

תכנית מחקר מספר 430-0367-13

תפקיד בקרת וויסות ה-pH בהתקפה וביצור המיקוטוקסין ב-*Penicillium expansum*

**pH signaling in *Penicillium expansum*: a role in pathogenesis**

**and mycotoxin production**

דוח המוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

דב פרוסקי, סיגל הורוביץ, אילנה קובילר,

המחלקה לאחסון,

מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Dov Prusky, Sigal Horowitz, Ilana Kobiler,

Department of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, P.O.B 6 Bet-Dagan.

E-mail: [dovprusk@agri.gov.il](mailto:dovprusk@agri.gov.il)

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא

-----חתימת החוקר

## דו"ח סופי 2013

### ע"י שירי ברד (סטודנטית), אילנה קובילר, דב פרוסקי

1. תקציר..... 3
2. מבוא ומטרות המחקר..... 4
3. פירוט עיקרי הניסויים..... 4
4. סיכום ודיון..... 13

## דו"ח סופי 2013

ע"י שירי ברד (סטודנטית), אילנה קובילר, דב פרוסקי

### תקציר

הפטרייה פניציליום אקספנסום (Pe) הינה פתוגן הרסני הגורם למחלת העובש הכחול במגוון רחב של פירות נשירים לאחר הקטיף ולאורך האיחסון. הפטרייה גורמת להתרככות רקמת הפונדקאי על ידי הפרשה של חומצה גלוקונית (GLA) ומטאבוליטים שניוניים כגון המיקוטוקסין פטולין (PAT). GLA נמצאה כמעורבת בתהליך הפתוגניות אבל לא ידוע מהי תרומתו של PAT להתקפה של Pe. תפקידם של GLA ו-PAT נבדק על ידי יצירת מוטנטים ל-3 גנים בטכנולוגיית ה-RNAi: 1) GOX2-RNAi הפגועים בביטוי הגן GOX2, שהינו הגן החשוב ביותר בתהליך יצירת חומצה גלוקונית ב-Pe. תבדידים אלו מעוכבים ביכולתם להפריש GLA ולתקוף תפוחים. 2) IDH-RNAi הפגועים בביטוי הגן IDH, שהינו אחד הגנים האחרונים בביוסינתזה של פטולין. תבדידים אלו מעוכבים ביכולתם להפריש PAT והתקפת תפוחים אך אינם פגועים ביצירת חומצה גלוקונית. 3) PACC-RNAi הפגועים בביטוי הגן PACC, שהינו פקטור שיעתוק המבקר גנים המתבטאים ב-pH גבוה. תבדידים אלו פגועים גם בביטוי הגנים GOX ו-IDH ולכן מעוכבים ביכולתם להפריש הן GLA והן PAT ובעלי יכולת הדבקה מופחתת. תוצאות אלו מראות כי הגורמים המשפיעים על הפרשת PAT הם לא pH סביבתי נמוך כפי שסברו מחקרים קודמים, אלא ביטוי הגנים GOX ו-PACC שפגיעה בהם מעכבת את הפרשת ה-GLA. אנו מציעים כי הצטברות GLA מווסתת את יצירת ה-PAT כפרקורסור ישיר תחת שינויי pH דינאמיים המשפיעים את פקטור השיעתוק PACC. כתוצאה מכך, משופעלים גם פקטורי פתוגניות נוספים התורמים לאכלוס רקמת הפונדקאי על ידי הפטרייה Pe.

## מבוא

פניציליום אקספנום הינה פטרייה הגורמת למחלת העובש הכחול ותוקפת פירות נשירים לפני ואחרי הקטיפה. אכלוס הרקמה מאופיין ע"י מצרציה נרחבת של הרקמה ויצירה מסיבית של נבגים. בתוך הרקמה הנגועה הפטרייה מיצרת כמויות גדולות של מיקוטוקסין פטולין (PAT) הרעיל לבני אדם ובמיוחד לילדים. במשך תהליך התקפה הפטרייה Pe מפרישה חומצות אורגניות, בעיקר חומצה גלוקונית, הגורמת להחמצה של הפונדקאי המובילה לשפעול של פוליגלקטורונאז פטרייתי הדרוש לאיכלוס של הפונדקאי. סינתזה של GLA על ידי Pe היא תוצאה של חימצון של גלוקוז על ידי גלוקוז אוקסידאז שמקודד על ידי שני גנים (*GOX1* ו-*GOX2*). החמצה של הפונדקאי על ידי הפרשת GLA והצטברות של המיקוטוקסין PAT בזמן האיכלוס מראים על חשיבות של חומרים אלו בפתוגניות של הפטרייה. במחקר זה נחקר את תפקיד הסיגנלים של הפונדקאי בהשראה של שינויי pH, הצטברות GLA, ביוסינתזה של PAT ותרומתם לפתוגניות של Pe. היפותזת העבודה שלנו היא שהחמצה תלויית GLA מבוקרת על ידי פקטור השעתוק המבקר pH – pacC בעל תפקיד חשוב גם בביוסינתזה של טוקסינים. רצף האירועים המתחיל בשינוי pH של הפונדקאי ← תגובת pacC ← הצטברות GLA ← ביוסינתזה של PAT הוא השולט על איכלוס הפונדקאי על ידי Pe. על סמך היפותזה זו המטרות שלנו הן: 1. לאפיין את הרגולציה של GLA וסינתזת ה-PAT על ידי ה-pH ותרומתם לפתוגניות; 2. לזהות את תפקיד pacC ביצירת GLA וביוסינתזה של PAT; 3. לזהות פקטורים מולקולאריים המשפיעים על מסלולים המבוקרים על ידי pacC והדרושים לוירולנטיות מלאה. זיהוי נקודות המפתח בהצטברות של GLA וביוסינתזה של PAT יכולים לתרום לפיתוח שיטות חדשות להפחתה של איכלוס על ידי Pe ועל ידי כך הפחתת הנזק הנגרם לתעשיית הפירות הנשירים.

## **מטרות המחקר**

1. לאפיין את תהליך הבקרה של הצטברות GLA וביוסינתזה של PAT על ידי ה-pH ותרומתו לפתוגניות. 2. לאפיין את תפקיד הרגולטור pacC בהצטברות GLA וביוסינתזה של PAT. 3. לזהות פקטורים מולקולאריים המשפיעים על מסלולים המבוקרים על ידי pacC והדרושים לוירולנטיות מלאה. זיהוי נקודות המפתח בהצטברות של GLA וביוסינתזה של PAT יכולים לתרום לפיתוח שיטות חדשות להפחתה של איכלוס על ידי Pe ועל ידי כך הפחתת הנזק הנגרם לתעשיית הפירות הנשירים. בשנת העבודה הראשונה אפיינו את המערכת על ידי הבנת הביטוי של *GOX* והצטברות ה-GLA. בשנה השנייה למדנו את הקשר בין יצירת GLA ל-PAT. בשנה הזו הבנו מה הקשר בין שני המטאבוליטים ואיך pacC משפיע על שניהם.

## **פירוט עיקרי הניסויים**

### **שינויי pH, הפרשת GLA ו-PAT במהלך ההתקפה של Pe.**

רקמת תפוח המאולחת ב-Pe 5 ימים לאחר הדבקה חולקה ל-4 אזורים: אזור מרכזי (CCT) אשר מראה התחלת הנבגה, איזור ביניים (ICT), חזית התקפה (LECT) ואיזור בריאה (Fig 1A). ריכוז ה-GLA

באיזורים CCT ו-ICT הוא  $2.2-2.6 \text{ g} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$  ויורד באזור LECT לריכוז של  $1.6 \text{ g} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$  בעוד באיזור הבריאה לא הצטברה GLA כלל (Fig 1B). כאשר נבדקה הצטברות הפטולין באיזורים אלו נראה כי ב-CCT וב-ICT קיימת הצטברות גבוהה ( $8.8-9.7 \mu\text{g} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ ) לעומת ה-LECT ( $3.5 \mu\text{g} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ ) ובאזור הבריאה לא התגלה פטולין (Fig 1C). הביטוי היחסי של הגן *IDH*, אחד הגנים האחרונים בסינתזת פטולין, עלה פי 7 באיזור ה-CCT בהשוואה ל-LECT (Fig 1D). בנוסף, ה-pH של הרקמה הבריאה ירד מ-4.2 ל-3.5 ברקמה המאולחת (Fig 1B). כלומר, הפטרייה Pe מפרישה GLA ו-PAT במהלך ההתקפה. הדבר העלה את השאלה מהו המכאניזם שגורם להפרשת כל אחד מהמטאבוליטים ומה תפקידם בפתוגניות. על מנת לבחון את השאלה הזו השתמשנו במוטנטים RNAi של *GOX2* המראים פגיעה בהפרשת GLA ויכולת התקפה מעוכבת.

### המוטנטים *GOX-RNAi* מראים ירידה בביטוי *IDH* ובהצטברות *PAT*.

על מנת להבין את השפעת הצטברות ה-GLA על יצירת PAT ופתוגניות, השתמשנו במוטנטים בעלי ביטוי דיפרנציאלי של *GOX2* המראים יכולות מעוכבות של יצירת GLA ופתוגניות. על מנת לבחון האם יש קשר בין הירידה ב-*GOX2* להפרשת PAT וביטוי *IDH*, תבדד ה-Wild Type (WT) והמוטנטים גודלו על מצע שניוני אגר ב-pH 7 למשך 48 שעות (Fig 2). אנליזה פונקציונלית של המוטנטים *GOX2-RNAi* הראתה ירידה משמעותית בהפרשת GLA וכתוצאה מכך ה-pH של המצע הראה ירידה פחותה יותר לעומת ה-WT. התבדדים TPe<sub>141</sub> ו-TPe<sub>130</sub> מראים ירידה של 50-60% ( $4.4 \text{ g/DW}$ ) ו-3.7, בהתאמה) ביכולת הצטברות ה-GLA וה-pH של המצע ירד מ-7.0 ל-4.3 ו-4.45 בהתאמה, לעומת ה-pH של המצע ב-WT שירד ל-4.12 עם ריכוז GLA של  $8.8 \text{ g} \cdot \text{DW}^{-1}$  (Fig 2A). כמו כן, נצפתה ירידה משמעותית בביטוי *IDH* במוטנטים וכן ביצירת PAT. הירידה המשמעותית ביותר היתה במוטנט TPe<sub>141</sub> שהראה ירידה של פי 10 ביצירת הפטולין במהלך גידול במצע שניוני אגר (Fig 2B,C). תוצאות אלו מראות כי ירידה בביטוי של *GOX2* גורמת לירידה משמעותית ביצירת GLA ו-PAT וכנראה שיצירת PAT תלויה בהפרשת GLA הגורמת לשינויים ב-pH. בנוסף, כאשר נבדקה יכולת ההתקפה של *GOX2-RNAi* נראה כי הירידה ביצירת GLA ו-PAT גורמת לירידה משמעותית ביכולת הפתוגניות של מוטנטים אלו (Fig 2D).

מחקרים קודמים הראו שיצירת חומצה גלוקונית מעוכבת כאשר מגדלים את הפטרייה ב-pH נמוך (4.0). על מנת להבין איך שינויי pH משפיעים על יצירת PAT, ה-WT והמוטנטים *GOX2-RNAi* גודלו במצע שניוני אגר ב-pH התחלתי 4.5 ו-7.0. גידול המוטנטים ב-pH התחלתי 7.0 הראה ירידה משמעותית ביצירת PAT בהתאם לירידה ב-GLA (Fig. 3B). במקרה זה ה-pH של המצע ירד ל-4.0 כמעט בכל המוטנטים. כלומר לאחר 72 שעות, ההצטברות השונה של GLA גורמת להצטברות שונה של PAT וזאת למרות שה-pH הגיע ל-4.0. לעומת זאת, ב-pH התחלתי 4.5, כמויות ה-PAT היו נמוכות בכל התבדדים ולא נראה הבדל כמעט ב-pH המצע (Fig. 3A). ניתן להניח כי לא ה-pH הנמוך אלא הפוטנציאל ייצור GLA הוא שמעודד את יצירת ה-PAT.

**דינמיקה של יצירת PAT ע"י מוטנטים של *goxRNAi* כפונקציה של זמן וביטוי *GOX*.**

השינוי הזמני בירידת ה-pH במוטנטים *GOX2-RNAi* נלמד על מנת להבין מה החשיבות של שינויי ה-pH לעומת הירידה בביטוי של *GOX2* באינדוקציה ליצירת PAT. ה-WT ותבדידי ה-*GOX2-RNAi* גודלו על מצע שניוני אגר ב-pH התחלתי 7.0 למשך 24-72 שעות ונבדקו יכולת ירידת ה-pH והפרשת ה-PAT למצע. ה-WT הראה ירידה ב-pH ל-6.9, 4.3 ו-3.8 לאחר 24, 48 ו-72 שעות בהתאמה (Fig. 4A). הירידה ב-pH לוותה בעלייה משמעותית ביכולת הצטברות הפטולין, כאשר לאחר 24 שעות ה-pH היה עדיין 7.0 וה-PAT  $0.76 \mu\text{g}\cdot\text{DW}^{-1}$  בעוד לאחד 72 שעות, כשה-pH ירד ל-3.8 כמות ה-PAT במצע עלתה ל- $63.1 \mu\text{g}\cdot\text{DW}^{-1}$  במוטנטים *GOX2-RNAi* נצפתה ירידה ביכולת יצירת הפטולין. 24 שעות לאחר אילוח הצלחת, כשה-pH היה עדיין גבוה וכמויות הפטולין שנוצרו ע"י ה-WT היו  $0.76 \mu\text{g}\cdot\text{DW}^{-1}$ , כמויות ה-PAT שנוצרו ע"י המוטנטים הראו ירידה של 20-30% (Fig. 4A). לעומת זאת, 48 שעות לאחר האילוח, כשה-pH ירד ל-4.0 ב-WT ול-4.5 ב- $\text{Tpe}_{141}$ , כמויות ה-PAT שהצטברו היו כמעט פי 10 יותר ב-WT לעומת רק פי 2 יותר במוטנט  $\text{Tpe}_{141}$ . כלומר, קיימת חשיבות לזמן האינקובציה וירידת ה-pH במנגנון יצירת ה-PAT. תבנית דומה נצפתה כאשר נבדקה כמות ה-PAT 72 שעות לאחר אילוח. במקרה זה, ה-pH ירד רק ב-0.4 יחידות והפטולין עלה פי 10 ב-WT בעוד המוטנטים הראו עיכוב בעליית יצירת הפטולין. תוצאות אלו מרמזות שייצירת ה-PAT הנמוכה יותר ב-*GOX2-RNAi* תלויה בעיקר בירידה בביטוי של *GOX2*. השינוי ב-pH בין 48 ל-72 שעות היה רק 0.4 יחידות לעומת פי 10 יותר ביצירת ה-PAT ע"י ה-WT שוב מרמז שכנראה לא ה-pH עצמו הוא הגורם העיקרי המשפיע על יצירת פטולין.

מחקרים קודמים הראו כי גלוקוז הינו הפרקורסור העיקרי ליצירת PAT. גידול הפטרייה Pe בריכוזי גלוקוז הולכים ועולים (25-50mM) במצע שניוני מבופר בבופר פוספאט 0.2M ב-pH 7.0 (Fig. 5A-C) הראה הצטברות גבוהה של GLA בכל הריכוזים לאחר 48 שעות ולאחר 24 שעות נוספות נצפתה הצטברות גבוהה של PAT עם ירידה בריכוז ה-GLA. העלייה בריכוז ה-PAT לוותה גם באקטיבציה של הגן *IDH*. ממצאים אלו ומחקרים קודמים מציעים כי GLA יכול לעבור מטאבוליזה לפטולין דרך מעגל הגליקוליזה. על מנת לתמוך בהשערה זו, ה-WT גודל בנוכחות GLA כמקור פחמן יחיד במצע מבופר למשך 72 שעות. ה-GLA נצרכה בתנאים אלו (Fig. 5A) ועברה מטאבוליזם ל-PAT (Fig. 5B) דרך אקטיבציית הביטוי של *IDH* (Fig. 5C). גידול ה-WT בנוכחות סוכרוז כמקור פחמן יחיד גרם ליצירת פטולין גבוהה פי 10 מאשר בתנאים דומים בנוכחות גלוקוז (תוצאות לא מופיעות). כלומר, GLA וסוכרים אחרים מעודדים יצירת PAT ביעילות שונה.

### הקשר בין PAT ופתוגניות

מחקרים קודמים הראו שתהליך ההחמצה של הפרי המאכסן על ידי הצטברות של GLA מעודדים ביטוי גבוה של *Pepg1* ב-Pe ועל ידי כך עלייה ביכולת ההתקפה והאכלוס של הפרי על ידי הפטרייה. הממצאים במחקר זה מראים כי מוטנטים *GOX2-RNAi*, המציגים פתוגניות פחותה מה-WT, פגועים ביכולתם לייצר GLA ו-PAT. התוצאות הללו העלו את השאלה האם PAT תורם לפתוגניות של Pe. על מנת לענות על שאלה זו, פיתחנו מוטנטים *IDH-RNAi* (Fig. 6A). בודדו 87 טרנספורמנטים העמידים להיגרומיציין והביטוי של *IDH* נבדק לאחר 48 שעות מההעברה למצע שניוני ב-pH 7.0.

אנליזה פיזיולוגית של המוטנטים *IDH-RNAi* הראו גידול והנבגה דומה ל-WT כאשר הם גודלו על PDA. הטרנספורמנטים אומתו על ידי PCR למציאת הגן לעמידות היגרומיצין (Fig. 6B). בדיקת יצירת GLA וירידת pH לא הראתה הבדלים בין ה-WT ותבדיד הביקורת, שמכיל פלסמיד ללא הגן *IDH*, למוטנטים *IDH-RNAi* TPe<sub>17</sub> ו-TPe<sub>77</sub> (Fig. 6D). לעומת זאת, התבדידים המוטנטים הראו ירידה של 87.5% ביצירת ה-PAT (Fig. 6E). אנליזה של יכולת ההתקפה של התבדידים TPe<sub>17</sub> ו-TPe<sub>77</sub> הראתה עיכוב של 28% ו-12% בהתאמה (Fig. 6F). כלומר, ה-PAT תורם גם לפתוגניות של הפטרייה Pe. היכולת של PAT לעודד מוות תאים ובכך לתרום לאיכלוס של הפטרייה נצפתה כאשר תפוח טופל בריכוזי פטולין 50 ו-100 µg/ml. התוצאות מוכיחות כי המוות התאי עלה פי 3-4 ברקמת תפוח כתוצאה מהטיפול ב-PAT (Fig. 7).

**ויסות דיפניציאלי של הצטברות GLA ו-PAT ויכולת התקפה ע"י מוטנטים של *PACC-RNAi***  
 הביטוי היחסי של הגנים *PACC*, *GOX2* ו-*IDH* נבדק במצע מעודד יצירת GLA ב-pH 4.0 ו-7.0 על מנת לאשר את הקשר בין pH להצטברות GLA ו-PAT. ב-pH 7.0 יש ביטוי גבוה ב-3 הגנים לעומת 4.0 pH (Fig. 8). תוצאות אלו מראות כי יש תלות בתנאים בסיסיים לאקטיבציה של *GOX2* ו-*IDH* לצורך ייצור GLA ו-PAT.

מאחר ו-*PACC* הינו פקטור שיעתוק המבקר את pH הסביבה, השתמשנו שוב בשיטת ה-RNAi ליצירת מוטנטים *PACC-RNAi* (Fig. 9A). בודדו 120 טרנספורמנטים עמידים להיגרומיצין ונבדק ביטוי הגן *PACC* במצע SM ב-pH 7.0 לאחר 3 שעות. נמצאו 2 מוטנטים TPe<sub>34</sub> ו-TPe<sub>109</sub> שהראו ירידה משמעותית ביותר בביטוי היחסי של *PACC* ואומתו להמצאות הגן לעמידות לאנטיביוטיקה היגרומיצין באמצעות PCR (Fig. 9B). אנליזה פיזיולוגית של המוטנטים TPe<sub>34</sub> ו-TPe<sub>109</sub> שגודלו על מצע SM ב-pH 7.0 הראתה שקיימת ירידה בביטוי הגן *PACC* ב-72% וב-44% בהתאמה לעומת ה-WT ותבדיד הביקורת (Fig. 9C). הירידה בביטוי הגן *PACC* גרמה ל-TPe<sub>34</sub> ו-TPe<sub>109</sub> להפחית את יכולת ההתקפה שלהם ב-46% ו-40% בהתאמה, 5 ימים לאחר אילוח תפוחי Golden delicious (Fig. 9F). בנוסף, המוטנטים הראו ירידה בהצטברות ה-GLA ב-63% וב-27% בהתאמה (Fig. 9D) והפחתה בייצור PAT ב-92% ו-95% בהתאמה 48 שעות לאחר אילוח מצע SM מוצק ב-pH 7.0 (Fig. 9D). התוצאות מראות כי בעוד הפחתה בביטוי *IDH* רק מפחיתה את יכולת ייצור ה-PAT ללא השפעה על רמות ה-GLA, הפחתה בביטוי *GOX2* מפחיתה הן את הצטברות ה-PAT והן ה-GLA ובעלת השפעה אדטיבית על יכולת ההתקפה של המוטנטים הללו.

**TABLE 1.** – זני פניציליום אקספנסום ששימשו למחקר זה

Strain <sup>a</sup>	Genotype	Source
Pe-21	Wild type <i>P. expansum</i>	Hadas et al. (2007)
<i>gox1:gox2RNAi</i> strains: TPe <sub>130</sub> ; TPe <sub>141</sub> ; TPe <sub>114</sub> ;	<i>RNAi gox1: gox2:hygR</i>	This study

TPe <sub>116</sub>		
<i>IDH</i> -RNAi strains:	<i>RNAi idh:hygR</i>	This study
TPe <sub>17</sub> ; TPe <sub>77</sub>		
PACC-RNAi strains:	<i>RNAi pacC:hygR</i>	This study
TPe <sub>34</sub> ; TPe <sub>109</sub>		
ps6 – control strain	<i>RNAi hygR</i>	This study

---

<sup>a</sup>Strains starting with "T" are original transformants.



Fig.1

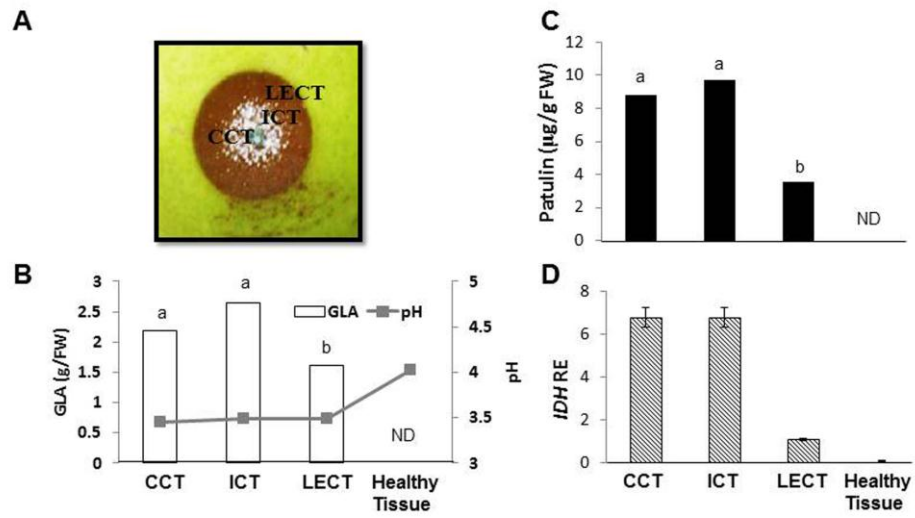


Fig.2

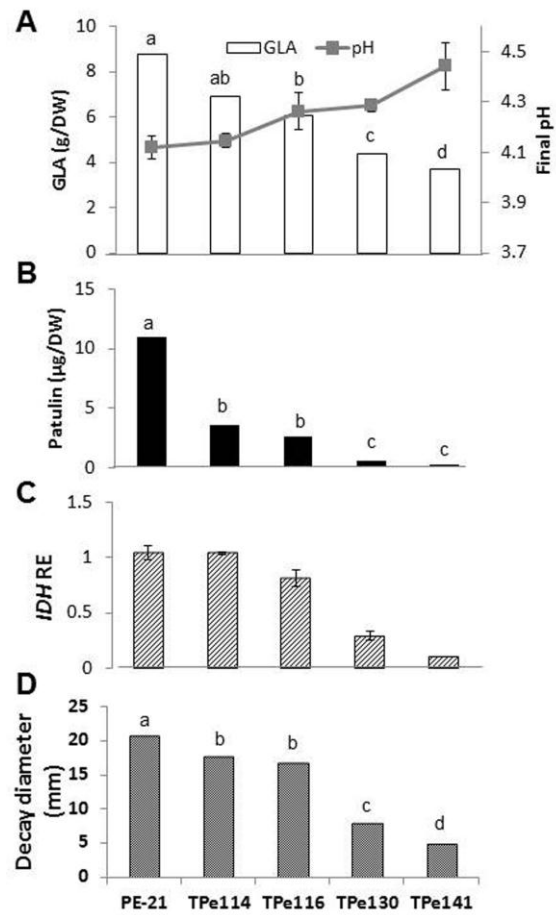


Fig.3

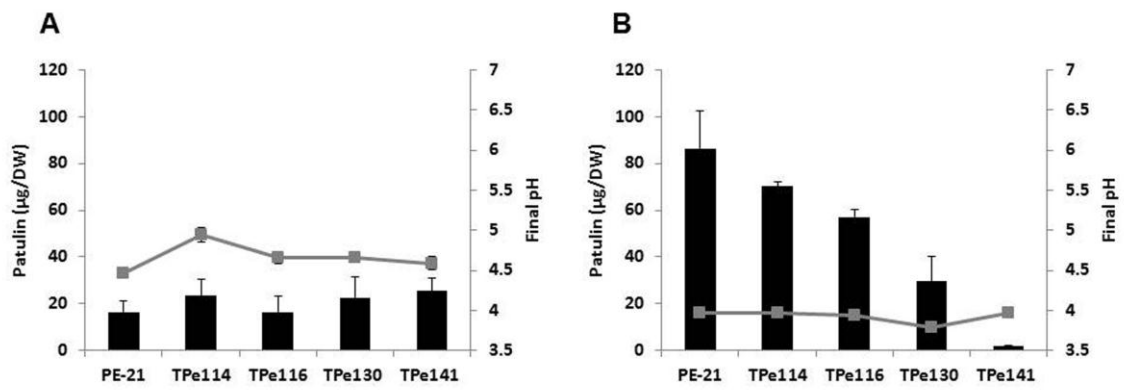


Fig.4

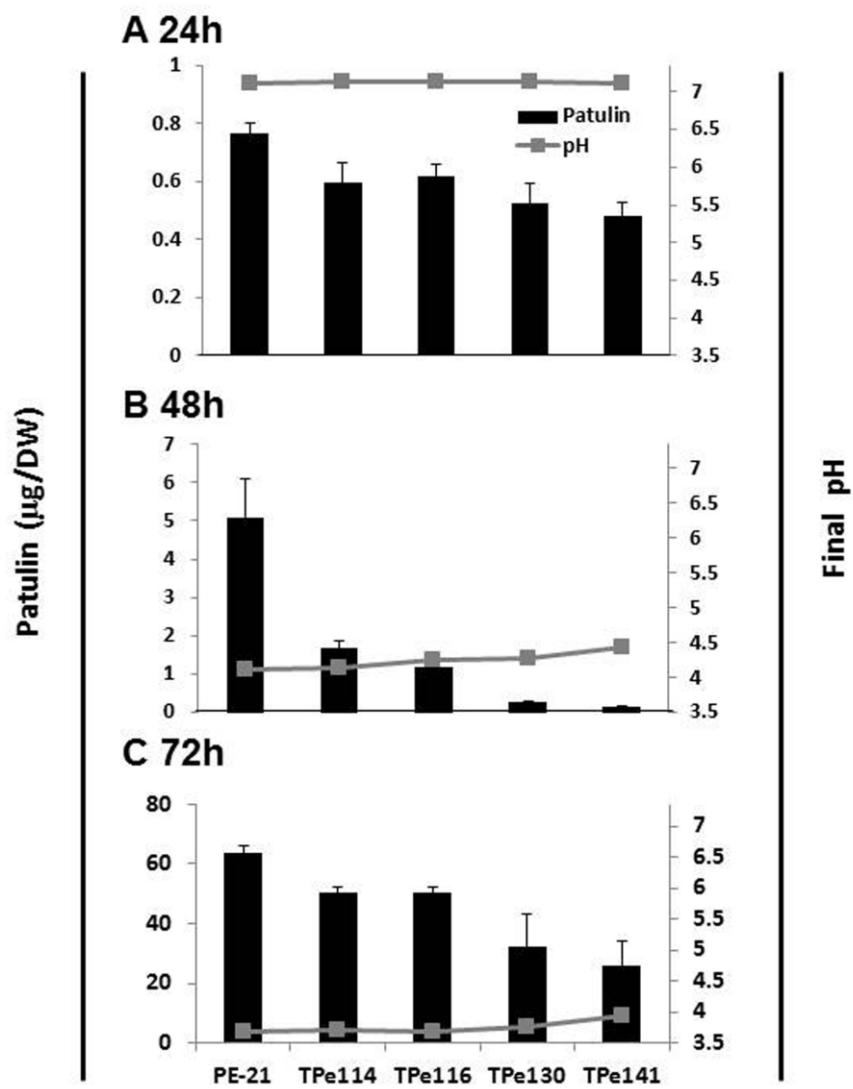


Fig. 5

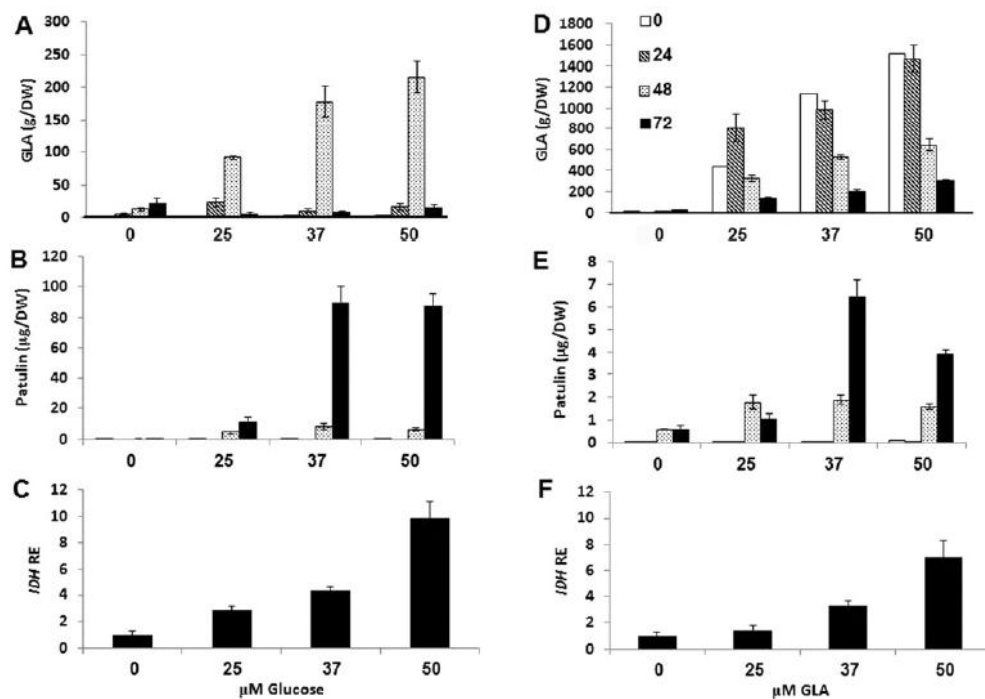


Fig. 6

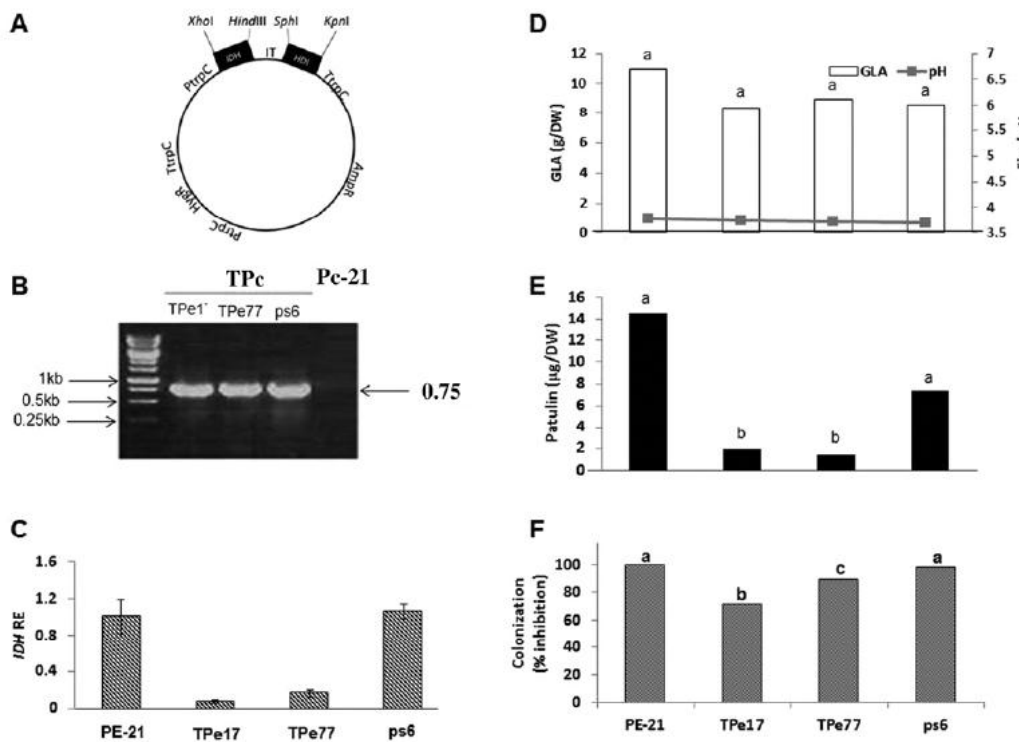


Fig. 7

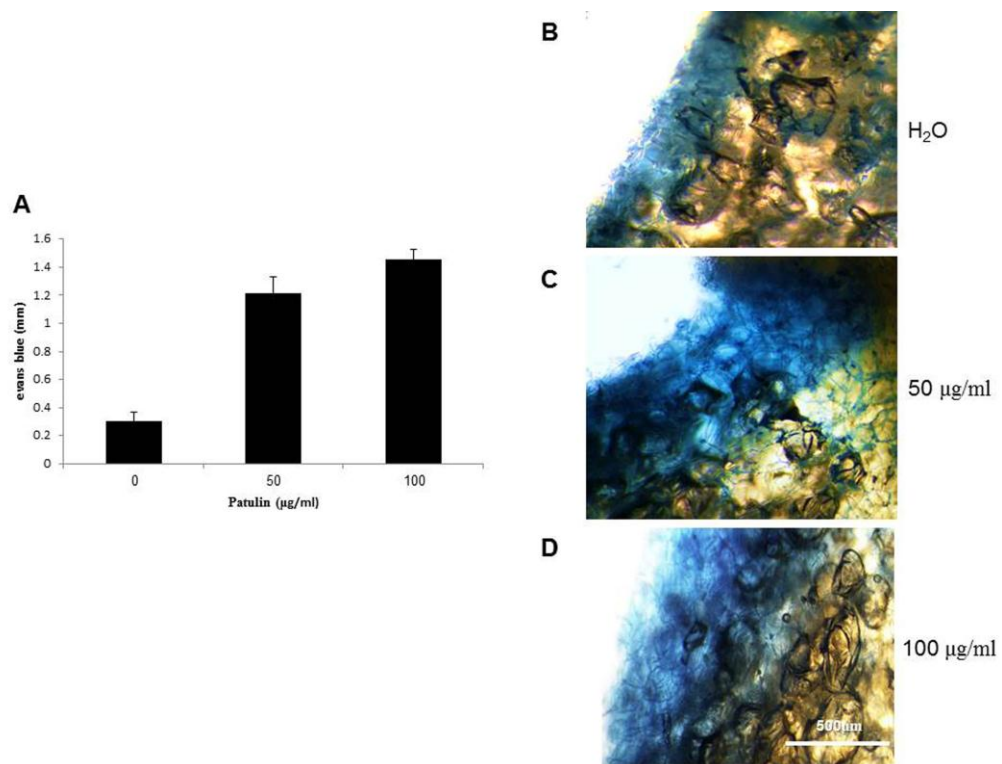


Fig. 8

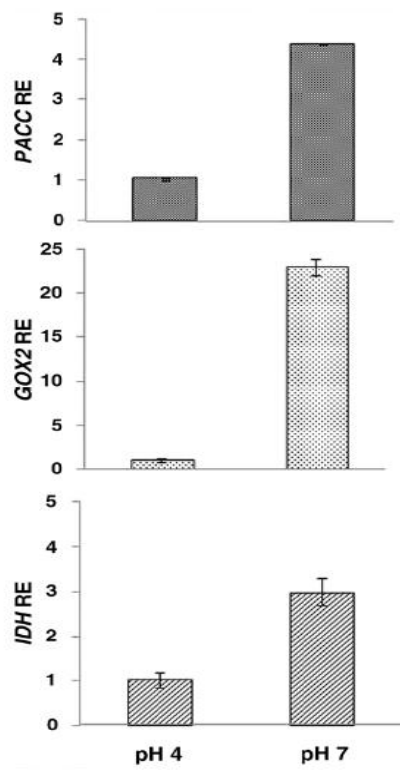
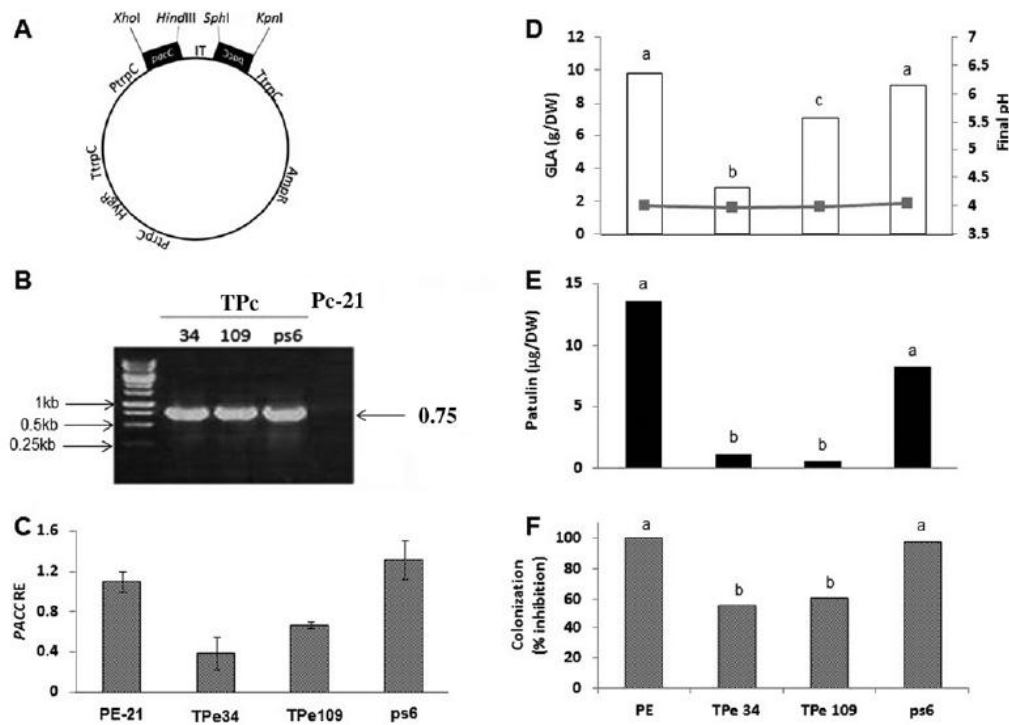


Fig. 9



## סיכום ודיון

- הפטרייה פניציליום אקספנסום מפרישה חומצה גלוקונית וכך גורמת לירידת pH ומפרישה את המיקוטוקסין פטולין בזמן ההתקפה ובזמן גידול התפטיר.
- *GOX2* הינו בעל חשיבות עיקרית בתהליך ההתקפה וביצירת חומצה גלוקונית.
- יצרנו 4 תבדידים בשיטת RNAi, הפגועים במשפחת *GOX* אשר הראו ירידה בהצטברות החומצה הגלוקונית, הפחתה בפתוגניות וכן פגיעה ביכולת יצירת ה-PAT.
- יכולת הצטברות ה-PAT תלויה ככל הנראה בפוטנציאל הירידה של ה-pH ע"י הפרשת חומצה גלוקונית ולא ב-pH הנמוך עצמו.
- סוכרים שונים יכולים להוות פרקורסורים ליצירת PAT ביעילות שונה.
- הצטברות GLA בשלבי התקפה ראשונים מאפשרת יצירה של פטולין מאחר ומהווה פרקורסור ליצירתו.
- PAT תורם לפתוגניות של הפטרייה Pe ע"י גרימת מוות תאי לתאי הפונדקאי.
- התרומה של PAT לפתוגניות משופעלת ע"י עלייה בכמות ה-GLA.
- פקטורים הקשורים לפתוגניות (PAT ו-GLA) מבוקרים על ידי פקטור השעתוק *PACC*.

**רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים**

- Barad, S., Horowitz, S., Sherman, L., and Prusky, D. 2012. *Penicillium expansum* glucose oxidase-encoding gene, *gox2*, is essential for gluconic acid production and acidification during colonization of deciduous fruits. *Molecular Plant Microbe Interaction*: 25:779-788.
- Barad, S., Kobilier, I., Horowitz, S., Sherman, A., and Prusky, D., 2014. Accumulation of the Mycotoxin Patulin in the Presence of Gluconic Acid Contributes to Pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27:66-77**.

### 3. טופס סיכום עם שאלות מנחות

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

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

**הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
לאפיין את תהליך הבקרה של הצטברות GLA וביוסנתזה של PAT על ידי ה-pH ותרומתו לפתוגניות
לאפיין את תפקיד הרגולטור pacC בהצטברות GLA וביוסנתזה של PAT
לזהות פקטורים מולקולאריים המשפיעים על מסלולים המבוקרים על ידי pacC והדרושים לוירולנטיות מלאה
עיקרי הניסויים והתוצאות.
<ul style="list-style-type: none"> <li>הפטרייה פניציליום אקספנסום מפרישה חומצה גלוקונית וכך גורמת לירידת pH ומפרישה את המיקוטוקסין פטולין בזמן ההתקפה ובזמן גידול התפטיר.</li> <li><i>GOX2</i> הינו בעל חשיבות עיקרית בתהליך ההתקפה וביצירת חומצה גלוקונית.</li> <li>יצרנו 4 תבדידים בשיטת RNAi, הפגועים במשפחת <i>GOX</i> אשר הראו ירידה בהצטברות החומצה הגלוקונית, הפחתה בפתוגניות וכן פגיעה ביכולת יצירת ה-PAT.</li> <li>יכולת הצטברות ה-PAT תלויה ככל הנראה בפוטנציאל הירידה של ה-pH ע"י הפרשת חומצה גלוקונית ולא ב-pH הנמוך עצמו.</li> <li>סוכרים שונים יכולים להוות פרקורסורים ליצירת PAT ביעילות שונה.</li> <li>הצטברות GLA בשלבי התקפה ראשונים מאפשרת יצירה של פטולין מאחר ומהווה פרקורסור ליצירתו.</li> <li>PAT תורם לפתוגניות של הפטרייה Pe ע"י גרימת מוות תאי לתאי הפונדקאי.</li> <li>התרומה של PAT לפתוגניות משופעלת ע"י עלייה בכמות ה-GLA.</li> <li>פקטורים הקשורים לפתוגניות (PAT ו-GLA) מבוקרים על ידי פקטור השעתוק <i>PACC</i>.</li> </ul>
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
<ul style="list-style-type: none"> <li>הפטרייה פניציליום אקספנסום מפרישה חומצה גלוקונית בזמן ההתקפה ובזמן גידול התפטיר וכך גורמת לירידת pH. הפטרייה גם מפרישה מיקוטוקסין פטולין במהלך ההתקפה. תבדידים הפגועים ביצירת חומצה גלוקונית מראים ירידה משמעותית ביכולת הפרשת הפטולין ובהתקפה. הפטרייה מייצרת פטולין כפונקציה של pH וזמן.</li> </ul>

בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
-
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: <b>פרסומים בכתב</b> - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; <b>פטנטים</b> - יש לציין שם ומס' פטנט; <b>הרצאות וימי עיון</b> - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p> <p>Barad, S., Horowitz, S., Sherman, L., and Prusky, D. 2012. <i>Penicillium expansum</i> glucose oxidase-encoding gene, <i>gox2</i>, is essential for gluconic acid production and acidification during colonization of deciduous fruits. <i>Molecular Plant Microbe Interaction</i>: 25:779-788.</p> <p>Barad, S., Kobiler, I., Horowitz, S., Sherman, A., and Prusky, D., 2014. Accumulation of the Mycotoxin Patulin in the Presence of Gluconic Acid Contributes to Pathogenicity of <i>Penicillium expansum</i>. <i>Molecular Plant-Microbe Interactions</i> 27:66-77.</p>
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) <
חסוי – לא <
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

\*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים