

דוח מסכם לתוכנית מחקר 261-0585-09
לימוד הבסיס הגנטי של שחור פיטם בפלפל
Genetic analysis of blossom end rot in pepper

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

אילן פארן	המחלקה לחקר ירקות
דוד גרנות	המחלקה לחקר הירקות
בני אלוני	המחלקה לחקר הירקות
אשר בר טל	המכון לקרקע מים ומדעי הסביבה
פוסלסקי יצחק	שה"ם
בני גמליאל	מו"פ לכיש

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

David Granot, Department of Vegetable Research, The Volcani Center, ARO

Benny Aloni, Department of Vegetable Research, The Volcani Center, ARO

Asher Bar Tal, Institute of Soil, Water and Environmental Sciences, The Volcani Center, ARO

Itzak Posalsky, Agricultural Extension Service

Benny Gamliel, Lahish R&D

אפריל 2010

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

תקציר

הצגת הבעיה: שחור פיטם הינו פגם פיזיולוגי נפוץ של פרי הפלפל ושל פירות נוספים כגון עגבניה. למרות חשיבות הבעיה, כמעט ולא נעשו מחקרים גנטיים או מולקולריים ללמוד התורשה של יצירת שחור פיטם למרות שידוע שזנים נבדלים במידת רגישותם. *מטרות המחקר:* מטרות המחקר היו לימוד הבסיס הגנטי של העמידות לשחור פיטם ומיפוי הגנים המבקרים תכונה זו בפלפל. *תוצאות עיקריות:* התפלגות הצאצאים לשחור פיטם מעידה על תורשה כמותית ופוליגנית של העמידות לשחור פיטם. נמצאה קורלציה גבוהה בין התפלגות הצאצאים בשתי השנים שנבדקו. לזיהוי סמנים מולקולריים בתאחיזה לגנים המבקרים את התכונה יצרנו באלקים של DNA מצמחים עמידים ורגישים לשחור פיטם. באלקים אלו נסרקו ע"י מספר מאות של פריימרים מסוג RAPD אולם לא זוהו סמנים המבדילים בין הבאלקים העמידים והרגישים. נמצאה מובהקות גבוהה של אורך הפרי על מידת הרגישות לשחור פיטם. *מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות:* התכונה של רגישות לשחור פיטם נמצאה כמורשת תכונה כמותית ובקורלציה גבוהה לאורך פרי. נסיון מיפוי הגנים המבקרים את התכונה לא צלח בגלל אופי התורשה של התכונה ורמה נמוכה של שונות ברמת ה DNA בין ההורים.

מבוא

שחור פיטם הינו פגם פיזיולוגי נפוץ של פרי הפלפל ושל פירות נוספים כגון עגבניה. שחור פיטם מתפתח בצד המרוחק של הפרי הצעיר והוא בא לידי ביטוי בהתמוטטות תאים ברקמת האפידרמיס והפרנכימה שמתחתיה הגורמים לכתמים נקרוטים גדולים ולפיכך לאובדן היבול. האינדוקציה לשחור פיטם חלה בשלב צעיר של התפתחות הפרי המאופיינת בהתחלקות תאים וגדילה מואצת. פגם זה אופייני לפירות המתפתחים בתנאי עקה; רמות גבוהות של טמפרטורה ויובש באוויר, מליחות וחוסר מים בקרקע והרכב יסודות הזנה לא מאוזן בקרקע המתאפיין ביחס גבוה של אמון \ חנקן ושל אשלגן לסידן. הבעיה קשה בארץ בעיקר בעונות האביב והקיץ בגידול הפלפל בחממות כתוצאה מהשפעת טמפרטורה גבוהה ולחות נמוכה. מחקר רב נעשה לאיפיון התנאים הפיסיולוגיים הגורמים להיווצרות שחור פיטם בעגבניה ופלפל והועלו מספר השערות בדבר הבסיס הפיסיולוגי של התופעה. אולם כמעט ולא נעשו מחקרים גנטיים או מולקולריים ללמוד התורשה של יצירת שחור פיטם למרות שידוע שזנים נבדלים במידת רגישותם.

כדי לחקור את הבסיס הגנטי של יצירת שחור פיטם בפלפל ערכנו סריקה של חומר גנטי מגוון על מנת לאתר קוים הנבדלים ברגישותם לשחור פיטם. סריקה זו איפשרה זיהוי של שני קוים רגישים במיוחד (רב הפירות נגועים) ושני קוים עמידים (ללא פירות נגועים). קוים אלו הוכלאו ליצירת אוכלוסיות מתפצלות שישמשו ללמוד את אופן התורשה של העמידות לשחור פיטם, למיפוי הגנים לעמידות ולאתור סמנים מולקולריים האחוזים לגנים אלו. החומר הגנטי העמיד שמקורו בקוי בר של פלפל בשלוב של הסמנים המולקולריים יאפשרו בעתיד טיפוח פלפל מטיפוס בלוקי בעל עמידות לשחור פיטם.

מטרות המחקר היו לימוד הבסיס הגנטי של העמידות לשחור פיטם ומיפוי הגנים המבקרים תכונה זו בפלפל.

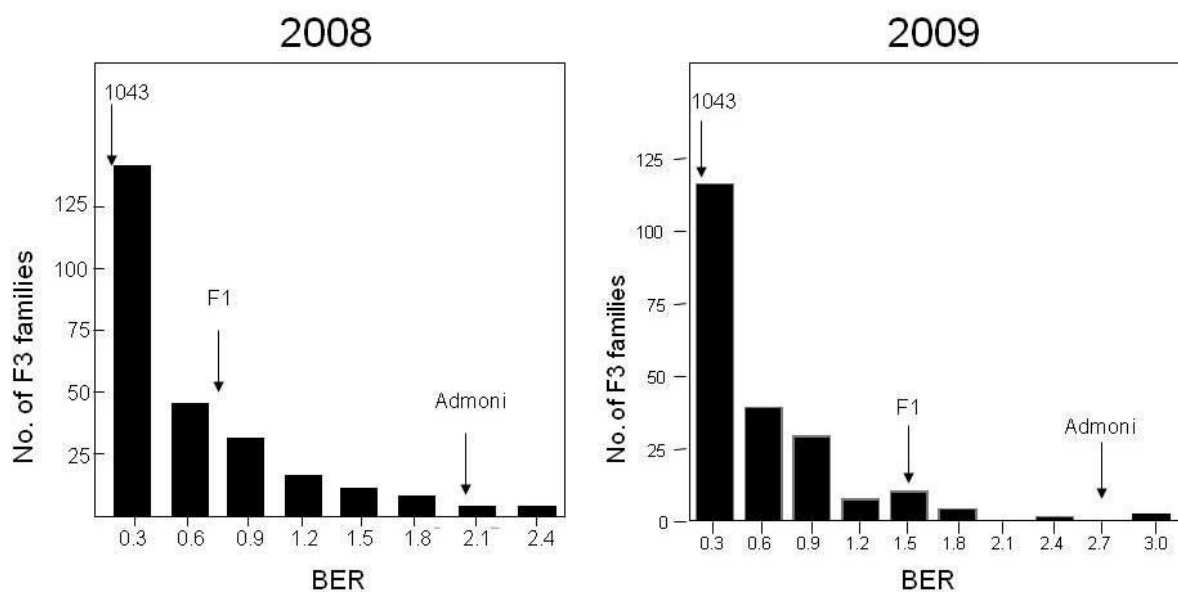
פרוט עיקרי הניסויים

250 משפחות F3 (20 צמחים במשפחה בנוסף לקוי הורים ו F1 בשני בלוקים, 10 צמחים בכל בלוק) שמקורם מצמחי F2 מהכלאה בין זן הפפריקה (*Capsicum annuum*) אדמוני בעל רגישות גבוהה לשחור פיטם לקו הבר 1043 (*C. annuum*) בעל עמידות לשחור פיטם (איור 1) גודלו בשדה הפתוח בבית דגן בעונת הקיץ בשנים 2008 ו 2009 (בכל ניסוי גודלו כ 5000 צמחים). בשנת 2008 הדישון היה מסוג שפר 3+ 8-3-5 כמקובל בחלקות רגילות של צמחי פלפל בשטח הניסוי. בשנת 2009 בנסיון להגביר את האינדוקציה ליצירת שחור פיטם, השתמשנו בדשן מסוג שפר אולם החנקן ממקור אמוני מהווה בו 40-50% מכלל החנקן. לקראת הבשלת הפירות נערכה סריקה פנוטיפית של כל הצמחים בניסוי למדידת רמת הרגישות לשחור פיטם. נקבעה סקלה ויזואלית לעוצמת הנגיעות עבור כל צמח: 0 = כל הפירות ללא שחור פיטם, 1 = 5-1 פירות נגיעים, 2 = 10-6 פירות נגיעים, 3 = מעל 10 פירות נגיעים. על פי נתוני הצמחים הבודדים בכל משפחה חושבו ממוצעי משפחות F3. התפלגות האוכלוסיה וההורים מוצגת באיור 2.



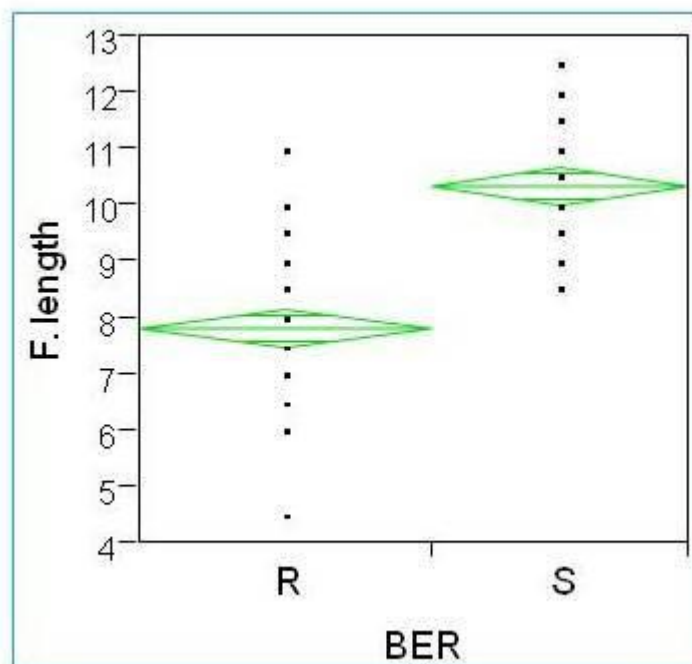
איור 1. הורי האוכלוסיה המתפצלת למידת הרגישות לשחור פיטם.

נתוני התפלגות האוכלוסיה מעידים שרק צמחים בודדים היו בעלי רמת נגיעות דומה להורה הרגיש אדמוני. ואילו מירב הצמחים היו עמידים או עם נגיעות קלה. נתוני ה F1 הראו ערך ביניים של רמת הרגישות בשנת 2009 ודומיננטיות חלקית לעמידות בשנת 2008. הקורלציה בין שתי השנים בהתפלגות הצאצאים היתה חיובית וגבוהה $r = 0.69$ וכן היתה רמת אחידות גבוהה במופע ההורים בתוך ובין השנים, תוצאות המעידות על תורשתיות בינונית-גבוהה של התכונה.



איור 2. התפלגות שחור פיטם (BER) באוכלוסית הצאצאים בשנים 2008 ו 2009.

ההורים של האוכלוסיה נבחרו בשל היותם בעלי פנוטיפ עמיד או רגיש חד משמעי וכן בשל היותם בעלי צורת פרי מאורכת דומה, אם כי קיימים הבדלים באורך הפרי. אורך הפרי של הזן הרגיש אדמוני הוא 11 ס"מ, אורך הפרי של הזן העמיד 1043 הוא 7 ס"מ ואורך הפרי של ה F1 הוא 11.6 ס"מ. מאחר וקיימים הבדלים באורך הפרי בין ההורים המתפצלים באוכלוסיה, מדדנו בשנת 2009 את אורך פרי באוכלוסית הצאצאים ובדקנו האם יש קשר בין אורך הפרי לרמת הרגישות לשחור פיטם (איור 3).



איור 3. ממוצע אורך הפרי של צמחי F3 עמידים לשחור פיטם (R) ורגישים לשחור פיטם (S).

התוצאות מראות שלאורך הפרי השפעה מובהקת חזקה על הרגישות לשחור פיטם ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.53$). אורך הפרי של ממוצע צמחי F3 העמידים לשחור פיטם הוא 7.8 ס"מ ואילו אורך הפרי של ממוצע צמחי F3 הרגישים הוא 10.3 ס"מ.

בהתאם לתוצאות ההקדמיות לפיהן חוסר במינרלים כגון סידן ומנגן קשור ליצירת שחור פיטם, בדקנו פירות צעירים (ללא התפתחות שחור פיטם) משני קוי ההורים לתכולת מינרלים (טבלה 1). ניתן לראות שפירות מהזן הרגיש אדמוני בעלי תכולת אשלגן, סידן, מגנזיום, מנגן וברזל נמוכה באופן מובהק מאלו של הזן העמיד.

טבלה 1. תכולת מינרלים בפירות של קוי ההורים (ממוצע 15 דגימות)

הורה	מינרל	ממוצע	סטית תקן
אדמוני	% נתרן	0.05	0.003
1043		0.05	0.003
אדמוני	% אשלגן	1.92*	0.03
1043		2.23	0.03
אדמוני	% סידן	0.15*	0.003
1043		0.19	0.003
אדמוני	% מגנזיום	0.19*	0.002
1043		0.24	0.002
אדמוני	מנגן ppm	10.9*	0.88
1043		18.2	0.96
אדמוני	ברזל ppm	64.7*	2.4
1043		96.4	2.7
אדמוני	אבץ ppm	46.9	1.1
1043		44.6	1.1

* הבדל מובהק $P < 0.0001$

לאור התוצאות של שנה ראשונה בה נמצאו הבדלים מובהקים בתכולת מינרלים בין פירות של שני ההורים, נמדדה תכולת מינרלים בהורים ובצמחים מ 5 המשפחות העמידות ביותר ומ 5 המשפחות הרגישות ביותר באוכלוסיה המתפצלת (טבלה 2). ניתן לראות שפירות מהזן הרגיש אדמוני היו בעלי תכולת אשלגן, סידן, מגנזיום, מנגן וברזל ואבץ נמוכה מאלו של הזן העמיד, אולם בנגוד לשנה הראשונה בה נצפו הבדלים מובהקים בין ההורים, ההבדלים בניסוי הנוכחי אינם מובהקים אם כי קיימת מגמה דומה

לתוצאות הניסוי מהשנה הראשונה. תכולת המינרלים בצאצאים הרגישים היתה נמוכה יותר כצפוי (אך לא מובהקת) או ברמה זהה לצאצאים העמידים.

טבלה 2. תכולת מינרלים בפירות של קוי ההורים וממוצעי צאצאים עמידים ורגישים (ממוצע 5 דגימות לפנוטיפ).

הורה	מינרל	ממוצע
אדמוני 1043	% נתרן	0.028 0.026 0.029 ± 0.002 0.029 ± 0.002
אדמוני 1043	% אשלגן	1.95 2.46 2.35 ± 0.1 2.13 ± 0.1
אדמוני 1043	% סידן	0.09 0.11 0.11 ± 0.007 0.09 ± 0.007
אדמוני 1043	% מגנזיום	0.11 0.12 0.11 ± 0.004 0.11 ± 0.003
אדמוני 1043	מנגן ppm	11.64 12.06 11.9 ± 0.46 11.9 ± 0.46
אדמוני 1043	ברזל ppm	56.9 58.8 66 ± 8.3 50 ± 8.3
אדמוני 1043	אבץ ppm	37.1 41.2 30.9 ± 3.28 35.2 ± 3.28
ממוצע עמידים		
ממוצע רגישים		

לשם איתור סמנים מולקולריים הנמצאים בתאחיזה לגנים המבקרים את מידת הרגישות לשחור פיטם, יצרנו באלקים של DNA מצמחים עמידים ורגישים לשחור פיטם ממשפחות הצאצאים וסרקנו את ההורים והבאלקים למציאת פולימורפיזם שחוזר על עצמו בין ההורים והבאלקים. למרות שנסרקו למעלה מ 300 פריימרים מסוג RAPD לא זוהו סמנים המבדילים בין הבאלקים העמידים והרגישים. אי לכך המטרה של איתור הסמנים המולקולריים לא הושגה.

התפלגות משפחות F3 הראתה שהעמידות לשחור פיטם מורשת כתכונה כמותית עם מספר לא ידוע של גנים המבקרים אותה. ההתפלגות היתה לא סימטרית, דבר המעיד על דומיננטיות של העמידות (בהתאמה לערכי F1), או לחילופין על העדר נגיעות מספקת והתחמקות של צמחים רבים. הבקורות הרגישות (ההורה אדמוני) שפוזרו במספר אתרים בשדה היו עם נגיעות גבוהה, דבר המעיד שרמת הנגיעות היתה גבוהה ואחידה בשדה. כמו כן הקורלציה הגבוהה יחסית בין שתי השנים במשפחות ה F3 מעידה על נגיעות הומוגנית בשדה. מובהקות הקשר בין מידת הרגישות לשחור פיטם לבין אורך הפרי תומכת בממצאים ספורדים מהעבר לפיהם זנים בעלי פרי מאורך (כגון רמירו) נוטים להיות בעלי רגישות יתר לשחור פיטם. אולם עד היום לא הוכח הקשר הזה באוכלוסיה מתפצלת. ככל הנראה פירות מאורכים סובלים יותר מחוסר הספקת מינרלים לפיטם הפרי, דבר המהווה ככל הנראה את הגורם המרכזי לנגיעות. אי לכך הבסיס לקורלציה אינו ככל הנראה גנטי, היינו תאחיזה של גנים המבקרים שתי תכונות בלתי תלויות אלא בסיס פיסולוגי משותף. התורשתיות הבינונית-גבוהה של מידת הרגישות לשחור פיטם מעידה שניתן לטפח זנים עמידים ביעילות גבוהה, במגבלה של קושי לטפח זנים עמידים בעלי פרי ארוך.

בשנה השניה של הניסוי תכולת המינרלים בפירות של ההורה הרגיש היתה נמוכה מזו של ההורה העמיד, בהתאמה לנתונים קודמים על הקשר בין חסר במינרלים ורגישות לשחור פיטם, אך בניגוד לשנה הראשונה ההבדלים לא היו מובהקים. תכולת המינרלים בצאצאים הרגישים היתה נמוכה יותר (אך לא מובהקת) או ברמה זהה לצאצאים העמידים, אי לכך המגמה הכללית של ירידה בתכולת המינרלים בהורה הרגיש נשמרה גם בצאצאים. תוצאות אלו מעידות שבחירת ההורים לרמת רגישות שונה לשחור פיטם היתה מהימנה וכי קיים קשר גנטי בין רמת הרגישות לשחור פיטם לתכולת המינרלים בפרי.

המטרה של איתור סמנים מולקולריים הנמצאים בתאחיזה לגנים המבקרים את הרגישות לשחור פיטם לא הושגה. לכך מספר סיבות אפשריות. א. תורשת התכונה כמבוקרת ע"י מספר גדול של גנים שככל הנראה כל גן מבקר רק חלק קטן מהשונות לתכונה ולכן לא ניתן לאתר באמצעים העומדים לרשותנו. ב. השמוש באוכלוסיה תוך מינית (כלומר ששני ההורים מהמין *Capsicum*) *annuum* לבדיקת התפצלות התכונה. בדרך כלל משתמשים באוכלוסיות בין מיניות למטרות מיפוי מולקולרי בגלל רמת פולימורפיזם גבוהה ב DNA. אולם במחקר הנוכחי אנו נמנענו משמוש באוכלוסיות בין מיניות בגלל פוריות נמוכה של הצאצאים. ג. כיסוי לא מלא של הגנום בסמנים. במחקר זה עשינו שמוש בסמנים אקראיים שמקומם בגנום אינו ידוע. בגלל מגבלות תקציב לא ניתן היה לבדוק מספר רב של סמנים המכסים באופן מלא את הגנום.

סכום

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה. מטרות המחקר היו בחינת ההתפצלות של משפחות F3 מהכלאה בין הורה עמיד ורגיש לשחור פיטם, למוד התורשה של העמידות לשחור פיטם באוכלוסיה המתפצלת וסריקת סמנים מולקולריים למציאת תאחיזה לגנים המבקרים את תכונת העמידות.	
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. התפלגות הצאצאים לשחור פיטם מעידה על תורשה כמותית ופוליגנית של העמידות לשחור פיטם. נמצאה קורלציה גבוהה בין התפלגות הצאצאים בשתי השנים שנבדקו. כמו כן נמצאה מובהקות גבוהה של אורך הפרי על מידת הרגישות לשחור פיטם. לזיהוי סמנים מולקולריים בתאחיזה לגנים המבקרים את התכונה יצרנו באלקים של DNA מצמחים עמידים ורגישים לשחור פיטם. באלקים אלו נסרקו ע"י מספר מאות של פריימרים מסוג RAPD אולם לא זוהו סמנים המבדילים בין הבאלקים העמידים והרגישים.	
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח. לרמת הרגישות לשחור פיטם נמצאה תורשתיות בינונית עד גבוהה, המעידה שניתן לטפח זנים עמידים ביעילות גבוהה, במגבלה של קושי לטפח זנים עמידים בעלי פרי ארוך. סריקת הסמנים לא הניבה תוצאות חיוביות בגלל מספר סיבות אפשריות: רמת פולימורפיזם נמוכה בהכלאה התוך מינית, כיסוי לא מספיק של הגנום ובקרה פוליגנית של התכונה.	
הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר. לשם מיפוי הגנים המבקרים את התכונה יש צורך להשתמש בטכנולוגיות גנומיות חדישות המבוססות על רצוף DNA בעלות כושר זיהוי גבוה של פולימורפיזם ב DNA	
. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.	
לא	
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)	
☐	ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
☐	