

גורמי וירולנטיות בחיידקים פתוגניים לצמחים

שולמית מנוליס-ששון¹, לאורה צ'לופוביץ¹ ויצחק ברש²

¹המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, ראשון לציון

²המחלקה למדעי הצמח ואבטחת מזון, הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת תל אביב, תל אביב

תקציר

הצמחים בטבע חשופים למספר רב של מיקרואורגניזמים המצויים בסביבתם הקרובה ולמרות זאת מספרן של המחלות המופיעות כתוצאה מהמגע ביניהם הינו נדיר. הסיבה העיקרית לכך נעוצה ביכולת הצמחים לזהות פתוגנים פוטנציאליים הנמצאים בשכנותם ולהפעיל מנגנוני הגנה בסיסיים (Basal host defenses) המקנים חיסון לצמח ומונעים מהמיקרואורגניזמים מלאכלס אותו ובעילות ולהשתמש בו כמקור מזון ובכך לגרום למחלה. כדי להתמודד עם המצב הקיים בטבע פיתחו הפתוגניים לצמחים מנגנוני וירולנטיות רבים ומגוונים המאפשרים את עקיפת מנגנוני ההגנה הצמחיים תוך שימוש בצמח כמקור יעיל למזון ומים. ההתפתחות המהירה בגנטיקה מולקולרית ובביואינפורמטיקה בעשורים האחרונים הביאה לאפיון מעמיק של מנגנוני וירולנטיות ידועים וחדשים הכוללים טוקסינים, הורמונים ואנזימים הנוצרים ע"י החיידק וכן חלבונים רבים נוספים הפוגעים במנגנוני ההגנה של הצמח ומקלים על החדירה והתרבות הפתוגן בפונדקאי. במיוחד יש לציין את גילוי מערכת ההפרשה מסוג 3, (Type III secretion system-T3SS) בחיידקים גרם שליליים המהווה גורם מרכזי במנגנוני הוירולנטיות שלהם. מאחר וגורמי הוירולנטיות הרבים שנחקרו לעומקם לא ניתנים לכסוי במסגרת הנוכחית, נתאר בפרק זה מספר מצומצם של גורמי וירולנטיות בחיידקים המהווים פתוגנים מרכזיים לגידולים רבים בארץ ובעולם כמו הסוגים *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Acidovorax* שהם חיידקים גרם שליליים והחיידקים הגרם חיוביים *Streptomyces* ו- *Clavibacter*.

אופן הציטוט: מנוליס-ששון ש' צ'לופוביץ ל' וברש י' (2021) **גורמי וירולנטיות בחיידקים פתוגניים לצמחים** בספר **תובנות חדשות במחלות צמחים**, בעריכת אלעד י', דומברובסקי א', מנוליס-ששון ש' ועזרא ד', הוצאת המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים.
<https://volcaniarchive.agri.gov.il/skn/tu/e51898>



מבוא

ניתן לחלק את הפתוגנים של צמחים לביוטרופיים, המיביוטרופיים, ונקרוטרופיים (Biotrophs, Hemibiotrophs, Necrotrophs) לפי אורח החיים שלהם. חיידקים ביוטרופיים מקבלים את האנרגיה והמזון הדרושים להם מתאים חיים, לעומתם חיידקים נקרוטרופיים ניזונים מתאים מתים. האחרונים חודרים והורגים את רקמת הצמח באמצעות

הפרשת אנזימים ופיטוטוקסינים וחיים כספרופיטים על הרקמה המתה. גורמי וירולנטיות ביטורופיים, המכונים אפקטורים, גורמים לנטרול גורמי ההגנה של הצמח ולמניפולציה של המטבוליזם הצמחי לטובת הפתוגן. לעומתם גורמי וירולנטיות נקרוטופיים כגון טוקסינים או אנזימים מפרקי דופן, גורמים לתמותת תאי הצמח ומאפשרים לפתוגן לגדול עליו כספרופיט. ההמיביטורופיים משלבים את שני המנגנונים: תחילה פועלים כביטורופיים ובהמשך כנקרוטופיים. חדירת החיידקים לצמח נעשית באמצעות פצעים, פיוניות ופתחים טבעיים אחרים.

גורמי וירולנטיות בחיידקים גרם שליליים הפתוגנים לצמחים

מערכת ההפרשה מסוג 3

הפתוגניות של מרבית החיידקים הגרם שליליים בצמחים ובבעלי חיים תלויה במערכת ההפרשה מסוג שלוש (Type III secretion system-T3SS). ה-T3SS הינו מבנה ממברנלי הדומה מבחינה פילוגנטית לשוטון (flagellum) של חיידקים. מערכת ה-T3SS מהווה מעין מזרק (Injectisome) המעביר את חלבוני הוירולנטיות, המכונים אפקטורים מסוג 3 (Type 3 effectors - T3Es) מתא החיידק ישירות לתא הצמח באמצעות צינורית חיצונית המכונה Pilus. תיאור מפורט על מבנה ה-injectisome ניתן למצוא ב-(Cornelis 2006). האפקטורים מהסוג T3Es מופעלים באמצעות רצף חומצות אמיניות הנמצא בקצה N של חלבון ה-T3E. במקרים רבים תלוי מעבר אפקטורים אלה ב-Chaperon שהינו חלבון המסייע להתקפלות נכונה של חלבון האפקטור הדרושה למעבר דרך ממברנת החיידק לצמח.

מבחינה פילוגנטית מחולקות מערכות ה-T3SS בחיידקים גורמי מחלות בצמחים למשפחות שונות הכוללות *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* ו-Hrp2 המצוי בסוגים *Ralstonia*, *Xanthomonas* ו-*Acidovorax*. חיידקים פטופתוגנים גרם שליליים נושאים, בדרך כלל, מספר רב של אפקטורים שונים מסוג 3. לדוגמה, מספר האפקטורים השונים בכל התת-מינים של *Pseudomonas syringae* כולל כ-94 משפחות אפקטורים, בעוד שתבדיד בודד יכול להכיל כ-39 אפקטורים. בחיידק *Acidovorax citrullii* בתבדיד M6 שבודד ממלון נמצאו 51 גנים שהראו דמיון לאפקטורים ידועים בפתוגנים אחרים (Jiménez-Guerrero et al., 2020). לעומת זאת בשני הפתוגרים של החיידק יוצר העפצים על גבסנית וסלק ו-*P. a. pv. betae* (*Pag*), *P. a. pv. gypsophilae* (*Pag*), *Pantoea agglomeranse* *pab* ריצוף גנום כללי בשילוב אנליזה המכונה "Machine-learning approach" זוהו 9 T3Es המספיקים ל-*Pag* לגרום עפצים על גבסנית ותגובת עמידות (HR) Hypersensitive response, על סלק, ו-8 אפקטורים המספיקים ל-*Pab* לגרום לעפצים על גבסנית וסלק (Nissan et al., 2018). מספר ה-T3Es בחיידק מושפע מאורך תקופת יחסי הגומלין שבין הפתוגן לפונדקאי. המספר הנמוך של T3Es בשני הפתוגרים של *P. agglomeranse* בהשוואה לחיידקים פטופתוגנים אחרים כגון, *Pseudomonas syringae* (DC 3000), *Xanthomonas sp.* או *Ralstonia solani*, שבהם מספר ה-T3Es המינימלי לפתוגר הוא גבוה (מעל 30), מהווה תמיכה בהיפותזה שהופעתם הייתה כנראה בשלב מאוחר באבולוציה. במספר מקרים נמצא שהפחתה של אפקטור בודד ע"י מוטציה אינה משפיעה באופן מובהק על הוירולנטיות, דבר היכול להעיד על חפיפה

(redundancy) במנגנון הפעילות עם אפקטורים אחרים. לעומת זאת בחיידקים *Pag* ו-*Pab* נמצא כי מספיקה העברת שני אפקטורים מחיידקים אלו לחיידקים לא פתוגניים או פתוגנים על צמחים אחרים כמו *Erwinia* (*amylovora*, *Dickeya solani*, *Xanthomonas campestris* (Nissan et al., 2019).

נוסף לדיכוי המערכת החיסונית הבסיסית של הצמח, מעורבים ה-T3Es בשיבוש תהליכים רבים אחרים בתא הצמחי הכוללים פרוק חלבונים, השפעה על פעילות הורמונלית, מעבר חלבונים באמצעות שלפוחיות (Vesicles) ועוד. תיאור מפורט על מגוון תפקידי האפקטורים מסוג 3 בהקשר ליורולנטיות של חיידקים פטופתוגניים גרם שליליים ניתן למצוא ב-Büttner (2016). אחת הדרכים היעילות המופעלות על ידי האפקטורים מסוג 3 להטיית המטבוליזם של הצמח לטובת הפתוגן היא מעורבות בתהליכי השעתוק המשפיעים על ביטוי הגנים. פעילות זו נעשית על ידי חדירה ישירה של חלבוני ה-T3Es לגרעין התא הצמחי וקשירתם ל-DNA או למרכיבים אחרים של תהליך השעתוק. דוגמאות בולטות לאפקטורים מסוג 3 הפועלים כמפעילי שעתוק מצויים במשפחת האפקטורים המכונה Transcription Activator-Like effectors (TALe) והנפוצה ב-*Xanthomonas spp.* ובמספר סוגי חיידקים מעטים נוספים, וכן האפקטורים HsvG ו-HsvB המצויים בשני הפתוגנים של החיידק יוצר העפצים על גבסנית וסלק *Pag* ו-*Pab*. תכונות אופייניות למבנה ה-TALe כוללות: Acidic activation domain הנמצא באזור ה-C-terminal של הגן והדרוש להפעלתו, Nuclear Localization Signal (NLS), הדרוש להכנסת האפקטור לגרעין תא הצמח וכן האזור המרכזי של האפקטור הדרוש לקשירתו לגן הצמחי. האזור המרכזי מורכב מרצפים דומים המופיעים במספר עותקים (חוזרנים) של חומצות אמינו (כ-17 חוזרנים בממוצע) ודרושים לפחות 6.5 חוזרנים להפעלת גן המטרה על ידי ה-TALe. מחקרים רבים נעשו בשנים האחרונות על הקשר בין הרכב הרצפים החוזרניים לקשירתם הספציפית לגנים המופעלים על ידי ה-TALe בצמח. מאמר סקירה מפורט על נושא זה ניתן למצוא ב-Büttner (2016). המחקרים על הקשר שבין רצפי ה-TALe להפעלת הגנים של הצמח סייעו רבות לחקר עריכה גנומית בצמחים (Gene editing). למרות זאת המנגנונים הכרוכים בהפעלת השעתוק על ידי ה-TALe עדיין אינם ברורים לגמרי.

הופעת אפקטורים חדשים בפתוגנים יכולה להיגרם באמצעות שני תהליכים: האחד במעבר אופקי (horizontal gene transfer) שבו אפקטורים מפתוגן אחד נרכשים ע"י פתוגן אחר, והשני בתהליך המכונה פתואדפטציה (pathoadaptive) שבו כתוצאה ממוטציות וסלקציה נוצרים אפקטורים חדשים החשובים לאותו פתוגן (Sokurenko et al. 1999).

הורמונים צמחיים הנוצרים על ידי הפתוגנים

לאוקסין תפקידים רבים וחשובים ביחסי הגומלין בין חיידקים פטופתוגניים לצמחים (Kunkel & Harper, 2018). אוקסין וציטוקינין הם גם ההורמונים העיקריים הידועים כמופרשים ע"י חיידקים יוצרי עפצים בצמחים. ביניהם בולט במיוחד ה-*Agrobacterium tumefaciens* שעליו מבוסס מנגנון מורכב וייחודי להנדסה גנטית בצמחים (Gelvin,

2003). החיידק גורם לגידולים סרטניים על מיני צמחים דו פסיגים רבים ומכיל פלסמיד המכונה Tumor-inducing plasmid (Ti plasmid). מקטע ממנו, ה-T-DNA (transferred DNA) הנושא עליו גנים ליצירת אוקסין וציטוקינין, עובר אינטגרציה לכרומוזומים של הצמח בתהליך המכונה "הנדסה גנטית טבעית". חיידקים נוספים היוצרים הורמונים צמחיים הם *Pag* ו-*Pab* היוצרים עפצים על גבסנית וסלק בהתאמה. הפתוגניות של שני הפתוברים תלויה בנוכחות פלסמיד לפתוגניות המכונה pPATH. ה-pPATH מכיל "אי פתוגניות" (Pathogenicity island, PAI) המצוי באוכלוסיות שונות של *P. agglomerans* ועשוי להיות בגדלים שונים. מחקרים על הפלסמיד בתבדיל *Pag824-1* הראו שגודלו כ-135 kb והוא מכיל PAI בגודל של כ-75 kb. ה-PAI נושא את צבר הגנים *hrp/hrc* בשלמותו הכולל את ה-T3SS והמאפשר את החדרת האפקטורים מסוג 3 מהחיידק ישירות לתא הצמח (Barash and Manulis-Sasson, 2009). בנוסף כולל הפלסמיד את כל האפקטורים מסוג 3 שזוהו בחיידק וכן מספר "insertion sequences" שונים, שחלקם כנראה נשאו טרנספוזונים (transposons) ואשר היו כנראה מעורבים באבולוציה של הפלסמיד. ה-PAI מכיל גם צבר גנים המקודדים לביוסינטזה של אוקסין וציטוקינינים המשפיעים על גודל העפצים הנוצרים.

יש לציין שאוקסין ממקור צמחי נמצא חיוני ליצירת העפצים ע"י *Pag*. הפתוגן משפיע על מעבר אוקסין בצמח באמצעות "polar auxin transport" ובכך מגביר את זרימת האוקסין לאזור ההדבקה (Chalupowicz et al., 2013).

אנזימים פקטוליטיים

ריקבון רך הוא תוצאה של פרוק מבנה דופן התא הגורם להפרדות התאים וקריסתם בתהליך הקרוי מצרציה (maceration) והגורם לשחרור הנוזל התוך תאי לרקמה הנגועה. החיידק הגרם שלילי *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* (*Pcc*), הנחשב כגורם הקלאסי לריקבון רך על צמחים רבים, יוצר את האנזימים הפקטוליטיים: pectate lyases, pectin acetyl esterases, polygalacturonases, pectin methyl esterases, pectin lyase (Kado, 2010). כקבוצה מכונים אנזימים אלה פקטינזות. הביוסינטזה של הפקטינזות עוברת אינדוקציה ע"י מרכיבי דפנות תאי צמח מבודדים, פקטין, ותוצרי פרוק של הפקטין. ניסויים בתנאים טבעיים (*in vivo*) הראו שהביוסינטזה של האנזימים: endopectate lyase, exopectate lyase and endopolygalacturonase עוברים אינדוקציה בשלבים (sequential induction) בסדר הנ"ל כשלוש שעות לאחר ההדבקה. ביטוי האנזימים העיקריים המשתתפים בפרוק דפנות התאים, הכוללים גם את הצלולזה Cel VI, מצויים תחת בקרה גלובלית של הגן *expI* וכן בקרות נוספות, כולל חישה קבוצתית (Quorum Sensing). ה-endopectate lyases, נחשבים לאנזימים העיקריים הגורמים לתסמינים של ריקבון רך. פרוק החומצה הפוליגלקטורונית נעשה בפריפלסמה של תאי הפתוגן במספר שלבים, תחילה יצירת אוליגומרים ולאחר מכן מונומרים העוברים הטמעה במטבוליזם של תאי החיידק.

כאמור יצירת האנזימים מפרקי הדופן בגורמי ריקבון רך הינה תחת בקרה של חישה קבוצתית שבה ל- *N*-acyl homoserine lactone (AHL) תפקיד מרכזי. צמחים טרנסגניים כמו תפוח אדמה, חציל, גזר ועוד, המבטאים נגזרות של קטונות ממיני *Bacillus*, מראים עמידות לריקבון הרך (Dong et al., 2000). בנוסף לאנזימים מפרקי דופן נושא החיידק *Pcc* פרוטאזה הדרושה להשגת מקור חנקני לגידולו ברקמה הנגועה. *Pcc* מכיל מספר מנגנונים להפרשת האנזימים הדרושים לפרוק דפנות הצמח הכוללים את המערכת להפרשה כללית המכונה "Type II secretion system" המורכבת ממספר חלבונים. למרות יכולתו של גורם הריקבון הרך לתקוף צמחים רבים מבלי לגרום לתופעת עמידות, המתבטאת בתגובת רגישות היתר HR (הנגרמת ע"י מערכת ההפרשה מסוג 3), מכיל פתוגן זה גם את צבר הגנים *hrp/hrc* האופייניים למערכת זו ואשר לחלקם תפקיד מוכח בהפרשת האנזימים של גורם הריקבון הרך.

גם החיידק הגרם שלילי *Dickeya chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* גורם לריקבון רך על פונדקאים רבים. בפתוגן זה קימת שונות בספציפיות לצמחים שונים ובהתאם לכך חלוקה לפתוברים (Kado, 2010). יש לציין שגם חיידקים פיטופתוגנים אחרים מכילים בדרך כלל פקטינזות בכמות מוגבלת המסייעות לחדירתם לצמח אך אלו אינן גורמות לריקבון.

פיטוטוקסינים

פיטוטוקסינים הנוצרים ע"י חיידקים פתוגניים לצמחים אינם ספציפיים לפונדקאי ויכולים לגרום לתסמינים גם על צמחים רבים שאינם נתקפים ע"י הפתוגן היוצר אותם. הם משמשים כגורמי וירולנטיות המגבירים את סימני המחלה. בניגוד לגורמי וירולנטיות אחרים המדכאים את מערכות ההגנה של הצמח, ומאפשרים את התפתחות הפתוגן, הם אינם דרושים לעצם קיומה של המחלה. הטוקסינים coronatine, syringomycin, syringopeptin, tabtoxin and phaseolotoxin של הפתוגן *Pseudomonas syringae*, לדוגמה, נחקרו באינטנסיביות (Bender et al., 1999). ה-coronatine המזכיר במבנהו methyl jasmonate, הורמון הנוצר בצמח בתנאי עקה, גורם לסגירת הפיוניות, ה-syringomycin וה-syringopeptin יוצרים חורים בממברנת הצמח הגורמים לדליפת אלקטרוליטים, tabtoxin ו-phaseolotoxin הם מעכבים של האנזימים glutamine synthetase ו-ornithine carbamoyltransferase בהתאמה.

מנגנון הפעולה של coronatine מעניין במיוחד (Melotto et al., 2017). בצמחים רבים הפיוניות, המהוות אתר חדירה חשוב לחיידקים פיטופתוגניים, נסגרות בלילה ונפתחות ביום. במחקרים שנעשו ב-*Arabidopsis thaliana* נמצא: א' שריכוזים ביולוגיים של coronatine היו אפקטיביים בפתיחת הפיוניות בחושך, ב' מוטנט חסר יכולת סינתזה של הטוקסין היה באופן מובהק פחות אפקטיבי בהדבקת הצמחים בחושך מאשר באור לעומת זן הבר, וג' הגן *cma* המקודד לביוסינתזה של coronatine, עובר אינדוקציה מיד לאחר שהוא בא במגע עם העלה ללא כל קשר לאור או לחושך. תוצאות אלה מציעות ש-*Pseudomonas syringae* DC3000 מפעיל את הטוקסין לפני חדירתו לעלים וגורם לפתיחת הפיוניות למרות שהחושך גורם לסגירתן.

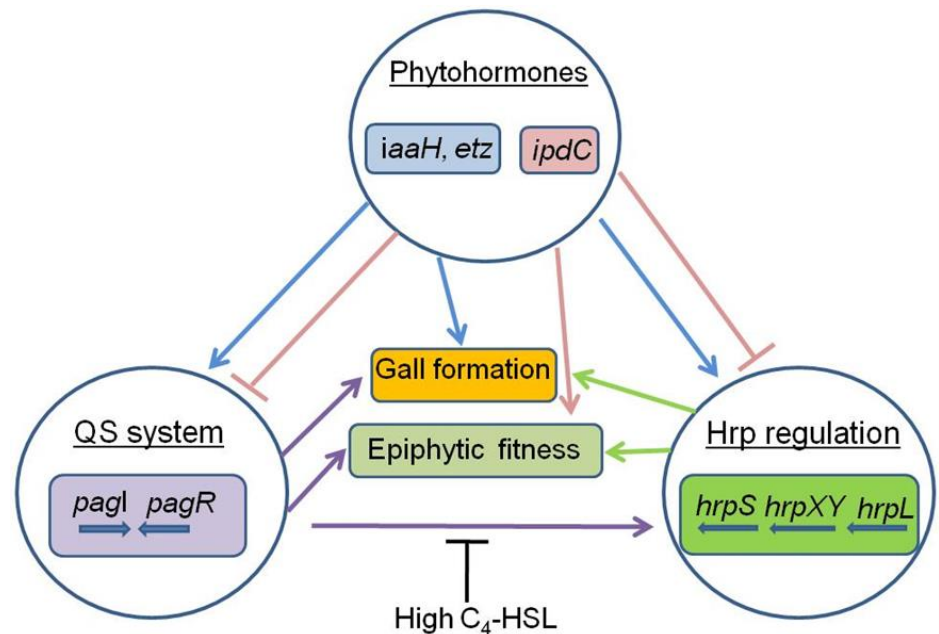
בקרה על ביטוי גורמי וירולנטיות

הבקרה של ביטוי האפקטורים מסוג 3 ממשפחת ה- *Hrp1* נחקרה לעומק בחיידקים *Pag* ו- *Pab* ותואר כאן בפירוט. הגנים לבקרה של ה- T3SS (*Hrp regulon*), המצויים על הפלסמיד *pPATH*, הם *hrpXY*, *hrpS* ו- *hrpL* (Nizan-Koren et al., 2003). *hrpXY* אופרן מקודד למערכת דו-מרכיבית, *hrpS* מקודד לפקטור שיעתוק ממשפחת ה- *NtrC* ואילו *HrpL* פועל כסיגמא (sigma factor) שהינו חלבון המזהה פרומוטורים של גנים ומפעיל את השיעתוק שלהם, ובכך מביא לביטויים. חלבוני ה- *HrpL* שמורים היטב ברצף חומצות האמינו שלהם וכולם מכילים בחיידק רצף דומה (consensus sequence) המכונה "Hrp box". המודל לבקרה שהוצע הוא כדלקמן: חלבון ה- *HrpY* שעובר פוספורילציה מפעיל את הגן *hrpS* וזה מפעיל את *hrpL*. חלבון ה- *HrpL* מפעיל גנים הנושאים "Hrp box" בפרומוטור (Nissan et al., 2005).

מערכת בקרה זו אינה פועלת לבדה אלא משולבת במערכות בקרה נוספות. כפי שהוזכר הפתוגניות של החיידקים *Pag* ו- *Pab* תלויה באופן מוחלט בפלסמיד הנושא את מערכת ההפרשה מסוג 3 שהועבר לחיידק במעבר אופקי. מעבר זה נמצא מלווה בהשתלבות ה- T3SS במערכות כרומוזומליות לבקרה גלובלית של החיידק כגון חישה קבוצתית (QS) "Quorum sensing" (Chalupowicz et al., 2008) וכן *Gac/Rsm post* transcriptional global regulatory pathway (Panijel et al., 2013). חישה קבוצתית היא תקשורת בין תאית המאפשרת לחיידקים לקבל אינפורמציה על צפיפות התאים שלהם ובהתאם לכך לווסת את ביטוי הגנים. ל-QS בחיידקים תפקיד חשוב גם ביצירת הביופילם (Biofilm) המהווה שכבת חיידקים צפופה על פני משטחי צמח או בעל חיים ומשפרת את עמידות החיידקים לתנאים קשים ויכולת ההדבקה של הפונדקאים. בחיידקים גרם-שליליים רבים ה- QS מתאפיין בנוכחות חלבוני הבקרה *LuxR*, המתפקד כ- Transcriptional regulator בעוד ש- *LuxI* אחראי ליצירת הסיגנל N-acylhomoserine lactone-synthase המפעיל את ה- *luxR*. ההומולוגיים של חלבוני הבקרה ב- *Pantoea* (*PagR* ו- *PagI*) אופיינו ב- *Pag824-1* (Chalupowicz et al., 2008). *PagI* נמצא אחראי ליצירת הסיגנל *N-butanoyl-L-homoserine lactone* (*C4HSL*). מוטציה בכל אחד משני חלבוני הבקרה גרמה להקטנת העפץ בכ-50%. הפחתה גבוהה יותר בגודל העפצים (70% ל-90%) נגרמה על ידי ביטוי ביתר של *PagI* או הוספת עודף של הסיגנל *C4HSL*. במחקר מקיף נמצאו יחסי גומלין בין מנגנון הבקרה של ה-QS, יצירת ההורמונים אוקסין וציטוקינין ע"י הפתוגן, והגנים לבקרה של ה- T3SS המצויים על ה- *pPATH* (Chalupowicz et al., 2009). שילוב של גורמי הבקרה הידועים בפתוגניות של החיידקים *Pag* ו- *Pab* אפשר לראות באיור 1. הגנים לבקרה- (*Hrp regulon*) של ה- T3SS מפעילים את מערכת ה- T3SS. הפעלת ה- T3SS נעשית באמצעות ה- "*hrp box*". ה- *PagR* פועל כ- "כחלבון בקרה המפעיל שעתוק" של הגנים ל- "*Hrp regulon*" תוך תלות בסיגנל *C4HSL* המקודד ע"י *PagI*.

במחקר נוסף נמצא ש- *PagR* ו- *PagI* גורמים גם לעליה בביטוי ה- *Gac/Rsm post-transcriptional* pathway (Panijel et al., 2013). מוטנטים בגנים של מסלול ה- *Gac/Rsm* או ביטוי ביתר שלהם משפיעים על

ביטוי ה-RsmA (regulator of secondary metabolism) הפועל גם כגן בקרה חשוב של ה- "Hrp regulon" ומשפיע על הוירולנטיות של החיידק ויכולת האכלוס שלו בצמח.



איור 1. יחסי גומלין בין פיטוהורמונים, חישה קבוצתית (QS) וגנים לרגולציה של Hrp המשפיעים על יצירת עפצים ואכלוס משטחי הצמח (Epiphytic fitness) בחיידק *Pantoea agglomerance* pv. *gypsophylae* (לקוח מ-Chalupowicz et al., 2009). המרכיבים השונים נתונים בתוך העיגולים. החיצים מסמנים את הגברת השפעת הרגולציה ואילו הקווים החסומים את הורדתה. ברמת הדבקה נמוכה (10^6 תאים למיליטר) המסלול הפלסמידי לביוסינטזה של IAA בחיידק (*iaaH*) והציטוקינין (*etz*) מזרזים את ביטוי הגנים לבקרה של ה-QS (*PagR*) ומסלול הבקרה של ה-Hrp regulon (*hrpS hrpXY and hrpL*). לעומת זאת למסלול הכרומוזומלי ליצירת האוקסין בחיידק (*ipdC*) בקרה שלילית על שעתוק ה-Hrp regulon ומערכת ה-QS. ה-QS מזרז את ה-Hrp regulon ולכן הסיגנל C₄HSL בריכוז גבוה מעכב את ביטוי ה-QS והגנים של ה-Hrp regulon.

גורמי וירולנטיות בחיידקים גרם חיוביים הפתוגנים לצמחים

ההתקדמות בגנטיקה מולקולרית הביאה לאפיון מעמיק יותר של גורמי הוירולנטיות גם בחיידקים גרם חיוביים הפתוגניים לצמחים הכוללים *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* השייכים ל-Actinobacteria או ל-Candidatus, Spiroplasma or Phytoplasma השייכים ל-Firmicutes. פרק זה יעסוק רק ב-*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*) ו-*Streptomyces* spp. הגורמים למחלות חשובות בארץ. חיידקונים (חיידקי Phytoplasma) מתוארים בפרק על מחלות צמחים הנגרמות על ידי חיידקים המועברים על ידי ווקטורים חרקיים (פרקי מחלות חיידקים שוכני שיפה וחיידקים שוכני עצה).

Cmm הוא המין היחיד המוכר בסוג *Clavibacter*. תת-מינים אחרים של מין זה תוקפים פונדקאים אחרים כמו *C. m. ssp. sepedonicus*. התוקף צמחי תפוח אדמה. ה-*Cmm* חודר דרך פצעים או פתחים טבעיים ועובר

דרך זרעים. הוא גדל בעיקר בצינורות העצה וגורם לנבילה, להופעת כיבים (cankers) על הגבעולים ומעין אבעבועות (blisters) בעלים המסייעים בהפצה המשנית של הפתוגן. הפתוגניות נגרמת באמצעות גורמי וירולנטיות הכוללים מווסתי שעתוק (Transcriptional regulators) הממוקמים על הכרומוזום ושני פלסמידים טבעיים (Eichenlaub & Gartemann, 2011; Nandi et al., 2018). הגנום של ה- *Cmm* רוצף במספר תבדידים והוא מכיל כרומוזום בגודל הנע בין 3.3-3.6 Mb ושני פלסמידים: *pCM1* (31-59 kb) ו- *pCM2* (64-109 kb). מחקרים רבים נעשו על התבדיד *Cmm382* השייך כאמור ל-*Actinobacteria* המאופיינים בתכולת GC גבוהה בכרומוזום. בתבדיד *Cmm382* אזור בכרומוזום אזור של 129 kb עם תכולת GC נמוכה יותר מזו שבכרומוזום המכונה "אי פתוגניות" (Pathogenicity island). אזור זה הנקרא *chp/tomA* נושא עליו גנים לפתוגניות משתי קבוצות. תת-אזור ה- *chp* מכיל גנים המקודדים לפרוטאזות וגנים נוספים לוירולנטיות, ואילו תת האזור *tomA* מקודד לאנזים *tomatinase* שגורם לפרוק ה- *tomatin*, המקנה הגנה בסיסית לצמח. ה- *chp/tomA* נמצא כ- "אי פתוגניות" כרומוזומלי יחיד בכל תבדידי ה-*Cmm* הפתוגניים לעגבנייה שרוצפו וחסר בתבדידי *Cmm* אנדופיטים בלתי פתוגניים. מלבד אי הפתוגניות בכרומוזום, ממוקמים גנים לוירולנטיות על שני הפלסמידים *pCM1* ו-*pCM2*. ה- *pCM1* חיוני לוירולנטיות ואילו ה- *pCM2* דרוש רק לוירולנטיות של תבדידים מסוימים אולם ברוב המקרים מצוי בכל התבדידים.

תנועת ה- *Cmm382* בעגבנייה נמדדה על ידי סימונו ב- Green Fluorescence Protein (GFP) ומעקב באמצעות מיקרוסקופ קונפוקלי (Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)). נמצא שהפתוגן מאכלס באופן ניכר את חלל צינורות הקסילים, תוך יצירת צברים של תאים וביופילם, ובמיוחד נקשר לספירלות של הדופן המשנית (Chalupowicz et al., 2012). במעקב אחר תבדיד הבר *Cmm382* נמצא שהגיע לאזור האפיקלי של הצמח תוך 15 ימים ואילו התבדידים *Cmm100* (החסר את שני הפלסמידים *pCM1* ו- *pCM2*), או *Cmm27* (החסר את אי הפתוגניות הכרוזומלי - *chp/tomA*) נשארו בעיקר באזור ההדבקה. תוצאות אלה תומכות בהשערה שגורמי וירולנטיות הממוקמים על אי הפתוגניות *chp/tomA* והפלסמידים דרושים לתנועת ה- *Cmm* ויצירת הצברים בצינורות הקסילים. עוד נמצא שגורמי וירולנטיות שונים אחראים ליצירת הסימפטום של blisters על העלים, ולהם תפקיד חשוב בהפצה המשנית של הפתוגן במשתלות עגבנייה, לעומת סימפטום הנבילה (Chalupowicz et al., 2017). סימון באמצעות GFP הראה שהחדירה לעלים נעשית בעיקר דרך הטריכומות (Trichomes). כאשר עלי עגבנייה הודבקו על ידי ריסוס של תבדיד הבר *Cmm382* או *Cmm100* (החסר *pCM1* ו- *pCM2*), הופיעו כתמים דמויי שלפוחית (blisters), בעוד שהחיידק *Cmm27* החסר את אי הפתוגניות *chp/tomA* נשאר בלתי פתוגני. מכאן שנוכחות הפלסמידים חיונית לנבילה אך לא להופעת השלפוחיות. בנוסף, באמצעות מוטציות נמצא שגנים כרומוזומליים המקודדים ל- serine proteases וכן אנזימים מפרקי דופן ואתילן, הנוצר ע"י הצמח, חיוניים לנבילה (Balaji et al., 2008). גם שני מפעילי שיעתוק של ה- *Vatr1 Cmm* ו- *Vatr2* חיוניים לפתוגניות (Savidor et al., 2014).

חיידקים גרם חיוביים מהסוג *Streptomyces* השייכים ל-Actinobacteria ידועים במגוון המורפולוגי שלהם וביכולתם ליצור מספר רב של מטבוליטים ביואקטיבים המשמשים לרפואת אדם ובעלי חיים כמו חומרי אנטיביוטיקה (Li et al., 2019). לעומת זאת יכולתם להדביק רקמות צמחים וליצור מחלות כמו גרב תפוח אדמה הינה תכונה נדירה בקרב תבדידי *Streptomyces*. מחקרים על מנגנוני הפתוגניות של תבדידי *Streptomyces* בצמחים הדגישו את חשיבות הפיטוטוקסינים ממשפחת ה-Thaxtomins ביצירת הגרב (Loria et al., 2006). מרבית הסטרפטומיצטים הפיטופתוגניים גורמים ל- "גרב מצוי" (common scab) על תפוחי אדמה. תיאור מפורט של התסמינים ניתן בפרק העוסק במחלות הנגרמות ע"י חיידקים בצמחים בישראל. בשנים האחרונות מחקרים מולקולריים על מיני סטרפטומיצטים קידמו את ההבנה כיצד מיקרואורגניזמים אלה מאכלסים צמחים חיים. הגנומים של מספר מינים פתוגניים ובלתי פתוגניים רוצפו ושימשו לאנליזה משה ואיתור גורמי וירולנטיות שניתן לחלקם לשלוש קבוצות עיקריות: פיטוטוקסינים, פיטוהורמונים וחלבונים מופרשים. הפיטוטוקסינים הראשונים שאופיינו היו thaxtomins A and B ב-*S. scabies* והם נחשבים גם כיום כטוקסינים העיקריים בגרב של תפוחי אדמה. הם מורכבים מ- cyclic dipeptides שנוצרו מ- L-phenyl alanine ו- L-4-nitrotryptophan. קיימים מספר אנלוגיים ל-thaxtomins כאשר ל-thaxtomin A הפעילות הגבוהה ביותר וקורלציה גבוהה בין ריכוזו לתסמינים שהוא גורם (Li et al., 2019). הביוסינטזה של ה-thaxtomins ייחודית למיני סטרפטומיצטים פתוגניים לצמחים וקשורה בנוכחות צבר גנים שמור. נוכחות צבר זה במיני סטרפטומיצטים השונים מבחינה פילוגנטית מעידה על התפקיד החשוב שיש למעבר גנים הוריזונטלי בהופעת מיני סטרפטומיצטים חדשים הגורמים לגרב בצמחים (Loria et al., 2006). פיטוטוקסינים נוספים שתורמים למחלת הגרב הם: coronafacoyl, cocanamycins ואחרים (Li et al., 2019).

הפיטוהורמונים הנוצרים על ידי סטרפטומיצטים והחשובים לוירולנטיות הם בעיקר הציטוקינינים, האינדול חומצה אצטית (אוקסין) והאתילן. הציטוקינינים הידועים כהורמוני גדילה בגלל תפקידם בבקרת הגידול והתפתחותו, מסייעים למעבר חומרי המזון לאזורי ההדבקה וגידול הפתוגן. לאוקסין תפקיד קריטי בבקרה של גידול והתפתחות הצמח. יצירת אוקסין מטריפטופן נמצאה במספר מינים של *Streptomyces* כולל המסלול דרך Indole-acetamide שנמצא ב-*S. scabies* (Manulis et al., 1994).

אתילן הינו הורמון נדיף בעל תפקיד חשוב בוויסות מערכות ההגנה של הצמח. תפקידו המדויק ביצירת הגרב עדיין אינו ברור. בנוסף זהו מספר חלבונים מופרשים המכונים אפקטורים המשפיעים על עוצמת המחלה (Li et al., 2019).

סיכום

גורמי הוירולנטיות בחיידקים פיטופתוגניים הם רבים ומגוונים ומייצגים את מרבית קבוצות החומרים המטבוליים הנוצרים ע"י החיידקים. חלקם דרושים לדיכוי מערכות ההגנה של הצמח והתפתחות המחלה וחלקם להגברת

התסמינים וסימני המחלה בלבד. בשנים האחרונות התרכז המחקר בעיקר בהבנת מנגנוני הפעולה של גורמי הוירולנטיות בשיטות מתקדמות.

מקורות

- Balaji V., Mayrose M., Sherf O., Jacob-Hirsch J., Eichenlaub R., Iraki N., Manulis-Sasson S., Rechavi G., Barash I. and Sessa, G. (2008) Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology* 146: 1797-1809.
- Barash I. and Manulis-Sasson S. (2009) Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming *Pantoea agglomerans* case. *Annual Review of Phytopathology* 47: 133-152.
- Bender C. L., Alarcón-Chaidez F. and Gross D. C. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology Molecular Biological Reviews* 63: 266-292.
- Büttner D. (2016) Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews* 40: 894-937.
- Chalupowicz L., Barash I., Panijel M., Sessa G. and Manulis-Sasson S. (2009) Regulatory interactions between quorum-sensing, auxin, cytokinin, and the Hrp regulon in relation to gall formation and epiphytic fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophila*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 849-856.
- Chalupowicz L., Barash I., Reuven M., Dror O., Sharabani G., Gartemann K-H., Eichenlaub R., Sessa G. and Manulis-Sasson S. (2017) Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology* 18: 336-346.
- Chalupowicz L., Manulis-Sasson S., Itkin M., Sacher A., Sessa G. and Barash I. (2008) Quorum-sensing system affects gall development incited by *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophila*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1094-1105.
- Chalupowicz L., Weinthal D., Gaba V., Sessa G., Barash I. and Manulis-Sasson S. (2013) Polar auxin transport is essential for gall formation by *Pantoea agglomerans* on *gypsophila*. *Molecular Plant Pathology* 14: 185-190.
- Chalupowicz L., Zellermann E-M., Fluegel M., Dror O., Eichenlaub R., Gartemann K.-H., Savidor A., Sessa G., Iraki N., Barash I. and Manulis-Sasson S. (2012) Colonization and

- movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 102: 23-31.
- Cornelis G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* 4: 811-825.
- Dong Y-H., Xu J-L., Li X-Z. and Zhang L-H. (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 3526-3531.
- Eichenlaub R. and Gartemann K-H. (2011) The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 49: 445-464.
- Gelvin S. B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiological Molecular Biology Reviews* 67: 16-37.
- Jiménez-Guerrero I., Pérez-Montaña F., da Silva GM., Wagner N., Shkedy D., Zhao M., Pizarro L., Bar M., Walcott R. and Sessa G. (2020) Show me your secret(ed) weapons: a multifaceted approach reveals a wide arsenal of type III-secreted effectors in the cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* and novel effectors in the *Acidovorax* genus. *Molecular Plant Pathology* 21: 17-37.
- Kado C. I. (2010) *Plant Bacteriology*. American Phytopathology Society Press. St. Paul, Min, USA.
- Kunkel B. N. and Harper C. P. (2018) The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *Journal of Experimental Botany* 69: 245-254.
- Li Y., Liu J., Díaz-Cruz G., Cheng Z. and Bignell D. R. (2019) Virulence mechanisms of plant-pathogenic *Streptomyces* species: An updated review. *Microbiology* 165:1025-1040.
- Loria R., Kers J. and Joshi M. (2006) Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology* 44: 469-487.
- Manulis S., Shafrir H., Epstein E., Lichter A. and Barash I. (1994) Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140: 1045-1050.
- Melotto M., Zhang L., Oblessuc P. R. and Sheng Y. (2017) Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology* 174: 561-571.

- Nandi M., Macdonald J., Liu P., Weselowski B., Yuan Z. C. (2018) *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: Bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology* 19: 2036-2050.
- Nissan G., Gershovits M., Morozov M., Chalupowicz L., Sessa G., Manulis-Sasson S., Barash I. and Pupko T. (2018) Revealing the inventory of type III effectors in *Pantoea agglomerans* gall-forming pathovars using draft genome sequences and a machine-learning approach. *Molecular Plant Pathology* 19: 381-392.
- Nissan G., Manulis S., Weinthal D. M., Sessa G. and Barash I. (2005) Analysis of promoters recognized by HrpL, an alternative σ -factor protein from *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophillae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 634-643.
- Nizan-Koren R., Manulis S., Mor H., Iraki N. and Barash I. (2003) The regulatory cascade that activates the Hrp regulon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophillae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 249-260.
- Panijel M., Chalupowicz L., Sessa G., Manulis-Sasson S. and Barash I. (2013) Global regulatory networks control the *hrp* regulon of the gall-forming bacterium *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophillae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 1031-1043.
- Savidor A., Chalupowicz L., Teper D., Gartemann K-H., Eichenlaub R., Manulis-Sasson S., Barash I. and Sessa G. (2014) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Vatr1 and Vatr2 transcriptional regulators are required for virulence in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 1035-1047.
- Sokurenko E. V., Hasty D. L. and Dykhuizen D.E. (1999) Pathoadaptive mutations: Gene loss and variation in bacterial pathogens. *Trends in Microbiology* 7: 191–195.