

שימוש באוסף גנטי במלון לאיתור ומיפוי אללים משפרי תכונות בעלות ערך הורטיקולטורי וחקלאי ככלי לטיפוח זנים חדשים

Use of melon diversity collection for discovery and mapping of horticulturally and agriculturally beneficial alleles to enhance melon breeding

שמות השותפים במחקר:

- עמית גור (חוקר ראשי, אנליזות גנטיות)¹
איילה מאיר (אנליזות פיגמנטים (מהנדסת מחקר, קרוטנואידים וכלורופילים)¹
גליל צורי (מהנדסת מחקר, אנליזות מוקולריות)¹
פביאן באומקולר (רכז ניסויי שדה)¹
עוזי סער (מהנדס מחקר, טיפוח מלון)¹
ארי שפר (חוקר שותף, אנליזות של סוכרים)²
יעקב תדמור (חוקר שותף, אנליזות גנטיות)¹
רוני כהן (חוקר שותף, פיטופתולוגיה - פטריות)¹
יוסף בורגר (חוקר שותף, אנליזות גנטיות וטיפוח מלון)¹

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

² המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מנהל המחקר החקלאי

תקציר

1. הצגת הבעיה

כחלק מובנה במתודולוגיה הטיפוחית המקובלת כיום, הולכת השונות הגנטית המנוצלת בתהליך הטיפוח ומצטמצמת עם הזמן כך שהיכולת להתקדם, לפרוץ את גבולות הזנים הקיימים ולפתח מוצרים חדשים נהיית מוגבלת. לכן, תנאי הכרחי לשמירה על טיפוח אפקטיבי וחדשני לאורך זמן הוא החדרת שונות חדשה למאגר הגנטי המשמש לתהליך. האתגר הוא באיתור, אפיון והנגשת השונות לעשייה הטיפוחית. מטרת עבודה זו היא להנגיש שונות גנטית לצרכי מיפוי גנטי וטיפוח זנים במלון.

2. שיטות העבודה

- גידול ואפיון פנוטיפי של אוסף המלון בנווה יער לתכונות בעלות חשיבות לחקלאי (תכונות ייצור) ולצרכן (תכונות איכות).
- אפיון גנוטיפי מפורט של הקווים באוסף בשיטות מבוססות ריצוף (GBS, WGS)
- שימוש במידע הגנוטיפי והפנוטיפי שנאסף לניתוחים סטטיסטיים ולמיפוי תכונות.
- בחירת קווים באוסף, על בסיס האפיונים הפנוטיפיים והגנוטיפיים לבניית סט ליבה (Core subset) ולפיתוח אוכלוסיות למיפוי ממוקד של תכונות ולפיתוח סמנים לטיפוח.
- ביצוע הכלאות לאפיון יחסי דומיננטיות ומבחני אלליות למגוון תכונות.

המטרה הבסיסית של תוכנית זו היא לייצר תשתית שתאפשר נגישות ושימוש יעיל בשונות הקיימת באוסף המלון ככלי לטיפוח. לתוכנית מספר מטרות ספציפיות ויישומיות:

1. פרוק השונות הפנוטיפית למרכיביה ובניית קטלוג פנוטיפי - אפיון פנוטיפי מקיף של אוסף המלון יאפשר את פרוק השונות האצורה בו למרכיביה ובניית קטלוג פנוטיפי רחב ומפורט המתאר את השונות בכלים המאפשרים חיפוש וניתוח נתונים ממוחשב.

2. מיפוי תכונות וזיהוי אללים חדשים בעלי חשיבות טיפוחית – במסגרת תוכנית זו יפותחו תשתיות שיאפשרו שימוש באוסף המלון ככלי למיפוי גנטי של תכונות. אפיון גנוטיפי ברזולוציה גבוהה (ע"י ריצוף סלקטיבי של הגנום וזיהוי אתרים פולימורפיים), לצד אפיון פנוטיפי מקיף ושימוש בכלים חישוביים וסטטיסטיים, יאפשרו מיפוי סימולטני של מגוון רחב של תכונות פנוטיפיות וזיהוי אללים חדשים וייחודיים המצויים במאגר הגנטי.

3. פיתוח סמנים תומכי טיפוח – על בסיס תוצאות המיפוי יפותחו סמנים יעילים לעבודה בהספק גבוה, בתאחיזה לאללים הרצויים ויישמו פרוטוקולים לסלקציה בעזרת סמנים (MAS). היכולת לפתח סמנים אינפורמטיביים באוסף רחב ומגוון מבטיחה אפקטיביות של הסמנים לסלקציה במגוון רקעים גנטיים בטיפוח.

4. בניית בסיס נתונים וממשק להנגשת הנתונים החזותיים (תמונות) והתיאוריים למשתמשים – כחלק מההצעה הנוכחית יוקם בסיס נתונים מאוחד אשר ירכז את הנתונים הגנוטיפיים והפנוטיפיים שיאספו על אוסף קווי המלון. בסיס נתונים זה יתממשק לתשתית ביואינפורמטית שתוקם ותאפשר חיפוש מידע יעיל ומהיר, אנליזה של הנתונים ואינטגרציה שלהם עם נתונים נוספים שנאספים על אוכלוסיות מיפוי מתפצלות ועל נתונים פנוטיפיים נוספים שיצטברו על האוסף בעתיד.

רקע מדעי

טיפוח והשבחת גידולים חקלאיים הוא תהליך מעגלי רציף המבוסס על יצירת שונות גנטית בעזרת הכלאות ובחירת צמחים בעלי מופע המתאים ליעדים חקלאיים וצרכי השוק. על פי רוב, ההכלאות הראשוניות בכל שושלת מתבססות על חומר גנטי שעבר תהליך סלקציה. לכן, כחלק מובנה במתודולוגיה זו, הולכת השונות הגנטית המנוצלת בתהליך הטיפוח ומצטמצמת עם הזמן כך שהיכולת להתקדם, לפרוץ את גבולות הזנים הקיימים ולפתח מוצרים חדשים נהיית מוגבלת. לכן, תנאי הכרחי לשמירה על טיפוח אפקטיבי וחדשני לאורך זמן הוא החדרת שונות חדשה למאגר הגנטי המשמש לתהליך. האתגר הוא באיתור, אפיון והנגשת השונות לעשייה הטיפוחית. אוספים גנטיים הם מקור שונות רב ערך למטרה זו. באופן מטאפורי ניתן לחשוב על אוספים גנטיים כצבר גולמי של פנוטיפים אשר אפיון וקטלוג שלו ייעל את השימוש בו בתוכניות טיפוח. המרכיב האולטימטיבי בתהליך האפיון הוא מיפוי גנטי המפרק את השונות למרכיבים בדידים.

טכנולוגיות ריצוף מתקדם שנעשו זמינות בשנים האחרונות מסמנות מהפכה ביכולת למפות תכונות בגידולים חקלאיים ובכלל זאת גידולים אשר "סובלים" מתשתיות גנומיות מוגבלות. כיום, ניתן למעשה ללא מידע מוקדם או תשתיות גנומיות קיימות לזהות סמנים פולימורפיים לכל אורכו של הגנום ובעזרתם לבצע אפיון גנוטיפי מפורט של אוכלוסיות, לצורך מיפוי גנטי מדויק של תכונות פשוטות ומורכבות (Elshire et al., 2011; He et al., 2014). תהליך זה אפקטיבי ומדויק יותר במינים בהם קיים רצף מלא של הגנום כייחוס. במקביל, בשנים האחרונות פותחו והותאמו המתודולוגיות והכלים הדרושים למיפוי תכונות באוספים גנטיים בצמחים. גישה זו נקראת "מיפוי ע"י

אסוציאציה" (Genome-Wide Association Study - GWAS) (Ersoz et al., 2007; Flint-Garcia et al., 2003;) (Gupta et al., 2014; Zhu et al., 2008).

אפיון אוספים גנטיים, בניגוד לאוכלוסיות מתפצלות מהכלאה בין שני הורים, מאפשר סריקה סימולטנית של שונות רחבה וטיפול במספר רב של אללים הקיימים באוסף. האוספים מהווים תשתית זמינה ומיידית למיפוי, בניגוד לאוכלוסיות מיפוי מתפצלות אותן יש לפתח במשך מספר שנים תוך השקעת משאבים ניכרים. בנוסף לכך, אוספים המייצגים שונות רחבה הכוללת זנים מתקדמים לצד זנים ישנים וייצוג של מגוון הקבוצות ותתי המין, צפויים לשקף מספר רב של אירועי רקומבינציה אשר הצטברו לאורך דורות רבים של תירבות וטיפול ובכך לאפשר רזולוציית מיפוי טובה ביחס לגודל המדגם.

ביחידת הדלועים בנווה-יער עוסקים בהצלחה, לאורך עשרות השנים האחרונות, במחקר ובטיפול של זני מלון. במקביל לפעילות ברוכה זאת, נבנה במאגרי הזרעים בנווה יער אוסף גנטי רחב ומגוון של מלון (Burger et al., 2006). האוסף הנ"ל מייצג שונות רחבה כמעט לכל תכונה בעלת חשיבות הן לחקלאי (תכונות ייצור) והן לצרכן (תכונות איכות). החומר הגנטי שנאסף, לצד הידע המקיף שנרכש ע"י החוקרים והמטפחים העוסקים בהשבחת גידול זה מהווים משאב רב ערך וחומר גלם המתאים לאפיון גנטי ופנוטיפי מקיף ולמיפוי של תכונות בעלות חשיבות טיפוחית וחקלאית.

בשנים האחרונות מופו מגוון תכונות איכות פרי במלון, בעיקר על בסיס ניתוח אוכלוסיות מיפוי מתפצלות המבוססות על הכלאה בין שני קווי הורים שונים (Cohen et al., 2012; Diaz et al., 2011; Feder et al., 2015;) (Harel-Beja et al., 2010; Tzuri et al., 2015) את רצף הגנום (Garcia-Mas et al., 2012), נתוני טרנסקריפטום ומטבולום (Freilich et al., 2015; Chayut et al., 2013; Gonda et al., 2013; al. 2015) וריצוף גנומי בכיסוי גבוה (Re-sequencing) של מגוון קווים (ידע שלנו, לא פורסם). כלים אלו מאפשרים כיום מחקר גנטי אפקטיבי, רזולוציות מיפוי גבוהות מבעבר ויכולת משופרת לזיהוי הגנים המבקרים תכונות בעלות עניין במלון.

בהצעה הנוכחית נרחיב את טווח השונות הנסרקת ונשתמש באוסף המלון הקיים בנווה-יער ובשונות האצורה בו. מטרתנו לאפיין, לקטלג ולמפות מגוון תכונות רחב בעלות חשיבות לחקלאי ולצרכן תוך שימוש בטכנולוגיית ריצוף מתקדם ובאסטרטגיית GWAS. התשתית הפנוטיפית שתפותח והאפיון הגנוטיפי המפורט יאפשרו מיפוי של מגוון תכונות בעלות חשיבות חקלאית/הורטיקולטורית ופיתוח סמנים אחוזי תכונה לשימוש בטיפול. בנוסף, האפיון המפורט יאפשר זיהוי פנוטיפים ייחודיים אותם ניתן יהיה למפות בהמשך בעזרת אוכלוסיות דו-הוריות במידה ותדירותם באוסף נמוכה מכדי למפותם בעזרת GWAS. המידע שייאסף ויקוטלג ישמש גם כתשתית למחקרי המשך ולבידוד גנים המבקרים תכונות בעלות עניין טיפוחי שיאפשר, לצד טיפוח קלאסי בעזרת סמנים, שימוש בטכנולוגיית עריכה גנומית לטיפול ממוקד. הנתונים שיאספו בפרויקט יועלו לבסיס נתונים בעל ממשק ידידותי אשר יהיה זמין, על בסיס הרשאה, לחוקרים ומטפחים ויוכל להוות כלי אפקטיבי להחדרת שונות חדשה לתוכניות הטיפול.

תאור מקיף של תוצאות והישגי פעילות המחקר למול המטרות, לכל אורך תקופת המחקר



1. ריבוי ותחזוקת זרעי אוסף המלון - במסגרת הפרוייקט, בוצע גידול וריבוי זרעים בהיקף רחב של אוסף 180 קווי המלון – בוצע ארגון מחדש של זרעי האוסף ונבנה סט זרעים ייעודי שמשמש לריבוי וקיבוע (עיי סלקציה) של קווים שעדיין לא עברו מספר מספק של דורות בהאבקה עצמית. בקיץ-סתיו 2018 התחלנו בתהליך ריבוי של חלק מהקווים עיי סלקציות, האבקות עצמיות והפקת זרעים מצמחים נבחרים בגידול בבית רשת. תהליך זה נמשך באופן רציף לכל אורך הפרוייקט לשימור האוסף וזמינות זרעים.

2. השלמת אפיון גנוטיפי מבוסס ריצוף של אוסף המלון - ביצענו אפיון גנוטיפי מבוסס ריצוף גנומי סלקטיבי (GBS) של אוסף קווי המלון ($n=180$). בנתונים הגולמיים אותרו כ-100,000 סמנים פולימורפיים (SNPs) באוסף. לאחר סינון הנתונים הגנוטיפיים נבנה סט המונה 23,900 סמנים (SNPs) אינפורמטיביים המפורזים לכל אורכו של גנום המלון. ניתוח הנתונים הגנוטיפיים אפשר אפיון פילוגנטי של האוסף ובחינת פרופיל Linkage Disequilibrium (LD) בגנום המלון, ככלי לאומדן פוטנציאל רזולוציית המיפוי באוסף הקווים.

3. בניית סט ליבה (Core subset) של 25 קווים מייצגים ואוכלוסיית דיאלל רחבה – במסגרת הפרוייקט ועל בסיס האפיון הגנוטיפי והפנוטיפי המקיף שבוצע על אוסף 180 הקווים, נבנה סט ליבה של 25 קווים מייצגים אשר שימש לבניית אוכלוסיות ממוקדות לפרוייקט הנוכחי וכתשתית לפרוייקטים נוספים. המבנה המרכזי שיצרנו מ-25 קווי הליבה הוא סט של 300 מכלואים המייצגים את כל הצירופים האפשריים בין 25 קווי ההורים, במבנה הכלאות של חצי-דיאלל (איור 1). סט זה מהווה כלי אפקטיבי למחקר גנטי מרובה אללים ולמיפוי. בנוסף לכך, בוצעו בשנת המחקר השלישית האבקות עצמיות על כל 300 מכלואי הדיאלל ובידינו כעת ספריית זרעי F2 של 300 אוכלוסיות המייצגות את המגוון הגנטי במלון. זהו כלי אפקטיבי מאד למחקרים גנטיים עתידיים.

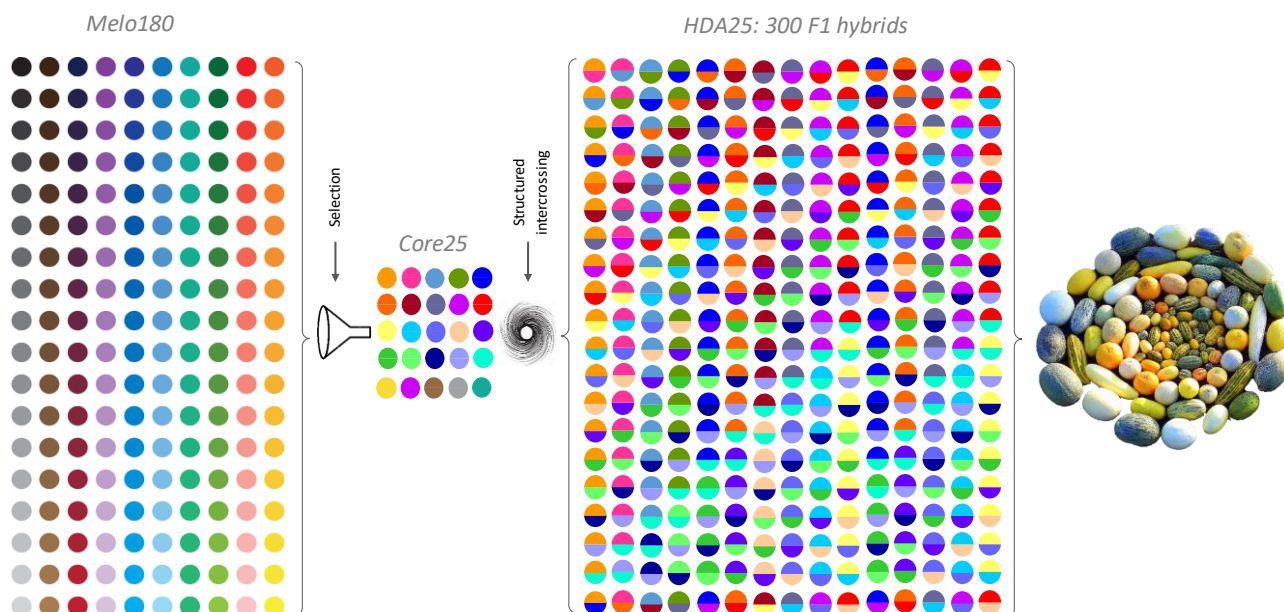
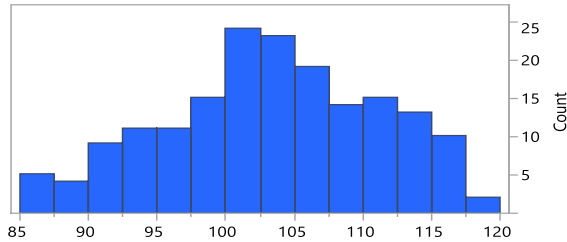


Figure 1: path for development core panel and half-diallele population. Melo180 is a diverse collection. HDA25 is half-diallele population developed from the 25 core founders. On the right are representative fruits from the HDA25 population (grown in summer 2019), reflecting the wide phenotypic diversity.

4. אפיון גנטי של בכירות ואופי ההבשלה (קלימקטריות) במגוון רחב של קווי ומכלואי מלון, ומיפוי QTLs

באוכלוסייה מתפצלת

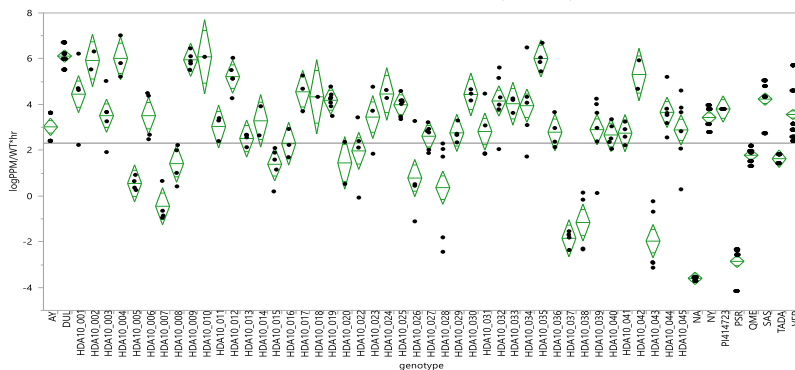
בכירות ואופי הבשלת הפרי (קלימקטריות) הן תכונות בעלות חשיבות חקלאית עצומה הן לחקלאי והן לכל הגורמים המעורבים בשלבים השונים מקטיף דרך האחסון (Post-harvest) ועד איכות הפרי לצרכן.



איור 2: התפלגות תכונת בכירות (ימים מזריעה להבשלה באוסף 180 קווי המלון).

אוסף 180 קווי המלון אופיין לבכירות (ימים מזריעה לקטיף) בניסוי שדה בחזרות. **איור 2** מציג את התפלגות תכונה זו על בסיס ממוצעי הקווים. ניתן לראות שונות פנוטיפית משמעותית מאד הנעה בין 85 ימים להבשלה בקווים הבכירים ל 120 ימים בקווים האפילים. שונות זו נמצאת בקורלציה מסוימת לאופי ההבשלה כפי שיתואר בהמשך.

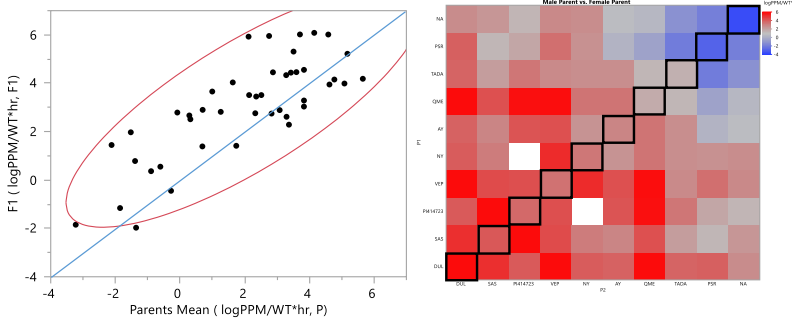
לאפיון אופי ההבשלה (קלימקטריות), בשלב ראשון סט מייצג של 10 קווי הורים ו 45 מכלואי די-אלל המייצגים את כל הצירופים ביניהם, גודל ואופיין לשחרור אתילן בפרי הבשל, ע"י דגימת Heads space מפירות שמאוחסנים לפרק זמן קבוע בשקיות אטומות והרצת הדוגמאות ב GC למדידה כמותית של אתילן. קווי ההורים בניסוי זה מייצגים קבוצות זן שונות ונבדלים בצורה ניכרת (לצד תכונות רבות) גם באופי ההבשלה וברמת הקלימקטריות (**איור 3**). בניתוח השונות התקבל כי השונות הגנטית הסבירה כ 90% מהשונות ברמת הקלימקטריות, מה שמצביע על התכונות טובה לביצוע המשך מחקר למיפוי התכונה.



איור 3: ניתוח שונות בקלימקטריות (שחרור אתילן בפרי הבשל) באוכלוסיית HDA10 (10 קווי הורים + 45 מכלואי דיאלל). בציר ה-Y ערכי אתילן בסקאלה לוגריתמית. כל נקודה מייצגת מדידת אתילן מפרי מייצג מחלקת ניסוי. מעוינים ירוקים מייצגים ממוצעי הגנוטיפים ורווח בר-סמך (5%)

בנוסף, בחנו את רמת הקלימקטריות של מכלואי F1 בהקשר של ביצועי הוריהם. **באיור 4a** מוצגים ערכי האתילן של ההורים ומכלואיהם בפורמט של Heat map (אדום רמה גבוהה של שחרור אתילן וכחול ללא אתילן). באיור זה ניתן לבחון בצורה נוחה את ערכי הקלימקטריות של המכלואים השונים ביחס להוריהם. ניתן לראות שמכלואים שאינם קלימקטריים מתקבלים רק מהכלאה בין שני הורים לא קלימקטריים ושקיימת תורשה תוספתית עם דומיננטיות להורה הקלימקטרי. ישנן אפילו מספר דוגמאות מעניינות בהן המכלואים קלימקטריים יותר משני הוריהם. **איור 4b** מציג את הקשר בדרך נוספת, ע"י הצגת הקורלציה בין ממוצע שחרור האתילן של שני קווי הורים (ציר X) לערכי האתילן של המכלוא (ציר ה Y), כך שכל נקודה מייצגת מכלוא ושני הוריו. ניתן לראות את השונות בקלימקטריות באוכלוסייה ואת הרכיב התוספתי החזק המתבטא בקורלציה המובהקת בין ממוצע ההורים לערכי המכלואים ($r=0.8$). נתון מעניין נוסף שעולה מ**איור 4b** הוא רכיב הדומיננטיות של ההורה הקלימקטרי בקביעת רמת הקלימקטריות של המכלוא. ניתן לראות את זה בכך שמרבית הנקודות ממוקמות מעל האלכסון המייצג ערכים בהם ממוצע ההורים שווה לערך המכלוא. לסיכום, הניתוח של ההבשלה הקלימקטרית במבנה אוכלוסייה מגוון זה מהווה נקודת פתיחה מצויינת להמשך המחקר

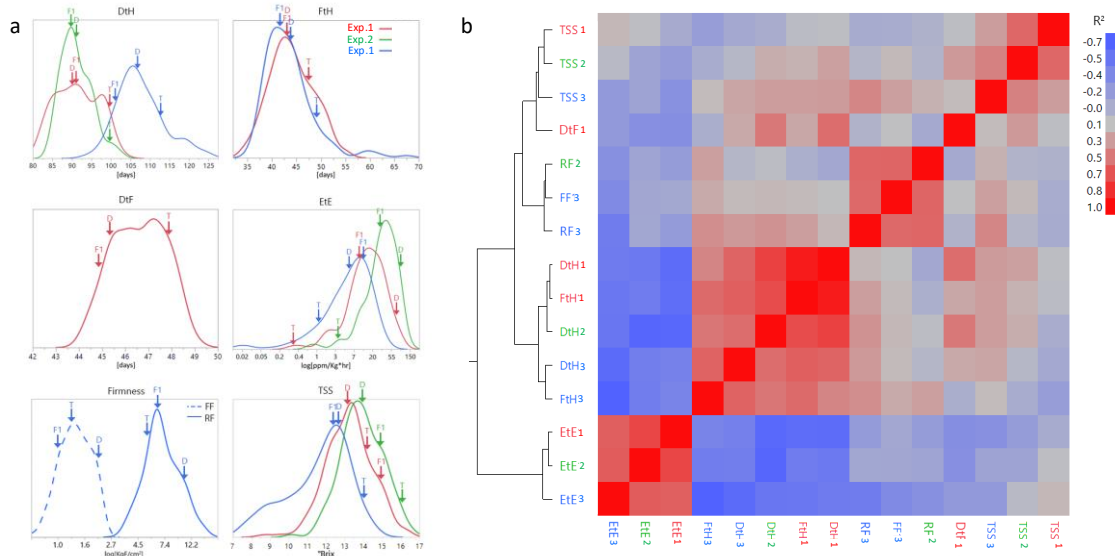
להבנת הגנטיקה של תכונה זו. החשיבות המיידית של התוצאות היא באפיון כמותי של הקשר בין הורים למכלואיהם בתכונה זו ובכך ביכולת לצפות ביצועי מכלואים טוב יותר על בסיס קלימקטריות של קווי הורים.



איור 4: אפיון הקשר ברמת הקלימקטריות בין הורים למכלואיהם. (a) Heat map המציג ערכי אתילן (בסקאלה לוגריתמית). האלכסון (ריבועים עם מסגרת שחורה) מייצג את ערכי ההורים. (b) קורלציה בין ממוצע הורים (ציר X) למכלוא F1 (ציר Y). ערכי שחור האתילן הנמדד (PPM) מנורמלים למשקל הפרי ולזמן הדגימה (שעה), ומוצגים בסקאלה לוגריתמית.

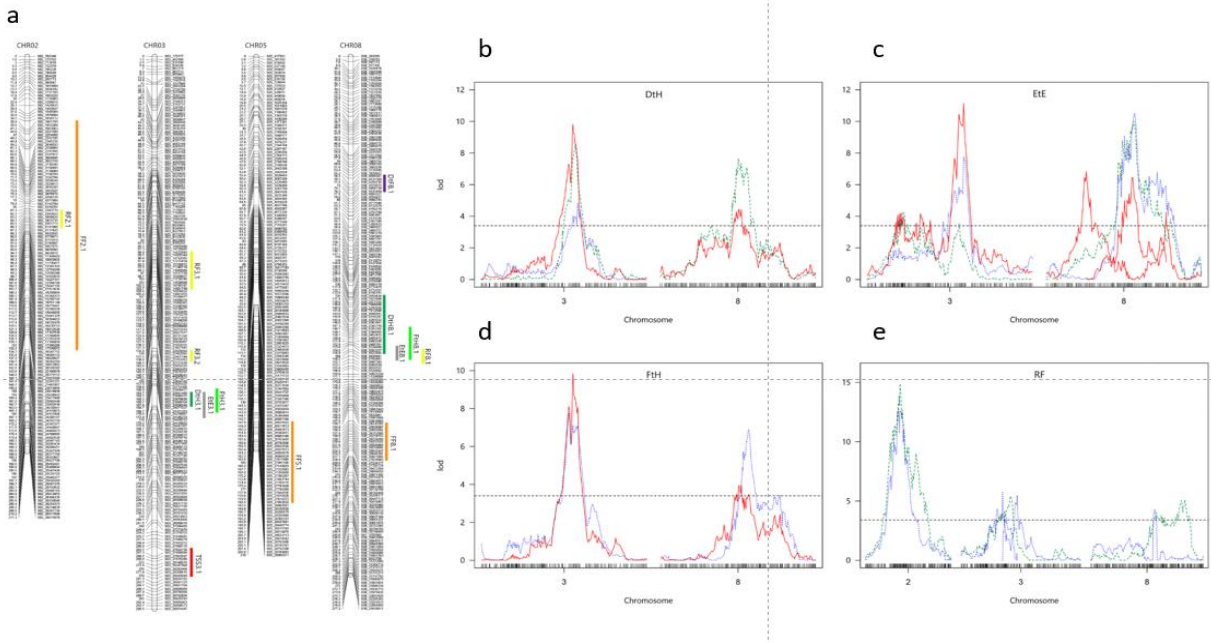
בשלב השני, המשכנו לרכז מאמץ באפיון תכונות אלו תוך שימוש באוכלוסיית RILs המתפצלת לבכירות ואופי ההבשלה. הבכירות אופיינה ע"י מעקב ותיעוד של מועדי הפריחה (בשלב אנטזיס) והקטיף (בשלב פרי בשל), ברמת הפרי הבודד. נתוני פריחה והבשלה נאספו על כל הקווים באוכלוסיה המתפצלת (בניסוי בחזרות). בשל העובדה שהניסוי נשתל במועד אחיד, ניתן לתרגם את הערכים שנאספו לימים מזריעה לפריחה (DtF), ימים מפריחה לקטיף (FtH) והסה"כ, ימים מזריעה לקטיף (DtH), כפי שמוצג ומסוכם בהתפלגות תכונות אלו באוכלוסיה (איור 5a). ניתן לראות כי אוכלוסיה מתפצלת דו-הורית זו, אשר נבנתה מהכלאה בין הורה קלימקטרי (מקבוצת Reticulatus להורה שאינו קלימקטרי (מטיפוס Honey Dew), מייצגת את רוב טווח השונות בבכירות (105-80 ימים בשדה פתוח ו 125-90 בבית רשת) בהשוואה לאוסף המלון ובכך מהווה אוכלוסיה מתאימה למיפוי תכונות אלו.

אפיון אופי ההבשלה בוצע ע"י מדידת שחרור אתילן (EtE) בפרי הבשל על כל 164 הקווים באוכלוסיית RILs. אוכלוסיה מתפצלת זו אפשרה לנו לאפיין את השונות ולמפות QTLs לתכונה זו. בניסוי זה נדגמו מאות פירות בשלים מהקווים באוכלוסיה. באיור 5a מוצגות התפלגויות ערכי תכונות הבכירות ואופי ההבשלה על בסיס ממוצעי הקווים באוכלוסיה. קורלציות בין התכונות ובין הניסויים השונים מוצגות באיור 5b ומאפשרות לראות כי קיים מתאמים גבוהים בין הניסויים (תורשתיות טובה) וקורלציה שלילית בין ימים לקטיף לבין רמת הקלימקטריות - כצפוי, קווים בכירים יותר קלימקטרים.



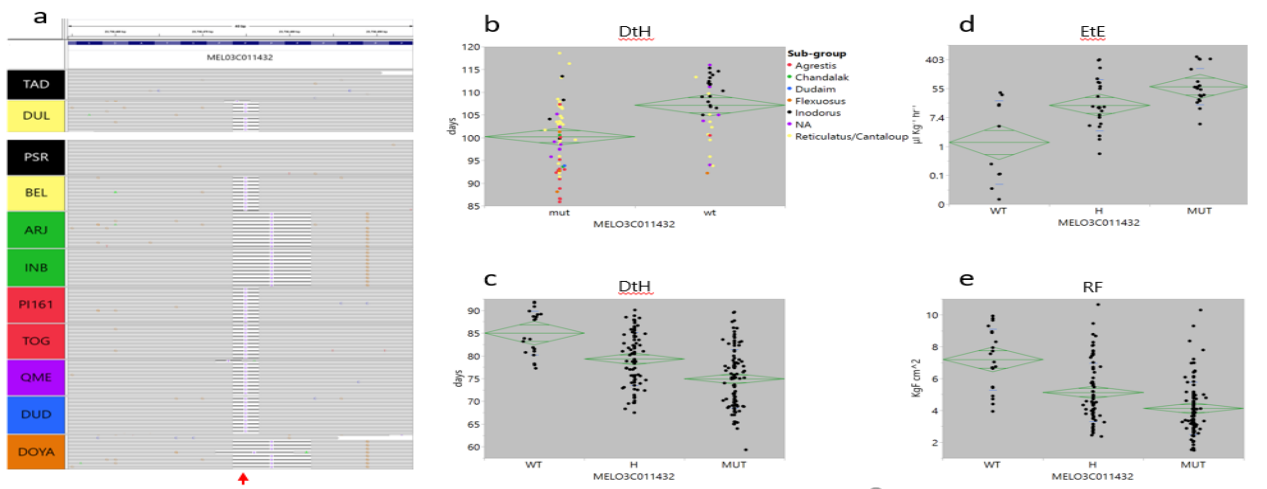
איור 5: אפיון תכונות בכירות והבשלה קלימקטרית באוכלוסיית RILs TADxDUL (A) התפלגות התכונות בשלושה ניסויים. (B) קורלציה בין התכונות ובין הניסויים השונים. TSS: Total Soluble solids, RF: Rind Firmness, FF: Flesh Firmness.

על בסיס הנתונים שנאספו באוכלוסיית ה RILs ביצענו מיפוי גנטי של QTLs למגוון התכונות (איור 6). מספר QTLs בעלי אפקט יציב בניסויים השונים זוהו ומאפשרים כעת פיתוח סמנים גנטיים בתאחיזה.



איור 6: מיפוי QTLs לתכונות בכירות ואופי ההבשלה (קלימטריות – רמת אתילן) באוכלוסיית RILs TADxDUL (A). תצוגת תוצאות מיפוי כל התכונות על מפה גנטית בארבעה כרומוזומים בהם מצויים ה QTL העיקריים (B-E). תצוגת מיפוי ממוקדת יותר של התכונות השונות בנפרד בגרף LOD.

ה QTLs שמייפנו לתכונות הבכירות וההבשלה איפשרו לנו לבצע ניתוח ביואינפורמטי ולזהות באזורים הגנומיים שבהם, גנים מועמדים על בסיס מספר שכבות מידע ובהן שונות ברצף בין קווי ההורים, פרופיל הביטוי של הגנים והאנטוציה הפונקציונלית שלהם. אימות נוסף לגנים מועמדים כאלו בוצע ע"י חזרה לנתונים שנאספו על אוסף קווי המלון ואוכלוסיית הדיאלל ובחינת האסוציאציה גם באוכלוסיות אלו. **איור 7** מציג גן מועמד כזה ב QTL מרכזי המשותף למספר תכונות (ימים להבשלה, רמת אתילן בפרי בשל, ומוצקות הפרי הבשל) בכרומוזום 3, בו מצאנו כי אסוציאציה חזקה קיימת בין התפצלות הגן לתכונות אלו גם באוסף קווי המלון (**7b**) ובאוכלוסיית הדיאלל (**7c-e**).



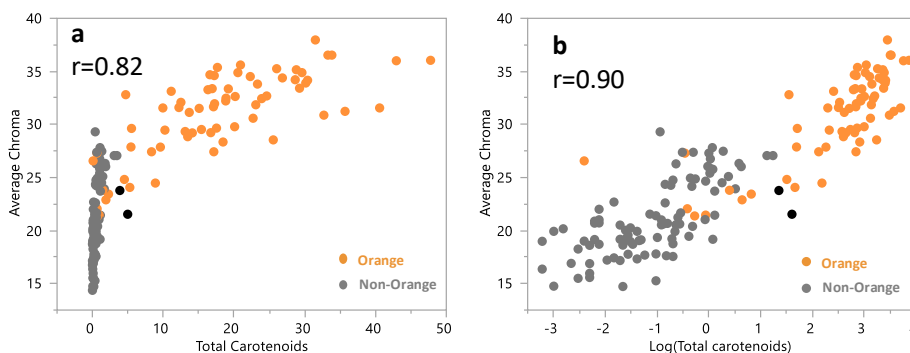
איור 7: אפיון ממוקד של גן מועמד (MELO3C011432) ב QTL לכבירות, קלימטריות ומוצקות הפרי בכרומוזום 3. (A) שונות ברצף הגן (INDEL) בקווים מייצגים באוסף המלון. (B) אסוציאציה מובהקת של התפצלות ה INDEL עם בכירות ב 100 קווי מלון באוסף. C-E) אסוציאציה מובהקת של התפצלות ה INDEL עם בכירות, קלימטריות ומוצקות הפרי באוכלוסיות דיאלל HDA10, HDA20

תוצאות האפיון הגנטי של תכונות הבכירות ואופי ההבשלה שהוצגו כאן בתמציתיות, מסוכמות בהרחבה במאמר שנמצא כעת בשלבי כתיבה מתקדמים ולקראת הגשה. כותרתו:

"QTL mapping and genomic analyses of earliness and fruit ripening traits in a melon Recombinant Inbred Lines population supported by *De novo* assembly of their parental genomes"

5. אפיון פנוטיפי וגנטי של צבירת פיגמנטים בציפה וקליפת הפרי באוסף קווי המלון ובאוכלוסייה מתפצלת ובידוד גן עיקרי המשפיע על תכונות אלו.

בשנת המחקר הראשונה, דוגמאות ציפה מפירות בשלים שנקטפו בניסוי מכל הקווים באוסף שימשו לאפיון כמותי של קרוטנואידים (ע"י הרצה ב HPLC). הראנו כי ע"י אנליזת GWAS או מצליחים למפות באוסף באופן מדויק את הגן העיקרי שבודד בעבר (*CmOr*, Tzuri *et al.* 2015) שמבקר את צבע הציפה ומבדיל בין שלוש קטגוריות הצבע במלון (כתום, ירוק ולבן) (Gur *et al.* 2017). אפיון כמותי של קרוטנואידים מקנה הסתכלות ממוקדת יותר על מרכיבי השונות. מיפוי הצבע בעבר התבסס על סריקת חתכי פירות וניתוח תמונה לקביעת הצבע (לצד מאפיינים מורפולוגיים נוספים בפרי, Gur *et al.* 2017). בשלב ראשון בחנו את הקורלציה בין אפיון צבע מבוסס תמונה (Chroma) לבין תכולת הקרוטנואידים שנמדדה. **איור 8a** מציג את הקורלציה על כל 179 הקווים שאופיינו. נקודות אפורות מייצגות קווים בעלי ציפה שאינה כתומה ונקודות כתומות מייצגות את הקווים בעלי גוון כתום בדרגות שונות. בשל תכולת הקרוטנואידים הנמוכה בקווים שאינם כתומים (לבנים וירוקים), אשר מייצרת התפלגות שאינה נורמלית, ניתן לראות כי טרנספורמציה לוגריתמית (**איור 8b**) שיפרה את הקשר הלינארי בין תכולת הקרוטנואידים לעוצמת הצבע.

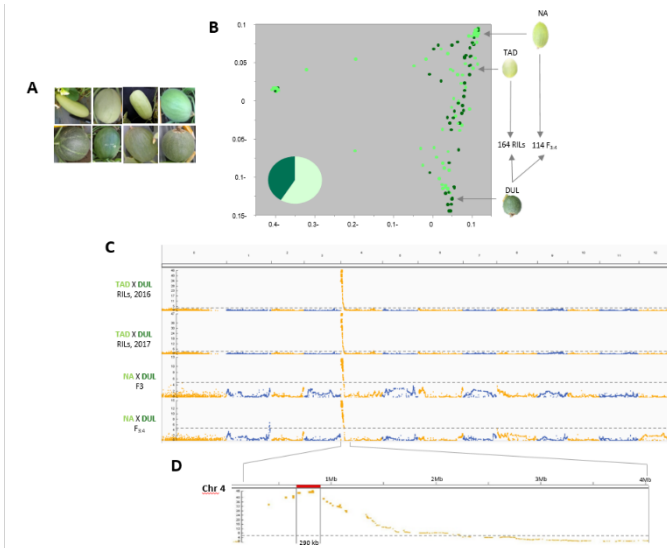


איור 8: קורלציה בין תכולת קרוטנואידים בציפה לצבע ציפה כפי שנמדד בסריקת פירות. (a) גרף מבוסס על ערכי המדידה. (b) גרף לאחר טרנספורמציה לוגריתמית של ערכי הקרוטנואידים

כפי שניתן לראות באיור 8, כאשר מנתחים רק את הקווים בעלי הפירות

הכתומים קיים קשר לינארי בין תכולת הקרוטנואידים לבין עוצמת הצבע הכתום ללא צורך בטרנספורמציה. בשני המקרים הקורלציה היא גבוהה ומייצגת אומדן טוב המאפשר אפיון עקיף של תכולת קרוטנואידים כוללת דרך אנליזה פשוטה, מהירה וזולה של צבע הציפה ע"י סריקה דיגיטלית של פירות.

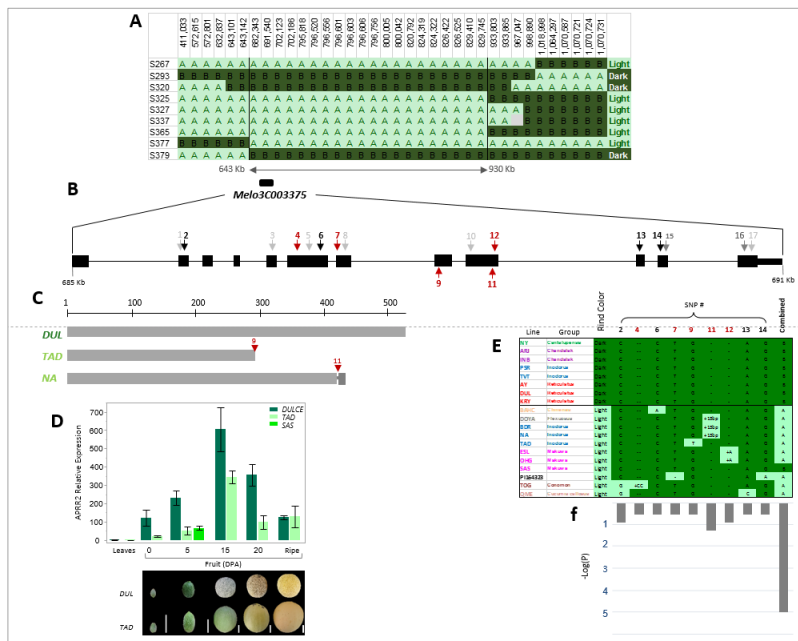
בשנת המחקר השנייה השלמנו פרוייקט מיפוי, בידוד ואפיון גן המעורב בבקרת צבירת הפיגמנטים במלון. בעבודה נעשה שימוש מרכזי באוסף קווי המלון אשר שימשו בין השאר לאיתור מגוון אללים בקווים שונים המכילים מוטציות שונות בגן. מבחן אלליות רחב בין קווים באוסף סיפק תמיכה חשובה בתוצאות המיפוי ואיפשר



איור 9: מיפוי גנטי שלל תכונת צבע הקליפה בפרי הצעיר

לנו לפתח סמנים ממוקדים לסלקציה. תוצאות המחקר מפורטות במאמר שפורסם בשנת 2019 (Oren et al. (2019) Journal of Experimental Botany) ולכן מובאות כאן בקצרה: באיור 9 מוצג תהליך מיפוי תכונת צבע הקליפה בפרי הצעיר (בהיר או כהה) שהחל באפיון האוסף (9A,B) אשר על בסיסו נבחרו קווי הורים ואוכלוסיות מתפצלות אשר שימשו למיפוי ברזולוציה גבוהה של התכונה למקטע מצומצם בכרומוזום 4 (9C,D).

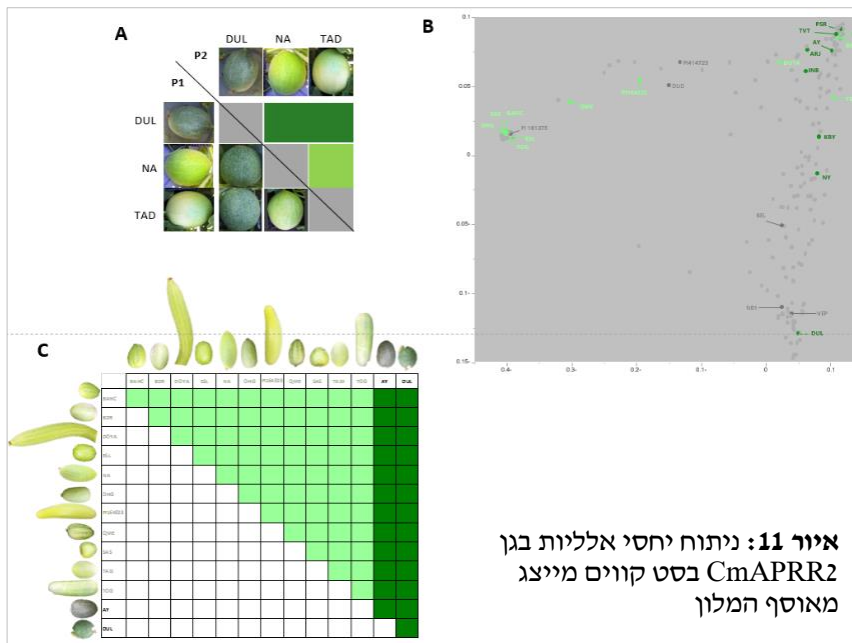
איור 10 מציג את אפיון הגן המועמד (*CmAPRR2*) שזוהה במקטע הגנומי אליו מופתה התכונה. עיי אפיון גנוטיפי ופנוטיפי של 25 קווים מייצגים מהאוסף, הראנו כי ישנן שתי מוטציות בלתי תלויות בקווי ההורים בעלי הפרי הבהיר של אוכלוסיות המיפוי (10B,C). כמו כן, נמצאו מוטציות אחרות בקווים נוספים בעלי מופע הפרי הבהיר (10E). זיהוי מספר מוטציות



איור 10: אפיון הגן המועמד *CmAPRR2*

משמעותיות בגן המועמד (הגורמות להסטת מסגרת הקריאה או ל Stop Codon) בקווים שונים, מהווה תמיכה חשובה בהיותו הגן המבקר את התכונה. בכדי לספק תמיכה גנטית נוספת לכך ביצענו מבחני אלליות עיי הכלאות בין כל הקווים השונים בעלי מופע הפרי הבהיר הנושאים מוטציות שונות. איור 11 מסכם תוצאות ניסוי זה אשר מוכיח את האלליות בין כל הקווים הבהירים כך שלמעשה כולם אכן נושאים מוטציות ב *CmAPRR2* אשר יוצרות את המופע. באיור 11A מוצגות תוצאות מבחן האלליות בין ההורים הבהירים של שתי אוכלוסיות המיפוי (TAD ו-NA). באיור 11B מוצגים עיי PCA plot 177 קווי

אוסף המלון (נקודות אפורות) כאשר בצבעי ירוק בהיר וכהה מוצגים 19 הקווים הנבחרים אשר שייכים לקבוצות זן שונות המייצגות את השונות במלון. בקווים אלו רוצף הגנום במלואו והם משמשים אותנו לניתוחים ממוקדים כפי שהוצג במקרה זה של השוואת הרצף בגן *cmAPRR2*. איור 11C מציג את תוצאות מבחני האלליות שביצענו בין כל הקווים הבהירים (בצירוף שני קווים כהים ששימשו כביקורת. סה"כ 78 מכלואי F1). המבחן המקיף חיזק מאד את ההיפוטזה כי מקור הקליפה הבהירה בפרי הצעיר במגוון קווים מקבוצות זן שונות במלון, מקורו במוטציות באותו הגן, *CmAPRR2*.



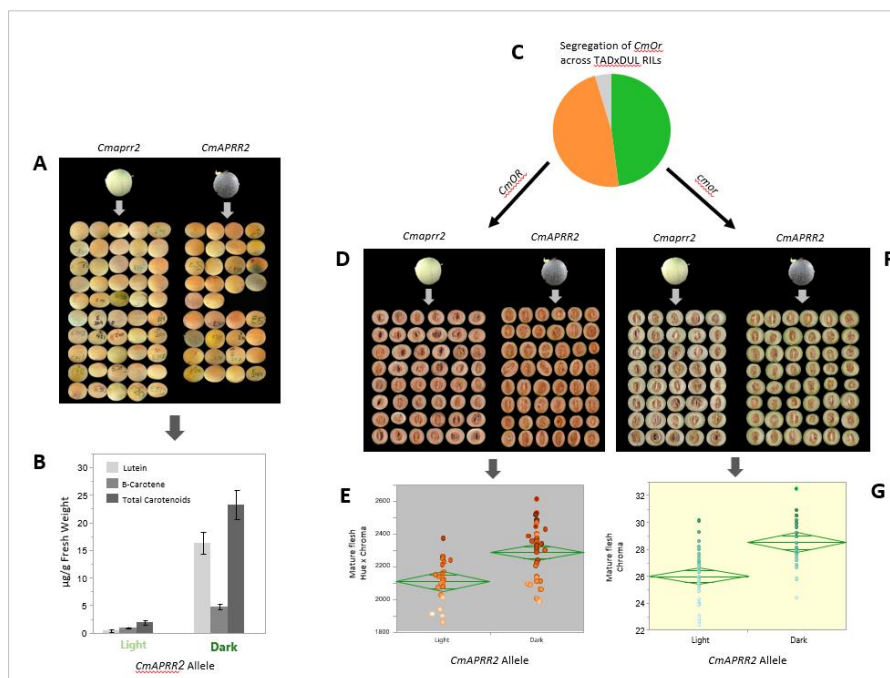
איור 11: ניתוח יחסי אלליות בגן *CmAPRR2* בסט קוויים מייצג מאוסף המלון

השלב הבא בעבודה זו היה בחינת השפעת השונות האללית בגן *CmAPRR2* גם על צבירת פיגמנטים בפרי הבשל. לצורך כך אופיינו מאות פירות בשלים באוכלוסיה המתפצלת ששימשה למיפוי התכונה בפרי הצעיר. אנליזה מקיפה זו איפשרה לנו להגיע למספר תוצאות מרכזיות המספקות תובנות על מעורבותו של הגן *CmAPRR2* בצבירת פיגמנטים במלון:

1. נמצא קשר מובהק בין התפצלות הגן באוכלוסיה לבין תכולת הפיגמנטים (קרוטנואידים) בקליפת פירות בשלים (איור 12A,B).

2. נמצא קשר מובהק בין התפצלות הגן באוכלוסיה לבין עוצמת הצבע הכתום בפירות כתומים בשלים באוכלוסיה (איור 12D,E).

3. נמצא קשר מובהק בין התפצלות הגן באוכלוסיה לבין עוצמת הצבע הירוק בפירות ירוקים בשלים באוכלוסיה (איור 12F,G).



איור 12: אפיון השפעת השונות האללית בגן *CmAPRR2* גם על צבירת פיגמנטים בפרי הבשל, באוכלוסיית TADxDUL RILs

לסיכום, תוך שימוש בשונות שזוהתה באוסף קווי המלון ונחקרה גם באוכלוסיה מתפצלת ממוקדת, זיהינו גן המעורב בבקרת צבירת פיגמנטים בפרי בכל מהלך התפתחותו. שונות בגן זה נמצאת באסוציאציה מובהקת לצבירת פיגמנטים בקליפה

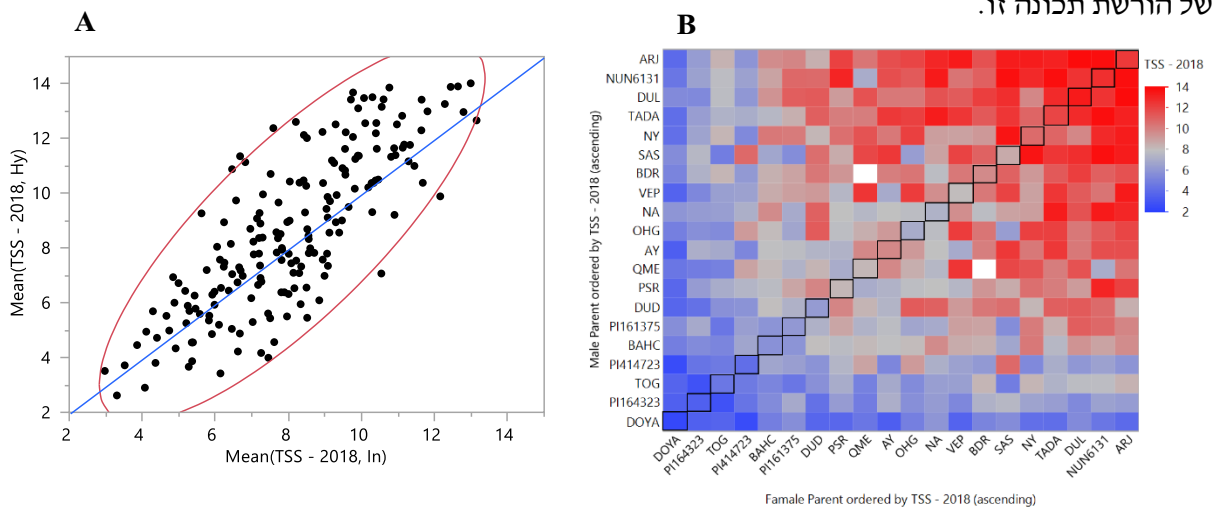
ובציפה של מלונים בשלים ולכן זהו ממצא חשוב גם מבחינה טיפוחית. כחלק מהפרוייקט זהו ופותרו סמנים שייאפשרו סלקציה גנוטיפית וטיפוח יעיל לתכונה זו (Oren et al. 2019).

6. אפיון גנטי של השונות בתכולת סוכר בפרי

בדוח המסכם את שנת המחקר הראשונה תואר אפיון פנוטיפי מפורט של אוסף 177 קווי המלון לתכולת סוכרים בפירות הבשלים. בשנת המחקר השנייה התקדמנו באפיון השונות בתכולת הסוכרים בפרי באוכלוסיות נוספות.

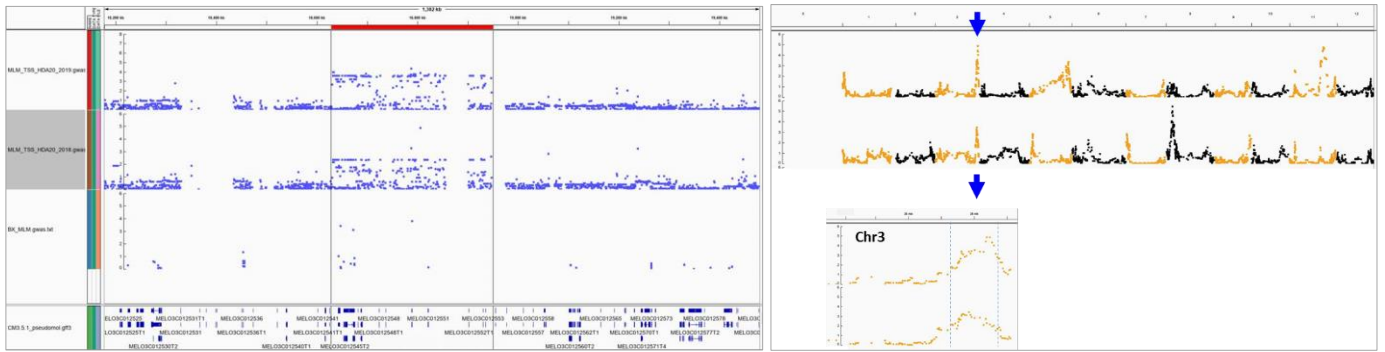
נעשה אפיון גנוטיפי ופנוטיפי מקיף של אוכלוסיית דיאלל גדולה (המייצגת את כל הצירופים בין 20 קווי הורים מהאוסף – 190 מכלואים) ובמקביל אופיינה גם אוכלוסייה מתפצלת. אנליזה ממוקדת זו איפשרה לנו למפות QTLs לתכולת סוכרים ולאפיין בצורה רחבה את אופן ההורשה של תכונה זו במלון.

כאמור, בשנת המחקר השנייה ביצענו אפיון פנוטיפי מקיף של אוכלוסייה ייעודית (של 190 מכלואים) שפותחה על בסיס הכלאות במבנה דיאלל של 20 קווים המייצגים את קבוצות הזן השונות באוסף המלון. הקווים והמכלואים גודלו בניסוי שדה בחזרות ורמת הסוכר (TSS) נמדדה במדגם מייצג של פירות בשלים (15 פירות) לכל אחד מהגנוטיפים בניסוי. **באיור 13A** מוצג ניתוח הקשר בין רמת הסוכר במכלואים למוצע הוריהם. כפי שניתן לראות מניתוח 190 המכלואים, קיימת קורלציה חזקה ומובהקת ($r=0.80$) בין ממוצע הבריקס של ההורים לבין הבריקס של המכלוא. נתון זה מצביע על המרכיב התוספתי החזק הקיים באופן ההורשה של רמת הסוכר בפרי במלון. סט נתונים זה, אשר למיטב ידיעתנו מהווה את הניתוח הרחב ביותר שנעשה (מבחינת ייצוג ספקטרום פנוטיפי ומגוון אללי) של אופן הורשת מתיקות הפרי במלון, מספק תובנה חשובה מאד גם בהיבט הטיפוחי, ניתן לצפות בצורה טובה מאד את ביצועי מכלוא על בסיס ממוצע הוריו. **באיור 13B** מוצג Heat Map של ערכי הבריקס של כל 190 המכלואים והוריהם. כל תא במטריצה מייצג מכלוא (על בסיס החיתוך בין הטור לשורה של קווי ההורים) ובאלכסון מוצגים ערכי קווי ההורים. הערכים בצירי המטריצה ממיינים בסדר עולה על בסיס ערכי הבריקס הממוצעים של כל טור או שורה. הגרדיינט (מכחול לאדום) המיוצג בגרף זה ממחיש, בדרך שונה, את האפקט התוספתי המשמעותי של הורשת תכונה זו.



איור 13: אפיון השונות בבריקס (TSS) באוכלוסיית דיאלל (20 הורים ו 190 מכלואי F1)

במקביל לאפיון אוכלוסיית הדיאלל, בוצע בשנת המחקר השנייה גם המשך אפיון פנוטיפי ומיפוי QTLs לבריקס באוכלוסייה מתפצלת. 164 קווים רקומביננטים (RILs) מאותה אוכלוסייה מתפצלת ששימשה גם למיפוי הגן לפיגמנטים בפרי, גודלו בניסוי שדה ואופיינו לתכולת סוכר בפרי הבשל ונתונים אלו שימשו למיפוי QTLs. **באיור 14** מובאות שתי דוגמאות לתוצאות המיפוי: **באיור 14A** מוצג QTL שזוהה בכרומוזום 1 ואשר מופה באסטרטגיית GWAS גם באוסף הקווים וגם באוכלוסיית הדיאלל. זהו QTL עם אפקט משני אך העובדה שהוא הופיע בצורה עקבית בשתי האוכלוסיות ובניסויים שונים מחזקת את אמינותו ובכך הוא מהווה יעד אפשרי להמשך מחקר. **באיור 14B** מוצגות תוצאות המיפוי באוכלוסייה המתפצלת (TADxDUL RILs). במקרה זה מוצג QTL שזוהה בכרומוזום 3 ואשר מופה באופן עקבי בשני ניסויים שונים. ה-QTL בכרומוזום 3 תחום במקטע של כ 1,000,000 בסיסים בגנום המלון ובתוכו כ-100 גנים וגם הוא מהווה לוקוס מעניין להמשך המחקר.

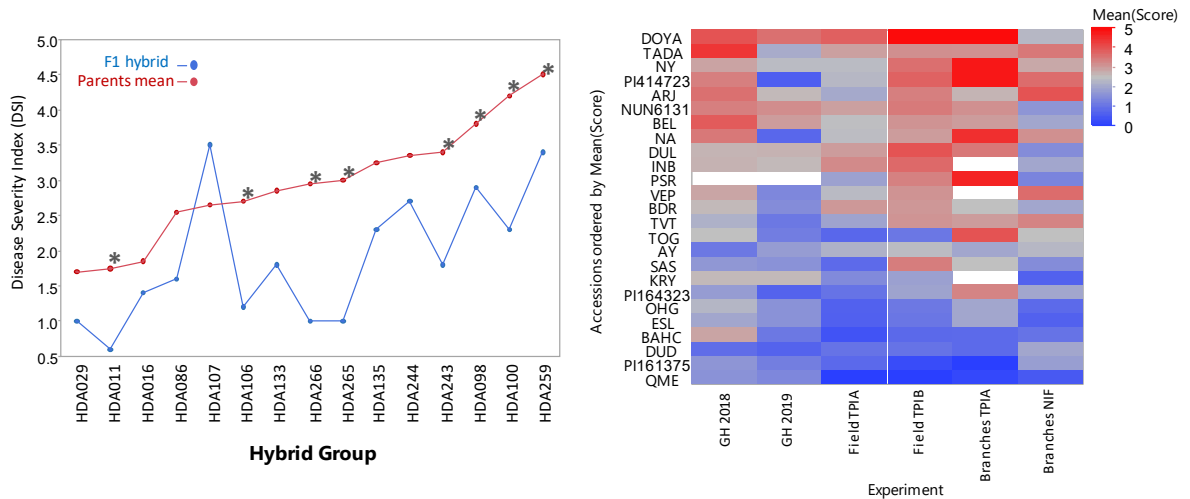


איור 14: מיפוי QTLs לבריקס באוסף הקווים, אוכלוסיית דיאלל ואוכלוסייה מתפצלת.

על בסיס תוצאות אלו, בשנת המחקר השלישית המשכנו בניית תוצאות ובפיתוח אוכלוסיות ממוקדות נוספות למיפוי גנים המבקרים את צבירת הסוכרים בפרי. התשתיות שפותחו והתוצאות שנאספו במסגרת הפרוייקט, איפשרו לנו להגיש תוכנית ולזכות בתקציב מחקר נוסף לפרוייקט המשך הממוקד בנושא זה.

7. אפיון עמידות למקרופומינה (*Macrophomina phaseolina*) באוסף המלון.

בהמשך לעבודה שהחלה בשנת המחקר הראשונה, בשיתוף עם דר' רוני כהן, אופיינו במהלך מספר ניסויים בחזרות ובהדבקה מבוקרת 25 קווי הורים מהאוסף, המייצגים את כלל השונות (Core subset). על בסיס ניתוח משוקלל של הניסויים זוהו ונבחרו קווים עמידים ורגישים (**איור 15**) מהם התחלנו לקדם בניית אוכלוסייה מתפצלת כשלב ראשוני בדרך למיפוי התכונה ובידוד גנים המעורבים בעמידות. בשלב זה בידדנו זרעי F2 לאוכלוסיות מיפוי פוטנציאליות לתכונה זו. בנוסף לכך נבחנו סט של מכלואים לצד קווי ההורים שלהם והתקבל מידע על אופן ההורשה של תכונה זו (**איור 16**). נתון מעניין (הדורש אימות נוסף) הוא שמרבית המכלואים הראו רמת עמידות גבוהה יותר מהוריהם ובממוצע המכלואים עמידים יותר מההורים.



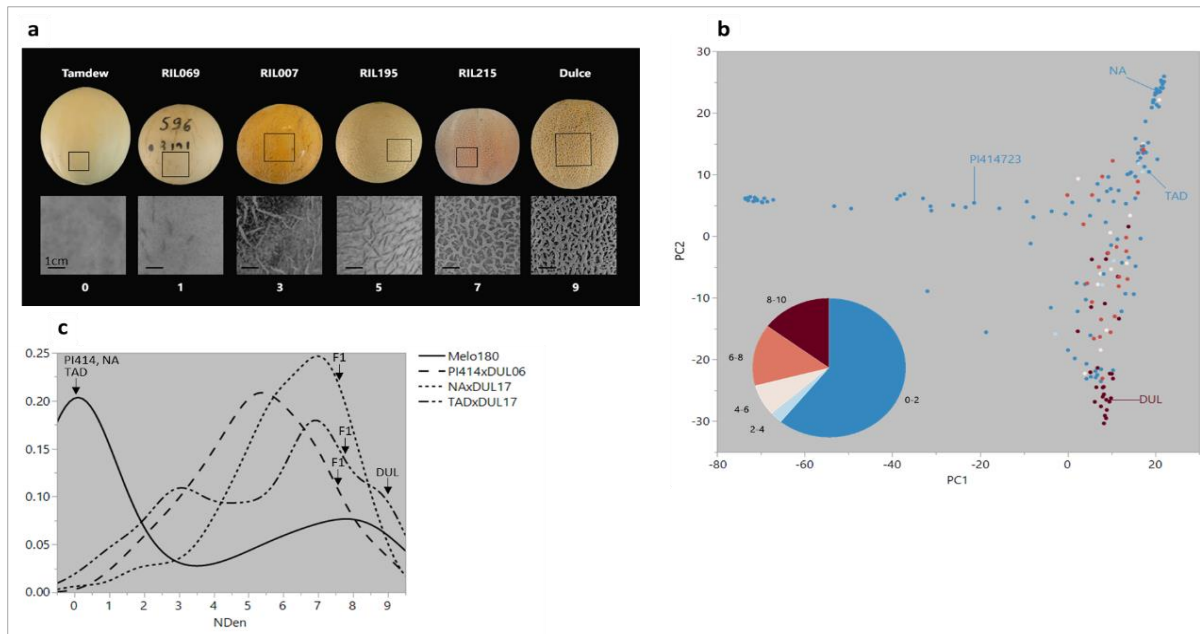
איור 15: סריקת העמידות למקרופומינה (*M. phaseolina*) בסט הליבה של אוסף המלון במספר

איור 16: סריקת העמידות למקרופומינה (*M. phaseolina*) בסט של 15 מכלואים נבחרים והוריהם.

8. אפיון פנוטיפי וגנטי של רישות הקליפה באוסף המלון ומיפוי QTL באוכלוסייה מתפצלת.

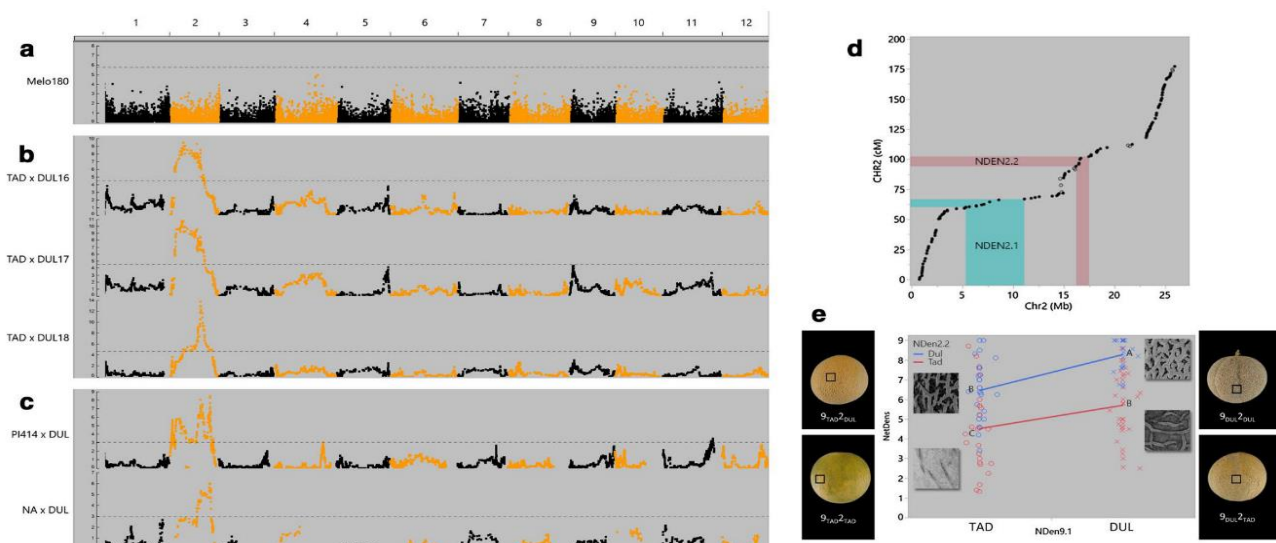
לצורך אפיון גנטי אפקטיבי של תכונת רישות הקליפה, גם בתכונה זו אנו משלבים בין אפיון האוסף לאפיון אוכלוסייה מתפצלת ייעודית. **איור 17** מבוסס על אפיון הרישות בפירות בשלים ומציג את קטגוריית הרישות ואת התפלגות התכונה באוסף קווי המלון ובאוכלוסיות המתפצלות שנותחו. **באיור 17b** ניתן לראות את התפלגות דרגות רישות הקליפה (בסקאלה בין 0=קליפה חלקה ל-10=קליפה עם רישות צפוף) על גבי PCA plot בו כל נקודה מייצגת קו באוסף והמרחק בין הנקודות על גבי מערכת הצירים מייצגת את המרחק הגנטי ביניהם (על בסיס 23,000 סמנים

גנטיים). ניתן לראות כי רוב הקווים באוסף הם בעלי קליפה חלקה או רישות עדין וכי מרבית הקווים בעלי הרישות הצפוף שייכים לקבוצת זן מובחנת (reticulatus) הממוקמת בצד הימני התחתון של הגרף. **איור 17c** מציג את גרפים של התפלגות דרגות הרישות באוכלוסיות נוספות שאופיינו לצורך מיפוי השוואתי של התכונה.



איור 17 : אפיון רישות הקליפה באוסף קווי המלון ובאוכלוסיות מתפצלות. (A) אופן אפיון רמת הרישות. (B) השוואת ברישות הקליפה באוסף המלון על גבי PCA plot. (C) התפלגות תכונת רישות הקליפה באוכלוסיות מתפצלות ובאוסף הקווים.

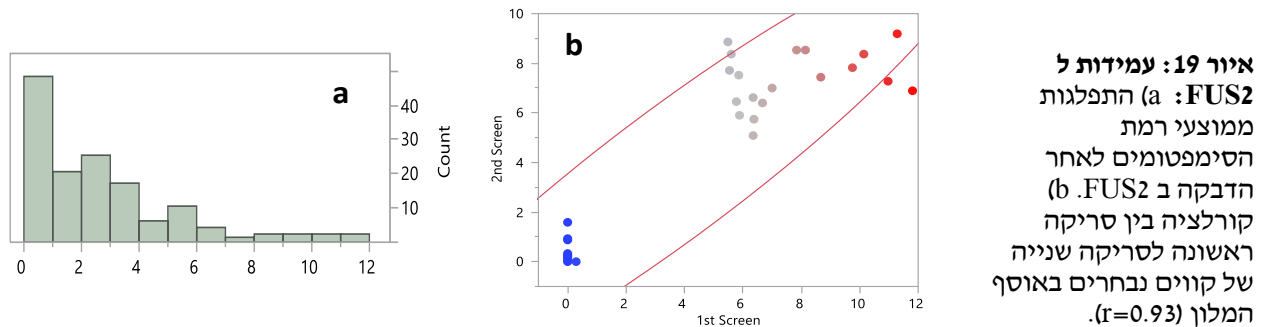
בשנות המחקר השנייה והשלישית השלמנו אפיון וניתוח נתוני רישות הקליפה באוכלוסיות מתפצלות ומיפיו QTLs לתכונה זו (**איור 18**). זוהי QTL עיקרי בכרומוזום 2 לצד QTLs משניים נוספים. תוצאות מיפוי אלו מאפשרות לנו כעת לחקור יותר בפירוט אינטרקציות בין QTLs (גנים) המשפיעים על רישות הקליפה (**איור 18e**). בנוסף, אנליזות גנומיות של רצפי הגנום של קווי ההורים של האוכלוסיות המתפצלות ושל כל קווי סט הליבה, מאפשרות כעת לחקור בפירוט גנים מועמדים. תוצאות אלו מתוארות בהרחבה במאמר שפירסמנו לאחרונה (Oren et al. (2020



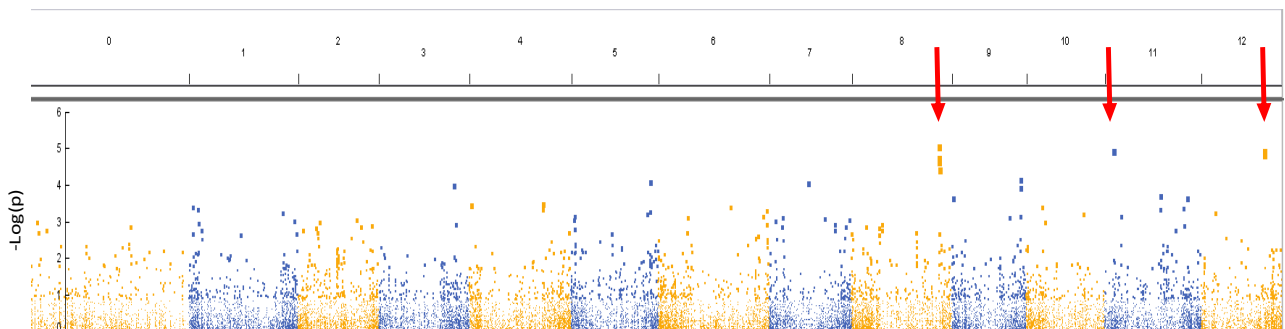
איור 18 : מיפוי QTLs לרישות הקליפה (a-c – מיפוי QTLs באוכלוסיות מתפצלות. QTL עיקרי זוהה בכרומוזום 2. (d) השוואת מפה גנטית ומפה פיזית של כרומוזום 2. מפה גנטית על בסיס אוכלוסיית TADxDUL RILs ומפה פיזית מבוססת על גנום ייחוס של מלון. (e) ניתוח השפעות גומלין בין QTL עיקרי על כרומוזום 2 ל QTL משני על כרומוזום 9.

9. אפיון האוסף לעמידות לפוזריום (FUS2)

במסגרת הפרוייקט (שיתוף פעולה עם דר' רוני כהן) נסרק אוסף קווי המלון גם לעמידות לפוזריום (FUS2). **איור 19a** מציג את התפלגות ממוצעי רמת הסימפטומים של הקווים (5 חזרות לכל קו). ניתן לראות כי ההתפלגות אינה נורמלית ומתאפיינת בפרופוציה גבוהה של קווים רגישים ביחס לעמידים (כצפוי) אך בקיומה של שונות פנוטיפית לתכונה זו. 40 קווים המייצגים את קצוות ההתפלגות נבחרו להדבקה נוספת לאימות התוצאות. **איור 19b** מציג את הקורלציה בין ההדבקה הראשונה לשנייה אשר הייתה גבוהה ומעידה על מרכיב גנטי משמעותי לתכונה.



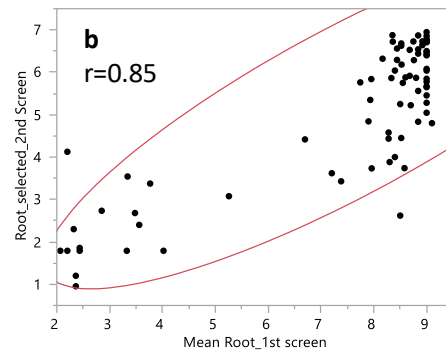
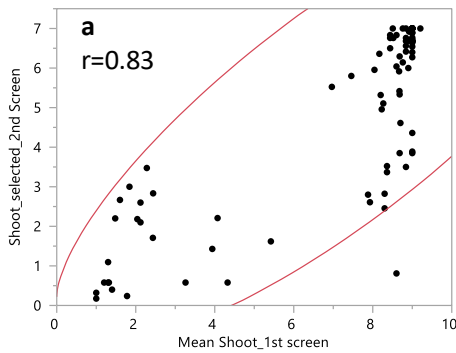
התוצאות הללו שימשו למיפוי בשיטת GWAS. כפי שמוצג ב**איור 20**, בניית זהו אנו מצליחים לזהות 3 אזורים גנומיים בהם ישנם סמנים גנטיים (SNPs) הנמצאים באסוציאציה מובהקת עם רמת העמידות. אלו כמובן תוצאות ראשוניות המצריכות אימות והדרך הטובה ביותר תהיה לבחור על בסיס התוצאות קווי הורים מתאימים לבנייה וניתוח של אוכלוסייה מתפצלת.



איור 20: ניתוח אסוציאציה (GWAS) לעמידות ל FUS2. Manhattan plot, כל נקודה מייצגת סמן גנטי. אזורים בהם זוהה אפקט מובהק מוצגים בעזרת חץ אדום.

10. אפיון האוסף לעמידות לפוזריום רקבון הכתר (FORC)

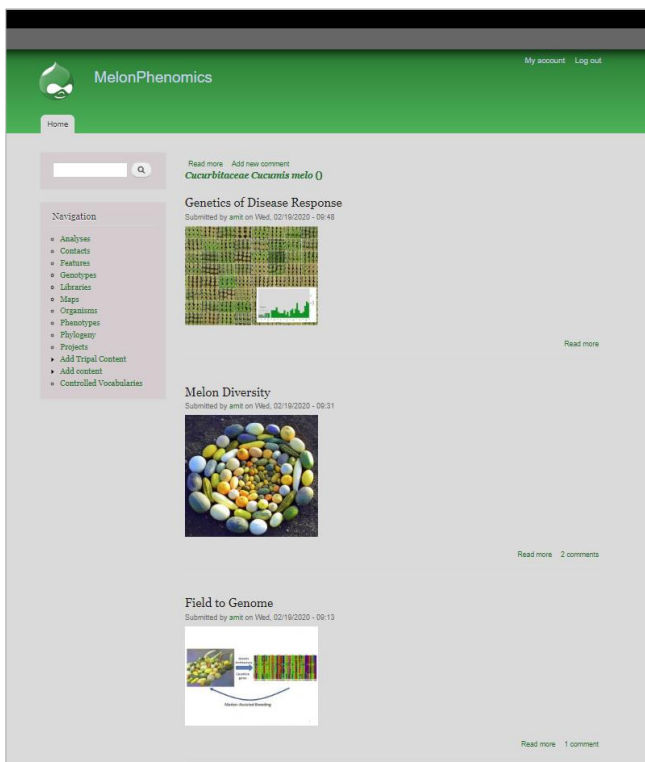
חלק פיתופתולוגי זה של הפרוייקט בוצע ע"י שיתוף פעולה עם דר' רוני כהן. בהמשך לתוצאות ההקדמיות שדווחו בהצעת המחקר, בהן בוצעה סריקה של האוסף לעמידות ל FORC, ביצענו הדבקה נוספת של 80 קווים נבחרים בעלי מופע עמידות או רגישות מובהק. ניתן לראות כי יש עקביות של התוצאות אשר מצביעה על תורשתיות גבוהה של התכונה (**איור 21**). עם זאת, במיפוי בשיטת GWAS לא זוהו אזורים גנומיים בעלי אפקט מובהק. תוצאה זו יכולה להעיד על תורשה פוליגנית ועל מעורבות גנים שונים המשפיעים על רמת העמידות בקווים שונים באוסף. לאור תוצאות אלו, המצביעות על היתכנות למיפוי גנטי של העמידות (על בסיס התורשתיות הגבוהה), והמורכבות שהתקבלה באפיון האוסף, השלב הבא יהיה לבחור אוכלוסיית מיפוי מתפצלת מהכלאה בין הורה עמיד לרגיש ולהתקדם לכיוון של מיפוי מבוסס תאחיזה (Linkage mapping). התשתית שהוקמה בפרוייקט (300 אוכלוסיות F2 מכל צירוס קווי הליבה), מאפשרים המשך מחקר גנטי ממוקד לתכונה זו.



איור 21: עמידות ל
FORC: קורלציה בין
סריקה ראשונה לסריקה
שנייה של קווים נבחרים
באוסף המלון. (a) אפיון
הסימפטומים הנוף
הצמח. (b) אפיון
הסימפטומים בשורשים.

11. המשך ארגון הנתונים בבסיס נתונים ותחילת פיתוח תשתית וממשק אינטרנטי –

במקביל להתקדמות שתוארה באפיון הגנטי הפרטני של התכונות השונות, במהלך השנה השנייה והשלישית אנו מתקדמים בהקמת התשתית לניהול המידע והנגשתו. במסגרת הפרוייקט מומנה עבודה של ביואינפורמטיקאי בנווה



יער אשר התחיל לעבוד על הקמת התשתית תוך שימוש בפלטפורמת TRIPAL, שזוהי תבנית גנרית המשמשת לבניית ממשקים לבסיסי נתונים גנומיים ופנוטיפיים. באיור 22 מוצג Home Page טנטטיבי של הפרוטל שנמצא בתהליך בנייה. השלב בו אנו נמצאים הוא אפיון טבלאות הנתונים והתאמתם לתבניות (templates) המיושמות בממשק TRIPAL. בשלב הבא, לאחר השלמת הקמת בסיס הנתונים, נתקדם לעבר הפעלת כלי חיפוש, בניית טבלאות וגרפים מסכמים וניתוחים סטטיסטיים וגנטיים נוספים. לצערנו, בשנת המחקר השלישית לא הושגה ההתקדמות הרצויה - הביואינפורמטיקאי שהחל לעבוד על הפרוייקט לא המשיך בכך ובניגוד לציפיות שלנו, חלק זה של הפרוייקט לא הושלם.

איור 22: עמוד השער של פורטל אינטרנטי אשר מוקם להנגשת נתונים גנומיים ופנוטיפיים במלון.

דיון בתוצאות

הפרוייקט הנוכחי הוא במהותו פרוייקט תשתיתי אשר ממנף את השונות הגנטית הקיימת במלון ליצירת כלים וידע למיפוי תכונות וטיפול זני מלון בעלי תכונות ייחודיות. כמפורט בדוח, במהלך הפרוייקט הושגה התקדמות באפיון הפנוטיפי של האוסף וכן נבנו ואופיינו אוכלוסיות נוספות למגוון תכונות חקלאיות ובהן תכונות איכות פרי ועמידויות למחלות. במקביל למשימות התשתיות אשר היוו את מירב הפוקוס בשנה הראשונה, עברנו בהמשך הפרוייקט לשלבים ממוקדים ומכווני תכונות, וכפי שתואר בדו"ח הושגה התקדמות באפיון הגנטי והמיפוי של מגוון תכונות בעלות חשיבות חקלאית. מספר דוגמאות מרכזיות למימוש האסטרטגיה הנ"ל:

1. מיפוי ואפיון הגן המבקר צבירת פיגמנטים בפרי - בשנה השנייה הושלמו מספר היבטים ופורסם מאמר מפורט הממנף את השונות הגנטית שיש בידינו לבידוד גן בעל חשיבות לאיכות הפרי (Oren et al. (2019) Journal

(of Experimental Botany). בעבודה זו בוצע שימוש אינטגרטיבי באוסף קווי המלון ובאוקלוסיה ייעודית המתפצלת לתכונת המטרה – צבירת פיגמנטים בפרי. לצד החשיבות המדעית של זיהוי גן מרכזי המבקר צבירת פיגמנטים במלון, בידינו כעת סמנים גנטיים המאפשרים סלקציה של אללים רצויים במגוון רחב של אוכלוסיות טיפוח. בנוסף לכך, אפיון השפעתו של הגן CmAPRR2 על צבירת פיגמנטים בפרי צעיר ובשל, וכמו כן ברקמות הפרי השונות (קליפה וציפה), מהוות תמריץ לשימוש עתידי בעריכה גנומית כערוץ נוסף ליצירת זנים בעלי תכולת פיגמנטים גבוהה.

2. מיפוי גנטי של QTLs לבכירות ואופי ההבשלה (קלימקטריות) – גם תכונות אלו אופיינו במקביל באוכלוסיה מרובת אללים (אוכלוסיות חצי די-אלל) ובאוקלוסיה מתפצלת דו-הורית. מיפוי QTLs בעלי השפעה מובהקת על תזמון הפריחה ועל קצב התפתחות הפרי. שתי תכונות אלו מגדירות למעשה את הבכירות החקלאית – הזמן מזריעה לקטיפה. זמינות רצף הגנום של קווי ההורים יאפשר לנו כעת להמשיך ולחקור גנים מועמדים המבקרים תכונות אלו. סמנים גנטיים הנמצאים בתאחיזה ל-QTLs שמופו לבכירות יאפשרו כעת סלקציה גנוטיפית וטיפוח תכונה זו ברקעים גנטיים רלבנטיים. במקביל לבכירות, מיפוי גם QTLs לאופי ההבשלה, ע"י אפיון כמותי של שחרור אתילן בפירות בשלים בקווי הליבה, אוכלוסיית דיאלל ואוכלוסיות מיפוי דו-הוריות. תוצאות אלו מצטרפות לעבודות קודמות בהן בוצע אפיון גנטי של אופי ההבשלה במלון. שני QTLs עיקריים שזוהו (בכרומוזומים 3 ו-8) מאפשרים כעת המשך מחקר לזיהוי גנים מועמדים. סמנים בתאחיזה ל-QTLs אלו, אשר זמינים על בסיס רצפי הגנום של קווי אוסף הליבה יאפשרו סלקציה גנוטיפית של אללים רצויים (קלימקטריות גבוהה או נמוכה) בתהליך טיפוח זנים. מאמר המסכם תוצאות אלו, שכותרתו: "QTL mapping and genomic analyses of earliness and fruit ripening traits in a melon Recombinant Inbred Lines population supported by *De novo* assembly of their parental genomes" נמצא בשלבים מתקדמים של כתיבה.

3. אפיון פנוטיפי ומיפוי ראשוני של QTLs לתכולת סוכרים בפרי הבשל – תכולת סוכרים בציפת הפרי הבשל היא תכונה מרכזית המגדירה את איכות הפרי במרבית טיפוסים הזן במלון. לאורך השנים נעשו מספר מחקרים למיפוי גנטי של QTLs לסוכרים בפרי, אך עד כה לא בודד גן עיקרי המבקר תכונה זו. בפרוייקט הנוכחי השתמשנו באוסף הקווים ובאוקלוסיות נוספות לאפיון השונות הפנוטיפית ולמיפוי ראשוני של QTLs לתכולת סוכרים בפרי. על בסיס תוצאות אלו, ברור כי תכונה זו מורכבת ומעורבים בה מספר רב של גנים. האסטרטגיה הנכונה לזיהוי QTLs היא שימוש במספר אוכלוסיות מתפצלות דו-הוריות על בסיס השונות בין קווי האוסף. התשתית שנבנתה בפרוייקט אפשרה לנו לזהות הכלאות רלבנטיות ולקדם אוכלוסיות כאלו לפרוייקט ממוקד בנושא זה. בגישה זו בכוונתנו לסרוק מספר גדול של צאצאים ולרצף צברים של פרטים קיצוניים באוכלוסיה הנבדלים בתכולת הסוכרים. אנו מצפים לזהות את ה-QTLs המרכזיים בכל אוכלוסייה ברזולוציה שתאפשר לזהות גנים מועמדים.

4. אפיון פנוטיפי ומיפוי גנטי של תכונת רישות הקליפה – כחלק מאפיון תכונות מורפולוגיות הפרי, בוצע במהלך הפרוייקט אפיון פנוטיפי של האוסף ושל אוכלוסיות מיפוי מתפצלות לתכונת רישות הקליפה המהווה מופע חשוב בקביעת איכות הפרי בטיפוסי זן ספציפיים במלון. מעבר לחשיבות הטיפוחית, קיים עניין רב בהבנת הבסיס הגנטי של יצירת רישות חיזוני כמנגנון אחי סדקים בציפוי שעוותי (סוברין). במסגרת חלק זה בעבודה מיפוינו QTLs לתכונה זו ואיתרנו גנים מועמדים. תוצאות עבודה זו פורסמו במהלך שנת המחקר השלישית, במאמר המתאר את השימוש השמושלב באוסף קווים, אוכלוסיה מתפצלת ורפיון גנוטיפי ברזולוציה גבוהה למיפוי תכונות איכות פרי (Oren *et al.* 2020. Theoretical and Applied Genetics).

לסיכום, במסגרת הפרוייקט נבנתה תשתית חומר גנטי (זרעים) למחקר גנטי וטיפוחי ארוך טווח במלון. במהלך שלושת שנות הפרוייקט נבנו אוכלוסיות ונאספו עשרות אלפי נקודות מידע (data-points) במגוון תכונות, על אוסף הקווים ועל האוכלוסיות הנוספות שפותחו. בנוסף, כחלק מתהליך איסוף הנתונים בוצע תיעוד וויזואלי של השונות בתכונות הפרי, ע"י צילום וסריקה של פירות במהלך ההתפתחות ובהבשלה. תיעוד שיטתי זה של אוסף הקווים ושל

אוכלוסיות הדיאלל מכיל כיום כ-10,000 תמונות דיגיטליות מתויגות, הזמינות להפעלת חיפוש ואפיון תכונות נוספות. במקביל לתוצאות הגנטיות, שחלקן מסוכמות במאמרים שפורסמו במהלך הפרוייקט, נמשך המאמץ לארגן ולהנגיש את כלל הנתונים לשימוש עתידי ולכריית תובנות נוספות, ובכלל זה זיהוי חומר גנטי להמשך טיפוח זנים. חשוב לציין שעד כה בדלועים לא קיים בסיס נתונים מאוחד פנוטיפי וגנומי, המאפשר סריקת שונות וגישה לנתוני מיפוי QTLs. ולכן, מעבר לחשיבות המקומית של הנגשת המידע ושמירה על המשכיות המחקר ביחידת הדלועים בנה-יער ובמכון וולקני, בסיס נתונים זה צפוי להיות בעל ייחודיות בקהילת המחקר הגלובלית בדלועים.

רשימת ספרות

- Burger, Y., Sa'ar, U., Paris, H.S., Lewinsohn, E., Katzir, N., Tadmor, Y., Schaffer, A.A., 2006. Genetic variability for valuable fruit quality traits in *Cucumis melo*. *Isr. J. Plant Sci.* 54, 233–242.
- Boualem, A., Fergany, M., Fernandez, R., Troadec, C., Martin, A., Morin, H., Sari, M., Collin, F., Flowers, J., Pitrat, M., Purugganan, M., Dogimont, C., Bendahmane, A., 2008. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* 321, 836–838.
- Chayut, N., Yuan, H., Ohali, S., Meir, A., Yeselson, Y., Portnoy, V., Zheng, Y., Fei, Z., Lewinsohn, E., Katzir, N., Schaffer, A.A., Gepstein, S., Burger, J., Li, L., Tadmor., 2015. A bulk segregant transcriptome analysis reveals metabolic and cellular processes associated with Orange allelic variation and fruit β -carotene accumulation in melon fruit. *BMC Plant Biology* 15, 274.
- Cohen, R., Elkabetz, M., Edelstein, M., 2016. Variation in the responses of melon and watermelon to *Macrophomina phaseolina*, *Crop Protection* 85, 46-51.
- Cohen, S., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Itkin, M., Portnoy, V., Sa'ar, U., Lev, S., Yeselson, L., Petrikov, M., Rogachev, I., Aharoni, a, Ophir, R., Tadmor, Y., Lewinsohn, E., Burger, Y., Katzir, N., Schaffer, a a, 2012. Co-mapping studies of QTLs for fruit acidity and candidate genes of organic acid metabolism and proton transport in sweet melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 125, 343–53.
- Diaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J.E., Zalapa, J.E., Cuevas, H.E., Dace, G., Oliver, M., Boissot, N., Dogimont, C., Pitrat, M., Hofstede, R., van Koert, P., Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Cohen, S., Schaffer, A., Katzir, N., Xu, Y., Zhang, H., Fukino, N., Matsumoto, S., Garcia-Mas, J., Monforte, A.J., 2011. A consensus linkage map for molecular markers and quantitative trait loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol.* 11, 111.
- Elkabetz, M., Paris, HS., Burger, J., Hanan, A., Cohen, R., 2016. Two genes for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae), *Scientia Horticulturae* 201, 57-60

- Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J. a., Kawamoto, K., Buckler, E.S., Mitchell, S.E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* **6**, 1–10.
- Ersoz, E.S., Yu, J., Buckler, E.S., 2007. Applications of linkage disequilibrium and association mapping in crop plants. In: *Genomics-Assisted Crop Improvement*. Springer, pp. 97–119.
- Feder, A., Burger, J., Gao, S., Lewinsohn, E., Katzir, N., Schaffer, A. a., Meir, A., Davidovich-Rikanati, R., Portnoy, V., Gal-On, A., Fei, Z., Kashi, Y., Tadmor, Y., 2015. A Kelch domain-containing F-box coding gene negatively regulates flavonoid accumulation in *Cucumis melo* L. *Plant Physiol.* pp.01008.2015.
- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., S, E., IV, B., 2003. STRUCTURE OF LINKAGE DISEQUILIBRIUM IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 357–374.
- Freilich, S., Lev, S., Gonda, I., Reuveni, E., Portnoy, V., Oren, E., Lohse, M., Galpaz, N., Bar, E., Tzuri, G., Wissotsky, G., Meir, A., Burger, J., Tadmor, Y., Schaffer, A., Fei, Z., Giovannoni, J., Lewinsohn, E., Katzir, N., 2015. Systems approach for exploring the intricate associations between sweetness, color and aroma in melon fruits. *BMC Plant Biol.* **15**.
- Garcia-Mas, J., Benjak, a., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., Gonzalez, V.M., Henaff, E., Camara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., Alioto, T., Capella-Gutierrez, S., Blanca, J., Canizares, J., Ziarsolo, P., Gonzalez-Ibeas, D., Rodriguez-Moreno, L., Droege, M., Du, L., Alvarez-Tejado, M., Lorente-Galdos, B., Mele, M., Yang, L., Weng, Y., Navarro, a., Marques-Bonet, T., Aranda, M. a., Nuez, F., Pico, B., Gabaldon, T., Roma, G., Guigo, R., Casacuberta, J.M., Arus, P., Puigdomenech, P., 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 11872–11877.
- Gonda, I., Lev, S., Bar, E., Sikron, N., Portnoy, V., Davidovich-Rikanati, R., Burger, J., Schaffer, A. a, Tadmor, Y., Giovannoni, J.J., Huang, M., Fei, Z., Katzir, N., Fait, A., Lewinsohn, E., 2013. Catabolism of L-methionine in the formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Plant J.* **74**, 458–72.
- Gupta, P.K., Kulwal, P.L., Jaiswal, V., 2014. Association mapping in crop plants: Opportunities and challenges, *Advances in Genetics.* **85**, 109-147.
- Gur, A., Tzuri, G., Meir, A., Sa'ar, U., Portnoy, V., Katzir, N., Schaffer, AA., Burger, J., Tadmor, Y., , 2017. Genome-Wide Linkage-Disequilibrium Mapping to Candidate Genes Level in *Cucumis melo*. *Scientific Reports.* **7**: 9770. DOI: 10.1038/s41598-017-09987-4.
- Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Lotan-Pompan, M., Lev, S., Cohen, S., Dai, N., Yeselson, L., Meir, a, Libhaber, S.E., Avisar, E., Melame, T., van Koert, P., Verbakel, H., Hofstede, R., Volpin, H., Oliver, M., Fougodoire, a, Stalh, C., Fauve, J., Copes, B., Fei, Z., Giovannoni, J., Ori, N., Lewinsohn, E., Sherman, a, Burger, J., Tadmor, Y., Schaffer, a a, Katzir, N., 2010. A

genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theor. Appl. Genet.* **121**, 511–33.

He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z., Liu, H., Li, Z., 2014. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Front. Plant Sci.* **5**, 1–8.

Oren, E., Tzuri, G., Vexler L, Dafna A, Meir A, Faigenboim A, Kenigswald M, Portnoy VT, Schaffer AA, Levi A, Buckler ES, Katzir N, Burger J, Tadmor Y, Gur A.(2019) . Multi-allelic APRR2 Gene is Associated with Fruit Pigment Accumulation in Melon and Watermelon . *Journal of Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/erz182.

Oren E, Tzuri G, Dafna A, Meir A, Kumar R, Katzir N, Elkind Y, Freilich S, Schaffer AA, Tadmor Y, Burger J and Gur A (2020) High-density NGS-based map construction and genetic dissection of fruit shape and rind netting in *Cucumis melo*. *Theor Appl Genet*. doi: 10.1007/s00122-020-03567-3

Rodríguez, G.R., Moysenko, J.B., Robbins, M.D., Morejón, N.H., Francis, D.M., van der Knaap, E., 2010. Tomato Analyzer: a useful software application to collect accurate and detailed morphological and colorimetric data from two-dimensional objects. *J. Vis. Exp.* 1–9.

Sufrin-Ringwald, T., Lapidot, M., 2011. Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit- infecting begomoviruses: *Squash leaf curl virus* and *Watermelon chlorotic stunt virus*. *Phytopathol.* **101**: 281-289.

Tzuri, G., Zhou, X., Chayut, N., Yuan, H., Portnoy, V., Meir, A., Sa'ar, U., Baumkoler, F., Mazourek, M., Lewinsohn, E., Fei, Z., Schaffer, A. a., Li, L., Burger, J., Katzir, N., Tadmor, Y., 2015. A “golden” SNP in CmOr governs fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*). *Plant J.* **82**: 267-279.

Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., Kresovich, S., Buckler, E.S., 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* **38**, 203–8.

Zhu, C., Gore, M., Buckler, E.S., Yu, J., 2008. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *Plant Genome J.* **1**, 5.