

דו"ח מדעי מסכם לתוכנית מחקר מס' 10-0655-261

גנטיקה של תכולה גבוהה של קרוטנואידים במלון (high pigment)

Genetic study of high pigments of melon flesh.

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

יוסף בורגר, המחלקה לירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
אפרים לוינסון, המחלקה לירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
עוזי סער, המחלקה לירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
נורית קציר, המחלקה לירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער
ארתור שפר, המחלקה לירקות, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
יעקב תדמור, המחלקה לירקות, מינהל המחקר החקלאי, נווה יער

Yosef Burger, Department of Vegetable, Newe Ya'ar. E-mail: burgery@agri.gov.il

Efraim Lewinsohn, Department of Vegetable, Newe Ya'ar. E-mail: tavlinim@gmail.com

Uzi Sa'ar, Department of Vegetable, Newe Ya'ar

Nurit Katzir, Department of Vegetable, Newe Ya'ar. E-mail: katzirn@agri.gov.il

Ari Schaffer, Department of Vegetable, Volcani Center, Bet Dagan, mail: vcaris@agri.gov.il

Yaakov Tadmor, Department of Vegetable, Newe Ya'ar, E-mail: tadmory@agri.gov.il

מרץ 2011

אדר ב תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים-פן/לא מחק את המיותר

* חתימת החוקר

תקציר

הקרוטנואיד העיקרי בציפת פרי מלונים הוא β carotene שהופך לויטמין A בגופנו. לכן, לזני מלון בעלי ציפה כתומה יש ערך בריאותי נוסף. מטרת המחקר הן לאפיין זני מלון בעלי תכולה גבוהה במיוחד של β carotene וללמוד על אופן הבקרה הגנטית של צבירתו, כלומר לאתר את הגן הקובע אם הציפה תצבור β carotene, ואת הגן או הגנים הקובעים צבירה מוגברת של ביתא קרוטן. בשנה הראשונה איתרנו קבוצה של זנים המוגדרת כטיפוס Majenta, על שם הזן הראשון ששחרר המכיל תכולה מוגברת של ביתא קרוטן, שבה מצאנו תכולה גבוהה במיוחד של β carotene, פי שניים מאשר בזנים הנפוצים מטיפוס שרנטי וקנתלופ אמיריקאי. נמצא שלעונת הגידול יש חשיבות רבה לצבירה של β carotene בציפת הפרי, בגידול בשדה בעונת הקיץ התקבלה רמה גבוהה יותר מאשר בגידול בחממה בעונת החורף אולם טיפוס שצובר ביתר בעונה אחת יהיה צובר ביתר גם בעונה אחרת. ניתן לאפיין את הקבוצות השונות של המלונים לכאלה שאינם צוברים β carotene, כאלה הצוברים מעט, כאלה הצוברים רמה רגילה המאפיינת את הזנים מקבוצת שרנטי וקנתלופ אמיריקאי, וכאלה הצוברים רמה גבוהה במיוחד שאותם איתרנו בעבודה זו. כדי ללמוד על הבקרה הגנטית של תכונה זו יצרנו במהלך השנה חמש אוכלוסיות מתפצלות שמקורן מהכלאה בין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד לבין זנים שאינם צוברים כלל וזנים הצוברים רמות נמוכות יותר. באוכלוסיית המחקר שבה תכולת ביתא קרוטן מבוקרת פוליגנית מיפנו מספר QTL המשפיעים על תכולה גבוהה יותר של β carotene. בשנה השנייה זיהינו את הגן הקובע את צבירת ה- β carotene בפרי המלון. באמצעות אוכלוסיה מתפצלת שבה התכונה לצבע פרי כתום מבוקרת ע"י גן אחד ובחיפוש גנים מועמדים לתכונה זו, זיהינו התאמה מלאה בין צבע ציפה כתום לבין הגן OR שזוהה לראשונה בכרובית. גן זה מעורב ביצירת כרומו פלסטידות ההכרחיים לצבירה של β carotene. נמצאו חמישה SNP ב-C-DNA של ה-OR שנבדלו בין שני ההורים המרכיבים אוכלוסיה זו. בסריקה של אחד מה-SNP על DNA שהופק מצמחי F2 של משפחות שבדור F3 לא התפצלו לתכונה (הומוזיגוטים כתומים וירוקים), נמצאה התאמה מלאה לתכונה. בסקירה של חמשת ה-SNP על גנוטיפים ממקורות שונים הנבדלים ביניהם בצבע הציפה, נמצאה התאמה לצבע הציפה ב-49 זנים מתוך 52. תוצאה מצביעה על האפשרות שיש גן או גנים נוספים המעורבים בבקרה על יצירת β carotene בציפת פרי המלון. במהלך השנה השנייה הכנו אוכלוסיות F2 ו-backcross מההכלאות שבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד לבין זנים הצוברים רמות שונות. במהלך הכנת דור ה-F2 באוכלוסיות השונות השווינו את רמת ה- β carotene בדור F1 לבין קווי ההורים. בכל המקרים הרמה ב-F1 הייתה נמוכה באופן משמעותי מההורה עם התכולה הגבוהה, תוצאה המצביעה על כך שהתכונה לרמה גבוהה במיוחד של β carotene היא תכונה רצסיבית. במהלך השנה השלישית למדנו על אופן הבקרה של ההורשה לרמה גבוהה במיוחד של β carotene בארבע אוכלוסיות F2 ו-BC שגידלנו בעונת קיץ 2010. במעקב אחר הפנוטיפ (כפי שנראה בעין) מצאנו שיש גן אחד OR, שאותו אפיינו בשנה השנייה הקובע עם הפרי יצבור β carotene ועוד שני גנים המבקרים את רמתו. האחד גן דומיננטי הקובע רמה נמוכה של β carotene והשני גן רצסיבי הקובע רמה גבוהה של β carotene. בגידול שתי אוכלוסיות בעונת החורף בגידול חממה לצורך דגימה ל- β carotene ויצירת F3, קיבלנו להפתעתנו פירות עם ציפה ירוקה באחד מזני ההורים שהיה אמור להיות עם ציפה כתומה רגילה. בדיקת תצורת הגן OR הקובע אם הפרי יהיה כתום מצאנו שכל הפרטים בזן זה היו עם תצורה לקבלת ציפה כתומה. מכאן שלתנאי הסביבה יש כנראה השפעה קריטית עם על ביטוי גן זה או גנים אחרים ממסלול סנתיזת ה- β carotene. תוצאה זו פתחה לנו פתח למחקר נוסף של השפעת תנאי סביבה על ביטוי הגנים המעורבים בהצטברות β carotene בציפת פרי המלון.

מבוא

בשנים האחרונות, הולכת וגוברת המודעות לאכילת פירות וירקות כמקור לחומרים המגנים על הגוף מפני מחלות. פירות וירקות ידועים כמקור לויטמינים ונוגדי חימצון הנחשבים חיוניים להגנה ולריפוי של מחלות כגון סרטן, מחלות לב, סוכרת, מחלות עיניים, לחץ דם גבוה וכו'.

הקרוטנואיד העיקרי בזני המלון הכתומים הוא β carotene שהופך לויטמין A בגופנו. לפיכך, לזני מלון בעלי ציפה כתומה יש ערך בריאותי נוסף בזכות תכולת הקרוטנואידים הגבוהה מבזנים בעלי ציפה ירוקה או לבנה. בנוסף, מצאנו שלפליגמטים השונים יש חשיבות בקביעת הארומה של הפרי, מאחר והקרוטנואידים מהווים חומרי מוצא למרכיבי ארומה חשובים. למשל בפירות מלון הצוברים β carotene נמצא β ionone הנעדר בזנים בעלי ציפה שאינה כתומה. יש לציין שקיימת שונות רבה הן בהרכב והן בכמות הקרוטנואידים בתוך הזנים הכתומים. בסקר של כ-200 זנים שערכנו בנווה יער, מצאנו שונות גבוהה בתכולת הקרוטנואידים בין הזנים כאשר בשנתיים האחרונות זיהינו זנים עם ציפה כתומה במיוחד בעלת גוון הקרוב לאדום.

הבדלים בסינתיזת ה- β carotene קיימים בשני מישורים: 1. ההבדלים הגנטיים הקיימים בין זנים המסנתזים β carotene בציפת הפרי לבין אלה שאינם מסנתזים ונשארים ירוק או קרם; 2. ההבדלים בין זנים המסנתזים רמה נמוכה של β carotene והם בעלי ציפה כתומה בהירה, לבין אלו המייצרים רמה גבוהה והם בעלי ציפה בצבע כתום-עז וכאמור לאחרונה זיהינו זני מלונים עם ציפה כתומה בגוון הקרוב לאדום. המרכיב הגנטי הוא ראשון בחשיבותו בקביעת צבירת ה- β carotene.

בשנים קודמות למדנו את התורשה של התכונה לקבלת ציפה כתומה לעומת ירוקה, ע"י אוכלוסיות מתפצלות בין הטיפוסים הקיצוניים הראה שהתכונה נשלטת ע"י גן אחד מרכזי. לעומת זאת התכונה לקבלת רמה גבוהה של β carotene באוכלוסייה שהתקבלה מהכלאה בין זן האוגר מעט קרוטן (כתום חוור, פחות מ-10 PPM) לבין זן האוגר רמה גבוהה יותר של קרוטן (40 PPM), מבוקרת ע"י מספר גנים, דבר המרמז על תורשה כמותית האחראית על כמות הקרוטן (תוצאות מתוכנית מדען קודמת).

מטרות העבודה בשנה א הייתה לאפיין את התכונה של צבירת רמה גבוהה במיוחד של β carotene, להכין אוכלוסיות מתאימות ללימוד גנטי של תכונה זו. כמו כן להתחיל עבודה של איתור הגן המבקר את הצטברות ה- β carotene באוכלוסייה שבה התכונה מבוקרת ע"י גן אחד ולאיתור סמני QTL באוכלוסייה שבה התכונה היא מבוקרת ע"י מספר גנים (תכונה כמותית).

מטרות העבודה בשנה ב הייתה לזהות את הגן המבקר צבירה של β carotene בפרי המלון. מטרה נוספת הייתה להכין אוכלוסיות F2 ו-BC בין הזן האוגר רמה גבוהה במיוחד לבין זנים שאינם אוגרים וזנים האוגרים רמות נמוכות יותר של β carotene.

מטרות העבודה בשנה ג היו ללמוד על הבקרה הגנטית של תכולה גבוהה של β carotene בציפת הפרי ע"י אוכלוסיות מתפצלות.

עיקרי הניסויים

שנה א

באביב 2008 (אפריל) נשתלו בשדה בנווה יער 22 זני מלונים השונים בצבע הציפה. בשלב הבשלת הפירות נדגמה ציפה מחמש פירות בשלים מכל זן לבדיקה של תכולת והרכב הקרוטנואידים. בהמשך, בסתיו 2008 (שתילה ב-20.8),

גידלנו בחממה בהדליה 15 זנים הנבדלים ביניהם בצבע הציפה כאשר מתשעה זנים דגמנו ציפה של פירות בשלב צעיר (20 יום מהפריה) ובשלב בשל (בהתאמה לזן), ומשש הזנים הנוספים דגמנו מציפת הפרי בזמן ההבשלה. תכולת הקרוטנואידים נקבעה באמצעות ספקטופוטומטר ובפירות של זנים נבחרים באמצעות HPLC.

כדי להתחיל בעבודה לאיתור הגן המבקר את צבירת ה- β carotene גידלנו בשדה כ-80 משפחות דור F3 של אוכלוסייה שנוצרה מהכלאה בין הזן Dulce שהוא בעל ציפה כתומה לבין הזן Tam Dew שהוא בעל ציפה כתומה. באוכלוסייה זו זיהינו בעבודה קודמת שהתכונה לקבלת ציפה כתומה מבוקרת ע"י גן אחד דומיננטי. מכל משפחה גידלנו 12 צמחים ובשלב הפרי הבשל קבענו את צבע הציפה ולפי התפלגות צבע הציפה בתוך המשפחות קבענו אם המשפחה היא הומוזיגוטית ירוקה, הומוזיגוטית כתומה או הטרוזיגוטית.

אנליזת QTL נעשתה על אוכלוסיית קווים רקומביננטיים (RI) שמוצאה מהכלאה בין זן בעל ציפה קרם-כתום חיזור (PI414723) וזן בעל ציפה בצבע כתום (DUL). הגנוטיפ ותכולת הקרוטנואידים נותחו בתכנה סטטיסטית מתאימה (QTL Map). הגנוטיפים של קווי ה-RI נחקרו כבר מספר שנים במעבדתה של נורית קציר. מגידול 2007 של 112 קווי ה-RI אספנו פירות בשלים ודגימות להפקת DNA. פירות אלו נבדקו לתכולת קרוטנואידים.

שנה ב

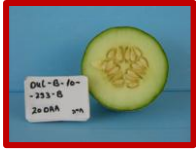

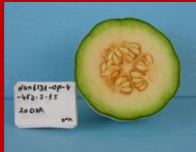



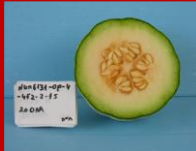


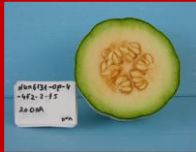

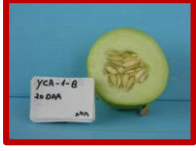

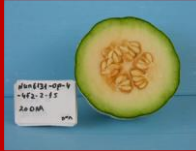

באביב 2009 (מרץ) נשתלו בחממה שישה אוכלוסיות בדור F1, בין הזן האוגר רמה גבוהה במיוחד של β carotene לבין זנים שונים האוגרים רמות שונות (טבלה מס' 1). במקביל ל-F1 שתלנו את קווי ההורים לצורך הכלאות חוזרות. במהלך הגידול יצרנו את אוכלוסיות ה-F2 וה-BC מההכלאות השונות. במקביל במטרה לעשות הערכה ראשונית של אופן ההורשה של התכונה דגמנו ציפה של חמישה פירות מכל ה-F1 ומזני ההורים לאנליזה של β carotene.

לאיתור הגן המבקר את צבירת ה- β carotene גידלנו בשנה הראשונה כ-80 משפחות דור F3 של אוכלוסייה שנוצרה מהכלאה בין הזן Dulce שהוא בעל ציפה כתומה לבין הזן Tam Dew שהוא בעל ציפה ירוקה. באוכלוסייה זו זיהינו בעבודה קודמת שהתכונה לקבלת ציפה כתומה מבוקרת ע"י גן אחד דומיננטי.

20 משפחות היו הומוזיגוטיות לציפה כתומה, 24 משפחות היו הומוזיגוטיות לציפה ירוקה ו-36 משפחות התפצלו לצבע הציפה. תוצאות אלה שימשו אותנו לאיתור הגן לקבלת ציפה כתומה ע"י בדיקת התפצלות משותפת של גנים מועמדים עם תכולת קרוטנואידים באוכלוסייה זו. אחד מהגנים המועמדים העיקריים OR, ששיערנו שהוא יכול להיות מעורב בהצטברות β carotene במלון נבדק בתחילה. בשלב הראשון נבדק פולימורפיזם לגן זה בין שני ההורים (DUL ו-TAD). איתרנו SNP'S על הגן המבדילים בין שני הזנים ובדקנו אם יש התאמה בין ה-SNP'S לבין צבע הציפה בדור F2. במקביל בדקנו את ההבדלים בגן בין 52 זנים שונים של מלוניס הנבדלים ביניהם בצבע הציפה. בשנה השלישית של המחקר גידלנו ארבע אוכלוסיות מתפצלות מהכלאות בין הזן הצובר רמה גבוהה במיוחד של β carotene (NUN61310 b) לבין זן מטיפוס קנתלופ אמריקאי (Dulce) הצובר רמה רגילה, הכלאה עם זן הצובר רמה נמוכה של β carotene (INB), הכלאה עם זן עם ציפה ירוקה שאינו צובר β carotene (NY) והכלאה עם זן עם ציפה לבנה שגם הוא אינו צובר β carotene (YCA). מכל אחת מהאוכלוסיות גידלנו כ-250 צמחי F2, הכלאות חוזרות לכל אחד מההורים ואת ההורים של כל אוכלוסייה (טבלה מס' 1). בשלב הבשלת הפרי תיעדנו את עצמת צבע הציפה. לפי תוצאות הקיץ בחרנו שתי אוכלוסיות שגידלנו שוב בעונת החורף, האחת האוכלוסייה עם ההכלאה עם הזן Dulce בעל ציפה כתומה רגילה והאוכלוסייה השנייה מהכלאה עם הזן NY בעל ציפה ירוקה. מכל אוכלוסייה גידלנו כ-250 צמחי F2, 100 צמחים עם הכלאה חוזרת להורה התורם רמה גבוהה של β carotene, 20 צמחים

מהכלאה חוזרת להורה השני וכ-20 צמחים של כל אחד מההורים. על כל הצמחים נעשו הפריות עצמיות לקבלת F3 ולקבלת דור F2 מההכלאות החוזרות. במהלך הגידול דגמנו עלים להפקת DNA מכל הצמחים, תיעדנו את צבע הפרי ודגמנו מרקמת הציפה לאנליזה של קרוטנואידים.

טבלה מס' 1. הכלאות לקבלת F1 בין זן האוגר רמה גבוהה של β carotene, NUN6131-OP-4-4F2-2-15 לבין זני מלוניס שונים הנבדלים ביניהם בצבע הציפה.

hybrid	female	Young	Mature	male	Young	Mature
GOR01	DUL-B-10-293-B			NUN6131-OP-4-4F2-2-15		
GOR03	INB-1-2-B			NUN6131-OP-4-4F2-2-15		
GOR04	NY			NUN6131-OP-4-4F2-2-15		
GOR06	YCA-1-B			NUN6131-OP-4-4F2-2-15		

תוצאות ודיון

עיקרי התוצאות מהניסויים שנעשו במהלך שנת 2008 ותחילת 2009, שנה ראשונה של הפעלת המחקר.

אפיון זנים בעלי רמה גבוהה במיוחד של β carotene

בקיץ 2008 גידלנו בשדה 24 זני מלוניס. רמת ה- β carotene בציפת הפרי הבשל מוצגת באיור מס' 1. נתין לראות

שישנה שונות בתכולת ה- β carotene בין הזנים הצוברים אותו שנעה בין 15 ל-50 מיקרו גרם לגרם רקמה טרייה.

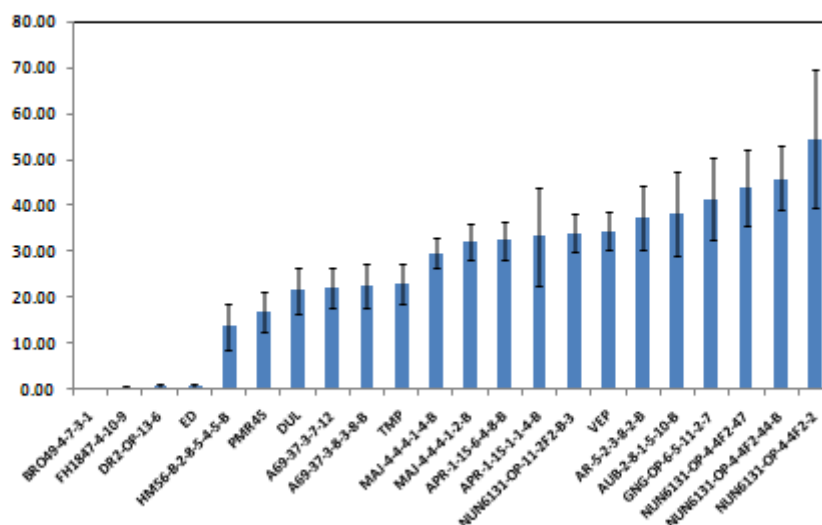
זיהינו גם קווי טיפוח המסומנים כ-NUN6131 שהיו עם תכולה גבוהה במיוחד, פי שניים יחסית לזנים הכתומים

הרגילים מטיפוס קנתלופ אמירקאי, הזנים PMR45, Dulce (DUL), Top Mark (TPM) ופי 1.5 מהזן מטיפוס

שרנטי, Vedrante (VEP) (איור 1).

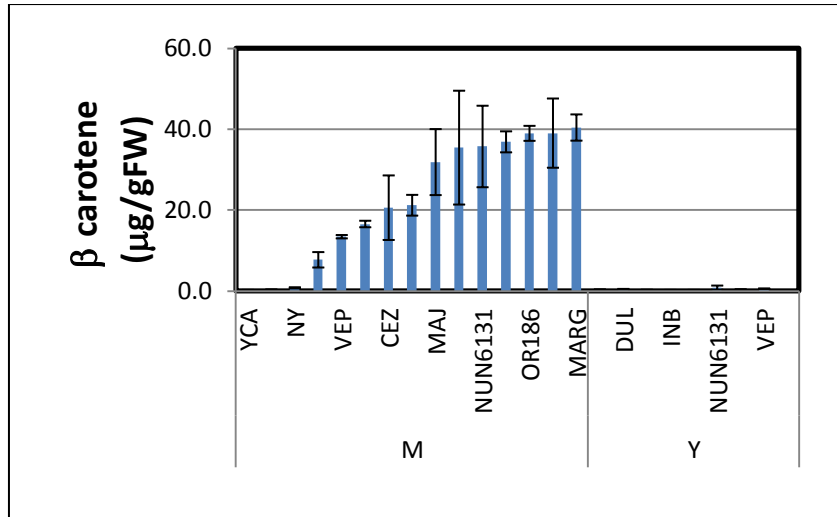
Summer 2008, Field

Average of b carotene



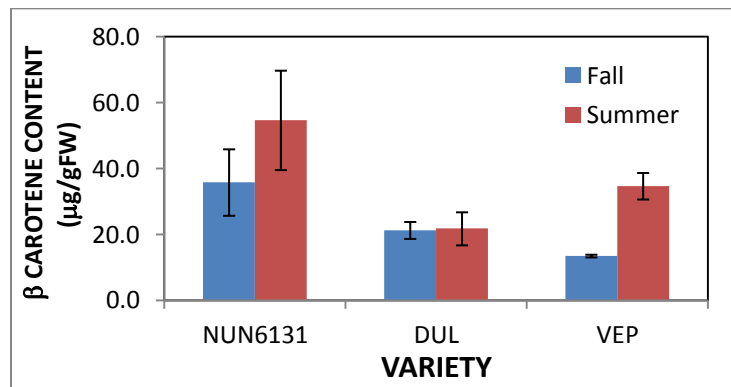
איור מס' 1. תכולת β carotene בציפת פירות בשלים של זני מלון שונים שגדלו בשדה בקיץ 2008. התוצאות מבטאות ממוצע של חמש פירות בשלים.

במהלך עונת סתיו 2008 גידלנו 15 זנים בהדליה, תשעה מהם דגמנו פירות בשלב צעיר של התפתחות הפרי (20 יום מהפריה ומהשלב הבשל ושאר הזנים דגמנו רק מהשלב הבשל. בכל הזנים לא נמצא β carotene בשלב הצעיר ואילו בשלב הבשל הזנים עם הציפה הירוקה (Yellow Canary (YCA), Early Sweet (ESL), Noy Yisre'el (NY), לא נמצאו כמויות מדידות של β carotene ואילו בזנים עם הציפה הכתומה התקבלה ערכים של בין 8 ל-40 מיקרוגרם לגרם משקל טרי (איור מס' 2). ניתן לראות קבוצה של זנים (MAJ, MAGI, NUN6131, MAGE, OR186, OR180, MAGR) שהכילו רמה גבוהה יחסית של β carotene, בין 30 ל-40 מיקרוגרם לגרם משקל טרי. קבוצה זו שונה בגוון מקבוצות המלוניים בעלי ציפה כתומה (תמונה מס' 1) והם מוגדרים כזנים מקבוצת Magenta, כלומר בעלי צבע כתום-אדום. זנים אלו הכילו פי 2 β carotene לעומת זן מטיפוס קנתלופ אמיריקאי, DUL וזן מטיפוס שרנטי, CEZ ופי 2.5 מזן מטיפוס שרנטי, VEP.



איור מס' 2. תכולת β carotene ב-15 זנים שגדלו בחממה בהדליה והבשילו בעונת סתיו 2008. תשעה זנים נדגמו גם בשלב הצעיר (Y) וגם בשלב הבשל (M) ושישה זנים רק בשלב הבשל.

עונת הגידול משפיעה גם היא על רמת ה- β carotene (איור מס' 3). בזנים NUN6138 ו-VEP מצאה רמה גבוהה יותר בעונת הקיץ, אולם הזן NUN6131 היה בעל תכולת β carotene גבוהה יחסית בשתי עונות הגידול.



איור מס' 3. השוואה בתכולת β carotene בשלושה זנים בעלי ציפה כתומה בעונת הקיץ בגידול בשדה ובעונת הסתיו בגידול בחממה. הזן Dulce (DUL), מטיפוס קנתלופ אמריקאי, הזן VEDRANTE (VEP), מטיפוס שרנטי והזן NUN6131 מטיפוס Magenta.



תמונה מס' 1. חתך פרי של זן בעל ציפה מטיפוס Magenta, NUN6131 בעל ציפה בצבע כתום-אדום וזן מטיפוס שרנטי עם ציפה בצבע כתום רגיל.

לאיתור הגן המבקר את צבירת ה- β carotene גידלנו בשדה כ-80 משפחות דור F3 של אוכלוסייה שנוצרה

מהכלאה בין הזן Dulce שהוא בעל ציפה כתומה לבין הזן Tam Dew שהוא בעל ציפה ירוקה. באוכלוסייה זו זיהינו

בעבודה קודמת שהתכונה לקבלת ציפה כתומה מבוקרת ע"י גן אחד דומיננטי. מכל משפחה גידלנו 12 צמחים ובשלב הפרי הבשל קבענו את צבע הציפה ולפי התפלגות צבע הציפה בתוך המשפחות קבענו אם המשפחה היא הומוזיגוטית ירוקה, הומוזיגוטית כתומה או הטרוזיגוטית.

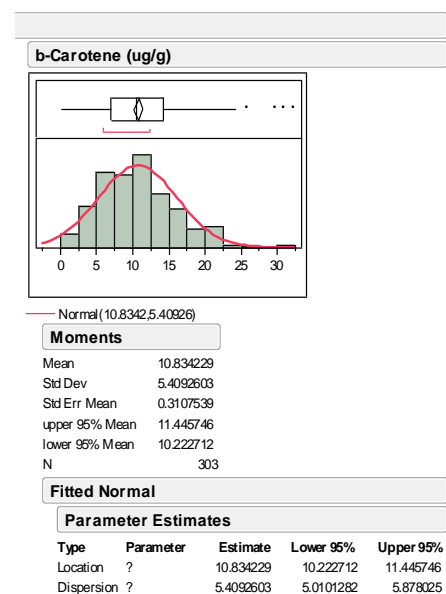
20 משפחות היו הומוזיגוטיות לציפה כתומה, 24 משפחות היו הומוזיגוטיות לציפה ירוקה ו-36 משפחות התפצלו לצבע הציפה (טבלה מס' 2). ההתפלגות באוכלוסיות ה-F3 מחזקות את התוצאה משנים קודמות של בקרה של גן אחד לצבע ציפה באוכלוסייה זו. תוצאות אלה שימשו אותנו לאיתור הגן לקבלת ציפה כתומה ע"י בדיקת התפצלות משותפת של גנים מועמדים עם תכולת קרוטנואידים באוכלוסייה זו.

טבלה מס' 2. התפלגות משפחות F3 מאוכלוסייה שנוצרה מהכלאה בין הזן Dulce שהוא בעל ציפה כתומה לבין הזן Tam Dew שהוא בעל ציפה כתומה.

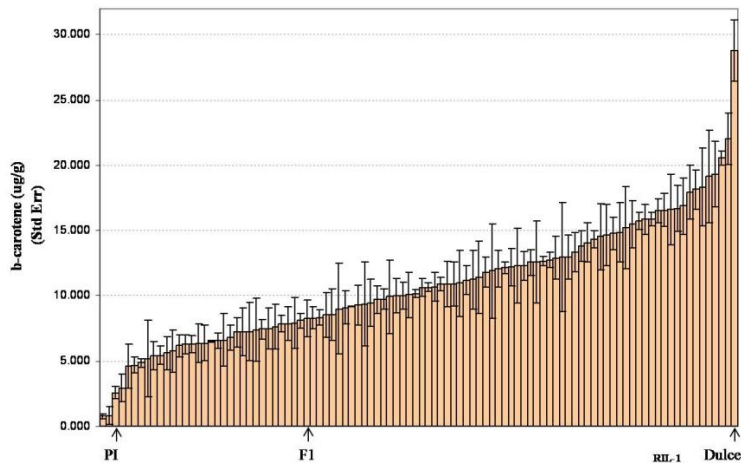
פנוטיפ	מספר משפחות F3
ציפה כתומה	20
ציפה ירוקה	24
מתפצל	36

תכולת בטא – קרוטן באוכלוסיית ה-RIL

אנליזת QTL נעשתה על אוכלוסיית קווים רקומביננטיים (RI) שמוצאה מהכלאה בין זן בעל ציפה קרם-כתום חיוור (PI414723) וזן בעל ציפה בצבע כתום רגיל (DUL). הגנוטיפ ותכולת הקרוטנואידים נותחו בתוכנה סטטיסטית מתאימה (QTL Map). הגנוטיפים של קווי ה-RI נחקרו כבר מספר שנים, מגידול 2007 של 112 קוי ה-RI אספנו פירות בשלים ודגימות להפקת DNA. פירות אלו נבדקו לתכולת קרוטנואידים. תכולת קרוטנואידים בפרי נקבעה על סמך אנליזה בלתי תלויה של שלוש פירות מכל משפחה (RIL) בתוכנת JMP. תכולת בטא – קרוטן בצאצאי האוכלוסייה מתפלגת נורמאלית (איור מס' 4), רציפה, מדורגת ואינה חורגת מנתוני ההורים (איור מס' 5). כמו כן, ניתוח שונות חד כיווני הראה מובהקות סטטיסטית ($F < 0.05$), משמע כי השונות בתוך המשפחות נמוכה מהשונות בין המשפחות.



איור מס' 4. מבחן התפלגות סטטיסטי לתכולת בטא – קרוטן בצאצאי אוכלוסיית RIL.



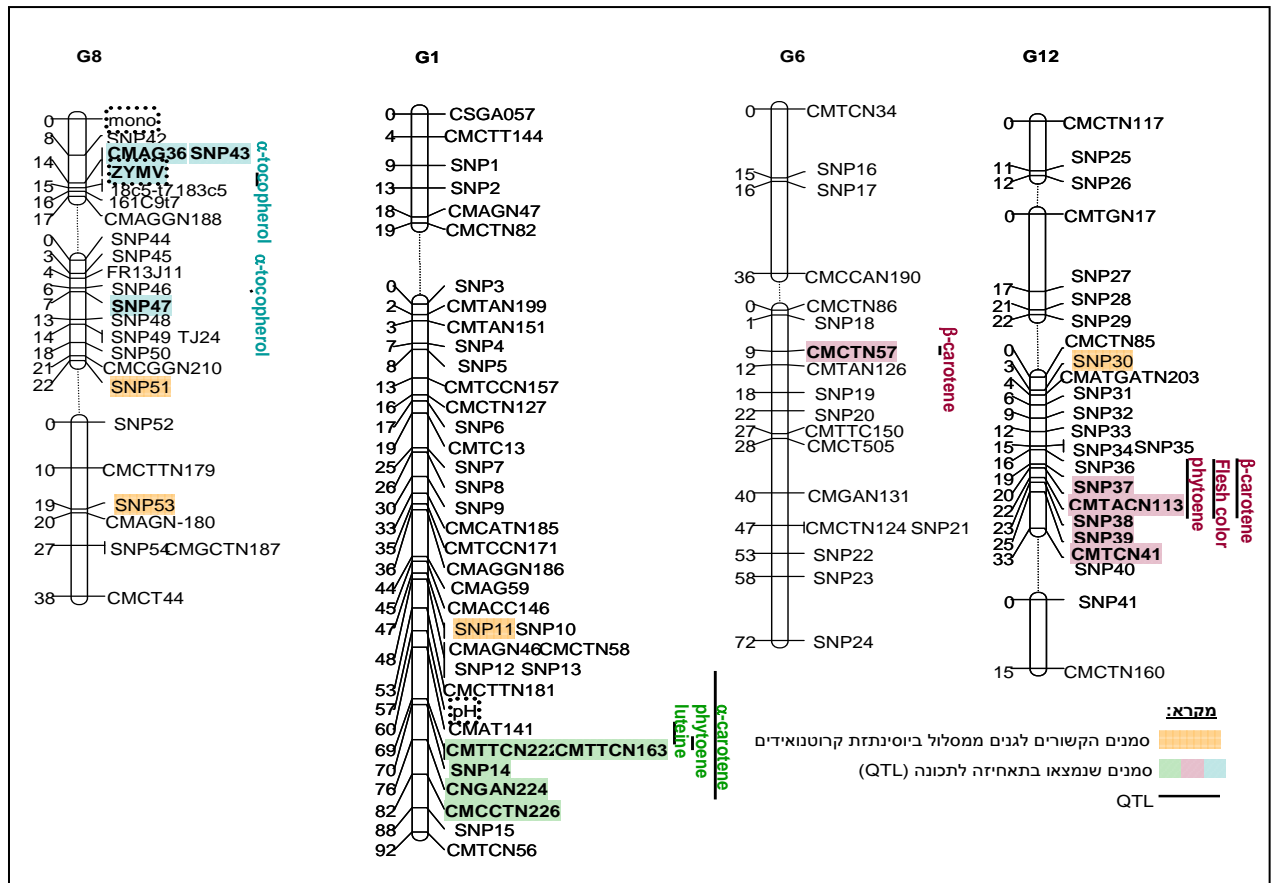
איור מס' 5. תכולת בטא – קרוטן ושגיאת התקן במשפחות השונות באוכלוסיית ה-RIL. ערך בטא – קרוטן עבור כל משפחה מקורו בממוצע ערכי 3 פירות למשפחה. תכולת בטא – קרוטן נעה בתחום 0.777 – 28.772 מיקרוגרם לגרם ציפה, כאשר הממוצע עומד על 10.83 מיקרוגרם לגרם ציפה. הורי האוכלוסייה, *Dulce* ו- *PI 414723* ממוקמים בקצוות התחום, בערכי תכולה של 28.772 ו- 2.588 מיקרוגרם לגרם ציפה.

מיפוי QTL הקשורים בתכולת קרוטנואידים

מיפוי גנטי של תכולת הקרוטנואידים השונים באוכלוסיית ה-RIL הניב שישה QTLs בעלי השפעה מובהקת על תכולת הקרוטנואידים בציפת פרי המלון המכילים 11 סמנים גנטיים שאינם מהווים גנים מבניים הקשורים בייצור קרוטנואידים בצמח (טבלה 3; איור 6).

טבלה מס' 3. QTLs עבור קרוטנואידים באוכלוסיית ה-RIL. אימות מיפוי תכולת הקרוטנואידים בוצע בתוכנת JMP.

QTL	הקרוטנואיד	קבוצת התאחיה	הסמן	רמת המובהקות	%השונות המוסבר ע"י הסמן	LOD _{max}	אורך ה-QTL (centiMorgan)
1	בטא – קרוטן	12	SNP37	0.0003	15.9	3.65	9.979
			CMTACN113	0.0031			
			SNP38	0.0010			
			SNP39	0.0051			
			CMTCN41	0.0003			
2	בטא – קרוטן	6	CMCTN57	0.0016	22.0	3.79	2.098
3	פיטואן	12	SNP37	0.0009	20.6	4.86	12.979
			CMTACN113	0.0017			
			SNP38	0.0014			
			SNP39	0.0004			
			CMTCN41	0.0001			
4	פיטואן	1	CNGAN224	0.0015	13.3	3.12	3
5	אלפא – קרוטן	1	CMTTCN222	0.0001	39.4	10.5	20.631
			CMTTCN163	0.0001			
			SNP14	0.0001			
			CNGAN224	0.0001			
			CMCCTN226	0.0001			
6	לוטאין	1	CNGAN224	0.0004	16.6	3.83	7.108

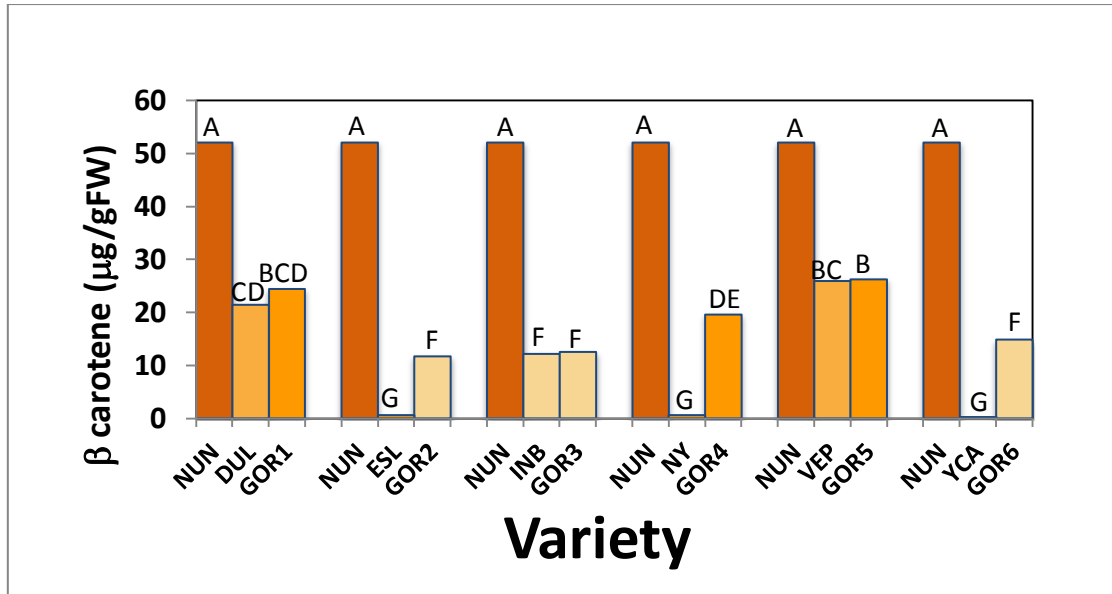


איור מס' 6. קבוצות תאחיזה במפה הגנטית לאוכלוסיית ה-RIL בהן נמצאו QTLs, (G1, G6, G12) מיפוי QTL לתכולת קרוטנואידים.

הכנת אוכלוסיות ללימוד גנטי של רמה גבוהה במיוחד של β carotene

עיקרי התוצאות מהניסויים שנעשו במהלך שנת 2009 ותחילת 2010, שנה שנייה להפעלת המחקר.

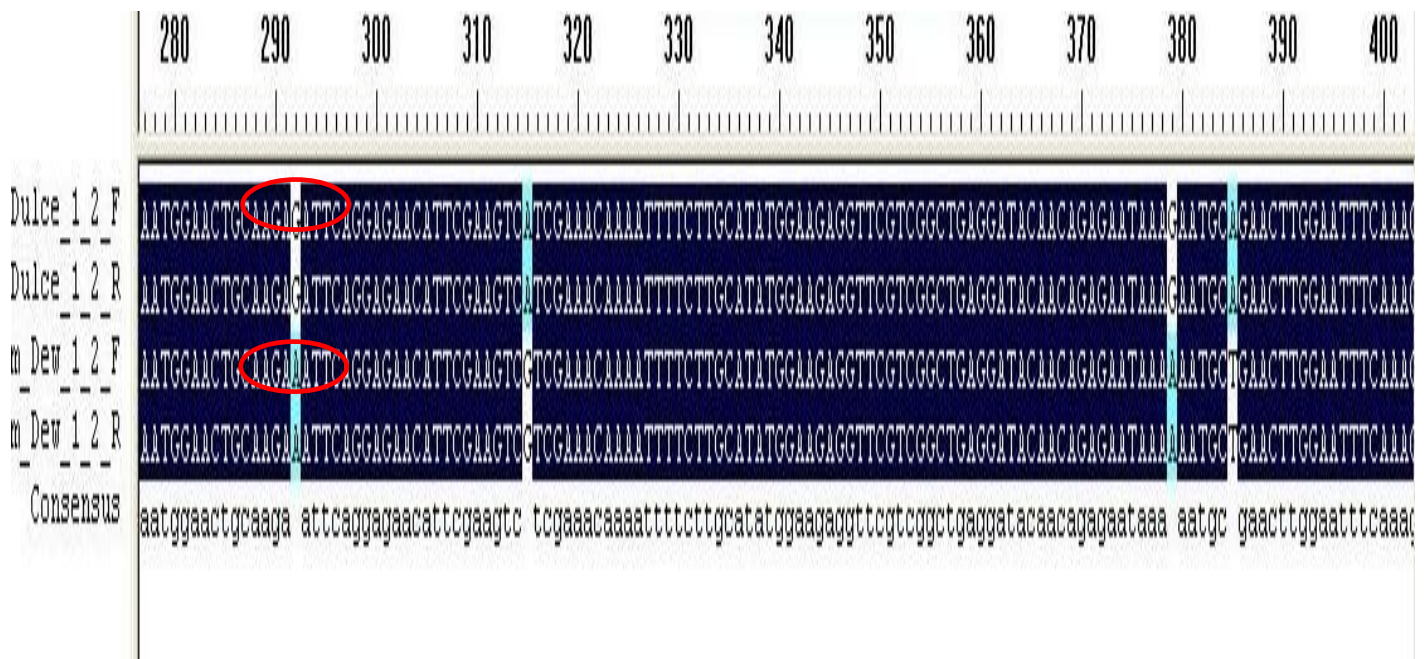
באביב 2009 גידלנו בחממה 6 מכלואי F1 בין זן האוגר רמה גבוהה של β carotene לבין זנים האוגרים רמות שונות או שאינם אוגרים כלל. כאמור בדקנו את רמת ה- β carotene בזני ההורים וב-F1. כאשר ההורה השני היה עם ציפה כתומה רמת ה- β carotene הייתה דומה להורה עם הרמה הנמוכה ואילו כאשר ההורה השני היה לא כתום רמת ה- β carotene הייתה בממוצע או מעט נמוך מהממוצע של שני ההורים (איור מס' 7). תוצאה זו מצביעה על כך שהתכונה לרמה גבוהה במיוחד של β carotene היא כנראה תכונה רצסיבית. להבנה מלאה יותר של אופן ההורשה בחנו אוכלוסיות של F2 ו-BC בעונת הגידול של קיץ 2010 וחורף 2011.



איור מס' 7. תכולת β carotene בציפת פירות בשלים של F1 מהכלאות בין זן האוגר רמה גבוהה של β carotene, NUN6131-OP-4-4F2-2-15 לבין זני מלוניס שונים הנבדלים ביניהם בצבע הציפה.

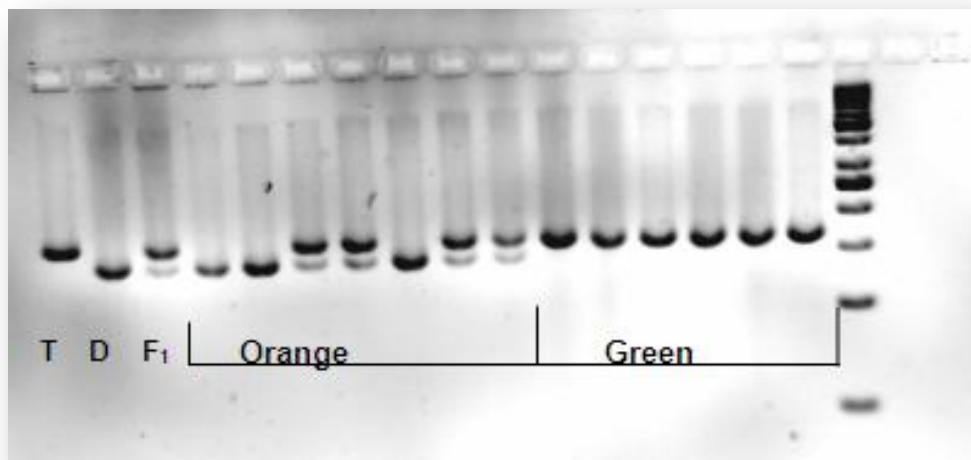
זיהוי הגן העיקרי המבקר צבירה של β carotene בציפת פרי המלון

גנים מועמדים (candidate genes) הינם גנים "חשודים" כבעלי קשר לתכונה כלשהי, אשר אותה רוצים לחקור, על פי מיקומם על כרומוזום מסוים או על פי החלבון אשר אליו הם מקודדים. החיפוש אחר גנים מועמדים מתבסס על איתור דמיון בין גנים בעלי פונקציה דומה לתכונה נחקרת במינים אחרים, על ידי התפצלות משותפת של מעקבות DNA עם התכונה הנחקרת באוכלוסיות מתפצלות או על ידי אנליזה השוואתית של שכילות אללים ושל הפנוטיפ באוספים גנטיים או באוכלוסיות טבעיות (association study). גישות אלו יכולות להסתייע ממידע בסיסי על התהליכים הפיסיולוגיים וההתפתחותיים הכרוכים בתכונה הנבדקת. בעבודה זו השתמשנו בשני גנים מועמדים החשודים כבעלי קשר להצטברות קרוטנואידים בפרי המלון. שני הגנים שבדקנו היו גן ה- *PSY* וגן ה- *OR* אשר נמצאים באותה קבוצת תאחיזה שמחקרים קודמים קשרו אותו לצבע הפרי. הכוונה הייתה להשתמש באנליזה גנטית על מנת למצוא מי משני הגנים המועמדים הוא הגן הקשור בתכונה, אם בכלל. השתמשנו באוכלוסיית F2 ו-F3 שבין DUL ו-TAD למיפוי הגן המועמד ביחד עם התכונה, על ידי התפצלות משותפת המוכיחה את הקשר הישיר שלו לתכונה. על מנת למפות את הגן מצאנו הבדלי מעקובת בין ההורים של האוכלוסיה ופיתחנו סמן מולקולרי מסוג Simple single nucleotide polymorphism (SNP). בעבודה קודמת לא נמצאה שונות בין ההורים בגן *PSY* לכן הגן *OR* הפך להיות אחד מהגנים המועמדים העיקריים ששיערונו שהוא יכול להיות מעורב בהצטברות β carotene במלון. בשלב הראשון נבדק פולימורפיזם לגן זה בין שני ההורים (DUL ו-TAD). נמצאו 14 SNP'S בגן *OR* בין שני הזנים DUL ו-TAD, חמישה מהם נמצאו על ה-cDNA. ה-SNP בעמדה 292 משנה אתר חיתוך של האנזים Hinf I (תמונה 2). דוגמאות DNA של הורי האוכלוסיה, F1 ואוכלוסיית F2 הוגברו ב-PCR בעזרת התחלים המתאימים לגן ה- *OR*, נחתכו בעזרת אנזים החיתוך HinfI והופרדו על גבי ג'ל אגרוז 2.5% (תמונה 2).



תמונה מס' 2. סמן ה SNP בגן Or הנמצא באתר החיתוך של אנזים הרסטרקציה HinFI החותך את הרצף GANTC בין ה A ל G, בעזרתו ניתן לבחון את הפולימורפיזם לתכונה הנבדקת בין שני הזנים.

בתמונה מס' 3 ניתן לראות כי בסמן זה כל הפרטים המייצרים פירות כתומים הומוזיגוטיים או הטרוזיגוטיים לאלל של ההורה הכתום בעוד שכל הפרטים המייצרים פרי בעל ציפה ירוקה הומוזיגוטיים לאלל של ההורה הירוק (TamDew).

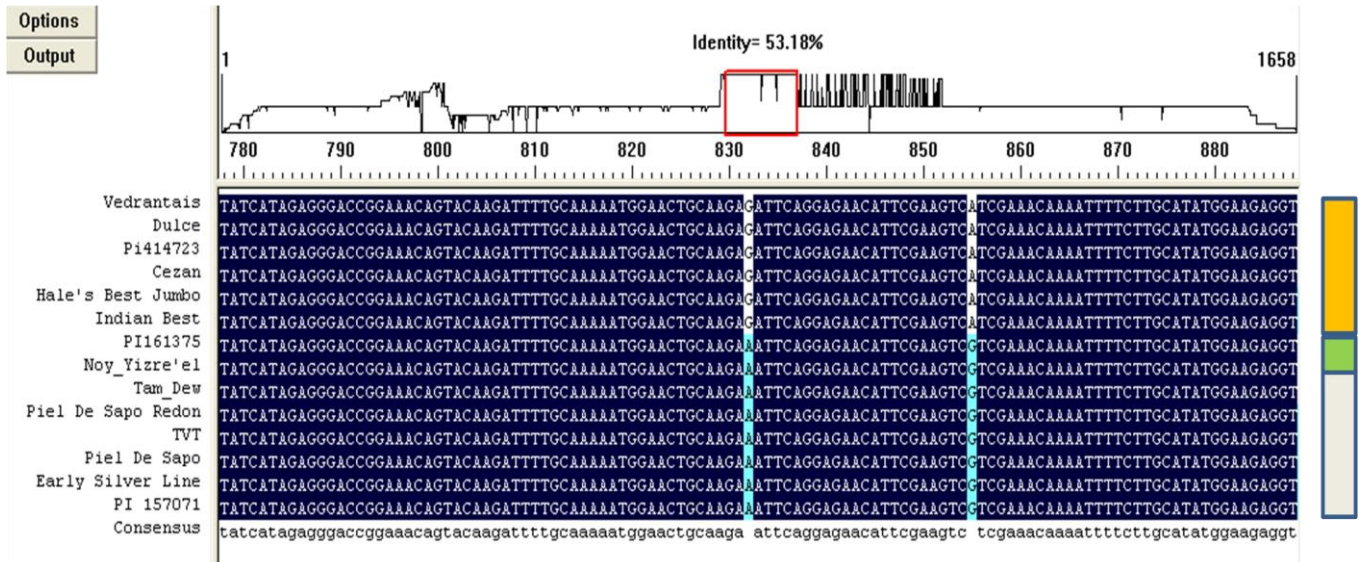


תמונה מס' 3. תוצרי PCR עם שימוש בתחל ל OR לאחר חיתוך עם אנזים חיתוך HinFI והרצה על גיל אגרוז 2.5%.

באימות באוכלוסיית F3 שבה אופיין צבע הציפה ב-80 משפחות נמצאה התאמה מלאה בין הסמן שמקורו בגן OR לצבע הציפה.. תוצאות אלו מראות כי הגן OR קובע את צבע הפרי במלון מאחר וידוע כי ציפת פרי כתומה דומיננטית לציפת פרי ירוקה.

מתוצאות האוכלוסייה המתפצלת הסקנו שההבדלים בצבע הציפה בזנים DUL ו-TAD נובעים בגן OR. בהמשך העבודה סרקנו 52 זנים של מלוניס הנבדלים ביניהם בצבע הציפה לסמני ה-SNP שהבדילו בין הזנים DUL ו-TAD. הייתה התאמה

טובה בין הסמן לבין צבע הציפה, להוציא שלושה זנים. חלק מהתוצאות מופיע בתמונה 4. כל הזנים עם הציפה הכתומה היו עם C בעמדה מס' 832 ו-A בעמדה מס' 855 ואילו הזנים עם הציפה הירוקה או הלבנה היו עם A בעמדה מס' 832 ו-C בעמדה מס' 855. תוצאה זו מעלה את האפשרות שאכן הגן OR הוא הגן העיקרי הקובע את צבע הציפה במלונים, אך יתכן וישנה מעורבות של גנים נוספים.



תמונה מס' 4. השוואה בין זני מלון לשני SNP'S הממוקמים על גבי הגן OR. צבע הכתום בצד ימין של התמונה מייצג זנים עם ציפה כתומה, הצבע הירוק זים עם ציפה ירוקה והצבע הלבן זנים עם ציפה לבנה.

תוצאות שנה ג

בקיץ 2010 גידלנו בשדה בנווה יער ארבע אוכלוסיות מתפצלות שמקורן מהכלאה בין הזן האוגר רמה גבוהה של β carotene לבין ארבעה זנים הנבדלים ביניהם ברמת ה- β carotene. בשלב הבשלת הפירות תיעדנו את רמת צבע הפרי לפי המקרא הסמוך וקבענו את התפלגות התכונה של צבע הפרי באוכלוסיות הללו.

מהכלאה בין זן האוגר רמה רגילה של β carotene (DUL) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN) נראה שהתכונה לקבלת רמה גבוהה במיוחד של β carotene באוכלוסיה זו מבוקרת ע"י גן אחד רצסיבי (טבלה 4).

Legend of Flesh Colors: 1-Green / White Flesh
2- Pale Orange Flesh
3- Orange Flesh
4- Strong Orange Flesh

טבלה מס' 4. התפלגות צבע הציפה באוכלוסיית F1, F2 והכלאות חוזרות מהכלאה בין זן הצובר רמה רגילה של β carotene (DUL) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131).

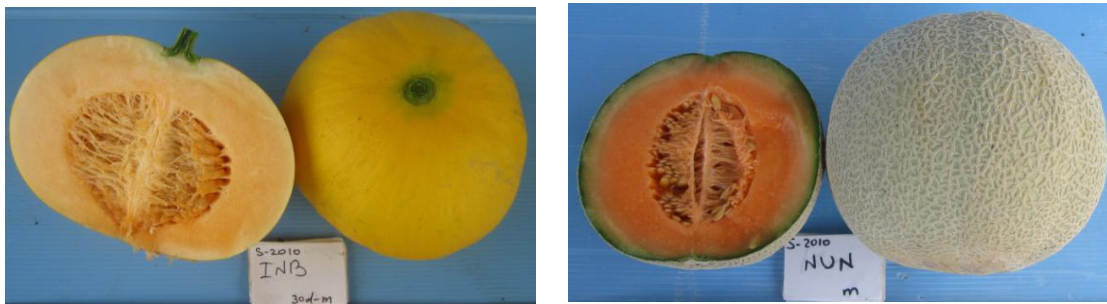


Flesh Color

Generation	Description	No. Plants	1	2	2'-3	3	3'-4	4
P1	DUL-B-10-293-B	30	0	0	0	30	0	0
P2	NUN6131-OP-4-4F2-2-15	30	0	0	0	0	0	30
F1	GOR1 (P1 X P2)	10	0	0	0	10	0	0
F1	GOR1R (P2 X P1)	8	0	0	0	8	0	0
BC	(P1 X P2) X P2	88	0	0	0	50	0	38
BC	(P1 X P2) X P1	38	0	0	0	38	0	0
F2	(P1 X P2)∅	219	0	0	0	170	1	48

מההתפלגות לצבע הציפה באוכלוסייה שמקורה מהכלאה בין זן האוגר רמה נמוכה של β carotene (INB) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131) נראה שבאוכלוסייה זו מעורבים שני גנים בקביעת רמת ה- β carotene (טבלה 5).

טבלה מס' 5. התפלגות צבע הציפה באוכלוסיית F1, F2 והכלאות חוזרות מהכלאה בין זן הצובר רמה נמוכה של β carotene (I) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131).

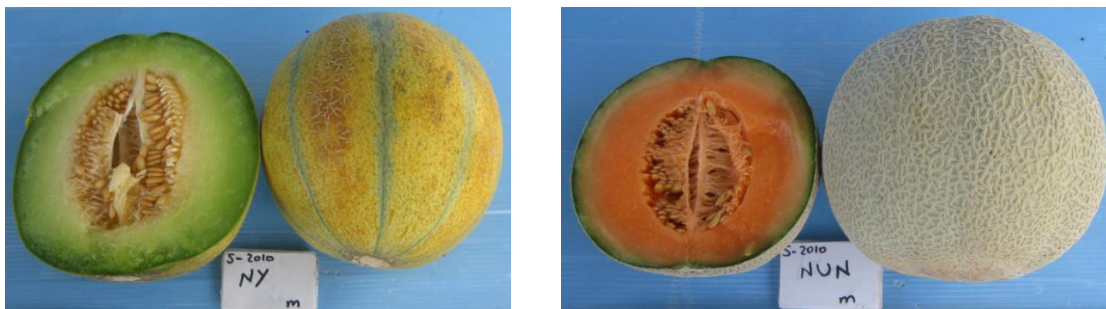


Flesh Color

Generation	Description	No. Plants	1	2	2'-3	3	3'-4	4
P1	INB-1-2-B	30	0	30	0	0	0	0
P2	NUN6131-OP-4-4F2-2-15	30	0	0	0	0	0	30
F1	GOR3 (P1 X P2)	7	0	7	0	0	0	0
F1	GOR3R (P2 X P1)	11	0	11	0	0	0	0
BC	(P1 X P2) X P2	83	0	11	22	29	1	20
BC	(P1 X P2) X P1	42	0	42	0	0	0	0
F2	(P1 X P2)∅	116	0	88	1	22	0	5

מההתפלגות לצבע הציפה באוכלוסייה שמקורה מהכלאה בין זן בעל ציפה ירוקה שאינו אוגר β carotene (NY) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131) נראה שבאוכלוסיה זו מעורבים שני גנים בקביעת רמת ה- β carotene (טבלה 6). גן אחד שהוא ככל הנראה OR קובע עם תהיה צבירה של β carotene גן זה הוא דומיננטי ולכן כל צמחי ה-F1 וההכלאה החוזרת לזן עם צבע הציפה הכתום היו עם ציפה כתומה. נראה שבאוכלוסיה זו שיש גן נוסף רצסיבי המבקר רמה גבוהה במיוחד של β carotene.

טבלה מס' 6. התפלגות צבע הציפה באוכלוסיית F2 והכלאות חוזרות מהכלאה בין זן בעל ציפה ירוקה שאינו אוגר β carotene (NY) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131).



Flesh Color

Generation	Description	No. Plants	1	2	2'-3	3	3'-4	4
P1	NY	30	30	0	0	0	0	0
P2	NUN6131-OP-4-4F2-2-15	30	0	0	0	0	0	30
F1	GOR4 (P1 X P2)	6	0	0	0	6	0	0
F1	GOR4R (P2 X P1)	11	0	0	0	11	0	0
BC	(P1 X P2) X P2	51	0	0	0	26	1	24
BC	(P1 X P2) X P1	75	41	6	7	21	0	0
F2	(P1 X P2)Ø	127	30	10	1	70	2	14

מההתפלגות לצבע הציפה באוכלוסייה שמקורה מהכלאה בין זן בעל ציפה לבנה שאינו אוגר β carotene (YCA) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131) נראה שבאוכלוסיה זו מעורבים מספר גנים בקביעת רמת ה- β carotene (טבלה 7). גן אחד שהוא ככל הנראה OR קובע עם תהיה צבירה של β carotene גן זה הוא דומיננטי ולכן כל צמחי ה-F1 וההכלאה החוזרת לזן עם צבע הציפה הכתום היו עם ציפה כתומה ומספר גנים נוספים המבקרים את רמת ה- β carotene. נראה שגם באוכלוסיה זו יש גן רצסיבי המבקר רמה גבוהה במיוחד של β carotene. יש לציין שאפיון רמת ה- β carotene נקבעה לפי מדדים של צפייה ולא לפי מדידת תכולת ה- β carotene, לכן קשה להעריך במדויק את אופן ההורשה של התכונה אלא ניתן לאמוד אותה רק באופן ראשוני.

טבלה מס' 7. התפלגות צבע הציפה באוכלוסיית F1, F2 והכלאות חוזרות מהכלאה בין זן בעל ציפה לבנה שאינו אוגר β carotene (YCA) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131).



Flesh Color

Generation	Description	No. Plants	1	2	2'-3	3	3'-4	4
P1	YCA-1-B	30	30	0	0	0	0	0
P2	NUN6131-OP-4-4F2-2-15	30	0	0	0	0	0	30
F1	GOR6 (P1 X P2)	13	0	0	10	3	0	0
F1	GOR6R (P2 X P1)	12	0	0	10	2	0	0
BC	(P1 X P2) X P2	80	0	0	2	67	2	9
BC	(P1 X P2) X P1	62	20	33	4	5	0	0
F2	(P1 X P2)Ø	95	23	21	0	45	1	5

בעקבות התוצאות שהיו לנו מקיץ 2010 החלטנו להמשיך וללמוד על התכונה של אגירה של רמה גבוהה במיוחד של β carotene בשתי אוכלוסיות. האוכלוסייה האחת, מהכלאה בין זן האוגר רמה רגילה של β carotene (DUL) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN) נראה שהתכונה לקבלת רמה גבוהה במיוחד של β carotene באוכלוסייה זו מבוקרת ע"י גן אחד רצסיבי המבדיל בין פרטים עם רמה רגילה של β carotene לבין פרטים עם רמה גבוהה במיוחד של β carotene. אוכלוסייה שנייה שנבחרה באוכלוסייה שמקורה מהכלאה בין זן בעל ציפה ירוקה שאינו אוגר β carotene (NY) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN6131) נראה שבאוכלוסייה זו מעורבים שני גנים בקביעת רמת ה- β carotene (טבלה 6). גן אחד שהוא ככל הנראה OR קובע עם תהיה צבירה של β carotene גן זה הוא דומיננטי ולכן כל צמחי ה-F1 וההכלאה החוזרת לזן עם צבע הציפה הכתום היו עם ציפה כתומה. נראה שבאוכלוסייה זו שיש גן נוסף רצסיבי המבקר רמה גבוהה במיוחד של β carotene.

שתי אוכלוסיות אלה נבחרו להמשך מכיוון שלאחר התצפית הראשונית נראה שהבקרה לקבלת רמה גבוהה במיוחד של β carotene היא מונוגנית באוכלוסיות אלה, ויהיה קל יותר לאתר את ולבודד את הגן המבקר תכונה זו. בעקבות זאת שתלנו את שתי האוכלוסיות הללו בגידול בחורף 2011. מכל אחת מהאוכלוסיות גידלנו כ-20 צמחים של ההורים שמהם נבנתה האוכלוסייה, כעשרים צחים מדור F1 ודור F1 רציפרוקלי, כ-250 צמחי F2, כ-100 צמחים עם הכלאה חוזרת להורה עם התכולה הגבוהה של β carotene, וכ-20 צמחים עם הכלאה חוזרת להורה השני. על כל צמח מעשה הפריה עצמית וציפת הפרי מכל צמח נדגמה למדידה של רמת הקרוטנואידים. להפתעתנו הרבה אופן ההתפלגות בעונת החורף לצבע הציפה הייתה שונה בעונת החורף מאשר בעונת הקיץ. תוצאה לא שאין לנו כרגע הסבר וצריכה הרחבה של המחקר הייתה בעיקר באוכלוסייה מהכלאה בין זן האוגר רמה רגילה של β carotene (DUL) לבין זן הצובר רמה גבוהה במיוחד (NUN). אם בעונת הקיץ כל הפירות מאוכלוסייה זו היו עם ציפה

כתומה בעונת החורף קיבלנו התפלגות בדור ה-F2 לפרטים עם ציפה ירוקה. יתר על כן בזן DUL בעל הציפה כתומה רגילה התקבלו פרטים שהיו עם ציפה ירוקה (תמונה 5). בעקבות תוצאה זו חששנו שיתכן ויש לנו זיהום בזרעים, אולם לאחר שימוש בגן OR כסמן לצבע ציפה התברר שכל הפרטים של הזן DUL והזן NUN6131 שהיו אמורים להיות עם ציפה כתומה נשאו אלל של ה-OR המאפיין ציפה כתומה ואילו ככל הפרטים של הזן NY בעל הציפה הירוקה נשאו אלל של ה-OR המאפיין ציפה ירוקה (תמונה 6).

תמונה מס' 5. צבע הציפה של הזן DUL בגידול בחורף 2011 בחממה ובגידול בקיץ 2008 בשדה בנווה יער.

DUL מקיץ 2008

DUL מחורף 2011



תמונה מס' 6. שימוש בגן OR כסמן לתצורת הגן בשלושה זני מלוניים: 1. Dulce, בעל צבע ציפה כתום רגיל 2. NUN6131, בעל צבע ציפה כתום עז 3. NY, בעל צבע ציפה ירוק.



סיכום

במהלך השנה הראשונה זיהינו זני מלוניס בעלי תכולה גבוהה במיוחד של β carotene. זנים אלה הם בעלי גוון כתום-אדום ולכן הם מוגדרים כזנים מטיפוס Magenta. תכונה זו היא כנראה גנטית והיא חוזרת על עצמה בעונות ובצורות גידול שונות למרות שיש השפעה לעונת הגידול. כדי ללמוד על תכונה זו הכנו במהלך 2008 חמש אוכלוסיות של F1, F2 והכלאה חוזרת לכל אחד מההורים כדי ללמוד על אופן ההורשה של תכונה זו והאם הגן המבקר קבלת ציפה כתומה הוא זהה גם לקבוצה זו.

בדקנו אוכלוסייה מתאימה של F3 שבה התכונה מבוקרת ע"י גן אחד לאיתור הגן הקובע הצטברות β carotene במלוניס.

באוכלוסיית RIL שבה התכונה מבוקרת ע"י תורשה פוליגנית בין זן האוגר רמה נמוכה לבין זן האוגר רמה רגילה, מיפינו מספר QTL המתמפים יחד עם תכולה גבוהה יותר של β carotene.

במהלך השנה השנייה זיהינו את הגן הקובע את צבע הצבע הכתום של המלון, כלומר הגן המבקר את התכונה של צבירת β carotene בפרי. גן זה אינו מהמסלול המטבולי של סינתזת הקרוטנואידים אלא גן שכנראה מעורב במעבר של פלסטידות לכרומופלסטים. כלומר באנלוגיה למפעל, הגורם המשפיע על צבירת ה- β carotene במלון אינו נובע ממחסור באמצעי יצור ופועלים אלא במבנה המתאים. גן זה הקרוי OR היה אחד הגנים המועמדים, ואפיונו במלוניס חסך את הצורך בשיטות שהוזכרו בתוכנית העבודה למציאת הגן.

גן זה נמצא כמבקר את האפשרות של צבירת ה- β carotene אך אינו מבקר כנראה את רמתו המצטברת. הגן היה זהה בכל הזנים עם צבע הציפה הכתום ללא תלות בעצמת הצבע. רמת ה- β carotene מבוקרת כנראה ע"י גן או גנים נוספים.

במהלך השנה השלישית למדנו על אופן הבקרה של ההורשה לרמה גבוהה במיוחד של β carotene בארבע אוכלוסיות F2 ו-BC שגידלנו בעונת קיץ 2010. במעקב אחר הפנוטיפ (כפי שנראה בעין) מצאנו שיש גן אחד OR, שאותו אפיינו בשנה השנייה הקובע עם הפרי יצבור β carotene ועוד שני גנים המבקרים את רמתו. האחד גן דומיננטי הקובע רמה נמוכה של β carotene והשני גן רצסיבי הקובע רמה גבוהה של β carotene. בגידול שתי אוכלוסיות בעונת החורף בגידול חממה לצורך דגימה ל- β carotene ויצירת F3, קיבלנו להפתעתנו פירות עם ציפה ירוקה באחד מזני ההורים שהיה אמור להיות עם ציפה כתומה רגילה. בדיקת תצורת הגן OR הקובע אם הפרי יהיה כתום מצאנו שכל הפרטים בזן זה היו עם תצורה לקבלת ציפה כתומה. מכאן שלתנאי הסביבה יש כנראה השפעה קריטית עם על ביטוי גן זה או גנים אחרים ממסלול סנתזת ה- β carotene. תוצאה זו פתחה לנו פתח למחקר נוסף של השפעת תנאי סביבה על ביטוי הגנים המעורבים בהצטברות β carotene בציפת פרי המלון.

שאלות סיכום

1. מטרת המחקר

מטרת העבודה בשנה א הייתה לאפיין מטבולית את התכונה של צבירת יתר של β carotene. בשנה ב, לאפיין את הגן המבקר הצטברות של β carotene וללמוד על QTL לקבלת רמה גבוהה יותר של β carotene באוכלוסייה שהתכונה

מבוקרת באופן כמותי. שנה ג, לימוד גנטי של התכונה להצטברות רמה גבוהה במיוחד של β carotene לאפיון ההורשה ומספר הגנים המבקרים תכונה זו באוכלוסיות גנטיות שונות.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות

בגידול זנים שונים של מלוניס בשדה ובחממה איתרנו קבוצה של זנים המוגדרת כטיפוס Majenta שבה הייתה תכולה גבוהה במיוחד של β carotene, פי שניים מאשר בזנים הנפוצים מטיפוס שרנטי וקנתלופ אמריקאי. נמצא שלעונת הגידול יש חשיבות רבה לצבירה של β carotene בציפת הפרי. באוכלוסייה שבה התכונה מבוקרת ע"י תורשה פוליגנית בין זן האוגר רמה נמוכה לבין זן האוגר רמה רגילה, מיפינו מספר QTL המתמפים יחד עם תכולה גבוהה יותר של β carotene. בשימוש באוכלוסייה שבה התכונה לצבע ציפה כתום מבוקרת ע"י גן אחד עיקר זיהינו את הגן הקובע את צבע הצבע הכתום של המלון, כלומר הגן המבקר את התכונה של צבירת β carotene בפרי. בדור F3 מאוכלוסייה זו נמצאה התאמה מלאה בין הגן OR לצבע הציפה. באביב 2009 גידלנו בחממה 6 מכלואי F1 בין זן האוגר רמה גבוהה של β carotene לבין זנים האוגרים רמות שונות או שאינם אוגרים כלל. בדקנו את רמת ה- β carotene בזני ההורים וב-F1. כאשר ההורה השני היה עם ציפה כתומה רמת ה- β carotene הייתה דומה להורה עם הרמה הנמוכה ואילו כאשר ההורה השני היה לא כתום רמת ה- β carotene הייתה בממוצע או מעט נמוך מהממוצע של שני ההורים. תוצאה זו מצביעה על האפשרות שהתכונה לרמה גבוהה במיוחד של β carotene היא כנראה תכונה רצסיבית. במהלך השנה השלישית למדנו על אופן הבקרה של ההורשה לרמה גבוהה במיוחד של β carotene בארבע אוכלוסיות F2 ו-BC. במעקב אחר הפנוטיפ מצאנו שיש גן אחד OR, הקובע עם הפרי יצבור β carotene ועוד שני גנים המבקרים את רמתו. האחד גן דומיננטי הקובע רמה נמוכה של β carotene והשני גן רצסיבי הקובע רמה גבוהה של β carotene. בגידול שתי אוכלוסיות בעונת החורף בגידול חממה קיבלנו להפתעתנו פירות עם ציפה ירוקה באחד מזני ההורים שהיה אמור להיות עם ציפה כתומה רגילה. בדיקת תצורת הגן OR הקובע עם הפרי יהיה כתום מצאנו שכל הפרטים בזן זה היו עם תצורה לקבלת ציפה כתומה. מכאן שלתנאי הסביבה יש כנראה השפעה קריטית עם על ביטוי גן זה או גנים אחרים ממסלול סנתזת ה- β carotene. תוצאה זו פתחה לנו פתח למחקר נוסף של השפעת תנאי סביבה על ביטוי הגנים המעורבים בהצטברות β carotene בציפת פרי המלון.

3. המסקנות המדעיות

הגן הקובע במלוניס את התכונה לצבירה של b carotene הוא OR. גן זה אינו מהמסלול המטבולי של סינתזת הקרוטנואידים אלא מעורב במעבר של פלסטידות כמו כלורופלסטים לכרומופלסטים. גן זה נמצא כמבקר את האפשרות של צבירת ה- β carotene אך אינו מבקר כנראה את רמתו המצטברת. הגן היה זהה בכל הזנים עם צבע הציפה הכתום ללא תלות בעצמת הצבע. במלון יש זנים המכילים רמה גבוהה במיוחד של β carotene. תכונה זו נמאה יציבה במהל מספר עונות גידול. רמת ה- β carotene מבוקרת כנראה ע"י מספר גנים כאשר רמה גבוהה במיוחד מבוקרת כנראה ע"י גן אחד רצסיבי.

4. הבעיות שנותרו לפתרון

יש לזהות את הגן או הגנים המבקרים תכונה זו. יש לבדוק את הקשר בין גנים אלו לגן הקובע את סינתזת ה- β carotene בציפת המלון וההשפעה של תנאי סביבה שונים על שפעול וביטוי גנים אלה.

5. הפצת הידע

הידע לא הופץ בשלב זה.

6. פרסום הדוח

אני ממליץ לפרסם את הדוח ללא הגבלה.