

חקר הצופנים האקסטראפלורלים של צמח הקיקיון

מעובד על פי:

New Phytol. (1978) 81, 129-137 D.A. BAKER J.L. HALL & J.R. THORPE

מאת: יהודית שניצר*

עיבוד מאמר ובדיקה במעבדה של פעילות אנזים בצופנים

מבוא

צופנים הם מבנים בלוטיים המפרישים נוזל עשיר בסוכר – צוף. צופנים הקשורים במבנה הפרח נקראים צופני הפרח (צופנים פלוראליים) ואלה המתפתחים על חלקים וגטיביים של הצמח נקראים צופנים אקסטראפלורליים = צא"פ.

צמח הקיקיון הוא שיח השייך למשפחת החלבלוביים, בעל עלים מסורגים. טרף העלה מאוצבע או דמוי כוכב ונישא על פטוטרת ארוכה. גם על הפטוטרת, וגם בבסיס הטרף מפוזרות בלוטות המפרישות נוזל סוכרי. הבלוטות הללו הן צופנים אקסטראפלורליים. בלוטות אלו מצויות גם על העלים והגבעולים של מספר צמחים ממכסי הזרע, אך התפקוד שלהן עדיין לא ברור.

גם לסוגים שונים של שרכים (צמחים חסרי פרחים) ישנם צא"פ. הצא"פ מפרישים בעיקר סוכרים המגיעים אליהם מצינורות השיפה. המים והמלחים שבצוף מגיעים מצינורות העצה. מנגנון הפרשת הצוף אינו ידוע. הוצעו מודלים לפיהם, הסוכר (סוכרוזה) מוזרם באופן אקטיבי אל מחוץ לצינורות השיפה, עובר הידרוליזה ע"י האנזים אינברטאז לחד-סוכרים, וזה גורם למים לצאת מצינורות העצה לפי מפל הריכוזים. כך מתקבל התוצר הסופי – הנוזל של הצופנים.

מטרות המחקר:

השוואת המבנה המיקרוסקופי של הצא"פ בדרגות התפתחות שונות שלהם – צעירים (לא פעילים) ובשלים (מפרישי צוף) – במיקרוסקופ האור ובמיקרוסקופ האלקטרוני. השוואת הרכב מוהל השיפה עם המיצוי של הצא"פ. בדיקת ההשפעה של הסרת הצא"פ על התפתחות צמח הקיקיון. בהתבסס על הממצאים ייערך דיון על מנגנון ההפרשה ותיערך השוואה בין תפקוד הצא"פ לתפקוד של בלוטות אחרות.

* יהודית שניצר (03 5580790) – מנחת מורים בנושא הבידוע, חברת צוות במרכז הארצי למורי הביולוגיה תודה לרותי מנדלוביץ ולאורה הירש על ההערות וההארות

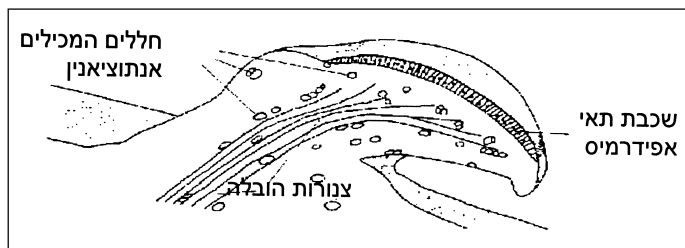
תומרים ושיטות

הצוף נאסף מצא"פ של צמחי קיקיון בני 6-8 שבועות. נוזלי השיפה והעצה נלקחו מאותם צמחים, לפי השיטה שתיארו (Hall, Baker & Milburn (1971 בניסוי אחד הוסרו הצופנים האקסטראפלורליים. כל הצא"פ שהופיעו לאחר מכן על העלים החדשים, הצעירים, הוסרו גם כן. הצמחים גודלו במצע Hogland (שהוא מצע גידול עשיר) וגם במצע Hogland שנמהל פי 10. הכנת הצופנים לבדיקה במיקרוסקופ האלקטרוני מפורטת באריכות בקטע זה של המאמר. הבדיקות במיקרוסקופ האור נעשו עם צופנים שהוטבלו בחומר רזין, נחתכו לפרוסות בעובי 1mm ונצבעו עם טולואידין כחול.

תוצאות

מאפיינים כלליים ובדיקות במיקרוסקופ האור

הצופנים האקסטראפלורליים של הקיקיון נמצאים בדרך כלל בצד העליון של הפטוטרת (הפונה לגבעול) ובבסיסי הטרפים. מספרם של הצא"פ נע בין 3-7 צופנים לעלה בודד. לצופנים יש "גבעול" קצר וראש שטוח, בקוטר של כשני מילימטרים בלבד (ציור מספר 1).



ציור מס. 1

מבנה הצופנים האקסטראפלורליים בקיקיון: ניתן להבחין בשכבת האפידרמיס, חללים המכילים אנתוציאנין, ומערכת צינורות ההובלה (עצה ושיפה).

בצופנים "פעילים" (שמפרישים צוף), מבחינים בשכבה אחת, חיצונית, של תאי אפידרמיס גליליים. מתחתיה חללים רבים שמכילים אנתוציאנין (פיגמנט בצבע אדום). הללו מפוזרים בכל הבלוטה והם בד"כ מרוכזים בקצוות של צינורות ההובלה. הצינורות מסתעפים מ"גבעול" הבלוטה ומסתיימים במרחק 6-10 תאים מהאפידרמיס. אנתוציאנין מופיע גם בחלק מתאי האפידרמיס.

בדיקות במיקרוסקופ האלקטרוני

בצופנים צעירים, תאי האפידרמיס העליון שבהיקף הצופן מצופים בשכבה דקה של קוטיקולה, ולא מבחינים במבנה מיוחד של התאים, המכילים חללית מרכזית גדולה אחת. התאים שבמרכז הצופן מכילים מספר חלליות: שתי חלליות גדולות ועוד כמה קטנות. הציטופלסמה של תאים אלה צפופה מאוד ומבחינים בה במספר רב של ריבוזומים ורשת תוך תאית מעובה. בתאים של צופנים פעילים, הקוטיקולה עבה יותר, נצפו הרבה יותר חלליות קטנות בקבוצות, קרוב

לצד החיצוני של התא (קרוב לקוטיקולה), בעוד הגרעין נמצא בצד השני של התא. הרשת האנדופלסמטית נפוחה, שלפוחיות רבות, ומיעוט יחסי של ריבוזומים.

כמות המיטוכונדריה רבה. הם מרוכזים בבסיס התא והקרום הפנימי שלהם מסועף מאוד. בשטחו העליון של הדופן הופיעו לעיתים קרובות רווחים בין דופן התא לבין הקוטיקולה ובין דפנות האורך של תאים סמוכים.

ניתוח הרכב המיצוי

הרכב המיצוי של צופנים אקסטרפלורליים ומיצוי השיפה מוצגים בטבלה. ריכוז החומרים מבוסס ביחידות של mg/ml. הנתונים מאפשרים לערוך השוואה בין נוזל שיפה (שלא התאדה) ובין נוזל הצוף (שעבר אידוי). בשני המיצויים הייתה כמות גדולה של חומר יבש שהכיל בעיקר סוכרים. אבל, בעוד שמיצוי השיפה הכיל סוכרוז כסוכר יחיד, מיצוי הצא"פ הכיל כמויות ניכרות של פרוקטוז וגלוקוז עם מעט גלקטוז. היחס בין גלוקוז ופרוקטוז היה 1:1, דבר המעיד על כך שסוכרים אלו הם התוצרים של הידרוליזת הסוכרוז.

טבלה מס. 1

השוואה בין נוזל השיפה ובין מיצוי הצופנים האקסטרפלורליים שנלקחו מצמחי קיקיון. התוצאות בטבלה מובאות ביחידות מדידה של מ"ג למ"ל.

החומר	מיצוי צא"פ (mg/ml)	נוזל שיפה (mg/ml)
חומר יבש	900	125-100
סוכרוז	280	106-80
גלוקוז α	107	חסר
גלוקוז β	190	חסר
פרוקטוז α ו-β	295	חסר
גלקטוז	1.0	חסר
חלון	0.20-0.12	2.2-1.45
חומצות אמיניות	1.7	5.2

בצמחים שבהם הוסרו בלוטות הצא"פ לא נראה שום הבדל בהתפתחותם ביחס לצמחים בהם לא הוסרו הבלוטות.

אותה התוצאה התקבלה בגידול הצמחים בתמיסת Hogland מלאה, וגם בתמיסה מהולה פי עשרה (כתוצאה מכך הוקטנה הספקת החנקן, למשל, פי עשרה).

דין

למבנה של תאי הצופנים בצמח הקיקיון יש תכונות המשותפות גם לצופני פרחים וגם לתאי בלוטות אחרות. בין התכונות הללו: רשת תוך תאית מוגדלת, שלפוחיות רבות, ריבוזומים ומיטוכונדריה רבים המעידים על צריכה מוגברת של אנרגיה בתאים.

גופיפי גולג'י אינם פעילים באופן מיוחד. לא נמצאה הוכחה למקור השלפוחיות הרבות – לא ברור אם מקורם מגופיפי גולג'י או מהרשת האנדופלסמטית. חוסר הפעילות של גופיפי גולג'י נמצא גם בצופנים של צמחים אחרים, למרות שבצמחים מסויימים הפרשה בתאי צופנים באמצעות גופיפי גולג'י היא חשובה ומשמעותית יותר.

קרום הפלסמה הוא כנראה המקום דרכו מתקיימת העברה אקטיבית של סוכר, והדבר מוביל להצטברות תוצרי ההפרשה מחוץ לתא, מתחת לקוטיקולה. מבנה דומה של קוטיקולה, המרוחקת מתאי האפידרמיס שהפרישו אותה, מופיע גם בתאים חיצוניים של בלוטות אחרות. לא נמצאה הוכחה להימצאות נקבים בקוטיקולה או דרכים אחרות ליציאת הצוף.

אנליזה של מיצוי צא"פ והשוואה של הרכבו עם מיצוי שיפה, מאותם צמחים, תומכת בדעה שנוזל הצא"פ מקורו בעיקר מנוזל שיפה שעבר שינוי, בתוספת קטנה של נוזל העצה. הרכב הסוכר של מיצוי צא"פ דומה להרכב המיצוי מצופני צמחים אחרים. הסוכרים מהווים 97% ממשקלו היבש של מיצוי הצא"פ. סוכרוז, גלוקוז ופרוקטוז מהווים את רוב אחוזי הסוכר בצוף. היחס בין גלוקוז ופרוקטוז במיצוי צופנים אקסטרואפלורליים של קיקיון הוא 1:1, מה שקיים גם בצוף של צמחים אחרים וזה מעיד על פירוק של דיסוכר לחד־סוכרים בשלב כלשהו של התהליך.

סוכרוז הוא הסוכר היחיד המצוי בנוזל השיפה של הקיקיון. כיון שיש כמויות גדולות של סוכרוז בצוף הצא"פ לא סביר להניח שהפירוק לחד־סוכרים הוא תנאי חשוב להעברת הסוכר החוצה דרך תאי הבלוטה. מניחים כי הפירוק לחד־סוכרים בצופני פרחים הוא תהליך חוץ־תאי המזורז ע"י האנזים אינברטאז, שנמצא אף הוא בצוף.

התפקוד והחשיבות של הצופנים האקסטרואפלורליים מוטלים עדיין בספק. לדעת החוקרים תוכן צינורות השיפה נלחץ החוצה דרך הצופנים ע"י עודף הלחץ שבצינורות השיפה. הוצע כי הצא"פ משמשים כ"שסתומי מוהל", המכוונים את האספקה של חומרים לא סוכריים

במוהל השיפה לכיוון איברים מתפתחים, במחיר של הפרשת סוכרים ע"י הצופנים. (רעיון זה הוצע עוד בשנת 1935 ע"י Frey-Wyssling).

מילבורן (1975) עשה אנלוגיה בין צא"פ לבין כנימות עלים (המוצצות את נוזל השיפה ומפרישות נוזל סוכרי): בשני המקרים נלקחים חומרים מהשיפה ומופרשים הסוכרים הלא רצויים. כדי שהפרשת עודפי הסוכרים תהיה יעילה לצמח, צריכה להיות גם העברה של יתר החומרים (כמו מינרלים) שלא מופרשים החוצה, במיוחד חנקן, מן הבלוטה לכיוון האיברים המתפתחים. ההוכחה לכך היא קלושה.

במחקר הנוכחי, רק 20% מתרכובות החנקן שהגיעו לצופנים נכללו בהרכב הצוף. בניסויים בהם הוסרו בלוטות מן הצמחים, הצמיחה לא הייתה שונה מזו של צמחי הבקרה, גם כאשר אספקת החנקן הייתה מוגבלת בתמיסת הגידול. לפיכך מחקר זה אינו מאשר את תאוריית "שסתום המוהל".

בצמח Bixa הוכח, כי צא"פ שלו מבוקרים לעיתים קרובות ע"י נמלים. במקרה זה יש לנמלים תפקיד בהגנה על הצמח – בהרתעת חרקים הניזונים ממנו, כמו כנימות עלים המוצצות את מוהל השיפה או זחלי פרפרים הניזונים מכרסום העלים (Bentley, 1977). הפרשת צוף באיברים מתפתחים כמו עלים צעירים או פרחים, מגדילה את תדירות ביקורי הנמלים ובכך מגינה על האיבר מפני החרקים המזיקים הללו. לפיכך מקנה הפרשת צוף יתרון ברירתי לצמחים בעלי צא"פ למרות שהתהליך כרוך באיבוד של סוכרים. ובאשר ל"איבוד סוכרים" – אותה תופעה קיימת למעשה גם במינים של צמחים אחרים, המייצרים פירות עתירי סוכר, אשר משמשים כאמצעי משיכה לבעלי חיים ואלה האחרונים מסייעים בהפצת הזרעים שבפירות.

רשימת מקורות

1. פאהן, א., (1967) אנטומיה של הצמח, הוצאת הקיבוץ המאוחד, 372-381.
2. מופט, מ., (1999) נשיונל ג'יאוגרפיק (מהדורה עברית) נמלים וצמחים 100-113.

כתובות באינטרנט לחומר על צופנים אקסטרופלורליים:

<http://trc.ucdavis.edu/coursepages/plb105/html/Un7.html>

על צופנים וצופנים אקסטרופלורליים

<http://www.ruf.rice.edu/~bws/efns.html>

נמלים על צופנים אקסטרופלורליים בקקטוסים

הערה:

לאחר עיבוד המאמר קיימתי שיחה עם פרופ' דן איזיקוביץ מאוניברסיטת ת"א שמסר לי את הפרטים הבאים:

מחקרים חדישים מאשרים את חשיבות הצופנים האקסטרפולורליים כמוסתי זרימת נוזל השיפה. מקובל היום כי הנמלים אכן תורמות לצמח בהגנה מפני חרקים מזיקים. יש ניסויים המאשרים כי בצמחים המבוקרים ע"י נמלים שיעור כרסום העלים קטן יותר. הנמלים מסלקות מהצמח ביצים וזחלים של חרקים אוכלי עלים.



פעילות האנזים אינברטאז בצופנים אקסטרפולורליים (צא"פ) של קיקיון עיבוד קטע מעבודת מחקר של תלמידים בהדרכת יהודית שניצר

ניסוי א' – בדיקת השפעת גיל הצא"פ על ריכוז הגלוקוז בצוף שבו
בניסוי זה השתמשנו ב-15 צא"פ מכל קבוצת גיל: צעירים, בוגרים וזקנים. הצא"פ הצעירים נלקחו מראש ענף הקיקיון, הצא"פ הבוגרים נלקחו מהשליש האמצעי בענף והצא"פ הזקנים נלקחו מהשליש התחתון של הענף.

לכל מבחנה הוכנסו 15 צא"פ מאותה קבוצת גיל. המיצוי הוכן ע"י הוספת 1 מ"ל מים לצא"פ במבחנות וטלטולן. לאחר כעשר דקות הוטבל בכל מבחנה מקלון קליניסטיקס ועפ"י שינוי צבעו נקבע ריכוז הגלוקוז.

טבלה 1: בדיקת ריכוז הגלוקוז בצא"פ מגילאים שונים

מספר המבחנה	גיל הצופנים n=15	מים מ"ל	ריכוז גלוקוזה (mg/dl)	ריכוז ממוצע של גלוקוזה (mg/dl)
1	צעירים	1		
2		1		
3		1		
4	בוגרים	1		
5		1		
6		1		
7	זקנים	1		
8		1		
9		1		

ניסוי ב' – בדיקת פעילות האנזים אינברטאז בצא"פ מגילים שונים

הניסוי התבסס על שיטת עבודה שנלמדה במעבדה חוקרת [בעיה מספר 1 מבחינת בגרות במעבדה, תשנ"ח] הבודקת פירוק סוכרוז ע"י אינברטאז מתאי שמרים והוא מהווה ניסוי המשך לניסוי הקודם. בכל חזרה 15 צא"פ.

בניסוי השתמשנו בתמיסת סוכרוז 0.1M שמשמשת כסובסטרט. להכנת המיצוי השתמשנו ב־0.5 מ"ל מים. הוסיפו שלוש מבחנות של בקרה ללא הצא"פ מבחנות 10-12.

בניסוי הקודם התקבלו תוצאות שמראות את הריכוז ההתחלתי של הגלוקוז, לפני הוספת הסוכרוז. את התוצאות הללו (9-1 מניסוי א') נפחית אח"כ מהתוצאות שיתקבלו בניסוי ב' לאחר הוספת סוכרוז. תוצאות ניסוי א' מהוות בקרות לניסוי ב', בקרות אלו יוכיחו כי תוספת הגלוקוז במבחנות היא בעקבות פעילות האנזים אינברטאז על הסוכרוז, שהוא הסובסטרט.

לאחר כעשר דקות, בטמפ' החדר, שנועדו לפעילות האינברטאז, נמדד ריכוז הגלוקוז בעזרת מקלון קליניסטיקס.

טבלה 2: בדיקת פעילות האנזים אינברטאז בצא"פ מגילים שונים

מספר המבחנה	גיל הצופנים n=15	סוכרוז 0.1M מ"ל	מים מ"ל	ריכוז גלוקוזה (mg/dl)		רכוז ממוצע של גלוקוזה (mg/dl)	
				מהסוכרוז נטו	מהצוף + סוכרוז	מהסוכרוז נטו	מהצוף + סוכרוז
1	צעירים	0.5	0.5				
2		0.5	0.5				
3		0.5	0.5				
4	בוגרים	0.5	0.5				
5		0.5	0.5				
6		0.5	0.5				
7	זקנים	0.5	0.5				
8		0.5	0.5				
9		0.5	0.5				
10	ללא צופנים	0.5	0.5				
11		0.5	0.5				
12		0.5	0.5				