

## אפיון מולקולארי מתקדם של הלוקוס *AFT* המבקר יצירת אנטוציאנינים

### בפרי העגבניה ושימושים בו

#### Advanced molecular characterization and applications of the *AFT* locus controlling anthocyanin accumulation in the tomato fruit.

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	אילן לוין
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	משה ראובני
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	מיכל אורן-שמיר
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	משה פלישמון
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	דליה אבנאור
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	רינת עובדיה
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	לאה חן
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	שרה גולובוביץ
מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	זאב יבלוביץ

Ilan Levin, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [vclevini@volcani.agri.gov.il](mailto:vclevini@volcani.agri.gov.il)  
Moshe Reuveni, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [vhmoshe@volcani.agri.gov.il](mailto:vhmoshe@volcani.agri.gov.il)  
Michal Oren-Shamir, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [vhshamir@volcani.agri.gov.il](mailto:vhshamir@volcani.agri.gov.il)  
Moshe Flaishman, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [vhmoshea@volcani.agri.gov.il](mailto:vhmoshea@volcani.agri.gov.il)  
Dalia Evenor, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [vhevenor@volcani.agri.gov.il](mailto:vhevenor@volcani.agri.gov.il)  
Rinat Ovadia, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [rinat@volcani.agri.gov.il](mailto:rinat@volcani.agri.gov.il)  
Lea Chen, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [chenleah@volcani.agri.gov.il](mailto:chenleah@volcani.agri.gov.il)  
Sara Golobovitch, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [golobovichs@volcani.agri.gov.il](mailto:golobovichs@volcani.agri.gov.il)  
Ze'ev Yablovitz, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan 50250. E-mail: [vhzyablo@volcani.agri.gov.il](mailto:vhzyablo@volcani.agri.gov.il)

מרץ 2011

אדר ב' תשע"א

### הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

### הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.

### חתימת החוקר \*

#### רשימת פרסומים:

1. גלי שרייבר (2010) "אפיון תפקודי של הגן *ANTHOCYANINI* מעגבניית הבר *Solanum chilense* בצמחי עגבנייה תרבותית טרנסגניים". עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'.
2. עמיר בוטבול-מן (2010) "אפיון פונקציונאלי של הגן *ANTI* מעגבנייה בצמחי טבק טרנסגניים". עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'.
3. Schreiber, G., Reuveni M., Evenor D., Oren-Shamir M., Ovadia R., Sapir-Mir M., Bootbool-Man A., Nahon S., Shlomo H., Chen L., and Levin, I. (2011). Functional analysis of the *Solanum chilense ANTHOCYANINI* in relation to its cultivated

counterpart and *ANTHOCYANIN FRUIT* in transgenic tomato and tobacco plants. *Plant & animal Genome XIX, San Diego, USA. p. W530.*

4. Schreiber, G., Reuveni M., Evenor D., Oren-Shamir M., Ovadia R., Sapir-Mir M., Bootbool-Man A., Nahon S., Shlomo H., Chen L., and Levin, I. A comparative transgenic analysis of *ANTHOCYANINI* from *Solanum chilense* and *Solanum lycopersicum* in relation to the *ANTHOCYANIN FRUIT* genotype of tomato. Submitted to Theoretical and Applied Genetics.

**תקציר.** בעבר מצאנו כי *ANTI*, המקודד לפקטור תעתוק ממשפחת ה-*MYB*, נמצא בתאחיזה מלאה עם הגן הקובע אגירה של אנטוציאנינים ופלבונולים פונקציונאליים בפרי העגבניה בגנוטיפ *AFT* שמקורו ממין הבר *S. chilense*. תאחיזה מלאה זו ותוצאות מולקולאריות אחרות הראו כי קיימת סבירות גבוהה כי *ANTI* הוא אכן הגן הקובע אגירת אנטוציאנינים בגנוטיפ *AFT* וכי הייתרון של הגן ממקור *S. chilense* (*ANTI<sup>C</sup>*) על פני האלל התרבותי (*ANTI<sup>L</sup>*) קשור למבנה ולא לרמת התעתוק שלו. כדי להוכיח זאת הכנו עשרות צמחים טרנסגניים של עגבנייה, טבק ותאנה אשר בהם מבוטאים שני האללים, *ANTI<sup>C</sup>* ו-*ANTI<sup>L</sup>* תחת פרומוטר קונסטיטויטיבי 35S. בשנה הראשונה לפרויקט דיווחנו כי חלק גדול מצמחי העגבנייה והטבק הטרנסגניים מבטאים פנוטיפ עז של צבירת אנטוציאנינים באיברים ווגטיביים ורפרודוקטיביים ואילו צמחי התאנה, אשר היו עדיין בשלב הווגטיבי, לא מבטאים עדיין פנוטיפ נראה לעין. כמו כן דיווחנו כי צמחי העגבנייה והטבק קודמו במהלך השנה הראשונה לדורות T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub> ועברו אפיון ראשוני הן בהיבט התעוקי והן בהיבט הפנוטיפי במספר רקמות ווגטיביות ורפרודוקטיביות. בשנת המחקר השנייה השלמנו חלק זה של המחקר תוך כדי ביצוע סדרה גדולה של ניתוחים תעוקיים ופנוטיפיים נוספים בעגבניה ובטבק. התוצאות שנתקבלו בשני המינים מראות, ללא ספק, כי האלל *ANTI<sup>C</sup>* יעיל יותר בהשוואה לאלל *ANTI<sup>L</sup>* בשפעול גנים של מסלול יצירת הפלבונואידים וכתוצאה מכך ביצירת פנוטיפ של אגירת אנטוציאנינים ברקמות ווגטיביות ורפרודוקטיביות גם יחד. תוצאות אלו תומכות בהשערה כי *ANTI* הוא הגן הקובע אגירת אנטוציאנינים בגנוטיפ *AFT* וכי הייתרון של *ANTI<sup>C</sup>* על פני *ANTI<sup>L</sup>* קשור למבנה ולא לתעתוק שלו. במהלך השנה השנייה התחלנו גם לנתח את טיב השפעת הגומלין בין *ANTI* לבין *HP-1*, בהתאם למטרה השנייה של מחקר זה. בנוסף, ייצרנו קונסטרקטים של *ANTI<sup>C</sup>* ו-*ANTI<sup>L</sup>* וכן קונסטרקטים עם מוטציות נקודתיות, כל אלה עם תוספת של שייר חלבוני, 3XHA, אשר יאפשרו לנו לעקוב אחר רמת החלבון הטרנסגני ולבודד את השינוי המבני הנקודתי המחולל את הייתרון של *ANTI<sup>C</sup>* על פני *ANTI<sup>L</sup>*. במהלך השנה השלישית לפרויקט ביצענו טרנספורמציות לקונטראקטים החדשים לצמחי טבק. צמחים אלו עוברים כרגע אפיונים מולקולאריים ומטבולומיים. כמו כן, נשלח לפרסום מאמר המסכם את התוצאות שקבלנו בעגבניה ומאמר נוסף, המסכם את התוצאות אשר קבלנו בטבק, נמצא בהכנה ויישלח לפרסום לאחר קבלת התוצאות מצמחי הטבק המותמרים החדשים.

**מבוא.** פלבונואידים הינם תרכובות פוליפנוליות, המצויות באורח טבעי ברב הצמחים. בשל חשיבותם הפונקציונאלית ומגוון הצבעים האטרקטיביים שהם יוצרים, הם מהווים יעד חשוב בטיפוח ומחקר של מיני פרחים, ענפי קישוט ופירות וכן מקור חשוב לצבע מאכל טבעי במזון ומשקאות. בהיבטים הללו יש לאנטוציאנינים, המהווים תת-קבוצה בתוך מגוון הפלבונואידים, תפקיד מרכזי בשל הצבעים העזים (צהבהב, דרך גוונים רבים של אדום ועד סגול עז) מסיסי המים, שהם יוצרים.

פלבונואידים בכלל והאנטוציאנינים בפרט היוו במהלך השנים, החל מהניסויים הגנטיים הבסיסיים של גרגור מנדל וברברה מקלינטוק, יעד במחקרים קלאסיים ומודרניים שתכליתם להבין את ההורשה של אגירת מטבוליטים חשובים אלה ועד ניסיונות להגביר את אגירתם באברים ווגטיביים ורפקודוקטיביים במגוון של מינים לצרכים חקלאיים כלכליים. בשל חשיבותה החקלאית והכלכלית, היוותה העגבניה התרבותית יעד חשוב במחקרים מעין אלה. אולם, למעט מיני בר ומספר מועט ולא מסחרי של "עגבניות מורשת", לא ידועים במגוון הגנטי והפנוטיפי של העגבניה התרבותית טיפוסים המסוגלים לייצר כמות גדולה של פלבונואידים ובמיוחד אנטוציאנינים בפרי. לכן, רב המחקרים שנעשו על העגבניה התרבותית בהיבט זה התבססו על טרנספורמציה טרנסגנית של גנים מבניים ובקרתיים ממקורות הומולוגיים והטרולוגיים. למרות ההצלחה הגדולה של מחקרים אלו, תוצריהם לא זכו למסחר

עקב חששות הצרכנים מתוצרת טרנסגנית, במיוחד באירופה. במסגרת מחקר שהחל לפני כשלוש שנים, החלטנו לבחון אפשרויות להגביר את ייצור הפלבנואידיים בפרי העגבניה באמצעים שאינם טרנסגניים. לאחרונה מצאנו כי *ANTI*, המקודד לפקטור תעתוק ממשפחת ה-*MYB*, נמצא בתאחיזה מלאה עם הגן (או הגנים) הקובעים אגירה של אנטוציאנינים ופלבנוולים פונקציונאליים בפרי העגבניה בגנוטיפ *AFT* שמקורו ממין הבר *S. chilense*. תאחיזה מלאה זו ותוצאות מולקולאריות נסיבתיות נוספות אשר הצטברו בידינו הראו כי קיימת סבירות גבוהה כי *ANTI* הוא אכן הגן הקובע אגירת אנטוציאנינים בגנוטיפ *AFT* וכי הייתרון של הגן ממקור *S. chilense* (*ANTI<sup>C</sup>*) על פני האלל התרבותי (*ANTI<sup>L</sup>*) קשור למבנה ולא לתעתוק שלו. בנוסף, מצאנו כי שילוב של הגן *AFT* עם הגן *HP-1*, אשר ידוע כמגביר ביוסינטיזה של קרוטנואידיים ופלבנוולים בפרי, יכול להעלות בצורה דרמטית והרבה יותר מאדיטיבית מגוון שלם של פלבנואידיים בפרי, במיוחד אנטוציאנינים, לקבלת פרי עם צבע סגול עז. להערכתנו, תוצאות אלו פותחות דרך להעשרה משמעותית של פרי העגבניה במגוון של מטבוליטים פונקציונאליים ממשפחת הפלבנואידיים וכן להעשרה של פרי העגבניה התרבותית בגווי צבע אקזוטיים שעשויים להיות אטרקטיביים לצרכן. כל זאת ללא אמצעים טרנסגניים. על תוצאות אלו נרשם פטנט בסוף שנת 2007 ופורסם מאמר בתחילת 2008 עוד לפני תחילתו של מחקר זה.

למחקר זה שתי מטרות עיקריות: (1) להוכיח כי *ANTI* הנו הגן אשר קובע את הפנוטיפ *AFT*, ו- (2) לאפיין

ברמה הפונקציונלית את פעילות הגן ובמיוחד את השפעת הגומלין שלו עם *HP-1*.

**פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות העיקריות.** בשתי שנות המחקר הראשונות השלמנו את המטרה הראשונה אשר מתמקדת בניסיונו להוכיח כי *ANTI* הנו הגן אשר קובע את הפנוטיפ *AFT*. לצורך זאת בחנו עשרות צמחים טרנסגניים של עגבנייה, טבק ותאנה אשר בהם מבוטאים שני האללים, *ANTI<sup>C</sup>* ו-*ANTI<sup>L</sup>* תחת פרומטר קונסטיטוטיבי 35S. חלק גדול מצמחי העגבנייה והטבק הטרנסגניים בטאו פנוטיפ עז של צבירת אנטוציאנינים באיברים ווגטיביים ורפרודוקטיביים. לעומת זאת, בצמחי התאנה לא נתקבל עד כה פנוטיפ נראה לעין. צמחי העגבנייה והטבק קודמו במהלך השנה השנייה לדורות מתקדמים, T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub>, ועברו אפיון מקיף הן בהיבט התעתוקי והן בהיבט הפנוטיפי בכל הדורות ובמספר רקמות ווגטיביות ורפרודוקטיביות. מאחר שתאנה אינה יכולה לשמש כמודל טוב לבחינת ההיפותזה הנוגעת למטרה הראשונה של מחקר זה החלטנו שלא להמשיך עם הניסויים במין זה.

להלן עיקר הממצאים שנתקבלו:

טבק: תוצאות המחקר בטבק סוכמו בהרחבה בעבודת מוסמך של התלמיד עמיר בוטבול-מן אשר הוצגה, בהצטיינות, לצוות בוחנים בשנת 2010: "אפיון פונקציונאלי של הגן *ANTI* מעגבנייה בצמחי טבק טרנסגניים". נתקבלו 20 צמחי טבק בלתי תלויים מדור T<sub>0</sub>, המבטאים ביתר את האלל *ANTI<sup>C</sup>*, ו-19 צמחים בלתי תלויים מאותו הדור, המבטאים ביתר את האלל *ANTI<sup>L</sup>*. מדגם של 5 צמחים בלתי תלויים בעלי ביטוי עז של אנטוציאנינים מכל גנוטיפ קודם לדורות T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> ו-T<sub>3</sub>. בעוד שבדור T<sub>0</sub> גודלו הצמחים אלו במבנה ניסוי של אקראיות מירבית, בדורות העוקבים גודלו הצמחים במבנה ניסוי של בלוקים באקראי (3 בלוקים, 3 צמחים מכל גנוטיפ). מהתוצאות היוזואליות שנתקבלו בכל הדורות, שרק חלקן מוצג באיור 1, ניתן היה להסיק שתי מסקנות עיקריות: (1) שני האללים יכולים להעלות בצורה משמעותית את צבירת האנטוציאנינים ברקמות ווגטיביות ורפרודוקטיביות בטבק, ו- (2) קיים יתרון ויזואלי ברור לאלל *ANTI<sup>C</sup>* על פני האלל *ANTI<sup>L</sup>* בצבירת אנטוציאנינים ברקמות אלו. בהתאם למסקנה 2 שלעיל הופקו אנטוציאנינים מהרקמות השונות של הצמחים בדורות השונים. כימות האנטוציאנינים בוצע בד"כ באמצעות ספקטרוטומטר (באורך גל 530), ואילו על מדגם של

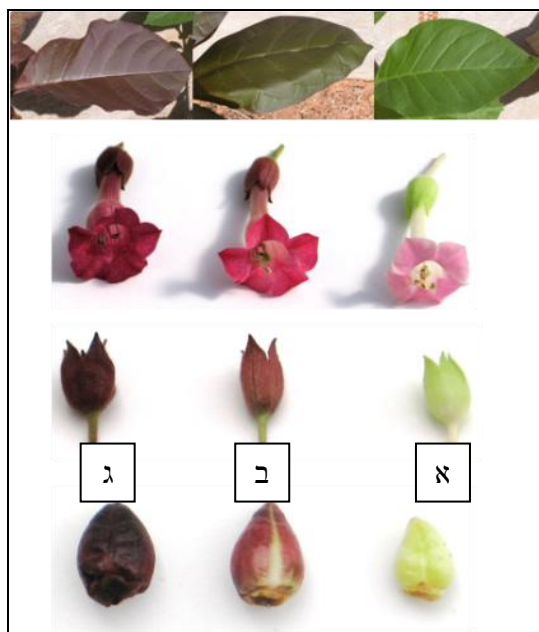
הצמחים בוצע אפיון מפורט יותר באמצעות HPLC אשר הציג מתאם גבוה מאוד לתוצאות הספקטראליות. למרות השונות שנתקבלה ברמות האנטוציאנינים בין הדורות השונים (תוצאה של מבנה הניסוי והשפעות סביבתיות מותנות עונת גידול), התקבל יתרון מובהק לקבוצת הגנוטיפ  $ANTI^C$  בהשוואה לקבוצת הגנוטיפ  $ANTI^L$  בכל הרקמות שנבחנו לאורך הדורות השונים. מפאת הכמות הרבה של הנתונים, נראה זאת להלן באופן מדגמי בלבד, המייצג נאמנה את תמונת האפקטים אשר נתקבלו לאורך הניסוי ברקמות השונות. מאיור 2 ניתן לדוגמא לראות כי קיימים הבדלים מובהקים במוצע רמות האנטוציאנינים ברקמת עלה הגביע בין שתי קבוצות הגנוטיפים שנבחנו לאורך 3 דורות גנטיים ובניסויים בלתי תלויים. בכל הדורות נתקבל ייתרון לקבוצת הגנוטיפ  $ANTI^C$  על פני קבוצת הגנוטיפ  $ANTI^L$ . בדור  $T_0$  היה היתרון פי 3.5  $[P(F)<0.001]$ , בדור  $T_1$  - פי 6.0  $[P(F)<0.001]$  ובדור  $T_2$  - פי 6.4  $[P(F)<0.001]$ . תוצאות דומות נתקבלו כאשר נדגמו רקמות נוספות. לדוגמא, בדור  $T_2$  נבחנו, בנוסף לעלי הגביע, גם עלים עטרות פרחים וקליפות תרמילים. התוצאות המוצגות באיור 3 ממחישות שוב את היתרון שיש לקבוצת הגנוטיפ  $ANTI^C$  על פני קבוצת הגנוטיפ  $ANTI^L$ . היתרון שהתקבל בביטוי הפנוטיפ לקבוצת הגנוטיפ  $ANTI^C$ , כפי שמוצג באיור זה, היה פי 6.3 בעלה  $[P(F)<0.001]$ , פי 3.5 בעטרת הפרח  $[P(F)<0.001]$ , פי 6.4 בעלה הגביע  $[P(F)<0.001]$ , ופי 6.0 בקליפות התרמילים  $[P(F)<0.001]$ .

כדי לבחון את התוצאות שנתקבלו לאור רמת התעתיקים של הגן המותמר, ביצענו Real time PCR לגן זה בשתי קבוצות הניסוי. אנליזות תעתוקיות אלו בוצעו על cDNA שסונתז מ-RNA שהופק מרקמות שונות ולאורך דורות הניסוי. בד"כ לא נתקבלו הבדלים מובהקים ברמת התעתיקים בין קבוצות הניסוי. כך ניתן לדוגמא להסיק מאיור 4, המציג את רמת התעתיקים של הניסוי אשר הוצג באיור 2. הצלבה של התוצאות, המוצגות באיור 2 לאלו המוצגות באיור 4, ממחישה את היעילות הגבוהה יותר של  $ANTI^C$  על פני  $ANTI^L$  כפי שמוצג באיור 5. תוצאות אלו וכן תוצאות אחרות שאיננו מציגים בגלל חוסר מקום מחזקות משמעותית את העובדה כי לאלל  $ANTI^C$  יעילות גבוהה יותר בהשוואה ל- $ANTI^L$  באגירת אנטוציאנינים ברקמות שונות של צמחי טבק טרנסגניים, בהתאם להנחות העבודה היסודיות שלנו.

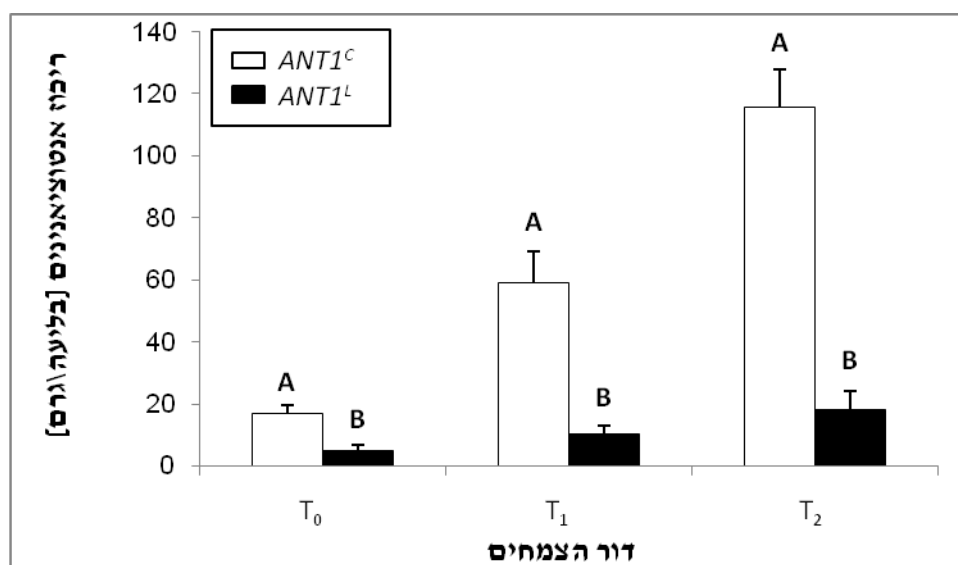
במהלך שתי השנים הראשונות לעבודה בוצע גם ניתוח תעתוקי של חמישה גנים מבניים הפועלים על מסלול יצירת הפלבנואידים ברקמות השונות ולאורך דורות הניסוי. התוצאות מראות כי לצמחים הטרנסגניים המבטאים את האלל  $ANTI^C$  יתרון תעתוקי מובהק על פני הצמחים הנושאים את האלל  $ANTI^L$ , במיוחד בגנים הפעילים בחלק המאוחר של המסלול, זה המוביל ליצירת אנטוציאנינים (התוצאות מוצגות באופן מפורט בעבודת המוסמך של מר עמיר בוטבול-מן "אפיון פונקציונאלי של הגן  $ANTI$  מעגבנייה בצמחי טבק טרנסגניים" אשר הוגשה ב-2010 לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים).

למרות שתוצאות אלה תומכות בהנחות העבודה היסודיות שלנו, עדיין אין בהן כדי להעיד על המכניזם שבאמצעותו מחולל  $ANTI^C$  את היתרון הפונקציונאלי שלו על פני האלל  $ANTI^L$ . לכן הכנו במהלך השנה השנייה לפרויקט קונסטרקטים של  $ANTI^C$  ו- $ANTI^L$  וכן קונסטרקטים עם מוטציות נקודתיות, כל אלה עם תוספת של שייר חלבוני 3XHA, אשר יאפשרו לנו לעקוב אחר רמת החלבון הטרנסגני ולבודד את השינוי המבני הנקודתי המחולל את היתרון של  $ANTI^C$  על פני  $ANTI^L$ . במהלך השנה השלישית לפרויקט ביצענו גם טרנספורמציות לקונסטרקטים החדשים לצמחי טבק. צמחים אלו עוברים כרגע אפיונים מולקולאריים ומטבולומיים. עם סיום האפיונים הללו נשלח לפרסום מאמר המסכם את התוצאות אשר נתקבלו בטבק.

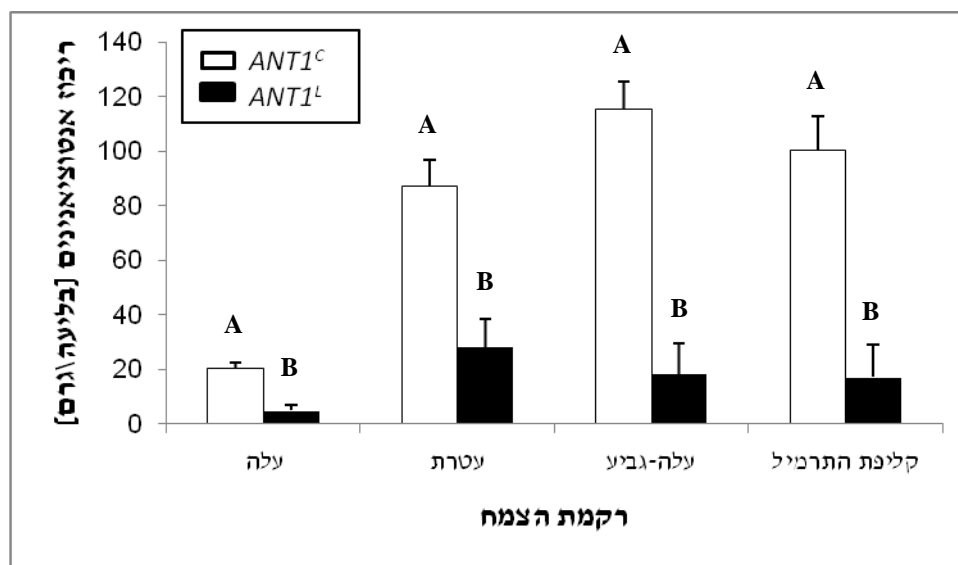
**איור 1.** מגוון פנוטיפים אשר התקבלו ברקמות הצמחים המותמרים בדורות  $T_2$  ו-  $T_3$  (א. רקמות מצמח נבחר מקבוצת הביקורת; ב. רקמות מצמח נבחר מקבוצת  $ANT1^L$ ; ג. רקמות מצמח נבחר מקבוצת  $ANT1^C$ ).



**איור 2.** ממוצעי ריכוז האנטוציאנינים ברקמת עלה הגביע של צמחי הטבק הטרנסגניים בשלושת דורות הניסוי [הבליעה נמדדה באורך גל של 530 nm; האותיות השונות מציינות הבדל מובהק,  $P < 0.05$ , בין קבוצות הגנוטיפ, בכל דור בנפרד, על-פי מבחן Tukey-Kramer HSD; ריכוז האנטוציאנינים בקבוצת צמחי הביקורת הלא מותמרים שואף לאפס ולכן אינו מוצג].



**איור 3.** ממוצעי ריכוז האנטוציאנינים ברקמת העלה, עטרת הפרח, עלה הגביע וקליפת התרמיל בדור T<sub>2</sub> [הבליעה נמדדה באורך גל של 530 nm; האותיות השונות מציינות הבדל מובהק, P<0.05, בין קבוצות הגנוטיפ, בכל דור בנפרד, על-פי מבחן Tukey–Kramer HSD; ריכוז האנטוציאנינים בקבוצת צמחי הביקורת הלא מותמרים שואף לאפס ולכן אינו מוצג].

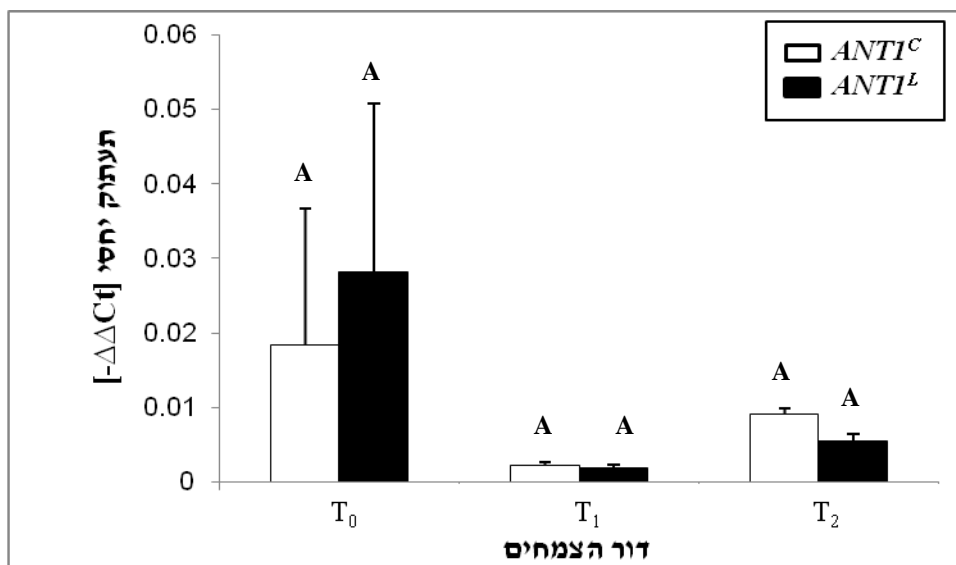


עגבניה: תוצאות המחקר בעגבנייה סוכמו בהרחבה בעבודת מוסמך של התלמידה גלי שרייבר אשר הוצגה בשנת 2010, בהצטיינות יתירה, לצוות בוחנים בפקולטה לחקלאות: "אפיון תפקודי של הגן *ANTHOCYANINI* מעגבניית הבר *Solanum chilense* בצמחי עגבנייה תרבותית טרנסגניים". בדומה לטבק, התקבלו בעגבניה תוצאות ויזואליות דומות לאלו שהתקבלו בטבק. במפתיע קבלנו צבירה חזקה מאוד של אנטוציאנינים בכל רקמות הפרי, כולל הפריקרב, בשתי קבוצות הגנוטיפים, אך עם שכיחות גבוהה יותר לגנוטיפ ANTI<sup>C</sup>, כפי שהצגנו באופן מפורט בדוח שהגשנו בשנה הראשונה. תוצאות אלו שונות באורח מובהק מעבודות קודמות שבהן בטאו ביתר פקטורי תעתוק דומים. נראה כי הצלחנו לייצר פירות אשר בהם ישנו ביטוי עז של אנטוציאנינים בכל רקמות הפרי כתוצאה מביטוי ביתר של פקטור תעתוק בודד בעוד שבעבודות קודמות היה צורך לבטא ביתר פקטור תעתוק נוסף, ממשפחת ה-*MYC*, כדי לקבל פנוטיפ דומה (איור 6).

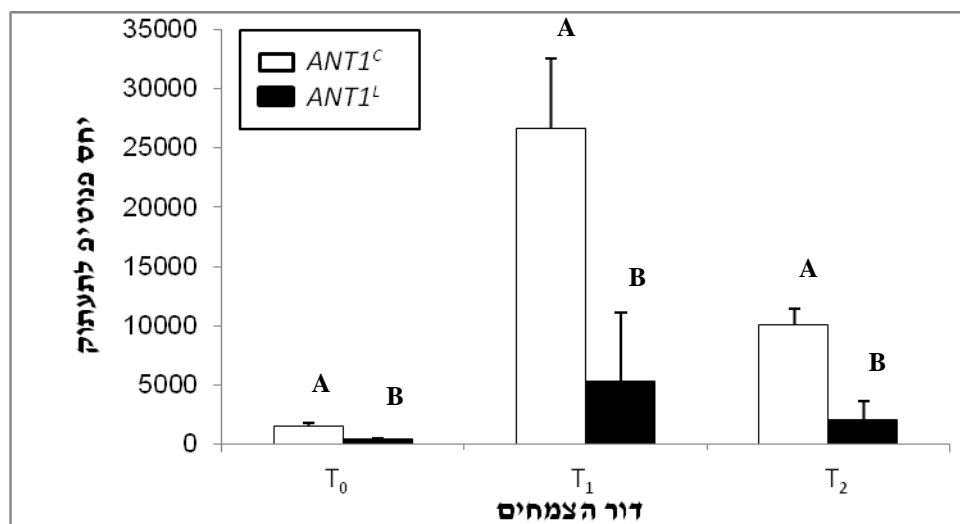
כפי שדיווחנו בשנה הראשונה והרחבנו לדורות נוספים בשנה השנייה, גם בעגבנייה בדומה לטבק נתקבל יתרון לאלל ANTI<sup>C</sup> על פני האלל ANTI<sup>L</sup> במונחי יחס פנוטיפ לתעתוק. יתרון זה נתקבל בקליפות פרי בשל (היעד המרכזי של מחקר זה), אך גם ברקמת הפסיג. תוצאות אלו מסוכמות בטבלה 1.

כפי שדיווחנו בשנה הראשונה והרחבנו במהלך השנה השנייה, בצענו אפיון HPLC על מדגמים מייצגים של אוכלוסיות הניסוי. התוצאות שנתקבלו, כפי שהדגמנו בשנה הראשונה, מראות הגברה של שלשת האנטוציאנינים בקווים הטרנסגניים עם יתרון ברור ומובהק מאד לאלל ANTI<sup>C</sup>. לעומת זאת, האפקט של הטרנסגן על הפלבונולים היה פחות קונסיסטנטי, אם כי התקבל יתרון לאלל ANTI<sup>C</sup> על פני האלל ANTI<sup>L</sup> בפלבונולים Quercetin ו-Kaempferol. תוצאות אלו הולמות באופן כללי את מתאר האפקטים אשר קיבלנו בעבר במוטנט הטבעי בפרי ומראות כי ANTI פועל חזק יותר על החלק המאוחר של המסלול הפלבונואידי, המוביל ליצירת אנטוציאנינים, מאשר על החלק המוקדם של המסלול המוביל ליצירת פלבונולים.

**איור 4.** ממוצע רמות התעתוק היחסיות של האללים המותמרים ברקמת עלה הגביע של צמחי הטבק הטרנסגניים בשלושת דורות הניסוי (האותיות הזהות מציינות כי אין הבדל מובהק,  $P > 0.05$ , בין קבוצות הגנוטיפ, בכל דור בנפרד, במבחן Tukey–Kramer HSD).



**איור 5.** ערכי הפנוטיפ המתקבלים ליחידת-תעתוק מחושבת ברקמת עלה הגביע של צמחי הטבק הטרנסגניים בשלושת דורות הניסוי (האותיות השונות מציינות הבדל מובהק,  $P < 0.05$ , בין קבוצות הגנוטיפ, בכל דור בנפרד, במבחן Tukey–Kramer HSD).

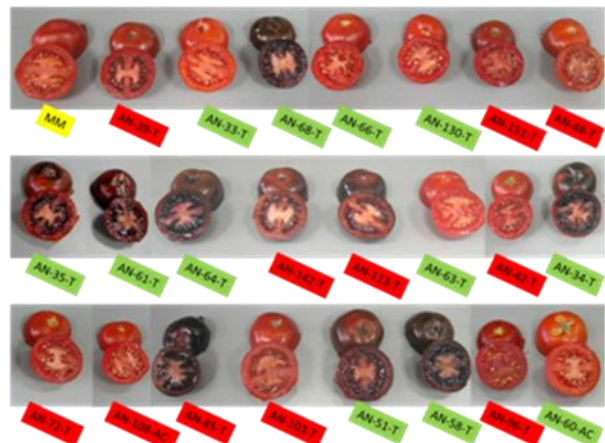




**איור 6.** השוואה בין המאפיינים הפנוטיפיים אשר התקבלו בפרי בעבודה הנוכחית לעומת עבודה יחידאית קודמת אשר הצליחה לבטא אנטוציאנינים בכל רקמות הפרי.



Butelli *et al.*, 2008



עבודה נוכחית

Butelli	עבודה נוכחית	
Micro-Tom (~10g)	MoneyMaker (~80g)	זן
<i>Rosea1 + Delila</i>	<i>ANT1</i>	מחדר
MYB + MYC	MYB	סוג פקטור התיעותוק
לוע הארי	עגבנייה	מקור הגן

במסגרת המחקר בעגבניה אשר ביצענו במהלך השנה השנייה התמקדנו גם באפיון פונקציונלי של השפעת הגומלין של הגנוטיפ *AFT* עם הגנוטיפ *HP-1* כפי שמוצג בטבלה 2. מניסוי זה, אשר נערך במתכונת של שלושה בלוקים באקראי, התקבל להפתעתנו כי אין אפקט תעתוקי כלשהוא של *HP-1* על *ANTI*. כאמור, כל התוצאות אשר נתקבלו מעגבניה הוצגו בצורה מפורטת בעבודת המוסמך של התלמידה גלי שרייבר. בנוסף, נשלח מאמר המסכם תוצאות אלו שתקצירו מופיע בנספח המצורף לדוח זה.

**תאנה:** ייצרנו 12 צמחים טרנסגניים, מחציתם נושאים את האלל *ANTI<sup>C</sup>* ומחציתם את האלל *ANTI<sup>L</sup>*. אף לא אחד מצמחים אלו הציג פנוטיפ כלשהוא הן בשלב הווגטיבי והן בשלב הרפרודוקטיבי. לכן, בהתאם לאמור לעיל, החלטנו שלא להמשיך עם הניסויים במין זה.

**טבלה 1.** סיכום תוצאות האפיון של הרקמות שונות של צמחי עגבנייה המבטאים ביתר את הגן *ANTI* והשוואה בין האללים שמקורם בעגבניית התרבות, *ANTI<sup>L</sup>*, ובעגבניית הבר, *ANTI<sup>C</sup>* (האותיות השונות מציינות הבדל מובהק,  $P < 0.05$ , בין קבוצות הגנוטיפ, בכל דור בנפרד, במבחן Tukey–Kramer HSD; הכוכביות מציינות הבדלים מובהקים בין הגנוטיפים ( $P < 0.05$ ) על פי מבחן *t*. מספר הכוכביות מסמל את מידת המובהקות: \*  $0.01 \leq p(F) < 0.05$ , \*\*  $0.01 \leq p(F) < 0.01$ , \*\*\*  $p(F) \leq 0.001$ ].

יעילות האלל <i>ANTI<sup>C</sup></i> ביחס לאלל <i>ANTI<sup>L</sup></i>	יחס פנוטיפ לתתוק		דור גנטי	רקמה
	<i>ANTI<sup>L</sup></i>	<i>ANTI<sup>C</sup></i>		
3.65***	24236 <sup>B</sup>	88607 <sup>A</sup>	T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>	פסיגים
1.87**	44429 <sup>B</sup>	83322 <sup>A</sup>	T <sub>2</sub> /T <sub>3</sub>	
4.48***	25.8 <sup>B</sup>	115.8 <sup>A</sup>	T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>	קליפות פרי אדום בשל
3.89*	1226574 <sup>B</sup>	4772898 <sup>A</sup>	T <sub>2</sub> /T <sub>3</sub>	

**טבלה 2.** אפיון מטבולומי ותתוקי של קליפות פרי עגבנייה בדור ההורים ( $P_1, P_2$ ) ובדור הצאצאים  $F_1$  ו- $F_3$  מתפצל [הגנוטיפ *AFT* נקבע על פי הסמן *ANTI*; הערכים יחסיים ומייצגים ממוצע של כל הדוגמאות הנבחנו עבור גנוטיפ מסוים כפי שנמדדו כבליעה באורך גל 530nm לגרם דוגמא טרייה של רקמה ± שגיאת תקן; אותיות שונות בכתב עילי מצביעות על הבדלים מובהקים בין הגנוטיפים בכל רקמה,  $P < 0.05$ , על פי מבחן Tukey–Kramer HSD. *hp-1/hp-1* – צמחים הומוזיגוטים למוטציית ה-*hp-1*, *AFT/AFT* – צמחים הומוזיגוטים לתכונת ה-*AFT* (LA1996),  $+/+$  – צמחים נורמאליים (Money maker), *hp-1/+* – צמחים הטרוזיגוטיים למוטציית ה-*hp-1*, *AFT/+* – צמחים הטרוזיגוטיים לתכונת ה-*AFT*].

דור גנטי	הגנוטיפ <sup>1</sup>	<i>ANTI</i>	<sup>2</sup> O.D <sub>530</sub> /gFW	ממוצע תתוק [סקאלה לוגריתמית טבעית]
P <sub>1</sub>	$+/+, hp-1/hp-1$	LL	0.44 <sup>D</sup> ± 0.04	-4.60 <sup>A</sup> ± 0.40
P <sub>2</sub>	<i>AFT/AFT</i> , $+/+$	CC	2.32 <sup>BC</sup> ± 0.28	-3.91 <sup>A</sup> ± 0.25
F <sub>1</sub>	<i>AFT</i> +, $hp-1/+$	CL	0.83 <sup>CD</sup> ± 0.18	-5.09 <sup>A</sup> ± 0.05
F <sub>3</sub>	<i>AFT/AFT</i> , $hp-1/hp-1$	CC	7.48 <sup>A</sup> ± 1.14	-4.17 <sup>A</sup> ± 0.84
F <sub>3</sub>	<i>AFT</i> +, $hp-1/hp-1$	CL	2.65 <sup>B</sup> ± 0.16	-4.61 <sup>A</sup> ± 0.28
F <sub>3</sub>	$+/+, hp-1/hp-1$	LL	0.63 <sup>CD</sup> ± 0.01	-4.04 <sup>A</sup> ± 0.69
F <sub>3</sub>	<i>AFT/AFT</i> , $+/+$	CC	1.54 <sup>BCD</sup> ± 0.38	-3.27 <sup>A</sup> ± 0.81
F <sub>3</sub>	<i>AFT</i> +, $+/+$	CL	0.94 <sup>BCD</sup> ± 0.10	-3.39 <sup>A</sup> ± 1.33
F <sub>3</sub>	$+/+, +/+$	LL	0.39 <sup>D</sup> ± 0.09	-3.39 <sup>A</sup> ± 0.56
	p(F)		1.71x10 <sup>-10</sup>	0.1870

**דיון.** לסיכום, התוצאות שנאספו עד כה מראות כי האלל *ANTI<sup>C</sup>* יעיל יותר בסדרי גודל בהשוואה לאלל *ANTI<sup>L</sup>* ביצירת פנוטיפ של אגירת אנטוציאנינים ופלבונולים ברקמות ווגטיביות ורפרודוקטיביות, גם בעגבנייה וגם בטבק. תוצאות אלו תומכות בהשערה כי *ANTI* הוא הגן הקובע אגירת אנטוציאנינים בגנוטיפ *AFT* וכי היתרון של *ANTI<sup>C</sup>* על פני *ANTI<sup>L</sup>* קשור למבנה ולא לתעתוק שלו. תוצאות אלו פותחות את הדרך לאפיונים מורכבים יותר ברמה הגנטית והטרנסגנית שהחלנו לבצע בשנה השלישית של הפרויקט. כמו כן ראוי לציין כי עבודה זו זכתה לתיעוד נרחב בעברית ובאנגלית, כולל שתי עבודות מוסמך, הרצאה בכנס הגנומי ב-San Diego USA, מאמר שנשלח לפרסום ומאמר אחד שנמצא בהכנה.

#### **רשימת פרסומים.**

1. גלי שרייבר (2010) "אפיון תפקודי של הגן *ANTHOCYANINI* מעגבניית הבר *Solanum chilense* בצמחי עגבנייה תרבותית טרנסגניים". עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'.
2. עמיר בוטבול-מן (2010) "אפיון פונקציונאלי של הגן *ANTI* מעגבנייה בצמחי טבק טרנסגניים". עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'.
3. Schreiber, G., Reuveni M., Evenor D., Oren-Shamir M., Ovadia R., Sapir-Mir M., Bootbool-Man A., Nahon S., Shlomo H., Chen L., and Levin, I. (2011). Functional analysis of the *Solanum chilense ANTHOCYANINI* in relation to its cultivated counterpart and *ANTHOCYANIN FRUIT* in transgenic tomato and tobacco plants. *Plant & animal Genome XIX, San Diego, USA. p. W530.*
4. A comparative transgenic analysis of *ANTHOCYANINI* from *Solanum chilense* and *Solanum lycopersicum* in relation to the *ANTHOCYANIN FRUIT* genotype of tomato. Submitted to Theoretical and Applied Genetics.

## סיכום עם שאלות מנחות

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b>
<p>1. לבצע ניתוח טרנסגני השוואתי של שני האללים של הגן <i>ANTI<sup>L</sup></i> (<i>ANTI<sup>C</sup></i>) שמקורו מהמין התרבותי <i>S. lycopersicum</i> ו-<i>ANTI<sup>C</sup></i> ממין הבר <i>S. chilense</i>. בעגבנייה ובשני מינים הטרולוגיים: טבק ותאנה.</p> <p>2. לבצע ניתוח פונקציונאלי מקיף יותר של האינטראציה בין הגן <i>AFT</i> לבין הגן <i>HP-1</i> באוכלוסיות מתפצלות של עגבנייה.</p>
<b>עיקרי הניסויים והתוצאות.</b>
<p>ייצרנו מספר גדול של צמחי עגבניה, טבק ותאנה טרנסגניים המבטאים ביתר <i>ANTI<sup>L</sup></i> ו-<i>ANTI<sup>C</sup></i>. צמחי העגבניה והטבק הציגו פנוטיפים רב-גוונים של ייצור אנטוציאנינים באיברים ווגטיביים ורפרודוקטיביים. צמחי התאנה הטרנסגניים לא הציגו עד כה שום פנוטיפ נראה לעין. התוצאה המרכזית של העבודה בשנתיים הראשונות היא כי גם בעגבניה וגם בטבק לאלל <i>ANTI<sup>C</sup></i> ייתרון מובהק וחד משמעי ביצירת אנטוציאנינים על פני האלל <i>ANTI<sup>L</sup></i>.</p>
<b>מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</b>
<p>גדלה באורח משמעותי הסבירות לכך שהגן <i>ANTI</i> הוא זה הקובע את הפנוטיפ של אגירה מוגברת של יצירת אנטוציאנינים בפרי העגבניה במוטנט <i>AFT</i>. למרות שתוצאות אלה תומכות בהנחות העבודה היסודיות שלנו בהתאם למטרות המחקר, עדיין אין בהן כדי להעיד על המכניזם שבאמצעותו מחולל <i>ANTI<sup>C</sup></i> את היתרון הפונקציונאלי שלו על פני האלל <i>ANTI<sup>L</sup></i>. לכן הכנו במהלך השנה השנייה לפרויקט קונסטרקטים של <i>ANTI<sup>C</sup></i> ו-<i>ANTI<sup>L</sup></i> וכן קונסטרקטים עם מוטציות נקודתיות, כל אלה עם תוספת של שייר חלבוני, 3XHA, אשר יאפשרו לנו לעקוב אחר רמת החלבון הטרנסגני ולבודד את השינוי המבני הנקודתי המחולל את היתרון של <i>ANTI<sup>C</sup></i> על פני <i>ANTI<sup>L</sup></i>. במהלך השנה השלישית לפרויקט ביצענו גם טרנספורמציות לקונסטרקטים החדשים לצמחי טבק. צמחים אלו עוברים כרגע אפיונים מולקולאריים ומטבולומיים וייתכן שיעידו על המכניזם שלעיל.</p>
<b>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?</b>
<p>בהתאם להתפתחויות שחלו במהלך העבודה עדיין היינו רוצים להבין המכניזם שבאמצעותו מחולל <i>ANTI<sup>C</sup></i> את היתרון הפונקציונאלי שלו על פני האלל <i>ANTI<sup>L</sup></i>. אולם, בירור מנגנון זה הינו סבוך. אנו מקווים כי באמצעות הקונסטרקטים החדשים שייצרנו בשנה האחרונה לפרויקט נצליח להבין טוב יותר מנגנון זה. בנוסף, החלטנו כפי שדיווחנו בשנה הקודמת ובדוח זה שלא להמשיך עם התאנה כיוון שמין זה אינו יכול להוות מודל מתאים למחקר זה.</p>
<b>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.</b>
<p>גלי שרייבר (2010) "אפיון תפקודי של הגן <i>ANTHOCYANINI</i> מעגבניית הבר <i>Solanum chilense</i> בצמחי עגבנייה תרבותית טרנסגניים". עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'.</p> <p>עמיר בוטבול-מן (2010) "אפיון פונקציונאלי של הגן <i>ANTI</i> מעגבנייה בצמחי טבק טרנסגניים". עבודת-גמר מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'.</p>
<p>Schreiber, G., Reuveni M., Evenor D., Oren-Shamir M., Ovadia R., Sapir-Mir M., Bootbool-Man A., Nahon S., Shlomo H., Chen L., and Levin, I. (2011). Functional analysis of the <i>Solanum chilense</i> <i>ANTHOCYANINI</i> in relation to its cultivated counterpart and <i>ANTHOCYANIN FRUIT</i> in transgenic tomato and tobacco plants. <i>Plant &amp; animal Genome XIX, San Diego, USA. p. W530.</i></p> <p>A comparative transgenic analysis of <i>ANTHOCYANINI</i> from <i>Solanum chilense</i> and <i>Solanum lycopersicum</i> in relation to the <i>ANTHOCYANIN FRUIT</i> genotype of tomato. Submitted to Theoretiacl and Applied Genetics.</p>
<b>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</b>
<p style="text-align: right;">ניתן לפרסם דוח זה. <span style="float: left;">←</span></p>
<b>האם בכוננתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן</b>

## התקציר של המאמר אשר נשלח לפרסום

A comparative transgenic analysis of *ANTHOCYANINI* from *Solanum chilense* and *Solanum lycopersicum* in relation to the ANTHOCYANIN FRUIT genotype of tomato

Gali Schreiber, Moshe Reuveni, Dalia Evenor, Michal Oren-Shamir, Rinat Ovadia, Maya Sapir-Mir, Amir Bootbool-Man, Sahadia Nahon, Haviva Shlomo, Lea Chen, and Ilan Levin

**Abstract** Anthocyanins are flavonoid metabolites contributing attractive colors and antioxidant qualities to the human diet. Accordingly, there is a growing interest in developing crops enriched with these compounds. Fruits of the cultivated tomato, *Solanum* (*S.*) *lycopersicum*, do not normally produce high levels of anthocyanins. However, several wild tomato species yield anthocyanin-pigmented fruits, and this trait has been introgressed into the cultivated tomato. Two genes encoding homologous R2R3 MYB transcription factors, termed *ANT1* and *AN2*, were previously genetically implicated in anthocyanin accumulation in tomato fruit peels of the ANTHOCYANIN FRUIT (AFT) genotype originating from *S. chilense*. Here we compared transgenic tomato plants constitutively over-expressing the *S. lycopersicum* (*ANT1<sup>L</sup>*) or the *S. chilense* (*ANT1<sup>C</sup>*) allele, and show that each displayed variable levels of purple pigmentation in vegetative as well as reproductive tissues. However, *ANT1<sup>C</sup>* was significantly more efficient in producing anthocyanin pigments, attributed to its gene coding-sequence rather than to its transcript levels. These results expand the potential of enhancing anthocyanin levels through engineering coding-sequence polymorphisms in addition to the transcriptional alterations commonly used. In addition, a segregating population obtained from a recombinant genotype revealed that *ANT1* is more associated with the AFT phenotype than *AN2* and that *AN2* is not necessarily required for anthocyanin accumulation in the AFT genotype. Our results therefore provide further support to the hypothesis that *ANT1* is the gene responsible for anthocyanin accumulation in fruits of the AFT genotype.

**Key words** Tomato, ANTHOCYANIN FRUIT, *ANTHOCYANINI*, flavonoids, anthocyanins.