

נושא: מערכת הטפילות בכשות: חקר מעורבותם של אנזימים בפריצת תאי הטפיל לרקמות פונדקאי

מוסד: מינהל המחקר החקלאי

ד"ר דניאל יואל

חוקר ראשי:

חוקרים שותפים: 1

תקופת מחקר: 1996-1998

מאמרים: 4

תקציר

מטרות המחקר: העשב הטפילי כשות גורם נזקים בגידולי חקלאות. מעט ידוע על התהליכים המרכזיים של טפילות הכשות. חדירת ההוסטריום של הטפיל לרקמות פונדקאי היא שלב קריטי בהתפתחותו. כדי למצוא דרכים למלחמה בטפיל, נבחנה המעורבות של אנזימים בחדירה, וכן בודדו ואופיינו פקטינאזות של הטפיל.

מהלך עבודה: הכשות גודל על פונדקאים שונים וכן בתרבית. לבירור פעילות פקטינאזות in situ עקבנו במיקרוסקופ האור ובמיקרוסקופ האלקטרונים אחר התפתחות הטפיל בפונדקאים שונים והתחקינו אימונוציטוכימית אחר אנזימים ופקטינים ברקמות המעורבות בתהליך. במקביל עסקנו בניקוי האנזימים פקטין מתיל אסטרז (PME) ופוליגלקטורנו (PG) מכשות.

תוצאות עיקריות: גוף ההוסטריום מתקדם על ידי מערכת תאי פונדקאי, והתקדמות תאי הגישוש של הטפיל בתוך הפונדקאי מתקיימת תוך כדי חדירה לתוך תאים חיים. תאי הגישוש תופסים את חלל תא הפונדקאי לתוכו הם נכנסים, ודוחפים את הדפנות תוך מערכת תאים שכנים. החדירה לתוך התאים כוללת ניקוב מבוקר של דפנות, כפי הנראה בעזרת צלולאזות.

רקמות הכשות מכילות כמויות גדולות של תרכובות פנוליות שמתחמצנות בעת המיצוי תודות לנוכחות PPO ברקמה. פעילות ה-PPO אופיינה, ופותחה שיטה להקטנת פעילותו שמפריעה למיצוי PME. כמו כן הוכנס לשימוש האנזים פקטולאז לפירוק עודפי הפקטין כדי לאפשר את ניקוי ה-PME.

האנזים פוליגלקטורנו (PG) אופיין גם כן מרקמות כשות. התברר שלפעילותו דרוש פפטיד בעל משקל מולקולארי נמוך היציב בהרתחה, ואשר משמש כקו-פקטור.

מסקנות: נדחתה ההיפותזה שתאי הכשות חודרים לרקמות פונדקאי על ידי פרימת למלת הביניים שבין התאים בעזרת פקטינאזות. התברר שהאנזים PME מופרש באזור החדירה על ידי תאי הפונדקאי ולא על ידי הטפיל. כמו כן התברר שלהתפתחות ההוסטריום דרושה נוכחות של תאי פונדקאי חיים.

האנזימים PG ו-PME בכשות הם בעלי תכונות מיוחדות. כנראה קיימות שתי צורות של PME הנבדלות בכמות הסוכר הקשור לגליקופורוטאין. ה-PG זקוק לקו-פקטור לשם פעילותו.

שלילת מעורבות PME ו-PG בתהליך החדירה, והממצא שחדירת תאי טפיל מתבצעת דרך דפנות פונדקאי, מצביעים על אפשרות מעורבותם של אנזימים אחרים, כנראה צלולאזות, בחדירת ההוסטריום.

מערכת הטפילות בכשות:
חקר מעורבות של אנזימים בפריצת הטפיל לרקמות הפונדקאי

דו"ח סופי לתוכנית מחקר 138-0290-98
מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות
על ידי

דני יואל¹, אברהם מ. מאיר², נורית בר-נח², ויטלי פורטנוי¹, וצופית גלדמן-גוז¹

¹המחלקה לחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, נוה יער, ת.ד. 1021 רמת ישי 30095

Email: dmjoel@netvision.net.il

²המחלקה לבוטניקה, וזאוניברסיטה העברית בירושלים, ירושלים 91907

The Parasitic System of Dodder:
study of the involvement of enzymes in parasite penetration
into Host Tissues

Final Scientific Report

submitted to the Research Fund of the Chief Scientist of the Ministry of Agriculture

by

Daniel M. Joel¹, A.M. Mayer², Nurit Bar-Nun², Vitaly Portnoy¹ and Tzufit Goldman-Guez¹

¹Agricultural Research Organization, Newe-Ya'ar Research Center, Ramat-Yishay, Israel

²Department of Botany, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91907, Israel

Email: dmjoel@netvision.net.il

1. רקע מדעי

באזורים נרחבים בארץ ובעולם השדות נגועים קשה בעשב הטפילי כשות (*Cuscuta campestris*) שזרעיו מופצים בדרכים מגוונות כולל בזרמי מים ובחומר ריבוי. קיימים רק מעט חומרי הדברה המשפיעים על הטפיל, רובם לא סלקטיביים למרבית הפונדקאים, ואין כיום דרך אחת ספציפית, יעילה וכלכלית להדברת כשות בכל הגידולים.

הכשות מתקשרת לפונדקאי בעזרת אברי חיבור מיוחדים הפזורים בצפיפות לאורך הגבעול באיזורי המגע עם הפונדקאי (Dawson et al. 1994). אברי החיבור שנקראים הוסטריות הם אברים רב-תאיים החודרים לרקמות הפונדקאי ומשמשים גשר פיסיולוגי בין מערכות ההובלה של הפונדקאי לאלו של הטפיל. חדירת ההוסטריום לאברי הפונדקאי היא שלב קריטי בהתפתחות כשות. גבעול כשות שנכרך על גבעול פונדקאי יוצר תחילה אבר הצמדה שנצמד לפונדקאי בעזרת תאי אפיתל מיוחדים המפרישים דבק עיגון. ההוסטריום עצמו מתפתח מחלקו הפנימי של גבעול הכשות ופורץ דרך אבר ההצמדה לגבעול הפונדקאי כגוף חרוטי רב-תאי. גוף זה שולח שלוחות דמויות אצבע בניצב לפני השטח שלו. תא אחד של הגוף החרוטי יכול לשלוח מספר שלוחות. בעוד שידוע ארגון תאי הטפיל במהלך חדירת ההוסטריום, לא נערכה עד היום עבודה מקפת שתכליתה הבנת התהליכים האנזימטיים המשתתפים בתהליך זה והבנת התנהגות דפנות תאי הטפיל באתרי הפריצה של הכשות. בעבודה יחידה שפורסמה בנושא הראו בשיטות ביוכימיות קלאסיות שבאזור החדירה קיימת פעילות מוגברת של אנזימים מפרקי דופן (Nagar et al. 1984). השאלות המרכזיות בנושא שנותרו ללא מענה ואשר משמשות מטרות בפרויקט המחקר הנוכחי הן: מיהם האנזימים המעורבים בתהליך, מהו המיקום המדויק של פעילות האנזימים בדופן, האם מוצא האנזימים בתאי טפיל או בתאי פונדקאי, מה עיתוי הופעתם, ומה קורה למרכיבי הדופן הרלבנטיים של תאי הפונדקאי והטפיל כתוצאה מפעילותם. לאחר שגילינו פעילות של פקטין מתיל אסטרזא (PME) בגבעולים של כשות, ובעקבות ראיות שמצאנו לאחרונה לתפקידו המרכזי של אנזים זה בחדירת ההוסטריום של עלקת (Losner-Goshen et al. 1998), החלטנו לבדוק את ההיפותזה שמצב דומה קיים גם בכשות.

PME תואר בצמחים רבים אחרים ומיצויו נעשה בדרך כלל בעזרת בופרים עם ריכוז מלח גבוה (למשל: Bordenave & Goldberg 1994). רוב הדיווחים מתארים את האנזים כגליקופרוטאין, בעל צורות מגוונות המתבטאות במשקלים מולקולריים ומוביליות אלקטרופורטית שונים. באפרסק תואר PME שאינו גליקופרוטאין (Glover & Brady 1994). אנזים זה לא נתפס על Con A Sepharose והיה בעל נקודה איזואלקטרית בסיסית. האנזים בשעועית mungo הוא בעל משקל מולקולרי 32000 באלקטרופוז SDS ו-75000 בגל נטיבי (Goldberg et al 1992).

במקרה זה התגובה של צורות האנזים השונות לפקטין ו- p-nitrophenyl acetate היתה שונה.

האיזומים היו בעלי נקודות איזואלקטוריות שונות (Bordenave & Goldberg 1993), קודדו על ידי משפחה קטנה של multigenes, והראו תגובה שונה לנוכחות קטיונים (Bordenave et al 1996). PME מפרי עגבניה הופרד לארבע צורות שונות עם תכונות שהצביעו על הבדלי מבנה, למרות דמיון אימונולוגי (Warrilow et al 1994). Gaffe et al (1994) תארו בעגבניה שתי קבוצות הנבדלות אימונולוגית. ברור לכן ש PME מראה שונות גבוהה בין מינים ואף באותו מין, ואין מבנהו פשוט.

2. מטרות המחקר: לנקות את האנזים פקטין מתיל אסתרז מכשות. לברר אם אנזימים מפרקי דופן מעורבים בתהליך החדירה של כשות לרקמות פונדקאי.

פירוט ניסויים ותוצאות לתקופת הדו"ח:

יצירת הוסטוריות של כשות in vitro על פונדקאי:

גידול קטעי גבעול (צעירים ובוגרים) על מצע אגר MS עם קינטין, גרם להתפתחות קאלוסים של כשות ללא הוסטוריות.

בנסיונות להשתמש בכשות להדבקת פונדקאי בתנאים אספטים in vitro השתמשו כפונדקאי לכשות בצמחי בזיל שהונבטו וגודלו בקופסאות מגנטה. התברר שכשות שגדלה על מצע מזון איננה נכרכת על גבי פונדקאי למרות המגע איתו, כלומר איננה מגיבה בצמיחה מפותלת לגרוי מגע. בנסיונות להשרות יצירת הוסטוריות באמצעים הורמונלים מצאנו כי שימוש בקינטין ובבנזיל אדין (50 ו- 100 מיקרומול במצע עליו הונחו קטעי גבעול של כשות השדות) גרם ליצירת פרה-הוסטוריות ברקמות הפנימיות של הכשות. קטעי גבעול שנלקחו מן החלקים הצעירים של הצמח (4 סנטימטרים עליונים) הגיבו במהירות תוך יצירת פרה הוסטוריום והוסטוריום, כולל רקמות הובלה. קטעי גבעול שנלקחו מן החלקים הבוגרים של הטפיל הגיבו באיטיות, ולעיתים קרובות יצרו פרה-הוסטוריות בלבד.

כדי להתגבר על קושי זה ניסינו לגדל כשות על מצע MS ללא חומר אורגני והורמונים, ולאפשר לטפיל המתפתח להשען על פונדקאי in vitro. אמנם הטפיל פיתח גבעולים נורמלים, אך עד כה לא הצלחנו באיסטרטגיה זו (שהצליחה עם עלקת) להביא להדבקה, כלומר לכריכה של הכשות על גבעולי פונדקאי וליצירת הוסטוריות פונקציונליות. גם קטעי כשות שפיתחו פרה-הוסטוריות והוסטוריות צעירות בתגובה לטיפול הורמונלים והונחו על גבי גבעולים של פונדקאי, לא יצרו חיבור עם רקמות הפונדקאי.

שימוש במצע נוזלי הביא לתוצאות טובות יותר. נבטי כשות שגודלו במצע סטרילי הועברו למצע שפיתחנו לצורך גידול כשות שהכיל בנוסף ל MS גם ויטמינים, סוכרוז, חלב קוקוס, בנזיל אדין, ABA, וגיברלין. בניגוד לעבודות קודמות שהראו דרישה של הכשות להרכב אור ביחס רצוי של אדום / אדום רחוק, מצאנו שהארה ממנורות פלורסצנטיות ללא פילטרים מאפשרת את הגידול היעיל ביותר של הטפיל. הגבעולים שצמחו בתמיסה הראו ליפופים רבים סביב עצמם עם התפתחות ברורה של הוסטוריות.

ניקוי פקטין מתיל אסטרזאז מכשות:

עבדנו על כשות שנאסף מהשדה ועל כשות שגידלנו על מצע נוזלי בתנאים אספטים. גבעולי הכשות שומרו בהקפאה עד לשימוש. ניסינו לנקות PME על עמודות שונות:

1. DEAE Sephadex A 25. הוכנו תמציות בבופר פוספט המכיל מלח, בערכי pH שונים. הפרדה על מיני ספדקס בכל אחד מערכי pH, תוך כדי אלוציה באותו pH. האנזים ירד ב- 7.2, 6.0, 5.0 pH במקטעים הראשונים עם מרבית החלבון, ולכן העמודה לא מתאימה לניקוי PME מכשות.

2. Con A Sepharose נוסה בהנחה ש PME בכשות הוא גליקופרוטאין. הצלחה חלקית התקבלה כאשר העמסנו בבופר פוספט pH 6.5 בנוכחות מלח ותוך אלוציה תחילה בבופר, ואחריו בבופר עם methyl-D-mannoside. התברר שלפחות חלק מן ה- PME הוא גליקופרוטאין כי הוא נתפס בעמודה.

3. Sephacryl S-200, ו- CM Sephadex C 50 לא נתנו ניקוי משביע רצון.

4. Biogel P-100, fine נוסה לאחר שנתן תוצאות טובות בעלקת. הניקוי השתפר כשעברנו לכתישת רקמות בבופר אצטט 10mM pH 4.5 עם 10mM NaCl.

ניסינו שיטות נוספות, אינפילטרציה של רקמה חיה בבופר וסחיטת הנוזל הוכיחה שלפחות חלק מפעילות PME קשורה בצורה רופפת לדפנות התאים וניתן למצות אותה בקלות בשיטה זו, שנתנה פעילות הזזה לזו של רקמה כתושה לאחר סינון וסירכוז.

בדיקת פעילות על גל אלקטרופורזה בוצעה על פי Ben-Hod et al 1997. איתור הגליקופרוטאין בוצע על פי Zaccharius et al 1969. גילוי פעילות PME לאחר SDS בוצע על פי Blank et al. 1982, לאחר שטיפות לסילוק SDS שמעכב PME (Zimmerman 1982). בגל נטיבי הופיעו גליקופרוטאין ופעילות PME קרוב לקו ההתחלה. אחרי הפרדה בעמודות לא גילינו פעילות על הגל כנראה בגלל ריכוז נמוך. התברר גם שאחרי ניקוי בביוגל נשארו במקטעים המנוקים מספר פסי חלבון.

תמציות הכשות הכילו כמות גדולה של האנזים PPO (פוליפנול אוקסידאז) שגרם להשחמה, לאיבוד פעילות PME ולצביעת רקע על הגלים. לכן התפתח צורך ללמוד את תכונותיו ולמצוא דרכים לעיכוב פעילותו. התברר שלאנזים PPO של כשות יש תכונות מיוחדות. אם כי הוא מעוכב על ידי DIECA,

התברר ש- Naphthalene diol שמקובל כמעכב שלו פועל דוקא כמזרז. התברר שזרז על ידי Naphthalene diol תלוי בנוכחות חומר כלשהו בתמצית כשות אשר נהרס בהרתחה. CO גורם עיכוב מחלט של PPO מכשות שלא ניתן לביטול על ידי הארה. מתוצאות סדרת הניסויים שלנו עולה שמדובר כנראה על מעכב עם שני אתרי פעולה שונים, אחד אחראי אולי לשינוי קונפורמטיבי של האנזים שגורם זרז, והשני - לעיכוב תחרותי על האתר הפעיל של האנזים. ה- PPO של כשות הוא

כפי הנראה מסיס ולא מצאנו אותו בפלסטידות מבודדות. יתכן ש-Naphthalene diol גורם ב-PPO של כשות שנוי קונפורמטיבי מזרז.

סרוז של תמציות כשות במבחנות vivaspin דרש זמן ארוך מהמומלץ. מתוך הסתכלות ומנתונים בספרות הסקנו שהדבר אולי נגרם מנוכחות עודפת של פקטין בתמציות. דרך סבירה להתגבר על זה היא לפרק הפקטין אנזימטית. משום כך הפקנו PME בדרך חדשה: כתישת כשות בבופר אצטט

DTT 1mM, 2mM DIECA, NaCl 10mM, pH 4.5 10mM, ולעיתים PPO הוספו: 10% PVP מוצק בלתי מסיס. לאחר סרוז עברה התמצית אינקובציה עם Pectolyase לפרוק הפקטינים, שבמהלכה נוצרו משקעים שסולקו בסירכוז. לאחר ריכוז במבחנות vivaspin העלנו את התמצית על עמודה של Biogel P-100, fine. העמודה נשטפו בבופר אצטט 50mM pH 4.5. השיטה הארוכה והמורכבת יחסית איפשרה ניקוי של פי עשרה לעומת התמצית הגולמית. לאחר סירכוז ראשוני. האנזים ירד בשיא חד למדי, אך בגל אלקטרופורזה נטיבי שוב גילינו מספר ניכר של פסי חלבון במשקלים 11500-90000. יתכן שהדבר נגרם מנוכחות אגרגטים של חלבונים אשר נפרדים באלקטרופורזה בסביבה בסיסית גם ללא תנאי דנטורציה.

ניסינו לדלג על פירוק הפקטינים. לכן העברנו את תמצית הכשות בפרקציונציה עם אמון סולפט. המקטע ששקע בין 40-80% או 50-90% רוויה פוזר בבופר והועבר ישירות על עמודת ביוגל. נתקבל דגם אלוציה זהה לקודם. מאחר ובשלב זה היו בידינו כמויות ניכרות של תכשיר אנזימטי יכולנו לרכז את המקטע הפעיל ולערוך אלקטרופורזה. המקטע הפעיל עדיין הכיל מספר רב של פסי חלבון.

תוצאות אלה אינן משביעות רצון ולכן שילבנו מיצוי עם טיפול באמון סולפט ועם עמודת Con A Sepharose לפני עמודת Biogel. הפעילות הספציפית שהתקבלה בשיטה זו היתה 525 לעומת 2.1 בתמצית המקורית. יתרון השיטה הוא בדילוג על פרוק הפקטינים שעלול לגרום שינוי בתמציות.

בשלב זה ערכנו עשרות הפרדות של תכשירי אנזים מנוקה חלקית כנ"ל בגל נטיבי ובגל SDS. בגלים בלי SDS מצאנו תמיד שני אזורי פעילות אנזימטית, סביב 90000 וסביב 20-30000. הדגם האלקטרופורטי של מיצוי גולמי אחרי pectolyase וריכוז ב-vivaspin מראה פסים רבים עם צביעת רקע גבוהה. שימוש במעכבי PPO וב-pectolyase נתן קצת פחות צביעת רקע. צביעת פעילות הראתה פעילות עם מריחה באזור של משקל מולקולרי גבוה. צביעת גליקופורטאין נתנה מריחה דומה. למרות שהמקטע מעמודת ביוגל ירד בצורה חדה למדי עם משקל מולקולרי סביב 47500, ולמרות הניקוי הגבוה למדי, עדיין מצאנו מספר ניכר של פסי חלבון על הגל.

שיפור בהפרדה התקבל עם SDS-PAGE. אחרי הרחקת SDS נשארו עם שני פסי פעילות המקבילים לשני פסי חלבון ברורים.

פעילות האנזים פוליגלקטורונאז נבחנה על ידי מדידת השחרור של קבוצות מחזרות מחומצה גלקטורונית (Ben-Hod et al. 1997). בכל המיקרים הביקורת של אנזים בלבד, או אנזים בתוספת קופקטור וסובסטרט בלבד נבחנו בזמן אפס ולאחר 22 שעות אינקובציה. כמו כן עקבו ויסקוזיטרית אחר השפעת האנזים. בידוד הקופקטור נעשה בקור והסולבנט נוסף באוירת חנקן למניעת תהליכי חימצון.

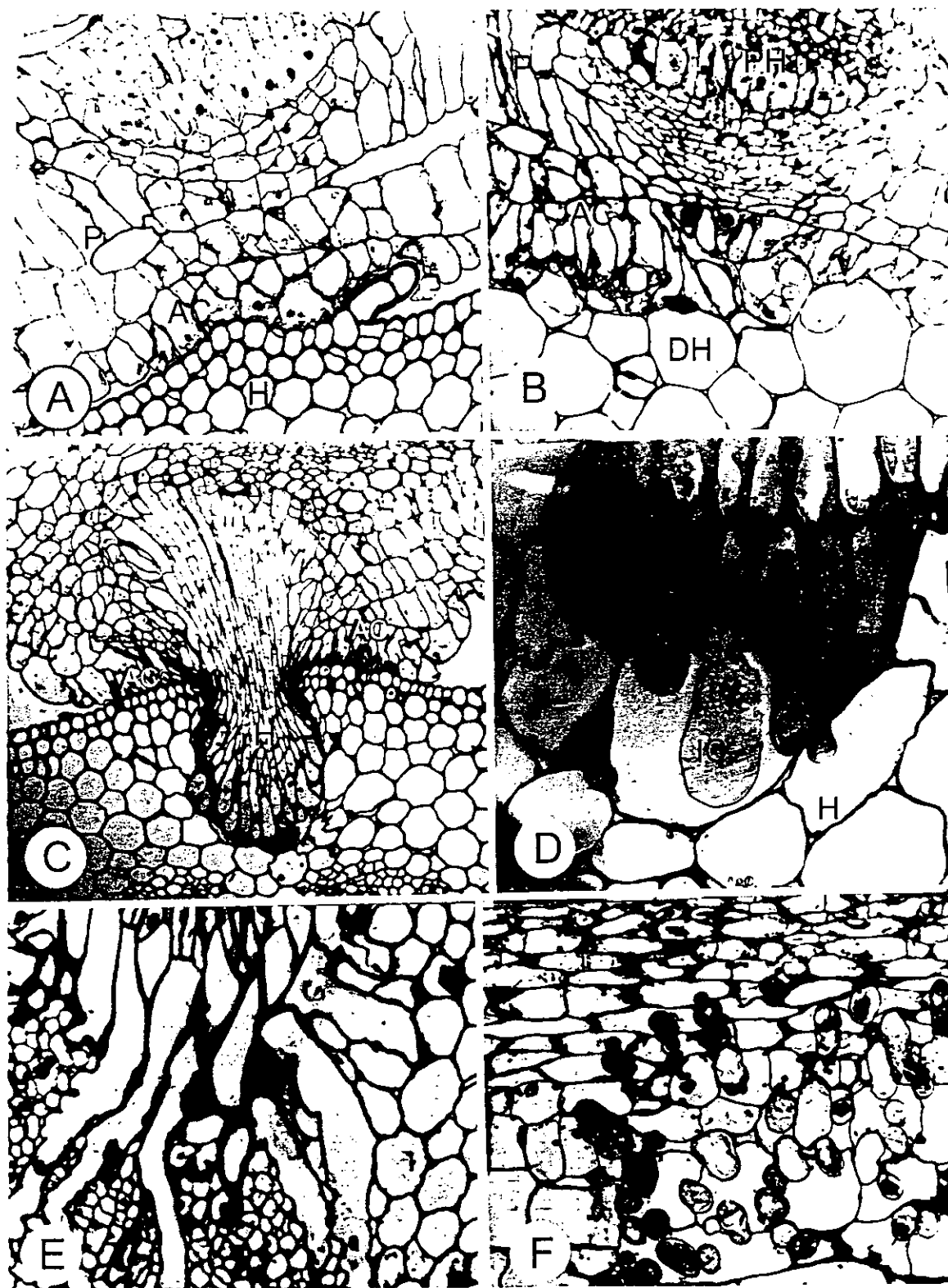
פעילות פוליגלקטורונאז התגלתה בתמציות כשות ב- 6.0, 7.0, 8.0 pH. פעילות זו איננה יציבה בתמציות, אבל יציבה למדי ברקמה עצמה. אינדיקציה ראשונה להתנהגות הבלתי רגילה של האנזים שמקורו בכשות היתה איבוד מוחלט של הפעילות לאחר דיאליזה במשך 24 שעות כנגד 10mM NaCl בשקית שעבירה למולקולות עד 12000 dalton. איבוד זה של הפעילות לא נבע מחוסר יציבות. תמצית מורתחת שניתנה לאנזים שעבר דיאליזה השיבה לו את הפעילות.

השבת הפעילות עמדה ביחס ישר לנפח התמצית המורתחת. לא ניתן ליחס את השבת הפעילות לקופקטורים פשוטים. תוספת של DTT או DIECA, או קטיונים כסידן ואשלגן לא השיבה את הפעילות. דיאליזה בשקית שעבירה למולקולות עד 1200 dalton איפשרה שמירה מלאה של פעילות האנזים. איפיון יותר מדויק של גודל מולקולת הקופקטור התאפשר בעזרת קולונת פרמציה HiTrap ו-Vivaspin tubes. התברר שהחומר בעל משקל מולקולרי של 1200-5000 dalton. התמצית המורתחת לא איבדה פעילות לאחר טיפול בקולונת Con A Sepharose, תוצאה שמטילה ספק באפשרות שזהו קרבוהידראט. השריה של תמציות מתנוליות עם תערובות של גליקוזידאז a ו-b ב- 25 °C לא פגעה ביכולתן לשמר פעילות. לעומת זאת הרסו K proteinase ו-papain את יכולת התמצית המורתחת לשמר את פעילות האנזים בתמציות שעברו דיאליזה. תוצאות אלה מצביעות על כך שהגורם שהולך לאיבוד בדיאליזה הוא פפטיד בעל משקל מולקולרי נמוך היציב בהרתחה. בניסויים נוספים מצאנו כי מדובר בפפטיד המסיס ב- 80% מתנול וב-petroleum ether שנותן פיק בודד ב-Biogel P6. האופי המדויק של החומר ותפקידו האפשרי בפרוק פקטינים נחקרים כעת.

אנליזה סטרוקטורלית של חדירת כשות לרקמות פונדקאי

השלב הראשון של העבודה הסטרוקטורלית היה בחירת צמח פונדקאי המתאים למחקר. לאחר בדיקה של שורת פונדקאים אפשריים, נבחרו מלון ובזיל לעבודה זו בזכות ההצמדות והגידול המהירים של כשות השדות על גבעוליהם, ובזכות הקלות היחסית של הכנתם לאנליזה במיקרוסקופ האור ובמיקרוסקופ האלקטרונים. תחילה הוכן חומר למיקרוסקופ האור כדי ללמוד את אופן חדירת הוסטריום הכשות בשני הפונדקאים.

מצאנו שלשה שלבים בפריצת הוסטריום הכשות: הצמדה, פריצת גוף ההוסטריום, והתפתחות תאי גישוש. גבעול כשות שנכרך על גבעול בזיל יוצר אבר הצמדה (תמונה 1A) שנצמד לפונדקאי (H)



תמונה 1: A. חתך אורך באזור ההצמדה של כשות [P] על גבעול של בזיל [H]. תאי הצמדה. במרכז למעלה נראה פרה-הוסטוריום מתפתח בגבעול הכשות. B. x55. חתך כנייל על ליבה של סמבוק [DH]. [PH] פרה-הוסטוריום בגבעול הכשות. תאי הצמדה של כשות חדרו לתאים ההיקפיים של רקמת הסמבוק. C. x55. הוסטוריום [H] לאחר שפרץ לגבעול בזיל. D. x55. תאי גישוש [IC] חודרים לתוך תאי פונדקאי [H]. E-F. x220. חתכי אורך ורוחב בהתאמה של תאי גישוש ברקמות של גבעול בזיל. x140.

בעזרת תאי אפיתל מיוחדים (AC) המפרישים דבק עיגון. גוף ההוסטריום שמתפתח כמו שרש אדוונטיבי מחלקו הפנימי של גבעול הכשות פורץ לגבעול הבזיל כגוף חרוטי רב תאי (תמונה 1C). גוף זה שולח שלוחות דמויות אצבע בניצב לפני השטח שלו (תמונה 1D-F), חלקם בקורטקס, אחרים בכוון השיפה והעצה. תא אחד של הגוף החרוטי יכול לשלוח מספר שלוחות. לפעמים אין הגוף החרוטי מוציא שלוחות כנ"ל (תמונה 2B). במקרה כזה, שיכול לעיתים להופיע באותו צמח פונדקאי בסמיכות לגוף חרוטי בעל שלוחות, תאי הפונדקאי השכנים שנדחסים על ידו הם בעלי דפנות מעובים וציטופלסמה צפופה הנצבעים חזק, וכנראה תגובתם היפרסנטסיטיבית.

חדירת כשות לרקמה צמחים מתה

אחת הבעיות בחקר החדירה של ההוסטריום היתה האפשרות ההיפוטטית שאנזימים שמקורם בתאי פונדקאי מעורבים בתהליך. על מנת לבחון היפותיזה זו לקחנו ליבה יבשה של ענפי סמבוק שחור, שבנויה דפנות תאי פרנכימה בלבד, ואיפשרנו לצמחי כשות להכרך סביבה על מנת שהכשות יחדיר לתוכה הוסטריות. ניסינו להדביק כשות על ליבה גם בתנאי תרבית אספטיים, כאשר היא יבשה או רטובה ובנוכחות בופרים שונים. בכל המיקרים הכשות נצמדה לליבה תוך יצירת אבר הצמדה אופייני בעל תאי אפיתל (AC) שריפדו את השטח החיצון של הליבה (תמונה 1B), ובתוך גבעול הכשות התפתח פרה-הוסטריום (PH). בשום מקרה לא התפתחו הוסטריות ולא נצפתה חדירה של רקמת כשות לתוך הליבה. מצאנו רק תאי הצמדה של כשות שחדרו לתאי היקף הליבה (DH) בהם הדופן החיצון היה פגום. לא היתה חדירה אקטיבית של תאים דרך דפנות של תאי ליבה חסרי ציטופלסמה. תאי הכשות שחדרו לתאי ליבת סמבוק היו תאי הצמדה אופייניים.

גידול כשות על מקלות פלסטיק הביא להתפתחות דומה של אבר הצמדה ופרה-הוסטריום בתוך גבעול הכשות, ללא יצירת הוסטריות. תוצאות ניסויים אלה מצביעים על כך שדרושה אינטראקציה של הכשות עם פונדקאי חי על מנת שההוסטריום יפרוץ אל מחוץ לאבר ההצמדה. מרכיבי אינטראקציה זו צריכים לשמש נושא למחקר נפרד.

אולטראסטרוקטורה של חדירת הוסטריום כשות לרקמות פונדקאי

חומר רב נחתך לאחר פיקסציות מגוונות, כהכנה לבדיקת החומר במיקרוסקופ האלקטרוני ולצביעות אימונולוגיות. שלש שאלות עיקריות נשאלו בהקשר זה:

1. האם חל שינוי בתאי הפונדקאי בעת חדירת ההוסטריום.
 2. האם מופרשים אנזימים מפרקי פקטין *in situ* בעת חדירת ההוסטריום.
 3. האם חל שינוי בדרגת האסטרופיקציה של פקטינים בדפנות תאי פונדקאי סביב ההוסטריום.
- במיקרוסקופ האלקטרוני הצלחנו להבחין בין תאי טפיל לתאי פונדקאי על פי צורת התאים ואופי דפנותיהם, ועל פי מבנה הפלסטידות וגרגרי העמילן שלהם.



תמונה 2: A. תאי גבעול של בזיל בצמוד להוסטריום של כשות. צביעה אימונוציטוכימית ב-JIM5 למיקרוסקופ אלקטרוני. פקטין דל-מתוקסי בחלל התא ובשרידי הדפנות [WM]. B. $\times 13,600$. חתך אורך באזור החדירה של הוסטריום כשות. תאי פונדקאי מעוכים סביב ההוסטריום. C. $\times 55$. PME (חצים) בתא פונדקאי הסמוך להוסטריום כשות. צביעה אימונוציטוכימית למיקרוסקופ אלקטרוני. D. $\times 32,000$. תאי בזיל מעוכים בין תאי גישוש [P]. דפנותיהם בשלבי פירוק [WM]. $\times 8,500$.

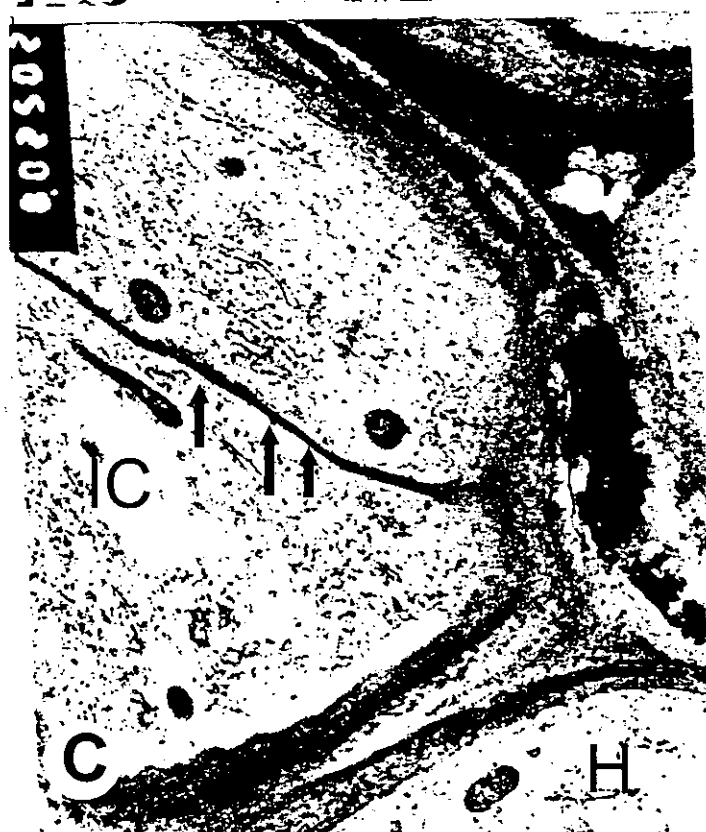
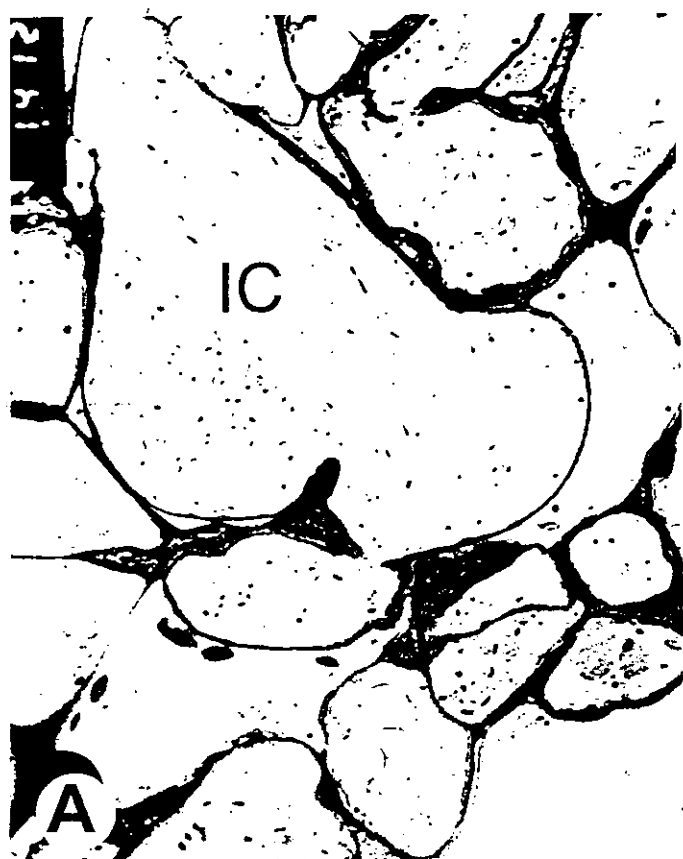
צביעת חתכים של צמחי פונדקאי נגועים בכשות למיקרוסקופ האלקטרוני, בעזרת נוגדנים מונוקלונלים לפקטינים בעלי דרגות אסטרופיקציה שונות (פקטינים עתירי קבוצות מתוקסי סומנו בחלקיקי זהב בני 5nm, ופקטינים דלי קבוצות מתוקסי ב-10nm) גרמה להופעת סימון צפוף של חלקיקי זהב משתי הקבוצות על כל דפנות תאי הווסטוריום הכשות (לדוגמא: תמונה 3C). התברר שדפנות תאי הווסטוריום של כשות עשירים מאד בפקטינים, בכמות רבה בהרבה מזו שמוצאים ברקמות צמחיות רגילות, ובכללן רקמות גבעול של בזיל ומלון ששמשו פונדקאים בעבודתנו.

חדירת תאי גישוש לתאי פונדקאי

בדיקה אולטרא-סטרוקטורלית קפדנית של דפנות תאי גבעול של בזיל הגובלים בהווסטוריות לא העלתה הבדלים בין דפנות אלה לדפנות תאים דומים באזורי גבעול בלתי נגועים. לא נמצאו הבדלים ברמות האסטרופיקציה של הפקטינים בדפנות באזור חזית החדירה של תאי כשות וגם לא באזורי גבעול נגועים של בזיל בהם נוכחים תאי כשות בוגרים. בכולם נראה פיזור אחיד יחסית של סימון הפקטינים השונים. מאחר ויתכן כי הכשות גורמת שינויים מינוריים בדפנות, ביצענו גם פיקסציה בנוכחות אוסמיום שגורם לקשירה חלקית של פקטינים, בתקווה ששיטה זו תאפשר להבחין בהבדלים דקים בתכולת פקטינים בדופן. גם בדרך זו לא מצאנו הבדלים ברמת נוכחות הפקטין באזורי חדירת הכשות לפונדקאי.

פריצת גוף הווסטוריום לרקמות הפונדקאי

פריצת גוף הווסטוריום היא ארוע טראומטי לפונדקאי: גוף הווסטוריום הוא אבר רב תאי המתפתח תחילה כמו שורש צדדי בגבעול הכשות. אבר זה פורץ כגוף אחד לרקמות הפונדקאי תוך כדי דחיסת תאי פונדקאי (תמונה 2A). כתוצאה מכך מתקבלת שכבה של שרידי תאים סביב האבר הפורץ (תמונה 2A). שכבה זו יכולה להיות עבה בגבול האפידרמיס וההיפודרמיס של גבעול הפונדקאי, כי שם מצויים תאים קטנים יחסית שדפנותיהם עבים (תמונה 2B). שכבת שרידי התאים דקה יותר בפרנכימה של קליפת גבעול הפונדקאי כי תאי הפרנכימה גדולים ודקי דופן. עובי השכבה עומד על כן ביחס ישר לנפח הדופן שנדחס בין הווסטוריום לרקמות הפונדקאי. תופעה זו של דחיסת תאים על ידי גוף הווסטוריום של כשות שונה מאופן ההשפעה של הווסטוריום על רקמות פונדקאיות: בעלאת חודר הווסטוריום הרב-תאי בין תאי הפונדקאי שנשארים חיים. תוספת זו של תאי טפיל ללא מעיכה של תאי פונדקאי גורמת לעיבוי השרש בעקבות חדירת העלקת (Joel et al 1996). חדירת גוף הווסטוריום של כשות מתקיימת, לעומת זאת, על חשבון נפח תאי הפונדקאי: תאי פונדקאי נמעכים ומתים והמרחב המתפנה נתפס על ידי הטפיל, כך שגבעול הפונדקאי איגנו מתעבה. תאי הפונדקאי שנדחקים על ידי גוף הווסטוריום עוברים שינויים מפליגים: נפחם מצטמצם, הציטופלסמה בהם מתה ומתפרקת בהדרגה והופכת אוסמיופילית בדומה לתאי בלוטה מזדקנים (Joel and Fahn 1980).



תמונה 3: A. תא גיטוס של כשות [IC] בעל שלוחה בתוך תא פונדקאי. בשולי התא מצויים דפנות מעובים העשויים תאי פונדקאי מעוכים. $\times 2,200$. B. חתך אורך באזור החדירה של תא גיטוס של כשות [IC] לתוך תא פונדקאי. דופן תא הפונדקאי [HCW] נקטע במקום החדירה [חץ גדול] ודופן הטפיל [חצים קטנים] צמוד אליו. $\times 16,000$. C. תא גיטוס מתחלק. צביעה אימונוציטוכימית ב-JIM5 למיקרוסקופ אלקטרוני. $\times 16,000$. D. דפנות תאי בזיל מקופלים על יד תאי גיטוס. $\times 12,300$.

ודפנות התאים משנים את צורתם ואת הרכבם (תמונה 2A,D). במקום דפנות מוגדרים וקמפקטים מתקבלים איזורי דופן תפוחים (WM) שבהם ריכוז גבוה של פקטינים דלי קבוצות מתוקסי, כפי שניתן לראות בצביעה אימונוציטוכימית עם הנוגדן JIM5 (תמונה 2A). שנויים כאלה יכולים להתרחש רק על ידי פעולה של אנזימים מתאימים.

על מנת לאתר אימונוציטוכימית את האנזים PME באזור המגע בין הטפיל לפונדקאי השתמשנו בנוגדנים ספציפים כנגד האנזים. מאחר שעדיין לא הופקו נוגדנים ספציפים עבור חלבוני כשות השתמשנו בנוגדנים ממקורות חלופיים. צביעת חומר מיקרוסקופי עם נוגדנים ספציפים לאנזימים PME ו-PG ממקורות שונים (שאינם כשות) הראתה נוכחות דלה אך אחידה של האנזימים בדפנות צמחי הפונדקאי, ללא קשר לנוכחות הכשות ברקמת הפונדקאי.

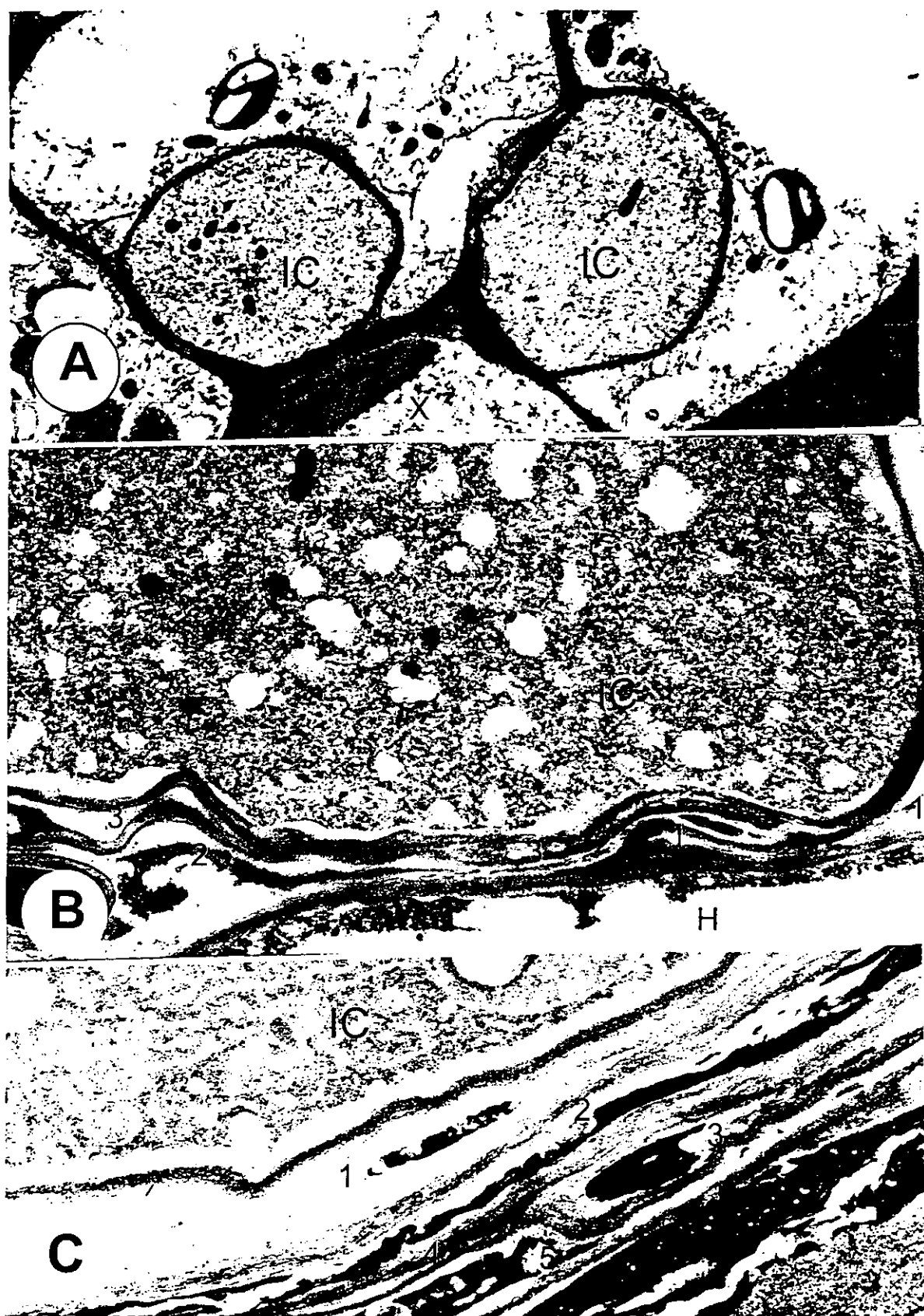
בניגוד לצפוי, ראינו חלקיקי זהב הקשורים לנוגדן בתאי פונדקאי הסמוכים לתאים החודרים של הכשות. האנזים PME נוכח בתאי פונדקאי פגועים (תמונה 2C) ולא בתאי הטפיל. נראה לנו על כן שיתכן והטפיל משרה אוטוליזיס חלקי של דפנות תאי הפונדקאי העומדים בדרכו.

חדירה בין תאית של תאי גישוש

תאי גישוש רבים חורגים מגוף ההוסטריום ומתארכים בנפרד בתוך רקמות הפונדקאי. חלקם מגיעים עד צרורות ההובלה של הפונדקאי ויוצרים עמם קשר. בעבודה זו התמקדנו בשלבים הצעירים של התפתחות תאי הגישוש ובמעבר שלהם ברקמות הפונדקאי. התברר שתאי הגישוש עוברים בדרך כלל דרך תאי הפונדקאי ולא ביניהם. קצות תאי הגישוש המתארכים חודרים דרך דפנות תאי פונדקאי ללא יצירת קרעים (תמונה 3A,B), ומכאן ברור שהחדירה אנזימטית. יחד עם זאת לא הצלחנו למצוא ראיות אימונוציטוכימיות *in situ* לפעילות פקטינזות בלמלת הביניים בתפר שבין תאי פונדקאי ליד תאי טפיל, או בצואר החדירה.

היפותזת העבודה בתוכנית המחקר היתה שחדירת הכשות מבוססת על פעילות פקטינזות שמפלסות להוסטריום דרך בין תאי פונדקאי על ידי פירוק למלת הביניים הקושרת את התאים זה. ניתוח התוצאות של הצביעה הדיפרנציאלית של הפקטינים, שלא הראתה שינויים בפקטינים שבלמלת הביניים, וניתוח נתוני הסימון האימונולוגי של PME באזורי החדירה מביאים אותנו לשלילת ההיפותיזה שהטפיל מפלס דרך על ידי פרימה של החיבור בין תאי פונדקאי, ולא־ימוץ היפותיזה חלופית. שחדירת הטפיל מתאפשרת על ידי פריצה אנזימטית של דפנות תאים. הממצא החדש שקיימת חדירה לחלל התא של תאי פונדקאי דרך הדופן שלהם, כלומר שהחדירה מתקיימת בעיקר דרך התאים ולא ביניהם, מביאה אותנו להנחה שאנזימי המפתח של הוסטריום הכשות שייכים דוקא לקבוצת הצלולאזות.

בחינה אלקטרון-מיקרוסקופית של אזור החדירה הראתה שבצואר החדירה (כלומר באזור הדופן של תא הפונדקאי דרכו עבר תא כשות) שונים דפנות תאי הפונדקאי מאזורי דופן אחרים. בתמונה 3B נראה אזור צואר החדירה של שלוחת תא כשות (IC) לתוך תא פונדקאי. בעוד שדופן תא הטפיל רציף



תמונה 4: A. תאי גישוש של כשות [IC] בתוך תאי פונדקאי בסמוך לטרכיאה של העצה [X]. $\times 4,300$. B. שולי תא גישוש של כשות [IC] על יד תא פונדקאי [H]. המירווח ביניהם עשוי דפנות של שלושה תאי פונדקאי דחוסים [ממוספרים]. $\times 8,000$. C. שולי תא גישוש של כשות [IC] על יד שכבה העשויה יותר מחמישה תאי פונדקאי דחוסים [ממוספרים]. $\times 10,700$.

באזור זה (חיצים קטנים), דופן תא הפונדקאי (HCW) נקטע בצואר החדירה (חץ גדול), ודופן הכשות צמוד אליו תוך יצירת רציפות מושלמת ביניהם.

תאי הכשות יכולים לעבור חלוקה שבמהלכה נוצר דופן חדש (תמונה 3C). נוכחות של דופן תא טפיל גורמת שינויים בדופן תא הפונדקאי בתוכו הוא צומח (תמונה 4A). תוך כדי הצמיחה של תאי הכשות נדחקים תאי הפונדקאי ונמעכים. מעיכת תאי הפונדקאי יוצרת לעיתים קרובות קפלי-דופן אופייניים (תמונה 3D). גם תאי פונדקאי שכנים נמעכים לעיתים קרובות, תוך יצירת מעטה סביב תאי הטפיל. מעטה זה עשוי שכבות דופן אחדות שניתן לראות ביניהן שרידים של חללי התאים (תמונה 4B,C).

מסקנות

נדחתה ההיפותיזה שתאי הכשות חודרים לרקמות פונדקאי על ידי פרימת למלת הביניים שבין התאים בעזרת פקטינאזות. במקום זאת הועלתה היפותיזה חלופית שהחדירה מתאפשרת בעזרת צלולאזות.

השקענו מאמצים לבירור השאלה אם קיימות ראיות לפעילות פקטינאזות *in situ*, על ידי איתור האנזים באמצעים אימונוציטוכימיים ברקמות, והתחקות אחר הבדלים כמותיים בנוכחות פקטינים שונים בדפנות תאי גבעול הפונדקאי הסמוכים להוסטריום כשות. לא נמצאו הבדלים כמותיים בנוכחות הפקטינים בסביבת ההוסטריום והתברר ש-PME לא מופרש על ידי ההוסטריום אלא על ידי הפונדקאי. אנזימים מפרקי פקטין נמצאו רק בתאי הפונדקאי הנמעכים ולא בגבולם עם תאי הגוף החודר של הטפיל.

חדירת גוף ההוסטריום של כשות מתקיימת תוך כדי מעיכה של תאי פונדקאי, ולא על ידי פרימה של למלת הביניים בין התאים. זוהי חדירה הרסנית שממיתה קבוצה גדולה של תאי פונדקאי. תאי הגישוש של הכשות אינם צומחים בין תאי הפונדקאי, אלא חודרים לתוך תאי הפונדקאי, כנראה בעזרת צלולאזות, וגם תוך כדי גדילתם נדחקים תאי פונדקאי שכנים שמקומם נתפש על ידי הפולש. תוצאות אלה סותרות את ההנחה שמנגנון חדירת הכשות דומה למנגנון החדירה של עלקת. קביעה זו נכונה הן לשלב פריצת ההוסטריום והן לשלב החדירה של תאי הגישוש המתפתחים בהיקף ההוסטריום. הפקטינאזות שמצאנו בגבעולי הכשות עשויות להיות אחראיות לתהליכי ההתפתחות של הטפיל עצמו, ולא לפגיעה בדפנות תאי הפונדקאי ולהתקדמות ההוסטריום.

תוצאות הניסויים עם ליבת סמבוק וגבעולים מפלסטיק מצביעות על כך שדרושה אינטראקציה עם פונדקאי חי על מנת שיתפתח הוסטריום של כשות שיפרוץ אל מחוץ לאבר ההצמדה של הטפיל. מרכיבי אינטראקציה זו צריכים לשמש נושא למחקר נפרד.

ניקוי האנזים פקטין מתיל אסטרז (PME) מכשות נתקל בבעיות בלתי צפויות. רקמות הכשות מכילות כמויות גדולות של תרכובות פנוליות שמתחמצנות בעת המיצוי תודות לאנזים PPO שמצוי אף הוא ברקמה. התרכובות הנ"ל משתייכות לשתי קבוצות של חומרים, האחת flavones והשניה

cafeoyl glycoside esters. הרקמה גם עשירה בפקטין שהופך את התמציות לצמיגות ומפריע בהפרדה על עמודות. כדי להתגבר על בעיות אלה איפיינו את ה- PP0 ופיתחנו שיטה להקטנת פעילותו. כמו כן הכנסנו לשימוש אנזים (pectolyase) לצורך פירוק עודפי הפקטין. בעזרת אמצעים אלה יכולנו לגשת לניקוי PME.

התברר שהאנזים PME קשור בצורה רופפת לדפנות התאים בגבעול הכשות ומשתחרר מהם בקלות, בניגוד לדיווחים על PME מצמחים שונים אחרים שקשה למצותו. חלק מהאנזים נקשר לעמודות Con A Sepharose ויורד בשני מקטעים נפרדים, ראיה לכך שכנראה קיימות שתי צורות הנבדלות בכמות הסוכר שמרכיב את הגליקופרוטאין. למרות שהצלחנו להשיג הפרדה משמעותית של PME, עדיין מתקבלים מספר פסי חלבון בהפרדה אלקטרופורטית, והניקוי לא מספיק לצורך הפקת מוגדנים. גם ניקוי הפוליגלקטורונז נתקל בקשיים בלתי צפויים. התברר שלפעילות האנזים בכשות דרוש קופקטור שהוא פפטיד העמיד בהרתחה.

פרסומים מדעיים והרצאות שנבעו מביצוע המחקר

Mayer, A.M., Bar-Nun, N., Ben-Hod, G., Losner-Goshen, D., Portnoy, V.H. and Joel, D.M.

(1999) Involvement of pectinases in plant infection by parasitic weeds.

Phytoparasitica 27: 111-112

Bar-Nun, N. and Mayer, A.M. (1999) Culture of pectin methylesterase and

polyphenoloxidase in *Cuscuta campestris*. Phytochemistry 50: 719-727.

Bar-Nun, N., Mor, A. and Mayer, A.M. (1999) A cofactor requirement for polygalacturonase

from *Cuscuta campestris*. Phytochemistry (in Press)

מאיר, א.מ., נ. בר-נון, א. בן-הוד, ו. פורטנוי, ד. לוזנר, וד. יואל (1998). מעורבות של פקטינאזות

בהדבקת הפונדקאי ע"י צמחים טפילים. הרצאה בהועידה הארצית ה-15 לעשבים רעים

והדברתם. האגודה הישראלית למדע העשבים הרעים.

- Ben-Hod, G., Bar Nun, N., Tzaban, S. and Mayer, A.M. (1997) *Phytochemistry* 45, 1115-1121
- Blank, A., Sugiyama, R.H. and Dekker, C.A. (1982) *Analyt. Biochem.* 120, 267.
- Bordenave, M. and Goldberg R. (1993) *Phytochemistry* 33,999-1003
- Bordenave, M. and Goldberg R (1994) *Plant Physiol.* 106, 1151-1156
- Bordenave, M., Breton, C., Goldberg R., Huet, J-C., Perez S. and Pernollet, J-C. (1996) *Plant Mol Biol.* 31, 1039-1049.
- Dawson, J.H., Musselman, L.J., Wolswinkel, P. and Dorr, I. (1994) *ev. Weed Sci.* 6, 265-317
- Gaffe, J., Tieman, D.M. and Handa, A.K. (1994) *Plant Physiol.* 105, 199-203
- Goldberg R., Pierron, M., Durand, L., Mutaftschiev, S. (1992) *J. Expt. Bot.* 43, 41-46
- Glover, H. and Brtady, C. (1994) *Phytochemistry* 37, 949-955.
- Joel D.M. and Fahn, A. (1980) *Ann Bot.* 46: 225-223.
- Joel D.M., Losner-Goshen, D., Hershenhorn, J., Goldwasser, Y. and Assayag M. (1996) In *Advances in Parasitic Plant Research* (eds. M.T. Moreno, J.I. Cubero, D. Berner, D.M. Joel, L.J. Musselman and C. Parker. pp. 531-541
- Losner-Goshen D., Portnoy V., Mayer A.M. and Joel, D. M. (1998). *Annals of Botany* 81:319-326
- Nagar, R., Singh, M. and Sanwal, G.B. (1984) *J. Expt. Bot.* 35, 1104.
- Warrilow, A.G.S, Turner, R.J and Jones, M.G. (1994) *Phytochemistry*, 35, 863-868
- Zaccharius, R.M., Zell, T., Morrison, J.H. and Woodlock J.J. (1969) *Anal. Biochem.* 30: 148
- Zimmerman, R.E. (1982) *Anal. Biochem.* 85, 129-223

3. סיכום עם שאלות מנחות לדוחות מחקר 1998

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. תודה.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p>1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה:</p> <p>א. לברר אם אנזימים מפרקי דופן מעורבים בתהליך החדירה של הוסטוריום כשות לרקמות פונדקאי.</p> <p>ב. לנקות ולאפיין את האנזימים PME ו-PG מכשות.</p>
<p>2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופת אליה מתייחס הדו"ח:</p> <p>בעבודה המיקרוסקופית הוכח כי תאי כשות חודרים לתאי פונדקאי ומועכים תאים שכנים. נדחתה ההיפותזה שפקטינאזות של הטפיל אחראיות לחדירה, והתקבלו ראיות ראשונות לפעילות צלולאזות. האנזימים PME ו-PG אופיינו. שני האנזימים בעלי תכונות מיוחדות. התברר שדרוש קופנקטור (שהוא הפטיד) לפעילות PG.</p>
<p>3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:</p> <p>מנגנון החדירה של ההוסטוריום של כשות שונה ממנגנוני חדירה הידועים בצמחים טפילים אחרים, בכך שלא מעורבות בו פקטינאזות. התפתחות ההיסטוריום אפשרית רק על רקמת פונדקאי חיה. יחסי הגומלין בין הטפיל והפונדקאי המאפשרים את התפתחות ההוסטוריום דורשים מחקר נוסף.</p>
<p>4. הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים): התייחסות המשך המחקר לגביהן:</p> <p>דרוש איפיון של הצלולאזות של הכשות, למיקומם באזור חדירת ההיסטוריום, ובירור מנגנון החישה המאפשר לטפיל להבחין בפונדקאי המתאים. כמו כן דרוש מחקר לבירור הסטימולציה של סינטזת פלקטינוזות בתאי הפונדקאי שמתרחשת בעת חדירת ההוסטוריום.</p>
<p>5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – יש לפרט: פרסומים – כמקובל ביבליוגרפיה, פטנטים – יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון – יש לפרט מקום ותאריך. פרסומים:</p> <p>1. Mayer et al. 1999. Phhytoparasitica 27: 111-112. 2. Bar-Nun et al. 1999. Phytochemistry 50: 719-727. 3. Bar-Nun 1999. Phytochemistry (in press).</p> <p>4. הרצאה: א.מ. מאיר. הוועידה ה-15 לעשבים רעים והדברתם. מרכז וולקני, 4 במרץ 1999. ר' פירוט בגוף הדו"ח.</p>