

פיתוח זני אבטיח ייחודיים עשירים בפרו-ויטמין A

Development of unique watermelon varieties enriched with pro-vitamin A

שמות השותפים במחקר:

- עמית גור (חוקר ראשי, אנליזות גנטיות)¹
טל אייזקסון (אנליזות גנטיות וביוכימיות)¹
איילה מאיר אנליזת פיגמנטים (מהנדסת מחקר, קרוטנואידים וכלורופילים)¹
גליל צורי (מהנדסת מחקר, אנליזות מוקולריות)¹
פביאן באומקולר (רכז ניסויי שדה)¹
יעקב תדמור (חוקר שותף, אנליזות גנטיות)¹

¹ המכון למדעי הצמח, מרכז מחקר נווה-יער, מנהל המחקר החקלאי
² המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מנהל המחקר החקלאי

תקציר

בישראל מגודלים מידי שנה יותר מ-30,000 דונם אבטיח למאכל (בנוסף ליותר מ-70,000 דונם אבטיח לגרעינים לפיצוח), כשליש מתוכם אבטיחים בכירים תחת חיפוי פלסטיק, המייצרים כ-180,000 טונות פרי (ישראלי ממוצע צורך כ-20 ק"ג אבטיח בשנה). בעולם, האבטיח מדורג כאחד מחמשת הפירות הנצרכים ביותר בעולם. גידול האבטיח תופס שבעה אחוזים מהשטח בו מגודלים פירות וירקות בעולם וסך תנובתו השנתית העולמית עומדת על כתשעים מיליון טונות פירות (http://faostat.fao.org). צבע פרי האבטיח נקבע על ידי קרוטנואידים אשר מהווים מרכיב חשוב בתזונת האדם, כנוגדי חמצון ופרו-ויטמין A הנחשבים כמונעי מחלות כרוניות וכמדכאי תהליכי הזדקנות ודלקת (Bowen et al., 2015). אבטיחים אדומים ידועים כמקור עשיר ויעיל לליקופן, נוגד חמצון קרוטנואיד בעל השפעה מיטיבה על בריאות האדם, אולם תכולת בטא-קרוטן, המקור העיקרי לויטמין A בתזונת האדם, נמוכה בהם מאוד (Tadmor et al., 2005). אבטיחים כתומים הקיימים כיום בשוק צוברים פרו-ליקופן (טטרא-ציס-ליקופן) כקרוטנואיד העיקרי שלהם. פרו-ליקופן אינו משמש כפרו-ויטמין A. בסריקת זנים, קווי טיפוח ואינטרודוקציות שונות של אבטיחים בודדו וייצבו קו של אבטיח המניב פרי כתום הצובר בטא-קרוטן כקרוטנואיד העיקרי שלו, אותו כינינו NY0016 (Tadmor et al., 2005). בניגוד לפרו-ליקופן, בטא קרוטן הוא מקור עשיר לויטמין A ולכן אבטיח כמו NY0016, עשוי לשמש כמקור גנטי להגדלה משמעותית של תכולת בטא-קרוטן בפרי האבטיח ולפיתוח זנים ייחודיים עתירים בפרו-ויטמין A. ממצאים קודמים הראו גם שהרכב הצבענים של הפירות משפיע על הטעם המלא של האבטיח מכון שקרוטנואידים משמשים חמרי מוצא לתרכובות ארומה (Lewinsohn et al., 2005). אנו גם נוודא ששינוי בהרכב הקרוטנואידים משפיע לטובה על טעמו של הפרי.

במחקר הנוכחי בנינו את התשתית הגנטית והטיפוחית וייצרנו אבות-טיפוס של אבטיח עתיר פרו-ויטמין A. התשתית כוללת את פענוח המנגנון הגנטי השולט בתכונה ייחודית זאת, לצד יצירת כלים טיפוחיים שיאפשרו מעקב אפקטיבי אחר התכונה והחדרתה ביעילות לקווי טיפוח מתקדמים ברקעים גנטיים שונים ובחינת השפעת האינטרקציות הגנטיות והמצב האללי (הומוזיגוט או הטרוזיגוט) על מופע התכונה ברקעים גנטיים שונים.

לצורך המיפוי הגנטי הכולל ההורה הכתום (NY0016) עם הורה בעל ציפה צהובה (Early Moon Beam) ונבנתה אוכלוסייה מתפצלת. על בסיס תוצאות ראשוניות מדור F1 ו-F2 נראה היה כי מדובר בתכונה קודומיננטית ובבקרה גנטית פשוטה. מיפוי התכונה החל באוכלוסיית F2: 3. אפיון גנוטיפי של צמחי F2 התבצע ע"י ריצוף סלקטיבי של מקטעים לכל אורכו של הגנום בשיטת GBS (Genotyping-By-Sequencing) (Elshire et al., 2011). האפיון הפנוטיפי של צבע הציפה התבצע על פירות ממשפחות F3. ניתוח התוצאות והמיפוי הגנטי שביצענו ביססו את הנחת העבודה והראו כי לוקוס יחיד בכרומוזום 1 באבטיח מבקר את התכונה ומסביר את הצבע הכתום וצבירת בטא-קרוטן בריכוז גבוה.

בהמשך העבודה ביצענו מיפוי מדוייק יותר של התכונה ע"י ריצוף גנומי מלא של צברים ושל קווי ההורים (BSA-Seq). בשנות המחקר השנייה והשלישית התקדמנו במיפוי הגנטי גם ע"י סריקה ממוקדת של מאות פרטים מאוכלוסייה מתפצלת לזיהוי רקומבינציות באזור המטרה. בנקודת הזמן הנוכחית הצלחנו למפות את התכונה למקטע גנומי מצומצם מאוד של אלפי בסיסים בודדים התוחם בתוכו גן מועמד עיקרי ובו זיהינו פולימורפיזם יחיד פוטנציאלי כגורם למופע הפרי הכתום. תוך שימוש בצאצאי אוכלוסייה מתפצלת הנבדלים בגן ה"כתום" בוצע אפיון פרופיל הביטוי ע"י אנליזת טרנסקריפטום השוואתית. תוצאות ניסוי זה מאפשרות לנו לזהות גנים המתבטאים דיפרנציאלית בשלבי התפתחות הפרי ונבדלים בין הקבוצות האלליות. נתונים אלו מהווים נדבך חשוב בדרך להבנת המנגנון המבקר את התכונה.

במקביל לעבודת המיפוי הגנטי מתבצעת פעילות טיפוחית בה הוחדרה התכונה למגוון רקעים גנטיים נוספים אדומי פרי, בטכניקה של הכלאות מחזירות ושימוש בסמן גנטי אחוז לתכונה, במטרה לבחון את השפעת האלל ה"הכתום" על פרופיל הקרוטנואידים גם באבטיח אדום הצובר ליקופן כפיגמנט העיקרי. בידינו אינדיקציות ראשוניות לכך שהאלל ה"הכתום" מעלה את תכולת בטא קרוטן גם ברקע של אבטיחים אדומים.

תוצאות העבודה הגנטית בפרוייקט, ובכלל זה פיתוח סמן גנטי בתאחיזה הדוקה לגן ה"הכתום", מהוות התקדמות משמעותית ביותר בדרך לפיתוח זני אבטיח ייחודיים עתירי בטא-קרוטן ובכלל זה בסבירות טובה גם זנים אדומים עתירי קרוטנואידים אשר ניתנים לטיפוח תוך שימוש בסמן גנטי.

מטרות המחקר וחשיבותו

היעד המרכזי של תכנית המחקר הוא פיתוח טיפוס אבטיח חדש וייחודי שישווק כאבטיח בריאות ממותג בעל צבע ייחודי ובעל תכולה מוגברת של פרו-ויטמין A. הדרך להשגת היעד הנ"ל כוללת פיתוח ידע תשתית-בסיסי וטכנולוגיות:

- אפיון המנגנון הגנטי השולט במופע פרי הצובר בטא-קרוטן באבטיח.
- מיפוי מדוייק של התכונה ופיתוח סמני דנא לסלקציה גנוטיפית בטיפוח.
- בידוד הגן המבקר את התכונה.
- בחינת מופע צבירת בטא-קרוטן ברקעים גנטיים שונים ובקומבינציות אלליות שונות (הומוזיגוט, הטרוזיגוט)
- המחקר המוצע יוביל להבנה גנטית, ביוכימית ומולקולרית של מנגנון הצטברות בטא-קרוטן בצירת פרי האבטיח. הבנה זאת תיצור כלים טיפוחיים חדשים שיאפשרו פיתוח קווים ומכלואים עתירי בטא-קרוטן. אבטיח הצובר תכולה מוגדלת ומשמעותית של פרו-ויטמין A ניתן למיתוג כמוצר אטרקטיבי לשוחרי בריאות עם צבע פרי חדש ומושך לכלל הצרכנים.

שאלות המחקר

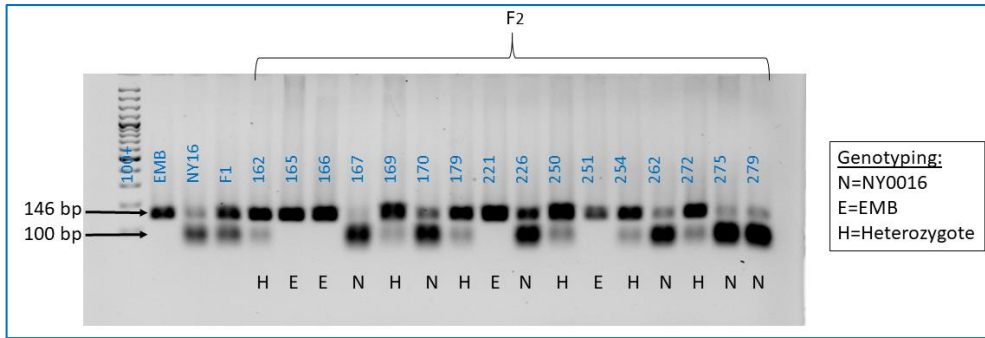
הנחת היסוד שלנו היא כי הידע שיתקבל מהבנת הבקרה הגנטית על צבירת בטא-קרוטן באבטיח כתום הצובר פיגמנט זה, עשוי לסייע בפיתוח אבטיחים צוברי ליקופן עם תכולת בטא-קרוטן מוגברת. בהתאם להנחת היסוד הזאת, שאלות המחקר עליהן המחקר המוצע יענה הן:

1. מהו המנגנון הגנטי השולט במופע פרי אבטיח הצובר בטא-קרוטן כקרוטנואיד העיקרי שלו?
2. האם יש קשר בין המנגנון הנ"ל לבין השונות הטבעית בתכולת בטא-קרוטן הנצפית בין זני אבטיח אדומים שונים?
3. האם ניתן להעלות את תכולת בטא-קרוטן בפרי האבטיח מבלי לפגוע בהצטברות הפיגמנט האדום ליקופן?
4. האם השינויים בתכולה והרכב הקרוטנואידים משפיעים על הארומה של הפירות?

תאור מקיף של תוצאות והישגי פעילות המחקר למול אבני הדרך בהצעת המחקר

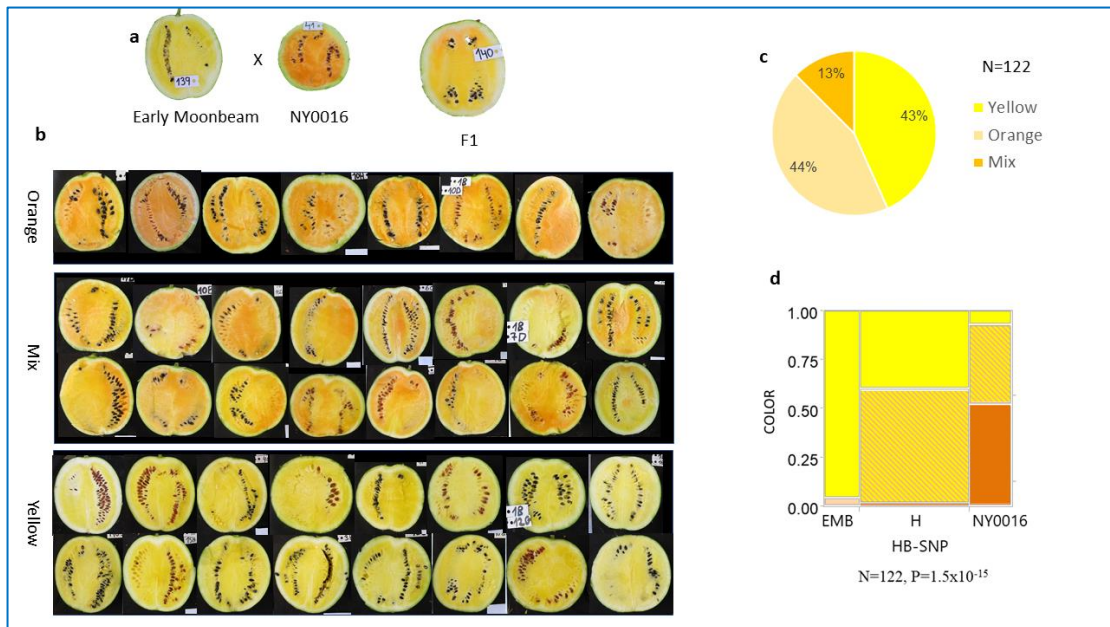
- **אבן דרך #1:** פיתוח סמן גנטי ראשוני לתכונת הציפה הכתומה ובחינת עוצמת התאחיזה לתכונה. בחינת אפקטיביות הסמן וביטוי התכונה ברקעים גנטיים נוספים.

על בסיס תוצאות המיפוי באוכלוסיית F2:3 ותוך שימוש בגנום הייחוס של האבטיח, Charleston www.icugi.org Gray genome, פותח סמן PCR מבוסס חיתוך (CAPs) אשר נבחן לתאחיזה לתכונת הציפה הכתומה באוכלוסיית המיפוי. **איור 1** מציג דוגמא להתפצלות הסמן.



איור 1: תמונת ג'ל של סמן CAPs (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) שפותח עבור HB- SNP (תוצרי PCR לאחר חיתוך באנזים Eam1104I).

בעזרת סמן זה אופיינה אוכלוסיית F2 נוספת מהכלאה בין ההורה הכתום (NY0016) להורה הצהוב (EMB) ונבחנה האסוציאציה בין התפצלות הסמן להתפצלות תכונת הציפה הכתומה. התקבלה אסוציאציה מובהקת ביותר ($P=1.5 \times 10^{-15}$) המאפשרת סלקציה גנוטיפית בעזרת סמן זה. עם זאת, כפי שראינו גם באוכלוסיית המיפוי, בעוד גנוטיפ הסמן ההומוזיגוט לאלל מההורה הצהוב נמצא באסוציאציה מושלמת עם ציפה צהובה, לא כל הפרטים בעלי גנוטיפ ההומוזיגוטי לאלל מההורה הכתום הינם בעלי ציפה כתומה (איור 2).



איור 2: אפיון גנוטיפי ופנוטיפי של 122 צמחים באוכלוסיית F2 של NY0016 x EMB (ההורים: (a) גרף הפילוח של F2, (b) תמונות של פירות בעלי ציפה שונים באוכלוסיית F2 (c) גרף הפילוח של התפצלות צבע הציפה באוכלוסיית F2. (d) היסטוגרמה המציגה את התפצלות הסמן HB-SNP עם צבע הציפה באוכלוסיית F2 של NY0016 x EMB. בציר ה-X מוצגים הגנוטיפים ובציר ה-Y מוצגים יחסים של כל פנוטיפ בקבוצת גנוטיפ מסוימת.

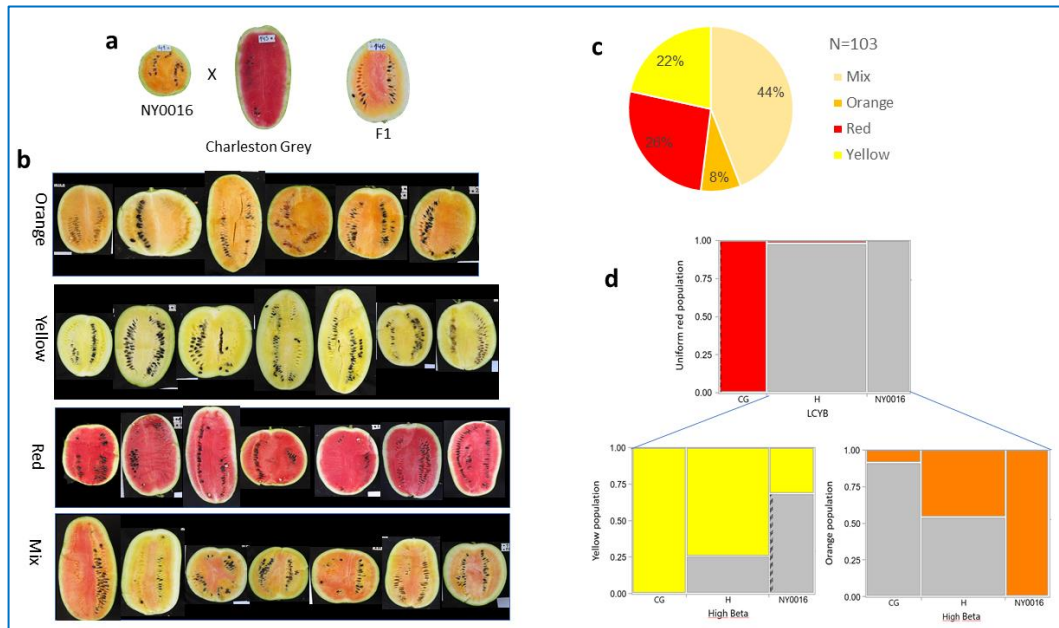
בכדי להרחיב את אימות ה-QTL לצבע הציפה הכתום (qFC.1), שלוש אוכלוסיות מתפצלות נוספות מהכלאות עם הורים צוברי ליקופן ופרו-ליקופן (בדור F2) נבחנו להתפצלות צבע הציפה ולאסוציאציה בין הסמן שפותח לבין צבע ציפה כתום. מאחר וליקופן הוא במעלה הזרם ביחס לביתא-קרוטן במסלול הקרוטנואידים, אנו מניחים שציפה אדומה (המשקפת עצירה של שטף מסלול הקרוטנואידים בשלב צבירת הליקופן) תהיה אפיסטטית לצבע ציפה כתום (צבירה של ביתא-קרוטן). לכן, אנליזה של אוכלוסיית כתום x אדום אפשרה לנו לבחון את הנחת הקשר האפיסטטי ולהעריך את ההשפעה של qFC.1 ברקע גנטי המתפלג לצבירת ליקופן. צמחים בשתי אוכלוסיות F2 מהכלאות של NY0016 עם קווי הורים אדומים אופיינו גנוטיפית על ידי הסמן qFC.1 וסמן LCYB בגן המקודד לאנזים ליקופן ביתא ציקלאז, שבעבר דווח שקשור להתפצלות

של הפנוטיפ של ציפה אדומה (Bang et al. 2007). במקביל אופיינו כל הפירות באוכלוסיות F2 הנ"ל לצבע הציפה.

אוכלוסייה NY0016 x Charleston Grey 2:

מהכלאה זו של ההורה בעל צבע ציפה כתום (NY0016) והורה בעל צבע ציפה אדום (CG) (איור a3) התקבלה אוכלוסיית F2 שהתפצלה לצבעים אדום, כתום, צהוב ושילובים שונים בין שניים מהצבעים או שלושתם (איור b,c3). אפיינו גנוטיפית ופנוטיפית פירות מ-103 צמחי F2. בניתוח אוכלוסייה זו, הסמן LCYB הסביר בצורה מושלמת את ההתפצלות למופע צבע ציפה אדום אחד. כל הפירות מ-26 הצמחים שהיו הומוזיגוטים לאלל של CG בסמן LCYB היו בעלי צבע ציפה אדום אחד (Uniform red) (Chi-square=108.5 P value = 2.7x10⁻²⁴). הגנוטיפים האחרים בסמן הזה, הומוזיגוטים לאלל של EMB או הטרוזיגוטים, התפצלו לצהוב, כתום או שילובים של הצבעים כולל שלובים עם צבע אדום.

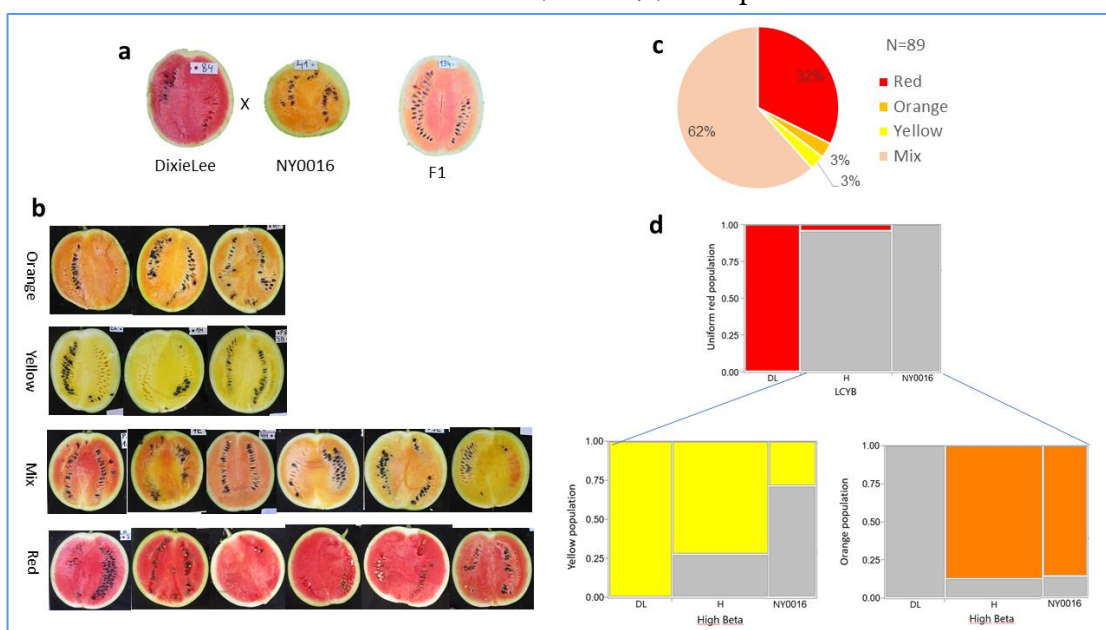
את התפצלות הסמן qFC.1 והפנוטיפ לצבע ציפה כתום בחנו על כל 77 הצמחים הנותרים בעלי הגנוטיפים האחרים בסמן LCYB, הומוזיגוטים לאלל של NY0016 או הטרוזיגוטים. בקבוצה זו, נצפו פנוטיפים שאינם אדום אחד אלא מעורבים עם אדום או ללא אדום כלל. מאחר וחלק גדול מהפירות (53) הראו פנוטיפ של צבע ציפה מעורב, ניתחנו (בצורה ויזואלית) את פנוטיפ הצבע לנוכחות פיגמנט צהוב או כתום וציינו בצורה ויזואלית את הנוכחות של צבעים אלו בצבע הציפה באופן בלתי תלוי וכשתי תכונות נפרדות, כך שבפירות שבהן צבע הציפה מעורב נרשמה בנפרד נוכחות הפיגמנטים צהוב וכתום. בניתוח התוצאות בקבוצה זו (N=77), התקבל קשר מובהק בין התפצלות הסמן qFC.1 ובין צבע הציפה בשני הפנוטיפים: צבע ציפה צהוב נצפה בכל הצמחים שהיו הומוזיגוטים לאלל של CG בסמן qFC.1 ונצפה בשכיחות נמוכה בצמחים שהיו הומוזיגוטים לאלל של NY0016 (Chi-square=28.5 P value = 6.3x10⁻⁷). נוכחות של צבע ציפה כתום היתה באופן הפוך בשכיחות גבוהה בצמחים הומוזיגוטים לNY0016 וכמעט ולא הייתה נוכחות של כתום בצמחים שהיו הומוזיגוטים לאלל של CG (Chi-square=43.3 P value = 3.9x10⁻¹⁰) (איור d14).



איור 3: אפיון גנוטיפי ופנוטיפי של 103 צמחים באוכלוסיית F2 של NY0016 x CG (a: ההורים NY0016, CG ו-F1. (b) תמונות לדוגמה של צבעי ציפה באוכלוסיית F2 (c) גרף הפילוח של התפצלות צבע הציפה באוכלוסיית F2. (d) היסטוגרמות המציגות את הקשר בין התפצלות הסמן HB-SNP באוכלוסיית F2 של NY0016 x CG להתפצלות צבירת הפיגמנטים השונים. ההיסטוגרמה העליונה מציגה את ההתפלגות הגנוטיפית בסמן LCYB למול התפלגות פנוטיפ הצבע האדום. על שאר הגנוטיפים בסמן זה נעשתה האנליזה להתפצלות הסמן HB-SNP וצבעי ציפה כתום וצהוב כפי שניתן לראות בשתי ההיסטוגרמות הנוספות. בציר X- מוצגים הגנוטיפים ובציר ה-Y מוצגים יחסים של כל פנוטיפ בקבוצת גנוטיפ מסוימת.

אוכלוסייה 3 : NY0016 x DL

מהכלאה זו של הורה בעל צבע ציפה כתום (NY0016) והורה בעל צבע ציפה אדום (DL) (איור 4a) התקבלה אוכלוסיית F₂ שהתפצלה אף היא לצבעים אדום, כתום, צהוב ושילובים שונים בין שניים מהצבעים או שלושתם (איור 4b,c). אפיינו גנוטיפית ופנוטיפית פירות מ-89 צמחי F₂. בניתוח אוכלוסייה זו, נצפו אחוזים גבוהים יותר של פירות בעלי צבע ציפה אדום (32%) ופירות בעלי פנוטיפ מעורב (62%) לעומת אחוזים נמוכים של פירות כתומים וצהובים (3% בכל אחד מהם) (איור 4c). ניתוח התפצלות הסמנים וצבעי הציפה נעשה באותו אופן כמו באוכלוסייה 1 (איור 4d). גם באוכלוסייה זו, הסמן LCYB הסביר באופן מלא את ההתפצלות למופע צבע ציפה אדום אחד. כל הפירות מ-27 הצמחים שהיו הומוזיגוטים לאלל של DL בסמן LCYB היו בעלי צבע ציפה אדום אחד (Uniform red) (Chi-square=99.9 P value = 2x10⁻²²). בכל הצמחים בעלי הגנוטיפים האחרים, שאינם בעלי צבע ציפה אדום אחד בפירות (N=64), התקבל קשר מובהק בין התפצלות הסמן qFC.1 ובין צבע הציפה צהוב (Chi-square=23.8 P value = 6.8x10⁻⁶) ובין צבע ציפה כתום (Chi-square=50.3 P value = 1.2x10⁻¹¹) (איור 4d).



איור 4: אפיון גנוטיפי ופנוטיפי של 89 צמחים באוכלוסיית F₂ של NY0016 x DIX (a: ההורים NY0016, DixieLee ו-F₁; (b) תמונות של צבעי ציפה באוכלוסיית F₂; (c) גרף הפילוח של התפצלות צבע הציפה באוכלוסיית F₂; (d) היסטוגרמות המציגות את הקשר בין התפצלות הסמן qFC.1 באוכלוסיית F₂ x DL להתפצלות צבירת הפיגמנטים השונים. ההיסטוגרמה העליונה מציגה את ההתפלגות הגנוטיפית בסמן LCYB למול התפלגות פנוטיפ הצבע האדום. על הגנוטיפים שאינם בעלי האלל האדום בסמן זה נעשתה האנליזה להתפצלות הסמן qFC.1 וצבעי ציפה כתום וצהוב כפי שניתן לראות בשתי ההיסטוגרמות הנוספות. בציר ה-X מוצגים הגנוטיפים ובציר ה-Y מוצגים יחסים של כל פנוטיפ בקבוצת גנוטיפ מסוימת.

ניתן לסכם, שבשלושת האוכלוסיות האינפורמטיביות בהם נבחנה האסוציאציה בין התפצלות הסמן להתפצלות צבע הציפה (כתום או צהוב), נמצאה אסוציאציה מובהקת המאמת את תוצאות המיפוי ואת אפקטיביות הסמן המולקולרי.

אבן דרך #2: מיפוי מדויק של התכונה בעזרת רקומביננטים ממוקדים באזור המטרה. אבן הדרך תבחן על בסיס רזולוציית המיפוי שתושג. תוצאה טובה תהיה מיפוי למקטע של פחות מ-30 גנים לצורך השגת התקדמות במיפוי התכונה למקטע גנומי מצומצם יותר (fine-mapping) נקטנו במקביל בשתי גישות, ובכלל זה בגישת מיפוי נוספת, מבוססת ריצוף, אשר לא נכללה בהצעת המחקר, ותוצאותיה מתוארות להלן:

מיפוי מבוסס ריצוף צברים (BSA-Seq analysis):

במקביל להגדלת אוכלוסיית המיפוי ואיתור פרטים רקומביננטים נוספים באזור ה-QTL (כפי שיתואר בהמשך), ביצענו גם אנליזת ריצוף של צברי דנא ממשפחות ה-F3 המקובעות לצבעי הציפה הכתום והצהוב. באנליזה זו מתבצע ריצוף גנומי עמוק (30x בממוצע) של צברי הדנא ושל

קווי ההורים של אוכלוסיית המיפוי. בשל העובדה שהצברים מייצגים קווים באוכלוסייה הנבדלים (במצב הומוזיגוטי) בגן העיקרי המבקר את תכונת צבע הציפה הכתום, הנחת היסוד היא כי אתרים פולימורפיים הנמצאים בתאחיזה לגן המבקר את התכונה, יראו הבדלים מובהקים בתדירות האללים ההוריים, בעוד שאתרים אחרים, בלתי תלויים, לאורכו של הגנום יראו תדירות אללים שווה בשני הצברים (סביב 50%). היתרון הגדול בשימוש בגישה זו הוא כמות הסמנים העצומה המתקבלת, ואשר מאפשרת שיפור ברזולוציית המיפוי על אוכלוסייה נתונה. לצורך השוואה, במיפוי הראשוני השתמשנו בכ- 3,000 סמנים מבוססי GBS, ובאנליזת ה BSA-Seq הצלחנו לזהות כ- 400,000 סמנים אינפורמטיביים.

על בסיס נתוני ריצוף אלו ביצענו ניתוח לזיהוי SNPs ולחישוב מספר הקריאות לכל אלל בכל אחד מ- 400,000 SNPs שזוהו לכל אורכו של הגנום. נתונים אלו איפשרו לנו לבצע אנליזת SNP-Index הבוחנת את הפרש תדירויות האללים בכל אחד מהסמנים. **איור 5a,b** מציג את הקטנת מקטע המיפוי מ כ-2 מליון בסיסים למקטע גנומי בגודל של כ 400 אלף בסיסים. בכל אחד מהאיורים החלק העליון מציג את תוצאות המיפוי הראשוני (GBS) ובחלק התחתון מוצגות תוצאות אנליזת ה- Δ SNP-index המבוססת על BSA-Seq. בנוסף, האנליזות הגנומיות הבלתי תלויות (BSA-Seq and RNA-Seq) איפשרו לנו לקבל אימות נוסף לתוצאות המיפוי הממוקד. כפי שניתן לראות **באיור 6**, בו למעשה מוצגות תוצאות המיפוי הגנטי באמצעות צברים, בשתי השיטות השונות, המקטע הגנומי (QTL peak) אליו מצביע המיפוי משותף לשתי האנליזות.

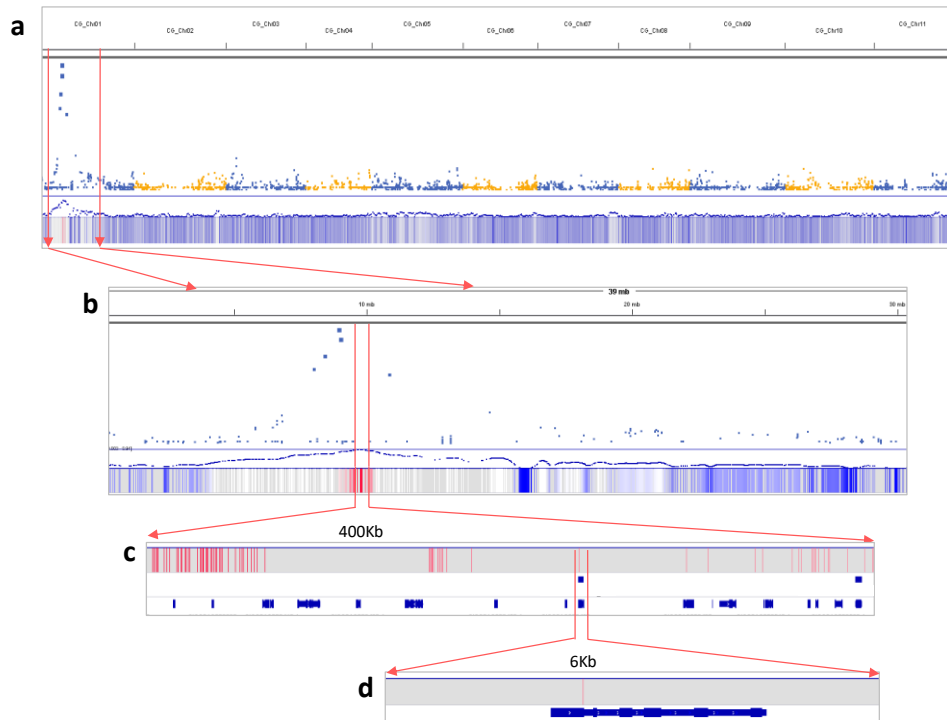


Figure 5: Genetic mapping of the high-beta carotene trait. **a)** Who-e genome view. **b)** Zoom in on chromosome 1: GBS upper panel and BSA-Seq lower panel. **c)** zoom in on 400 Kb interval on chr1 based on the Δ SNP-index analysis: upper panel are SNPs positions, lower panel are gene models. **d)** Zoom in on our current candidate gene based on further recombinants analysis.

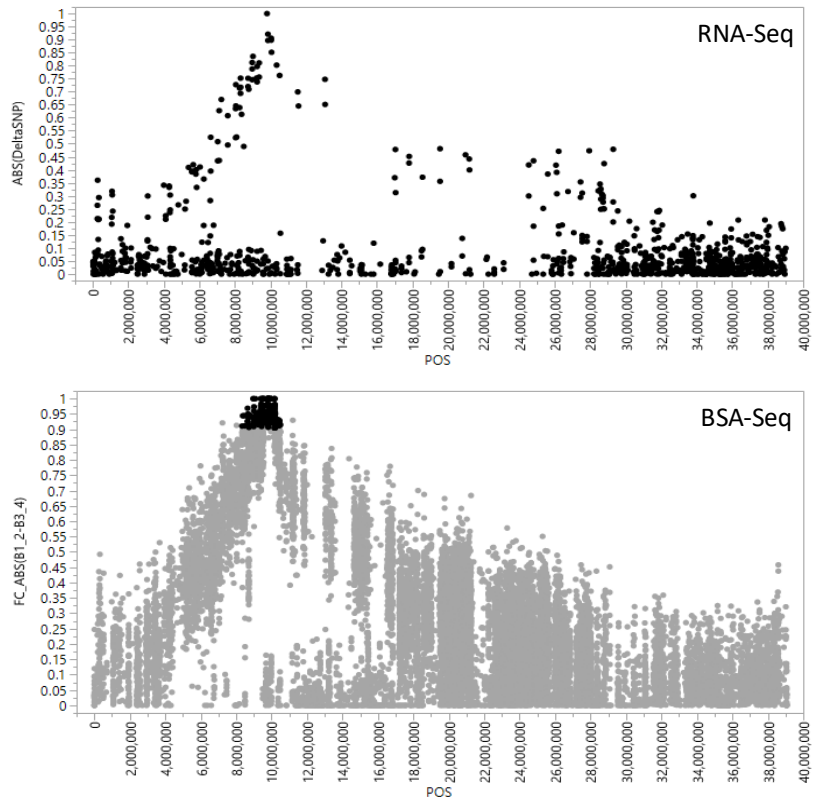


Figure 6: Comparison of mapping results based on SNP-index analyses of yellow and orange bulks using RNA (RNA-Seq, upper panel) and DNA (BSA-Seq, lower panel) data.

מיפוי מדויק באמצעות רקומביננטים נוספים:

במקביל לאנליזת ריצוף הצברים (BSA-Seq), התקדמנו עם מיפוי התכונה גם בשיטה הקלאסית של אפיון אוכלוסיה מתפצלת גדולה יותר ואיתור רקומביננטים נוספים בצורה ממוקדת באזור המיפוי. לצורך כך גידלנו אוכלוסיות F2 נוספות מההכלאה בין EMB ו-NY0016; בשלב ראשון, כ-500 צמחי F2 אופיינו גנוטיפית עם סמני CAPs שפותחו משני צידי מרכז ה-QTL וסמן CAPs נוסף בגן המועמד הממוקם ב-QTL peak. לאחר סלקציה גנוטיפית על בסיס תוצאות הסמנים הקיצוניים, נבחרו צמחים אינפורמטיביים אשר גודלו בשדה בקיץ 2019 ופירותיהם אופיינו ותועדו (ע"י צילום) לצבע הציפה. ניסוי זה השיג שתי מטרות חשובות:

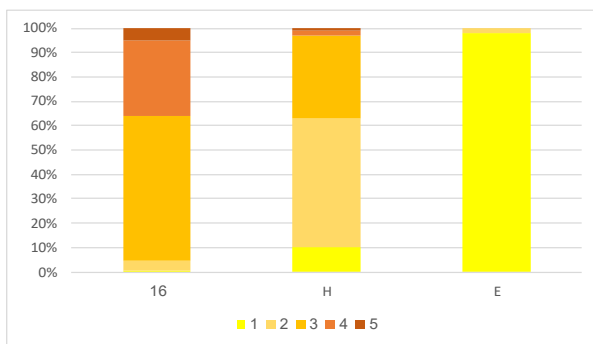


Figure 7: Co-segregation of SNP marker at the candidate gene and flesh color, across 380 F2 plants. E=EMB, 16=NY0016, H=Hetrozygote

1. התקבל אימות נוסף למיפוי התכונה ולתאחיזה בין התפצלות סמן גנטי בגן המועמד לבין צבע הציפה. איור 7 מסכם את התפצלות התכונה (בסקלה מספרית 1-5 ובצבעים תואמים) מול התפצלות הסמן בגן המועמד, ומדגים את התאחיזה החזקה ($n=380$). כפי שראינו בעבר, במצב הומוזיגוטי לאלל הצהוב מתקבלים פירות צהובים לגמרי, ולעומת זאת במצב ההטרוזיגוטי או הומוזיגוטי לאלל הכתום מתקבלים פירות עם צבע מעורב צהוב/כתום או אפילו צהובים בתדירות נמוכה. תוצאה זו תומכת שוב במעורבות אפשרית של גורם גנטי נוסף בצבירת הפיגמנט הכתום.

2. הרקומביננטים שאותרו באוכלוסייה, אופיינו גנוטיפית בעזרת סמנים נוספים (קרובים יותר לגן המועמד) בתוך מקטע ה-QTL. ניתוח המידע הגנוטיפי הנייל והמידע הפנוטיפי (צבע הציפה

שנאסף בניסוי השדה) איפשר לנו לצמצם את המיפוי למקטע של כ- 200 Kb המכיל בתוכו גנים בודדים ובהם גם הגן המועמד המרכזי (איור 5 d, c).

בשלב שני, אשר בוצע באביב-קיץ 2020, אופיינו משפחות F3 של צמחי F2 רקומביננטים. אפיון גנוטיפי מפורט עם סמנים באזור הממוקד, לצד אפיון פנוטיפי של משפחות אלו בשדה איפשר לנו לצמצם את המיפוי למקטע של כ- 150kb. בסריקה גנטית של 282 צמחים נוספים מאוכלוסיית F2 חמישה רקומביננטים נוספים התווחים את אזור ה QTL ומחזקים את תוצאות המיפוי.

לסיכום, אבן דרך זו הושגה במלואה. הצלחנו להגיע למיפוי גנטי ברזולוציה גבוהה ולתחום את התכונה לאזור גנומי של גנים בודדים ובתוכם גן מועמד עיקרי המכיל פולימורפיזם משמעותי שיכול להסביר את השונות.

אבן דרך #3 : זיהוי גנים מועמדים מאנליזת RNA-Seq של צברי F3.

אנליזת טרנסקריפטום (RNA-Seq) של צברים כתומים וצהובים ממשפחות F3

30 משפחות F3 המקובעות לצבע הציפה (15 צהובות ו-15 כתומות) וקווי ההורים של האוכלוסייה (EMB, NY0016) גודלו בשדה (20 צמחים למשפחה או קו). פירות סומנו בשלב ההפרייה (אנטזיס) ונדגמו מכל המשפחות וקווי ההורים בשלושה שלבי התפתחות 20, 30 יום לאחר הפרייה ופירות בשלים (ב-3 חזרות ביולוגיות). RNA הופק מכל הדוגמאות ונבנו צברים לצורך ריצוף (RNA-Seq). במהלך שנת המחקר השנייה, דוגמאות ה-RNA נשלחו לריצוף, ועל בסיס תוצאות הריצוף בוצע ניתוח השוואתי לאפיון רמת הביטוי של כלל הגנים המתבטאים בכל שלב התפתחותי ובכל אחד מהגנוטיפים. בידינו כעת בסיס נתונים מקיף המתאר את טרנסקריפטום ציפת הפרי בהתפתחות (משלב תחילת צבירת הפיגמנטים ועד להבשלה) בצברים הנבדלים ב-QTL ובקווי ההורים של אוכלוסיית המיפוי.

באיור 8 מוצגים ניתוחי HCA (Hierarchical Cluster Analysis) אשר בהם התבצע תהליך סידור וקיבוץ הגנים עפ"י פרמטרים שונים. **באיור 8a**, בו מוצגת רמת הביטוי הממוצעת של כל אחד מהגנים בגנוטיפים השונים ובשלבי ההתפתחות, ניתן לזהות קבוצות גנים (clusters) הנבדלות בפרופיל הביטוי שלהן (ביטוי גבוה בכל הדוגמאות, נמוך בכל הדוגמאות, או דיפרנציאלי בין הדוגמאות). **באיור 8b** מוצג ניתוח הביטוי הדיפרנציאלי (Log Fold Change) של כל אחד מהגנים, בין הצבר הכתום לצבר הצהוב בכל אחד משלבי ההתפתחות. בשיטה זו ניתן ביעילות לאתר קבוצות גנים המתבטאים בצורה דיפרנציאלית באחד או יותר משלבי התפתחות הפרי.

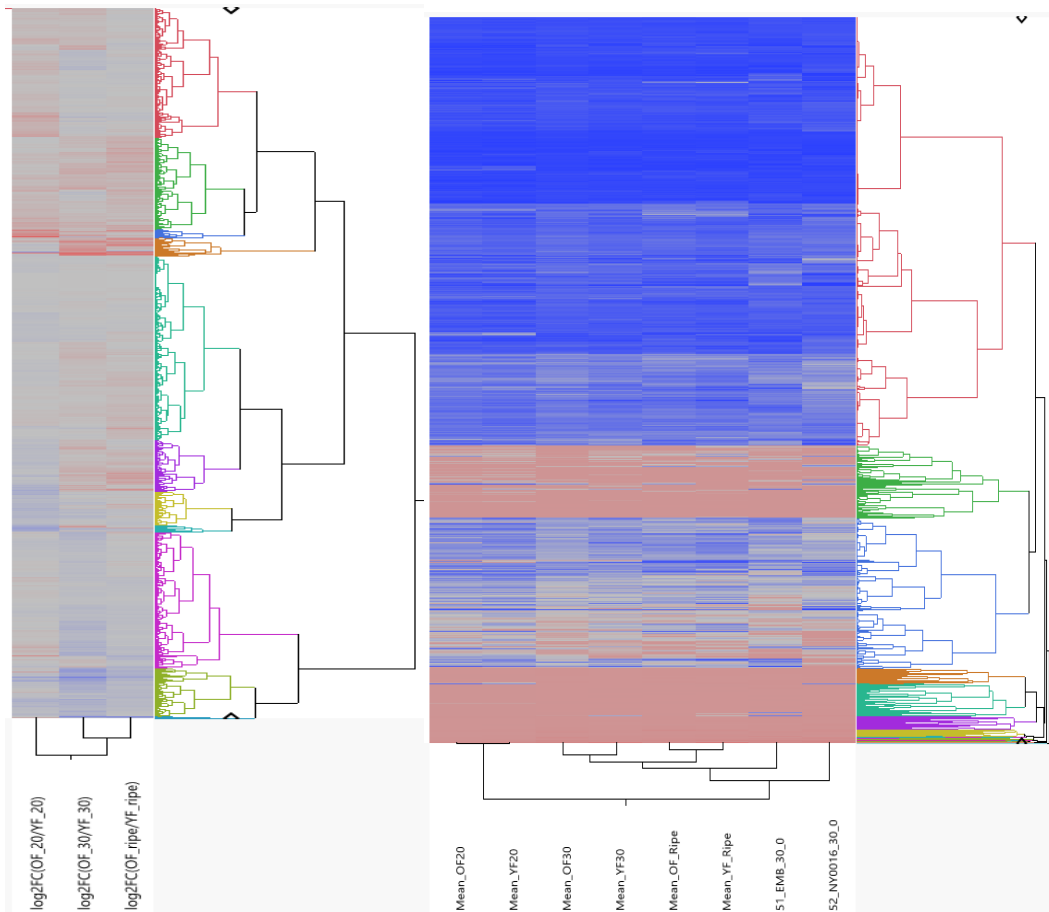


Figure 8: Hierarchical Cluster Analyses (HCA). **A)** Comparison of expression across Genotype x Dev. Stage combinations. **B)** Differential expression (Log (FC)) between QTL bulks across fruit developmental stages

ניתוח נוסף שבוצע על בסיס נתוני הטרנסקריפטום הוא אנליזת פרופיל הביטוי השוואתי בין הצבר הצהוב לכתום של גנים מבניים הקשורים למסלול הביוסינטיזה של קרוטנואידים ושל גורמי שיעתוק המוכרים כמעורבים בבקרת צבירת פיגמנטים בפירות. בנוסף, ביצענו אנליזת Gene Ontology (GO) enrichment לגנים המתבטאים דיפרנציאלית בין הצברים. ניתוח זה מאפשר ללמוד על מסלולים ופונקציות המופעלות בצורה דיפרנציאלית. תוצאות אלו ישמשו אותנו בהמשך כמימד חשוב באפיון המנגנון המולקולרי של בקרת התכונה.

אבן דרך #4: יצירת רשימה מצומצמת של גנים מועמדים על בסיס ניתוח מאוחד של מיפוי וביטוי ניתוח משולב של תוצאות המיפוי לצד אנליזת הטרנסקריפטום ממקדת אותנו כרגע בגן מועמד עיקרי יחיד. מטעמים מובנים לא נחשוף את הגן במסגרת זו לפני פרסום או הגשת בקשה לרישום פטנט. מאמר שפורסם ב 2019 (Guo et al 2019) מתאר ריצוף מחדש של 414 זנים וקווים אבטיח. השתמשנו בנתוני הרצף שפורסמו כדי לאפיין את שכיחות האללים ב SNP המועמד בקרב זני האבטיח שרוצפו. מצאנו כי 95 קווים היו הומוזיגוטיים לאלל "הכתום" (כולם *C. lanatus*, מתוך 345 קווי *C. lanatus* שרוצפו). Guo et al. ציינו עבור חלק מהקווים את צבע הפרי. כך יכולנו לראות שמתוך 14 הקווים שתוארו במאמר כבעלי פרי כתום, 12 קווים נושאים את האלל "הכתום", ובאחד מצאנו מוטציה בגן CRTIso (שידועה כגורמת לצבע ציפה כתום כתוצאה מהצטברות פרוליקופן). ממצא זה מחזק את המסקנה שלנו שהמקטע הכרומוזומלי המכיל את הגן המועמד אחראי לתכונה של צבירת β -קרוטן בפרי. אף קו שתואר כבעל פרי לבן או צהוב לא נושא את האלל "הכתום".

קווים בעלי אבטיח בצבע אדום או ורוד צוברים ליקופן. ההנחה היא שהתכונה הגורמת לצבירת ליקופן בפירות הקווים האדומים והוורודים קשורה בפגיעה בפעילות האנזים ליקופן-β-ציקלאז האחראי לייצור β-קרופן, ולכן היא אפיסטטית לתכונה של צבירת β-קרופן בפרי. יש לציין כי מתוך 95 הקווים ההומוזיגוטיים לאלל "הכתום" 56 קווים אופיינו כבעלי צבע אדום או ורוד. כנאמר, לא ניתן עדיין ללמוד מקווים אלו על הקשר בין האלל "הכתום" ליכולת הצבירה של β-קרופן בפרי, אך הופתענו לגלות עד כמה אלל זה נפוץ גם בקרב קווים בעלי פרי אדום. בחינה של הפלוטיפ המקיף את האלל הכתום בן NY0016 (ע"ס נתוני ריצוף מחדש של גנום NY0016) והשוואתו לנתוני הרצף מהמאמר, מראים כי לכל 95 הקווים שנושאים את האלל "הכתום" יש הפלוטיפ זהה באיזור המקיף את הגן. ממצאים אלו מצביעים על כך שהמוטציה בגן המועמד התרחשה אצל אב קדמון, ושכל 95 הקווים בעלי האלל "הכתום" הם צאצאים שלו. בעקבות הממצאים בדקנו 53 קווי אבטיח אדומים מקרב האוסף הגנטי של קווי האבטיח של נווה יער, ומצאנו שלושה קווים הומוזיגוטיים לאלל "הכתום" בגן המועמד. קווים אלו הוכלאו עם הקו EMB בעל הפירות הצהובים כדי לבחון את פעילות האללים הללו ברקע שבו אין עיכוב ביצירת β-קרופן.

לסיכום, אבן דרך זו הושגה. אנו בדרך לזיהוי הגן המבקר את התכונה – תוצאה משמעותית שתאיץ את היכולת לטפח בעזרת האלל הרצוי ועשויה להוביל גם לאפשרויות ליישומים גנטיים (כגון שימוש בעריכה גנומית) בפירות נוספים.

אבן דרך #5 : בחינת מכלואי אבטיח אדום עתירי בטא-קרופן על חומר טיפוח.

השלב היישומי בתוכנית דיבר על בחינת היתכנות לשימוש באלל "הכתום" להגברת צבירת בטא-קרופן באבטיחים אדומים. בעת כתיבת התוכנית זה היה יעד בעל היתכנות נמוכה (אך קיימת) שכן הנחת העבודה בעלת ההסתברות הגבוהה יותר הייתה שצבירת בטא-קרופן באבטיח הכתום נגרמת בשל עצירת המסלול הביסינטי והצטברות תוצר ביניים. בנקודת הזמן הנוכחית, ובשל ההתקדמות המשמעותית שהושגה במיפוי הגנטי ואיתור גן מועמד, הנחת העבודה שלנו היא שיכול להיות שהמופע הכתום נובע משינוי בבקרת המסלול כולו ומופע עתיר פיגמנטים יכול להתקיים גם ברקע אדום הצובר ליקופן כפיגמנט העיקרי. בלוחות הזמנים של הפרוייקט הצלחנו לחזיר את התכונה ולהגיע לדור BC3 ברקע של פרי צהוב. החדרת התכונה לרקעים אדומים נמצאת בשלב מוקדם יותר וכעת בידינו זרעי F2 ו BC1 לרקעים אדומי פרי, אשר יוצרו בעונה הנוכחית (סתיו 2020) בנוה-יער (איור 9). היעד של בחינת מכלואים אדומי פרי לא התקיים במסגרת לוחות הזמנים ומבחנים ראשוניים של אוכלוסיות מתפצלות ברקע פרי אדום יתקיימו בקיץ 2021. במסגרת זו נמדוד גם קרוטנואידים וסוכרים ונשווה בין הקבוצות האלליות.



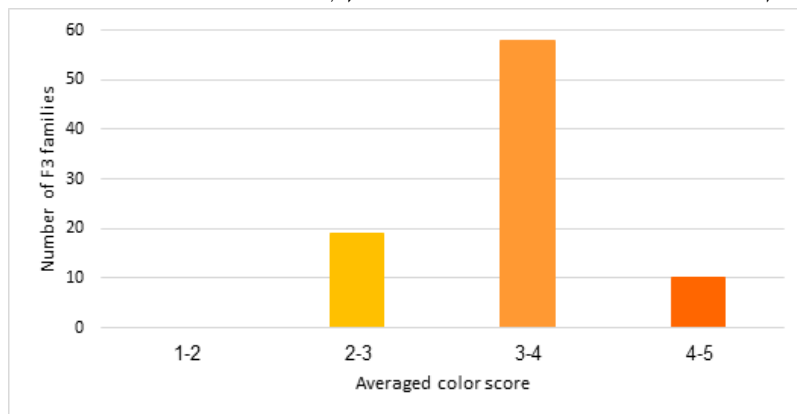
איור 9: הכלאות באבטיח בעונת סתיו 2020. נוה-יער.

לסיכום, אבן דרך זו לא הושגה במלואה בלוחות הזמנים של הפרוייקט, אך הושגה התקדמות משמעותית ביותר ובידינו כעת אבות טיפוס פוטנציאליים לזנים עתירי פיגמנטים, ומבחנים ראשוניים מתוכננים בקיץ הקרוב (2021).

משימות נוספות שנוצעו במהלך הפרוייקט ולא נכללו בתוכנית העבודה בהצעת המחקר:

1. בניית אוכלוסייה מתפצלת ואפיון פנוטיפי של צבע הציפה למיפוי אתרים גנטיים משניים המעורבים בצבירת בטא-קרוטן

הנחת העבודה שלנו על בסיס ההתפצלות הפנוטיפית באוכלוסיית NY0016xEMB F2: 3 היא כי לצד הגן העיקרי המבקר את צבירת הבטא-קרוטן אותו אנו בדרך לבודד, קיים לפחות גן נוסף (אולי יותר מאחד) המעורב באלמנטים הכמותיים של צבירת הפיגמנט הכתום. לצורך מיפוי גנטי של האתרים המשניים המעורבים בצבירת בטא-קרוטן בציפה, נבחרו על בסיס אנליזה גנוטיפית מאוכלוסיית ה-F2 שגודלה בקיץ 2019 88 צמחים הומוזיגוטים לאלל הכתום (NY0016). על צמחים אלו בוצעו האבקות עצמיות מבוקרות ונאספו זרעי F3. בקיץ 2020 גודלה ואופיינה בשדה אוכלוסייה מתפצלת בדור F3 אשר מקובעת לאלל הכתום ב QTL, ולכן ההתפצלות הפנוטיפית הצפויה בצבע הציפה בין המשפחות תוכל לאפשר מיפוי גנטי של הגנים המשניים. דוגמאות עלים נלקחו מכל 88 צמחי ה-F2 לצורך הפקת דנ"א לצורך המיפוי. פירות בשלים מ-10 צמחים למשפחה נקטפו ואופיינו לצבע הציפה (איור 10). על בסיס ההתפצלות ייבחרו משפחות ספציפיות מהן ייבנו צברי דנ"א אשר יישלחו לריצוף, במטרה למפות את הגנים המשניים בשיטת BSA-Seq.



איור 10: התפלגות ציון ממוצע של צבע הפרי שקיבלו משפחות F3 הומוזיגוטיות לאלל "הכתום". סקלת הצבע: 1=צהוב, 2= בעיקר צהוב עם קצת כתום, 3=כתום מעורב בצהוב, 4= בעיקר כתום עם קצת צהוב, 5=כתום.

2. אפיון פרופיל קרוטנואידים מפורט בקווי ההורים

לצורך אפיון מפורט יותר של השונות בהרכב הקרוטנואידים בין קווי ההורים, בוצעה אנליזה HPLC על דוגמאות ציפה מ- EMB ו-NY0016. באיור 11 ניתן לראות הבדל ברור בהרכב הקרוטנואידים ובכמות הכוללת, בין ההורים. לצד ההבדל המובהק בתכולת הבטא-קרופן, ישנם הבדלים גם בתכולת קרוטנואידים נוספים כגון Phytoene, Phytofluene, ו-z-carotene אשר מצויים בריכוזים גבוהים יותר בהורה הכתום.

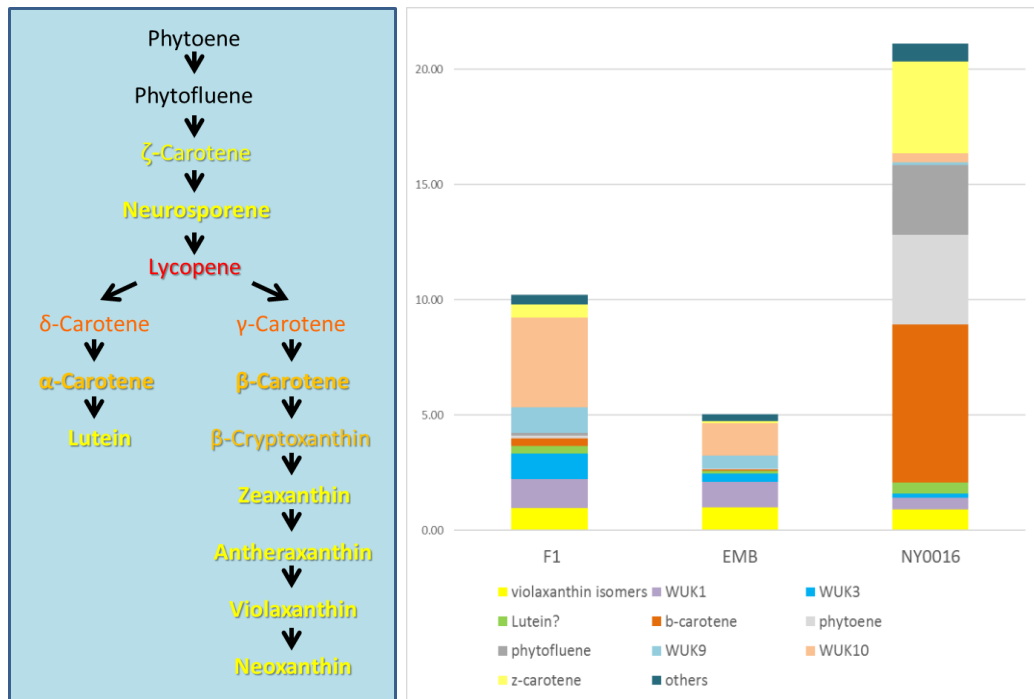


Figure 7: Characterization of carotenoids composition in flesh of mature fruits of NY0016, EMB and their F1 hybrid. A) schematic illustration of carotenoids biosynthetic pathway in plant. B) carotenoids compositions in NY0016, EMB and F1.

דיון בתוצאות

המחקר הנוכחי נולד מתוך השונות הטבעית באבטיח. קו ייחודי, כתום ציפה, הצובר בטא-קרופן כפיגמנט העיקרי, משך את תשומת ליבנו מבחינה מדעית ומבחינה טיפוחית. המחקר תוכנן לקדם שני יעדים: 1) אפיון גנטי להעמקת ההבנה של בקרת התכונה. 2) פעילות טיפוחית מקבילה לעבודה הגנטית, במטרה לבחון את הפוטנציאל היישומי של התכונה. כיום, לאחר 3 שנות מחקר, וכפי שהוצג בדו"ח, ניתן לקבוע כי הושגה התקדמות משמעותית בשני הערוצים:

1) הושגה התקדמות משמעותית במיפוי גנטי של התכונה תוך התמקדות באזור הגן העיקרי המבקר את מופע הציפה הכתומה באבטיח. תחילה בוצע מיפוי על כל הגנום שמיקס אותנו בלוקוס בכרומוזום 1, ולאחר מכן ע"י שימוש סימולטני בשתי אסטרטגיות (BSA-Seq and substitution mapping), הצלחנו למקד את המיפוי למקטע גנומי קצר מאד המכיל בתוכו גנים בודדים ובכללם הגן המועמד. בהשוואת הרצף הגנומי המקודד בגן המועמד בין קווי ההורים זוהה פולימורפיזם יחיד הגורם להחלפת חומצת אמינו שמורה ביותר (בהשוואה למיני צמחים נוספים ואף לפטריות וחיידקים) אשר עפ"י מיקומה ברצף החלבון יכול ששינוי בה הוא בעל אפקט על פעילות החלבון או יכולת הקשרותו. לצד השלמת המיפוי לרזולוציה שלמעשה ממקדת אותנו בבטחון גבוה מאד בגן המועמד שבידינו, התוכנית להמשך היא לבסס את האסוציאציה בין הגן המועמד (וה-SNP הספציפי בו) לתכונה, בין השאר ע"י השוואת רצפים של מאות זני אבטיח.

במקביל, בכוונתנו לבחון שיטות להוכחה פונקציונלית של הקשר בין הגן המועמד והאלל שלו בקו NY0016 לבין צבירת בטא-קרופן. תוצאות אלו יהוו את הבסיס להמשך מחקר בסיסי לפענוח המנגנון המולקולרי המבקר את התכונה. על בסיס תפקודו המשוער של הגן המועמד, יש לנו כעת בסיס להניח כי השונות הגנטית שזיהינו תוכל לאפשר גם הגברת תכולת קרוטנואידים באבטיח אדום, תוצאה אשר תרחיב את העניין המדעי.

2) בהיבטים היישומיים של הפרוייקט, ביסוס התשתית הגנטית מאפשרת כעת לנוע ביעילות לעבר יצירת קווים איזוגניים המתפצלים לתכונה ברקעים של פרי צהוב ואדום. כאמור, הכלאות וסלקציה בעזרת סמן גנטי נמצאים בשלבים מתקדמים של פיתוח קווים ברקעים גנטיים שונים אליהם אנו מחדירים את התכונה. כרגע אנו מבצעים פעילות טיפוחית סימולטנית ליצירת זנים כתומים ואדומים המכילים את האלל "הכתום". במידה ותאומת ההנחה כי האלל "הכתום" מגביר את צבירת הקרוטנואידים הכוללת גם באבטיח אדום, אין ספק שערופך זה יהווה כיוון מרכזי בעתיד ויהיה בעל פוטנציאל מסחרי משמעותי.

References

- Bowen, P.E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Diwadkar-Navsariwala, V., 2015. Carotenoids in Human Nutrition. In: Pigments in Fruits and Vegetables. Springer, pp. 31–67.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., Mitchell, S.E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS One 6, 1–10.
- Guo, S., Zhang, J., Sun, H., Salse, J., Lucas, W.J., Zhang, H., Zheng, Y., Mao, L., Ren, Y., Wang, Z., Min, J., Guo, X., Murat, F., Ham, B.-K., Zhang, Z., Gao, S., Huang, M., Xu, Y., Zhong, S., Bombarely, A., Mueller, L.A., Zhao, H., He, H., Zhang, Y., Zhang, Z., Huang, S., Tan, T., Pang, E., Lin, K., Hu, Q., Kuang, H., Ni, P., Wang, B., Liu, J., Kou, Q., Hou, W., Zou, X., Jiang, J., Gong, G., Klee, K., Schoof, H., Huang, Y., Hu, X., Dong, S., Liang, D., Wang, J., Wu, K., Xia, Y., Zhao, X., Zheng, Z., Xing, M., Liang, X., Huang, B., Lv, T., Wang, J., Yin, Y., Yi, H., Li, R., Wu, M., Levi, A., Zhang, X., Giovannoni, J.J., Wang, J., Li, Y., Fei, Z., Xu, Y., 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. Nat Genet 45, 51–58.
- Guo S, Zhao S, Sun H, et al. 2019. Resequencing of 414 cultivated and wild watermelon accessions identifies selection for fruit quality traits. Nature Genetics 51, 1616–1623.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay Y., Ibdah, M., Meir, A., Yosef, E., Zamir, D., Tadmor, Y. (2005). Not just color - Carotenoid degradation as a link between color and aroma in tomato and watermelon fruit. Trends in Food Science and Technology 16, 407-415.
- Tadmor, Y., Hirschberg, J., Lewinsohn, E., 2005. Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. Food Research International 38, 837–841.