

2000-2002

תקופת המחקר:

259-0093-02

קוד מחקר:

**Subject:** ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MYCORRHIZAL GENES FOR THE IMPROVMENT OF TOMATO PRODUCTIVITY

**Principal investigator:** YORAM KAPULNIK

**Cooperative investigator:** ABRAHAM LEVY, SMADAR WINENGER, IDIT GINZBERG

**Institute:** Agricultural Research Organization (A.R.O.)

**שם המחקר:** בידוד וזיהוי גנים מיקורייטים לשיפור ההתפתחות ויבול צמחי עגבניה

**חוקר ראשי:** יורם קפולניק

**חוקרים שותפים:** אברהם לוי, סמדר וינגר, עידית גינזברג

**מוסד:** מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

## תקציר

מיקוריזה הנה יחסי גומלין בין פטריית קרקע אובליגטורית לבין יותר מ- 80% ממיני הצמחים היבשתיים. קיום הסימביוזה תורם לגידול הצמח ויבולו. חסר בידע גנטי המוביל לסימביוזה מגביל את היכולת לשפר את תרומת המיקוריזה לצמח. מטרת העבודה לבחון את האפשרות של המצאות בקרה גנטית על תהליכי האינטראקציה צמח-פטרייה.

**מהלך העבודה** - איתור מוטנטים למיקוריזה נעשה בצמחי עגבניה משלוש אוכלוסיות שונות. הצמחים גודלו בתנאי חממה בנוכחות הפטרייה ושורשיהם נבדקו לאכלוס במיקוריזה. הבסיס הגנטי לעמידות נקבע לאחר הכלאות של הקווים השונים ובחינת הצאצאים לעמידות. כמו כן, נעשו ניסויי טמפרטורה ואור לשלילת גורמים פיסיוולוגיים לעמידות. בדיקת השלב בו חל העיכוב באינטראקציה נעשה תוך שימוש בטכניקת ה "sandwich". אנליזות חומצות אמינו, מינרלים, סוכרים וגזים נעשו במטרה לאתר את גורם העמידות. אנליזות HPLC נעשתה ללמידת מעורבות האקסודטים בעמידות ואנליזות AFLP נעשתה על מנת לאתר סמן מולקולרי לעמידות.

**תוצאות ומסקנות** - בסריקת אוכלוסיית צמחים שטופלו בקרינת נויטרונים מהירים, נמצאו שני צמחי עגבניה מוטנטים עמידים לפטריית המיקוריזה. שני המוטנטים נראו דומים באופי הגידול אך הראו רמת עמידות שונה למיקוריזה. הפנוטיפ העמיד התפצל כתכונה מנדלית רצסיבית יחידה ומבחן קומפלמנטציה הראה שהמוטנטים לא אללים. שני המוטנטים הראו עמידות מלאה בנוכחות ספורות מבודדות אך נדבקו בתפטיר שהגיע משורש WT מודבק. שיעור נביטת הספרות ויצירת גופי הצמדה נמצא נמוך בנוכחות הפרשות שורשים מהמוטנטים ביחס לשיעור שהתקבל בנוכחות הפרשות שורשים מה-WT. מסדרת ניסויים שנערכה בעבודה זו, לא נמצאו הבדלים מובהקים בין המוטנט M161 לבין צמח המקור בתכולת מינרלים, חומצות אמיניות ותכולת סוכרים. כמו כן, קצב יצירת אתילן נמצא דומה בין המוטנט לבין צמח המקור. באמצעות שיטת AFLP נמצאה שונות גנטית בין צמח המוטנט לבין צמח המקור ושלושה פסי DNA נבדלים אותרו באוכלוסיית מיפוי. אחד מהם מופה לכרומוזום 3 של גנום העגבניה, ושניים מצויים בתהליכי מיפוי.

שני המוטנטים שנמצאו ואופיינו במהלך עבודה זו מחזקים את ההנחה כי ביסוס סימביוזת המיקוריזה מבוקר גנטית ע"י הצמח, באמצעות שני גנים לפחות. מוטנטים אלו מהווים כלי חשוב בהבנת תהליכים המובילים לביסוס סימביוזת המיקוריזה בצמחים בכלל ומודל המאפשר חקירת יחסי צמח-מיקרואורגניזם ברמה הגנטית-מנגנונית. ידע זה יאפשר התייחסות שימושית לתופעה הטבעית הן בטיפוח צמחים חדשים לחקלאות וביצירת ממשקים מתחשבים אקולוגית בשמירת הקרקע והסביבה.

#### רשימת פירסומים

Rakefet David-Schwartz, Hana Badani, Smadar Wininger, Avraham A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. (2001) Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not to extraradical hyphae. *The Plant Journal* 27:561-569.

Rakefet David-Schwartz, Vijay Gadkar, Smadar Wininger, Roza Bendov, Avi A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. Isolation of a *pre-mycorrhizal* infection (*pmi2*) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization. *In press, MPMI*.

Vijay Gadkar, Rakefet David-Schwartz, Gerald Nagahashi, David D.Douds Jr, Smadar Wininger, Yoram Kapulnik. Root exudate of *pmi* tomato mutant M161 reduces AM fungal proliferation in vitro. *Submitted to FEMS Microbiology Letters, February 2003.*

בידוד וזיהוי גנים מיקורייטים לשיפור התפתחות ויבול צמחי עגבניה

**Isolation and identification of mycorrhizal genes for the improvement of tomato productivity**

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

ע"י

יורם קפולניק, גידולי שדה ומשאבי טבע, מינהל המחקר החקלאי

עידית גינזברג, ירקות, מינהל המחקר החקלאי

אברהם לוי, גנטיקה של צמחים, מכון ויצמן למדע, רחובות

סמדר ויינגר, גידולי שדה ומשאבי טבע, מינהל המחקר החקלאי

**Yoram Kapulnik, Agronomy and Natural Resources, Agricultural Research Organization**

[kapulnik@volcani.agri.gov.il](mailto:kapulnik@volcani.agri.gov.il)

**Idit Ginzberg, Vegetable Department, Agricultural Research Organization**

**Avraham Levy, Plant Sciences Department, The Weizmann Institute of Science**

[Avi.levy@weizmann.ac.il](mailto:Avi.levy@weizmann.ac.il)

**Smadar Weininger, Agronomy and Natural Resources, Agricultural Research Organization**

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימה



**תקציר**

מיקוריזה הננה יחסי גומלין בין פטריית קרקע אובליגטורית לבין יותר מ-80% ממיני הצמחים היבשתיים. קיום הסימביוזה תורם לגידול הצמח ויבולו. חסר בידע גנטי המוביל לסימביוזה מגביל את היכולת לשפר את תרומת המיקוריזה לצמח. מטרת העבודה הנוכחית היא לבחון את האפשרות של המצאות בקרה גנטית על תהליכי האינטראקציה צמח-פטרייה.

איתור מוטנטים למיקוריזה נעשה בצמחי עגבניה משלוש אוכלוסיות שונות. הצמחים גודלו בתנאי חממה בנוכחות הפטרייה ושורשהם נבדקו לאיכלוס במיקוריזה. הבסיס הגנטי לעמידות נקבע לאחר הכלאות של הקוים השונים ובחינת הצאצאים לעמידות. כמו כן, נעשו ניסויי טמפרטורה ואור לשלילת גורמים פיזיולוגיים לעמידות. בדיקת השלב בו חל העיכוב באינטראקציה נעשה תוך שימוש בטכניקת ה"sandwich". אנליזות חומצות אמינו, מינרלים, סוכרים וגזים נעשו במטרה לאתר את גורם העמידות. אנליזות HPLC נעשתה ללמידת מעורבות האקסודטים בעמידות ואנליזות AFLP נעשתה על מנת לאתר סמן מולקולרי לעמידות.

בסריקת אוכלוסיית צמחים שטופלו בקרינת נויטרונים מהירים, נמצאו שני צמחי עגבניה מוטנטים עמידים לפטריית המיקוריזה. שני המוטנטים נראו דומים באופי הגידול אך הראו רמת

עמידות שונה למיקוריה. הפנוטיפ העמיד התפצל כתכונה מנדלית רצסיבית יחידה ומבחן קומפלמנטציה הראה שהמוטנטים לא אללים. שני המוטנטים הראו עמידות מלאה בנוכחות ספורות מבודדות אך נדבקו בתפטיר שהגיע משורש WT מודבק. שיעור נביטת הספורות ויצירת גופי הצמדה נמצא נמוך בנוכחות הפרשות שורשים מהמוטנטים ביחס לשיעור שהתקבל בנוכחות הפרשות שורשים מה-WT. מסדרת ניסויים שנערכה בעבודה זו, לא נמצאו הבדלים מובהקים בין המוטנט M161 לבין צמח המקור בתכולת מינרלים, חומצות אמיניות ותכולת סוכרים. כמו כן, קצב יצירת אתילן נמצא דומה בין המוטנט לבין צמח המקור.

באמצעות שיטת AFLP נמצאה שונות גנטית בין צמח המוטנט לבין צמח המקור ושלושה פסי DNA נבדלים אותרו באוכלוסיית מיפוי. אחד מהם מופה לכרומוזום 3 של גנום העגבנייה, ושניים מצויים בתהליכי מיפוי.

שני המוטנטים שנמצאו ואופיינו במהלך עבודה זו מחזקים את ההנחה כי ביסוס סימביוזת המיקוריה מבוקר גנטית ע"י הצמח, באמצעות שני גנים לפחות. מוטנטים אלו מהווים כלי חשוב בהבנת תהליכים המובילים לביסוס סימביוזת המיקוריה בצמחים בכלל ומודל המאפשר חקירת יחסי צמח-מיקרואורגניזם ברמה הגנטית-מנגנונית. ידע זה יאפשר התייחסות שימושית לתופעה הטבעית הן בטיפוח צמחים חדשים לחקלאות וביצירת ממשקים מתחשבים אקולוגית בשמירת הקרקע והסביבה.

#### רשימת פירסומים

Rakefet David-Schwartz, Hana Badani, Smadar Wininger, Avraham A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. (2001) Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not to extraradical hyphae. *The Plant Journal* 27:561-569.

Rakefet David-Schwartz, Vijay Gadkar, Smadar Wininger, Roza Bendov, Avi A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. Isolation of a *pre-mycorrhizal* infection (*pmi2*) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization. *In press, MPMI*.

Vijay Gadkar, Rakefet David-Schwartz, Gerald Nagahashi, David D. Douds Jr, Smadar Wininger, Yoram Kapulnik. Root exudate of *pmi* tomato mutant M161 reduces AM fungal proliferation in vitro. *Submitted to FEMS Microbiology Letters, February 2003.*

## מבוא

איכלוס שורשים של צמחים בפטריה המיקוריה מעלה את פוטנציאל הגידול באמצעות שיפור בהזנת הצמח, קליטת המים ועמידות למחלות שורש. פטריות שכאלה קיימות בטבע אבל לא תמיד מתאפשרת התבססות ופעילות הסימביוזה בגידולי שדה שכן, הפטריה "מאחרת" את חדירתה לצמח ללא סיבה ברורה ובכך נמנעת התרומה הפוטנציאלית לצמח. מידת הנזק שבהעדרה תלוי ברמת אילוח הקרקע (בעקבות חיטיים), בעונת הגידול, באופי האגרוטכני ובעיקר בפונדקאי. היכולת לבסס את הסימביוזה בין הצמח לפטריה הינה בבקרת מנגנון גנטי שליווה את התפתחות הצמחים במהלך האבולוציה (Bonfante-Fasolo, 1988). מחקרים פיסיוולוגים שנעשו עד כה מצביעים על שינויים המתרחשים במערכת הצמחית (Kapulnik et al, 1996) – אך לא נמסר עד כה על בידוד בקרה גנטית כל שהיא המעודדת את התבססות הסימביוזה בשורש.

מבחינה חקלאית ניתן כיום למצוא שטחי גידול בהם קיים עיכוב בהתפתחות הצמח. עיכובים אלו ניתנים לפתרון ע"י ישום המיקוריה לפני הזריעה, אך עלותו גבוהה ולא ניתנת להצדקה. יחד עם זאת, נהוג ליישם כמוריות גדולות של כימיקלים, שהינם בעלי משמעות אקולוגית חמורה ויכולים להיחסך בתנאי עידוד הסימביוזה. על רקע זה ברור כי קיים הכרח במציאת מקורות גנטיים שיעודדו את האילוח הטבעי של גידולים חקלאיים.

## מטרת המחקר

מטרת המחקר הנוכחי לאתר אינפורמציה גנטית התומכת בסימביוזה כחומר מוצא ליצירת זנים המבטאים ביתר תכונות לאינטראקציה משופרת עם פטריית המיקוריה. לצורך זה ינקטו הצעדים הבאים:

1. איתור צמח עגבניה עמיד לפטריית המיקוריה מאוכלוסיית Fast neutron שבמרכז הגנום הצמחי.
2. פרטים שיוזחו כבעלי עמידות יוכלאו בהכלאות עצמיות, חוזרות והדדיות, על מנת לקבוע את האופי הגנטי של הלוקוסים המעורבים.
3. איפיון מעמיק של השלב הפגוע באינטראקציה בין הצמח לבין הפטריה.
4. מיפוי ראשוני של הלוקוסים המוטנטים על גבי כרומוזום. איפיון מעמיק של הגנים הינו חורג ממסגרת העבודה של הצעה זו.

## ניסויים ותוצאות

### סריקת אוכלוסיית קוי מחדר

אוכלוסיית קוי המחדר פותחה לצורך מיפוי גנים מהיר בצמחי עגבניה (Eshad and Zamir, 1995). על מנת למקם באופן ישיר את תכונות העמידות למיקוריה על גבי אחד הכרומוזומים של העגבניה, נעשה ניסיון לבחון את שני ההורים M82 ו-*L. pennellii* ביכולת לקיים את סימביוזת המיקוריה. M82 נמצא רגיש למיקוריה ואוכלס ברמה גבוהה ואילו *L. pennellii* אוכלס ברמה נמוכה מאוד ובלתי ברורה. מאחר ולא היה ברור אם *L. pennellii* עמיד למיקוריה, נבחנו כל 50 קוי המחדר ונמצאו מאוכלסים ברמה גבוהה במיקוריה. מכאן שהקושי בהדבקה של ההורה *L.*

*pennellii* נבע כנראה מתכונות מורפולוגיות ולא מחומר גנטי שונה. לאור זאת נמצאה אוכלוסיית קוי המחדר כלא מתאימה לאיתור ישיר של תכונת העמידות על גבי כרומוזום, אך תשמש בהמשך המחקר למיפוי סמנים גנטיים שיאתרו בשיטות אחרות.

### סריקת אוכלוסיית טרנספוזונים

במסגרת פרויקט הגנום הצמחי הוכנה מערכת מוטגנזה בעגבניה טרנספוזוני Ac/Ds של תירס (Meissner et al., 1997). יעילותה של מערכת זו היא ביכולת למפות באופן ישיר את המוטציה דרך הטרנספוזון שמשמש כדייג, אך עם זאת מגבילה את שיעור המוטגנזה. עד כה נסרקו 1,300 צמחי M3 מאוכלוסייה זו ולא נמצא מוטנט עמיד למיקוריה. לאחר ששיעור המוטציה למיקוריה נקבע באוכלוסיית FN כ-  $4 \times 10^{-4}$  הוחלט כי סריקת אוכלוסיית הטרנספוזונים איננה כדאית, שכן יש צורך בסריקה ידנית מייגעת של כ- 20,000 צמחים על מנת לאתר מוטנט אחד של מיקוריה, ותנאים אלה חורגים ממסגרת המחקר הנוכחי.

### סריקת אוכלוסיית Fast Neutron

במהלך עבודה זו נסרקו 2,500 צמחי עגבניה (Micro-Tom) מאוכלוסיית M2 שפותחה מזרעי יסוד שעברו טיפול בקרינה (Fast neutron, FN). בסריקה זו זוהו שני פרטים (M161 ו-M20) שאינם נדבקים במיקוריה *G. intraradices* ויחד עם זאת פוריים, ודומים לזן המקור פנוטיפית. המוטנטים שנמצאו גודלו ונבדקו במשך 8 דורות שבהם הראו עמידות למיקוריה ללא התפצלויות. שני המוטנטים נמצאו הומוזיגוטים. משני סריקות לא תלויות אלו נקבע שיעור המוטציה כ-  $4 \times 10^{-4}$ .

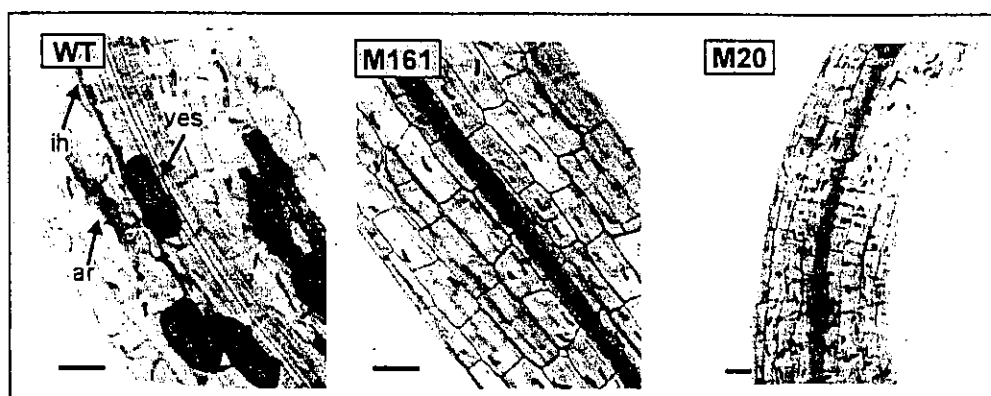
הקוים M161 ו-M20 הוכלאו עם צמח wild type (WT) וכל חמשת הצאצאים בדור F1 היו רגישים למיקוריה והראו הדבקה נורמלית בדומה להדבקה שנצפתה בצמחי WT. תוצאה זו מרמזת שהלוקוס שנפגע בשני הקוים הינו רציבי. צאצאי F2 של ההכלאה בין M161 לבין WT התפצלו ל- 101 צמחים רגישים ו- 32 צמחים עמידים, שזה יחס מנדלי של 3:1 ( $\chi^2$  analysis:  $p > 0.8$ ). תוצאה זו מחזקת את ההנחה שהלוקוס שנפגע הינו רציבי. גם צאצאי F2 של ההכלאה בין M20 לבין WT התפצלו ל- 154 צמחים רגישים ו- 44 צמחים עמידים ביחס מנדלי של 3:1 ( $\chi^2$  analysis:  $p > 0.3$ ).

על מנת לבדוק האם שני הקוים פגועים באותו אלל הוכלאו הקוים ביניהם וכל צאצאי F1 (8) נמצאו רגישים למיקוריה בדומה להדבקה בצמחי WT ( $84 \pm 5$  ו-  $87 \pm 3\%$  בהתאמה). מכאן שמדובר בשני לוקוסים נפרדים. תוצאה זו מעידה על כך ששני המוטנטים אינם אללים.

### תצפיות מיקרוסקופיות

המוטנטים M161 ו-M20 גודלו בנוסף לצמחי WT בתנאי חממה תוספת מידבק מיקוריה בריכוז גבוה (500 ספורות לצמח) בעומק 3 ס"מ מגובה פני הקרקע. שורשי הצמחים הוצאו, נשטפו ונצבעו שישה שבועות מיום הזריעה. מהסתכלות ראשונית במיקרוסקופ אור ניתן היה להבחין

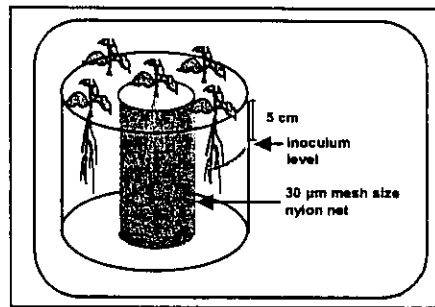
שצמחי WT נדבקו באופן נורמלי בפטריית המיקוריזה ואילו בצמחי המוטנט לא נצפתה נוכחות של הפטריה (תמונה מס' 1).



תמונה מס' 1: תמונות ממיקרוסקופ אור של שורשי עגבנית WT מודבקים בפטריית המיקוריזה *G. intraradices* (משמאל), ושורשי המוטנטים M161 (באמצע) ו-M20 (מימין) ללא איכלוס בפטרייה. השורשים נצבעו בצביעת trypan blue. קיצורים: ves, vesicles; ih, internal hyphae; ar, arbuscules; ap, appressoria; eh, external hyphae. Bar = 50  $\mu$ m.

#### ניסיונות הדבקה בגורמי מידבק שונים

יכולת תפטיר חיצוני של פטריית המיקוריזה לאכלס צמח נוסף ידועה מזה זמן (Bethlenfalvay *et al.*, 1991). במערכת דו-מדורית, שתואר לעיל, נעשה ניסיון להדביק את הצמחים המוטנטים באמצעות תפטיר חיצוני מצמח WT. במערכת זו נבנו שני מדורים ביניהם הפרידה יריעת ניילון בעלת חורים בגודל 30  $\mu$ m, באופן זה נמנעה חדירת שורשים ממדור למדור, אך התאפשר מעבר תפטיר והפרשות שורשים (תמונה מס' 2). כשספורות המיקוריזה יושמו במדור החיצוני בלבד והצמחים המוטנטים גודלו בשני המדורים, לא נצפתה הדבקה לאורך הניסוי. כשצמחי WT גדלו בשני המדורים נצפתה הדבקה ברמה שווה בשני המדורים (טבלה מס' 1). תוצאות אלו מראות כי תפטיר חיצוני עובד מהמדור החיצוני ומדביק את הצמח שנמצא במדור הפנימי. כאשר הצמחים המוטנטים גודלו במדור הפנימי וצמחי WT גדלו במדור החיצוני, נדבקו שורשי המוטנטים באופן דומה להדבקה בצמחי WT. תוצאות אלו מעידות כי שני המוטנטים מסוגלים לקיים את סימביוזת המיקוריזה בדומה לצמח WT באמצעות תפטיר חיצוני או בהשפעת הפרשות שורשים של צמח WT. בנוסף ניתן להסיק כי התהליכים התומכים בקיום הסימביוזה אינם פגועים בצמח המוטנט.



תמונה מס' 2: מערכת דו-מדורית. המדור הפנימי מופרד מהמדור החיצוני ע"י ניילון  $30\text{-}\mu\text{m}$  mesh. פטריית המיקוריזה *G. intraradices* הושמה 5 סמ' מתחת לפני השטח בריכוז של 200 ספורות לצמח.

טבלה מס' 1: שיעורי הדבקה (%) במוטנטים M161 ו-M20 כשהודבקו בתפטיר שהגיע מצמחי WT מודבקים במערכת דו-מדורית. הצמחים גודלו למשך 8 שבועות. הערכים הינם ממוצע של ארבע חזרות ושגיאת תקן.

Surrounding compartment (+AM)		Central compartment (- AM)	
M161	0	M161	0
M20	0	M20	0
WT	$46.8 \pm 10.6$	WT	$60.6 \pm 9.5$
M161	$74.1 \pm 10.7$	WT	$59.8 \pm 11.2$
M20	$42.5 \pm 3.9$	WT	$60.6 \pm 3.7$

על מנת לבחון את יכולת ההדבקה של צמחי M161 באמצעות ספורות בלבד, נעשה ניסיון בלתי תלוי בו יושם מידבק המיקוריזה שהורכב מספורות בלבד בריכוזים 0 – 1,000 ספורות לצמח. שישה שבועות ממועד הזריעה נצפתה הדבקה בצמחי WT שנעה בין 0 ל-  $93.3 \pm 2.5\%$  בהתאם לכמות הספורות שיושמו. בצמחי M161 לא נצפתה הדבקה כלל (טבלה מס' 2). בניסוי נוסף בלתי תלוי, נבדקה גם עמידותו של המוטנט M20 למידבק מיקוריזה מלא בלבד. תוצאות הניסוי מראות כי המוטנט M20 עמיד יותר לפטריית המיקוריזה מאשר המוטנט M161 (טבלה מס' 3). מכל מקום, גם צמחי WT וגם הצמחים המוטנטים נמצאו מודבקים כאשר מידבק המיקוריזה הכיל בנוסף לספורות גם תפטיר וחלקי שורשים מודבקים. גם במקרה זה אחוז ההדבקה בצמחי WT היה גבוה מאשר בצמחים המוטנטים M161 ו-M20 ( $59.2 \pm 6.1$ ,  $34.7 \pm 9.4$  ו-  $18.9 \pm 7.5$  בהתאמה).



טבלה מס' 2: אחוז הדבקה (%) של פטריית המיקוריזה בשורשי WT, M161 ו-M20 בשלושה ניסויים שונים. Experiment I, כולל צמחי WT ו-M161 בנוכחות ספורות בלבד. Experiment II, כולל צמחי WT ו-M20 בנוכחות מידבק מיקוריזה מלא וניסוי Experiment III כולל את צמחי WT ושני המוטנטים בנוכחות מידבק מלא אלים במיוחד. הצמחים גודלו במשך שישה שבועות. הערכים הינם ממוצע של שבעה צמחים ושגיאת תקן. האותיות הקטנות מציינות שונות מובהקות (Tukey-Kramer HSD test,  $P > 0.05$ ).

		Inoculum density (propagules/plant)	WT	M161	M20
Experiment I					
Isolated spores	1000	93.3 ± 2.5	0	nd*	
	500	72.5 ± 15.9	0	nd	
	100	19.8 ± 8.6	0	nd	
	10	15.3 ± 4.5	0	nd	
	0	0	0	nd	
Experiment II					
Whole inoculum	1000	52.7 ± 11.3	nd	2.2 ± 1.0	
	500	58.7 ± 11.3	nd	2.4 ± 1.1	
	100	40.5 ± 8.7	nd	0	
	10	20.1 ± 10.1	nd	0	
	0	0	nd	0	
Experiment III					
Whole inoculum	1000	59.2 ± 6.1 <sup>a</sup>	34.7 ± 9.4 <sup>b</sup>	18.9 ± 7.5 <sup>b</sup>	

\* - nd = not detected.

מתוצאות אלו עולה כי שני המוטנטים מגיבים באופן שונה לנוכחות פטריית המיקוריזה. על מנת לעמוד על ההבדלים בין שני המוטנטים נערך ניסוי בו נכללו שלושה סוגים שונים של מידבק. שני סוגים של מידבק מלא משני מקורות בלתי תלויים ומדבק של ספורות בלבד. התוצאות המוצגות בטבלה מס' 3 מעידות על הבדל מובהק בין שני המוטנטים בתגובתם למידבק מלא של מיקוריזה בעוד שלא נמצא הבדל בתגובתם למידבק של ספורות בלבד. ממצאים אלו מצביעים על כך כי המוטנטים עמידים להדבקה באמצעות ספורות ורגישים, ברמות שונות, להדבקה באמצעות מדבק מלא, דבר המעלה את הסברה כי שני המוטנטים פגועים בשלב ראשוני בהכרה בין הצמח לספורה.

טבלה מס' 3: שעורי הדבקה (%) בצמחי WT ובצמחים המוטנטים בנוכחותם של שני מידבקים מלאים שונים (Whole inoculum I, Whole inoculum II) ומידבק של ספורות בלבד (Isolated spores). השורשים נאספו ונצבעו 5, 7 ו-9 שבועות מהזריעה. הערכים המוצגים הינם ממוצע של חמישה צמחים ושגיאת תקן. האותיות הקטנות בכל שורה מציינות שונות מובהקת (Tukey-Kramer HSD test,  $P > 0.05$ ).

Treatment	Sampling time (weeks)	WT	M161	M20
Whole inoculum I	5	$30.3 \pm 5.9^a$	$30.3 \pm 7.5^a$	$4 \pm 3^b$
	7	$95.0 \pm 1.4^a$	$73.0 \pm 4.4^b$	$0^c$
	9	$98.5 \pm 0.6^a$	$86.3 \pm 5.2^b$	$0^c$
Whole inoculum II	5	$16.3 \pm 1.4^a$	$8.3 \pm 1.8^b$	$0.2 \pm 0.2^c$
	7	$26.8 \pm 5.1^a$	$17.5 \pm 5.6^a$	0
	9	$45.7 \pm 7.7^a$	$27.8 \pm 7.2^b$	0
Isolated spores	5	$0.5 \pm 0.3$	0	0
	7	$15.5 \pm 3.3$	0	0
	9	$28.3 \pm 6.2$	$1.5 \pm 1.2$	0

#### חקירת השלבים הראשונים של הסימביוזה

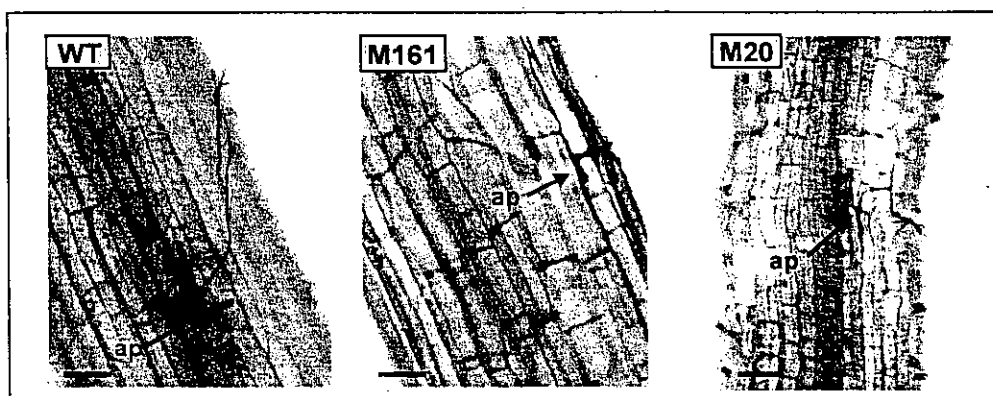
על מנת לקבוע האם המוטנט פגוע בשלב ראשוני בסימביוזה נעשה שימוש במערכת "Sandwich approach" שפותחה ע"י Giovannatti וחבריה (1993). בניסוי זה הונחו כ-100 ספורות מבודדות על ממברנת ניטרוצלולוז וכוסו בממברנה נוספת, עליה הונחו צמחונים כך ששורשיהם נחו על גבי הממברנה וכוסו בממברנה שלישית. מערכת זו גודלה בחול בתנאי חממה. לאחר שלושה שבועות נבדקו אחוזי נביטת הספורות, התארכות והתפצלות התפטיר. במערכת שהכילה את שורשי צמח הבר (WT) נמצא שיעור נביטה של 68.5% ואילו במערכת שהכילה את שורשי המוטנט נמצא שיעור הנביטה 37.8% בלבד (טבלה 4). לא נצפה הבדל בהתארכות התפטיר ובמספר ההתפצלויות. מתוצאות אלה ניתן להסיק כי הפרשות משורשי המוטנט גורמים לעיכוב בנביטת הספורות.

טבלה מס' 4: שלבי התפתחות ספורות ותפטיר של פטריית המיקוריזה *G. intraradices* בשלבים שלפני ההדבקה: נביטת ספורות, אורך כולל של תפטיר ומספר התפצלויות, ללא צמח ובנוכחות צמחי WT ו-M161. הערכים הינם ממוצע של 4 חזרות ושגיאת תקן. האותיות הקטנות מצביעות על שונות גנטית (Kramer HSD test,  $P > 0.05$ ).

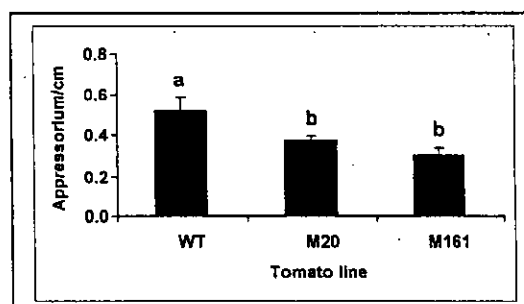
Developmental stage	Control	WT	M161
Spore germination (%)	$7.3 \pm 0.9^c$	$68.5 \pm 9.6^a$	$37.8 \pm 4.1^b$
Total hyphal length/spore (mm)	$4.4 \pm 0.8^a$	$5.9 \pm 1.0^a$	$4.0 \pm 0.2^a$
Number of branches/spore	$7.3 \pm 1.8^a$	$8.9 \pm 1.5^a$	$5.4 \pm 0.6^a$

בניסוי אחר בו נבדקה השפעת הפרשות השורש על יצירת גופי הצמדה על גבי השורש (appressoria) הונחו צמחונים כך ששורשיהם נחו על גבי ממברנת ניטרוצלולוז שהכילה ספורות

נבטות וכוסו בממברנה נוספת. מערכת זו גודלה בחול בתנאי חממה למשך 6 ימים. גופי ההצמדה נצפו על גבי שורשי צמח ה-WT כמו גם על גבי שורשי המוטנט (תמונה 3). אך על גבי שורשי המוטנטים מספר גופי ההצמדה היה נמוך באופן מובהק ביחס למספרם על גבי שורשי ה-WT (גרף מס' 1). מתוצאות שני ניסויים אלו ניתן להסיק כי חומר מסויים המופרש משורשי המוטנטים גורם לעיכוב נביטת ספורות פטריית המיקוריזה וליצירת גופי הצמדה.



תמונה מס' 3: נוכחות גופי הצמדה של גבי שורשי WT (משמאל), M161 (באמצע) ו-M20 (מימין). קיצורים: ap, appressoria; ar, arbuscules; ih, internal hyphae; ves, vesicles; eh, external hyphae. Bar = 50  $\mu$ m.



גרף מס' 1: יצירת גופי הצמדה על שורשי WT, M161 ו-M20 כפי שנמדדו העמודות מוצגות כמספר גופי הצמדה לסי"מ שורש. הערכים הינם ממוצע של ארבעה צמחים. אותיות קטנות מייצגות שונות מובהקות (Kramer HSD test,  $P > 0.05$ ).

#### מיצויים והפרשות צמחיות

במטרה לאתר את הגורם המופרש משורשי המוטנטים ומעכב את התפתחות ספורות המיקוריזה, גודלו הצמחים במערכת סטרילית עם מצע נוזלי שנאסף והוחלף מספר פעמים. הפרשות השורשים הופרדו על גבי קולונת C-18 על פי התמוססותם במתנול. פעילותם הביולוגית של חומרים אלו נבחנה במערכת סטרילית *in vitro* שפותחה במעבדתנו ומשמשת לקביעת אחוזי נביטת ספורות המיקוריזה. בסיום שני ניסויים עוקבים נמצא כי נביטת ספורות המיקוריזה

מעודדת בצמחי WT במקטעים שמוצו מהקולונה באמצעות 10 ו- 40% מתנול לעומת הנביטה שהתקבלה במוטנטים באותן פרקציות.

בנוסף, נבחנו הגרפים שהתקבלו מהפרדה של הפרשות השורשים באמצעות מכשיר HPLC, ונמצא כי עיקר השינויים בין שני המוטנטים לבין צמח הבר מצויים במקטע שיצא בין 0-10% מתנול. אי לכך, הוחלט לאסוף את המקטעים בטווח ריכוזים זה ולבחון את פעילותם הביולוגית. המבחן הביולוגי ששימש למטרה זו היה שיעור התפצלויות תפטיר פטריית המיקוריזה שגדל *in vitro* ללא נוכחות צמח. בניסויים אלו הוחלפו צמחי M161 בצמחי BC1 שהם צאצאים של צמח עמיד מדור F2 של הכלאה בין המוטנט M161 לבין WT (Back cross). מהתוצאות המובאות בטבלה מס' 5 ניתן ללמוד שהפרקציה של 10% מתנול מצמחי המוטנט גורמת לעיכוב ביצירת התפצלויות מסדר ראשון שני ושלישי בתפטיר הפטרייה. עוד ניתן ללמוד מטבלה זו שמיהול הפרקציה הנבדקת פי 5 ביטל עיכוב זה. מסקנת תוצאות אלו היא שהגורם לירידה בשיעור ההתפצלויות הוא חומר מעכב המופרש משורשי המוטנט.

טבלה מס' 5: מבחן ביולוגי לשיעור התפצלויות תפטיר פטריית המיקוריזה בנוכחות אקסודטים (מפרקציית 10% מתנול) של צמחי WT, BC1 ו-M20. הספורות הודגרו באינקובטור עם 2% CO<sub>2</sub> למשך 8 ימים לפני ביצוע המבחן. הערכים הינם ממוצע של שש חזרות עם שגיאת תקן. אותיות סטנות מציינות שונות מובהקת (Tukey-Kramer HSD test,  $P > 0.05$ ).

Treatment	Branches of the dominant germ tube			
	1 <sup>st</sup> order	2 <sup>nd</sup> order	3 <sup>rd</sup> order	4 <sup>th</sup> order
WT (1:1)	7.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	8.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	2.7 ± 1.0 <sup>b</sup>	0
BC1 (1:1)	4.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	0	0
M20 (1:1)	5.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.5	0
WT (1:5)	9.0 ± 0.8	10.6 ± 1.8	5.3 ± 2.1	0.6 ± 0.4
BC1 (1:5)	8.0 ± 1.1	9.8 ± 1.8	3.6 ± 1.1	0.4 ± 0.4
M20 (1:5)	7.0 ± 0.8	7.4 ± 2.2	3.4 ± 1.6	0
10% methanol	1.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	0	0

#### איפיון מעמיק למוטנט M161

מאתר ואיפיון מעמיק דורש היקף עבודה נרחב וזמן ארוך הוחלט להתמקד במוטנט M161 שבודד ראשון.

#### מבחני ספציפיות

רגישותו של צמח המוטנט M161 לשלוש פטריות מיקוריזה נוספות נבחנה במערכת דומה לזו שיושמה עם *G. intraradices*. צמחי WT נמצאו מודבקים בשלושת הפטריות *G. Mosseae*,

*Gi. Rosea* ו- *Gigaspora margarita* עם אחוזי הדבקה  $38 \pm 3.4$ ,  $23 \pm 5.5$  ו-  $55.5 \pm 4.8$  בהתאמה. ואילו צמחי M161 באותם תנאים הראו אחוזי הדבקה נמוכים יותר,  $2.5 \pm 1.4$ ,  $1.7 \pm 1.7$  ו-  $32.5 \pm 1.5$  בהתאמה, טבלה מס' 6. תוצאות אלו מראות כי העמידות של M161 איננה ספציפית לזן מיקוריזה אחד ונמצאות בקנה אחד עם חוסר הספציפיות שמאפיין את פטריות המיקוריזה בכלל.

טבלה מס' 6: שיעור הדבקה (%) של מידבק מלא (ספורות תפטיר וחלקי שורשים) של פטריות מיקוריזה שונות בצמחי WT, ו- M161 אחרי 6 שבועות של גידול. הערכים מייצגים ממוצע של שלוש חזרות ושגיאת תקן.

Fungi	Inoculum density (spores/plant)	WT	M161
<i>G. intraradices</i>	500	$87.5 \pm 5.3$	$1.9 \pm 0.9$
<i>G. mossea</i>	5000	$70.0 \pm 5.4$	$16.3 \pm 2.4$
	500	$38.8 \pm 3.4$	$2.5 \pm 1.4$
<i>Gigaspora margarita</i>	1000	$45.0 \pm 8.7$	$2.5 \pm 1.4$
	400	$23.0 \pm 5.5$	$1.7 \pm 1.7$
<i>Gi. rosea</i>	500	$55.5 \pm 4.8$	$32.5 \pm 1.5$

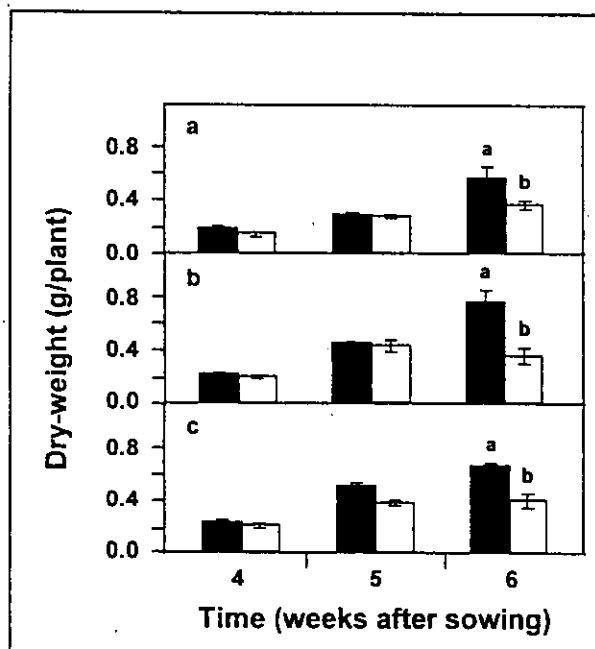
בנוסף נבדקה רגישותם של צמחי WT ו- M161 לפתוגנים שונים. צמחי WT נמצאו עמידים לפתוגנים *Verticillium dahliae* ו- *Fusarium oxysporum* race1 and 2. בשני המקרים צמחי M161 הראו עמידות בדומה לצמחי WT (תוצאות לא מוצגות). בדומה לכך, לא נמצאו הבדלים ברגישות לנמטודות *Meloidogyne javanica* ו- *M. incognita* (נבחנו לחומרת-מחלה בסולם של 0-5), בין צמחי WT ( $3.4 \pm 0.2$  ו-  $3.9 \pm 0.1$  בהתאמה) לבין M161 ( $3.1 \pm 0.1$  ו-  $3.6 \pm 0.3$  בהתאמה). תוצאות אלו מרמזות כי המוטציה בצמחי M161 יחודית לסימביוזה המיקוריזה.

#### איפיון פיסילוגי לצמחי M161

על מנת לבטל את האפשרות כי העמידות למיקוריזה בצמחי המוטנט נובעת מעיכובים שונים בתהליכים פיסילוגיים חיוניים לצמח, נבחנה יכולת הצמחים להידבק במיקוריזה בתנאי טמפרטורה והארה שונים.

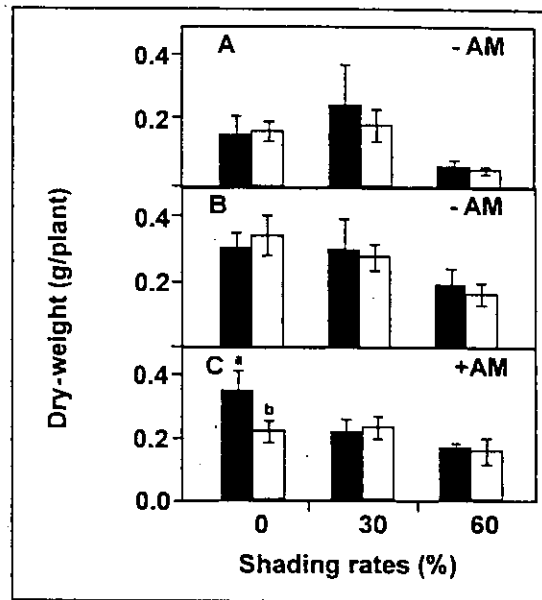
בניסוי שנעשה בו גודלו הצמחים בטמפי  $12/21^{\circ}\text{C}$ ,  $18/26^{\circ}\text{C}$  ו-  $21/29^{\circ}\text{C}$  (יום/לילה), נדבקו צמחי WT בשיעורים של  $48 \pm 5$  ו-  $68 \pm 5$  ו-  $52 \pm 8\%$  בהתאמה, ואילו צמחי M161 הראו אחוזי הדבקה שלא עלו על 2%.

שינויים בעוצמות אור תוך כדי הגברת הצל (0, 30 ו-60%), גרמו להפחתה באחוזי האיכלוס בצמחי WT ( $42 \pm 2$ ,  $12 \pm 4$  ו-  $22 \pm 3\%$  בהתאמה). בצמחי M161 לא נצפתה הדבקה בכלל. בנוסף לאחוזי הדבקה נקבע גם משקל יבש של צמחי WT ו-M161 בשני הניסויים. השפעת הטמפ' על המשקל היבש נצפתה בשני ניסויים נפרדים: מודבק ולא מודבק. בניסוי בו לא יושם מדבק מיקוריזה לא נמצא הבדל במשקל היבש של צמחי M161 לבין צמחי WT בכל הטמפ' שנבדקו. לעומת זאת בניסוי המודבק משקלם היבש של צמחי WT היה גבוה ממשקל צמחי M161 בכל הטמפ' שנבדקו במועד ההוצאה האחרון (גרף מס' 2).



גרף מס' 2: משקל יבש של צמחי WT (■) ו-M161 (□) בנוכחות פטריית המיקוריזה. הצמחים גודלו למשך 6 שבועות בטמפרטורות שונות; (a) 12/21°C יום/לילה, (b) 18/26°C יום/לילה ו- (c) 21/29°C יום/לילה. הערכים הינם ממוצע של חמישה צמחים והברים מציינים שגיאת תקן. אותיות קטנות מציינות שונות מובהקות (Tukey-Kramer HSD test,  $P > 0.05$ ).

בניסוי בו שונתה עוצמת האור לא נצפו הבדלים מובהקים בין WT לבין M161 בצמחים בהם לא יושם מידבק המיקוריזה. לעומת זאת, בצמחים בהם יושם המידבק, משקלם היבש של צמחי WT נמצא גבוה מהמשקל היבש של צמחי M161 וזאת בעוצמת האור המלאה (גרף מס' 3). המשקל הגבוה של צמחי WT הוא ככל הנראה תוצאה של איכלוס השורש במיקוריזה ( $42 \pm 2$ ), שלא אכלסה כלל את צמחי M161.

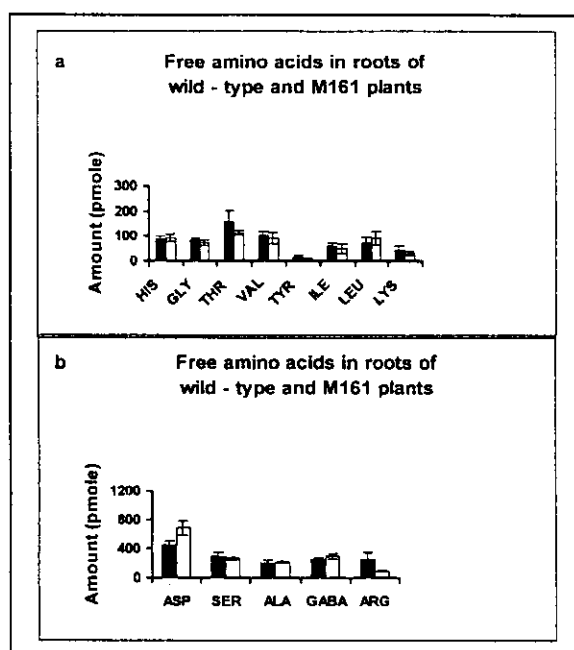


גרף מס' 3: משקל יבש של צמחי WT (■) ו-M161 (□) שגודלו למשך 6 שבועות במשטרי הצללה שונים (%). עוצמת ההארה המירבית היתה  $1500 \mu E s^{-1} m^{-2}$ . (A) שורשי WT ו-M161 בהעדר פטריית המיקוריצה, (B) עלוות WT ו-M161 בהעדר פטריית המיקוריצה, (C) עלוות WT ו-M161 בנוכחות פטריית המיקוריצה. העמודות הן ממוצע של חמש חזרות והברים מייצגים שגיאת תקן. אותיות קטנות מציינות הבדל מובהק בין הטיפולים (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

#### בדיקת המצב הביוכימי בצמחי M161

על מנת לאתר תכונה ביוכימית או פיסיוולוגית הקשורה לתכונת העמידות בצמח M161, נבחנו הצמחים במספר היבטים:

**תכולת חומצות אמינו חופשיות – שורשי WT ו-M161 גודלו למשך 6 שבועות בתנאי חממה בהעדר פטריית המיקוריצה.** חומצות אמינו חופשיות מוצו משורשי הצמחים והורצו על מכשיר HPLC במכון וייצמן למדע. התוצאות מציגות תכולת 18 חומצות אמינו ביחידות של pmol (גרף מס' 4). ארבע חומצות אמינו הראו רמה נמוכה מאוד בשני הקווים והחומצה האמינית GLU הראתה רמה גבוהה ושווה בשני הקווים. בגרף מס' 4 ניתן לראות כי אין הבדל מובהק בתכולת שאר 13 חומצות האמינו שנבדקו בצמחי M161 לעומת צמחי WT.



גרף מס' 4: חומצות אמינו חופשיות בצמחי WT (■) ו-M161 (□) בהעדר נוכחות המיקוריה. הצמחים גודלו למשך שישה שבועות. חומצות האמינו נמדדו ע"י HPLC ומוצגות ב- pmoles. a. חומצות אמינו בכמויות מזעריות. b. חומצאות אמינו שכיחות. הערכים הינם ממוצע של חמישה צמחים והברים מייצגים את שגיאת התקן.

**מינרלים** – צמחי M161 ו-WT גודלו למשך 6 שבועות בתנאי חממה ללא נוכחות המיקוריה. דוגמאות במשקל יבש של 200 מ"ג נלקחו מהעלווה ומשורשי הצמחים והוכנו לאנליזה באמצעות מכשיר ICP-AES spectrometry (צב"מ בפקולטה לחקלאות – האוניברסיטה העברית בירושלים). התוצאות בטבלה מס' 7 מראות כי אין הבדל מובהק בתכולת מינרלים בין M161 לבין WT, פרט לארבעה מינרלים (S ו-B, Co, Ca, P) שהיו נמוכים בכ-20% בצמחי M161 ביחס ל-WT. ירידה זו לא נמצאה משמעותית מבחינה פיסיוולוגית, אך מכיוון שידועה חשיבות הפוספט בסימביוזה המיקוריה, הוחלט לבחון השפעתו על ביסוס הסימביוזה בצמחי המוטנט. צמחי M161 ו-WT גודלו בתנאי חממה בריכוזים שונים של פוספט בנוכחות ובהעדר פטריית המיקוריה. לא נמצאה הדבקה בצמחי WT שטופלו בפוספט בריכוזים: 0 או 2 mM, ואילו בריכוזים 0.25, 0.5, 1 ו-1.5 mM נמצאה הדבקה של  $16 \pm 2$ ,  $39 \pm 23$ ,  $7 \pm 89$  ו- $6 \pm 14$ %, בהתאמה. לא נמצאה הדבקה בצמחי M161 בכל הריכוזים שנבדקו. תוצאות אלו מעידות כי רמה נמוכה של P בצמחי M161 איננה הסיבה לפנוטיפ העמיד.

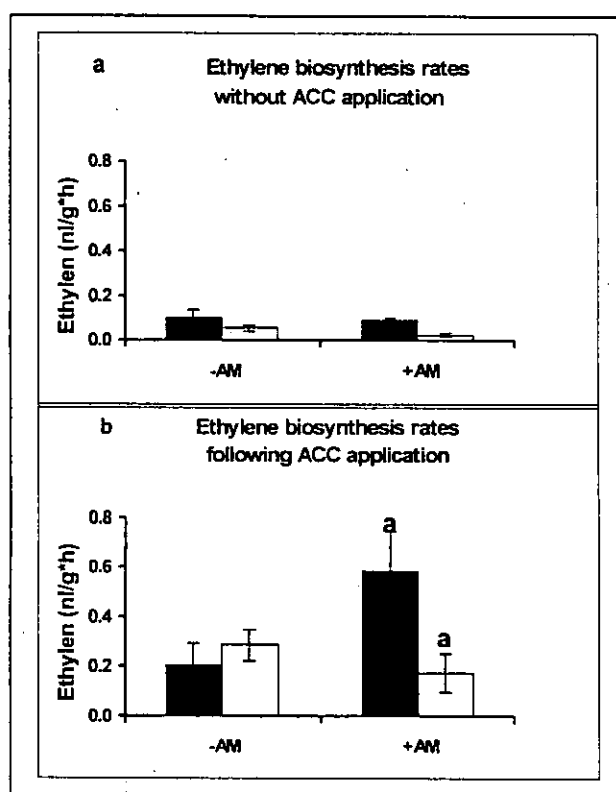


טבלה מס' 7: תכולת מינרלים (mg/kg dry weight) בצמחי WT ו-M161. בהעדר פטריית המיקוריוזה. כל ערך מייצג ממוצע של ארבעה צמחים. כוכבית (\*) מציינת הבדל מובהק בין WT לבין M161.

Mineral	Roots		Leaves	
	WT	M161	WT	M161
Ag	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Al	645 ± 58.7	680 ± 20	37 ± 3.5	129.5 ± 52.3
As	<1	<1	<1	<1
*B	21.8 ± 1.2	17.7 ± 0.9	33.8 ± 1.3	30 ± 1.8
Ba	47 ± 6.9	60 ± 10.2	18 ± 2.2	24 ± 2
*Ca	19175 ± 2537	12733 ± 590	14150 ± 1478	14675 ± 1220
Cd	<1	<1	<1	<1
*Co	3.25 ± 0.25	2.43 ± 0.12	1 ± 0	1.13 ± 0.13
Cr	2.75 ± 0.25	2.73 ± 0.15	1.5 ± 0.5	5 ± 3.7
Cu	32.3 ± 1.4	36 ± 3.1	34.8 ± 3	42 ± 14
Fe	850 ± 98.2	873.3 ± 107	1270 ± 745	1162.5 ± 371.6
Hg	<1	<1	<1	<1
K	60525 ± 2435	52667 ± 4708	53750 ± 2658	53250 ± 2364
Li	<1	<1	<1	<1
Mg	11400 ± 668	11300 ± 710	9700 ± 646	9775 ± 665
Mn	47.5 ± 3.3	37.7 ± 2.9	44 ± 3.3	74.8 ± 31.8
Mo	2.75 ± 0.25	3 ± 0	5.5 ± 0.65	8 ± 1.3
Na	6100 ± 81.7	5466.7 ± 296.6	3475 ± 1240	3300 ± 675
Ni	18.8 ± 5.4	15 ± 4.6	17.3 ± 7.1	45.8 ± 34.8
*P	1700 ± 40.8	1400 ± 57.8	2175 ± 292.6	2425 ± 137.7
Pd	<2	<2	<2	<2
*S	5100 ± 227.3	3966.7 ± 120.3	6050 ± 740	4950 ± 184.8
Se	<1	<1	<1	<1
Si	910 ± 53.4	976.7 ± 6.7	265 ± 22.2	402.5 ± 89.9
Sn	8.25 ± 4.9	3.67 ± 1.2	3 ± 0.6	7.75 ± 5.4
Sr	119.3 ± 7.3	108.3 ± 6.2	67.3 ± 8.1	73 ± 6.3
Ti	34.3 ± 7.6	29.7 ± 1.5	3 ± 0.6	7.8 ± 3.2
V	3.25 ± 0.25	2.67 ± 0.3	0.88 ± 0.13	1.13 ± 0.13
Zn	187.5 ± 22.1	166.7 ± 3.3	73.8 ± 4.9	91.5 ± 21.7

**אתילן** - מעורבותו של ההורמון אתילן בתהליכי הסימביוזה עדיין לא ברורה. על מנת לבחון את השפעתו או חיוניותו של האתילן לסיביוזת המיקוריוזה נעשה ניסיון בו יושם ACC (שהוא פרקורסור לאתילן) לצמחי M161 ו-WT בריכוז 0.1 mM כל חמישה ימים. לאחר 6 שבועות נבדקה נוכחות אתילן באמצעות Gas chromatography. בהעדר פטריית המיקוריוזה וללא טיפול ב-ACC לא נמצא הבדל מובהק בקצב יצירת אתילן בשורש בין M161 לבין WT. ואילו בנוכחות פטריית המיקוריוזה צמחי M161 יצרו אתילן בקצב איטי יותר מצמחי WT. (גרף מס' 5) טיפול ב-

ACC גרם לעלייה דומה בקצב יצירת האתילן בשני הקווים בהעדר פטריית המיקוריזה, ואילו בנוכחות פטריית המיקוריזה העלייה בקצב יצירת האתילן היתה משמעותית יותר בצמחי WT (גרף מס' 5). קצב יצירת האתילן בצמחי WT נובע כנראה מנוכחות פטריית המיקוריזה או מפטריית המיקוריזה עצמה. מאחר וצמחי M161 אינם מקיימים סימביוזה, לא נצפתה בהם עליה זו. מסקנת ניסוי זה היא כי מסלול ביוסינטזה של אתילן בצמחי M161 אינו פגוע.

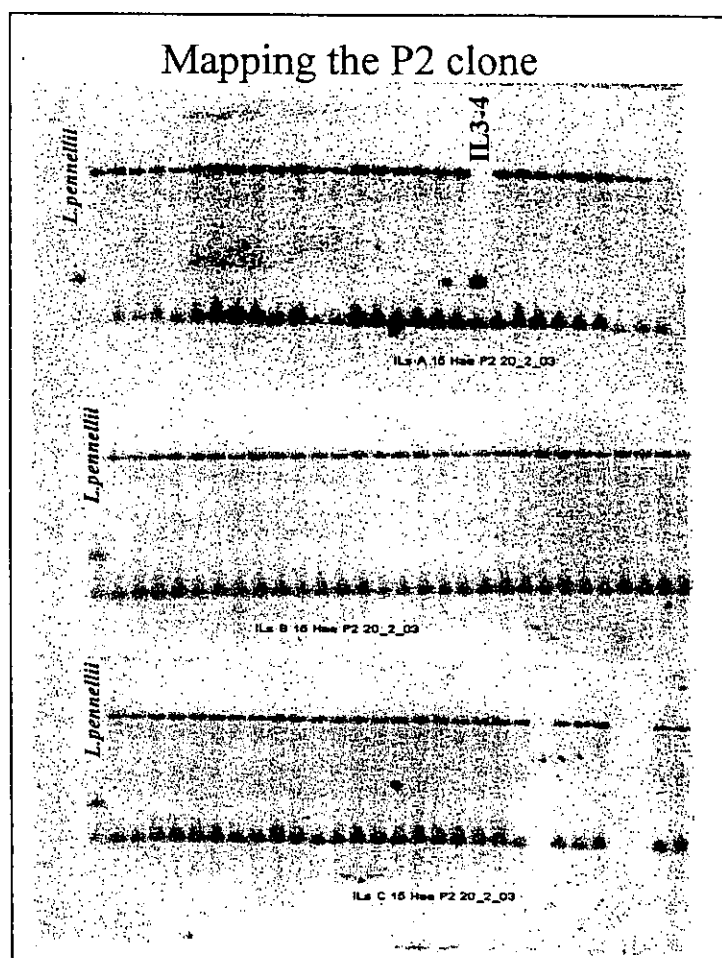


גרף מס' 5: קצב יצירת אתילן בצמחי WT ו-M161 בנוכחות והעדר פטריית המיקוריזה. השורשים הוכנסו למבחנות אטומות וקצב יצירת האתילן נמדד ( $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). a. ללא טיפול ACC, b. לאחר טיפול ב-ACC. הערכים הינם ממוצע של שלושה צמחים והברים מייצגים את שגיאת התקן. אותיות קטנות מייצגות הבדלים מובהקים (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

#### איתור סמן מולקולרי המתפלג בתאחיזה עם תכונות העמידות

במטרה למפות את הלוקוס האחראי על העמידות למיקוריזה בצמחי M161, הוכלאו צמחי המוטנט עם צמחי *L. esculentum* מהקו VF36. צאצאי F2 נסרקו לעמידות המיקוריזה ונמצאו מתפלגים 3:1. אנליזת AFLP נעשתה לקוי ההורים במטרה לקבוע את אחוז השונות ביניהם. נבדקו 22 זוגות תחלים שנתנו שונות של 7.1% בין שני קוי ההורים (תוצאות לא מוצגות). לאחר וידוי בדור F3, נבחרו 10 פרטים הומוזיגוטים עמידים ו-10 פרטים הומוזיגוטים רגישים. צמחים אלו שמשו ל-bulk segregant analysis. אנליזת AFLP נעשתה לשתי קבוצות אלו וסמן אחד (P2)

( שנבדל בין שתי הקבוצות נבחר למיפוי באמצעות קוי האינטרוגרסיה (באדיבותו של פרופ' דניאל זמיר, הפקולטה לחקלאות ברחובות, האוניברסיטה העברית בירושלים). סמן זה מופה באתר אחד על כרומוזום 3 מקטע מס' 4 בגנום העגבניה (תמונה מס' 4).



תמונה מס' 4: היברידיזציה של הסמן P2 עם סדרת קוי האינטרוגרסיה (ILs). DNA גנומי הופק מקוי האינטרוגרסיה, *L. pennellii* ו- *L. esculentum* cultivar M82, נחתך באנזים הרסטריקציה HaeIII והודגר עם הסמן P2 (100bp).

בנוסף, הוכנה אוכלוסיית F2 של הכלאה בין צמחי M161 לבין קו הבר *L. pennellii* שהשונות בינו לבין *L. esculentum* קרובה ל- 50%, דבר שמעלה באופן משמעותי את הסיכוי למצוא סמן שמתפצל בתאחיזה עם תכונת העמידות למיקוריה. באנליזת AFLP שנעשתה לאוכלוסיה זו נסרקו 32 זוגות תחלים שנתנו כ- 1000 פסים פולימורפים בין קוי ההורים (M161 ו- *L. pennellii*). באנליזה זו בודדו שני פסי DNA (B1, C2) שהופיעו בתאחיזה לתכונת העמידות למיקוריה. סמנים אלו מצויים ישמשו להמשך מיפוי התכונה.

## מסקנות והשלכתייה

בעבודה הנוכחית נמצאו שני מוטנטים עמידים לפטריית המיקוריצה. שני המוטנטים הומוזיגוטים רציסיבים ואינם אללים. שני המוטנטים הראו עמידות גבוהה למידבק של ספורות בלבד ועמידות חלקית למידבק מלא, אם כי לא ברמה שווה (M20 נמצא עמיד יותר למידבק מלא). עמידות זו הופרה כאשר נחשפו הצמחים לתפטיר שהגיע מצמח WT שגדל באותו עציץ. ממצאים אלו מצביעים על מגנוני בקרה שונים לצורות מידבק שונות, עובדה שלא היתה ידועה עד כה. מאיפיון מעמיק של המוטנטים ניתן להסיק כי הפרשות השורשים (אקסודטים) גורמות לעיכוב בהתפתחות פטריית המיקוריצה עוד בקרקע. איפיון ראשוני של האקסודטים באמצעות אנליזת HPLC מראה שונות בהרכב החומרים המופרשים מהשורש. בידוד, זיהוי ואיפיון חומרים אלו כרוך בעבודה רבה. בהמצא זיהויין של תרכובות אלו, ניתן יהיה לבחון את השפעתם גם על אורגניזמים אחרים כדוגמת פטריות קרקע ונוף פתוגניות. נוכחות תרכובות טבעיות המקנות עמידות כנגד פתוגנים בצמחים יקטין את השימוש בחומרי הדברה שונים המהווים כיום נזק אקולוגי.

בשנים האחרונות נתגלו מוטנטים רבים שאינם נדבקים במיקוריצה אך רובם ככולם משתייכים למשפחת הקיטניות (Marsh and Schultze, 2001). מוטנטים אלו מסייעים בחקירת מגנונים מולקולרים המבקרים את סימביוזת המיקוריצה, ואכן שני גנים הקשורים לביסוס הסימביוזה בודדו לאחרונה (Endre et al. 2002; Stracke et al. 2002). בעבודה זו בחרנו להתמקד בצמח העגבניה שהוא צמח יבול חשוב לחקלאות. מציאת סמנים מולקולרים ראשוניים הקשורים לסימביוזה מהווים פתח לאפשרות כי בעתיד יבודדו סמני DNA נוספים, ללא צורך בבידוד גנים, תהליך הכרוך בעבודה רבה וממושכת. סמנים אלו ישמשו בטיפול זני עגבניה לקבלת צמחים המקיימים את סימביוזת המיקוריצה באופן יעיל יותר, דבר שיאפשר להקטין את תצרוכת הדשנים בגידולים אלו.

שני המוטנטים שנמצאו ואופיינו במהלך עבודה זו מחזקים את ההנחה כי ביסוס סימביוזת המיקוריצה מבוקר גנטית ע"י הצמח, באמצעות שני גנים לפחות, ומהווים שלב מפתח לשלבי טרום-ההדבקה של הפטרייה (*pre-mycorrhizal infection, pmi*). מוטנטים אלו מהווים כלי חשוב בהבנת תהליכים המובילים לביסוס סימביוזת המיקוריצה בצמחים בכלל ומודל המאפשר חקירת יחסי צמח-מיקרואורגניזם ברמה הגנטית-מגנונית. ידע זה יאפשר התייחסות שימושית לתופעה הטבעית הן בטיפול צמחים חדשים לחקלאות וביצירת ממשקים מתחשבים אקולוגית בשמירת הקרקע והסביבה.

## רשימת ספרות

- Bethlenfalvay, G.J., Reyes-Solis, M.G., Camel, S.B., Ferrera-Cerrato, R. 1991. Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plants connected by a common mycorrhizal mycelium. *Physiol. Plant.* 82: 423-432.
- Bonfante-Fasolo, P. 1988. The role of the cell-wall as a signal in mycorrhizal associations. Page 219 in: *Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial*

- Symbiosis*, NATO ASI Ser., Vol. 17. S. Scannerini, D. C. Smith, P. Bonfante-Fasolo, and V. Gianinazzi-Pearson, eds. Springer-Verlag, Berlin.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., Kiss G.B.** 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. 417: 962-967.
- Eshed, Y. and Zamir, D.** (1995). An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enable the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*. 141: 1147-1162.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citerinesi, A.S., Logi, C.** 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol.* 125: 587-593.
- Marsh, J.F, and Schultze, M.** 2001. Analysis of arbuscular-mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytol.* 150: 525-532.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. and Levy, A.** (1997). A new model system for tomato genetics. *The plant J.* 12: 1465-1472.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczylowski, K., Parniske, M.** 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962.
- Yoram Kapulnik, Hanne Volpin, Hanan Itzhaki, Dana Ganon, Shmuel Galili, Rakefet David, Orna Shaul, Yigal Elad, Ilan Chet and Yaacov Okon.** (1996) Suppression of defense responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytol.* 133: 59-64

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה:

מטרות המחקר הושגו. בודדו שני מוטנטים ואופיינו גנטי. איפיון מעמיק קבע כי המוטנטים פגועים בשלב שלפני ההדבקה וכי האקסודטים שלהם גורמים לעיכוב בנביטת והתפתחות נבגי המיקוריצה. נעשה מיפוי ראשוני של המוטציה במוטנט אחד (M161) מפאת היקף העבודה הנדרש לשני המוטנטים.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:

בודדו שני צמחי עגבנייה עמידים לפטריית המיקוריצה. תכונת העמידות הינה רציבית ומתפצלת מנדלית. המוטנטים נמצאו פגועים בשלבים שלפני ההדבקה והוכח כי האקסודטים של המוטנטים גורמים לעיכוב בנביטת ספורות המיקוריצה וביצירת גופי הצמדה על גבי השורש. אוכלוסיות מיפוי שימשו למציאת סמני DNA שאחד מהם מופה על כרומוזום 3.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

מסקנת העבודה הנוכחית היא כי השלבים שלפני ההדבקה מבוקרים גנטית מצד הצמח על שני גנים לפחות. עובדה זו תסייע בפיתוח סמנים גנטיים שימשו בטיפוח צמחי עגבנייה שמקיימים את סימביוזת המיקוריצה באופן טוב יותר. עוד ניתן להסיק כי עיכוב פטריית המיקוריצה נגרם על ידי חומר המופרש מהשורש ומשפיע על הספורה הנובטת. זיהוי חומר זה יאפשר אנליזות שונות על פטריות ופוטוגנים אחרים.

הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן:

עבודה זו מהווה צעד ראשון והכרחי בבידוד גנים הקשורים לסימביוזת המיקוריצה. כמו כן, פתחה עבודה זו פתח למחקר שיבדוק את החומרים המופרשים מהשורש שגורמים לעיכוב בהתפתחות פטריית המיקוריצה ואולי פטריות אחרות.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח (פרסומים, הרצאות וימי עיון):

פרסומים:

Rakefet David-Schwartz, Hana Badani, Smadar Wininger, Avraham A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. (2001) Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not to extraradical hyphae. *The Plant Journal* 27:561-569.

Rakefet David-Schwartz, Vijay Gadkar, Smadar Wininger, Roza Bendov, Avi A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. Isolation of a *pre-mycorrhizal infection* (*pmi2*) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization.

*In press, MPMI.*

Vijay Gadkar, Rakefet David-Schwartz, Gerald Nagahashi, David D.Douds Jr, Smadar Wininger, Yoram Kapulnik. Root exudate of *pmi* tomato mutant M161 reduces AM fungal proliferation in vitro.

*Submitted to FEMS Microbiology Letters, February 2003.*

פרסום בכינוסים מדעיים:

Rakefet David-Schwartz, Avraham A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik.(1999) Identification and partial characterization of a non-mycorrhizal *Lycopersicon esculentum* mutant. Plant Genomic meeting, May 18-20. Tel-Aviv University, Maagan Holiday Village, Israel.

Rakefet David-Schwartz, Hana Badani, Smadar Vininger, Avraham A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. (2001) Isolation and characterization of a tomato mutant defective in pre-infection stages of plant-mycorrhizal symbiosis. Molecular Plant Microbe Interactions meeting, July 10-15. Madison Wisconsin, USA.

Rakefet David-Schwartz, Vijay Gadkar, Smadar Wininger, Roza Bendov, Edi Belausov, Avi A. Levy, Gad, Galili, Hana Badani and Yoram Kapulnik. Early events in plant-AM fungi interaction: The role of the host in the pre-infection stages. (2002) III Congress of the Israeli Society for Microbiology. February 18-19. Jerusalem, Israel.

Rakefet David-Schwartz, Vijay Gadkar, Smadar Wininger, Edi Belausov, Roza Bendov, Avraham A. Levy, Gad Galili and Yoram Kapulnik. Isolation and characterization of two tomato mutants blocked at the pre-infection stages of AM symbiosis. (2002) COST - ACTION 838. Managing Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Improving Soil Quality and Plant Health in Agriculture. October 10-12. Pisa, Italy.