

דוח לתוכנית מחקר 261-1150-16

קוד זיהוי מדען ראשי: 20-10-0048

**שם המחקר:** שיפור חיי מדף בפלפל: זיהוי גנים המבקרים אבוד מים לאחר האחסון של הפרי והחדרתם לקווי טיפוח

**Title:** Improvement of pepper fruit shelf life: identification of genes controlling post-harvest water loss and their introgression to elite backgrounds

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

שנת המחקר: דוח סופי

אילן פארן המחלקה לחקר ירקות

אלי פליק המחלקה לאחסון תוצרת חקלאית

עדי פייגנבוים המחלקה לחקר ירקות

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

מאי 2019

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

\_\_\_\_\_ חתימת החוקר

## תקציר

הצגת הבעיה: כדי ללמוד את הבקרה הגנטית של קצב אבוד מים לאחר הקטיפה בפרי הפלפל בצענו מיפוי מולקולרי של התכונה ומיפוי ברזולוציה גבוהה של שני לוקוסים בכרומוזום 10 המבקרים את התכונה. כמו כן יש צורך להעביר את התכונה לקווים בעלי פרי בלוקי גדול לבדיקה של הפוטנציאל הטיפוחי של הלוקוסים ברקעים גנטיים רלוונטיים לגידול המסחרי. **מטרות המחקר** היו: 1 מיפוי ברזולוציה גבוהה של שני ה QTLs בטכנולוגיית Genotyping by Sequencing (GBS) ופיתוח סמנים מולקולריים בתאחיזה הדוקה ל QTLs אלו. 2. זיהוי גנים מועמדים לבקרת התכונה. 3. שימוש בסמנים בתאחיזה ל QTLs להחדרת התכונה לרקעים גנטיים של פרי בלוקי מסחרי ובחינת האפקט של שני ה QTLs ברקעים אלו. **שיטות העבודה**: יצרנו שתי אוכלוסיות מיפוי עבור כל לוקוס בנפרד ומיפוינו את התכונה בשיטת genotyping by sequencing (GBS) המאפשרת יצירת מפה רוויה בסמנים. כמו כן בצענו הכלאות מחזירות להעברת הלוקוסים לרקע של פרי בלוקי ובדקנו את אפקט ה QTL באוכלוסיות מתקדמות של הכלאות מחזירות. **תוצאות עיקריות**: עבור ה QTL WL10.1 התקבל אזור רחב של כרומוזום 10 בעל מובהקות גבוהה על התכונה. עבור ה QTL WL10.2 התקבל פיק ברור בכרומוזום 10 אך במובהקות נמוכה יחסית. נמצאו מספר גנים ממשפחת ציטוכרום P450 הממופים באזור ה QTL ומתבטאים באופן דיפרנציאלי בין קוים הנבדלים בקצב אבוד מים מהפרי. בצענו ארבעה מחזורים של הכלאות מחזירות והפרייה עצמית לקבלת דור BC4S1 להעברת ובחינת שני הלוקוסים לשלשה רקעים גנטיים של פרי בלוקי גדול תוך פיתוח סמנים מולקולרים האחוזים ל QTLs. איפיון פנוטיפי של אוכלוסיות אלו הראה רמת שמור טובה של שני ה QTL ברקעים של פרי בלוקי. **מסקנות והמלצות**: המיפוי של QTL WL10.1 מעיד על אפקט מובהק מאד על התכונה בכרומוזום 10 אולם רזולוציית המיפוי לא אפשרה למקם ביתר דיוק את אזור ה QTL. סיבות אפשריות הן קיומם של מספר גנים, יותר מאשר גן יחיד באזור ה QTL המבקרים את התכונה או תורשתיות נמוכה המקשה על הערכה מדויקת של הפנוטיפ. מיקום ה QTL WL10.2 חזר על עצמו באוכלוסיית המיפוי בהשוואה למיפוי בדור קודם. זוהתה משפחת גנים באזור ה QTL WL10.2 שחברים בה מהוים גנים מועמדים לבקרת ה QTL. שימור אפקט שני ה QTLs ברקעים בלוקים ופיתוח סמנים מולקולרים פולימורפים בתאחיזה ללוקוסים אלו מעידים על פוטנציאל גבוה של שמוש בידע ובתוצרים שפותחו למטרת השבחת פלפל.

## מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

אמנון לרס, המכון לאחסון תוצרת חקלאית

רן חובב, המכון למדעי הצמח

רואי בן דוד, המכון למדעי הצמח

## תוכן עניינים

### עמודים

2.....	תקציר
3 .....	מבוא
3.....	מטרות המחקר
4.....	עקרי הניסויים ותוצאות המחקר
9.....	דיון
10 .....	רשימת ספרות

## מבוא

אחד הגורמים המגבילים את אספקת פרי הפלפל לשווקים רחוקים הוא אורך חיי המדף. פרי הפלפל נשמר באחסון לתקופה מרבית של שבועיים אך גם בתנאי אחסון מיטיבים חלה בתקופה זו התרככות של הפרי, הזדקנות הרקמות, התפתחות ריקבון וירידה כללית באיכותו. איבוד מים מהפרי הוא הגורם המרכזי לתהליכי ההזדקנות של הפרי באחסון כך שהיכולת להפחית את איבוד המים תאפשר הגמשת מועד הקטיף, צמצום הפחת בקטיף, הארכת משך האחסנה של הפרי והוזלת עלויות האחסנה. בנוסף תתאפשר הוזלה של הוצאות השיווק על ידי ייצוא ימי ופתיחת שווקים חדשים כגון במזרח הרחוק במיוחד לאור המשבר שחוה הענף בתקופה האחרונה עם התמוטטות השוק הרוסי והירידה בשער האירו.

למרות חשיבות התכונה של הארכת חיי מדף של פרי הפלפל, השבחת פלפל לתכונה זו לא הביאה לפריצת דרך משמעותית בגלל העדר ידע על הגנים המבקרים את התכונה, העדר חומר גנטי מאופיין בחיי מדף ארוכים והעדר כלים טיפוחים כגון סמנים מולקולריים ליעול הסלקציה של תכונה מורכבת זו. כדי ללמוד על הבקרה הגנטית של התכונה יצרנו אוכלוסיות צאצאים מהכלאה של שני הורים הנבדלים בקצב אבוד מים לאחר הקטיף. עבודה הקדמית במעבדתנו אפשרה מיפוי מולקולרי של התכונה וזיהוי של שני לוקוסים של תכונות כמותיות ( quantitative trait loci, QTL) הנמצאים במרחק גנטי של כ 40 cM זה מזה בכרומוזום 10 המבקרים את התכונה (Popovsky et al. 2017). כמו כן המיפוי הראשוני של ה QTLs נעשה על אוכלוסיות שבהם שני ה QTLs התפצלו יחד ולכן עשוי להיות מיסוך של QTL אחד על השני ולפגום ביעילות המיפוי. במחקר הנוכחי יצרנו שתי אוכלוסיות נפרדות שכל אחת מהם מתפצלת ל QTL יחיד.

## מטרות המחקר

המטרה הכללית של המחקר היא שיפור חיי מדף של הפלפל ע"י זיהוי גנים המבקרים את התכונה ובחינתם ברקעים טיפוחיים. המיפוי הראשוני של התכונה אפשר הגדרת אזורים בגנום של 5-10 cM המכילים כל QTL. רזולוציה זו לא מספקת על מנת לזהות את הגנים המבקרים את התכונה. לכן יש צורך בהגברת רזולוציית המיפוי שתאפשר זיהוי גנים אלו. כמו כן מאחר והעבודה הראשונית נעשתה בהכלאה של קווים בעלי פרי חריף וקטן, יש צורך להעביר את התכונה לקווים בעלי פרי בלוקי גדול לבדיקה של הפוטנציאל הטיפוחי של ה QTLs ברקעים גנטיים רלוונטיים לגידול המסחרי.

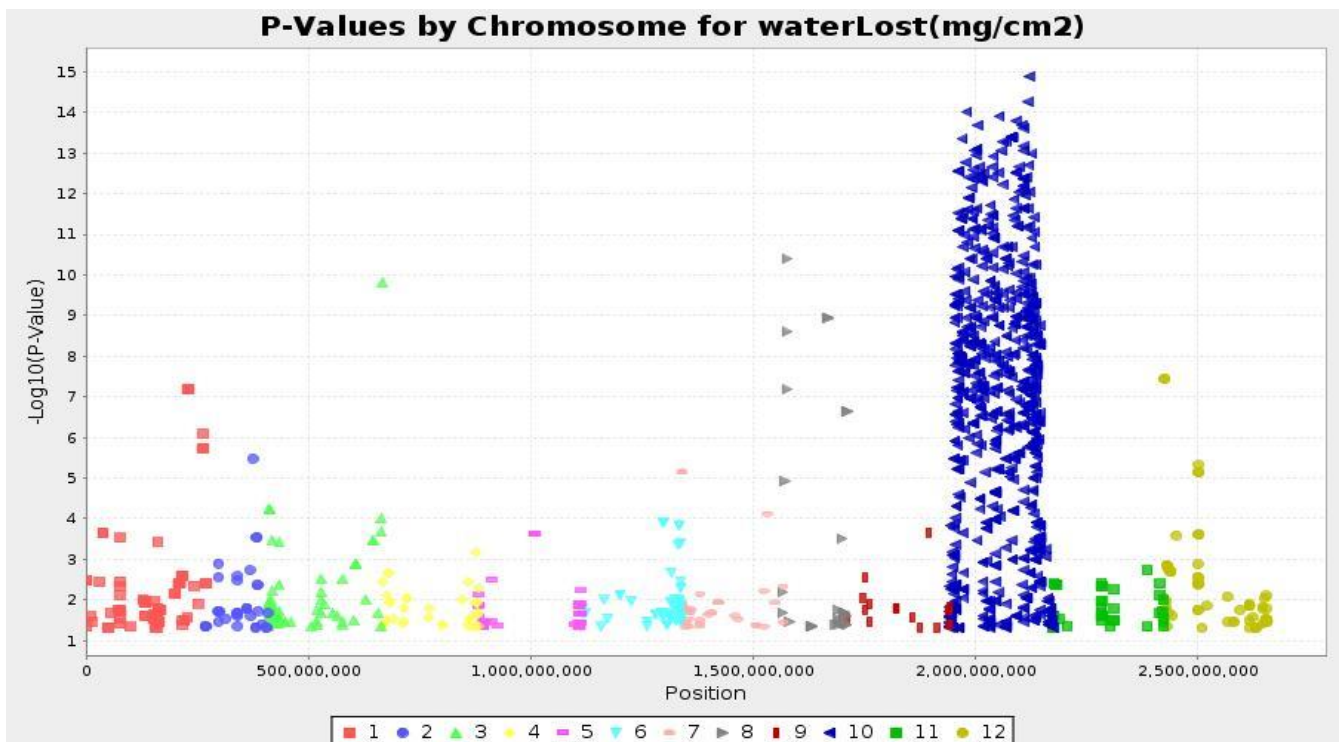
המטרות הספציפיות של המחקר הן:

1. מיפוי ברזולוציה גבוהה של שני ה QTLs בטכנולוגית Genotyping by Sequencing (GBS) ופיתוח סמנים מולקולריים בתאחיזה הדוקה ל QTLs אלו.
2. זיהוי גנים מועמדים לבקרת התכונה.
3. שימוש בסמנים בתאחיזה ל QTLs להחדרת התכונה לרקעים גנטיים של פרי בלוקי מסחרי ובחינת האפקט של שני ה QTLs ברקעים אלו.

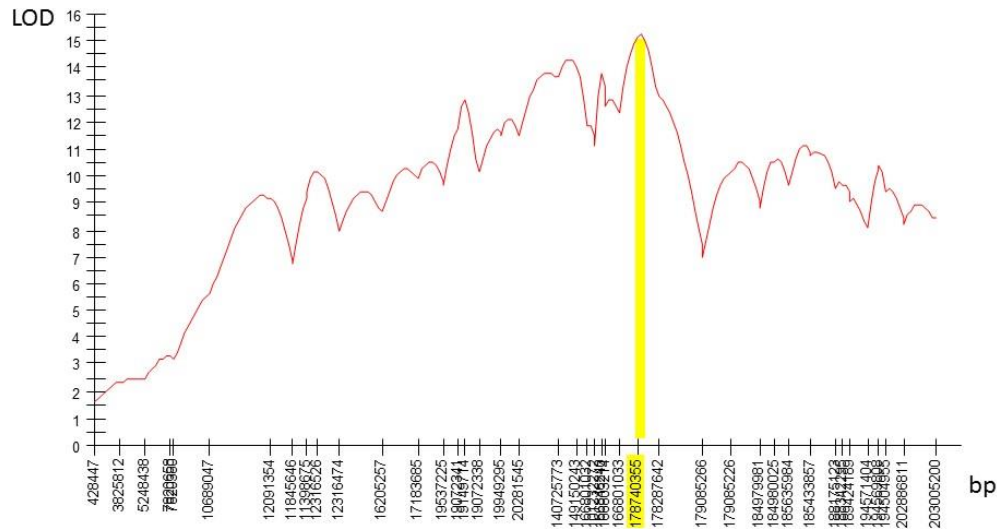
יצרנו שתי אוכלוסיות מיפוי המתפצלות כל אחת לאחד משני ה QTL המבקרים את התכונה, WL10.1, WL10.2. הורי האוכלוסיה היו קוים איזוגנים (BC4F3) המכילים את המחדר של ה QTL ממין הבר *C. chinense* בעל קצב אבוד מים נמוך על הרקע של הקו מהמין התרבותי 1154 בעל קצב אבוד מים גבוה.

### מיפוי WL10.1

ב2016 גידלנו כ 200 צמחי F2 מהאוכלוסיה המתפצלת ל WL10.1. DNA הופק מכל הצמחים ונשלח לאנליזת GBS במרכז לביוטכנולוגיה באוניברסיטת ויסקונסין למיפוי סמנים מולקולרים וכן 5-10 פרות בשלים נקטפו מכל צמח ונבדקו לקצב אבוד מים לאחר האחסון כמפורט ע"י Popovsky et al. 2017. ניתוח הסמנים נעשה ע"י התוכנה TASSEL. באוכלוסיה זוהו כ 37,000 סמני SNP ולאחר סינון של סמנים שאינם בעלי התאמה להתפצלות גנטית של דור F2 נותרו כ 9000 סמנים. כצפוי מכך שהקו האיזוגני מכיל מחדר עיקרי בכרומוזום 10, מירב הסמנים התמפו בכרומוזום זה באנליזת GLM בתוכנת TASSEL (איור 1). אולם אנליזה זו לא אפשרה זיהוי מדויק של אזור הפיק של ה QTL שכן פיזור הסמנים בכרומוזום היה רחב מאד. כדי לנסות למפות את ה QTL ביתר דיוק החמרנו את סינון הסמנים והשתמשנו בתוכנה של MapQTL (Kyazma, v. 6) ופונקציה של interval mapping. אנליזה זאת הראתה פיק רחב אולם אפשרה לזהות את האזור עם המובהקות המקסימלית על התכונה ( $LOD=15$ ,  $R^2=0.31$ ) ב 178 Mb במפה הפיסיקלית של כרומוזום 10 (איור 2, טבלה 1).



**איור 1.** אנליזת GLM לסמני SNP בתוכנת TASSEL באוכלוסית המיפוי של WL10.1. מירב הסמנים ממופים בכרומוזום 10 (צבע כחול) במובהקות גבוהה אולם פיזור הסמנים על הכרומוזום רחב. המיפוי נעשה על בסיס רצף הגנום של פלפל CM334 (Kim et al. 2014).



**איור 2:** מיפוי של ה QTL WL10.1 בשיטת interval mapping בתוכנת MapQTL. הקו הצהוב ממקם את האזור המובהק ביותר המבקר את ה QTL באזור 178 Mb במפה הפיסיקלית בכרומוזום 10.

**טבלה 1:** סכום נתוני ה QTL WL10.1.

QTL	Genomic location	Mean water loss genotype 1*	Mean water loss heterozygous	Mean water loss genotype 3	LOD	R <sup>2</sup>
WL10.1	178 Mb	22.4	24.8	29.1	15.1	0.31

\* גנוטיפ 1 = ממוצעי איבוד המים (מ"ג/סמ<sup>2</sup>) של הצאצאים ההומוזיגוטים לאלל של ההורה בעל אבוד מים נמוך.

גנוטיפ הטרזיגוט = ממוצע איבוד המים של הצאצאים ההטרזיגוטים.

גנוטיפ 3 = ממוצעי איבוד המים (מ"ג/סמ<sup>2</sup>) של הצאצאים ההומוזיגוטים לאלל של ההורה בעל אבוד מים גבוה.

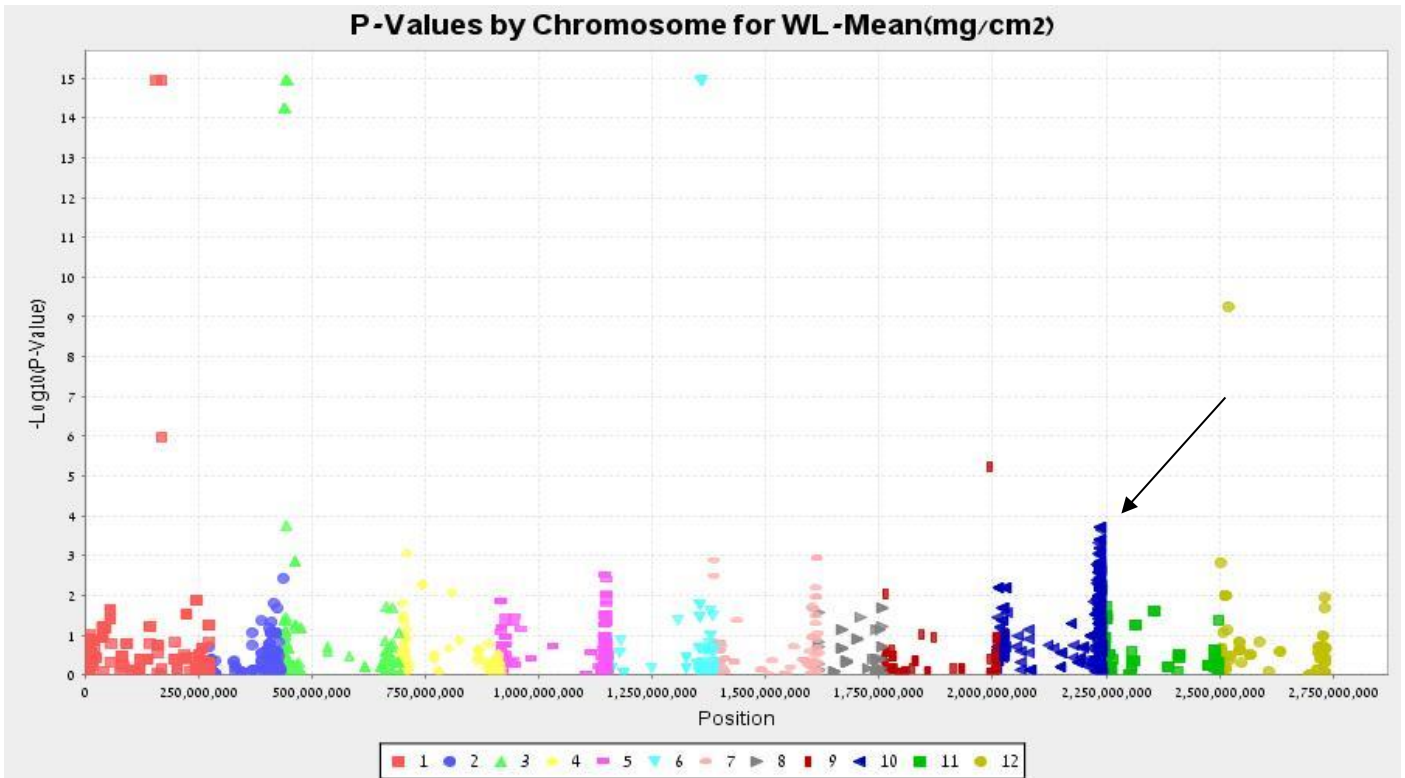
LOD = מדד למובהקות ה QTL.

R<sup>2</sup> = מקדם הרגרסיה המבטא את החלק היחסי של השונות המוסבר על ידי ה QTL

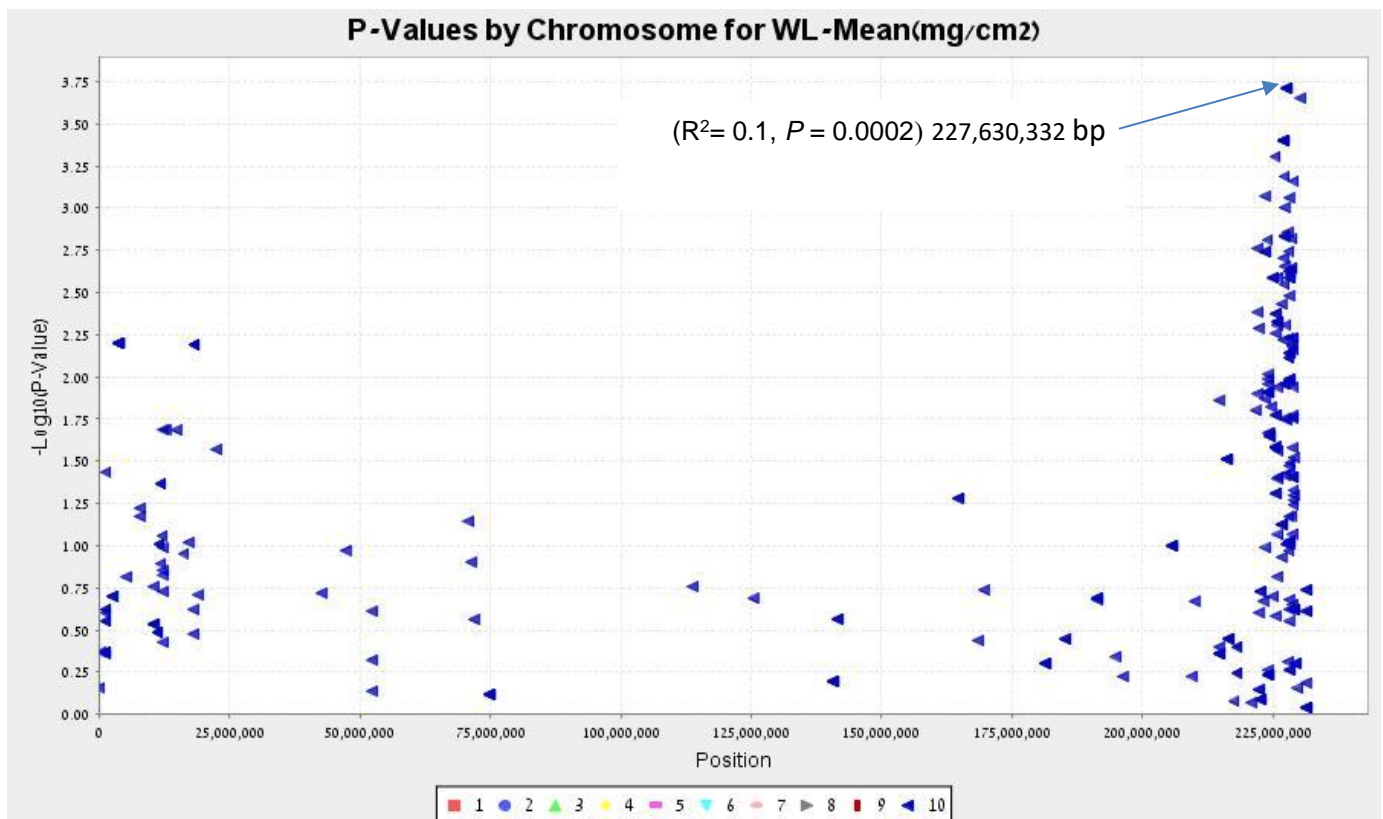
### מיפוי WL10.2

בשנת 2017 התמקדנו במיפוי ה QTL WL10.2 וגידלנו 186 צמחי F2 מהאוכלוסיה המתפצלת ל QTL זה. DNA הופק מכל הצמחים ונשלח לאנליזת GBS במרכז לביוטכנולוגיה באוניברסיטת ויסקונסין למיפוי סמנים מולקולריים בטכנולוגיה של genotyping by sequencing (GBS) וכן 5-10 פרות בשלים נקטפו מכל צמח ומההורים ונבדקו לקצב אבוד מים לאחר האחסון כמפורט ע"י Popovsky et al. 2017. ניתוח הסמנים נעשה ע"י התוכנה TASSEL.

לאחר סינון של סמנים שאינם בעלי התאמה להתפצלות גנטית של דור F2 נותרו כ 1800 סמני SNP המתפצלים באוכלוסיה על בסיס גנום הפלפל CM334 V. 1.55 (Kim et al. 2014; <https://www.sgn.cornell.edu>). כצפוי מכך שהקו האיזוגני מכיל מחדר עיקרי בכרומוזום 10, מירב הסמנים התמפו לכרומוזום זה באנליזת GLM בתוכנת TASSEL (איור 3). התמקדות בכרומוזום 10 אפשרה זיהוי של פיק ברור באזור 227-230 Mb (איור 4). נתוני הסמן המובהק ביותר ב 227 Mb העידו על אחוז הסבר יחסית נמוך של התכונה ( $R^2 = 0.1$ ,  $P = 0.0002$ , איור 4).



**איור 3.** אנליזת GLM לסמני SNP בתוכנת TASSEL באוכלוסיית המיפוי של WL10.2. כל צבע מסמן כרומוזום אחר. מירב הסמנים ממופים בכרומוזום 10 (צבע כחול מסומן בחץ). המיפוי נעשה על בסיס רצף הגנום של פלפל CM334 V. 1.55 (Kim et al. 2014).



**איור 4:** אנליזת GLM לסמני SNP בכרומוזום 10 בתוכנת TASSEL באוכלוסיית המיפוי של WL2. הסמן המובהק ביותר מסומן בחץ.

גנים מועמדים לבקרת ה QTL: עבור WL10.1 לא ניתן היה לזהות גנים מועמדים לפי תוצאות מיפוי ה GBS שכן הפיק של ה QTL היה רחב מאד (איור 1). עבור WL10.2 התקבל פיק חד אם כי במובהקות נמוכה יחסית. בחינת הגנים המועמדים בעלי קשר ביולוגי אפשרי לתכונת אבוד מים המתבטאים באופן דיפרנציאלי בין קוים איזוגנים ל QTL וממוקמים באזור ה QTL (Popovsky-Sarid, 2015), אפשרה זיהוי של חמישה גנים ממשפחת ציטוכרום P450 הממוקמים באזור 227 Mb. ארבעה מבין חמישה הגנים הראו ביטוי גבוה יותר באופן מובהק בקו בעל קצב אבוד מים נמוך בפרי בשל ואילו גן אחד היה בעל ביטוי גבוה יותר באופן מובהק בקו בעל קצב אבוד מים גבוה בפרי ירוק לאחר שבוע ולאחר 4 שבועות מחנטה (טבלה 2).

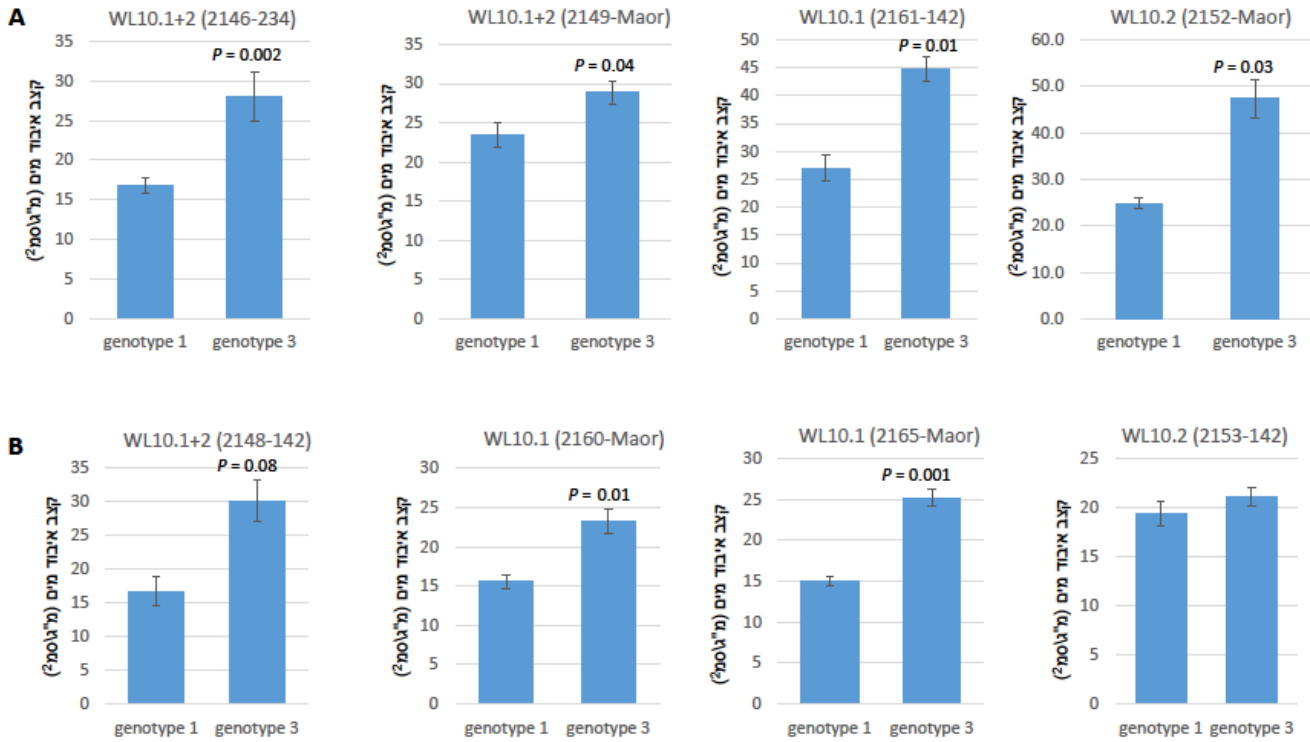
**טבלה 2.** ביטוי דיפרנציאלי ( $FDR < 0.1$ ) של גנים ממשפחת ציטוכרום P450 בין קוים איזוגנים הנבדלים בקצב אבוד מים מהפרי לאחר הקטיף (נלקח מעבודת הדוקטורט (Popovsky-Sarid, 2015). \* = לפי גנום CM334 V. 155. \*\* = היחס של מספר תעתיקים בפרי במועדים שונים לאחר חנטה של קו איזוגני בעל קצב אבוד מים נמוך לקו איזוגני בעל קצב אבוד מים גבוה.

Gene	Gene start (bp)*	Log <sub>2</sub> fold-change between NILs**		
		1 week	4 weeks	Ripe
CA10g18880	227654386			4.55
CA10g18900	227728326			3.31
CA10g18910	227862822			3.05
CA10g18920	227891747			3.71
CA10g18930	227915812	-5.8	-4.17	

#### העברת ה QTL לרקעים גנטיים בעלי פרי בלוקי גדול:

בצענו הכלאות מחזירות של שלשה קוים תורמים-132, 555 ו-176 המכילים את ה QTL WL10.1, WL10.2, בצענו הכלאות מחזירות של שלשה רקעים של פרי בלוקי גדול כהורים חוזרים. לשם ביצוע ההכלאות יצרנו סמנים מולקולריים האחוזים לכל אחד מה QTL אשר אפשרו בחירת צמחים הטרוזיגוטים ל QTL בכל דור של הכלאות. בצענו ארבעה מחזורים של הכלאות מחזירות והפרייה עצמית לקבלת דור BC4S1. עשרים צמחים ממשפחה (סה"כ 8 משפחות) נשתלו בשני ניסויים שונים ב-2017 וב-2018 בחממה בבית דגן ונקבע הגנוטיפ שלהם בסמנים בשני ה QTL. צמחים הומוזיגוטים לסמנים (כחמש פרות לצמח) נמדדו לקצב אבוד מים לאחר הקטיף ונמדדה מובהקות ה QTL על התכונה במשפחות השונות (איור 5). פרט לקו אחד (142-2153), הקוים הראו הבדלים מובהקים בקצב אבוד מים של הפרי לאחר האחסון, כלומר האפקט של שני ה QTL נשמר גם לאחר העברה לרקעים של פרי בלוקי.





**איור 5.** השוואת גנוטיפים הומוזיגוטים בתוך משפחות מתפצלות ל QTLs לקצב אבוד מים. המשפחות הם בדור BC4S1 לאחר הכלאות מחזירות לשלשה רקעים של פרי בלוקי- 142, 234 Maor, כמפורט בכותרת של כל גרף. גנוטיפים 1 ו 3 מייצגים פרטים הומוזיגוטים לאללים המורידים והמגבירים אבוד מים בפרי בתוך כל משפחה, בהתאמה. מובהקות סטטיסטית נקבעה במבחן t. A- ניסוי משנת 2017. B- ניסוי משנת 2018.

## דיון

נשלחו שתי אוכלוסיות מיפוי בשיטת GBS עבור שני ה QTL שזוהו בעבודה ההקדמית (Popovsky et al. 2017). המיפוי של QTL WL10.1 מעיד על אפקט מובהק מאד על התכונה בכרומוזום 10 אולם רזולוציית המיפוי לא אפשרה למקם ביתר דיוק את אזור ה QTL. סיבה אפשרית היא קיומם של יותר מאשר גן יחיד באזור ה QTL המבקרים את התכונה או תורשתיות נמוכה המקשה על הערכה מדויקת של הפנוטיפ. הסמן המובהק ביותר נמצא באזור 178 Mb. כמו כן אנליטת MLM בתוכנת TASSEL זיהתה את הסמן המובהק ביותר על התכונה באותו אזור (תוצאות לא מובאות). תוצאות אלו בהתאמה לעבודה ההקדמית שזיהתה את ה QTL WL10.1 במקטע 171Mb-183Mb בכרומוזום 10 (Popovsky et al. 2017).

בשנה השניה של המחקר הושם דגש על מיפוי ה QTL WL10.2. ה QTL מופה ברמת דיוק טובה אולם רמת המובהקות היתה נמוכה יחסית בהשוואה למיפוי המקורי (Popovsky et al. 2017). בעבודת הדוקטורט של סיגל פופובסקי-שריד (Popovsky-Sarid, 2015), התקבלו שתי תוצאות מיפוי של QTL זה באוכלוסיות שונות. באוכלוסיה אחת ה QTL מופה לאזור 220-223 Mb בכרומוזום 10 ואילו באוכלוסיה השניה הוא מופה לאזור 223-228 Mb. המיפוי הנוכחי נמצא בהתאמה לתוצאות האוכלוסיה השניה ומחזק את ההנחה על מיקומו באזור זה. ההבדל בין אוכלוסיות המיפוי הנוכחית לאוכלוסיות המיפוי המקוריות הוא שבאוכלוסיה הנוכחית התפצל אך ורק ה QTL WL10.2 ואילו באוכלוסיות המקוריות התפצלו שני ה QTL ביחד דבר שיכול היה ליצור פחות דיוק עקב המיסוך

של שני ה QTL אחד על השני. מיקום הגנים ממשפחת ציטוכרום P450 באזור ה QTL ודגם הביטוי הדיפרנציאלי שלהם בין קוים איזוגנים הנבדלים בקצב אבוד מים מעיד על התכנות להיותם מבקרים את ה QTL. לגנים ממשפחה זאת תפקיד במעבר מאלקנים לקטונים במסלול הביוסנטזה של הקוטיקולה בארבידופסיס (Greer et al. 2007). גנים אלו נמצאים במיקבץ גנומי אחד ויתכן שחלקם או כולם משפיעים על התכונה. ברור מעמיק על תפקידם יחייב יצירת מוטנטים של פלפל ובחינת ההשפעה על התכונה. בהשוואה למיפוי של WL10.2 שאפשר זיהוי גנים מועמדים לבקרת ה QTL, לא ניתן היה לזהות גנים מועמדים לבקרת ה QTL שכן אזור הפיק של ה QTL היה רחב מדי.

ההכלאה הראשונית לזיהוי ה QTLs היתה בין שני הורים בעלי פרי קטן ונשאלה השאלה האם אפקט ה QTL ישמר ברקע של פרי בלוקי גדול. אי לכך במקביל לאוכלוסיות המיפוי, יצרנו אוכלוסיות הכלאות מחזירות להעברת ה QTLs ובחינת האפקט שלהם ברקעים של פלפל בלוקי גדול תוך פיתוח של סמנים מולקולריים לשני ה QTL (Popovsky et al. 2017). סמנים אלו נמצאו פולימורפים במגוון רקעים ולכן יש להם פוטנציאל גבוה ליישום בתוכניות טיפוח להקטנת אבוד המים מהפרי. בחינת ה QTL ברקעים בלוקים העידה על שימור האפקט של ה QTL ופוטנציאל שמוש בקוים אלו לצרכי השבחה. נתוני האוכלוסיות השונות מחזקים את ההשערה שה QTL WL10.1 הוא בעל אפקט חזק יותר על התכונה מאשר WL10.2.

#### פרסומים:

Popovsky-Sarid, S, Yelena Borovsky, Adi Faigenboim, Eugene P. Parsons, Gregory T. Lohrey, Sharon Alkalai-Tuvia, Elazar Fallik, Matthew A. Jenks, Ilan Paran. 2017. Genetic and biochemical analysis reveals linked QTLs determining natural variation for fruit post-harvest water loss in pepper (*Capsicum*). Theoretical and Applied Genetics 130: 445-459

#### References

- Greer S, Wen M, Bird D, Wu X, Samuels L, Kunst L, Jetter R. 2007. The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of Arabidopsis. Plant Physiology 145: 653-667.
- Kim S, Park M, Yeom SI, Kim YM, Lee JM, Lee HA, Seo E, et al. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. Nature Genetics 46: 270-278.
- Popovsky-Sarid S. 2015. Genetic, physiological and biochemical characterization of post-harvest water loss of pepper fruit. A PhD thesis submitted to the Hebrew University of Jerusalem (in Hebrew with an English summary).
- Popovsky-Sarid, S, Yelena Borovsky, Adi Faigenboim, Eugene P. Parsons, Gregory T. Lohrey, Sharon Alkalai-Tuvia, Elazar Fallik, Matthew A. Jenks, Ilan Paran. 2017. Genetic and biochemical analysis reveals linked QTLs determining natural variation for fruit post-harvest water loss in pepper (*Capsicum*). Theoretical and Applied Genetics 130: 445-459.