

לימוד ההשפעה ומנגנון הפעולה של ציטוקינינים בשילוב סוכר בדחיית
הזדקנות פרחים בענפי קטיף של גרוויליאה
(*Grevillea 'Spiderman'*)

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית

של האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר "מוסמך במדעי החקלאות"

מאת

זויה צ'רנוב

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

ד"ר שמעון מאיר

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף

מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

ופרופ' יוסף ריוב

המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות ע"ש רוברט ה. סמית,

הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית

האוניברסיטה העברית בירושלים

ברצוני להודות מכל הלב

**למנחים שהדריכו וכיוונו את עבודתי במקצועיות רבה, תמכו ועזרו לאורך כל הדרך.
כמו כן תודה רבה לד"ר סוגיה פילוסוף-הדס.**

לכל צוות הפרחים במחלקה לאחסון, ובמיוחד לשושי, אידה, בטינה, תמי, יעקב ודני.

**לכל הסטודנטים על העזרה, החברה והאוזן הקשבת במהלך עבודתי במעבדה: בקלה, ארנון,
אלון ובמיוחד לאילנה.**

**לד"ר יעקב וינוקור מהמחלקה לאחסון, על העזרה בהפעלת מכשיר ה-HPLC.
לכל חברי המחלקה לאחסון על העזרה והחברה הנעימה.**

**לפרופ' ארי שפר מהמכון למדעי הצמח ולחברי מעבדתו על העזרה הנדיבה באנליזה של
הסוכרים.**

לסבתי ז"ל

לאמי ואבי היקרים

ולכל המשפחה התומכת.

לחברי שהיו עמי

לאורך כל הדרך

ובייחוד לבני.

תוכן העניינים

רשימת קיצורים

i

תקציר

ii

1. מבוא וסקירת ספרות

1

1.1. הצגת נושא המחקר

1

2.1. גורמים המעורבים בבקרת ההזדקנות של פרחי קטיף

2

1.2.1. ציטוקינינים

2

2.2.1. אתילן

3

3.2.1. יחסי גומלין של ציטוקינינים ואתילן

4

4.2.1. נשימה

5

5.2.1. פחמימות

5

6.2.1. יחסי מקור-מבלע

8

7.2.1. אנזימים מפרקי סוכרוז

9

8.2.1. הקשר בין אינברטאזות, ציטוקינינים ופחמימות

12

3.1. השפעת פחמימות על פרחי קטיף

13

1.3.1. השפעת פחמימות על פתיחת פרחים ומשך חיי האגרטל

13

2.3.1. תנועה של סוכרים המיושמים באגרטל

14

3.3.1. השפעת פחמימות על פרחי גרוויליאה

15

4.1. מטרות העבודה

15

2. חומרים ושיטות

16

1.2. חומרים

16

2.2. החומר הצמחי והטיפול בו

17

3.2. קביעת מדדי איכות

18

א. ענפי פריחה

18

1.3.2. מדדים חזותיים בענף הפריחה

18

2.3.2. משך חיי האגרטל

18

3.3.2. שינוי המשקל ומאזן המים

19

4.3.2. קינטיקה של קליטת סוכרוז מהתמיסה ותנועתו באיברי הענף הקטוף

19

ב. פרחונים

19

5.3.2. תכולת מים יחסית (RWC) בעטיף ובעמוד העלי

19

6.3.2. מיצוי ותכולת פיגמנטים

19

7.3.2. תכולת פחמימות

20

20	א. סוכרים מסיסים
21	ב. עמילן
21	8.3.2 פעילות אינברטאזות
21	9.3.2 תכולת חלבון
22	10.3.2 קצב נשימה וייצור אתילן
22	4.2 ניתוח סטטיסטי
23	3. תוצאות
23	1.3 בחינת ההשפעה של אופן היישום של הציטוקינינים עם וללא סוכר בתמיסת האגרטל על איכות ענפי פריחה של גרוויליאה
28	2.3 בחינת ההשפעה של טיפולי טבילה בציטוקינינים, בשילוב עם סוכרוז בתמיסת האגרטל, על מדדי איכות של תפרחות של גרוויליאה במהלך חיי האגרטל
28	1.2.3 משך חיי האגרטל של ענפי הפריחה
28	2.2.3 פתיחת תפרחות
28	3.2.3 מידת הטורגידיות בתפרחות
28	4.2.3 החמת העטיפ של הפרחונים בתפרחת
31	5.2.3 נשירת פרחונים
31	6.2.3 משקל טרי של ענף הפריחה
35	7.2.3 מאזן המים בענף הפריחה
36	8.2.3 משקל טרי ויבש של הפרחונים
36	9.2.3 תכולת מים יחסית בפרחונים
43	10.2.3 רמת הפיגמנטים בפרחונים
46	11.2.3 ייצור אתילן וקצב הנשימה בפרחונים
47	3.3 בחינת ההשפעה של טיפולי טבילה של תפרחות גרוויליאה בציטוקינינים בשילוב עם הוספת סוכרוז באגרטל על הקליטה, ההובלה וההרכב של הפחמימות במהלך חיי האגרטל
47	1.3.3 קליטת סוכרוז והובלתו בענף הקטוף
47	2.3.3 תכולת עמילן וסוכרים מסיסים בפרחונים
51	3.3.3 פעילות אינברטאזות בפרחונים
53	4. דיון
53	1.4 השפעת ציטוקינינים ואופן יישומם על האיכות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן'
54	1.2.4 TDZ נמצא יעיל יותר מ- BA בשיפור האיכות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן'
55	2.2.4 השפעת הציטוקינינים בשיפור האיכות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' אינה נעשית באמצעות עיכוב ייצור אתילן או הקטנת קצב הנשימה
56	3.4 השפעת הטיפול המשולב של טבילה ב- BA או TDZ והוספת סוכרוז באגרטל על האיכות של פרחי

גרוויליאה

- 56 1.3.4. משך חיי האגרטל ופתיחת פרחונים
- 58 2.3.4. נשירת פרחונים ועלי העטיף
- 59 3.3.4. מאזן המים בענף הפריחה ובפרחונים
- 60 4.3.4. רמת הפיגמנטים (כלורופיל וקרוטנואידים) בפרחונים ובעלי העטיף
- 61 4.4. השפעת הטיפול המשולב של טבילה ב- BA או TDZ והוספת סוכרוז באגרטל על מאזן הפחמימות בפרחי

גרוויליאה

- 63 5.4. סיכום
- 64 5. רשימת ספרות
- 72 6. נספח - רשימת פרסומים
- I תקציר באנגלית

רשימת קיצורים

ACC = 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
 AVG = aminoethoxyvinylglycine
 AZ = abscission zone
 BA = benzyladenine (6-benzylaminopurine)
 BCA = bicinehoninic acid
 Bq = Becquerel
 BSA = bovine serum albumin
 BW = branch weigh
 CPPU = forchlorfenuron
 DW = dry weight
 EDTA = ethylene diamine tetra acetic acid
 FW = fresh weight
 HEPES = 4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid
 8- HQC = 8-hydroxyquinoline citrate
 HPLC= high pressure liquid chromatography
 1-MCP = 1-methylcyclopropene
 nm = nanometer
 OD = optical density
 ppm = parts per million
 RWC = relative water content
 TDZ = thidiazuron
 TW = turgid weight
 STS = silver thiosulfate

ח"מ = חלקי מליון

מ"ג = מיליגרם

מ"ל = מיליליטר

מ"צ = מעלות צלסיוס

סל"ד = סיבובים לדקה

פד"ח = פחמן דו חמצני

תקציר

הגרוויליאה הנה צמח ממשפחת הפרוטאיים שמקורו באוסטרליה, שם קיימים כ- 340 מינים שונים ומאות זנים תוצרי הכלאות שאירעו באופן טבעי או מכוון. צמחי הגרוויליאה גדלים כשיחים או עצים, שחלקם הם בעלי תפרחת מסיימת גדולה המורכבת מעשרות פרחונים במגוון צבעים, ונישאת על גבי ענפים ארוכים המותאמים לענפי קטיפ. כיום הזן המסחרי העיקרי הגדל בארץ הוא גרוויליאה 'ספיידרמן'. הבעיה העיקרית המגבילה את הגרוויליאות כפרחי ייצוא מהארץ או מאוסטרליה היא משך חיי האגרטל הקצרים של הפרחים. הבעיה מתבטאת בכמישה מהירה, נשירה, דהיית צבע ו/או השחרה של חלקי הפרח, אי פתיחת פרחים והזדקנות מהירה ולא אחידה של התפרחת.

מבין הטיפולים השונים שנבחנו לאחר הקטיפ במטרה לשפר את איכות פרחי הגרוויליאה נמצאה השפעה חיובית לסוכרים, שהתבטאה בהארכת משך חיי האגרטל, שמירה על טורגור גבוה ומניעת החמה ונשירה. לפני מספר שנים נמצא, שטבילת תפרחות גרוויליאה מזן 'סילויה' בציטוקינין (BA) Benzyladenine האריכה את משך חיי הפרחים ע"י דחיית הזדקנותם. השילוב של שני הטיפולים המיטביים האלה, ציטוקינין וסוכרים באגרטל, נבחן במעבדתנו בגרוויליאה 'ספיידרמן' ובזנים נוספים, ונמצא כיעיל באופן סינרגיסטי בעיכוב ההזדקנות וההחמה של הפרחים. כדי להבין כיצד פועל הטיפול המיטבי בדחיית ההזדקנות של ענפי גרוויליאה יש צורך לבחון את האינטראקציה בין שני מרכיבי הטיפול, סוכרים וציטוקינין.

מאזן הפחמימות בענף הקטוף תלוי במספר מרכיבים: קליטה, הובלה, מטבוליזם וניצול ע"י הנשימה. בעבודה זו התמקדנו באינברטאז, שהוא הידרולאז המפרק סוכרוז לגלוקוז ופרוקטוז, מאחר ופעילותו מהווה מדד לכושר המבלע של הפרח. האנזים קיים בצמח בשלוש צורות, אינברטאז חוץ-תאי (אפופלסטי), וקואולרי וציטוזולי, הנבדלות במיקום התאי וב- pH האופטימאלי הנחוץ לפעילות.

ההורמון ציטוקינין, המיוצר בקצות השורשים ונע בצינורות השיפה לאתרי הפעולה בצמח, הינו בעל יכולת להשפיע, בין השאר, על חלוקת תאים ועיכוב תהליכי הזדקנות. לכן שימוש בציטוקינינים סינתטיים בהטענה או בטבילה יכול להאריך את משך חיי האגרטל של פרחי קטיפ.

ישנם ממצאים המראים שהשילוב של ציטוקינינים וסוכרים יעיל בעיכוב ההזדקנות, כאשר הוספת סוכרים הגבירה ושימרה את הסינגל של הציטוקינינים. אחד המנגנונים המוצעים לפעילות של ציטוקינינים בדחיית הזדקנות הוא הגברת כוח המבלע לסוכרים ע"י הגברת הפעילות של אינברטאז ציטוזולי. מאחר ופרחים מהווים איברי מבלע לפחמימות שמקורן מהעלים, ניתן להניח שעיכוב ההזדקנות של פרחי גרוויליאה ופרחים נוספים באמצעות סוכרים וציטוקינינים פועל כנראה באמצעות ויסות של יחסי מקור-מבלע. היפותזת העבודה הייתה שציטוקינינים מגבירים את כוח המבלע של אברי הפרח באמצעות הגברת פעילות האינברטאז. כתוצאה מכך, מוגברת קליטת הסוכרים הניתנים באגרטל והובלתם בענף הקטוף, ו/או מוגברת הובלת הסוכרים מהעלים והגבעול לפרח. מטרת עבודה זו הייתה לפתח טיפול מיטבי לענפי קטיפ של גרוויליאה 'ספיידרמן', המבוסס על הטענה או טבילה בציטוקינינים ותוספת של סוכרים באגרטל, והבנת המנגנון הפיסיולוגי של הטיפול. המטרות הייחודיות של העבודה היו: (1) לימוד אופן היישום של ציטוקינינים בענפי קטיפ של גרוויליאה 'ספיידרמן' ובחינת מנגנון הפעולה שלהם בהארכת משך חיי האגרטל; (2) בחינת השפעה של טיפולים בציטוקינינים בשילוב מתן סוכרים בתמיסת האגרטל על מדדי איכות של הפרחים; (3) לימוד השפעת ציטוקינינים וסוכרוז על מאזן הפחמימות בתפרחות במהלך ההזדקנות, על קליטת סוכרוז מתמיסת

האגרטל והובלתו בענף הקטוף, ועל הפעילות של שלושת סוגי האינברטאזות בתפרחות במהלך ההזדקנות, כמדד לכושר המבלע שלהן.

הציטוקינינים BA או Thidiazuron (TDZ) יושמו באמצעות הטענה (במשך 4 שעות ב- 20 מ"צ ו- 20 שעות נוספות ב- 4 מ"צ), או בטבילה רגעית של התפרחת או הענף כולו. בתום הטיפול הענפים הוצבו בחדר תצפית מבוקר ב- 20 מ"צ, עם או ללא תוספת של סוכרוז בתמיסת האגרטל. השפעת הטיפולים נבחנה במהלך חיי האגרטל על מדדי איכות ומדדים פיסולוגיים בענפי הפריחה (משך חיי האגרטל, שינוי משקל, נשירת תפרחות, מאזן מים, קינטיקה של קליטת סוכרוז והובלתו בענף) ובפרחונים (תכולת מים יחסית, תכולת פיגמנטים, תכולת פחמימות, פעילות אינברטאזות, קצב ייצור אטילן וקצב נשימה).

ממצאי העבודה הראו כי ציטוקינינים הניתנים בטבילה של התפרחות שיפרו את האיכות ומשך חיי האגרטל של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן', כאשר TDZ היה יעיל יותר מ- BA. הציטוקינינים מנעו את נשירת הפרחונים והעטיף ואת החמת העטיף, ושמרו או העלו את תכולת הפיגמנטים (כלורופיל וקרוטנואידים) בפרחונים. נמצא, כי הציטוקינינים אינם פועלים דרך עיכוב ייצור האטילן או קצב הנשימה. גם הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל שמרה על איכות פרחים גבוהה במהלך חיי האגרטל, בדומה לממצאים בפרחי קטיף רבים. התוצאות הראו שהשילוב של שני הטיפולים היה מיטבי, כאשר ההשפעות של ציטוקינינים וסוכרוז על מדדי האיכות השונים במהלך חיי האגרטל היו בחלקן נפרדות ובחלקן משלימות: ציטוקינינים מנעו נשירה של פרחונים ועטיף, עיכבו הזדקנות איברים והחמת העטיף ושמרו על תכולת הפיגמנטים ע"י מניעת פירוקם ואף הגברת הסינתזה שלהם. טיפול בסוכרוז שיפר את מאזן המים ע"י הקטנת הטרנספירציה וע"י העלאת רמת הסוכרים המסיסים, דבר שכנראה הגביר את הפוטנציאל האוסמוטי ברקמה.

בנוסף, טיפולי הטבילה בציטוקינינים העלו באופן ברור את ההובלה של סוכרוז מסומן מתמיסת האגרטל אל התפרחות במשך שלושת הימים הראשונים בהם בוצע הניסוי, וכאשר הוסף סוכרוז לאגרטל הוגברה התנועה של הסוכרוז המסומן אל התפרחות. תוצאות אלו תמכו בהשערה של הגדלת כוח המבלע בתפרחות בהשפעת הטיפולים בציטוקינין, שכן השינויים ברדיואקטיביות בעלים הראו שסוכרוז מסומן נע מהעלים אל התפרחת. מבדיקת השפעת הטיפול המשולב של ציטוקינינים וסוכרוז על פעילות האינברטאזות בפרחונים במהלך חיי האגרטל נמצא, שפעילות האינברטאזות המסיסות (החומצית והבסיסית) ירדה בהשפעת הטיפולים ביום השלישי בהשוואה לביקורת, ורק האינברטאז החוץ-תאי (האפופלסטי) עלה ביום השלישי בהשפעת הטיפול בציטוקינינים. ביום השמיני נראתה השפעה מובהקת רק לטיפול בסוכרוז שהעלה את הפעילות של שלושת האינברטאזות. כנראה, שבפרחי גרוויליאה האינברטאז האחראי על כוח המבלע הוא אינברטאז אפופלסטי, והנשאים הספציפיים שמעבירים את הסוכרים לתאים הם של גלוקוז ו/או פרוקטוז ולא נשאים של סוכרוז.

תוצאות העבודה מאמתות את השערת המחקר לגבי מנגנון הפעולה של הטיפול המשולב של ציטוקינינים וסוכרוז, ומציעות שטיפול זה מעכב הזדקנות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן', כנראה באמצעות ויסות של יחסי מקור-מבלע בפרח, כאשר האינברטאז האחראי על כוח המבלע הוא אינברטאז אפופלסטי. לתוצאות העבודה ישנם כבר שימושים מעשיים. טיפול משולב של טבילת התפרחות בציטוקינינים ותוספת של סוכרים באגרטל מומלץ לחקלאים ולצרכנים, בהתאמה, ויישמו מאפשר כיום תובלה ימית מוצלחת של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' לאירופה.

1. מבוא וסקירת ספרות

1.1. הצגת נושא המחקר

החדרת מיני פרחים חדשים לגידול בארץ חשובה על מנת להרחיב את מגוון הפרחים המשוקים לייצוא, וגרוויליאה היא אחד הגידולים החדשים שהובאו לצורך זה. הגרוויליאה היא צמח שמקורו באוסטרליה, שם קיימים כ- 340 מינים שונים ומאות זנים תוצרי הכלאות שאירעו באופן מקרי ו/או מכוון (Joyce and Beal, 1999). הסוג גרוויליאה כולל שיחים ועצים. למיני/זני גרוויליאה רבים יש פוטנציאל גדול כענפי קטיף פרחים, בשל היותם בעלי תפרחת מסיימת גדולה (15-25 ס"מ), המופיעה במגוון צבעים רחב (אדום, כתום, ורוד, סגול, צהוב ולבן). בתפרחת עשרות פרחונים (תמונה 1) והיא נישאת על ענפים ארוכים. העטיף של פרחון בודד כולל 4 עלי כותרת מאוחים, כאשר האבקנים ניצבים מול עלי העטיף ומעורים בהם (תמונה 2). עם התפתחות הפרח, עמוד העלי פורץ קודם כלולאה מבין עלי העטיף (תמרי וחוב', 2004; מאיר וחוב', 2005; Joyce and Beal, 1999).

המגבלה של פיתוח הגרוויליאה כגידול יצוא חשוב ורחב היקף הן בארץ (תמרי וחוב', 2004; מאיר וחוב', 2005; Joyce, 2004) והן באוסטרליה (Joyce et al., 1996, Joyce and Beal, 1999; Setyadjit et al., 2004b), היא משך חיי האגרטל הקצרים של הפרחים. הדבר מתבטא בהזדקנות וכמישה מהירה, נשירה, דהיית צבע ו/או השחרה של איברי הפרחון, אי פתיחת פרחונים והזדקנות מהירה ולא אחידה של התפרחת. בנוסף, הענפים הפורחים כומשים גם בגלל חוסר איזון בין קליטת מים מתמיסת האגרטל לבין איבוד המים בטרנספירציה (Halevy and Mayak, 1981), וישנם דיווחים על בעיות במאזן המים של פרחי גרוויליאה קטופים (He et al., 2006a). תוצאות, המסכמות מספר ניסויים בזנים שונים ממקורות שונים ובעונות שונות מראות, שטווח חיי האגרטל הבסיסיים של פרחי גרוויליאה נע בין 3.3 ל- 8.7 ימים, כאשר ענפי הפריחה מוכנסים ישירות לאגרטל ללא טיפולים והדמיות משלוח (Joyce and Beal, 1999). יחד עם זאת, החוקרים מציינים שמשך חיי אגרטל של 5-7 ימים לפרח קטוף של גרוויליאה אינו מהווה מגבלה חמורה, שכן גם משך חיי האגרטל של פרחים מבוקשים רבים כמו איריס, צבעוני ואדמונית הנו דומה.

בארץ מגדלים כיום גרוויליאות בשטח של כ- 700 דונם, מתוכם יותר מ- 65% הם מהזן הצהוב 'ספיידרמן', שיש לו גם משך חיי אגרטל טובים של 8-13 ימים (תלוי בעונה ובתנאי הגידול) לאחר תובלה אווירית. עונת הגידול משפיעה על משך חיי האגרטל, כאשר משך חיי האגרטל של פרחי קיץ קצר משמעותית מזה של פרחי חורף. בנוסף, דווח שענפים שנקטפו מצמחים בריאים היו בעלי משך חיי אגרטל ארוך יותר, אך מקור תוצאות אלו היה בתצפיות בלבד (Joyce et al., 1993, 1996; He et al., 2006b). שלב הקטיף האופטימאלי בגרוויליאה הוא שלב בו מתקבלת באגרטל פתיחה מלאה של התפרחות והתפתחות צבע מרבית, כאשר הסימנים של כמישה, שינוי צבע (דהייה או השחרה) ונשירת פרחונים או איברי פרחונים מופיעים מאוחר ככל האפשר. חשוב לקטוף את הפרח בשלב בו עמודי העלי (שהם החלק הדקורטיבי בתפרחת) משתחררים בצורת לולאה אך עדיין לא נפרשים (תמונה 1). קטיף מוקדם יותר גורם לאי פתיחת התפרחות באגרטל ולהתייבשותן.

מבין הטיפולים שנבחנו לשיפור איכות פרחי הגרוויליאה נמצאה השפעה חיובית עקבית להוספה של סוכרוז לתמיסת האגרטל (מאיר וחוב', 2005; Joyce et al., 1996; Ligawa et al., 1997), ולטיפולים בציטוקינין בנזילאדינין (BA) (Setyadjit et al., 2004b). השילוב של שני הטיפולים, ציטוקינינים וסוכרוז, נבחן במעבדתנו

בגרוויליאה 'ספיידרמן' ובזנים נוספים, ונמצא כיעיל ביותר, עקב השפעה סינרגיסטית של החומרים בעיכוב ההזדקנות וההחממה של התפרחות (מאיר וחוב', 2005). כדי להבין כיצד פועל הטיפול המשולב הכולל ציטוקינינים וסוכר בעיכוב ההזדקנות, יש צורך לבחון את ההשפעות הייחודיות והמשולבות של חומרים אלה (Leon and Sheen, 2003). אחד המנגנונים המוצעים לפעילות של ציטוקינינים בדחיית הזדקנות הוא הגברת כוח המבלע לסוכר ע"י הגברת הפעילות של אינברטאז (Roitsch et al., 1995; Godt and Roitsch, 1997; Roitsch, 1999; Roitsch and Ehness, 2000). מאחר ופרחים מהווים איברי מבלע לפחמימות שמקורן מהעלים, ניתן להניח שעיכוב ההזדקנות של פרחי גרוויליאה באמצעות סוכר וציטוקינינים נעשה דרך הגברת כוח המבלע של התפרחות. בעבודה הנוכחית נעשה ניסיון ללמוד את ההשפעה ומנגנון הפעולה של ציטוקינינים בשילוב עם סוכר בדחיית הזדקנות התפרחות בענפי קטיף של גרוויליאה 'ספיידרמן'.

2.1. גורמים המעורבים בבקרת ההזדקנות של פרחי קטיף

1.2.1. ציטוקינינים

ציטוקינינים ידועים כמעכבי תהליכי הזדקנות בצמח (Eisinger, 1977; Van Staden et al., 1988), וכהורמונים המעורבים גם בתהליכים נוספים שונים, כגון חלוקת תאים, שבירת תרדמה בזרעים, שבירת שלטון קדקודי, התמיינות כרומו/כלורו פלסטיות ועידוד לבלוב ניצנים. הציטוקינינים מיוצרים בדרך כלל בקצות השורשים ונעים במערכת העצה לאתרי הפעולה (Van Staden and Davey, 1979; Aloni et al., 2005). הציטוקינינים יכולים להיות מיוצרים גם באיברים אחרים, כמו עלים וגבעולים (Davey and Van Staden, 1976). הציטוקינינים הטבעיים, טרנס/ציס - זיאטין, דהידרוזיאטין, איזופנטנילאדנין, מוגדרים היום כנגזרות של פורין ואדנין, ומאופיינים בשייר ארומטי בעמדה 6 בשרשרת הצדדית של חמישה פחמנים. קיימים מספר חומרים סינתטיים בעלי השפעות פיסולוגיות המאופיינות כהשפעות של ציטוקינינים, והיכולים להתקשר לקולטן (רצפטור) של זיאטין בתא. בין הנפוצים בשימוש בפרחים הם בנזילאדנין (BA) (Van Staden and Joughin, 1988; Paull and Chantrachit, 2001) ותידיאזורון (TDZ) (Ferrante et al., 2002; Sankhla et al., 2003, 2005a,b).

הציטוקינינים מבקרים תהליכים שונים ברקמות (Eisinger, 1977; Van Staden and Davey, 1979; Cook and Van Staden 1988). כיוון שהשורשים הם מקור הסינתזה העיקרי של ציטוקינינים (Van Staden and Davey, 1979), הרי כשהפרחים נקטפים וניתקים מאתר הביוסינתזה, רמת הציטוקינינים בהם יורדת באמצעות תהליכי פירוק וקשירה. מתן טיפול לאחר הקטיף בציטוקינינים סינתטיים בהטענה או בטבילה (של הענף כולו או של התפרחת בלבד) יכול להאריך את משך חיי האגרטל של ענפי קטיף. לכן, טיפול בציטוקינינים חיצוניים יכול לפצות על הירידה בהספקה של ההורמון האנדוגני. ההשפעה החיובית של מתן ציטוקינינים חיצוניים על משך חיי האגרטל של פרחי קטיף שונים הודגמה בעבודות רבות. ציטוקינינים עכבו הזדקנות של פרחי ורד קטופים (Lukaszewska et al., 1994b), והציטוקינינים האנדוגניים בעלי כותרת של ורדים היו בעלי השפעה חיובית על חיי הפרח (Lukaszewska et al. 1994a). בפרחי ציפורן נמצא כי ריכוזים גבוהים של BA דחו את ההזדקנות, בעוד שריכוזים נמוכים זירזו הזדקנות (Van Staden and Joughin, 1988; Bichara and Van Staden, 1993). מחקריו של Van Staden מראים שיעילות התגובה

לציטוקינינים תלויה בשיטת היישום, בריכוז ובסוג הציטוקינינים. פרחי ליזיאנתוס הגיבו בצורה חיובית להטענה ב-BA וסוכרוז (מאיר וחוב', 2003, 2004), וטיפול הטענה מקדים ב-BA האריך את משך חיי האגרטל שלהם עקב דחיית הזדקנות הפרחים (Huang and Chen, 2002). טיפולי הטענה ב-BA האריכו באופן משמעותי את משך חיי האגרטל של פרחי חרציות (Petridou et al., 2001) וסולידגו (Philosoph-Hadas et al., 1996). טיפול הטענה ב-TDZ בריכוז של $10 \mu\text{M}$ שניתן לפרחי אלסטרומריה מנע את הזדקנות העלים והצהבתם למשך יותר מ-60 יום (Ferrante et al., 2002). כנראה ש-TDZ נשאר יציב ברקמה, וממשיך להשפיע לאורך זמן על תכולת הכלורופיל. בנוסף, TDZ מנע גם נשירת פרחים והזדקנות עלווה בפרחי פלוקס (Sankhla et al., 2003).

למרות התוצאות החיוביות שהתקבלו בטיפול הטענה בציטוקינינים של פרחים מסוימים, נמצא במחקרים רבים, שטיפול טבילה של הענפים או הפרחים/תפרחות בציטוקינינים היו יעילים יותר בהארכת משך חיי האגרטל בהשוואה לטיפול הטענה (Bichara and Van Staden, 1993; Paull and Chantrachit, 2001). כך למשל, ריסוס או טבילה ב-BA דחו הזדקנות בפרחי אנטוריום קטופים (Paull and Chantrachit, 2001; Fukui et al., 2005). נמצא, שטבילה של תפרחות של גרוויליאה 'סילווייה' ב-BA האריכה את משך חיי הפרח ביומיים עקב דחיית ההזדקנות, שהתבטאה בכמישה, החמה ונשירה של חלקי הפרח השונים (Setyadjit et al., 2004a). יישום ציטוקינינים בהטענה או באופן מתמשך בתמיסת האגרטל לא שיפר את איכות הפרחים, אך מתן ציטוקינינים בטבילה לגרוויליאה 'סילווייה' בריכוזים עולים השפיע בצורה חיובית. ככל שהריכוז היה גבוה יותר הירידה במשקל הטרי הייתה איטית יותר, אם כי קליטת המים לא הושפעה. הריכוז האופטימאלי לטבילה של פרחי גרוויליאה ב-BA היה 10 mM , שכן בהשפעת טיפול זה גם אחרי שמונה ימי אגרטל לא הייתה נשירת פרחים, איבוד צבע וכמישה (Setyadjit et al., 2004a).

אופן הפעולה של ציטוקינינים בדחיית הזדקנות אינו ברור עדיין לגמרי, ונמצאו עדויות למספר מנגנונים. אחת האפשרויות שהוצעה היא שציטוקינינים מגבירים את כושר המבלע לסוכרים. במחקר עם צמחי טבק טרנסגניים שייצרו ציטוקינינים בעודף בניצנים החיקיים (בעזרת פרומוטור ספציפי והגן *ipt*), נמצאה פריצה של כל הניצנים החיקיים, כאשר הציטוקינינים הגבירו את כושר המבלע לפחמימות של הפקעים (Guivarc'h et al., 2002). כן הוצע, שציטוקינינים מעכבים הזדקנות באמצעות עיכוב ייצור אתילן ו/או הפחתת הרגישות להורמון (Mor et al., 1983; Cook et al., 1985; Van Staden et al., 1987; Cook and Van Staden, 1988; Chang et al., 2003). השערה נוספת הייתה שציטוקינינים משפרים בצורה ישירה את מאזן המים בענף הקטוף (מאיר וחוב', 2003; Bichara and Van Staden, 1993; Petridou et al., 2001), וע"י כך ההורמון משפיע על דחיית תהליכי ההזדקנות בפרחים ומעכב את פירוק הפיגמנטים ברקמות הפרח. נראה ש-BA פועל במספר רמות בדחיית ההזדקנות. לאחרונה הוצעה האפשרות שציטוקינינים מזרזים את הפעילות של אנזימים אנטי-חמצוניים, כמו קטלאז ואסקורבט פראוקסידאז, וע"י כך הם שומרים על שלמות הכלורופלסטים במהלך הזדקנות בחושך (Zavaleta-Mancera et al., 2007).

2.2.1. אתילן

בבקרת ההזדקנות משתתפים הורמונים צמחיים שונים, אשר מביניהם האתילן הוא בעל התפקיד החשוב ביותר. האתילן, שמוצר בכל הצמחים, מעורב במספר תהליכים פיסיולוגיים שונים, כגון שבירת תרדמה, הגברת

פריחה והבשלת פירות. סינתזת האתילן מוגברת בתגובה לעקות שונות, ביוטיות ואביוטיות, הכוללות טמפרטורות קיצוניות, עקת מים, פגיעה מכאנית, הדבקה בפתוגנים וחשיפה לכימיקלים או להורמונים אחרים (Yang and Hoffman, 1984; Abeles, 1987; Abeles et al., 1992).

רגישות לאתילן מוגדרת כתגובה פיזיולוגית של הרקמה לאתילן ממקור חיצוני או אנדוגני (Serek et al., 2006). פרחים המראים שיא בנשימה ובייצור אתילן במהלך ההזדקנות מוגדרים כקלימקטריים, והם רגישים גם לאתילן חיצוני. פרחים שאינם מראים תופעות אלו אינם קלימקטריים. לעומת זאת, ישנם פרחים, כגון איריס, הרצית וסייפן, בהם ההזדקנות מתרחשת ללא נוכחות של אתילן ואינה מבוקרת ע"י ההורמון (Woltering and Van Doorn, 1988; Serek et al., 2006). בפרחים המסווגים כקלימקטריים, כמו ציפורן, תחילת ההזדקנות מלווה בעלייה חדה בנשימה ובייצור אתילן, כשבהמשך ישנה ירידה לאחר השיא הקלימקטרי, במקביל להתקדמות ההזדקנות (Woltering and Van Doorn, 1988). בפרחים קלימקטריים, הזדקנות עלי הכותרת מתרחשת במקביל לייצור מוגבר של אתילן (Halevy and Mayak, 1979; Serek et al., 2006), וחשיפתם לאתילן חיצוני מזרזת את ההזדקנות המתבטאת בכמישה או נשירה (Borochoy and Woodson, 1989; Reid et al., 1989).

קיימת שונות רבה בין זני הגרוויליאה השונים מבחינת רגישותם לאתילן חיצוני (מאיר וחוב', 2005). הזן 'Pink Princess' רגיש מאוד לאתילן ולכן טיפולים במעכבי פעילות של אתילן כגון: (STS) silver thiosulfate, שיפרו (1-MCP) 1- methylcyclopropene או מעכבי ייצור אתילן כמו (AVG) aminoethoxyvinylglycine את איכות הפרחים. בזן 'Robin Gordon', השינויים בקצב ייצור האתילן והנשימה שיקפו את קצב ההזדקנות של הפרחים באגרטל, וטיפול ב-1-MCP עיכב את ההזדקנות. בזנים 'Calundra Gem', 'Honey Gem' ו-'Misty Pink', חשיפה לאתילן חיצוני (1 ח"מ למשך 24 שעות) לא השפיעה על משך חיי אגרטל.

ייצור אתילן בפרחונים בודדים ובתפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' עלה במהלך ההזדקנות, ונראה שיא ברמת האתילן עם הפתיחה וההתיישרות של עמודי העלי ביום 5 באגרטל, אך לא נמצא שיא דומה בנשימה (מאיר וחוב', 2005). הוספת סוכר לתמיסת האגרטל לא השפיעה על הנשימה של פרחי גרוויליאה 'סילווייה', והמסקנה הייתה שהפרח אינו קלימקטרי טבעי (Joyce et al., 1995), אולם הוא רגיש לאתילן חיצוני, שמגביר את הזדקנות הפרחים (Joyce and Beal, 1999). במחקר אחר שבוצע בפרחי גרוויליאה 'סילווייה' (Setyadjit et al., 2004b) נמצא, שייצור האתילן היה נמוך עד יום 3 באגרטל, ומיום 3 הייתה עליה ברמתו עד יום 7 אך ללא שיא בייצור. בימים הראשונים נצפתה ירידה בנשימה, שהתייצבה בהמשך. מועד הייצור המוגבר של האתילן היה מאוחר במהלך ההזדקנות, ולכן נראה שאתילן אינו הגורם המשרה את תהליכי ההזדקנות הטבעית בפרחים אלה (Setyadjit et al., 2004b).

3.2.1 יחסי גומלין של ציטוקינינים ואתילן

יחסי הגומלין בין ציטוקינינים ואתילן נחקרו בעבודות רבות. מאחר וציטוקינינים ידועים כמעכבי הזדקנות, נבחנה ההשערה האם פעילותם נובעת מהפחתת קצב ייצור האתילן ודחיית השיא הקלימקטרי בייצורו ו/או מהפחתת הרגישות לאתילן. הוכחות ישירות לעיכוב הזדקנות באמצעות עיכוב ייצור אתילן ע"י ציטוקינינים נמצאו בפרחי ציפורן. טיפול בקינטיין גרם לעלייה בחיי האגרטל של פרחי ציפורן, עקב הפחתה בייצור האתילן (Eisinger, 1977), וטיפול מקדים ב-BA שניתן לעלי כותרת של ציפורן עיכב את הפיכת 1-Aminocyclopropane-1-

(ACC) carboxylic acid חיצוני לאתילן ומנע את העלייה ב- ACC האנדוגני שקשור בהזדקנות (Mor et al., 1983; Cook et al., 1985; Cook and Van Staden, 1988). בנוסף, ישנם דיווחים על עליה ברמת האתילן או ברגישות לאתילן בפרחי ציפורן במקביל לירידה ברמת הציטוקינינים במהלך ההזדקנות (Van Staden et al., 1987), או על ירידה ברגישות לאתילן ודחיית הזדקנות בתגובה לעליה ברמת הציטוקינינים בצמחים טרנסגניים של פטוניה (Chang et al., 2003). גם בפרחי גרוויליאה 'סילווייה', טבילה ב- BA הפחיתה נשירה, שהוסברה בהפחתת הרגישות לאתילן אנדוגני ברקמת הניתוק של הפרחונים (Setyadjit et al., 2004a,b). נראה לכן, שירידה ברמות האנדוגניות של ציטוקינינים ברקמה יכולה להיות אות להזדקנות, שמתחילה עם העלייה בייצור האתילן (Van Staden et al., 1988), במקביל לעלייה ברגישות הפרחים לאתילן (Halevy and Mayak, 1981).

4.2.1. נשימה

קצב הנשימה של תוצרת טרייה הוא גורם בעל משמעות חשובה ביותר לגבי משך האחסון, חיי המדף או האגרטה של פרחים. קצב נשימה גבוה ברקמה שגילה הפיסולוגי צעיר דרוש כדי למלא דרישות אנרגטיות לחלוקת תאים, גדילה והתפתחות. הנשימה בפרחים רבים עולה עד מקסימום כשהפרח מתחיל להיפתח ויורדת כשהפרח מתבגר. העלייה הנוספת בנשימה (נשימה קלימקטרית), המלווה לאחר מכן ירידה מצביעה על השלב הסופי של ההזדקנות. ירידה זו בנשימה יכולה לנבוע ממחסור בסוכסטרט נשימתי (Halevy and Mayak, 1979).

קצב נשימה גבוה נמצא במתאם חיובי עם משך חיי אגרטה קצרים, כמו למשל בגרוויליאה 'סילווייה' המאופיינת בקצב נשימה גבוה ביותר וחיי אגרטה קצרים (Joyce et al., 1995; Joyce and Beal, 1999; Setyadjit et al., 2004a,b). במאמרים אלו מדווח על סדר גודל דומה של קצב נשימה בגרוויליאה 'סילווייה' לאחר הקטיף, אך מובאות תוצאות שונות לגבי שינויים בנשימה במהלך חיי האגרטה. במאמר אחד דווחה ירידה בנשימה, ובשני האחרים לא נמצא שינוי בנשימה במהלך חיי האגרטה. טיפולים בסוכרוז בפרחי גרוויליאה, שהאריכו את משך חיי האגרטה, לא השפיעו על קצב הנשימה של התפתחות, ולא נמצאו שינויים בקצב הנשימה של פרחים בודדים בשלבי התפתחות שונים (Joyce et al., 1995; Setyadjit et al., 2004a,b).

5.2.1. פחמימות

הפחמימות הנוצרות בתהליך הפוטוסינתזה בצמח מהוות את המקור להמשך התפתחות הצמח, בהיותן סוכסטרט לחומרים הבונים את התאים, לאנרגיה וכחומר מוצא ליצירת מטבוליטים משניים. התפקיד והמטבוליזם של הפחמימות בפרחי קטיף נחקרו בהרחבה, שכן פרח קטוף המנותק מצמח האם תלוי במלואו במאגרים שהצטברו בו במהלך גדילתו, ולכן לרמה ולהרכב הפחמימות שלו ישנה השפעה חשובה על המופע והאיכות של הפרח באגרטה (Halevy and Mayak, 1979, 1981). הזנת סוכר לפרחים קטופים מיושמת הן כטיפול הטענה לאחר הקטיף והן בתמיסת האגרטה באופן מתמשך. לסוכרים המסיסים תפקיד חשוב ביותר בפרחים קטופים, הן כמקור אנרגיה שנצרכת בנשימה לתהליכי הגדילה והפתיחה והן כמרכיב חשוב התורם לפוטנציאל האוסמוטי שלהם, המהווה כוח מניע לקליטת מים (Halevy and Mayak 1979, 1981; Kuiper et al., 1991).

סוגי הפחמימות: גלוקוז ופרוקטוז הינם חד-סוכרים (הקסוזות) המשמשים בתהליכי הנשימה והגדילה בצמח. סוכרוז הוא דיסכריד הבנוי מיחידות של α -גלוקוז ו- β -פרוקטוז הקשורות ביניהן בקשר גליקוזידי α -1-2. סוכרוז הינו הסוכר העיקרי הנע במערכות ההובלה בצמח, והידרוליזה שלו מביאה לשחרור אנרגיה רבה. סוכרוז

מסוננתו בציטוזול ונאגר בוואקואולה, ומובל בשיפה לאיברים שאינם פעילים פוטוסינתטית. אחרי הפריקה מהשיפה, הסוכרוז יכול לעבור הידרוליזה לחד-סוכרים באופולסט, בציטוזול או בוואקואולה (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998). עמילן הינו פולימר (רב-סוכר), המורכב מיחידות של גלוקוז. העמילן נוצר בכלורופלסטים ונאגר בעמילופלסטים (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998). ניתן לסווג את הפרחים מבחינת צבירת העמילן כחומר תשמורת לשתי קבוצות: פרחים, כמו ורדים, בהם העמילן מצטבר בפקעים המתפתחים, ופירוקו מהווה מקור חשוב ומיידי לסוכר מסיס בזמן פתיחת הפרח, ופרחים בהם אין הצטברות של עמילן והם זקוקים להזנה מתמשכת של סוכרים. המאזן, ההובלה וההשתנות של הרכב ורמת הפחמימות בזמן התפתחות פרחי ורדים, בהם העמילן מצטבר בפקעים ומשמש כחומר תשמורת המתפרק לגלוקוז בזמן פתיחת הפרחים, נחקרו בהרחבה הן בפרחים לא מנותקים המתפתחים ומזדקנים על הצמח והן במערכת של פרחים קטופים (Sacalis and Durkin, 1972; Sacalis and Chin, 1976; Ho and Nichols, 1977; Nichols and Ho, 1979; Goszczynska et al., 1990; Kuiper et al., 1991, 1995; Van Doorn et al., 1991; Kumar et al., 2007).

פחמימות כסובסטרט לנשימה: בנשימה חל פירוק של פחמימות ומשתחררת אנרגיה. כ- 3% מהפחמן בעלי הכותרת של הורדים מנוצל באופן יומי לנשימה בתנאי חדר תצפית (Nichols and Ho, 1979). מבדיקות קצב הנשימה של עלי כותרת וחישוב רמת הפחמימות הקיימות ומנוצלות בעלי הכותרת נמצא, שכמות הפחמימות של ורד מהזן 'מדלון' מספיקה בשלב הפקע כסובסטרט נשימתי ל- 48 שעות (Kuiper et al., 1995). נראה שבשלב הנבילה עלי הכותרת עדיין עשירים בהקסוזות, ופחמימות אלה נעות מעלי הכותרת המזדקנים (ההופכים למקור) לשחלות המתפתחות (ההופכות למבלע), כפי שנמצא למשל בציפורן (Cook and Van Staden, 1983; Featonby-Smith et al., 1987). פחמימות אלה יכולות לנוע גם לפרחים צעירים יותר באותו גבעול, כפי שהודגם בפרחי סייפן (Halevy and Mayak, 1981; Borochoy and Woodson, 1989; Waithaka et al., 2001). בנוסף נמצא, שבפרחי ציפורן מזדקנים קיימת רמה גבוהה של פחמימות (Nichols and Ho, 1975; Sacalis and Chin, 1976), ולכן ירידה ברמת הפחמימות אינה הגורם לתחילת תהליך ההזדקנות.

פחמימות כמקור לפוטנציאל אוסמוטי: הסוכר המסיס בפרחים מעלה את הפוטנציאל האוסמוטי שלהם ומשפר את יכולתם לקלוט מים ולשמור על טורגידיות. כך למשל בגבעולי צבעוני, נמצא שהידרוליזה של סוכרוז מעלה את הפוטנציאל האוסמוטי של התאים, ובכך משפרת את קליטת המים (Lambrechts and Kolloffel, 1993). בורדים ובציפורן, שהוזנו באגרטל בסוכרוז מסומן, הסימון נמצא בשלב הראשון בעלים ובגבעולים, ורק במהלך פתיחת הפרחים הייתה תנועה של הסוכר המסומן אל הפרחים דרך השיפה (Sacalis and Durkin, 1972; Sacalis and Chin, 1976). סוכרוז הוא הפחמימה העיקרית המובלת בשיפה במיני צמחים רבים (Frommer et al., 1996). הסוכרוז אינו עובר זרחון ישיר, מאחר שלא קיים בטבע האנזים סוכרוז קינאז. רק לאחר שהוא עובר פירוק אנזימטי ע"י אנזימים הממודרים ברקמות מקור או ברקמות מבלע, תוצרי הפירוק שלו זמינים למטבוליזם (Hawker et al., 1976). מאחר שקליטת סוכר בוואקואולה מוגבלת ע"י הפוטנציאל האוסמוטי או לחץ הטורגור, ישנה עדיפות לאגירת סוכרוז על פני אגירת חד-סוכרים, היות והאוסמולריות של סוכרוז הינה מחצית מזו של גלוקוז או פרוקטוז (Yelle et al., 1988). בתרבית תאים של כף אווז אדומה נמצא, שסוכרוז משוחרר מתאי הכברה ע"י נשאים ועובר הידרוליזה ע"י אינברטאז הממוקם בדופן. החד-סוכרים נקלטים בתאי המבלע בעזרת נשאים ספציפיים, שחלקם מזרזים בנוכחות ציטוקינינים (Ehness and Roitsch, 1997).

פחמימות כסינגל: בשנים האחרונות מתרבות העדויות המצביעות על כך שלפחמימות יש תפקיד בקרתי,

בנוסף לתפקידים שתוארו לעיל. נמצא, שהפחמימות משמשות כגורם בקרה של מטבוליזם, תגובות לעקות והתפתחות הצמח (Rolland et al., 2002, 2006; Rolland and Sheen, 2005) הבקרה באמצעות פחמימות מתווכת ע"י אותות שונים, שמיוצרים באזורים שונים בצמח, והתלויים בתנאי סביבה ובשלב ההתפתחותי של האיבר (Rolland et al., 2006).

כאשר רמת הפחמימות נמוכה, ישנה עליה בפעילות של רקמת מקור, כמו עלים מטמיעים, או בשינוע ובייצוא של מוטמעים. הדרישות לפוטוסינתזה ולמבלעים צריכות להיות מבוקרות, וחלק מהבקרה היא ע"י מערכת של מעבר אותות של פחמימות. נמצא שמולקולות הסינגל יכולות להיות מיוצרות ולהיקלט בתאי מקור או מבלע (Rolland and Sheen, 2005; Rolland et al., 2006). בנוסף, אנאלוגים של גלוקוז (שאינם בהכרח מטבוליים), שאינם עוברים זרחון, יכולים לחקות את השפעת הגלוקוז בבקרת גנים מסוימים (Godt et al., 1995; Roitsch et al., 1995). כדי ללמוד את מערכת מעבר האותות של הפחמימות השתמשו בנגזרות של סוכרוז שאינן מסונתזות בצמחים עילאיים, ולכן הן יציבות לפעילות של אנזימי הצמח. כך נמצאו מסלולים שונים של מעבר האותות בעגבנייה: מסלול נפרד לפחמימות שעוברות מטבוליזם ומסלולים אחרים לפחמימות לא מטבוליות. הימצאות המערכת המורכבת הזו מרמזת על החשיבות של העברת האותות שמתווכת ע"י פחמימות בצמחים עילאיים (Sinha et al., 2002).

בנוסף להשפעה הישירה של הפחמימות בבקרת תהליכים פיסולוגיים, הצטברו עדויות להשפעות גומלין בין הפחמימות לבין הורמונים צמחיים (Eisinger, 1977; Leon and Sheen, 2003; Lara et al., 2004). כבר לפני שנים דווח כי פחמימות וציטוקינינים מעורבים בהארכת משך חיי האגרטל של פרחי ציפורן, כאשר סוכרוז מגביר את השפעת הציטוקינינים ומעכב הזדקנות של פרחי ציפורן קטופים (Mayak and Dilley, 1976). ניתוחים גנטיים ופנוטיפיים במוטנטים לאותות של פחמימות בארבידובסיס הראו, שקיים מגוון רחב של יחסי גומלין בין מערכת האותות של פחמימות לבין ההורמונים (Leon and Sheen, 2003). ציטוקינינים למשל, משרים ביטוי של הגן המקודד לאינברטאז הדופן, הנחוץ כדי לעכב הזדקנות עלים (Lara et al., 2004). בנוסף, יתכן שסוכרוז מעודד את ההשפעה של ג'יברלינים המשרים פיגמנטציה בעלי כותרת של פטוניה (Moalem-Beno et al., 1997). עידוד קליטת סוכרוז ע"י ג'יברלינים דווח במספר פרחים, כמו ורד (Kuiper et al., 1991), צבעוני (Lukaszewska et al., 1995) ופטוניה (Moalem-Beno et al., 1997). בורדים, נמצא שג'יברלינים מגבירים את קצב קליטת הסוכרים ומעודדים קליטה אקטיבית של סוכרוז בעלי הכותרת (Kuiper et al., 1991). יעילות הטיפול הייתה רבה יותר בנוכחות גלוקוז או סוכרוז (השפעת גומלין), למרות שבורדים ג'יברלינים אינם תמיד יעילים (Goszczyńska et al., 1990). השפעת טיפול ב-GA₃ בציפורן הייתה דומה לזו של ציטוקינינים, והם הקטינו ודחו את השיא הקלימקטרי של אתילן (Bossè and Van Staden, 1989). ישנם גם דיווחים על אינטראקציה של פחמימות עם אתילן. נמצא, שפחמימות הפחיתו את הרגישות של פרחים קלימקטריים לאתילן וע"י כך דחו את הזדקנותם (Van Doorn, 2001). סוכרוז האריך את משך חיי האגרטל של ציפורן, בין השאר, ע"י הפחתת השפעת האתילן, שהושגה כנראה ע"י הפחתת רגישות הרקמה לאתילן ו/או ע"י עיכוב ייצור האתילן (Mayak and Dilley, 1976; Halevy and Mayak, 1979). כמו כן, גנים שביטויים עולה בהזדקנות בהשפעת אתילן עוכבו לאחר מתן טיפול בפחמימות, ממצא הרומז כי פחמימות מסיסות פועלות כמעכבים של מעבר הסינגל של אתילן (Hoerberichts et al., 2007).

6.2.1. יחסי מקור-מבלע

רקמות מקור, כמו עלים בוגרים, פעילות ומייצרות יותר פחמימות ממה שהן צורכות. לכן רקמות אלה מייצאות פחמימות לאברים פחות פעילים מבחינה פוטוסינתטית, כגון עלים צעירים, או לאברים שאינם פעילים כלל מבחינה פוטוסינתטית, כמו שורשים ופירות. יחסי מקור-מבלע אינם קבועים ומשתנים כל הזמן במהלך ההתפתחות של הצמח. למשל, במהלך הגידול הוגטטיבי מרבית הפחמימות מיוצאות לשורשים ולעלים הצעירים, בעוד שלאחר הפריחה הפחמימות מנותבות בעיקר לפירות המתפתחים או לאברי אגירה (Roitsch et al., 2000).

חוזק המבלע הוא מושג המציין את כושרו של המבלע לגייס מוטמעים. בפרחים ובפירות, מתרחשת פעילות התפתחותית מוגברת, ולכן הם משמשים מבלע חזק. עקת שונות, כמו טמפרטורות קיצוניות ומחסור במים, משפיעות על איברי הפרח והפרי ומחלישות את כושר המבלע שלהם (Halevy, 1987). הוצע שבקרת הפירוק של סוכרוז, שהוא הסוכר המובל, מהווה סמן ביוכימי לחוזק המבלע (Ho, 1988). בלא תלות אם הסוכרוז המובל נאגר כסוכרוז, הקסוזות או עמילן, פירוק הסוכרוז הוצע כשלב הכרחי במסלול הצריכה או האגירה של המוטמעים המיובאים למבלע. לפיכך, אנזימים המפרקים סוכרוז יקבעו את יכולת המבלע לייבא מוטמעים, ובכך את חוזקו (Ho, 1988). ריכוז הסוכר הסופי במבלע תלוי בחוזק המבלע, בהימצאות אברי מבלע מתחרים ובמרחק של המבלע מרקמת המקור. במחקר שבוצע עם פרחי חרציות נבדק כיצד יחסי מקור-מבלע השפיעו על גודל הפרח ומהי ההשפעה שיש למבלע חלש על חוזק המקור (Carvalho et al., 2006). נמצא, שגודל הפרח עלה כאשר היחס מקור/מבלע היה קטן, כלומר כשהיו פחות פרחים על הענף או כשפעילות המקור עלתה. גם למועד ההסרה של ניצני הפריחה הצדדיים הייתה השפעה על גודל הפרח. פרח שנמצא בקדקוד הענף היה גדול יותר ובעל מסה גדולה יותר מאשר פרח שהתפתח על ענף צדדי. הפרח שהתהווה ראשון התחרה עם הפקעים שהתפתחו מאוחר יותר על המוטמעים והיה גדול יותר. היחס בין פוטנציאל הגדילה לבין הגודל האמיתי של הפרח תלוי בזן וביכולת התחרותית שלו לצבור מוטמעים, והוא נמצא תחת בקרה גנטית (Carvalho et al., 2006). חלוקת הפחמימות בין המקור למבלע נחוצה להתפתחות וגדילה של הצמח. פריקה של סוכרוז מהשיפה מגבירה את הגרדיאנט שלו במערכת ההובלה, וע"י כך ישנה הגברת זרימה אל המבלעים. אנזימים המעורבים בפירוק סוכרוז הם בעלי חשיבות גם לפריקה מהשיפה וגם ליבוא סוכרוז לאיברי המבלע (Ehness and Roitsch, 1997).

כמות הסוכרים המגיעה אל הפרח נקבעת ע"י פעילויות משולבות ברקמות המקור והמבלע, והיא מבטאת את המכלול של רמת הפעילות בתגובה לשינויים סביבתיים ופנימיים (Ho and Nichols, 1977). סוכרים שעוברים מטבוליזם מדכאים ביטוי של גנים פוטוסינתטיים ומעודדים אנזימים הספציפיים למבלע, כמו אינברטאז (Roitsch, 1999). בנוסף, מפל לחץ הטורגור, שמבוסס על ריכוז הסוכרוז, הוא הכוח המניע את המוטמעים מעלי המקור לאברי המבלע, ולכן פירוק סוכרוז ע"י פעילות אנזימטית כלשהיא תורם לכוח המבלע (Strum and Tang, 1999). העלאת קצב הפוטוסינתזה אינה תורמת בהכרח להובלה של כמות מוטמעים גדולה יותר למבלעים, מאחר שבמקרים רבים חלק גדול מהמוטמעים הופך לעמילן כבר במקור ולא מיוצא למבלעים (Ho and Nichols, 1977). כוח המבלע בעלי כותרת של פרחים קשור למטבוליזם של סוכרים, המווסת ע"י אנזימים והורמוני צמיחה (Ho and Nichols, 1977). כאשר הוסרו עלי הכותרת בפרחים, ריכוז הפחמימות בעלים הסמוכים עלה (Nichols and Ho, 1979). ממצא זה תומך בתלות הקיימת בין עלי הכותרת לעלים.

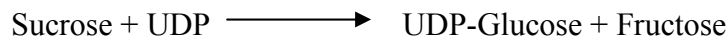
פריקה של הסוכרוז מהשיפה: האתר בו הסוכרוז עובר פירוק ע"י אינברטאז שנוי במחלוקת, אך כנראה שהוא משתנה מצמח לצמח. בצמחים מסוימים, הסוכרוז עובר הידרוליזה באפופלסט, והחד-סוכרים נקלטים בתאים באמצעות נשאים ספציפיים. בצמחים אחרים, קליטת הסוכרוז ע"י התאים נעשית כנראה ע"י נשאים של סוכרוז והוא מתפרק בתוכם. יתכן קיום של שתי האפשרויות בו זמנית כמפורט בסכמה 1 (Leigh et al., 1979; Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998). אחד המודלים (Eschrich and Eschrich, 1992) מציע שסוכרוז עובר מהשיפה לאפופלסט, שם הוא עובר הידרוליזה, ובכך ישנה שמירה על מפל של סוכרוז בין השיפה לאפופלסט. פעילות אינברטאז הדופן מהווה את הכוח המניע של הפריקה מהשיפה, כאשר ישנה יותר פריקה פאסיבית מהשיפה. לפי מודל זה, רמות גבוהות של סוכרוז בצינורות ההובלה אינן מספיקות לגרום לפעילות מבלע. ההקסוזות אינן יכולות להיות מוכנסות חזרה לשיפה, ולכן הן מצטברות בפרנכימה. אם הסוכרוז לא עובר הידרוליזה הוא יכול לחזור לצינורות ההובלה.

בניגוד למודל זה, נטען שבגזר הסוכרוז נע מהאפופלסט לתאי פרנכימה ללא פירוק, שם הוא מנוצל לצורכי גדילה או נאגר כעמילן בחללית (Sturm et al., 1995). במודל זה אינברטאז חוץ-תאי כלל לא פעיל בפריקה מהשיפה. המיקום האפופלסטי של אינברטאז הדופן במבלעים, כגון עלים ושורשים (היכן שמתבצעת הפריקה מהשיפה), תואם את המודל של Eschrich and Eschrich (1992).

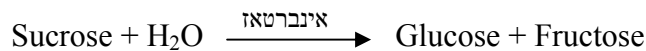
7.2.1. אנזימים מפרקי סוכרוז

קיימים מספר אנזימים המפרקים סוכרוז:

סוכרוז סינתאז (sucrose synthase) - הוא גליקוזיל טראנספראז שהופך סוכרוז ל- UDP-Glucose ופרוקטוז בנוכחות UDP:



אינברטאז (invertase) - הוא הידרולאז שמפרק סוכרוז לגלוקוז ופרוקטוז:



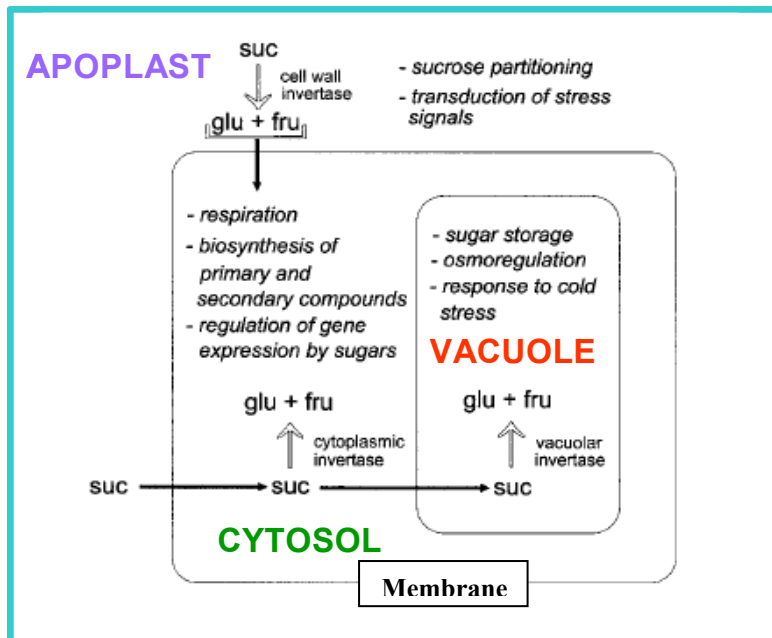
האינברטאז הוא אנזים דומיננטי ברקמות מתפתחות, בהן ישנה חלוקת תאים נמרצת, בעוד שסוכרוז סינתאז הינו דומיננטי באיברים האוגרים פחמימות כחומרי תשמורת לאגירה (שורשים ופירות) (Ehness and Roitsch, 1997; Strum and Tang, 1999). פירוק הסוכרים מתבצע ע"י שני האנזימים, אך ברמות שונות במהלך ההתפתחות (Roitsch et al., 1995; Ranwala and Miller, 1997, 1998). ההידרוליזה של סוכרוז ע"י אינברטאז היא בלתי הפיכה, בעוד שהפירוק ע"י סוכרוז סינתאז הוא הפיך (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998). בפרחי ציפורן האנזים הפעיל ביותר במטבוליזם של סוכרוז הוא אינברטאז חומצי, אך כנראה גם אינברטאז ציטוזולי וגם סוכרוז סינתאז מפרקים סוכרוז בעלי הכותרת במידה קטנה יותר. לעומת זאת, בפרח של אפונת המדבר, בו הפעילות של סוכרוז סינתאז נמוכה, אינברטאז חומצי פעיל ברמה גבוהה מאוד (Hawker et al., 1976). האינברטאז נפוץ מאוד בצמחים. הידע המפורט ביותר על אנזים זה מקורו במחקרים שנערכו בשמרים ובפטריות (Ho, 1988). קיימים שלושה סוגי אינברטאז, שלכל אחד מהם ישנן תכונות ביוכימיות שונות, והם

ממוקמים באזורים שונים בתא כמתואר בסכמה 1. שלושת סוגי האינברטאז מוגדרים עפ"י מיקומם בתא וה- pH האופטימאלי לפעילותם (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998; Sergeeva and Vreugdenhil, 2002; Strum and Tang, 1999):

(1) אינברטאז חוץ-תאי (אפופלסטי)/הדופן (extracellular/cell wall invertase) קשור לדופן התא (סכמה 1) ומספק הקסוזות למטבוליזם ואנרגיה לגדילת התא. האנזים מפרק סוכרוז בצורה היעילה ביותר ב- pH שבין 4.5 ל- 5.

(2) אינברטאז ציטוזולי (cytosolic invertase) (אינברטאז בסיסי) – מצוי בציטוזול (סכמה 1), והפעילות האופטימאלית שלו היא ב- pH ניטרלי או מעט בסיסי.

(3) אינברטאז ואקואולרי (vacuolar invertase) (אינברטאז חומצי) – הוא גליקופרוטאין המצוי בוקואולה (סכמה 1), וה- pH המיטבי לפעילותו הוא בין 3.5 ל- 5.6 (Ho, 1988; Sturm, 1999).



סכמה 1: מיקום שלושת סוגי האינברטאזות ותפקידם של הסוכרים בצמח. סוכרוז המסונתז בציטוזול נאגר בחללית. פירוק הסוכרוז נעשה בעזרת אינברטאז וואקואולרי. סוכרוז, לאחר פריקה מהשיפה, יכול לעבור פירוק באפופלסט, בציטוזול או בחללית. בסכימה מתוארים חלק מתפקידי הסוכרים: באפופלסט הסוכרים יכולים להעביר אותות של מצבי עקה לאזורים רחוקים בצמח; בציטוזול, הסוכרים מעורבים בנשימה, בבניית תרכובות ובבקרה של ביטוי גנים; בחללית, פירוק הסוכרים משנה את הלהץ האוסמוטי, וזה יכול לרמז על מעורבות הסוכרים בהתארכות תאים. כמו כן, סוכרים אחרים על התגובה לעקת קור (Sturm, 1999).

אינברטאז הדופן (אפופלסטי) פעיל בשינוע סוכרים גם באזורים מתארכים (Tymowska-Lalanne and

Kreis, 1998). אינברטאז הדופן מושרה ע"י סוכרים, וגם סוכר שהוא לא מטבולי הגביר את הביטוי והפעילות שלו. אינברטאז הדופן קשור בתנועת הסוכרים בין רקמות מקור למבלע ויצירת מבלעים מטבוליים. במערכות עם פריקה אפופלסטית מהשיפה, פירוק סוכרוז ע"י אינברטאז הוא השלב הראשון של המטבוליזם באיברי המבלע (Roitsch et al., 1995, 2000; Strum, 1999). האנזים חשוב כי ישנה לו יכולת לאפשר אספקה של הקסוזות לאבקנים, והוא קובע את התפתחותם ואת פוריות הצמח (Godt and Roitsch, 1997). בגלל הפעילות של האינברטאז האפופלסטי

האבקנים קולטים חד-סוכרים ולא סוכרוז (Ylstra et al., 1998). נמצא, שהשתקת הגן לאינברטאז הדופן באמצעות אנטיסנס גרמה לפגיעה חמורה בגדילה ובהתפתחות של צמחי טבק (Lara et al., 2004). דווח שבנבטי לוביה, לאינברטאז הדופן יש תפקיד חשוב בהובלה ובפריקה של פחמימות (Weber et al., 1995). גם בנבטים של פטוניה ישנה הפיכה מהירה של סוכרוז לגלוקוז ופרוקטוז, כנראה כתוצאה מפעילות מוגברת של אינברטאז הדופן.

האינברטאז הוואקואולרי הממוקם בחללית (סכמה 1) הוא אינברטאז מסיס (Ranwala et al., 1998),

ונחשב לאינברטאז הפעיל ביותר ברקמות צמחיות רבות (Hawker et al., 1976; Woodson and Wang, 1987). נמצא, שבתאים עם דרישה גבוהה להקסוז, האינברטאז הוואקואולרי מנע אגירה של סוכרוז, וכל הסוכרוז שנכנס לחללית התפרק להקסוזות (Leigh et al., 1979). בפרחי ציפורן נמצא מתאם בין רמת הפחמימות לבין התרחבות עלי הכותרת, שנבע מפירוק מהיר של סוכרוז באמצעות אינברטאז וואקואולרי (Strum and Tang, 1999). כמו כן נמצא, שאינברטאז וואקואולרי בניצני פריחה של שושן יכול לפרק גם דו-סוכרים אחרים, כמו ראפינוז וסטאכיוז (Miller and Ranwala, 1994).

האינברטאז הציטוזולי הוא אינברטאז בסיסי, האחראי כנראה על המטבוליזם של סוכרוז בתאים שבהם

ישנה דרישה קטנה יחסית לסוכרים (Leigh et al., 1979). אינברטאז ציטוזולי פעיל באברים בוגרים, בהם ישנה פעילות נמוכה של אינברטאזות חומציות (Miller and Ranwala, 1994). בפרחי שושן צהור למשל, לא נמצא אינברטאז ציטוזולי, אלא פעילות גבוהה מאוד של אינברטאז וואקואולרי (Ranwala and Miller, 1998; Ranwala et al., 1998). פעילות האינברטאז בכל חלקי הפרח עלתה בצורה הדרגתית במהלך התפתחות פקעי הפריחה. הפעילות בדופן של צינורות ההובלה ירדה עד התבגרות הפרח ועלתה בשלב הפרח הפתוח. באבקנים, פעילות האינברטאז הייתה הגבוהה ביותר, כנראה עקב הייחוד של רקמה זו והתהליך המטבולי הקשור בייצור האבקה. באזורים אחרים העוברים התארכות וגדילה, כמו עלי כותרת וסיבים, נמצאה רמה גבוהה יותר של פחמימות ושל פעילות אינברטאז מאשר באברים שאינם מתארכים, כמו השחלה (Ranwala and Miller, 1998; Ranwala et al., 1998).

בצבעוני, נמצאה עליה באינברטאז הציטוזולי, שהייתה קשורה לשינויים בתכולת הפחמימות (Lambrechts and Kolloffel, 1993). העלייה בפעילות האינברטאז חלה כאשר הייתה התארכות מהירה של הגבעול. כנראה, שבנוסף לתהליך ההתארכות, אינברטאז מעורב גם בצבירת גלוקוז. צבירה זו יכולה להיות תוצאה של פירוק סוכרוז, מאחר ורמות הגלוקוז והסוכרוז נמצאות ביחס הפוך, ופעילות האינברטאז המסיס השתנתה בהתאם לשינויים ברמת הפחמימות. יש לציין שגם פעילות האינברטאז וגם התארכות התאים מזורזות ע"י אוקסין (Lambrechts and Kolloffel, 1993). יש חוקרים הסבורים שאינברטאז ציטוזולי שומר על מפל של סוכרוז בין הסיבים לבין תאי המבלע, וע"י כך מעודד פריקה של סוכרוז מהשיפה (Morris and Arthur, 1984).

כבר לפני שנים נמצא בפרחי לפופית מתאם חיובי בין רמת הפחמימות לבין פעילות אינברטאז, כאשר פעילות האנזים עלתה במהלך התפתחות עלי הכותרת וירדה בצורה תלולה עם כמישתם (Winkenbach and Matile, 1970). גם במחקר נוסף (Halaba and Rudnicki, 1983) נמצא שפעילות האינברטאז בעלי כותרת של ציפורן ירדה במהירות כאשר הפרחים התחילו להזדקן ולכמוש. הזדקנות עלי הכותרת הייתה במתאם שלילי לפעילות של אינברטאז וגורמים המזרזים הזדקנות, כגון טיפול ב-ABA, גרמו לירידה מהירה יותר של פעילות האינברטאז ולכמישה מוקדמת של פרחים (Halaba and Rudnicki, 1983). במהלך השנים הראו שקיים ויסות של פעילות

האינברטאז ע"י פחמימות, אם כי התוצאות היו סותרות. חלק מהחוקרים טוענים שפעילות האינברטאז מעוכבת ע"י גלוקוז ופרוקטוז, בעוד שאחרים הראו עידוד של אינברטאז ע"י גלוקוז. כך למשל הראו, שגלוקוז זרז את אינברטאז הדופן, אך לא השפיע על האינברטאזות האחרות (Roitsch et al., 1995). התוצאות הנ"ל משקפות כנראה מצב, שבו האינברטאזות השונות, הממוקמות באזורים שונים בצמח, מעוכבות או מזורזות ע"י פחמימות.

8.2.1. הקשר בין אינברטאזות, ציטוקינינים ופחמימות

מחקרים שונים הראו שאינברטאז הדופן מזורז ע"י ציטוקינינים (Roitsch et al., 1995, 2000; Ehness and Roitsch, 1997; Godt and Roitsch, 1997). נמצא ש-TDZ מגביר את הפעילות של אינברטאז הדופן, במידה גדולה ומובהקת יותר מזו של BA, דבר שהתבטא בעיכוב ההזדקנות של עלים וגבעולים בצמחי ארבידופסיס וטבק (Roitsch et al., 2000; Roitsch and Ehness, 2000). לעומת זאת, מתן ציטוקינינים לא שינה את הרמה של האינברטאז הוקואולרי בצמח (Godt and Roitsch, 1997). עליה בפעילות אינברטאז הדופן בתגובה למתן ציטוקינינים נצפתה במספר צמחים (Ehness and Roitsch, 1997), אולם לא ברור אם זו השפעה ישירה של ההורמון על הגנים המקודדים לאינברטאז, או שההורמון פועל בעקיפין ע"י עידוד חלוקת תאים וע"י כך יוצר מבלעים חדשים לסוכרוז (Strum, 1999). נמצא, שמתן ציטוקינינים דחה הזדקנות של עלי הכותרת בפרחי גרוויליאה 'סילויה' (Setyadjit et al., 2004a). אחד המנגנונים שהוצע לפעילות של ציטוקינינים בדחיית ההזדקנות היה הגברת כוח המבלע לפחמימות ע"י הגברת הפעילות של אינברטאז הדופן (Roitsch and Ehness, 2000; Lara et al., 2004). במחקר אחר נמצא, שציטוקינינים עיכבו הזדקנות עלים רק כאשר אינברטאז הדופן היה פעיל, והגברת הפעילות של אינברטאז הדופן יכלה להחליף את השפעת הציטוקינינים בדחיית ההזדקנות (Roitsch et al., 2000). השראת הפעילות של אינברטאז ונשאי סוכרוז ע"י ציטוקינינים יכולה להצביע על הקשר בין תגובות לציטוקינינים ומטבוליזם הפחמימות (Ehness and Roitsch, 1997).

ניתן באמצעות ציטוקינינים להגביר רמות של אינברטאז. כנראה קיים מנגנון להשראה של מטבוליזם הפחמימות במבלע ע"י הפעלת נשאים ועיכוב הייצוא של פחמימות באזור שטופל בהורמון (Roitsch and Ehness, 2000; Roitsch et al., 2000). כך למשל, בצמחים טרנסגניים של טבק, שבהם בוטא הגן *ipt* תחת פרומוטר שמתבטא בהזדקנות (*SAG12*), עוכבה הזדקנות העלים (Gan and Amasino, 1995; Lara et al., 2004). דחיית ההזדקנות ע"י ציטוקינינים הייתה במתאם חיובי עם עליה בפעילות של אינברטאז, תוצאה שתמכה בהנחה שעידוד הפעילות של מבלעים גורמת למשיכת מוטמעים אל העלים ומונעת תנועה שלהם מהעלים המזדקנים לאזורים אחרים בצמח. נמצא, כי אינברטאז הדופן מתבטא כאשר יש צורך בהספקה רבה של פחמימות, והוא מבוקר חיובית ע"י מספר גורמים שמשפיעים על יחסי מקור-מבלע (Roitsch et al., 2000). אינדוקציה של האינברטאז ע"י ציטוקינינים עודדה נשאי סוכרים, שגרמו לעליה של פי שניים בקליטת הסוכרוז (Ehness and Roitsch, 1997). ממצא זה תומך בהשערה שקיים קשר בין גנים המקודדים להורמון והמטבוליזם הראשוני של הפחמימות (Roitsch et al., 2003). מתן טיפול בתרכובות בעלות פעילות ציטוקינינית העלתה את רמת mRNA של אינברטאז הדופן. ריכוז נמוך ומשך הדגרה קצר בתרכובות אלה הספיק כדי לעלות את רמת האינברטאז. ההשראה הרבה ביותר התקבלה לאחר טיפול בזיאטין או ב-TDZ, כאשר הספיק ריכוז מאוד נמוך של TDZ להשראה מקסימאלית של האנזים. ממצאי המחקר הראו, ששינוי בביטוי של הגנים המקודדים לאינברטאז הדופן ונשאי גלוקוז נחוץ כדי לעודד

גדילה וחלוקת תאים בהשפעת ציטוקינים. עליה באנזימים הדרושים לפריקת הסוכרוז מהשיפה מגבירה את תנועת המוטמעים, המספקים את הדרישה המוגברת לפחמימות בתאים הגדלים (Ehness and Roitsch, 1997). נמצאו חלבונים שזוהו כמעכבי פעילות של אינברטאז, וממצא זה מבטא מנגנון נוסף של הצמח בבקרת הפעילות של האינברטאז. הצורך במנגנון מיוחד לעיכוב הפעילות של האינברטאז נובע מכך, שהאנזים יציב מאוד ונדרש זמן בין הפסקת הביטוי של הגן לירידה בפעילות האנזימטית. במחקרים ישנים הראו לראשונה על נוכחות של מעכב אינברטאז בפקעות של תפוח אדמה (Schwimmer et al., 1961), שמהן הופק בהמשך גם החלבון המעכב (Pressey, 1966). מאוחר יותר הופק מעכב אינברטאז גם מתירס (Jaynes and Nelson, 1971), בטטה (Matsushita and Uritani, 1976) ופקעות תפוח"א (Bracho and Whitaker, 1990). המעכבים הם חלבונים מסיסים, והפעילות המעכבת שלהם מוגבלת כנראה לאינברטאזות חומציות בלבד. כמו כן, היו עדויות להימצאותו של מעכב חלבוני לפעילות של אינברטאז, שנוצר במהלך ההזדקנות של עלי כותרת של ציפורן ובהשפעת ABA (Halaba and Rudnicki, 1983). הפעילות של מעכב זה במהלך ההזדקנות של הפרחים מורידה את פעילות האינברטאז (Halaba and Rudnicki, 1983), וכתוצאה מכך נעצרת ההידרוליזה של סוכרוז (Ho and Nichols, 1975). במקרה זה פעילות המעכב מונעת את העברת הסוכרוז מהרקמה המזדקנת לאברים שכנים. נמצא, שהמעכב קיים בפרחים של מינים נוספים, כמו אלסטרומריה, דליה, סייפן, פטוניה וורד, והוא גורם לירידה בפעילות האינברטאז בשיעור של 20-30% (Halaba and Rudnicki, 1989a). כן נמצא, שמעכב שבודד מצמח אחד יכול לעכב פעילות של אינברטאז בצמח אחר *in vitro* (Halaba and Rudnicki, 1989b). עדויות אלו מצביעות על ההשפעה שישנה לבקרת הפעילות של האינברטאז באמצעות מעכבים על פעילותו במהלך הזדקנות פרחים, ותומכת בהנחה שהגברת הפעילות של האינברטאז ע"י טיפול בציטוקינים עשויה לדחות הזדקנות בפרחים.

3.1. השפעת פחמימות על פרחי קטיפה

1.3.1. השפעת פחמימות על פתיחת פרחים ומשך חיי האגרטל

הוספת פחמימות לתמיסת האגרטל מאריכה את משך חיי אגרטל של ענפים קטופים רבים, אך מנגנון הפעולה לא לגמרי ברור. פתיחת פרחים היא תופעה פיסיולוגית מורכבת מאוד, שבמהלכה ישנה גדילה מואצת של תאים ומעורבות של מערכות בקרה של אותות פנימיים וחיצוניים. לכן, לתהליך הפתיחה דרושים מקור אנרגיה וגדילה של דפנות התא (Van Doorn and Van Meeteren, 2003). בפרחים צוברי עמילן, כגון ורדים, ישנה גדילת תאים וצבירת עמילן וסוכרוז החל משלב גדילת הפקע (Kumar et al., 2007). במהלך פתיחת הפרחים של צמחים אלו נמצאה ירידה בתכולת הסוכרוז והעמילן בעלי הכותרת, בעוד שרמת הגלוקוז והפרוקטוז עלתה, כאשר בעלי כותרת מנותקים קצב הפירוק של העמילן היה גדול יותר (Sacalis and Chin, 1976). לעומת זאת, פרחים שהוסף להם סוכרוז באגרטל צברו יותר חומר יבש, תכולת המים בהם הייתה גבוהה יותר והם היו קשיחים יותר במהלך ההזדקנות (O'Donoghue et al., 2002). הוספת סוכרים באגרטל לפרחים קטופים תורמת לפתיחה טובה יותר, לשימור הצבע ולדחיית ההזדקנות. השפעות חיוביות אלה דווחו בפרחי ליאטריס (Han, 1992), ורד (Kuiper et al., 1991, 1995), לימוניום (Doi and Reid, 1995; Ichimura, 1998), אפונה ריחנית (Halevy and Mayak, 1979; Ichimura, 1998; Ichimura and Hiraya, 1999) וציפורן (Nichols, 1973) ובזני גרוויליאה

שונים (Meir et al., 2009). הוספת סוכרים לפרחי ורד ולציפורן שילשה את משך חיי האגרטל, שיפרה את איכות הפרח הקטוף, מנעה ירידה של המשקל הטרי והעלתה את המשקל היבש (Halevy and Mayak, 1979). גם בפטוניה (Weiss and Halevy, 1991), לזיאנתוס (Huang and Chen, 2002) וורד (מאיר וחוב', 1995), טיפול הטענה בסוכרוז האריך את משך חיי האגרטל של הפרחים. במחקר אחר נמצא כי סוכרוז בהטענה עודד ביוסינתזה של אנתוציאנינים בליזיאנתוס, וכך שיפר את מופע הפרח (Uddin et al., 2001; Ichimura, 1998). בליאטריס, הוספת 2% או 5% סוכרוז גרמה להתפתחות טובה ביותר של הפרחים והכפילה את משך חיי התפרחות (Han, 1992). מכיוון שתמיסות סוכר מעודדות זיהומים בקטריאליים, הוספת סוכרוז בלבד לא שיפרה את הפתיחה של פרחי ורד 'מדלון', אלא אם היא ניתנה בשילוב עם תרכובת אנטימיקרוביאלית, כמו HQC (Van Doorn et al., 1991). בהשוואת הפתיחה של ורדי 'מדלון' על גבי הצמח לאלו שנפתחו באגרטל נמצא, שהפתיחה טובה יותר על הצמח. הפוטנציאל האוסמוטי של הפרחים באגרטל לא עלה בארבעת הימים הראשונים, דבר המרמז על כך, שכנראה אין זרימה של תרכובות המשפיעות על הפוטנציאל האוסמוטי בניצנים (Van Doorn et al., 1991).

2.3.1. תנועה של סוכרים המיושמים באגרטל

הסוכר (גלוקוז או סוכרוז) המוסף באגרטל מועבר לעלים בעצה עם זרם הטרנספירציה, ומהם הוא מיוצא כסוכרוז בשיפה, כאשר רק כמות קטנה ממנו מגיעה לתפרחות דרך העצה (Halevy and Mayak, 1979). הסוכרוז מצטבר בדרך כלל בחללים הבין-תאיים בעלים ומפורק ע"י אינברטאז לגלוקוז ופרוקטוז (Van Doorn, 2001). בפרחי ורד לאחר הקטיף יש עליה בתכולת הסוכרים המסיסים, אולם לאחר מספר ימים חלה ירידה (Sacalis and Chin, 1976; Nichols and Ho, 1979; Van Doorn et al., 1991). רב-סוכרים כגון עמילן הראו ירידה כבר ממועד הקטיף. כאשר הפרחים הוחזקו בתמיסת סוכרוז, תכולת הסוכר הכללית נשמרה ואף עלתה בכל חלקי הפרח (Sacalis and Chin, 1976). יישום של סוכרוז מסומן בהטענה לפרחי ציפורן וורד גרם לרמת סימון גבוהה בעלים כבר לאחר 10 דקות, בעוד שבפרחים לא נמצא כל סימון. רק לקראת סוף ההטענה (10-24 שעות) נמצאה רמה גבוהה של סוכר מסומן גם בפרחים. בוורד, גיל הפרח לא שינה את הזרימה של הסוכר המסומן לפרחים, ואילו בציפורן ההזדקנות גרמה לעיכוב העברת הסוכר המסומן מהגבעולים לפרחים. כשהטעינו את הפרחים בריכוזי סוכרוז של 1%-5% נראתה לעיתים פגיעה בעלים, שנבעה כנראה מייבוא מהיר של סוכרוז לעלים וייצוא לא מספיק מהיר לתפרחת. סוכרוז מגיע לפרחים ע"י תנועה בשיפה, ולא רק בזרם הטרנספירציה (Sacalis and Durkin, 1972).

במחקר בו ניסו לאפיין שוני בתנועה של סוכרוז מסומן בוורד, כאשר הפרחים הוחזקו במים או בתמיסת סוכרוז, נמצא שהפיזור של הסוכרוז המסומן היה דומה לזה שתואר לעיל, כאשר ריכוז הסוכר בעלים היה גבוה יותר מאשר בגבעולים ובפרחים (Sacalis and Chin, 1976). בהמשך, רמת הסוכר בעלי הכותרת עלתה והמשקל היבש נשאר זהה, למרות ניצול הפחמימות בתהליך הנשימה. ממצא זה מורה שקיים שינוע של מרכיבי המשקל היבש מהגבעול והעלים אל עלי הכותרת. בשעות הראשונות לאחר הטיפול רוב הסוכר נמצא בעלווה, אך ככל שהענף מזדקן עלי הכותרת הופכים לדומיננטיים כמבלע. בבדיקה של רמת העמילן בפרחים שהוחזקו במים נמצאה ירידה חדה בריכוזו, בעוד שבפרחים שהוחזקו בתמיסת סוכרוז נשמרה רמת העמילן (Ho and Nichols, 1977). התברר שהעלים מתפקדים כמחזורי פחמימות, והסוכרים יכולים לנוע מהם אל הפרחים. כאשר הפרחים הוצבו בתמיסת סוכרוז, העלים איבדו את חשיבותם כמחזורי פחמימות והפכו לצוברי פחמימות (Sacalis and Chin, 1976).

נמצא, שהפחמימות העיקריות בעלי הכותרת של הוורד היו גלוקוז, גלקטוז, קסילוז, סוכרוז ואינוזיטול (Ho and Nichols, 1977). הסוכר המוסף נדרש בדרך כלל לאוסמורגולציה (Kuiper et al., 1995). בנוסף נמצא, שהעלים רגישים יותר לריכוזי סוכר גבוהים באגרטל מאשר עלי הכותרת (Halevy and Mayak, 1981). העלים מהווים בדרך כלל מקור לסוכרוז, ולכן הם מתקשים לקלוט את הסוכרוז המגיע אליהם מהתמיסה בזרם הטרונספירציה. כתוצאה מכך, הסוכרוז עלול להצטבר בחללים הבינתאיים ולגרום להתייבשות העלים (מאיר וחוב, 1995). לעומת זאת, סוכרוז המגיע מהתמיסה מנותב באופן ישיר לתפרחות, המהוות אבר מבלע טבעי בפרח הקטוף.

3.3.1. השפעת פחמימות על פרחי גרוויליאה

הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל שיפרה את משך חיי האגרטל של ענפי גרוויליאה מזן 'סילווייה' (Ligawa et al., 1997) ומזנים אחרים (Meir et al., 2009). בחינת מאזן הפחמימות בזן 'סילווייה' הראתה על עליה חדה בתכולת הסוכרים המסיסים בפרחים טריים, שנדגמו בשלבים שונים. לעומת זאת, במהלך חיי אגרטל הייתה ירידה הן בתכולת הסוכרים המסיסים והן בתכולת העמילן, ממצא שאינו מפתיע בהתחשב בקצב הנשימה הגבוה של הפרחים (Joyce et al., 1995). החוקרים מציינים, שנוכחות סוכר בתמיסת האגרטל (בתוספת חומרים משמרים) היא למעשה הגורם המשמעותי ביותר המשפר את משך חיי האגרטל, דוחה את ההזדקנות ודהיית הצבע בתפרחות ומאפשר פתיחה טובה של פרחי הגרוויליאה באגרטל (Joyce et al., 1993, 1996). כאשר נבחנה השפעת נוכחות ריכוזים שונים של סוכרוז באגרטל נמצא שיפור באיכות עם עליית הריכוז עד ל- 4% סוכרוז. התמיסה המסחרית המקובלת כ'מזון פרחים' לאגרטל מכילה 1% גלוקוז. נמצא, שנדרשים ריכוזים של עד 10% סוכרוז כטיפול הטענה לאחר הקטיף לפרחי הזן 'סילווייה', אך לאחר סימולציית משלוח הטיפול לא היה יעיל (Joyce and Beal, 1999), ולכן הוא לא הומלץ למגדלים באוסטרליה.

4.1. מטרות העבודה

פיתוח טיפולים מיטביים המבוססים על ציטוקינינים ותוספת של סוכרים לפרחים קטופים של גרוויליאה 'ספיידרמן', והבנת המנגנון הפיזיולוגי של הטיפולים המשולבים עמדו במרכזו של תכנית מחקר זו. השערת המחקר הייתה שציטוקינינים פועלים באמצעות הגברת הפעילות של אינברטאז, ובכך מגבירים את כוח המבלע של איברי הפרח. כתוצאה מכך, הציטוקינינים גורמים לשיפור קליטת הסוכר הניתן באגרטל והובלתו אל התפרחות, ו/או משפרים את ההובלה של הסוכר מהעלים והגבעולים לתפרחות. כמודל לבחינת השערת המחקר נבחרו ענפי פריחה של גרוויליאה 'ספיידרמן', המגיבים בצורה חיובית לציטוקינינים וסוכרים. המטרות הייחודיות של העבודה הן:

- (1) לימוד אופן היישום של ציטוקינינים (TDZ /BA) בענפי קטיף פרחים של גרוויליאה 'ספיידרמן' ובחינת מנגנון הפעולה שלהם בהארכת משך חיי האגרטל של פרחים אלה.
- (2) בחינת ההשפעה של מתן סוכרוז בתמיסת האגרטל בשילוב עם טיפול בציטוקינינים על איכות הפרחים.
- (3) לימוד השפעת ציטוקינינים וסוכרוז על מאזן הפחמימות בתפרחת במהלך ההזדקנות.
- (4) לימוד השפעת ציטוקינינים וסוכרוז על הובלה של סוכרוז הניתן בתמיסת האגרטל לענף.
- (5) לימוד השפעת ציטוקינינים וסוכרוז על פעילות האינברטאז בתפרחות במהלך ההזדקנות, כמדד לכושר המבלע שלהן.

2. חומרים ושיטות1.2. חומרים

טבלה 1: פרוט החומרים ששימשו בעבודה.

שם החברה	שם מסחרי	שם החומר
Amersham Biosciences Danyl Biotech	---	[U- ¹⁴ C] Sucrose
Sigma Aldrich	DROPP	Thidiazuron; N-phenyl-n-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea (TDZ)
אחים מילצ'ן	TOG-L-101	Benzyladenine (BA)
אחים מילצ'ן	TOG-6	Sodium dichloroisocyan-urate
אחים מילצ'ן	TOG-4	8-Hydroxyquinoline citrate (8-HQC)
Sigma Aldrich	---	Amyloglucosidase
Pierce	---	A :ראגנט BCA
Pierce	---	B :ראגנט BCA
Sigma Aldrich	---	Bovine serum albumin
Sigma Aldrich	---	Dinitro-salicylic acid
Sigma Aldrich	---	Sodium potassium tartrate
Sigma Aldrich	---	Hepes
Sigma Aldrich	---	EDTA
Sigma Aldrich	---	Dithiothreitol
Sigma Aldrich	---	Phenylmethane-sulphonyl fluoride

טבלה 2: פרוט הבופרים והריאגנטים ששימשו בעבודה.

ריכוז	שם הבופר/הראגנט והרכבו
10 g/l 200 ml/l 300 g/l	<u>ראגנט סמנר</u> Dinitrosalicylic acid Sodium hydroxide Sodium potassium tartrate
2M (pH = 5 or 7)	<u>בופר אצטט</u> Sodium acetate Acetic acid
50 mM 5 mM 1 mM 2 mM 0.1mM	<u>בופר ריטוק</u> Hepes Magnesium chloride EDTA Dithiothreitol Phenylmethanesulphonyl fluoride
0.1 mM 0.1 mM	<u>בופר פוספאט - ציטראט</u> Citric acid di-Potassium hydrogen phosphate
0.2 N 0.2 N 0.2 N 0.2 N 0.2 N	<u>A :ראגנט BCA</u> Sodium tartrate Sodium hydroxide Sodium carbonate Sodium bicarbonate BCA detection reagent
4%	<u>B :ראגנט BCA</u> Copper sulphate

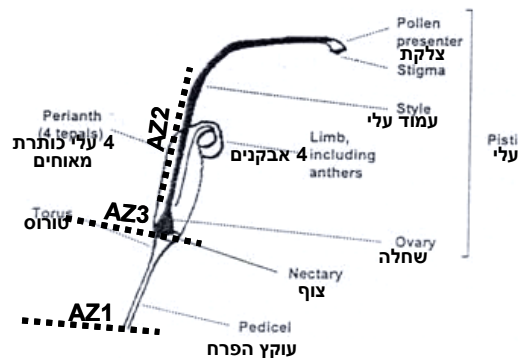
2.2. החומר הצמחי והטיפול בו

ענפי גרוויליאה 'ספיידרמן' נקטפו בשלב הפתיחה המסחרי המקובל משטחים מסחריים באזורים שונים בארץ (מושב אניעם, בני עטרות, משתלת וונדי ובית-הלוי) והובאו למעבדה בוולקני תוך 1-2 שעות. שלב הקטיפה האופטימאלי (תמונה 1) הוא השלב בו 70-80% מהפרחונים בתפרחת נמצאים במצב של לולאה קטנה, ואילו הפרחונים שבבסיס התפרחת נמצאים בשלב של לולאה גדולה, לקראת פריצת עמוד העלי. שלב קטיפה זה מאפשר פתיחה מלאה של התפרחות והתפתחות מרבית של צבע באגרטל.



תמונה 1: שלב הקטיפה האופטימאלי של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן'.

המבנה של הפרחון הבודד של גרוויליאה ואיבריו השונים מוצגים בתמונה 2 (Joyce and Beal, 1999). העטיף כולל ארבעה עלי כותרת מאוחים, כאשר האבקנים ניצבים מול עלי העטיף ומעורים בהם. השחלה עילית בת מגורה אחת. העלי הבודד כולל את עמוד העלי, הפורץ קודם כלולאה מבין עלי העטיף (באזור AZ2, תמונה 2), ואת הצלקת המורחבת ל"מגיש אבקה". בתמונה 2 מוצגים גם אזורי הניתוק של הפרחונים. נשירת פרחונים באזור העוקץ (AZ1) ונשירת חלקי פרחון, בעיקר עלי העטיף לאחר פריצת עמוד העלי (AZ2) ולאחר הזדקנותם באגרטל (AZ3), מהווים את הגורם המרכזי למשך חיי האגרטל הקצרים של גרוויליאה ולדחיית המוצר ע"י הצרכנים.



תמונה 2: המבנה של פרחון גרוויליאה בשלב הפתוח. הקווים המקווקים המסומנים ב-AZ (abscission zone) מציינים את המיקום של אזורי הניתוק. AZ2 = איזור הפתיחה של הפרחון דרכו פורץ עמוד העלי בצורת לולאה; AZ1 ו-AZ3 = אזורי הניתוק של הפרחון הממוקמים בעוקץ הפרח ובעטיף המאוחה, בהתאמה.

ענפי הפריחה מוינו ונגזמו לאורך של כ- 30 ס"מ. כל הענפים הוטענו בחומר המשמר 8-HQC (שניתן כתכשיר המסחרי TOG-4 0.2%) למשך 4 שעות ב- 20 מ"צ ולמשך 16 שעות נוספות ב- 4 מ"צ. חלק מהענפים טופלו גם בציטוקינינים, כמפורט להלן. נבחנו שלוש שיטות יישום שונות של הציטוקינינים: 1) בתמיסת ההטענה כמפורט לעיל; 2) טבילה של התפרחת בלבד (טבילת ראש); 3) טבילה של כל הענף. הציטוקינינים שנבחנו היו: TDZ בריכוז של 100 μM (שניתן כתכשיר המסחרי DROPP בריכוז של 44 מ"ג לליטר) ו-BA בריכוז של 220

μM (שניתן כתכשיר המסחרי TOG-L-101 בריכוז של 0.5%). לאחר הטיפול ענפי הפריחה הוצבו בחדר תצפית מבוקר (20 מ"צ, 60-70% לחות יחסית, אורך יום של 12 שעות) למעקב אחר איכותם במהלך חיי האגרטל. ענפי הפריחה הוכנסו למבחנות עם תמיסות של סוכרוז או דקסטרוז בריכוז של 1% + 50 ח"מ כלורין אורגני (תכשיר מסחרי TOG-6). כל ענף הוכנס לאחר חידוש החתך לתוך מבחנה (50 מ"ל) מכוסה (למניעת התנדפות) דרך נקב בקוטר של 0.8 מ"מ במכסה (תמונה 3). כל מבחנה הכילה 50 מ"ל של התמיסה הנבדקת. הענפים והמבחנות נשקלו מידי יום למעקב אחר השינויים במשקל, קצב הטרנספירציה וקליטת מים. כמו כן, נעשו הערכות חזותיות של הענפים, כמפורט להלן. בנוסף, נבחנו קצב קליטת הסוכרוז ותנועתו בענף הקטוף. במועדים נבחרים במהלך חיי האגרטל נלקחו דוגמאות לבדיקת מדדים ביוכימיים שונים בפרחונים השלמים או באיברי הפרחון (עטיף ועמוד עלי), כמפורט להלן.



תמונה 3: הצבת ענפי פריחה בודדים של גרוויליאה 'ספיידרמן' במבחנות בחדר תצפית למעקב אחר חיי אגרטל. כל ענף בודד באורך של 30 ס"מ, שמבסיסו הוסרו העלים, הוכנס דרך פקק מחורר למבחנה של 50 מ"ל שהכילה תמיסה בנפח של 50 מ"ל. קוטר הנקב היה 0.8 ס"מ, כדי לאפשר את הכנסת הענף ומניעת התאדות מים.

3.2. קביעת מדדי איכות

א. ענפי פריחה

1.3.2. מדדים חזותיים בענף הפריחה

מידי יום בוצעו הערכות חזותיות של איכות הענפים לפי המדדים הבאים: נשירת פרחונים בתגובה למגע קל, בסולם מ-0-5, שבו 0 = תפרחת ללא נשירה של פרחונים; 5 = תפרחת בה כל הפרחונים נשרו; החמת תפרחות בסולם מ-0-3, שבו 0 = תפרחת ללא החמה; 3 = תפרחת בהחמה מלאה. החמת התפרחות נקבעה עפ"י החמת עלי העטיף של הפרחונים (תמונה 2). טורגידיות התפרחות עפ"י רמת הטורגור שלהם בסולם מ-0-3, שבו 0 = תפרחת ללא טורגור; 3 = תפרחת בטורגור מלא; דרגת הפתיחה של התפרחות בסולם מ-0-5, כאשר 0 = תפרחת בה כל הפרחונים סגורים; 5 = תפרחת בה כל הפרחונים פתוחים לגמרי; פתיחת הפרחונים נקבעה עפ"י התיישרות עמוד העלי (תמונה 2), כאשר בפרחון סגור עמוד העלי מכופף, מכונס פנימה (תמונה 1) ובפרחון פתוח עמוד העלי ישר וכולט החוצה.

2.3.2. משך חיי האגרטל

משך חיי האגרטל נקבע כמוצע המשוקלל של סכום המכפלה של סה"כ מספר ענפי הפריחה שכמשו

ונפסלו בכל יום במספר הימים עד לפסילה, מחולק במספר ענפי הפריחה שנבחנו בניסוי. כל טיפול כלל 10 חזרות והתוצאות מוצגות כממוצעים \pm שגיאת תקן.

3.3.2. שינוי המשקל ומאזן המים

בעת הצבת ענפי הפריחה במבחנות ומידי יום לאחר מכן בוצעו שקילות של המבחנה והתמיסה עם וללא הענף, ומשקל הענף חושב כהפרש בין שתי השקילות. עפ"י הנתונים שהתקבלו חושבו שינויי המשקל של הענף במהלך חיי האגרטל (% מהמשקל בזמן אפס), קצב קליטת המים ע"י הענף והטרנספירציה על בסיס משקל הענף. כדי לחשב את קצב קליטת המים וקצב הטרנספירציה, ערכי קליטת המים והטרנספירציה חולקו בהפרש הזמן בין שני מועדי בדיקה (ימים) ולמשקל הענף ביום 0 (בגרמים), כמפורט להלן:

משקל ענף (BW) = ההפרש בין המשקל הכללי (מבחנה + תמיסה + ענף) למשקל המבחנה + התמיסה.

קליטת המים בין שני מועדי בדיקה במ"ל = ההפרש במשקל המבחנה + התמיסה בין שני מועדי בדיקה.

טרנספירציה בין שני מועדי בדיקה במ"ל = איבוד המים הכללי המחושב עפ"י ההפרש במשקל הכללי (ענף + מבחנה + תמיסה) בין שני מועדי בדיקה.

4.3.2. קינטיקה של קליטת סוכרוז מהתמיסה ותנועתו באיברי הענף הקטוף

הקינטיקה של תנועת הסוכר בענף בוצעה כמתואר ע"י Abebie (2007). לאחר ביצוע הטיפולים בציטוקינינים כמתואר בסעיף 2.2, ענפי הפריחה הועברו למבחנות שהכילו 10 מ"ל של תמיסת כלורין (TOG-6) בריכוז של 50 ח"מ או תמיסת כלורין עם 1% סוכרוז. לתמיסות הוספו 50 מיקרוליטר של מים מזוקקים פעמיים, שהכילו 4 מיקרוליטר של סוכרוז רדיואקטיבי (פעילות ספציפית 60.7 MBq/mg). לאחר קליטת כל התמיסה הרדיואקטיבית (כ- 30 שעות) ענפי הפריחה הועברו למבחנות חדשות, עם אותן התמיסות אך ללא הסוכרוז הרדיואקטיבי, והודגרו למשך שלושה ימים בחדר תצפית מבוקר. במועדים שונים בחיי האגרטל, 24, 48 ו- 72 שעות מתום מועד ההטענה בסוכרוז הרדיואקטיבי, מדגם של ענפי פריחה הועבר לייבוש תחת לחץ למשך שבוע לפחות. בתום הייבוש כל ענף הוכנס בנפרד לקלטת, של Fujifilm למשך 24 שעות, ומיקום החומר הרדיואקטיבי בענף נקבע בעזרת FUJIFOTO LA-5000 phosphoimager (FuJiFoto Film Co.).

ב. פרחונים

5.3.2. תכולת מים יחסית (RWC) בעטיף ובעמוד העלי

$$RWC = \frac{(FW - DW) \times 100}{(TW - DW)}$$

תכולת המים חושבה לפי הנוסחה הבאה (Turner, 1981):

כאשר FW = המשקל הטרי במועד הדגימה; TW = המשקל בטורגור מלא לאחר הגמעת האברים במים; ו-DW = המשקל היבש לאחר ייבוש האברים. בכל מועד הבדיקות נעשו ב- 5 חזרות, כאשר כל חזרה כללה 3 עמודי עלי (שנלקחו משלושה פרחונים) ו/או 3 עלי עטיף (עלי כותרת מאוחים) שהופרדו משלושה פרחונים. הגמעת האברים לקביעת ה-TW בוצעה באמצעות הדגרתם בצלחות פטרי עם מים מזוקקים ב- 4 מ"צ לכ- 12-16 שעות. ייבוש הדוגמאות בוצע בתנור בטמפרטורה של 60 מ"צ למשך שבוע (Turner, 1981).

6.3.2. מיצוי ותכולת פיגמנטים

הפיגמנטים, כלורופיל וקרונואידים, מוצו מהעטיף ומעמוד העלי של הפרחונים. המיצוי בוצע במתנול בנפח

של 1 מ"ל במבחנות אפנדורף של 2 מ"ל. המיצויים הוכנסו לקירור למשך 24 שעות עד שכל הפיגמנטים מוצו לתמיסה, והרקמה הפכה לשקופה. תכולת כלורופיל a, כלורופיל b וכלל הקרוטנואידים נקבעה בספקטרופוטומטר מסוג 2100 Ultrospec (Hamersham, USA) ב-3 אורכי גל: 665 (כלורופיל a), 652 (כלורופיל b) ו-470 (קרוטנואידים) ננומטר, עפ"י נוסחאות ידועות (Lichtenthaler, 1987), המפורטות להלן. הבדיקות בוצעו ב-5 חזרות, שכללו כל אחת 3 עלי עטיף או 3 עמודי עלי.

כלורופיל a

$$Ca = 16.72 \times A665 - 9.16 \times A652$$

כלורופיל b

$$Cb = 34.09 \times A652 - 15.28 \times A665$$

קרוטנואידים

$$Cx+c = \frac{1000 \times A470 - 1.63 \times Ca - 104.96 \times Cb}{221}$$

221

7.3.2. תכולת פחמימות

מדגמים של גרם אחד של פרחונים, עלי עטיף ועמוד העלי נלקחו מהתפרחות במועדים שונים, הוקפאו מיידית בחנקן נוזלי ונשמרו במקפיא ב-80 מ"צ עד לייבושם באמצעות ליופיליזר במשך כ-72 שעות. לאחר הליופיליזציה הדגימות נשמרו בשקיות אטומות ב-20 מ"צ. הדוגמאות היבשות נטחנו לאבקה בחנקן נוזלי לפני מיצוי הסוכרים.

א. סוכרים מסיסים

מיצוי הסוכרים המסיסים נעשה במדגמים של 50 מ"ג חומר יבש. המיצוי נעשה ב-10 מ"ל של אתנול 80% במבחנות זכוכית. המבחנות הודגרו באמבט ב-80 מ"צ למשך 60 דקות, שבסופן האתנול נשפה הועבר לכוס כימית (50 מ"ל). לכל דוגמא הוספו 5 מ"ל נוספים של אתנול 80%, והדוגמאות הודגרו שוב למשך 30 דקות ב-80 מ"צ (פעולת הוספה זו בוצעה פעמיים). האתנול שנשפה נאסף לאותה כוס כימית, והמיצוי כולו נודף עד ליובש במינדף במהלך הלילה. המשקע שנותר הורחף במ"ל אחד של מים מזוקקים פעמיים, התערובת עורבבה באמצעות סטירר והועברה למבחנות אפנדורף בנפח של 2 מ"ל, שסורכזו במהירות של 12,500 סיבובים לדקה (סל"ד) למשך 20 דקות בצנטריפוגה מסוג 5810 R (אפנדורף).

כימות הסוכרים נעשה באמצעות HPLC. לפני ההזרקה למכשיר, המיצוי הצלול שהתקבל לאחר הסרכוז הועבר דרך פילטר מסוג Waters Sep-Pak C-18 Cartridges, ולאחר מכן דרך פילטר מסוג Millex®-HV באמצעות מזרק של 1 מ"ל אל מבחנות שנשמרו ב-20 מ"צ עד למועד הבדיקה (Stoop and Pharr, 1994). מדגם של 20 מיקרוליטר מכל דוגמא הוזרק לקולונה (300 mm x 6.5 mm) Sugar-PAK™ I של חברת Waters™, וההרצה בוצעה בקצב של 0.5 מ"ל לדקה ב-90 מ"צ, בלחץ שלא עלה על 2000 psi. ההרצה הייתה איזוקרטית ונעשתה באמצעות מים. לזיהוי הסוכרים הוזרקו לקולונה סטנדרטים של גלוקוז, פרוקטוז וסוכרוז לחוד (0.1%) ובתערובת (0.2-0.5%), וכן סטנדרטים של סוכרים נוספים, מלטוטריז, גלקטוז, מאנוז, מניטול, פוקוז, גליצרול וקסיליטול. ריכוז הסוכרים בדוגמאות חושב עפ"י שטח השיאים בהשוואה לעקומת הכיול, במ"ג לגרם משקל יבש.

ב. עמילן

מיצוי העמילן נעשה מהמשקע שהתקבל לאחר המיצוי של הסוכרים המסיסים. למשקע הוספו 5 מ"ל של אתנול 80% והמבחנות הודגרו באמבט מים ב- 75 מ"צ למשך 30 דקות (הפעולה בוצעה פעמיים). הנוזלים נשפו והמשקע יובש במשך הלילה בתנור ב- 70 מ"צ. המשקע היבש הועבר למבחנות פלסטיק שאליהן הוספו 6 מ"ל של מים מזוקקים פעמיים, המבחנות כוסו בפקק ונייר אלומיניום והוכנסו לאוטוקלב למשך שעה (121 מ"צ ולחץ של 2 אטמוספרות) לפירוק דפנות התאים ושחרור העמילן. לאחר ההוצאה מהאוטוקלב הוספו למבחנות החומרים הבאים: 2.5 מ"ל מים מזוקקים פעמיים, 0.5 מ"ל בופר אצטט (pH = 4.8) ו- 1 מ"ל של עמילוגלוקוזידאז (11,600 units/g). הנפח הסופי של תמיסת הריאקציה היה 10 מ"ל. במקביל, הוכן בלנק אנזים שהכיל 6 מ"ל מים + כל המרכיבים הנ"ל ללא הדוגמא. המבחנות כוסו במכסים מתברגים והודגרו למשך הלילה ב- 55 מ"צ באמבט מטלטל. בתום הריאקציה האנזימטית הדוגמאות סוננו דרך נייר ווטמן מס' 1, ונפח התמיסה הושלם ל- 10 מ"ל עם מים מזוקקים פעמיים. ריכוז הגלוקוז שהשתחרר מפירוק העמילן נקבע באמצעות ראגנט סמנר (Dubois et al., 1956). הריאקציה בוצעה במבחנות שהכילו 1 מ"ל דוגמא ו- 1 מ"ל ראגנט סמנר. המבחנות הורתחו למשך 5 דקות ב- 100 מ"צ. עוצמת הבליעה של הצבע שהתקבל נקבעה בספקטרופוטומטר כנגד בלנק באורך גל של 550 ננומטר. ריכוז העמילן ברקמה חושב בעזרת עקומת כיוול של גלוקוז, והוא בוטא במ"ג לגרם חומר יבש.

8.3.2. פעילות אינברטאזות

נבחנו הפעילויות האנזימטיות של שלושת סוגי האינברטאזות: אינברטאז ציטוזולי = מסיס בסיסי, אינברטאז וקואולרי = מסיס חומצי ואינברטאז של דופן התא = אפופלסטי חומצי. המיצויים בוצעו כמפורט בסכימה 2. למיצוי האינברטאזות, נלקחו דוגמאות (100-200 מ"ג) שעברו ליפיליזציה (כמפורט בסעיף 7.3.2). הדוגמאות נכתשו ב- 2 מ"ל של בופר ריסוק וסורכזו בצנטריפוגה במשך 30 דקות במהירות של 14,000 סל"ד לקבלת מקטע עליון מסיס (מקטע A בסכמה 2) שהכיל את האינברטאז הציטוזולי והואקואולרי. המשקע הורחף ב- 1 מ"ל של בופר הומוגנציה ו- 4M NaCl ביחס של 3:1, בהתאמה. הדוגמאות הודגרו בקרח למשך 30 דקות וסורכזו בצנטריפוגה במשך 30 דקות במהירות של 14,000 סל"ד עד לקבלת מקטע עליון מסיס (מקטע B בסכמה 2) המכיל את האינברטאז של דופן התא. המיצויים הועברו דרך קולונת Sephadex G-25 (medium). ריכוז הגלוקוז שהשתחרר מפירוק סוכרוז נקבע בריאקציה שנמשכה 30 דקות, באמצעות ראגנט סמנר (Dubois et al. 1956). בדיקת הפעילות בוצעה בספקטרופוטומטר באורך גל של 550 nm. פעילות האינברטאז בוטאה ביחידות הבאות:

$$\text{pmol glucose / mg protein} \times \text{min}$$
9.3.2. תכולת חלבון

לבדיקת כמות החלבון שנלקחה לריאקציה של פעילות האינברטאז נדגמו 25 מיקרוליטר מהמיצויים והושלמו לנפח של 100 מיקרוליטר עם מים מזוקקים פעמיים. הבדיקה בוצעה בשיטת ה- Bicinchoninic acid (BCA). ריאגנט ה- BCA הוכן ע"י ערבוב תמיסות של ריאגנט B ו- A (טבלה 2) ביחס של 1:50. הדוגמאות הודגרו למשך 30 דקות ב- 37 מ"צ ונקראו בספקטרופוטומטר באורך גל של 562 ננומטר. במקביל, הוכנה עקומת סטנדרט של BSA, שבאמצעותה תורגמו ערכי הבליעה האופטית לכמות החלבון בדגימות שבוטאה ביחידות של מ"ג חלבון.

3. תוצאות

1.3. בחינת ההשפעה של אופן היישום של הציטוקינינים עם וללא סוכר בתמיסת האגרטל על

איכות ענפי הפריחה של גרוויליאה

מטרת הניסויים הראשונים הייתה לקבוע את אופן היישום של BA ו-TDZ, במטרה לשפר את האיכות של ענפי גרוויליאה קטופים באגרטל. לצורך זה, הענפים או התפרחות הוטענו (pulsed) או נטבלו בתמיסות שהכילו BA או TDZ, ולאחר 24 שעות הטענה הועברו לחדר תצפית והוצבו במבחנות, כמתואר בתמונה 3. מדדי האיכות שנבחנו היו משך חיי האגרטל וטורגידיות התפרחות (סעיף 3.2. בפרק חומרים ושיטות).

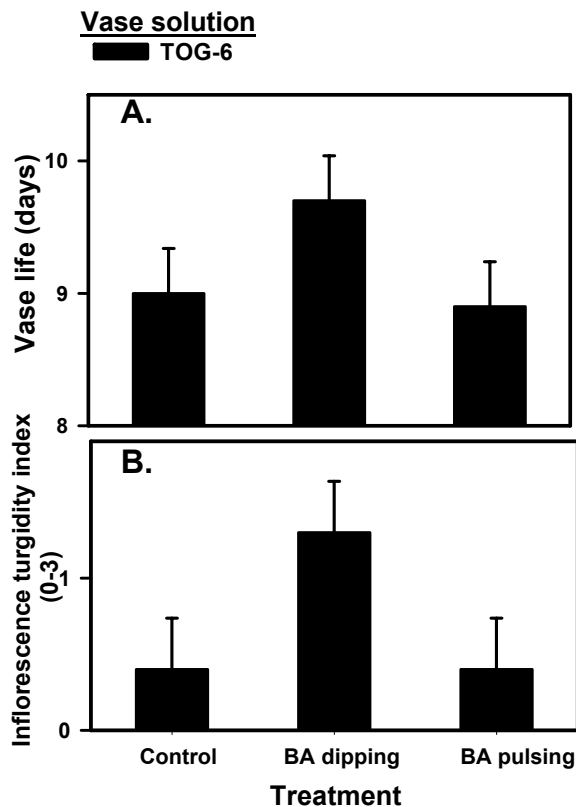
בניסוי הראשון נבחנה ההשפעה של יישום BA בלבד בהטענה או בטבילה של כל הענף. השפעת הטיפולים על משך חיי האגרטל של ענפי הפריחה ועל הטורגידיות של התפרחות במהלך חיי האגרטל מוצגת באיור 1. נמצא, שרק מתן BA בטבילה שיפר באופן מובהק את משך חיי האגרטל (איור A1), וכמו כן שיפר את הטורגידיות של התפרחות בהשוואה לטיפול בהטענה בציטוקינין זה (איור B1). תופעה נוספת שניתן היה לראות היא, שהתיישרות הלולאות של עמודי העלי בפרחי הביקורת (המבטאת את פתיחת הפרחונים) ביום ה-8 הייתה מלווה בהפרדות של עלי העטיף המאוחרים, שנשארו דבוקים אל הצלקת, מצב המצביע על קיומו של תהליך ניתוק.

הניסוי הראשון אמנם הראה, שיישום BA בטבילה היה עדיף מיישומו בהטענה, אולם נדרש ניסוי נוסף לביסוס הממצאים ולקביעת שיטת יישום סטנדרטית. בניסוי השני נבחנו, בנוסף לטיפול בהטענה, שני טיפולי טבילה: האחד, של כל הענף (בדומה לזה שנבחן בניסוי הראשון); והשני, טבילה של התפרחת בלבד. בנוסף, נערכה השוואה בין BA ו-TDZ, עם או ללא נוכחות סוכר בתמיסת האגרטל. הסוכר שנבחן בתמיסת האגרטל היה דקסטרוז (שהוא גלוקוז מסחרי בו משתמשים בארץ ובחו"ל כ"מזון פרחים" המוסף לאגרטל). מהתוצאות המובאות באיור 2 ניתן לראות, ששני אופני הטבילה בציטוקינינים בלבד האריכו באופן מובהק את משך חיי האגרטל, עם עדיפות קלה לשימוש ב-TDZ, בעיקר בהתחשב בריכוז הנמוך יותר בו הוא יושם. גם בניסוי זה יישום הציטוקינינים בהטענה לא שיפר את משך חיי האגרטל. ההשפעה של הוספת הדקסטרוז לתמיסת האגרטל הייתה מובהקת ביותר הן ללא ציטוקינינים והן בכל טיפולי הציטוקינינים, ותרמה להארכת משך חיי האגרטל בכמעט 3 ימים במוצע, 11.6 ימים בהשוואה ל-8.8 ימים בביקורת ללא דקסטרוז (איור B2).

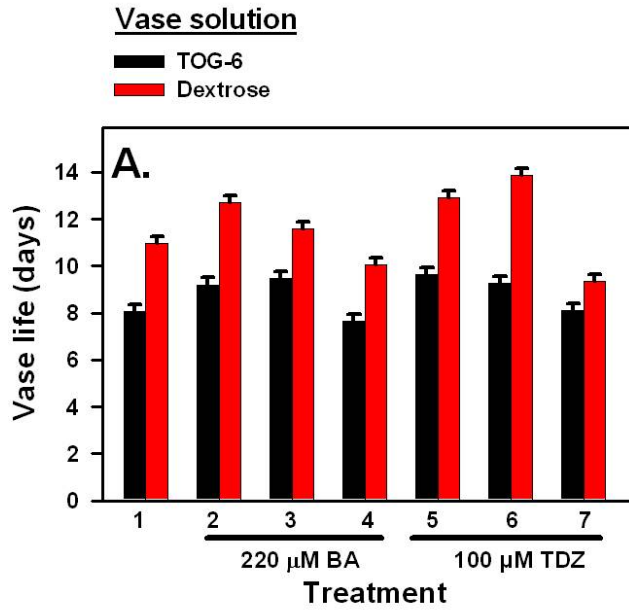
גם מדדי האיכות האחרים שנבחנו בניסוי זה, דרגת הנשירה של הפרחונים (איור A3) ומידת ההחמה של העטיף בפרחונים (איור B3), הושפעו באופן מובהק מטיפולי הטבילה בציטוקינינים ומהטיפול בדקסטרוז באגרטל. הטיפול ב-TDZ היה יעיל יותר באופן עקבי מאשר הטיפול ב-BA. לא נמצאו הבדלים מובהקים בהשפעה של אופני הטבילה, טבילת כל הענף בהשוואה לטבילת התפרחת בלבד, בציטוקינינים אלה. המופע של תפרחות מייצגות לאחר 7 ימים באגרטל מדגים יפה את השפעת נוכחות הדקסטרוז באגרטל בהשוואה לביקורת (תמונה A4 ו-B), את ההשפעה המיטבית של טיפולי הטבילה בציטוקינינים (תמונה C4, D, I ו-J), ואת ההשפעה של שילוב הטבילה בציטוקינינים עם נוכחות דקסטרוז באגרטל (תמונה F4, G, L ו-M).

מכיוון שהנחת העבודה הייתה, שההשפעה של הציטוקינינים בתפרחת קשורה בהובלת סוכר אליה, הוחלט לצורך בחינת השערה זו ליישם את הציטוקינינים בהמשך העבודה בטבילה של התפרחות בלבד, שכן לא היו הבדלים בין שני סוגי הטבילה. הסוכר שנבחן כתוספת לתמיסת האגרטל בניסויים שיפר באופן כללי את איכות התפרחות.

בהמשך העבודה, הוחלט להשתמש בסוכרון כטיפול סוכר בתמיסת האגרטל, שכן זה הסוכר המובל בצינורות השיפה של מרבית הצמחים, ונמצא שישנה לו השפעה חיובית מובהקת בכל הניסויים שבוצעו בזנים שונים של גרוויליאה (מאיר וחוב', 2005).

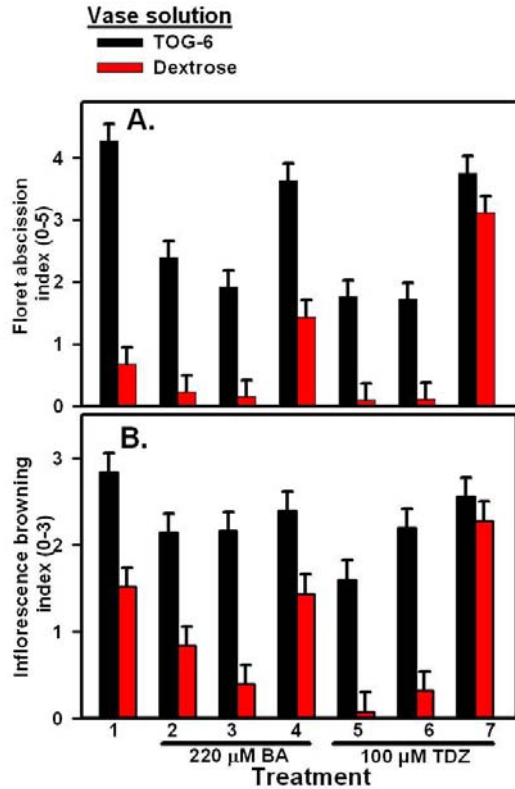


איור 1: השפעת אופן היישום של BA על משך חיי האגרטל (A) ומדד הטורגידיות של התפרחות (B) של ענפי גרוויליאה 'ספיידרמן' לאחר 10 ימים באגרטל. ענפי הביקורת הוטענו למשך 24 שעות בתמיסת TOG-4 0.2% בלבד ללא טבילה. טיפולי הטבילה ב-BA 220 μM נעשו למשך דקה. בתום טיפולי ההטענה והטבילה הענפים הוצבו באגרטל בחדר תצפית. מדד הטורגידיות הוערך ע"י מגע ידני עפ"י סולם של 4 דרגות, כאשר 3 = תפרחת בטורגור מלא עם פרחונים מוצקים למגע; 0 = תפרחת ללא טורגור עם פרחונים כמושים. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 ענפי פריחה. לפי ניתוח חד-גורמי, טיפול הטבילה ב-BA היה מובהק סטטיסטית מטיפול ההטענה בציטוקינין זה ומהביקורת.

**B.**

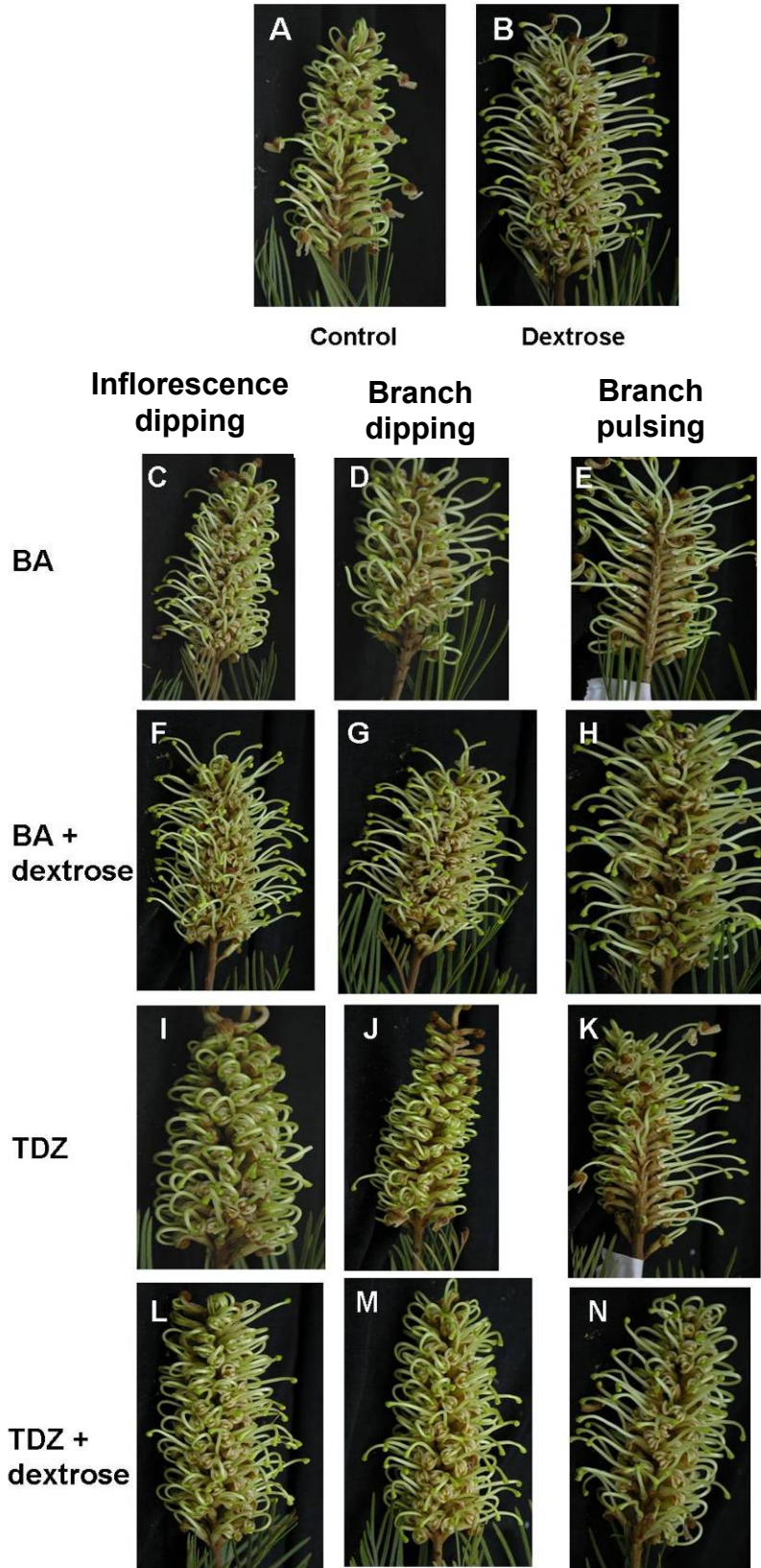
משך חיי אגרסל (ימים)	סוג טיפול (A)	מס' טיפול
9.5 c	ביקורת	.1
10.9 ab	טבילת ראש ב- BA	.2
10.5 b	טבילת ענף ב- BA	.3
8.8 c	הטענה ב- BA	.4
11.3 ab	טבילת ראש ב- TDZ	.5
11.6 a	טבילת ענף ב- TDZ	.6
8.7 c	הטענה ב- TDZ	.7
	(B) תמיסת אגרסל	
8.8 b	TOG-6	
11.6 a	דקסטרוז + TOG-6	
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי		
***	A	
***	B	
***	B X A	

איור 2: השפעת סוג הציטוקינין ואופן יישומו, בשילוב עם 1% דקסטרוז בתמיסת האגרסל, על משך חיי האגרסל של ענפי פריחה של גרוויליאה 'ספיידרמן' (A), וניתוח סטטיסטי של התוצאות (B). ריכוזי הציטוקינינים שנבחנו היו: TDZ 100 μ M ו- BA 220 μ M. פירוט הטיפולים מובא בטבלה (B). טיפולי ההטענה בציטוקינינים ניתנו למשך 24 שעות בתמיסת TOG-4 0.2%. הענפים מכל טיפול הוצבו בחדר תצפית בתמיסת 50 ח"מ TOG-6 או בתמיסת 1% דקסטרוז. התוצאות מייצגות ממוצעים של 4 חזרות של 5 פרחים כל אחת. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *** מציינ מובהקות סטטיסטית בניתוח הדו-גורמי ברמה של 0.001.



מדד החמת עטיף (3-0)		מדד נשירת פרחונים (5-0)		C.	מס' טיפול
9 יום	7 יום	9 יום	5 יום		
2.1 a	1.50 b	2.5 b	0.32 bc	סוג טיפול (A)	.1
1.5 bc	0.54 c	1.3 c	0.08 cd	טבילת ראש ב- BA	.2
1.3 bc	0.52 c	1.0 c	0.02 cd	טבילת ענף ב- BA	.3
1.9 ab	1.84 a	2.5 b	0.44 ab	הסענה ב- BA	.4
0.8 c	0.10 c	0.8 c	0.00 d	טבילת ראש ב- TDZ	.5
1.3 bc	0.24 c	0.9 c	0.06 cd	טבילת ענף ב- TDZ	.6
2.4 a	2.06 a	3.4 a	0.70 a	הסענה ב- TDZ	.7
(B) סוג טיפול					
2.3 a	1.50 a	2.8 a	0.30 a	TOG-6	
0.4 b	0.10 b	0.8 b	0.15 b	דקסטרוז + TOG-6	
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי					
***	***	***	***	A	
***	***	***	**	B	
*	***	***	ל.מ.	B X A	

איור 3: השפעת סוג הציטוקינין ואופן יישומו בשילוב עם 1% דקסטרוז בתמיסת האגרטל על מדד הנשירה של פרחונים בתפרחת (A) ומדד ההחמה של העטיף (B) בתפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' לאחר 9 ימים באגרטל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (C). הניסוי בוצע כמפורט באיור 2. נשירת הפרחונים הוערכה באופן חזותי עפ"י סולם של 6 דרגות, כאשר 0 = תפרחת ללא נשירה של פרחונים; 5 = נשירה מקסימאלית של כל הפרחונים בתפרחת. החמת עלי העטיף בתפרחת הוערכה באופן חזותי עפ"י סולם של 4 דרגות, כאשר 0 = תפרחת עם עטיף ללא חמה; 3 = תפרחת עם עטיף בהחמה מקסימאלית. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.



תמונה 4: השפעת BA (H-C) ו-TDZ (I-N) בטבילת התפרחת בלבד (C, F, I, L), טבילת כל הענף (D, G, J, M) או הטענת הענף (E, H, K, N) בהשוואה לביקורת (A, B) ובשילוב עם 1% דקסטרוז (B, A, F, G, H, I, J, K, L, M, N) בתמיסת האגרטל, על מופע תפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' לאחר 7 ימים באגרטל. הניסוי בוצע כמפורט באיור 2.

2.3. בחינת ההשפעה של טיפולי טבילה בציטוקינינים, בשילוב עם סוכרוז בתמיסת האגרטל.

על מדדי איכות של תפרחות של גרוויליאה במהלך חיי האגרטל

מטרת הניסויים הייתה לבחון את ההשפעה של טבילת התפרחות ב- BA או TDZ בנפרד, ובשילוב עם הוספת סוכרוז באגרטל, על מדדי איכות שונים המשקפים את תהליך ההזדקנות בפרחי גרוויליאה במהלך חיי האגרטל. המדדים שנבחנו היו: משך חיי האגרטל, פתיחת תפרחות, טורגידיות התפרחות, נשירת פרחונים, החמת העטיפה בפרחונים, שינויי משקל ומאזן המים בענף הפריחה, תכולת הפיגמנטים (כלורופיל a ו- b וכלל הקרוטנואידים), קצב הנשימה וייצור אתילן בפרחונים. יש לציין שהמדדים הנ"ל נבחנו בניסויים שונים, בהם האיכות הבסיסית של ענפי הפריחה הייתה שונה, ולכן משך חיי האגרטל היה שונה מניסוי לניסוי. בהתאם לכך, לגבי מדדים מסוימים מובאים נתונים לגבי 7 ימי אגרטל, ובאחרים לגבי 8 עד 11 ימי אגרטל. כיוון שמבין הטיפולים בציטוקינינים, הטיפול עם ההשפעה המובהקת ביותר היה טיפול הטבילה ב- TDZ (ראה בהמשך), במספר ניסויים בהם נבחנו מדדים הדורשים הליך בדיקה ממושך נבחן רק הטיפול הזה.

1.2.3. משך חיי האגרטל של ענפי הפריחה

טיפול הטבילה ב- BA וב- TDZ שיפרו את משך חיי האגרטל של ענפי הפריחה (איור A4), אולם רק השפעת הטיפול ב- TDZ הייתה מובהקת (איור B4). יש לציין שההשפעה הבולטת ביותר של TDZ התקבלה למרות שריכוזו ($100 \mu\text{M}$) היה נמוך מזה של ה- BA ($220 \mu\text{M}$). תוספת סוכרוז שיפרה בצורה מובהקת את חיי האגרטל בכל הטיפולים, כשהטיפול המשולב עם TDZ נתן את התוצאות הטובות ביותר (7.4 יום).

2.2.3. פתיחת תפרחות

טיפול הטבילה ב- BA לא שיפר את פתיחת התפרחות, בעוד שטבילה ב- TDZ האיצה באופן מובהק את פתיחת התפרחות ביום 5 באגרטל (איור A5 ו- C). השילוב של טבילה ב- TDZ עם נוכחות הסוכרוז בתמיסת האגרטל האיץ עוד יותר את פתיחת התפרחות ביום 5 (איור A5). לאחר 9 ימים באגרטל לא נמצאה השפעה של הטיפולים בציטוקינינים על פתיחת התפרחות. הוספת סוכרוז בתמיסת האגרטל שיפרה בצורה מובהקת את פתיחת התפרחות בכל הטיפולים, כשהטיפול המשולב עם TDZ נתן את התוצאות הטובות ביותר (איור 5).

3.2.3. מידת הטורגידיות בתפרחות

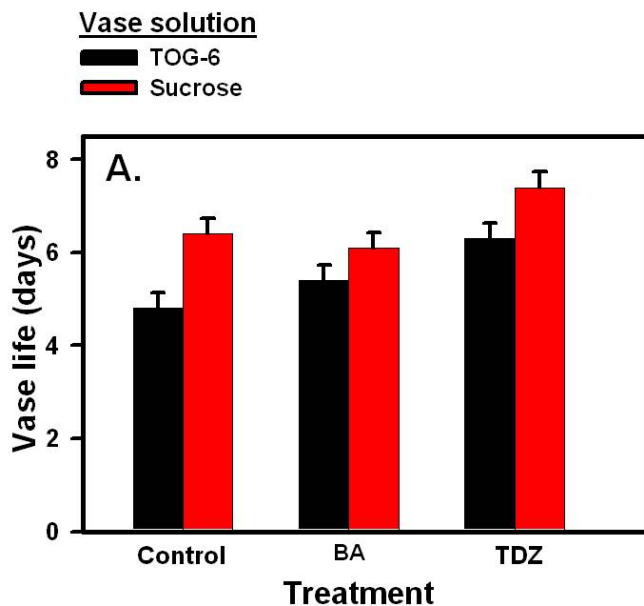
הטורגידיות, המתבטאת במוצקות התפרחות למגע יד, של תפרחות הביקורת ירדה באופן משמעותי כבר ביום השלישי באגרטל, והירידה התחזקה בהמשך עד לדרגת אפס ביום 7 (איור A6). טיפול הטבילה ב- BA וב- TDZ האיט את קצב הירידה בטורגידיות של התפרחות. עד יום 3, שני הציטוקינינים עכבו את הירידה בטורגידיות, ואילו בהמשך רק הטבילה ב- TDZ (הקו הירוק) הייתה יעילה בעיכובו (איור A6). הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל (הקו הצהוב) עיכבה באופן מובהק את הירידה בטורגידיות של התפרחות במשך כל חיי האגרטל בכל הטיפולים. הטיפול המשולב של טבילה ב- TDZ עם סוכרוז באגרטל היה היעיל ביותר במניעת הירידה בטורגידיות, והתפרחות נשארו מוצקות עד לסוף הניסוי למרות הירידה המסוימת בטורגידיות (הקו הורוד באיור A6).

4.2.3. החמת העטיפה של הפרחונים בתפרחת

הזדקנות עלי העטיפה המאוחים של פרחוני גרוויליאה 'ספיידרמן' מתבטאת בהחמתם, במקביל לפירוק של כלורופיל וקרוטנואידים, איבוד מים ונשירה (תמונות 4, 5) באזור הניתוק AZ2 (תמונה 2). בניסוי שתוצאותיו

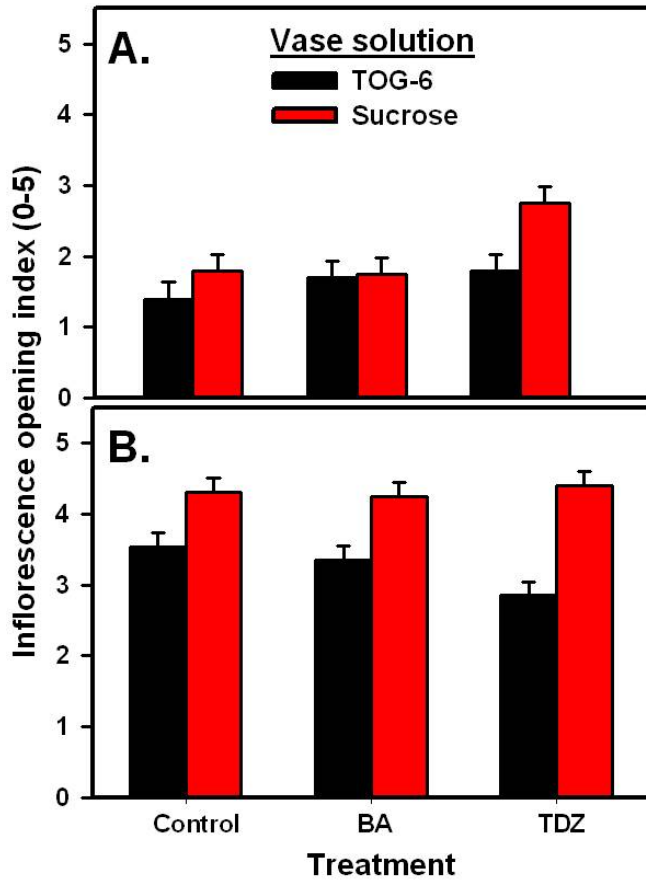
מוצגות באיור A7, ניתן לראות שהחמת העטיף בתפרחות הביקורת (הקו השחור) נצפתה ביום 7, ועד ליום ה- 11 התקבלה החמה מלאה. תוספת סוכרוז באגרטל (הקו הצהוב) עיכבה את ההחמה מיום 7 (איור A7), וההשפעה ביום 9 וביום 11 באגרטל הייתה מובהקת (איור B7). טבילת התפרחות ב- BA (הקו האדום) עיכבה את ההחמה, אך לא באופן מובהק, בעוד שהטבילה ב- TDZ (הקו הירוק) עיכבה באופן מובהק את החמת העטיף (איור A7). טיפולי הטבילה בשני הציטוקינינים בשילוב עם סוכרוז באגרטל (הקווים הכחול והורוד) הראו השפעות אדיטיביות, כאשר הטיפול המשולב של טבילה ב- TDZ וסוכרוז באגרטל עיכב את ההחמה באופן המשמעותי ביותר במשך 13 ימי האגרטל (איור A7).

במתונה 5 מובא מופע של פרח מייצג לאחר הבדיקה ביום 8 באגרטל. בתפרחות הביקורת (תמונה A5) ניתן לראות החמות חמורות בעטיף. בנוסף, עמודי העלי שלא פרצו ולא התיישרו, נראים דקים ורפויים. בתפרחת שנטבלה ב- BA ללא סוכרוז (תמונה B5), נצפתה פחות החמה ופריצה מוגברת של עמודי העלי, אך במספר פרחונים העטיף התנתק ונשאר צמוד לצלקות העלי. בתפרחות שנטבלו ב- TDZ (תמונה C5), ההחמה עוכבה ולא נראתה התנתקות של העטיף בפרחונים שנפתחו ושעמוד העלי שלהם התיישר. מופע מאוד דומה למופע התפרחות שטופלו ב- BA התקבל בתפרחות שטופלו בסוכרוז באגרטל בלבד (תמונה D5). התפרחות שטופלו בטבילה ב- BA במשולב עם סוכרוז באגרטל (תמונה E5) נראו יפה יותר מאלה שטופלו רק באחד מהחומרים האלו, והיו בעלות החמה פחותה, עמודי עלי זקופים וללא התנתקות של העטיף. התפרחות שטופלו בטבילה ב- TDZ במשולב עם סוכרוז באגרטל היו בעלות המופע היפה ביותר לאחר 8 ימי אגרטל בהשוואה לתפרחות משאר הטיפולים (תמונה F5).



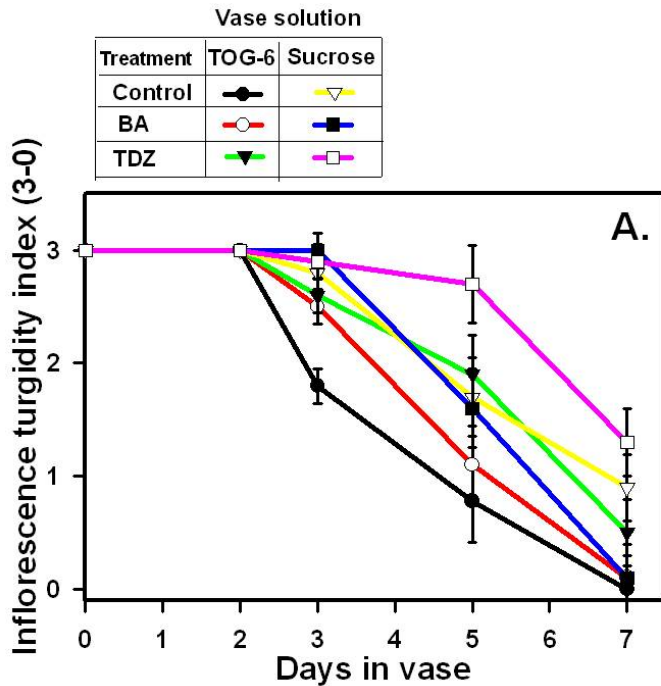
משך חיי האגרטל (ימים)	B. סוג טיפול (A)
5.6 b	ביקורת
5.7 b	טבילה ב- BA
6.8 a	טבילה ב- TDZ
	תמיסת אגרטל (B)
5.5 b	TOG-6
6.6 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי	
***	A
***	B
ל.מ.	B X A

איור 4: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרטל על משך חיי האגרטל (A) של ענפי פריחה של גרוויליאה 'ספיידרמן', וניתוח סטטיסטי של התוצאות (B). ריכוזי הציטוקינינים שנבחנו היו: TDZ 100 μ M ו- BA 220 μ M. שאר פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 2. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 חזרות של ענף פריחה אחד בכלי לכל טיפול. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *** מציינ מובהקות סטטיסטית בניתוח הדו-גורמי ברמה של 0.001; ל.מ. = לא מובהק.



מדד פתיחת תפרחות (5-0)		C.
יום 9	יום 5	
		סוג טיפול (A)
3.9 a	1.6 b	ביקורת
3.8 a	1.7 b	טבילה ב- BA
3.6 a	2.2 a	טבילה ב- TDZ
		תמיסת אגרסל (B)
3.2 b	1.6 b	TOG-6
4.3 a	2.1 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי		
ל.מ.	*	A
***	*	B
ל.מ.	ל.מ.	B X A

איור 5: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על דרגת הפתיחה של תפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' לאחר 5 (A) ו- 9 (B) ימים באגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (C). דרגת הפתיחה של התפרחות הוערכה באופן חזותי עפ"י סולם של 6 דרגות, כאשר 0 = תפרחת בה כל הפרחונים סגורים; 5 = תפרחת בה כל הפרחונים פתוחים לגמרי. התוצאות מבטאות ממוצעים של 4 חזרות של 5 תפרחות כל אחת. שאר פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 4. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.



מדד טורגור בתפרחות (0-3)		B.
5 יום	3 יום	
		סוג טיפול (A)
1.2 b	2.3 b	ביקורת
1.3 b	2.7 a	טבילה ב- BA
2.3 a	2.7 a	טבילה ב- TDZ
		תמיסת אגרסל (B)
1.3 b	2.3 b	TOG-6
2.0 a	2.9 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי		
**	**	A
*	***	B
ל.מ.	ל.מ.	B X A

איור 6: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על מדד הטורגידיות של תפרחות גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרסל (A), וניתוח סטטיסטי של התוצאות הניסוי בוצע כמתואר באיור 4. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 תפרחות \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.01, 0.1, או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

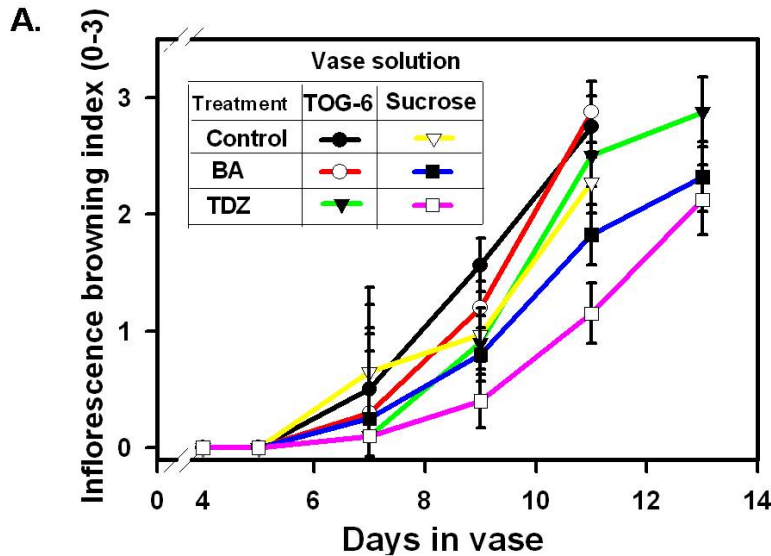
5.2.3. נשירת פרחונים

בענפי הביקורת שהוחזקו באגרסל בכלורין בלבד (הקו השחור) חלה נשירה של הפרחונים כבר ביום 4 באגרסל, שהחמירה מאוד בהמשך (איור A8). נשירת הפרחונים עוכבה באופן משמעותי ע"י הטבילה ב- BA (הקו האדום), ונמנעה לחלוטין ע"י הטבילה ב- TDZ (הקו הירוק). הוספת סוכרוז לתמיסת האגרסל (הקו הצהוב) דחתה את נשירת הפרחונים ביומיים. נמצאה השפעת גומלין מובהקת ביותר בין טיפולי הטבילה בציטוקינינים ונוכחות סוכרוז באגרסל על נשירת הפרחונים (איור B8), והשפעה זו בלטה במיוחד בטיפול המשולב של BA + סוכרוז שמנע את הנשירה לחלוטין עד היום העשירי (הקו הכחול באיור A8). יש לציין שמאחר וטבילת התפרחות ב- TDZ בלבד מנעה לגמרי את נשירת הפרחונים, לא התקבלה בטיפול זה השפעה של תוספת סוכרוז באגרסל.

6.2.3. משקל טרי של ענפי הפריחה

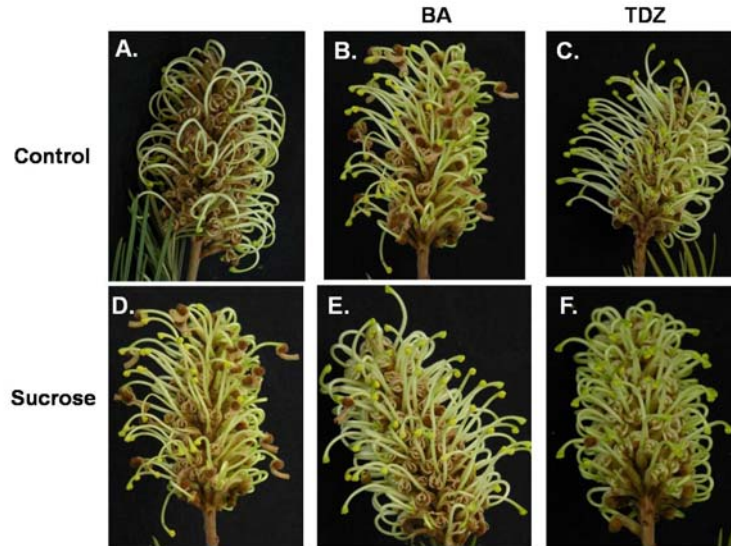
מאזן מים שלילי הנוצר בענפי קטיף של גרוויליאה מהווה בעיה חמורה. בניסוי הנוכחי הוא התבטא בירידה חדה במשקל ענפי הביקורת שחלה כבר לאחר 5 הימים הראשונים באגרסל, עם שינוי בשיפוע של הגרף (הקו השחור באיור A9). הטיפולים ב- BA ו- TDZ בלבד (הקווים האדום והירוק באיור A9) שיפרו באופן משמעותי את מאזן המים, והדבר התבטא בעלייה במשקל הענפים במהלך 5 הימים הראשונים, שלוותה בירידה מתונה במשקלם בטיפולים אלה רק לאחר היום החמישי באגרסל. נוכחות סוכרוז באגרסל (הקו הצהוב באיור A9) שיפרה את העלייה במשקל של ענפי הביקורת במשך שלושת הימים הראשונים באגרסל, אף יותר מאשר הטיפול

בציטוקינינים, אך הירידה במשקל הענפים החלה כבר ביום הרביעי, בקצב הדומה לירידה במשקל של ענפי הביקורת ללא סוכרוז. הטיפול ב- BA בשילוב עם סוכרוז באגרטל (הקו הכחול באיור A9) לא שיפר את משקל הענפים בהשוואה לטיפול בסוכרוז בלבד, ורק ביום השביעי נראה הבדל בין הטיפולים לטובת הטיפול המשולב. לעומת זאת, הטיפול של טבילה ב- TDZ בשילוב עם סוכרוז באגרטל (הקו הירוק באיור A9) גרם לעליה במשקל הענפים, בעיקר במשך חמשת הימים הראשונים באגרטל. כתוצאה מכך ביום 7 משקל הענף הטרי עמד על 101% בהשוואה למשקלו ביום 0, בעוד שמשקל ענפי הביקורת ללא טיפול ירד ל- 87% (איור A9).

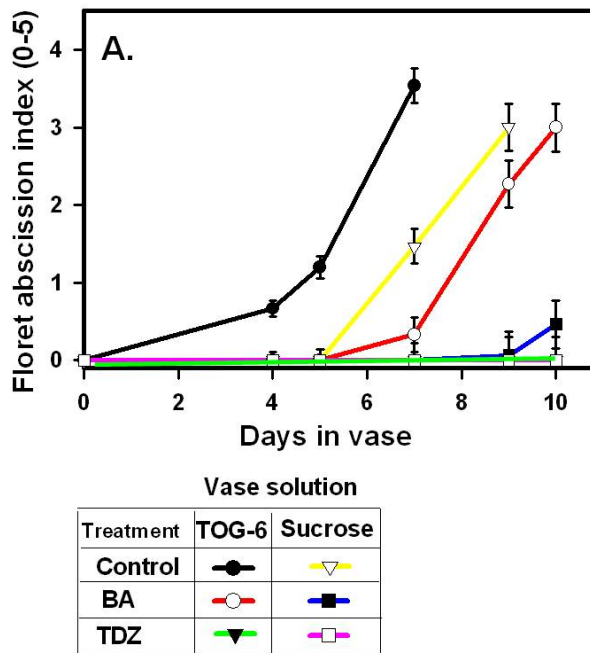


מדד החמה בעטיף (0-3)		B.
11 יום	9 יום	
		סוג טיפול (A)
		ביקורת
2.5 a	1.2 a	טבילה ב- BA
2.3 ab	1.0 ab	טבילה ב- TDZ
1.8 b	0.6 b	תמיסת אגרטל (B)
2.7 a	1.2 a	TOG-6
1.7 b	0.7 b	TOG-6 + סוכרוז
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי		
*	*	A
***	*	B
.ל.מ.	.ל.מ.	B X A

איור 7: השפעת טיפולי טבילה ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרטל על מדד החמת העטיף בתפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרטל (A) וניתוח סטטיסטי של התוצאות (B). הניסוי בוצע כמפורט באיור 4. החמות העטיף הוערכו באופן חזותי עפ"י סולם של 4 דרגות, כאשר 0 = תפרחת ללא החמה בעטיף; 3 = תפרחת עם החמת עטיף מקסימאלית. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 תפרחות ± שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, ***, מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

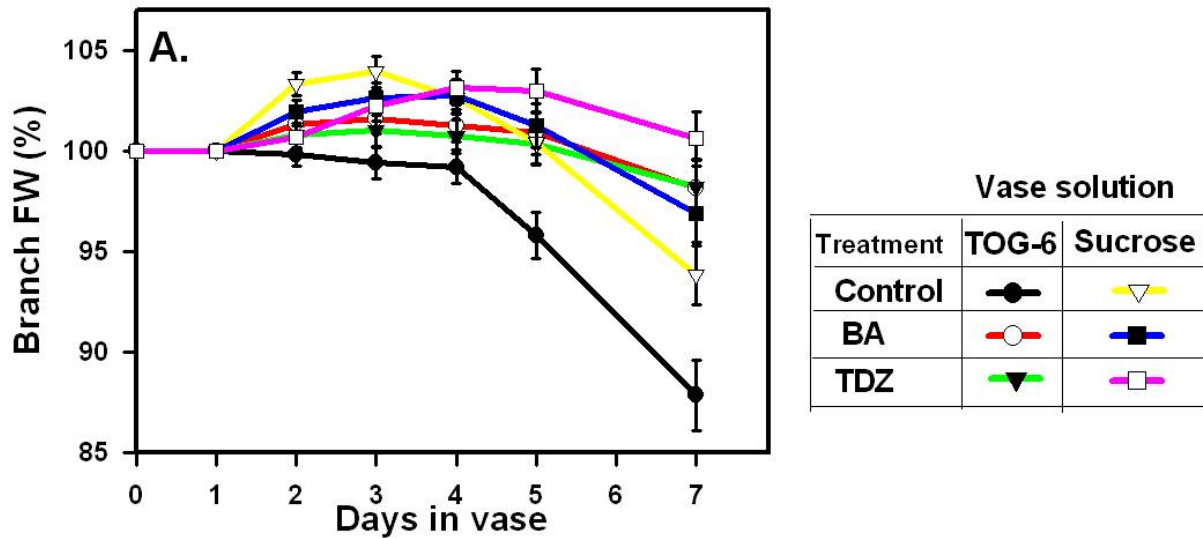


תמונה 5: השפעת טבילה ב- BA (E, B) ו- TDZ (F, C) בהשוואה לביקורת (D, A), בשילוב עם 1% סוכרוז (E, F), בתמיסת האגרטל, על מופע התפרחות של ענפי גרוויליאה 'ספיידרמן' לאחר 8 ימי אגרטל. הניסוי בוצע כמפורט באיור 7.



מדד נשירת פרחונים (5-0)		B.
10 יום	7 יום	
		(A) סוג טיפול
3.26 a	2.50 a	ביקורת
1.73 b	0.17 b	טבילה ב- BA
0.00 c	0.00 b	טבילה ב- TDZ
		(B) תמיסת אגרטל
2.18 a	1.29 a	TOG-6
1.15 b	0.49 b	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי		
***	***	A
***	***	B
***	***	B X A

איור 8: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרטל על מדד נשירת פרחונים מתפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרטל (A) וניתוח סטטיסטי של התוצאות (B). ריכוזי הציטוקינינים בניסוי הם כמפורט באיור 4. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 חזרות של ענף פריחה אחד בכלי לכל טיפול ± שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *** מציינ מובהקות סטטיסטית בניתוח הדו-גורמי ברמה של 0.001.



שינוי במשקל הענף (%)			B. סוג טיפול (A)
7 יום	5 יום	2 יום	
90.8 b	98.1 b	101.5 a	ביקורת
97.5 a	101.1 a	101.6 a	טבילה ב- BA
99.4 a	101.7 a	100.7 a	טבילה ב- TDZ
			תמיסת אגרסל (B)
94.7 a	99.0 b	100.6 b	TOG-6
97.1 a	101.5 a	101.9 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי			
***	**	ל.מ.	A
ל.מ.	**	**	B
ל.מ.	ל.מ.	**	B X A

איור 9: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על שינוי המשקל של ענפי פריחה של גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרסל (A), וניתוח סטטיסטי של התוצאות (B). הניסוי בוצע כמפורט באיור 4. שינוי משקל הענף בכל מועד בדיקה חושב באחוזים ממשקלו בזמן 0. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 חזרות של ענף פריחה אחד בכלי לכל טיפול ± שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

7.2.3. מאזן המים בענפי הפריחה

השינויים במשקל הענף במהלך חיי האגרטל, שהוצגו באיור 9, נבעו משינויים במאזן המים, שהוא היחס בין קצב קליטת המים לבין קצב הטרנספירציה, במהלך חיי האגרטל. כאשר יחס זה גדול מ-1 (הקליטה גדולה מהטרנספירציה) המשקל הטרי של הענף עולה, דבר העשוי להתבטא בגדילה של הענף או של איבריו, ובפרט בגדילת התפרחות. באיור 9 מוצגות התוצאות של שינוי משקל הענפים בתגובה לטיפולים השונים, כולל "נקודות שבירה" במועדים שונים בעקומות, המייצגות למעשה שינוי מגמה מעליה לירידה במשקל. המשמעות היא שבנקודות אלה משתנה היחס של קליטת המים לטרנספירציה מערך גדול מ-1 לערך קטן מ-1. כדי לנתח שינויים אלה בצורה מפורטת, מובאים באיור 10 הנתונים לגבי קצב קליטת המים והטרנספירציה והיחס ביניהם בימים 0-3 (איור 10א'), בימים 3-5 (איור 10ב'), בימים 5-7 (איור 10ג') ובימים 7-10 (איור 10ד') במהלך חיי האגרטל. עד יום 3 ענפי הביקורת שמרו על משקלם, בעוד שהענפים מכל הטיפולים עלו במשקלם, ואכן היחס בין קליטת המים לטרנספירציה לא ירד מ-1 בשלושת הימים הראשונים (איור 10א'). טיפול הטבילה ב-BA הפחית את קצב הטרנספירציה וקליטת המים, אך לא באותה מידה כמו הטיפול ב-TDZ, שהפחית באופן מובהק את קצב הטרנספירציה וקליטת המים. למרות זאת, היחס בין שני המדדים האלה בטיפול השני נשאר גדול מ-1 (1.02) (איור 10א'), דבר שהתבטא בעליה במשקל הענפים (איור 10א'). גם הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל הפחיתה באופן מובהק את הטרנספירציה ואת קליטת המים בכל הטיפולים, ובנוסף גרמה גם לעליה מובהקת ביחס של קליטת המים לטרנספירציה (איור 10א'), דבר המסביר את השפעת הסוכרוז בהעלאת המשקל הטרי בשלושת הימים הראשונים (איור 10א').

הערכים של קצב קליטת המים והטרנספירציה בימים 3-5 (איור 10ב') היו דומים מאוד לערכים המקבילים שהתקבלו בימים 0-3 (איור 10א'). בענפים שנטבלו ב-BA או טופלו בסוכרוז באגרטל, היחס בין קצב קליטת המים וקצב הטרנספירציה היה גדול באופן מובהק מזה שהתקבל בענפי הביקורת (איור 10ב'). הטיפול ב-TDZ הפחית את הטרנספירציה אך לא השפיע על קליטת המים, ולכן היחס בין קצב קליטת המים לקצב הטרנספירציה בימים 3-5 בהשפעת ציטוקינין זה נשאר גדול מ-1 (איור 10ב').

קליטת המים והטרנספירציה בענפי הביקורת פחתו באופן משמעותי בימים 5-7 (איור 10ג'), והגיעו לערכים של כ-40% מאלו שהתקבלו בימים 0-3 (איור 10א'). בנוסף, מאזן המים בימים אלה היה שלילי, דבר שהתבטא בערך של 0.8 לגבי היחס של קליטת המים והטרנספירציה (איור 10ג'). בענפים שנטבלו ב-BA, התקבל ערך ביניים, 0.91, שהיה גבוה באופן מובהק מזה של ענפי הביקורת (איור 10ג'). טיפול הטבילה ב-TDZ שיפר באופן מובהק את קליטת המים, והיחס של קליטת המים לטרנספירציה בימים אלה הגיע לערך של 0.97 (איור 10ג'). ערך זה מייצג אומנם מאזן מים שלילי, אך הטיפול גרם לירידה מתונה בלבד במשקל הענפים בהשוואה לענפי הביקורת (איור 10א'). גם הטיפול בסוכרוז הפחית את קליטת המים והטרנספירציה בימים האלו, אך מאזן המים היה דומה לזה של ענפי הביקורת (איור 10ג'), ולכן קצב הירידה במשקל הענפים שהוחזקו בסוכרוז היה דומה לקצב הירידה במשקל של ענפי הביקורת (איור 10א').

בימים 7-10 התחזקו כל המגמות (איור 10ד') שנצפו בימים 5-7: ירידה בקצב קליטת המים וקצב הטרנספירציה בענפי הביקורת, ערכי ביניים בענפים שנטבלו ב-BA, עליה במדדים אלה בהשפעת TDZ וירידה בהשפעת סוכרוז. מאזן המים השלילי החמיר בענפים מכל הטיפולים, אך עדיין הוא היה טוב יותר באופן מובהק

בענפים שטופלו בציטוקינינים ובעיקר ב-TDZ (איור 10D').

8.2.3. משקל טרי ויבש של הפרחונים

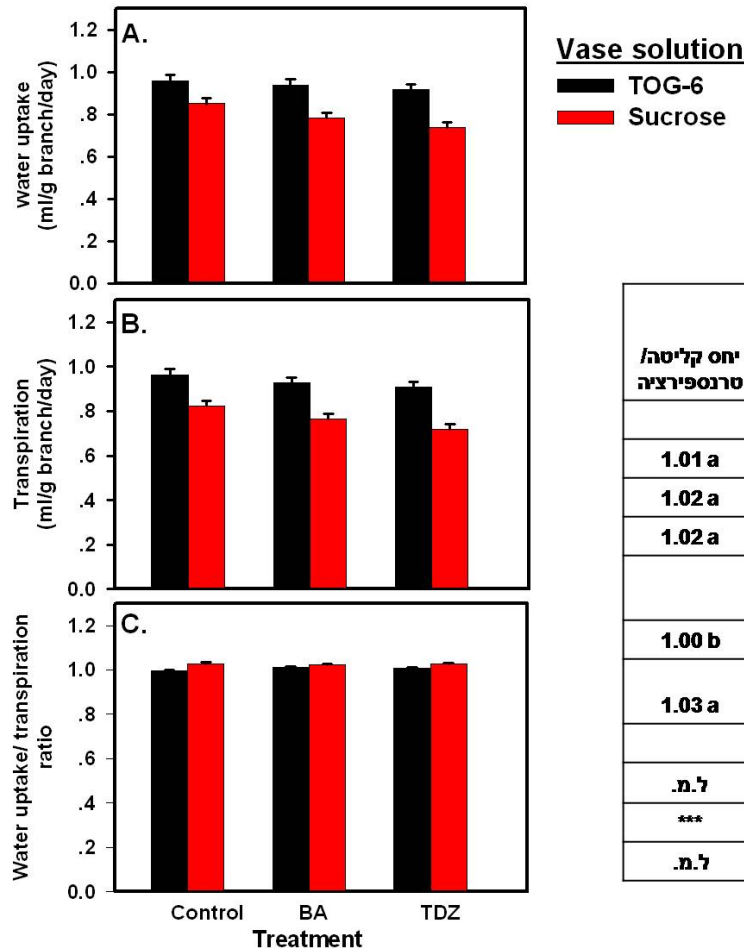
השתנות המשקל הטרי והיבש של עלי העטיף בפרחונים נמדדה במהלך חיי האגרטל עד יום 8 (איור 11). בפרחי הביקורת (הקו שחור), המשקל הטרי (איור A11) והמשקל היבש (איור B11) ירדו בצורה החדה ביותר מיום 2 ואילך באגרטל. טיפול טבילה ב-TDZ (הקו אדום) שמר על משקל טרי גבוה וקבוע במשך 8 ימים (איורים A11, C11), אך הוא לא מנע את הירידה במשקל היבש פרט ליום 8 (איור B11). הוספת סוכרוז לתמיסה (הקו הירוק) מיתנה את איבוד המשקל הטרי (איור A11), וגם את הירידה במשקל היבש מיום 2 ואילך (איור B11). הטיפול המשולב של טבילה ב-TDZ ותוספת סוכרוז באגרטל (הקו הצהוב) העלה בצורה מובהקת את המשקל הטרי של העטיף מיום 2 עד ליום 6 באגרטל, ולאחר מכן חלה ירידה מתונה במשקל (איור A11). תוצאה זו תואמת את שינויי המשקל הטרי של הענפים (איור A9). לעומת זאת, המשקל היבש של העטיף בטיפול המשולב של TDZ וסוכרוז לא היה שונה מהמשקל היבש שהתקבל בטיפול הסוכרוז בלבד (איור B11). ההשפעות של TDZ על המשקל הטרי ושל הסוכרוז על המשקל הטרי והיבש של העטיף היו מובהקות בימים 6 ו-8 באגרטל (איור C11).

המשקל הטרי והיבש של עמוד העלי לא השתנה במהלך חיי האגרטל והוא לא הושפע כמעט מהטיפולים השונים, פרט לכך שתוספת הסוכרוז באגרטל גרמה לעלייה במשקל הטרי בימים 6-8 (תוצאות לא מוצגות).

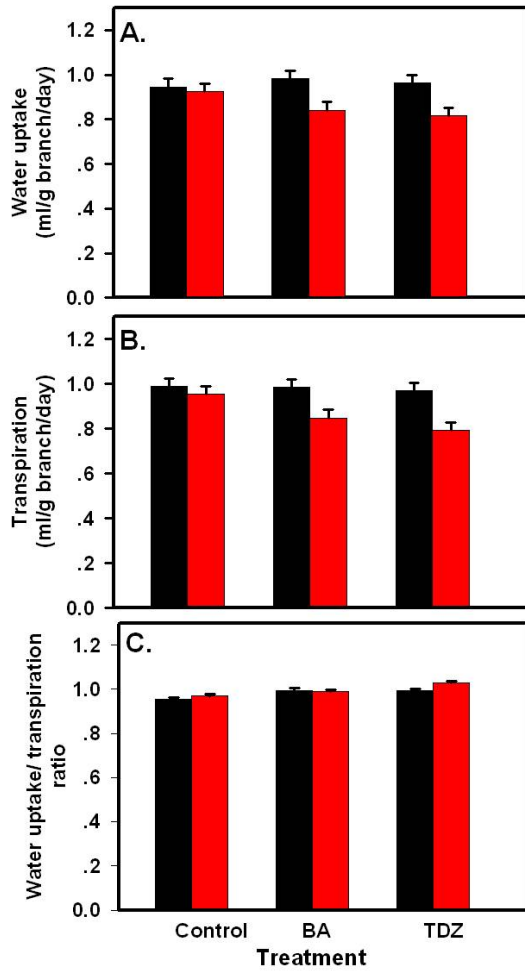
9.2.3. תכולת מים יחסית בפרחונים

תכולת המים היחסית (Relative Water Content = RWC) מבטאת את דרגת המיום של הרקמה. כאשר תכולת המים ברקמה נמוכה גם הטורגידיות נמוכה, וכתוצאה מכך תהיה פגיעה בגדילה ויופיעו תסמינים של כמישה. תכולת המים היחסית בעטיף ביום 0 באגרטל (לאחר 6 שעות) הייתה דומה בכל הטיפולים (איור A12 ו-C). לעומת זאת, ביום 5 נצפו שינויים משמעותיים בתכולת המים: בפרחוני הביקורת, חלה ירידה חדה מאוד מ-78% ל-9.4% (איור B12), מצב המבטא כמישה מהירה של פרחוני הביקורת. טיפולי הטבילה ב-BA ו-TDZ מנעו את הירידה החדה הזו בתכולת המים בעטיף, כאשר ל-BA הייתה באופן מובהק השפעה מיטיבה יותר מ-TDZ (איור B12 ו-C). לתוספת סוכרוז באגרטל הייתה גם כן השפעה מובהקת ביותר על שמירת תכולת המים בעטיף בכל הטיפולים (איור B12).

טבילת התפרחות ב-TDZ או הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל שיפרו את תכולת המים בעמודי העלי של הפרחונים כבר לאחר 6 שעות באגרטל (איור D12). טיפולי הטבילה ב-BA או ב-TDZ שיפרו במידה דומה את תכולת המים בעמודי העלי גם ביום ה-5 באגרטל (איור E12). גם הוספת הסוכרוז שיפרה באופן מובהק את תכולת המים היחסית של עמוד העלי בכל הטיפולים לאחר 5 ימים (איורים E, 12 ו-F). בדומה לממצאים לגבי תכולת המים בעטיף, השפעת הסוכרוז על תכולת המים בעמוד העלי הייתה משמעותית, ללא תלות בטיפול הטבילה בציטוקינינים (איור E12 ו-F).



איור 10א: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ, עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל, על קצב קליטת המים (A), קצב הטרנספירציה (B) והיחס בין קצבי הקליטה והטרנספירציה (C) של ענפי גרוויליאה 'ספידרמן' מיום 0 עד יום 3 באגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 4. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

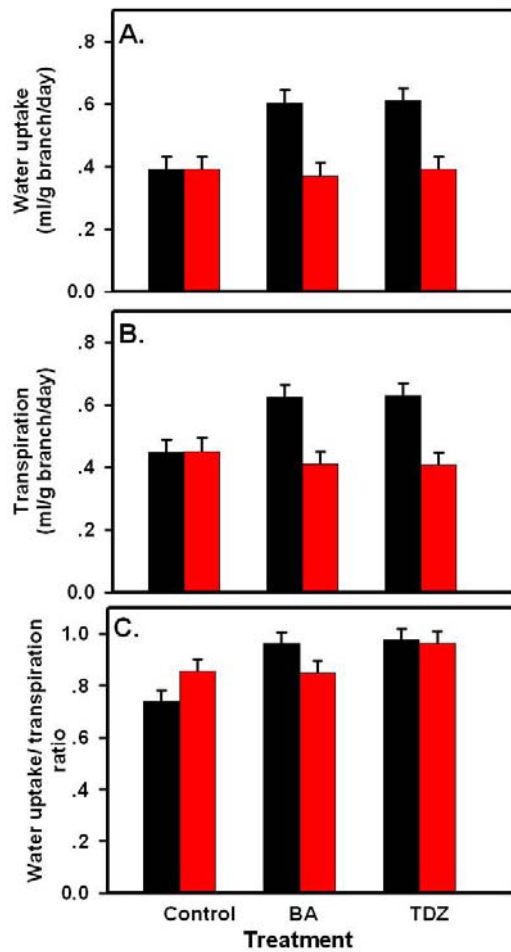


Vase solution

■ TOG-6
■ Sucrose

יחס קליטה / טרנספירציה	קצב טרנספירציה (מ"ג/גורם ענף/ליום)	קצב קליטה (מ"ג/גורם ענף/ליום)	D.
			סוג טיפול (A)
0.96 b	0.97 a	0.94 a	ביקורת
0.99 a	0.92 ab	0.91 a	טבילה ב- BA
1.01 a	0.88 b	0.89 a	טבילה ב- TDZ
			תמיסת אגרסל (B)
0.98 b	0.98 a	0.96 a	TOG-6
1.00 a	0.86 b	0.86 b	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי			
***	*	ל.מ.	A
*	***	***	B
ל.מ.	ל.מ.	ל.מ.	B X A

איור 10: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל, על קצב קליטת המים (A), קצב הטרנספירציה (B) והיחס בין קצבי הקליטה והטרנספירציה (C) של ענפי גרוויליאה 'ספיידרמן' **מיום 3 עד יום 5 באגרסל**, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 4. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, ***, מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

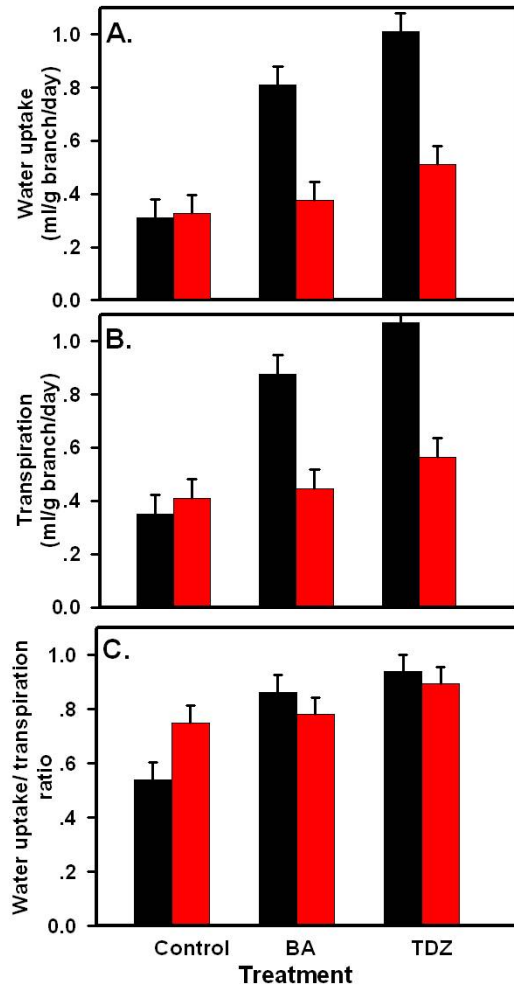


Vase solution

■ TOG-6
■ Sucrose

סוג טיפול (A)	קצב קליטה (מ"ג / גרם ענף/ ליום)	קצב קליטה (מ"ג / גרם ענף/ ליום)	יחס קליטה/טרנספירציה
ביקורת	0.39 b	0.45	0.80 b
טבילה ב- BA	0.48 ab	0.52	0.91 a
טבילה ב- TDZ	0.51 a	0.52	0.97 a
תמיסת אגרסל (B)			
TOG-6	0.54 a	0.57 a	0.89 a
סוכרוז + TOG-6	0.39 b	0.42 b	0.89 a
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי			
A	*	ל.מ.	***
B	***	***	ל.מ.
B X A	**	*	*

איור 10: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ, עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל, על קצב קליטת המים (A), קצב הטרנספירציה (B) והיחס בין קצבי הקליטה והטרנספירציה (C) של ענפי גרוויליאה 'ספידרמן' **מיום 5 עד יום 7 באגרסל**, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 4. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

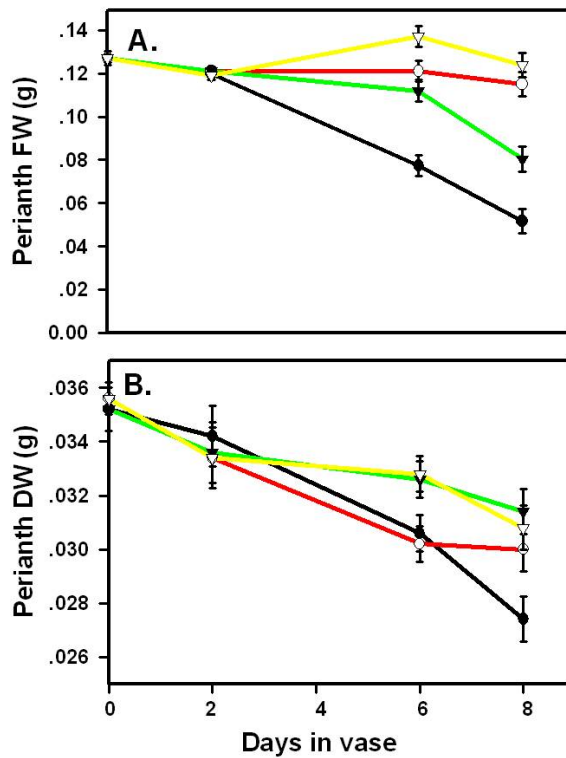


Vase solution

■ TOG-6
■ Sucrose

יחס קליטה / טרנספירציה	קצב טרנספירציה (מ"ג/גרם ענף/ליום)	קצב קליטה (מ"ג/גרם ענף/ליום)	D.
			סוג טיפול (A)
0.64 b	0.38 b	0.32 c	ביקורת
0.82 a	0.66 a	0.59 b	טבילה ב- BA
0.92 a	0.82 a	0.76 a	טבילה ב- TDZ
			תמיסת אגרסל (B)
0.78 a	0.76 a	0.71 a	TOG-6
0.81 a	0.47 b	0.41 b	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי			
***	***	***	A
ל.מ.	***	***	B
*	***	***	B X A

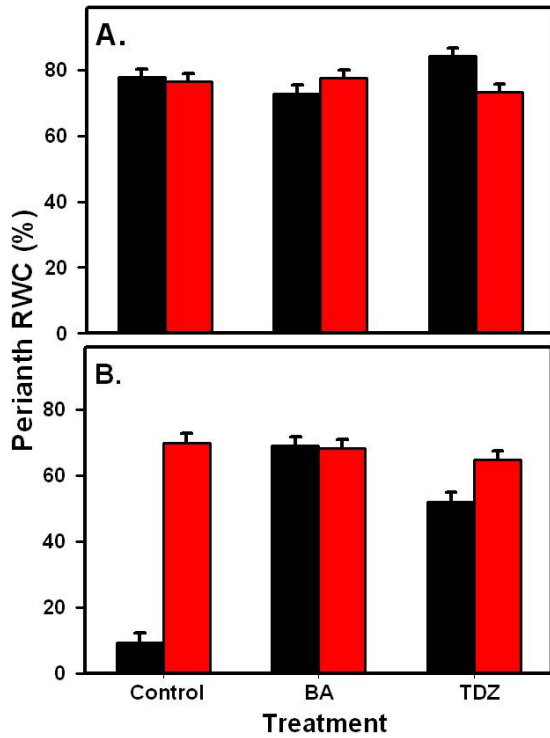
איור 10: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ, עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל, על קצב קליטת המים (A), קצב הטרנספירציה (B) והיחס בין קצבי הקליטה והטרנספירציה (C) של ענפי גרוויליאה 'ספידרמן' **מיום 7 עד יום 10 באגרסל**, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 4. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.



Vase solution	
Treatment	TOG-6 Sucrose
Control	● ▼
TDZ	○ ▽

משקל עלי עטיף (גרם)				C.
משקל יבש		משקל טרי		
8 יום	6 יום	8 יום	6 יום	
				סוג טיפול (A)
0.029 a	0.032 a	0.066 b	0.090 b	ביקורת
0.030 a	0.031 a	0.120 a	0.129 a	טבילה ב-TDZ
				תמיסת אגרסל (B)
0.028 b	0.030 b	0.083 b	0.099 b	TOG-6
0.032 a	0.034 a	0.102 a	0.125 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי				
.ל.מ.	.ל.מ.	***	***	A
*	**	**	***	B
.ל.מ.	.ל.מ.	.ל.מ.	.ל.מ.	B X A

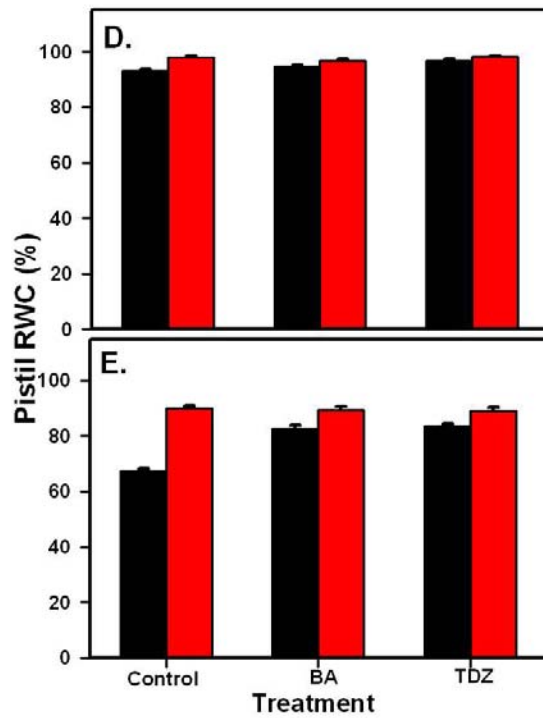
איור 11: השפעת טיפול טבילה של התפרחת ב-TDZ עם 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על המשקל טרי (A) והיבש (B) של העטיף בפרחונים של גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (C). ריכוז הציטוקינין TDZ 100 μ M. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות של 3 עלי עטיף לכל טיפול בכל מועד בדיקה \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.01, 0.1 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.



Vase solution

■ TOG-6
■ Sucrose

תכולת מים יחסית של העטיף (%)		C.
5 יום	0 יום (6 שעות)	
		סוג טיפול (A)
39.7 c	77.1 a	ביקורת
68.6 a	75.1 a	טבילה ב- BA
58.4 b	78.7 a	טבילה ב- TDZ
		תמיסת אגרסל (B)
43.5 b	78.2 a	TOG-6
67.6 a	75.7 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי		
***	ל.מ.	A
***	ל.מ.	B
***	*	B x A



תכולת מים יחסית בעמוד העלי (%)		F.
5 יום	0 יום (6 שעות)	
		סוג טיפול (A)
78.5 b	95.6 b	ביקורת
85.9 a	95.6 b	טבילה ב- BA
86.2 a	97.5 a	טבילה ב- TDZ
		תמיסת אגרסל (B)
77.7 b	94.9 b	TOG-6
89.4 a	97.6 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי		
***	**	A
***	***	B
***	*	B x A

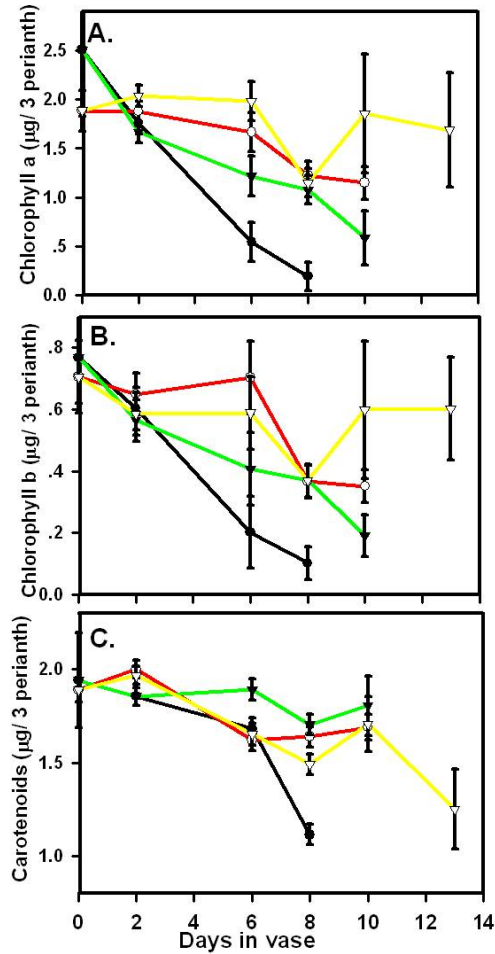
איור 12: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם וללא 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על % תכולת המים היחסית (RWC) של העטיף (A, B) ועמודי העלי (D, E) של פרחוני גרוויליאה 'ספיידרמן' לאחר 6 שעות (A, D) או 5 ימים (B, E) באגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (C, F). פרטי הניסוי הם כמפורט באיור 4. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות של 3 פרחונים כל אחת. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

10.2.3. רמת הפיגמנטים בפרחונים

הזדקנות איברי הפרחונים, העטיף ועמוד העלי, מתבטאת באיבוד מים והחמה המלווה גם בפירוק של כלורופיל וקרוטנואידים. נבחנה השפעת הטיפולים השונים על השינויים בהרכב הפיגמנטים בעטיף ובעמוד העלי במהלך חיי האגרטל. תכולת הכלורופיל (a ו-b) בעטיף של פרחוני הביקורת (הקו השחור) ירדה בצורה חדה מיום 2 ועד ליום 8 באגרטל, בו כל הפרחים נפסלו (איור A13 ו-B). טבילת התפרחות ב-TDZ (הקו האדום) עיכבה במידה רבה את הירידה ברמה של הכלורופיל עד ליום 10 (איור A13 ו-B). גם התוספת של סוכרוז לתמיסת האגרטל (הקו הירוק) עיכבה את הירידה ברמה של הכלורופיל, אך במידה קטנה יותר מהשפעת הטבילה ב-TDZ (איור A13 ו-B). הטיפול המשולב של TDZ + סוכרוז (הקו הצהוב) עיכב את פירוק הכלורופיל בדומה לטיפול הטבילה ב-TDZ בלבד עד היום השמיני באגרטל, ולאחר מכן, ביום 10, התקבלה עליה ברמת הכלורופיל, והיא נשארה גבוהה עד ליום 12. הירידה ביום 8 נבעה כנראה מסיבה טכנית. לא ברורה הסיבה לירידות ולעליות ברמת הכלורופיל שנמצאו בין הימים 6-10, אך ביום 10 רמת הכלורופיל בפרחונים בהשפעת הטיפול המשולב של TDZ + סוכרוז הייתה גבוהה באופן מובהק מרמתו בשאר הטיפולים. השוני במועדי בדיקות הפיגמנטים נבע ממשך חיי אגרטל שונה של הפרחונים: פרחוני הביקורת של הטיפולים השונים נפסלו כולם כבר ביום השמיני, הפרחונים שנטבלו ב-TDZ או קיבלו תוספת סוכרוז באגרטל נפסלו לאחר היום העשירי, ואילו הפרחונים שטופלו בטיפול המשולב (TDZ + סוכרוז) היו יפים וחיוניים גם לאחר יום 13 (תוצאות לא מובאות).

בניגוד לכלורופיל, הירידה בתכולת כלל הקרוטנואידים בפרחי הביקורת הייתה מתונה יותר עד יום 6, ורק בין יום 6 ל-8 היא הייתה חדה יותר (איור C13). טיפול הטבילה ב-TDZ, תוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל והטיפול המשולב של TDZ + סוכרוז עכבו את הירידה בתכולת הקרוטנואידים במידה דומה אך רק לאחר יום 6, כאשר בפרחונים מהטיפול המשולב התקבלה תכולת קרוטנואידים גבוהה יחסית גם לאחר יום 13 (איור C13). ההשפעות המובהקות של טיפול הטבילה ב-TDZ על תכולת הפיגמנטים בעטיף בהשוואה לביקורת התקבלו בימים 2 עד 8 באגרטל (איור D13).

הירידה בכלורופיל a ו-b בעמודי העלי של פרחוני הביקורת הייתה מתונה יותר (איור A14 ו-B) בהשוואה לירידתם בעטיף (איור A13 ו-B). תוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל כמעט ולא השפיעה על הרמה של כלורופיל a בעמודי העלי עד יום 8 (הקו הירוק, איור B14) בהשוואה לביקורת, אך מנעה את הירידה בכלורופיל b ואף גרמה לעליה ברמתו בין יום 8 ליום 10 (איור B14). טיפול הטבילה ב-TDZ (קו אדום) מנע את הירידה בכלורופיל a ו-b, ואף גרם לעלייה בתכולתם לאחר יום 6 (איור A14 ו-B). הטיפול המשולב של טבילה ב-TDZ וסוכרוז באגרטל (קו צהוב) שמר על רמה גבוהה של כלורופיל a ו-b במשך 10 ימים, שאף עלתה עד ליום 12, וכן גרם להקדמת העלייה בכלורופיל b, שהייתה מובהקת מאוד כבר ביום השני באגרטל (איור A14 ו-B). בניגוד לכלורופיל, הטיפולים ב-TDZ בנפרד ובמשולב לא השפיעו על הירידה בתכולת הקרוטנואידים בעמוד העלי עד יום 6 או יום 8 באגרטל, בהתאמה, כשלאחר מכן נצפתה עליה מסוימת בהשפעת טיפול הטבילה ב-TDZ והטיפול המשולב של TDZ + סוכרוז (איור C14).

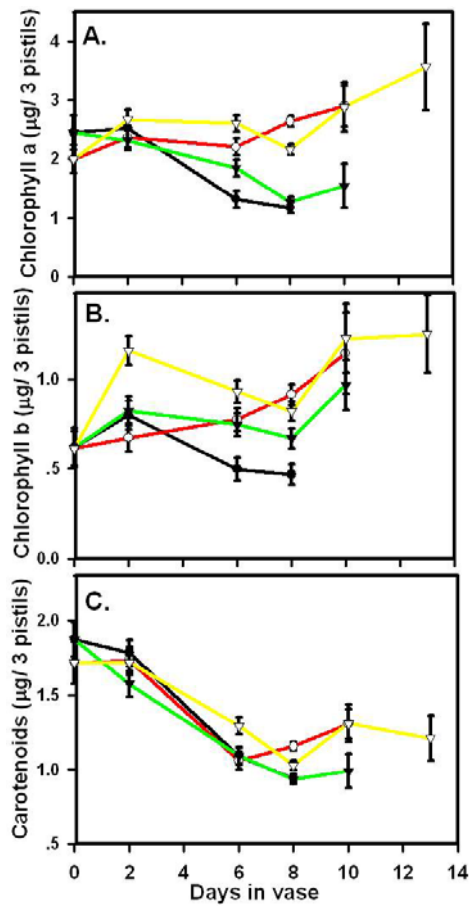


Vase solution

Treatment	TOG-6	Sucrose
Control	●	▼
TDZ	○	▽

קרוטנואידים ($\mu\text{g}/3$ perianth)		כלורופיל b ($\mu\text{g}/3$ perianth)		כלורופיל a ($\mu\text{g}/3$ perianth)		D.
8 יום	2 יום	8 יום	6 יום	6 יום	2 יום	
(A) סוג טיפול						
1.4 b	1.9 b	0.2 b	0.3 b	0.9 b	1.7 b	ביקורת
1.6 a	2.0 a	0.4 a	0.6 a	1.8 a	1.9 a	טבילה ב-TDZ
(B) תמיסת אגרסל						
1.4 b	1.9 a	0.2 b	0.4 a	1.1 b	1.8 a	TOG-6
1.6 a	1.9 a	0.4 a	0.5 a	1.6 a	1.8 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי						
*	*	**	**	***	*	A
***	ל.מ.	**	ל.מ.	*	ל.מ.	B
***	ל.מ.	**	ל.מ.	ל.מ.	ל.מ.	B X A

איור 13: השפעת טיפול טבילה של התפרחת ב-TDZ עם 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על השינויים בתכולת כלורופיל a (A), כלורופיל b (B) וכלל קרוטנואידים (C) **בעטיפ** של פרחוני גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). פרטי הניסוי הם כמפורט באיור 11. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות של 3 עלי עטיפ כל אחת \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח דו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.



Vase solution

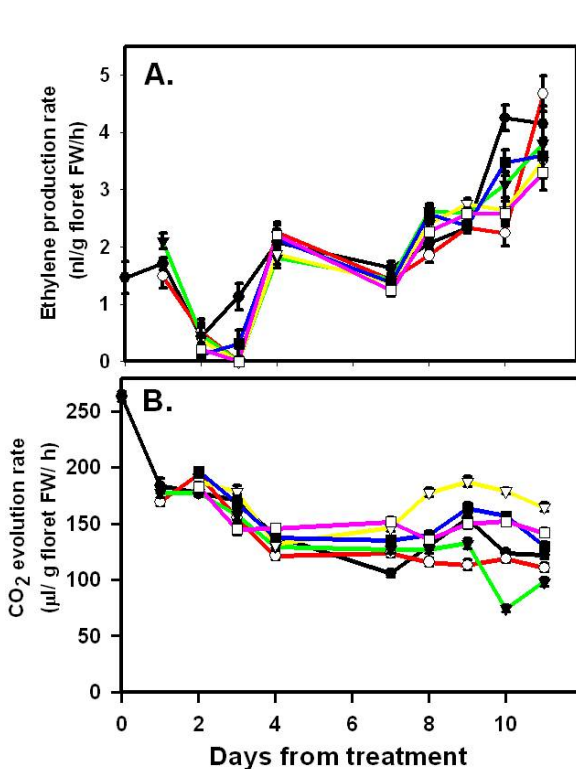
Treatment	TOG-6	Sucrose
Control	●	▼
TDZ	○	▽

קרוטנואידים (µg/ 3 pistils)		כלורופיל ב (µg/ 3 pistils)		כלורופיל a (µg/ 3 pistils)		D.
8 יום	6 יום	8 יום	6 יום	8 יום	6 יום	
						(A) סוג טיפול
0.9 b	1.1 a	0.6 b	0.6 b	1.2 b	1.6 b	ביקורת
1.1 a	1.2 a	0.9 a	0.8 a	2.4 a	2.4 a	טבילה ב-TDZ
						תמיסת אגרסל (B)
1.0 a	1.1 b	0.7 a	0.6 b	1.9 a	1.7 b	TOG-6
0.9 b	1.2 a	0.7 a	0.8 a	1.72 b	2.2 a	סוכרוז TOG-6+
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי						
***	.n.ל	***	**	***	***	A
*	*	.n.ל	**	*	**	B
.n.ל	.n.ל	*	.n.ל	**	.n.ל	B X A

איור 14: השפעת טיפול טבילה של התפרחת ב-TDZ עם 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על השינויים בתכולת כלורופיל a (A), כלורופיל b (B) וקרוטנואידים (C) **בעמודי העלי** של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). פרטי הניסוי הם כמפורט באיור 11. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות של 3 עמודי עלי כל אחת ± שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

11.2.3. ייצור אתילן וקצב הנשימה בפרחונים

השפעות של חומרים שונים המעכבים הזדקנות בפרחים קלימקטריים, כגון סוכרים, ג'יברלינים, ציטוקינינים, אתנול ועוד (ראה פירוט בדיון) מוסברות בין השאר באמצעות השפעתם על הפחתת קצב ייצור האתילן והנשימה בפרחים. לכן, נבחנה השפעת טיפולי הטבילה בציטוקינינים וכן הוספת הסוכרוז לאגרסל על קצב ייצור האתילן וקצב הנשימה של הפרחונים במהלך חיי האגרסל. התוצאות מראות שייצור האתילן בפרחוני הביקורת ירד בין היום הראשון לרביעי, ולאחר מכן עלה באופן הדרגתי עד לסוף הניסוי ביום 11 (איור A15). באופן כללי לטיפולים בציטוקינינים וסוכרוז לא הייתה השפעה על קצב ייצור האתילן עד ליום 8 באגרסל. רק בימים 8-11 טיפולי הטבילה בשני סוגי הציטוקינינים ותוספת הסוכרוז שניתנה במשולב מיתנו את העלייה בייצור האתילן בהשוואה לביקורת ולטיפול בסוכרוז בלבד (איור A15 ו-C). גם ההשפעה של הטיפולים השונים על קצב הנשימה הייתה קטנה מאוד עד יום 8. רק מיום זה ואילך נמצאו השפעות שונות של הטיפולים, שהתבטאו בעיכוב נשימה ע"י הטיפולים בציטוקינינים ובהגברת הנשימה ע"י הטיפול בסוכרוז, בעיקר כשהוא ניתן בנפרד (איור B15 ו-C).



Vase solution						
Treatment	TOG-6	Sucrose				
Control	●	▼				
BA	○	■				
TDZ	▽	□				

C.	קצב נשימה (מיקרו ליטר/ גרם פרחונים טריים/ לשעה)			קצב ייצור אתילן (נמוליטר/ גרם פרחונים טריים/ לשעה)		
	10 יום	7 יום	4 יום	10 יום	9 יום	8 יום
סוג טיפול (A)						
ביקורת	151 a	126 b	135 ab	3.2	2.3 b	1.9 b
טבילה ב- BA	138 b	129 b	130 b	3.0	2.5 ab	2.4 a
טבילה ב- TDZ	113 c	139 a	138 a	2.9	2.6 a	2.5 a
תמיסת אגרסל (B)						
TOG-6	106 b	119 b	130 b	3.6 a	2.5 a	2.4 a
סוכרוז + TOG-6	163 a	144 a	138 a	2.5 b	2.5 a	2.2 b
ניתוח סטטיסטי דו- גורמי						
	***	***	*	ל.מ.	*	***
A						
B	***	***	**	***	ל.מ.	*
B X A	***	***	***	**	ל.מ.	ל.מ.

איור 15: השפעת טיפולי טבילה של התפרחת ב- BA ו- TDZ עם 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על קצב ייצור אתילן (A) וקצב הנשימה (B) של פרחוני גרוויליאה 'ספידרמן' במהלך חיי האגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (C). פרטי הניסוי הם כמפורט באיור 4. בכל מועד בדיקה נכלאו פרחונים בארלנמיירים למשך שעתיים ונקבע ריכוז הגזים שהצטברו בכלי. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות של פרחונים לכל טיפול ± שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.01, 0.1 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

3.3. בחינת ההשפעה של טיפולי טבילה של תפרחות גרוויליאה בציטוקינינים בשילוב עם

הוספת סוכרוז באגרטל על הקליטה, ההובלה וההרכב של הפחמימות במהלך חיי האגרטל

1.3.3. קליטת סוכרוז והובלתו בענף הקטוף

לסוכרים יש תפקיד חשוב בהספקת אנרגיה לנשימה, בתהליכי גדילה ופתיחה של פרחים קטופים, וכן ביצירה של הפוטנציאל האוסמוטי ובשמירתו. כדי ללמוד על תנועת הסוכר מתמיסת האגרטל אל הענף הקטוף ומידת הובלתו לאיברי הפרח השונים, בחנו בשלב הראשון את רמת הרדיואקטיביות של סוכרוז מסומן ברקמות הענף, לאחר הדגרת ענף הפריחה בתמיסת סוכרוז מסומן בנוכחות או בהעדר סוכרוז לא מסומן.

מהתוצאות המוצגות באיור A16 ו-G ניתן לראות שרמת הרדיואקטיביות בענפי הביקורת הייתה נמוכה יחסית בהשוואה לענפים המטופלים, וכן נראה פיזור אחיד של הרדיואקטיביות בכל חלקי הענף ב- 24 השעות הראשונות באגרטל. לעומת זאת, במועד המאוחר יותר (72 שעות) הרדיואקטיביות פחתה בגבעול ובעלים והתרכזה בעיקר בתפרחות, כנראה כתוצאה מהובלה מוגברת של סוכר אל התפרחת ו/או ממטבוליזם שלו בתהליך הנשימה. בניגוד לכך, בנוכחות סוכרוז לא מסומן בתמיסת האגרטל (איור B16 ו-H) נמשכה ההצטברות של רדיואקטיביות בתפרחות, בעלים ובגבעול עם הזמן, ממצא המראה שהסוכר המשיך להיות מובל אל התפרחת המשמשת כמבלע. טיפולי הטבילה ב- BA (איור C16 ו-I) או ב- TDZ (איור E16 ו-K) הגבירו בשני המועדים את הצטברות הרדיואקטיביות הן בתפרחות והן בעלים ובגבעול בהשוואה לענפי הביקורת (איור A16 ו-G). מגמה זו הוגברה לאחר 72 שעות בהשפעת הטיפול המשולב של טבילה בציטוקינינים בנוכחות סוכרוז לא מסומן בתמיסה (איור J16 ו-L), שהייתה בולטת יותר במועד זה מהצטברות הרדיואקטיביות בהשפעת הסוכרוז (איור H16) או הציטוקינינים בלבד (איור I16 ו-K). תוצאה זו תומכת בהנחת המחקר, שציטוקינינים מגבירים את חוזק המבלע של התפרחות, ועקב כך ישנה משיכה רבה יותר של סוכרים אליהן.

2.3.3. תכולת עמילן וסוכרים מסיסים בפרחונים

בניסוי זה נבחנה השפעת הטיפולים השונים על תכולת העמילן, שנקבע בשיטה קולורימטרית, ועל תכולת הסוכרים המסיסים, שנקבעה באמצעות HPLC, בפרחונים. באיור 17 מוצגת דוגמא מייצגת של אנליזת HPLC של פרופיל הסוכרים בפרחונים ביום 8 באגרטל בהשפעת טיפולים שונים. כל הסוכרים המצוינים להלן להוציא סוכרוז, שרמתו הייתה נמוכה יחסית, הופיעו בכל הטיפולים. השיא הראשון הוא של סוכר לא מזוהה A. השיא שהתקבל לאחר 7.8 דקות מתאים לסוכרוז (איור B17). השיא לאחר 9.7 דקות מתאים לגלוקוז, השיא לאחר 10.4 דקות הוא סוכר לא מזוהה B, השיא לאחר 11.6 דקות מתאים לפרוקטוז והשיא לאחר 14 דקות הוא סוכר לא מזוהה C (איור A17, B, C, ו-D).

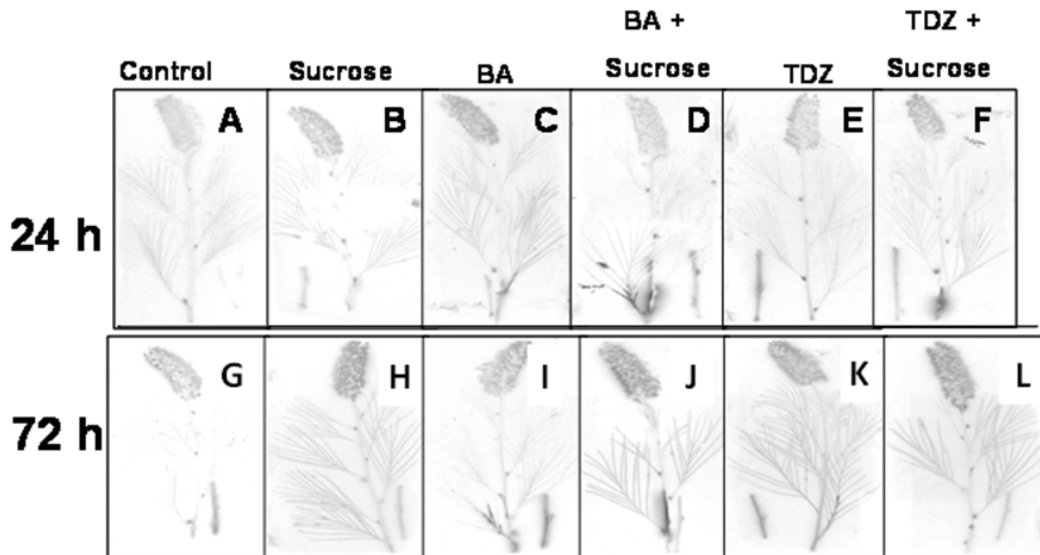
תכולת העמילן בפרחונים במועד הקטיף הייתה כ- 2 מ"ג לגר' משקל יבש (איור A18). רמה זו מהווה פחות מ- 10% מכלל הפחמימות בפרחונים, שכן תכולת הסוכרים המסיסים (גלוקוז + פרוקטוז + סוכרוז) בפרחונים הייתה כ- 22 מ"ג לגר' משקל יבש (איור B18, C, ו-D). זאת מבלי לקחת בחשבון את הסוכרים הלא מזוהים (איור 19). תכולת העמילן בפרחוני הביקורת לא השתנתה משמעותית במשך 8 ימי אגרטל, והיא לא הושפעה מטיפול הטבילה ב- TDZ ו/או מתוספת סוכרוז באגרטל (איור A18). תוצאות אלו מצביעות על כך, שפרחוני גרוויליאה אינם אוגרים עמילן כמאגר לסוכרים מסיסים בזמן פתיחת התפרחות באגרטל. עם זאת, בטיפול המשולב של TDZ +

סוכרוז הייתה עליה ברמת העמילן בימים 10 ו-14 (איור A18).

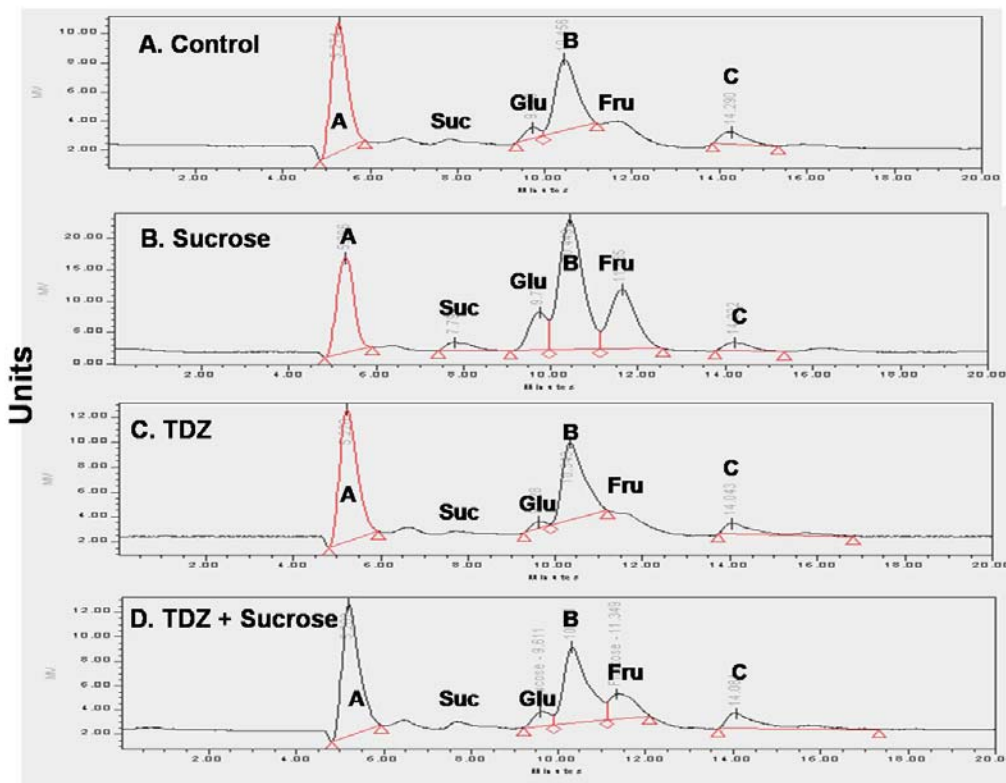
בפרחוני הביקורת, חלה ירידה חדה ברמת הסוכרוז לאחר יום 3 באגרטל, שהתייצבה רק מיום 6 ואילך (איור B18). טיפול הטבילה ב-TDZ (הקו הירוק) לא השפיע על תכולת הסוכרוז בפרחונים, בעוד שנוכחות סוכרוז באגרטל (הקו האדום) העלתה בצורה משמעותית את תכולת הסוכרוז בהם עד יום 6 באגרטל, ורק לאחר מכן חלה ירידה מסוימת ברמה, אם כי תכולת הסוכרוז ביום 8 נותרה עדיין גבוהה יותר באופן מובהק מזו של פרחוני הביקורת (איור B18). השילוב של TDZ עם סוכרוז (הקו הצהוב) גרם להקדמת העלייה בתכולת הסוכרוז, שבלטה ביום 3 באגרטל. בהמשך חלה ירידה חדה בתכולה עד ליום 8 באגרטל, שלוותה לאחר מכן שוב בעלייה מובהקת ברמת הסוכרוז עד ליום 14 (איור B18).

רמות הגלוקוז (איור C18) והפרוקטוז (איור D18) הראו מגמות השתנות דומות מאוד במהלך חיי האגרטל. בפרחוני הביקורת (הקו השחור) ובפרחונים שנטבלו ב-TDZ (הקו הירוק), נראתה עלייה מתונה בסוכרים אלו עד יום 3, שלוותה בירידה חדה עד לימים 6-8 באגרטל. הירידה בסוכרים אלו הייתה חדה יותר בטיפול הטבילה ב-TDZ, ורמתם נשארה נמוכה עד ליום 10 באגרטל (איורים C18, D). הוספת סוכרוז לאגרטל (הקו האדום) שמרה על תכולה יציבה של שני החזד-סוכרים, ואף גרמה לעלייה בתכולתם ביום השמיני (איור C17 ו-D). לעומת זאת, תכולת החזד-סוכרים הנ"ל בפרחונים שטופלו במשולב ב-TDZ + סוכרוז (הקו הצהוב) לא הייתה שונה מהותית מזו שבפרחונים שנטבלו ב-TDZ בלבד, למעט העלייה ברמתם ביום העשירי (איור C18 ו-D).

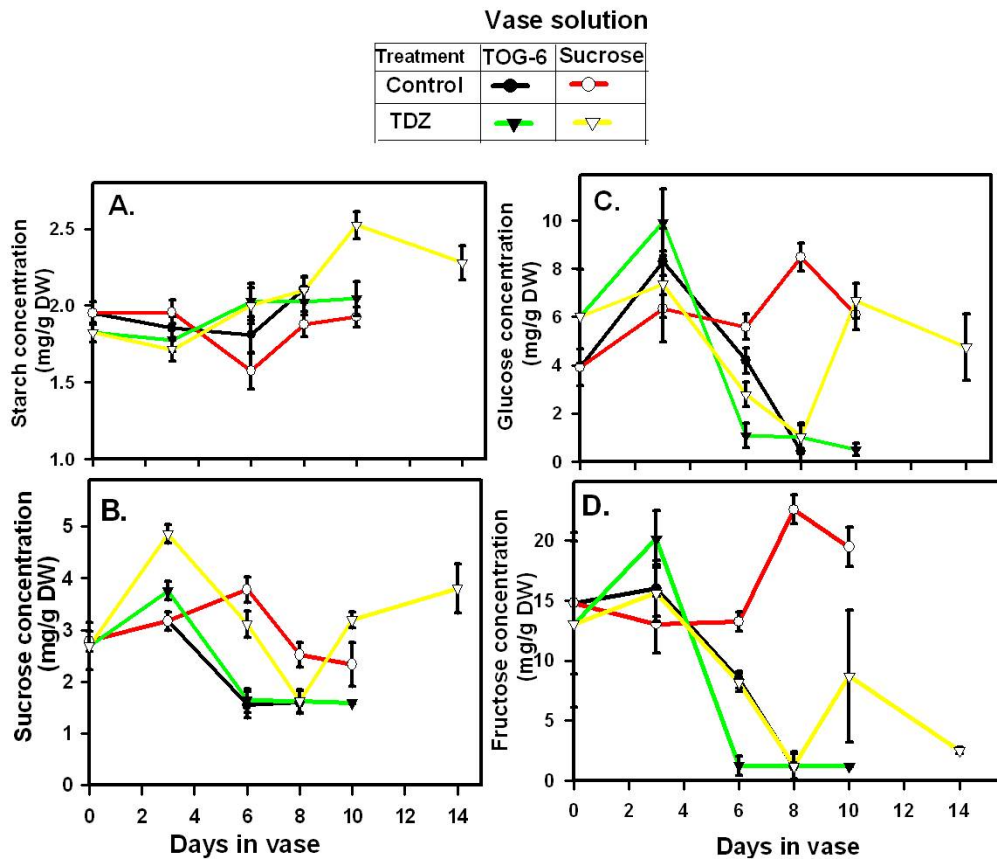
באנליזה של הסוכרים ב-HPLC התקבלו שלושה שיאים נוספים שלא זוהו ולא התאימו לסטנדרטים שנבחנו (איור 19). האומדן של תכולת הסוכרים האלה הנו יחסי, והוא נעשה לפי שטח השיא. תכולת סוכר A לא השתנתה כמעט במהלך חיי האגרטל ולא הושפעה מהטיפול השונים, למעט עלייה משמעותית שנמצאה ביום העשירי בפרחונים שטופלו ב-TDZ + סוכרוז (הקו הצהוב באיור A19). יש לציין שהשינויים בתכולת הסוכר הזה בטיפול המשולב (איור A19) היו דומים מאוד לשינויים שהתקבלו לגבי עמילן בטיפול זה (איור A18). תכולת הסוכרים B ו-C בפרחוני הביקורת ירדה לאחר יום 3 (קו שחור באיורים B19, C). הטבילה ב-TDZ (קו ירוק) השפיעה באופן שונה על תכולת שני הסוכרים הנ"ל וגרמה להעלאת הרמה של סוכר B ביום 3 (איור B19) ולהגברת הירידה ברמת סוכר C (איור C19). הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל (הקו האדום) שמרה על תכולה יציבה פחות או יותר של סוכר B במשך 10 ימים (איור B19), והעלתה בצורה משמעותית את הרמה של סוכר C עד ליום 6 באגרטל (איור C19). השינויים בתכולת סוכרים אלה בפרחונים שטופלו במשולב ב-TDZ + סוכרוז (הקו הצהוב באיור B19 ו-C) היו דומים ביותר לשינויים שהתקבלו בתכולת הגלוקוז והפרוקטוז בהשפעת טיפול זה (איור C18 ו-D).



איור 16: רדיוגרמה המציגה את ההשפעה של הוספת 1% סוכרוז בתמיסת האגרטל (B, H), של טיפולי הטבילה של התפרחת ב-BA (C, I) ו-TDZ (E, K) והשילוב בין שני סוגי הטיפולים (D, F, J, L) בהשוואה לענפי ביקורת שלא טופלו (A, G) על פיזור סוכרוז רדיואקטיבי [¹⁴C] בענפי גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך 3 ימי אגרטל. ריכוזי הציטוקינינים הם כמפורט באיור 2.

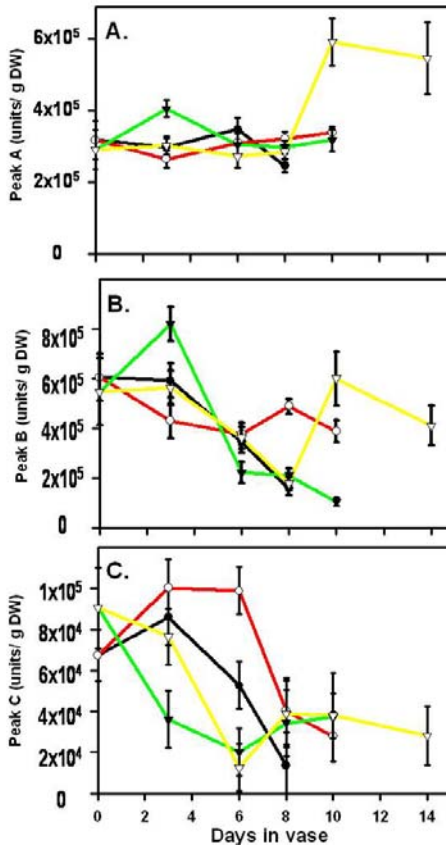


איור 17: השפעת הוספת 1% סוכרוז לתמיסת האגרטל (B), טבילה בציטוקינין TDZ (C) ושילוב שני סוגי הטיפולים (D) בהשוואה לביקורת (A) על התפלגות הרכב הסוכרים בפרחוני גרוויליאה 'ספיידרמן' לאחר 8 ימים באגרטל כפי שהתקבלה באנליזת HPLC. הניסוי בוצע כמפורט באיור 11. מוצגות תוצאות אנליזה מייצגת של HPLC מתוך חמש שבועות על מיצוי סוכרים מפרחוני גרוויליאה. שיאי הסוכרים הבלתי מזהים הוגדרו באותיות A, B, C, ושיאי הסוכרים המזהים עפ"י סטנדרטים, סוכרוז (Suc), גלוקוז (Glu) ופרוקטוז (Fru) מצוינים עפ"י מועד יציאתם מהקולונה.



ריכוז סוכרים בפרחונים (mg / g DW)								E.
פרוקטוז		גלוקוז		סוכרוז		עמילן		
8 יום	6 יום	8 יום	6 יום	6 יום	3 יום	8 יום	3 יום	
								(A) סוג טיפול
11.8 a	10.8 a	4.5 a	4.9 a	2.6 a	3.1 b	2.5 a	2.4 a	ביקורת
1.2 b	4.7 b	1.0 b	1.9 b	2.4 a	4.3 a	2.5 a	2.2 b	טבילה ב-TDZ
								תמיסת אגרסל (B)
1.2 b	4.8 b	0.7 b	2.6 b	1.6 b	3.4 b	2.7 a	2.4 a	TOG-6
11.8 a	10.7 a	4.7 a	4.1 a	3.4 a	4.0 a	2.4 b	2.2 b	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי								
***	***	***	***	.ל.מ.	***	.ל.מ.	*	A
***	***	***	*	***	**	*	*	B
***	.ל.מ.	***	.ל.מ.	.ל.מ.	**	.ל.מ.	.ל.מ.	B X A

איור 18: השפעת טיפול טבילה של התפרחת ב-TDZ עם 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על השינויים בריכוז עמילן (A), סוכרוז (B), גלוקוז (C) ופרוקטוז (D) בפרחונים של גרוויליאה 'ספידרמן' במהלך חיי האגרסל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (E). פרטי הניסוי הם כמפורט באיור 11. התוצאות מייצגות ממוצעים של שטחי השיאים של הסוכרים השונים שהתקבלו מהאנליזה ב-HPLC של 5 חזרות ± שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; .ל.מ. = לא מובהק.



Vase solution

Treatment	TOG-6	Sucrose
Control	●	○
TDZ	▼	▽

שטח שיא של סוכרים לא מזוהים (יחידות גרם משקל יבש)						D.
סוכר C		סוכר B		סוכר A		
8 יום	3 יום	8 יום	3 יום	8 יום	3 יום	
						סוג טיפול (A)
26,750 a	93,200 a	323,200 a	511,550 b	283,600 a	281,600 b	ביקורת
36,500 a	56,300 b	194,500 b	691,400 a	291,950 a	354,000 a	טבילה ב-TDZ
						תמיסת אגרסל (B)
23,850 a	61,000 a	184,000 b	706,000 a	272,000 a	351,900 b	TOG-6
39,400 a	88,500 a	333,700 a	496,900 b	303,500 a	283,6800 a	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי						
.n.ל.	**	***	*	.n.ל.	**	A
.n.ל.	.n.ל.	***	**	.n.ל.	*	B
.n.ל.	.n.ל.	***	.n.ל.	*	.n.ל.	B X A

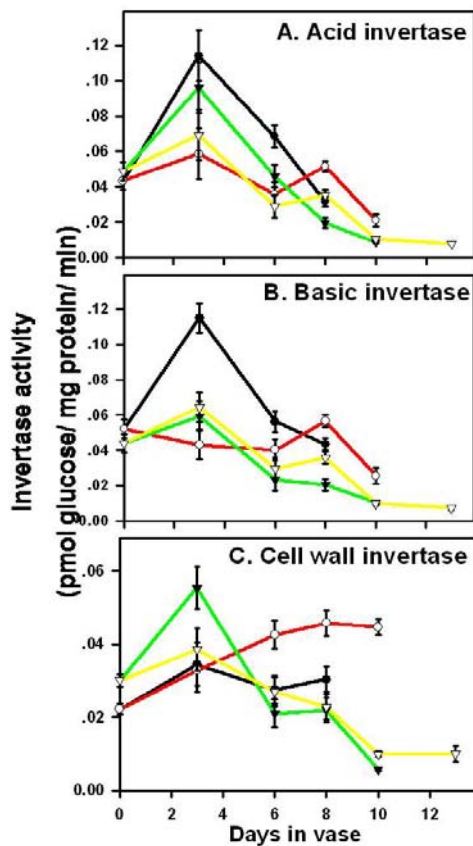
איור 19: השפעת טיפול טבילה של התפרחת ב-TDZ עם 1% סוכרוז בתמיסת האגרסל על השינויים בריכוזי הסוכרים הלא מזוהים בפרחונים של גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרסל, בשיאים המתקבלים לאחר 5.3 (A), 10.4 (B) או 14.2 (C) דקות, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). שאר פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 18. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, **, *** מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1, 0.01 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

3.3.3 פעילות אינברטאזות בפרחונים

בניסוי זה נבחנה פעילותן של שלושת סוגי האינברטאזות במהלך חיי האגרסל בהשפעת הטיפולים השונים. פעילות האינברטאז החומצי (הוקואולרי) עלתה בפרחוני הביקורת (קו שחור) לשיא ביום 3, שלוה בירידה חדה לאחר מכן עד ליום 8 (איור A20). טיפול הטבילה ב-TDZ (קו ירוק) לא השפיע על הפעילות, פרט לכך שהעלייה בפעילות הייתה קטנה מזו שהתקבלה בפרחוני הביקורת (איור A20). בפרחונים שטופלו בסוכרוז בנפרד באגרסל או בשילוב עם TDZ (קווים אדום וצהוב, בהתאמה), פעילות האנזים הייתה יציבה יחסית עד ליום 8, וירדה לאחר מכן (איור A20). מהתוצאות ניתן להסיק שתוספת סוכרוז באגרסל עיכבה את העלייה בפעילות האינברטאז החומצי.

השינויים בפעילות האינברטאז הבסיסי (הציטוזולי) בפרחוני הביקורת היו דומים מאוד לשינויים שהתקבלו בפעילות האינברטאז החומצי, כשגם לגבי אנזים זה נמצאה עליה בפעילות עד יום 3 וירידה לאחר מכן (איור B20). כל הטיפולים, TDZ, סוכרוז ושילוב שלהם, עכבו את פעילות האנזים עד ליום 6, כאשר הטיפול של סוכרוז בלבד העלה את פעילות האנזים לאחר מכן, ואילו בשני הטיפולים שכללו טבילה ב-TDZ נמצאה ירידה מתמשכת בפעילות האנזים עד לפסילת ענפי הפריחה ביום 13 (איור B20).

הפעילות של אינברטאז הדופן בפרחוני הביקורת נשארה יציבה פחות או יותר במשך 8 הימים של חיי האגרטל (קו שחור באיור C20). טיפול הטבילה ב-TDZ העלה באופן מובהק את פעילות האנזים ביום 3, ולאחר מכן חלה ירידה חדה בפעילות (הקו הירוק באיור C20). הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל העלתה את פעילות האנזים בהדרגה עד ליום 8 (הקו הצהוב באיור C20). לעומת זאת, פעילות האנזים בפרחונים שטופלו בטיפול המשולב (הקו הצהוב) לא נבדלה מפעילותו בפרחוני הביקורת עד ליום 8, אולם לאחר מכן הייתה ירידה בפעילות עד לפסילת הפרחים ביום 13 (איור C20).



Vase solution	
Treatment	Sucrose
Control	●
TDZ	▼

פעילות אינברטאז (pMol glucose/ mg protein/ min)						D.
אינברטאז חומצי		אינברטאז בסיסי		אינברטאז דופן תא		
יום 8	יום 3	יום 8	יום 3	יום 8	יום 3	
						סוג טיפול (A)
38 a	34 b	50 a	79 a	42 a	86 a	ביקורת
22 b	47 a	28 b	61 b	27 b	82 a	טבילה ב-TDZ
						תמיסת אגרטל (B)
26 b	45 a	32 b	87 a	25 b	105 a	TOG-6
34 a	36 a	46 a	53 b	44 a	64 b	סוכרוז + TOG-6
ניתוח סטטיסטי דו-גורמי						
***	*	***	*	***	ל.מ.	A
*	ל.מ.	***	***	***	*	B
ל.מ.	ל.מ.	ל.מ.	***	ל.מ.	ל.מ.	B X A

איור 20: השפעת טיפול טבילה של התפרחת ב-TDZ עם 1% סוכרוז בתמיסת האגרטל על הפעילות של אינברטאז חומצי (A), אינברטאז בסיסי (B) ואינברטאז של דופן התא (C) בפרחוני גרוויליאה 'ספיידרמן' במהלך חיי האגרטל, וניתוח סטטיסטי של התוצאות (D). פרטי הניסוי הם כמפורט באיור 11. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מייצגות מובהקות סטטיסטית ברמה של 95% לפי מבחן תחום מרובה. *, ***, מציינים מובהקויות סטטיסטיות בניתוח הדו-גורמי ברמות של 0.1 או 0.001, בהתאמה; ל.מ. = לא מובהק.

4. דיון

פרחי גרוויליאה 'ספייזרמן' מהווים כיום את הזן המסחרי העיקרי של הגרוויליאה בארץ, אך משך חיי האגרטל שלהם קצר יחסית בשל בעיות של הזדקנות לא אחידה וכמישה מהירה של התפרחת, נשירה, דהיית צבע ו/או השחרה של חלקי הפרח ואי פתיחת פרחים. הפרחים הקטופים הגיבו באופן חיובי לטיפול הטענה או טבילה בציטוקינינים והוספת סוכר באגרטל, ולכן נבדק מנגנון הפעולה של טיפול משולב זה בשיפור איכות הפרחים. בספרות דווח שהשילוב של ציטוקינינים וסוכר היה יעיל בעיכוב הזדקנות עלים, כאשר הוספת סוכר הגבירה ושיפרה את הפעילות של הציטוקינינים. אחד המנגנונים המוצעים לפעילות של ציטוקינינים בדחיית הזדקנות הוא הגברת כוח המבלע לסוכרים, ע"י הגברת הפעילות של אינברטאז ציטוזולי. מאחר ופרחים מהווים איברי מבלע לפחמימות שמקורן מהעלים, ניתן להניח שעיכוב ההזדקנות של פרחי גרוויליאה ופרחים אחרים באמצעות סוכר וציטוקינינים פועל כנראה באמצעות ויסות של יחסי מקור-מבלע.

השערת העבודה הייתה שציטוקינינים פועלים באמצעות הגברת הפעילות של אינברטאז, ובכך מגבירים את כוח המבלע של איברי הפרח, ובאופן זה משפרים את קליטת הסוכרוז הניתן באגרטל והובלתו אל הפרחים, ו/או את הובלת הסוכרוז מהעלים והגבעול לפרח. מטרות העבודה היו (א) לפתח טיפולים מיטביים המבוססים על ציטוקינינים ותוספת של סוכר באגרטל, ו(ב) ללמוד את המנגנון של השפעת הטיפול המשולב של ציטוקינינים וסוכרוז על חיי האגרטל של ענפי פריחה קטופים של גרוויליאה 'ספייזרמן'. לצורך זה נבדקו ההשפעות של טיפול בציטוקינינים (BA ו-TDZ) בשילוב עם מתן סוכרוז בתמיסת האגרטל על מדדי איכות שונים של הפרחים, מאזן הפחמימות בתפרחת במהלך ההזדקנות, הובלה של סוכרוז מתמיסת האגרטל לענף והפעילות של שלושה סוגי אינברטאזות בתפרחת במהלך ההזדקנות כמדד לכושר המבלע של התפרחת.

1.1. השפעת ציטוקינינים ואופן יישומם על האיכות של פרחי גרוויליאה

'ספייזרמן'

ציטוקינינים סינתטיים כגון קינטיין, BA ו-TDZ נעים בעצה (Lagerstedt and Langston, 1967; Van Staden and Joughin, 1988; Upfold and Van Staden, 1994, 1995) ולכן טיפולי הטענה בציטוקינינים אלו נמצאו יעילים ביותר בהארכת משך חיי האגרטל של מינים רבים של פרחים וענפי קישוט (מאיר וחוב, 2003, 2004; Van Staden and Joughin, 1988; Clarke et al., 1994; Lukaszewska et al., 1994b; Lukaszewska and Barthe, 1995; Philosoph-Hadas et al., 1996; Petridou et al., 2001; Ferrante et al., 2002; Huang and Chen, 2002; Ferrante and Tognoni, 2003; Sankhla et al., 2005a,b; Meir et al., 2007, 2009). בגרוויליאה 'ספייזרמן', בניגוד למתואר לעיל, טיפולי הטענה בציטוקינינים לא שיפרו את איכות הפרחים (איורים 1-3; מאיר וחוב, 2005). תוצאות דומות, שאיכות הפרחים לא שופרה בעקבות טיפולי הטענה בציטוקינינים, התקבלו גם בזנים אחרים של גרוויליאה, כמו 'מיסטי פינק', 'מיסטי רד', 'האני ג'ם' ו'קלונדרה ג'ם' (Meir et al., 2007, 2009), וכן בזן 'סילווייה' (Setyadjit et al., 2004a). לעומת זאת, בכל הניסויים בהם יישום הציטוקינינים BA או TDZ נעשה בהטבלה של התפרחות לאחר הקטיפה, התקבל שיפור משמעותי באיכות הפרחים,

שהתבטא בהארכת משך חיי האגרטל (איורים 1, 2, 4). תוצאות אלו מצביעות על שתי מסקנות חשובות: **(א)** פרחי גרוויליאה מגיבים באופן חיובי לציטוקינינים, המשפיעים על מדדים שונים הקשורים באיכות ובמופע הפרחים (כפי שיפורט בהמשך); **(ב)** יישום ההורמון בשיטת ההטענה אינו יעיל, כנראה מפני שכמות הציטוקינינים המגיעה אל התפרחת בזרם הטרנספירציה במהלך ההטענה קטנה מדי ו/או מגיעה לאברי המטרה מאוחר מדי. לפיכך, קיים הכרח ליישם את הציטוקינינים בטבילה, כדי לקבל את התוצאות הרצויות. לא נמצאו הבדלים בהשפעה של טבילת ענף הפריחה כולו בהשוואה לטבילת התפרחת בלבד (איורים 2, 3). באופן מעשי ההמלצה למגדלים היא טבילה של כל ענף הפריחה. עם זאת, בכל הניסויים במחקר הנוכחי הציטוקינינים יושמו ע"י טבילת התפרחת בלבד.

התוצאות שהתקבלו לגבי יישום הציטוקינינים בגרוויליאה בטבילה דומות לאלו שהתקבלו לגבי יישום STS, שלו הייתה השפעה סינרגיסטית עם הטיפול בציטוקינינים בזנים שונים של גרוויליאה, כמו 'ספיידרמן', 'מון-לייט', 'מיסטי רד', 'האני ג'ם', 'סילווייה' ו'קלונדרה ג'ם', רק ביישום בטבילה (מאיר וחוב, 2005). זאת, למרות ש-STS נע היטב בזרם הטרנספירציה ומשמש כטיפול יעיל לעיכוב הפעילות של אתילן בפרחים הרגישים להורמון זה (Serek et al., 2006). גם במורן החורש, שנקטף כענף עם פקעי פריחה, נדרשה הטבלה של ענף הפריחה ב-STS למניעת נשירת הפקעים (מאיר וחוב, 2006 א', ב'), וכך גם בזנים מסוימים של פרח השעווה (מאיר וחוב, תוצאות לא מפורסמות). הגורם המשותף לכל ענפי הפריחה הללו (מורן החורש, פרח השעווה וגרוויליאה) הוא, שהתפרחות מורכבות מפקעי פריחה קטנים, ותנועת המים אליהם מתמיסת האגרטל היא איטית, ולכן מרבית המים מגיעים כנראה קודם אל העלים ורק מיעוטם מגיע אל הפקעים או התפרחות. מכאן, שבמקרים אלו יש ליישם את ה-STS ו/או הציטוקינינים ישירות באברי המטרה באמצעות טבילה, מאחר ויישומם בהטענה אינו יעיל למרות ששני החומרים נעים בעצה.

TDZ 1.2.4.1 נמצא יעיל יותר מ-BA בשיפור האיכות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן'

ציטוקינינים דוחים הזדקנות ברקמות וגטיביטיות ופורחות (Van Staden et al., 1988). בספרות דווח, שמתן ציטוקינינים מעכב הזדקנות פרחים, אך ההשפעות היו מגוונות ותלויות בריכוז הציטוקינינים, בסוג שלהם, בצורת יישומם ובשלב ההתפתחותי של הפרח (Eisinger, 1977; Mor et al., 1983; Bossè and Van Staden, 1989). כשנבחנו ההשפעות של טיפולי הטבילה ב-BA וב-TDZ על מדדי האיכות בפרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' (איורים 4-10) ובזני גרוויליאה אחרים (מאיר וחוב, 2005; Meir et al., 2007, 2009) נמצא, ש-TDZ היה יעיל יותר מ-BA בשיפור האיכות, שכן ריכוזים נמוכים יחסית שלו נתנו תוצאות בולטות יותר מאשר ריכוזים גבוהים יחסית של BA. תוצאות המראות על יעילות גבוהה יחסית של TDZ דווחו גם לגבי עיכוב הזדקנות של עלי טבק (Roitsch and Ehness, 2000; Roitsch et al., 2000). גם במערכת של תרביות רקמה נמצא, ש-TDZ היה יעיל יותר מ-BA. כך דווח ש-TDZ היה יעיל יחסית בזירוז ההתחדשות של תאי תרבית כשניתן לבדו או בנוכחות הורמונים אחרים (Nayak et al., 1997; Murthy et al., 1998; Murch et al., 2000). בשלושה סוגי תרביות של סחלבים, ריבוי הניצנים היה טוב יותר כאשר המצע הכיל TDZ ולא BA, למרות שריכוזי ה-TDZ שנדרשו לכך היו נמוכים יותר (Nayak et al., 1997). TDZ אף עודד בתאים מסוימים יצירת קאלוס עם מקדם חלוקה טוב יותר בהשוואה ל-BA. לעידוד ניצנים דרושים בדרך כלל ריכוזים גבוהים של BA, בעוד ש-TDZ היה יעיל בריכוזים נמוכים יחסית. בזנים רבים נמצא ש-TDZ לבדו יכול לגרום ליצירת עוברים סומאטיים (Murthy et

TDZ al., 1998) בריכוזים נמוכים יחסית היה יעיל ביותר בזירוז צמיחה וחלוקת תאים בקאלוסים של סויה וצנונית (Thomas and Katterman, 1986). שימוש ב-TDZ בתרבית רקמה של פרע (St. Jone's Wort) עודד צמיחת ניצנים מהיפוקוטילים אטיולנטיים במידה רבה יותר מאשר BA ו-IAA (Murch et al., 2000).

2.2.4. השפעת הציטוקינינים בשיפור האיכות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' אינה נעשית

באמצעות עיכוב ייצור אתילן או הקטנת קצב הנשימה

קיימת חלוקה קלאסית לשלוש קבוצות עיקריות של פרחים לפי רגישותם לאתילן וקצב ייצור האתילן בהם (Halevy and Mayak, 1981; Woltering and Van Doorn, 1988; Borochoy and Woodson, 1989; Reid and Wu, 1991: **א**) מיני פרחים המוגדרים כפרחים קלימקטריים, בהם האתילן משרה באופן אנדוגני את תהליכי ההזדקנות הקשורים גם בעליה הקלימקטרית והאוטוקטליטית של ייצור אתילן. בפרחים אלו, מעכבי אתילן, STS או 1-MCP, מונעים תהליכים פיסולוגיים תלוי-אתילן, כמו הזדקנות ונשירת עלי הכותרת, וע"כ מאריכים את משך חיי האגרטל (Ichimura and Hiraya, 1999: **ב**). פרחים שאינם רגישים כלל לאתילן, ואפילו חשיפה ממושכת שלהם לאתילן בריכוז גבוה של 10 עד 100 ח"מ אינה משפיעה על קצב ההזדקנות שלהם. **ג**) פרחים הרגישים לאתילן חיצוני בריכוזים גבוהים שאינם פיסולוגיים (תחום של 1-100 ח"מ), אך הרמה האנדוגנית של האתילן בהם נמוכה, ואין עליה בייצור אתילן בשלבי ההזדקנות. במינים מסוימים מקבוצה זו, ישנה אמנם עליה בייצור אתילן, אולם היא חלה בשלב מאוחר של ההזדקנות. מכאן, שבפרחים אלו למרות שאתילן חיצוני משפיע ומזרז תהליכי הזדקנות הוא אינו מהווה גורם אנדוגני ראשוני המשרה הזדקנות. לקבוצה זו שייכים זנים רבים של גרוויליאה, כגון 'ספיידרמן' ו'גונסונאי'. בפרחים אלו, טיפול במעכבי פעילות של אתילן מגן רק מפני חשיפה אפשרית שלהם לאתילן חיצוני (מאיר וחוב', 2005; Meir et al., 2009; Setyadjit et al., 2004b) במהלך המשלוח, בשל נוכחותם של פירות, פרחים וירקות שונים המפרישים אתילן. התגובה לאתילן חיצוני מתבטאת בהזדקנות פרחים ו/או בנשירתם. מצד שני, חוסר ההשפעה של האתילן האנדוגני במהלך ההזדקנות הטבעית מהווה כנראה את הגורם להשפעות הסותרות שהתקבלו בתגובה לטיפולים במעכבי אתילן בפרחי גרוויליאה מזנים שונים (מאיר וחוב', 2005) (Joyce and Beal, 1999; Setyadjit et al., 2004a; Meir et al., 2009). רק לגבי גרוויליאה מהזן 'פינק פרינסס' דווח על השפעה מובהקת של מעכב פעילות של אתילן (1-MCP) ושל מעכב סינתזה של אתילן (מאיר וחוב', 2005), כך שבזן זה האתילן האנדוגני מבקר כנראה את ההזדקנות הטבעית.

קיימים חומרים רבים, כגון ג'יברלינים, אוקסינים, ציטוקינינים וסוכרים, המעכבים הזדקנות של פרחים קלימקטריים שונים, כפי שפורט בפרק המבוא. במחקרים רבים, שמטרתם הייתה ללמוד את מנגנון הפעולה של חומרים אלו הוכח, שפעילותם נבעה מהפחתת קצב ייצור האתילן ודחיית השיא הקלימקטרי בייצורו או מהפחתת הרגישות לאתילן. למשל, הוצע בעבר, שציטוקינינים מעכבים הזדקנות באמצעות עיכוב ייצור אתילן, ואכן נמצא שטיפול מקדים ב-BA שניתן לעלי כותרת של ציפורן עיכב הפיכת ACC חיצוני לאתילן ומנע את העלייה ב-ACC האנדוגני שקשור בהזדקנות (Mor et al., 1983; Cook et al., 1985). התוצאות המוצגות במחקר הנוכחי מראות שהעלייה האנדוגנית בייצור האתילן בפרחי גרוויליאה חלה בימים 8-10, כאשר עד יום 10 באגרטל לטיפול ציטוקינינים והסוכרוז לא הייתה כל השפעה על קצב ייצור האתילן (איור A15). תוצאות אלה מבטלות את האפשרות שההשפעה העיקרית של הציטוקינינים והסוכרוז על פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' נעשית באמצעות

השפעתם על ייצור אתילן. בנוסף, הטיפול בסוכרוז הגביר באופן מובהק את הנשימה מיום 4 ואילך, בעוד שהטיפול בציטוקינינים הפחית את הנשימה רק ביום 10 (איור B15). השפעות מנוגדות אלה, ובעיקר הגברת הנשימה ע"י סוכרוז, מעידות גם הן על כך, שלא ניתן להסביר את השפעת הטיפולים הנ"ל בדחיית ההזדקנות ושיפור איכות הפרח באמצעות השפעתם על הנשימה.

בנוסף לעיכוב ייצור אתילן, ישנן עדויות שציטוקינינים מפחיתים גם את הרגישות לאתילן בפרחים, כמו בציפורן ובפטוניה (Eisinger, 1977; Cook et al., 1985; Cook and Van Staden, 1988; Chang et al., 2003), כנראה ע"י חסימת הקולטן לאתילן (Cook et al., 1985). במקביל, ישנם דיווחים המצביעים על קשר קורלטיבי בין רגישות לאתילן וירידה בציטוקינינים, שכן עם ההזדקנות הפרחים הופכים לרגישים יותר לאתילן (Halevy and Mayak, 1981), ושינוי זה כנראה נמצא במתאם עם ירידה בתכולת הציטוקינינים (Borochoy and Woodson, 1989; Taverner et al., 2000; Chang et al., 2003). נושא זה לא נבדק בעבודה הנוכחית.

3.4. השפעת הטיפול המשולב של טבילה ב- BA או TDZ והוספת סוכרוז

באגרטל על האיכות של פרחי גרוויליאה

לאחר כיוול המערכת וקביעת הטיפולים האופטימאליים מבחינת הריכוזים ושיטת היישום, נלמדה בעבודה השפעת טבילת תפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' בתמיסות של ציטוקינינים (BA או TDZ), עם או ללא הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל, והשפעות הגומלין בין טיפולים אלה על משך חיי האגרטל (איור 4) ועל מדדי איכות שונים הקובעים את משך חיי האגרטל. מדדים אלה כללו: פתיחת פרחונים (איור 5), טורגידיות (איור 6), החמת עלי העטיף (איור 7), נשירת פרחונים (איור 8), שינוי משקל ענף הפריחה (איור 9), מאזן המים (איורים 10-12) ותכולת הפיגמנטים (כלורופיל וקרונואידים) בעטיף ובעמודי העלי (איורים 13-14). יש לציין שהאיכות הבסיסית של הפרחים נבדלה בניסויים השונים בשל שינויי עונתיות, תנאי גידול וטיפולים אגרוטכניים, דבר שהתבטא בהבדלים במופע הפרחים ובמשך חיי האגרטל של פרחים שנקטפו במועדים שונים. נושאים אלו לא נבחנו במחקר הנוכחי, אלא התמקדנו רק בלימוד ההשפעות הבסיסיות של הטיפולים שלאחר הקטיף (ציטוקינינים וסוכרוז), ולכן נערכה השוואה רק לגבי השפעת הטיפולים השונים באותו ניסוי ולא בין ניסויים שונים. נמצאו השפעות מיטביות מובהקות הן לטיפול בציטוקינינים והן לטיפול בסוכרוז לגבי כל המדדים שצוינו לעיל, כאשר לשני הטיפולים שניתנו במשולב היו השפעות אדיטיביות ובד"כ ללא השפעות גומלין. ברוב המדדים הטיפול בעל ההשפעה החיובית המיטבית היה הטיפול המשולב של טבילה ב- TDZ בתוספת סוכרוז באגרטל, ולאחריו טיפול הטבילה ב- BA בתוספת סוכרוז באגרטל. השפעות גומלין מובהקות בין שני הטיפולים נמצאו לגבי נשירת פרחונים (איור 8), תכולת המים היחסית (איור 12) ותכולת הפיגמנטים בעטיף ובעמודי העלי (איורים 13 ו-14, בהתאמה). יחד עם זאת, גם כאשר נמצאו השפעות גומלין מובהקות בין הטיפולים, הן היו בדרך כלל אדיטיביות ולא סינרגיסטיות.

1.3.4. משך חיי אגרטל ופתיחת פרחונים

בפרק המבוא פורטו בהרחבה דוגמאות רבות המראות שיפור באיכות והארכת משך חיי האגרטל של מינים שונים של פרחי קטיף בהשפעת טיפולי הטענה בסוכרים ו/או תוספת סוכר לתמיסת האגרטל לאחר טיפול בציטוקינינים, תוך התייחסות לדיווחים לגבי השפעת טיפול בסוכרים בפרחי גרוויליאה. במחקר הנוכחי הראינו

כאמור, שהן טיפול טבילה בציטוקינינים והן תוספת סוכרוז באגרטל האריכו באופן מובהק את משך חיי האגרטל של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' (איורים 2, 4). האיכות הבסיסית של הפרחים בניסוי המוצג באיור 4 הייתה ירודה יחסית, ומשך חיי האגרטל של פרחי הביקורת היה פחות מ- 5 ימים, כאשר הגורם העיקרי לירידה באיכות בניסוי זה היה איבוד מהיר של הטורגידיות (איור 6). הן סוכרוז והן TDZ האריכו את משך חיי האגרטל בכ- 35%, כשבטיפול המשולב (סוכרוז + TDZ) היה שיפור של כ- 67% (הערכים מתבססים על חישוב התוצאות המיוצגות בעמודות באיור A4). ערכים אלו נחשבים נמוכים מאוד לפרחי גרוויליאה 'ספיידרמן'. לעומת זאת, בניסוי נוסף, בו הגורמים לסיום חיי האגרטל היו החמת העטיפ של הפרחונים (איור 7) ונשירת הפרחונים מהתפרחת (איור 8), משך חיי האגרטל של פרחי הביקורת היה כ- 6 ימים (אמנם לא הוצגו תוצאות למשך חיי האגרטל, אך מדד זה הוערך עפ"י דרגת הנשירה החמורה בערך של 3.3 שהובאה באיור 8). תפרחות שטופלו בסוכרוז + TDZ או BA היו באיכות סבירה גם ביום 13 (איור 7) ולא נשרו כלל (איור 8). תוצאות של ניסויים מקבילים שבוצעו במעבדתנו (מאיר וחוב, 2005) מראות משך חיי אגרטל של 17 יום בפרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' שטופלו בטבילה ב-TDZ וסוכר (גלוקוז) באגרטל, לעומת 13 יום בהשפעת TDZ בלבד, כאשר פרחי הביקורת נפסלו כבר לאחר 7 ימי אגרטל.

כאשר הפרחים טופלו בסוכר + TDZ משך חיי האגרטל היה ארוך יחסית, והתקבל אף שיפור נוסף בו כאשר הוסף STS לתמיסת הטבילה. השפעה חיובית זו התקבלה גם בארבעה זני גרוויליאה נוספים, בניגוד לניסויים בהם STS לבדו לא שיפר את איכות הפרחים (מאיר וחוב, 2005). הסיבה לתוצאות אלו נובעת כנראה מכך שהארכת משך חיי האגרטל מאפשרת לפרחונים להשלים את התפתחותם ולהגיע לשלב המאוחר יותר, בו יש בהם ייצור אנדוגני מוגבר של אתילן (איור A15), ואזי STS מונע את פעולת האתילן האנדוגני. תוצאות דומות דווחו גם לגבי פרחי ליזיאנתוס, בהם הטענה בסוכר ו-Ba האריכה את משך חיי האגרטל ואפשרה את העלייה האנדוגנית באתילן, וכאשר הוסף למערכת STS, אשר היה חסר השפעה כאשר הוא ניתן לבדו, התקבלה הארכה נוספת של משך חיי האגרטל (מאיר וחוב, 2003, 2004).

במרבית הפרחים, פתיחת הפרח מתבטאת בגדילה של עלי הכותרת (Abeles et al., 1992; Van Doorn and Van Meeteren, 2003; Kumar et al., 2007). בניגוד לכך, בגרוויליאה ובמיני פרחים אחרים ממשפחת הפרוטאיים, פתיחת הפרח מתבטאת בגדילה של עמודי העלי (איור 5), התפתחות לולאות, הפיכתן ללולאות מוצקות ואח"כ התיישרותן, וזאת לאחר שעלי העטיפ כבר הגיעו לגודל המרבי. הן הטיפול בציטוקינינים והן הטיפול בסוכרוז הקדימו את פתיחת הפרחונים של גרוויליאה 'ספיידרמן' (ראה תוצאות המתייחסות ליום 5 באיור C5), כאשר בהמשך רק לטיפול בסוכר הייתה השפעה. הנחת המחקר הייתה שהשפעת הטיפול בציטוקינינים על פתיחת הפרחונים (המתבטאת בגדילת עמודי העלי) נובעת, לפחות בחלקה, מהשפעת הטיפול על קליטת הסוכר מתמיסת האגרטל והובלתו בענף הקטוף. תוצאות המחקר הנוכחי תומכות בהנחה זו (ראה דיון בהמשך). השפעת טיפול בסוכר על פתיחת פרחי גרוויליאה מזנים שונים דווחה גם בעבר (מאיר וחוב, 2005); (Joyce et al., 1996; Joyce and Beal, 1999; Meir et al., 2009).

פתיחת הפרחים היא תהליך מורכב המבוקר ע"י גורמים רבים, כמו אור, טמפרטורה ושעון ביולוגי (Van Doorn and Van Meeteren, 2003). בגדילה והתרחבות של עלי הכותרת או של עמוד העלי מעורבים חלוקות תאים ותהליכי גדילה, הכוללים שינויים בדפנות התאים כמו החלשת הקשרים בין המולקולות השונות בדופן התאים. תהליכים אלו, כמו כל תהליכי הגדילה בצמחים, דורשים אנרגיה, (Abeles et al., 1992; Kumar et al., 2007).

ולחץ טורגור חיובי, הנובע מפוטנציאל אוסמוטי גבוה. רמה גבוהה של פחמימות תורמת לאספקת אנרגיה ולפוטנציאל האוסמוטי (Moalem-Beno et al., 1997). לכן, מאזנים שליליים של פחמימות ושל מים גורמים בדרך כלל לאי פתיחה של פרחים. במקרים רבים ניתן להתגבר על בעיית הידלדלות הפחמימות ע"י הספקתם לענף הקטוף באמצעות טיפול הטענה בסוכרים שונים בריכוזים גבוהים יחסית (3-5%), ובמקרים מסוימים כאשר הפרחים נקטפים ללא עלים ניתן אף להטעיןם ב- 20% סוכר (Halevy and Mayak, 1981). בנוסף, ניתן לחדש את הספקת הפחמימות לענף הקטוף באמצעות תוספת של סוכר בריכוז של 1-2% לתמיסת האגרטל, ויישנם דיווחים רבים בספרות המתארים השפעה חיובית של טיפולים בסוכרים על פתיחת פרחים באגרטל (Han, 1992; Doi and Reid, 1995; Kuiper et al., 1995; Ichimura and Hiraya, 1999). רוב המחקרים מראים שרמת הסוכרים המסיסים בפרחים הייתה יציבה או עלתה כאשר הם הוזנו בסוכרוז בתמיסת האגרטל (O'Donoghue et al., 2002). מחקרים רבים שבוצעו במעבדה של הפרח הקטוף במכון וולקני, הראו השפעה חיובית של הטענה בסוכרים או תוספת סוכרים באגרטל, כולל תכשירים מסחריים, בגידולים חדשים וותיקים, כמו גיבסנית, לימוניום, עדעד, ליזיאנתוס, ליאנונוטיס ליאונורה, ליאטריס, שושן, אסקלפיאס, סולידגו, מורן החורש ועוד (מאיר וחוב', 1995, 2003, 2004, 2006 א', ב' Meir et al., 2007, 2009). תוצאות מחקרים אלו מיושמות באופן מעשי בארץ ובעולם, והן באות גם לידי ביטוי בצירוף של שקית הכוללת סוכר ובקטריוציד לזרי הפרחים, המיועדת להוספה לתמיסת האגרטל ע"י הצרכן הסופי.

2.3.4. נשירת פרחונים ועלי העטיף

הטבילה ב- BA ו- TDZ וגם תוספת סוכרים (גלוקוז או סוכרוז) לתמיסת האגרטל הפחיתו באופן מובהק את הנשירה של פרחונים ועלי עטיף (איורים 3, 8 ותמונה 4). TDZ היה יעיל יותר מאשר BA, והשילוב של הטבילה ב- TDZ ותוספת סוכרוז באגרטל היה היעיל ביותר במניעת הנשירה (איור 3 ובמיוחד איור 8). כפי שצוין בפרק המבוא, הגורמים המשפיעים ביותר על תהליכי הנשירה הם אוקסין ואתילן, אך ישנם דיווחים גם לגבי השפעות של ציטוקינינים וסוכרים על הנשירה.

התוצאות שהתקבלו בעבודה הנוכחית מורות, שסוכרוז וציטוקינינים פועלים באופן עצמאי בעיכוב ומניעת הנשירה של תפרחות גרוויליאה ועלי העטיף. ההשפעה של שני החומרים הנ"ל בעיכוב נשירת הפרחונים, הנגרמת אולי גם ע"י עצם דחיית ההזדקנות, יכולה להיות באמצעות בקרת תהליכים ברקמת הניתוק. לעומת זאת, עיכוב נשירת עלי העטיף שחלה בסוף תהליך הזדקנות יכול לנבוע מעיכוב תהליכי ההזדקנות ע"י טיפולים אלו, שכן עלי העטיף שנושרים הם חומים, כמושים וללא פיגמנטים אופייניים (כלורופיל וקרונואידים).

גם בספרות ישנם דיווחים לגבי ההשפעה העצמאית של סוכרוז וציטוקינינים בעיכוב הנשירה בפרחי קטיף. מתן טיפולים בסוכר לפרחים קטופים של פלוקס, סחלב (*Epidendrum ibaguense*) ודלפיניום הפחיתו את הנשירה (Ichimura et al., 2000; Sankhla et al., 2005b, 2006; De Moraes et al., 2007). כאשר צמחי עציץ של דלפיניום גודלו בתנאי הארה שונים, נמצא מתאם חיובי בין עוצמת האור לבין תכולת הפחמימות, שהייתה במתאם שלילי למידת הנשירה של הפרחים (Tanase et al., 2005). ייתכן, שרמת הפחמימות ברקמה מהווה סיגנל ביוכימי לבקרת הנשירה, כפי שהוצע לגבי חנטי הדורים (Ruiz et al., 2001).

לציטוקינינים תפקידים סותרים במערכות של נשירה: הציטוקינינים BA ו- Forchlorfenuron (CPPU)

משמשים לדילול פירות תפוחים, מאחר והם מעודדים נשירה של חנטי ע"י עידוד אתילן (Stopar and Zadavec,

(Bondok et al., 2004; Dal Cin et al., 2005, 2007). השימוש הנפוץ ביותר ב-TDZ הוא לשילוך של עלי כותנה (Bondok et al., 1996). התכשיר Dropp, ששימש כמקור ל-TDZ בניסויים בעבודה הנוכחית, נועד למעשה למטרה זו. מצד שני, במערכת של הפרח הקטוף, TDZ עיכב נשירה של פרחי תורמוס ופלוקס (Sankhla et al., 2003, 2005a,b), ומנע נשירת עלים בתרבית רקמה של אנונה, כנראה ע"י דחיית הזדקנות העלים (De Oliveira et al., 2007). בפרחי קטיף של פלוקס ותורמוס דווח על השפעות אדיטיביות של ציטוקינינים וסוכר במניעת הנשירה (Sankhla et al., 2003, 2005a,b), בדומה לממצאי העבודה הנוכחית בגרוויליאה. כן דווח, שטבילה של תפרחות גרוויליאה ב-BA עיכבה את נשירת הפרחונים בזן 'סילויה' (Setyadjit et al., 2004a).

3.3.4. מאזן המים בענף הפריחה ובפרחונים

מאזן המים בענף הקטוף הוא גורם חשוב ביותר המשפיע על מופע הפרחים ומשך חיי האגרטל שלהם. גורם זה הינו בעל משמעות רבה במיוחד בפרחי גרוויליאה, כאשר הזנים השונים מאופיינים ברגישות שונה לעקת מים. אחד מזני הגרוויליאה הסובל מקליטת מים לקויה הוא הזן 'Crimson Yul-lo'. הבעיה נגרמת עקב סתימה פיסולוגית של צינורות העצה, הנובעת מהתפתחות סוכרין בחדך, ועיכוב הטרנספירציה ע"י ABA פתר באופן חלקי את הבעיה (He et al., 2006a,b). בעבודה המקיפה שבצעה קבוצת מחקר זו נמצאה ירידה בפוטנציאל המים של התפרחת כבר ביום השני באגרטל, שהתגברה בהמשך חיי האגרטל. מאזן מים שלילי בענף הקטוף נובע מכך, שאיבוד המים מהענף באמצעות הטרנספירציה עולה על קליטת המים מתמיסת האגרטל. מאזן המים השלילי בפרחי הזן 'Crimson Yul-lo', התבטא בירידה במשקל הטרי של הענף, בפוטנציאל המים ובתכולת המים בתפרחת, באיבוד הטורגידיות ובכמיסה חזותית, שחלה כבר לאחר 2-4 ימים באגרטל (He et al., 2006 a,b). בעבודה הנוכחית נבדקו בפרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' השינויים במשקל הטרי של הענף (איור 9), בטורגידיות, שבאה לידי ביטוי במוצקות התפרחת (איור 6), ובמאזן המים הכללי בענף, המתבטא ביחס בין קליטת מים מהאגרטל והטרנספירציה, לאחר 0-3, 3-5, 5-7 ו-7-10 ימים באגרטל (איורים 10-א', ד', בהתאמה). בנוסף למדדים שתוארו לעיל, המתייחסים לענף השלם ולתפרחות, נבדקו גם המשקל הטרי של הפרחונים בתפרחת (איור 11), ותכולת המים היחסית באברי הפרחונים, העטיף ועמודי העלי, במהלך חיי האגרטל (איור 12). כל אחד מהטיפולים שנבחנו, טבילה בציטוקינינים והוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל, מנע את השינוי החד במדדים הנ"ל, שהתרחש בפרחי הביקורת, כאשר לטיפולים המשולבים הייתה השפעה אדיטיבית, והם היו הטיפולים הטובים ביותר. עד יום 3 מאזן המים היה חיובי בכל הטיפולים (איור 10א'). מעניין לציין, שגם הטיפול בסוכרוז וגם הטיפול ב-TDZ הפחיתו את הטרנספירציה, שהיא הכוח המניע את קליטת המים. בין הימים 3-5 השתנתה המגמה, ובענפי הביקורת התפתח כבר מאזן מים שלילי (היחס בין הקליטה לטרנספירציה היה קטן מאחד). סוכרוז הפחית הן את הקליטה והן את הטרנספירציה בהשוואה לביקורת, בעוד ש-TDZ הפחית רק את הטרנספירציה (איור 10ב'). בהמשך חיי האגרטל חלה כבר ירידה כללית ונמשכת בקליטת המים ובטרנספירציה בפרחים בכל הטיפולים (השווה איורים 10 ג'-ד' לאיורים 10 א'-ב'). הטיפול בציטוקינינים מיתן את הירידה בקליטת המים ובטרנספירציה, ממצא המעיד על מצב פיסולוגי טוב של הענף הקטוף, והירידה ביחס של קליטת מים לטרנספירציה הייתה הרבה יותר קטנה מאשר בפרחי הביקורת. לעומת זאת, סוכרוז הפחית את קליטת המים מהתמיסה ואת הטרנספירציה גם בימים 7-5 ו-10-7 באגרטל, ולכן מאזן המים בהשפעת סוכרוז לא היה טוב יותר מאשר בביקורת בימים אלו. מכאן,

שסוכרוז שיפר את מאזן המים רק בימים 0-5 באגרטל, בעוד שהטיפול ב-TDZ שיפר את מאזן המים במשך כל ימי האגרטל.

גם בורדים נמצא, שהוספת סוכרוז הפחיתה את קליטת המים בגלל ההשפעה המעכבת שהייתה לו על הטרנספירציה, אולם בטווח הארוך הסוכרוז שמר על תכולת מים גבוהה יחסית (Kuiper et al., 1995). לעומת זאת, ישנם דיווחים המראים, שטיפול בציטוקינינים הגביר את הטרנספירציה (Tal and Imber, 1971; Fusseder et al., 1992). בנוסף נמצא, שקירור שורשים, שגרם לירידה בתכולת הציטוקינינים בשיפה ובעלים, הפחית את הטרנספירציה ע"י הקטנת מוליכות הפיוניות (Veselova et al., 2005). כן דווח, שעקת מים בשורשי עגבנייה הפחיתה את הטרנספירציה באמצעות הורדת רמת הציטוקינינים בשיפה והעלאת רמת ה-ABA. לכן הוצע ששני הורמונים אלו מהווים סיגנל לעקת מים המועברת מהשורש לנוף (Kudoyarova et al., 2007). יש להדגיש, שבמחקר הנוכחי טיפול הטבילה בציטוקינינים ניתן לתפוחת בלבד, שהוא למעשה טיפול מקומי, וקשה להניח שציטוקינינים שניתנו לתפוחת נעו אל העלים והשפיעו על הטרנספירציה. יחד עם זאת, ניתן לשער שבענף הקטוף ישנה טרנספירציה גבוהה יחסית, גם מהתפוחת הגדולה עצמה. לא בוצעו ניסויים ואין דיווחים לגבי מידת הטרנספירציה היחסית בתפוחות של גרוויליאה ללא נוכחות עלים.

בטיפולים בהם היחס בין קליטת המים לטרנספירציה היה גדול מאחד (איורים 10א'-ב'), הייתה גם עליה במשקל הכללי של הענף בימים 0-5 באגרטל (איור 9). עליה זו משקפת את הגדילה וההתפתחות של הפרחונים בתפוחת, המלווה בגדילה של עמודי העלי. גדילה זו קשורה בפוטנציאל המים ובטורגידיות של האברים האלו ובמאזן הפחמימות המשופר שלהם בעקבות הטיפולים (ראה סעיף 4.4).

4.3.4 רמת הפיגמנטים (כלורופיל וקרונואידים) בפרחונים ובעלי העטיף

פרוק הכלורופיל והקרונואידים הוא אחד התהליכים המתרחשים במהלך ההזדקנות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן', המכילים רמה גבוהה יחסית של פיגמנטים אלו. הירידה בתכולת הכלורופיל בעטיף (איור A13, B) הקדימה בהרבה את החמת הפרחונים (איור 7). אומנם שני הניסויים בוצעו בנפרד, אך האיכות הבסיסית של הפרחים בשני ניסויים אלו הייתה דומה, ולכן ניתן להשוות ביניהם.

כבר מהיום השני באגרטל נצפתה ירידה בתכולת הכלורופיל והקרונואידים בעלי העטיף של גרוויליאה 'ספיידרמן', כאשר רמת הכלורופיל ירדה בקצב מהיר יותר (איור A13, B), בעוד שרמת הקרונואידים ירדה בצורה מתונה (איור C13). לעומת זאת, בעמודי העלי הירידה ברמת הכלורופיל הייתה מתונה יותר (איור A14, B) בהשוואה לירידה ברמת הקרונואידים (איור C14). טיפול טבילה ב-TDZ עיכב את הירידה ברמת הכלורופיל, כשל-TDZ הייתה השפעה רבה יותר מזו של הסוכרוז, וטיפול המשולב (סוכרוז + TDZ) הייתה אף עליה בתכולת כלורופיל b בעמודי העלי ביום 2 באגרטל בהשוואה לזמן 0 (איור B14).

ניתן להתייחס להשפעת הציטוקינינים על תכולת הכלורופיל והקרונואידים בשתי רמות: א. עיכוב פירוק הכלורופיל והגברת הסינתזה של קרונואידים במערכות של הזדקנות באור ובחושך (Van Staden et al., 1988; Zacarias and Reid, 1990; Zavaleta-Mancera et al., 2007). בעבודה הנוכחית נמצא, שגם בפרחי גרוויליאה הציטוקינינים מונעים את פירוק הכלורופיל והקרונואידים, ואף מגבירים את סינתזת הקרונואידים (איורים 13, 14). הנושא של הגברת הסינתזה של הכלורופיל בולט בניסויים בהם עלים שהחלו להצהיב טופלו

בציטוקינינים, וכתוצאה מכך חלה הורקה שלהם מחדש (Clarke et al., 1994; Philosoph-Hadas et al., 1996; Petridou et al., 2001; Ferrante et al., 2002). הגברת סינתזת הכלורופיל בשלב ההזדקנות ע"י ציטוקינינים דווחה גם בצמחים טרנסגניים של טבק או עגבניות, בהם הוגברה הסינתזה של הציטוקינינים באמצעות התמרה בגן *ipt* של אגרובקטריום תחת הפרומוטר של גן המעורב בהזדקנות, *SAG12* (Gan and Amasino, 1995; Guivarc'h et al., 2002; Roitsch et al., 2003; Skorov et al., 2007). טיפול בציטוקינינים הגביר סינתזה של כלורופיל וקרונואידים גם במערכות לא מזדקנות, כגון בזרעי חמניות בהם טיפול בציטוקינינים הגביר את תכולת הפיגמנטים בנבטים (Yaronskaya et al., 2007). ציטוקינינים הגבירו גם את רמת הקרונואידים של נבטי מלפפון, שגודלו בחושך וקיבלו גוון צהוב ולא לבן, שאפיין נבטים אטיולנטים לא מטופלים (Montague, 2000; Quanten et al., 2007).

4.4. השפעות הטיפול המשולב של טבילה ב- BA או TDZ והוספת סוכרוז

באגרטל על מאזן הפחמימות בפרחי גרוויליאה

בהתבסס על סקירת הספרות והתוצאות הראשוניות הנחת העבודה הייתה, שטיפול טבילה של תפרחות גרוויליאה בציטוקינינים מגביר את כוח המבלע של הרקמה לפחמימות. בנוסף לכך, גם תוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל גורמת לעליה בתכולת הפחמימות בפרח. פחמימות אלה משמשות כמקור לאנרגיה, לגדילה ולהעלאת הפוטנציאל האוסמוטי בענפי הפריחה. השערה זו נבחנה ע"י מדידת הקליטה וההובלה של סוכרוז מסומן מתמיסת האגרטל אל הפרח בשלושת הימים הראשונים באגרטל, וקביעת תכולת הפחמימות והפעילות של שלושה סוגים של אינברטאזות בפרחונים במהלך חיי האגרטל בהשפעת הטיפול המשולב ב-TDZ ובסוכרוז.

התוצאות מראות, שאכן טיפול הטבילה בציטוקינינים הגביר באופן ברור את הובלת הסוכרוז המסומן אל התפרחות במשך שלושת הימים הראשונים באגרטל (איור 16). תוצאות אלה מצביעות על הגדלת כוח המבלע של התפרחות בהשפעת הטיפול בציטוקינינים. כאשר סוכרוז נכלל בתמיסת האגרטל, חלה הצטברות מוגברת של סוכרוז רדיואקטיבי בתפרחת (איור B16, H), שהינה התרומה של הגדלת הספקת המקור. בטיפולים המשולבים, נראה הסימון הרדיואקטיבי המרבי בתפרחת בעיקר לאחר 72 שעות (איור J16, L). במשך שלושת הימים האלו בלטה מאוד הצטברות הרדיואקטיביות בעמודי העלי בהשוואה להצטברות בעטיף. עמודי העלי הם האברים הגדלים בשלב זה. הם מתארכים, מתעבים והתיישרותם מהלולאה חלה לאחר 72 שעות באגרטל. גם הנתונים המתייחסים לשינויים במשקל היבש של העטיף (איור B11) מצביעים על כך, שמעט מאוד סוכרים מגיעים אל התפרחת, שכן המשקל היבש של העטיף ירד בכל הטיפולים כבר ביום השני, כאשר בטיפולים שכללו סוכרוז בתמיסת האגרטל הירידה הייתה מתונה יותר. הירידה נבעה מניצול הסוכרים השונים בנשימה. עמילן אינו מהווה מאגר לסוכרים אלו, שכן רמתו הייתה נמוכה יחסית, ולא חלו בה שינויים במהלך ימי האגרטל (איור A18). בניגוד לשינויים במשקל היבש של העטיף, המשקל היבש והטרי של עמודי העלי נשמר יציב לאורך ימי האגרטל, ולא הושפע מהטיפולים. סוכרוז בתמיסת האגרטל שמר על המשקל הגבוה ביותר של עמודי העלי (תוצאות שלא הוצגו).

השינויים ברדיואקטיביות שהצטברה בעלים מצביעים על כך, שסוכרוז רדיואקטיבי נע מהעלים אל התפרחות בתקופה שבין 24 ל-72 שעות, תופעה שבלטה מאוד בפרחי הביקורת (איור A16, G). גם בפרחים

המטופלים, הגברת הסימון הרדיואקטיבי בתקופה זו חלה בתפרחת בלבד, ובעיקר בעמודי העלי (איור H, F-B16, L). ממצאים דומים דווחו בפרחי ציפורן וורדים, בהם הראו הובלה ראשונית של הסוכרים אל העלים ומשם אל הפרחים, דבר שגרם להפחתת רמת הסוכרים בעלים ולעלייתה בפרחים (Nichols, 1972; Sacalis and Durkin, 1976; and Ho, 1975, 1979; Sacalis and Chin, 1976).

יש לציין, שעלייה ברדיואקטיביות שמקורה בסוכרוז מסומן בתפרחות אינה מצביעה בהכרח על עליה בתכולת הסוכרים המסיסים, שכן אם הסוכרוז מהווה מקור לפחמימות הדרושות לשינויים המבניים והוא נצרך בתהליך הגדילה, הסימון הרדיואקטיבי היה מצטבר בדפנות התאים ובעיקר בעמודי העלי הגדלים. יחד עם זאת, ביום 3 באגרטל הטיפול ב-TDZ העלה את רמות הסוכרוז, הגלוקוז והפרוקטוז (איור D, C, B18, בהתאמה) וגם את רמות הסוכרים הלא מזוהים A ו-B (איור A19, B). לעומת זאת, הטיפול ב-TDZ גרם להפחתת רמת הסוכר הלא מזוהה C (איור C19). העלייה שנצפתה ברמה של כל הסוכרים בהשפעת הטיפול המשולב של טבילה ב-TZD וסוכרוז באגרטל ביום 10 (איור B18), נבעה כנראה מפירוק של מרכיבים סוכריים של דופן התא בסוף חיי האגרטל. רמה גבוהה של סוכרים לקראת סוף חיי האגרטל נצפתה גם בפרחים רבים אחרים (Halevy and Mayak, 1979), בהם הראו שלתאים ישנם מאגרי פחמימות. יש לציין, שמיצוי הסוכרים בוצע מפרחונים שלמים, ללא הפרדה בין עמוד העלי והעטיף. יש להניח שהשינויים בסוכרים בעמודי העלי הנם משמעותיים יותר, לאור הצטברות עיקר הסוכרוז הרדיואקטיבי בעמודי העלי (איור 16). בהמשך חיי האגרטל (לאחר 3 ימים) רק הטיפול בסוכרוז שמר על רמה גבוהה של סוכרים מסיסים לאורך זמן (איור D, C, B18). ממצא זה מסביר מדוע מתן סוכר באגרטל הוא הטיפול המשמעותי ביותר להארכת משך חיי האגרטל ושיפור האיכות של פרחי גרוויליאה מזנים שונים (Joyce et al., 1993, 1996; Ligawa et al., 1997). לא ידוע לנו טיבם של הסוכרים שלא זוהו. יחד עם זאת, נראה שיש להם תפקיד חשוב במאזן הפחמימות בפרח, בעיקר לקראת סוף חיי האגרטל, שכן הטיפול המשולב של טבילה ב-TZD וסוכרוז באגרטל גרם לעלייה חדה ברמות הסוכרים A ו-B ביום 10 באגרטל (איור A19, B). יתכן שהסוכרים הלא מזוהים הם סוכרים המרכיבים את הנקטר של הפרחים, המשמש למשיכת המאביקים אליהם.

ידוע שישנו קשר ישיר בין רמת הסוכרים לבין הפעילות של האינברטאזות. אינברטאז תורם כנראה להארכת משך חיי האגרטל של הפרחים ומבקר את חלוקת המוטמעים בפרח. כבר לפני עשרות שנים נמצא מתאם גבוה בין צבירת סוכרים מסיסים והתרחבות פסיגים בצנון (Howard and Witham, 1983). סוכרים מסיסים הם הרכיב האוסמוטי העיקרי הפעיל באור. הסוכרוז מהווה את המקור לסוכרים המחזרים בפסיגים, ולכן צבירתם תלויה בפעילות האינברטאז. טיפול בקינטין העלה את הפעילות של האינברטאזות החומציות, כנראה עקב סינתזה *de novo* של אנזימים אלה. העידוד ההורמונאלי של צבירת סוכרים מחזרים והתרחבות פסיגים קשורה בהידרוליזה של סוכרוז ע"י אינברטאז (Howard and Witham, 1983).

כדי להבין את המנגנון האחראי לשיפור כוח המבלע של תפרחות של גרוויליאה 'ספיידרמן' בעקבות הטיפול בציטוקינינים נבדקה השפעתם על הפעילות של שלושת סוגי האינברטאזות בפרחונים שלמים, ללא הפרדה של העטיף מעמוד העלי. נמצא, שפעילות האינברטאזות המסיסות (החומציות והבסיסית) ירדה בהשפעת הטיפולים לאחר יום 3 בהשוואה לביקורת (איור A20, B), ורק הפעילות של האינברטאז של דופן התא (האפופלסטי) עלתה ביום 3 בהשפעת הטיפול ב-TDZ (איור C20). ביום 8 נצפתה השפעה מובהקת רק לטיפול בסוכרוז, שגרם לפעילות מוגברת של שלושת האינברטאזות (איור 20). יש לציין, שהעבודות שעליהן התבססה הנחת המחקר הראו גם הן,

שציטוקינינים מגבירים את פעילות האינברטאז האפופלסטי בעלים (Ehness and Roitsh, 1997; Sturm, 1999; Roitsch and Ehness, 2000; Lara et al., 2004). התוצאות שהתקבלו מציעות, שהאינברטאז האחראי על כוח המבלע בפרחי גרוויליאה הוא האינברטאז האפופלסטי, וכנראה, שהנשאים הספציפיים המעבירים את הסוכרים לתאים הם של גלוקוז ו/או פרוקטוז ולא נשאים של סוכרוז. זאת, בניגוד לפרחים אחרים, כגון ציפורן, בהם נמצא קשר חיובי בין פעילויות האינברטאזות המסיסות לבין חייית הזדקנות ומשך חיי אגרטל ארוכים (Hawker et al., 1976). בנוסף, יש לציין, שהבדיקה הראשונה של פעילות האינברטאזות בוצעה רק ביום 3 באגרטל. יתכן ואם בדיקת הפעילות הייתה נערכת ביומיים הראשונים ניתן היה לקבל הבדלים משמעותיים יותר בהשפעת הטיפול בציטוקינינים. הסבר אפשרי נוסף לירידה בפעילות האינברטאזות המסיסות קשור לנוכחותו של מעכב אינברטאז, המתחיל לפעול בפרחים עם התקדמות תהליך ההזדקנות. נוכחות מעכב זה דוחה בפרחי קטיף, כגון אלסטרומריה, דליה, סייפן, ציפורן, פטוניה וורד (Halaba and Rudnicki, 1983, 1989a,b). יתכן ומחקר על מעכב האינברטאז ובידודו מפרחי גרוויליאה יתרום להשלמת ההבנה של המנגנונים הפועלים בבקרת ההזדקנות של פרח זה.

5.4. סיכום

- (1) במחקר הנוכחי נמצא שציטוקינינים הניתנים בטבילה של התפרחת משפיעים על האיכות ומשך חיי האגרטל של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן', כאשר TDZ היה יעיל יותר מ-BA.
- (2) הוספת סוכרוז לתמיסת האגרטל שמרה על איכות פרחים גבוהה במהלך חיי האגרטל. תוספת הסוכרים הייתה חיונית להארכת משך חיי האגרטל של פרחים, והיא מיושמת כיום בפרחי קטיף רבים.
- (3) ההשפעות של ציטוקינינים וסוכרוז על מדדי האיכות השונים במהלך חיי האגרטל היו בחלקן נפרדות ובחלקן משלימות: ציטוקינינים השפיעו ישירות על מניעת נשירה של פרחונים ועטיף, על עיכוב הזדקנות האיברים, החמת העטיף ושמירה על תכולת הפיגמנטים, ע"י מניעת פירוקם ואף הגברת הסינתזה שלהם. טיפול בסוכרוז שיפר את מאזן המים, ע"י העלאת רמת הסוכרים המסיסים, דבר שכנראה הגביר את הפוטנציאל האוסמוטי ברקמה, וכן ע"י הקטנת הטרנספירציה.
- (4) תוצאות העבודה מאמתות את הנחת המחקר לגבי מנגנון הפעולה של הטיפול המשולב של ציטוקינינים וסוכרוז, ומציעות שטיפול זה מעכב הזדקנות של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' כנראה באמצעות ויסות של יחסי מקור-מבלע בפרח, כאשר האינברטאז האחראי על כוח המבלע הוא האינברטאז האפופלסטי.
- (5) לתוצאות העבודה ישנם כבר יישומים מעשיים. טיפול משולב של טבילת התפרחת בציטוקינינים ותוספת של סוכר באגרטל מומלץ לחקלאים ולצרכנים, בהתאמה, ויישומו מאפשר כיום תובלה ימית מוצלחת של פרחי גרוויליאה 'ספיידרמן' מישראל לאירופה.

5. רשימת ספרות

- מאיר ש., דודזון ה., ראובני י., פילוסוף-הדס ס. 1995. שיפור איכות פרחי ורדים מזן יגואר ע"י טיפולי הטענה בסוכרוז בשילוב עם טבילת העלווה באנטיטרנספירנטים. דפי מידע, גיליון נובמבר: 60-56.
- מאיר ש., סלים ש., מור י., פילוסוף-הדס ס. 2003. ליזיאנתוס – שיפור משך חיי האגרטל באמצעות הוספת ציטוקינין לתמיסת ההטענה המומלצת. עולם פורח, 29: 44-46.
- מאיר ש., סלים ש., פילוסוף-הדס ס., 2006א'. שיפור חיי האגרטל של ענפי מורן החורש (*Viburnum tinus*) מקלונים שונים לאחר תובלה אווירית. עולם הפרח, גיליון מרץ: 54-56.
- מאיר ש., סלים ש., קוכאנק ב., פילוסוף-הדס ס. 2004. ליזיאנתוס: שיפור נוסף במשך חיי האגרטל באמצעות הוספת STS לתמיסת ההטענה. עולם הפרח, גיליון אוקטובר-נובמבר: 60-56.
- מאיר ש., פילוסוף-הדס ס., סלים ש., רוזנברגר א., פינקלשטיין ס., גפני א. 2006ב'. תובלה ימית של ענפי מורן החורש (*Viburnum tinus*) מקלונים שונים. עולם הפרח, גיליון אפריל: 63-58.
- מאיר ש., פילוסוף-הדס ס., סלים ש., תמרי י., שלמה א., רן י. 2005. גרווילאה: ריכוז תוצאות מחקרים המתייחסים לפיזיולוגיה שלאחר הקטיף ולטיפולים להארכת חיי האגרטל של מיני גרווילאה שונים, לתקופה שבין 1999-2003. עמ' 26. <http://www.mop-zafon.org.il/lab/flower/0065.pdf>
- תמרי י., רן י., שלמה א. 2004. גרווילאה: מינים וזנים לקטיף פרחים ולענפי קישוט. עולם פורח, 33: 44-47.
- Aebie B.T.** 2007. Differential effects of 2,4-D and NAA on floret abscission in red cestrum (*Cestrum elegans* Schlecht.) cut flowers. Ph.D. Thesis, The Hebrew University of Jerusalem.
- Abeles F.B.** 1987. Manipulation of plant growth by ethylene. Acta Hort. 201:11-20.
- Abeles F.B., Morgan P.W. Saltveit M.E.** 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd ed. Academic Press, New York, NY.
- Aloni R., Langhans M., Aloni E., Dreieicher E., Ullrich C.I.** 2005. Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream. J. Exp. Bot. 56:1535-1544.
- Bichara A.E., Van Staden J.** 1993. The effect of aminooxyacetic acid and cytokinin combinations on carnation flower longevity. Plant Growth Regul. 13:161-167.
- Bondok M.A., Shehata S.A., Rabie K.A.E., El-Antably H.M.** 1996. Induced abscission of cotton leaves by the bioregulator thidiazuron. Bulletin Fac. Agr. University Cairo 47:99-115.
- Borochoy A., Woodson R.D.** 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. Hort. Rev. 11:15-43.
- Bossè C.A., Van Staden J.** 1989. Cytokinins in cut carnation flowers. V. Effects of cytokinin type, concentration and mode of application on flower longevity. J. Plant Physiol. 135:155-159.
- Bracho G.E., Whitaker J.R.** 1990. Purification and partial characterization of potato (*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor. Plant. Physiol. 92:386-394.
- Carvalho S.M.P., Heuvelink E., Harbinson J., Van Kooten O.** 2006. Role of sink-source relationships in chrysanthemum flower size and total biomass production. Physiol. Plant. 128:263-273.
- Chang H., Jones M.L., Banowitz G.M., Clark D.G.** 2003. Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with *P_{SAG12}-IPT* delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. Plant Physiol. 132:2174-2183.
- Clarke S.F., Jameson P.E., Downs C.** 1994. The influence of 6-benzylaminopurine on post-harvest senescence of floral tissues of broccoli (*Brassica oleracea* var. 'Italica'). Plant Growth Regul. 14:21-27.
- Cook D., Rasche M., and Eisinger W.** 1985. Regulation and action of cytokinins in cut

- carnation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **110**:856-859.
- Cook D., Van Staden J.** 1983. Senescence of cut carnation flowers: Ovary development and CO₂ fixation. J. Plant Growth Regul. **1**:221-232.
- Cook D., Van Staden J.** 1988. Manipulating carnation petal senescence II. The influence of benzyladenine on indoleacetic acid metabolism and ethylene production. J. Plant Physiol. **133**:470-474.
- Dal Cin V., Boschetti A., Dorigoni A., Ramina A.** 2007. Benzylaminopurine application on two different apple cultivars (*Malus domestica*) display new and unexpected fruitlet abscission features. Ann. Bot. **99**:1195-1202.
- Dal Cin V., Danesin M., Ramina A., Dorigoni A., Boschetti A., Ruperti B.** 2005. Fruit abscission as related to fruit quality. Acta Hort. **682**:781-787.
- Davey, J. E., Van Staden, J.** 1976. Cytokinin translocation: Changes in zeatin and zeatin riboside levels in the root exudate of tomato plants during their development. Planta **130**: 69-72.
- De Moraes P.J., Finger F.L., Barbosa J.G., Cecon P.R.** 2007. Postharvest longevity of *Epidendrum ibaguense* orchid flowers. Rev. Bra. Hort. Orn. **13**:31-37.
- De Oliveira L.M., Paiva R., De Santana J.R., Nogueira R.C., Soares F.P., Silva L.C.** 2007. Effect of cytokinins on senescence and foliar abscission during *in vitro* *Annona glabra* L. cultivation. Revista Brasileira Fruticultura **29**:25-30.
- Doi M., Reid M.S.** 1995. Sucrose improves the postharvest life of cut flowers of a hybrid *Limonium*. HortScience **30**:1058-1060.
- Dubois M.K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. **28**:350-356.
- Ehness R., Roitsch T.** 1997. Coordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. Plant J. **11**:539-548.
- Eisinger W.** 1977. Role of cytokinins in carnation flower senescence. Plant Physiol. **59**:707-709.
- Eschrich W., Eschrich B.** 1992. Control of phloem unloading by source activities and light. Plant Physiol. Biochem. **25**:625-634.
- Featonby-Smith B.C., Van Staden J., Hofman P.J.** 1987. Cytokinins in cut carnation flowers: I. The complex in ovaries. Plant Growth Regul. **5**:15-23.
- Ferrante A., Hunter D. Hackett W.P., Reid M.S.** 2002. Thidiazuron - a potent inhibitor of leaf senescence in *Alstroemeria*. Postharvest. Biol. Technol. **25**:333-338.
- Ferrante A., Tognoni F.** 2003. Treatment with thidiazuron for preventing leaf yellowing in cut tulips and chrysanthemum. Acta Hort. **624**:357-363.
- Frommer W.F., Hirner B., Kuhn C., Harms K., Martin T., Riesmeier J.W., Schulz B.** 1996. Sugar transport in higher plants. Membranes: Specialized Functions in Plants. In: Knox J.P., Bowles D.J. (eds.). BIOS Sci. Publ., Oxford. pp. 319-335.
- Fukui R., Kikuchi S., Ichida Y., Honjo H.** 2005. Vase life of imported *Anthurium* flowers evaluated in Japan in relation to the effects of postimportation benzyladenine treatment. HortScience **40**:1439-1443.
- Fusseder A., Wartinger A., Hartung W., Schulze E.D., Heilmeier H.** 1992. Cytokinin in the xylem sap of desert-grown almond (*Prunus dulcis*) trees: daily courses and their possible interaction with abscisic acid and leaf conductance. New Phytol. **122**:45-52.
- Gan S.S., Amasino R.M.** 1995. Inhibition of leaf senescence by auto-regulated production of cytokinin. Science **270**:1986-1988.
- Godt D.E., Riegel A., Roitsch T.** 1995. Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. Plant Physiol. **146**:231-238.

- Godt D.E., Roitsch T.** 1997. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol.* **115**:273-282.
- Goszczyńska D.M., Zieslin N., Mor Y., Halevy A.H.** 1990. Improvement of postharvest keeping quality of 'Mercedes' roses by gibberellin. *J. Plant Growth Regul.* **9**:293-303.
- Guivarc'h A., Rembur J., Goetz M., Roitsch T., Noin M., Schmülling T., Chriqui D.** 2002. Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *J. Exp. Bot.* **53**:621-629.
- Halaba J. Rudnicki R.M.** 1983. An invertase inhibitor as affecting wilting of carnation petals. *Acta Hort.* **138**:261-267.
- Halaba J. Rudnicki R.M.** 1989a. Control of invertase activity by an inhibitor in aging petals. *Acta Hort.* **251**:119-120.
- Halaba J. Rudnicki R.M.** 1989b. Invertase inhibitor in wilting flower petals. *Scien. Hort.* **40**:83-90.
- Halevy A.H.** 1987. Assimilate allocation and flower development. In: Atherton, J.G. (Ed.), *Manipulation of Flowering*. Butterworths, London. pp. 363-378.
- Halevy A.H., Mayak S.** 1979. Senescence and postharvest physiology of cut flowers, part 1. *Hort. Rev.* **1**:204-236.
- Halevy A.H., Mayak S.** 1981. Senescence and postharvest physiology of cut flowers, Part 2. *Hort. Rev.* **3**: 59-143.
- Han S.S.** 1992. Role of sucrose in bud development and vase life of cut *Liatris spicata* (L.) willd. *HortScience* **27**:1198-1200.
- Hawker J.S., Walker R.R., Ruffner H.P.** 1976. Invertase and sucrose synthase in flowers. *Phytochemistry.* **15**:1441-1443.
- He S., Joyce D.C., Irving D.E.** 2006a. Competition for water between inflorescences and leaves in cut flowering stems of *Grevillea* 'Crimson Yul-lo'. *J. Hort. Sci. Biotech.* **81**:891-897.
- He S., Joyce D.C., Irving D.E. Faragher J.D.** 2006b. Stem end blockage in cut *Grevillea* 'Crimson Yul-lo'. *Postharvest Biol. Technol.* **41**:78-84.
- Ho L.C.** 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **39**:355-378.
- Ho L.C., Nichols R.** 1975. The role of phloem transport in the translocation of sucrose along the stem of carnation cut flowers. *Ann. Bot.* **39**:439-446.
- Ho L.C., Nichols R.** 1977. Translocation of ¹⁴C-sucrose in relation to changes in carbohydrate content in rose corollas cut at different stages of development. *Ann. Bot.* **41**:227-242.
- Hoeberichts F.A., Van Doorn W.G., Vorst O., Hall R.D., Van Wordragen M.F.** 2007. Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. *J. Exp. Bot.* **58**:2873-2885.
- Howard H.F., Witham F.H.** 1983. Invertase activity and the kinetin-stimulated enlargement of detached radish cotyledons. *Plant Physiol.* **73**:304-308.
- Huang K.L., Chen W.S.** 2002. BA and sucrose increase vase life of cut *Eustoma* flowers. *Postharvest Biol. Technol.* **37**:547-549.
- Ichimura K.** 1998. Improvement of postharvest life in several cut flowers by the addition of sucrose. *Japan. Agri. Res. Quarterly.* **32**:275-280.
- Ichimura K., Hiraya T.** 1999. Effects of silver thiosulfate complex (STS) in combination with sucrose on vase life of cut sweet pea flowers. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **68**:23-27.
- Ichimura K., Kohata K., Goto R.** 2000. Soluble carbohydrates in *Delphinium* and their influence on sepal abscission in cut flowers. *Physiol. Plant.* **108**:307-313.
- Jaynes T.A., Nelson O.E.** 1971. Invertase activity in normal and mutant maize endosperms

- during development. *Plant Physiol.* **47**:623-628.
- Joyce D.C.** 2004. A brief report on cut-flower *Grevillea* in Israel. *Aust. Flower Ind.* **2**:16-17.
- Joyce D.C., Beal P.** 1999. Cutflower characteristics of terminal flowering tropical *Grevillea*: a brief review. *Aust. J. Exp. Agr.* **39**:781-794.
- Joyce D.C., Beal P., Shorter A.J.** 1996. Vase life characteristics of selected *Grevillea* genotypes. *Aust. J. Exp. Agr.* **36**:379-382.
- Joyce DC, Jones, R, Faragher, JD** 1993. Postharvest characteristics of native Australian flowers. *Postharvest News Info.* **4**: 61N-67N.
- Joyce D.C., Shorter A.J., Joyce P.A. Beal P.R.** 1995. Respiration and ethylene production by harvested *Grevillea* 'Sylvia' flowers and inflorescences. *Acta Hort.* **405**:224-229.
- Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Cherkozyanova A., Dodd I.C.** 2007. Effect of partial root zone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. *J. Exp. Bot.* **58**:161-168.
- Kuiper D., Ribot S.A., Van Reenen H.S., Marissen N.** 1995. The effect of sucrose on the flower bud opening of 'Madelon' cut roses. *Scien. Hort.* **60**:325-336.
- Kuiper D., Van Reenen H.S., Ribot S.A.** 1991. Effect of gibberellic acid on sugar transport into petals of 'Madelon' rose flowers during bud opening. *Acta Hort.* **298**:93-98.
- Kumar N., Srivastava G.C., Dixit K., Mahajan A. and Pal M.** 2007. Role of carbohydrates in flower bud opening in rose (*Rosa hybrida* L.). *J. Hort. Sci. Biotech.* **82**:235-242.
- Lagerstedt H.B., Langston.** 1967. Translocation of radioactive kinetin. *Plant Physiol.* **42**:611-622.
- Lambrechts H., Kolloffel C.** 1993. Soluble and insoluble invertase activity in elongating *Tulipa gesneriana* flower stalks. *Physiol. Plant.* **89**:830-834.
- Lara M.E.B., Garcia M.C.G., Fatima T., Ehness R., Lee T.K., Proels R., Tanner W., Roitsch T.** 2004. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell.* **16**:126-1287.
- Leigh R.A., ap Rees T., Fuller W.A., Banfield J.** 1979. The location of invertase activity and sucrose in the vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*). *Biochem. J.* **178**:539-547.
- León P., Sheen J.** 2003. Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* **8**:110-116.
- Lichtenthaler H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol.* **148**:350-382.
- Ligawa J.K., Joyce D.C., Hetherington S.E.** 1997. Exogenously supplied sucrose improves the postharvest quality of *Grevillea* 'Sylvia' inflorescences. *Aust. J. Exp. Agri.* **37**: 809-816.
- Lukaszewska A.J.** 1995. Distribution of sugars in tulip flowers parts as affected by Ethrel and GA₃ in the holding solutions. *Acta Hort.* **405**:351-355.
- Lukaszewska A.J., Barthe Ph.** 1995. The effect of exogenous cytokinins on longevity of cut roses. *Acta Hort.* **105**:122-126.
- Lukaszewska A.J., Bianco J., Barthe P., Le Page-Degivry M.T.** 1994a. Changes in contents of endogenous cytokinins in petals of cut 'Sonia' roses during flower development. *Acta Hort.* **424**:157-161.
- Lukaszewska A.J., Bianco J., Barthe P., Le Page-Degivry M.T.** 1994b. Endogenous cytokinins in rose petals and the effect of exogenously applied cytokinins on flower senescence. *J. Plant Growth Regul.* **14**:119-126.
- Matsushita K., Uritani I.** 1976. Isolation and characterization of acid invertase inhibitor from sweet potato. *J. Biochem.* **79**:633-639.
- Mayak S., Dilley D.R.** 1976. Effect of sucrose on response of cut carnation to kinetin, ethylene, and abscisic acid. *J. Amer. Hort. Sci.* **101**:583-585.
- Meir S., Salim S., Chernov Z., Philosoph-Hadas S.** 2007. Quality improvement of cut flowers and potted plants with postharvest treatments based on various cytokinins and

- auxins. *Acta Hort.* **755**:143-154.
- Meir S., Salim S., Chernov Z., Zadka T., Riov J. Philosoph-Hadas S.** 2009. Improving the quality of various *Grevillea* cultivars grown in Israel by postharvest treatments. *Acta Hort.* In press.
- Miller, W. B., Ranwala A. P.** 1994. Characterization and localization of three soluble invertases from *Lilium longiflorum* flower buds. *Physiol. Plant.* **92**:247-253.
- Moalem-Beno D., Tamari G., Leitner-Dagan Y., Borochoy A., Weiss D.** 1997. Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in petunia corollas. *Plant Physiol.* **113**:419-424.
- Montague M.J.** 2000. Physiological characterization of the response of excised etiolated cucumber cotyledons to benzyladenine: expansion begins at 30 minutes. *J. Plant Physiol.* **156**:530-536.
- Mor Y., Spiegelstein H., Halevy A.H.** 1983. Inhibition of ethylene biosynthesis in carnation petals by cytokinin. *Plant Physiol.* **71**:541-546.
- Morris D.A., Arthur E.D.** 1984. Invertase activity in sinks undergoing cell expansion. *Plant Growth Regul.* **2**:327-337.
- Murch S.J., Choffe K.L., Victor J.M.R., Slimmon T.Y., KrishnaRaj S., Saxena P.K.** 2000. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*, cv 'Anthos'). *Plant Cell Rep.* **19**:576-581.
- Murthy B.N.S., Murch S.J., Saxena P.** 1998. Review Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **34**:267-275.
- Nayak N.R., Rath S.P., Patnaik S.** 1997. In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) SW., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) SW. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Scien. Hort.* **71**:243-250.
- Nichols R.** 1973. Senescence of the cut carnation flower: respiration and sugar status. *J. Hort. Sci.* **48**:111-121.
- Nichols R., Ho L.C.** 1975. Effects of ethylene and sucrose on translocation of dry matter and ¹⁴C-sucrose in the cut flower of the glasshouse carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Ann. Bot.* **9**:287-296.
- Nichols R., Ho L.C.** 1979. Respiration, carbon balance and translocation of dry matter in the corolla of rose flowers. *Ann. Bot.* **44**:12-25.
- O'Donoghue E.M., Somerfield S.D., Heyes J.A.** 2002. Vase solutions containing sucrose result in changes to cell walls of sandersonia (*Sandersonia aurantiaca*) flowers. *Postharvest Biol. Technol.* **26**:285-294.
- Paull R.E., Chantrachit T.** 2001. Benzyladenine and the vase life of tropical ornamentals. *Postharvest Biol. Technol.* **21**:303-310.
- Petridou M., Voyiatzi C., Voyiatzis D.** 2001. Methanol, ethanol and other compounds retard leaf senescence and improve the vase life and quality of cut chrysanthemum flowers. *Postharvest Biol. Technol.* **23**:79-83.
- Philosoph-Hadas S., Michaeli R., Reuveni Y., Meir, S.** 1996. Benzyladenine pulsing retards leaf yellowing and improves quality of goldenrod (*Solidago*) cut flowers. *Postharvest Biol. Technol.* **9**:65-73.
- Pressey R.** 1966. Separation and properties of potato invertase and invertase inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **113**:667-674.
- Quanten L., Chaerle L., Noben J.P., Van-Onckelen H., Prinsen E., Van-Der-Straeten D., Valcke R.** 2007. Effects of tetracycline on wild-type and inducible *P35So IPT-5/TETR* transgenic tobacco plants. *Physiol. Plant.* **130**:290-300.
- Ranwala A.P., Baird W.V., Miller W.B.** 1998. Organ-specific localization and molecular properties of three soluble invertases from *Lilium longiflorum* flower buds. *Physiol.*

- Plant. **103**:551-559.
- Ranwala A.P., Miller W.B.** 1997. Expression of invertases in *Lilium longiflorum* flower buds. Acta Hort. **430**:49-54.
- Ranwala A.P., Miller W.B.** 1998. Sucrose-cleaving enzymes and carbohydrate pools in *Lilium longiflorum* floral organs. Physiol. Plant. **103**:541-550.
- Reid S.M., Evans Y.R., Dodge L.L.** 1989. Ethylene and silver thiosulfate influence opening of cut rose flowers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **114**:436-440.
- Reid S.M., Wu M.J.** 1991. Ethylene in flower development and senescence. In: Mattoo A.K., Suttle J.C. (Eds.), The Plant Hormone Ethylene. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 215-234.
- Roitsch T.** 1999. Source-sink regulation by sugars and stress. Curr. Opin. Plant Biol. **2**:198-206.
- Roitsch T., Balibrea M.E., Hofmann M., Proels R., Sinha A.K.** 2003. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. J. Exp. Bot. **54**:513-524.
- Roitsch T., Bittner M., Godt D.E.** 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggests a role in sink-source regulation. Plant Physiol. **108**:285-294.
- Roitsch T., Ehness R.** 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. Plant Growth Regul. **32**:359-367.
- Roitsch T., Ehness R., Goetz M., Hause B., Hofmann M., Sinha A.K.** 2000. Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signaling. Aust. J. Plant Physiol. **27**:815-825.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J.** 2006. Sugar sensing and signalling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. **57**:675-709.
- Rolland F., Moore B., Sheen J.** 2002. Sugar sensing and signalling in plants. Plant Cell. Suppl. 185-205.
- Rolland F., Sheen J.** 2005. Sugar sensing and signaling networks in plants. Biochem. Soc. **33**:269-271.
- Ruiz R., Garcia-Luis A., Monerri C., Guardiola J.L.** 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *Citrus*. Ann. Bot. **87**:805-812.
- Sacalis J.N., Chin, C.K.** 1976. Metabolism of sucrose in cut roses. I. Comparison of sucrose pulse and continuous sucrose uptake. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **101**: 254-257.
- Sacalis J.N., Durkin D.** 1972. Movement of ^{14}C in cut roses and carnations after uptake of ^{14}C -sucrose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **97**:481-484.
- Sankhla N., Mackay W.A., Davis T.D.** 2003. Reduction of flower abscission and leaf senescence in cut phlox inflorescence by thidiazuron. Acta Hort. **628**:837-841.
- Sankhla N., Mackay W.A., Davis T.D.** 2005a. Effect of thidiazuron on senescence of flowers in cut inflorescence of *Lupinus densiflorus* Benth. Acta Hort. **669**:239-243.
- Sankhla N., Mackay W.A., Davis T.D.** 2005b. Corolla abscission and petal color in cut phlox flower heads: effects of sucrose and thidiazuron. Acta Hort. **669**:389-393.
- Sankhla N., Mackay W.A., Davis T.D.** 2006. Manipulation of postharvest quality and display life in cut phlox flower heads: effect of sucrose, prohexadione-Ca and gibberellic acid. Acta Hort. **712**:835-840.
- Schwimmer S., Makower R.U., Rorem E.** 1961. Invertase and invertase inhibitor in potato. Plant Physiol. **36**:313-316.
- Serek M., Woltering E.J., Sisler E.C., Frello S., Srikandarajah S.** 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. Biotech. Adv. **24**:368-381.
- Sergeeva L.I., Vreugdenhil D.** 2002. In situ staining of activities of enzymes involved in carbohydrate metabolism in plant tissues. J. Exp. Bot. **53**:361-370.

- Setyadjit, Joyce D.C., Irving D.E., Simons D.H.** 2004a. Effects of 6-benzylaminopurine treatments on the longevity of harvested *Grevillea* 'Sylvia' inflorescences. *Plant Growth Regul.* **43**:9-14.
- Setyadjit, Joyce D.C., Irving D.E., Simons D.H.** 2004b. Development and senescence of *Grevillea* 'Sylvia' inflorescences, flowers and flower parts. *Plant Growth Regul.* **44**:133-146.
- Sinha A.K., Hofmann M.G., Römer U., Köckenberger W., Elling L., Roitsch T.** 2002. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiol.* **128**:1480-1489.
- Skorov B., Kureov G., Daskalova S., Trkov M., Hoyerov K., Raimanov I., Motyka V., Trvnkov A., Elliott M.C., Kamnek M.** 2007. Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens ipt* gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. *J. Exp. Bot.* **59**:377-387.
- Stoop J.M.H., Pharr D.M.** 1994. Mannitol metabolism in celery stresses by excess macronutrients. *Plant Physiol.* **106**:503-511.
- Stopar M., Zadavec P.** 2004. Thinning of 'Jonagold' and 'Elstar' apples with the combination of ethephon and CPPU. *Acta Hort.* **653**:93-97.
- Sturm A.** 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* **121**:1-7.
- Sturm A., Sebkova V., Lorenz K., Hardegger M., Lienhard S., Unger C.** 1995. Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β -fructofuranosidase in carrot. *Planta* **195**:601-610.
- Sturm A., Tang G.Q.** 1999. The sucrose- cleaving enzymes of plants and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* **4**:401-407.
- Tal M., Imber D.,** 1971. Abnormal stomatal behavior and hormone imbalance of *flacca*, a wilted mutant of tomato. II. Auxin and abscisic acid-like activity. *Plant Physiol.* **46**:373-376.
- Tanase K., Ushio A., Ichimura K.** 2005. Effects of light intensity on flower life of potted *Delphinium* plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **74**:395-397.
- Taverner E.A., Letham D.S., Wang J., Cornish E.** 2000. Inhibition of carnation petal inrolling by growth retardants and cytokinins. *Aust. J. Plant Physiol.* **27**:357-362.
- Thomas J.C., Katterman F.R.** 1986. Cytokinin activity by thidiazuron. *Plant Physiol.* **81**:681-683.
- Turner N.C.** 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* **58**:339-366.
- Tymowska-Lalanne Z., Kreis M.** 1998. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv. Bot. Res.* **28**:71-109.
- Uddin A.F.M.J., Hashimoto F., Kaketani M., Keiichi S., Sakata Y.** 2001. Analysis of light and sucrose potencies on petal coloration and pigmentation of lisianthus cultivars (*in vivo*). *Scien. Hort.* **89**:73-82.
- Upfold S.J., Van Staden J.** 1994. Metabolism of (6-benzylamino)purine in shoots, shoot-derived callus and shoot cell suspension cultures of *Erythrina caffra*. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* **35**:81-85.
- Upfold S.J., Van Staden J.** 1995. Metabolism of [8-(14)]-(6-benzylamino)purine by individual carnation flower components. *Plant Growth Regul.* **16**:65-71.
- Van Doorn W.G.** 2001. Role of soluble carbohydrates in flower senescence: a survey. *Acta Hort.* **543**:179-183.
- Van Doorn W.G., Groenewegen G., Van de Pol P.A., Berkhofst C.E.M.** 1991. Effects of carbohydrate and water status on flower opening of cut 'Madelon' roses. *Postharvest*

- Biol. Technol. **1**:47-57.
- Van Doorn W.G., Van Meeteren U.** 2003. Flower opening and closure: a review. *J. Exp. Bot.* **54**:1801-1812.
- Van Staden J., Cook E., Nooden L.** 1988: Cytokinins and senescence. In: Nooden L., Leopold A. (ed.), *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press, San Diego. pp. 281-328.
- Van Staden J., Davey J.E.** 1979. The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. *Plant Cell Environ.* **2**:93-106.
- Van Staden J., Featonby-Smith B.C., Mayak S., Spiegelstein H., Halevy A.H.** 1987. Cytokinins in cut carnation flowers. II. Relationship between endogenous ethylene and cytokinin levels in the petals. *J. Plant Growth Regul.* **5**:75-86.
- Van Staden J., Joughin J.I.** 1988. Cytokinins in cut carnation flowers. IV. Effects of benzyladenine on flower longevity and the role of different longevity treatments on its transport following application to the petals. *J. Plant Growth Regul.* **7**:117-128.
- Veselova S.V., Farhutdinov R.G. Veselov S.Y., Kudoyarova G.R., Veselov D.S., Hartung W.** 2005. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). *J. Plant Physiol.* **162**:21-26.
- Waithaka K., Dodge L.L., Reid M.S.** 2001. Carbohydrate traffic during opening of gladiolus florets. *J. Hort. Sci. Biotech.* **76**:120-124.
- Weber H., Borisjuk L., Heim U., Buchner P., Wobus U.** 1995. Seed coat-associated invertases of faba bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expressions. *Plant Cell.* **7**:1835-1846.
- Weiss D., Halevy A.H.** 1991. The role of light reactions in the regulation of anthocyanin synthesis in petunia corollas. *Physiol. Plant.* **81**:127-133.
- Winkenbach F., Matile P.H.** 1970. Evidence for *de novo* synthesis of an invertase inhibitor protein in senescing petals of *Impomea*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **63**:292-295.
- Woltering E.J., Van Doorn W.G.** 1988. Role of ethylene in senescence of petals - morphological and taxonomical relationships. *J. Exp. Bot.* **39**:1605-1616.
- Woodson W.R., Wang H.** 1987. Invertase of carnation petals. Partial purification, characterization and changes in activity during petal growth. *Physiol. Plant.* **71**:224-228.
- Yang S.F., Hoffman N.E.** 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**:155-189.
- Yelle S., Hewitt J.D., Robinson N.L., Darnon S., Bennet A.B.** 1988. Sink metabolism in tomato fruit. III. Analysis of carbohydrate assimilation in wild species. *Plant Physiol.* **87**:737-740.
- Ylstra B., Garrido D., Busscher J., Van Tunen A.J.** 1998. Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. *Plant Physiol.* **118**:297-304.
- Zacarias L., Reid M.**, 1990. Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* **80**:549-554.
- Zavaleta-Mancera H.A., Lopez-Delgado H., Loza-Tavera H., Mora-Herrera M., Trevilla-Garcia C., Vargas-Suarez M., Ougham H.** 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J. Plant Physiol.* **164**:1572-1582.

6. נספח - רשימת פרסומים

1.6. מאמרים

Meir S., Salim S., **Chernov Z.**, Philosoph-Hadas S. 2007. Quality improvement of cut flowers and potted plants with postharvest treatments based on various cytokinins and auxins. Acta Hort. **755**:143-154.

Meir S., Salim S., **Chernov Z.**, Zadka T., Riov J. Philosoph-Hadas S. 2009. Improving the quality of various *Grevillea* cultivars grown in Israel by postharvest treatments. Acta Hort. In press.

2.6. תקצירים בכנסים

Meir S., Salim S., **Chernov Z.**, Abebie B., Philosoph-Hadas S. 2007. Quality improvement of cut flowers and potted plants by postharvest treatments with various auxins and cytokinins. QMSCO 2007, International Conference on Quality Management in Supply Chains of Ornamentals, Bangkok, Thailand. p. KI-12.

Meir S., Salim S., **Chernov Z.**, Riov J., Philosoph-Hadas S. 2008. Improving the quality of various *Grevillea* cultivars by postharvest treatments. IPA 2008, 13th International Protea Association Conference & IXth International Protea Working Group Symposium, Stellenbosch, South Africa. p. 26.

Chernov Z., Philosoph-Hadas S., Riov J., Meir S. 2009. Effects and mode of action of cytokinins combined with sucrose in delaying senescence of *Grevillea* 'Spiderman' cut flowers. ACPD 2009, Third International Symposium on Auxins and Cytokinins in Plant Development, Prague, Czech Republic. p 85.

II

pulsing (for 4 h in a controlled room maintained at 20°C followed by an additional 20-h incubation at 4°C in darkness) or by a momentary dipping of the inflorescence or the whole branch. The treated branches were then placed in a standard controlled observation room, with or without sucrose in the vase solution. The effect of the various treatments on the quality and physiological parameters of the flowering branch (longevity, changes in fresh weight, floret abscission, water balance, kinetics of sucrose uptake, and its transport in the branch) and the florets (relative water content, content of pigments and carbohydrates, activity of invertases, and rates of ethylene production and respiration) during vase life was examined.

The results show that *G.* 'Spiderman' cut flowers reacted positively to dipping the inflorescences in cytokinin solutions, with TDZ being more effective than BA. The positive effect of the cytokinins increased by provision of sucrose in the vase solution. This combined treatment delayed flower senescence, browning and pigment (chlorophyll and carotenoids) breakdown in the perianth, improved the water balance of the cut flowering branches, and prevented floret abscission. The senescence retarding effect of the cytokinins did not operate via their inhibitory effect on ethylene production and respiration rate. It should be noted that the effects of cytokinins and sucrose on the various quality parameters were partially separated and partially complementary. Thus, the cytokinin treatment delayed senescence, prevented abscission and retained pigment content in the florets, while the sucrose treatment improved water balance by reducing transpiration and increasing the content of soluble carbohydrates, which probably led to an increase in the osmotic potential of the tissues. Consequently, the vase life of the cut flowers was significantly extended by the combined treatment.

Additionally, the combined treatment of TDZ and sucrose enhanced sucrose transport from the vase solution to the inflorescences and increased sucrose hydrolysis in the florets and activity of the cell wall invertase. It seems, therefore, that the sink strength in *G.* 'Spiderman' flowers is controlled by cell wall invertase. The results suggest that the positive effect of the combined treatment of cytokinin and sucrose in delaying flower senescence of *G.* 'Spiderman' operates via the regulation of sink-source relationships. The present research also resulted in the development of an applicative treatment, based on dipping the inflorescences in cytokinins and inclusion of sucrose in the vase solution, which enables sea transport of *G.* 'Spiderman' branches from Israel to Europe.

Abstract

Grevillea (*Grevillea* spp.) is a relatively new cut flower crop with a high export potential, characterized by unique and diverse shapes and colors of the inflorescences. The *Grevillea* commercial industry in Israel is based on one cultivar, *G.* 'Spiderman'. The vase life of cut *Grevillea* flowers is limited particularly due to the rapid senescence and associated wilting, abscission, and color fading of the inflorescences.

Among the various treatments examined to improve the quality of cut *Grevillea* flowers, sugars and the cytokinin benzyladenine (BA) delayed had a positive effect, expressed in extension of vase life, retaining flower turgidity and delaying flower browning, senescence and abscission. The combination of these two beneficial treatments was found to act synergistically in delaying flower senescence and browning. In order to understand how this combined treatment works, it is necessary to examine the possible interactions between sugar and cytokinins.

Cytokinins, known as senescence retardants, are often used as a means to extend the vase life of various cut flowers, and the cytokinin effect is improved by addition of sugars. Extracellular invertase, which catalyzes the hydrolysis of sucrose to glucose and fructose, has been found to be an essential component of the cytokinin-mediated delay of leaf senescence, thereby increasing the sink strength of the tissue. Since flowers are considered as sink organs for the sugars produced in the leaves, it can be assumed that the senescence retarding effect of cytokinins and sugar operates by regulation of sink-source relationships.

The aim of the present study was to examine whether a similar mode of action operates in improving quality of *G.* 'Spiderman' cut flowers, which responded positively to cytokinins and sugars. We hypothesized that cytokinins act by increasing invertase activity, and thereby increase the sink strength of the flower, and/or by improving sugar uptake from the vase solution. The specific objectives of this research were: 1) To examine the optimal cytokinin application for *G.* 'Spiderman' cut flowers and their mode of action in extending vase life; 2) To examine the effect of the combined treatment of cytokinins and inclusion of sucrose in the vase solution on quality parameters of the inflorescences, carbohydrate balance in the inflorescences during vase life, sucrose uptake from the vase solution and its transport in the cut branch, and the activity of the three invertases in the inflorescences during vase life, as a parameter for their sink strength.

Experiments were performed with freshly harvested *G.* 'Spiderman' cut flowers, obtained from local commercial growers. The cytokinins BA or Thidiazuron (TDZ) were applied either by

This work was carried out under the supervision of:

Dr. Shimon Meir

Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce,
Agricultural Research Organization (ARO),
The Volcani Center

Prof. Joseph Riov

The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture,
The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment
The Hebrew University of Jerusalem

**Studying the effect and mode of action of cytokinins
combined with sugar in delaying senescence of
Grevillea cut flowers**

**Thesis submitted to The Robert H. Smith Faculty of
Agriculture, Food and Environment of
The Hebrew University of Jerusalem
For the degree of
Master of Science**

**by
Zoya Chernov**

November 2009

Rehovot