

ניסויים לבחינת עיכוב נביטה וצמיחה על ידי שמנים אתריים מצמחי תבלין ובושם

מאת: נתיב דודאי*



במסגרת לימודי הביולוגיה נדרשים התלמידים להתנסות בעריכת עבודות חקר הכוללות ניסוי מדעי, לרוב בנושא הנוגע בתחום האקולוגיה או החקלאות. כחוקר בתחום צמחי התבלין, נשאלתי רבות על ידי מורים ותלמידים לגבי השפעות אללופתיות של הצמחים הללו ועל הדרך הטכנית לערוך ניסויים כמותיים. כמי שבמסגרת עבודתו כבר יותר מעשור שנים עוסק בנושא, יש בידי לשתף בניסיוני, בעיקר בשיטות עבודה פשוטות יחסית, כיצד לערוך בחינה כמותית של עיכוב הנביטה על ידי שמנים אתריים ומרכיביהם. מטרת המאמר להלן היא להתרכז, אם כן, בצד הטכני של עריכת הניסויים, ולהוסיף רקע מדעי תאורטי בנושא.

אללופתיה – מהי?

מדען בשם האנס מולישי (Hans Molisch) טבע לראשונה ב־1937 את המונח "אללופתיה" (Allelopathy), בהתייחס ליחסים **ליחסי גומלין כימיים** בין צמחים, כולל מיקרואורגניזמים. החוקר Rice (1984), בספרו "אללופתיה" המסכם כ־50 שנות מחקר בנושא, תומך בהגדרה זו, אשר כוללת אינטראקציות המתבטאות הן בעיכוב והן בהמרצה. יש להדגיש שיש הבדל בין עיכוב צמיחה של צמח על ידי צמח אחר כתוצאה מתחרות על משאבים, כגון מים, חמרי הזנה, אור, מקום וכו' לבין "אללופתיה" – שהיא בהגדרתה אך ורק השפעה שנגרמת על ידי חומר או כמה חומרים שמקורם בצמח או במיקרואורגניזם המשפיע. חומרים אלה מכונים בשם "אללוקימיקלים" (Allelochemicals). רוב האללוקימיקלים שזוהו, המיוצרים על ידי צמחים עילאיים, הם פנולים ונגזרות של חומצה צינאמית (Rice 1984; Inderjit 1996). במינים רבים נמצאו חומרים מעכבים מקבוצות כימיות שונות: חומצות פנוליות, קומרינים ופרוקומרינים, פלבנואידים, אלקלואידים, ציאנוגליקוזידים, חלבונים וחומצות אמיניות, חומצות אמיניות לא חלבוניות ואחרים (Waller G.R. 1989; Putnam 1983; Friedman and Waller 1986; Friedman and Waller 1983). לרשימה זו יש להוסיף טרפנואידים וביניהם טרפנים נדיפים, שהם המרכיבים החשובים בשמנים אתריים (Elakovich 1988; Muller 1986).

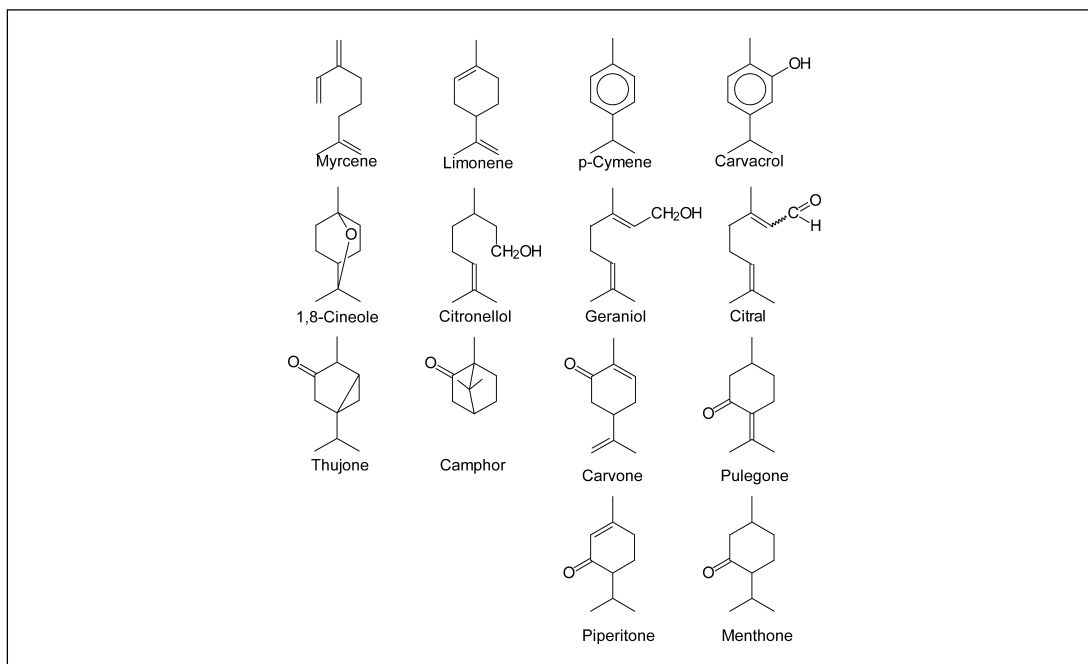
שמנים אתריים

"שמן אתרי" הוא שם שניתן לחומרים הנדיפים בצמח ארומטי (מלשון "ארומה") אשר יחדיו מקנים לו את ריחו האופייני. כל השמנים האתריים מכילים תערובות שונות ומורכבות של חומרים כימיים נדיפים, בעלי מסיסות נמוכה מאוד במים. ברוב המקרים מרכיבי השמן האתרי שייכים לקבוצה

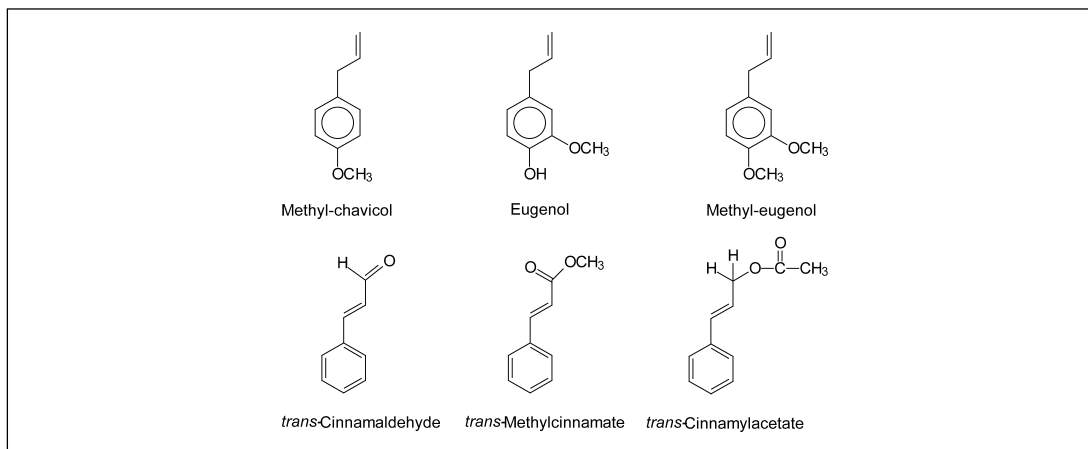
* ד"ר נתיב דודאי (04 9539510) – היחידה לצמחי תבלין ובושם, מנהל המחקר החקלאי, נווה יער.

המכונה "טרפנים", בעלי 10 ("מונוטרפנים") או 15 ("ססקוטרפנים") אטומי פחמן. בשמנים האתריים נפוצים מונוטרפנים וססקוטרפנים מקבוצות כימיות שונות: פחמימנים, כהלים, קטונים, אלדהידים, פנולים ועוד.

דוגמאות לנוסחאות מבנה של מונוטרפנים שכיחים בשמנים אתריים ניתן לראות באיור 1. כמו כן ניתן למצוא בשמנים אתריים רבים חומרים נדיפים אחרים, בעיקר כאלה הנוצרים במסלולים ביו סינתטיים שמקורם בחומצה השיקימית, כגון אאוגנול, מתיל אאוגנול, מתיל חביקול, ונגזרות של צינאמאלדהיד (איור 2).



איור 1: נוסחאות מבנה של מונוטרפנים שונים הנפוצים בשמנים אתריים.



איור 2: פניל – פרופנואידים הנפוצים בשמנים אתריים.

מרכיבי השמן האתרי נחשבים כ"מטבוליטים משניים" בצמחים, ותפקידם אינו ידוע. יש המשערים שהם בעלי תפקיד מכריע למשיכה וכאמצעי זיהוי לחרקים מאביקים (בקר וחובריה 1988). השמנים האתרים לרוב רעילים לצמח, וסביר להניח שאגירתם בבלוטות מיוחדות הינה התאמה המונעת "הרעלה עצמית" (רביד וורקר 1994). קיימות ראיות רבות לפעילות שמנים אתריים ומרכיביהם כנגד נביטת זרעים (דודאי וחובריו 1994ב), פטריות (פסטר 1994), חיידקים וחרקים (שעיה וחובריו 1994). מכאן נובעת ההשערה המקובלת כיום שתפקידם המרכזי של השמנים האתריים הוא הקניית יתרון אקולוגי לצמח ע"י הגנה מאויבים טבעיים, כגון מזיקים, מחלות, בע"ח וכד'.

שמנים אתריים כאללוקימיקלים

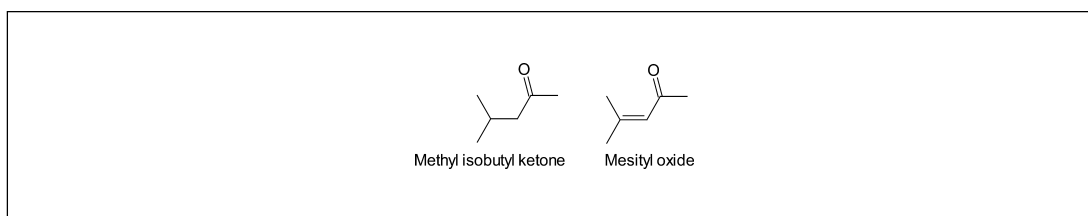
כבר לפני כמעט 80 שנה בחן זיגמונד (Sigmund 1924) את השפעתם של מגוון שמנים אתריים על עיכוב נביטת זרעים והתפתחות נבטים בחיטה, לפת ובקיה. מילר וקבוצתו דיווחו במהלך שנות הששים על עיכוב צמיחת חדשנתיים בסביבת שיחי צמחים ארומטיים – מספר מיני מרווה (*Salvia*) ולענה קליפורנית (*Artemisia californica*), בעמק Santa Inez בקליפורניה.

באוכלוסיות נמצאו שטחים ריקים מצמחים חדשנתיים עד כדי 90 ס"מ מן השיחים, וניכר אף עיכוב ברמות שונות אפילו במרחקים של 2-6 מ' מן הנוף (Muller et al. 1964; Muller 1986). בבדיקות המעבדה הם לא מצאו חומרים מעכבים בשורשים. לעומת זאת פיסות עלים ועלים כתושים גרמו לעיכוב בהתפתחות השורשון בנבטי מלפפון (*Cucumis sativa*) ושיבולת שועל (*Avena fatua*) בצלחת פטרי. העיכוב התקבל מבלי שהיה מגע של העלים בנבטים, כנראה על ידי חומרים נדיפים. בנוסף, הם גידלו את הנבטים מתחת לנוף עציצי הצמחים הארומטיים בחממה, בהשוואה לביקורת של צמחים אחרים, שאינם ארומטיים, וללא עציצים כלל. בניסוי זה נמצא עיכוב של יותר מ-50% בגידול השורשונים בקרבת עציצי הצמחים הארומטיים.

מאמרים רבים מביאים עדויות על קיומה של תופעת האללופתיה בטבע על ידי צמחים המכילים אללוקימיקלים נדיפים. גם בישראל נערכו תצפיות המעידות על קיום התופעה על ידי קבוצתו של יעקב פרידמן מאוניברסיטת תל אביב (Friedman et al. 1977, 1987, פרידמן 1986). הם מצאו שבאזור שדה בוקר בנגב, במפנה דרומי (=מדרון הפונה לכיוון דרום) יכול הצמחים החד שנתיים עלה פי 6-8 על זה שבמפנה הצפוני הסמוך. זאת למרות שהמפנים הדרומיים צחיחים יותר מן הצפוניים. נמצא שהמפנים הצפוניים נשלטים ע"י **לענת המדבר** (*Artemisia siberi*), שהוא צמח ריחני, בעוד שעל המפנים הדרומיים שלט זוגן השיח (*Zygophyllum dumosum*), שאינו ריחני. שנה אחת לאחר הרחקת בני השיח משני המדרונות, גדל יכול החד שנתיים במפנה הצפוני בצורה משמעותית, אם כי לא הגיע לזה שבמפנה הדרומי. הועלתה השערה שחומרים נדיפים מעלי הלענה הם הפיטוטוקסינים האחראים לדיכוי העשבים השכנים. ניסויים מעבדתיים במיכלי פלסטיק אישרו שלענת המדבר דומה מאד ללענה הקליפורנית ביצור חומרים נדיפים. גרם אחד של נצרי הלענה במיכל בנפח 50 סמ"ק מנע נביטת זרעי עשבים חדשנתיים שונים, הנפוצים בשטח המחקר. בטיפול הביקורת, לא נגרם עיכוב כזה ע"י עלים של זוגן השיח. מסקנתו של פרידמן היא שהחומרים הנדיפים גורמים למיעוטם של העשבים החדשנתיים בסביבתה של לענת המדבר. בתצפיות על אוכלוסיות לענת המדבר באזורים פחות צחיחים לא נמצאה השפעה משמעותית כמו שנצפתה באזור שדה בוקר. פרידמן (1987) מציע

שבאזורים יבשים השפעת האללוקימיקלים גדולה יותר, כיוון שבתנאים אלה ריכוזם בצמח גבוה יותר מחד גיסא, ומאידך גיסא הקרקעות החוליות סופחות אותם היטב ואינן נשטפות (עקב מיעוט המשקעים). אספלונד (Asplund 1968) בדק את כושר עיכוב נביטת זרעי צנון של מגוון מונוטרפנים נקיים המהווים מרכיבים עיקריים בשמנים אתריים שונים. הוא מצא שלא לה המכילים קבוצה קטונית במולקולה – קמפור ופולגון, הייתה פעילות העיכוב החזקה ביותר, אפילו יותר מחומר רעיל מאוד כמו חומצה הידרוציאנית (HCN), בהשוואה למונוטרפנים שהם פחמימנים, כוהלים או אתרים. בנוסף, הוא גילה שכמויות קטנות מאוד של מונוטרפנים מסוגלות לעודד ולזרז נביטה, למרות שבכמות גדולה יותר הם פועלים כמעכבים.

החוקר ריינולדס (Reynolds 1987) בחן ודירג את עיכוב הנביטה של זרעי חסה ע"י מונוטרפנים נקיים, וגם הוא קיבל עיכוב משמעותי בעיקר ע"י מונוטרפנים מכילי חמצן. החוקרים לרנר ואבן ארי מהאוניברסיטה העברית (Lerner and Evenari 1961) הציעו שרמת העיכוב גדולה יותר בחומרים שיש להם מערכת קרבונלית מצומדת בלתי רוויה בעמדות α , β (איור 3). כראיה הם הדגישו עיכוב על ידי מזיתיל אוקסיד, שהוא חומר פשוט המקיים תנאי זה, אשר עיכב את הנביטה במידה משמעותית לעומת מתיל-איזובוטיל-קטון, שהוא חומר דומה אך ללא קשר כפול מחוץ לקבוצת הקרבונל במולקולה (איור 3).



איור 3: מזיתיל-אוקסיד ומתיל-איזובוטיל – קטון.

תוצאות סדרת ניסויים שערכנו במעבדתנו לבחינת כושר העיכוב של מונוטרפנים שונים המהווים מרכיבים של שמנים אתריים שנמצאו מעכבים, מאוששות בהחלט את ההשערה הזו (דודאי 1998).

טבלה 1: עיכוב נביטת זרעי חיטה על ידי מונוטרפנים מקבוצות כימיות שונות*

החומר*	I ₅₀ (נ"ל/מ"ל)		קטגוריה
	נביטה חלקית***	פריצת שורשון	
(+)	36	16	קטון**
(-)	36	16	קטון**
(-)	36	16	קטון**

החומר*	I ₅₀ (נ"ל/מ"ל)		קטגוריה
	נביטה חלקית***	פריצת שורשון	
campho	60	16	קטון
β -thujo	36	16	קטון
piperito	48	20	קטון**
(+)	36	24	קטון**
Citral	44	25	אלדהיד**
carvacr	36	28	פנול
geranio	>100	44	כוהל
citronel	64	48	כוהל
mentho	68	48	קטון
1,8-cineol	68	48	אתר
myrcen	>100	56	פחמימן
Limone	80	56	פחמימן
p-cyme	68	60	פחמימן
LSD	8	8	

* נוסחאות מבנה באיור 1.

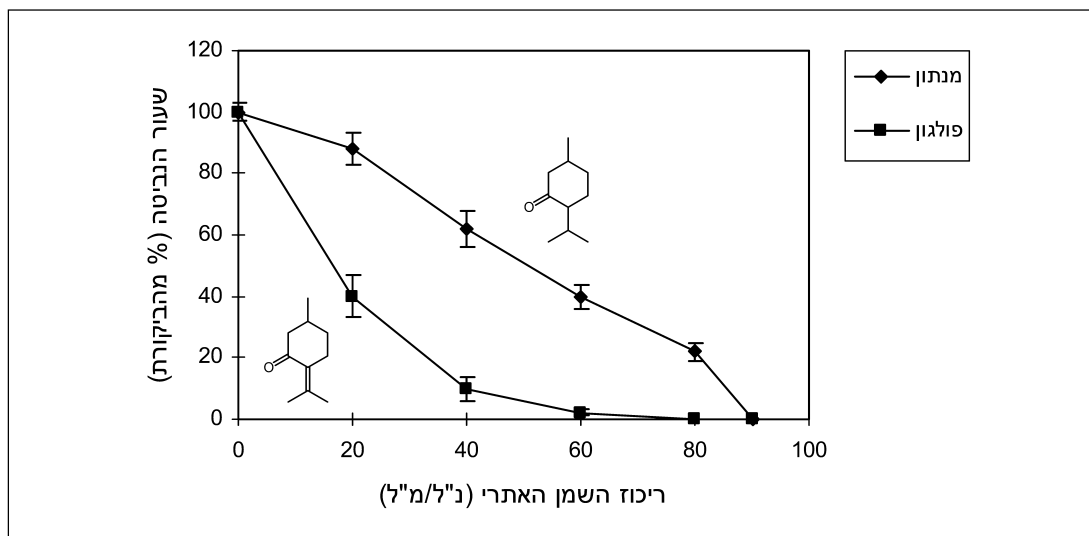
** מכיל קשר בלתי רווי בעמדת α - β לקרבניל

*** נביטה חלקית: פריצת רקמת תאים ללא שורשון

בניסוי נמצאו הבדלים גדולים ברמת פעילות העיכוב של החומרים השונים. למונוטרפנים מכילי החמצן נצפתה פעילות עיכוב חזקה יותר (טבלה 1). לפיכך, ניתן לראות שקרבקרוֹל פעיל הרבה יותר בהשוואה לפראצימן (טבלה 1), למרות שהם נבדלים רק בנוכחות קבוצת OH בקרבקרוֹל (איור 1). מבין החומרים שנבדקו, הפעילים ביותר היו קטונים (טבלה 1). אחריהם נמצאה פעילות גבוהה לציטראל (אלדהיד) ולקרבקרוֹל (פנול). לגרניול וציטרונול (כהלים), מנתון (קטון) וצינאול (אתר) הייתה הפעילות הנמוכה ביותר מבין מכילי החמצן. לאיזומריה אופטית לא הייתה השפעה על כושר עיכוב הפולגון. מאידך, (-) קרוון מעכב חזק יותר בהשוואה ל-(+) קרוון.

חלק מן החומרים הפעילים ביותר הם בעלי קבוצת קרבניל מצומדת בלתי רוויה בעמדות α - β : פולגון, פיפריטון, קרוון וציטראל. בהשוואת פעילות מנתון לפולגון ניתן לבדוק את ההשערה שתכונה

זו משפרת את כושר העיכוב: אלה מולקולות בעלות מבנה דומה, אך המנתון נעדר קשר בלתי רווי בעמדת α - β , כפי שיש בפולגון. אכן, לפי התוצאות פעילותו של הפולגון גבוהה יותר מזו של המנתון (איור 4), וזה כאמור תומך במידה מסויימת בהשערה לגבי חשיבות הקשר הכפול המצומד. עם זאת, גם בהעדר הקשר הזה נמצאה פעילות.



איור 4: השפעת פולגון ומנתון על נביטת זרעי חיטה.

מנגנוני פעולה

סקירה ממצה על תוצאות מחקרים שנערכו בנוגע למנגנוני הפעולה של שמנים אתריים ומרכיביהם בזרעים ניתן למצוא במאמר קודם שפורסם ב"מחקר חקלאי בישראל" (דודאי וחובריו 1994 ב).

עיכוב נביטת זרעים

מטרת השורות להלן להגדיר ולדון בתופעות העיכוב השונות. אנו נגדיר להלן "נביטה" כהליך פריצת השורשון דרך קליפת הזרע. זה בניגוד ל"נביטה" במובן החקלאי, אשר מוגדרת כ"הצצה" של הנבט מן הקרקע. קוטלי עשבים בדרך כלל מעכבים את התפתחות השורשון או הנצרון לאחר הנביטה, וכך מונעים הצצתם מן הקרקע.

עיכוב התפתחות השורשון ו/או הנצרון לאחר הנביטה הוא למעשה "עיכוב התפתחות הנבטים". עבודות רבות המתוארות לעיל (Reynolds 1987; Lerner and Evenari 1961; Friedman 1977;) עוסקות בעיכוב נביטה על ידי שמנים אתריים ומרכיביהם. עם זאת, רוב העבודות שעוסקות בהיבטים הפיסיולוגיים ובמנגנוני העיכוב של אללוקימיקלים, מרבות לעסוק דווקא בשלבי ההתפתחות והצמיחה אחרי הנביטה (Muller 1986; Friedman 1995). יש להבחין בין "עיכוב נביטה", הנובע מרעילות או נזק לזרעים, לבין "תרדמת זרעים", הנובעת משינויים פנימיים בזרע (מאיר ופוליאקוב-מיבר 1985).

תרדמת זרעים היא מצב פיסיולוגי מיוחד שמאופיין על ידי אי יכולתם של זרעים מותפחים לנבוט. שינויים פנימיים או סביבתיים עשויים לעורר את הזרע מתרדמתו, ולגרום לנביטה (מאיר ופוליאקוב-מיבר 1985).

"תרדמה ראשונית" היא זו המושרית בזמן ההתפתחות על צמח האם (Bewley and Black 1982) **"תרדמה משנית"** מתפתחת בזרעים שלא היו בתרדמה ראשונית, או יצאו ממנה, ונחשפו לתנאי נביטה בלתי מתאימים כמו: עקת מים, טמפרטורה לא אופטימלית, מחסור בחמצן, אור וכו' (Hilhorst 1998). ניתן לחלק את הגורמים המשרים תרדמה ל"תרדמת עובר" ול"תרדמה מושרית על ידי מעטפות הזרע" (Bewley and Black 1994). לעתים קשה להבדיל באופן חד וברור בין "תרדמה משנית" לבין "עיכוב נביטה" שנוצר על ידי גורמי סביבה או חמרים כימיים. לעיתים תרדמה משנית מושרית על ידי חמרים כימיים. חמרים מעכבי נביטה נמצאו בפירות, קליפת הזרע או באנדוספרם ביניהם חומצה אבציסית (ABA), catechin, coumarin, חומצות שומן, חומצות פנוליות ועוד (Bewley and Black 1994). חמרים אלה עשויים לעכב את זרעי הצמח שבהם הם נוצרו, או זרעים אחרים בסביבה. בזרעים שונים (אורז, חמנית, סויה, גזר וחסה) שאוחסנו נמצאו חומרים נדיפים כגון: מתאנול, אתאנול, אצטאלדהיד ואצטון אשר עשויים לגרום לעיכוב נביטה (Zhang et al. 1997). תכולתם עולה במשך זמן האחסון, בעוד כושר הנביטה של הזרעים יורד. בניסויים במעבדה הראו החוקרים שתוספת חיצינית של החמרים הללו גורמת גם היא לעיכוב נביטה. העיכוב הגדול ביותר התקבל על ידי אצטאלדהיד. גם אלדהידים נוספים נמצאו כמעכבי נביטה, אם כי פחות בהשוואה לאצטאלדהיד. השערתם היא שהחמרים הנדיפים הנוצרים בזרע הם הסיבה לירידה בכושר הנביטה באחסון. כדי לבסס את ההשערה, הם הראו שיש עליה בתכולת החמרים הנדיפים הפנימיים ככל שירד שיעור הנביטה לאחר איחסון. הגורמים שתרמו לנזק שנגרם באיחסון (לחות וטמפרטורה) גרמו גם לעלייה בתכולת החומרים האלה בזרעים (Zhang et al. 1997). הם מצאו שאצטאלדהיד גורם לשינוי במבנה חלבונים בזרע, ומציעים שזהו מנגנון לפעולת העיכוב והירידה בכושר הנביטה במשך איחסון הזרעים (Zhang et al. 1997). הם מציעים שיש בזרע מעבר כימי של אצטאלדהיד לאתאנול, כמנגנון לביטול הרעילות (detoxification), בעזרת האנזים אלוהול דהידרוגנאז (Zhang et al. 1997). (Hilhorst 1998) מציע ששינויים בתכונות הממברנה הם הסיבה לעיכוב נביטה של זרעים (תרדמה משנית) המתקבל כתוצאה מחומרים כימיים ומשינויים בטמפרטורה.

איך לערוך ניסויים בעיכוב נביטה על ידי שמנים אתריים

1. הפקת השמן האתרי

החומר הצמחי

את השמנים האתריים ניתן להפיק מצמחים טריים או מיובשים. במקרה של צמחים מיובשים – הייבוש חייב להיות בתנאים שלא יגרמו לנידוף השמן האתרי מהצמח. ייבוש כזה ניתן לקבל באויר הפתוח, רצוי בצל, או בתנור מאוורר בטמפרטורה שלא תעלה על 40 מ"צ. ישנם הבדלים בריכוז השמן האתרי במינים השונים. לדוגמא: מינים עתירי שמן הם זוסה לבנה, לענה שיחנית, רוזמרין, נענה, פרחי לבנדר, אזוב מצוי. במינים אלה ניתן לקבל 0.5-1.5 אחוז שמן מהחומר

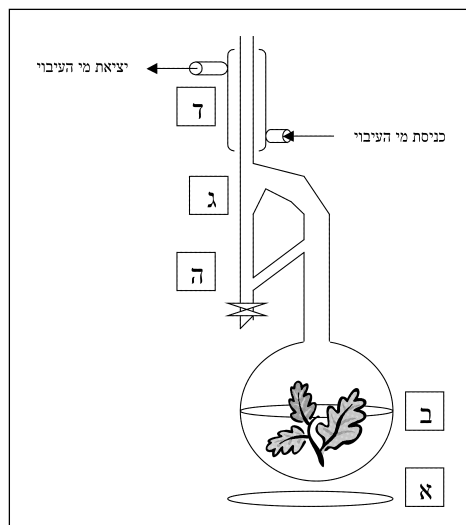
הטרי. מינים בעלי ריכוז שמן נמוך יחסית (פחות מ־0.3 אחוז) הם: מליסה, ריחן (בזיל), פלרגוניום ריחני, פטרוזיליה. גם לתנאי הגידול ועונת השנה יש השפעה על תכולת השמן (דודאי וחובריו 1994): תכולה גבוהה תתקבל בדרך כלל בקיץ בגידול בשטח פתוח. ייבוש נאות גורם לעלייה בריכוז השמן האתרי בחומר הצמחי.

שיטת ההפקה

לקבלת שמן אתרי טהור בתנאי מעבדה מומלץ לערוך זיקוק של הצמח במערכת מטיפוס "קלונגר" (איור 5). זוהי מערכת פשוטה המורכבת משלושה חלקים: מיכל המכיל את הצמחים והמים (ב), "מלכודת השמן" (ג) ומעבה (ד). את המעבה יש לחבר למקור מים. מומלץ להשתמש במיכל של שני ליטר. חשוב לרכוש מערכת שבה פתח המיכל רחב – קוטר של 45 עד 50 מ"מ – לנוחיות הכנסת הצמחים והוצאתם. במיכל כזה ניתן להכניס 200 עד 350 גרם צמחים טריים או כמאה גרם צמחים מיובשים. לאחר הכנסת הצמח יש למלא מים עד שלישי הגובה של המיכל. עודף מים יגרום לבעיות במהלך הזיקוק! לאחר הכנסת הצמחים והמים יש להרכיב את יתר חלקי המערכת ולוודא שמי הקירור זורמים בקצב איטי במעבה. ברז הסיליקון במלכודת חייב להיות סגור, ומעליו למלא מעט מים. רק אז להתחיל בחימום המיכל בעזרת פלטה חשמלית או בונזן. יש להקפיד שעוצמת ההרתחה לא תהיה חזקה מדי כדי שלא תגרום למים לגלוש לתוך המלכודת. לודא שהמעבה עובד היטב, ואם אין בריחה של אדים ממנו לחלל החדר. לאחר ההרתחה, מהלך הזיקוק אורך כשעה עד שעה וחצי. השמן האתרי נאגר מעל המים במלכודת. תום הזיקוק הוא כאשר אין יותר תוספת שמן במשך הזמן. מכבים את מקור החימום בלי להפסיק את זרימת המים במעבה, עד שהמערכת כולה תתקרר. אז אוספים את השמן האתרי על ידי ניקוז דרך ברז הסיליקון לתוך בקבוק. זאת לאחר הוצאת המים שמתחתיו לכלי קיבול אחר. את השמן רצוי לשמור בבקבוק אטום במקרר או במקום מוצל.

בדיקת הרכב השמן האתרי דורשת מיומנות ונערכת במערכת גאז כרומטוגרפיה שאינה נמצאת בדרך כלל במעבדות בבתי ספר. תלמיד שמעוניין בבדיקת ההרכב, רצוי שיפנה למעבדה מצויידת במוסד מחקר. הבדיקה נערכת בשיטה של הפרדת החומרים המרכיבים את השמן וזיהויים בשיטות שונות.

כדי לבדוק מיהם החומרים הפעילים בשם אתרי מסוים, ניתן לבחון את פעילות החומרים המרכיבים אותו. חומרים נקיים המהווים מרכיבים של השמן האתרי, ניתן לרכוש בחברות המספקות כימיקלים למעבדות.



איור 5: מערכת להפקת שמן אתרי (א) מקור חימום; (ב) גולת זכוכית; (ג) מלכודת השמן האתרי; (ד) מעבה, (ה) ברז ריקון השמן.

2. מבחני עיכוב הנביטה והצמיחה

מאחר ששמינים אתריים אינם מסיסים היטב במים, היישום המתואר לעיל מתבסס על היותם נדיפים ויכולתם להגיע לזרעים בפאזה הגאזית. היישום דרך הפאזה הגאזית חושף את המערכת לרגישות לתנאי הטמפרטורה והלחות היחסית. לכן, רצוי לערוך את הניסוי בתנאים מבוקרים, רצוי באינקובטור בטמפרטורה קבועה. בנוסף, נדרש איטום של המערכת למניעת "בריחה" של שמן אתרי במצב גאזי החוצה.

א. **בצלחות פטרי:** לבחינת עיכוב הנביטה ניתן להנביט זרעים בצלחות פטרי על גבי נייר סינון בתנאים מבוקרים, רצוי אינקובטור בטמפרטורה קבועה. כמות מדודה של השמן האתרי מוספגת (על ידי מיקרו קפילרה) בפיסת נייר סינון אשר מוצמדת בעזרת נייר דבק דו צדדי למרכז מכסה הצלחת מעל הזרעים. כזרעי בוחן מומלץ להשתמש בזרעי חיטה מזן מסחרי, 20 זרעים בצלחת בחושך בטמפ' קבועה של 27 מ"צ, בצלחות בקוטר 60 מ"מ (נפח 25 סמ"ק) ע"ג 3 שכבות נייר סינון ווטמן מס' 3, ו-3 סמ"ק מים. חובה לאטום כל צלחת בעזרת סרט אטימה מסוג "Parafilm M". התוצאות ניתנות למדידה לאחר 48 שעות על ידי ספירת הזרעים הנובטים. זרע יוגדר נובט אם חלה בו פריצת שורש.

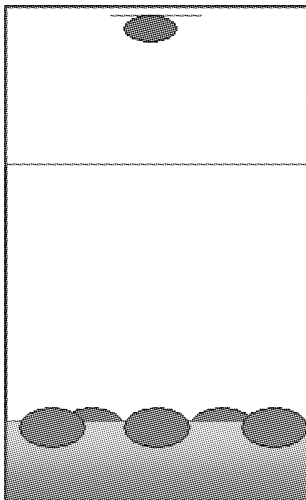
מבחני השפעת החומרים הנדיפים על הצמיחה נערכים באותה המערכת, כאשר זרעי הבוחן יונבטו תחילה במשך 24 שעות, ימויינו לנבטים בעלי גודל אחיד ואז ייחשפו במשך 48 שעות לחומרים המעכבים. בבדיקה נמדדת התארכותם של השורשון והנצרון.

ב. **בבקבוקי סינטלציה** (איור 6): שיפור משמעותי ומומלץ של המערכת הנ"ל ניתן לקבל בעזרת שימוש בבקבוקי סינטלציה 25 סמ"ק. הם ניתנים לאיטום מוחלט בעזרת הברגת המכסה עד הסוף והתוצאות מדויקות ואחידות יותר. 20 זרעי חיטה נזרעים בתחתית הבקבוק על גבי 3 שכבות נייר סינון "ווטמן" מס' 1 אשר נגזר בקוטר הבסיס (25 מ"מ). לאחר הזריעה נוסף 1.5 סמ"ק מים. השמן האתרי יוספג על גבי נייר סינון שידבק בצד הפנימי של מכסה הבקבוק. האינקובציה בטמפרטורה 27 מ"צ. כמובן שניתן לבחון בשיטה זו זרעי מינים שונים בתנאי טמפרטורה ואור רצויים.

איור 6:

מערכת פשוטה לבחינה כמותית של עיכוב נביטה על ידי חומרים נדיפים.

- * בקבוק זכוכית בנפח 25 סמ"ק
- * 20 זרעים על גבי 3 שכבות סינון
- * 1.5 סמ"ק מים מזוקקים
- * השמן האתרי מוספג בפיסת נייר סינון המוצמדת למכסה הבקבוק

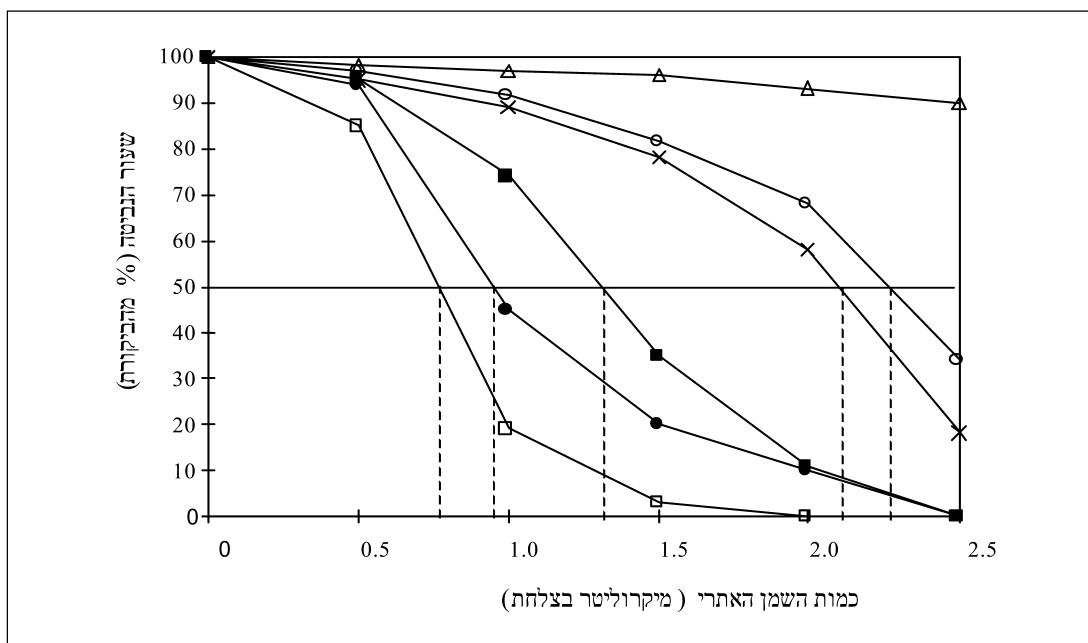


מבנה הניסוי, ריכוזים ועריכת התוצאות:

ניסויים בעיכוב נביטה על ידי שמנים אתריים בטכניקות המתוארות לעיל יש לערוך לפחות ב-4 חזרות. כל שמן אתרי שנבדק יש לבחון במגוון מיונים, כלומר – כמויות המוספגות בנייר המוצמד למכסה צלחת הפטרי או הבקבוק. בשמינים הפעילים ביותר, כמו של עשב לימון, זוטה לבנה, נענה,

לענת יהודה, 2 מיקרוליטר בטמפרטורה של 27 מ"צ גורם לעיכוב נביטה מוחלט של זרעי חיטה. 1 מיקרוליטר גורם לעיכוב חלקי, כלומר: רק חלק מן הזרעים נובטים. ברור שאת התוצאות יש לייחס בהשוואה לטיפול ביקורת ללא שמן אתרי. השוואה בין שמנים אתריים שונים ניתן לערוך ב־2 דרכים: 1. בחינה של כמות אחת מכל שמן, לדוגמא 1 מיקרוליטר, והשוואת תוצאות הנביטה לאחר יומיים. 2. השוואת עקומות תגובה למינונים: כל שמן אתרי יבחן במגוון של 3-4 מינונים בהשוואה לביקורת. לבסוף נערוך גרף שבו המינונים יוצגו על ציר ה־X כאשר הביקורת היא 0, ותוצאות הנביטה (באחוזים) על ציר Y. רצוי להציג את התוצאות כאחוז מתוך הביקורת.

כלומר: נביטת הביקורת תוצג כ־100 אחוז (איור 4 מתוך דודאי וחובריו 1994 ב). בנוסף לתצוגה הזו, ניתן לחשב מתוך הגרף את הכמות התיאורטית הנדרשת לעיכוב 50% ("I₅₀") של הנביטה בהשוואה לביקורת. נמתח קו אופקי מקביל לציר ה־X כך שיחצה את ציר ה־Y בערך 50% מן הביקורת. מנקודת החיתוך עם עקום התגובה לריכוזים נטיל אנך לציר ה־X. נקודת המפגש עם הציר היא הערך המבוקש. כך ניתן לדרג את השמנים האתריים הנבחנים לפי רמת פעילותם (דודאי וחובריו 1994 ב).



איור 7: השפעת שמנים אתריים על נביטת זרעי חיטה.

זרעי החיטה נחשפו לכמויות שונות של שמנים אתריים בצלחת פטרי (בנפח 25 סמ"ק) בפאזה הגאזית (דודאי וחובריו 1994 ב).
 השמנים האתריים הופקו מהמינים הבאים:
 □ זוטה לבנה, ● עשב לימון, ■ בזיל לימוני, x מיורם מתוק, ○ פלרגוניום ריחני, Δ לענה שיחנית.



רשימת מקורות

- בקר ר., איזקוביץ ד., דפני א. (1988) שמנים אתריים באזוב מצוי כגורם זיהוי ומשיכה למאביקים. רותם – כתב עת לנושאי שדה בוטניים בארץ ישראל, 26, ע"מ 37-61.
- דודאי נ., פוטיבסקי א., ורביד ע. (1994) גורמים המשפיעים על כמות ואיכות השמן האתרי בצמחים ארומטיים. מחקר חקלאי בישראל, ז' (2) 3-20.
- דודאי נ., פוליאקוב-מיבר א., לרנר צ., פוטיבסקי א. (1994) (ב) שמנים אתריים כמעכבי נביטה וצמיחה. מחקר חקלאי בישראל – צמחי תבלין ובושם, ז', (2), ע"מ 141-149.
- דודאי נ., פוטיבסקי א., פוליאקוב-מיבר א., לרנר צ. (1996) צמחי תבלין נגד עשבים רעים. השדה – ירחון להתיישבות וחקלאות, כרך ע"ז, חוברת א', ע"מ 27-30.
- דודאי נ., (1998) שמנים אתריים כמעכבי נביטה וצמיחה. ע"ג לקבלת תואר דוקטור לפילוסופיה, הוגשה לסנאט האוניברסיטה העברית בירושלים.
- מאיר א., פוליאקוב-מיבר א. (1985) נביטת זרעים, מאגנס, ירושלים.
- רביד ע., וורקא א. (1994) השמן האתרי בצמחי ארומה מאגן הים התיכון – שיטות הפקה, הרכב, חומרים כימאליים ואברי הפרשה. מחקר חקלאי בישראל, ז' (2) 85-102.
- פסטר נ. (1994) שימוש בחומרי טבע לעיכוב פטריות עובש התוקפות מזון וגרעינים מאוסמים. מחקר חקלאי בישראל, ז' (2) 103-122.
- פרידמן י. (1986) אללופתיה ורעילות עצמית באזורים צחיחים. רותם – כתב עת לנושאי שדה בוטניים בארץ ישראל, 21, ע"מ 5-12.
- שמידע א., אהרונסון א. (1984) מבט אקולוגי על צמחי מזון, תבלין רפואה בשם ורעל. רותם 11 : 56-17.
- שמעוני מ., ראובני ר., רביד ע. (1993) עיכוב התפתחות פטריות פתוגניות לצמחים בעזרת שמנים אתריים. השדה – ירחון להתיישבות ולחקלאות, כרך עד, ע"מ 306.
- שעיה א., קוסטיבסקי מ., ורביד ע. (1994) השימוש בשמנים אתריים ובמרכיביהם כחומרי איוד יעילים נגד חרקים התוקפים מזון מאוחסן. מחקר חקלאי בישראל, ז' (2) 133-140.
- Asplund, R.O. (1968) Monoterpenes: relationship between structure and inhibition of germination. *Phytochemistry* 7: 1995-1997.
- Bewley J.D. and Black, (1982) *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Vol. II. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994) Dormancy and the control of germination. In: *Seeds: physiology of development and germination* 2nd Ed., Chap. 5. Plenum Press, New York and London.
- Elakovich, S.D. (1988) Terpenoids as models for new agrochemicals. In: Cutler H. G. (ed.), *Biologically Active Natural Products -Potential use in Agriculture*. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 250-261.
- Friedman, J. (1987) Allelopathy in desert ecosystems. In: Waller, G.R. (ed.) *Allelochemicals: Role in Agriculture, Forestry and Ecology*. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 56-68.



- Friedman, J., Orshan, G. and Ziger-Cfir, Y. (1977) Suppression of annuals by *Artemisia herba-alba* in the Negev Desert of Israel. J. Ecol. 65: 413-426.
- Friedman, J. and Waller, G.R. (1983) Seeds as allelopathic agents. J. Chem. Ecol. 9: 1107-1117.
- Friedman, J. (1995) Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: Kigel, J. and Galili, G. (Eds.) Seed Development and Germination. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 629-644.
- Hilhost, H.W.M. (1998) The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. Seed Sci. Res. 8:77-90.
- Inderjit (1996) Plant phenolics in allelopathy. Bot. Rev. 62(2) 186-202.
- Leather G.R. and Einhellig F.A., (1986) Bioassays in the study of allelopathy. In: Putnam, A.R. and Tang, C.S. (eds), The Science of Allelopathy. Wiley - Interscience, New York, pp. 133-145.
- Lerner, R.H. and Evenari, M. (1961) The nature of the germination inhibitor present in leaves of *Eucalyptus rostrata*. Physiol. Plant. 14: 221-229.
- Mayer, A.M. and Poljakoff- Mayber, A. (1989) The Germination of Seeds. 4th Ed. Pergamon Press, Oxford.
- Molisch, H. (1937) Der Einfluss einer pflanze auf die andere - Allelopathie. G. Fischer. Jena.
- Muller, C.H., Muller, W.H. and Haines, B.L. (1964) Volatile growth inhibitors production by aromatic shrubs. Science 143: 471-473.
- Muller, W.H., (1986) Allelochemical mechanisms in the inhibition of herbs by chaparral shrubs. In: Putnam, A.R. and Tang, C.S. (eds), The Science of Allelopathy. Wiley - Interscience, New York, pp. 189-199.
- Putnam, A.R. and Tang, C.S., (1986) Allelopathy: state of the science. In: Putnam, A.R. and Tang, C.S. (eds), The Science of Allelopathy. Wiley - Interscience, New York, pp. 1-19.
- Reynolds, T. (1987) Comparative effect of alicyclic compounds and quinones on inhibition of lettuce fruit germination. Annals of bot. 60: 215-223.
- Rice, E.L. (1984) Allelopathy. 2nd ed. Academic Press Inc., Orlando.
- Sigmund, W. (1924) Über die Einwirkung von Stoffwechsel Endprodukten auf die Pflanzen. Biochem. Z. 146: 389-419.
- Waller, G.R. (1989) Allelochemical action of some natural products. In: Chou, C.H. and Waller G.R. (eds), Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 9, Taipei, ROC, 129-154.
- Werker, E., Putievsky, E. and Ravid, U. (1985) Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of Labiatae. Isr. J. Bot. 34: 35-45.
- Zhang, M., Negata, S., Miyazawa, K., Kikuchi, H. and Esahi, Y. (1997) A competitive enzyme-linked immunosorbent assay to quantify acetaldehyde-protein adduct that accumulate in dry seeds during aging. Plant Physiol. 113:397-402.