

27/03/2016

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 132165015

דוח מסכם שנת 2015

נושא המחקר: האנזים RDR1 חשיבותו לזיהוי ופיתוח עמידות רחבה כנגד וירוסים של RNA בצמחים

The role of RNA-dependent RNA polymerase 1 in RNA virus resistance in plants

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות תחום ביוטכנולוגיה חקלאית יישומית
ע"י:

עמית גל-און - המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים מינהל המחקר החקלאי
דיאנה ליבמן - המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים מינהל המחקר החקלאי
ויקטור גאבה - המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים מינהל המחקר החקלאי
דליה וולף - המחלקה לחקר ירקות, מינהל המחקר החקלאי.

Amit Gal-On, – Dept. Plant Pathology and weed science, ARO, Bet Dagan, 50250 P.O.B 6.

amitg@volcani.agri.gov.il

Diana Leibman - Dept. Plant Pathology and weed science, ARO, diana@agri.gov.il

Victor Gaba - Dept. Plant Pathology and weed science, vpgaba@volcani.agri.gov.il

Dalia Wolf, Dept. Vegetable Research, , ARO, daliaw@volcani.agri.gov.il

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח:

1. מוניר מואסי

2. אביב דומברובסקי

3. משה לפידות

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר _____ תאריך 4.2014 

תקציר

הצגת הבעיה: צמחים פיתחו מערכת השתקה המאפשרת להם להתמודד עם וירוסים. הבנת מולקולרית וביוכימית של מערכת זו עשויה להציע דרכים חדשות להתמודדות עם מחלות ויראליות. האנזים RNA-1 dependent-RNA polymerase (RDR1) הוא אנזים מפתח במערכת ההתגוננות של הצמח כנגד וירוסים שונים.

מטרות המחקר: לאפיין את הגנים של *CsRDR1* במלפפון (*Cucumis sativus*) כמודל ובדלועי בר/ותרבות, וללמוד על מעורבותו בעמידות רחבת טווח לוירוסים בדלועיים.

שיטות העבודה: בשיטות מולקולאריות נעשה שיבוט של משפחת הגנים של *RDR1* בדלועיים. ובאמצעות אנליזה של Q-RT-PCR אופיין הביטוי הדיפרנציאלי של גנים אלו בדלועיים רגישים או עמידים לוירוסים. נעשה שימוש בחמישה וירוסים של RNA ו-DNA שונים לאפיין את פעילות של *RDR1* השונים. נעשתה אנליזה ביוכימית לאפיין הקשר שבין Salicylic acid, *RDR1s* ורגישות לוירוסים. יצרנו מוטנטים לגן *RDR1* ע"י טרנספורמציה של מלפפון עם תבנית של CRISPR/Cas9.

תוצאות עיקריות של המחקר: לראשונה אופיינו במלפפון ארבעה גנים שונים של *CsRDR1* הממוקמים על כרומוזום 5. הגנים *CsRDR1c1* ו-*CsRDR1c2* הם משוכפלים (98% זהות ברמת החלבון), ביטויים מושרה באופן קיצוני בנוכחות וירוס (פי 1300-25) והשתקתם גרמה לעלית רמת הווירוס בתא. הגנים *CsRDR1b* ו-*CsRDR1a* (55% זהות ברמת החלבון) מתבטאים בצמח בריא ומושרים בהדבקה ויראלית ובאמצעות Salicylic acid (SA). במחקר אפינו את הקשר בין ביטוי גבוה של *CsRDR1b* ועמידות רחבה לוירוסים שונים. מוטנט פגוע בגן *CsRDR1b* מראה רגישות יתר לוירוס. בנוסף הראנו שרמת ביטוי גבוה של *CsRDR1b* אינה תלויה מנוכחות של SA. במלון *Cucumis melo* אפינו שלושה גנים של *CmRDR1* כאשר רק אחד מתבטא *CmRDR1a* בעוד ששני הגנים האחרים *CmRDR1b* ו-*CmRDR1c* הם פגומים. במלון הבר *Cucumis callosus* הרגיש לוירוסים נמצא שמערך הגנים של *RDR1* דומה לזה של מלון תרבותי. באבטיח אפינו שלושה *CIRDR1* כאשר הגן *CIRDR1b* נמצא באסוציאציה עם קווי טיפוח עמיד ל-ZYMV. באבטיח הבר *Citrullus colocynthis* הרגיש לוירוסים הגן *RDR1a* מתבטא ברמה גבוהה והגן *RDR1b* ברמה נמוכה יחסית. בירוקת החמור אפינו חלקית שלושה גנים *RDR1a,b,c* ברמת הרצף.

מסקנות והמלצות: המחקר הביא לידיע חדש וייחודי למדע באשר למעורבות מספר גנים של *RDR1* בדלועיים בהגנה מפני וירוסים. המחקר מהווה בסיס לטיפול לעמידות לוירוסים בדלועיים (*RDR1b* גבוה) וחשיבה עתידית של תיקון גנים במלון ליצירת עמידות.

סכום עם שאלות מנחות:

✓ מטרת המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

1. לאפיין את הגנים *RDR1a,b,c* בדלועים. תוכנית המחקר העיקרית עסקה בנושא וברובה הושגה.
2. לבחון את רמת הביטוי של *RDR1a-c* בדלועים. עפ"י תוכנית העבודה נבחן ונלמד הביטוי של הגנים השונים בהדבקה בוורוסים שונים וע"י ריסוס בחומצה סלצילית SA.
3. לבחון את הקשר בין העמידות בקוו 823 עם הרמה הגבוהה של ביטוי *RDR1b*. עפ"י תוכנית העבודה נעשו הכלאות ונבחן הקשר הנדון.
4. לבחון האם ביטוי חולף של dsRNA משרה ביטוי של הגן *RDR1b*. נעשו ניסויים רבים ולא הצלחנו להראות השרייה של *CsRDR1b* לעומת זאת, הצלחנו להראות הגברה של *CsRDR1c*.
5. ליצור צמחי knockout וביטוי יתר לגנים *RDR1a,b,c*. הצלחנו להשתיק את הגן *RDR1c* וליצור מוטנט knockout לגן *CsRDR1b*. אבל לא הצלחנו ליצר צמחים טרנסגניים המבטאים בעודף של גנים אלו.
6. בחינת התגובה של פרומוטריים של *RDR1a,b,c* לביטוי של dsRNA. מטרה זו לא הושגה, קוים טרנסגניים המכילים גן מדווח מאוחה לפרומוטרים *CsRDR1a,b,c* לא הראו פעילות מסיבה שאינה ברורה.

✓ אלו ממטרות המחקר הושגו בעבודת המחקר הנוכחית.

המטרות 1-3 הושגו במלואן בעוד שהמטרות 4-5 הושגו בחלקן. מטרה 6 לא הושגה.

✓ עיקרי התוצאות.

- אופיינה משפחת גנים חדשה *RDR1a,b,c*, הגנים רוצפו בדלועים שונים ובדלועי בר.
- אופיינה רמת הביטוי של הגנים *RDR1a,b,c* בדלועים שונים ונמצא שהגן *RDR1b* הוא גן חדש לעמידות במלפפון ובאבטיח. הביטוי של *RDR1b* מושפע מהדבקה בוורוס ומ-SA אבל אינו תלוי בהם.
- בכל הדלועיים בר ותרבות אופיינו בגנום שלושה גנים כאשר במלון שני הגנים *RDR1b* ו-*RDR1c* נמצאו פגומים ואינם מתבטאים.
- השתקה של הגן *CsRDR1c1/2* גרמה לעליה ברמת הווירוס, ובדומה יצירת מוטנט של הגן *csrdr1b* גרמה להגברת הרגישות לוורוס.

✓ המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

המחקר הביא להישג מדעי חדש למדע של אפיון משפחת גנים של *RDR1s* בדלועים ואיתור הגן לעמידות *RDR1b* בדלועיים. תוצאות אלו מהוות בסיס גנטי לטיפול עמידות כנגד וירוסים במלפפון ואבטיח. כמו כן הידע שנצבר יאפשר בעתיד תיקון של הגנים במלון באמצעות

טכנולוגיות חדישות. היכולת לפגוע בגנים אלו באמצעות מוטגנזה מכוונת בדלועיים היא הישג מדעי שיאפשר לימוד מעמיק יותר על הגנים במשפחה.

✓ **בעיות שנותרו/או השינויים שחלו במהלך העבודה.**

נתקלנו בבעיות טכניות של יצירת *in vitro* dsRNA בכמות של עשרות מיקרוגרמים. כמו כן לא הצלחנו להראות ביטוי מוגבר של הגן *RDR1b* באמצעות ריסוס עלוותי של מלפפון.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח.

תוצאות המחקר הוצגו בכנס מדעי בן-לאומי של MPMI שהתקיים ברודוס ובכנס של האגודה למחלות צמחים הישראלית.

התוצאות סוכמו והוגשו לפרסום מדעי לעיתון Plant Physiology. חלק מהתוצאות הוצגו בפני חברות זרעים שהביאו עניין לשתף פעולה באשר לשימוש בגן *RDR1b* כסמן גנטי לעמידות.

✓ **אני ממליץ לפרסם את הדוח.**

ב. מבוא רקע מדעי קצר.

יחסי הגומלין צמח ווירוס, מבוססים על מערכת ההשתקה Gene silencing הצמחית שהיא מערכת "חיסון" המונעת את התרבות הווירוס (Baulcombe 2004). וירוסים צמחיים מקדדים לחלבונים המעקבים את מערכת ההשתקה הנקראים (GS) suppression genes (Ding and Voinnet 2007). שתי מערכות אלו פועלות אחת כנגד השנייה ובאבולוציה זו אין מנצח מרבית הצמחים בטבע נגועים בוורוסים שונים ומרביתם אינם פוגעים במהלך ההתרבות התקינה של הצמח. בצמחי תרבות כמו בגידולים חקלאיים נפגע שיווי המשקל ובמקרים של מחלה מערכת הדיכוי הויראלית (SG) גברה על מערכת ההשתקה של הצמח (GS). מערכת ההשתקה של הצמח מופעלת להשמדת מולקולות של double-strand-RNA (dsRNA). וירוסים יוצרים בתהליך השכפול, מולקולות של dsRNA לצורך יצירת תעתיקים חדשים של הווירוס. ולכן, מולקולות ה-dsRNA הויראלית שהם שלב בהתרבות הווירוס מפעילות את מערכת ההשתקה לחיתוך גנום הווירוס למקטעים קצרים של RNA (viral-small-RNA) (Llave 2010). מערכת ההשתקה מבוססת על חישה של מולקולות dsRNA ולא פחות חשוב על הגברה שלהם ע"י אנזימי פולימראזות כמו RDR6 ו-RDR1 המסנתזים מקטעים של dsRNA ויראלי על גנום הווירוס באמצעות viral-siRNA (Wang et al. 2012). האנזים RDR1 פעילותו העיקרית במערכת ההשתקה היא בסינתזה של מקטעי dsRNA ויראליים באמצעות RDR1, כדרך להגברת מערכת ההשתקה (GS) שהיא חיונית בהתמודדות עם וירוסים של RNA. מכאן שבכל צמח נגוע בוורוס ישנה הצטברות של V-siRNA שמקורו מחיתוך של מקטעי viral-dsRNA המסונתזים ע"י RDR1 ו-RDR6 (Pandey and Baldwin 2007). פעילותו האנדוגנית של RDR1 אינה ברורה והוא הכרחי להגנה יעילה של הצמח בפני הדבקה של וירוסים של RNA. בעבר הראו את הקשר בין: א. הדבקה של וירוסים ועליה ברמה של salicylic acid (SA) (Xie et al. 2001), ב. SA משרה עליה בביטוי של RDR1 (Carr et al. 2010). ג. פגיעה או מוטציות טבעיות בגן RDR1 גורמת לעליה ברגישות להדבקה בוורוסים של RNA (Yang et al. 2004). ד. לאחרונה הראנו בצמחים טרנסגניים עמידים לוורוסים (קו 823) עליה בביטוי של הגן RDR1, בהתאמה עם הצטברות גבוהה בצמח של transgene-siRNA (t-siRNA) בלתי תלוי ברמה של SA (Leibman et al. 2011). ה. ראוי לציין, לאחרונה הראו במאמר בו אנוכי שותף שהדבקה ויראלית משרה את פעילותו של RDR1 בהשתקה של גנים אנדוגניים רבים (Cao et al. 2014).

היפותזות המחקר:

- א. רמת ביטוי גבוהה של RDR1 בתא משרה להקנות עמידות רחבה לוירוסים.
- ב. רמה גבוהה של dsRNA או vsiRNA גורמת לעליה בשעתוק של RDR1.
- ג. האנזים RDR1 מעורב ביצירת siRNA, שלהם תפקיד בשתקת גנים המעורבים בעמידות לוירוסים.

מטרות המחקר היו:

1. לאפיין את הגנים של RDR1 בדלועיים במינים רגישים ועמידים לוירוסים (מלון, מלפפון).
2. לבחון האם מולקולות של dsRNA או siRNA גורמות לביטוי יתר של RDR1 ללא תלות ברמה של Salicylic Acid.
3. להשוות את רמת הביטוי של RDR1 בין דלועי בר ומתורבתים.
4. לאפיין RDR1-dependent endogenous siRNA שקשורים למערכת ההגנה של הצמח כנגד וירוסים.

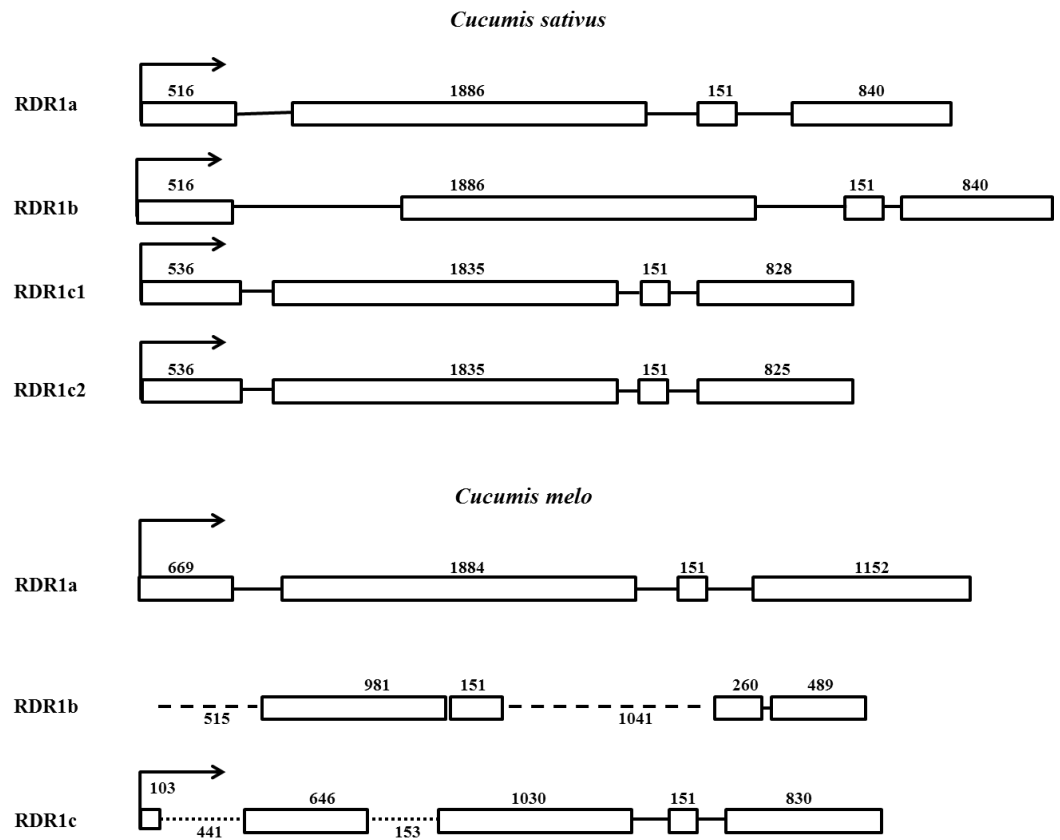
אפיון הגנים RDR1a,b,c במלפפון ומלון.

בראשית המחקר הנחנו שקיים *RDR1* אחד בדלועיים כמו בצמח המודל ארבידופסיס ובמרבית המינים (סולניים מצליבים וכו'). לאחר שהתברר שבדלועיים קיימים מספר גנים של *RDR1s* הקדשנו את עיקר המחקר באפיון הגנים השונים בדלועיים.

בדלועיים אפיינו לראשונה משפחה של גנים של *RDR1s* שלא קימת ממשפחות אחרות. במקרים בודדים כמו בשעורה (Madsen et al. 2009) ובתפוא"א (Hunter et al. 2016) אופיינו בגנום שני גנים שהם דופליקט של אותו הגן פעמיים. במלפפון (*Cucumis sativus*) אפיינו 4 גנים של *CsRDR1s* ושלושת גנים של *CmRDR1s* במלון (*Cucumis melo*) (ראה איור 1). באנליזה גנומית אפיינו ארבעה גנים אפשריים של *CsRDR1s* במלפפון, שקראנו להם *CsRDR1a,b,c1* and *c2*. במלון אפיינו שלושה גנים הומולוגיים למלפפון (a,b,c) אלה שהראנו שרק *CmRDR1a* מתבטא, בעוד ש-*CmRDR1b* ו-*CmRDR1c* נמצאו פגומים ואינם מתבטאים (איור 1) בדומה לגן הפגום שנמצא ב-*Nicotiana benthamiana* (Yang et al. 2004). כל גן מורכב מארבעה אקסונים כאשר המבנה של כל הגנים (אקסונים ואינטרונים) המתבטאים במלפפון ומלון הוא מאד דומה. הגנים *CmRDR1b* ו-*CmRDR1c* ממוקמים האחד מהשני במרחק של 350K בעוד הגנים *CmRDR1a* ו-*CmRDR1b* הם צמודים האחד לשני במרחק של 2.5K ובאורנטציה של ראש-לראש. תבנית דומה מצאנו במלון תרבותי ובר בגן *CmRDR1a*. ריבוי הגנים של *RDR1* בדלועים והחלוקה לאקסונים/אינטרונים (כולל קישוא ואבטיח)

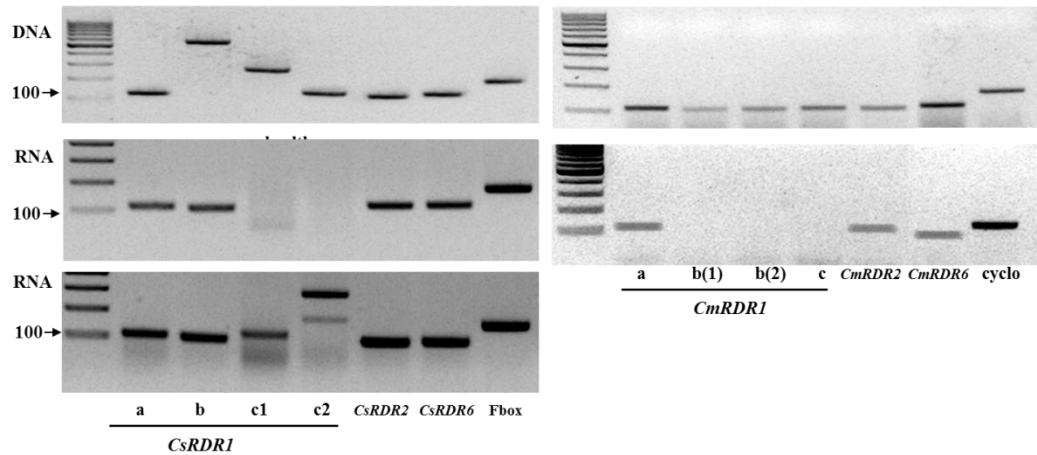
מעידה שההפרדה למספר גנים של RDR1 בדלועיים התרחשה באבולוציה במועד מוקדם טרם ההתפצלות למינים בדלועיים.

במלפפון הראנו שהגנים *CsRDR1a* ו-*CsRDR1b* מתבטאים באופן רציף גם ללא תלות בנוכחות הווירוס (איור 2), בעוד שהגנים *RCsRDR1c1* ו-*CsRDR1c2* אינם מתבטאים בצמח בריא. במלון רק הגן *CmRDR1a* מתבטא באופן רציף גם ללא הדבקה בווירוס (איור 2).

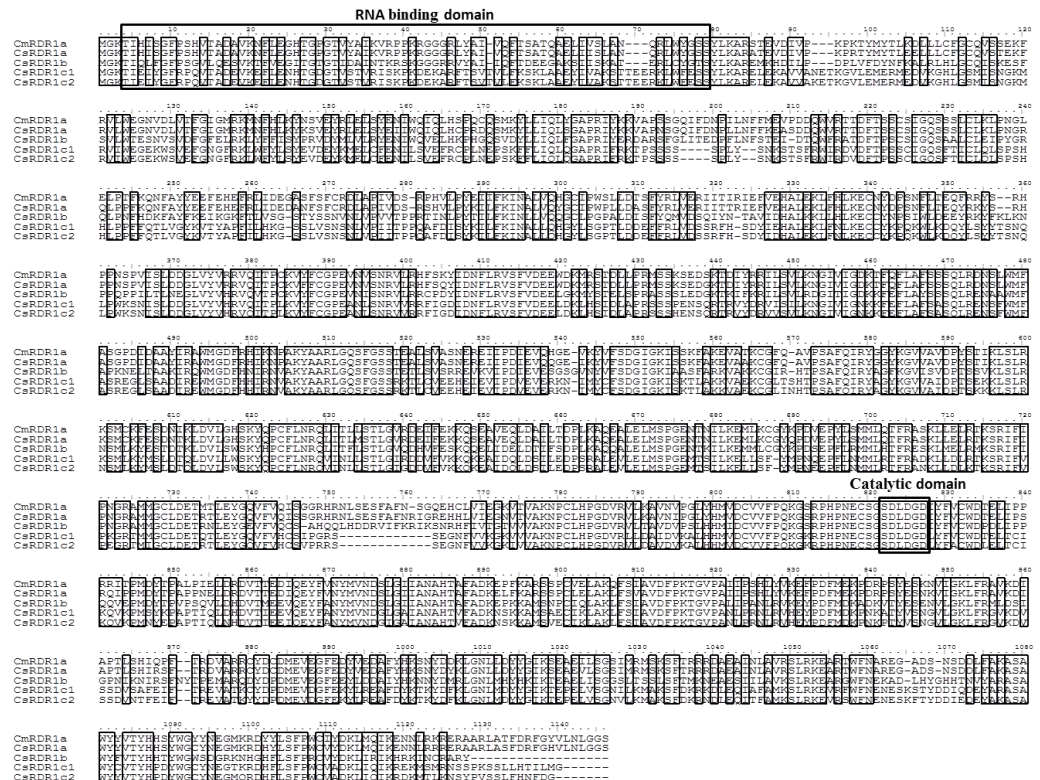


איור 1: מערך הגנים של *RDR1a,b,c1,c2* שאופיין במלפפון *Cucumis Sativus* ובמלון *Cucumis Melo*. הקו הבלתי רציף מיצג אזורי *Introns* והמלבן *Exon*. ניתן לראות תבניות של 4 אקסונים בגדלים דומים בין הגנים השונים. במלון האקסון הראשון חסר ב- *RDR1b* ומקוצר ב-*RDR1c*.

B. Melon



איור 2. ביטוי של mRNA של הגנים RDR1a,b,c1,c2 במלפפון ובמלון. כביקורת נבדקו הגנים RDR2, RDR6 והגנים האנדוגנים Cyclophilin במלון ו-Fbox במלפפון. החלק העליון של התמונה מעיד על נוכחות הגן (DNA) בעוד שחלקו התחתון מציין את הביטוי של הגן (אנליזה של RT-PCR).

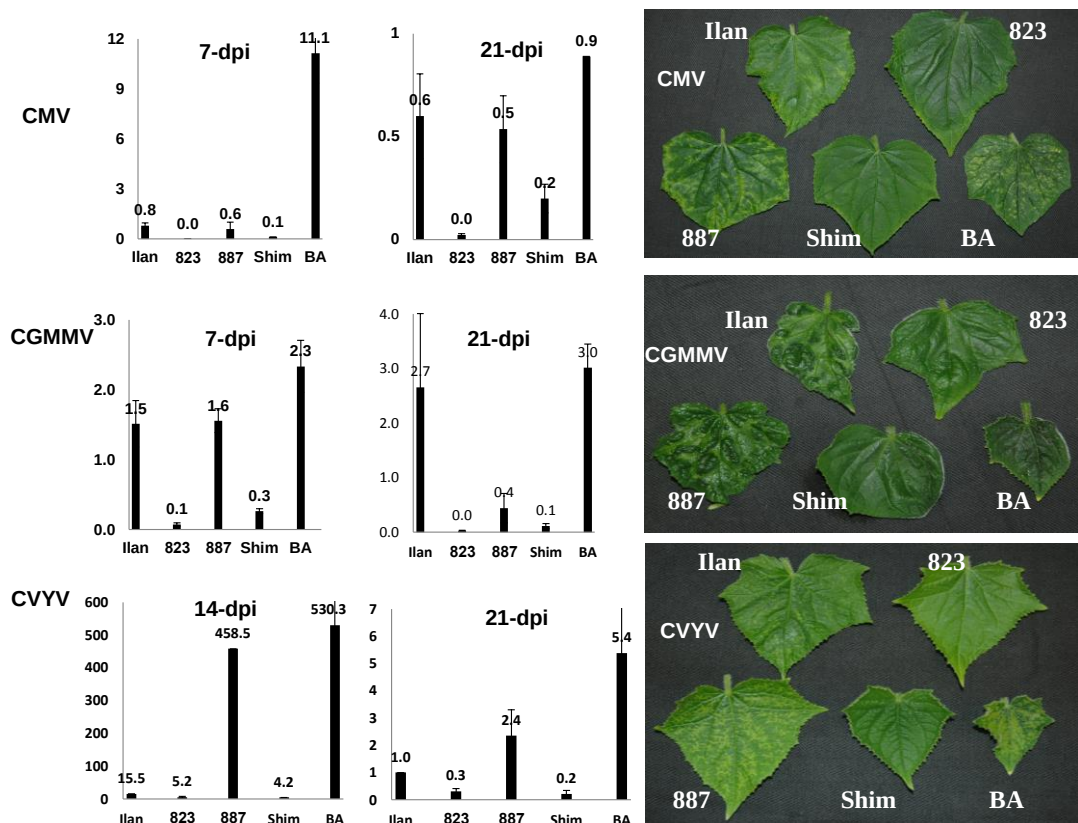


איור 3. השוואת הרצפים של RDR1a,b,c1,c2 במלפפון ו-RDR1a ברמה של חומצות אמיניות. המלבנים מקיפים ח. אמיניות זהות ודומות. האזור הקטליטי והאזור קושר RNA מסומן.

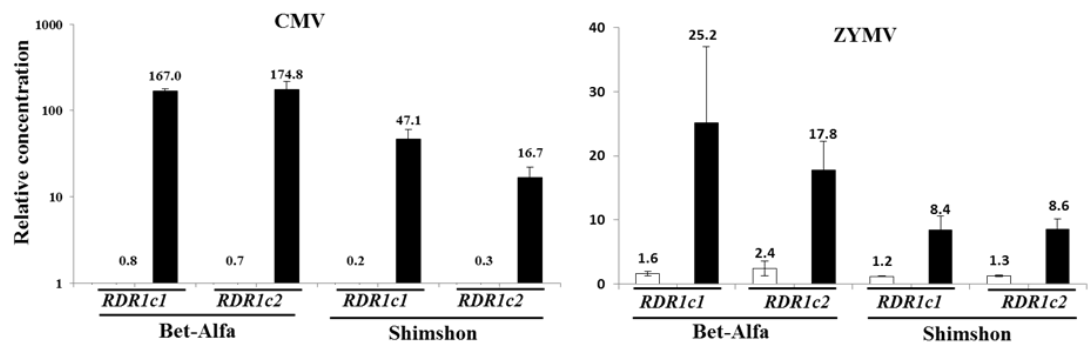
הגנים *CsRDR1c1* ו-*CsRDR1c2* הם למעשה משוכפלים בגנום והם בעלי דמיון מאד גבוה של 98% ברמת חומצות אמיניות (איור 3). הגנים *RDR1a,b,c* במלפפון הראו דמיון של 55-66% ביניהם ברמת חומצות אמיניות כולל המוטיבים של קישור ל-RNA והאזור הקטליטי (איור 3).

אפיון עמידות לוירוסים בגנוטיפים השונים

לצורך בחינת מעורבותם של *CsRDR1s* בעמידות לוורוסים נבחרו שלושה גנוטיפים ושני קווים טרנסגניים. הגנוטיפ 'בית אלפא', 'אילן' והקו הטרנסגני 887 שהם רגישים לוורוסים והגנוטיפ 'שמשון' והקו הטרנסגני 823 שהם עמידים לוורוסים. העמידות של הגנוטיפים והקווים הטרנסגניים השונים מצוינת באיור 4. בהדבקה בשלושה וירוסים שונים CMV, CGMMV ו-CVYV הופיעו תסמינים חריפים בקווים בית-אלפא, אילן והקו 823 בעוד שבקו שמשון והקו הטרנסגני 887 התסמינים הם מוחלשים ביחד עם רמת וירוס יחסית נמוכה (איור 4).



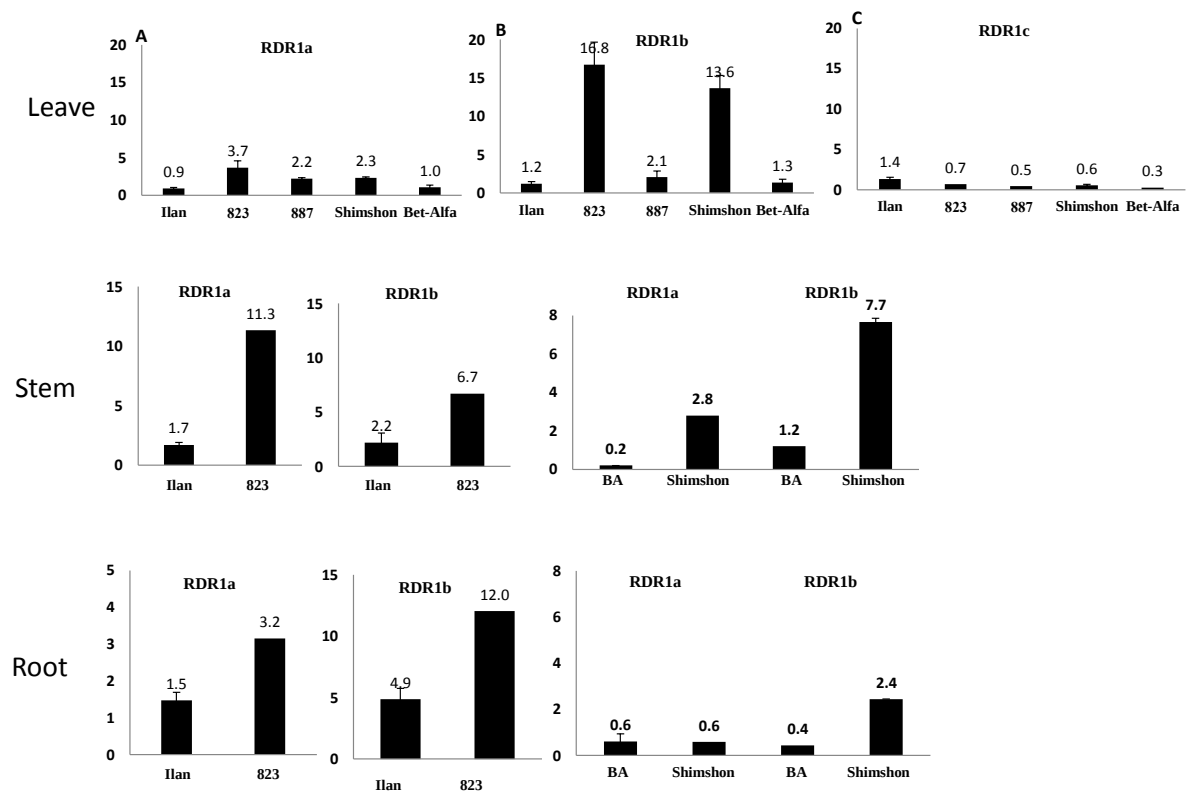
איור 4. רגישות ועמידות של שלושה גנוטיפים אילן, בית-אלפא ושמשון ושני קווים טרנסגניים 823 ו-887 להדבקה בשלושה וירוסים שונים וירוס המוזאיקה של המלפפון CMV, וירוס הנימור הירוק של המלפפון CGMMV ו-וירוס הצהבת העורקים של המלפפון CVYV. העמודות מציגות את רמת הווירוס באנליזה של Real-time RT-PCR. התמונות מציגות את הנגיעות ברמת התסמינים כשלושה שבועות לאחר הדבקה.



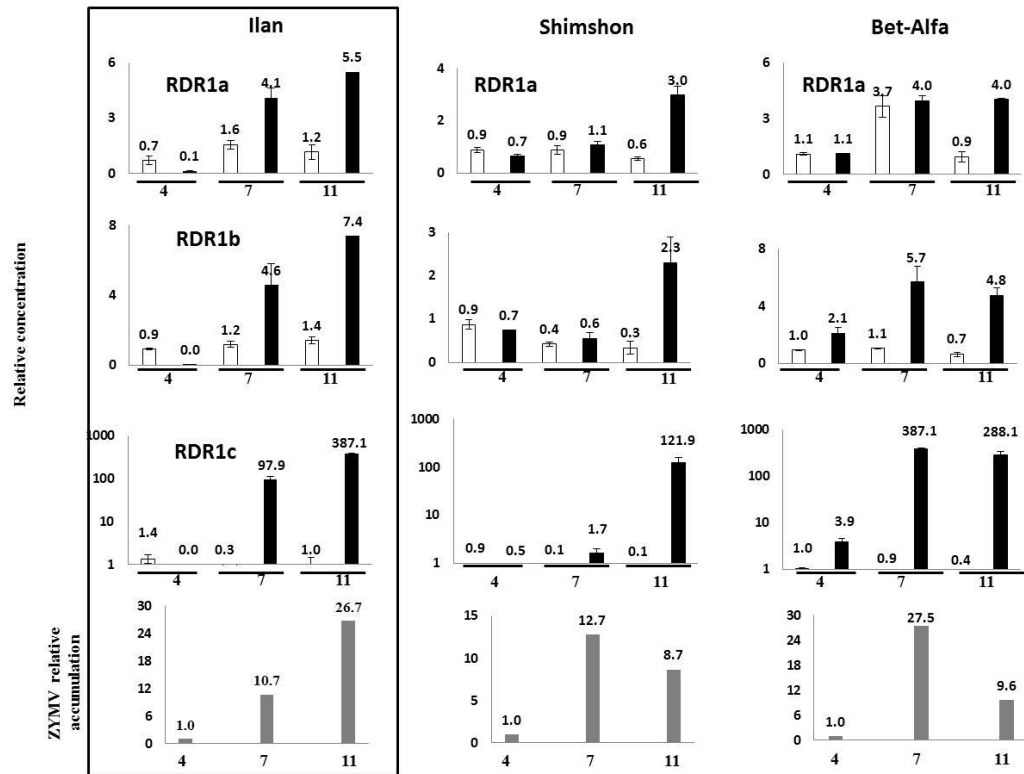
איור 5: ביטוי הגניים *CsRDR1c1* ו-*CsRDR1c2* עולה בהדבקה בוירוסים CMV ו- ZYMV של מלפפון בית-אלפא ושמשון. התוצאות הם תוצאה של אנליזה כמותית של Q-RT-PCR.

ביטוי דיפרנציאל של הגנים *CsRDR1s*

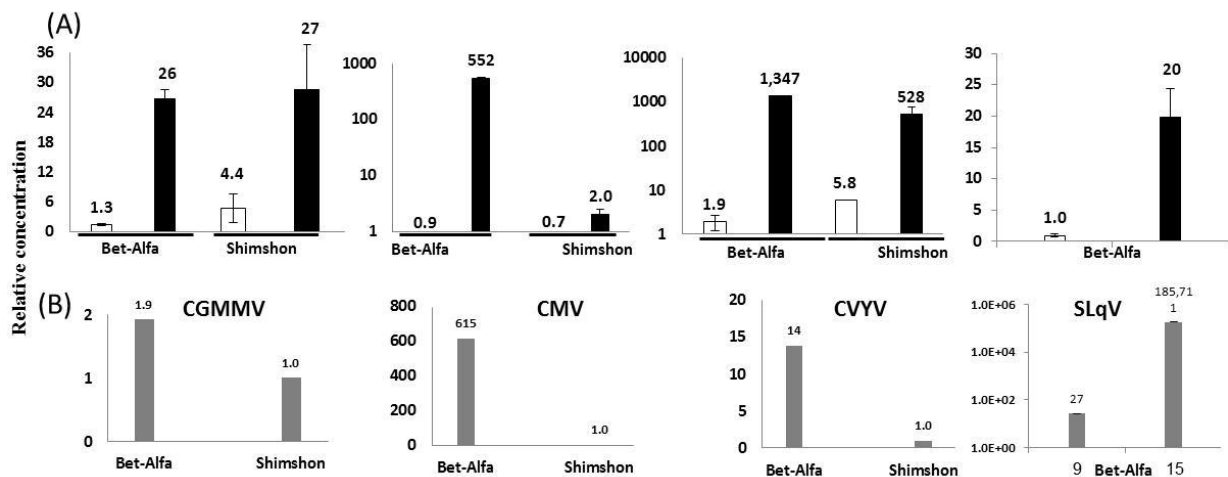
הגנים *CsRDR1c1* ו-*CsRDR1c2* אינם מתבטאים בצמח בריא, או שהביטוי הוא נמוך מתחת לרמת סף הבדיקה (איור 2). לעומת זאת בהדבקה בוירוסים כמו CMV ו- ZYMV רמתם עולה באופן דרמטי בגנוטיפים השונים בית-אלפא ושמשון (איור 5). אנו מניחים שבקרת גנים אלו דומה, היות שיש להם רצף זהה של פרומוטר (3000 בסיסים במעלה הגן). במלפפון נמצא שהגנים *CsRDR1a,b* מתבטאים בכל חלקי הצמחי כאשר רמת ביטוי גבוהה של *CsRDR1b* אופיינה בגנוטיפ העמיד שמשון ובצמח הטרנסגני העמיד 823. רמת הביטוי הגבוהה של *CsRDR1b* אופיינה בשורשים גבעולים ועלים של הגנוטיפים העמידים (איור 6A). בשורשים וגבעול ניתן לראות רמה גבוהה יחסית של *CsRDR1a* (איור 6A). התבטאות הגן *CsRDR1c1* הייתה נמוכה מאד ללא הדבקה בוירוס (איור 6, 7). בהדבקה בוירוס ZYMV רואים עליה בביטוי בכל שלושת הגנים *CsRDR1a,b,c* כאשר "קפיצה דרמטית" ניתן לראות בגן *CsRDR1c* (איור 6, 7). הביטוי המושרה של הגן *CsRDR1c1* במלפפון אופיין בהדבקה בוירוסים של RNA מקבוצות שונות (CVYV, CGMMV, CMV) וגם בוירוס של SLCV DNA מקבוצת ה-geminivirus (איור 8).



איור 6A. רמת ההתבטאות היחסית של הגנים *CsRDR1a,b,c* בעלה, גבעול ושורש של מלפפון. האנליזה בוצעה ע"י Q-RT-PCR עם פרימרים מתאימים בהשוואה לגן האנדוגני *Fbox*.



איור 6. הביטוי היחסי של הגנים *RDR1a,b,c* בעלים סיסטמיים של קווים בית אלפא, שמשון ואילן מודבקים ב- *ZYMV* (מלבנים השחורים) 4,7,11 ימים לאחר הדבקה, לעומת צמחים שאינם מודבקים (מלבנים לבנים). העמודות בחלק התחתון מציגות את רמת הווירוס *ZYMV* שאופיינה בגנוטיפים השונים. האנליזה הכמותית נעשתה ב-Q-RT-PCR.

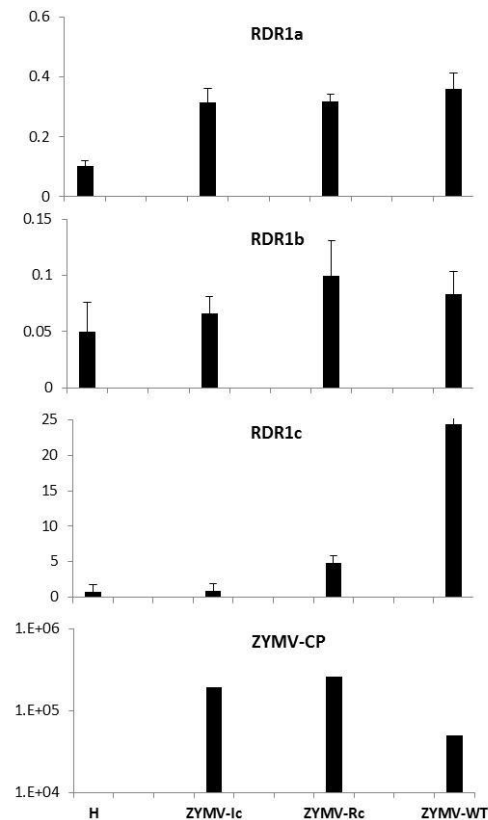


איור 7. הביטוי היחסי שלהגן *RDR1c* בעלים סיסטמיים של הגנוטיפים בית אלפא ושמסון. הצמחים הודבקו בשלושה וירוסים של RNA (*CVYV*, *CGMMV*, *CMV*) ובוירוס *SLCV-DNA* (מלבנים השחורים) 14 ימים לאחר הדבקה לעומת צמחים שאינם מודבקים (מלבנים לבנים). העמודות בחלק התחתון מציגות את רמת הווירוסים שאופיינה בגנוטיפים השונים. האנליזה הכמותית נעשתה ב-Q-RT-PCR.

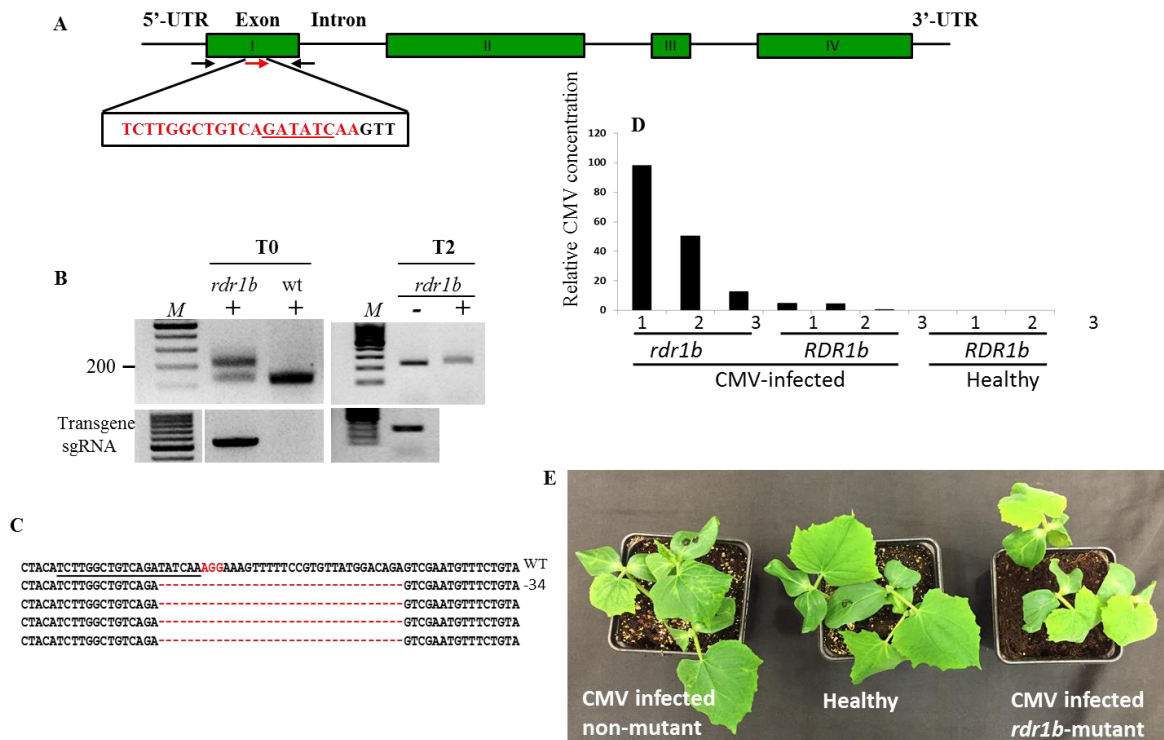
תפקיד הגניים *CsRDR1c1/2* ו-*CsRDR1cb* במערכת ההגנה הצמחית:

בכדי לבחון את תפקיד הגנים *CsRDR1c1/2* ו-*CsRDR1cb* נקטנו בדרך של פגיעה בביטוי גנים אלו. השתמשנו בווקטור ZYMV כמערכת של השתקה של גנים (VIGS) (Shoresh et al. 2006). החדרנו לווקטור הוויראלי מקטע של הגן *CsRDR1c1/2* והדבקנו צמחי דלועים שונים. הווירוסים הרקומביננטים אלים $ZYMV^{Rc}$ והמוחלש $ZYMV^{lc}$ נושאי מקטע של *CsRDR1c1/2* היו אינפקטיביים ולא היו נבדלים מווירוס הבר *ZYMV-wt*. במלפונים מודבקים בווירוסים הרקומביננטים נמדדה ירידה ברמת הביטוי של הגנים *CsRDR1c1/2* ולא של הגנים האחרים *CsRDR1a* ו-*CaRDR1b* (איור 8). במקביל נמצא שרמת הווירוסים הרקומביננטים $ZYMV^{Rc}$ ו- $ZYMV^{lc}$ הייתה גבוהה מהרמה של וירוס הבר. תוצאה זו מחזקת את המידע שהגן *RDR1c* בארבידופסיס ובעבודה זו *CsRDR1c/2* מעורבים בהגנה על הצמח בהגברת מערכת ההשתקה של הצמח (Garcia-Ruiz et al. 2010).

איור 8. ביטוי *RDR1a,b,c* בצמחי מלפון מודבקים בווירוסים הרקומביננטים $ZYMV^{Rc}$ ו- $ZYMV^{lc}$ נושאי מקטע של *RDR1c* ובוירוס הבר *ZYMV-wt*. רמת הווירוסים מצויינת בתחתית האיור. רמת הביטוי של הגנים *RDR1a,b,c* ורמת הווירוס נמדדה באנליזה של Q-RT-PCR



בכדי לבחון את פעילות הגן *CsRDR1b* יצרנו מוטנט knockout של הגן *rdr1b*. לאחרונה פיתחנו את המערכת של מוטגנזה באמצעות CRISPR/Cas9 במלפון (Chandrasekaran et al. 2016) שאפשרה את יצירת מוטנטים הומוזיגוטיים לגן *CsRDR1b*. בניסויים ראשוניים הראנו שצמח מוטנט לגן *csrdr1b* רגיש משמעותית לוירוס CMV בהשוואה לצמחי ביקורת (איור 9).



איור 9. מוטנט של *csrdr1b* מראה רגישות גבוהה להדבקה בווירוס CMV. **A.** ציור סכמתי של מבנה הגן *CsRDR1b* ורצף אתר המטרה המיועד (מסומן באדום). **B.** זיהוי של המוטציה באמצעות חיתוך באנזים *EcoRI*. **C.** מיפוי מוטציית החסר (-34 nt) בצאצאים לעומת הביקורת *wt*. **D.** הרמה המצטברת של הווירוס CMV בשלושה צמחים המוטנטים לעומת צמחים שאינם מוטנטים. **E.** תסמיני CMV על צמחים מוטנטים (*rdr1b*) לעומת ביקורת של צמחים שאינם מוטנטים (*RDR1b*).

אפיון הגניים RDR1a,b,c באבטיח ובדלועי בר.

שובטו שלושת הגנים של *CIRDR1a,b,c* מאבטיח (*Citrullus lanatus*). ברמת הגנום מופו שלושה גנים אפשריים של *CIRDR1* באבטיח בדומה למערך הגנים במלפפון. שובטו רק קטעים מהגנים שהראו הומולוגיה גבוהה לגנים המתאימים במלפפון (תוצאות שאינן מוצגות). בחנו את רמת הביטוי של הגנים *CIRDR1a,b,c* בגנוטיפים שונים, רגישים עמידים ובמין הבר פקועה *Citrullus colocynthis* (איור 10). הזנים שנבחרו הם הזן הרגיש 'קרימסון' ושלושה קווי טיפוח עמידים ל-ZYMV 59, 69, PI-54 (Ling et al. 2009).

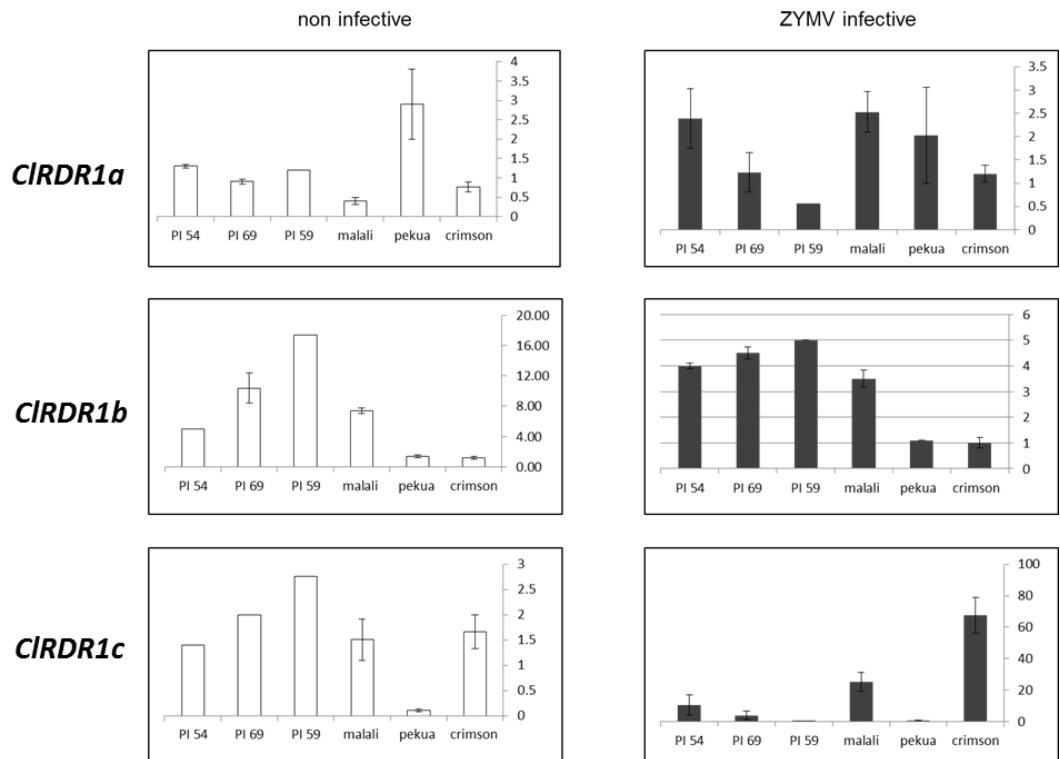
סכום התוצאות שהתקבלו באבטיח:

א. *CIRDR1c* מתבטא כתגובה להדבקה ויראלית בדומה למלפפון. *CIRDR1c* אופיין בזנים הרגישים קרימסון ומללי, בקווי 59, PI-69, רמתו נשארה נמוכה. ראוי לציין, שבמין הבר *Citrullus colocynthis* שבו אופיינה עמידות חלקית להדבקה ב-ZYMV (עיכוב של 10 ימים לעומת קרימסון) לא אופיינה עליה בביטוי של *CcRDR1c*.

ב. *CIRDR1b* מתבטא ברמה גבוהה בקווים העמידים 59, PI-69 לפני ואחרי הדבקה בוורוס בדומה לקווי מלפפון עמידים.

ג. *CIRDR1a* מתבטא ברמה יחסית גבוהה במין הבר פקועה, אך רמתו אינה מושפעת משמעותית בהדבקה בוורוס בדומה לקווי מלפפון שונים.

ראוי לציין שהזן מללי הראה תסמיני כ-7 ימים לאחר הזן קרימסון כאשר תסמיני המחלה היו פחות אלימים בהשוואה לזן קרימסון.



איור 10 . אפיון רמת הביטוי היחסית של הגנים *CIRDR1a*, *CIRDR1b* ו-*CIRDR1c* בקווי אבטיח שונים. קרימסון, מללי זנים איזוגניים מסחריים, פקועה מין הבר *Citrullus colocynthis*, וקווי טיפוח 59, 69, PI-54. רמת הביטוי היחסי נבחנה ב-Real-Time-RT-PCR כאשר הגן cyclophilin שימש כגן אנדוגני לייחוס.

בחינת רמת הביטוי של *RDR1a,b,c* בדלועי הבר.

אפיין הגנים של *RDR1a,b,c* נעשה בארבעה מיני בר של דלועיים: ירוקת החמור מצויה *Ecballium elaterium*, מלון משולש *Cucumis callosus*, אבטיח פקועה (*Citrullus colocynthis* (L.) ומלון מר *Momordica charantia* (טבלה 1). בירוקת החמור ובאבטיח פקועה, אופיינה נוכחותם של שלושת הגנים *RDR1a,b,c* ב-PCR וכמו כן הביטוי שלהם ב-RT-PCR (טבלה 1). במלון משולש שמקורו מהמזרח ומיצג מלון בר אופיין הביטוי של *RDR1a* כאשר הגנים *RDR1b,c* הם פגומים ואינם מתבטאים בדומה לתוצאות שאופיינו במלון התרבותי. במלון המר הצלחנו בשלב זה לאפיין רק את הביטוי של *McRDR1a*.

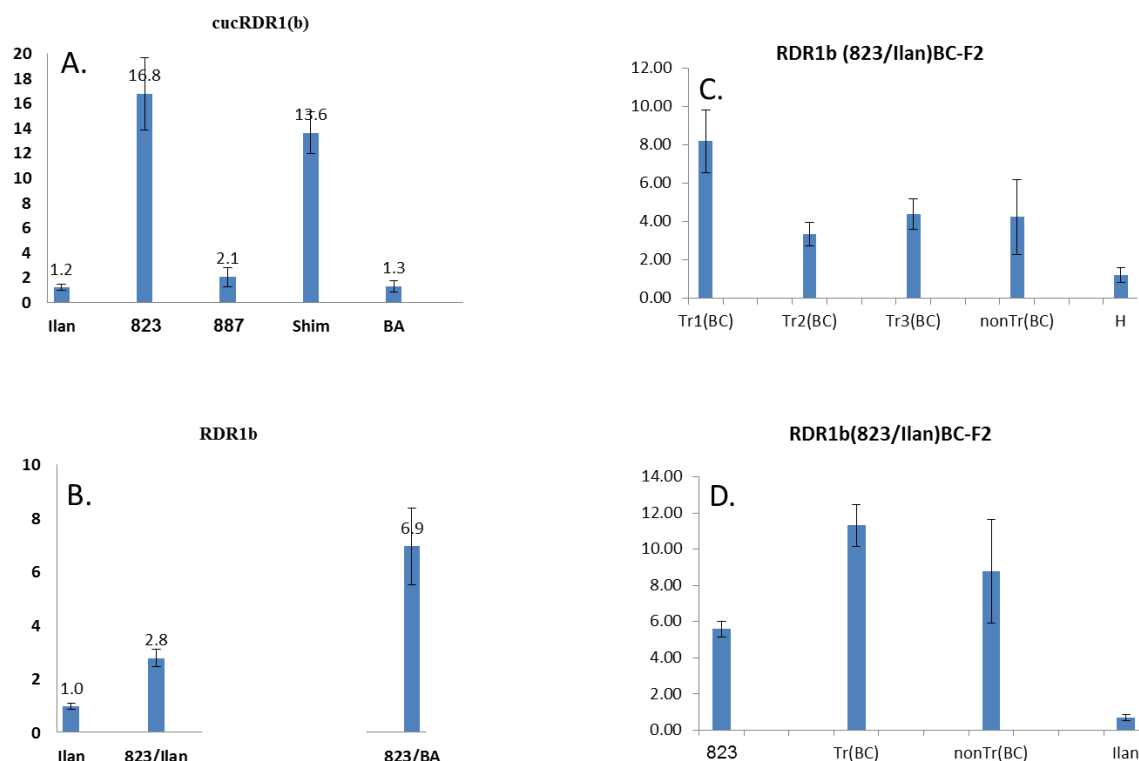
טבלה 1. המצאות הגנים *RDR1a,b,c* בדלועי בר.

RDR1c		RDR1b		RDR1a		מין צמח הבר
Expression level	Gene	Expression level	Gene	Expression level	Gene	
++	+	++	+	++	+	ירוקת החמור <i>Squirting cucumber (Ecballium elaterium)</i>
-	-	-	-	+++	+	מלון משולש <i>Cucumis callosus</i>
+	+	+++	+	++	+	אבטיח פקועה (<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrad
?	?	?	?	+	+	מלון מר <i>Bitter melon (Momordica charantia)</i>

בחינת הקשר בין העמידות לוורוסים של קוו טרנסגני 823 עם הרמה הגבוהה של *CsRDR1*

במחקר קודם הראנו את הקשר בין ביטוי גבוהה של transgene-siRNA בקוו הטרנסגני 823 עם ביטוי גבוה של *CsRDR1* (Leibman et al. 2011). במחקר הנוכחי הראנו שהביטוי הגבוה הוא ספציפי ל *CsRDR1b* ולא ל-*CsRDR1a* ו-*CsRDR1c1/2*. בכדי לבחון את הקשר בין הרמה הגבוהה של transgene-siRNA עם זו של *CsRDR1b*, בוצעו הכלאות חוזרת עם קוו המקור 'llan' לקבלת קווים הטרנזיגוטיים לטרנסגן. הקו אילן שהוא הגנוטיפ שעליו נעשתה הטרנספורמציה, הינו רגיש לוירוס ומבטא רמה נמוכה יחסית של *RDR1b* (איור 12A). רמת הביטוי של *CsRDR1b* בקווי המכלוא ההטרנזיגוטיים הייתה גבוהה באופן מובהק יותר מקווים שאינם טרנסגניים, ונמוכה מזו של הקו 823 ההומוזיגוט (איור 12B). ראוי ציין, שבצאצאים הטרנזיגוטיים אלו היו עמידים סיסטמית להדבקה ב- ZYMV. הצאצאים ההטרנזיגוטיים הוכלאו עם עצמם לקבלת אוכלוסייה מתפצלת F2 של צמחים שאינם טרנסגניים וצמחים הטרנזיגוטיים והומוזיגוטיים לטרנסגן. בכל הצאצאים אובחנה רמה גבוהה יותר של *CsRDR1b* מאשר בהורה אילן. המעניין שבצאצאים F2 שאינם טרנסגניים אופיינה רמה דומה של *CsRDR1b* לצמחים הטרנסגניים. קיימת אפשרות שרמה גבוהה של transgene-

siRNA גרמה לשינויים אפיגנטיים המבקרים את *CsRDR1b*, ושינויים ספציפיים אלו עברו בתורשה לצאצאים שאינם טרנסגניים.



איור 12. רמת הביטוי היחסית של *CsRDR1b* בקווים השונים: Ilan (מקור ליצירת צמחים טרנסגניים) רגיש לוירוסים; 823 קו טרנסגני הומוזיגוטי עמיד למספר וירוסים; 887 קו טרנסגני מחוסן רק ל-ZYMV הומוזיגוטי לטרנסגן; Shim הזן שימשון מראה עמידות למספר וירוסים; BA הזן בית-אלפא רגיש מאד לוירוסים; 823/Ilan ו Tr1(BC) הטרנזיגוט לטרנסגן; Tr2, Tr3(BC) קווי F2 טרנסגניים מתפצלים. רמת הביטוי היחסי נבחנה ב-Real-Time-RT-PCR כאשר הגן F-Box שימש כגן אנדוגני לייחוס.

האם ביטוי חולף של dsRNA גורם לביטוי יתר של הגן *CsRDR1b*?

השערת המחקר הייתה שרמת ביטוי מוגבר של *CsRDR1b* בקו טרנסגני 823 גרמה לעמידות רחבה לוירוסים. כאשר הרמה הגבוהה היא תוצאה של ביטוי רב של transgene-dsRNA שהביאה להצטברות של transgen-siRNA (43% from total) (Leibman et al. 2011). בכדי להוכיח היפותזה זו, תכננו לעקוב אחר

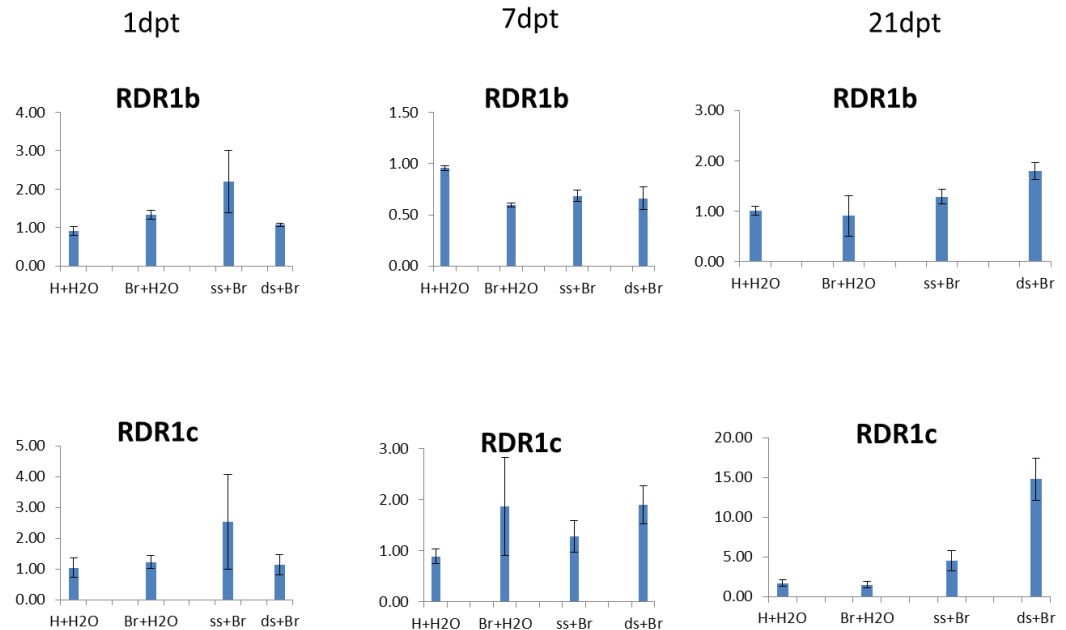
רמת הביטוי של RDR1b לאחר יישום חיצוני של dsRNA על עלי מלפפון. ניסינו שיטות שונות ליצר dsRNA ולהחדירו לצמח.

א. החדרת dsRNA באמצעות אגרו-אינפילטריציה למלפפון. השתמשנו בתבנית גנית המבטא GFP לצורך בדיקת יעילות השיטה. מצאנו שמבחינה טכנית נוח להזריק לפסיגים של מלפפונים אלא שהביטוי הוא מאד חלש בהשוואה לביטוי בטבק בנטמיאנה. הנחנו שרקמת הפסיגים אינה דומה לעלים אמתיים. ערכנו מספר רב של ניסיונות של הזרקת אגרו לעלים של מלפפון. בכל הניסויים שבצאנו לא הצלחנו להחדיר את התרבית ביעילות לרקמת העלה.

ב. ריסוס של dsRNA על פני העלה. לצורך זאת בחנו מספר שיטות לסינתזה *in vitro* של dsRNA. סינתזה *in vitro* של כל גדיל בנפרד ואיחוי הגדילים ליצירת dsRNA. לאחר האיחוי נבדק התוצר בחיתוך של DICER. התוצאות הראו שפרקציה מאד קטנה עברה איחוי ל-dsRNA.

שימוש Replicator RNAi Kit, מערכת זו הניבה כמות של 0.6 mg/ml dsRNA. שימוש במערכת של פאג'ים ליצירת כמות גדולה של dsRNA עפ"י (Aalto et al. 2007). לאחר כיוול המערכות נבחרה השיטה השנייה של Replicator ליצירת dsRNA. אפליקציה של dsRNA נעשתה עפ"י פרוטוקול מפטנט מספר Wo-2013025670 A1. במערכת זו מוסיפים ל-dsRNA את ההורמון הצמחי plant hormone-mediated penetration of dsRNA brassinoostroid (BR) ביצענו מספר ניסויים כאשר איור 13 הוא מיצג. לאחר האפליקציה בחנו את רמת הביטוי של הגנים *CsRDR1b* ו-*CsRDR1c* במועדים שונים. התוצאות מראות שאין שינוי משמעותי בביטוי *CsRDR1b* אלו בטיפולים ובמועדים שונים: dsRNA+ hormone (Br), ssRNA+ hormone (ssRNA+Br) וטיפול הביקורת של הורמון (Br+H₂O) ומים (H+H₂O). המסקנה שיש לבחון שיטות נוספות לבחינת היפותזת המחקר. המעניין הוא שדווקא *CsRDR1c* הראה עליה ברמת הביטוי בשילוב של dsRNA עם ההורמון (br) (איור 13). יתכן שהחדרת dsRNA לתא מזוהה ע"י מערכת ההשתקה ומפעילה את *RDR1c* בדומה לרפליקציה של הווירוס.

Exp1



איור 13. רמת הביטוי היחסית של *RDR1b* ו-*RDR1c* בצמחי מלפפון לאחר 24 שעות, שבוע ו-21 יום ממתן הטיפולים השונים. *dsRNA + hormone* (*ds+Br*), *ssRNA + hormone* (*ss+Br*) והביקורות הורמון (*Br*) ומים (H_2O). התוצאות הם סיכום של שלוש חזרות ביולוגיות שבכל חזרה היו שלושה צמחים. 0.6 מיגרורם נמרחו על עלה אמיתי ראשון. רמת הביטוי היחסית נבחנה ב-*Real-Time-RT-PCR* כאשר הגן *F-Box* שימש כגן אנדוגני לייחוס. הניסוי כלל מדגם של 3 צמחים בשלוש חזרות.

עבודת המחקר סוכמה במודל על פעילות הגנים *RDR1a,b,c* במלפפון כתגובה (איור 14).

נראה שבדלועים ישנה פעילות משולבת של משפחת הגנים *RDR1a,b,c* בהדבקה וללא הדבקה בוורוס שאינה קיימת במשפחות אחרות. המודל מתאר את התוצאות הבאות:

- שלושת הגנים מושרים ע"י *Salicylic acid* (SA) ברמה דומה במלפפון.
- הגן *RDR1a* אינו מושרה בהדבקה ויראלית במלפפון, מלון ואבטיח ופעילותו אינה ברורה.
- הגן *RDR1b* מתפקד כנראה כגן לעמידות לוירוסים שונים ללא תלות ברצף שלהם. במינים רבים של מלפפון אופיינה התאמה בין עמידות ל-CMV ורמת ביטוי גבוהה. Knockout של גן זה הראה רגישות יתר ל-CMV. במלונים הגן הוא פגום, יתכן שזו הסיבה לרגישות הגבוהה של מלונים לוירוסים שונים.
- הגנים *RDR1c1/2* מושרים בהדבקה של וירוסים באופן מאד דרמטי, והשתקתם מלווה בעליה של רמת הווירוס ZYMV במלפפונים. נראה שגנים אלו מושרים בנוכחות dsRNA חיצוני (ויראלי), ולכן לגנים אלו תפקיד חשוב במערכת ההשתקה.

- הביטוי הגבוהה של *CsRDR1b* אינו תלוי ב-SA והבקרה שלו אינה ידועה.

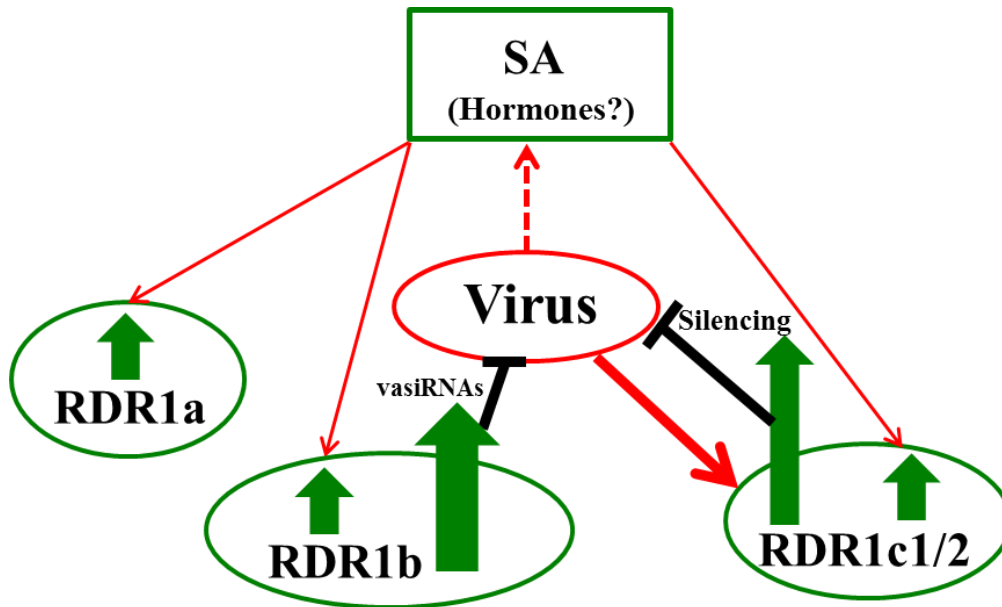


Figure 11. A model describing the effects of virus infection on expression of *CsRDR1* genes in susceptible and resistant plants. The model shows induced expression of the four *CsRDR1* genes (short, thick, green arrows) by SA (long thin red arrows), and possibly other phytohormones (JA or ABA). Virus induced *CsRDR1* expression occurs via SA induction (red dashed arrow). However, virus infection (thick red arrow) induces a much higher level of *CsRDR1c1/c2* (long, thick, green arrow) than does SA alone, leading to virus silencing. The high constitutively expressed (*CsRDR1b*) (thick green arrow) causes broad virus resistance. A high level of RDR1b expression is possibly associated with the production of viral-activated siRNAs (vasiRNAs) (Cao et al., 2014) which activates broad-spectrum antiviral activity via widespread silencing of host genes.

סכום:

א. המחקר אפיין משפחה ייחודית של גנים של *RDR1s* הקימת בדלועיים תרבותיים ובדלועי הבר. התוצאות מעידות שהחלוקה לגנים השונים של *RDR1a,b,c* התרחשה אבולוציונית לפני ההתפצלות

לסוגים השונים של הדלועים, בעוד שהדופליקציה של הגן *CsRDR1C1/2* במלפפון התרחשה לאחר ההתפצלות לסוגים השונים.

ב. משפחת הגנים מבוקרת חלקית ע"י הורמונים צמחיים ואילו הגן *RDR1c* מושרה ע"י הדבקה בוורוסים (ראה מודל איור 14).

ג. הגן *RDR1b* הוא גן לעמידות, שהבקרה שלו אינה תלויה ב-SA. יתכן שגן זה מעורב בהשתקה של גנים אנדוגניים שמעורבים בעמידות לוירוס במערכת של viral-activated-siRNA (Cao et al. 2014). הבקרה של הגן אינה ידועה יתכן שהיא מבוקרת ע"י microRNA כפי שנמצא לאחרונה באורז (Wang et al. 2016).

ד.

רשימת פרסומים:

א. עיקרי הדו"ח הוצגו בכנס בין לאומי של MPMI ב-2014 ברודוס.

The role of *Cucumis spp* RNA-Dependent RNA Polymerase genes in antiviral defense

Diana Leibman, Dalia Wolf, sabrina haviv, marina brumin, Victor Gaba, Amit Gal-On.

ב. תוצאות המחקר נשלחו לפרסום לעיתון Plant Physiology:

Differential Expression of Cucurbit RNA-dependent RNA polymerase 1 Genes During Antiviral Defense and Resistance

Diana Leibman, Sabrina Haviv, Dalia Wolf, Mira Weissberg, Ron Ophir, Victor Gaba, Peter Palukaitis, Shou-Wei Ding and Amit Gal-On*

רשימת ספרות:

Aalto AP, Sarin LP, Dijk AA van, et al (2007) Large-scale production of dsRNA and siRNA pools for RNA interference utilizing bacteriophage $\phi 6$ RNA-dependent RNA polymerase. RNA 13:422–429.

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. Nature 431:356–363.

Cao M, Du P, Wang X, et al (2014) Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci 111: 14613–14618

Carr JP, Lewsey MG, Palukaitis P (2010) Chapter 3 - Signaling in Induced Resistance. In: John P. Carr and Gad Loebenstein (ed) Advances in Virus Research. Academic Press, pp 57–121

Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, et al (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Mol Plant Pathol n/a–n/a. doi: 10.1111/mpp.12375

- Ding S-W, Voinnet O (2007) Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* 130:413–426.
- Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, et al (2010) Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during Turnip Mosaic Virus Infection[W][OA]. *Plant Cell* 22:481–496.
- Hunter LJR, Brockington SF, Murphy AM, et al (2016) RNA-dependent RNA polymerase 1 in potato (*Solanum tuberosum*) and its relationship to other plant RNA-dependent RNA polymerases. *Sci Rep* 6:23082. doi: 10.1038/srep23082
- Leibman D, Wolf D, Saharan V, et al (2011) A High Level of Transgenic Viral Small RNA Is Associated with Broad Potyvirus Resistance in Cucurbits. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1220–1238.
- Ling K-S, Harris KR, Meyer JDF, et al (2009) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon eIF4E gene are closely associated with resistance to Zucchini yellow mosaic virus. *Theor Appl Genet* 120:191–200.
- Llave C (2010) Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci* 15:701–707. doi: 10.1016/j.tplants.2010.09.001
- Madsen CT, Stephens J, Hornyik C, et al (2009) Identification and characterization of barley RNA-directed RNA polymerases. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1789:375–385.
- Pandey SP, Baldwin IT (2007) RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *Plant J* 50:40–53.
- Shoresh M, Gal-On A, Leibman D, Chet I (2006) Characterization of a Mitogen-Activated Protein Kinase Gene from Cucumber Required for Trichoderma-Conferred Plant Resistance. *Plant Physiol* 142:1169–1179.
- Wang H, Jiao X, Kong X, et al (2016) A signaling cascade from miR444 to RDR1 in rice antiviral RNA silencing pathway. *Plant Physiol* pp.01283.2015. doi: 10.1104/pp.15.01283
- Wang M-B, Masuta C, Smith NA, Shimura H (2012) RNA silencing and plant viral diseases. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* 25:1275–1285.
- Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6516–6521.
- Yang S-J, Carter SA, Cole AB, et al (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6297–6302.