

דוח לתוכנית מחקר מספר 132-1364-08

**חיפוש אחר סמנים מולקולאריים לעמידות בפני מחלת כתמי חלפת (אלטרנריה)
בהדרים**

A quest for molecular markers for resistance to Alternaria brown spot disease in citrus

מוגש לקרן המדען הראשי, משרד החקלאות

מוגשת על ידי:

עזרא דוד

המחלקה לפתולוגיה של צמחים, וירולוגיה ומדע העשבים,

וניר כרמי

המחלקה לעצי פרי, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן

David Ezra, Department of Plant Pathology and Weed Research, ARO, the Volcani Center,
P.O.Box 6 Bet Dagan, 50250 Israel; dezra@volcani.agri.gov.il

Carmi Nir, Fruit Tree Sciences, ARO, the Volcani Center, P.O.Box 6 Bet Dagan, 50250
Israel; vhncarmi@volcani.agri.gov.il

יולי 2011

סיוון תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/ לא

חתימת החוקר _____:

הצגת הבעיה:

מחלת כתמי הינה אחת המחלות החשובות בהדרים בישראל ובעולם. גורם המחלה, הפטרייה *Alternaria alternata*, מפרישה רעלן ייחודי וגורמת להופעת נקודות נקרוטיות שחורות-חומות בפרי ועלים של זנים רגישים. הרעלן נמצא מקושר עם דליפת אלקטרוליטיים מהרקמה הפגועה, בנוסף מעריכים שהרעלן נקשר לממבראנת התא כשאתר המטרה שלו הוא חלבון בממבראנת התא. חשיבות המחלה בזנים ההיברידיים של אשכולית ומאנגארין גדולה למגדלים שכן עיקר הפגיעה היא בפרי, פגיעה הפוסלת אותו לשיווק. האמצעי היחיד להתמודדות והדברת המחלה הוא הדברה כימית המיושמת 8 עד 12 פעמים בשנה. דרך אפשרית נוספת להתמודד עם המחלה, בדרך "ירוקה" יותר, היא על ידי פיתוח זני הדרים עמידים למחלה. אנו מציעים לפתח סמנים גנטיים לעמידות למחלה.

היפותזת העבודה שלנו היא שניתן להשתמש בגנים צמחיים כסמנים גנטיים שיאפשרו לנו לזהות צמחים בעלי פוטנציאל לעמידות/רגישות למחלה זאת על ידי זיהוי הגנים שתוצריהם באים באינטראקציה עם הרעלן הספציפי למחלה או על ידי חיפוש גנים לעמידות הייחודיים לצמחים לא רגישים.

מטרות המחקר ושיטות עבודה: 1. שימוש ברעלן כמלכודת לחלבונים צמחיים הנקשרים אליו בתהליך הפתוגנוזה בצמח. לכידה זו של חלבונים תבוצע על ידי שימוש בטכנולוגיית ה-Three Hybrid System. הגנים לחלבונים אלה ישמשו כסמנים גנטיים לרגישות למחלה. 2. שימוש בגישה מבוססת PCR לבידוד גנים לעמידות למחלות בהדרים ודרכם לזהות את הגנים הקשורים לעמידות למחלת החלפת ולהשתמש בהם כסמנים גנטיים לסלקציה של זנים חדשים.

תוצאות עיקריות לתקופת המחקר: במסגרת עבודה זו נבנתה ספריית cDNA שמקורה בצמח רגיש (מינאולה) שובטה לפלסמיד הנושא את חלקו האחד של מערכת ה-THS, וזה הוחדר לשמר המכיל את חלקו השני של ה-THS בגנום שלו. בצענו הגברה ואנליזה לזנים רגישים ועמידים למציאת R-Genes הסריקה בוצעה על DNA גנומי ו-cDNA שהופק מצמחים שהודבקו בפתוגן. שימוש ב-cDNA נועד לצמצם את מספר המקטעים לאלה המתבטאים במהלך ההתקפה בלבד, וזאת לאחר שמספר המקטעים שהתבטאו ב-DNA גנומי היה גדול מכדי שניתן יהיה ללמוד ממנו לגבי הביטוי השונה בזנים השונים. קישור הטוקסין למולקולה המקשרת נתקל בקשיים היות והטוקסין שבידנו מגלה תכונות שונות משל זה המפורסם בספרות. הטוקסין בודד נוקה ונעשו נסיונות מרובים הכוללים שימוש ב-LC/MS ו-NMR בכדי לאפינו ולקבוע את המבנה שלו אך עד כה אין בידנו מבנה כימי של החומר הפעיל ביולוגית המופרש מהפטרייה שלנו. ברמת ה-cDNA נמצאו מספר תוצרי PCR יחודיים לצמחים עמידים לעומת רגישים אך בבחינתם לשמש כסמנים על DNA ו-cDNA מהדרים שונים התברר כי הם לא ספציפים לזנים העמידים בלבד. בשנת המחקר האחרונה ניסינו להשתמש בשיטה מבוססת PCR נוספת במטרה למצוא את הגנים המתבטאים בזנים הרגישים ברקמות הצעירות ושאינם מתבטאים ברקמות הבוגרות שיטה זו הנקראת Suppression Subtractive Hybridization והמגבירה את אותם רצפי DNA הנמצאים רק בעלים צעירים או בוגרים ברמת ה-cDNA (תלוי בהחלטה של החוקר). בשיטה זו הצלחנו למצוא מספר גנים המוגברים באופן בולט בעלים צעירים ואינם מופיעים בעלים בוגרים.

מסקנות: לאחר שלוש שנים בהן נתקלנו במספר ממצעים שחייבו אותנו לשנות את מרכז העבודה ולנסות לפתור בעיות שיאפשרו לנו להמשיך בתוכנית המקורית או יכולים לסכם שישנה עוד עבודה רבה באפיון הטוקסין של הפטרייה הפעילה בארץ, רק לאחר אפיון המולקולה נוכל להחליט האם להמשיך בנסיון המקורי ולהשתמש בשיטת ה-THS או לחפש דרכים אחרות להשגת המטרה. מבחינת האפשרות למצוא רצפים המקושרים לגנים של עמידות בזנים העמידים לא הצלחנו למצוא בדרך שבחרנו רצפים שיוכלו לשמש כסמנים לעמידות אבל אנו מתכוונים להמשיך גם בתום התוכנית הנוכחית לחפש גנים המתבטאים ברקמות צעירות רגישות אך לא ברקמות בוגרות עמידות בכדי לנסות ולהבין את מנגנון הפעולה ביחסים המולקולאריים בן הפטרייה לפונדקאי שלה.

מחלת כתמי חלפת הינה אחת המחלות החשובות בהדרים בישראל ובעולם. מחלה זו התגלתה לראשונה באוסטרליה בראשית המאה העשרים וכישראל בשנות השמונים [1, 2]. מאז גילויה לראשונה, התפשטה המחלה לארצות מגדלות הדורים נוספות ולאחרונה נמצאה גם בברזיל, ארגנטינה וספרד [3, 4]. מחלת החלפת בהדרים נחשבת לאחת המחלות בעלות פוטנציאל גרימת הפסד כלכלי מהגדולות בענף, מרבית זני ההדרים הנפגעים הינם קליפים ואשכוליות המשווקים לשוק המקומי ומיוצאים לשוק האירופי ומזרח אסיה [5]. גורם המחלה, הפטרייה *Alternaria alternata* תוקפת את העלים והפירות של זנים רגישים. פרי שנפגע בשלבי החנטה או בשלבי ההתפתחות הראשונים שלו נושר. הפגיעה בפרי בשלבים מאוחרים יותר מתבטאת בהופעת כתמים שחורים-חומים על הפרי, כתמים אלה פוגעים באיכות הפרי באופן המונע את ייצואו. לעיתים הפגיעה היא כל כך חמורה שהפרי נפסל לשיווק גם לשוק המקומי [1]. על העלים הנפגעים מופיעים בשלב הראשוני נקודות חומות שחורות המתרחבות ויוצרות הילה צהובה. מאוחר יותר העלה מצהיב כולו ונושר. פגיעה קשה בעלים עלולים לגרום לעץ כולו לאבד ממסת העלים שלו במהירות ובכך להשפיע על כושר הנשיאה שלו ועל התפתחות הפרי ואף לנשירתו [1, 4]. שני גזעים של הפטרייה מחוללים את מחלת הכתמים החומים בהדרים האחד ספציפי ללימון גם (rough lemon) (*C.jambhiri*) וראנגפור ליים (*rangpur lime (C.limonia Osbeck)*), במקרה זה חשיבותה והשפעתה של המחלה היא בעיקר במשתלות לעצים המיועדים לשמש כקנות לזנים אחרים [1, 6]. גזע שני ספציפי לטאנגריין, אשכולית והיברידיים שלהם (*tangerines, grapefruit (C.paradisi Macf.)*). ספציפיות זו, מתברר, נובעת מהימצאותם של שני רעלנים שונים המאפשרים את התרחשות המחלה בזנים המתאימים בלבד [1, 6, 7]. הרעלן המיוצר על ידי הגזע התוקף לימון גם (ACR) פועל על חלבונים הקשורים למיטוכונדריות של צמח הפונדקאי ובדרך זו מונע חמצון זירחוני במיטוכונדריה (uncoupling of oxidative phosphorylation) דבר הגורם לשינוי בפוטנציאל הממברנה של המיטוכונדריה ועקב כך לקריסתה ואי תפקודה [8, 9]. האפקט של הרעלן המקושר לפגיעה בזני טאנגריין (ACT) נמצא מקושר עם דליפת אלקטרוליטיים מהרקמה הפגועה, בנוסף נמצא שהרעלן נקשר לממברנת התא ולכן מעריכים כי אתר המטרה שלו הם חלבונים בממברנת התא [4, 7]. חשיבות המחלה בזנים ההיברידיים של אשכולית וטאנגאריין גדולה יותר למגדלים שכן עיקר הפגיעה היא בפרי, פגיעה הפוסלת אותו לשיווק. כיום, האמצעי היחיד להתמודדות והדברת המחלה הוא הדברה כימית המיושמת 8 עד 12 פעמים בשנה. דרך אפשרית נוספת להתמודדות עם המחלה, בדרך "ירוקה" יותר, היא על ידי פיתוח זני הדורים עמידים למחלה. כיוון שהרעלנים ההכרחיים להתקיימות המחלה, אופיינו מבחינה מולקולארית וביוכימית ואתר המטרה שלהם ידוע,

אנו מציעים לפתח סמנים גנטיים לעמידות למחלה על בסיס ידע זה. מהמפורסם בספרות, ידוע כי הרעלן ACT הינו מולקולה בעלת מבנה המכיל שרשרת פחמנים, חמצנים, חנקן ומימנים. התנאים לבידוד מולקולת הרעלן ממצעי מזון עליהם גדלה הפטרייה ידועים ובוצעו בעבודות שונות בהם אופיין ונחקר הרעלן [7, 10]. כיוון שרעלן זה הינו מולקולה קטנה ולא חלבונית, זיהוי החלבונים הבאים באינטראקציה עם הרעלן בטכנולוגית ה-Yeast Two hybrid system, המשמשת לזיהוי אינטראקציה בן שני חלבונים, בלתי אפשרי. לעומת זאת השימוש בטכנולוגית Yeast Three hybrid system (Y3S) שהינה פיתוח של ה Two hybrid system מתאימה לבירור האינטראקציה של מולקולה זו עם חלבונים בתא הצמח [11, 12]. ב-Y3S מחברים את המולקולה הקטנה (הרעלן) לנשא (ליגנד ידוע), בעזרת מולקולה מקשרת (קישור קוולנטי), המגיב עם רצפטור המאוחה לחלק אחד של מערכת הדיווח (bait) בעוד החלק השני של מערכת הדיווח מחובר לחלבונים שונים המתקבלים באיחוי של ספריית גנים מצמח המטרה (prey). בהתקרבות שני חלקי המערכת בעקבות אינטראקציה המתרחשת בן המולקולה הקטנה לחלבון מתקבלת תגובת צבע. תגובת צבע זו מורה לנו על אפשרות שהגן הספציפי המשובט בפלסמיד הנבחן, מקודד לאחד החלבונים אותם אנו מחפשים (פירוט נוסף בפרק שיטות המחקר בהמשך) [11, 12]. דרך נוספת לגילוי גנים לעמידות כנגד גורמי מחלות היא על ידי שימוש במערכת המבוססת על סריקה בעזרת PCR. בשיטה זו, על בסיס השוואת גנים המקודדים לגני התנגדות (resistance genes-R genes) מצמחים שונים, נמצאו אזורים שמורים בחלק ה-C-terminal וה-N-terminal. אזורים אלה שימשו לתכנון מספר סטים של פרימרים האמורים לבצע הגברה על בסיס הטרולוגי של גנים דומים בעלי פונקציונאליות בעמידות הצמח כנגד פתוגנים שונים [13-16]. השוואה של תוצרי הגברה כאלה שיתקבלו ממספר זני הדרים עמידים למחולל המחלה ולעומתם הגברה ממספר זני הדרים רגישים למחלה יאפשרו לנו למצוא תוצרי PCR המופיעים בכל הזנים העמידים אך לא מופיעים בזנים הרגישים וההפך. תוצרי הגברה אלה עשויים להיות הגנים אותם אנו מחפשים. תוצרים אלה יבחנו כגלאים להיברידיזציות ולשימוש ברצף הנוקליאוטידים לתכנון פרימרים ספציפים שישמשו לראקצית PCR על זני הדרים שעמידותם ידועה למחלה. רק אותם תוצרי PCR שיראו התאמה חד משמעית לעמידות המחלה יוכלו לשמש כסמן לעמידות. מערכת זו שימשה בעבר לגילוי R- genes בהדרים. בעבודה שבוצעה על ידי Deng וחבריו [17] הצליחו החוקרים לשבט באמצעות טכנולוגיה זו 39 רצפים שונים כש 30 מתוכם הראו הומוולוגיה לרצפי R-Genes ידועים מצמחים אחרים. מתוך רצפים אלה זיהו החוקרים שני גנים ידועים לעמידות מהדרים: האחד כנגד וירוס הטריסטזה (*Ctv*) והשני כנגד נמטודות (*Tyr1*).

היפותזת העבודה שלנו בעניין זה היא שניתן להשתמש בגנים צמחיים כסמנים גנטיים שיאפשרו לנו לזהות צמחים בעלי פוטנציאל לעמידות כנגד המחלה וזאת על ידי זיהוי הגנים הבאים באינטראקציה עם הרעלנים הספציפיים למחלה או על ידי חיפוש גנים לעמידות הייחודים לצמחים לא רגישים.

דרך נוספת לגילוי ההבדלים בין זנים רגישים לעמידים או לזיהוי ההבדלים המולקולאריים המתבטאים בשלב רגיש (עלים/רקמה צעירה) לעומת שלב לא רגיש (עלים/רקמה בוגרת) היא השימוש בטכנולוגיה מבוססת PCR הנקראת [20] Suppression Subtractive Hybridization. מסתבר כי עלים ורקמה צעירה רגישים לטוקסין המופרש על ידי הפטרייה הפתוגנית בעוד עלים ורקמה בוגרת (חוץ מפירות) לא מראים סימפטומים של המחלה, ואף על אותו עץ. בעזרת הטכנולוגיה המתוארת, בה מבצעים הפחתה של הרצפים המשותפים בשני המצבים הפסיולוגיים של עלים, מזהנים רגיש אפשר על ידי היברידיזציה זו לבודד את אותן מולקולות cDNA הנמצאים רק ברקמה הצעירה אך לא נמצאים ברקמה הבוגרת וההפך. שיטה זו שימשה בהצלחה בעבר בעבודות רבות שפורסמו בספרות המקצועית כולל בהדרים [21-23].

מטרות המחקר לתקופת הדוח הן:

שימוש ברעלן כמלכודת לחלבונים צמחיים הנקשרים אליו בתהליך הפתוגנזה בצמח.

- ניקוי והפקת הרעלן מתרביות רקמה על פי עבודות קודמות
 - שימוש ב אנליזת LC/MS ו-NMR לקביעת מבנה הטוקסין והרכבו.
 - וקישורו למולקולה המקשרת
- שימוש בגישה מבוססת PCR לבידוד גנים לעמידות למחלות בהדרים
- הגברת רצפים ספציפיים ל R Genes מגנום הצמחים השונים, והשוואתם.
 - הפקת total RNA מזנים עמידים ורגישים, יצירת cDNA והגברת רצפים ספציפיים ל R Genes מהצמחים השונים, והשוואתם.
 - שימוש בשיטת ה Suppression Subtractive Hybridization להגברת ובידוד cDNA המבוטא ברקמה צעירה ולא ברקמה בוגרת וההפך.

דוח זה מתאר את התוצאות של עבודה זו, רוב השיטות והחומרים תוארו בעבר בדוחות השנתיים ובהצעת המחקר ומפאת הגבלת אורך הדוח, לא יתוארו בדוח מסכם זה.

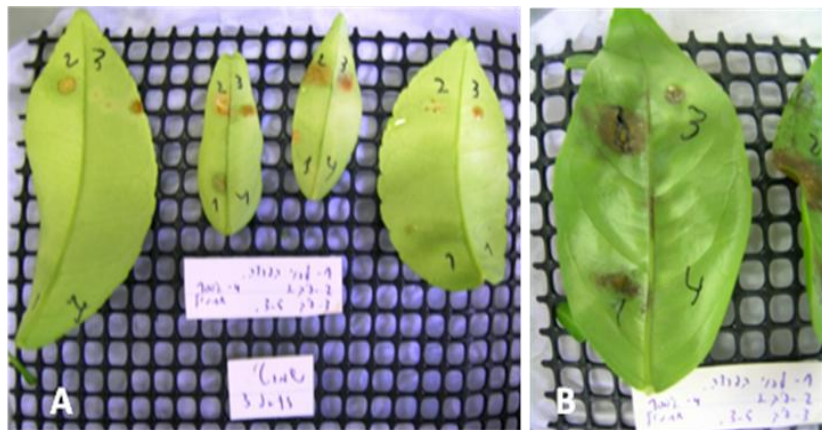
תוצאות

שימוש ברעלן כמלכודת לחלבונים צמחיים הנקשרים אליו בתהליך הפתוגנזה בצמח.

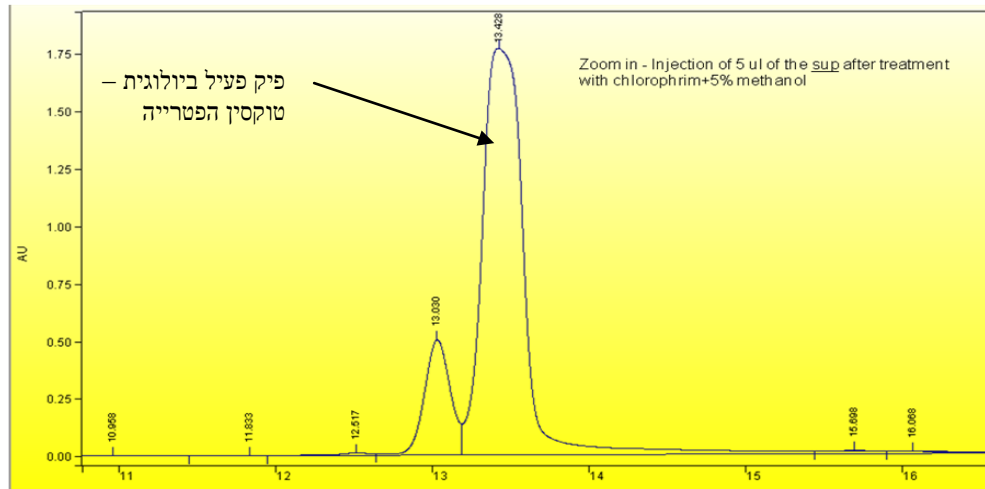
בשנה הראשונה והשניה הטוקסין הופק מהפטרייה בהתאם למפורסם בספרות. ניקוי הטוקסין הינו תהליך רב שלבי אותו ביצענו בהתאם לפרוטוקול ששימש את הקבוצות שפירסמו מידע זה. הטוקסין הופרד משאר המרכיבים במצע המזון על ידי שימוש בקולונות Sepak בלחץ נמוך ובעזרת HPLC. לאורך כל תהליך הניקוי של הטוקסין בוצעו מבחנים לפעילות ביולוגית של הפרקציות הנקיות בכדי לזהות את הפרקציות הפעילות בהן נמצא החומר הפעיל כלומר הטוקסין. המבחנים הביולוגיים בעיקרם הם הנחת מספר מיקרוליטרים (10 בדרך כלל) מהנוזל הנבדק,

בשלוש חזרות וביקורת ממס (אתנול) על גבי עלה מנותק של זן הדורים רגיש ובמקביל בדיקה דומה בזן לא רגיש. העלים, ב 4 חזרות, הועברו לקופסאות באוירה לחה ונשמרו באינקובאטור בטמפרטורה של 27 מ"צ למשך 48 עד 72 שעות בהן התקבלו התוצאות (תמונה 1). רק אותן פרקציות שגרמו להופעת תסמינים נשמרו להמשך ניקוי. המשך הניקוי שבוצע בעזרת HPLC נבחן בדרך דומה, פיקים שונים (תמונה 2) שיצאו מהקולונה נאספו ונבחנו לפעילות ביולוגית במבחנים כמתואר. בסופו של התהליך בודד ונוקה פיק יחיד מרכזי שהראה פעילות ביולוגית חזקה. פיק זה שהווה מבחינתנו את הטוקסין הנקי אמור היה לעבור תהליך כימי של קישור למולקולה מקשרת הקשורה למולקולת Methotrexate (Mtx) כמתואר בהצעת המחקר המלאה. למרות שכל הפרמטרים כולל זמן היציאה מהקולונה של החומר, הפעילות הביולוגית שלו ודרך ההפקה שלו היו זהים לאלה שפורסמו בספרות רצינו לוודא שהחומר שיש בידנו זהה גם מבחינת המשקל המולקולרי שלו לזה שפורסם בספרות ולשם כך נשלחה דוגמא ליחידה להפרדה וזיהוי מטבוליים שבמכון וולקני בכדי לבצע אנליזת LC/MS. בבדיקה התברר לנו כי משקלה המולקולרי של המולקולה שבידנו קטן פי שניים לערך מהמולקולה שפורסמה (196.1 דלתון לעומת כ 450 דלתון).

בנוסף ניסינו לסמן את הטוקסין בעזרת חומר פלואורסנטי (פלורסטיין) במטרה לבצע הגבה של הטוקסין המסומן עם עלים ולאחר זמנים שונים לבחון על ידי צביעת הממברנה של העלים בעזרת צבען FM4-64. בסימון זה של הטוקסין בעזרת הסמן הפלורוסנטי הסתמכנו על ביצוע קישור בן הסמן עצמו וקבוצת הקרבוקסיל שקיימת בטוקסין. הסימון לא צלח ובדיעבד אנו משערים שאנו מבינים מדוע. כפי הנראה המולקולה שיש בידנו אינה מכילה את הקבוצה הקרבוקסילית. בבחינת תגובת הממברנה לנוכחות הטוקסין במהלך 24 שעות וצביעת הממברנה בעזרת צבען FM4-64 (תמונה מספר 3) ניתן להבחין בשינוי בממברנה הנראה כהרס הממברנה וחוסר סדר לאחר כ 12 שעות חשיפה. בעבודה קודמת שבוצעה על ידי קבוצת חוקרים מיפן הם טוענים כי בהסתכלות מיקרוסקופית ניתן להבחין בשינויים בממברנה כבר לאחר כשעה וחצי. אנו לא הבחנו בשינוי כלשהו לאחר זמן כל כך קצר תחת המיקרוסקופ הקונפוקאלי.

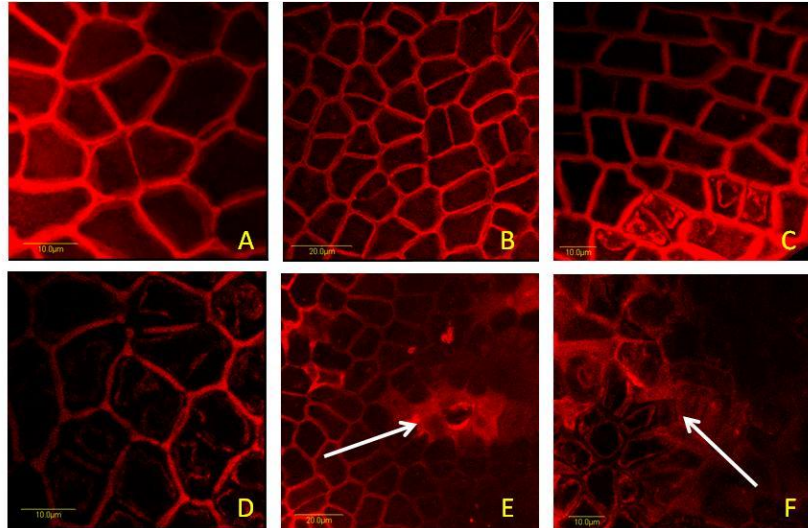


תמונה מספר 1: מבחני פעילות ביולוגית לפרקציות שונות של טוקסין האלטרנריה. A. פרקציות שונות (1-4) על עלי שמוטי (עמיד) וביקורת אתנול (הממס בו השתמשנו להרחפת הטוקסין). B. פרקציות שונות על עלה מינאולה רגיש, 1. מיצוי לפני הפרדה, 2. פיק מספר 2 בהפרדה, פיק מספר 3 בהפרדה, 4. אתנול כביקורת



תמונה 2: הפרדת HPLC של פיק נקי פעיל ביולוגית
 בהרצה זו נבחן פיק נקי תוצר הליך הפרדה ב HPLC שבוצע לפני כן לטוקסין בדרגת נקיין פחות גבוהה. מתקבל פיק מרכזי פעיל וצמוד לו פיק קטן יותר שלאחר נסינות רבים של הפרדה בנהם הגענו למסקנה שמדובר באותו חומר (כנראה איזומרים של אותו חומר) פיק זה נשלח לבחינה ב NMR ו LC/MS

בשנה האחרונה ניסינו לקבוע את מבנהו המולקולרי של הטוקסין הפעיל שבידנו על ידי אנליזה בעזרת NMR מימנים. הפרקציה הנקיה הועברה אל דר' שמואל כרמלי מהמחלקה לכימיה באוניברסיטת תל אביב. דר' כרמלי הריץ אנליזת NMR מספר פעמים ולמרות שהומר נראה נקי בהפרדת ה HPLC הסתבר שישנו לפחות חומר אחד נוסף הממסך על הטוקסין שלנו. מיסוך זה לא אפשר לקבוע מהו המבנה של הטוקסין שלנו ולכן הרצנו את הפרקציה הפעילה על צלחות TLC ואכן הסתבר בפיתוח עם כלורופורם: אתנול ביחסים של 1:10 שיש הפרדות של לפחות 4 חומרים. היות וההפרדה לא היתה מלאה ניסינו גם הפרדות בעזרת ממסים אחרים כולל כלורופורם:חומצה אצטית ביחס של 1% חומצה אצטית בכלורופורם. לאחר ההפרדה בפלטות TLC אפשר להבחין במידת היפרדות החומרים בדרכים שונות על ידי שימוש ב "מפתחים" (developers) שונים. היות ואנו משתמשים בצלחות פלואורסנטיות זיהוי החומרים המופרדים נעשה על ידי חשיפה לאור UV באורך גל 254 נ"מ. בכדי לבדוק מי מבין החומרים המופרדים הוא הפעיל, כמות גדולה של הפרקציה הפעילה הופרדה בתנאים אלה על פלטה גדולה. החומרים השונים נגזרו מהפלטה (הפלטה עשויה נייר אלומיניום מצופה בסיליקאט) כל מקטע הוכנס למבחנת 50 מ"ל והחומר מוצה מהסיליקאט בעזרת 40 מ"ל מתנול 100%. לאחר 24 שעות במקרר תוך כדי ערבוב כל מספר שעות המתנול הועבר לבקבוק נידוף ונודף במכשיר רוטאוופוראטור עד לייבוש מלא. החומר שנותר בבקבוק הנידוף נשטף מנו על ידי מתנול בנפח קטן. כל חומר שהתקבל נבחן לפעילות ביולוגית על גבי עלים צעירים של זן ההדרים מינאולה. אחד החומרים נמצא פעיל ונשלח פעם נוספת לבחינת NMR.



תמונה 3: הסתכלות במיקרוסקופ קונפוקאלי ברקמה חשופה לטוקסין לאורך זמן צביעה ב FM4-64 האזורים שנחשפו לטוקסין הושארו למשך 24 שעות באינקובציה כאשר בזמנים קצובים בוצעה הסתכלות מיקרוסקופית לבחינת מצב הממברנה. A. ביקורת ללא טוקסין (נחשף לאתנול בלבד) ומיד נבחן. B. לאחר שלוש שעות חשיפה, C. שש שעות לאחר חשיפה לאתנול בלבד, D. שש שעות חשיפה לטוקסין. E. 12 שעות לאחר חשיפה לטוקסין, F. 24 שעות לאחר חשיפה לטוקסין. אזורים בהם נצפתה פגיעה בממברנה מסומנים בחצים

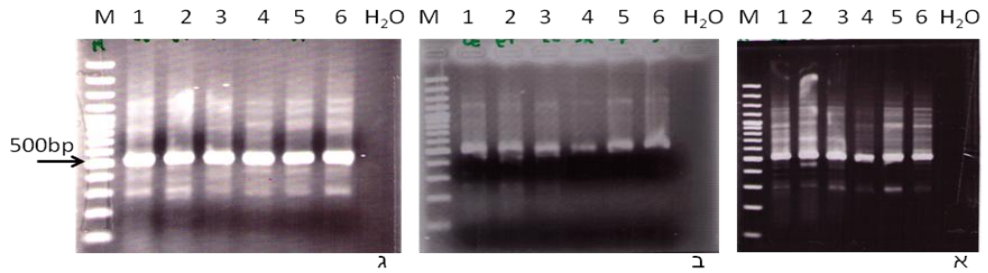
לפטרייה לתקוף את אותו ספקטרום פונדקאים והינו בעל פעילות ביולוגית חזקה. הפקת ואיפיון הטוקסין בניסיון ההפקה השני יאפשר לנו להגיע לתובנות ומסקנות שיעזרו לנו לענות על שאלות/ הנחות אלה. אפיון הטוקסין יאפשר לנו להחליט על אסטרטגיית המשך לעבודה, כיצד אפשר ועם איזה לינקר אפשר יהיה לקשור את הטוקסין למולקולת ה MTX כדי שאפשר יהיה להתחיל בסריקת ספריית ה THS שבשמרים.

שימוש בגישות מבוססות PCR לבידוד גנים לעמידות למחלות בהזרים

הגברת רצפים ספציפיים ל R Genes מגנום הצמחים השונים, והשוואתם.

בתחילת העבודה, הפקנו DNA מהפטרייה והגברנו מקטעי DNA בעלי הומולוגיה לגנים לעמידות (R genes) ההפקות וההגברות בוצעו ממספר צמחים הידועים כעמידים למחלה ביניהם לימון גס (*Citrus jambhiri*), אתרוג (*Citrus medica* L.), שמוטי (*Citrus sinensis* L. Osbeck), סצומה (*Citrus unshiu* Marc), לימטה (*Citrus limetta*) והזן הרגיש אשכולית (*Citrus paradisi*).

ה DNA הגנומי של צמחים אלה הוגבר בעזרתם של שלוש זוגות פרימרים שתוכננו על בסיס מוטיבים שמורים לגנים אלה המופיעים בקבוצות שונות של גנים אלה (R11-F11, R16-F11 ו-R11-F18). תוצאות ההגברה של ה DNA הגנומי שהופק מצמחים אלה התאפיינו בהופעת מקטעי DNA שנראו על גבי ג'לים להפרדה (אלקטרו פורזה) דומים מאוד (תמונה 5).

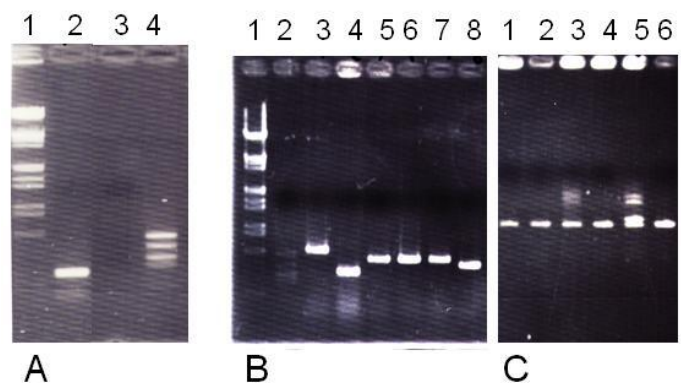


תמונה 5: תוצאות הגברה ב PCR ל R Genes מהדרים שונים
 1. לימטה (LE), 2. אתרוג (ET), 3. לימון גס (RL), 4. שמוטי (SH), 5. אשכולית (GF), 6. סצומה (S)
 -1 H₂O ביקורת מים.
 א. הגברה בשימוש בזוג ההתחלים (פרמרים) R11- F11. ב. הגברה בשימוש בזוג ההתחלים R16- F11.
 ג. הגברה בשימוש בזוג ההתחלים R18- F11

בנוסף, ככולם הופיע מקטע בגודל 500 נוקליאוטידים שהוגבר בעוצמה גבוהה יותר משאר המקטעים. לאחר שיבוט וריצוף של עשרות רבות של מקטעי DNA התבהר לנו שהשונות הגבוהה בן הרצפים השונים ומספרם הגדול לא מאפשרים לנו למצוא קורלציה בן הזנים העמידים לרצפים מסוימים.

הפקת total RNA מזנים עמידים ורגישים, יצירת cDNA והגברת רצפים ספציפיים ל R Genes מהצמחים השונים, והשוואתם.

לאחר מחשבה מחדש הגענו למסקנה שיהיה נכון יותר לחפש את ההבדלים הללו ברצפים של גנים ששועתקו בעקבות חשיפה לפטרייה כלומר הגברה של cDNA על בסיס mRNA שהופק מעלים של שלושה זנים עמידים ושלושה זנים רגישים והגברתם בעזרת PCR תוך שימוש בסטים השונים של הפריימרים שסונטזו על בסיס העבודות שהוזכרו בהצעה המלאה ושימשו אותנו בשנה הראשונה והשניה להשגת מטרות פרק זה בעבודה. Total RNA הופק מהזנים הרגישים מינאולה (grapefruit x Dancy tangerine hybrid), אשכולית (Citrus paradisi) ומיכל ומהזנים העמידים לימון גס, לימון, סצומה ואור.



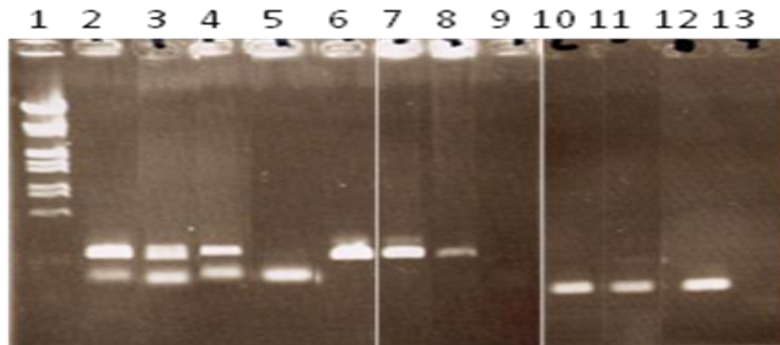
תמונה 6: הגברת ושיבוט רצפים הומולוגיים ל-R genes על בסיס ה cDNA לפני ריצוף.

A. הגברת המקטעים על בסיס mRNA מינאולה (2) בעזרת סט הפרימרים As1/s1, ביקורת מים (3) והגברת המקטעים על בסיס mRNA מאור בעזרת סט הפרימרים As3/s2
 B. תוצרי הגברת שיבוט המקטעים (המוצג ב A) של תוצר ההגברה בון אור עם סט הפרימרים As3/s2 מפלסמיד pGemTeasy vector התוצרים שהתקבלו בגדלים שונים תואמים את הגדלים הצפויים בהשוואה לתוצרי ההגברה של המקטעים מה- mRNA.

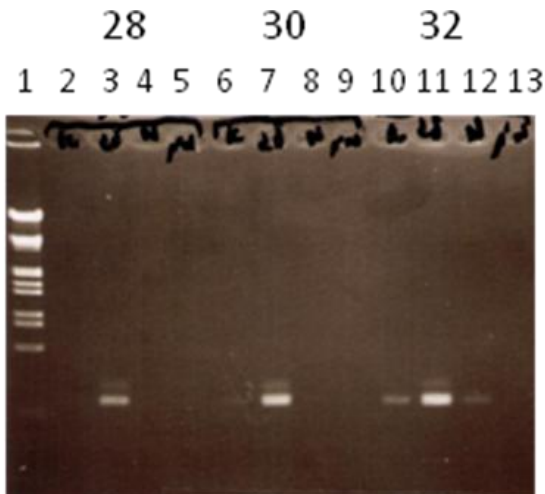
C. תוצרי הגברת שיבוט המקטעים (המוצג ב A) של תוצר ההגברה בון מיכל עם סט הפרימרים As1/s1 מפלסמיד pGemTeasy vector. התוצרים שהתקבלו בגודל יחיד תואמים את הגודל הצפוי בהשוואה לתוצרי ההגברה של המקטעים מה- mRNA.

שישה סטים של פרימרים שימשו אותנו להגברות בכל הזנים. סט אחד נתן תוצרי PCR (AS1/S1) בכל הזנים. בזן אור התקבל תוצר גם בסט פרימרים נוסף (AS3/S2) (תמונה מספר 6 א'). תוצרים אלה שובטו לוקטור pGEMTeasy vector והוחדרו לחיידקי *E. coli* להגברה. בחינת המחזר על ידי הגברה בעזרת PCR במושבות שונות של החיידקים הטרנספורמנטים אפשרה לנו לבחור מספר מושבות חיידקים המבטאות פלסמידים בעלי מחזרים שונים. מושבות אלה נבחרו להמשך עבודה (תמונה 6 ב'). הוקטורים מוצו מהחיידקים והמחזר בהם רוצף. מריצוף כל תוצרי ה PCR והשוואתם בעזרת תוכנות מחשב יעודיות (clustal w), הצלחנו לאפיין שלושה מקטעי DNA ייחודיים המופיעים רק בזנים העמידים אך לא בזנים הרגישים. שני רצפים שהופיעו בלימון גם ורצף אחד מהזן אור. פרימרים על בסיס שלושה רצפים אלה שימשו לבחינת הגברת רצפים גנומיים וברמת ה cDNA בזני ההדרים השונים. סט הפרימרים הראשון (A) שמקורו בזן אור נתן תוצר הגברה הן בזנים העמידים והן בזנים רגישים (מינאולה), ברמת ה DNA הגנומי וברמת ה cDNA. סט הפרימרים השני (B) שמקורו בלימון גם נתן תוצרי הגברה בכל הזנים שנבחנו הן ברמה הגנומית והן ברמת ה cDNA. הסט השלישי (C) הגביר גם הוא תוצרים בזנים רגישים ועמידים בשתי הרמות ה DNA (תמונה 7 מציגה הגברות ברמת ה DNA הגנומי). היות ובסט B תוצרי ההגברה שהתקבלו בזן הרגיש מינאולה היו חלשים יותר ניסינו לשנות את תנאי ההגברה (העלאת הטמפרטורה לקבלת ספציפיות גבוהה בקישור הפרימרים לרצף) כך שבזנים העמידים יתקבלו תוצרי הגברה בעוד בזנים הרגישים לא יתקבלו. לעיתים ישנם רצפים בגנום הפטרייה שבתנאי הגברה לא מחמירים יקשרו לפרימרים בעלי רצפים דומים אך לא זהים, החמרת תנאי הראקציה יעלו את הספציפיות של הפרימרים לרצפים אליהם הם נקשרים כך שרק רצפים זהים יקשרו לפרימרים הנבחנים בעוד רצפים "דומים" לא יקשרו. החמרת התנאים אומנם העלימה את הבנד שהתקבל במינאולה אך גרמה גם להעלמותו של הבנד בזן אור שהינו עמיד. הבנד בזן לימון גם המשיך להופיע. בכדי למצות שיטה זו ניסינו לשנות את תנאי הראקציה על ידי שימוש בתוכנית הגברה שונה בה ישנה הגברה בתנאים פחות מחמירים בשלב ראשון ואז התנאים משתנים למחמירים מאוד. בדרך זו יש העשרה של תבניות ההגברה בראקציה בשלב הראשון ולאחר מכן הגברה רק של רצפים ספציפיים. תוכנית ה PCR שהשתמשנו בה לשם כך תוכננה כך שתשעה המחזורים הראשונים טמפרטורת הקישור (anniling) נקבעה על 61 מ"צ ו 24 המחזורים לאחר מכן הטמפרטורה הועלתה ל 63 מ"צ. התוצאה היתה הגברה חלשה יחסית של הרצף מלימון גם אך ללא הגברה כלל באור ומינאולה (תוצאות לא מוצגות). תוכנית נוספת שהשתמשנו בה היתה גישה הפוכה לחלוטין בה מתבצעת בשלב ראשון הגברה מאוד ספציפית על ידי שימוש בטמפרטורת קישור לפרימרים גבוהה יחסית ולאחר מכן הגברה בטמפרטורה נמוכה יותר בדרך זו מבצעים העשרה של מקטעי ה DNA הספציפיים יותר ולאחר מכן הגברה שלהם. תוכנית זו התחלנו עם 14 מחזורים בטמפרטורת קישור של 63 מ"צ שנמשכו ב 14 מחזורים נוספים בטמפרטורה של 62 מ"צ. בתוכנית זו לא התקבלו כלל תוצרי הגברה בכל הזנים שנבחנו (תוצאות לא מוצגות). אפשרות נוספת היא הפחתת מספר מחזורי ההגברה בהנחה שראקציה ספציפית תגביר תוצר לאחר מספר קטן יותר של מחזורי ראקציה בעוד ראקציה פחות ספציפית תזדקק ליותר מחזורים כדי לקבל תוצר שאפשר לראות על הג'ל. בניסון זה ביצענו תוכניות בעלות 28 מחזורים, 30 ו-32 מחזורים. הסתבר שאכן לאחר 28 מחזורים רק

בלימון גס התקבל תוצר הגברה אך לא באור ומינאולה. לאחר 32 מחזורים התקבל תוצר גם באור אבל תוצר זהה התקבל גם במינאולה (תמונה 8). לאור תוצאות כל השיטות הסקנו שמדובר בפרימרים המגבירים רצף ספציפי ללימון גס ולא רצף היכול לזהות בן זנים רגישים לעמידים לפטרייה. בסט פרימרים נוסף שנבנה על בסיס המקטע שהוגבר מהזן אור קיבלנו תוצאות דומות ובשלב זה הפסקנו את הניסויים בכיוון זה.



תמונה 7 : בחינת פרימרים להגברת רצפים בזני הדורים עמידים לאלטרנריה אלטרנטה (DNA גנומי) שלוש זוגות פרימרים שנבנו על בסיס מוטיבים חוזרניים בגנים לעמידות בצמחים נבחנו ליכולתם להגביר מקטע ספציפי בזנים עמידים. 1. סמן מולקולרי (Lambada Hind /EcorI). סט פרימרים A : 2. אור 3. לימון גס 4. מינאולה. 5. ביקורת מים. סט פרימרים B: 6. אור. 7. לימון גס. 8. מינאולה. 9. ביקורת מים סט פרימרים C: 10. אור. 11. לימון גס. 12. מינאולה. 13. ביקורת מים.



תמונה מספר 8: שינוי מספר מחזורי ההגברה בראקצית זיהוי רצפים להגברת ספציפיות הראקציה סט פרימרים B שימש להגברת מקטע ה DNA במספר מחזורים עולה: 1. סמן מולקולרי (Lambada Hind /EcorI) 28 מחזורים- 2. אור 3. לימון גס 4. מינאולה. 5. ביקורת מים. 30 מחזורים: 6. אור. 7. לימון גס. 8. מינאולה. 9. ביקורת מים 32 מחזורים: 10. אור. 11. לימון גס. 12. מינאולה. 13. ביקורת מים.

שימוש בשיטת ה **Suppression Subtractive Hybridization** להגברת ובידוד cDNA המבוטא ברקמה צעירה ולא ברקמה בוגרת וההפך.

עלים צעירים ועלים בוגרים של מינאולה שימשו להפקת mRNA ששימש ליצירת cDNA. ההיברידיזציות בוצעו על פי הפרוטוקולים של חברת Clontech. בקצרה, cDNA מעלים צעירים רגישים למחלה, חובר ללינקרים בעלי רצף ספציפי וידוע בעוד cDNA מעלים בוגרים עמיד לא חובר ללינקרים כלל. ה cDNA של שניהם עורבב יחדיו, חומם לפירוק הדו גדיל (דהנטורציה), והונח להתקרר. במהלך ההתקררות מולקולות ה DNA מתחברות לבנות זוג על בסיס התאמת הרצף שלהן. באופן עקרוני מולקולות זהות הקימות גם בעלים צעירים רגישים וגם בעלים בוגרים עמידים עשויות להחבר זו לזו. בסוף תהליך ההתחברות מחדש אנו אמורים לקבל שלוש אוכלוסיות של מולקולות במבחנה: 1. מולקולות הקיימות גם בעלים צעירים וגם בעלים בוגרים מחוברות זו לזו באוכלוסיה זו יהיה לינקר רק לגדיל אחד 2. מולקולות הנמצאות רק בעלים בוגרים עמידים ולכן יהיו ללא לינקרים כלל ואוכלוסיה של מולקולות שנמצאות רק בעלים צעירים הרגישים ונושאות לינקרים על שני הגדילים שלהן. עיכול הקצוות יגרום לכך שמולקולות כימרה של השניים יאבדו את הלינקר שלהן ולכן רק מולקולות בעלות שני לינקרים שמקורן בעלים צעירים יוגברו בראקצית PCR. חוזרים על היברידיזציה זו מספר פעמים כשכל פעם מוסיפים DNA מהעלים הבוגרים. בסוף ההיברידיזציות ומחזורי הגברה, מתקבלים תוצרי PCR שאמורים לייצג רק את הגנים המבוטאים בעלים צעירים הרגישים אך לא מעלים בוגרים עמידים. רצפים אלה משובטים לפלסמידים ומרוצפים. אותה ראקציה בוצעה גם "הפוך" כלומר כך שהרצפים הנמצאים רק בעלים בוגרים יוגברו בעוד אלה מהעלים הצעירים סולקו.

באנליזה של הרצפים שבוצעה לראקצית עלים צעירים מול עלים בוגרים שובטו מאות קלונים מתוכם נאספו 75 לריצוף והמשך אנליזה. באנליזה של הרצפים שבוצעה לראקצית עלים בוגרים מול עלים צעירים שובטו מאות קלונים מתוכם נאספו 103 לריצוף והמשך אנליזה עד לרגע כתיבת דוח זה עברו אנליזת ריצוף 18 שיבוטים (טבלה 1) מעלים צעירים והשאר (צעירים מול בוגרים וההפך) נמצאים בשלב הפקת הפלסמידים ושליחתם לריצוף.

טבלה מספר 1. תוצאות ריצוף שבטי cDNA שהוגברו בשיטת ה SSH מרקמת עלים צעירים מול עלים בוגרים של הזן מינאולה מהדרים.

Clone	Predicted annotation according to BLAST
10, 77, 79, 104, 110, 112, 136, 149, 158	Citrus x paradisi lectin-related protein precursor
47, 73	Tubulin alpha chain
59	plasma membrane H ⁺ ATPase
63	No significant similarity
85	Gossypium hirsutum cultivar Deltapine 33 B clone MONCS1083 SSR marker CGR6572 genomic sequence
95	Pyruvate decarboxylase
99	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
132	Expansin like protein
173	Transcription factor

מהסתכלות ראשונית " המעניינים" ביותר הם 9 רצפים שהראו זהות ל lectin-related protein precursor מאשכולית ברמה של 98-99 אחוז ו- Plasma membrane H⁺ ATPase. שנהם יכולים להקשר לתגובת הצמח להתקפה. הראשון נמצא בהדרים כחלבון העולה בכמותו בהתקפת וירוסים, עם זאת לא ברור כיצד הוא יכול להקשר לפעילות החלבון. במקרה של ה plasma membrane H⁺ ATPase פגיעה במשאבות מימן אלה יכולה לגרום לחוסר צימות וקריסת הממברנה בדיוק התופעה הנצפית בהתקפת הפטריה על העלים. עם זאת לא סביר שמשאבות אלה "נעלמות" בעלה הבוגר ולכן הסבירות שזהו הגן אותו אנו מחפשים היא להערכתנו לא גבוהה. שני גנים נוספים שנמצאו: Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase ו- Expansin like protein מקושרים לפירוק ובניה של דופן התא וזה די צפוי היות ומדובר בעלים צעירים בהם בניית התאים הינה במלוא המרץ ולכן גם סביר שגנים הקשורים בפירוק וייצירת צלולוז ומרכיבי דופן תא יבוטאו בעודף.

דיון

בתחילת העבודה על פרויקט זה היה ברור לנו שהחלק העוסק בקישור הטוקסין ללינקר ולאחר מכן החדרתו לתאי השמר יהיה החלק המסובך יותר. לא חשבנו שהדבר שיאט ויסבך את החלק הזה בפרויקט באופן כל כך קיצוני יהיה דווקא הטוקסין עצמו. כפי שהוסבר במבוא לדוח זה הטוקסין נלמד ונחקר בעבר על ידי חוקרים מיפן, ארה"ב וישראל וגם במקומות אחרים ובכולם הוא אופייני, מבנהו ותכונותיו נקבעו וכל מי שעסק בתחום בנה את ניסוייו על בסיס מידע זה. גם אנו ביססנו את תוכנית העבודה שלנו על פרוטוקולים ששימשו קבוצות אחרות בעבר למיצוי הטוקסין ועבודה איתו, יותר מכך ביססנו את הנחת העבודה שלנו שמיבנהו הכימי של הטוקסין יוכל לשרת אותנו בבואנו לחברו ללינקר שישמש מאוחר יותר בהליך ה S3T. להפתעתנו הטוקסין לא ניקשר לצבען הדורש קבוצה קרבוקסילית להתחברותו, המשקל המולקולרי של הטוקסין שונה מזה המפורסם בספרות ויותר מכך נתקלנו בקשיים לקבוע את מבנהו והרכבו הכימי של הטוקסין ב NMR בשל נוכחות חומרים נוספים בתמיסה וזאת למרות שהחומר הפעיל בודד ונוקה מספר פעמים על גבי קולונת HPLC. מקריאת הספרות מסתבר שכנראה מקור הפטרייה ששימשה בעבודות הקודמות שפורסמו היה בפלורידה ואיתה כולם עבדו בעבר. יתכן והפטרייה שבודדנו בישראל אינה זהה לפטרייה הפלורידנית בן היתר בטוקסין שהיא מפרישה, נושא זה עד כמה שידוע לנו לא נבדק עד היום. לאור התוצאות הללו אנו מניחים כיום כי הפטרייה הישראלית מפרישה טוקסין פעיל כנגד זני הדרים רגישים השונה בהרכבו מזה שפורסם בספרות. ללא מבנהו המדויק של הטוקסין המופרש על ידי הפטרייה הישראלית אי אפשר להמשיך לשלב חיבורו עם הלינקר ומשם לסריקת ספריית ה S3T. האפשרות שיתכן ואנו עובדים עם טוקסין שונה מזה המפורסם אינה בלתי מתקבלת על הדעת כמו גם האפשרות שאנו מחזיקים בידינו חלק מהטוקסין השלם-האתר הפעיל שלו. בשני המקרים ממצאים כאלה הינם חשובים ומהווים דלת למחקר מעמיק ומעניין ביותר. בניית המערכת המבוססת על שמרים בה ספריית ה cDNA מזן ההדרים הרגיש והמשובטת לוקטור מתאים בעוד המולקולה המדווחת משובטת לווקטור אחר, היוותה אתגר שכן אפשרויות שיבוט המחדר מוגבלות מאוד. פניה אל דר' ורגיניה קורניש מאוניברסיטת קולומביה שבארה"ב, שהיא אחת מהמדענים שפיתחו מערכת זו לבחינת קישור תרופות לרצפטורים במערכות אנימליות, הקנתה לנו אישור עבודה עם מערכת משוכללת יותר שהיא בנתה בעזרת עמיתיה במעבדתה. במערכת זו, במקום לשבט את מולקולת הקישור בווקטור אחד ואת

ספריית ה cDNA בווקטור שני ולבצע החדרה כפולה של שניהם לשם הפעלת המערכת, קבוצתה בנתה שמר בו הקונסטרוקט המכיל את מולקולת הקישור (הצייד) נמצאת באופן קבוע בגנום השמר. פיתוח זה מאפשר לשבט את ספרייה ה cDNA לווקטור השני ולהחזיר רק פלסמיד אחד לשמר ולא שניים. היתרון הוא בכך שיעילות ההחדרה היא גבוהה בהרבה מיעילות טרנספורמציה כפולה. נקודה שניה היא העובדה שאינקורפורציה זו של הווקטור השני לגנום השמר מביאה לבקרה יעילה יותר של המערכת ועקב כך הרקע יורד משמעותית ומאפשר סריקה יעילה ואמינה יותר של הספרייה. קבלת מערכת זו קידמה אותנו באופן משמעותי לעומת הצורך לבנות את כל הספרייה במערכת הפשוטה יותר.

איפיון המבנה הכימי של הטוקסין ימשך גם בתום פרויקט זה ויתבצע בעזרתו של דר' שמואל כרמלי מהמחלקה לכימיה באוניברסיטת תל אביב המבצע גם את מבדקי ה NMR על מולקולת הטוקסין שבידנו. רעיון הגברת וזיהוי רצפים המקודדים לגנים לעמידות (R-Genes) בוצע בעבר גם בצמחים ממשפחת הסולניים וגם בהדרים. המחשבה שנוכל לזהות גנים המופיעים רק בזנים העמידים אך לא בזנים הרגישים או ההפך נראתה לנו סבירה אך, לאחר שקיבלנו את תוצאות ההגברה והריצוף של עשרות רצפים מהזנים הבנו שהמספר הגדול של הרצפים והעובדה שישנם רצפים רבים הנמצאים בכל הזנים הנבדקים לא יאפשר לנו להסיק מסקנות עוד תובנה שעלתה מתוצאות אלה היא שכנראה ישנם הרבה מאוד רצפים הנמצאים בחזרות שונות בגנום הצמח ולא בהכרח משועתקות בזמן ההתקפה על הצמח. ולכן עלתה המחשבה לצמצם את מספר הרצפים על ידי שימוש ב cDNA מצמחים שנחשפו לפתוגן, כך שרצפים רלוונטים יוגברו רק מתוך אלה שעברו שיעתוק. אכן שינוי גישה זה צמצם את מספר הרצפים המוגבר. בתום ההליך קיבלנו שלושה רצפים מזנים עמידים שלא נמצאו בזנים רגישים. בבחינתם על זנים עמידים ורגישים התברר לנו שהם מגבירים הן ברמת ה DNA הגנומי והן ברמת ה cDNA רצפים בכל זני ההדרים שנבדקו. לא הצלחנו, על אף העבודה הרבה שביצענו בשלושת שנות המחקר, לסיים פרק זה של העבודה כשבידנו סמנים לעמידות כנגד הפטרייה. אין הדבר אומר שהם לא נמצאים איפה שהוא בגנום הצמחים העמידים אך אנו לא הצלחנו לגלות אותם בשיטה זו.

ההבדל ברגישות העלים לנוכחות הרעלן המופרש על ידי הפטרייה, בזנים הרגישים, יכול לשמש אותנו כדי לבחון מהו אותו גורם המקנה את הרגישות לרקמות הצעירות. לשם בחינה זו השתמשנו שיטה מולקולארית הנקראת Suppression Subtractive Hybridization כפי שהוסבר בפרק התוצאות בשיטה זו מבצעים הפחתה על ידי היברידיזציות של מולקולות זהות הנמצאות בתא מרקמה הרגישה אל מול הרקמה העמידה וההפך ובאותו זמן מבצעים הגברה של רצפים האמורים להיות ייחודיים לרקמה הנבדקת. בסריקה ראשונה שביצענו על רקמה רגישה מול רקמה עמידה מצאנו מספר רצפים שעברו הגברה ב PCR. יש עוד לבצע אנליזה של כל הרצפים שהוגברו ורק לאחר מכן לבחון מי מבין רצפים אלה יכול להיות "רצף המטרה" להמשך עבודה. רצף זה יבחן לתפקידו ברקמה הרגישה ומניפולציות מולקולאריות (במידה שאפשר יהיה לבצען) שיבוצעו לרצפים רלוונטים אלה יבחנו להשפעתן על רגישות הצמח לרעלן הפטרייה והפטרייה עצמה. בנוסף, יש לבצע אנליזה של הרצפים שהתקבלו ברקמה עמידה מול רגישה ולבחון גם אותם ליכולת השפעתם על עמידות הרקמה לרעלן והפטרייה.

לסיכום: למרות העבודה הרבה שהושקעה בפרויקט זה הוא לא מסתיים בהשגת המטרות אותן כתבנו, כלומר אין כרגע בידינו סמנים מולקולאריים לעמידות כנגד הפטרייה גורמת מחלת הכתמים החומים בהדרים. עם זאת התוצאות שהתקבלו בכל חלקיו של פרויקט זה פתחו בפנינו שאלות מחקר חדשות אותן אנו לומדים גם שלא

במסגרת מימון זה. אין לנו ספק כי תשובות שנקבל לשאלות אלה יאפשרו לנו בעתיד להבין את מנגנון הפעולה המתקיים ביחסים בן הפטרייה גורמת המחלה והצמחים הרגישים והעמידים כמו גם האפשרות להבין מהם הגורמים המשפיעים על הרגישות /עמידות ברקמות צעירות מול רקמות בוגרות בעלים.

- .1 Timmer, L.W., S. Z., and O.-S. M., *Compendium of citrus diseases*. Second ed, ed. T. L.W., G. S.M., and G. J.H. 2000, St. Paul, Minnesota: APS.
- .2 Solel, Z., *Alternaria brown spot on Minneola tangelos in Israel*. Plant Pathology, 1991. **40**: p. 145-147.
- .3 Armengol, J., R.Sales, and J.Garcia-Jimenez, *First report of Alternaria brown spot of citrus in Spain*. Plant Disease, 2000. **84**(9): p. 1044.
- .4 Timmer, L.W., et al., *Alternaria disease of citrus- Novel pathosystems*. Phytopathologia Mediterranea, 2003. **42** :p. 99-112.
- .5 Solel, Z. and M. Kimchi, *Susceptability and resistance of Citrus genotypes to Alternaria alternata pv.citri*. Journal of Phytopathology, 1997. **145**: p. 389-391.
- .6 Masunaka, A., et al., *An isolate of Alternaria alternata that is pathogenic to both tangarines and rough lemon and produces host selective toxins, ACT and ACR-toxins*. phytopathology, 2004. **95**(3): p. 241-247.
- .7 Kohmoto, K., et al., *Isolation and biological activity of two host specific toxins from the Tangarine pathotype of Alternaria alternata*. phytopathology, 1993. **83**(5): p. 495-502.
- .8 Akimitsu, K., et al., *Host specific effects of toxin from the rough lemon pathotype of Alternaria alternata on mitochondria*. Plant Physiology, 1989. **89**: p. 925-931.
- .9 Ohtani, K., H. Yamamoto, and A .K., *Sensitivity to Alternaria alternata toxin in citrus because of altered mitochondrial RNA processing*. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(4): p. 2439-2444.
- .10 Kohmoto, K., R.P. Scheffer, and J.O. Whiteside, *Host selective toxins from Alternaria citri*. Phytopatology, 1979. **69**: p. 667-671.
- .11 Henthorn, D.C., A.A. Jaxa-Chamiec, and E. Meldrum, *A GAL4 based yeast three hybrid system for the identification of small molecule target protein interactions*. Biochemical Pharmacology, 2002 :63 .p. 1619-1628.
- .12 Licitra, E.J. and J.O. Liu, *A three hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**: p. 12817-12821.
- .13 Bent, A.F., *Plant disease resistance genes :Function meets structure*. The Plant Cell, 1996. **8**: p. 1757-1771.
- .14 Wang, H.Y., et al., *isolation and characterization of resistance gene homology sequence from wheat*. Journal of Phytopathology, 2006. **154**: p. 670-675.
- .15 Leister, D., et al., *A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants*. Nature Genetics, 1996. **14**: p. 421-429.
- .16 Ohmori, T., M. Murata, and F. Motoyoshi, *Characterization of disease resistance gene-like sequences in near isogenic lines of tomato*. Theoretical and Applied Genetics, 1998. **96**: p. 331-338.
- .17 Deng, Z., et al., *cloning and characterization of NBS-LRR class resistance gene candidate sequences in citrus*. Theoretical and Applied Genetics, 2000. **101**: p. 814-822.
- .18 Abida, W.M., et al., *Receptor dependence of the transcription read out in small molecule three-Hybrid System*. ChemBioChem, 2002. **3**: p. 887-895.
- .19 Becker, F., et al., *A Three Hybrid approach to sacaning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors*. Chemistry and Biology, 2004. **11**: p. 211-223.
20. Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, and Siebert PD (1996). Suppression

- subtractive hybridization: *A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*. PNAS **93**: 6025-6030.
21. Gao X, Li ZG, Fan J, and Yang YW (2006). *Screening and expression of differentially expressed genes for peel pitting of citrus fruit*. Acta. Hort. **712**: 473-479.
 22. Gonzaliz-Candelas L, Sanchez-Torres P, Alamar S, Estables B, Ballester AR, Sanchez-Ballesta MT, Luch YL, Gosalbes MJ, Zacarias L, Mrcos JF, and Lafuente MT (2005). *Genomic approaches to postharvest biotic and abiotic stresses of Citrus fruit*. Acta. Hort. **682**: 247-254.
 23. Mishra RB, Reddy PS, Nair S, Markandeya G, Reddy AR, Sopory SK, and Reddy MK (2007). *Isolation and characterization of expressed sequence tags (ESTs) from subtracted cDNA libraries of Pennisetum glaucum seedlings*. Plant mol biol **64**: 713-732.

3 סיכום עם שאלות מנחות

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

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

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

<p>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה. שימוש ברעלן כמלכודת לחלבונים צמחיים הנקשרים אליו בתהליך הפתוגנזה בצמח. שימוש בגישה מבוססת PCR לבידוד גנים לעמידות למחלות בהדרים</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</p>
<p>ספריית cDNA במערכת THS שובטה ומוכנה לסריקה. הטוקסין עובר אנליזה למבנה ותכונות היות והוא מראה תכונות השונות מאלה המפורסמות בספרות. אנליזה זו כוללת שימוש בהפרדות HPLC ו-NMR</p>
<p>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.</p>
<p>מטרות העבודה לא הושגו כפי שהן הוגדרו בתחילת הפרויקט עם זאת כמות הממצאים והעבודה שבוצעה גילו לנו מידע רב המפנה אותנו לאפיקי מחקר אחרים שאולי דרכם נצליח להשיג את המטרות שהצבנו לנו.</p>
<p>הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.</p>
<p>הבעיה המרכזית שאנו צריכים לפתור היא זהותו ומבניהו של הטוקסין ובהתאם למבנהו נוכל לתכנן את המשך הניסויים לקראת סריקת הספרייה המוכנה. לא הצלחנו בשתי רמות DNA לאפיין רצפים היכולים לשמש כסמנים לעמידות על בסיס גנים לעמידות. עדיין גילוי רצפים/ גנים המעורבים בהליך הרגישות עמידות של רקמות צעירות מול בוגרות ו/או זנים עמידים מול רגישים יבחן גם בתום פרויקט זה באמצעות שיטות אחרות בנהן Suppression Subtractive Hybridization.</p>
<p>האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.</p>
<p>לא הוחל בהפצת הידע שנוצר. נכון לרגע זה המידע אינו מצדיק פירסום בעיתונות או במסגרות אחרות.</p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</p>
<p>רק בספריות</p>
<p>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>
<p>חסוי – לא לפרסם</p>