

פיתוחים חדשים להגברת כושר האחסון של תאנים

Improvement of fig storagabilty

צוות המחקר:

חוקר ראשי: משה פליישמן

זאב יבלוביץ, שרה גולובוביץ המחלקה למדעי עצי הפרי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן ויקטור רודוב, חיה פרידמן המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, המכון לטכנולוגיה ואחסון של תוצרת חקלאית, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן

משה ראובני המח' פרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
אלון סמך המכון למדעי הצמח והגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, א. עברית, רחובות

Moshe Flaishman, *Institute of Plant Sciences, Agricultural Research Organization, P.O. BOX 6,*

Bet-Dagan 50250, Israel, vhmoshea@agri.gov.il

Victor Rodov, *Institute of Postharvest and Food Science, Agricultural Research Organization,*

P.O. Box 6, Bet-Dagan 50250, Israel vrodov@agri.gov.il

Haya Friedman, *Institute of Postharvest and Food Science, Agricultural Research Organization,*

P.O. Box 6, Bet-Dagan 50250, Israel hayafr@agri.gov.il

Moshe Reuvini, *Institute of Plant Sciences, Agricultural Research Organization, P.O. BOX 6, Bet-*

Dagan 50250, Israel, vhmoshe@agri.gov.il

Alon Samach, *The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture,*

Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem, P.O. Box 12, Rehovot 76100, Israel,

samach@agri.huji.ac.il

דצמבר 2011

כסלו תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.

חתימת החוקר הראשי:

פרסומים מדעיים:

Zohar E. Freiman; Victor Rodov; Zeev Yabloviz; Batia Horev; Moshe Flaishman (2011). Preharvest application of 1-methylcyclopropene inhibits ripening and improves keeping quality of 'Brown Turkey' figs (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae* (accepted for publication).

1. תקציר

הצגת הבעיה החקלאית. לתאנים טריות כושר אחסון נמוך יחסית דבר המגביל את השיווק בארץ ובחו"ל. כדי לקבל פריצת דרך מבחינת שיווק הפרי לחו"ל חייבים להאריך את כושר אחסון הפרי. התאנה הינה פרי קלימקטרי והורמון ההבשלה אתילן משפיע על תהליכי ההזדקנות של הפרי.

מטרת המחקר בעבודה זו נבחן דרכים להורדת ביטוי האתילן והשפעתם על במהלך הבשלה ואחסון פרי התאנה. **שיטות עבודה** א. ישום החומר 1-MCP על פירות במטע. ב. בדיקה פונקציונאלית של גנים לבקרת אתילן באמצעות התמרה גנטית של תאנים ועגבניות. ג. בחינת ייצור אתילן בפירות של מיני פיקוסים בהשוואה לתאנה. **תוצאות עיקריות:** במהלך המחקר בחנו שתי גישות עבודה שונות למניעת אתילן הורמון ההבשלה בתאנה ובדרך זו לגרום להאטת תהליך ההבשלה בפרי:

א. הגישה ההורטיקולטורית באמצעות ישום 1-MCP.

בחנו טיפולים הורטיקולטוריים שיגרמו לעיכוב חישת אתילן באמצעות ישום 1MCP על פירות במטע. בעבר הראינו כי ישום 1MCP באחסון לא משפיעה על יכולת האחסון של הפרי. בשלב הראשון בחנו את עיתוי ישום החומר 1MCP ומצאנו כי הוא אפקטיבי ביישום על פירות בהם רואים אובדן כלורופיל בקליפת הפרי. יישום של 1MCP על גבי העץ גרם לעיכוב חישת אתילן שהביא להאטה בתהליכי הבשלת הפרי. מצאנו במשך 3 שנים של יישום החומר במטע כי 1MCP גרם לעיכוב חישת אתילן ולעיכוב בהזדקנות הפרי באחסון ובכך ניתן היה להאריך את משך אחסון של הפרי. אופן הישום שביצענו לא אפשרי מסחרית אך ניתן ללמוד ממנו כי ניתוק האתילן לא ימנע את המשך התפתחות הפרי במהלך ההבשלה.

ב. בכדי ללמוד את השפעות עצירת יצירת אתילן בהבשלה בודדנו באמצעות פרימרים דגנרטיביים גנים שהראו הומולוגיה לגנים מבקרי בקרת הבשלה בעגבניה המצויים במוטנטים RIN ו-NOR. נבנו 3 קונסטרוקטים של 35S::RIN-like ו-35S::NOR-like הקונסטרוקטים השונים הותמרו בעגבניות במוטנטים של RIN ו-NOR בהתאמה. עגבניות אלו אינן מבשילות. מצאנו כי אחד הקונסטרוקטים 35S::RIN-like מסוגל לעשות קומפלמנטציה חלקית וגורם להאדמה של העגבניה בהשוואה למוטנט שאינו מבשיל. בעיתוי הנוכחי אנו עדין בודקים את שני הקונסטרוקטים האחרים. בנוסף בודדנו שורה של גנים ממשפחת ה-ACC וה-ACO, המבקרים את יצירת האתילן בפירות קלימקטריים דוגמת התאנה. יצרנו מבנה לשיתוק פעילותו של הגן ACO המבקר את יצירת האתילן באמצעות טכנולוגיית RNAi. המבנה הותמר בצמחי תאנה. מתוך 10 קווי התמרה שגדלים בחממה נראה כי ב-5 קוויים מתקיים תהליך הבשלה בפרי ויש ייצור אתילן. בקוויים הנותרים לא נוצרו עדין פירות. קיימת אפשרות שהם מעוככים בשל מגבלת יצירת האתילן בעצים. בכונתנו להמשיך ולגדל צמחים אלו ולבחון בהם את מהלך הבשלת הפרי.

ג. בחינת ייצור אתילן בצמחים ממשפחת הפיקוסים. בחנו את מהלך יצירת האתילן בצמחים ממשפחת הפיקוסים במטרה לזהות השתקה טבעית של התהליך. מצאנו כי בשני מיני פיקוסים שאינם מתרככים נוצרת כמות קטנה של אתילן בפרי.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות. הראינו את מרכזיות הורמון ההבשלה אטילן בתהליכי הבשלת הפרי בתאנה. מצאנו כי שיתוק האטילן עם על ידי ישום 1MCP או באמצעות בידוד גנים מבקרי תהליכי הבקרה והיצירה של האטילן ניתן להשפיע על תהליכי ההבשלה. בחנו את מהלך יצירת האטילן במספר צמחים ממשפחת הפיקוסים כדי לזהות מוטנטים טבעיים ליצירת אטילן. המינים שאינם מיצרי אטילן הם ברי הכלאה עם תאנה. בשל החשיבות החקלאית הרבה של הנושא בכוונתנו להמשיך ולבחון את המערכות שפיתחנו מעבר לתוכנית המדען הנוכחית.

2. מבוא ותאור הבעיה

בשנים האחרונות חל גידול בענף התאנים הטרויות כיום מייצאים את זן התאנה הארגמנית והזן הסתוים סתויות הדבש. יצוא התאנים נעשה בדרך האוויר, ובשל העלויות הוא מוגבל לארצות אירופה. כדי לקבל פריצת דרך בשיווק הפרי לחו"ל, חייבים להאריך את משך אחסון הפרי, ועל ידי כך לאפשר שווק ימי זול. הבשלת פרי התאנה מושפעת באופן מובהק מאטילן. בעבר ניסינו לבנות פרוטוקולי אחסון חדשים, ובין היתר מצאנו כי ההפריה בתאנים גורמת לשיפור כושר אחסון הפרי. כמו כן, אנחנו ואחרים בחנו את האפשרות להאריך את משך האחסון באמצעות החומר 1-MCP, המעכב את פעילות האטילן, במהלך אחסון פרי התאנה. בפועל מצאנו כי טיפול זה לא שיפר את כושר האחסון. נכון להיום, משטר האחסון מתבצע על-ידי שמירת שרשרת קרור הנשמרת מזמן הקטיף, במהלך האריזה והשינוע עד לחנויות ממכר הפרי. בדרך זו משיגים יכולת אחסון מוגבלת של עד 10-20 ימים של הפרי הקייצי והסתווי, בהתאמה. פריצת דרך בענף התאנים הטרויות בארץ ובעולם תתרחש רק לאחר שיפור כושר אחסון הפרי. מטרת המחקר המוצע היא להאריך את יכולת האחסון של תאנים. כדי להגיע לפריצת דרך באחסון תאנים ניתן להשפיע על בקרת הבשלת הפרי: א. באמצעות טיפולים הורטיקולטוריים שיגרמו לעיכוב חישת אטילן. ב. על ידי יצירת שינויים גנטיים מכוונים בגנים העשויים להשפיע על בקרת ההבשלה ו/או מניעת יצירת האטילן בפרי.

3. פירוט עיקרי הניסויים

קיימות מספר אסטרטגיות לעיכוב תהליכי ההבשלה המתוארות בספרות ומתאימות לפירות קלימקטריים. אלו מבוססות על עיכוב ייצור האטילן או על מניעת החישה של האטילן. קיימות מספר אסטרטגיות לעיכוב תהליכי ההבשלה המתוארות בספרות ומתאימות לפירות קלימקטריים. אלו מבוססות על עיכוב ייצור האטילן או על מניעת החישה של האטילן. מסלול החישה של אטילן נחקר במספר רב של צמחים, וזוהו הרצפטורים, קינזות ומרכיבי שעתוק המעורבים בתהליך. פגיעה ברצפטורים לאטילן גורמת למוטציה דומיננטית ולעיכוב חישת האטילן. למיטב ידיעתנו, מרכיבים מולקולריים אלו לא זוהו עדיין בפרי התאנה. חסימת מסלול החישה של אטילן (Wilkinson et al., 1997) על ידי ביטוי של הגן המוטנט לרצפטור הראתה שניתן לעכב את ההבשלה. יתכן שגישה זו אינה מתאימה לפרי התאנה, משום שפגיעה במסלול החישה של אטילן עלולה לפגוע בתכונות הורטיקולטוריות חשובות לצמח כמו למשל גדילת הפרי. משום שגדילת הפרי מלווה בייצור האטילן ויש מקום להניח שהאטילן אחראי לשני התהליכים גם יחד, יש חשש שעיכוב החישה עלול לפגוע בתהליך גדילת הפרי. בשנת המחקר הראשונה בחנו טיפולים ב 1-MCP המעכבים את חישת האטילן.

א. בחינת ישום 1MCP במטע על משך אחסון והתפתחות הפרי.

לבשנת המחקר השניה חזרנו ובחנו כמו בשנה הראשונה את השפעת טיפולים ב 1-MCP במטע על הגדלת כושר האחסון של הפרי. כמו בשנה הראשונה מצאנו כי ישום של 1MCP גורם לדחיית הבשלת הפרי על גבי הענף ובהמשך גם במהלך אחסון הפרי. ישום של 1MCP נעשה בשקיות שלתוכם הוכסה תמיסה שגרמה להתנדפות הגז לחלל השקית. כמו בשנה הראשונה מצאנו כי התפתחות הפירות המטופלים התעכבה על גבי העץ וגם בהמשך משהוכנסו הפירות לאחסון נמצא כי הטיפול גרם לעצירת הזדקנות הפרי. בפועל הטיפול שיפר את צבע הפרי רמת הסוכר ומראה הפרי.

בתמונה מס' 1 ניתן לראות את מהלך הבשלת הפירות בפרי התאנה מהזן ארגמנית. כמו בפירות קלימקטריים אחרים במהלך ההבשלה יש עליה ביצירת אתילן ושינויים מהירים של צבע ובתרככות הפרי. בתאנה בשלב יש גם גידול מהיר של הפגה והיא מכפילה את גודלה במהלך ההבשלה.

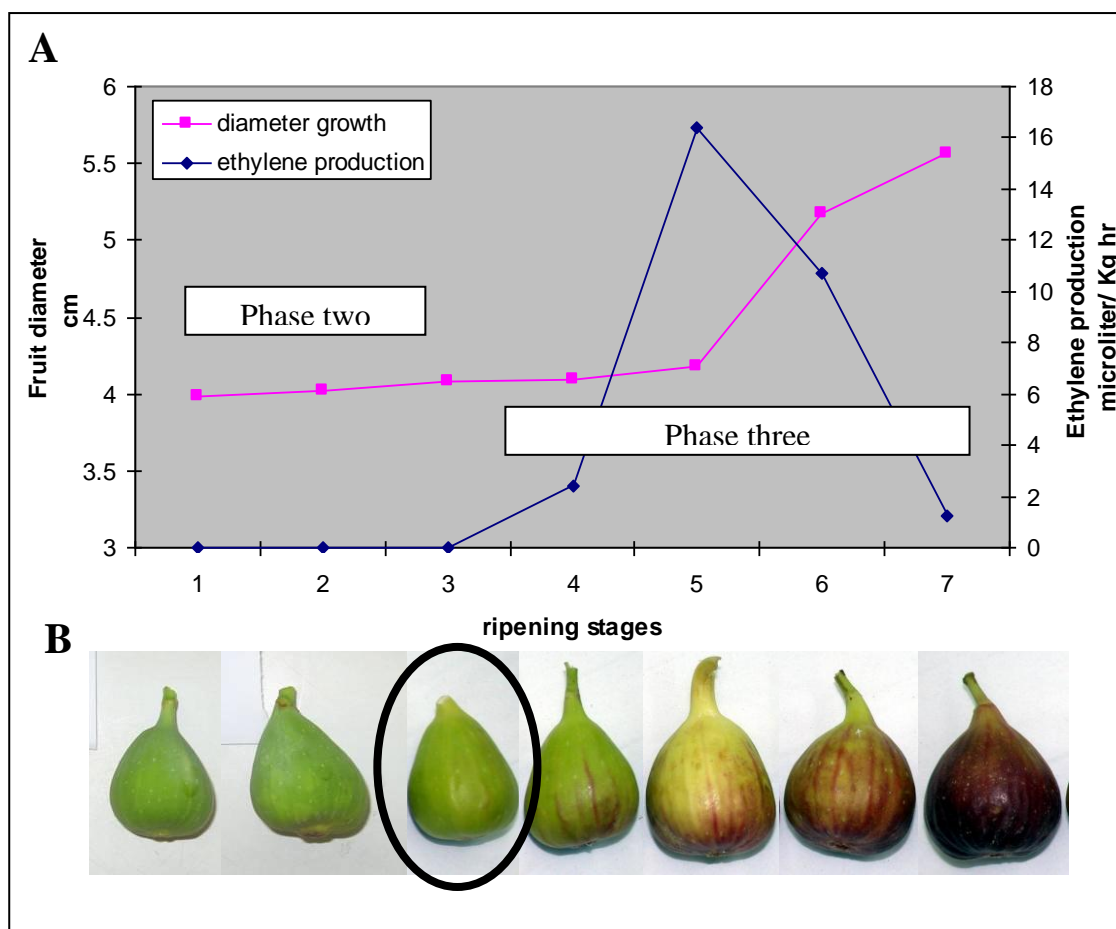
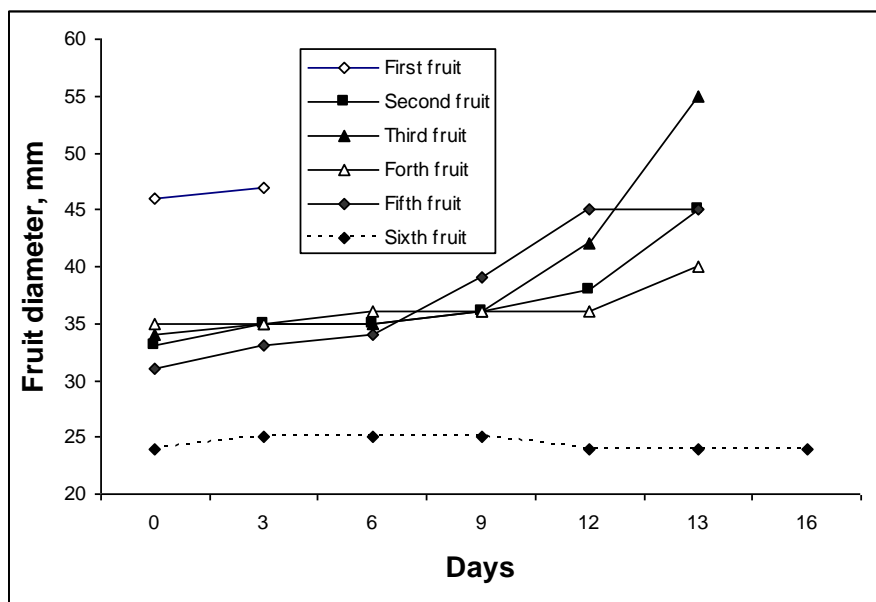
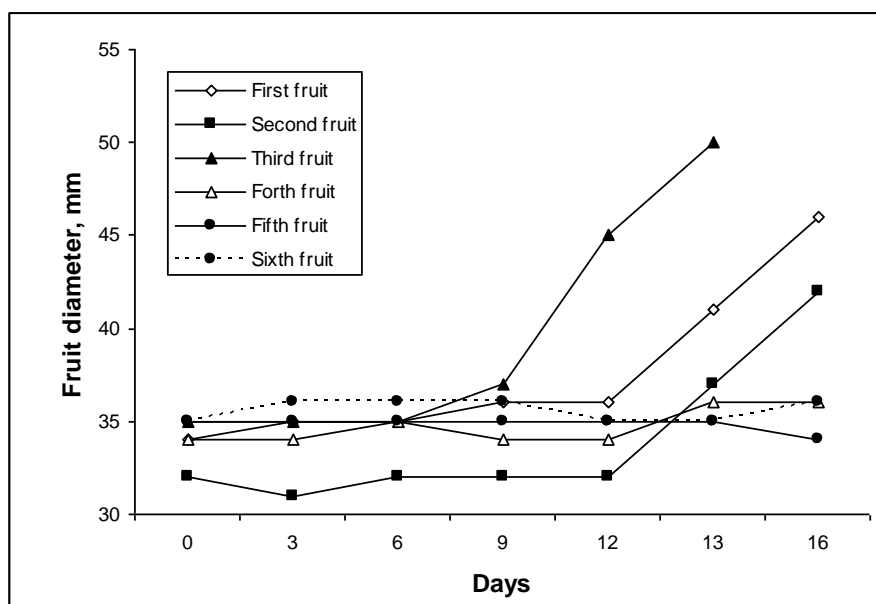


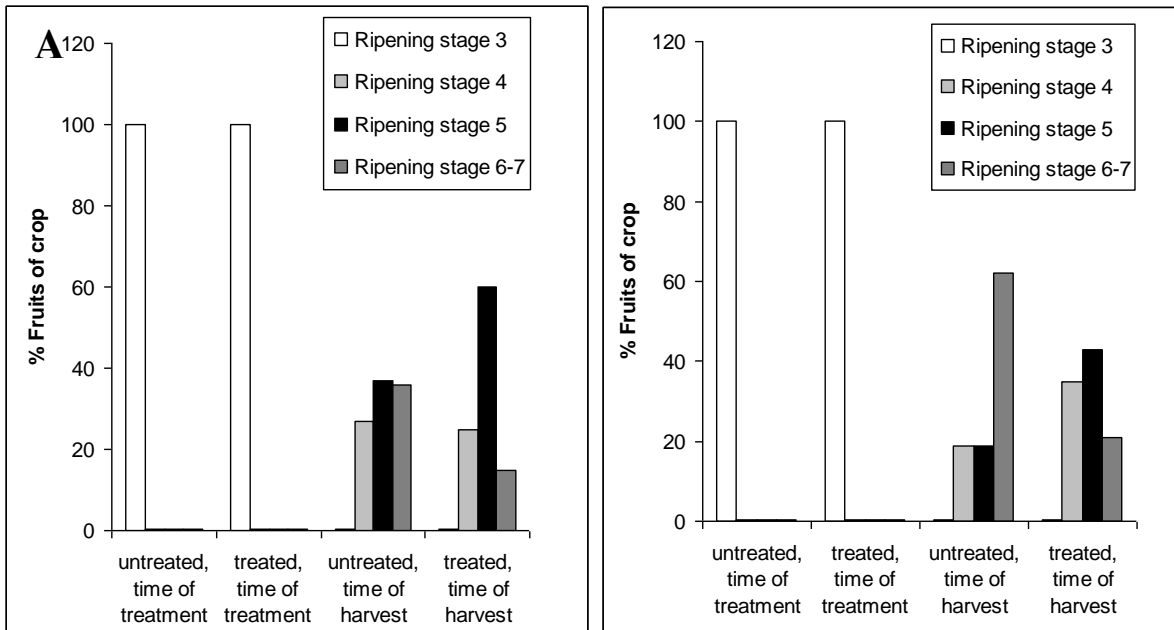
Fig.1. Ripening of fig (A) Diameter and ethylene production evolution during the ripening of fig. (B) Transformation in size and color of the fig.

ניתן להבחין כי לפני ההבשלה יש איבוד כלורופיל בקליפת הפרי היא בהירה יותר ובהמשך מתחילים להופיעים אנטוציאנינים הגורמים ליצירת הצבע הסגול בפרי. בחנו את השפעה ישום 1MCP בחלקה על גבי העץ באמצעות הזרקת החומר במהלך שעות אחה"צ והלילה בשקית שבה עטפנו את הפרי וכלאנו את הגז. ישום הגז נעשה בפירות שהגיעו לשלב איבוד הכלורופיל המסומן בתמונה מס' 1.

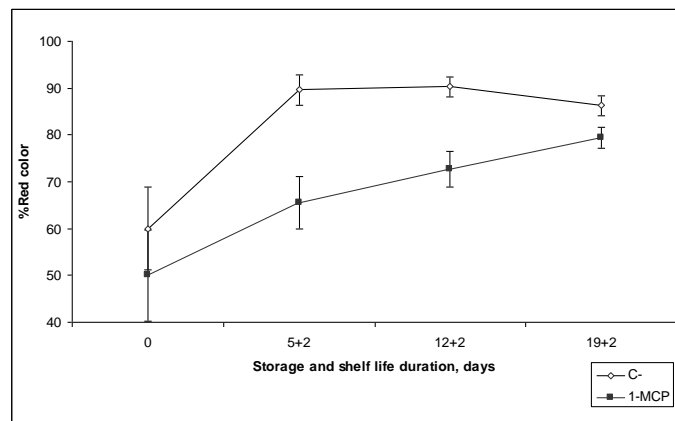
מצאנו כי ישום של 1MCP גורם לדחיית הבשלת הפרי על פני הענף וגם ריכוז הבשלה של הפגות (תמונות 2, 3).



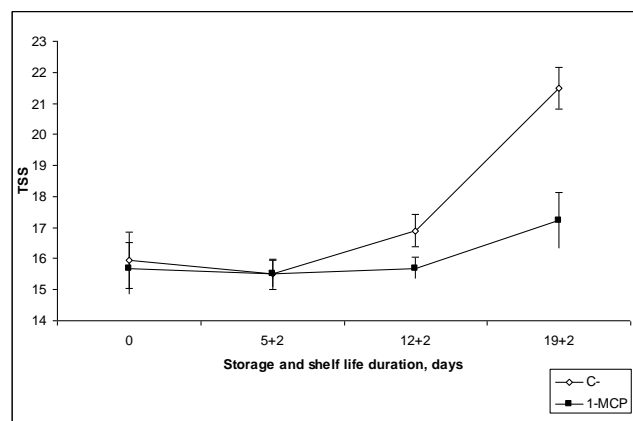
תמונה מס' 2 מהלך הבשלת פירות על ענפים שטופלו ב-1MCP



תמונה מס' 3. מהלך הבשלה של פירות מטופלים ובלתי מטופלים ב-1MCP. בהמשך הפירות המטופלים הוכנסו לאיחסון ונמצא כי הטיפול שיפר את צבע הפרי (תמונה מס' 4), רמת הסוכר ומראה הפרי.



תמונה מס' 4. השפעת הטיפול ב-1MCP על התפתחות הצבע באחסון.



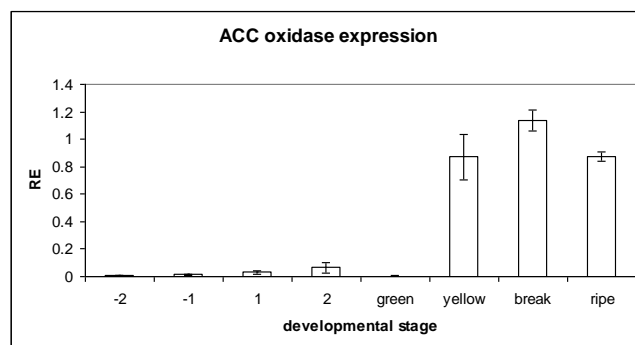
תמונה מס' 5. השפעת הטיפול ב-1MCP על התפתחות סוכרים בפרי.



תמונה מס' 6. תמונה של פירות לאחר 19 ימי אחסון הפרי העליון אינו מטופל והפרי התחתון טופל במטע.

ב. בקרת יצירת אתילן בפרי התאנה.

כדי לעצור את יצירת האתילן בהבשלה בודדנו את הרצף של הגן לסינתזת אתילן ACO על סמך הרצף שפורסם ומצוי ב- NCBI. בחנו את מהלך הביטוי של הגן בתהליך הבשלת הפרי. מצאנו כי הגן מתבטא בעיקר בשלב של שבירת צבע הפרי (תמונה מס' 1) בשלב יש יש עדות לתחילת היווצרות אתילן בתאנה (Owino et al, 2006).



תמונה מס' 1. ביטוי הגן לסינתזת אתילן ACO במהלך גדילה והבשלה של פרי התאנה.

בכדי לגרום לעצירת יצירת אתילן בהבשלה בודדנו באמצעות פרימרים דגנרטיביים גנים שהראו הומולוגיה לגנים שנמצאו לאחרונה כמבקרים את יצירת האתילן בעגבניה הגנים RIN והגן NOR (Giovannoni, 2004). הגן RIN נמצא לאחרונה במספר רב של צמחים דוגמא עגבניה תפוח ותות שדה. תמונה מס' 2 ניתן לראות את השוואת הרצף בין הגן RIN ומקטע הגן המבודד למקטע שבודד לאחרונה מתות שדה. הגן RIN שייך למשפחת גנים הקרויה MADS שלה

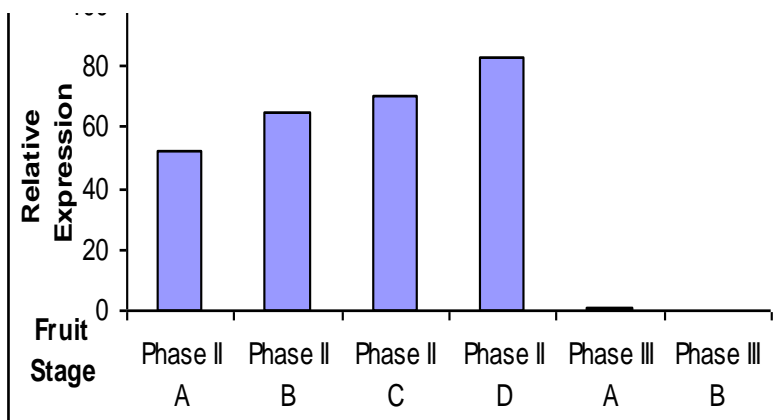
אזורי הומולוגיה אך ידוע שקציע ה-N טרמינאלי של הגן הוא האזור הוריאבילי. מצאנו כי מידת הדמיון של הרצף בקציה ה-N טרמינאלי מראה את הדמיון הגדול ביותר לגן ההומולוגי שבודד לאחרונה מתות-שדה. להומולוג של גן RIN שבודד מתאנה וההומולוג מתות שדה יש 76% הומולוגיה (תמונה מס' 2). הרצף שבודד ישמש לבניית קונסטרקט להשתקת הגן בתאנה.

Fc-RIN Like	MGRGRVELKRIENKINRQVTFARRNGLLKKAYELSVLCD	40
MADS RINL	MGRGRVELKRIENKINRQVTFARRNGLLKKAYELSTILCD	40
Fc-RIN Like	AEVALIIFSNRGKLYEFCSSPSMVKTLERYQKCSYGAIEV	80
MADS RINL	AEVALIIFSNRGKLYEFCSSSSMLKTLERYQKCSYGAMEV	80
Fc-RIN Like	SKPSKEFEIN.YREYLKLGREFESLQRTQRNLLGEDLGPL	119
MADS RINL	QKPAKELEESSYREYLKLGTRCESLQQTQRNLLGEDLGPL	120
Fc-RIN Like	STKELEQIERQLESSLKQVRSTKTQYMLDQLADLQSKEHM	159
MADS RINL	NTKELEQLERQLESSLKHVRSTKTQHMDLSDLQSKEHM	160
Fc-RIN Like	LIDANRALTLKLDEISSRNNFRSESWEVGDQDHQQTMPYA	199
MADS RINL	LIEANRDLTKLDEIDSRTQDR.QTWEHG..HDHQTMLYG	197
Fc-RIN Like	PPHAHSQGLIFQPLDCNPNLQIGFNAVVSQETSTST..HA	237
MADS RINL	TQHAQTQGLMFQPLDCNPTLQIGYNAVVSQEMPAATPAHA	237
Fc-RIN Like	QQVNGFIPG..	246
MADS RINL	QFVNGFIPGWM	248

תמונה מס' 2. השוואת רצף של הגן RIN-LIKE שבודד מתאנה לגן ההומולוגי בתות שדה.

בחנו את הביטוי של הגן במהלך הבשלת פרי התאנה. לשם כך בודדנו cDNA מתאנים בדרגות הבשלה שונות ובהן את מידת הביטוי של הגן. תמונה מס' 3 ואיור מס' 12ה' מסכמים את מידת ביטוי הגן במהלך הבשלת פרי התאנה. בחינת ביטוי הגן *FcACO1* נבדק ב-qPCR בשלבי ההתפתחות השונים, בסוף הפאזה השנייה הגן לא מתבטא כלל (דוגמא 1, איור מס' 12ה'). במעבר בין הפאזות, בפרי הצהוב (דוגמא 2, איור מס' 12ה'), יש עלייה ששיאה בפרי מחליף הצבע (איור מס' 12ה'). ביטוי הגן יורד בפרי בהבשלה מלאה, כל זאת בהתאמה למדידות האתילן שבוצעו לאורך פרופיל התפתחות הפרי, ראו איור מס' 2א'. בריצוף הטרנסקריפטום קיימת מגמה דומה כאשר מספר העותקים נמוך בדוגמאות הפאזה השנייה מתחילתה ובסופה והוא עולה בשני סדרי גודל בפרי המעבר בין הפאזה השנייה לפאזה השלישית. מספר

העותקים הגדול נשמר גם בדוגמאת הפרי שרוצפה בשיא תהליכי ההבשלה. לא מן הנמנע שלגן תפקידים נוספים בארכיטקטורת הפרה כפי שידוע בצמחים נוספים.



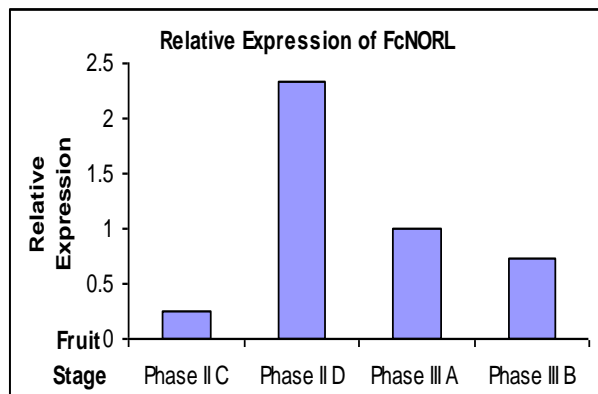
תמונה מס' 3. ביטוי כמותי של הגן RIN-LIKE במהלך הבשלת הפרי.

באמצעות פרימרים דגנרטיביים בודדו מתאנה גן הומולוגי לגן NOR שבעגבניה הראו כי הוא קשור לבקרת יצירת אתילן. תמונה מס' 5 ניתן לראות את הרצף שבודד ומידת ההומולוגיה שלו לגן בעגבניה שמגיעה ל-30%.

Fc-NOR Like	0
Le-NOR	MESTDSSTGTRHQPQLPPGFRFHPTDEELIVHYLKKRVAG	40
Fc-NOR Like	0
Le-NOR	APIPVDIIGEIDLYKFDPWELPAKAIFGEQEWFFSPRDR	80
Fc-NOR LikeASRLDKPVLTSXGTQKVGVKKA	22
Le-NOR	KYPNGARPNRAATSGYWKATGTDKPVFTSAGTQKVGVKKA	120
Fc-NOR Like	LVFYGGKPKPKGIKTNWIMHEYRLAENKANNRPPGCD..LA	60
Le-NOR	LVFYGGKPKPKGVKTNWIMHEYRVVENKTNKPLGCDNIVA	160
Fc-NOR Like	NKKNLSRLDDWVLCRIYKKNNTNRPLDHQEMDHSIDDM	100
Le-NOR	NKKSRLDDWVLCRIYKKNNTOR.....SIDLHDM	193
Fc-NOR Like	CPINQ.VFMSNLLGPQ..NICLKRRAVLPGMYW.....N	131
Le-NOR	GSIFQNVPSILQGIKPSNYGTILLENESNMYDGIMNNTN	233
Fc-NOR Like	DAMNNDNDEASGPGSSSKR.....LQLDHDCAETG...	162
Le-NOR	DIINNNNR..SIFQISS.KRTMHGGLYWNNDEATTTTTI	270
Fc-NOR LikeECNS.....HASSLAT	173
Le-NOR	DRNHSPNTRKFLVENNEDDGLNMNNSRITNHEQSSIAN	310
Fc-NOR Like	MHTQLPQGTSSPLHQO.....	189
Le-NOR	FLSQSPQNSIQQQQQQEEVLGSLNDGVFRQPYNQVTG	350
Fc-NOR Like	189
Le-NOR	MNWY	354

תמונה מס' 4. השוואת רצפים בין הגן NOR מעבניה לגן NOR-LIKE שבודד מתאנה.

בחנו את הביטוי של הגן במהלך הבשלת פרי התאנה. לשם כך בודדנו cDNA מתאנים בדרגות הבשלה שונות וביחנו בהן את מידה הביטוי של הגן. תמונה מס' 5 מסכמת את מידת ביטוי הגן במהלך הבשלת פרי התאנה. מצאנו כי רמת הביטוי בגן עולה במהלך התקופה שקרובה להבשלת הפרי.



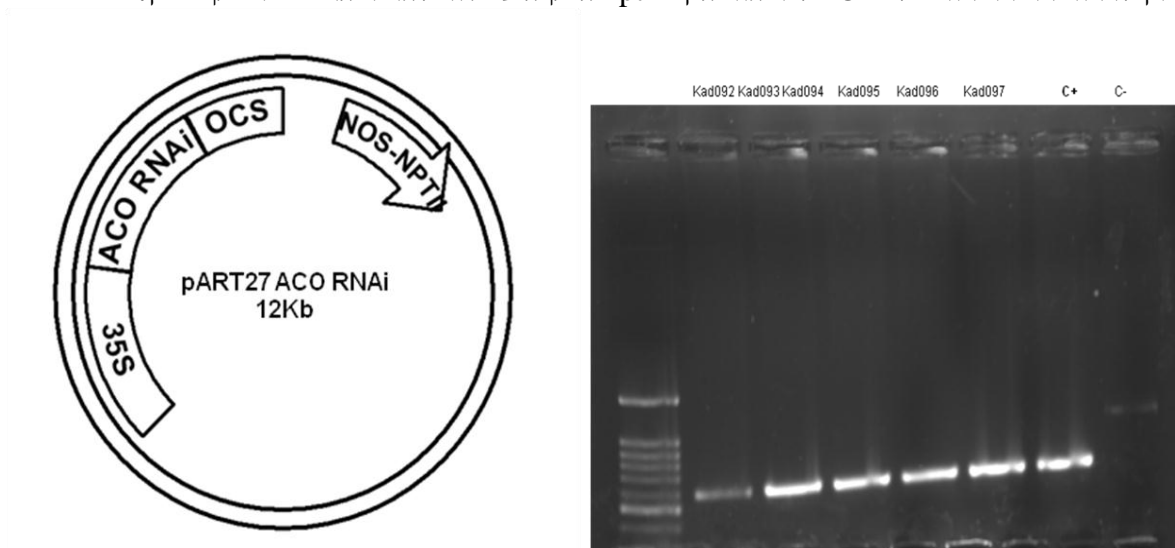
תמונה מס' 5. ביטוי כמותי של הגן NOR-LIKE במהלך הבשלת הפרי.

בחינה פונקציונאלית של הגנים באמצעות התמרה בתאנה.

מהתוצאות שהוצגו עד כה נראה כי בידנו מצויים 3 גנים שעולים במהלך תהליך ההבשלה של התאנה. כדי לאשש את הקשר והחשיבותם של הגנים הנ"ל לתהליך ההבשלה נעשת כעת בחינה פונקציונאלית. הבחינה הפונקציונאלית נעשית באמצעות השתקתם של הגנים הנ"ל. השתקת הגנים תאפשר לבחון האם בדרך זו ניתן להאריך את חיי כושר האחסון של הפרי.

א. השתקת הגן ACO

במהלך שנת העבודה הראשונה, בנינו מבנה לעצירת הביטוי של הגן לסינתזת אתילן ACO, בטכנולוגיית RNAi. באמצעות החיידק אגרובקטריאום נעשתה התמרה גנטית של הקונטרקט לתאנה והתקבלו 4 קווי התמרה. תמונה מס' 6 ניתן לראות את תוצאות של PCR לנוכחות הגן nptII המקנה עמידות לחומר האנטיביוטי קנמיצין.



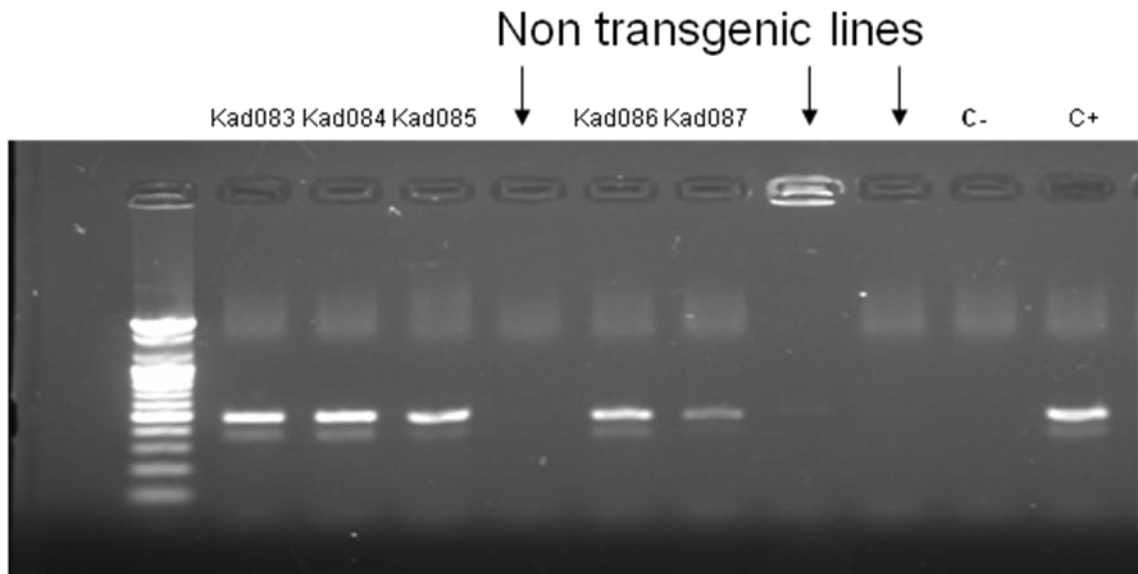
תמונה מס' 6. התמרה גנטית של צמחי תאנה בקונטרקט pART ACO RNAi. מבנה הפלסמיד ותוצאות PCR לנוכחות הגן nptII.

ב. השתקת הגן NOR.

בנינו מבנה לעצירת הביטוי של הגן לבקרת סינתזת אתילן NOR-LIKE שבודד מתאנה, בטכנולוגיית RNAi (תמונה מס' 7). באמצעות החיידק אגרובקטריאום נעשתה התמרה גנטית של הקונטרקט לתאנה והתקבלו 4 קווי התמרה. תמונה מס' 8 ניתן לראות את תוצאות של PCR לנוכחות הגן nptII המקנה עמידות לחומר האנטיביוטי קנמיצין.

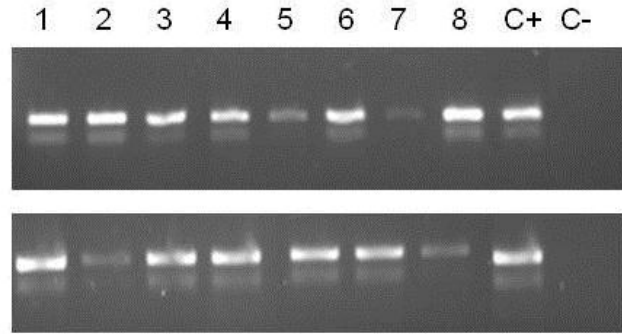


תמונה מס' 7. מבנה הפלסמיד ששימש להתמרה גנטית של תאנה ליצירת השתקה של הגן NOR-LIKE.



תמונה מס' 8. התמרה גנטית של צמחי תאנה בקונטרקט pART NOR RNAi. מבנה הפלסמיד ותוצאות PCR לנוכחות הגן nptII.

הקווים המותמרים גדלים כעת בחממה הטרנסגנית. לאחרונה הם החלו ליצר פירות (תמונה מס' 9). במהלך שנת העבודה השלישית נבחן את תהליכי ההבשלה של הפרי בקווי התאנה מותמרים.

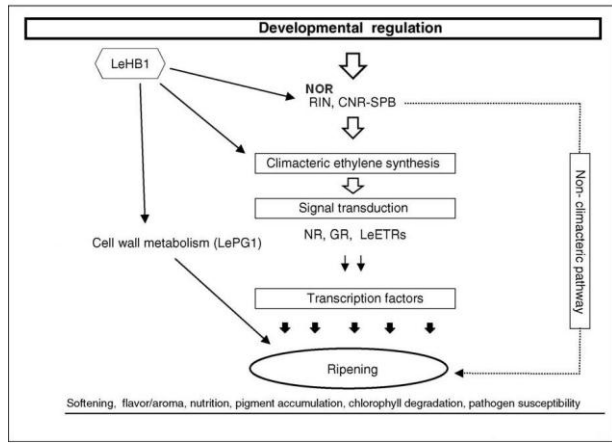


תמונה מס' 9. קווי תאנה מותמרים הגדלים בחממה הטרנסגנית. התמרת צמחי תאנה עם מבנים להשתקת גנים מועמדים לבקרת הבשלה. א. בדיקת צמחים מותמרים במבנה להשתקת הגן *FcNORI*. בחינת ההתמרה נעשתה ב-PCR עם פריימר לפרומוטור 35S ופריימר לסוף מבנה ההשתקה. מתוך הקוים שהראו התמרה מוצלחת נבחרו 5 קוים להמשך הניסוי. הבקורת החיובית היא פלסמיד המכיל את המקטע המוגבר. הבקורת השלילית היא צמח WT. ב. בחינת צמחים מותמרים במבנה להשתקת הגן *FcACOI*. כמפורט באיור א'. ג. צמח תאנה מותמר במבנה להשתקת הגן *FcACOI*. הצמח כיום בגובה של כ-120 ס"מ, וצפוי לתת פרי בקיץ הקרוב.

הומולוגיית הגן *FcMADS2* לרצף של *LeRIN* גבוהה מזו של הגן *FcMADS1* ולכן נבחר *FcMADS2* להתמרה בצמח תאנה. מבנה להשתקת הגן *FcMADS2* שימש להתמרה לפני מספר חודשים וצפוי לתת פרי בקיץ 2013.

בחינת פונקציונאליות של גנים דמויי RIN ו-NOR מתאנה על ידי התמרה בעגבניות

בקרי השעתוק *LeHB-1*, *NOR*, *RIN* ו-*CNR* מפעילים את מערכת ייצור האתילן 2 בפירות קלימקטריים. הרצפטורים לאתילן *NR* ו-*LeETRs* קולטים את ההורמון (GR הוא חלבון עזר לרצפטור) ומעבירים את האות לתחילת תהליכי ההבשלה. מוטנטים שאינם מבשילים בעגבניה סללו את הדרך למציאת בקרי השעתוק המקדימים ליצירת אתילן וליתר תהליכי ההבשלה. הגנים *RIPENING INHIBITOR (RIN)*, *NON RIPENING (NOR)* ו-*COLOURLESS NON RIPENING (CNR)* בודדו ממוטנטים בהם לא מתרחשת עלייה בייצור אתילן או בנשימה המאפיינות את הבשלת העגבניה הקלימקטרית, בעוד תהליכים אחרים תלויי אתילן מתרחשים באופן רגיל דוגמת הזדקנות ונשירת עלים. שלושת המוטנטים אינם מבשילים גם במתן אתילן חיצוני ונמצא כי השוני הגורם לפנוטיפ חסר ההבשלה הוא בגנים של שני בקרי שעתוק במוטנטים *rin* ו-*nor*, ובמטילציית פרומוטור של בקר שעתוק במוטנט *cnr*. בקרי שעתוק אלו אחראים להפעלת כלל תהליכי ההבשלה ובראשם ייצור וחישת אתילן (איור מס' 10).



איור מספר 10: סכימה כללית של גנים ותהליכים בהבשלת פרי העגבניה.

שני מקטעים הומולוגיים לגן *LeRIN* באורך מלא (כ- 750bp) בודדו מתאנה. הרצף *FcMADS1* מראה הומולוגייה ברמת החלבון של 50% לעגבניה (GB AAM15775), (איור מס' 11א'), 77% להומולוג בתות (GB AAO49380) ו- 51% להומולוג בפלפל (GB ABJ98752). הרצף *FcMADS2*, מראה הומולוגייה ברמת החלבון של 56% לעגבניה (GB AAM15775), (איור מס' 11ב'), 57% להומולוג בתות, ו- 56% להומולוג בפלפל. מקטע הומולוגי לגן *LeNOR* מעגבניה באורך מלא (1119bp) בודד מתאנה. הרצף *FcNAC1* מראה הומולוגייה ברמת החלבון של 54% לעגבניה (GB AAU43922), (איור מס' 11ג').

ב.

FcMADS2 S1RIN	MGRGRVELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCEAEVALIIFSN MGRGKVELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCEAEIALIIFSS *****:*****.
FcMADS2 S1RIN	RGKLYEFCSSPSMVKTLEKYHKYSYGSELEATQPTNDTQSSYQEYLKLR RGKLYEFCSSNSMSKTLERYHRYNYGTLEGTQSSSDSQNNYQEYLKLR *****.* **
FcMADS2 S1RIN	VEVLQRSQRNLLGEDLGPLSSKELEHLENQLETSLRHIRSTRQSMLDQL VEMLQSQRHLLGEDLGLGTKDLEQLERQLDSSLRQIRSTKTQHILDQL **:*
FcMADS2 S1RIN	ANLQQREHTLEARNALRRQLEENNSAQIPLRLAWEAAGEQDSIPFTRH AELQQKEQSLTEMNKSLRIKLEELGVT---FQTSWH-CGEQSVQYRHEQ *:
FcMADS2 S1RIN	PTQPEWFFQPLGNS-SAALQIGNNSMGPDGMVNGAQAFNGYVHGWM PSHHEGFFQHVNCNNTLPIISYGYDNVQPE--NAAPSTHDATGVVPGWML *:

א.

FcMADS1 S1RIN	MGRGRVELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCEAEVALIIFSN MGRGKVELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCEAEIALIIFSS *****:*****.
FcMADS1 S1RIN	RGKLYEFCSSPSMVKTLEKYHKYSYGSELEATQPTNDTQSSYQEYLKLR RGKLYEFCSSNSMSKTLERYHRYNYGTLEGTQSSSDSQNNYQEYLKLR *****.* **
FcMADS1 S1RIN	FESLQRTQRNLLGEDLGPLSTKELEQIERQLESLSLKQVSTKTQYMLDQL VEMLQSQRHLLGEDLGLGTKDLEQLERQLDSSLRQIRSTKTQHILDQL .* *:*:
FcMADS1 S1RIN	ADLQSKHEMLIDANRALTKLDEISRRNFRSESEWEVGDQDHQQTMPYAP AELQQKEQSLTEMNKSLRIKLEELGVT---TFQ-TSWHCGEQSVQYRHE--Q *:
FcMADS1 S1RIN	PHAHSQGLIFQPLDCNPNLQI--GFNAVVSQITSTSHAQQVXGFIPEGWM P-SHHEG-FFQHVNCNNTLPIISYGYDNVQPE--NAAPSTHDATGVVPGWML *:
FcMADS1 S1NOR	L IMESTDSSAGSQPQPNLPP21GFRFHPTDEELVVHYLKKKT41LAPL IMESTDSSSTGTR--HQPLP--PGFRFHPTDEELIVHYLKK--RVAGAPI *****:
FcNAC S1NOR	PVAIIAEVDLYKFD61WELPAKATFGEQEWYFFSPR81DRKYPNGARPN PVDIIGEDLYKFD61LPAKAFGEQEWYFFSPR--RKYPNGARPN *:
FcNAC S1NOR	RAATSGYWK101ATGTDKPVLTSGGTQKVGWK121KALAFYGGKPPKGIK RAATSGYWKA---TGTDKPVLTSGGTQKVGWK121LVFYGGKPPKGVK *****.* ** ** ** ** ** ** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:
FcNAC S1NOR	TNWIM141HEYRLAENKANNRPPGCDLA161NKKNSLRLLDDWVLCRIYKK TNW---IMHEYRVVENKTNKPLGCD--NIVAKKNSLRLLDDWVLCRIYKK *:
FcNAC S1NOR	N181NTNRPLDHEMDHSDIDDM201GPIINQVPMNLLGPQINIGK221 N-----181NTQRSIDDLHMDLGSIPQ-----NV *:
FcNAC S1NOR	QQQLLKSATVISYGTALSEN241DHNLFQDGLSCGNDNGVHVS261ASCF PNSILQGIKPSNYGTILLNESN--MYDGMNNTNDI--INNNN--- *:
FcNAC S1NOR	KQPDHQQQEQQLPMK281RAVLPGMYWNDAMNNDNDEA301---SGPG -----241RSIPQISSKRTMHGGLYWN---DEATTTTTIDRHH *:
FcNAC S1NOR	SSSKRLQDHDHDCATG32-----1TEGNH--ASSLATMHAQLPGQ341 SPNTRKFLVENNEDDGLMNMNISRT301NHEQSSSIANFLSQFPQNPISI *:
FcNAC S1NOR	TSSPLHQQTIVLGGLDGLFQ361RPFQPLGMW-- QQQQQQQEEVLGSLNDGVVFRQPY--NQVTGMNWS *:

איור מספר 11: השוואת רצפים שבודדו מתאנה.

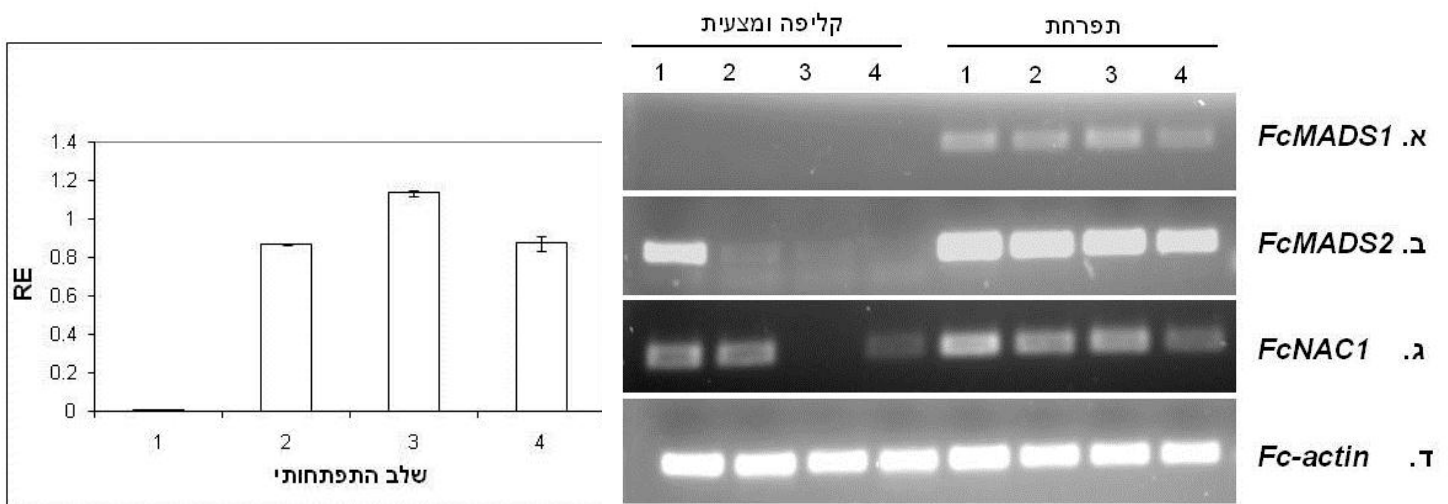
א. השוואת תרגום הרצף *FcMADS1* לחלבון MADS-RIN בעגבניה (GB AAM15775). הומולוגייה של 50% קיימת בין תרגום הרצף *FcMADS1* מהתאנה לחלבון העגבניה MADS-RIN.

ב. השוואת תרגום הרצף *FcMADS2* לחלבון MADS-RIN בעגבניה (GB AAM15775). הומולוגייה של 56% קיימת בין תרגום הרצף *FcMADS2* מהתאנה לחלבון העגבניה MADS-RIN.

ג. השוואת תרגום הרצף *FcNAC1* לחלבון NAC-NOR בעגבניה (GB AAU43922). הומולוגייה של 54% קיימת בין תרגום הרצף *FcNAC1* מהתאנה לחלבון העגבניה NAC-NOR.

בעגבניה (GB AAU43922). הומולוגייה של 54% קיימת בין תרגום הרצף *FcNAC1* מהתאנה לחלבון העגבניה NAC-NOR.

הערכה של ביטוי הגנים *FcMADS1*, *FcMADS2* ו-*FcNAC1* נעשתה ב-RT-PCR באמצעות פריימרים לאזורים ייחודיים ברצף. נבדקו דוגמאות cDNA מארבעה שלבי ההתפתחות: סוף פאזה שנייה- הפרי ירוק וקשה, מעבר לפאזה שלישית- הפרי צהוב ומתחיל להתרכך, אמצע פאזה שלישית- הפרי מחליף צבעו לסגול וסוף פאזה שלישית- הפרי הגיע להבשלה מלאה, סגול לגמרי, רך ועסיסי. בכל שלב הופרדו המצעית עם הקליפה מן התפרחת. עפ"י הערכת הביטוי נראה כי הגן *FcMADS1* אינו מתבטא במצעית בשלבים שנבדקו אך בתפרחת הגן מתבטא בארבעת שלבי ההתפתחות (איור מס' 12א'). בריצוף הטרנסקריפטום רצף הגן מופיע בדוגמא הראשונה והרביעית שרוצפו: פרי בתחילת הפאזה השנייה, ופרי בשיא תהליכי ההבשלה. מספר העותקים של גן זה נמוך מאוד בדוגמאות בו נמצא, דבר המרמז על ביטוי נמוך של הגן. הגן *FcMADS2* מתבטא במצעית בסוף הפאזה השנייה (דוגמא 1, איור מס' 12ב') ורמת הביטוי יורדת באופן חד מפרי המעבר (דוגמא 2, איור מס' 12ב') עד לפרי הבשל (דוגמא 4, איור מס' 12ב'). בתפרחת גן זה מתבטא בכל השלבים שנבדקו (איור מס' 12ב'). בריצוף הטרנסקריפטום רצף הגן מופיע בארבעת הדוגמאות שרוצפו. מספר העותקים של גן זה קטן בכל הדוגמאות שרוצפו, דבר המרמז על ביטוי נמוך של הגן. הגן *FcNAC1* מתבטא במצעית בסוף הפאזה השנייה (דוגמא 1, איור מס' 12ג') ובשלב המעבר מהפאזה השנייה לפאזה השלישית (דוגמא 2, איור מס' 12ג'). רמת ביטוי הגן יורדת בפרי המשנה את צבעו והמתרכך (דוגמא מס' 3, איור מס' 12ג') ועולה שוב בפרי הבשל (דוגמא 4, איור מס' 12ג'). בתפרחת גן זה מתבטא לאורך כל השלבים (איור מס' 12ג'). בריצוף הטרנסקריפטום רצף הגן מופיע בארבעת הדוגמאות שרוצפו. בכל הדוגמאות מספר העותקים דומה, דבר המרמז על ביטוי קבוע, בניגוד להערכה עפ"י ה-RT-PCR. ייתכן כי הדבר נובע מהפרדה לא מלאה של התפרחת בדוגמאות שרוצפו.



איור מספר 12: הערכת ביטוי גנים מועמדים לבקרת הבשלה בתאנה. נאספו 4 דוגמאות בהן הופרדו המצעית והקליפה מן התפרחת. דוגמא 1- סוף פאזה שנייה, פרי ירוק וקשה. דוגמא 2- מעבר בין פאזה שנייה לשלישית, פרי צהוב ומתחיל להתרכך. דוגמא 3- אמצע פאזה שלישית, פרי מחליף צבע ורך. דוגמא 4- פרי שהגיע להבשלה מלאה. א. הערכת ביטוי הגן *FcMADS1* בשלבי התפתחות שונים. תוצר הגברה של אזור ספציפי לגן *FcMADS1* על דוגמאות 1-4. ב. הערכת ביטוי הגן *FcMADS2* בשלבי התפתחות שונים. תוצר הגברה של אזור ספציפי לגן *FcMADS2* על דוגמאות 1-4. ג. הערכת ביטוי הגן *FcNAC1* בשלבי התפתחות שונים. תוצר הגברה של אזור ספציפי לגן *FcNAC1* על דוגמאות 1-4. ד. הערכת ביטוי הגן *Fc-actin* בשלבי התפתחות שונים. תוצר הגברה של הגן *Fc-actin* על דוגמאות 1-4. ה. ביטוי יחסי של הגן *FcACO1* בשלבי התפתחות שונים. ביטוי הגן *FcACO1* נבדק ביחס לביטוי הגן *actin* ב-qPCR (RE- relative expression). דוגמאות 1-4 הן כנוזר למעלה.

שלושה מבנים בינאריים המכילים את אורך הגן המלא *FcMADS1*, *FcMADS2*, ו-*FcNAC1* במסגרת קריאה תחת הפרומוטר 35S (ראו איור מס' 13א) נבנו והותמרו למוטנט העגבניה *rin* (מבני הגנים *FcMADS1* ו-*FcMADS2*) ולמוטנט *nor* (מבנה הגן *FcNAC1*). מכל התמרה נאספו כ- 10 קוים הנמצאים כיום בשלבי התארכות וצפויים לתת פרי בקיץ הקרוב. סיכום ההתמרות שבוצעו עבור כל גן מופיע בטבלא 3.



איור 13. שלושה מבנים בינאריים המכילים את אורך הגן המלא *FcMADS1*, *FcMADS2*, ו-*FcNAC1* במסגרת קריאה תחת הפרומוטר 35S

מבנים בינאריים המכילים מקטעים ייחודיים לגנים *FcMAD2*, *FcNAC1* ו-*FcACO* בתצורת RNAi תחת הפרומוטר 35S נבנו והותמרו לתאנה (איור מס' 16ב). מהתמרות המבנים להשתקת *FcNAC1* ו-*FcACO* נלקחו 5 קוים שהתמרתם הוכחה באמצעות PCR למחדר (איור מס' 17א), הצמחים גדלים כיום בעציצים וצפויים לתת פרי בקיץ הקרוב (איור מס' 17ב).

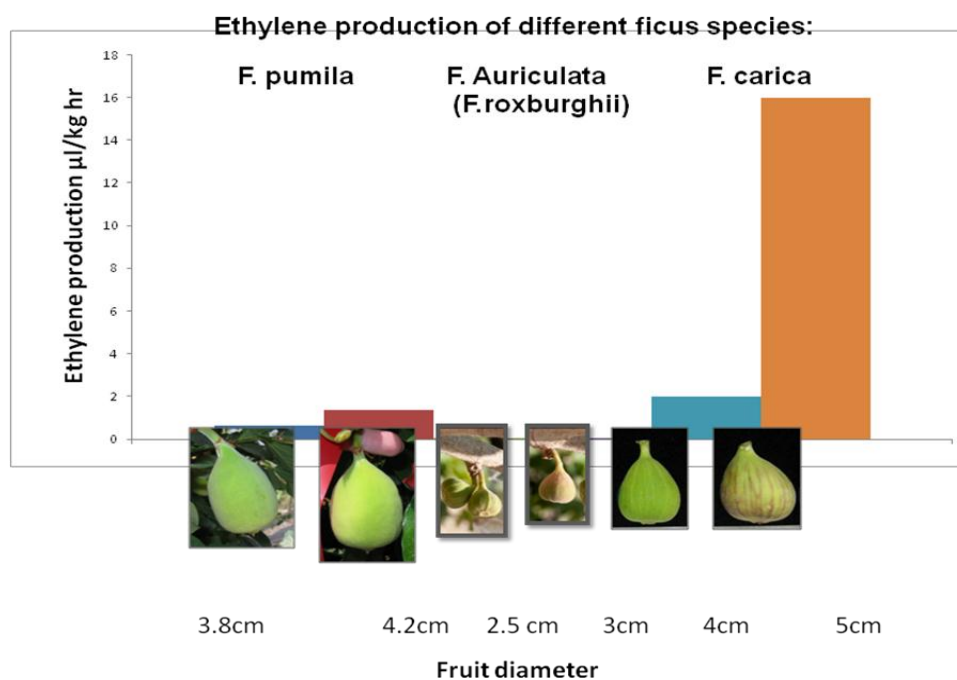
סיכום ההתמרות שבוצעו עבור כל גן מופיע בטבלא 1.

טבלה מס' 1. סיכום ההתמרות שבוצעו עבור כל גֵּבְתָּאנָה ובעגבניה.

הגן הנבדק	שם המבנה	צמח מותמר	צפי	זמן יבול
<i>FcMADS1</i>	pART27:: <i>FcMADS1</i>	מוטנט העגבניה <i>rin</i>	הבשלה/הבשלה חלקית	קיץ 2011
<i>FcMADS2</i>	pART27:: <i>FcMADS2</i>	מוטנט העגבניה <i>rin</i>	הבשלה/הבשלה חלקית	קיץ 2011
	pART27:: <i>FcMADS2</i> RNAi	תאנה	עיכוב הבשלה	קיץ 2013
<i>FcNAC1</i>	pART27:: <i>FcNAC1</i>	מוטנט העגבניה <i>nor</i>	הבשלה/הבשלה חלקית	קיץ 2011
	pART27:: <i>FcNAC1</i> RNAi	תאנה	עיכוב הבשלה	קיץ 2011
<i>FcACO1</i>	pART27:: <i>FcACO1</i> RNAi	תאנה	עיכוב הבשלה	קיץ 2011

בחנת יצירת אתילן במיני פיקוסים שונים.

בחנו את מהלך יצירת האתילן במיני פיקוסים שונים בהשוואה ל- *F. carica* זן התאנה (תמונה מס' 14). נמצא כי בשני סוגי פיקוסים שאינם מתרככים ונשארים קשים על גבי העץ אין כמעט יצירת אתילן. יתכן שהכלאות בין מיני פיקוסים אלו לזן התאנה יכולים לגרום ליצירת פירות שאינם מיצרי אתילן ובדרך זו למנוע את התרככות הפרי.



תמונה מס' 14. יצירת אתילן במיני פיקוסים שונים.

5. רשימת ספרות מצוטטת

Giovannoni, J. J., 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16,s170-s180.

Owino, W.O., Manabe, Y., Mathooko, F.M., Kubo, Y., and Inaba, A. 2006. Regulatory mechanisms of ethylene biosynthesis in response to various stimuli during maturation and ripening in fig fruit (*Ficus carica* L.) *Plant Physiology and Biochemistry* 44:335–342.

6. סיכום על פי שאלות מנחות

מטרות המחקר. המטרה ארוכת הטווח של המחקר היא לאפיין את מערך ההבשלה בתאנים וליצור תאנה שאינה מייצרת אתילן ולבחון בה את היכולת להאריך את כושר אחסון הפרי. **עיקרי הניסויים והתוצאות.** בחנו במחקר הנוכחי 3 גישות: הגישה הורטיקולטורית של ישום מעכב חישת האתילן 1MCP. הגישה הטרנסגנית בודדו שורה של גנים מבקרי יצירת אתילן ובחנו בחינה פונקציונאלית של גנים אלו בתאנה ועגבניה. בחנו את מהלך יצירת האתילן במספר מיני פיקוסים אחרים שהם ברי הכלאה עם התאנה. **המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.**

הראינו את מרכזיות הורמון ההבשלה אתילן בתהליכי הבשלת הפרי בתאנה. מצאנו כי שיתוק האתילן עם על ידי ישום 1MCP או באמצעות בידוד גנים מבקרי תהליכי הבקרה והיצירה של האתילן ניתן להשפיעה על תהליכי ההבשלה. בחנו את מהלך יצירת האתילן במספר צמחים ממשפחת הפיקוסים כדי לזהות מוטנטים טבעיים ליצירת אתילן. המינים שאינם מיצרי אתילן הם ברי הכלאה עם תאנה.

המשך ביצוע המחקר. בשל החשיבות החקלאית הרבה של הנושא בכוונתינו להמשיך ולבחון את המערכות שפיתחנו מעבר לתוכנית המדען הנוכחית. **הבעיות שונתרו לפתרון.** לבדוד גנים פונקציונאליים להערכת כושר האחסון. לבצעה הכלאות בין מיני פיקוסים לקבלת טיפוסים מעוכבי הבשלה.

האם הוחל כבר בהפצת הידע. התקבל לפרסום המאמר הבאה:

Zohar E. Freiman; Victor Rodov; Zeev Yabloviz; Batia Horev; Moshe Flaishman (2011).

Preharvest application of 1-methylcyclopropene inhibits ripening and improves keeping quality of 'Brown Turkey' figs (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae* (accepted for publication).

תוצאות דווחו בכנס מגדלי תאנים בישראל.

כמו כן, חלק מהתוצאות הוצגו בכנסים בינלאומיים במרוקו ובפורטוגל ובהרצאות מוזמנות בצרפת וסין.

הפצת הידע. אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

