

דו"ח לשנת 2010 למחקר מספר 10-0253-430

אפיון זן רוקולה מוטנטי בעל פריחה מאוחרת והשתמרות איכותית לאחר הקטיף והתאמתו ליצוא ימי

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

ע"י

דוד קניגסבוך	המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי
דניאל צ'לופוביץ'	המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי
דליה מאורר	המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי
ציון אהרון	המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי
ויקטור רודוב	המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי
יעקב וינוקור	המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי

David Kenigsbuch, Dept. of Postharvest science, ARO, Volcani Center, P.O.B.6 Beit Dagan 50250.
Email: davke@volcani.agri.gov.il

Daniel Chalupowicz, Dept. of Postharvest science, ARO, Volcani Center, P.O.B.6 Beit Dagan 50250.
Email: chalu@volcani.agri.gov.il

Dalia Maurer, Dept. of Postharvest science, ARO, Volcani Center, P.O.B.6 Beit Dagan 50250.
Email: daliam@volcani.agri.gov.il

Zion Aharon, Dept. of Postharvest science, ARO, Volcani Center, P.O.B.6 Beit Dagan 50250.
Email: Aharont@volcani.agri.gov.il

Victor Rodov, Dept. of Postharvest science, ARO, Volcani Center, P.O.B.6 Beit Dagan 50250.
Email: vrodov@volcani.agri.gov.il

Yaacob Vinokur, Dept. of Postharvest science, ARO, Volcani Center, P.O.B.6 Beit Dagan 50250.
Email: yvinokur@volcani.agri.gov.il

יולי 2011

תמוז תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר

תקציר

על בסיס הרצף הגנטי של צמח הארבידופסיס בודדו ע"י ריאקציות PCR קטעי גנים מרוקולה המעורבים בבקרת הפריחה, בסינתזת אתילן ובמעבר הסיגנל שלו. לקטעי הגנים האלה נמצאה הומולוגיה מעל 80% לאלו מארבידופסיס. אנליזות ראשוניות לבקרת הביטוי של גנים אלה בזני הרוקולה רוק-עד והמסחרי הראו כי רמת הביטויים משתנה מעלה צעיר לבוגר. כמו כן נמצא הבדל בין הזנים ברמת הביטוי של גנים מסוימים.

אנליזות ביוכימיות לעלי הרוקולה הראו כי קיימים לפחות שישה חומרים הקשורים לגופרית ומתוכם שלושה גלוקוזינולאטים להם מייחסים חשיבות קולנירית ובריאותית. מצאנו כי כמותם משתנה עם גיל העלה. בסדרת ניסויים ראשונה בהם נעשתה סימולציה למשלוח ימי וחיי מדף של רוקולה מהזנים המסחרי ורוק-עד, ראינו כי כושר ההשתמרות המשופר של הזן רוק-עד משפיע גם על השתמרות טובה יותר של חלק מהגלוקוזינולאטים לעומת הזן המסחרי. האנליזות נעשו בעזרת ה-GCMS לאפיון החומרים הנדיפים - האיזותיאוציאנטיים, תוצרי פירוק אנזימטי של הגלוקוזינולאטים. אנו מתכוונים בהמשך לאפיין בצורה מדויקת יותר את כושר השתמרותם של חומרי בריאות בזן רוק-עד כגון אנטיאוקסידנטיים וגלוקוזינולאטים. כמו-כן בכוונתנו להמשיך לאפיין את ההבדלים בבקרה הגנטית וברמת התבטאותם של גנים המעורבים בבקרת הפריחה ובתהליך ההתכלות שלאחר הקטיפה כדי שניתן יהיה להגן על הזן רוק-עד.

מבוא ותיאור הבעיה

צמח הרוקולה (*Diplotaxis tenuifolia*) ממשפחת המצליבים הינו אחד מגידולי העלה החשובים לשוק מקומי וליצוא. עיקר הגידול כיום נעשה בחורף, ועם המעבר לתקופת האביב והקיץ היקף הגידול יורד משמעותית שכן הצמחים בתקופה זו מגיעים לפריחה תוך זמן קצר וניתן לקבל יכול של קציר אחד או שניים בלבד במקום יכול של מספר קצירים הקיים בחורף. נעשים מאמצים רבים על-מנת למצוא ולטפח זנים בעלי פריחה מאוחרת. לאחרונה אף בחנו זן רוקולה מאחר פריחה, אך נמצא כי איכותו הקולינרית והשתמרותו לאחר הקטיפה אינם עומדים ברמה הנדרשת. זרעי רוקולה מסחריים עברו במעבדתנו מוטגנזה כימית על בסיס השיטה המקובלת לצמחי ארבידופסיס באמצעות החומר המוטגני - Ethyl Methane Sulphanate (EMS). לאחר שלושה דורות של סלקציה לבחינת התכונות הרצויות נבחר פרט אחד שמראה פוטנציאל רב להמשך העבודה בשקלול סך התכונות הרצויות: מיעוט עלים בעלי מופע תמים או תמים חלקי, גבעול קצר (שושנת), דחיית פריחה של כשבועיים לעומת הזן המסחרי וכושר השתמרות גבוה באחסון. זן זה נמצא כעת בתהליכי רישום ע"י מינהל המחקר החקלאי כדי לשמור על זכויות מטפחים, אולם נדרשת עבודה מקיפה כדי ללמוד על אופי השינוי הגנטי שהביא ליצירת התכונות הנ"ל, לאפיינו מבחינת שיטות האחסון להשגת כושר השתמרות מקסימאלי ובדיקות ביוכימיות כדי לבחון את איכותו הקולינרית והבריאותית לאחר אחסון וחיי מדף.

מטרות המחקר

אפיון מקיף של זן רוקולה תוצר מוטגנזה בעל תכונות ייחודיות של פריחה מאוחרת וכושר השתמרות גבוה לאחר הקטיף; הבנה של התהליכים והגנים המעורבים בתכונות אלה ואפיון של מטבוליטים בעלי איכות בריאותית. מחקר זה יסייע מבחינה מדעית ללמוד על המנגנונים המעורבים ביצירת תכונות אלה ומהבחינה היישומית, להגן על הזן לטובת מדינת ישראל וחקלאיה.

המטרות הספציפיות:

- א. אפיון גנים המעורבים בדחיית הפריחה והאטת ההזדקנות לאחר הקטיף.
- ב. התאמת אריזות ליצירת אווירה מתואמת המכילה רמות CO_2 מיטביות לשיפור האיכות באחסון.
- ג. לימוד השפעת 1-MCP על האטת תהליך ההצהבה ואפשרות שילובו עם רמות CO_2 מתאימות.
- ד. בדיקות ביוכימיות לאפיון הומרים בעלי חשיבות בריאותית כמו אנטיאוקסידנטים וגליקוזינולאטים ובחינת השתמרותם באחסון וחיי מדף.
- ה. לימוד השפעת השינוי הגנטי על עמידות/רגישות הרוקולה לפתוגנים בזמן הגידול והתפתחות ריקבון לאחר הקטיף.

ביצוע הניסויים, תוצאות ומסקנות

אפיון גנים המעורבים בדחיית הפריחה והאטת ההזדקנות לאחר הקטיף

הקו המוטנטי רוק-עד נרשם לאחרונה כזן רוקולה מוגן. כדי להגן על הזן יש צורך למצוא סמנים גנטיים שיאפשרו את זיהויו ביחס לקווים המסחריים. אחד ההבדלים בין הזן רוק-עד לזן המסחרי הוא הפריחה המאוחרת, בעיקר בעונות המעבר בהן התופעה בולטת במיוחד. לפיכך, גנים הקשורים לבקרת הפריחה יכולים להיות מועמדים לבדיקת ההבדל ברמת ההתבטאות בין הזנים (1,2,3). סרקנו מאגרי גנים עבור גנים הקשורים בבקרת הפריחה. אולם, כיוון שמאגר הגנים עבור רוקולה הינו דל, חיפשנו גנים אורתולוגיים בצמח המודל ארבידופסיס השייך לאותה משפחה של הרוקולה - מצליבים (2). מתוך מספר גדול של גנים הקשורים לבקרת הפריחה בארבידופסיס הצלחנו לשבט בעזרת פרימרים מהגנים האורתולוגיים בארבידופסיס מקטעים ספציפיים לחמישה גנים של הרוקולה : TFL, FT, LFY, GI ו-EMF1, בעלי דמיון של כ- 80-90% לגנים מארבידופסיס (טבלה 1).

טבלה 1: מקטעי הגנים שבודדו מרוקולה בעלי הומולוגיה לגנים מארבידופסיס המעורבים בבקרת פריחה.

הגן	אורך (bp)	דימיון לארבידופסיס
GI	360	87%
LFY	368	87%
FT	325	78%
TFL	334	80%
EMF	35	88%

טכונה נוספת של הזן רוק-עד היא כושר השתמרותו המשופר באחסון המתבטא בהצהבה פחותה לעומת הזן המסחרי. להורמון הצמחי אתילן ישנו תפקיד חשוב בהזדקנות צמחים, לפני ולאחר הקטיפה. לפיכך, ניסינו לשבט מקטעים מהגנים הקשורים לביוסינתזה של אתילן ולמעבר הסיגנל שלו בתא. חשוב לציין כי חלק מגנים אלו נמצאים בארבידופסיס תחת בקרת השעון הביולוגי. כפי שהוסבר לעיל, החיפוש במאגרי המידע נעשה לגנים של ארבידופסיס, ומתוך כל הגנים שנבדקו התקבלו מקטעים ספציפיים לרוקולה ובהם שלשה גנים הקשורים לביוסינתזה של אתילן: ACS5, ACS8, ACS9 וגן הקשור למעבר הסיגנל של אתילן: CTR1. בטבלה 2 מופיעים אזורים בגנים ACS9, ACS5 ו-CTR1 בעלי הומולוגיה גבוהה וביניהם אזורים ללא הומולוגיה שחסרים בארבידופסיס.

טבלה 2: מקטעי הגנים שבודדו מרוקולה בעלי הומולוגיה לגנים מארבידופסיס המעורבים בביוסינתזה ובמעבר הסיגנל של אתילן.

הגן	אורך (bp)	דימיון לארבידופסיס
ACS5	278	94%
	96	0%
	167	88%
	107	0%
	243	89%
ACS8	705	88%
ACS9	611	92%
	92	0%
	94	95%
CTR1	265	91%
	101	0%
	278	85%

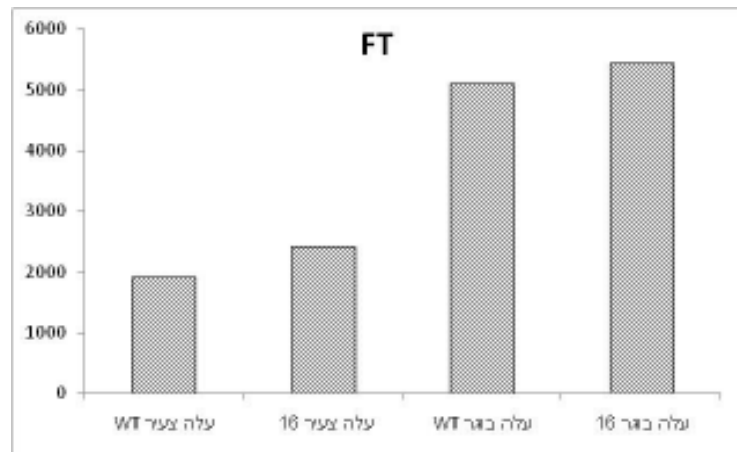
גורם נוסף שיכול להשפיע על הזדקנות עלים הוא האנזים פוספוליפאז המשתתף בתהליכי פירוק הממברנות, גן זה קשור לבקרת אתילן ונמצא תחת בקרת השעון הביולוגי. באותה שיטה שהוזכרה קודם בודד מקטע באורך 526bp מהגן PLD1 מרוקולה הנמצא בהומולוגיה של 86% לגן מארבידופסיס.

התבטאות הגנים בזנים רוק-עד והמסחרי

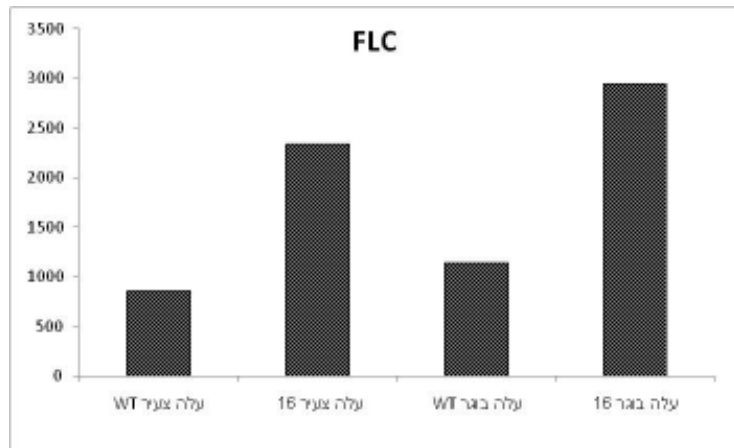
סדרת ניסויים ראשונה נעשתה לאפיון רמת ההתבטאות של הגנים המעורבים בבקרת הפריחה בעלי רוקולה משני הזנים. אפיון שינויים בבקרת הגנים ייתן אינדיקציות ראשוניות על מיקום המוטציה/ות והיקף השפעתם על בקרת הפריחה. עלי רוקולה צעירים (עלים שני ושלישי מהקודקוד) ועלים מבוגרים (עלים שמיני – עשירי מהקודקוד) משני הזנים נקצרו והוקפאו בחנקן נוזלי. מעלים אלה הופק RNA (סיגמה) וממנו נעשה cDNA (פרומגה), עליו נעשו ריאקציות PCR עם פרימרים ספציפיים מהגנים שבודדנו מרוקולה. כימות הבנדים שהתקבלו נעשה בעזרת תוכנת TINA. אנליזות אלה נעשו עד כה פעמיים בלבד (לעלי רוקולה מקצירים שונים) לכן התוצאות מובאות ללא סטטיסטיקה בשלב זה. הגן FT נמצא בקומפלקס הבקרה המרכזי של הפריחה ופועל באופן חיובי על מעבר הסיגנל לפריחה. מתמונה 1 רואים כי רמת ביטוי של הגן FT גבוהה יותר בעלים מבוגרים אך לא נמצא הבדל ברמת הביטוי של הגן בין הזנים רוק-עד והמסחרי.

במעבר הסיגנל לפריחה ישנם מעכבים שונים ברמות שונות של מעבר האות לפריחה. נציגים של גנים מעכבים אלה: FLC המעכב פעילות של הגן FT, והגנים TFL ו-EMF המעכבים אף הם את קומפלקס הבקרה המכיל את הגן FT וכן את קומפלקס הגנים המעורבים בבקרת התפתחות המריסטמה הקודקודית, מובאים בתמונות 2-4 בהתאמה. מתמונה 2 רואים כי רמת הביטוי של הגן מעכב הפריחה FLC גבוה יותר בזן רוק-עד מאשר בזן המסחרי, הן בעלים צעירים והן במבוגרים. גם באנליזות הביטוי של הגן המעכב TFL נמצא כי רמתו גבוהה יותר בזן רוק-עד מאשר בזן המסחרי, אולם רק בעלים המבוגרים (תמונה 3). לעומתם, לא נמצא הבדל ברמת הביטוי של הגן המעכב EMF בין הזן המסחרי לזן רוק-עד בעלים צעירים או מבוגרים (תמונה 4).

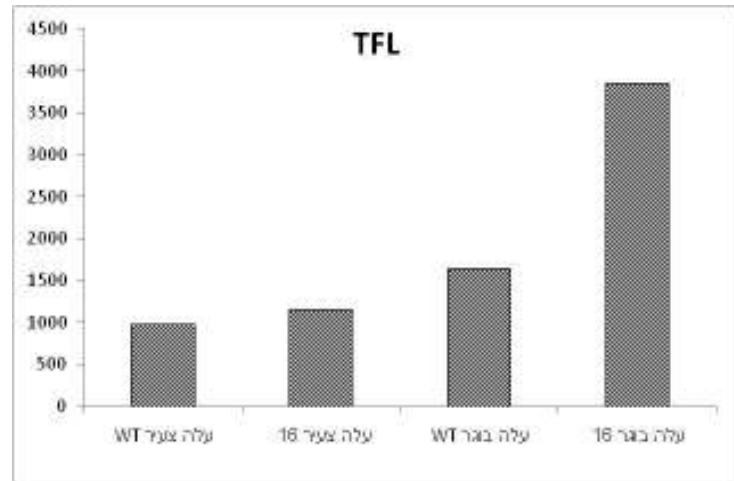
תמונה 1: ביטוי של הגן FT בעלים צעירים ומבוגרים של רוקולה מהזנים המסחרי ורוק-עד



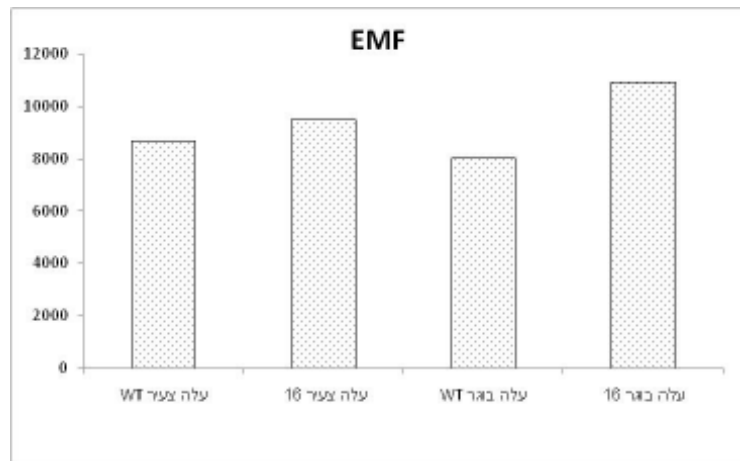
תמונה 2: ביטוי הגן FLC בעלים צעירים ומבוגרים של רוקולה מהזנים המסחרי ורוק-עד



תמונה 3: ביטוי הגן TFL בעלים צעירים ומבוגרים של רוקולה מהזנים המסחרי ורוק-עד



תמונה 4: ביטוי הגן EMF בעלים צעירים ומבוגרים של רוקולה מהזנים המסחרי ורוק-עד

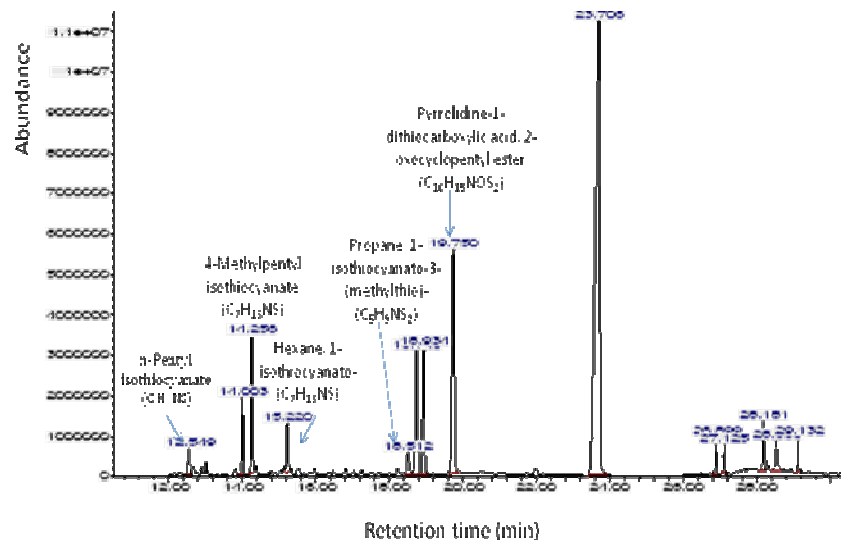


העיכוב בהופעת הפריחה בזן רוק-עד לעומת הזן המסחרי יכול להיות מוסבר בהבדלים בהתבטאות הגנים שבודדו משני הזנים. יש לציין כי תוצאות אלה הן ראשוניות ויש לחזור עליהן מספר פעמים כדי לאמתן שכן יש שונות גדולה בביטוי גנים התלויה בתנאי הגידול. במידה ותוצאות אלה יהיו מובהקות והדירות הן יוכלו לשמש אותנו להבנה על השפעת המוטציה/ות בבקרת מועד הפריחה ובהמשך לשמש סמנים לזיהוי הזן רוק-עד.

בדיקות ביוכימיות לאפיון חומרים בעלי חשיבות בריאותית כמו אנטיאוקסידנטים וגליקוזינולאטים ובהינתן השתמרותם באחסון וחיי מדף

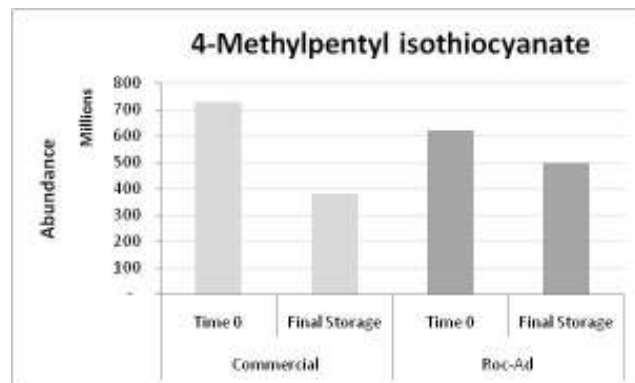
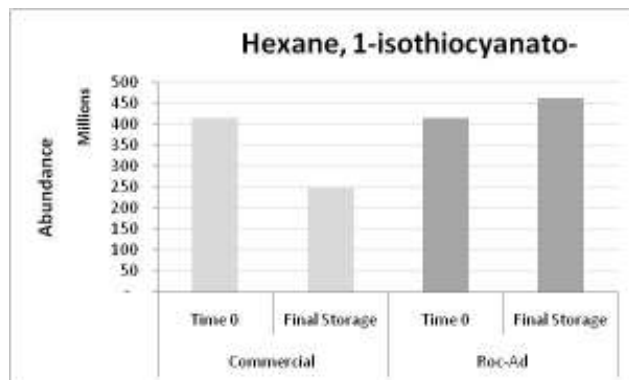
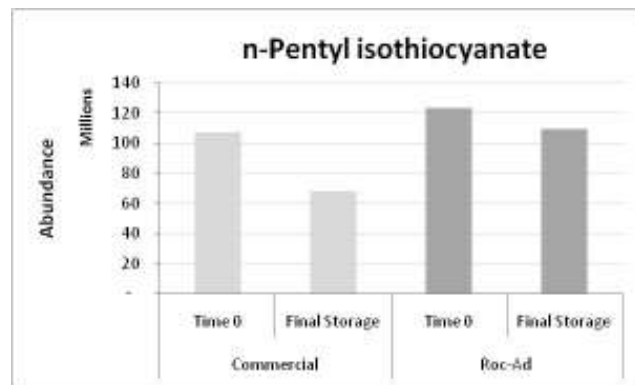
בסדרת ניסויים ראשונה התחלנו לאפיין את תכולת הגלוקוזינולאטים בעלי רוקולה. חומרים אלה הינם מטבוליטים משניים אשר להם חשיבות בריאותית וקולינרית שכן הם מקנים לצמח את טעמו ה"חריף עוקצני" – (pungent). חומרים אלה מתפרקים לתיאו ואיזותיאוציאנטים ע"י האנזים מירוזינאז תוצרי הפירוק נדיפים וניתנים לאפיון בעזרת ה-GCMS. בתמונה 5 פלט אופייני ממיצוי עלי רוקולה בו ניתן לזהות ברמת ודאות גבוהה 3 איזותיאוציאנטים: n-pentyl isothiocyanate, hexane 1- isothiocyanate ו-4-methylpentyl isothiocyanate וחומרים נוספים בעלי ודאות נמוכה יותר. חומרים אלה מסומנים בתמונה בחץ.

תמונה 5: פלט מהרצת מיצוי עלי רוקולה ב-GCMS.



אנליזות ראשונות נעשו לעלי רוקולה מהזנים רוק-עד והמסחרי לבדיקת שינויים בתכולת הגלוקוזינולאטים לאחר סימולציית אחסון וחיי מדף. בדו"ח שהוגש בשנה שעברה הראנו כי כושר ההשתמרות של הזן רוק-עד היה טוב יותר מהזן המסחרי. זה התבטא במבחני איכות ויזואליים וברמת כלורופיל ואנטיאוקסידנטים. מהתוצאות המופיעות בתמונה 6 א-ג אנו מראים כי גם רמת הגלוקוזינולאטים, ובהתאם לכך גם הטעם החריף האופייני, נשמר טוב יותר בזן רוק-עד. תוצאות ראשוניות של אנליזות ב-GCMS מראות בתמונה 6 א-ג כי שלושת האיזותיאוציאנטים תוצרי הפירוק

של הגלוקוזינולאטים : 4-methylpentyl ו- n-pentyl isothiocyanate, hexane 1-isothiocyanate
 isothiocyanate נשמרו טוב יותר בזן רוק-עד בהשוואה לזן המסחרי. השינוי הכללי בזן המסחרי הראה
 פחיתה של כ-40% ברמת האיזותיאוציאנטים בסוף סימולציית האחסון וחיי מדף לעומת הזן רוק-עד בו
 השינוי היה בין 0 ל-15% בלבד (תמונה 6). התוצאות המופיעות בדו"ח זה הן ממוצע של שלושה
 ניסויים בלבד לכן לא מופיעים בשלב זה ערכים סטטיסטיים. מעניין לציין כי ערכי ההשתנות בתכולת
 הגלוקוזינולאטים במהלך האחסון וחיי המדף תואמת את הערכים (הוצגו בדו"ח של שנה שעברה) של
 האנטיאוקסידנטים וכלורופיל, דבר המעיד כי קיים מתאם גבוה בין הפרמטרים שנבדקו למופע היוזואלי
 וניתן להעריך על פי המופע גם את הערכים הבריאותיים והקולינריים. חשוב לציין כי עדיין לא ערכנו
 השוואות עם חזרות מספיקות כדי לאפיין את כושר ההשתמרות של מטבוליטים אלה בתנאי אחסון שונים.
 תמונה 6: כושר השתמרות של הגלוקוזינולאטים לאחר סימולציית אחסון וחיי מדף (משלוח ימי).



רשימת ספרות

1. Putterill J., Laurie R., and Macknight R.(2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays*. 26:363–373.
2. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M., and Soppe W. (1998). Genetic control of flowering time in Arabidopsis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 345-370.
3. Weigel, D. and Meyerowitz, E.M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, Vol. 78, 203-209.

סיכום עם שאלות מנחות

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

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
אפיון גנים המעורבים בדחיית הפריחה והאטת ההזדקנות לאחר הקטיף.
בדיקות ביוכימיות לאפיון חומרים בעלי חשיבות בריאותית כמו אנטיאוקסידנטים וגליקוזינולאטים וכושר השתמרותם באחסון וחיי מדף.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
לצורך מציאת סמנים גנטיים לזן רוק-עד בודדו מספר גדול של מקטעי גנים מרוקולה השייכים לגנים המעורבים בביוסינתזה ומעבר הסינגל של אתילן, לבקרת הפריחה ולפירוק של ממברנות. אנליזות ראשוניות הראו הבדלים ברמת התבטאותם בזן רוק-עד לעומת הזנים המסחריים.
פוחזה שיטה לאפיון רמת הגלוקוזינולאטים בעלי הרוקולה במכשיר ה-GCMS בשיטת ה-SPME. נעשו אנליזות ראשוניות לשני הזנים לפני ואחרי סימולציית אחסון. מצאנו כי כושר ההשתמרות של מטבוליים אלה נמצא בקורלציה לכושר ההשתמרות של הכלורופיל והאנטיאוקסידנטים. בזן המסחרי יש פחיתה ממוצעת של כ-40% לאחר אחסון וחיי מדף לעומת פחיתה של כ-10% בלבד בזן רוק-עד.
בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?
בדיקות ביוכימיות לאפיון גליקוזינולאטים וכושר השתמרותם באחסון וחיי מדף.
אנליזות גנטיות ליצירת סמנים גנטיים ע"י אפיון רמת התבטאות גנים בזן רוק-עד לעומת הזן המסחרי.
לימוד השפעת השינוי הגנטי על עמידות/רגישות הרוקולה לפתוגנים בזמן הגידול והתפתחות ריקבון לאחר הקטיף.
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.
הרצאה ביום עיון למגדלים ב-1.3.10 במשרד החקלאות, בבית-דגן.
הרצאות ביום עיון של חברת אגריבר (2.9.10).
השתתפות ביום עיון של מגדלי הבקעה.
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
< רק בספריות X
< ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
< חסוי – לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -