנחה אותי בעבודה מעניינת, מאתגרת ועל הידע הרחב והעצות המועילות.

לפרופי שוקי סרנגה- על שתמך והנחה בסבלנות רבה וחוכמה גדולה, על התמיכה ללא היסוס ושיתוף הנסיון.

לדויד חיימוביץ- על העזרה והתמיכה שתמיד היתה מלווה בחיוך רחב ושיתוף הרעיונות.

לפרופי אלי פוטיבסקי- על העזרה והנכונות.

לדרי אפרים לוינסון- על החברות, תשומת הלב, האוזן הקשבת ברגעים הקשים ועל כך ששיתף אותי בידע ובעצות המועילות.

לפרופי עוזי רביד- על העזרה והייעוץ.

לדויד סעדי- על הכוח והרצון לעזור בכל רגע ומקום, על החברה הנעימה והאופטימיות.

לאיתי רבינוביץ – על החברות, הצחוקים, השיתוף, הטירוף, התמיכה והעצות.

ליעריט צברי- על הרעות, העזרה הרבה לאורך כל הדרך והקפה והלחוח הטעימים.

להילה טמיר- על העזרה הרבה בקצירים ובפיטורון, הצחוקים והתמיכה.

לרווית פישר – על העזרה והתמיכה לאורך הדרך.

לרועי חגי – על העזרה והייעוץ בדרך.

לדויד בחשיאן – על העזרה המקצועית והתכליתית.

לכל המסטרנטים בנווה יער- שרי לב, אלון זקס, אילן בוטניק, רז קריזבסקי ואיתי מוזונגו שעזרו לי ברגעים הקשים, על השיחות הפוריות והרעיונות שעלו בדרך, היה לי הכבוד להכיר אתכם.

לעובדי חברת פרוטליקס- על התמיכה וההבנה לאורך הדרך.

תודה להורי – יוסי ומרים, שחזקו אותי בדרכים רבות עם עקרונות וערכים אמיתיים, ושנתנו בביטחון ובאמון את כל מה שיכלו ומעבר בתקופה הזו ובכלל.

לאחיותי- ורד ודנה, על ההבנה והמסירות לאין שיעור.

תקציר

צמח הרוזמרין משמש כיום בעיקר למטרת צריכה כתבלין- טרי או מיובש, וכן להפקת שמן אתרי שהוא בעל חשיבות כלכלית רבה בתעשיית המזון, הקוסמטיקה והרפואה האלטרנטיבית. לאור הנטייה הגוברת לצריכת מזון בריא וטבעי יותר, גוברת ההתעניינות, מצד תעשיות המזון והקוסמטיקה למצוא תחליפים טבעיים למשמרים סינתטיים אשר המידע הקיים מצביע על כך שהם מתפרקים עם הזמן לתרכובות רעילות. נוגדי חמצון ממקורות טבעיים עשויים להיות תחליף בריא ויעיל לחומרים הסינתטיים. מבין צמחי מאכל פוטנציאליים שנבחנו הרוזמרין נמצא כצמח מתאים להפקת מטבוליטים משניים, כגון Carnosic acid (CA), Carnosol (CAR) שהן abitanes diterpenes ו-Rosmarinic acid (RA) שהיא Hydroxycinnamic acid ester – פנולים אשר להם פעילות נוגדת חימצון גבוהה. לפיכך יש כיום ייצור נרחב בעולם של מוצרים על בסיס מיצוי רוזמרין המשווקים כתחליף לחומרים משמרים סינתטיים. עם זאת, המידע על הגידול החקלאי ופיתוח הזנים למטרה זו הוא דל ולכן קיים צורך בפיתוח זני עלית של רוזמרין עתירי CA ו-RA- המהווים את התרכובות העיקריות והאחריות לפעילות נוגדת החמצון הגבוהה, ובהם מעוניינת תעשיית המזון והקוסמטיקה.

המטרה העיקרית של עבודה זו היתה לבחון את התאמת צמח הרוזמרין לייצור והפקת מיצוי נוגדי חמצון, ואת פוטנציאל שילובו כגידול חקלאי מסחרי למטרה זו. לצורך בחינת שאלה מהותית זו מטרת עבודתי היו: לבחון כיצד משתנים רכיבי היבול ותכולת נוגדי החמצון בארבעה זני רוזמרין ("אורנית", "ישראל", "סטאר" ו-"זקוף") לאורך עונות השנה, לבחון את השפעת מועדי הקציר על ההתחדשות, וכן לבדוק את השפעת גורמי הסביבה (טמפרטורה ואורך יום) על תכולת נוגדי החמצון בצמח הרוזמרין.

בעבודה זו נמצאה השפעה משמעותית של הגורם הגנטי שהתבטאה בהבדלים בין הזנים ברכיבי היבול ובתכולת נוגדי החמצון לאורך עונת השנה. הזן אורנית היה בעל רכיבי יבול (יבול טרי, יבש ויבול עלים יבשים) הגדולים ביותר, בצורה מובהקת, משאר הזנים הנבחנים. בנוסף נמצא שהזן אורנית היה בעל תכולה ויבול CA, CAR ו-RA הגבוהה בצורה מובהקת משאר הזנים. נמצא מתאם חיובי מובהק בין הפעילות האנטיאוקסידנטית של המיצוי לתכולת הפנולים CA, CAR ו-RA. בבדיקה של השפעת גורמי הסביבה על תכולת נוגדי החמצון נמצא כי תכולת CA בזן אורנית הושפעה בצורה מובהקת מהטמפרטורה כך שבטמפרטורות נמוכות היתה תכולה גבוהה של CA מאשר בטמפרטורות הגבוהות, ללא תלות באורך היום. המצביע על זן אשר יכול לספק תוצרת איכותית לאורך זמן למפעלים אשר עוסקים במיצוי החומרים הפעילים. כיום כבר נשתלו כמה שדות מסחריים חדשים של הזן אורנית למטרת ייצור עלים יבשים למיצוי החומרים הפעילים במפעלים מתאימים בחו"ל. מחקרים נוספים כמו עבודה זו יסייעו לשיפור איכות התוצרת החקלאית של רוזמרין ע"י יצירת תוכניות גידול מיטביות לקבלת יבול גבוה ואיכותי יותר למטרת מיצוי הרוזמרין להפקת אנטיאוקסידנטים.

תוכן עניינים

<u>7</u>	<u>מבוא</u>	<u>1</u>
7	רוזמרין- היסטוריה ואתנובוטניקה	1.1
8	הרכיבים הפעילים	1.2
9	נוגדי חמצון	1.3
9	פנולים	1.4
10	דיטרפנים ברוזמרין ותפקידם	1.5
12	חומצה רוזמרינית	1.6
13	גורמים המשפיעים על תכולת נוגדי חמצון ברוזמרין	1.7
<u>16</u>	<u>חומרים ושיטות</u>	<u>2</u>
16	חומר צמחי:	2.1
16	הכנת המיצוי הצמחי לכל הבדיקות:	2.2
16	אנליזה של RA-ו CAR ,CA ב-HPLC	2.3
17	מדידת פעילות נוגדת חמצון	2.4
18	תכולת פנולים (TOTAL PHENOLS)	2.5
19	בחינת גידול רוזמרין בשדה, אורים 2006-7	2.6
19	בחינת השפעת הטמפרטורה ואורך היום בתנאים מבוקרים, רחובות 2006	2.7
20	סטטיסטיקה	2.8
<u>21</u>	<u>תוצאות</u>	<u>3</u>
21	בחינת גידול זני רוזמרין בשדה הפתוח, אורים 2006-07	3.1
21	צבירת היבול הצמחי במהלך השנה	3.1.1
23	השפעת מועד הקציר על פעילות נוגדי החמצון ותכולת הפנולים בזני הרוזמרין	3.1.2
24	השפעת מועד הקציר על תכולת RA-ו CAR ,CA	3.1.3
26	השפעת מועד הקציר על יבול נוגדי החמצון בזני הרוזמרין	3.1.4
27	התחדשות הרוזמרין לאחר הקציר	3.1.5
29	קציר שני של החלקות לאחר התחדשות	3.2
30	יבול טרי של הזנים בקציר המסכם.	3.2.1
30	פעילות נוגדי החמצון ותכולת הפנולים בזני הרוזמרין בקציר המסכם	3.2.2
32	תכולת RA-ו CAR ,CA בקציר המסכם	3.2.3
35	בחינת השפעת טמפרטורה ואורך יום בתנאים מבוקרים, רחובות 2007	3.3
35	השפעת הטמפרטורה ואורך היום על פעילות נוגדת חמצון ותכולת כלל הפנולים	3.3.1
37	השפעת הטמפרטורה ואורך היום על תכולת RA-ו CAR ,CA	3.3.2
39	השפעת טמפרטורה ואורך יום על התארכות הענף הראשי בזני רוזמרין	3.3.3
41	השפעת טמפרטורה ואורך יום על תוספת הפרקים בענף הראשי של זני רוזמרין	3.3.4
<u>42</u>	<u>דיון ומסקנות</u>	<u>4</u>
42	שינויים בתכולת נוגדי החימצון במהלך השנה בשדה הפתוח	4.1
44	השפעת מועד הקציר על קצב ההתחדשות והיבול השנתי	4.2
44	מתאם בין המדדים השונים	4.3
45	השפעת הטמפרטורה ואורך היום	4.4
<u>46</u>	<u>סיכום</u>	<u>5</u>
<u>47</u>	<u>ביבליוגרפיה</u>	<u>6</u>
<u>53</u>	<u>נספח 1: השפעת הטמפרטורה וזמן הכנת מיצוי מעלי רוזמרין על תכולת נוגדי החמצון במיצוי</u>	

CA- Carnosic acid

CAR- Carnosol

RA- Rosmarinic acid

ER- Endoplasmic reticulum

DPPH- 2, 2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl

DW- Dry weight

FW- Fresh weight

RPM- Rounds per minutes

HPLC- High pressure liquid chromatography

1.1 רוזמרין- היסטוריה ואתנובוטניקה

רוזמרין רפואי (*Rosmarinus officinalis* L.) הינו שיח רב-שנתי, ירוק-עד ממשפחת השפתניים (Labiata). הרוזמרין הוא שיח ארומטי הנפוץ באוכלוסיות בר בארצות אגן הים התיכון (Cuvelier et al., 1996). עלי הרוזמרין תמימים ודמויי סרגל, צידם התחתון לבן אפרפר, צידם העליון ירוק כהה. הגביע בעל 5 שיניים. הכותרת דו-שפתנית. השפה העליונה שסועה ל-2 אונות. השפה התחתונה שסועה ל-3 אונות, שהאמצעית בהן קעורה מהיתר. בפרח שני אבקנים. צבע הפרחים תכול. הפרי מורכב מ-4 פרודות חלקות בנות זרע אחד (טל, 1981). הרוזמרין פורח בין ינואר למאי, כאשר שיא פריחתו היא בימים האחרונים של מרץ עד לימים הראשונים של אפריל (תלוי בזן ובתנאי הסביבה). תזמון זה קשור כנראה לחרקים המאביקים ששיא פעילותם בתקופת האביב לפני שיא החום של הקיץ (Piacini and Franchi, 1984).

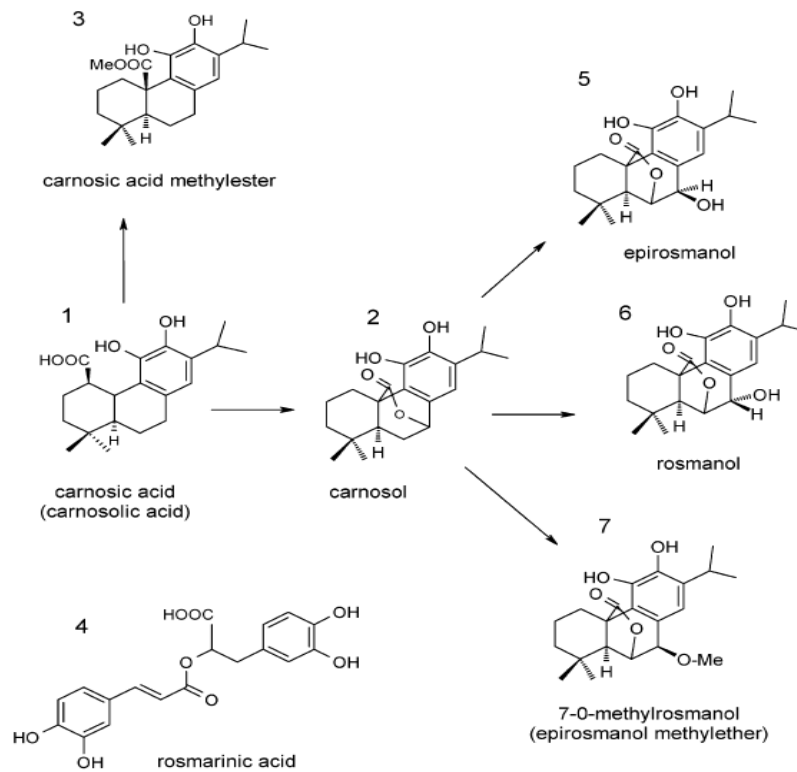
אגדה נוצרית מספרת שבעת בריחתה התרעננה מרים עם ישו והניחה את בגדיה על שיח רוזמרין ולאחר מכן פרחיו הלבנים הפכו לתכולים ומכאן שמו ורד (Rose) מרים (Mary). לרוזמרין חשיבות רבה בטכסים דתיים מאז ימי הרומאים והיוונים. ענפיו שימשו כסמל האהבה בחתונות וטכסי פולחן לאלת האהבה- אפרודיטה (ביוון) או ונוס (ברומא) (Heinrich et al., 2006). שמו של הרוזמרין נקשר גם בפולחני קבורה של המצרים הקדמונים. ברומא העתיקה, ענפי רוזמרין וזיתים נשרפו יחד עם שריפת הגופות. הרוזמרין שימש גם כקטורת לכן הציע Dioscorides, מרפא יווני בימי הקיסר Nero, את השם *libanotis coronaria* ('crown incense') (De Cleene and Lejeune, 2003).

הרוזמרין נמצא בשימוש נרחב ברפואה המסורתית, כחומר המועיל למערכת העיכול, מרענן, עוצר דימומים, מעודד הזעה ומקל במתן שתן (Chang et al., 1977; Aqel., 1991; Leung and Foster, 1996; Haloui et al., 2000). בנוסף, מיצוי שמנים אתריים ומרכיבים כימיים שבודדו מרוזמרין הצביעו עליו כבעל תפקיד אפשרי כחומר נוגד חמצון (Inatani et al., 1983; Houlihan et al., 1985; Aruoma et al., 1992, 1996; Haraguchi et al., 1995; Cuvelier et al., 1996; Paris et al., 1993), מסייע במניעת כיבי קיבה (Dias et al., 2000), מונע הופעת גידולים ממאירים (Offord et al., 1995) ובעל פעילות אנטי מיקרוביאלית (Takenaka., 1997).

נוגדי חמצון ממקורות טבעיים עשויים להיות תחליף בריא ויעיל לחומרים הסינתטיים כיום משתמשים בעיקר בנוגדי חמצון סינתטיים כגון butylated hydroxytoluene ו-propyl gallat שצריכתם באופן ממושך עלולה להיות מזיקה (Wellwood and Cole, 2004). לכן מושקעים מאמצים ומשאבים רבים בחיפוש, הפקה ופיתוח שימוש בחומרי טבע נוגדי חמצון מצמחים. חומרים אלו מוספים למזון, למוצרי קוסמטיקה ולמוצרים רפואיים בכמויות קטנות על-מנת למנוע חמצון שומנים והארכת חיי המדף של מוצרים עשירים בליפידים ללא חשש מרעילות בטווח הרחוק (Wellwood and Cole, 2004).

1.2 הרכיבים הפעילים

נוגדי חמצון המופקים מרוזמרין (*Rosmarinus officinalis* L.), נמצאים בשימוש נרחב בתהליכי עיבוד מזון. זהו אחד הצמחים הבודדים, שרכיביו משמשים כחומרים משמרים, תוספים תזונתיים וקוסמטיים במוצרים מסחריים באירופה וארצות הברית (Yanishlieva et al., 2006). פעילותו נוגדת החמצון של הרוזמרין מיוחסת לנוכחות תרכובות פנוליות. אלו משתייכות לשלוש קבוצות: פנולים דיטרפנים, הדומים במבנם לחומצה אביאטית (Abietic acid), פלבנואידים וחומצות פנוליות (Nakatani et al, 1984; Aruoma et al., 1992; Cuvelier et al., 1996; Bicchi et al., 2000). התרכובות נוגדות החמצון העיקריות ברוזמרין (איור 1) הן Carnosic acid (CA) ו-Carnosol (CAR) שהן abitanes diterpenes ו-Rosmarinic acid (RA) שהיא hydroxycinnamic acid ester (Wellwood and Cole, 2004; Penuelas and Munné-Bosch, 2005).



איור 1: מבנה כימי של (1) Carnosic acid (CA), (2) Carnosol (CAR) וניגזרותיו (3,5-7), ו- (4) Rosmarinic acid (RA) (Backleh et al., 2003).

1.3 נוגדי חמצון

חמצון הינו תהליך כימי במהלכו מועברים אלקטרונים ממולקולה מסוימת לחומר המחומצן. מולקולות נוגדות חמצון הינן תרכובות אשר מסוגלות לעכב או למנוע חמצון של מולקולות אחרות (Wellwood and Cole, 2004).

רוב הצמחים והיצורים החיים זקוקים לחמצן לתהליכי החיים, תהליכי חמצון אלו מייצרים צורות פעילות של חמצן (reactive oxygen species). מולקולות אלו המיוצרות בתאים כוללות: מי חמצן (hydrogen peroxide H_2O_2), הידרוקסיל רדיקל (OH^{\cdot}), סופראוקסיד רדיקל ($O_2^{\cdot-}$) וחמצן סינגלטי (1O_2). הידרוקסיל רדיקל וחמצן סינגלטי הינם רדיקלים מאד לא יציבים והמגיבים במהירות ובאופן לא ספציפי עם רוב המולקולות הנמצאות בתא, ועלולים לגרום לנזק חמצוני בתא (Elstner, 1991; Asada, 1999; Davies, 1995).

על-מנת להימנע מנזק חמצוני בתא, לצמחים ובע"ח ישנם מנגנונים מורכבים של נוגדי חמצון, כדוגמת מטבוליטים ואנזימים, הפועלים במקביל על מנת למנוע את הנזק החמצוני למרכיבים תאיים כמו חומצות גרעין (DNA), חלבונים וליפידים (Sies, 1997).

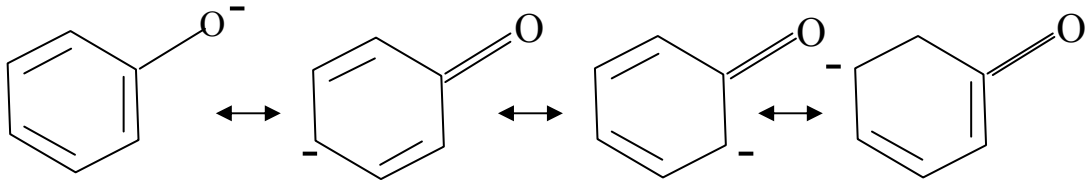
עקה חמצונית במערכת ביולוגית מתוארת כחוסר איזון בין הרדיקלים החופשיים לנוגדי חמצון ועלולה להיגרם ע"י יצירה מוגברת של הרדיקלים החופשיים ו/או ירידה בפעילות מערכת ההגנה נוגדת חמצון (Halliwell and Gutteridge, 1989; Fuchs et al., 1997). בתנאים מיטביים מערכת נוגדי החמצון מספקת הגנה הולמת כנגד הרדיקלים החופשיים, ע"י פעילות משותפת של נוגדי חמצון אנזימטיים ולא אנזימטיים (Halliwell and Gutteridge, 1989; Asada, 1999). בתאים צמחיים, הכלורופלסט הוא אחד האברונים התוך-תאיים המייצר רדיקלים חופשיים בכמויות נכבדות ובהעדר מערכות הגנה יכול להיגרם נזק למבנה התא ולתפקודו (Asada, 1999).

1.4 פנולים

הפנולים הינם מטבוליטים מישניים, הנוצרים במסלולי ביוסינתזה של פנטוז פוספט, חומצה שיקמית ופניל פרופנואידים בצמח (Randhir et al., 2004). חומרים אלו שייכים לאחת הקבוצות הנפוצות ביותר של פיטוכימיקלים והם בעלי חשיבות רבה לתהליכים פיזיולוגיים ומורפולוגיים המתרחשים בצמחים: לפנולים תפקיד חשוב בגדילה וגטטיבית ורפרודקטיבית של הצמח, מספקים הגנה כנגד פתוגנים והרביבורים (Bravo, 1998). בהגדרתו, פנול הוא כל חומר בעל קבוצה אחת או יותר של שייר הידרוקסיל, הקשור לטבעת ארומטית. פנולים בעלי שיירי הידרוקסיל רבים הקשורים לטבעת ארומטית, נקראים פוליפנולים (Rice-Evans et al., 1997). במפגש בין פנול ומולקולת חמצן פעיל, הפנול תורם אטום מימן לחמצן הפעיל ומייצב אותו, בעקבות שבירת הקשר בין החמצן למימן בפנול, מתקבל פנואוקסיד בעל מטען שלילי. מולקולת הפנואוקסיד אף היא ראדיקל חופשי, אך בעלת פעילות נמוכה יותר מהרדיקאל המקורי, בשל יכולתה לשנות את מיקום המטען השלילי בתוך הטבעת הארומטית. הודות לאפקט הרזוננס (איור 2), בטבעת הארומטית, משך שהות האלקטרון הבודד על החמצן קצרה יותר ועוצמת הנזק מופחתת, לכן מהווים הפנולים נוגדי חמצון יעילים.



התגובה: $\text{ROO}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}\cdot$: כדי שחומר AH יהיה נוגד חמצון חומר A צריך להיות יציב יותר מהרדיקאל ההתחלתי $\text{ROO}\cdot$,
יעיל (Waterman and Mole, 1994).



איור 2: אפקט הרזוננס בפנול (Waterman and Mole, 1994).

1.5 דיטרפנים ברזומרין ותפקידם

למולקולות דיטרפנים פעילות מגוונת בצמחים: הורמונים (גייברלינים), פיגמנטים פוטוסינתטיים (phytol) ותרכובות הנוצרות כתוצאה מפגיעה מכנית בצמח כדוגמת חומצה אביאטית (abietic acid) (Hanson., 1995; McGarvey and Croteau., 1995). פנולים מקבוצת abitanes diterpenes, הידועים גם כ- "phenolic diterpenes" זוהו, עד כה, ברזומרין בלבד, ובזנים בודדים של הסוג *Salvia*. בנוסף, דווח על הימצאות Carnosol ב- *Lepechinia hastate* (Dimayuga et al., 1991).

Carnosic acid (CA) הינו נוגד חמצון ליפופילי, המנטרל רדיקלים כדוגמת חמצן סינגלטי ($^1\text{O}_2$), הידרוקסיל רדיקל ($\text{HO}\cdot$) ו- lipid peroxy radicals ($\text{LOO}\cdot$), ובכך מונע חמצון שומנים ופגיעה בממברנות ביולוגיות (Aruoma et al., 1992; Haraguchi et al., 1995; Perez-Fons et al., 2006). מנגנון נטרול הרדיקלים של CA דומה לזה של נוגדי חמצון כדוגמת אלפא-טוקפרול וזאת בשל הימצאותן של שתי קבוצות O-phenolic hydroxyl על C_{11} ו- C_{12} של המולקולה (Richheimer et al., 1999).

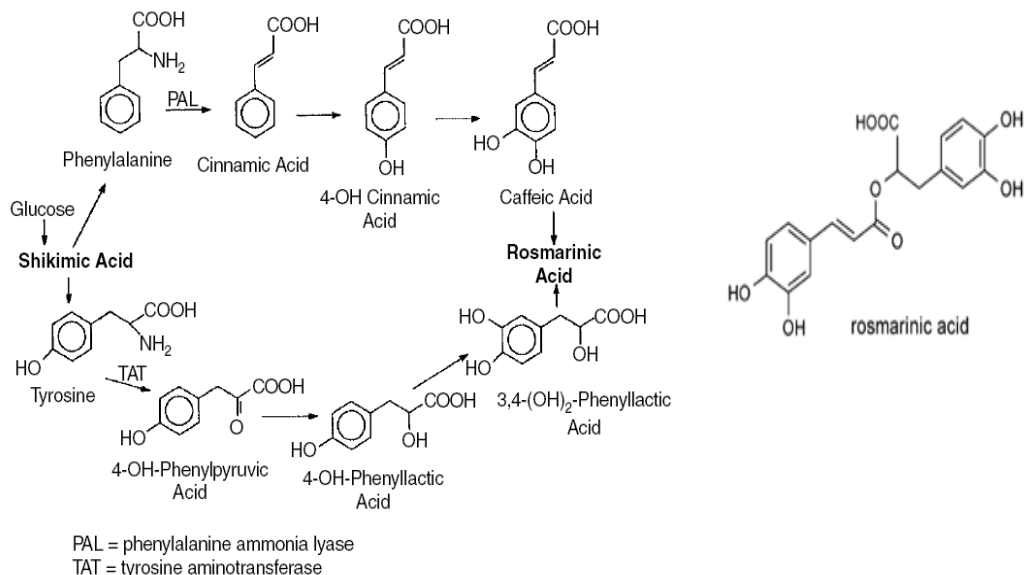
כאשר CA נמצא בסביבה רווית רדיקלים חופשיים חלה עליה ברמות של rasmanol, carnosol (בעלי פעילות נוגדת חמצון אף הם) ו-isorosmanol (Luis, 1991; Luis et al., 1994). עקה חמצונית המתרחשת בצמח כתוצאה מעקת מים או קרינת שמש חזקה, תגרום ליצירה מוגברת של דיטרפנים מחומצנים כתוצאה מהפעילות נוגדת חמצון של CA (Munne-Bosch et al., 1999; Munne-Bosch and Alegre, 2000).

מולקולות CA ו-isorosmanol יכולות לעבור O-methylation, ליצירת 12-O-methylcarnosic acid ו-11,12-di-O-methylisorosmanol, בהתאמה. התמרת שייר מתיל על קבוצת O-phenolic hydroxyl, מונעת את הפעילות נוגדת חמצון של המולקולה ומעלה את מסירותה בסביבה שומנית (Brieskorn and Domling, 1969).

הדיטרפנים מסונתזים בפלסטידות דרך מסלול ה- non-mevalonate isopentenyl diphosphate (McGarvey and Croteau, 1995). במסלול זה, pyruvate ו- glyceraldehyde 3-phosphate יוצרים isopentenyl diphosphate, וזה בתורו הופך ל- 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (Kleinig, 1989; Lichtenthaler, 1999). אנזימי פניל-טרנספראז שונים הופכים את geranylgeranyl pyrophosphate (C_{20}) ל- 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. זה האחרון עובר שינויים נוספים ליצירת copalyl pyrophosphate - ממנו נוצרים abitanes diterpenes copalyl pyrophosphate (McGarvey and Croteau, 1995). geranylgeranyl pyrophosphate ו- copalyl pyrophosphate נוצרים בפלסטידות, אך תיתכן אינטראקציה בין אברוני התא במהלך העברת מטבוליטים מהפלסטידות אל אתר הטרנספורמציה המשני, כגון ציטוכרום P450 אוקסיגנאז הקשור ל-ER. אינטראקציה כזו מתרחשת במהלך סינתזה של ההורמון הצמחי- גיברלין (McGarvey and Croteau, 1995). ואכן דווח ש-CA, CAR, Rosmanol ו-isorosmanol נמצאו רק בכלורופלסטים. לעומת זאת, נגזרות של CA ו-isorosmanol שעברו O-methylation, 12-O-methylcarnosic acid ו-11,12-di-O-methylisorosmanol בהתאמה, נמצאו בכלורופלסט, ב-ER, בגולגיי ובממברנות הפלסמה (Munne-Bosch and Alegre, 2001). האופי הליפופילי של CA, פעילותו כנוגד חמצון, ומיקומו בתא, מצביעים על תפקידו כמנטרל רדיקלים חופשיים, הנוצרים במהלך פעילות המערכת הפוטוסינתטית בכלורופלסט, בדומה לפעילותו של אלפא-טוקפרול (Fryer, 1992; Shintani and DellaPenna, 1998). דיטרפנים נמצאים בריכוזים גבוהים ברקמות הפוטוסינתטיות (עלים ועלי גביע), ובריכוזים נמוכים יותר, בזרעים ובעלי הכותרת. בנוסף, עלי הרוזמרין מכילים גם כמויות דומות של אלפא-טוקפרול (Munne-Bosch and Alegre, 2000). פעילותו של CA הינה משולבת (השפעה סינרגטית) עם פעילותו של אלפא-טוקפרול בכלורופלסט, ואינה מחליפה אותו. מספר חוקרים הציעו ש-CA פועל בסינרגיסטיות עם אלפא-טוקפרול ע"י חיזור של טוקפריל רדיקל לצורה הפעילה שלו אלפא-טוקפרול (Hopia et al., 1996). היווצרות של דיטרפנים שעברו O-methylation, כתוצאה מחמצון CA, יכולה להצביע על מנגנון הוצאת רדיקלים חופשיים מהכלורופלסט. הצטברות אותם דיטרפנים מחומצנים בממברנת הפלסמה, יכול להצביע על תפקיד נוסף להיותם נוגדי חמצון, יתכן שפעילותם דומה לזו של סטרולים (sterols). דיטרפנים שעברו O-methylation איבדו לפחות שייר הידרוקסיד אחד. הידרוקסיל זה יכול ליצור קשרי מימן עם הפוספוליפיד, והודות למימדיו הקטנים, ליצור קשרי ואן דר-ואלס ובכך לחזק ולייצב את השרשרת הליפידית (Havaux, 1998). השערה שקיבלה אישוש נוסף בעבודתה של Pérez-Fons וחבריה (2006) שהוכיחו כי דיטרפנים מחזקים ומייצבים ממברנות.

1.6 חומצה רוזמרנית

caffaic acid הינה (α -O-caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyl lactic acid) Rosmarinic acid (RA) ester ו-3,4-dihydroxyphenyllactic acid. המולקולה בודדה וזוהתה בשנת 1958 ע"י שני כימאים איטלקים, מכיוון שהם בודדו את המולקולה מרוזמרין הם קראו לה rosmarinic acid (Petersen and Simmonds, 2003). RA נפוצה בצמחים רבים כגון: *Artemisia capillaries*, *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, *Calendula officinalis* L. ובכמה משפחות צמחים נוספות (Gerhardt and Schroter, 1983). למולקולת RA שתי טבעות פנוליות, אשר להן שני שיירי הידרוקסיל במבנה *ortho*, דבר המאפשר למולקולה פעילות נוגדת חמצון. חומרי המוצא לביוסינתזה של RA הן חומצות האמינו פניל אלנין וטירוזין. מסלול הביוסינתזה (איור 3) ידוע והאנזימים המשתתפים בתהליך זהו ואופיינו (Shetty, 2001).



איור 3: ביוסינתזה של Rosmarinic acid מטירוזין ופניל אלנין (Shetty, 2001).

RA בעלת פעילויות ביולוגיות רבות בניהם: עצירת דימומים, פעילות אנטי דלקתית וויראלית, והגנה מפני מוטציות (Parnham and Kesselring, 1985). RA היא אחת מנוגדי חמצון הטבעיים היעילים ביותר בסביבה מימית, ואף הוכיחה יעילות גבוהה יותר בנטרול רדיקלים מאשר נוגדי חמצון סינטטיים וטבעיים כאחד. כתוצאה מכך ישנה התעניינות גדולה מאד במולקולה מכיוון תעשיות המזון כמשמר טבעי (Shetty, 2001).

1.7 גורמים המשפיעים על תכולת נוגדי חמצון ברוזמרין

שונות גנטית באוכלוסיה

Hidalgo וחבריו (1998) דיווחו שבאוכלוסיית רוזמרין, שגודלה בתנאי בעל, נמצאה שונות רבה (עד 50%) בין הפרטים. באוכלוסייה המכילה שניים-עשר פרטים, נמצאה שונות רבה בגודל וצורת הצמח והעלים, צבע העלים, וצבע הפרחים. עוד מצאו החוקרים, כי הפרטים נבדלו גם בתכולת CA בעלים, בטווח שבין 18-35 mg/g. לא נמצאה קורלציה בין מופע הצמח לבין תכולת CA, לכן הסיקו החוקרים, שהשונות בתכולת CA, ברובה, ממקור גנטי. קיימים גורמים נוספים המשפיעים על תכולת ה-CA, אלו יידונו בהמשך.

Yesil-Celiktas וחבריו (2007) הראו שונות גנטית וסביבתית בתכולת CA, CAR ו-RA בצמחי רוזמרין, שנדגמו באזורים שונים מבחינה גיאוגרפית ואקלימית בטורקיה. האזורים היו Canakkale (אקלים הקר ביותר), Izmir (אקלים בינוני) ו-Marsin (אקלים החם ביותר). ברוזמרין מאזור Marsin, נמדדו רמות נמוכות של RA, בעוד שברוזמרין מ-Izmir ו-Canakkale, נמדדה תכולה גבוהה יותר של RA. התכולה הגבוהה ביותר של CA, נמצאה ברוזמרין שנדגם מאזור - Marsin האזור החם ביותר. מאחר ומולקולות ה-CA מסייעת בהגנה על המערכת הפוטוסינתטית, תחת עקת יובש, ניתן לשער שבאזור זה שרדו הפרטים המותאמים יותר להתמודד עם הקיץ החם, ולכן נמדדה בהם תכולה גבוהה של נוגדי חמצון.

שינויים בתכולת נוגדי חמצון באיברים השונים במהלך התפתחות הצמח

Del Bano וחבריו (2003), דגמו עלים, פרחים, גבעולים ושורשים מצמחי רוזמרין בני שלושה חודשים, שגודלו בחממה, ומצאו כי בעלי רוזמרין צעירים נמדדה כמות CA הגבוהה ביותר. ונמצא כי חלה ירידה הדרגתית בתכולת ה-CA עם צמיחת העלה ועד הגעה לגודלו המירבי. משלב זה ועד לפריחה, תכולת CA נותרה יציבה יחסית (Del Bano et al., 2003). במהלך הפריחה, נמדדה ירידה בתכולת CA בעלים, במקביל לעלייה בכמות בגבעול ובפרחים. תכולת CA עלתה במקצת במהלך התפתחות הפרח והגיע לרמה דומה לזו שבעלים (Del Bano et al., 2003). CAR התנהג בצורה דומה ל-CA בשלב הראשון של התפתחות העלים, הגיע לרמה המקסימלית כאשר העלים הגיעו לאורך של 5-10mm ולאחר מכן תכולת CAR ירדה בהדרגה. בזמן הפריחה תכולת CAR בעלים ירדה בעוד שתכולתה בפרחים ובגבעול עלתה (Del Bano et al., 2003). רמות נמוכות מאד של CA ו-CAR נמצאו בשורש במהלך הגדילה, ונעלמו לחלוטין בשורשים שקוטרם גדול מ-0.5mm. RA הגיע לרמתו המקסימלית כאשר העלה היה צעיר (5-10mm), והיה גדול מזה של CA ו-CAR, ולאחר מכן, התנהג בצורה דומה לזה של CA. תכולת RA בפרחים הייתה קבועה, עם עליה קטנה במהלך החודש הראשון של הפריחה, והיתה בריכוז גבוה מזה שבעלים (Del Bano et al., 2003). במחקר שערכו Hidalgo וחבריו (1998), נמצא שתכולת CA בעלים המבוגרים הייתה קטנה ב- $21 \pm 5\%$ מאשר בעלים הצעירים. ממצאים דומים נמצאו גם

במחקר נוסף (Heller and Forkmann, 1988). הירידה בריכוז נוגדי החמצון עם התפתחות הצמח נובעת, ככל הנראה, מדילולם עם גדילת העלה (Del Bano et al., 2003). כפי שתואר בצמחים אחרים (Castillo et al., 1997), הימצאותם של פוליפנולים בגבעול יכולה להעיד על אינטראקציה בין תהליכי הביוסינתזה, פירוק וההובלה, המעורבים בשינוע של פוליפנולים לאברי הצמח השונים (Del Bano et al., 2003; Munne-Bosch and Alegre, 2001). מולקולות CA ו-CAR נמצאו גם הן, בגבעול, בשלב ההתפתחות של העלים הצעירים, מה שיכול להצביע על הובלת CA ו-CAR לעלים הצעירים. השערה זו נתמכת ע"י העובדה שכאשר הסתיימה גדילת העלה, נעלמו CA ו-CAR מהגבעול (מערכת ההובלה) (Del Bano et al., 2003).

השפעת גורמי סביבה על תכולת נוגדי החימצון

צמחים הגדלים באגן הים התיכון חשופים למגוון עקות סביבתיות, כגון: זמינות מים נמוכה, קרינה חזקה, תנודות בטמפרטורה ומחסור בחומרי הזנה. עקות אלו יכולות להוביל לחוסר איזון בין נוגדי החמצון לבין הרדיקלים החופשיים ולגרום לעקה חמצונית (Smirnoff, 1993; Pastori and Foyer., 2002; Xiong et al., 2002). בניסויי שדה, שנערכו בתנאי בעל, עקבו אחר תכולת CA ונגזרותיה בהשפעת עקת מים (Munne-Bosch and Munne-Bosch et al., 1999, 2000; Munne-Bosch and Alegre, 2003). בעקבות עקת המים נמדדה עליה בנגזרות המחומצנות של CA, וירידה בתכולת CA. תוצאה זו תומכת בתפקידו של CA כמגן על המערכת הפוטוסינתטית ברזומרין המצוי בעקת מים (Munne-Bosch et al., 1999, 2000; Munne-Bosch and Alegre, 2003). בנוסף, נמדדה ירידה בתכולת CA עם העלייה בעוצמת הקרינה ובטמפרטורה (Munne-Bosch et al., 2000). עליה בלחץ הטורגור בעלים כתוצאה ממשקעים או השקיה גרמה לעליה בתכולת CA (Munne-Bosch et al., 2000; Hidalgo et al., 1998).

בעבודה שנערכה ע"י Luis וחבריו (2007), בחנו החוקרים את השפעת קרינת UV-B על תכולת CA, CAR ו-RA ברזומרין. הצמחים גודלו בחממה, הושקו מידי יום ודושנו פעמיים בשבוע. הצמחים טופלו בעוצמות קרינת UV-B שונות. נמצא שתחת חשיפה לרמת הקרינה הגבוהה, חלה עלייה בריכוז CA מ-12 ל-22 mg g^{-1} FW, CAR עלה מ-0.6 ל-3 mg g^{-1} FW ו-RA עלה מ-2 ל-5 mg g^{-1} FW (Luis et al., 2007). קיימים דיווחים נוספים בספרות, על כך שקרינת UV-B מעודדת יצירת טרפנואידים, במיוחד במשפחת השפתניים (Johnson et al., 1999; Karousou et al., 1998; Maffei and Scannerini, 2000).

עבודה אחרת שפורסמה לאחרונה ע"י Luis וחבריו (2007), בדקה את תכולת CA, CAR ו-RA בשני זני רוזמרין תחת חשיפה לעקת קור. שני הזנים טופלו בטמפרטורות שונות, בחדר קור: $12 \pm 1^\circ\text{C}$ (8 שעות אור) וב- $6 \pm 2^\circ\text{C}$ (16 שעות חושך) למשך 6 שבועות. כביקורת, גודלו צמחים ב- 22°C (8 שעות אור) ו- $18 \pm 2^\circ\text{C}$ (16 שעות חושך). דווח כי נמצאה שונות בתגובת הזנים לעקת הקור. זן אחד הראה עליה של 3% בריכוז CA ועליה של 50% בריכוז RA, זאת לעומת הזן השני ועליה של 40% בריכוז CA שהראה ירידה של 50% בריכוז RA. ריכוז CAR הראה ירידה יוצאת דופן של 52% בזן הראשון ו-94% בריכוז בזן השני (Luis et al., 2007). תוצאות אלו מחזקות את

התוצאות מתצפיות, שנערכו בתנאי שדה, והראו עליה בריכוז CA בחודשי הסתיו והחורף (Munne Bosch et al., 1999; Luis and Johnson, 2005).

עד היום לא פורסם מחקר אשר עוקב אחר תכולת נוגדי החמצון ויבול החומר היבש ברוזמרין המגודל בתנאים חקלאיים אינטנסיביים לאורך השנה. לפיכך מטרת העל של עבודה זו היתה לבחון את התאמת צמח הרוזמרין לייצור והפקת מיצוי נוגדי חמצון, ואת פוטנציאל שילובו כגידול חקלאי מסחרי למטרה זו. לצורך בחינת שאלה מהותית זו מטרות עבודתי היו (i) לבחון כיצד משתנים רכיבי היבול ותכולת נוגדי החמצון בארבעה זני רוזמרין ("אורנית", "ישראל", "סטאר" ו-"זקוף") לאורך עונות השנה (ii) לבחון את השפעת מועדי הקציר על ההתחדשות ו-(iii) לבדוק את השפעת גורמי הסביבה (טמפרטורה ואורך יום) על תכולת נוגדי החמצון בצמח הרוזמרין.

2 חומרים ושיטות

2.1 חומר צמחי:

בעבודה זו נבחנו זני רוזמרין שנאספו וטופחו בנווה יער ביחידה לתבלינים. מתוכם נבחרו שלושה זנים עתירי חומצה קרנוזית ("ישראל", "אורנית", "סטארי") וזן מסחרי כביקורת ("זקוף") (Dudai et al., 2007).

2.2 הכנת המיצוי הצמחי לכל הבדיקות:

החומר הצמחי הטרי יובש ב-40 מ"צ במשך 3 ימים והופרד לעלים ולגבעולים. העלים נטחנו לאבקה בעזרת מטחנת קפה. לדגימה נלקח 0.1 גרם אבקה לתוך מבחנות פלסטיק בנפח 15 מ"ל ונמהלו ב-10 מ"ל מתנול 80% HPLC grade הדוגמאות טולטלו במשך שעתיים במטלטלת סיבובית שהושמה במקרר (נספח S1). לאחר מכן המבחנות סורכזו ב-3000RPM 3min כדי להשקיע את החומר הצמחי. לצורך הרצה ב-HPLC, לאחר השקיעה נשאב וסונן 1 מ"ל מהמיצוי לבקבוקון הזרקה (vial) דרך פילטר 0.2µm בנוסף נלקח עוד 1 מ"ל מיצוי לאנליזות נוספות.

2.3 אנליזה של CAR, CA ו-RA ב-HPLC

מדידת תכולת האנטיאוקסידנטים בעלי הרוזמרין בוצעה באמצעות מכשיר לכרומוטוגרפיה נוזלית בלחץ גבוה (HPLC) מתוצרת HP דגם 1090. לצורך הבדיקה הותאמה שיטה המתבססת על עבודת Cuvelier et al. (1996).

דוגמאת המיצוי בנפח 80µl הוזרקה לקולונה אנליטית מסוג C-18 (reverses phased) של חברת MERCK (PhosphorStar®), אורך 250mm, קוטר 4.6mm, גודל חלקיקים 5µ בתוספת פרה קולונה מתאימה (החלפה כל 60-100 הזרקות). קצב הזרימה במכשיר נקבע על 1ml/min ונפח הזרקה: 80µL. ההרצה בוצעה עם גרדיאנט כאשר ממס A מורכב ממים-אצטוניטריל-חומצה אצטית (8.5ml-150ml-850ml בהתאמה), ממס B מתנול 100% (כל הממסים HPLC grade) תכנית ההרצה: ההרצה נמשכה 60 דקות, מעבר מ-B 10% ל-B 100% תוך 45 דקות, 5 דקות ב-B 100% וחזרה ליחס ההתחלתי תוך 10 דקות. בין כל הרצה היה הפרש של 8 דקות (post run) על מנת לאפשר למערכת להתייבב ולקבל base line יציב.

זיהוי CAR, CA ו-RA: UV diode array detector. CAR, CA ו-RA: 284nm.

סטנדרטים של CAR, CA ו-RA נקנו מחברת A.G. Scientific, INC. (ארה"ב) והוזרקו בנפחים שונים ליצירת עקומת כיוול. על בסיס השיפוע של משוואת הקו הישר של עקום הכיוול חושבה הכמות היחסית במ"ג/גרם חומר יבש שהתקבלה בכל הזרקה. נוסחת החישוב:

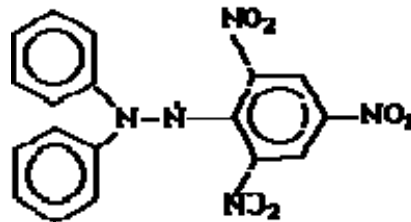
$$X = \frac{Amount \times Vol(ml) \times Delution}{Vol(\mu L) \times W(gr) \times 1000} = \frac{mg}{gr} DW$$

יבול המרכיבים השונים למ"ר חושב ע"י מכפלת הריכוז שלהם בעלים ביבול עלים יבשים (גרם למ"ר).

2.4 מדידת פעילות נוגדת חמצון

ניתן לבדוק את הפעילות נוגדת החמצון בצורה ישירה, על ידי שימוש בתכונתם של נוגדי החמצון כתורמי מימן. הפעילות מבוססת על תחרות קינטית. שיטה זו הוצגה לראשונה ע"י Marsden Blois בשנת 1958.

DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) הוא רדיקאל חופשי יציב יחסית, בעל צבע סגול כהה. כאשר הוא מגיב עם חומר נוגד חמצון התורם לו מימן, הוא מאבד את צבעו באורך גל של 517nm (Molyneux, 2004).



איור 4: מבנה DPPH (Wang et al. 1999).

מאפייני התגובה: תחילת התגובה מהירה מאד (שניות) ולאחר מכן המשכה איטי יותר. יתרונות השיטה נובעים מכך שהיא פשוטה ולא מצריכה מכשור מיוחד, רק ספקטרופוטומטר. החיסרון נובע מכך שהתחום הליניארי המתקבל עבור ה-DPPH קטן (Schaich, 2005).

חומרים:

DPPH(sigma) (2, 2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl), Chlorogenic acid, Etanol 96%

הכנת תמיסת DPPH: נשקלו 6mg מאבקת DPPH הנמצאת בהקפאה לתוך 100ml אתנול 96%. עורבבו עם סטירר למשך 20 דקות עד חצי שעה, בכדי לקבל תמיסה הומוגנית, הבליעה נבדקה בספקטרופוטומטר באורך גל של 517nm. ערך הבליעה צריך להיות בטווח של 0.9-1 במידה והערך גבוה יותר יש למהול ע"י הוספת אתנול 96%.

עקומת כיוול

10 מ"ג חומצה כלורוג'ינית ב- 10 מ"ל אתנול נמהל פי 10 עד לריכוז 0.1 מ"ג/מ"ל. מתמיסה זו הוכנו במבחנות אפנדורף דוגמאות בגרדיאנט עולה של ריכוז חומצה כלורוג'ינית עם תמיסת ה-DPPH, כך שסה"כ נפח הריאקציה 1ml. כל נקודה בעקומת הכיוול הייתה ממוצע של שלוש חזרות. שלבי הבדיקה: עורבבו במבחנת אפנדורף 10µl מהמיצוי הצמחי עם 990µl מתמיסת ה-DPPH בטווח הרצוי. המבחנות כוסו בנייר אלומיניום במשך האינקובציה למניעת קרינה חיצונית ולאחר חצי שעה נקראה הבליעה בספקטרופוטומטר באורך גל של 517nm. התוצאות חושבו ע"פ עקומת הכיוול בערכים של מ"ג אקוויוולנטי חומצה כלורוג'ינית בגרם חומר יבש.

2.5 תכולת פנולים (Total Phenols)

בדיקה זו מבוססת על שיטת Folin & Denis (1912). הרעיון הבסיסי בבדיקה הזו הוא לכמת את הריכוז הכללי של קבוצות הידרוקסיל פנוליות במיצוי, מבלי להתחשב במולקולות המסויימות שעליהן הן מופיעות. הבדיקה לא מספקת מידע לגבי הרכיבים הפנוליים המסויימים שנוכחים במיצוי. השיטה מאוד נפוצה ובמקור היא שימשה לכימות החומצה האמינית הפנולית טירוזין. כסטנדרט שמשה חומצה גאלית, ריאגט פולין דניס עובר חיזור בנוכחות פנולים ולאחר שינוי ה-pH ע"י סודיום קרבונט משנה התמיסה את צבעה לסגול (קריאה ב-760nm).

חומרים:

Sodium Carbonate Anhyd (sigma), Folin-Denis Reagent (sigma) and Galic Acid (sigma).

עקומת הכיוול: לצורך עקומת הכיוול הוכנה תמיסת חומצה גאלית במים מזוקקים (0.15mg/ml). מהתמיסה הזו הוספו ועורבבו נפחים של 0, 0.02, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4ml ב- 7.5ml מים מזוקקים. לכל בקבוק הוסף ועורבב 0.5ml ריאגנט פולין-דניס. לאחר 3 דקות הוסף ועורבב 1ml של תמיסת סודיום קרבונט רוויה. לאחר אינקובציה של 30 דקות נקראה התמיסה בספקטרופוטומטר באורך גל 760nm. כל נקודה בעקומת כיוול הייתה ממוצע של שלוש חזרות.

שלבי הבדיקה: הכנת תמיסת סודיום קרבונט רוויה: לתוך 100ml מים הוספו 35gr Sodium carbonate Anhyd. לאחר ההמסה ב- 70-80°C צוננה התמיסה במשך לילה וסוננה דרך צמר זכוכית. כ- 50µl מהמיצוי הוספו ל-7ml מים מזוקקים ועורבבו. הוספו ועורבבו 0.5ml ריאגנט פולין-דניס. לאחר 3 דקות הוספו 1ml מתמיסת הסודיום קרבונט הרוויה ועורבבו. לאחר אינקובציה של 30 דקות נקראה התמיסה בספקטרופוטומטר באורך גל 760nm. התוצאות חושבו ע"פ עקומת הכיוול בערכים של מ"ג אקוויוולנטי לחומצה גאלית בגרם חומר יבש.

2.6 בחינת גידול רוזמרין בשדה, אורים 7-2006

לצורך בחינת התפתחות הרוזמרין ואיכותו נשתלו בקיבוץ אורים שבנגב המערבי ערוגות של רוזמרין בשדה חלוץ מסחרי. כל הזנים שנבחנו נשתלו בשדה במהלך יוני 2005. הצמחים נשתלו בארבע שורות על ערוגה ברוחב 1.93 מטר, בעומד 12 צמחים למטר ערוגה (6 צמחים/ מ"ר). המרחק בין הצמחים בשורה היה 30 ס"מ. ההשקיה בשטח נעשתה בשתי שלוחות טפטוף, בין השורות, בטפטוף 17 מ"מ, 3 טפטפות למטר, מווסתות. הצמחים הושקו פעם בארבעה ימים בספיקה של 3-6 קוב ליום לדונם, בהתאם לתנאי מזג האוויר. דישון חנקני (אמון גופרתי) בלבד התבצע דרך מערכת הטפטוף. קביעת רמות הדשן הנדרשת הייתה לפי מופע הצמחים. עישוב ידני התבצע אחת לחודשיים לערך.

לא בוצעו ריסוסים מאחר שבמהלך הגידול לא נצפו מחלות בצמחים ולא נצפתה פגיעת מזיקים למרות נוכחות מאסיבית של חרקים במהלך כל השנה. כמה צמחים מתו במהלך השנה כנראה לאחר שלא התאוששו מהקציר, במיוחד אלו שנקצרו בחורף.

בתוך השטח הזה הוצב ניסוי במבנה חלקות מפוצלות. כל ערוגה (זן) חולקה לארבע ובכל חלק סומנו 12 יחידות דיגום של מטר עבור מועדי קציר שונים. כל חלקה נקצרה לראשונה במועד המיועד לה ופעם שניה נקצרו כל החלקות לאחר שהתחדשו במועד אחיד בתאריך 07-4-30. לפני תחילת הניסוי נקצרו הערוגות ע"י קומביין (קציר טכני). גובה הקציר נקבע ל-10 ס"מ על מנת לייצג מכוונות חקלאיות הקיימות ברשות החקלאים.

אחת לחודש, החל באפריל 06, נמדד גובה הצמחים בכל יחידת דיגום של אותו המועד. לאחר מכן, החלקה נקצרה בגובה 10 ס"מ, החומר הצמחי הקצור נשקל והופרשה דגימה אקראית במשקל 0.3 ק"ג. הדגימה הוכנסה לתנור ייבוש למשך כשלושה ימים ב-40 מ"צ. בתום הייבוש הופרדה הדגימה לרכיבי היבול: עלים וגבעולים, וכל אחד מהם נשקל. העלים הוכנסו לשקית פוליאטילן והושמו במקפיא, לאחר מכן הם עברו את האנליזות שתוארו לעיל.

2.7 בחינת השפעת הטמפרטורה ואורך היום בתנאים מבוקרים, רחובות 2006

ניסוי בתנאים מבוקרים נערך בפיטוטרון של הפקולטה לחקלאות ברחובות. הניסוי נערך בארבעה משטרי טמפרטורה בכל חדרי הפיטוטרון (טבלה 1), בשני אורכי יום בארבעה עציצים (חזרות), עם שני צמחים בעציץ. לפיכך, הניסוי כלל 256 צמחי רוזמרין (4 זנים 4×2 טמפרטורות 2×2 אורכי יום 4×2 חזרות 2×2 צמחים לחזרה) שהוכנו מייחורים מצמחי אם הנמצאים בנווה יער. כל שני יחורים מושרשים בני שבועיים נשתלו בעציץ פלסטיק מנוקז בתחתית שהכיל תערובת שתילה בנפח של 2 ליטר. השתילים שהו חודשיים בחממה מחוממת בנווה יער לצורך קליטה ועל מנת להביא לאחידות מרבית, ולאחר מכן הוכנסו (באותו היום) לכל אחד מחדרי הפיטוטרון. בכל חדר היו 36 עציצים, מחציתם (16) ביום ארוך ומחציתם (16) ביום קצר.

טבלה 1 : תנאי הסביבה בחדרי הפיטוטרון

D	C	B	A	חדר תנאי סביבה
16	22	28	34	טמפרטורה ביום (מ"צ)
10	16	22	28	טמפרטורה בלילה (מ"צ)
70	75	75	85	לחות יחסית (%)

השקיה ידנית עד נגר ניתנה פעם ביום בשעה 12 בצהריים. בימים: א, ג ו-ה הצמחים הושקו בתמיסת הזנה ובשאר הימים במי ברז. תמיסת ההזנה הכילה תערובת חומרי הזנה – שפר (1.34ml/L), קורטין (0.5ml/L) וקלמגאון (1ml/L) (טבלה 2).

טבלה 2 : הרכב המינרלים בתמיסת הזנה בפיטוטרון.

מינרל	ריכוז (mg/L)
N	140
P	16.3
K	139
B	0.06
Ca	129
Cu	0.03
Fe	9.3
Mg	56
Mn	0.27
Mo	0.01
Na	74
S	27
Zn	0.29
pH	7.5

בתנאי יום ארוך היו הצמחים על שולחנות הערוכים בצורת האות ח' סביב קירות החדר. בין השעות 16-22 הואר החדר באמצעות נורות להט 100 וואט התלויות בגובה של 2.5 מטר מעל הרצפה במרחקים של ½ מטר אחת מהשנייה. בסה"כ התקבלה הארה של 16 שעות אור. בתנאי היום הקצר שהו הצמחים בחדרים אפלים על עגלות שהוצאו בשעה 7 בבוקר אל החדר הראשי והוחזרו אליהם בשעה 16, לפיכך קיבלו הצמחים 9 שעות הארה. עם הכנסת השתילים לחדרי הפיטוטרון הם נקצרו קציר טכני, לאחר 20 ימים מכניסתם לפיטוטרון נבחר ענף מייצג (סומן בסרט אדום) ובמשך 131 ימים, מדי שבוע או שבועיים (9.1.07-18.10.06), נלקחו מכל צמח מדדי גובה ונספרו הפרקים בענף המסומן. בתאריך 23.4.07 נקצרו הצמחים בגובה 15 ס"מ מפני הקרקע העציץ והוכנסו לשקית נייר לייבוש בתנור בחום של 50 מ"צ. לאחר ייבוש מלא הופרדו העלים והגעעולים, והעלים שמשו לאנליזות שתוארו לעיל.

2.8 סטטיסטיקה

עיבוד הנתונים בוצע בעזרת תוכנת Excel. השוואות בין ממוצעי הטיפולים בוצעו באמצעות תוכנת JMP בשיטת ANOVA (comparisons for each pair using student's t test one way) ברמת מובהקות של 0.05, מבחני מובהקות מקדם הרגרסיה נערכו באמצעות תוכנת JMP ברמת מובהקות של 0.05.

3.1 בחינת גידול זני רוזמרין בשדה הפתוח, אורים 07-2006

בשלב הראשון נערך מעקב אחר גידול ושינויים ברכיבי היבול של צמחי רוזמרין במשך עונות השנה בשדה מסחרי בקיבוץ אורים. זהו שדה חלוץ בארץ בגידול זני רוזמרין להפקת נוגדי חמצון. לאחר קציר טכני בסוף אפריל 2006, נדגמו מדי חודש במהלך השנה מכל זן 4 חלקות בגודל של 2 מ"ר.

כדי לאפיין את השפעת מועד הקציר על ההתחדשות, נערך מעקב לאחר כל קציר בכל חלקה אחר השינוי בגובה הצמחים לאורך הזמן.

בסופו של הניסוי, באפריל 2007, נערך קציר מסכם של כל החלקות שנקצרו לפני כן במועדים השונים.

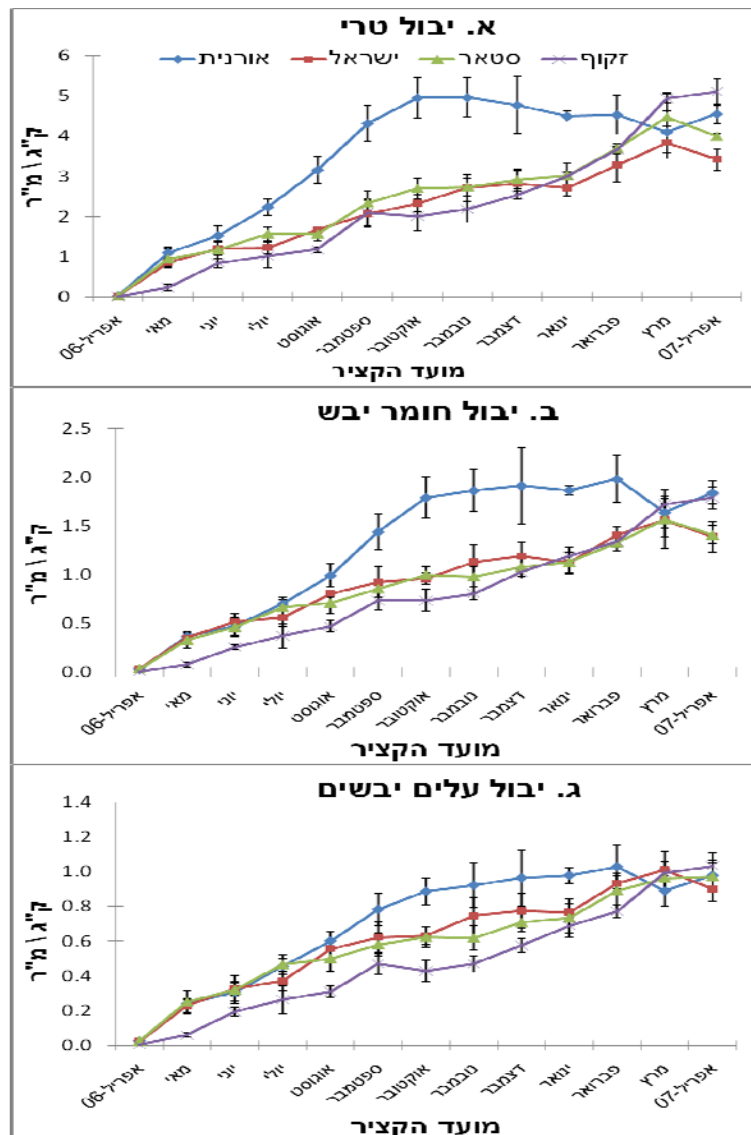
3.1.1 צבירת היבול הצמחי במהלך השנה

צבירת היבול הטרי (איור 5.א): לצמחים מהזן אורנית היתה צמיחה וגטטיבית נמרצת של כ- 1 ק"ג חומר טרי לחודש בממוצע במהלך חודשי הקיץ והסתיו (אפריל 2006 - נובמבר 2006). זן זה הגיע ליבול של כ- 5 ק"ג למ"ר בנובמבר 2006. במהלך חודשי החורף נצפתה עצירה בצבירת החומר טרי, כך שהיבול הטרי נשאר בסביבות ה- 5 ק"ג למ"ר עד לסיום הניסוי באפריל 2007. לעומתו, לשלושת הזנים האחרים: זקוף, ישראל וסטאר, היתה צמיחה וגטטיבית איטית יותר. לאחר 5 חודשי צמיחה (אפריל-ספטמבר) צבר כל אחד מהם כ- 2 ק"ג יבול טרי למ"ר. גם בזנים אלו במהלך חודשי החורף (ספטמבר 2006 - פברואר 2007) לא השתנה היבול הטרי, אולם מפברואר 07 התחדשה בהם הגדילה הוגטטיבית. הזן זקוף הגיע לשיא ביבול הטרי בקציר מרץ של כ- 5 ק"ג למ"ר, ונשאר ברמה זו עד לסיום הניסוי (אפריל 2007). הזנים ישראל וסטאר השיגו שיא ביבול הטרי בקציר מרץ 2007, 3.8 ו- 4.4 ק"ג למ"ר, בהתאמה. היבול הטרי של הזן אורנית היה גדול באופן מובהק משאר הזנים בקצירים יולי 2006 עד ינואר 2007.

צבירת החומר היבש (איור 5.ב): במהלך 2 חודשי הגידול הראשונים (אפריל-יוני) לזנים ישראל, סטאר ואורנית הייתה צבירה דומה של החומר היבש והם הגיעו ליבול של כ- 0.5 ק"ג למ"ר. לעומתם, הזן זקוף צבר פחות חומר יבש ולאחר חודשיים הגיע ל- 0.26 ק"ג למ"ר. בקצירים אוקטובר 2006 - ינואר 2007 יבול החומר היבש של זן אורנית היה גדול באופן מובהק משאר הזנים, וקצב צבירת החומר היבש בקצירים אוגוסט - אוקטובר עמד על כ- 0.35 ק"ג למ"ר בממוצע. לאחר מכן, בחודשי החורף לא השתנה יבול החומר היבש ועמד על כ- 2 ק"ג למ"ר עד לסיום הניסוי. הזנים זקוף, ישראל וסטאר הראו מגמה דומה בצבירת החומר היבש מיוני עד מרץ: כ- 0.1 ק"ג למ"ר בחודש, עד לערך סופי של 1.4 ק"ג למ"ר.

יבול העלים היבשים (איור 5.ג): במהלך 4 חודשי הגידול הראשונים, צברו הזנים אורנית, ישראל וסטאר יבול עלים יבשים בקצב דומה שהגיע עד כדי כ- 0.5 ק"ג למ"ר בקציר אוגוסט. מחודש אוגוסט ועד לסיום הניסוי באפריל 07 הייתה לזנים ישראל וסטאר מגמה דומה של צבירת יבול עלים יבשים, ובקציר האחרון (אפריל 07) היה היבול בשניהם כ- 1 ק"ג עלים יבשים. לעומת זאת,

בקציר אוקטובר וינואר היה לזן אורנית יבולים גבוהים של עלים יבשים באופן מובהק, מאשר זה של הזנים זקוף וסטאר.



איור 5: שינויים ברכיבי היבול הצמחי בזני רוזמרין לאורך עונת הגידול בשדה: א. יבול טרי. ב. יבול יבש. ג. יבול עלים יבשים.

הזן זקוף היה בדרך כלל בעל יבול עלים נמוך משאר הזנים מתחילת הניסוי (אפריל 06) ועד לקציר בפברואר 07. לעומת זאת, בקצירים מרץ ואפריל 07 השתווה יבול העלים היבשים שלו לזה של שאר הזנים לרמה של 1 ק"ג למ"ר.

לסיכום, כאשר מתבוננים בגרפים של צבירת היבול הטרי (איור 5.א) וצבירת היבול היבש (איור 5.ב) ניתן לראות שקיים הבדל בין הזן אורנית לזנים זקוף, ישראל וסטאר. לזן אורנית צמיחה ווגטיבית נמרצת מתחילת הניסוי (אפריל 2006), אך גדילתו נעצרה עם הכניסה לחודשי החורף, והיבול הטרי והיבש לא השתנה עד לסיום הניסוי באפריל 2007. לעומת זאת, לזנים זקוף, ישראל וסטאר הייתה גדילה ווגטיבית מתונה יותר מתחילת הניסוי (אפריל 2006). בחודשי החורף נעצרה צמיחתם, אם כי לזן זקוף הייתה צמיחה מתונה גם בחודשי החורף. עם ההתחממות מזג האוויר

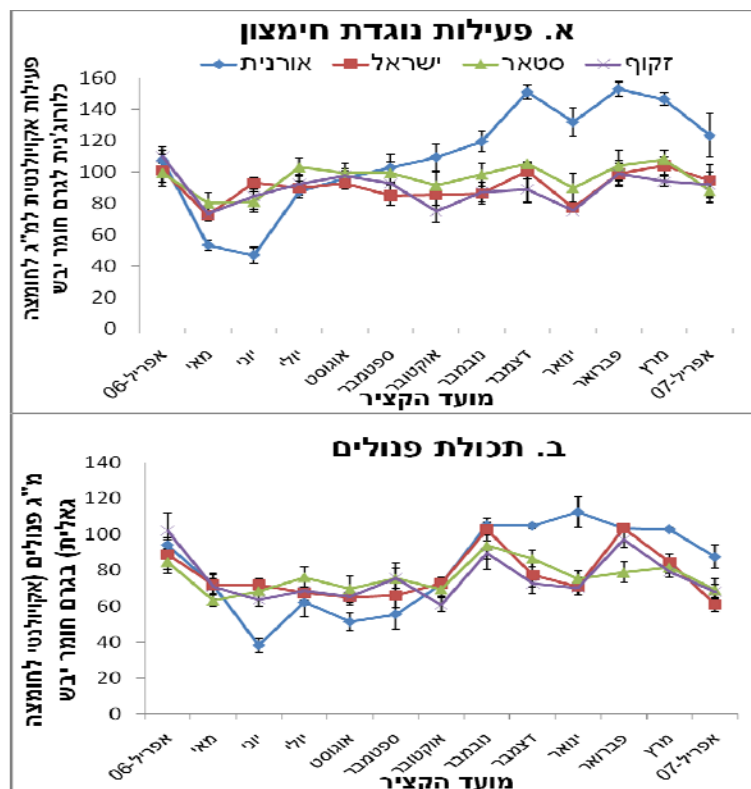
הזנים זקוף, ישראל וסטאר חידשו צמיחתם עד לסיום הניסוי באפריל 2007. הבדלים אלו מקורם ככל הנראה ברקע הגנטי הקשור להתאמות שונות לטמפרטורות. ההבדלים בין הזנים ביבול העלים היבשים (איור 5.ג) הצטמצמו, אם כי זן אורנית עדיין הגיע ליבול גבוה יותר משאר הזנים בזמן קצר יותר. לקראת סוף הניסוי יבול העלים היבשים של הזנים זקוף, ישראל וסטאר השתווה לזה של זן אורנית.

3.1.2 השפעת מועד הקציר על פעילות נוגדי החמצון ותכולת הפנולים בזני הרוזמרין

מאחר ורוזמרין הינו בעל תכולה גבוהה של נוגדי חמצון, נמדדה פעילותו נוגדת החמצון של הצמח. מאחר ונוגדי החמצון הנחקרים בעבודה זו הינם פנולים נמדדה גם תכולת כלל הפנולים במיצויים של עלי רוזמרין במהלך עונת הגידול.

השפעת מועד הקציר על פעילות נוגדת חמצון של מיצוי רוזמרין (איור 6.א): בזנים ישראל, סטאר וזקוף לא היו שינויים גדולים בפעילות נוגדת החמצון של המיצויים במהלך עונת הגידול. המיצויים של הזן אורנית לעומת זאת השתנתה לאורך העונה, בחודשים מאי 2006-יוני 2006 חלה בהם ירידה מובהקת בהשוואה לשאר הזנים. לאחר מכן, בחודשים אוקטובר 2006-אפריל 2007 הייתה עלייה תלולה בפעילות נוגדת החמצון של המיצויים. פעילות נוגדת החמצון הגיעה לערכי שיא של כ-150 מ"ג אקווילנטי לחומצה כלורוגנית לגרם חומר יבש בקצירים דצמבר, פברואר ומרץ.

השפעת מועד הקציר על תכולת כלל הפנולים במיצוי רוזמרין (איור 6.ב): תכולת כלל הפנולים של הזנים ישראל, סטאר וזקוף לא השתנתה באופן משמעותי במהלך עונת הגידול, והייתה בעלת מגמה דומה לזו של הפעילות נוגדת החימצון (איור 6.א). גם לזן אורנית היתה בתכולת הפנולים מגמה דומה לזו של פעילות נוגדת החימצון. בחודשים אפריל 2006-יוני 2006 חלה ירידה בתכולת כלל הפנולים בזן אורנית, לאחר מכן בחודשים יוני 2006-נובמבר 2006 חלה עליה בתכולתם (איור 6.א). מנובמבר 2006 ועד לסוף הניסוי נשמרה רמה גבוהה של פנולים עם ירידה קלה לקראת לסוף הניסוי באפריל 2007.



איור 6 : א. פעילות נוגדת חמצון במיצויים (80% מתנול) של עלי רוזמרין. ב. תכולת פנולים במיצויים (80% מתנול) של עלי רוזמרין.

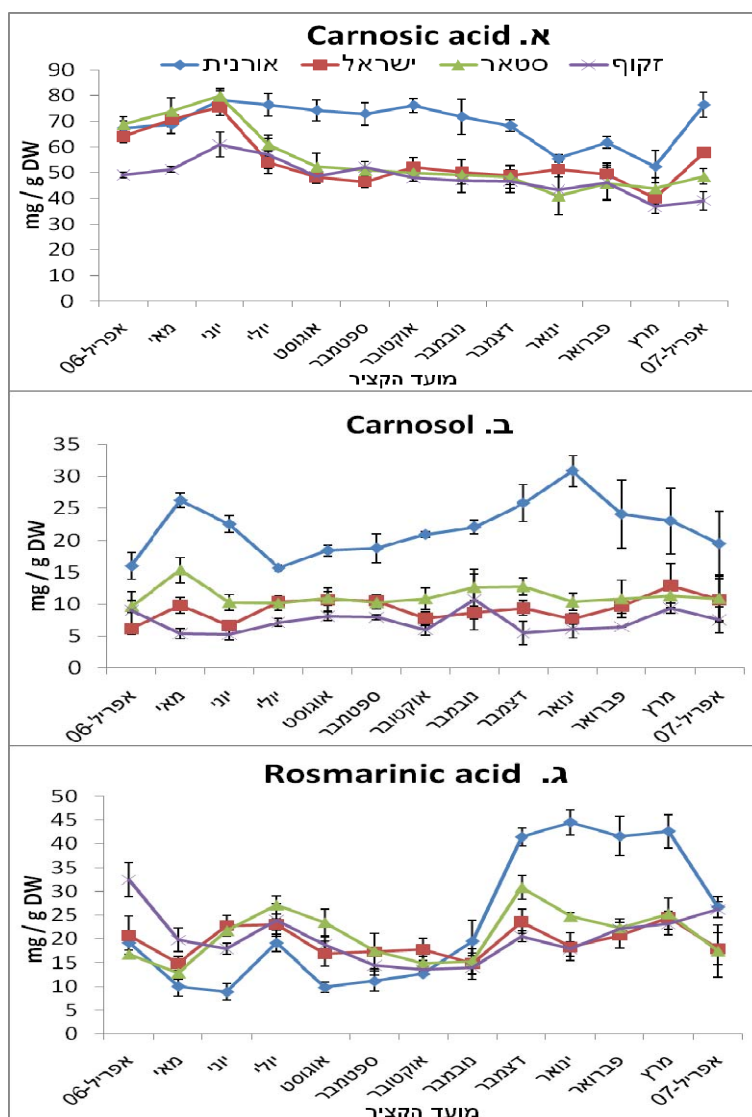
3.1.3 השפעת מועד הקציר על תכולת CA, CAR ו- RA

השינוי בתכולת נוגדי החמצון במהלך עונת הגידול הינו מדד חשוב ביותר, מכיוון שאיכות התוצרת החקלאית וערכה נקבעת בעיקר ע"פ תכולת CA. לאחר הקציר נלקח מכל חלקה דגימה של כ-300 גרם חומר טרי ויובשה בתנור. לאחר מכן הופרדו העלים מהגבעולים, העלים נלקחו לאנליזה ב-HPLC כדי לבדוק את תכולת CA, CAR ו-RA.

השפעת מועד הקציר על תכולת CA (איור 7.א) בחודשיים הראשונים של הצמיחה לזנים אורנית, ישראל וסטאר היתה תכולה דומה של CA של כ-70mg/g DW. באותו הזמן הזן זקוף היה בעל תכולה נמוכה יותר של CA משאר הזנים, כ-50mg/g DW. במהלך החודשים יולי 2006-דצמבר 2006 הזן אורנית היה בעל תכולה גבוהה של CA באופן מובהק (כ-70 mg/g DW), בעוד שבזנים ישראל וסטאר היתה מגמת ירידה בתכולת CA, והיא השתוותה לזו של הזן זקוף עד לסוף הניסוי באפריל 2007. בחודשים ינואר 2007-מרץ 2007 היתה ירידה בתכולת CA בזן אורנית לערכים של 60mg/g DW.

השפעת מועד הקציר על תכולת CAR (איור 7.ב): הזן אורנית היה בעל תכולה גבוהה של CAR משאר הזנים שנבחנו. יתכן שהדבר נבע מתכולה גבוהה של CA בזן אורנית (איור 7.א). ניתן לראות

שתכולת CAR עלתה בהדרגה מיוני 06 לתכולת שיא של 30 mg/g DW בינואר 2007. סיבה אפשרית לכך היא הזדקנות העלים ופירוק CA ל-CAR. תכולת CAR בזנים ישראל, סטאר וזקוף לא השתנתה באופן משמעותי במהלך השנה, והיתה ברמה של כ-5-10 mg/g DW לאורך כל הניסוי.

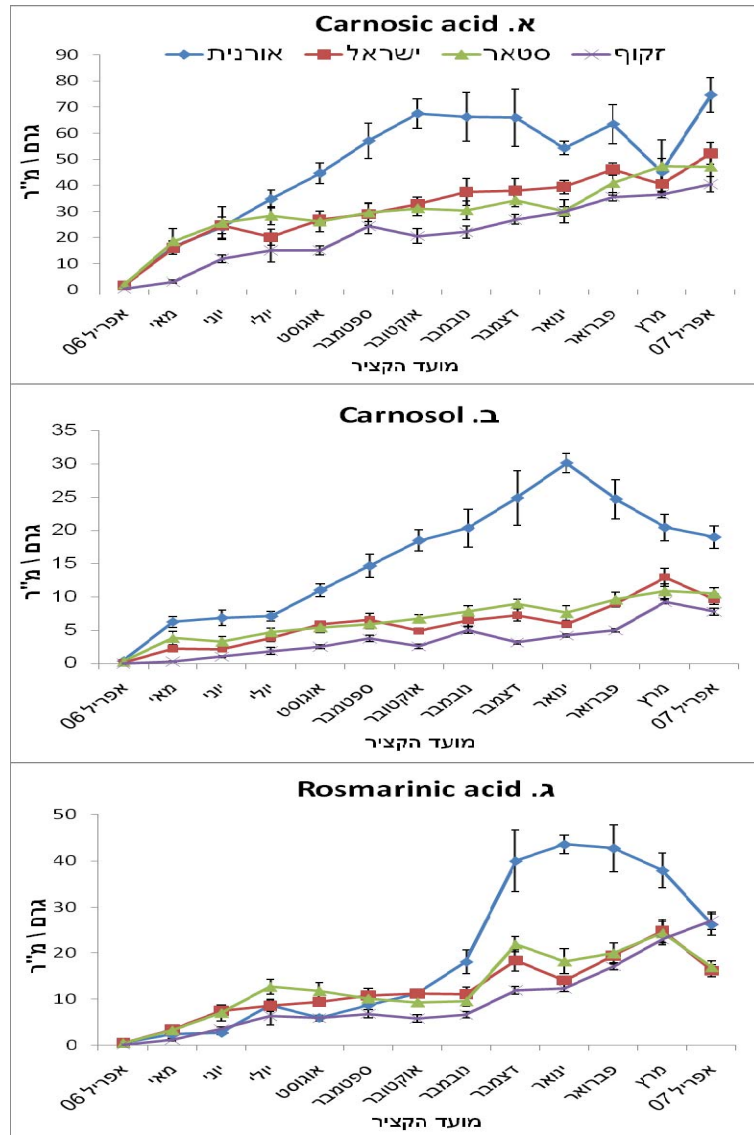


איור 7: השפעת מועד הקציר על תכולת CA, CAR & RA בעלים מיובשים של זני רוזמרין.

השפעת מועד הקציר על תכולת RA (איור 7.ג): בזנים ישראל, סטאר וזקוף הייתה עליה בתכולת RA במהלך החודשי הקיץ (מאי - אוגוסט 2006) ואילו עם תחילת הסתיו (ספטמבר 2006) חלה ירידה קלה בתכולת RA בזנים אלה. הזן אורנית לעומת זאת התנהג בצורה שונה, מתחילת הניסוי (אפריל 2006) ועד אוקטובר 2006 תכולת RA שבו הייתה נמוכה מכל הזנים שנבחנו. מאוקטובר 2006 החלה עליה ב-RA, שהגיעה לשיא של כ-40 mg/g DW בקצירים דצמבר 2006 עד מרץ 2007 והיתה גדולה באופן מובהק משאר הזנים. לאחר מכן ירדה תכולת RA ל-25 mg/g DW. ראוי לציין כי העליה בתכולת RA התרחשה בו זמנית עם ירידה בריכוז CA (איור 7.א).

3.1.4 השפעת מועד הקציר על יבול נוגדי החמצון בזני הרומרין

השפעת מועד הקציר על יבול CA (איור 8.א): הזן אורנית היה בעל יבול CA גדול באופן מובהק משאר הזנים בחודשים אוגוסט 2006 ואפריל 2007, והגיע ל-67.5 גרם למ"ר CA בחודש אוקטובר. בחודשים ינואר ומרץ יבול CA בזן אורנית ירד ל-54.3 גרם למ"ר ו-45.2 גרם למ"ר, בהתאמה. הזנים ישראל וסטאר היו בעלי יבול CA דומה לאורך כל הניסוי. הזן ישראל הגיע ליבול שיא CA של 52.2 גרם למ"ר בקציר אפריל 2007. הזן סטאר הגיע ליבול הגבוה ביותר בקצירים מרץ-אפריל 2007 של כ-47 גרם למ"ר. הזן זקוף היה בעל יבול CA הנמוך מבין הזנים ברוב הקצירים ובאפריל 2007 עמד על 40 גרם למ"ר בלבד.



איור 8: השפעת מועד הקציר על יבול CA, CAR & RA.

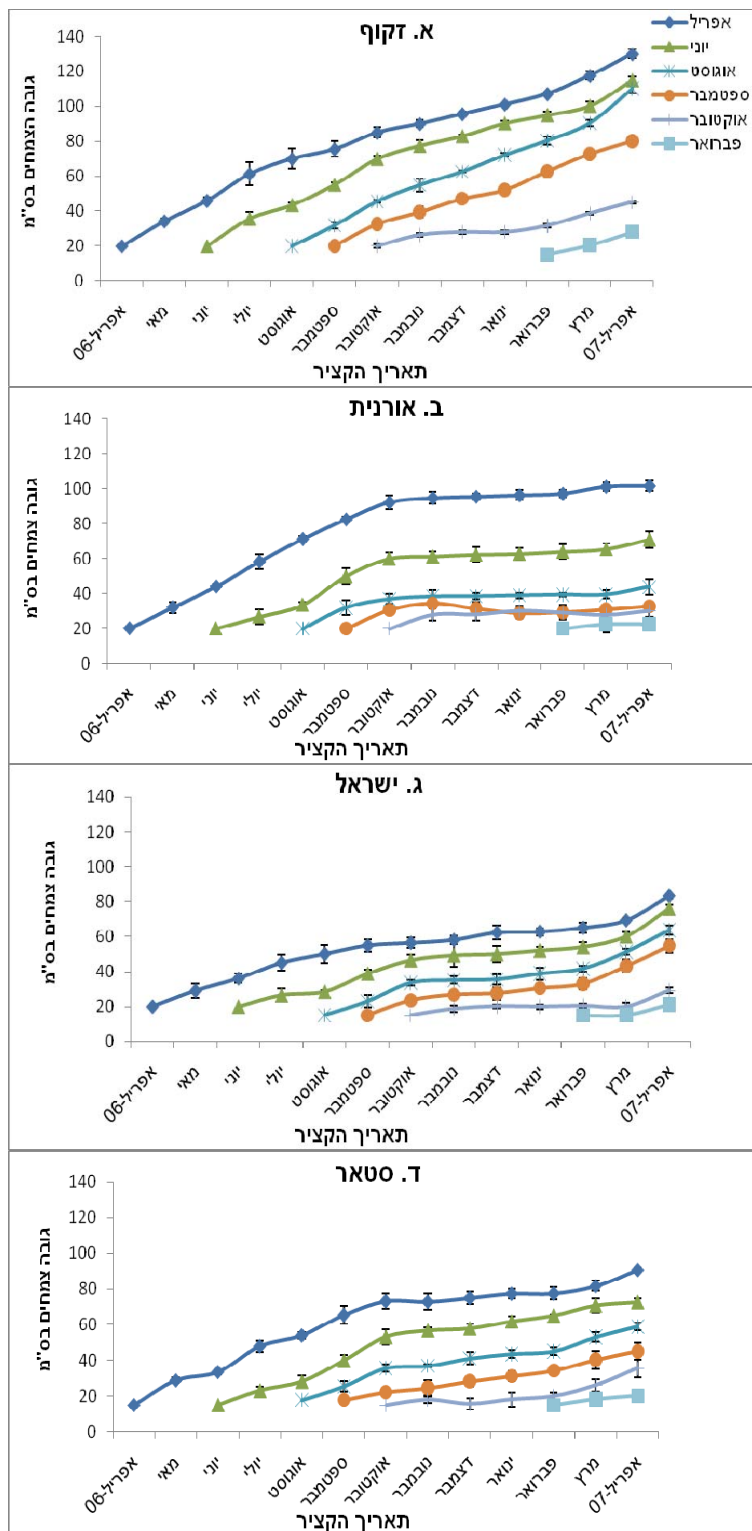
השפעת מועד הקציר על יבול CAR (איור 8.ב): הזן אורנית היה בעל יבול CAR הגבוה ביותר מבין הזנים באופן מובהק החל מקציר אוגוסט ועד אפריל 2007. בקציר ינואר זן אורנית הגיע ליבול שיא של CAR ועמד על 30 גרם למ"ר. בזנים ישראל וסטאר לא חל שינוי משמעותי ביבול

CAR בכל הקצירים שבוצעו. זן ישראל הגיע ליבול שיא של 13 גרם למ"ר בקציר מרץ. זן סטאר הגיע ליבול שיא של 10 גרם למ"ר בקצירים פברואר- אפריל 2007. זן זקוף היה בעל יבול CAR הנמוך ביותר מבין הזנים והגיע לשיא של 9 גרם למ"ר בקציר מרץ.

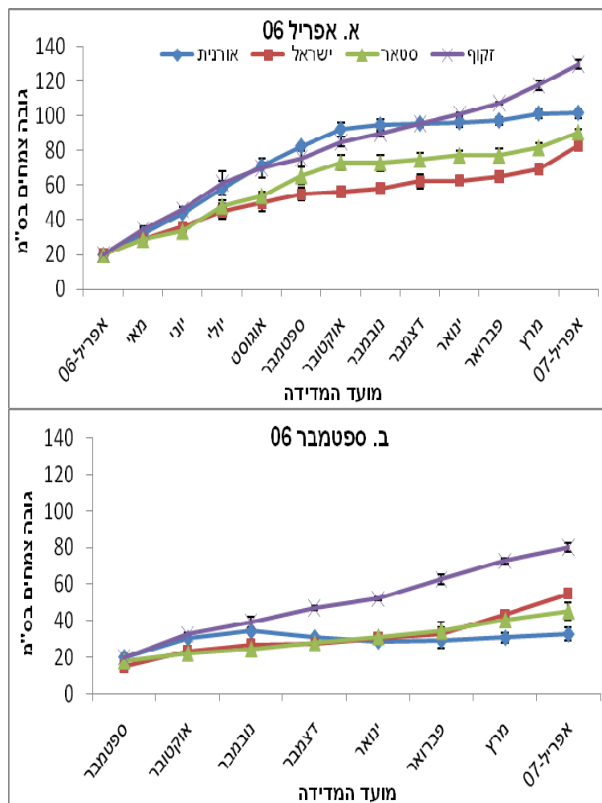
השפעת מועד הקציר על יבול RA (איור 8.8): הזן אורנית היה בעל יבול RA גבוה באופן מובהק בהשוואה לזנים האחרים החל מקציר דצמבר ועד מרץ. בקצירים דצמבר-פברואר זן אורנית הגיע ליבול של כ-40 גרם למ"ר, שהוא יבול כפול משאר הזנים הנבחנים. הזנים ישראל, סטאר וזקוף הראו מגמה דומה של יבול RA במשך השנה. זנים ישראל וסטאר הגיעו ליבול שיא של 25 גרם למ"ר בקציר מרץ. זן זקוף הגיע ליבול שיא של 27 גרם למ"ר בקציר אפריל 2007.

3.1.5 התחדשות הרוזמרין לאחר הקציר

על מנת ללמוד את השפעת מועד הקציר על קצב ההתחדשות של כל אחד מהזנים, בוצע מעקב אחר גובה החלקות שנקצרו במועדים השונים. מניתוח עקומות הגדילה המוצגות באיור 9 ניתן ללמוד כי באופן כללי קצב הגידול בזנים השונים מושפע ממועד הקציר. בזנים אורנית, ישראל וסטאר נצפתה האטה משמעותית בקצב הגידול (המתבטא בשיפוע הגרף) בחודשי החורף, בעוד שהזן זקוף המשיך לגדול בקצב כמעט אחיד לאורך כל השנה (איור 9). הבדל זה בין הזנים מתבטא גם בגובה הצמחים המקסמלי אליו הגיע כל זן. כך לדוגמה בחלקות שנקצרו באפריל 2006 והתחדשו במשך שנה שלמה הגיעו צמחי הזן זקוף לגובה של כ-130 ס"מ, בעוד שהזן אורנית הגיע לגובה של כ-105 ס"מ, והזנים ישראל וסטאר הגיעו לגובה של כ-90 ס"מ (איורים 9 ו-10). ע"פ עקומות הגדילה של הזנים השונים ניתן לראות כי לצמחים מהזן אורנית ישראל וסטאר אשר נקצרו בחודשי האביב והקיץ היה קצב גידול אחיד עד חודש אוקטובר ולאחר מכן גדילתם כמעט ונעצרה. לעומת זאת חלקות הזן זקוף אשר נקצרו במועדים אלו המשיכו לגדול בקצב אחיד גם בחודשי החורף (איור 9). יש לציין שהזן זקוף בורר לצורך הספקתו כתבלין טרי גם בחודשי החורף. המסקנה עיקרית מהתצפית הזו הינה שלאחר קציר של הזנים אורנית, ישראל וסטאר לאחר יולי-אוגוסט קצב הגידול איטי עד חודש מרץ, דבר המתבטא בשיפוע מתון יותר של עקום הגדילה בהשוואה לזה של הצמחים שהתחדשו לאחר קצירים מוקדמים יותר (איור 10.ב). לעומתם הזן זקוף אשר נקצר מאוחר, אפילו בספטמבר המשיך לגדול בקצב משביע רצון בחודשי החורף. מכאן שניתן לקצור את הזן הזה במועד מאוחר יותר משאר הזנים, דבר המאפשר לבצע שני קצירים במהלך השנה ובכך להגדיל את היבול (איורים 9 ו-10.ב). ממצא מעניין נוסף העולה מן התוצאות (איור 9) הינו כי התאוששות הזנים זקוף, ישראל וסטאר לאחר חודשי החורף מתחילה בחודשי מרץ-אפריל, דבר המתבטא בשינוי שיפוע הגרף בזנים אלו. לעומת זאת, הזן אורנית אינו מראה התאוששות בקצב הגדילה בחודשים אלו (איורים 9 ו-10).



איור 9: השפעת מועד הקציר על קצב התחדשות רוזמרין בשדה מסחרי באורים. כל השטח נקצר לראשונה באפריל 2006 ולאחר מכן נקצרו בו חלקות בנות 2 מ"ר בכל חודש. הנתונים המוצגים הם השינויים בגובה הצמחים לאחר כל מועד קציר.



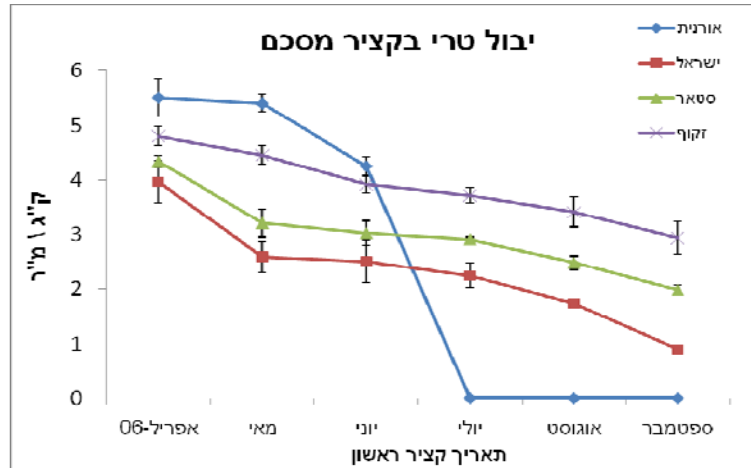
איור 10 : השוואת גובה הצמחים של הזנים הנבדקים. א. גובה הצמחים בחלקה שנקצרה באפריל 2006. ב. גובה הצמחים בחלקה שנקצרה בספטמבר 2006.

לסיכום: ניתן לראות כי קיימים הבדלים בין הזנים השונים בקצב ההתחדשות לאחר הקצירים. הזנים אורנית, ישראל וסטאר שנקצרו לאחר חודש אוקטובר לא התחדשו, וכמה מהחלקות שנקצרו אף מתו, כנראה כתוצאה מהקור ששרר באזור. בנוסף לכך צמחים מזנים אלו שנקצרו מאוקטובר ואילך היו בעלי גבעולים מעוצים, דבר שגרם להאטה בקצב ההתחדשות. לעומת זאת, הזן זקוף הראה עמידות יחסית לתנאי הסביבה השוררים בחורף והמשיך בקצב צמיחה סביר בחודשים אלו.

3.2 קציר שני של החלקות לאחר התחדשות

בקציר המסכם בניסוי השדה באורים (07-4-30), נקצרו החלקות בהם הייתה התחדשות ונשקל היבול. בחלקות בהם לא הייתה התחדשות נלקחה דוגמא של כ-250 גרם. כל הדוגמאות יובשו בתנור ולאחר מכן נמדדו הפעילות נוגדת החמצון ותכולת הפנולים במיצויים הצמחיים, ותכולת נוגדי החמצון CA, CAR ו-RA.

3.2.1 יבול טרי של הזנים בקציר המסכם.

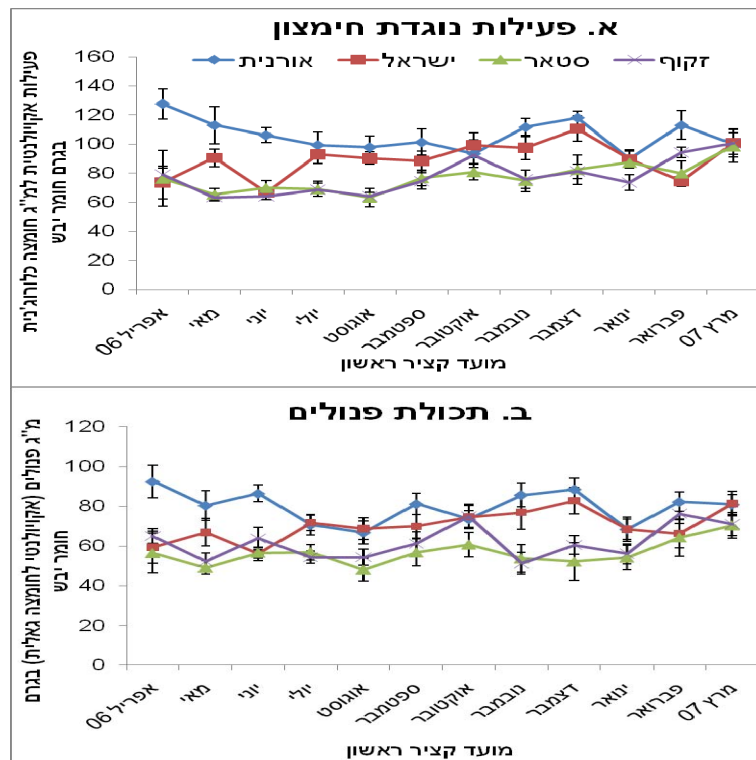


איור 11 : יבול טרי של הזנים בקציר מסכם באורים 30 באפריל 2007.

היבול הטרי בקציר המסכם (איור 11) : בחלקות של הזן אורנית שנקצרו לראשונה ביולי 2006 לא היתה כלל התחדשות והיבול היה אפסי (איור 10) למרות שגובה הצמחים שנמדד היה כ-30 ס"מ, מכיוון שצמחו ענפים מעטים בעלי עלים בודדים בחלקות אלו (איור 9). הזן אורנית הניב את היבול הרב ביותר באופן מובהק מבין הזנים שנקצרו לראשונה באפריל 06 ובמאי, כ-5.5 ק"ג למ"ר בשניהם. זאת למרות שהזן זקוף היה גבוה יותר מזן אורנית (איור 10), הזן אורנית היה בעל יבול טרי גדול יותר (איור 11).

3.2.2 פעילות נוגדי החמצון ותכולת הפנולים בזני הרוזמרין בקציר המסכם

פעילות נוגדת חמצון של מיצויי רוזמרין מהקציר המסכם (איור 12.א) : הזן אורנית היה בעל הפעילות הגבוהה ביותר בקציר המסכם בטיפול שנקצר לראשונה באפריל 2006, ברמה של 127 מ"ג אקוילנטי לחומצה כלורוג'ינית. פעילות זו ירדה בהדרגה עד ל-93.5 מ"ג אקוילנטי לחומצה כלורוג'ינית בטיפול אוקטובר 2006 (איור 12.א). לאחר מכן בטיפולים בהם בוצע הקציר הראשון בחודשים נובמבר-דצמבר נמדדה עליה בפעילות, ירידה בפעילות בטיפול ינואר 2007 ולאחריה שוב עליה (איור 12.א).

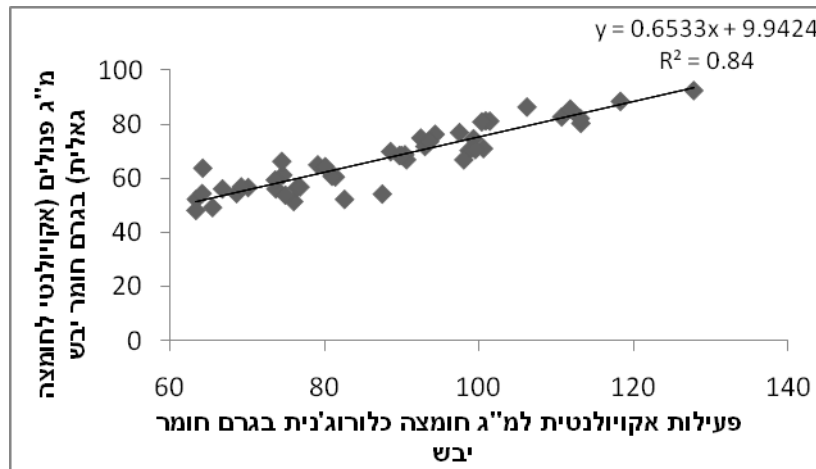


איור 12: השפעת הקציר המסכם על: א. פעילות נוגדת חמצון במיצויים (80% מתנול) של עלי רוזמרין. ב. תכולת פנולים במיצויים (80% מתנול) של עלי רוזמרין.

פעילות נוגדת חמצון במיצויים של הזן ישראל היתה גבוהה בטיפולים בהם נערך הקציר הראשון במהלך החודשים יולי- דצמבר 06, והגיעה לשיאה בטיפול דצמבר עם פעילות של 110 מ"ג אקוילנטי לחומצה כלורוג'נית, שהייתה גבוהה באופן מובהק מהזנים סטאר וזקוף. בטיפולים שנקצרו לראשונה בינואר-פברואר חלה ירידה בפעילות נוגדת החמצון לכ-74 מ"ג אקוילנטי לחומצה כלורוג'נית ועלתה שוב במרץ לכ-100 מ"ג אקוילנטי לחומצה כלורוג'נית (איור 12.א). פעילות נוגדת החמצון של הזנים סטאר וזקוף היתה דומה בטיפולי החודשים אפריל-אוגוסט 2006 ונעה סביב 70 מ"ג אקוילנטי לחומצה כלורוג'נית. בטיפולי החודשים ספטמבר-2006-פברואר 2007 הפעילות של זן סטאר הייתה כ-80 מ"ג אקוילנטי לחומצה כלורוג'נית (איור 12.א).

תכולת כלל הפנולים במיצויי רוזמרין בקציר המסכם (איור 12.ב): תכולת כלל הפנולים של זן אורנית בקציר המסכם היתה גבוהה יותר מזו של שאר הזנים הנבחנו בטיפולים שנקצרו לראשונה בחודשים אפריל-יוני 2006. לאחר מכן, בטיפולי יולי 2006, ירדה תכולת כלל הפנולים של הזן אורנית והייתה שווה לזו של הזן ישראל. תכולת הפנולים של שני זנים אלו עלתה בהדרגה בטיפולי אוגוסט עד דצמבר 2006. הזנים זקוף וסטאר היו בעלי תכולת פנולים נמוכה יחסית לזנים אורנית וישראל. תכולת כלל הפנולים של הזן סטאר לא השתנתה מהותית במהלך השנה, אך נצפתה עליה קלה בתכולת הפנולים בטיפולי החודשים ינואר-מרץ 07. הזן זקוף היה בעל תכולה נמוכה יחסית של כלל הפנולים ברוב מועדי הקציר, אך ניתן היה לראות עליה בתכולתם בטיפולים מאוגוסט עד אוקטובר 2006.

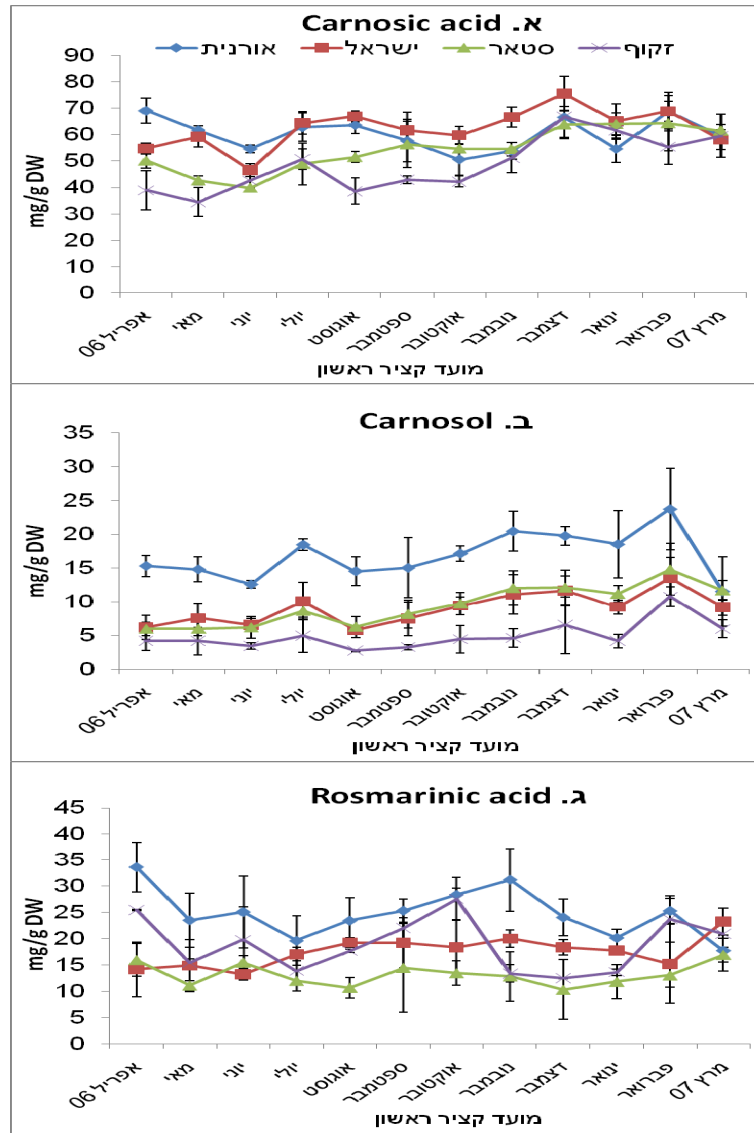
בהשוואת תכולת כלל הפנולים ופעילות נוגדת החמצון של הזנים הנבחנים (איור 12), ניתן לראות שקיים מתאם ביניהם. באיור 13 ניתן לראות מתאם חיובי במקדם של $R^2=0.84$ ($p<0.001$) בין תכולת כל הפנולים ופעילות נוגדת החמצון של הזנים הנבחנים.



איור 13 : מתאם בין תכולת הפנולים לפעילות נוגדת החמצון בזנים הנבחנים בקציר המסכם

3.2.3 תכולת CA, CAR ו-RA בקציר המסכם

השפעת מועד הקציר הראשון על תכולת CA (איור 14.א): תכולת CA בזן אורנית ובזן ישראל השתנתה בצורה דומה בכל הטיפולים. בזן ישראל תכולת CA הייתה הגבוהה ביותר מבין כל הזנים בטיפולים שנקצרו לראשונה מיולי 2006 ועד דצמבר 2006. תכולת CA בזן סטאר עלתה בהדרגה מ-39.9 mg/g DW בטיפול קציר ראשון ביוני 2006 עד ל-63.8 mg/g DW בדצמבר 2006, ונשארה ברמה זו עד טיפול קציר ראשון במרץ 2007. הזן זקוף היה בעל תכולת CA הנמוכה ביותר מבין הזנים מטיפולי אוגוסט עד ספטמבר 2006, לאחר מכן, מנובמבר 2006-מרץ 2007, עלתה תכולת CA לרמה שהיתה בזנים סטאר ואורנית.

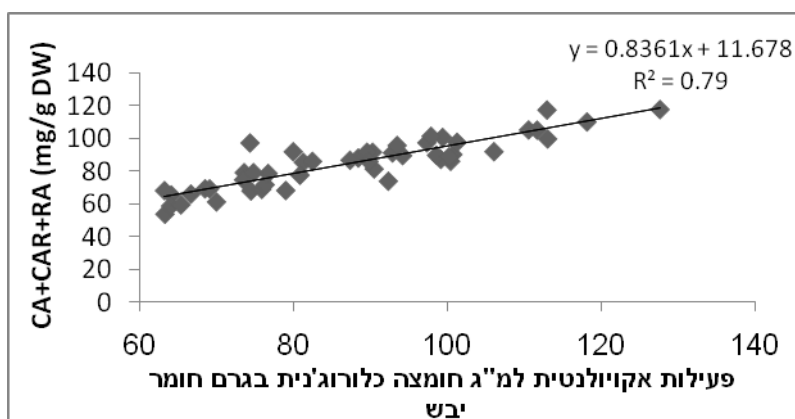


איור 14 : תכולת CA, CAR & RA בעלים יבשים של זני רוזמרין בקציר מסכם.

השפעת מועד הקציר הראשון על תכולת CAR (איור 14.ב): הזן אורנית היה בעל תכולת CAR הגבוהה ביותר מבין כל הזנים הנבחנים. הזן ישראל וסטאר היו בעלי תכולת CAR דומה בכל הטיפולים. בזנים אורנית, ישראל וסטאר הייתה מגמת עליה בתכולת CAR בטיפולים בהם הקציר הראשון היה מאוגוסט עד דצמבר 2006. הזן זקוף היה בעל תכולת CAR הנמוכה ביותר מבין הזנים בכל הטיפולים.

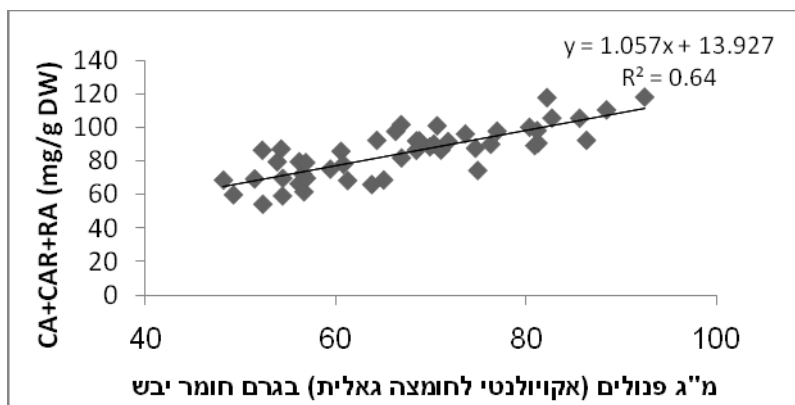
השפעת מועד הקציר הראשון על תכולת RA (איור 14.ג): זן אורנית היה בעל תכולת RA הגבוהה ביותר בכל הטיפולים. כאשר הקציר הראשון בוצע מיולי עד נובמבר 2006 הייתה עליה בתכולת RA בזן אורנית ובזן זקוף. בזנים ישראל וסטאר תכולת RA הייתה ללא שינויים גדולים בכל הטיפולים, כאשר בזן ישראל תכולת RA הייתה גדולה יותר מאשר בזן סטאר.

נמצא מתאם חיובי במקדם של $R^2=0.79$ ($p<0.001$) בין תכולת סך נוגדי החמצון הנבדקים לבין הפעילות נוגדת החמצון של המיצויים (איור 15). בין כל אחד מנוגדי החמצון (CA, CAR, או RA) לבין הפעילות נוגדת החימצון נמצא מתאם חיובי במקדם נמוך יותר: $CA-R^2=0.5$ ($p<0.001$) , $CA-R^2=0.4$ ($p<0.001$) ו- $RA-R^2=0.5$ ($p<0.001$).



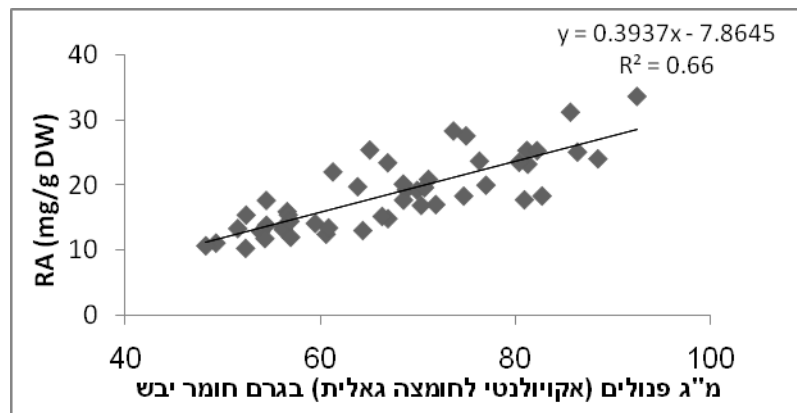
איור 15: מתאם בין תכולת נוגדי החמצון (CA+CAR+RA) לפעילות נוגדת החמצון של המיצויים בקציר המסכם.

בין תכולת נוגדי החמצון הכוללת לבין תכולת כלל הפנולים במיצוי התקבל מתאם חיובי במקדם של $R^2=0.64$ ($p<0.001$) (איור 16). מעניינת העובדה שמקדם המתאם במקרה זה היה נמוך יותר מהמתאם בין תכולת נוגדי החמצון לפעילות נוגדת החמצון (איור 15). סיבה אפשרית לכך היא הימצאות פנולים שאינם נוגדי חמצון במיצוי.



איור 16: מתאם בין תכולת נוגדי החמצון (CA+CAR+RA) לתכולת הפנולים של המיצויים בקציר המסכם.

נמצא מתאם חיובי במקדם של $R^2=0.66$ ($p<0.001$) בין תכולת RA לתכולת הפנולים במיצוי (איור 17). לעומת זאת בין תכולת CA ו-CAR לתכולת הפנולים נמצא מתאם חיובי מובהק של $R^2=0.23$ ($p<0.001$) ושל $R^2=0.4$ ($p<0.001$) בהתאמה (הנתונים אינם מוצגים).



איור 17: מתאם בין תכולת RA לבין תכולת כלל הפנולים של המיצויים בקציר המסכם.

3.3 בחינת השפעת טמפרטורה ואורך יום בתנאים מבוקרים, רחובות 2007

לאור תוצאות ניסוי השדה באורים הוחלט לבחון את תגובת זני הרוזמרין הנבחנים לתנאי סביבה מבוקרים בפיטוטרון, שבו גודלו הצמחים בארבעה משטרי טמפרטורה בשני אורכי יום.

3.3.1 השפעת הטמפרטורה ואורך היום על פעילות נוגדת החמצון ותכולת כלל הפנולים

ככלל, נצפתה מגמה של השפעה שלילית של העליה בטמפרטורת הסביבה על פעילות נוגדת החמצון ותכולת כלל הפנולים, אם כי היו הבדלים ברמת הרגישות של הזנים השונים.

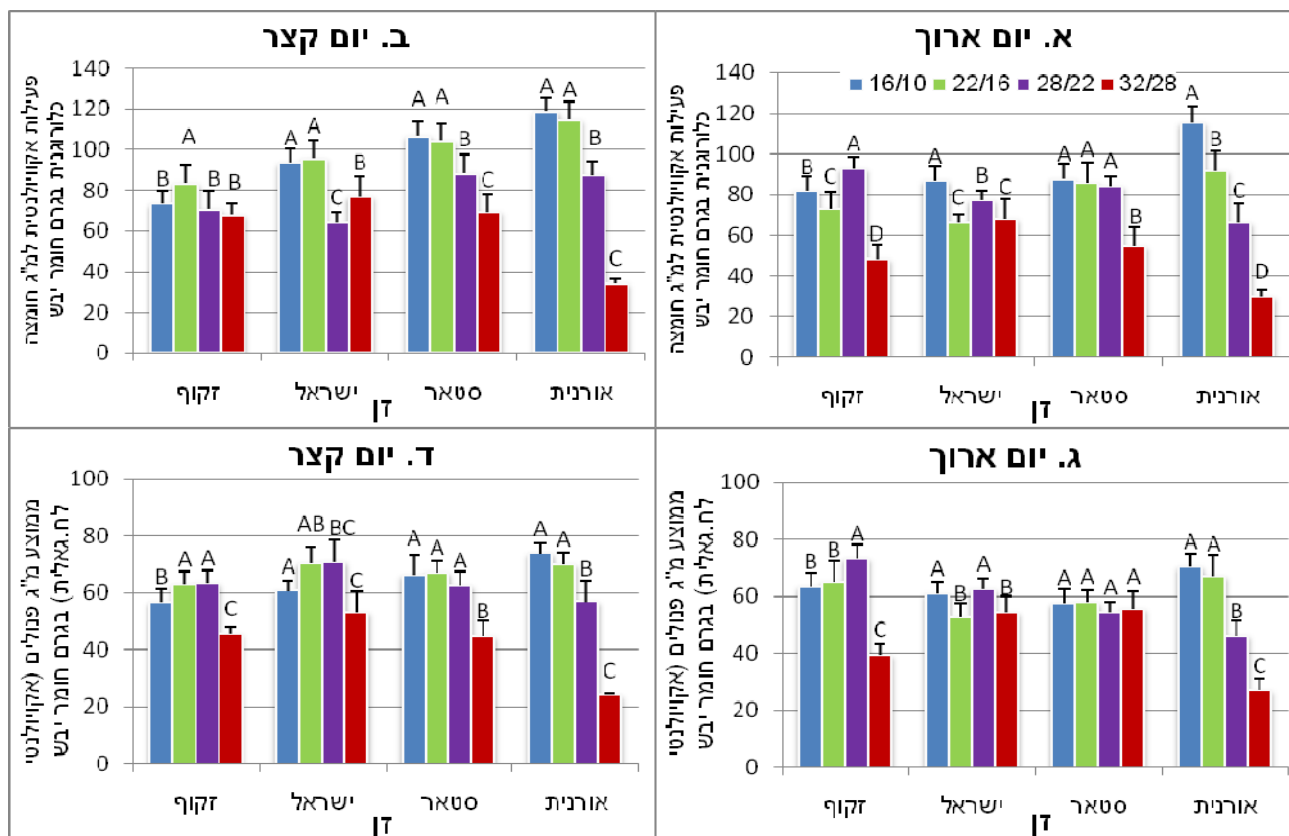
הזן אורנית היה הרגיש ביותר לעליית הטמפרטורה: במשטר היום הארוך, כאשר בחדר הקר ביותר (16/10) הוא היה בעל פעילות נוגדת החמצון הגבוהה ביותר בהשוואה לזנים האחרים, ועם העליה בטמפרטורה ירדה הפעילות בהדרגה, עד לרמה הנמוכה ביותר מבין כל הזנים בחדר החם ביותר (32/28) (איור 18.א). תגובת תכולת כלל הפנולים לטמפרטורה בזן אורנית היתה דומה במשטרי היום הארוך והקצר, כאשר בין החדרים 16/10 ו-22/16 לא היה הבדל מובהק, אך עם העליה בטמפרטורה היתה ירידה משמעותית (איור 18.ג.ד).

הזן סטאר היה פחות רגיש לעליה בטמפרטורה. לא היה הבדל מובהק בפעילות נוגדת החמצון במשטר היום הארוך בחדרים (16/10), (22/16) ו-(28/22), אך היתה ירידה משמעותית בפעילות בחדר החם ביותר (32/28) (איור 18.א).

במשטר היום הקצר לא היו הבדלים מובהקים בפעילות בחדרים (16/10) ו-(22/16) לעומת זאת בחדרים החמים יותר הירידה בפעילות היתה מובהקת (איור 14.ב). תכולת כלל הפנולים בזן סטאר לא הושפעה במשטר היום הארוך ולא היה הבדל מובהק בין החדרים השונים (איור 18.ג). במשטר היום הקצר לא היו הבדלים מובהקים בתכולת כלל הפנולים בחדרים (16/10), (22/16) ו-(28/22), אך היתה ירידה משמעותית בתכולת כלל הפנולים בחדר החם ביותר (איור 18.ד).

הזן ישראל בשונה משאר הזנים לא הושפע מהעליה בטמפרטורה. פעילות נוגדת החמצון במשטר היום הארוך היתה הגדולה ביותר בחדר הקר (16/10). בחדרים עם טמפרטורה של (22/16) ו- (32/28) היתה הפעילות הנמוכה ביותר (איור 18.א). במשטר יום קצר הפעילות הגבוהה ביותר היתה בחדרים (16/10) ו-(22/16) והנמוכה ביותר היתה בחדר (28/22) (איור 18.ב). תכולת כלל הפנולים במשטר היום הארוך היה גדול ביותר בחדרים (16/10) ו- (28/22) ונמוך בחדרים (22/16) ו-(32/28) (איור 18.ג).

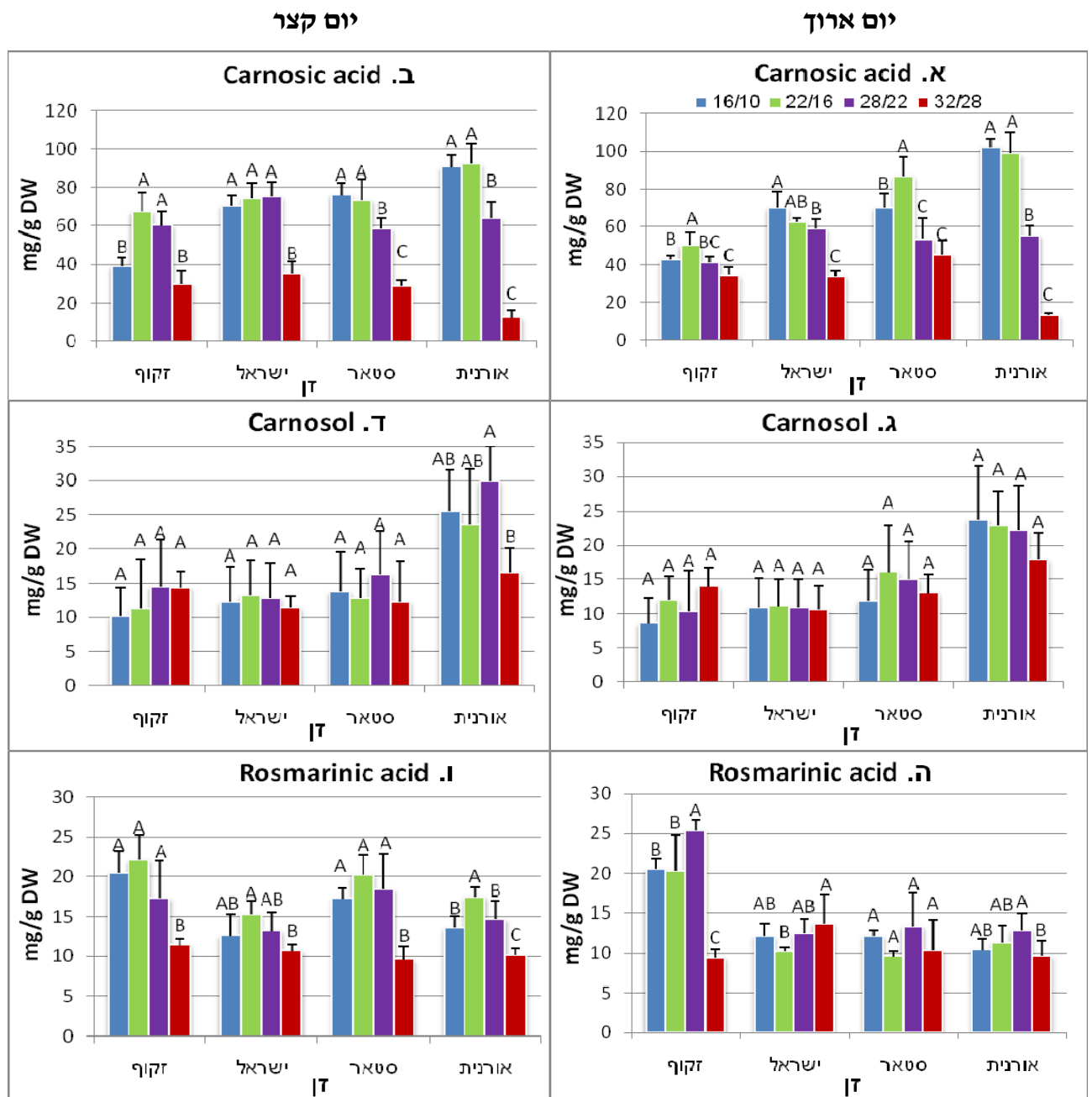
הזן זקוף הראה במשטר היום הארוך פעילות נוגדת החימצון הגבוהה ביותר בחדר (28/22) והפעילות הנמוכה ביותר בחדר החם ביותר (32/28) (איור 18.א). במשטר היום הקצר לא היה הבדל מובהק בפעילות בחדרים (16/10), (28/22) ו-(32/28), לעומת זאת בחדר (22/16) היתה פעילות הגבוהה ביותר (איור 18.ב). תכולת כלל הפנולים בטיפול יום ארוך היתה הגדולה ביותר בחדר (28/22) והנמוכה ביותר בחדר (32/28) (איור 18.ג) ובטיפול היום הקצר היתה מגמה דומה (איור 18.ד).



איור 18 : השפעת הטמפרטורה במעלות צלזיוס (לילה/יום) ואורך היום על פעילות נוגדת חמצון (א-ב) ותכולת הפנולים (ג-ד) של הזנים השונים. בוצע מבחן t בכל זן בין הטמפרטורות בחדרים (p<0.05).

3.3.2 השפעת הטמפרטורה ואורך היום על תכולת CA, CAR ו-RA

השפעת הטמפרטורה ואורך היום על תכולת CA: תכולת CA בזן אורנית הושפעה מהטמפרטורה בשני משטרי אורך היום בצורה דומה. בשניהם תכולת CA הגבוהה ביותר היתה בחדרים (16/10) ו-(22/16). ועם העליה בטמפרטורה ירדה תכולת CA באופן משמעותי כאשר בחדר החם (32/28) היתה התכולה הנמוכה ביותר. ולא היה הבדל בתכולת CA בין טיפולי אורך היום (איור 19 א.ב). במשטר היום הארוך הזן סטאר היה בעל תכולת CA הגדולה ביותר בחדר (22/16), ובעל תכולה נמוכה ביותר בחדרים (28/22) ו-(32/28) (איור 19 א). במשטר היום הקצר תכולת CA הגדולה ביותר היתה בחדרים (16/10) ו-(22/16). עם עליה בטמפרטורה ירדה תכולת CA באופן מובהק (איור 19 ב).



איור 19: השפעת הטמפרטורה במעלות צלזיוס (לילה/יום) ואורך היום על תכולת Carnosic acid (א-ב), Carnosol (ג-ד) ו-Rosmarinic acid (ו-ה) בזני רוזמרין. בוצע מבחן t בכל זן בין הטמפרטורות בחדרים ($p < 0.05$).

זן ישראל הראה תגובה מתונה יותר להשפעת הטמפי' על תכולת CA. במשטר היום הארוך היתה ירידה מובהקת בתכולת CA עם עליה בטמפרטורה (איור 19.א). לעומת זאת במשטר היום הקצר לא היה הבדל מובהק בתכולת CA בחדרים (16/10), (22/16) ו-(28/22) ורק בחדר (32/28) היתה ירידה משמעותית בתכולת CA (איור 19.ב).

תכולת CA בזן זקוף במשטר היום הארוך הושפעה פחות מהטמפרטורה, לעומת משטר היום הקצר, שבו הצמחים שגדלו בחדרים (22/16) ו-(28/22) היו בעלי תכולת CA גדולה יותר מאשר החדרים עם הטמפרטורות הקיצוניות (16/10) ו-(32/28) (איור 19.א-ב).

השפעת הטמפ' ואורך היום על תכולת CAR: תכולת CAR בזנים השונים נשארת קבועה ולא היה הבדל מובהק בין החדרים. לא נמצא הבדל ברור בין משטרי אורך היום. יוצא דופן היה זן אורנית במשטר היום הארוך שבו תכולת CAR בחדר (28/22) היתה גדולה באופן מובהק מחדר (32/28) (איור 19.ג-ד).

השפעת הטמפ' ואורך היום על תכולת RA: בתכולת RA במשטר היום הארוך בזן אורנית היה הבדל מובהק בין החדרים (28/22) ו-(32/28). בזן סטאר לא היה הבדל מובהק בין החדרים. בזן ישראל תכולת RA בחדר (32/28) היתה גדולה באופן מובהק מחדר (22/16). הזן זקוף היה בעל תכולת RA הגבוהה ביותר בחדרים (16/10), (22/16) ו-(28/22) (איור 19.ה) מבין הזנים שנבדקו. תכולת RA בזן זקוף הושפעה באופן מובהק מהטמפרטורה בחדר (32/28) והיתה הנמוכה ביותר בין החדרים במשטרהיום הארוך (איור 19.ה).

במשטר היום הקצר בזן אורנית תכולת RA יוצרת עקומת אופטימום, כאשר בחדר (22\16) התקבלה תכולת RA הגבוהה ביותר ובחדר (32/28) הנמוכה ביותר (איור 19.ו). תכולת RA בזן סטאר לא היתה שונה באופן מובהק בחדרים (16/10), (22/16) ו-(28/22) אך ירדה באופן מובהק בחדר (32/28), מגמה דומה נצפתה גם בזן זקוף (איור 19.ו).

3.3.3 השפעת טמפרטורה ואורך יום על התארכות הענף הראשי בזני רוזמרין

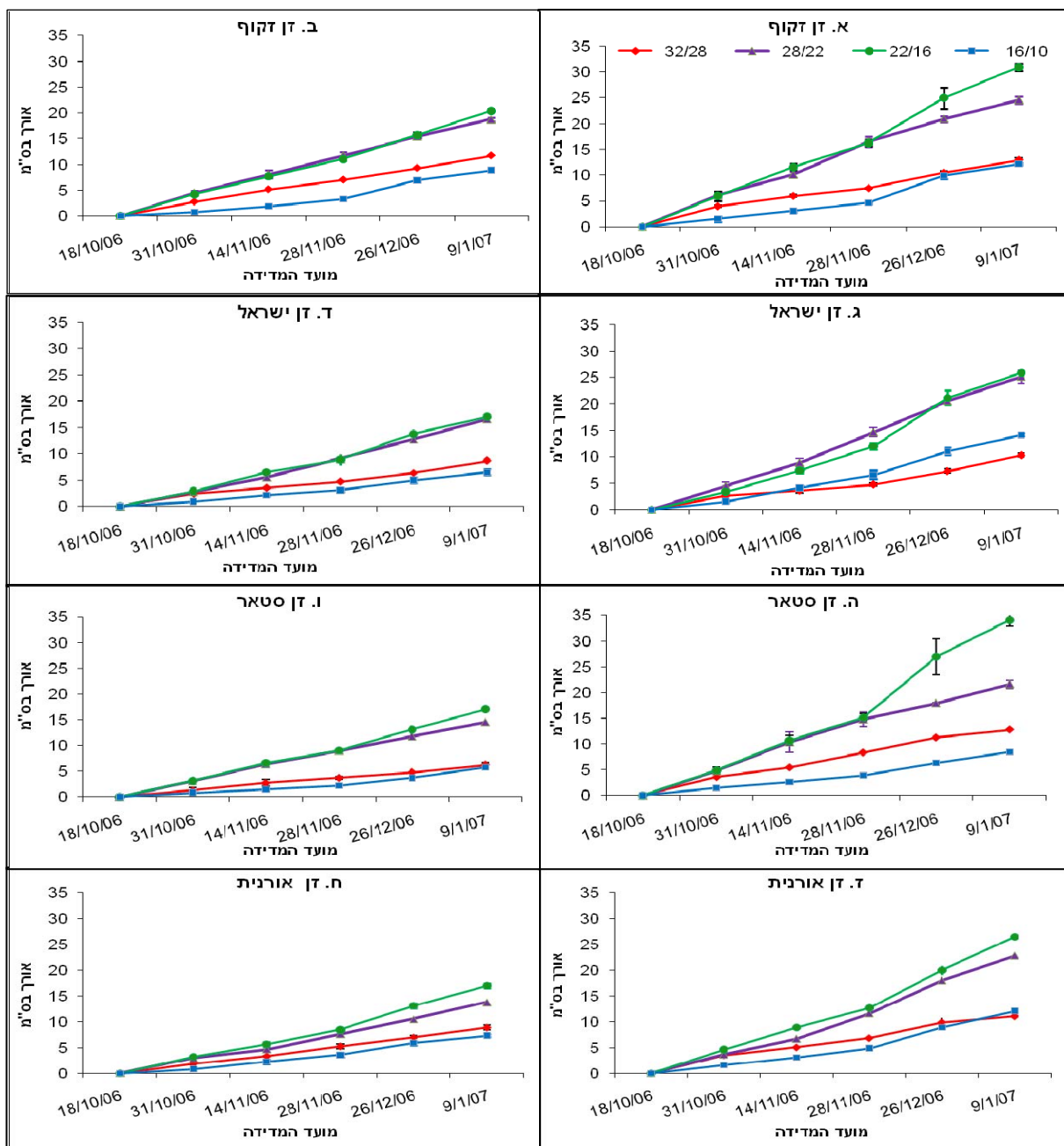
במהלך שהיית הצמחים בפיטורון בוצע מעקב אחר גדילת הענף הראשי במשך 131 ימי גידול בכל הטיפולים (איור 20).

ניתן לראות שהענף הראשי של הצמחים במשטר היום הארוך (איור 20 : א,ג,ה,ז) בכל החדרים היה ארוך יותר מזה של הצמחים במשטר היום הקצר (איור 20 : ב,ד,ו,ח).

מהתבוננות בגרפים באיור 20, ניתן לראות שהענף הראשי של כל הזנים התארך בקצב מרבי בחדרים עם הטמפרטורות (28\22) ו-(22\16), עם עדיפות קלה לחדר עם הטמפרטורה (22\16) מ"צ לילה/יום) (איור 20). הענף הראשי של כל הזנים כמעט ולא התארך בחדרים עם הטמפרטורות הקיצוניות (32\28) ו-(16\10) (איור 20), אם כי נראה שהזן סטאר בטיפול יום ארוך (32\28) התארך ב-12.7 ס"מ לאחר 131 ימי גדילה, שהיא ההתארכות המירבית שנצפתה בקרב הזנים השונים (איור 20.ה).

יום קצר

יום ארוך

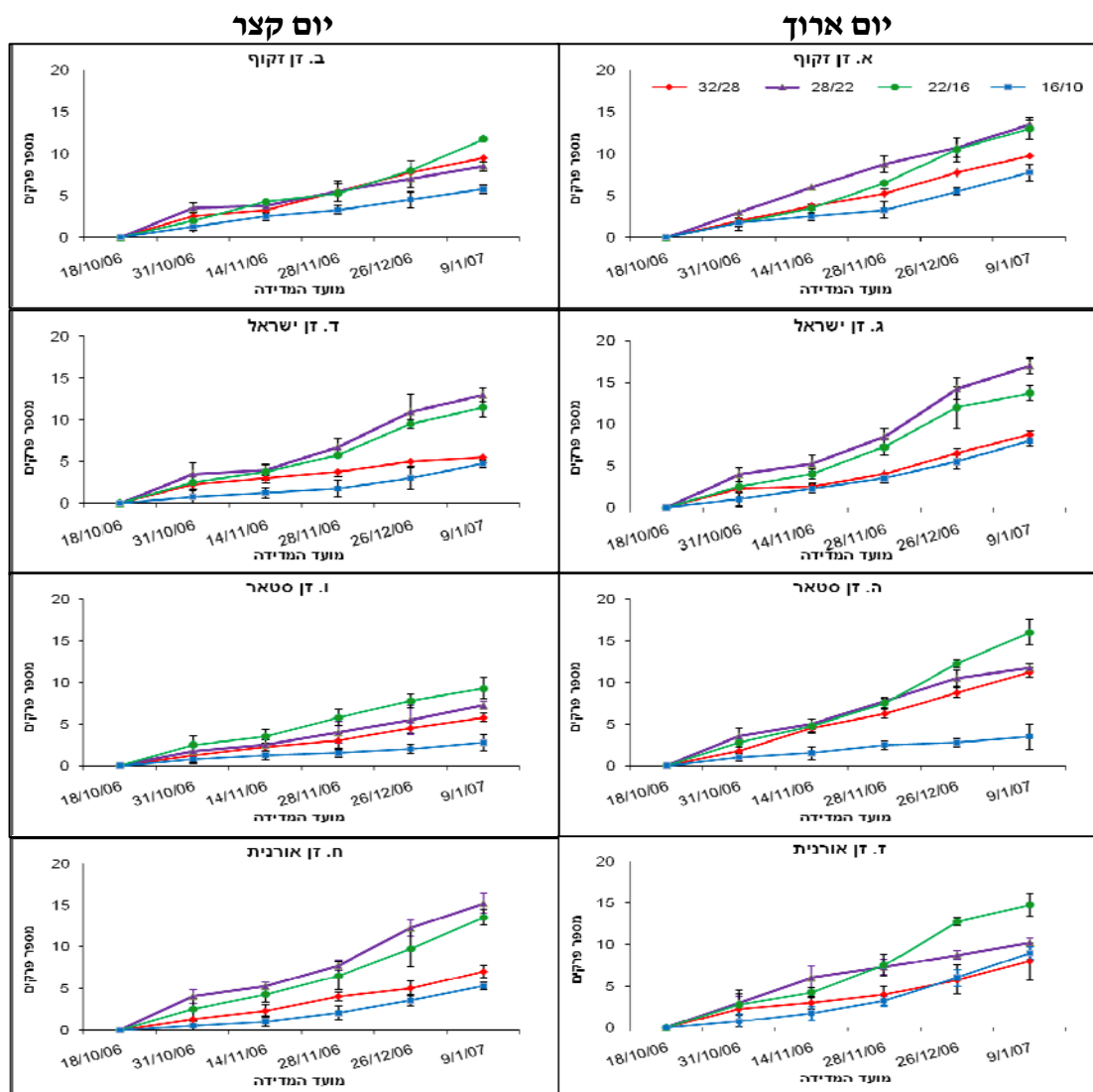


איור 20: השפעת הטמפרטורה במעלות צלזיוס (לילה/יום) ואורך היום על התארכות של ענף ראשי בארבעת זני רוזמרין. הערכים מבטאים תוספת לאורך הענף ההתחלתי מיום 18-10-06

הענף הראשי של הזן סטאר ביום ארוך (22\16) התארך ב-34 ס"מ שהיא ההתארכות המירבית שנצפתה בקרב הזנים השונים בתנאים אלה (איור 16.ה).
נראה שבזני הרוזמרין שנבדקו שילוב טמפרטורות קרירות עם משטר יום ארוך הוא אופטימלי לצמיחה ווגטיבית.

3.3.4 השפעת טמפרטורה ואורך יום על תוספת הפרקים בענף הראשי של זני רוזמרין

נצפו הבדלים במספר הפרקים שהתווספו בזנים הנבחנים. במשטר היום הארוך הייתה תוספת פרקים גדולה יותר בזנים זקוף, ישראל וסטאר מאשר בטיפול יום קצר (איור 21). יוצא דופן היה הזן אורנית שלא הראה הבדלים בתוספת מספר הפרקים בין טיפול ארוך היום.



איור 21: השפעת הטמפרטורה במעלות צלזיוס (לילה/יום) ואורך היום על תוספת הפרקים של הענף הראשי בארבעת זני רוזמרין. הערכים מייצגים תוספת פרקים מיום 18-10-06.

פרט לחדר (22\28) שבו התווספו במשטר היום הקצר יותר פרקים בהשוואה ליום הארוך (איור 21 ז, ח). תוספת הפרקים הקטנה ביותר מבין כל החדרים נמצאה בחדר הקר ביותר (10\16) הן בטיפול יום קצר והן בטיפול יום ארוך (איור 21). בהתאמה למגמה שנצפתה באיור 20, שם ההתארכות הגדולה ביותר הייתה בחדרים שבהם שררו הטמפרטורות (16\22) ו-(22\28), באותם החדרים הייתה גם התוספת הגדולה ביותר של פרקים (איור 21).

4 דיון ומסקנות

גידול צמח הרוזמרין משמש כיום בעיקר למטרת צריכה כתבלין- טרי או מיובש, וכן להפקת שמן אתרי שהוא בעל חשיבות כלכלית רבה בתעשיית המזון, הקוסמטיקה והרפואה האלטרנטיבית. לאור הנטייה הגוברת לצריכת מזון בריא וטבעי יותר, גוברת ההתעניינות, מצד תעשיות המזון והקוסמטיקה בתחליפים טבעיים לחומרים משמרים סינתטיים. מבין צמחי מאכל פוטנציאליים שנבחנו הרוזמרין נמצא כצמח מתאים להפקת מטבוליטים משניים, כגון CA, CAR ו-RA – פנולים אשר להם פעילות נוגדת חימצון גבוהה (Cuvelier et al., 1996; Wellwood and Cole, 2004; Yesil-Celiktas et al., 2007). בעבודתו של Etter (2004) נמצא שמוצרים שהוספו להם פנולים נוגדי חמצון היו בעלי חיי מדף ארוכים יותר כתוצאה מפעילות נוגדת החמצון הגבוהה של תרכובות אלו. לפיכך יש כיום ייצור נרחב בעולם של מוצרים על בסיס מיצוי רוזמרין המשווקים כתחליף לחומרים משמרים סינתטיים. עם זאת, המידע על הגידול החקלאי ופיתוח הזנים למטרה זו הוא דל. קיים צורך בפיתוח זני עלית של רוזמרין עתירי CA ו-RA- המהווים את התרכובות העיקריות האחראיות לפעילות נוגדת החמצון הגבוהה, ובהם מעוניינת תעשיית המזון והקוסמטיקה (Etter., 2004; Wellwood and Cole, 2004; Cuvelier et al., 1996; Yanishlieva et al., 2006; Luis and Johnson, 2005). עבודה זו בחנה את צמח הרוזמרין בייצור והפקת מיצוי נוגדי חמצון, ואת פוטנציאל שילובו כגידול חקלאי מסחרי למטרה זו. בנוסף לזיהוי ובחינת הזנים המצטיינים ביצירת כמות נוגדי חמצון גבוהה, נבחנה בעבודתי השתנות רכיבי היבול ותכולת נוגדי החמצון בזני הרוזמרין השונים לאורך עונת השנה ובהשפעת מועדי הקציר, וכן נבדקו לעומק השפעת גורמי הסביבה והגורמים ההתפתחותיים של הצמח על היבול ואיכותו.

4.1 שינויים בתכולת נוגדי החימצון במהלך השנה בשדה הפתוח

ניסוי זה בוצע בשדה מסחרי חלוץ של זנים שבוררו במיוחד לצורך גידול להפקת אנטיאוקסידנטים בהשוואה לזן המשמש לגידול כתבלין טרי בישראל ("זקוף"). המעקב נמשך כשנה ובמהלכו נמדדו השינויים בגובה הצמחים כמדד לקצב התפתחותם וכן רכיבי היבול הרלוונטיים למטרה הזו: יבול העלים היבשים, תכולת CA, CAR ו-RA. המסקנה העיקרית הינה שלעיתוי נכון של קציר הצמח יש השפעה מכרעת על הצלחת הרוזמרין כגידול חקלאי לצורך הפקת נוגדי חמצון. כמו כן נמצאה השפעה משמעותית של הגורם הגנטי שהתבטא בהבדלים בין הזנים ברכיבי היבול ובתגובתם לעונת השנה. הזן אורנית היה בעל רכיבי יבול (יבול טרי, יבש ויבול עלים יבשים) הגדולים ביותר, בצורה מובהקת, משאר הזנים הנבחנים. בספרות דווח על שונות גבוהה בצבירת ביומסה, בין פרטים שונים של רוזמרין באוכלוסייה טבעית (Martinez-Fernandez et al., 1994). בנוסף, דווח שקיימת שונות גנטית רבה בתכולת נוגדי החמצון וכן בתכולת CA בעלי הרוזמרין והיא נעה בין 1-50 mg/g DW בקוים גנטיים שונים (Luis et al., 2007; Munne-Bosch et al., 2000; Wellwood and Cole, 2004; Yesil-Celiktas et al., 2007; Hidalgo et al., 1998). ידוע כי תנאי השקיה וקרינת שמש גבוהה, מעודדים יצירה מוגברת של CA ברוזמרין (Munne Bosch)

(Luis et al., 2007; Hidalgo et al., 1998; et al., 2000). תופעה דומה לזו נמצאה גם במרווח ומליסה (Munne-Bosch et al., 2003). במדידת תכולת נוגדי החמצון לאורך השנה, נמצא שקיימת שונות בין הזנים: לזן אורנית היתה תכולה גבוהה של CA לאורך מרבית השנה, וירידה בחודשי החורף. לעומת זאת בזנים ישראל וסטאר נצפתה עליה לתכולה מכסימלית של CA בתחילת הקיץ, כאשר ביולי חלה ירידה לרמה שנשארה קבועה עד אפריל. בכל הזנים שנבחנו נצפתה עליה בתכולת CA בקציר אפריל, עם ההתחממות במזג האוויר.

מבחינת השינוי בתכולת CAR לעומת CA ניתן לראות כי בזן אורנית חלה עליה ב-CAR בחודשי החורף בד בבד עם ירידה ב-CA. עלייה זו נובעת ככל הנראה, כתוצאה מהפעילות נוגדת החמצון של CA והפיכתו כתוצאה מכך ל-CAR (Munne-Bosch and Munne-Bosch et al., 1999; Munne-Bosch, 2000). בספרות קיימים דיווחים סותרים לגבי השתנות תכולת CA לאורך השנה. חוקרים מספרד דיווחו שתכולת CA ברוזמרין, שהושקה סדיר, עלתה בהדרגה במהלך האביב עד לשיא בחודשי הקיץ, וירדה בצורה חדה בספטמבר (Hidalgo et al., 1998). בעבודה אחרת מספרד נמצא שבצמחים שגודלו בתנאי בעל ריכוזי ה-CA ו-CAR היו גבוהים יותר דווקא בין אוקטובר לפברואר והירידה בריכוזם חלה ממאי ועד סוף אוגוסט (Munne-Bosch et al., 2000). החוקרים Luis and Johnson (2005) הציגו תוצאות דומות: זן שגודל בדרום אנגליה, בתנאי בעל, הניב תכולה גבוהה של CA בחודשי החורף אך בחודשי הקיץ נמדדה ירידה של 50%. במחקר נוסף דגמו החוקרים צמחי-בר, אשר נאספו מאזורים אקלימיים שונים, ובזמנים שונים. נמצא כי בכל האזורים תכולת ה-CA היתה הגבוהה ביותר בקציר ספטמבר ונמוכה ביותר בקציר מרץ. תכולת ה-CA הגבוהה ביותר נמדדה ברוזמרין שגדל באזור החם וכנראה מותאם טוב יותר לאקלים הזה (Yesil-Celiktas et al., 2007).

בעבודה הנוכחית נמצא ההבדל בולט בין הזנים בשינויים בתכולת RA לאורך השנה: בעוד שביתר הזנים נמדדה עליה ב-RA במהלך חודש יולי, ולאחריה חלה ירידה קלה בתכולה עד לקציר נובמבר. בזן אורנית תכולת ה-RA עלתה בכ-50% בדצמבר ונשארה ברמה זו עד מרץ. במאמר של Yesil-Celiktas וחבריו (2007), שצוטט לעיל, נמצא שבשניים מהאזורים שנדגמו, נמדדה עליה קבועה בתכולת RA במהלך הקיץ עד לשיא בספטמבר, ולאחריה ירידה בדצמבר עד למינימום במרץ. לעומת זאת בעבודה אחרת נמדדה עליה קטנה בתכולת ה-RA במהלך הקיץ עד למכסימום בספטמבר, וזו נותרה קבועה לאורך כל השנה (Luis and Johnson, 2005).

אחת הסיבות העיקריות לסתירה בדיווחים בעבודות השונות היא שמצב המים בעלים הוא אחד הגורמים העיקריים המשפיעים על תכולת נוגדי החמצון (Smirnoff, 1993; Pastori and Foyer, 2002; Xiong et al., 2002; Munne-Bosch et al., 1999, 2000; Munne-Bosch and Alegre, 2000, 2003). לפיכך, סביר להניח שהסיבה לשונות בתוצאות שהתקבלו בעבודות אלו נעוצה בהבדלים בתנאי הגידול של הצמחים שנבחנו - איסוף מהבר או בתנאי בעל, וכן לעובדה שהניסויים נערכו במקומות שונים מבחינה גיאוגרפית- בהם האקלים, הקרקע והזנים הנבחנים משתנים. מכאן נובעת חשיבותה של העבודה הנוכחית, שבדקת לראשונה את המדדים הללו בגידול רוזמרין בתנאים המאפיינים גידול שלחין בישראל.

אין ספק שיכול נוגדי החמצון ליחידת שטח, המחושב כמכפלת יכול העלים היבשים בריכוז החומר הפעיל בהם, הוא מדד חשוב ביותר בגידול רוזמרין למטרה הזו. בעבודתנו מצאנו כי הזן אורנית היה בעל יכול CA הגבוה ביותר, בצורה מובהקת, משאר הזנים בחודשים אוגוסט-פברואר. הזן אורנית גם הצטיין גם ביכול CAR גבוה. במהלך חודשים יוני עד אפריל נמדד יכול ה- CAR גבוה באופן מובהק מיתר הזנים והגיע לשיא של כ- 30 גרסומ"ר בחודש ינואר, בעוד ששאר הזנים לא הניבו יכול גדול מ-13 גרסומ"ר. בכל הזנים שנבחנו, נמדד יכול RA דומה עד לחודש נובמבר, אך במהלך החודשים נובמבר עד מרץ, הזן אורנית נמצא כבעל יכול ה-RA הגבוה ביותר מבין הזנים והגיע ליכול שיא של כ- 40 גרסומ"ר בדצמבר.

4.2 השפעת מועד הקציר על קצב ההתחדשות והיכול השנתי

לאחר הקציר בניסוי מועדי הקציר הנ"ל המשכנו לעקוב אחר קצב ההתחדשות. זאת כדי לבחון את השפעת מועד הקציר על כושר ההתחדשות של הצמח. ככלל, נמצאו הבדלים בקצב ההתחדשות בין הזנים השונים, וכן בהשפעת מועד הקציר. במעקב אחר השינויים בגובה הצמחים לאחר הקציר הזן זקוף נמצא כבעל קצב ההתחדשות המהיר ביותר מבין הזנים שנבחנו. הזן הזה טופח במקור כזן המשמש כתבלין יבש או טרי, ואחד ממאפייניו הוא קצב צימוח מהיר. זן אורנית היה בדרך כלל בעל קצב צימוח מהיר מזה של הזנים ישראל וסטאר בחלקות אשר נקצרו בחודשי הקיץ. בזנים אורנית, סטאר וישראל היתה ירידה בקצב הצימוח בחודשי החורף ללא קשר למועד הקציר. חלקות של הזנים הנבחנים אשר נקצרו במהלך החורף כמעט לא התחדשו וחלקן אף מת. סיבה אפשרית לכך היא שהצמחים התקשו להתאושש משילוב הלם הקציר, הטמפרטורות הנמוכות וקרירת שמש נמוכה. לפיכך כדאי להימנע מקציר חורפי, ולחילופין לשקול קציר גבוה יותר של החלקות כדי להימנע מקציר של ענפים מעוצים. זן אורנית היה בעל יכול טרי גדול בצורה מובהקת בחלקות שנקצרו לראשונה באפריל 06 משאר הזנים. לאור תוצאות קצב הצימוח, יכול הטרי ותכולת CA בעלים לאורך השנה כדאי לבצע קציר אחד בשנה של הזן אורנית כאשר המועד האופטימלי הוא אפריל

4.3 מתאם בין המדדים השונים

עבודות קודמות מצאו, שקיים מתאם חיובי ישר בין תכולת נוגדי החמצון CA, CAR ו-RA, לפעילות נוגדת החמצון הגבוהה של המיצויים. בנוסף, נמצא קשר ישיר בין תכולת הפנולים במיצוי, לפעילות נוגדת החמצון שלו (Luis and Johnson, 2005; Yesil-Celiktas et al., 2007; Dudai et al. 2009; Del Bano et al., 2003; Wellwood and Cole, 2004; Rice-Evans et al., 1997). התוצאות בעבודה זו תואמות לממצאים בספרות. באיור 13 ניתן לראות שקיים מתאם חיובי מובהק של 0.84 ($p < 0.001$) בין תכולת הפנולים לפעילות נוגדת החמצון של המיצוי. התוצאות המוצגות באיור 15 מראות כי התקבל מתאם חיובי מובהק של 0.79 ($p < 0.001$) בין פעילות נוגדת החמצון לתכולת סך נוגדי החמצון CA, CAR ו-RA במיצוי, בעוד שבכל אחד

מנוגדי החמצון בנפרד התקבל מתאם נמוך יותר אך עדיין חיובי. מאחר ובדיקת פעילות נוגדת החמצון של המיצוי היא פשוטה וזולה יותר מאנליזת HPLC ניתן להשתמש בה כבדיקה מהירה בסריקת זנים או פרטים שהתקבלו במהלך הטיפוח. כמו כן, התקבל מתאם חיובי של 0.66 ($p < 0.001$) בין תכולת RA לתכולת כלל הפנולים, בעוד המתאם שהתקבל עבור CA ו-CAR היה נמוך יותר. לפיכך, בדיקת כלל הפנולים אינה מתאימה כבדיקה מהירה לתכולת חומצה קרנוזית, אך יכולה לשמש בסריקה שמטרת איתור צמחים בעלי חומצה רוזמרנית, שיתרונה הוא בכך שהיא מסיסה יותר במים (Del Bano et al., 2003; Munne-Bosch and Alegre, 2001).

4.4 השפעת הטמפרטורה ואורך היום

גורמי הסביבה העיקריים המשתנים לאורך עונת השנה בישראל, בהנחה שההשקיה האינטנסיבית מקטינה מאוד את גורם המשקעים, הם הטמפרטורה ואורך היום. לפיכך ניסינו לבודד את גורמי הטמפרטורה ואורך היום וללמוד את השפעתם והשפעות הגומלין ביניהם על הצמיחה ותכולת נוגדי החמצון בזני רוזמרין שונים. ניתן לראות כי תכולת CA בזן אורנית הושפעה בצורה מובהקת מהטמפרטורה, כך שבחדרים הקרים יותר תכולת CA היתה בדרך כלל גבוהה ביותר בצורה מובהקת והגיעה לכ-100mg/g DW. לעומת זאת בחדרים החמים תכולת ה-CA ירדה בהדרגה עד למינימום של כ-13mg/g DW. יש לציין כי בזן אורנית לא היה הבדל מובהק בין טיפולי אורך היום. מאחר והטמפרטורה משפיעה על הפוטוסינטזה היא עלולה להשפיע גם על יצירת מטבוליטים משניים (Luis and Johnson, 2005; Lincoln and Langenheim, 2008; Dudai, 1978). דווח בספרות שצמחים יכולים להגביר יצירת רדיקלים חופשיים למטרת העברת סיגנלים בצמח (Sagi and Fluhr, 2006), ובכך לשלוט על תהליכי גדילה, התפתחות (Gapper and Dolan, 2006) וכתגובה לגורמים ביוטיים ואביוטיים (Van Breusegem and Dat, 2006). בנוסף עבודות קודמות הראו שתנאי עקת קור גרמו לעליה משמעותית בפעילות אנזימים ובכך גרמו לעליה משמעותית ביצירת פנולים בעלים (Solecka and Kacperka, 1995; Solecka et al., 1999). גם בזנים ישראל וסטאר ניכרה מגמה של תכולת CA גדולה יותר בחדרי הפיטורון הקרירים יותר אך לא בצורה בולטת כמו בזן אורנית. בעבודה שבדקה השתנות תכולת CA בשני זנים של רוזמרין אשר היו חשופים לעקת קור, נמצא שתכולת CA היתה גבוהה יותר ברוזמרין אשר שהה בתנאי קור בהשוואה לצמחי הביקורת (Luis and Johnson, 2005), ממצא אשר תואם את תוצאות עבודתי זו. בזן זקוף, לעומת זאת, תכולת CA הגבוהה ביותר בטיפולי היום הקצר היתה בחדרים (22/18, 28/22), ותכולת CA הנמוכה ביותר נמדדה בחדרי הטמפרטורות הקיצוניות (16/10, 32/28). התוצאות השונות בין הזנים מצביעות על השפעת הגורם הגנטי על תגובת הצמח (המתבטאת בתכולת נוגדי החימצון) לתנאי הסביבה. כפי שפורסם בעבודות קודמות לגבי הקשר בין יצירת מטבוליטים משניים לתנאי הסביבה (Penuelas and Llusia, 1997; Dudai, 2008). המגמה הכללית מצביעה על כך שבשני טיפולי אורך היום תכולת CA היתה נמוכה יחסית בחדר החם ביותר (32/28). תוצאה זו תואמת את המתואר בספרות שכאשר הצמח חשוף לטמפרטורה גבוהה,

לקרינה חזקה או לחות גבוהה תכולת CA יורדת ותכולת הנגזרות המחומצנות שלו עולות (Munne Bosch et al.,1999, 2003; Munne-Bosch and Alegre, 2000, 2001). מכאן שהיינו מצפים למצוא תכולת CAR, שהוא תוצר חימצון של CA (Munne-Bosch and Alegre, 2001), גבוהה ביותר בזן אורנית בחדר 32/28. התוצאות שהתקבלו לא תאמו את הציפיות, ויתכן שהסיבה לכך היא ש-CAR המשיך להתפרק לנגזרות מחומצנות אחרות (Munne-Bosch et al.,1999; Munne (Bosch and Alegre, 2000, 2003).

תכולת RA בזן אורנית לא הושפעה מהטמפרטורה באותו האופן שבו הושפעה תכולת ה-CA - ברוב הזנים לא היו הבדלים מובהקים בתכולת RA בין החדרים עם הטמפרטורות 16/10, 22/16 ו-28/22. עם זאת יש לציין כי בחלק מהזנים היתה ירידה מובהקת בתכולת RA בחדר החם ביותר. בטיפול יום ארוך הזן זקוף היה בעל תכולת RA הגבוהה ביותר מבין הזנים בחדרים 16/10, 22/16 ו-28/22, זאת בניגוד לממצאים שהתקבלו בניסוי השדה. הסבר אפשרי להבדלים אלו הוא כי ישנם גורמים נוספים אשר משפיעים על תכולת RA בעלים כדוגמת השלב המורפולוגי בו נמצא העלה (Del Bano et al., 2003).

כאשר מתבוננים על השפעת הטמפרטורה ואורך היום על התארכות הענף הראשי, ניתן לראות שההתארכות המכסימלית של הענף הראשי הייתה בחדרים 28/22 ו-22/16 (איור 20). הענף הראשי של זן אורנית היה ארוך ביותר בחדר 22/16 בטיפול יום ארוך, והיה גדול בצורה מובהקת מאותו החדר בטיפול יום קצר. בחדר הקר ביותר (16/10) הייתה התארכות הנמוכה ביותר של הענף הראשי בכל הזנים, ממצא אשר עולה בקנה אחד עם נתוני קצב הצמיחה שהתקבלו בניסוי בשדה לפיהם בחורף כמעט ולא נצפתה צמיחה.

5 סיכום

התוצאות של עבודתי מלמדות כי המרכיב הגנטי הוא המשפיע העיקרי על תכולת נוגדי החמצון בזנים השונים. בנוסף מצאתי כי ישנה השפעה של מועד הקציר על תכולת נוגדי החמצון ויכול העלים היבשים כך שקציר באביב הוא האפקטיבי ביותר. בהתאמה לממצאים קודמים מצאתי כי CA, CAR ו-RA הינם המשפיעים העיקריים על פעילות נוגדת החמצון של המיצויים. בעבודה זו זוהה הזן אורנית כזן מוביל למטרת מיצויים של חומרים פעילים לתעשיית המזון והקוסמטיקה. הזן אורנית היה בעל יכול עלים יבשים גבוה ועתיר CA - שילוב של שני פרמטרים המצביע על התאמתו לספק חומר גלם איכותי לאורך זמן למפעלים העוסקים במיצוי החומרים הפעילים. כיום כבר נשתלו מספר שדות מסחריים חדשים של הזן אורנית למטרת יצור עלים יבשים למיצוי החומרים הפעילים במפעלים מתאימים בחו"ל.

טל, פ. 1981. צמחי מרפא. הוצאת ספרים "רשפים" ע"מ 214

Aqel, M. B. (1991). Relaxant effect of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* on tracheal smooth muscle. *J. Ethnopharmacol.* 33, 57–62

Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loligers, J. (1992). Antioxidants and pro-oxidant properties of active Rosemary constituents: carnosol, and carnosic acid. *Xenobiotica.* 22, 257–268.

Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. (1996). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs. *Food Chem. Toxicol.* 34, 449–456.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50, 601–639.

Backleh, M., Leupold, G., Parlar, H. (2003). Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* 51(5), 1297–301.

Bicchi, C., Binello, A., Rubiolo, P. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochem. Anal.*, 11 (4): 236-242.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, 317–333.

Brieskorn, C. H., Domling, H. (1969) Carnosolsäure, der wichtige antioxidativ wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin- und Salbei-Blattes. *Z. Lebens. Unter. Fors.* 141, 10-16.

Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Sabater, F., Marin, F., Ortuno, A., Del Rio, J. A. (1997). Flavanone neohesperidosides distribution in *Citrus aurantium* stems. Evidence for a possible translocation process in relation with biosynthesis in leaves and fruits. *Phytochem.* 1, 77-84.

Chang, S. S., Ostric-Manjasevic, B., Hsieh, O. L., Huang, C. L. (1977). Natural antioxidants from Rosemary and sage. *J. Food Sci.* 42, 1102–1106.

Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and Rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 645–652.

Davies, K. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1–31.

De Cleene, M., Lejeune, M. C. (2003). Compendium of Symbolic and Ritual plants in Europe. *Man and Culture.* Ghent, Belgium.

- Del Bano, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Del Rio, J. A., Ortuno, A., Qurin, K. W., Gerard, D. (2003).** Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 4247–4253.
- Dias, P. C., Foglio, M. A., Possenti, A., De Carvalho, J. E. (2000).** Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Ethnopharmacol.* 69, 57–62.
- Dimayuga, R. E., Keer Garcia, S., Per Halfdan, N., Christophersen, C. J. (1991).** Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico). III. Carnosol: A diterpene antibiotic form *Lepechinia hastata*. *J. Ethnopharmacol.* 31, 43-48.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M. J. (2003).** Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food. Chem.* 83, 255–262.
- Dudai, N., Putievsky, E., Chaimovitsh, D., Ravid, U., Saadi D. (2007).** Registered rosemary cultivar rich in carnosic acid, Israel registration number 2655, Oranit registration number 2656, Star registration number 2657. *Israel Plant Breeders Gazette* 69:23
- Dudai, N., Raz, A., Hofesh, N., Aharon, A., Ficsher, R., Segev, D., Chaimovitsh, D. (2008).** Antioxidant activity and phenol content of plant germplasm originating in the Dead Sea area. *Isr. J. Plant Sci.* 56, 227-232.
- Dudai, N. (2008).** Optimization and improvement of phenolic monoterpene production in oregano (*Origanum* SPP.). *Acta Hort. (ISHS)* 778, 15-28.
- Elstner, E. F. (1991).** Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In *Active Oxygen Species, Oxidative Stress and Plant Metabolism* (eds E.J. Pell & K.L. Steffen), pp. 13–25. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Etter, S. C. (2004).** *Rosmarinus officinalis* as an antioxidant. *J. Herbs Spices Med. Plants.* 11, 121-159
- Frankel, E. N., Huang, S., Prior, E., Aeschbach, R. (1996).** Evaluation of antioxidant activity of Rosemary extracts, carnosol, and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *J. Sci. Food Agric.* 72, 201–208.
- Fryer, M. J. (1992).** The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (a-tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15: 381–392
- Fuchs, D., Baier-Bitterlich, G., Wede, I., Wachter, H. (1997).** Reactive oxygen and apoptosis. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (ed. S.G. Scandalios), pp. 785–813. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gapper, C., Dolan, L. (2006).** Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 141, 341–345.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989).** Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press (Clarendon), Oxford, UK.
- Haloui, M., Louedec, L., Michel, J. B., Lyoussi, B. (2000).** Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. J. Ethnopharmacol. 71, 465–472.
- Hanson, R. (1995).** Diterpenoids. Nat. Prod. Rep. 12:207-218.
- Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A. (1995).** Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. Planta Med. 61, 333–336.
- Havaux, M. (1998).** Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. Trends Plant Sci. 3: 147–151
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. (2006).** Ethnobotany and Ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. J. Ethnopharmacol. 107, 157–160.
- Heller, W., Forkmann, G. (1988).** The flavonoids advances in research since 1980. In Biosynthesis. Harborne, J. B., Ed. Chapman and Hall: London. pp 399-426.
- Hidalgo, P. J., Ubera, J. L., Tena, M. T., Valcarcel, M. (1998).** Determination of the carnosic acid content in wild and cultivated *Rosmarinus officinalis*. J. Agric. Food Chem. 46, 2624-2627.
- Hopia, A. I., Huang, S., Schwarz, K., German, J. B., Frankel, E. N. (1996).** Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. J. Agri. Food Chem. 44: 2030–2036
- Houlihan, C. M., Ho, C. T., Chang, S. S. (1985).** The structure of rosmariquinone: A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. J. Am. Oil Chem. Soc. 62, 96–98.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. (1983).** Antioxidant effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their derivatives. Agric. Biol. Chem. 47, 521–528.
- Johnson, C., Kirby, J., Naxakis, G., Pearson, S. (1999).** Substantial UV-B mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Phytochem. 51: 507–510.
- Karousou, R., Grammatikopoulos, G., Lanaras, T., Manetas, Y., Kokkini, S. (1998).** Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oil. Phytochem. 49:2273–2277.
- Kleinig, H. (1989)** The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 39–59
- Leung, A. Y., Foster, S. (1996).** Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics, second ed. Wiley, New York, pp. 446–448.

- Lichtenthaler, H. K. (1999).** The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 47–65.
- Lincoln, D. E., Langenheim, J. H. (1978).** Effect of light and temperature on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii*. *Bioch. Sys. Eco.* 6, 21–32.
- Luis, J. C., Johnson, C. B. (2005).** Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity. *Span. J. Agric. Res.* 3, 106–112.
- Luis, J. C., Martín Perez, R., Valdes, G. F. (2007).** UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chem.* 101, 1211–1215.
- Luis, J. C., Martín, R., Frías, I., Valdés, F. (2007).** Enhanced carnosic acid levels in two Rosemary accessions exposed to cold stress conditions. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8062–8066.
- Luis, J. G. (1991).** Chemistry, biogenesis, and chemotaxonomy of the diterpenoids of *Salvia*. In JB Harborne, FA Tomas-Barberan, eds, *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Clarendon Press, Oxford, pp 63–82.
- Luis, J. G., Quinones, W., Grillo, T. A., Kishi, M. P. (1994).** Diterpenes from the aerial part of *Salvia columbariae*. *Phytochem.* 35, 1373–1374.
- Maffei, M., and Scannerini, S. (2000).** UV-B effect on photo-morphogenesis and essential oil composition in peppermint (*Mentha piperita* L.). *J. Essen. Oil Res.* 12, 523–529.
- Martinez-Fernandez, J., Lopez-Bermudez, F., Belmonte-Serrato, F. (1994).** Crecimiento y producción primaria de *Rosmarinus officinalis* en relación con algunos factores ambientales. *Ecology.* 8:177-183.
- McGarvey, D.J., Croteau, R. (1995).** Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* 7: 1015–1026
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* 26: 211-219.
- Munne-Bosch, S., Schwarz, K., Alegre, L. (1999).** Enhanced formation of α-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiol.* 121: 1047–1052
- Munne-Bosch, S., Alegre, L. (2000).** Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210, 925–931.
- Munne-Bosch, S., Alegre, L., Schwarz, K. (2000).** The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. *Eur. Food Res. Technol.* 210, 263-267.

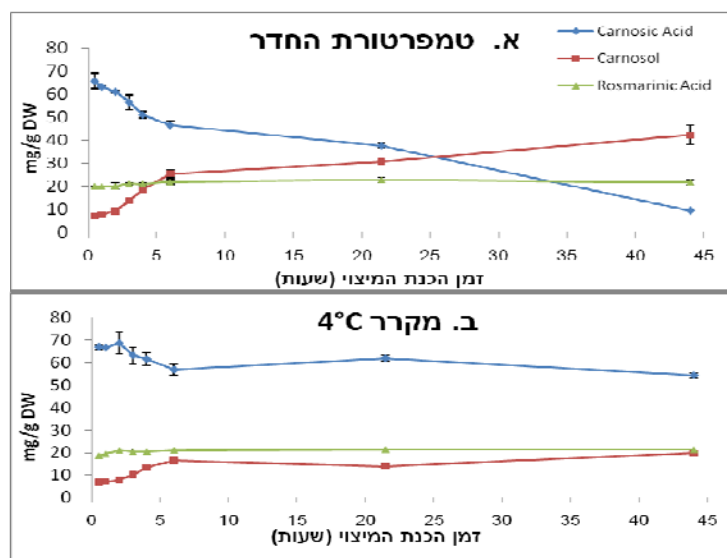
- Munne -Bosch, S., Alegre, L. (2001).** Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant Physiol.* 125, 1094–1102
- Munne-Bosch, S., Algere, L. (2003).** Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol.* 131, 1816–25.
- Nakatani, N., Inatani, R. (1984).** Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2081-2085
- Paris, A., Strukelj, B., Renko, M., Turk, V., Puki, M., Umek, A., Korant, B. D. (1993).** Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays. *J. Nat. Prod.* 56, 1426–1430.
- Parnham, M. J., Kesselring, K. (1985).** Rosmarinic acid. *Drugs of the Future* 10, 756–757.
- Pastori, G., Foyer, C. H. (2002).** Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress: the central role of “redox” and abscissic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129: 460–468.
- Penuelas, J., Llusia, J. (1997).** Effects of carbon dioxide, water supply, and seasonality on terpene content and emission by *Rosmarinus officinalis*. *J. Chem. Eco.* 23, 993–979.
- Penuelas, J., Munné-Bosch, S. (2005).** Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci.*, 10, 166-169.
- Pérez-Fons, L., Aranda, F., Guillén, J., Villalaín, J., Micol, V. (2006).** Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 453, 224-236.
- Randhir, R., Lin, Y. T., Shetty, K. (2004).** Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 13, 295–307.
- Rice-Evans, C. A, Miller, N. J, Paganga, G. (1997).** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152-159.
- Richheimer, S. L., Bailey, D. T., Bernart, M. W., Kent, M., Vininski, J. V., Anderson, L. D. (1999).** Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. *Recent Res. Dev. Oil. Chem* 3, 45–58.
- Richheimer, S. L., Bernart, M. W., King, G. A., Kent, M. C., Bailey, D. T. (1996).** Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from Rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 507–514.
- Schaich, K. M. (2005).** Bakto Flavors Conference on Natural Preservatives in Food Systems. Rutgers University Princeton NJ March 30-31.

- Shetty, K. (2001).** Biosynthesis and medical applications of rosmarinic acid. *J. Herbs Spices Med. Plants.* 8, 161-183
- Shintani, D., Della-Penna, D. (1998).** Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* 282, 2098–2100
- Sagi, M., Fluhr, R. (2006).** Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141, 336–340.
- Sies, H. (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82 (2): 291-5.
- Smirnov, N. (1993).** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125, 27–58.
- Solecka, D., Kacperka, C. (1995).** Phenylalanine ammonia-lyase in leaves of winter oil seed rape as affected by acclimation of plants to low temperature. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 585–591.
- Solecka, D., Boudet, A., Kacperska, A. (1999).** Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low temperature treated oilseed rape leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 491–496.
- Takenaka, M., Watanabe, T., Sugahara, K., Harada, Y., Yoshida, S., Sugawara, F. (1997).** New antimicrobial substances against *Streptomyces scabies* from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1440–1444.
- Van Breusegem, F., Dat, J. F. (2006).** Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* 141, 384–390.
- Waterman, P. G and Mole, S. (1994).** Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications.
- Wellwood, C. R., Cole, R. A. (2004).** Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (20), 6101 -6107.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., Zhu. J. (2002).** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* 14, S165–S183
- Yanishlieva N. V., Marinova E., Pokorný J. (2006).** Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 776-793.
- Yesil-Celiktas, O., Girgin, G., Orhan H., Wichers, H. J. , Bedir, E., Vardar-Sukan F. (2007).** Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *Eur. Food. Res. Technol.* 224, 443-451.

7 נספח 1: השפעת הטמפרטורה וזמן הכנת מיצוי מעלי רוזמרין על תכולת נוגדי החמצון במיצוי

בוצע מעקב אחר השפעת טמפרטורת ומשך הכנת המיצוי על תכולת נוגדי החמצון במיצוי. כדי לברר השפעות אלו הוכנו מיצויים מתנולים (80%) של עלים טחונים מזן אורנית במבחנות 15 מ"ל, והושמו בטלטול בטמפרטורות שונות (טמפרטורת החדר וקירור ל-4°C) למשך זמנים שונים (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 22 ו-44 שעות).

כאשר הוכן מיצוי מתנולי של עלי רוזמרין בטמפרטורת החדר חלו מספר שינויים בתכולת נוגדי החימצון: חלה ירידה בתכולת CA כבר מהשעה הראשונה של התהליך. בהמשך נמצאה ירידה קבועה בתכולת CA ככל שמשך המיצוי עלה. תכולת CA ירדה ב-14% לאחר 3 שעות מיצוי, וב-22.4% לאחר 4 שעות (איור S1.א). במקביל לירידה בתכולת CA נצפתה עליה בתכולת CAR. לאחר 3 שעות מיצוי, תכולת CAR כמעט והכפילה את עצמה מ-7.2 mg/g DW ל-13.9 mg/g DW (איור S1.א). תכולת RA לעומת זאת נשארה קבועה במשך כל הניסוי ועמדה על כ-21 mg/g DW (איור S1.א).



איור S1: השפעת הטמפרטורה ומשך מיצוי עלי רוזמרין על תכולת נוגדי החמצון במיצוי.

מיצוי עלי רוזמרין בקירור עיכב את הירידה בתכולת CA לזמן קצר, אך לאחר 6 שעות מיצוי כבר הייתה ירידה של 15% (איור S1.ב). מיצוי במקרר מיתן את העלייה בתכולת CAR. ככול שמשך המיצוי התארך עלתה תכולת CAR: לאחר שעתיים ב-1.2 mg/g DW, ולאחר 3 שעות ב-3.4 mg/g DW (איור S1.ב). תכולת RA נשארה קבועה במשך כל הניסוי והייתה כ-21.0 mg/g DW (איור S1.ב). הירידה בתכולת CA במיצוי בטמפרטורת החדר מקורה בהתפרקות CA ל-CAR (איור S1.ב). הירידה בתכולת RA, אשר מתמתנת בקירור, היא יציבה יותר ותכולתה לא ירדה או עלתה בטיפולים השונים. כתוצאה מניסוי זה, הוכנו כל המיצויים בטלטול במקרר במשך שעתיים לכל היותר.

We found positive and significant correlation between the antioxidant activity to the total phenol content, and between the content of CA, CAR, and RA and antioxidant activity of the extract. We found that CA content in the cultivar Oranit was significantly dependent on temperature. In cold temperatures (16/10°C) the content of CA was higher than in higher temperatures (32/28°C). Interestingly, no influence of day length on the CA content was observed. Today, several new fields of Oranit are grown for commercial production of dried rosemary leaves for the extraction of the active ingredients by companies abroad. Additional studies are required to improve the quality of agricultural crop of rosemary by creating more specific cultivation protocols and post harvest procedures.

Abstract

The rosemary plant is grown today primarily for use as a culinary herb, fresh or dried, and for extraction of essential oils. The oils have economic importance in the food and cosmetic industries, as well as for alternative medicine. Increasing consumer demand for natural and healthier food has raised an interest to find natural replacements for artificial preservatives, due to the possibility of their toxicity while decomposing. Rosemary was found suitable for the extraction of secondary metabolites, such as antioxidants. It is widely used for extraction of phenols such as carnosic acid (CA) and carnosol (CAR), which are abitanes diterpenes, and rosmarinic acid (RA), which is hydroxycinnamic acid ester. These phenols are responsible for the distinctive antioxidant activity of rosemary extract. Today there are a growing number of products that are based on rosemary extracts, which replace artificial preservatives. Nevertheless, the knowledge regarding cultivating rosemary for this purpose is very limited, and hence there is a growing need to develop elite cultivars of rosemary that are rich in CA and RA, which are the main compounds responsible for the high antioxidant activity of rosemary extracts.

The major goal of this study was to examine the suitability of the rosemary plant for production and extraction of natural antioxidants. In addition, the potential of integrating these cultivars as an agricultural and commercial crop was assessed. To examine this issue, three major questions were investigated: (i) The cultivars were evaluated during a period of a year for examination of the variation of yield components and antioxidant content, (ii) The influence of harvest time on plant regeneration was evaluated, and (iii) Different abiotic and developmental plant factors were examined extensively for their impact on the yield and quality of the antioxidant content in rosemary crops.

Among the findings of this work is the significant influence of the genetic factor on the different cultivars. This influence is expressed in the diverse yield of components (fresh weight, dry weight and leaves) and the antioxidant content through the duration of the seasons. "Oranit" cultivar displayed significantly the greatest content of yield components (both in fresh yield and in dry leaf yield) compared to the other examined cultivars. In addition, this study demonstrated that the "Oranit" cultivar has a significantly higher content of CA, CAR and RA compared to the other cultivars. These findings indicate the ability of "Oranit" cultivar to provide high quality and consistent yield for industries dealing with extraction of the active ingredients.

**Optimization of *Rosmarinus officinalis* L.
cultivation for antioxidants production**

**Thesis Submitted to The Robert H. Smith Faculty of
Agriculture, Food and Environment
The Hebrew University of Jerusalem**

**For the degree
"Master of Science"**

**By
Dror Kaldes**

Rehovot, Israel

December 2009