

409-0041-99

קוד מחקר:

נושא: שיפור איכות פרחי קטיפה של אסקלפיאס "סילקי גולד" ע"י בקרת הפרשת הלטקס באיזור החיתוך ומניעת הקשייתו

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

חוקר ראשי: דר' שמעון מאיר

חוקרים שותפים: 3

1998-1999

תקופת מחקר:

מאמרים:

תקציר

1. הצגת הבעיה (חשיבות ומטרות): פרחי אסקלפיאס 'סילקי גולד' (אסיג) נחשבים כפרח קטיפה חדש בעל פוטנציאל יצוא גבוה שקל מאוד לגדלו, אך חיי האגרטל שלו מוגבלים ביותר. הנחת המחקר הייתה שחיי האגרטל הקצרים נובעים מהפרשת לטקס מהגבעול לאחר חיתוכו וסתימת צרורות ההובלה עקב קרישת הלטקס. המטרות הספציפיות של המחקר היו: 1. אפיון הגורמים הפיסיולוגיים (פוטנציאל מים, כמות העלווה, הורמונים צמחיים) המשפיעים על מידת הפרשת הלטקס באסיג; 2. פיתוח טיפולים לשיפור קליטת המים והארכת חיי האגרטל של אסיג; 3. הבנת מנגנון הפעולה של הפרשת הלטקס בגבעולי אסיג ומנגנון הקשייתו לאחר הנגירה; 4. לימוד האנטומיה הקשורה בלטקס ובחינת ההנחה שסתימת צרורות העיצה נגרמת עקב הקשיית הלטקס המופרש.

2. מהלך ושיטות עבודה: בוצעו ניסויים שונים בהם נלמדה השפעת טיפולי הטענה שונים במגוון תנאים והשפעת טיפולים המשנים את מצבו הפיסיולוגי של הענף, על שיעור קליטת התמיסה, כמות הפרשת הלטקס ואיכות הפרחים בחיי אגרטל לאחר סימולציות משלוח. איכות הפרחים הוערכה עפ"י המדדים הבאים: כמישת עלים, איבוד טורגור, נשירת עלים והזדקנות פרחים. בנוסף, בוצעה אנליזה של הרכב הלטקס ופעילויות אנזימטיות בו, וכן נבחנו האנטומיה של הלטיציפרים בענף הקטיפה והיבטים פיסיולוגיים נוספים ברקמה.

3. תוצאות עיקריות: פותחה תמיסת הטענה המתאימה ביותר לפרחי אסיג המורכבת מ- $TOG-10 + GA_3 + STS$ והמשפרת בצורה משמעותית את איכות ענפי הפריחה. פותחו תנאי הטענה התורמים להפתחת כמות הלטקס המופרשת באמצעות ייבוש קל של ענפי הפריחה בשיעור של כ- 10% ממשקלם, הסרת עלים בגובה 30 ס"מ בגבעול, והטענה בתמיסה קרה המפורטת לעיל למשך 3-5 שעות ב- 20 מ"צ + 20 שעות בקירור. פותחו טיפולים נוספים שניתנו לפני ההטענה (כמו: טבילה של גבעול הפרח למשך 15 דקות ב- 90% כוהל או טבילה רגעית במים חמים) ותרמו לשיפור קליטת המים ומשך חיי האגרטל. האנליזה של הלטקס והבדיקות האנטומיות הראו את הממצאים הבאים: א) מערכת הלטיציפרים של צמחי אסיג מרוכזת בעיקר בהיקף הליבה; ב. הלטקס מורכב משתי פאזות עיקריות, פאזה הידרופובית דביקה ופאזה הידרופילית הכוללת אנזימים שונים ובכללם פוליפנול אוקסידאזות; ג) הלטקס נקשר במגע עם מים, אך בדרך כלל לא סותם את צינורות ההובלה של הגבעול הקטוף; ד) לא ניתן להסביר את כמישת גבעולי קטיפה של אסיג באמצעות סתימת צינורות ההובלה כתוצאה מקרישת הלטקס כגורם בלעדי. יתכן והסתימה החלקית היא רק אחד מהגורמים הפיסיולוגיים התורמים לכמישה.

מסקנות והמלצות: תהליך הפרשת הלטקס הוא תהליך מורכב, הנתון להשפעות פיסיולוגיות, ביוכימיות ופיסיקליות. התוצאות שהתקבלו הצביעו על שתי מגמות סותרות: מחד, הוכח באופן ברור שעיקוב בהפרשת הלטקס מהגבעול באמצעות טיפולים שדווחו בספרות כיעילים לענפי קטיפה מפרשי לטקס (כמו טבילה בכוהל או במים חמים) תרמו לשיפור איכות ענפי הפריחה. מאידך, הממצאים האנטומיים בעיקר לא הצביעו על סתימה פיזית של צרורות העיצה באמצעות הלטקס המופרש, דבר המפריך למעשה את הנחת העבודה שעמדה בבסיס המחקר.

ב. תקציר (עד 300 מילים לדו"ח מסכם)

1. הצגת הבעיה (חשיבות ומטרות): פרחי אסקלפיאס 'סילקי גולד' (אס"ג) נחשבים כפרח קטיפי חדש בעל פוטנציאל יצוא גבוה שקל מאוד לגדלו, אך חיי האגרטל שלו מוגבלים ביותר. הנחת המחקר היתה שחיי האגרטל הקצרים נובעים מהפרשת לטקס מהגבעול לאחר חיתוכו וסתימת צרורות ההובלה עקב קרישת הלטקס. המטרות הספציפיות של המחקר היו: 1. אפיון הגורמים הפיסיולוגיים (פוטנציאל מים, כמות העלווה, הורמונים צמחיים) המשפיעים על מידת הפרשת הלטקס באס"ג; 2. פיתוח טיפולים לשיפור קליטת המים והארכת חיי האגרטל של אס"ג; 3. הבנת מנגנון הפעולה של הפרשת הלטקס בגבעולי אס"ג ומנגנון הקשייתו לאחר הנגירה; 4. לימוד האנטומיה הקשורה בלטקס ובחינת ההנחה שסתימת צרורות העיצה נגרמת עקב הקשיית הלטקס המופרש.

2. מהלך ושיטות עבודה: בוצעו ניסויים שונים בהם נלמדה השפעת טיפולי הטענה שונים במגוון תנאים והשפעת טיפולים המשנים את מצבו הפיסיולוגי של הענף, על שיעור קליטת התמיסה, כמות הפרשת הלטקס ואיכות הפרחים בחיי אגרטל לאחר סימולציית משלוח. איכות הפרחים הוערכה עפ"י המדדים הבאים: כמישת עלים, איבוד טורגור, נשירת עלים והזדקנות פרחים. בנוסף, בוצעה אנליזה של הרכב הלטקס ופעילויות אנזימטיות בו, וכן נבחנו האנטומיה של הלטיציפרים בענף הקטיפי והיבטים פיסיולוגיים נוספים ברקמה.

3. תוצאות עיקריות: פותחה תמיסת הטענה המתאימה ביותר לפרחי אס"ג המורכבת מ- $TOG-10 + STS + GA_3$ והמשפרת בצורה משמעותית את איכות ענפי הפריחה. פותחו תנאי הטענה התורמים להפחתת כמות הלטקס המופרשת באמצעות ייבוש קל של ענפי הפריחה בשיעור של כ- 10% ממשקלם, הסרת עלים בגובה 30 ס"מ בגבעול, והטענה בתמיסה קרה המפורטת לעיל למשך 3-5 שעות ב- 20 מ"צ + 20 שעות בקירור. פותחו טיפולים נוספים שניתנו לפני ההטענה (כמו: טבילה של גבעול הפרח למשך 15 דקות ב- 90% כוהל או טבילה רגעית במים חמים) ותרמו לשיפור קליטת המים ומשך חיי האגרטל. האנליזה של הלטקס והבדיקות האנטומיות הראו את הממצאים הבאים: א) מערכת הלטיציפרים של צמחי אס"ג מרוכזת בעיקר בהיקף הליבה; ב. הלטקס מורכב משתי פאזות עיקריות, פאזה הידרופובית דביקה ופאזה הידרופילית הכוללת אנזימים שונים ובכללם פוליפנול אוקסידאזות; ג) הלטקס נקרש במגע עם מים, אך בדרך כלל לא סותם את צינורות ההובלה של הגבעול (הקטוף; ד) לא ניתן להסביר את כמישת גבעולי קטיפי של אס"ג באמצעות סתימת צינורות ההובלה כתוצאה מקרישת הלטקס כגורם בלעדי. יתכן והסתימה החלקית היא רק אחד מהגורמים הפיסיולוגיים התורמים לכמישה.

4. מסקנות והמלצות: תהליך הפרשת הלטקס הוא תהליך מורכב, הנתון להשפעות פיסיולוגיות, ביוכימיות ופיסיקליות. התוצאות שהתקבלו הצביעו על שתי מגמות סותרות: מחד, הוכח באופן ברור שעיכוב בהפרשת הלטקס מהגבעול באמצעות טיפולים שדווחו בספרות כיעילים לענפי קטיפי מפרישי לטקס (כמו טבילה בכוהל או במים חמים) תרמו לשיפור איכות ענפי הפריחה. מאידך, הממצאים האנטומיים בעיקר לא הצביעו על סתימה פיזית של צרורות העיצה באמצעות הלטקס המופרש, דבר המפריק למעשה את הנחת העבודה שעמדה בבסיס המחקר. לאור הממצאים הסותרים וסיבות נוספות (המפורטות בדו"ח) החלטנו מיוזמתנו לפנות למדען הראשי להפסיק את הפרוייקט בתום השנה השניה למחקר שהוא אושר במקור לשלוש שנים.

ג. מבוא, רקע מדעי קצר ומטרות המחקר לתקופת הדו"ח:

הבסיס להצלחתו של ענף הפרחים הוא היכולת לגוון ולחדש במהלך זמן קצר יחסית את סל הפרחים המשווקים מהארץ תוך שמירה על איכותם, דבר המגביר את כושר התחרות של הפרח הישראלי בשווקים. אחת הדרישות העיקריות להתאמתו של פרח קטוף כגידול מסחרי היא שיהיה בעל חיי אגרטל ארוכים. פרחים רבים בעיקר ממשפחת האסקלפיים וההרדופיים הם בעלי חיי אגרטל מוגבלים עקב כמישה מהירה הנובעת מסתימת מערכת ההובלה של הצמח ע"י מיץ חלבי (לטקס). הלטקס הוא נוזל צמיג המורכב מחומרים שונים בהתאם לסוג הצמח, ומצטבר בצמחים ממשפחות ספציפיות בתאים מיוחדים, המוגדרים כמובילי המיץ החלבי (לטיציפרים). הלטקס הנוצר במובילי המיץ החלבי יוצא מן התאים לאחר חיתוך הגבעול, מתקשה במגע עם האוויר או המים וסותם את צינורות הובלת המים (הקסילים) בשטח החתך בשל צמידתם אל הלטיציפרים. כתוצאה מכך נמנעת הספקת מים לפרח הקטוף והוא כומש במהירות. תהליך ההתקשות אף מואץ כאשר אזור החתך מוכנס למים. כך שגבעולים חתוכים של צמחים מפרישי לטקס הם למעשה חסרי כושר לקליטת מים לאחר הקטיף. תופעה זו מהווה מיגבלה עיקרית בשיווק פרחים רבים שהם אטרקטיביים כפרחי קטיף בהיותם קלים לגידול. למרות חשיבותו של הנושא לגבי פרחי קטיף רבים, התופעה של סתימת צינורות ההובלה הנגרמת כתוצאה מהתקשות הלטקס לא נחקרה ביסודיות.

בעבודה זו הנושא נבחן לראשונה בפרחי אסקלפיאס פורפוראה 'סילקי גולד'. פרחי אסקלפיאס (משפחת האסקלפיים) ממינים וזנים שונים נמצאו ע"י מועצת הפרחים כבעלי פוטנציאל רב כפרחי קטיף ליצוא, וגידולם נבחן כעת במספר משקי מודל. לאסקלפיאס 'סילקי גולד' (אס"ג) יש ענפי פריחה גבוהים עתירי עלווה רחבה, ותפרחות קטנות בצבע כתום-צהוב המקובצות בקצה הענף. הבעיות הנובעות מהפרשת הלטקס מהוות את המגבלה העיקרית בשיווקו של פרח זה. ואכן, זני אסקלפיאס פורפוראה אחרים, כמו 'סינדרלה', או המין אסקלפיאס טוברוזה בהם בעיית הלטקס פחותה, נקלטו במהירות ע"י המגדלים בארץ. כתוצאה מכך הגידול מדורג כיום במקום ה- 11 מבין גידולי הפרחים המיוצאים מהארץ והגיע להיקפי שיווק של 34.8 מיליון ענפים (176 דונם) בעונת היצוא 1998/99. לשם השוואה, בעונה הקודמת דורג האסקלפיאס במקום 13 מבחינת היקפי היצוא, עם 30 מיליון ענפים שגדלו ב- 133 דונמים. הנתונים ה"ל מצביעים על הפוטנציאל הרב הטמון בשיווק פרחי אסקלפיאס 'סילקי גולד', שהם אף אטרקטיביים יותר מאלה של זני האסקלפיאס האחרים.

מטרות המחקר: א. פיתוח ומציאת שיטות יעילות הניתנות ליישום מסחרי, על בסיס הבנת התהליכים

המעורבים בהפרשת הלטקס, להארכת חיי האגרטל של פרחי אס"ג באמצעות פתרון בעיית סתימת צינורות ההובלה של גבעולי הפריחה הנובעת מהפרשת הלטקס; ב. הבנת מנגנון הפעולה של הפרשת הלטקס בגבעולי אס"ג ומנגנון הקשייתו לאחר הנגירה.

ד. פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו:

ד1. פיתוח שיטות יעילות הניתנות ליישום מסחרי, על בסיס הבנת התהליכים המעורבים בהפרשת

הלטקס, להארכת חיי האגרטל של פרחי אסקלפיאס 'סילקי גולד'.

במשך שתי שנות המחקר בוצעו ניסויים להגדרת תנאי ההטענה האופטימליים לגבי המדדים הבאים: קטיף ישירות לתמיסה, קטיף למים, בחינת ייבוש מוקדם, טמפרטורות ההטענה וטמפרטורות התמיסה. כן נבחנו טיפולים לשינוי המצב הפיסיולוגי בגבעול, כמו ייבוש מוקדם והסרת עלים מוקדמת, במטרה להפחית את כמות הלטקס המופרש ממנו לאחר חידוש החתך. בנוסף נבחנו ההשפעה של הטענה מוקדמת בתמיסות המכילות כוהל בריכוז גבוה.

הערכת יעילות הטיפול התבססה על מדדי איכות שנקבעו במועדים שונים במהלך חיי האגרסל בחדר

תצפית לאחר ביצוע הטיפולים השונים בפרחים הקטופים ולאחר סימולציית משלוח. המדדים שנבחנו היו:

(א) כיפוף חזותי של קצות הגבעול = מדד טורגור הגבעול - נקבע בסולם של 3 דרגות, בו 1 = גבעול זקוף ו-3 גבעול מכופף כלפי מטה. מאחר ויצירת הסיבים בגבעול האסקלפיאס איטית, הגבעול קורס בעקת מים קלה יחסית, ולכן מידת כיפוף הגבעול יכולה להוות מדד חזותי נוסף לעקת המים.

(ב) כמישה עלים כללית בכל גבעול הפריחה - נקבעה בסולם של 4 דרגות, בו 1 = ענף ללא סימני כמישה בעלים; 2 = התחלת כמישת עלים תחתונים בענף; 3 = 50% מהעלים בענף בתהליך כמישה (העלים התחתונים כמושים לגמרי); 4 = כל העלים בענף בתהליך כמישה.

(ג) כמישת עלים בגבהים מסוימים בגבעול - בכל גבעול פריחה סומנו מספר עלים ב-3 גבהים (תחתונים, מרכזיים ועליונים), ודרגת הכמישה של עלים אלה הוערכה בצורה חזותית במועדים שונים בחיי אגרסל עפ"י סולם של 4 דרגות, בו 1 = עלה טורגידי; 4 = עלה כמוש לגמרי.

(ד) הצהבת עלים כללית - נקבעה בסולם של 5 דרגות, בו דרגה 1 = כל העלים בגבעול ירוקים; דרגה 2 = התחלת הצהבה רק בעלים תחתונים; דרגה 5 = הופעת סימני הצהבה כמעט בכל העלים, כאשר העלים התחתונים צהובים מאוד.

(ה) הצהבת עלים בגובה מסוים בגבעול - נקבעה בסולם של 4 דרגות, בו 1 = עלה ירוק; 4 = יותר מ-75% מהעלה צהוב.

(ו) נשירת עלים - נקבעה בסולם של 4 דרגות, בו 0 = אין נשירת עלים; 1 = נשירה של 1-3 עלים לגבעול; 3 = נשירה של 4 עלים ועד 50% מהעלים בגבעול; 4 = נשירה של יותר מ-50% מהעלים.

(ז) פתיחת פרחים והזדקנותם - נקבעה ע"י סימון תפרחות בהן הפרחים היו תפוחים ובעלי צבע כתום אופייני (שלב 3 ראה להלן), ומעקב אחר התפתחות התפרחות עד להזדקנותן המאופיינת בקיפול עלי הכותרת לאחר. נקבעו 7 שלבים להתפתחות תפרחות עפ"י ההגדרות הנ"ל: 1 = פקעי פריחה ירוקים וקטנים מאוד (פחות מ-5 מ"מ); 2 = פקעי פריחה ירוקים בגודל של 5 מ"מ; 3 = פקעי פריחה בגודל מלא של 6-7 מ"מ ובצבע כתום כאשר 1-2 פרחים בתפרחת פתוחים; 4 = 50% מהפרחים בתפרחת פתוחים; 5 = כל הפרחים בתפרחת פתוחים, בטורגור מלא ובזווית הפוכה האופיינית לפרחי אסקלפיאס; 6 = פרחים בתחילת הזדקנות (תחילת גלגול עלי הכותרת כלפי מעלה); 7 = פרחים בכמישה מלאה.

(ח) קצב קליטת מים ע"י גבעול הפרח בעת ההטענה ובחיי אגרסל - נקבע ע"י שקילת המשורה עם וללא פרחים כדי לחשב את משקל גבעול הפרח. כן בוצע גם מעקב אחר שינוי במשקל הפרח במהלך חיי האגרסל, שבוסא באחוזים ביחס למשקלו במועד הכנסתו לאגרסל.

(ט) תכולת מים בעלים - נקבעה ע"י שקילת עלים שנקטפו מגבהים שונים בגבעול לפני ואחרי ייבושם בתנור (יום ב-65 מ"צ). כן נקבעה גם תכולת מים יחסית (RWC) לאחר מיום העלים (שקילת העלים לפני ואחרי הדגרתם בצלחות פטרי ע"ג מים למשך 24 שעות).

(י) כמות הפרשת הלסקס - נקבעה ע"י הכנסת הגבעול מיד לאחר חיתוך הקצה למבחנה שקולה של 5 מ"ל שבתוכה נייר סופג. לאחר הספגת הלסקס המופרש מקצה הגבעול בנייר הסופג - נבדק השינוי במשקל המבחנה + הנייר.

סיכום הממצאים שהתקבלו בשנת המחקר הראשונה (דו"ח הוגש באפריל 1999):

1. פותחה תמיסת ההטענה המתאימה ביותר לענפי פריחה של אס"ג. תמיסה זו מורכבת

מ- 0.2% STS + 40 ppm GA₃ + 0.2% TOG-10 ושיפרה את איכות הענפים מבחינת טורגידיות הגבעול,

מניעת הזדקנות ונשירת העלים, השלמת תהליך התפתחות התפרחות באגרסל ועיכוב תהליך ההזדקנות.

2. נלמדו התנאים המיטביים התורמים להפחתת כמות הלטקס המופרשת לאחר חידוש החתך בגבעול. נמצא שיפור בקליטת תמיסת ההטענה בהשפעת הורדת הטורגור בעלים ובגבעול באמצעות ייבוש חלקי של הענף נובע כנראה מהפחתת כמות הלטקס המופרשת בחיתוך. מידת הייבוש המינימלי שהביא תועלת היה של 10% ממשקל הפרחים. גם הסרת העלים מגבעול טורגידי בגובה של 15 ס"מ או 30 ס"מ הפחיתה ב- 35 או 50%, בהתאמה, את כמות הלטקס שהופרשה לאחר חיתוך הענף והאריכה את חיי האגרטל של הפרחים.
3. נמצא שהורדת עלים בגובה 30 ס"מ כשעה לפני הקטיף הפחיתה את מידת כמישת העלים במהלך הובלת הפרחים במים במשך שעותיים ממשק המגדל במושב היוגב אל המעבדה בוולקני.
4. לא נמצאה השפעה לקטיף ישירות לתמיסת ההטענה בהשוואה למים.
5. נמצא שטמפרטורת התמיסה בזמן ההטענה עשויה לשפר את הופעת ענפי הפריחה במהלך חיי האגרטל. כך הטענת ענפי הפריחה במים או בתמיסת הטענה של $TOG-10 + GA_3 + STS$ למשך 3 שעות ב- 5 מ"צ שיפרה באופן משמעותי את הופעת ענפי הפריחה בהשוואה לענפים שהוטענו בתמיסות אלה ב- 21 מ"צ.

סיכום הממצאים שהתקבלו בשנת המחקר השניה:

בשנת המחקר השניה חזרנו והעמקנו בנושאים ה"ל וכן בצענו למידות נוספות. בארבעה ניסויים נפרדים חזרנו על הנושאים שנלמדו קודם: תמיסת ההטענה, טמפרטורת התמיסה בשעות הראשונות לאחר הקטיף, הורדת עלים לפני הקטיף ו/או לפני ההטענה והייבוש הקל לפני ההטענה. התוצאות חזרו על עצמן באופן מובהק (טבלה 1 ותוצאות נוספות לא מובאות), למעט נושא הורדת עלים לפני הקטיף שלא הראה בשני ניסויים יתרון בהשוואה לקטיף רגיל. הן תמיסת ההטענה שפותחה בשנה הקודמת והן קירור התמיסה הפחיתו את כמישת הגבעול והעלים. בבדיקות מפורטות יותר (תוצאות לא מובאות) למדנו שהיה שיפור בקליטת המים ע"י גבעולי הקטיף שהוטענו בתמיסה המשולבת ובטמפרטורה נמוכה באגרטל ולכן נמנעה הירידה במשקל האגדים במשך 4 ימים ראשונים באגרטל.

טבלה 1: השפעת ההרכב והטמפרטורה של תמיסת ההטענה על כמישת הגבעול והעלים של פרחי אס"ג במהלך חיי האגרטל.

סוג הטיפול			מדד טורגור הגבעול (3-1)			מדד טורגור בעלים (4-1)		
	יום 0	יום 1	יום 4			יום 0	יום 1	יום 4
A. טיפולי הטענה								
1. מים	1.2 a	1.4 a	1.7 a	1.2 a		1.2 a	1.5 a	3.3 a
2. $TOG-10 + STS + GA_3$	1.0 b	1.2 a	1.4 b			1.1 a	1.2 a	2.2 b
B. טמפרטורת תמיסת ההטענה								
1. 25 מ"צ	1.1 a	1.1 b	1.5 a			1.1 a	1.2 b	3.1 a
2. 5 מ"צ	1.1 a	1.5 a	1.6 a			1.2 a	1.5 a	2.4 b
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי								
A. טיפולי הטענה	**	ל.מ	*	ל.מ		ל.מ	ל.מ	***
B. טמפרטורת תמיסת ההטענה	ל.מ	*	ל.מ			ל.מ	*	***
B X A	ל.מ	***	***			ל.מ	**	***

גבעולי אס"ג שקוצצו לאורך של 60 ס"מ ושהוסרו מהם העלים בגובה של 25 ס"מ מבסיס הגבעול, הוטענו מיידית בתמיסות. הדלי עם התמיסה הקרה הוכנס לכלי גדול יותר בו הוכנס קרח לשמירת הטמפרטורה. לאחר 4 שעות כל הפרחים הועברו לקירור ב- 4 מ"צ למשך 20 שעות. לאחר הוצאת הפרחים מהקירור הם הועברו לאגרטלים לתצפית. התוצאות מייצגות ממוצעים של 4 חזרות עם 5 גבעולי קטיף באגרטל ל"א. אותיות שונות מימין לערכים מייצגות מובהקות ברמה של 5%, **, * = מובהקויות ברמה של 1, 5, או 0.1%, בהתאמה.

1. השפעת ייבוש הענף וטבילתו בכוהל

נושא נוסף שנבחן השנה לראשונה היה השהיית הפרחים על השולחן למשך 3 שעות (ייבוש) בשילוב עם השריית הגבעול בכוהל (אתנול בריכוז 90%) למשך 15 דקות לפני העברתם להטענה בתמיסה המומלצת לעיל - TOG-10 + GA₃ + STS. ההטענה בתמיסה הייתה למשך 4 שעות בחדר התצפית (20 מ"צ) ו-16 שעות נוספות בקירור (6 מ"צ). מחצית מהפרחים הועברו ישירות לאגרסל ומחציתם הועברו לאגרסל לאחר סימולציית משלוח (אריזה ואחסון למשך יום ב-6 מ"צ). מהתוצאות המסוכמות בטבלאות 2 ו-3 ניתן לראות שהן הייבוש והן הטבילה בכוהל שיפרו את קליטת המים באגרסל במשך 5 או 6 ימים באגרסל, כאשר השילוב ביניהם (ייבוש + טבילה בכוהל) שמר על טורגור גבוה בפרחים שלא עברו סימולציית משלוח למשך 6 ימים וגם ביום 8 באגרסל (תוצאות לא מובאות).

טבלה 2: השפעת ייבוש פרחי אס"ג ו/או טבילת ענפי הקטיף ב-90% אתנול לפני הטענת הפרחים בתמיסת TOG-10 + GA₃ + STS על קליטת המים במהלך חיי אגרסל בפרחים שלא עברו סימולציית משלוח.

קצב קליטת מים (מ"ל תמיסה / ק"ג פרחים)		סוג הטיפול	
בימים 5-3	בימים 2-0	כוהל	ייבוש
149.0 b	334.6 a	-	-
153.3 ab	333.0 a	+	-
192.9 a	326.4 a	-	+
188.1 ab	303.5 a	+	+

טבלה 3: השפעת ייבוש פרחי אס"ג ו/או טבילת ענפי הקטיף ב-90% אתנול לפני הטענת הפרחים בתמיסת TOG-10 + GA₃ + STS על קליטת המים במהלך חיי אגרסל לאחר סימולציית משלוח.

קצב קליטת מים (מ"ל תמיסה / ק"ג פרחים)		סוג הטיפול	
בימים 5-3	בימים 2-0	כוהל	ייבוש
89.9 b	165.8 b	-	-
107.2 ab	203.6 ab	+	-
117.9 ab	202.6 ab	-	+
136.8 a	253.5 a	+	+

2. השפעת טבילת קצה הענף במים חמים

בניסוי בו נבחנה השפעת טבילת קצה גבעולי הקטיף (10 ס"מ) במים חמים בטמפרטורות שונות ולמשכי זמן שונים לפני טיפול ההטענה הרגיל נמצא שהטבילה ב-50 מ"צ למשך 3 או 5 דקות או ב-60 מ"צ למשך דקה שמרו על טורגור גבוה של הענפים במשך 6 ימים באגרסל בהשוואה לטיפול הביקורת, אם כי ההבדלים לא היו מובהקים מבחינה סטטיסטית (טבלה 4). לעומת זאת רק הטבילה ב-50 מ"צ למשך 5 דקות או ב-60 מ"צ למשך דקה מנעו את הזדקנות וכמישת התפרחות בתקופה זו (טבלה 4).

טבלה 4: השפעת טבילת קצה גבעולי פרחי אס"ג במים חמים למשכי זמן שונים לפני הטענת הפרחים בתמיסת TOG-10 + GA₃ + STS על טורגור הענף וכמישת התפרחות לאחר 6 ימים באגרטל בפרחים שלא עברו סימולציית משלוח.

סוג טיפול הטבילה במים	מדד טורגור הגבעול (3-1)	כמישת התפרחות
ביקורת - 20 מ"צ ל- 2 דקות	1.7 ab	+
40 מ"צ למשך דקה	2.3 a	+
40 מ"צ למשך 3 דקות	1.8 ab	+
50 מ"צ למשך דקה	1.3 ab	+
50 מ"צ למשך 3 דקות	1.0 b	+(חלקית)
50 מ"צ למשך 5 דקות	1.0 b	-
60 מ"צ למשך דקה	1.0 b	-

2. הבנת מנגנון הפעולה של הפרשת הלסקס בגבעולי אס"ג ומנגנון הקשייתו לאחר הנגירה

פירוט המחקר המתייחס לנושא זה מובא בהרחבה בנספח לד"ח. במסגרת המחקר בוצעה אנליזה של הרכב הלסקס ופעילויות אנזימטיות בו, וכן נבחנו האנטומיה של הלטיציפרים בענף הקטיפי והיבטים פיסיולוגיים נוספים ברקמה.

1. בדיקת הלסקס

בדיקת הלסקס בוצעה במטרה להכיר את תכונות הצביעה של הלסקס בהן ניתן יהיה להשתמש כדי לזהות את הלטיציפרים בתוך הרקמה. לצורך זה בוצעו: (א) איפיון מיקרוסקופי בשיטה פיזיקלית ע"י פלורסצנסיה; (ב) איפיון בשיטות כימיות ע"י חומרי צבע; (ג) איפיון התנהגות הלסקס בממסים שונים (אתנול, מים). הלסקס במיקרוסקופ אור נצבע בחום ונתן פלורסצנסיה כחולה או ירוקה בהתאם לאורך הגל בעירור. לאחר חשיפתו לאתנול נמצא שהלסקס של אס"ג מורכב משתי פאזות: פאזה גרגרית ופאזה דביקה.

2. בדיקות אנטומיות

א. איתור לטיציפרים ברקמה: נבדקו חתכי גבעול ועלה על מנת לזהות את הלטיציפרים על פי הלסקס המצוי בתוכם, ועל מנת לאתר את מיקומם באברי הצמח השונים. החתכים הוכנו ע"י חיתוך ידני של חומר טרי, וחיתוך במיקרוטום של חומר שעבר פיקסציה ב-FAA או בגלוטרלדהיד, ואמבדינג בפרפין או בפלסטיק (LRWhite). החתכים נבחנו במיקרוסקופ אור (אור לבן), וכן במיקרוסקופ פלורסצנטי בשני אורכי גל שונים. נמצא שהתנהגות הלסקס *in situ* היתה זהה, בהתאמה, להתנהגותו *in vitro* הן במצב טרי תחת המיקרוסקופ הפלורסצנטי והן לאחר הצביעות השונות. בחתכי רקמה ניתן היה לראות שהלטיציפרים נצבעו לכל אורכם בצורה בולטת יותר מאשר שאר תאי הרקמה. הלטיציפרים העיקריים מופיעים בעיקר בהיקף הליבה של הגבעול. לטיציפרים יותר צרים מלוים גם את השיפה בגבול קליפת הגבעול, ובעלה הלטיציפרים מלווים את השיפה בצורות.

ב. ארגון הלטיציפרים לאורך הגבעול: מספר הלטיציפרים נבדק בכל חתך על מנת לבדוק את מגמת

התפתחותם לאורך הגבעול. נעשו חתכים עוקבים לאורך הגבעול. התברר כי ככל שאזור הגבעול בוגר יותר יש בו יותר קבוצות לטיציפרים, ובכל קבוצה יש מספר גדול יותר של לטיציפרים.

3. פעילות אנזימטית

באופן כללי הלסקס של אס"ג אינו נקרב בקלות בבואו במגע עם האוויר, אך הוא נקרב בנוכחות מים. בוצעה הפרדה אלקטרופורטית של חלבונים בלסקס של אס"ג, ובוצעה הרצת הלסקס בג'ל פוליאקרילאמיד שהראתה נוכחות של מספר פסי-חלבונים עיקריים. בוצעה בדיקה לפעילות קואגולאז בהסתמך על דיווחים לגבי לסקס של *Havea brasiliensis* לפיהם נמצא שפעילות האנזים קואגולז גורמת לקרישה. בבדיקות בלסקס של אס"ג והתברר שבאסקלפיאס הנבדק אין פעילות דומה של קואגולאז. נבדקה נוכחות של פנול אוקסידוזות בלסקס. נמצאה פעילות אופיינית התלויה בסובסטרט כאשר הפעילות החזקה ביותר היתה עם הסובסטרטים DOPA ו-4 -מתיל קטכול. חלק מהפנול אוקסידוזות מצוי בנוזל העליון, וחלק במשקע. נוכחות אוקסידאזות בלסקס הוכחה גם בצביעת Nitro Blue Tetrazolium.

4. היבטים פיסיולוגיים

מטרת הניסויים היתה לבחון אם הלסקס הינו גורם הכמישה היחיד בפרחי אס"ג או שישנם גורמים אחרים נוספים הגורמים לכמישתו המהירה של הענף הקטוף. נבחנה השפעת חיתוך הגבעול על הכמישה: לשם כך נבחנו שתי קבוצות צמחים אשר שהו במים לאורך כל הניסוי: א. גבעולי אס"ג קטופים מפרישי לסקס. ב. צמחי אס"ג עקורים עם שורשיהם אשר אינם מפרישים לסקס (הלטיציפרים אינם מתפתחים בשורשים). שינוי מיקומם הפיסי של שתי קבוצות הצמחים גרם לכמישתם והם דרשו תנאי קור ולחות על מנת להתאושש. שתי הקבוצות התאוששו לאחר כשבוע. נבחנה התנהגות הלסקס לאחר גיזום גבעול וטבילתו במים. הלסקס ניגר לתוך המים ונקרש בהם. בחינה מיקרוסקופית של שטח הגיזום הראה כי הלסקס כיסה רק את אזור הליבה והוא איננו מכסה את אזור צינורות העצה. נבחנה השפעת עקה וטיפול במים חמים על מידת הפרשת הלסקס וכמישת גבעולי הקטיף ונמצא מתאם חיובי בין שתי התופעות. נבדקה רמת הפוטוסינתזה ומוליכות הפיוניות בצמחי אס"ג בתנאים רגילים ובתנאי עקה. התברר שבעקה נסגרו הפיוניות וכתוצאה מכך הופחתה המוליכות בכמחצית וכן הפוטוסינתזה ירדה בהתאמה. מסקנות עיקריות:

1. מערכת הלטיציפרים של צמחי אסקלפיאס מרוכזת בעיקר בהיקף הליבה.
2. הלסקס מורכב משתי פאזות עיקריות, פאזה הידרופובית דביקה ופאזה הידרופילית הכוללת אנזימים שונים ובכללם פוליפנול אוקסידאזות.
3. הלסקס נקרב במגע עם מים, אך בדרך כלל לא סותם את צינורות ההובלה של הגבעול הקטוף.
4. לא ניתן להסביר את כמישת גבעולי קטיף של אס"ג באמצעות סתימת צינורות ההובלה כתוצאה מקרישת הלסקס כגורם בלעדי. יתכן והסתימה החלקית היא רק אחד מהגורמים הפיסיולוגיים התורמים לכמישה.

ה. מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

במסגרת המחקר שארך שנתיים פותחה תמיסת ההטענה המתאימה ביותר לענפי פריחה של אס"ג. תמיסה זו מורכבת מ- $0.2\% \text{ TOG-10} + 40 \text{ ppm GA}_3 + 0.2\% \text{ STS}$ ושיפרה את איכות הענפים מבחינת טורגידיות הגבעול, מניעת הזדקנות ונשירת העלים, השלמת תהליך התפתחות התפרחות באגרטל ועיכוב תהליך ההזדקנות. כן פותחו תנאים מיטביים התורמים להפחתת כמות הלסקס המופרשת באמצעות ייבוש קל של הענפים בשיעור של כ- 10% ממשקלם, הסרת עלים בגובה 30 ס"מ, הטענה ב- 20 מ"צ למשך 3-5 שעות בתמיסה קרה והשלמת ההטענה בקור. טיפולים נוספים לפני ההטענה שתורמו לשיפור בחיי האגרטל מבחינת קליטת מים ומשך חיי האגרטל היו טבילה של גבעול הפרח למשך 15 דקות ב- 90% כוהל או טבילה רגעית במים חמים. כל התוצאות הנ"ל מרמזות בעקיפין שללסקס ישנה השפעה שלילית על משך חיי האגרטל שכן קרישתו מונעת את קליטת המים.

מצד שני, העבודה האנטומית המפורטת הנספח הראתה בבירור שקרישת הלסקס סותמת רק באופן חלקי את צרורות הקסילים, וכנראה שהקרישה אינה הגורם היחיד המגביל את חיי האגרטל של הפרח. הממצא הנ"ל יצר אי ודאות לגבי הנחת היסוד של העבודה. בנוסף, מכיוון שנמצא שההרכב הכימי והאנזימטי של הלסקס שונה מצמח לצמח (לדוגמה: חוסר פעילות של האנזים קואגולאז באס"ג) לא נראה שהמשך לימוד הנושא בפרחי האסקלפיאס כמערכת מודל יעזור בפתרון הבעיה בגידולים אחרים המפרישים לסקס. במקביל לעבודה שבצענו גם החקלאים התייאשו מהפרח והפסיקו לגדלו, וכתוצאה מכך בשנה האחרונה למחקר נאלצנו לגדל בעצמנו את כל הצמחים שהיו דרושים לבצוע הניסויים.

לאור כל זאת החלטנו מיוזמתנו לפנות למדען הראשי להפסיק את הפרוייקט בתום השנה השנייה למרות שהוא אושר במקור לשלוש שנים.

1. פרוט הפרסומים המדעיים בכתב ובע"פ:

אין עדיין פרסומים בנושא.

סיכום לדו"ח המחקר

1. מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה.

פרחי אסקלפיאס 'סילקי גולד' (אס"ג) נחשבים כפרח קטיפה חדש בעל פוטנציאל יצוא גבוה שקל מאוד לגדלו, אך חיי האגרטל שלו מוגבלים ביותר. הנחת המחקר הייתה שחיי האגרטל הקצרים נובעים מהפרשת לסקס מהגבעול לאחר חיתוכו וסתימת צרורות ההובלה עקב קרישת הלסקס. המטרות הספציפיות של המחקר היו: 1. אפיון הגורמים הפיסיולוגיים (פוטנציאל מים, כמות העלווה, הורמונים צמחיים) המשפיעים על מידת הפרשת הלסקס באס"ג; 2. פיתוח טיפולים לשיפור קליטת המים והארכת חיי האגרטל של אס"ג; 3. הבנת מנגנון הפעולה של הפרשת הלסקס בגבעולי אס"ג ומנגנון הקשייתו לאחר הנגירה; 4. לימוד האנטומיה הקשורה בלסקס ובחינת ההנחה שסתימת צרורות העיצה נגרמת עקב הקשיית הלסקס המופרש.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.

בוצעו ניסויים שונים בהם נלמדה השפעת טיפולי הטענה שונים במגוון תנאים והשפעת טיפולים המשנים את מצבו הפיסיולוגי של הענף, על שיעור קליטת התמיסה, כמות הפרשת הלסקס ואיכות הפרחים בחיי

אגרטל לאחר סימולציית משלוח. איכות הפרחים הוערכה עפ"י המדדים הבאים: כמישת עלים, איבוד טורגור, נשירת עלים והזדקנות פרחים. בנוסף, בוצעה אנליזה של הרכב הלסקס ופעילויות אנזימטיות בו, וכן נבחנו האנטומיה של הלטיציפרים בענף הקטיפי והיבטים פיסיולוגיים נוספים ברקמה. במהלך המחקר פותחה תמיסת הטענה המתאימה ביותר לפרחי אס"ג המורכבת מ- $0.2\% \text{ STS} + 40 \text{ ppm GA}_3 + 0.2\% \text{ TOG-10}$ והמשפּרָת בצורה משמעותית את איכות ענפי הפריחה. פותחו תנאי הטענה התורמים להפחתת כמות הלסקס המופרשת באמצעות ייבוש קל של ענפי הפריחה בשיעור של כ- 10% ממשקלם, הסרת עלים בגובה 30 ס"מ בגבעול, והטענה בתמיסה קרה המפורטת לעיל למשך 3-5 שעות ב- 20°C + 20 שעות בקירור. פותחו טיפולים נוספים שניתנו לפני ההטענה (כמו: טבילה של גבעול הפרח למשך 15 דקות ב- 90% כוהל או טבילה רגעית במים חמים) ותרמו לשיפור קליטת המים ומשך חיי האגרטל. האנליזה של הלסקס והבדיקות האנטומיות הראו את הממצאים הבאים: א) מערכת הלטיציפרים של צמחי אס"ג מרוכזת בעיקר בהיקף הליבה; ב. הלסקס מורכב משתי פאזות עיקריות, פאזה הידרופובית דביקה ופאזה הידרופילית הכוללת אנזימים שונים ובכללם פוליפנול אוקסידאזות; ג) הלסקס נקשר במגע עם מים, אך בדרך כלל לא סותם את צינורות ההובלה של הגבעול הקטוף; ד) לא ניתן להסביר את כמישת גבעולי קטיפי של אס"ג באמצעות סתימת צינורות ההובלה כתוצאה מקרישת הלסקס כגורם בלעדי. יתכן והסתימה החלקית היא רק אחד מהגורמים הפיסיולוגיים התורמים לכמישה.

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

תהליך הפרשת הלסקס הוא תהליך מורכב, הנתון להשפעות פיסיולוגיות, ביוכימיות ופיסיקליות. התוצאות שהתקבלו הצביעו על שתי מגמות סותרות: מחד, הוכח באופן ברור שעיקוב בהפרשת הלסקס מהגבעול באמצעות טיפולים שדווחו בספרות כיעילים לענפי קטיפי מפרישי לסקס (כמו טבילה בכוהל או במים חמים) תרמו לשיפור איכות ענפי הפריחה. מאידך, הממצאים האנטומיים בעיקר לא הצביעו על סתימה פיזית של צינורות העיצה באמצעות הלסקס המופרש, דבר המפריך למעשה את הנחת העבודה שעמדה בבסיס המחקר. לאור הממצאים הסותרים וסיבות נוספות (המפורטות בדו"ח) החלטנו מיוזמתנו לפנות למדען הראשי להפסיק את הפרוייקט בתום השנה השניה למחקר למרות שהוא אושר במקור לשלוש שנים.

4. הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים

ואחרים).

מכיוון שנמצא שההרכב הכימי והאנזימטי של הלסקס שונה מצמח לצמח (לדוגמה: חוסר פעילות של האנזים קואגולאז באס"ג) לא נראה שהמשך לימוד הנושא בפרחי האסקלפיאס כמערכת מודל יעזור בפתרון הבעיה בגידולים אחרים המפרישים לסקס. במקביל לעבודה שבצענו גם החקלאים התייאשו מהפרח והפסיקו לגדלו. נראה לכן שיש לברר באופן ספציפי את סיבת הכמישה בצמחים מפרישי לסקס והחשובים מבחינה חקלאית כדי לפתור את בעייתם, ואי אפשר להכלילם במערכת אחת.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים -

כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום

ותאריך.

תוצאות המחקר לא הופצו עדיין. מאמר נמצא בהכנה.

נספח :

הפרשת לטקס באסקלפיאס סילקי-גולד

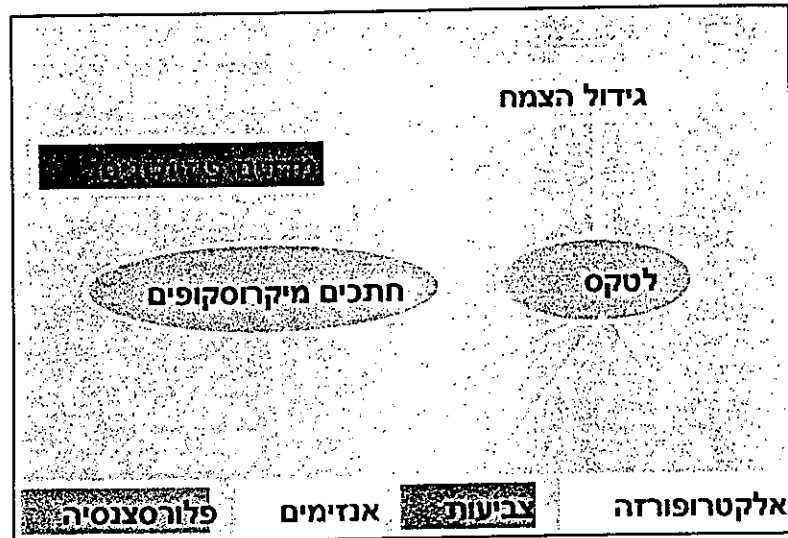
סיכום של עבודת מחקר של התלמידה אנג'לה וייסבך ממכללת אורט בראודה בכרמיאל, שבוצעה

במרכז מחקר נווה-יער בהדרכת ד"ר דני יואל וד"ר אפרים לוינסון.

המחקר בוצע על אסקלפיאס 'סילקי-גולד' = (אס"ג) שכומש לאחר קטיף, תוך השוואה עם

אסקלפיאס 'טוברוזה' = (אט"ב) שאיננו כומש.

תכנית המחקר כללה את המרכיבים הבאים :



1. בדיקת הלטקס

מטרת הניסויים : הכרת תכונות הצביעה של הלטקס בהן ניתן יהיה להשתמש כדי לזהות את הלטיציפרים בתוך הרקמה.

א. איפיון מיקרוסקופי : האיפיון המיקרוסקופי של הלטקס נעשה בשיטה פיזיקלית ע"י

פלוורסצנסיה, בשיטות כימיות ע"י חומרי צבע, ובשיטות אנזימטיות ע"י מתן סובסטרטים

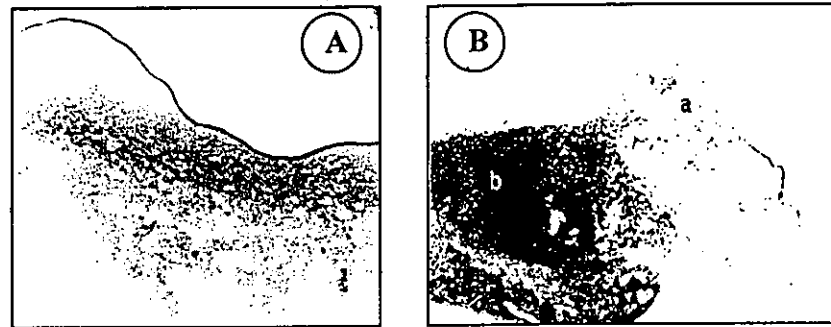
מתאימים במשולב עם ריאקציות-צבע.

תכונות הלטקס הטבעי כפי שנראו במיקרוסקופ אור ובמיקרוסקופ פלוורסצנטי מוצגות בטבלה 1.

טבלה 1 : מראה הלטקס במיקרוסקופ

מיקרוסקופ פלורסצנטי				מיקרוסקופ אור		אורך גל / חומר
עירור ב- 436 ננומטר		עירור ב- 365 ננומטר		אור לבן		
אט"ב	אס"ג	אט"ב	אס"ג	אט"ב	אס"ג	לטקס
פלורסצנסיה ירוקה	פלורסצנסיה ירוקה	פלורסצנסיה כחולה	פלורסצנסיה כחולה	ללא צבע	חום	

ב. התנהגות הלטקס עם ממיסים שונים: לאחר חשיפת הלטקס לאתנול ניתן היה להבחין בכך שלטקס מאסיב מורכב מלפחות שני מרכיבים: מרכיב דביק ומרכיב מגורגר, ואילו לטקס מאסיב בעל מרכיב אחד בלבד, המרכיב הדביק (תמונה 1).



תמונה 1: לטקס אסייג כפי שנראה במיקרוסקופ אור X100.

A. ללא ממש, x 260.

B. לאחר טיפול באתנול.

a. מרכיב דביק, b מרכיב מגורגר.

סיכום הבדיקות במיקרוסקופ אור ובמיקרוסקופ פלורסצנטי מוצג בטבלה 2.

טבלה 2: התנהגות הלטקס בממיסים שונים

מקור הלטקס		ממש / תאורה
אסייג	אסייב	
שני המרכיבים אינם מתמוססים ונוצרים אגרגטים.	אינו מתמוסס	מים / אור לבן
המרכיב המגורגר בעל פלורסצנסיה ירוקה חזקה. המרכיב הדביק בעל מעט פלורסצנסיה ירוקה.	ירוק	מים / עירור ב- 436 ננומטר
מתמוסס בחלקו ומתארגן מחדש. ישנה הפרדה ברורה בין המרכיב הדביק והמגורגר.	מתמוסס	אתנול / אור לבן
המרכיב הדביק בעל פלורסצנסיה ירוקה-צהובה חזקה. המרכיב המגורגר בעל פלורסצנסיה קלה בלבד.	ירוק-צהוב	אתנול / עירור ב- 436 ננומטר

ג. אפייניות לחומרי צבע שונים: חומרי הצבע בהם השתמשנו:

א. פלורוגלוצינול-HCl - צביעת פנולים.

ב. מתילן בלו - צביעה בלתי ספציפית, לצביעה כללית של הרקמה.

ג. Nitro Blue Tetrazolium (NBT) - צביעה אנזימטית של אוקסידזות

T. Sudan III + Sudan IV - צביעת ליפידים.

ה. Auramine O - צביעה פלורסצנטית של ליפידים.

הצביעות במתילן בלו וב NBT - בוצעו על לטקס טרי ועל לטקס מחומם ב- 30°C .

תוצאות הצביעה מוצגות בטבלה 3.

טבלה 3: התנהגות הלטקס בצביעות שונות

צבע / פרפרט		לטקס אס"ג		לטקס אס"ב	
טרי		מחומם		טרי	
פלוורוגלוציטול-HCl		אין צביעה		אין צביעה	
מתילן בלו		טורקוז		טורקוז	
NBT		אדום		אדום	
Sudan III+IV		מרכיב דביק: אדום. מרכיב מגורגר: אין צביעה		אדום	
Auramine O (436 ננומטר)		מרכיב דביק : פלורסצנסיה ירוקה-צהובה		אין צביעה	

לא נבדק.

2. אנטומיה

א. איתור לטיציפרים ברקמה: נבדקו חתכי גבעול ועלה על מנת לזהות את הלטיציפרים על פי

הלטקס המצוי בתוכם, ועל מנת לאתר את מיקומם באברי הצמח השונים. החתכים הוכנו ע"י

חיתוך ידני של חומר טרי, וחיתוך במיקרוטום של חומר שעבר פיקסציה ב-FAA או

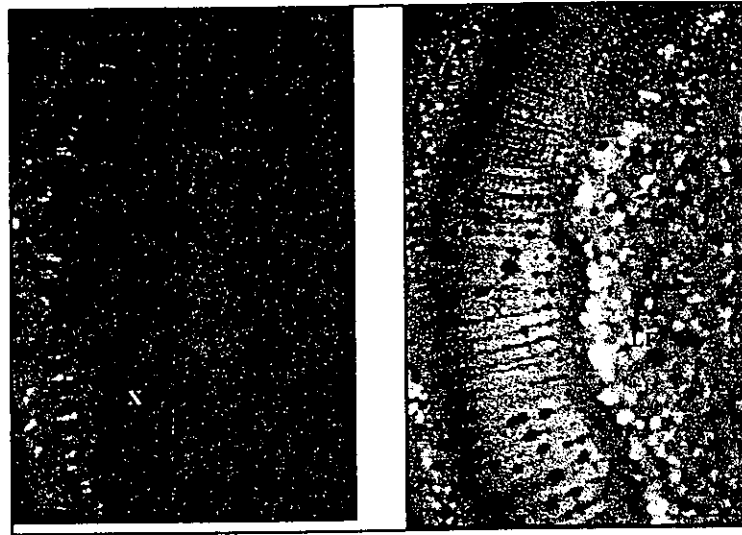
בגלוטראלדהיד, ואמבדינג בפרפין או בפלסטיק (LRWhite). החתכים נבחנו במיקרוסקופ אור (אור

לבן), וכן במיקרוסקופ פלורסצנטי בשני אורכי גל שונים. התוצאות מוצגות בטבלה 4.

טבלה 4: התנהגות מרכיבים שונים בחתכים טריים במיקרוסקופ

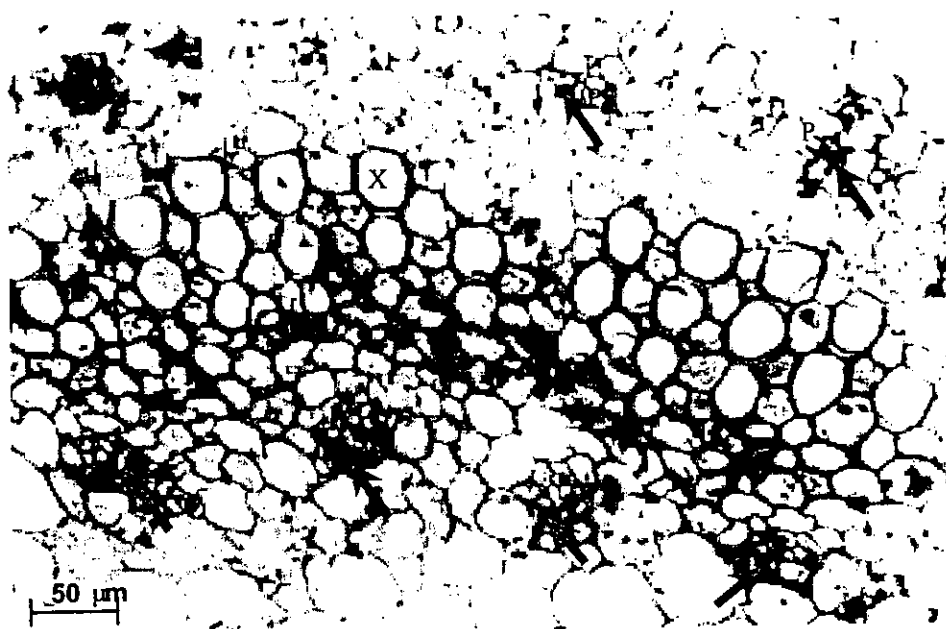
מיקרוסקופ פלורסצנטי				מיקרוסקופ אור		אורך גל / חומר
436 ננומטר		365 ננומטר		אור לבן		
אס"ב	אס"ג	אס"ב	אס"ג	אס"ב	אס"ג	
ירוק	ירוק	כחול	כחול	שקוף	חום	לטקס
ירוק	ירוק	כחול	כחול	ירוק	ירוק	ליגנין
ירוק	ירוק	ירוק-כחול	כחול	-	-	קוטין
אדום	אדום	-	-	ירוק	ירוק	כלורופיל

התנהגות הלטקס *in situ* היתה זהה, בהתאמה, להתנהגותו *in vitro* הן במצב טרי תחת המיקרוסקופ הפלורסצנטי (תמונה 2) והן לאחר הצביעות השונות. בחתכי רקמה ניתן היה לראות שהלטיציפרים נצבעו לכל אורכם בצורה בולטת יותר מאשר שאר תאי הרקמה. הלטיציפרים העיקריים מופיעים בעיקר בהיקף הליבה של הגבעול. לטיציפרים יותר צרים מלוים גם את השיפה בגבול קליפת הגבעול (תמונות 2-3). בעלה הלטיציפרים מלוים את השיפה בצורות (תמונה 4).



תמונה 2. חתך רוחב בגבעול של אס"ג. מיקרוסקופ פלורסצנטיה.

A, עירור באורך גל של 436 ננומטר. הלטקס נותן פלורסצנטיה צהובה-ירקרקת, ע"י כך ניתן להבחין במיקום הלטיציפרים. LF- לטיציפר, X- צינורות העצה. B, אותו חתך לאחר עירור ב-365 ננומטר. הלטקס נותן פלורסצנטיה כחולה, בהתאמה לפלורסצנטיה שב-A. x100.

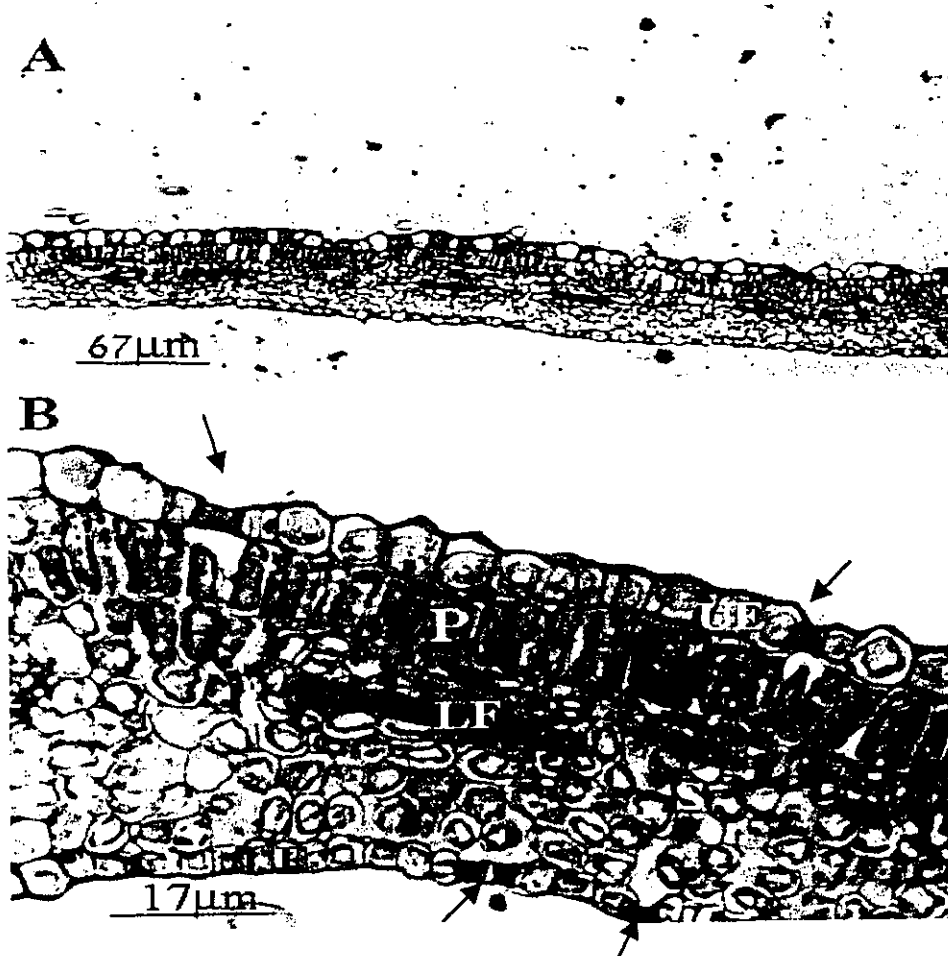


תמונה 3. חתך רוחב בגבעול של אס"ג. מיקרוסקופ אור - Toluidine blue.

X=עצה. P=שיפה. החצים מורים על לטיציפרים.

תמונה 4: חתך רוחב בעלה של אס"ג לאחר אמבדינג בפרפין וצביעת Toluidine blue.

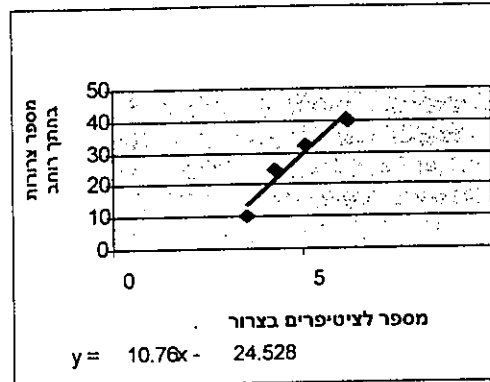
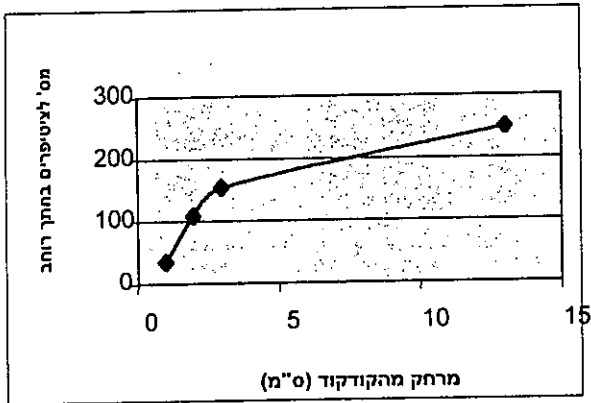
LF – קטע ארוך של לטיציפר, UE – אפידרמיס עליון, LE – אפידרמיס תחתון, P – רקמת עמודים, S – רקמה ספוגית. החצים מסמנים את הפיוניות. A, מבט כללי על החתך. B, קטע מוגדל.



ב. ארגון הלטיציפריס לאורך הגבעול: פרקי הגבעול מוספרו בהתאמה כך שהפרק העליון ביותר (הצעיר ביותר) הוא מס' 1. מספר הלטיציפריס נבדק בכל חתך על מנת לבדוק את מגמת התפתחותם לאורך הגבעול. נעשו חתכים עוקבים לאורך הגבעול. התברר כי ככל שאזור הגבעול בוגר יותר יש בו יותר קבוצות לטיציפריס, ובכל קבוצה יש מספר גדול יותר של לטיציפריס. התוצאות מוצגות בגרף 1.

ב.

א.

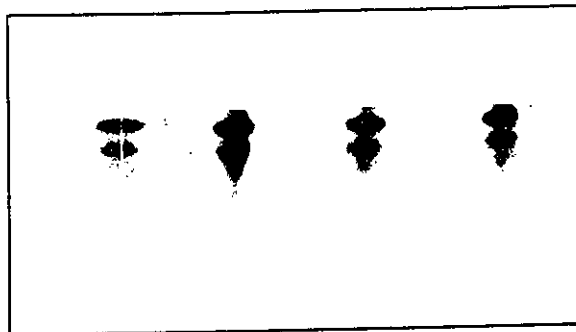


גרף 1: השתנות מספר הלטיציפריס לאורך הגבעול. א. היחס בין מספר הצורות בחתך רוחב של הגבעול למספר הלטיציפריס בצרור. ב. השתנות מספר הלטיציפריס לאורך הגבעול.

3. פעילות אנזימטית

באופן כללי הלטקס של אס"ג ואט"ב אינו נקרא בקלות בבואו במגע עם האויר. אך הלטקס נקרא בנוכחות מים.

א. הפרדה אלקטרופורטית של חלבונים בלטקס אס"ג: הרצת הלטקס בג'ל פוליאקרילאמיד הראתה נוכחות של מספר פסי-חלבונים עיקריים (תמונה 7).



תמונה 7: ג'ל אלקטרופורזה (PAGE) של הרצת לטקס של אס"ג.

הורצו ארבע כמויות שונות של לטקס שנתנו תוצאות דומות.

ב. בדיקה לפעילות קואגולאז: בניסוייו של Woo (1973) עם לטקס של *Havea brasiliensis* נמצא

שפעילות האנזים Coagulase גורמת לקרישה.

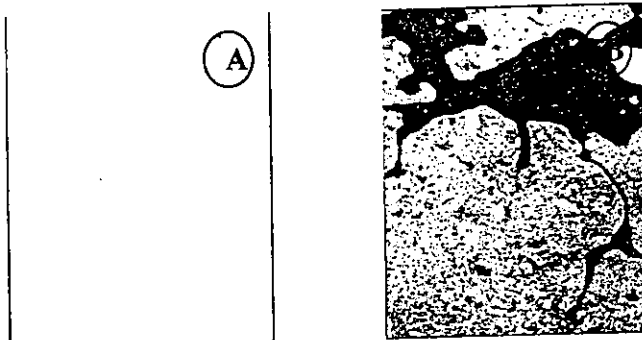
בעבודה שלנו בדקנו לפי הפרוטוקול של Woo האם הלטקס של אסייג נקרש כתוצאה מפעילות של אנזים דומה. התברר שבאסקלפיאס הנבדק אין פעילות דומה של קואגולאז.

ג. נוכחות פנול אוקסידזות בלטקס: הבדיקה נערכה ע"י הוספת סובסטרטים שונים ללטקס בנוכחות פארא פנילן דיאמין שתפקידו לתת ריאקציה צבע לאחר חימצון הסובסטרט. שינוי צבעו של הלטקס נבדק במיקרוסקופ אור. הלטקס שנבדק נמהל פי שניים בבופר פוספט 0.1M, pH 6.2 ועבר סירכוז. לאחר מכן הפרדנו את הנוזל העליון והמשקע וביצענו עליהם את הבדיקות הנ"ל. התוצאות מוצגות בטבלה 5 ובתמונה 5.

טבלה 5: בדיקת פעילות פנול אוקסידזות

חומר נבדק	ללא לטקס	לטקס מלא	משקע של לטקס	נוזל עליון של לטקס
DOPA	-	++	+	+
חומצה גלית	-	+	+	++
Quinol	-	+	+	-/+
4- מתיל קטכול	-	++	+	++
בקורת • בופר פוספט	-	-	-	-
** ביקורת פארא פנילן דיאמין	-	-	-	-

לפי טבלה זו ניתן לראות שהפעילות החזקה ביותר היתה עם הסובסטרטים DOPA ו-4-מתיל קטכול. חלק מהפנול אוקסידזות מצוי בנוזל העליון, וחלק במשקע.

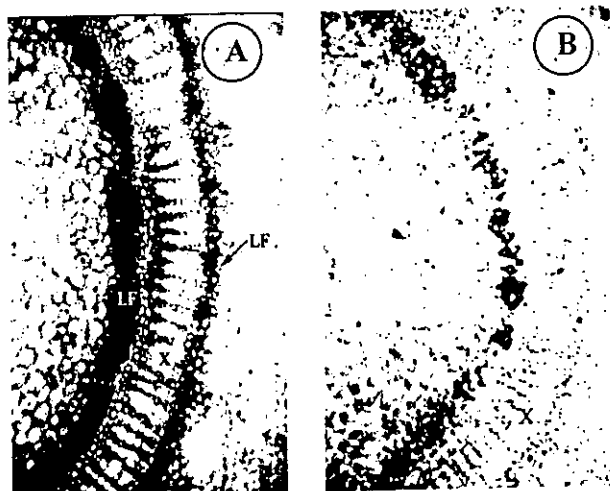


תמונה 5: תמונות מיקרוסקופיות של פעילות פוליפנול אוקסידאז בלטקס אסיג.
x 100

A. ביקורת בנוכחות בופר פוספט 0.1M, pH 6.2. ללא ריאקציה צבע.

B. בתוספת DOPA ופאראנילן דיאמין התקבלה ריאקציה צבע ברורה.

ד. נוכחות אוקסידאזות בלטקס: צביעת Nitro Blue Tetrazolium.



תמונה 6: צביעת NBT על חתך רוחב בגבעול X100.

A, ריאקציה הצבע בולטת. הלטיציפרים נצבעים בצביעה האנזימטית. B, בקורת לאחר חימום. חתך מקביל שעבר צביעה לאחר חימום של חצי שעה ב-70°C לא נתן ריאקציה אנזימטית כנייל. LF - לטיציפר, X - צינורות עצה.

4. היבטים פיסיוולוגיים

בדקנו האם הלטקס הינו גורם הכמישה או שישנם גורמים אחרים הגורמים לכמישתו המהירה של הענף הקטוף.

1. ניסוי א.

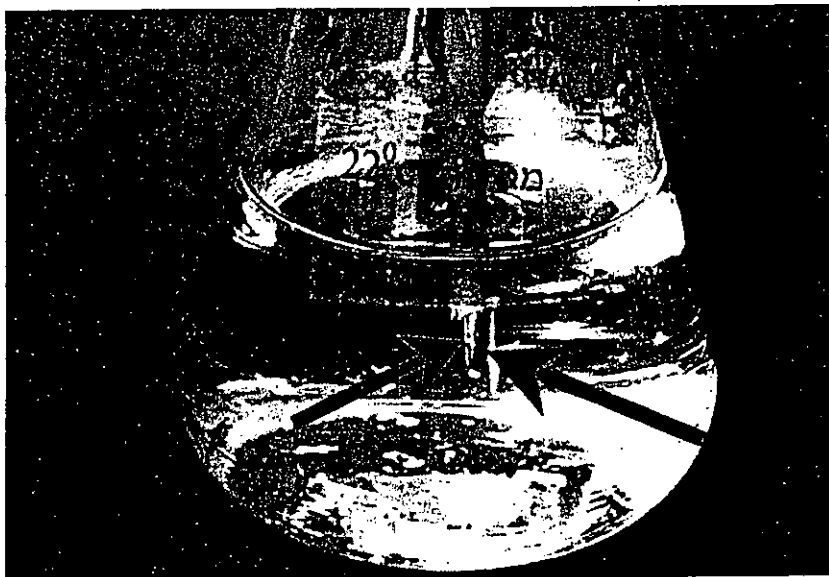
השפעת חיתוך הגבעול על הכמישה: נבחנו שתי קבוצות צמחים אשר שהו במים לאורך כל הניסוי: א. גבעולי אס"ג קטופים מפרישי לטקס.

ב. צמחי אס"ג עקורים עם שורשיהם – אינם מפרישים לטקס (הלטיציפרים אינם מתפתחים בשרשים).

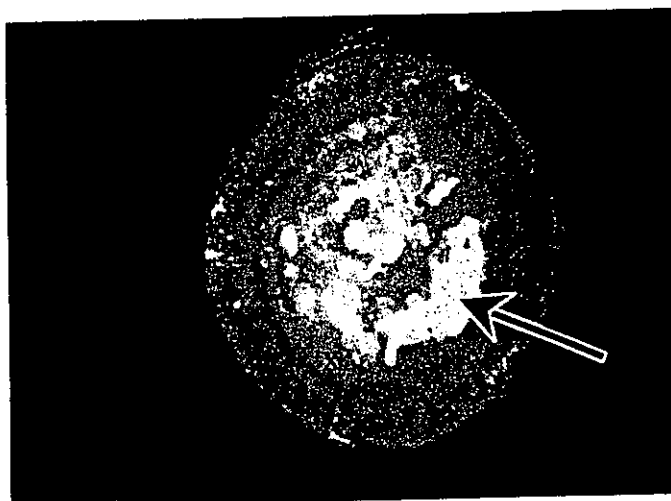
שינוי מיקומם הפיסי של שתי קבוצות הצמחים גרם לכמישתם והם דרשו תנאי קור ולחות על מנת להתאושש. שתי הקבוצות התאוששו לאחר כשבוע.

2. ניסוי ב.

בחינת התנהגות הלטקס לאחר גיזום גבעול וטבילתו במים. הלטקס ניגר לתוך המים ונקרש בהם (תמונה 7). בחינה מיקרוסקופית של שטח הגיזום (תמונה 8) מראה כי הלטקס מכסה רק את אזור הליבה והוא איננו מכסה את אזור צינורות העצה.



תמונה 7. גבעול אס"ג גזום טבול במים. החיצים מורים על לטקס שניגר משטח הגיזום ונקרש במים.



תמונה 8: שטח החתך של גבעול אסייג שהוכנס למי ברז ב- 22°C מיד לאחר הגיזום. הלטקס הלבן אשר ניגר מן הלטיציפרים מכסה את אזור הליבה בלבד (חץ) ואין הוא מכסה את אזור צינורות העצה (X).

3. ניסוי ג.

בדיקת מצבם הפיסיולוגי של צמחי אסייג בתנאי עקה. הניסוי נערך בשני שלבים. שלב א' - שמנו צמחי אסייג במים בטמפרטורות שונות. לאחר כמישה והתאוששות של חלק מהצמחים הוכנו חתכים באזור הגיזום שלהם שהועברו לבחינה במיקרוסקופ. התוצאות מוצגות בטבלה 6.

שלב ב' - הצמחים שלא התאוששו הועברו למים חמים (50°C) מבלי שיעברו חיתוך נוסף, ואילו הצמח שהתאושש הועבר למי ברז לאחר שנחתך בסיסו שנית. תגובת הצמחים נבדקה לאחר 5 שעות ולאחר 24 שעות. התוצאות מוצגות בטבלה 7.

טבלה 6: התנהגות גבעול קטוף בטמפ' שונות

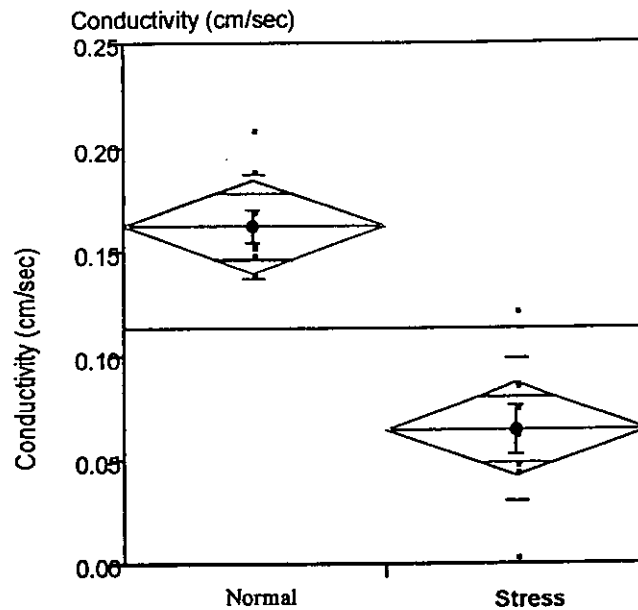
מים	טמפ'	התנהגות הצמח	התנהגות הלטקס
מי ברז	24°C	כמישה קלה	הלטקס מכסה את אזור הליבה בלבד.
מים קרים	8°C	כמישה חזקה	הלטקס מכסה כמעט את כל אזור הליבה ומספר מצומצם של צינורות עצה.
מים חמים	50°C	כמישה הדרגתית והתאוששות לאחר שעה.	מעט לטקס, המכסה את אזור הליבה בלבד.

טבלה 7: התנהגות גבעול קטוף בתנאים שונים לאורך זמן

התנהגות הצמח		טמפ' מים	
לאחר 24 שעות	לאחר 5 שעות	שלב ב'	שלב א'
התאוששות מלאה	התאוששות	50°C	24°C
התאוששות מלאה	חזרת טורגור והתחלת התאוששות	50°C	8°C
נשאר מאושש	נשאר מאושש	24°C	50°C

4. ניסוי ד':

בדיקת רמת הפוטוסינתזה ומוליכות הפיוניות בצמחי אס"ג בתנאים רגילים ובתנאי עקה. התברר שבעקה נסגרות הפיוניות ומפחיתות את המוליכות בכמחצית (תמונה 9). והפוטוסינתזה יורדת בהתאמה.



1. תמונה 9: מוליכות הפיוניות בעלים של אסקלפיאס סילקי גולד בתנאים רגילים ובתנאי עקה. המוליכות יורדת לכמחצית מערכה הרגיל בתנאי עקה. ניתוח התוצאות בוצע בתוכנה הסטטיסטית JMP.

מסקנות

1. מערכת הלטיציפריס של צמחי אסקלפיאס 'סילקי גולד' מרוכזת בעיקר בהיקף הליבה.
2. הלטקס מורכב משתי פזות עיקריות, פזה הידרופובית דביקה ופזה הידרופילית הכוללת אנזימים שונים ובכללם פוליפנוול אוקסידאזות.
3. הלטקס נקרש במגע עם מים, אך בדרך כלל לא סותם את צינורות ההובלה של הגבעול הקטוף. הלטקס סתם חלק מצינורות העיצה רק לאחר טיפול במים קרים שגרם לכמישה חזקה של הענף.
4. לא ניתן להסביר את כמישת גבעולי הקטיף של אס"ג באמצעות סתימת צינורות ההובלה כתוצאה מקרישת הלטקס כגורם בלעדי. יתכן והסתימה החלקית היא רק אחד מהגורמים הפיסיולוגים התורמים לכמישה.