

דוח מסכם לתוכנית מחקר 261-0652-09

זיהוי ואפיון לוקוס המבקר העלאת תכולת פיגמנטים בפרי הפלפל

**Identification and characterization of a gene that controls pigment
content in pepper fruit**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף ירקות

אילן פארן המחלקה לחקר ירקות

אסף אהרוני המחלקה למדעי הצמח

Ilan Paran, Department of Vegetable Research, The Volcani Center, ARO

Asaph Aharoni, Department of Plant Science, Weizmann Institute

מרץ 2011

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**

חתימת החוקר

תוכן עניינים

<u>עמוד</u>	<u>נושא</u>
3	תקציר
3	מבוא
4	פרוט עקרי הניסויים
13	דיון
14	פירסומים
15	סכום

תקציר

הצגת הבעיה: בידינו קו פלפל בעל תכולת פיגמנטים גבוהה בפרי היכול לשמש כחומר גנטי לטיפוח זנים עתירים בחומרי טבע בעלי ערך תזונתי גבוה. אולם, הבסיס הגנטי והמולקולרי של תכונה זו אינו ידוע. במיפוי ראשוני זיהינו 2 לוקוסים (QTL) המבקרים את התכונה. מטרת המחקר: אשרור התוצאות הראשוניות של זיהוי ה-QTL, יצירת קוים איזוגנים ל-QTL המבקרים את התכונה, מיפוי ברזולוציה גבוהה של ה-QTL, איפיון היסטולוגי ומטבולומי של פרי בעל תכולת פיגמנטים גבוהה, זיהוי שונות נוספת של צמחי פלפל בתכולת הפיגמנטים. תוצאות עיקריות: תוצאות המיפוי הראשוני אושרו בדורות מתקדמים וניבנו קוים איזוגנים ל-QTL המרכזי. איפיון היסטולוגי של הקוים האיזוגנים מראה שקוים בעלי תכולת פיגמנטים גבוהה יותר מאופיינים בפלסטידות גדולות ורבות יותר. איפיון מטבולי של הקוים הראה שבשלב של פרי ירוק יש מתאם גבוה בין נוכחות האללים ב-QTL שמקורם בהורה בעל הפרי הכהה לבין תכולת הפיגמנטים. מתאם זה פחות מובהק בשלב הפרי האדום. מוטנטים נוספים בצבע הפרי בודדו. מסקנות והמלצות: יש צורך בבדיקת מובהקות ה-QTL ברקעים גנטיים נוספים. כמו כן הקוים האיזוגנים שפותחו ישמשו להמשך המחקר למיפוי ברזולוציה גבוהה ואיפיון דגם הביטוי של הגנום בקוים נבדלים ל-QTL. אנליזות אלו יאפשרו זיהוי הגן המבקר את התכונה.

מבוא

לאחרונה זוהה במעבדתנו קו פלפל (הקרוי 1154) מהמין התרבותי *Capsicum annuum* אך המרוחק גנטית מהטיפוס הבלוקי המקובל, והוא מאופיין בתכולת פיגמנטים גבוהה המתבטאת בפרי ירוק כהה בשלב הבלתי בשל ופרי אדום חזק בשלב הבשל. הקו מכיל פי 10 יותר תכולת כלורופיל בפרי מאשר פרי של "מאור" (קו פלפל עם פרי בלוקי טיפוס) ויותר מפי חמש תכולת קרוטנואידים ותכולת ויטמין E בפרי בשל לעומת "מאור". על מנת ללמוד את הבקרה הגנטית של התכונה ולבצע מיפוי ראשוני של הגנים המבקרים אותה, יצרנו אוכלוסיה מתפצלת מדור F2 מהכלאה בין 1154 להורה בעל פרי ירוק בהיר (איור 1). תכולת כלורופיל בפרי ירוק מלא התפצלה כתכונה כמותית. מיפוי הגנום ע"י סמנים מולקולרים איפשר לזהות 2 לוקוסים (quantitative trait locus, QTL) המבקרים את התכונה. ה-QTL העיקרי (*hp8.1*) המסביר 51% מהשונות הפנוטיפית לתכונה מופה בכרומוזום 8. כמו כן QTL זה היה מובהק גם לתכונת כלל קרוטנואידים בפרי הבשל אולם ברמת מובהקות נמוכה יותר. QTL משני המסביר 13% מהשונות הפנוטיפית לתכונה של תכולת כלורופיל מופה בכרומוזום 10 (איור 2, טבלה 1). המטרה ארוכת הטווח של המחקר היא לנצל את החומר הגנטי, הידע על בקרת התכונה והכלים המולקולרים המפותחים במסגרת תוכנית מחקר זו ליצור זני פלפל בעלי תכולת פיגמנטים גבוהה וערך תזונתי משופר.

מטרות המחקר היו: 1. אשרור התוצאות הראשוניות של זיהוי ה QTL. 2. יצירת קוים איזוגנים ל QTL המבקרים את התכונה. 3. מיפוי ברזולוציה גבוהה של ה QTL. 4. איפיון היסטולוגי ומטבולומי של פרי בעל תכולת פיגמנטים גבוהה. 5. זיהוי שונות נוספת של צמחי פלפל בתכולת הפיגמנטים.

פרוט עקרי הניסויים

פירות של הורי אוכלוסית המיפוי מוצגים באיור 1. ההבדל הפנוטיפי בין ההורים ניכר במיוחד בשלב פרי ירוק (לא בשל). ההבדלים הדרמטיים בין ההורים בתכולת הכלורופיל מוצגים בטבלה 1. פרי ה F1 בעל ערך ביניים של שני ההורים.

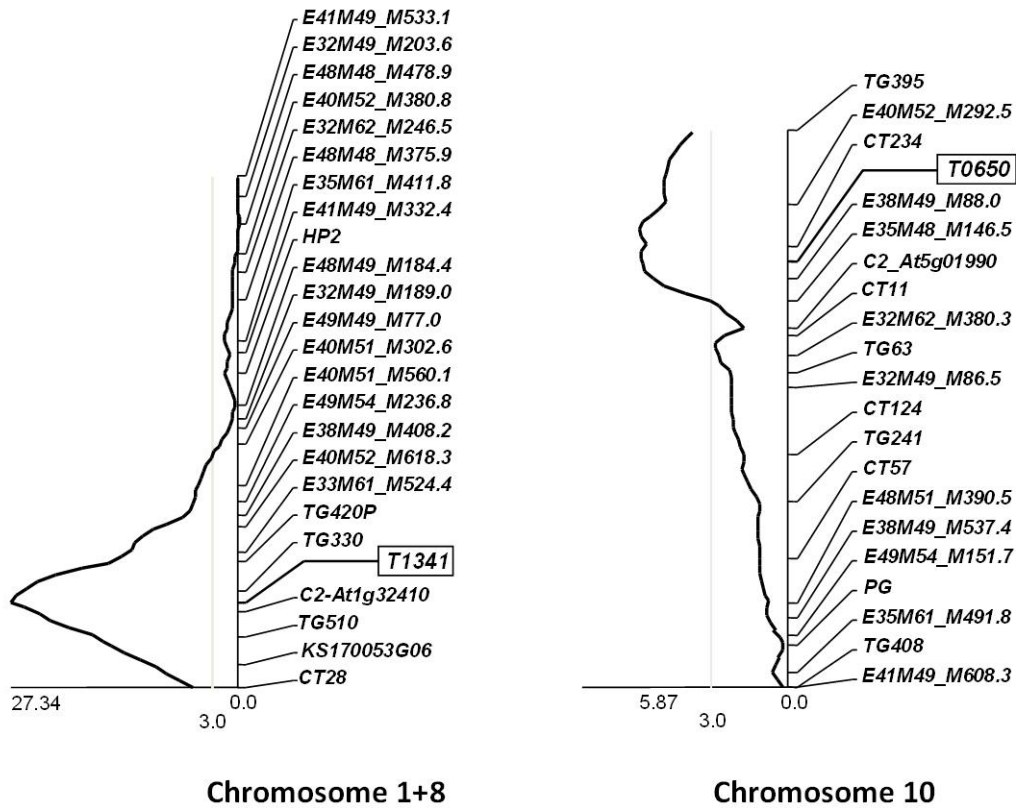


איור 1. שני קווי ההורים המשמשים ליצירת אוכלוסיית מיפוי שבה מתפצלת תכונת עוצמת הצבע בפרי. ניתן לראות את ההבדל הברור בעוצמת הצבע בין שני הקוים.

טבלה 1. תכולת כלורופיל בהורים, F1, ו F2 של אוכלוסית המיפוי.

Trait	'1154'	'PI 152225'	F ₁	F ₂	F ₂ Min	F ₂ Max
Chlorophyll content (µg/gFW)	62.7±4.0	2.2±0.2	36.3±2.3	19.4±0.9	1.3	45.4

אוכלוסית F2 שימשה למיפוי סמנים מולקולרים וזיהוי QTL 2 המבקרים את התכונה (איור 2, טבלה 2).



איור 2. QTLs לתכולת כלורופיל באוכלוסית F2 בין 1154 ל PI 152225.

טבלה 2. נתוני QTL לתכולת כלורופיל בדור F2.

QTL	Marker	Means			R ² (%)	LOD
		AA	AC	CC		
<i>pc8.1</i>	T1341	29.9±1.4	22.8±0.8	7.4±1.1	54	27.6
<i>pc10.1</i>	T0650	23.7±1.5	20.5±1.2	11.8±1.7	15	5.7

AA-הומוזיגוט לאלל של 1154, AC-הטרזיגוט, CC-הומוזיגוט לאלל של PI 152225.

כדי לאשרר את המיפוי הראשוני שנערך בדור F2, יצרנו אוכלוסיית BC2F2 המתפצלת לשני האזורים הגנומים בכרומוזום 8 ו 10 המכילים את ה QTL שנמצאו במיפוי הראשוני. בדיקת שני הסמנים שנמצאו אחוזים ל QTL אלו הראתה מובהקות שלהם גם בדור

המתקדם (טבלה 3). כמו כן בדור זה בנוסף לתכולת כלורופיל נבדקה תכולת קרוטנואידים. נמצא שה QTL *pc8.1* מובהק עבור תכולת כלורופיל ותכולת קרוטנואידים ואילו *pc10.1* מובהק רק עבור תכולת כלורופיל.

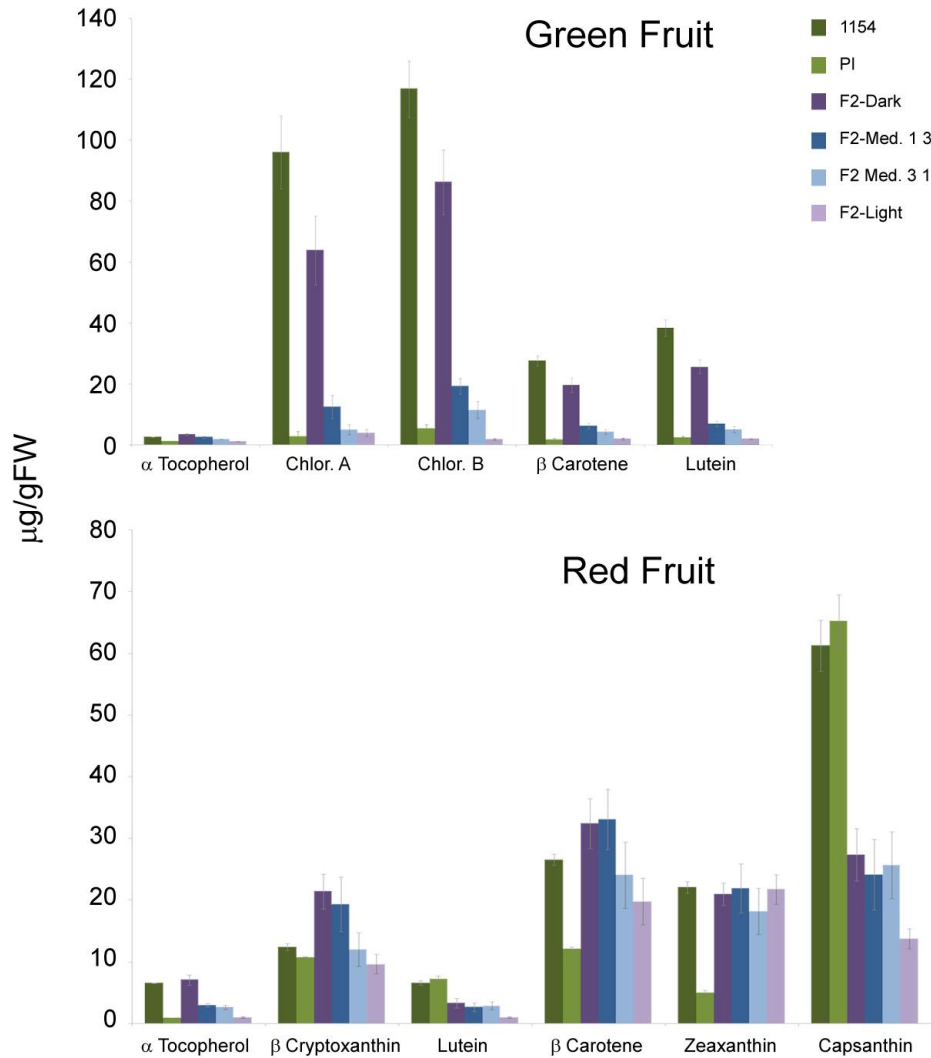
טבלה 3. QTL לתכולת כלורופיל וקרוטנואידים באוכלוסיית BC2F2.

Trait	QTL	Marker	Means			<i>p</i>	R ² (%)
			AA	AC	CC		
Chlorophylls content (µg/gFW)	<i>pc8.1</i>	T1341	40.9±1.7	26.9±1.2	5.9±1.7	<.0001	60
	<i>pc10.1</i>	T0650	33.2±2.6	25.3±1.8	14.1±2.6	<.0001	17
Carotenoids content (µg/gFW)	<i>pc8.1</i>	T1341	2763±111	2324±76	2017±103	<.0001	16
	<i>pc10.1</i>	T0650	2146±119	2405±81	2352±117	N.S.	-

AA-הומוזיגוט לאלל של 1154, AC-הטרזיגוט, CC-הומוזיגוט לאלל של 152225.PI. N.S - לא מובהק.

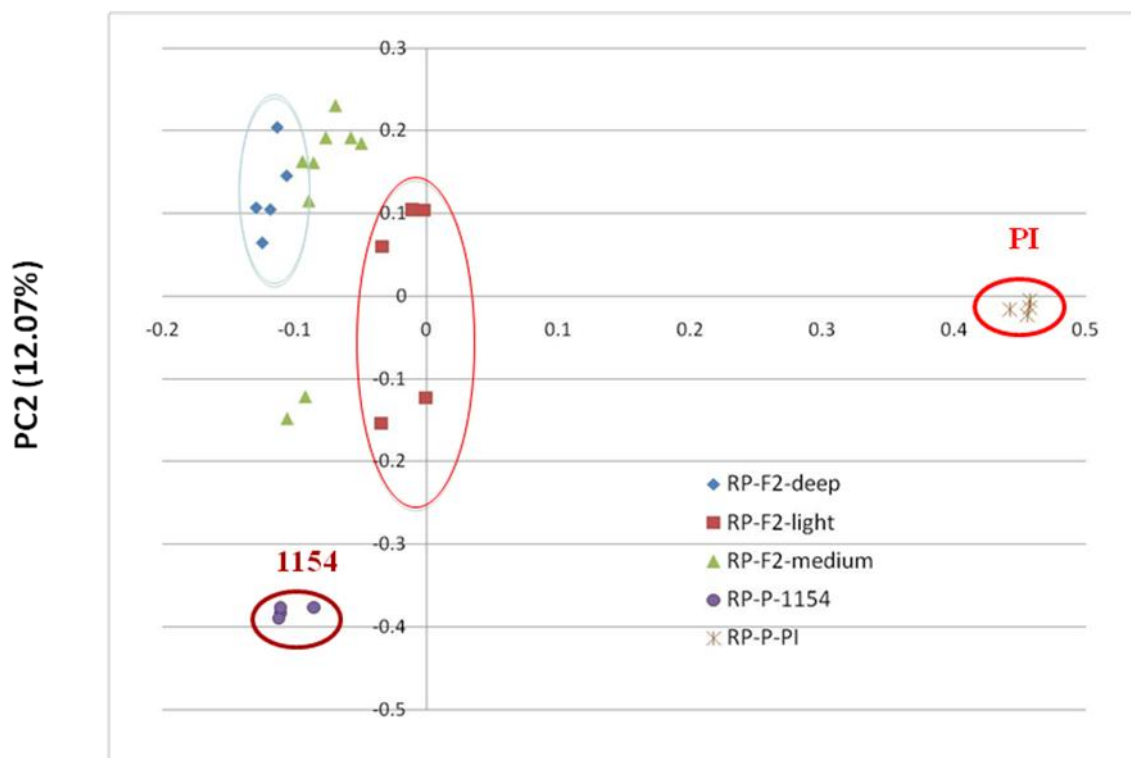
נעשה איפיון מטבולי ב HPLC לפירות ירוקים ואדומים של קוי ההורים 1154 ו-152225.PI וגנוטיפים שונים מאוכלוסיית ה-BC2F2. גנוטיפים אלו נלקחו מתוך מטרה לצמצם את ההבדלים הנובעים מן הרקע הגנטי של שני ההורים והם נקבעו על-סמך הסמנים הנמצאים בתאחיזה לשני הלוקוסים *hp8.1* ו-*hp10.1*, לצורך כך לקחנו 4 טיפוסים גנוטיפים באופן הבא: א. צמחים בהם הסמנים בשני הלוקוסים במצב הומוזיגוטי לאללים של 1154 ("F₂-Dark"), ב. צמחים בהם הסמנים בשני הלוקוסים במצב הומוזיגוטי לאללים של PI ("F₂-Light") ושני מצבי הביניים בהם האלל בלוקוס *hp8.1* הומוזיגוטי ל-1154 והאלל בלוקוס *hp10.1* הומוזיגוטי ל-PI ("F₂-Med.1.3") והמצב הפוך ("F₂-Med.3.1") (איור 3). התוצאות בפירות הירוקים הראו עליה ברמת ריכוזי כל החומרים הנבדקים (α -Tocopherol, β -Carotene ו-Lutein), בקו 1154 ביחס ל-PI ובגנוטיפים המכילים את האללים מהקו 1154 בשני הלוקוסים. צמחי F₂-Dark הראו ריכוז חומרים קרוב מאוד להורה 1154. במגמה דומה F₂-Med.1.3 הראה ריכוזים גבוהים מעט יותר מ-F₂-Med.3.1.

בפירות האדומים לא נראתה מגמה ברורה. במקרים מסוימים (ב-Zeaxanthin וב-Capsanthin) סתר ההבדל שבין ההורים את המגמה בגנוטיפים מאוכלוסית הצאצאים, ובאחרים נשמרה המגמה שנראתה בפירות הירוקים.



איור 3 . אנליזת HPLC של קרוטנואידים, כלורופיל ואלפא טוקופרול (ויטמין E) על פירות ירוקים ואדומים של קווי ההורים (1154 ו-PI), ו-4 גנוטיפים מאוכלוסית ה-BC2F₂.

אותם גנוטיפים מאוכלוסית BC2F₂ נדגמו גם לאיפיון מטבולי באמצעות אנליזת LCMS (איור 4, טבלה 4). אנליזת principle component analysis (PCA) איפשרה לזהות מטבוליטים המבדילים בין הגנוטיפים השונים. כעת אנו עובדים לזהות את המטבוליטים הדיפרנציאליים.



איור 4. אנליזת principle component analysis (PCA) של מטבוליטים בשיטת LCMS בפרי אדום בגנוטיפים שונים באוכלוסית BC2F2.

טבלה 4. סכום סיגנלים מטבוליים בשיטת LCMS בגנוטיפים שונים באוכלוסית BC2F2.¹ מספר סיגנלים נבדלים (FDR<0.005) בין ההורים 1154 ו PI 152225.² מספר סיגנלים נבדלים (FDR<0.005) בין קוים F2-dark ל F2-light.³ מספר סיגנלים נבדלים (FDR<0.005) בין ההורים 1154 ו PI 152225 וגם בין הקוים F2-dark ל F2-light.

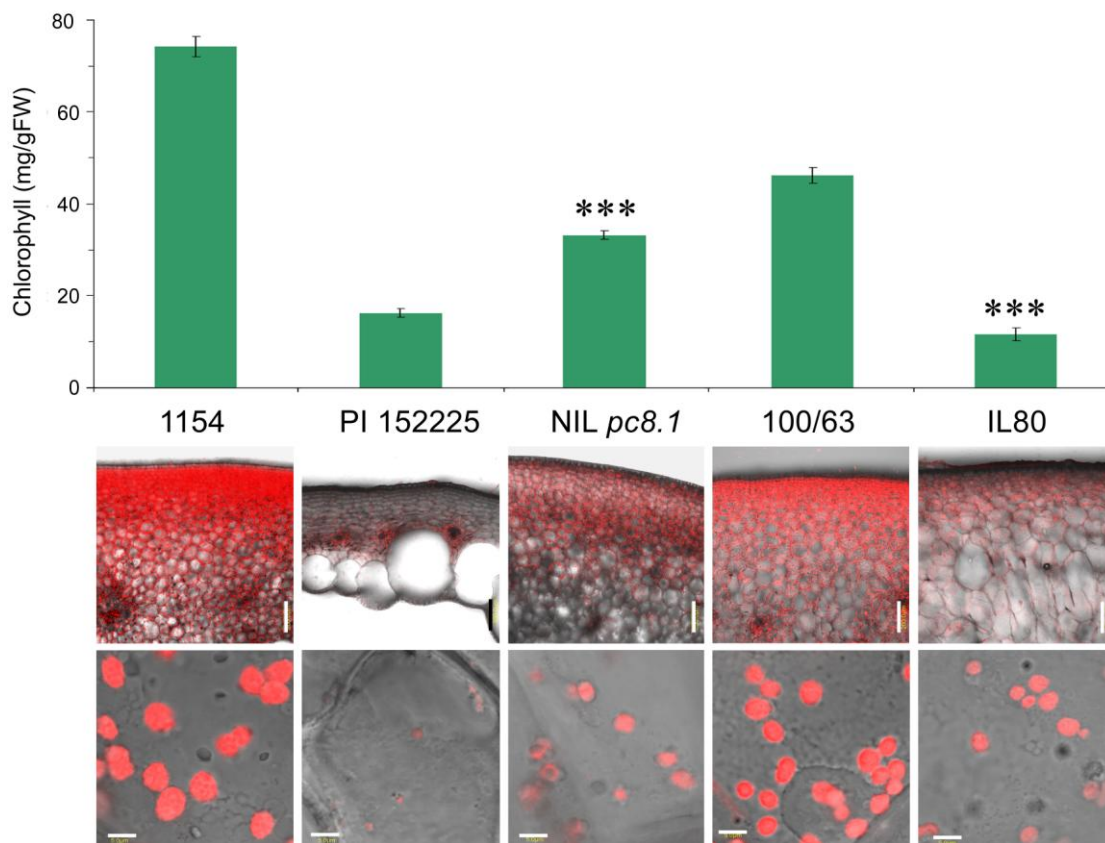
Negative mode	Positive mode	
23268 ¹ ; 13030 ² ; 2644 ³	16796 ¹ ; 11902 ² ; 3433 ³	פרי ירוק
28158 ¹ ; 15321 ² ; 969 ³	24211 ¹ ; 12949 ² ; 2751 ³	פרי אדום

כדי לאפיין את ה QTL המרכזי בכרומוזום 8 יצרנו קוים איזוגנים ל QTL זה ברקעים גנטיים שונים (איור 5). הקו IL-80 הוא איזוגני לקו 100/63 ומכיל מחדר מההורה בעל הפרי הבהיר (PI 152225) ברקע של הקו 100/63 באזור ה QTL. בנוסף יצרנו ע"י הכלאות דחיקה להורה 1154 קו איזוגני לו הנבדל בצבע הפרי הירוק.

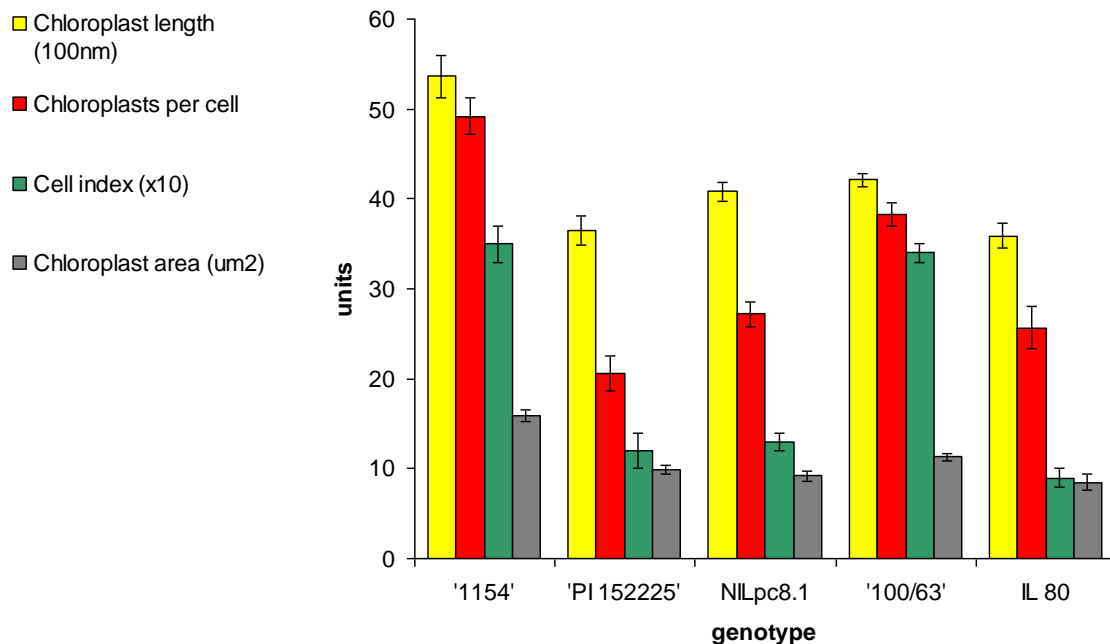


איור 5. קוים איזוגנים לQTL pc8.1. קו לבן בתמונה מימין מסמל 5 ס"מ.

חתכי פרי של הקוים האיזוגנים וקוי ההורים נבדקו במיקרוסקופ קונפוקלי למספר וגודל פלסטידות ורמת פלורסנציה של הכלורופיל (איור 6, איור 7). ההבדל בתכולת הכלורופיל בין הקוים נמצא באסוציאציה עם הבדלים במספר ושטח הפלסטידות ובאינדס תאי (יחס בין שטח פלסטידות לשטח התא), כלומר בקוים בהירי הפרי יש פחות פלסטידות והן קטנות יותר מאשר בקוים בעלי הפרי הכהה (איור 7).

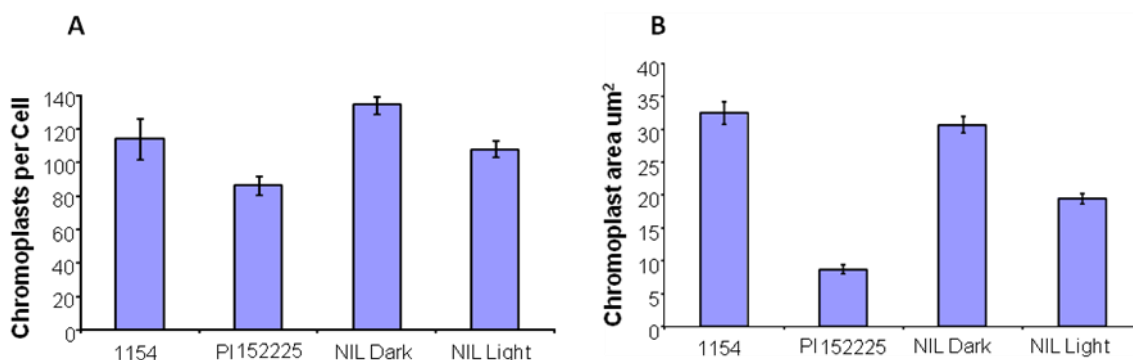


איור 6: כלורופלסטידות בקווים בעלי תכולת כלורופיל שונה. בחלק העליון: השוואת כמות הכלורופיל בפרי ירוק בכל קו. בחלק התחתון תצפית בכלורופלסטידות במיקרוסקופ קונפוקלי (מופיעות כגופים אדומים). לכל גנוטיפ שתי עמדות תצפית: בשורה העליונה - חתך דופן הפרי (קנה המידה מציין 200 μm); בשורה התחתונה - מבט ממוקד על מספר פלסטידות בתא בודד (קנה המידה מציין 5 μm). עוצמת האוטופלורסנציה של האברונים ניתנת להשוואה כיוון שכל הצילומים בוצעו בעוצמת צמצם זהה. *** - הבדל מובהק ($p < 0.0001$) בתכולת כלורופיל בין ההורים (1154, 100/63) והאיזוגנים שלהם (NIL *pc8.1*, IL80).

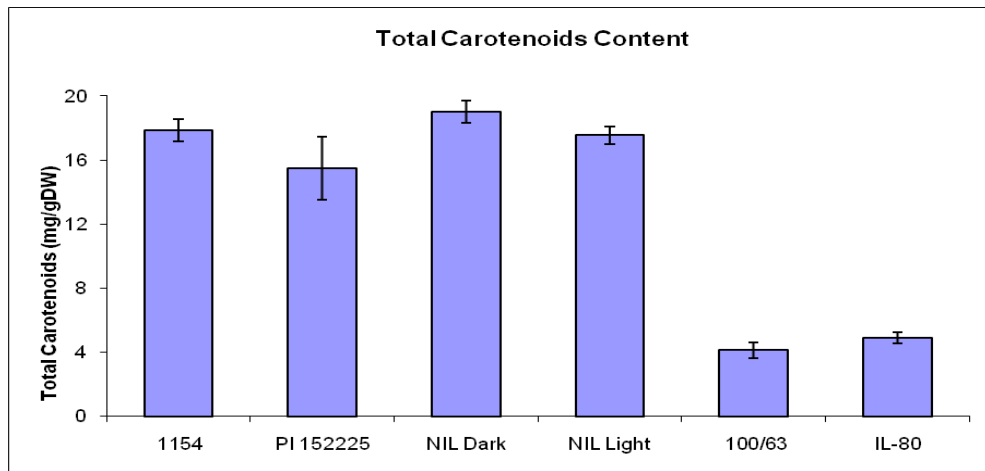


איור 7. מדידת מספר ושטח פלסטידות בפירות של הורים וקיום איזוגנים.

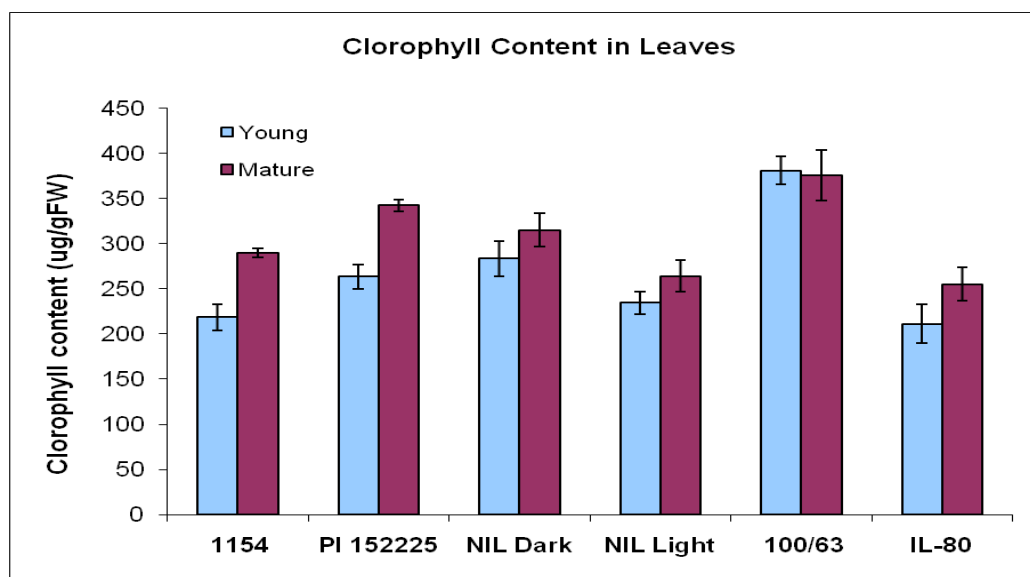
מגמה דומה של ירידה במספר ובגודל של הכרומופלסטים נצפתה גם בפרי האדום בשל (איור 8). לעומת זאת במדידה של כלל תכולת קרוטנואידים בפרי הבשל היתה מגמה של ירידה בתכולת הקרוטנואידים בין ההורים והקיום האיזוגנים, אך ההבדלים לא היו מובהקים (איור 9). תוצאות אלו מחזקות את המסקנה שהשפעה של ה QTL $pc8.1$ מוגבלת בעיקר לשלב של הפרי הירוק. כמו כן האפקט של ה QTL על תכולת הכלורופיל הוא בעיקר בפרי ואילו בעלים ההבדלים בין ההורים והאיזוגנים אינם נשמרים באופן אחיד (איור 10).



איור 8. מספר כרומופלסטים בתא (A) ושטח כרומופלסטים (B) בפרי בשל של ההורים והקיום האיזוגנים. המדידות נעשו במיקרוסקופ אור.



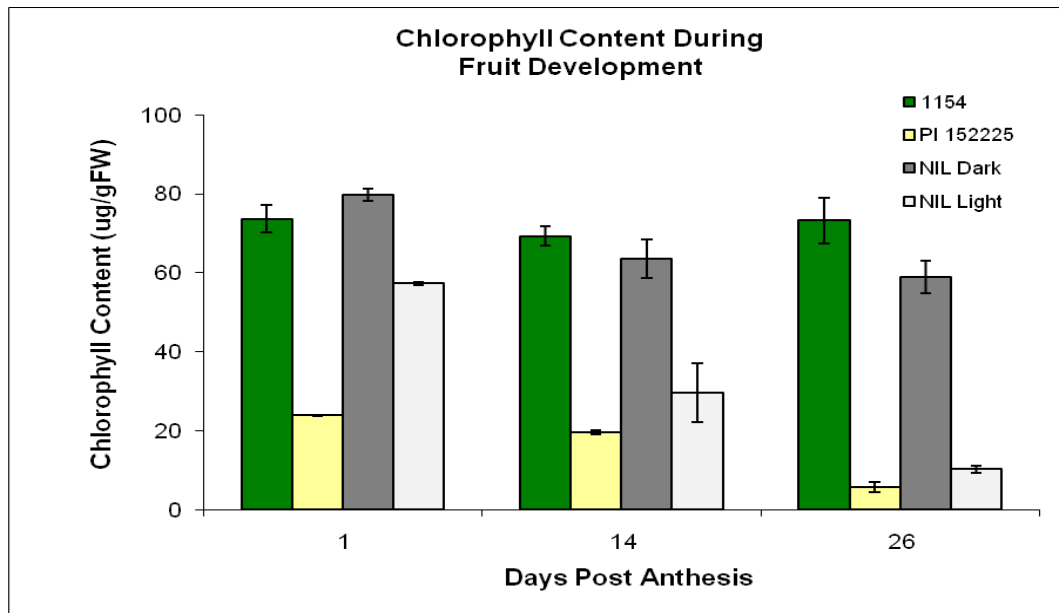
איור 9. תכולת כלל קרוטנואידים בין ההורים והקוים האיזוגנים.



איור 10. תכולת כלורופיל בהורים ובאיזוגנים בעלים צעירים ומפותחים.

האפקט של ה-QTL $pc8.1$ על תכולת כלורופיל בפרי ניכר כבר בשחלות בעת החנטה, אולם האפקט מעצים עם התפתחות הפרי (איור 11).

במטרה לזהות קוים נוספים בעלי שונות בצבע הפרי, נסרקה אוכלוסית מוטנטים EMS של צמחי הזן מאור בעל פרי בלוקי טיפוסי, זיהינו 2 משפחות בעלי פרי ירוק בהיר (E-09-86; E-09-410). דוגמא לפרי מאחת המשפחות מוצג באיור 12. בצענו הכלאות עם הקוים האיזוגנים ל-QTL במטרה לבדוק אלליות של הגנים שמופו. תוצאות מבחני האלליות הראו שהמוטנטים החדשים אינם מבוקרים ע"י ה-QTL $pc8.1$.



איור 11. תכולת כלורופיל בשלבי התפתחות שונים של הפרי.



איור 12. הזן מאור (מימין) בעל פרי בלוקי עם צבע ירוק נורמלי. המוטנט האיזוגני E-09-86 (משמאל) בעל פרי ירוק בהיר ועלווה בצבע נורמלי.

דין

המיפוי הראשוני של QTL לתכולת הפיגמנטים אושרר בדורות נוספים. פיתחנו מספר קוים איזוגנים בלתי תלויים ברקעים שונים המאפשרים לאפיין את הגנים העקריים המבקרים את רמת הפיגמנטציה בפרי. המדידות המיקרוסקופיות מראות הבדלים בפרמטרים שונים של

הכלורופלסטים בהתאמה לצבע הפרי בשלב הירוק, דבר שיכול להוות בסיס להבדל בעוצמת הצבע. האיפיון המטבולי של רמת הפיגמנטים בשלב הפרי הירוק היה בהתאמה לנוכחות האללים המעלים בשני ה-QTL שמקורם מההורה הירוק כהה, כלומר צמחים הומוזיגוטים לאללים של 1154 היו בעלי תכולת פיגמנטים גבוהה יותר מאשר צמחים הומוזיגוטים לאללים של ההורה עם הפרי הבהיר. התאמה זאת לא התקיימה בשלב הפרי האדום. אי לכך ניתן לברור צמחים על סמך המידע הגנוטיפי של ה-QTL בשלב הפרי הירוק, אולם אין זה אומר בהכרח שצמחים אלו יהיו בעלי תכולת פיגמנטים גבוהה גם בשלב הפרי הבשל. האפקט של תכולת פיגמנטים גבוהה נמצא בעיקר בפרי ואילו בעלים הוא פחות מובהק. ההבדל בתכולת הפיגמנטים קיים כבר בשלב החנטה של הפרי אולם הוא מעצים עם התפתחות הפרי. מדידות של כרומופולסטים בפרי אדום של הקיום האיזוגנים הראו הבדל מובהק בכמות וגודל הכרומופולסטים בין הקיום האיזוגנים, זאת לעומת חוסר הבדל מובהק בתכולת הקרטונואידים בין הקיום. הוזמנו ציפים (מיקרו אריי) של פלפל במטרה לאפיין את דגם ביטוי הגנים בין הקיום האיזוגנים בשלבי התפתחות שונים. ניסוי זה יערך במהלך 2011 ויאשר לאפיין את המסלולים המטבולים והגנים הנמצאים באסוציאציה עם תכולת הפיגמנטים. זיהוי מוטנטים נוספים לרמת הצבע עשויה לזהות לוקוסים נוספים בגנום המבקרים תכונה זו. בנוסף יצרנו אוכלוסית F2 גדולה (בשלב ראשון של 1000 צמחים) בין הקיום האיזוגנים למיפוי ה-QTL ברזולוציה גבוהה כבסיס לשיבוט הגן.

פרסומים:

Brand, A., Borovsky, Y., Meir, S., Rogachev, I., Aharoni, A., Paran, I. 2010. Variation in pigment content in pepper fruit is associated with plastid compartment size. Abstract of presentation in Solanaceae Genome Workshop 2010, Dandee Scotland.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
אשרור התוצאות הראשוניות של זיהוי ה QTL, יצירת קוים איזוגנים ל QTL המבקרים את התכונה, מיפוי ברזולוציה גבוהה של ה QTL, איפיון היסטולוגי ומטבולומי של פרי בעל תכולת פיגמנטים גבוהה, זיהוי שונות נוספת של צמחי פלפל בתכולת הפיגמנטים.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
תוצאות המיפוי הראשוני אושרו בדורות מתקדמים וניבנו קוים איזוגנים ל QTL המרכזי. איפיון היסטולוגי של הקוים האיזוגנים מראה שקוים בעלי תכולת פיגמנטים גבוהה יותר מאופיינים בפלסטידות גדולות ורבות יותר. איפיון מטבולי של הקוים הראה שבשלב של פרי ירוק יש מתאם גבוה בין נוכחות האללים ב QTL שמקורם בהורה בעל הפרי הכהה לבין תכולת הפיגמנטים. מתאם זה פחות מובהק בשלב הפרי האדום. מוטנטים נוספים בצבע הפרי בודדו.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
יש צורך בבדיקת מובהקות ה QTL ברקעים גנטיים נוספים. כמו כן הקוים האיזוגנים שפותחו ישמשו להמשך המחקר למיפוי ברזולוציה גבוהה ואיפיון דגם הביטוי של הגנום בקוים נבדלים ל QTL. אנליזות אלו יאפשרו זיהוי הגן המבקר את התכונה.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
מטרות המחקר יושגו במלואם עד תום 2011. המחקר מתנהל לפי התוכנית המקורית.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
תוצאות המחקר פורסמו עד כה בכנס מדעי, Solanaceae Genome Workshop 2010 Dandee, Scotland
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
←
← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
←