

דוח סופי לתוכנית מחקר 255-0807

פיתוח טיפוסי פלפל בעלי חיי מדף ארוכים ע"י שינוי בעבירות המים דרך הקליפה
Development of peppers with reduced water permeability of the fruit
cuticle

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף ירקות

ארי שפר המחלקה לחקר ירקות

אילן פארן המחלקה לחקר ירקות

אלי פליק המחלקה לאחסון תוצרת חקלאית

Ari Schaffer, Department of Vegetable Research, The Volcani Center, ARO

Ilan Paran, Department of Vegetable Research, The Volcani Center, ARO

Eli Fallik, Department of Postharvest Science, The Volcani Center, ARO

ספטמבר 2009

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

תקציר

הצגת הבעיה:

קצב איבוד המים המהיר בפרי פלפל מיד לאחר הקטיף נקבע בעיקר ע"י תכונות הפרי. הפירות מכוסים בקוטיקולה המהווה את המחסום הראשוני לאיבוד המים. תהליך איבוד המים בפלפל מתרחש כתוצאה מדיפוזיה דרך הקוטיקולה, או דרך סדקים מיקרוסקופיים. מחקר בעגבנייה הצביע על ביטוי הגן CWP ביצירת סדקים בקוטיקולה של הפרי. מטרת התוכנית הנוכחית היתה לבדוק את מעורבותו של ביטוי הגן CWP בפלפל בתופעה של איבוד מים אחרי הקטיף ולבחון ע"י כך אסטרטגיות לשיפור איכות הפרי.

מהלך ושיטות העבודה ותוצאות עיקריות:

אנליזת RT-PCR לאיפיון דגם ההתבטאות של הגן בפלפל הראתה שבדומה לעגבנייה שיא ההתבטאות הוא בפרי ירוק צעיר. דגם ההתבטאות בין קוים שונים הראו שונות בעוצמת התבטאות הגן אבל לא היה קשר בין ההתפצלות של CWP לקצב איבוד מים באוכלוסייה מתפצלת לתכונות. על מנת לבדוק את הקשר בין רמת התבטאות הגן CWP לבין תכונת קצב איבוד מים בפלפל הופק RNA מקליפת פרי צעיר מ-14 קוים השונים בקצב איבוד מים מהפרי אחרי קטיף. נצפתה שונות גנטית בין הקוים עבור תכונות אלו אולם הקורלציה בין התכונות היתה נמוכה. מסקנת המחקר בשלב זה שלא נמצא בפלפל שונות גנטית לתכונה של איבוד מים מהקליפה ע"י המנגנון של CWP שכן קיים בעגבנייה. לא נמצא קו של פלפל בו ביטוי הגן הושתק לגמרי. לכן, נקטנו אסטרטגיה להשתיק ביטוי הגן בפלפל בשיטות ביוטכנולוגיות. קונסטרקטים של SiRNA ל CWP של פלפל נבנו בהצלחה. בהעדר שיטת רגנרציה וטרנספורמציה בפלפל נעשו ניסיונות לבדיקת האפשרות של טרנספורמציה של פלפל במספר גנוטיפים אך ללא הצלחה. לאור הצלחה של קבוצת מחקר בקוריאה בטרנספורמציה של פלפל התחלנו בשיתוף פעולה מדעית כדי לבחון השפעת ה SiRNA ל CWP בפלפל טרנסגני.

מסקנות והמלצות:

מסקנת המחקר בשלב זה שלא נמצאה בפלפל שונות גנטית לתכונה של איבוד מים מהקליפה ע"י המנגנון של CWP שכן קיים בעגבנייה ולא נמצא קו של פלפל בו ביטוי הגן הושתק לגמרי. התחלנו בשיתוף פעולה עם חוקרים בקוריאה כדי לבחון השפעת השתקת הגן בפלפל טרנסגני ע"י שיטת SiRNA.

מבוא, רקע מדעי קצר ומטרות המחקר:

פיתחנו טיפוס עגבניות בעלי קליפה חדירה למים (בדומה לפלפל) וגם זיהינו את הגן הקובע את התכונה של חדירה למים בקליפה. הגן זוהה בשיטת Map Based Positional Gene Cloning והוא גן שלא דווח עליו קודם ושתפקידו הביולוגי עדיין לא ידוע (Hovav et al., 2006). קראנו לגן *CWP* (cuticular water permeability). נמצא שביטוי הגן גורם לקליפה חדירה למים בעגבניות וחלק מתירבות העגבנייה היה בסלקציה למוטציה שגרמה להשתקת ביטוי הגן וע"י השתקה זו העגבניות המתורבתות אינן מאבדות משקל באחסון. הצלחנו גם לייצר עגבניה שמצטמקת ע"י הנדסה גנטית כתוצאה מביטוי הגן בעודף בצמח טרנסגני. גילינו **שפרי פלפל אכן מבטא את הגן *CWP*** לחדירת מים מהקליפה.

תגלית זו, שפרי פלפל מבטא את הגן *CWP* לחדירת מים מהקליפה, פיתחה אסטרטגיה להקטין את איבוד המים בפלפל ע"י פיתוח וברירת טיפוס פלפל שבהם הגן לא מתבטא, בדומה לתהליך שהתרחש בתרבות העגבנייה, ע"י גילוי או יצור גנוטיפים של פלפל בהם הגן *CWP* הושקת. מטרת המחקר היתה לגלות שונות גנטית טבעית, או לייצר שונות כזאת בשיטות הנדסיות, לטיפוסים בעלי איבוד מים נמוך אחרי הקטיף, יחד עם ביטוי נמוך או ביטוי מושקת של הגן *CWP*. הנחתנו היתה שלפי חוק ההקבלות באבולוציה מוטציה דומה לזו שהתרחשה בעגבנייה קרתה גם ב-*Capsicum* וש אפשר לאתר קוים שמכילים מוטציה שגורמת לקליפה בעלת חדירה נמוכה. ההנחה השנייה היתה שניתן ליצור טיפוסים אלו ע"י שיטות הנדסיות במקרה שלא קיים שונות גנטית טבעית במין פלפל.

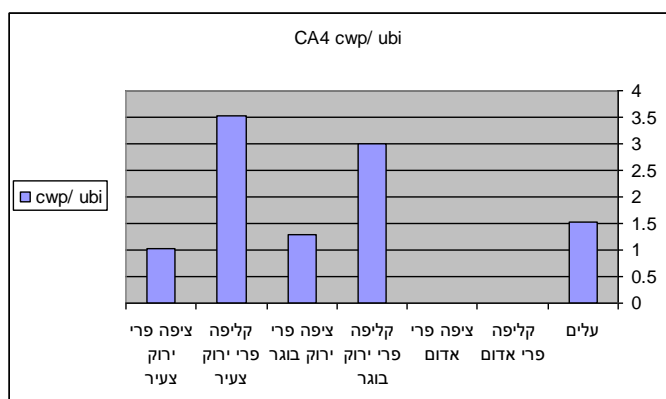
פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות שהתקבלו:

1. אפיון ביטוי הגן בצמח פלפל

על סמך הרצף ההומולוגי של הגן *CWP* מפלפל סונטזו פריימרים המגבירים בטכניקת PCR את הגן מפלפל. הופק RNA מרקמות שונות של פלפל הכוללות עלים וקליפה וציפת פרי בשלשה שלבים של התפתחות הפרי: צעיר, ירוק בוגר ובשל ונמדדה רמת התבטאות הגן ברקמות אלו (איור 1). ניתן לראות שרמת ההתבטאות הגדולה ביותר היא בקליפה של פרי צעיר בדומה לאופן

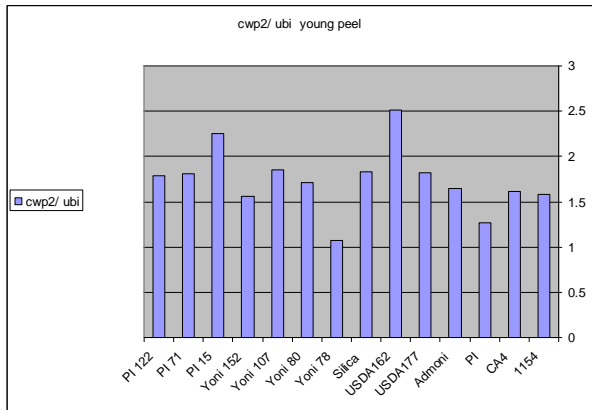
הביטוי בעגבניה. אולם שלא כמו עגבניה בה הגן מתבטא בפרי בלבד, נצפתה התבטאות הגן גם בעלים.

איור 1. רמת ההתבטאות של *CWP* בקו CA4 ביחס לביקורת (יוביקוויטין) ברקמות שונות של פלפל.



סריקת אוסף גנטי לביטוי הגן

סרקנו גנוטיפים של *Capsicum* מהאוסף הגנטי העולמי שקיים אצלנו כדי לאתר שונות בביטוי הגן. גודלו בחממה בבית דגן 14 זנים של פלפל השונים בקצב איבוד מים. הופק RNA מקליפה של פרי צעיר

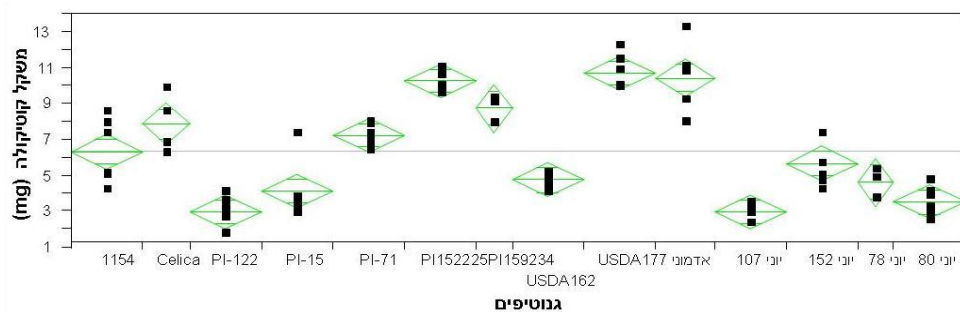


ונבדקה רמת ההתבטאות של הגן בקוים אלו (איור 2). בדיקה זו הראתה שונות ברמת ההתבטאות של הגן אבל בכולם היה ביטוי משמעותי ולא נמצא קו המאופיין בהעדר ביטוי.

איור 2. רמת ההתבטאות של 14 קוים ביחס לביקורת (יוביקוויטין) בקליפה של פרי צעיר של פלפל.

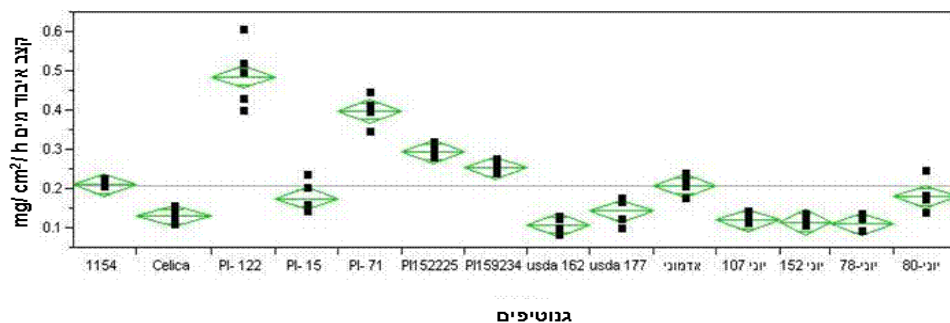
במטרה לבדוק האם יש קשר בין רמת התבטאות הגן לתכונות הפרי הקשורות לקליפה נבדקו משקל קוטיקולה (איור 3א) וקצב איבוד מים (איור 3ב) בפרי בגנוטיפים אלו. מכל גנוטיפ נלקחו 6-8 פירות שונים בשלב אדום בשל עבור משקל קוטיקולה ובשלב של 85% צבע אדום עבור קצב אבוד מים לאחר אחסון של 4 ימים.

איור 3א. משקל הקוטיקולה בגנוטיפים שונים



ניתן לראות שיש הבדלים מובהקים בין הממוצעים של הגנוטיפים השונים במשקל הקוטיקולה כאשר ל- *usda177* משקל קוטיקולה הגבוה ביותר ואילו ל- *PI-122* המשקל הנמוך ביותר.

איור 3ב. קצב איבוד מים בגנוטיפים שונים



ניתן לראות שיש הבדלים מובהקים בין הממוצעים של הגנוטיפים השונים כאשר ל- *PI- 122* קצב איבוד המים הגבוה ביותר ול- *usda162* קצב איבוד המים הנמוך ביותר. בגנוטיפים *PI- 71* ו- *PI- 122* נצפו סדקים בפרי (האופייניים לפרי של קוים אלו מסוג חלפניו) שתרמו ככל הנראה לקצב איבוד מים גבוה במיוחד.

כדי לבדוק האם יש קשר בין התכונות של משקל הקוטיקולה, קצב איבוד המים בפרי לאחר אחסון ורמת התבטאות הגן *Cwp1* נבדקה הקורלציה בין תכונות אלו בגנוטיפים השונים (טבלה 1).

טבלה 1. קורלציות של משקל הקוטיקולה, קצב איבוד מים ורמת ביטוי הגן *Cwp1* בין גנוטיפים

מסקל קוטיקולה mg	קצב איבוד מים mg/cm ² /h	ביטוי <i>Cwp1</i>	תכונה
0.1450	-0.2096	1.0000	ביטוי <i>Cwp1</i>
0.0274	1.0000	-0.2096	קצב איבוד מים mg/cm ² /h
1.0000	0.0274	0.1450	משקל קוטיקולה mg

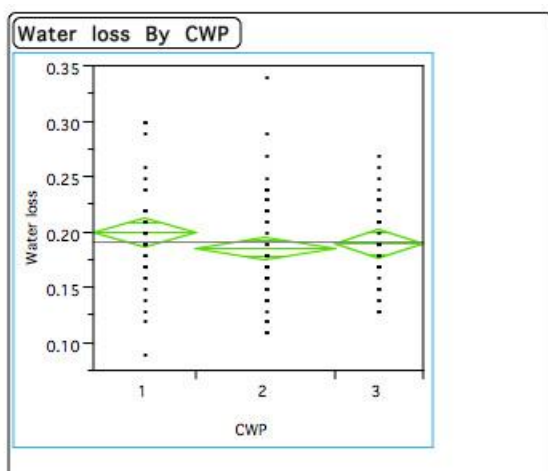
ניתן לראות שמקדמי הקורלציה בין התכונות השונות נמוכים ואינם מובהקים ($P > 0.05$). קיימת קורלציה שלילית בין ביטוי *Cwp1* לקצב איבוד המים וקורלציה חיובית בין ביטוי *Cwp1* משקל הקוטיקולה.

3. בדיקת אוכלוסיה מתפצלת

כדי לבחון בשיטה נוספת אם קיים מעורבות של הגן *CWP* ואיבוד מים זיהינו פולימורפיזם ברצף ה DNA של הגן בין מספר קוי הורים. שונות זו מאפשרת לעקוב אחרי התפצלות הגן באוכלוסיות המתפצלות לקצב איבוד מים ולבדוק האם קיימת תאחיזה בין הגן לתכונה. יצרנו אוכלוסיית F2 בין הקו 1154 לקו PI 152225. צמחי F2 (סה"כ 180 צמחים) גודלו בשדה, 3 פרות בשלים נקטפו מכל צמח ונלקחו לבדיקת קצב איבוד מים באחסון. קטיף פירות ומדידת קצב איבוד מים התבצעו פעמיים. כמו כן

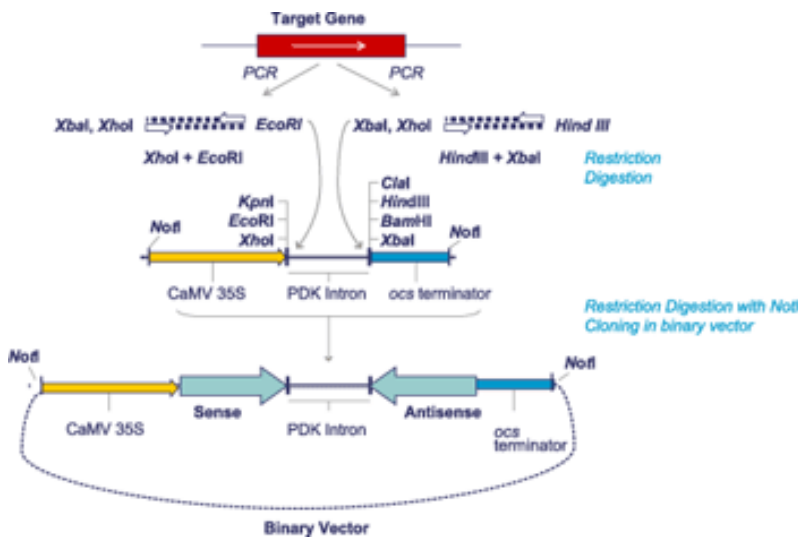
ה DNA הופק מכל צמח ונבדקה התפצלות *CWP* באוכלוסיה. התפלגות התכונה הראתה דגם הורשה של תכונה כמותית אולם לא נמצא קשר מובהק בין התפצלות הגן לתכונה. (איור 4)

איור 4: השפעת הגנוטיפ של *CWP* ($AA=1, AB=2, BB=3$) על איבוד המים בפרי פלפל באוכלוסיה מתפצלת בין שני הורים השונים באיבוד מים מהפרי.



4. השתקת הגן בשיטות הנדסיות

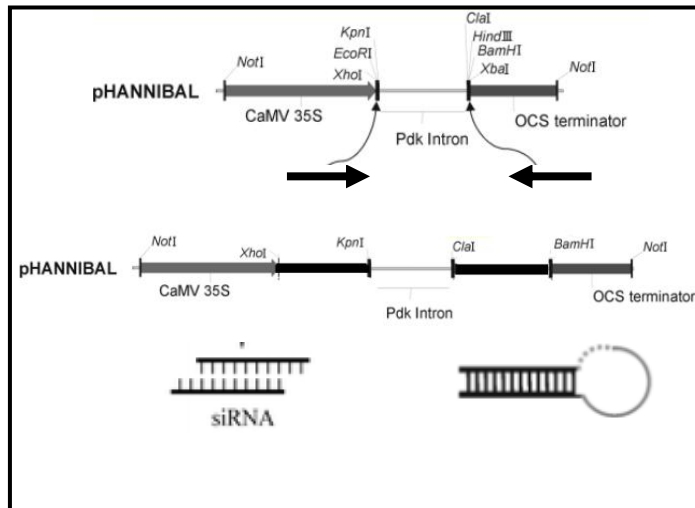
השתקת הגן *cwp* של פלפל תחבצע בשיטת siRNA המבוססת על מנגנון השתקה טבעי בשלב התעתיק,



באמצעות יצירת RNA דו-גדילי וחיתוכו למקטעים קצרים במנגנון RISC. הווקטור שנבחר לצורך הכנת פלסמיד ההשתקה הוא pHANNIBAL המיועד לשיבוט מקטעי DNA באוריינטציה חיובית ושליטת כאשר ביניהם מפריד אינטרון, ותחת בקרה של פרומטר 35S. כאשר מבוטא הפלסמיד בצמח, נוצר RNA דו-גדילי המכיל מבנה hair-pin בקצהו (איור 5). וקטור זה הוכח כיעיל ביצירת siRNA והשתקת גנים בצמחים.

מקטע בן 267 בסיסים מתוך רצף ה-DNA של הגן *cwp* של פלפל הוגבר ב-PCR באמצעות תחלים ספציפיים לתחילת וסוף האקסון הראשון של הגן והמכילים שני אתרי חיתוך בכל תחל (איור 6). תוצר ה-PCR שובט לפלסמיד pGEM, והפלסמיד המשובט הוחדר לחיידקי *E. coli* בשיטת heat shock. החיידקים גודלו על צלחות LB עם אמפיצילין לסלקציה ראשונית ובתוספת x-gal/IPTG לסלקציה שניונית על סמך צבע כחול/לבן. 14 מושבות חיידקים לבנות נבחרו לסריקה ב-PCR עם תחלים ספציפיים לפלסמיד (SP6 ו-T7)

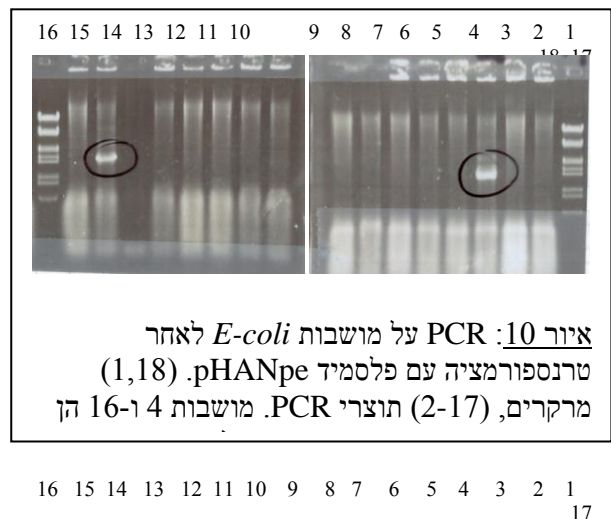
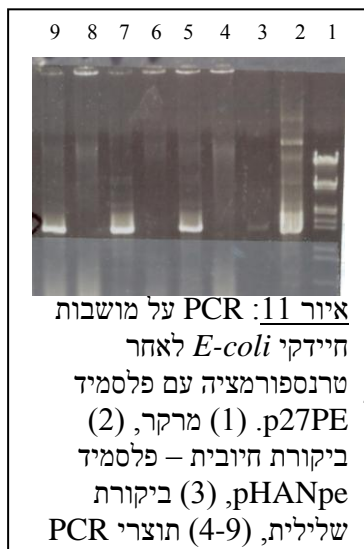
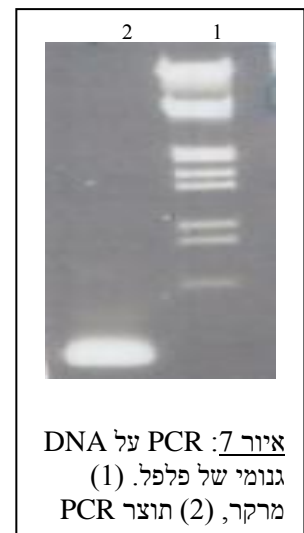
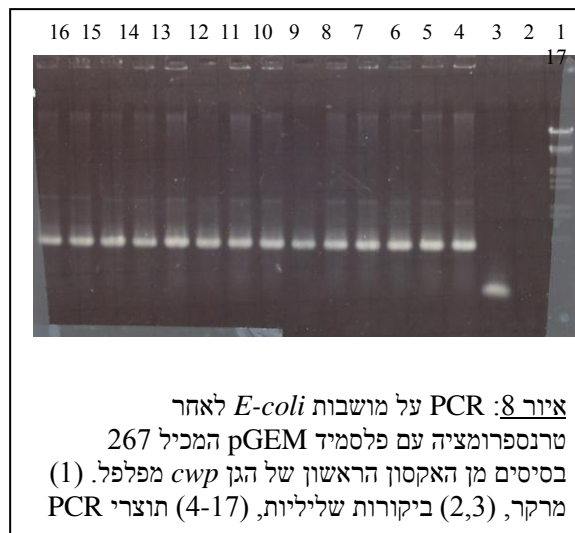
וכולו נמצאו חיוביות לנוכחות המחזר (איור 7). מושבה אחת נבחרה לגידול, הפלסמיד הופק מן החיידקים ורוצף. המחזר נחתך מן הפלסמיד בשני אנזימי החיתוך XhoI ו-KpnI, ובאותם אנזימים



איור 6: תהליך בניית קונסטרוקט pHANNIBAL עם המקטע מתוך הגן *cwp* של פלפל. (א) מבנה קונסטרוקט pHANNIBAL ללא מחזר. (ב) מבנה קונסטרוקט pHANNIBAL עם המחזר בשתי האוריינטציות. (ג) RNA דו-גדילי שמתקבל לאחר שעתוק, (ד) siRNA שמתקבל לאחר חיתוך ה-RNA הדו-גדילי במנגנון RISC.

נחתך גם הווקטור pHANNIBAL (איור 8). המחזר החתוך שובט לתוך הווקטור החתוך והתקבל פלסמיד עם עותק אחד של מקטע ה-DNA של הגן *cwp* באוריינטציה חיובית. פלסמיד ה-pHANNIBAL המשובט עם המחזר באוריינטציה החיובית (+pHANpe) הוחדר לחיידקי *E. coli* בשיטת heat shock, החיידקים גודלו

בצלחות LB עם אמפיצילין, והפלסמיד הופק ורוצף. בכדי להכניס את המחזר באוריינטציה שלילית, נחתכו פלסמיד ה pGEM המשובט ו pHANpe+ עם אנזימי החיתוך BamHI ו-ClaI, תוצרי החיתוך נוקו מג'ל והמחזר שובט לפלסמיד pHANpe+ החתוך לקבלת פלסמיד pHANNIBAL המכיל את 267 הבסיסים באוריינטציות הפוכות וביניהם אינטרון (pHANpe). פלסמיד pHANpe הוחדר לחיידקי *E-coli* בשיטת heat shock, נעשה PCR על מושבות נבחרות עם תחל forward בלבד, שתי מושבות חיוביות נבחרו לגידול (איור 9) ומהן הופק פלסמיד ונשלח לריצוף. בכדי להעביר את המחזר מתוך פלסמיד pHANpe לפלסמיד בינארי, פלסמיד pHANpe ופלסמיד בינארי pART27 נחתכו באנזימים SacI ו SpeI, תוצרי החיתוך עברו ליגציה לקבלת פלסמיד p27PE, תוצר הליגציה הוחדר לחיידקי *E-coli* בשיטת heat shock, והחיידקים נזרעו על צלחות LB המכילה אנטיביוטיקה ספקטינומיצין. על המושבות שגדלו על הצלחת נעשה PCR עם תחל forward בלבד (איור 10), ושתי מושבות חיוביות גודלו במצע LB נוזלי המכיל ספקטינומיצין למשך לילה. הפלסמיד הופק מהמושבות, ובכדי לבדוק את הצלחת הליגציה, הפלסמיד נחתך חיתוך כפול עם האנזימים XhoI ו XbaI החותכים מקטע DNA המכיל פעמיים את 267 הבסיסים, בשתי האוריינטציות, יחד עם האינטרון שביניהם (איור 11). הפלסמיד נשלח לריצוף בכדי לוודא שהוא נכון. לאחר אימות הנכונות, פלסמיד p27PE הוחדר לחיידקי אגרובקטריום בשיטת אלקטרופורציה, החיידקים גודלו על צלחות LB עם אנטיביוטיקה ספקטינומיצין למשך שני לילות בטמפרטורה של 28 מעלות צלסיוס, נעשה PCR על מושבות נבחרות עם תחל forward בלבד (איור 12), ושתי מושבות חיוביות גודלו ב LB עם ספקטינומיצין והוקפאו ב -80 מעלות צלסיוס לטווח ארוך.



נעשו נסיונות לבדיקת האפשרות של ביצוע טרנספורמציה גנטית של פלפל בארץ במטרה לבדוק את תפקיד CWP בפלפל ע"י השתקתו. בצוע טרנספורמציה בפלפל היא משימה קשה ולשם כך גייסנו לעזרה את רון וונטש שהוא מומחה לטרנספורמציה של צמחים. לשם כך נבחרו שני גנוטיפים ונבדקה יעילות הרגנרציה שלהם. נמצא שאחד הגנוטיפים בעל רגנרציה טובה יותר. אבל לא היתה הצלחה במשך השנתיים הראשונות של התוכנית לייצר פלפל טרנסגני. במקביל לנסיונות אלו ניסינו לפתח בפלפל מערכת ביטוי גנים חולפת (virus induced gene silencing, VIGS) ע"י שמוש בוירוס TRV על מנת להשתק את הגן האנדוכני של CWP, אולם לצערינו לא הצלחנו לקבל מערכת הדבקה של פלפל באמצעות וירוס זה. בינתיים קבוצה מחקר בקוריאה הצליחה לייצר פלפל טרנסגני באופן יחודי ונפתח איתם שיתוף פעולה להשתקת הגן בפלפל. קבוצה זו שייכת למכון Biotechnology Institute of Nongwoo Bio Co. בראשותו של Dr. Chee H. Harn. אנו נשלח לקוריאה בקרוב את הקונסטרוט שהכנו (איור 6) וכן זרעים לבצוע הטרנספורמציה.

סיכום

הצלחנו להגביר את הגן CWP מפלפל ונמצא שכמו בעגבניה הוא מתבטא בעיקר בקליפה של פרי צעיר. בנוסף הגן מתבטא גם בעלים בנגוד לעגבניה כך שיתכן שיש הבדלים בתפקיד הגן בין שני המינים. זיהינו שונות ברמת התבטאות הגן בין קוים שונים אבל לא נמצאה קו בו לא היה קיים ביטוי הגן.

לא נמצא מתאם משמעותי בין רמת הביטוי לקצב איבוד המים בפרי בין הקוים השונים וכנראה רמת הביטוי ככולם היא מעל רמת סף כדי לגרום לאיבוד מים. בדקנו גם את התפצלות הגן באוכלוסיה המתפצלת לקצב איבוד מים אך לא נמצאה תאחיזה בין הגן לתכונה. עדיין קיימת אפשרות שבמגוון יותר רחב של גנוטיפים אכן יימצא השונות הנכספת ויש לבדוק קיום תאחיזה זו ברקעים גנטיים נוספים.

לאור העדר השונות הגנטית הטבעית התחלנו לבצע השתקת הגן CWP בפלפל ע"י שיטות הנדסיות. הוכן קונסטרוקט להשתקה בשיטת siRNA בעזרת הווקטור pHANNIBAL. בהעדר מערכת ליצירת פלפל טרנסגני בארץ התחלנו בשיתוף פעולה עם קבוצת מחקר בקוריאה להם קיימת מערכת מצליחה ליצירת פלפל טרנסגני. לאחר יצירת הצמחים נוכל לבדוק את השפעת ההשתקה על איבוד מים בפרי כדי לבחון אסטרטגיה זו לשיפור איכות הפרי אחרי איחסון.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
- בדיקת אופן התבטאות הגן CWP בפלפל, סריקת גנוטיפים הנבדלים בקצב איבוד מים, בדיקת רמת ההתבטאות של הגן בגנוטיפים אלו ובדיקת הקשר עם קצב איבוד מים. - יצירת קונסטרוקט להשתקת הגן CWP בפלפל בשיטת siRNA בעזרת הווקטור pHANNIBAL ויצירת צמחי פלפל טרנסגניים עם חוסר ביטוי בפרי.
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
<ul style="list-style-type: none"> - אפיון ביטוי הגן בצמח פלפל - סריקת אוסף גנטי לביטוי הגן - בדיקת אוכלוסייה מתפצלת - השתקת הגן בשיטות הנדסיות
סקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.
-טרם נמצא מקור גנטי להשתקת הגן CWP בתוך המין פלפל ורצוי להרחיב את יריעת החיפוש. במקביל רצוי להמשיך לבצע השתקת הגן ע"י שיטת siRNA שכבר הוכן.
הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן.
<ul style="list-style-type: none"> - טרם נמצא שונות גנטית טבעית להשתקת הגן בפלפל - טרם נוצר צמחים טרנסגניים עם השתקת הגן
האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - <u>יש לפרט</u> : פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
<ul style="list-style-type: none"> - טרם פורסם תוצאות המחקר ומחכים ליצירת צמחים טרנסגניים
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
<ul style="list-style-type: none"> • רק בספריות

