

דוח לתוכנית מחקר מס' 16-1043-261

פיתוח אשכולית מתוקה על בסיס דיהידרוצ'לקונים

Developing Sweet Tasting Grapefruits Based on Dihydrochalcones

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מופק אבדאח: המחלקה למדעי הצמח

אפרים לוינסון: המחלקה למדעי הצמח

יורם איל: המחלקה למדעי הצמח, מדעי עצי הפרי

רחל דודוביץ-רקנאטי: המחלקה למדעי הצמח

Mwafaq Ibdah, Plant Science, Newe Yaar Research Center.

mwafaq@volcani.agri.gov.il

Efraim Lewinsohn, Plant Science, Newe Yaar Research Center.

twefracim@volcani.agri.gov.il

Yoram Eyal, Plant Sciences, Fruit Tree Sciences, The Agriculture Research Organization (ARO). eyalab@volcani.agri.gov.il

Rachel Davidovich-Rikanati, Plant Science, Newe Yaar Research Center.

davidovi@volcani.agri.gov.il

February, 2017

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)



חתימת החוקר

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

- Ibdah, M.**, Berim, B., Martens, S., Valderrama, A.L.H., Palmieri, L., Lewinsohn, E. and Gang DR. (2014). Identification and cloning of an NADPH-dependent hydroxycinnamoyl-CoA double bond reductase involved in dihydrochalcone formation in *Malus x domestica* Borkh. *Phytochemistry*. 107:24-31.
- Mossab Yahyaa, Rachel Davidovich-Rikanati, Yoram Eyal, Sally Marzouk, Efraim Lewinsohn, **Mwafaq Ibdah**. (2016). Identification and characterization of UDP-glucose:Phloretin 4'-O-glycosyltransferase from *Malus x domestica* Borkh. *Phytochemistry*. 130:47-55.
- Mosaab Yahyaa, Samah Ali, Rachel Davidovich-Rikanati, Muhammad Ibdah. Alona Shachtier, Yoram Eyal, Efraim Lewinsohn, **Mwafaq Ibdah**. Characterization of Four Chalcone Synthase-like Genes from apple (*Malus x domestica* Borkh.) submitted (2017).

תקציר

הצגת הבעיה: דיהידרוצ'לקונים הינם חומרים טבעיים בעלי מתיקות גבוהה. מסלול הביוסינתזה שלהם לא אופייני עדיין אך הודגם כי מקורם בחומר *p-coumaroyl-CoA*. זיהינו גן מתפוח ומתפוז המקודד לאנזים *p-coumaroyl CoA double bond reductase (CCDBR)* אשר יכול להפוך *p-coumaroyl-CoA* ל-*p-dihydrocoumaroyl-CoA*, חומר המוצא לפלורטין המשמש כממתיק טבעי.

מטרות המחקר:

1. ביטוי הגן CCDBR בצמחי אשכולית (*Citrus paradisi* Var. *Duncan*).
2. Co-expression לגן CCDBR ו-*Chalcone synthase (CHS)*.
3. שיבוט וביטוי ל-*UDP-glucose:Phloretin 4'-O-glycosyltransferase (MdPh-4'-OGT)* מתפוח.
4. Co-expression לשלושה גנים CCDBR עם *CHS* ו-*MdPh-4'-OGT*.
5. אפיון קווים הטרונסגנים של אשכולית המכילים שלושה גנים.

שיטות העבודה:

1. טרנספורמציה ל-CCDBR לשתילי אשכולית ול-*Anthocyanin-rich grape cell culture*.
- 2: בידוד רצפים של הגן הספציפי *MdPh-4'-OGT* מתפוח.
3. בידוד רצפים של הגן *Chalcone synthase (CHS)*.
4. ניקוי וריכוז האנזים *MdPh-4'-OGT* ו-*CHS*.
5. קביעת פעילות אנזימטית של האנזים וזיהוי תוצרי הריאקציה האנזימטית באמצעות LC-MS.
6. *Extraction* ואנאליזת LC-MS לשתילי אשכולית ול-*Anthocyanin-rich grape cell culture* שעברו טרנספורמציה.

תוצאות עיקריות:

1. הגן CCDBR עבר טרנספורמציה לאגרובקטריום ולצמחי אשכולית. נעשתה אנליזת RT-PCR להוכחת אינטגרציה וביטוי הגן CCDBR בצמח ונמצא כי הגן עבר ומבוטא בביטוי יתר.
2. ביטוי ואפיון ביוכימי של חלבון *MdPh-4'-OGT*.
3. צמחי אשכולית שעברו טרנספורמציה כבר הורכבו על כנות.
4. הגן CCDBR עבר טרנספורמציה לאגרובקטריום ו-*Anthocyanin-rich grape cell culture*.
5. ביטוי ואפיון ביוכימי של חלבון *CHS*.
6. אנאליזת LC-MS לצמחי אשכולית ול-*Anthocyanin-rich grape cell culture* שעברו טרנספורמציה עם הגן CCDBR.

מבוא

טעם מתוק הינו אחד ממרכיבי הטעם החשובים בפירות ובתזונת האדם והינו אחד מהמאפיינים העיקריים בהעדפת צרכנים. תחושת המתקות מושגת בדרך כלל מהצטברות סוכרים בפירות הבשלים, אך יכולה גם להתקבל ע"י חומרי טבע אחרים בעלי טעם מתוק כגון הדיטרפן סטביל המצטבר בצמח הסטיביה. אשכוליות ידועות כבעלות טעם כללי מר בגלל הצטברות של פלבנונים דיסכרידים הנוצרים במסלול הפלבנואידים, אך מסלול זה יכול לייצר חומרי טעם מתוקים. דיהידרוצ'לקונים כגון פלורטין (phloretin) הינם חומרים טבעיים בעלי מתקות גבוהה. מסלול הביוסינתזה של דיהידרוצ'לקונים אלה לא אופיין עד כה אך הודגם כי מקורם בחומר *p-coumaroyl-CoA*. בעבודה מקדימה זיהינו גן מתפוח המקודד לאנזים *p-coumaroyl CoA double bond reductase* אשר יכול להפוך *p-coumaroyl-CoA* ל-*p-dihydrocoumaroyl-CoA*, חומר המוצא לפלורטין.

מטרות המחקר:

מטרת תכנית זו היא להשתמש בגן *CCDBR* בכדי לפתח אשכוליות מתוקות המייצרות דיהידרוצ'לקונים כגון פלורטין וטרילובאטין (*trilobatin*). אנו מציעים להשתמש בהנדסה גנטית כדי לייצר שלב ביוסינתטי חדש באשכולית שיהיה מקור לבניית החומרים המתוקים בשתילי אשכולית (*Citrus paradisi* Var. *Duncan*). לשם כך אנו מתכננים לבטא שלושה גנים המקודדים לאנזימים המשתתפים במסלול.

1. הגן שבודד מתפוז *p-coumaroyl CoA double bond reductase* האחראי לייצור *p-dihydrocoumaroyl-CoA*.
2. צ'לקון סינתאז (CHS) מתפוח ההופך *p-dihydrocoumaroyl-CoA* ל-*phloretin*.
3. גלוקוסילטראנספראז *MdPh-4'-OGT* מתפוח, כדי לגרום לצבירת *trilobatin* מ *phloretin*.

עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

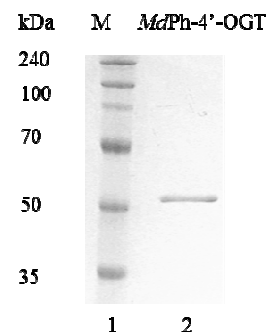
1. הגן *CCDBR* עבר טרנספורמציה לאגרובקטריום ולצמחי אשכולית. נעשתה אנליזת RT-PCR להוכחת אינטגרציה וביטוי הגן *CCDBR* בצמח ונמצא כי הגן עבר ומבוטא בביטוי יתר.
2. צמחי אשכולית שעברו טרנספורמסיה כבר הורכבו על כנות. הרכבת צמחים (*grafting*) הינה שיטה נפוצה ועתיקת יומין שבה רקמות צמח מזן אחד מחוברות אל רקמות צמח אחר מזן אחר, צינורות העצה והשיפה של שני הצמחים מתאחות ונוצר צמח אחד. וכך בכוונתנו לבצע בדיקת ייצור וכימות ל-*phloretin* ול-*trilobatin* בשתילי אשכולית הטרנסגנים המורכבים על כנות.
3. במקביל הגן *CCDBR* עבר טרנספורמציה ל-*anthocyanin-rich grape cell culture*.

4. בידוד רצף הגן גלוקוסילטרנספראז *MdPh-4'-OGT* מתפוח עץ. על מנת לקבל הגן המיועד ל overexpression בשתילי אשכולית (*Citrus paradisi* Var. *Duncan*), הגן השלם של גלוקוסילטרנספראז *MdPh-4'-OGT* מתפוח עץ נעשה חיפוש והשוואה על סמך רצפים ידועים לגלוקוסילטרנספראז ב-database <http://www.rosaceae.org>. סונתז שני פריימרים forward ו- reverse עפ"י רצף הגן, הופק total RNA מתפוח עץ ועליו סונתז cDNA ע"י שימוש בפריימרים שנבחרו וראקציית RT-PCR. הגן השלם לגלוקוסילטרנספראז שהתקבל בראקציית RT-PCR שובט לווקטור ביטוי pEXP5-CT/TOPO. נבחרו מספר מושבות חיוביות, נבדקו על ידי הפקת פלסמיד וראקציית חיתוך. הפלסמידים שהכילו את הגן נשלחו לריצוף לצורך אישור נוכחות שהגן בצורה נכונה במבנה המיועד ל overexpression.

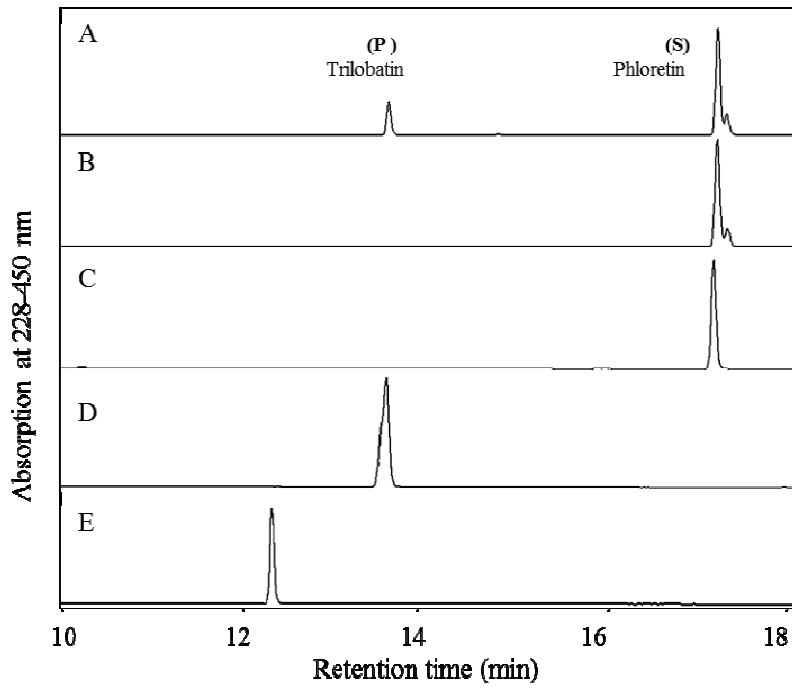
MdF7OGT-F: 5'- ATG GTG CAA CAC CGC TTT CTA C -3'

MdF7OGT-R: 5'- GTG CCT AGC ATC TTT TAA AAC CTT GAT CTG -3'

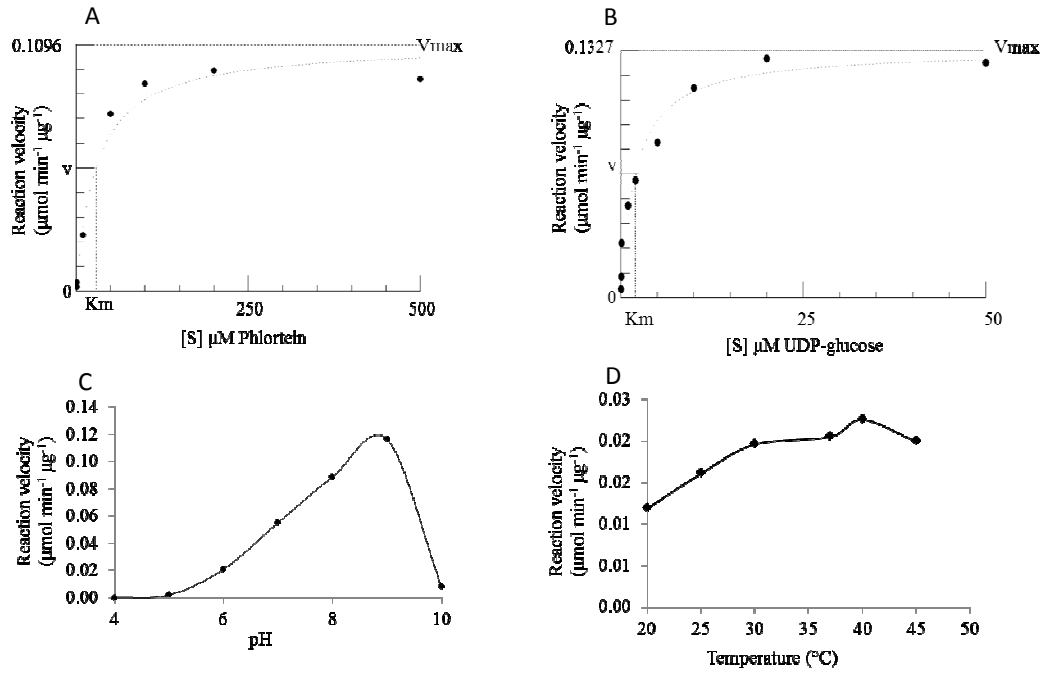
5. ביטוי גלוקוסילטרנספראז *MdPh-4'-OGT* בחיידקים ובדיקת פעילות אנזימתית. לצורך קבלת מידע על פעילות אנזימתית *MdPh-4'-OGT* מתפוח עץ, נעשתה טרנספורמציה של הקונסטרקט הנ"ל לחיידקים *E. coli* (B121) ולאחר מכן נעשה ניקוי לחלבון בעזרת Ni-agarose affinity chromatography, נבדקה רמת הניקיון לחלבון בעזרת SDS gel. נבחנה הפעילות אנזימתית לגלוקוסילטרנספראז בשימוש הסובסטרט phloretin ו UDP-Glucose, לאחר ואינקובציה למשך 30 דקות בטמפרטורת של 30 °C הפעילות אנזימתית נבדקה באמצעות HPLC.



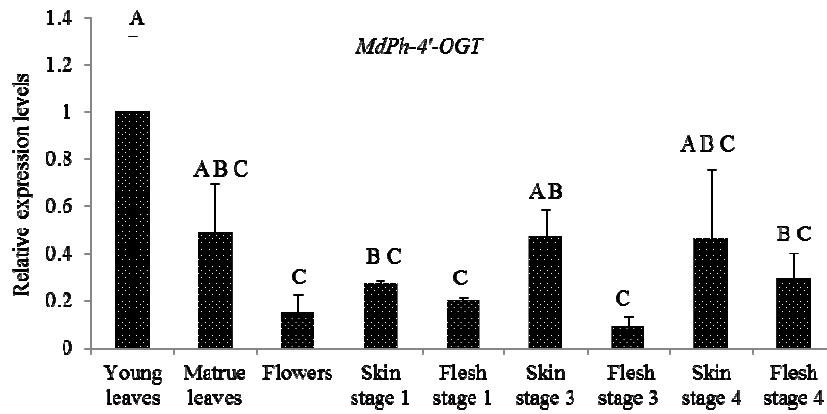
איור 1 : אנליזת SDS לניקיון החלבון גלוקוסילטרנספראז הרקומביננטי *MdPh-4'-OGT* מתפוח עץ.



איור 2 : אנליזה אנזימתית לחלבון גלוקוסילטרנספראז הרקומביננטי MdPh-4'-OGT ב- HPLC. (A) ריאקציה אנזימתית לגלוקוסילטרנספראז MdPh-4'-OGT בשימוש הסובסטרט phloretin ו UDP-Glucose. (B) ריאקציה אנזימתית לגלוקוסילטרנספראז MdPh-4'-OGT אחרי רתיחה ב- 95°C. (C) Phloretin standard. (D) Trilobatin standard. (E) Phloridzin standard. S: substrate; P: product



איור 3: פעילות אנזימאטית של החלבון הרקומביננטי MdPh-4'-OGT. הגרפים מראים מצב קינטי יציב של MdPh-4'-OGT ע"י (A) phloretin (B) UDP glucose. קביעת האופטימליות ל- pH (C) ולטמפרטורה (D).

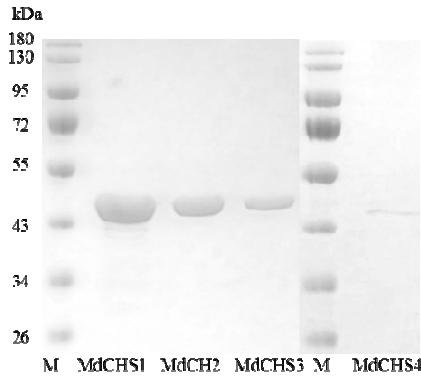


איור 4: התבטאות הגנים MdPh-4'-OGT ברקמות שונות של תפוח מהזן "Golden Delicious"

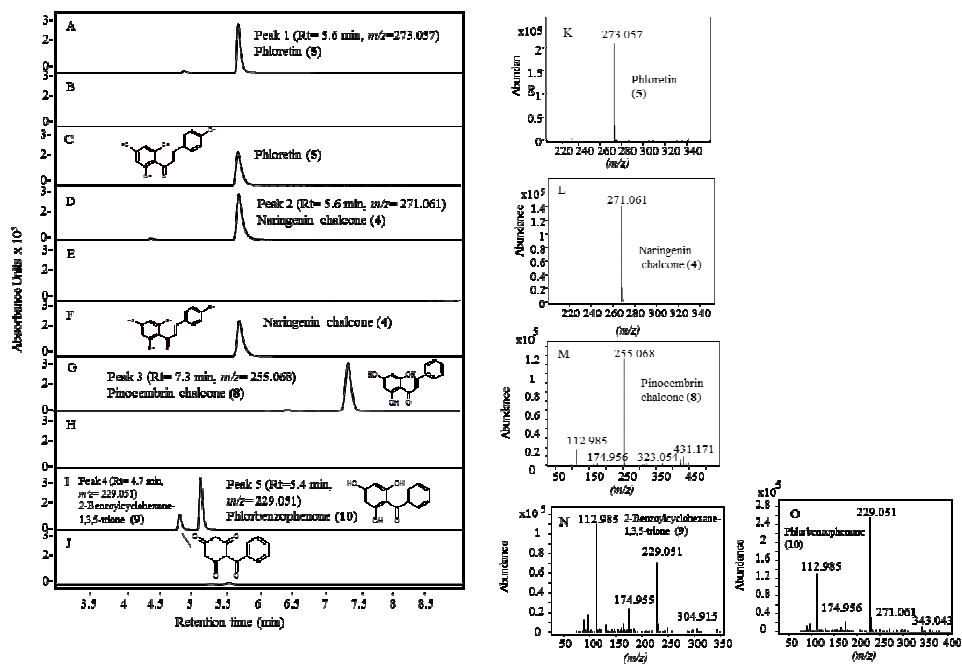
6. בידוד רצף הגנים לצ'לקון סינתאז CHS, מתפוח עץ. על מנת לקבל הגן המיועד ל overexpression בשתילי אשכולית (*Citrus paradisi* Var. *Duncan*), נעשה חיפוש והשוואה לגן השלם של CHS מתפוח עץ על סמך רצפים ידועים ל CHS ב- <http://www.rosaceae.org> database סונתזו שני פריימרים forward ו- reverse עפ"י רצפי הגנים, הופק total RNA מתפוח עץ ועליו סונתזו cDNA ע"י שימוש בפריימרים שנבחרו וראקציית RT-PCR. הגנים השלמים CHS שהתקבלו בראקציית RT-PCR שובטו לווקטור ביטוי pEXP5-CT/TOPO. נבחרו מספר מושבות חיוביות, נבדקו על ידי הפקת פלסמיד וראקציית חיתוך. הפלסמידים שהכילו את הגן נשלחו לריצוף לצורך אישור נוכחות שהגן בצורה נכונה במבנה המיועד ל overexpression.

Primer description	Sequence (5' - 3')
<i>MdCHS1</i>	Forward-5'-ATGGTTACAGTCGAGGAAGTTCGCAAG-3' Reverse-5'-AGCCGTTAAACCCACGCTGTGAA-3'
<i>MdCHS2</i>	Forward-5'-ATGGTGACTGTCGAGGAAGTTCGCAAG-3' Reverse-5'-AGCAGCCACGCTGTGAAGCA-3'
<i>MdCHS3</i>	Forward-5'-ATGGTGACTGTCGAGGAAGTTCGCAAG-3' Reverse-5'-AGCAGCCACGCTGTGAAGCA-3'
<i>MdCHS4</i>	Forward-5'-ATGGGGAGTGAACATGTTGTTC-3' Reverse-5'-GACAGCAAGGTTCTTGCTA-3'

5. ביטוי *MdCHS* בחיידקים ובדיקת פעילות אנזימתית. לצורך קבלת מידע על פעילות אנזימתית ל- *MdCHSs* מתפוח עץ, נעשתה טרנספורמציה של הקונסטרוקטים הנ"ל לחיידקים *E. coli* (B121) ולאחר מכן נעשה ניקוי לחלבון בעזרת Ni-agarose affinity chromatography, נבדקה רמת הניקיון לחלבון בעזרת SDS gel. נבחנה הפעילות אנזימתית ל- *CHSs* בשימוש הסובסטרט *p*-dihydrocoumaroyl-CoA ו *malanoyl*-CoA, לאחר ואינקובציה למשך 60 דקות בטמפרטורת של 30 °C הפעילות אנזימתית נבדקה באמצעות HPLC.



איור 5 : אנליזת SDS לניקיון החלבון CHSs הרקומביננטי (MdCHS1-MdCHS4) מתפוח עץ.



איור 6 : אנליזה אנזימטית לחלבון CHS הרקומביננטי (MdCHS3) ב-LC-MS.

(A) ריאקציה אנזימטית MdCHS3 בשימוש הסובסטרט *p*-dihydrocoumaroyl-CoA ו- malanoyl-CoA.

(D) ריאקציה אנזימטית MdCHS3 בשימוש הסובסטרט *p*-coumaroyl-CoA ו- malanoyl-CoA.

(G) ריאקציה אנזימטית MdCHS3 בשימוש הסובסטרט cinnamoyl-CoA ו- malanoyl-CoA.

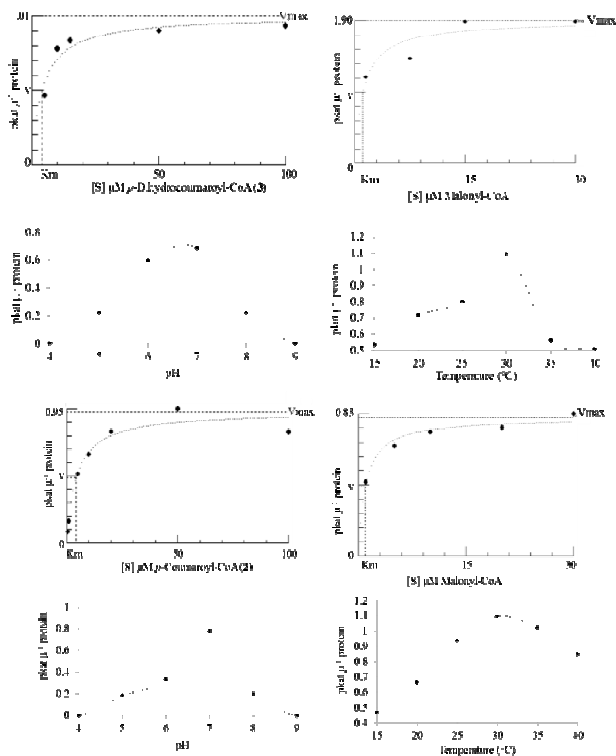
(I) ריאקציה אנזימטית MdCHS3 בשימוש הסובסטרט benzoyl-CoA ו- malanoyl-CoA.

(B, E, H, J) ריאקציה אנזימטית ל-MdCHS3 אחרי רתיחה ב-95°C.

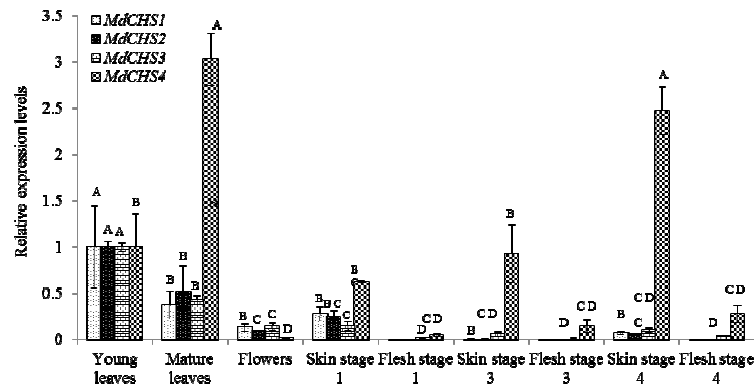
(C) Phloretin standard (F). Naringenin chalcone standard (F).

Substrate	Structure	Conversion rate (%)			
		<i>Md</i> CHS1	<i>Md</i> CHS2	<i>Md</i> CHS3	<i>Md</i> CHS4
<i>p</i> -Dihydrocoumaroyl-CoA (3)		100±0.81	93±1.90	100±3.53	nd
<i>p</i> -Coumaroyl-CoA (2)		82±1.05	30±2.70	69±1.41	nd
Cinnamoyl-CoA (6)		94±1.63	100±2.17	10±1.17	nd
Benzoyl-CoA (7)		14±0.23	38±1.21	11±1.1	nd

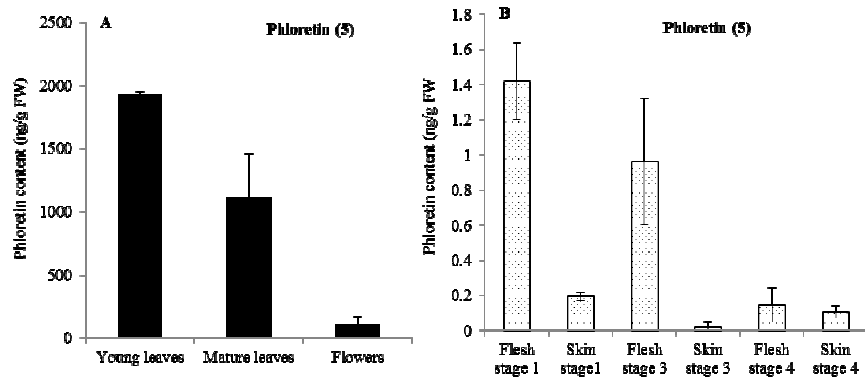
איור 7 : פעילות ספציפית של האנזימים *Md*CHS1-*Md*CHS4 עם סובסטרטים שונים



איור 8: פעילות אנזימאית של החלבון הרקומביננטי *Md*CHS3. הגרפים מראים מצב קינטי יציב של *Md*CHS3 ע"י *p*-dihydrocoumaroyl-CoA ו *malanoyl*-CoA ; *p*-coumaroyl-CoA ; קביעת האופטימליות ל- pH ולטמפרטורה .



איור 9: התבטאות הגנים *MdCHS1-MdCHS4* ברקמות שונות של תפוח מהזן "Golden Delicious"



איור 10: ריכוז ה- phloretin ברקמות התפוח השונות מהזן "Golden Delicious"

עקב טרנספורמציה וביטוי הגן המקודד לאנזים *p-coumaroyl CoA double bond reductase* אשר יכול להפוך *p-coumaroyl-CoA* ל-*p-dihydrocoumaroyl-CoA*, חומר המוצא *phloretin*, בצמחי אשכולית *Citrus paradisi Var. Duncan*, התקבלו קווי אשכולית טרנסגנים, בעלי יכולת לייצר חומרים מתוקים ששייכים לדיהידרוצ'לקונים כגון *trilobatin*. בעבודה זו הצלחנו לקבל צמחי אשכולית ו-*anthocyanin-rich grape cell culture* שמבטאים את הגן *CCDBR*.

לאחר בדיקה בקווי אשכולית טרנסגניים ו-*anthocyanin-rich grape cell culture* שמכילים את הגן השלם *CCDBR* לא נמצא ייצור של דיהידרוצ'לקונים. לכן אנו נצטרך בעתיד להעביר את הגנים *CHS* ו-*MdPh-4'-OGT* לאגרובקטריום ולצמחי אשכולית ו-*anthocyanin-rich grape cell culture* המכילים את הגן *CCDBR*. אנו נצטרך גם בבדיקת ייצור וכימות בעזרת אנאליזות במכשיר ה-*LC-MS* לחומרים השייכים לדיהידרוצ'לקונים כגון *phloretin* ו-*trilobatin* בשתילי אשכולית הטרנסגנים ו-*anthocyanin-rich grape cell culture*.

בעבודה זו הצלחנו לנקות את החלבון החדש לגלוקוסילטראנספראז *MdPh-4'-OGT* בעזרת *Ni-agarose affinity chromatography*, נבדקה רמת הניקיון לחלבון בעזרת *SDS gel* (איור 1). נבחנה הפעילות האנזימטית לגלוקוסילטראנספראז *MdPh-4'-OGT* תוך כדי שימוש בסובסטרטים *phloretin* ו-*UDP-Glucose*, באמצעות *LC*. בזה גילינו שהחלבון הרקומביננטי *MdPh-4'-OGT* מתפוח מהווה פעילות חדשה. ה-*MdPh-4'-OGT* הוא אנזים ספציפי שהופך *phloretin* ל-*trilobatin* (איור 2). מדידות הפרופיל הקינטי של *MdPh-4'-OGT* מראות כי ערך ה- K_m ל-*phloretin* הוא $21.3 \mu\text{M}$ ול-*UDP-glucose* הוא $4.4 \mu\text{M}$ (איור 3). ה-*MdPh-4'-OGT* מראה פעילות אנזימטית אופטימלית ב- $\text{pH } 8-9$, ובטווח הטמפרטורה $25-45^\circ\text{C}$ (איור 3).

גם כן בעבודה זו הצלחנו לנקות ארבעה חלבונים ל-*CHS* בעזרת *Ni-agarose affinity chromatography*, נבדקה רמת הניקיון לחלבונים בעזרת *SDS gel* (איור 5). נבחנה הפעילות האנזימטית ל-*CHS* תוך כדי שימוש בסובסטרטים *p-dihydrocoumaroyl-CoA* ו-*malanoyl-CoA*, באמצעות *LC* (איור 6). *MdCHS3* הוא אנזים ספציפי שהופך *p-dihydrocoumaroyl-CoA* ל-*phloretin* (איור 6). בזה גילינו שהחלבונים הרקומביננטיים *MdCHS1-MdCHS3* מתפוח מהווה פעילות אנזימטית (איור 7). מדידות הפרופיל הקינטי של *MdCHS3* מראות כי ערך ה- K_m ל-*p-dihydrocoumaroyl-CoA* הוא $5.0 \mu\text{M}$ (איור 8). ה-*MdCHS3* מראה פעילות אנזימטית אופטימלית ב- $\text{pH } 7$, ובטווח הטמפרטורה 30°C (איור 8).

רמת ביטוי הגנים ל-*CHSs* נבדקה בשיטת *qPCR* והתקבלה רמת הביטוי הגבוהה בעלים צעירים ומבוגרים כמתואר באיור 9. לשם כך נבדק תחילה ריכוז ה-*phloretin* ברקמות התפוח השונות מהזן "Golden Delicious" שהם פרחים, עלים צעירים ומבוגרים, קליפה חיצונית וליבה פנימית בשלבי התפתחות שונים, והתקבל הריכוז הגבוה ביותר בעלים צעירים ומבוגרים כמתואר באיור 10.

המשך המחקר

אנו מתכוונים לבטא את הקונסטרקט Phloretin-4'-O-glycosyltransferas שמקורו תפוח עץ בשתילי אשכולית. כמו-כן בעתיד נשבט ונבטא לפי הצורך את Chalcone synthase לווקטור ביטוי המיועד לטרנספורמציה בצמחים ואז נוכל להמשיך באנאליזות הדרושות.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר בהתייחסות לתוכנית העבודה.
פיתוח אשכוליות מתוקות המייצרות דיהידרוצ'לקונים : <ol style="list-style-type: none"> 1. ביטוי הגן CCDBR בצמחי אשכולית (<i>Citrus paradisi</i> Var. <i>Duncan</i>). 2. Co-expression לגן CCDBR ו-CHS. 3. שיבוט וביטוי לגלוקוסילטראנספראז MdPh-4'-OGT מתפוח. 4. Co-expression לשלושה גנים CCDBR עם CHS וקוסילטראנספראז MdPh-4'-OGT. 5. אפיון קווים של אשכולית טרנסגנים המבטאים שלושת הגנים.
עיקרי התוצאות
<ol style="list-style-type: none"> 1. טרנספורמציה ל CCDBR לשתילי אשכולית (<i>Citrus paradisi</i> Var. <i>Dunca</i>). נעשתה אנליזת PCR במטרה להוכיח אנטגרציה וביטוי בשתילי אשכולית. 2. ביטוי ואפיון ביוכימי של חלבון MdPh-4'-OGT. 3. צמחי אשכולית שעברו טרנספורמציה כבר הורכבו על כנות. 4. הגן CCDBR עבר טרנספורמציה ל- Anthocyanin-rich grape cell culture 5. ביטוי ואפיון ביוכימי של חלבונים CHS
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.
הוכנה התשתית הדרושה להמשך המחקר. הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר
ביצוע המחקר נמשך ללא תקלות, וצפוי כי יימשך כמתוכנן.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; תוצאות המחקר פורסמו עד כה בכנס מדעי
ISAHN Polyphenols, Lisbon, Portugal (2014) 11 th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, Eisenach, Germany (2016)
פרסום הדוח: <u>ללא מגבלה</u>
<input type="checkbox"/> חסוי - לא לפרסום

