

סקירה 492
חוכנית מס
71/324

המכון הלאומי והאוניברסיטאי לחקלאות
מכון וולקני לחקר החקלאות

האגף למסעים
המחלקה למסעים סובטרופיים

בדיקות אנאטומיות והיסטוכימיות בפירות אבוקאדו
בשלים מזן פוארטה (תשכ"ג ותשכ"ד)

מאת

ש' גזית וע' גינזבורג

סקירה מקדימה

המחלקה לפירסומים, רחובות
שבט תשכ"ה, ינואר 1965

בדיקות אנאטומיות והיסטוכימיות בפירות אבוקאדו בשלים מזן פוארטה

(תשכ"ג ותשכ"ד)

מאת

ש' גזית וע' גינזבורג

ת ק צ י ר

בשנים תשכ"ג ותשכ"ד נערכו בדיקות מיקרוסקופיות - היסטולוגיות והיסטוכימיות - בציפת פירות אבוקאדו מזן פוארטה, לשם הבהרת מהותה של אי ההתרככות החלקית בפירות אבוקאדו. לא נמצא כל שוני במיבנה ובתגובות לריאגנטים היסטוכימיים, בין ריקמה קשה מפרי נורמאלי וריקמה קשה פגומה מפרי רך.

נמצא, כי ההתרככות קשורה בהעלמות חומרים פקטיניים בלתי מסיסים מדפנות התאים. הפרדה בין תאי ריקמת פרי קשה הושגה על-ידי שימוש בפקטינזה, אמוניום-אוכסלט וורסן. הוצאה זו מחזקת, מחד, את המסקנה על חשיבותם של הפקטינים בהצמדת תאים, אך ניתן, מאידך, להסתמך עליה גם להדגשת חשיבות השתתפותם של קטיונים וגורמים נוספים בתהליכי ההתרככות.

מ ב ו א

בעקבות הגברת הייצוא של פירות האבוקאדו מישראל לארצות חוץ התעוררה הבעיה החמורה של אי-התרככות חלקית בפירות אבוקאדו מזן פוארטה. הפרי הפגום מתרכך לכאורה כרגיל, אך כשהוא נחתך, נמצא שחלק קטן או גדול ממנו, בקרבת הזרע, נשאר קשה ואינו ראוי למאכל. התופעה תוארה ובחברה לראשונה על-ידי ח' אופנהיימר (1). בשנת תש"ך (1960) הוחל במחקר מקיף (2) בבעיה ובמסגרתו נערך בשנים תשכ"ג ותשכ"ד (1962/63 ו-1963/64) מחקר אנאטומי והיסטוכימי, במגמה להבהיר את מהות הליקוי. נעשה ניסיון לקבוע מה קורה ברמה המיקרוסקופית בעת ההתרככות הטבעית של הפרי, ובמה שונה ריקמה שלא התרככה מריקמה נורמאלית לפני ההתרככות ואחריה.

ציפת פרי האבוקאדו בנוייה בעיקרה מתאים פרנכימאטיים, שביניהם מפורזים אידיובלואסטים, שהם תאים מכילי שמן בעלי דופן עבה (3,10) וצרורות צינורות. התרככות הפרי היא תוצאה של התרופפות הקשר שבין התאים הפארנכימאטיים, מקובל לחשוב, שתהליך זה קשור בפירוק תרכובות פקטיניות, ובבדיקות כימיות בפרי האבוקאדו אף נמצא אישור לכך (8), אולם, לאחרונה, החלו להדגיש גם את חשיבותם של קטיונים שונים במיבנה החומר המצמיד את התאים (4,5,7).

ש י ט ו ת ו ח ו מ ר י ם

לבדיקה בלחקר חלקים של פרי קשה נורמאלי, פרי שהתרכך, ופרי שהתרככותו היתה פגומה. הכנת החומר נעשתה בשיטות הבאות: החומר עבר, כרגיל, פיכסאציה ב-FAA, ורק חומר שהוכן לבדיקה ציטולוגית עבר פיכסאציה ב-Craf. דהידראציה של החומר נעשתה בכוהל-בוטילי שלישוני, ואחר כך הוחדר החומר בפאראפין-צהוב (tissuemat). חיתוך קוביות הפאראפין נעשה במיקרוטום-סיבובי, לעובי של 10-12 מיקרון. מישור החיתוך היה באמצע הפרי, מקליפת הפרי ועד לקליפת הזרע. החומר שנועד לבדיקות ציטולוגיות נצבע בהמאטוכסילין. השיטות ההיסטוכימיות בהן השתמשנו מתוארות ברובן בספרו של ג'נסן (6).

ה ת ו צ א ו ת

א. בדיקות מורפולוגיות-אנאטומיות

בהשוואות שנערכו בין ריקמת פרי קשה נורמאלי לבין ריקמות של חלקים קשים מפרי פגום שהתרכך, לא נמצא כל שוני בין שני מיני הריקמות. צורת התאים, גודלם, אופן סידורם וכן המיבנה של דפנות התאים ועוביים היו זהים בשתיהן.

בבדיקות ציטולוגיות לא נמצאו תאים שהיו בתהליך התחלקותם, אך בכל סוגי הפירות שנבדקו נראו תאי-אם רבים. בתאים אלה יש מחיצה דקה שממשי עבריה דבוקים גרעיני התא (תמונות 1, 2, ו-3) - מצב המעיד על כך שהתא סיים את התחלקותו לפני זמן קצר (9, 10).

ב. תגובות לריאגנטים היסטוכימיים הפועלים על מרכיבי דופן התא

לא נמצא כל שוני בין תגובת חתכי חלקים קשים מפרי פגום לבין זו של חתכי פרי קשה נורמאלי בכל הריאגנטים ההיסטוכימיים בהם השתמשנו. בלט, לעומת זאת, השוני בתגובת תאי הפארנכימה בריקמות שהתרככו, בהשוואה לתגובתם בריקמות קשות. בתאי השמן, האידויובלאסטים, המצטיינים בדופן עבה (10), וכן בתאי צרורות הצינורות ובתאי האכסוקרפ, לא נראה כל שינוי המתלווה להתרככות הפרי.

1. ריאגנט PAS (Periodic Acid Schiff) צובע בצבע אדום חזק (6) את כל הפוליסאכארידים (פקטינים, צלולוזה, המיצלולוזה, עמילן, וכו'), שלא הומסו ונשמרו בעת הכנת החתכים. נראה, שדפנות התאים הפרנכימאטיים בפרי הרך עברו התכווצות והתמוטטות, ועוצמת צביעתם חלשה במידה ניכרת מזו שבדיקת קשה של פרי פגום (תמונה 4) ומדיקמת פרי קשה נורמאלי (תמונות 1 ו-2). נראה, שהריאגנט גורם גם לתפיחה חלקית של הדפנות.

2. Ruthenium red צובע באדום תירכויות פקטיניות, ומשמש לכן לזהוין, אף שיש ספק אם ניתן תמיד להסתמך על תוצאות צביעתו (6). עוצמת הצביעה של דפנות תאי הפרנכימה בחתכי ריקמה רכה היתה חלשה במידה ניכרת מזו שבחתכי ריקמות קשות.

3. I-KI (חומצה גופריתנית) צובע בתחילה בצבע כחול את הצלולוזה שבדופן ולבסוף מוסט הדופן ע"י החומצה (6). ריאגנט זה הופעל על חתכים של ריקמה טרייה. לא נראה הבדל בצביעת ריקמות קשות ורכות. דפנות האידויובלאסטים לא התמוססו - כנראה, הודות למעטה הסוברין הבלתי חדיר שלהם (10).

4. ריאגנט אבץ-כלור-יוד צובע צלולוזה בצבע כחול ובאופן חלקי - גם את ההמצלולוזה (6). החומר גרם לתפיחה, התעגלות והפרדה של תאי הפרנכימה ברקמות הפרי הרך (תמונה 3), והביא לתפיחת דפנותיהם, וצביעתן בעוצמה החזקה במקצת מזו שהתקבלה בריקמת פרי קשה. בתאי-אם תופחים ומתעגלים רק הדפנות החיצוניות העבות ואילו בתוך התא נראות מחיצות דקות שאינן תופחות ונשארות ישרות.

ג. חומרים הממיסים באופן סלקטיבי מרכיבי דופן שונים

גם ריאגנטים דלהלן פעלו באופן שווה על חתכי ריקמה קשה, בין אם נלקחו מפרי פגום ובין אם נלקחו מפרי קשה נורמאלי. שובי נראה רק בין ריקמות קשות ורכות.

1. ריאגנט שווייזר (Schweitzer) הממיס את הצלולוזה שבדופן (6), גרם להעלמותה המוחלטת של דופן תאי הפרנכימה בריקמה הרכה. כשהחומר הופעל על ריקמה קשה נשארה דופן, והיא נצבעה בצבע עז ב-PAS, ובבדיקה באור פולארי נמצאה הדופן כאנאיזוטרופית (תכונה האופיינית לפקטין).

2. פקטינאזה - פרפראאטים הושרו במשך חמש שעות בתמיסת פקטינאזה מסחרית בריכוז של 0.1%, ובופר-אצטאט (pH-4.2). כביקורת הושרו פרפראאטים בתמיסת בופר בלבד. לאחר ההשרייה נצבעו החתכים ב-PAS. הטיפול גרם להבהרה ניכרת של הצבע בחתכי פרי קשה, עד לרמה דומה לזו המתקבלת בפרי רך. בהשפעת החומצה הפריודית תפחו הדפנות והתבלטו סדקים בין התאים, הנראים אך בקושי בחתכי הביקורת (תמונות 5 ו-6).

תכשיר הפקטינאזה (תוצרת N.B.Co) בו השתמשנו, אינו נקי דיו, והכיל אנזימים נוספים בדומה לתכשירי פקטין-מסחרי אחרים. הטיפול גרם גם לפירוק הג'לאטינה והצלואידין ששימשו להדבקת החתכים. אין, לכן, ביטחון מלא שההשפעה של התכשיר היתה רק הודות לפעילותו הפקטוליטית.

3. אמוניום-אוקסלט בריכוז של 0.5% שימש למיצוי הפקטין (8,6). חתכים מפרי קשה הושרו בו במשך כ-16 שעות, בטמפרטורה של 90 מ"צ. עוצמת הצביעה ב-PAS נחלשה לאחר הטיפול והיתה ברמה דומה לזו שבפרי רך.

4. Na₂EDTA בריכוז של 0.1% שימש למיצוי פקטינים מפרי אבוקאדו (8) ולהפרדת תאים בשורשים (5) ובפירות-תפוח (7). פרפאראמים הושרו למשך הלילה בתמיסת הכילט, ב-pH 9-9.5 וב-35 מ"צ, ונצבעו לאחר מכן ב-PAS. הטיפול גרם, במקרים רבים, להפרדת הדפנות מבלי שעוצמת הצבע הוחלשה במידה ניכרת; כנראה, שבתנאי הטיפול לא הושלם מיצוי הפקטין.

ד י ו נ ו מ ס ק נ ו ת

לא נמצא כל הבדל בין ריקמה קשה מפרי פגום וריקמה קשה מפרי נורמאלי. בין הריקמות הקשות משני סוגי הפירות קיים דמיון מלא הן במיבנה והן בתגובות לריאגנטים של מרכיבי הדופן העיקריים, שהם: פקטין וצלולוזה. ניתן מכך להסיק, שאי-ההתרככות החלקית הקיימת בפרי פגום אינה קשורה בסטייה בולטת במיבנה הריקמה, התא או הדופן, ואף אינה נגרמת על-ידי סטייה ניכרת בהרכבה של הדופן.

עם ההתרככות חל שינוי בולט בדופן תאי הפרנכימה. הדפנות כאילו מתמוטטות ונעלם חלק ניכר מהמרכיבים הפוליסאכארידיים שבדופן, כפי שמעידה התגובה החלשה לצביעה ב-PAS. התגובה, הדומה לזו שבאה אחר צביעה ברוטניום-רד, והתמוטטותה המוחלטת של הדופן בתמיסת שווייצר, נותנות מקום להניח שהמרכיב שנעלם מהדופן הן התרכובות הפקטיניות. מכאן, שההתרככות קשורה בהפיכת התרכובות הפקטיניות למסיסות. בריקמה קשה מפרי פגום לא נמצא שינוי בתרכובות הפקטיניות והן נשארו בלתי מסיסות כבריקמה קשה נורמאלית.

פקטינאזה, אמוניום-אוקסלט וורסן, אשר הופעלו על ריקמות שלא התרככו גרמו להתרופפות הקשר שבין התאים ואף להפרדתם. חומרים אלה משמשים למיצוי תרכובות פקטיניות (9,6), ושני החומרים הראשונים אף עשו זאת בחתכים. תוצאה זו מחזקת, לכאורה, את הדעה על חשיבותם המרכזית של הפקטינים בתהליך ההתרככות, אך ניתן גם לנסות ולהסביר את התוצאה באופן שונה לחלוטין. העובדה שהצלחנו לגרום להפרדת תאים

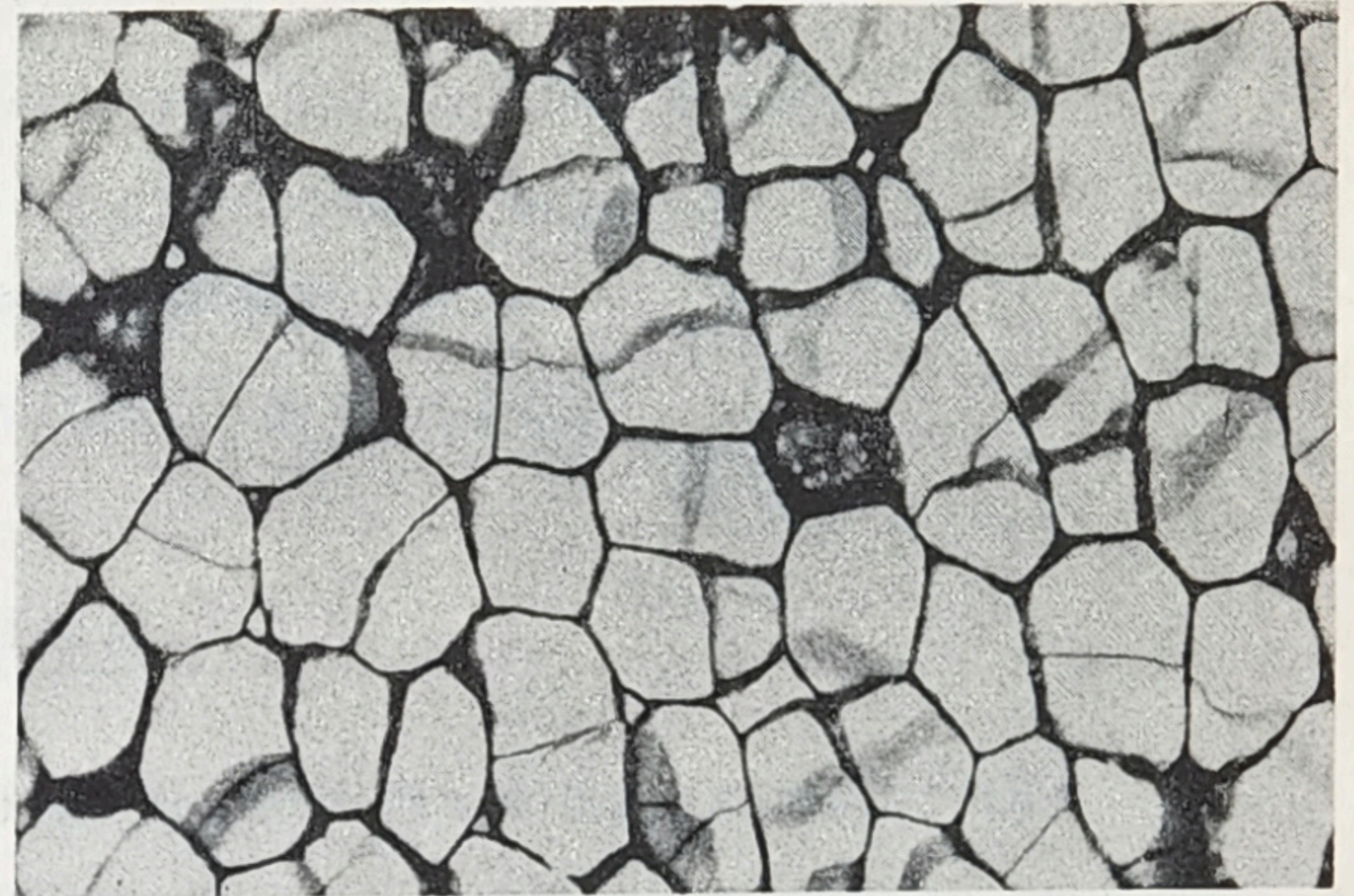
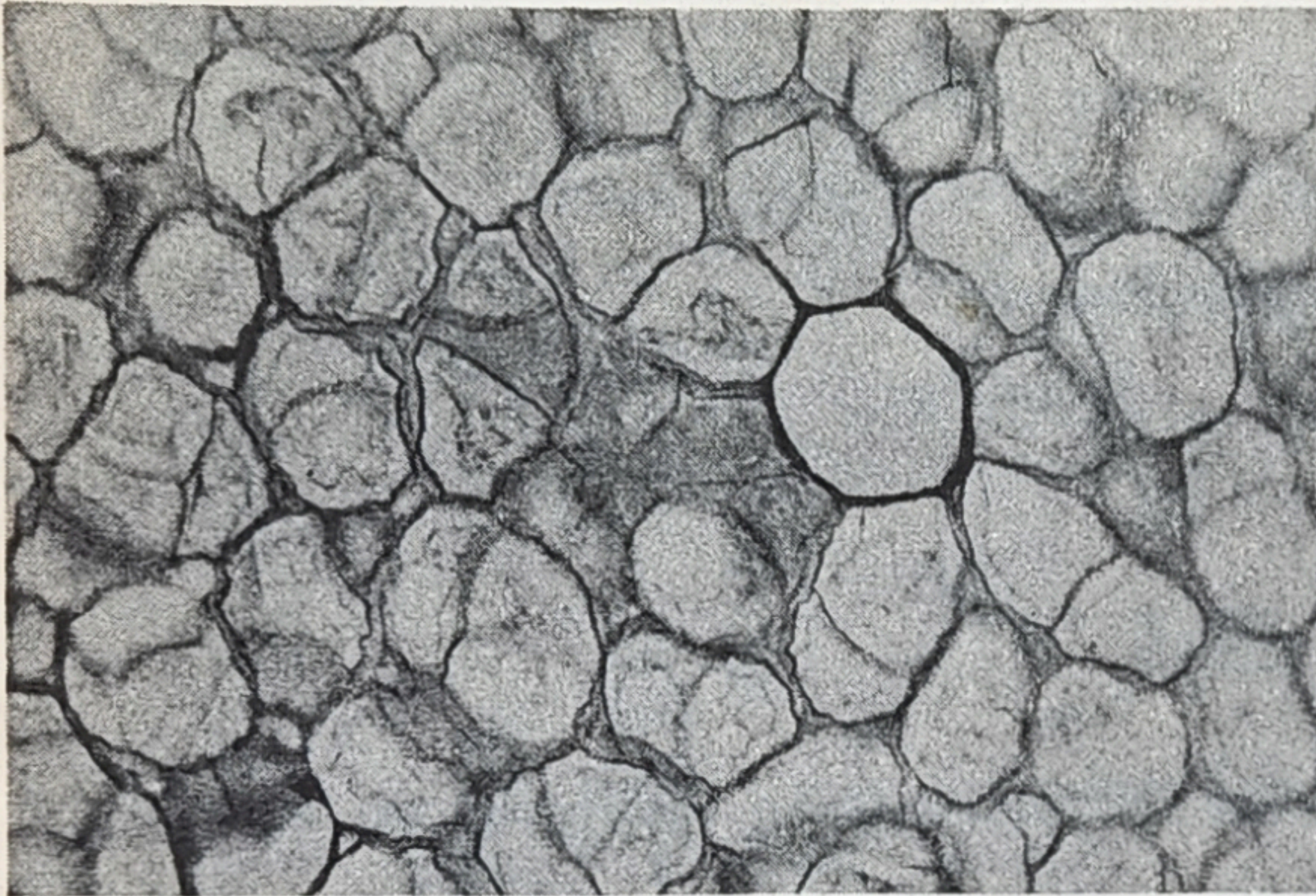
ללא כל פעולה אנזימאטית, אלא רק בעזרת שימוש בכלים המרחיקים קטיונים מהדופן, מעלה את הרעיון שהפעולה הראשונית, הגורמת להפרדת התאים, קשורה בשינוי במשק הקטיונים שבדופן. שינוי זה יכול לגרום לפירוק הקשרים שבין פרודות הפקטין ולניתוק הדפנות (7,5). למסקנה דומה הגיע דוסברג (4) במחקרו על התרככות התפוחים.

ס פ ר ת

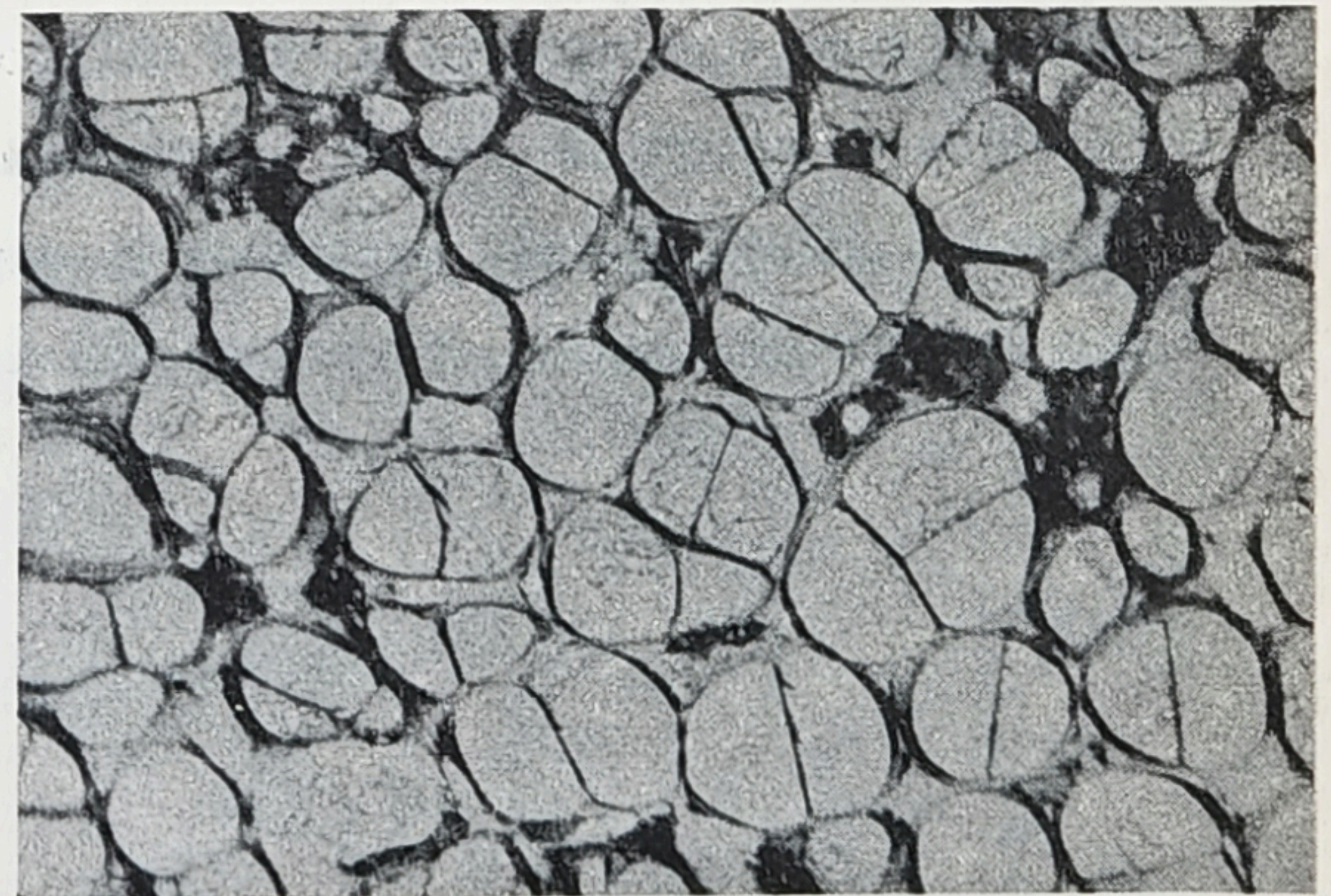
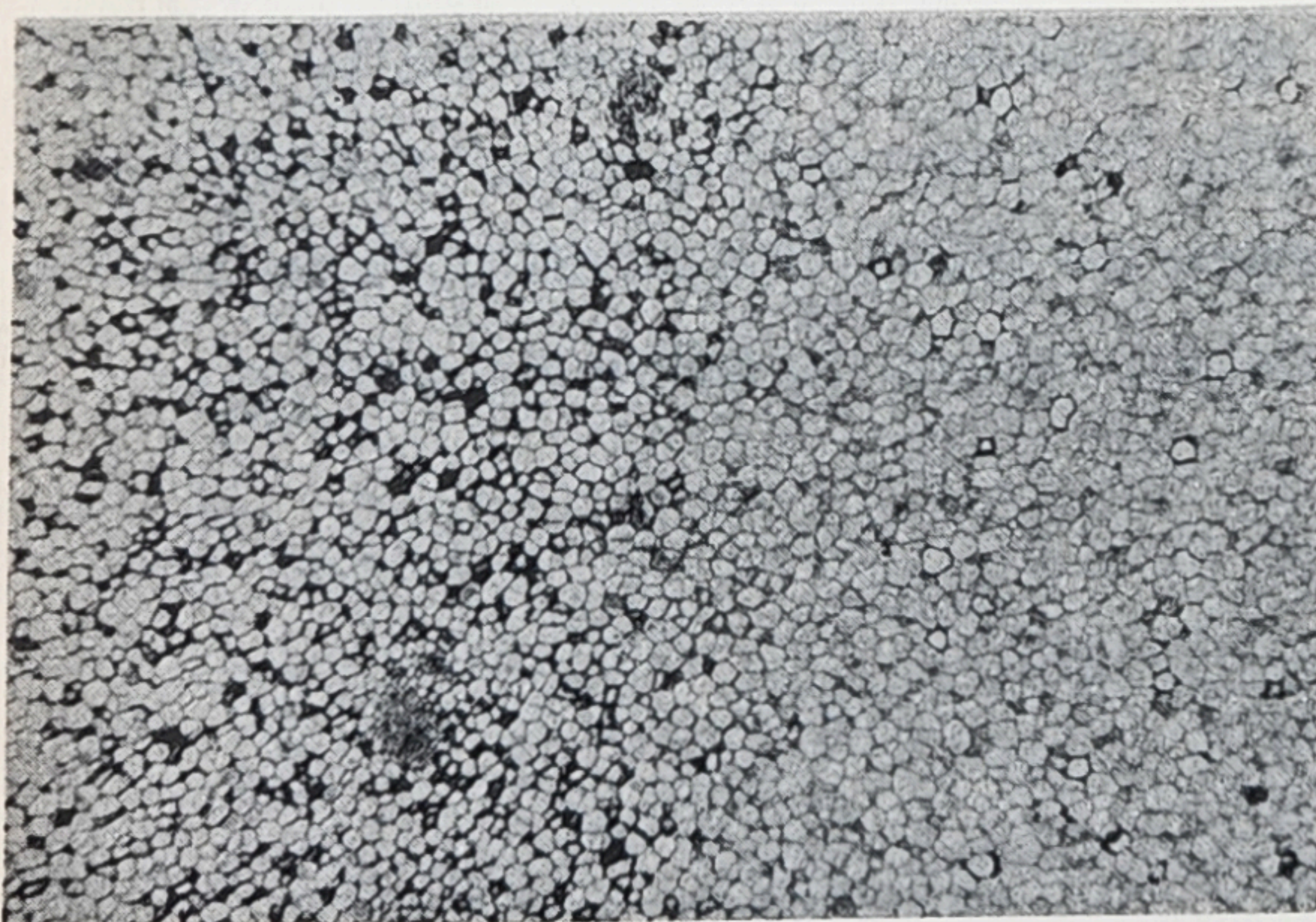
1. אופנהיימר, ח' (1959) על אי-התרככות חלקית בפירות אבוקדו "כתבים" מ' (3-2): 217-227.
2. גזית ש' (1965) בעיית אי-התרככות החלקית בפירות אבוקדו. ניסויים בעונות 1962/63 ו-1963/64. המכון הלאומי והאוניברסטאי לחקלאות סקירה מקדימה מס' 491.
3. Cummings, Katherine and Schroeder, C.A. (1942) Anatomy of the avocado fruit. Yearb. Calif. Avocado Soc. 1942:56-64.
4. Doesburg, J.J. (1957) Relation between the solubilization of pectin and the fate of organic acids during maturation of apples. J. Sci. Fd. Agric. 8:206-216.
5. Ginzburg, B.Z. (1961) Evidence for a protein gel structure cross-linked by metal cations in the intercellular cement of plant tissue. J. exp. Bot. 12:85-107.
6. Jensen, W.A. (1962) Botanical Histochemistry. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
7. Letham, D.S. (1960) The separation of plant cells with ethylenediamintetraacetic acid. Exp. Cell Res. 21:353-360.
8. McCready, R.M. and McComb, E.A. (1954) Pectic constituents in ripe and unripe fruits. Food Res. 19:530-535.

9. Schroeder, C.A. (1953) Growth and development of the Fuerte avocado fruit.
Proc. Amer. Soc. hort. Sci. 61:103-109.
10. Scott, Flora M., Bystron, Barbara C. and Bowler, E. (1963) Persea americana,
mesocarp cell structure, light and electron microscope study.
Bot. Gaz. 124:423-428.

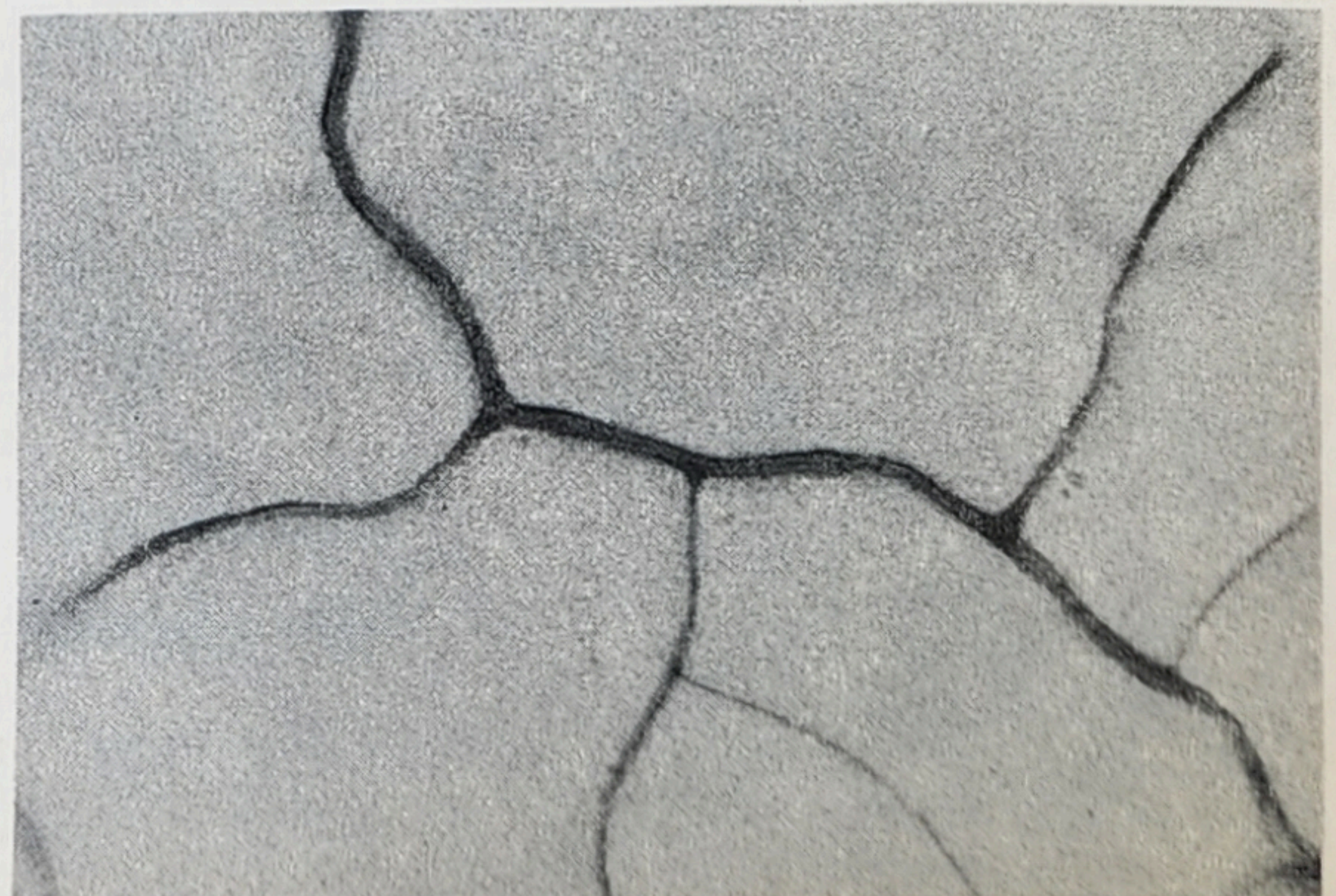
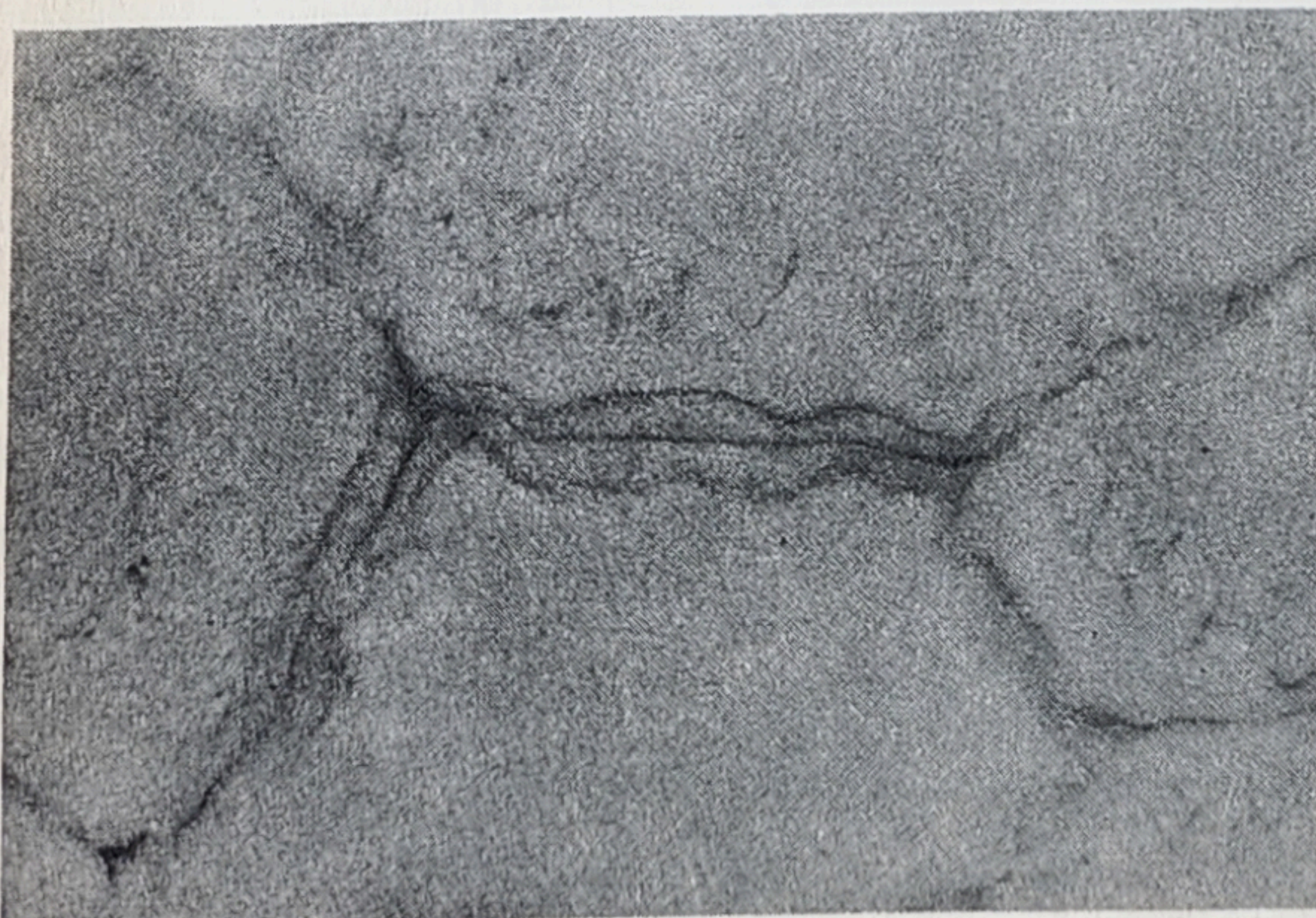
תמונות 2,1: צביעה ב-PAS של חתך-רוחב בציפת פרי (×190)
פרי קשה נורמאלי



תמונה 4: צביעה ב-PAS של חתך-רוחב בפרי פגום.
בולט השוני בעוצמת הצביעה של הריקמה הקשה שנצבעה
בצבע חזק והריקמה הרכה שנצבעה בצבע חלש (×26)



תמונות 6,5: דופן תא פרנכימאטי מריקמה קשה הצבועה ב-PAS (×750)
לאחר טיפול בפקטינזה



ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF MATURE FUERTE AVOCADO FRUITS

By

S. Gazit and O. Ginzburg

S U M M A R Y

Histological and histochemical tests were carried out in 1962-1963 on the pulp tissues of Fuerte avocado pears. No differences were found in the anatomy, or in the reaction to histochemical reagents, between hard tissues from normal fruits and hard tissues from abnormal soft fruits.

Softening was found to be correlated with the disappearance of insoluble pectic substance from the cell walls. The cells of hard tissues could be separated by the use of pectinase, ammonium oxalate and versene. This finding supports the conclusion that the pectic substances are important in cementing the cells, but it can also be used to emphasize the importance of cations and additional factors in softening processes.

THE NATIONAL AND UNIVERSITY INSTITUTE OF AGRICULTURE

The Volcani Institute of Agricultural Research

DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Division of Subtropical Horticulture

Prelim. Rep. No. 492

Project No. 71/324

ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF MATURE FUERTE AVOCADO FRUITS

By

S. AZIT and O. GINZBURG

Division of Publications

Rehovot, January 1965