

אוקסינים והשתרשות ייחורים

א' אפשטיין¹

תקציר

מאמר זה מסכם מחקרים על השתרשות ייחורים ועל חלקם של האוקסינים IBA ו-IAA בתהליך זה. בעיקר נחקרו המטאבוליזם והתנועה של האוקסינים מבחינת יכולתם לעודד יצירת שורשים בייחורים.

ייחורים של שני זנים מהמין *Leucadendron discolor* (ממשפחת הפרוטיאות) טופלו ב-³H-IBA. נמצא שייחורים של הזן קלההשרשה קלטו IBA באותה מידה כמו הזן קשההשרשה והפכו אותו מהר לתצמיד. ואולם בזן קלההשרשה התפרק התצמיד ושחרר IBA חופשי, וזה הצטבר בבסיס הייחורים ועודד שם את תהליכי יצירת השורשים, ואילו בזן קשההשרשה נוצר תצמיד של IBA, כנראה עם גלוקוז, שאינו מתפרק בייחור להורמון החופשי. בניסוי בתרחיף של תאי פטוניה (*Petunia hybrida*) נמצאו הבדלים בקליטת שני האוקסינים. ³H-IBA חדר מהר יותר לתאים מאשר ³H-IAA, אך קליטת IBA הגיעה לשיאה שעתיים לאחר תחילת ההדגרה, בעוד שקליטת IAA המשיכה לעלות. התוצאות לא השתנו הרבה בעקבות הוספת אוקסין לא-מסומן למצע.

³H-IBA נהפך בתאי פטוניה בקצב מהיר לחומרים חדשים, ואלה זוהו באופן ארעי כתצמידים של IBA עם גלוקוז וחומצה אספארטית. נמצא ש-IBA-glucose נוצר ראשון ועם הזמן הוא נהפך ל-IBA-aspartate. גם במצע נעלם ההורמון החופשי בקצב מהיר ובמקומו הופיע חומר חדש (כנראה IBA-aspartate). גם IAA עבר מטאבוליזם מהיר ונוצרו שני חומרים חדשים (שלא זוהו), אך קצב המטאבוליזם שלו היה איטי יותר ולא נמצא שינוי בריכוז המטאבוליטים עם הזמן.

בניסויים בונים קשההשרשה וקלההשרשה של דובדבן מתוק (*Prunus avium*) הודגרו ייחורים במצע מעוקר בנוכחות ³H-IBA. רוב הרדיואקטיביות בשני הזנים נמצאה בבסיס הגבעולים. לאחר שה-IBA נקלט, הוא נעלם בקצב מהיר בשני הזנים ונוצר מטאבוליט זהה זהה באופן זמני כתצמיד של IBA וגלוקוז. נמצאו הבדלים בין שני הזנים במטאבוליזם של IAA ו-IBA, ואפשר להניח לכן שההבדל בכושר ההשתרשות בין שני הזנים הוא בכך שבזן קשההשרשה התצמיד של ההורמון אינו מתפרק להורמון החופשי, הדרוש לתהליכי ההשרשה, בעוד שבזן קלההשרשה, התצמיד מתפרק ומספק הורמון בזמן הדרוש להתפתחות של תחיליות השורשים. טיפול בייחורי זית קשההשרשה בחומר המונע יצירת תצמידים (2,6-dihydroxyacetophenone) גרם לאחוז השתרשות גבוה, כנראה בגלל היווצרות אוקסין חופשי. נמצא גם שטיפול ב-IBA עודד השתרשות ייחורים של לוביה מקרינה, ובמקביל עלתה גם רמת האנזים 1,4-β-glucanase.

מפרסומי מינהל המחקר החקלאי, סדרה ע', 1992, מסי' 49.

1 המחלקה לגפן וזית, המכון למטעים, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני בית-דגן, ת"ד 6, 50250.

מבוא

בחקלאות המודרנית קיים צורך לייצר מספר רב של שתילים אחידים. דרך אחת להשיג זאת היא לרבותם מזרעים, אך בשיטה זו קיימות בעיות של איראחידות, ובמקרים רבים נדרשים לכך זמן רב וטיפול יקר בחממות. משום כך מעדיפים השתלנים להשתמש בריבוי בעזרת ייחורים. ואולם בריבוי הווגטטיבי של צמחים רבים יש קשיים המגבילים את פיתוחם ומונעים את גידולם המסחרי. כך למשל ידועים מינים של צמחי תרבות, החשובים מהבחינה החקלאית, שאינם משתרשים כלל או שהם משתרשים רק לאחר טיפול בחומרי צמיחה. Pearse (17) פרסם רשימה של כאלף מינים שממנה אפשר לראות את הבעיות בהשרשה הנובעות מעונתיות, מהבדלים בין זנים ומתגובותיהם השונות לחומרי צמיחה.

האוקסין אינדול-חומצה-בוטירית (Indole-3-Butyric Acid - IBA) הוא הורמון הצמיחה הראשון שהוצא בצורה מסחרית לשימוש בחקלאות, והוא החומר מעודד-ההשרשה המועדף ביותר כיום. נמצא שהוא יעיל בתחום צמחים גדול, וברחבי העולם משתמשים בו בהצלחה במינים רבים. בשנים האחרונות זוהה IBA ברקמות של צמחים רבים (ראה 8 ברשימת הספרות וציטוטים בנושא זה שם). פעילותו של הורמון זה יעילה יותר בעידוד ההשרשה מזו של חומצה אינדול אצטית (Indole-3-Acetic Acid - IAA), למרות שהאחרון הוא ההורמון האנדוגני הפועל בצמחים כמעודד השרשה. ההסבר המקובל ליתרון זה הוא ש-IBA נקלט כנראה מהר יותר, מובל מהר יותר או מתפרק לאט יותר בצמחים. הורמון זה שימש נושא למאות ניסויים ומאמרים זה כשישים שנה, וברובם נטבלו הייחורים בריכוזים שונים של IBA, בממיסים שונים ולמשכר-זמן שונים (13). למרות כל הניסויים האלה עדיין קיימים כמעט בכל המינים זנים רבים וחשובים שאי אפשר להשרישם בכל אמצעי שהוא, כאלה שמגיבים לאוקסין רק בתקופות מסוימות במשך הגדילה, או שרק כמה מהייחורים משתרשים עקב הטיפול. רק במספר עבודות קטן ניסו ללמוד את הסיבות לתופעות אלו. המעוניינים במאמרי סיכום בנושא יפנו לספריהם של Blakesley et al (3) ו-Davis (4).

לפני כמה שנים התחלנו לחקור את חלקו של האוקסין IBA בתהליך ההשתרשות. בעיקר נחקרו המטאבוליזם והתנועה של IBA הניתן כטיפול חיצוני, ונחקרו הסיבות ליעילותו הרבה בעידוד יצירת שורשים בייחורים, לעומת זו של IAA. לצורך הניסויים בזנים קלהשרשה וקשההשרשה בחרנו במינים שהם חשובים מבחינה חקלאית, כמו זית אשר לו זנים קשים להשרשה (למשל קאלאמאטה) וזנים המשתרשים רק לאחר טיפול ב-IBA (כמו מונזילו), וכן זנים קשים להשרשה וקלים להשרשה של פרוטיאה (*Leucadendron discolor*). לעבודה בתנאים מעוקרים בחרנו בדובדבן, בהיותו משתרש בתוך שבוע, והיו ברשותנו זן קלהשרשה וזן קשההשרשה של מין זה. כמו כן היו ידועים התנאים לגידולו בתרבות רקמה.

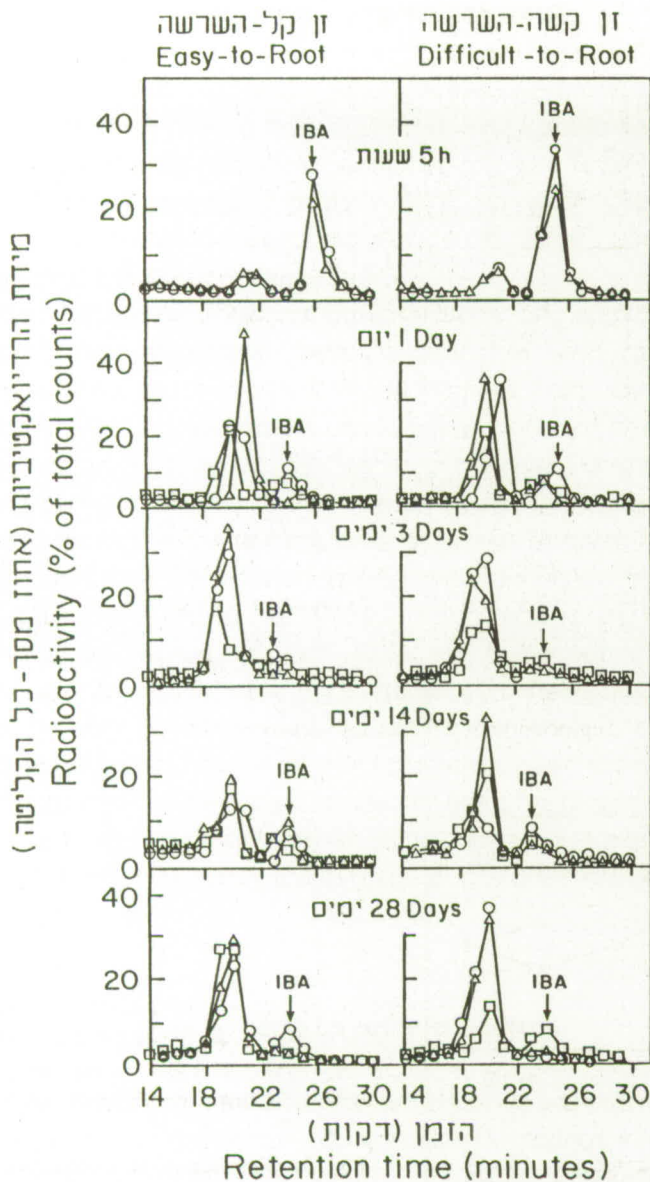
פרק א': מחקרים בפרוטיאה

לניסויים נבחרו שני זנים מהמין *Leucadendron discolor*, ממשפחת הפרוטיאות, זן אחד המאחר לפרוח והוא גם קשה להשרשה וזן אחר המקדים לפרוח ומשתרש לאחר טיפול ב-IBA. ייחורים משני הזנים, באורך של כ-10 ס"מ ובעלי שישה עלים, הודגרו בתמיסה של IBA רדיואקטיבי (^3H -IBA) ולאחר מכן הועברו למצע השרשה בחממה. ייחורים הוצאו מהמצע לאחר פרקיזמן שונים, ועלים, בסיסי גבעולים וגבעולים רוסקו באצטון מימי בעזרת המכשיר Ultra Turrax.

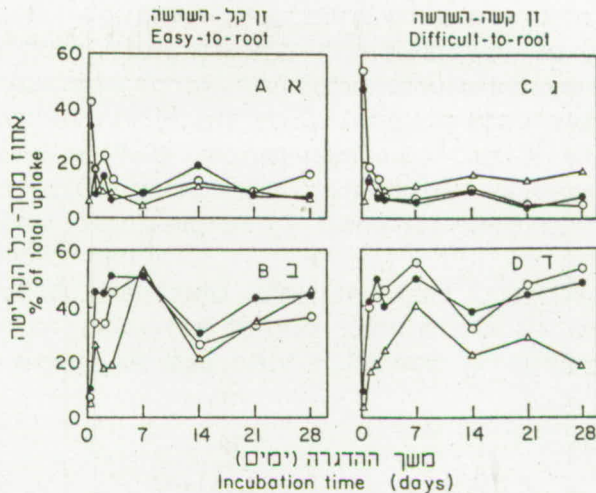
בעזרת HPLC נמצא ש-IBA עבר מטאבוליזם מהיר ברקמות של שני הזנים ובמקומו נמצא חומר חדש. אפשר לראות (איור 1) שלאחר חמש שעות הדגרה הכילו כל חלקי הייחור ^3H -IBA, וחומר חדש החל להופיע לאחר 20 דקות. לאחר יום הדגרה אחד נמצאה רובה של הרדיואקטיביות בחומר החדש, בכל חלקי הייחורים. מעניין לציין שבמשך כל תקופת ההשרשה, גם לאחר ארבעה שבועות, עדיין נמצאה כמות קטנה של IBA בייחורים של שני הזנים. כשנבחנו אחוזי ה-IBA החופשי והמטאבוליט במיצויים של חלקי הייחורים נמצא כי לאחר 21 ו-28 ימי הדגרה היה יותר IBA חופשי בבסיסי הייחורים קלההשרשה ובעלים של הייחורים קשרההשרשה (איור 2, א' רג'). בשני הזנים נמצאה רוב הרדיואקטיביות במטאבוליט (איור 2, ב' רד'). הידרוליזה של המטאבוליט עם 1N NaOH, בטמפרטורת החדר למשך שעה, שחררה IBA חופשי, ולכן יש להניח שהתצמיד קשור ל-IBA בקשר אסטרי (2). IBA חופשי השתחרר גם לאחר הדגרה עם האנזים β -glucosidase, בטמפרטורת החדר למשך 24 שעות, דבר המצביע על קשר עם גלוקוז ומאפשר להניח שהמטאבוליט הוא תצמיד אסטרי של IBA עם גלוקוז. נמצא (7) ששני הזנים קלטו IBA באותו מידה ובאותה מהירות, אך בזן קלההשרשה נמצאו בעלים כ-40% ממידת הרדיואקטיביות התחילית (איור 3 א') לעומת כ-10% בלבד בייחורים של הזן קשרההשרשה (איור 3 ב').

פרק ב': מחקרים בפטוניה

חדירת האוקסינים לתאים ותהליכי המטאבוליזם שלהם נחקרו (10) גם על-ידי שימוש בתרחיף של תאי פטוניה (*Petunia hybrida*). במערכת זו נקלטים האוקסינים דרך כל דופן התא והממברנות, ולא רק דרך שטח החתך בייחור, ומשום כך אין בעיות של הובלה. מערכת זו היא מעוקרת ובכך נמנעים שיבושים בתוצאות בגלל נוכחותם של חיידקים אפיפייטיים (12). בשיטה זו אפשר לקבל תוצאות מהירות ומדויקות של תהליכי המטאבוליזם של ההורמונים לאחר קליטתם בתאים. תאים של פטוניה גודלו במצע נוזלי של Murashige and Skoog (15), ובתוספת האוקסינים IAA ו-IBA. דוגמאות של תאים ומצע נלקחו במועדים שונים והתאים

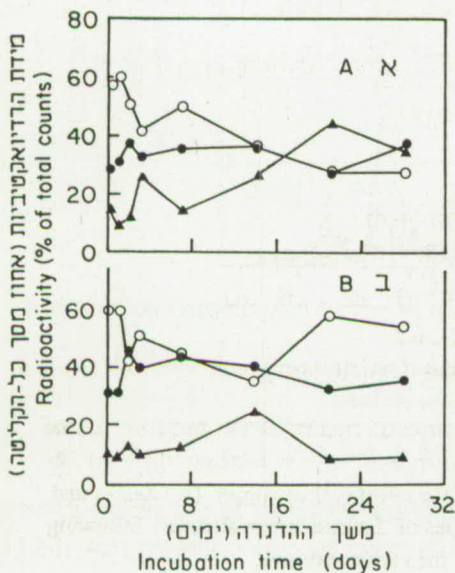


איור 1: התפלגות הרדיואקטיביות במיצויים של החצי התחתון (○), החצי העליון (△) והעלים (●) של ייחורי פרוטיאה קלה-השרשה וקשה-השרשה לאחר הדגרה ב- ^3H -IBA למשכי זמן שונים.
Fig. 1: Reverse phase HPLC of extracts of the lower (○) and upper (△) halves and leaves (●) of easy- and difficult-to-root varieties of *Leucadendron discolor* following incubation with ^3H -IBA for various periods.



איור 2: כמויות ^3H -IBA והתצמיד שלו בחצי התחתון (○), בחצי העליון (●), ובעלים (△) של ייחורים קליהשרשה (A ו-B, בהתאמה) וקשיהשרשה (C ו-D, בהתאמה) של *Leucadendron discolor* לאחר הדגרה עם ^3H -IBA למשכי זמן שונים.

Fig 2: Amounts of ^3H -IBA and its conjugate in lower half (○), upper half (●) and leaves (△) of easy- (A and B, respectively) and difficult-to-root (C and D, respectively) cuttings of *Leucadendron discolor* at various intervals following incubation with ^3H -IBA for various periods.

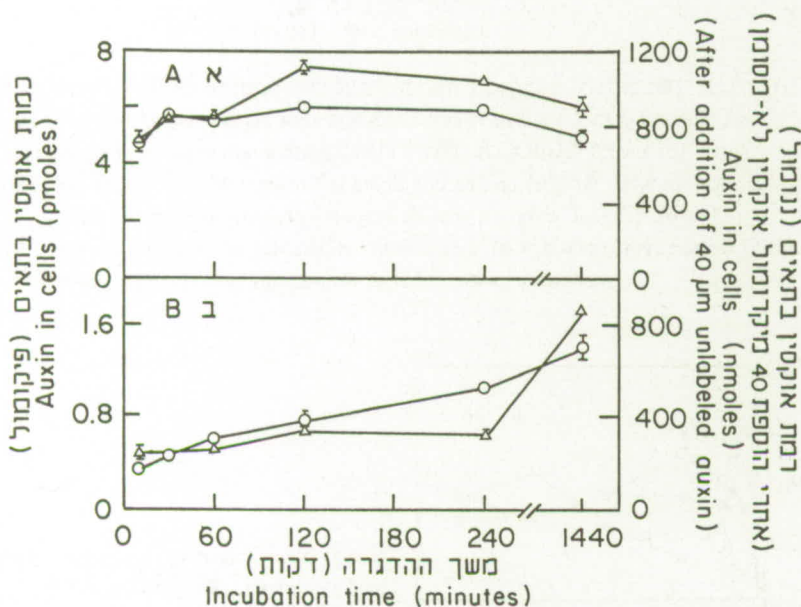


איור 3: התפלגות הרדיואקטיביות בחלק התחתון (○), בחלק העליון (●), ובעלים (△) של ייחורים קליהשרשה (A) וקשיהשרשה (B) של זני פרוטיאה לאחר הדגרה ב- ^3H -IBA למשכיזמן שונים.

Fig. 3: Distribution of radioactivity in lower (○) and upper (●) halves, and in leaves (△) of cuttings of easy- (A) and difficult-to-root (B) varieties of *Leucadendron discolor* at various intervals following incubation with ^3H -IBA for various periods.

הופרדו מהמצע, רוסקו באצטון מימי, בעזרת עלי ומכתש, ומידת הרדיואקטיביות שלהם נמדדה במיצוי ובמצע. החומרים הרדיואקטיביים מוצו גם מהמצע, והמיצויים מהתאים ומהמצע נלקחו לכרומאטוגרפיה ולאטופלואורוגרפיה. בשיטה זו מריצים את המיצויים בכרומאטוגרפיה של רובד דק (TLC) ואחר כך מרססים את הכרומאטוגרמה בחומר DuPont Enhance (ומניחים עליה פילם לקרני X. התרסים הופך את האלקטרונים הנפלטים מהחומר הרדיואקטיבי לנצנוצי אור ומאפשר לעבוד גם עם טריטיום, שבגלל האנרגיה הנמוכה שלו משחיר את הפילם, בשיטות הרגילות, רק לאחר תקופה ארוכה מאוד.

התברר ש- ^3H -IBA חדר לתאים מהר יותר מאשר ^3H -IAA (איור 4). לאחר 10 דקות של הדגרה באוקסינים מסומנים נמצאו בתאים 4.6 פיקומול של IBA לעומת 0.35 פיקומול של IAA (51% ו-10% מכלל הרדיואקטיביות, בהתאמה).



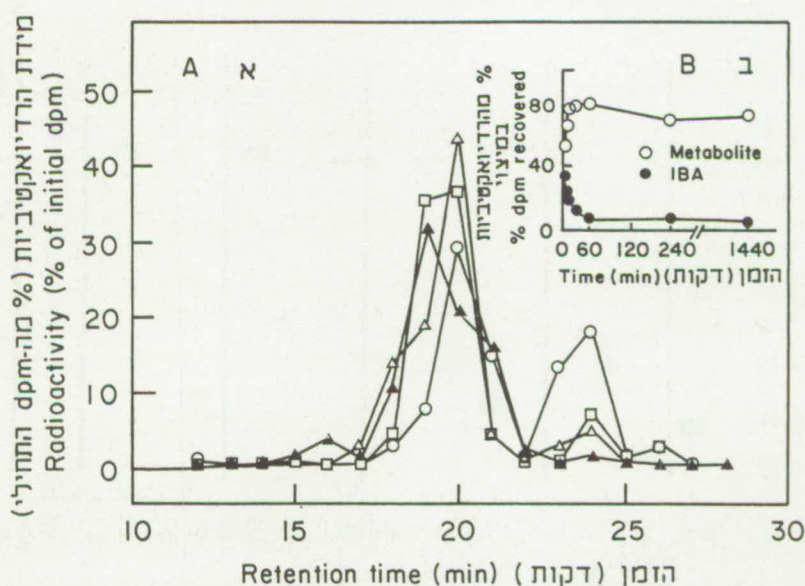
איור 4: קליטת אוקסינים על-ידי תרחיף של תאי פטוניה לאחר הדגרתם ב-IBA (A) וב-IAA (B) למשכי זמן שונים.

Fig. 4: Uptake of auxins by Petunia cell suspension after incubation with IBA (A) and IAA (B) for various periods.

ואולם קליטת ה-IBA הגיעה לשיאה לאחר שתי שעות הדגרה, בעוד שקליטת ^3H -IAA (איור 4ב') המשיכה לעלות גם לאחר 24 שעות. לאחר 24 שעות הדגרה נמצאו בתאים

60% ר 46% מהרדיואקטיביות התחילית של IBA ו-IAA, בהתאמה. התוצאות לא השתנו הרבה לאחר הוספת $40\mu\text{M}$ אוקסין לא-רדיואקטיבי למצע. לאחר 10 דקות הדגרה ב-IBA (איור 4א') נמצאה בתאים יותר רדיואקטיביות מאשר לאחר הדגרה ב-IAA (איור 4ב') - 700 ננומול לעומת 250 ננומול, או 39% לעומת 12% מכלל הרדיואקטיביות שבתאים, בהתאמה). רמת ה-IAA נשארה נמוכה גם לאחר ארבע שעות, אך לאחר 24 שעות היא הגיעה כמעט לרמת IBA (840 ננומול). בעבודה בפרוטופלאסטים של תאי טבק מצאו Caboche ועמיתיו (4) שלאחר 24 שעות הדגרה ב-17 מיקרומול IAA וב-16 מיקרומול NAA חדרו 30% מהאוקסינים לתאים. הם גם מצאו שהחדירה של 2,4-D היתה איטית מאוד ולאחר ארבעה ימים נמצאו רק 20% של האוקסין בפרוטופלאסטים. אפשר אפוא להסיק שמכל האוקסינים שנבחנו, חדירתו של IBA היתה היעילה ביותר.

כרומאטוגרפיה של המיצויים (איור 5) הראתה שכבר לאחר חמש דקות הדגרה ירד שיא ה-IBA ובו בזמן הופיע שיא של חומר רדיואקטיבי חדש. הוברר שרוב



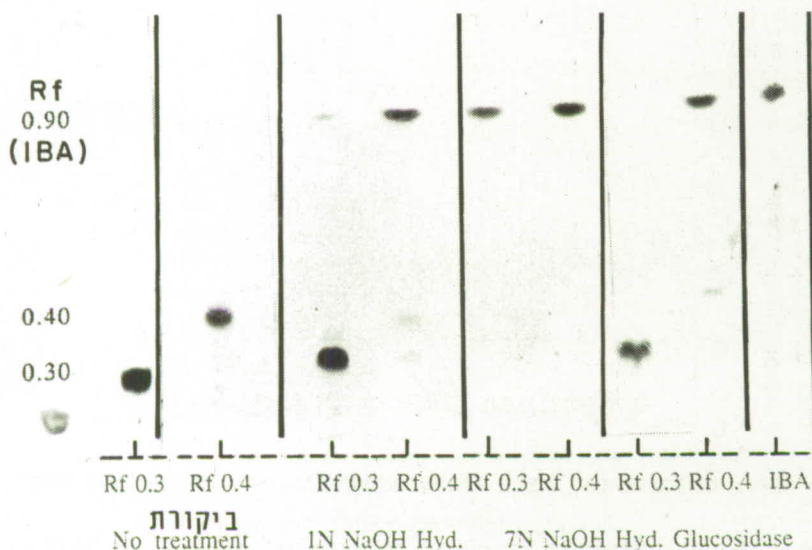
איור 5: א. HPLC של מיצויי תאים של פטוניה לאחר הדגרתם ב- ^3H -IBA למשכי זמן שונים ב. אינטגרציה של השיאים של IBA ושל והתצמיד.

Fig. 5: A. HPLC of extracts of *Petunia* cells from cell suspension after incubation with ^3H -IBA for various periods.

B. Insert shows the integration of the peaks of IBA and the metabolite.

הרדיואקטיביות שבתאים (80%) נמדדה בשיא החדש לאחר חצי שעה של הדגרה ב-IBA. מעניין הממצא שגם במצע נעלם ההורמון החופשי בקצב מהיר, ובמקומו הופיע חומר חדש (התוצאות אינן מובאות במאמר זה). לאחר שעת הדגרה נמצאו רק 50% מהרדיואקטיביות ב-IBA ולאחר 24 שעות נמצאה מרבית הרדיואקטיביות בחומר החדש. ההופעה המהירה של המטאבוליט במצע מצביעה על כך שהמטאבוליזם של IBA נעשה כנראה על גבי השטח החיצוני של התאים. הריאקציה של הפיכת ההורמון לחומר החדש הואטה בטמפרטורה נמוכה (בקרר) או באווירה של חנקן. כמו כן נמצא שתאים מרוסקים לא פרקו את ההורמון, ויש כנראה צורך בתאים שלמים ופעילים לשם קליטה ומטאבוליזם של ההורמון.

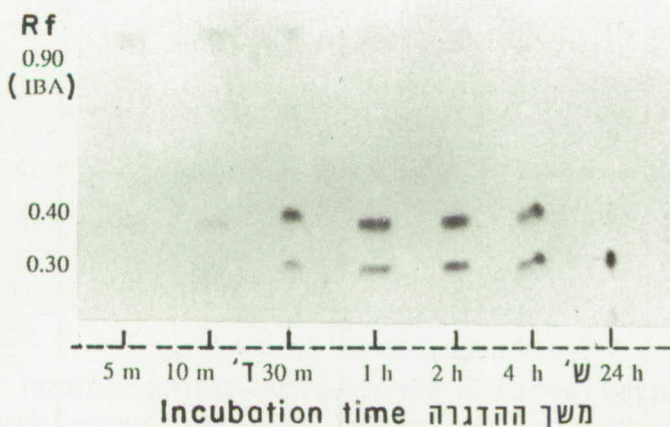
בכרומאטוגרפיה עם DEAE Sephadex מצאנו שהמיצוי של התאים הכיל שני מטאבוליטים; האחד נשטף מהעמודה עלידי איזרפרופנול (מקטע נייטרלי), והשני עלידי איזרפרופנול שהובא ל-2.5pH בעזרת חומצה זרחנית (מקטע חומצי). באוטופלואורוגרפיה שנעשתה לאחר הידרוליזה של החומרים נמצא (איור 6) שחומר אחד (R_f 0.3) התפרק ל-IBA (R_f 0.90) על ידי 7N NaOH בטמפרטורה של 100 מ"צ למשך



איור 6: אוטופלואורוגרפיה של המיצויים של תאי פטוניה לאחר הידרוליזה עם 1N NaOH, עם 7N NaOH או עם β -glucosidase.

Fig. 6: Autofluorography of extracts of petunia cells after hydrolysis with 1N NaOH, 7N NaOH or with β -glucosidase.

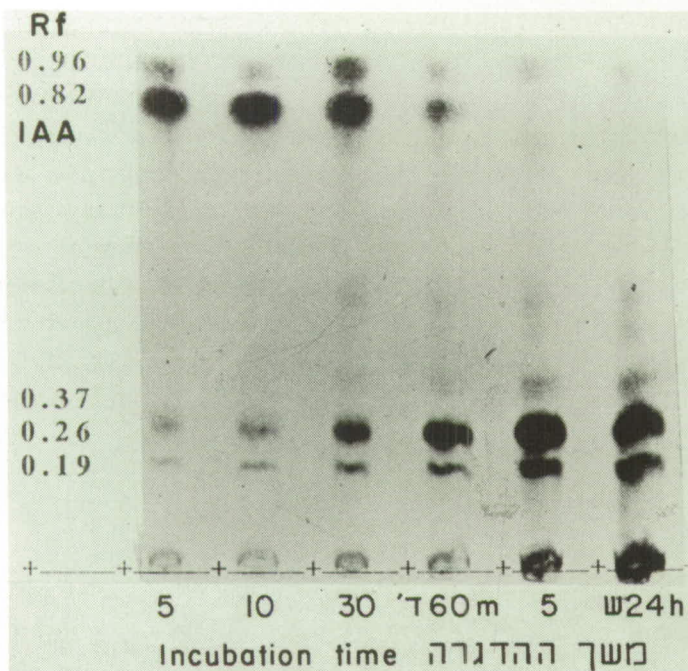
שלוש שעות, ולא התפרק על-ידי 1N NaOH בטמפרטורת חדר למשך שעה, או על-ידי β -glucosidase בטמפרטורת החדר למשך 24 שעות, דבר המוכיח על קשר פפטידי (8). בכרומאטוגרפיה אחרת הורצו המיצוי ותצמיד של IBA עם חומצה אספארטית על אותו כרומאטוגרם. נמצא שלשניהם היה R_f דומה ולכן אפשר להניח שהחומר במיצוי הוא IBA הקשור בקשר פפטידי לחומצה אספארטית. העובדה שהחומר השני (R_f 0.4) התפרק בכל שלושת הטיפולים מצביעה על קשר אסטרי, כנראה עם גלוקוז (איור 6). באוטופלואורוגרמה שבאיור 7 אפשר להבחין שבזמן ההדגרה של תאי הפטוניה ב-IBA הופיע תחילה החומר ב- R_f 0.4 (IBA glucose). עוצמתו של חומר זה גברה עם הזמן והוא נעלם לאחר 24 שעות הדגרה. חומר נוסף הופיע מאוחר יותר ב- R_f 0.3 (IBA aspartate) ועוצמתו גברה עם הזמן אך ירדה לאחר 24 שעות, כשהופיע שוב כתם ב- R_f 0.90 (IBA).



איור 7: אוטופלואורוגרפיה של המיצויים של תאי פטוניה לאחר הדגרה עם ^3H -IBA למשכיזמן שונים.

Fig. 7: Autofluorography of Petunia cell extracts after incubation with ^3H -IBA for various periods.

גם IAA עבר מטאבוליזם מהיר ונוצרו שני חומרים חדשים (שלא זוהו), אך קצב המטאבוליזם שלהם היה איטי יותר ולא נמצאה ירידה בריכוזם עם הזמן (איור 8).



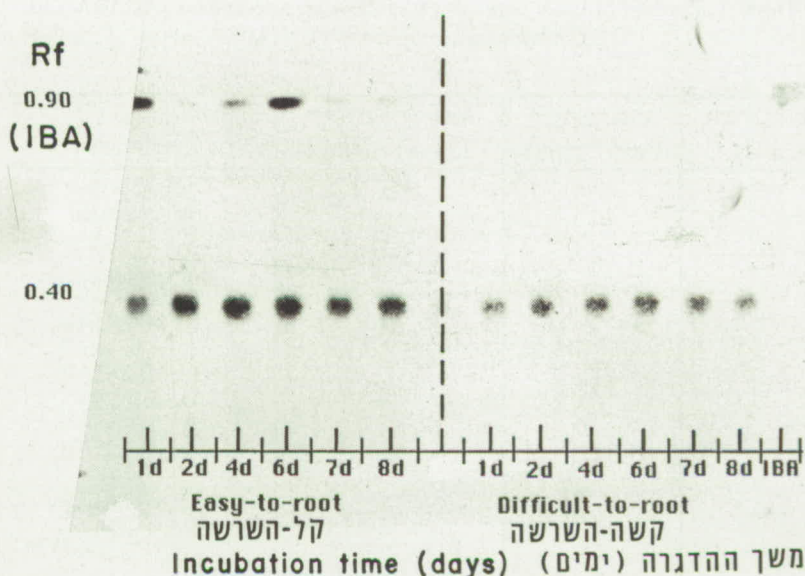
איור 8: אוטופלואורוגרפיה של המיצויים של תאי פטוניה לאחר הדגרה ב- ^{14}C -IAA למשך זמן שונים.

Fig. 8: Autofluorography of Petunia cell extracts after incubation with ^{14}C -IAA for various periods.

פרק ג': מחקרים בדובדבן

אחד החסרונות הגדולים בעבודה עם ייחורים, כמתואר לעיל, הוא האפשרות שחידקים אפיפיטיים משבשים את התוצאות (12). משום כך החלטנו לעבוד עם מערכת מעוקרת. לניסויים נבחרו צמחי דובדבן מתוק (*Prunus avium*), מזנים קשה וקל להשרשה (9). הזן קל ההשרשה (Rainier) משתרש בתוך שבוע על מצע המכיל 1 ח"מ IBA, בעוד שהזן קשה ההשרשה (40-E-50) אינו משתרש כלל על מצע זה. העבודה נעשתה כאמור במערכת מעוקרת, על מצע אגר שהכיל תמיסת מזון (15) ר IBA מסומן (^3H -IBA). ייחורים הוצאו מהמצע במועדים שונים ומוצו, כמו שתואר לעיל. אחר כך נבדקה רמת הרדיואקטיביות שבבסיס הייחורים, בגבעול ובעלים. החומר הרדיואקטיבי במיצויים זוהה בשיטות כרומאטוגרפיה ואוטופלואורוגרפיה.

בשני הזנים נמצאה רוב הרדיואקטיביות בבסיס הגבעולים, ומעט מאוד בחלק העליון של הגבעולים או בעלים. לאחר שנקלט ה-IBA, הוא נעלם בקצב מהיר בשני הזנים (איור 9). בשניהם אפשר לראות בבירור את הכתמים ב- R_f 0.40 ואת העלמות הכתמים של IBA ב- R_f 0.90. החומר שהופיע ב- R_f 0.40 נוקה בעזרת HPLC ובוצעה בו הידרוליזה - עלידי 1N NaOH בטמפרטורת החדר למשך שעה, ובעזרת האנזים β -glucosidase בטמפרטורת החדר למשך 24 שעות. בשניהם נמצא שהחומר התפרק ל-IBA ואפשר להניח שהוא תצמיד של IBA עם גלוקוז. במיצויים של הזן קל ההשרשה הובחנה עדיין נוכחות IBA לאחר יום הדגרה אחד, אך החומר כמעט נעלם לאחר יומיים, הופיע שוב לאחר ארבעה ימים, התעצם לאחר שישה ימי הדגרה ונעלם שוב. במיצויים של הזן קשה ההשרשה לא הובחן כלל ה-IBA.



איור 9: אוטופלואורוגרפיה של מיצויים של בסיסי גבעולים של זנים קליהשרשה וקשרהשרשה של דובדבן מתוק על גבי מצע מעוקר, בתוספת ^3H -IBA לאחר הדגרה למשכי זמן שונים.

Fig. 9: Autofluorography of extracts of bases of easy- and difficult-to-root cultivars of sweet cherry after various periods of growth on sterile medium supplemented with ^3H -IBA.

פרק ד': מחקרים בזית

הוחלט לנסות ולהשפיע על תהליך ההשתרשות על-ידי טיפול בייחורים בחומר הנחנן שאם טיפול בחומר זה ימנע יצירת תצמידים, יעלה ריכוז האוקסין החופשי המעודד השתרשות, ואתו - גם אחוז ההשתרשות. בחרנו בזן זית קשה-השרשה (Uovo di piccone) וייחורים טופלו ב-IBA בלבד, או לאחר טבילה מוקדמת במשך ארבע שעות ב-2 מילימול של DHAP. נמצא (טבלה 1) ש-DHAP הגדיל במידה משמעותית את שיעור ההשתרשות והגביר את יצירת הקאלוסים.

טבלה 1. השתרשות ייחורי זית (%) לאחר טיפולים ב-IBA וב-2,6-Dihydroxyacetophenone (DHAP)

Table 1. Rooting of olive cuttings (%) following a treatment with IBA and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP).

יצירת קאלוס Callus	ייחורים שמתו Dead cuttings	ייחורים שהשתרשו Rooted cuttings	הטיפול Treatment
+	37.5	0	ללא טיפול No treatment
++	22.5	15±2.9	IBA (0.8%) בטאלק IBA (0.8%) in talc
--	50.0	0	(1mM) DHAP
+++	15.0	17.5±4.8	(1mM) DHAP 0.8% IBA+
--	92.5	0	(2mM) DHAP
+++	12.5	30.0±5.8	(2mM) DHAP 0.8% IBA+
--	95.0	0	מים Water

הערות: 40 ייחורים נלקחו מהזן קשה-השרשה Uovo di piccone מענפים בני שנה ונבדקו בארבעה גושים באקראי. בטיפול ב-DHAP הוחזקו הייחורים בתמיסה מימית בריכוז של 2mM, עם בעבוע אוויר למשך ארבע שעות.

Notes: 40 cuttings were removed from one year-old branches of difficult-to-root olive cv. Uovo di piccone. The work was done in four randomized blocks. For treatment with DHAP the cuttings were kept in 2 mM aqueous solution with aeration for 4th.

דיון וסיכום

Bandurski ועמיתיו (1) Cohen & Bandurski (5) הציעו שתפקיד התצמיד הוא לווסת את רמת ההורמון החופשי בצמח. לפי תיאוריית "מאגר האוקסין" (IAA pool), פעילות האוקסין נעשית בעזרת הכנסה והוצאה מהמאגר ההורמוני של הצמח בעזרת אנזימים מתאימים היוצרים ומפרקים תצמידים של ההורמון. בכל הצמחים שנבדקו נמצא רובו של ההורמון כתצמיד ומיעוטו חופשי. התצמידים שזוהו היו בקשר אסטרי עם סוכרים כמו מיראינוזיטול (myo-inositol), גלוקוז, גלקטוז ואחרים, או בקשר פפטידי עם חומצות אמינו ובעיקר עם חומצה אספארטית. תצמידים אלה נחשבים לעמידים לתהליכי חמצון בצמח יותר מההורמון החופשי, ומקובל כיום לחשוב שהם מעורבים בהובלת האוקסין, באיחסון ובאגירת העודף, בהגנה מפני הרס אנזימתי, ובויסות הומאוסטאטי של ריכוז האוקסין בצמח. לפי התיאוריה של Bandurski (1), ההורמון החופשי מצטבר כתצמיד וכך הוא מגיע לאתר, שם הוא משתחרר בעזרת אנזימים הידרוליטיים ופועל עם אתרי קישור. בגמר פעילותו, על ההורמון לעבור תהליך של איהפעלה, אחרת תימשך פעילותו הפיזיולוגית. איההפעלה נעשית על-ידי יצירה מחודשת של התצמיד בעזרת אנזימים שבאתר.

בכל העבודות שעסקו בהשפעת אוקסינים על השרשה נמצא שהאוקסין החופשי עובר מטאבוליזם מהיר לתצמיד. בעבודה בדובדבן מתוק מעניינת במיוחד היא העלמותו של ה-IBA בזן קליההשרשה, והופעתו המחודשת לאחר ארבעה ימי הדגרה, המועד שבו התחילו להופיע תחיליות השורשים. תופעה זו לא נראתה בזן קשה ההשרשה; נראה שהזן קשההשרשה אמנם יצר תצמידים, אך יותר מאוחר לא שחרר IBA חופשי. אפשר אפוא להסביר את התופעות שנמצאו בעבודות בדובדבן בכך ששני הזנים, הקל והקשה להשרשה, אמנם מסוגלים לקלוט IBA באותה מידה ולהופכו לתצמיד במהירות רבה, אך הייחורים קליההשרשה מסוגלים כנראה לפרק את התצמיד ולשחרר IBA חופשי, וזה מצטבר בבסיס הייחור ומעודד שם את תהליכי יצירת תחיליות השורשים (ארבעה עד שישה ימים מתחילת ההדגרה). בגמר השלב של יצירת תחיליות והופעת השורשים, ההורמון שוב נקשר לתצמיד ובכך נפסקת פעילותו הביולוגית.

בעבודה בתאי פטוניה נראה בבירור ש-IBA נעלם במהירות ונהפך לחומרים חדשים ואלה זוהו כ-IBA-glu וכ-IBA-aspl. ידוע ש-IBA-glu הוא הקדם (פרקורסור) בתהליך יצירת התצמיד IAA myo-inositol (1) והוא יעיל מאוד כתורם של קבוצות אציליות (acyl donor). אפשר לכן להניח ש-IBA-glu משמש באותה הדרך כקדם בסינתזה של IBA-aspl. כלומר, תאי הפטוניה הופכים תחילה את ה-IBA שבמצע ל-IBA-glu, וזה נהפך אחר כך ל-IBA-aspl ומשמש כמאגר של IBA, המתפרק ומשחרר IBA חופשי. גם IAA עבר מטאבוליזם מהיר ונוצרו שני חומרים חדשים (שלא זוהו), אך קצב המטאבוליזם שלהם היה איטי משל IBA ולא נמצאה ירידה בריכוזם עם הזמן (איור 8). כמו כן נמצא שקצב החדירה של IBA לתאים היה מהיר מאשר זה של IAA, גם אחרי הוספת אוקסין לאימסומן בעודף. Merkclbach ועמיתיה (14) מצאו שבצפצפה יצר IBA תצמידים לאט יותר מ-IAA. בעוד ש-IBA יצר בעיקר אסטרי, גרם IAA

להשראה עצמית של האנזים IAA-asp synthase הגורם ליצירת תצמידים של ה-IAA האנדוגני עם חומצה אספארטית. היות והאסטר מתפרק ברקמה ביתר קלות מאשר הפפטיד, הם הניחו שזו הסיבה ש-IBA יותר יעיל מ-IAA בעידוד ההשראות. Plüss ועמיתיו מצאו (18) ש-IAA שניתן לייחורי צפצפה נהפך בתוך זמן קצר לתוצר של IAA אספארטאט וזה זוהה כ-2-Indonone-3-Acetylaspatic Acid (OxIAsp). נמצא שחומר זה אינו מסוגל לעודד השראות, ומשום כך IAA כנראה יעיל פחות מ-IBA בעידוד ההשראות.

על תוצאות דומות דיווחו וייסמן ועמיתיו (20, 21). הם מצאו שקצב המטאבוליזם של IAA ו-IBA בלוביה מקרינה היה דומה, וכי לאחר 24 שעות של הדגרה כמעט שלא נותר אוקסין חופשי בייחורים. לעומת זאת, בעוד ש-IBA נהפך ל-IBA-asp ולתצמיד עם חלבון, נהפך IAA ל-IAA-asp. Nordstrom ועמיתיו (16) מצאו בעבודתם עם ייחורי שעועית שהסיבה לכך ש-IBA יעיל מ-IAA בעידוד ההשראה היא שרמתו של IBA נשארה גבוהה זמן רב יותר בייחורים. אפשר לייחס אפוא את יעילות ההשראה השונה של IAA ו-IBA לסוג התצמידים שהם יוצרים. סוג התצמיד קובע אם הצמח יוכל לפרקו שוב ולשחרר אוקסין חופשי שיעודד השראות, או שהוא ייהפך למטאבוליט שאינו מתפרק יותר בצמח ולכן, כנראה, גם אינו מעודד השראות.

דרושים עוד מחקרים כדי לאמת את התיאוריות המנסות להסביר את ההבדלים ביעילות עידוד ההשראה של שני האוקסינים. הבעיה העיקרית היא צמצמים שונים מגיבים באופן שונה להורמונים אלה, ומשום כך אי אפשר עדיין להסיק מסקנות חד משמעיות שיבטאו את המצב בכל הצמצמים. שוסיוב ועמיתיה מצאו (19) שטבילת ייחורים של לוביה מקרינה בריכוז גבוה של IBA עודדה השראות, ובמקביל עלתה גם רמת האנזים 1,4- β -glucanase, הדרוש לפירוק דופן התאים בתהליך יצירת השורשים. ייתכן שהאוקסין משמש כהדק (trigger) לתגובת שרשרת (cascade) של ריאקציות המוליכות בסופו של דבר ליצירת שורשים. לא ברור עדיין תפקידם של התצמידים במערכת זו.

הבעת תודה

הניסויים נעשו בשיתוף עם העמיתים האלה:

במינהל המחקר החקלאי: המחקר על ההשראות של ייחורי פרוטיאה נעשה בשיתוף עם ד"ר יעקב בריעקב ומר אלכסנדר אקרמן מהמחלקה לפרחים. המחקר על המטאבוליזם של IBA ו-IAA עלידי תרחיף של תאי פטוניה נעשה בשיתוף עם ד"ר אהרן זלצר מהמחלקה לגנטיקה, וד"ר עודד שגיא מהמחלקה להדרים. המחקר על מטאבוליזם והעברה של IBA עלידי שתילונים מעוקרים של דובדבן מתוק נעשה בשיתוף עם ד"ר שמואל זילכה, גבי גניה פיינגרש ומר אריה רוטבאום מהמחלקה לנשירים. המחקר על השרשת זית נעשה בשיתוף עם ד"ר בנימין אבידן מהמחלקה לנשירים.

בפקולטה לחקלאות ברחובות: המחקר על השראת צלולאז בלוביה מקרינה בהשפעת טיפול ב-IBA נעשה כחלק מהעבודה לקבלת התואר M.Sc. של גבי ליסה שוסיוב מהמחלקה לבוסתנאות בפקולטה לחקלאות ברחובות.

רשימת הספרות

1. Bandurski, R.S. (1982) Auxin biosynthesis and metabolism. *in*: Wareing. P.F. [Ed.] Plant Growth Substances. Academic Press, New York. pp. 3-11.
2. Bandurski, R.S. and Schulze, A. (1974) Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiol.* 60: 211-213.
3. Blakesley, D., Weston, G.D. and Hall, J.F. (1991) The role of endogenous auxin in root formation. I. Evidence from studies on auxin application, and analysis of endogenous levels. *Plant Growth Reg.* 10: 341-353.
4. Caboche, M., Aranda G., Poll A.M., Huet, J.C. and J.C. Leguay (1984) Auxin conjugation by tobacco mesophyll protoplasts. Correlations between auxin cytotoxic under low density growth conditions and induction of conjugation processes at high density. *Plant Physiol.* 75: 54-59.
5. Cohen, J.D. and Bandurski, R.S. (1982) Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:403-430.
6. Davis, D.D., Haissig, B.E. and Sankhla, N. (1988) Adventitious root formation in cuttings. *in*: Dudley, T.R. (Generl Ed). *Adv. Plant Sci.* Dioscorides Press, Portland, OR. vol 2.
7. Epstein, E., Ben Jacob, J. and Ackerman, A. (1993) Transport and metabolism of indole-3-butyric acid in cuttings of *Leucadendron discolor*. *Plant Growth Reg.* 12: 17-22.
8. Epstein, E., Cohen, J.D. and Chen, K-H (1989) Identification of indole-3-butyric acid as an endogenous constituent of maize kernels and leaves. *Plant Growth Reg.* 8: 215-223.
9. Epstein, E., Zilkah, S., Faingersh, G. and Rotebaum, A. (1993) Transport and metabolism of indole-3-butyric acid in sterile easy- and difficult-to-root cuttings of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Hort.* (In press).
10. Epstein, E., Sagee, O and Zelcer, A. (1992) Uptake and metabolism of indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid by *Petunia* cell suspension culture. *Plant Growth Reg.* 11: 357-362.

11. Lee, E.E. and Starratt, A.N. (1986) Inhibition of conjugation of indole-3-acetic acid with amino acids by 2,6-dihydroxyacetophenone in *Teucrium canadense*. *Phytochemistry* 25: 2457-2461.
12. Libbert, E., Wichner, S., Scheiwer, U., Risch, H., and Kaiser, W. (1966) The influence of epiphytic bacteria on auxin metabolism. *Planta* 68: 327-34.
13. McGuire, J.J. (1980) Root initiation: A survey of current literature. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30: 282-288.
14. Merkelbach, C., Buchala, A.J., and Meier, H. (1991) Adventitious rooting in cuttings of *Populus tremula*: metabolism of IAA and IBA. *14th Int. Conf. Plant Growth Subst.* p. 21.
15. Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
16. Nordstrom, A-C, Jacobs, F.A. and Eliasson, L. (1991) Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiol.* 96: 856-861.
17. Pearse, H.L. (1948) Growth substances and their practical importance in horticulture. *Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops Technical Comm.* #2.
18. Plüss, R., Jenny, T. and Meier, H. (1989) IAA induced adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* and formation of 2-indolone-3-acetylaspatic acid, a new metabolite of exogenously applied indole-3-acetic acid. *Physiol. Plant.* 75: 89-96.
19. Shoseyov, L., Sutter, E.G., Epstein, E. and Shoseyov, O. (1988) IBA induces β -1,4-glucanase activity in 2-day old mung bean cuttings. *16th Annu. Plant Gr. Regul. Soc. Am. Quart.* 17: 92.
20. Wiesman, Z., Riov, J., and Epstein, E. (1988) Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean cuttings. *Physiol. Plant.* 74: 556-60.
21. Wiesman, Z., Riov, J. and Epstein, E. (1989) Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiol.* 91: 1080-84.