

דו"ח שנה א' של תוכנית מחקר מסי 203-0712-08
מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

פיתוח תפוח חסר יובניליות

DEVELOPMENT OF JUVENAIL FREE APPLE THCHNOLOGY

צוות המחקר:

חוקר ראשי: משה פליישמן

יובל כהן, זאב יבלוביץ, שרה גולובוביץ, רעיה קורצ'ינסקי
המחלקה למדעי עצי הפרי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
אלון סמך
המכון למדעי הצמח והגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, א. עברית, רחובות

כתובת אלקטרונית: vhmoshea@agri.gov.il

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר הראשי:

מאי 2009

אייר תשס"ט

1. תקציר

הבעיה החקלאית. בישראל מגדלים מגוון מצומצם של זני תפוחים. בדיונים שנערכו בענף עלה הצורך בפיתוח מערכת השבחה ליצירת זני איכות מקומיים. אחד הבעיות העיקריות בהשבחת עצי פרי היא תקופת היובנליות הארוכה ומשך הדור המגביל את שיטות וקצב ההשבחה. מחקרים בנושא בקרת פריחה בצמחי מודל ועצים הראו כי ניתן באמצעים טרנסגניים לקצר את היובנליות בצמחי מודל ועצי פרי. כך, הראינו לאחרונה כי ניתן לייצר אגס ספדונה חסר יובנליות, הפורח ומניב פירות מספר חודשים לאחר נביטתו או הרכבתו. מטרת העבודה היא לנפתח זני תפוחים חסרי יובנליות ונבחן דרכים למעבר התכונה של חוסר יובנליות בין כנה מותמרת לרוכב.

תוצאות. א. בניסיון לקבל צמחים חסרי יובנליות נבנו שלושה קונסטרוקטים המכילים צרופים שונים של הגן FT: תחת בקרת הפרומוטור הקונסטיטוטבי 35S, תחת בקרת הפרומוטור האינדוסבילי pER10 (אינדוקציה באמצעות 17- β -estradiol) וקונסטרוקט כימרי של FT-GFP תחת בקרת הפרומוטור 35S. בקונסטרוקטים השונים התקבלו מספר קווי התמרה בזן התפוח האיכותי גלקסי. הם מצויים בתרביות רקמה ובחממה הטרנסגנית.

ב. בחינת מעבר החלבון המדווח GFP בין כנה לרוכב נעשו הרכבות רציפרוקאליות בין זני תפוח טרנסגנים המכיל את המחדר 35S::GFP לצמחים לא מותמרים. נמצא כי הגן המדווח נשאר רק בצמח המותמר ואינו עובר לזן הבר הלא מותמר. בכדי לבחון העברה ארוכת טווח של חלבונים באמצעות החלבון FT בהרכבות הותמרו צמחי המודל טבק בקונסטרוקט הכימרי FT-GFP תחת בקרת הפרומוטור 35S. תקבלו צמחים T2 הומוזיגוטיים להתמרה ובמהלך שנת העבודה השנייה יבחן מהלך העברת החלבון הכימרי בצמח המודל ובהמשך בזן התפוח גאלקסי.

המשך המחקר. בשנת העבודה השנייה יבחנו התכונות של צמחי התפוח המותמרים ויכולתם לקצר יובנליות כמו גם השפעת הגן FT על היכולת להעברה ארוכת טווח של חלבונים בהרכבות בין כנה מותמרת לרוכב שאינו מותמר.

2. מבוא ותאור הבעיה

בישראל מגדלים מגוון מצומצם של תפוחים, בעיקר את הזנים זהוב, סטארקינג וגרני סמיט ובהיקפים קטנים יותר הזנים כמו גאלה, יונתן ופינק ליידי. לעומת זאת, בעולם מגדלים מגוון רחב יותר של זנים ובשנים האחרונות הציבור הישראלי נחשף אליהם כאשר הם מיובאים לישראל. הזנים בעולם מצטיינים בגודל פרי ובצבעים של ירוק, אדום, ביקולור (ירוק עם לחי אדומה) וצהוב. כמו כן נעשים פיתוחים של זני תפוחים חדשים בעולם במקומות כמו צרפת, אנגליה, קנדה, ארה"ב וניו-זילנד. בתוכניות ההשבחה ההקפדה היא על שיפורים בטעם, בגודל ובצבע. לאחרונה פותחו זני התפוח חדשים כמו הזן 'פינק ליידי' שזכה להצלחה רבה בארץ ובעולם בזכות טעמו המיוחד וכן זן תפוחים בעל ציפה אדומה מניו-זילנד שעדין לא הופץ. מעבר למראה, טעם וגודל יש גם פיתוח של זנים צבעוניים בעלי פוריות מוגברת. מרבית הזנים אלה מאופיינים בדרישות קור גבוהות ולכן אינם יכולים לגדול ולהניב פרי איכותי בארץ.

במהלך שלושים השנים האחרונות נעשו מספר ניסיונות לאינטרודוקציה של זני תפוח. בפועל עד היום לא הצליחו לגדל בהצלחה מגוון רב של זני תפוח שיובאו לישראל, כנראה בשל התנאים

האקלימיים החמים יחסית בהשוואה לאזורי גידול התפוח בעולם. כמו כן, גם באותם זני התפוח הגדלים בישראל יש בעיות של גודל וצבע הנובעים מתנאי הגידול בארץ. בשנים האחרונות באמצעות עבודות שבוצעו על ידי חוקרים ומדריכי שה"מ הוכנסו מגוון של שיפורים בממשק הגידול. שיפורים אלו באו לתת מענה לבעיות כמו פוריות, גודל פרי וצבע. כדי להגיע לפרי איכותי בישראל נראה שיש צורך לפתח תפוחים שיגלו התאמה גדולה יותר לתנאי האקלים בארץ. בעבר הרחוק, עבודות שנעשו על ידי אבא שטיין, הביאו לפיתוח של זנים המותאמים לתנאי הגידול בארץ. הזן ענה שפותח אז הפך לזן בעל היקף יצור עולמי המשמש עד היום לגידול באזורים חמים. באמצעות הכלאות בין זני תפוח דוגמת הענה לזנים דורשי קור ניתן יהיה להערכתנו לפתח זני תפוח בעלי התאמה גדולה יותר לגידול בישראל.

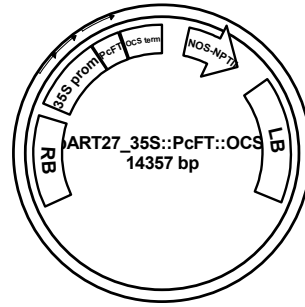
אחד הבעיות העיקריות בהשבחת עצי פרי היא תקופת היובנליות הארוכה ומשך הדור המגביל את שיטות וקצב ההשבחה. מחקרים בנושא בקרת פריחה בצמחי מודל ועצים הראו כי ניתן באמצעים טרנסגניים לקצר את היובנליות בצמחי מודל ועצי פרי. כך, הראינו לאחרונה כי ניתן לייצר אגס ספדונה חסר יובנליות, הפורח ומניב פירות מספר חודשים לאחר נביטתו או הרכבתו. בעבודה זו נפתח תפוחים חסרי יובנליות ונבחן דרכים למעבר התכונה בין כנה מותמרת לרוכב.

3. תוצאות

א. בניית קונסטרוקטים המכילים צרופים שונים של הגן FT. בעבודות שונות הראו כי הגן FT FLOWERING LOCUS T (FT) מקודד לחלבון המשרה פריחה, ונראה כי יש לו תפקיד כזה במיני צמחים רבים כולל עצים. לאחרונה ישנן ראיות לכך ש-FT יכול לשמש כ"פלורוגן"- אותו חומר עלום שתואר בשנות ה-30 של המאה הקודמת כבעל יכולת לנוע בצמח ולקדם פריחה בהגיעו למריסטמה. בעגבניה, ביטוי ביתר של גן דמוי FT בכנה, גרם לשינוי מועד פריחה של רוכב שהורכב עליו. FT מפעיל פריחה ע"י העלאת הביטוי של גנים מפעילי פריחה כגון (FUL) FRUITFULL. ביטוי ביתר של FUL או של FT גרם לפריחה מוקדמת במספר מיני צמחים. במספר עבודות שנעשו בצמחי מודל ולאחרונה גם בעצי פרי הראו כי הגן FT מסוגל לקצר יובנליות.

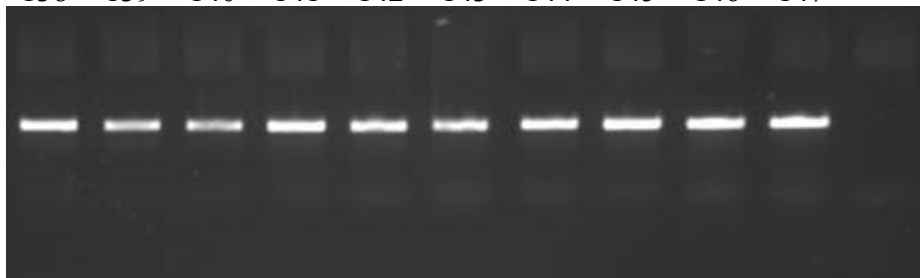
יצרנו שלושה מבנים המכילים את הגן FT ויצרנו את קווי תפוח המותמרים הבאים:

א. הגן TF תחת בקרת הפרומוטור הקונסטטיטויבי 35S. המבנה של הפלסמיד שנבנה מצוייר בתמונה מס' 1. ניתן לראות את הגן המותמר תחת בקרה הפרומוטור הקונסטטיטויבי ואת המרקר הסלקטיבי קנמיצין. מהלך ההתמרה בוצע בהתאם לפרוטוקולים הרגילים במעבדתנו. צמחים מותמרים התקבלו על גבי החומר האנטיביוטי קאנמיצין. ובתמונה מספר 2 ניתן לראות תוצאות של ריאקציית PCR עם פריימרים של גן קנמיצין. ברשותנו כעת 10 קווי התמרה הגדלים בחממה הטרנסגנית. בעיתוי כתיבת הדו"ח הצמחים עדין לא פרחו.



תמונה מס' 1 : מבנה הפלסמיד המכיל את הגן TF תחת בקרת הפרומוטור הקונסטיטויבי 35S.

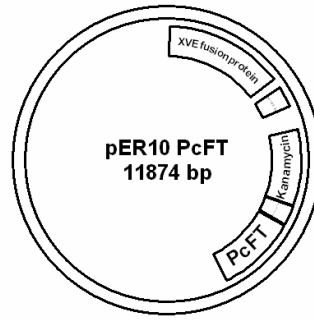
GAL GAL GAL GAL GAL GAL GAL GAL GAL GAL
138 139 140 141 142 143 144 145 146 147



תמונה מס' 2 : תוצאות ריאקציית PCR של פריימרים שנבנו על סמך הרצף של הגן Kn על צמחי תפוח גאלקסי מותמרים בגן 35S::FT.

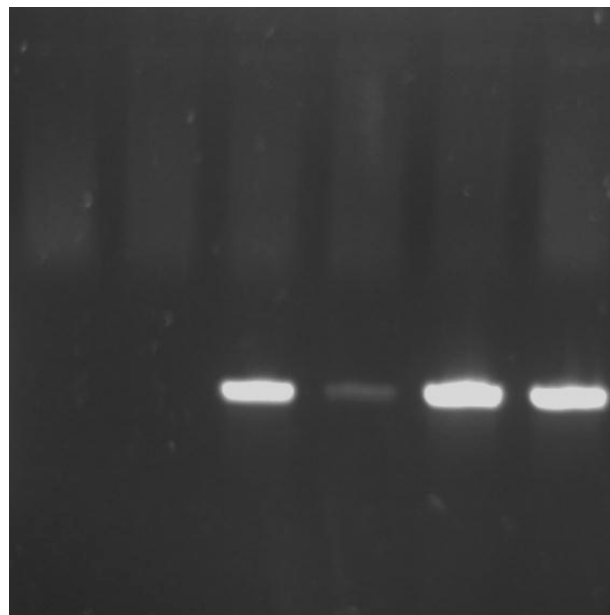
ב. הגן TF תחת בקרת הפרומוטור אינדוסבילי pER10 (אינדוקציה באמצעות 17-β-estradiol):

המבנה של הפלסמיד שנבנה מצויר בתמונה מס' 3. ניתן לראות את הגן המותמר תחת בקרת הפרומוטור אינדוסבילי pER10 ואת המרקר הסלקטיבי קנמיצין. מהלך ההתמרה בוצע בהתאם לפרוטוקולים הרגילים במעבדתנו. צמחים מותמרים התקבלו על גבי החומר האנטיביוטי קאנמיצין. ובתמונה מספר 2 ניתן לראות תוצאות של ריאקציית PCR עם פריימרים של גן לקנמיצין. ברשותנו כעת 5 קווי התמרה שהועברו לאחרונה למצע השרשה וגדלים בחממה הטרנסגנית. בעיתוי כתיבת הדו"ח לא נבחנה האינדוקציה להפרחת הצמחים.



תמונה מס 3 : מבנה הפלסמיד המכיל את הגן TF תחת בקרת הפרומוטור אינדיוסבילי pER10.

GAL w.t	Positive control	GAL 589	GAL 592	GAL 594
---------	------------------	---------	---------	---------

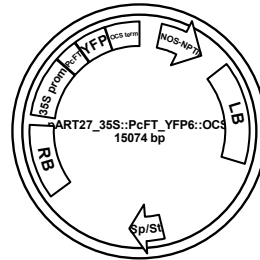


תמונה מס' 4. תוצאות ריאקציית PCR של פריימרים שנבנו על סמך הרצף של הגן Kn על צמחי תפוח גאלקסי מותמרים בגן FT :: pER10.

ג. הגן כימרי FT::GFP תחת בקרת הפרומוטור הקונסטיטויבי 35S

המבנה של הפלסמיד שנבנה מצויר בתמונה מס' 3. ניתן לראות את הגן המותמר תחת בקרה הפרומוטור אינדיוסבילי pER10 ואת המרקר הסלקטיבי קנמיצין. מהלך ההתמרה בוצע בהתאם

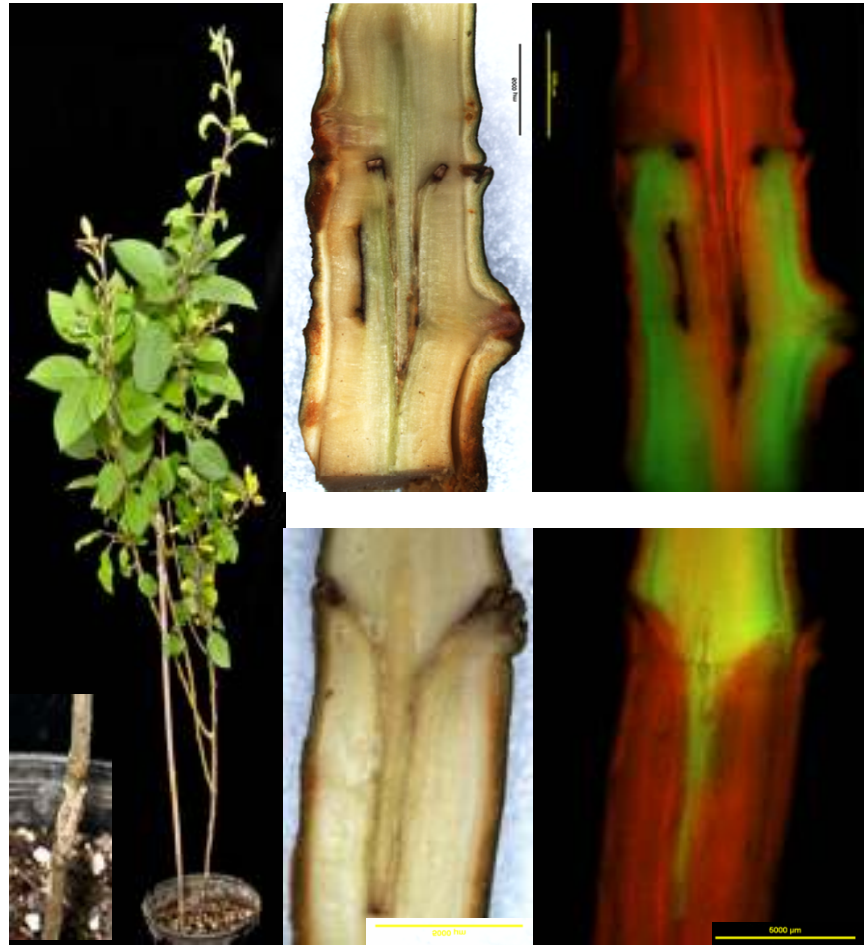
לפרוטוקולים הרגילים במעבדתנו. ארבעה קווים של צמחים מותמרים התקבלו לאחרונה וגדלים בתרבית על גבי החומר האנטיביוטי קאנמיצין.



תמונה מס' 5 : מבנה הפלסמיד המכיל את הגן כימרי FT::GFP תחת בקרת הפרומוטור 35S.

ב. בחינת מעבר החלבון המדווח GFP בין כנה לרוכב.

כיום השימוש בצמחים מותמרים ובמיוחד בעצי פרי הוא מוגבל ביותר ונתון להשפעות של חוקים מקומיים שונים. כך, באירופה כמעט ואין חלקות בהם גדלים צמחים מותמרים לעומת זאת בארה"ב ובמספר רב של מדינות מתפתחות בעולם מתירים את השימוש בצמחים מותמרים. בכל מקרה בעת השימוש בצמחים יש לנקוט באמצעי זהירות ולמנוע את הפצת הזן המותמר בטבע באמצעות האבקה. דרך אפשרית להפצת הזנים המותמרים בטבע היא על ידי ישום צמחים מותמרים ככנות בלבד. מערכת ההובלה של הצמח העילאי מורכבת מעצה המשמשת בעיקר להובלת מים ומשיפה המשמשת למעבר תוצרי פוטוסינתזה. בשנים האחרונות הראו כי מערכות ההובלה בצמחים עילאיים משמשות להעברת אותות למרחקים ארוכים בצמת. הנחת העבודה היא שיצירת חלבון כימרי FT::GFP תאפשר מעבר ארוך טווח של חלבונים מכנה מותמרת לרוכב. בכדי לבחון הנחה זו בצורה מהירה ביצענו התמרה גנטית של הפלסמיד FT::GFP (תמונה 5) בצמחי טבק קבלנו דור הומוזיגוטי להתמרה T2. בכוונתנו לבחון את המהלך ההעברה של החלבון הכימרי במהלך שנת העבודה השניה בצמחי המודל. כמו כן בחנו השנה את מהלך ההעברה של חלבון GFP שאינו מחובר לגן FT בהרכבות רציפרוקאליות בין צמחי תפוח מותמרים ובלתי מותמרים. בתמונה מס' 6 ניתן לראות כי החלבון הזוהר GFP מוגבל לאזור ההרכבה ולא עובר לכנה הלא מותמרת.



תמונה מס' 6: הרכבות רציפרוקאליות של כנה לא מותמרת וכנה מותמרת GFP::35S. מימין תמונת הצמחים המורכבים, למעלה תמונה באור רגיל ואור פלורוסנטי של כנה מותמרת ועליה מורכב זן התפוח גלקסי לא מותמר, למטה ההרכבה הרציפרוקאלית של רוכב מותמר על כנה שאינה מותמרת. **החלבון הזוהר אינו עובר בהרכבות הרציפרוקאליות.**

4. מסקנות והשלכות על המשך ביצוע המחקר

בשנת המחקר הראשונה נבנו מספר קונטרקטים שונים שח הגן FT שיאפשרו בחינה של שתי שאלות המחקר המרכזיות: א. האם ניתן לקצר יובנליות בתפוח באמצעות התמרתו בגן FT? ב. האם חלבון כימרי שמוצמד לFT מסוגל לעבור בהרכבות בין כנה לרוכב? הקונטרקטים השונים הותמרו בתפוח וכיום מצויים כ-20 קווים מותמרים בשלבים שונים של גידול, השרשה ותרבות רקמה. במהלך שנת העבודה השניה כל הקווים יצאו לגידול בחממה הטרנסגנית ויבחן בהם מופע הקדמה הפריחה. בכדי לבחון את מהלך המעבר של חלבון כימרי דמוי FT יצרנו מבחן מקדים באמצעות התמרה גנטית של החלבון FT::GFP בצמחי טבק. מצויים בידנו קווים הומוזיגוטיים T2 קווים אלו ישמשו לבחינת מהלך המעבר של החלבון בצמח החד שנתי. בנוסף בחנו בצמחי תפוח מורכבים שהחלבון הזוהר GFP אינו מסוגל לעבור בהרכבות. במהלך השנה הבאה לאחר הוצאת הקווים המותמרים בגן FT::GFP נבחן את מעבר החלבון בהרכבות בתפוח.

5. המשך ביצוע המחקר

בכוונתנו לבחון את הביטוי של הקווים המותמרים ושינויים הפנוטיפ שלהם לאחר התפתחותם בחממה הטרינסגנית. כמו כן יבחן מהלך המעבר של חלבון כימרי FT::GFP בהרכבות בצמחי טבק ותפוח.

6. פרסומים מדעיים

עד כה לא פורסמו פרסומים מדעיים.

7. סיכום

מטרות המחקר. המטרה ארוכת הטווח של המחקר היא ליצור תפוח חסר יובנמיליות ומערכת יעילה להעברת חלבונים מכנה לרוכב.

עיקרי הניסויים והתוצאות. יצרנו מבנים שונים בפלסמידים שהותמרו בתפוח קבלנו כ-20 קווים התמרה שונים המצויים בתרביות רקמה, תהליך השרשה וגדלים בחממה. בחנו את מעבר האותות של חלבונים בהרכבות בתפוח ויצרנו מערכת לבחינה מעבר האותות בצמח המודל טבק.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

נראה כי ללא הגן FT אין מעבר של הגן הזוהר GFP מכנה לרוכב בתפוח. עדין לא ניתן לראות האם הגן FT אכן מקצר יובנליות בתפוח כפי שנמצא בצמחים אחרים.

המשך ביצוע המחקר. בכוונתנו לבחון את הביטוי של הקווים המותמרים ושינויים הפנוטיפ שלהם לאחר התפתחותם בחממה הטרינסגנית. כמו כן יבחן מהלך המעבר של חלבון כימרי FT::GFP בהרכבות בצמחי טבק ותפוח.

הבעיות שנתרו לפתרון. להבין את הבסיס המולקולארי להקדמת יובנליות בתפוח ומציאת דרכים להגברת המעבר בין כנה לרוכב.

האם הוחל כבר בהפצת הידע. עדיין לאר.

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