

"נביטה" של גרגרי אבקה

בפרחים זכריים או בפרחים דו מיניים של צמחים המתרבים ברבייה זוויגית¹ מתפתחים גרגרי אבקה². גרגרי האבקה הם בעלי מבנה ייחודי המאפשר להם להגיע אל הצלקת של הפרח. בתנאים מתאימים, מכל גרגר אבקה יצמח נחשון אל תוך עמוד העלי ובהגיעו אל השחלה תתרחש הפריה. תהליך זה של התפתחות נחשון מגרגר האבקה מכונה נביטה רק בשל הדמיון הצורני בין יציאת הנחשון מגרגר האבקה ליציאת השורשון מהזרע. במחקר החקלאי, במיוחד בפיתוח של זנים חדשים, נפוץ שימוש בשיטה כמותית לבדיקה *in vitro* של נביטת גרגרי אבקה. שיטה זו חשובה מכיוון שחיוניות גרגרי האבקה היא [מדד להצלחת תהליך ההפריה](#) בצמחים הנחקרים.

תיאור השיטה - "הטיפה התלויה"³

שיטה זו מתאימה לניסויים בהם המשתנה התלוי הוא מידת החיוניות של גרגרי האבקה (בתנאי הניסוי) ודרכי המדידה הן: אחוז הנביטה של גרגרי האבקה ואורכם של הנחשונים.

כלים וחומרים

- זכוכית שקע + זכוכית מכסה
- מחט מתקן
- פיפטת פסטור מזכוכית + טפטף
- זולין + קיסם עץ (או כפית קטנה)
- מגבות נייר
- מיקרוסקופ או מיקרוסקופ עם מצלמה / וידאוסקופ
- אבקנים מפרחים שונים, לדוגמה פרחים של הצמח כובע הנזיר
- 5 מ"ל תמיסת סוכרוז בריכוז 30%⁴
- 5 מ"ל של תמיסת חומצה בורית בריכוז 0.002%

¹ תיאור מפורט של מבנה חלקי הפרח ותהליך ההפריה ניתן לקרוא בספר [רבייה בטבע בצמחים, באדם ובבעלי חיים](#) עמ' 119 – 122, 127 – 129. (האוניברסיטה עברית בירושלים, המרכז להוראת המדעים, מהדורה שניה, תשע"ב 2012)

² פרופ' ע. אשל, "גרגרי אבקה של צמחים", באתר [צמח השדה](#).

³ בנספח (עמודים 7,8) מתוארת שיטה אחרת.

⁴ [חשיבותו של הסוכרוז](#) במהלך נביטה *in vitro* של גרגרי אבקה היא כפולה: הוא שומר על הריכוז האוסמוטי של הנוזל ומשמש כסובסטר לתהליכים מטבוליים. חומצה בורית מזרזת את צמיחת הנחשון.

מהלך העבודה:

בסעיפים 1 - 5 תכינו "טיפה תלויה" שבה יהיו גרגרי אבקה בתוך תמיסת סוכרוז וחומצה בורית. לפני הביצוע מומלץ לצפות ב**סרטון** המתאר את מהלך העבודה.

1. היעזרו בקיסם ומרחו זולין **מסביב** לשקע שבזכוכית הנושאת (לא בתוך השקע).

2. לרשותכם תמיסה המכילה 15% סוכרוז ו- 0.001% חומצה בורית.

- הניחו על השולחן **זכוכית מכסה**.

- באמצעות פיפטת פסטור, טפטפו טיפה מהתמיסה במרכז של הזכוכית מכסה.

3. לרשותכם פרח של הצמח "כובע הנזיר".

- באמצעות מחט מתקן הוציאו מהמאבקים של הפרח מעט גרגרי אבקה (ניתן להבחין בצבע

צהוב בקצה המחט).

- טבלו את קצה המחט בטיפה שעל הזכוכית מכסה (הטבילה מאפשרת פיזור הגרגרים).

- חזרו עוד 3 - 4 פעמים על הוצאת גרגרי אבקה וטבילתם בטיפה.

4. **הפכו את זכוכית השקע והניחו אותה בזהירות על הזכוכית מכסה**, כך שהזולין שבשולי השקע

"ידיבק" את שתי הזכוכיות זו לזו.

5. **הפכו בתנועה סיבובית את הזכוכיות הצמודות והניחו על השולחן את הזכוכית שקע**.

התוצאה של פעולה זו היא "טיפה תלויה" של נוזל ובו גרגרי אבקה.

6. המתינו כ- 30 דקות⁵.

- התבוננו בתכשיר בהגדלה קטנה של המיקרוסקופ ואתרו את האזור שבו נראים גרגרי אבקה.

- עברו להגדלה בינונית וחפשו גרגרים שבהם ניתן להבחין בתחילת צמיחה של נחשון.

- עברו להגדלה גדולה של המיקרוסקופ.

- צלמו או ציירו מספר גרגרי אבקה שהצמיחו נחשון.

⁵ כדי לשמור על לחות, יש המכניסים את הזכוכיות בזמן ההמתנה לצלחת פטרי המרופדת בנייר סינון לח או בצמר גפן לח. ראו תיאור השיטה בעמ' 8 [במקור המידע](#)

7. בכל טיפול אפשר לספור את מספר הנחשונים שנבטו ולמדוד את האורך של נחשונים שהתפתחו (ראו פירוט בסעיף ט).



גרגרי אבקה על
צלקת כובע הנזיר



פרח כובע הנזיר בשלב הזכרי
צילום: יהודית שניצר, מתוך
"המרכז הארצי למורי
הביולוגיה, תופעות בתמונות"

הערות לגבי ההכנות לניסוי

- א. נוח מאד לעבוד עם אבקנים של פרחי **כובע הנזיר** (*Tropaeolum majus*).
צמחי כובע הנזיר פורחים בסוף החורף (מסוף ינואר עד תחילת מאי), הצמח נפוץ בגינות וחשוב למנוע את הפצת זרעיו מגינות לשטחי בר (מין פולש).

גרגרי האבקה⁶ של כובע הנזיר הם גדולים יחסית ולפני ביצוע ניסוי כדאי שהתלמידים יצפו בהם בהסתכלות במיקרוסקופ. הצלחה מרבית של נביטת גרגרי אבקה אלו תתרחש כאשר בוחרים פרחים בשלב הזכרי שבו מתבלטים גרגרי האבקה (ראו צילום).
בספרות יש מידע על שימוש בטטרזוליום כלורי הצובע גרגרי אבקה טריים באדום בהיר ומאפשר להבחין בין גרגרי אבקה חיוניים לבין גרגרי אבקה מתים.

ב. ישנם פרחים ממינים אחרים של צמחים שאפשר להנביט בהצלחה את גרגרי האבקה שלהם (ראו המלצות ב"אוגדן ניסויים בביולוגיה", נושא רביה, האבקה בצמחים: הנבטת גרגרי אבקה והתאמת פרחים לדרך האבקה). לפני בחירת צמח לניסוי יש לבדוק האם פרטים של המין זמינים עבורכם, מהי עונת הפריחה ומהו גודל הפרח.

לתשומת לבכם: אין לבצע ניסויים עם פרחים של צמחים רעילים. אם אחד התלמידים סובל מאלרגיה לפרחי המין הנבחר, יש למנוע ממנו לבצע את הניסוי המתוכנן (ראו **הנחיות לשמירה על בטיחות בעבודה במעבדה לביולוגיה**).

ג. מומלץ לשמור במקרר את תמיסות האם (סוכרוז וחומצה בורית) בריכוזים המפורטים ברשימת הכלים והחומרים (עמ' 1), כדי שתוכלו להכין מהן תמיסות בריכוזים שונים על פי ערכי המשתנה הבלתי תלוי שנבחר לניסוי.
תמיסת סוכרוז עלולה להזדהם. לכן, מומלץ לשמור אותה רק ימים אחדים, בכלי פקוק ובמקרר.

⁶ הצילום בוצע במיקרוסקופ אלקטרוני סורק, SEM. מומלץ לצפות בצילום בשורה האמצעית מצד שמאל ולשים לב ל"סרגל הגודל" שמצורף לצילום.

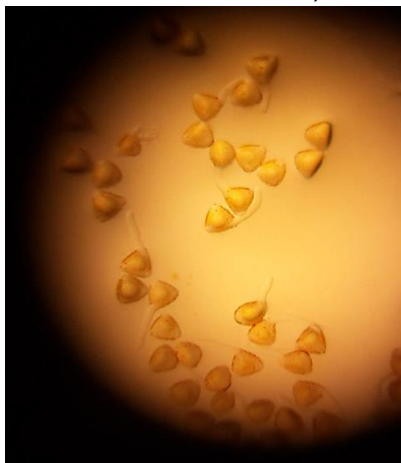
אם התמיסה עכורה היא בוודאי מזוהמת ולא ראויה לשימוש.

ד. בדוגמה שהוצגה בפרוטוקול עורבבו נפחים שווים של תמיסות אָם: סוכרוז וחומצה בורית. על פי הבסיס הביולוגי של הניסוי שיבחר יש לתכנן ולהכין מתמיסות האָם תמיסות בריכוזים שנדרשים לניסוי.

בכל ניסוי נדרש נפח קטן מאד של תמיסות.

ה. חשוב למרוח את הוּזלִין על זכוכית שקע רק **מסביב ובצמוד** לשקע ולא בתוכו. כאמור, הוּזלִין מאפשר ל"הדביק" את הזכוכית מכסה אל הזכוכית נושאת.

ו. לפני ביצוע ניסוי רצוי לתרגל את התלמידים ב"הדבקת הזכוכיות" (זכוכית מכסה וזכוכית



גרגרי אבקה ונחשונים של פרח
כובע הנזיר. צולם במצלמה של

נושאת) ואת ההיפוך שלהן כמתואר ב"מהלך העבודה" סעיפים 4 ו-5. את ההיפוך צריך לבצע בזריזות.

ז. אם ברשותכם מיקרוסקופ עם מצלמה, מומלץ להשתמש בו לביצוע ניסוי בו נבדקת נביטת גרגרי אבקה. הצילומים נשמרים כקבצים במחשב, ואפשר לבצע בהם בכל עת את המדידות והספירות הנדרשות.

הערות לגבי ביצוע ניסוי ושיטות המדידה

ח. משך הזמן הנדרש עד לקבלת תוצאות משמעותיות תלוי גם בטמפרטורה בה נשמרים התכשירים (על השפעת גורמים נוספים ראו סעיף י).

כדאי לבדוק את התוצאות לאחר 30 דקות כפי שהוצע בדוגמה לפרוטוקול (עמ' 2) ולחזור ולבדוק אותן לאחר פרק זמן נוסף. כפי שצוין בסעיף ז לעיל, שימוש במיקרוסקופ עם מצלמה מאפשר שמירת קבצים, ובקלות רבה אפשר יהיה לצלם שנית לאחר פרק זמן נוסף.

ט. הפרוטוקול לדוגמה (עמודים 1, 2) מתאים לניסוי בו המשתנה התלוי הוא הצלחת הנביטה של הנחשונים.

אפשר לבדוק את **המשתנה התלוי** – **בשתי שיטות מדידה** המתבצעות תוך כדי הסתכלות במיקרוסקופ או בצילומים שבוצעו בזמן ההסתכלות:

- בדיקת אחוז גרגרי אבקה נובטים מסך הגרגרים.

בוחרים שדה ראייה בו ניתן להבחין בגרגרי אבקה שהצמיחו נחשון ובגרגרים שלא נבטו בהם נחשונים. סופרים את כל גרגרי האבקה בשדה הראייה ואת המספר של אלה שיש להם נחשון ומחשבים את אחוז הנביטה. מזיזים את הזכוכית נושאת, בוחרים שדה ראייה אחר וחוזרים

על ספירה של הפרטים בכל קבוצה, וכך הלאה.
מחשבים את אחוז הנביטה הממוצע של גרגרי אבקה באותו הטיפול. אם משתמשים במיקרוסקופ עם מצלמה, מצלמים כמה שדות ראייה ואת כל הספירות מבצעים בקבצים של התמונות.

- מדידה או אומדן של אורך הנחשון של גרגרי אבקה.
בוחרים באקראי שדה ראייה ואומדים את האורך של כל נחשון ביחס לקוטר של שדה הראייה⁷ בהגדלה בה מתבוננים. עוברים לשדה ראייה נוסף ואומדים באותו אופן ומחשבים את האורך הממוצע של הנחשונים באותו הטיפול. אם משתמשים במיקרוסקופ עם מצלמה, חשוב לרשום באיזו הגדלה צולמה כל תמונה ולמדוד בצילום את אורך הנחשונים. כדי לקבל את הערך האמיתי של האורך, חשוב לחלק כל מדידה בפקטור ההגדלה.

בדיקה של משתנה תלוי בשתי שיטות מדידה וביצוע חזרות על מדידות בכל אחת מהשיטות מגדילות את מהימנות התוצאות.

הערות לגבי שימוש אפשרי בשיטה במסגרת עבודת ביוחקר

- א. היתרון של ביצוע ניסוי בו משתמשים בשיטת העבודה שתוארה (עמ' 1, 2) הוא האפשרות לעקוב אחר תהליך ביולוגי הדומה במידה רבה לתהליך *in vivo* המתרחש בגרגרי אבקה של פרח.
יתרונות אחרים של ניסוי בו משתמשים בשיטה זו או בשיטה שמתוארת בנספח (עמ' 7-8) הם שהניסוי הוא קצר מועד ונוח מאד לבצע ריבוי פריטים וחזרות על הניסוי ולחשב ממוצע בכל טיפול.
קשיים אפשריים הם איתור הצמח המתאים והשלב ההתפתחותי של הפרח, אי התאמה בין עונת הפריחה של הצמח לבין לוח הזמנים שתוכנן לביצוע הניסוי וקושי של תלמיד לעבוד עם מיקרוסקופ.

⁷ תחילה יש למדוד באמצעות נייר מילימטרי את קוטר שדה הראייה באותה ההגדלה בה צופים. ראו אוגדן ניסויים בביולוגיה, [תרגילי מעבדה 7](#)

ב. ניתן לבצע מגוון ניסויים במסגרת ביוחקר שבהם משתמשים בשיטה.

תהליך נביטת גרגרי אבקה מושפע ממספר רב של גורמים כגון מין הצמח⁸ אשר מפרחיו הוצאו גרגרי האבקה, משך הזמן בו נמשכת ההנבטה, ריכוז הסוכרוז בתמיסת ההנבטה, נוכחות וריכוז חומצה בורית, נוכחות וריכוז יוני סידן, נוכחות וריכוז יוני מגנזיום, טמפרטורה בעת נביטת גרגרי האבקה, נוכחות וריכוז הורמונים צמחיים (כגון אוקסין, ג'יברלין), דרגת pH בנוזל ההנבטה.

כל אחד מהגורמים שהוזכרו יכול להיות משתנה בלתי תלוי בניסוי בו משתמשים בדוגמה לפרוטוקול. מכאן, ששאר הגורמים, מלבד המשתנה הבלתי תלוי בו בוחרים, חייבים להישאר קבועים וכך ישפיעו במידה שווה על התהליך שיימדד.

7 /... המשך בעמ'

⁸ בספרות יש דווח על מחקרים בהם בדקו השפעה של גורמים שונים על התהליך בגרגרי אבקה של [קוטב](#) [מצי](#) או נץ החלב (לדוגמה: [Effect of different media and boric acid on pollen germination and tube growth of Tribulus terrestris](#))

נספח: שיטה להנבטת גרגרי אבקה על אגר

שיטה זו מתאימה לניסויים זהים לאלה שצוינו לגבי שיטת ה"טיפה התלויה" (ראו עמ' 1).

כלים וחומרים

- כוס כימית ובה תמיסת אגר בריכוז 2% וסוכרוז בריכוז 20% + מקל זכוכית
- הוראות הכנה:**
- העבירו לכוס 1 גרם אגר ו- 10 גרם סוכרוז. הוסיפו 50 מ"ל מים מזוקקים.
 - חממו תוך ערבוב עד לרתיחה. (מומלץ לבצע שלב זה זמן קצר לפני שמתחילים לבצע את הניסוי. אם מכינים מראש את האגר יש לחמם את הכלי לפני תחילת ביצוע ניסוי).
 - לפני היציקה לצלחות, המתינו כמה דקות לקירור הנוזל.
 - צלחת פטרי מרופדת בצמר גפן לח + מכסה לצלחת
 - מיקרוסקופ + 2 זכוכיות נושאות למיקרוסקופ.
 - אבקנים מפרחים (על פי בחירה)
 - מחט מתקן.

מהלך העבודה:

בחרו פרח טרי בשלב התפתחותי מתאים (ראו הערות בעמודים 1, 2).

1. הכנת מצע הנבטה לגרגרי אבקה:
לאחר שהאגר שהכנתם התקרר מעט, אך עדיין לא נקרש, העבירו בעזרת מקל זכוכית טיפה של תמיסת אגר מהכוס אל כל אחד מקצות הזכוכית נושאת. (כאשר מטפטפים נוזל חם נוצרות בו בועות רבות, המפריעות בזמן בדיקת התכשיר במיקרוסקופ).
2. הוצאת גרגרי אבקה מהפרח ופיזורם על טיפות האגר:
- בעזרת מחט מתקן הוציאו גרגרי אבקה מהמאבקים.
- לאחר שטיפת האגר התקררה מעט, טלטלו קלות את המחט מעל כל אחת מטיפות האגר, כך שהגרגרים יתפזרו במרכז כל טיפה.
(אם שקי האבקה של הפרח סגורים / אם גרגרי האבקה לא נראים על פני המאבקים, יש להיעזר במחט מתקן, לפתוח את שקי האבקה ולשחרר גרגרי אבקה).

3. השהייה של גרגרי האבקה באינקובטור:

- הניחו את הזכוכית הנושאת על הצמר גפן הלח המרפד את צלחת פטרי וכסו את הצלחת (הרטבת הצמר גפן גורמת ליצירת סביבה לחה שתמנע את התייבשות הגרגרים ותאפשר את צמיחת הנחשונים).
- העבירו את הצלחת המכוסה לאינקובטור או תנור בטמפרטורה של 25 - 30 מעלות צלזיוס. בניסוי מקדים ש לבדוק מהו משך הזמן האופטימלי לשהות בטמפרטורות אלה.

4. דיווח על תוצאות:

- הוציאו את הצלחת מהאינקובטור.
- נגבו את הצד התחתון של הזכוכית הנושאת, הניחו אותה על שולחן המיקרוסקופ והתבוננו בתכשיר בהגדלה קטנה (X40). **אין להניח זכוכית מכסה על האגר.**
- ציירו גרגר אבקה עם נחשון נביטה.

הערה: כפי שהוסבר בדוגמה לפרוטוקול הטיפה התלויה (סעיף ט עמ' 4) אפשר לספור את מספר הגרגרים שנבטו בכל טיפול ולחשב את אחוז הנביטה וכן למדוד את אורך הנחשונים.

גרגרי אבקה מאבקנים של פרחי כובע הנזיר בנוכחות סוכרוז וללא סוכרוז (הצלחות שבהן היה אגר וגרגרי אבקה נשמרו ב-25°C)

