

דו"ח מסכם לתכנית מחקר 255080806
**פיתוח מערכת חדשה של צבעים ושל נוגדי חמצון בפירות של מלון, דלעת
 ואבטיח**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

על ידי

יעקב תדמור, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 יוסף בורגר, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 הארי פריס, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 אילה מאיר, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 עינת בר, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 עוזי סער, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 ויטלי פורטנוי, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 אפרים לוינסון, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 נורית קציר, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
 ארי שפר, המחלקה לגנטיקה ולירקות, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Yaakov Tadmor, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar:

tadmory@agri.gov.il

Yosef Burger, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar: burglary@agri.gov.il

Harry Paris, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar: hsparis@agri.gov.il

Ayala Meir, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar.

Einat Bar, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar.

Uzi Sa'ar, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar.

Vitali Portnoy, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar:

portnoyv@volcani.agri.gov.il

Efraim Lewinsohn, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar:

twefraim@volcani.agri.gov.il

Nurit. Katzir, Department of Genetics and Vegetable Crops, Neve Ya'ar:

katzir@agri.gov.il

Ari Schaffer, Dept. of Genetics and Vegetable Crops, Beit Dagan:

vcaris@volcani.agri.gov.il

יולי 2009

תמוז תשס"ט

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

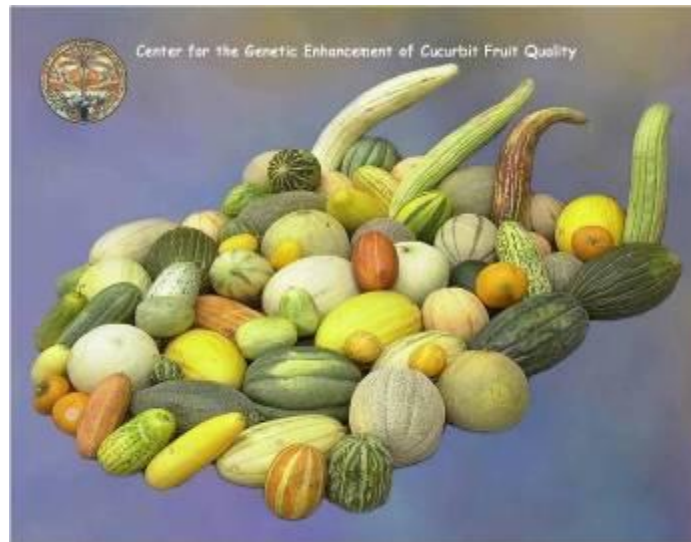
הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים



חתימת החוקר

תוכן העניינים

.....3	1. תקציר
.....4	3. מטרות המחקר
.....4	4. שיטות העבודה
.....5	5. תוצאות עיקריות
.....5	5.1 אנליזה של פלבנואידים בציפת פרי האבטיח
.....6	5.2 אנליזה של פלבנואידים בקליפת פרי המלון
.....12	6 סיכום
.....13	7. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות
.....13	8. רשימת ספרות
.....14	9. סיכום עם שאלות מנחות



1. תקציר

הצגת הבעיה - על פי הידע הקיים בספרות נשלטים צבעי הפרי בדלועיים על ידי שני סוגי פיגמנטים: קרוטנואידים וכלורופיל. בעבודת סריקה ראשונית גילינו מרכיב פלבונואידים המשפיע כנראה על צבע קליפת המלון ועל צבע ציפת האבטיח. תגלית זאת פותחת פתח לפיתוח מערכת צבענים חדשה בדלועיים שתהיה מבוססת על מרכיבים פלבונואידים.

מטרות המחקר

1. אפיון השונות הקיימת לתכונה של צבירת פלבונואידים בקליפה של מלון ובציפה של אבטיח.
2. פיתוח תשתית צמחית, גנטית ואנליטית להבנת הביולוגיה של התכונה ולפיתוח מוצרים חדשים ומשופרים המבוססים על צבירת פלבונואידים, בשילוב עם הכלורופיל והקרוטנואידים שקיימים בפרי.

שיטות העבודה - גידלנו עד הבשלת פרי זני אבטיח ומלון שונים על מנת לקבוע את סוגי הפרי הצוברים פלבונואידים בקליפת פרי המלון ובציפת פרי האבטיח. מצאנו כי הצטברות הפלבונואידים בציפת האבטיח אינה קשורה לצבעו והעבודה איתו נפסקה. ממספר זני מלון נבחרים נדגמו פירות במהלך התפתחות הפרי כדי לאפיין כימית את הצטברות המרכיב הפלבונואידים וכדי לקבוע את רמת הביטוי של גנים נבחרים. פותחה שיטת HPLC להפרדה ולכימות של מרכיבים פלבונואידים בציפת הפרי של מלון. את המרכיב הפלבונואידים זיהינו בעזרת הספקטרום שלו והשוואה לסטנדרט אותנטי. ויזוי הזיהוי נעשה בעזרת השוואת ספקטרוסקופיית המסות של מרכיב הצבע עם זאת של הסטנדרט. גנים מועמדים שובטו, רוצפו ונבדקה רמת הביטוי שלהם בעזרת שיטות עבודה מקובלות. פותחה אוכלוסייה שהתפצלה לתכולת המרכיב הפלבונואידים, הפירות של F2 אופיינו מטבולית ויוצרו משפחות F3 להמשך העבודה.

תוצאות עיקריות - נמצא כי מרכיב הצבע הפלבונואידים המצטבר בקליפתם של מלונים מסוימים הוא נרינג'יין צ'לקון. הצטברות הצ'לקון בקליפה אינה תלויה בהצטברות הפיגמנטים האחרים, כלורופיל וקרוטנואידים. הצטברות הצ'לקון אינה תלויה גם בקלימקטריזם, היא מופיעה גם בזנים המאופיינים בהבשלת פרי התלויה באתילן קלימקטרי ובזנים בהם הבשלת הפרי אינה תלויה באתילן. בדיקה של אוכלוסיה מתפצלת העלתה כי הצטברות הצ'לקון נשלטת על ידי גן אחד. שובטו גנים מרכזיים המשתתפים בייצור הצ'לקון אולם לא נמצא פולימורפיזם בין הורי האוכלוסייה שיאפשר בדיקת התפצלות משותפת (co-segregation) של ההבדל עם התכונה. נבדקה רמת הביטוי של גנים אלו במהלך התפתחות הפרי של פירות הצוברים ושאינם צוברים צ'לקון אולם לא נמצא קשר ישיר בין רמות הביטוי לבין התופעה.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות - מאחר והגישה של השוואת מעקובות ורמות ביטוי של גנים מועמדים לא הובילה לזיהוי הגן השולט במערכת הייצור ובגורמים המגבילים את ייצור הפלבונואידים בציפת הפרי או לייצור אנטוציאנינים בקליפה, הצענו גישה רחבה לאיתור הגן על ידי שימוש בצברים שייצרו על סמך נתוני האוכלוסייה המתפצלת אותה ייצרנו. לשמחתנו, אושרה הצעתנו ואנו נתחיל לפעול בכיוון בקרוב.

2. הצגת הבעיה

צבעי הפרי במלון מוגבלים היום לגוונים של הפיגמנטים כלורופיל וקרונואידים, דבר שמהווה צוואר בקבוק לפיתוח צבעים וגוונים חדשים בגידול זה. טרם דווח על נוכחות פיגמנטים אחרים בפרי של מינים אלו. לאחרונה, בעבודה הקדמית על מספר זנים של מלון מהאוספים הגנטיים העומדים לרשותנו, גילינו גנוטיפים הצוברים פיגמנטים צהובים שאינם קרונואידים בקליפת הפרי. זיהוי ראשוני, על סמך אי-מסיסות הפיגמנט בסולבנט אורגני ומסיסותו בפאזה המימית ואנליזה ספקטרוסקופית, מראה כי מדובר בתרכובת פנולית, כנראה פלבונואידים. תוספת בסיס למיצוי המימי גרמה להעמקת הצבע הצהוב עובדה שמרמזת שמדובר כנראה בפלבון או בפלבונול. תגלית זו פתחה דרכים חדשות ומנגנונים מטבוליים חדשים ליצירת צבעי פרי חדשים וגם להעלאת תכולת נוגדי החמצון בפרי.

מטרת תוכנית המחקר הנוכחית הייתה לאפיין את השונות הגנטית הקיימת לתכונה של צבירת פלבונואידים בדלועיים שונים ולפתח את התשתית של הבנת הביולוגיה של התכונה כדי שיהיה אפשר להשתמש בה לפיתוח מוצרים חדשים ומשופרים המבוססים על צבירת פלבונואידים, בשילוב עם הכלורופיל והקרונואידים שקיימים בפרי. על מנת להשיג מטרה זאת השתמשנו באוספים הגנטיים הנמצאים בנוה יער ובטכנולוגיות חדשות לזיהוי מטבוליטים, לשיבוט גנים ולבדיקת ביטויים של גנים נבחרים. מחקר זה מייצג חשיבה חדשה על נושא הצבע והאיכות של פירות במשפחת הדלועיים. הכרת הגנטיקה של מרכיבים פלבונואידיים בפרי תסייע לייצר זני דלועיים חדשים בעלי צבעים חדשים ובלתי מוכרים, בעלי ערך בריאותי מוסף ותרחיב את הבנתנו בנושא.

3. מטרת המחקר

מטרות המחקר היו:

1. אפיין השונות הקיימת לתכונה של צבירת פלבונואידים בקליפה של מלון ודלעת ובציפת פרי האבטיח.
2. פיתוח תשתית צמחית, גנטית ואנליטית להבנת הביולוגיה של צבירת פלבונואידים בפרי הדלועיים ולפיתוח מוצרים חדשים ומשופרים המבוססים על צבירת פלבונואידים, בשילוב עם הכלורופיל והקרונואידים שקיימים בפרי.

4. שיטות העבודה

הצמחים גודלו, פירותיהם נדגמו, מוצו ונבדקה תכולת הקרונואידים והכלורופיל על פי שיטות שפורסמו בעבר (Tadmor et al., 2004 לקרונואידים ו-Arnon, 1949 לכלורופיל). מיצוי הפלבונואידים והפרדתם נעשו על פי Muir et al., 2001. הפרדת הפלבונואידים בוצעה במכשיר HPLC מדגם 2996 של חברת Waters, (Waters, Milford, MA, USA), המחובר לגלאי – Photo Diode Array (PDA) דגם 996 של חברת Waters, מצויד בקולונה C18™ Reverse phase (Nova-Pak) (250mm*4.6mm i.d.; 60Å; 4µm). הדוגמאות הורצו בפאזה נעה המורכבת מ-2 תמיסות (כל החומרים בדרגת נקיון HPLC grade): תמיסה A: מיס + 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid),

תמיסה B: אצטוניטריל. ההפרדה התרחשה המיצויים עברו הפרדה בתנאים איזוקרטיים 75% אצטוניטריל ו-25% TFA 0.1% (Trifluoroacetic acid) במים. אנליזה כמותית ואיכותית נעשתה בעזרת תוכנת MILENIUM32 (Waters, Milford, MA, USA) ושימוש בעקומי כיוול שנוצרו על-סמך הזרקות של כמויות ידועות של סטנדרטים של החומר נרינג'ינין. ושל תערובת החומרים נרינג'ינין/נרינג'ינין-צילקון (1:1) (Apin chemicals).

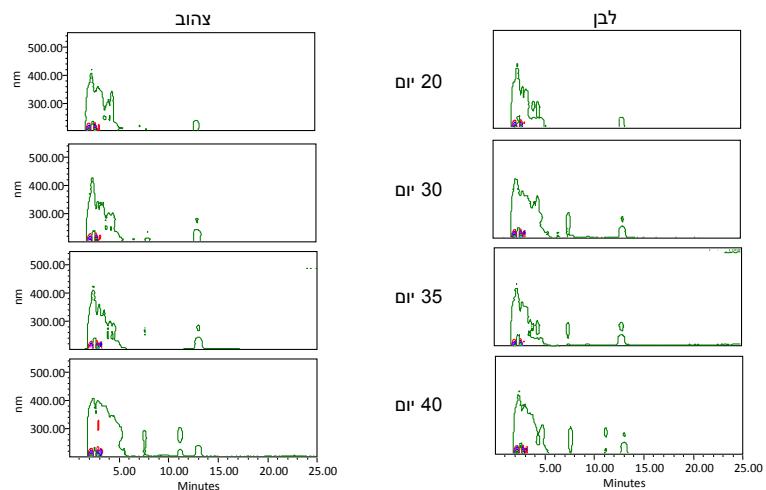
הפרדות של חומצות גרעין, מיצוי RNA, הפיכתו ל-cDNA, תהליכי הגברה ב-PCR, ריצוף של מעקובות DNA ובדיקת רמת ביטוי של גנים ב-RT-PCR בוצעו לפי פרוטוקולים של המעבדה הגנטית בנוה יער.

5. תוצאות עיקריות

5.1 אנליזה של פלבנואידים בציפת פרי האבטיח

(חלקים מעבודה זאת בוצעו על ידי קרין רותם, סטאג'רית ממכללת בראודה, כרמיאל) בעבודה ההקדמית שערכנו נבחנו זנים הצוברים קרוטנואידים לעומת זן צהוב קנרי ונמצא כי לאבטיח הצהוב הקנרי מרכיב פלבנואידים שאינו קיים באבטיחים אדומים או כתומים. על מנת לאפיין את התופעה נבדקה הצטברות קרוטנואידים ופלבנואידים בפרי המתפתח של אבטיח לבן, צהוב וכתום ונבדקה ההתפלגות של מופעי הצבע והפיגמנטים השונים בשתי אוכלוסיות F2 – 1. אבטיח כתום הצובר ביתא קרוטן כפיגמנט העיקרי שלו X אבטיח צהוב ו-2. אבטיח צהוב X אבטיח לבן. לא נמצא קשר בין הופעת הצבע לזן נוכחות מרכיב פלבנואידים מסוים בהורים (איור 1) או באוכלוסיות המתפלגות שנבדקו.

אפיין התפתחותי של הצטברות צבענים באבטיח לבן וצהוב-פלבנואידים



איור 1 – אנליזת HPLC של הצטברות פלבנואידים בפרי אבטיח צהוב ובאבטיח לבן. באבטיח הלבן נמצאים המרכיבים הפלבנואידים הנמצאים באבטיח הצהוב והוא חסר צבע

5.2 אנליזה של פלבנואידים בקליפת פרי המלון

(חלקים מעבודה זאת בוצעו על ידי אילן יעקב, תלמיד מחקר לתואר שני, הפקולטה לחקלאות, רחובות, וסמדר ליבהבר, סטאגירית ממכללת בראודה, כרמיאל)

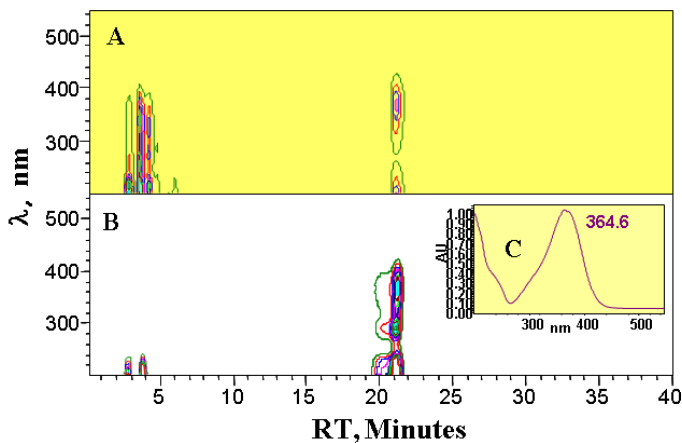
סריקה רחבה של טיפוסי פרי במין *C. melo* הראתה כי ישנם טיפוסי מלון הצוברים בקליפת הפרי כלורופיל ואת הקרוטנואידים הנלווים שלו (קליפה ירוקה), טיפוסי הצוברים קרוטנואידים ללא קרוטנואידים (קליפה כתומה) וטיפוסי צהובים שאינם צוברים קרוטנואידים כלל, חלקם לבנים וחלקם צהובים (איור 1).



איור 1
טיפוסי פרי נבחרים במלון.

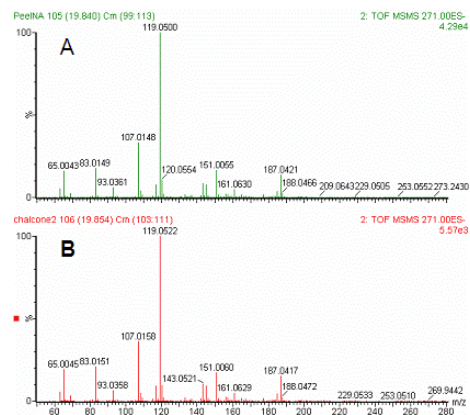
מיצוי של הפלבנואידים בקליפה של זנים מטיפוס צהוב קנרי (צהוב שאינו צובר קרוטנואידים) גילה פיק היוצא ב-21 דקות (איור 2A) זמן בו יוצא סטנדרט של 4, 6', 4', 2', הנקרא גם נרינג'נין צילקון או צילקון (איור 2B). הפיק מהקליפה והסטנדרט הראו ספקטרום זהה (איור 2C)

איור 2
A - כרומטוגרמת HPLC של מיצוי פלבנואידים מקליפת פרי בשל מהזן 'נוי עמיד'
B - כרומטוגרמה של סטנדרט אוטנטי של נרינג'נין-צילקון
C - ספקטרום הבליעה של נרינג'נין צילקון



זיהוי הפיק כנרינג'נין צילקון נעזר גם באנליזה של LCMS שבוצעה במכון וייצמן במעבדתו של אסף אהרוני (איור 3)

איור 3
A - ספקטרוסקופית המסות של הפיק שיוצא ב-21 דקות ממיצוי של קליפת פרי כשל מהזן נוי עמיד
B - ספקטרוסקופית המסות של סטנדרט אוטנטי של נרינג'נין צילקון



נבדקו זנים קלימקטריים ושאינם קלימקטריים הצוברים קרוטנואידיים (עם ובלי כלורופיל) ונמצא כי אין קשר בין צבירת הצ'לקון לקלימקטריזם או לצבירת קרוטנואידיים או כלורופיל נבחרו ארבעה זנים, דולציה ו-TVT שאינם צוברים צ'לקון בקליפתם ונוי עמיד ורושט הצוברים צ'לקון בפרי הבשל שלהם, לעבודה התפתחותית הפירות נדגמו ביום האנטזיס, 10 ימים אחרי האנטזיס, 25 יום אחרי האנטזיס ופרי בשל (איור 4). מועדים אלו נבחרו על סמך תצפיות ויזואליות בשנים קודמות.

איור 4

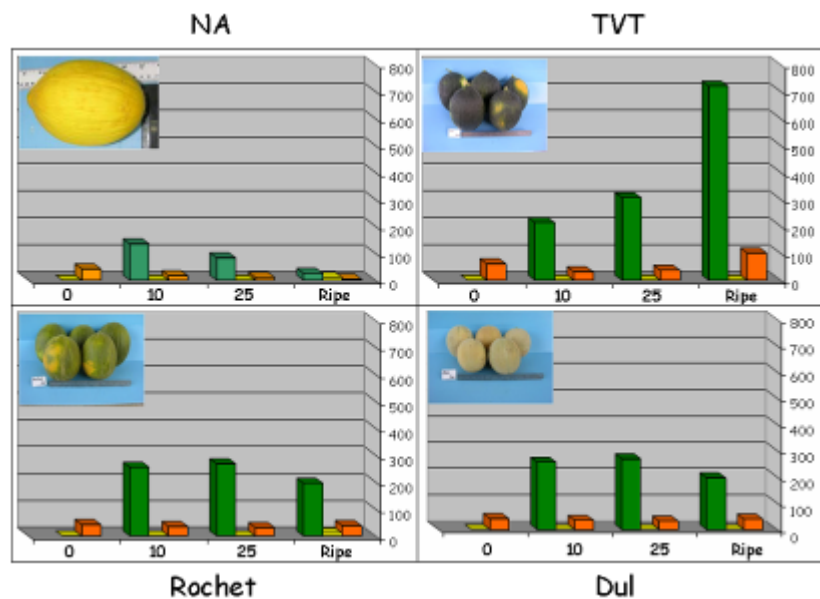
פירות מתפתחים של זנים הצוברים צ'לקון (נוי עמיד ורושט) ושל זנים שאינם צוברים צ'לקון.

	10 Daa	25 Daa	ripe
Noy Amd			
TVT			
Rochet			
Dulce			

נבדקה הצטברות הקרוטנואידיים, הכלורופיל (נבדק רק החל מ-10 ימים לאחר ההפריה) והצ'לקון בקליפת הפרי במהלך ההבשלה (איור 5). בזן נוי עמיד יורדת תכולת הקרוטנואידיים והכלורופיל

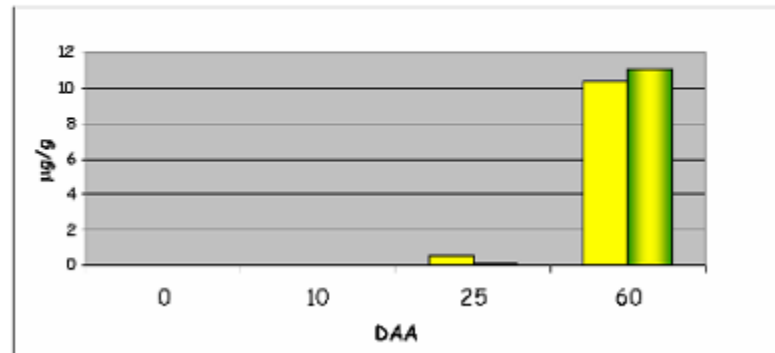
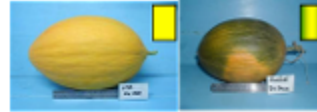
איור 5

הצטברות הקרוטנואידיים (כתום) הכלורופיל (ירוק) והצ'לקון (צהוב) במהלך הבשלת הפרי בזנים נוי עמיד (NA), TVT, דולציה (DUL) ורושט (Rochet).



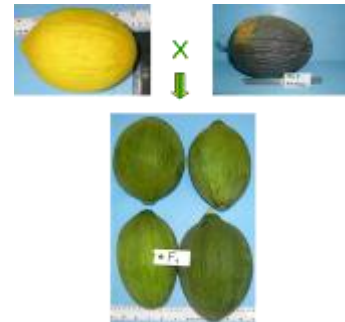
איור 6 מציג בהרחבה את הצטברות הצ'לקון בזנים שצוברים צ'לקון בקליפתם, נוי עמיד ורושט. ההצטברות מתחילה להראות 25 ימים לאחר ההפריה ומגיעה לשיאה בפרי הבשל. לא נראה הבדל משמעותי בין הזנים בתכולת הצ'לקון המצטברת למרות שרושט צובר גם כלורופיל בקליפתו.

איור 6
הצטברות הצ'לקון בקליפות הפרי במהלך התפתחותו. עמודות צהובות מייצגות את הזן נוי עמיד ועמודות ירוקות צהובות את הזן רושט



לצורך הבנת ההורשה של צבירת צ'לקון בקליפה יצרנו אוכלוסיה מתפצלת בין ההורים 'נוי עמיד', מטיפוס צהוב קנרי הצובר צ'לקון כפיגמנט העיקרי של הקליפה, לבין TVT, הצובר כלורופיל וקרוטנואידים בקליפתו. בן הכלאיים צובר צ'לקון, קרוטנואידים וכלורופיל בקליפתו (איור 7).

איור 7
פירות של הורי האוכלוסייה המתפצלת ושל בן הכלאיים. ההורים נוי עמיד (משמאל) ו-TVT (מימין).



בדור F2 קיבלנו ארבעה טיפוסים צבע של פרי בעוצמות משתנות: פרי ירוק, הצובר כלורופיל וקרוטנואידים בלבד, פרי ירוק צהוב, הצובר כלורופיל, קרוטנואידים וצ'לקון, פרי צהוב הצובר צ'לקון בלבד ופרי לבן שאינו צובר פיגמנטים (איור 8).

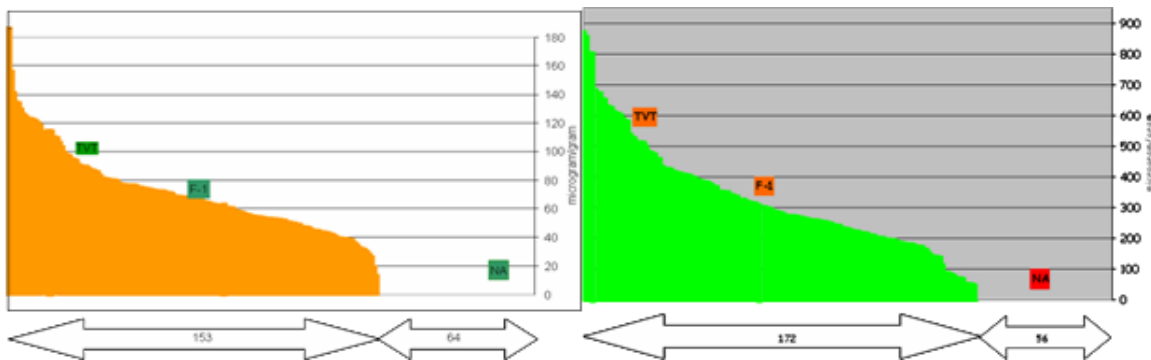
הסיבות לגוויי הביניים יכולות להיות בגלל מצב הבשלה של הפרי, כזכור אלו פירות F2, פרי בודד מכל צמח, שנקטפו מועדי קטיף מוגבל ולפיכך בדרגות הבשלה שונות, או בגלל מעורבות של מספר גנים בקביעת הצבע ועוצמתו. הפנוטיפ החזותי של הפרי לא היה חד-משמעי דיו על מנת לבחון את מנגנון התורשה של הצטברות צ'לקון בקליפת הפרי, לכן ביצענו בדיקות פוטוספקטרליות לנוכחותם של הפיגמנטים השונים.

איור 8

פירות מאוכלוסיית F2. משמאל מלמעלה למטה: ארבעת טיפוסים הפרי העיקריים, ירוק צהוב, ירוק, צהוב ולבן. מימין מלמעלה למטה: טיפוסים הביניים, פרי הצובר מעט כלורופיל וצ'לקון, פרי הצובר מעט כלורופיל, פרי הצובר צ'לקון ומעט כלורופיל ופרי לבן הצובר מעט כלורופיל ומעט צ'לקון.



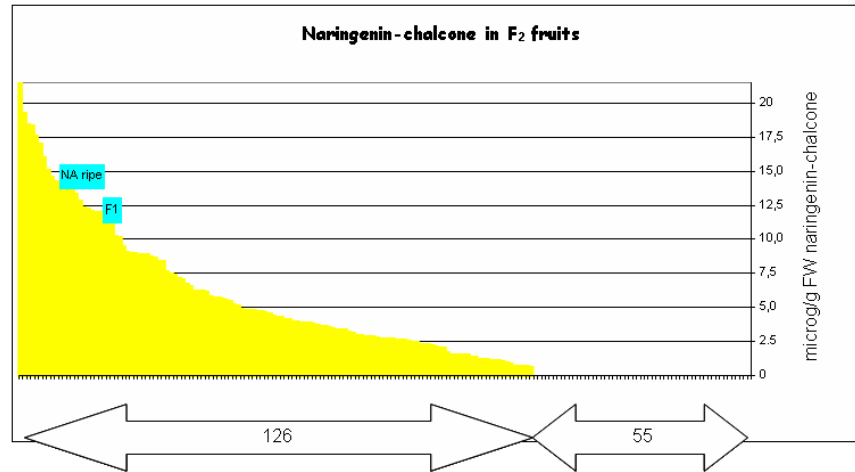
תכולת כלורופיל נבדקה בספקטרופוטומטר ותכולת הקרוטנואידים (ביתא קרוטין ולוטאין) ב-HPLC. רבע מצאצאי האוכלוסייה לא צברו כמויות מדידות של כלורופיל או של קרוטנואידים עובדה המעידה כי גן דומיננטי בודד קובע אם יצטברו כלורופיל וקרוטנואידים בקליפת הפרי (איור 9) כאשר נמצאה גרסיה לינארית מובהקת ($p < 0.0001$) בין תכולת הכלורופיל לבין תכולת הקרוטנואידים. גרסיה זאת מוסברת בעובדה שהקרוטנואידים שנמצאו הם קרוטנואידים כלורופלסטיים המלווים את המערכת הפוטוסינטטית. הגן הקובע הצטברות כלורופיל והקרוטנואידים הנלווים אליו מעורב ישירות בתהליך יצירת הכלורופלסטים בפרי תהליך בעל משמעות טיפוחית נרחבת. במסגרת תכנית ההמשך שאושרה לנו אנו נלמד גם את מהותו של גן זה. כמויות הפיגמנטים המשתנות בפירות צוברי הפיגמנטים הנבדקים מוסברות בדרגת ההבשלה השונה של הפירות בעת הקטיפה או בעובדה כי קיימים גנים אחרים הקובעים את כמות הפיגמנטים ולא את עצם היווצרותם.

**איור 9**

התפלגות תכולת הכלורופיל (ימין) והקרוטנואידים (שמאל) באוכלוסיית F2 הנבדקת. שתי התכונות התפלגו כתכונה מנדלית דומיננטית בדידה.

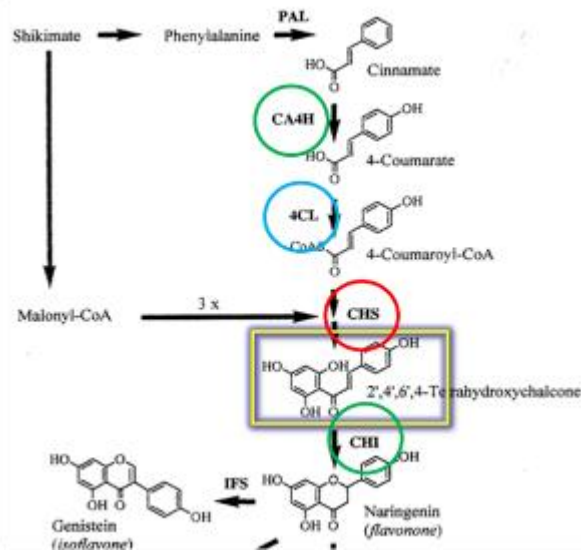
הצטברות צ'לקון בקליפות פירות של צמחי F2 נבדקה בעזרת HPLC. מצאנו כי רבע מהצאצאים לא צברו כמויות מדידות של צ'לקון עובדה המעידה על נוכחות גן יחיד דומיננטי הקובע הצטברות או אי הצטברות של צ'לקון. הכמויות המשתנות של צ'לקון בקליפות המכילות כמויות מדידות של צ'לקון, מעידות על קטיפה פירות בעלי דרגות הבשלה שונות או על נוכחות גנים אחרים המשפיעים על כמות הצ'לקון בקליפה ולא על עצם יצירתו (איור 10).

איור 10
 התפלגות תכולת הצ'לקון באוכלוסיית F2 הנבדקת.



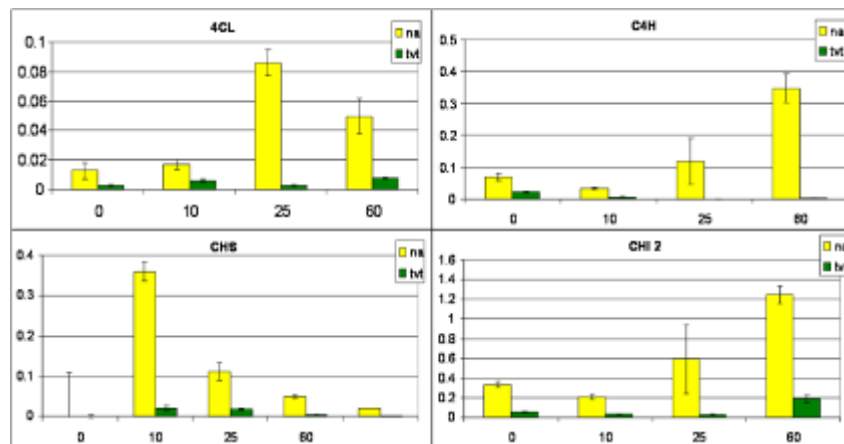
כאמור לא נמצאה התאמה בין צבירת הצ'לקון לבין הצטברות הפיגמנטים האחרים שנבדקו. הגן הקובע צבירת צ'לקון והגן הקובע צבירת כלורופיל והפיגמנטים הנלווים אצבירת הצ'לקון אינה תלויה גנטית בצבירת הכלורופיל מאחר וההתפלגות המשותפת אינה שונה באופן מובהק ($p < 0.001$) מהיחסים המנדליים הצפויים לשני גנים בלתי תלויים 9:3:3:1 (לבן : צהוב : ירוק : ירוק-צהוב). הגנים המועמדים לקביעת הצטברות צ'לקון בקליפת הפרי הם הגנים הקודמים לצ'לקון במסלול היצירה, PAL, CHS ו-CHS, והגן, CHI, ההופך את הצ'לקון לנרינגנין (איור 11). PAL קיים במספר העתקים בגנום המלון ולכן עבודה איתו עלולה להיות מורכבת. בודדנו את ארבעת הגנים האחרים משני הורי האוכלוסייה וריצפנו אותם הכוונה לזהות הבדלי מעקובת בין ההורים. לא נמצאו הבדלי מעקובת שכאלה.

איור 11
 מסלול היצירה של הפניל פרופנואידים. יצירת הצ'לקון על ידי האנזים CHI היא הצעד הראשון המחייב ליצירת פלבנואידים.



ברוב העבודות שבחנו את הגורמים המבקרים את מנגנון ההצטברות של פלבנוואידיים בצמחים נמצאה בקרה ברמת השעתוק (transcriptional regulation), לכן בדקנו את רמת הביטוי של הגנים שבדדנו במהלך התפתחות הפרי בטיפוסי ההורים. רמת הביטוי נקבעה בעזרת אנליזת RT-PCR של דוגמאות cDNA שהופקו מקליפות פרי בדרגות הבשלה שונות: יום ההפריה, עשרה ימים, עשרים וחמישה ושישים יום לאחר יום ההפריה. רמת הביטוי של כל גן חושבה יחסית להתבטאות הגן ציקלופרין המתבטא באופן אחיד במהלך התפתחות הפרי. ככלל, רמת הביטוי של הגנים הנבדקים במאשר רמת ההתבטאות של גנים אלו בפירות מהזן TVT שאינו צובר צ'לקון כלל (איור 12). אולם תבנית הביטוי של הגנים אינה מסבירה את הצטברות הצ'לקון. רמת הביטוי של הגנים 4CL ו-C4H בקליפת הפרי המתפתח של נוי עמיד אמנם תואמת את הצטברות הצ'לקון אך רמת אנזים המפתח צ'לקון סינתאז (CHS) גבוהה כשהצ'לקון אינו מצטבר ויורדת עם הצטברותו. רמת הביטוי של הצ'לקון איזומראז (CHI), שתוצרו האנזים שסוגר את הטבעת, ובכך מפר את הכרומופור שנתן לצ'לקון את הצבע הצהוב, ויוצר את הנרינג'ינין חסר הצבע. למרות זאת, לא נצפתה הצטברות של נרינג'ינין בקליפת נוד עמיד בשום שלב בהתפתחות הפרי. תמונה מסובכת זאת עשויה להיפתר במסגרת פרויקט ההמשך המאושר של התכנית.

איור 12
הצגה גרפית של אנליזת RT-PCR לבדיקת רמת הביטוי של הגנים 4CL, CHS, C4H ו-CHI בפירות המתפתחים של הזנים נוי עמיד (עמודות צהובות) ו-TVT (עמודות ירוקות). mRNA הופק מקליפת הפרי היום האנטזיס 0, 10, 25-60 ימים לאחר האנטזיס.



6 סיכום

- התגלתה מערכת צבענים חדשה בקליפת פרי המלון המבוססת על פלבונואידים.
- המערכת פעילה בקליפת הפרי אך לא בציפתו.
- הפלבונואיד המצטבר הוא נרינג'נין צ'לקון.
- הצטברות הצ'לקון בקליפת הפרי אינה תלויה בקלימקטריות או בייצור צבענים אחרים.
- הצטברות הצ'לקון והצטברות הכלורופיל נשלטת על ידי גנים דומיננטיים יחידים בלתי תלויים גנטית או מטבולית.
- רמת הביטוי של גנים המעורבים ביצירת הצ'לקון גבוהה משמעותית בקליפת פרי הצוברת צ'לקון לעומת קליפת פרי שאינה צוברת צ'לקון. למרות זאת רמות הביטוי של הגנים השונים במהלך התפתחות הפרי אינן מספקות הסבר פשוט להצטברות הצ'לקון. לפיכך, מהות וזהות הגן עדיין לא ברורים.
- למערכת פוטנציאל ליצור טיפוסי מלון חדשים. הבנת מערכת הבקרה על הצטברות הצ'לקון כוללת גם את הבנת הגורם העוצר את המסלול הביוסנינטי בתוצר זה. הבנה הגורם העוצר תאפשר פיתוח מערכות גנטיות שיאפשרו ליצור פירות הצוברים פיגמנטים רב גוניים כמו האנטוציאנינים. הבנת נננליצור פירות מלון הצוברים נוגדי חמצון פלבונואידים ואולי גם צבעוניים.



7. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות

לאור הערכתנו את חשיבות המערכת הצמחית והגנטית שפיתחנו הגשנו את מסקנותינו בצורת הצעה להמשך המחקר. לשמחתנו זכתה הצעתנו למימון מלא. עיקר ההצעה הוא בשימוש בטכנולוגיות גנומיות מתקדמות לאיתור הגנים המעורבים בייצור הצ'לקון. אנו נשתמש בידע המטבולי שצברנו במסגרת תכנית זאת ליצור צברים של משפחות F₃, אותן ייצרנו גם כן במסגרת תכנית זאת. אנו ניצור צברים של פירות מתפתחים שייצגו משפחות F₃ הצוברות כלורופיל וצ'לקון, כלורופיל, צ'לקון או משפחות שאינן צוברות פיגמנטים בקליפת הפרי שלהם. mRNA שיופק מצברים אלו יעבור אנליזת 454 שתוליד מידע בעזרתו נוכל לאתר את הגנים הבדידים המשפיעים על הצטברות הצבענים וגנים אחרים המושפעים מהם. בנוסף, ניצור תשתית מידע ציבורית רבת ערך לקהילה המדעית הישראלית והבינלאומית כאשר נפתח את המידע לציבור באתר ICUGI.

8. רשימת ספרות

- Arnon, D.I. copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidaes in *Beta Vulgaris*. *Plant physiol.* **1949**, 24, 1-15.
- Muir, S.R.; Collins, G.J.; Robinson, S.; Hughes, S.; Bovy, A.; De Vos, C.H.R; Van Tunen, A.J.; Verhoeyen M.E. "Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols." *Nat Biotech.* **2001**, 19, 470 – 474

9. סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה

1. אפיון השונוות הקיימת לתכונה של צבירת פלבנואידיים בקליפה של מלון ובציפה של אבטיח. 2. פיתוח תשתית צמחית, גנטית ואנליטית להבנת הביולוגיה של התכונה ולפיתוח מוצרים חדשים ומשופרים המבוססים על צבירת פלבנואידיים, בשילוב עם הכלורופיל והקרוטנואידיים שקיימים בפרי. מטרות המחקר המקוריות כללו גם עבודה בדלעת. יריעת התקציב לא אפשרה עבודה בדלעת והממצאים באבטיח לא הצדיקו את המשך העבודה איתו כמפורט בדו"ח בעמוד 6.

עיקרי הניסויים והתוצאות

אנליזה גנטית של אוכלוסיות מתפצלות משולבת באנליזות מטבוליות ואנליזה השוואתית של מעקובות והתבטאות גנים מרכזיים בתחילת מסלול הייצור של הפלבנואידיים הראו כי: 1. הצבע צהוב קנרי בציפת האבטיח אינו קשור בהצטברות פלבנואידיים, 2. הפיגמנט המצטבר בקליפת מלון צהוב קנרי הוא נרינג'נין צ'לקון, 3. צ'לקון יכול להצטבר גם בקליפות של טיפוזי מלון אחרים, 4. הצטברות הצ'לקון והצטברות הכלורופיל עם הקרוטנואידיים הנלווים אליו נשלטת על ידי גנים בלתי תלויים בעלי אופי הורשה דומיננטי, 5. לא נמצאו הבדלי מעקובות בין מלון הצובר צ'לקון לכזה שאינו צובר בארבעה גנים מרכזיים המעורבים בייצור הצ'לקון ו-6. רמת הביטוי של גנים אלו בקליפה של מלון הצוברת צ'לקון גבוהה משמעותית מאשר בקליפה שאינה צוברת צ'לקון.

מסקנות מדעיות

שילוב של עבודה גנטית, מטבולית ומולקולארית יצר תשתית מחקרית שזיהתה ופענחה את מנגנון הצטברות נרינג'נין צ'לקון בקליפת הפרי של המלון. התשתית המחקרית שיצרנו עשויה להוביל לזיהוי מנגנונים מרכזיים במופע פרי המלון ובאיכותו. מנגנונים אלו כוללים את היווצרות כלורופלסטים בפרי והצטברות פלבנואידיים בפרי.

בעיות שנתרו לפתרון

זיהוי הגן המבקר צבירת צ'לקון והגן המבקר היווצרות כלורופלסטים בקליפת הפרי במלון. הבנת הגורמים המגבילים הצטברות פלבנואידיים במורד הזרם לצ'לקון בקליפת הפרי ובציפתו.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:

חלקים מתוצאות העבודה הוצגו ב: עבודות סטאג' של סמדר ליבהבר (2008) וקרין רותם (2009) עבודת כתובות וסמינר שהוצג במכללת בראודה, כרמיאל, בכינוס Plant and Animal Genome 2008 בסן-דייגו, קלפירניה (תקציר+הרצאה), הרצאה מוזמנת בפני חוקים מה-USDA באמריקן פולס, איידהו (2008). נשלח תקציר והתקבל להרצאה בכינוס דלועיים שייערך בספטמבר 2009 בסין.

אני ממליץ לפרסם את הדוח ללא הגבלה בספריות ובאינטרנט.