

דו"ח מסכם סופי לתכנית 10-0661-261

הקניית עמידות נגד נמטודות עפצים בדלועים

Generation of resistance against root-knot nematodes in cucurbits

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות, הפחתת השימוש בחומרי הדברה

ע"י

הגנת הצומח, חוות גילת, מנהל המחקר החקלאי	יוג'י אוקה
הגנת הצומח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי	עמית גל-און
מדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי	אהרן זלצר
מדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי	דליה וולף
הגנת הצומח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי	דיאנה ליבמן

Yuji Oka, Nematology, Gilat Research Center, ARO, M.P. Negev 85280. E-mail:

okayuji@volcani.agri.gov.il

Amit Gal-On, Diana Leibman, Plant Pathology, Volcani Center, ARO, POB 6, Bet- Dagan

50250. E-mail: amitg@volcani.agri.gov.il / diana@volcani.agri.gov.il

Dalia Wolf, Aaron Zelcer, Plant Sciences, Volcani Center, ARO, POB 6, Bet-Dagan 50250. E-

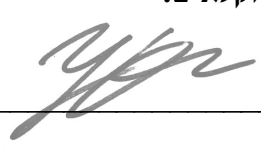
mail: daliaw@volcani.agri.gov.il

פברואר 2012

שבטן תשע"ב

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר הראשי: 

תקציר

1. הצגת בעיה. נמטודות עפצים (*Meloidogyne* spp.) הינן נמטודות טפיליות על צמחים הגורמות נזקים קשים במספר גדול של גידולים. מיני דלועיים מסחריים נתקפים קשה ע"י נמטודות עפצים בארץ ובעולם. לאחרונה הוצגה אלטרנטיבה של פיתוח עמידות טרנסגנית כנגד נמטודות ע"י השתקת גן אנדוגני של הנמטודה החיוני לפתוגנזה. מחקר הקדמי זה מבוסס על אפיון הגן 16D10 הממלא תפקיד חשוב בהתפתחות אתר ההזנה של מינים החשובים של נמטודות עפצים. החוקרים הראו שהשתקתו בנמטודות ע"י יצרת siRNA בצמחי ארבידופסיס השרתה עמידות לנמטודות.

2. מטרת המחקר ליצור צמחי מלפפון המבטאים תבנית השתקה של הגן 16D10, ולאפיין את קווים טרנסגניים עמידים למינים שונים של נמטודות פתוגניות בארץ ברמת הצמח השלם וברמה של כנה בצמח מורכב. צוות המחקר הרחיב את מטרות המחקר גם לגידול מלון ועגבנייה.

3. שיטות עבודה, נבנו תבניות גניות להשתקה של גנים אנדוגניים של נמטודות בכלים מולקולאריים. טרנספורמציה לצמחים התבניות נבדקו ליצירת siRNA באמצעות אגרו-אינפילטריציה. טרנספורמציה למלון מלפפון ועגבנייה נעשתה באמצעות אגרובקטריום, ובחינה ביולוגית לעמידות לנמטודות של מספר ביצים ונמטודות על שורשים נעשו ע"י סטנדרטים ביולוגיים מקובלים ברמת הצמח השלם בעצצים בתנאים מבוקרים עם ביקורות מתאימות.

4. תוצאות עיקריות: פותחו מספר קווים טרנסגניים של מלפפון, מלון ועגבנייה המבטאים siRNA של הגנים 16D10. מרבית הצמחים הטרנסגניים שיצרנו (דור T1) עם תבנית ההשתקה של הגן 16D10 הראו הצטברות של 16D10-transgene-small-RNAs (t-siRNA). חלק מהצמחים הטרנסגניים בדור T1 שהראו הצטברות של t-siRNAs הועברו לניסויים ביולוגיים של בחינת עמידות עם הנמטודות *M. javanica* או-*M. incognita*. בניסויים ביולוגיים לעמידות, לא נמצאו שושלות בעלי עמידות מספקת לנמטודות. לאור התוצאות הללו נבנתה תבנית גנית להשתקת שלושה גנים חיוניים לנמטודות: 16D10, Splicing factor ו-Integrase. יוצרו צמחי מלפפון טרנסגניים ודור T1 נבחן לעמידות. גם במקרה זה לא אופיינה עמידות לקווים השונים למרות נוכחות של t-siRNA.

5. מסקנות והמלצות: ביטוי רב של t-siRNA של גנים של נמטודה תחת פרומוטר של 35S אינו מספיק להקנות עמידות ויש לחשוב על שיפור המערכת ע"י ביטוי תחת פרומוטר ספציפי שעובר אינדוקציה בהאכלה של נמטודה. בנוסף יתכן שמודל ההשתקה שהוצג ב-*C. elegans* ע"י האכלה של dsRNA אינו דומה להאכלה של t-siRNA מצמח טרנסגני ע"י נמטודה העפצים, בשל מערכות שונות של השתקה ופיזיולוגיה של תזונה. לכן דרוש מחקר בסיסי להבין את מערכת ההשתקה של נמטודות העפצים, בכדי לפתח עמידות טרנסגנית על בסיס של השתקה.

מבוא

אפיון גנים אנדוגניים של הנמטודה, ושימוש לפיתוח עמידות לנמטודות בצמחים

נמטודות עפצים מהסוג *Meloidogyne* מפרישות לתוך תאי שורש מספר פפטידים, אשר מהווים מרכיבים הכרחיים להתפתחות העפצים (Davis et al., Trends Parasitol. 20:134). הפפטיד 16D10, אשר נוצר בבלוטה

האסופגלית של הטפיל, משתייך לקבוצה הזאת, ודווח שהוא משפיע על גידול השורש של הצמח הפונדקאי (Huang et al., Mol Pl Microbe Interact 19:463). פפטיד זה מהווה גורם הכרחי ליצירת הטפילות היות והוא מעורב ב היווצרות של תאי ענק ("giant cells") הדרושים לקיום והתפתחות הנמטודות. הרצף של פפטיד זה שמור מאד בין מיני *Meloidogyne* השונים, ולכן הוא מהווה מטרה מאד אטרקטיבית לפיתוח עמידות בפני טפיל זה. קבוצת מחקר בראשותו של R. Hussey (Univ. Georgia) הצליחה להשתיק את פעילותו של הגן 16D10 ולהשרות עמידות בפני הנמטודות (Huang et al., PNAS 103:14302) ע"י יצרת צמחי ארבידופסיס הנושאים את הגן 16D10 בתצורה המשרה יצירה של siRNA של הגן 16D10. הצמחים המהונדסים הודבקו עם נמטודות ולאחר 4 שבועות נצפתה עמידות מאד משמעותית לטפיל, המתבטאת בהפחתת מספר עפצים וביצים. זהות הרצף של 16D10 בין מיני *Meloidogyne* השונים גרמה כצפוי לתגובת עמידות של הצמחים המהונדסים בפני כל ארבעת מיני הטפיל אשר נכללו בניסוי. ההצלחה של הניסויים אשר תוארו לעיל הובילה אותנו לנסות להרחיב את השראת העמידות למינים חקלאיים אשר אינם מכילים עמידויות טבעיות לנמטודות, ובפרט לגידולי דלועים. ראוי לציין שהיות שאנחנו לא קיבלנו עמידות במלפפון המבטא t-siRNA של הגן 16D10 החלטנו ליצור תבנית גניית להשתקה נוספת. בתבנית זו הוחדרו שלושה גנים נוספים 16D10, Splicing factor ו- Integrase (Yadav et al., 2006 Mol Biochem Parasitol 219) הכרחיים להתפתחות נמטודות העפצים.

מטרות המחקר

כפי שהוגדרו בהצעת המחקר המקיפה, הינן:

פיתוח עמידות כנגד נמטודות עפצים במלפפונים, כחלופה יעילה וידידותית לסביבה לשימוש בנמטוצידים רעילים. אנחנו הרחבנו את המטרה בגידול המלפפון גם למלונים ועגבנייה בשל תוצאות שליליות במלפפונים).

מטרות המשנה של המחקר היו:

1. בחינת תגובת העמידות של הצמחים המותמרים למיני נמטודות העיקריים בתנאים מבוקרים.
2. בחינת ההתפתחות של זנים רגישים של מלפפון מורכבים על קווים עמידים, לאחר הדבקה בנמטודות.

פירוט עיקרי הניסויים

להלן מובאים פרטי ניסויים שבוצעו. תנאי הניסוי מפורטים בקצרה, פירוט רחב ניתן למצוא בהצעה המקיפה של התכנית.

סכום ניסויי טרנספורמציה של מלפפון עם תבנית השתקה

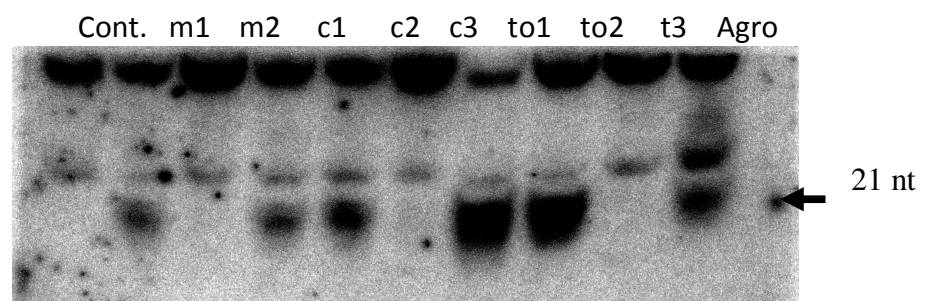
מלפפון: מתוך מספר ניסויי התמרה זוהו ובודדו 24 קווים טרנסגניים. טרנספורמציה של תבנית ההשתקה 16D10 לגנום של הצמחים הטרנסגניים בדור T0, זוהתה בעזרת PCR עם פרימרים מתאימים. מחוננים מותמרים הועברו לחממה טרנסגנית לאחר הקשיה מתאימה. בחלק מקווי המלפפון הטרנסגניים התאפשרה הכלאה עצמית, ויתר הצמחים הוכלאו עם אבקה של מלפפון מזן בית אלפא שאינו פרטנוקרפי. זרעי מלפפון חיוניים התקבלו רק בחלק מהקווים. כול קווי המלפפון נבדקו בדור T1 להצטברות של transgene-siRNAs של המקטע

הטרנסגני 16D10. התגלו הבדלים משמעותיים בין שושלות שונות. בשלב זה אין לנו הסבר מדוע בחלק מהקווים לא נראתה נוכחות של t-siRNA ובחלק כן. יתכן שרמה שונה של מתילציה של הטרנסקן היא הגורם, או שונות הנובעת ממיקום שונה של הטרנסקן לגנום. ראוי לציין, שלבדיקות ביולוגיות של עמידות לנמטודות נבחרו רק קווים שניתן היה לזהות ביטוי של t-siRNA באמצעות Northern blot.

מלון: מתוך מספר ניסויי התמרה זוהו ובודדו 33 צמחים טרנסגניים. הנוכחות של הגנים המוחדרים אושררה בעזרת בדיקות PCR. בדומה למלפפון, גם במין זה כמות זרעי T1 הייתה לא אחידה ובחלק מהצמחים לא הצלחנו לקבל זרעים חיוניים. בדומה למלפפון גם במלון התגלו הבדלים משמעותיים בין שושלות שונות ברמה המצטברת של ה-t-siRNA באנליזה של Northern blot.

מינים נוספים: נוסף למיני הדלועים שנכללו בהצעת המחקר המקורית, הותמרו גם צמחי טבק ועגבנייה אל מנת לאפשר בדיקה של השפעת הגן 16D10 לתגובה לנמטודות במינים רגישים בעלי כושר מצטיין להתמרה. הושגה התמרה יעילה בקלות יחסית, אשר אושררה בעזרת PCR. כל צמחי הטבק ועגבנייה מדור T1 הראו ביטוי גבוהה של t-siRNA בהשוואה למלפפון ומלון. לא ברור מדוע בדלועיים הרמה המצטברת של t-siRNA הייתה נמוכה מאשר בצמחי טבק ועגבנייה, יתכן שהסיבה לכך היא יעילות גבוהה יותר של עיבוד dsRNA טרנסגני ע"י אנזימי ה-DICR, או, יתכן שהסיבה נובעת מיציבות גבוהה יותר של duplex-small-RNA בסולניים מאשר בדלועיים.

איור 1. הצטברות transgene-small-RNA של המקטע 16D10. אנליזה של Northern blot של דוגמאות מייצגות של RNA מקווים טרנסגניים של מלפפון (c1-3), מלון m1-2 ועגבנייה (t1-3). RNA מצמח מלפפון לא טרנסגני (Cont.) ומעלי בנטמיאנה מוזרקים בתבנית ההשתקה (Agro) הוטענו כביקורת. זיהוי siRNA של תבנית ההשתקה 16D10 נעשה ע"י שימוש בסמן תעתיק רדיאקטיבי של הגן 16D10.



ניסויי הדבקה עם נמטודות ממינים שונים

לניסויים הביולוגיים לעמידות נבחרו צמחים טרנסגניים עמידים ומבטאים רמה יחסית גבוהה של t-siRNA.

שתילים מותמרים הועברו לשתילה בעציצים, ולאחר 1-2 שבועות הודבקו בביצי או זחלי נמטודות (2000 עד 2500 נמטודות לצמח). הצמחים הודבקו עם המין *Meloidogyne javanica*. תגובת הצמחים לנמטודות הוגדרה לאחר 6 שבועות על בסיס של 2 פרמטרים עיקריים:

1) אומדן ויזואלי של כמות העפצים בשורשי הצמח (GI: Gallig Index) בדרגות של 0 אין עפצים עד 5 (נגיעות מרבית).

2) מספר ביצי נמטודות אשר בודדו מהצמח המודבק. ההדבקות בוצעו במרכז מחקר גילת.

טבלה מסכמת של מספר הצמחים הטנסגניים ותכונותיהם:

מספר קווים שנבדקו לעמידות לנמטודות	מבטאים siRNA+/total	כמה נבדקו ב-PCR	מספר צמחים טנסגניים דור T1	מספר צמחים טנסגניים דור T0	צמחים שעברו טנספורמציה עם תבנית ההשתקה 16D10
14	9/9	37	23	37	מלפפון אילן
16	13/17	29	29	37	מלון
13	24/24	27	31	42	עגבנייה
10	n.d	10	10	10	טבק

ניסויי הדבקה עם נמטודות ממינים שונים

זרעים מדור T1 של מלפפון, מלון, עגבנייה וטבק חוטאו והונבטו על מצע סלקטיבי המכיל 100-150 מ"ג קנמיצין לליטר. זרעים מותמרים התפתחו באופן תקין עקב הנוכחות של הגן הסלקטיבי NPTII בו בזמן שזרעים סגרגנטים לא מותמרים עוכבו ע"י האנטיביוטיקה, ופיתחו שורש קצר ולא מסועף. במידת הצורך הנוכחות של הטנסגן אושרר ע"י בדיקת PCR. זרעים מותמרים הועברו לשתילה בעציצים, ולאחר 1-2 שבועות הודבקו בביצי או זחלי נמטודות (2000 עד 2500 נמטודות לצמח). הצמחים הודבקו עם המין *Meloidogyne javanica* ובמקרים מסוימים עם *M. incognita* או *M. hapla*. תגובת הצמחים לנמטודות הוגדרה לאחר 6 שבועות על בסיס של 2 פרמטרים עיקריים:

1) אומדן ויזואלי של כמות העפצים בשורשי הצמח (GI: Gallig Index) בדרגות של 0 אין עפצים עד 5 (נגיעות מרבית).

2) מספר ביצי נמטודות אשר בודדו מהצמח המודבק.

תוצאות: עמידות צמחים טרנסגניים (16D10) לנמטודות:

מלפפון: נבדקה עמידותם של 16 קווים טרנסגניים ע"י הדבקת הנמטודות (טבלה 4-1). הקו N69 הראו עמידות בניסוי אחד, אבל התוצאות לא חזרו בניסוי נוסף. לא נמצאו קווים עמידים לנמטודות.
מלון: נבדקה עמידותם של 15 קווים טרנסגניים ע"י הדבקת הנמטודות (טבלה 9-5). לא נמצאו קווים עמידים לנמטודות.

עגבנייה וטבק: נבדקה עמידותם של 7 קווי עגבנייה ו-7 קווי טבק טרנסגניים ע"י הדבקת הנמטודות (עגבנייה: טבלה 9, 8; טבק: תוצאות לא מוצגות). לא נמצאו קווים עמידים לנמטודות. זן עגבנייה המסחרי העמיד 1912 הראה עמידות לנמטודות.

טבלאות 9-1 מסכמות ניסויי עמידות לשני מיני נמטודות בקווים טרנסגניים של מלפפון מלון ועגבנייה

טבלה 1. תגובת קווי מלפפון לנמטודות עפצים *Meloidogyne javanica* ו-*M. incognita*. הדבקה עם 2000 זחלי *M. incognita* לצמח. הדבקה עם 2000 זחלי *M. javanica* לצמח

Line	Galling index (0-5)		Eggs/plant	
	Mean	SD	Mean	SD
N116	2.6	0.6	282150	55454
N12	3.2	0.3	305250	137827
N69	0.1	0.1	1313	2154
N109	2.8	0.9	120938	107190
N108	3.1	0.7	293400	33997
N73XBA	2.9	0.5	114188	97009
109X72N	3.2	0.3	394650	173181
N74XBA	3.0	0.3	410400	122275
N72XBA	3.8	0.3	288900	96483
Ilan WT	3.2	0.3	243000	81948

Line	Galling index (0-5)		Eggs/plant	
	Mean	SD	Mean	SD
N116	2.8	0.8	5000	3536
N108	3.8	0.4	71625	71595
109X72N	3.5	0.3	107100	91321
N74XBA	3.3	0.3	123000	88706
N72XBA	3.0	0.4	129150	118201
Ilan WT	3.4	0.4	17250	20416

טבלה 2. תגובת קווי בילפפון לנמיטודות
עפצים *Meloidogyne javanica*.

הדבקה עם 2500 ביצים לצמח

Galling index (0-5)

Ilan WT	N10	N200	N203	N199	
3.1	3.5	2.6	2.7	3.0	Mean
0.2	0.5	0.2	0.2	0.0	SD

Eggs/plant

Ilan WT	N10	N200	N203	N199	
478350	348750	276750	222188	382500	Mean
69373	105750	13870	53703	65752	SD

טבלה 4. תגובת קווי בילון לנמיטודות
עפצים *Meloidogyne javanica*.
הדבקה עם 2500 ביצי *M. javanica* לצמח.

Galling index (0-5)

WT	N62	N63	N64	
2.6	3.2	3.3	3.6	Mean
0.6	0.8	0.4	0.4	SD

Eggs per plant

WT	N62	N63	N64	
496500	412977	645750	470250	Mean
134374	151889	76368	103817	SD

טבלה 3. תגובת קווי מלפפון לנמיטודות עפצים
Meloidogyne javanica. הדבקה עם 2000 זחלי
M. javanica לצמח.

Galling index (0-5)

Ilan	N3A	N69	N186	N207	
3.0	3.2	3.2	3.4	3.0	Mean
0.6	0.4	0.3	0.4	0.0	SD

Eggs/plant

Ilan	N3A	N69	N186	N207	
471528	536352	326340	262404	404595	Mean
137905	165726	171307	95877	174053	SD

טבלה 5. תגובת קווי בילון לנמיטודות
עפצים *Meloidogyne javanica*.
הדבקה עם 2000 זחלי *M. javanica* לצמח.

Galling index (0-5)

Vedranite	N94	N76	N76	N63	
2.1	2.1	3.0	2.9	2.5	Mean
0.2	1.2	0.0	0.4	0.7	SD

Eggs/plant

Vedranite	N94	N76	N76	N63	
171900	6862	156375	265050	182250	Mean
83122	5746	52503	108286	136825	SD

טבלה 8. תגובת קווי עגבנייה לנמטודות

עפצים *Meloidogyne javanica*.

הדבקה עם 2500 ביצי *M. javanica* לצמח.

טבלה 6. תגובת קווי מלון לנמטודות

עפצים *Meloidogyne javanica*.

הדבקה עם 2000 זחלי *M. javanica* לצמח.

Galling index (0-5)

Vedranite	N-92	N-10	
3.9	3.6	3.5	Mean
0.2	0.3	0.4	SD

Eggs/plant

Vedranite	N-92	N-10	
308700	20565	212400	Mean
89429	51421	108678	SD

Galling index (0-5)

MP-1	Mm	39	103	
3.3	2.1	3.2	3.1	Mean
0.2	0.3	0.4	0.3	SD

Eggs/plant

MP-1	Mm	39	103	
447000	378750	379800	584625	Mean
129164	93234	58897	150904	SD

טבלה 7. תגובת קווי מלון לנמטודות

עפצים *Meloidogyne javanica*.

הדבקה עם 2500 ביצי *M. javanica* לצמח.

Galling index (0-5)

Vedranite	170	171	177	178	179	184	183	192	
2.5	2.8	2.6	1.7	2.8	3.1	3.3	2.3	1.7	Mean
0.5	0.3	0.2	0.6	0.3	0.2	0.3	0.4	0.7	SD

Eggs/plant

Vedranite	170	171	177	178	179	184	183	192	
233100	30103	314352	65120	445332	363192	183150	112332	183372	Mean
146394	12803	116942	22458	201633	74189	51604	58580	74867	SD

טבלה 9. תגובת קווי עגבנייה לנמיטודות עפצים *M. incognita* ו-*Meloidogyne javanica*. זן מסחרי עמיד WT1912.

M. javanica 2000 זמ

Galling index (0-5)

WTMM	WT1912	N100	N82	N147	N149	N155	
2.4	0.1	2.2	2.1	1.8	1.8	2.1	Mean
0.2	0.1	0.6	0.6	0.7	0.4	0.4	SD

זן עגבנייה מסחרי

Egg/plant

WTMM	WT1912	N100	N82	N147	N149	N155	
225563	5100	463	20340	0	92700	295200	238500
127116	2724	136	10660	1572	157012	177874	SD

זן עגבנייה מסחרי

M. incognita 2000 זמ

Galling index (0-5)

N100	N82	N14	N149	N155	
2.4	3.3	3.3	2.5	2.7	Mean
0.5	0.4	0.3	0.4	0.6	SD

Egg/plant

N100	N82	N14	N149	N155	
222188	210600	293	16312	21525	Mean
11178	10100	101	1511	11181	SD

תוצאות: בחינת העמידות לנמיטודות של צמחים טרנסגניים עם תבנית השתקה המכילה 3 גנים:

לאור התוצאות השליליות עם הגן 16D10 נבנתה תבנית השתקה המכילה מקטעים משלושה גנים שונים של

Integrase ו- Splicing factor, 16D10.

מלפפון: נבדקה עמידותם של 18 קווי טרנסגניים המכילים את תבנית ההשתקה עם שלושת קטעי הגנים. ניסויי

ההדבקה לאופן שתואר בניסויים קודמים. במרבית הקווים לא אופיינה עמידות כל שהיא להדבקה בנמיטודות

(טבלה 10-14). ירידה קלה בדרגת הנגיעות נצפתה עם קו N9, ללא ירידה במספר ביצי הנמיטודה (טבלה 10). הקו

111-7 נמצא מבטיח, אופיינה בו ירידה ברמת הנגיעות בניסוי אחד (טבלה 13), אבל התוצאות לא חזרו בניסוי

נוסף (טבלה 14). לא נמצאו קווים עמידים לנמיטודות.

טבלה 10. תגובת קווי מלפפון לנמטודות עפצים *Meloidogyne javanica*. הדבקה נעשתה עם 1500 זחלי *M. javanica* לצמח.

Galling index (0-5)

ilan	N1	N1X7	N9	N12	N14
3.4	3.5	3.4	2.4	2.8	2.4
0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4

mean

SD

Tukey

P<0.0001

Nematode eggs per plant

ilan	N1	N1X7	N9	N12	N14
192150	160313	114300	109800	183375	176400
79048	68527	91110	65933	71116	36717

mean

SD

Tukey

P=0.2083

טבלה 12. תגובת קווי מלפפון לנמטודות עפצים *Meloidogyne javanica*. הדבקה נעשתה עם 1500 זחלי *M. javanica* לצמח.

Galling index (0-5)

WT/אילן	850D(19)	111(2)
3.8	3.8	3.6
0.3	0.3	0.5

Mean

SD

Tukey

P=0.384

Nematode eggs

WT/אילן	850D(19)	111(2)
78469	80250	62250
46400	37694	38806

Mean

SD

Tukey

P=0.5927

טבלה 13. תגובת קווי מלפפון לנמטודות עפצים *Meloidogyne javanica* הדבקה נעשתה עם 1500 זחלי *M. javanica* לצמח.

Galling index (0-5)

Ilan	8D-15	8D-15-21	8D-19	8D-23	111-5	111-6	111-7	111-8	
2.5	2.0	1.8	2.3	1.9	2.1	2.2	1.0	2.5	Mean
0.4	0.7	0.4	0.3	0.3	0.6	0.6	0.5	0.5	SD
a	ab	ab	a	ab	a	a	b	a	Tukey

Nematode eggs

Ilan	8D-15	8D-15-21	8D-19	8D-23	111-5	111-6	111-7	111-8	
20550	4050	4950	14288	17750	11400	11610	12690	17460	Mean
8036	3711		13305	6290	8296	1893	5687	15674	SD
a	b	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	Tukey

טבלה 14. תגובת קווי מלפפון לנמטודות עפצים *Meloidogyne javanica* הדבקה נעשתה עם 1500 זחלי *M. javanica* לצמח.

Galling inde (0-5)

Ilan	111-7
3.6	2.9
0.4	0.5

Mean
SD

a a

t-test

P=0.0607

Ilan	111-4	111-7	111-8
3.0	2.8	3.3	2.7
1.2	1.3	0.3	0.4

Mean
SD

a a a a

Tukey

P=0.4761

Nematode eggs

Ilan	111-7
327600	297750
149313	200241

P=0.6194

a a

t-test

Ilan	111-4	111-7	111-8
319050	299813	199500	219235
195196	190400	61118	124216

Mean

SD

a a a a

Tukey

P=0.4801

דיון ומסקנות

יצרנו מספר רב של קווים טרנסגניים של מלפפון, מלון, עגבנייה או טבק המבטאים t-siRNA של 16D10. כמו כן יצרנו מספר רב של קוו מלפפון המכילים תבנית בת שלושה גנים. מכול פונדקאי נבחרו מספר קווים לבחינה ביולוגית לעמידות לנמטודות עפצים. כול הצמחים שנבדקו לעמידות לנמטודות הראו רגישות בדומה לביקורת. אמנם לא נבדקו כול הקווים הטרנסגניים שיצרנו, אך העובדה שקווים שביטאו רמה גבוהה של t-siRNA 16D10 לא השרו עמידות מעידה שה-t-siRNA בלבד אינו מספיק להשרות עמידות. ולכן התוצאות שלנו אינן תואמות את התוצאות שפרסמו ע"י הקבוצה האמריקאית בארבידופסיס עם אותה תבנית השתקה (16D10). הסיבות לכך יכולות להיות :

- א. יתכן שכדי להשתיק גן בנמטודה בדרך של האכלה צריכה הנמטודה לעבד את ה-dsRNA ל-siRNA. בתאים שלה, וקליטה של siRNA שמעובד בצמח אינה מאפשרת אמפליפיקציה והשתקה יעילה של גן המטרה. בעבודת המחקר של Huang et al., 2006 ניתן לראות שצמחי הארבידופסיס המותמרים בתבנית ההשתקה מבטאים פרט ל-siRNA גם dsRNA.
- ב. יתכן שבכדי לקבל עמידות צריך לסרוק מאות קווים טרנסגניים.
- ג. הניסויים הביולוגים שנערכו אצלנו היו מותאמים לניסויים ברמת הצמח השלם ולא כפי שנעשה בארבידופסיס בצלחות פטרי. יתכן שהאינוקולום של נמטודות שניתן במבחנים שלנו היה רב יותר מאשר אצל Huang et al., 2006. רמת האינוקולום שאנחנו חשפנו את הצמחים היא הרמה המקובלת בבחינת עמידות שדה.
- ד. ידוע שביטוי של הפרומוטר 35S בתאי השורש הקודקודיים הוא אינו אופטימאלי כך שיתכן שרמת ההצטברות של ה-siRNA הטרנסגני באזורי ההזנה של הנמטודה הייתה נמוכה.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

מטרות המחקר היו מוגבלות לגידול המלפפון ותבנית השתקה אחת המבטא siRNA של הגן 16D10. בשל התוצאות השליליות המחקר הורחב הרבה מעבר לתוכנית המקורית ובחנו את המטרות במלון עגבנייה וטבק. וכמו כן בחנו תבנית השתקה חדשה עם שלושה גנים שונים.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.

פותחו צמחי מלפפון מלון ועגבנייה טרנסגניים המבטאים תבניות השתקה שונות לגנים של נמטודת העפצים. צמחים אלו נבחנו בדור T1 לעמידות לשני מינים של נמטודות העפצים בתנאי מבוקרים. נעשו מספר רב של ניסויים ביולוגים ולא אופיינה עמידות בעשרות קווים שונים.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.

ביטוי של מולקולות קטנות siRNA בצמחים טרנסגניים שלהם הומולוגיה לגנים חיוניים של נמטודת העפצים אינו גורם לפגיעה בהתפתחות הנמטודות הגדלות על צמחי מלפפון מלון ועגבנייה. ולכן התוצאות שלנו אינן תואמות את התוצאות שפרסמו ע"י הקבוצה האמריקאית בארבידופסיס. הסיבות מצוינות בדוח.

הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה) טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים; (התייחסות

המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.

התוצאות שהתקבלו הן שליליות ולכן אין להמשיך את המחקר במתכונת של מחקר יישומי. יש להשקיע במחקר בסיסי בתחום בכדי להבין את מנגנון ההשתקה בנמטודת ואופן ההזנה שלה.

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

מאמרים ופטנטים: לא פורסמו.