

זרעי הצמח הטפיל עלקת מצרית *Orobanche aegyptiaca*
בשלים שלפני הנביטה

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי הטבע של האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תאר מוסמך למדעי הצמח

מאת

הילה בר

פברואר 2004

ירושלים

שבט תשס"ד

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של
ד"ר דני יואל מהמחלקה לחקר עשבים
במרכז המחקר נוה-יער של מינהל המחקר
החקלאי,
ופרו'פ א.מ. מאיר מהמחלקה למדעי הצמח
בפקולטה למדעי הטבע, האוניברסיטה
העברית, ירושלים.

תודה

לפרופ' מאיר ולד"ר דני יואל, בהערכה רבה -
על הדרכתם המסורה בכל שלבי העבודה, על היחס החם, על ההתלהבות, על הגישה החיובית בכל מצב,
אשר הפכו את העבודה לאפשרית עבורי.

לד"ר דינה פלקחין, לד"ר יבגניה דור ולשמואל גולן- על עזרתם המקצועית ועל התמיכה החברית.

לכל חברי מחלקת 'עשבים רעים' בהווה ובעבר, על תמיכתם והיותם בית חם.

לסווטלנה ולכל צוות המעבדה למרקם של ד"ר אילן שומר בבית דגן- תודה על העזרה המקצועית והאירוח הלבבי.

לדרורית, על שאת קיימת לי.

ותודה באהבה למשפחתי: נגב, דרור ושחר.

תוכן עניינים

6.....	תקציר
8.....	מבוא
8.....	פתיחה
8.....	טקסונומיה
9.....	תפוצה
10.....	מחזור חיים
13.....	הזרע
16.....	שלב ההכנה לנביטה
20.....	מטרת המחקר
21.....	שיטות
21.....	מקורות החומר הצימחי
21.....	טיפול הכנה
21.....	הכנת החומר הצימחי להסתכלות מתחת ל LM ו TEM
23.....	מיקרוסקופיה
23.....	צביעות ל LM
24.....	צביעות ל TEM
24.....	צביעות אימונולוגיות
26.....	תוצאות
26.....	מבנה הזרע המתפתח
37.....	מבנה זרע בוגר של עלקת במהלך ההכנה לנביטה
45.....	אימונוציטוכימיה

52.....	דיון
52.....	שיטות
53.....	מבנה הזרע ..
57.....	נשימה עמידה לציאניד בזרע עלקת מצרית
58.....	פעילות DIOXYGENASE בזרע עלקת מצרית בשלב ההכנה לנביטה
59.....	רשימת ספרות

ת ק צ י ר

במחזור החיים של צמחים מהווים הזרע והנביטה שלבים קריטיים. עדות לכך היא השונות הרבה המאפיינת את המבנה, אופן התפוצה, ומנגנוני הנביטה של זרעי צמחים שונים. העבודה שלהלן התמקדה בזרעים של הצמח הטפיל עלקת מצרית *Orobanchae aegyptiaca* בשלבים שקודמים לנביטה.

העלקת הוא צמח עילאי, טפיל שורש אשר תלוי בפונדקאי שלו לכל משאביו. טפיל מוחלט. צמח העלקת הוא מזיק חקלאי בארץ ובעולם.

זרעי העלקת הם קטנטנים (אורכם כ- 200-300 μm , משקלם כ- 15-25 μg) הם מתאפיינים ביכולת הישרדות גבוהה של עשרות שנים.

הנביטה של זרעי עלקת נחלקת לשני שלבים נבדלים. הראשון, שלב ההכנה לנביטה (conditioning) בו הזרע זקוק לסביבה רטובה במשך מספר ימים. רק לאחריו יכול הזרע להמשיך לשלב השני, כלומר לנביטה עצמה. בכדי להתחיל את השלב השני זקוק הזרע לסיגנל כימי שמקורו בשורשי הפונדקאי. גם זרעי העלקת וגם מנגנון הנביטה של העלקת הינם יוצאי דופן. מטרת עבודה זו היתה לאפיין את הזרעים המיוחדים הללו בשלב ההכנה לנביטה.

אפיון של שלב ביניים זה, עשוי לתרום להבנה של נביטה בצמחים בכלל, כמו גם להניב אפשרויות חדשות לניטור של העלקת בחקלאות.

זרעי העלקת הם מערכת קשה לעבודה מבנית (סטרוקטוראלית). בעבודה זו הצלחנו להתגבר על הבעייתיות ולהפיק חתכים באיכות טובה של זרעי העלקת בזמנים שונים של ההכנה לנביטה ולקבל תמונות אינפורמטיביות במיקרוסקופ אור ומיקרוסקופ אלקטרוניים. בעבודה נילמדה האנטומיה של זרע עלקת מצרית, ואנו מראים לראשונה עדות לדיפרנציאציה בעובר העלקת, קודם הנביטה.

באנטומיה של זרע עלקת מצרית אחד המאפיינים העיקריים היא שכבת האנדותרליום בקליפת הזרע. התאים בשכבה זו הם בעלי בליטות דופן, דומים מאד לתאים המכונים (TC) transfer cell מושג שטבעו Gunning & Pate (1974) עבור תאים המתמחים בטרנספורט של תמיסות למרחקים קצרים. לתאי ה TC באנדותרליום של עלקת מצרית מאפיין אחד חשוב שמבדיל אותם מ TC טיפוסיים: התאים הינם חסרי ציטופלסמה. אלו תאים מתים, וחלל התא ממולא ב מוצילאג (mucilage) בעל אופי פוליסכרידי.

בעבודה זו הצלחנו לזהות את מבני הדופן המיוחדים ולהראות את תחילת היווצרותם בזרע מתפתח.

בכדי לענות על שאלת תפקידה של שכבת האנדותרליום בזרע העלקת נדרשת עבודה נוספת. השערותנו היא שתפקידה הוא בהובלת המים בשלב ההתפחה הראשוני, פנימה אל האנדוספרם והעובר.

כמו כן בעבודה הפקנו תוצאות ראשוניות של איתור מרחבי של שני אנזימים חשובים במהלך שלב ההכנה:

ה *alternative oxidase (AOX)*, שכן בשלב ההכנה פרקציה מהנשימה מתרחשת במסלול האלטרנטיבי.

וה *dioxygenase* - שבפרופיל גנטי (עבודה של קבוצה שותפה) עלה כאנזים מפתח בשלב ההכנה לנביטה.

פתיחה

באבולוציה של צמחים וסקולריים, הופעת הזרע היא אירוע מרכזי. לזרע יש ערך הישרדותי רב: הוא זעיר (יחסית לצמח האם), לא מקובע במקומו, נהנה מאספקה עצמית של משאבים ומהגנה המאפשרים לו לשמור על חיוניות למשך תקופה ממושכת. הוא עמיד בתנאי סביבה קשים, ואף לעיתים בעל מגננונים המשפרים את סיכויי התבססות הנבט בזמן ובמקום מתאימים. הזרע הוא אחד הגורמים העיקריים שאפשרו שגשוג רב של חשופי זרע ומכוסי זרע על פני כדור הארץ.

הזרע והנביטה מהווים שלבים קריטיים, במחזור החיים של צמחים: הדבר גם מתבטא בין השאר בשונות הרבה המאפיינת את המבנה, אופן התפוצה, ומגננוני הנביטה של זרעי צמחים שונים (Raven, 2003).

העלוקת, *Orobanche spp.*, הוא צמח עילאי מכוסה זרע (Angiosperm) שאיבד את אחד המאפיינים הבסיסיים של צמחים: היכולת לבצע פוטוסינתזה. זהו צמח הטרוטרופי. עלוקת, צמח טפיל מוחלט (holoparasite), תלוי בפונדקאי שלו לכל משאביו, הוא מחוסר עלים, מחוסר מערכת שורשים של ממש (Kuijt, 1969 ; Musselman, 1980), וגנום הכלורופלסט שלו פגום (dePamphilis and Palmer, 1990).

מאורח החיים הטפילי נגזרות התאמות מעניינות לטפילות בשלבים שונים במחזור החיים של הצמח. בעבודה זו התמקדנו במאפיינים של צמח מיוחד זה, בזרעים, בשלבים שלקראת הנביטה.

טקסונומיה

העלוקת משתייכת למשפחת העלוקתיים, Orobanchaceae, מן הדו פסיגיים, קרובים למשפחת הלוענתיים Scrophulariaceae.

יחסי הקרבה בין שתי המשפחות, כמו גם הטקסונומיה בתוך העלוקתיים הם שטח מחלוקת ונושא לעבודות רבות (Nickrent, 1998 ; Holub, 1990). קיימות חלוקות שונות של סוגים, מינים ותתי מינים בתוך העלוקתיים: על בסיס מורפולוגי (Teryokhin 1997), מולקולרי (Schneeweiss, 2001), ופיטוכימי (Velasco et al. 2000).

עפ"י Parker and Riches (1993) במשפחת העלוקתיים כ-14 סוגים וכ-130 מינים. מורכבות העבודה הטקסונומית בעלוקת נובעת הן ממיעוט פרמטרים מורפולוגיים שעליהם מסתמכת הטקסונומיה בקבוצות צמחים אחרות, שכן צמח העלוקת מורכב למעשה מתפרחת בלבד, ללא עלים,

והן על שום השונות המאפיינת את העלוקת, שתלויה לא רק בתנאי סביבה, אלא גם בפונדקאים.

בתוך הסוג עלוקת, אחת האבחנות היותר מקובלות היא בין תת-סוג עלוקת מסועפת (Trionychnon) לתת-סוג עלוקת לא מסועפת (Orobanchae/Osproleon) (Feinbrun-Dothan, 1978; Parker and Riches) (1993).

בין הלא מסועפות כלולים המינים: ע.חרוקה (*O. crenata*), ע.נטויה (*O. cernua*), ע.קטנה (*O. minor*), ע.החמנית (*O. cumana*).

בין המסועפות כלולים המינים: ע. מצרית (*O. aegyptiaca*), ע. ענפה (*O. romosa*). מאחר והקבוצות השונות במשפחה לא מראות הבדלים מהותיים בביוגיה של הזרע והנביטה (Teryokhin, 1997), בחרנו מין זמין כמודל מייצג: העבודה התמקדה בעלוקת מצרית.

תפוצה

העלוקת היא חלק מצומח הבר של אזור הים התיכון (Feinbrun-Dothan, 1978). נציג נוסף של משפחת העלוקתיים באוכלוסיית הבר בארץ הוא היחנוק *Cistanche spp.* מיני עלוקת מסוימים מהווים עשב רע, מזיק חקלאי קשה של גידולי שדה זו פסיגיים בארץ ובעולם. בארץ מהווים חמישה מיני עלוקת בעיה חקלאית: ע.מצרית, ע.ענפה, ע.חרוקה, ע.נטויה, וע.החמנית. העלוקת המצרית נטפלת לירקות רבים: סולניים (עגבנייה, תפוח-אדמה, חציל, טבק) מצליבים (לפת, צנון) קטניות (חימצה, בקיה) ואף חמניות ודילועיים שונים (יואל ויעקובסון, 1988). הנזק שגורמת העלוקת מתבטא גם בכמות, וגם באיכות היבול, לעיתים עד כדי השמדתו כליל (יואל וחוב', 1991).

העלוקת המצרית מתפתחת בכל עונות השנה (בניגוד לעלוקת חרוקה שפעילה בעיקר בחורף ובאביב). אזור התפוצה העיקרי של העלוקת בחקלאות הוא סביב הים התיכון: דרום אירופה, צפון אפריקה ודרום מערב אסיה. אך יש גם התפשטות לכיוון מזרח אירופה, מרכז אסיה, ואף לאזורים אחרים המתאפיינים באקלים ים תיכוני (Joel et al., 1995).

בין הצמחים העילאיים יש כ-3,000 מינים של צמחים טפיליים ברמות טפילות שונות (Press and Graves, 1995). צמח הסטריגה (*Striga spp.*) השייך ללועניתיים הטפיליים, דומה מאד במאפייניו לצמח העלוקת. הוא מאפיין אזורים עם אקלים טרופי, וגורם נזק רב לחקלאות באפריקה (Musselman, 1980; Parker and Riches 1993).

מחקרים רבים בסטריגה ובעלוקת נערכו במקביל וקידמו זה את זה. עובדה מעניינת היא שלמרות שהסטריגה הוא בעל יכולת פוטוסינתטית מסוימת (נחשב לטפילות חלקית) הוא מקבל את עיקר הפחמן האורגני שלו מהפונדקאי (Press et al, 1987), בדומה לעלוקת.

מחזור החיים:

בכדי לנבוט, זקוק זרע העלוקת לסיגנל נביטה (סטימולנט) כימי. Vaucher (1827) תיעד את העובדה שבכדי לנבוט, זקוק זרע העלוקת לנוכחות של שורשי פונדקאי בסביבתו. כמאה שנים אח"כ, הראה *Sunders* שמיצוי של שורשי תירס, מנביט זרעי סטריגה (Joel et al., 1995)

הסטימולנט הראשון שבודד ואופיין כימית הוא *Strigol*. שמו ניתן לו בשל יכולתו להנביט זרעי סטריגה למרות שבודד תחילה מכותנה שאיננה פונדקאי של סטריגה (Cook et al, 1966). לאחרונה הסטריגול זוהה גם בשורשי צמחים אחרים שאינם פונדקאים, וכן במיצוי של שורשי פונדקאים של סטריגה כמו תירס וסורגום (Siame et al., 1993).

Strigol הוא חומר לא יציב כימית. עובדה זו מגדירה חלון הזדמנויות מצומצם למפגש של הטפיל עם שורש הפונדקאי, הן מבחינת תזמון והן מבחינת הקירבה לשורש הפונדקאי. בכך גדל הסיכוי למימוש פוטנציאל נביטת הזרע, שכן לאחר הנביטה - יכול הזרע לשרוד ללא קשר עם פונדקאי רק ימים ספורים. *Strigol*, כמו גם האנלוגים הסינתטיים שלו (דוגמת GR24 בו השתמשנו במעבדה) הם סטימולנטים יעילים לנביטת עלוקת וגם לטפילי שורש עשבונים נוספים (Musselman, 1980). קיימות היפותזות שונות לגבי המנגנון הביוכימי שלו (Keyes et al., 2001; Wigchert and Zwannenburg, 1999). בשנים האחרונות בודדו שלושה סטימולנטים טבעיים של עלוקת קטנה (*O. minor*) מהפונדקאי שלו - תלתן (*red clover*). שניים מתוך השלושה זהו: *alectrol*, *orobanchol*. כמו ה-*strigol*, הוא *strigolactone*. מהותו של ה-*alectrol* טרם הובררה אם כי הוא חולק תכונות משותפות עם ה-*strigolactones* (Yokota et al. 1998).

מלבד ה-*strigolactones* ישנן שתי קבוצות חומרים נוספות שדווחו כסטימולנטים של נביטה: *sesquiterpene lactones* דווחו כסטימולנטים של סטריגה ואף של עלוקת חמנית. ישנן עדויות ראשוניות לביוסנתזה של *sesquiterpene lactones* בשורשים של חמנית (Bouwmeester et al, 2003).

Dihydrosorgoleone דווח כסטימולנט של סטריגה שמוצה מסורגום. יתכן וזהו הסטימולנט של פונדקאים חד פסיגיים, אך בנושא זה הדעות עדיין חלוקות, ואין עדויות לגבי פעילותו על זרעי עלוקת.

למעשה, עד היום אין הוכחה מוחלטת שהנביטה של זרעים בשדה מושרית ע"י מולקולה אחת מסוימת, או קבוצה מסוימת של מולקולות. ואכן קשה מאד להשיג הוכחה כזו (Bouwmeester, 2003). כל העבודות בנושא זה נערכו עד כה במעבדה .

המנגנון באמצעותו מתחיל סטימולנט את תהליך הנביטה בזרע איננו ברור עדין. בתגובה לסיגנל נביטה מתפתח השורשון שאינו מושפע ע"י כוח הכובד. להתפתחות השורשון אחראים תאים מתחלקים בקצהו הדיסטלי של הנבט ותאים מתארכים במרכזו. אורך השורשון יכול להגיע עד כ- 5 מ"מ, אך נביטה בצמוד לשורש פונדקאי, השורשון יכול להיות קצר בהרבה (Joel and Losner-Goshen, 1994).

הדעה המקובלת היא שכמוטרופיזם הוא המנגנון שמכוון את התארכות הטפיל אל שורש הפונדקאי. עדות תומכת לכך נמצאה בהתארכות דיפרנציאלית של השורשון (Whitney and Carsten 1981). אם בתום גידולו לא פוגש הנבט פונדקאי - הוא מתנוון ומת.

במפגש עם שורש הפונדקאי נוצרת היצמדות אשר מתווכת ע"י חומר רירי המופרש מתאים בודדים בקצה הנבט (Joel and Losner-Goshen, 1994). לאחר ההיצמדות מתפתח הוסטריום (מצץ) אשר חודר אל הגליל המרכזי של שורש הפונדקאי ומתחבר ישירות אל מערכת ההובלה שלו. החדירה המכאנית מתבצעת בשילוב עם פעילות אנזימתית של פקטינאז על למלת הביניים שמחברת בין הדפנות. פעילות אנזימתית זו מאפשרת היפרדות של תאים שכנים וחדירה של הוסטריום ביניהם (Losner-Goshen et al. 1998).

לאחר החיבור ביו מערכות ההובלה פונדקאי – טפיל, העלקת מקבלת את כל משאביה: מים, פחמן אורגני ושאר נוטריאנטים - מהפונדקאי. הטפיל הצעיר מפתח על פני שורש הפונדקאי איבר אגירה, הוא הפקעית (tubercle) האוגרת בעיקר עמילן.

במינים אחדים, מתפתחים מהפקעית גם שורשים צדדיים שתפקידם העיקרי הוא יצירת הוסטריות נוספות להיטפלות יעילה יותר. הפקעית הבוגרת מצמיחה נצר אל מעל פני הקרקע - הוא עמוד התפרחת, עליו מתפתחים פרחים ופירות.

הפרי של העלקת הוא הלקט. בכל פרי יש כ 500 זרעים. לאחר הבשלתם והשלמתם מופצים הזרעים הפצה אביוטית, בדרך כלל ע"י רוח.

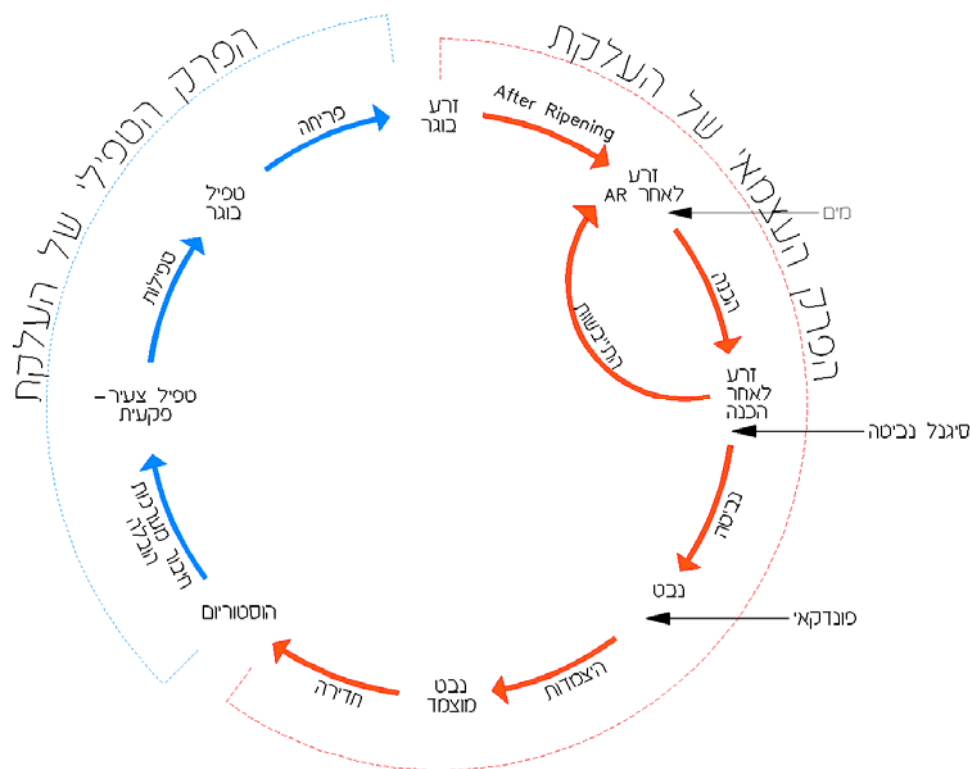
הזרע המושל נכנס לשלב ה- after ripening המלווה בתרדמה, במהלכה גם אם יוצרו תנאים מתאימים לנביטה, ויתקבל סיגנל נביטה מפונדקאי שכן, הזרע לא ינבוט. במהלך תקופת ה- AR עובר הזרע שינויים פנימיים, רובם אינם ידועים עדין. יתרון אפשרי של AR הוא מניעת נביטת הטפיל בסוף עונת הגידול של פונדקאי.

מעבודות שנעשו על סטריגה ידוע שמשך ה-AR הוא תלוי טמפרטורה (Kust, 1963) ונע בין מספר שבועות לבין מספר חודשים. בעלאת מצרית אורך תקופת ה-AR היא קצרה יחסית (לעומת סטריגה) ואורכת כחודש (Joel et al., 1995). לאחר גמר תקופת ה-AR, בהיווצרות תנאים מתאימים, יכול הזרע לעבור תקופת הכנה לנביטה (conditioning) כפי שיפורט להלן. שלב ההכנה לנביטה מתחיל בכניסת מים לזרע (התפחה), ונמשך מספר ימים לאחריה. במהלך תקופה זו הזרע הופך בעל יכולת תגובה לסיגנל נביטה.

ניתן לחלק את מחזור החיים של העלאת לשני פרקים: פרק חיים עצמאי, אשר מתחיל בזרע הבשל ומסתיים ביצירת ההוסטוריום, בפרק זה מנצלת העלאת את חומרי התשמורת האגורים בזרע. ולאחריו הפרק הטפילי שמתחיל בשלב חיבור מערכות ההובלה ומסתיים ביצירת הזרעים וקמילת הצמח, ואשר במהלכו תלויה העלאת באופן מוחלט בהזנה ע"י צמח פונדקאי. המעבר בין הפרק העצמאי לפרק הטפילי מלווה בשינויים מטבוליים שהבולט ביניהם הוא אגירת עמילן (יואל וחוב', 1991).

מחזור החיים של

העלקת



עבודה זו התמקדה בפרק העצמאי של העלקת, בשלבים המקדימים לנביטה, ובפרט בתקופת ההכנה לנביטה.

1.5 הזרע

צמחים מאמצים בד"כ אחת משתי אסטרטגיות הישרדות ניבדלות. אסטרטגיות אלו ידועות בספרות כאסטרטגית K (מספר קטן של צאצאים, השקעה הורית גדולה, קצב גידול איטי) ואסטרטגית r (מספר צאצאים גדול, השקעה הורית קטנה, קצב גידול מהיר) (Begon, 1996). אסטרטגית r מאפיינת קבוצות צמחים רבות, ביניהן למשל סחלבים המהווים מקרה קיצוני, כמו גם צמחים אפיפיטים, צמחים טורפים, וגם מרבית טפילי השורש העילאיים.

כמו צמחי r אחרים, צמח העלוקת מניב כמות עצומה של זרעים קטנים מאד. כמות הזרעים שצמח בודד לא טפיל יכול להניב, מגיעה בדרך כלל לכל היותר לכמה אלפים. צמח עלוקת בודד יכול להניב עשרות אלפי זרעים, וצמח בודד של סטריגה עשוי להניב במקרים קיצוניים אף כחצי מליון זרעים (Parker and Riches, 1993).

מאסטרטגית r נגזרת העובדה שכל זרע מקבל משאבים מצומצמים, ואכן מאפיין ברור של זרעי העלוקת הוא ממדיהם הזעירים: אורכם כ- $200-300 \mu\text{m}$, משקלם כ- $15-25 \mu\text{g}$, מספר התאים שבונים את הזרע הוא כ-200 בסה"כ. העובר מוקף אנדוספרם מצומצם המהווה מאגר מוגבל של חומרי תשמורת. האנדוספרם מוקף ע"י קליפת זרע.

לאחרונה תואר ההרכב של הזרע היבש של עלוקת מצרית (Bar-Nun and Mayer, 2002):

ליפידים: מהווים 29% ממשקלו היבש של הזרע. זהו חומר התשמורת העיקרי בזרע. כאופייני לזרעים בכלל, מרבית החומצות השומניות המרכיבות את תכולת הזרע הן בלתי רוויות (מאיר ופוליקוב-מיבר, 1984). מדובר בעיקר בחומצה אולאית (64%) ובחומצה לינולאית (24%) שהיחס ביניהן הוא 2.7.

הדומיננטיות הנ"ל של ח.אולאית עולה בקנה אחד עם ממצאים במינים אחדים של עלוקת: Velasco et al. (2002) בדקו את היחס ח.אולאית: ח.לינולאית בזרעי מינים שונים של עלוקת. הם ניסו להשתמש ביחס הנ"ל כסמן טכסונומי. בכל המינים שנבדקו ח.אולאית היתה הדומיננטית. היחס ח.אולאית: ח.לינולאית במינים שונים הראה וריאביליות בטווח שבין 0.5-2.5.

ח.שומניות הרויות בזרע העלוקת מצרית הן בעיקר: ח.פלמיטית 6.9% וח.סטיארית 3.0%.

חלבונים: במדידות של אחוז משקלי יבש, החנקן בזרע מהווה 1.7-2.1%. בזרעים בד"כ התרכובות החנקניות הן חלבונים, למעט ח.א. חופשיות ואמידים, כך שנימצא מתאם טוב בין סה"כ כמות החנקן לכמות החלבון בזרע (מאיר ופוליקוב-מיבר, 1984).

סוכרים: בזרע ע.מצרית אחוז הסוכרים כפי שנמדד ע"י מיצוי בכוהל, לאחר יבוש בהקפאה הינו כ-6% ממשקלו היבש של הזרע.

הסוכרים העיקריים בזרע, כפי שנקבע בעזרת HPLC: סוכרוז, פרוקטוז, גלוקוז, גלאקטוז ומניטול.

מאפיין נוסף של זרעי העלוקת הוא יכולת ההישרדות הגבוהה שלהם.

למרות מימדיהם הזעירים הזרעים שומרים על חיוניותם בקרקע למשך שנים רבות. ישנן עדויות לכך שאפילו אחרי 20 שנות תרדמה, נובט זרע העלקת במפגש עם פונדקאי מתאים (Kebreab and Murdoch, 1999).

יכולת זו מעידה על הסתגלויות מיוחדות לאורח החיים הטפילי. על מנת להבינם נדרשת גם הבנה יסודית של מבנה הזרע.

צורתם האופיינית של זרעי עלקת היא דמוית אגס. עם זאת, ניתן למצוא שונות רבה בצורת הזרע בין זרעים - אף מאותו הלקט. פני הזרע בנויים מכתשים מכתשים, וזאת בשל התמוטטות הדפנות החיצוניים של התאים בקליפה.

קיימת שונות מורפולוגית בפני הזרע בין מינים שונים (Kuijt, 1969). הדבר נחקר במספר עבודות טקסונומיות (Teryokhin, 1997 ; Abu Sbaïn,1994 ; Joel, 1987).

מרבית העבודה האנטומית בזרעי עלקת נעשתה עד כה ע"י Teryokhin (1997) : המבנה האנטומי של זרעי עלקת תואר כאחיד יחסית בין מינים שונים. קליפת הזרע בנויה משתי שכבות תאים שמקורם במעטה היחיד של הביצית: האפידרמיס החיצוני והאנדותריום הפנימי. באזור המיקרופילה מתאפיין האפידרמיס החיצוני בדפנות דקים יותר. החלק העיקרי מבחינת נפח הזרע הוא האנדוספרם. שכבת התאים ההיקפית באנדוספרם, המכונה לעיתים שכבת האלאורון (מושג מושאל מדגניים), נבדלת מהאנדוספרם הפנימי בדפנות עבים יותר (Kumar, 1977). שכבה זו מובהקת במיוחד בעלקת מצרית, ובה מרוכזים שומנים וחלבונים (Teryokhin, 1997). העובר סגלגל בצורתו וממוקם בסמוך למיקרופילה של הזרע. הוא חסר פסיגים, חסר כיפת שורש ולא תוארה בו דיפרנציאציה כלשהי (Teryokhin, 1997; Kumar 1977). בעלקת מצרית העובר בנוי מכ- 50 תאים סה"כ (Joel et al., 1995).

1.6 שלב ההכנה לנביטה:

כבר בעבודות הראשונות על העלאת תואר הצורך בקבלת סיגנל כימי שמקורו משורשי צמחים אחרים (בעיקר פונדקאים) בכדי לקבל נביטה.

סיגנל הנביטה הכימי הוא דרישה הכרחית אך לא מספקת:

ניסויים בתנאי מעבדה הראו שעל מנת שהזרע יגיב לסיגנל נביטה, יש לאפשר לו שהייה של מספר של ימים בתנאי טמפרטורה מתאימים ובסביבה רטובה (Brown & Edwards, 1946) לפני חשיפתו לסיגנל הכימי.

גם בניסויים בסטריגה אופיינה דרישה דומה (Vallance, 1951). שלב זה המקדים לנביטה, שדרוש לזרע לפני שיוכל להגיב לסטימולנט, ניקרא: הכנה.

עבור מרבית העלאתיים והלוענתיים הטפיליים שלב ההכנה הוא דרישה הכרחית לקיום נביטה (Joel et al., 1995). משך תקופת ההכנה ותנאי הטמפרטורה האופטימליים משתנים בין מינים ואף בין אוכלוסיות. בעלאת מצרית משך ההכנה הוא כשבוע ימים.

ההכנה היא תהליך רברסבילי, כלומר: אם לא יקבל הזרע את סיגנל הנביטה, הוא שומר על חיוניותו, מתייבש ונכנס לתרדמה, עד ששוב יבשילו התנאים להכנה (Joel et al., 1995).

השמות הרבים conditioning, preconditioning, pretreatment (Worsham, 1987) שקיבל שלב ההכנה, מעידים על חוסר הבהירות סביב התפקיד שהוא ממלא בחיי הצמח. עפ"י Kust (1966), תפקידה העיקרי של תקופה רטובה זו הוא לאפשר לחומרים מעכבי נביטה הנמצאים בקליפת הזרע לדלוף ממנו. ואכן, לנוזל ההשריה של הזרעים נמצאו תכונות של עיכוב נביטה, אם כי חלשות (יואל וחוב', 1991). העובדה שהכנה נדרשת גם לאחר תרדמות משניות מערערת את הרעיון הנ"ל, שכן המעכבים זלגו כבר בפעם הראשונה שהזרע עבר הכנה.

Hsiao (1981) שעבד על סטריגה הציע שזהו שלב השניה, שבו מצטברות רמות סף של פקטורים הדרושים לנביטה אפקטיבית.

מדידות בעזרת אלקטרודת חמצן, בעבודות שנעשו ב-סטריגה (Vallance, 1951) ובעלאת (Mayer & Bar-Nun, 1997) הראו שינויים בקצב הנשימה של הזרעים בימי ההכנה השונים, זאת למרות שהזרע לא התחיל עדיין את שלב הנביטה.

השינויים שנמדדו מרכיבים תבנית התנהגות אופיינית.

בעלוקת מצרית: מזמן תחילת ההתפחה, קצב הנשימה עולה חדות עד לשיא שמתקבל ביום השלישי ($15\mu\text{mol O}_2 100\text{mg fr wt}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ולאחריו יש ירידה חדה.

בשבוע השני מתקבל שיא נוסף של קצב צריכת חמצן. שיא זה מתקבל בין אם ניתן סינגל נביטה ובין אם לאו, והוא מאופיין לעיתים במשרעת גדולה יותר מהשיא הראשון. בזרעים ללא סינגל נביטה, אחרי השיא השני מתקבלת ירידה חדה בצריכת חמצן עד לרמה נמוכה וקבועה ($4\mu\text{mol O}_2 100\text{mg fr wt}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

זרעים מאסיף מוקדם יותר הגיבו לאט יותר, אך תבנית התגובה שהתקבלה הייתה זהה (Bar Nun and Mayer, 1993).

שינויים בקצב נשימה מצביעים על פעילות מטבולית.

בתקופת ההכנה, אין לפעילות מטבולית זו ביטויים חיצוניים.

מכיוון שבשלב ההכנה נוצרת יכולתו של הזרע להגיב לסינגל נביטה, הדעה המקובלת הייתה שתפקיד הפעילות המטבולית בשלב זה היא סינתוז או שיפעול של חלבון מפתח במנגנון הקליטה של סינגל נביטה.

עבודות שונות שנעשו על השינויים והמטבוליזם במהלך שלב ההכנה, מציירות תמונה מורכבת יותר:

א. שינויים בהרכב הזרע

משקל יבש: במהלך שלושת הימים הראשונים להכנה מאבד הזרע כ-30% ממשקלו. הסבר חלקי הוא הזליגה של חומרים מסיסים מתוך הזרע אל הסביבה המימית. בשלושת הימים האחרונים אין איבוד משקל נוסף. (Bar-Nun and Mayer, 2002).

ליפידים: עפ"י מדידות משקליות במהלך תקופת ההכנה, לא מתקבלים שינויים באחוז הליפידים במשקל היבש של הזרע (Bar-Nun and Mayer, 2002) וזאת על אף היותו חומר התשמורת העיקרי בזרע.

סוכרים: בשלושת הימים הראשונים יש ירידה בכמות של סוכרים מחזרים חופשיים לאחר מכן רמתם נשארת קבועה. בשלושת הימים האחרונים של ההכנה ישנה עליה ברמת הסוכרוז.

חלבונים: במדידה ע"י ייבוש בהקפאה (lyophilization) במהלך שלב ההכנה, מתקבלת עליה קטנה באחוז המשקלי של תרכובות החנקן. מכיוון שזו מדידה יחסית, יתכן שעליה זו נובעת מהירידה בסה"כ המשקל היבש (Bar-Nun and Mayer, 2002).

מאלקטרופורזה חד מימדית של מיצוי החלבונים, ניתן לראות מגמה כללית של ירידה במספר הפפטידים במהלך ההכנה. מגמה זו התחזקה בזרעים שהושארו במים לשבועיים נוספים (Bar-Nun and Mayer, 1997).

DNA: רמת סה"כ ה-DNA בזרע לא משתנה במהלך שלב ההכנה. רק לאחר קבלת סינגל נביטה מתקבלת עליה חדה.

ב. פעילות מטבולית.

סינתזת חלבונים: מיד עם השריית הזרע במים, ישנה אינקורפרציה של חומצות אמינו, עדות לסינתזה אקטיבית של חלבונים או turn-over של חלבונים.

בניסוי מ-1994, במתן של ח.א.לאוצין רדיואקטיבית בזמנים שונים במהלך שלב ההכנה, נצפו 13 חלבונים מסומנים לאחר 8 שעות. בהעדר סיגנל נביטה תבנית ביטוי זו נשמרת כ- 20 יום. במתן סיגנל נביטה תבנית הביטוי של חלבונים מסומנים הולכת ומצטמצמת. 6 ימים לאחר מתן סיגנל הנביטה מתקבלים רק 4 חלבונים מסומנים (Bar-Nun and Mayer 1993).

סינתזת DNA: זרעים בהכנה הראו קצב יחסית קבוע של יבוא תימידין רדיואקטיבי שנשמר עד יום 14 לפחות. אך מתן סיגנל הנביטה גורם להפוגה זמנית (יומיים) היבוא של תימידין מסומן עשוי להעיד על סינתזה או על turn-over של DNA. ביבוא תימידין מסומן, ישנן תוצאות ראשוניות המעידות שהתימידין נקלט בתוך המיטוכונדריון (Mayer and Bar-Nun, 1994).

ההשפעה של aphidicolin (מעכב DNA פולימראז) על יבוא של תימידין רדיואקטיבי היתה לא משמעותית במהלך ההכנה ולעומת זאת לאחר מתן סיגנל נביטה גרמה לירידה חדה ביבוא.

סינתזת RNA: קצב היבוא של אורידין מסומן עולה בצורה לאורך 10 ימים בין אם ניתן סיגנל נביטה ובין אם לאו.

נשימה: המדד העיקרי לנשימה הוא קצב קליטת חמצן וכפי שתואר לעיל התקבלה תבנית אופיינית של שינויים במהלך ההכנה והנביטה של הזרעים.

עדות נוספת היא פליטת CO₂ מסומן בקבלת ח.א. לאוצין כלומר יש צריכה של לאוצין לנשימה. שיחרור ה-CO₂ המסומן דועך בסוף שלב ההכנה, לאחר הנביטה הוא מתחדש (Bar-Nun and Mayer, 1993).

בצמחים קיים גם מסלול נשימה אלטרנטיבי, המסתעף מהמסלול הציטוכרומי ב- ubiquinone pool, אל ה-AOX (quinol oxidase - חלבון שמקודד בגרעין).

כפועל יוצא של התהליך משתחרר חום, ולא ATP. זוהי אם כן נשימה שאינה מצומדת. אחד המאפיינים של מסלול זה, שאינו נחסם ע"י ציאניד. מכאן שמו – 'נשימה עמידה לציאניד'. המסלול האלטרנטיבי נראה שמור בעולם הצומח, ועם זאת, תפקידו עדיין אינו ברור (Simons & Lambers, 1999).

אחוז מסוים מהנשימה של הזרע בשלב ההכנה מתרחש במסלול האלטרנטיבי. העדויות לכך מרובות: ציאניד גורם לירידה בצריכת החמצן אך אינו חוסם אותה לגמרי. חומצה סליצילית (SA) ידועה כגורמת אינדוקציה של המסלול האלטרנטיבי (Vanlerberghe and McIntosh, 1997). מתן של SA בשלב ההכנה גורר עליה בצריכת החמצן לאחר הנביטה לא מתקבלת השפעה שכזו ומעכבים של המסלול האלטרנטיבי: פרופיל גאלט ואוקטיל גאלט גורמים לירידה בצריכת החמצן (Bar-Nun et al., 2003).

ג. שינויים הורמונליים

לחומצה ג'יברלית (GA) יש מספר השפעות על זרעי עלקת בשלב ההכנה : היא גורמת לעליה באחוזי הנביטה של הזרעים, מידת העלייה הנגרמת משתנה בין מינים שונים. כמו גם מקטינה את זמן החשיפה המינימלי לסינגל הכימי הנדרש לקבלת נביטה (Joel et al., 1991). מתן של חומצה ג'יברלית בהכנה לנביטה, מגדיל את קליטת החמצן (Bar-Nun and Mayer, 1993). במתן פקלובוטראזול שהוא מעכב ביוסינתזה של ג'יברלין נגרם עיכוב נביטה. ניתן לבטל את השפעת המעכב ע"י הוספת חומצה ג'יברילינית בימים 4 ו 5 של ההכנה לנביטה. השפעתו של פקלובוטראזול אינה ספציפית, הוא עשוי להשפיע על הנביטה גם ע"י עיכוב תהליכי הפירוק של ABA חומצה אבסצית.

ואכן מתן של ABA חומצה אבסצית ממקור חיצוני מהווה מעכב חזק של נביטת זרעי עלקת. Zehhar הוכיח שבמהלך ההכנה לנביטה יש אכן ביוסינתזה של ג'יברלין, ע"י שימוש במעכבים ספציפיים לביוסינתזה של ג'יברלין, שהם חסרי השפעה (ישירה) על הצטברות או פירוק של ABA: chlormequat (CCC) ו daminozide שגורמו לעיכוב בנביטת הזרעים (Zehhar et al., 2002).

מעורבתו של אתילן בנביטה של זרעי עלקת עדין איננה ברורה, אתילן ממקור חיצוני אינו גורם לנביטה של זרעי עלקת, אך הוספה במהלך ההכנה לנביטה של 2-chloroethylphosphonic אשר משחרר אתילן in vivo גורמת לנביטה של זרעים ללא נוכחות של GR24 (Zehhar et al., 2002).

שלב ההכנה הוא שלב ביניים, זוהי תופעה ייחודית לצמחים טפיליים ואינו מוכר בצמחים אחרים. כשאנו בוחנים את התהליכים המטבוליים המתרחשים בו, בניסיון להבין את תפקידו של השלב, אנו מגלים תהליכים המוכרים לנו משלב הנביטה בצמחים אחרים:

ביוסינתזה של ג'יברלין

מעורבות של נשימה אלטרנטיבית

וסינתזה לא משכפלת של DNA.

המייחד את זרעי העלקת – היא מערכת הבקרה ההדוקה והמידור שהיא יוצרת, כך שנוצר שלב ההכנה. ישנה הבחנה במגוון תהליכים במהלך שלב ההכנה, וגם לאחר קבלת סינגל הנביטה:

1. במהלך ההכנה, נצפה שחרור של CO₂ מסומן בקבלת ח.א. לאוצין מסומנת. בסוף השלב נצפית ירידה בשחרור CO₂.

2. מתחילת ההכנה ישנה אינקופרציה של תימידין מסומן. לקראת סוף השלב – ישנה הפוגה זמנית באינקופרציה שלו, והיא מתחדשת לאחר קבלת סינגל הנביטה.

3. בשלב ההכנה ניתן להשרות נשימה אלטרנטיבית בעזרת ח.סליצילית. לאחר קבלת סיגנל נביטה לא ניתנת אינדוקציה זו.

4. תבנית ביטוי החלבונים משתנה 7 ימים לאחר מתן סיגנל נביטה .

5. המאפיין המובהק ביותר למידור בתהליכים הוא העובדה שבמהלך שלב ההכנה לא ניתן לקבל תגובה לסיגנל נביטה, אלא רק לאחר סיומו.

ניתן לומר שהמידור בין שלב ההכנה לקבלת סיגנל הנביטה מתקשר ברובו לתהליכי נשימה, ציטוכרומית ואלטרנטיבית.

בקרה קפדנית על תהליכי נשימה היא אסטרטגיה הגיונית עבור זרע קטן משאבים כזרע העלקת.

הבנה של שלב ההכנה בזרעי העלקת, והתהליכים המתרחשים בו, עשויה לתרום להבנה הכוללת של תהליכי נביטה בצמחים עילאיים .

שלב ההכנה גם עשוי להיות יעד מתאים לניטור של עלקת בשדות חקלאיים .

בעבודה זו התמקדנו באפיון מרחבי של זרע העלקת במהלך תקופת ההכנה .

מטרת המחקר:

- תאור וניתוח המבנה האנטומי של זרע עלקת מצרית .
- איתור של אנזימים חשובים במהלך שלב ההכנה לנביטה .

מקורות החומר הצמחי

איסוף: הזרעים נאספו בקיץ בשדות חקלאיים של עגבניות, ע"י אנשי מחלקת עשבים של מרכז מחקר נווה יער. הזרעים אוחסנו ב 4°C . בכל הניסויים השתמשתי בשתי אוכלוסיות זרעים: מי – עמי 2000 (3288), בית השיטה 2001 (3290) לצורך מעקב אחר התפתחות הזרע נאספו עמודי תפוחית של עלקת משדה עגבניות ברמת הגולן. סומנו פרחים בשלבי התפתחות שונים (5 – 1) בעמוד תפוחית אחד (לוח B1) ונחתכו פרוסות שחלה בעובי של 3-5 מ"מ מהן הופרדו צברים של ביציות

חיטוי הזרעים: השריות עוקבות של 1 דקה ב 70% אתנול ו 12 דקות בתמיסת היפוכלוריד 1% + tween20 ולאחריהן שטיפות במי-קולונה שלוש פעמים למשך 5 דקות ויבוש.

טיפול הכנה (coditining)

בצלחת פטרי מפלסטיק (15 x 50 מ"מ) על מצע של 2 דסקיות נייר סינון (Whatman GFA) ספוג במים סטריליים פוזרו כ 200 זרעים. הם נישמרו בתוך סביבה רטובה וחשוכה ב 24° למשך מספר ימים (7-1 ימים).

הכנת החומר הצמחי להסתכלות מתחת ל LM ו TEM

פציעה: בכדי לאפשר קיום של תהליכי הפיקסציה הכימית, הזרעים עברו פציעה פריפריאלית בעזרת מחט עדינה מתחת לסטיראו-מיקרוסקופ לפני הכנסתם אל תמיסת הפיקסטיב. **פיקסציה כימית:**

(א) ל LM פיקסציה ב FAA (4% formalin ו 5% acetic acid בתוך 50% אתנול).

(ב) ל LM ו TEM בתמיסת פיקסטיב משולבת:

0.1M Na cacodylate בופר + 2% Paraformaldehyde + 2.5% Glutaraldehyde בתוך בופר.

ל-TEM השתמשנו גם בשיטת פיקסציה כפולה:

(ג) פוסט פיקסציה בחומצה אוסמית: לאחר פיקסציה בגלוטאראלדהיד, הזרעים/פרוסות השחלה הושרו בתמיסה של 1% OsO₄ בבופר 0.1M cacodylate למשך שעה אחת ולאחר מכן שטיפות בבופר ובמים.

(ד) פיקסציה ב-KMnO₄: לאחר פיקסציה בגלוטאראלדהיד, הזרעים הושרו בתמיסה של 5%

Km_nO₄ במים למשך 5 דקות בלבד ולאחר מכן שטיפות במים.

דהידרציה:

כל חומר שעבר פיקסציה הועבר לדהידרציה הדרגתית באתנול ו/או באצטון (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%).

תהליכי החלפת המילוי (אמבדינג)

לאחר פיקסציה ב-FAA השתמשנו בקסילן כחומר ביניים ובפארפין כחומר מילוי .
לאחר הפיקסציה ב-GA+PFA השתמשנו בחומרי מילוי פלסטיים: LR White, Epon (תערובת משקלית : 14.4 גר' אגר 100, 2.1 גר' DDSA, 14.2 גר' MNA ו 0.6 גר' DDMA) ו- Spurr' (Spurr, 1969). תהליך ההחלפה נעשה באופן הדרגתי (ביחסים 1:3, 1:1, 1:3) בפרקי זמן משתנים (משעה ועד לילה) לעיתים תחת וואקום .

יציקה לתבניות והקשיה

זרעים בפארפין יצקנו לתבניות בתוך מי קרח.
זרעים ב LR White יצקנו לתוך קפסולות גילטין, פילמור בתוך תנור 50°C .
זרעים ב Epon יצקנו לתוך תבניות גומי, פילמור למשך 24 – 20 שעות ב 60°C .
זרעים ושחלות ב C Spurr's תבניות גומי או קפסולות גילטין, פילמור 8 שעות ב 60°C .

חיתוך

עבור LM: פארפין : חתכים בעובי של $5\mu\text{m}$ בעזרת סכין פלדה במיקרוטום REICHERT JUNG-1150/פלסטיק (resin Epon, Spurr's, LRW) חתכים בעובי של $1\mu\text{m}$ ע"י סכין זכוכית (Ralph-knife) .
עבור TEM: בסכין יהלום (Diatome) באולטרא-מיקרוטום LKB. נאספו חתכים בצבע זהב על גבי גרידים 300msh מנחושת, ניקל או זהב, או בגרידים של ניקל מצופים פילם של formvar.

מיקרוסקופיה

המיקרוסקופים ששימשו למחקר זה :
LM : ZEISS STANDARD-16 . TEM : JEOL 100CX ב 80 kv .

צביעות ל LM

Alcian Green Safranin (AGS) (Joel,1983)

סטוק : Alcian green 0.5 % w/v , Safranin-O 0.5% w/v ב ethanol 25% עם 0.05 ח.אצטית .

תמיסת הצביעה היא תערובת ביחס 1:1 של תמיסות הסטוק. פרוצדורה : לאחר המסת הפארפין ורה-הידרציה הדרגתית של החתכים דרך קסילן עד לאתנול 30% מכניסים את הפרפרטים לאמבט צבע למשך 10 דקות לאחר מכן שטיפות ב 30% אתנול, דה-הידרציה מהירה לקסילן ולבסוף כיסוי בזכוכית מכסה בעזרת דבק .

Toluidine Blue (O'Brien&McCully,1981)

תמיסת סטוק : T.Blue 0.5% ב 0.1% של sodium carbonate pH=11.1 .

פרוצדורה : טיפת צבע על החתכים למשך 3 – 1 דקות על גבי פלטת חימום ב 50°C , שטיפה עדינה במי ברז ובמיים מזוקקים ויבוש על גבי הפלטה .

(Aparicio&Marsden, 1969) Methylene blue- basic fuchsin

תמיסות סטוק : 0.1 גרי Methylene blue ב 10 מ"ל של 1% borax.

0.2 B גרי basic fuchsin ב 10 מ"ל של מים מזוקקים.

פרוצדורה : טיפת צבע של A על החתכים למשך 2 דקות על פלטת חימום ב 70°C שטיפה

במים חמים, קירור וטיפת צבע B למשך 1 דקה ב RT^0 , שטיפה במים ויבוש.

צביעות ל TEM

אורניל אצטט : הגריד הונח על טיפה של 2% אורניל אצטט רוויה במים, בתוך צלחת פטרי

בחושך, למשך 20 דקות. לאחר מכן שטיפות עוקבות במים, יבוש על נייר סינון.

(Hall&Hawes,1991).

עופרת ציטרארט : 0.44 גרי של סודיום ציטרארט ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Na_3 , ו 0.33 גרי של עופרת

ניטראט $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ מומסים ב 7.5 מ"ל של מים רתוחים מקוררים. אליהם מטטרים כ 2 מ"ל של

1N NaOH. הגריד הונח על טיפה של תמיסת הצבע בתוך צלחת פטרי בנוכחות גבישים של

KOH למשך 10 דקות לאחר מכן שטיפות עוקבות במים, יבוש על נייר סינון.

צביעות אימונולוגיות

מקור נוגדן I :

הנוגדנים mouse anti-AOX הופקו כנגד חלבון ה AOX של *Sauromatum guttatum*

(Elthon,1989) (voodoo lilies).

הנוגדנים chicken anti-DOG הופקו ע"י שותפינו בארה"ב ל פפטיד שסונתז עפ"י הרצף של

חלבון שזוהה בעלוקת מצרית בתקופת ההכנה לנביטה.

מקור נוגדן II :

gold conjugated anti-mouse (קוטר 10nm) מ Sigma

gold conjugated anti-chicken (קוטר 10nm) מ Aurion

פרוצדורה : גרידים של זהב או ניקל הוצפו 20 דקות על blocking buffer 1% w/v BSA בבופר

TBST (140mM NaCl ו 1µl tween20, ph7.4 10mM Tris-Hcl)

לאחר מכן עברו אינקובציה עם נוגדן I למשך שעה אחת ב RT^0 : anti-AOX (1: 50) או-anti

DOG (1: 500) ב blocking buffer. לאחר מכן שטיפות בבופר TBS.

אינקובציה עם נוגדן II למשך שעה אחת ב RT, (1: 50) ב blocking buffer. לאחר מכן שטיפות

בבופר TBS.

לבסוף פיקסציה ב 1% גלואטראלדהיד למשך 3 דקות, שטיפה במים והמשך צביעה רוטינית ל

TEM באורניל- אצטט ועופרת- ציטראט.

לוח 1

A חתך אלכסוני זרע בוגר לאחר 3 ימי הכנה שעבר פיקסציה בפארפין, מיקרוסקופ אור צביעה AGS. החץ מסמן את מקום הפציעה המכוונת שנעשתה לצרכי פיקסציה.

B עמוד התפרחת ממנו נילקחו הפרחים הצעירים לפיקסציה. התמונות בהמשך העבודה לקוחות כולן מהפרח שמסומן בחץ.

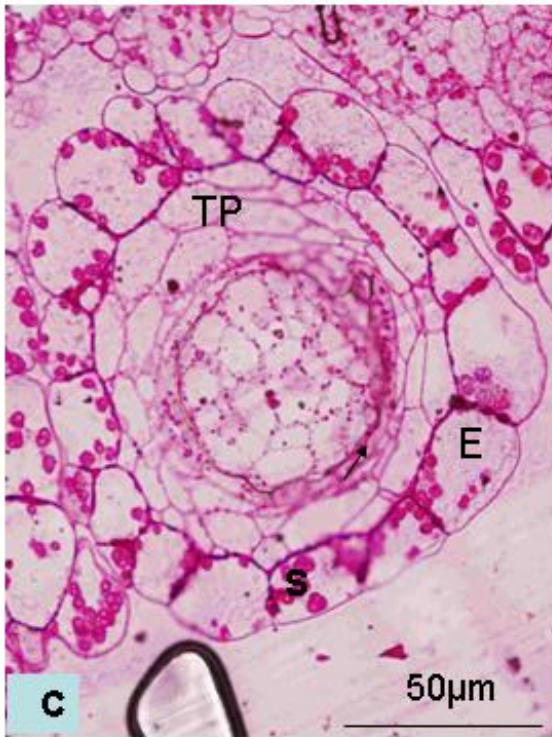
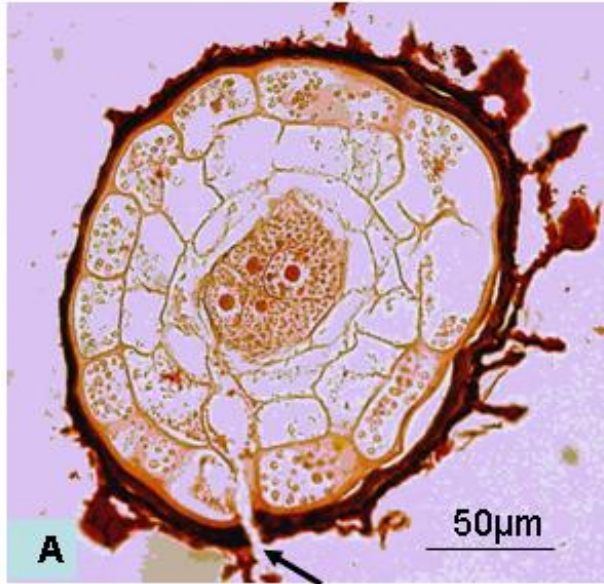
C זרע מתפתח במיקרוסקופ אור צבוע ב X 400 T.blue האנדוספרם במרכז. שלשה איזורים בקליפה: אנדותליום פנימי (חץ), פרנכימה (TP) ואפידרמיס (E). דפנות האפידרמיס מעובים, עמילופלסטים מרובים בכל רקמות הזרע.

מיקרא סימונים ללוחות

EM - עובר
ES - אנדוספרם
T - קליפת הזרע

E – אפידרמיס של הקליפה
TP – פרנכימה של הקליפה
ET - אנדותליום

ER - רשת אנדופלסמתית (rER)
G - גופי גולג'י, דיקטיוזומים
MB - גופיפי אגירה (microbody)
M - מיטוכונדריה
N - גרעין
NI - גרעינון
OB - גופי שומן
S – גרגר עמילן
V - חללית
WT - בליטות דופן



1 לוח

תוצאות

א. מבנה הזרע של עלקת מצרית

בעבודה זו בחנו את המבנה של זרע עלקת בוגר במהלך שלב ההכנה לנביטה .
כדי לבסס את הבנה של האנטומיה בזרע הבוגר , למדנו את המבנה של הזרע המתפתח בשלב של ביצית
כ-4 ימים לאחר ההפריה (לוח 1 B).

מבנה הזרע המתפתח

העובר: בזרע המתפתח צורת העובר היא בדרך כלל כדורית(לוח 2), מעט מוארכת. מבחינים בעובר,
בתאים צעירים (לוח 2) כוון החלוקה שלהם ניכר בבירור, עם דפנות דקים בקווים ישרים שמאונכים זה
לזה ושחוצים זוגות תאים שברור כי מוצאם בתא אחד, הדופן דק במיוחד –מעיד על כך שהפיקסציה
נעשתה סמוך מאד למועד חלוקת התא (לוח 2) .
בתאי העובר יש ציטופלזמה צפופה, ניתן גם לראות ואקואולות קטנות יחסית וגופי גולג'י קטנים אשר
ניראו בעיקר ליד הדפנות .

בתא העובר שפונה אל המיקרופילה(לוח 3 A) ניראים מיטוכנדריה רבים, קטנים, מעט מאורכים
(לערך $0.2\mu\text{m}$) חלקם בעלי שניז אשר מעיד על חלוקתן .
המיטוכנדריה מסודרים במרכז התא. הריכוז כפי הנראה מסמן את סביבת הגרעין שלא ניראה בחתך זה.

האנדוספרם: תאי האנדוספרם מתאפנים בציטופלסמה צפופה, ועשירה בריבוזומים (rER) (לוח 3
B). אין בתאים וקואולות משמעותיות אלא ריכוזים של ואקואולות קטנות באיזורי תא מסוימים (לוח 2)
המיטוכונדריון באנדוספרם ניראה גדול יחסית ($0.4\mu\text{m}$), כפול באורכו לעומת המיטוכונדריון שבתאי
העובר . המיטוכונדריון ניראה עם קריסטות ברורות (לוח 3 B) ותוכן לא צפוף. ניראים גופי גולג'י
קטנים, בעיקר ליד דפנות התאים. בולטת נוכחתם של פלסטידות קטנות עם תוכן צפוף, נראית גם
פלסטידה עם שניז כלומר במהלך חלוקה . חלק מהפלסטידות מאורכות חלקן קעורות (לוח 2) .
יש בתאי האנדוספרם גרגרי עמילן גדולים (כ- $1\mu\text{m}$) לבנים עם איזורים כהים אופייניים לעלקת, בחלק
מהגרגרים הצעירים ניתן גם להבחין בממברנות שעוטפות אותם(לוח 2) .
בנוסף ניראים בציטופלזמה של תאי האנדוספרם אברונים כפי הנראה גופי אגירה גדולים –מהות החומר
בתוכם איננה ברורה (לוח 3 B), אם כי אנו מניחים שהם גופי שומן.
בלוח 2 רואים חלוקה בין אנדוספרם חיצוני ופנימי, ביניהם קטע דופן שנימצא עדין בהתהוות (חץ), שכן
איננו רציף . תאי האנדוספרם הפנימי עשירים בגופי תשמורת יותר גדולים .
גודל תאי האנדוספרם בשלב הזה עדיין יחסית קטן, רוחבו של תא אנדוספרם חיצוני $8\mu\text{m}$ לערך, ותא
אנדוספרם פנימי כ- $4\mu\text{m}$ (לוח 1 C).

קליפת הזרע המתפתח: בקליפת הזרע ניכרות מספר שכבות של תאים (לוח C 1) :

הקליפה שמוצאה מהמעטה היחיד של הביצית, מורכבת מאפידרמיס חיצוני, מאנדותרליום פנימי ומפרנכימה מרכזית.

תאי האפידרמיס מתאפיינים בואקואולה גדולה, ובהתעבויות דופן משנית גדולות של הדופן הטנגנציאלי הפנימי. אזורי הדופן המעובים ניראים כהים יותר מאזורי דופן ראשוני. הציטופלזמה מהווה רפידה דקה יחסית לאורך הדופן, וניכרים בה גרגרי עמילן גדולים (לוח 1C).

הפרנכימה מורכבת מאחת עד שלוש שכבות של תאים בעלי וקואולה גדולה מרכזית ורפידה דקה של ציטופלזמה עם גרעין קטן.

(לוח 3C)

בתאי האנדותרליום (לוח 3C) הציטופלזמה נראית צפופה, הגרעין גדול יחסית, לעיתים איננו עגול ובעל הטרוכרומטין רב ומפוזר. התאים מכילים מספר וקואולות לא גדולות. הציטופלזמה עשירה בריבוזומים חלקם מכסים את הרטיקולום האנדופלסמטי (rER). באיזורים פריפריאליים של התא יש יותר rER. נראה שזהו - rER צינורי (טובולרי) (לוח 4D). עמילופלסטים גדולים נראים באזורים שונים של הציטופלסמה (לוח 4C). סביב הגרעין ניראו עמילופלסטים גדולים כל אחד מהם ממוקם בשני של הגרעין (לוח 3C).

נראית מערכת גופי גולג'י פעילה עם הרבה דיקטיוזומים קטנים בעיקר באזורים הקרובים לדפנות (4) (D-1 B,A).

הציטופלזמה עשירה במיטוכונדריה, פיזורם נראה אחיד (לוח 4D,A).

התאים בשכבת האנדותרליום מתאפיינים במבנה מיוחד של הדפנות הטנגנציאליים הפנימיים, שהם הדפנות שגובלים באנדוספרם: על גבי הדופן הראשוני של התא מתוספות בליטות של דופן משני (לוח 4A). בליטות דופן אלה בפנים התא יוצרות מארג תלת-מימדי דמוי ספוג שדומה למארג הדופן של תאי מעבר (transfer cells) שתוארו בצמחים אחרים באזורים שבהם מתקיים מעבר אינטנסיבי של חומרים מרקמה אחת אל השניה (Gunning and Pate, 1974).

בתאי האנדותרליום, מספר בליטות הדופן ליחידת שטח הוא גדול יחסית, באזורי הדופן הטנגנציאליים שצמודים לאנדוספרם. בליטות הדופן שצמודות לדופן הראשוני מעובות יותר וקטרן יכול להגיע לכ- $0.2\mu\text{m}$ ובאזורים הפונים לפנים התא הן דקות יותר רובן מגיע רק עד כ- $0.05\mu\text{m}$ (לוח 4D) מרבית בליטות הדופן, מקבילות ב עמדתן לדופן הראשוני, הבליטות מחוברות זו לזו אך המשכן הוריזנטלי והן נראות שכובות אחת על גבי השניה. (לוח 3B)

לוח 2

זרע מתפתח, מיקרוסקופ אלקטרוני חודר $X 2,000$ ניתן לראות את הרקמות השונות שמרכיבות את זרע העלקת הזרע : עובר, אנדוספרם והאנדותרליום של קליפת הזרע.

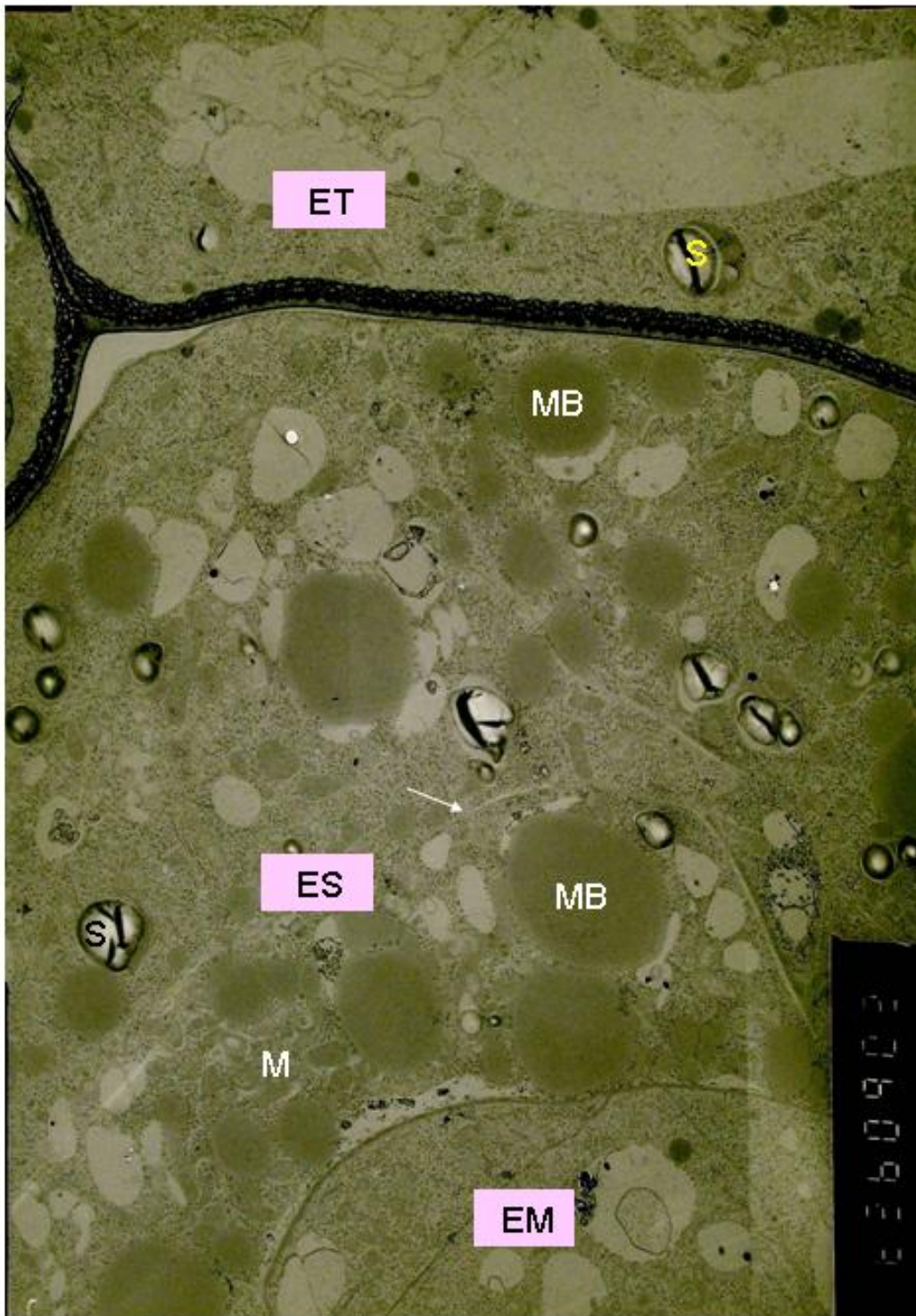
לוח 3

- A** תא עובר בזרע מתפתח מיקרוסקופ אלקטרוני חודר $X4,000$ ריכוז מיטוכונדריה קטנים.
- B** תא אנדוספרם על גבול תא אנדותרליום $X10,000$ רטיקולום אנדופלסמתי (rER), מיטוכונדריון גדול עם קריסטות ברורות וגוף-אגירה שתוכנו לא ידוע. רווח צר בין אנדותרליום לאנדוספרם (חץ).
- C** תא אנדותרליום בגבול שכבת פרנכימה $X2,000$ בתא האנדותרליום גרעין גדול, מסביבו גרגרי עמילן, תשתית צפופה של בליטות הדופן בגבול האנדוספרם, בצד של הפרנכימה בליטות הדופן רק בתחילת היווצרותם (חצים). בתא הפרנכימה וקואולות גדולות, רפידת ציטופלסמה דקה בהיקף, וגרעין קטן יחסית.

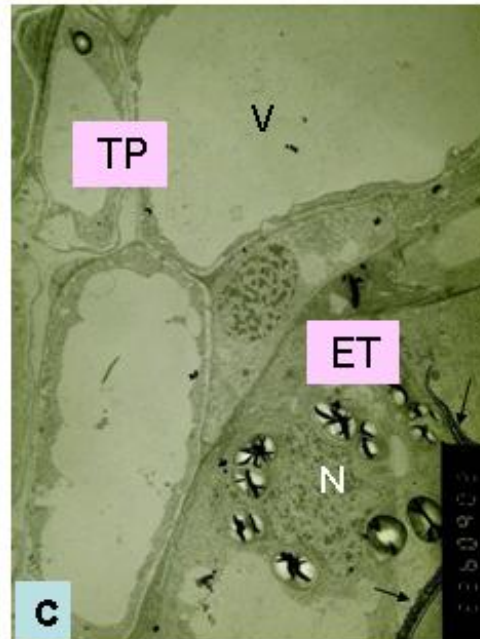
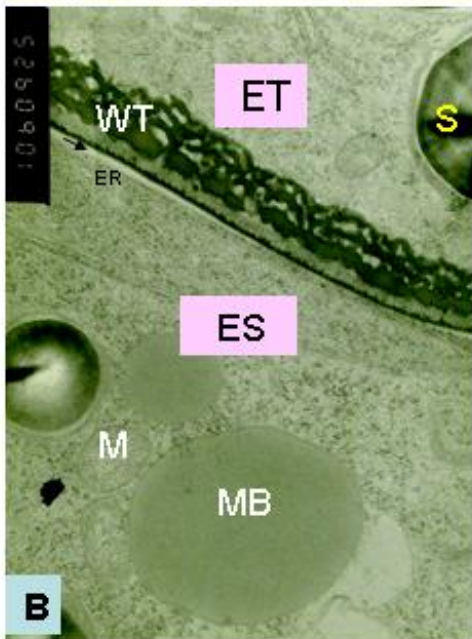
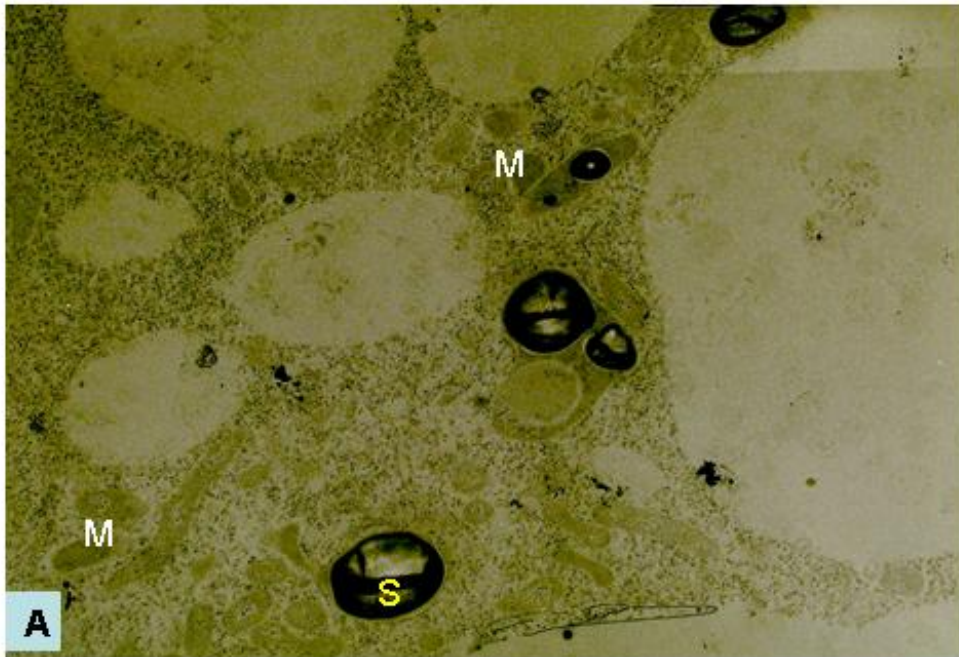
לוח 4

תאי אנדותרליום בזרע מתפתח, מיקרוסקופ אלקטרוני חודר

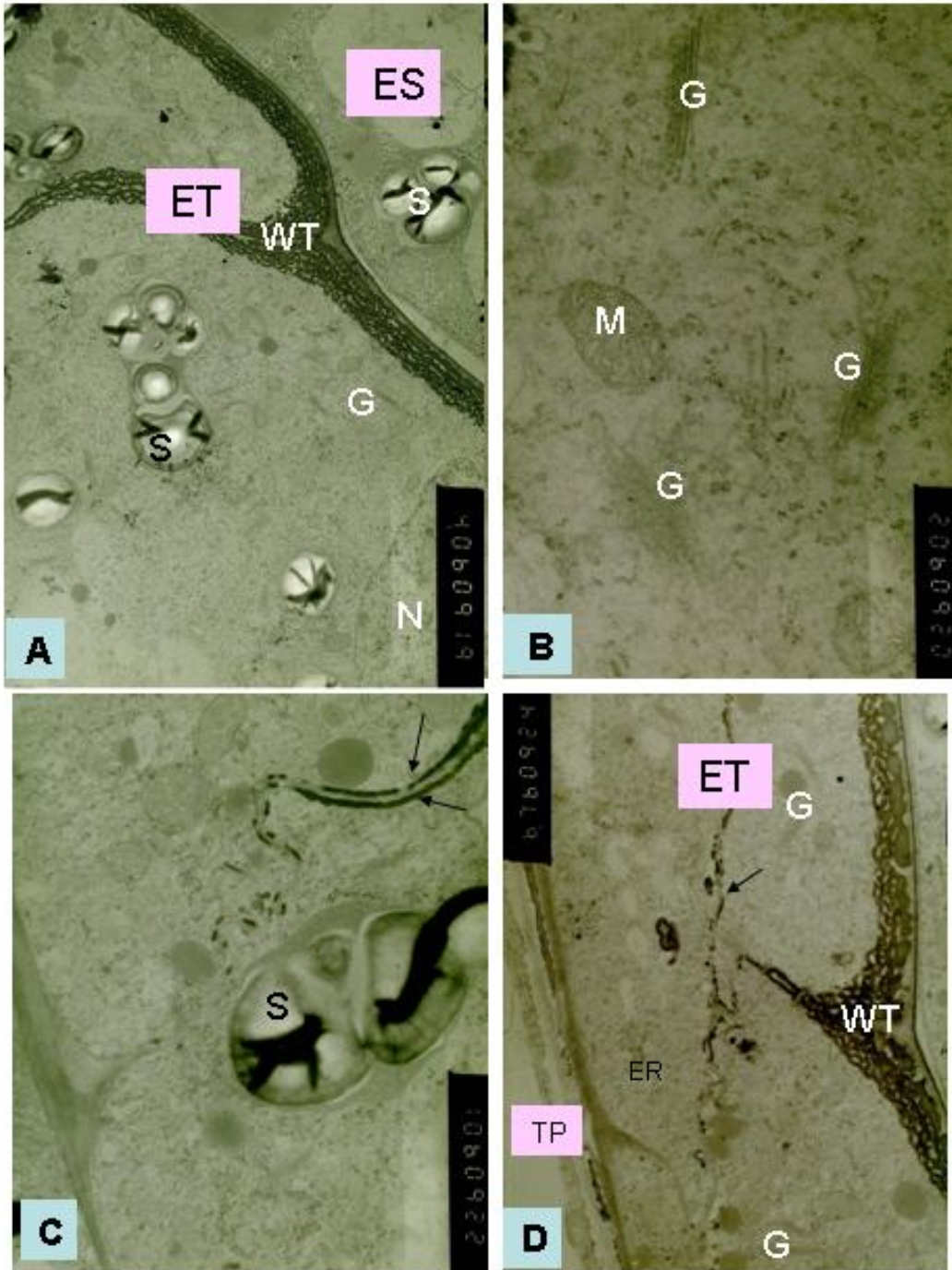
- A** על גבול האנדוספרם $X4,000$ גרגרי עמילן גדולים, גרעין, הרבה דיקטיוזומים.
- B** מיטוכונדריה ודיקטיוזומים אשר נחתכו בכיוונים שונים $X20,000$
- C** בליטות דופן (חצים) משני צידו של הדופן המתפתח, גרגרי עמילן גדולים. $X10,000$
- D** תא אנדותרליום על גבול פנכימה באיזור המיקרופילה $X 6,700$ שתי שכבות תאים, בליטות דופן מפותחות בגבול האנדוספרם, ובליטות דופן בהיווצרות (חץ). rER טובולרי.



2 ml



3 ml



לוח 4

לוח 5

חתי פארפין בזרע בוגר לאחר שלושה ימי הכנה מיקרוסקופ אור X400
A חתך אורך, שכבת האנדותרליום נצבעת בכחול. נראה כאן צוואר נביטה באזור המיקרופילה, והתעבות אנדותרליום גם באזור החלצה.

B חתך אורך, צביעה דיפרנציאלית של העובר (AGS)

C חתך רוחב מרכזי, בולט ההבדל בין אנדוספרם היקפי (1) לאנדוספרם פנימי (2).

D חתך אלכסוני, בחלקו משיק לשכבות השונות של קליפת הזרע: האפידרמיס עם הרישות המתקבל כתוצאה מהתעבויות בדופן הפנימי שלו. ושכבת האנדותרליום עם המוצילג שנצבע באלציאן ירוק.

לוח 6

חתי פארפין בזרע בוגר לאחר שלושה ימי הכנה מיקרוסקופ אור X400
A חתך אורך אלכסוני, ניתן לראות שני אזורים שונים בעובר. המיקרופילה * =

E-B חתכים אלכסוניים עוקבים במישורים שונים של הזרע: ב C תאים גדולים בעובר וב E תאים קטנים.

לוח 7

תאי עובר של זרע בוגר, לאחר שלושה ימי הכנה, מיקרוסקופ אלקטרוני חודר

A ריכוז של מיטוכנדריה סביב הגרעין.

B גבישים בתוך גופיפים,

C בתאים לאחר פוסט פיקסציה ב OsO₄, מודגש סידור 'פרחים'. ניתן גם להבחין בגרעינון, בריכוז מיטוכנדריה.

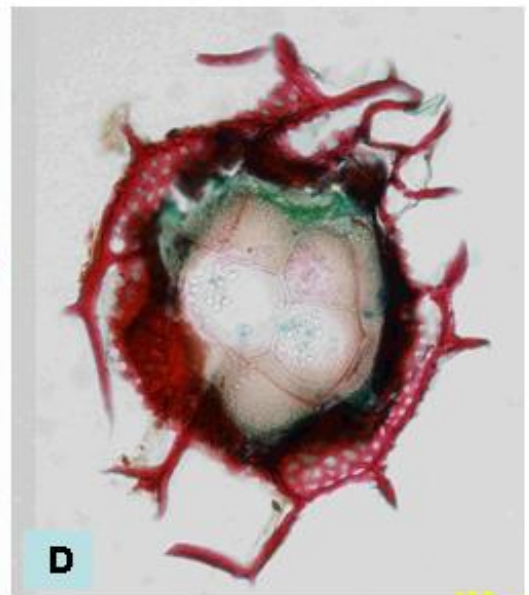
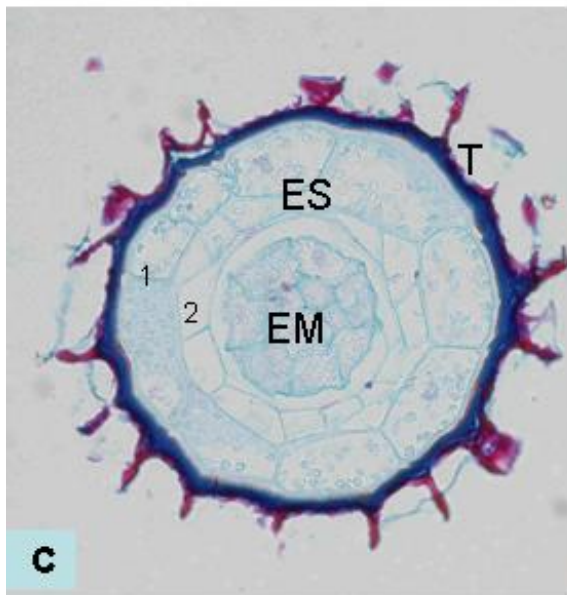
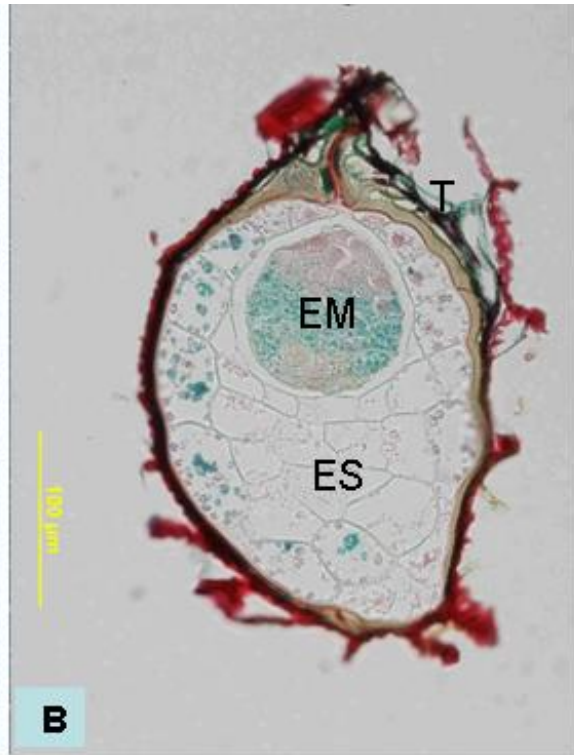
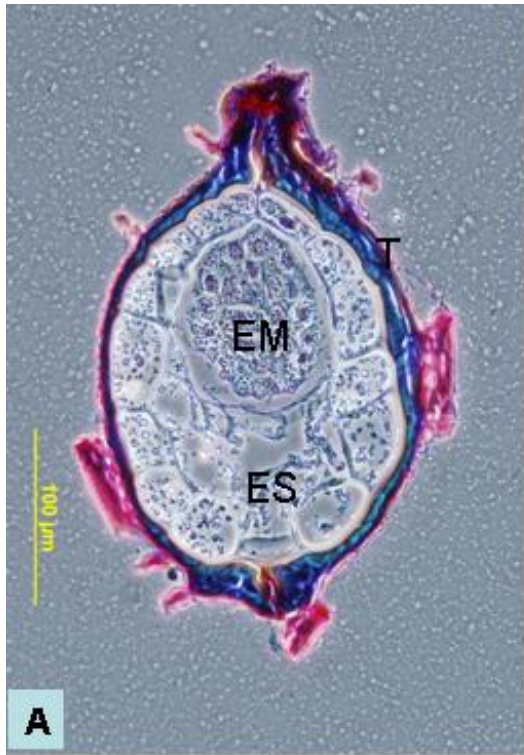
לוח 8

זרע בוגר לאחר שלושה ימי הכנה, פיקסציה בגלוטראלדהיד, מיקרוסקופ אלקטרוני חודר

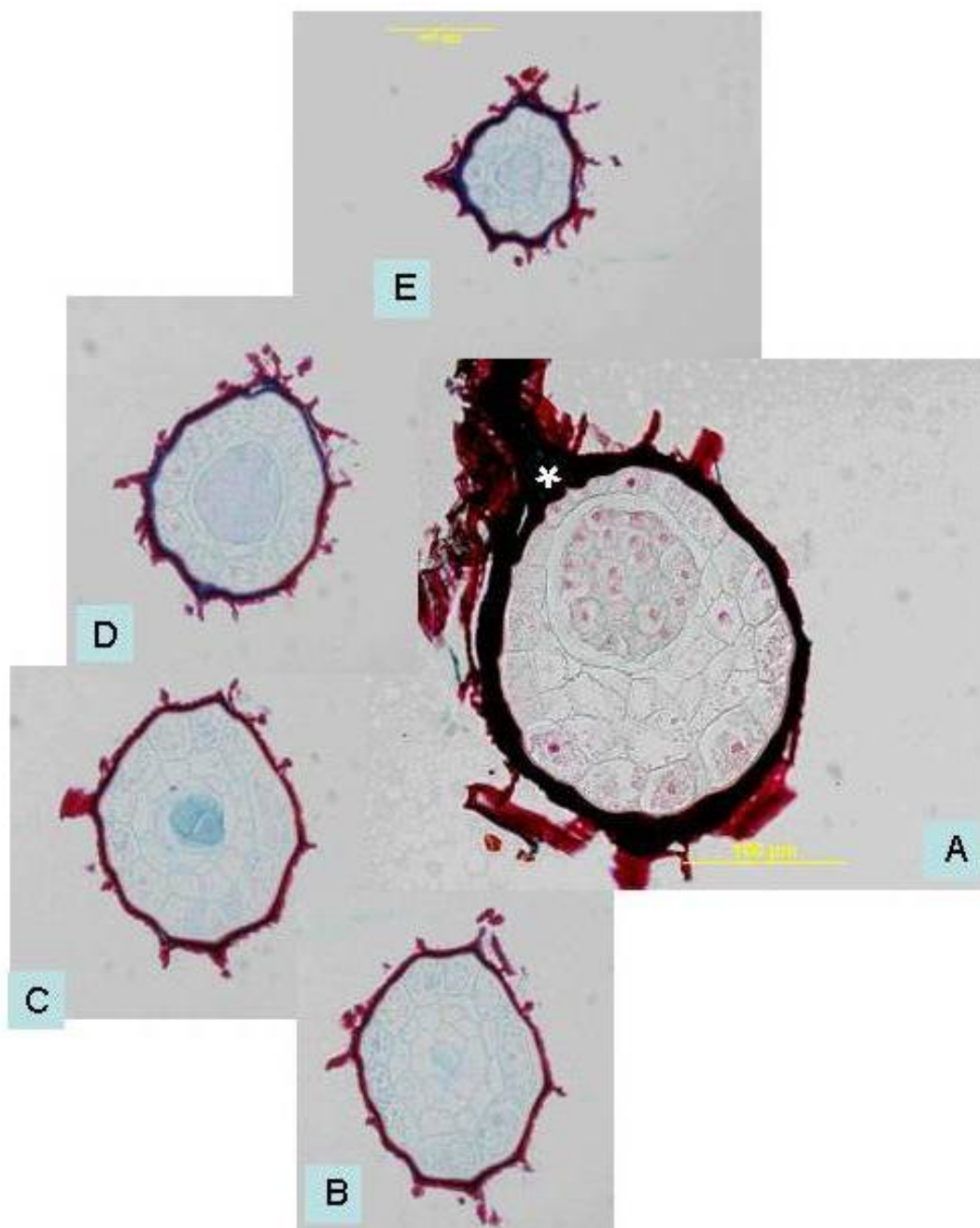
A תאי עובר על גבול אנדוספרם, בעובר הגופיפים הכהים קטנים משמעותית לעומת הגופיפים באנדוספרם

B גוף תשמורת בעל תוכן גרגרי (חץ).

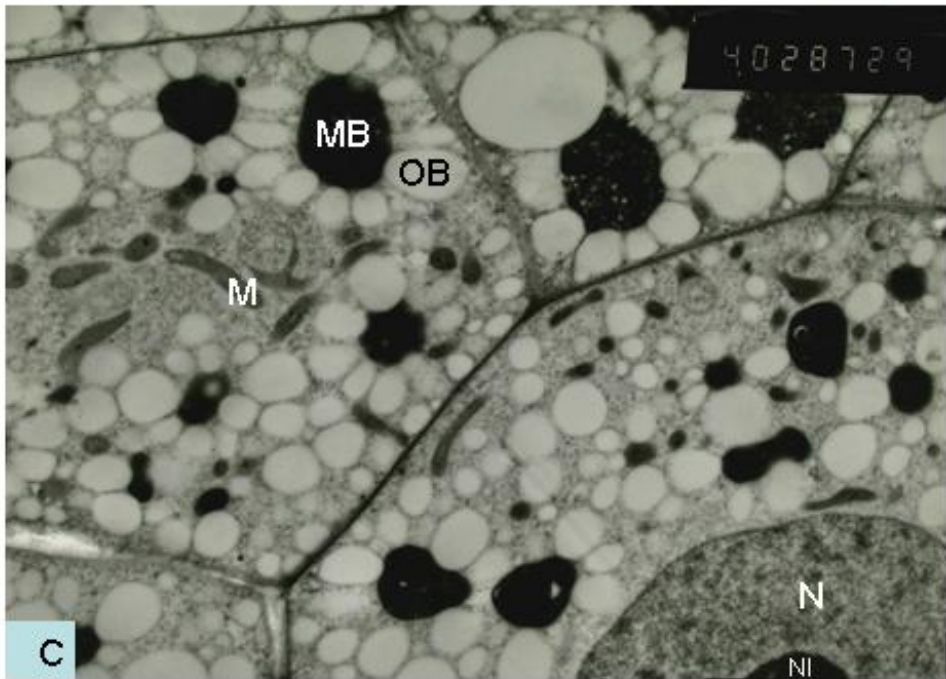
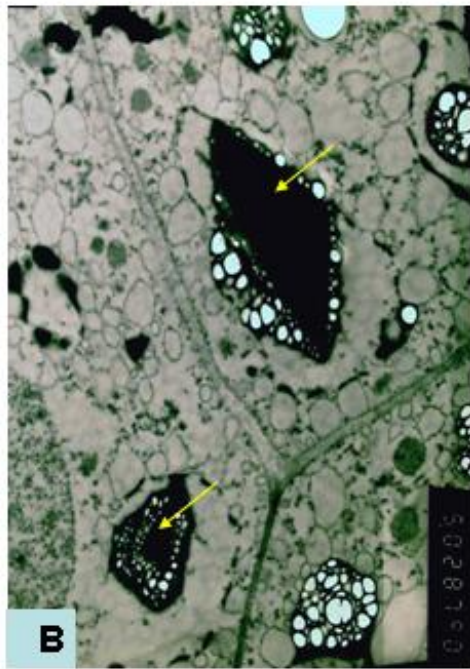
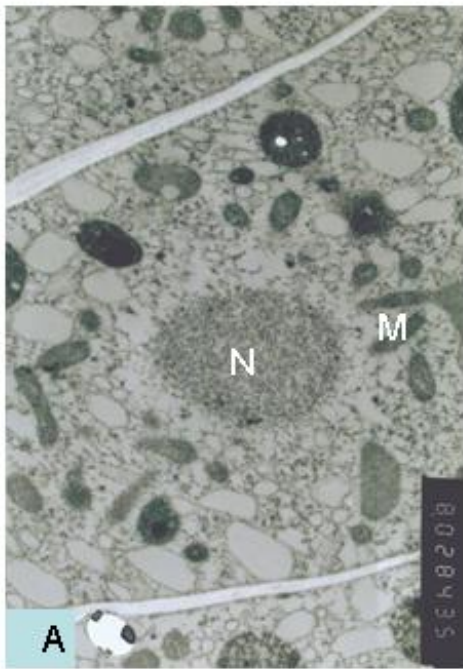
C תאי עובר, המיטוכנדריה מרוכזות באזורי תא מסוימים.



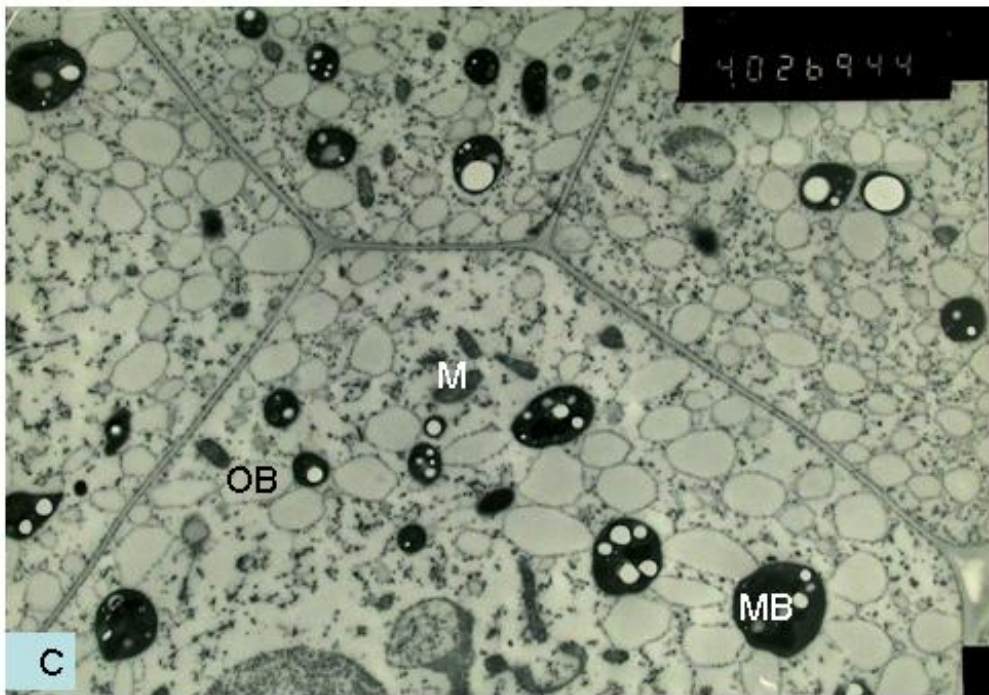
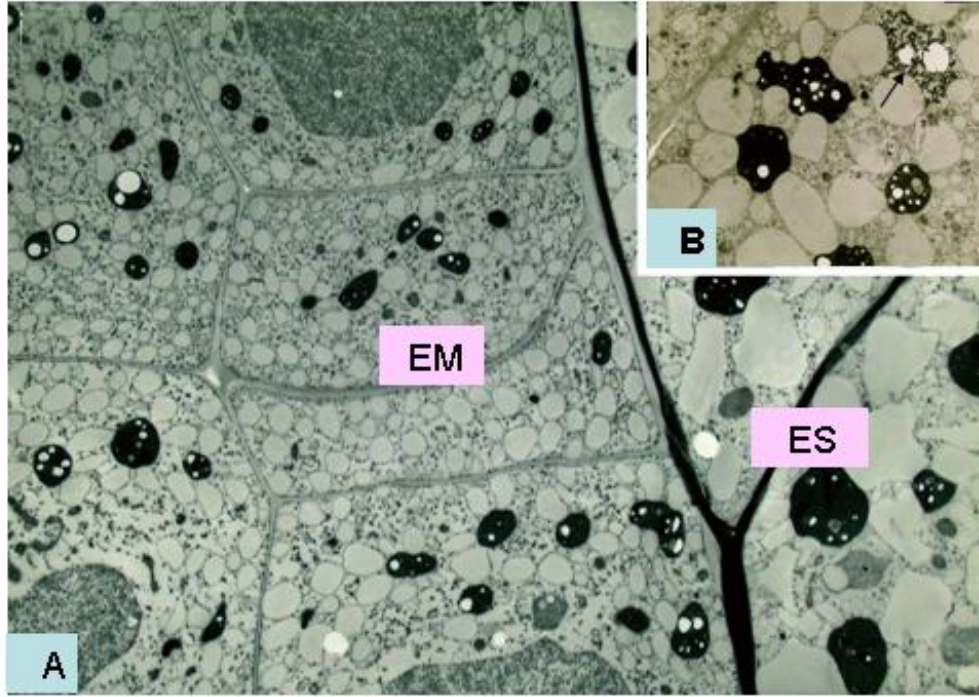
5 ml



6 לול



7 nlt



8 לח

בין תאים שכנים של אנדותליום קיים דופן דק לעיתים מפותל (לוח 4 C). הדופן עבה יותר על יד בסיס התא שפונה לאנדוספרם ונעשה דק יותר ככול שהוא קרוב יותר לפרנכימה (לוח 4 D). על הדופן הראשוני הדק (לוח 4 C), שמפריד בין שני תאי אנדותליום שכנים, קיימות משני צדדיו בליטות דופן בודדות בלבד. על יד בליטות הדופן קיימים גופי גולג'י גדולים יחסית ופעילים (לוח 4 D). ראינו גם תא בשלבי חלוקה שבו דופן בתהליך היווצרות. בעוד שהדופן הראשוני בהיר, בליטות הדופן הן כהות לאחר פוסט פיקסציה באוסמיום.

באזור שקרוב למיקרופילה קיימת יותר משכבה אחת של תאי אנדותליום, במקרה זה בליטות הדופן מפותחות יותר בתא הפנימי שצמוד לאנדוספרם (לוח 4 D). בתאים אלה רוחב הבליטות שצמודות לדופן הראשוני הוא כ- $0.3\mu\text{m}$.

מתקבל הרושם שמבוך הדופן מצוי בשלבים הראשונים של התפתחותו, בשלב זה של התפתחות הזרע. בליטות הדופן הראשוניות שניראות בקטעי דופן ראדילים (לוח 4 C ו D) מיצגות התחלה של הרבצת מבוך דופן באיזורי דופן אלה.

בלוח B 4 רואים ליד בליטות הדופן שלושה דיקטיוזומים: העליון והימני חתוכים לאורכם ומראים וזיקולות משתנצות בצדדים, ובתחתון שחתוך באלכסון משיק לציסטרנות ניתן לראות את הוזיקולות המשתנצות מהיקף הציסטרנה.

הדופן הבסיסי של תאי האנדותליום שעליו יושבות בליטות הדופן הוא בעל שכבה אוסמיופילית צפופה שפונה לאנדוספרם. בין השכבה הנ"ל לאנדוספרם מופיעה רווח, שהוא הרווח שבין המעטה לגוף הביצית (לוח 3 B).

מבנה הזרע בוגר של עלקת, במהלך ההכנה לנביטה

העובר: העובר של הזרע הבוגר בנוי מתאים קטנים, צפופים וללא חללים בין-תאיים. צורתו כדורית (לוח 5,6).

ניתן להבחין באזורים שונים בעובר (לוח 6) בצד הפונה אל החלצה התאים גדולים יחסית לעומת האזור שפונה אל המיקרופילה בו ניראים תאים קטנים יותר, איזורי העובר ניצבעים באופן שונה בצביעת AGS (לוח B5).

הדפנות בעובר דקיקים (דופן ראשוני בלבד). בדרך כלל הדפנות ישרים ומאונכים לדופן הטנגנציאלי (לוח A8). בין תאים שכנים רואים פלזמודזמות (לוח A9).

תאי העובר מתאפנים בגרעין גדול יחסית, כאופיני לתאים מריסטמטים, הגרעין הופיע בצורות שונות: צורה כדורית נפוחה (לוח 9 C) או צורה אמורפית לא עגולה, (לוח 9 B). ניכר גם הגרעינון (לוח 9 C). הציטופלזמה בתאי העובר איננה צפופה אך היא עשירה באברונים קטנים (לוח 8).

ניראים הרבה מיטוכנדריה (לוח 7 C) לרוב בריכוזים באזורי תא מסוימים (לוח 7 A), סביב הגרעין, או ליד הדפנות. המיטוכנדריון הוא קטן יחסית (אורכו בערך $0.3\mu\text{m}$), לרב צורתו מאורכת (לוח 7 C).

מבחינים בהרבה גופי אגירה microbody (לוח 9) המכילים תוכן צפוף לאלקטרונים, הם נראים כהים, צורתם בד"כ אליפטית והם בד"כ בגודל בינוני גדול (קוטר של כ $1-4 \mu\text{m}$), חלקם מכילים טיפות בהירות קטנות, לעיתים הטיפות בתוך הגופים נראות כחורים (לוח B9), כי תוכן הגופים לא נשמר בפיקסציה ונגרמו קרעים בחתך תחת אלומת האלקטרונים במיקרוסקופ, ולעיתים (לוח A9) הטיפות נראות כגופי תשמורת קטנים כנראה של שמנים. בגופים אחרים היו טיפות שחורות או שהופיעו יחדיו באותו גופיף גם טיפות בהירות וגם כהות, גופים אלו מזכירים במראם כרומופלסטים (9, D10, D1C).

מצויים גם גופים כהים שבהם נראה גביש בודד מצולע של חומר צפוף לאלקטרונים, אולי חלבוני, הגבישים גדולים עד כדי תפיסת חלק נכבד מנפח האברון (7 B).

בתאים יש הרבה וזיקולות שאנו מניחים כי הן גופי שמן (oil bodies) /ניתן למיננס עפ"י קריטריון גודל: הגופים הגדולים שלעיתים נראים מצולעים, וטיפות קטנות אליפטיות (לוח B9).

הגופים אינם פזורים אקראית הן נראים מסודרים לאורך הדפנות, או בסידור קונצנטרי מסביב למיקרובודי כהה. לסידור זה קראנו 'פרחים'. סידור זה מופיע בפיקסציה של גלוטראלדהיד עם צביעת אורניל ועופרת (לוח 8 B1C) אך מודגש לאחר פיקסציה ב- KMnO_4 או OsO_4 (לוח A9, C7).

בתאי העובר נראות לפעמים גם וקואולות קטנות עם תוכן בעל אופי גרגרי כהה (צפוף לאלקטרונים) (לוח B8).

האנדוספרם ההיקפי : בנוי משכבת אחת של תאים גדולים יחסית (לוח 5C). הדפנות באנדוספרם בכלל ובאנדוספרם ההיקפי במיוחד הם דפנות עבים (לוח 13 C). בין תאים שכנים ניתן לראות פלסמודסמות (לוח 10 A). הדופן שפונה לכיוון האנדותרליום הוא עבה במיוחד ולא נראות בו פלסמודסמות (לוח 11 D). יותר מכך באזורים מסוימים בגבול אנדוספרם אנדותרליום נראית גם קוטיקלה עבה (לוח 11 A).

נראה כי קיימת התמחות של תאי האנדוספרם שונים, ישנם תאים שתוכנם הגורף וזיקולות שבדומה למצב בעובר, אנו מניחים שהם גופי שמן (לוח 10B) וישנם תאים המתאפיינים בנוכחות של 'פרחים', כלומר של קבוצות של גופי שומן המרוכזות במעגל סביב גופיף microbody (לוח D11).

בתאי אנדוספרם היקפי שמכילים בעיקר גופי שומן קל יותר להבחין באיברונים נוספים דוגמת מיטוכונדריון. המיטוכונדריה מרוכזות באזורי תא מסוימים, והן יחסית קטנות, מוארכות, חלקן כנראה בהשתנצות (לוח 10E).

התאים שמתאפיינים בסידור 'פרחים', בד"כ נראים עמוסים יותר באברונים. הציטופלזמה ברווחים הקטנים בין האיברונים אף היא נראית צפופה. ה'פרחים' הללו ממלאים את כל תוכן התא. סידור זה מופיע גם בפיקסציה בגלוטראלדהיד עם צביעת אורניל ועופרת (לוח B8) אך מודגש לאחר פיקסציה ב- KMnO_4 או OsO_4 (לוח A9).

גופי השומן בתאי האנדוספרם דומים בפזורם וארגונם הכללי בתא לגופי השומן שתוארו בעובר (לוח A8), אך גודלם משמעותית גדול יותר.

לוח 9

תאי עובר לאחר שלשה ימי הכנה

A פוסט פיקסציה ב KMnO_4 , ניתן לראות פלסמודזמות (חץ) בין תאים שכנים.

B גרעין בצורה אמורפית לא עגולה. ניראה שתוכן גופיפי האגירה לא נשמר בפיקסציה שכן אזורים מסוימים נוטים להקרע. ניתן לראות בגופיפי האגירה גם טיפות קטנות אליפטיות וגם טיפות גדולות שלעיתים ניראות מצולעות.

C גרעין וגרעינון, ריכוז מיטוכנדריה, וגופיפי אגירה (MB) המכילים טיפות כהות.

D גופיפי אגירה המכילים טיפות בהירות וטיפות כהות,

לוח 10

אנדוספרם היקפי

A האנדוספרם מתאפיין בדפנות עבים, בין תאים שכנים ניתן לראות פלסמודזמות (חצים)

B תא שמכיל בעיקר גופיפי שומן (OB)

C גופיפי אגירה המכילים טיפות בהירות וכהות, בדומה למצוי בתאי עובר.

D הגדלה של גוף האגירה הנ"ל.

E ריכוז מיטוכנדריות.

לוח 11

תאי אנדוספרם

A דופן תא אנדוספרם היקפי על גבול אנדותליום, ניתן לראות גבישי קוטיין של הקוטיקולה (חצים) בין האנדוספרם לאנדותליום.

B תא אנדוספרם פנימי המורכב מגוף שומן מרכזי וגם גבישים מצולעים כהים (חצים).

C תא אנדוספרם פנימי (שמאל למטה) על גבול תאי אנדוספרם היקפים (במרכז), שנבדלים ביניהם.

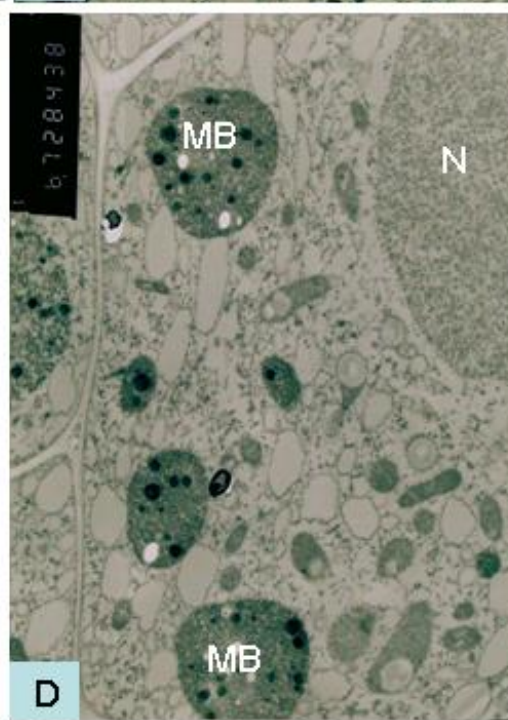
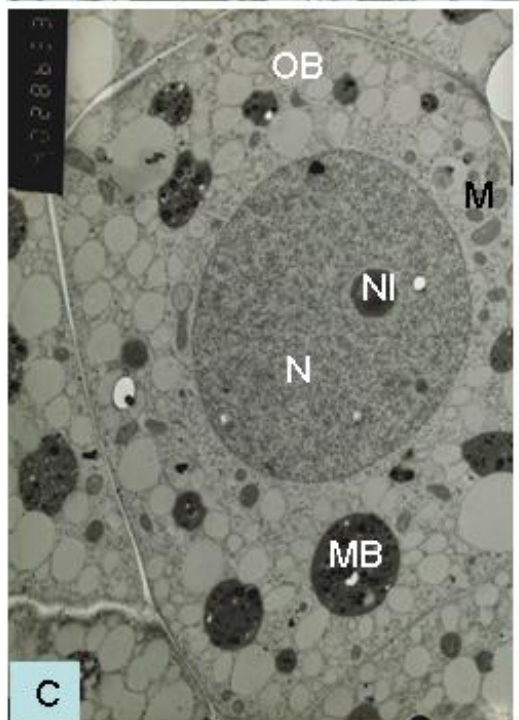
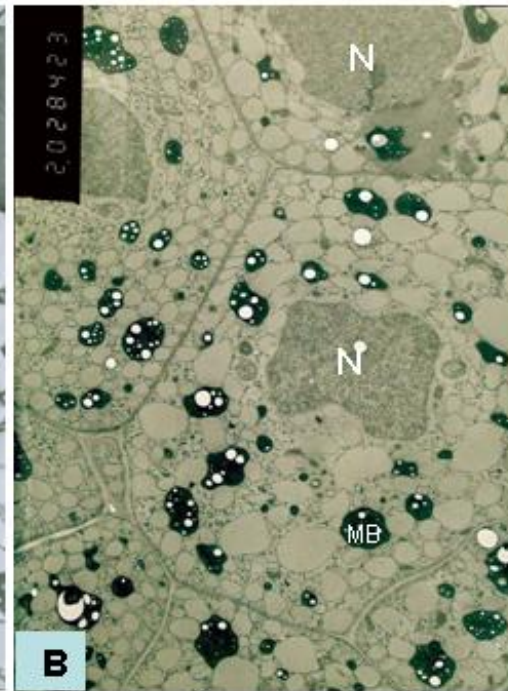
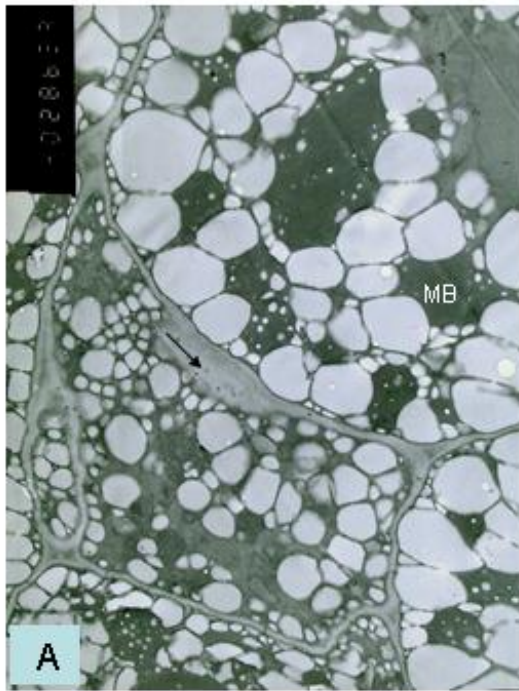
D תא אנדוספרם היקפי על גבול אנדותליום (ימין למעלה), סידור 'פרחים' של גופיפי שומן סביב גופיפי אגירה.

לוח 12

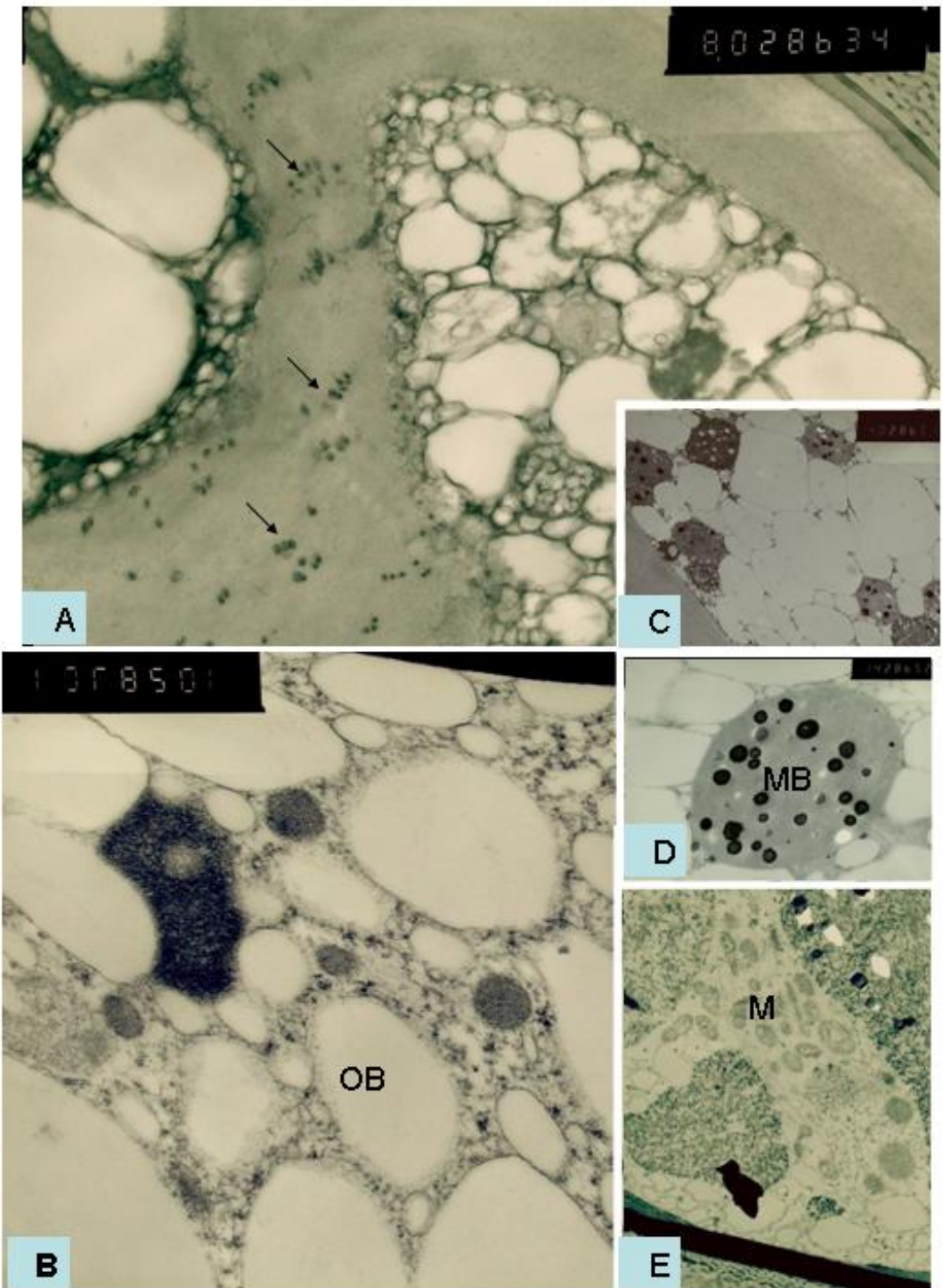
A תאי אנדוספרם פנימי לאחר פוסט פיקסציה באוסמיום, ב TEM , ניתן להבחין בגופיפי שומן בגווני אפור, ובגרגרי עמילן.

B חתך אורך לא מרכזי בזרע, מיקרוסקופ אור, לאורכו של הזרע יש בסה"כ כ-4 תאי אנדותליום מאורכים (דפנות הרוחב בינהם מסומנים בחצים).

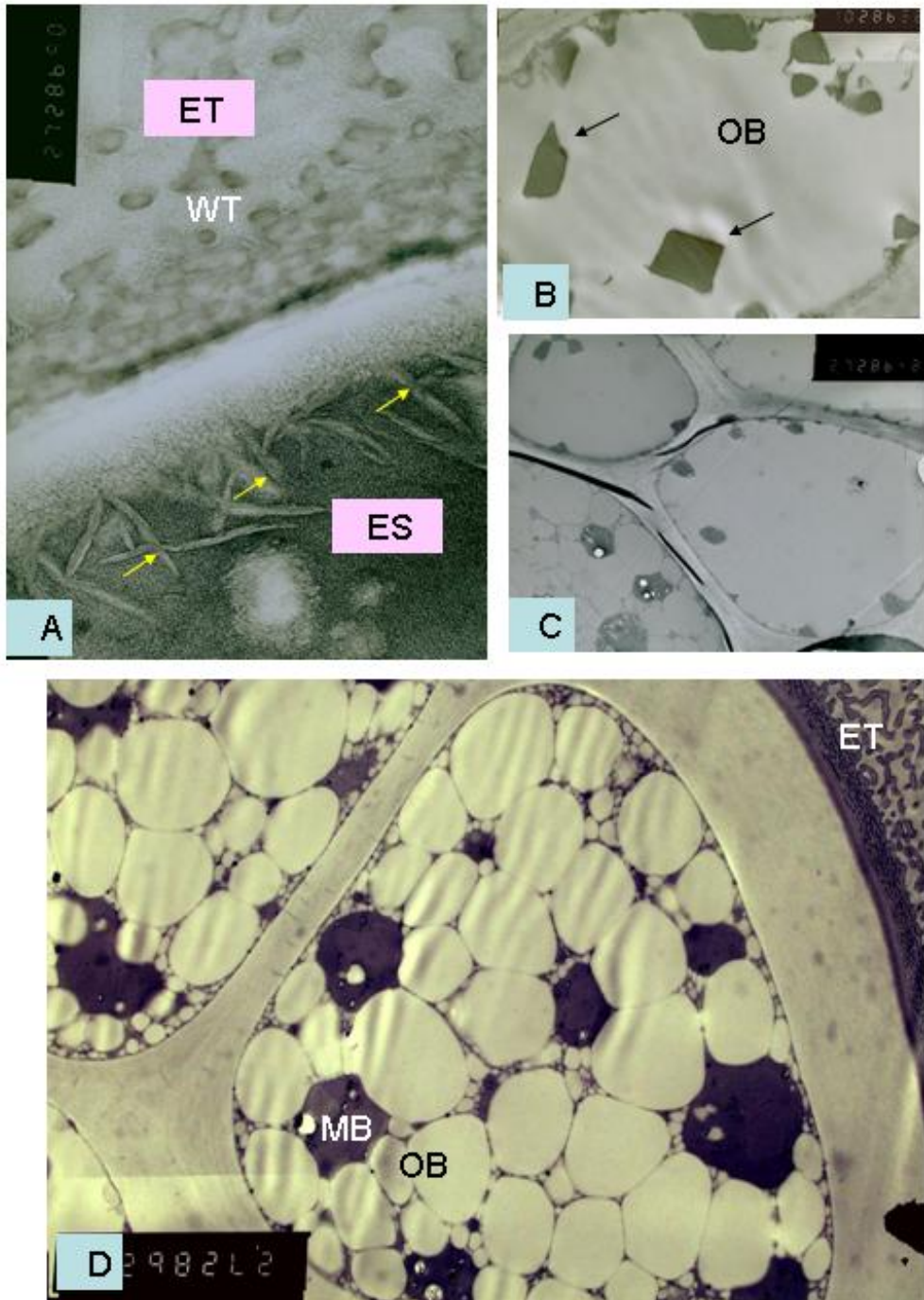
C חתך אורך מרכזי מקביל לנ"ל, מראה את העובר, האנדוספרם והקליפה. אזור צוואר הנביטה בצדו התחתון (*). ניתן להבחין בפציעה המכוונת שבוצעה לצרכי פיקסציה (חץ).



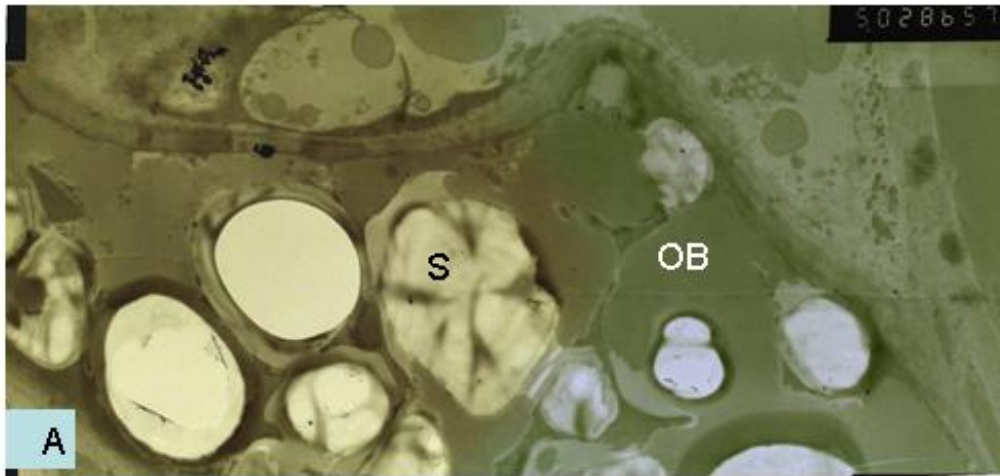
9 ml



10 חל



לוח 11



12 לוח

אנדוספרם פנימי: לוח C11 מראה תאים האופייניים לאנדוספרם הפנימי, בהם אזור מרכזי, שכפי הנראה מכיל בצפיפות ליפידים. אחרי פוסט פיקסציה באוסמיום נראים באזור זה בבירור גופי שומן שנחלקים הן עפ"י גודל (בעיקר גדולים וקטנטנים, לעיתים גם בינוניות), והן עפ"י צביעתם אפור כהה או אפור בהיר או לבן (לוח A12). בתוך התאים נראים גם גבישים כהים (לוח B11 ו C) בעלי צורה מצולעת בדרך כלל, הגבישים בד"כ פזורים לאורך הדפנות (לוח B11) לעיתים רחוקות מצאנו בתאים אלה גם גרגר עמילן (לוח A 12).

קליפת הזרע מורכבת משתי שכבות תאים עיקריות: אפידרמיס ואנדותרליום, כאשר ביניהם דפנות של תאים מעוכים, שהם שרידי הפרנכימה של הקליפה (לוח 13B). בזרע הבוגר תאי האפידרמיס הם תאים מתים, חסרי ציטופלזמה. במקרוסקופ אלקטרוני רואים בדפנות הטנגנציאלים הפנימיים של תאי האפידרמיס (לוח 13B) ובדפנות הרדיאליים (לוח 14B,A) התעבויות דופן המזכירות התעבויות של תאי עצה. במקרוסקופ אור רואים שההתעבויות מרושתות (לוח D5). הדופן החיצון הטנגנציאלי דק מאד ובד"כ קורס וניצמד לפנים התא (לוח 16B, 14B), וע"י כך נוצרים "מכתשים" בקליפת הזרע, כאשר כל אחד מהם הוא תא אפידרמיס שנראה כקערה (Joel 1987). לפעמים מצאנו על פני קליפת הזרע מושבות חיידקים (לוח 14A). מתחת לשכבות הפרנכימה המעוכות נימצא האנדותרליום:

תאי האנדותרליום בזרע הבוגר הינם תאים צרים ומאורכים. לאורך הזרע מצאנו בדרך כלל בין 4 ל 5 תאים בלבד, כלומר אורכו הממוצע של תא אנדותרליום בוגר הוא כ $60\mu\text{m}$ (לוח 12B). דפנות הרוחב(רדיאליים) שלהם הם לעיתים אלכסוניים (לוח 16B). שכבת האנדותרליום היא שכבה חד תאית במרבית אזורי הזרע מלבד אזור המיקרופילה המתאפיין בשתיים עד שלוש שכבות. (לוח C 14, 16A). סביב החלצה ישנו גם כן אזור מעובה של האנדותרליום, אם כי שטחו מצומצם (לוח 5A). כל הדפנות של תאי האנדותרליום מכוסים בליטות דופן דקות. בתאים רבים חלק גדול מנפח התא תפוס ע"י מארג של בליטות דופן מאלה. קיים גראדיאנט צפיפות של בליטות הדופן (לוח 13C), מהבסיס (הדופן הטנגנציאלי שפונה לאנדוספרם) כלפי חוץ, כאשר הדופן הטנגנציאלי הפנימי מכוסה בתשתית צפופה של בליטות בעקר אופקיות (לוח 13A), ועליהן כלפי מרכז התא נמצאות בליטות המכוונות לכיוונים שונים כולל ורטיקאליות (לוח 15, 14D). הדופן הטנגנציאלי החיצוני של תאי האנדותרליום כמו גם דופן הרוחב, נושאים גם כן בליטות דופן, אם כי בצפיפות נמוכה יותר (לוח 16B). בליטות הדופן שמכסות את דפנות הרוחב נמצאו המשכיות בין תאים שכנים. ומתקבל הרושם שהן ממלאות פתחים בדופן הראשוני שבין תאי אנדותרליום שכנים (לוח 14D, 15, 16B). באזורי דופן אלה לא ראינו את למלת הביניים, שניכרת רק במקצת מאזורי הדופן הבין תאיים (לוח 16B). תאי האנדותרליום בזרע הבוגר הם תאים מתים חסרי ציטופלסמה, שמכילים מוצילאג פוליסכרידי שנצבע בעזרת אלציאן בצבע ירוק (לוח 5B,D). באזורי הזרע, בהם רק שכבה אחת של תאי אנדותרליום, מופיע בדרך כלל מוצילאג שנראה גרגרי במיקרוסקופ האלקטרוני וממלא באופן אחיד את כל הנפח שבין בליטות הדופן בחלל התא, וחלק מחלל התא החופשי מבליטות דופן (לוח 16B). באזורים המעובים של

האנדוליום מופיעים ריכוזים צפופים של המוצילאג שממלאים את החלק החופשי של התא במבנה שנראה במיקרוסקופ האלקטרוני פיברילארי משוכב בלתי הומוגני (לוח 16A, 15), בעוד שבבסיס מבוך הדופן מופיע המוצילאג בצורה גרגרית.

שינויים מבניים במהלך שלב ההכנה במהלך העבודה בדקנו זרעים לאחר יום התפחה אחד ולאחר שלושה ושישה ימי הכנה. קשה להצביע על שינויים אולטראסטרוקטורליים בולטים שעובר זרע במהלך ההכנה, אך הצטברו עדויות לשינויים קטנים שהבולט שביניהם הוא בגרעין תאי העובר, שמקבל צורה רגולרית "נפוחה" ביום הששי (לוח 9C, 7C), לעומת צורה אי-רגולרית ביום הראשון ובשלישי (לוח 9B). הבדל שני ראינו בגופיפים (microbodies) של העובר: שבו מצאנו מובלעות בהירות בלבד עד היום השלישי (לוח 8B, 9B), ואילו ביום הששי של ההכנה נמצאו בהם גם מובלעות שחורות (לוח 9CD). מכיוון שלעתים ראינו מובלעת שהייתה שחורה רק באופן חלקי התקבל הרושם שבהדרגה הופכות המובלעות הבהירות ל"שחורות".

אימונוציטוכימיה : תוצאות ראשוניות

AOX : לאחר צביעה עם הנוגדן כנגד AOX התקבלה צביעה במיטוכונדריה של העובר ביום השלישי של ההכנה (לוח 17A). לא הצלחנו לחזור על צביעה זו שדורשת עבודה נוספת כולל ביקורות.

DIOXYGENASE : לאחר צביעה עם הנוגדן לדיאוקסיגנאז התקבלה צביעה בתאי העובר שהתרכזה בוזיקולות ובציטרנה של גולג'י (לוח 17BC).

- A** דופן טנגנציאלי פנימי של תא אנדותליום (על גבול האנדוספרם), מבחינים בתשתית הצפופה של בליטות דופן אופקיות, ומהן נימשכות בליטות דופן בכיוונים שונים.
- B** חתך רוחב בשכבות השונות של קליפת הזרע: האנדותליום עם בליטות דופן, שרידי שכבת פרנכימה מעוכה, והאפידרמיס עם התעבות דופן פנימי אופיינית (*).
- C** האנדוספרם ההיקפי על גבול האנדותליום. האנדוספרם ההיקפי מתאפיין בדפנות עבים במיוחד. ניתן להבחין בפלסמודזמות בין תאי האנדוספרם שכנים (חצים).

לוח 14

- A** האפידרמיס של קליפת הזרע, ניתן להבחין בהתעבויות האופייניות בדופן הפנימי (*) ובדופן חיצוני דק. ובחידקים על פני הזרע.
- B** חתך רוחב בקליפת הזרע, אנדותליום ואפידרמיס עם התעבויות דופן אופייניות על הדופן הטנגנציאלי פנימי ועל הדפנות הראדיאלים (*). דופן האפידרמיס הטנגנציאלי החיצון דק מאד וקורס על הדופן הפנימי (חצים).
- C** חתך רוחב בקליפה באיזור המקרופילה, האנדותליום מורכב באזור זה ביותר משכבה אחת. דפנות הרוחב בין תאי האנדותליום הם לעיתים אלכסוניים.
- D** בליטות הדופן על דפנות הרוחב נראות המשכיות בין תאים שכנים (חץ), ניראה שהם ממלאות פתחים בדופן הראשוני.

לוח 15

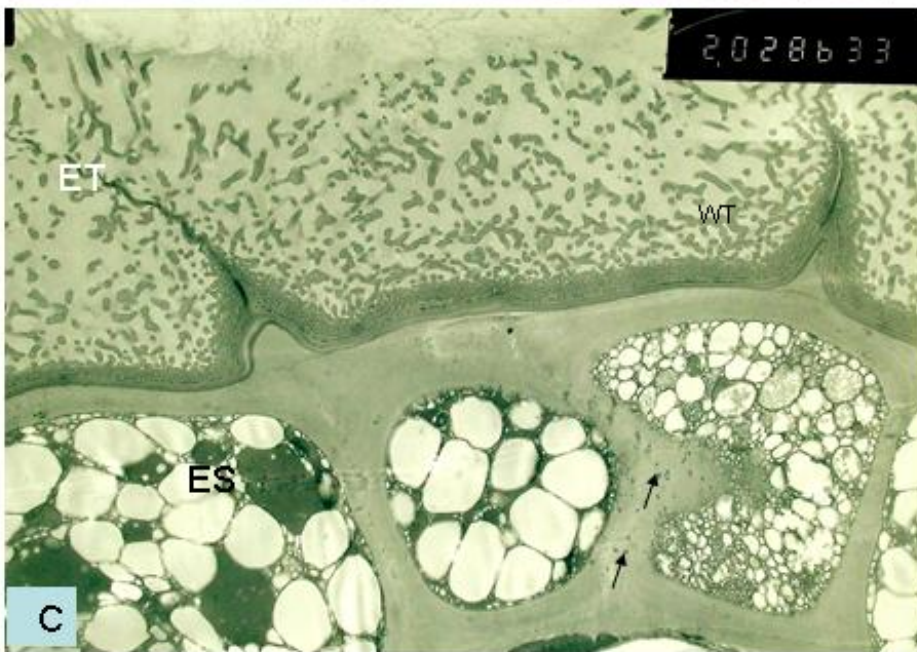
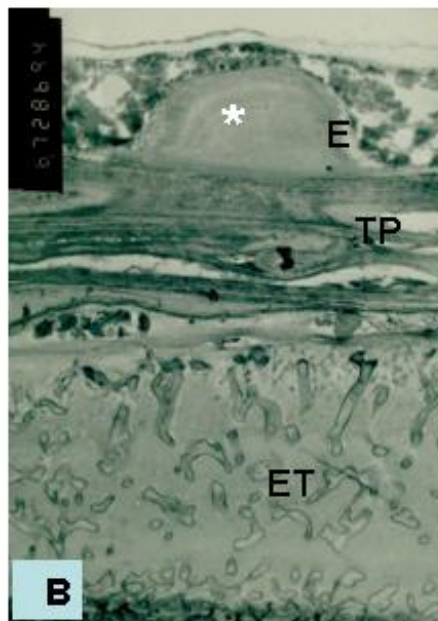
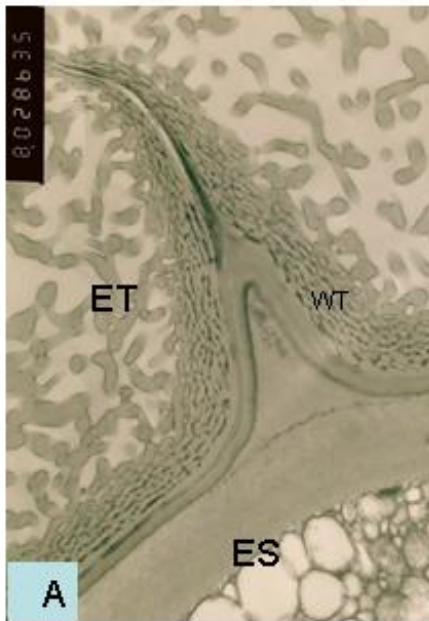
דופן רוחב בין תאי אנדותליום עם בליטות דופן המשכיות משני צדי הדופן הראשוני שביניהם. המוצילג שממלא את התאים ניראה באיזור הפנימי יותר במרקם גרגרי אחיד (*), ואילו באיזור החיצוני של התא ניראה במרקם פיברילארי משוכב ולא הומוגני (חצים).

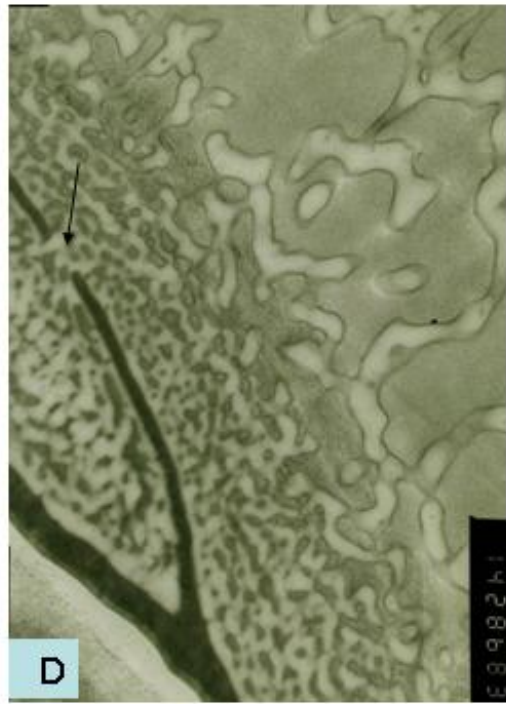
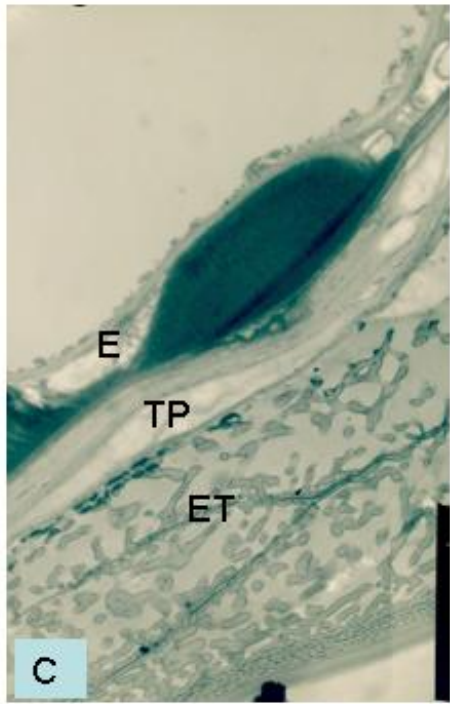
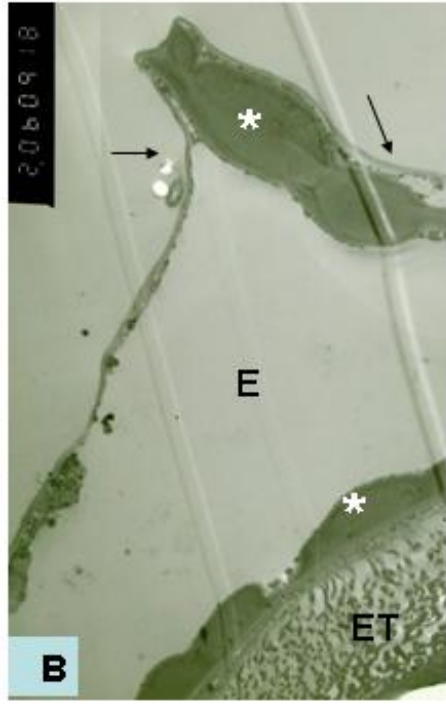
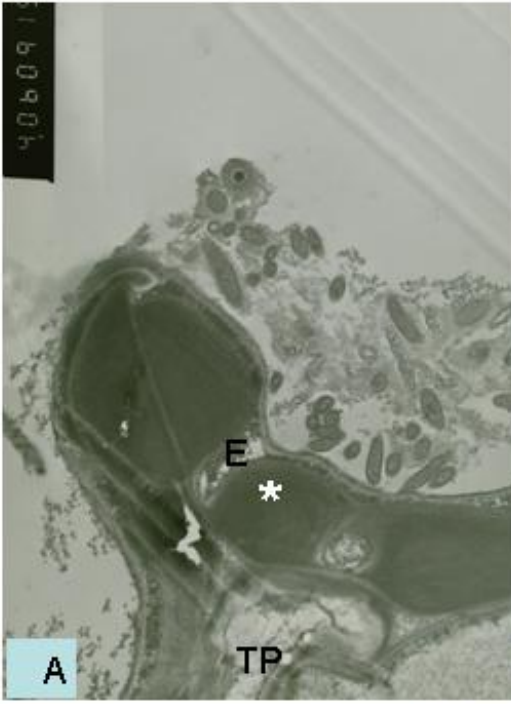
לוח 16

- A** אנדותליום דו שכבתי באיזור המיקרופילה על גבול האנדוספרם. נראה בברור המוצילג במרקם גרגרי אחיד באזור התשתית הצפופה של בליטות הדופן (*) לעומת המרקם הפיברילרי משוכב באיזור החופשי יותר של התא (חצים).
- B** חתך רוחב בקליפת הזרע, אנדותליום חד שכבתי, דופן רוחב אלכסוני, מוצילג גרגרי (*). התעבות כהה בדופן הפנימי של האפידרמיס. הדופן החיצון של האפידרמיס קורס על הדופן הפנימי (חץ).

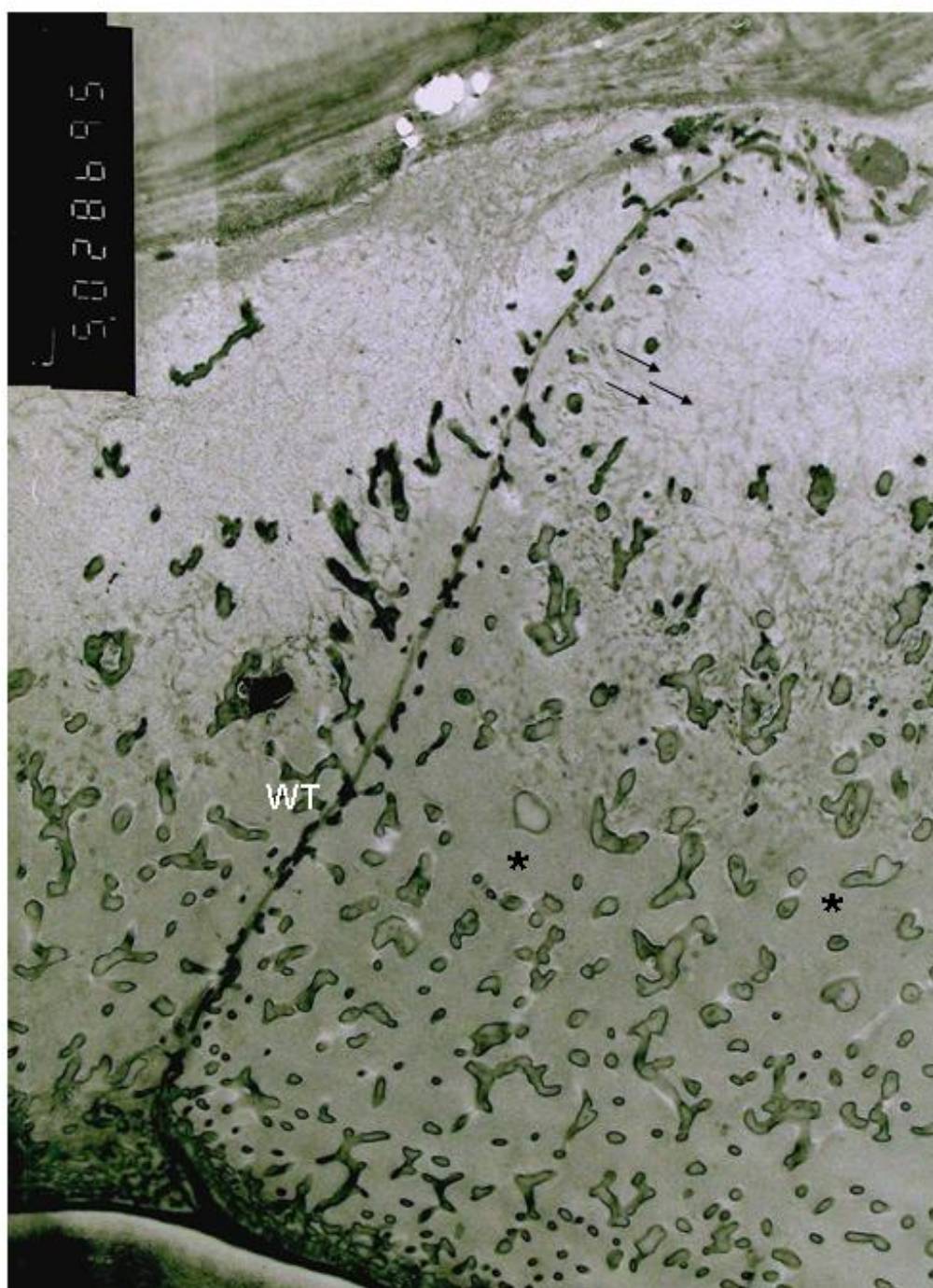
אימונוציטוכימיה – תוצאות ראשוניות.

- A** צביעה אימונוציטוכימית עם נוגדן של AOX, התקבל סימון במיטוכונדריון בעובר של זרע לאחר שלושה ימי הכנה (חץ).
- B** ו-**C** צביעה עם נוגדן של דאוקסיגנאז, התקבל סימון בתאי עובר של זרע לאחר שלושה ימי הכנה. ניראים צברים של חלקיקי זהב בתוך שלפוחיות גולג'י (חצים).

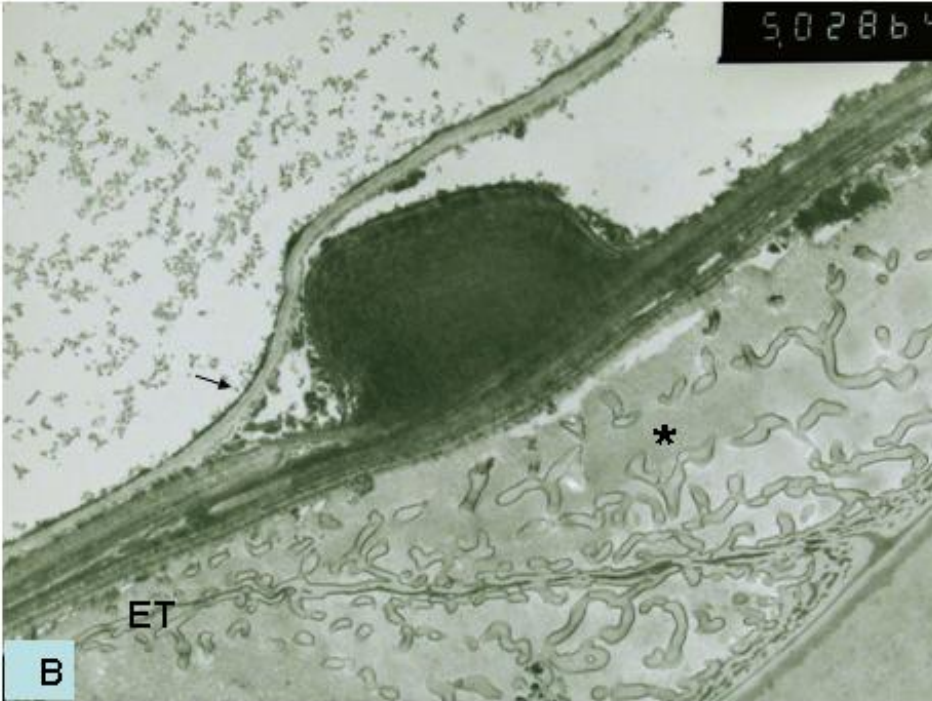
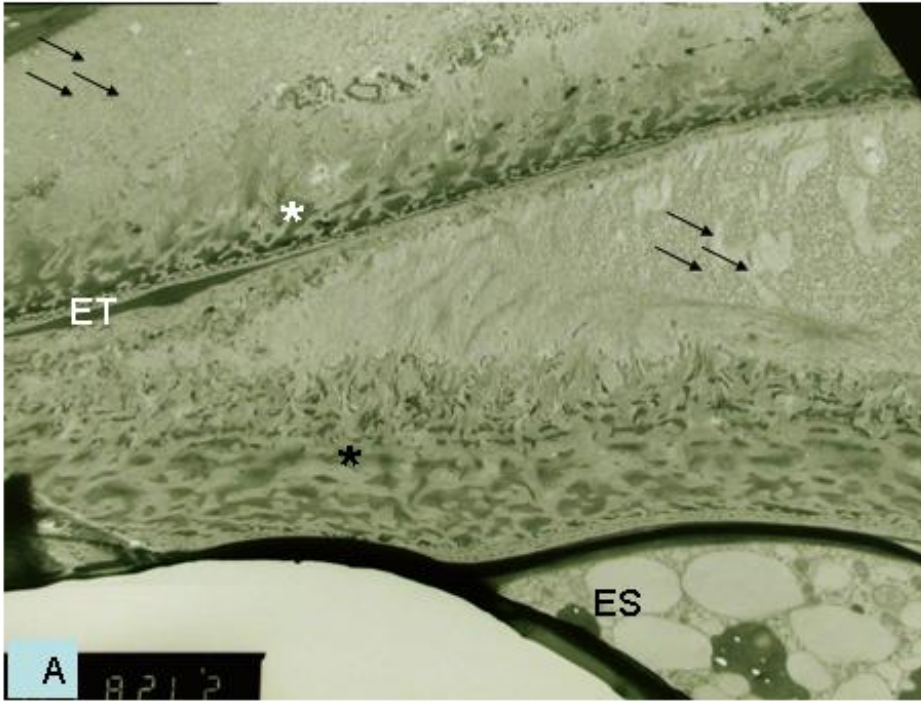




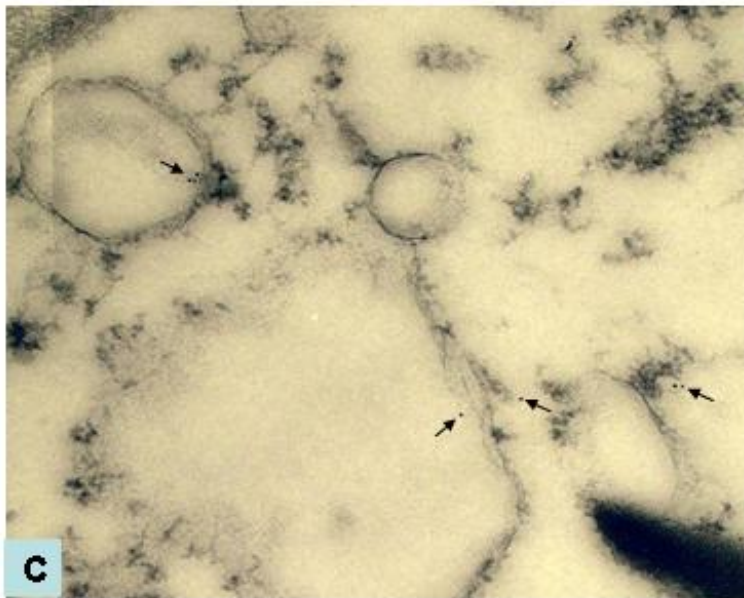
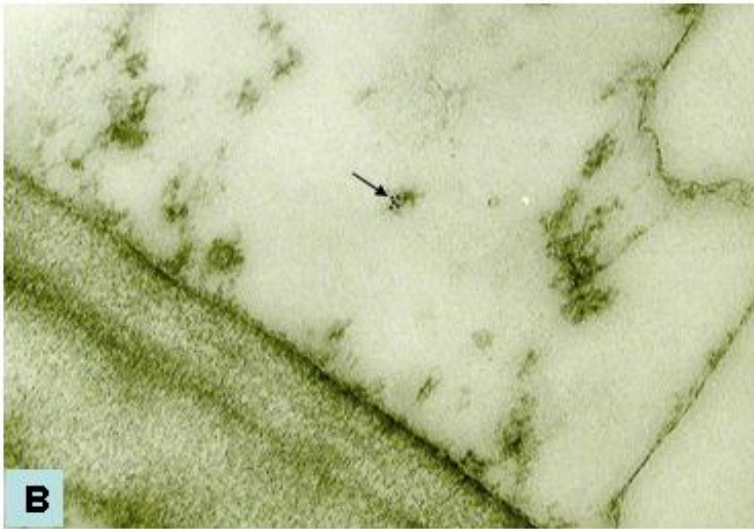
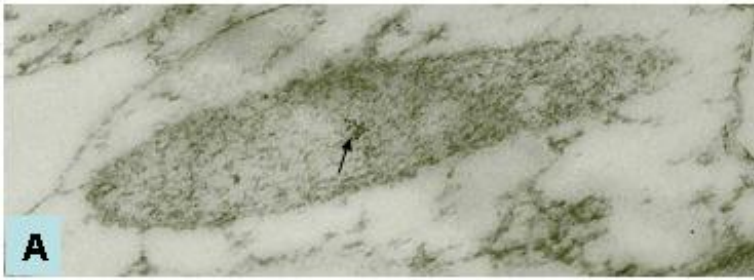
14 nt



לוח 15



16 ml



17 n17

שיטות

למיטב ידיעתנו, אין בספרות עד כה תמונות של חתכים אנטומיים בזרע בוגר של עלקת, בשלב שלפני הנביטה, ולא בכדי.

זרע העלקת הוא מערכת קשה לעבודה מבנית: קליפת הזרע היא בלתי חדירה, ואינה מאפשרת כניסת חומרי פיקסציה כימית וחומרי מילוי (embedding). כלומר, לא מתאפשר שימור של פנים הזרע ולא ניתן לקבל חתכים ראויים למחקר. בעיות חדירות אלו אינן קיימות בעבודה עם זרעי עלקת בתחילת נביטה (Joel & Losner-Goshen, 1994; Aber & Salle, 1983) וגם לא עם זרעים דומים שהותקפו ע"י פטרייה (Sauerborn et al., 1996; Thomas et al., 1999) ואכן, מירב העבודה האנטומית שנעשתה בעבר בזרעי עלקת, ושכוצעה ע"י Teryokhin (1997), כוללת ציורים ולא צילומים. ועבודות אחרות שמציגות את מבנה הזרע ומראות צילומים מיקרוסקופיים, התבססו כפי הנראה על בחינה של זרעים בתחילת הנביטה. בעבודה של Aber & Salle (1983) מופיעה תמונה של זרע עלקת בוגר, אך התבוננות בתמונה זו מגלה שורשון, כלומר: הזרע נחתך כשהיה כבר בתחילת נביטה.

בעיה נוספת הקשתה גם על הכנת חתכים למיקרוסקופ האלקטרוניים. הבעיה התעוררה במיוחד בזמן שניסינו לקבל חתכי זרע שעברו פיקסציה שניונית באוסמיום טטרא-אוקסיד. הזרע עשיר מאד בליפידים שנקשרו לאוסמיום, ויצרו מארג צפוף, שמנע מחומרי המילוי להיכנס פנימה לתוך הזרע. משום כך פנים הזרע לא נשמר ולא ניתן היה לקבל חתכים תקינים.

הדרך שלנו להתגבר על בעיית החדירות בקליפת הזרע, הייתה לפצוע את הזרעים בעת הפיקסציה, פציעה מינורית ומבוקרת באזורים מוגדרים (לוח A1) שאפשרה כניסת חומרים לאזורי הזרע השונים אך לא הרסה את מבנה הזרע. ביצוע הפציעה קשה מאד טכנית, שכן מדובר בזרעים זעירים (בסה"כ כ- 13 תאים לאורך הזרע) ולכן היה צורך לבצע זאת בעזרת מיקרוסקופ.

כדי להתגבר על המחסום שיצר הקומפלקס אוסמיום + ליפידים, נקטנו בפרוצדורה שונה מעט:

1. הפיקסציה נעשתה תחת ואקום, כמו גם שלבי האמבדינג הראשוניים.
2. שלבי התהליך הווארכו ונפרסו על פני מספר ימים.
3. נעשה שימוש באוסמיום בריכוז נמוך, וקוצר עד מאד שלב ההשריה בחומר זה.
4. כחומר מילוי נעשה שימוש ב-Spurr's epoxy resin, המתאפיין בחדירות גבוהה, וזאת לאחר שלא הצלחנו לקבל חתכים של חומר שעבר אמבדינג ב LRW או Epon.

רק בדרכים אלה הפקנו חתכים באיכות טובה, של זרעי עלקת בשלבים שונים של ההכנה לנביטה, וקיבלנו תמונות אינפורמטיביות במיקרוסקופ אור ובמיקרוסקופ אלקטרוניים.

מבנה הזרע

העובר של זרע עלקת מצרית נשאר גוף קטן של תאים ואינו מפתח איברים, שלא כמו במרבית משפחות הצמחים בהם העובר הוא בעל פסיגים, תת פסיג, שורשון עם כפת שורש ונצרון. העלקת אינו הצמח היחיד בעל עובר מצומצם (reduced embryo), ניתן למצוא זאת בצמחים מסוימים נוספים לדוגמא בעוד צמחים טפיליים: סטריגה, ורימונית הלוטם (Rafflesiaceae) כמו גם בצמחים מסוימים במשפחת הסחלביים (Fahn, 1982). יתכן וניתן לקשר בין העובר המצומצם בעלקת לאסטרטגית r שתוארה במבוא.

בעבודה זו אנו מדווחים לראשונה על דיפרנציציה מורפולוגית בעובר זרע העלקת לפני הנביטה. ניתן להבחין בעובר עלקת מצרית בשני אזורים (לוח 6) האזור שפונה אל החלצה שמתאפיין בתאים גדולים יותר לעומת האזור שפונה אל המיקרופילה שמורכב מתאים שהם קטנים יותר. האזורים השונים ניצבעים דיפרנציאלית ב-AGS (לוח B5).

נראה כי ההבדלים האנטומיים בין שני חלקי העובר קשורים לתפקיד שממלאים החלקים השונים. באזור שפונה אל המיקרופילה נוצרת בזמן הנביטה המריסטמה של קצה השורשון (Teryokhin, 1997), ואילו תאי העובר בצד שפונה אל החלצה אינם מתחלקים במהלך הנביטה (Joel & Losner-Goshen, 1994) אלא הופכים תאי הזנה שמתווכים בין הנבט המתפתח לאנדוספרם, בו עיקר חומרי התשמורת (Teryokhin, 1997).

תאי העובר הם תאים פעילים: הם מתאפיינים בציטופלזמה צפופה וגרעין גדול בדומה למצוי בתאי עובר בקבוצות צמחים רבות אחרות. המספר הגדול של מיטוכונדריה בתאי העובר בשלב ההכנה לנביטה מתאים לקצב נשימה עולה כפי שתואר בעבודה פיזיולוגית פרלימינרית על זרעים אלה, בה נמצאה גם אינקורפציה של תימידין בפרקציה המיטוכונדרילית (Mayer & Bar-Nun, 1994). מציאת מיטוכונדריות עם שני עשויה להעיד על חלוקה שלהם.

בזרעי העלקת מצאנו כי הן העובר והן האנדוספרם עמוסים בגופי שומן (oil bodies). תוצאה זו תואמת את הממצא ש-30% ממשקלו היבש של זרע העלקת הוא ליפידים (Bar-Nun and Mayer, 2002). ממצא זה תואם גם את ידוע מצמחים אחרים כי הליפידים בזרעים נאגרים בד"כ באנדוספרם או בפסיגים (Miquel & Browse, 1995).

פיזור גופי השומן באנדוספרם ובעובר נראה לעיתים אקראי, ולעיתים בסידור מאורגן שכונה בעבודתנו "פרחים", בו גופי השומן מאורגנים בסידור קונצנטרי (לוח B8) סביב אברון שתוכנו צפוף לאלקטרוניים (נראה כהה ב-E.M.). סידור 'פרחים' מאפיין את תאי העובר ואת תאי האנדוספרם ההיקפי בזמן ההכנה

לנביטה. סידור האברונים ב'פרחים' כפי שמצאנו בזרעי עלקת דומה מאד לסידור של גופי שומן סביב גליאוקסוזומים בזרעים אחרים (Miquel, and Browse, 1995) ה- glyoxysomes הם גופיפים (microbodies) המאפיינים רקמות עתירות שומן בזרעים ואשר בהם מתרחשת ההפיכה של חומרי תשמורת שומניים לסוכרים זמינים לנביטה זאת ע"י מערך של אנזימים המקטלזים פירוק חימצוני של חומצות שומניות (β -oxidation) ואת מעגל החומצה הגליאוקסילית. (Chapman & Trelease, 1991; Herman, 1995), על מנת לזהות בודאות את הגליאוקסוזומים בזרע העלקת יש לבצע צביעות אימונולוגיות עם נוגדנים ספציפיים לאנזימים הרלבנטים.

האנדוספרם בזרע העלקת נחלק לשני אזורים ניבדלים: האנדוספרם ההיקפי והאנדוספרם הפנימי. תאי האנדוספרם ההיקפי מתאפיינים בציטופלזמה צפופה ובה גופי שומן וגופיפים דמויי גליאוקסוזומים. ואילו בתאי האנדוספרם הפנימי קיים מעטה דק של ציטופלזמה היקפית, ובמרכז ואקואולה גדולה המכילה כפי הנראה ליפידים וגבישים כהים. ממצאים אלה שהתקבלו בעבודה האלקטרון מיקרוסקופית תואמים את ממצאי Teryokhin 1997 שהבחין בשתי שכבות באנדוספרם וקרא לשכבה ההיקפית בשם אלורון (מושג שאול מגרגרי הדגניים). באנדוספרם צעיר בזרע המתפתח תאי האנדוספרם הפנימי נראים עשירים יותר בגופי תשמורת. כלומר במהלך התפתחות הזרע חל המהפך בו מתמלאים תאי האנדוספרם הפנימי והחיצוני בצורה דיפרנציאלית בחומרי תשמורת. להבנת תהליכים אלה נדרש עוד מחקר התפתחותי.

ליפידים הינם צורה יעילה לאגירת אנרגיה. ואכן, בהרבה זרעים ובמיוחד בזרעים קטנים, ליפידים הם חומר התשמורת העיקרי (מאיר ופוליקוב-מיבר, 1984). עובדה מעניינת היא שעל פי רוב, זרעים עם תכולת שומן גבוהה מתאפיינים בתוחלת חיים קצרה (Smith & Berjak 1995). זרעי העלקת הינם יוצאי דופן שכן כפי שנאמר לעיל הם מתאפיינים בתוחלת חיים ארוכה.

עמילן הוא חומר תשמורת אופייני לעלקת, בפרק החיים הטפילי (בפקעית ובגבעול). עפ"י עבודות קודמות (Bar-Nun & Mayer, 2002) העמילן אינו מצוי בזרע הבוגר, בפרק העצמאי של חי הטפיל, ולמרות זאת - מצאנו באנדוספרם גרגרי עמילן בודדים טיפוסיים לעלקת בשלב ההכנה לנביטה (לוח A12).

בזרע המתפתח (לוח C1, לוח 2) ראינו מספר רב של גרגרי עמילן בקליפה, באנדוספרם ובעובר. מאחר וכמות העמילן בזרע הבוגר היתה קטנה בהרבה, אנו מניחים שהעמילן עבר פירוק במהלך הבשלת הזרע כך שנותר ממנו רק מעט בזרע הבוגר. Kumar (1977) כתב שהימצאות גרגרי עמילן מאפיינת את האנדוספרם ההיקפי בעלקת מצרית, בעבודה שלנו לא קיבלנו תוצאות דומות. בהעדר פסיגים מהווה האנדוספרם רקמת הזנה עיקרית, ואכן מצאנו פלזמודזמות בין תאי אנדוספרם שכנים אשר מתאימות להעברה סימפלסטית של חומרים בתוך רקמת הזנה (לוח A10).

בין האנדוספרם ההיקפי לקליפת הזרע אין פלזמודזמות ויותר מכך באיזורים מסוימים ניתן לראות קוטיקולה עבה ביניהם (לוח A11) בדומה לזרעים של צמחים אחרים שבהם יש קוטיקולה בין המעטה

הפנימי לאנדוספרם כגון בחרוב המצוי *Ceratonia siliqua* ובלחך האיזמלני *Plantago lanceolata* (Fahn, 1982).

אחד המאפיינים העיקריים של זרע העלקת המצרית הוא השכבה המיוחדת של תאים, שכונתה 'אנדותרליום של קליפת הזרע' על ידי Teryokhin (1997). התברר שתאי השכבה דופן הממוקמת בצד הפנימי של קליפת הזרע הם בעלי בליטות היוצרות שכבה של מבוך דופן. ניתן להבחין בשכבה זו ב LM היא ניצבעת בצפיפות ע"י באלציאן כחול וע"י Toloiodine Blue (לוח 5). תאי האנדותרליום הינם תאים מאורכים ודפנותיהם הראדיאליים בד"כ אלכסוניים. שכבת האנדותרליום מעובה יותר סביב המיקרופילה וגם סביב החלצה (אם כי במידה פחותה יותר) (לוח 5A). עובדות אלה מרמזות אולי על הקשר של הובלה.

בליטות הדופן בזרע הבוגר ממלאות את מרביתו של חלל התא כאשר ניתן לראות גראדיאט של צפיפות מהדופן הטנגנציאלי הפנימי לכיוון הדופן הטנגנציאלי החיצון.

תאים אלו דומים מאד לתאים המכונים (TC) transfer cells, מושג שטבעו Gunning & Pate (1974) עבור תאים המתמחים בטרנספורט של תמיסות למרחקים קצרים.

מבוך של בליטות דופן משני הוא המאפיין המרכזי של TC. בדומה לשכבת האנדותרליום בעלקת מצרית, הבליטות שתוארו עבור TC ניצבעות באלציאן כחול ובטולאידין כחול ופיזורם על פני התא מאופיין בפולריות (Gunning & Pate 1974). הראשון שהתייחס למבוך הדופן הוא Fisher שתאר ב-1884 אזור שנצבע בצפיפות ב-Minor Veins של השיפה בעלים (Gunning & Pate 1974). מבוך הדופן בנוי ממיקרופברילות שיוצרות בליטות בעלות צורות לא רגולריות, מסועפות, אלה יוצרות רשת תעלות שהודגמו ע"י Gunig & Pate בעזרת lanthanum hydroxide ששימש כסמן לתנועה אפופלסטית בצמח.

מבוך הדופן הוא תבנית רב גונית המאפשרת לו לבצע מגוון מטלות שונות. ואכן הוא מצוי בכל עולם הצמחים כולל במערכות צמחים ירודים. הוא בד"כ מאפיין אזורים המוגדרים כ'צואר בקבוק' של טרנספורט: ברקמות וסקולריות: תאי שיפה או תאי עיצה של ה-Minor Veins של עלים.

ברקמות מעבר בין הגמטופיט לספורופיט. ובין סימביונט ופונדקאי (מיקוריזה). כל האזורים מתאפיינים בהעברה אינטנסיבית של מים ומזון.

תאי TC נוכחים ברקמות שונות של זרעים ממינים רבים ממשפחות שונות: בצמחים מסוימים הם מופיעים כבר בשלב הביצית אלו ה-TC של הסינרגידיים וה-TC של האנטיפודים. ה-TC של הסינרגידיים יעלמו במהלך התפתחות הזרע ואילו ה-TC של האנטיפודים ישארו ויתפתחו בשלב הבוגר של הזרע, אז מקום הופעתם הוא משני צידי האנדוספרם (כלפי העובר וכלפי הקליפה).

בזרע העלקת המצב שונה: מבוך הדופן ממוקם בצד הפנימי של הקליפה (לוח 12 C ו B) ומצאו כפי הנראה באינטגומנט.

לתאי ה-TC באנדותרליום של עלקת מצרית מאפיין אחד חשוב שמבדיל אותם מ-TC טיפוסיים: התאים הינם חסרי ציטופלסמה, אלו תאים מתים, וחלל התא ממולא ב מוצילאג (mucilage) בעל אופי

פוליסכרידי שכן הוא ניצבע באלציאן ירוק. באזורים מסוימים המוצילג הוא בעל אופי פיברילארי לא הומוגני. באזורים אחרים המוצילג הוא בעל אופי גרגרי שממלא באופן אחיד את כל הנפח שבין בליטות הדופן בחלל התא. לא ברור האם מדובר בחומרים שונים או אולי באותו החומר באינטראקציות שונות עם הסביבה.

בזרע המתפתח, רואים תאי TC בשלבי היווצרותם, כאן אלו תאים חיים וניתן לראות בהם מאפיינים ציטופלסמטיים הידועים מ TC בצמחים אחרים: ריבוי מיטוכונדריה, מערכת גולג'י פעילה עם דיקטיוזומים קטנים, והרבה ריבוזומים שחלקם קשורים לרטיקולום אנדופלסמטי (rER). ניתן לראות שתהליך ההיווצרות של בליטות הדופן הוא הדרגתי, הבליטות נוצרות קודם על גבי הדופן הטנגנציאלי הפנימי ורק אח"כ על גבי דפנות ראדיאלים לכיוון הפרנכימה. הכיוונית הנ"ל בהתפתחות הבליטות היא האחראית ליצירת הפולריות האופינית לתאי TC בוגרים.

בעבודה שנעשתה על זרע הסטריגה תוארה שכבה המקבילה במיקומה לשכבת האנדותרליום של עלקת מצרית, אך החוקרים חשבו שמדובר בתאי קליפה שמכילים פיגמנטים (מוקד העבודה היה אחר) והתאים לא תוארו כתאים מיוחדים או כ TC. Teryokhin (1997) גם כן לא הבחין בייחוד זה של הרקמה, והתייחס אליה רק כ'אנתוליום של קליפת הזרע'. בעבודה שלנו הצלחנו לזהות את מבני הדופן המיוחדים, ולהראות את תחילת התפתחותם.

תאי האנדותרליום הינם מאורכים עם פתחים בין תאים בדפנות הרחב שבין תאים שכנים בהם בליטות הדופן ניראות המשכיות, כלומר נוצרת כאן שכבה של תאים המזכירים רקמת הובלה.

נשאלת השאלה: מהו תפקידה של שכבת האנדותרליום בזרע העלקת?

בזרע מינימלי כזרע העלקת, לא יתקומו מבנים ללא הצדקה מספקת לקיומם. מעבודתנו עולה כי שכבת האנדותרליום נבנית לאורך התפתחות הזרע כך שנצפה שתפקידה יבוא לידי ביטוי בשלב הבוגר של הזרע, יתכן שרק בשלב הנביטה מגיע זמן תיפקודה של שכבת האנדותרליום. תוצאות העבודה הסטוקטוראלית מחזקות את ההיפותזה ששכבת האנדותרליום מתפקדת כרקמת הובלה של המים בשלב ההתפתחה הראשוני של הזרע (Joel et al., 1995). כלומר המסלול שהמים עושים הוא מהמיקרופילה דרך האנדותרליום אל החלצה ורק משם פנימה אל האנדוספרם והעובר. (בין האנדוספרם לאנדותרליום יש קוטיקולה עבה שמקורה כנראה בקוטיקולה שבין המעטה לשק הביצית). יתכן גם שתפקידו של המוצילג שממלא את חללי התאים בשכבת האנדותרליום הוא בהחזקה של המים, ותהליך המיום בשאר אזורי הזרע הוא תהליך איטי יותר.

ככדי לענות על שאלות אלו יש לבצע ניסויי חדירות ומעקב אחר תנועת המים למשל בעזרת הסמן

.lanthanum hydroxide

קליפת הזרע

פני הזרע מתאפיינים במראה מרושת (לוה5D). האפידרמיס החיצון קורס בשלב החדירה של הזרע לאדמה (Teryokhin, 1997) בלוה16 B ו לוה14 C ניתן לראות את הדופן החיצון הדק שניצמד לדופן הפנימי . Kuijt (1969) טען שהדופן החיצוני של תאי האפידרמיס מתפרק ונעלם. Aber לעומתו, גרס כי הדופן הטנגנסציאלי החיצון של תאי האפידרמיס קורס, ונצמד לדופן הפנימי. תוצאותינו מאשרות את תיאורו של Aber .

שינויים מבניים

במהלך שלב ההכנה של הזרעים צפינו במספר שינויים אולטראסטרוקטורליים שקשורים בודאי לתהליכים המטבוליים החלים בזרע, שניהם חלו בעובר:
גרעין תאי העובר הגדיל את נפחו ותפח ביום הששי של ההכנה לנביטה, וב-microbodies של העובר נוספו מובלעות שחורות .

נשימה עמידה לציאניד

המסלול האלטרנטיבי שמור מאד בעולם הצומח. מופיע ברקמות צמחיות שונות וגם בהקשר של תהליכי נביטה בזרעים שונים (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989).
עבודותיהם של Bar-Nun et al מראות כי יש ביטוי של חלבון ה-AOX (Alternative Oxidase) במהלך ההכנה לנביטה. נמצא מתאם יפה בין קצב נשימה והתבטאות ה-AOX. וכן נצפתה מתאם בין עיכוב נביטה לעיכוב נשימה אלטרנטיבית.
בתוצאות ראשוניות, בעבודה האימונוציטוכימית שביצענו עם נוגדנים מונוקלונאליים לחלבון AOX, התקבל סימון של חלבון ה-AOX במיטוכונדריון רק בעובר, ביום השלישי. ממצא זה תואם את הידוע לנו על נשימה אלטרנטיבית, אך תוצאות אלה התקבלו פעם אחת בלבד, ולא הצלחנו לחזור עליהן.
אמנם הנוגדנים שבהם השתמשנו הופקו כנגד AOX מצמח אחר (Sauromatum guttatum), אך איננו סבורים שזה מקור הבעיה, שכן בעבודה של Bar-Nun et al. (2003) זוהה החלבון בעלוקת מצרית בעזרת נוגדנים אלו ב Westren blot .
ייתכן שתהליכי הפיקסציה הכימית פגעו באימונוגניות של החלבון.

שאלת תפקידו של מסלול הנשימה האלטרנטיבי עדיין פתוחה. קיימת היפותזה שמסלול זה מהווה בעצם הגנה כנגד Oxidative Stress, כלומר מהווה מסלול ניקוז לאלקטרונים ומונע היוצרות רדיקלים חופשיים. הזרע בשלב ההכנה עשוי להיות חשוף לרדיקלים חופשיים, העלולים לגרום לו נזק רב. כך שלמנגנון הגנה כנגד רדיקלים חופשיים עשויה להיות חשיבות בשלב זה. התבטאותו בשלב זה מתאימה להיפותזה הנ"ל (Bar-Nun et al., 2003).

פעילות dioxygenase בשלב ההכנה לנביטה

מתוצאות הפרופיל הגנטי של שלב ההכנה שהתקבלו על ידי שותפינו למחקר בארה"ב עולה שדיאוקסיגנאז הוא אנזים מפתח במהלך שלב ההכנה של זרעי עלקת מצרית. ביטויי החזק ביותר התקבל ביום השישי להכנה (תקשורת בע"פ).

הדיאוקסיגנאזות הם אנזימים המקטלזים הכנסה של שני האטומים מחמצן אטמוספרי לתרכובת אורגנית. הם בעלי תפקידים חשובים במסלולים ביוסינתתיים של הורמונים צמחיים כגון אתילן, חומצה אבסצית (ABA) וג'יברלין. כמו גם במסלולים ביוסינתתיים של מטבוליטים שניוניים.

הדיאוקסיגנאזות נחלקים לשתי קבוצות עיקריות : lipoxygenases

ו ה-2-oxoacid-dependent dioxygenases (2-oxoglutarate-dependent dioxygenases) האנזים שבודד מזרע עלקת מצרית משתיך עפ"י הרצף שלו לקבוצה השניה (תקשורת בע"פ). ישנן עבודות רבות המעידות על התפקיד שממלאים ה-2-oxoacid-dependent dioxygenases בשלבים האחרונים במסלול הביוסינתתי של ג'יברלין (Prescott&John,1996). מספר עבודות הראו שיש ביוסינתזה של ג'יברלין בשלב ההכנה בזרעי עלקת (Joel et al.,1991;Zehhar et al.,2002). התברר שהביטוי החזק ביותר של האנזים בזרעי עלקת התקבל ביום השישי של ההכנה לנביטה, עובדה שמתאימה לממצאים קודמים שהראו כי ההוספה של חומצה ג'יברלנית הביאה לביטול השפעת מעכב ביוסנתזה של ג'יברלין בימים האחרונים של שלב ההכנה.

בצביעה אימונולוגית עם נוגדנים של דיאוקסיגנאז התקבל סימון בתאי העובר ביום השלישי להכנה, נראה בצברים בתוך שלפוחיות גולג'י.

רשימת ספרות

- יואל, ד. ויעקובסון, ר. 1988 מיני העלאת בשדות החקלאות בארץ ופונדקאיהם החשובים. השדה כרך ס"ח חוברת י"ב 2441-2442.
- יואל, ד. לוזנר, ד. ידיד, ש. (1991) מחקרים בביולוגיה של עלאת. השדה כרך ע"א חוברת י"א 1748-1752.
- מאיר, א.מ. ופוליקוב-מיבר, א. (1984) נביטת זרעים. הוצאת מאגנס, האוניברסיטה העיברית, ירושלים.
- פאהן, א. 1987 אנטומיה של הצמח. הוצאת הקיבוץ המאוחד.

- Aber, M. and Salle, G. 1983 Graine et procalÔme d'Orbanche crenata Frosk: etude histocytologique et cytochimique. Canadian Journal of Botany.61(12):3302-3313
- Abu Sbaih, H.A . and Jury,S.L. 1994 Seed micromorphology and taxonomy in *Orobanche(Orobanchaceae)*. Flora Mediterranea 4.
- Aparicio, S.R. and Marsden, P. 1969 Methylene blue – basic fuchsin. Journal of microsc. (Eng.) 89:139-141.
- Bar Nun, N. and Mayer, A.M. 1993 Preconditioning and germination of *Orobanche* seeds: respiration and protein synthesis. Phytochemistry 34: 39-45.
- Bar-Nun, N and Mayer, A .M . 2002 composition of and changes in storage compounds in *Orobanche aegyptica* seeds during preconditioning. Israel Journal of Plant Sciences.50:277-279
- Bar-Nun, N., Plakhine, D., Joel, D.M., and Mayer, A.M. 2003. Changes in the activity of the alternative oxidase in *Orobanche* seeds during conditioning and their possible physiological function. Phytochemistry 64: 235-241.
- Begon, M. Harper, J.L. Townsend, C.R. 1996 Ecology : individuals, populations and communities. 3ed Blackwell Science Oxford .
- Bouwmeester, H.J. Matusova, R. Zhongkui, S. Beale, M.H. 2003 Secondary metabolite signaling in host-parasitic plant interactions. Current Opinion in Plant Biology. 6:358-364 .
- Brown R. and Edwards, M. 1946. The germination of the seed of *Striga lutea*. Ann. Bot. 10:133-142

- Chapman, K.D. and Trelease R.N. 1991 Acquisition of membrane lipids by differentiating glyoxysomes: role of lipid bodies. *J. Cell Biol.* 115:995-1007
- Cook, C.E. Witchard, L.P., Turner, B. and Egley, G.H. 1966. Germination of witchweed (*Striga lutea*): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 118:1189-1190
- DePamphilis, C.W. and Palmer, J.D. 1990 Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* 348:337-339
- Elthon, T.E. Nickels, R.L. McIntosh, L. 1989 Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 89,1311-1317.
- Fahn, A. 1982. *Plant Anatomy*. 3rd Ed. Pergamon Press, Oxford.
- Feinbrun-Dothan, N. 1978 *Flora palaestina*. Academic press, Jerusalem
- Gunning B.E. and Pate J.S. 1974. Transfer cells. In: *Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure*. (Ed. Roberts, A.). McGraw Hill, Maidenhead. Pp 441-480.
- Hall, J.L. and Hawes, C. 1991 *Electron microscopy of plant cells*. Academic Press London.
- Holub, J. 1990. Some taxonomic and nomenclatural changes within *Orobanchaceae*. *Preslia* 62, 193-198.
- Joel, D.M., 1983. AGS (Alacian Green Safranin) – A simple differential staining of plant material for the Light Microscope. *Proceedings RMS* 18(3):149-151.
- Joel, D.M., 1987. Identification of *Orobanche* seed. In Webr, H.C. and Forstreuter, W. (eds), *Parasitic flowering plants*. Proceedings of the 4th ISPPF, 437-444. Phillips University, M
- Joel, D.M., A. Back, Y. Kleifeld and Gepstein S., 1991. Seed conditioning and its role in *Orobanche* seed germination: inhibition by paclobutrazol. In K. Wegmann and L.J. Musselman [eds.], *Progress in Orobanche research*. Proceedings of the international workshop on *Orobanche* research. 147-156. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, FRG.
- Joel, D.M., and Lossner-Goshen, D. 1994. The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche Cumana* and *Orobanche aegyptiaca* and its development. *Canadian Journal of Botany* 72: 564-574.
- Joel, D. M., Steffens, J. C. and Matthews, D. E. 1995. Germination of Weedy Root Parasites. In J. Kigel and G. Galili (eds.) *Seed Development and Germination*. 567-598. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Kebreab, E. and Murdoch, A.J. 1999 Effect of moisture and temperature on longevity of *Orobanche* seeds. *Weed Research* 39:199-211.
- Keyes, W.J. Taylor, J.V. Apkarian, R.P Lynn, D.G. 2001 Dancing together Social controls in parasitic plant development. *Plant Physiol* ,127:1508-1512.
- Kuijt, J. 1969 The biology of parasitic flowering plants . University of California Press, Berkeley, CA .
- Kumar,U. 1977. Morphogenetic regulation of seed germination in *Orobanche aegyptiaca* Pers. *Canadian Journal of Botany* 55:2613-2621.
- Kust,C.A. 1963. Dormancy and viability of witchweed seeds as affected by temperature and relative humidity during storage. *Weeds* 11:247-250.
- Kust,C.A. 1966. A germination inhibitor of *Striga* seeds. *Weeds* 14:327-329
- Losner-Goshen D., Portnoy V., Mayer A.M. and Joel, D. M. (1998) Pectolytic Activity by the Haustorium of the Parasitic Plant *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) in Host Roots. *Annals of Botany* 81:319-326.
- Lynn, D.G. and Chang, M 1990. Phenolic signals in cohabitation : implications for plant development. *Ann. Rev. Plant Phsiol. Mol. Biol.* 41:497-526.
- Mayer A..M. and Bar Nun, N. 1994. Metabolism during preconditioning and germination of *Orobanche aegyptiaca* seeds. In :Pieterse,J.A.C , Verkleij and S.C,ter Borg, eds *Biology and Management of Orobanche* Proc. 3rd Intertational Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Royal Tropical research Institute Amsterdam pp. 146-156.
- Mayer A..M. and Bar Nun, N. 1997. Germination of *Orobanche*: some aspects of metabolism during preconditioning. In: Ellis, R., Black, M., Murdoch, A.J. and Hong, T.D.,eds. *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 633-639.
- Mayer A..M. and Poljakoff-Mayber A. 1989 *The Germination of seeds* 4ed Pergamon Press Oxford
- Miquel, M and Browse, J. 1995 lipid biosynthesis in developing seeds in J. Kigel and G. Galili (eds.) *Seed Development and Germination*.169-193. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Musselman, L.J. 1980. The biology of *Striga*, *Orobanche*, and other root-parasitic weeds. *Annual Review of Phytopathology* 18: 463-489.

- Nickrent, D.L. 1998 Molecular phylogenetic and evolutionary studies of parasitic plants. In Soltis, D. et al (eds) Molecular systematics of plants II DNA sequencing 211-241. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA
- O'Brien, T.P. and McCueilly, M.E. 1981 The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi pty. ltd., Melbourne Australia.
- Parker, C. and Riches, CR (1993) Parasitic Weeds of the World, Biology and Control. CAB International, UK.
- Prescott, A.G., John, P. 1996 Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. Annu. Rev. plant physiol. Plant mol. Boil. 47: 245-271.
- Press, M.C., N. Shah, J.M. Tuohy and G.R. Stewart. 1987. Carbon isotope ratios demonstrate carbon flux from C4 host to C3 parasite. Plant Physiology 85: 1143-1145.
- Press, M.C. and Graves, D. 1995 Parasitic plants. Chapman & Hall
- Raven, P.H. 2003 Biology of Plants. 6th ed. Freeman and cmp. New York
- Sauerborn, J. Dörr, I. Abbasher, A. Thomas, H. and Kroschel, J. 1996 Electron microscopic analysis of the penetration process of *Fusarium nygamai*, a hyperparasite of *Striga hermonthica*. Biological Control 7:53-59.
- Schneeweiss, G.M. 2001 Relationships within *Orobanche sect. Trionychon*: insights from its sequenceces. Proceedings of the 7 th International Parasitic Weed Symposium, Nantes, France pp 49-52
- Siame, B.A. Weerasuriya, Y. Wood, K. Ejeta, G. Butler, L.G. 1993 Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. J Agtic Food Chem, 41:1486-1491.
- Simons, B.H and Lambers, H. 1999 The alternative oxidase: is it a respiratory pathway allowing plants to cope with stress. In: Plant responses to environmental stress ed. H.R. Lerner Marcell Dekker, New York pp265-286.
- Smith, M.T. and Berjak, P. 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In J. Kigel and G. Galili (eds.) Seed Development and Germination. 701-746. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Spurr, A.R. 1969 A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy . J. Ultrastructure Res . 26:31-43

- Teryokhin, E.S. 1997 Weed Broomrapes: Systematics Ontogenesis Biology Evolution. Aufstieg-Verlag, Germany
- Thuring, J.W.J.F., Bitter, H.H de Kok M.M., Nefkens, G.H.L. van Riel A.M.D.A and Zwanenburg, B. *N*-Phthaloylglycine-derived strigol analogues. Influence of the D-ring on seed germination activity of the parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Orobanche crenata*. J. Agr. Food Chem., 45: 2284-2290.
- Thomas, H., Heller, A., Sauerborn, J., Muller-Stover, D. 1999. *Fusarium oxysporum f sp orthoceras*, a potential mycoherbicide, parasitizes seeds of *orbanches cumana* (Sunflower, Broomrape): a cytological study. Ann Bot. 83: 453-458 .
- Vaucher, J.P. 1827. Monographie des Orobanches. Geneve.
- Vallance, K.B. 1951 Studies on the germination of *Striga hermonthica* III Ann. Bot. 15:109-128.
- Vanlerberghe, G. and McIntosh, L. 1997. Alternatine Oxidase from gene to function . Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol. 48:703-734.
- Velasco, L., Gofman, F.D., Pujadas Salva, A.J. 2000 Fatty acids and tocochromanols in seeds of *Orobanche*. Phytochemistry 54: 295-300.
- Wigchert, S.C.M., Zwanenburg, B 1999. A critical account on the inception of *Striga* seed germination. J Agric Food Chem, 47:1320-1325.
- Whitney P.J. and Carsten C. 1981. Chemotropic response of broomrape radicles to host root exudates. Ann. Bot. 48:919-921.
- Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y (1998) Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. Phytochemistry 49: 1967–1973
- Zehhar, N., Ingouff, M., Bouya, D., Fer, A. 2002 Possible involvement of gibberellins and ethylene in *Orobanche ramosa* germination. Weed Research 42:464-469.
- Zwanenburg, B and. Wigchert, S.C.M. 1998, The Molecular Inception of *Striga* and *Orobanche* Germination. In Current problems of *Orobanche* researches. Proceedings of the Fourth International Workshop on *Orobanche* Research, Wegman, K.; Musselman, L.J.; Joel, D.M., Eds., Albena, Bulgaria, 25-31.