

דוח מסכם לתכנית מחקר מספר 261090614

'סופר-פרוטר' - הערכה חקלאית של טיפוס מלון חדש superfruiter - agricultural evaluation of a new melon type

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
על ידי

תדמור יעקב, קציר נורית, לוינסון אפרים, מאיר איילה, סער עוזי, באומקולר פביאן, בורגר יוסף.
נוה יער, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי.

Yaakov Tadmor, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Newe Ya'ar.

tadmory@agri.gov.il

Nurit. Katzir, Dept of Genetics and Vegetable Crops, Newe Ya'ar, katzir@agri.gov.il

Efraim Lewinsohn, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Newe Ya'ar.

twefraim@volcani.agri.gov.il

Ayala Meir, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Newe Ya'ar. meira@agri.gov.il

Uzi Sa'ar, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Newe Ya'ar

Baumkoler Fabian, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Newe Ya'ar

Yosef Burger, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Newe Ya'ar. burglary@agri.gov.il

תקציר

הצגת הבעיה

בסריקה של מוטנטים מושרים במלון התגלה מוטנט רצסיבי ייחודי המייצר פי חמש ואף יותר פירות מטיפוס הבר. הפירות קטנים, כשליש מגודל הפרי של טיפוס הבר, וחסרי זרעים. המוטציה כונתה (*sf*) *superfruiter* והיא יכולה לשמש בסיס לפיתוח טיפוס מלון חדש. המחקר בחן את הפוטנציאל החקלאי של *sf*.

מטרות המחקר היו

1. בחינת השפעת מוטציית *sf* על היבול של טיפוס מלון שונים
2. בחינת השפעת מוטציית *sf* על איכות הפרי של טיפוס מלון שונים
3. בחינת השפעת המוטציה *sf* על ריכוז היבול בטיפוסי מלון שונים
4. בחינת הקשר בין ריבוי הפירות להיעדר הזרעים במוטציית *sf*

שיטות העבודה

1. מבחן שדה של אוכלוסיות F2 בהן אחד ההורים הוא *sf*. בחינת יבול ומרכיביו.
2. בחינת איכות פרי הכוללת: קרוטנואידיים (HPLC), מוצקים מסיסים (רפרקטומטר) וטעם (אורגנורפטי-סובייקטיבי)
3. רישום פרחי נקבה לאורך התפתחות הצמחים
4. בירור המנגנון הגנטי של התכונה *sf*.

תוצאות עיקריות

1. sf מוריד באופן מובהק את משקל הפרי, מגדיל באופן מובהק את מספר הפירות ובסופו של דבר מעלה את היבול באופן מובהק ללא פגיעה באיכות הפרי.
2. בהשוואה של קווים איזוגניים לא נמצאה פגיעה בהצטברות הקרוטנואידים, כלל מוצקים מסיסים (TSS) ובתחושת הטעם. באוכלוסיות המתפצלות השונות ניתן היה לאתר פרטים איכותיים מאוד.
3. סופר מגדיל באופן מובהק את מספר החנטים בגל הפריחה הראשון אולם עיקר התרומה שלו הינה לגל הפריחה השני.
4. הגן האחראי לתכונה sf הינו פקטור שעתוק המשפיע על ביטוי גנים נוצלאריים ופוגע בהתפתחות העובר. לפיכך לא מתפתח זרע פורה, נמנעת גדילת הפרי ולא מועבר סיגנל מדכא התפתחות פרי לפרח הנקבה הבא על הענף.
5. פותח סמן יעיל לתכונה.
6. נרשם PCT/IL2015/050252

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות

1. sf יכול לאפשר פיתוח של טיפוס מלון חדש ואטרקטיבי
2. אנו מפתחים חומר טיפוחי שיאפשר ריבוי זני sf בעיקר מזרעים.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדו"ח המדעי

1. דני זמיר (הפקולטה לחקלאות), 2. יוני אלקינד (הפקולטה לחקלאות), 3. אילן לוין (מכון וולקני)

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים

ספטמבר 2015

אלול ה'תשע"ה

חתימת החוקר

מבוא

שווקי התוצרת החקלאית המודרניים מחפשים באופן מתמיד טיפוסים וסוגי פירות חדשים. פירות קטנים, אישיים הם מוצר נדרש בכל סוגי הפירות והירקות כאשר הבעיה המרכזית בטיפול לכיוון זה היא הפחתת היבול הקשורה בו. כדרך ליצירת שונות חדשה במלון בצענו מוטגנזה כימית של זרעי מלון ובחנו הפעת טיפוסים צמח ופרי חדשים. אחת המשפחות התפצלה לתכונה אותה כינינו סופר-פרוטר (sf). טיפוס מלון ייחודי זה עשוי ליצור מהפכה בשווקי המלונים כי הוא נושא שתי תכונות מרתקות: הקטנת הפרי ללא פגיעה משמעותית ביבול או באיכות ופרתנוקרפיה, שתאפשר ייצור פירות ללא זרעים, תכונה חדשנית ומפתה לשוקי הפירות. תכונה זו ברקע של זן החונט ללא הפריה עשויה ליצור שילוב ייחודי המתאים לגידולי חממה.

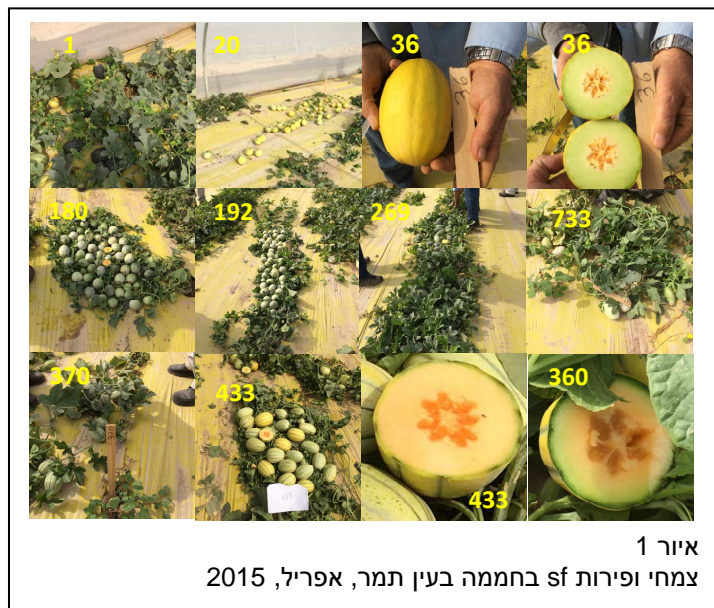
מטרות המחקר היו לאפיין את sf מבחינה חקלאית ואיכותית כדי לבחון את הפוטנציאל החקלאי שלו וליצור את התשתית הטיפוחית והמחקרית הנחוצה לפיתוח מוצרים חדשים המבוססים עליו.

המחקר הניח כי: 1. שימוש בגן sf יאפשר פיתוח מוצר חדש בשוק הפירות והירקות: מלון מיני (אישי) חסר זרעים בעל יבול משופר, 2. למוטציה sf פוטנציאל רחב יותר כולל יצירת מוטציות דומות בגידולים נוספים ושימושים טרנסגניים.

תוצאות

ביצועי הצמחים בשדה ובחממה פורטו בדו"ח המדעי של השנה השנייה. בשנה השלישית בחנו ביצועי אוכלוסיות נוספות והתוצאות חזרו על עצמן: sf מעלה יבול בצורה משמעותית, ממוצע השיפור ביבול הוא מעל 40% אבל ניתן לאתר טיפוסים עם שיפור יבול של 100%, ללא פגיעה באיכות הפרי.

הגורם המרכזי המונע פריצה לשוק של טיפוסים sf הוא נושא הריבוי, מאחר ו-sf לא מייצר זרעים חיוניים. בשיתוף עם חברת חישתיל ניסינו לפתח מוצר המתבסס על ריבוי וגטטיבי. נבחרו פרטים מצטיינים מאוכלוסיות F2 ומהם פותחו ייחורים שנשתלו בסוף החורף בחממות בערבה הצפונית (עין תמר). נצפו צמחים בעלי יבול אדיר ואיכות פרי סבירה (איור 1), אולם כמויות השתילים שניתן לפתח מצמח אם מוגבלות, קיימת בעיה עם פיתוח ייחורים מצמחים בוגרים

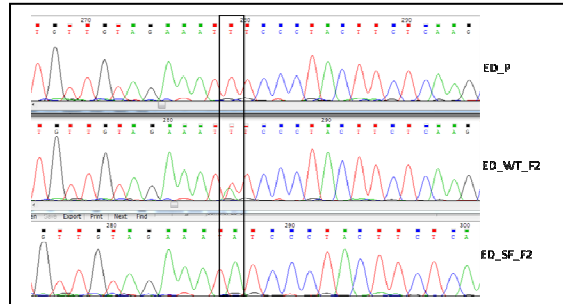


ואין למוצר שכזה אופק כלכלי ראוי.

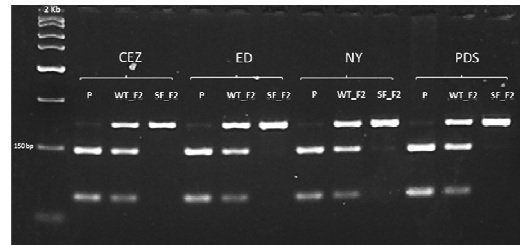
פריצת הדרך נעשתה כאשר מצאנו את הגן ופיתחנו סמן גנטי יעיל לתכונה superfruiter.

sf זיהוי הגן

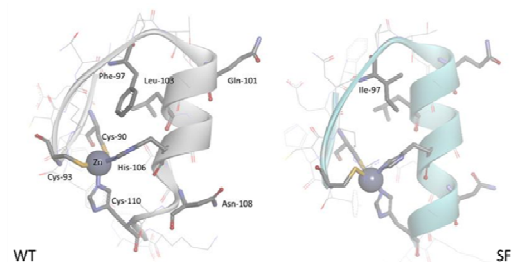
מאחר ולא היה לנו גן מועמד לתכונה הייחודית שמצאנו נקטנו בגישה של אנליזת ריצוף RNA של צברים (BSR-Seq) של רקמות מטיפוסי הצמח השונים שהתפצלו בשלוש אוכלוסיות בלתי תלויות. נאספו קודקודי צמיחה, גבעולים, עלים, פרחים וחנטים צעירים (5-7 ימים לאחר ההפרייה) משלושים פרטים שהראו מופע *sf* ומשלושים פרטים שהראו את המופע של טיפוס הבר משלש אוכלוסיות F₂ שמקורן בהכלאה של צמח *sf* המקורי (מוטנט ברקע של הקו CEZ) כזכר עם הקו CEZ, עם NY ועם ED. מכל אחד מצירופי הרקמה גנוטיפי הופק RNA ובנו שלוש חזרות ביולוגיות של צברי הרקמות של הגנוטיפים *sf* וטיפוס הבר (wild-type) בכל אחת משלושת האוכלוסיות. הצברים עברו אנליזת ריצוף (RNA-Seq). אנליזת הרצפים זיהתה כי בכל האוכלוסיות הנבדקות עיקר ה-SNP מרוכזים ב-scaffold 11 (כרומוזום 4). בגן MELO3C009603 המקודד לפקטור שעתוק מטיפוס C2H2 עם אצבע אבץ (Zinc finger) נמצא SNP שמבדיל בין כל הפנוטיפים. תוצאה זאת וודאה בעזרת ריצוף ישיר של הגן ברקעים גנטיים שונים (לדוגמא, איור 2). זיהוי ה-SNP איפשר לנו לפתח סמן גנטי בעזרתו אנו יכולים לזהות את הגנוטיפ של הצמח כבר בשלב הנבט (איור 3). החלפת T ב-A ב-DNA גרמה לשינוי החומצה האמינית פנילאלנין בעמדה 97 של החלבון באיזולאוצין. החלפה זאת גרמה לשינוי מבנה של 'אצבע האבץ' (איור 4). אנליזת ה-BSR-Seq בצירוף אנליזת RT-PCR של הרקמות השונות הראתה כי שינוי המבנה של חלבון ה-*sf* גרם לשינוי בתבנית הביטוי של גנים שונים, הבולטים מביניהם היו שני גנים נוצלריים המתבטאים באופן ספציפי רק בפרי הצעיר בטיפוס הבר וכמעט ואינם מתבטאים ב-*sf* (איור 5).



איור 2
דוגמת כרומוטוגרמת הריצוף של ה-SNP בעמדה 3,450,971 ב-scaffold 11. מימין לכל רצף מצוין שם הצבר שממנו נלקחה דוגמת הריצוף כאשר הרצף העליון הוא של קו ההורה ED, הרצף האמצעי הוא של קבוצת הגנוטיפ WT בדור F₂ והרצף התחתון הוא של הגנוטיפ *sf* בדור F₂.

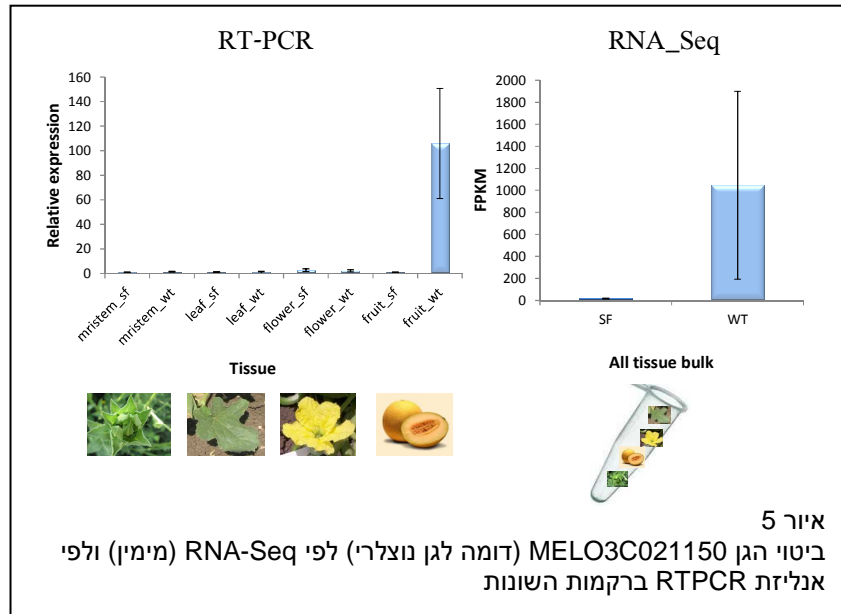


איור 3
ראקציית חיתוך עם האנזים Apol של SNP בעמדה 3,450,971 ב-scaffold 11. שם האוכלוסייה מופיע בחלק העליון, בכל אוכלוסייה מוצגים תוצרי חיתוך של קו ההורה - P, צבר קבוצת הגנוטיפ WT וצבר הגנוטיפ *sf*.



איור 4
מודל חזוי של מבנה מוטיב ה-C2H2 בחלבון *sf*. טיפוס הבר WT (משמאל) והמוטנט *sf* (ימין). מסומנים בטיפוס הבר ציסטאין 93 ו-90 והיסטידין 106 ו-110 הקשורים לאבץ (Zn), פנילאלנין 97 וליאוצין 103 היוצרים קשר מימני המייצב את האצבע וממצב את גליצין 101 ואת אספרגין 108 במקומם. החלפת פניל אלנין 97 באיזולאוצין ב-SF משנה כנראה את המבנה המרחבי של האצבע ומכאן את התפקוד שלה

העובר, בעקבותיה להפסקה בהתפתחות הזרע, בעקבות כך לא מיוצר סיגנל להתארכות התאים והפרי נשאר קטן ולא נשלח סיגנל לנקבה הבאה על הענף הווא מצליחה לפתח פרי נוסף. זה הוא כנראה הגורם למופע *sf*.



העתיד של *sf*

בעזרת הסמן הגנטי שפתחנו אנו מעוניינים עכשיו לטפח טיפוסים מלון נבחרים על ידי הכלאות מחזירות לטיפוס המלון הרצוי תוך שמירה על הטרנזיגוטיות לתכונה *sf*. לאחר מספר דורות של הכלאות מחזירות נוכל לפתח מלון *sf* מטיפוס נתון בעל אחדות גבוהה על ידי הכלאה עצמית של הפרט הטרנזיגוטי ובחירה של כרבע מהצאצאים ההומיגוטיים *sf* בעזרת הסמן או על ידי הכלאה של טיפוס *sf* כזכר עם נקבות הטרנזיגוטיות ובחירה של כמחצית מהצאצאים ההומיגוטיים *sf* בעזרת הסמן. אנו מנסים עכשיו לגייס כספים להעמדת התוכנית הזאת.

סיכום עם שאלות מנחות

| |
|---|
| מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. בחינת השפעת מוטציית <i>sf</i> על היבול של טיפוסי מלון שונים 2. בחינת השפעת מוטציית <i>sf</i> על איכות הפרי של טיפוסי מלון שונים 3. בחינת השפעת המוטציה <i>sf</i> על ריכוז היבול בטיפוסי מלון שונים 4. בחינת הקשר בין ריבוי הפירות להיעדר הזרעים במוטציית <i>sf</i> |
| עיקרי הניסויים והתוצאות. |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. אנליזה של פרטים מאוכלוסיות מתפצלות שונות הראתה כי <i>sf</i> מוריד באופן מובהק את משקל הפרי, מגדיל באופן מובהק את מספר הפירות ובסופו של דבר מעלה את היבול באופן מובהק ללא פגיעה באיכות הפרי. 2. בהשוואה של קווים איזוגניים לא נמצאה פגיעה בהצטברות הקרוטנואידים (HPLC), כלל מוצקים מסיסים (TSS) ובתחושת הטעם. באוכלוסיות המתפצלות השונות ניתן היה לאתר פרטים איכותיים מאוד. 3. ספירת החנטים והפירות לאורך עונת הגידול הראתה כי <i>sf</i> מגדיל באופן מובהק את מספר החנטים בגל הפריחה הראשון אולם עיקר התרומה שלו הינה לגל הפריחה השני. 4. הגן האחראי לתכונה <i>sf</i> הינו פקטור שעתוק המשפיע על ביטוי גנים נוצלאריים ופוגע בהתפתחות העובר. לפיכך לא מתפתח זרע פורה, נמנעת גדילת הפרי ולא מועבר סיגנל מדכא התפתחות פרי לפרח הנקבה הבא על הענף. 5. פותח סמן יעיל לתכונה. |
| מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח? |
| <p>מטרות המחקר הושגו עד כה במלואן. אנו מחפשים משקיע שיסייע במימוש הממצאים שלנו ובהפיכתם למוצר מסחרי.</p> |
| בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר? |
| <p>מטרות המחקר הושגו במלואן. אנו עוסקים כעת בנסיון לגיוס כספים שיאפשרו את מסחור הממצאים שלנו. 'קידום' מנהלת משא ומתן לחתימת הסכם פיתוח משותף עם יזם פרטי</p> |
| <p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p> |
| הוגש PCT/IL2015/050252 |
| פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות) |
| < רק בספריות |
| < ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) |
| < חסוי – לא לפרסם |