

261-0257-98

קוד מחקר:

נושא: שיפור התנטה ואיכות הפאי של עגבניות חממה ותעשייה באמצעות החדרת גן לפרתנוקרפיה

מוסד: מינהל המחקר החקלאות

ד"ר רבקה ברג

חוקר ראשי:

5

חוקרים שותפים:

1996-1998

תקופת מחקר:

מאמרים:

תקציר

מטרות המחקר: השוואת קווים טרנסגניים לקוי המוצא לגבי פרתנוקרפיה ומדדי יכול.

בחינת מכלואים בין קוי עלית לטרנסגן ולקו המוצא.

התמרה ישירה של הטרנסגן לקוי עלית של זני חממה ותעשייה ובחינת ביצועיהם ההורטיקולטוריים.

עיקרי הניסויים: בקו MPB-12 נמצאה חנטה פקולטיבית בתנאים מיטביים בקיץ, וכן בטמפרטורות נמוכות תוך שמירת מילוי הגילי בפרי ועליה ב-Brix, היה קושי בהכנת מכלואים עם קו זה. במכלואי הקו MPB-28 עם שלשה הורים של זני חממה נשמר גודל הפרי ובמכלוא עם g-11 היתה גם פחיתה בכמות זרעים ב-F1. בהתמרה ישירה להורה המצטיין CP-117 נתקבלו טרנסגנים פרתנוקרפיים בעוצמות שונות. בדור R_1 לא היתה ירידה ביכול ובגידול פרי והיתה עליה בגודל הליבה.

בהתמרה ישירה לזן לתעשייה UC82 נתקבלה פרתנוקרפיה חלקית שהובילה בדור R_1 להפחתת חלילות במגורות חסרות זרעים בהשוואה לקו המוצא.

מסקנות: הטרנסגן מקנה פרתנוקרפיה בכל הרקעים הגנטיים שנבחנו, אם כי לא באותה עוצמה.

העדר הזרעים לווה בעליה בערך ה-Brix ובגודל ליבת הפרי, תכונות רצויות כלשעצמן.

המשך המחקר צריך להתמקד בהורים של זני תעשייה מצטיינים.

הבעיות שונתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה:

אי-קבלת מכלואים עם הקו MPB-12 למרות מאמצים מרובים הביאו להשקעת מאמצים ביצירת פרתנוקרפיים טרנסגניים בהורה המצטיין CP-117 בחינת ביצועי CP-117B וקווים אחרים במכלואים תמשך בעונה הבאה. כמו כן יש להשלים בחינת הקווים המותמרים של UC82 לחנטה בטמפרטורות נמוכות. מה שלא התאפשר השנה.

דו"ח מסכם לתכנית מס' 98-0257-261

בנושא:

**שיפור החנטה ואיכות הפרי של עגבניות חממה ותעשיה
באמצעות החדרת גן לפתרנוקרפיה**

מוגש ע"י:

רבקה ברג¹, יחיעם זלץ¹, מאיר פילובסקי¹, ארי שפר², מיכאל פרידמאן¹,
שרה שבתאי¹, לאה חן¹

¹ המחלקה לגנטיקה של צמחים ² המחלקה לירקות
המכון לגידולי שדה וגן, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן 50250.

**Effect of genetically engineered parthenocarpy on
quality and yield parameters in tomato**

Rivka Barg¹, Y. Salts¹, M. Pilowsky¹, A. Shaffer², M. Friedmann¹
Sara Shabtai¹, Lea Chen¹.

¹ Department of Plant Genetics ² Department of Vegetable Crops
Institute of Field & Garden Crops
A.R.O., The Volcani Center, Bet-Dagan 50-250.

Email: bargrja @ netvision net.il.

מבוא

כושר חנטה פרתנוקרפית עשוי להקנות יתרונות הן לזני עגבניה לחממה והן לזנים לתעשיה ביניהם: הרחבת עונת הגידול, צמצום ההשקעה במיזוג בתי-צמיחה ובהוצאות עיבוד פרי לתעשיה, ואפשרות לשיפור איכות הפרי.

המקורות הטבעיים לפרתנוקרפיה בעגבניה נשלטים ע"י מערכות רב-גניות רצסיביות ללא סמנים מולקולריים מלווים, ובנוסף הם מתאפיינים בחודרנות והתבטאות חלקיים המושפעים מתנאי הסביבה ומהרקע הגנטי בו הם כלולים. כל אלו מקשים מאוד על שילוב המקורות הללו לפרתנוקרפיה בתכניות טיפוח.

במסגרת מחקרים קודמים במעבדתנו (ר.ב. – י.ז.) נבנה טרנסגן מלאכותי לפרתנוקרפיה המבוסס על ביטוי הגן החידקי *rolB* תחת בקרת פרומוטר TPRP-F1 שבודד במעבדתנו והוא יחודי לשחלה ולפרי הצעיר.

הגן *rolB* מחקה חלק מהשפעות האוקסין על צמחים. מנגנון פעילותו לא ברור יתכן והוא פועל כפוסטטאזת-טירוזין המעורבת בהעברת האות הניתן ע"י אוקסין.

תוצאות הקדמיות הראו שבצמחים טרנסגנים מקו העגבניות MP-1 הוא מקנה כושר חנטה פרתנוקרפית.

מטרות התכנית: לבחון השפעות הורטיקולטוריות של הטרנסגן לפרתנוקרפיה במיגוון רקעים גנטיים, הן של זני חממה והן של זן לתעשיה, ולהחדירו לרקעים גנטיים נוספים הן ע"י אינטרוגרסיה והן ע"י התמרה ישירה לקוי-הורים מתקדמים.

תוצאות

1. בחינה הורטיקולטורית של קווים טרנסגניים לעומת קו ההורים הבלתי מסיים MP-1

1.א. השוואת הקו MPB-12 לקו המוצא:

צמחים מהקו ההומוזיגוטי הטרנסגני MPB-12 הושוו לקו המוצא MP-1, כאשר גודלו בבית רשת בבית דגן באביב קיץ 1996. נבחנו הפרמטרים הבאים: משקל פרי, Brix, מספר מגורות, מבנה פרי, מספר זרעים לפרי, משך זמן עד להבשלה ויבול לצמח. עיקר הממצאים מוצגים ומנותחים בטבלה 1.

השפעה על גודל הפרי:

מטבלה 1 עולה כי בנוכחות הטרנסגן משקל הפרי עלה באופן מובהק, אף שהיתה ירידה מובהקת במספר הזרעים לפרי. מניתוח התלות של משקל הפרי במספר הזרעים (איור 1), עולה כי נוכחות הטרנסגן מפצה באופן מושלם, ואפילו ביתר, על תרומת הזרעים לגודל הפרי בקו-המוצא MP-1. זאת בניגוד למקורות טבעיים לפרתנוקרפיה בעגבניה לגביהם קיימים דיווחים כי הם מלווים בהקטנת הפרי.

בשתי עונות הגידול הבאות (טבלאות 2 ו-3) לא נמצאה הגדלה מובהקת בגודל הפרי לעומת הבקורת, אך גם לא הפחתה.

השפעת על כלל היבול לצמח:

נמצאה ירידה מובהקת ביבול הפרי לצמח, אף שהיא פחות מובהקת אם נאמדים בכלל היבול רק פירות שהגיעו למשקל שמעל 10 גר' (דהיינו לכ- 30% מהמשקל הממוצע). מגמה זו של ירידה ביבול נצפתה גם בניסויים שנערכו בשתי עונות הגידול הבאות באביב-קיץ 1997 ו-1998.

נראה שהסיבה העיקרית לפחיתה ביבול נעוצה בירידה בכמות הפרחים שנוצרו בקומות ביניים. בטבלה 1 מוצגים הנתונים עד קומה 5-6, בקו הטרנסגני היתה ירידה משמעותית בפריחה בקומות 5-6.

הממצאים המובאים בטבלה 2, הם לגבי 2-3 הקומות הראשונות, אח"כ חלה ירידה חדה בהנבה. אולם לקראת סוף הקיץ (9/9/97) בקומות גבוהות (5-6) הופיע גל הנבה שני בצמחי MPB-12, גל שלא היתה לו מקבילה בקו – ההורה MP-1. בגל זה נאסף כל היבול בחד (ולא מכל צמח בנפרד). מתוכו, 100 פירות היו במשקל ממוצע של 30 גר', 70 פירות במשקל ממוצע של 24 גר' ו-65 במשקל 13.5 גרם. סה"כ תוספת יבול ממוצעת של 325 גר' לצמח. ובסיכומו עדין היתה ירידה של 50% ביבול לצמח, שנבעה בעקר מאי התפתחות פרחים ותפרחות בקומות ביניים. כנראה שזו תופעת לוואי של ביטוי הטרנסגן. הסיבה להתחזקות התופעה עם הדורות לא מוסברת בשלב זה.

מענין שהתופעה היתה חמורה יותר בצמחים שגודלו בקיץ המאוחר (שתילת יוני) ברמת הגולן שם הגיע המצב לכך שמחצית צמחי MPB-12 כלל לא נשאו פירות בקומות הראשונות. אולם הפירות שכן התפתחו היו פרתנקורפיים. נראה שהתופעה קשורה לטרנסגן מכיון שצמחי הבקורת MP-1 כן פיתחו פרי בתנאים אלו. יש לזכור שקיץ 97 הצטיין בטמפי' מאד נוחות יחסית למקובל בעונה זו ברמת-הגולן. כך שאין מדובר בהעדר חנטה בגלל סיבה פיזיולוגית.

השפעה על ה-Brix:

העדר זרעים בקו-הטרנסגני MPB-12 מלווה בעליה מובהקת בערך ה-Brix כפי שעולה מטבלה מס' 1, ומאזור מס' 2. יתרה מזו, בקו הטרנסגני ככל שמספר הזרעים נמוך יותר כן ערך ה-Brix גבוה יותר. הקורלציה שנמצאה היא שלילית במובהק, אם כי לא חזקה ($r = 0.4$). אין ליחס את העליה בתכולת הסוכרים המסיסים אך ורק לעובדה שסך היבול ירד. באזור מס' 3 מובאים נתוני הקורלציה בין ה-Brix ומשקל הפרי כשהם מנותחים לגבי סך כל הפירות הטרנסגניים, ובנפרד לגבי הפירות הטרנסגניים נושאי הזרעים וחסרי הזרעים. מאזור 3 עולה כי:

א. ככל שהפרי גדול יותר ערך ה-Brix גבוה יותר, מה שמצביע כנראה על כך שתחרות מוצלחת יותר על קבלת מוטמעים מתבטאת הן בגודל הפרי והן בכמות ה-TSS.

ב. ממצא חשוב יותר הוא שהפירות חסרי הזרעים הם באופן מובהק בעלי Brix גבוה יותר מהפירות נושאי הזרעים שהתפתחו על גבי אותם צמחים טרנסגניים. כאן כבר "מנוכה" השפעת היבול על גובה ה-Brix.

עליה בערך ה-Brix נצפתה גם בעונה הבאה (טבלה 2). כך שנראה שזו תכונה נלוות שהיא פועל יוצא מירידה בכמות הזרעים, מעבר להשפעה שעשויה להיות לירידה בכלל היבול.

השפעה על כמות הזרעים:

פירות של הקו הטרנסגני MPB-12 מכילים במובהק הרבה פחות זרעים מפירות קו-המוצא גם כשהם מתפתחים בתנאים מיטביים, כפי שמוצג בטבלאות 1, 2 ו-3. הירידה המובהקת בכמות הזרעים נובעת ככל הנראה לא רק מהנטיה החזקה לפרתנוקרפיה הדוחפת להתנפחות מוקדמת של השחלה המלווה "בסגירת" השחלה להאבקה, אלא גם בירידה בחיוניות האבקה. בבדיקת נביטת גרגרי אבקה של הקו MPB-12 לעומת קו המוצא לא נצפתה ירידה בשעור האבקה הנובטת, אך נצפתה השפעה מובהקת על ההתארכות של הנחשונים שנבטו. כעבור 2-3 שעות של הדגרה בתמיסת ההנבטה היה אורך הנחשונים נמוך ב- 40-60% מזה של אבקת הביקורת.

ממצא זה עשוי להיות מוסבר ע"י ביטוי שאריתי מאד נמוך של הפרומוטר TPRP-F1 באבקה (או בתאי-אם האבקה), זאת למרות שמבחינת ביטוי הפרומוטר באמצעות גן מדווח לא נמצאו עדויות לביטוי באבקנים ובאבקה בשלה. למרות זאת יתכן שביטוי נמוך באבקה, שלא זוהה ע"י בדיקות היסטו-כימיות, הספיק כדי לגרום פגיעה מסוימת בחיוניות האבקה. ברור שההשפעה אינה לטאלית שכן ניתן בכל זאת לקבל זרעים, אם כי בשעור נמוך.

השפעה על מילוי ג'לי וכמות מגורות:

מילוי הג'לי בפירות הטרנסגניים של הקו MPB-12 היה מושלם הן בפירות נושאי הזרעים והן בפירות חסרי הזרעים (טבלה 1). ממצא דומה נמצא גם בעונות הגידול הבאות. הדבר נכון הן לגבי הפירות הבינוניים והן לגבי הפירות הגדולים יותר. מכאן, שבניגוד למקורות אחרים בהם נמצא שפרתנוקרפיה מלווה הרבה פעמים בחלילות הפרי, במקרה זה, ביטוי הטרנסגן מפצה באופן מלא על תרומת הזרעים למילוי הג'לי.

תכונה נוספת שצפתה הן בפירות הטרנסגניים של MPB-12 (והן בקוים נוספים כפי שיצויין בהמשך) היא נטיה לעליה בגודל הליבה ובמספר המגורות בפרי. העליה אינה מובהקת מבחינה סטטיסטית בשעור 5% אבל מובהקת כאשר $P=0.1$ (טבלה 1). לעליה בגודל הליבה ובמספר המגורות עשויה להיות השפעה חיובית על מוצקות הפרי, אך מדד זה לא נבחן באופן ישיר.

השפעה על משך התפתחות הפרי:

מטבלה מס' 1 עולה שמשך הזמן מאנטזיס להבשלה מלאה התקצר בצמחים הטרנסגניים. הסיבה לכך אינה ברורה אבל קיצור משך הזמן להבשלה עשוי להיות תכונה רצויה.

השפעה על חנטה בטמפרטורות חריגות:

חנטה בטמפרטורה נמוכה: נערך ניסוי קטן לבחינת חנטה והתפתחות פרי בטמפרטורות נמוכות. נמצא כי בתנאי חורף, בחממה בלתי מחוממת בבית-דגן, צמחי הקו MPB-12 חנטו בשתי הקומות הראשונות שנבדקו, פירות חסרי זרעים במשקל ממוצע של 22.1 גר'. צמחי קו הבקורת MP-1 חנטו בקומות אלו פירות "nuts" קטנים חסרי זרעים במשקל ממוצע של 5.1 גר' לפרי. לגבי חנטה בטמפרטורות גבוהות: לא ניתן היה להוכיח במובהק כי החנטה חסרת הזרעים בקיץ מפצה על העדר כשר חנטה בתנאים אלו בקו-המוצא, זאת משום שהקו MP-1 מצטיין בסבילות גבוהה לזיקי טמפרטורה גבוהה לחנטה. כך שגם בצמחים שגודלו מאוחר בקיץ (בשנת 96/97) חנטו פירות בקו-המוצא MP-1 למרות הטמפרטורות הגבוהות ששררו בבית-הרשת. הנטיה לחנטה בטמפרטורות גבוהות כפיצוי לזק להפריה תצטרך להבחן ברקעים גנטיים הסובלים מרגישות לטמפרטורות גבוהות.

ב.1. השוואת הקו MP8-28 לקו המוצא וביצועיו במכלואים:

צמח מותמר נוסף: MPB-28, שמוצאו מהתמרת הטרנסגן לקו MP-1, הניב בדור R_0 פירות רבים חסרי זרעים, בגודל מלא, ובמבנה רגולרי. השוואה ראשונית של צמחי MPB-28 בדור R_1 (שנבטו בנוכחות קנמיצין) וצמחי MP-1 נעשתה ברמת הגולן. מחד לא נמצאה נטיה ברורה לפרתנוקרפיה, אולם היתה ירידה של כ-25% במשקל פרי ממוצע: בעוד שמשקל פרי ממוצע של MP-1 היה 28.8 ± 0.45 גר' משקל MPB-28 היה 21.5 ± 0.69 גר' (נבדלים באופן מובהק $P > 0.001$). בדור R_0 נאספה אבקה מהצמח MPB-28 (שהראה פרתנוקרפיה חזקה בדור זה) ושמשה להכלאות עם קווי ההורים המצטיינים: g-11, g-17, g-26. הזרעים שהתקבלו מההכלאות הונבטו בנוכחות קנמיצין לבחירת צאצאים מותמרים. לפי שעור הצאצאים העמידים (שהיה כ-20% מכלל אוכלוסית F_1) נראה שהיה יתרון להתפתחות עוברים שאינם מכילים את הטרנסגן כנראה בגלל תחרות טובה יותר של גרגרי אבקה שאינם טרנסגניים. נבדקה ההנבה, גודל הפרי והנטיה לחנטה ללא זרעים בצמחי F_1 . בטבלה מס' 4 מסוכמים מאפיינים של פירות המכלוא עם קווי ההורים השונים. בדומה להתנהגות צמחי MPB-28 בדור R_1 ברמת הגולן, לא נצפתה נטיה משמעותית לפרתנוקרפיה במכלואים שגודלו בבית-רשת בבית-דגן, בתנאים מיטביים. באופן כללי נראה שהמכלואים עם קו g-11 הראו את הנטיה הברורה ביותר לפרתנוקרפיה, שכן חנטו גם מספר פירות ללא זרעים, או עם מספר זרעים מועט כשגודל הפרי ומילוי הגיל נשמרים. מחד, נראה מהטבלה כי במכלואים עם קוים g-26 ו-g-11 היתה ירידה מסוימת, אם כי לא מובהקת, במשקל הפרי הממוצע של המכלוא, מאידך, במכלוא עם הקו g-17 כלל לא נצפתה ירידה במשקל.

בסיכום, הקו MPB-28 אינו מצטיין בפרתנוקרפיה חזקה בדורות עוקבים לאחר R_0 . אנליזה של השפעתו על ביצועי מכלואים בטמפרטורות נמוכות עדין לא נבדקה.

2. יצירת טרנסגניים על ידי התמרה ישירה לקו ההורים CP-117 הבלתי - מסיים

במהלך המחקר נעשו מספר ניסויי התמרה לקו CP-117 שהוא הורה מצטיין של זני חממות. הקו הזה נוטה להתמרה הרבה פחות מהקו MP-1, ולהתמיינות קודמת יצירת קלוס על פני הפסיג. נתונים אודות משקל פרי ונשיאת זרעים בדור R_0 של 7 מהצמחים המותמרים מובאים בטבלה 5. מהטבלה עולה, כצפוי, כי נמצאה שונות בעוצמת ביטוי הפרתנוקרפיה בדור R_0 שנעה מהצמח CP-117B-8 שבו התפתחו רק פירות נושאי זרעים והפירות מיעוטי או חסרי הזרעים היו מאד קטנים, דרך CP-117B-6 שיצר אמנם הרבה פירות חסרי זרעים אבל במשקל נמוך, ועד הצמחים CP-117B-4A, CP-117B-7A, CP-117B-9 ו-CP-117B-4A שהראו פרתנוקרפיה מאד חזקה שהתלוותה בעליה ברורה בגודל הליבה ונטיה לעליה במספר האונות בפרי מ-2-3 בקו המוצא ל-3-4 בפירות הטרנסגניים.

הצמח CP-117B-7B התנהג כפרתנוקרפי פקולטטיבי שעליו התפתחו גם פירות חסרי זרעים שהראו ברובם, אם כי לא כולם, ירידה מסוימת במשקל הפרי הממוצע.

זרעים של קו זה הונבטו במגשי חיש-שתיל והפסיגים נדגמו לבחינת נוכחות הגן הסלקטיבי $ptII$ המקנה עמידות לקנימיצין באמצעות אנליזת PCR. צמחי R_1 גודלו באביב 1998 בתנאים מיטביים בבית-רשת.

הממצאים אודות יבול, גודל פרי ותכולת זרעים בצמחי CP-117B-7B (R_1) שנאספו ב-2-3 קומות ראשונות מובאים בטבלה 6.

הירידה במספר פירות ממוצע בצאצאים שאינם נושאים את הטרנסגן לא מוסברת. אולם אין ירידה מובהקת ביבול לצמח של הצאצאים נושאי הטרנסגן וכן לא במשקל הפרי הממוצע. היתה עליה בשעור הפירות שנושאים מעט זרעים אך היא לא היתה מובהקת סטטיסטית; כנראה בגלל השונות הגדולה בתכולת הזרעים בין הפירות השונים. הליבה של הפירות הטרנסגניים היתה בדרך-כלל גדולה משל פירות קו-המוצא. יש לציין שהפירות מיעוטי הזרעים היו מלאי גילי כמו הפירות שנשאו מספר זרעים גבוה.

מכיון שהצמחים גודלו בתנאים מיטביים לא סופקו תנאים לבחינת חנטה בתנאים חריגים. מדד זה יבחן בהמשך.

מהפנוטיפים שהתקבלו בצמחים המותמרים של CP-117 עולה שהטרנסגן מקנה פרתנוקרפיה גם בזן המצטיין במשקל פרי גבוה.

3. יצירת טרנסגנים ע"י התמרה ישירה לזן עגבניות לתעשייה UC82

לגן לפרתנוקרפיה עשויה להיות חשיבות מרובה דוקא בזנים לתעשייה. מכיון שלא יכולנו לקבל זרעים של הורים של זני מכלוא מצטיינים לתעשייה, נערכו מספר נסיונות טרנספורמציה אל הקו הותיק UC82 שהוא זן פתוח.

למרות ששעור הניצורונים שמתחיל להתמין מקו זה גבוה יחסית רובם המכריע לא ממשיכים להתפתח. כנראה שהעובדה שהרגנרציה מתרחשת לאחר יצירה נמרצת של קלוס, מובילה לראשית התמיינות של פוליפלואידים ואנאופלואידים רבים שלא ממשיכים בהתמיינות תקינה. נתקבלו 3 צמחים שהגיעו עד לפריחה ונשיאת פירות. מאפייני הפירות שנוצרו על גבי צמחי R_0 מסוכמים בטבלה 7. פנוטיפ הפירות בדור R_0 הצביע על נטיה מסוימת, אם כי לא חזקה, לפרתנוקרפיה בצמחים UC82B-1 ו-UC82B-3 והרבה פחות בצמח UC82B-4.

לאחר שמבין הפירות הראשונים היו כאלו שנשאו מעט זרעים בהמשך העונה נעשה ניסוי נוסף של הפרחים כדי להגדיל מספר הפירות נושאי הזרעים כך, שניתן יהיה לבחון ביצועי הצאצאים בדור R_1 .

צאצאי שלושת הצמחים הונבטו בחי-שתיל ונוכחות הטרוסגן נבחנה ע"י מבחן PCR לנוכחות הגן הסלקטיבי nptII, שנערכה על דגימה של הפסיגים.

מבחני ה-PCR רמזו שצמחים הומוזיגוטיים לטרוסגן לא נוצרו או לא נבטו. היחס עמידים לרגישים היה 2:1 בצאצאי UC82B-1 ו-UC82B-4. בין צאצאי UC82B-3 היחס היה אפילו מוטת לטובת צמחים שאינם נושאים את הטרוסגן (1:3).

נמנענו מהנבטה על גבי קנמיצין שכן נצפו בעיות בהקשחת הצמחים שהועברו ממצע אגר+קנמיצין לגדילה בחי-שתיל שהובילה לאובדן הרבה צמחים.

בטבלה 8 מובאים הממצאים לגבי דור R_1 שגודל בבית-רשת בתנאים מיטביים בשנת 1998. מהטבלה עולים הממצאים הבאים: א) לא היתה פחיתה ביבול הן מבחינת מספר הפירות והן מבחינת סך היבול, אף שהיתה פחיתה לא מובהקת לגבי UC82B-4, כן נמצאה ירידה במשקל פרי ממוצע ב-UC82B-4 אך לא בקווים UC82B-1 ו-UC82B-3.

הממצא המעודד ביותר הוא הירידה בחלילות המגורות שנשאו מעט זרעים או לא נשאו זרעים כלל. כפי שעולה מהטבלה, בקווים UC82B-1 ו-UC82B-4 הטרוסגן הפחית באופן משמעותי את החלילות של המגורות חסרות הזרעים, ולכך חשיבות רבה בזנים לתעשייה.

ממצא נוסף היה עליה בגודל הליבה של הפירות הטרוסגניים. ביצועי הצמחים הטרוסגניים, בטמפרטורה נמוכה, במיוחד הקווים UC82B-1 ו-UC82B-4, שנראו המבטיחים ביותר מבחינת פיצוי על חלילות בהעדר זרעים, יבחנו בעונה הבאה.

מסקנות והשלכות

המסקנה העקרית העולה מכלל הניסויים שנערכו היא כי הטרוסגן TPRP-F1:rolB אכן מקנה כושר חנטה פרתנוקרפית במספר רקעים גנטיים. התכונה לפרתנוקרפיה מלווה בעליה בערכי TSS ומעידה שאכן הזרעים מהווים מבלע שמפחית מכמות המוטמעים שעשויה לתרום לאיכות הפרי. בזן לתעשייה נמצא שהטרוסגן מפחית משמעותית את חלילות הפירות תכונה שהיא חשובה בפירות לתעשייה המשונועים במיכלים גדולים.

אפקט לוואי חיובי נוסף הוא עליה בגודל הליבה של הפרי.

מכאן נראה שהטרוסגן הזה הוא בעל פוטנציאל לשפור TSS ומוצקות בנוסף לתרומתו להרחבת עונת הגידול של זנים לתעשייה.

בקו MP-1 נצפתה ירידה ביבול הכללי, לא ברור אם תופעה זו אופיינית דוקא לשני הקווים הטרנסגניים שנבחנו MPB-12 ו MPB-28 או שהיא תופעה כללית. כן נצפתה בהרבה מהטרנסגניים פחיתה בשעורים משתנים של חיוניות האבקה. במסגרת שלש שנות המחקר לא הספקנו לבחון בניסוי גדול את השפעתו על חנטה בטמפרטורות נמוכות של זנים לתעשייה. מדד זה יבחן בשנה הבאה (מעבר לסיום הרשמי של התכנית). כיוון שיפור נוסף, שנדרש עפ"י הממצאים, הוא שימוש בפרומוטר חלופי שיפחית את הביטוי השאריתי של הטרנסגן באבקה ובזרעים ובכך תשמר התרומה של הטרנסגן rolB להתפתחות הפרי ויפחתו תופעות לוואי בלתי-רצויות.

פרסומים:

Barg R , Salts Y (1997) Method for the induction of genetic parthenocarp in plants. .

Barg R, Pilowsky M, Shabtai S, Carmi N, Szechtman AD, Dedicova B, Salts Y (1997) The TYLCV-tolerant tomato line MP-1 is characterized by superior transformation competence. J Exp Bot 48: 1919-1923.

Barg R. Shabtai S, Salts Y. (1999) Transgenic Tomato. In: Biotechnology in agriculture and forestry (ed. YPS Bajaj) Vol 47 (in press).

Carmi N, Salts Y, Shabtai S, Pilowsky M, Dedicova B, Barg R, (1997) Transgenic parthenocarp due to specific over-sensitization of the ovary to auxin. In: Hort.Biotech. In Vitro Cult. and Breeding (Eds. A Altman . M Ziv) Acta Hort. 447: 579-581, ISAS.

הצגה בכנסים:

Barg R. Biotechnological modulation of fruit set: Application emerging from studies on fruit development. The 6th symposium of the Otto Warburg Center on: Developmental pathways in plants: Biotechnological implications. April 16-17. 1997. Rehovot. Israel. (oral presentation).

Carmi N, Salts Y, Szechtman AD, Dedicova B, Shabtai S, Barg R. Parthenocarp induced by auxin modulation in transgenic tomato ovaries. In: Eucarpia Tomato 97,

XIII meeting of Eucarpia Tomato Working Group. January 19-23, 1997, Jerusalem, Israel. (oral presentation).

Salts Y, Carmi N, Szechtman AD, Shabtai S, Pilowsky M, Dedicova B, Barg R. Seedless fruit production via biotechnological manipulations. In: IX Inter. Congress on Plant and Cell Culture. June 14-19, 1998, Jerusalem, Israel. (oral presentation).

סיכום

1. מטרות המחקר:

- השוואת קווים טרנסגניים לקוי המוצא לגבי פרתנוקרפיה ומדדי יבול.
- בחינת מכלואים בין קוי עלית לטרנסגן ולקוי המוצא.
- התמרה ישירה של הטרנסגן לקוי עלית של זני חממה ותעשיה ובחינת ביצועיהם ההורטיקולטוריים.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות:

בקו MPB-12 נמצאה חנטה פקולטטיבית בתנאים מיטביים בקיץ, וכן בטמפרטורות נמוכות תוך שמירת מילוי הגילי בפרי ועליה ב-Brix, היה קושי בהכנת מכלואים עם קו זה. במכלואי הקו MPB-28 עם שלשה הורים של זני חממה נשמר גודל הפרי ובמכלוא עם g-11 היתה גם פחיתה בכמות זרעים ב-F1. בהתמרה ישירה להורה המצטיין CP-117 נתקבלו טרנסגנים פרתנוקרפיים בעוצמות שונות. בדור R_1 לא היתה ירידה ביבול ובגידול פרי והיתה עליה בגודל הליבה. בהתמרה ישירה לזן לתעשיה UC82 נתקבלה פרתנוקרפיה חלקית שהובילה בדור R_1 להפחתת חלילות במגורות חסרות זרעים בהשוואה לקו המוצא.

3. מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

הטרנסגן מקנה פרתנוקרפיה בכל הרקעים הגנטיים שנבחנו, אם כי לא באותה עוצמה. העדר הזרעים לווה בעליה בערך ה-Brix ובגודל ליבת הפרי, תכונות רצויות כלשעצמן. המשך המחקר צריך להתמקד בהורים של זני תעשיה מצטיינים.

4. הבעיות שונתרו לפתרון ואו השינויים שחלו במהלך העבודה:

אי-קבלת מכלואים עם הקו MPB-12 למרות מאמצים מרובים הביאו להשקעת מאמצים ביצירת פרתנוקרפיים טרנסגניים בהורה המצטיין CP-117 בחינת ביצועי CP-117B וקווים אחרים במכלואים תמשך בעונה הבאה. כן יש להשלים בחינת הקווים המותמרים של UC82 לחנטה בטמפרטורות נמוכות, מה שלא התאפשר השנה.

5. הפצת ידע:

הצגת תוצאות בכנס אאוקרפיה (ירושלים 1-23 ינואר 1997)

בכנס אוטו-ורבורג (רחובות, 16-17 אפריל 1997).

בכנס ביוטכנולוגיה בצמחים (ירושלים, 14-16 יוני 1998).

פרסומים:

Barg et al, 1997. J. Exp. Bot 48: 1919-1923.

Carmi et al 1997. Acta Hort. 447: 579-581.

Barg R., Salts S. Patent application WO1997IL000051.

Table 1: Effects of *rolB* on Yield and Fruit Characteristics OF MPB-12
(Summer 1996 Bet-Dagan, net-house)

Parameters	MP-1	MPB-12	Effect
<u>Fruit weight (g)</u>			
All fruits	19.75 ± 0.46 D	25.65 ± 0.90 B	Increase (+ 30%)
Fruits > 10 g	23.07 ± 0.43 C	28.40 ± 0.87 A	Increase (+ 23%)
<u>Yield per plants (g)</u>			
All fruits	427.6 ± 27.1 A (a)	292.9 ± 18.8 BC (b)	Decrease (- 31%)
Fruits > 10 g	387.3 ± 27.2 AB (a)	283.2 ± 19.1 BC (b)	Decrease (- 27%)
Fruits > 10 g, S-5*	372.0 ± 26.3 AB (a)	278.8 ± 18.1 C (b)	Decrease (- 25%)
<u>Days to full red ripening</u>			
All fruits on truss	48.0 ± 0.6 A	43.2 ± 0.9 B	Shortening (- 10%)
First 4 fruits on truss	46.5 ± 0.6 A	42.7 ± 0.9 B	Shortening (- 8%)
<u>Locule number</u>			
All fruits	3.08 ± 0.045 A	3.08 ± 0.08 A	None
Seedless fruits		3.15 ± 0.098 A (b?)**	
<u>^oBrix</u>			
All fruits	6.94 ± .021 B	7.32 ± .021 A	Increase (~ 6%)
Seedless fruits	6.75 ± .108 B (c)	7.43 ± .051 A (a)	
Seeded fruits	6.97 ± .056 B (b)	7.11 ± .067 B (b)	
<u>Seed number</u>			
All fruits	34.8 ± 1.4 (n=430) B	4.7 ± 0.7 (n=157) D	Decrease (-86%)
Seeded fruits	47.0 ± 1.5 (n=319) A	14.5 ± 1.4 (n=50) C	Decrease (70%)
<u>Jelly fill</u>			
All fruits	Complete	Complete	None

Footnotes to Table 1

Experiment included 20 plants of MP-1 and 18 plants of MPB-12 (*rolB/rolB*). Values followed by different capital letters differ significantly according to Tukey-Kramer multiple comparison test (a stringent test). Values followed also by different low case letters, differ significantly only according to Student-Newman Keuls comparison test (a less stringent test).

* S-5 refers to yield up to the 5 th stage.

** 0.05 < P < 0.1

Table 2: Fruit parameters of MP-1 and MPB-12 (R5) lines. Plants were grown in Bet-Dagan, summer 1997. The data collected from 17 plants of MPB-12 and 20 plants of MP-1, fruits collected between July 21 and August 3, 1997. Data analyzed by t-test.

Parameter	MP-1	MPB-12	t-test
Yield per plant (g)*	1349.1 \pm 74.47	297.7 \pm 39.89	P<0.001
Average fruit weight (g)	44.7 \pm 1.14	40.6 \pm 2.18	P= 0.094
Average Fruit No.*	30.3 \pm 1.67	7.5 \pm 0.85	p< 0.001
Percent seedless fruits (%)	1.6	75.4	P<0.001**
$^{\circ}$ Brix	5.8 \pm 0.0497	6.37 \pm 0.0663	p<0.001

* Fruits collected from 3 stages of most MP-1 plants and only from two stages of most MPB-12 plants because of lack of fruit development on the third stage of the latter.

** Statistical analysis performed on arcsin transformation of the ration between the number of seedless fruits and the total number of fruits per plant. Most "seeded" fruits of MPB-12 bore very low seed number (< 5), however, fruits bearing even one seed were scored as "seeded".

Table 3: Analysis of fruit characteristics of MPB-12 rolB progenies. Within columns numbers followed by different letters differ significantly ($P=0.05$), either according to Anova one way analysis of variance, or to Kruskal-Wallis one way analysis when the normality test failed. (grown spring 1998).

Genotype	No. Plants	No. fruits		Yield per plant (g)	Average fruit weight (g)	Distribution of seed content ^a							
		per plant				Ratio Os ^{1c}	Ratio Fs ^{1cd}	Ratio Ms ^{1cd}					
MP-1 (wt)	8	24.5±3.12	a	788.4±86.09	a	0±0.0	a	0±0.0	a	1±0.0	a		
MPB 12-15-13-16-8 (+) ^b	9	7.89±1.23	b	247.8±30.4	b	33.02±2.04	a	0.36±0.146	a	0.617±0.156	b	0.022±0.022	b
MPB 12-15-13-16-11 (+) ^b	6	9.17±3.69	b	315±119.0	b	33.94±2.63	a	0.292±0.187	a	0.542±0.21	b	0.167±0.124	b

^a Expressed as ratio of fruits: with no seeds - Os, with a few seeds - Fs (~ < 20 seeds), or with normal seed content - Ms (~ > 20 seeds)
^b Progenies of MPB-12-rolB (R₃) which were PCR positive for *mp111*.

^c Analysis was performed after arcsin⁻² transformation of the ratios.

^d According to Dunn's test, each value was compared to the control (MP-1).

¹ Kruskal-Wallis one way analysis on ranks was performed, because the normality test failed.

Table 4: Effect of the *TPRP-F1::rolB* transgene expression in line MPB-28 on the average fruit weight in F1 hybrids. Crosses were made between MPB-28 (Ro) and three parental intermediate lines: g-26, g-17 and g-26. The average fruit weight was compared by t-test# to that of parallel F1 hybrids made with the non-transformed line MP-1. The F1 seeds of the crosses with MPB-28 were germinated on 1% Agar+100 mg/L Kanamycin. Control F1 seeds were germinated on 1% Agar, all transplanted to soil mixture in 'sowing flats' and after hardening planted in 10L pots and transferred to an insect-proof net-house and grown in Bet-Dagan, Summer 1997.

Pairs of F1 compared	No. plants tested	Fruit weight (g)	t-test	Power of performed t-test*
g-26 x MPB-28	14	38.01 \pm 1.1	P = 0.037*	0.464 (< 0.8)
g-26 x MP-1	12	42.44 \pm 1.69		
g-17 x MPB-28	6	41.35 \pm 2.52	P = 0.874*	0.05 (< 0.8)
g-17 x MP-1	5	41.83 \pm 1.05		
g-11 x MPB-28	25	38.44 \pm 1.69	P = 0.357** according to Mann-Whitney	
g-11 x MP-1	16	42.94 \pm 3.65	rank sum test (normality test failed)#	

Anova test including all the six F1 hybrids could not be performed because the normality test failed, hence Kruskal-Wallis one way analysis of variance test on ranks was performed, and the differences among the six F1 hybrids were statistically **insignificant** (p=0.343).

* When the power of the performed test is less than 0.8 the results should be interpreted cautiously.

** Since the normality test failed, t-test could not be performed, instead the Mann-Whitney rank sum test was performed and the difference was found to be **insignificant**.

Table 5: Fruit characteristics of CP-117-rolB (Ro) transgenic plants

Plant No.	Fruit No.	Fruit weight (and range)	Seed bearing phenotype
CP-117B-9	6	54.2 (35-67)	all seedless
CP-117B-6	17	12.0 (3-18)	most seedless ("nuts")
CP-117B-8	14	48.9 (24-68)	most seeded, smaller fruit with a few seeds (very weak)
CP-117B-4B*	14	44.3 (16-72)	all seedless (obligate parthenocarp)
CP-117B-4A*	6	28.7 (15-55)	most seedless, 2 contained < 10 seeds (strong parthenocarp)
CP-117B-7A*	11	34 (22-44)	6-seedless, 5 contained < 8 seeds (strong parthenocarp)
CP-117B-7B*	29	32 (13-54)	varying seed number, reduced seed number associated with decreased fruit weight

* Plants designated by the same number followed by different letters (4A/4B and 7A/7B) regenerated from the same cotyledon.

Table 6: Analysis of fruit characteristics of CP-117 rolB-7B (R₁): Analysis of fruit Characteristics. Within columns numbers followed by different letters differ significantly (P=0.05), either according to Anova one way analysis of variance, or to Kruskal-Wallis one way analysis when the normality test failed. (grown spring 1998).

Genotype	No. Plants	No. fruits per plant	Yield per plant (g) ¹	Average fruit weight (g) ¹	Distribution of Ratio Os ^{1d}	Ratio Fs ^{1d}	Ratio Ms ^{1de}
CP-117 (wt)	9	7.2 ± 0.83 a	805±101.9 a	111.3±5.31 a	0 ± 0 a	0.063 ±0.046 a	0.937±0.04
CP-117B-7B (-) ^b	19	4.7±0.62 a	446.1±69.03 b	97.4±6.09 a	0 ± 0 a	0.29±0.076 a	0.708±0.07
CP-117B-7B (+) ^c	36	7.3±0.77 a	762.2±86.2 a	105.3±2.7 a	0.0102±0.007 a	0.27±0.0502 a	0.721±0.05

^a Expressed as ratio of fruits with no seeds: Os, with a few seeds: Fs (~ < 20 seeds), or with normal seed content: Ms (~ > 20 seeds)

^b R₁ progenies of CP-117 rolB-7B (Ro) which were PCR negative for *npIII*.

^c R₁ progenies of CP-117 rolB-7B (Ro) which were PCR positive for *npIII*.

^d According to Dunn's test, each value was compared to the control (CP-117).

¹ Kruskal-Wallis one way analysis on ranks was performed, when the normality test failed.

Table 7: Characteristics of fruit developed on transgenic plants (R₀) of the determinate cultivar UC82 transformed for the *TPRP-F1::rolB* gene

Plant name	Dates of fruit Collection	Fruit No. (g)*	Fruit weight	Seed bearing	Remarks
UC82B-1	31.3.96-5.5.97	16	27.4 (n=11)	most fruits with < 10 seeds	Jelly fill incomplete in seedless locules,
UC82B-3	9.7.96-16.9.97	16	39.5 (n=13)	most contain < 8 seeds	but complete if few seeds (<5) present Jelly fill incomplete in seedless locules
UC82B-4	9.7.96-15.7.97	19	40 (n=15)	most fruits seeded, 3 fruits with < 10 seeds	but complete if few seeds (<5) present no profound parthenocarp

* only fruits greater than 15 g were included.

Table 8: UC82 rolB R₁ progenies: Analysis of fruit characteristics of transgenic progenies compared with the parental line UC82. Within columns numbers fol different letters differ significantly (P=0.05), either according to Anova one way analysis of variance, or to Kruskal-Wallis one way analysis when the normality (grown spring 1998).

Genotype	No. Plants	No. fruits per plant	Yield per plant (g)	Average fruit weight (g) ¹	Distribution of seed content ^a			Puffiness ^{1 f}
					Ratio Os ^{1d}	Ratio Fs ^{1de}	Ratio Ms ^{1de}	
UC82 (wt)	7	22±5.756 a	1851.4±464.18 a	88.8±8.105 a	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	1.0±0.0 a	1.00±0.0 a
UC82-rolB-1 (+)	14	28.93±4.86 a	1971.8±291.49 a	72.79±5.68 a	0.0322±0.02 a	0.427±0.102 b	0.541±0.106 b	1.91±0.251 b
UC82-rolB-3 (+)	3	19±3.22 a	1301.67±213.78 a	68.85±2.39 a	0.023±0.023 a	0.197±0.111 a	0.78±0.114 a	1.33±0.333 a
UC82-rolB-4 (+)	11	23.9±5.19 a	1426.5±301.05 a	60.03±2.89 b	0.134±0.0887 a	0.42±0.099 b	0.444±0.097 b	2.22±0.222 b

^a Expressed as ratio of fruits: with no seeds - Os, with a few seeds - Fs (~ < 20 seeds), or with normal seed content - Ms (~ > 20 seeds)

^b R₁ progenies of UC82-rolB (Ro) which were PCR negative for *mp111*.

^c R₁ progenies of UC82-rolB (Ro) which were PCR positive for *mp111*.

^d Analysis was performed after arcsin² transformation of the ratios.

^e Dunn test, each value compared to the control (UC82) and to each other (pairwise comparison).

^f Puffiness of locules containing very few or no seeds was evaluated visually, 1= very puffy, 2= medium, 3= low puffiness.

¹ Kruskal-Wallis one way analysis on ranks was performed, because the normality test failed.

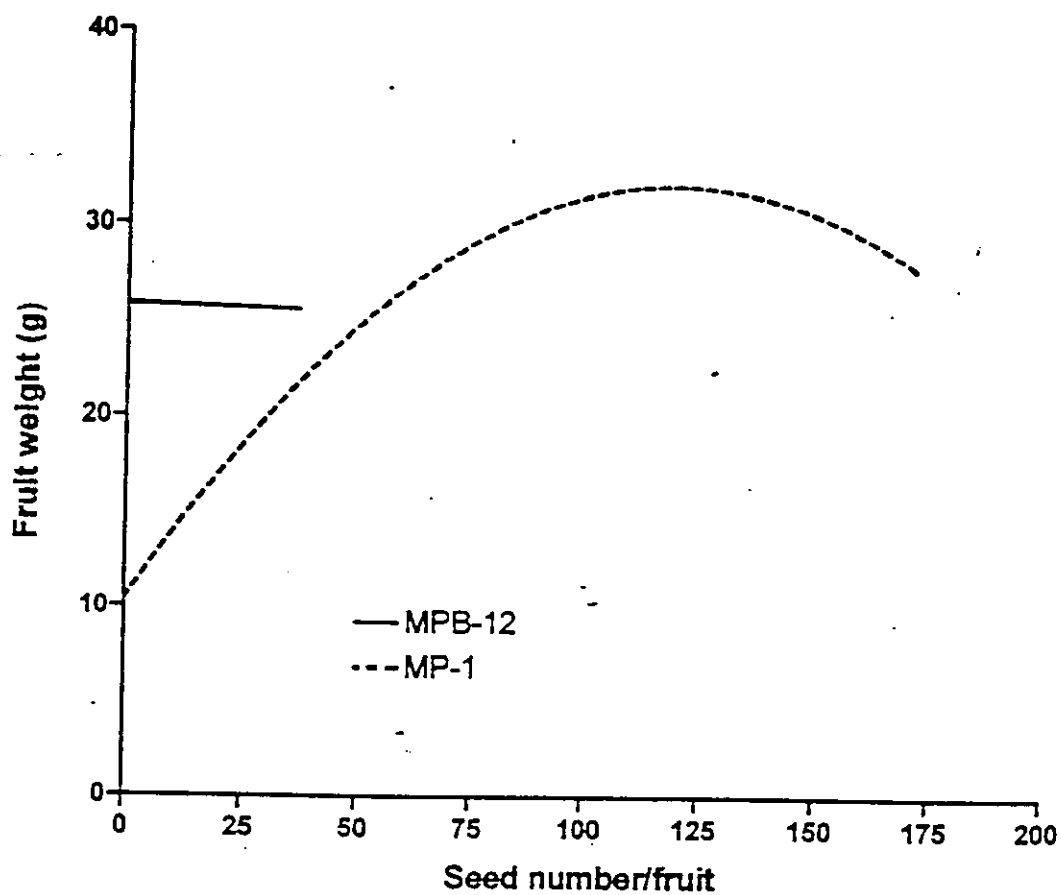


Figure 1: Correlation of fruit weight (g) with the number of seeds in the fruit, in lines MP-1 and MPB-12. In fruits of line MPB-12 the regression is insignificant ($P < 0.0001$) while it is significant for MPB-12 ($P > 0.05$).

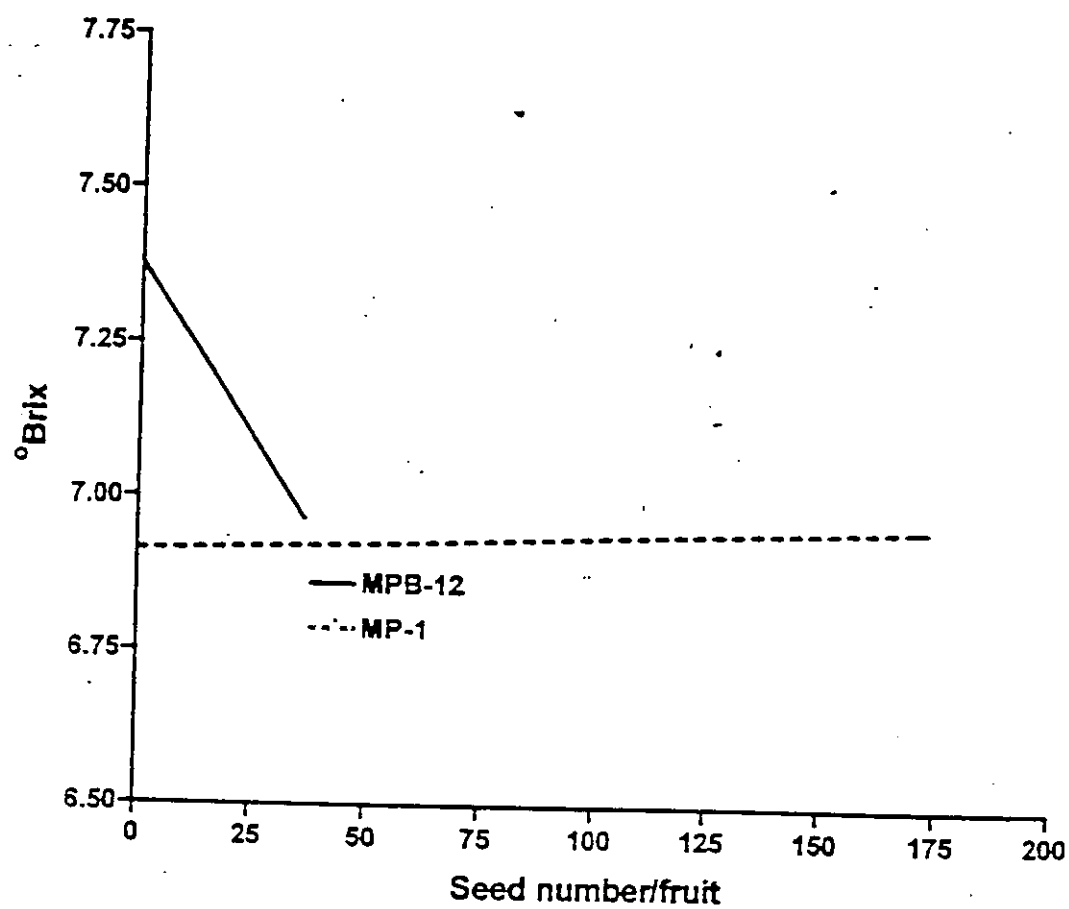


Figure 2: Correlation of °Brix with the number of seeds in the fruit, in lines MP-1 and MPB-12. In fruits of line MPB-12 the regression is significant ($P < 0.05$) while it is insignificant for MPB-12 ($P > 0.05$).

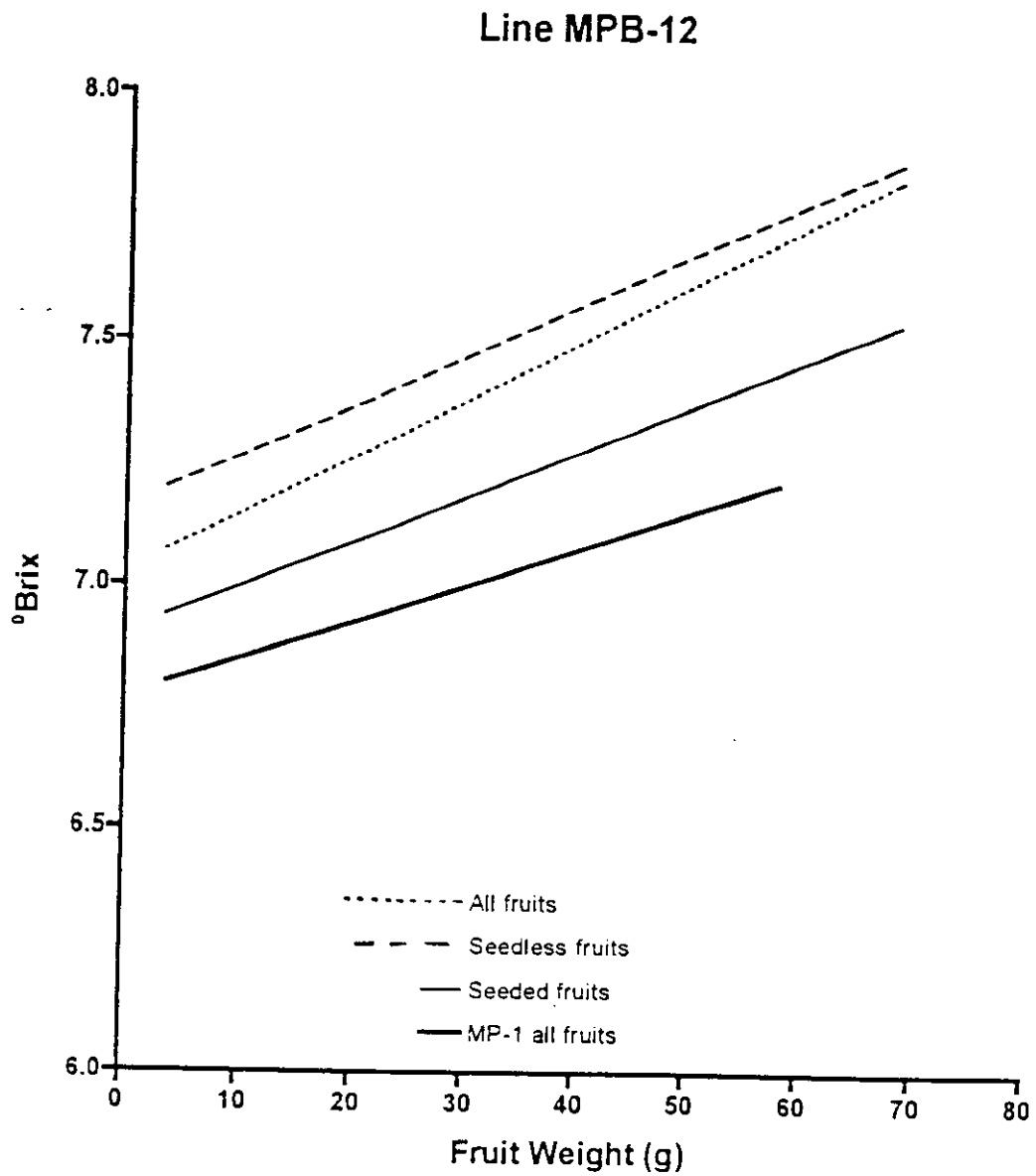


Figure 3: Regression of °Brix versus fruit weight of line MPB-12 and MP-1.

Regression of MPB-12 fruits was performed either for all fruits (dotted line), or for seedless fruits only (dashed line), or for seeded fruits only (full thin line), and for MP-1 fruits which were mostly seeded (thick line).