

דוח מדעי מסכם 2012

תוכנית מחקר מספר 11-1644-131

שימוש בעגבנייה "מהונדסת שורש" לסריקת גנים פוטנציאליים להשבת עמידות כנגד אוכלוסיית נמטודת עפצים *Meloidogyne javanica* שוברת עמידות (*Mi-Resistance breaking*)

Application of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for a rapid high through put screen for genetic resistance to *Mi* resistance breaking nematodes populations

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

סיגל בראון הורוביץ המחלקה לאנטומולוגיה והיחידות לנמטולוגיה וכימיה, מכון וולקני, בית דגן

Sigal Brown Horowitz, Department of Entomology and the Units of Nematology and Chemistry, the Volcani Center, Bet Dagan, Israel

E-mail: sigalhor@agri.gov.il

הדוח מוגש לצוות היגוי מחקרי היתכנות

דצמבר 2012

תשע"ב

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים, התוצאות לא מהוות המלצות למגדלים

החוקר האחראי: סיגל בראון הורוביץ

_____ תאריך:

_____ חתימת החוקר:

רשימת הפרסומים שנבעו מהמחקר:

סיגל בראון הורוביץ ורחל אוזלבו. 2010. שבירת עמידות לנמטודות יוצרות עפצים בעגבניות: הגברת המודעות ודרכים להתמודדות. שדה וירק, מוסף מיוחד להגנת הצומח, גיליון 18 : 39-42.

Ionit Iberkleid, Paulo Vieira, Janice de Almeida Engler, Kalia Firester, Yitzhak Spiegel AND Sigal Brown Horowitz. (2012). Fatty Acid-and Retinol-Binding Protein, Mj-FAR-1 Induces Tomato Host Susceptibility to Root-Knot Nematodes. **Submitted to PLOSone**

תקציר

הצגת הבעיה. נמטודות יוצרות העפצים *Meloidogyne spp.*, נמנות עם פגעי הקרקע הקשים ביותר בגידול ירקות בארץ ובעולם. בעוד שהשימוש בתכשירים לחיטוי קרקע טרום שתילה ושימוש בנמטוצידים במהלך הגידול נמצאים תחת רגולציה מתמדת, מקורות העמידות לנמטודה זו נמצאים תחת איום גובר. עמידות לנמטודת העפצים בזני עגבניות מוקנית ע"י גן דומיננטי יחיד שמקורו מעגבניית הבר *Lycopersicon peruvianum* הנקרא *Mi-1 gene*. ברם, שימוש ממושך בזנים עמידים וההישענות על מקור עמידות זה, הובילו לברירתם של ביוטיפים וירולנטים שוברי עמידות בשטחי גידול עגבנייה בארץ ובעולם, תופעה המסכנת את המשך קיומה של העמידות *Mi* היחידה. מכאן קיים צורך בזיהוי מסלולים גנטיים המובילים לביטוי האינטראקציה המתאימה למרות נוכחותו של הגן לעמידות *Mi*.

המטרה של המחקר. במחקר זה ביקשנו לזהות מסלולים גנטיים אשר עוברים שינוי עם ההדבקה באוכלוסיית נמטודות *M. javanica* וירולנטית המתגברת על העמידות *Mi-1* ולבחון את היתכנות השימוש במערכת צמחי עגבנייה "מהונדסי שורש" לבחינת תפקוד גנים באינטראקציה הפרזיטית צמח X נמטודה. מידע ממחקר זה ישמש בסיס להבנת מנגנון שבירת העמידות תלוי *Mi-1* ויוכל להצביע על מסלולים נוספים הדרושים לביטוי עמידות כנגד הביוטיפים הוירולנטים.

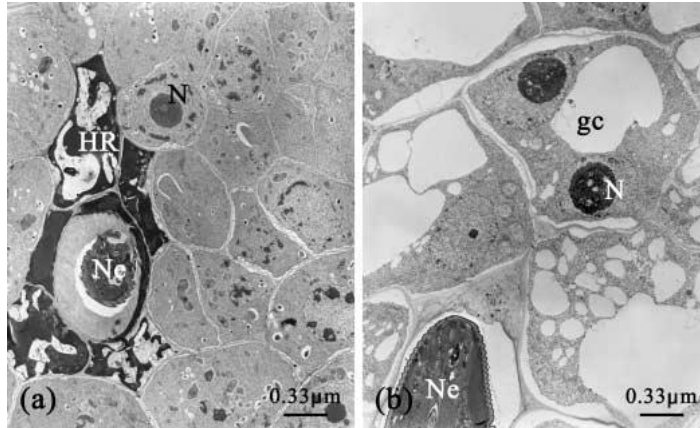
שיטות העבודה. העבודה במחקר זה שילבה בתוכה עבודה בתרבויות סטריליות של שורשי עגבנייה נושאי *Mi* ותרבויות שאינן נושאות את הגן לעמידות. התבצעו מבחני עמידות/רגישות לנמטודת העפצים בתנאי *in vitro*, בניית פלסמידים בינאריים, וייצור עגבניות "מהונדסות שורש" באמצעות *Agrobacterium rhizogenes*. איפיון השורשים המותמרים התבצע באמצעות PCR ואנליזת southern blot. מעקב אחר ביטוי הגנים המוחדרים בשלבי ההדבקה השונים של הנמטודה הפרזיטית נעשה באמצעות qRT-PCR (quantitative real time PCR). אנליזת immunolocalization של החלבון המופרש מהנמטודה נעשתה במהלך מחזור החיים הפרה-פרזיטי והפרזיטי של הנמטודה באמצעות חתכים היסטולוגיים והסתכלות תחת המיקרוסקופ.

תוצאות עיקריות. נמצא כי לתבדיל *A. rhizogenes* ישנה השפעה חזקה על אחוז השורשים המותמרים. מבין חלקי צמח העגבנייה אשר נבחרו להדבקה (גבעול, פסיגים, שורשים ועלים אמיתיים) נמצא כי קטעי גבעול מהווים את ה *explant* המתאים ביותר ליצירת שורשים מותמרים. על מנת לבחון את השינוי בדפוס ביטוי הגנים בשורשי העגבנייה בעקבות ההדבקה בביוטיפים הוירולנטים לעומת הביוטיפים האוירולנטים החלנו בסריקה רחבה של גנים המשתתפים בתגובת ההגנה הצמחית. בחינה רחבה של גנים השייכים למסלולי הגנה תלויי Salicylic acid (SA) ושאינם תלויי SA בעגבנייה הצביעה כי ביטויים נבדל בשורשי עגבניה נושאי *Mi* לאחר הדבקה עם נמטודות אוירולנטיות לעומת נמטודות וירו לנטיות. במקביל לסריקה של הגנים ניצלנו את מערכת צמחי העגבנייה "מהונדסי השורש" לבירור תפקיד אפקטור מהנמטודה המקודד לחלבון קושר חומצות

שומן ורטינול (Fatty acid and retinol binding protein FAR). ביטוי יתר של האפקטור Mj-FAR-1 הוביל לרגישות גבוהה להדבקה בנמטודה כפי שנמדד ע"י מספר נקבות ושקי ביצים גבוה יותר בשורשים המבטאים *mj-far-1*. אנליזת qRT-PCR של גנים הקשורים למערך ההגנה מצביעה כי בשורשים בהם FAR מבוטא ביטויים של גנים הקשורים למסלול ה Jasmonic acid יורד. התוצאות שהצטברו עד כה מצביעות בבירור כי מערכת צמחי העגבניה "מהונדסי שורש" מהווה מערכת מהימנה לזיהוי ואפיון גנים המעורבים בביטוי תגובת העמידות/רגישות כנגד נמטודות מסוג *Meloidogyne spp.*

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות. שימוש במערכת צמחי עגבניה "מהונדסי שורש" ללימוד האינטראקציה צמח X נמטודה מהווה אמצעי מהימן לזיהוי גנים המעורבים בתגובת עמידות/רגישות. בנוסף ביטוי נבדל של גנים בגנוטיפ נושא עמידות *Mi* באינטרקציה המתאימה והאינטראקציה הבלתי מתאימה מצביע על עיכוב/עירור מסלולים גנטיים ע"י הביוטיפים הוירולנטים. שימוש במידע זה יוכל לשפר את טווח העמידות הקיים.

מבוא. נמטודות יוצרות עפצים, *Meloidogyne* spp., הן נמטודות אנדופרזיטיות התוקפות שורשי צמחים ממגוון משפחות בוטניות ונמנות עם פגעי קרקע קשים בגידול ירקות בארץ ובעולם (Agrios et al., 1997). הנזק מתבטא בהאטת צימוח, הצהבת קודקודים ונבילה המובילים להפסדי יבול. הפסקת השימוש במתיל ברומיד לחיטוי קרקע כמו גם איסור השימוש בנמטוצידים משיקולי בריאות ואיכות סביבה, מדגישים את הצורך בלימוד מנגנוני עמידות. רגישות לנמטודת העפצים היא תוצאה של דיכוי ו/או עיכוב תגובות הגנה צמחיות ספציפיות ושאינן ספציפיות המובילים ליצירת תאי ההזנה המאפשרים את התבססות הנמטודה ואת התרבותה (Berker 1993). עמידות לנמטודת העפצים בעגבנייה קיימת ומוקנית ע"י גן דומיננטי יחיד שמקורו מעגבניית הבר *Lycopersicon peruvianum* הנקרא *Mi-1*, המקנה עמידות כנגד שלושת מיני *Meloidogyne* spp.: *M. incognita*, *M. javanica* ו *M. arenaria* אך לא בפני *M. hapla*, מין פחות שכיח בארץ. בעוד שזחלי נמטודות בשלב J2 נמשכים ונעים לעבר אתר ההזנה בשורש באופן דומה בקוים נושאי הגן *Mi* ובקוים שאינם, בקוים נושאי *Mi* התפתחות תאי ההזנה בצינורות ההובלה מעוכבת ותגובת רגישות יתר (HR) נצפית



איור 1. התפרצות ביוטיפים וירולנטים ל *Mi*. a. תגובת HR רגישות יתר בתאי הזנה ראשוניים, בצמח עמיד נושא *Mi* שהודבק בנמטודה אוירולנטית. b. התפתחות תאי הזנה, בצמח "עמיד" לכאורה, שהודבק בנמטודה וירולנטית ל *Mi*, תאי הזנה מפותחים נראים. תא הזנה (gc), תגובת רגישות יתר (HR), נמטודה (Ne), גרעין (N) (Melillo et al., 2006).

במקום תא ההזנה (Dropkin, 1969). ברם, השימוש התדיר וההישענות על מקור העמידות היחיד אם בזנים ו/או בכנות (Cortada et al., 2009; 2008) ביחוד בצל איסור השימוש במתיל ברומיד מאז 2005 גרר אחריו ברירת ביוטיפים וירולנטים למקור העמידות היחיד, תופעה המדווחת יותר ויותר בארץ ובעולם

(Roberts and Thomason, 1989; Verdejo-Lucas and Sorribas, 2009; Castagnone-Sereno 2002).

הרעיון המחקרי של עבודה זו מתבסס על

עבודות אחרונות המראות שמספר רב של גנים המעורבים בתגובת עמידות המוקנית ע"י הגן *Mi* הם בעלי דגם ביטוי משתנה כתלות בין אינטראקציה נמטודה-צמח עמידה או רגישה (incompatible או compatible בהתאמה). לדוגמה ביטוי גנים המקודדים למוטיב פרוקסידאז מוגבר בשורשים העמידים לעומת זאת מופחת ברגישים (Schaff et al., 2007). תוכנית מחקר זו מתמקדת בזיהוי גנים שביטויים מוגבר או מעוכב בצמחי עגבניה נושאי הגן *Mi* באינטראקציה הבלתי מתאימה (incompatible) לעומת האינטראקציה המתאימה (compatible). אנליזה תפקודית של הגנים הפוטנציאליים כנגד אוכלוסיית *M. javanica* וירולנטית שבודדה לאחרונה בארץ תוכל להצביע על מנגנונים ומסלולים אשר ישפרו את טווח העמידות הקיים. תחת ההנחה

שמערכות הגנה צמחיות עוברות דיכוי באינטראקציה המתאימה (compatibility) הכוונה תחילה להגביר את ביטוי הגנים המשתתפים בתגובת ההגנה. במחקר זה זוהו גנים אנדוגניים המעורבים בתגובת ההגנה הצמחית בשלבי ההכרה הראשוניים ואשר ביטויים ביתר או השתקתם ימנעו את יצירת תאי ההזנה והתפתחות הנמטודה. כיוון שמרבית זני העגבניות המסחריים נושאים את הגן Mi , היקף התבססות אוכלוסיות שוברות עמידות ואיתם שבירת העמידות מתעצמים ולכן זיהוי גנים נוספים להשבת העמידות ודרכים להבנת המנגנון המוביל לשבירת העמידות הינו מחייב.

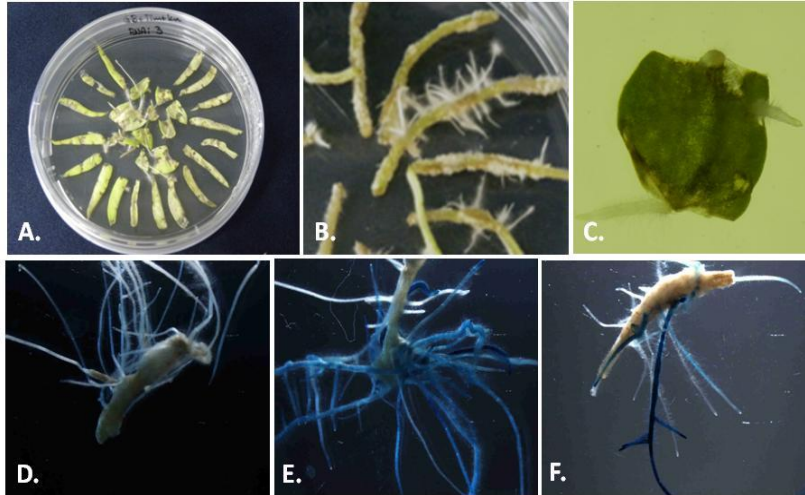
מטרת המחקר (כפי שהוגדרה בתוכנית המקורית). מטרתנו הכללית היא לזהות מסלולים מולקולאריים המשתתפים בהקניית עמידות בפני אוכלוסיית נמטודת העפצים, לבטאם ביתר או להשתיקם בצמחי Mi ולהשיב עמידות כנגד נמטודות שוברות עמידות. גנים ספציפיים/ מסלולים מולקולאריים אלה ישמשו בסיס ללימוד אופן הפעולה של מנגנוני עמידות ושבירתם במחקרים עתידיים.

מטרות המחקר בפירוט הן:

1. פיתוח מערכת לסריקה פונקציונאלית של גנים לעמידות בעגבנייה מהונדסת-שורש לצורך זיהוי גנים המעורבים בהפעלת מערכות הגנה צמחיות תלויות גן Mi .
2. ניצול מידע טרנסקריפטומי קיים אודות גנים העוברים אקטיבציה או רפרסייה במהלך תגובת העמידות תלויות Mi לנמטודת העפצים ובחינת תפקודם.
3. לימוד ואפיון תפקיד גנים פוטנציאליים (ממטרות 1 ו 2) באמצעות שימוש בצמחים שלמים מהונדסי-שורש ורגנרציה לצמח טרנסגני שלם.

1. כוילה מערכת טרנספורמציה לקבלת צמחי עגבנייה "מהונדסי שורש"

בסידרת ניסויים אלה נבחנה יעילותם של שני תבדידי אגרובקטריום, תבדיד *A. rhizogenes* 15834 ותבדיד A.



איור 2. מערכת ליצירת שורשי עגבנייה מותמרים. **A.** חלקי עלים מונחים על מצע MS לאחר הדבקה ב *A. rhizogenes* 15834. **B.** התמיינות ליצירת שורשים מותמרים מושרית ע"י התבדיד *A. rhizogenes* 15834. **C.** גדילת שורש מותמר מפסיגי עגבניה. **D-F.** שורש עגבניה מושרה ע"י *A. rhizogenes* לאחר התמרה בפלסמיד בינארי המכיל אפקטור של הנמטודה (**D**), ולאחר התמרה בוקטור בינארי הנושא את הגן המדווח GUS (**E-F**). יש לציין את האחוזה הגבוהה של השורשים המותמרים כפי שנראה לאחר GUS staining.

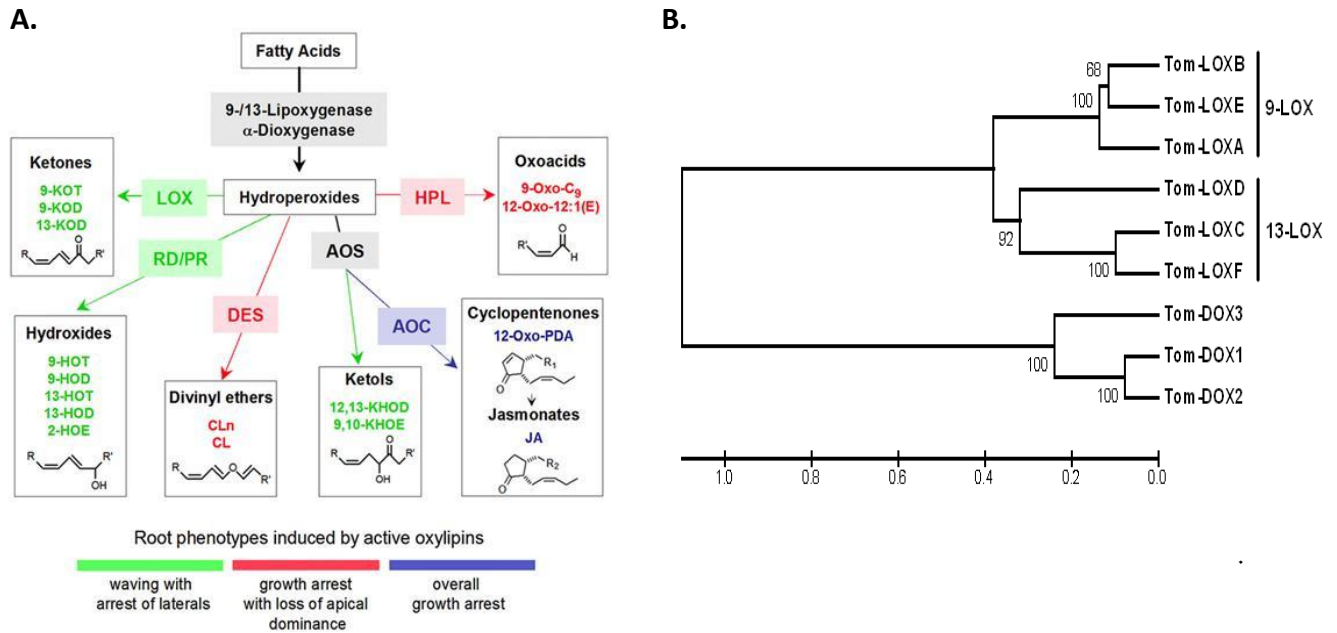
rhizogenes K599 בהתמרת חלקי צמח שונים. שני התבדידים שימשו לאילוח חלקי צמח שונים: פסיגים, גבעול, שורשים ועלים אמיתיים ע"י טבילה בתרחיף חיידקים מתאים אשר גודל O.N. (איור 2). שורשים טרנסגניים גדלו על מצע סלקטיבי המכיל Kanamycin כגורם סלקציה. מספר השורשים הטרנסגניים אשר התקבל בכל טיפול (תבדיד X חלקי

צמח) השווה לצורך קביעת הטיפול המניב את מספר השורשים הרב ביותר. שורשים טרנסגניים הועברו לגידול במצע MS המכיל גורם סלקציה להמשך אפיון. לצורך בחינת אחוז השורשים המותמרים מכלל השורשים המושרים ע"י A.

rhizogenes, השתמשנו בפלסמיד PME524 הנושא את הגן המדווח β -glucuronidase. אחוז גבוה של שורשי עגבנייה אשר מבטאים את הגן המדווח GUS מצביע על יעילות גבוהה בשימוש בתבדיד *A. rhizogenes* 15834 כאשר ה explants המתאים ביותר הוא קטעי גבעול (איור 2B). בשלב הבא הראנו כי השורשים המותמרים אכן מאוכלסים ע"י נמטודות יוצרת העפצים, הנמטודות השרו יצירת תאי ענק, והשלימו מעגל חיים בשורשים המותמרים. למערכת טרנספורמציה זו ישנן השלכות רבות בלימוד אינטראקציה צמח X נמטודה ולבחינת מסלולים גנטיים המבקרים תגובת עמידות / רגישות כמו גם בחינת תפקוד של גנים. אמצעי זה שפותח ובוסס במעבדתנו במחקר זה שימש ככלי לזיהוי גנים המעורבים במערכת ההגנה הצמחית שביטויים ביתר או לחילופין השתקתם יספקו הגנה רחבה יותר בפני ביוטיפים וירולנטים של נמטודות יוצרת העפצים.

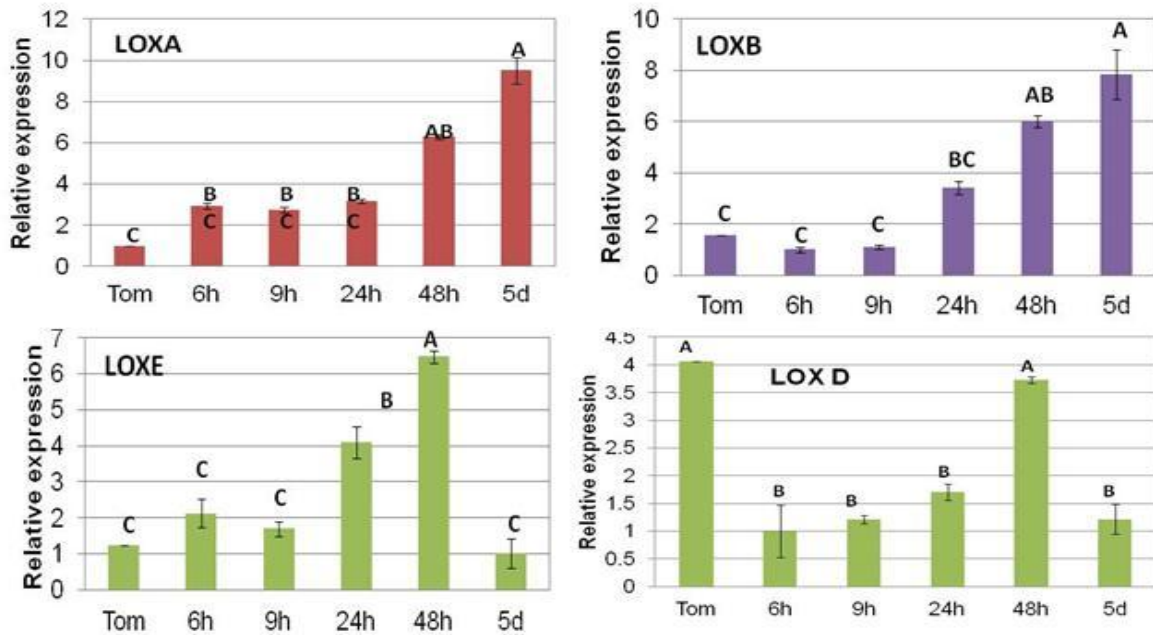
2. בחינת השפעת ההדבקה בנמטודות על ביטוי גנים המשתתפים במסלול יצירת האוקסיליפינים

בניסויים אלו ביקשנו לבחור מספר גנים פוטנציאליים אשר ייבחנו במערכת הטרנספורמציה שכוללה בתחילתו של המחקר. בשלב זה בחרנו להתמקד בגנים המעורבים במטבוליזם של חומצות שומן ונגזרותיהן המכונות אוקסיליפינים אשר ממצאים אחרונים בספרות מצביעים על מעורבותם בתגובת ההגנה כנגד פתוגנים (Vellosillo et al., 2007). בצמחים אוקסיליפינים מיוצרים ע"י ליפוקסיגנז ודיאוקסיגנזא לאחר חמצון חומצות שומן בלתי רוויות (Poly unsaturated fatty acids) PUFAs (Feussner, et al., 2002) (איור 3A). חיפוש בגנום העגבנייה העלה כי בצמחי עגבנייה, שישה גנים המקודדים לליפוקסיגנזא ושלושה המקודדים לדיאוקסיגנזא (Griffiths et al., 1999; Chen et al., 2004; Marriutto et al., 2011) ביניהם TomLOXA, TomLOXB ו TomLOXE שייכים לקבוצת ה 9-LOX ובעוד TomLOXC, TomLOXD, ו TomLOXF שייכים לקבוצת ה 13-LOX (איור 3B).



איור 3. A. מסלול האוקסיליפינים. חמצון חומצות שומן בלתי רוויות linoleic acid (18:2) ו linolenic acid (18:3) ע"י ליפוקסיגנזא ודיאוקסיגנזא מוביל לנגזרות הידרופרוקסיד 9-LOX או 13-LOX המעורבות בתהליכי גדילה והתמיינות ובתגובת ההגנה הצמחית לפתוגנים (Vellosillo et al., 2007). **B.** עץ פילוגנטי הבוחן את קירבת חלבוני הליפוקסיגנזא והדיאוקסיגנזא בעגבנייה. השוואת הרצפים נעשתה ע"י MEGA 5.05 עם ClustAWL.

למרות המחקר הרב שהוקדש בלימוד מעורבות גנים המקודדים לליפוקסיגנאז ודיאוקסיגנאז בבקרה על תהליכי גדילה, התמיינות והזדקנות מעורבותם במערכות הגנה כנגד נמטודות עדיין לא נלמדה לעומק (Gao et al., 2009). מעקב אחר תעתיקי הגנים המקודדים לאנזימים מסוג 9- ו 13-ליפוקסיגנאז ו α -דיאוקסיגנאז מצביע כי ביטוי שלושת הגנים ממשפחת ה 9-LOX מוגבר עם ההדבקה בנמטודות. אולם ביטוי

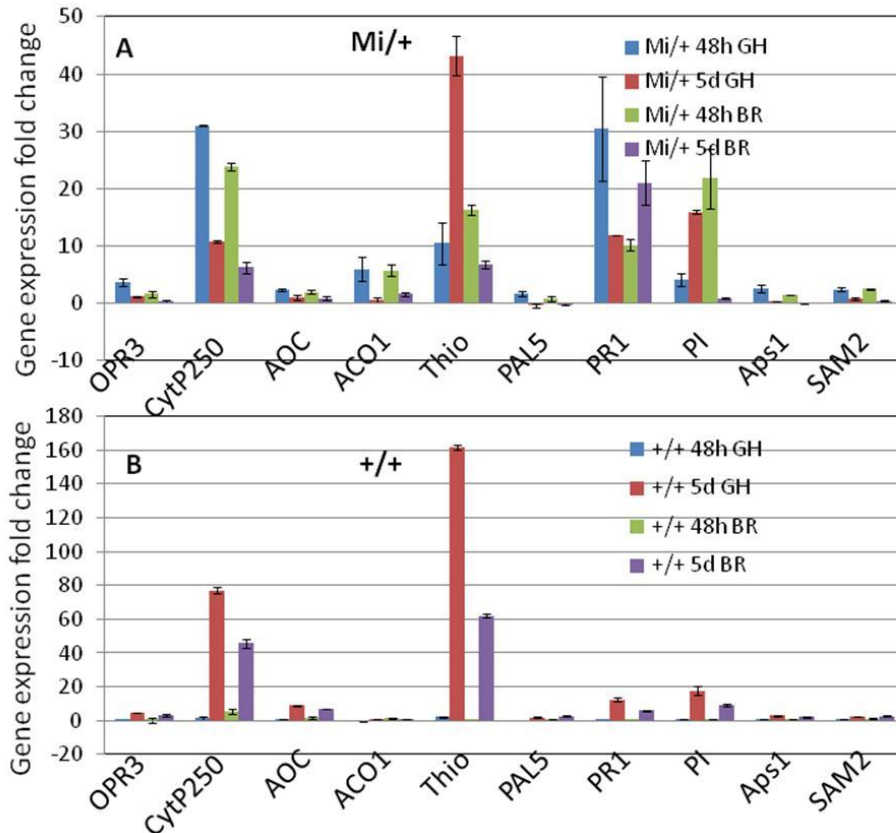


איור 4. מעקב אחר ביטוי גנים מקבוצת ה 9-LOX וה 13-LOX במהלך הדבקה של צמחי עגבניה שאינם נושאי הגן *Mi* עם ביוטיפים אוירולנטים. שורשי עגבנייה בתרבית סטירילית אולחו בזחלי J2 של *M. javanica* אוירולנטים ו RNA הופק 6,9,24,48 שעות ו 5 ימים לאחר ההדבקה. ביטוי הגנים נבחן באמצעות ריאקציית qRT-PCR כמותי ביחס לביטוי 18S הצמחי.

של איזופורם ה 13-LOX, TomLOXD יורד עם ההדבקה (איור 4), מה שמצביע על היתכנות מעורבותם בביטוי תגובת הרגישות לנמטודת יוצרת העפצים. בנוסף, השינוי בדפוס הביטוי של גנים המקודדים לליפוקסיגנאז מצביע על מעורבות המסלול של ההורמון הצמחי Jasmonic acid בקביעת תגובת הצמח להדבקה. בשלב הבא של המחקר נקטנו בסריקה רחבה של גנים הקשורים למסלול זה תוך השוואת ביטוי הגנים מקבוצה זו באינטראקציה המתאימה (compatible) של שורשי עגבניה נושאי *Mi* המודבקים בביוטיפים הוירולנטים לעומת האינטראקציה הבלתי מתאימה (incompatible) עם אוכלוסיות אוירולנטיות. תוצאות אנליזה זו יוכלו להצביע על מידת מעורבותם בתופעת שבירת העמידות המוקנית ע"י *Mi*.

3. בחינת שינויים בדפוס ביטוי הגנים באינטראקציה המתאימה (compatible) ובאינטראקציה הבלתי

מתאימה (incompatible). בניסויים אלו ביקשנו לברר מהו השינוי בביטוי גנים בעקבות אינטראקציה בלתי מתאימה (אילוח בביוטיפים אוירולנטים) לעומת אינטראקציה מתאימה (אילוח בביוטיפים וירולנטים) עם גנוטיפ עגבנייה נושא



איור 5. אנליזת qRT-PCR כמותי לבחינת רמות ביטוי הגנים הקשורים במסלול ה Jasmonic acid ו Salicylic acid. שני גנוטיפים של עגבניה האחד נושא עמידות *Mi-1* במצב הטרוזיגוטי (A) וגנוטיפ עגבניה רגיש שאינו נושא את הגן (+/+) (B) אולחו בשני ביוטיפים: ביוטיפים אוירולנטים (GH) וביוטיפים וירולנטים (BR).

Mi/+ (איור 5A). בנוסף נבחן דפוס הביטוי של אותם הגנים לאחר אינטראקציה מתאימה עם הביוטיפים האוירולנטים והוירולנטים על גנוטיפ עגבניה שאינו נושא Mi (+/+) (איור 5B). לצורך סריקה זו נבחרו גנים הקשורים לשני מסלולים עיקריים של תגובת הגנה תלויית Salicylic acid ותגובה שאינה תלוייה ב SA. בהשוואת התגובה של גנוטיפ עגבנייה נושא

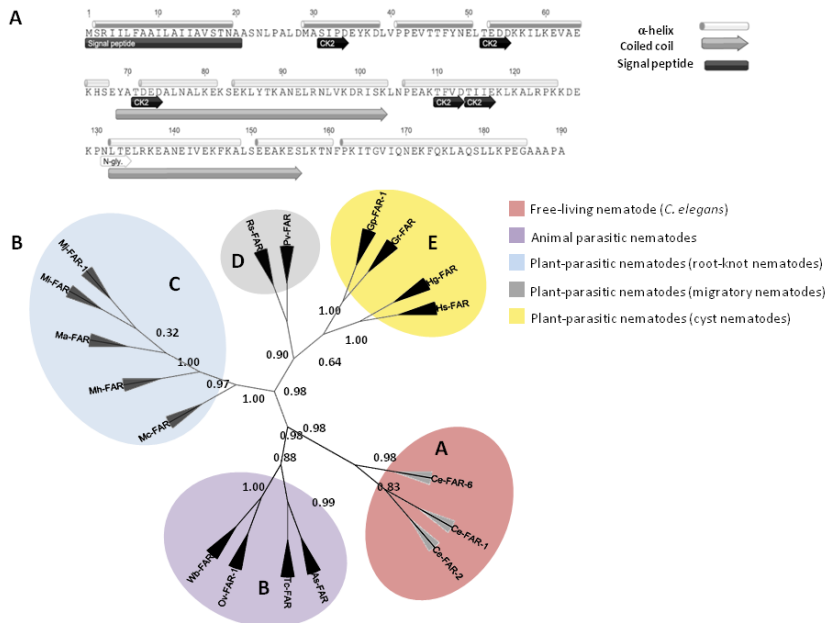
Mi להדבקה עם הביוטיפים האוירולנטים לעומת הוירולנטים עולה כי באינטראקציה הבלתי

מתאימה עם האוכלוסיה האוירולנטית רמות ביטוי גבוהות נראות של הגן α -thionin תוך חמישה ימים מההדבקה זאת לעומת רמות נמוכות של ביטוי לאחר הדבקה עם הביוטיפים הוירולנטים. תוצאות אלו מצביעות על האפשרות כי דיכוי הגן המקודד ל α -thionin לאחר אילוח עם הביוטיפים הוירולנטים מאפשר את התבססות האינטראקציה על אף נוכחותו של הגן *Mi-1*. התוצאות המתקבלות אף מצביעות כי באינטראקציה הבלתי מתאימה (אילוח עם ביוטיפים אוירולנטים) יש עירור מוקדם של גנים הקשורים ל Salicylic acid כדוגמת PR1 אולם באינטראקציה המתאימה בעקבות הדבקה עם הביוטיפים הוירולנטים יש עירור מוקדם של הגן המקודד ל proteinase inhibitor אשר אינו נצפה בשלב זה בהדבקה עם הביוטיפים האוירולנטים. בחינת

ביטוי הגנים בגנוטיפ (+/+) שאינו נושא *Mi* מראה באופן מובהק שביטוי הגנים הקשורים למסלולי ההגנה השונים מעוכב ותגובת הגנים להדבקה נראית רק כעבור 5 ימים מההדבקה בשונה מהגנוטיפ נושא *Mi*, בו נראית תגובה תוך 48 שעות, עובדה הנכונה לשני הביטיפים האוירולנטים והוירולנטים יחדיו. מסדרת ניסויים אלו נבחרו הגנים אשר ביטויים עולה באינטרקציה הבלתי מתאימה אך יורד באינטרקציה המתאימה בגנוטיפ נושא *Mi-1* על מנת לבחון את הדרכים להשבת העמידות כנגד הביטיפים הוירולנטים.

4. בחינת היתכנות השימוש בצמחי עגבנייה "מהונדסי שורש" לבחינת תפקיד אפקטורים של הנמטודה באינטרקציה האנדופרזיטית

ההיפותזה של המחקר המתבצע במעבדתנו הינה כי סיגנלים ליפידים מבקרים את תגובת ההגנה הצמחית או



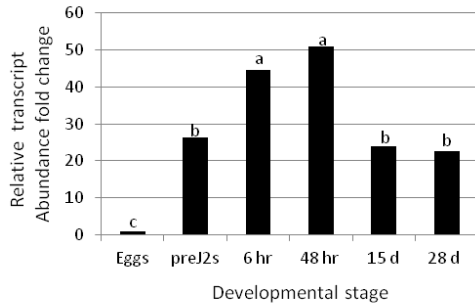
איור 6. A. איפיון החלבון באמצעות אנליזת in-silico מצביעה על נוכחות סיגנל ליפיד המכוון את הפרשת החלבון אל מחוץ לנמטודה. **B.** אנליזה פילוגנטית מראה כי מידת הקירבה של חלבוני ה FAR גבוהה יותר בין הנמטודות פרזיטיות לצמחים מאשר נמטודות פרזיטיות לחיות או הנמטודה החופשי *C. elegans*.

לחילופין חשופים למניפולציה ע"י אפקטורים המופרשים מהנמטודה ובכך קובעים את התגובה להדבקה. יתרה על כן, ראיות עד כה מוכיחות כי אחת מקבוצות האפקטורים המופרשות ע"י הנמטודה ומסייעת בשיבוש מערכות הגנה צמחיות המבוססות על סיגנל ליפידים הם קבוצת חלבונים קושרי חומצות שומן ורטינול (FARs) (איור 6). אנו משערים שחלבונים אלו משבשים מערכות סיגנל המבוקרות ע"י LOXs זאת ע"י הרחקת חומצות

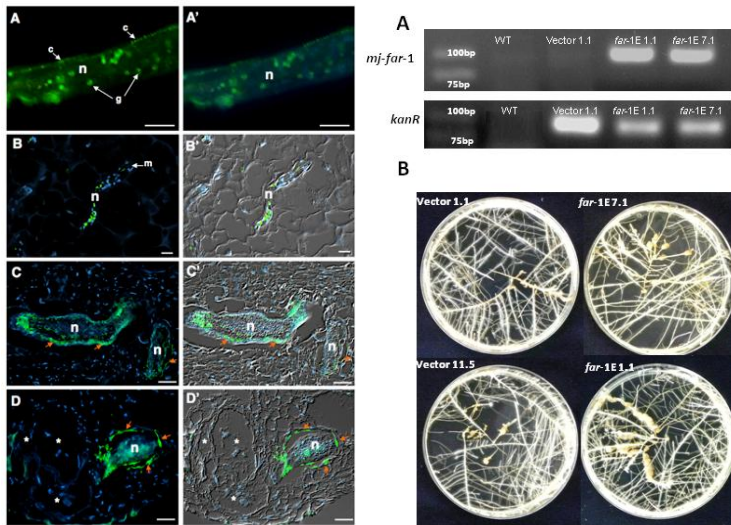
שומן חופשיות או נגזרותיהם הדרושות לתגובת ההגנה הצמחית. במקביל לבחינת ביטוי גנים פוטנציאליים של עגבנייה נבחנו גם גנים המקודדים לאפקטורים של

הנמטודה *M. javanica* ויכולים להיות מעורבים בשיבוש מסלולי הגנה. בשלב הראשון לצורך לימוד דפוס הביטוי של האפקטור במהלך שלבי החיים של הנמטודה הופק RNA משלבי החיים השונים ונלקח לאנליזת ביטוי של הגן *mj-far-1*. תוצאות ה qRT-PCR הצביעו שביטוי הגן נמשך במשך השלבים הפר פרזיטים המאוחרים וכל השלבים

הפרזיטים (איור 7). אנליזת immunolocalisation של החלבון מצביעה כי החלבון אכן מופרש במהלך שלבי החיים הפרזיטים של הנמטודה ומהווה חלבון דומיננטי במעטפת שטח הפנים (איור 8).



איור 7. מעקב אחר ביטוי האפקטור FAR2 מהנמטודה במהלך השלבים הפרהפרזיטים והפרזיטים במחזור החיים. שורשי עגבנייה בתרבית סטירילית אולחו בזחלי J2 של *M. javanica* אוירולנטים. RNA הופק מזחלי J2 וכן 6, 48 שעות ו 5 ימים לאחר ההדבקה. ביטוי הגנים נבחן באמצעות ריאקציית qRT-PCR כמותי.



איור 8. א. אנליזת immunolocalization של חלבון FAR בשלבים הפרה-פרזיטים והפרזיטים מצביעים כי החלבון מופרש משיכבת האיפודרמיס של הנמטודה ומצטבר בין הנמטודה והתאים כמעין סוכך. **ב.** יצירת שורשים טרנסגניים באמצעות מערכת שורשי העגבנייה מהונדסי שורש אומתה באמצעות RT-PCR לבחינת ביטוי הגן *mj-far-1* וביטוי הגן המקנה עמידות Kanamycin (*kanR*).

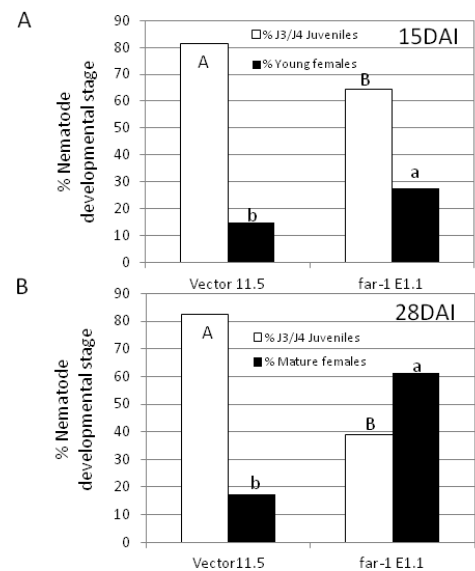
הביקורת המותמרים בפלסמיד נושא עמידות Kan (איור 9). תוצאות אלו ממחישות את חוזקה של השיטה באפיון תפקיד גנים באינטרקציה הפרזיטית צמח X נמטודה.

על מנת להמשיך וללמוד על תפקיד הגן ולבחון את התפקיד של האפקטור FAR במהלך ההדבקה נבנו שני פלסמידים בינארים האחד לביטוי ביתר של האפקטור והשני להשתקת האפקטור במערכת של RNAi (איור 8B). שורשים מותמרים התקבלו לפי הפרוטוקול שפותח ואופיינו מולקולארית לזיהוי המחדר באמצעות PCR, Southern ו/או qRT-PCR.

(איור 8). בשלב הבא אולחו השורשים בתנאי תרבית והתפתחות

הנמטודה נקבעה על פי ספירת השלבים הפרזיטים (זחל J3/4, נקבה, שק ביצים). תוצאות ראשוניות מצביעות

כי ביטוי ביתר של החלבון האפקטור FAR בקו *far-1* *E1.1* מוביל לעלייה ברגישות כפי שנראה ע"י מספר גבוה יותר של נקבות ושקי ביצים לעומת שורשי



איור 9. בחינת תגובת שורשי עגבנייה בהם ביטוי יתר של *mj-far-1* להדבקה בנמטודת עפצים. שורשי עגבנייה של Vector 11.5 ו *far-1 E1.1* הודבקו בזחלים אינפקטיביים. אחוז הדרגות של כל שלב הוערך.

דיון

מטרות המחקר הנוכחי כפי שהוגדרו בתחילת המחקר כללו: (א). פיתוח מערכת לסריקה פונקציונאלית של גנים לעמידות בעגבנייה מהונדסת-שורש לצורך זיהוי גנים המעורבים בהפעלת מערכות הגנה צמחיות תלויות גן *Mi*. (ב). ניצול מידע טרנסקריפטומי קיים אודות גנים העוברים אקטיבציה או פרסייה במהלך תגובת העמידות תלוית *Mi* לנמטודת העפצים ובחינת תפקודם.

בחינה מהימנה של תפקוד גנים הינה תנאי הכרחי להצלחת תוכנית העבודה. במהלך השנה הראשונה כוילה מערכת לבחינת תפקוד גנים באמצעות החיידק *Agrobacterium rhizogenes*. מבין שני התבדידים שנבחנו התבדיד *A. rhizogenes* 15834 בשילוב עם הדבקת מקטעי גבעולים הניב את מספר השורשים המותמרים הרב ביותר (איור 2) ועל כן שימש בהמשך המחקר. במסגרת בחינת גנים פוטנציאליים המעורבים בתגובת עמידות/רגישות לנמטודה נבחר ראשון מסלול האקוסיליפינים כאשר הדגש הושם על גנים ממשפחת ה-9-LOX וה-13-LOX בעגבנייה אשר ביטויים הושפע כתוצאה מאילוח בנמטודות. שינוי בדפוס הביטוי של גנים ממשפחה זו מצביע על מעורבות מסלול ה-*Jasmonic acid* בתגובת ההגנה ולכן מעורבות גנים הקשורים למסלול זה נבחנה במהלך האינטראקציה המתאימה (ביוטיפים וירולנטים) והאינטראקציה הבלתי מתאימה (ביוטיפים אוירולנטים) עם גנוטיפ נושא *Mi-1*. סריקה רחבה של גנים העלתה מספר גנים פוטנציאליים אשר ביטויים נבדל בשני סוגי האינטראקציות עם הביוטיפים השונים ויכולים לקבוע את תגובת הצמח להדבקה. גנים אלו ישמשו להמשך המחקר ע"י ביטויים ביתר או השתקתם במערכת צמחי העגבניה "מהונדסי שורש" אשר פותחה כאן.

על מנת לבחון לעומק את האינטראקציה משני צידיה החלטנו לבחון את היתכנותה של מערכת צמחי עגבניה "מהונדסי שורש" לאיפיון אפקטורים המופרשים מהנמטודה במהלך האינטראקציה הפרזיטית. במחקר זה מערכת התמרת השורשים שימשה בהצלחה לבחינת תפקיד חלבוני FAR מהנמטודה *M. javanica*. אולם, למרות השימוש הנפוץ בטכנולוגיית ה-RNAi לצורך השתקת גנים של הנמטודה, גישה זו לא צלחה במחקר זה שכן לא נצפתה השתקה של הגן המקודד ל-FAR. זאת לעומת ביטוי יתר של הגן בשורשים המותמרים אשר הצביע כי שורשים אלו רגישים יותר באופן מובהק להדבקה בנמטודה לעומת שורשי הביקורת. הממצאים שהצטברו עד כה מצביעים כי בידינו מערכת הדירה לאפיון וזיהוי גנים המעורבים בתגובת ההגנה הצמחית. נתונים אלו ביחד עם רשימת הגנים אשר ביטויים נבדל בין שתי האינטראקציות (המתאימה והבלתי מתאימה) עם גנוטיפ נושא *Mi-1* מספקים תשתית רחבה לפיתוח עמידות וכלים לשמירה על קיימותה של העמידות.

פירוט מלא של הפרסומים המדעיים

מאמר בעיתונות עברית:

סיגל בראון הורוביץ ורחל אוזלבו. 2010. שבירת עמידות לנמטודות יוצרות עפצים בעגבניות: הגברת המודעות ודרכים להתמודדות. שדה וירק, מוסף מיוחד להגנת הצומח, גיליון 18 : 39-42.

יום פתוח מו"פ דרום: פנל מיוחד לבעיות הגנת הצומח הרצאה מוזמנת בנושא (ינואר 2012)

Peer Reviewed Journal:

Ionit Iberkleid, Paulo Vieira, Janice de Almeida Engler, Kalia Firester, Yitzhak Spiegel AND Sigal Brown Horowitz. (2012). Fatty Acid-and Retinol-Binding Protein, Mj-FAR-1 Induces Tomato Host Susceptibility to Root-Knot Nematodes. Submitted to PLOSone

International and National presentation:

1. Iberkleid, I., Spiegel, Y., Ozalvo, R. and Brown Horowitz, S. 2012. Lipid signals governing plant interactions with the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica*. The 32th Congress of the Israeli Phytopathological Society. Oral Presentation.
2. Brown Horowitz, S. 2010. Studying and characterization of resistance-breaking populations of the root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. on Tomato in Israel. COST 872 Meeting: Exploiting genomics to understand plant-nematode interactions. Lisbon, Portugal.
3. Brown Horowitz, S., Ozalvo, R. and Iberkleid, I. 2010. The FAR proteins of *Meloidogyne* spp. and their possible role in intercellular lipid signaling during the parasitic interaction. The 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, Vienna, Austria. ESN Proceeding. S04-T2 (16).
4. Brown Horowitz, S., Iberkleid, I. and Ozalvo, R. 2011. Lipid Signals Governing Plant Interactions with Root Knot Nematode. The 63th International Symposium on Crop Protection & COST 872 final meeting. Ghent, Belgium.
5. Sigal Brown Horowitz*, I. Iberkleid, R. Ozalvo, P. Vieira, J. de Almeida Engler, and Y. Spiegel. 2012. *Meloidogyne* Fatty Acid and Retinol Binding protein (MJFAR) is required for defense signaling manipulation during parasitism. The 51th Annual Meeting of The Society of Nematology. Savannah Georgia

סיכום עם שאלות מנחות

1. **מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.** מטרות המחקר הנוכחי כפי שהוגדרו בתחילת המחקר כוללות: (א). פיתוח מערכת לסריקה פונקציונאלית של גנים לעמידות באמצעות עגבנייה מהונדסת-שורש לצורך זיהוי גנים המעורבים בהפעלת מערכות הגנה צמחיות תלויות הגן *Mi*. (ב). ניצול מידע טרנסקריפטומי קיים ו/או בניית סיפריות cDNA ללימוד אודות גנים העוברים אקטיבציה או הפרסייה במהלך תגובת העמידות תלוית *Mi* לנמטודת העפצים ובחינת תפקודם באינטראקציה המתאימה לעומת הבלתי מתאימה.

2. **עיקרי הניסויים והתוצאות.** כוילה והותאמה מערכת המאפשרת אנליזה פונקציונאלית של גנים פוטנציאליים לבחינת מעורבותם בתגובת עמידות/רגישות לנמטודות. גנים הקשורים לביוסינתיזה של אוקסיליפינים נבחרו כקבוצה ראשונה שביטויים נבדל כתוצאה מהדבקה בנמטודת העפצים. הבדלים אלו הובילו להתמקדות בתפקיד הסינגל הליפידי בהדבקה. זהו גנים בגנוטיפ עגבניה נושא *Mi-1* אשר ביטויים נבדל כתוצאה מהדבקה עם ביוטיפים וירולנטיים לעומת אורולנטיים. בנוסף, המערכת שבוססה נמצאה מתאימה אף לאיפיון אפקטורים של הנמטודה בעלי תפקיד באינטראקציה האנדו פרזיטית.

3. **מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו והאם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח** מערכת ליצירת צמחי עגבנייה "מהונדסי שורש" שפותחה כאן מתאימה לאנליזה פונקציונאלית של גנים. מניפולציה של גנים אשר ביטויים יורד באינטראקציה עם הביוטיפים הוירולנטיים יכולה לתרום לשיפור טווח העמידות הניתן ע"י *Mi-1*. מטרות המחקר אשר הוגדרו לתקופת הדוח הושגו בהחלט.

4. **בעיות שנתרו לפתרון ו / או שינויים (טכנולוגיים , שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ; התייחסות המשך המחקר לגבי הן , האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?**

אחת הבעיות בה ניתקלנו היתה חוסר הצלחה של שימוש בטכנולוגיית ה RNAi להשתקת גנים של הנמטודה המקודדים לאפקטורים במהלך האינטראקציה המתאימה. בעתיד ניתן לשקול הנדוס שונה של מולקולת ה RNAi לקבלת מבנה אשר ישפר את יעילות ההשתקה.

5. **הפצת הידע שנוצר בתקופת הדוח : פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי.**

הופעת ביוטיפים וירולנטיים על גנוטיפים נושאי עמידות *Mi-1* דווחה במאמר בעיתונות העברית. בנוסף איפיון אפקטור של הנמטודה ע"י שימוש במערכת צמחי עגבנייה "מהונדסי שורש" נשלח לפרסום בעיתון Plosone ומאמר נוסף מתגבש בימים אלו. בנוסף הנושא הועבר במספר פרומים של ימי עיון וימים פתוחים וכן בכנסים בינלאומיים שפורטו מעלה.

סיגל בראון הורוביץ ורחל אוזלבו. 2010. שבירת עמידות לנמטודות יוצרות עפצים בעגבניות: הגברת המודעות ודרכים להתמודדות. שדה וירק, מוסף מיוחד להגנת הצומח, גיליון 18 : 39-42.

יום פתוח מו"פ דרום: פנל מיוחד לבעיות הגנת הצומח הרצאה מוזמנת בנושא (ינואר 2012)

Peer Reviewed Journal:

Ionit Iberkleid, Paulo Vieira, Janice de Almeida Engler, Kalia Firester, Yitzhak Spiegel AND Sigal Brown Horowitz. (2012). Fatty Acid-and Retinol-Binding Protein, Mj-FAR-1 Induces Tomato Host Susceptibility to Root-Knot Nematodes. Submitted to PLOSone

6. פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי

העבודה הוצגה ביום פתוח של מו"פ הבשור באמצעות הרצאה בפנל מיוחד של בעיות הגנת הצומח (ינואר 2012). בנוסף העבודה הוצגה בכניסים נמטולוגים בינלאומיים המפורטים מטה.

7. פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: סמן אחת מהאופציות ללא הגבלה, בספריות ובאינטרנט

האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן

- Abad, P and Williamson, V.** 2010. Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Advances in Botanical Research* 53:147-192.
- Agrios, G. N.** 1997. Plant diseases caused by nematodes. In: Agrios, G.N. *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, cap.15, p. 565-597.
- Barker, K. R.** 1993. Resistance/ tolerance and related concepts/ terminology in plant nematology. *Plant Disease* 77:111-113.
- Castagnone-Sereno, P.** 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes?. *Euphytica* 124:193-199.
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z. and Grierson, D.** 2004. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (*TomloxC*) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology* 136:2641-2651.
- Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C., Andrés, M. F., Verdejo-Lucas, S.** 2009. Response of tomato rootstocks carrying the *Mi*-resistance gene to populations of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*. *European Journal of Plant Pathology* 124:337-343.
- Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C., Kaloshian, I., Verdejo-Lucas, S.** 2008. Variability in infection and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato rootstocks with the *Mi* resistance gene. *Plant Pathology* 57:1125–1135.
- Dropkin, V. H.** 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology* 59:1632-1637.
- Feussner, I., Wasternack, C.** 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53:275-297.
- Gao, X., Starr, J., Göbel, C., Engelberth, J., Feussner, I., Tumlinson, J. and Kolomiets, M.** 2008. Maize 9-lipoxygenase *ZmLOX3* controls development, root specific expression of defense genes, and resistance to Root-Knot nematodes. *Molecular Plant Microbe Interaction* 21:98-109.

- Griffiths, A., Prestage, S., Linforth, R., Zhang, J., Taylor, A. and Grierson, D. 1999b.** Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 17:163-173.
- Mariutto M, Duby F, Adam A, Bureau C, Fauconnier ML, Ongena M, Thonart P, Dommes J. 2011.** The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC Plant Biology* 11:29
- Roberts, P. A. 2002.** Concepts and consequences of resistance. In: Plant resistance to parasitic nematodes. Eds. Starr, J. L., Cook, R., Bridge, J. Cabi Publishing. Pp: 23-41.
- Schaff, J.E., Nielsen, D. M., Smith, C. P., Scholl, E. H. and Mck Bird, D. 2007.** Comprehensive Transcriptome Profiling in Tomato Reveals a Role for Glycosyltransferase in *Mi*-Mediated Nematode Resistance. *Plant Physiology* 144:1079-1092.
- Vellosillo, T., Martinez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M. and Castresana, C. 2007.** Oxylipins produced by the 9-Lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell* 19:831-846.
- Verdejo-Lucas, S., Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C. 2009.** Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of *Mi* resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathology* 58:990-998.