

**לימוד מנגנון העמידות למחלת הקימחון בתות-שדה הנגרמת
ע"י הפטרייה *Podosphaera aphanis***

עבודת גמר
מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה
האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך" במדעי החקלאות

מאת
נדב דוד

עבודה זו נעשתה בהנחייתם של דר' ניר דאי,
המכון למדעי הצמח, ודר' יגאל אלעד,
המחלקה לפתולוגיה של צמחים ומדע העשבים,
מנהל המחקר החקלאי בית דגן;

הבעת תודה

לדר' ניר דאי – על ההנחיה, העזרה והתמיכה שניתנו לכל אורך המחקר בתחומים מקצועיים ומדעיים, בדרכי נועם ובחביבות.

לדר' יגאל אלעד – על ההנחיה והעצות המועילות, הסבלנות והעידוד. על התרומה והניסיון הרב בתחומים המקצועיים והמדעיים, והתמיכה במהלך המחקר.

לזכריה תנעמי – על העזרה הרבה בהכנה והעמדת ניסויים, והנכונות התמידית לסייע ולתמוך.

לשרה סלוצקי – על העזרה העידוד והחביבות הרבה לאורך כל המחקר.

לדליה רב דוד – על העזרה בניסויים, התמיכה, האוזן הקשבת הידידות הרבה וסביבת העבודה הנעימה.

לחברי המחלקה לירקות על העזרה הטכנית והמקצועית בהעמדת ניסויים הקצאת משאבים, על התמיכה והמילים הטובות לאורך כל המחקר.

תודה לחברי בשתי המעבדות – לכרמית ומיכל מוי, ליאת, דפנה, עומר ודנה. על החברות הרבה התמיכה העזרה והעצות המועילות, כל אחד בתחומו. ועל סביבת העבודה הנעימה.

תודות רבות להורי היקרים על העידוד התמיכה והאהבה.

וכמובן לאשתי ואהבתי לירון שתמיד איתי ובלעדיה שום דבר לא היה אותו הדבר.

תוכן עניינים

<u>עמוד</u>	
1	מבוא
2	סקירת ספרות
2	1. תות שדה
3	2. קימחונות (Erysiphaceae): מאפיינים כלליים
4	3. קימחון התות
7	4. מנגנוני הגנה בצמחים
16	שיטות וחומרים
16	1. כללי
17	2. התפתחות הפטרייה בעלי התות בזנים העמידים והרגישים
19	3. אפיון מנגנוני הגנה צמחיים
28	4. רשימת זנים וקווים של תות שדה
29	תוצאות
29	1. איתור קווים עמידים ורגישים למחלת הקימחון בתות שדה
33	2. התפתחות הפטרייה <i>Podosphaera aphanis</i> בעלי תות שדה
33	2.1 בחינת שיעור הנביטה והתארכות נחשון הנביטה
36	2.2 בחינת מספר אירועי חדירה לתאים
39	2.3 יצירת Callose בתאי הצמח כתגובה לחדירת הפטרייה
41	2.4 סריקת חתכים באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני חודר TEM
43	3. אפיון מנגנוני הגנה צמחיים
43	3.1 מנגנון הגנה פיסי- עובי הקוטיקולה ודפנות תאי האפידרמיס
44	3.2 מנגנוני הגנה אקטיביים
48	דין
54	רשימת ספרות

תקציר

מחלת הקימחון נגרמת על ידי הפטרייה הטפילה המוחלטת *Podosphaera aphanis* הפוגעת בעלווה, בפרחים ובפירות, ייחודית לתות והנה פגע חמור בתות שדה בארץ ובעולם. הנזק מתבטא בכיסוי בתפטיר סבוך בעל נבגים רבים, המפחית מיכולת הצמח להטמיע, גורם לנקרוזה, לנשירת העלווה, לפחיתה ביכולת הצמח להניב פרי ובפרי עצמו. נגיעות קשה מתרחשת בתות שדה בכל צורות הגידול, וכן במשתלות בקיץ. מערך בקרת המחלה המומלץ, המבוסס על ריסוסים כימיים רבים, הינו בעייתי הן בגלל כשלון ההדברה והחשש מפני עמידות, והן בגלל שאריות התכשירים הנמצאים תכופות בפרי המשווק בארץ ובפרי המיוצא אשר מסכנים את היצוא מישראל.

המטרה העיקרית של העבודה הייתה לימוד מנגנוני ההגנה של צמחי התות- שדה כנגד פטריית הקימחון, תוך התמקדות בהבדלים הקיימים בין זנים עמידים ורגישים. לשם כך בתחילת עבודה זו בחנו את אוסף הזנים המצוי במכון וולקני, ובחרנו את הזנים העמידים והרגישים ביותר לקימחון. בזנים אלו נערכו ניסויים שבחנו את מנגנוני ההגנה הפיסיים והאקטיביים של הצמח כנגד הקימחון, כמו כן נעשה ניסיון להבדיל בשלבי התפתחות הפטרייה (נביטה, התארכות נחשון הנביטה וחדירה לאפידרמיס) בין הזנים הללו.

בעבודה זו, בניסויים שנערכו בתנאי מעבדה לצורך בחינת הבדלים בשיעורי הנביטה בין הזנים והתארכות נחשון הנביטה, נמצא כי בזנים העמידים אחוזי הנביטה היו גבוהים יותר מאשר בזנים הרגישים, והבדל מובהק נמצא בין 214 ו 628 לבין 636. אחוזי הנביטה היו 17.3, 12.4 ו- 5.7% בהתאמה. על גבי העלים במצב הפנולוגי הצעיר, שעור הנביטה נמצא גבוה באופן מובהק יותר מאשר על גבי עלים מצירופי הזנים במצב הבוגר. בבחינת הזנים אורך נחשון הנביטה נמצא דומה בכל הזנים שנבדקו ללא הבדלים משמעותיים.

מספר אירועי החדירה לתאי האפידרמיס שנספרו בזנים הרגישים היה בין 16-21, והוא נבדל משמעותית מהזנים העמידים בהם נספרו 6 אירועי חדירה בלבד. על פי הניסויים שנערכו בעבודה זו, לא נראה כי קאלוז קשור במנגנון העמידות של הצמח לקימחון, אלא שהופעתו קשורה בתגובת הצמח לחדירת הפטרייה לתאי הצמח, אולם באופן איכותי וברור נראים הבדלים בין הזנים בהצטברותו שבוע לאחר האילוח, כתוצאה מאירועי חדירה רבים יותר. באנליזה נוספת, שבחנה את נושא חדירת הפטרייה לתאים ע" סריקה במיקרוסקופ אלקטרוני חודר, נראים הבדלים בתמונות בצורת דפנות תאי האפידרמיס ובאכלוסן. נראה כי ההבדל בהתפתחות הפטרייה בין הזנים מתרחש רק בשלב החדירה לאפידרמיס, הבדל שגורם לשוני בהתפתחות המחלה בצמח, ומעיד על פעולת מנגנוני ההגנה הצמחיים כנגד הקימחון.

בבחינת עובי שכבת הקוטיקולה בזנים לא נמצאו הבדלים קורלטיביים למידת הרגישות. בכל הזנים, בצידו העליון של העלה, שכבת הקוטיקולה לא היתה אחידה בעובייה, אך רציפה ושלמה. בצידו התחתון של העלה, שבו מופיעים סימני המחלה, שכבת הקוטיקולה לא היתה רציפה ושלמה.

ממצאים אלו מעידים כי לעובי שכבת הקוטיקולה, כאשר היא רציפה, אין תפקיד משמעותי בהבדלים בין הזנים, אולם ייתכן כי שלמותה חיונית, והופעת הקימחון בצד התחתון של העלה קשורה לכך, בנוסף להבדלי מיקרואקלים ועוצמת אור.

ביטוי חלבוני PR, הקשורים בהתגוננות הצמח בפני פתוגנים ופצעים מכאניים, נמצא שונה בין הזנים העמידים והרגישים. השוני מתבטא באופי הביטוי וברמתו, הן ברמה הבאזלית והן במועדים שונים לאחר אילוח. ביטוי החלבון השייך לקבוצת הכיטינאזות Chitinase 2-2 היה גבוה פי עשר בזן העמיד 635 לעומת הזנים הרגישים 216 ו-636. למרות שרמת הביטוי היחסית איננה אחידה בכל המועדים בזנים העמידים דפוס הביטוי שלהם גבוה משמעותית מאשר בזנים הרגישים, בכל הגנים שנבדקו. נראה כי לחלבונים אלו תפקיד חשוב בהתגוננות הצמח בפני פטריית הקימחון, והבדלים במידת הרגישות נובעים, במידה רבה, מהבדלים בביטויים.

מבוא

תות שדה *Fragaria X ananassa* Duchesne נמנה על משפחת הוורדניים, שה"כ היקף הגידול בארץ כ- 4000 דונם. הגידול מרוכז באזור השרון והמשולש הדרומי (גנאים, 2006). שיטת הגידול הנפוצה בארץ היא במנהרות נמוכות ולא עבירות, בהן מוגנים הצמח והפרי המתפתח מפגעי מזג האוויר בחורף, ומידה מסוימת מפני התפתחות מחלות נוף (Sutton, 1995). נגיעות קשה בקימחון הנגרמת ע"י הפטרייה האובליגטורית *Podosphaera aphanis* מתרחשת בתות שדה שגדל תחת חיפוי פוליאיתילן, בבתי צמיחה ובמנהרות עבירות, בעת גידול במנהרות נמוכות וכן במשתלות בקיץ. המעבר לחממות ומצעים מנותקים מחמיר את בעיות הקימחון מאחר וכנראה תנאי הגידול מתאימים להתפתחות המחלה (צוראל וחוב', 2004).

מחלת הקימחון פוגעת בעלווה, בפרחים, בפירות, בפטוטרות, בעלי הגביע ובנושאי הפרי של תות שדה. בעלים, הנזק מתבטא בכיסוי העלווה בתפטיר סבוך עם שפע נבגים, דבר המפחית מהפוטוסינתזה, גורם לנקרוזה, להתקפלות העלים כלפי מעלה וחושף את הצד התחתון, הרגיש לקרינת השמש, ולהחמרת הנזק. המחלה מפחיתה את היבול ואיכותו (צוראל וחוב', 2004). טיפולי הדברה נסמכים בעיקר על ריסוסים תכופים בתכשירי הדברה אך במקרים רבים מתפתחת עמידות באוכלוסיות הפתוגן, ומומלץ היום על יישום תכשירי הדברה שונים בכדי לדחות או למנוע את עמידות הפתוגן (Wang and Tzeng, 1998). תוצאות הריסוסים התכופים הן שאריות אסורות של תכשירים כימיים בפרי הנקטף, וכתמים לבנים המכערים את הפרי הנפסל לייצוא.

במחקרים קודמים נמצא כי עמידויות של צמחים ממינים שונים למחלת הקימחון קשורה במספר גורמים, בהם רמת ביטוי של חלבוני PR, עובי והרכב שכבת הקוטיקולה, ריכוז ותכולת הפוליפנולים וגורמים נוספים. בנוסף, נמצא כי חדירת הפטרייה לתאי הצמח איננה מתבצעת דרך הפיוניות, אלא חודרת ישירות לאפידרמיס, והיא אינה חודרת מעבר לכך.

מטרת העבודה היתה לימוד הגורמים הצמחיים המעורבים במנגנון העמידות לקימחון בתות שדה. לשם כך אותרו קווים עמידים ורגישים לקימחון, והם שימשו ללימוד ההבדלים בין הזנים. המטרות הספציפיות של העבודה הן: 1. איתור השלב הנבדל בהתפתחות הפטרייה בעלי הצמחים בין הזנים העמידים והרגישים. 2. אפיון מנגנוני הגנה צמחיים: פסי- עובי הקוטיקולה, ואקטיביים- ביטויים ונוכחותם של חלבוני PR, וכימות התרכובות הפוליפנוליות, תוך ניסיון למציאת הבדלים איכותיים וכמותיים בין הזנים העמידים והרגישים לפטריית הקימחון בתות שדה.

סקירת ספרות

1 תות שדה

תות שדה, *Fragaria X ananassa* Duchesne, נמנה על משפחת הוורדניים (Rosaceae). מין זה הינו לרוב רב שנתי הגדל כמין בר וגם באופן מתורבת. מלבד *Fragaria X ananassa* שהינו הכלאה בין *Fragaria virginiana* לבין *F. chiloensis*, ישנם גם מינים של *F. vesca* ו-*F. virginiana*. מספר מערכות הכרומוזומים משתנה ממין למין, משתיים במין הבר- *F. vesca* ועד שמונה במין המתורבת (Shi, 2005). תות שדה הינו בעל גבעול (כתר) מרכזי, ממנו פורצים העלים, השורשים, השלוחות והתפרחות. בראש כל עלה מצוי ניצן חיקי שיכול ליצור שלוחות או תפרחות בהתאם לתנאי הסביבה. העלים מסודרים בצורה לוליינית, מנוצים ובעלי שלושה עלעלים. העלים עבים יחסית, הקוטיקולה עבה והפינויות שקועות ומצויות רק בצידו התחתון של העלה. השורשים פורצים מבסיס הכתר באזור המגע עם הקרקע (זקס ועבדל ראזק, 1989). שלוחות נוצרות במשך הקיץ מן הניצנים שבחיקי העלים החדשים. הניצן מתפתח לשני פרקים, כאשר צמח הבת נוצר בפרק השני, בעוד שהפקע הראשון נשאר רדום או שמייצר שלוחה נוספת, שהינה בדרך כלל קטנה מהשלוחה הראשונית. התפרחת היא למעשה גבעול שהשתנה, ובכל מפרק מחליף חפה את העלה המקורי. הפרח הראשוני בתפרחת מתפתח מקודקוד הצמיחה המקורי, ואילו הפרחים השניוניים מתפתחים מניצנים שבחיקי החפים. תפרחת תות שדה היא מטיפוס האשכול ומתאפיינת בקומות פריחה ובפריחה מחזורית במשך עונות הגידול (Hancock, 1999). קוטרו של הפרח 25-40 מ"מ ולו מצעית מורחבת. עלי הגביע ירוקים ומסודרים בשני דורים. עלי הכותרת לבנים ובמרכזם מספר דורים של אבקנים ועליים. מספר האבקנים בדרך כלל 20-35 (בכפולות של חמישה). המאביקים מכילים אבקה פורייה בצבע צהוב עמוק במשך שלושה ימים. צוף מופרש מן המצעית ומתרכז בבסיס האבקנים ומחוץ לשורה ההיקפית של העליים. סידורם של העליים הרבים הוא סלילי, ומיקומם בקצה המצעית. צלקת העלי גסה ודביקה, ובסיסה מתפתח לזירעון המכיל שחלה אחת וביצית אחת. הזירעון מבשיל ימים אחדים לפני הבשלת הפרי (זקס ועבדל ראזק, 1989). תות שדה מואבק על ידי חרקים, כשלרוב דבורים משמשות להאבקה. פרי התות הוא פרי מדומה הבנוי ממצעית הנושאת ומזינה צבר אגוזיות. גודלו מושפע ממספר השחלות המופרות, וחוסר הפריה גורם לעיוותים קשים בצורת הפרי. למקום הפרח בתפרחת השפעה ניכרת על החנטה, התפתחות הפרי וגודלו הסופי. הזרעים בפרי הקרויים "זרעונים", הנם הפרי "האמיתי". הזמן הממוצע להתפתחות פרי, מפתיחת הפרח ועד להבשלה, בחודשי החורף, הוא 32-38 ימים. באביב עם עליית הטמפרטורות, משך הזמן מתקצר ל-25-28 ימים. התפתחות תות שדה מווסתת על ידי מערכת מורכבת של אותות פיסיולוגיים וסביבתיים (זקס ועבדל ראזק, 1989).

1.1 מאפייני גידול תות שדה בתנאי הארץ

הגידול המסחרי של תות שדה בישראל הוא חד שנתי. שותלים בסתיו בתחילת ספטמבר והקטיף נמשך עד חודש מאי (Sutton, 1995; גנאים, 2006). דרך הריבוי המקובלת בזנים המסחריים היא באמצעות צמחי בת הגדלים על שלוחות היוצאות מצמח האם. צמחי הבת לעונה הבאה נשתלים במאי בשטח המשתלה המחוטא הסמוך לשדה התות שגמר להניב. צמחי הבת מתמיינים במשתלת השטח בתקופת הקיץ החמה, נעקרים ונשתלים במהלך ספטמבר לעונת הניבה הבאה. תהליך ריבוי שתילי התות במשק החקלאי עצמו גורם לרצף שנתי של צמחי תות-שדה העשוי לעודד העברת גורמי מחלה שונים משנה לשנה בשדה. שיטת הגידול הנפוצה בארץ היא גידול חפוי במנהרות נמוכות. גידול התות בחממות גבוהות או במנהרות עבירות בקרקע, וגידול במצע מנותק נפוץ פחות, אך קיים במספר משקים בכל אזורי הגידול. בכל צורות הגידול מוגנים הצמח והפרי המתפתח מפגעי מזג האוויר בחורף אך הטמפרטורה הגבוהה, הלחות והעדר אוורור יוצרים תנאים טובים להתפתחות והתגברותן של מספר מחלות, כגון עובש אפור וקימחון התות. נהוג לפתוח את המנהרות לשם אוורור ולסוגרן עם עליית הלחות בערב או בתנאי מזג אויר גשום. מועדי השתילה מותאמים לזן, מתחילת ספטמבר עד תחילת אוקטובר. הפריחה מתחילה בחודש אוקטובר והצמח מתחיל להניב פירות בהדרגה מאמצע נובמבר בזנים מקדימים, ועד תחילת הקיץ (Sutton, 1995; גנאים, 2006). סה"כ היקף הגידול בארץ כ- 4000 דונם. הגידול מרוכז באזור השרון והמשולש הדרומי. שני הזנים הדס (543) ותמר (328) תפסו כ- 65% מכלל היקף הענף. הזן יעל (329) כ- 18%, הזן יובל, החדש יחסית כ- 12%, מלאך (156) ושאר הזנים כ- 5% (גנאים, 2006).

2 קימחונות (Erysiphaceae): מאפיינים כלליים

פטריות הקימחון הן טפילות מוחלטות הנמנות עם פטריות השק (Ascomycotina). פטריות אלו, חיות בעיקר על צמחים מכוסי זרע ומופיעות בצורה אל מינית, ולעיתים גם בצורה מינית. פטריות מסדרת הקימחונות ברובן, ובכלל זה קימחון התות, הן טפיליות חיזוניות (אקטופרזיטיות). קורי הנביטה מסתעפים ונצמדים אל שטח העלים בעזרת כריות הצמדה (appressoria). ממרכז הכריות יוצאים קורים דקים החודרים לתאי האפידרמיס ויוצרים את המצעים (haustoria). הנבגים האל מיניים, ברוב הקימחונות, נוצרים בשרשרות היוצאות מהתפטיר המצוי על פני העלים, צורתם דמוית חבית או אליפסה באורך 20-45 מיקרון (פלטי, 2000). בקימחונות רבים השלב המיני אינו חשוב מאחר והריבוי נעשה בעיקר בעזרת הנבגים האל מיניים התפוחים (conidia), המכילים חללים (vacuoles) עשירים במים ונפוצים בייחוד על ידי זרמי האוויר. פיזור הנבגים פאסיבי באמצעות תנועת אויר בעיקר עם שינוי הלחות מגבוהה לנמוכה עם התחממות האוויר בבוקר. גופי פרי (קליסטוציות) נמצאו בחלק מהקימחונות (פלטי, 2000). רוב הקימחונות יוצרים את נבגיהם האל מיניים בלחות יחסית בינונית עד גבוהה אך במספר

קימחונות מים נוטים למנוע נביגה, ואחרים מעדיפים לחות נמוכה. לרוב, פטריות הקימחון עמידות ללחות נמוכה של האוויר. נביגת הקימחונות מתרחשת בתחומי טמפרטורה רחבים למדי ולרובם הטמפרטורה המיטבית הנה 15-25°C (פלטי, 2000).

הקשר עם הפונדקאי הוא מתאים (compatible), כלומר הנזק לפונדקאי הוא איטי ומתמשך והצמחים הפגועים עשויים להתקיים זמן רב וליצור דורות רבים של נבגים. הפגיעה האיטית והמודרגת של הקימחונות, נובעת מהעובדה שברוב הצמחים מנוצלים רק השכבות השטחיות ולכן מצומצמת כמות המזון שהפטרייה צורכת מהפונדקאי. מתקבלת על הדעת ההנחה שהפטרייה אינה יוצרת חומרים רעילים. ברוב הצמחים העשבוניים העלים הצעירים נפגעים בשדה פחות מהמתבגרים (פלטי, 2000).

3 קימחון התות

מחלת הקימחון הנה פגע חמור בתות שדה בארץ ובעולם. היא נגרמת על ידי הפטרייה האובליגטורית *Podospaera aphanis* הפוגעת בעלווה, בפרחים ובפירות וייחודית לתות (Spencer, 1978; Mass, 1998). בעלווה, הנזק מתבטא בכיסוי בתפטיר סבוך בעל נבגים רבים, המפחית מיכולת הצמח להטמיע, גורם לנקרוזה, לנשירת העלווה ופחיתה ביכולת הצמח להניב פרי. בזנים הרגישים מופיעים כתמי תפטיר לבן שמכסה בתחילה את החלק התחתון של העלה ומתפשט אח"כ לצדו העליון, העלה מתקפל כלפי מעלה וחושף את הצד התחתון. הרגיש לקרינת שמש והנזק מוחמר. לעיתים נראים כתמים בצבע אדמדם-סגלגל (אמסלם וחוב', 2005). הפתוגן נמצא גם על גבי הפטוטורות. נגרמת פחיתה רבה ביכולת הצמח להניב פרי כתוצאה מהפחתת ייצור האבקה בפרח ובעקבותיה, ירידה בחנטה. כמו כן, נגרמים נזקים ישירים של פסילת פירות ואובדן פרחים ופירות, הרגישים למחלה בכל שלבי התפתחותם. פרחים נגועים מתכסים בתפטיר, מתעוותים ומתים. פרי ירוק שנידבק בקימחון, מתקשה ולא מגיע לבשלות ולעומת זאת, פרי בשל נגוע, מתרכך ונסדק. בנוסף, נגיעות מעטה בפרי מתבטאת בנזקים קשים לאחר הקטיפה מאחר וחיי המדף מתקצרים, טיב הפרי פוחת והוא עובר דה-הידרציה מהירה (Spencer, 1978). מבחינה הדבקת מוצלבות הוכיחו שהפטרייה ספציפית מאד. אין עדות לקיום גזעים של הפטרייה, אך רמת הרגישות שונה בגנוטיפים שונים של תות שדה. (Mass, 1998)

מאפייני בית הגידול כגון תנאי אקלים, אופי הגידול המסחרי ועונת הגידול עשויים להשפיע על התבססות פתוגן ועל התפתחות מגיפה. נגיעות קשה מתרחשת בתות שדה שגדל תחת חיפוי פוליאאתילן, כגון בתי צמיחה ומנהרות עבירות אך לא פחות בעת גידול במנהרות נמוכות, וכן במשתלות בקיץ. קימחון תות שדה נמנה, לפי פלטי (2000) בקבוצת הקימחונות שסבילותם ליובש רבה, אך הם מתפתחים היטב בתנאי לחות גבוהה. גם את הגידולים החד שנתיים בארץ חילק פלטי לקבוצות, בהתאם לאומדן ההפסדים הצפויים ממחלות הקימחון: תות שדה ניכלל בקבוצת ההפסדים החמורים המחייבים בד"כ טיפולי הדברה. רשתות צל צבעוניות להארכת העונה הגבירו את חומרת המחלה (צוריאל וחוב', 2004).

המעבר לחממות ומצעים מנותקים מחמיר את בעיות הקימחון מאחר וכנראה תנאי הגידול מתאימים להתפתחות המחלה. כאשר צמחי בת נדבקים במחלה במשתלה קשה ביותר להתמודד עם המחלה בצמח המניב. הזנים המבכירים והמועדפים ליצוא רגישים במידה רבה למחלה. בפלורידה, נערך ניסוי להשוואת יבול תות שדה בתנאי מנהרות פלסטיק ובתנאי שדה בשני זנים בעלי רגישות שונה. קימחון תות שדה נמצא חמור יותר בזן הרגיש (קמרוסה) בגידול תחת מנהרות. בזן העמיד (Sweet Charlie) היבול היה גבוה יותר במנהרות מאשר בשדה פתוח. מחברי המאמר טוענים שהתוצאה מקורה בתקופות קצרות של רטיבות עלה וטמפרטורות גבוהות שתרמו לשכיחות נמוכה של בוטריטיס (*Botrytis cinerea*) וגבוהה יותר של קימחון על הפירות ביחס לגידול בשטח פתוח (Xiao et al., 2001).

3.1 נביטת נבגים, גידול וחדירה לעלה

נבגי *P. aphanis* דמויי חבית או אליפסה, שממדיהם 15-26 X 23-44 מיקרון. לפי הספרות, הנבגים הנם קצרי חיים. לשם הדבקה נחוצים להם 4-6 שעות של תנאי לחות אויר גבוהה, אך משטח עלה יבש בכדי לחדור ולהתבסס בעלה. שתיים עשרה שעות לאחר הנביטה נוצרות כריות הדבקה לעיגון התפטיר וחדירה מכאנית לפונדקאי מושגת לאחר 24 שעות (Peries, 1962a,b; Mass, 1998). קורי הנביטה מסתעפים ונצמדים אל שטח העלים בעזרת כריות הצמדה הנוצרות ע"י התרחבות קצוות קורים והסתעפותם. ממרכז הכריות יוצאים קורים דקים דמויי צינור, חודרים אל תאי האפידרמיס ויוצרים מצעים (פלטי, 2000). בניסויים ע"ג עלים מנותקים של תות שדה שאולחו בנבגים של *P. aphanis*, והודגרו ב-21 מ"צ באווירה רוויה, תארו Jhooty and McKeen (1965) את נביטת הנבגים שהחלה לאחר 6 שעות וכעבור 12 שעות, רוב הנבגים נבטו. בתום 24 שעות כ-75% מהנבגים הנובטים פיתחו 2 נחשוני נביטה ו-25% פיתחו נחשון יחיד. בתום 24 שעות החלה הסתעפות של הקור. נחשון הנביטה הראשון לא תמיד הסתיים בכרית הדבקה והמשיך לגדול ולהתנפח לקצה שייצר קור שניוני. כרית ההדבקה שטוחה וצורתה דסקית. לאחר 48 שעות כל נחשוני הנביטה היו מפותחים והסיעוף של קור ראשוני ושניוני הפך למושבה. בתום 48 שעות מצעים התפתחו בתא הפונדקאי. לאחר 96 שעות נושאי הנבגים החלו להופיע. קוטרם של נושאי הנבגים תמיד עלה על קוטר קורי התפטיר. לאחר 120 שעות, נושאי הנבגים התפתחו במלואם והחל ייצור שרשרות הנבגים.

כרית ההדבקה יוצרת פין דוגמת מחט, נחשון חדירה שחודר דרך הקוטיקולה ומבעד לדופן העליונה והתחתונה של התאים האפידרמליים. לא נראו סימני פירוק שכבת הקוטיקולה, או דופן התאים האפידרמליים סביב נחשון החדירה. לאחר החדירה לתאי הפתוגן, נחשון החדירה מתפתח למבנה עגול. המצץ נצפה רק בתאים האפידרמליים. פנים המצץ נמצא מלא בציטופלסמה מגורגרת ובמרכזו גוף עגול, לעיתים אליפטי, כהה, שטיבעו לא ידוע (Jhooty and McKeen, 1965a).

3.2 עמידות זנים

מידת הנזק משתנה בין זני התות השונים, אך לא ידוע על זן עמיד ממקור מקומי או אחר, למרות שדווח על "עמידות יחסית" בזנים מסוימים בקליפורניה (Nelson et al., 1995; Nelson et al., 1996; Simpson, 1987). בזנים רבים הנזק עשוי להגיע לכדי 60% אבדן יבול (Nelson et al., 1995). בארץ קיימים הבדלים בין רגישות הזנים למחלת הקימחון, אולם רב הזנים המסחריים רגישים לקימחון. אחד מהזנים המסחריים העיקריים- הזן תמר (328) הינו רגיש ביותר (צוריאל וחוב', 2004).

ביפן התפרצה המחלה בתות עם הרחבת גידול זן חדש של תות שדה. יתכן שתופעה זו התרחשה גם במקומות אחרים. החוקרים היפאנים דווחו ששתילי בת צעירים היו רגישים להדבקה ובהם העלים הצעירים יותר היו רגישים במידה רבה יותר מעלים מבוגרים (Okayama et al., 1995). נעשו מחקרים וניסויים (Simpson, 1987) לבחינת מנגנון הורשת עמידות לקימחון התות, תוך הסקת מסקנות וגיבוש המלצות לתוכניות טיפוח עתידיות, המבוססות על אסטרטגיות שימוש בגנוטיפים עמידים כהורים ובחינת ביצועי הצאצאים, לאיתור רמה גבוהה של הורשת עמידות.

3.3 הדברה כימית וביולוגית

טיפול הדברה סומכים בעיקר על ריסוסים תכופים של תכשירי הדברה פרוטקטנטים וסיסטמיים ומומלץ היום ריסוס תכשירים לחילופין על מנת לדחות את התפתחות העמידות באוכלוסיות הפתוגן (Okayama et al., 1995; Wang and Tzeng, 1998). מעט חומרים מורשים לטיפול נגד קימחון בייחוד לתוצרת המיועדת לשוקי חו"ל ומומלץ להשתמש בחומר ריבוי נקי מהמחלה, לטפל בשתילי בת במשתלות החקלאיים לפני העברתם לשדות המניבים, לחסל שאריות עלים נגועים מעונה קודמת ולרסס בשטח המניב מתחילת הופעת המחלה, להגנת פרחים, פירות ועלווה.

קיימים פונגיצידיים מקבוצות כימיות שונות, המדבירים ביעילות רבה את מחולל מחלת הקימחון בתות שדה. מתכשירי ההדברה הפרוטקטנטים בולטים תכשירי הגופרית באיוד, איבוק או ריסוס. מקבוצת התכשירים הסיסטמיים בולטים התכשירים בעלי מנגנון הפעולה הפוגע בביוסינתזה של הארגוסטרול של הפטרייה וכתוצאה מכך חלה פגיעה בתפקוד הממברנה, עיכוב גידול, דליפה ומוות של התאים. בשנים האחרונות פותחה קבוצה חדשה- Strobilurins (עמיסטאר, פלינט) הפוגעים בהולכת אלקטרונים דרך המיטוכונדריה של הפטרייה וכתוצאה מכך פוגעים בתהליך הנשימה (לייכטניר, 1998). יוני ביקרבונט הם בעלי אפקט פונגיצידי ישיר על הפטריות, כפי שצפו Israel et al. (1993a,b) על נבגים של קימחון האפרסק.

פונגיצידיים כימיים בד"כ יעילים יותר מהתכשירים הביולוגיים, שעדיין לא הוכיחו רמת יעילות עקבית ומוצלחת בכל התנאים. תופעה זו קשורה בתכשירים ביולוגיים המבוססים על אורגניזמים חיים, הדורשים תנאים מיוחדים ביותר להתפתחות מיטבית ופעילות אנטגוניסטית. במקרה של קימחונות, לחות יחסית

היא הגורם המגביל למדבירים ביולוגיים. מסיבה זו, תכשירים אלה מוצלחים יותר בשימוש בתנאי חממה, כאשר הלחות נשמרת מעל לסף מסוים. התנאים בבתי צמיחה (חום, לחות יחסית גבוהה וחוסר אוורור) הינם תנאים מיטביים להתפתחות המדביר הביולוגי והפתוגן. יתכן שניתן לנסות להתגבר על בעיית היעילות של תכשירי הדברה ביולוגיים ע"י שינוי קל בתנאים (במיוחד בטמפרטורה ובלחות היחסית) באופן שיעודדו יותר את התפתחות המדביר הביולוגי על פני הפתוגן (Paulitz and Bélanger 2001; Elad et al., 1999)

4 מנגנוני הגנה בצמחים

צמחים חשופים למספר רב של מיקרואורגניזמים שעשויים להיות פתוגנים פוטנציאליים. למרות זאת, רק מספר קטן ביותר מצליח לחדור ולגרום למחלה. יחסי הגומלין בין הצמחים למיקרואורגניזמים הם מורכבים ביותר. מיקרואורגניזמים המצויים על פני משטחי הצמח או החודרים לתוך רקמותיו משפיעים על הסביבה האינטימית הנוצרת עם הצמח או שהם מושפעים ממנה. הצמח עשוי לספק למיקרואורגניזם סביבה תומכת, כגון חומרי מזון, אך הוא גם עלול ליצור סביבה עוינת כגון: הצבת מחסומים פיזיקליים לחדירה, הפרשת חומרים אנטימיקרוביאליים, אנזימים מפרקי דופן, מעכבי אנזימים של הפתוגן וכו'. מנגנוני העמידות מונעים בדרך כלל את התפתחותם של המיקרואורגניזמים בתוך הצמח. תגובת ההגנה של הצמח מתחלקת לתגובה מקומית, במקום הפגיעה על ידי הפתוגן, ולתגובה סיסטמית, באזורים בצמח המרוחקים ממקום הפגיעה. התגובה המקומית גורמת למניעת חדירה או להגבלה של הפתוגן ולמניעת התקדמותו אל אזורים נוספים בצמח מעבר למקום החדירה הראשוני. התגובה הסיסטמית מביאה לעירור של מערכות ההגנה בכלל הצמח, הן ספציפיות לפתוגן והן כלליות, ומשפרת את יכולת הצמח להתמודד עם הפתוגן (פלטי, 2000).

את מנגנוני העמידות ניתן לחלק לשתי קבוצות: עמידות פיסית, מבנית- המבוססת על מבנה התאים והרקמות, ועמידות ביוכימית- המבוססת על תהליכים וחומרים ביוכימיים. בכל אחת מהקבוצות מבחינים בין גורמי הגנה המצויים בצמח באופן טבעי ללא קשר לתקיפת הפתוגן (עמידות בלתי מושרית- Constitutive resistance), ובין גורמים הנוצרים כתגובה לתקיפת הפתוגן (עמידות מושרית- Induced resistance). בדרך כלל, תגובת ההגנה של הצמח כוללת שילוב של מספר גורמים מהקבוצות הללו, גורמים העשויים להיות שונים ביחסי הגומלין שבין פונדקאים ופתוגנים שונים (פלטי, 2000).

4.1 מנגנוני הגנה מקומיים

תגובת ההגנה המקומית בצמחים, המכונה "תגובת רגישות יתר" (Hypersensitive Response-HR) מאופיינת בהופעה של כתמים נקרוטים הנוצרים כתוצאה מתמותת תאים במקום חדירת הפתוגן אל הצמח ובסביבתו. ההפעלה של תגובת רגישות היתר דורשת, לרוב אך לא תמיד, היכרות של גן לעמידות

של הצמח (R-gene) עם גן לאוירולנטיות של הפתוגן (*avr*) במערכת גן-מול-גן. ההשערה המקובלת היא שהגן *avr* בפתוגן מייצר חומר מסוים המוכר על ידי קולטן ספציפי, הגן R בצמח. ההיכרות בין המשרן לקולטן מתחילה את שרשרת התהליכים הגורמים בסופו של דבר לתמותת תאים. תגובת רגישות היתר מביאה למספר תופעות פיזיולוגיות, כמו שטף של יוני סידן- Ca^{+2} הנכנס אל התא, שככל הנראה גורם להפעלה של תהליכים שונים, כגון זירחון חלבונים בתא. תופעה נוספת היא השינוי בחדירות של ממברנת התא שאופיינית לתגובת רגישות יתר כנגד חיידקים ופטטריות. כמו כן, ניתן לראות בתאים שעוברים מוות תאים מתוכנן (Programmed Cell Death- PCD) כתוצאה מרגישות יתר, גם ייצור של חמצן פעיל וחומצה סליצילית, החיוניים ככל הנראה להפעלת תגובת הרגישות ברוב המערכות של צמח- פתוגן (Heath, 2000).

ממחקרים רבים עולה שתגובת רגישות היתר גורמת לא רק לשינויים ביוכימיים ופיזיולוגיים מקומיים אלא גם לביטוי מקומי וסיסטמי של גנים. במערכת של תפוחי אדמה *Phytophthora infestans* נמצא מגביר ביטוי של חלבוני PR, כגון כטינאז וגלוקנאז המהווים סמנים של העמידות הסיסטמית הנרכשת, בעקבות הביטוי של תגובת רגישות היתר. ישנן עדויות סותרות לגבי התלות בין התגובה המקומית של רגישות היתר לבין העמידות הסיסטמית הנרכשת, וככל הנראה במערכות שונות של פתוגן- צמח יחסי התלות בין שתי תופעות אלה שונה (Kombink and Schmelzer 2001).

4.1.1 תרכובות פנוליות

פנולים הינם תוצרים טבעיים בצמחים בעלי תפקידים פיזיולוגיים רבים, בין השאר כחלק ממערכת ההגנה הצמחית. מעורבות פנולים בתגובת ההגנה של צמחים כלפי פתוגנים כוללת פנולים שנמצאים בצמח באופן תמידי וכאלה המיוצרים כתגובה לתקיפה על ידי פתוגנים. ניתן לחלק, באופן גס, את הפנולים המיוצרים *de novo* בתגובה לפתוגנים לשלוש קבוצות עיקריות: תרכובות פנוליות המצטברות במהירות לאחר חדירת הפתוגן באזור החדירה המיידית, פולימרים של פנולים, כמו ליגנין, המיוצרים מסביב לאזור הפגיעה, ופיטואלקסינים שרבים מהם הינם פנולים בעלי פעילות אנטיביוטית. בצמחים בהם מנגנון ההגנה בפני פתוגנים כולל תמותת תאים מסביב למקום החדירה, כחלק מתגובת רגישות היתר (HR), ניתן להבחין בתגובת הצמח לחדירה של פתוגנים בשלבים הבאים: תמותת תאי הצמח מסביב לאזור החדירה על ידי הפתוגן, שינוי במבנה של דופן התא על ידי הצטברות של תרכובות פנוליות המשמשות כמחסום פיזי בפני התקדמות הפתוגן, למשל יצירת פפילות, ולבסוף יצירה של חומרים אנטיביוטיים ספציפיים, כגון פיטואלקסינים (Nicholson and Hammerschmidt, 1992).

מעורבות של פנולים בתגובה המיידית של צמחים לתקיפה על ידי פתוגנים מוכרת עבור פתוגנים מסוגים שונים, ביניהם פטריות, חיידקים ווירוסים (Skalamera and Heath, 1996). התגובה הראשונית הינה הצטברות של תרכובות פנוליות, כמו סוברין, המהוות מרכיב בפפילות המשמשות

כמחסום פיזי בפני התקדמות הפתוגן ברקמת הצמח. בנוסף, נראית קשירה של פנולים בקשרי אסטר אל דופן התא, התורמים לחיזוקה. ככל הנראה, לתרכובות פנוליות בעלות משקל מולקולרי נמוך, כגון פנילפרופנואידים, יש חלק חשוב בתגובה זו של צמחים ממינים שונים לתנאי עקה (Von Ropenack et al., 1998).

נוכחות של בנזוטיאדיאזול (BTH), חומר סינטטי, על עלי תות שדה יצר עמידות יעילה כנגד קימחון, באמצעות הפעלת מנגנון הגנה סיסטמי (SAR), וביטוי מוגבר של טווח רחב של תרכובות פנוליות (Karjalainen et al., 2002).

4.2 מנגנוני הגנה סיסטמיים

בנוסף לתגובת ההגנה המקומית מתמודד הצמח עם פתוגנים גם על ידי הפעלה של מנגנון הגנה סיסטמית המעורר בעקבות התרחשות של תמותת תאים, או בגלל תגובת רגישות היתר או כסימפטום למחלה הנגרמת על ידי הפתוגן. מבחינים בין שני מנגנוני הגנה סיסטמיים: מערכת הגנה המכונה עמידות סיסטמית נרכשת (SAR), ומערכת שנייה המכונה עמידות סיסטמית מושרית (Induced Systemic Resistance- ISR) מערכות אלו אינן תלויות אחת בשנייה. המערכות מאופיינות בהקניית עמידות של הצמח כלפי טווח רחב של פתוגנים, וביטוי אינטנסיבי של גנים האופייניים לתגובות הגנה ועקה. כאשר מופעל ה-SAR יחסי גומלין של התאמה (Compatibility) בין צמח לפתוגן, שתוצאתם הינה מחלה, הופכים ליחסי גומלין של אי-התאמה (Incompatibility). הפעלת ה-SAR מלווה בביטוי של גנים אופייניים. רבים מגנים אלה מקודדים לחלבונים המכונים Pathogenesis-related (PR) proteins. הסיגנל המועבר בעת הפעלת ה-SAR ממקום הפגיעה הראשוני של הפתוגן אל שאר חלקי הצמח עובר ככל הנראה דרך השיפה (Van Bel and Gaupels, 2004). טיבו של סיגנל זה לא ידוע לאשורו כיום, אולם ישנן השערות לגבי חומרים שונים המהווים אותו, לדוגמה חנקות, חומצה סליצילית ונגזרות של חומצות שומן (Ryals et al., 1996). שלושה מסלולים שונים להפעלה של SAR מוכרים כיום, והם מזוהים על פי המולקולה המהווה את הסיגנל להפעלתם, שהן חומצה סליצילית, חומצה ג'סמונית ואתילן (Kunkel, 2002). חומצה סליצילית הינה בעלת תפקיד מפתח בהפעלת העמידות הסיסטמית הנרכשת, ובהגנה של צמחים מפני פתוגנים. ישנו מידע רב בספרות לגבי הקשר בין עליית ריכוז החומצה הסליצילית בצמח לבין הפעלת מנגנון העמידות וביטוי הגנים האופייניים לו, כמו גנים של חלבוני PR, וכן לגבי הפעלת מערכת העמידות על ידי יישום חיצוני שלה. בנוסף, בצמחים מוטנטים החסרים את היכולת לצבור חומצה סליצילית מעוכבת מערכת ה-SAR (Dong, 2001; Glazebrook, 2001). המסלולים השונים של העמידות הסיסטמית הנרכשת מתפקדים בתלות אחד בשני והם אף משפיעים אחד על השני, לעיתים על ידי הגברה ולעיתים על ידי הפחתה הדדית (Kunkel and Brooks, 2002). מערכת ה-ISR, בניגוד ל-SAR, אינה קשורה בחומצה סליצילית להפעלתה, ואופיינית בצמחים שאינם מסוגלים

לצבור חומצה סליצילית. מערכת ה-ISR אינה קשורה בהפעלת הגנים המקודדים לחלבוני PR (Frye and Innes, 1998).

4.2.1 חלבוני PR

חלבונים צמחיים הידועים כ-PR-Proteins נמצאו כמעורבים במנגנוני הגנה צמחיים מפני פתוגנים שונים (Stintzi et al., 1993). חלבוני ה-PR זהו לראשונה בצמחי טבק, ולאחר מכן בלפחות 9 משפחות צמחים. כיום ידוע שקבוצות החלבונים הינם בעלי פעילויות שונות, כגון קבוצת הכיטינאזות (PR3, PR4), קבוצת האנדוגלוקנאזות (PR2), וכן קבוצות שתפקידיהן הביוכימי טרם זוהה (PR1). חלבוני ה-PR המושרים הם בדרך כלל חלבונים חומציים, בעלי משקל מולקולרי נמוך ועמידות כנגד פרוטאזות, המופרשים לתוך החלל הבין תאי של העלה. ביחד, יוצרים חלבוני ה-PR מערכת של חלבונים המושרים על ידי פתוגנים ולכן יכולים להיחשב כחלבוני עקה. אולם, בניגוד לרוב חלבוני העקה, חלבוני ה-PR מצטברים ברקמות הצמח לרמות שבאופן יחסי קל לזהות (Van Loon, 1997; Shi, 2005). נמצא כי חלבוני PR מושרים גם כתוצאה מעקות שונות: יובש, מליחות, פציעות מכאניות, סביבת מתכות כבדות ועוד (Kasprzewska, 2003). בניגוד לפיטואלקסינים, שמיוצרים בעיקר על ידי תאים בריאים הסמוכים לתאים הפגועים, חלבוני ה-PR אינם מצטברים סביב האזור המקומי של הפגיעה, אלא גם ברקמות מרוחקות שלא נפגעו (Shi, 2005).

חלבוני PR חומציים מושרים על ידי חומצה סליצילית, בעוד שחלבוני PR בסיסיים מושרים על ידי אתילן או חומצה ג'סמונית. הביטוי של חלק מחלבוני ה-PR הינו קונסטיטוטיובי, חלק אחר מווסת התפתחותית, וחלק ספציפי לרקמה או איבר. החלוקה לקבוצות השונות של חלבוני ה-PR מבוססת על מאפיינים ביולוגיים, פעילות אנזימתית, ומידת זהות הרצף המקודד.

4.2.1.1 כיטינאזות PR-3, PR-4

עד לא מכבר נהוג היה לשייך לקבוצת הכיטינאזות רק את חלבוני PR-3, אולם לאחרונה נמצא גם כי חלבוני PR-4 פועלים כנגד כיטין, המצוי בדופן תאי הפטריות. עם זאת, ישנם בספרות מקורות שמיחסים לחלבוני PR-4 פעילות אנטי-פטרייתית לא ידועה. לקבוצת הכיטינאזות יש תפקיד חשוב בהתגוננות הצמח בפני פתוגנים. הסובסטרט העיקרי של הכיטינאזות זה כיטין-הומופולימר המורכב מתת יחידות של אצטילגלוקוזאמין [N-acetyl-D-(glucos-2-amine)] אשר מחוברות ביניהן בקשרים גליקוזידיים β -1,4. מולקולת הכיטין היא למעשה מולקולה של תאית, שבכל מונומר של גלוקוז, אחת מקבוצת ההידרוקסילים (OH-) הוחלפה בשייר אצטילאמיני. שחלוף זה מאפשר יצירת קשרי מימן נוספים בין שרשרות סוכריות קרובות, מה שמביא לחוזק הרב של החומר הנוצר. שרשראות הכיטין הן ארוכות ובלתי מסועפות, בעלות מבנה מסולסל. דה-אצטיליה הינו תהליך נפוץ, שאחד מששת שיירי האמינו-סאכרידים

חסר קבוצת אצטיל. תהליך זה גורם ליצירת כיטוזאן. כיטין וכיטוזאן נמצאים בדופן תאי פטריות, אצות, חיידקים וחסרי חוליות. חומרים אלו, הם מרכיבי השלד החיצוני (exoskeleton) ביחד עם חלבונים, מלחי סידן ומגנזיום (Kasprzewska, 2003). דופן תאי הפטריות מורכב מקומפלקס משולב של פולימרים סוכריים. שני הפולימרים החשובים ביותר הם כיטין וגלוקן. אולם, כיטין הינו המרכיב השולט בדופן פטריית הקימחון (Jacobs et al., 1999).

כל הצמחים מבטאים איזומרים שונים של כיטינאזות שסווגו לשבע קבוצות (I-VII) על בסיס המאפיינים המבניים שלהם (Jacobs et al., 1999). ניתן למצוא כיטינאזות בכל איבר ורקמה בצמח, גם באפופלסט ובחללית (vacuole). חלבונים אלו מיצגים קבוצה גדולה ומגוונת של אנזימים. הם שונים לא רק במיקום המרחבי או הטמפורלי שלהם, אלא בעיקר במבנה המולקולארי שלהם ובספציפיות הסובסטרט. ניתן לחלק את הכיטינאזות על פי אופי פעילותם לשתי קבוצות: כיטינאזות חיצוניות (exochitinases) - פועלים רק על הקצה הבלתי מחוזר של שרשרת הכיטין. וכיטינאזות פנימיות (endochitinases) - מפרקים את הקשרים הגליקוזידיים (β -1,4) בתוך שרשרת הכיטין. חלק מחלבוני PR-4 בעלי רמת פעילות נמוכה שייכים לקבוצה זו, והם חלבונים קושרי כיטין. השריית ביטוי הכיטינאזות עקב התקפת פתוגן יכולה להיות מקומית או סיסטמית. אופי זה תלוי בסוג הפתוגן התוקף, מידת האלימות שלו ובקבוצת הכיטינאזות הספציפית (Kasprzewska, 2003).

נראה כי לכיטינאזות יש תפקיד כפול בהגנה כנגד פטריות פתוגניות. הכיטינאז האפופלסטי לוקח חלק בשלב המוקדם של היווצרות המחלה. הוא משחרר מולקולות מושרות, שמעורבות במעבר של מידע לגבי התקפת הפתוגן, כתוצאה מחדירת הקורים לחלל הבין תאי. לאחר מכן, חלקיקים אלו נקשרים לרצפטור ייחודי שמפעיל את מנגנוני ההגנה, על ידי סינטזה מוגברת של כיטינאזות אפופלסטיות והפרשתן לאפופלסט, וכן סינטזה של כיטינאזות חלליות. עליה ברמת הכיטינאזות האפופלסטיות מגבירה את ייצור המולקולות המושרות, הגורמת להגברת הסינגל להתקפה. במהלך השלב המתקדם יותר בהיווצרות המחלה, כשהקורים חודרים לתאי הצמח, וגורמים להרס הפרוטופלסט, באים לידי ביטוי הכיטינאזות החלליות. הם מפרקים את שרשראות הכיטין החדשות שמסונטזות, דבר שגורם לדיכוי גדילת הפטרייה. על פי ההיפותזה המוצעת, נראה כי כיטינאזות באפופלסט לוקחות חלק ביצירת סיגנלים שמודיעים לצמח על ההתקפה, בעוד שכיטינאזות בחללית מעכבות את התפתחות הפתוגן (Kasprzewska, 2003).

4.2.1.2 גלוקנאזות PR-2

האנזים β -1,3 גלוקנאז משמש לפרוק של גלוקן, שהינו פולימר של גלוקוז הקשור בקשרי β -1,3. גלוקנאזות נמצאו בצמחים, שמרים, חיידקים, פטריות, חרקים ודגים. β -1,3 גלוקן הינו מרכיב מבני מרכזי של דופן התא של פטריות פתוגניות רבות. גלוקנאזות צמחיות שייכות לחלבוני PR ומשויכות לקבוצת

PR-2. סינתזה של חלבונים אלו מושרת בדרך כלל על ידי פתוגנים. בנוסף, בגלל שהסובסטרט לגלוקנאזות מצוי בצמחים, אנזימים אלו עשויים להיות מעורבים בתהליכים התפתחותיים ופיזיולוגיים שונים, כגון התארכות תאים, חלוקת תאים, הבשלת פירות, הפריה ועוד.

כל הגנים המקודדים לגלוקנאזות שנבחנו עד כה, כוללים אינטרון בודד. המיקום של האינטרון בדרך כלל זהה בכל הגנים האלו. נמצאו מספר אלמנטים שקשורים בוויסות ביטוי הגנים לגלוקנאזות. Tae-Seok-Ko et al. (2003), מדווח על אלמנט AGC (AGCCGCC) שהינו שמור מאוד ונמצא באזור הפרומוטור של רוב הגנים המקודדים לגלוקנאזות. אלמנט זה ידוע כמגיב לאתילן. רצף הידוע כ-W-box (TTGAC), גם כן נמצא בפרומוטור של חלק מהגלוקנאזות, והוא מושרה על ידי חומצה סליצילית. רוב הגלוקנאזות מסונטזות כחלבונים פרקורטורים באורך של 300-400 חומצות אמינו. חלקם מכילים סיגנל פפטידי (signal peptide) ומופרשים לחלל הבין תאי. רבים מפרקורטורים אלו מכילים רצף בקצה ה-C טרמינלי שמכוון אותם לחלית, והוא אחראי גם למעבר החלבונים האלו ברשת האנדופלסמטית – ER דרך הגולג'י לחלית שם מוסר הרצף (Sticher et al., 1997). חלבוני הגלוקנאזות הבוגרים שונים באורכם, ובנקודה האיזואלקטרית (PI) שלהם. חלקם בסיסיים, אחרים חומציים או ניטרליים.

גלוקנאזות זוהו במגוון רב של צמחים ביניהם טבק, שעועית, עץ גומי, בננה ואורז. צמח בודד ממין כלשהו יכול גם להכיל מספר עותקים של גלוקנאזות. טבק למשל, מכיל יותר מ-14 סוגים של גלוקנאזות. לגלוקנאזות תפקיד חשוב בהתגוננות הצמח בפני פתוגנים (Cordero et al., 1994). גלוקנאזות משחקות תפקיד ישיר בהתגוננות בפני פטריות, על ידי פרוק דופן תאי הפטרייה, וגורמים אפוא, להרס תאי הפטרייה. בנוסף, אנזימים אלו עשויים לגרום באופן ישיר ליצירת אוליגוסכארידים, שמביאים ליצירת חלבוני PR אחרים או מולקולות אנטי פטרייתיות נוספות, כגון פיטואלקסינים (Klarzynski et al., 2000). בספרות ישנן דוגמאות רבות למינים שונים של צמחים שרמות הביטוי של אנזימים אלו עלו באופן משמעותי לאחר אינטראקציה של צמח-פתוגן. מחקרים רבים הראו שגלוקנאזות מתבטאים באופן קונסטטיטוטיבי ברמות נמוכות בצמחים, ורמת הביטוי עולה מאופן משמעותי לאחר התקפת פתוגן. Ignatius et al. (1994), דיווח על עליה ברמות הביטוי האנזימיים לאחר הדבקה של שעורה בקימחון. גם עמידות של גפן למחלת הקימחון קשורה ישירות לפעילותם של האנזימים כיטינאז וגלוקנאז. ככל שרמת הפעילות האנזימתית הייתה גבוהה יותר, כך עמידות הגפן לקימחון הייתה טובה יותר. Jacobs et al. (1999) הראו כי הדבקה של גפן בקימחון מעלה באופן משמעותי את רמת הביטוי של האנזימים כיטינאז וגלוקנאז. בנוסף, רמת פעילותם של האנזימים, בחלקי עלים בהם הסימפטומים של המחלה נראים באופן ברור, גבוהה משמעותית מאשר באותם עלים, בחלקים בהם לא נראים הסימפטומים. רמת הפעילות האנזימתית בחלקי העלים בהם לא נראתה מחלה היה דומה לרמת הפעילות בעלים לא נגועים כלל.

4.2.1.3 קבוצת חלבוני PR-1

קבוצת חלבוני PR-1 נחשבת כקבוצה דומיננטית בין חלבוני ה-PR שמושרים על ידי פתוגנים או חומצה סליצילית, ומשמשת כמרקר נפוץ ל-SAR. מאז גילוי קבוצה זו ב-1970, נערכו מחקרים רבים בניסיון לאפיין את אופי פעילותה בצמחים, אבל ללא הצלחה מרובה. ידוע כי לחלבוני PR-1 פעילות אנטי פטרייתית מסוימת, ולכן תפקיד קבוצה זו קשור כנראה למנגנון ההגנה של הצמח בפני פתוגנים, אך דרך הפעולה או הקשר לחלבונים אחרים אינו ברור (Van Loon, 1999). בקבוצת חלבוני ה-PR-1 ישנם חלבונים חומציים ובסיסיים, והם בעלי משקל מולקולרי נמוך יחסית (14-16 kDa). בטבק, מתבטאים שלושה חלבונים חומציים מקבוצת PR-1, ושני חלבונים בסיסיים כתוצאה מאינטראקציה עם פתוגן למשל, ווירוס המוזאיקה של הטבק (Bryngelsson et al., 1994).

4.2.2 קוטיקולה

הקוטיקולה מכילה רשת פולימרים בלתי מסיסים, הידועים כקוטיקולה מטריקס, המאוחים עם תערובת של ליפידים. המטריקס הזה כולל קוטיין-פולי-אסטר משולב של חומצה שומנית הידרוקסית, חומצה שומנית הידרוקסי-אפוקסי ושעווה. המבנה הפנים מולקולרי המדויק של פולימר הקוטיין עדיין אינו ברור. בנוסף לקוטיין, מכיל המטריקס גם קוטיין-פולימר של פולימתילאן, שעשוי להיות הפולימר העיקרי של הקוטיקולה במינים מסוימים (Kolattukudy, 1985). הקוטיקולה הינה שכבה דקה ומתמשכת המכילה בעיקר חומר שומני, שמסונטז על ידי התאים האפידרמליים, ונמצא בדפנות החיצוניים שלהם. הקוטיקולה מורכבת משתי שכבות, האזור החיצוני מורכב בעיקר מליפידים אליפטים מסיסים, בעוד שהשכבה הפנימית מכילה כמויות גדולות יחסית ושונות של פוליסאכרידים. בסמוך לקוטיקולה מצויה שכבה של פקטין שנקראת פקטין למלה (Kirkwood, 1999). עובי הקוטיקולה משתנה מאוד בין צמחים ממינים שונים, ובין איברים שונים של אותו הצמח, כתלות בשלב ההתפתחותי ובתנאי הסביבה, הטווח הוא בין 1-14 מיקרון (Kolattukudy, 1985).

הקוטיקולה מגנה על הצמח מפני מצבי עקה שונים. ראשית, הקוטיקולה משמשת כמחסום דיפוזיה, מצמצמת איבוד מים ומומסים, ובנוסף מגבילה כניסה של מזהמים מימיים. התכונות הדיפוזיות של הקוטיקולה נובעות מהרכב ובעיקר מעובי הקוטיקולה. בנוסף להיותה מחסום פיזי, הקוטיקולה יכולה להוות גם מחסום כימי מאחר שהיא מכילה חומרים אנטגוניסטים לפטריות (Elad et al., 1995). חדירת חיידקים ווירוסים לצמח נעשית בדרך כלל דרך פצעים, בעוד שמרבית הפטריות יכולות לחדור גם כשמחסומי ההגנה הם ללא פגע (Kolattukudy, 1985). התפקיד המדויק של הקוטיקולה בעמידות הצמחים למספר פטריות פתוגניות אינו ברור. מספר מחקרים הראו כי מוטציה בקוטיקולה שבעלה סורגום גרמה לירידה בעמידות בפני מחלות פטרייתיות. לא ברור האם השוני בכמות, בהרכב הכימי או במבנה הקוטיקולה גרם להבדלים בעמידות (Jenks et al., 1994). כמות הקוטיקולה שניתן

היה למצות מזנים שונים של חיטה הייתה בקורלציה ישירה לעמידות שלהם כנגד קימחון. בנוסף, הסרה של הקוטיקולה מפני העלים של צמחי- *Lolium rigidum* (צמחי בר נפוצים), הפחיתה מעמידות הצמחים לקימחון (Kerstiens, 1996). Elad et al. (1995) דיווחו כי פגיעה בקוטיקולה מעלה את הנגיעות של בוטריטיס ופטריות פתוגניות נוספות. בנוסף, נמצא כי לעובי הקוטיקולה קשר ישיר לעמידות לעובש אפור בעגבניות וורדים. בזן עמיד של תות שדה כנגד קימחון נמדדה קוטיקולה עבה פי שבע מאשר בזן הרגיש. תופעה דומה התרחשה בשלוחות של אותם הזנים, אולם עובי הקוטיקולה שנמדד בזן העמיד היה פי שניים מאשר בזן הרגיש (Joothy and McKeen, 1965a). קוטיקולה עבה מקנה עמידות במספר אופנים: (1) מספקת עמידות מכאנית לחדירה, (2) מספקת כמות גדולה יותר של סובסטרט שמפורק על ידי קוטינאזות ואנזימים אחרים, (3) צמצום החדירות מקטין דיפוזיה של חומרי מזון לפני העלה, המשפיעים על נביטה והתבססות הפטרייה. קוטיקולה שהיא עבה, אינה סדוקה וחסרת שקעים או אזורים חדירים לפתוגנים, בהחלט תשפר את עמידות הצמח לפטריות פתוגניות (Elad et al., 1995). ההשפעה הגדולה ביותר של הקוטיקולה על אכלוס פטריות בעלים, קשורה כנראה לשלב של נביטת הנבגים ויצירת האפרסוריום. למרות שהקוטיקולה משמשת כמחסום לחדירת הפטרייה, ייתכן כאמור, כי הקוטיקולה בעצמה, במקרים מסוימים, מגבילה אכלוס על ידי הפרשת מעכבי גדילה כימיים (Kerstiens, 1996). הרכב ואיכות הקוטיקולה משתנה בעקבות השפעה מגורמים חיצוניים ופנימיים. אור, טמפרטורה, ולחות עשויים להשפיע על השעווה המרכיבה את הקוטיקולה. לגיל העלים אפקט בולט על הרכב וכמות השעווה. מרכיבים כימיים מסוימים מתגברים עם גדילת העלה וביוסינתזה של שעווה, אולם חל צמצום במרכיבים אלו במהלך השלב הבוגר של העלה (Kirkwood, 1999).

פטריות פתוגניות רבות, פיתחו מנגנונים כדי לחצות את המחסומים המבניים החיצוניים של הצמח- הקוטיקולה ודופן תאי האפידרמיס. פטריות מסוימות, מפרישות תערובת של אנזימים הידרוליטיים, כגון קוטינאזות, צלולאזות ופקטינאזות. אנזימים אלו חיוניים למחזור החיים של הפטרייה, אולם פרוק אנזימתי של קוטין קריטי לחדירה של פטריות פתוגניות, ולכן, קוטינאז הינו אנזים חשוב בתהליך החדירה. עיכוב האנזים מנע נגיעות של *Fusarium solani* באפונה (Knogge, 1996). בנוסף, פטריות פתחו מנגנון חדירה מורכב ומתוחכם יותר על ידי אברים ספציפיים לחדירה שנקראים אפרסוריה, ונמצאים בקצה נחשון הנביטה. אברים אלו נצמדים בחוזקה לפני השטח של העלה על ידי דבק חוץ תאי (extracellular adhesives). במהלך התפתחות האפרסוריום, רמת הנקבוביות יורדת על ידי איחוי של מלנין, דבר המאפשר לחץ טורגור גבוה. לחץ זה מרוכז באזור מצומצם בבסיס האפרסוריום, שאינו מכיל מלנין וחומרי דופן. משקע חדירה זה, מתפתח מעין פין חדירה שמנקב את הקוטיקולה כנראה גם בעזרת אנזימים הידרוליטיים. פטריות פתוגניות אחרות פתחו מנגנון חדירה ישיר שעוקף את הקוטיקולה, על ידי חדירה דרך הפיוניות, אולם מנגנון זה אינו קיים בקימחון תות שדה (Knogge, 1996).

4.2.3 קאלוז

קאלוז הינו פוליסאכריד שבו יחידות הגלוקוז מחוברות בגשר גליקוזידי β -1,3. סוג קשרים אלו גורם לפולימר להסתדר בצורת הליקס. האנזים האחראי לסינתזה של קאלוז הינו קאלוז סינטאז (β -1,3-glucan). הרבצה של קאלוז, כתוצאה מנזק לדופן תאי הצמח או הממברנה, הינה תגובה אופיינית ואוניברסאלית בצמחים עילאיים. הרבצה של קאלוז מתרחשת בתאים כתגובה לחדירה (מוצלחת או כושלת) של פתוגן, ובתאים הסמוכים לפתוגן בחלל הבין תאי. הרבצה של קאלוז שמתרחשת לאחר חדירה של פטרייה, גורמת לאריזה של הפטרייה התוך תאית. קאלוז אינו מופרש ישירות כנגד פטריות, אלא גדל בפני השטח על ידי הממברנה הפלסמטית. נבדקת השערה לפיה הרבצת קאלוז הינה למעשה תגובת הצמח לנזק המכאני, שאיננה קשורה לנוכחות הפטרייה (Skalamera and Heath, 1996).

Schmele and Kauss (1990), דיווחו כי בצמחי מלפפון, פפילות המכילות קאלוז נוצרות בשלב מוקדם יחסית, ויעילות יותר במניעת חדירת הפטרייה *Colletotrichum lagenarium* לעלים. הופעת פפילות אלו, כתוצאה מאינטראקציה עם הפטרייה, מיוחסת לפעילות ספציפית של ממברנת התאים-עלייה בריכוז Ca^{+2} , שמווסת את פעילות האנזים קאלוז סינטאז. בעלים לא נגועים, פעילות האנזים רדומה, אך כאשר מופרעת חדירות הממברנה ל Ca^{+2} בעקבות ניסיון החדירה של פטרייה, מתרחש תהליך שפעול, שתוצאתו שטף של Ca^{+2} , וייצור קאלוז בצורה מוגברת ומהירה (Sticher et al., 1997:).

(Schmele and Kauss, 1990).

שיטות וחומרים

1 כללי

בעבודה זו נבחנו גורמים צמחיים שונים המשפיעים על מנגנוני העמידות של תות שדה כנגד הפטרייה *Podosphaera aphanis*, מחוללת מחלת הקימחון בתות שדה. לשם כך בוצעו ניסויי חממה למציאת זנים עמידים ורגישים למחלה, ששימשו כמודל במהלך העבודה. בנוסף, בוצעו ניסויי מעבדה לבחינת ביטוי הגנים המקודדים לחלבוני PR מקבוצות שונות, תכולת כלל הפנולים בעלי התות, עובי הקוטיקולה ונבחן הקשר בין הרבצה של קאלוז לעמידות. כמו כן, בוצעו ניסויים לבחינת השלב בהתפתחות הפטרייה המבדיל בין הזנים העמידים לרגישים.

1.1 גידול צמחי תות שדה והדבקתם בקימחון

הפטרייה *P. aphanis* גודלה באופן סדיר על צמחי תות שדה מזנים שונים, שהינם רגישים לקימחון. שתילי התות הוכנו בחממה ממוזגת, נקיייה ממחלות וממזיקים, בטמפרטורת יום של 22-25 מ"צ וטמפרטורת לילה של 15-18 מ"צ, בהתאם לעונות השנה. השתילים נשתלו וגודלו בעציצים בעלי קוטר של 13 ס"מ ונפח של כ- 800 סמ"ק. מצע הגידול היה תערובת קליפות קוקוס וקלקר ביחס נפחי של 15:85, בהתאמה. השתילים הושקו מדי 1-3 ימים, בהתאם לצורך ודושנו ב- 5 גרם לליטר מים בדשן 20:20:20 (יחסי N;P;K).

הצמחים אולחו אילוח יבש, באמצעות פיזור מעלי תות, הנגועים בקימחון, שנאספו באותו יום מצמחי תות רגישים. בתקופת הגידול ניתנו מספר טיפולים נגד אקריות וכנימות שתקפו את הצמחים. לא נדגמו עלים לניסויים השונים סמוך למתן הטיפולים הכימיים. סימני המחלה החלו להופיע כ- 7-10 ימים ממועד ההדבקה. הערכת חומרת המחלה התבצעה חזותית בעלים, כמתואר להלן.

1.2 הערכת נגיעות בקימחון

מדד חומרת המחלה מבטא את החלק היחסי בערכי % 0-100 של שטח העלים המכוסה בסימני המחלה. הסימנים האופייניים הינם כיסוי קמחי ואף תמותת רקמת העלה. לשם הערכת הנגיעות נבחרו עלים באופן אקראי. בחלק מהניסויים ערכי הנגיעות במועדים שונים במהלך הניסוי שימשו לחישוב ערכי השטח שמתחת לעקומת התפתחות המחלה (AUDPC - Area Under the Disease Progress Curve). מדד זה מבטא את עוצמת המחלה במהלך כל התקופה הנבדקת.

2 התפתחות הפטרייה בעלי התות בזנים העמידים והרגישים

בסדרת ניסויים זו נעשה ניסיון למצוא את השלב המבדיל בהתפתחות הפטרייה בין הזנים העמידים והרגישים. ראשית נבדקה נביטת נבגי הפטרייה והתארכות נחשון הנביטה על פני העלה, ולאחר מכן נבדק אופן חדירת הפטרייה לתאים במספר שיטות.

2.1 שעור הנביטה והתארכות נחשון נביטה

במהלך הניסויים העוסקים בבחינת שעור הנביטה והתארכות נחשון נביטה, נעשה שימוש בעלים מנותקים של תות שדה מזנים רגישים ועמידים. העלים הונחו על גבי צלחות פטרי שבתחתיתן הונח נייר סינון רווי מים ליצירת אווירה לחה. העלים נקטפו ביום הניסוי מצמחים בריאים וחסרי סימפטומים בחממת הגידול, אולחו באילוח יבש (כמתואר בסעיף 1.2) והונחו להדגרה ב- 20 מ"צ, למשך 24 שעות. לשם צפייה בנבגים נפרסו רצועות דבק שקוף (צלטייפ) על גבי העלה והופרדו ממנו. על רצועות הדבק טופטפו טיפות צבע Cotton blue, לצביעת הנבגים ולאחר 30 דקות בוצעה הסתכלות מבעד למיקרוסקופ אור על הנבגים הצבועים ע"ג רצועות הדבק. ההליך בוצע על פי הפרוטוקול של Peries (1962a). יתרון השיטה הוא בקבלת תמונת המצב של הנבגים על גבי העלה, ללא הרקע הצמחי ואפשרות הסתכלות במיקרוסקופ אור. כל טיפול נערך בארבע חזרות, בכל חזרה נספרו 50 נבגים. נתונים אלה שימשו לחישוב שיעור הנבגים הנובטים. אורך נחשון הנביטה חושב על ידי הכפלת אומדן מספר הפעמים שאורך הנבג מוכל באורך נחשון הנביטה, באורך ממוצע נבג של *P. aphanis* שהוא 30 מיקרון (Boesewinkel, 1980).

2.2 חדירת הפטרייה לרקמת העלה

במהלך בחינת חדירת הפטרייה לתאים נבחנו חתיכות עלים בגודל של 1X1 ס"מ. חתיכות העלים נלקחו מזנים שונים של צמחי תות במועדים של 24, 48, 72, 120 שעות מאילוח בקימחון, ועברו הבהרה על ידי השרייה בריכוזי אתנול משתנים - 50, 70, 80, ו- 96% למשך שעה בכל ריכוז בטמפרטורה של 50 מ"צ. תהליך זה חיוני לשם הוצאת הכלורופיל מהעלים וקבלת תמונה ברורה יותר של פני העלים. לאחר מכן נצבעו העלים ב- Cotton blue, לצביעת הנבגים וקורי הפטרייה. לאחר 30 דקות נערכה הסתכלות על הקורים מבעד למיקרוסקופ אור.

2.3 סריקת חתכים במיקרוסקופ אלקטרוני חודר TEM

לצורך מציאת הבדלים באכלוס קורי הפטרייה בתאי האפידרמיס של הצמחים הרגישים והעמידים, נערכה בדיקה בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר (Transmission Electron Microscope-TEM) על פי סדר הפעולות הבא:

1. הכנת פיסות עלים בגודל 1X1 מ"מ.
2. קיבוע ב- PBS (phosphate buffer saline) 3.5% Glutar aldehyde ב- 4 מ"צ למשך לילה שלם בטלטול.
3. שלוש שטיפות ב- PBS למשך 10 דקות בטלטול.
4. קיבוע ב- PBS 1% OsO₄ למשך 1-2 שעות, עד להשחמת הרקמה.
5. שתי שטיפות בבופר PBS למשך 10 דקות.
6. שתי שטיפות במים מזוקקים למשך 10 דקות.
7. צביעה ב- EnBlock -Uranyl Acetate 5% מומס במים, למשך 30 דקות.
8. צביעה ב- Uranyl Acetate 3% מומס ב- 50% אתנול, למשך 30 דקות.
9. המשך דהידרציה - 70% אתנול, 95% אתנול למשך 10 דקות בכל ריכוז.
10. שתי השריות ב- 100% אתנול, למשך 20 דקות כל השרייה.
11. שתי השריות ב- 100% אצטון, למשך 20 דקות כל השרייה.
12. Embedding - החדרת הרזין (Agar Scientific LTD. England) Agar 100 - תערובת אגר אצטון (1:1). 30 דקות במבחנות סגורות.
13. תערובת אגר אצטון (1:1) 30 דקות במבחנות פתוחות.
14. תערובת אגר אצטון (1:1) בטמפ' 50 מ"צ למשך שעה.
15. 100% אגר בטמפ' 50 מ"צ למשך שעה.
16. יצירת הבלוק ב- 100% אגר, והעברה לפילמור בתנור למשך לילה ב- 65 מ"צ. מהבלוק מכינים חתכים דקים בעובי של 70-100nm.
17. הסתכלות במיקרוסקופ (FEI- TECNAI G2) TEM, וצילום התמונות בעזרת מצלמה דיגיטלית- SIS Megaview3.

2.4 קאלוז

על מנת לבדוק את הקשר בין עמידות הזנים לקימחון והרבצה של קאלוז בתאים בהם מתרחשת החדירה, נבדקו עלים בזמנים של 24, 48, 72, 120 שעות לאחר אילוח בנבגי קימחון. מספר החזרות בכל טיפול הינו 30 דגימות. העלים הובהרו בעזרת תמיסת Lacto-phenol (יחס נפחי 1:1:1:1 של פנול, גליצרול, חומצה לקטית, מים וארבעה נפחים של אתנול) ל- 15 דקות בטמפרטורת החדר, ולאחר מכן הודגרו באמבט חם בטמפרטורה של 65 מ"צ למשך כשעה, עד להלבנת העלים. בשלב הבא, הודגרו הדוגמאות בטמפרטורת החדר בתמיסת lacto-phenol חדשה למשך לילה שלם. למחרת נשטפו הדוגמאות ב- 50% אתנול ואחרי זה במים. הדוגמאות הועברו לתמיסת 0.15M K₂HPO₄ המכילה גם

Cotton blue 0.01%, למשך 30 דקות. הדוגמאות הונחו על זכוכית נושאת, ונערכה הסתכלות במיקרוסקופ באורך גל של 345 nm.

3 אפיון מנגנוני הגנה צמחיים

בעבודה זו נבדקו מנגנוני הגנה צמחיים משני סוגים: מנגנון הגנה פיסי הקיים באופן קבוע בצמחים- עובי הקוטיקולה, ומנגנוני הגנה אקטיביים, הבאים לידי ביטוי בתגובה לפתוגן- נוכחות וביטוי של חלבוני PR וריכוז פוליפנולים בעלים.

3.1 מיצוי פנולים מעלי תות-שדה

מיצוי הפנולים מהרקמה נעשה בצורה הבאה: 500 מ"ג של רקמה צמחית טרייה נכתשו בעזרת מכתש ועלי בעזרת חנקן נוזלי והוספה של 10 מ"ל אתנול בריכוז 50%. הרקמה הכתושה הועברה למבחנות 15 מ"ל והונחה להדגרה באמבט חם בטמפרטורה של 75 מ"צ במשך 15 דקות. בשלב הבא בוצע סירכוז של הדוגמאות למשך 5 דקות במהירות 3000 סל"ד בטמפרטורה של 4 מ"צ. לאחר הסירכוז נישפה הנוזל העליון והועבר למבחנה נקייה בנפח 15 מ"ל. נפח הנוזל הסופי במבחנה הושלם ל- 10 מ"ל באמצעות אתנול 50%.

3.1.1 מדידה פוטומטרית של התרכובות הפנוליות

מדידת ריכוז הפנולים נעשה בצורה הבאה: 1 מ"ל של ריאגנט פולין (Folin ciocalteu's phenol reagent, Sigma) הוכנסו למבחנת זכוכית 15 מ"ל. לריאגנט הוסף 1 מ"ל מנוזל המיצוי ובוצע ערבוב בוורטקס ואינקובציה בטמפרטורת החדר למשך שתי דקות. לאחר מכן הוספת 800 µl של נתון פחמתי Na_2CO_3 15%, והדוגמאות הושארו בהמתנה במשך שתי דקות נוספות, שלאחריהן הוספו 7.2 מ"ל מים מזוקקים. הדוגמאות הועברו לאינקובציה באמבט חם בטמפרטורה של 55 מ"צ למשך חמש דקות ומיד לאחר מכן נבדקה הבליעה בעזרת ספקטרופוטומטר- Spectronic instruments Genesys 5 (סיפן, קרמירה) באורך גל של 735 nm. להכנת עקום הכיול שימשה חומצה גלית כסטנדרט. בטווח הריכוזים שבין 250-50 מ"ג/ליטר התקבל עקום ליניארי.

3.2 אנליזת עובי הקוטיקולה של עלי התות

אנליזת עובי הקוטיקולה בעלי התות בוצעה על ידי קיבוע, הכנת חתכים, צביעה והסתכלות במיקרוסקופ. הקיבוע מאפשר הכנת חתכים מיקרוניים, והקוטיקולה נבדלת ע"י צביעה ב- Sudav IV שצובע אותה בצבע אדום.

3.2.1 קבוע הרקמה, הכנת חתכים וצביעות היסטולוגיות

קבוע הרקמה - בשלב הראשון של קבוע הרקמה הודגרו הדוגמאות בתמיסת FAA (50% אתנול, 5% חומצה אצטית, 10% פורמהאלדהיד, 35% מים סטריליים). לשם החדרה טובה יותר של התמיסה המקבעת הופעל וואקום באמצעות משאבה של Biometra3257-BM, שישה מחזורים למשך 15 דקות כל מחזור. לאחר מכן הושארו הדוגמאות למשך הלילה בתמיסה בטמפרטורת החדר. למחרת יובשו הדוגמאות באתנול 50% פעמיים, ופעם נוספת בתמיסות אתנול בריכוזים הבאים: 60, 70, 85 ו-95%. בכל שלב הודגרו הדגימות למשך 30 דקות, כאשר לאחר כל החלפה הופעל וואקום במשך 15 דקות. בסיום התהליך הדוגמאות הודגרו למשך לילה באתנול 95% בטמפרטורת החדר. ביום שלמחרת בוצעו שלוש החלפות אתנול אבסולוטי, ולאחריהן בוצעה החלפה לתמיסות קסילן אתנול (X-E) בריכוזים עולים של קסילן ויורדים של אתנול (X25%-E75%, X50%-E50%, X75%-E25%), כאשר זמן ההדגרה בכל שלב היה 30 דקות, ולאחר כל החלפה הופעל וואקום במשך 15 דקות. בשלב הבא הודגרו הדגימות ב-100% קסילן למשך שלוש שעות עם החלפת התמיסה כל שעה, ומיד לאחר מכן הפעלת וואקום למשך 15 דקות. בסוף המחזור האחרון הוספו כ-25 חתיכות ציפים של פראפלסט, (Paraplast Plus, Oxford Labware, MO, USA), והדוגמאות הודגרו למשך הלילה בטמפרטורת החדר. למחרת הועברו הדגימות לתנור בטמפרטורה של 42 מ"צ, והוספו עוד שתי מנות ציפים בכל יום, לקבלת רקמה המקובעת בתוך פראפלסט. בשלב הבא הועברו הדגימות לתנור ב-62 מ"צ להחלפת הפראפלסט המומס בקסילן בפראפלסט נקי מותר, שהוכן מראש. בוצעו ארבע החלפות שלאחריהן הדגימות הועברו לצלחות אלומיניום להקרשת הפראפלסט.

חתכים היסטולוגיים - החתכים בוצעו על ידי מיקרוטום (Microtom 820 American Optical Company) בעובי של 15-25 מ"מ. הדוגמאות הונחו על זכוכית נושא וקובעו ב-45-50 מ"צ במשך 48 שעות. צביעת הרקמה - תהליך הצביעה החל בהמסת הפראפלסט על ידי טבילות חוזרות למספר דקות, של הרקמה המקובעת בזכוכית הנושאת, בשני כלים נפרדים המכילים Histo-clear ("פינקלמן כימיקלים בע"מ"). לאחר מכן הועברו הדוגמאות לסדרת תמיסות של אתנול: 95% שלוש פעמים (בכלים נפרדים), ופעם אחת בתמיסות 70% ו-50%. הדוגמאות הועברו לכלי עם הצובען Sudan IV בריכוז של 0.75 גרם/300 מ"ל 85% אתנול, במשך 30 דקות, נשטפו ב-50% אתנול ובמים להורדת שאריות צבע, ונסגרו בזכוכית מכסה באמצעות גליצרוול 50%. הדוגמאות נבדקו במיקרוסקופ Leica DMLB (Germany), הצילום נעשה באמצעות מצלמת Leica DC2000 (Germany) CCD camera תוך שימוש בתוכנת Leica IM1000.

3.3 בדיקת רמת ביטוי חלבוני ה-PR

בכדי לבדוק את אופי הביטוי של חלבוני ה-PR בעלי התות, יש צורך לבדוד את רצפי הגנים המקודדים

לחלבונים אלו. בידוד הרצפים נעשה על ידי הפקת RNA מעלי התות, סינתזה של cDNA, וביצוע PCR עם התחלים המתאימים. השלב הבא הינו בדיקת ביטוי החלבונים על ידי אנליזת PCR כמותית (qPCR) או על ידי ריאקצית Northern.

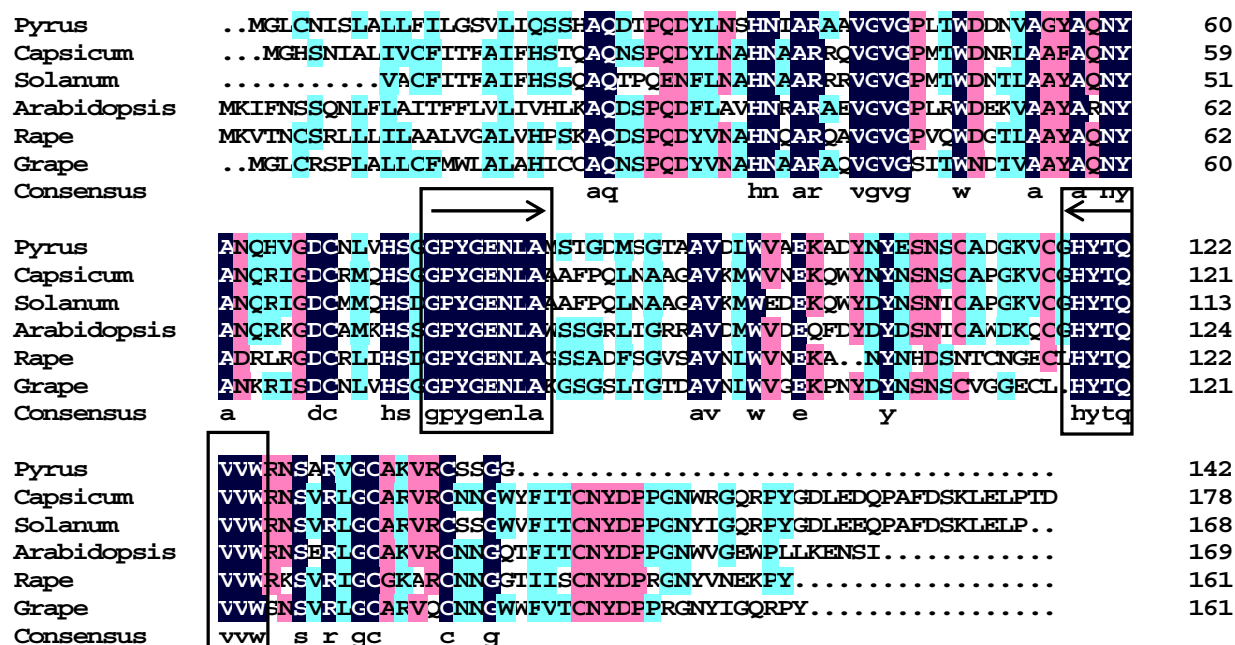
3.3.1.1 בידוד רצפי הגנים המקודדים ל PR's

בכדי לבדוק את ביטוי החלבונים מקבוצת ה-PR, היה צורך תחילה לבודד את הגנים המבטאים חלבונים אלו. רצפי הגנים לחלבון PR-2, ולקבוצת חלבוני הכיטינאזות- Chitinase 2-1, Chitinase 2-2 ו-PR-3 נמצאו במאגרי המידע, אולם נערכו השוואות עם מיני צמחים קרובים לקבלת אזורים שמורים (תמונה 1).

TabacumMFLCIKNGFLAAALVL..VGLLICSIQMIGAQSIGVCYCKHANNLESDQDVINLY	53
FragariaMYFSYTTLKNFTFMPILLI..LVLFMPALQITGGQSAGVCYGRNGDNLESDTEVIDLY	56
ArabidopsisMTLFLLLIALFITITILNPTSGESV.GVCYGMGNNLESDTITALE	45
Prunus	MAKSNSSVGRGSPMISIVFLGL..LM...ASFETTGAQI.GVCYGMGLDRLEPPSEVIATLY	56
Rubber Tree	MAISSSTSGTSSSLPSRTTVMLLI..LFFFAASVGIITDAQV.GVCYGMQGNLEPPVSEVIATLY	59
LycopersicomMAFLSLLASLLI..VGLLI...QITGAQPIGVCYCKIANNLESDQDVIKLY	47
Tabacum	NANGIRKMRITYNPDITNVFNALRGSNIEIILLVPLQDITQSTIDPS.RANGVVDNIIINHFPDV	114
Fragaria	KSNGLIGRMRIYEPNQATLEALRGSNIEIMVTILNINNLOALTDAA.AATDWWQKNVQPYSDV	117
Arabidopsis	RQNNIRRVRLYDPNQAAALNARNTGIEVIIGVPNTIDLRSLTNPS.SARSWLQNNVNLNYPVAV	106
Prunus	KQNNIRRMRLYDPNQAAALAKGSSYIIEMLGVPNDNLOSLASSQANANTWVQNNVRNYGN.V	117
Rubber Tree	KKSNITIRMRIYDPNRVLEALRGSNIEILIGVPNSDITQSTTNPS.NAKSWVQKNVGRGFWSSV	120
Lycopersicom	NSNNIKKMRITYFPETNVFNALKGSNIEIILLVPNQDLEALANPS.KRQGVVDNIRNHFPDV	108
Tabacum	KFKYIYAVGNEVSPGNN.GQY.APFVAPAMQVYNALAAAGIQDQIKVSTAYSGILANTYPP	174
Fragaria	KFKYIYAVGNEVHPD...AAEAQYLLPATQNIQNAVKANLQSQIKVSTADTILLDPSEFP	175
Arabidopsis	SFKYIYAVGNEVSPSNGGDV...VLPAMRNVDALRGANIQDRIKVSTADMTLIGNSEFP	163
Prunus	RFKYIYAVGNEVKPSDSY...AQFLVAPAMQIQNAISSAGLG..IKVSTAVDTGVLGNSFP	173
Rubber Tree	LFRYIYAVGNEISPVNRGTAWLAQFVLPAMRNIDHAIRSAGIQDQIKVSTADLTLVGNSEFP	182
Lycopersicom	KFKYIYAVGNEVDPGRDSGKY.ARFVGPAMENIYNALSSAGIQNQIKVSTAYLGLLINTYPP	169
Tabacum	KDSIFRGEFNSFINPITIGFTLQVHNLPLLIANVYPYFGHIFNTADVPLSYALFTQQEANPA...	233
Fragaria	SDGAFSSAANSFITPITIGFTLQVHNLPLLIANVYPYFAYIGDPANIKLEYALFTSPGVVVQDGS	237
Arabidopsis	SSGEFRGDVWRWYIDPVIGFTLSTNSALLANVYPYFSYVDNPRDISLSYALFTSPSVVVWDGS	225
Prunus	SKGEFRKSEYGALLNPITIRFVNNRSPLLVNIYPYFSYSSNTHDIRLDYALFTAPSVVVQDGG	235
Rubber Tree	SAGAFRDDVRSYLNPIIRFVSSIRSPLLANVYPYFTYAGNPRDISLPYALFTSPSVVVWDGQ	244
Lycopersicom	RDSIFRDEYKSFINPITIGFTSRHNLPLLIANVYPYFGHADD..NVPLPYALFKQQGLNDA...	226
Tabacum	.GYQNLFDALLDSMYFAVEKAGGQNVETIVSESGWPSEGNLSAATIENAOITYENLINHV..K	292
Fragaria	NGYQNLFDAILDTHYSALEKAGAPNMVIVVSESGWPSEGSDAATNGNAGTYYSNLINHV..K	297
Arabidopsis	RGYQNLFDALLDVVYSAVERSGGGSLPVVVSESGWPSNGGNAASFDNARAFYTNLASRVREN	287
Prunus	RGYRNLFDAILDAVYAALFKAGGGSLEIVVSESGWPSAGGTATTIDNARTYNANLIQHV..K	295
Rubber Tree	RGYKNLFDAILDVLYSALFKERAGGGSLEVVVSESGWPSAGAFATFDNGRTYLSNLIQHV..K	304
Lycopersicom	.GYQNLFDALVDSMYFAVEKLGQNIETIVSESGWPSEGHPSATLENAMTYTNLINHV..K	285
Tabacum	SGAGTPKKEPKAIETYL FAMFDENKEGDITTEKHFGLFSPDQRAKYQLNFN.....	343
Fragaria	TG..TPKRENGAIETYL FAMFDENLKDGAEVEKHFGLFSPENKQPKYQLTFG.....	346
Arabidopsis	RG..TPKREGRGVETYL FAMFDENQKSP.EIEKHFGLFSPENKQPKFPIIFSAARDGTAV	343
Prunus	GG..TPKREGRAIETYL FAMFDENRKNP.EIEKHFGLFSPSPKQPKYPIFN.....	343
Rubber Tree	RG..TPKRENRAIETYL FAMFDENKQKQ.EVEKQFGLFSPDKWQKYNLNF.....	352
Lycopersicom	GGAGTPKKEPGRITETYL FAMFDENRKGKPSQHFGLFSPDQRAKYQLKFD.....	336

תמונה 1: השוואת רצף ח' האמינו של החלבון PR-2 במיני צמחים שונים, ביחס לתות שדה. האזורים הצבועים בשחור מעידים על אזורים שמורים ברצף; ההשוואה נעשתה בעזרת תוכנת DNAMAN

על פי האזורים השמורים בקצוות הגנים, תוכנו התחלים הספציפיים PR2-F184 ו- PR2-R744 לבידוד הגן מ- cDNA (פרוט רצפי התחלים בסוף הפרק). באופן זה בודדו רצפי הגנים המקודדים לחלבונים מקבוצת הכיטינאזות PR-3, CHT2-1, CHT2-2. מנגד, רצפי חלבוני PR-1 ו- PR-4 בתות שדה לא נמצאו במאגרי המידע, ולכן על סמך השוואת רצפים אלו במינים קרובים (תמונה 2) סונטזו התחלים PR1-F1 ו- PR1-R1, לבידוד מקטע הגן המקודד לחלבון PR-1, ו- PR4-F1 ו- PR4-R1, לבידוד מקטע הגן המקודד לחלבון PR-4 (טבלה 1).



תמונה 2: השוואת רצפי ח. אמינו של החלבון PR-1 במינים שונים, האזורים השמורים מופיעים כ- Consensus. התחלים המתאימים תוכנו מהאזורים המסומנים. ההשוואה נערכה בתוכנת DNAMAN. ביצוע PCR בעזרת תחלים אלו על cDNA ובידוד המקטע, לאחר הפרדת התוצר בג'ל אגארוז, איפשר שיבוט לפלסמיד, הפקתו, בידוד המקטע וריצופו. באופן זה נמצאו האזורים השמורים בגן המקודד לחלבון PR-4.

טבלה 1: רצפי התחלים שתוכנו על סמך האזורים השמורים ברצפי החלבונים

הגן	שם התחל	הרצף השמור (ח. אמינו)	רצף התחל
PR-1	PR-1 F1	GPYGENLA	5'-GGNCCNTAYGGNGARAA-3'
PR-1	PR-1 R1	HYTQVWW	5'-CCANACNACCTGNGTRTARTG-3'
PR-4	PR-4 F1	CATWDA	5'-TGYKCNACNTGGGAYGC-3'
PR-4	PR-4 R1	DQCSNG	5'-CCNCCRTTG CYRCAYTG-3'

מיצוי תוצרי ה-PCR מהגלל נעשתה באמצעות קיט: High Pure PCR Product Purification (Roche, Germany) Kit. שיבוט מקטעי ה-cDNA נעשה על ידי קיט: pGEMT- T Easy vector (Promega, USA) systemI. פלסמידים עברו טראנספורמציה לחיידקי *E. coli* XL1-blue בשיטת אלקטרופורציה במכשיר- Eppendorf Electroporator 2510 (Eppendorf, USA). החיידקים גודלו על מצע LB amp נוזלי, בטמפרטורה של 37 מ"צ למשך שעה וחצי, ולאחר מכן נזרעו על צלחות LB amp עם X-gal ו-IPTG, וגודלו ב-37 מ"צ במשך יממה. מושבות לבנות שהכילו את מקטעי הגנים, נזרעו על צלחות LB amp חדשות, ועברו PCR עם תחלים ספציפיים לפלסמיד: SP₆, T₇. בנוסף, מושבות אלו גודלו למשך לילה במצע נוזלי-3 מ"ל LB amp. הפלסמידים הופקו, ונשלחו לריצוף, בשיטת מיני-פרב על פי פרוטוקול הקיט- NucleoSpin®Plasmid, (Macherey-Nagel, Germany). בנוסף, הפלסמידים נחתכו באנזים הרסטריקציה EcoRI לווידוא קיומו של המחדר. לשם כך נלקחו DNA 4.5 µg, 1 µg אנזים, buffer (x10) 1.5 µg, 8.5 µg מים סטריליים. התערובת הודגרה ב-37 מ"צ למשך שעה, ולאחר מכן הופרדה בגלל. תוצרי הפקת הפלסמיד נשלחו לריצוף.

3.3.2 הפקת RNA בשיטת CTAB

הפקת RNA מעלים של צמחי תות שדה בוצעה על ידי שיטת CTAB. 2 גרם רקמה נכתשה בחנקן נוזלי, והועברה למבחנת 50 מ"ל. לאחר הוספת בופר CTAB (0.1M Tris pH-8, 0.025M EDTA pH-8, 2M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP) ו-1 מ"ל β-Mercapto Ethanol, הודגרו הדוגמאות באמבט חם ב-65 מ"צ במשך 10 דקות. לאחר מכן הוספו 20 מ"ל של chloroform:isoamyl alcohol (1:1) לשם הפרדת החלבונים. התמיסה עורבבה ידנית 5 דקות, ועברה סרוז ב-10000 סל"ד למשך 10 דקות, 4 מ"צ. לאחר מכן הועברה הפאזה העליונה למבחנה נקייה. למיצוי חוזר וניקוי נוסף הוספו שוב 20 מ"ל chloroform:isoamyl alcohol, ולאחר ערבוב וסרוז באותם תנאים, הועברה הפאזה העליונה למבחנה נקייה. השקעת ה-RNA בוצעה ע"י הוספת 10M LiCl, בנפח השווה לשליש נפח המיצוי במבחנה, לקבלת ריכוז סופי של 2.5M, והדגרת התמיסה ללילה ב-4 מ"צ.

למחרת, סורכזה התמיסה ב-10000 סל"ד, למשך 20 דקות, 4 מ"צ, ושטיפת הפלט שנוצר ב-1 מ"ל 70% אתנול קר, סרוז 10000 סל"ד למשך 3 דקות, 4 מ"צ. לניקוי נוסף של ה-RNA, הוספו לפלט 1 מ"ל SSTE (1 M NaCl, 0.1 M Tris pH-8, 0.5% SDS, 1 mM EDTA pH-8), השלמת נפח עם מים סטריליים) ו-1 מ"ל Acidic Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (1:1), וסרוז ב-10000 סל"ד, 5 דקות, 4 מ"צ. הפאזה העליונה הועברה למבחנה נקייה, הוספת 1 מ"ל chloroform:isoamyl alcohol (24:1) וסרוז 10000 סל"ד, 5 דקות, 4 מ"צ. השקעה אתנולית התבצעה על ידי חלוקת הפאזה העליונה לשתי מבחנות, הוספת 10 M אמוניום אצטט בנפח השווה לשליש נפח המיצוי במבחנה, ו-100% אתנול בנפח כפול מנפח המיצוי + המלח. הדגרה ללילה ב-20 מ"צ.

ביום שלמחרת, ה-RNA הושקע על ידי סרוז ב-13000 סל"ד, למשך 20 דקות, 4 מ"צ, הפלט נשטף ב-200 µl אתנול 70% קר. לאחר הוצאת האתנול יובשו הפלטים בוואקום במשך כ-30 דקות. הפלטים הורחפו ב-30 µl מים סטריליים ואוחדו למבחנה אחת, לנפח סופי של 60 µl. ריכוז ה-RNA נמדד במכשיר (NanoDrop Technology) NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, באורך גל של 230 nm. דוגמאות ה-RNA נשמרו ב-80 מ"צ.

3.3.3 ניקוי ה-RNA משאריות DNA

לאחר הרחפת הפלט המכיל RNA במים סטריליים, עברו הדוגמאות טיפול נוסף לסילוק שאריות DNA. עבור כל RNA 14.5 µl התקבלה כמות סופית של 20 µl, לאחר הוספת המרכיבים הבאים: Buffer 2 µl (x10) DNase, DNase (RQ1-RNase-free DNase, Promega, USA) 0.5 µl, 3 µl, 0.5 µl Ribonuclease-inhibitor (Promega, USA). הדוגמאות הועברו לאינקובציה ב-37 מ"צ למשך 30 דקות, שלאחריהן הופסקה פעילות ה-DNase על ידי הוספת 20 mM EDTA ואינקובציה של 10 דקות בטמפרטורה של 70 מ"צ. בדיקת ניקיון דוגמאות ה-RNA משאריות DNA נעשתה על ידי ריאקציה PCR אשר בה ה-RNA שימש כ-Template עם תחלים לגן המקודד לאקטין. דוגמאות שמהן לא התקבל תוצר (כלומר נקיות מ-DNA) נלקחו להמשך עבודה.

3.3.4 סינתזת cDNA

על מנת לסנטז cDNA מה-RNA שהופק הוכנסו המרכיבים הבאים למבחנת אפנדורף: 0.5-1 µg total RNA, 0.2 µg random hexamers (Sigma), 0.5 µg oligo (dT)₁₈, והנפח הושלם ל-11 µl עם מים סטריליים. התערובת הוכנסה לאינקובציה ב-70 מ"צ למשך 5 דקות, והועברה מיד לקרח ל-5 דקות נוספות. לאחר מכן הוספת: reaction buffer (5X) 4 µl, 10 mM dNTPs 2 µl, 0.5 µl Ribonuclease-inhibitor, 2 µl מים סטריליים להשלמת הנפח ל-19.5 µl. התערובת הושארה ב-25 מ"צ למשך 5 דקות, ולאחר מכן הוסף האנזים-Reverse Transcriptase (RevertAid™M- 0.5 µl (MuLV; Fermentas). התערובת הושארה ב-25 מ"צ למשך 10 דקות נוספות, ולאחר מכן הועברה לאינקובציה ב-42 מ"צ למשך שעה. סיום הריאקציה נערך על ידי אינקובציה ב-70 מ"צ למשך 10 דקות.

3.3.4.1 PCR לקביעת תקינות ה-cDNA

עיקרון השיטה- הכפלת מקטעי DNA ספציפיים על ידי סינתזה אנזימתית *in vitro*. הסינתזה מתבצעת בעזרת שני תחלים העוברים היברידיזציה כל אחד לגדיל המשלים, ותוחמים את האזור בו מצוי מקטע ה-DNA אותו מעוניינים להגביר, ואנזים DNA פולימראז עמיד לחום- Taq polymerase, שיציב

בטמפרטורות גבוהות (95 מ"צ). ריאקציה ה-PCR נעשתה במכשיר PCR, Whatman biometra (Germany). Tgradient (Germany). ה-cDNA מהדוגמאות השונות שימש כתבנית בריאקציות ה-PCR. מרכיבי הריאקציה- 0.2 mM dNTP's, 3 מיקרוליטר בופר 10X, 10-100 ng DNA, מים סטריליים, 1 Unit/Kb Taq polymerase, 0.2-0.5 μ M forward/reverse primers.

נפח הריאקציה- 30 מיקרוליטר.

שלבי הריאקציה-

שלב 1: 94 מ"צ - שתי דקות.

שלב 2: 94 מ"צ - 15 שניות.

שלב 3: 60 מ"צ - 30 שניות.

שלב 4: 72 מ"צ, משך הזמן תלוי באורך התוצר המתקבל בין שני התחלים.

חזרה על שלבים 2-4 35 מחזורים.

שלב 5: 72 מ"צ - דקה.

שלב 6: סיום הריאקציה על ידי הורדת הטמפרטורה ל- 4 מ"צ..

הדוגמאות הופרדו בג'ל אגרוז באחוזים משתנים, בהתאם לגודל התוצר, ובהתאם לשיטות המקובלות.

3.3.5 קביעה כמותית של ביטוי גנים על ידי RT-PCR (Real Time)

ביטוי הגנים לחלבוני ה-PR נבדק במערכת RT-PCR. עקרון השיטה הוא PCR המתבצע בנוכחות צבע פלורוסנטי, במקרה זה Syber Green, אשר נקשר באופן לא ספציפי למולקולות dsDNA, ופולט אור פלורוסנטי בעקבות הקרנה ב-U.V. הריאקציה מתבצעת במכשיר בעל חיישנים לפלואורסנציה אשר קוראים את עוצמת הפלואורסנציה בכל מחזור הגברה (cycle). רמת הפלואורסנציה המתקבלת נמצאת ביחס ישר לכמות תוצרי ה-PCR, כלומר לכמות ה-dsDNA שנוצר.

במחזורי ההגברה הראשונים רמת הפלואורסנציה נמוכה, אך ישנה נקודת זמן בה הפלואורסנציה מצטברת עד לסף מסוים שנקבע מראש. סף זה זהה בכל הדוגמאות. מחזור ההגברה שבו עוצמת הפלואורסנציה מגיעה לסף שנקבע נקרא Ct-threshold cycle. ה-Ct של כל דוגמא משקף את הכמות ההתחלתית של ה-dsDNA כך שדוגמא בה כמות התחלתית גבוהה של dsDNA תהיה בעלת Ct נמוך (הפלואורסנציה שתפלט תגיע לערך הסף לאחר מעט מחזורי הכפלה), בעוד שדוגמא המכילה מעט dsDNA תהיה בעלת Ct גבוה (יידרשו הרבה מחזורי הכפלה על מנת שהפלואורסנציה תגיע לערך הסף). על מנת לבטל הבדלים הנובעים מכמות התחלתית שונה של Total RNA נבדק גם הביטוי של גן המתבטא ברמה קבועה בכל הרקמות ואינו מושפע מטיפול כלשהו (Reference gene). את תוצאות הביטוי של הגנים הספציפיים מנרמלים ביחס לביטוי של ה-Reference gene. בריאקציות אלו נעשה שימוש בזוגות התחלים כפי שמופיע בטבלה 2.

טבלה 2: רצפי זוגות התחלים ששימשו לראקצית qPCR ותוצרים

שם התחל	רצף התחל	אורך התוצר המתקבל (bp)
PR1-F28	5'-GGCTACGGAGAGATGACAG-3'	103
PR1-R112	5'-CCCACATTCATCACCAAC-3'	
PR2-F575	5'-TCACCTTTTTGGGCAACAATG-3'	148
PR2-R702	5'-CTGGTGAAGTGAACAAGGCAT-3'	
PR3-F515	5'-AGGGCGGCAAGAAAGTTTAC-3'	217
PR3-R712	5'-GTGCAGGAATGGCTGAAGTC-3'	
PR4-F57	5'-GCCACGTACCACCTCTACAA-3'	170
PR4-R207	5'-TAGCAGGCATCTTCCACAGG-3'	
CHT1-F449	5'-GACCGATTCAACTATCTTGG-3'	140
CHT1-R569	5'-CTCCGTCATCCAGAACCATA-3'	
CHT2-F520	5'-TGGTTCTGGATGACTCCTCAG-3'	184
CHT2-R683	5'-TTATCTTGTCCACTCCCACATT-3'	
ACTIN-F104	5'-GCCAGAAAGATGCTTATGACG-3'	129
ACTIN-R212	5'-AGAAGGTGTGATGCCAAATCT-3'	

מרכיבי הריאקציה - Syber Universal PCR Mix (Eurogentec) $10.6 \mu\text{l}$, cDNA $1 \mu\text{l}$, $0.5 \mu\text{l}$ מכל תחל, השלמה לנפח סופי- $20 \mu\text{l}$ עם מים סטריליים. הריאקציה נעשתה במכשיר ABI PRISM™ 7000. שלבי הריאקציה - 10 דקות ב- 95°C מ"צ להפעלת האנזים (Hot Start), 40 מחזורים של 15 שניות ב- 95°C מ"צ ודקה ב- 60°C מ"צ.

3.3.6 אנליזת Northern

RNA הופק בשיטת CTAB, לקבלת ריכוזים גדולים יחסית, כפי שתואר בסעיף 3.3.2. עיקרון שיטת ה-northern הינו הגבת RNA מטיפולים שונים עם גלאי cDNA מסומן רדיואקטיבית של הרצף המקודד לגן ספציפי. הגלאי המסומן עובר היברידיזציה עם ה-RNA ולפי כימות הסימון הרדיואקטיבי נקבע רמת הביטוי היחסי של הגן.

3.3.6.1 הפרדת RNA בג'ל והעברתו לממברנה

השיטה נעשתה על פי Sambrook et al. (1998). 10 מ"ג Total RNA, טופלו בבופר דגימות (60% פורמאמיד, 25% פורמאלדהיד, 15% MOPS (X10) והוספת bromophenol-blue). ה-RNA הורצו בג'ל פורמאלדהיד (1.2% (8% פורמאלדהיד ו-12% MOPS X10), ובבופר הרצה (x1) MOPS (0.2M) MOPS 50 mM, נתן אצטט, EDTA 10mM). בתום ההרצה הג'ל נבדק על ידי חשיפה ל U.V., לזיהוי אופן הפרדת מולקולות ה-RNA. והעברתו מהג'ל לממברנה (Amersham Pharmacia Hybond-N+ (Biotech, UK). בתום התהליך הממברנה עברה קיבוע על ידי הדגרה ב-65 מ"צ למשך 3-4 שעות.

3.3.6.2 קביעת ה-rRNA

הממברנה עברה הדגרה בתמיסה של 5% חומצה אצטית תוך כדי טלטול במשך 5 דקות, ולאחר מכן נצבעה במתילן-בלו (0.04% מתילן-בלו ב-0.5 M נתן אצטט pH-5.2) למשך 5 דקות. הצבע נשטף במים סטריליים עד לקבלת רקע לבן של הממברנה ופסים ברורים של שתי תתי היחידות (18S, 28S). הממברנה צולמה על מנת לקבל הערכת מיקום ה-RNA אחרי ההיברידיזציה.

3.3.6.3 סימון גלאי ה-cDNA

ה-cDNA סומן באמצעות Random Priming, על פי הוראות הקיט- (New England Biolabs) Klenow NEBlot™ Kit (England BioLabs), ולפי הוראות היצרן. ל-50-100 ng DNA נעשתה דנטורציה על ידי הרתחה במשך 5 דקות. לאחר מכן הוספו 0.5 M מכל אחד מהנוקלאוטידים dATP, dGTP, dTTP, ו- $[\alpha^{32}P]$ dCTP 50 μ Ci ו-2 U אנזים Klenow בבופר המכיל תחלים הקסמרים אקראיים. לתמיסת הריאקציה נעשתה אינקובציה ב-37 מ"צ למשך שעה. הגלאים המסומנים רדיואקטיבית עברו ניקוי בקולונה, Mini Quick Spin Colum (Roche), לסילוק הנוקלאוטידים והתחלים החופשיים, לפי הוראות היצרן.

3.3.6.4 פרה-היברידיזציה והיברידיזציה של הממברנה

חסימת האתרים החשופים שעל הממברנה, והכנתה להיברידיזציה עם הסמן, נעשתה ע"י אינקובציה בתמיסת פרה-היברידיזציה בטמפרטורה של 65 מ"צ למשך שלוש שעות. לאחר מכן הוסף לתמיסה סמן רדיואקטיבי. ההיברידיזציה נמשכה לילה ב-65 מ"צ ובסופה הממברנה עברה שתי שטיפות קרות וחמות. חשיפת הממברנה במכשיר הפוספואימיג'ר (FLA-5000; FujiFilm) מכומת האות הרדיואקטיבי.

תמיסות פרה-היברידיזציה והיברידיזציה

Denhardt's (x50) עבור 500 מ"ל

BSA 5 גרם, Ficoll (Sigma, Israel) 5 גרם, PVP (Amresco, USA) 5 גרם, מים להשלמת הנפח.

SSC (x20) עבור 1 ליטר

NaCl 175.3 גרם, 88.2 גרם נתרן אצטט, מים סטריליים להשלמת נפח, וטיטור ל- pH-7 עם HCL.

SSPE (x20) עבור 1 ליטר

NaCl 175.3 גרם, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ 27.6 גרם, EDTA 7.4 גרם, השלמת נפח וטיטור ל- pH-7.4.

תמיסת פרה- היברידיזציה

2.75 מ"ל מים סטריליים, 1.25 מ"ל (x20) SSPE, 0.5 מ"ל (x50) Denhardt's, 0.5 מ"ל 10% SDS, הוספת 100 מיקרוגרם/מ"ל Salmon sperm לאחר הרתחה של 5 דקות וקירור בקרח.

תמיסת היברידיזציה

NaCl 0.7M, 25% dextran sulfate salt sol., 10% SDS, DNA 150 $\mu\text{g/ml}$ Salmon sperm.

תמיסות לשטיפת הממברנה אחרי היברידיזציה

שטיפה קרה

SSC (x2), 0.1% SDS, 20 דקות ב- 20 מ"צ.

שטיפות חמות

SSC (x0.5), 0.1% SDS, 20 דקות ב- 65 מ"צ. SSC (x0.1), 0.1% SDS, 20 דקות ב- 65 מ"צ.

4 רשימת זנים וקווים של תות שדה

הניסויים נערכו בזנים וקווים של תות שדה שמצוינים במספרים. בטבלה 3 מופיע מפתח השמות לזנים.

טבלה 3: רשימת הזנים והקווים ששימשו לניסויים לאחר מבחני העמידות בעבודה זו

מספר	זן/קו	מספר	זן/קו
59	קו טיפוח מכון וולקני	538	בובה
177	רחל	543	הדס
205	Oso-grande	628	קו מפלורידה FI-90-15
214	Santana	635	קו טיפוח US-438
216	דורית	636	Toyanaqa זן יפני
328	תמר		

5 ניתוחים סטטיסטיים

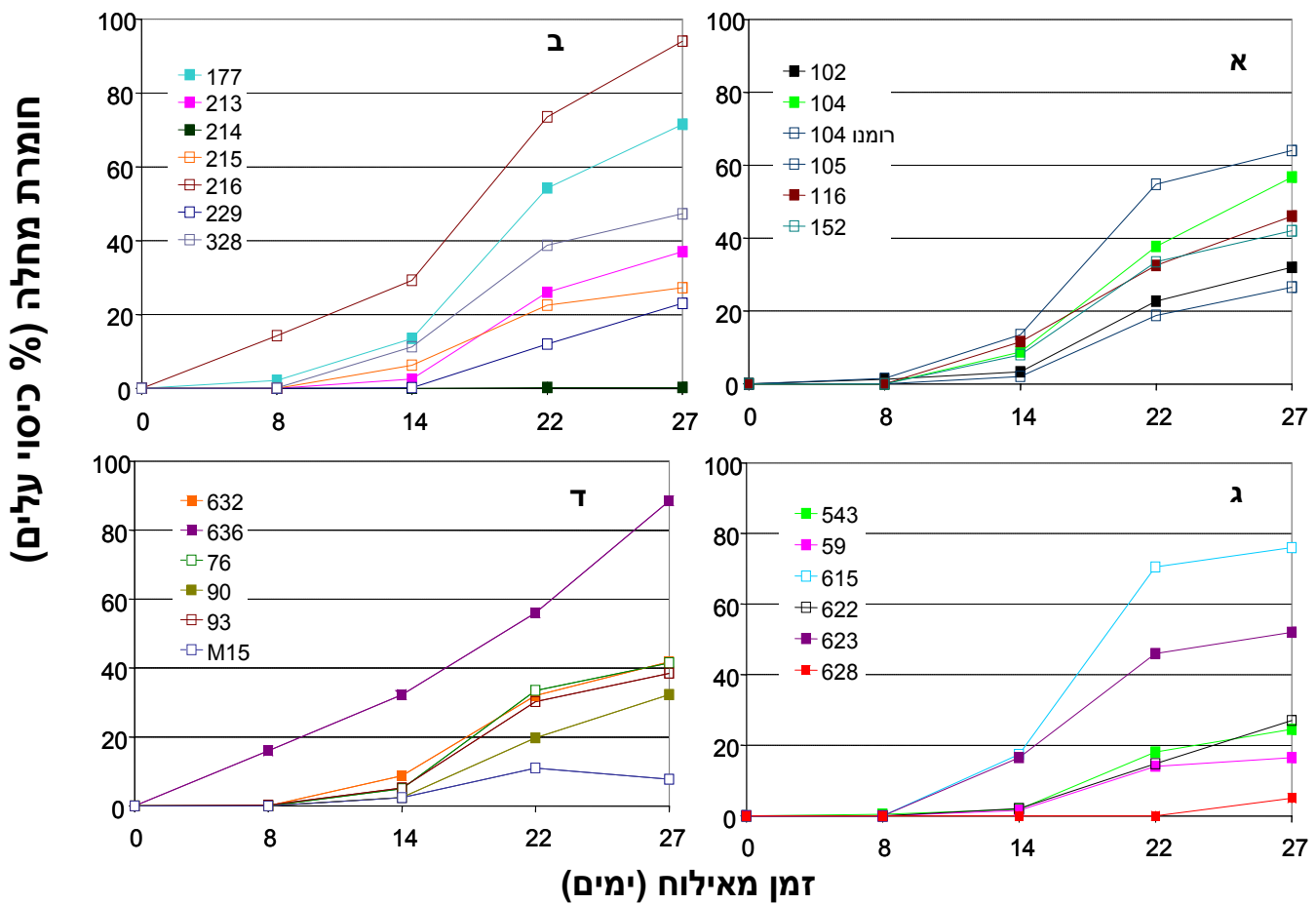
בעבודה זו בוצעו הניתוחים הסטטיסטיים הבאים: ניתוח השונות (ANOVA) ומבחני F חד ודו- כיווניים, חישוב ערכי L.S.D. לקביעת הבדלים בין הטיפולים ורגרסיות. כל המבחנים הסטטיסטיים נעשו בתוכנת JMP 5, ברמת מובהקות של $P \leq 0.05$.

תוצאות

בעבודה זו נבדקו מאפיינים גנטיים ופיסולוגיים אשר עשויים להיות מעורבים במנגנון העמידות של תות שדה למחלת הקימחון. המאפיינים השונים נבדקו בצמחי תות שדה רגישים ועמידים ביותר למחלת הקימחון. לשם כך, נסרקו בתחילה קווים זנים של תות שדה ואותרו הזנים הרגישים והעמידים ביותר. לאחר מכן, נעשו בדיקות לאיתור ההבדל בשלב הפנולוגי בהתפתחות הפטרייה בין הזנים. במקביל, נערכו ניסויים לאפיון מנגנוני הגנה צמחיים: מנגנון הגנה פסי-עובי הקוטיקולה, ומנגנוני הגנה אקטיביים-ביטויים ונוכחותם של חלבוני PR מהקבוצות השונות וכמותן של תרכובות פוליפנוליות בעלי התות.

1 איתור קווים עמידים ורגישים למחלת הקימחון בתות שדה

נבדקה רגישות למחלת הקימחון של אוסף הזנים והקווים של תות שדה המצוי כיום במרכז וולקני. הצמחים אולחו בנבגי פטריית הקימחון, ונערך מעקב אחר הופעת סימפטומים והתפתחות המחלה במהלך 28 ימים מיום האילוח (איור 1).



איור 1: התפתחות קימחון בקווים זנים של תות שדה (א-ד), במשך כארבעה שבועות מיום האילוח (מבחן הזנים נערך כיחידה אחת, והפיצול נעשה להמחשה בלבד)

הבדלים בין הזנים הרגישים ביותר לשאר הזנים נצפו כבר לאחר 8 ימים מהאילוח, בעוד שההבדל בין שאר הזנים התבטא מאוחר יותר. במקרים מסוימים, חומרת הנגיעות בזנים הרגישים הייתה אף מעל ל 90% כיסוי עלים 27 ימים לאחר האילוח, בעוד שבזנים העמידים חומרת המחלה הייתה מתחת ל- 10% (איור 1, טבלה 4). הבדלים בחומרת המחלה נבדקו גם על ידי השוואת השטחים שמתחת לעקומת התפתחות המחלה (AUDPC) (טבלה 1).

טבלה 4: חומרת נגיעות צמחי תות שדה במחלת הקימחון בזנים וקווים של תות שדה, פרוט הנתונים המתוארים באיור 1

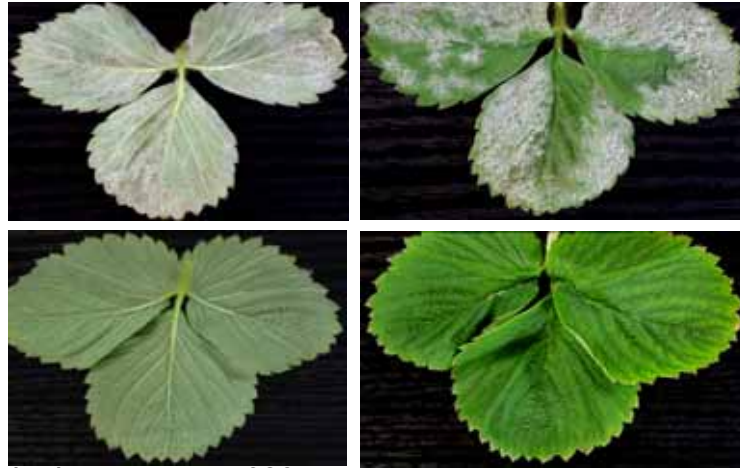
AUDPC (ימים X % כיסוי)		חומרת מחלה בתום הניסוי (% כיסוי עלים)		זן/קו תות שדה
א	1010.0	א	94.0	216
אב	952.6	אב	88.5	636
אבג	770.5	אבג	76.0	615
אבגד	639.8	בגד	71.5	177
בגדה	603.5	בגדה	64.0	105
גדהו	544.5	בגדה	52.0	623
גדהוז	449.7	בגדה	47.5	328
גדהוז	407.4	גדהוז	46.0	116
דהוזח	378.7	דהוזח	42.0	152
דהוזח	373.6	דהוזח	41.7	632
דהוזח	356.8	דהוזח	41.5	76
דהוזח	351.1	בגדה	56.6	104
דהוזח	331.2	הוזח	38.5	93
דהוזח	279.3	הוזח	37.0	213
הוזח	258.1	וזח	27.2	215
הוזח	226.1	הוזח	32.2	90
וזח	201.7	הוזח	32.0	102
וזח	194.4	וזח	24.5	543
וזח	177.7	וזח	27.0	622
חז	143.1	חז	16.5	59
חז	136.9	וזח	23.0	229
חז	12.5	ח	5.0	628
ח	2.2	ח	0.25	214

האותיות השונות בכל עמודה מעידות על הבדל מובהק בין הזנים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA.

מניתוח סטטיסטי של חומרת המחלה, המתבטאת באחוזי הנגיעות הסופית, והשטח מתחת לעקומות התפתחות המחלה (AUDPC) נמצאו הזנים 216 ו- 636 רגישים ביותר. הזנים 214 ו- 628 נמצאו עמידים ביותר (טבלה 1, תמונה 3). בניסוי זה נמצאו הבדלים מובהקים בין זנים רבים בניסוי. על מנת לחדד את ההבדלים בין הזנים העמידים והרגישים, נערך מבחן הדבקה נוסף, לזנים בעלי המדדים הגבוהים ביותר והנמוכים ביותר (איור 2).

צד העלה התחתון

צד העלה העליון

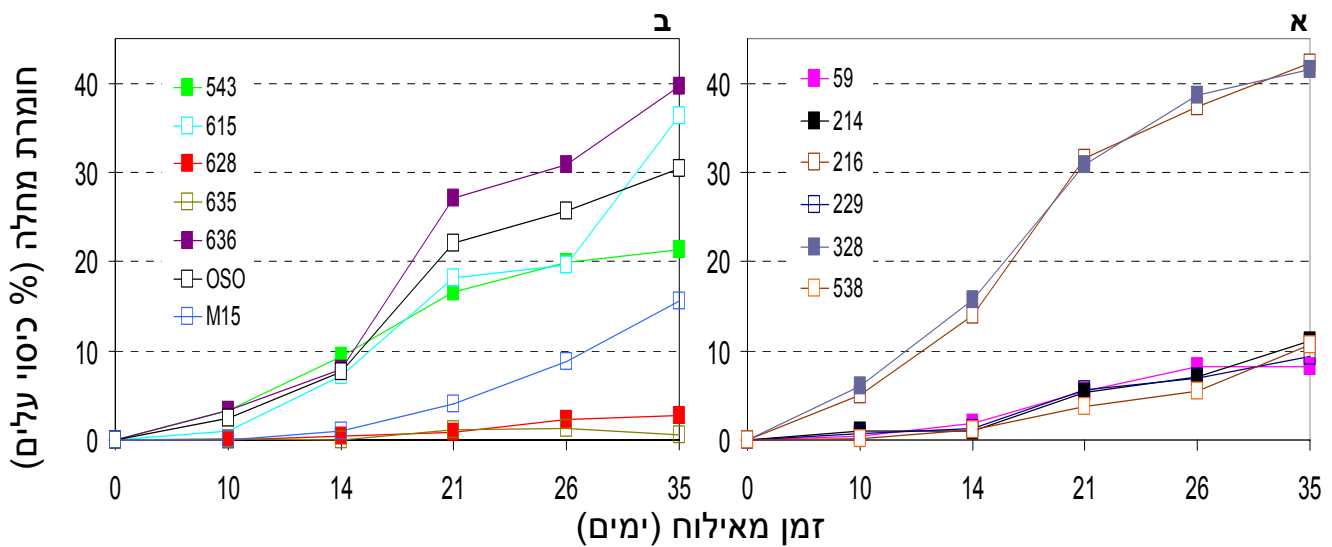


הזן דורית (216)

קו 628

תמונה 3: הבדלים בין הזן הרגיש דורית (216) לקו העמיד 628 בחומרת המחלה לאחר הדבקה מכוונת של עלי תות

הזנים האלו זנים נוספים, בעלי מדדים קרובים אליהם, נבחנו שוב לאימות ההבדלים בין הזנים הרגישים ביותר והעמידים ביותר (איור 2).



איור 2: חומרת המחלה (% כיסוי עלים) בזנים העמידים והרגישים ביותר (א-ב), במשך חמישה שבועות מיום האילוח. הניתוח הסטטיסטי מובא בטבלה 2.

בניסוי זה חומרת הקימחון שנמדדה בזנים הרגישים הייתה נמוכה יותר מאשר בניסוי הראשון. נראה שההבדלים נובעים מהבדלים בתנאי הסביבה כגון: טמפרטורת יום/לילה נמוכות יותר, ולחות יחסית שאיננה אופטימלית. עם זאת גם בניסוי זה ניתן לראות את ההבדלים בין הזנים ברמת הרגישות למחלה,

והתאמה כמעט מלאה לניסויים קודמים. הזנים 328, 216, 636 נמצאו רגישים ביותר; בעלי רמת נגיעות של 36.9-42.2%, הזנים 628 ו- 635 נמצאו עמידים ביותר; בעלי ערכי נגיעות של 2.8 ו- 0.64%, בהתאמה (איורים 2 ו- 3, טבלה 5).

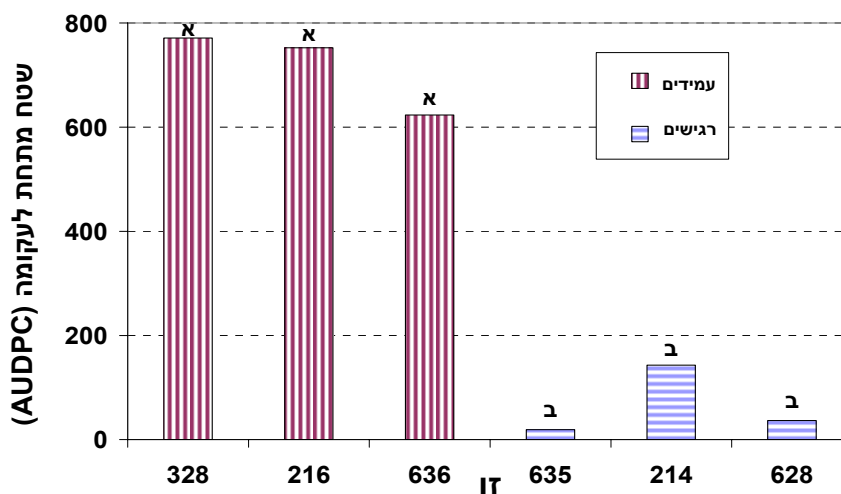
טבלה 5: חומרת נגיעות קימחון בזנים וקווים של תות שדה

AUDPC (ימים X %כיסוי)	חומרת מחלה בתום הניסוי (%כיסוי עלים)	זן/קו תות שדה
771.1 א	41.6 א	328
752.3 א	42.2 א	216
623.3 א	36.9 א	636
508.6 אב	34.4 אב	OSO
456.2 אבג	36.3 א	615
410.2 אבגד	21.2 בגד	543
161.8 בגד	15.6 בגד	M15
143.2 בגד	11.1 בגד	214
140.4 בגד	8.2 בגד	59
136.8 בגד	9.3 גד	229
115.7 גד	10.6 בגד	538
36.8 גד	2.8 ד	628
19.3 ד	0.64 ד	635

האותיות השונות מעידות על הבדל מובהק בין הזנים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA

1.1 בחירת הקווים העמידים והרגישים ביותר להמשך העבודה

חומרת המחלה בזנים העמידים והרגישים ביותר הייתה דומה לניסוי הקודם. הקווים העמידים- 628, 214, 635 והרגישים- 328, 216, 636 נמצאו בכל הניסויים כקווים הקיצוניים ביותר. קווים אלו, נבדלים באופן מובהק גם בשטח שמתחת לעקומת התפתחות המחלה (איור 3), והם שנבחרו להמשך העבודה.



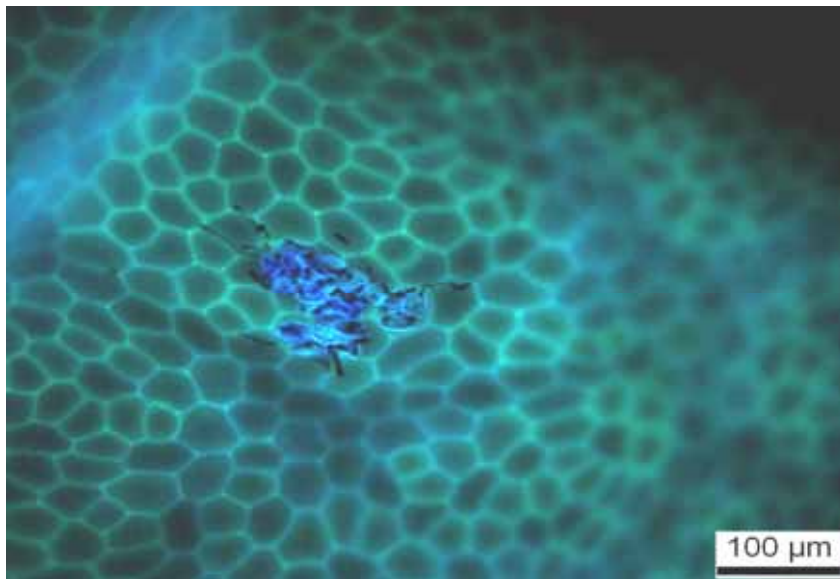
איור 3: ערכי AUDPC של הזנים שנחקרו בעבודה. האותיות השונות מעידות על הבדל מובהק בין הזנים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA.

2 התפתחות הפטרייה *Podosphaera aphanis* בעלי תות שדה

נערכו ניסויים על גבי עלים מנותקים של הזנים הרגישים והעמידים ביותר למחלת הקימחון תוך התייחסות לגיל העלה ולמצב הפנולוגי שלו. נבדקו שלבים בהתפתחות הפתוגן ובכללם שעור נביטת נבגי הפטרייה *P. aphanis* ואורך נחשון הנביטה, חדירת הפטרייה לתאים תוך איתור אפרסוריה ואתרי חדירה והתבססות, וצבירת קאלוז (callose) בעלה כתגובה לחדירת הפטרייה.

2.1 בחינת שיעור הנביטה והתארכות נחשון הנביטה

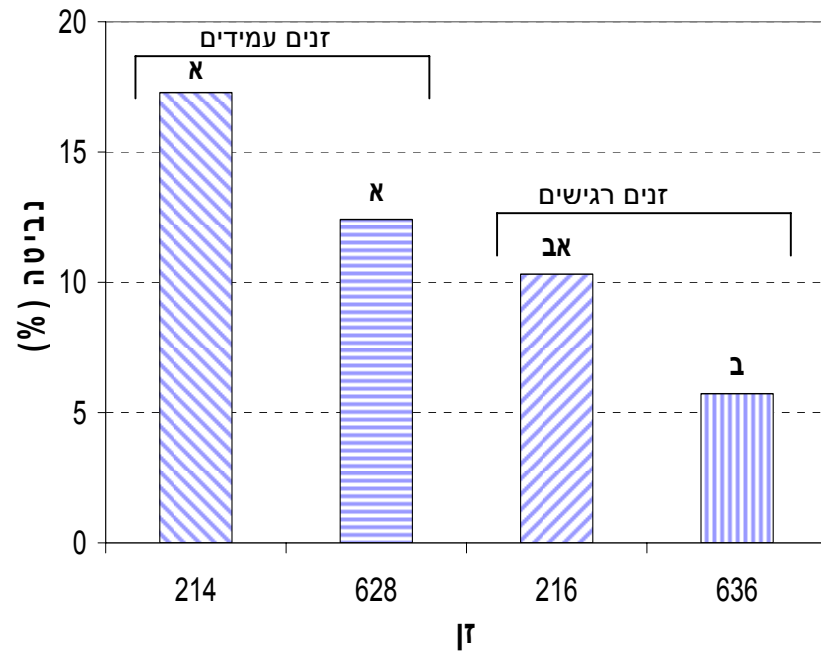
בדיקה של נביטת נבגי הקימחון על עלים מנותקים מאפשרת להעריך אם חלק ממנגנון העמידות נובע מהבדלים בנביטת הנבגים על פני העלים. לחילופין, אם מתרחשת נביטה דומה על גבי עלים של הקווים העמידים והרגישים אז העמידות קשורה לתהליכים מאוחרים יותר בשלבי התפתחות הפטרייה, כגון חדירה והתבססות באפידרמיס. שעור הנביטה חושב באחוזים של הנבגים הנובטים מכלל הנבגים שנספרו. נבג נובט הוגדר כבעל נחשון נביטה, שאורכו עולה על רוחב הנבג (תמונה 4). אורך הנחשון, נאמד גם כן, כפי שמתואר בפרק חומרים ושיטות 2.1.



תמונה 4: נבגים נובטים, בעלי נחשון נביטה, של הפטרייה *P. aphanis*, צבוע ב Cotton blue

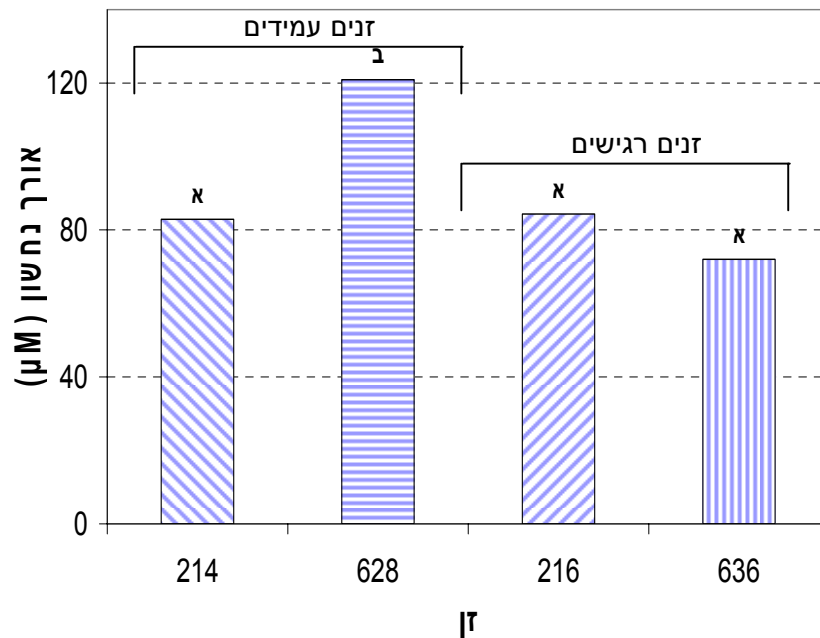
2.1.1 שעור הנביטה ואורך נחשון הנביטה בזנים עמידים ורגישים לקימחון

הנביטה נבדקה על עלים צעירים מכל זן במצב פנולוגי דומה. לא נמצא מתאם בין עמידות הזנים לקימחון לבין נביטת הנבגים על פני העלה. בזנים העמידים אחוז הנובטים היה אף גבוה יותר מאשר ברגישים, והבדל מובהק נמצא בין 214 ו 628 לבין 636. אחוזי הנביטה היו 17.3, 12.4 ו- 5.7% בהתאמה (איור 4).



איור 4: נביטת הפטרייה *P. apahnis* על גבי עלים מנותקים מזנים שונים. האותיות השונות, מעידות על הבדל מובהק בין הטיפולים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA.

בבדיקת אורך נחשון הנובטים בלבד, לא התקבלו הבדלים מובהקים בין הזנים הרגישים לעמידים. הזן העמיד 628 נבדל מכל שאר הזנים ואורך הנחשון הממוצע היה $120 \mu\text{M}$ (איור 5). לא נמצא מתאם בין אחוזי הנביטה לבין אורך נחשון הנביטה, ולכן אורך הנחשון הנובט, אינו מושפע מאחוז הנבגים הנובטים.

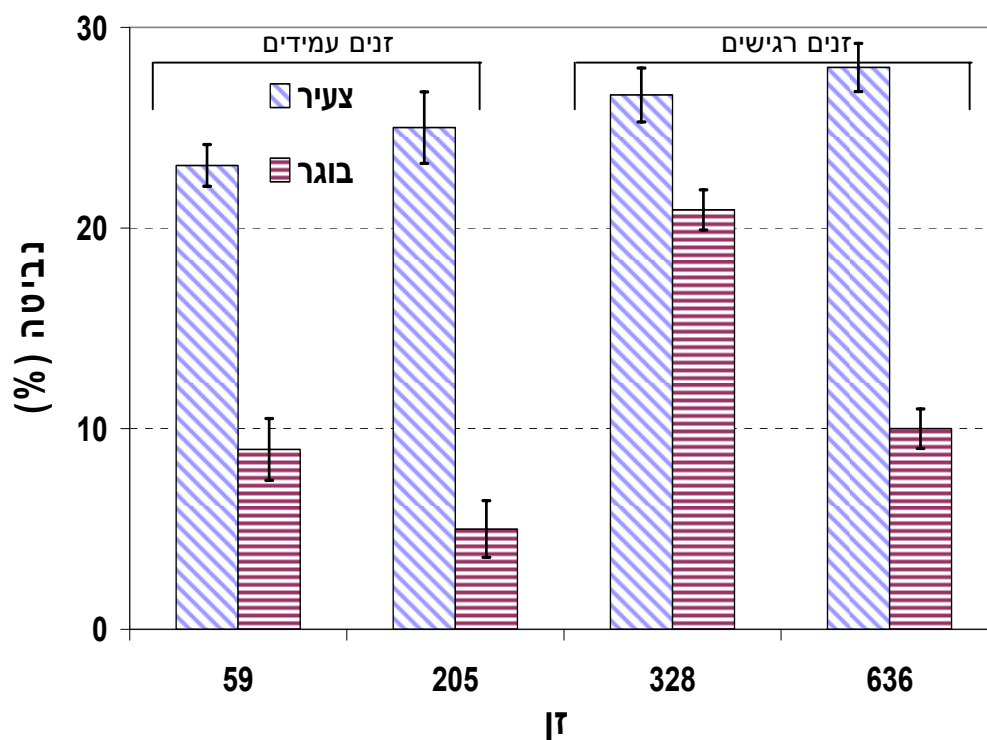


איור 5: אורך נחשון הנבגים הנובטים של הפטרייה *P. apahnis* על גבי עלים מנותקים בזנים שונים. האותיות השונות, מעידות על הבדל מובהק בין הטיפולים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA.

לסיכום בדיקה זו, לא נמצא מתאם חיובי בין רגישות הזן לשיעור נביטת הנבגים בזנים השונים, ואף אורך נחשון הנביטה איננו קשור כנראה לרגישות הזנים.

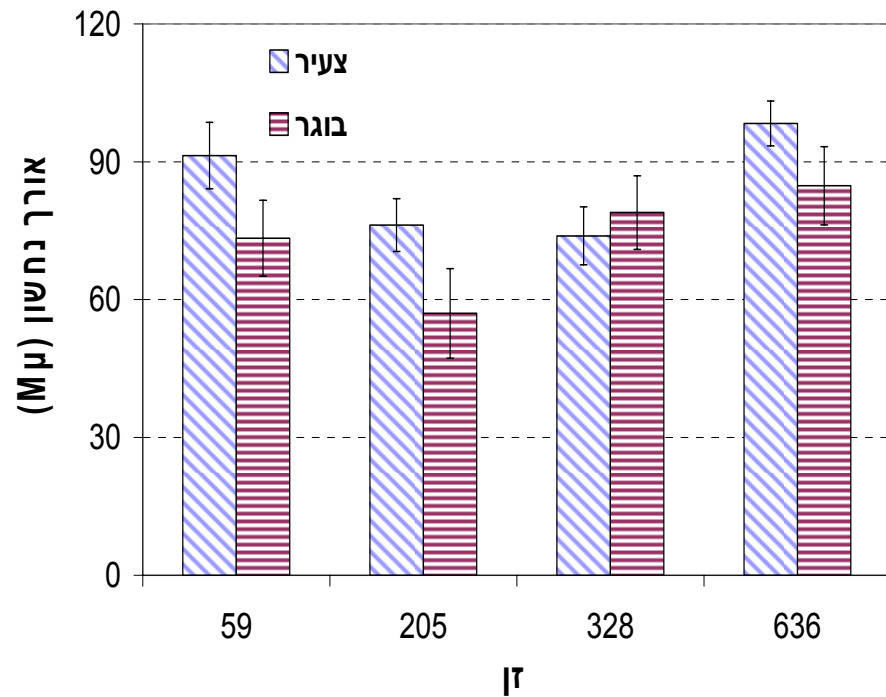
2.1.2 השפעת המצב הפנולוגי של העלים על שיעור הנביטה ואורך הנחשון

נבדקה השפעת הזן והמצב הפנולוגי של העלים על שיעור הנביטה ואורך נחשון הנביטה. עלים מהזנים העמידים: 205 ו- 59, ומהזנים הרגישים: 636 ו- 328, נבדקו בשני מצבים פנולוגיים: עלים צעירים, קטנים יחסית וצבעם בהיר, ועלים בוגרים, פתוחים לחלוטין, בעלי שטח גדול וצבעם כהה. מתוצאות הניסוי (איור 6) ניתן לראות שהנביטה טובה יותר על גבי עלים צעירים בכל הזנים. השפעה הקטנה ביותר לגיל ומופע העלה התקבלה בזן 328. בנוסף כמו בניסוי הראשון (איור 6) לא נמצאה השפעה לרגישות הזן על אחוז הנבגים הנובטים.



איור 6: השפעת הזנים והמצב הפנולוגי של העלה- צעיר ובוגר על שיעור הנביטה. הקווים האנכים מציינים את שגיאת התקן (S.E.).

בבדיקת נחשון הנובטים בלבד, בשלושה זנים התקבלו הבדלים מובהקים להבדל בגיל העלה (איור 7), בדומה להבדלים נביטת הנבגים. בזן 328 בו לא היה הבדל בשיעור הנביטה לא היה גם הבדל באורך נחשון הנביטה בין עלה צעיר לבוגר.



איור 7: השפעת הזנים והמצב הפנולוגי של העלה, צעיר ובוגר, על אורך נחשון הנביטה. הקווים האנכים מציינים את שגיאת התקן (S.E.).

בסיכום בדיקת נביטה והתארכות הנחשון נראה שנביטה טובה יותר מתרחשת על עלים צעירים והתארכות הנחשון כמעט ואינה מושפעת מגיל העלה. כמו בניסויים הקודמים לא נמצאה השפעה במדדים אלו למידת רגישות הזן לקימחון. תוצאות אלו מחזקות ממצאים של הדבקה טבעית בחממה ותצפיות בשטחים מסחריים בהם עלים צעירים רגישים יותר לקימחון.

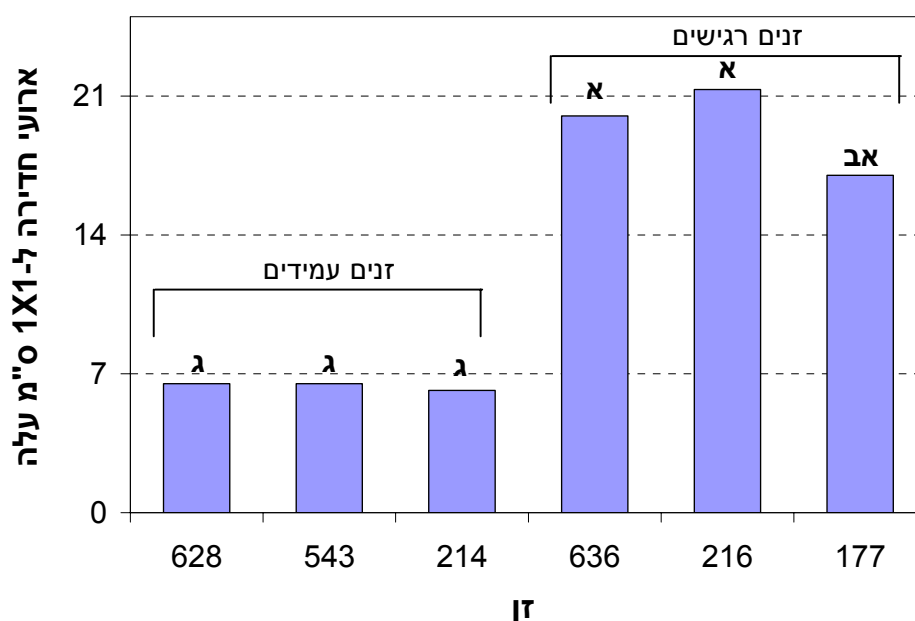
2.2 בחינת מספר אירועי חדירה לתאים

על מנת לנסות לאתר את השלב בהתפתחות הפטרייה והתקדמות המחלה בו מתבטא הבדל בין הזנים העמידים והרגישים, ערכתי ניסויים לבחינת החדירה של קורי פטריית הקימחון לתאי האפידרמיס של עלי התות. הערכת מספר אירועי החדירה נעשתה בשלושה אופנים: א) ישירות לאחר צביעה במיקרוסקופ אור. ב) בחינת יצירת קאלוז בתאים כתגובה לחדירה הנראה במיקרוסקופ UV. ג) צילום שכבת תאי העלה במיקרוסקופ אלקטרוני חודר (TEM).

2.2.1 בדיקת מספר אירועי חדירה לתאי האפידרמיס

בניסוי זה נבדקו מספר אירועי החדירה של נבג נובט, בעל נחשון נביטה, לאפידרמיס של הצמח. אירוע חדירה הוגדר כנבג בעל נחשון נביטה, בו נראית התעבות שמעידה על יצירת אפרסוריום וזיהוי של קור כלשהו בכיוון האפידרמיס של העלה. כמו כן נספרו תאי האפידרמיס בהם נראה בברור קור שמקורו

בנחשון הנביטה. הניסוי הראשון בוצע במספר חזרות, על עלים נגועים שנראה בהם סימפטום מחלה ברור. העלים עברו הבהרה בעזרת אתנול ונצבעו ב- Cotton blue כפי שמתואר בפרק שיטות וחומרים. 2.2. נמצאו הבדלים במספר אירועי החדירה של קורי הנבגים לתאי האפידרמיס בין הזנים השונים. בזנים הרגישים 636 ו- 216 נספרו בממוצע 20 ו- 21.3 אירועי החדירה, בהתאמה, והם נבדלים משמעותית ממספר אירועי החדירה שנספרו בזנים העמידים 214, 543 ו- 628 שבהם נספרו 6.5 אירועי חדירה בממוצע (איור 8).

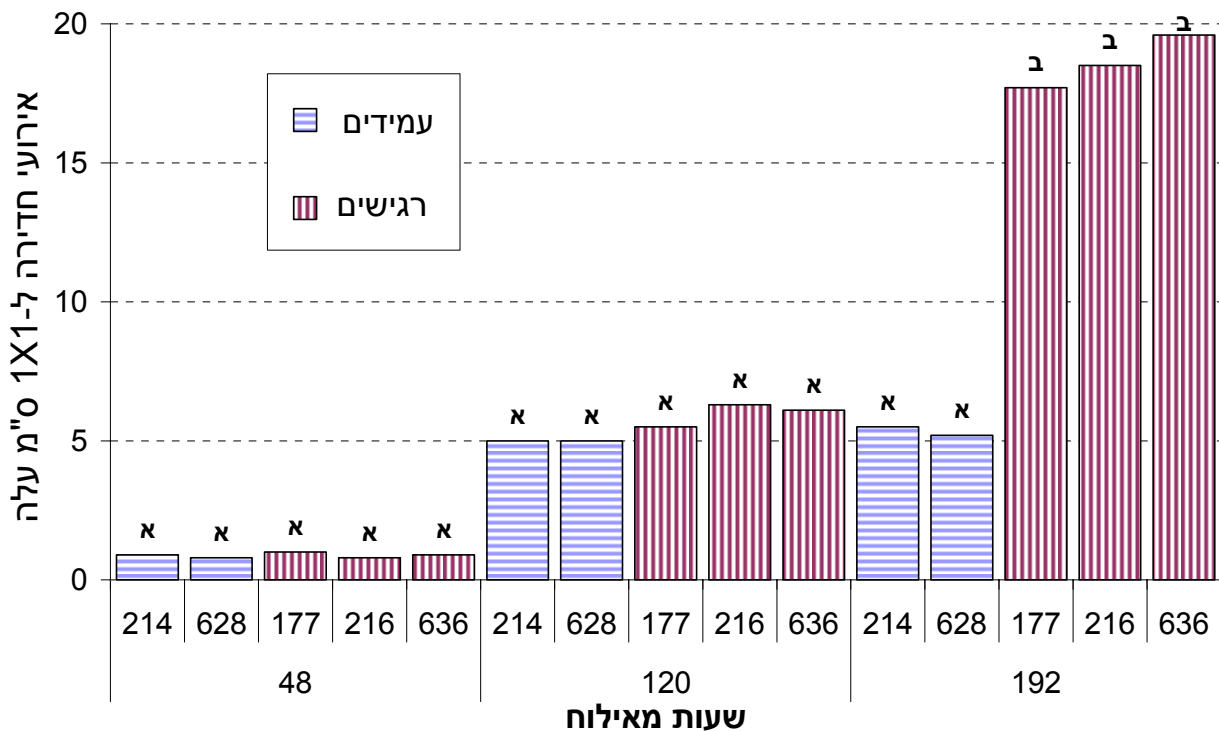


איור 8: שכיחות אירועי חדירת נחשון הנביטה לאפידרמיס עלי תות מזנים שונים כשבוע מאילוח. האותיות השונות מעידות על הבדל מובהק בין הטיפולים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA.

תוצאות אלו מעידות על הבדל מובהק בין הזנים העמידים לרגישים בחדירה והתבססות הפטרייה באפידרמיס העלה. ההבדל הכמותי ביכולת חדירת הפטרייה לאפידרמיס עלי התות הוא כנראה אחד מהגורמים להבדלים בחומרת המחלה בין זני תות השדה הרגישים והעמידים.

2.2.2 בחינת אירועי חדירה כתלות בזמן לאחר האילוח

בניסוי זה אולחו זנים רגישים ועמידים בנבגי קימחון באותו זמן ודוגמאות עלי הצמחים נלקחו בפרקי זמן של 24, 48, 120 ו 192 שעות מהאילוח. בזמן 24 שעות מאילוח לא נצפתה חדירת פטרייה כלל. במועד 48 שעות מאילוח נמצאו מספר אירועי חדירה בודדים בלבד, ללא הבדלים בין הזנים. הבדלים מובהקים בחדירת הפטרייה בין הזנים נמצאו רק לאחר 192 שעות מאילוח (איור 9).



איור 9: בחינת מספר אירועי חדירת נחשון הנביטה לתאים. האותיות השונות מעידות על הבדל מובהק בין הטיפולים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA.

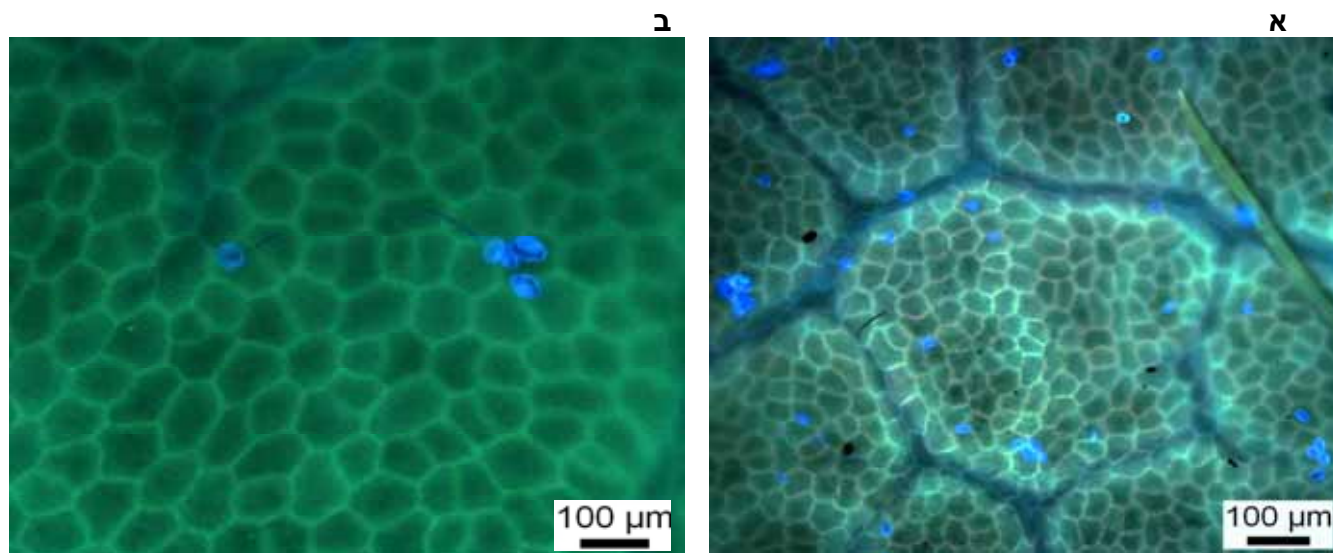
אירועי החדירה בזמן 48 שעות מאילוח כמעט ואינם מתרחשים כלל בכל הזנים. 120 שעות מאילוח נמצאו 5 עד 6 אירועי חדירה בממוצע בכל הזנים, כאשר הבדלים אלו אינם מובהקים. בזמן של 192 שעות מאילוח, כאשר סימפטום המחלה ברור, נבדלים שלושת הזנים הרגישים משני הזנים העמידים באופן מובהק. מספר אירועי החדירה הממוצע בזנים הרגישים 177, 216, 636 הינם 18.5, 19.6 ו-15.2 בהתאמה. בזנים העמידים 628 ו-214 הערכים הינם 5.2 ו-5.5 בהתאמה.

לסיכום חדירות הפטרייה לתאי האפידרמיס נראה כי יש מתאם חיובי בין רגישות הזן למספר אירועי חדירת הפטרייה לתאים. הזנים העמידים 214, 628 נבדלים באופן מובהק מהזנים הרגישים 177, 216, 636 (איורים 8,9). ההבדלים הכמותיים במספר אירועי החדירה נוצרים בשלב בו קורי הקימחון והמחלה כבר נראים לעין, אולי בשלב של אילוח משני של נבגים חדשים שנוצרו מגופי פרי על העלה המודבק עצמו.

2.3 בדיקת Callose הנוצר כתגובה לחדירת הפטרייה לתאי הצמח.

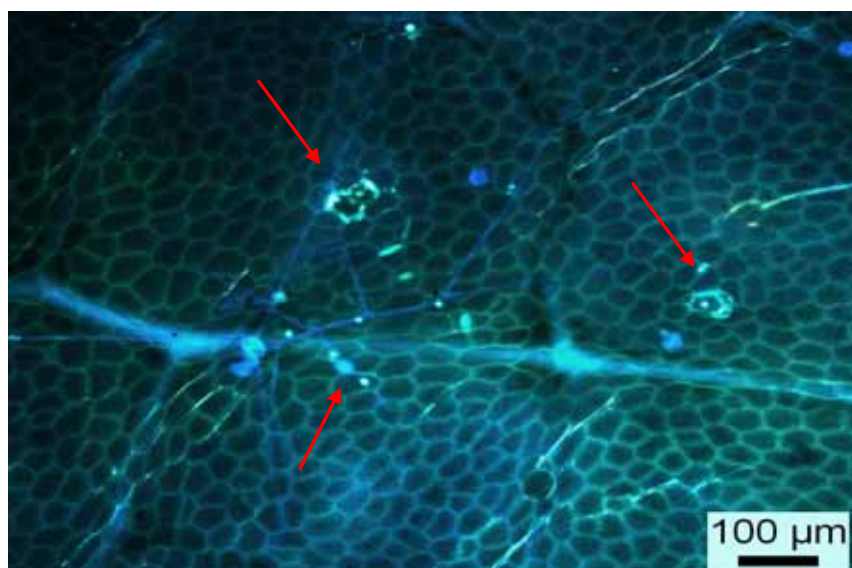
בניסוי זה הודבקו זנים עמידים ורגישים של תות שדה, ונלקחו דוגמאות לאחר 1, 3 ו-7 ימים מהדבקה. העלים עברו הבהרה בשיטה המפורטת בפרק שיטות וחומרים 2.4, בה נראית הפלואורסנציה העצמית של הקאלוז במיקרוסקופ לאחר הארה ב U.V.

ממצאי סריקת דוגמאות העלים במיקרוסקופ, מצביעים כי אזורי סינתזת הקאלוז מתרחשת בעיקר בזנים הרגישים, בהם מספר חדירות הפטרייה לעלה גדול יותר. בדומה לממצאי הבדיקה הישירה של חדירת הפטרייה לעלה, סינתזת קאלוז איננה מתרחשת לאחר 24 שעות מאילוח, בזנים הרגישים והעמידים (תמונה 5).



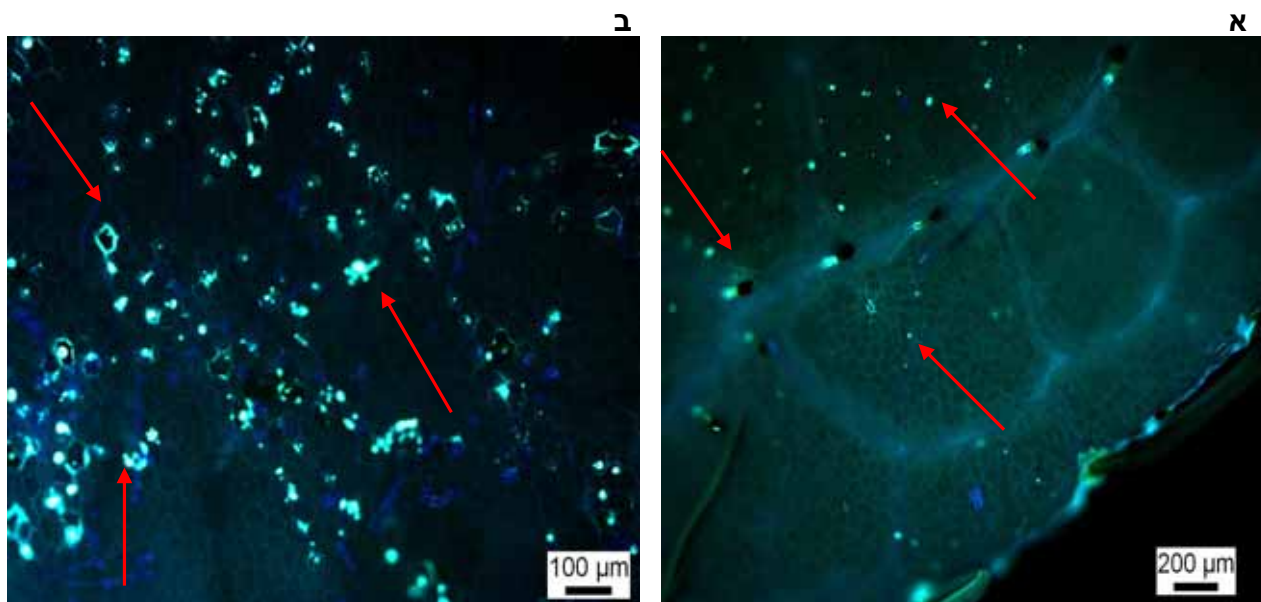
תמונה 5: נבגים נובטים לאחר 24 שעות מאילוח, בזן הרגיש 636 (א), ובעמיד 214 (ב). אין יצירת callose, ואין חדירה לתאי הצמח.

לאחר 48-72 שעות מאילוח נראה callose במקומות בודדים, בהם יש איכלוס תפטיר הפטרייה (תמונה 6). ה-callose נראה לאורך נחשון הנביטה, במספר מקומות בהם חודרת הפטרייה לתאי הצמח. הופעת ה-callose בזמן זה מתרחשת במקרים בודדים ובזנים הרגישים בלבד.



תמונה 6: הופעת callose כתגובה לחדירת הפטרייה לתאי הצמח, 72 שעות לאחר אילוח. החצים מציינים מקומות בהם הופיע callose כתגובה לחדירה.

בהמשך התקדמות המחלה, callose מופיע בעוצמה חזקה יותר ומספר נקודות רב יותר בזנים הרגישים בהם מספר אירועי חדירת הפטרייה רב וישנם קורים ונחשוני נביטה רבים. כאשר הפטרייה מתבססת בתאים וישנם סימני מחלה ברורים, ה- callose נצפה באופן אינטנסיבי בזנים הרגישים (תמונה 7 ב'), ולעומת מיעוט נקודות הזהירה בזנים העמידים (תמונה 7 א').

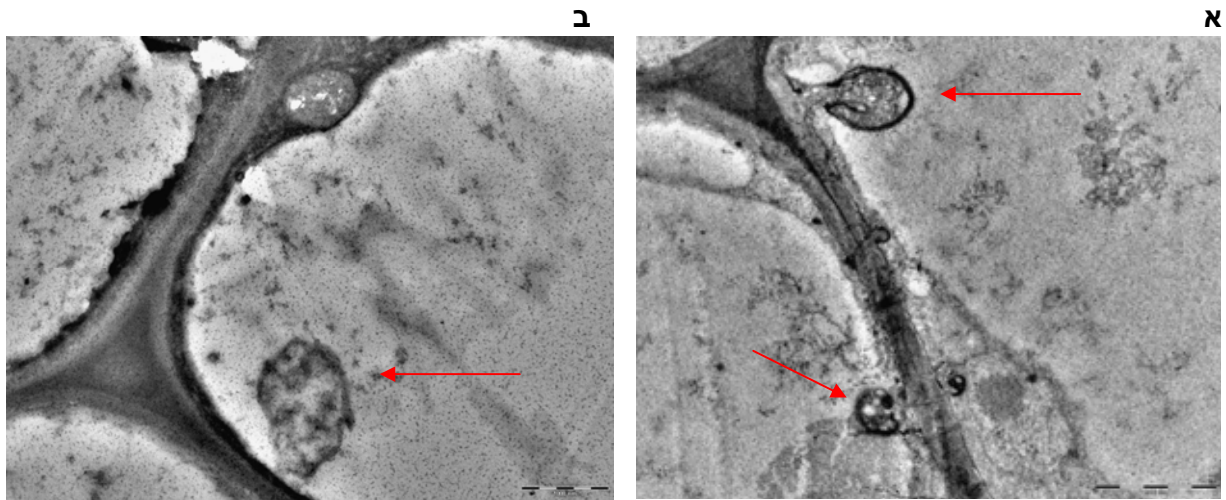


תמונה 7: הופעת callose כתגובה לחדירת הפטרייה לתאי הצמח. הצמחים נבדקו כשבוע מאילוח. א- זן עמיד- 628, ב- זן רגיש- 328. החצים מציינים מקומות בהם הופיע callose כתגובה לחדירה.

תמונות אלו ממחישות שיצירת callose בתאים יכולה להוות אינדיקציה למספר חדירות הפטרייה לתאי העלים. בנוסף, לא נראה כי callose קשור במנגנון העמידות של הצמח לקימחון, אלא שהופעתו קשורה בתגובת הצמח לחדירת הפטרייה לתאי הצמח.

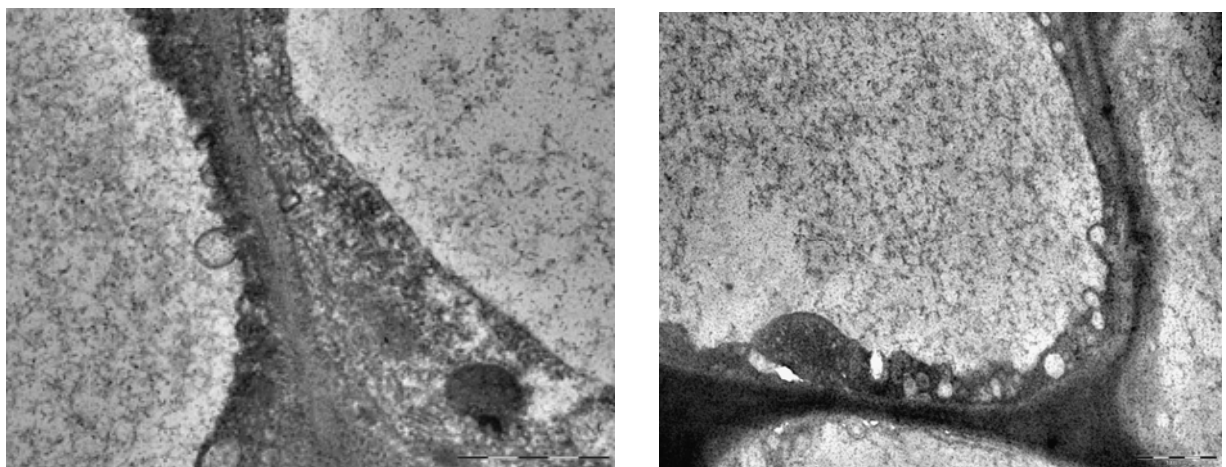
2.4 סריקת חתכים באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני חודר TEM

דוגמאות של עלים מאולחים מזנים רגישים ועמידים נבדקו תחת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר למציאת הבדלים באופי חדירת קורי הפטרייה ואכלוסם בתאי האפידרמיס של הצמח הנגוע. בשיטה זו נסרקו עשרות עד מאות דוגמאות עלים, ורק מחלקן ניתן היה להסיק בברור על חדירת הפטרייה לעלים. מסריקת החתכים של תאי הזנים הרגישים נראו שלפוחיות ובליטות לא מזוהות הנכנסות מדופן התא פנימה. יתכן כי אלו קורי הפטרייה שחדרו לתוך תא האפידרמיס. כמו כן נראו התנפחויות אחרות בדופן התאים שעשויות לרמוז על התהוות האוסטוריום (תמונה 8).



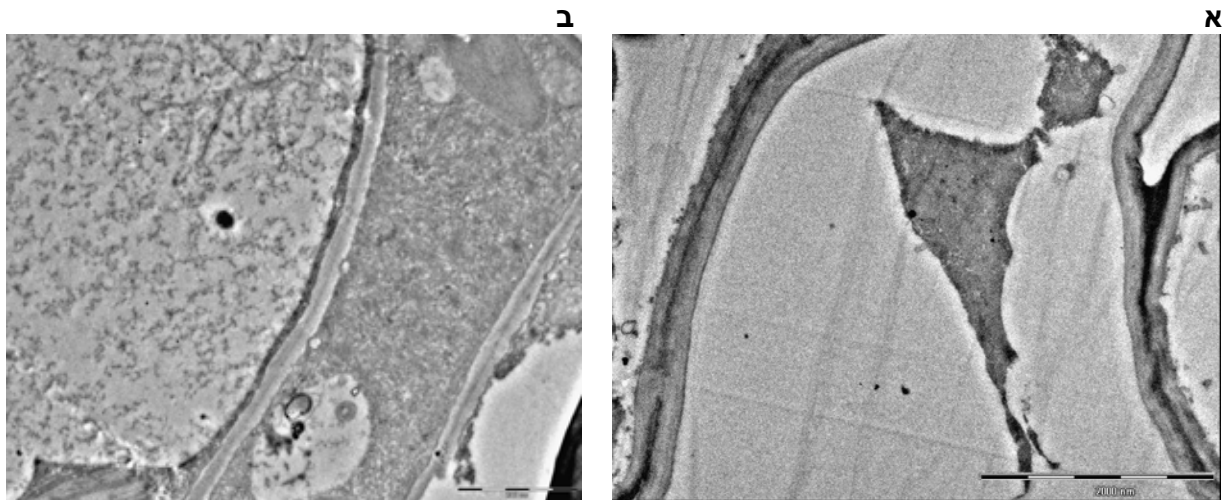
תמונה 8: צילום דפנות תאים בצמח מהזן הרגיש 636. (א) חדירת קורים לתא, (ב) התהוות האוסטוריום (מצוינים בחצים). התמונות צולמו ממיקרוסקופ חודר.

תוצאות אלו לא התקבלו בעת סריקת התמונות מהחתיכים שבוצעו בזנים העמידים, ולא נראו תופעות חריגות כאלו ואחרות שעשויות להיות קשורות בחדירת הפטרייה לתאים. כמו כן, ניתן להבחין כי דופן התאים בזנים הרגישים איננה חלקה, ונראה כי הגורם האחראי לתופעה זו קשור בחדירת הפטרייה לתאים (תמונה 9).



תמונה 9: דופן תאי אפידרמיס בתות שדה. התמונות צולמו ממיקרוסקופ חודר מצמח זן רגיש 216.

לעומת זאת, דפנות התאים של הזנים העמידים נמצאו שונות בצורתן והן חלקות. לא נראו בליטות או שלפוחיות בדפנות התאים או בין התאים, שעשויות להעיד על חדירת הפטרייה או על אכלוסן בתאים (תמונה 10).



תמונה 10: דופן תאי אפידרמיס בתות שדה. (א) הזן העמיד 214, (ב) הזן העמיד 628. התמונות צולמו ממיקרוסקופ חודר.

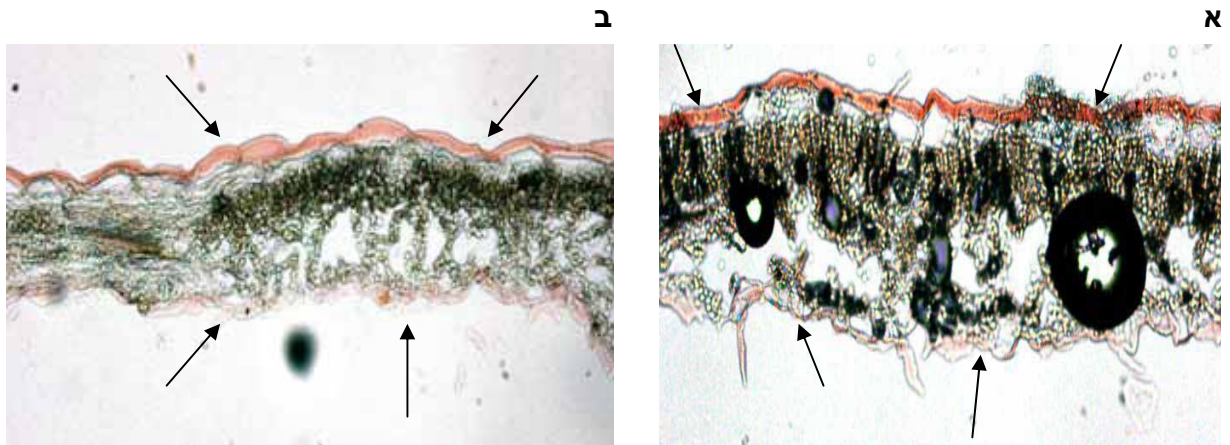
תמונות אלו ונוספות אינן מדד מוכח כמותי להבדל בין הזנים עמידים לרגישים, אך יכולות להצביע על הבדל באופי תגובת הצמח לתהליך חדירת קורי הקימחון. הבדלים אלו עשויים להוות גורם נוסף בסיבות לשוני במידת הרגישות בין הזנים.

3 אפיון מנגנוני הגנה צמחיים

מנגנוני ההגנה של הצמח בפני פתוגנים, עשויים להוות מרכיב מרכזי בהבדלים בעמידות הזנים למחלת הקימחון. נבדקו מנגנוני הגנה פיסיים הקיימים בצמחים באופן תמידי, ואקטיביים הבאים לידי ביטוי בתגובה לאילוח בנבגי הפטרייה.

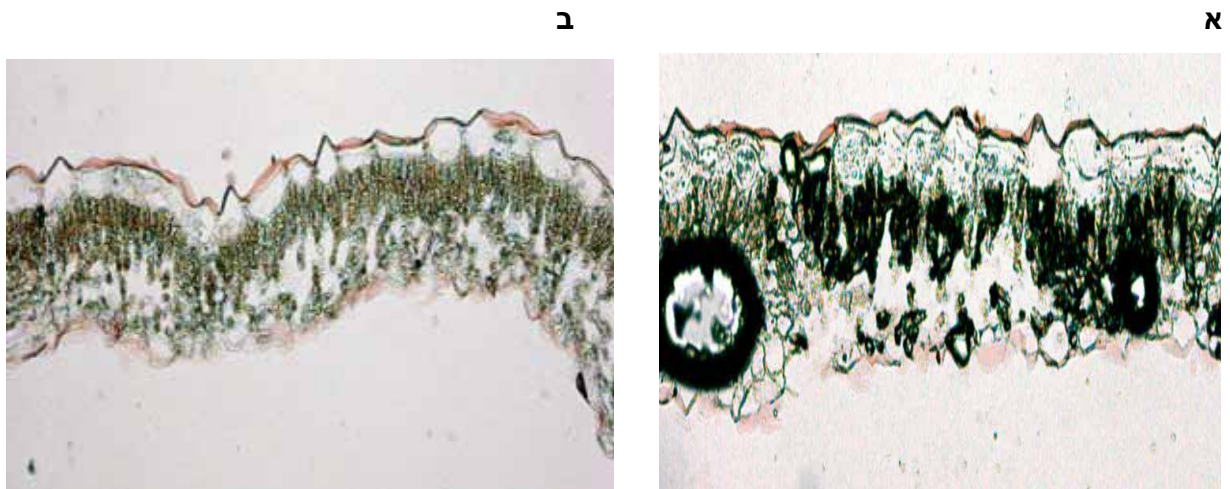
3.1 מנגנון הגנה פיסי- עובי הקוטיקולה ודפנות תאי האפידרמיס

הקימחון חודר ישירות את שכבת הקוטיקולה ולא מבעד לפיוניות העלה ולכן לעובי או הרכב שכבה זו עשוי להיות תפקיד במניעת חדירת נחשון הנביטה והעמידות של הצמח לקימחון. ישנה חשיבות לבחינת שתי שכבות הקוטיקולה משני צידי העלה, משום שתפטיר פטריית הקימחון הנראה לעין מתחיל בדרך כלל, בצידו התחתון של העלה, ובהמשך התפתחות המחלה מופיע גם על פני שכבת העלה העליונה. עובי הקוטיקולה נבדק בצמחים מזנים שונים באופן איכותי. הערכת עובי הקוטיקולה בוצעה על חתכי עלים שנצבעו בצובען Sudan IV ונסרקו במיקרוסקופ, כמפורט בפרק שיטות וחומרים 3.2. מסריקת התמונות עולה כי עובי הקוטיקולה אינו משתנה בין הזנים הרגישים והעמידים. במקומות מסוימים על פני העלה, עובי הקוטיקולה הוא עבה יחסית (תמונה 11). בעוד שבאתרים אחרים על פני העלה שכבה זו דקה יחסית (תמונה 12). תופעה זו אופיינית לכל הזנים שנבדקו.



תמונה 11: שכבות הקוטיקולה בעלים. א- זן רגיש 216; ב- זן עמיד 628. החצים מציינים את שתי שכבות הקוטיקולה בעלה.

שכבת הקוטיקולה בצידו העליון של העלה עבה יחסית ורציפה לאורך פני העלה, ואין הבדלים בעובי שכבה זו בין שני הזנים שבתמונה. שכבת הקוטיקולה התחתונה לעומתה, דקה יותר ולעיתים לא רציפה, אולם ממצא זה אינו קשור להבדלים ברגישויות הזנים. שכבת הקוטיקולה בעלי התות יכולה להיות רציפה ועבה או דקה גם בצד העלה העליון, ללא מגמה המבדילה בין הזנים (תמונה 12).



תמונה 12: שכבות הקוטיקולה בעלים. א- זן רגיש 216; ב- זן עמיד 628. ניתן לראות שעובי השכבה העליונה דק יחסית בשני הזנים.

מסיכום בחינת הקוטיקולה, ניתן להניח כי חדירת הקימחון קלה יותר לאפידרמיס התחתון של העלה, משום שהיא דקה יותר ואינה רציפה. שכבת הקוטיקולה בצידו העליון של העלה רציפה יותר, ועבה או דקה באופן יחסי בכל הזנים שנבדקו. מלבד זאת, לא נראים הבדלים איכותיים בשכבות הקוטיקולה בין הזנים שנבדקו, שהינם במתאם לרגישויות הזנים לקימחון, ולכן הנחנו כי עובי שכבת הקוטיקולה אינו

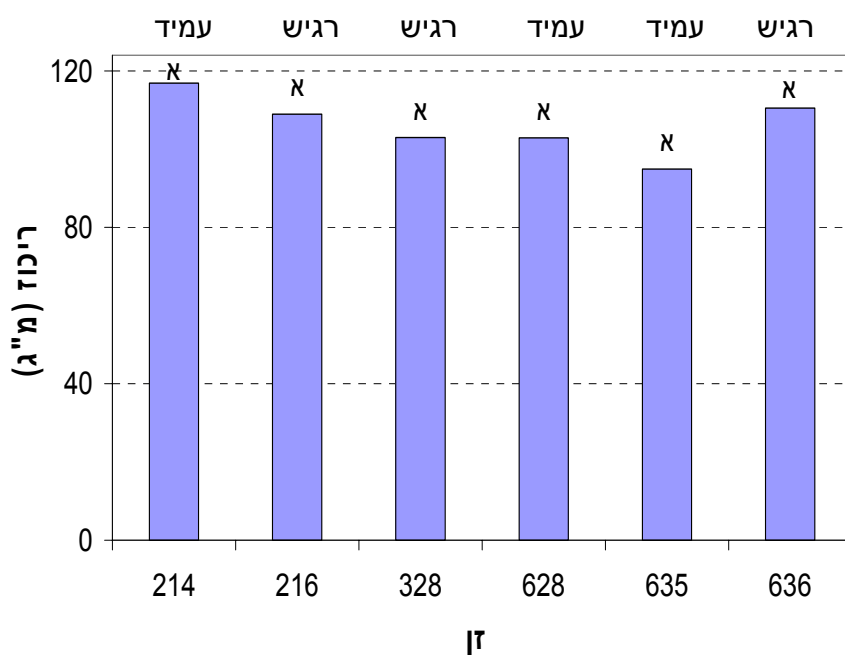
גורם לעמידות הצמח לקימחון. הרכב שכבת הקוטיקולה ואופי שטח פניה שלא נבדקו בעבודה זו, עשויים באופן בלתי קשור להיות גורם בעמידות.

3.2 מנגנוני הגנה אקטיביים

מנגנוני הגנה אקטיביים ביניהם, תרכובות פוליפנווליות וחלבוני הגנה מקבוצת חלבוני ה-PR, מתבטאים באופן מוגבר כתוצאה מאינטראקציה בין פתוגן לפונדקאי. בעבודה זו נבדק הקשר בין תכולת תרכובות פוליפנווליות לבין עמידות לקימחון בתות שדה. בנוסף, נבדק אופי הביטוי של חלבוני PR בזנים עמידים ורגישים, לפני ולאחר הדבקה בקימחון.

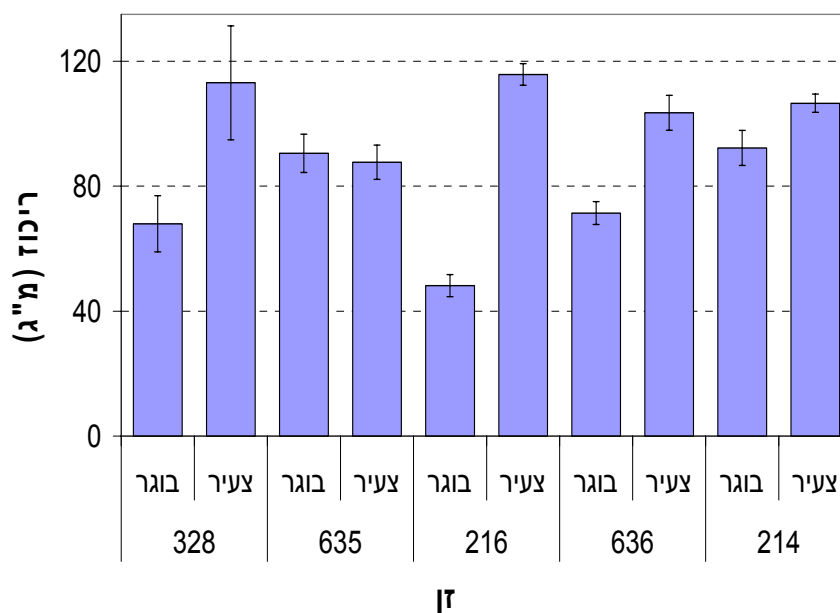
3.2.1 תרכובות פוליפנווליות

בניסויים אלו נבדקו ריכוזי כלל הפוליפנוולים בזנים הרגישים והעמידים. הפוליפנוולים נבדקו בעלים נגועים, בעלי סימפטום מחלה ברור לעין (איור 10). מאחר ולא נמצאו הבדלים בניסויים הראשונים נערכה גם השוואה בין עלים צעירים ובוגרים בזנים העמידים והרגישים. עלים צעירים רגישים יותר להדבקה בקימחון מעלים בוגרים ולכן נבדק האם יש לכך קשר לתכולת התרכובות הפנווליות בעלים אלו.



איור 10: ריכוז כלל הפוליפנוולים בעלים נגועים של זנים שונים. הריכוזים חושבו על פי עקום כיוול. אותיות שונות מעל כל עמודה מעידות על הבדל מובהק בין הטיפולים ($P \leq 0.05$), לפי מבחן ניתוח שונות ANOVA.

על פי התוצאות נראה שאין הבדל בריכוזי הפוליפנולים בין הזנים הרגישים והעמידים. כל הזנים מראים ריכוזים דומים, ואין הבדל סטטיסטי בניהם. ניסוי נוסף בדק את השפעת הזן והמצב הפנולוגי של העלים על ריכוז הפוליפנולים. עלים מכל זן נבדקו בשני מצבים פנולוגיים: צעיר ובוגר. בארבעה זנים ריכוז הפוליפנולים היה גבוה יותר בעלים הצעירים, ובשלושה מתוכם ללא מובהקות סטטיסטית. בזן אחד ריכוז הפוליפנולים בעלים בוגרים היה גבוה יותר, אולם גם כאן ללא מובהקות סטטיסטית (איור 11).



איור 11: ריכוזי פוליפנולים בעלים צעירים ובוגרים. הקווים האנכים מציינים את שגיאת התקן (S.E.).

בסיכום תכולת הפוליפנולים בעלים, נראה כי אין מתאם בין הריכוז לעמידות הצמחים לקימחון. בזנים הרגישים והעמידים נמדדו ריכוזים דומים ללא הבדל מובהק. בבדיקת הבדלים בין העלים הצעירים לבוגרים נמצא כי דווקא בעלים הצעירים, הרגישים יותר, תכולת הפוליפנולים גבוהה יותר, אולם בשלושה זנים ללא הבדל מובהק.

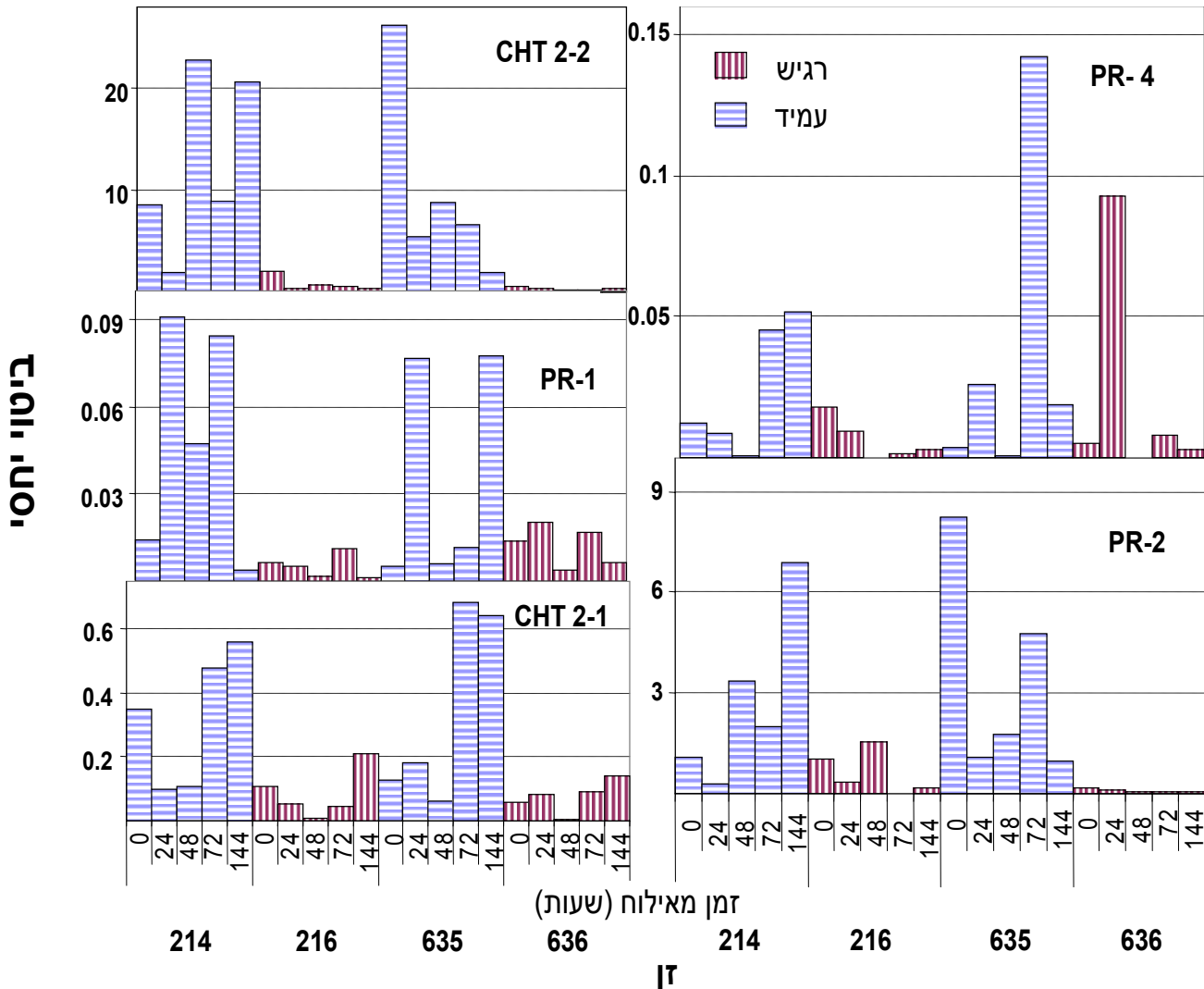
3.2.2 נוכחותם וביטויים של חלבונים מקבוצת PR's (Pathogenesis Related)

חלבונים צמחיים הידועים כ- PR-Proteins נמצאו מעורבים במנגנוני ההגנה הצמחיים מפני פתוגנים שונים. בעבודה זו בודדו מצמחי תות- שדה מספר גנים המקודדים לחלבוני PR אשר לא נמצאו במאגרי המידע. ביטויי הגנים לחלבונים השונים נבדק לפני ואחרי הדבקה בקימחון, תוך השוואה בין הזנים העמידים לרגישים.

3.2.2.1 ביטוי הגנים המקודדים לחלבוני ה-PR

אופי ביטוי הגנים המקודדים לחלבוני ה-PR נבדק בצמחים עמידים ורגישים, לפני אילוח הצמחים בקימחון (זמן 0), ובזמנים של 24, 48, 72, ו-144 שעות לאחר האילוח. ביטוי הגנים נבדק ביחס לגן המקודד לאקטין.

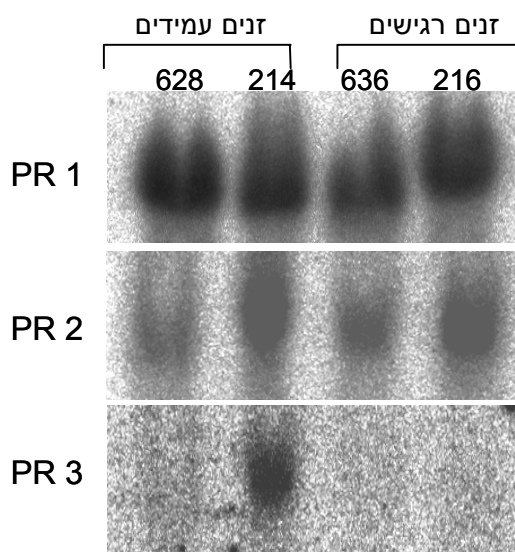
נראה כי ישנם הבדלים ברמת הביטוי היחסי של הגנים בין הזנים הרגישים לזנים העמידים (איור 12). נמצא כי הגן המקודד ל-CHT2-2 מתבטא פי 10 ויותר בזנים העמידים לעומת אלו הרגישים בכל בדיקות הזמנים שבוצעו (איור 12). דפוס זה נמצא גם בגנים האחרים שנבדקו. הגן המקודד ל-CHT2-1 מתבטא באופן יחסי ברמה גבוהה בזנים העמידים 214 ו-635 לאחר 72 שעות מהדבקה, לעומת הזנים הרגישים בהם רמת ביטוי הכיטינאז איננה משתנה כתגובה להדבקה ונשארת נמוכה יחסית.



איור 12: ביטוי יחסי של גנים המקודדים לקבוצת חלבוני ה-PR, הקשורים בעמידות הצמח בפני קימחון. ביטוי הגנים נקבע באמצעות Real-Time PCR עם פריימרים ספציפיים, ועבר נרמול ביחס לרמת הביטוי ה-Actin באותן דוגמאות.

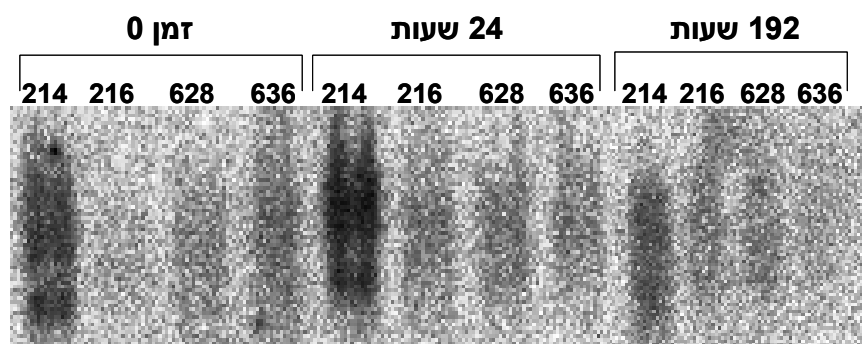
תוצאות אלו מעידות על הבדלים ניכרים ברמת ביטוי הגנים בין הזנים הרגישים לעמידים הן ברמה ההתחלתית, והן ברמות שלאחר האילוח בזמנים שונים. למרות שאופן ביטוי הגנים אינו אחיד, ניתן לראות שככלל הוא גבוה יותר בזנים העמידים מאשר ברגישים.

בנוסף לשיטה זו, נבחנו רמות ביטוי הגנים גם על ידי Northern blot כפי שמתואר בפרק שיטות וחומרים 3.3.6. הניסוי בדק את רמות ביטוי החלבונים בצמחים לא נגועים בזנים רגישים ועמידים. חלבוני PR-1 התבטאו ברמה גבוהה באופן יחסי בכל הזנים, ולעומתם חלבוני PR-2 התבטאו ברמה נמוכה יחסית בכל הזנים. רמת ביטוי החלבון PR-3 נמצא גבוהה רק בזן העמיד 214 ולא בשאר הזנים שנבדקו (איור 13).



איור 13: רמת ביטוי של חלבוני PR שונים, בצמחים עמידים ורגישים לפני הדבקה בקימחון.

בנוסף, נבדקה ב Northern-blot רמת ביטוי הגנים בשני זמנים לאחר האילוח בקימחון. מתוצאות ניסוי זה, ניתן לראות ביטוי משמעותי של הגן המקודד לחלבון Chitinase 2-2 בזן העמיד 214 בשלושת הזמנים, לעומת הזנים האחרים בהם התבטא הגן חלש (איור 14).



איור 14: רמת ביטוי הגן המקודד ל- chitinase 2-2, בזמנים שונים מאילוח, בזנים עמידים ורגישים.

תוצאות אלו מחזקות את הממצאים כי אופי ורמת הביטוי של חלבוני ה-PR שונה בין הזנים העמידים והרגישים ומצביע על מעורבותם בהקניית העמידות לקימחון. תוצאות אלו אמנם נקודתית, אך מצטרפות הן לתוצאות דומות קודמות ומחזקות אותן.

בסיכום רמות הביטוי של גנים המקודדים לחלבוני PR מהקבוצות השונות, ניתן לראות כי התוצאות מעידות על מגמה, לפיה ביטוי חלבוני ה-PR שונה בין הזנים העמידים לרגישים. ההבדלים קיימים כבר לפני הדבקה ולעיתים אף גדולים יותר כתגובה לאילוח בקימחון.

דיון

עמידות צמחים מזנים שונים למחלות נובעת מגורמים רבים. את העמידות ניתן להגדיר כמצב שבו הצמח אינו מאפשר לפתוגן להתפתח במלוא עוצמתו, אם בכלל (פלטי, 2000). מנגנוני העמידות הצמחיים קיימים בכל הזנים, אולם אופי הביטוי שלהם, כמותם המצטברת והשפעתם על הפתוגן משתנה בין הזנים ובין הפתוגנים. עם זאת, התפתחות המחלה תלויה גם בפתוגן ובתנאי הסביבה. הדיון שלהלן יעסוק במידע שהצטבר בעבודה זו ובעבודות אחרות, בהתקדמות מחלת הקימחון כפונקציה של התפתחות הפתוגן בפונדקאי בזנים שונים, ובהבדלים הקשורים במנגנוני העמידות של זני תות שדה כנגד פטריית הקימחון.

1 התפתחות הפטרייה *Podosphaera aphanis* בעלי תות שדה

להבנת ההבדלים ברגישות זני התות השונים, נערכו ניסויים למציאת השלב בהתפתחות הפטרייה בו נבדלים הזנים הרגישים מהעמידים. האינטראקציה בין הפטרייה והצמח כוללת מספר שלבים התפתחותיים של הפטרייה: נביטה, התפתחות הנחשון, חדירה, צמיחת התפטיר ברקמת הצמח ונביגה. למציאת השלב בהתפתחות הפטרייה בו מתבטאת עמידות הצמח, חשיבות רבה, משום שהיא מאפשרת את מיקוד המחקר לחיפוש והבנה של מנגנוני ההגנה לשלב זה.

1.1 נביטת נבגים והתארכות נחשון הנביטה

הנביטה של *P. aphanis* נבחנה לאחר 24 שעות מאילוח, כפי שעשו Peries (1962a) ו-Jothy (1965a). שעורי הנביטה המרביים שהתקבלו במבחנים אלו הגיע לכדי 5%-17%, כשהערכים הגבוהים מתייחסים דווקא לזנים העמידים 214 ו-628 (איור 4). תוצאות אלו מצביעות על כך ששיעור נביטת הנבגים אינו מהווה מדד להבדל בהתפתחות המחלה בין הזנים העמידים לרגישים. על פי Miller (2003) נביטה מרבית הושגה אחרי 48 שעות מאילוח, אולם גם על פי שיטה זו, אין זה הגורם המעיד על הבדלים ברגישויות בין הזנים.

אורך נחשון הנביטה, שנבדק אף הוא בזנים עמידים ורגישים, נמצא בממוצע, הארוך ביותר בזן העמיד 628, ובין שאר הזנים לא נמצאו הבדלים סטטיסטיים. מאחר ואין מתאם בין רגישות הזנים לאורך נחשון הנביטה, נראה שגם שלב התפתחותי זה השלב בו נעצרת מחלת הקימחון בזנים העמידים. כמו כן לא נמצא מתאם בין אחוזי הנביטה לבין אורך הנחשון הנובט, כלומר אין השפעה של אחוזי הנביטה על אורך הנחשון. ממצאים אלו ניתן להסיק כי נביטת הנבגים ו/או בהתארכות הנחשון אינם השלב בו נעצרת התפתחות המחלה על פני העלים, ומיעוט הסימפטומים בזנים העמידים קשורה בבלימת התפתחות בשלב מתקדם יותר של הפטרייה *P. aphanis* מחוללת מחלת הקימחון.

1.2 השפעת הזן והמצב הפנולוגי

בבדיקת שעור הנביטה והתארכות נחשון נביטה, נמצאה השפעת גומלין בין המצב הפנולוגי לגורם הזן, ולכן לא ניתן להסיק מסקנות לגבי כל גורם בנפרד, אלא על הצירופים ביניהם. על גבי עלים במצב הפנולוגי הצעיר, שעור הנביטה נמצא גבוה באופן מובהק יותר, בשלושה זנים, מאשר על גבי עלים מצירופי הזנים במצב הבוגר (איור 6). הנתונים תואמים את המדווח ע"י החוקרים היפנים שמצאו שצמחים משתילי הבת היו הרגישים ביותר להדבקה (Okayama, 1995). עם זאת חשוב לציין כי גם בניסוי זה, לא נמצאו הבדלים בנביטת הנבגים בין הזנים העמידים והרגישים.

בסיכום רגישויות הזנים במצב הפנולוגי הצעיר והבוגר, רגישות הזן 328 במצב הצעיר אינה שונה מהמצב הבוגר, אולם בשאר הזנים ישנם הבדלי נביטה שנמצאים בהתאמה להבדלי חומרת המחלה בין שני המצבים. אומנם תוצאה תואמת את ההשערה כי ישנו מתאם חיובי בין רגישות לקימחון ושיעורי נביטה, אך עדיין נראה כי נביטת הנבגים ואורך נחשון הנביטה אינם השלב המבדיל בהתפתחות המחלה בין זנים עמידים ורגישים.

1.3 אירועי חדירה לתאי הצמח

הערכת חדירת הפטרייה לתאי הצמח נעשתה במספר שיטות, ובכולן נמצא הבדל בין הזנים העמידים והרגישים. במיקרוסקופ נספרו בממוצע 20 אירועי חדירה לתאים בצמחים הרגישים, בעוד שבזנים העמידים נספרו 6 אירועי חדירה בממוצע (איור 8). ממצאים אלו אומתו בניסוי שבחן את מספר אירועי חדירת הפטרייה לתאי האפידרמיס בזמנים שונים לאחר האילוח, ובו נמצא כי ההבדל בין הזנים העמידים והרגישים אינו מתרחש מיד אחרי הדבקה, אלא לאחר כשבוע. לאחר 8 ימים מאילוח, בשלב בו ישנם כבר סימפטומים ברורים על הצמחים הרגישים נמצא ההבדל הגדול ביותר במספר אירועי החדירה בין צמחים עמידים לרגישים (איור 9). ממצאים אלו ייתכן ועמידות הזנים היא למעשה נרכשת כתגובה להדבקה בפתוגן ותגובת הצמח בהפעלת מערכת ההגנה היא זו שמונעת חדירה והתפתחות של גל קורים שני. התוצאה של פרופורציית חדירה דומה בתחילה (5 ימים מהדבקה) והבדל בכמות החדירות רק לאחר 7-8 ימים מרמזת על עמידות צמחית נרכשת והשפעה על הגל השני של הנבגים.

גם בבדיקת הופעת הקאלוז, שנראה במיקרוסקופ UV, נראו מספר רב יותר של אירועי חדירה בזנים הרגישים לעומת הזנים העמידים. בדומה לבדיקת החדירה הישירה, גם הקאלוז הופיע רק כעבור מספר ימים לאחר האילוח, כתוצאה מחדירת נחשוני הפטרייה. ידוע כי הרבצה של קאלוז מתרחשת כתגובה לפציעה פיזית של רקמות הצמח, אומנם לא ברור הקשר לעמידות בפני מחלות (Skalamera, 1996). על פי ממצאי עבודה זו, נראה כי הקאלוז איננו קשור במנגנון העמידות, אך הוא מהווה אינדיקציה נוספת לחדירת הפטרייה לאפידרמיס.

מסריקת דוגמאות החתכים של תאי האפידרמיס במיקרוסקופ אלקטרוני חודר, נמצאו הבדלים באופי דפנות התאים ובאכלוס קורי הפטרייה בתאי האפידרמיס של עלים מאולחים בעלי סימפטומי המחלה, לבין עלים ללא נגיעות. בזנים העמידים, בשונה מהרגישים, דופן התא נראית חלקה, ללא בליטות או שלפוחיות שעשויות להיות האוסטוריום (תמונות 9,10), כמו כן נראו בזנים הרגישים קורים שחדרו לתוך התא (תמונה 8).

כלל הממצאים הללו מעידים על ההבדל בשלב התפתחות הפטרייה בתאי הצמח בזנים העמידים והרגישים. הבדלים אלו מתרחשים כשבוע בלבד לאחר אילוח, וזאת משום שנביטת נבגי הפטרייה מתרחשת בעיקרה 24 עד 48 שעות מהאילוח, ורק לאחר מכן מתחילה הפטרייה לחדור לתאים ולהתבסס בתאי הצמח הנגוע (Joothy, 1964). שלב התבססות הפטרייה בתאים הינו קריטי להתפתחות המחלה, ובהמשך מחזור חיי הפטרייה, לשם יצירת נבגים ותפטיר נוסף על פני העלה. מכאן שההבדל ביכולת חדירת הקורים לזני התות השונים, הוא השלב שבו נעצרת התפתחות הפטרייה וכתוצאה מכך להבדלים בחומרת המחלה בין הזנים הרגישים והעמידים. אנליזה כמותית של אירועי החדירה בזמנים שונים מאילוח מרמזת במקרה שלנו על אפשרות של עמידות נרכשת בה מעוררת מערכת ההגנה של התות ע"י הדבקה ראשונית בקימחון ומונעת חדירות קורים נוספות והמשך התבססות הפתוגן לאחר כשבוע מהדבקה.

2 אפיון מנגנוני הגנה צמחיים

מנגנוני הגנה צמחיים נחקרו וידועים כיום במספר צמחים רב. בעבודה זו נערכו ניסויים לבחינת הקשר בין העמידות לקימחון לבין מספר מנגנוני ההגנה פיסיים ואקטיביים. לשם כך נערכו השוואות איכותיות וכמותיות לאפיון המנגנונים, ונבחנו הבדלים בדפוסי הביטוי ורמת הביטוי של הגנים המקודדים לחלבוני PR שונים.

2.1 עובי שכבת הקוטיקולה

עובי הקוטיקולה משתנה מאוד ונמצא עבה בחלקים מסוימים לאורך התאים על פני העלה, ודק בחלקים אחרים, בזנים הרגישים והעמידים כאחד. בצידו התחתון של העלה עובי הקוטיקולה היה דק באופן כללי, וגם לא נמצאו הבדלים בין הזנים שנבדקו (תמונות 11,12). אומנם, Jhoothy (1964) מצא קשר ישיר בין עובי הקוטיקולה ועמידות לקימחון, אך מחקרו נערך על שני מינים שונים של תות שדה (*F. chiloensis* - *F. ovalis*). בתחילת המחלה באופן רגיל בשדה או בחממה מתפתחים קורי הקימחון בעיקר מצדו התחתון של העלה בו הקוטיקולה דקה יותר. בנוסף, קיימים הבדלי לחות טמפרטורה וקרינה בין שני צדדי העלה, העשויים להסביר מדוע נראה הקימחון בתחילה בצידו התחתון של העלה. למרות התאם נסיבתי זה להעדפת הצד התחתון בו שכבת הקוטיקולה דקה התוצאות בעבודה זו אינן מחזקות

את הקשר בין עובי הקוטיקולה ועמידות העלה לקימחון. עובי שכבת הקוטיקולה נמצא דומה בין זני התות העמידים והרגישים גם בצידו העליון של העלה וגם התחתון אין קשר ישיר לעמידות הזנים לקימחון. תוצאות אלו עומדות בניגוד לממצאים קודמים המרמזים על תפקיד לשכבת הקוטיקולה במניעה של חדירת פתוגן לתאי הצמח (Elad, 1995; Kerstiens, 1996) בכלל, וקימחון בפרט (Joothy and Mckeen, 1964). עם זאת, אנליזה כימית של הרכב הקוטיקולה, או אופי פני שטחה, שלא נבדקו בעבודה זו, עשויים לתרום לעמידות הצמח לקימחון ולא נסתרו בעבודה זו.

2.2 תרכובות פוליפנווליות

בתגובה המיידית של צמחים לתקיפה, ידועה גם מעורבותם של הפנולים כנגד פתוגנים רבים, בהם פטריות, חיידקים ווירוסים (Skalamera, 1996) ולכן, נבדקה תכולת כלל הפוליפנולים בעלי התות בזנים העמידים והרגישים, כתגובה לקימחון. תכולת הפוליפנולים נמצאה דומה מאוד בכל הזנים שנבדקו, ללא הבדלים משמעותיים בין העמידים והרגישים (איור 10). בנוסף, בדיקת ריכוז פוליפנולים בעלים צעירים ובוגרים הראתה, בחלק מהזנים, ריכוז פוליפנולים גבוה יותר דווקא בעלים הצעירים, שהם גם הרגישים יותר לקימחון (איור 11). בניגוד לפרסומים בהם נמצא קשר בין הפנולים ועמידות הצמחים בפני פתוגנים (Von Ropenack, 1998; Nicholson, 1992), בעבודה זו לא נמצא קשר בין תכולת הפנולים לבין עמידות בפני קימחון. עם זאת בדיקה ספציפית של פנולים מסוימים, או בדיקת ביטוי הגנים המקודדים להם תוך התפתחות המחלה, עשויים להניב תוצאות אחרות. מידע נוסף עשוי להתגלות מבדיקת הקשר בין תכולת הליגנין ועמידות הזנים כנגד פטריית הקימחון.

2.3 נוכחותם וביטויים של חלבונים מקבוצת PR's (Pathogenesis Related)

ביטוי מוגבר של גנים המקודדים לחלבוני ה-PR ספציפיים, הינו אחד הסימנים הידועים להפעלת מנגנון העמידות הסיסטמית הנרכשת (Ryals, 1996). רמת ביטוי הגנים עולה, בין השאר, בעת אילוח של צמחי תות-שדה בפטרייה- *Colletotrichum fragariae* וטיפול בחומצה סליצילית (Anwar, 2003). לבדיקת ביטוי הגנים ואיתור הבדלים בין הזנים העמידים והרגישים, נלקחו דוגמאות עלים מצמחים לפני אילוח בקימחון, ובזמנים שונים לאחר האילוח. על סמך הממצאים ניתן להסיק כי לא רק רמת הביטוי שונה בין הזנים העמידים והרגישים (איורים 13,14), אלא גם אופי הביטוי משתנה בין הזנים כתלות בזמן שלאחר ההדבקה (איור 12). רמת ביטוי חלבוני ה-PR נמצאה גבוהה יחסית בזנים העמידים לעומת הרגישים, גם בזמן אפס ללא תלות בהדבקה בקימחון. למרות שדפוס הביטוי איננו אחיד בכל הזנים העמידים, מגמת הביטוי הכללית גבוהה ושונה באופן משמעותי מהביטוי בזנים הרגישים, ועשויה להיות גורם חשוב בהבדלי רגישות הזנים. הבדלי ביטוי אלו תואמים את הידוע בספרות, וניסויים במגוון גידולים הוכיחו את הקשר הזה. אופי ורמת הביטוי, משתנים לא רק בהתאם לפתוגן הנבדק, אלא גם בין הזנים

השוניים (Shi, 2005), ולכן ייתכן בהחלט כי הביטוי לא יהיה אחיד ברמתו בזנים העמידים בזמנים השונים.

הגן המקודד לחלבון Chitinase 2-2 מתבטא עד פי 10 בזן העמיד 635 לעומת שני הזנים הרגישים 216 ו-636, רמת הביטוי של הגן לחלבון Chitinase 2-1 עולה פי 3 בערך לאחר 72 ו-144 שעות מאילוח לעומת המועדים המוקדמים יותר, בזנים העמידים בלבד. רמת הביטוי אינה משתנה בין הזמנים בזנים הרגישים ונותרת נמוכה יחסית בכל המועדים שנבדקו (איור 12). גם ברמת הביטוי הבזאלית נמצאו הבדלים בין הזנים, הגן המקודד לחלבון PR-3 התבטא ברמה גבוהה יחסית בזן העמיד 214 לעומת שאר הזנים שנבדקו. ההבדלים הללו מחזקים את המסקנה כי חלבוני ה-PR מעורבים במנגנון העמידות לקימחון התות-שדה.

Shi (2005) מצא כי ריכוז חלבוני ה-PR גבוה יותר בעלים בוגרים מאשר בעלים צעירים. ממצא זה מחזק את הקשר בין עמידות הצמח לנוכחות חלבוני ה-PR ועליית ביטויים לאחר ההדבקה וייתכן כי הבדלי הרגישות בין עלים צעירים ובוגרים, כפי שנמצאו מתצפיות בחממה ובשדות ברוב הזנים, נובע, מרמות ביטוי וכמות המצטברת שונה של חלבוני ה-PR.

בעבודה זו נמצא שהתפתחות הפטרייה בזנים העמידים מעוכבת בשלב החדירה וההתבססות בתאי האפידרמיס לאחר חמישה ימים מהדבקה ושהעמידות כנראה מושרת ומתפתחת לאחר הדבקה בקימחון. ממצא זה עשוי לקשור את מעורבותם של חלבוני ה-PR כגורם המשמעותי ביותר במנגנון עמידות הצמח לקימחון. חלבוני ה-PR, המושפעים מההדבקה בפטריית הקימחון, עולים באופן משמעותי יותר בזנים העמידים ומקנים עמידות להמשך התבססות והתפתחות הפטרייה. נראה כי במקביל לנביטת נבגי הפטרייה, התארכות נחשון הנביטה וחדירה לתאים (תהליך שלוקח כ-5 ימים) עולה ביטוי חלבוני ה-PR, וגורם להבדלים שנראים לאחר מספר ימים מאילוח, ולא כעבור שעות ספורות כפי שמתרחש באינטראקציה בין פונדקאים שונים, ואף תות שדה עם פטריות פתוגניות אחרות.

רשימת ספרות

- אמסלם ל, אלעד י, פרימן ס, ניצני י, רב דוד ד, שטיינברג א, צוריאל ס, מור נ, גנאים נ ופרטוט א 2005. הדברת מחלת הקימחון בתות שדה הנגרמת ע"י הפטרייה *Sphaerotheca macularis*. גן שדה ומשק. עמ' 46-53.
- גנאים נ, 2006. ענף תות שדה מגמות וסיכום עונת 2005-2006. מתוך "סיכום מחקרים בתות שדה" יום מרוכז בנושא תות שדה.
- זקס מ, ועבדל ראזק ע, 1989. אנציקלופדיה לחקלאות. ירקות כרך ב'. הוצאת האנציקלופדיה לחקלאות, תל-אביב. תות שדה עמ' 305-334.
- לייכטנייר, ל', 1998. קובץ חומרי הדברה להגנת הצומח המורשים בישראל משרד החקלאות ופיתוח הכפר, השירותים להגנת הצומח ולביקורת, המחלקה לתכשירי הדברה, בית דגן.
- פלטי י, 2000. קימחונות (Erysiphaceae), מתוך: "מחלות צמחים בישראל" בעריכת רותם י, פלטי י ובן יפת י, הוצאת המחלקה לפרסומים מדעיים, מרכז וולקני. הוצאה שנייה. עמ' 185-197.
- צוריאל ס, מור נ, אלעד י, פרימן ס, אמסלם ל ורב דוד ד 2004. ניסוי להדברת קימחון בתות שדה 2004, מתוך דיסק "סיכום מחקרים בתות שדה 2003/2004", יום מרוכז בנושא תות שדה.
- Bélanger R.R., Dik A.J. and Menzies J.G. 1998. Powdery mildew – recent advances towards integrated control. In: "Plant Microbe Interactions and Biological Control". G.J. Boland and L.D. Kuykendall, eds. Marcel Dekker, N.Y, USA. pp. 89-109.
- Boesewinkel H.J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). Botanical Review. 46:167-224.
- Bryngelsson T., Sommer-Knudsen J., Gregersen P.L., Colling D.B., Ek B. and Thordal-Christensen H. 1994. Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. Molecular Plant-Microbe Interactions. 7:267-75.
- Cordero M.J., Raventos D. and San Segundo B. 1994. Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. Molecular plant-microbe interactions. 7:23-31.
- Dong X. 2001. Genetic dissection of systemic acquired resistance. Current Opinion in Plant Biology. 4:309-314.
- Elad Y., Malathrakis N.E. and Dik A.J. 1995. Biological control of Botrytis incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. Crop Protection. 15:229-240.

- Elad Y., Bélanger R.R and Köhl J. 1999. Biological control of disease in the phyllosphere. In: "Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops". R. Albajes, M. L. Gullino, J. C. Van Lentern and Y. Elad, eds., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 338-352.
- Frye C.A. and Innes W.R. 1998. An arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell*. 10:947-956.
- Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responding in arabidopsis-2001 status. *Current opinion in Plant Biology*. 4:301-308.
- Hancock J.F. 1999. Crop production science in horticulture. In: "Strawberries". pp. 90-100. CABI Publishing, UK.
- Heath M.C. 2000. Hypersensitive response related death. *Plant Molecular Biology*. 44:321-334.
- Ignatius S.M.J., Chopra R.K. and Muthukrishnan S. 1994. Effects of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and β -1,3 glucanases in near-isogenic lines of barley. *Physiologia Plantarum*. 90:584-592.
- Israel H.W., Ingalls S.J., Porter L.L. and Horst R.K. 1993a. Control of powdery mildew of rose with biocarbonates: I. A qualitative microscopic study of eradication. *Phytopathology*. 83:244. (Abstr.).
- Israel H.W., Ingalls S.J., Porter L.L. and Horst R.K. 1993b. Control of powdery mildew of rose with biocarbonates: III. A microscopic study of protection. *Phytopathology*. 83:244. (Abstr.).
- Jacobs A.K., Dry I.B. and Robinson S.P. 1999. Powdery mildew infection and ethephon treatment induce different pathogenesis-related cDNAs in grapevine. Final report to grape and wine research & development corporation. Urrbrae, South Australia. pp. 12-44.
- Jenks M.A., Joly R.J., Peters P.J., Rich P.J., Axtell D.A. and Ashworth E.N. 1994. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiology*. 105:1239-1245.

- Jhooty J.S. and McKeen W.E. 1965a. Studies on powdery mildew of strawberry caused by *Sphaerotheca macularis*. *Phytopathology*. 55:281-285.
- Jhooty J.S. and McKeen W.E. 1965b. The influence of host leaves on germination of the asexual spores of *Sphaerotheca macularis* (Wallr. ex. Fr.) Cooke. *Canadian Journal of Microbiology*. 11:539-545.
- Karjalainen R., Lehtinen A., Hietaniemi V., Pihlava J.-M., Jokinen K., Keinänen M. and Julkunen-Tiito R. 2002. Benzothiadiazole and glycine betaine treatments enhance phenolic compound production in strawberry. *Acta Horticulturae*. No. 567:353-356.
- Kasprzewska A. 2003. Plant chitinases – regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 8:809-824.
- Kerstiens G. 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends in Plant Science*. 1:125-129.
- Kirkwood R.C. 1999. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pesticide Science*. 55:69-77.
- Klarzynski O., Plesse B., Joubert J.M., Yvin J.C., Kopp M., Kloareg B. and Fritig B. 2000. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*. 124:1027-1038.
- Knogge W. 1996. Fungal infection of plants. *Plant Cell*. 8:1711-1722.
- Kolattukudy P.E. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 23:223-250.
- Kombrink E. and Schmelzer E. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*. 107:69-78.
- Kunkel B.B. and Brooks D.M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:325-331.
- Maas J. 1998. *Compendium of Strawberry Diseases*. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 42-43; 66-67.
- Miller T.C., Gubler W.D., Geng S. and Rizzo D.M. 2003. Effect of temperature and water vapor pressure on conidial germination and lesion expansion of *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*. *Plant Disease*. 87: 484-492.

- Nelson M.D., Gubler W.D. and Shaw D.V. 1995. Inheritance of powdery mildew resistance in greenhouse-grown versus field-grown Californian strawberry progenies. *Phytopathology*. 85:421-424.
- Nelson M.D., Gubler W.D. and Shaw D.V. 1996. Relative resistance of 47 strawberry cultivars to powdery mildew in California greenhouse and field environments. *Plant Disease*. 80:326-328.
- Nicholson R.L. and Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 30:369-389.
- Okayama K., Nakano T., Matsutani S. and Sugimura T. 1995. A simple and reliable method for evaluating the effectiveness of fungicides for control of powdery mildew (*Sphaerotheca macularis*) on strawberry. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 61:536-540.
- Paulitz T.C. and Bélanger R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*. 39:103-133.
- Peries O.S. 1962a. Studies on strawberry mildew, caused by *Sphaerotheca macularis* (Wallr. ex Fries) Jaczewski, I. Biology of the fungus. *Annals of Applied Biology*. 50:211-224.
- Peries, O.S. 1962b. Studies on strawberry mildew, caused by *Sphaerotheca macularis* (Wallr. ex Fries) Jaczewski, II. Host – parasite relationships on foliage of strawberry varieties. *Annals of Applied Biology*. 50:225-233.
- Ryals J., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H. and Hunt M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. 8:1809-1819.
- Sambrook A., Scheel D. and Strack D. 1998. Elicitor-stimulation biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *solanum tuberosum*. *Planta*. 205:51-55.
- Schmele I. and Kauss H. 1990. Enhanced activity of the plasma membrane localized callose synthase in cucumber leaves with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 37: 221-228.

- Shi Y. 2005. Isolation, characterization, and expression analysis of β -1, 3-Glucanase genes from strawberry plants. Dissertation, Louisiana University, USA. pp. 4-24; 51-84.
- Simpson D.W. 1987. The inheritance of mildew resistance in everbearing and day-neutral strawberry seedlings. *Journal of Horticultural Science*. 62:329-334.
- Skalamera D. and Heath M.C. 1996. Cellular mechanisms of callose deposition in response to fungal infection or chemical damage. *Canadian Journal of Botany*. 74:1236-1242.
- Spencer, D.M. 1978. Powdery mildew of strawberries. In: "The Powdery Mildews", D.M. Spencer, ed. Academic Press, N.Y, USA. pp. 355-358.
- Sticher L., Mauch-mani B. and Métraux J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 35:235-270.
- Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand, M. and Fritig B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*. 75:687-706.
- Sutton J.C. 1995. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. *Advances in Plant Pathology*. 11:73-190.
- Tae-Seok K., Sangman L., Scott C.S. and Schuyler S.K. 2003. Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β -1,3-glucanase gene family in *Prunus persica*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:955–963.
- Van-Bel A.J.E. and Gaupels F. 2004. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Molecular Plant Pathology*. 5:495-504.
- Van Loon L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European journal of Plant Pathology*. 103:753-765.
- Von Ropenack E., Parr A. and Schulze-Lefert P. 1998. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in broad spectrum resistance to powdery mildew fungus in barley. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:9013-9022.
- Vogel J. and Somerville S. 2000. Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *PNAS*. 97:1897-1902.

- Wang S.Y. and Tzeng D.D.-S. 1998. Methionine-riboflavin mixtures with surfactants and metal ions reduce powdery mildew infection in strawberry plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 123:987-991.
- Xiao C.L., Chandler C.K., Price J. F., Duval J.R., Mertely J.C. and Legard D.E. 2001. Comparison of epidemics of botrytis fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease*. 85:901-909.

Abstract

Powdery mildew of strawberry caused by the obligate pathogenic fungus *Podosphaera aphanis*. This disease affects leaves, flowers and fruits of strawberry crops in Israel and around the world. Infection results in a thick covering of mycelia that reduces photosynthesis, causes necrosis or even defoliation, and reduces fruit yield. Severe infections occur in all kinds of cropping systems, including nurseries during the summer. Current disease management practices are based on many chemical sprays, which have failed in controlling the disease and leave residues on the fruits that jeopardize the Israeli export crop.

The long-term objective of this research is to study the strawberry plant's innate defense mechanisms against powdery mildew, focusing on the differences in sensitivity to the pathogen of different cultivars. For this purpose, all the cultivars currently available to the "Agricultural Research Organization" were examined, and the most sensitive and resistance ones were selected for the further study. Experiments were conducted in those cultivars in order to gather information about the active and inactive plant defense mechanisms against powdery mildew. In addition, some experiments examined differences in the development stages of the fungi (germination, germ tube and penetration) on the different cultivars.

In laboratory experiments conducted to study germination and conidial germ tube length of the pathogen, the resistant spices showed germination rate of 12-17%. These rates were significantly higher than the 5.7% of the sensitive ones. Leaves of plants of all tested cultivars, at a young phonological stage had significantly higher conidial germination percentages than leaves of plants in a mature phonological stage. The length of the conidial germ tube was found to be at the same length both in the sensitive and the resistant cultivars that were examined.

The number of germ tubes that penetrate the epidermal cells of the sensitive cultivars was between 16 and 21 per sample, significantly more than the 6 which were counted on the resistant ones. According to the results of our experiments, it seems that callose is not related to the mechanisms of resistance, and that the accumulation of callose observed in infected plants is due to the wounding, that occurs during the germ tubes' penetration of the cells not the infection itself. However, there were differences in

the amount of callose that had accumulated in the different cultivars at one week after infection, as a result of differences in the penetration rates of the pathogen on the different cultivars. Another analysis, conducted using TEM (Transmission Electron Microscope), revealed cultivar differences in the shape of the walls of the epidermal cells and their colonization. As a result of this research, it seems the critical difference in fungal development on the different cultivars occurs at the penetration stage. Differences at this stage lead to subsequent differences in the rest of the fungus's development, shedding light on the mechanisms of the plant's defense against powdery mildew.

The cuticle layer was investigated in order to examine the effect of its thickness on disease severity. The results of this examination did not indicate any differences between the cultivars. All the cultivars had a thick or thin, but continuous, cuticle on the adaxial side of their leaves. However, on the abaxial side of the leaves, where most of the disease symptoms appear, the cuticles were mostly thin and not continuous. These results indicate that when the cuticle is complete (undamaged), it is not affected by cultivar differences. On the other hand, its homogeneity is important to reduce the fungal penetrations. The fact that powdery mildew symptoms appear on the abaxial side is due to the variations in the cuticle on that surface, as well as the different microclimate and light intensity on that surface.

Pathogenesis-related (PR) proteins are involved in plant defense responses to pathogen infection. Their expression levels differ among the sensitive and resistant cultivars. The observed expression patterns among the cultivars were different in healthy plants, and at certain time points after fungal infection. High levels of expression of the gene encoding the protein Chitinase 2-2 were observed in resistant cultivars, whereas the expression levels of that gene observed in the sensitive cultivars were 10 times lower. Despite the fact that expression levels in the resistant cultivars were not identical at all the examined time points, their overall expression levels were significantly higher than those observed in the sensitive ones, for all of the examined genes that encode PR proteins. This research shows that PR proteins in strawberry may play roles in the defense of the plant and cause the differences in sensitivity to powdery mildew observed in the different cultivars.

**Studying the mechanism of resistance to powdery mildew in
strawberry caused by *Podosphaera aphanis***

Thesis submitted to the Faculty of Agricultural, Food and
Environmental Quality Sciences of the Hebrew University of
Jerusalem
For the degree of Master of Science

By
Nadav David

December 2007

Rehovot