

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר לקרן המדען הראשי**

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
873 - 007411 -	עמידות מלון לפטריית הפוזריום ולוירוס ה-PRSV: משיבוט הלוקוס לפענוח הבסיס המולקולרי לעמידות

ג. כללי	
מוסד מחקר של החוקר הראשי	
אוניברסיטת בר אילן	
סוג הדו"ח	דו"ח תאריכים
מסכם	תקופת המחקר
	עבודה מוגש הדו"ח
	התחלה סיום
שנה / חודש	שנה / חודש
2011 / 6	2014 / 5
שנה / חודש	שנה / חודש
2014 / 6	

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	חוקר ראשי
רפאל	פרל-טרבס	
חוקרים משניים		
1	קציר וולף	נורית דליה
2		
3		
4		
5		
6		
7		

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
קרן מדען ראשי לביוטכנולוגיה	150,000	

**ה. תקציר**

מחקרנו עסק בלוקוס המבקר עמידות לשתי מחלות חשובות במלון: פוזריום מגזע 0 ו-2, והוירוס PRSV. שיבוט גנים לעמידות ולימוד מנגנון פעולתם הוא משימה ביוטכנולוגית חשובה. זיהוי גן כזה מאפשר למטפחים לפתח סמנים מתוך הלוקוס עצמו כדי להעבירו בטיפוח בצורה מדויקת. הכרת הלוקוס והפולימורפיזם שבו חשובה כדי להבין את הבסיס לזיהוי הפתוגנים על ידי הצמח, להפעלת תגובות ההגנה אפקטיביות כנגדם. מטרת המחקר היו: זיהוי של הגנים עצמם, פענוח רצפי הגנים הקנדידאטים בסדרת גנוטיפים עמידים ורגישים, חקר הפולימורפיזם הייחודי של הלוקוס, אפיון פונקציונאלי של הגנים ורצפי הבקרה שלהם בצמחים טרנסגנים, ומעקב אחר התגובה הפיסיולוגית של הצמח לפטריה. לפני תחילת המחקר, האתר מופה על ידנו בעזרת סמני דנ"א ברזולוציה גבוהה, ובדדנו מספריות גנומיות קלונים מסוג BAC המכילים את האתר. בשנה הראשונה פענחנו את רצפי הקלונים, והגדלנו במקביל את הרזולוציה של המיפוי, על מנת להקטין את מספר הגנים החשודים. בשנה השנייה השלמנו את המיפוי הגנטי והפיסיקלי, זיהינו את שני הגנים המקדדים את שתי תכונות העמידות, ופירסמנו את תוצאות המיפוי ואת האנליזה המולקולארית של רצף הגן Prv. בהמשך (שנים 2-3) השלמנו את האנליזה גם עבור הגן Fom-1. מטרה שנייה היתה, להשוות את הרצפים האלליים של הגן החשוד בכמה זני מלון נוספים, ולנסות לפענח את הבסיס להבדלים בפנוטיפ העמידות לשני הפתוגנים; זאת כצעד ראשון בלימוד מנגנוני-תפקודי של גנים אלה, והבנת האבולוציה של הלוקוס. הפולימורפיזם בשני הגנים גבוה ומעיד על סלקציה מגוונת, במיוחד בגן Prv. גן זה מצטיין בצורות שחבור מרובות ובאזור NBS חריג. האנליזה של הגנים Fom-1 ו-Fom-2 (גן נוסף המבקר עמידות לגזעים 0 ו-1) במלון טרנסגני נתקלה בקשיים ולא הושלמה עדיין. לעומת זאת, לימוד הביטוי של הפרומוטורים במלונים בעלי שורשים מהונדסים הניב תיאור של דגמי ביטוי ייחודיים לצמד הגנים, במקביל למעקב ישיר אחר רמת התעתיקים האנדוגניים. לימוד האינטראקציה הפיסיולוגית בין פוזריום למלון נעשה בעזרת פטריות המבטאות סמן פלואורסנטי, שאפשר לנו לראות אכלוס בזן רגיש, ונקיון של הגבעול בזנים עמידים. כן הצבענו על האפשרות כי אתילן הוא הורמון המגביר את רגישות הצמח לפוזריום. כדי להתקדם בלימוד האינטראקציה עם וירוס הפפאיה רכשנו נסיון וכלים להדבקה בעזרת קלון אינפקטיבי של הוירוס. מטרה נוספת שהגדרנו במהלך המחקר, היתה בניית כלים לבדיקת האינטראקציות החלבוניות של תוצרי הגן לעמידות, והושגה התקדמות גם בכיוונים אלה, לקראת מחקרי המשך.

1. אישורים: הני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (חודש) (יום)
-----------	-------------	---------------------	----------------------	------------	--------------------------

**עמידות מלון לפטריית הפוזריום ולוורוס ה-PRSV: משיבוט הלוקוס לפענוח הבסיס המולקולרי לעמידות**

הוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות למחקר ביוטכנולוגי

**רפאל פרל-טרבס, הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת בר אילן**  
**נורית קציר, המחלקה לחקר ירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער**  
**דליה וולף, המחלקה לחקר ירקות, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן**

**תקציר הדו"ח**

מחקרנו עסק בלוקוס המבקר עמידות לשתי מחלות חשובות במלון: פוזריום מגזע 0-2, והוורוס PRSV. שיבוט גנים לעמידות ולימוד מנגנון פעולתם הוא משימה ביוטכנולוגית חשובה. זיהוי גן כזה מאפשר למטפחים לפתח סמנים מתוך הלוקוס עצמו כדי להעבירו בטיפוח בצורה מדויקת. הכרת הלוקוס והפולימורפיזם שבו חשובה כדי להבין את הבסיס לזיהוי הפתוגנים על ידי הצמח, להפעלת תגובות ההגנה אפקטיביות כנגדם. מטרת המחקר היו: זיהוי של הגנים עצמם, פענוח רצפי הגנים הקנדידאטים בסדרת גנוטיפים עמידים ורגישים, חקר הפולימורפיזם הייחודי של הלוקוס, אפיון פונקציונאלי של הגנים ורצפי הבקרה שלהם בצמחים טרנסגנים, ומעקב אחר התגובה הפיסיולוגית של הצמח לפטריה. לפני תחילת המחקר, האתר מופה על ידנו בעזרת סמני דנ"א ברזולוציה גבוהה, ובודדנו מספריות גנומיות קלוניות מסוג BAC המכילים את האתר. בשנה הראשונה פענחנו את רצפי הקלוניות, והגדלנו במקביל את הרזולוציה של המיפוי, על מנת להקטין את מספר הגנים החשודים. בשנה השנייה השלמנו את המיפוי הגנטי והפיסיקלי, זיהינו את שני הגנים המקדדים את שתי תכונות העמידות, ופירסמנו את תוצאות המיפוי ואת האנליזה המולקולארית של רצף הגן *Prv*. בהמשך (שנים 2-3) השלמנו את האנליזה גם עבור הגן *Fom-1*. מטרה שנייה היתה, להשוות את הרצפים האלליים של הגן החשוד בכמה זני מלון נוספים, ולנסות לפענח את הבסיס להבדלים בפנוטיפ העמידות לשני הפתוגנים; זאת כצעד ראשון בלימוד מנגנוני-תפקודי של גנים אלה, והבנת האבולוציה של הלוקוס. הפולימורפיזם בשני הגנים גבוה ומעיד על סלקציה מגוונת, במיוחד בגן *Prv*. גן זה מצטיין בצורות שחבור מרובות ובאזור NBS חריג. האנליזה התפקודית של הגנים *Fom-1* ו-*Fom-2* (גן נוסף המבקר עמידות לגזעים 0-1) במלון טרנסגני נתקלה בקשיים ולא הושלמה עדיין. לעומת זאת, לימוד הביטוי של הפרומוטורים במלוניות בעלי שורשים מהונדסים הניב תיאור של דגמי ביטוי ייחודיים לצמד הגנים, במקביל למעקב ישיר אחר רמת התעתיקים האנדוגניים. לימוד האינטראקציה הפיסיולוגית בין פוזריום למלון נעשה בעזרת פטריות המבטאות סמן פלואורסנטי, שאפשר לנו לראות אכלוס בזן רגיש, ונקיון של הגבעול בזנים עמידים. כך הצבענו על האפשרות כי אתילן הוא הורמון המגביר את רגישות הצמח לפוזריום. כדי להתקדם בלימוד האינטראקציה עם וירוס הפפאיה רכשנו נסיון וכלים להדבקה בעזרת קלון אינפקטיבי של הוורוס. מטרה נוספת שהגדרנו במהלך המחקר, היתה בניית כלים לבדיקת האינטראקציות החלבוניות של תוצרי הגן לעמידות, והושגה התקדמות גם בכיוונים אלה, לקראת מחקר המשך.

הצהרת החוקר הראשי: הממצאים בדו"ח הינם תוצאות ניסויים, ולא מהווים המלצה לחקלאים.

הכוונה היא לפרסום בעיתונות המדעית. אין לפרסם מידע מהדו"ח טרם פירסום הממצאים בעיתונות מדעית ללא אישור החוקר.

חתימת החוקר: \_\_\_\_\_ תאריך: \_\_\_\_\_

## תוכן העניינים

1	א. מבוא .....
1	ב. מטרות המחקר .....
1	ג. פירוט עיקרי הניסויים .....
1	ג1. פענוח רצפי BAC בשיטת 454 .....
2	ג2. אנוטציה של הרצף לזיהוי מסגרות קריאה ואלמנטים חוזרניים .....
3	ג3. מיפוי גנטי גבה-רזולוציה בתוך רצף ה-BAC וזיהוי גנים קנדידאטים ...
4	ג4. מאפייני הגן <i>Prv</i> , התעתיק והחלבון המקודדים על ידו .....
5	ג5. פענוח רצפים אלליים של הגן <i>Prv</i> מזני מלון נוספים והפולימורפיזם ביניהם
6	ג6. מבנה הגן <i>Fom-1</i> וצורות השחבור שלו .....
7	ג7. ניתוח פולימורפיזם בין רצפים אלליים של הגן <i>Fom-1</i> מזני מלון נוספים
7	ג8. ביטוי הגנים <i>Fom-1</i> ו- <i>Prv</i> : מעקב אחר התעתיקים .....
9	ג9. הפרומוטור של הגנים <i>Fom-1</i> ו- <i>Prv</i> : אנליזה ביואינפורמטית, ובעזרת גן דווח
11	ג10. יצירת מלוניס טרנסגניים המבוססים על הגנים <i>Fom-2</i> , <i>Fom-1</i> , <i>Prv</i>
12	ג11. השפעת הגנים <i>Fom-1</i> ו- <i>Fom-2</i> על אכלוס צמח המלון בפטריית הפוזריום
13	ג12. קשר אפשרי בין ההורמון אתילן ותגובת הצמח לפוזריום .....
14	ג13. בניית מערכת הדבקה הדירה של צמחי מלון בוירוס PRSV .....
14	ג14. לקראת זיהוי הליגנדים של חלבוני העמידות <i>Fom-2</i> , <i>Fom-1</i> , <i>Prv</i> ...
17	ד. דיון וסיכום .....
19	ה. ביבליוגרפיה .....
21	ו. פרסומים שנבעו ממחקר זה .....
	ז. נספחים: מאמרים שפורסמו
	טופס שאלות מנחות

## א. מבוא

מחקר זה עוסק באתר גנטי המבקר שתי עמידויות בצמח המלון, כנגד הפוטיווירוס PRSV, וכנגד הגזעים 0 ו-2 של פטריית הפוזריום. לפני תחילת המחקר, האתר מופה על ידנו בעזרת סמני דנ"א ברזולוציה גבוהה, ובודדנו מספריות גנומיות שני קלונים מסוג BAC המכילים בתוכם את האתר. זו היתה נקודת המוצא לשיבוט שני הגנים ואפיונם המולקולרי, כמתואר בהמשך. יצויין כי בצמח המלון – אחד מגידולי הירקות המובילים – נעשה זיהוי מולקולרי רק למספר זעום של עמידויות (ארבע), ולימוד מעמיק של אינטראקציות בין צמח זה לפתוגנים הרבים הפוגעים בו הוא יעד למחקר בסיסי עם השלכות יישומיות.

## ב. מטרת המחקר המקורית – לשלוש שנים

- א. פענוח רצפי BAC וזיהוי גנים קנדידאטים.
- ב. קריאת רצף ואנליזת פולימורפיזם של הגנים החשודים בגנוטיפים נוספים בעלי אללים לעמידות ממקורות בלתי תלויים.
- ג. זיהוי תפקודי (validation) של הגנים החשודים בעזרת מערכות טרנסגניות: אנליזת פרומוטר, ביטוי יתר והשתקה בשורשים טרנסגניים, ובצמחים טרנסגניים שלמים.
- ד. לימוד תגובת הצמחים או השורשים הטרנסגניים לוירוס ה-PRSV ולפטריית הפוזריום: דינמיקה של ההדבקה, ספציפיות לגזע, ביטוי גנים להגנה.
- ה. ייצור של אללים כימריים המשלבים עמידות לשני הפתוגנים, (האללים המוכרים מקודדים רק לאחת משתי העמידויות), כדי לייצור חלבוני עמידות משופרים. סיום המיפוי ברזולוציה גבוהה הוביל למסקנה, כי מדובר בצמד גנים סמוכים ולא בגן בודד, ולכן הכנת גנים כימריים ירדה מהפרק. במקום זה התחלנו בניסויים לאפיון תוצרי הגנים בשיטות נוספות.

## ג. פירוט עיקרי הניסויים

### ג1. פענוח רצפי BAC בשיטת 454

נסרקו שתי ספרייה גנומית של זני מלון בעלי פנוטיפים הופכיים, WMR29 הרגיש לפוזריום ועמיד ל-PRSV והזן MR1 העמיד לפטרייה ורגיש לוירוס, בעזרת סמנים גנטיים משני צדי הגן. אותרו שני קלונים המכילים את הלוקוס *Fom/Prv*: קלון מס' 39 מהזן WMR29 וקלון מס' 160 מהזן MR1. הקלונים נשלחו למרכז הגנומיקה באוניברסיטת Illinois בארה"ב, ושם פוענח הרצף בשיטת 454 של חברת Roche. הרצפים הגולמיים עברו עיבוד ראשוני בעזרת ד"ר תירצה דוניגר מהיחידה לביואינפורמטיקה בפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת בר-אילן. סיכום הקריאה מוצג בטבלה מס' 1. תחילה הוסרו רצפי הווקטור בעזרת תוכנת <http://compbio.dfc.harvard.edu/tgi/software/> (CleanSeq), והוסרו רצפים בקטריאליים "מזדמנים". לאחר הסינון, הורכבו אלפי הקריאות לקונטיגים ארוכים בעזרת תוכנת (Roche) Assembler ver. 2.5.3.

Clone	Clone 39 (genotype WMR29)	Clone 160 (genotype MR1)
Total No. of reads	25,449	26,247
Average length of reads	432 bp	505 bp
Average GC-content	37%	44%
Total No. of unique reads	25,268	26,200
Length of assembled clone	172,670 bp	74,594 bp

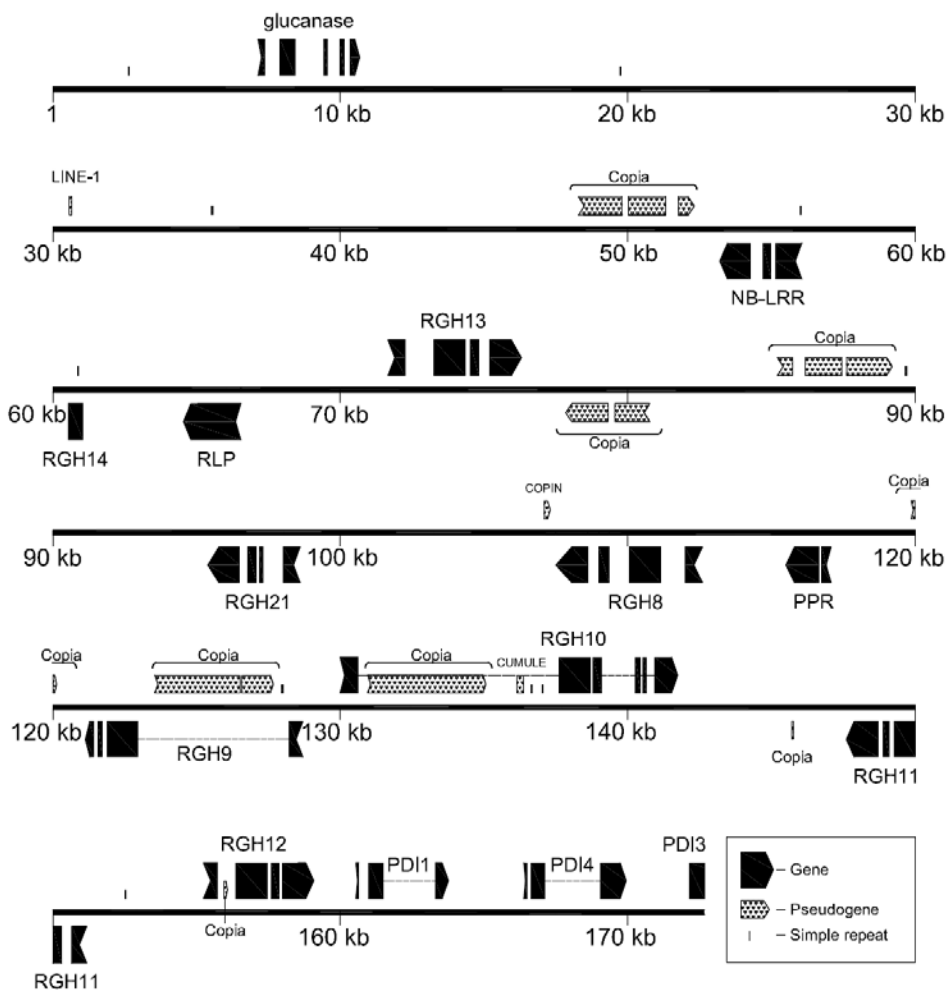
טבלה מס' 1. ריצוף קלונים גנומיים: מספר הרצפים שנתקבלו, הרכבם ואורכם הממוצע.

בתום ההרכבה נוצרו מקלון 39 ארבעה קונטיגים שלא התחברו זה לזה, ועל כן תוכנו פריימרים הסמוכים לקצוות, בוצעו ראקציות PCR שגישרו על כל הפערים הקטנים וחיברו את ארבעת הקטעים לכלל רצף אחד שאורכו כ-172 אלף בסיסים. בדרך דומה חובר הקלון 160 לרצף בן 74 אלף בסיסים (טבלה 1). במקרים בודדים נעזרנו ברצף BAC 31016 שפורסם על ידי van Leeuwen et al. (2005), הכולל את האזור הגנומי הזה מהגנוטיפ PIT92, הרגיש לשני הפתוגנים.

## 2.2. אנוטציה של הרצף לזיהוי מסגרות קריאה ואלמנטים חוזרניים

איתור הגנים על גבי רצפי ה-BAC נעשה בעזרת תוכנת BLAST. בוצעה בדיקה של הרצף המאוחד מול מאגר גנים כללי של NCBI, מול מאגר רצפי מלון מבוטאים ב-Cucurbits Genomics Database, וכנגד גנום המלפפון. כן נעשתה השוואה של שני הקלונים שלנו זה לזה, וכל אחד מהם מול הרצף שלו-עצמו, לזיהוי אזורי החפיפה ביניהם, ואיתור חזרות פנימיות.

האנוטציה המדוייקת של מסגרות הקריאה ושל הגבולות המשוערים בין האקסונים והאינטרונים בוצעה בעזרת התוכנה לצפייה/עריכה של רצפים Artemis 13.2.0 (Rutherford et al. 2000). הגבולות המשוערים בין האינטרונים לאקסונים סומנו בהתאם לרצפי קונצנוס לשחבור המתוארים בספרות (Reddy 2007), או על ידי השוואת רצפים ממאגרי cDNA לרצף הגנומי. על גבי הרצף מקודדים בסה"כ 10 גנים: 7 גנים הומולוגים לגנים ממשפחת R-genes (RGH), שני גנים לדי-סולפיד איזומראז (DPI1,4), גן לגלקוקנאז, לפנטטריקופפטיד, וחלבון דמוי רצפטור ללקטין (תמונה מס' 1).

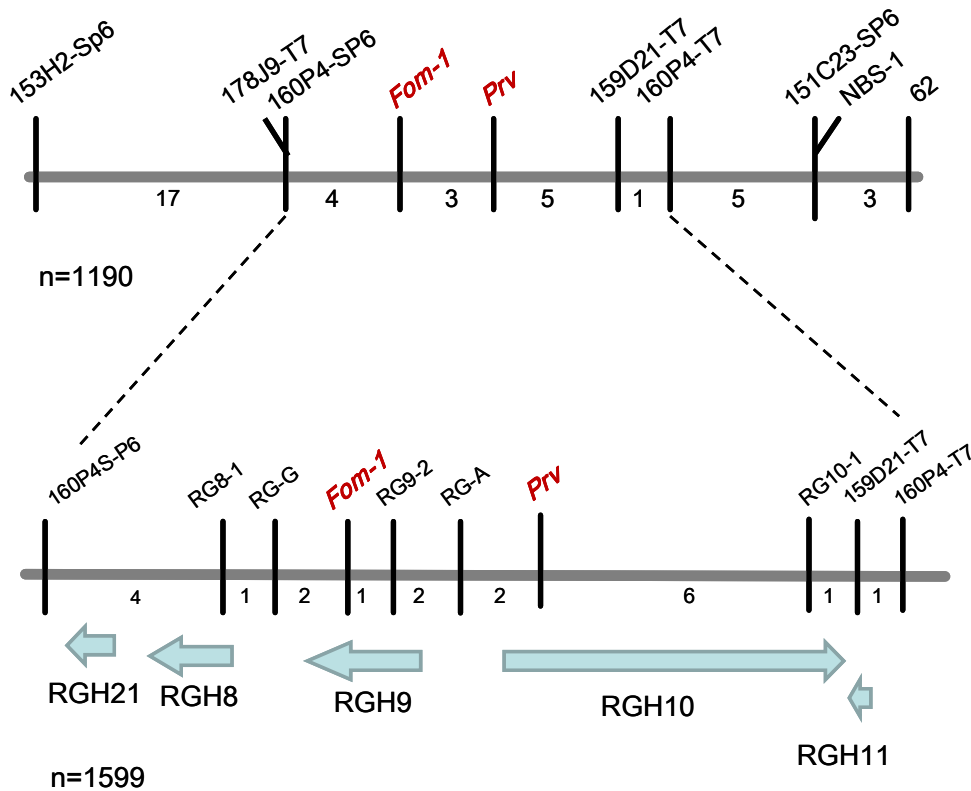


תמונה מס' 1. אנוטציה של קלון 39 בעזרת התוכנה Artemis 13.2.0. RGH הם הומולוגים לגנים לעמידות: בעבודה זו, RGH9 זוהה כגן *Fom-1* ו-RGH10 זוהה כגן *Prv*.

**3. מיפוי גנטי גבה-רזולוציה בתוך רצף ה-BAC וזיהוי גנים קנדידאטים עבור שתי העמידויות**

כדי להכריע בין הקנדידאטים הרבים שבתוך הקלון, נדרש פיתוח של סמנים קרובים יותר. על סמך האזור ש"רוצף" בנינו פריימרים לאורך הקלון, שכפלו בעזרתם מיקטעי דנ"א, וקראנו את הרצפים המשוכפלים בהורים של אוכלוסיות המיפוי שלנו (המונות כ-1600 צאצאים בסך הכל). זיהינו אתרי פולימורפיזם שאפשרו לייצר סמנים ולמפותם באוכלוסיה.

בתום השנה הראשונה שיערנו, כי הלוקוס הנחקר מקודד חלבון יחיד ביפונקציונלי, לעמידות לוירוס PRSV ולפטריה FOM2. אולם, כאשר חזרנו וניתחנו את התוצאות, והרצנו מחדש מספר רב של נתוני מיפוי קריטיים (סמנים גנטיים נסקרו פעם נוספת ב-29 צאצאים בעלי שחלוף בסביבת הגן), התברר לנו כי האתר מקודד שני גנים נפרדים, צמודים זה לזה ("אוריינטציה ראש-אל-ראש"), כל אחד לעמידות נפרדת. הרצף RGH-10 הוא לפיכך הגן *Prv*, ואילו שכנו במרחק של כ-1500 בסיסים, רצף RGH-9, הוא הגן *Fom-1*. איור 1 מסכם את המיפוי הגנטי-פיסיקלי של הלוקוס. המאמר שפרסמנו מצורף כנספח לדו"ח זה.

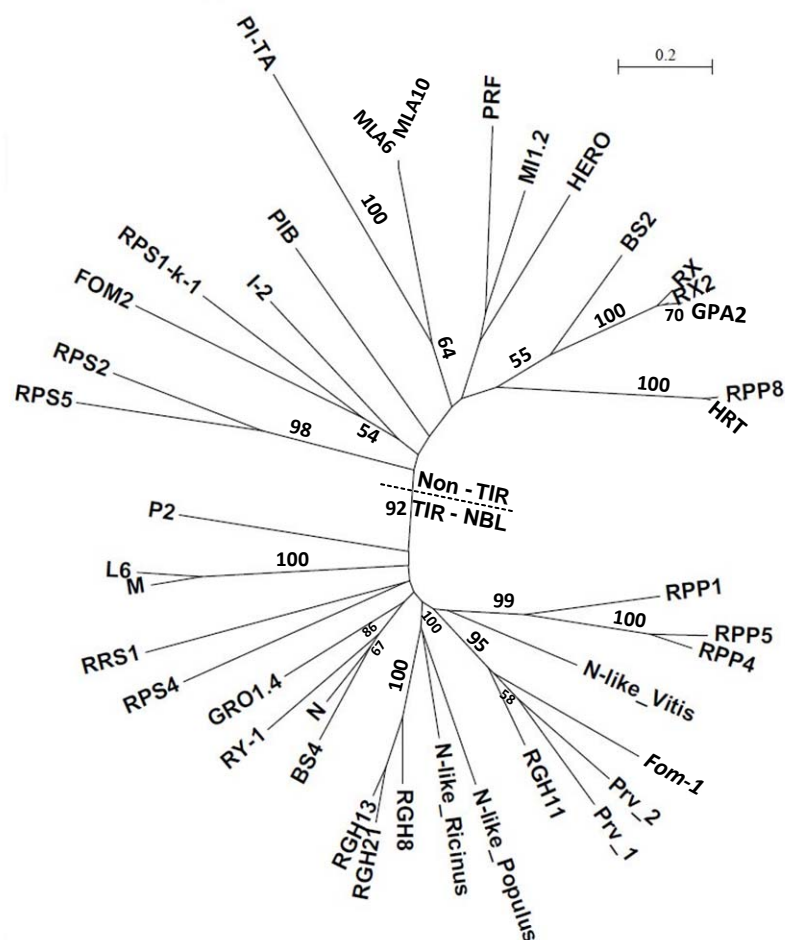


2. שיבוט-על-סמך-מיפוי של הגנים הסמוכים *Fom-1* ו-*Prv*. חלק עליון: מיפוי גנטי עדין של הלוקוס, המתבסס על אוכלוסיית BC1 המונה 1190 פרטים. מתחת: מיפוי ברזולוציה גבוהה יותר, המתבסס על סמנים שהוכנו על סמך הרצף של קלון BAC-39 שריצפנו. המרחקים מציינים מספר ארועי שחלוף שנצפו בכל האוכלוסיות שבדקנו (1599 פרטים). החיצים מתארים הומולוגים של גנים לעמידות ממשפחת NB-LRR.

הגנים *Fom-1* (RGH-9) ו-*Prv* (RGH-10) מתפרסים כל אחד על פני כ-10,000 בסיסים, ומצטיינים באינטרון ענק בן כ-5500-7000 בסיסים בין האקסון הראשון לשני. הם חלק מצבר של שמונה גנים כאלה המתפרס על פני כ-200,000 בסיסים. בין חברי הצבר מפוזרים גם גנים "רגילים" וכן אלמנטים רפטטיביים דמויי טרנספוזון. חלק מהאלמנטים החוזרניים מצוי בתוך האינטרונים ואזורי הפרומוטור, ומילא כנראה תפקיד ביצירת בני משפחה חדשים והשתנות שלהם באבולוציה.

החלבונים המקודדים על ידי הגנים *Fom-1* ו-*Prv* שייכים לתת-משפחת TIR-NB-LRR, משפחה גדולה של גנים לעמידות בצמחים. עץ פילוגנטי שבדק את קירבתם לחלבונים אחרים (איור 3) ממקם אותו בקרב תת-המשפחה TIR-

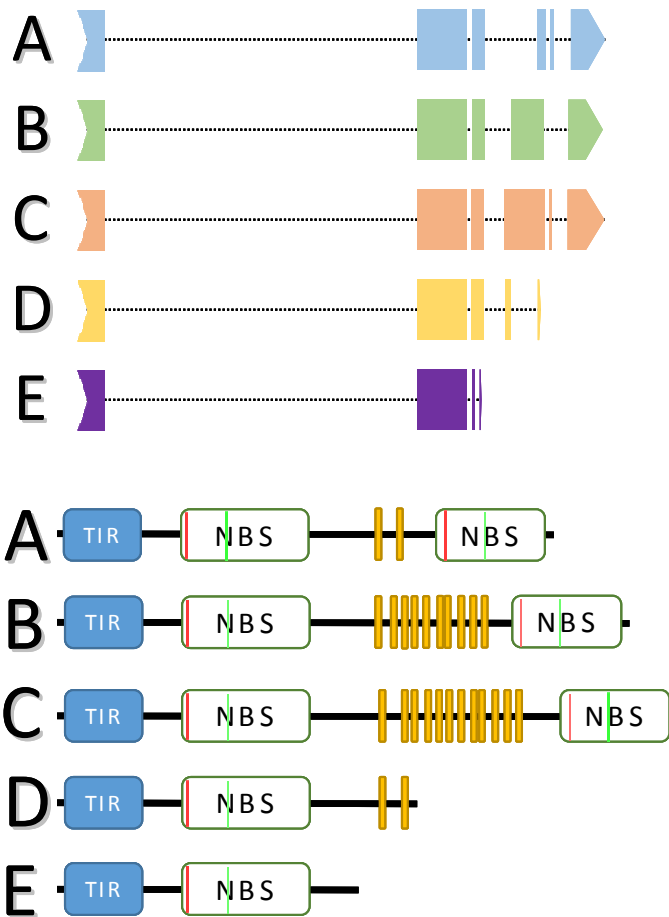
NB-LRR, והקרובים אליהם ביותר הם הרצפים מגנום המלון השכנים לו בצבר. הדבר מבליט את חשיבותם של צברי RGH באבולוציה של גנים לעמידות (McDowell and Simon 2006), ומוכיח כי בני הצבר נוצרו בזמן מאוחר כתוצאה מארועי הכפלה מלווים בדיורסיפיקציה. מעניין כי הגן *Fom-2* המקנה עמידות כנגד פוזריום מגזעים אחרים, 1 ו-0, מרוחק מאוד מבחינה אבולוציונית מהגן "שלנו" ואף שייך לתת-משפחה אחרת (CC-NB-LRR), כלומר הצמח פיתח מענה שונה ובלתי תלוי להתקפת גזעים שונים של הפטריה.



תמונה 3. עץ פילוגנטי של בני משפחת LRR-NB. העץ נבנה בעזרת תוכנת PHYLIP לאחר סידור (alignment) של רצפי בני משפחה נבחרים בעזרת תוכנת Needle. השתמשנו רק באזור NB השמור יחסית לצורך האנליזה, כי אזורים בלתי שמורים עלולים לעוות את יחסי הקרבה בין הרצפים. המספרים ליד מפרקי העץ מציינים את שיעור חזרות Bootstrap התומכות בקיום כל מפרק (מפרקים עם ערכים קטנים מ-50% אינם נחשבים מהימנים).

#### 4. מאפייני הגן *Prv*, התעתיק והחלבון המקודדים על ידו

הגן *Prv* מונה 5 או 6 אקסונים, ומצטיין באינטרון ענק בן כ-7000 בסיסים בין האקסון הראשון לשני. החלבון מתייחד בתוספת לא שכיחה של אקסון טרמינלי המקודד לאזור NB (nucleotide binding domain) נוסף. חלבונים בעלי הרכב כזה נדירים מאוד. בצענו אנליזה של מקטעי cDNA ספציפיים לגן, ששיכפלו בעצמנו או שדלינו ממאגרי EST. תחילה זיהינו שתי צורות שחבור חלופיות, הנבדלות זו מזו באורך אקסון 4 ובנוכחות אקסון 5, המקודדים את האזור של ה-LRR (leucine rich repeat). יותר מאוחר זיהינו צורות נוספות. איור 4 מציג את כל התעתיקים החלופיים שזיהינו עד היום. האם צורות אלה מתבטאות האופן דיפרנציאלי? האם הביטוי ישתנה עקב הדבקה בפתוגן? האם הן קושרות חלבונים שונים עם פונקציית היכרות שונה? ומה תפקיד ה-NBS הנוסף? שאלות אלה תיחקרנה בעתיד.



תמונה 4. למעלה: מסגרות הקריאה החלופיות העשויות להתקבל משחבור חלופי של תעתיק הגן *Prv*. התעתיקים המסומנים התקבלו על ידי ריצוף BAC גנומי והשוואתו למקטע cDNA שהוכנו במעבדתנו, או נמצאו במאגרי EST. מסגרות C,D,E לאחרונה מתגובת cDNA. הפסים המקווקווים מייצגים את האינטרונים והצורות הצבעוניות את האקסונים. ההבדל בין תוצרי השחבור A, B, C מצוי באקסונים 4-5, המקודדים (יחד עם אקסון 3) את אזור ה-LRR. תעתיקי D ו-E בעלי סיום מוקדם ולכן חסר בהם אזור ה-NBS ה-C טרמינאלי. **למטה:** חיזוי ה"דומיינים" והמוטיבים החלבוניים המקודדים על ידי התעתיקים החלופיים. האזורים המסומנים בצהוב הינם חזרות ה-LRR. בתוך דומיין ה-NBS סומנו המוטיבים החלבוניים Walker A ו-Walker B בצבעים אדום וירוק בהתאמה.

**5. פענוח רצפים אלליים של הגן *Prv* מזני מלון נוספים וניתוח הפולימורפיזם ביניהם**

על מנת להבין מה מקור ההבדל הפנוטיפי בין זנים עמידים לזנים רגישים לפטרייה ולוורוס, ואיזה מבין ההבדלים ברצף עשוי להסביר את ההבדל בעמידות, החלטנו לרצף מקטע גנומי בן כ-12 אלף בסיסים המכיל את הגן הקנדידאט בשלושה זני מלון נוספים: הזנים העמידים לפטרייה ו-Dulce ו-Védraçais, והזן הרגיש לפוזריום מגזע PI414723. זאת בנוסף לזנים MR1 ו-WMR29 שמהם בודדו הקלונים 160 ו-39. טבלה מס' 4 מסכמת את הפנוטיפים של הזנים הללו.

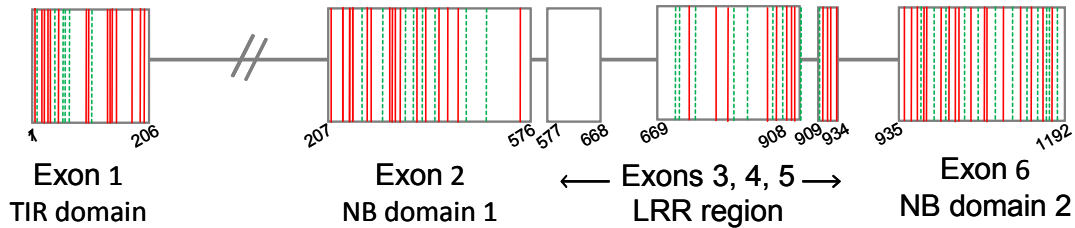
	FOM1	FOM2	PRSV
WMR29	S	S	R
MR1	R	R	S
PI414723	R	S	R
Védraçais	S	R	S
Dulce	S	R	S

טבלה מס' 2. פנוטיפ העמידות לפוזריום גזע 1 (FOM1), גזע 2 (FOM2), והוורוס PRSV של זני המלון בהם רוצף אזור גנומי המכיל את הגן *Fom-1/Prv*. S=susceptible, R=resistant.



הרצפים סודרו זה לעומת זה על מנת לאתר את כל האתרים הפולימורפיים. חמשת הרצפים נבדלים, באזור המקודד, בעשרות (98) חילופי נוקליאוטיד, שרובם אינו "שקט" אלא גורם לחילוף של חומצת אמינו. הדבר מוכיח כי הגן מצוי תחת סלקציה מגוונת (diversifying selection), תופעה אופיינית לגנים לעמידות הנתונים במרוץ חימוש נגד הפתוגנים "שלהם".

תמונה 5 מדגימה את הפיזור של האתרים הפולימורפיים לאורך האזור המקודד של הגן. הופתענו לגלות כי דווקא האזורים TIR ו-NB הם הכי פולימורפיים, יותר מאזור ה-LRR שאמור להיות מעורב בהכרת הפתוגן. הדבר דווקא מתיישב עם תמונה מורכבת יותר של התפקוד הביוכימי והאבולוציה של חלבונים אלה (Friedman and Baker 2007; Burch-Smith et al. 2007).

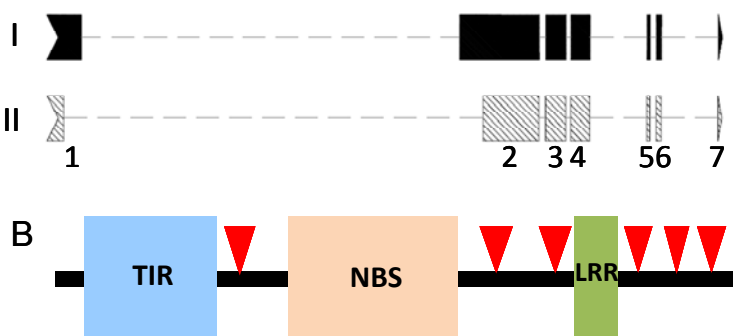


תמונה 5 : פיזור אתרים פולימורפיים באזור המקודד של הגן *Prv* בחמישה זני מלון. קווקו ירוק מייצג חילוף "שקט" וקו אדום – חילוף של חומצת אמינו.

### 6. מבנה הגן *Fom-1* וצורות השחבור שלו

גן זה מקודד אף הוא לחלבון ממשפחת R-genes, תת משפחה TIR-NB-LRR, לגן 7 אקסונים ו-6 אינטרונים (תמונה 6), שהראשון בהם בן יותר מ-5,000 בסיסים. על מנת לאתר מוטיבים חלבוניים שמורים בחלבון *Fom-1* ביצענו אנאליזה של רצף החלבון בעזרת תוכנת Pfam (<http://pfam.xfam.org>). הניתוח זיהה את שלושת האזורים המאפיינים גנים לעמידות מתת-משפחה זו. ראינו שבדומה לגנים האחרים בצבר, מיקום הדומיינים החלבוניים תואם את החלוקת לאקסונים: אזור ה-TIR ממוקם על האקסון הראשון, ה-NB על גבי האקסון השני, ואזור ה-LRR מתחלק בין חמשת האקסונים הנותרים. אזור ה-NB אחראי על פעילות תקינה של החלבון בעזרת קישור נוקליאוטיד באתר הפעיל. מולקולת ATP הנקשרת למוטיב ה-p-loop באזור זה מפעילה את החלבון, ומתפרקת ל-ADP ופוספאט. סקרנו את הרצפים שקיבלנו למוטציות המתוארות בספרות (Harris 2013), וראינו שמוטיב ה-p-loop, אשר פגיעה בו מביאה להפסקת פעילות של החלבון, היה תקין בכל האללים, וכן לא נמצאו מוטציות בשיירים המשתתפים בקישור הנוקליאוטיד. מאידך, המוטיב MHD מופיע כ-100 חומצות אחרי דומיין ה-NB בחלבוני עמידות רבים, ומוטציה המחליפה את שייר ההיסטידין פוגעת בפעילותם. להפתעתנו, בגן *Fom-1* לא נמצא כלל מוטיב כזה.

במהלך שכפול קטעי cDNA זיהינו צורה נוספת של תעתיק, קצרה יותר, המופיעה רק בזן PI414732. בכל הזנים האחרים שבדקנו, ובמקטעי EST שמצאנו במאגרי מלון, רצפי הרני"א השליח תואמים את ואריאנט I, וגם את האנוטציה של הגן ברצף הגנום שפורסם השנה (Garcia-Mas et al. 2012). בווריאנט II, אקסונים 1 ו-2 קצרים יותר והאינטרון הראשון מוגדל (תמונה 6).



תמונה 6. מבנה הגן *Fom-2* והחלבון המקודד על ידו. A. צורות השחבור של הגן. B. מודל החלבון והמוטיבים שלו. ראשי חץ אדומים מציינים את אתרי השחבור.

**7. ניתוח פולימורפיזם בין רצפים אלליים של הגן *Fom-1* מזני מלון נוספים**

על מנת להבין מה מקור ההבדל הפנוטיפי בין זנים עמידים לזנים רגישים לפטרייה, ואיזה מבין ההבדלים ברצף עשוי להסביר את ההבדל בעמידות, ריצפנו מקטע cDNA בן כ-3200 בסיסים המכיל את הגן הקנדידאט בשלושה זני מלון נוספים: הזנים העמידים לפטרייה *Dulce*-ו-*Védrañtais*, והזן הרגיש לפוזריום מגזע 2, PI414723 (טבלה 2).

בסך הכל, נמצאו 26 אתרים של חילופי חומצות בארבעת הזנים השונים (אחד מהם כולל חסר של 4 חומצות בון העמיד MR1). בדומיין TIR של החלבון (אקסון 1) נמצאו 5 חילופי חומצות ייחודיים לזן MR1. ארבעה חילופים נוספים נמצאו בדומיין ה-NBS (אקסון 2), שלושה מתוכם ייחודיים ל-MR1, ועוד שישה חילופים נמצאו באזור ה-LRR (אקסונים 3-7), כאשר שלושה מהם ייחודיים לזן *Dulce* (טבלה 3). שיעור הפולימורפיזם הכללי בגן עמד על 0.012 והיחס Ka/Ks עמד על 1.75, דבר המעיד על כך שהגן נמצא תחת סלקציה מגוונת.

exon-1 polymorphism (160 a.a, 480 nt)												
a.a pos.	12	17	19	41	54	56	100	103	107	135		
MR1	A (K)	G (T)	G (T)	T (F)	T (I)	A (K)	C (V)	A (H)	A (H)	AgC (S)		
PI414732	G (E)	T (T)	A (T)	G (L)	C (I)	G (N)	G (V)	G (R)	G (R)	TgC (C)		
WMR29	G (E)	T (T)	A (T)	G (L)	C (I)	G (N)	G (V)	G (R)	G (R)	TgG (W)		
DULCE	G (E)	T (T)	A (T)	G (L)	C (I)	G (N)	G (V)	G (R)	G (R)	TgC (C)		
exon-2 polymorphism (365 a.a, 1095 nt)												
a.a pos.	177	240	370	374	385	424						
MR1	12 nt del.	AC (T)	C (R)	A (K)	A (K)	C (T)						
PI414732	LHHQ	TT (F)	A (S)	G (E)	A (K)	A (T)						
WMR29	LHHQ	TT (F)	A (S)	G (E)	G (E)	A (T)						
DULCE	LHHQ	TT (F)	A (S)	G (E)	G (E)	A (T)						
total = 0.012												
exon-3												
a.a pos.	516	554					exon-4 polymorphism (89 a.a, 267nt)					
MR1	C (A)	C (R)					MR1	G (E)	G (S)	A (N)	C (P)	G (C)
PI414732	G (A)	T (R)					PI414732	A (E)	G (S)	A (N)	C (P)	C (S)
WMR29	C (A)	C (R)					WMR29	G (E)	C (T)	C (P)	C (P)	G (C)
DULCE	C (A)	T (R)					DULCE	G (E)	G (S)	A (N)	T (S)	G (C)
Ks=0.004												
Ka=0.007												
Ka/Ks=1.75												
exon-5		exon-6		exon-7								
a.a pos.	716	a.a pos.	737	a.a pos.	737							
MR1	T (L)	MR1	G (S)	MR1	C (S)							
PI414732	T (L)	PI414732	G (S)	PI414732	C (S)							
WMR29	T (L)	WMR29	G (S)	WMR29	C (S)							
DULCE	A (Q)	DULCE	A (N)	DULCE	T (S)							

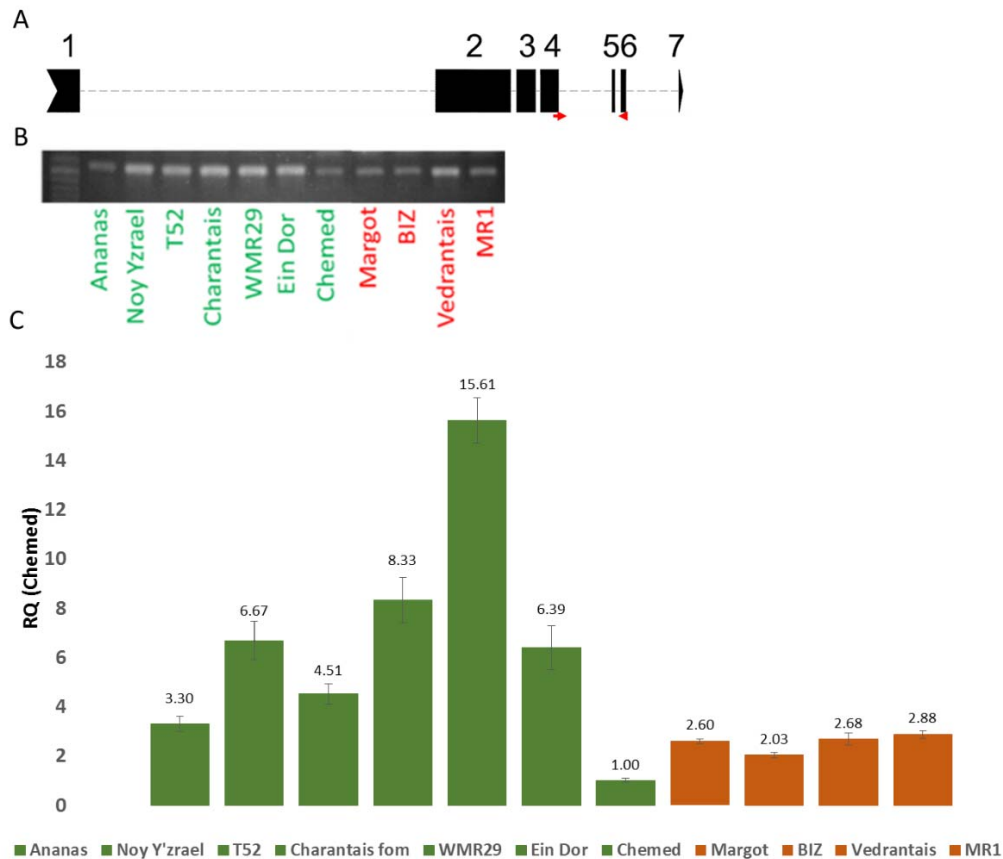
טבלה 3. האתרים הפולימורפיים באזור המקודד של הגן *Fom-1* בארבעה זני מלון, מוצגים עבור כל אקסון בנפרד. בוורוד- זנים עמידים לפוזריום המלון מגזע 2, בתכלת- זנים עמידים לפתוגן. בצהוב- SNP המחליף חומצה אמינית, בכחול- SNP שקט, בירוק- החסרה של חומצה אמינית, כתום – שלושה אללים בעמדה אחת. בעמדה 135 יש שני SNP באותו קודון.

מקורם של האללים של שני הזנים העמידים, MR1 ו-*Dulce*, הוא בלתי תלוי, ולא נמצאו חילופים המייחדים את שניהם יחד לעומת שני האללים האחרים. יתכן לפיכך, שלכל אחד יש בסיס מולקולארי שונה לעמידות, וכי החילופים הייחודיים לו עשויים לגרום לעמידות. אפשרות נוספת היא, שהעמידות נובעת מהבדלים ברמת הביטוי או מתהליכי בקרה גנטיים אחרים, כגון שחבור, או עריכה של התעתיק. במקרה של שחבור חלופי, ייתכן שהעמידות תושפע מהיחס הסטוכיומטרי בין התעתיקים השונים (Dinesh-Kumar and Baker 2000). דגם הפולימורפיזם שונה בין שני הגנים, וניכר כי הגן *Prv* מגוון בהרבה מהגן *Fom-1* (SNP 98 בגן הראשון לעומת 26 בלבד בשני). אכן, כוחות הסלקציה פועלים על כל גן לעמידות בנפרד, וניתן להבחין בין גנים מטיפוס ראשון המשתנים במהירות ויוצרים כימרות בין פרלוגים, לגנים מטיפוס שני הנשמרים לאורך זמן (Kuang et al. 2005).

**8. ביטוי הגנים *Fom-1* ו-*Prv*: מעקב אחר התעתיקים**

האם הגנים שזיהינו מתבטאים? האם ביטויים שונה בזנים עמידים לעומת רגישים?

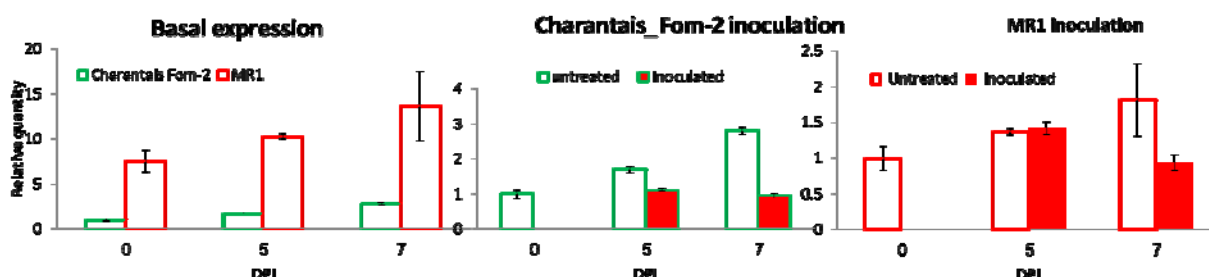
תחילה בדקנו את הביטוי הבסיסי ללא אילוח בפתוגן. אחד עשר זנים, חמישה עמידים ושישה רגישים לפוזריום מגזע 2 הונבטו (עד שלב פרישת הפסידים), ושורשיהם נדגמו להפקת RNA והכנת cDNA. הביטוי של הגן *Fom-1* נבדק תחילה ע"י שכפול PCR "רגיל" ואלקטרופורזה של התוצר, בעזרת זוג פריימרים הממוקמים על האקסון הרביעי והשישי, ומגבירים אמפליקון בגודל 150 בסיסים (תמונה 7A). בהמשך, נבדקה רמת הביטוי של הגן באחד עשר הזנים בעזרת real time PCR, ורמת הביטוי חושבה יחסית לביטוי הגן בזן MR1 (הנמוך ביותר). ראינו שהגן מתבטא ברמה גבוהה יותר דווקא באחדים מהזנים הרגישים. היו הבדלים גדולים למדי בין הזנים בביטוי הבסיסי, בטווח של פי שבעה (תמונה 7B). הביטוי חושב ביחס לביטוי הגן המקודד לרנ"א הריבוסומלי 16S.



תמונה מס' 7. ביטוי הגן *Fom-1* בשורשים של זני מלון עמידים ורגישים לפוזריום גזע 2. A- מבנה הגן *Fom-1*, הפריימרים לבדיקת הביטוי מסומנים בחיצים אדומים. מימין, תמונת האלקטרופורזה של תוצרי השכפול מראה ביטוי ברור בכל הזנים שנבדקו. B- בדיקת real-time PCR של זני מלון שונים, בגווי ירוק מסומנים זנים רגישים לפטרייה, ובגווי אדום מסומנים זנים עמידים. הביטוי מוצג היחסית לזן MR1, לאחר נרמול על פי הגן בעל הביטוי הקבוע 16S.

בניסוי המשך, בדקנו בשיטת ה-real-time PCR, האם ביטוי הגן משתנה בעקבות אילוח בפטרייה. צמחים מהזן הרגיש *Charantais-Fom-2* ומהזן העמיד MR1 אולחו בפוזריום מגזע 2, ונדגמו להפקת RNA. בניסוי זה, הצמחים נדגמו בתת הפסיד שלהם בשלוש נקודות זמן: T0-טרם אילוח, חמישה ימים, ושבעה ימים לאחר האילוח, כאשר כל דוגמה הורכבה מתערובת של שלושה צמחים. הצמחים אולחו על ידי השקיה בתרחיף נבגים בריכוז סופי של  $10^6$  נבגים למ"ל. צמחים לא מאולחים שימשו קבוצת ביקורת. מהצמחים הופק רנ"א והוכן cDNA כללי בעזרת פריימרים רנדומאליים. בדיקת הביטוי של הגן *Fom-1* נעשתה כמתואר לעיל, והנירמול היה לפי הגן לחלבון הריבוסומלי L2 (Sestili et al. 2013). הכמות היחסית מוצגת ביחס לדגימת הביקורת הלא-מאולחת של כל זן (T0). תמונה 8A מציגה את רמת הביטוי הבסיסית בשני הזנים. בשלושת מועדי הדגימה, רמת התעתיק של הגן גבוהה פי 7-10 בזן העמיד MR1 לעומת הזן הרגיש *Charentais Fom-2*. בשני

הזנים (תמונה 8B,C) האילוח לא גרם לשינוי מובהק בביטוי הגן, ודווקא בצמחים לא מאולחים מהזן הרגיש נצפתה עליה פי 2.5 עם התקדמות הניסוי. כרגע מתבצעים ניסויים נוספים לאישוש הממצאים, והתוצאה המקדמית רומזת על עליה בתעתיק בשלושה-ארבעה הימים הראשונים לאחר האילוח, וירידה אחר כך.



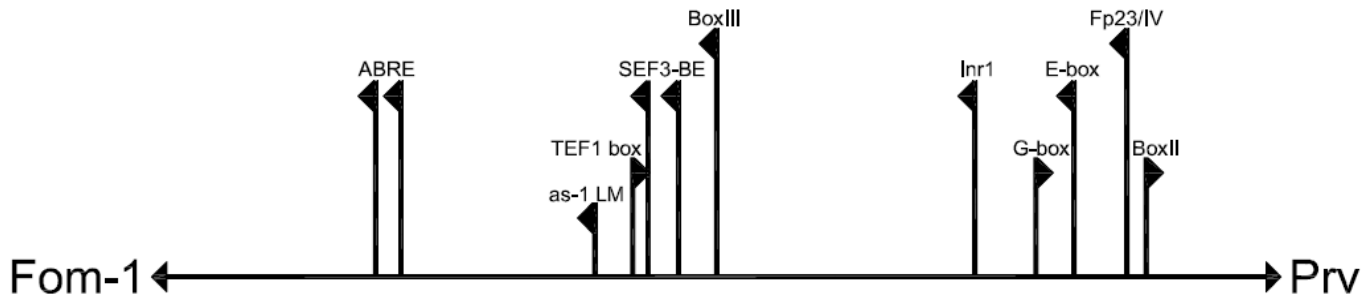
תמונה מס' 8. ביטוי הגן *Fom-1* בתת פסיגים בעקבות אילוח בפטריה. A- ביטוי בסיסי בשלושת מועדי הדיגום בזן העמיד MR1 ובזן הרגיש Charentais-Fom-2, ללא אילוח בפטריה. B- ביטוי הגן בזן העמיד MR1 חמישה ושבעה ימים לאחר אילוח בפזורים מגזע 2, יחסית לביטוי לפני האילוח. C- הביטוי בזן הרגיש Charentais Fom-2 לאחר אילוח כנ"ל. הנירמול לפי הגן L2.

### 9. הפרומוטור של הגנים *Fom-1* ו-*Prv*: אנליזה ביואינפורמטית ואנליזה פונקציונלית בעזרת גן דווח

שני הגנים *Fom-1* ו-*Prv* משועתקים בכיוון הפוך זה מזה (אוריינטציה ראש אל ראש). בין קודוני ההתחלה של השניים מפריד מקטע DNA בגודל של כ-1400 בסיסים, העשוי לשמש פרומוטר לשניהם, בשתי אוריינטציות מנוגדות. על מנת לחזות את יכולתו של המקטע לבקר שיעתוק, ביצעתי אנליזה ביואינפורמטית בעזרת תוכנה לניבוי אתרי קישור של פקטורי שיעתוק, NSITE-PL (softberry.com). אותרו 11 אתרים רגולטורים אפשריים, שמונה מהם על הגדיל הפונה אל הגן *Fom-1* ושלושה על הגדיל הפונה אל הגן *Prv* (טבלה 4, תמונה 9). עבור שישה מתוך 11 האתרים שנמצאו, ידועים בספרות פקטורי שיעתוק מוכרים העשויים להיקשר אליהם. שלושה מהאלמנטים באוריינטציה *Fom-1* קשורים לפעילות של הורמונים צמחיים: הפקטורים ABI5 ו-ABF נקשרים לאלמנט ABRE (Finkelstein and Lynch, 2000; ABA response element), האחראי להשראת שעתוק על ידי חומצה אבסיסית (ABA). אלמנט הבקרה E-box עשוי לקשור את פקטור השיעתוק RAVL1, אחראי לביטוי גנים לייצור וחישה של ברסינוסטרואידים (Je and Han, 2010). באוריינטציה כלפי ישנו אלמנט רגולטורי, BoxII, בעל דמיון לרצף הפרומוטור של rice tungro bacilliform virus (RTBV), והוא מבקר ביטוי גנים ייחודי לרקמת השיפה. בצמח האורז הראו, שהפקטור הנקשר לרצף זה הוא RINGF2 (Yin et al., 1997).

Orientation	RE	Sequence Element	Position (+)	Described in	Binding Factor
<i>Prv</i>	G-box	CACATGGCACT	299-309	Peas	GBF
	TEF 1 box	ATtGGGGTAgaaTTGTAATTTGGC	820-843	Arabidopsis	unknown
	BoxII	TCCCAAAtCA	152-161	Rice	RNFG2
<i>Fom-1</i>	SEF3-BE	AACCCA	809-814, 771-776	Soybean	SEF3
	as-1 LM	AAATGACGAAgAaGg	877-891	Cucumis sativus	unknown
	ABRE	TCAACGTGTC	1132-1141	Arabidopsis	ABI5
	ABRE	ACcCaCCTCCTC	1152-1163	Maize	ABF
	Box III	TGAAtTTAATG	720-729	Brassica oleracea	unknown
	Inr 1	TTCATTTCCTCAATT	379-392	Arabidopsis	unknown
	E-box	TACAAATGAT	251-260	Rice	RAVL1
	Fp23/IV	ATTGAAAAG	183-191	Soybean	unknown

טבלה 4. אלמנטים רגולטורים בפרומוטורים המשוערים של *Fom-1* ו-*Prv*, והפקטורים הנקשרים אל מוטיבים אלה עפ"י הספרות. האתרים נחזו על ידי תוכנת NSITE-PL בהתאם למאגר המידע של האתר. אותיות קטנות ברצף האלמנט מציינות מקומות בהם אין התאמה בין רצף הפרומוטר הנחקר לרצף הקונצנזוס. המיקום ברצף הדנ"א מתייחס לגן *Prv*, כאשר קודון ה-ATG של גן זה הוא נקודת הראשית.



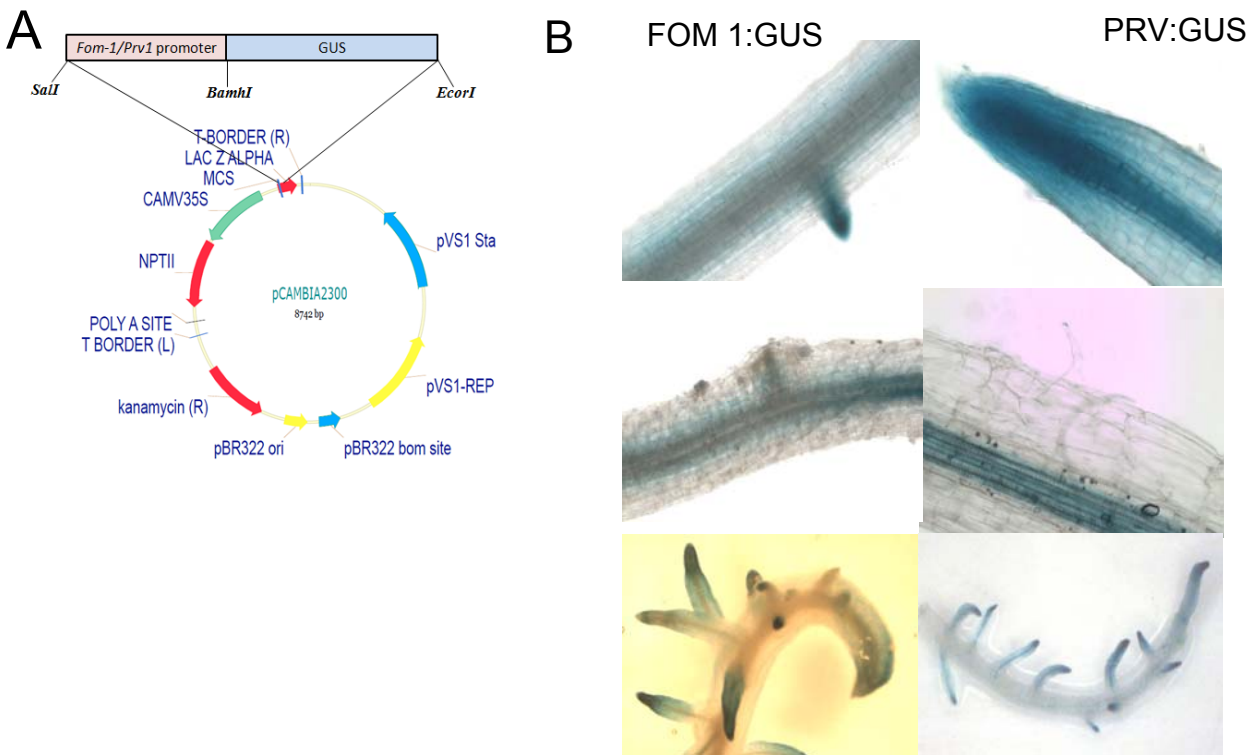
תמונה 9. אתרים רגולטורים משוערים על גבי רצף הפרומוטור המשוער של הגנים *Fom-1* ו-*Prv* על פי תוכנת Nsite-PL (טבלה מס' 4). הדיגלונים מציינים את כיוון האלמנט, והחיצים האפקיים את כיוון השעתוק של הגנים.

בהמשך המחקר, בדקנו את פעילות המקטע החשוד כפרומוטר כפול בעזרת צמחים "מהונדסי שורש". המערכת מבוססת על התמרת תת הפסיג על ידי חיידקי *A. rhizogenes*, המביאה ליצירת מערכת שורשים שחלקה טרנסגני. השיטה יעילה וזולה, ואינה מצריכה שימוש בתרביות רקמה סטריליות (Veena and Taylor 2007). מקטע הפרומוטור שובט בשתי האוריינטציות שלו בסמוך לגן מדווח GUS לתוך הווקטור הבינארי pCAMBIA2300 (תמונה 10A). המקטע הוגבר ב-PCR מקלון 39 של מלון מהזן WMR29 בעזרת פריימרים עם קצוות אדפטור המכילים אתרי חיתוך מתאימים. שני הפלסמידים העברו לחיידקי אגרובקטריום ריזוגנס, ובוצע ניסוי התמרה לזן הרגיש T52. מספר רב של צמחים הותמרו בשני הפלסמידים הנחקרים (Fom1:GUS, n=35; Prv:GUS, n=40), ובפלסמיד בעל דגם ביטוי קונסטיטטיבי חזק כביקורת (35S: GUS, n=15). צמחים לא מותמרים שטופלו במי ברז (n=15) שמשו כביקורת שלילית. בנוסף לכך, הכנתי קונסטרוקט דומה ובו איחוי של פרומוטר של כיטינאז ממלפפון ל-GUS הפרומוטר שובט מהזן אילן, בהסתמך על רצף הגן שפורסם על ידי (Shores et al., 2005). ניסיונות קודמים שנעשו במעבדתנו הראו כי ביטוי הגן ההומולוגי מושרה בזנים עמידים של מלון בנוכחות פטריית פוזריום מגזע 1.2 (Zvirin et al., 2010). עם הנצת השורשים האדוונטיביים, הצמחים הועברו להמשך גידול במצע הידרופוני, ושורשיהם נדגמו לצורך מבחן GUS והסתכלות בבינוקולר. קבוצות הטיפול השונות הציגו אחוזי התמרה גבוהים (70% עבור *Prv*, 62% עבור *Fom-1* ו-70% עבור קונסטרוקט הביקורת 35S::GUS). המקטע הנבדק הצליח לגרום לשיעתוק של הגן המדווח GUS בשתי האוריינטציות, וככל הנראה הוא אכן משמש פרומוטור פונקציונאלי הן עבור הגן *Fom-1* והן עבור הגן *Prv*. קבוצת הביקורת השלילית לא נצבעה כלל. שני הפרומוטורים השרו דגם ביטוי ספציפי ברקמת השורש (טבלה 5, תמונה 10B). הערכת את עוצמת הצביעה בצורה חזותית (1- צביעה חלשה מאוד, 5 - צביעה חזקה מאוד), וזיהיתי את דגם הצביעה באזורים ספציפיים: קצה השורש, איזור הגליל הווסקולארי והיונקות (תמונה 10). צמחים שהותמרו בקונסטרוקט עם פרומוטור *Prv* הראו ביטוי דומה בעוצמתו (הממוצעת) לביטוי בצמחי הפרומוטר של *Fom-1*, 4.18 ו-4.6 בהתאמה. כמחצית (8/17) מצמחי Prv:GUS הראו ביטוי בקצה השורש, לעומת צמחי Fom-1:GUS בהם קצה השורש נצבע כמעט בכל הצמחים (13 מתוך 16). בשני המקרים הגן המדווח מתבטא בצורת שררול סביב צרור צינורות ההובלה, אם כי ביטוי *Fom-1* מפוזר גם בקליפת השורש, ועוצמתו נחלשת ככל שמתרחקים מהקצה. צמחים אלה הראו צביעה חזקה באזור הנצת השורשים הצדדיים שהלכה נחלשה עם התארכות השורש. ניתן היה להבחין בביטוי GUS סביב צינורות ההובלה, בדומה לדגם הביטוי שראינו בניסוי דומה שערכתני עבור הפרומוטר של הגן Fom-2 (דו"ח שנתי תשע"ג). באף אחד מהשורשים המותמרים לא נצפה ביטוי GUS ביונקות או בשאר אזורי האפידרמיס (תמונה 5B). למרות הדמיון, דגמי הביטוי של שני הגנים נבדלו זה מזה ברמת השעתוק. צמחים שהותמרו ב-35S:GUS נצבעו בכל רקמות השורש כולל האפידרמיס והקורטקס.

בנוסף לני"ל, הכנתי קונסטרוקט דומה ובו איחוי של פרומוטר של כיטינאז ממלפפון ל-GUS הפרומוטר שובט מהזן אילן, בהסתמך על רצף הגן שפורסם על ידי (Shores et al., 2005); הרצף תואם את כיטינאז 1 במלון,

AF241266). ניסיונות קודמים במעבדתנו הראו, כי ביטוי הגן מושרה בזנים עמידים ורגישים של מלון, בנוכחות פטריית פוזריום מגזע 1.2 (Zvirin et al., 2010). הביטוי שראינו, ב-7 מתוך 24 צמחים, היה בצורת כתמים חלשים לאורך השורש.

מערכת זו מאפשרת מעקב רק אחר הביטוי בשרשים. כדי לבדוק הביטוי בנצר, יידרשו צמחים שכל רקמותיהם הותמרו, או מעקב אחר התעתיק האנדוגני ע"י real-time PCR. בשנה השלישית למחקר, התמרנו צמחי טבק, צמחי מלון וצמחי מלפפון שלמים בצמד הפלסמידים הללו, כדי להשלים ולהרחיב את תמונת הביטוי של הגנים. צמחונים מותמרים נמצאים כעת בשלבי רגנרציה והם ייבדקו במהלך החודשים הקרובים. בניסוי המשך בדקנו, האם חשיפת השרשים המהונדסים לפטריית הפוזריום תחולל שינוי בדגם הביטוי של הגן. הוספנו למערכת ההידרופונית את הפטריה ובדקנו את פעילות הגן הדווח בדגימות שורש לפני האילוח ולאחריו, אך לא הבחנו בשינוי. נסינו להעריך את פעילות האנזים GUS לא רק באופן חזותי-איכותי אלא גם בעזרת התוצר הפלואורסנטי MUG, ולא הבחנו בהשראת פעילות עקב אילוח. יתכן שמבחן GUS לא מאפשר הבחנה בשינויים כמותיים עקב הביטוי היציב והחזק, ויתכן גם, כי מתקיימת השראה קצרת טווח בימים הראשונים בלבד. הנושא נבדק בימים אלה ע"י מעקב אחר התעתיק האנדוגני.



תמונה 10. דגם הביטוי של צמד הגנים *Prv-Fom-1* כפי שהודגם ע"י גן דווח GUS בצמחים מהונדסי שורש. A – שני הקונסטרוקטים מכילים את אותו מקטע פרומוטור אבל באוריינטציה הפוכה ביחס לגן הדווח. B – טור ימני: ביטוי GUS מותמר בפלסמיד PRV:GUS. טור שמאלי: ביטוי GUS מותמר בפלסמיד FOM1:GUS.

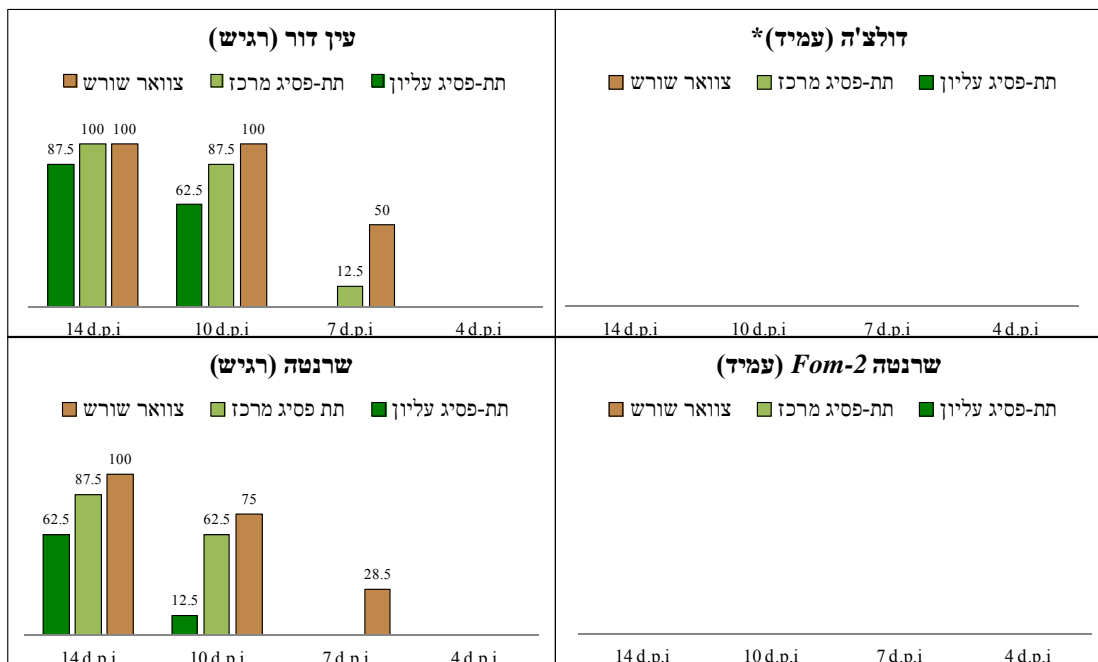
10. יצירת מלוניס טרנסגניים עם קונסטרוקטים המבוססים על הגנים *Fom-2, Fom-1, Prv* במעבדתה של החוקרת דליה וולף בוצעו ניסויי התמרה רבים עם הגן *Fom-2*, המקנה עמידות לגזעים 0 ו-1 (להבדיל מהגן *Fom-1* שנדון לעיל). הגן *Fom-2* (Joobeur et al. 2004) לא אופיין תיפקודית, ולכן החלטנו בראשית העבודה לאפיין אותו, בשלב בו טרם זיהינו בוודאות את *Fom-1*. לצורך זה הכנו פלסמידים בינריים לאפיין הפרומוטור, השתקה, והגברת הביטוי. טרנספורמציה לביטוי יתר של *Prv, Fom-1, Fom-2* הקונסטרוקט נבנה בווקטור pCAMBIA 2300. בשנה האחרונה, לאחר שנבנו משפחות טרנסגניות אחדות ולא התגלה בהן פנוטיפ עמידות שונה מהביקורת הלא-

מותמרת, בחנו מחדש את הפלסמיד עמו עבדנו וגילינו בו טעות מבנית המפריעה לביטוי. התחלנו לפיכך מחדש ביצירת וקטור כזה. במקביל נעשית כרגע עבודה על שיבוט מסגרות הקריאה של *Fom-1* ו-*Prv* לוקטורים בינריים כדי לבחון את פעילותם האפשרית בצמחים הרגישים לפוזריום ולוירוס הפפאיה, בהתאמה. הכוונה להתחיל את הבדיקה בצמחי מלון מהונדסי שורש, ולהרחיבה בהמשך למלוניס טרנסגניים.

טרנספורמציה להשתקה של *Fom-2*. נערכו ניסויי התמרה בקו הטיפוח BIZ העמיד לארבעת הגזעים של הפתוגן, ובזן Védrañtais הנוח להתמרה ועמיד לגזעים 0, 2. התקבל צמח בודד מכל זן, ובוצע ריבוי ע"י הכלאה לזן נוסף. משפחות הצאצאים נמצאות בבדיקה.

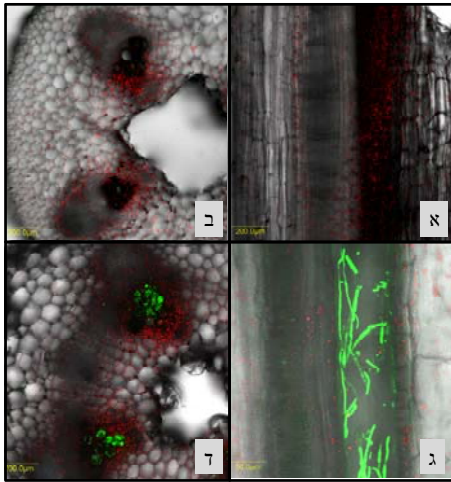
### 11. השפעת הגנים *Fom-1* ו-*Fom-2* על אכלוס צמח המלון בפטריית הפוזריום

מהו מנגנון התגובה המושרה על ידי הגנים לעמידות *Fom-2* ו-*Fom-1*? כדי לברר זאת, בחנו את ההבדלים בהתפשטות הפטרייה בין צמח מלון רגיש לפטריית פוזריום מגזע 0 לבין צמח העמיד כלפיה. עקבנו אחר פטרייה מהונדסת גנטית המבטאת גן מדווח פלורוסנטי, בחתכים היסטולוגיים של גבעול, באמצעות מיקרוסקופ פלואורסנטי. תמונה 11 מציגה ניסוי בארבעה זני מלון, שניים עמידים ושניים רגישים לפטרייה.



**תמונה 11:** מעקב אחר אכלוס צמחים עמידים ורגישים, בפטריית פוזריום מגזע 0 המבטאת GFP. הגרפים מתארים את אחוז החתכים המאולחים בפטרייה בכל אחד מחלקי הצמח בארבעה מועדים אחר האילוח. המספרים על כל עמודה מציינים את אחוז הנבטים שאובחנה בהן פטרייה.

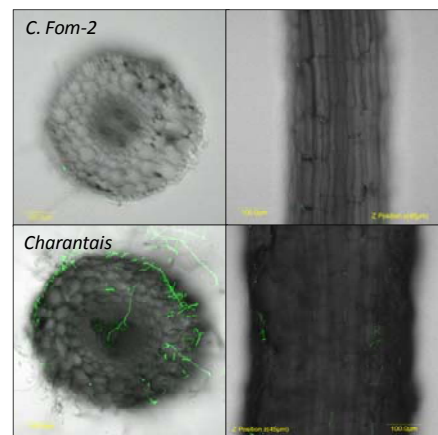
שמונה נבטים מכל זן נדגמו בכל אחת מנקודות הזמן 4, 7, 10 d.p.i. (בנקודת הזמן האחרונה, 14 d.p.i., נדגמו פחות נבטים רגישים כי הרוב כבר מתו). ב-4 d.p.i. הנבטים של הזנים הרגישים נראו בריאים, ולא נצפו תפטירים פלורוסנטיים בצינורות העצה. ב-7 d.p.i. נצפה תפטיר בצינורות העצה של צוואר השורש ב-28% מנבטי ה'שרנטה', ו-50% מנבטי 'עין דור'; בחלק מהם הופיע תפטיר פלורוסנטי במרכז תת-הפסיג, אולם לא נצפה תפטיר בחלק העליון של תת הפסיג. עשרה ימים לאחר הדבקה, כאשר החלה נבילת עלים בחלק מן הנבטים, הפטרייה התפשטה גם לחלק העליון של תת הפסיג. ב-14 d.p.i., שלב בו מתרחשת תמותה של חלק גדול מן הנבטים הרגישים, 62% מנבטי 'שרנטה' ו-87% מנבטי 'עין דור' ששרדו הראו אכלוס מלא בפטרייה עד גובה הפסיגים (תמונה 12). בזנים העמידים לא נראה תפטיר באף נבט, בכל ארבעת המועדים. חזרנו על הניסוי שלוש פעמים והתקבלו תוצאות דומות.



**תמונה 12:** חתכים היסטולוגיים של נבטי מלון מאולחים בפוזריום מגזע 0 המבטא GFP כשלושה שבועות לאחר אילוח. (א) חתך אורך של תת פסיג מנבט עמיד (זן שרנטה *Fom-2*). (ב) חתך רוחב של צוואר שורש מנבט עמיד. (ג) חתך אורך של תת-פסיג מנבט רגיש (זן שרנטה). (ד) חתך רוחב של תת-פסיג מנבט רגיש.

חתכי אורך ורוחב שבדקתי במיקרוסקופ קונפוקלי סורק בסיועו של מר אדוארד בלאוסוב ממכון וולקני, הראו כי התפשטות הפטרייה ויצירת התפטיר והנבגים בזן הרגיש מוגבלת, גם כשלושה שבועות לאחר הדבקה, לצינורות העצה בלבד (תמונה 2). סקירה דומה, שנעשתה על מנת לתאר יחסים לא קומפטיבילים בין הגנוטיפ העמיד ('שרנטה *Fom-2*') לפטרייה, הראתה עמידות מוחלטת: הנבטים העמידים שהודבקו בפטרייה לא הראו כלל סימפטומים של מחלה, גם לאחר שבועיים, ובנוסף לא ניתן היה להבחין בהימצאות תפטיר בצינורות העצה גם לאחר שבועיים מהדבקה.

בניסויים אלה טרם הוברר באיזה שלב מתבצעת בלימת הפטריה בצמח העמיד: האם הפטרייה כלל אינה מצליחה לחדור אל הצמח, או שמא היא חודרת, אך נעצרת בצינורות ההובלה בשורש או קרוב אליהם, ואיננה מגיעה לתת הפסיג במועדים שבדקנו. על מנת לענות על שאלה זו, יש לבדוק היכן נמצאת הפטרייה בשורש בשלושת הימים הראשונים לאחר ההדבקה. לניטור שלושת הימים הראשונים לאחר אילוח, השתמשתי בנבטים בני כ-10 ימים שהונבטו על גבי צלחת פטרי ואלחו ע"י טפטוף של תרחיף נבגים בריכוז  $10^6$  נבגים למ"ל, כ-0.2 מ"ל לנבט. בתמונה 13 רואים כי הנבט העמיד נקי מתפטיר, וברגיש נצפית חדירה אל עומק הרקמה.



**תמונה 13:** חתכים היסטולוגיים של שורשי מלון מאולחים בפוזריום מגזע 0 המבטא GFP כשלושה ימים לאחר אילוח. למעלה: חתך אורך וחתך רוחב של שורש מנבט עמיד (שרנטה *Fom-2*). למטה: חתך אורך וחתך רוחב של שורש מנבט רגיש (שרנטה).

### 12ג. קשר אפשרי בין ההורמון אתילן ותגובת הצמח לפוזריום

תפקיד האתילן בתגובת ההגנה מפני פתוגנים כגון *F. oxysporum* אינו טריוויאלי. מחד, הוספת אתילן או ביטוי ייתר של רכיבים המשתתפים בתגובה לאתילן עשויים להשרות עמידות (Berrocal-Lobo and Molina 2004), ומאידך, ישנן עדויות כי אתילן גורם רגישות למחלות מסוימות (Broekart et al. 2006). על מנת לבדוק באופן מיקדמי את השפעת האתילן במערכת הניסוי שלנו, בצענו טיפול חיצוני באתרל, ובדקנו את השפעת הטיפול על העמידות לפוזריום בזנים איזוגניים, עמידים ורגישים. בשלב ראשון נזרעו 36 זרעים מכל זן (*C. Fom-2* ו-*Charantais*). לאחר כשבוע, בטרם התפתח עלה אמיתי, חולקו הנבטים מכל זן מלון לשלוש קבוצות שוות, כאשר כל קבוצה רוססה בריכוז אתילן שונה (0, 0.036 g/l, 0.36 g/l).



שלושה ימים לאחר הריסוס, פוצלה כל קבוצה, חלקה הודבק בפוזריום, וחלק נותר ללא הדבקה. הקבוצות נבדקו לתסמיני נבילה שבוע לאחר האילוח (טבלה 5) ואחד-עשר יום לאחר אילוח.

	0.036 גר' לליטר	0.36 גר' לליטר	ללא אתרל	
מודבק	0%	0%	0%	<i>C. Fom-2</i>
	70%	50%	25%	<i>Charantais</i>
ביקורת	0%	0%	0%	<i>C. Fom-2</i>
	0%	0%	0%	<i>Charantais</i>

**טבלה 5:** השפעת אתרל על רגישות הצמח לפוזריום: אחוזי התמותה שבוע לאחר אילוח.

טבלה 5 מראה, כי צמחי שרנטה (רגישים לפוזריום) הראו, שבוע לאחר האילוח, אחוזי תמותה גבוהים יותר בעקבות חשיפה לאתרל. מאידך גיסא, הוספת אתילן לא גרמה לתמותה מפוזריום בזן העמיד. גם לאחר 11 יום, נצפה אחוז תמותה גבוה יותר בצמחים שטופלו באתרל לעומת הצמחים שלא טופלו מטופלים באתילן (100% לעומת 75%). בניסוי המשך, שנערך ב-36 נבטים מכל זן, נבדקה השפעת יוני כסף, המעכבים את מעבר הסיגנל לאתילן, על הרגישות לפוזריום. הנבטים רוססו בריכוזי כסף תיו סולפאט (STS) שונים (0.6 mM, 0.06 mM), והודבקו בפוזריום שלושה ימים לאחר הריסוס, כאשר מדגם שווה של נבטים נותר כביקורת ללא הדבקה. הקבוצות נבדקו לתסמיני נבילה שבוע לאחר אילוח (טבלה 6). התוצאה תואמת את תוצאות הניסוי באתרל: יוני הכסף הפחיתו מעט את הרגישות של הזן הרגיש.

	0.06 mM STS	0.6 mM STS	ללא טיפול	
מודבק	0%	0%	0%	<i>C. Fom-2</i>
	25%	0%	33%	<i>Charantais</i>
ביקורת	0%	0%	0%	<i>C. Fom-2</i>
	0%	0%	0%	<i>Charantais</i>

**טבלה מס' 6:** השפעת כסף תיוסולפאט על רגישות הצמח לפוזריום: אחוזי התמותה שבוע לאחר אילוח.

### 13ג. בניית מערכת הדבקה הדירה של צמחי מלון בוירוס PRSV

כמו פוטיווירוסים אחרים, PRSV מועבר בטבע על ידי כנימת העלה. הדבקה נסיונית באמצעות החרק מצריכה עבודה קפדנית כדי למנוע הדבקות לא מבוקרות. אפשרות נוחה יותר היא העברה של הוירוס מצמח מודבק אל צמחים נקיים על ידי ריסוק רקמות מודבקות, ושפשוף פסיגי הצמח הנקי, אך גם בשיטה זו קשה להכין מדבק בצורה הדירה, ולאחר מספר מחזורי העברה המדבק עלול להיחלש. כדי להתגבר על הבעיות הנ"ל החלטנו לבנות, בעזרתו האדיבה של ד"ר ויקטור גאבה ממניחה המחקר החקלאי, רובה חלקיקים שישמש להדבקה מבוקרת של הצמחים בקלון אינפקטיבי של PRSV. המכשיר מאפשר לירות חלקיקי טונגסטן אליהם נספח פלסמיד המכיל את גנום הוירוס PRSV-E2. שקלון התקבל באדיבות ד"ר Cecile Desbiez ממכון INRA בצרפת. השיטה יעילה כארבעה סדרי גודל מהדבקה על ידי שפשוף, ובכל הדבקה מתחילים מריכוז ידוע של אותו פלסמיד, זאת בניגוד להעברה מצמח מודבק בה עלולה להתרחש מוטגנוזה טבעית או רקומבינציה עם וירוסים אחרים מהמשפחה המצויים בטבע. פעולת הרובה נבדקה על שלושת זני מלון Vedranta, WMR29, PI414723. הראשונים עמידים והאחרון רגיש. כ-14 ימים לאחר ההדבקה העמידים לא הראו סימני מחלה והתפתחו בדומה לצמחי הביקורת. לעומתם, הצמחים הרגישים הפגינו מוזאיקה טיפוסית להדבקה ויראלית והתפתחותם התעכבה. כלי זה יאפשר ניסויים מולקולאריים מתקדמים על האינטראקציה בין הוירוס למלון.

### 14ג. לקראת זיהוי הליגנדים של חלבוני העמידות Fom-2, Fom-1, Prv

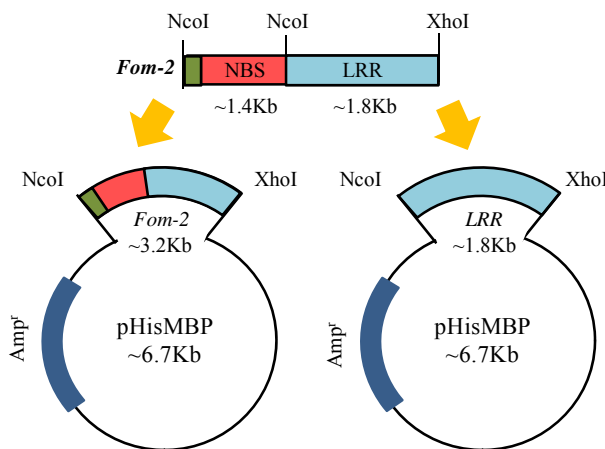
בשנה השלישית החלטנו להוסיף כיווני מחקר חדשים, כגיבוי לעבודה הטורנסגנית בצמחי מלון שלמים, שלא צלחה עד כה. בעקבות הזיהוי המולקולרי של גנים לעמידות, עולה השאלה המרתקת, מהם

החלבונים שאותם מזהים תוצרי הגנים לעמידות ששיבטנו. הצעד הראשון בתגובת העמידות הוא היכרות מולקולארית בין חלבון העמידות לחלבון של הפתוגן, או לחלבון צמחי שהותקף על ידי הפתוגן.

#### 14א. ביטוי חלבון העמידות בחיידק

על מנת לזהות אינטראקציות בין החלבונים Fom-1, Fom-2 לחלוני פטריה בשיטות כדוגמת Co-IP, יש לבטא את החלבון במערכת ביטוי חיידקית. הדבר יאפשר להגיב את חלבון העמידות עם מיצויים מצמחים מודבקים או מתפטיר הפטריה ולזהות פרטנרים חלבוניים הנקשרים אליו.

הגן *Fom-2* מקודד ל-1073 חומצות אמינו, וביטוי החלבון במערכת פרוקרוטית עלול להיות קשה, לכן במקביל לשיבוט מסגרת הקריאה השלמה, ביצענו גם שיבוט חלקי, של אזור ה-LRR. כדי להגדיר את אזור ה-LRR נעזרתי בתוכנת 'Pfam' המזהה אזורים שמורים בחלבון נתון על פי רצפי קונצנזוס, ובמאמר של Joobeur וחבריו מ-2004 שזיהו בגן זה 17 רצפי LRR נוספים באופן "ידני". לצורך השיבוט הגברנו באמצעות PCR את מקטע ה-LRR של הגן *Fom-2* מהזן העמיד MR-1, מתוך פלסמיד. התחלים ששימשו לריאקציה תוכננו כך שיכילו אתר חיתוך *XhoI* בקצה ה-3' של הגן ואתר חיתוך *NcoI* בקצה ה-5' של הגן (תמונה 14). תוצר ההגברה נחתך, ושובט לוקטור ביטוי pHisMBP המוסיף חלבון קושר מלטוז (MBP) לקצה ה-N טרמינלי של מסגרת



הקריאה (תמונה 14; שיטות עבודה ופלסמידים התקבלו מד"ר צפי דניאלי, היחידה לביטוי חלבונים האוניברסיטה העברית ירושלים). תוספת התג נועדה להגביר את מסיסות החלבון רמת ביטוי. התג אף מאפשר לנקות החלבון על גבי קולונת מלטוז, ולזהותו על גבי תספיג Western באמצעות נוגדנים כנגד MBP. תוצר השיבוט נשלח לפענוח רצף ב-Macrogen, Korea כדי לוודא את תקינותו של הגן ואת השמירה על מסגרת הקריאה.

#### תמונה 14: סכמת השיבוט של המקטעים *Fom-2* ו-LRR אל תוך וקטור ביטוי pHisMBP.

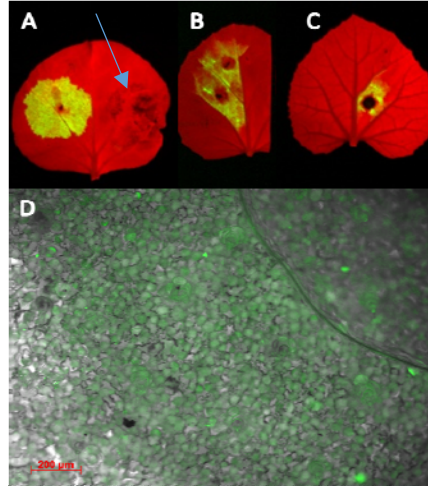
במקביל לשיבוט מקטע ה-LRR מהזן העמיד, הגברנו את מסגרת הקריאה השלמה של החלבון מדני"א גנומי של הזנים הרגישים 'עין דור', 'דולציה' ו-'שרנטה', ואת האלל העמיד מדגימת cDNA של הזן MR-1, באמצעות תחלים המכילים אתרי חיתוך *XhoI* ו-*NcoI* בקצה ה-5' של הגן. תוצרי ההגברה שובטו אל תוך וקטור ביניים pGEM (promega) וריצפם פוענח, ומשם הועברו אל וקטור הביטוי. ניסויים מיקדמיים כבר אישרו כי החיידקים מבטאים את מקטע ה-LRR (טרם נבדק החלבון השלם). מערכת זו תאפשר לכידה (Co-IP) של חלבון העמידות או חלקים ממנו וזיהוי חלבונים צמחיים או פטרייתיים הנמצאים במיצוי של צמח נגוע, ונקשרים אליו.

במקביל, התחלנו בשיבוט הגן *Prv* – מסגרת קריאה שלמה ואזור LRR מבודד - של שתי צורות שחבור חלופיות, מזן עמיד לוירוס, לתוך וקטור ביטוי בחיידק כפי שתואר עבור הגן *Fom-2*. השערת המחקר שלנו היא, שתתכן תגובה ישירה בין חלבון העמידות לאחד מבין עשרת חלבוני הווירוס, ועל כן ניתן יהיה לבטא גם את חלבוני הווירוס בחיידקים, ולבדוק את האינטראקציה *in vitro*.

#### 14ב. אינטראקציה *in vivo* בשיטה שיטת האגרואיניפילטרציה

שיטת האגרואיניפילטרציה גורמת ביטוי מקומי של גנים לעמידות וחלבון אפקטור (Avr) בעזרת אגרובקטריום. בשיטה זו מזריקים לעלה חיידקים המבטאים פלסמידים לביטוי שני פרטנרים חלבוניים: אינטראקציה מולקולארית תוביל במקרים רבים לתגובת רגישות יתר (HR). לא דווח על מערכת אגרואיניפילטרציה בצמחי מלון, ובמחקר זה בצענו כיוול ראשון של מערכת כזאת. גידלנו חיידקי אגרובקטריום שנושאים פלסמיד בינארי לביטוי חלבון GFP תחת בקרה של פרומוטור 35S, וביצענו הזרקה לעלי מלון (Ma et al., 2012). עלי המלון בהם השתמשנו היו דקים ומרושתים בצניורות הובלה קשיחים, דבר המגביל כנראה

את ההתמרה של הרקמה, אך ניתן היה לראות ביטוי של הגן הדווח. במקביל הוזרק הפלסמיד גם לעלים של *Nicotiana benthamiana*, הנוחים להתמרה. לאחר יומיים או שלושה צולמו הצמחים במכשיר ההדמיה CRi Maestro II<sup>TM</sup>. חלבון ה-GFP עורר בגל בן 480 nm, והאור הנפלט נמדד באמצעות פילטר בתחום 510-530 nm. בתמונה 15 ניתן לראות את הביטוי באזורי ההזרקה. בעלה הטבק כמעט כל האזור אליו הגיע תרחיף החיידקים עבר התמרה ונצפה ביטוי ברור וחזק של GFP. במלון עברו התאים הקרובים לאתר ההזרקה התמרה, אך ביעילות פחותה. כעת אנו מבטאים את חלבוני הוירוס ואת חלבון העמידות בוקטור בינארי ונערכים לביצוע ניסויים במלון ובניקוטיאנה.



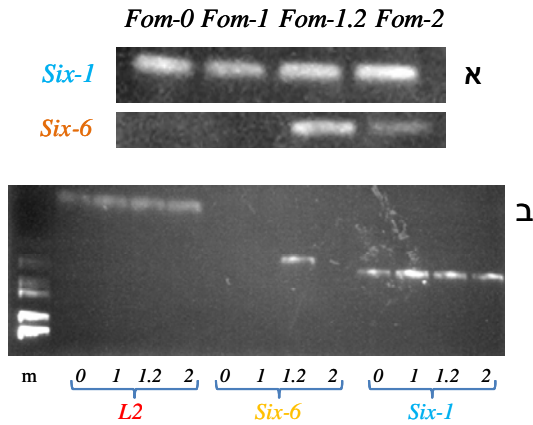
תמונה 15. ביטוי GFP בעקבות אגרואינפילטרציה. בתמונות A, B, C - עלה *N. benthamiana*, עלה מלון מהזן PI414723, עלה מלון מהזן Vedrantais, בהתאמה. צבע אדום מסמן פליטת אור של הכלורופיל, וצבע ירוק פליטה של GFP. החץ הכחול מצביע על אזור שהוזרק עם מים לצורך ביקורת שלילית. התמונות צולמו באמצעות CRi Maestro II<sup>TM</sup>. D – תמונה מוגדלת של אזור מותמר בעלה הטבק בו ניתן להבחין בתאים המבטאים GFP בצבע ירוק וסביבם תאים שלא עברו התמרה. התמונה צולמה באמצעות מיקרוסקופ פלואורוסצנטי Zeiss AxioImager Z1.

#### 14ג. בידוד הומולוגים של הגנים six בפוזריום המלון

האינטראקציה בין פטריית הפוזריום *Fusarium oxysporum f.sp lycopersicii* לצמח העגבניה נחקרה לעומק, וזוהו חלבונים קטנים המופרשים ע"י הפתוגן לחלל הקסילאם (*secreted in xylem, six*), ומתפקדים כאפקטור וכפקטור Avr (Lievens et al. 2009). בדקנו, האם קיימים בפוזריום המלון (*Fusarium oxysporum f.sp melonis*) גנים הומולוגיים, העשויים לשמש כ-Avr בהיכרות עם הפונדקאי. לאחרונה פורסם רצף גנומי וטרנסקריפטום של פוזריום מלון מגזע 1 (Broad Institute, NRRL 26406, VCG0136), ואנו סרקנו אותו בעזרת אלגוריתמים BLAST בדרגות חומרה שונות. בפוזריום העגבניה תוארו שבעה גנים מסוג *Six*, ואנו מצאנו לשניים מהם (*Six1* ו-*Six6*) הומולוגים בפוזריום מגזע 1 של המלון (טבלה 7). תוצאות אלה עולות בקנה אחד עם הדיווח של Lievens המראה בעזרת PCR הימצאות כי הומולוגים ל-*Six6* בפוזריום התוקף מלון.

<i>Fol</i>	Gene nam	Homology to f. sp. melonis	<i>Fom</i> homologu	Homology score
GQ268948	<i>Six1</i>	+	FOMG 19530	80% DNA identity
GQ268949	<i>Six2</i>	-	-	-
GQ268950	<i>Six3</i>	-	-	-
GQ268951	<i>Six4</i>	-	-	-
GQ268952	<i>Six5</i>	-	-	-
GQ268958	<i>Six6</i>	+	FOMG 18978.1	94% DNA identity
GQ268954	<i>Six7</i>	-	-	-

טבלה 6: חיפוש הומולוגים לגנים *Six* מפוזריום התוקף עגבניה (*Fol*) בפוזריום התוקף מלון (*Fom*).



**תמונה 16:** א. נוכחות בגנום של גנים הומולוגים ל-*Six-1* ול-*Six-6* בפוזריום המלון. אלקטרופוריזה של תוצרי הגברה (PCR) של הגנים ההומו לוגים, מתוך דנ"א גנומי של ארבעת גזעי פוזריום המלון. ב. ביטוי הגן *Six-1*, *Six-6* בארבעת גזעי פוזריום המלון. הרנ"א הופק מנבטי מלון מהזן עין דור (רגיש לכל הגזעים) שהודבקו בתבדיל של אחד מארבעת הגזעים. הבדיקה נעשתה ע"י semi-quantitative RT-PCR.

שני הרצפים ההומולוגיים מפוזריום המלון (FOMG 18978, FOMG 19530) חולקים 66% זהות ברצף חומצות האמינו שלהם. הם נבדקו בתוכנת SignalP 3.0, היודעת לחזות signal peptides, רצפים בקצה ה-N טרמינלי המכוונים חלבון למנגנון ההפרשה התאית. הרצפים של פפטיד הסיגנל אינם שמורים במיוחד, אך התוכנה חוזה את הימצאותם באמצעות השוואה לחלבונים אחרים שנצא בהם פפטיד סיגנל באופן ניסויי. ראינו, כי בחלבון FOMG 19530 מופיע סיגנל הפרשה משוער בן 16 נוקלאוטידים, ואילו בחלבון FOMG 18978 מופיע סיגנל הפרשה ארוך יותר, בן 25 נוקליאוטידים. הדבר מרמז כי מדובר בחלבונים שעשויים להיות מופרשים בדומה לחלבוני Six בעגבניה.

הפקנו דנ"א מתבדילים השייכים לארבעת הגזעים של פוזריום המלון (0, 1, 2 ו-1.2), וביצענו PCR להגברת הגנים ההומולוגים ל-*Six-1* ו-*Six-6*, על מנת לראות האם הם נוכחים בגנום של ארבעת הגזעים (תמונה 16). ההשערה היא, שחלבון פתוגני המתפקד כ-Avr יהיה נוכח רק בגזעים מסויימים, ויוכר על ידי גן לעמידות המכיר גזעים אלה. כך נצפה, ש-Avr המזוהה על ידי תוצר הגן *Fom-1* יהיה נוכח בגזעים 0 ו-2, ואילו זה המזוהה על ידי *Fom-2* יהיה נוכח בגזעים 0 ו-1. יתכן עם זה, שיהיה Avr ייחודי לכל גזע בנפרד. מתברר כי הגן ההומולוג ל-*Six-1* קיים בארבעת הגזעים השונים, אולם הגן ההומולוג ל-*Six-6* קיים בגזעים 1.2 ו-2 בלבד. התוצאות חזרו על עצמן בשתי הפקות דנ"א בלתי תלויות. על מנת לדעת האם רצף הגן ההומולוגי ל-*Six-1* זהה בכל ארבעת הגזעים, נשלחו תוצרי ה-PCR של ה-ORF השלם לריצוף: לא נמצאו הבדלי רצף בין הגזעים השונים. על מנת לבדוק אם יש הבדל בביטוי הגנים בין הגזעים השונים, הוכן רנ"א מנבטי מלון מסוג 'עין דור' המאולחים בכל אחד מבין ארבעת גזעי פוזריום המלון, בהתאמה. בתמונה 16 בי ניתן לראות כי ההומולוג ל-*Six-1* מתבטא בכל גזעי פוזריום המלון, אולם הגן *Six-6* מתבטא בגזע 1.2 בלבד.

בהמשך הדרך נרצה לחקור את תפקיד שני הגנים הללו בפטריה, והאם ניתן לזהות אינטראקציה *in vivo* או במבחנה בינם לבין הגנים לעמידות? כן נרצה לבדוק האם בגזעים האחרים שהגנום שלהם טרם רוצף קיימים הומולוגים נוספים ממשפחת six.

#### ד. דיון וסיכום

בשלוש שנות המחקר הושגה התקדמות משמעותית. השגנו חלק מהמטרות שהתווינו, בעוד מטרות אחרות הושגו רק באופן חלקי. במקביל, הרחבנו את הפעילות ופתחנו כיווני מחקרי חדשים. ההישג המרכזי היה הזיהוי המולקולרי של צמד הגנים לעמידות, *Prv* ו-*Fom-1* (מטרה א'). עבודה מאומצת של מיפוי ברזולוציה גבוהה אפשרה לנו לזהות קנדידאט יחיד האחראי לכל אחת מהעמידויות. רצפי הגנים פוענחו ונעשה ניתוח ביואינפורמטי שלהם. עבור הגן *Prv* גילינו ארכיטקטורה ייחודית של

הגן, המקודד כנראה לחלבון עם אתר NB (קישור נוקליאוטיד) נוסף. לא ידועים חלבונים עמידות כאלה עדיין, ובמחקרים עתידיים נצטרך להידרש לתפקיד האפשרי של אזור זה. ממצא מעניין נוסף הוא צורות שחבור חלופיות בגן זה (חמש צורות זוהו עד כה) וגם בגן *Fom-1* (שתיהן צורות). מעניין יהיה לבדוק את משמעותן, והאם הן מתבטאות באופן שונה במצבים שונים, למשל בגנוטיפים שונים, או בצמח מודבק לעומת צמח לא מודבק.

אנליזת הפולימורפיזם של שני הגנים כללה קריאה של הרצף בכמה זנים, עמידים ורגישים (מטרה ב'). השוואת האללים נתנה לנו תמונה מעניינת של הכוחות האבולוציוניים הפועלים על החלבון בכללותו: יותר מוטציות המשנות את החלבון לעומת מוטציות שקטות (*diversifying selection*), דבר המעיד על מרוץ חימוש פעיל המתקיים בין הפוטיווירוס והפוזריום, בהתאמה, לבין הצמח. להפתעתנו אזורי ה-NBS וה-TIR הצטיינו בגיוון אף יותר מאזור ה-LRR. שני הגנים השכנים נבדלו בשיעור הפולימורפיזם, הגן *Prv* מגוון בהרבה מהגן *Fom-1*, והכוחות הסלקטיביים פועלים על כל אחד מהם בנפרד. לא מצאנו, באף אחד מהם, אתר פולימורפי מסוים היכול להסביר את העמידות, כלומר לחלק בין זנים עמידים לרגישים. הדבר מסתבר, שכן על פי הספרות, יש במאגר הגנים של המלון מספר מקורות עמידות בלתי תלויים כנגד כל אחד מהפתוגנים הללו, ואכן האללים נבדלים זה מזה בשיעור נרחב של אתרים פולימורפיים: יש כנראה יותר מדרך אחת להגיע לעמידות או לרגישות על ידי שינויים נקודתיים ב"אלל קדמון" אחד.

מטרתנו השלישית היתה זיהוי תפקודי (*validation*) של הגנים החשודים בעזרת מערכות טרנסגניות: אנליזת פרומוטר, ביטוי יתר והשתקה בשורשים טרנסגניים, ובצמחים טרנסגניים שלמים. אנליזת הפרומוטר הניבה תוצאות מעניינות לגבי דגם הביטוי של המקטע המפריד בין צמד הגנים השכנים: המקטע אכן הפעיל ביטוי של גן דווח ביעילות גבוהה, בכל אחת משתי האוריינטציות של הפרגמנט. כילנו מערכת לצמחים מהונדסי שורש במלון, והיא התגלתה ככלי יעיל לאנליזת פרומוטר בצמח זה. בשתי האוריינטציות, הביטוי הבולט הוא בקצה השורש ובתאים המלווים את צינורות ההובלה, אם כי באוריינטציה "*Fom-1*" הביטוי הוא גם בקורטקס. הביטוי של *Fom-1* נבדק גם בעזרת *real time PCR*, ומצאנו כי הוא מתבטא הן בזנים רגישים והן בעמידים. יש הבדלים ברמת הביטוי בין זנים, אם כי הבדלים אלה אינם במיתאם לעמידות או רגישות. תוצאות מיקדמיות הראו שיתכן שקיימת אינדוקציה של גן זה בימים הראשונים להדבקה, ולאחר כ-4 ימים רמת הביטוי יורדת בחזרה לרמת הסף.

באשר לבחינה התפקודית של הגן בעזרת צמחי מלון טרנסגניים שלמים, ניסויים של ביטוי יתר כשלו מסיבה טכנית, בעוד ניסוי ההשתקה טרם נשלם. רכשנו ניסיון יקר בייצור מלוני טרנסגניים, אם כי היעילות של ההתמרה נותרה נמוכה, ושרידות הצמחים ופוריותם היו נמוכות גם כן, ועיכבו את התקדמותנו.

מטרה רביעית של הפרוייקט היתה לימוד תגובת הצמחים או השורשים הטרנסגניים לוירוס ה-PRSV ולפטריית הפוזריום: דינמיקה של ההדבקה, ספציפיות לגזע, ביטוי גנים להגנה.

באשר לוירוס הפאפיה, בתחילת הפרוייקט לא היה לנו ניסיון מעשי בהדבקה בארץ (ההדבקות שהיו נחוצות למיפוי נעשו בצרפת), וניסיון לעבוד עם תבדיד מקומי נתן תוצאות לא ברורות. במהלך המחקר קיבלנו קלון אינפקטיבי של הוירוס, ובנינו רובה חלקיקים שאפשר לנו לכייל הדבקה הדירה, שתשמש אותנו בניסוי המשך.

כדי ללמוד את תהליך ההדבקה בפוזריום הכנו (בעזרת ד"ר פרימן ממנהל המחקר החקלאי) גזעים שונים של הפטריה המבטאים GFP. עקבנו אחר אכלוס נבטי מלון מזנים שונים בפטריה פלואורסנטית, והוכחנו שהן הגן *Fom-1* והן הגן *Fom-2* מסוגלים למנוע כניסת הפטריה לגבעול. ראינו כי בצמחים רגישים יצירת סופר אוקסיד גבוהה יותר מאשר בעמידים, ויתכן שהדבר משקף את העקה בה שרוי הצמח, או את ייצור צורוני החמצן על ידי הפטריה עצמה. ממצא נוסף שנרצה לבסס ולהעמיק קשור לתפקיד אפשרי של האתילן במהלך ההתקפה: אתילן הגביר את קצב התמותה של צמח רגיש גנטית לפוזריום, ואילו מעכבי אתילן דחו מעט את הופעת הסימפטומים. מעניין יהיה לבדוק בעתיד, האם הפטריה משרה ייצור אתילן ע"י הצמח כדי להעצים את ההדבקה, והאם צמח עמיד מונע זאת.

מטרה אחרונה, שלא הופיעה בתכנית המחקר ולקחנו על עצמנו בשנה האחרונה, היא לחקור אינטראקציות חלבון בין תוצר הגן לעמידות לבין חלבוני הפתוגן. לשם כך בנינו פלסמידים שונים שיבטאו את החלבונים בצמח (בשיטת אגרואינפילטראציה), או בחיידקים (כדי לבצע ניסוי אימונופרסיפיטציה). במסגרת זו נעשתה הכנה של התשתית הנדרשת במעבדה כדי לחקור את פעולת הגנים לעמידות ברמה הביוכימית, ולזהות פקטורי וירולנטיות וחלבונים צמחיים המגיבים עימם.

## ה. ביבליוגרפיה

- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A. (2004). Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 763-770.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F.C., and Cammuel, B.P.A. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 44, 393-416.
- Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Caplan, J. L., Tsao, J., Czymmek, K., & Dinesh-Kumar, S. P. (2007). A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS biology*, 5(3), e68.
- Dinesh-Kumar, S. P., & Baker, B. J. (2000). Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1908-1913.
- Finkelstein, R. R., & Lynch, T. J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell*, 12(4), 599-609.
- Friedman, A. R., & Baker, B. J. (2007). The evolution of resistance genes in multi-protein plant resistance systems. *Current opinion in genetics & development*, 17(6), 493-499.
- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., ... & Puigdomènech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11872-11877.
- Harris, C. J., Sloatweg, E. J., Goverse, A., & Baulcombe, D. C. (2013). Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 21189-21194.
- Je, B. I., & Han, C. D. (2010). Brassinosteroid homeostasis via coordinate regulation of signaling and synthetic pathways. *Plant Signal. Behav*, 5, 1440-1441.
- Joobeur, T., King, J. J., Nolin, S. J., Thomas, C. E., & Dean, R. A. (2004). The fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features. *The Plant Journal*, 39(3), 283-297.
- Lievens, B., Houterman, P. M., & Rep, M. (2009). Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS microbiology letters*, 300(2), 201-215.
- Ma, L., Lukasik, E., Gawehns, F., and Takken, F.L.W. (2012). The Use of Agroinfiltration for Transient Expression of Plant Resistance and Fungal Effector Proteins in *Nicotiana benthamiana* Leaves. *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols* 835, 61-74.
- Mcdowell, J. M., & Simon, S. A. (2006). Recent insights into R gene evolution. *Molecular plant pathology*, 7(5), 437-448.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10), 944-945.

- Reddy, A. S. (2007). Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 267-294.
- Sestili, S., Sebastiani, M. S., Belisario, A., & Ficcadenti, N. (2013). Reference gene selection for gene expression analysis in melon infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1-11.
- Shoresh M, Yedidia I and Chet I, 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95, 76-84.
- van Leeuwen, H., Monfort, A., Zhang, H. B., & Puigdomènech, P. (2003). Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 51(5), 703-718.
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(5), 383-403.
- Yin, Y., Zhu, Q., Dai, S., Lamb, C., & Beachy, R. N. (1997). RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *The EMBO journal*, 16(17), 5247-5259.
- Zvirin, T., Herman, R., Brotman, Y., Denisov, Y., Belausov, E., Freeman, S., & Perl-Treves, R. (2010). Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1· 2. *Plant pathology*, 59(3), 576-585.

#### 1. פרסומים שנבעו ממחקר זה

1. Brotman Y, Normantovich M, Goldenberg Z, Zvirin Z, Kovalski I, Stobun N, Donniger T, Bolger AM, Troadec C, Bendahmane A, Cohen R, Katzir N, Pitrat M, Dogimont C, **Perl-Treves R** (2013) Dual resistance of melon to *Fusarium oxysporum* races 0 and 2 and to *Papaya ring-spot virus* is controlled by a pair of head-to-head oriented NB-LRR genes of unusual architecture. *Molecular Plant* 6: 235-238

2. Normantovich M, Yogev O, Taylor CG, Perl-Treves R (2012) Study of the *Fom-2* resistance gene using composite melon plants (invited lecture). In: Proceedings of the X Eucarpia meeting on the Cucurbitaceae, Antalia, Turkey, October 15–18th, 2012, pp 240–246

#### כן הצגנו את תוצאות מחקרנו בכנסים הבאים :

Perl-Treves R, Normantovich M, Stobun N, Herman R, Zvirin Z, Brotman Y, Yogev O, Goldenberg T, Kovalski I (2012) the melon-*Fusarium* interaction: a range of responses, and the underlying resistance genes (Invited Lecture). Meeting of the Israeli Society of Microbiology, 13-14 February 2012, Bar Ilan University

R. Perl-Treves, I. Kovalski, M. Normantovich, G. Miller and A. Amitzur. (2014) Cloning a pair of resistance genes in melon: molecular basis of "gene for gene" responses. Invited lecture at the Annual Meeting of the Israeli Phytopathology Society, 30th January 2014, Bet Dagan

Rafael Perl-Treves, Golan Miller, Michael Normantovich and Irina Kovalski (2014) Positional cloning and characterization of *Fusarium* resistance genes in melon. Abstract accepted as oral presentation at the American Phytopathological Society Meeting, August 9-13, Minneapolis, USA.

Arie Amitzur, Michael Normantovich, Irina Kovalski and Rafael Perl-Treves (2014) The melon *Prv* gene conferring PRSV resistance is a member of a TIR-NBS-LRR gene pair expressing multiple splice variants. Abstract accepted for the American Phytopathological Society Meeting, August 9-13, Minneapolis, USA.

**סיכום עם שאלות מנחות**

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

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

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b>
מטרה כללית: לימוד תיפקודי ואבולוציוני של הגנים <i>Fom-1/Prv</i> במלון
הושגה התקדמות רבה בזיהוי הגנים, באפיון מולקולרי שלהם, תובנות על האבולוציה שלהם וביטויים.
הוכנו כלים חשובים להמשך המחקר. הושג ניסיון רב במערכות טרנסגניקה שונות. ליתר פירוט,
אין ברירה, נא לקרוא את הדו"ח ובמיוחד המטרות, התוצאות והדיון.
<b>עיקרי התוצאות.</b>
זיהוי גן קנדידאט עבור הגנים <i>Fom-1</i> ו- <i>Prv</i> . פרסום מאמר המסכם את המיפוי והשיבוט. שני הגנים שייכים
למשפחת <i>TIR-NB-KRR</i> ומצטיינים בשחבור חלופי ובפולימורפיזם רב באזורי <i>TIR, NB</i> . ביטוי הגנים נחקר ע"י
מעקב אחר התעתיקים. כן נלמד דגם הביטוי של שני הפרומוטורים במערכת מלון-מהונדס שורש ע"י חיבור לגן
דווח. מחקר בצמחי מלון טרנסגנים לא נשלם. נחקר תפקיד האתילן כמעצים רגישות. הוכנו כלים לביטוי החלבון
וללימוד האינטראקציה המולקולארית (ביטוי בחיידק, אגרואינפילטראציה בטבק ומלון).
<b>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?</b>
הגנים <i>Fom-1</i> ו- <i>Prv</i> הם חברי משפחת <i>TIR NBS LRR</i> הנתונים במרוץ חימוש וסלקציה "מגוונת". הרצף עצמו
אינו מגלה את הבסיס לעמידות/רגישות. הביטוי בשרשים ממוקם בקצות שורש ולאורך צינורות ההובלה.
שני הגנים לעמידות <i>Fom1</i> ו- <i>Fom2</i> חוסמים את התפשטות הפטריה לגבעול. טיפול אתרל מעצים רגישות.
לגנים צורות שחבור חלופיות. לפטריה חלבוני <i>six</i> הדומים לאלה של פוזריום העגבניה.
לדעתנו הושגו רוב מטרות המחקר.
<b>בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות</b>
כדאי ללמוד את דגמי השחבור החלופי של הגנים ואת הביטוי שלהם ביתר פירוט.
יש להגיע להצלחה נוספת בהתמרה, קיום וריבוי מלוניס טרנסגנים.
יש לבסס מערכות ללימוד אינטראקציה מולקולארית בעלים של <i>Nicotiana benthamiana</i> ובמלון, ולבטא את
החלבון בחיידקים ללימוד האינטראקציה בין חלבון העמידות לחלבוני הפתוגן.
מעניין להעמיק בתפקיד האתילן: כיצד משרה רגישות? האם בריכוז מתאים יש לו גם תפקיד בהשראת עמידות?
<b>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסום בכתב; הופעה בכנס (כמפורט בדו"ח)</b>
פורסם מאמר, פרק מספר של כנס ומספר תקצירים
<b>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</b>
<input type="radio"/> ניתן לפרסם, בעברית בלבד
<input type="radio"/>
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן (מתוכננת הצעה מיקדמית בתשע"ה)

\*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים