

**גורמים אנטומיים ופיסיולוגיים המשפיעים על
מאזן המים בענפי קטיף של דודונאה 'דנה' במהלך
השנה**

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה

**מאת
אילנה שטיין**

הוגש לסנט האוניברסיטה העברית

מרץ 2013

אדר תשע"ג

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

ד"ר סוניה פילוסוף-הדס

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף
מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

ופרופ' יוסי ריוב

המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות ע"ש רוברט ה. סמית,
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית
האוניברסיטה העברית בירושלים

שלמי תודות

אני מודה מכל הלב:

למנחים, ד"ר סוניה פילוסוף-הדס ופרופ' יוסי ריוב, ולד"ר שמעון מאיר, על הדרכתם המסורה והקפדנית ועל עזרתם הרבה.

לחברי צוות הפרחים הנחמדים: ד"ר יעקב פרצלן, אידה רוזנברגר, בטינה קוכאנק, תמר צדקה, שושנה סלים, דני סתיו וילנה שחר-איבנוב.

לחבריי למעבדה – הסטודנטים: ד"ר אלון גליק, ד"ר בקלה אבבה, ארנון דותן, זויה צ'רנוב, סריויגנש סנדרסן ונטע בשן על האוזן הקשבת והחברות.

לחברי הועדה המלווה: פרופ' אמנון שוורץ מהפקולטה לחקלאות ולד"ר שבתאי כהן ממינהל המחקר החקלאי על העזרה והעצות לאורך כל הדרך.

לפרופ' עמרם אשל מאוניברסיטת תל אביב על השימוש בקוויטרון והחברה הנעימה.

לגב' יעל אפרת מאוניברסיטת תל אביב על היותה האורים והתומים שלי במיקרוסקופיה.

לד"ר דרור מינץ וד"ר מיה אופק ממינהל המחקר החקלאי על העזרה המסורה והרבה ב-
Real time PCR ועל האירוח הנדיב.

לפרופ' שאול ילובסקי מאוניברסיטת תל אביב וכל חברי מעבדתו הנפלאים על העזרה
בביצוע שיטת ה- *in situ hybridization*.

לגב' נעמי אגור מהפקולטה לחקלאות על העזרה באנליזת הסוכרים.

לגב' סימה קגן ממינהל המחקר החקלאי על טיפול בשיחי הדודונאה.

לד"ר ורד הולדנגרבר ממינהל המחקר החקלאי על העזרה במיקרוסקופ האלקטרוני.

לד"ר ורה הרשקו ממינהל המחקר החקלאי על העצות בכל השיטות המולקולאריות.

לד"ר סמיר דרובי ממינהל המחקר החקלאי וכל חברי מעבדתו על השימוש במיקרוסקופ.

ולכל אנשי המחלקה לאחסון - על הנכונות לעזור והחברה הנעימה.

להורי, ד"ר הלן וארי שטיין ולאחותי כרמלה

לאורי גורן, בעלי

לבני דניאל

לסבתי, עו"ד חנה לוינסון ז"ל

על האמונה בי, הסבלנות והעזרה האינסופית

תוכן העניינים

i א. תקציר
1 רשימת קיצורים
2 ב. מבוא
2 1.1. דודונאה 'דנה' - רקע כללי
2 2.2. הסיבות לכמישת ענפים קטופים
2 1.2.1. הגורמים לקליטת מים לקויה
4 2.2.2. הזדקנות מואצת בעקבות הקטיף
7 3.3. התמודדות הצמח עם עקת מים
7 1.3.1. מנגנונים להגברת מעבר מים
9 2.3.2. נוכחות של פוליסכרידים חומציים
9 3.3.3. מנגנונים לחסכון במים
10 4.4. התאמות אנטומיות למחסור במים
11 5.5. השפעת הסביבה על גורמים אנטומיים ופיסיולוגיים הקשורים למאזן המים
13 6.6. גישות בסיסיות לפתרון בעיות מאזן המים בענפי קטיף
14 7.7. מדדים ושיטות להערכת מאזן המים בענפי קטיף והגורמים המשפיעים עליו
16 8.8. מטרות המחקר
16 1.8.1. השערת המחקר
16 2.8.2. מטרות ספציפיות
17 ג. שיטות המחקר
17 1.1.1. חומר צמחי
17 1.1.1.1. ענפי קטיף
17 2.1.2. עלים מנותקים
17 2.2.2. יישום טיפולים
17 1.2.2.1. הטענה בתמיסות סוכר
17 2.2.2.2. מתן סוכר באגרטל
17 3.2.2. מעכבי תעלות מים
18 4.2.2. אתילן ומעכב פעילות של אתילן
18 3.3.3. בדיקות אנטומיות
18 1.3.3.1. היסטולוגיה - כללי
18 2.3.3.2. אנליזת דוגמאות במיקרוסקופ אלקטרוני
19 3.3.3.3. קביעת מימדי הצינורות בעזרת מצרציה וחתכים ידניים
19 4.3.3.4. הדפסי האפידרמיס
19 5.3.3.5. מעקב אחר קליטת מים אפופלסטית

19	4.ג. קביעת מדדים של מאזן המים
20	5.ג. מדידת אורך צינורות ההובלה
20	6.ג. כימות הסתימות בענפים
20	7.ג. יצירת אווירה לחה
21	8.ג. קביעת מדד האמבוליה
21	9.ג. קביעת קצב ייצור אתילן וקצב הנשימה
22	10.ג. קביעת הרמה של פחמימות ופרולין בעלים
22	11.ג. קביעת מדדי הזדקנות בעלים
22	1.11.ג. דליפת יונים
22	2.11.ג. בדיקת כלורופיל
23	12.ג. בחינת הביטוי של גנים של תעלות מים (אקוואפורנים) בעלים ובגבעולים
23	1.12.ג. הפקת RNA וסינתזת cDNA
23	2.12.ג. שיבוט וריצוף של הומולוגים של גנים ממשפחת ה-PIP בדודוואה
24	3.12.ג. כימות רמת התוצר בשיטת ה-Real-Time PCR
24	13.ג. קביעת המיקום בעלה של הגן <i>PIP2a</i> בעזרת <i>in situ hybridization</i>
25	14.ג. ניתוח סטטיסטי
26	ד. תוצאות
26	1.ד. אפיון המבנה המורפולוגי והאנטומי של ענפי דודוואה 'דנה'
26	1.1.ד. אנטומיה של הגבעולים
29	2.1.ד. אנטומיה של העלים
33	2.ד. אפיון פיסיולוגי של ענפי קטיף של דודוואה 'דנה' בהקשר למאזן המים באגרטל
33	1.2.ד. מאזן המים של הענפים במהלך חיי האגרטל
35	2.2.ד. בירור הסיבות לכמישת ענפי קטיף של דודוואה 'דנה'
37	3.2.ד. איתור סתימות בגבעול ובפטוטרות העלים
41	4.2.ד. תנודות יומיות בקליטת המים ע"י הענפים
44	5.2.ד. השפעות אתילן על מאזן המים של ענפי הקטיף
47	3.ד. שינויים עונתיים במאזן המים במהלך חיי האגרטל
54	4.ד. שינויים עונתיים במבנה האנטומי של ענפי דודוואה והשפעתם על חיי האגרטל
54	1.4.ד. גבעולים
57	2.4.ד. עלים
60	3.4.ד. השוואה בין המבנה האנטומי של ענפים וגטטיביים לזה של ענפים נושאי פירות
61	5.ד. שינויים עונתיים בתכולת הפחמימות והאוסמוליטים בעלים והשפעתם על חיי האגרטל
61	1.5.ד. שינויים עונתיים בתכולת העמילן
61	2.5.ד. שינויים עונתיים בתכולת הסוכרים המסיסים
	3.5.ד. תכולת סוכרים ופרולין בעלים מענפים וגטטיביים בהשוואה לעלים של ענפים נושאי
62	פירות במהלך חיי אגרטל והשפעת מתן סוכר חיצוני על ענפים אלו

65	האגרטל	6.ד. שינויים עונתיים בנוכחות ובהפעלה של תעלות מים (אקוואפורינים) והשפעתם על חיי
65	1.6.ד. השפעת מעכבי תעלות מים על מאזן המים בענפי דודנאה	
67	2.6.ד. אפיון של גנים המקודדים לתעלות מים שבודדו מעלים של דודנאה 'דנה'	
69	3.6.ד. ביטוי גנים של תעלות מים במהלך חיי האגרטל בעונות שונות	
72	4.6.ד. מיקום הגן <i>PIP2a</i> בעלה	
73	ה. דיון ומסקנות	
73	1.ה. אפיון אנטומי ופיסיולוגי של ענפי דודנאה 'דנה' קטופים במהלך חיי האגרטל	
73	ה.1.1. המבנה האנטומי	
74	ה.2.1. מהלך חיי האגרטל	
74	ה.3.1. הסיבה לכמישת ענפי דודנאה 'דנה' קטופים באגרטל	
75	ה.4.1. היווצרות אמבוליה	
76	ה.5.1. תנודות יומיות במאזן המים	
77	ה.6.1. קליטת מים מהאוויר ע"י העלים בתנאים של לחות מלאה	
79	ה.7.1. השפעת אתילן על מאזן המים	
79	2.ה. שינויים עונתיים במהלך חיי האגרטל של ענפי דודנאה 'דנה'	
79	ה.1.2. שינויים עונתיים במאזן המים	
80	ה.2.2. שינויים באנטומיה הפונקציונאלית של העלים והגבעולים	
83	ה.3.2. שינויים עונתיים במדדים ביוכימיים	
84	ה.4.2. שינויים עונתיים הקשורים בתעלות מים	
	ה.1.4.2. אפיון מולקולארי ופיסיולוגי של תעלות מים ומעורבותן במאזן המים של	
84	ענפי דודנאה 'דנה' קטופים	
85	ה.2.4.2. השפעת אתילן על תעלות מים	
86	ה.3.4.2. שינויים עונתיים בביטוי גנים של תעלות מים	
87	ה.5.2. תוצאות המחקר לאור שינוי האקלים הגלובלי	
87	ה.3. סיכום	
89	ו. ביבליוגרפיה	
105	ז. נספח – רשימת פרסומים	
105	1.ז. מאמרים	
105	2.ז. תקצירים של הרצאות או פוסטרים שהוצגו בכנסים בארץ ובח"ל	
I	תקציר באנגלית	

א. תקציר

דודונאה 'דנה' הנה מכלוא גנני ישראלי בין *Dodonaea viscosa* cv. 'Purpurea' לבין מין נוסף, השייך למשפחת הסבונניים (Sapindaceae). דודונאה 'דנה' היא שיח ירוק-עד, היכול להגיע עד לגובה של 3 מטר. עליו פשוטים דמויי אזמל, באורך של כ- 10 ס"מ וברוחב של כ- 2 ס"מ. צבע העלים של דודונאה 'דנה' בקיץ הנו ירוק כהה, ובסתיו, עם רדת הטמפרטורה, העלים מקבלים גוון אדמדם. הפריחה חלה בחורף. מחודש מרץ ועד סוף אפריל מופיעים על קצות הענפים פירות קרומיים בצבע אדום-סגול המסודרים באשכולות מסיימים. בשל העלים והפירות הדקורטיביים, דודונאה 'דנה' היא בעלת פוטנציאל מסחרי גבוה לשיווק כענף קישוט קטוף. אולם הסתבר שענפי קטיף של דודונאה כומשים לאחר זמן קצר באגרטל, בעיקר בשלב בו הם נושאים פרחים ופירות, וכן כשהקטיף של ענפים וגטטיביים נעשה בעונת החורף. כך, ענפים וגטטיביים שנקטפו בחורף כמשו כבר לאחר 6 ימים באגרטל, בעוד שבקיץ הענפים כמשו רק לאחר 3 שבועות, למרות שהצמחים גדלו כל השנה בתנאים מיטביים של השקיה. על בסיס הממצאים הראשוניים של העבודה והספרות נבחנו הגורמים האפשריים המשפיעים על מאזן המים בענפים שנקטפו בעונות שונות וכן בענפים בשלבי התפתחות שונים. ידוע, כי ענפי קטיף כומשים טרם זמנם במהלך חיי האגרטל בעקבות הובלת מים לקויה או בשל הזדקנות מואצת, המושרית לאחר הקטיף. מדידות של דליפת יונים מהתאים ופירוק הכלורופיל במהלך חיי האגרטל וכן ניסויים בהם הענפים באגרטל כוסו בשקית ניילון למניעת איבוד מים הראו, כי כמישת ענפי דודונאה באגרטל לא נבעה מהזדקנות מוגברת, אלא מהולכת מים לקויה. תמיכה נוספת במסקנה זו הוא הממצא, שאתילן, הנחשב כגורם העיקרי להזדקנות מואצת של ענפי קטיף, האריך את משך חיי האגרטל של ענפי דודונאה 'דנה'. לפיכך, העבודה התמקדה בהמשך בבחינת הגורמים העשויים להשפיע על הפגיעה במאזן המים של ענפי קטיף וגטטיביים בעונת החורף ובענפי קטיף נושאי פרחים ופירות. לא נצפו סתימות (טילות, פולימרים שונים) באיברי הצמח השונים. מאידך, הטענת ענפי קטיף בצבען פוקסין הראתה, כי חלק מצינורות ההובלה לא העבירו מים למרות שלא היו סתימות נראות לעין. לכן, סביר להניח שהצינורות עברו אמבוליה ע"י בועות אוויר. הנחה זו חוזקה ע"י הממצא שהראה, כי חיתוך מחדש של הענפים באוויר במהלך חיי אגרטל הגביר את הכמישה, כנראה עקב כניסה נוספת של בועות אוויר לצינורות ההובלה. ואכן, כימות בועות האוויר הנוצרות ברקמה באמצעות חיתוך הענפים בתוך גליצרול וצפייה בחתכים באמצעות מיקרוסקופ הראה באופן חד-משמעי, שענפי קטיף של דודונאה 'דנה' עוברים אמבוליה במהלך חיי האגרטל.

נמצא, שהמבנה האנטומי של דודונאה 'דנה' דומה למבנה של צמחים אחרים ממשפחת הסבונניים. הגבעול של דודונאה 'דנה' מאופיין בסיבים מרובים ובעצה בעלת נקבוביות מפוזרת עם אלמנטים טרכיאריים בעלי לוח פשוט וגמצים מתורבצים. העלים הנם בעלי מאפיינים קסרומורפיים, קוטיקולה עבה, טריכומות בלוטיות ופיוניות הממוקמות בצד התחתון של העלה. הטריכומות אינן חדירות למים, אך האפידרמיס כולו מעביר מים. צינורות ההובלה בעלים מסתיימים באלמנטים חופשיים במזופיל. הגבעול נמצא כגורם העיקרי המשפיע על מאזן המים בענפים הקטופים. מסקנה זו נתמכה ע"י הממצאים המראים, שענפי קטיף וגטטיביים כמשו בחורף ושמרו על מאזן מים גבוה בקיץ, בעוד שעלים מנותקים מאותם ענפים לא כמשו במהלך חיי האגרטל, ונשמר בהם מאזן מים חיובי במשך כל תקופות השנה.

המחקר התמקד בבחינה של שלושה כיוונים עיקריים, שהיו עשויים להסביר את ההבדלים במאזן המים של הענפים הקטופים שנצפו בעונות שונות ובשלב התפתחות שונים:

(א) אנטומיה פונקציונאלית (מבנה העצה ומבנה העלים) של הענפים במהלך השנה, העשויים להשפיע על הולכת המים.

(ב) שינויים בהתאמה האוסמוטית (הצטברות סוכרים מסיסים ופרולין) של הענפים במהלך חיי האגרטל. זאת, מאחר ועליה בפוטנציאל האוסמוטי מעודדת קליטה של מים.

(ג) פעילות של תעלות מים (Aquaporins) במהלך חיי האגרטל בעונות שונות, העשויה להשפיע על מאזן המים. נבחנה השפעת מעכבים של אקוואפורינים על מאזן המים בענפים, וכן רמת הביטוי של גנים המקודדים לאקוואפורינים בגבעולים ובעלים במהלך חיי האגרטל.

בנוסף, נבחנה גם ההשפעה האפשרית של אתילן על מאזן המים של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה', שכן הורמון זה מהווה גורם חשוב לגבי משך חיי האגרטל של ענפי קטיף.

ממצאי המחקר הראו, שקיימים שינויים עונתיים בשלושת הגורמים שנבחנו, כמפורט להלן:

שינויים עונתיים באנטומיה פונקציונאלית - נמצאו הבדלים במבנה העצה של ענפים שנקטפו בחורף בהשוואה לענפים שנקטפו בקיץ. קוטר צינורות ההובלה ואורך חוליות הטרקיאיה היו במתאם שלילי, וצפיפות צינורות ההובלה הייתה במתאם חיובי לטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף. כלומר, בחורף קוטר צינורות ההובלה ואורך חוליות הטרקיאיה היה גדול יותר מאשר בקיץ. מהספרות ידוע, כי הממדים של צינורות ההובלה משפיעים על הרגישות לאמבוליה, כאשר צינורות רחבים וארוכים נחשבים לבעלי רגישות גבוהה יחסית לאמבוליה. מכאן ניתן להסיק, שהרגישות לכמישה בעונות השונות מוכתבת במידה רבה ע"י המבנה האנטומי של העצה.

מדד האמבוליה, אשר נקבע בשיטת כימות בועות האוויר בחתכי רקמה שנעשו בתוך גליצרול, היה גבוה בענפי חורף כבר החל מהיום הראשון באגרטל ונשאר ברמה זו לאורך כל חיי האגרטל, ואילו בענפי קיץ מדד האמבוליה היה נמוך בתחילת חיי האגרטל ועלה רק לאחר 7 ימים. ממצא זה מחזק את ההנחה, כי ענפי חורף רגישים לאמבוליה בגלל המבנה האנטומי של העצה, ולכן הם סובלים מאמבוליה מוגברת מיד לאחר הקטיף, וכתוצאה מכך הם כושמים מהר יותר מאשר ענפי קיץ.

מבנה העלים הושפע מהשינויים העונתיים, שהתבטאו בשינויים בטמפרטורת הסביבה היומית המקסימאלית ביום הקטיף. עובי העלה היה במתאם שלילי, ואילו צפיפות הטרקומות והפיוניות היו במתאם חיובי לטמפרטורה. המבנה האנטומי של העלים השפיע על שינויים עונתיים במאזן המים של הענף רק בתחילת חיי האגרטל (יום 1) אך לא בסופם (יום 16).

שינויים עונתיים בהתאמה האוסמוטית - לא נמצא מתאם בין תכולת הסוכרים המסיסים והעמילן בעלים לבין מאזן המים של ענפים וגטטיביים שנקטפו בעונות שונות. לעומת זאת, תכולת הסוכרים בעלים של ענפים נושאי פירות הייתה נמוכה מזו של ענפים וגטטיביים. ממצא זה מראה, שבענפים נושאי פירות קליטת המים הנה פחותה, כנראה בשל פוטנציאל אוסמוטי נמוך יחסית. בענפים אלו נדרשה תוספת סוכר לשמירת האיכות בחיי האגרטל, כיון שהפירות מהווים מבלע לסוכרים. תכולת הפרולין בעלים של ענפים נושאי פירות הייתה נמוכה יותר מזו שבעלים של ענפים וגטטיביים מיד לאחר הקטיף, אך במהלך חיי האגרטל תכולת הפרולין עלתה והייתה דומה בשני סוגי הענפים.

שינויים עונתיים בנוכחות ובהפעלה של תעלות מים (אקוואפורינים) - מעכבי תעלות מים מסוגים שונים (פלורטין וכספית) השפיעו בצורה שונה על מאזן המים של ענפי דודונאה, כאשר פלורטין פגע כצפוי במאזן המים, בעוד שינוי כספית שיפרו את מאזן המים. נראה לכן, כי בדודונאה ישנן תעלות מים שאינן רגישות לכספית.

מעלי דודונאה בודדו רצפים חלקיים של שלושה גנים המקודדים לתעלות מים מסוג PIP, שממוקמות בממברנה הציטופלסמטית. מבין הגנים שבודדו, רק הביטוי של הגן *PIP2a*, שירד במהלך חיי האגרטל והיה גבוה ביום הקטיף בעלים של ענפי קיץ ונמוך בענפי חורף, הראה מתאם עם השינויים העונתיים במאזן המים בדודונאה. מיקום הגן בעלה, אשר נקבע בשיטת *in situ hybridization*, היה באפידרמיס, בסמוך להצטברות פקטינים, שהנם פולימרים הידרופיליים השומרים על רמת המים של הרקמות.

השפעת אתילן – טיפול באתילן חיצוני העלה את משקל ענפי הקטיף של דודונאה 'דנה' לאורך כל החיי האגרטל. כן נמצאו השפעות גומלין בין אתילן לבין פעילות של תעלות מים בענפי דודונאה. יחד עם זאת, בניגוד למצופה, אתילן הפחית את הביטוי של הגן *PIP2a*, המקודד לתעלת מים בעלי דודונאה.

מסקנות:

- ממצאי העבודה ניתן להסיק, שהכמישה המהירה יחסית של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' בעונת החורף, מקורה בהובלת מים גרועה בענפים. ממצאי המחקר מראים בבירור, ששינויים אנטומיים התלויים בטמפרטורה העונתית גורמים לשינויים במוליכות ההידראולית בענפים קטופים במהלך חיי האגרטל, ומצביעים על קשר הדוק בין גורם סביבתי עונתי לבין תכונות אנטומיות והמוליכות ההידראולית של הענפים הקטופים.
- מבנה האלמנטים הטרנזיסקריפטיים (קוטר וצפיפות צינורות ההובלה ואורך חוליות הטרנזיסקריפטיים) נמצא כגורם העיקרי הקובע את יעילות הולכת המים בענפי קטיף של דודונאה 'דנה' בעונות השונות. האמבוליה המוגברת שנצפתה בענפי חורף למרות תנאי הגידול המיטביים (השקיה סדירה) נובעת מהמבנה השונה של צינורות ההובלה בענפי חורף בהשוואה לענפי קיץ.
- בענפים נושאי פירות נמצא, שהפירות מהווים מבלע לסוכרים שבעלים, וכתוצאה מכך מחסור בסוכרים בעלים פוגע בקליטת המים של הענפים הקטופים, ומכאן במאזן המים שלהם. ממצאים אלו מורים, שנשיאת הפירות אינה מבטאת רק שלב התפתחותי בענפים, אלא גם מצביעה על כך שישנה מעורבות של יחסי מקור-מבלע במאזן המים של הענפים האלו.
- תעלות מים מעורבות כנראה במאזן המים של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה', אולם בשל המורכבות של המערכת הזו לא ניתן עדיין לקבוע במדויק את אופי המעורבות.
- אתילן אינו גורם להזדקנות וכמישה של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה', אלא משפר באופן ייחודי את מאזן המים שלהם בתנאי סביבה נורמליים ללא עקה. השפעה זו יכולה לנבוע מהשפעת האתילן על הפעילות של תעלות המים.
- מאחר ובעבר לא נעשה מחקר מעמיק בנושא ההשתנות העונתית של מאזן המים בענפי קטיף, הממצאים החדשניים של העבודה הנוכחית יוכלו לשמש כמודל להבנת מאזן המים בענפי קטיף מעוצים נוספים הסובלים מכמישה מהירה בכלל ובעונות שונות בפרט.

רשימת קיצורים

ח"מ – חלקי מיליון
מ"צ – מעלות צלסיוס

ABA = abscisic acid
ACC = 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
DW = dry weight
FAA = Formalin : acetic acid : alcohol
FW = fresh weight
GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP = green fluorescent protein
1-MCP = 1-methylcyclopropene
NIPs = NOD26-like intrinsic proteins
PBS = phosphate buffered saline
PCR = polymerase chain reaction
PIPs = plasma membrane intrinsic proteins
RWC = relative water content
SIPs = small basic intrinsic proteins
STS = silver thiosulfate
TIPs = tonoplast intrinsic proteins
WC = water content
XIPs = X intrinsic proteins

ב. מבוא

ב.1. דודונאה 'דנה' - רקע כללי

דודונאה 'דנה' הנה מכלוא של *Dodonaea viscosa* cv. 'Purpurea' עם *Dodonaea lobulata*, שנוצר בישראל באופן טבעי. הסוג דודונאה, השייך למשפחת הסבונניים (Sapindaceae), כולל כ- 60 מינים של שיחים ירוקי עד, שהמוכר בהם הוא המין דודונאה דביקה (*D. viscosa*), צמח גדרות נפוץ בארץ (קגן, 2004). דודונאה דביקה היא עץ או שיח גבוה המגיע לגובה של כ- 8 מטר ולהיקף גזע של כ- 20 ס"מ, שהנו בעל תפוצה עולמית רחבה מאוד (Liu and Noshiro, 2003).

בספרות מדווח, שהעצה של דודונאה דביקה הינה בעלת נקבוביות מפוזרת, כמו של רוב הצמחים ממשפחת הסבונניים, עם טבעות גדילה מאוד לא ברורות ולא סדירות. הלוחות פשוטים והעצה מאופיינת בסיבים עבים מאוד (Patel, 1975; Liu and Noshiro, 2003). למרות שניתן היה לצפות להבדלים במבנה באזורי אקלים שונים, באופן מפתיע לא נמצא שינוי באנטומיה של דודונאה דביקה, למרות תפוצתה בכל היבשות ואף בגבהים של עד 3,600 מטר, כך שנראה שתנאי בית הגידול אינם משפיעים על המבנה האנטומי של צמח זה (Liu and Noshiro, 2003).

דודונאה 'דנה' היא שיח ירוק-עד, שיכול להגיע עד לגובה של 3 מטר. עליו פשוטים דמויי אזמל, באורך של כ- 10 ס"מ וברוחב של כ- 2 ס"מ (קגן, 2004). צבע העלים של דודונאה 'דנה' במהלך הקיץ הנו ירוק כהה, ובסתיו, עם ירידת הטמפרטורה, העלים מקבלים גוון אדמדם. הפריחה חלה בחורף. רוב המינים בסוג דודונאה הנם דו-ביתיים, ודודונאה 'דנה' הנה נקבית. מחודש מרץ ועד סוף אפריל מופיעים על קצות הענפים פירות קרומיים אופייניים בצבע אדום-סגול המסודרים באשכולות מסיימים (קגן, 2004).

דודונאה 'דנה' הנה צמח חסכני במים, המעדיף שמש מלאה. היא עמידה לטמפרטורות גידול קיצוניות וניתן לגדלה בכל רחבי הארץ. הריבוי של דודונאה 'דנה' נעשה באמצעות השרשה של ייחורים. שיחים של דודונאה 'דנה' מאופיינים בצימוח מהיר, ונהוג לגזום אותם בתדירות גבוהה. הודות לתכונות אלה דודונאה 'דנה' משמשת כצמח גדרות פופולרי, בדומה לדודונאה דביקה. בשל גוון העלים והפירות הדקורטיביים, דודונאה 'דנה' היא בעלת פוטנציאל גבוה לשימוש מסחרי כענף קישוט קטוף. הבעיה היא, שענפי דודונאה קטופים כומשים לאחר זמן קצר באגרטל, אם כי הכמישה מופיעה בעונות מסוימות בלבד.

ב.2. הסיבות לכמישת ענפים קטופים

ענפים קטופים כומשים טרם זמנם במהלך חיי האגרטל, בעקבות הובלת מים לקויה או בגלל הזדקנות מואצת המושרית בשל הניתוק מצמח האם.

ב.2.1. הגורמים לקליטת מים לקויה

לפי Van Doorn (1997), מחסור במים בענף קטוף מתפתח כאשר קצב קליטת המים מתמיסת האגרטל הנו נמוך יותר מקצב הטרנספירציה. לקליטת מים לקויה יכולות להיות מספר סיבות:

טילות (Tyloses) - בליטות המתפתחות מתוך תאי פרנכימה של העצה לתוך תאי האלמנטים הטרנכאריים כתוצאה מפציעה או הזדקנות (פאהן, 1993). הטילות סותמות את צינורות ההובלה ומונעות מעבר מים דרכם. היווצרות טילות נמצאה במספר פרחים קטופים, כגון מיני *Prunus*, ורדים (*Rosa*) ולילך (*Syringe*)

(Van Doorn, 1997). דווח, שבמינים מסוימים של דודוואה נצפו טילות בצינורות הובלה בודדים (Metcalfe and Chalk, 1965), אם כי בדודוואה דביקה לא נמצאו טילות (Patel, 1975).

שרפים (Gums) וצמגים (Gels, Mucilages) - חומרים אמורפיים בלתי מאורגנים, הנוצרים מהתפרקות עמילן או חומרי דופן התא כתוצאה מהפרעות פיסולוגיות או פציעה (פאהן, 1993). בצמחים שונים, כמו *Acacia, Alnus, Amelanchier, Dahlia, Prunus, Rosa*, כי צינורות ההובלה נסתמים בעקבות הפרשת שרפים בתנאים של עקת מים (Van Doorn, 1997). בצינורות העצה של קנה (*Phragmites australis*), דווח על התפתחות צמגים כתוצאה מפציעה, כאשר חומרי הצמג הראשונים מופרשים ע"י תאים חיים במהלך הימים הראשונים לאחר הפציעה (Soukup and Votrubová, 2005). הצמגים הנוצרים בתחילה הנם שקופים ומכילים בעיקר פוליסכרידים חומציים (פקטינים), אך מאוחר יותר הרכבם משתנה ונוצרים צמגים כהים ובסיסיים העמידים לפירוק.

סוברין (Suberin) - אחד המרכיבים העיקריים ברקמות השעם (פאהן, 1993). ישנה סברה, כי הצטברות סוברין בענפי קטיף בתגובה לפציעה פוגעת בקליטת המים שלהם. למשל, ישנן עדויות המראות, שקליטת המים של ענפי גרווילאה (*Grevillea*) קטופים עוכבה כתוצאה מהצטברות סוברין בצינורות ההובלה (He et al., 2006).

התפתחות והצטברות חיידקים - החיידקים המתרבים בתמיסת האגרטל סותמים את צינורות ההובלה של הצמח. הסתימות מתפתחות בצינורות עצה רבים בחלקו התחתון של הגבעול, ובכך מפריעות לקליטת מים מתמיסת האגרטל ולמעבר תקין של מים בענף הקטוף (Van Doorn, 1997).

אמבוליה, חסם (Embolism) - סתימת צינורות ההובלה ע"י בועות אויר. בצמח השלם הבועות נוצרות כתוצאה מלחץ נמוך מאוד בעצה, הנוצר בעקבות חשיפה לעקת מים או לאחר הפרשת המים בצינורות העצה מקיפאון החורף באזור הממוזג הקר. בנוסף, בענפי קטיף אוויר עלול לחדור מבסיסם לתוך צינורות ההובלה בזמן הקטיף, כתוצאה מפגיעה בשלמות דפנות התאים, או מתוך תמיסת האגרטל (Canny et al., 2007). בענפים של צמחים מעוצים, ישנה בדרך כלל רמה מסוימת של אמבוליה טבעית הגורמת לירידה של 20%-5 במוליכות ההידראולית שלהם (Tyree and Ewers, 1991). מכאן, שאמבוליה הנה תופעה נורמלית בצמחים. בתירס נמצא, כי הצינורות מתחילים לעבור אמבוליה עם עלות השחר, ורמת האמבוליה עולה ומגיעה עד ל-70% מכלל הצינורות ככל שעוצמת הקרינה עולה, ואילו אחר הצהריים העצה מתחילה להתמלא מחדש (McCully et al., 2008). גם בוורדים נמצא, כי כבר בשדה, לפני הקטיף, צינורות העצה מתמלאים באוויר, כאשר רמת האמבוליה הגבוהה ביותר חלה בשעות הצהריים של ימים חמים, ולכן ורדים אשר נקטפים במועד זה כומשים מהר יותר (Van Doorn and Suiro, 1996). לפיכך, בענפי קטיף כדאי להתחשב בתנודות האמבוליה היומיות ולקטוף את הענפים בשעה שרמת האמבוליה נמוכה - מוקדם בבוקר או בימים קרירים יחסית.

מקובל לחשוב, כי רמת האמבוליה במהלך חיי האגרטל תלויה באנטומיה של מערכת ההובלה, השונה בין מינים שונים (Van Meeteren et al., 2001). כאשר ענפי קטיף של *Dendranthema × grandiflorum* Tzvelev נחשפו לאוויר כך שפוטנציאל המים בענף ירד בהדרגה, מדידות של רמת האמבוליה הראו, כי כבר בפוטנציאל מים של -6 kPa הצינורות הרחבים התמלאו באוויר, בעוד שבצינורות

הצרים היה צורך בפוטנציאל מים נמוך בהרבה, -24kPa , כדי שהם יעברו אמבוליה (Van leperen et al., 2001). כלומר, קיים מתאם שלילי ברור בין קוטר הצינור לבין הרגישות לאמבוליה. לאחר העברת הענפים לתמיסת האגרטל, חלק מבועות האוויר מתמוסס בתמיסה ומתרחש תיקון חלקי של האמבוליה. לפי (Van leperen et al., 2002) גם תיקון האמבוליה של ענפים קטופים תלוי בקוטר הצינור - ככל שהצינורות צרים יותר, כך התיקון יהיה מהיר יותר. לעומת זאת, חוקרים אחרים סבורים, שאין הסבר ברור לעובדה שענפים קטופים מסוימים מתאוששים מהר וקולטים מים לאחר חשיפת צינורות ההובלה לאוויר, ואילו צמחים של מינים או זנים אחרים כומשים (Van Doorn and Reid, 1995). חוקרים אלו לא מצאו מתאם בין האנטומיה של מערכת ההובלה והבקרה על מנגנון הפתיחה של הפיוניות בזני ורדים שונים לבין ההתאוששות של פרחי קטיף של זנים אלו לאחר החשיפה לאוויר. הגורם האפשרי שהוצע כדי להסביר הבדלים אלו הוא עובי הקוטיקולה של העלה, אשר משפיע כנראה על התאדות המים מהעלים (Van Doorn and Reid, 1995). התאמות אנטומיות לאמבוליה בענפי קטיף יידונו בהמשך.

ישנו ויכוח נרחב בספרות, האם מצבי אמבוליה בצמח השלם הנם הפיכים ומהו המנגנון האפשרי לתיקונם (Holbrook and Zwieniecki, 1999; Tyree et al., 1999; Sperry et al., 2003). הבעיה במילוי צינורות ההובלה מחדש במים היא שישנו קושי בהוצאת אוויר מהצינורות בזמן שקיים בתוכם לחץ שלילי מאוד. עם זאת, קיימות עדויות למילוי מחדש של צינורות הובלה אשר עברו אמבוליה, לא רק בעזרת לחץ שורש, אלא גם במצבים רגילים תוך כדי טרנספירציה. למרות שעדיין לא ברור מהו המנגנון של המסת האמבוליה, ישנן עדויות שבתהליך זה מעורבת הפרנכימה של העצה, אשר מזרימה מים לעצה באמצעות הפעלת תעלות מים (אקוופורנים) והעלאת הלחץ האוסמוטי על ידי פירוק סוכרים (Holbrook and Zwieniecki, 1999; Secchi et al., 2011).

2.2.2. הזדקנות מואצת בעקבות הקטיף

1. שינויים ביוכימיים

הזדקנות בצמחים הנה תהליך מורכב, הכולל שלבים רבים, ביניהם ביטוי של גנים, פירוק מקרומולקולות, כגון חלבונים, פוליסכרידים ושומנים, פירוק כלורופיל, הגברת קצב הנשימה ושינוע של חומרים לאיברים אחרים בצמח, כמפורט לגבי עלים (Buchanan-Wollaston, 1997) ופרחים (Rogers, 2006). ידוע, כי עקה או פציעה יכולות לגרום להזדקנות מואצת. במחקר מולקולארי מקיף שנעשה בארבידופסיס (*Arabidopsis thaliana*) נמצא, כי מתוך 43 גנים הקשורים להזדקנות, רמת הביטוי (mRNA) של 28 גנים המקודדים לגורמי שעתוק (Transcription factors) עלתה בתגובה לעקות ביוטיות ואביוטיות שונות (Chen et al., 2002). ממצא זה מצביע על החפיפה הרבה הקיימת בין המסלולים של תגובות לעקה לבין אלה של הזדקנות עלים. (Page et al., 2001) מצאו, כי בתפרחות קטופות של ברקולי (*Brassica oleracea*) התרחשו שינויים משמעותיים בתכולת השומנים, החלבונים, הכלורופיל ושינויים בביטוי של גנים, עוד לפני שסימני ההזדקנות נראו לעין. טמפרטורת אחסון הנה אחד הגורמים החשובים התורמים לתהליך של הזדקנות מואצת. טמפרטורת אחסון נמוכה עיכבה את ההזדקנות בענפי קטיף שונים, כגון אכינצאה (*Echinacea*), גיבסנית (*Gypsophila*), חמנית (*Helianthus annuus*) (Redman et al., 2002), גרברה (*Gerbera*) (Celikel and Reid, 2002), ציפורן (*Dianthus*), נרקיס (*Narcissus*), חרצית

(*Chrysanthemum*), צבעוני (*Tulipa*) (Cevallos and Reid, 2001) ואקליפטוס (*Eucalyptus* Pacifici) (et al., 2007). לעומת זאת, טמפרטורת אחסון גבוהה האיצה את ההזדקנות במינים אלה.

2. השפעת סוכרים על ההזדקנות

ידוע, כי תוספת סוכרים מעכבת את ההזדקנות של עלי הכותרת ולעיתים גם של אבקנים בפרחי קטיף רבים (Van Doorn, 2004), אם כי הסיבה לכך לא לגמרי ברורה. (Van Doorn, 2004) הציע מספר הסברים לתופעה זו. ההסבר המקובל הוא, שברקמה מזדקנת קים מחסור בסוכרים, אך הדבר אינו נכון לכל הפרחים. הסבר נוסף הוא, שהסוכרים מעלים את הלחץ האוסמוטי של הרקמה ועל ידי כך משפרים את מאזן המים של הענף כולו. קיימת גם טענה, שסוכרים מעכבים את ייצור האתילן בצמחים בהם ההזדקנות נגרמת ע"י הורמון זה. כלומר, במקרה כזה הסוכרים פועלים כהורמון, ולא כאוסמוליט או כמקור אנרגיה לרקמה. לגישה זו ישנן מספר עדויות. למשל, טיפול בסוכרוז עיכב ביטוי של גנים הקשורים בהזדקנות בעלי כותרת של ציפורן, בדומה לפעולת מעכב האתילן, (Silver thiosulfate (STS) (Hoeberichts et al., 2007).

3. השפעת אתילן על חיי האגרטל של ענפי קטיף

להורמון הצמחי אתילן יש מגוון פעילויות המשפיעות על תהליכים חיוניים רבים בצמח, כמו הבשלת פירות, הזדקנות, תגובות לעקות ונשירה, והשפעותיו על פרחים קטופים, פירות וירקות תועדו רבות (Abeles et al., 1992; Reid, 1995; Van Doorn, 2002; Gapper et al., 2005; Barry and Giovannoni, 2006). בנוסף להשפעות הנ"ל, ידוע כי לאתילן יש השפעות על תהליכים נוספים, כגון מות תאים מתוכנן, פירוק פקטינים ויצירת אארנכימה (He et al., 1996; Gunawardena et al., 2001). התגובות לאתילן מתרחשות לאחר שאתילן נקשר לקולטנים ממברנליים, וכתוצאה מכך מופעלים גנים הקשורים לפעילותו המשפיעים על מגוון של תהליכים פיסיולוגיים בצמח (Chen et al., 2005). בענפי קטיף של מינים מסוימים, אתילן הגביר יצירת טילות והפרשת שרפים (מחקרים שונים המצוטטים ע"י Van Doorn, 1997). למעכבי הפעילות של אתילן, 1-Methylcyclopropene (1-MCP) ו-STS ישנה השפעה מיטיבה על תוצרת חקלאית קטופה, בעיקר בשל השפעתם על עיכוב הזדקנות ונשירה והאטת הבשלה (Sisler and Serek, 1997; Blankenship and Dole, 2003; Philosoph-Hadas et al., 2005; Meir et al., 2010).

מבחינת התגובה לאתילן ניתן לחלק את התוצרת החקלאית הקטופה (פירות, ירקות, ענפי קטיף של צמחי נוי) לקלימקטריים וללא קלימקטריים. המוצרים הקלימקטריים מאופיינים בהפרשה מוגברת של אתילן, וכתוצאה מכך בעלייה בקצב הנשימה ובהמשך בהבשלה או הזדקנות מואצים (Yang and Hoffman, 1984). במוצרים הלא קלימקטריים, לעומת זאת, אין עליה בהפרשת אתילן. אולם למרות שהמוצרים הלא קלימקטריים אינם מפרישים אתילן, אתילן מגביר בהם לעתים תגובות של הבשלה והזדקנות. לכן ניתן לחלק את המוצרים הלא קלימקטריים לשתי קבוצות: 1. אלה שלא מראים תגובה כלשהיא לאתילן; 2) אלה שלא מראים עליה קלימקטרית ברמות האתילן האנדוגני, אך אתילן חיצוני גורם בהם להבשלה והזדקנות מואצים (Goldschmidt, 1997).

כאמור, לאתילן יש חשיבות רבה בחיי המדף וחיי האגרטל של תוצרת חקלאית קטופה, מכיוון שהפרשתו מגבירה את ההזדקנות בצמחים רבים. כפי שצוין לעיל, הזדקנות של מיני צמחים מסוימים אינה תלויה

אתילן, ביניהם מרבית הגיאופיטים המסחריים, כגון סייפן (*Gladiolus*), איריס (*Iris*), נרקיס (*Narcissus*) וצבעוני (*Tulipa*) (Reid and Wu, 1992). עם זאת, מרבית הפרחים רגישים במידה כלשהי לאתילן. כך, ממחקר מקיף שערכו Woltering and Van Doorn (1988) עולה, כי בין החד-פסיגיים, פרחים ממשפחות השושניים (Liliaceae), נרקסיים (Amaryllidaceae) ואיריסיים (Iridaceae) אינם רגישים לאתילן בד"כ, ואילו פרחים ממשפחת הסחלביים (Orchidaceae) רגישים לאתילן במידה רבה. בין הדו-פסיגיים, פרחים ממשפחת המורכבים (Compositae) והסוככיים (Umbelliferae) אינם רגישים לאתילן, לפרחים ממשפחת החבלוביים (Euphorbiaceae) ישנה רגישות קטנה בלבד, ואילו פרחים משאר המשפחות של הדו-פסיגיים רגישים לאתילן במידה בינונית עד רבה. למשל, ציפורן הנו פרח רגיש לאתילן וכומש בחשיפה לאתילן חיצוני, אם כי זני ציפורן שונים ביניהם במידת הרגישות להורמון (Reid and Wu, 1992). פרחי גרניום (*Pelargonium × hortorum*) נשרו בחשיפה לאתילן חיצוני, וטיפול ב-1-MCP עיכב תגובה זו (Jones et al., 2001).

חשוב לציין, כי מרבית העבודות על השפעת אתילן על ענפי קטיף נעשו בפרחים, ורק מיעוטן נעשו בענפי קישוט ירוקים. בענפי קטיף של אקליפטוס (*Eucalyptus parvifolia*) נמצא, שגם אתילן אנדוגני וגם טיפול באתילן קיצרו את משך חיי האגרטל, אם כי לאתילן האנדוגני הייתה השפעה גדולה יותר (Ferrante et al., 2002). בנוסף להאצת ההזדקנות, לאתילן יכולה להיות השפעה שלילית גם על משך חיי האגרטל של ענפי קטיף בשל פגיעה בהובלת המים. למשל, עלים של שרך *Adiantum raddianum* כומשים תוך שלושה ימים באגרטל. נמצא, שלאחר הקטיף ישנה בעלים אלו עליה מהירה בייצור אתילן אנדוגני בבסיס החתוך, הגורם לחסמים בצינורות ההובלה, ומכאן לכמישה מהירה (Fujino and Reid, 1983).

היה מקובל לחשוב, כי עקת מים מגבירה הפרשת אתילן הגורמת להזדקנות ולנשירה (Taylor and Whitelaw, 2001). בתנאים של עקת מים נמצאה הפרשת אתילן מוגברת במקטעי גבעול של זני עגבנייה (*Leucopersicon esculentum*) רגישים, שגרמה לעליה באנזימים צלוליטיים המפרקים את דפנות תאי הליבה של הגבעול (Huberman et al., 1993). בעלי אספסת (*Medicago*) שנחשפה לעקת יובש, נמצאה יצירה מוגברת של אתילן והזדקנות מואצת (Irigoyen et al., 1992). בגרגי אורז (*Oryza*), עקת מים מתונה הקטינה את הייצור של אתילן ושל הקדם שלו, 1-aminocyclopropne-1-carboxylic acid (ACC), בעוד שעקת מים חזקה הגבירה את הייצור שלהם (Yang et al., 2004). מספר עבודות הראו, כי הפרשת אתילן מוגברת בתגובה לעקת מים חלה רק באיברים מנותקים, כגון עלים, ואילו בצמח השלם אין בד"כ הפרשה מוגברת של אתילן בעקבות עקת מים (Morgan et al., 1990; Narayana et al., 1991). כלומר, הפרשת אתילן מוגברת חלה רק כאשר עקת מים משולבת עם ניתוק האיבר מצמח האם, ומצב זה אכן מתקיים בד"כ בענפים קטופים.

לאתילן יש גם השפעות חיוביות על מאזן המים בצמח בתנאי עקה. נמצא, כי אתילן מגביר קליטת מים בצפצפה (*Populus tremuloides*), באשוחית (*Picea mariana*) ובארזית (*Larix laricina*) בתנאים של מחסור בחמצן כתוצאה מהצפה (Kamaluddin and Zwiazek, 2002; Islam et al., 2003). נמצא, שהגברת המוליכות ההידראולית בצפצפה חלה עקב הגברת הפעילות של אקוואפורינים שהושרתה ע"י

3.3. התמודדות הצמח עם עקת מים

ענפי קטיף רבים סובלים מעקת מים באגרטל כתוצאה מהובלת מים לקויה. כך למשל, היכולת של פרחי ורדים להתמודד עם עקת מים נחשבת כגורם העיקרי הקובע את איכות חיי האגרטל שלהם (Spinarova and Hendriks, 2007). כתוצאה מחשיפה לעקת מים, צמחים מפעילים מנגנוני התמודדות שונים המגבירים את מעבר המים, או לחילופין, גורמים לחסכון במים, וע"י כך מאפשרים להם לשרוד. בספרות דווח, שבדודונאה דביקה המוליכות ההידראולית לא השתנתה באופן משמעותי בתנאים בהם אובחנו תנודות רבות בפוטנציאל המים של העלים (Mishio, 1992). מכאן ניתן להסיק, שלדודונאה דביקה ישנם מנגנונים יעילים להגברת מעבר המים בתנאי יובש, והודות לכך הצמח שומר על מוליכות הידראולית קבועה.

1.3.3. מנגנונים להגברת מעבר מים

1. התאמה אוסמוטית (Osmotic adjustment) - צבירת מומסים בתא בתגובה לירידה בפוטנציאל המים. כתוצאה מההתאמה האוסמוטית הפוטנציאל האוסמוטי של התא עולה, דבר המאפשר חדירת יותר מים פנימה, וע"י כך שמירה על לחץ הטורגור בתוך התא. המומסים המצטברים בעת התאמה אוסמוטית, יכולים להכיל אוסמוליטים (פרולין, אשלגן, חומצות אמינו שונות) או סוכרים מסיסים (סוכרוז, גלוקוז, פרוקטוז, סורביטול ומניטול), שלגביהם נעשו מרבית העבודות. עליה ברמת הסוכרים המסיסים יכולה להתרחש בשני אופנים: על ידי פירוק של עמילן או על ידי ביוסינתזה שלהם. בפקעות תפוחי אדמה (*Solanum tuberosum*) שנחשפו לעקת מים, עלתה רמת האנזים Sucrose phosphate synthase ובמקביל חל פירוק של עמילן (Geigenberger et al., 1997). כלומר, בצמח זה צבירת הסוכרים המסיסים התרחשה בשתי הדרכים במקביל.

העלאת הפוטנציאל האוסמוטי מתרחשת בתגובה לעקות סביבתיות. במחקרים רבים נמצאו עדויות להתאמה אוסמוטית בעקבות עקת יובש. לדוגמה, עקת יובש גרמה לירידת הפוטנציאל האוסמוטי באורז (Babu et al., 1999) ובחמצה (*Cicer arietinum*) (Moinuddin and Khanna-Chopra, 2004), להצטברות פרולין בטבק (*Nicotiana tabacum*) (Van Rensburg et al., 1993) ובחציל (*Solanum melongena*) (Sarker et al., 2005), להצטברות חומצות אמינו שונות ופרולין בצפצפה (*Populus przewalskii*) (Lei et al., 2006) ולהצטברות סוכרים מסיסים ואשלגן במיני דובדבן (*Prunus*) (Ranney et al., 1991).

בצמחים רבים נמצא, שתהליכי יצירה ופירוק של עמילן לסוכרים מסיסים במהלך השנה מבקרים את הפוטנציאל האוסמוטי. התנודות בתכולת הפחמימות השונות מותאמות לתנאי הסביבה והן שונות בצמחים מאזורים אקלימיים שונים. באזור הממוזג הקר העמילן מתפרק לסוכרים מסיסים בעונה הקרה, מכיוון שתנאי הסביבה אינם מאפשרים פוטוסינתזה. למשל, בליבה של רוביניה בת-שיטה (*Robinia pseudoaccacia*) עמילן מסונתז באביב ובקיץ, ואילו בסתיו ובחורף הוא מתפרק לגלוקוז כהגנה מפני טמפרטורות נמוכות (Hauch and Magel, 1998). באגוז אלסר (*Juglans regia*), נמצא פירוק של עמילן

לסוכרים במקביל להפעלת תעלות מים (אקוואפורינים) בעצה בחודשי החורף, דבר שגרר ירידה בפוטנציאל האוסמוטי ברקמה והגברת מעבר מים לתוכה. הוצע, ששינויים אלה נועדו לאפשר לצמח להתגבר על אמבוליות הנוצרות בצינורות ההובלה לאחר הקיפאון בחורף (Sakr et al., 2003), או למילוי צינורות שהתמלאו באוויר כתוצאה מעקת מים (Zwieniecki and Holbrook, 2009).

גם בצמחים הגדלים באזורים ים-תיכוניים נמצאה הצטברות של פחמימות בחורף, אולם בניגוד לצמחים של האזור הממוזג, אובחנה בהם עליה הן של סוכרים מסיסים והן של עמילן. הצטברות זו הנה תולדה של הטמפרטורות הנוחות השוררות באזורים אלו בחורף, המאפשרות פעילות פוטוסינתטית גם בעונה זו. הצטברות משמעותית של פחמימות בחורף דווחה במחקרים שנערכו בישראל בזית (Bustan et al., 2011) ובאורן ירושלים (ד. ברנד, מידע אישי; Grunzweig et al., 2003). החוקרים האחרונים טוענים, שהצטברות פחמימות בחורף באזורים ים-תיכוניים בהם אין גשמי קיץ, נובעת מהעובדה שבאזורים אלו הפיוניות פתוחות בחורף במשך כל שעות היום, בשל משטר המים הנוח בקרקע, ואילו בקיץ הן פתוחות בבוקר ובערב בלבד. עם זאת, ישנם ממצאים המורים, שגם באזור הים-תיכוני הצטברות פחמימות בחורף הנה תגובה לירידת הטמפרטורה, והיא מיועדת להעלות את הפוטנציאל האוסמוטי כהגנה מטמפרטורות נמוכות השוררות בעונה זו. ראשית, הצטברות פחמימות בחורף נמצאה גם בזית הגדל במטע המטופל אינטנסיבית, בו משטר המים בקרקע נוח כל השנה (Bustan et al., 2011). שנית, חשיפה של שתילים של מחטניים ים-תיכוניים לטמפרטורות נמוכות בתנאים מבוקרים גרמה לעליה משמעותית מאוד ברמת הפחמימות, בדומה לזו שהתקבלה במחטניים של האזור הממוזג הקר (Tinus et al., 2000). באזורים טרופיים, בהם שוררות טמפרטורות נוחות כל השנה, הצטברות הפחמימות חלה בעונה הגשומה. תופעה זו דווחה במספר מינים של עצים טרופיים (Newell et al., 2002) ובקקטוס אופונציה (*Opuntia bigelovii*), בו סונתזו בעונה היבשה צמגים, שתרמו למאזן המים של הצמח (Sutton et al., 1981).

2. הפעלת תעלות מים (Aquaporins) - פתיחת אקוואפורינים מזרזת מעבר מים דרך הממברנות לאורך מפל לחצים. לכן, אקוואפורינים משפיעים על מוליכות הממברנות ועל קליטת מים בצמחים (Maurel, 1997; Kaldenhoff et al., 2008). למשל, צמחי טבק טרנסגניים בהם עוכב הגן לאקוואפורין *NtAQP1*, הראו עמידות מופחתת לעקת יובש וירידה במוליכות ההידראולית של השורשים (Siefritz et al., 2002). אקוואפורינים מגיבים לתנאי סביבה, כגון אור/חושך (Cochard et al., 2006) וטמפרטורה (Azad et al., 2010; Ionenko et al., 2004). גנים של אקוואפורינים מתבטאים ברקמות שונות ובמועדים שונים, וע"י כך מבקרים בצורה יעילה מאוד את יחסי המים בצמח (Barrieu et al., 1998; Otto and Kaldenhoff, 2000; Eisenbarth and Weig, 2005).

האקוואפורינים הצמחיים שייכים לעל-משפחת ה-MIPs (Major intrinsic proteins), שאותה מקובל לסווג לחמש משפחות (Luu and Maurel, 2005; Park et al., 2010), כמפורט להלן: PIPs – Plasma NOD26-like intrinsic – NIPs; Tonoplast intrinsic proteins – TIPs; membrane intrinsic proteins – SIPs; Small basic intrinsic proteins – XIPs, ו-X intrinsic proteins. בכל צמח קיימים איזופורמים רבים של אקוואפורינים. למשל, בארבידופסיס נמצאו 35 גנים של אקוואפורינים (Luu and Maurel, 2005), בתירס - 37 (Chaumont et al., 2001), באורז - 33 (Sakurai et al., 2005) ובכותנה

(*Gossypium*) נמצאו 71 גנים, ביניהם 28 השייכים למשפחת ה- PIPs ו- 23 השייכים למשפחת ה- TIPs (Park et al., 2010). האקוואפורינים הנפוצים ביותר שייכים למשפחות ה- TIPs וה- PIPs. למרות שקיימת הומולוגיה גבוהה בין כל האקוואפורינים הצמחיים, אקוואפורינים ממשפחות שונות נבדלים זה מזה במבנה שלהם ובמיקום התוך-תאי שלהם. ה- PIPs ממוקמים בעיקר בממברנה הציטופלסמטית, ה- TIPs – בממברנת הטונופלסט, וה- SIPs – בממברנת הרטיקולום האנדופלסמטי. שתי המשפחות האחרות נחקרו פחות ומיקומן שונה במינים שונים. שונות כזאת במיקום מאפשרת שליטה עדינה ומדויקת על תהליכי מעבר מים בתוך ומחוץ לתאים. בנוסף לחלוקה למשפחות, קיימת גם חלוקה נוספת של אקוואפורינים לתת-משפחות. למשל, משפחת ה- PIPs חולקה לשתי תת-משפחות, PIP1 ו- PIP2. ישנן עדויות לכך, שאקוואפורינים של שתי תת-משפחות ה- PIPs עוברים אינטראקציה אחד עם השני (Zelazny et al., 2007). האקוואפורינים השונים נבדלים ביניהם גם ביכולתם להעביר מולקולות קטנות נוספות מלבד מים, כגון אוראה, אמוניה, פחמן דו-חמצני וחומצה לקטית (Chaumont et al., 2001). כמעט ולא נעשו עבודות על תעלות מים בענפי קטיף, והעבודות המעטות שנעשו בוצעו בוורדים. בוורדים מהזן 'Red France', מעכבי אקוואפורינים הקטינו את המוליכות ההידראולית במהלך חיי האגרטל (Maggio and De Pascale, 2007). בוורדים מהזן 'Movie Star', יוני כסף שעיקבו את פעילות האתילן והאריכו את משך חיי האגרטל, גרמו לירידה בקצב הטרנספירציה וברמת הביטוי של הגן של האקוואפורין *Rh-PIP2* (Lü et al., 2010). בוורדים מהזן 'Samantha', ביטוי הגן של האקוואפורין *Rh-TIP1;1* ירד בהשפעת עקת יובש ואתילן (Xue et al., 2009).

2.3.3. נוכחות של פוליסכרידים חומציים (Acid polysaccharides, Mucopolysaccharides)

פוליסכרידים חומציים הם צמגים ג'ליים הצמודים לדופן צינורות העצה ומסוגלים לספוח מים, וע"י כך משפיעים על פוטנציאל המים בצינורות ההובלה. למרות, כפי שמתואר לעיל, מקובל לחשוב שצמגים מגבילים בד"כ את הובלת המים בענפי הקטיף (Van Doorn, 1997), ישנם חוקרים הסבורים, שפוליסכרידים אלו מהווים גורם חיובי בהובלת המים בצמח השלם (Zimmermann et al., 2002a,b). לדעת חוקרים אלו יש לצמגים כנראה תפקיד חשוב באגירת מים, בעמידות בפני אמבוליה ואולי אף בהקניית יכולת לטרנספירציה הפוכה, כלומר קליטת מים מהאטמוספירה בתנאי לחות גבוהה באמצעות הפיוניות. עם זאת, במיני שיזף (*Ziziphus*) נמצא, שרמת הפוליסכרידים לא עלתה בתנאים של עקת יובש (Clifford et al., 2002). הוצע, שלפוליסכרידים יש גם תפקיד בהתאמה אוסמוטית, מכיוון שבעקת מים הם יכולים להתפרק לסוכרים מסיסים. בנוסף, לטווח ארוך יותר הם יכולים לשמש כמקור אנרגיה חלופי לצמח.

3.3.3. מנגנונים לחסכון במים

עיצוב טרנספירציה וסגירת פיוניות – כאמור, מחסור במים בענף הקטוף מתפתח בד"כ כאשר קצב אידוי המים שלו גבוה מקצב קליטת המים מתמיסת האגרטל. לפיכך ניתן לעכב או למנוע עקת מים ע"י הקטנת

קצב האיידוי מהעלים (Van Doorn, 1997). ואכן נמצא, שאסטרטגיה של סגירת פיוניות ותנועה פרה-הליטרופית של עלים מאפשרת לצמח לשרוד עקת יובש קצרה בהשקעה של אנרגיה מעטה (Ludlow, 1989). בנוסף, עלים של צמחים קסרומורפיים מכוסים לעתים בטריכומות, בשעווה או בשרף, אשר מסייעים לצמח להקטין את הנידוף הפאסיבי מפני העלה (פאהן, 1993).

עיכוב גדילה - רקמות גדלות מהוות מבלע למים. למשל נמצא, כי תנועת המים גדולה יותר בעלי שעורה (*Hordeum vulgare*) צעירים מאשר בבוגרים, ולכן צריכת המים שלהם גבוהה יותר (Volkov et al., 2007). צמחים משתמשים במים לגדילה, מכיוון שהגידול בממדי התאים מצריך גם את הגדלת נפח החללית, ולכן עיכוב גדילה חוסך מים. לאחר החשיפה ליובש גדילת הצמח מואטת ולאחר מכן נעצרת לחלוטין (Milburn, 1979). אסטרטגיה של עיכוב גדילה של עלים חדשים ו/או השרת עלים קיימים מאפשרת לצמח לשרוד תקופת יובש ארוכה יחסית, אך מחירה של אסטרטגיה זו גדול בגלל הפגיעה ביכולת הפוטוסינתטית לאורך זמן (Ludlow, 1989). עיכוב גדילה בעקבות עקת מים נצפה בצמחים רבים, ביניהם בננה (*Musa*) (Kallarackal et al., 1990), שעורה (Blum, 1989) וארבידופסיס (Engelmann and Schlichting, 2005). לא ידוע לנו על דיווחים דומים בענפי קטיף.

4. התאמות אנטומיות למחסור במים

באופן כללי, למבנה האנטומי של העצה ולמבנה האפידרמיס יש השפעה רבה על יחסי המים של הצמח. הגורמים האנטומיים העיקריים המשפיעים על מאזן המים כוללים:

1. רדיוס צינור ההובלה - לפי נוסחת Poiseuille, המוליכות ההידראולית פרופורציונית לרדיוס הצינור בחזקה הרביעית (Taiz and Zeiger, 2002):

$$L_p = R^4 \pi \Delta \Psi_p / (8 \eta \Delta x)$$

כאשר L_p = מוליכות ההידראולית; R = רדיוס הצינור; $\Delta \Psi_p$ = מפל לחצים; η = צמיגות; x = מרחק. ממשוואה זו ברור, כי צינור שהרדיוס שלו גדול פי 5 מרדיוס של צינור אחר מוליך כמו $5^4 = 625$ צינורות בעלי הרדיוס הנמוך. מצד שני, בצמח עם מעט טרכיאות רחבות, אמבוליה בטרכיאיה אחת תשתק יותר שטח מוביל. יתרה מכך, במקרה של סתימה כזו, הדרישה למים עולה עוד יותר, פוטנציאל המים יורד, וזה גורר עוד ועוד אמבוליה במערכת ההובלה. כך למשל, Van Ieperen et al. (2001) הראו, שבגבעולי חרציות (*Chrysanthemum*) קטופים אמבוליה נוצרת בצינורות הרחבים כבר בפוטנציאל מים של -6kPa, בעוד שבצינורות הצרים היווצרות אמבוליה מתרחשת בפוטנציאל מים הרבה יותר נמוך של -24kPa. בנוסף לכך, ככל שישנן יותר טרכיאות בעלות קוטר קטן יותר, הצמח עמיד יותר לאמבוליה, כי ישנן גם טרכיאות חלופיות במערכת המורכבת יותר. היבט נוסף של יצירת מעט צינורות גדולים במקום צינורות קטנים רבים הוא בעיית התמיכה. צינורות קטנים חזקים יותר, ולכן מספקים תמיכה טובה יותר לענף (Tyree and Ewers, 1991; Tyree, 2003).

2. אורך צינור ההובלה - לאורך צינור ההובלה ישנה השפעה על מעבר מים. טרכיאות ארוכות יעילות יותר למעבר מים, אך יחד עם זאת הן גם מהוות חיסרון במצבי אמבוליה, מכיוון שכל יחידה מהווה אחוז גדול יותר מהעצה יחסית לצינורות קצרים יותר (Comstock and Sperry, 2000). הדבר בולט במיוחד בענף

קטוף, שכן חיתוך הענף פוגע בטרכיאות הארוכות ומגביר את האמבוליה.

3. מבנה וצפיפות הגמצים (Pits) - אמבוליה נוצרת עקב חדירת בועות אוויר לצינורות ההובלה דרך הגמצים (Sperry and Tyree, 1988). לגודל ולצפיפות הגמצים בדפנות של צינורות ההובלה יש השפעה על היווצרות אמבוליה. ככל שהגומץ קטן יותר, כך נדרש לחץ גדול יותר על מנת שאוויר יכנס לתוך הצינורות. כאשר הגמצים גדולים, בועת אוויר יכולה לעבור דרכם במפל לחצים נמוך יותר ו"להדביק" צינורות הובלה נוספים, תופעה המוגדרת כ- Air seeding (Tyree and Sperry, 1989). באלון (*Quercus gambelii*) מתפתחים מוקדם בעונה צינורות הובלה בעלי גמצים מרובים. צינורות אלה רגישים במיוחד לאמבוליה (Christman et al., 2012). לעומת זאת, בשבעה מינים של אדר (*Acer*) הרגישות לאמבוליה לא הייתה קשורה לצפיפות או לשטח הגמצים, אך הייתה קשורה למבנה של הממברנה הקושרת שני גמצים מצינורות שכנים. יתכן כי מבנה הממברנה מאפשר כניסה של בועות אוויר מצינור אחד לשני (Lens et al., 2011).

4. שטח העלים - שככל ששטח העלים גדול יותר, כך מפל הלחצים בצמח עולה, וישנה סכנה של סתימות.

מהנוסחאות הבאות (Tyree and Ewers, 1991) $LSC = k_h/A_L$; $dp/dx = E/LSC$;

כאשר $LSC =$ מוליכות עלים; $A_L =$ שטח העלים; $dp/dx =$ מפל לחצים בגבעול; $E =$ נידוף; $k_h =$ מוליכות הידראולית, ניתן לפתח את הנוסחה הבאה: $dp/dx = A_L \times E / k_h$. מנוסחה זו ניתן לראות, כי מפל הלחצים פרופורציוני לשטח העלים. לכן יש יתרון לצמח בהקטנת מספר העלים או שטחם. (Van Doorn 1997) הראה, שענפי קטיף בעלי שטח עלים קטן מאבדים פחות מים ליחידת גבעול מאשר ענפים בעלי שטח עלים גדול. בנוסף ידוע, שבתנאי יובש גודל התאים קטן, הדפנות מתעבים, צפיפות הפיוניות עולה וישנה התפתחות של פרנכימת העמודים על חשבון הפרנכימה הספוגית (פאהן, 1993).

5. מבנה האפידרמיס - האפידרמיס מהווה חיץ בין הצמח לבין הסביבה, ולכן המבנה של הקוטיקולה וצפיפות הפיוניות והטריכומות יכולים לתרום רבות למניעת התייבשות. קוטיקולת עלה עבה ופיוניות מעטות בעלות מפתח קטן נחשבות כהתאמות נפוצות ליובש (Dickison, 2000). נמצא, כי במצבים של עקת מים הקוטיקולה מתעבה תוך מספר ימים (Bengston et al., 1978; Premachandra et al., 1991). בורדים שגדלו בתנאי לחות גבוהה, התפתחו פיוניות צפופות יותר ובעלות מפתח גדול, וכתוצאה מכך משך חיי האגרטל שלהם היה קצר יחסית (Torre et al., 2003). בהשוואה שנערכה בין שני זני תירס עם עמידות שונה ליובש נמצא, כי בזן העמיד תאי האפידרמיס היו גדולים יותר והקוטיקולה הייתה עבה יותר (Ristic and Jenks, 2002). בתת מין של לוטם (*Cistus incanus subsp. Incanus*), התפתח פולימורפיזם עונתי של עלים כהגנה מפני יובש. עלי החורף הנם עלים רגילים, אך עלי הקיץ מפתחים פיוניות שקועות, טריכומות מרובות, תאי עמודים קטנים יותר ופחות חללים בין תאיים (Aronne and De Mico, 2001).

5.ב. השפעת הסביבה על גורמים אנטומיים ופיסיולוגיים הקשורים למאזן המים

עונה - במינים רבים דווח על שינויים עונתיים במבנה האנטומי ופיסיולוגיה של הצמח. למשל, באגוז קליפורניה (*Juglans regia*) ישנה סכנת אמבוליה גבוהה בחודשי החורף, והצמח מתגבר על כך ע"י העלאת הלחץ באוסמוטי באמצעות פירוק עמילן לגלוקוז וע"י הגברת מעבר מים באמצעות הפעלת תעלות מים

(Sakr et al., 2003). רוביניה בת-שיטה היא דוגמא נוספת לכך. כאמור לעיל, צמח זה אוגר עמילן בחודשי האביב, הקיץ והסתיו. בסתיו פעילות הקמביום יורדת והיא נפסקת בחורף, ולאחר מכן חל פירוק של עמילן לסוכרים מסיסים. באביב, פעילות הקמביום מתחדשת, ולאחר צמיחת העלים ישנה אגירה מחודשת של עמילן (Hauch and Magel, 1998).

במספר עבודות נמצאו מתאם בין עונת הגידול ותנאי הסביבה לפני הקטיף לבין איכות ענפי הקטיף בחיי האגרטל. למשל, משך חיי האגרטל של פרחי ציפורן היה ארוך יותר בחורף מאשר בקיץ (Nukui et al., 2004). לעומת זאת בוורדים, משך חיי האגרטל היה ארוך בהרבה בקיץ מאשר בחורף (Pompodakis et al., 2005). כן דווח, כי משך חיי האגרטל של פרחי ורדים ומדדי איכות שלהם, כמו טרנספירציה וכמישת עלים, השתנו בהתאם לעונה (Slootweg et al., 2001; Marissen, 2005).

הטמפרטורה היא אחד הגורמים החשובים של השפעת העונה על התפתחות הצמח. לטמפרטורת העונתית ישנה השפעה רבה על מבנה העלים והעצה בצמחים רבים. למשל, שינויים עונתיים במבנה העלים ב-*Encelia farinosa* נבעו משינויים בטמפרטורה ובפוטנציאל המים בקרקע (Ehleringer, 1982). טמפרטורה גבוהה לירידה בעובי העלה של עצי צפצפה (*Populus tremula*) (Hartikainen et al., 2009). באורנים (*Pinus silvestris*) טמפרטורה גבוהה השפיעה על מבנה העצה, והעלתה את הצפיפות, אורך וקוטר הטרכאידים (Kilpelainen et al., 2007). בנבטים של אקליפטוס (*Eucalyptus grandis*), טמפרטורת גידול גבוהה העלתה את צפיפות העצה. הצפיפות עלתה בעיקר הודות לעליה בעובי הדפנות של סיבי העצה, אך גם בשל ירידה בקוטרם של צינורות ההובלה (Thomas et al., 2007). משך חיי האגרטל של פרחי פרזיה (*Fresia*) (Slootweg, 2005) ופרחי שושן (*Lilium*) וחמנית (*Helianthus*) (Possiel and Dole, 2009) הושפע ממגוון גורמים במהלך הגידול, ביניהם טמפרטורה, לחות יחסית, לחות הקרקע, רמת CO₂ ועוצמת אור.

עקת מים במהלך הגידול - בחשיפה לעקת מים מתמשכת צמחים מתאימים את המבנה ואת התפקוד הפיסיולוגי שלהם בהתאם. כך למשל, בתורמוס (*Lupinus albus*) שנחשף לעקת יובש הדרגתית, אובחנו שינויים פיסיולוגיים לפני שהעקה השפיעה על פוטנציאל המים של הצמח. שינויים אלה כללו עליה ברמת החומצה האבציסית (ABA), ירידה בקצב הפוטוסינתזה ועליה בריכוז הסוכרים המסיסים (Pinheiro et al., 2011). החוקרים הסיקו, כי כבר בעקת יובש קלה צמחים עוברים התאמות לעקה, כהכנה אפשרית לחשיפה לעקת מים חמורה יותר בעתיד. גם עצי זית אשר גדלו בתנאי יובש עברו התאמה אוסמוטית, אך עם חידוש ההשקיה ההתאמה האוסמוטית פסקה (Dichio et al., 2004). בטבק (*Nicotiana tabacum*), חשיפה לעקת יובש גרמה לסגירת הפיוניות, הקטנת קצב הטרנספירציה וירידה בפוטנציאל המים. כאשר נבדקה הפעילות של שלוש תעלות מים ממשפחת ה-PIPs בשורשים, הסתבר שהביטוי של אחת מהן עלה כתוצאה מעקת היובש, ואילו הביטוי של שתי האחרות ירד (Mahdieh, 2008).

שינויים פיסיולוגיים ומבניים המתרחשים עקב עקת מים מוקדמת יכולים להשפיע על התפקוד ההידראולי בהמשך. כך למשל, צמחי כותנה אשר נחשפו לעקת יובש תפקדו טוב יותר בעקות היובש הבאות מאשר צמחי כותנה שלא נחשפו לעקה הראשונית (Ackerson and Hebert, 1981). החשיפה המוקדמת לעקה הגבירה את ההתאמה האוסמוטית והשפיעה על מבנה התאים וגודל הכלורופלסטים, וכתוצאה מכך צמחים

אלה יכלו לבצע יותר פוטוסינתזה בתנאים של עקת יובש. גם עצי אפרסק (*Prunus armeniaca*) צעירים הראו עמידות גבוהה יותר לעקת יובש לאחר חשיפה מוקדמת לעקת יובש קצרה, כנראה הודות להתאמה אוסמוטית (Ruiz-Sánchez et al., 2000). בהתבסס על תוצאות מחקר זה, החוקרים המליצו לחשוף שתילים לעקה קצרה לפני העברתם לנטיעה בשדה. בנוסף, השקיה בשיטה של השקיית חסר מווסתת (Deficit irrigation) הינה פרקטיקה מקובלת בחקלאות ומשמשת בגידול צמחים רבים, ביניהם עצי פרי שונים (Fereres and Soliano, 2006). העיקרון של השקיית חסר הוא, שצמחים המקבלים מים בכמות קטנה מהאופטימום מנצלים את המים ביעילות רבה יותר הודות למנגנוני התאמה ליובש. חשיפה לעקת יובש במהלך הגידול השפיעה גם על משך חיי האגרטל של ענפי קטיף שונים. למשל, לפרחי ציניה (*Zinnia elegans*) שגודלו בתנאי יובש היה משך חיי אגרטל ארוך יותר מאשר לפרחים שגודלו בתנאי השקיה מרובה (Twumasi et al., 2005). לורדים אשר גודלו בתנאי יובש (טמפרטורה גבוהה, השקיה מופחתת ולחות נמוכה) היו פיוניות בעלות מפתח קטן יותר וקצב טרנספירציה נמוך, והודות לכך משך חיי אגרטל ארוך יותר (In et al., 2007).

6.2. גישות בסיסיות לפתרון בעיות מאזן המים בענפי קטיף

קיימות מספר גישות בסיסיות לפתרון בעיות באיכות חיי האגרטל של ענפי קטיף. להלן נדון בעיקריות שביניהן:

1. שיפור איכות הענף הקטוף במהלך חיי האגרטל על ידי טיפולים שונים בתקופת הגידול בשדה. בפעמונית (*Campanula*), רמת הדישון במהלך הגידול השפיעה על איכות הפרחים ומשך החיים שלהם (Serek, 1990). בציפורן, גידול צמחים בחממות הגדיל את משקל הפרחים והאריך את משך חיי האגרטל שלהם (Celikel and Karacaly, 1995). בזנים שונים של ורדים, טמפרטורת גידול גבוהה גרמה לחיי אגרטל ארוכים יותר הודות לאקלום המוקדם לתנאי עקה (Marissen, 2005).
2. שיפור קליטת המים בענף הקטוף ע"י הגברת המוליכות של מים במערכת ההובלה שלו. מטרה זו מושגת על ידי שימוש במשטחים למיניהם (Van Doorn et al., 1993), אשר נצמדים לצינורות ההובלה ומקלים על תנועת המים בהם. למשל, בורדים מהזן 'סוניה' השימוש במשטחים מסוג Alkylethoxylate שיפר את הולכת המים וכתוצאה מכך את משך חיי האגרטל (Van Doorn et al., 2002).
3. מניעת איבוד מים מהענף הקטוף ע"י הפחתת קצב הטרנספירציה שלו. מטרה זו מושגת באמצעות ריסוס הענף או טבילתו בחומרי כיסוי למיניהם למניעת נידוף מים, או באמצעות מתן ABA אשר גורם לסגירת הפיוניות. שימוש ב- ABA הקטין את הנידוף והאריך את משך חיי האגרטל במינים שונים, כמו פרח השעווה (*Chamelaucium*) (Joyce and Jones, 1992). מאידך, ל- ABA יכולה להיות גם השפעה שלילית, בשל פעילותו להגברת נשירה והאצת הזדקנות. בפרחי פטוניה קטופים, למשל, השימוש ב- ABA גרם לכמישה מוגברת של הפרחים (Vardi and Mayak, 1989). בורדים, ABA הגביר את הנשימה, עודד את צמיחת עלי הכותרת והפחית את רמת הסוכרים, וכתוצאה מכך התקצר משך חיי האגרטל (Borochoy et al., 1976).

7.ב. מדדים ושיטות להערכת מאזן המים בענפי קטיף והגורמים המשפיעים עליו

בתחום של אחסון ענפי קטיף של מוצרי נוי ישנה חשיבות רבה להערכת מאזן המים של הענפים. ישנם מספר מדדים המקובלים בתחום, אם כי הם אינם ייחודיים לענפי קטיף ומשמשים גם להערכת מאזן המים של הצמח השלם.

1. מדדי משקל

א. משקל טרי של ענפים (FW) - המדד הבסיסי ביותר, שהנו קל מאוד למדידה לאורך חיי האגרטל. בנוסף, על ידי שקילה פשוטה ניתן למדוד גם את קליטת המים מהאגרטל וגם את הטרנספירציה. היחס בין הקליטה לטרנספירציה הוא מדד חשוב, אשר ערכו נותן אינדיקציה טובה למאזן המים של הענף הקטוף. כאשר היחס גדול מ-1, זה מראה שהענף קלט יותר מים ממה שהוא נידף, ולכן הוא במאזן מים חיובי. לעומת זאת, כאשר היחס קטן מ-1, זה מראה שהענף במאזן מים שלילי ומתחיל לכמוש.

ב. תכולת מים יחסית (RWC) - מדד זה נחשב אמין מאוד, כי הוא לוקח בחשבון גם את המשקל היבש של הרקמה ואת המשקל ברוויה, כלומר, הוא נותן אינדיקציה לפוטנציאל המים של הרקמה (Turner, 1981).

2. מדדי אמבוליה ורגישות לתופעה

א. Acoustic emission (AE) - בשיטה זו ניתן למדוד את ההיווצרות של אמבוליה בענפי קטיף. השיטה אינה הרסנית, והיא מודדת את הגלים האקוסטיים שהרקמה פולטת בזמן של ניתוק עמודת מים בעצה (Van Doorn and Cruz, 2000). הבעיה היא שהשיטה אינה כמותית, מכיוון שחלק מהרעשים נובעים מסיבות אחרות מאשר אמבוליה.

ב. דימות תהודה מגנטית (Magnetic resonance imaging, MRI) - בשיטה זו משתמשים בשילוב של קרינת רדיו ושדה מגנטי חזק, על מנת להשפיע על אטומים ברקמה (Formica and Silvestri, 2004). שיטת ה-MRI מאפשרת הבחנה ברורה בין הרקמות השונות. זאת שיטה לא פולשנית ולא הרסנית, שבאמצעותה ניתן לקבוע את מצב המים של ענפי קטיף, עד כדי מעקב אחרי היווצרות והתמוססות של אמבוליה בצרורות ההובלה (Valle et al., 2001). שיטת ה-MRI נותנת תוצאות מאוד אמינות, התואמות במידה טובה את ההסתכלות המיקרוסקופית והמדידות של זרימת מים (Scheenen et al., 2007).

ג. קרו-מיקרוסקופ אלקטרוני סורק, (Cryo scanning electron microscope CryoSEM) - מאפשר בחינה של דוגמאות עדינות, מכיוון שהן מוקפאות באופן פתאומי לפני ההסתכלות. ישנן מספר עבודות בהן נעשה שימוש בשיטה זו להסתכלות על בועות אוויר בתוך העצה. שיטת ה-CryoSEM שנויה במחלוקת, מכיוון שעצם ההקפאה יכולה ליצור ארטיפקטים, ולכן דרושה מיומנות רבה בשימוש בשיטה זו (McCully et al., 2000; Cochard et al., 2000).

ד. חתכים מיקרוסקופיים - בשיטה זו ניתן להעריך את מידת האמבוליה של העצה באופן פשוט ומהיר לפי מספר בועות האוויר שהופיעו בחתך של הרקמה הצמחית (Koizumi et al., 2007). החתכים נעשים בתוך גליצרוֹל, המונע בריחה של בועות האוויר מצינורות ההובלה. החסרונות של השיטה הם שהיא הרסנית ודורשת מיומנות בהיסטולוגיה.

ה. טומוגרפיית רנטגן ממוחשבת (High-Resolution Computed Tomography, HRCT) - בשיטה זו נעשה שימוש בקרני רנטגן ויש לה רזולוציה מאוד גבוהה (כמה עשרות מיקרונים). החיסרון של השיטה הוא שהיא הרסנית, מכיוון שמשתמשים בה בקרני רנטגן בעוצמה גבוהה, ולכן אין אפשרות לעריכת

ניסויים ארוכי טווח. יתרונה, באפשרות להערכה כמותית מדויקת של רמת האמבוליה בעצה (Brodersen et al., 2010).

1. קוטרון (Cavitron) – מכשיר המאפשר מדידת מוליכות הידראולית ויצירת עקומות קויטציה (Cavitation curves) בענפים מעוצים (Cochard, 2002). המכשיר בנוי על בסיס צנטריפוגה המסובבת את הענף, והכוח הצנטריפוגלי יוצר לחצים בעצה בהתאם למהירות הסיבוב. המכשיר מאפשר לקבל עקומות רגישות לקויטציה תוך זמן קצר והשימוש בו פשוט יחסית. עם זאת, המכשיר לא מתאים למיני צמחים רבים ויכול ליצור ארטיפקטים במדידות (Cochard et al., 2010). יש לציין שהמכשור הדרוש למרבית השיטות שתוארו לעיל אינו נמצא בארץ.

3. פוטנציאל המים

תא לחץ (Pressure chamber, Pressure bomb, Scholander's chamber) – במכשיר זה מופעל על מקטע גבעול או עלה לחץ המוגבר בהדרגה, והלחץ בו יוצאת טיפה של מוהל העצה מהקצה החתוך נחשב כשווה לפוטנציאל המים בעצה (Scholander et al., 1965). תא לחץ פשוט מאוד לשימוש ומשמש במחקרים רבים. עם זאת, נגד המכשיר מושמעת ביקורת בכך, שהערך אשר המכשיר מודד לא בהכרח מייצג את פוטנציאל המים, אלא ערך משוקלל שכולל גם את כוח הנימיות. בעיה נוספת היא העברת הלחץ מתוך התא של המכשיר לעצה. אמנם תיאורטית הלחץ בעצה הוא שווה ערך ללחץ בתא, אולם במציאות זה איננו כך (Zimmermann et al., 2004). למרות הביקורת, המדד אשר תא הלחץ מציג, אפילו אם אינו שווה ערך מדויק לפוטנציאל המים בעצה, נמצא במתאם טוב למאזן המים של מינים רבים של צמחים. למשל, בורדים קטופים נעשו במקביל מדידות פוטנציאל המים בתא לחץ, מדידות מוליכות הידראולית ומדידות של איבוד מים, ונמצא מתאם בין המדדים (Dixon et al., 1988). גם בענפי קטיף פורחים של *Thryptomene calycina*, נמצאה ירידה מקבילה במדדים השונים, פוטנציאל המים, מוליכות הידראולית וקליטת מים (Jones et al., 2003).

4. מוליכות הידראולית

מוליכות הידראולית נמדדת בדרך כלל בשיטה של Sperry (Sperry et al., 1988). בשיטה זו, תמיסה חומצית מוזרמת דרך מקטע של ענף וקצב הזרימה נמדד ע"י שקילת התמיסה היוצאת ממקטע הענף. מהנתונים מחשבים את המוליכות ההידראולית של הענף. לאחר מכן, הענף עובר תהליך של הזרמת תמיסה בלחץ גבוה, אשר ממס את האמבוליה, ושוב מודדים את קצב הזרימה דרך הענף. לפי ההפרשים בקצב הזרימה לפני ואחרי שטיפת האמבוליה ניתן לחשב את אחוז איבוד המוליכות ההידראולית - (PLC) Percent loss of conductivity.

5. התאמה אוסמוטית

התאמה אוסמוטית מתבטאת בצבירת מומסים בתאים כתוצאה מעקת מים. ניתן למדוד אותה ע"י מדידת הפוטנציאל האוסמוטי בצמח במקביל למדידת RWC (Babu et al., 1999). את הפוטנציאל האוסמוטי ניתן למדידה למדוד באופן ישיר באמצעות האוסמומטר. בנוסף, ניתן להעריך את ההתאמה האוסמוטית באופן עקיף ע"י מדידות של צבירת מומסים, כגון סוכרים ופרולין.

ב.8. מטרות המחקר

ב.8.1. השערת המחקר

בשל העלים והפירות הדקורטיביים, דודונאה 'דנה' היא בעלת פוטנציאל מסחרי גבוה לשיווק כענף קישוט קטוף. אולם הסתבר, שענפים קטופים של דודונאה כומשים לעתים לאחר זמן קצר באגרטל, בעיקר בשלבים הרפרודוקטיביים, וכן כשהקטיף של ענפים וגטיביים נעשה בעונת החורף, בעוד שבקיץ משך חיי האגרטל שלהם ארוך יחסית (Shtein et al., 2009).

מאחר ואיכות הענפים במהלך חיי האגרטל מושפעת ישירות ממאזן המים בענף, הנחת העבודה שלנו גרסה, שטמפרטורת הסביבה תשפיע על מבנה מערכת ההובלה, וע"י כך תשפיע על מאזן המים של הענף הקטוף. לכן מטרת העבודה הייתה לבחון את הסיבות לשינויים העונתיים הנ"ל באיכות הענפים הקטופים של דודונאה 'דנה' באמצעות מנגנונים שונים העשויים להסביר את השינויים במאזן המים.

ב.8.2. מטרות ספציפיות

1. בחינת ההשתנות של האנטומיה הפונקציונאלית של ענפי דודונאה 'דנה' במהלך השנה לצורך הבנת הגורמים המשפיעים על הולכת המים המשתנה בעונות השונות.
2. מדידה של היווצרות סתימות בצינורות ההובלה בעלים ובגבעול, ומעקב אחר מדדי מאזן המים בחיי האגרטל במהלך השנה.
3. אפיון הגורמים המשפיעים על מאזן המים בענפי קטיף במהלך השנה, הקשורים להתאמה אוסמוטית, התלויה בפירוק עמילן לגלוקוז, בסינתזה של סוכרים מסיסים ובעליה ברמת האוסמוליטים ברקמה.
4. בחינת מידת המעורבות של אקוואפורינים בעלים ובגבעול במאזן המים של ענפי דודונאה 'דנה' קטופים במהלך השנה.

ג. שיטות המחקר

ג.1. חומר צמחי

ג.1.1. ענפי קטיפ

צמחים של דודונאה 'דנה' גודלו בקרקע מסוג חרסית במרכז וולקני במשטר השקיה קבוע. הענפים נקטפו במזמרה בשעות הבוקר המאוחרות והוכנסו מיד בשדה לדלי עם מי ברז, שהועבר לאחר מכן לחדר תצפית מבוקר (20 מ"צ, לחות יחסית של 60-70%, והארה של 12 שעות עם מנורות ליבון ומנורות פלואורסצנטיות בעוצמת אור של $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). הענפים הושארו בדלי עם מים בחדר התצפית למשך מספר שעות לצורך אקלום, ולאחר מכן הם קוצרו לאורכים שווים, הקצוות נחתכו והעלים התחתונים הוסרו. הענפים הועברו לאגרטים, שהכילו תמיסת כלורין אורגני בצורת הרכובת Sodium dichloroisocyanurate (TOG-6), גדות אגרו בע"מ) בריכוז של 50 ח"מ, לצורך מעקב אחר מדדים שונים במהלך חיי האגרטל, אלא אם צוין אחרת. הניסויים השונים בוצעו בעיקר עם ענפים וגטיביים שגדלו בחורף או בקיץ, ועם ענפים נושאי פירות.

ג.1.2. עלים מנותקים

לצורך מעקב אחר מדדים שונים, נקטפו עלים מהענפים הנ"ל והודגרו בחדר תצפית כל עלה בנפרד במבחנות בנפח של 50 מ"ל, כשבסיס הפטוטורות בלבד טבול תמיסת כלורין אורגני בריכוז של 50 ח"מ.

ג.2. יישום טיפולים

ג.2.1. הטענה בתמיסות סוכר

הענפים הוטענו בתמיסות של 5% סוכרוז או גלוקוז למשך 20 שעות ב- 20 מ"צ, ולאחר מכן הוצבו בחדר תצפית באגרטים שהכילו תמיסת כלורין אורגני לצורך מעקב אחר שינויי המשקל במהלך חיי האגרטל.

ג.2.2. מתן סוכר באגרטל

הוספת סוכר בצורה מתמשכת לתמיסת האגרטל נעשתה באמצעות הדגרת הענפים בתכשיר המסחרי Long Life (LL) (גדות אגרו בע"מ). התכשיר האבקתי מכיל 1% גלוקוז ותערובת של בקטריוציידים.

ג.2.3. מעכבי תעלות מים

במחקר הנוכחי יוּשְׁמוּ שני מעכבים של תעלות מים, HgCl_2 (Sigma) ופלורטין (Phloretin) (Sigma). ענפי הקטיפ הודגרו למשך שעתיים בחדר תצפית בריכוזים שונים של תמיסות המעכבים: HgCl_2 בטווח ריכוזים של

25-100 μM , ופלורטין בטווח ריכוזים של 125-500 μM . בתום ההדגרה הענפים נשטפו במי ברז והוצבו בחדר תצפית באגרטים עם תמיסת כלורין אורגני למעקב אחר שינויי המשקל במהלך חיי האגרטל.

ג.2.4. אתילן ומעכב פעילות של אתילן

ענפי קטיף באגרטים עם תמיסת כלורין אורגני נחשפו לאתילן בריכוזים שונים למשך 24 שעות ב- 20 מ"צ בתוך תאים אטומים בנפח של 200 ליטר. על מנת למנוע הצטברות של CO_2 , הוספו לתוך כל תא 200 ג' של תחמוצת סידן (CaO). אתילן בטווח ריכוזים של 0.5-10 ח"מ הוזרק לתאים באמצעות מזרק. באופן דומה, הענפים נחשפו למעכב הגזי של פעילות אתילן, 1-MCP (EthylBloc, AgroFresh Inc., Spring House, PA) בטווח ריכוזים של 0.05-0.4 ח"מ למשך 4 שעות ב- 20 מ"צ. ריכוז האתילן וה- 1-MCP שהצטברו בתאים בסוף ההדגרה נבדק בגז כרומטוגרף (Varian 3300, Palo Alto, CA). ענפי הביקורת הודגרו באותם התאים ללא אתילן או ללא 1-MCP.

ג.3. בדיקות אנטומיות

בכל מועד בדיקה נלקחו במהלך השנה 10 ענפים מצמחים שונים. חתכי גבעול נעשו במרחק של 30 ס"מ מהקצה העליון של הענף. למצרציה נלקחו דגימות גבעול מאותם ענפים. לחתכי עלים נלקח העלה הבוגר העליון בכל ענף וממנו נדגם אמצע העלה.

ג.3.1. היסטולוגיה - כללי

הדגימות לחתכים קובעו בתמיסת Formalin:acetic acid:alcohol (FAA), הועברו דהידרציה בריכוזים עולים של אתנול וקובעו בפראפלסט לפי ארזי ושוורץ (1999). החתכים בעובי של 10 μm נעשו בעזרת מיקרוטום סיבובי ונצבעו ב- Safranin/Fast green או ב- Toluidine blue O למטרות זיהוי של מבנה אנטומי, ב- Ruthenium red לצביעת פקטין או ב- Chlorine-zinc-iodine לצביעת עמילן. הדוגמאות צולמו באמצעות מצלמת Zeiss המחוברת למיקרוסקופ אור. המדידות וספירת התאים נעשו בעזרת תוכנת Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, USA, ImageJ (1997-2008, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

ג.3.2. אנליזת דוגמאות במיקרוסקופ אלקטרוני

חתכי גבעול הודגרו ב- PBS שהכיל 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 נשטפו ב- PBS 1% OsO_4 in PBS, נשטפו ב- PBS ונצבעו בבלוק ב- Uranyl acetate. לאחר מכן הדוגמאות עברו דהידרציה על ידי העברתן בסדרת תמיסות עם ריכוזי אתנול עולים ואצטון. בתום הייבוש הדוגמאות הושקעו ב- epoxy resin Agar100 (Agar Scientific,

(Cambridge), נחתכו לחתכים באולטרא-מיקרוטום ונצבעו שנית ב-Uranyl acetate/lead citrate. הדוגמאות נצפו במיקרוסקופ אלקטרוני מסוג Tecnai G2 Spirit TEM (FEI company, Philips).

ג.3.3. קביעת מימדי הצינורות בעזרת מצרציה וחתכים ידניים

לצורך קביעת אורך חוליות הטרכיאה בוצעה מצרציה של הגבעול ב-Acetic acid: H₂O₂ (1:1) לפי (Franklin, 1945). בהמשך הדגימות נצבעו בספרנין ונחתמו בגליצרין-ג'לטין לפי ארזי ושוורץ (1999). לשם מדידת קוטר וצפיפות צינורות ההובלה בוצעו חתכים ידניים בעזרת סכין גילוח. החתכים נצבעו בפלורוגלוצינול חומצי (Acid phloroglucinol). לצורך המדידות נבחר שטח של כ- 25% מהחתך.

ג.4.3. הדפסי האפידרמיס

למדידת צפיפות הפיוניות והטרכיכומות הוכנו הדפסי אפידרמיס של העלים. לצורך זה העלים כוסו בלאק לציפורניים בעזרת מכחול, ולאחר ייבושו ההדפסים הורדו בעזרת נייר דבק והועלו על גבי זכוכיות נושאות. טרכיכומות נמדדו בשטח עלה של 9.4 מ"מ² ופיוניות בשטח עלה של 1.5 מ"מ².

ג.5.3. מעקב אחר קליטת מים אפופלסטית

המעקב אחר קליטת מים אפופלסטית דרך האפידרמיס של העלים בוצע באמצעות תמיסת קלקופלואור (Calcofluor) (Sigma), כמתואר בספרות (Fahn, 1986; Gouvra and Grammatikopoulos, 2003). עלים הורטבו בתמיסה של 0.1% קלקופלואור באמצעות מכחול עדין ולאחר מכן הודגרו בתמיסת TOG-6 במבחנות של 15 מ"ל. תמיסת הקלקופלואור יושמה בדרך כלל בציוד התחתון של העלה, פרט לשני מקרים בהם היא יושמה בצדו העליון. לאחר 30 דקות העלים נשטפו במים מזוקקים והוכנו מהם חתכי רוחב ידניים. החתכים נצפו במיקרוסקופ אור בפילטר של GFP ובבינוקולר באור UV, וצולמו במצלמה (Olympus) המחוברת למיקרוסקופ ולבינוקולר. באחד הניסויים העלים הודגרו בתמיסת 0.01% קלקופלואור למשך 48 שעות לפני ביצוע החתכים.

ג.4. קביעת מדדים של מאזן המים

המשקל של הענפים ושל תמיסת האגרטל נמדד כל 2-3 ימים. האגרטלים כוסו בנייר כסף ע"מ למנוע אידוי מים מפני התמיסה. המשקל הטרי (FW) של ענפים, קצב הטרכנספירציה וקצב קליטת המים חושבו לפי הנוסחאות הבאות (Turner, 1981):

$$100 \text{ FW} (\%) = [Wp(n) - Wp(0) / Wp(0)] \text{ שינוי המשקל הטרי במועד זמן מוגדר}$$

$$\text{Transpiration rate} [\text{ml g}^{-1} \text{ d}^{-1}] = [Ws(n-1) - Ws(n)] - [Wp(n) - Wp(n-1)] / Wp(0) [t(n) - t(n-1)]$$

$$\text{FW} = \text{Fresh Weight (g); } Wp = \text{Plant Weight (g); } Ws = \text{Solution weight (g); } t = \text{Time (d)}$$

לחישוב תכולת המים היחסית (RWC), עלים טריים נשקלו, נחתכו לשניים והודגרו בצלחות פטרי שהכילו מים מזוקקים ב- 4 מ"צ למשך 24 שעות בחושך. המשקל הטורגידי (TW) של העלים נמדד, והעלים יובשו בתנור ב- 65 מ"צ למשך 48 שעות. לאחר הייבוש' נמדד המשקל היבש (DW) של העלים, ותכולת המים היחסית חושבה לפי הנוסחה הבאה (Turner, 1981):

$$RWC (\%) = (FW - DW) / (TW - DW) \cdot 100$$

ג.5. מדידת אורך צינורות ההובלה

האורך המקסימאלי של צינורות ההובלה נמדד ע"י הזרמת אוויר בלחץ דרך הענף, כאשר קצהו השני נטבל במים וקוצר בהדרגה, עד שבמים הופיעו בוועות אוויר. אורך הענף בשלב הזה נחשב כאורך המקסימאלי של הצינור.

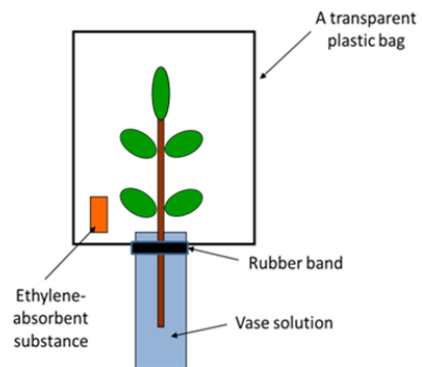
התפלגות אורך צינורות ההובלה נמדדה באמצעות הזרמת צבע לטקס. מים מזוקקים ללא אוויר הוזרמו בעזרת תא לחץ דרך הענף, עד שהענף היה רווי במים. הענפים הצדדים והעלים הוסרו, ודרך הענף הוזרמה תמיסת צבע מסוננת. הענף נחתך למקטעים, ופני החתכים צולמו בעזרת מצלמה (Olympus) המחוברת לבינוקולר. בכל מקטע נספר מספר הצינורות הצבועים. התפלגות אורך הצינורות חושבה כמפורט בספרות (Cohen et al., 2003).

ג.6. כימות הסתימות בענפים

לבחינת שיעור הסתימות של צינורות ההובלה במהלך השנה, נקטפו ענפים בעונות שונות והודגרו בכלי עם תמיסה של 0.5% פוקסין בסיסי למשך 3 שעות. בתום ההדגרה נעשו חתכים ידניים של הגבעול בגבהים שונים, לצורך הערכה של הצינורות הסתומים (שלא נצבעו) מתוך כלל צינורות ההובלה.

ג.7. יצירת אווירה לחה

על מנת ליצור אווירה לחה, ענפי קטיף באגרטלים שהכילו מים כוסו בשקיות פוליאאתילן שקופות. כל שקית נאטמה באמצעות גומייה. בתוך כל שקית הוכנס חומר סופח אתילן (סכמה 1). הלחות היחסית בתוך בשקית נבדקה בעזרת מד-לחות (Hobo) שהוכנס לשקית.



סכמה 1: הדגרת ענפי קטיף באווירה לחה.

8. קביעת מדד האמבוליה

מדד האמבוליה בענפים נקבע בשיטת כימות בועות האוויר המפורטת בספרות (Koizumi et al., 2007). הענפים הוכנסו לתוך תמיסה של 50% גליצרול, שממנה הוצא האוויר בעזרת וואקום. מהענפים המטופלים נחתכו מקטעים, שמהם נעשו חתכי רוחב ידניים כאשר המקטע כולו שקוע בתוך התמיסה. מספר בועות האוויר בחתכים נקבע בעזרת מיקרוסקופ אור. מדד האמבוליה נקבע לפי מספר בועות האוויר שהופיעו בחתך בסולם של 0-2, כאשר 0 = חתך ללא בועות; 1 = חתך עם מספר מועט (1-4) של בועות; 2 = חתך עם מספר רב (5 ומעלה) של בועות.

9. קביעת קצב ייצור אתילן וקצב הנשימה

ענפים קצרים באורך של 40 ס"מ הודגרו במבחנות בנפח של 15 מ"ל שהכילו תמיסת כלורין אורגני. המשקל ההתחלתי של הענף נמדד בתחילת הניסוי. מבחנות עם 4 ענפים כל אחת הודגרו בצנצנות אטומות בנפח של 2 ליטר למשך 48 שעות בטמפרטורת החדר. ריכוז האתילן בצנצנות נקבע ע"י הוצאת דגימת אוויר עם מזרק והזרקתה לגז כרומטוגרף (Varian 3300, Palo Alto, CA), המצויד בגלאי להבה (Flame Ionization Detector). הגז הנושא היה הליום, שהוזרם בקצב של 30 מ"ל לדקה. הפרדת האתילן נעשתה בקולונה מסוג Hase-Pack (Alltech) בטמפרטורה של 80 מ"צ. טמפרטורת ההזרקה הייתה 70 מ"צ וטמפרטורת הגלאי הייתה 150 מ"צ. מכיוון שבניסוי מקדים נמצא שלהצטברות פחמן דו-חמצני בצנצנות לא הייתה השפעה על הצטברות אתילן, בניסוי זה לא הוספה תחמוצת סידן (CaO) לתוך הכלים. קצב הנשימה נמדד באמצעות קביעת הפליטה של CO₂. ריכוז ה-CO₂ נקבע בעזרת גז כרומטוגרף של חברת Varian המצויד בגלאי (Fischer) Thermal Conductivity Detector. הגז הנושא היה הליום, שהוזרם בקצב של 30 מ"ל לדקה. הפרדת הגזים נעשתה בקולונה CTR1 (Alltech) בטמפרטורה של 20 מ"צ. קצב ייצור האתילן בדוגמאות בוטא ביחידות של ננוליטר (nl) לשעה לגרם רקמה, והוא חושב עפ"י הנוסחה הבאה:

Ethylene production rate (nl/g/h) = (EC) (VV) / (FW) (t)

EC = Ethylene Concentration (ppm); VV = Vessel Volume; FW = Fresh Weight (g); t = Time (h)

קצב ייצור ה- CO_2 בוטא ביחידות של מיקרוליטר (μl) לשעה לג' רקמה, והוא חושב עפ"י הנוסחה הבאה:

CO_2 production rate ($\mu\text{l/g/h}$) = (% CO_2) (VV) / (FW) (t)

VV = Vessel Volume; FW = Fresh Weight (g); t = Time (h)

בשתי המדידות כל טיפול נעשה ב- 5 חזרות (כלים).

ג.10. קביעת הרמה של פחמימות ופרולין בעלים

לצורך בדיקת הרמה של סוכרים מסיסים ועמילן נלקחו דגימות עלים במהלך השנה. העלים יובשו למשך שבוע ב- 60 מ"צ. בתום הייבוש העלים נטחנו לאבקה. המיצוי ובדיקת עמילן וסוכרים מסיסים נעשו בשיטה קולורימטרית, כמפורט בספרות (Dubois et al., 1956).

בדיקת פרולין נעשתה באמצעות נינהידרין (Larher et al., 1993) בדגימות של עלים, שנאספו ויובשו במהלך השנה כמפורט לעיל.

ג.11. קביעת מדדי הזדקנות בעלים

ג.11.1. דליפת יונים

עלים טריים (0.2 ג') נשטפו, נחצו לשלושה חלקים, הוכנסו למבחנה עם 15 מ"ל מים מזוקקים פעמיים והורתחו. מוליכות התמיסה נמדדה כל שעה בטמפרטורת החדר בעזרת מד-מוליכות (Butech Instruments), עד להתייצבותה על ערך קבוע. התוצאות בכל מועד מדידה חושבו כאחוז מדליפת היונים המקסימאלית, שנקבעה כ- 100%, ונמדדה בתמיסה שעברה הרתחה באוטוקלאב.

ג.11.2. בדיקת כלורופיל

מדגמים של 0.5 ג' עלים הוכנסו ל- 4.5 מ"ל תמיסת N,N-dimethylformamide. העלים הודגרו בתמיסה למשך 72 שעות ב- 4 מ"צ. בתום המיצוי, נקבעה הבליעה של התמיסה בספקטרופוטומטר באורכי גל של 647 ו- 664.5 ננומטר. על בסיס נתונים אלה חושב ריכוז הכלורופיל בעלים כמפורט בספרות (Inskeep and Bloom, 1985).

ג.12. בחינת הביטוי של גנים של תעלות מים (אקוואפורינים) בעלים ובגבעולים

ג.12.1. הפקת RNA וסינתזת cDNA

לצורך ההפקה נלקחו עלים בוגרים עליונים או דגימות של גבעולים במרחק של 30 ס"מ מהקצה העליון של הענפים. בכל הפקה, 80 מ"ג רקמה נטחנו עד דק במכשיר Bead Beater (BioSpec Products, Inc. Bartlesville, OK) RNA הופק בעזרת ערכה מסחרית - Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, Inc.), לפי הוראות היצרן. הדוגמאות כומתו באמצעות מכשיר Nanodrop (ThermoFisher Scientific, UK), ולאחר מכן אוחסנו ב-80 מ"צ עד לבדיקה.

ה-RNA נוקה משאריות DNA באמצעות RQ1 RNase free DNase (Promega Corp., Madison, WI) בנפח סופי של 10 µl, בהתאם להוראות היצרן. cDNA סונתז מה-RNA הנקי בעזרת ערכת Verso - cDNA kit (Thermo Scientific, ABgene, UK), לפי הוראות היצרן. לשימושים העתידיים ה-cDNA נמהל במים ביחס של 1:10. לבדיקת איכות ה-cDNA נעשה שימוש בגנים כלליים (Housekeeping genes), אקטין ו-GAPDH (GAPDH) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. איכות ה-cDNA נבדקה בריאקצית PCR עם התחלים הבאים של אקטין, אשר תוכננו במהלך המחקר:

5'-ATC CAC ATC TGC TGG AAG GT-3' (R)-5', GCT GGA AT-3' (F), GGA ATG GAA GCT

או עם התחלים הבאים של GAPDH, אשר תוכננו במהלך המחקר:

5'-AGACCCTCAACAATGCCAAA-3' (R)-5', ACATGTTTAAGTACGACAGTGTTTC-3' (F)

התוצרים הורצו על ג'ל אגרוז.

ג.12.2. שיבוט וריצוף של הומולוגים של גנים ממשפחת ה-PIP בדודונאה

רצפי נוקלאוטידים של גנים ממשפחת ה-PIP בדו-פסיגיים נותחו בתוכנת BioEdit (Ibis Biosciences, Abbot Park, IL) עפ"י ניתוח זה תוכננו שני זוגות של תחלים דגנרטיביים:

5'-GCY GGG TTV ATN SMD GYT CCR GTG A-3' (R1)-5', GCY GAG TTC RTH CMA C-3' (F1);

5'-GGB CCN RCC CAG WAD AYC CAR TGG-3' (R2).-5', CTC HGG KGG WCA YRH AAC CCN GC-3' (F2);

לאחר ריאקצית PCR עם ארבעת השילובים האפשריים של זוגות התחלים, התוצרים הורצו על ג'ל אגרוז ופסים בגודל המצופה נחתכו מהג'ל. תוצר PCR בודד מכל פס באמצעות ערכת Promega wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega Corp., Madison, WI).

כל תוצר עבר ליגציה עם T4 DNA ligase והוחדר לפלסמיד pGEM-T easy (Promega Corp., Madison, WI). הפלסמידים המשובטים עברו טרנספורמציה לתוך *E. coli* JM109 קומפלטניים (Promega Corp., Madison, WI). לאחר שהחידקים גדלו, המושבות נסרקו באמצעות PCR על מנת לגלות את החידקים

המכילים מחדר. המושבות הנבחרות נשלחו למעבדות חי בע"מ (פארק התמר, רחובות) לבידוד פלסמיד וריצוף דו-כיווני של המחדר. הרצפים שהתקבלו בריצוף שימשו להשוואה עם רצפים אחרים של גנים לתעלות מים במאגר ה-GeneBank בעזרת אלגוריתם BLASTX (Altschul et al., 1990). שלושה הומולוגים מדודונאה, שהוגדרו כ- *PIP1*, *PIP2a*, *PIP2b*, נבחרו לאנליזות נוספות. זוגות תחלים לגנים האלה תוכננו בתוכנת Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) (Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers).

ג.12.3. כימות רמת התוצר בשיטת ה- Real-Time PCR

כל הריאקציות בוצעו בצלחות פוליפרופילן עם 96 בארות ב-Mx3000P® QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA) נעשה שימוש בתערובת של ThermoFisher Absolute Blue QPCR SYBR Green ROX Mix (ThermoFisher Scientific, UK).

בדיקת ספציפיות, כיוול תנאי הריאקציה והכנת סטנדרטים מתאימים נעשו לפי Ofek et al. (2009). תערובת הריאקציה הכילה $1 \mu\text{M}$ של cDNA, $1 \mu\text{M}$ מכל אחד מהתחלים ושאר הרכיבים לפי המלצות היצרן. הריאקציות נעשו בשלוש חזרות. מכשיר ה-Real-Time PCR תוכנת כדלקמן: 40 cycles of 15s at 94°C, 15s at 55°C, 20s at 72°C. הנתונים נאספו במהלך שלב ההתארכות - Extension step. לאחר כל הרצה נעשה ניתוח של עקומת ההמסה של התוצרים (Melting curve analysis), על מנת לוודא שהאות הפלואורסצנטי אכן התקבל מתוצרי PCR ספציפיים. עקומות סטנדרט התקבלו מסדרת דופליקטים של תוצרי PCR מהולים באותה צלחת ובאותם התנאים כמו דוגמאות ה-cDNA. ע"מ לוודא שהתערובת לא מזוהמת ב-DNA זר, נעשה שימוש בבארות ריקות או בתערובת הריאקציה ללא cDNA כביקורות. הגנים הכלליים בהם נעשה שימוש כביקורת עבור רמות ביטוי יחסיות היו אקטין ו-GAPDH.

נתוני ה-Real-time PCR שהתקבלו נותחו בתוכנת MxPro™ QPCR (Stratagene, La Jolla, CA).

ג.13. קביעת המיקום בעלה של הגן *PIP2a* בעזרת *in situ hybridization*

הניסוי בוצע לפי Jackson (1991), עם שינויים קלים. הרצף של הגן *PIP2a* הוכנס לתוך פלסמיד מסוג-pCRII TOPO (Invitrogen, Germany). הרצף עם אתרי רסטריקציה משני צדדיו הוצא בריאקציית PCR בעזרת תחלים ספציפיים לפלסמיד זה. סמנים (Probes) באורך של כ-410 בסיסים המסומנים ב-digoxigenin-UTP (DIG) בכיוון sense ובכיוון antisense סונתזו בעזרת קיט (Roche, Germany). עלים של דודונאה עברו קיבוע ב-FAA, ובהמשך קובעו בפראפלסט לפי ארזי ושוורץ (1999). חתכי רוחב של העלים בעובי של $10 \mu\text{m}$ נעשו בעזרת מיקרוטום סיבובי, והועלו על גבי זכוכית טעונה (Menzel-Superfrost). (Glaser, Germany) החתכים ע"ג הזכוכית הטעונה הודגרו עם הסמן בריכוז של $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ לכל זכוכית, ולאחר

מכן הודגרו עם נוגדן Anti digoxigenin (Roche, Germany). בתום ההדגרה עם הנוגדן הוסף לחתכים צבע Western blue (Promega Corp., Madison, WI) למשך יומיים, והם נצפו לאחר מכן במיקרוסקופ אור וצולמו באמצעות מצלמת Zeiss המחוברת למיקרוסקופ.

ג.14. ניתוח סטטיסטי

התוצאות ניתחו באמצעות אנליזת Analysis of variance – ANOVA בתוכנת JMP (JMP statistical software; SAS Institute Inc., Cary, NC) לטיפולים בעלי הבדלים מובהקים סטטיסטית נעשו ניתוחי post hoc. המתאמים הלינאריים נעשו באמצעות תוכנת Excel.

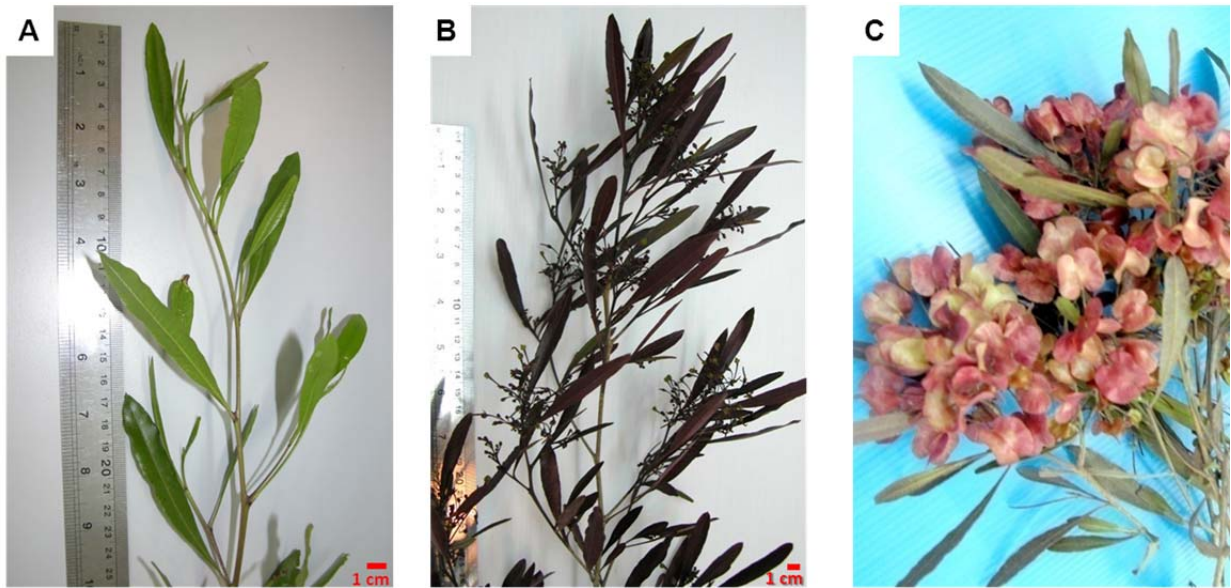
ד. תוצאות

ד.1. אפיון המבנה המורפולוגי והאנטומי של ענפי דודונאה 'דנה'

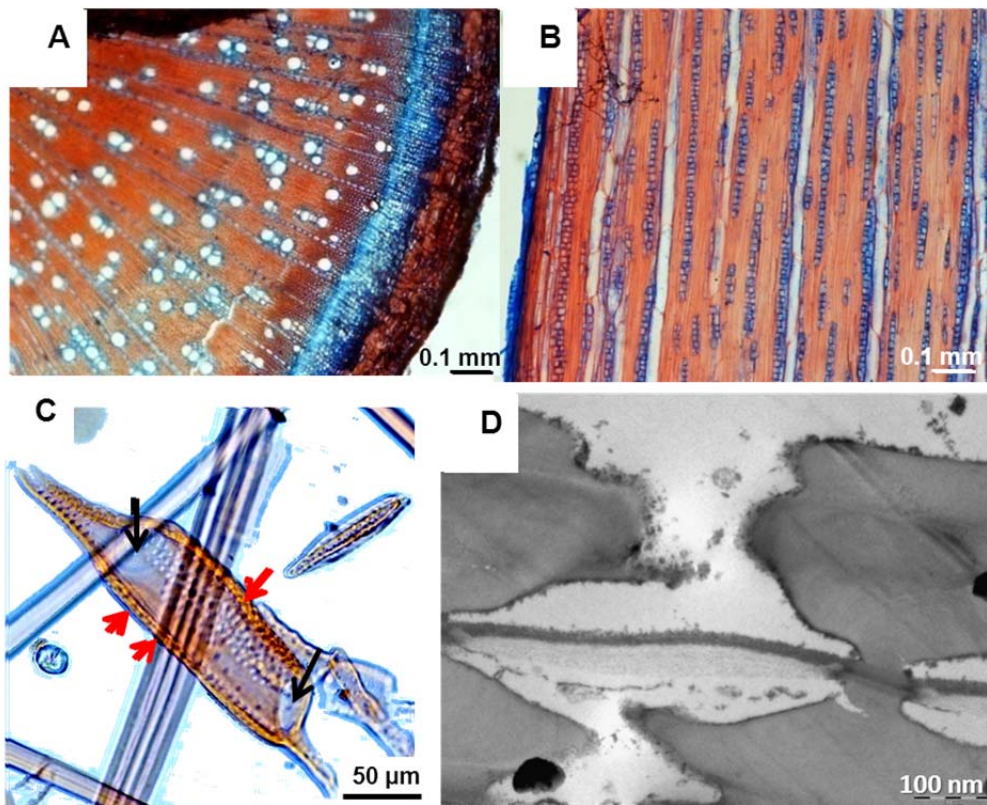
המכלוא דודונאה 'דנה' לא נחקר בעבר ולא קיים ידע אנטומי בסיסי לגביו. הניסויים בוצעו עם ענפים של זן זה בשלושה שלבי התפתחות שונים: וגטיביים, פורחים או נושאי פירות, בהתאם לעונה (תמונה 1). הענפים הוגטיביים (תמונה 1A) קיימים כל השנה. החל מחודשי הסתיו (נובמבר-דצמבר) ובהמשך החורף העלים מקבלים גוון אדמדם (עקב הצטברות של אנתוציאנינים באפידרמיס), כאשר הגוון אדום יותר בצד העליון של העלה (תמונה 1B). הענפים נושאי הפרחים זמינים בחודשי החורף (ינואר-פברואר), והתפרחות מסיימות ענפונים צדדיים (תמונה 1B). הענפים נושאי הפירות הבשלים (בתמונה 1C) זמינים החל מחודש מרץ ועד לסוף אפריל. מבחינה מורפולוגית, הענפים נושאי הפרחים והפירות מאופיינים במפרקים קצרים יותר ובעלים קטנים יותר (תמונות C, 1B), מאשר הענפים הוגטיביים (תמונה 1A). מבחינה אנטומית, נמצאו הבדלים בגודל התאים של ענפים וגטיביים בהשוואה לענפים נושאי פרחים ופירות, אך לא אובחנו הבדלים במבנה האנטומי הכללי של סוגי הענפים השונים. לפיכך, תאור המבנה האנטומי הכללי מובא לגבי ענפים וגטיביים בלבד.

ד.1.1. אנטומיה של הגבעולים

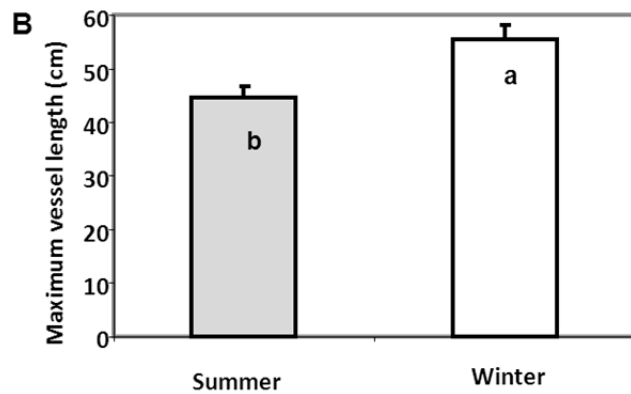
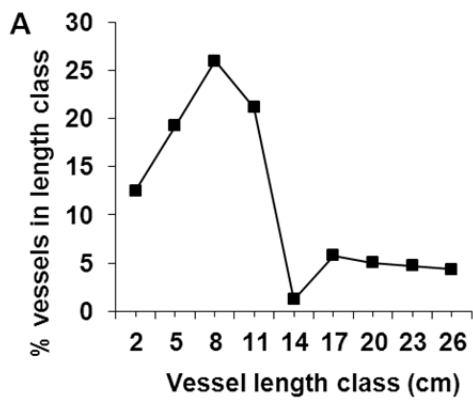
המבנה האנטומי של גבעולי דודונאה 'דנה', שנבחן בענפים וגטיביים, דומה למבנה של צמחים אחרים ממשפחת הסבונניים. בחתכי יד וחתכי מיקרוטום שבוצעו בגבעולים של דודונאה 'דנה' נמצא, שהגבעול הוא בעל נקבוביות מפוזרת, עם צינורות הובלה המקובצים בקבוצות של 1-4 צינורות (תמונה 2A). בדוגמאות של גבעולים שעברו מצרציה נמצא, שחוליות הרכיאה של דודונאה 'דנה' הן בעלות לוח מנוקב פשוט וגמצים מתורבצים (תמונות D, 2C). האורך הממוצע של טרכיאה בחורף היה 8 ס"מ (איור 1A). יחד עם זאת נמצא, שהאורך המקסימאלי של טרכיאה יכול להגיע ל- 45 ס"מ בקיץ ול- 55 ס"מ בחורף (איור 1B). גבעולי דודונאה 'דנה' מתאפיינים בסיבים מרובים, בעלי דופן עבה במיוחד (תמונה 3).



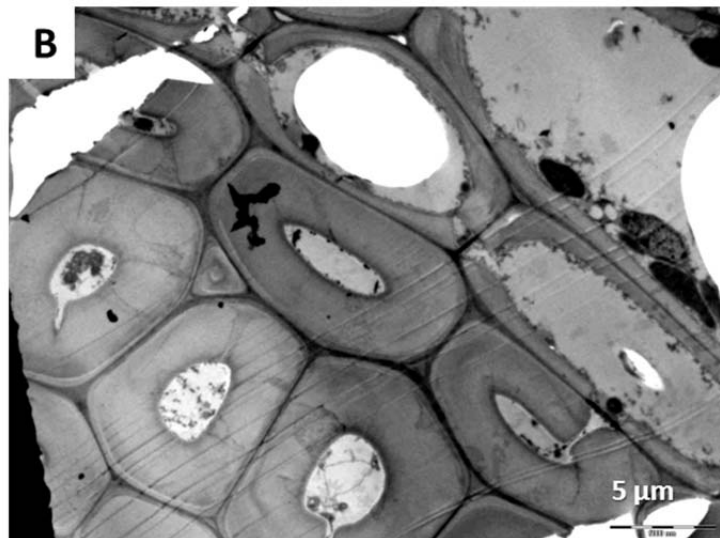
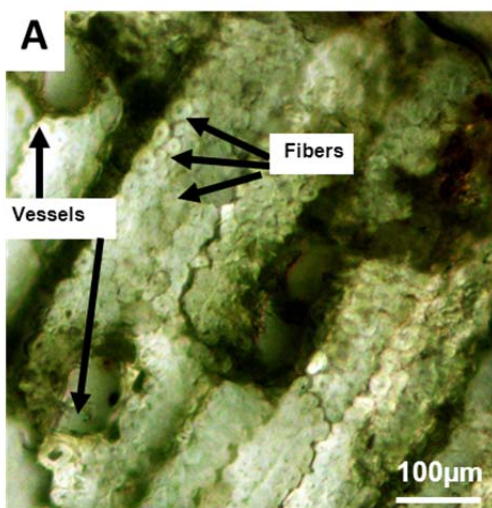
תמונה 1: מופע הענפים של דודוּנאה 'דנה': ענף וגטיבי (A); ענף נושא פרחים (B); ענף נושא פירות (C).



תמונה 2: מבנה הגבעול של ענף וגטיבי של דודוּנאה 'דנה': תמונות של מיקרוסקופ אור המראות חתך רוחב בגבעול (A), חתך אורך בגבעול (B) וגבעול לאחר מצרציה, בו נראית חוליית טרכיאה בעלת לוח פשוט (חיצים שחורים) וגמצים מתורבצים (חיצים אדומים) (C); תמונה של מיקרוסקופ אלקטרוני המראה את מבנה הגומץ (D).



איור 1: אורך צינורות ההובלה בענפים וגטיביים של דודנאה 'דנה' בעונות שונות. התפלגות האורכים של צינורות ההובלה בענפי חורף (A); אורכים מקסימאליים של צינורות הובלה בקיץ ובחורף, שנמדדו בענפים בקוטר של 0.45-0.60 ס"מ (B). כל עמודה באיור B מייצגת ממוצע של 20 מדידות \pm שגיאת תקן; אותיות שונות מציינות הבדלים מובהקים בין העונות ($P \leq 0.05$).

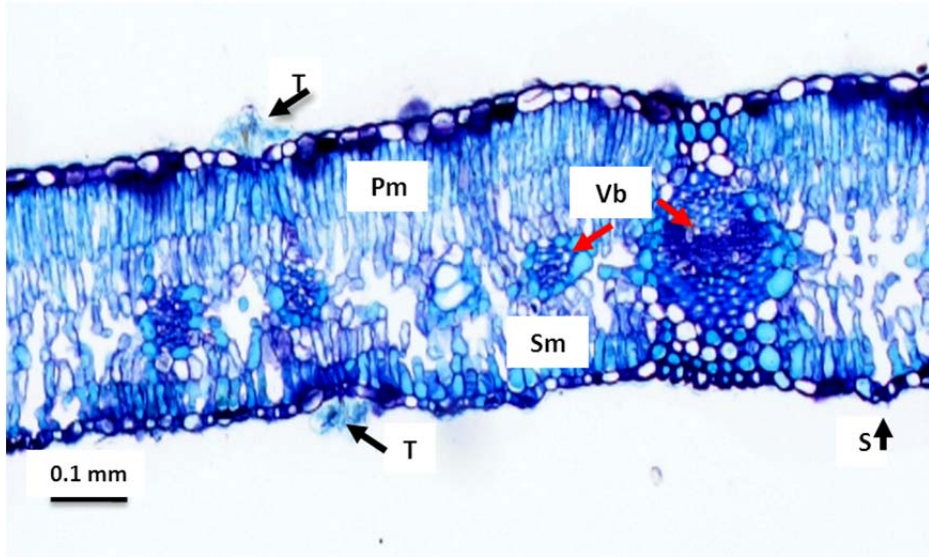


תמונה 3: מופע צפוף של סיבים בענף וגטיבי של דודנאה 'דנה', כפי שנצפה במיקרוסקופ אור בחתך רוחב של הגבעול (A); תמונה של מיקרוסקופ אלקטרוניים המראה חתך רוחב בתאי סיבים בעלי דופן עבה (B).

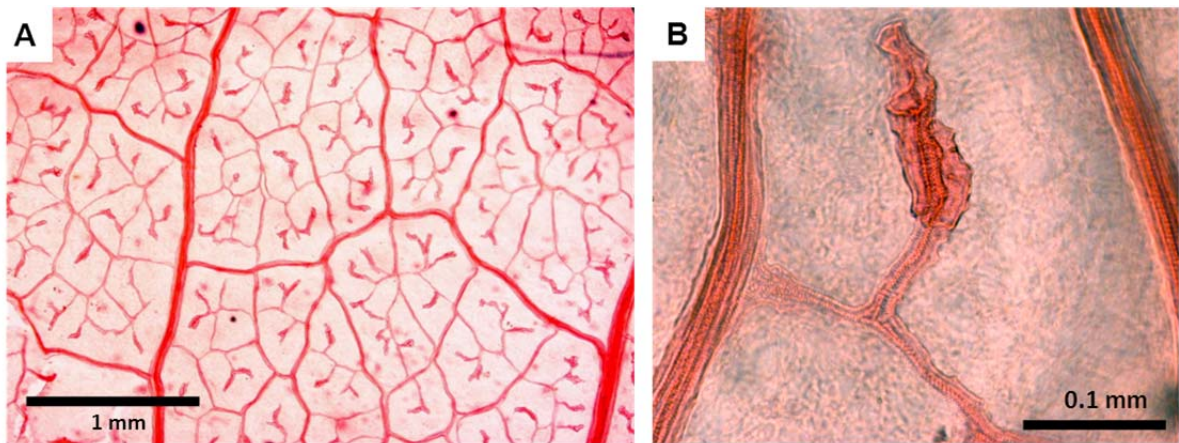
ד.1.2. אנטומיה של העלים

בבחינת מבנה העלים של דודונאה 'דנה' נמצא, שהעלים הינם קשיחים, מכוסים בשכבת שעווה עבה ובעלי טריכומות (שערות) בלוטיות משני צידי העלה (תמונה 4). בעלים מופיעות שתי שכבות של תאי עמודים עם סיבים מרובים מסביב לצרורות ההובלה, והפיוניות נמצאות רק בצד האבקסיאלי (תחתון) של העלים. משיקוף העלים וצביעתם בספרנין עולה, כי צינורות ההובלה בעלים מסתיימים במזופיל באלמנטים עם קצוות חופשיים (תמונה 5). צביעת העלים ב-Ruthenium red הצביעה על ריכוז של פקטין באפידרמיס של העלים (תמונה 6).

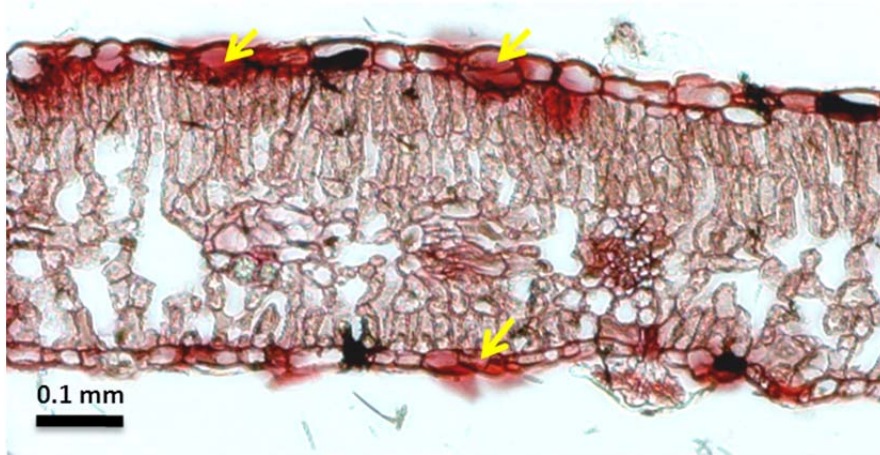
עלי דודונאה מאופיינים בטריכומות בלוטיות (תמונות 7A, D), שנראה בהן תוכן תוך-תאי לא מזוהה (תמונה 7B). מיקום הטריכומות במקרים רבים הינו סמוך לעורקי העלה (תמונה 7C). במינים מסויימים, טריכומות גורמות לאיבוד מים מהעלים (Fahn, 1986). לשם בחינת אפשרות זו בדודונאה 'דנה', גורדו האפידרמיס העליון והתחתון והעלים הוצפו על גבי תמיסת קלקופלואור (Calcofluor). קלקופלואור משמש למעקב אחר מעבר מים דרך התאים, מכיון שהוא אינו מועבר דרך האפופלסט. מהתוצאות המוצגות בתמונה 8 נראה בבירור, כי הטריכומות של דודונאה 'דנה' אינן גורמות לאיבוד מים מהעלה. על מנת לבחון את יכולת האפידרמיס להעביר מים, תמיסה מימית של קלקופלואור יושמה על גבי האפידרמיס של העלים. יישום הצבען היה בד"כ על הצד התחתון של העלה, פרט לניסוי אחד בו הצבען יושם על הצד העליון של העלה בלבד (תמונות 9G, F). לאחר יישום הצבען העלים נשטפו, וחתכי רוחב ידניים שלהם נצפו במיקרוסקופ באור UV (תמונה 9). הסתבר, שכל שטח האפידרמיס מסוגל להעביר מים, פרט לטריכומות, אשר אינן חדירות למים מבחוץ (תמונות 9A, B). האפידרמיס התחתון (תמונה 9I) היה חדיר יותר למים מאשר האפידרמיס העליון (תמונה 9G), שכן תמיסת קלקופלואור, שיושמה על הצד התחתון של העלים, הצליחה לחדור לצרורות ההובלה (תמונה 9C). כללית ניתן לומר, שהעלים של דודונאה 'דנה' הינם בעלי מאפיינים קסרומורפיים, הכוללים קוטיקולה עבה, טריכומות בלוטיות ופיוניות הממוקמות בצד התחתון של העלה.



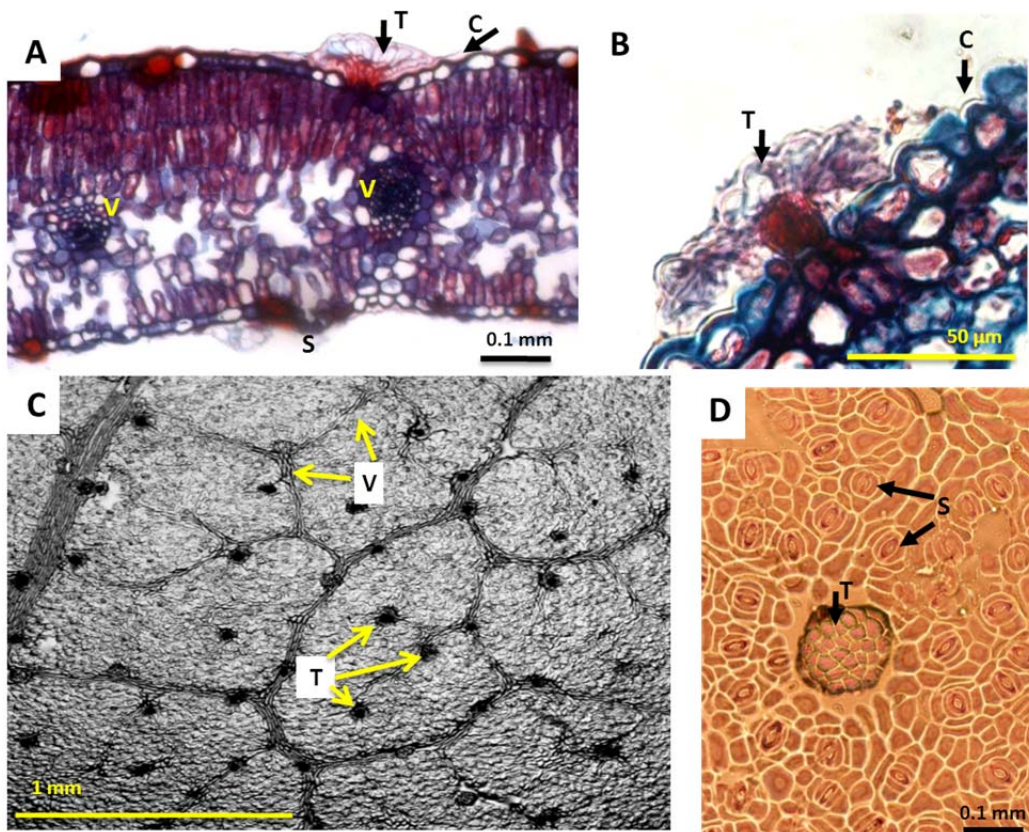
תמונה 4: מבנה העלה של דודונאה 'דנה'. תמונה של מיקרוסקופ אור המראה חתך רחב של העלה שנצבע ב-Toluidine blue O. T = שיערה (טריכומה); S = פיונית; Pm = מזופיל העמודים; Sm = מזופיל ספוגי; Vb = צרור הובלה.



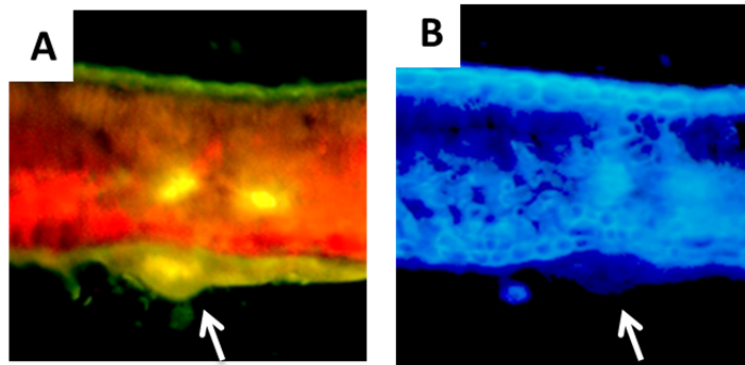
תמונה 5: עירוק העלים של דודונאה 'דנה'. תמונות של מיקרוסקופ אור המראות בשתי הגדלות עלים מובהרים צבועים ב-Safranin, שבהם נראים עורקים עם קצוות פתוחים למזופיל.



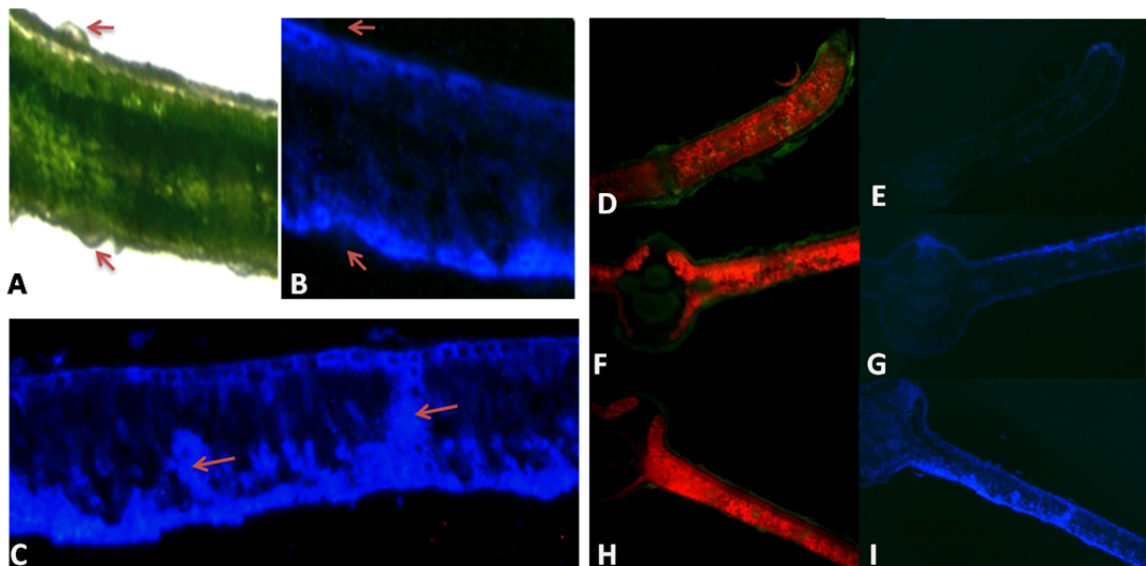
תמונה 6: תמונה של מיקרוסקופ אור המראה חתך רוחב של עלה של דודוואה 'דנה', שנצבע ב-Ruthenium red, בו נראים אזורים עשירים בפקטין (מסומנים בחיצים צהובים).
 -



תמונה 7: שערות (טריכומות) בעלים של דודוואה 'דנה': תמונות של מיקרוסקופ אור בהגדלות שונות, המראות חתך רוחב של עלה ומיקום השערות בו (A), טריכומה עם תוכן פנימי (B), הדפס של האפידרמיס של עלה עם טריכומות מרובות וצרורות הובלה (C) והדפס אפידרמיס עם שיערה בלוטית ופיוניות (D). T = שיערה (טריכומה); S = פיונית; C = קוטיקולה; V = צרור הובלה.



תמונה 8: בחינת יכולת איבוד מים דרך השערות (טריכומות) בעלים של דודג'נה 'דנה' באמצעות טיפול בתמיסת קלקופלואור (Calcofluor) וצילום חתכי רוחב של העלה במיקרוסקופ אור בפילטר ירוק כביקורת (A) או בבינוקולר באור UV (B). העלים הודגרו על גבי תמיסת קלקופלואור בריכוז של 0.01% למשך 48 שעות, ולאחר מכן הוכנו מהם חתכי רוחב ידניים לצפייה במיקרוסקופ אור ובבינוקולר. החיצים מצביעים על מיקום הטריכומות.



תמונה 9: מעקב אחר מהלך קליטת מים ע"י עלים באמצעות תמיסת קלקופלואור (Calcofluor) בריכוז של 0.1%, שיושמה בעזרת מכחול ע"ג הצד התחתון של העלה (פרט לתמונות F, G). תמונה של חתך רוחב ידני של העלה במיקרוסקופ אור, בה החיצים מצביעים על מיקום הטריכומות (A); מופע חתכי רוחב של העלה שנצפו בבינוקולר באור UV, שבהם הפלואורסצנציה הכחולה מצביעה על קלקופלואור הקשור לדפנות או על אוטופלואורסצנציה של ליגנין (B, C, E, G, I); חתכי רוחב של עלה שצולמו באמצעות פילטר של GFP (D, F, H), בהם נראה הכלורופיל כפלואורסצנציה אדומה; תמיסת הקלקופלואור שיושמה על הצד התחתון של עלה, אך לא חדרה דרך הטריכומות (המסומנות בחיצים) (B); תמיסת הקלקופלואור שיושמה על הצד התחתון של עלה, והגיעה עד לצרוורות ההובלה (המסומנים בחיצים) (C); חתכי רוחב של עלה שטופלו במים מזוקקים (ביקורת), בהם נראית רק האוטופלואורסצנציה של ליגנין (D, E); חתכי רוחב של עלה, שתמיסת הקלקופלואור יושמה על הצד העליון (F, G) או על הצד התחתון (H, I) של העלה.

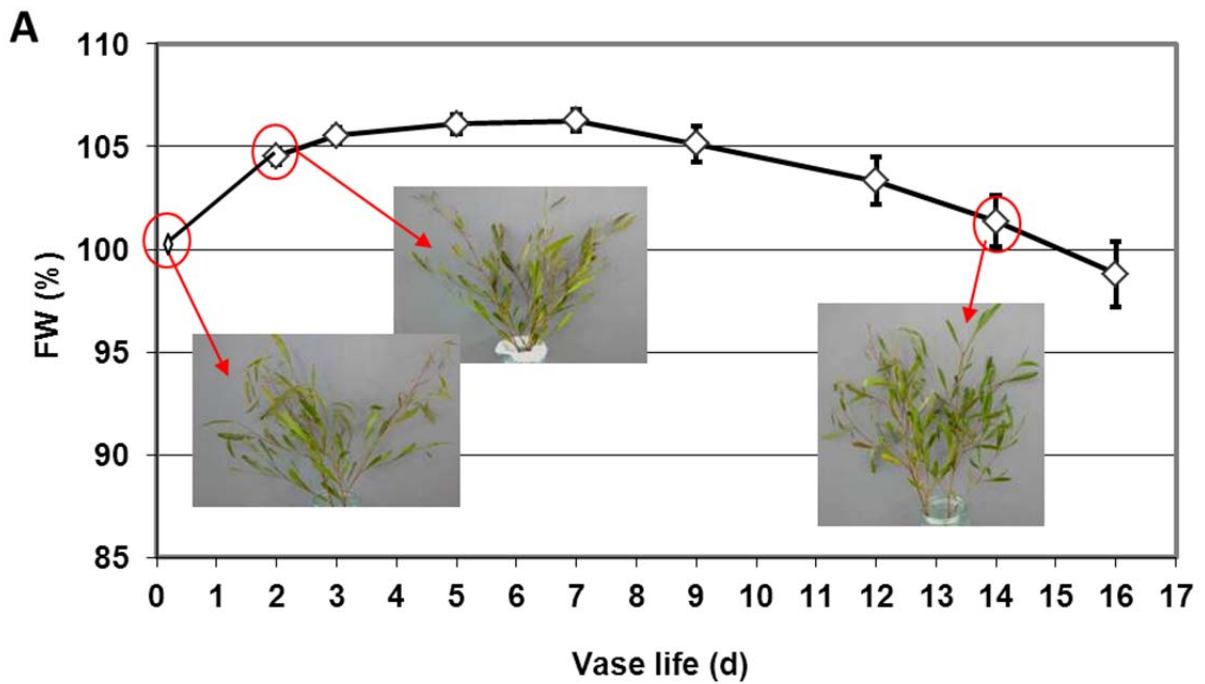
ד.2. אפיון פיסיולוגי של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה' בהקשר למאזן המים באגרטל

ד.1.2. מאזן המים של הענפים במהלך חיי האגרטל

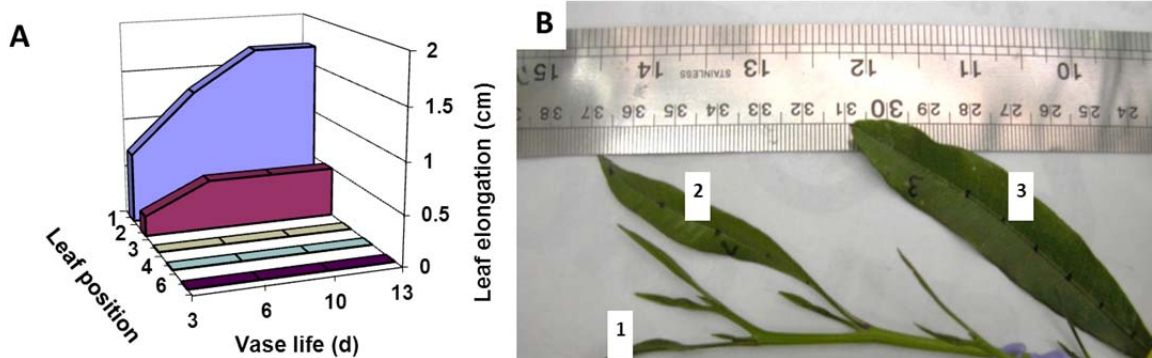
בכדי ללמוד את הסיבות לכמישה של הענפים הקטופים באגרטל, היה צורך ראשית לעקוב אחר מהלך חיי האגרטל של ענפי דודונאה 'דנה'. למטרה זו נעשה שימוש בענפים וגטטיביים. כפי שצוין לעיל, בדודונאה 'דנה' ישנם ענפים וגטטיביים וענפים רפרודוקטיביים. מאחר שענפים וגטטיביים זמינים כל השנה, הניסויים הראשונים ללימוד מאזן המים של ענפי קטיף נעשו בענפים אלו. בהמשך בחנו גם ענפים רפרודוקטיביים בכדי ללמוד את הסיבות להבדלים בקצב הכמישה שלהם.

הענפים הועברו ביום הקטיף לאגרטל עם תמיסת TOG-6 (כלורין אורגני, המעכב התפתחות חיידקים באגרטל), ומשקלם הטרי (FW) נמדד. המשקל הטרי ביום הקטיף נקבע כ- 100%. משקל הענפים נמדד שוב במועדים שונים במהלך חיי האגרטל, ושינויי המשקל בכל מועד מדידה בוטאו כאחוז מהמשקל ההתחלתי של הענפים ביום הקטיף. יש לציין, שהמדד הכמותי של שינויים במשקל הטרי של הענפים במהלך חיי האגרטל, נמצא כמיצג היטב את חיי האגרטל של הענפים הקטופים. במהלך המחקר נבחנו גם מדדים נוספים של יחסי המים של ענפים קטופים, ובהם תכולת מים יחסית ופוטנציאל מים. גם מדדים אלה נמצאו במתאם למשך חיי האגרטל של הענפים הקטופים. לכן המדד של שינויי המשקל נבחר כמדד המייצג לביטוי מאזן המים במהלך חיי האגרטל של ענפי הקטיף.

במשקל הענפים התקבלה עלייה בולטת ביותר ביממה הראשונה באגרטל (איור 2). בהמשך חיי האגרטל הענפים המשיכו לעלות במשקל בצורה מתונה ושמרו על משקלם הגבוה יחסית עד ליום 9, ולאחר מכן הם החלו לאבד ממשקלם באופן הדרגתי עד לכמישה ביום 14 (איור 2). באיור זה מתוארים ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' שנקטפו בקיץ, ושהראו מהלך טיפוסי של חיי אגרטל ממושכים יחסית. בענפים קטופים במהלך חיי אגרטל נוצר לעתים מצב של עקה, אשר בעקבותיו נפסקת גדילת העלים, מאחר שעלים צעירים מהווים מבלע חזק, הן למים והן לסוכרים. לכן נבדקה גדילת עלים מגילאים שונים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. נמצא, כי העלים הצעירים ביותר (עלה מספר 1 באיור 3B) ממשיכים לגדול במשך 10 ימים של חיי אגרטל, בעוד שעלים בוגרים יותר (עלה מספר 2 באיור 3B) גדלים במשך 6 ימים עד שהם מגיעים לגודלם הסופי (איור 3A).



איור 2: שינוי במשקל של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל התוצאות מייצגות ממוצעים של ± 10 חזרות שגיאת תקן.



איור 3: התארכות עלים בני גילאים שונים בענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל (A) בהתאם למיקומם בענף (B). 1 = עלה צעיר; 3 = עלה בוגר.

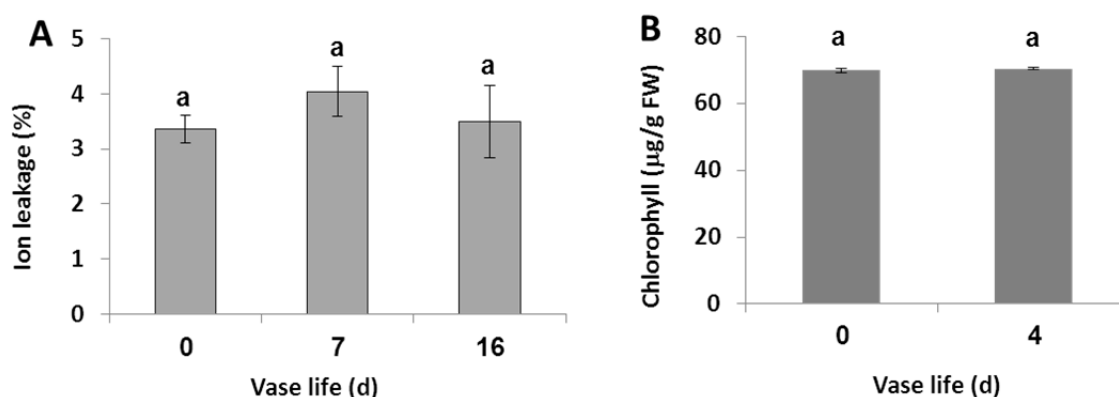
ד.2.2. בירור הסיבות לכמישת ענפי קטיף של דודונאה 'דנה'

ענפי קטיף של דודונאה מתחילים לאבד מים ולרדת במשקלם לאחר כשבוע באגרטל, גם אם הם בעלי משך חיי אגרטל ארוך יחסית (איור 2). תופעה זו יכולה לנבוע מהזדקנות מואצת של העלים לאחר הקטיף, או לחילופין, מהפרעה בהובלת המים של הענף הקטוף. על מנת לבחון את שתי האפשרויות האלה, נערך מעקב אחר שני מדדים, אשר שינוי שלהם במהלך חיי אגרטל עשוי להצביע על תהליך של הזדקנות מואצת, וכן נבחנה כמישת הענפים בתנאים של מאזן מים מיטבי. הסתבר כי שני מדדי ההזדקנות שנבחנו, דליפת יונים מהממברנות (איור 4A) ופירוק כלורופיל בעלים (איור 4B), לא השתנו בצורה מובהקת במהלך

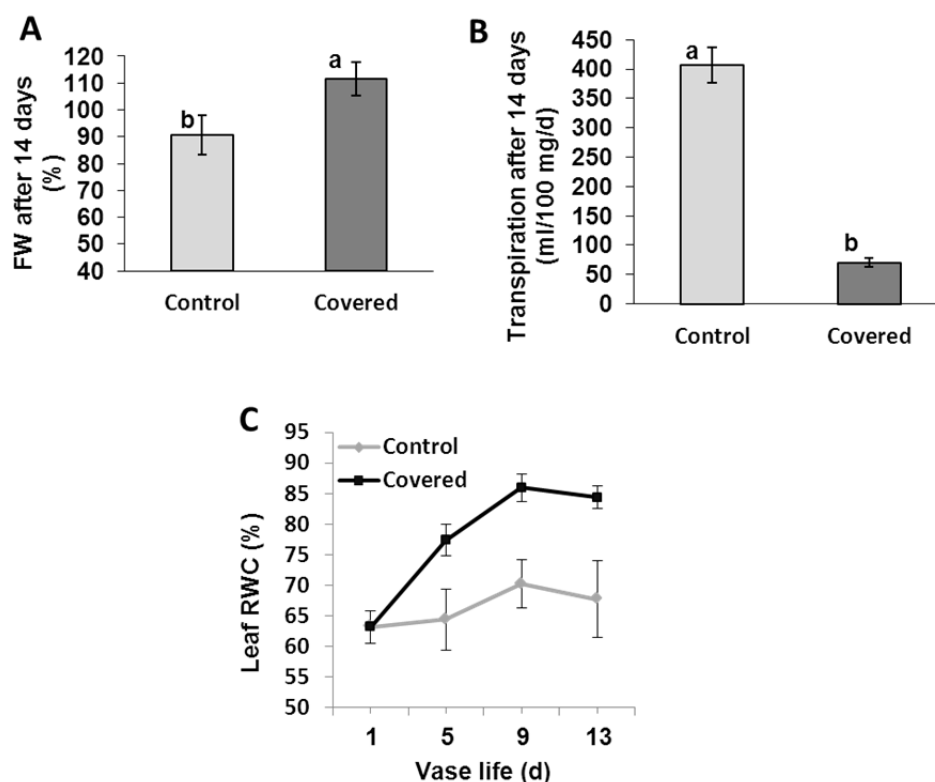
חיי האגרטל. ממצאים אלו שללו את האפשרות, שמקור הכמישה הוא בהזדקנות מואצת של העלים. כדי לבחון את האפשרות השנייה, בוצע ניסוי בו נמנע נידוף מים מענפי הקטיף (איור 5). בתנאים אלו מאזן המים של הענפים הוא מיטבי, ולכן כמישה בתנאים אלו תצביע על בעיית הזדקנות מואצת של הענפים. הניסוי בוצע ע"י הצבת ענפים קטופים של דודונאה 'דנה' באגרטלים בחדר תצפית מבוקר וכיסויים בשקיות פוליאיתילן שקופות, שלתוכן הוכנס תכשיר סופח אתילן (סכמה 1 בפרק השיטות). ענפי הביקורת הוצבו במקביל באגרטלים ללא כיסוי, שפתחם נאטם בנייר כסף על מנת למנוע איבוד מים. תוצאות הניסוי הראו, שהמופע הכללי של הענפים שכוסו בשקיות פוליאיתילן היה טורגידי ורענן, ללא עלים כמושים בהשוואה לענפי הביקורת. כיסוי הענפים שיפר את מצבם באופן מובהק, שכן משקלם גדל בכ- 10% במהלך שבועיים באגרטל בהשוואה לירידה של כ- 10% במשקל של ענפי הביקורת בתקופה זו (איור 5A), בשל ירידה משמעותית בטרנספירציה (איור 5B). במקביל, גם תכולת המים היחסית (RWC) בעלים של הענפים המכוסים הייתה גבוהה באופן מובהק מזו של העלים בענפי הביקורת (איור 5C).

כדי לאשר את הממצאים האלה, בוצע ניסוי נוסף עם ענפים קצרים של דודונאה שהודגרו במבחנות ללא מים עם כיסוי בשקית פוליאיתילן שקופה כדי ליצור אווירה לחה. התוצאות המוצגות באיור 6A מראות, שענפים מכוסים אשר הודגרו ללא מים שמרו על משקל יציב במשך 7 ימים באגרטל. לעומת זאת, הענפים שהודגרו במבחנות ללא מים וללא כיסוי איבדו כ- 35% ממשקלם לאחר 7 ימים באגרטל, בעוד שהענפים שהיו בכלי עם תמיסה (ביקורת) עלו במשקלם בכ- 5%. מבחינת המופע לא היה הבדל בין הענפים שכוסו בשקית והודגרו במבחנה ללא מים לבין ענפי הביקורת (איור 6B). היה מתאם בין שיעור איבוד המשקל לבין המופע של הענפים בטיפולים השונים, כאשר הענפים שהודגרו ללא מים וללא כיסוי בשקית כמשו לחלוטין, בעוד שהענפים משני הטיפולים האחרים נראו רעננים וטורגידיים לאחר 7 ימים באגרטל (איור 6B).

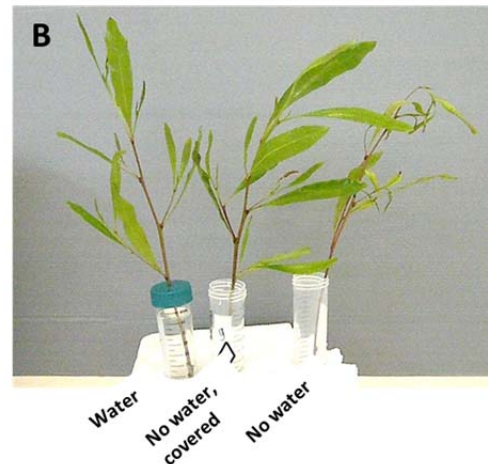
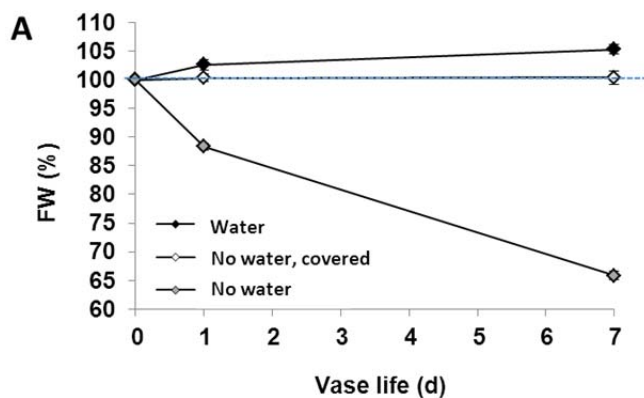
מסדרת ניסויים זו ניתן להסיק, כי כמישת ענפי דודונאה נובעת מבעיה במאזן המים, ואיננה תוצאה של הזדקנות מואצת.



איור 4: דליפת יונים (A) וריכוז כלורופיל (B) בעלים של ענפי קטיף וגטטיביים של דודוּנאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (3 ענפים בכל חזרה) ± שגיאת תקן. אותיות זהות מייצגות הבדלים לא מובהקים ברמה של $P = 0.05$.



איור 5: השפעת הדרגת ענפי קטיף וגטטיביים של דודוּנאה 'דנה' באווירה לחה על השינוי במשקל האגד (A) וקצב הטרנספירציה (B) לאחר 14 יום באגרטל, ועל תכולת המים היחסית (RWC) בעלים במהלך חיי האגרטל (C). הענפים הודגרו עם כלורין אורגני בחדר תצפית סטנדרטי. הענפים המטופלים כוסו בשקיות פוליאאתילן שקופות ליצירת אוירה לחה, וענפי הביקורת הודגרו ללא כיסוי. התוצאות מייצגות ממוצעים של 6 חזרות (3 ענפים בכל חזרה) ± שגיאות תקן. אותיות שונות מעל לעמודות באיורים A ו-B מייצגות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$).



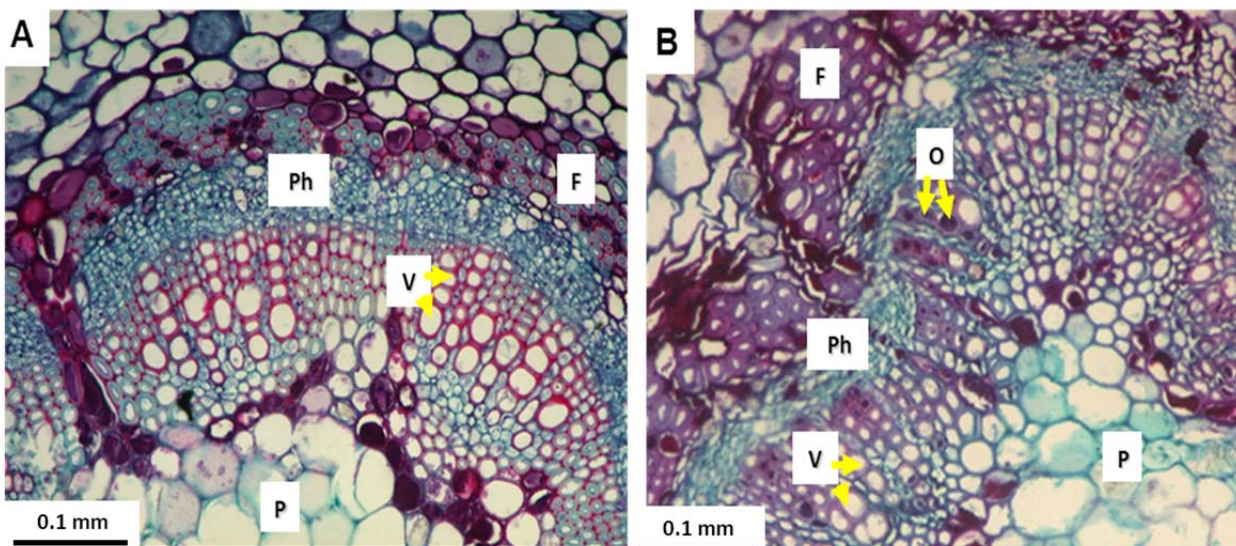
איור 6: השפעת הדגרה של ענפי קטיף וגטיביים של דודנאה 'דנה' בתנאים שונים על משקל ענפים שהוחזקו ללא תמיסה (A), ועל המופע שלהם ביום 7 (B). ענפי דודנאה 'דנה' הודגרו במבחנות עם כלורין אורגני (ביקורת) ללא כיסוי, במבחנות ללא מים שכוסו בשקיות פוליאתילן שקופות ליצירת אווירה של 100% לחות יחסית או במבחנות ללא מים וללא כיסוי. התוצאות מייצגות ממוצעים של 9 ענפים לטיפול \pm שגיאת תקן. הקו האופקי המרוסק מציין את המשקל ההתחלתי (100%) של הענפים.

ד.3.2. איתור סתימות בגבעול ובפטורות העלים

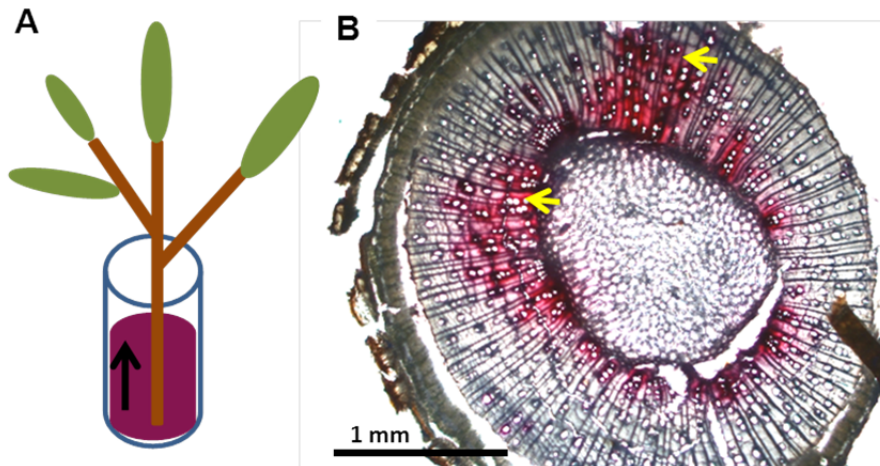
במטרה למצוא את הסיבות לירידה בקצב קליטת המים ולכמישת העלים בענפי דודנאה, בוצעו חתכים בחלקים שונים של הגבעול והעלים כדי לאתר סתימות אפשריות (טילות, פולימרים שונים). לא נמצאו סתימות נראות במיקרוסקופ אור באיברים אלו. יחד עם זאת, בחתכים שנעשו בפטורות העלים, אמנם לא נמצאו סתימות בצינורות ההובלה לאחר יום באגרטל (תמונה 10A), אך לאחר 14 ימים באגרטל נמצאו סתימות בודדות (תמונה 10B). מספר הסתימות היה מועט מאוד, והן נצפו בפחות מ-5% מצינורות ההובלה. הסתימות בפטורות אובחנו בענפים וגטיביים שנקטפו בקיץ, אך לא בענפים וגטיביים שנקטפו בחורף. יש לציין, שהטענת ענפי קטיף בצבען פוקסין (תמונה 11A), הצובע רק צינורות ההובלה מלאים במים, הראתה, כי חלק מצינורות ההובלה בגבעולים לא העבירו מים (תמונה 11B). לכן סביר להניח, שצינורות ההובלה עברו אמבוליה ונסתמו ע"י בועות אוויר. הנחה זו חוזקה ע"י הממצא, שחיתוך מחדש של הענפים באוויר במהלך חיי אגרטל הגביר את הכמישה (תמונה 12B), כנראה עקב כניסה נוספת של בועות אוויר לצינורות ההובלה והיווצרות אמבוליה.

כדי לבחון את המעורבות של אמבוליה בכמישת הענפים, בוצע מעקב ישיר אחר הדינמיקה של היווצרות בועות אוויר בצינורות ההובלה בענף הקטוף בשני מרחקים מקודקוד הצמיחה בשני מועדים במהלך השנה. המקטע העליון (30 ס"מ מהקודקוד) היה ממוקם מחוץ לתמיסת האגרטל, ואילו המקטע התחתון (40 ס"מ מהקודקוד) היה טבול בתמיסה. התוצאות המוצגות באיור 7A מראות, שבענפי קיץ הייתה עליה במדד האמבוליה של מקטע הגבעול העליון במהלך חיי האגרטל, בעוד שמדד האמבוליה של מקטע הגבעול התחתון כמעט ולא השתנה בצורה משמעותית. כך, לאחר יום באגרטל מדד האמבוליה של מקטע הגבעול העליון (במרחק 30 ס"מ מהקודקוד) היה 0.9, ולאחר 17 יום באגרטל הוא עלה לערך של 1.9. לעומת זאת, ענפי חורף התאפיינו באמבוליה גבוהה (מדד 2) כבר החל מהיום הראשון באגרטל בשני מקטעי הגבעול

(איור 7B). ואכן, בחתך של גבעול זה נראה בבירור שהליבה מלאה לחלוטין בבועות אוויר המקנים לה צבע כחול כהה (איור 7D). היווצרות האמבוליה במהלך חיי האגרטל לוותה בהרעה במאזן המים, שנמדד במקביל בענפים, כתוצאה מהיווצרות בועות אוויר: בענפי קיץ, קצב העלייה במשקל (איור 8A), קצב הטרנספירציה (איור 8B). והיחס בין קצב קליטת המים לקצב הטרנספירציה (איור 8C) ירדו בצורה מתונה במשך השבועיים באגרטל. יש לצין, שענפי קיץ שמרו על משקלם במשך שבועיים באגרטל, והראו ירידה קלה במשקל רק ביום 17, אולם המשקל היה גבוה מ-100% גם במועד זה (איור 8A). לעומת זאת, בענפי חורף נצפתה ירידה רציפה ומובהקת במאזן המים של הענפים, שהתבטאה בירידה במשקל הענפים ביותר מ-10% מהמשקל ההתחלתי (איור 8D), ולוותה בירידה משמעותית וחדה בקצב הטרנספירציה (איור 8E) וביחס בין קצב קליטת המים לקצב הטרנספירציה (איור 8F).



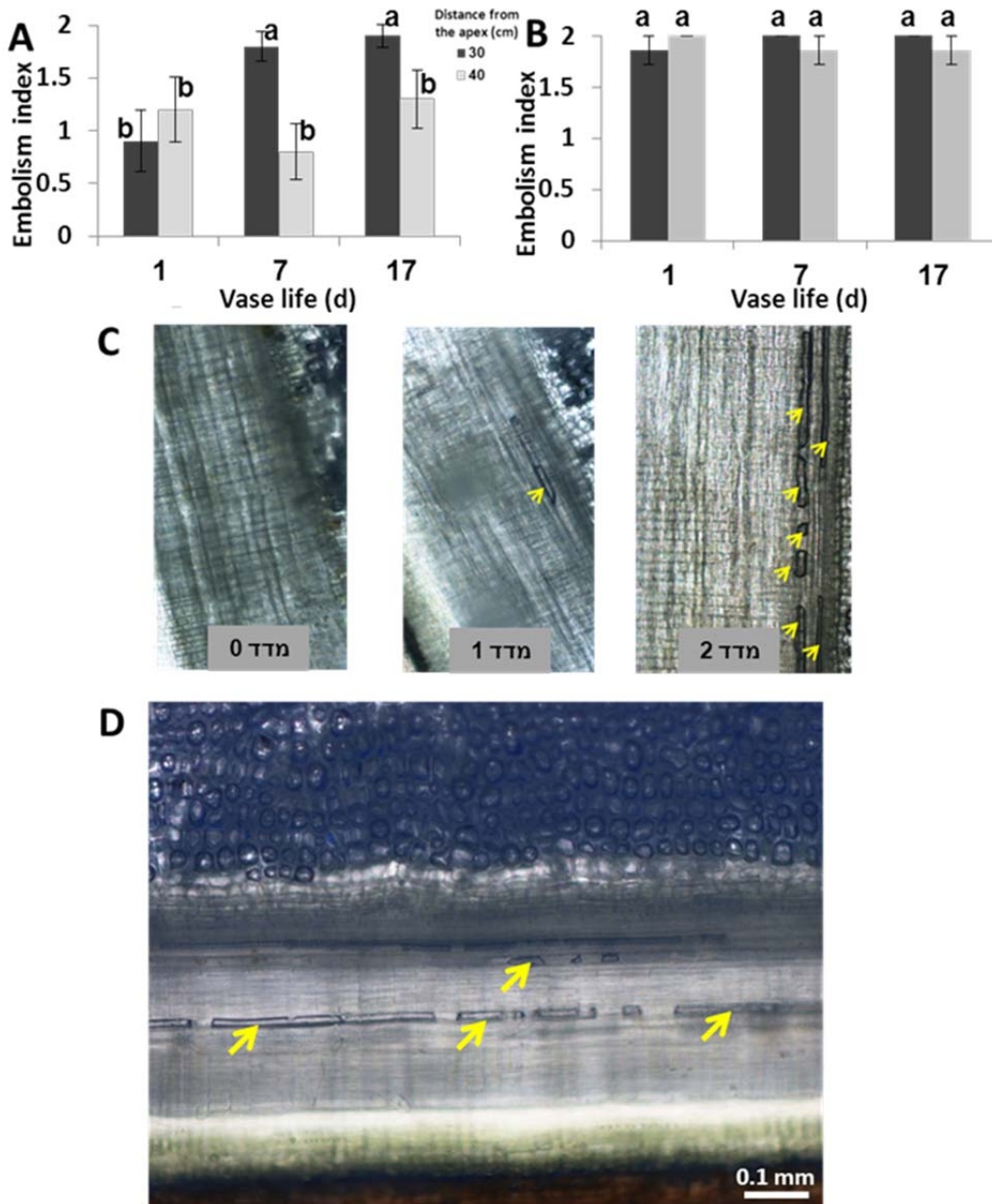
תמונה 10: הופעת סתימות בצינורות ההובלה בפטוטרות עלים של דודונאה 'דנה', כפי שנצפו בתמונות של מיקרוסקופ אור המראות חתכי רוחב של פטוטרות עלים ביום הקטיף (A) ולאחר 14 יום באגרטל (B). החיצים בצהוב מצביעים על מיקום הסתימות. החתכים בוצעו בעזרת מיקרוטום סיבובי ונצבעו ב-Safranin/Fast green. הענפים נקטפו בקיץ. O = סתימה; F = סיבים; V = צינורות הובלה; P = ליבה; Ph = שיפה.



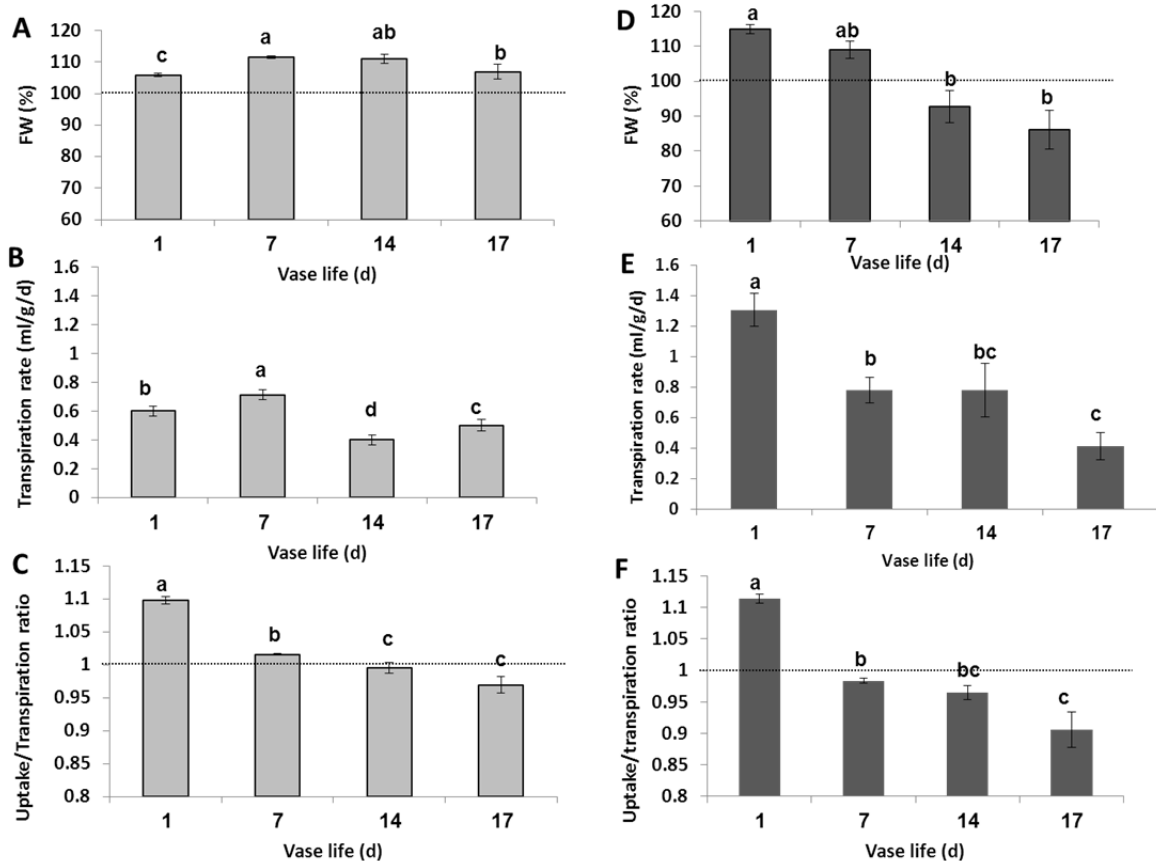
תמונה 11: הטענת ענף וגטיבי של דודנאה 'דנה' בצבען פוקסין (A) ומופע הצבע בצינורות הובלה, כפי שנראה בחתך רוחב של הגבעול (B). ענפים באורך של 30 ס"מ הודגרו בתמיסת פוקסין בסיסי 0.5% למשך 3 שעות. החתכים נעשו בגובה של 10 ס"מ מהקצה התחתון של הענף ונצפו במיקרוסקופ אור. החיצים הצהובים ב-(B) מסמנים צינורות הובלה צבועים המלאים במים.



תמונה 12: מופע ענפי קטיף וגטיביים של דודנאה 'דנה' לפני (A) ואחרי (B) חיתוך מחדש של הענפים באוויר לאחר 7 ימים באגרטל.



איור 7: רמת האמבוליה במהלך חיי האגרטל של ענפי קטיף וגטיביים של דודוואה 'דנה', שנקטפו בקיץ (A) ובחורף (B), מופע החתכים של הגבעול עם מדדי אמבוליה שונים (0-2) (C) ומופע של חתך של גבעול כולל הליבה (D). מדד האמבוליה נקבע לפי מספר בועות האוויר שהופיעו בחתך בסולם מ-0, כאשר 0 = חתך ללא בועות; 1 = חתך עם מספר מועט (1-4) של בועות; 2 = חתך עם מספר רב (5 ומעלה) של בועות. החתכים נעשו בשני מרחקים שונים מהקודקוד, 30 ו-40 ס"מ, כאשר המקטע הרחוק מקודקוד הענף היה טבול כולו בתמיסת האגרטל. אורך הענף כולו היה כ-80 ס"מ. התוצאות באיורים A ו-B מייצגות ממוצעים של 10 חזרות \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מייצגות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$). באיור D, הליבה מלאה לחלוטין בבועות אוויר, ולכן צבעה כחול כהה; החיצים הצהובים מצביעים על מיקום בועות האוויר בעצה.



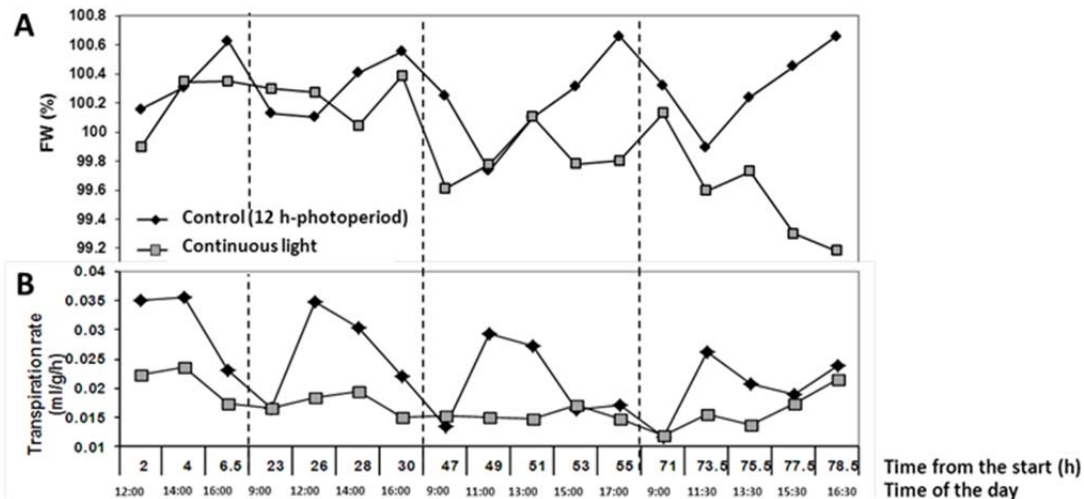
איור 8: שינויים במדדים ההידראוליים במהלך חיי האגרטל של ענפים וגטיביים של דודנאה 'דנה' שנקטפו בקיץ (A-C) ובחורף (D-F): משקל הענפים (A,C), קצב הטרנספירציה (B,E) והיחס שבין קצב קליטת המים לטרנספירציה (C,F). התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (3 ענפים לחזרה) ± שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מייצגות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$). הקו האופקי מציינ את המשקל ההתחלתי (100%) (איורים A, D או יחס של 1 בין קצב קליטת מים לטרנספירציה (איורים C, F)).

4.2.ד. תנודות יומיות בקליטת המים ע"י הענפים

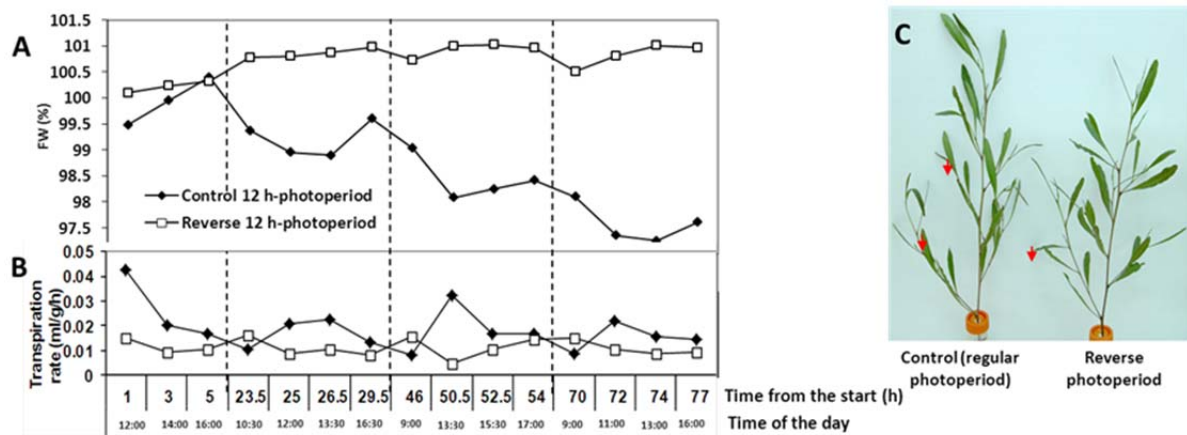
נבדקה האפשרות שישנן תנודות יומיות בקצב קליטת המים של ענפי קטיף. כדי לבחון אפשרות זו הועמדו ענפים וגטיביים קצרים (30 ס"מ) של דודנאה במבחנות עם תמיסת כלורין אורגני, ונמדדו בהם שינוי המשקל וקצב הטרנספירציה במהלך היום בחדר תצפית, במשטר הארה רגיל של 12/12 שעות אור/חושך בהשוואה למשטר של הארה רציפה באותם התנאים. נמצא, כי במשטר ההארה של 12/12 שעות קיימות תנודות קבועות בקצב קליטת המים, אשר התבטאו בתנודות במשקל הענפים (איור 9A) ובשינויים בקצב הטרנספירציה (איור 9B), כאשר שיא קליטת המים היה בסביבות השעה 16:00, והמינימום היה בסביבות השעה 9:00. התנודות נשמרו בצורה מדויקת לאורך שלושת ימי המדידה. יחד עם זאת, כאשר הענפים נחשפו להארה רציפה, התנודות איבדו את דפוסן המחזורי. מכאן, שהתנודות האופייניות בקליטת המים אינן צירקדיות. כאשר ענפי דודנאה הודגרו בתנאים של משטר הארה הפוך (12/12 שעות חושך/אור), תזמון התנודות היומיות בקליטת המים ובקצב הטרנספירציה היה הפוך (איור 10). שיא קליטת המים היה

בשעה 9:00, ואילו המינימום היה בשעה 16:00. באופן מפתיע, בעוד שענפים ששהו במשטר ההארה הרגילה (12/12 שעות אור/חושך) איבדו ממשקלם באופן הדרגתי, הענפים שנחשפו למשטר ההארה ההפוך שמרו על משקלם (איור 10A) ועל קצב טרנספירציה די קבוע ונמוך יחסית (איור 10B) במשך שלושת ימי הניסוי. בענפים אלה לא אובחנה תנודתיות במשקל וקצב הטרנספירציה שלהם דמה לזה של הארה רציפה. מופע הענפים משני משטרי ההארה בסוף הניסוי תאם את השינויים במשקל ובקצב הטרנספירציה (איור 10C).

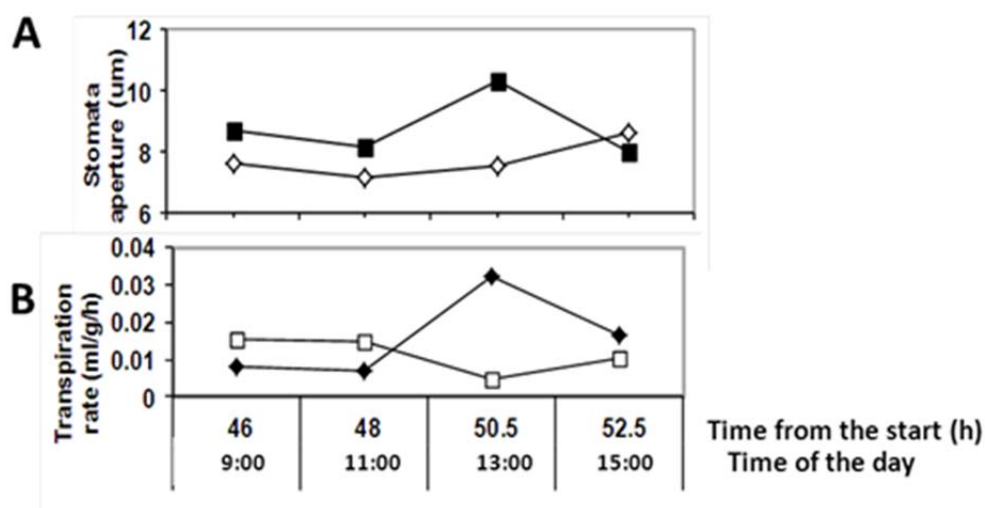
במקביל למדידות של המשקל וקצב הטרנספירציה, נמדדו גם ההשפעות של משטרי ההארה, רגיל והפוך, על התנודות היומיות בקוטר מפתח הפיוניות (איור 11). התוצאות מראות, כי השינויים בקוטר מפתח הפיוניות בשני משטרי ההארה (איור 11A) תאמו את השינויים בקצב הטרנספירציה היומי (איור 11B) של טיפולים אלו, כאשר העלייה במפתח הפיוניות הקבילה לעליה בקצב הטרנספירציה. התוצאות מראות, שמשטר ההארה הנו הגורם האחראי על התנודות היומיות בקליטת המים של ענפי קטיף של דודונאה קטופים.



איור 9: השפעת משטר של הארה רגילה (12 שעות אור/חושך) בהשוואה למשטר של הארה רציפה על שינוי המשקל (A) וקצב הטרנספירציה (B) של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך היממה. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 ענפים. הקווים המקווקים מציינים מעבר בין הימים.



איור 10: השפעת משטר של הארה רגילה (12 שעות אור/חושך) בהשוואה למשטר של הארה הפוכה (12 שעות חושך/אור) על שינוי המשקל (A) וקצב הטרנספירציה (B) של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך היממה ועל מופע הענפים בסוף הניסוי (C). התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 ענפים. הקווים המקווקים מציינים מעבר בין הימים.



איור 11: השפעת משטר של הארה רגילה (12 שעות אור/חושך) בהשוואה למשטר של הארה הפוכה (12 שעות חושך/אור) על התנודות היומיות בקוטר מפתח הפיוניות (A) ובקצב הטרנספירציה (B) של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה'. ■ משטר של הארה רגילה; □ משטר של הארה הפוכה. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 ענפים.

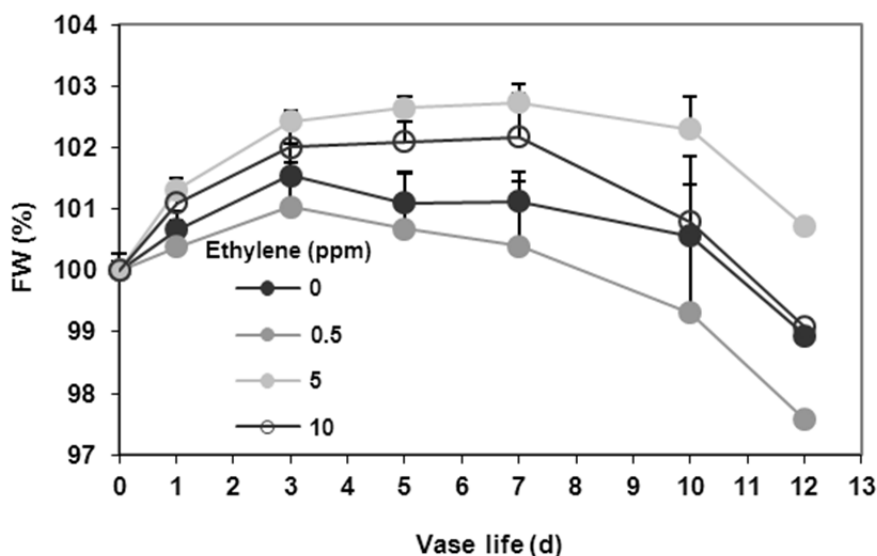
ד.5.2. השפעות אתילן על מאזן המים של ענפי הקטיף

אתילן הינו ההורמון החשוב ביותר לגבי משך חיי האגרטל של ענפי קטיף. כדי לבחון האם אתילן מעורב במאזן המים של ענפי דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל, נחשפו הענפים להורמון ולמעכב הפעילות שלו, 1-MCP.

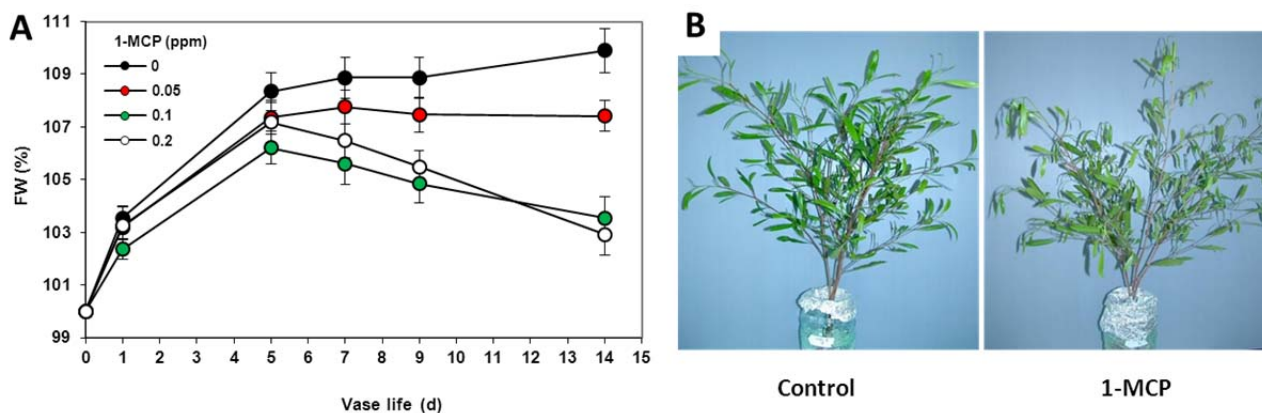
חשיפת ענפים וגטטיביים של דודונאה 'דנה' למשך 24 שעות לאתילן חיצוני בריכוזים של 5-10 ח"מ העלתה את משקלם במהלך חיי האגרטל, כאשר התלות בריכוז ההורמון הייתה חיובית (איור 12). משקל הענפים שנחשפו לריכוזים אלו של אתילן היה גבוה ב- 2-3% ממשקל ענפי הביקורת במהלך 13 ימים באגרטל, בעוד שמשקל הענפים שנחשפו ל- 0.5 ח"מ אתילן לא היה שונה משמעותית מזה של ענפי הביקורת. במקביל, חשיפת הענפים למשך 4 שעות למעכב פעילות של אתילן, 1-MCP, גרמה לירידה במשקל הענפים במהלך חיי האגרטל כתלות בריכוז המעכב (איור 13A). ענפים שנחשפו ל- 1-MCP בריכוזים של 0.1 ו- 0.2 ח"מ איבדו כ- 4% ממשקלם לאחר 14 יום באגרטל בהשוואה לענפי הביקורת, בעוד שענפים שנחשפו לריכוז הנמוך של המעכב (0.05 ח"מ) שמרו על משקל גבוה וקבוע בדומה לענפי הביקורת (איור 13A). כתוצאה מכך, הענפים שנחשפו ל- 1-MCP בריכוזים של 0.1 או 0.2 ח"מ כמשו לאחר 16 יום באגרטל בהשוואה לענפי הביקורת שנותרו במופע רענן (איור 13B). תוצאות אלה מראות כי אתילן משפר את מאזן המים של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה'.

בניסוי נוסף נבחנו ההשפעות של אתילן חיצוני ומעכב הפעילות שלו 1-MCP על קצב ייצור אתילן וקצב הנשימה בענפים וגטטיביים. התוצאות המוצגות באיור 14A מראות, ש- 1-MCP הגביר את קצב ייצור אתילן באופן מובהק במשך 4 ימים באגרטל, בעוד שלטיפול באתילן לא הייתה השפעה מובהקת על קצב ייצור אתילן בענפים. לעומת זאת, אתילן הקטין את קצב הנשימה באופן מובהק במשך שבוע באגרטל, בעוד של- 1-MCP לא הייתה כל השפעה מובהקת על קצב הנשימה (איור 14B).

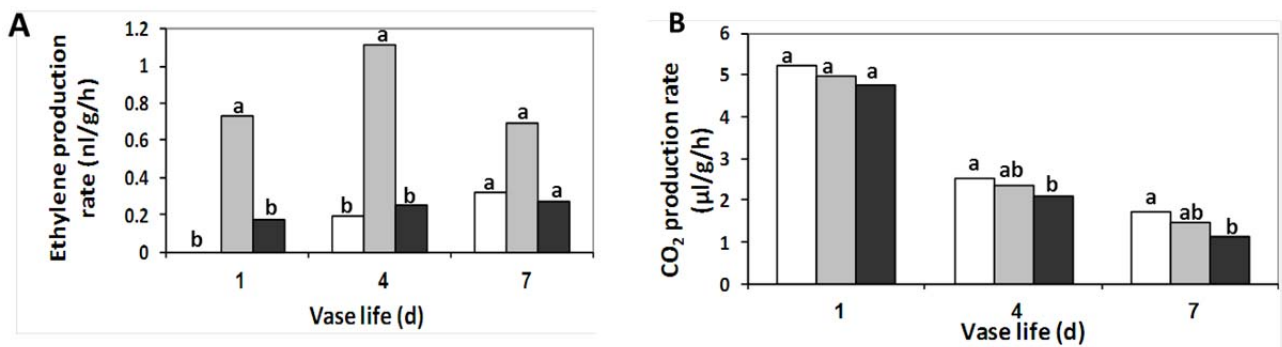
בהמשך נבדק קצב ייצור אתילן בענפי קטיף של דודונאה בשלבי התפתחות שונים. התוצאות המסוכמות באיור 15 מראות, שקצב ייצור אתילן בענפים וגטטיביים ובענפים נושאי פירות היה נמוך מאוד. לעומת זאת, קצב ייצור אתילן בענפים נושאי פרחים היה גבוה יחסית באופן מובהק. נראה לכן, שקצב ייצור אתילן האנדוגני תלוי בשלב ההתפתחות של הענף.



איור 12: השפעת אתילן על המשקל של ענפי קטיף וגטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. ענפי קטיף באגרטלים עם תמיסת כלורין אורגני הודגרו ב- 20 מ"צ למשך 24 שעות בתוך תאים אטומים אליהם הוזרקו ריכוזים שונים של אתילן, ולאחר מכן הועברו לחדר תצפית למעקב אחר שינויי המשקל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (3 ענפים לחזרה) \pm שגיאת תקן.

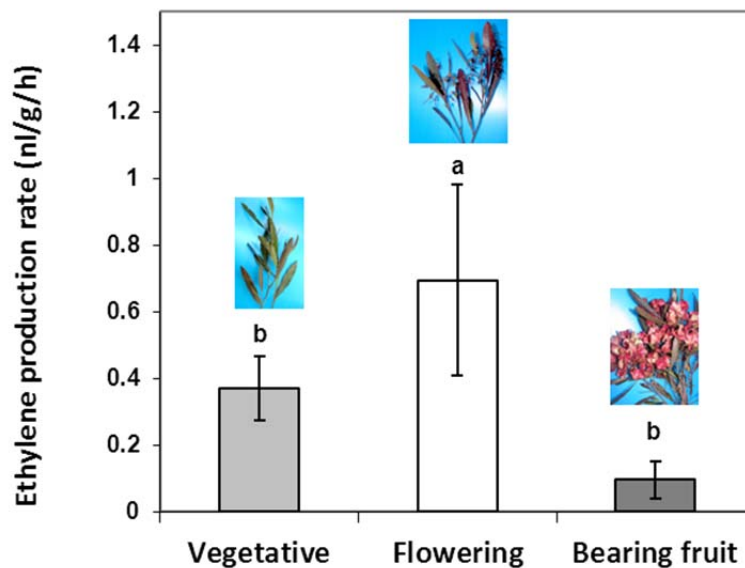


איור 13: השפעת 1-MCP על המשקל של ענפי קטיף וגטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל (A) ועל מופע הענפים לאחר 16 ימים באגרטל (B). ענפי קטיף באגרטלים עם תמיסת כלורין אורגני הודגרו ב- 20 מ"צ למשך 4 שעות בתוך תאים אטומים אליהם הוזרקו ריכוזים שונים של 1-MCP, ולאחר מכן הועברו לחדר תצפית למעקב אחר שינויי המשקל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (3 ענפים לחזרה) \pm שגיאת תקן.



Control □, Ethylene ■, 1-MCP ▒

איור 14: השפעת אתילן ו-1-MCP על קצב ייצור האתילן (A) וקצב הנשימה (B) של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. ענפי קטיף באגרטלים עם תמיסת כלורין אורגני הודגרו ב-20 מ"צ בתוך תאים אטומים למשך 4 שעות באווירה של 0.4 ח"מ 1-MCP או למשך 20 שעות באווירה של 5 ח"מ אתילן, ולאחר מכן הועברו לחדר תצפית. מדגמי ענפים נכלאו בצנצנות סגורות למשך 24 שעות במועדים שונים במהלך חיי האגרטל, וריכוזי האתילן וה- CO_2 שהצטברו באווירת הצנצנות נקבעו בגז כרומטוגרף. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (4 ענפים לחזרה). אותיות שונות מעל לעמודות מייצגות הבדלים מובהקים בין הטיפולים בכל תאריך בדיקה בנפרד ($P \leq 0.05$).



איור 15: קצב הייצור של אתילן בענפי קטיף של דודונאה 'דנה'. ענפים קצרים המכילים עלים בלבד, עלים ופרחים או עלים ופירות נכלאו מיד לאחר הקטיף בכלים אטומים למשך 48 שעות, וריכוזי האתילן שהצטבר בכלים נמדד בעזרת גז כרומטוגרף. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$).

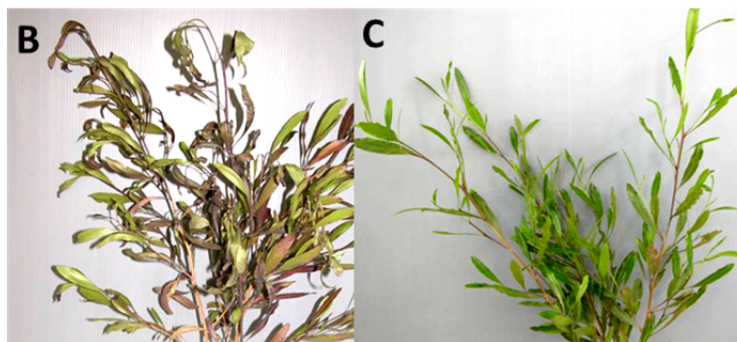
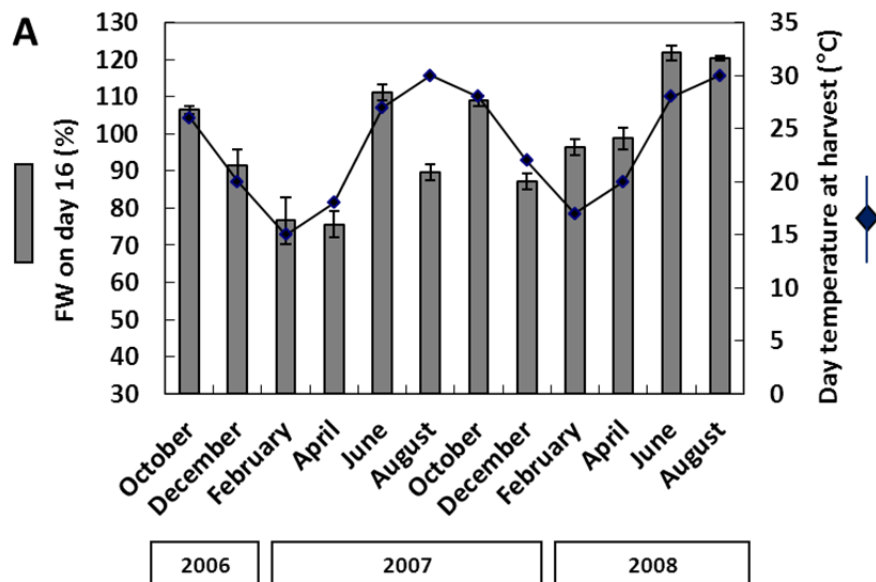
ד.3. שינויים עונתיים במאזן המים במהלך חיי האגרטל

מאחר והתקבלו הבדלים גדולים בקצב הכמיסה של ענפי דודונאה 'דנה' בניסויים השונים שבוצעו במהלך השנה, נבחנה ביסודיות ההשערה, שהכמיסה הלא סדירה של הענפים יכולה לנבוע משינויים עונתיים במבנה האנטומי ומשלבי התפתחות שונים של הענף. לשם כך נעשה מעקב רב-שנתי אחר מאזן המים במהלך חיי האגרטל של ענפים בשלבי התפתחות שונים (וגטטיביים ונושאי פרחים ופירות) בעונות שונות של השנה, במטרה למצוא תבנית כלשהי בכמיסה הלא סדירה של ענפי דודונאה 'דנה'.

התוצאות המוצגות באיור 16 מראות, ששינויי המשקל של האגדים לאחר 16 ימי אגרטל במהלך 3 שנים עוקבות (2006-2008) התרחשו עפ"י תבנית עונתית ברורה. במשך שלוש השנים העוקבות התנודות העונתיות בשינויי המשקל לאחר 16 ימי אגרטל תאמו את התנודות של הטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיפ (איור 16A), כאשר שינויי משקל גבוהים התקבלו בעונות בהן שררו טמפרטורות גבוהות יחסית, ושינויי משקל נמוכים התקבלו בעונות בהן שררו טמפרטורות נמוכות יחסית. בהתאם לכך, קצב הכמיסה לאחר 16 ימי אגרטל היה שונה באופן בולט ביותר בין החורף (איור 16B) לקיץ (איור 16C), כאשר בחורף הענפים היו כמושים לחלוטין, בעוד שבקיץ הענפים היו רעננים. יש לציין שבאוגוסט 2007 נמדד משקל נמוך שהיה חריג (איור 16A), וזאת בשל העובדה שהענפים נקטפו ביום חמסין.

על מנת לבחון את השינויים העונתיים החלים במשקל הענפים במהלך חיי האגרטל, נערך מעקב רציף אחר שינויי המשקל בשנים 2007-2008 (איור 17), במקביל לרישום הממוצע החודשי של הטמפרטורה היומית המקסימאלית (טבלה 1). הענפים נקטפו כל חודשיים, ושינויי המשקל נקבעו במהלך 16 יום באגרטל. במקביל, נלקחו עלים מאותם ענפים, ונערך מעקב אחרי שינויי המשקל של העלים המנותקים. ברוב המדגמים נבחנו ענפים וגטטיביים, פרט לחודשים פברואר ואפריל בהם נבחנו ענפים נושאי פרחים או פירות, בהתאמה. מהתוצאות המוצגות באיור 17A ניתן לראות, שבאוקטובר שינויי המשקל במהלך חיי האגרטל של הענפים ושל העלים המנותקים היו דומים. נצפתה עליה במשקל במהלך השבוע הראשון, ולאחר מכן המשקל נשמר ברמה קבועה פחות או יותר. בדצמבר, העלים המנותקים שמרו על משקל קבוע וגבוה במהלך 16 ימי אגרטל, ואילו הענפים התחילו לאבד ממשקלם כבר מהשבוע הראשון, וביום ה- 16 לחיי האגרטל הם איבדו כ- 15% ממשקלם (איור 17B). בפברואר, הן הענפים הוגטטיביים והן העלים המנותקים איבדו רק 2-3% ממשקלם לאחר 16 ימי אגרטל, בעוד שהענפים נושאי הפרחים איבדו כ- 25% ממשקלם, והעלים המנותקים של ענפים אלה איבדו 5% ממשקלם (איור 17C). הירידה במשקל העלים של ענפים נושאי פירות הקדימה את הירידה במשקל העלים של ענפים וגטטיביים, וכבר ביום ה- 13 משקלם היה כ- 95% מהמשקל ההתחלתי בהשוואה למשקל העלים של ענפים וגטטיביים, שמשקלם היה עדיין דומה לערך ההתחלתי. באפריל, הענפים הוגטטיביים החלו לאבד ממשקלם לאחר שבוע באגרטל, בעוד שבעלים המנותקים של ענפים אלו נשמר משקל גבוה וקבוע במשך 16 יום (איור 17D). לעומת זאת, ענפים נושאי פירות כמו בשורה חזקה ביותר, ובמשך 16 ימי אגרטל הם איבדו כ- 30% ממשקלם ההתחלתי, בעוד שעלים מנותקים של ענפים אלו שמרו על משקלם (איור 17D). ביולי ובאוגוסט המגמה התהפכה, והענפים הוגטטיביים עלו במשקלם (120%) אף יותר מאשר העלים המנותקים, והם שמרו על משקלם בדומה לעלים המנותקים במהלך כל חיי האגרטל (איורים 17E, F). יש לציין, שהן ענפים נושאי פרחים

(איור 17C), והן ענפים נושאי פירות (איור 17D) כמשו בצורה חזקה ביותר, ובמשך 16 ימי אגרטל איבדו כ- 25-30% ממשקלם ההתחלתי, בעוד שהעלים המנותקים של ענפים נושאי פרחים שמרו על משקל של 95% במשך חיי האגרטל, ועלים מנותקים של ענפים נושאי פירות היו במשקל גבוה בהרבה מערכם ההתחלתי, והשינוי במשקלם היה דומה לזה של העלים המנותקים מענפים וגטטיביים. הדבר התבטא במופע הענפים ביום ה- 16 באגרטל, כאשר הענפים הוגטטיביים נראו חיוניים, בעוד שהענפים נושאי הפירות היו כמושים וסבלו מנשירת איברים, בעיקר פירות (תמונה 13A), דבר המהווה גורם נוסף לאיבוד במשקל הענפים. לעומת זאת, העלים המנותקים משני סוגי הענפים שמרו על מופע חיוני לאחר 16 ימים באגרטל (תמונה 13B). תוצאות אלה מרמזות על כך שהפגיעה בהובלת המים, המשפיעה על מאזן המים בענפים הקטופים, חלה בגבעול ולא בעלים.

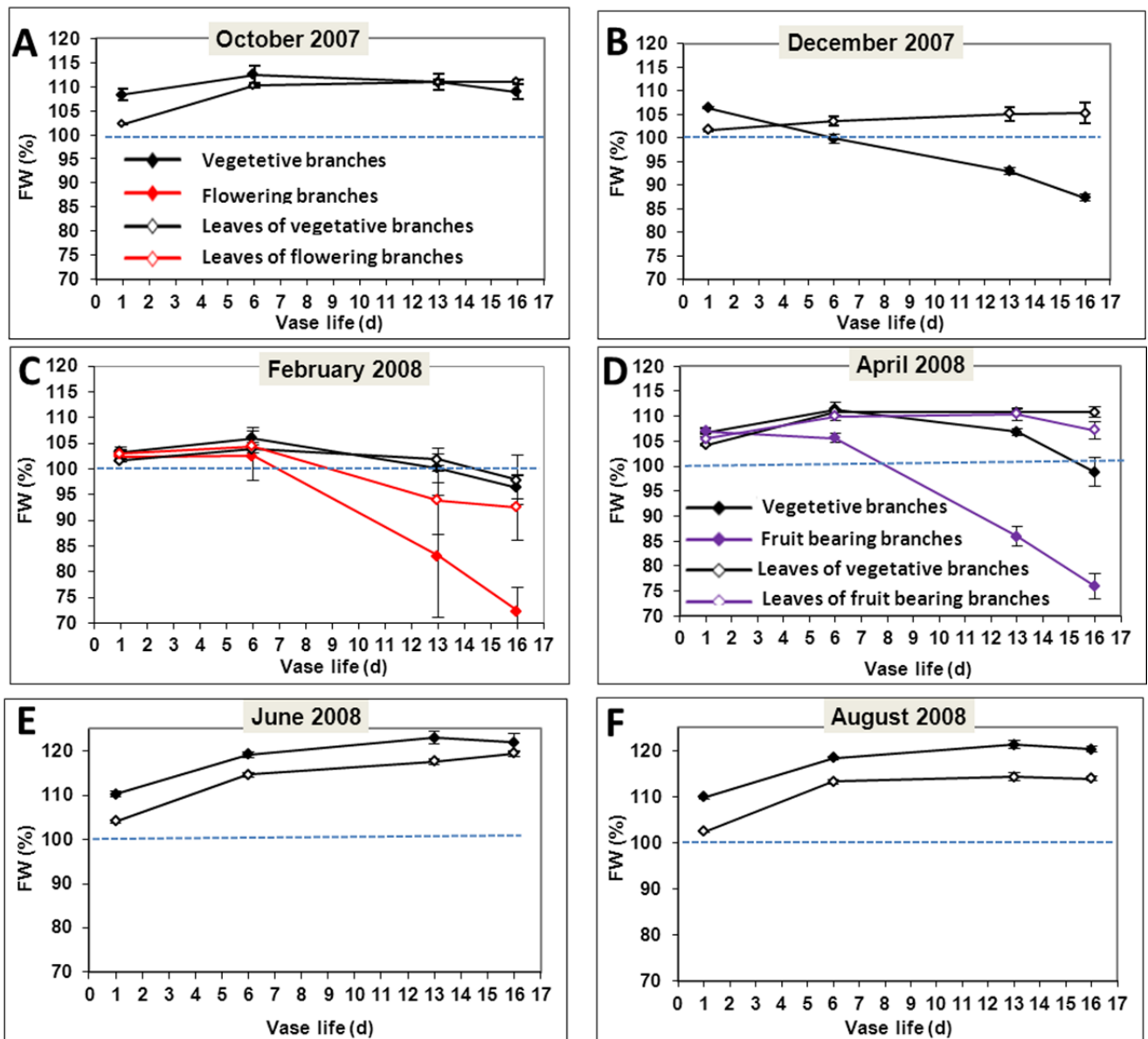


איור 16: שינויים עונתיים במשקל ענפי קטיף וגטטיביים של דודנאה 'דנה' לאחר 16 ימים באגרטל ביחס לטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף במהלך 3 שנים עוקבות (A), ומופע הענפים שנקטפו באפריל (B) וביוני (C) בשנת 2007 לאחר 16 יום באגרטל. הענפים נקטפו בתאריכים שצוינו והודגרו באגרטלים עם כלורין אורגני בחדר תצפית סטנדרטי. שינויי המשקל ביום 16 בוטאו כאחוז מהמשקל ההתחלתי של האגד ביום הראשון באגרטל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5-6 חזרות (2-3 ענפים לחזרה) \pm שגיאות תקן.

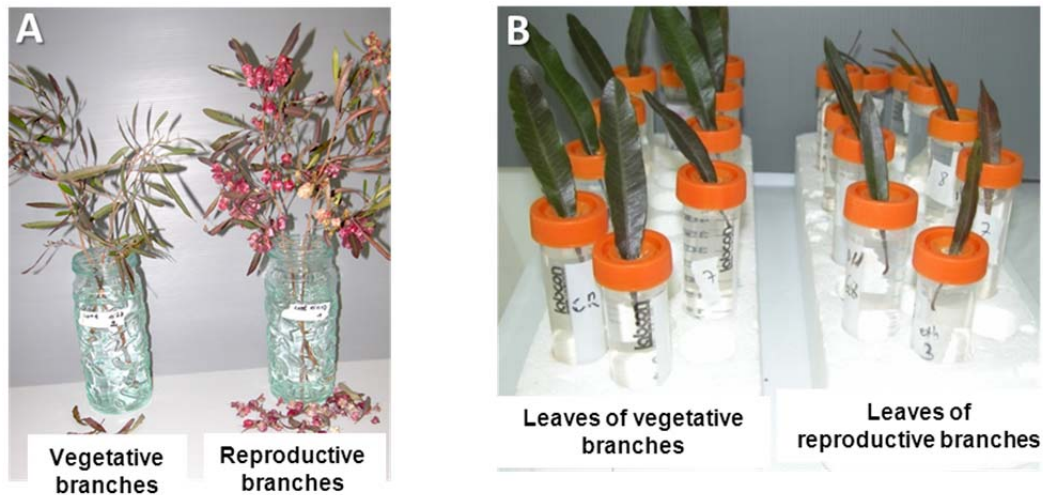
טבלה 1: הטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף והמוצע החודשי של הטמפרטורה היומית המקסימאלית.

חודש	ממוצע רב-שנתי (1983-2000) של טמפרטורה יומית ממוצעת**		ממוצע חודשי של טמפרטורה יומית מקסימלית**	טמפרטורה יומית מקסימלית ביום הקטיף*	שנה
	מינימום	מקסימום			
אוקטובר	16.0	28.3	28.3	26	2006
דצמבר	8.6	19.7	19.1	20	2006
פברואר	7.1	18.1	19.1	15	2007
אפריל	11.5	24.5	24.1	18	2007
יוני	17.9	29.2	29.9	27	2007
אוגוסט	21.2	31.2	31.9	30	2007
אוקטובר	16.0	28.3	29.1	28	2007
דצמבר	8.6	19.7	20.0	22	2007
פברואר	7.1	18.1	18.6	17	2008
אפריל	11.5	24.5	26.2	20	2008
יוני	17.9	29.2	30.5	28	2008
אוגוסט	21.2	31.2	31.9	30	2008

* הנתונים התקבלו מהשרות המטאורולוגי הישראלי
 ** הנתונים התקבלו מהלשכה המרכזית לסטטיסטיקה



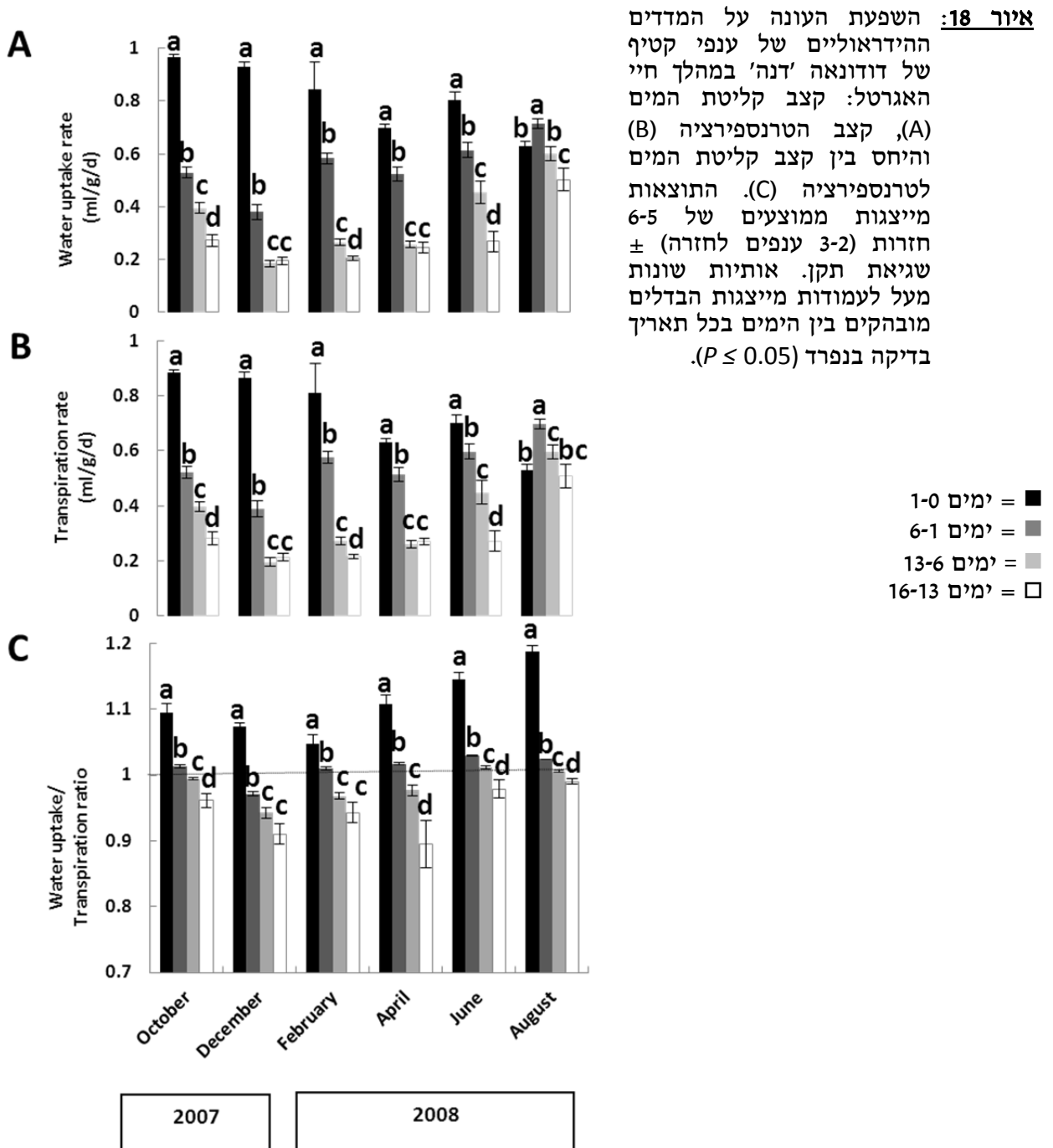
איור 17: השפעת העונה על המשקל הטרי של ענפי קטיף של דודוואה 'דנה' בשלבי התפתחות שונים ושל עלים מנותקים שנקטפו מענפים אלה במהלך חיי אגרטל בשנים 2007-2008 (A-F). ענפים וגטטיביים, ענפים נושאי פרחים וענפים נושאי פירות נקטפו בתאריכים שצוינו באיורים, והודגרו באגרטלים עם כלורין אורגני בחדר תצפית סטנדרטי. במקביל, נקטפו גם עלים מענפים אלה והודגרו במבחנות כמפורט לגבי הענפים. שינויי המשקל בוטאו כאחוז מהמשקל ההתחלתי ביום הקטיף. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (2 ענפים או 10 עלים לחזרה) \pm שגיאת תקן. הקו האופקי מציין את המשקל ההתחלתי (100%).

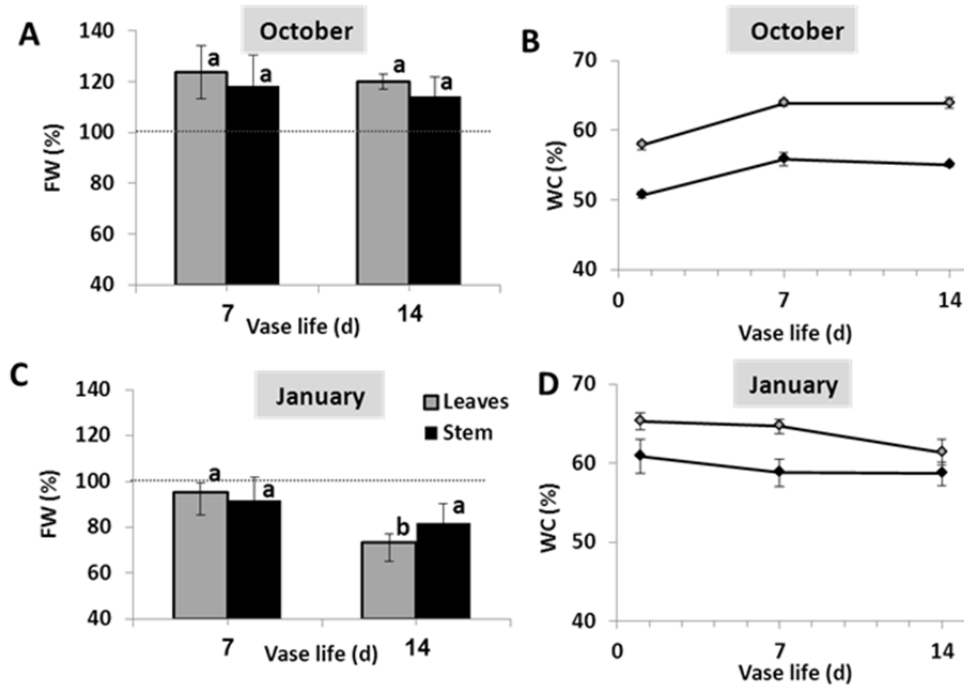


תמונה 13: מופע הענפים (A) והעלים (B) מקטיף של חודש אפריל 2008 ביום 16 באגרטל. ענפים וגטטיביים או נושאי פירות הודגרו באגרטלים עם כלורין אורגני בחדר תצפית סטנדרטי. במקביל, נקטפו גם עלים מענפים אלה והודגרו במבחנות כמפורט לגבי הענפים.

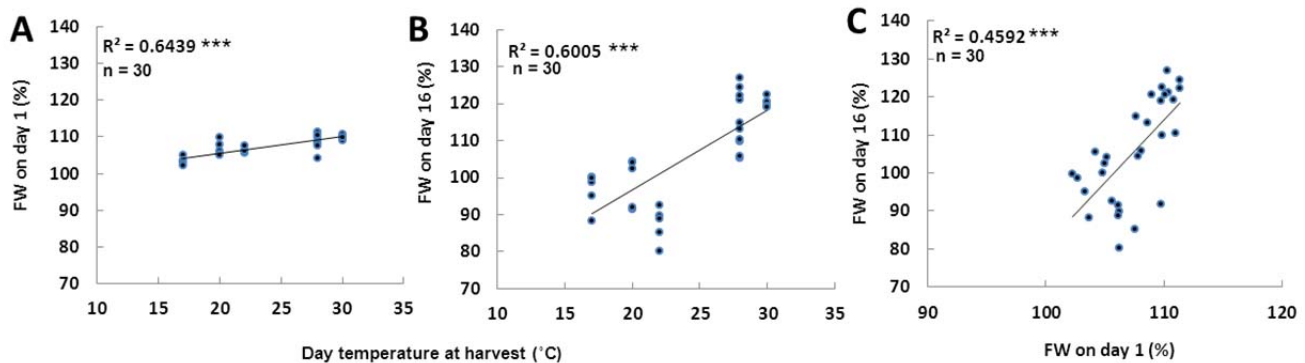
מאזן המים של הענף הקטוף במהלך חיי האגרטל תלוי ביחס שבין קצב קליטת המים לקצב הטרנספירציה. כאשר ערכו של יחס זה גדול מ-1, הדבר מצביע על כך שהענף קלט יותר מים מאשר הוא נידף ולכן הוא במצב מיום טוב, ואילו ערך קטן מ-1 מצביע על כך שקצב הטרנספירציה היה גבוה מקצב קליטת המים והענף נמצא לכן במגמת כמישה. המדדים ההידראוליים בענפי דודונאה 'דנה', קצב קליטת המים וקצב הטרנספירציה, שנבדקו במשך שנתיים עוקבות, ירדו בצורה משמעותית במהלך 16 יום של חיי האגרטל, פרט לחודש אוגוסט בו הירידה במדדים חלה רק בימים 13-16 (איורים 18A, B). כן נצפתה מגמה של ירידה במדדים אלו במהלך השנה עד לחודש אפריל, שלאחריו הייתה עליה מסוימת (איורים 18A, B). כתוצאה מכך, בתחילת חיי האגרטל ערכו של היחס בין קצב הקליטה לקצב הטרנספירציה היה תמיד גבוה מ-1, אך הוא ירד לערך קטן מ-1 לאחר כ-14 יום באגרטל (איור 18C). יחד עם זאת, בחודשי החורף היחס היה קטן מ-1 כבר לאחר 7 ימים באגרטל, בעוד שבחודשי הקיץ היחס היה גדול מ-1 גם לאחר 14 יום באגרטל. בכדי להבין בצורה מעמיקה יותר האם השינויים העונתיים במאזן המים של ענפי דודונאה 'דנה' מתבטאים בגבעול או בעלים, נבדקו שינויים עונתיים במשקל הטרי ובתכולת המים של העלים והגבעול במהלך חיי האגרטל בענפי דודונאה 'דנה' שנקטפו באוקטובר ובינואר. התוצאות מראות, שבענפים שנקטפו באוקטובר, השינוי במשקל העלים והגבעול היה דומה במהלך כל חיי האגרטל, כאשר המשקל של שני האיברים עלה בשבוע הראשון ונשמר לאחר מכן באותה רמה (איור 19A). תכולת המים של העלים הייתה גבוהה יותר מזו של הגבעול, אך שני האיברים שמרו על תכולת המים שעלתה בשבוע הראשון ונשארה גבוהה וקבועה בשבוע השני באגרטל (איור 19B). לעומת זאת, בענפים שנקטפו בינואר, השינוי במשקל הגבעול היה גדול מזה של העלים, והמשקל של שני האיברים היה במגמת ירידה במהלך 16 ימי אגרטל (איור 19C). תכולת המים של העלים שנקטפו בינואר הייתה גבוהה יותר ביום הקטיף מזו שנמדדה בעלים של ענפים שנקטפו באוקטובר, ובדומה למגמה שהתקבלה באוקטובר, היא הייתה גבוהה מזו של הגבעול במהלך כל חיי האגרטל (איור 19D). תכולת המים של הגבעול בענפים שנקטפו בינואר ירדה במידה מסוימת כבר בשבוע הראשון באגרטל, ונשמרה קבועה לאחר מכן, בעוד שתכולת המים של העלים שנקטפו מענפים אלה הראתה מגמה של ירידה קלה רק בשבוע השני באגרטל.

כאשר נבדק המתאם בין שינוי המשקל של הענפים לבין טמפרטורת הסביבה, התברר שקיים מתאם חיובי מובהק בין משקלם של הענפים הן ביום 1, והן ביום 16 של חיי האגרטל לבין הטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף (איורים 20A, B). בנוסף, היה מתאם חיובי מובהק בין המשקל הטרי של הענפים ביום 16 לבין משקלם הטרי ביום 1 (איור 20C).





איור 19: השפעת העונה על המשקל הטרי (A, C) ותכולת המים (B, D) של העלים והגבעול במהלך חיי האגרטל של ענפי קטיף וגטטיביים של דודנאה 'דנה' שנקטפו באוקטובר 2008 (A, B) ובינואר 2009 (C, D). הענפים הקטופים הודגרו באגרטלים עם כלורין אורגני בחדר תצפית סטנדרטי. בימים 0, 7 ו-14 של חיי אגרטל הענפים הופרדו לעלים וגבעול, ונמדדו המשקל הטרי ותכולת המים של כל איבר. השינוי בתכולת המים חושב על בסיס ההפרש בין שני מועדי מדידה עוקבים. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 חזרות (2 גבעולים או עלים לחזרה) \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$). הקו האופקי באיורים A ו-C מציין את המשקל ההתחלתי (100%).



איור 20: מידת המתאם (R^2) בין שינויי המשקל הטרי של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה' ביום 1 (A) וביום 16 (B) לבין הטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף, ומידת המתאם בין שינויי המשקל הטרי של הענפים ביום 1 וביום 16 (C). הנתונים נמדדו בשישה מועדים שונים במהלך השנה. רמת המובהקות הסטטיסטית: ***, $P \leq 0.001$; n = מספר הענפים.

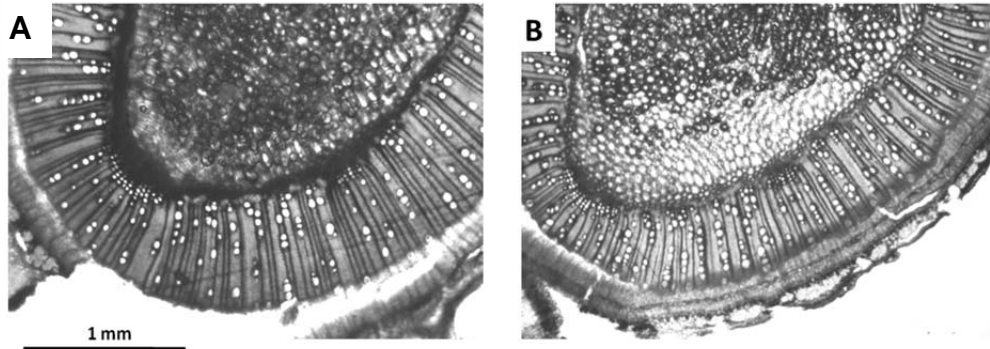
ד.4. שינויים עונתיים במבנה האנטומי של ענפי דודנאה והשפעתם על חיי האגרטל

כדי לברר מהו הגורם להבדלים במאזן המים של הענפים הקטופים שנצפו בעונות שונות ובשלב התפתחות שונים ולבחון את סיבת השינויים העונתיים בתפקוד ההידראולי של ענפי דודנאה 'דנה', נבדקה האנטומיה הפונקציונלית של הגבעולים והעלים (מבנה העצה ומבנה העלים) במהלך השנה.

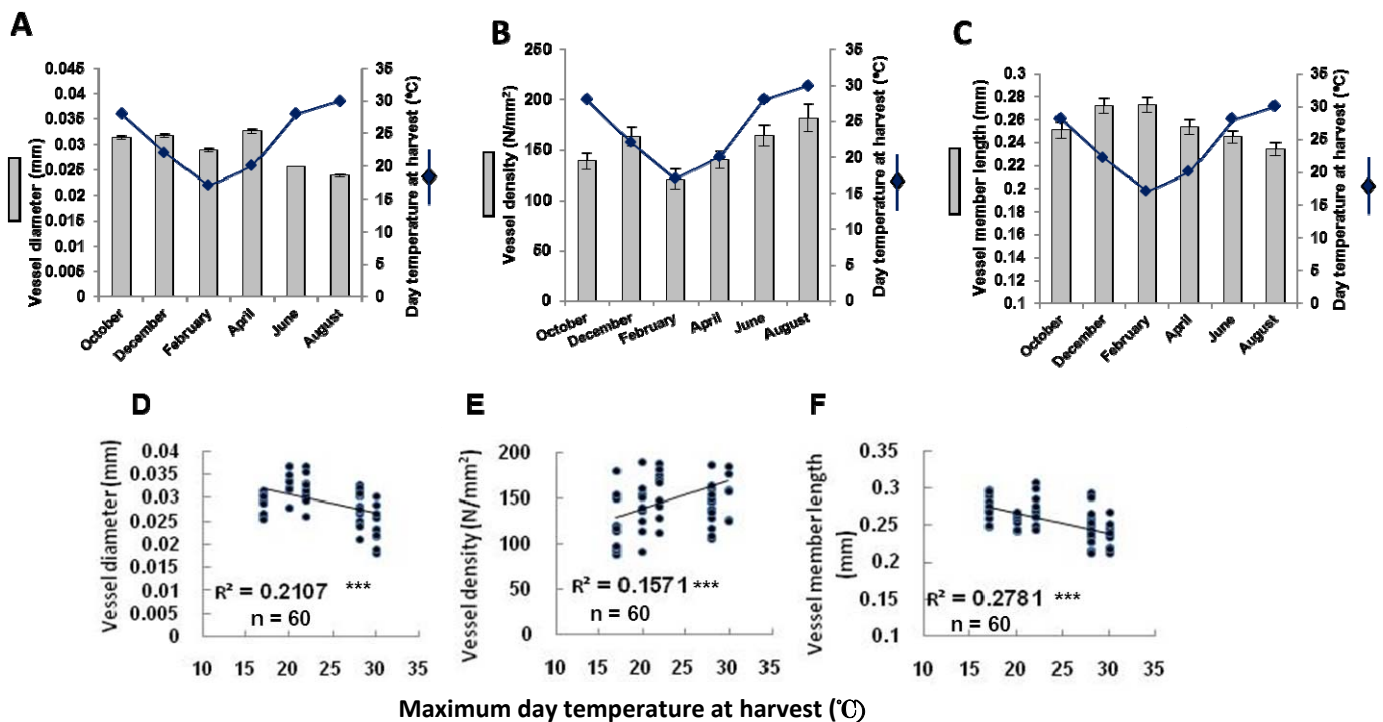
1.4.ד. גבעולים

נבדקו שלושה מדדים אנטומיים במבנה העצה הקשורים בהובלת המים: קוטר וצפיפות צינורות ההובלה ואורך חוליות הטרביאה. ניתן היה לראות הבדלים ברורים בין החורף לקיץ, כאשר בקיץ (תמונה 14B) הצינורות היו צפופים יותר ובעלי קוטר קטן יותר מאשר בחורף (תמונה 14A). כאשר נבחן המתאם שבין המדדים האנטומיים של הגבעול לבין הטמפרטורה היומית הממוצעת ביום הקטיפ נמצא, שכל שלושת המדדים שנבחנו היו במתאם מובהק מאוד עם הטמפרטורה (איור 21). קוטר צינורות ההובלה (איורים 21A, D) ואורך חוליות הטרביאה (איורים 21C, F) היו במתאם שלילי לטמפרטורה, ואילו צפיפות הצינורות (איורים 21B, E) הייתה במתאם חיובי לטמפרטורה. בשלושת המדדים, המתאם לטמפרטורה היה אמנם מובהק מאוד אך נמוך, שכן הוא מסביר רק כ- 20% מהשונות.

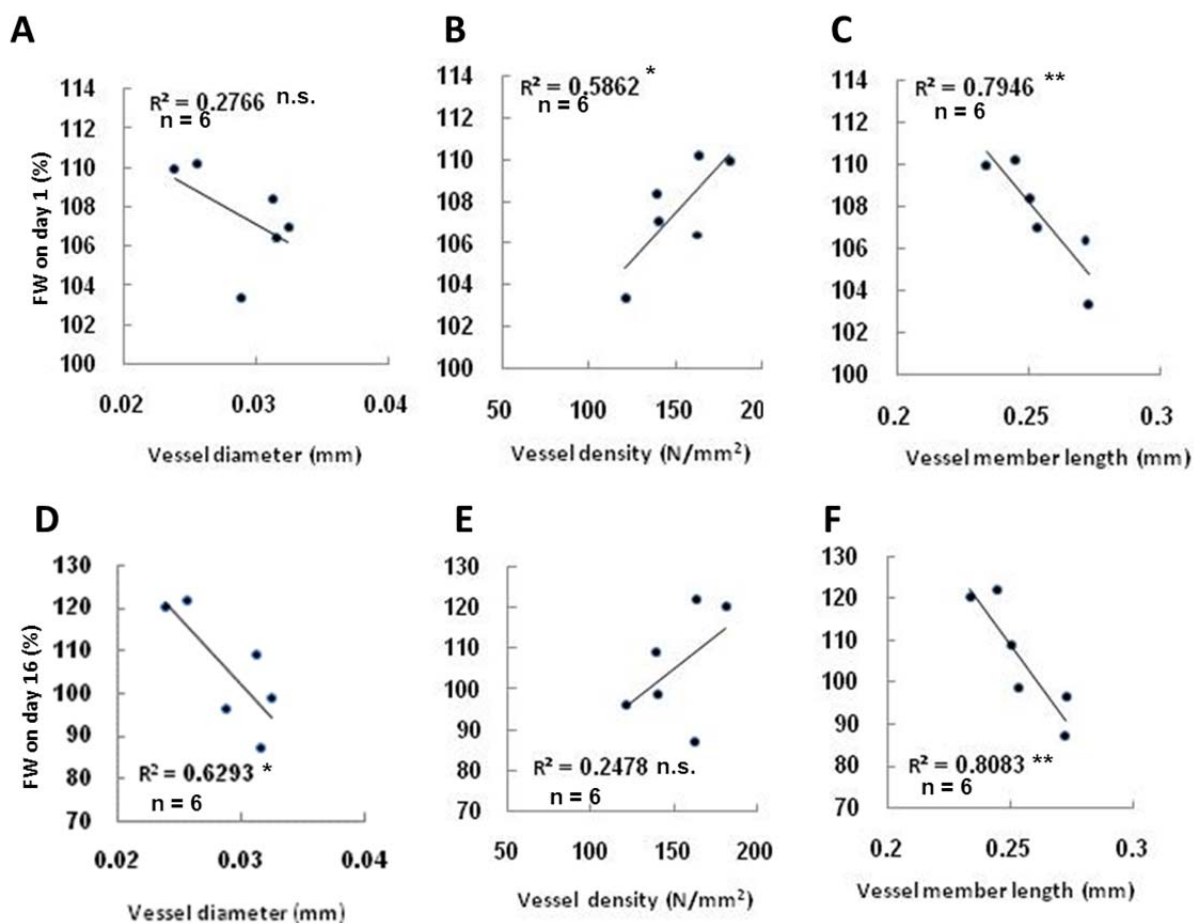
כדי לבחון את ההשפעה של המדדים האנטומיים על מאזן המים של הענפים במהלך חיי האגרטל, נבחן המתאם בין שינויי המשקל של האגד ביום 1 וביום 16 באגרטל לבין שלושת המדדים האנטומיים של מבנה העצה. התוצאות מראות, שביום 1 של חיי האגרטל השינוי במשקל הענפים היה במתאם שלילי אך נמוך לקוטר הצינורות (איור 22A), במתאם חיובי מובהק לצפיפות הצינורות (איור 22B), ובמתאם שלילי מובהק וגבוה לאורך חוליות הטרביאה (איור 22C). לאחר 16 ימים באגרטל השינוי במשקל הענפים היה במתאם שלילי מובהק וגבוה לקוטר הצינורות (איור 22D), במתאם חיובי אך נמוך לצפיפות הצינורות (איור 22E), ובמתאם שלילי מובהק וגבוה לאורך חוליות הטרביאה (איור 22F). נראה לכן, שלמרות שמגמות שינוי היחס בין המדדים האנטומיים לבין שינויי המשקל היו זהות בין שני המועדים במהלך חיי האגרטל, היה שינוי בתרומה היחסית של המדדים האנטומיים השונים למשקל הענפים בין תחילת חיי האגרטל ובסופם, אשר התבטאה בשינויים במובהקות המתאם בין שינויי המשקל למדדים האנטומיים.



תמונה 14: שינויים עונתיים במבנה הגבעול של דודנאה 'דנה' שנראו בחתכי רוחב של הגבעול בחורף (A) ובקיץ (B). חתכי הגבעול נעשו במרחק של 30 ס"מ מקודקוד הענף, והתמונות צולמו במיקרוסקופ אור. העצה התפתחה בעונה אחת. ניכרים הבדלים בצפיפות ובקוטר צינורות ההובלה בין שתי העונות.



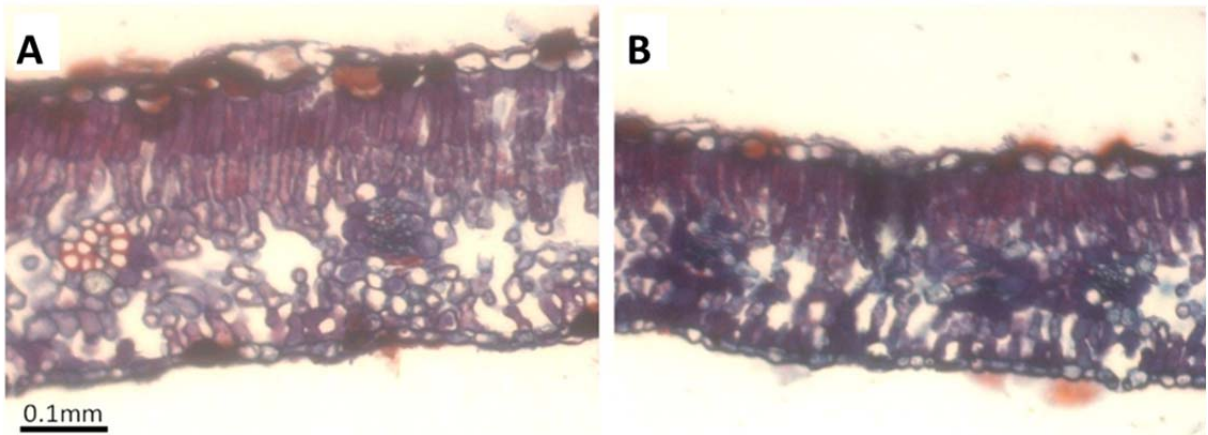
איור 21: ההשתנות העונתית של מדדים אנטומיים של העצה בגבעול של ענפי קטיף וגטיביים של דודנאה 'דנה' והטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף (A-C), ומידת המתאם (R^2) בין שינויים אלה (D-F) לקוטר צינורות ההובלה (A, D), צפיפות צינורות ההובלה (B, E), ואורך חוליות הרכיאה (C, F) נמדדו בשישה מועדים שונים במהלך השנה. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 חזרות בכל מועד בדיקה ($n = 60$) \pm שגיאת תקן. רמת המובהקות הסטטיסטית: ***, $P \leq 0.001$; $N =$ מספר צינורות ההובלה בחתך.



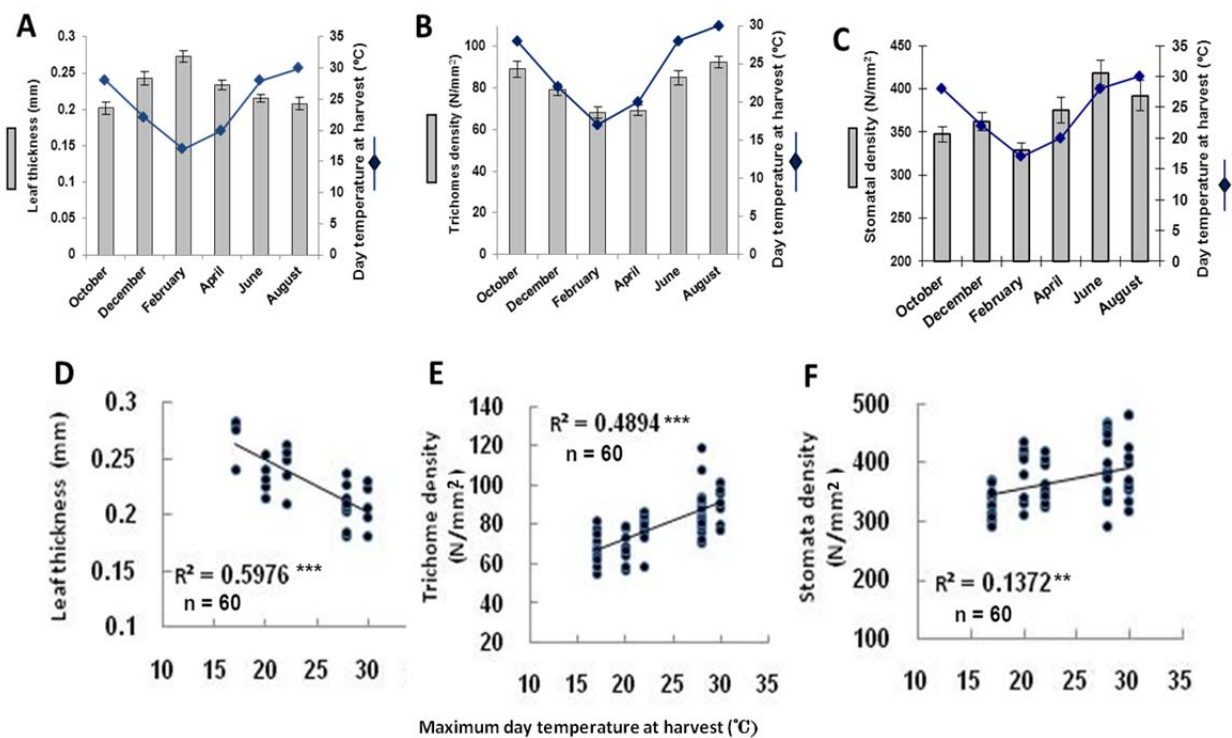
איור 22: הקשר בין השינויים העונתיים במשקל הענפים במהלך חיי אגרטל ביום 1 (A-C) וביום 16 (D-F) לבין השינויים במדדים האנטומיים של העצה בענפים וגטיביים של דודג'נאה 'דנה' שנקטפו בששה מועדים שונים במהלך השנה. כל נתון של משקל הענפים מייצג ממוצע של 5 חזרות (2 ענפים לחזרה), וכל נתון של המדדים האנטומיים מייצג ממוצע של 10 חזרות \pm שגיאת תקן. רמות המובהקות הסטטיסטית: **, $P \leq 0.01$; *, $P \leq 0.05$; n.s. ; לא מובהק ($P > 0.05$). $n = N$. מספר צינורות ההובלה בחתך.

ד.2.4. עלים

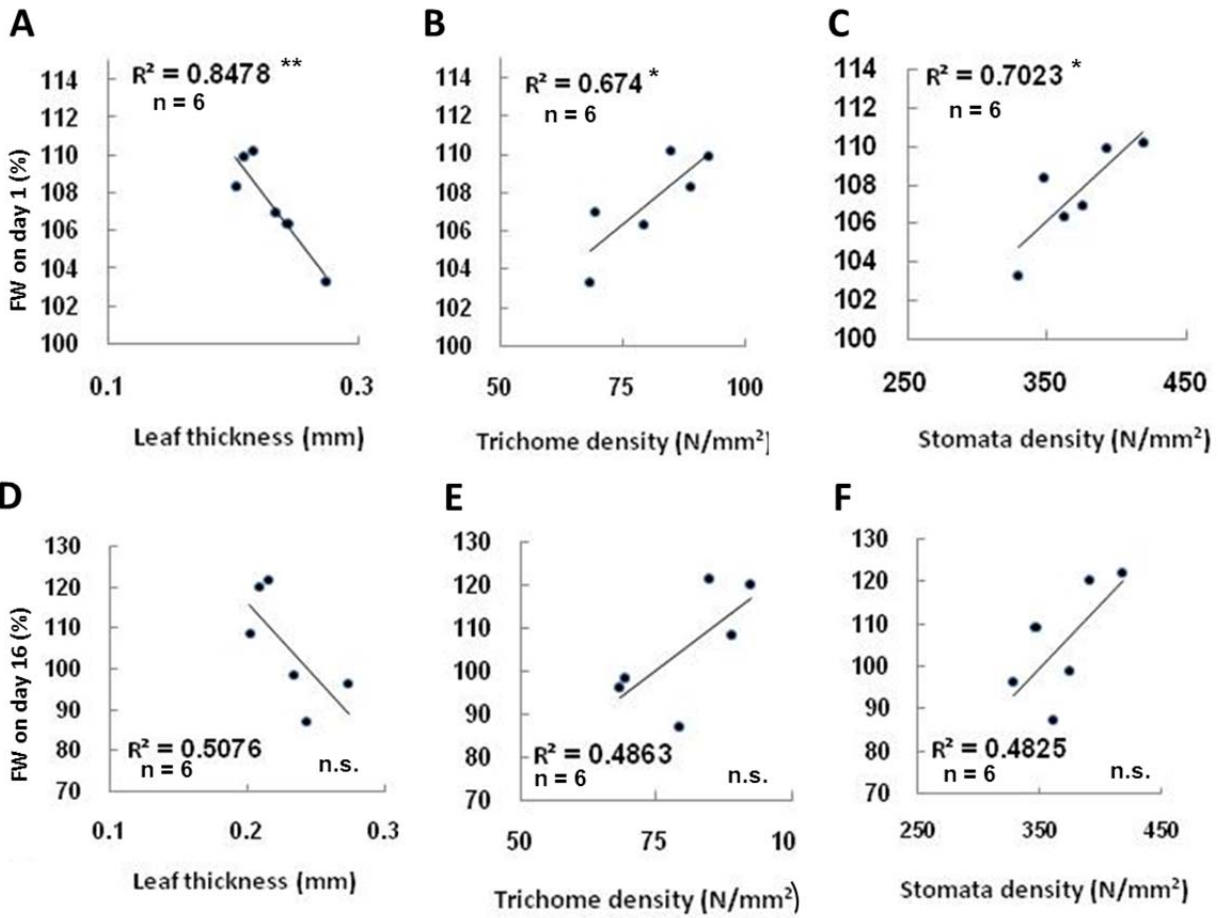
בחתכי רוחב של העלה ניתן היה לראות הבדלים ברורים במבנה העלים בין החורף לקיץ, כאשר בחורף העלים היו עבים יותר (תמונה 15A) מאשר בקיץ (תמונה 15B). בהתאם לכך, שלושת המדדים האנטומיים שנבדקו בעלה, עובי העלה וצפיפות הפיוניות והטריכומות, הראו מתאם מובהק לטמפרטורת היום המקסימאלית בזמן הקטיף (איור 23). עובי העלה היה במתאם שלילי לטמפרטורה (איור 23D), ואילו צפיפות הטריכומות (איור 23E) וצפיפות הפיוניות (איור 23F) היו במתאם חיובי לטמפרטורה. המתאם בין צפיפות הפיוניות לטמפרטורה היה נמוך, והוא ומסביר רק כ- 10% מהשונות. כדי לבחון את ההשפעה של המדדים האנטומיים של העלה על מאזן המים של הענפים במהלך חיי האגרטל, נבחן המתאם בין שינויי המשקל של האגד ביום 1 וביום 16 באגרטל לבין שלושת המדדים האלה. התוצאות מראות, שביום 1 השינוי במשקל הענפים היה במתאם שלילי מובהק וגבוה לעובי העלים (איור 24A), אך במתאם חיובי מובהק וגבוה לצפיפות הטריכומות (איור 24B) והפיוניות (איור 24C). לאחר 16 יום באגרטל, השינוי במשקל הענפים לא הראה מתאם מובהק לאף אחד מהמדדים הנ"ל (איורים 24D-F).



תמונה 15: שינויים עונתיים במבנה העלים של דודוואה 'דנה' שנראו בחתכי רוחב של העלים בחורף (A) ובקיץ (B). התמונות צולמו במיקרוסקופ אור. ניכרים הבדלים ברוחב העלים בין שתי העונות.



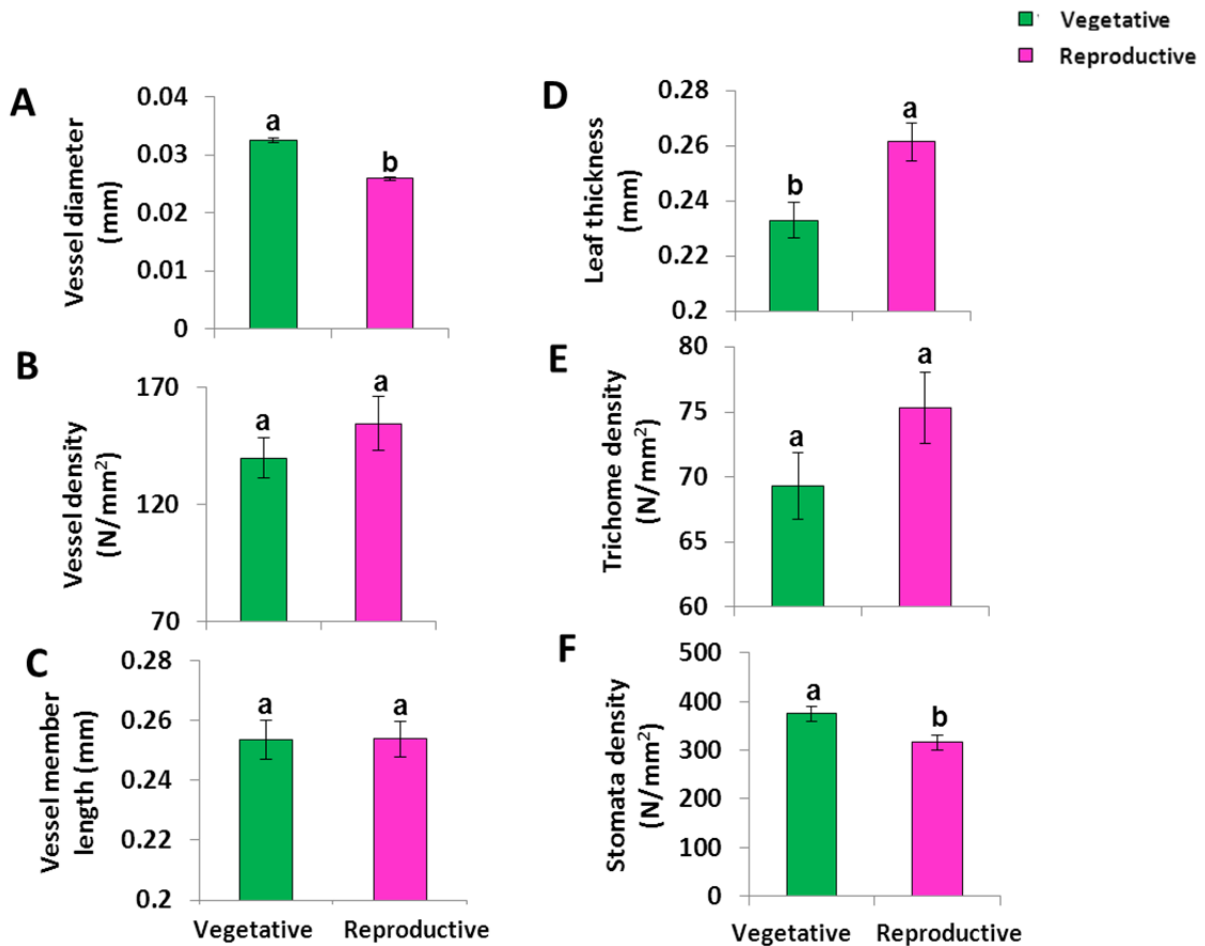
איור 23: ההשתנות העונתית של מדדים אנטומיים של העלים בענפי קטיף וגטיביים של דודונאה 'דנה' והטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף (A-C), ומידת המתאם (R^2) בין שינויים אלה רוחב העלה (A, D), צפיפות הטריכומות (B, E), וצפיפות הפיוניות (C, F) נמדדו בששה מועדים שונים במהלך השנה. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 חזרות בכל מועד בדיקה ($n = 60$) \pm שגיאות תקן. רמות המובהקות הסטטיסטית: $P \leq 0.001$, ***; $P \leq 0.01$, **; $P \leq 0.05$, *; $P > 0.05$, ns.



איור 24: הקשר בין השינויים העונתיים במשקל ענפי קטיפ וגטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי אגרטל ביום 1 (A-C) וביום 16 (D-F) באגרטל, לבין שינויים במדדים האנטומיים של עלים בענפים שנקטפו בשישה מועדים שונים במהלך השנה. כל נתון של משקל הענפים מייצג ממוצע של 5 חזרות (2 ענפים לחזרה), וכל נתון של המדדים האנטומיים מייצג ממוצע של 10 חזרות ± שגיאת תקן. רמות המובהקות הסטטיסטית: **, *; $P \leq 0.01$; $P \leq 0.05$; n.s.; לא מובהק ברמה של $P > 0.05$. N = מספר הטריכומות או הפיוניות בחתך.

ד.3.4. השוואה בין המבנה האנטומי של ענפים וגטיביים לזה של ענפים נושאי פירות

כדי לברר מה הגורם לשוני בתפקוד באגרסל בין ענפים וגטיביים לענפים נושאי פירות, נעשתה השוואה בין המדדים האנטומיים של העצה והמדדים האנטומיים של העלים של ענפים אלו (איור 25). צפיפות הצינורות (איור 25B), אורך חוליות הטרכיאה (איור 25C), וצפיפות הטרכימות (איור 25E) לא היו שונים באופן מובהק בין ענפים וגטיביים לענפים נושאי פירות. לעומת זאת, קוטר צינורות ההובלה (איור 25A) וצפיפות הפיוניות (איור 25F) היו נמוכים יותר באופן מובהק בענפים נושאי פירות, ואילו עובי העלים בהם (איור 25D) היה גדול יותר מזה של ענפים וגטיביים.



איור 25: קוטר צינורות ההובלה (A), צפיפות צינורות ההובלה (B), אורך חוליות הטרכיאה (C), עובי העלים (D), צפיפות השערות (טרכימות) (E) וצפיפות הפיוניות (F) בענפים וגטיביים וענפים נושאי פירות של דודנאה 'דנה'. התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 חזרות \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין העמודות ($P \leq 0.05$). N = מספר צינורות ההובלה, הטרכימות או הפיוניות בחתך.

ד.5. שינויים עונתיים בתכולת הפחמימות והאוסמוליטים בעלים והשפעתם על חיי האגרטל

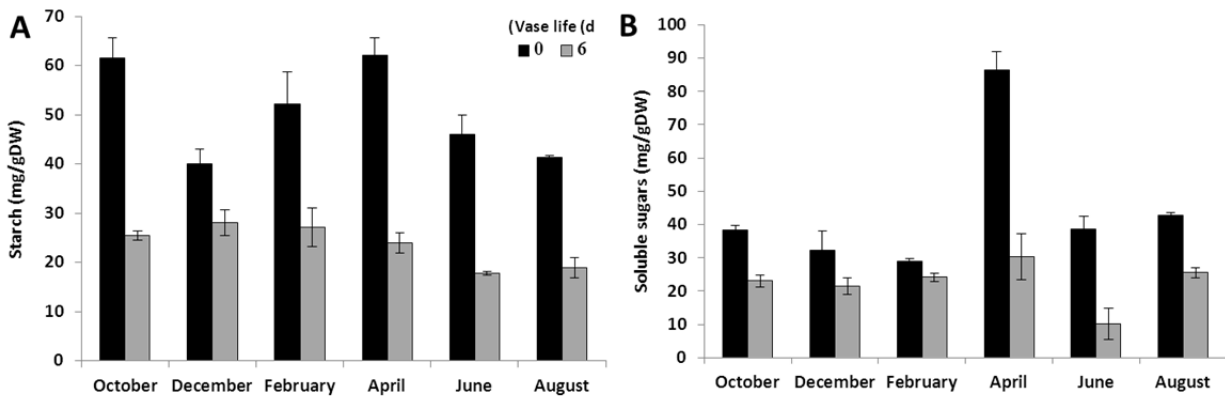
על מנת לבחון את הגורמים לשינויים בתפקוד ההידראולי של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה', נבדקו גם השינויים העונתיים בתכולת הפחמימות והפרולין בעלים במהלך חיי האגרטל.

ד.5.1. שינויים עונתיים בתכולת העמילן

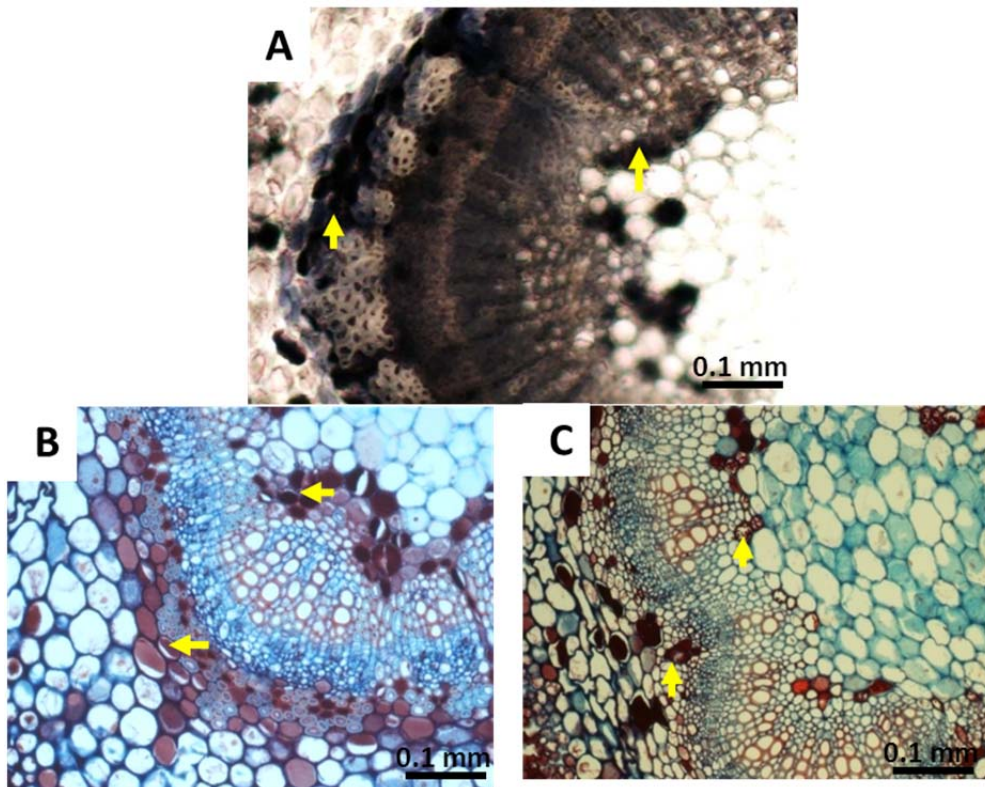
תכולת העמילן בעלים ביום הקטיף הייתה נמוכה יותר במידה מסויימת בחודשים יוני, אוגוסט ודצמבר מאשר בשאר חודשי השנה (איור 26A). במהלך 6 ימים באגרטל, העמילן התפרק במידה ניכרת בכל העונות (איור 26A), ואף ניתן היה לראות את הפירוק בחתכים האנטומיים (תמונה 16). לא נמצא קשר ברור בין השינוי במשקל הענפים לבין תכולת העמילן במהלך חיי האגרטל (תוצאות לא מובאות).

ד.5.2. שינויים עונתיים בתכולת הסוכרים המסיסים

תכולת הסוכרים המסיסים ביום הקטיף בעלים הייתה דומה בכל העונות, פרט לעלים של ענפים וגטיביים בחודש אפריל, שבהם תכולת הסוכרים המסיסים הייתה כפולה מאשר בשאר המועדים (איור 26B). בדומה לעמילן, תכולת הסוכרים המסיסים ירדה לאחר שבוע באגרטל במהלך כל השנה (איור 26B). לא נמצא קשר ברור בין השינוי במשקל הענפים לבין תכולת הסוכרים המסיסים במהלך חיי האגרטל (תוצאות לא מובאות).



איור 26: ההשתנות העונתית ברמת העמילן (A) והסוכרים המסיסים (B) ביום הקטיף ולאחר 7 ימים באגרטל בעלים של ענפי קטיף וגטיביים של דודנאה 'דנה' שנקטפו בששה מועדים שונים בשנים 2007-2008. התוצאות מייצגות ממוצעים של 4 חזרות \pm שגיאת תקן.



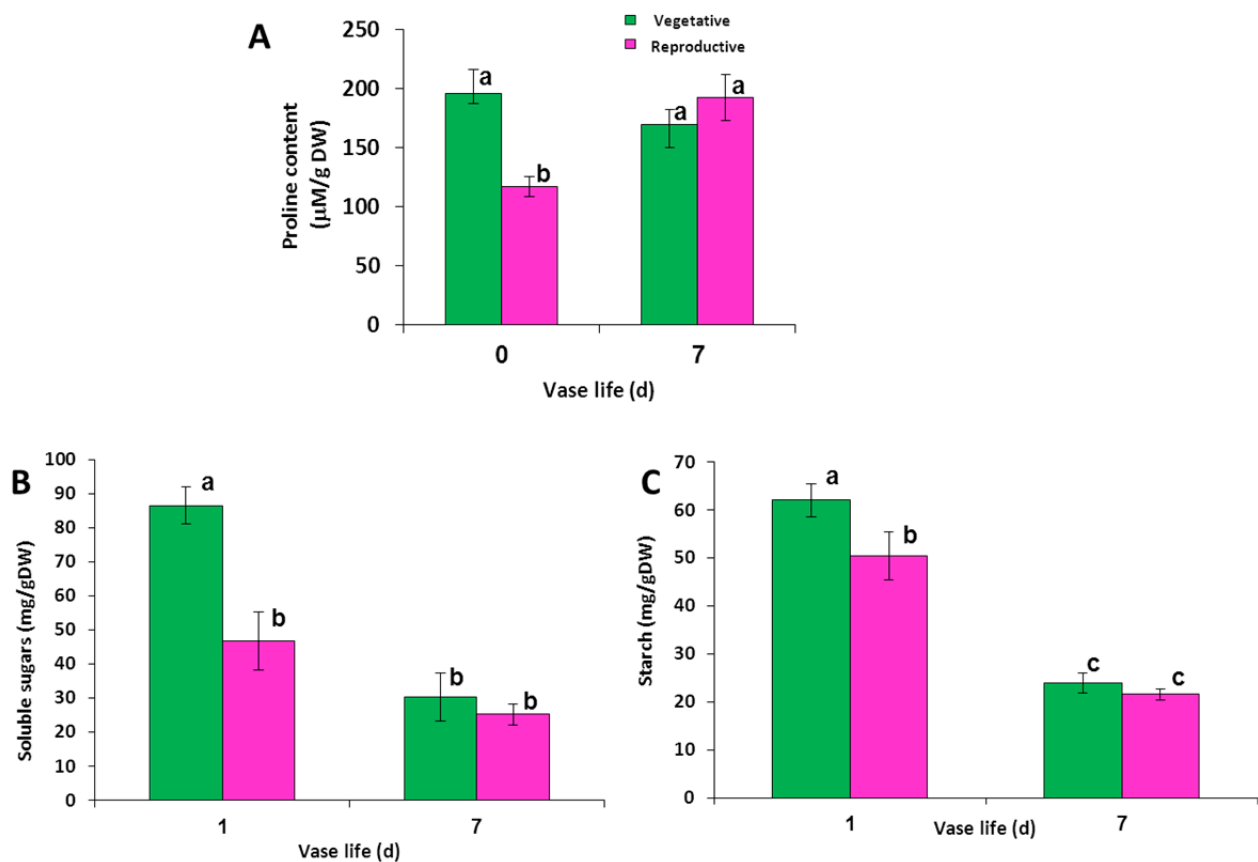
תמונה 16: תכולת העמילן בחתך רוחב ידני של פטוטרט עלה של ענפי קטיף וגטיביים של דודונאה 'דנה' שנצבע בכלור-אבץ-יוד ביום הקטיף (A) ובחתי רוחב במיקרוטום שנצבעו ב- Safranin/Fast green ביום הקטיף (B) ולאחר 7 ימים באגרטל (C). התמונות צולמו במיקרוסקופ אור. החיצים בצהוב מצביעים על תאים המכילים עמילן.

ד.3.5. תכולת סוכרים ופרולין בעלים מענפים וגטיביים בהשוואה לתכולה בעלים של ענפים נושאי פירות

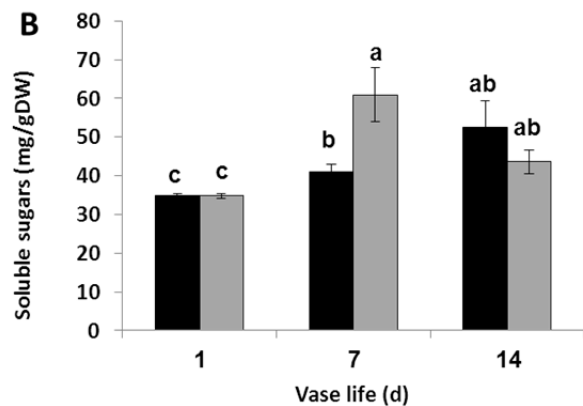
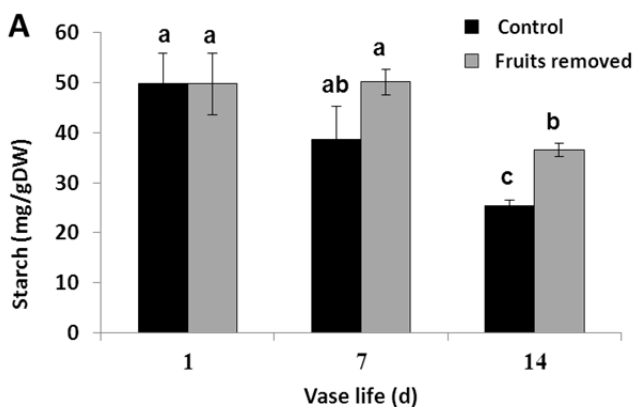
במהלך חיי אגרטל והשפעת מתן סוכר חיצוני על ענפים אלו

מכיוון שענפים נושאי פירות הנם חשובים מבחינה מסחרית, ראינו חשיבות ללמוד את התפקוד ההידראולי ומאזן הפחמימות שלהם. בנוסף, הפירות על הענף עשויים לשנות את מאזן המים של הענף הקטוף, בשל יחסי מקור-מבלע. מהשוואת המדדים הביוכימיים של ענפים וגטיביים לעומת ענפים נושאי פירות, נמצאו הבדלים משמעותיים ביניהם. ענפים נושאי פירות צברו פרולין בעלים במהלך 7 ימים באגרטל, בעוד שבענפים וגטיביים תכולת הפרולין כמעט ולא השתנתה (איור 27A). ענפים נושאי פירות הכילו פחות סוכרים מסיסים (איור 27B) ופחות עמילן (איור 27C) ביום הקטיף לעומת ענפים וגטיביים, אך לאחר 7 ימים באגרטל תכולת הסוכרים המסיסים והעמילן הייתה דומה בשניהם. על מנת לבחון את השפעת נוכחות הפירות בענף על תכולת הסוכרים בעלים, בוצע ניסוי בו הוסרו הפירות, ונבדקה תכולת הסוכרים בעלים במהלך חיי האגרטל. בהשוואה לענפי הביקורת, הסרת הפירות הקטינה את הירידה בתכולת העמילן (איור 28A), וגרמה לעליה בתכולת הסוכרים המסיסים בעלים במהלך חיי האגרטל (איור 28B). יש לציין שגם לאחר 14 יום רמת הסוכרים המסיסים לאחר הסרת העלים הייתה גבוהה באופן מובהק.

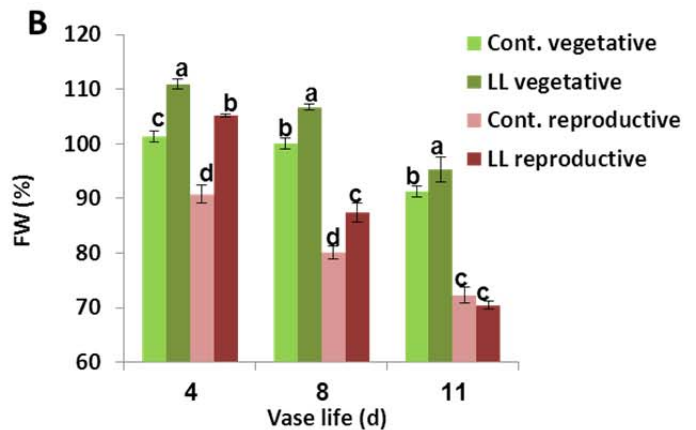
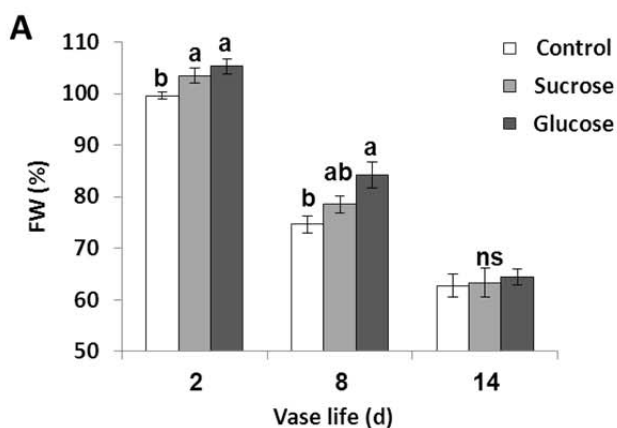
כדי לבחון את השפעת הסוכרים על מאזן המים בענף כטיפול להארכת משך חיי האגרטל, נבדקה ההשפעה של הטענה של ענפי דודונאה 'דנה' בסוכרים, או של אספקה מתמשכת של סוכרים בתמיסת האגרטל. השפעת ההטענה בסוכר נבחנה על מאזן המים בענפים נושאי פירות, ואילו השפעת נוכחות הסוכר בתמיסת האגרטל נבחנה על מאזן המים בענפים נושאי פירות בהשוואה לענפים וגטיביים. בניסויים, הן בהטענה בסוכרוז או גלוקוז (איור 29A) והן באספקה מתמשכת של גלוקוז בתמיסת האגרטל (איור 29B), לסוכרים הייתה השפעה חיובית על מאזן המים של ענפים נושאי פירות. לאספקה מתמשכת של גלוקוז באגרטל או הטענה בגלוקוז הייתה השפעה מובהקת במשך 8 ימים באגרטל, ואילו להטענה בסוכרוז הייתה השפעת מובהקת רק במשך 2 ימי אגרטל (איור 29). אספקה מתמשכת של גלוקוז שיפרה באופן מובהק גם את מאזן המים של ענפים וגטיביים (איור 29A).



איור 27: השינויים ברמה של פרולין (A), סוכרים מסיסים (B) ועמילן (C) בעלים של ענפים וגטיביים וענפים נושאי פירות של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 4 חזרות ± שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין שני סוגי הענפים ($P \leq 0.05$).



איור 28: השפעת הסרה של פירות על רמת העמילן (A) והסוכרים המסיסים (B) בעלים של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 4 חזרות \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מציינות הבדלים מובהקים בין הטיפולים ($P \leq 0.05$).



איור 29: השפעת הטענה של ענפים נושאי פירות בסוכר (A) ונוכחות סוכר בתמיסת האגרטל של ענפים נושאי פירות וענפים וגטיביים (B) על שינויי המשקל של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. ענפים נושאי פירות הוטענו למשך 20 שעות בתמיסת סוכרוז או גלוקוז 5%, ולאחר מכן הועברו לאגרטלים עם תמיסת כלורין אורגני למעקב בחדר תצפית (A). ענפים נושאי פירות וענפים וגטיביים הודגרו בחדר תצפית באגרטלים עם תמיסת גלוקוז 1% (LL) (B). הניסוי בוצע בחודש אפריל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (3 ענפים לחזרה) \pm שגיאות תקן. אותיות שונות מייצגות הבדלים מובהקים בין הטיפולים בכל מועד ($P \leq 0.05$).

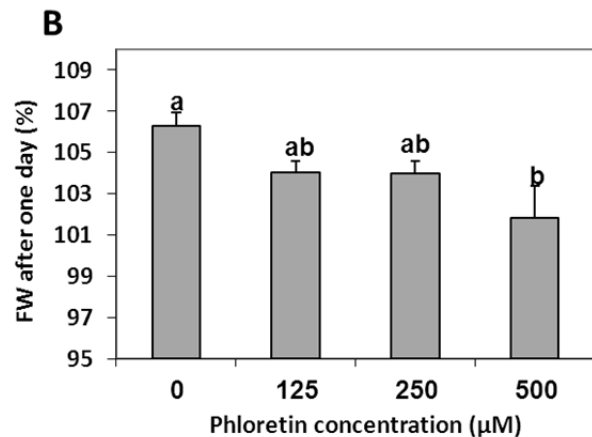
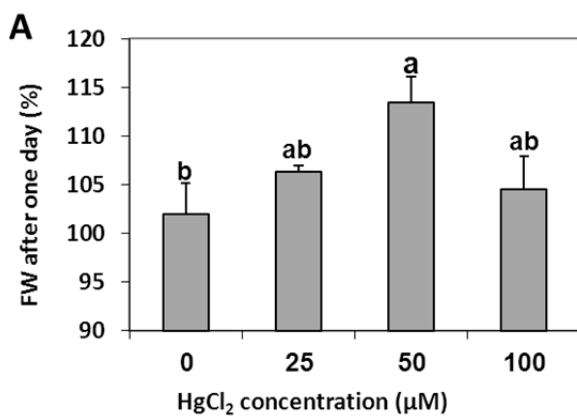
ד.6. שינויים עונתיים בנוכחות ובהפעלה של תעלות מים (אקוואפורינים) והשפעתם על חיי האגרטל

ד.6.1. השפעת מעכבי תעלות מים על מאזן המים בענפי דודנאה

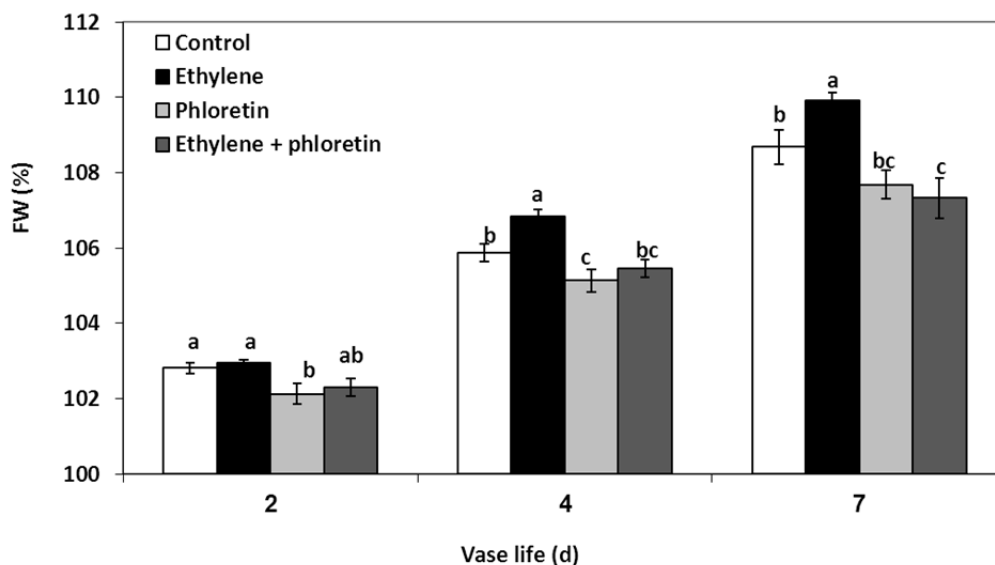
כפי שתואר לעיל, המדדים האנטומיים של העלים הראו קשר ברור למאזן המים של הענפים ביום הראשון באגרטל (איורים 24A, B, C), וכן נמצאו שינויים עונתיים במאזן המים של עלים מנותקים בימים הראשונים באגרטל (איור 17). לאור זאת, נבחנה אפשרות נוספת להסביר את ההבדלים העונתיים במאזן המים של ענפי דודנאה 'דנה' בימים הראשונים באגרטל באמצעות הפעילות של תעלות מים בעלים (Kaldendhoff et al., 2008).

על מנת לברר האם תעלות מים מעורבות ביחסי המים של ענפי דודנאה, נבדקה תחילה ההשפעה של שני מעכבים של תעלות מים, פלורטין וכספית, על מאזן המים של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה' במשך יום אחד באגרטל. מהתוצאות המוצגות באיור 30A ניתן לראות, שכספית השפיעה על קליטת המים של הענפים, כאשר ריכוז של $50 \mu\text{M}$ הגדיל באופן מובהק את משקל הענפים בהשוואה לענפי הביקורת ולענפים שהוטענו בריכוז כספית של $25 \mu\text{M}$. לעומת זאת, הטענה בכספית בריכוז של $100 \mu\text{M}$ לא שינתה את משקל הענפים באופן מובהק, כנראה בשל מינון גבוה מדי של החומר. הטענה בפלורטין, לעומת זאת, הקטינה את משקל הענפים, כאשר הטענה בריכוז הפלורטין הגבוה ביותר, $500 \mu\text{M}$, גרמה לירידה מובהקת במשקל הענפים בהשוואה לזה של ענפי הביקורת (איור 30B). נראה לכן, כי בדודנאה ישנן תעלות מים הרגישות לפלורטין ואינן רגישות לכספית.

מכיוון שנמצא, שלחשיפה לאתילן הייתה השפעה חיובית על מאזן המים של ענפי דודנאה 'דנה' (איור 12), וישנם דיווחים בספרות כי אתילן משפיע על תעלות מים (Xue et al., 2009), נבחנה האפשרות שהשפעת אתילן על מאזן המים נעשית באמצעות השפעתו על הפעילות של תעלות המים. לצורך זה בחנו את ההשפעה של אתילן עם וללא פלורטין. מהתוצאות המוצגות באיור 31 ניתן לראות, שכבר ביום השני לחיי האגרטל, פלורטין הקטין את משקל הענפים באופן מובהק, אך הטיפול המשולב של אתילן ופלורטין לא היה שונה מהביקורת. ביום 4 של חיי האגרטל אתילן הגדיל את משקל הענפים באופן מובהק ופלורטין הקטין את משקלם באופן מובהק. גם במועד זה השילוב של שני החומרים לא היה שונה מהביקורת. לאחר שבוע באגרטל השפעת אתילן בהגדלת משקל הענפים בלטה אף יותר, ואילו השפעת הפלורטין לא הייתה מובהקת, אך הטיפול המשולב הקטין באופן מובהק את משקל הענפים בהשוואה לענפי הביקורת, והענפים כמשו. נראה לכן, שמעכב תעלות המים ביטל לחלוטין את ההשפעה החיובית של אתילן בהגדלת משקל הענפים במהלך חיי האגרטל.



איור 30: השפעת ריכוזים שונים של מעכבים של תעלות מים, HgCl₂ (A) ופלורטין (B), על שינויי המשקל של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' לאחר יום באגרטל. הענפים הוטענו ביום הקטיף למשך שעות בריכוזים שונים של המעכבים, ולאחר מכן הוצבו באגרטלים עם כלורין אורגני בחדר תצפית. השינויים במשקל הענפים בוטאו כאחוז ממשקלם ההתחלתי שנמדד ביום הקטיף. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (3 ענפים כל אחת) ± שגיאת תקן. אותיות שונות מעל לעמודות מייצגות הבדלים מובהקים בין הריכוזים ($P \leq 0.05$).



איור 31: השפעת אתילן עם וללא נוכחות של פלורטין על שינויי המשקל של ענפי קטיף וגטטיביים של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל. הענפים טופלו ביום הקטיף ב-5 ח"מ אתילן למשך 24 שעות בתוך תאים אטומים ב-20 מ"צ, ולאחר מכן הוטענו במשך שעות ב-500 µM פלורטין והועברו לאגרטלים עם כלורין אורגני בחדר תצפית. השינויים במשקל הענפים בוטאו כאחוז ממשקלם ההתחלתי שנמדד ביום הקטיף. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות (3 ענפים לחזרה) ± שגיאות תקן. אותיות שונות מייצגות הבדלים מובהקים בין הטיפולים בכל מועד ($P \leq 0.05$).

ד.2.6. אפיון של גנים המקודדים לתעלות מים שבודדו מעלים של דודנאה 'דנה'

בעבר לא בודדו גנים המקודדים לתעלות מים בצמחים ממשפחת הסבונניים, אליה שייך הסוג דודנאה. לכן תוכננו תחלים דגנרטיביים, שהסתמכו על רצפים של מספר גנים ממשפחות וסדרות הקרובות לדודנאה, ובעזרתם הצלחנו לקבוע רצפים חלקיים של שלושה גנים של תעלות מים שבודדו מעלים של דודנאה 'דנה' (תמונה 17). הגנים שבודדו שייכים כולם למשפחת ה-PIP, והם גנים המקודדים לתעלות מים הממוקמות בממברנה הציטופלסמטית. רצפי שלושת הגנים שבודדו היו דומים יחסית זה לזה, והראו הומולוגיה גבוהה בטווח של 73-89%.

כאשר הרצפים סודרו בעץ פילוגנטי של תעלות מים מצמחים שונים, שני גנים מוקמו עפ"י הרצפים שלהם בתת-המשפחה של PIP2, ולכן הם הוגדרו כ- PIP2a ו- PIP2b, והגן השלישי מוקם בתת-המשפחה של PIP1 (תמונה 18).

נבחנה ההשפעה של מעכבי תעלות מים, כספית ופלורטין, על ביטוי שלושת הגנים שבודדו (איור 32). ביטוי הגן PIP2a ירד בהשפעת כספית ועלה בהשפעת פלורטין, ואילו ביטוי הגן PIP1 לא הושפע מכספית וירד מעט בהשפעת פלורטין. השפעת המעכבים על ביטוי הגן PIP2b לא הייתה ברורה בשל שגיאות התקן הגדולות, אם כי נראה שלא הייתה להם השפעה בולטת בהשוואה לביקורת.

כאשר נבחנה השפעת יישום אתילן או מעכב הפעילות שלו, 1-MCP, על ביטוי שלושת הגנים של תעלות מים התברר, שאתילן מעכב את הביטוי של PIP2a ו- PIP2b, בעוד ש- 1-MCP הגביר את ביטויים (איור 33). לעומת זאת, 1-MCP עיכב את הביטוי של הגן PIP1, אך לאתילן לא הייתה השפעה מובהקת על ביטויו (איור 33).

>PIP2a

```
ATTGCCGAGTTCATAGCCACCTTGCTCTTCCCTCTACGTAACCGTCCCTACCGTTCATCGGCCACAAGTCCCAGAGCCAGGCCGAAGCCGTGGAG
GCGTTGGCATTCTCGGCATCGCCTGGGCCCTTCGGCGGCATGATCTTTGTCTCGTCTACTGCACCGCCGGCATCTCCGGTGGTACATTAATCCG
GCCGTTGACGTTCCGGCTGCTCCTGGCGAGGAAGGTGTGCTGCTGGTGGCAGCTCTGATGTACATGGTGGCTCAAATGCCCTGGGTGCTATATGTGGT
TTGGGCTGGTGAAGGCCGTTCCAGTCTACTCTACGTGAGATACGAAGGTGGAGCCAAACGCTGAGTGTAGTACAGCAAAGGCCGTCGGG
TGGGCGCCGAGATCATCGGAACTTTGTCTTGGTCTACACCGTCTTCTCTGCCACCGATCCCAAGAGAAGCGCCAGAGACTCCCATGTTCCGGT
TTTGGCACCCATCCCTATTGGGTTGCTGTGTTTCATGGTTCACCTGGCCACCATCCCATCACCGGAACCTGCATCAACCCGGC
```

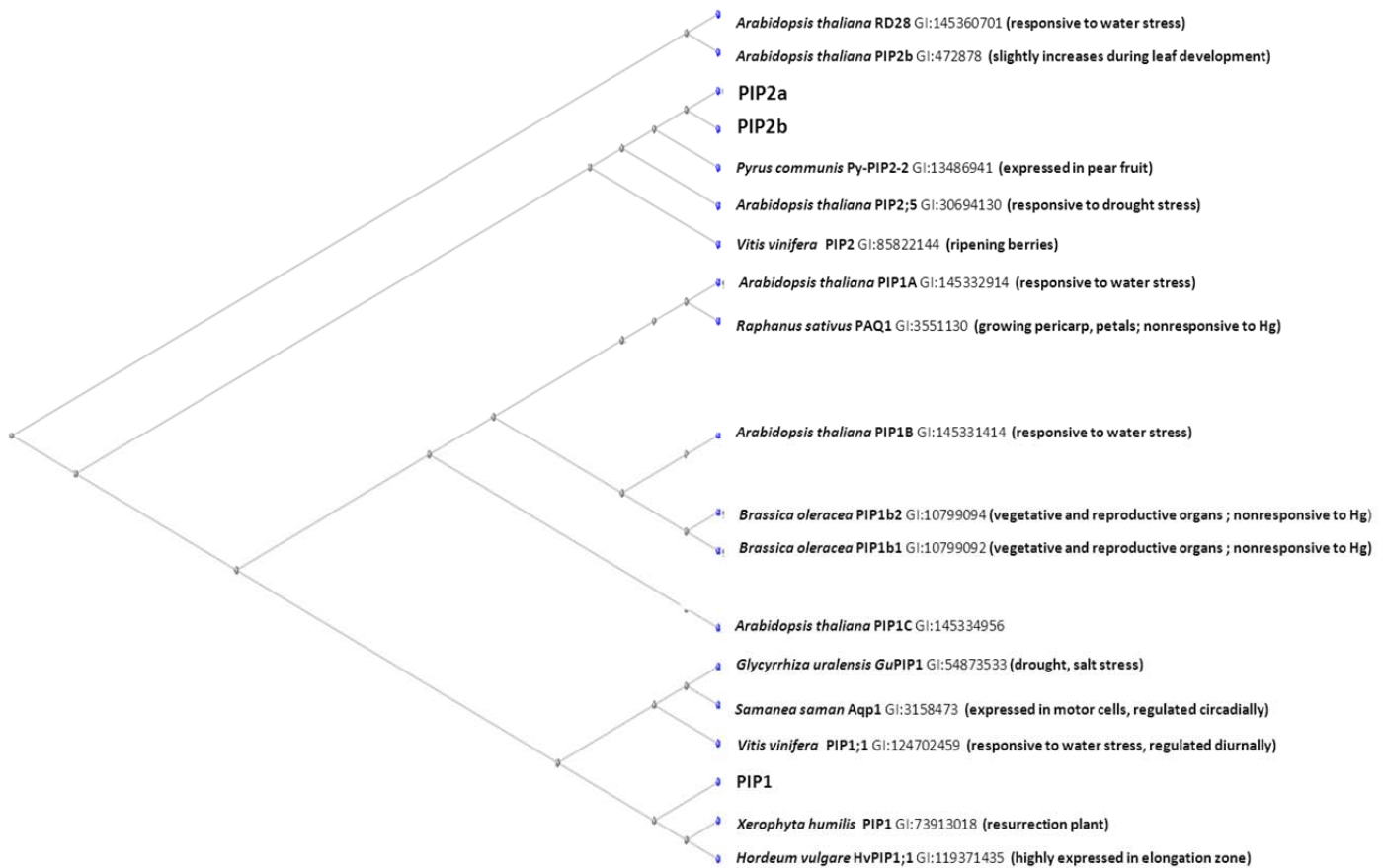
> PIP1

```
CCAGCCCAGAAGACCCAGTGGTTCATCCCAAGCGTGGTCCCTGTTGTAGATGATTGCAGCTCCGAGACTCCTGGCCGGGTGATGCCGGTTCGG
TGATCGGGATGGTCCCAAGTGCACCAAGAACACAGCGAACCCAAATTGGCAGCGGTGCCAAAATAGGAACATGGGAGTCTCTGGCCGCTACGTT
TGGCGTCCGGTGGCGGAGAAGACGGTGTAGACGAGAAGGTGCCGACGATCTCGGCCCAAAGTCCGTCACCTTTGGTGTAGCCAGAATTCA
CAACGTTGGCACCCACCTTTCAGACGCTCGTAATTACCCGATCCTTCGAAGCCCTTCACGACGCCGGCCGCCGAGATTGCTCCAGGCACCTGCAT
CACTATGTAGTACAGCGCTCGTGTACGTGACAGCTTCTCCCAAGGACACAGCCGAAAGTCAACCGCGGGTTGACGTGTCCACCTGAGA
```

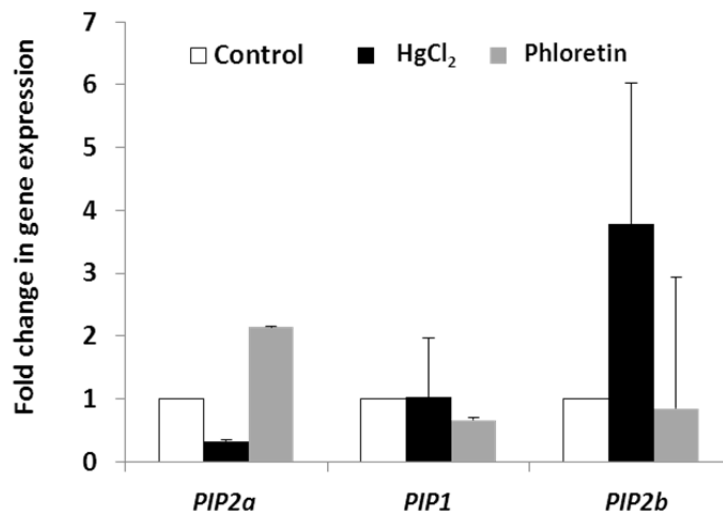
> PIP2b

```
GGCGCCTTCTCTGGGATCGGTGGCAGRGAAGACGGTGTAAAGMCCAAGACAAAAGTTCTGTATGATCTCTGGCGCCCAATCCAACGCCTGTGC
TGTACCCATCACTCAGSGTGTGGCTCCACCTTCGTATCTCACGTAAGAGTGMMSGACGTGGAACGCCCTTACCAGCCCAACWCCACATATAGCA
CCCACGGCATTGAGCCACTCRTGTACATYMRRRGCTCGCACAGCAGACACCTTCTCGCCAGGGAGCAGCCCGGARCGTCAACCGCACGGATT
AATGTNRCCAMCCGGAGATTCCGGCGGTGCAGGTAGACGAGGCCAAAWAGATCATGCCCGCCGAAAGGCCAGGCGATG
```

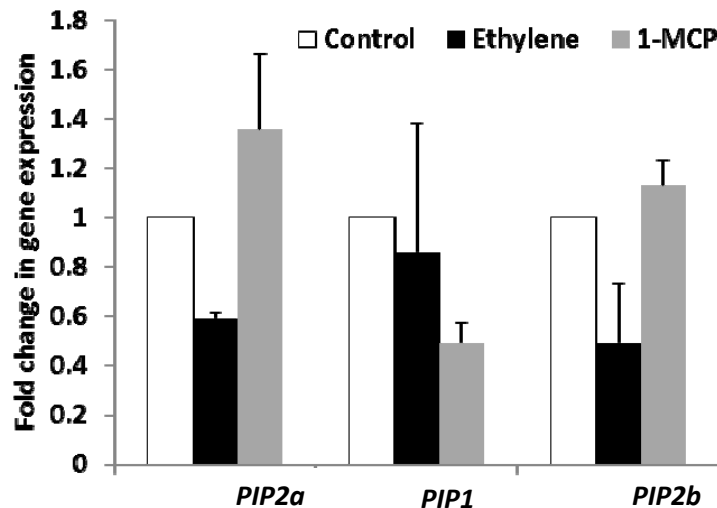
תמונה 17: רצפים חלקיים של שלושה גנים של תעלות מים, שבודדו מעלים של דודנאה 'דנה' ורוצפו במהלך המחקר.



תמונה 18: עץ פילוגנטי של גנים של תעלות מים ממשפחת ה-PIP, המראה את המיקום היחסי של שלושת הגנים המקודדים לתעלות מים, שבודדו מעלים של דודונאה 'דנה' ורוצפו במהלך המחקר.



איור 32: השפעת HgCl₂ ופלורטין על הביטוי של גנים של תעלות מים בעלים של ענפי קטיף וגטיביים של דודונאה 'דנה'. כספית (50 μM) ופלורטין (500 μM) יושמו כמפורט באיור 30 בענפים שמהם בודדו הגנים. רמת ה-mRNA נמדדה בשיטת ה-Real-Time PCR ונורמלה לרמת ה-mRNA של הגן GAPDH (שיטת ΔΔCT). רמת הביטוי בקבוצת הביקורת חושבה כ-1. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 חזרות ± שגיאת תקן.

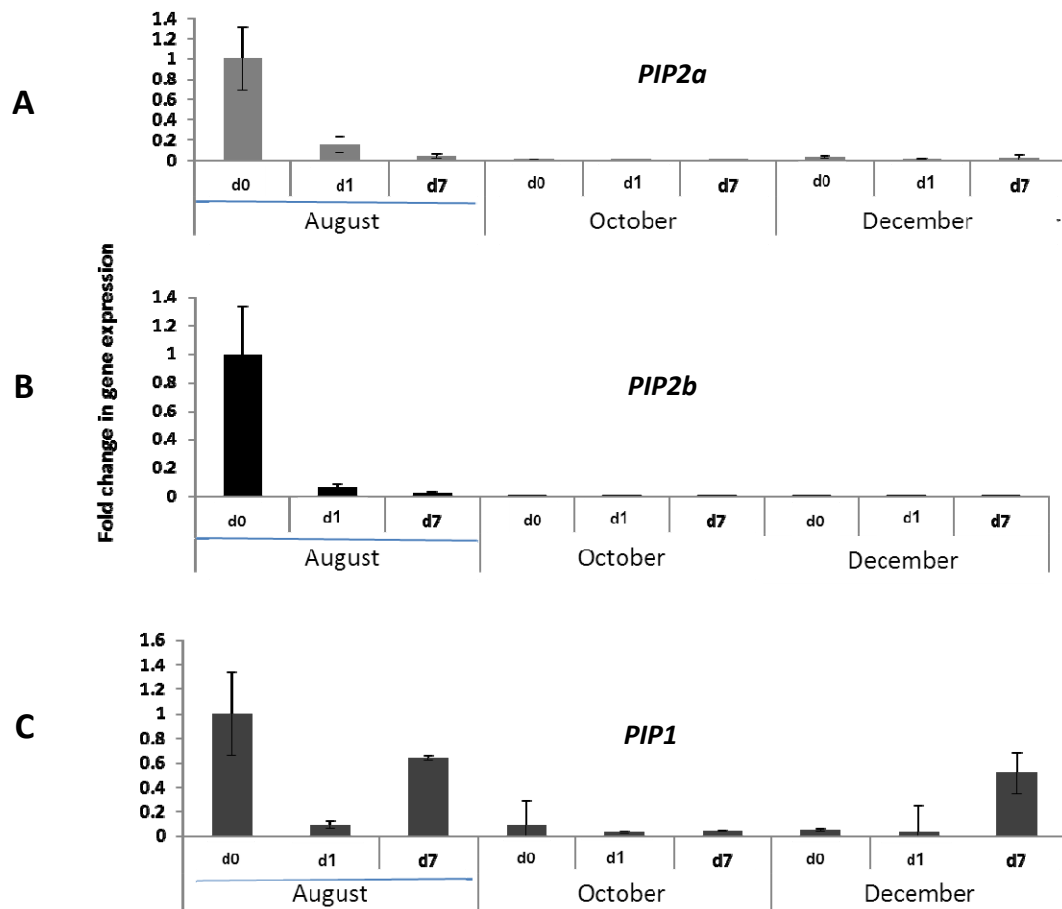


איור 33: השפעת אתילן ו-1-MCP על הביטוי של גנים של תעלות מים בעלים של ענפי קטיף וגטיביים של דודונאה 'דנה'. אתילן (5 ח"מ) ו-1-MCP (0.4 ח"מ) יושמו כמפורט באיור 14 בענפים שמהם בודדו הגנים. רמת ה-mRNA נמדדה בשיטת ה-Real-Time PCR ונורמלה לרמת ה-mRNA של הגן GAPDH (שיטת $\Delta\Delta CT$). רמת הביטוי בקבוצת הביקורת חושבו כ-1. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 חזרות \pm שגיאת תקן.

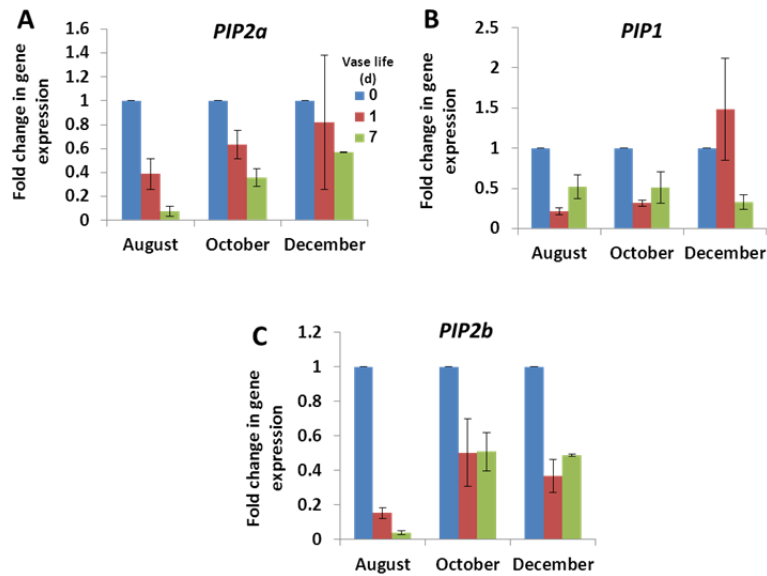
ד.3.6. ביטוי גנים של תעלות מים במהלך חיי האגרטל בעונות שונות

כאשר נבחן הביטוי העונתי במהלך חיי אגרטל של הגנים של תעלות מים בעלים, בלטה מאוד העובדה שהביטוי של שלושת הגנים ביום הקטיף בקיץ היה הגבוה ביותר (איור 34). על מנת לבחון את השינויים בביטוי הגנים במהלך חיי האגרטל, הושווה הביטוי היחסי של כל גן בכל אחד מחודשי הבדיקה, כאשר רמת הביטוי ביום הקטיף (זמן 0) בכל חודש חושבה כ-1 (איור 35). ניתן לראות, כי הביטוי של שלושת הגנים ביום הקטיף היה הגבוה ביותר בכל המועדים. בנוסף, התקבלה ירידה הדרגתית בביטוי הגן *PIP2a* במהלך חיי האגרטל בכל מועדי הבדיקה (איור 35A).

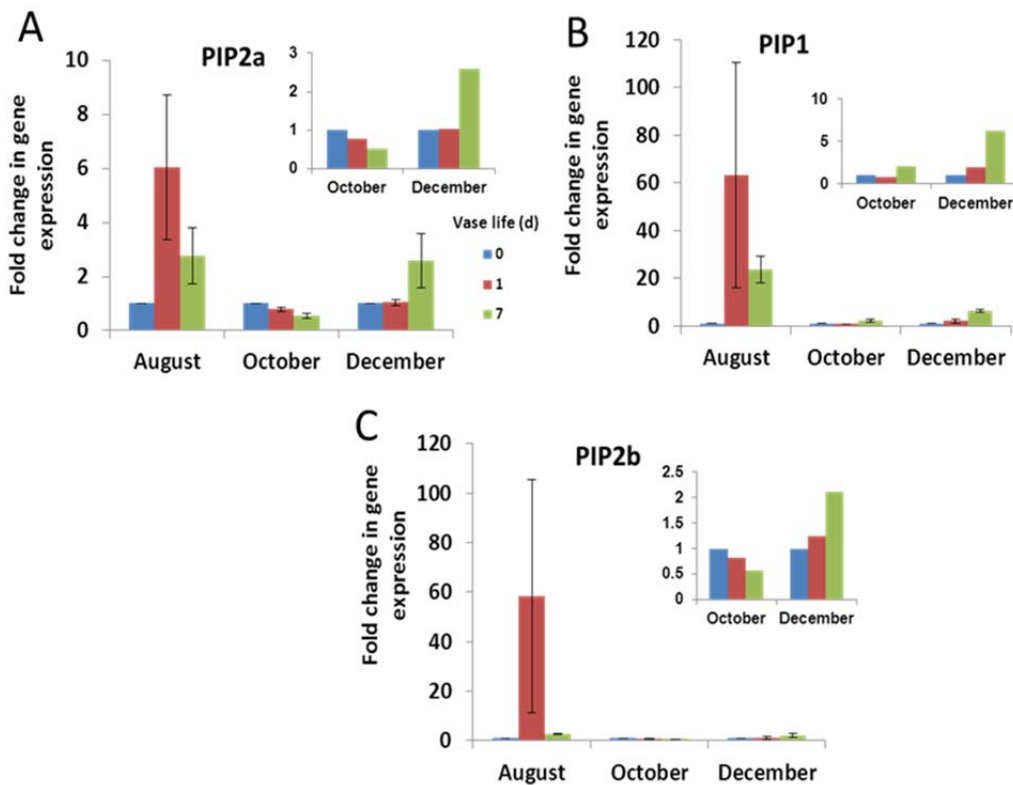
גם הביטוי העונתי במהלך חיי האגרטל של שלושת הגנים של תעלות מים בגבעול היה הגבוה ביותר בקיץ (תוצאות לא מובאות). על מנת לבחון שינויים בביטוי של הגנים שבודדו מהגבעול במהלך חיי האגרטל, הושווה הביטוי היחסי של כל גן בכל אחד מחודשי הבדיקה, כאשר רמת הביטוי ביום הקטיף (זמן 0) בכל חודש חושבה כ-1. התוצאות המוצגות באיור 36 מראות, שלא התקבלה תבנית ברורה בביטוי העונתי של גנים אלו.



איור 34: ההשתנות העונתית של הביטוי של שלושה גנים של תעלות מים בעלים של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל מחושבת ביחס לביטוי בחודש אוגוסט (A-C). רמת ה-mRNA נמדדה בשיטת ה-Real-Time PCR ונורמלה לרמת ה-mRNA של הגן GAPDH (שיטת $\Delta\Delta CT$). רמת הביטוי ביום הקטיף בחודש אוגוסט חושבה כ-1. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 חזרות \pm שגיאת תקן. ימי האגרטל (d) מצוינים בכל חודש בדיקה.



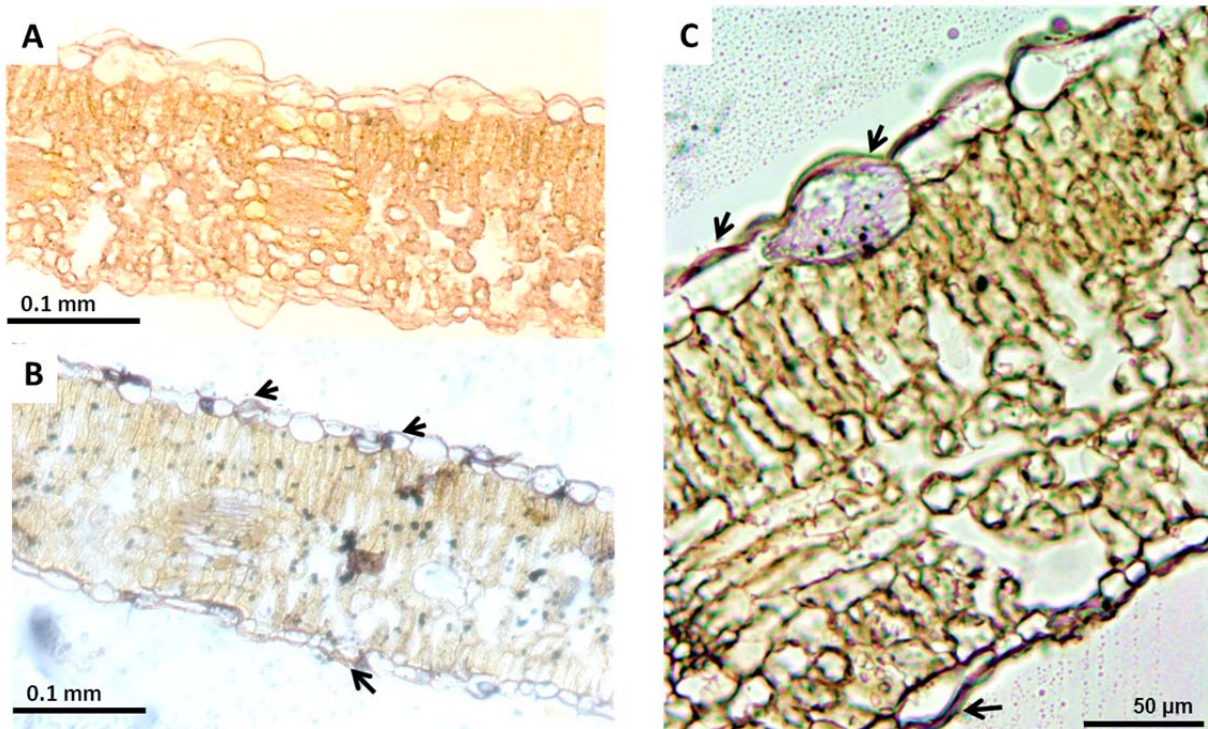
איור 35: ההשתנות העונתית של ביטוי של שלושה גנים של תעלות מים בעלים של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה' במהלך חיי האגרטל מחושבת לכל חודש בנפרד (A-C). רמת ה- mRNA נמדדה בשיטת ה- Real-Time PCR ונורמלה לרמת ה- mRNA של הגן GAPDH (שיטת $\Delta\Delta CT$). רמת הביטוי ביום הקטיף בכל אחד מהחודשים המצוינים בגרפים חושבה כ- 1. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 חזרות \pm שגיאת תקן.



איור 36: ההשתנות העונתית של ביטוי של שלושה גנים של תעלות מים בגבעול של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה' במהלך חיי אגרטל, מחושבת לכל חודש בנפרד (A-C). רמת ה- mRNA נמדדה בשיטת ה- Real-Time PCR ונורמלה לרמת ה- mRNA של הגן GAPDH (שיטת $\Delta\Delta CT$). רמת הביטוי ביום הקטיף בכל אחד מהחודשים המצוינים בגרפים חושבה כ- 1. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 חזרות \pm שגיאת תקן. d = ימי אגרטל.

ד.4.6. מיקום הגן *PIP2a* בעלה

על מנת לנסות להבין את אופן פעולתו של הגן *PIP2a*, נבדק המיקום של ביטוי בחתך רוחב של עלה דודנאה בשיטת *In situ* hybridization. לשם כך, חתכי רוחב של העלה הודגרו עם סמן ולאחר מכן עם נוגדן כנגד הגן המסומן *PIP2a* ונצבעו להסתכלות מיקרוסקופית. מהתוצאות המוצגות בתמונה 19 ניתן לראות, כי הגן *PIP2a* מתבטא באפידרמיס של העלים.



תמונה 19: תמונת *In situ* hybridization בחתך רוחב של עלה של דודנאה, שהתקבלה במיקרוסקופ אור, המראה את המיקום של ביטוי הגן *PIP2a* בשתי הגדלות (B, C) בהשוואה לחתך רוחב בעלה ביקורת ללא הסמן של הגן (A). החיצים בתמונות B ו-C מצביעים על מיקום הגן באפידרמיס עפ"י הצביעה הספציפית.

ה. דיון ומסקנות

העבודה הנוכחית עסקה בלימוד הסיבות לכמישה העונתית של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה'. בשל העלים והפירות הדקורטיביים, דודונאה 'דנה' היא בעלת פוטנציאל מסחרי גבוה לשיווק כענף קישוט קטוף. אולם הסתבר שענפי קטיף של דודונאה כומשים לאחר זמן קצר באגרטל, בעיקר בשלב בו הם נושאים פרחים ופירות, וכן כשהקטיף של ענפים וגטיביים נעשה בעונת החורף. כך, ענפים שנקטפו בחורף כמו כבד לאחר 6 ימים באגרטל, בעוד שבקיץ הענפים כמו רק לאחר 3 שבועות, למרות שהצמחים גדלו כל השנה בהשקיה סדירה.

מאחר ואיכות הענפים במהלך חיי האגרטל מושפעת ישירות ממאזן המים בענף הקטוף, המשתנה מעונה לעונה, הנחת העבודה שלנו גרסה, שישנה השפעה של טמפרטורת הסביבה על מבנה מערכת ההובלה והפיסיולוגיה, ומכאן על מאזן המים של הענף הקטוף. המחקר התמקד בבחינה של שלושה כיוונים עיקריים, העשויים להסביר את ההבדלים במאזן המים של ענפי קטיף בחיי האגרטל שנצפו בעונות שונות ובשלב התפתחות שונים: (א) אנטומיה פונקציונאלית (מבנה העלים ומבנה העצה) של הענפים במהלך השנה, העשויים להשפיע על הולכת המים; (ב) שינויים בהתאמה האוסמוטית (הצטברות סוכרים מסיסים ופרולין) של הענפים במהלך חיי האגרטל. זאת, מאחר ועליה בפוטנציאל האוסמוטי מעודדת קליטה של מים; (ג) פעילות של תעלות מים (Aquaporins) במהלך חיי האגרטל בעונות שונות, העשויה להשפיע על מאזן המים. בנושא זה נבחנה השפעת מעכבים של אקופורינים על מאזן המים בענפים, וכן מידת הביטוי של גנים המקודדים לאקופורינים בעלים ובגבעולים במהלך חיי האגרטל.

ה.1. אפיון אנטומי ופיסיולוגי של ענפי דודונאה 'דנה' קטופים במהלך חיי האגרטל

ה.1.1. המבנה האנטומי

מכיוון שהמכלול דודונאה 'דנה' לא נחקר בעבר, לא קיים ידע אנטומי ופיסיולוגי בסיסי לגביו. היות ולמבנה האנטומי ישנה, כאמור, חשיבות רבה לגבי מאזן המים בצמח, נלמדה האנטומיה של זן זה. הסתבר, כי המבנה האנטומי של דודונאה 'דנה' דומה למבנה של מיני דודונאה אחרים המתוארים בספרות המדעית (Liu and Noshiro, 2003).

בחתי יד ובחתיים במיקרוטום עץ שנעשו בגבעולים של דודונאה 'דנה' נמצא, שהעצה היא בעלת נקבוביות מפורזת, עם טבעות גדילה לא סדירות ומטושטשות, בדומה למיני דודונאה אחרים (Metcalf and Chalk, 1965; Patel, 1975; Liu and Noshiro, 2003). הגבעול הוא בעל צינורות הובלה מעטים יחסית ובעל סיבים מרובים (תמונות 2A, B ו-3). ידוע, כי סיבים מספקים תמיכה לצמח, ובנוסף מונעים קריסה והתעקלות של צינורות ההובלה בתקופות של יובש (Sperry et al., 2005; Jacobsen et al., 2006). לכן, ניתן לראות בתכונה של ריבוי סיבים התאמה לעקת יובש.

בדוגמאות של גבעולים שעברו מצרציה נמצא, כי חוליות הטרקיה של דודונאה 'דנה', בדומה לדודונאה דביקה (Patel, 1975), הן בעלות לוח מנוקב פשוט וגמצים מתורבצים (תמונה 2C). לוח מנוקב פשוט הנו היעיל ביותר מבחינת הובלת המים בענף, מכיוון שהוא מאפשר מעבר מים חופשי בין שני צינורות הובלה סמוכים (Sperry et al., 2006). לגמצים המתורבצים יש יתרון בהגנה מפני כניסת בועות אויר לצינור

ההובלה, מכיוון שהמבנה שלהם מונע מתיחה ואף קרעים של ממברנת הגומץ (Sperry and Hacke, 2004). מכאן, שהמבנה האנטומי של חוליות הטרכיאה בענפי דודונאה 'דנה' הנו יעיל ומאפשר להם עמידות לעקת יובש.

נראה, כי גם העלים של דודונאה 'דנה' הנם בעלי מאפיינים קסרומורפיים מסוימים, העוזרים להם להתגבר על עקת יובש. העלים הנם קשיחים ומכוסים בשכבת שעווה עבה, שיכולה להגן עליהם מפני איבוד מים לא מבוקר (תמונה 4). תאי האפידרמיס מלאים בפקטין (תמונה 6), בדומה לעלים של צמחים אחרים ממשפחת הסבונניים (Metcalf and Chalk, 1965). העלים הנם בעלי טריכומות (שערות) בלוטיות משני צידי העלה, בהן נראה תוכן תוך-תאי לא מזוהה (תמונה 7). לפי (Metcalf and Chalk, 1965), הטריכומות במשפחת הסבונניים מכילות לעתים קרובות ספונגים, ויתכן שגם הטריכומות בדודונאה 'דנה' מכילות חומרים אלו. בהתאם לספרות (Fahn, 2000), החלק החיצוני של כל טריכומה מפרישה בדודונאה עשיר בפקטין (תמונה 7B). בעלים, מופיעות שתי שכבות של תאי עמודים עם סיבים מרובים מסביב לצורות הצינורות (תמונה 4). בדומה לרובם המוחלט של צמחים ממשפחת הסבונניים (Metcalf and Chalk, 1965), גם בעלי דודונאה 'דנה' הפיוניות ממוקמות רק בצד האבקסיאלי (תחתון) של העלים (תמונה 4). הקצוות של צינורות ההובלה בעלים מסתיימים באלמנטים חופשיים (תמונה 5).

בספרות ישנם דיווחים סותרים לגבי הימצאות טילות בדודונאה. דווח על נוכחות של טילות בודדות בעצה של דודונאה דביקה (Metcalf and Chalk, 1965), אולם במחקר אחר לא נצפו טילות כלל בצמח זה (Patel, 1975). בעבודה הנוכחית לא נמצאו סתימות פיסילוגיות או טילות בצינורות ההובלה של דודונאה 'דנה'. כלומר, ענפי דודונאה 'דנה' כומשים באגרטל מסיבות אשר אינן קשורות בסתימות פיסיות בצינורות ההובלה. יחד עם זאת יש לציין, שבפטוטורות העלים נמצאו סתימות בודדות (תמונה 10), אם כי במספרים כה קטנים, שקרוב לודאי שהשפעתן על מאזן מים זניחה.

ה.2.1. מהלך חיי האגרטל

המהלך הטיפוסי של חיי האגרטל של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה' מוצג באיור 2. ענפי הקטיף עלו במשקלם במשך 7 ימים, ולאחר מכן איבדו ממשקלם עד לכמישתם המוחלטת. עקומת שינויי המשקל במהלך חיי אגרטל של ענפי דודונאה 'דנה' הנה עקומה אופיינית של חיי אגרטל, הדומה לזו של ענפי קטיף אחרים, כמו ורדים מזנים שונים (Ichimura et al., 2002) או חרציות (Van Meeteren, 1992). גם בענפי קטיף מעוצים, כמו אקליפטוס (Ferrante et al., 2002), פרח שעווה (Joyce and Jones, 1992) ו-*Thryptomene calycina* (Jones et al., 2003), התקבלו עקומות דומות של שינויי משקל במהלך חיי האגרטל. מבחינה זאת, ענפי דודונאה יכולים לשמש מודל לענפי קטיף הסובלים מכמישה. יחד עם זאת נמצא, שבדודונאה 'דנה' מהירות הכמישה באגרטל לא הייתה זהה בכל העונות, והיא השתנתה בהתאם לעונת הקטיף ולשלב ההתפתחותי של הענפים.

ה.3.1. הסיבה לכמישת ענפי דודונאה 'דנה' קטופים באגרטל

עלים צעירים מהווים מבלע חזק הן לסוכרים והן למים. לכן, אחת הדרכים של הצמח השלם להתמודד עם עקת מים הנה עיכוב גדילה של עלים חדשים ו/או השרת עלים קיימים, דבר המאפשר לצמח לשרוד

תקופת יובש ארוכה יחסית (Ludlow, 1989). יחד עם זאת, לא נמצאו בספרות דיווחים על עיכוב גדילה בענפים קטופים. בדודונאה 'דנה', העלים הצעירים של ענפים קטופים המשיכו לגדול במהלך השבוע הראשון של חיי אגרטל, עד לקבלת הגודל הסופי (איור 3). לכן ניתן היה לשער, שגדילת העלים באגרטל עלולה לגרום לכמישתם. יחד עם זאת, בעונת החורף בה התרחשה הכמישה הגדילה באגרטל הייתה מועטת, בעוד שבעונת הקיץ, בה לא נצפתה כמישה, העלים הצעירים המשיכו לגדול. נראה לכן שעייכוב גדילה אינו מהווה אמצעי להתמודדות עם עקת יובש בענפי קטיף של דודונאה 'דנה'. בזמן הקטיף הענפים עוברים פגיעה ובמקביל ניתוק של הרצף הטבעי של צינורות ההובלה. בעקבות הקטיף יכולה להתעורר תגובה של הזדקנות מואצת (Reid, 1995), ואילו נתק ברצף העצה יכול לגרום לעקת מים (Van Doorn, 1997; Van Meeteren et al., 2001). לכן, כמישת ענפים קטופים באגרטל יכולה לנבוע מהזדקנות מואצת של הענפים לאחר הקטיף, או לחילופין, מהובלת מים לקויה. במהלך ההזדקנות ישנה עלייה במוליכות הממברנות, הגורמת לזליגת מומסים מהתאים, וכן פירוק של כלורופיל הגורם להצהבת עלים (Sacher, 1973). כאשר נערך מעקב אחר מדדים אלה בענפי קטיף של דודונאה 'דנה', הסתבר, כי דליפת המומסים מהתאים (איור 4A) וריכוז הכלורופיל בעלים (איור 4B) לא השתנו בצורה משמעותית במהלך חיי האגרטל. כלומר, עלי דודונאה 'דנה' אינם מראים סימנים של הזדקנות, למרות שהם מראים סימנים של כמישה. כדי לאמת ממצאים אלו, בוצע ניסוי בו הוצבו ענפים קטופים של דודונאה 'דנה' באגרטלים בחדר תצפית מבוקר וכוסו בשקיות פוליאיתילן שקופות להורדת קצב הטרנספירציה. בתנאים אלו מאזן המים של הענפים הוא מיטבי, ולכן כמישה בתנאים אופטימאליים כאלה תצביע על הזדקנות מואצת של הענף. תוצאות הניסוי הראו, שהענפים שכוסו בשקיות פוליאיתילן לא כמשו בהשוואה לענפי הביקורת. כיסוי הענפים שיפר את מצבם באופן מובהק הן מבחינת איבוד המשקל והן מבחינת הטרנספירציה (איור 5B), וגם תכולת המים היחסית (RWC) של העלים בענפים המכוסים הייתה גבוהה באופן משמעותי מזו של העלים בענפי הביקורת במשך 13 ימים באגרטל (איור 5C). משני ניסויים אלה ניתן להסיק, כי כמישת ענפי דודונאה 'דנה' קטופים נובעת מבעיה בהובלת המים, ואיננה תוצאה של הזדקנות.

חיזוק נוסף למסקנה זו ניתן לקבל מההזדקנות יוצאת הדופן של ענפי דודונאה 'דנה' קטופים. ענפי קטיף של דודונאה 'דנה' לא הראו התנהגות קלימקטרית מבחינת ייצור אתילן אנדוגני ונשימה במהלך חיי האגרטל (איור 14), ולא הגיבו בהזדקנות מואצת לאתילן חיצוני (איור 12). יתר על כן, לאתילן הייתה אף השפעה חיובית על ענפי דודונאה, שכן חשיפה לאתילן חיצוני גרמה להגדלת משקל הענפים ולשמירה על משקל גבוה זה לאורך חיי האגרטל (איור 12). לכן, תוצאות אלה מחזקות את המסקנה, שכמישת ענפי דודונאה 'דנה' קטופים אינה נובעת מהזדקנות מואצת, אלא קשורה למאזן מים לקוי.

ה.1.4. היווצרות אמבוליה

בניסויים שנערכו במחקר זה נמצא, כי גבעולים של ענפי דודונאה קטופים רגישים לאמבוליה (תמונה 12). ידוע, כי בענפים קטופים אוויר יכול לחדור לתוך צינורות ההובלה בזמן הקטיף, כתוצאה מפגיעה בשלמות הדפנות, או באמצעות קליטה של תמיסת האגרטל בה מצוי אוויר (Canny et al., 2007). בדודונאה 'דנה', רמת האמבוליה בענפי קיץ הייתה דומה בשני קטעי הענף שנמדדו בתחילת חיי האגרטל, והיא עלתה עם הזמן בחלק התחתון אשר היה טבול בתמיסה (איור 7A). כלומר, האוויר לא נכנס לצינורות ההובלה מתוך

התמיסה, אלא היה קיים בהם קודם לכן. לכך יכולות להיות שתי אפשרויות: 1) האוויר נכנס לצינורות ההובלה בזמן הקטיף; 2) צינורות ההובלה של הענפים היו מלאים באוויר עוד לפני הקטיף. לפי הספרות, רמת האמבוליה של צמחים בשדה יכולה להשתנות במהלך היממה. למשל, בורדים רמת האמבוליה הייתה הגבוהה ביותר בשעות הצהריים של ימים חמים, ולכן ורדים אשר נקטפו במועד הזה כמשו מהר יותר (Van Doorn and Suiro, 1996). יתכן כי גם בדודנאה 'דנה' קטיף בשעות מוקדמות עשוי לתרום להארכת חיי האגרטל.

במעקב אחרי הקינטיקה של האמבוליה בענפי קיץ של דודנאה במשך 17 יום נמצא, כי במקטעי הגבעול שהיו מחוץ לתמיסת האגרטל (30 ס"מ מהקודקוד) רמת האמבוליה במהלך חיי האגרטל הייתה גבוהה יותר מזו שבקטע הטבול במים (40 ס"מ מהקודקוד) (איור 7A). רמת האמבוליה במהלך חיי האגרטל נשארה דומה בקטע הטבול במים (איור 7A), מכיוון שהבועות המשיכו להתמוסס כנראה בתמיסת האגרטל, שכן הצינורות והכלי היוו כלים שלובים. לעומת זאת, בקטע שהיה מחוץ לתמיסת האגרטל רמת האמבוליה עלתה לאחר שבוע באגרטל (איור 7A). סביר להניח שהאוויר נכנס לצינורות ההובלה מהליבה, אשר הייתה מלאה באוויר (איור 7D).

בספרות מוצע מודל לגבי התקדמות האמבוליה בפרחי חרציות קטופים, המתייחס לקרבה לחתך (Van leperen et al., 2002). חוקרים אלו טענו, כי בענף קטוף קיימת אמבוליה התחלתית, אשר מתמוססת בשני שלבים. השלב הראשון מתרחש בשניות הראשונות לאחר הכנסת הענף לתמיסה, בו הצינורות הצמודים לחתך מתמלאים במים ונוצר רצף מים בצינורות. במהלך השעות הבאות חלק מהאוויר שבצינורות היותר רחוקים מהחתך מתמוסס במים, וישנו תיקון חלקי של האמבוליה. לפי המודל הזה, הצינורות הרחבים מתמלאים מחדש פחות מהצינורות הצרים, והצינורות הרחוקים ממקום החתך מתמלאים רק חלקית. עם זאת, המודל הנ"ל מתייחס רק לשעות הראשונות של חיי האגרטל, בעוד שבניסוי שבוצע בעבודה הנוכחית המעקב אחר האמבוליה במהלך חיי האגרטל נמשך 17 יום.

ה.5.1. תנודות יומיות במאזן המים

עבודות רבות הראו, כי בעצה של מינים שונים ישנה מחזוריות יומית של לחץ העצה (Shneider et al., 1999; He and Joyce, 2007), של היווצרות והיעלמות בועות אוויר (Zufferey et al., 2011), ושל שינויים במוליכות ההידראולית (Zwieniecki and Holbrook, 1998). יחד עם זאת, בעבר לא נעשו בדיקות של תנודות יומיות במאזן המים של ענפי קטיף.

במחקר הנוכחי נמצא, כי בתנאים של פוטופריודה רגילה קיימות בענפי קטיף של דודנאה 'דנה' תנודות קבועות בקצב קליטת המים, אשר התבטאו בתנודות במשקל הענפים (איור 9A) ובשינויים בקצב הטרנספירציה (איור 9B), כאשר שיא קליטת המים היה בסביבות השעה 16:00 והקליטה הנמוכה ביותר הייתה בסביבות 9:00. התנודות נשמרו לאורך שלושה ימי המדידה בצורה מדויקת. יחד עם זאת, כאשר הענפים הודגרו במשטר של הארה רציפה, התנודות בשני המדדים לא היו עם דפוס קבוע (איור 9). כלומר, התנודות של קליטת המים אינן צירקדיות ודורשות אות סביבתי על מנת להתקיים. לעומת זאת, כאשר ענפי דודנאה הודגרו במשטר הארה הפוך (12 שעות חושך / 12 שעות אור), תזמון התנודות היומיות של קליטת מים והטרנספירציה היה הפוך (איור 10). נראה באופן ברור, כי מפתח הפיוניות תאם את השינויים

בקצב הטרנספירציה היומי של ענפי הטיפול וענפי הביקורת. כלומר, הפוטופיריודה הנה הגורם האחראי לתנודות היומיות בקליטת המים של ענפי דודנאה 'דנה' קטופים.

החוקרים אשר עסקו בשינויים היומיים בלחץ העצה הניחו כי הולכת המים משתנה במהלך היממה בעקבות השינויים הסביבתיים. כך הסבירו למשל את התנודות היומיות בלחץ העצה ע"י תנודות של לחות יחסית וטמפרטורה (Shneider et al., 1999) והראו, שלחץ העצה בענפי גרווילאה ומיפורום (*Myoporum*) השתנה בהתאם לשינויים בלחות האוויר (He and Joyce, 2007). לעומת זאת, במחקר הנוכחי המדדים הסביבתיים (טמפרטורה, לחות, עוצמת אור) נשארו קבועים, והגורם היחיד אשר השתנה היה הפוטופיריודה. מסתבר, כי התנודות היומיות במאזן המים נשמרות גם ללא שינויים בלחות ובטמפרטורה, אך הן בהחלט קשורות לפתיחת הפיוניות. כלומר, התנודות היומיות במפתח הפיוניות אינן קשורות ישירות לשינויים סביבתיים, אך הן גורמות לשינויים במאזן המים של ענפי קטיף של דודנאה 'דנה'. בנוסף נמצא, שתנודות אלה במאזן המים אינן צירקדיות, מכיוון שבהארה הציפה התנודות הפסיקו להיות סדירות והיפוך הפוטופיריודה גרם להיפוך מחזוריות התנודות. היפוך הפוטופיריודה גרם גם לשיפור כללי במצבם של הענפים. כלומר, להיפוך הפוטופיריודה יכולות להיות השלכות מעשיות. לעתים קרובות ענפים קטופים מיוצאים לארצות בקווי רוחב שונים, וכתוצאה מכך הפוטופיריודה משתנה. על בסיס הניסויים שעשינו ניתן להניח, ששינויים בפוטופיריודה משפיעים על מאזן המים של הענפים הקטופים. נראה, שבעזרת אור ניתן להפוך את קצב קליטת המים בענפי קטיף ללא קשר לשעה ביום, ולממצא זה יכולות להיות השלכות מעשיות בנושא שמירת ענפי קטיף לאורך זמן. יתכן שזהו גורם שבעתיד יהיה צריך לקחתו בחשבון במשלוחי תוצרת חקלאית קטופה לחו"ל.

ה.6.1. קליטת מים מהאוויר ע"י העלים בתנאים של לחות מלאה

בניסויים באווירה הלחה ענפי הביקורת איבדו 10% ממשקלם הטרי, בעוד שמשקלם הטרי של ענפים אשר הוחזקו בתנאי לחות מלאה עלה בכ- 10% (איור 5A). ההבדל של פי 8 בקצב הטרנספירציה בין ענפים מכוסים לבין ענפי הביקורת (איור 5B) יכול להסביר את העלייה של 10% במשקלם של הענפים המכוסים. יחד עם זאת, מאחר שבתנאי ניסוי אלו של לחות מלאה ותנודות טמפרטורה בחדר התצפית (± 1.5 מ"צ), נראתה הצטברות של מים חופשיים על גבי העלים, נבחנה השאלה האם עלים של ענפי דודנאה יכולים לקלוט ישירות מים חופשיים. כדי לבדוק שאלה זו, בוצעו מספר ניסויים נוספים.

כאשר ענפי דודנאה הוחזקו במבחנות ללא מים במשך שבוע, הענפים כמו שו לחלוטין כצפוי ואיבדו כ- 40% ממשקלם. אולם כאשר הענפים הוחזקו במבחנות ללא מים אך בתנאים של אווירה לחה, משקל הענפים לאחר שבוע נשאר ללא שינוי ממשקלם ההתחלתי (איור 6). כלומר, בתנאים של לחות מלאה משקל הענפים נשאר קבוע, למרות שהענפים איבדו מים בטרנספירציה ולא יכלו לקלוט מים דרך הגבעול. ניסוי זה רומז על האפשרות של קליטת מים ע"י העלים. יש לציין, שגם בניסוי הזה, אדי המים שנפלטו למערכת הסגורה עקב הטרנספירציה התעבו על גבי העלים ועל גבי שקית הפוליאאתילן שהייתה במגע עם העלים.

כדי לאמת את האפשרות של קליטת מים ע"י העלים, בוצעו ניסויים עם הצבען האפופלאסטי קלקופלואור. התוצאות מראות, כי כל שטח האפידרמיס של עלי דודנאה היה חדיר למים, פרט לטריכומות העלים (תמונה 8). בספרות דווח, שאכן טריכומות של מינים רבים אינן חדירות למים (Fahn, 1986). בנוסף נמצא, שהצד התחתון (אבקסיאלי) של העלה העביר מים ביעילות רבה יותר מאשר הצד העליון

(אדקסיאלי) (תמונה 9). דרך הצד האבקסיאלי המים חדרו עמוק יותר לתוך המזופיל ואף הגיעו עד לצרורות ההובלה. ממצא זה תואם את הנתונים של Karbulková et al. (2008), שטענו כי הצד האבקסיאלי (בו נמצאות הפיוניות) חדיר יותר למים בתנאי יובש מאשר הצד האדקסיאלי של העלה. לסיכום נראה, שעלי דודונאה מסוגלים לקלוט מים דרך כל שטח העלה, ואף להעביר את המים לצינורות ההובלה של העלה.

יש לציין, שגם האנטומיה של העלים של דודונאה 'דנה' נראית מותאמת לקליטת מים. האפידרמיס התחתון מורכב מתאים קטנים וצפופים יותר מאשר האפידרמיס העליון (תמונה 4). צרורות ההובלה הרחבים מגיעים עד לאפידרמיס בשני צידי העלה (תמונה 4), ותכונה זו יכולה לאפשר קליטת מים לתוך הצרור. בנוסף, עורקי העלים מסתיימים באלמנטים הפתוחים למזופיל (תמונה 5), ובכך מאפשרים מעבר מים חופשי. כל התכונות האלה גם יחד מאפשרות קליטת מים ע"י העלים של דודונאה 'דנה' בתנאי לחות מלאה, כאשר מים מתעבים על גבי העלים. יש לציין, שקליטת המים ע"י העלים בתנאים המאוד ייחודיים שתוארו לעיל, אינה מהווה דוגמה לקליטת המים בתנאים הרגילים של חיי האגרטל, בהם הענפים מודגרים בתנאי לחות יחסית של כ- $5 \pm 65\%$.

באשר למנגנון הקליטה, צביעה של העלים ב- Ruthenium Red הראתה, כי תאי האפידרמיס בעלה מכילים פקטין (תמונה 6). ידוע כי פקטין הינו הידרוקולואיד המסוגל לספוח מים. לדעתנו, קליטת המים ע"י העלים של דודונאה מתרחשת באמצעות תפיחת הפקטין בתאי האפידרמיס כאשר הוא בא במגע עם מים. הרעיון שלפקטינים יש תפקיד ביחסי המים של צמחים אינו חדש. מוצילגים של זרעים נחקרו רבות בהקשר לכך (פאהן, 1993; Esau, 1965). לעומת זאת, בעלים נושא זה נחקר מעט מאוד. בעבר נחקרו מספר מיני צמחים עם מוצילגים באפידרמיס. נמצא, כי פקטין הינו מרכיב חשוב של תאי האפידרמיס בעלים של *Spartocytisus filipes* (צמח מאיזורים יובשניים של האיים הקנאריים), והוצע שלפקטינים יש תפקיד באגירת וקליטת מים ובהפחתת הנידוף (Lishede 1977a; 1978). גם בגבעולים ירוקים של *Anabasis articulata* ושל *Calligonium comosum* (צמחים מהאזורים המדבריים של ישראל וסיני), נמצאו תאי אפידרמיס עשירים בפקטין (Lishede, 1977b). תאים אלה תפחו במהירות במגע עם מים, אך שיחררו מים באיטיות במהלך דהידרציה עם כוהל.

בעבר נעשתה סדרה של ניסויים בענפים מנותקים של מגוון מינים ונמצא, כי מיני הצמחים שונים זה מזה ביכולת לקלוט מים ע"י העלים (Waisel, 1958). בנוסף נמצא, כי הקינטיקה של מיום מחדש של העלים תלויה במידה רבה במבנה העלים, ובפרט בקשרים בין האפידרמיס לצרורות ההובלה ובהפרדה בין העצה לבין המזופיל (Zwieniecki et al., 2007). לדעתנו, הדבר נכון גם לגבי יכולתם של מיני ענפים שונים לקלוט מים ע"י העלים: ישנה חשיבות רבה לנוכחות הידרוקולואידים באפידרמיס וכן לחיבור בין עורקי העלה לאפידרמיס ולמזופיל. נוכחות הידרוקולואידים, כגון פקטין, מאפשרת את קליטת המים ע"י העלים, אך החיבור בין האפידרמיס לעצה מאפשר את העברת המים לצינורות ההובלה.

קליטת מים ע"י העלווה יכולה לתרום להישרדות הצמח בתנאי יובש. המים הנקלטים ע"י העלים בצמח נשארים בהם ומנוצלים על ידם בתנאים של עקה (Vaadia and Waisel, 1963). קליטת מים ע"י העלים מאפשרת ניצול מים הזמינים בחלקים העל-קרקעיים של הצמח, כגון טל (Stone, 1957; Waisel, 1958), ערפל (Dawson 1998; Burgess and Dawson, 2004) וגשם (Breshears et al., 2008). לסיכום נראה,

כי היכולת לקלוט מים ע"י העלים הינה חלק חשוב ממאזן המים של צמחים באקלים יבש, וכנראה גם בענפים קטופים מסוימים הסובלים מעקת מים באגרטל.

ה.1.1. השפעת אתילן על מאזן המים

בענפי דודונאה 'דנה', טיפול בריכוזי אתילן שונים העלה את משקל הענפים (איור 12), כאשר למעכב הפעילות של אתילן, 1-MCP הייתה השפעה הפוכה (איור 13). אתילן לא השפיע על קצב ההתנדפות, כלומר השפעתו התבטאה בהגברת קליטת מים לתוך הרקמות. הממצאים, שלאיתילן הייתה השפעה חיובית על ענפי דודונאה 'דנה' ואילו טיפול ב- 1-MCP פגע במצב הענפים מפתיעים מאוד, לאור העובדה שבמינים אחרים נצפתה תופעה הפוכה. למשל, טיפול ב- 1-MCP הגביר את המשקל הטרי של ייחורי פטוניה (Serek et al., 1998) ופרחי בורוניה קטופים (Macnish et al., 1999). השפעת ה- 1-MCP במינים אלה נבעה מעיכוב פעילות האיתילן שגרם להזדקנות, בעוד שבדודונאה 'דנה' אתילן לא השרה הזדקנות. חשיפה לאיתילן לא הגבירה את קצב ייצור האיתילן בענפי דודונאה (איור 14A). כלומר, השפעת האיתילן החיצוני על מאזן המים לא נבעה מהגברה של הביוסינתזה של אתילן, אלא דרך סיגנל לא ידוע במסלול האותות של אתילן. לעומת זאת, 1-MCP הגביר באופן מובהק את ייצור האיתילן (איור 14A). תגובה כזאת ל- 1-MCP דווחה במינים רבים, למשל בפרחי מטרסידרוס (Sun et al., 2000) ובעלי כוסברה קטופים (Jiang et al., 2002). ניתן להסביר הגברה זו של ייצור האיתילן בהשפעת 1-MCP בכך ש- 1-MCP מונע את האוטואינהיביציה של ייצור אתילן, ולכן מתחילה ביוסינתזה מוגברת של ההורמון (Blankenship and Dole, 2003).

ההורמון הצמחי אתילן מעורב בתהליכים רבים בצמח, כגון הבשלה והזדקנות, תגובות לעקה ונשירה (Gapper et al., 2005; Barry and Giovannoni, 2006; Meir et al., 2010). ניתן להסיק ממצאי העבודה הנוכחית שבדודונאה 'דנה' אתילן אינו גורם להזדקנות וכמישה, אלה משפר את מאזן המים בענפי הקטיף. מהבחינה הזאת דודונאה הנה ייחודית, שכן לא ידוע לנו על אף ענף קטוף אחר, שבתנאי סביבה נורמלים, ללא עקה, מגיב באופן חיובי לאיתילן. בסריקת הספרות נמצא שלאיתילן יש השפעות חיוביות על מאזן המים בצמח רק בתנאי עקה. כך דווח שאיתילן הגביר קליטת מים בעצי צפצפה (Kamaluddin and Zwiazek, 2002), אשוחית וארזית (Islam et al., 2003) בתנאים של מחסור בחמצן כתוצאה מהצפה. ההשפעה החיובית של אתילן על מאזן המים של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה' יכולה לנבוע מהשפעת אתילן על תעלות מים (אקוואפורינים). אכן קיימים דיווחים בספרות לגבי ההשפעות של אתילן על הפעילות של אקוואפורינים בצפצפה (Kamaluddin and Zwiazek, 2002) ובפרחי ורדים (Ma et al., 2008; Xue et al., 2009).

ה.2. שינויים עונתיים במהלך חיי האגרטל של ענפי דודונאה 'דנה'

ה.2.1. שינויים עונתיים במאזן המים

ענפי קטיף של דודונאה 'דנה' הראו תבנית עונתית של שינויים במאזן המים במהלך 16 ימי אגרטל (איור 16), כאשר התנודות העונתיות לא היו תלויות בטרנספירציה (איור 18). בחודשי הקיץ המשקל הטרי של

הענפים המשיך לעלות במשך השבועיים הראשונים באגרטל, בעוד שבחודשי החורף הענפים התחילו לכמוש כבר בשבוע הראשון באגרטל (איור 17). על מנת לפשט את ניתוח התוצאות, התייחסנו בהמשך רק ליום 1 ו-16 של חיי האגרטל.

שינויי המשקל ביום 1 ו-16 של חיי האגרטל היו במתאם חיובי מובהק עם הטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף (איורים 20A, B). יתרה מכך, משקל הענפים ביום 1 היה במתאם מובהק למשקלם ביום 16 (איור 20C). כלומר, ניתן לחזות את מצב הענפים הקטופים בסוף חיי האגרטל עפ"י משקלם בתחילת חיי האגרטל. תוצאות אלה מצביעות על כך, שמצב הצמחים בשדה משפיע על תפקוד הענפים הקטופים באגרטל.

בספרות ישנם דיווחים על הקשר בין תנאי הגידול של הצמחים לבין התפקוד של הענפים לאחר הקטיף. לפי הערכות מסוימות, 30-70% מאיכות חיי האגרטל נקבעים ע"י תנאי הגידול עד לקטיף (Halevy and Mayak, 1981). ההשפעה נובעת מהשינויים במדדים שונים, כגון עוצמת אור, משקעים, לחות, טמפרטורה וכו'. למשל נמצא, כי פרחי ציניה שגודלו בתנאי יובש היו בעלי משך חיי אגרטל ארוך יותר מאשר פרחים שגודלו בתנאים רגילים (Twumasi et al., 2005). צמחי ורדים, שגדלו בתנאים של לחות נמוכה וטמפרטורה גבוהה, ייצרו פרחים בעלי משך חיי אגרטל ארוך יותר (In et al., 2007). בנוסף דווח, כי תנאי הטמפרטורה, עוצמת האור, הלחות ורמת ה- CO_2 במהלך הגידול השפיעו על משך חיי האגרטל של פרחי פרזיה (Slootweg, 2005). גם התוצאות שהתקבלו עם ענפי דודונאה 'דנה' מצביעות על כך שטמפרטורה גבוהה במהלך הגידול משפרת את תפקוד הענפים במהלך חיי האגרטל.

הטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף נבחרה במחקר זה כמדד המייצג את תנאי הסביבה, שכן צמחי הדודונאה גודלו בחלקה עם השקיה רציפה, ולכן לא נחשפו לעקת יובש במהלך הגידול. בנוסף, צמחי דודונאה אינם רגישים לאורך יום. לכן, הטמפרטורה הייתה הגורם הסביבתי המשתנה החשוב ביותר בצמחים ששימשו לעבודה הנוכחית. בנוסף לכך, הטמפרטורות המקסימאליות ביום הקטיף היו דומות למוצע החודשי של הטמפרטורות היומיות המקסימאליות בכל שנות הבדיקה (טבלה 1), ולכן מדד זה בהחלט מייצג את תנאי הסביבה בתקופת הגידול סמוך לקטיף הענפים.

ה.2.2. שינויים באנטומיה הפונקציונאלית של העלים והגבעולים

ככלל, ענפים קטופים עלולים לסבול מעקת מים במהלך חיי האגרטל, כאשר הסיבות לעקה שונות בין המינים השונים. קליטת מים לקויה יכולה לנבוע מסתימות בצרורות ההובלה, אמבוליה או מקצב טרנספירציה גבוה מדי (Mayak et al., 1974; Van Doorn, 1997; Nijse, 2001). קיימים הבדלים גדולים בתפקוד ההידראולי של ענפי קטיף במהלך חיי האגרטל, ואפילו בין זנים שונים של אותו מין. כך למשל, משך חיי האגרטל נע בין 3.8 ל-14.5 ימים בזני ורדים שונים (Ichimura et al., 2002), בעוד שבזני ורטיקורדיה משך חיי האגרטל נע בין 5 ל-19 יום (Seaton et al., 2009). הבדלים כה גדולים בתגובה לשינויי מבנה מצביעים על קשר הדוק בין המבנה לתפקוד. לכן בחנו את הקשר בין השינויים העונתיים במבנה האנטומי של העצה בגבעולים ובעלים של דודונאה 'דנה' לבין התפקוד ההידראולי של הענפים הקטופים באגרטל.

כאשר נבחנו השינויים במבנה העצה בגבעול במהלך השנה אכן נמצא, כי מבנה העצה השתנה בין חורף לקיץ והיה במתאם מובהק לטמפרטורות העונתיות: בקיץ צינורות ההובלה היו יותר צפופים, יותר צרים

וקצרים (תמונה 14). יחד עם זאת, שינויי הטמפרטורה מסבירים רק כ- 20% מהשונות במדדים האנטומיים של העצה (איור 22), לכן סביר שישנם גורמים סביבתיים נוספים אשר משפיעים על התמיינות העצה, ואולי מעורבים בכך גם גורמים אנדוגניים. בספרות דווח, שלא נמצאו הבדלים במבנה העצה של דודנאה דביקה באזורי אקלים שונים (Liu and Noshiro, 2003), למרות שנבחנו אותם מדדים אנטומיים שנבחנו במחקר הנוכחי. מאחר ודודנאה 'דנה' הנה זן מכלוא של דודנאה דביקה, לא סביר שהאנטומיה של דודנאה דביקה לא השתנתה בתנאים אקלימיים שונים. יש לציין שמחקרם של Liu and Noshiro (2003) היה בעייתי, מכיוון שהם לא השתמשו בחומר צמחי טרי, אלא בחומר עשבייה (Herbarium) אשר נאסף בשנים שונות ובמועדים שונים על ידי אנשים שונים. סביר להניח, שאילו היו אוספים את הדוגמאות באופן מסודר, היו מגלים הבדלים אנטומיים בין אזורי האקלים השונים.

בספרות ישנם דיווחים מגוונים על הקשר בין תנאי הסביבה למבנה האנטומי של העצה. Carlquist and Hoekman (1985) מונים את התכונות האופייניות לעצה של צמחים מאיזורים יובשניים של דרום קליפורניה: צינורות הובלה צפופים ובעלי קוטר צר, חוליות תרכיאה קצרות, נוכחות של טרכאידיים ונקבוביות טבעתית. תכונות אלה מזכירות במידה רבה את עצת הקיץ של דודנאה 'דנה' (תמונה 14B). במחקרים רבים, בדומה למחקר הנוכחי, טמפרטורת הסביבה נמצאה כגורם מרכזי בקביעת הממדים של תאי העצה במינים שונים. כך, בצמחי ציניה, אשר גודלו בתאי גידול בטמפרטורות שונות, הטמפרטורה השפיעה באופן ישיר על אורך הגבעולים, אורך צינורות ההובלה ואורך חוליות התרכיאה (Twumasi et al., 2009). בעצי *Alnus nepalensis*, נמצא מתאם חיובי בין אורך חוליות התרכיאה לבין הגובה מעל פני הים בו גדלו העצים, כאשר לדעתם של החוקרים, הגובה מעל פני הים מקביל לטמפרטורת הסביבה (Noshiro et al., 1994). בניגוד למחקרים אלה, בדודנאה 'דנה', אורך חוליות התרכיאה היה במתאם הפוך לטמפרטורת הסביבה (איור 21F). יש לציין, שציניה הנה מין אירופי ו-*Alnus* הנו עץ הגדל בהרי נפאל, ובמינים אלה האמבוליה מתרחשת בחורף כתוצאה מקיפאון, בניגוד למינים ים-תיכוניים, בהם האמבוליה מופיעה בעיקר בקיץ. לכן בדודנאה 'דנה' ההתאמה לאמבוליה מופיעה בקיץ, בעוד שבמינים של האקלים הממוזג ההתאמה מופיעה בחורף. התאמה זו מתבטאת בקוטר צינורות שונה בין מינים של האזור הממוזג למינים של האקלים הים-תיכוני. מכיוון שקוטר קטן נחשב כהתאמה לאמבוליה, קוטר צינורות ההובלה נמצא במתאם שלילי לטמפרטורת הסביבה במינים הים-תיכוניים, ובמתאם חיובי במינים של האזור הממוזג הקר. כך למשל, במטרוסידרוס (*Metrosideros polymorpha*), אשר נחשף לעתים לטמפרטורות מתחת לאפס, קוטר צינורות ההובלה הראה מתאם חיובי לטמפרטורה (Fisher et al., 2007), ואילו באקליפטוס (*Eucalyptus camaldulensis*), שהוא מין ים-תיכוני, טמפרטורה גבוהה גרמה להקטנת הקוטר של צינורות ההובלה (Thomas et al., 2004). בנוסף דווח, שעקת חום קיצונית שהושרתה ע"י חריכת הצמחים (Charring stress) הקטינה את הקוטר של צינורות ההובלה בשישה מיני עצים טרופיים (Prior and Gasson, 1993).

מאזן המים של ענפי דודנאה קטופים היה במתאם מובהק עם המדדים האנטומיים של העצה (איור 22). משקל הענפים במהלך כל חיי האגרטל היה במתאם שלילי מובהק עם אורך חוליות התרכיאה (איורים 22C, F). חוליות תרכיאה קצרות מגבירות את ההתנגדות לזרימה, ועל ידי כך גורמות למעבר מים פחות

יעיל, אך יותר עמיד לאמבוליה (Sperry et al., 2006). מבחינה תאורטית עלייה בצפיפות הצינורות עשויה לשפר את הובלת המים, וזאת ללא העלאת הסיכון להיווצרות אמבוליה. בפועל, משקל הענפים היה במתאם חיובי מובהק עם צפיפות הצינורות רק ביום 1 של חיי האגרטל (איור 22B). כלומר, במצב של עקה הגברת יעילות ההובלה לא שיפרה את מאזן המים בענף. בנוסף, משקל הענפים היה במתאם שלילי מובהק עם קוטר צינורות ההובלה, אך רק בסוף חיי האגרטל (איור 22D). מדד זה, אולי יותר מכל המדדים האנטומיים האחרים, נחשב כחשוב ביותר מבחינת עמידות הענף לאמבוליה. כך דווח, שבגבעולי חרציות קטופים אמבוליה נוצרה בצינורות הרחבים כבר בלחץ של -6kPa , בעוד שבצינורות הצרים נדרש להיווצרות האמבוליה לחץ שלילי נמוך הרבה יותר של -24kPa (Van Ieperen et al. 2001; Meeteren et al., 2001). בנוסף נמצא, כי התמוססות האמבוליה בגבעולים קטופים של חרציות הייתה תלויה באנטומיה של צינורות ההובלה, כאשר קוטר קטן של צינורות ההובלה האיץ את ההתמוססות (Van Ieperen et al., 2002). לכן לעובדה, שקוטר הצינור מהווה גורם חשוב בשלבים המאוחרים של חיי האגרטל של דודונאה, ישנה חשיבות גדולה. יש לציין שבדודונאה 'דנה' התקבל יחס הפוך בין קוטר צינורות ההובלה לבין צפיפותם (איורים 21D, E; 22A, B, D, E). לא ברורה מהי המשמעות של היחס ההפוך שהתקבל, שכן אין דפוס כללי לגבי יחס זה במיני צמחים שונים, ובמינים מסוימים יש יחס הפוך בעוד שבאחרים אין קשר בין שני מדדים אלו.

מבנה העלים של דודונאה השתנה במהלך השנה. עלי קיץ היו דקים יותר ובעלי צפיפות גבוהה יותר של פיוניות וטריכומות (תמונה 15). השינויים העונתיים במדדים האנטומיים של העלים תאמו את השינויים בטמפרטורות העונתיות (איור 23), ממצא המצביע על כך, שהטמפרטורה הנה מדד סביבתי חשוב המשפיע על המבנה האנטומי של העלים. שינויים במבנה העלים בתנאים אקלימיים שונים נפוצים מאוד (Dickison, 2000). כך למשל, נמצאו שינויים דומים ב- *Phlomis fruticosa*, בו עלי הקיץ היו דקים ושעירים יותר מאשר עלי החורף (Christodoulakis, 1989). יחד עם זאת, עוצמת האור ולאוו דווקא הטמפרטורה נחשבת כגורם הסביבתי החשוב ביותר בהתפתחות עלים (Dickison, 2000). יתכן כי זהו גורם חשוב גם ביצירת פיוניות בעלי דודונאה, כיוון שהטמפרטורה הייתה אחראית רק ל-13% מהשונות במדדים השונים (איור 23), אף כי הקשר בין הטמפרטורה לצפיפות הפיוניות היה מובהק (איור 23F).

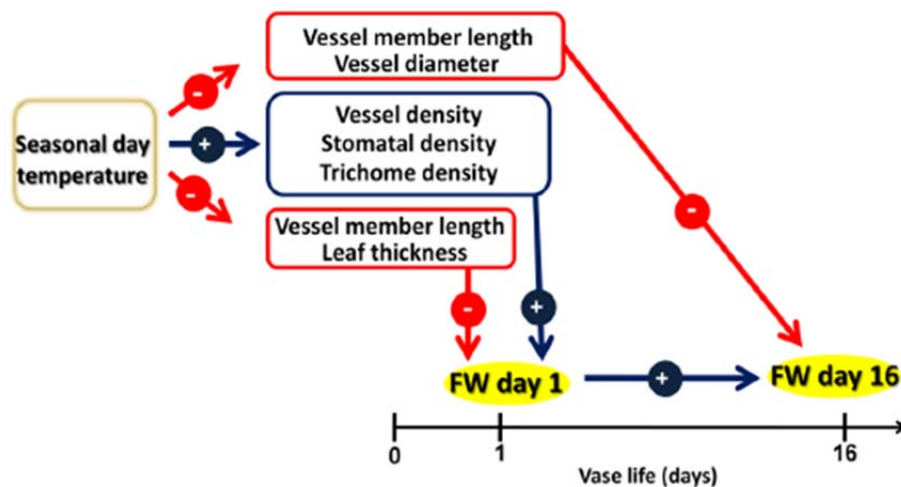
כאשר בוחנים את המתאם בין שינויי משקל הענפים במהלך חיי האגרטל לבין הטמפרטורה העונתית נראה, שבתחילת חיי האגרטל משקל הענפים היה במתאם מובהק לכל המדדים האנטומיים של העלה, אך מתאם זה נעלם לאחר 16 ימי אגרטל (איור 24). ממצאים אלה תואמים את הממצאים שהתקבלו במעקב אחר חיי האגרטל של ענפים בהשוואה לעלים מנותקים, שתפקדו באופן שונה (איור 19). בתחילת חיי האגרטל, העלים המנותקים עלו במשקל פחות מאשר הענפים, דבר שמצביע כנראה על יכולת גבוהה יותר של הענפים לקלוט מים. לאחר 16 ימי אגרטל התקבלה תגובה שונה בעונות שונות: בקיץ, העלים עלו במשקלם בדומה לענפים שלמים, אך בחורף, בעוד שענפים שלמים כמשו, העלים המנותקים המשיכו לעלות במשקל. ניתן להסיק, כי השפעת מבנה העלים על מאזן מים בתחילת חיי האגרטל הופכת להיות זניחה בשלב מאוחר יותר, שבו ההשפעה של מבנה הגבעול הופכת להיות דומיננטית.

הממצאים על היווצרות אמבוליה במהלך חיי האגרטל בעונות השונות הראו, כי בענפי קיץ של דודונאה 'דנה' קיימת אמבוליה התחלתית נמוכה, ומדד האמבוליה עולה במהלך חיי האגרטל (איור 7A). לעומת זאת בחורף, מדד האמבוליה היה גבוה כבר מתחילת חיי האגרטל ונשמר ברמה זו עד סופם (איור 7B).

מדדי מאזן המים שנמדדו במקביל, הראו שמאזן המים היה משופר הרבה יותר בענפי קיץ מאשר בענפי חורף (איור 8). כלומר, ניתן לקבוע באופן חד-משמעי, כי האמבוליה של צינורות ההובלה הנה הגורם הראשי לירידה בהולכת המים ולכמישה של ענפי קיץ וגטיביים של דודנאה 'דנה' בעונת החורף. לעומת זאת, ענפי קיץ מותאמים אנטומית לאמבוליה, ולכן מראים מדד אמבוליה נמוך מזה של ענפי חורף במהלך חיי האגרטל (איורים 7A, B).

מהממצאים שלנו עולה, כי תנאי הסביבה, המיוצגים במחקר זה ע"י הטמפרטורה, משפיעים על התמיינות העצה בגבעול ועל מבנה העלים, אשר בתורם משפיעים על התפקוד ההידראולי במהלך חיי האגרטל (סכמה 2). העלייה ההתחלתית במשקל הענפים (איור 2) נבעה ממכלול הגורמים האנטומיים של הגבעול ושל העלים. יחד עם זאת, ככל שעקת המים באגרטל גברה, חשיבות מבנה העלים וצפיפות הצינורות פחתה, ורק האורך והרוחב של חוליית הטרכיאיה היו רלוונטיים למאזן המים בענף הקטוף. צינורות ארוכים ורחבים אמנם יעילים יותר בהובלת מים, אך גם רגישים יותר לאמבוליה (Sperry et al., 2006). עפ"י הממצאים שלנו, משקל הענפים לאחר 16 ימי אגרטל היה במתאם הפוך לשני המדדים האלה (איורים 22D, F).

לסיכום, ענפי דודנאה 'דנה' מראים קשר בולט בין תנאי הגידול לבין המבנה של מערכת ההובלה ושל העלים, המשפיע על התפקוד ההידראולי של הענפים הקטופים באגרטל.



סכמה 2: תאור סכמטי של המתאם העונתי בין הטמפרטורה היומית המקסימאלית ביום הקטיף לבין המדדים האנטומיים של העצה והעלים ושינויי המשקל של ענפי קיץ של דודנאה קטופים במהלך חיי האגרטל. חיצים עם סימן (+) מציינים מתאם חיובי, וחיצים עם סימן (-) מציינים מתאם שלילי. המתאם החיובי המובהק בין משקל הענפים ביום 1 לבין משקלם ביום 16 מוצג באיור 20C.

ה.3.2. שינויים עונתיים במדדים ביוכימיים

תכולת העמילן בענפי דודנאה 'דנה' ביום הקטיף הייתה נמוכה בחורף ובקיץ, ועלתה בסתיו ולקראת אביב (איור 26A), בעוד שתכולת הסוכרים המסיסים הראתה עליה חדה באפריל (איור 26B). תבנית הצטברות הפחמימות בדודנאה שונה מהתבנית האופיינית לצמחים הים-תיכוניים, אשר צוברים פחמימות בחורף (Grunzweig et al., 2003; Bustan et al., 2011). עם זאת, ישנם צמחים נוספים אשר אינם מתנהגים

לפי התבנית הזו. למשל, בעלים של זית אירופי ביוון, בדומה לדודונאה, נצפתה עליה של עמילן וסוכרים מסיסים באביב ובסתיו (Drossopoulos and Niavis, 1988). אפשרות אחרת להסבר הממצאים יוצאי הדופן בדודונאה 'דנה', הנה העובדה שההתפתחות הרפרודוקטיבית בה חלה בחורף. פרחים ופירות מהווים מבלע לפחמימות ויכולים לגרום לכן לירידת רמתן בעלים, האיבר בו נמדדו הפחמימות בעבודה הנוכחית. לא נמצא קשר מובהק בין תכולת הסוכרים העונתית בעלים במהלך השנה לבין שינוי משקל הענפים הוגטיביים במהלך חיי האגרטל. כלומר, תכולת הסוכרים המסיסים והעמילן אינה מסבירה את השינויים העונתיים במאזן המים של ענפי דודונאה. לעומת זאת, כאשר נבחן ההבדל בין ענפים וגטיביים לבין ענפים נושאי פירות, נמצא שענפים נושאי פירות סינתזו פרולין בעלים במהלך 7 ימים באגרטל, בעוד שבענפים וגטיביים תכולת הפרולין כמעט ולא השתנתה (איור 27A). מבחינת תכולת הסוכרים בעלים, ביום הקטיף ענפים נושאי פירות הכילו פחות סוכרים מסיסים ופחות עמילן לעומת ענפים וגטיביים (איורים 27B, C). באופן דומה, מאגרי הפחמימות בזמן הקטיף נמצאו כמדד חשוב לטיב חיי האגרטל בסחלבי דנדרוביום (Ketsa, 1989). בנוסף, בענפי דודונאה הפירות היוו מבלע לסוכרים במהלך חיי האגרטל, כפי שניתן היה לראות בניסוי בו הוסרו הפירות (איור 28), ולכן בענפים נושאי פירות הייתה דרושה תוספת סוכר שניתנה בהטענה או בתמיסת האגרטל (איור 29). לענפי קטיף רבים, בעיקר פרחים, דרושה תוספת סוכרים על מנת להאריך את משך חיי האגרטל שלהם, ביניהם לימוניות (Doi and Reid, 1995), ליזיאנתוס (Cho et al., 2001) וורדים (Ichimura and Shimizu-Yumoto, 2007). לא מפתיע, אם כך, שבשלב התפתחות הפירות, כאשר מבנה העצה של ענפי דודונאה 'דנה' אינו יעיל (איור 25), המחסור בסוכרים גורם לעקה חמורה וכמישה חזקה, במיוחד בענפים נושאי פירות (איור 17D ותמונה 13A). נראה, שניתן להתגבר על בעיה זו בעזרת טיפול מתאים הכולל תוספת סוכר באגרטל (איור 29B).

ה.4.2. שינויים עונתיים הקשורים בתעלות מים

בעבר התחום של מאזן המים בצמח היה שייך לביופיסיקה בלבד וכלל מגוון נוסחאות פיסיקליות של מעבר מים דרך צינורות. כיום ברור, שמעבר מים בצמחים מורכב בהרבה ומעורבים בו גם מבנים תוך תאיים ותעלות מים. ישנן ראיות וממצאים רבים המורים שתעלות מים מהוות מרכיב חשוב בהובלת המים של צמחים. למרות זאת, לפי מיטב ידיעתנו, רק מחקר אחד בדק מעורבות של תעלות מים באיכות חיי האגרטל של ענפי קטיף (Maggio and De Pascale, 2007). החוקרים האלה מצאו, כי יישום מעכבי תעלות מים בורדים קטופים הקטין את המוליכות ההידראולית במהלך חיי האגרטל.

ה.1.4.2. אפיון מולקולארי ופיסיולוגי של תעלות מים ומעורבותן במאזן המים של ענפי דודונאה 'דנה'

קטופים

בעבר לא היו ידועים גנים המקודדים לתעלות מים (אקוואפורינים) בסוג דודונאה. מכיוון שתעלות מים מסווגות לארבע משפחות, כאשר ישנו מספר רב של תעלות שונות בכל מין של צמחים (Maurel et al., 2008), החלטנו להתמקד בגנים של משפחת ה-PIPs, הכוללת תעלות מים אשר ממוקמות בממברנה הציטופלסמטית.

בעזרת תחלים דגנרטיביים, אשר נסמכו על רצפים של גנים ממשפחות וסדרות קרובות לדודונאה, הצלחנו לרצף באפן חלקי שלושה גנים של תעלות מים בדודונאה 'דנה': *PIP2a*, *PIP2b*, ו-*PIP1* (תמונה 17). לפי הדיווחים בספרות, תת-משפחת ה-*PIP2* חשובה יותר בהולכת המים בצמחים (Baiges et al., 2002). לגן *PIP2a* של דודונאה ישנם הומולוגים בצמחים אחרים: תות שדה - *FaPIP2;1* (Alleva et al., 2011), ורדים - *RhPIP2;1* (Ma et al., 2008) ורודודנדרון - *RcPIP2;1* (Peng et al., 2008). נמצא, כי התעלה *FaPIP2;1* של תות שדה הנה תעלת מים פעילה מאוד, המעבירה מים בלבד ופועלת בשיתוף עם תעלות מים נוספות (Alleva et al., 2011). בורדים, התעלה *RhPIP2;1* ממוקמת באפידרמיס של עלי הכותרת, משפיעה על גדילתם ופעילותה מעוכבת ע"י אתילן (Ma et al., 2008). לתעלה *RcPIP2;1* ברודודנדרון מייחסים תפקיד בהגנה מפני עקת קור (Peng et al., 2008). על מנת לברר האם תעלות המים שבודדו מעורבות ביחסי המים של ענפי דודונאה קטופים, נעשה שימוש בשני מעכבים ידועים של תעלות מים, פלורטין (Phloretin) וכספית ($HgCl_2$). בניגוד למצופה, כספית הגבירה את קליטת המים בענפים (איור 30A). ידוע מהספרות, כי כספית ונגזרותיה פועלות על ידי קשירה לאתרי ה-*Cys* של התעלה, שאינם שמורים בתעלות המים ומיקומם אינו קבוע (Maurel et al., 2008). לכן, אין זה מפתיע שממשפחת ה-*PIPs* בודדו בארבידופסיס (Daniels et al., 1994; Otto and Kaldenhoff, 2000) ובטבק (Biela et al., 1999) תעלות מים שאינן רגישות לכספית. בכלל, תגובת הצמח לטיפול בכספית הנה הממוצע של השפעות על כלל תעלות מים, שחלקן רגישות וחלקן לא רגישות לכספית (Baiges et al., 2002). מכאן, שתגובת ענפי דודונאה לכספית יכולה להיות מוסברת על ידי העובדה, שחלק ניכר מתעלות המים בצמח זה אינן רגישות לכספית. ניתן להניח שכתוצאה מעיכוב התעלות הרגישות, התעלות אשר אינן רגישות לכספית הגבירו את פעילותן והביאו לקבלת תגובה הפוכה מהמצופה. מעכב התעלות השני שנבחן, פלורטין, הקטין כמצופה את משקל הענפים (איור 30B). לסיכום, מהניסוי עם המעכבים של תעלות המים ניתן לראות, כי תעלות מים משפיעות על יחסי המים של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה', וישנן השפעות גומלין בין התעלות השונות.

השפעת המעכבים לא מסתכמת רק בעיכוב פעילות התעלה, אלא השפעתם יכולה להתבטא גם בשינוי הביטוי של הגנים המקודדים לחלבוני התעלות. אכן, הביטוי של הגן *PIP2a* בדודונאה ירד בהשפעת כספית ועלה בהשפעת פלורטין, הביטוי של הגן *PIP1* לא הושפע מכספית וירד מעט בהשפעת פלורטין, ואילו הביטוי של הגן *PIP2b* לא היה עקבי, דבר שהתבטא בסטיות תקן גדולות (איור 32). ממצאים אלה שוב מורים על השפעות גומלין בין התעלות השונות, ומרמזים על קיומה של בקרה מורכבת על הביטוי והפעילות של תעלות המים בדודונאה.

ה.2.4.2. השפעת אתילן על תעלות מים

מספר מחקרים בספרות דווחו על הקשר בין אתילן לתעלות מים. כך, בעצי גומי אתילן השפיע בצורה דיפרנציאלית על ביטוי הגנים של תעלות מים, ובאמצעותם הוא הגביר את ייצור הלטקס (Tungngoen et al., 2009). גדילת עלי כותרת של ורדים הושפעה מתעלת המים *RhPIP2;1*, אשר ביטויה עוכב ע"י אתילן (Ma et al., 2008). גדילת ענבים מתרחשת בעזרת תעלות מים, אשר ביטוין מוגבר ע"י אתילן (Chervin

(et al., 2008). על מנת לבחון האם ישנן השפעות גומלין בין אתילן ותעלות מים בדודונאה, בדקנו את ההשפעה של מעכב תעלות המים פלורטין עם וללא אתילן על ענפי דודונאה קטופים (איור 31). בעוד אתילן הגדיל את משקל הענפים באופן מובהק ופלורטין הקטין את המשקל באופן מובהק, השילוב של שני החומרים לא היה שונה מהביקורת. כלומר, ניסוי זה מצביע על קיומן של השפעות גומלין בין אתילן לבין תעלות מים בדודונאה.

על מנת לבחון את השפעת האתילן על ביטוי הגנים של תעלות מים, בדקנו את ביטויים בהשפעת אתילן ומעכב פעילותו, 1-MCP (איור 33). בניגוד למצופה נמצא, שלמרות שאתילן שיפר את מאזן המים בענפי קטיף של דודונאה 'דנה' (איור 12), הוא הפחית את הביטוי של הגנים המקודדים לתעלות מים. כך, ביטוי הגן *PIP2a* ירד בהשפעת אתילן ועלה בהשפעת 1-MCP. ביטוי הגן *PIP1* כמעט ולא הושפע מאתילן וירד בהשפעת 1-MCP. ביטוי הגן *PIP2b* גם הוא ירד בהשפעת אתילן, ועלה מעט בהשפעת 1-MCP. נראה לכן, כי בדודונאה ביטוי הגנים *PIP2a* ו-*PIP2b* מעוכב על ידי אתילן (איור 33). על אף שבמבט שטחי התוצאות נראות תמוהות, מסתבר, שממצאים דומים התקבלו במינים נוספים. למרות שמקובל שתעלות מים מגבירות בד"כ את מוליכות המים של צמחים, הפעילות של תעלות מים אינה אחידה במצבי עקת מים, ודווח שפעילותן של תעלות מים רבות יורדת בתגובה לעקת מים בצמחים שונים (Tyerman et al., 2002). כך למשל בזית, הפעילות של שלוש תעלות מים ממשפחת ה-PIPs ירדה בעקבות חשיפה לעקת יובש (Secci et al., 2007). גם בצמחי טבק, הביטוי של שניים מתוך שלושה הגנים המקודדים לתעלות מים ממשפחת ה-PIPs שנבדקו ירד כתוצאה מחשיפה לעקת מים (Mahdieh et al., 2008). כלומר, במצב של עקת מים יכול להיות יתרון למיעוט של תעלות מים או לירידה בפעילותן, אם כי בספרות אין הסבר למשמעות של תופעה זו. בנוסף, בכל צמח ישנן תעלות מים רבות שפעילותן במצבים שונים, וכנראה שכך גם בדודונאה 'דנה'. בעבודה הנוכחית נבחנו רק שלוש תעלות מים, שכולן משתייכות לאותה המשפחה, ולא ידועה לנו מידת מעורבותן במאזן המים, אילו מולקולות הן מעבירות פרט למים ומהו מיקומן המדויק רק לגבי הגן של התעלה *PIP2a*, נבדק מיקום ביטוי בעלים ונמצא שהוא מתבטא באפידרמיס (תמונה 19). לכן, לא ניתן עדיין להסיק מתמונה חלקית זו, על מידת מעורבותן של תעלות מים במאזן המים של ענפי קטיף של דודונאה 'דנה'.

ה.3.4.2. שינויים עונתיים בביטוי גנים של תעלות מים

ישנם בספרות מחקרים בודדים בהם נעשה מעקב שנתי אחרי ביטוי גנים של תעלות מים. ברודודנדרון, נמצא ביטוי גבוה ביותר בחודשי קיץ (Peng et al., 2008), ואילו באגוזי מלך נמצא ביטוי גבוה בחורף, שניתן לייחס לו הקניית עמידות לקיפאון (Sakr et al., 2003).

כאשר נבחן הביטוי העונתי של הגנים של תעלות מים במהלך חיי האגרטל של ענפי דודונאה 'דנה', בלט מאוד הממצא, שהביטוי של שלושת הגנים שבודדו היה הגבוה ביותר בעונת הקיץ הן בעלים ביום הקטיף (איורים 34, 35), והן בגבעולים לאחר יום באגרטל (איור 36). יתכן, כי טמפרטורות גבוהות מגבירות את הביטוי של גנים של תעלות מים בדודונאה. בספרות קיימים מספר דיווחים על השפעת הטמפרטורה על הפעילות של תעלות מים. כך למשל, תעלות מים בשורשי מלפפון נסגרו בתגובה לטמפרטורות נמוכות (Lee et al., 2005). תעלות מים בשורשי תירס הראו תגובה לא לינארית בטווחי טמפרטורות שונים

(lonenko et al., 2010): בטמפרטורה של 10 מ"צ תעלות המים לא היו פעילות, ב- 20 מ"צ פעילות תעלות המים הייתה מרבית, ואילו ב- 25 מ"צ הפעילות של תעלות המים ירדה. התוצאות מרמזות כי תרומתן של תעלות מים להובלת המים בצמח משתנה בהתאם לטמפרטורת הסביבה. לא התקבלה תבנית ברורה בביטוי העונתי של גנים של תעלות מים בגבעול (איור 36), אך בעלים הביטוי ביום הקטיפה היה הגבוה ביותר בכל הגנים בכל העונות (איור 34). מכיוון שהעלייה הבולטת ביותר במשקל מתרחשת ביום הראשון של חיי האגרטל, ניתן להניח כי לתעלות המים בעלים ישנה השפעה על תהליך זה. בנוסף, בביטוי של הגן *PIP2a* בעלים הייתה ירידה הדרגתית במהלך חיי האגרטל בכל העונות (איור 35A), ממצא ההופך את הגן הזה למסקרן מבחינת מאזן המים של ענפי דודונאה קטופים. כאשר נבדק מיקום הביטוי של גן זה בעלים בשיטת *In situ hybridization*, התברר כי הוא מתבטא באפידרמיס של העלים בתאים עשירים בפקטין (תמונה 19). יתכן, שתאים אלה מסוגלים לשמש כמבלע למים אשר הענף קולט מהסביבה. לכן, תאים אלה צריכים לייצר תעלות מים על מנת להגדיל את מוליכות הדופן למים.

ה.2.5. תוצאות המחקר לאור שינוי האקלים הגלובלי

חלק גדול מענפי הקטיפה המעוצים טובלים מכמישה הנובעת מעקת מים במהלך חיי האגרטל שלהם, כתוצאה מפגיעה ברצף המים בצניורות ההובלה, האחראי להובלת המים אל העלים והפרחים (Van Doorn, 1997). ההתחממות הגלובלית לה אנו עדים בשנים האחרונות, עלולה להחמיר תופעות אלה של מאזן מים שלילי בחיי האגרטל של הענפים, אם הטמפרטורה תהיה גבוהה מהאופטימום הדרוש להתמיינות צניורות ההובלה, דבר שעלול להשפיע בעיקר על איכותם של ענפי קטיפה מצמחים שמקורם מאזורים ממוזגים. כפי שהראנו בעבודה הנוכחית לגבי ענפי דודונאה 'דנה', גם בענפים אחרים השפעת הטמפרטורה יכולה לגרום לשינויים אנטומיים במבנה מערכת ההובלה, ו/או להשפיע על שלב ההתפתחות של הענפים, וע"י כך להשפיע על מאזן המים בענפי הקטיפה (Tyree and Dixon, 1986; Ludlow, 1989; Beerling and Chaloner, 1993; Fraser et al., 2009).

ה.3. סיכום

במחקר זה נעשה מאמץ ללמוד את הגורמים, אשר משפיעים על מאזן המים של ענפי דודונאה 'דנה' קטופים. הממצא העיקרי של המחקר הוא, שמאזן המים של ענפי דודונאה, אשר משתנה במהלך השנה, תלוי במבנה האנטומי של הענפים, המושפע מתנאי הסביבה. נראה לכן, שמבנה האלמנטים הטרכיאריים הנו הגורם המכריע הקובע את יעילות הולכת המים בענפי דודונאה קטופים. האמבוליה המוגברת שנצפתה בענפים בחורף למרות תנאי הגידול המיטביים (בהשקיה מתמשכת) נובעת ממבנה הטרכיאיות השונה בענפי חורף בהשוואה לענפי קיץ. בענפים נושאי פירות, הפירות מהווים מבלע לסוכרים שבעלים, כאשר מחסור בסוכרים בעלים פוגע במוליכות ההידראולית ובפוטנציאל האוסמוטי בענף הקטוף. מכאן, שנשיאת הפירות אינה מבטאת רק שינוי עונתי בהתפתחות, אלא מצביעה על כך שישנה מעורבות של יחסי מקור-מבלע בהרעת מאזן המים בענפי קטיפה.

תעלות מים מעורבות כנראה במאזן המים של ענפי דודונאה קטופים, אך ממצאי המחקר אינם מספיקים עדיין כדי לאפיין את מידת מעורבותן.

מכיוון שעד כה לא נעשה מחקר מעמיק בנושא ההשתנות העונתית של מאזן המים בענפי קטיפה, מחקר זה הינו חדשני ומראה בבירור כיצד שינויים אנטומיים המושפעים מהטמפרטורה גורמים לשינוי של

המוליכות ההידראולית בענף הקטוף במהלך חיי האגרטל, ומצביע על הקשר בין גורם סביבתי לבין גורמים אנטומיים והמוליכות ההידראולית של הענף הקטוף. בנוסף, ממצאי המחקר עשויים לשמש מודל להבנת מאזן המים בענפי קטיף מעוצים נוספים הסובלים מכמישה מהירה.

1. ביבליוגרפיה

- ארזי ט ושוורץ מ (1999) יסודות המיקרוטכניקה הבוטנית. אוניברסיטת תל-אביב, ת"א.
פאהן א (1993) אנטומיה של הצמח. הדפסה שנייה, הוצאת הקיבוץ המאוחד, ת"א.
קגן ס (2004) דודונאה 'דנה' - *Dodonaea 'Dana'*. גן ונוף, גיליון א' כרך נ"ט: 50.
- Abeles FB, Morgan PW and Saltveit ME** (1992) Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. 398 pp., Academic Press, New York.
- Ackerson R and Hebert RR** (1981) Osmoregulation in cotton in response to water stress: I. Alterations in photosynthesis, leaf conductance, translocation, and ultrastructure. *Plant Physiol.* 67: 484–488.
- Alleva K, Marquez M, Villarreal N, Mut P, Bustamante C, Bellati J, Martinez G, Civello M and Amodeo G** (2011) Cloning, functional characterization, and co-expression studies of a novel aquaporin (*FaPIP2;1*) of strawberry fruit. *J. Exp. Bot.* 61: 3935–3945.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- Aronne G and De Mico V** (2001) Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *Incanus*. *Ann. Bot.* 87: 789-794.
- Azad AK, Sawa Y, Ishikawa T and Shibata H** (2004) Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant Cell Physiol.* 45: 608-617.
- Babu RC, Pathan MS, Blum A and Nguyen HT** (1999) Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Sci.* 39: 150-158.
- Baiges I, Schaffner AR, Affenzeller MJ and Mas A** (2002) Plant aquaporins. *Physiol. Plant.* 115: 175-182.
- Barrieu F, Chaumont F and Chrispeels MJ** (1998) High expression of the tonoplast aquaporin *ZmTIP1* in epidermal and conducting tissues of maize. *Plant Physiol.* 117: 1153-1163.
- Barry CS and Giovannoni JJ** (2006) Ripening in the tomato green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 7923-7928.
- Beerling DJ and Chaloner WG** (1993) The impact of atmospheric CO₂ and temperature changes on stomata density: observation from *Quercus robur* Lammas leaves. *Ann. Bot.* 71: 231–235.
- Bengston C, Larsson S and Liljenberg C** (1978) Effect of water stress on cuticular transpiration rate and amount and composition of epicuticular wax in seedlings of six oat varieties. *Physiol. Plant.* 44: 319–324.

- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R and Kaldenhoff R** (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin *NtAQPI* is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J.* 18: 565–570.
- Blankenship SM and Dole JM** (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28: 1-25.
- Blum A** (1989) Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Sci.* 29: 230-233.
- Borochoy A, Mayak S, and Halevy AH** (1976) Combined effects of abscisic acid and sucrose on growth and senescence of rose flowers. *Physiol. Plant.* 36: 221–224.
- Breshears DD, McDowell NG, Goddard KL, Dayem KE, Martens SN, Meyer CW and Brown KM** (2008) Foliar absorption of intercepted rainfall improves plant water status and enables drought recovery. *Ecology* 89: 41-47.
- Brodersen CR, McElrone AJ, Choat B, Matthews MA and Shackel KA** (2010) The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using High-Resolution Computed Tomography. *Plant Physiol.* 154: 1088-1095.
- Buchanan-Wollaston V** (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
- Burgess SSO and Dawson TE** (2004) The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): Foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant Cell Environ.* 27: 1023–1034.
- Bustan A, Avni A, Lavee S, Zipori I, Yeselson Y, Schaffer AA, Riov Y and Dag A** (2011) Role of carbohydrate reserves in yield production of intensively cultivated oil olive (*Olea europaea* L.) trees. *Tree Physiol.* 31: 519-530.
- Canny MJ, Sparks JP, Huang CX and Roderick ML** (2007) Hypothesis: Air embolisms exsolving in the transpiration water – the effect of constrictions in the xylem pipes. *Functional Plant Biol.* 34: 95–111.
- Carlquist S and Hoekman DA** (1985) Ecological wood anatomy of the woody southern California flora. *Iawa Bull. (NS)* 6: 319-347.
- Çelikel FG and Karaçalı Y** (1995) Effect of preharvest factors on flower quality and longevity of cut carnations (*Dianthus caryophyllus* L.). *Acta Hort.* 405: 156– 163.
- Çelikel FG and Reid MS** (2002) Storage temperature affects the quality of cut flowers from the Asteraceae. *HortScience* 37: 148-150.
- Cevallos JC and Reid MS** (2001) Effect of dry and wet storage at different temperatures on the vase life of cut flowers. *HortTechnology* 11: 199-202.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ and Jung R** (2001) Aquaporins constitute a

- large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125: 1206-1215.
- Chen YF, Etheridge N and Schaller GE** (2005) Ethylene signal transduction. *Ann. Bot.* 95: 901-915.
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X and Zhu T** (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-574.
- Chervin C, Tira-Umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D and Roustan J-P** (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiol. Plant.* 134: 534–546.
- Cho M-S, Çelikel FG, Dodge L and Reid MS** (2001) Sucrose enhances the postharvest quality of cut flowers of *Eustoma grandiflorum* (raf.) shinn. *Acta Hort.* 543: 305-315.
- Christman MA, Sperry JS and Smith DD** (2012) Rare pits, large vessels and extreme vulnerability to cavitation in a ring-porous tree species. *New Phytol.* 193: 713–720.
- Christodoulakis NS** (1989) An anatomical study of seasonal dimorphism in the leaves of *Phlomis fruticosa*. *Ann. Bot.* 63: 389–394.
- Clifford SC, Arndt SK, Popp M and Jones HG** (2002) Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae): Localization, composition and physiological roles during drought-stress. *J. Exp. Bot.* 53: 131-138.
- Cochard H** (2002) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant Cell Environ.* 25: 815–819.
- Cochard H, Bodet C, Améglio T and Cruziat P** (2000) Cryo-Scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles. Facts or artifacts? *Plant Physiol.* 124: 1191-1202.
- Cochard H, Herbette S, Barigah T, Badel E, Ennajeh M and Vilagrosa A** (2010) Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the Cavitron spinning technique. *Plant Cell Environ.* 33: 1543–1552.
- Cochard H, Venisse JS, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guilliot A, Tyree MT and Sakr S** (2006) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol.* 143: 122-133.
- Cohen S, Bennink J and Tyree M** (2003) Air method measurements of apple vessel length distributions with improved apparatus and theory. *J. Exp. Bot.* 54: 1889-1897.
- Comstock JP and Sperry JS** (2000) Tansley Review No. 119: Theoretical considerations of optimal

conduit length for water transport in vascular plants. *New Phytol.* 148: 195-218.

- Daniels MJ, Mirkov TE and Chrispeels MJ** (1994) The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol.* 106: 1325–1333.
- Dawson TE** (1998) Fog in the California redwood forest: Ecosystem inputs and use by plants. *Oecologia* 117: 476-485.
- Dichio B, Xiloyannis C, Sofo A and Montanaro G** (2006) Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering. *Tree Physiol* 26: 179-185.
- Dickison WC** (2000) Integrative Plant Anatomy. Academic Press, New York.
- Dixon MA, Butt JA, Murr DP and Tsujita MJ** (1988) Water relations of cut greenhouse roses: The relationships between stem water potential, hydraulic conductance and cavitation. *Sci. Hort.* 36: 109–118.
- Doi M and Reid MS** (1995) Sucrose improves the postharvest life of cut flowers of a hybrid *Limonium*. *Hortscience* 30: 1058–1060.
- Drossopoulos JB and Niavis CA** (1988) Seasonal changes of the metabolites in the leaves, bark and xylem tissues of olive tree (*Olea europaea*. L) II. Carbohydrates. *Ann. Bot.* 62: 321-327.
- Dubois MKA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Chem.* 28: 350-356.
- Ehleringer J** (1982) The influence of water stress and temperature on leaf pubescence development in *Encelia farinosa*. *Amer. J. Bot.* 69: 670-675.
- Eisenbarth DA and Weig AR** (2005) Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings. *J. Exp. Bot.* 56: 1831-1842.
- Engelmann KE and Schlichting CD** (2005) Coarse- versus fine-grained water stress in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Amer. J. Bot.* 92: 101-106.
- Esau K** (1965) Plant Anatomy. 2nd edition. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Fahn A** (1986) Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. *Ann. Bot.* 57: 631-637.
- Fahn A** (2000) Structure and function of secretory cells. *Adv. Bot. Res.* 31: 37-75.
- Fereres E and Soriano MA** (2007) Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *J. Exp. Bot.* 58: 147-159.
- Ferrante A, Mensuali-Sodi A, Serra G and Tognoni F** (2002) Effects of ethylene and cytokinins on vase life of cut *Eucalyptus parvifolia* Cambage branches. *Plant Growth Regul.* 38: 119-125.
- Fisher JB, Goldstein G, Jones TJ and Cordell S** (2007) Wood vessel diameter is related to elevation and genotype in the Hawaiian tree *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae). *Amer J.*

Bot. 94: 709-715.

- Formica D and Silvestri S** (2004) Biological effects of exposure to magnetic resonance imaging: An overview. *BioMedical Engineering OnLine* 3: 11-23.
- Franklin GL** (1945) Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature* 155: 51.
- Fraser, LH, Greenall A, Carlyle C, Turkington R and Friedman CR** (2009) Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: response of stomata density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Ann. Bot.* 103: 769–775.
- Fujino DW and Reid MS** (1983) Factors affecting the vase life of fronds of maiden-hair fern. *Sci. Hort.* 21: 181-188.
- Gapper NE, Coupe SA, McKenzie MJ, Sinclair BK, Lill RE and Jameson PE** (2005) Regulation of harvest-induced senescence in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by cytokinin, ethylene, and sucrose. *J. Plant Growth Regul.* 24: 153-165.
- Geigenberger P, Reimholz R, Geiger M, Merlo L, Canale V and Stitt M** (1997) Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* 201: 502-518.
- Goldschmidt EE** (1997) Ripening of citrus and other non-climacteric fruits: A role for ethylene. *Acta Hort.* 463: 335-340.
- Gouvra E and Grammatikopoulos G** (2003) Beneficial effects of direct foliar water uptake on shoot water potential of five chasmophytes. *Can. J. Bot.* 81: 1278-1284.
- Grunzweig JM, Lin T, Rotenberg E, Schwatz A and Yakir D** (2003) Carbon sequestration in arid-land forest. *Glob. Change Biol.* 9: 791-799.
- Gunawardena AHLAN, Pearce DME, Jackson MB, Hawes CR and Evans DE** (2001) Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant Cell Environ.* 24: 1369-1376.
- Halevy AH and Mayak S** (1981) Senescence and postharvest physiology of cut flowers. *Hort. Rev.* Vol. 1 & 3: 204-236.
- Hartikainen K, Nerg AM, Kivimäenpää M, Kontunen-Soppela S, Mäenpää M, Oksanen E, Rousi M and Holopainen T** (2009) Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. *Tree Physiol.* 29: 1163-1173.
- Hauch S and Magel E** (1998) Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are

- related to cambial wood production and heartwood formation. *Planta* 207: 266–274.
- He S and Joyce DC** (2007) Diurnal and seasonal changes in the xylem water potentials of *Grevillea* and *Myoporum* plants during drought. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 82: 290–296.
- He S, Joyce DC, Irving DE and Faragher JD** (2006) Stem end blockage in cut *Grevillea* ‘Crimson Yul-lo’ inflorescences. *Postharvest Biol. Technol.* 41: 78–84.
- He CJ, Morgan PW and Drew MC** (1996) Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol.* 112: 463–472.
- Hoeberichts FA, Van Doorn WG, Vorst O, Hall RD and Van Wordragen MF** (2007) Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. *J. Exp. Bot.* 58: 2873–2885.
- Holbrook NM and Zwieniecki MA** (1999) Embolism repair and xylem tension: Do we need a miracle? *Plant Physiol.* 120: 7–10.
- Huberman M, Pressman E and Jaffe MJ** (1993) Pith autolysis in plants: IV. The activity of polygalacturonase and cellulase during drought stress induced pith autolysis. *Plant Cell Physiol.* 34: 795–801.
- Ichimura K., Kawabata Y, Kishimoto M and Goto R** (2002) Variation with the cultivar in the vase life of cut rose flowers. *Bull. Natl. Inst. Floricult. Sci.* 2: 9–20.
- Ichimura K and Shimizu-Yumoto H** (2007) Extension of the vase life of cut roses by treatment with sucrose before and during simulated transport. *Bull. Natl. Inst. Flor. Sci.* 7: 17–27.
- In B-C, Motomura S, Inamoto K, Doi M and Mori G** (2007) Multivariate analysis of relations between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors, and vase life of cut ‘Asami Red’ Roses. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 76: 66–72.
- Inskeep WP and Bloom PR** (1985) Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483–485.
- Ionenko IF, Anisimov AV and Dautova NR** (2010) Effect of temperature on water transport through aquaporins. *Biol. Plant.* 54: 488–494.
- Irigoyen JJ, Emerich DW and Sánchez-Díaz M** (1992) Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: Photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiol. Plant.* 84: 67–72.
- Islam MA, MacDonald SE and Zwiazek JJ** (2003) Responses of black spruce (*Picea mariana*) and tamarack (*Larix laricina*) to flooding and ethylene. *Tree Physiol.* 23: 545–552.
- Jackson D** (1991) *In situ* hybridization in plants. In: Bowles DJ, Gurr SJ, and McPherson M, eds, *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Oxford University.

- Jacobsen AL, Ewers FW, Pratt RB, Paddock III WA and Davis SD** (2005) Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? *Plant Physiol.* 139: 546–556.
- Jiang W, Sheng Q, Zhou X-J, Zhang M-J and Liu X-J** (2002) Regulation of detached coriander leaf senescence by 1-methylcyclopropene and ethylene. *Postharvest Biol. Technol.* 26: 339–345.
- Jones RB, Faragher JD and Van Doorn WG** (2003) Water relations of cut flowering branches of *Thyrtomene calycina* (Lindl.) Stapf. (Myrtaceae). *Postharvest Biol. Technol.* 3: 57–67.
- Jones ML, Kim ES and Newman SE** (2001) Role of ethylene and 1-MCP in flower development and petal abscission in zonal geraniums. *HortScience* 36: 1305–1309.
- Joyce DC and Jones PN** (1992) Water balance of the foliage of cut Geraldton waxflower. *Postharvest Biol. Technol.* 2: 31–39.
- Kaldenhoff R, Ribas-Carbo M, Flexas JS, Lovisolo C, Heckwolf M and Uehlein N** (2008) Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell Environ.* 31: 658–666.
- Kallarackal J, Milburn JA and Baker DA** (1990) Water relations of the banana. III. Effects of controlled water stress on water potential, transpiration, photosynthesis and leaf growth. *Australian J. Plant Physiol.* 17: 79–90.
- Kamaluddin M and Zwiazek JJ** (2002) Ethylene enhances water transport in hypoxic aspen. *Plant Physiol.* 128: 962–969.
- Karbulková J, Schreiber L, Macek P and Šantrůček J** (2008) Differences between water permeability of stomatous and stomatous cuticular membranes: effects of air humidity in two species of contrasting drought-resistance strategy. *J. Exp. Bot.* 59: 3987–3995.
- Ketsa S** (1989) Vase-life characteristics of inflorescences of *Dendrobium* “Pompadour”. *J. Hort. Sci.* 64: 611–615.
- Kilpeläinen A, Gerendiain AZ, Luostarinen K, Peltola H and Kellomäki S** (2007) Elevated temperature and CO₂ concentration effects on xylem anatomy of Scots pine. *Tree Physiol.* 27: 1329–1338.
- Koizumi K, Ookawa T, Satoh H and Hirasawa T** (2007) A wilted mutant of rice has impaired hydraulic conductance. *Plant Cell Physiol.* 48: 1219–1228.
- Larher F, Leport L, Petrivalsky M and Chappart M** (1993) Effectors for the osmo-induced proline response in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 911–922.
- Lee SH, Chung GC and Steudle E** (2005) Low temperature and mechanical stresses differently gate aquaporins of root cortical cells of chilling-sensitive cucumber and -resistant fig leaf gourd. *Plant Cell Environ.* 28: 1191–1202.
- Lei Y, Yin C and Li C** (2006) Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiol.*

Plant. 127: 182–191.

- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D and Jansen S** (2011) Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytol.* 190: 709–723.
- Lishede OB** (1977a) Studies on the mucilaginous cells in the leaf of *Spartocyticus filipes* W.B. *Planta* 133: 255-260.
- Lishede OB** (1977b) Structure of the epidermal and subepidermal cells of some desert plants of Israel. *Israel J. Bot.* 26: 1-10.
- Lishede OB** (1978) Studies on outer epidermal cell walls with microchannels in a xerophytic species. *New Phytol.* 80: 421-426.
- Liu J and Noshiro S** (2003) Lack of latitudinal trends in wood anatomy of *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae), a species with worldwide distribution. *Amer. J. Bot.* 90: 532-539.
- Lü P, Cao J, He S, Liu J, Li H, Cheng G, Ding Y and Joyce DC** (2010) Nano-silver pulse treatments improve water relations of cut rose cv. 'Movie Star' flowers. *Postharvest Biol. Technol.* 57: 196-202.
- Ludlow MM** (1989) Strategies of response to water stress. In: Kreeb KH, Richter H and Hinckley TM (eds.), *Structural and Functional Responses to Environmental Stresses: Water Shortage*, SPB Academic Publishing, The Hague. pp. 269-282.
- Luu DT and Maurel C** (2005) Aquaporins in a challenging environment: Molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ.* 28: 85-96.
- Ma N, Xue J, Li Y, Liu X, Dai F, Jia W, Luo Y and Gao J** (2008) *Rh-PIP2;1*, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiol.* 148: 894–907.
- MacNish AJ, Joyce DC, Hoffman PJ and Simons DH** (1999) Involvement of ethylene in postharvest senescence of *Boronia heterophylla* flowers. *Austral. J. Exp. Agri.* 39: 911-913.
- Maggio A and De Pascale S** (2007) Hydraulic conductivity of cut flower stems and aquaporins function. *Acta Hort.* 755: 225-230.
- Mahdieh M, Mostajeran A, Horie T and Katsuhara M** (2008) Drought stress alters water relations and expression of PIP-Type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol.* 49: 801-813.
- Marissen N** (2005) Postharvest quality of roses as related to pre-harvest conditions. *Acta Hort.* 669: 255-262.
- Maurel C** (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 399-429.
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T and Santoni V** (2008) Plant aquaporins: Membrane channels

with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 595-624.

- Mayak S, Halevy AH, Sagie S, Bar-Yoseph A and Bravdo B** (1974) The water balance of cut rose flowers. *Physiol. Plant.* 31: 15–22.
- McCully ME, Huang CX and Ling LEC** (2008) Daily embolism and refilling of xylem vessels in the roots of field-grown maize. *New Phytol.* 138: 327–342.
- McCully ME, Shane MW, Baker AN, Huang CX and Ling LEC** (2000) The reliability of cryoSEM for the observation and quantification of xylem embolisms and quantitative analysis of xylem sap *in situ*. *J. Microscopy* 198: 24-33.
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Sundaresan S, Selvaraj VKS, Burd S, Ophir R, Kochanek B, Reid MS, Jiang C-Z and Lers A** (2010) Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. *Plant Physiol.* 154: 1929-1956.
- Metcalf CR and Chalk L** (1965) *Anatomy of Dicotyledons*. Vol. 1. Oxford University press, London. pp. 419-430.
- Milburn JA** (1979) *Water flow in plants*. Longman, London and New York.
- Mishio M** (1992) Adaptations to drought in five woody species co-occurring on shallow-soil ridges. *Australian J. Plant Physiol.* 19: 539-553.
- Moinuddin and Khanna-Chopra R** (2004) Osmotic adjustment in chickpea in relation to seed yield and yield parameters. *Crop Sci.* 44: 449-455.
- Morgan PW, He CJ, De Greef JA and De Proft MP** (1990) Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants? *Plant Physiol.* 94: 1616-1624.
- Narayana I, Lalonde S and Saini HS** (1991) Water stress-induced ethylene production in wheat - a fact or artifact? *Plant Physiol.* 96: 406-410.
- Newell EA, Mulkey SS and Wright JS** (2002) Seasonal patterns of carbohydrate storage in four tropical tree species. *Oecologia* 131: 333-342.
- Nijse J** (2001) *Functional anatomy of the water transport system in cut chrysanthemum*. Ph.D. thesis. Wageningen University, The Netherlands.
- Noshiro S, Joshi L and Suzuki M** (1994) Ecological wood anatomy of *Alnus nepalensis* (Betulaceae) in East Nepal. *J. Plant Res.* 107: 399-408.
- Nukui H, Kudo S, Yamashita A and Satoh S** (2004) Repressed ethylene production in the gynoecium of long-lasting flowers of the carnation ‘White Candle’: role of gynoecium in carnation flower senescence. *J. Exp. Bot.* 55: 641-650.
- Ofek M, Hadar Y and Minz D** (2009) Comparison of effects of compost amendment and of single-strain inoculation on root bacterial communities of young cucumber seedlings. *App. Environ.*

Microbiol. 75: 6441-6450.

- Otto B and Kaldenhoff R** (2000) Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin *NtAQPI* from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211: 167-172.
- Pacifici S, Ferrante A, Mensuali-Sodi A and Serra G** (2007) Postharvest physiology and technology of cut Eucalyptus branches: a review. *Agricultura Mediterranea* 137: 124-131.
- Page T, Griffiths G and Buchanan-Wollaston V** (2001) Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* 125: 718-727.
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ and Campbell BT** (2010) Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol.* 10: 142-159.
- Patel RN** (1975) Wood anatomy of the dicotyledons indigenous to New Zealand. 9. Sapindaceae. *New Zealand J. Bot.* 13: 131-140.
- Peng Y, Arora R, Li G, Wang X and Fessehaie A** (2008) *Rhododendron catawbiense* plasma membrane intrinsic proteins are aquaporins, and their over-expression compromises constitutive freezing tolerance and cold acclimation ability of transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Environ.* 31: 1275–1289.
- Philosoph-Hadas S, Golan O, Rosenberger I, Salim S, Kochanek B and Meir S** (2005) Efficiency of 1-MCP in neutralizing ethylene effects in cut flowers and potted plants following simultaneous or sequential application. *Acta Hort.* 669: 321-328.
- Pinheiro C, António C, Ortuño MF, Dobrev PI, Hartung W, Thomas-Oates J, Ricardo CP, Vanková R, Chaves MM and Wilson JC** (2011) Initial water deficit effects on *Lupinus albus* photosynthetic performance, carbon metabolism, and hormonal balance: Metabolic reorganization prior to early stress responses. *J. Exp. Bot.* 62: 4965-4974.
- Pompodakis NE, Terry LA, Joyce DC, Lydakis DE and Papadimitriou MD** (2005) Effect of seasonal variation and storage temperature on leaf chlorophyll fluorescence and vase life of cut roses. *Postharvest Biol. Technol.* 36: 1–8.
- Possiel EY and Dole JM** (2009) Effects of preharvest conditions on postharvest characteristics of lilies and sunflowers. *Acta Hort.* 847: 229-236.
- Premachandra GS, Saneoka H, Kanaya M and Ogata S** (1991) Cell membrane stability and leaf surface wax content as affected by increasing water deficits in maize. *J. Exp. Bot.* 42: 167–171.
- Prior J and Gasson P** (1993) Anatomical changes on charring six African hardwoods. *IAWA J.* 14: 77–86.
- Ranney TG, Bassuk NL and Whitlow TH** (1991) Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 684-688.

- Redman PB, Dole JM, Maness NO and Anderson JA** (2002) Postharvest handling of nine specialty cut flower species. *Sci. Hort.* 92: 293–303.
- Reid MS** (1995) Ethylene in plant growth, development and senescence. In: PJ Davies, ed., *Plant Hormones - Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 486-508.
- Reid MS and Wu MJ** (1992) Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regul.* 11: 37-43.
- Ristic Z and Jenks MA** (2002) Leaf cuticle and water loss in maize lines differing in dehydration avoidance. *J. Plant Physiol.* 159: 645–651.
- Rogers HJ** (2006) Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Ann. Bot.* 97: 309–315.
- Rozen S and Skaletsky HJ** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 365-386.
- Ruiz-Sánchez MC, Domingo R, Torrecillas A and Pérez-Pastor A** (2000) Water stress preconditioning to improve drought resistance in young apricot plants. *Plant Sci.* 156: 245–251.
- Sacher JA** (1973) Senescence and postharvest physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 197-224.
- Sakr S, Alves G, Morillon R, Maurel K, Decourteix M, Guillot A, Fleurat-Lessard P, Julien JL and Chrispeels MJ** (2003) Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. *Plant Physiol.* 133: 630-641.
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M and Maeshima M** (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* 46: 1568–1577.
- Sarker BC, Hara M and Uemura M** (2005) Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. *Sci. Hort.* 103: 387-402.
- Scheenen TWJ, Vergeldt FJ, Heemskerk AM and Van As H** (2007) Intact plant magnetic resonance imaging to study dynamics in long-distance sap flow and flow-conducting surface area. *Plant Physiol.* 144: 1157-1165.
- Schneider H, Thurmer F, Zhu JJ, Wistuba N, Gessner P, Lindner K, Herrmann B, Zimmermann G, Hartung W, Bentrup F-W and Zimmermann U** (1999) Diurnal changes in xylem pressure of the hydrated resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*: Evidence for lipid bodies in conducting xylem vessels. *New Phytol.* 143: 471-484.
- Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingsen EA and Hammel HT** (1965) Sap pressure in vascular plants. Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148: 339-346.
- Seaton K, Parlevliet G and Crowhurst M** (2009) Development of new varieties of Australian

- native plants for cut flower and pot plant markets. *Acta Hort.* 813: 55–60.
- Secchi F, Gilbert ME and Zwieniecki MA** (2011) Transcriptome response to embolism formation in stems of *Populus trichocarpa* provides insight into signaling and the biology of refilling. *Plant Physiol.* 157: 1419-1429.
- Secchi F, Lovisolo C, Uehlein N, Kaldenhov R and Schubert A** (2007) Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.). *Planta* 225: 381–392.
- Serek M** (1990) Effects of pre-harvest fertilization on the flower longevity of potted *Campanula carpatica* 'Karl Foerster'. *Sci. Hort.* 44: 119–126.
- Serek M, Prabucki A, Sisler EC and Andersen AS** (1998) Inhibitors of ethylene action affect final quality and rooting of cuttings before and after storage. *HortScience* 33: 153-155.
- Shtein I, Meir S, Perzelan Y, Rosenberger I, Riov J and Philosoph-Hadas S** (2009) Improving water balance and vase life of new cut foliage branches of *Dodonaea* by postharvest treatments. *Acta Hort.* 813: 225-232.
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A and Kaldenhoff R** (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14: 869–876.
- Sisler EC and Serek M** (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiol. Plant.* 100: 577-582.
- Slotweg G** (2005) Effects of greenhouse conditions on the quality and vase life of *freesia* 'Yvonne'. A nursery comparison. *Acta Hort.* 669: 297-301.
- Slotweg G, Ten Hoope MA and De Gelder A** (2001) Seasonal changes in vase life, transpiration and leaf drying of cut roses. *Acta Hort.* 543: 337–339.
- Soukup A and Votrubová O** (2005) Wound-induced vascular occlusions in tissues of the reed *Phragmites australis*: their development and chemical nature. *New Phytol.* 167: 415–424.
- Sperry JS, Donnelly JR and Tyree MT** (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ.* 11: 35-40.
- Sperry JS and Hacke UG** (2004) Analysis of circular bordered pit function. I. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *Amer. J. Bot.* 91: 369–385.
- Sperry JS, Hacke UG and Pitterman J** (2006) Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. *Amer. J. Bot.* 93: 1490–1500.
- Sperry JS, Stiller V and Hacke UG** (2003) Xylem hydraulics and the soil–plant–atmosphere continuum. Opportunities and unresolved issues. *Agron. J.* 95: 1362–1370.
- Sperry JS and Tyree MT** (1988) Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiol.* 88: 581-587.
- Spinarova S and Hendriks L** (2007) Post-harvest water stress tolerance of various rose cultivars:

- screening and characterization. *Acta Hort.* 751: 423-430.
- Stone EC** (1957) Dew as an ecological factor. I. A review of the literature. *Ecology* 38: 407-413.
- Sun A, Jameson PE and Clemens J** (2000) Stamen abscission and water balance in *Metrosideros* flowers. *Physiol Plant.* 110: 271-278.
- Sutton BG, Ting IP and Sutton R** (1981) Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. *Plant Physiol.* 68: 784–787.
- Taiz L and Zeiger E** (2002) *Plant Physiology*. 3rd Edition, Sinauer Associates.
- Taylor JE and Whitelaw CA** (2001) Signals in abscission. *New Phytol.* 151: 323-339.
- Thomas DS, Montagu KD and Conroy JP** (2007) Temperature effects on wood anatomy, wood density, photosynthesis and biomass partitioning of *Eucalyptus grandis* seedlings. *Tree Physiol.* 70: 251-260.
- Tinus RW, Burr KE, Atzmon N and Riov J** (2000) Relationship between carbohydrate and root growth potential of coniferous seedlings from three climates during cold hardening and de-hardening. *Tree Physiol.* 20: 1097-1104.
- Torre S, Fjeld T, Gislerod HR and Moe R** (2003) Leaf anatomy and stomatal morphology of greenhouse roses grown at moderate or high air humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 598-602.
- Tunggoen K, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Katsuhara M, Brunel N, Sakr S, Narangajavana J and Chrestin H** (2009) Involvement of *HbPIP2;1* and *HbTIP1;1* aquaporins in ethylene stimulation of latex yield through regulation of water exchanges between inner liber and latex cells in *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol.* 151: 843–856.
- Turner NC** (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* 58: 339-366.
- Twumasi P, Schel JHN and Van Ieperen W** (2009). Differential effects of temperature on stem length and xylem vessel length distribution in *Zinnia elegans*. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 84: 531-535.
- Twumasi P, Van Ieperen W, Woltering EJ, Emons AMC, Schel JHN, Snel JFH, Van Meeteren U and Van Marwijk D** (2005) Effects of water stress during growth on xylem anatomy, xylem functioning and vase life in three *Zinnia elegans* cultivars. *Acta Hort.* 669: 303-311.
- Tyerman SD, Niemietz CM and Bramley H** (2002) Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell. Environ.* 25: 173–194.
- Tyree M** (2003) The ascent of water. *Nature* 423: 923.
- Tyree M and Dixon MA** (1986) Water stress induced cavitation and embolism in some woody plants. *Physiol. Plant.* 66: 397–405.

- Tyree M and Ewers FW** (1991) Tansley review No. 34: The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytol.* 119: 345-360.
- Tyree M, Salleo S, Nardini A, Lo Gullo MA and Mosca R** (1999) Refilling of embolized vessels in young stems of Laurel. Do we need a new paradigm? *Plant Physiol.* 120: 11–22.
- Tyree M and Sperry JS** (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 19-38.
- Vaadia Y and Waisel Y** (1963) Water absorption by the aerial organs of plants. *Physiol. Plant.* 16: 44-51.
- Valle RE, Evans RY, Bobroff S and Reid MS** (2001) Magnetic resonance imaging investigation of the rehydration of cut roses. *Acta Hort* 553: 495-497.
- Van Doorn WG** (1997) Water relations of cut flowers. *Hort. Rev.* 18: 1–85.
- Van Doorn WG** (2002) Effect of ethylene on flower abscission: A survey. *Ann. Bot.* 89: 689-693.
- Van Doorn WG** (2004) Is petal senescence due to sugar starvation? *Plant Physiol.* 134: 35-42.
- Van Doorn WG, Abadie P and Belde PJM** (2002) Alkylethoxylate surfactants for rehydration of roses and *Bouvardia* flowers. *Postharvest Biol. Technol.* 24: 327–333.
- Van Doorn WG and Cruz P** (2000) Evidence for a wounding-induced xylem occlusion in stems of cut chrysanthemum flowers. *Postharvest Biol. Technol.* 19: 73-93.
- Van Doorn WG, Perik RRJ and Belde PJM** (1993) Effects of surfactants on the longevity of dry-stored cut flowering stems of rose, *Bouvardia* and *Astilbe*. *Postharvest Biol. Technol.* 3: 69-76.
- Van Doorn WG and Reid MS** (1995) Vascular occlusions in stems of cut rose flowers exposed to air: Role of xylem anatomy and rates of transpiration. *Physiol. Plant.* 93: 624-629.
- Van Doorn WG and Suiro V** (1996) Relationship between cavitation and water uptake in rose stems. *Physiol. Plant.* 96: 305–311.
- Van Ieperen W, Nijse J, Keijzer K and Van Meeteren U** (2001) Induction of air embolism in xylem conduits of pre-defined diameter. *J. Exp. Bot.* 52 :981-991.
- Van Ieperen W, Van Meeteren U and Nijse J** (2002) Embolism repair in cut flower stems: a physical approach. *Postharvest Biol. Technol.* 25: 1–14.
- Van Meeteren U** (1992) Role of air embolism and low water temperature in water balance of cut chrysanthemum flowers. *Sci. Hort.* 51: 275-284.
- Van Meeteren U, Van Ieperen W, Nijse, J Keijzer K, Scheenen T and Van As H** (2001) Processes and xylem anatomical properties involved in rehydration dynamics of cut flowers. *Acta Hort.* 543: 207-215.
- Van Rensburg L, Krüger GHJ and Krüger H** (1993) Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in

Nicotiana tabacum L. *J. Plant Physiol.* 141: 188-194.

- Vardi Y and Mayak S** (1989) Involvement of abscisic acid during water stress and recovery in petunia flowers. *Acta Hort.* 261: 107–112.
- Volkov V, Hachez C, Moshelion M, Draye X, Chaumont F and Fricke W** (2007) Water permeability differs between growing and non-growing barley leaf tissues. *J. Exp. Bot.* 58: 377-390.
- Waisel Y** (1958) Dew absorption by plants of arid zones. *Bul. Res. Council Israel* 6: 180-186.
- Woltering EJ and Van Doorn WG** (1988) Role of ethylene in senescence of petals - morphological and taxonomical relationships. *J. Exp. Bot.* 39: 1605-1616.
- Xue J, Yang F and Gao J** (2009) Isolation of *Rh-TIP1;1*, an aquaporin gene and its expression in rose flowers in response to ethylene and water deficit. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 407-413.
- Yang SF and Hoffman NE** (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- Yang JC, Zhang JH, Ye YX, Wang ZQ, Zhu QS and Liu LJ** (2004) Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of rice grains to water stress during filling. *Plant Cell Environ.* 27: 1055–1064.
- Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA and Chaumont F** (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12359-12364.
- Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH and Haase A** (2004) Tansley review. Water ascent in tall trees: Does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytol.* 162: 575–615.
- Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Wagner HJ, Szimtenings M, Haase A and Bentrup FW** (2002a) What are the driving forces for water lifting in the xylem conduit? *Physiol. Plant.* 114: 327-335.
- Zimmermann U, Wagner HJ, Heideker M, Mimietz S, Schneider H, Szimtenings M, Haase A, Mitlohner R, Kruck W, Hoffmann R and Konig W** (2002b) Implications of mucilage on pressure bomb measurements and water lifting in trees rooting in high salinity water. *Trees* 16: 100-111.
- Zufferey V, Cochard H, Ameglio T, Spring J-L and Viret O** (2011) Diurnal cycles of embolism formation and repair in petioles of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Chasselas). *J. Exp. Bot.* 62: 3885-3894.
- Zwieniecki MA, Brodribb TJ and Holbrook NM** (2007) Hydraulic design of leaves: Insights from rehydration kinetics. *Plant Cell Environ.* 30: 910-921.

Zwieniecki MA and Holbrook NM (1998) Diurnal variation in xylem hydraulic conductivity in white ash (*Fraxinus americana* L.), red maple (*Acer rubrum* L.) and red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Plant Cell Environ.* 21: 1173-1180.

Zwieniecki MA and Holbrook NM (2009) Confronting Maxwell's demon: Biophysics of xylem embolism repair. *Trends Plant Sci.* 14: 530-534.

ז. נספח - רשימת פרסומים

ז.1. מאמרים

1. Philosoph-Hadas S, Droby S, Rosenberger I, Perzelan Y, **Shtein I** and Meir S (2007). Sea transport of ornamental branches: Problems and solutions. *Acta Horticulturae* 755: 267-276.
2. **Shtein I**, Meir S, Perzelan Y, Rosenberger I, Riov J and Philosoph-Hadas S (2009). Improving water balance and vase life of new cut foliage branches of *Dodonaea* by postharvest treatments. *Acta Horticulturae* 813: 225-232.
3. **Shtein I**, Meir S, Riov J and Philosoph-Hadas S (2011) Interconnection of seasonal temperature, vascular traits, leaf anatomy and hydraulic performance in cut *Dodonaea* 'Dana' branches. *Postharvest Biology and Technology* 61: 184–192.
4. Philosoph-Hadas S, Perzelan Y, Droby S, Bar-Tal A, **Shtein I**, Salim S and Meir S (2013) *Pittosporum* cut branches: Characterization and prevention of the brown spots on the variegated leaves during growth and sea transport. *Acta Horticulturae* 970: 101-113.

ז.2. תקצירים של הרצאות או פוסטרים שהוצגו בכנסים בארץ ובה"ל

1. **Shtein I**, Meir S, Riov J, Kagan S and Philosoph-Hadas S (2007). Water balance of *Dodonaea* cut branches and their vase life improvement by postharvest treatments related to ethylene. Abstract in The Annual Meeting of the Israeli Society of Plant Sciences, Rehovot, Israel. p. 30. (Poster presentation).
2. **Shtein I**, Meir S, Perzelan Y, Rosenberger I, Riov J and Philosoph-Hadas S (2007). Improving water balance and vase life of new cut foliage branches of *Dodonaea* by postharvest treatments. Abstract in the Proceedings of the IV International Symposium on New Floricultural Crops, Madeira, Portugal. p. 138. (Lecture presentation).
3. Philosoph-Hadas S, Droby S, Peer R, **Shtein I**, Perzelan Y, Bar-Tal A, Keinan M, Rosenberger I and Meir S (2008). *Pittosporum* cut branches: Characterization and prevention of the brown spots on the variegated leaves during growth and sea transport. Abstract in The 9th International Symposium on Postharvest Quality of Ornamental Plants. Odense, Denmark, p. 39. (Lecture presentation).
4. **Shtein I**, Meir S, Riov J and Philosoph-Hadas S (2009). Seasonal changes in functional anatomy influence water balance in cut branches of *Dodonaea* 'Dana'. Abstract in The Annual Meeting of the Israeli Society of Plant Sciences, Rehovot, Israel. p. 35. (Poster presentation).
5. **Shtein I**, Meir S, Riov J and Philosoph-Hadas S (2010). Interconnection between seasonal temperature changes, vascular design, leaf anatomy and hydraulic performance of cut *Dodonaea* 'Dana' branches. Abstract no. 15005 in the Plant Biology Meeting, Montreal, Canada. (Poster presentation).
6. **Shtein I**, Meir S, Riov J and Philosoph-Hadas S (2011). Interconnection between seasonal temperature changes, vascular design, leaf anatomy and hydraulic performance of cut *Dodonaea*

'Dana' branches. Abstract in The Annual Meeting of the Israel Society of Ecology and Environmental Sciences, Megiddo, Israel. p. 212. (Poster presentation; awarded the third prize).

7. **Shtein I**, Meir S, Shahr-Ivanov Y, Perzelan Y, Riov J and Philosoph-Hadas S (2012). Ethylene extends the vase life of *Dodonaea* 'Dana' cut branches by improving their water balance. Abstract in The IX International Conference on the Plant Hormone Ethylene, Rotorua, New Zealand. p. 111.

Abstract

Dodonaea 'Dana' is an Israeli hybrid between *Dodonaea viscosa* cv. 'Purpurea' and another species, which belongs to Sapindaceae family. *Dodonaea* 'Dana' is an evergreen shrub of up to 3 m height. It has oval simple leaves of 10 cm length and 2 cm width. The leaf colour is green in summer, while in autumn, when the temperature decreases, the leaves acquire a reddish- tint colour. Flowering occurs in winter. From March till April the branches develop clusters of dry pink-purple fruits.

Because of the decorative leaves and fruits, *Dodonaea* 'Dana' has a high commercial potential as a cut decorative branch. However, *Dodonaea* branches wilt after a short time in the vase, especially flower and fruit bearing branches, or when the vegetative branches are harvested in winter. Thus, in winter cut vegetative branches wilted already after 6 days in the vase, while in summer the branches wilted only after 3 weeks, although the plants grew under constant irrigation all year round. Based on our preliminary results and the literature, we have examined several possible factors that can affect the water balance in cut branches harvested at various seasons and in different developmental stages.

It is known that cut branches suffer from accelerated wilting in the vase, either as a consequence of impaired water transport, or because of senescence induced following harvesting. From membrane ion leakage and chlorophyll degradation measurements during vase life, as well as from experiments in which the branches were covered with polyethylene bags to prevent transpiration, it is concluded that *Dodonaea* cut branches wilted as a consequence of impaired water transport. This conclusion is supported by the observations, that ethylene, which is regarded as the senescence hormone, did not cause senescence of *Dodonaea* cut branches and even improved their vase life. Therefore, the present research focused on the possible factors that can affect the water balance of cut vegetative branches harvested in winter and flower and fruit bearing branches.

Visible occlusions (tyloses, polymers) were not observed in any part of the plant. Nevertheless, using a fuchsin-coloured vase solution, we could show that some xylem vessels did not transport water, indicating that they might be filled with air. This suggestion was reinforced by the experiment showing that recutting the branches in air during vase life significantly increased leaf wilting, probably due to their vulnerability to embolism. Indeed, quantification of the embolism index in the vessels during vase life by sectioning the stems in glycerol for visualizing air bubbles in the xylem under the microscope, clearly demonstrated that xylem vessels developed embolism.

Dodonaea 'Dana' anatomy was found to be similar to that of other members of Sapindaceae family. The stem has multiple fibers, and the xylem is of a diffused porous type. The vessel elements have simple plates and bordered pits. The leaves exhibit xeromorphic features, including thick cuticle, secretory trichomes, and abaxial stomata. The trichomes are water impermeable, while the epidermis transfers water. The leaf vascular bundles have vessels freely ending in the mesophyll.

The stem appeared to be the limiting factor for water uptake. Cut vegetative branches quickly wilted in winter and exhibited a positive water status in summer, while detached leaves from the same branches had a positive water status all year round.

The present research focused on three main factors that might explain the differences found in the water balance of cut branches harvested in various seasons and in various developmental stages:

1. Functional anatomy (structure of xylem and leaves) during the year, which might affect the water balance.
2. Changes in the osmotic adjustment (accumulation of soluble sugars and proline) of the cut branches during vase life, since an increase in osmotic potential improves water uptake.
3. Changes in the activity of aquaporins during vase life in various seasons, which might affect the water balance. We have examined the effect of aquaporin inhibitors on the water balance, as well as the expression of several aquaporin genes during vase life.

In addition, we have examined the possible effect of ethylene on the water balance of cut *Dodonaea* branches, since this hormone has a significant effect on the duration of vase life of cut branches.

The results of the present research demonstrated seasonal changes in the three examined factors outlined above, as detailed herewith:

Seasonal changes in functional anatomy - The xylem anatomical structure of summer branches differed from that of vegetative branches harvested in winter. Vessel diameter and the length of vessel members showed a negative correlation with the maximal day temperature at harvest, while vessel density showed a positive correlation with temperature. Thus, winter vessels were significantly wider and with longer vessel members than the summer ones. The xylem structure influenced the water balance of the branches during the entire vase life. The xylem vessel dimensions are known to influence the vulnerability to embolism. According to the literature, long vessel members and wide vessels are relatively

more sensitive to embolism. It can, therefore, be concluded that the sensitivity to wilting in various seasons is mainly determined by the anatomical structure of the xylem.

The embolism index of the branches, evaluated by sectioning the branches in glycerol and counting the air bubbles under the microscope, was high in winter branches already from day 1 in the vase and remained high during the entire vase life, while in summer branches the embolism index was initially low and gradually increased during vase life. These results further confirm that winter branches are more sensitive to embolism than summer branches due to their xylem structure, and therefore they suffer from embolism immediately after harvest, leading to accelerated leaf wilting.

The leaf structure was affected by seasonal changes, mainly expressed in changes in the maximal daily temperature. Leaf thickness showed a negative correlation with day temperature, while stomata and trichome densities showed a positive correlation with day temperature. The leaf structure influenced the water balance of the branches only at the beginning of vase life (day 1), but not at its end (day 16).

Seasonal changes in the osmotic adjustment - Seasonal starch and sugar content in the leaves of vegetative branches did not significantly correlate with water balance during vase life. In fruit bearing branches, the soluble sugar content in the leaves was lower than that in leaves of vegetative branches at harvest, indicating that fruit bearing branches are more sensitive to water stress. Since fruits serve as a sink for carbohydrates, fruit bearing branches need sugar additives to preserve their vase life quality. At harvest, proline content in the leaves was lower in fruit bearing branches than that in vegetative branches, but later during vase life proline content was similar in both branch types.

Seasonal changes in the presence and activity of aquaporins - Aquaporins are considered as an important factor in plant water relations. To examine their possible involvement in the water balance of *Dodonaea* cut branches, two different aquaporin inhibitors, HgCl₂ and phloretin, were used. Phloretin inhibited the water uptake of the branches, while HgCl₂ increased the water uptake. It can, therefore, be concluded that *Dodonaea* has mercury-insensitive aquaporins.

Three partial sequences of putative aquaporin genes of the PIP family expressed in *Dodonaea* leaves and stems were obtained. The expression of one of the genes, *PIP2a*, was higher in summer leaves and it decreased during vase life, thus showing a correlation to the water balance of the cut branches. *In situ* hybridization showed that this gene was expressed in the leaf epidermis, in cells that contain pectin, which is a hydrophilic polymer that helps to retain the water status of the tissue.

Effect of ethylene - Exposure of *Dodonaea* cut branches to ethylene increased their fresh weight during the entire vase life. In addition, ethylene also affected the activity of aquaporins. However, unexpectedly, ethylene reduced the expression of the *PIP2a* gene, which encodes an aquaporin in *Dodonaea*.

Conclusions:

- From the results of the present study it can be concluded that the accelerated wilting of cut vegetative *Dodonaea* 'Dana' branches in winter stems from their impaired water balance. The present research demonstrates how seasonal temperature-related anatomical changes influence the hydraulic function of *Dodonaea* 'Dana' branches during vase life at different seasons.
- The vessel element structure is the critical factor, which defines the water transport efficiency in cut *Dodonaea* 'Dana' branches. Differential vessel dimensions increases the vulnerability to embolism and subsequently accelerated wilting of cut winter vegetative branches, compared to summer ones.
- In fruit bearing branches, the fruits serve as a sink for leaf carbohydrates, thereby accelerating the branch wilting in the vase.
- Aquaporins are probably involved in the water balance of cut *Dodonaea* branches, but their exact role is not yet clear.
- Ethylene did not induce senescence or wilting in cut *Dodonaea* branches, but uniquely improved their water balance under normal conditions. This effect might result from the effect of ethylene on the activity of aquaporins.
- Since no detailed research has been done so far on the seasonal changes of water balance in cut branches, the novel findings of the present study might serve as a model for understanding the water balance of cut woody ornamentals which suffer from accelerated seasonal wilting in the vase.

E.2.3. Seasonal changes in the biochemical parameters	83
E.2.4. Seasonal changes related to aquaporins.....	84
E.2.4.1. Molecular and physiological characterization of aquaporins, and their involvement in the water balance of cut <i>Dodonaea</i> `Dana` branches.....	84
E.2.4.2. Effect of ethylene on aquaporins	85
E.2.4.3. Seasonal changes in aquaporin gene expression	86
E.2.5. The results in relation to the global climate change	87
E.3. Conclusions	87
F. BIBLIOGRAPHY	89
G. APPENDIX – LIST OF PUBLICATIONS	105
G.1. Research articles	105
G.2. Abstracts of lectures or posters presented in local and international Conference	105
ABSTRACT IN ENGLISH	I

D.4. Seasonal changes in the anatomical structure of <i>Dodonaea</i> branches and their effect on the vase life	54
D.4.1. Stems	54
D.4.2. Leaves	57
D.4.3. Comparative anatomical structure of vegetative and reproductive branches	60
D.5. Seasonal changes in the content of leaf carbohydrates and osmolites and their effect on the vase life	61
D.5.1. Seasonal changes in starch content	61
D.5.2. Seasonal changes in the content of soluble sugars	61
D.5.3. Comparative content of leaf carbohydrates and proline in vegetative and reproductive branches during vase life, and effect of external sugar application on these branches	62
D.6. Seasonal changes in the presence and activity of aquaporins, and their effect on vase life	65
D.6.1. Effect of aquaporin inhibitors on the water balance of cut <i>Dodonaea</i> branches	65
D.6.2. Characterization of aquaporin genes isolated from <i>Dodonaea</i> 'Dana' leaves	67
D.6.3. Seasonal expression of aquaporin genes during vase life	69
D.6.4. Localization of the <i>PIP2a</i> gene in the leaves	72
E. DISCUSSION AND CONCLUSIONS	73
E.1. Anatomical and physiological characterization of cut <i>Dodonaea</i> 'Dana' branches during vase life	73
E.1.1. Anatomical structure	73
E.1.2. Vase life performance	74
E.1.3. The reason for wilting of cut <i>Dodonaea</i> 'Dana' branches in the vase	74
E.1.4. Embolism formation	75
E.1.5. Daily fluctuations in the water balance	76
E.1.6. Foliar water uptake from the air under full humid conditions	77
E.1.7. Effect of ethylene on the water balance	79
E.2. Seasonal changes during vase life of cut <i>Dodonaea</i> 'Dana' branches	79
E.2.1. Seasonal changes in the water balance	79
E.2.2. Seasonal changes in the functional anatomy of leaves and stems	80

C.3.2. Sample analysis by electron microscopy	18
C.3.3. Determination of vessel dimensions using maceration and hand sections	19
C.3.4. Epidermal imprints	19
C.3.5. Apoplastic water movement	19
C.4. Determination of water balance parameters	19
C.5. Vessel length determination	20
C.6. Occlusions evaluation	20
C.7. Creating humid atmosphere	20
C.8. Emboli index evaluation	21
C.9. Determination of ethylene and CO₂ production rates.....	21
C.10. Determination of carbohydrates and proline levels in leaves	22
C.11. Determination of leaf senescence parameters	22
C.11.1. Ion leakage	22
C.11.2. Chlorophyll concentration.....	22
C.12. Examination of aquaporin gene expression in leaves and stems	23
C.12.1. RNA extraction and cDNA synthesis	23
C.12.2. Cloning and sequencing of genes of the PIP family	23
C.12.3. Real-Time PCR	24
C.13. Determination of the <i>PIP2a</i> gene localization by <i>In situ</i> hybridization	24
C.14. Statistical analysis	25
D. RESULTS	26
D.1. Morphological and anatomical characterization of <i>Dodonaea</i> 'Dana' branches	26
D.1.1 Stem anatomy	26
D.1.2 Leaf anatomy	29
D.2. Physiological characterization of cut <i>Dodonaea</i> 'Dana' branches in regard with their water balance	33
D.2.1. Water balance of the cut branches during vase life	33
D.2.2. Examination of the reasons for wilting of cut <i>Dodonaea</i> 'Dana' branches ...	35
D.2.3. Detection of occlusions in the stem and the petioles	37
D.2.4. Daily fluctuations in the water uptake of the cut branches	41
D.2.5. Effect of ethylene on the water balance of the cut branches	44
D.3. Seasonal changes in the water balance during vase life	47

Table of Contents

A. ABSTRACT IN HEBREW	i
LIST OF ABBREVIATIONS	1
B. INTRODUCTION	2
B.1. <i>Dodonea</i> 'Dana' – general background	2
B.2. The reasons for wilting of cut branches	2
B.2.1. Factors causing impaired water uptake	2
B.2.2. Enhanced senescence after harvest	4
B.3. Mechanisms for coping with water stress in plants	7
B.3.1. Mechanisms for enhancing water uptake	7
B.3.2. Presence of acid polysaccharides	9
B.3.3. Water saving mechanisms	9
B.4. Anatomical adaptations to water stress	10
B.5. Environmental effects on anatomical and physiological factors related to water balance	11
B.6. Basic approaches to solve water balance problems in cut branches	13
B.7. Parameters and methods for evaluating water balance in cut branches and the factors affecting it	14
B.8. The research objectives	16
B.8.1. The research hypothesis	16
B.8.2. The specific objectives	16
C. METHODOLOGY	17
C.1. Plant material	17
C.1.1. Cut branches	17
C.1.2 Detached leaves	17
C.2. Treatments application	17
C.2.1. Sugar pulsing	17
C.2.2. Sugar in the vase solution.....	17
C.2.3. Aquaporin inhibitors	17
C.2.4. Ethylene and ethylene inhibitor	18
C.3. Plant anatomy	18
C.3.1. General histology	18

This work was carried out under the supervision of:

Dr. Sonia Philosoph-Hadas

Department 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

**Anatomical and physiological factors
influencing the vase life of cut *Dodonaea*
'Dana' branches during the year**

**Thesis submitted for the degree of
“Doctor of Philosophy”**

**By
Ilana Shtein**

Submitted to the Senate of the Hebrew University of Jerusalem

March 2013