

טקירה 449

תכנית מס'

3/324

המכון הלאומי והאוניברסיטאי לחקלאות
מכון וולקני לחקר החקלאות



77

מכון וולקני לחקר החקלאות

האגף למשעים
המחלקה למשעים סובטרופיים

שינויים בעלה-בונה בהשפעת טמפראטורות נמוכות
(הסתכלויות מיקרוסקופיות בחתכים בשנת 1963)

מאת

מ' גוסריך, ע' גינזבורג

סקירה מקדימה

המחלקה לפירסומים, רחובות
רחובות, אייר תשכ"ד אפריל 1964



ת ק צ י ר

נערכו הסתכלויות מיקרוסקופיות בחתכים צבועים של עלה-בננה אשר הוחזקו קודם לכן בשתי טמפרטורות נמוכות: 5- ו-1+ מ"צ. כן נערכו הסתכלויות מיקרוסקופיות בתהליך הקיפאון של ריקמה חיה של עלה-בננה. מתוארים השינויים שחלו בתוך העלה לאחר שהייה בטמפרטורות הנמוכות. רוב השינויים חלו בכלורופלאסטים.

ניתן תיאור של המיכשולים בהכנת שיטה להסתכלות ישירה בתהליך הקיפאון בתוך התא החי, ושל פיתרונם:

ירידה הדרגתית של הטמפרטורה הושגה ע"י מניעת סתימות והתפוצצויות בתהליך ההזרמה של הגז המקרר. היה צורך בבחירת מדיום מתאים לחתך, ונמצאו כמתאימים שמן פאראפין ושמן אימרסיה. משמש הראיה ע"י הצטברות מים על העדשות והזכוכיות נמנע ע"י הזרמת גז חנקן אל החלל שבין הפרפאראט לבין האובייקטיב.

כן מתואר תהליך הקיפאון בתא עלה-הבננה, המתהווה בדרך דומה לזו המתוארת בספרות לגבי צמחים אחרים.

בתחילה חלה האפלה באופן פתאומי, ולאחר החלשה הופיעו גבישי-קרח.

הסתכלו יירות מיקרוסקופיות בחתכים בשנת 1963

מ. גוטריך, ע. גינזבורג

מ. ב. ג. ד.

(א) הסתכלות בפרפראזיס קבועים שהוכנו מחומר אשר קיבל טיפול בטמפרטורות נמוכות.

(ב) הסתכלות ישירה לתוך ריקמה חיה בשעת הקירור.

שיטות וחרמרים

לשני השלבים שימשו שתילי בננות צעירים שגודלו בחצאי-חביות (לזפת).

שלב א' - באמצע נובמבר 1963 בלקח עליה צעיר אחד, וארבעה קטנים ממנו קיבלו את הטיפולים הבאים:

1. ביקורת, ללא החזקה בטמפראטורה נמוכה.

2. החזקה ב-5-מ"צ במשך שעה, והכנסה מיידית לפיקסאטיב.

3. " " " " " " , העברה לסמפראטורת החדר למשך חצי שעה, והכנסה:

לפי קסאטי ב.

4. התזקה ב-1+ מ"צ במשך חצי יום ולילה שלם, והכנסה לפיקסאטיב.

הפיקסאטיב היה מורכב מתמיסת Navashin. לאחר הפיקסאציה עברו כל הדוגמאות זיהוי ראציה

לפי שיטת הכוהל הבוטילי-טרציאלי (TBA): החדרת הפאראפין לתוך הריקמה והכנת הקוביות.

נעשו בדרך המקובלת בפארמפיין צהוב (tissue mat) מתוצרת חברת "פישר". חתכי-רוחב בעובי

10-12 מיקרון בעשו במיקרוטום סיבובי, ונצבעו בשתי שיטות: א. ספרנין-פסטגריין;

ב. המאטרכסיליין-ספרנין או המאטרכסיליין בלבד.

שלב ב' - בספטמבר-אוקטובר 1963 נערכה הסתכלות בריקמה חיה ולשם כך הוכנו, בעזרת סכין-

גילוח, חתכי רוחב דקים בעלים צעירים; החתכים, שעברו דרך העורק המרכזי בקצהו העליון

של העלה, הושמו בתוך טיפת שמן פאראפין שעל-גבי זכוכית-נושאת וכוסו בזכוכית-מכסה.

כן מיוחד של חברת Leitz, המותאם למיקרוסקופ של אותה החברה ומאפשר הסתכלות

לתוך הריקמה בעת קירורה. הקירור נעשה על-ידי הזרמת פחמן דו-חמצני ממיכל אל תוך הכן,

ראת הסמפראטורה ניתן היה לקרוא במדחום הצמוד לשולי הכן. ההסתכלות נעשתה בשיטת ה-Phase Contrast. כדי למנוע התעבות של טיפות מים על הפרפאראט והעזשות בעת הקירור, הוחזק הפרפאראט בתוך תא מיוחד שלתוכו הוזרם זרם חלש של חנקן איבריטי.

ה ת ו צ א ו ת

שלב א': ההסתכלויות המיקרוסקופיות בפרפאראטים קבועים.

שינויים בולטים חלו בעלה בעקבות החזקתה בסמפראטורה של 5- מ"צ: ניזוקו הכלורו-פלאסטים והגרעין, נוצרה פלאסמוליזה בתאים, תאי העמודים שינו צורתם ונתגלו קרעים בתוך הריקמות השונות.

בעלה הנורמאלי מצטיינת ריקמת תאי-העמודים במיבנה סגור ואחיד מבחינה גאומטרית: גשרי מאזופיל המכילים ציבורות-הובלה מפרידים בין חללי-אוויר גדולים; לכלורופלאסטים צורה מוגדרת, צורת עדשה או דיסקוס, והם מסודרים, על-פי-רוב, לצידי הדופן; בתוך הכלורופלאסטים ניתן לראות כתמים כהים שהם בוודאי הגרנות, והגרעין גדול וכדורי (תמונה 1).

טיפול 2. בעקבות הטיפול הזה חלו בכלורופלאסטים שינויי-צורה רבי-דרגות: לצד הצורה הנורמאלית ניתן לראות גם צורות מעוותות והצטמקויות; יש והכלורופלאסטים נוטים להצטופף במקום אחד בתא, בצמידים לקבוצות בצורת אגלומצינאציה ומתמזגים לחטיבה אחת, שבה אפשר עדיין להבחין במרכיבים העגולים. אבל השינוי הבולט ביותר הוא - אבדן כל צורה של כלורופלאסט; אין רואים אלה חומר אמורפי, המצטבר במקומות מסויימים בתא - במרכז או באחד מקטביו (תמונה 2). בתאים מעטים מסתמנת צורה שאפשר לפרשה כשרידי-גרעין.

פלאסמוליזה קיימת בכל התאים שתכנס נצבע. קרעים נגרמו במיוחד בגשרי המאזופיל שבין חללי האוויר, אשר נותקו מהריקמה העמודית. בתוך הריקמה העמודית עצמה התרופף הקשר בין תאי העמודים וניגלו פרוצות קטנות בין התאים (תמונה 4).

טיפול 3. הנזק שנגרם כתוצאה מטיפול זה גדמה כחומר יותר מאשר הנזק בטיפול 2: בתוך תאי העמודים נראה כל החומר כמסה אמורפית; קשה למצא כלורופלאסט שלם או גרעין; פלאסמוליזה קיימת בכל התאים; הריקמה העמודית נראית מפוררת, ובמקום הפרצות הקטנות בין תאי העמודים שנגרמו מטיפול 2 ישנם קרעים של ממש; תאי העמודים עצמם שינו את צורתם, ובמקום הצורה הישרה ניתן לראות תאים מעוקמים ומפותלים (ראה טבלה 3).

סיפור 4. השינוי היחיד בו ניתן להבחין מתייחס לכלורופלאסטים: הם גדולים בערך 1/3 מכלורופלאסטים נורמאליים, ובתוכם ניתן לראות עיגולים לבנים אחדים, כ-5 עד 6 במספר; עיגולים אלה תופסים, לפעמים, את החלק המכריע של הכלורופלאסט ומשאירים מן החומר הצבוע רק חוט דק עם כמה הסתעפויות בין העיגולים הלבנים. עיגולים לבנים כאלה אפשר לראות גם בתוך כלורופלאסטים נורמאליים, אלא שהם קטנים יותר ומעטים יותר, ואינם מתבלטים מן החומר הצבוע בצורה כל-כך ברורה, כך שבדרך-כלל קשה להבחין בהם (תמונה 5).

שלב ב': ההסתכלות המיקרוסקופית בתהליך הקיפאון שבחתך עלה-חי.

בעבודה הזו בתקלנו, בקשיים טכניים רבים, ולפתרונם יכולנו להעזר רק במעט בניסיונם של אחרים (1), (2); גם חוקרים אלה חקרו את תהליך הקיפאון אולם היה באפשרותם לבחור את הצמח המתאים למטרתם, ואת הציוד בנו לפי צרכי המטרה. לעומתם מוגבלים אנו בצמח אחד-הבגה - וכן בציוד העומד לרשותנו.

הקשיים העיקריים היו:

- (1) לא ניתן היה להוריד את הטמפרטורה בצורה אחידה;
- (2) קשה היה לבחור את המדיום לחתך;
- (3) קשה היה למנוע את שטוש הראייה שבגרם מהצטברות מים על הזכוכיות והעדשות.
- (4) קשה היה לקבוע את הטמפרטורה האמיתית של החתך.

1. השליטה על הוריסות של CO_2 הושגה ע"י הזרמת מים על פומית-היציאה של הגז, לשם מניעת התעבותו לאבקה שגרמה במקום הזה לסתימות והתפוצצויות. מניעת התקלה הזו איפשרה הורדת טמפרטורה בצורה אחידה והדרגתית.
2. כמדיום לחתך צריך היה לבחור בחומר: אשר דרכו ניתן לראות בבירור, המונע איבוד מים מן הריקמה, אינו רעיל, אשר נקודת קפאון נמוכה מזו של החתך, ומאידך אינו משפיע על נקודת הקיפאון של החתך. כמתאימים לכך במצאו - שמן פאראפין (לפי המלצתו של אסהינה (1)) וגם שמן אימריסה תוצרת Leitz.
3. בעת ירידת הטמפרטורה של הכן נוצרת התעבות רבה של אדי-מים שבאוויר על גבי הכן ועל הזכוכיות והעדשות; התעבות זו מערפלת ומטשטשת את הראייה במיקרוסקופ. בעייה זו נפתרה במלואה ע"י הזרמת חנקן דרך תא קטן שבו מוחזק הפרפאראט.
4. בשלב זה של העבודה הסתפקנו בקריאת הטמפרטורה במדחום הצמוד לשולי הכן, אף-על-פי שברור היה שאין זו הטמפרטורה של הפרפאראט. נדמה שניתן למצוא דרך לקביעת הפרש הטמפרטורות בין המדחום השולי לבין הפרפאראט.

מציאת הדרך לפעולה תקינה איפשרה הסתכלות תקינה בהיווצרות גבישי קרח בתאי-הפרנכימה הגדולים וכן בצינורות המים שבעורק המרכזי של עלה הבננה. כדי להתבונן בהיווצרות הקרח היה צורך להוריד, ברוב המקרים, את הטמפרטורה לתחום של 15- עד 20- מ"צ, כפי שנמדדה במדחום השולי של הכן. עם הורדת הטמפרטורה נתקבלה התופעה של ה-Flash שתוארה ע"י אסהינה (1) כתופעה מיוחדת של הקיפאון האינטרא-צללורי. החתך שנראה בהיר במשך כל הזמן נעשה באופן פתאומי אפל, ולאחר כמה שניות החלו לבצבץ גבישי קרח כמעט ברוב תאי הפרנכימה. לאחר שניות אחדות של האפלה החל החתך מבהיר שוב אבל המצב לא חזר לקדמותו. כאשר הובח לסמפראטורה לעלות ניתן היה לראות שגבישי הקרח הפשירו בסמפראטורה שהיתה גבוהה ב-10 עד 12 מעלות מעל לסמפראטורה שבה הופיע ה-Flash. בנקודה זו נעלמה האפלה לחלוטין והחתך חזר להיות בהיר כפי שהיה בתחילה. כדי לקבל את ה-Flash היה צורך, בכמה מקרים ליצור זעזועים מכאניים אחדים.

ד י ו ן

שלב א' אחדות מן התוצאות אשר נתקבלו בניסוי החד-פעמי הזה, ראויים לאימון, ואילו לאחרות יש להתייחס בזהירות. תופעות ההרס בתוך העלה - ובמיוחד של כלורופלאסטים - לאחר שהייה בסמפראטורה של 5- מ"צ, נראות מהימנות. ויש להן חיזוק מצדדים אחרים. מהסתכלות כללית במסעי בננות, במשך שנים רבות, ידוע שירידה קלה של טמפרטורה מתחת לאפס מעלות גורמת לתמותת עלים; נקודת הקיפאון של מיץ-התא שבעלי הבננות בקבעה 1- מ"צ ושינויי הלחץ האוסמוטי חלים אף הם בסביבת טמפרטורה זו (5). השינויים שחלו בתוך התאים של צמחים שהוקפאו והופשרו תוארו בפורומיקרוגראפים (3); גם בעבודה זו נמצא שהשינוי הבולט ביותר הוא העלמות או התמוססות הגופים המוגדרים, כגון: פלאסטידים וגרעין, תוך כדי התרכזותם במקומות מסויימים בתא וכן התהוות אגלוסינאציות. בניסוי הנוכחי, בהגיע הטמפרטורה ל-5- מ"צ היו העלים קפואים. העלה שהוכנס מיד לפיק לפיקסאטיב - טיפול 2 - היה ירוק; העלה שקיבל טיפול 3 נעשה חום ורך במשך הפשרתו בסמפראטורת החדר.

לגבי התופעות המשותפות שנתגלו בעלים לאחר הטיפולים 2 ו-3 - אין ספק, אולם קיימים ספיקות לגבי פירוש ההבדלים שביניהם. הכנסת העלים הקפואים לפיקסאטיב במועדים שונים, היתה מיועדת לבירור השאלה אם הנזק נגרם ע"י הקיפאון עצמו או ע"י ההפשרה. אולם, יש ספק אם הניסוי נערך בצורה המתאימה למציאת התשובה לשאלה זו. הפיקסאטיב לא קורר לפני השימוש, ולכן גרם בטיפול 2 להמסתו המהירה של הקרח; כך שגם טיפול זה כלל הפשרה. מאידך, אפשר לסעון שבטיפול 3 נגרם הנזק המוגבר דווקא ע"י ההתייבשות במשך חצי שעה, ולא ע"י ההפשרה.

התוצאה של הסיפול 4 נראית מעניינת. את התמונה של סיפול 4 (תמונה 5) אפשר להבין טוב יותר על-פי מראה הכלורופלאסטים דרך מיקרוסקופ אלקטרוני, המוצג בעמוד 100 בספרו של קופר (4); בתמונה זו ניתן לראות את המיבנה הפנימי של כלורופלאסט, המורכב מסבך של דפדפים (לאמלות) המצטופפים במקומות שונים ליצירת גרנות, ומידולים במקומות אחרים, כך שנשארים ביניהם מקומות ריקים לבנים בצורת עיגולים בגודלים שונים. בעזרת התמונה הזאת נוכל, אולי, להסביר את התוצאה שלנו בדרך זו: בהשפעת הצינה (צינה = סמפראטורה נמוכה ומזיקה קצת מעל נקודת הקיפאון) חלה תפיחות של הכלורופלאסטים המגדילה את המקומות הריקים הלבנים ומבליטה את חלקם בהשוואה לחלקו של הגרנות והדפדפים, אשר בלחצים זה לזה. הצטופפות החומר הכהה מביאה להבלטה ברורה של העיגולים הלבנים הגדולים.

לגבי התוצאה הזאת מן הראוי להזכיר, שהניסוי הוא חד-פעמי, וגם לא מצאנו ציור או צילום שנעשו ע"י חוקרים אחרים והמתארים שינויי הגופים הסובצלולאריים בהשפעת הצינה.

שלב ב' הסמפראטורות המובאות בפרק התוצאות, לעיל, מעידות על-כך שנתקלנו בתופעה של התת-קירור (Supercooling בלע"ז). תנודות התת-קירור מונעות את קביעתה של נקודת קיפאון יציבה. אסיהנה (1) התגבר על מכשור זה ע"י זריעת גבישי קרח לתוך הריקמה. סדרי העבודה הנוכחיים מונעים מאתנו את השימוש בפיתרון זה, אולם קיימת תוכנית לשינוי סדרי העבודה בעתיד, כדי לאפשר זריעת קרח.

ס ו מ

סמפראטורה של -5°C גרמה לפלאסמוליזה, לנזק בכלורופלאסטים ולקרעים בריקמות של עלה-בננה, כפי שנראו בחתכים מיקרוסקופיים. כל הנזקים היו חמורים יותר לאחר הפשרה במשך מחצית שעה מאשר כתוצאה מהכנסה מיידית לפיקסאטיב.

עלה שהוחזק במשך חצי יום ולילה שלם בסמפראטורה של $+1^{\circ}\text{C}$, הכלורופלאסטים שלו היו מוגדלים ובתוכם הופיעו עיגולים לבנים גדולים.

בהערכת התוצאות האלה יש לזכור שהן מתבססות על ניסוי חד-פעמי. התופעות שתוארו כאן בפעם הראשונה דורשות אימות בניסויים נוספים.

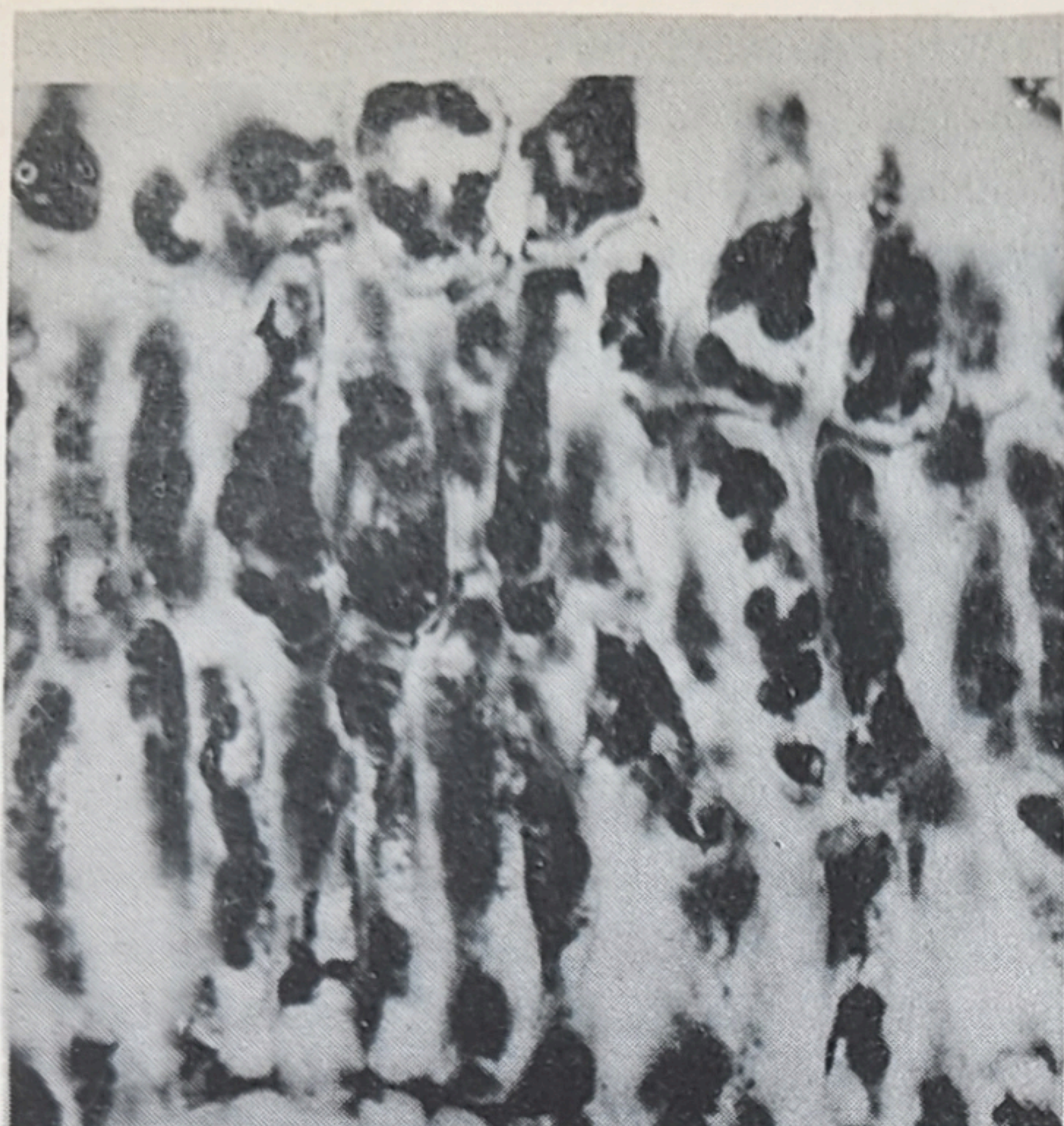
כהכנה להסתכלות ישירה על הנעשה בריקמת הבננה הנתונה להשפעת סמפראטורות נמוכות הצליחו האחראים לעבודה זו להתגבר על כמה קשיים טכניים, ולראות את תהליך הקיפאון בעלה-בננה באותה צורה המתוארת ע"י Asahina (1) לגבי צמחים אחרים. הוכנו דרכים לקביעת הסמפראטורה של הפראפראט ולמניעת התת-קירור, דבר שאיפשר תיכנונו של שלב נוסף בעבודה הזאת, והוא: התבוננות בקיפאון החל בריקמות השונות, ועיקוב אחר תופעות הצינה.

ס פ ר ו ת

1. Asshina, E. (1956) The freezing process of plant cells.
Contr. Inst. Low Temp. Sci. 10:83-126.
2. Hudson, M. A. and Idle, D. B. (1962) The formation of ice in plant tissues.
Planta. 57:718-730.
3. Kardo-Sysoeva, E. K. and Pakhomova, M. V. (1960) The nature of plant frost resistance.
Fiziologiya Rastenii (Transl.) 7:351-355.
4. Kuyper, H. M. A. (1962) The Organization of Cellular Activity. Elsevier, Amsterdam.
5. Shmueli, E. (1960) Chilling and frost damage in banana leaves . Bull. Res. Council.
Israel 8D (3-4):225-238.

ה ס ב ר ל ת מ ו נ ו ת

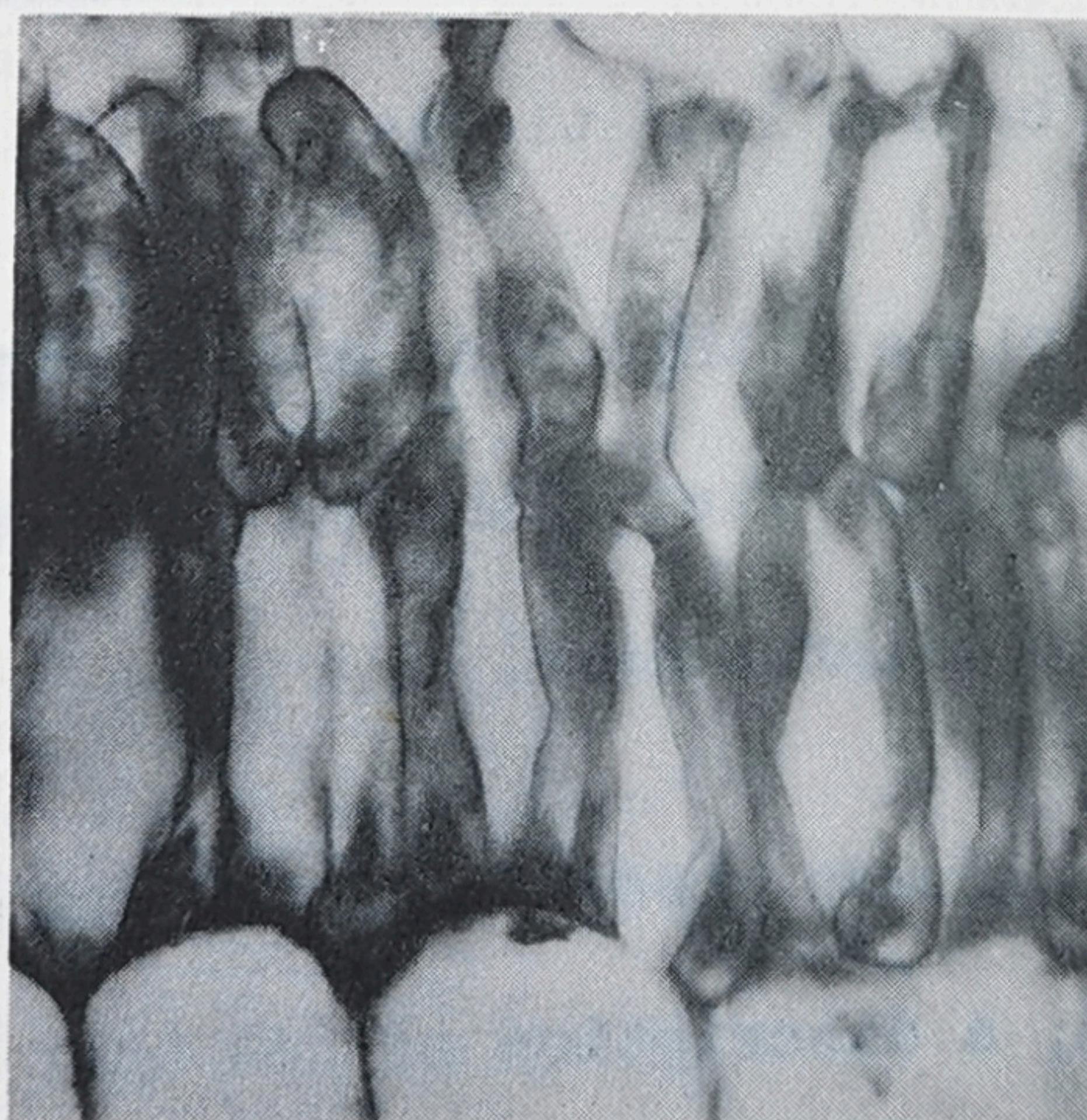
- תמונה 1. תאי-העמודים ובתוכם כלורופלאסטים בחתך רוחב של עלה-בננה ללא סיפור.
- תמונה 2. חתך רוחב של עלה-בננה ששהה ב- 5- מ"צ במשך שעה והוכנס מיד לפיקסאטיב. ניכרים שינויים בתוך תאי-העמודים. תאים שבהם הכלורופלאסטים מצטופפים לגושים, ותאים שבהם אין רואים עוד גופים מוגדרים.
- תמונה 3. חתך רוחב בעלה-בננה ששהה ב- 5- מ"צ במשך שעה, ובטמפרטורת החדר במשך חצי שעה לפני הכנסתו לפיקסאטיב. נראים תאי-עמודים מעוותים וחללים גדולים ביניהם, אין זכר לגופים מוגדרים. כל פנים התא הוא אמורפי.
- תמונה 4. חתך רוחב בעלה-בננה ששהה ב- 5- מ"צ במשך שעה. נראים קרעים בגשרי-המזופיל:
- תמונה 5. חתך רוחב בעלה-בננה ששהה 18 שעות בטמפרטורה של +1 מ"צ, נראים כלורופלאסטים מוגדלים ובתוכם עיגולים לבנים גדולים.



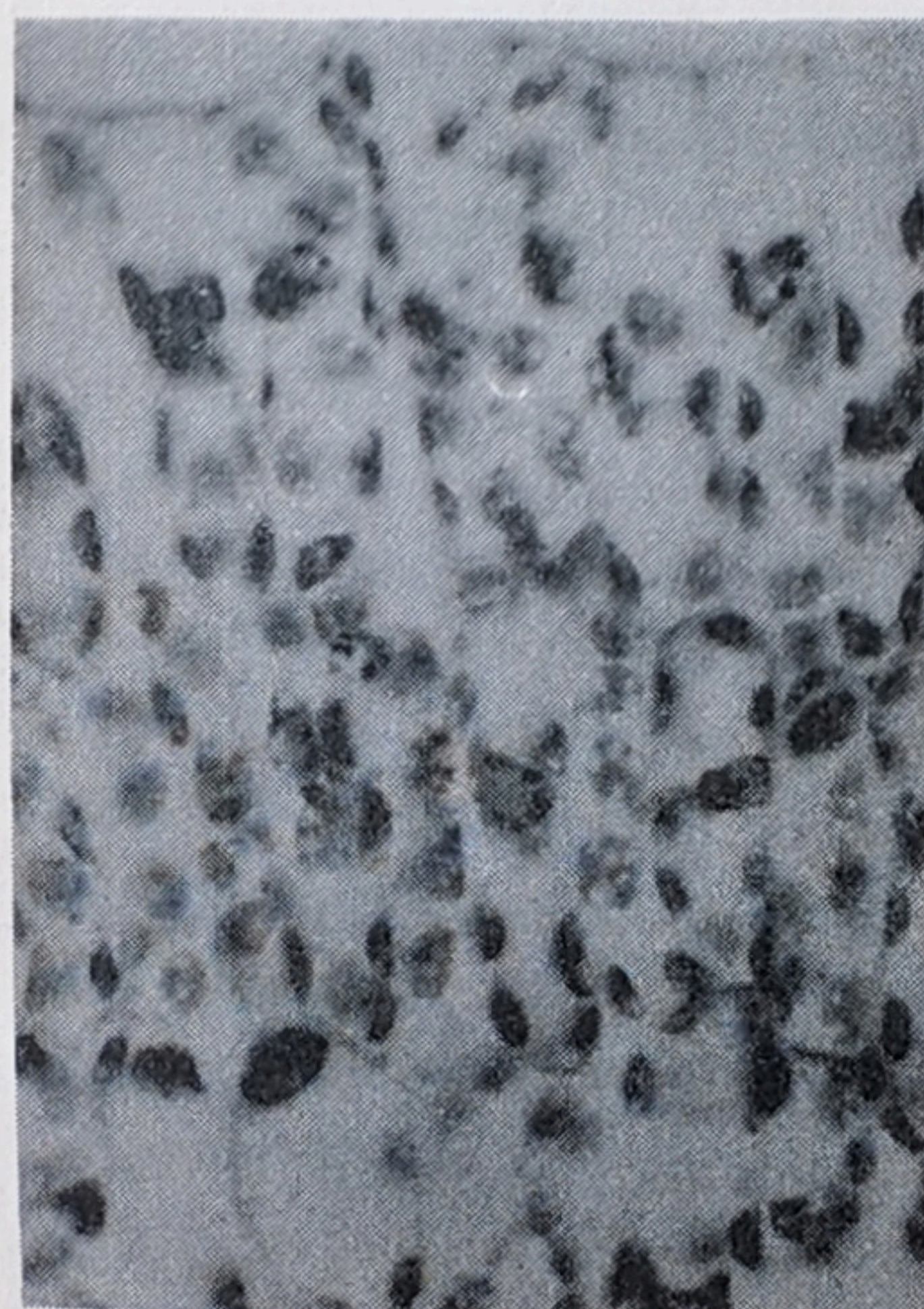
תמונה 2



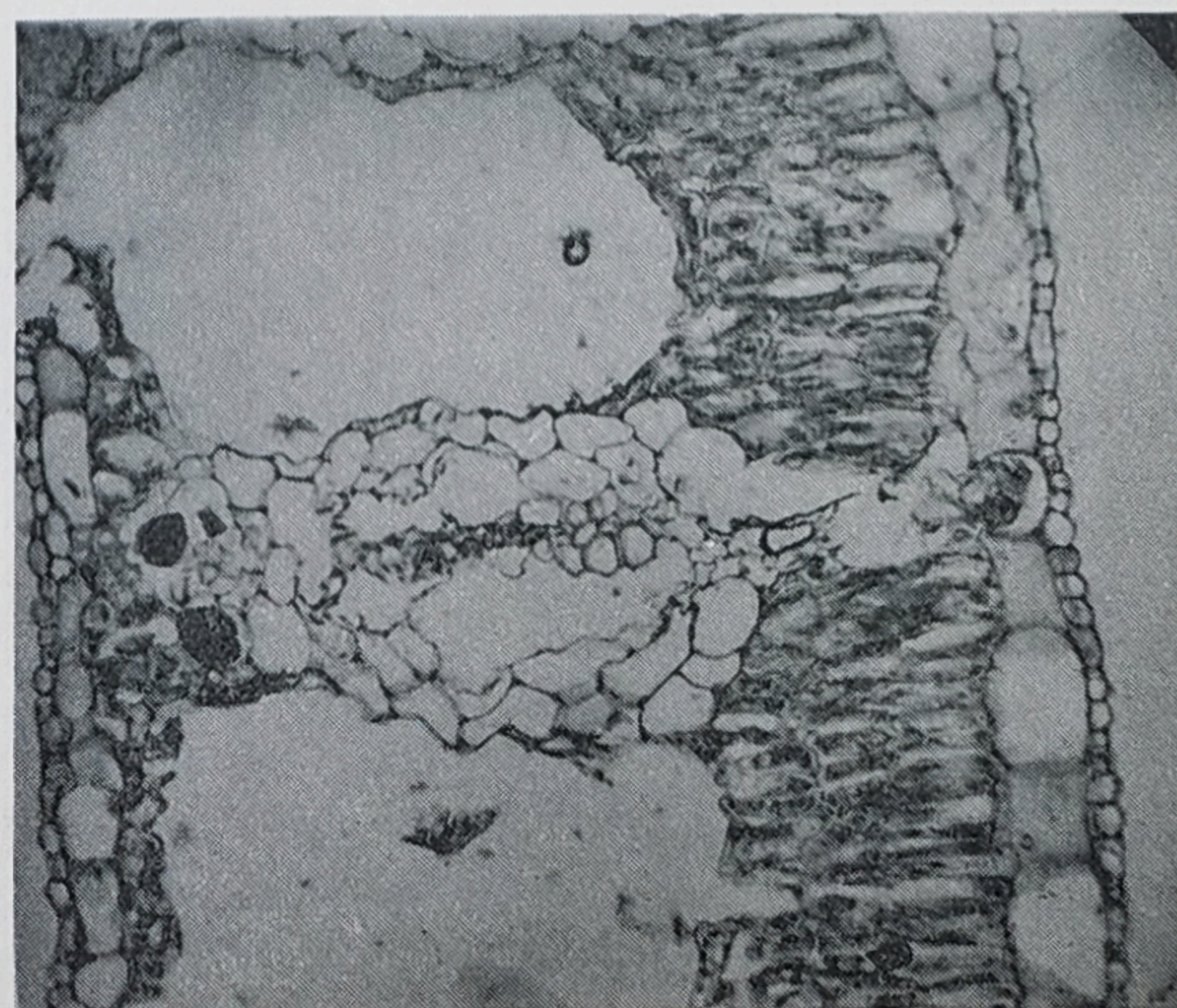
תמונה 1



תמונה 3



תמונה 5



תמונה 4

CHANGES IN BANANA LEAF TISSUES UNDER THE INFLUENCE OF LOW TEMPERATURES
(Observations made on cut and stained sections under the microscope)

By

M. Gottreich and O. Ginsburg

S U M M A R Y

Microscopic observations were made on cut and stained sections of banana leaves which had been treated previously with low temperatures at two levels: $+1^{\circ}\text{C}$ and -5°C . In addition, observations were made under the microscope during the process of freezing live banana leaf tissue.

The changes which took place within the leaf as a consequence of the treatments are described and illustrated with microphotos. The most important of these changes concerned the chloroplasts.

Obstacles to systematic direct observations of the freezing process in the living cell are described; a description of how they were overcome is provided.

It is shown that the processes taking place in the banana cells during freezing are similar to those reported for other plants.

The Hebrew University of Jerusalem

The Israel Ministry of Agriculture

THE NATIONAL AND UNIVERSITY INSTITUTE OF AGRICULTURE

The Volcani Institute of Agricultural Research

DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Division of Subtropical Horticulture

Prelim. Rep. No. 449

Project No. 3/324

CHANGES IN BANANA LEAF TISSUES UNDER THE INFLUENCE OF LOW TEMPERATURES

(Observations made on cut and stained sections under the microscope)

By

M. Gottreich and O. Ginsburg

Division of Publications

Rehovot, April 1964