

דוח סופי לתוכנית מחקר מספר 261-077

שיפור טעם הפרי ע"י אגירת חומצות בעגבניה

IMPROVING TOMATO FLAVOR BY ORGANIC ACID ACCUMULATION

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ארי שפר, ילנה יסלסון, מרינה פטריקוב, שמואל שן

מחלקה לחקר ירקות, מנהל המחקר החקלאי

Arthur Schaffer (vcaris@agri.gov.il), Yelena Yeselson, Marina Petrikov, Shmuel Shen

Department of Vegetable Research, ARO, Ministry of Agriculture, POB 6, Bet Dagan

מאי 2014

אייר תשע"ד

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר _____

תקציר

רמת החמיצות בפרי הבשל בעגבנייה משפיע על טעם הפרי. הצלחנו לזהות גן הקובע את רמת החמיצות בעגבנייה. הגן מקודד למשפחה חדשה של נשאים ממברנליים של פרוטונים והשתקתו בפרי עגבנייה גרמה לביטול החמיצות בפרי. בדיקות מטבולומיות של הפירות הלא חמוצים לעומת הפירות החמוצים גילה שלנשא יש תפקיד בהעברת פרוטונים, חומצות קרבוקסיליות ונוקליאוטידים בפרי. זיהוי גן האחראי לחמיצות בפרי העגבניה פותח את האפשרות לחפש ולזהות שונות גנטית טבעית בתוך משפחת העגבניה כדי לטפח עגבניות בעלי רמות חמיצות שונה.

מבוא

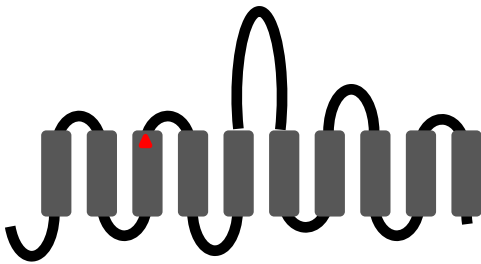
טעם הפרי בעגבנייה מושפע מאד מרמת החמיצות בפרי הבשל. עד היום קשה לשלוט על רמת החמיצות בעגבנייה ברמה הגנטית עקב העדר של שונות גנטית לחמיצות גבוהה בעגבנייה וחסור הבנה של הבקרה הגנטית של המסלול המטבולי של אגירת חומצות בפרי. בעצם, ללא זיהוי גן האחראי לחמיצות הפרי קשה לאתר שונות גנטית לתכונה.

מטרות המחקר

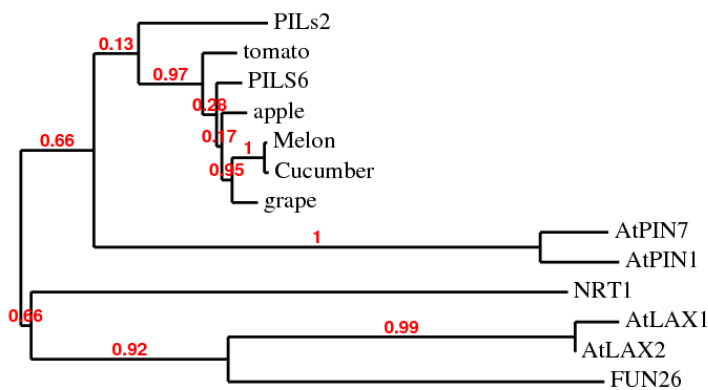
מטרת המחקר היא לפתח הכלים הגנטיים והמולקולריים שיאפשרו שליטה על התכונה של חמיצות הפרי בעגבנייה על ידי זיהוי גן בעגבנייה שמקודד לחלבון ממשפחת הנשאים שנמצא כקובע רמת החמיצות במלון. היפותיזת העבודה הייתה שגן כזה בעגבנייה שולט על רמת החמיצות בעגבנייה כמו שהגן המקביל לו שולט על חמיצות במלון.

פירוט עיקרי הניסויים

בשנה הראשונה הצלחנו לאפיין הגן הקובע חמיצות בעגבנייה אחרי שגילינו אורתולוג של הגן בתוך השונות הגנטית הטבעית של מלון. באיור 1 מובא בצד ימין מודל של הנשא שמראה 10 איזורים (באפור) שעוברים דרך הממברנה של התא וצורה זו אופיינית לנשאים שמעבירים פרוטונים, בדרך כלל בליווי מטבוליטים נוספים.



בניית עץ פילוגנטי מסביב הגן ממלון ועגבנייה מראה קרבה גדולה בין פאראלוגים שמתבטאים בפירות



1.

שונים, כולל תפוח, ענבים ומלפפון, שכולם צוברים חומציות במהלך התפתחותם. הגן גם מראה קרבה לגנים המקודדים למשפחות שונות של ושל LAX PIN הנשאים של אוקסין) אבל הזהות לא NRT1 נוקליאוסידיים מספיק קרוב כדי לשייך תפקיד לנשא. איור 2 מראה את משפחת הגנים הנמצאים בכל עולם הצמחים ומתבטאים במיוחד בפירות. על סמך הקרבה הזאת יצאנו לחפש את הגן המקביל בעגבנייה.

אחרי שזיהינו את הגן בעגבניה בדקנו האם הוא אכן משפיע על רמת החמיצות בפרי עגבניה. כדי

לבחון את מעורבות הגן ביצענו

ניסויי השתקה של ביטוי הגן

תחת הפרומוטור 35 עם

מערכת השתקה של הניבל.

אכן, בהשתקת הגן בעגבניה

קיבלנו פירות עם רמה נמוכה

מאד של חומצות ועם PH של

מעל 5.0, במקום PH של

4.0~ בעגבניה ללא השתקת

הגן (איור 3). בנוסף ביצענו

השוואה מטבולומית בעזרת

GCMSI LCMS של העגבניות

השונות וגילינו שהמטבוליטים

היחידים שמשתנים בעקבות

ביטוי הגן הם חומצות

האורגניות (בעיקר חומצות

ציטראט ומאלאט) וגם,

להפתעתנו, גם הנוקליאוסידים אדנוזין ויורידין (איור 3 E, H).

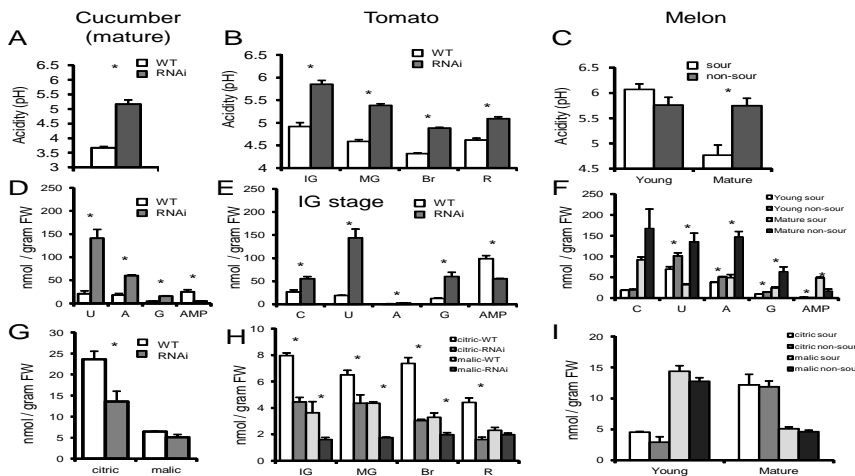


Fig. 2. Metabolic changes in fruit with altered PH expression. (A, D, G) Mature cucumber fruit; (B, E, H) tomato fruit; and (C, F, I) sour and non-sour melon genotypes ('PI414723' and 'Dulce', respectively). (A, B, C) show the pH values of fruit; (D, E, F) show the nucleoside and AMP levels; (G, H, I) show the citric and malic acid levels. Student's *t*-test results for significance ($P < 0.05$; $n = 3$ for tomato and melon, $n = 2$ for cucumber) are marked with an asterisk. daa, days after anthesis; FW, fresh weight; IG, immature green; MG, mature green; Br, breaker; R, red; C, cytidine; U, uridine; A, adenosine; G, guanosine. Additional metabolites and developmental stages (for tomato nucleosides and AMP) are presented in fig. S6.

כדי לבחון אם החלבון שמקודד על ידי הגן משמש כנשא לחומצות ו/או לנוקליאוסידים ביטאנו את הגן

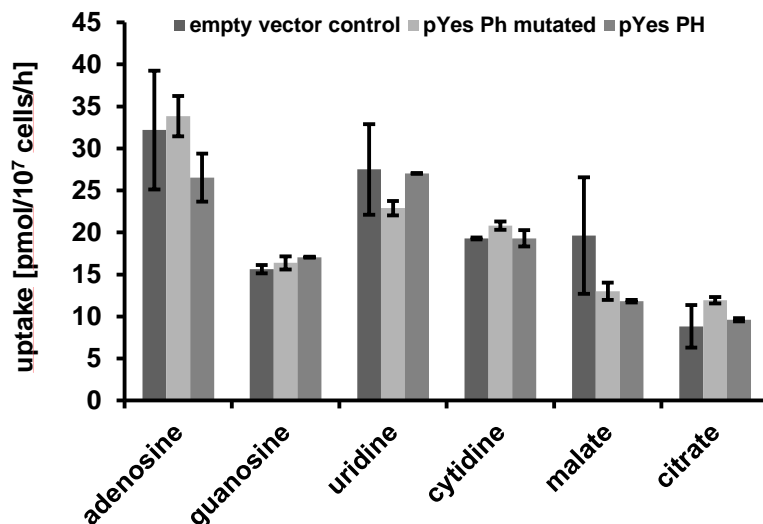
בשמר ובדקנו השפעת הגן על

קליטת חומצות ונוקליאוסידים

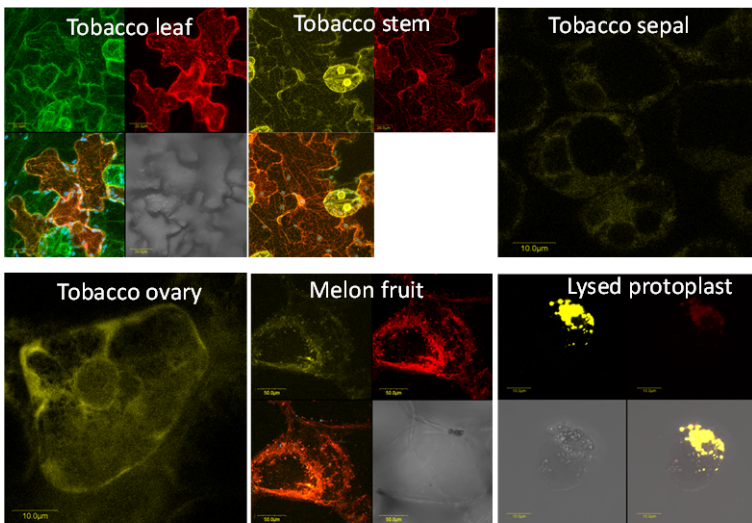
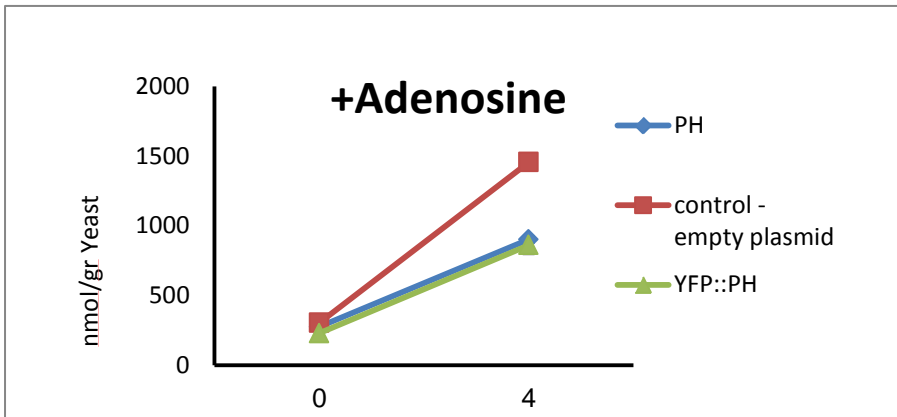
(איור 4). תוצאות הניסויים

הראו שהחלבון לא פועל כנשא

של חומרים אלו.



אבל ניסויים נוספים עם שמרים אלו אכן הראו שהגן משפיע על ההומיוסטזה של הנוקליאוסידים (איור 5). לתופעה זו אין לנו עדיין הסבר שמניח את הדעת.



כדי לשפוך אור על תפקיד הנשא ביצענו ניסויים כדי לזהות את מיקומו בתא. ביטאנו הנשא יחד עם גן מדווח GFP ברקמות שונות, בטבק ובפרי והוכחנו שהנשא ממוקם ב-ER של התא. למרות שציפינו למיקום בטונופלסט או בפלסמה-ממברנה, קיימים נשאים שאכן ממוקמים ב-ER (איור 6).

Fig. S5. Organellar localization of PH protein. PH-YFP (green) expression in stable transgenic tobacco. Transient HDEL-RFP expression is in red. The combined fluorescence is in orange. (A) leaf epidermal cells; (B) stem cells; (C) sepal cells; (D) immature seed in ovary; (E) transient PH-YFP and HDEL-RFP co-expression in young melon fruit. The micrograph of melon fruit is a 3-D reconstruction. Note the ER-like cytoplasmic strands in all the micrographs. (F) PH-YFP (Yellow) in lysed tobacco protoplasts showing the fluorescence in the cytoplasmic components attached to the vacuole but not on the tonoplast membrane.

Tobacco stem

דיון והמשך המחקר

בתוכנית זו הצלחנו לזהות ולאפיין את הגן הראשון שקובע רמת החמיצות בפרי עגבניה. בינתיים גרמנו לשונות גנטיות בחמיצות של הפרי על ידי השתקת ביטוי הגן. בעתיד נחפש שונות גנטיות טבעית לביטוי הגן, בין במיני בר של עגבניה ובין באוספים גנטיים של המין עצמו, שנוכל איתם לנהל תוכנית טיפוח ע"י גנטיקה קלאסית.

בנוסף עגבניות אלו ישמשו ככלי מחקר וכמודל לחיפוש גנים נוספים המעורבים בקביעת החמיצות בפרי על ידי אפיון הגנים האחרים שביטויים מושפעים על ידי ביטוי הגן לחמיצות.

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.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
איתור גנים הקובעים את רמת החמיצות בפרי עגבניה
עיקרי הניסויים והתוצאות.
- זיהוי גן עיקרי לקביעת חמיצות בעגבניה - הכנת עגבניות עם הגן מושתק כדי לבטל את חמיצות הפרי
מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
נמצא גן עיקרי הגורם לצבירת חמיצות בפרי עגבניה ושכנראה מעורב בהעברת פרוטונים
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?
איך משפיע ביטוי הגן וחמיצות הפרי על גנים אחרים שמעורבים בהומיוסטזה של חמיצות בפרי
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט 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.
מאמר התקבל ב NATURE COMMUNICATIONS
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים