

דו"ח לתוכנית מחקר מספר 203-0975-15

לשנת 2015 (שנה שלישית מתוך שלוש, דו"ח מסכם)

אפיון גנטי וביוכימי של הגורמים הקובעים את השונות בצבע קליפה וציפה בזני משמש *

Genetic and biochemical characterization of the factors determining flesh and peel color of different plum and apricot varieties

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י:

טל איזיקסון, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער

אפרים לוינסון, מחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער

דורון הולנד, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער

עדי פייגנבוים, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן

עינת בר, מחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער

מתת זהר, מחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער

Tal Isaacson, Fruit Tree Sciences, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. tali@volcani.agri.gov.il

Efraim Lewinsohn, Vegetable Crops, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. twefraim@volcani.agri.gov.il

Doron Holland, Fruit Tree Sciences, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. vhhollan@agri.gov.il

Adi Faigenboim, Fruit Tree Sciences, A.R.O. The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250. adif@volcani.agri.gov.il

Einat Bar, Vegetable Crops, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. bareinat@volcani.agri.gov.il

Matat Zohar, Fruit Tree Sciences, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. matat@volcani.agri.gov.il

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר

* תוכנית המחקר המקורית כללה אפיון פירות שזיף, אך עקב המלצת ועדת השיפוט להתרכז בגידול אחד, וצמצום התקציב שבוקש, נערך מחקר על משמש בלבד.

תקציר

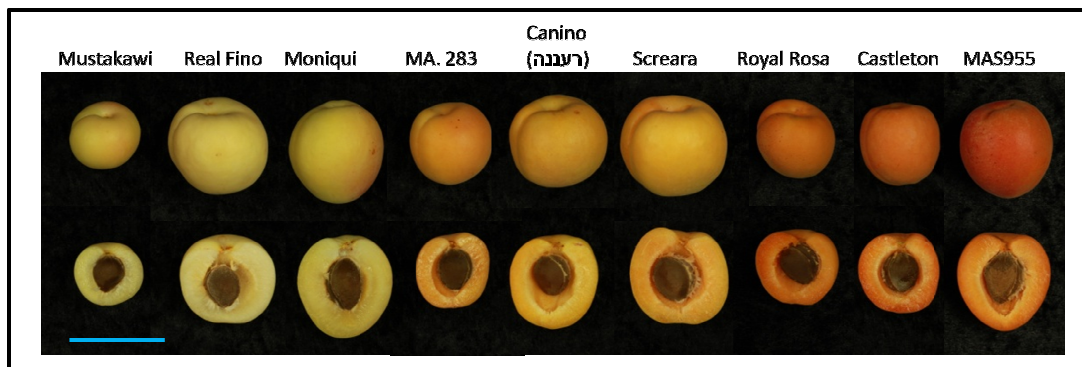
לתכולת והרכב קרוטנואידיים בפרי השפעה רבה על קביעת ערך הפרי הן מבחינת חזות (צבע) והן מבחינת תזונה וטעם. הפיגמנטים העיקריים בפרי המשמש הם ממשפחת הקרוטנואידיים. מטרת המחקר המוצג היא למצוא גורמים גנטיים הקובעים שונות בצבע פרי במשמש. במהלך המחקר בוצע אפיון הרכב ותכולת הקרוטנואידיים של פירות משמש בשלים מלמעלה מ 120 זני וקווי משמש מאוסף הזנים בנווה יער. תוצאות האפיון מצביעות על שונות רבה בין הפרטים ומצביעות על הרכב קרוטנואידיים ייחודי במשמש, המסמן אותו כאחד המקורות הצמחיים העשירים ביותר לקרוטנואידיים פיטואן ופיטופלואן. אפיון טרנסקריפטומי של פירות בסדרת הבשלה של שלושה זנים מייצגים, העלה כי ביטוי גבוה של גנים המשתתפים בתחילת מסלול היצירה של קרוטנואידיים עשוי להסביר רמות קרוטנואידיים גבוהות בפרי, וכן שביטוי גבוה של גנים המקודדים לאנזימים מפרקי קרוטנואידיים עשויים להסביר רמות קרוטנואידיים נמוכות בפרי. מבחני אסוציאציה גנטית שעשו שימוש בסמנים שפותחו על סמך רצפים מהטרנסקריפטום, העלו כי הגן *Ccd4* המקודד לאנזים מפרק קרוטנואידיים, נמצא באסוציאציה למרבית מתכונות הקרוטנואידיים שנבדקו. מתוך המבחנים עולה כי השונות הגנטית בסמנים שנבדקו בגן *Ccd4* עשויה להסביר כ 20% מהשונות הפנוטיפית. בדיקה של תוצרי קרוטנואידיים נדיפים בסדרה של פירות מייצגים מצאה שקיימים תוצרים ייחודיים בזנים בעלי פרי בהיר מאוד (בעיקר מגסטיגמה-טריאנים), שלא קיימים בזנים בעלי רמת קרוטנואידיים גבוהה. התוצרים שנמצאו אינם נראים כתוצרים ישירים של פירוק קרוטנואידיים ולא ניתן בשלב זה לקבוע האם פעילות הגן *Ccd4* אחראית להם. מהמחקר עולה כי תכונות הקשורות בכמות והרכב קרוטנואידיים בפרי המשמש מושפעות ממספר גורמים גנטיים, ויש צורך באוכלוסיות מיפוי נוספות ובמספר רב יותר של סמנים בכדי לאשש את הגנים המועמדים ולמצוא נוספים.

תוכן העניינים

| | |
|-----------------------------------|----|
| מבוא..... | 3 |
| מטרת המחקר..... | 5 |
| פירוט עקרי הניסויים והתוצאות..... | 6 |
| דיון וסיכום..... | 14 |
| בביליוגרפיה..... | 16 |
| סיכום עם שאלות מנחות..... | 18 |

מבוא (מבוא מפורט קיים בהצעת המחקר)

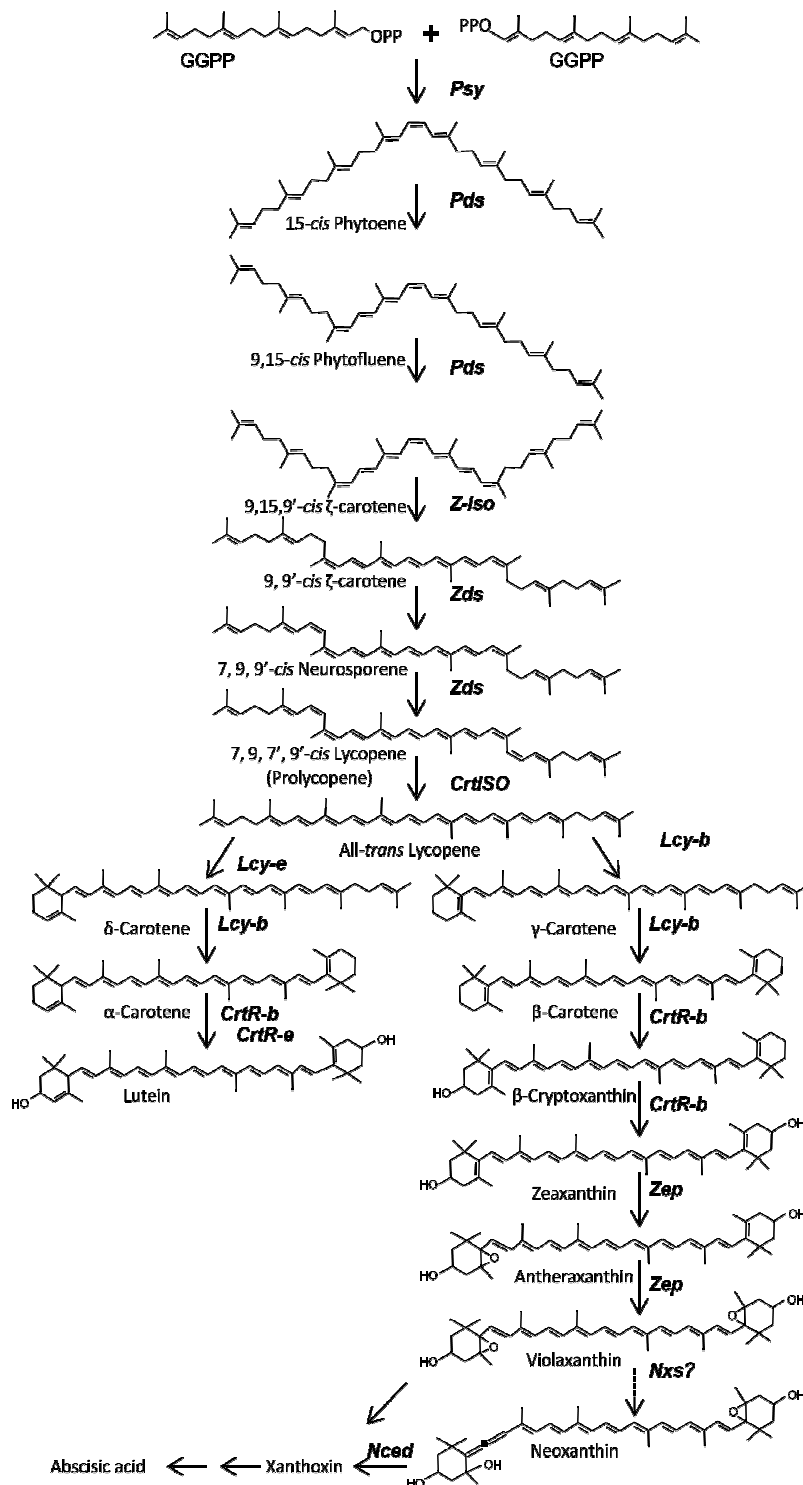
הצבענים העיקריים המקנים לפרי המשמש את צבעו הם חומרים ממשפחת הקרוטנואידים. חומרים אלו הם מהצבענים הנפוצים ביותר בטבע. בצמח, הקרוטנואידים חיוניים במערך הפוטוסינתטי (Domonkos et al., 2013), וכחומרי מוצא להורמונים צמחיים כגון חומצה אבסיסית (ABA) וסטריגולקטונים (McQuinn et al., 2015). בנוסף, הם מעניקים לפירות ופרחים רבים את גווני הצהוב, כתום ואדום (Yuan et al., 2015). מקורו של ויטמין A, החיוני לתזונתנו, הוא בקרוטנואידים מסוימים, ולחומרים רבים מהמשפחה מיוחסים תפקידים בהגנה מפני מחלות כגון סרטן ומחלות לב (Fraser and Bramley, 2004; Krinsky and Johnson, 2005; Davies, 2007). כמו כן, תוצרי פירוק נדיפים של קרוטנואידים הם חומרי ארומה חשובים. מכאן, **שלהרכב וכמות הקרוטנואידים בפירות שאנו צורכים יש תפקיד חשוב בקביעת ערך הפרי, הן מבחינה חזותית, והן מבחינת טעם ותזונה**. צבע הפרי של המשמש מהווה גורם חשוב מאוד בקביעת איכות הפרי, ובארץ הזן העיקרי המשווק, 'רעננה', הנטוע בכ 70% משטחי המשמש (אנטמן, 2009), הוא בעל פרי בצבע צהוב ואינו מושך כמו זנים אחרים בעלי צבע כתום עמוק (איור 1).



איור 1: שונות בצבע קליפה וציפה בין זני משמש שונים מאוסף הזנים בנווה יער. קנה המידה מייצג 5 ס"מ.

הקרוטנואידים הם מולקולות בעלות 40 פחמנים המיוצרים ונאגרים בפלסטידות. במהלך הבשלה של רקמות פרי הצוברות קרוטנואידים, מלווה השינוי בצבע הפרי, מירוק לצבעוני, בשינוי במבנה הכלורופלסטים והפיכתם לכרומופלסטים. תהליך הביוסנתזה של הקרוטנואידים בצמח, והגנים המקודדים לאנזימים המשתתפים בו, נחקרו רבות בצמחי מודל כגון ארבידופסיס, תירס ועגבניה וכיום המסלול ידוע כמעט לכל פרטיו (Cazzonelli and Pogson, 2010). הקרוטנואיד הראשון במסלול הוא פיטואן, שהוא חסר צבע. הוא נוצר ע"י דחיסה של שתי מולקולות ג'רנילג'רניל דיפוספאט (GGPP) ע"י האנזים פיטואן סינטאז (PSY), ויצירתו נחשבת לשלב הקובע את שטף יצירת הקרוטנואידים. האנזים פיטואן דסטוראז (PDS) מכניס שני קשרים כפולים במולקולת הפיטואן ליצירת ζ -קרופן דרך תוצר הביניים פיטופולאן שגם הוא כמעט חסר צבע. הכנסה של שני קשרים כפולים נוספים ע"י האנזים ζ -קרופן דסטוראז (ZDS) מביאה ליצירת הקרוטנואיד האדום ליקופן דרך תוצר הביניים נירוספורן (איור 2). הליקופן מסמן נקודת פיצול במסלול הביוסינתזה. הוא עשוי לעבור, משני צידיו, ציקליזציה מסוג אפסילון (ע"י האנזים ליקופן ϵ -ציקלאז) ו/או בטא (ע"י האנזים ליקופן β -ציקלאז) ולהפוך ל α -קרופן או ל β -קרופן. כל אחד מחומרים אלו יכול לעבור שינויים כימיים נוספים לקבלת חומרים ממשפחת הקסנתופילים (איור 2). גם תהליך הפירוק של קרוטנואידים והפיכתם לחומרים

נדיפים (אפוקרטנואידים) נלמד בשנים האחרונות, ונמצאו גנים המקודדים לאנזימים השותפים (Lewinsohn et al., 2005; Lewinsohn et al., 2005; Ibdah et al., 2006; Schwab et al., 2008; Brandi et al., 2011; Yahyaa et al., 2013).



איור 2: מסלול הביוסינתזה של הקרטנואידים העקריים בהדרים והאנזימים המרכזיים המשתתפים. PSY, פטואן סינטאז, PDS, פטואן דיסטוראז, Z-ISO, זטא-קרואן איזומראז, ZDS, זטא-קרואן דיסטוראז, CRTISO, קרואן איזומראז, LYC-B, ליקופן בטא-ציקלאז, LYC-E, ליקופן-ציקלאז, CHY-B, קרואן בטא-הדרוקסילאז, CHY-E, קרואן אפסילון-הדרוקסילאז, ZEP, זיקסנתין אפוקסידאז, NCED, 9-ציס-אפוקסיקרטנואיד דיאוקסיגנאז, CCD, אנזים חותר קרטנואידים. זיקסנתין אפוקסידאז, NCED, 9-ציס-אפוקסיקרטנואיד דיאוקסיגנאז, CCD, אנזים חותר קרטנואידים.

בצמחים ידועים שני סוגים של אנזימים המפרקים קרוטנואידים לאפוקרוטנואידים. סוג אחד כולל את NCED (9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase), שהסובסטרטים שלו הם ויולקסנתין ונאוקסנתין. הסוג השני כולל משפחה גדולה של אנזימים הקרויים CCD (Carotenoid Cleavage Dioxygenase) ולהם מגוון סובסטרטים רחב. במשמש, צבע הציפה והקליפה נע מזנים בעלי פרי בהיר, כמעט חסר צבע, דרך זנים צהובים ועד זנים בעלי גוון כתום עמוק (איור 1). למרות הידע הרב שקיים בנושא ביוסינתזה של קרוטנואידים בצמחי מודל, מעט מאוד נחקר בנושא בפרי משמש (Ruiz et al., 2005).

אפיון שנעשה ב-1960, לפירות של זן עלום, גילה כי המרכיב העיקרי הוא בטא-קרוטן, ואחריו בריכוזים פחותים פיטואן, ופיטופלואן (Curl, 1960). מעניין לציין שנמצא גם ליקופן, באיזומרים שונים, דבר שהינו שכיח בטבע (Curl, 1960). מאז, העבודות המעטות שנעשו בנושא נטו לבדוק את תכולת הקרוטנואידים הכוללת, או בדקו תכולה של β קרוטן בלבד או של β -קרוטן ומספר מצומצם של קרוטנואידים נוספים (Marty et al., 2005; Ruiz et al., 2005; Ruiz et al., 2008). גם ברמת האנזימים המשתתפים בתהליך הביוסינתזה של הקרוטנואידים במשמש, או הגנים המקודדים להם, נעשה מחקר מוגבל ביותר. הרצף, החלקי או המלא, של גנים בודדים מהמסלול פורסם, ורק חלק מהם נבדקו בהקשר ניסויי (Marty et al., 2005). בעבודת מחקר שניסתה לברר מדוע פירות של הזן 'Moniqui' הם בהירים מאוד, אפיינו החוקרים ביטוי של שלושה גנים נבחרים ממסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים בפירות של 'Moniqui' והשוו לביטוי הגנים בפירות של זן בעל צבע פרי כתום עז 'Goldrich'. תוצאות המחקר הראו שביטוי הגנים שנבדקו לא יכול להצביע על הסיבה להבדלים בצבע (Marty et al., 2005). חוקרים אלו לא בדקו ביטוי של גנים המקודדים לאנזימים מפרקי קרוטנואידים, ייתכן שזאת משום שגנים כאלו לא היו ידועים בגלעיניים בזמן עריכת המחקר. לאחרונה הודגם באפרסק כי פעילות של אנזים המפרק קרוטנואידים (CCD4) היא הגורם למופע פרי לבן באפרסק, שהוא כמעט נטול קרוטנואידים, בהשוואה למופע צהוב בו לא מתעוררת פעילות כזו במהלך ההבשלה. פעילות הפירוק של הקרוטנואידים באפרסק הלבן מתבטאת בארומה עשירה ושונה מזו של הפירות הצהובים כתוצאה מהצטברות תוצרי הפירוק (Brandi et al., 2011). במאמרים עוקבים פורסמו מוטציות שונות בגן CCD4 באפרסק שגורמות להבדלים בפנוטיפ (Adami et al., 2013; Falchi et al., 2013; Ma et al., 2014).

מטרת המחקר

המטרה העיקרית של עבודה זו היא למצוא גורמים גנטיים המשפיעים על השונות בצבעי הציפה והקליפה של זני משמש (*).

*תוכנית המחקר המקורית כללה אפיון פירות שזיף, אך עקב המלצת ועדת השיפוט להתרכז בגידול אחד, יצמצום התקציב שבוקש, נערך מחקר על משמש בלבד.

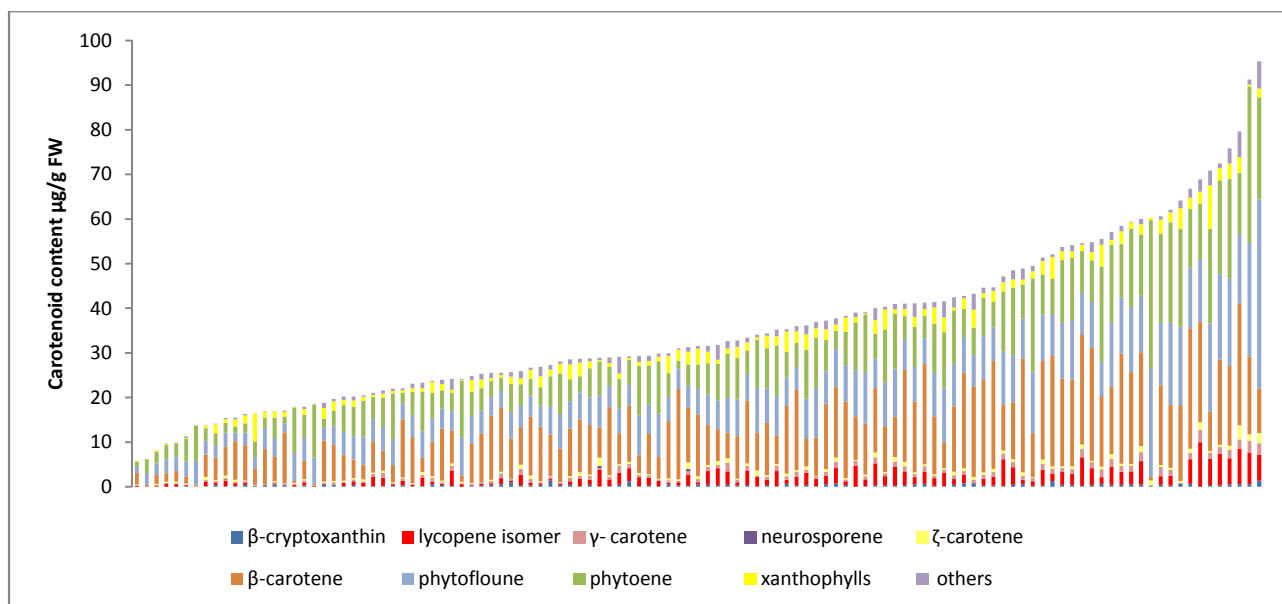
מטרות ספציפיות א. אפיון כימי של הרכב הצבענים ותוצריהם מפירות בשלים של זני המשמש והשזיף השונים שבאוסף שבנווה יער בשתי רקמות: ציפה וקליפה **ב.** אפיון הביטוי של גנים (טרנסקריפטום) במהלך תהליך שבירת הצבע בפרי המבשיל במספר מצומצם של זנים המייצגים את השונות בצבעי הפירות של

משמש ושזיף, בשתי רקמות: ציפה וקליפה (בסה"כ ריצוף עמוק של mRNA מרקמות ציפה של שלושה זנים ומרקמות קליפה של שלושה זנים). ג. מציאת גנים מועמדים להסברת השונות בצבע בזנים הנבחרים, ובדיקת השונות הגנטית שלהם, והביטוי שלהם בזנים נוספים מהאוסף, בעלי פנוטיפ דומה לצורך הבנת המנגונים קובעי הצבע.

פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות שהתקבלו:

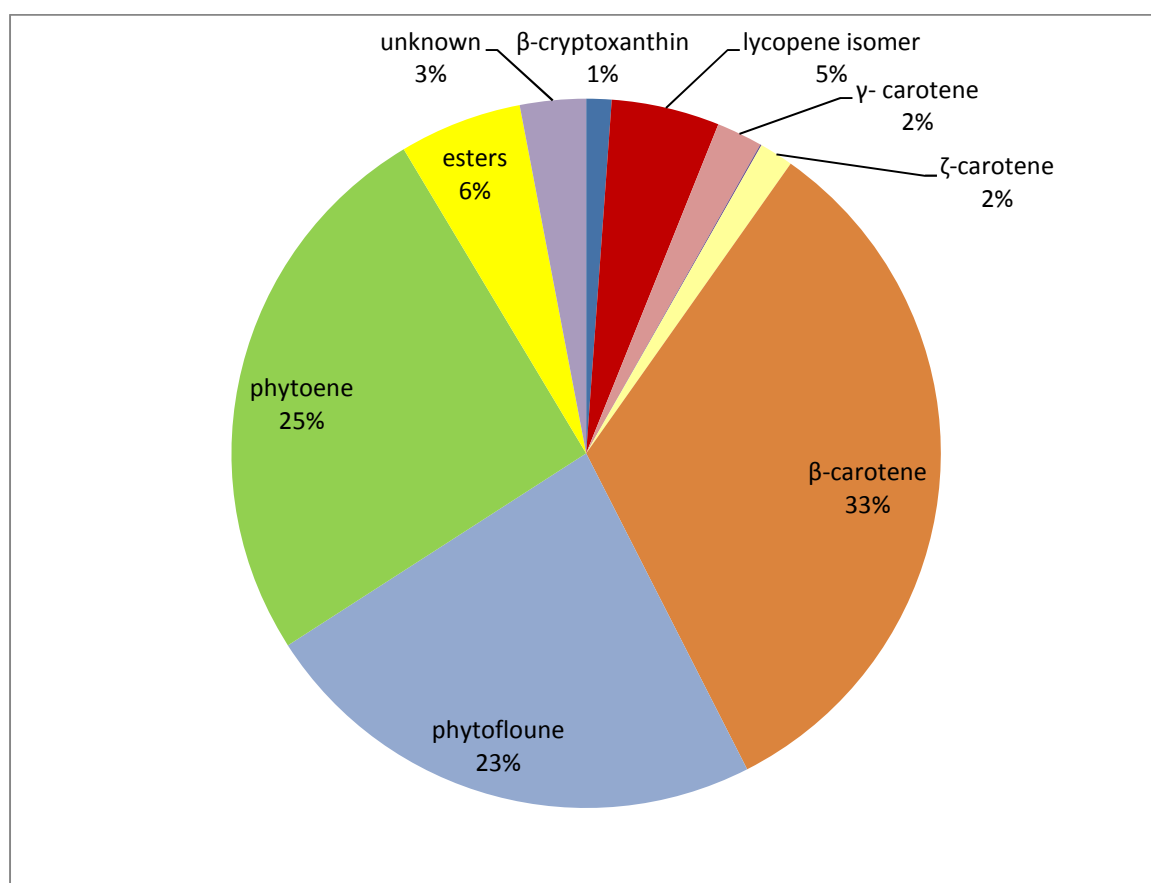
1. אפיון וכימות הקרוטנואידים ברקמות פרי משמש בשל מאוסף זני וקווי המשמש בנווה יער

במרכז המחקר בנווה יער קיים אוסף של זני משמש שנאספו מכל העולם וכוללים גם זנים מקומיים שלוקטו ברחבי הארץ (Holland et al., 2006). אוסף המשמש כולל כ-80 זנים ועוד עשרות קווים שהם תוצרי הכלאה בין הזנים. האוסף מייצג מגוון רחב של גוונים, הן בציפה והן בקליפה. במהלך המחקר נאספו פירות מכ-120 זנים וקווים של משמש, וכמות והרכב הקרוטנואידים אופיינו מדוגמאות שנלקחו משלושה פירות שונים מכל זן. אפיון ההרכב נעשה בעזרת HPLC וקביעת תכולת הקרוטנואידים הסתמכה על נתוני ההרכב ועל מדידות בספקטרוטומטר. תוצאות האנליזה מראות כי קיימת שונות רבה בכמות הקרוטנואידים בין זני המשמש השונים (איור 3), בטווח שנע מ-5 µg/g FW ועד ליותר מ-90 µg/g FW. נראה שברוב המקרים הפרופיל הקרוטנואידי דומה מבחינת מרכיביו, אך קיימים הבדלים ביחסים הכמותיים של הקרוטנואידים השונים (איור 3). כך שגם בהרכב הקרוטנואידים נראה טווח רחב של ערכים; אחוז הבטא-קרופן (β-carotene) בפרי נע בין 2% ל-67% (0.3-27 µg/g), אחוזי הליקופן (Lycopene) נעים בין 0% ל-14% (0-10 µg/g), והקרוטנואידים חסרי הצבע, פיטואן (Phytoene) ופיטופלואן (Phytofluene), מהווים בין 5% ל-64% (1-55 µg/g), ובין 12% ל-44% (1-42 µg/g) בהתאמה.



איור 3: פרופיל קרוטנואידים בדוגמאות פרי משמש בשל שנדגמו מ-115 זנים וקווים שונים. כל עמודה מייצגת ממוצע של שלוש חזרות ביולוגיות (פירות) של זן/קו יחיד.

הפרופיל הקרוטנואדי הממוצע של ציפת פרי המשמש ייחודי ביותר (איור 4). נראה שהקרוטנואיד העיקרי, כפי שמתואר בספרות, הוא אכן β -קרוטן, אך הרמה שלו בציפת הפרי היא רק כ-30% בממוצע. בנוסף לכך נראות רמות גבוהות ביותר של הקרוטנואידים חסרי הצבע פיטואן ופיטופלואן, כ-50% בממוצע (25.9%, ו-23.5% בהתאמה) מכלל הקרוטנואידים. פיטואן ופיטופלואן נמצאים בתחילת מסלול היצירה של הקרוטנואידים (איור 2) ולרוב לא מופיעים כלל או מופיעים ברמות נמוכות ברקמות צמחיות. בנוסף פרי המשמש מכיל קרוטנואידים נוספים הנמצאים בתחילת המסלול כמו ζ -קרוטן ונירוספורן, וכן נראות גם רמות גבוהות יחסית של ליקופן, כ-5% בממוצע, המופיע כאיזומרים המכילים קשרי *cis* (איור 4).



איור 4: הרכב קרוטנואידים ממוצע בפרי משמש בשל. מבוסס על אפיון פירות מ 115 זנים וקווים.

בכדי להבין אם פרופיל הקרוטנואידים הייחודי שנצפה בציפת פרי המישמש הוא ייחודי לרקמת הפרי או שגם ברקמת העלה קיים פרופיל שונה מהמצופה, אופיינו קרוטנואידים מרקמות עלים בשלבים שונים של התפתחות, בחושך (14 יום בתנאי חושך) או במשטר אור יום טבעי. ברקמות העלים לא נמצאו הקרוטנואידים המייחדים את רקמת הפרי: פיטואן, פיטופלואן, ζ -קרוטן, נירוספורן או ליקופן. עם זאת, תוצאות האנליזה הראו שהקרוטנואידים של רקמות עלי המשמש כוללים קרוטנואידים לא אופייניים שלא הצלחנו לזהות ועשויים להוות עד 30% מכלל הקרוטנואידים ברקמה (תוצאות לא מוצגות). הצטברות קרוטנואידים אלו בעלים עשויה להיות קשורה בגורמים לפרופיל המיוחד של הפרי וייתכן שזיהוי שלהם בעתיד עשוי להצביע על המנגנון הגורם לפרופיל זה.

2. אפיון הטרנסקריפטום במהלך הבשלת פירות של שלושה זני משמש מייצגים (RNAseq)

על סמך אפיון פרופיל הקרוטנואידים, נבחרו שלושה זני משמש המראים שונות רבה: 'מוסטקווי' הבהיר, 'רעננה' ('קנינו') בעל פרי בצבע ביניים ו'פז' בעל פרי בצבע כתום-תרוג (איור 5), נאספו פירות לאורך ארבע נקודות זמן במהלך ההבשלה: פרי ירוק, פרי בשלב שבירת צבע, פרי ששינה את צבעו אבל עדיין לא בשל, ופרי בשל, בחמש חזרות ביולוגיות. דוגמאות הפרי אוחסנו בהקפאה עמוקה. בשלב ראשון, הופק mRNA מפירות בודדים של כל שלבי ההבשלה השונים, עבור כל זן. הדוגמאות הועברו לריצוף עמוק ע"י מכשיר



איור 5: זנים המייצגים שונות בצבע פרי במשמש

ILLUMINA HighSeq 2000, בקריאות של 100 בסיסים מקצוות מזווגים. בסה"כ התקבלו בממוצע למעלה מ-33 מיליון רצפים באיכות טובה עבור כל תנאי ניסוי (טבלה 1).

טבלה 1: תיאור כמות ואיכות הרצפים שהתקבלו מריצוף עמוק של mRNA שהופק מסדרות הבשלה של פירות משלושה זנים שונים: מוסטקווי, פז ורעננה. המספרים 1,2,3,4 מייצגים שלבי הבשלה ירוק, שובר צבע, ביניים ובשל בהתאמה.

| Sample ID | # Reads | % of raw clusters per lane | Mean Quality Score (PF) |
|--------------|------------|----------------------------|-------------------------|
| Mustakawi 1 | 33,363,354 | 8.19 | 35.36 |
| Mustakawi 2 | 27,301,292 | 6.7 | 35.46 |
| Mustakawi 3 | 34,043,542 | 8.36 | 35.41 |
| Mustakawi 4 | 44,934,796 | 11.03 | 35.43 |
| PAZ1 | 26,353,976 | 6.47 | 35.46 |
| PAZ2 | 33,280,120 | 8.17 | 35.52 |
| PAZ3 | 38,336,006 | 9.41 | 35.5 |
| PAZ4 | 34,259,110 | 8.41 | 35.33 |
| canino1 | 31,405,632 | 7.71 | 35.39 |
| canino2 | 32,970,584 | 8.1 | 35.53 |
| canino3 | 30,453,924 | 7.48 | 35.58 |
| canino4 | 35,265,574 | 8.66 | 35.6 |
| Undetermined | 5,300,702 | 1.3 | 29.59 |

הרצפים הגולמיים עובדו ע"י דר' עדי פייגנבוים כך שנערכה בנייה של קונטיגים (*de novo*) ונערכה השוואה לרצף התעתיקים הידועים מגנום האפרסק הנגיש לקהילת המחקר. ע"ס הנתונים חושבו ערכים מנורמלים של ביטוי הגנים השונים. נערכה השוואה של הקונטיגים שנמצאו במשמש אל מול גנים ידועים המשתתפים בתהליך היצירה של קרוטנואידים בצמח (רובם מעגבנייה) וזוהו גנים הומולוגיים. טבלה 2 מסכמת את ביטוי הגנים ההומולוגיים במשמש במהלך הבשלת הפרי.

טבלה 2: רמות ביטוי של גנים הקשורים במסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים (ערכים מנורמלים), בשלושה זני משמש ('מוסטקאווי', 'רעננה' ו'פז') בארבעה שלבי ההבשלה (1: ירוק, 2: שובר צבע, 3: ביניים 4: בשל). גנים המתבטאים בצורה שונה בין הזנים מופיעים בהדגשה. גנים נבחרים העשויים להסביר את השונות הפנוטיפית בין הזנים מופיעים באדום.

| Gene symbol | name (function) | Mustakawi 1 | Mustakawi 2 | Mustakawi 3 | Mustakawi 4 | canino 1 | canino 2 | canino 3 | canino 4 | PAZ1 | PAZ2 | PAZ3 | PAZ4 |
|------------------------------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <i>lpi (ldi)</i> | IPP isomerase | 101.51 | 89.32 | 91.72 | 108.9 | 38.59 | 38.96 | 37.95 | 37.88 | 27.3 | 43.3 | 32.7 | 24.93 |
| <i>Ggps-2</i> | Geranylgeranyl diphosphate synthase | 28.09 | 27.76 | 37.54 | 44.34 | 30.09 | 51.26 | 55.3 | 44.55 | 21.4 | 56.7 | 58.9 | 71.64 |
| <i>Ggps-1</i> | Geranylgeranyl diphosphate synthase | 0.53 | 1.21 | 0.85 | 0.72 | 0 | 0.13 | 0.08 | 0.14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Psy-1</i> | Phytoene synthase 1 | 28.85 | 93.65 | 182.46 | 302.82 | 50.91 | 113.4 | 308.3 | 358.1 | 28.7 | 522 | 653 | 1173 |
| <i>Psy-2</i> | Phytoene synthase 2 | 2.08 | 1.48 | 1.34 | 1.24 | 4.6 | 5.57 | 5.06 | 9.71 | 2.72 | 0.93 | 0.92 | 1.56 |
| <i>PTOX</i> | Plastid terminal oxidase | 12.6 | 9.61 | 9.34 | 9.88 | 19.34 | 23.87 | 21.01 | 25.06 | 11.7 | 34.4 | 23.1 | 26.42 |
| <i>Pds</i> | Phytoene desaturase | 10.96 | 12.7 | 19.06 | 15.74 | 10.72 | 13.7 | 14.99 | 16.8 | 17.2 | 37.4 | 35.4 | 37.89 |
| <i>Zds</i> | Z-carotene desaturase | 156.5 | 264.03 | 417.18 | 413.01 | 185.4 | 296 | 443.1 | 429.5 | 131 | 571 | 652 | 848.5 |
| <i>CrtIso</i> | Carotene isomerase | 2.96 | 1.85 | 1.19 | 1.6 | 2.13 | 1.46 | 1.09 | 0.87 | 1.81 | 1.61 | 1.4 | 0.72 |
| <i>CRTISO2</i> | Carotene isomerase like | 0.38 | 0.49 | 0.4 | 0.2 | 0.26 | 0.08 | 0.23 | 0.17 | 0.28 | 0.25 | 0.28 | 0.25 |
| <i>Ziso</i> | Presumed ζ-carotene isomerase | 11.89 | 12.76 | 15.87 | 15.27 | 19.48 | 22.72 | 28.41 | 26.54 | 15.4 | 20.8 | 21.1 | 24.58 |
| <i>Lcy-e (CrtL-e)</i> | Lycopene ε-cyclase | 0.39 | 0.59 | 0.16 | 0.06 | 0.46 | 0.13 | 0.1 | 0.05 | 0.26 | 0.09 | 0 | 0.05 |
| <i>Lcy-b (CrtL-b)</i> | Lycopene β-cyclase | 5.14 | 10.74 | 11.74 | 14.42 | 13.09 | 24.23 | 38.68 | 35.68 | 4.75 | 15.6 | 19.8 | 15.79 |
| <i>CycB(1)</i> | Lycopene β-cyclase | 17.42 | 24.09 | 27.77 | 29.75 | 33.03 | 47.08 | 67.19 | 62.27 | 20.4 | 36.5 | 40.8 | 40.42 |
| <i>CycB(2)</i> | Lycopene β-cyclase | 22.56 | 34.83 | 39.51 | 44.17 | 46.12 | 71.31 | 105.9 | 97.95 | 25.1 | 52 | 60.6 | 56.21 |
| <i>CYP97C1</i> | ε-β-carotene hydroxylase | 5.47 | 4.1 | 5.64 | 7.27 | 6.72 | 7.76 | 11.01 | 13.67 | 6.49 | 23 | 19.9 | 22.38 |
| <i>CYP97A3</i> | β-carotene hydroxylase | 9.94 | 8.9 | 8.7 | 8.65 | 7.97 | 9.32 | 7.07 | 8.1 | 5.62 | 9.8 | 6.87 | 6.25 |
| <i>ZEP(1)</i> | Zeaxanthin epoxidase | 41.46 | 53.07 | 91.73 | 110.87 | 30.16 | 32.46 | 63.48 | 86 | 38.7 | 128 | 150 | 167.9 |
| <i>Vde</i> | Violaxanthin deepoxidase | 1.51 | 1.28 | 0.95 | 0.59 | 4 | 3.16 | 2.27 | 2.22 | 3.32 | 1.99 | 0.9 | 0.89 |
| <i>ABA4(1)</i> | ABA deficient mutant | 6.07 | 6.29 | 7.62 | 7.33 | 5.81 | 4.88 | 5.03 | 5.71 | 3.4 | 5.95 | 6.88 | 6.51 |
| <i>DWARF27</i> | β-carotene 9 cis isomerase | 0.16 | 0.1 | 0.09 | 0.19 | 0.43 | 1.71 | 0.74 | 0 | 0.82 | 0.3 | 0.46 | 0 |
| <i>LeNCED1</i> | Neoxanthin cleavage enzyme | 44.11 | 85.32 | 249.85 | 439.49 | 6.36 | 18.31 | 1.74 | 5.08 | 12.3 | 642 | 207 | 359.8 |
| <i>LeNCED2</i> | Neoxanthin cleavage enzyme | 197.33 | 218.71 | 334.47 | 437.16 | 29.65 | 49.58 | 73.29 | 62.61 | 20.6 | 123 | 213 | 199.6 |
| <i>CCD1A</i> | Carotenoid cleavage dioxygenase 1 | 81.47 | 80.23 | 71.01 | 65.62 | 88.66 | 64.47 | 46.73 | 53.29 | 75.8 | 97.2 | 67.8 | 63.83 |
| <i>CCD4</i> | Carotenoid cleavage dioxygenase 4 | 31.65 | 33.83 | 24.39 | 34.35 | 3.77 | 1.01 | 1.46 | 1.54 | 5.71 | 1.46 | 1.04 | 0.95 |
| <i>CCD7</i> | Carotenoid cleavage dioxygenase 7 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>SDR/ABA2</i> | Xanthoxin oxidase | 20.35 | 24.24 | 21.16 | 22.21 | 28.26 | 31.43 | 39.41 | 28.72 | 22.2 | 27.5 | 28.5 | 25.42 |
| <i>MCSU/ABA3</i> | MoCo sulfurase | 9.92 | 10.37 | 10.62 | 9.35 | 8.86 | 8.57 | 6.9 | 7.35 | 6.29 | 8.3 | 7.81 | 7.3 |
| <i>Or</i> | Oleracea Orange | 5.06 | 4.16 | 5.36 | 4.17 | 7.2 | 7.07 | 4.06 | 2.66 | 7.66 | 9.66 | 7.59 | 8.32 |
| <i>SDG8</i> | Set Domain Group 8 | 5.59 | 5.78 | 4.62 | 5.24 | 3.03 | 3.26 | 2.32 | 2.86 | 3.11 | 4.86 | 5.17 | 4.87 |

לגן *Psy-1*, הידוע כמבקר את שטף יצירת הקרוטנואידים, ביטוי גבוה ביותר בפירות בעלי הצבע החזק מהזן 'פז'. תופעה כזו עשויה להסביר את הרמה הגבוהה של קרוטנואידים בפירות של זן זה. ניתן לראות שגם

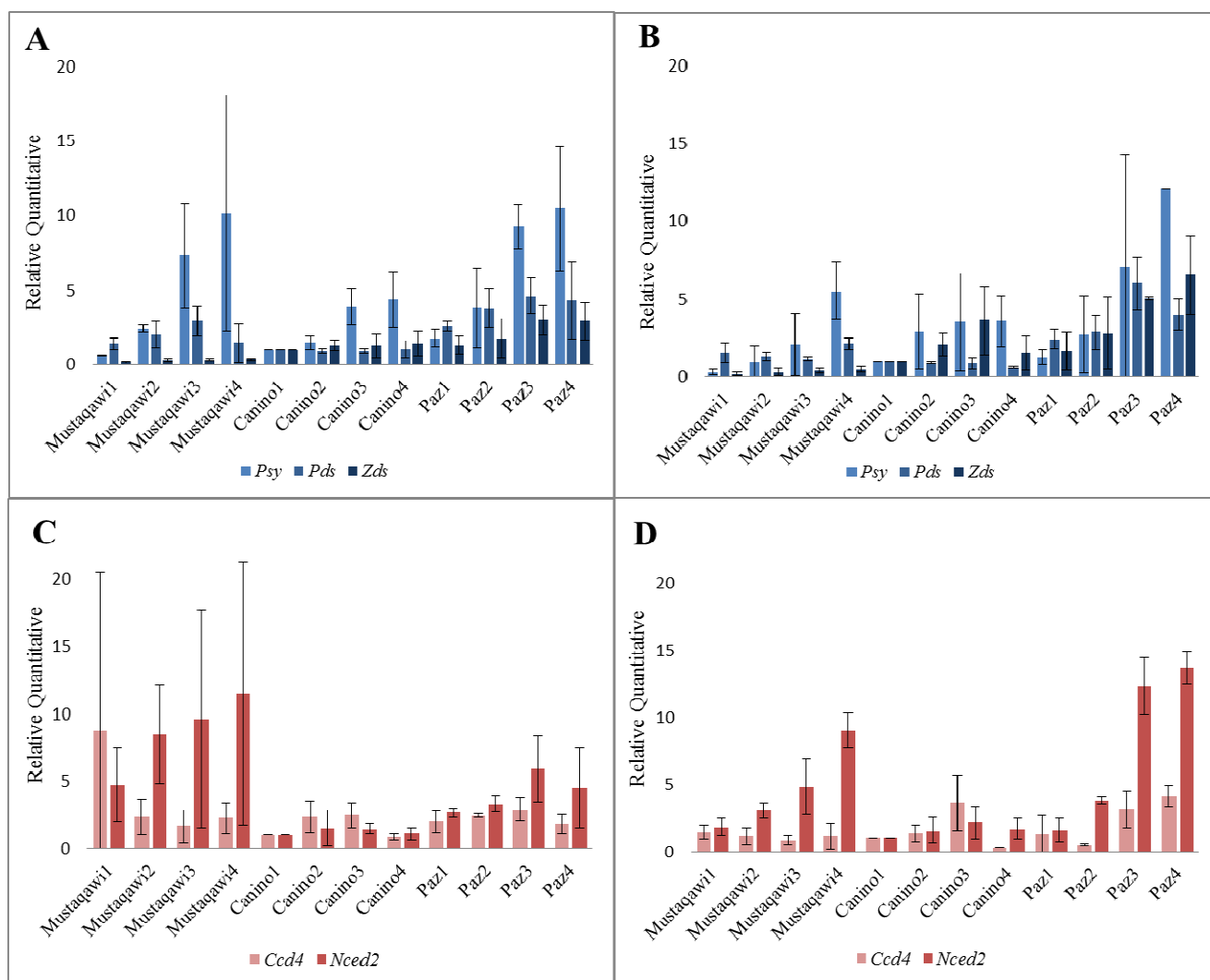
הגנים הבאים במסלול, *Zds* ו-*Pds* הם בעלי ביטוי גבוה ב'פז' וייתכן שהם תומכים בשטף המוגבר הנוצר ע"י *Psy* וכך ליצירה מוגברת של קרוטנואידים. בזן 'מוסטקאווי' בעל הפרי הבהיר לעומת זאת, נראה כי יש ביטוי מוגבר של גנים המקודדים לאנזימים המפרקים קרוטנואידים: *Nced* ו-*Ccd4*. ייתכן שבפירות של זן זה יש יצירה של קרוטנואידים, אך הם מתפרקים ולכן לא מצטברים ברקמה, בדומה לתהליך שמתרחש בפירות אפרסק לבן (Brandi et al., 2011; Ma et al., 2014).

רצפי הקונטיגים של הגנים במתבטאים במהלך הבשלת פרי המשמש שימשו גם למציאת הבדלים (SNPs) בין הרצפים שהתקבלו עבור כל זן בנפרד לבין הרצף ההומולוגי באפרסק. לא נמצא אף הבדל דרמטי, כגון מוטציה הגורמת לקודון פסק או לשינוי במסגרת הקריאה, אך נמצאו הבדלים הגורמים להבדלים באופי הכימי של חומצות האמינו המקודדות. טבלה 3 מסכמת את ההבדלים שנמצאו במספר גנים נבחרים.

טבלה 3: סיכום הבדלים ברצפי הנוקליאוטידים בין זני משמש 'מוסטקאווי', 'רעננה' ו'פז' ובינם לבין אפרסק, ברצפים המקודדים של גנים המולוגיים לגנים ידועים ממסלול היצירה של הקרוטנואידים בצמח. מוצגים הבדלים שמשנים קידוד לחומצה אמינית בלבד. בעמודה השמאלית מתואר השינוי הצפוי ברצף חומצת האמינו. קיצורי שמות הגנים מפורטים

בטבלה 2

| Gene | Protein length | SNP position | Nucleotide | | | | Amino acid change | |
|--------------|----------------|--------------|------------|-----|--------|-----------|-------------------|-----|
| | | | peach | paz | canino | mustakawi | | |
| <i>Psy-1</i> | 412 | 45 | T | C | C | C | W-R | |
| | | 61 | G | A | A | A | S-N | |
| | | 68 | A | C | C | C | N-T | |
| | | 71 | C | T | T | T | P-S | |
| | | 108 | C | G | G | G | N-K | |
| <i>Pds</i> | 584 | 52 | A | G | G | G | T-A | |
| | | 53 | T | T | C | T | I-T | |
| | | 68 | T | T | G | T | C-G | |
| | | 191 | G | A | A | A | S-N | |
| | | 341 | G | A | A | A | R-K | |
| | | 483 | T | C | C | C | V-A | |
| | | 485 | G | G | C | G | Q-H | |
| | | 508 | G | A | A | A | G-D | |
| 567 | G | T | T | T | V-L | | | |
| <i>Zds</i> | 588 | 559 | G | A | A | A | A | A-T |
| <i>Lcy-b</i> | 500 | 52 | C | G | G | G | A-G | |
| | | 54 | A | G | G | G | I-V | |
| | | 216 | C | A | A | A | Q-H | |
| <i>Nced1</i> | 605 | 8 | T | C | C | C | I-T | |
| | | 37 | T | A | A | A | Y-N | |
| | | 31 | T | C | C | C | L-S | |
| | | 46 | T | C | C | C | S-P | |
| | | 60 | C | G | G | G | P-A | |
| | | 77 | C | A | A | A | N-K | |
| | | 169 | C | A | A | C | P-Q | |
| | | 235 | G | C | C | C | R-S | |
| | | 271 | A | G | G | G | S-G | |
| | | 326 | A | A | A | T | K-M | |
| | | 429 | A | G | G | G | K-E | |
| | | 454 | C | A | A | A | P-T | |
| | | 469 | G | C | C | C | A-P | |
| | | 489 | C | C | C | T | L-F | |
| | | 503 | G | T | T | T | A-S | |
| 573 | A | C | C | A | E-A | | | |
| <i>Ccd4</i> | 595 | 204 | A | C | C | C | I-L | |
| | | 207 | G | G | G | A | S-N | |
| | | 210 | T | T | T | G | S-A | |
| | | 381 | C | T | T | T | P-S | |
| | | 477 | A | G | G | G | K-R | |
| 557 | C | G | G | G | S-R | | | |



איור 6: ביטוי גנים קנדידטים במהלך הבשלת פרי המשמש, לפי תוצאות qRT-PCR. כל עמודה מייצגת ערך ביטוי ממוצע לפי שלוש חזרות ביולוגיות. (A,B) ביטוי גנים קנדידטים העשויים להסביר את רמות הקרוטנואידים הגבוהות בפירות של הזן 'פז'. (C, D) ביטוי גנים קנדידטים העשויים להסביר את רמות הקרוטנואידים הנמוכות בפירות של הזן 'מוסטקאווי'. (A,C) תוצאות מעונת 2012. (D,B) תוצאות מעונת 2015. הספרות הצמודות לשמות הזנים מייצגות שלבי הבשלה

3. אפיון הביטוי של גנים נבחרים במהלך הבשלת פרי המשמש

בכדי לאמת את תוצאות ה RNAseq, נבדק ביטוי של גנים נבחרים בעזרת Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR). לצורך נרמול נבדקו רמות ביטוי של תשעה גנים ברקמות מכל תנאי הניסוי (תוצאות לא מוצגות), והוחלט לבחור בגן $EF1-\alpha$ כגן מנרמל. הבדיקה נעשתה לחמישה גנים שפרופיל הביטוי שלהם באפיון הטרנסקריפטומי העלה שהם מועמדים טובים להסברת השונות הפנוטיפית בין שלושת הזנים: *Psy*- *Pds*, *Zds*, *Ccd4*, *Nced2*. 1. הבדיקה בוצעה פעמיים, בשתי עונות שונות, עם שלוש חזרות ביולוגיות לכל תנאי ניסוי (שלושה זנים, ארבעה שלבי הבשלה לכל זן) (איור 6). ניתן היה לראות שתוצאות ה qRT-PCR לא תמיד איששו את תוצאות ה RNAseq, ועבור חלק מהדוגמאות ושלבי ההבשלה נצפתה שונות גדולה

מאוד בין החזרות הביולוגיות, דבר שהביא לסטיות תקן גדולות במיוחד. בנוסף, ערכי הביטוי שהתקבלו ב qRT-PCR היו יחסית נמוכים ובמקרה של הגן *Ccd4* אף היו קרובים מאוד לערכים של דוגמא ללא cDNA ולכן לא ניתן להסיק לגבי ערכי הביטוי שלו מניסוי זה. באופן כללי הגן *Psy-1* התבטא באופן גבוה יותר בשלבי ההבשלה המתקדמים של פירות מהזן 'פז', אך ייתכן שגם בפירות של 'מוסטקאווי' היה ביטוי גבוה (איור 6). הגנים *Pds*, *Zds* נראים כבעלי ביטוי גבוה ביותר בזן 'פז', בדומה לתוצאות ה-RNAseq.

4. אפיון תוצרי פירוק נדיפים של קרטנואידיים בפירות בשלים של זנים מייצגים

כדי לברר האם צבעם הבהיר של פירות הזן 'מוסטקאווי' וזנים אחרים כגון 'מוניקי', 'ריאל פינו', זנים מקומיים נוספים ומכלואים שלהם, נובע מפירוק קרטנואידיים, בדקנו את הרכב תוצרי הפירוק של קרטנואידיים בפירות בשלים שלהם, והשונו להרכב תוצרי פירוק של קרטנואידיים בפירות בשלים מזני משמש בעלי פירות שצוברים כמות גבוהה יחסית של קרטנואידיים כגון 'פז', 'תרוג' ו'ספרינג ג'יאנט'. דוגמאות פרי בשל של 4-5 חזרות ביולוגיות לכל זן או קו עברו מיצוי בשיטת SPME, ופרופיל הנדיפים שלהם אופיין בעזרת GC-MS. בטבלה 4 מוצגות תוצאות עבור הזנים 'מוסטקאווי' ו'פז' בלבד, עבור שלוש עונות. מהתוצאות עולה כי יש שונות רבה מאוד בין העונות השונות, וייתכן שחלק מהשונות נובע מכך שקביעת שלה ההבשלה 'בשל' היא סוביקטיבית (וקשה במיוחד בזנים הבהירים). לרוב דווקא בזנים בעלי כמות קרטנואידיים גבוהה ניתן להבחין ביותר תוצרי פירוק של קרטנואידיים שמצטברים ברקמה, בעיקר תוצרי פירוק של ליקופן והתוצרי הביניים הקודמים לו במסלול, מאשר בזנים בעלי פירות בהירים מאוד. עם זאת, הבדל בולט לעין הוא בהופעה של חומרים ממשפחת המגסטיגמה-טריאנים ב'מוסטקאווי' ודומיו (טבלה 4). חומרים אלו נגזרים כנראה מ β -קרופן או מקסנתופילים אך אינם תוצרי פירוק ישירים של הקרטנואידיים. תוצאות אלו אינן מחזקות את ההשערה שהצבע הבהיר נובע מפירוק הקרטנואידיים וכך אי-צבירתם ברקמה, אם כי ייתכן שהקרטנואידיים מתפרקים אך תוצרי הפירוק אינם מצטברים.

5. מבחני אסוציאציה גנטית בין תכונות הקשורות להרכב ותכולת קרטנואידיים לבין SNPs בגנים

מועמדים

אפיון הטרנסקריפטום ברקמות הפרי במהלך הבשלה, בשלושת הזנים 'פז', 'רעננה' ו'מוסטקאווי', בעזרת RNAseq אפשר למצוא את רצפי הגנים ההומולוגיים לגנים ידועים המשתתפים בתהליך היצירה והצבירה של קרטנואידיים ואת ההבדלים ברצפים בין שלושת הזנים (סעיף 2, טבלה 3). אומנם לא נמצאו הבדלים דרמטיים הצפויים לגרום לכך שאחד הגנים המועמדים יקודד לחלבון שאינו פעיל, אך ההבדלים שנמצאו (SNPs) שימשו אותנו ליצירת סמנים גנטיים. בסך הכל נבחרו 24 SNPs בתוך או בסמוך ל 13 גנים מועמדים. DNA גנומי הופק מכ 140 זנים וקווים של משמש מהאוסף הגנטי בנווה יער והם עברו אפיון גנטי לסמנים בעזרת מכשיר פלואידיים (Fluidigm) במעבדה של עמיר שרמן (מנהל המחקר החקלאי). נתוני הגנוטיפ הוצלבו עם נתוני הרכב וכמות קרטנואידיים שאופיינה לפירות של הזנים והקווים השונים, בעזרת תוכנת JMP והתוצאות מוצגות בטבלה 5. הגן שמראה את האסוציאציה החזקה ביותר למרבית התכונות הקשורות בהרכב ותכולת הקרטנואידיים הוא *Ccd4*. השונות הגנטית של ה-SNPs בגן זה מסבירה 17-20% מהשונות הפנוטיפית (R^2) בתכונות אלו. מעניין לציין שהגן *CrtR-b* המקודד להדרוקסילאז שחשוב בהפיכת β -קרופן לאנתרקסנתין ולזיאקסנתין, ובהפיכת α -קרופן ללוטאין, נמצא גם הוא באסוציאציה חזקה יחסית

טבלה 4: אפיון תוצרים נדיפים של פירוק קרוטנואידים שונים בפירות בשלים של זני משמש 'מוסטקאווי' (בהיר, תכולת קרוטנואידים נמוכה) ו'פז' (כתום עמוק, תכולת קרוטנואידים גבוהה) בדגימות פרי משוש עונות (2013-2015). הערכים ניתנים כנ"ג חומר לגרם רקמה טרייה, והם ממוצע מדגימות מ-4 פירות שונים לכל זן. בעמודה הימנית מצוין קרוטנואיד המקור המשוער. ערכים מודגשים בכתום גבוהים יחסית ב'פז', ערכים מודגשים בצהוב בהיר הם גבוהים יחסית ב'מוסטקאווי'.

| possible substrate | ng compound/gr sample | 2013 | | 2014 | | 2015 | |
|--------------------|-------------------------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|--------|
| | | Mustaqawi | Paz | Mustaqawi | Paz | Mustaqawi | Paz |
| β-Carotene | β-Cyclocitral | 0.0 | 155.9 | 1.4 | 78.2 | 0.26 | 51.93 |
| | Dihydro-β-Ionone | 0.7 | 2.2 | 6.7 | 1.8 | 0.00 | 0.15 |
| | Dihydro-β-Ionol | 1.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.37 | 3.37 |
| | (E)-β-Ionone | 1.8 | 84.0 | 39.1 | 95.9 | 4.73 | 172.89 |
| | b-ionone-epoxide | 0.9 | 72.5 | 1.5 | 18.7 | 0.00 | 0.00 |
| | Dihydroactinolide | 0.3 | 26.3 | 4.0 | 37.1 | 0.79 | 28.50 |
| Lycopen and up | 6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE | 29.5 | 368.1 | 45.3 | 99.1 | 7.91 | 82.53 |
| | Nerol | 13.7 | 3.2 | 57.7 | 54.3 | 0.00 | 0.00 |
| | Geraniol | 29.6 | 13.5 | 167.7 | 156.2 | 24.24 | 2.46 |
| | GERANIAL | 1.4 | 6.9 | 7.2 | 17.8 | 2.74 | 2.66 |
| | Neryl acetone | | | 90.3 | 55.9 | 9.57 | 72.76 |
| | 5E,9E-Farnesyl acetone | 0.0 | 4.7 | | | 1.31 | 6.35 |
| Xanthophylls | Vitispirane | | | 3.6 | 8.7 | 2.34 | 23.97 |
| | THEASPIRANE B | 0.1 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 0.65 | 4.30 |
| | THEASPIRANE A | 0.2 | 0.7 | 1.5 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| other | α-Ionene | | | 17.6 | 20.1 | 3.60 | 4.56 |
| | α-Ionene | | | 69.0 | 30.0 | 2.27 | 1.17 |
| | Megastigma-7(E),9,13-triene | 2.5 | 0.0 | 25.8 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| | nor isop | 0.0 | 0.0 | 31.4 | 10.8 | 0.20 | 0.00 |
| | Megastigma-4,6(E),8(E)-triene | 19.3 | 0.5 | 13.2 | 0.9 | 0.00 | 0.00 |
| | Megastigma-4,6(E),8(E)-triene | 14.6 | 0.7 | 40.0 | 2.5 | 0.00 | 0.00 |
| | Megastigma-4,6(Z),8(Z)-trien | 9.3 | 1.1 | 33.4 | 36.9 | 26.93 | 15.56 |
| | Megastigma-4,6(E),8(E)-triene | 18.6 | 6.7 | 82.5 | 1.7 | 0.00 | 0.00 |
| | nor isop | 5.0 | 0.2 | 148.9 | 0.0 | 3.53 | 0.00 |
| | Geranyl Acetone | 34.8 | 185.1 | | | | |

לתכונות של כמות קרוטנואידים. השונות ב SNP שבתוכו מסבירה 10-21% מהשונות הפנוטיפית (R^2). עוד מעניין שגם הגן *SDG8*, המקודד לאנזים היסטון-מתילאז, והודגם בארבידופסיס כמשפיע על ביטוי של הגן *CrtISO*, מראה אסוציאציה לתכונות הקשורות בקרוטנואידים, בעיקר להרכב (טבלה 5).

טבלה 5: סיכום של תוצאות עיקריות של מבחני אסוציאציה גנטית. בציר האופקי מופיעים הפנוטיפים שנבדקו, ובציר האנכי הגנים שנבדקו, כאשר בחלק מהגנים נבדקו שני SNPs, ולכן הם מסומנים במספרים לאחר השם. בטבלה מופיעים רק גנים שנראתה בהם אסוציאציה מול פנוטיפ מסויים. באדום- פנוטיפ שנראתה בו אסוציאציה בגן הנבדק כשה- P value נמוך מ 0.01 (נתון ערך ה P value). בורוד כהה- פנוטיפ שנראתה בו מגמה לא מובהקת בגן הנבדק כשה- P value הוא בין 0.01 ל 0.05. בורוד בהיר- פנוטיפ שלא נראתה מגמה כלשהי בגן הנבדק. β -carotene, β -Ph, Total carotenoids. שמות הגנים כפי שמופיעים בטבלה 2.

| | % | | | | | $\mu\text{g/gFW}$ | | | | | |
|------------------|---------|--------|--------|--------|--------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | β | Ph | Phf | Ly | Tr | β | Ph | Phf | Ly | Vis_c | To_c |
| <i>Ccd4-1</i> | 0.0008 | 0.0003 | 0.0026 | | 0.0026 | 0.0001 | | | 0.0018 | 0.0001 | 0.0028 |
| <i>Ccd4-2</i> | 0.0016 | 0.0046 | 0.0009 | 0.0096 | 0.0009 | 0.0003 | | | 0.0012 | 0.0003 | 0.0083 |
| <i>CrtISO 1</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>CrtR-b1-2</i> | | | | 0.0001 | | 0.0034 | | 0.002 | 0.0001 | 0.0037 | 0.002 |
| <i>Cyc1-1</i> | | | | 0.0075 | | | 0.0065 | 0.0095 | | | |
| <i>Cyc1-2</i> | | | | 0.0036 | | | | | 0.0023 | | |
| <i>Cyc2-1</i> | | | | 0.0045 | | | | | 0.0039 | | |
| <i>Cyc2-2</i> | | | | 0.0029 | | | | | 0.0021 | | |
| <i>lpi 1</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>Pds1</i> | | 0.0038 | 0.0078 | 0.0002 | 0.0078 | | | | | | |
| <i>Pds2</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>Psy1-1</i> | | | | | | 0.0088 | | | | | |
| <i>Ptox</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>SDG8-1</i> | 0.0007 | 0.0038 | 0.0056 | | 0.0056 | 0.0006 | | | 0.0023 | 0.0003 | |
| <i>Zep</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>Ziso1</i> | | | | 0.0045 | | | | | | | |

סיכום ודין

במסגרת תוכנית המחקר, אפיינו כמות והרכב הקרוטנואידים בפירות בשלים מלמעלה מ-120 זנים וקווים מהאוסף הגנטי הקיים בנווה יער. מעבר לשונות הרבה שנצפתה ביחס בין המרכיבים השונים ובכמות הכללית של הקרוטנואידים, האפיון העלה כי למשמש פרופיל קרוטנואידים ייחודי שבו מצטברים כמויות גדולות יחסית של תוצרי ביניים של המסלול כולל β -קרופן ותוצרים הנמצאים לפניו במסלול. בולטים במיוחד הם הקרוטנואידים חסרי הצבע פיטואן ופיטופלואן שמצטברים ברמות גבוהות בהרבה מאלו שנהוג למצוא בפירות או רקמות צמחיות אחרים, כמו גם הופעה של ציס-ליקופן שגם היא נדירה. יחודיות הפרופיל בולטת לאור העובדה שבמינים קרובים, כגון שזיף ואפרסק, הקרוטנואידים העיקריים המצטברים הם בדר"כ תוצרים מאוחרים יותר של המסלול כגון β -קרופן (שזיף) וקסנתופילים (אפרסק). הקרוטנואידים פיטואן ופיטופלואן

קיבלו בשנים האחרונות שימת לב מרובה ונראה כי גם להם תרומה במניעת מחלות כרוניות, וייתכן אף שיש להם השפעה סינרגיסטית כאשר הם משולבים עם ליקופן (Meléndez-Martínez et al., 2015).

על סמך האנליזה, נבחרו שלושה זנים מייצגים וביטוי הגנים בסדרות הבשלה של פירות שלהם אופיינו באמצעות RNAseq. הרצפים שהתקבלו עובדו וניתן יהיה למצוא בכל זני המשמש שנבדקו את רצפי הגנים המשתתפים בייצור של קרוטנואידים על סמך הומולוגיה לגנים ידועים מהמסלול. בהשוואה של רצפים מקודדים של מספר גנים נבחרים בין שלושת הזנים, ובינם לבין רצפים מגנום האפרסק, לא נמצאו הבדלים דרמטיים כגון מוטציות פסק או הסטת מסגרת קריאה, אך נצפו הבדלים הגורמים לשינוי מהותי באופי חומצת האמינו המקודדת. בהשוואה של ביטוי הגנים הקשורים בייצור קרוטנואידים בין שלושת הזנים, לאורך שלבי הבשלת הפרי, עלו כמה גנים שאופן ביטויים עשוי להסביר את רמת הקרוטנואידים בפרי: בזן 'פז', שלו פירות בעלי צבע כתום עז הצוברים רמה גבוהה של קרוטנואידים, נראה כי יש ביטוי מוגבר של גנים המקודדים לאנזימים הראשונים במסלול היצירה של הקרוטנואידים, במיוחד של הגן *Psy-1* הידוע כגן שביטוי קובע בצמחים רבים את שטף הייצור. בזן 'מוסטקאווי' לעומת זאת, שפירותיו בעלי צבע חיוור ואין בהם כמעט קרוטנואידים נראה שהגנים מהמסלול מתבטאים בצורה דומה לזו שבזן הכתום 'רעננה'. עם זאת, נראה שב'מוסטקאווי' יש ביטוי מוגבר של גנים המקודדים לאנזמים מפרקי קרוטנואידים. הדבר מעלה את האפשרות שבזן זה נוצרים קרוטנואידים אך הם מתפרקים ואינם מצטברים, בדומה למצב בפירות אפרסק לבן. בדיקה של ביטוי הגנים בשיטה qRT-PCR במשך שתי עונות הבשלה חיזקה חלק מההצפיות שעלו מה RNAseq (בעיקר לגבי ביטוי גבוה של הגנים מתחילת מסלול היצירה של קרוטנואידים *Pds* ו *Zds* בזן 'פז'), אך ביטוי נמוך של הגנים המועמדים ברקמות, ושונות רבה בין החזרות הביולוגיות, מקשות על מסקנות חד-משמעיות.

בכדי לבדוק האם כמות הקרוטנואידים הנמוכה בפירות מזני המשמש בעלי הפרי הבהיר נובעת מפירוק של קרוטנואידים, נערכה בדיקה של חומרי פירוק נדיפים בפירות בשלים של הזן 'מוסטקאווי' ודומיו, בעלי תכולת קרוטנואידים נמוכה בפרי, והשוואתה לתכולת אותם חומרים בפירות בעלי רמות קרוטנואידים גבוהות (כגון 'פז'). מהתוצאות עולה כי בשני סוגי הפירות ישנם חומרי פירוק של קרוטנואידים. נראה כי בזנים בעלי כמות קרוטנואידים גבוהה עיקר חומרים אלו הם תוצרים של פירוק β -קרופן וחומרי ביניים אחרים שנמצאים מעליו במסלול. לעומת זאת, ב'מוסטקאווי' הבהיר יש כמויות גבוהות במיוחד של חומרים ממשפחת המגסטיגמה-טריאנים, שנחשבים לתוצרים לא ישירים של פירוק של קרוטנואידים. לא ניתן לפסול את האפשרות שמתקיים תהליך של פירוק של קרוטנואידים מוגבר בזנים הבהירים אך שתוצרי הפירוק אינם יציבים בפרי ומתפרקים הלאה.

על סמך ההבדלים שנמצאו בין רצפי הגנים המעומדים של שלושת הזנים שנבדקו, נבחרו 24 SNPs, מ 13 גנים, לשמש כסמנים במבחני אסוציאציה גנטית. DNA גנומי הופק מכ 140 קווים זנים מהאוסף הגנטי בנווה יער והאפיון הגנטופי נעשה בטכנולוגיית Fluidigm. מהתוצאות בולט במיוחד הגן *Ccd4* שמראה אסוציאציה למרבית התכונות הקשורות להרכב וכמות קרוטנואידים ונראה שהשונות בסמנים שנבדקו בגן מסבירה 17-

20% מהשונות הפנוטיפית בקרב הפרטים שנבדקו. בנוסף, הגן *Ccd4* נמצא באיזור על כרומוזום 1, במקום שאליו התמפה QTL לצבע פרי במשמש במחקר קודם (Salazar et al., 2013).

לסיכום, ניתן לומר שנראה שכמות והרכב הקרטנואידים בפירות משמש הן תכונות בעלות הורשה מורכבת המושפעות ממספר רב של גורמים גנטיים. אפיון הטרנסקריפטום של פירות משמש לאורך תהליך ההבשלה, בזנים בעלי מופע קונטרסטי, העלה את האפשרות שקיים שיווי משקל בין ייצור קרטנואידים ופירוקם, כך שבזנים בהם ביטוי גבוה של אנזימים מתחילת מסלול היצירה עשוי לגרום להצטברות של רמות גבוהות של קרטנואידים, בעוד שביטוי או פעילות מוגברת של אנזימים מפרקי קרטנואידים עשויים להוביל לירידה בכמות הקרטנואידים המצטברת. בבדיקה של תוצרי הפירוק בפירות בעלי צבע כתום כהה והשוואתה לאלו שבפירות בהירים לא ניתן היה לקבוע שההשערה נכונה או מוטעית. במבחני אסוציאציה גנטית סמנים בגן המקודד לאנזים המפרק קרטנואידים, *Ccd4*, עלו כבעלי האסוציאציה למספר הרב ביותר של תכונות הרכב וכמות של קרטנואידים. בכדי להבין את התרומה של גן זה וגנים מועמדים אחרים לתכונות צבע פרי ופרופיל קרטנואידים, פיתחנו אוכלוסיית מיפוי ע"י הכלאה בין 'פז' ל'מוסטקאווי', אך ניתן יהיה לעבוד עם אוכלוסייה זו רק בעוד מספר שנים כאשר הצאצאים ייתנו פרי.

ביבליוגרפיה

- Adami M, Franceschi P, Brandi F, Liverani A, Giovannini D, Rosati C, Dondini L, Tartarini S** (2013) Identifying a carotenoid cleavage dioxygenase (*ccd4*) gene controlling yellow/white fruit flesh color of peach. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**: 1166-1175
- Brandi F, Bar E, Mourgues F, Horvath G, Turcsi E, Giuliano G, Liverani A, Tartarini S, Lewinsohn E, Rosati C** (2011) Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology* **11**: 24
- Cazzonelli CI, Pogson BJ** (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **15**: 266-274
- Curl AL** (1960) The carotenoids of apricots. *Journal of Food Science* **25**: 190-196
- Davies KM** (2007) Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **622**: 122-137
- Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Ughy B** (2013) Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research* **52**: 539-561
- Falchi R, Vendramin E, Zanon L, Scalabrin S, Cipriani G, Verde I, Vizzotto G, Morgante M** (2013) Three distinct mutational mechanisms acting on a single gene underpin the origin of yellow flesh in peach. *The Plant Journal* **76**: 175-187
- Fraser PD, Bramley PM** (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* **43**: 228-265
- Holland D, Bar-Yaakov I, Trainin T, Hatib K** (2006) Old deciduous fruit trees of the Rosacea family in Israel and their utilization in modern agriculture and breeding. *Israel Journal of Plant Sciences* **54**: 169-177
- Ibdah M, Azulay Y, Portnoy V, Wasserman B, Bar E, Meir A, Burger Y, Hirschberg J, Schaffer AA, Katzir N, Tadmor Y, Lewinsohn E** (2006) Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* **67**: 1579-1589
- Krinsky NI, Johnson EJ** (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* **26**: 459-516

- Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Ibdah M, Meir A, Yosef E, Zamir D, Tadmor Y** (2005) Not just colors—carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 407-415
- Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Meir A, Zamir D, Tadmor Y** (2005) Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 3142-3148
- Ma J, Li J, Zhao J, Zhou H, Ren F, Wang L, Gu C, Liao L, Han Y** (2014) Inactivation of a gene encoding Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD4) leads to carotenoid-based yellow coloration of fruit flesh and leaf midvein in peach. *Plant Molecular Biology Reporter* **32**: 246-257
- Marty I, Bureau S, Sarkissian G, Gouble B, Audergon JM, Albagnac G** (2005) Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *Journal of Experimental Botany* **56**: 1877-1886
- McQuinn RP, Giovannoni JJ, Pogson BJ** (2015) More than meets the eye: from carotenoid biosynthesis, to new insights into apocarotenoid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **27**: 172-179
- Meléndez-Martínez AJ, Mapelli-Brahm P, Benítez-González A, Stinco CM** (2015) A comprehensive review on the colorless carotenoids phytoene and phytofluene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **572**: 188-200
- Ruiz D, Egea J, Tomas-Barberan FA, Gil MI** (2005) Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties and their relationship with flesh and skin color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 6368-6374
- Ruiz D, Reich M, Bureau S, Renard CMGC, Audergon J-M** (2008) Application of reflectance colorimeter measurements and infrared spectroscopy methods to rapid and nondestructive evaluation of carotenoids content in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 4916-4922
- Salazar J, Ruiz D, Egea J, Martínez-Gómez P** (2013) Transmission of fruit quality traits in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked Quantitative Trait Loci (QTLs) using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**: 1506-1517
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E** (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* **54**: 712-732
- Yahyaa M, Bar E, Dubey NK, Meir A, Davidovich-Rikanati R, Hirschberg J, Aly R, Tholl D, Simon PW, Tadmor Y, Lewinsohn E, Ibdah M** (2013) Formation of norisoprenoid flavor compounds in carrot (*Daucus carota* L.) roots: characterization of a cyclic-specific carotenoid cleavage dioxygenase 1 gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 12244-12252
- Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L** (2015) Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* **2**: 15036

