פיתוח ומחקר גנטי של אגוזי-אדמה בעלי גוון תרמיל בהיר בקרקעות עמק החולה

דו"ח מדעי מסכם

יק"א ישראל 2016-2017

נבט צור[1], גליה קאים[1], יעל לוי[1], אביגנדן פטיל[1], און רבינוביץ[2], אורן בוכשטב[3] ורן חובב[1]*

1 - המחלקה לגידולי שדה וירקות, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, ראשון לציון.

2 – שירות הדרכה ומקצוע, משרד החקלאות ופיתוח הכפר, ראשון לציון.

3 – מפעלי חבל מעון, 8645700, הנגב, ישראל.

* חוקר ראשי - ranh@agri.gov.il

תקציר

בענף אגוזי-אדמה (אגוא"ד) לשיווק עם הקליפה, הצרכנים מעדיפים תרמילים בעלי גוון בהיר וזהוב. תרמילים בהירים נוצרים כתוצאה מגידול הצמחים על קרקעות חוליות. הרחבת הגידול לקרקעות כהות יותר מביאה להיווצרות תרמילים כהים ולירידה בערכם הכספי. בעבר, זיהינו מספר גנוטיפים של אגוא"ד אשר היו בעלי תרמילים יחסית בהירים, גם כאשר גדלו על קרקעות כהות. במחקר הנוכחי המשכנו את החקר הגנטי של תופעה זו. הניתוח הגנטי נערך על דורות F_2 ו- F_3 תוצרי ההכלאה בין גנוטיפ עם תרמילים בהירים לבין זן ישראלי "רגיל" (חנוך). שתי אוכלוסיות ה- F_2 גודלו באתרים שונים עם קרקע כהה. נאספו נתונים לגבי רכיבי הגוון (בהירות, אדום וצהוב), ותכונות תרמיל נוספות (כגון משקל תרמיל, רמת מילוי התרמיל ורמת החספוס). נמצא מתאם מובהק בין רכיבי הגוון לבין תכונות שיעור הגרעין ורמת החספוס. באופן מעניין, רמת החספוס התפלגה באוכלוסיית ה- F2 ביחס 3:1 עבור תרמילים חלקים ומחוספסים, מה שמצביע על מעורבותו של גן עיקרי בבקרת התכונה. גן זה כונה (*Sm*) *Smoothie*. פרטים עם פנוטיפ *smsm* היו בממוצע בעלי ערכי בהירות (L*) גבוהים ב- 2.8 וערכי רכיב אדום (a*) נמוכים ב- 1.5 מאשר פרטים בעלי פנוטיפ *SM_*. הדבר מרמז כי תרמיל חלק פחות נוטה לספוג רכיבי קרקע אדומים במהלך ההתפתחות. באופן כללי, התוצאות חזרו גם בדור F3 אבל רק בקרקע כבדה ולא בקרקע לס (חצי כבדה), מה שמרמז שוב שספיגת חלקיקים מהקרקע הם בעלי אפקט חשוב בקביעת הגוון. באמצעות שיטת bulk segregant analysis מיפינו את *Sm* לכרומוזום B6 של אגוא"ד (~114M). ניתוח רכיבים כימיים בקליפה הראה כי תרמילים מתפתחים מההורה החלק מכילים 20% יותר ליגנין מההורה המחוספס, מה שמרמז כי ביוסינתזה של ליגנין עשויה להיות קשורה לרמת החספוס ו/או בהירות. לתוצאות המחקר של תורשה פשוטה לרמת החספוס והקשר שלה לרמת הבהירות של התרמיל יהיו השלכות רבות בטיפוח זנים של אגוא"ד בעלי תרמיל בהיר באדמות כהות.

הקדמה

שוק אגוזי אדמה (אגוא"ד) בקליפה, אשר בו הבוטנים משווקים קלויים עם התרמיל, מהווה חלק חשוב בסחר הבוטנים העולמי. באירופה, למשל, סקטור זה מהווה כ- 15% מכלל הבוטנים המיובאים עם כ- 65000 טון בשנה. בשוק ייחודי זה יש למראה החיצוני של התרמיל חשיבות גבוהה, כאשר תרמילים בעלי גוון זהוב-בהיר מועדפים. הדבר משתקף גם במחיר התוצרת שלעיתים הוא 40% יותר עבור תרמילים בהירים ("extra-fancy") לעומת תרמילים "רגילים" ("choice"). כתוצאה מכך, ייצור אגוא"ד בעלי תרמילים בהירים הוא במקרים מסוימים קריטי לרווחיות הענף, במיוחד באזורים בעלי תשומות גבוהות לחקלאות כמו בישראל.

מכיוון שתרמילי אגוא"ד מתפתחים בקרקע, היא מהווה רכיב עיקרי שמבקר את הגוון החיצוני שלהם. ואכן, ניסויים מבוקרים הראו קשר חזק בין סוג הקרקע וגוון התרמיל (Ginzberg and Buchshtab, 2009; Ginzberg et al., 2010). נראה כי תרמילים בהירים או "זהובים" הם תוצאה של גידול צמחים באדמות חוליות. הרחבת הגידול לאזורים המאופיינים בקרקע כבדה יותר או כהה יותר, מביא בד"כ לאיבוד הגוון הצהוב הרצוי וליצירת גוון כהה. מלבד הקרקע, ישנם גורמים נוספים המשפיעים על הגוון כגון תזמון ורמת ההשקיה, מועד הקציר ורמת הבכירות של הצמח (Ginzberg et al., 2010; Gupta et al., 2014).

בנוסף לאפקט של הקרקע והאגרוטכניקה, לגוון הסופי של התרמיל יש גם רכיב גנטי ברור. למשל, דווחו מספר גנוטיפים בעלי תרמיל שחור (Branch et al., 1997). בנוסף, ניסויים הראו רמה מסוימת של שונות גנטית בגוון התרמיל בזנים תרבותיים ומסחריים. Yen וחובריו (Yen et al., 1993) בדקו את ערכי הגוון עבור זנים המייצגים את ארבעת טיפוסי השיווק של אגוא"ד (Virginia, Valencia, Runner - Spanish), ומצאו הבדלים בין ארבעת הזנים כאשר גדלו באותם תנאי קרקע. במחקר אחר נמצאה גם שונות בתוך 48 טיפוסי "וירג'יניה" שונים (זהו טיפוס השיווק בקליפה שגדל בישראל), אשר נבדקו באמצעות קולורימטר בשיטת Hunter (Isleib et al., 1997). נמצא הבדל מובהק בין הגנוטיפים בכל שלושת רכיבי הגוון – L* (בהירות), a* (אדום) ו- b* (צהוב). שונות בגוון התרמיל נצפתה גם בניסוי שלנו שכלל ארבעה זנים מובילים בישראל אשר גודלו על באותם תנאי קרקע ומשטר גידול (Gupta et al., 2014).

מלבד השונות הגנוטיפית, אנו מצאנו בעבודה קודמת גם אינטראקציה מובהקת של השפעת גנוטיפ X סביבה על גוון התרמיל (Hovav et al., 2012). במחקר ההוא נבחנו רכיבי הגוון של התרמילים בחלק גדול של אוסף אגוא"ד העולמי (Holbrook and Dong, 2005), כאשר כל הקווים גודלו בשני סוגי קרקעות: חולית ומינרלית כהה. כצפוי, כל טיפוסי ה- וירג'יניה היו רגישים למעבר מקרקע חולית לכהה, והיו בעלי ערך L* נמוך יותר וערכי a* גבוהים יותר. אולם, מספר טיפוסים מסוג ולנסיה הושפעו פחות מההבדל בין הקרקעות והציגו תרמילים בעלי בהירות כמעט זהה בקרקע החולית והכהה. תוצאה זו מרמזת כי ישנו גורם גנטי פנימי אשר מבקר את רמת הגוון של התרמיל ללא תלות בקרקע. ההיפותזה שלנו היא כי פני השטח של התרמיל בטיפוסי הוולנסיה , שהם מאוד חלקים (Pittman, 1995) עשויים להיות הגורם

ליציבות גוון התרמיל, מכיוון שפחות רכיבי קרקע אדומים נספגים לקליפה של התרמיל בשלב הבשלת התרמיל.

במחקר הנוכחי אנו המשכנו לחקור את הגורמים הגנטיים שקשורים לתופעת גוון התרמיל, ואת הקשר שלהם לתכונות איכות אחרות של תרמילי אגוא"ד. האנליזה הגנטית נערכה על שני דורות F2 ו- F3 שהם תוצרי ההכלאה בין קו ולנסיה "בהיר" וזן ישראלי "רגיל" מטיפוס וירג'יניה. רכיבי גוון (בהירות, אדום, צהוב) ותכונות נוספות (כגון משקל תרמיל, רמת מילוי התרמיל ורמת החספוס) נבדקו. אומדני תורשתיות ומתאם חושבו עבור כל התכונות. נמצא מתאם בין המופע של גן בודד שמבקר את תכונת רמת החספוס לבין ערכי L*/a* , והמיקום הגנטי של אותו גן מוצג כאן לראשונה. לבסוף אנו דנים בשימוש הפוטנציאלי של תוצאות אלה בטיפוח של זני אגוא"ד חדשים.

שיטות וחומרים

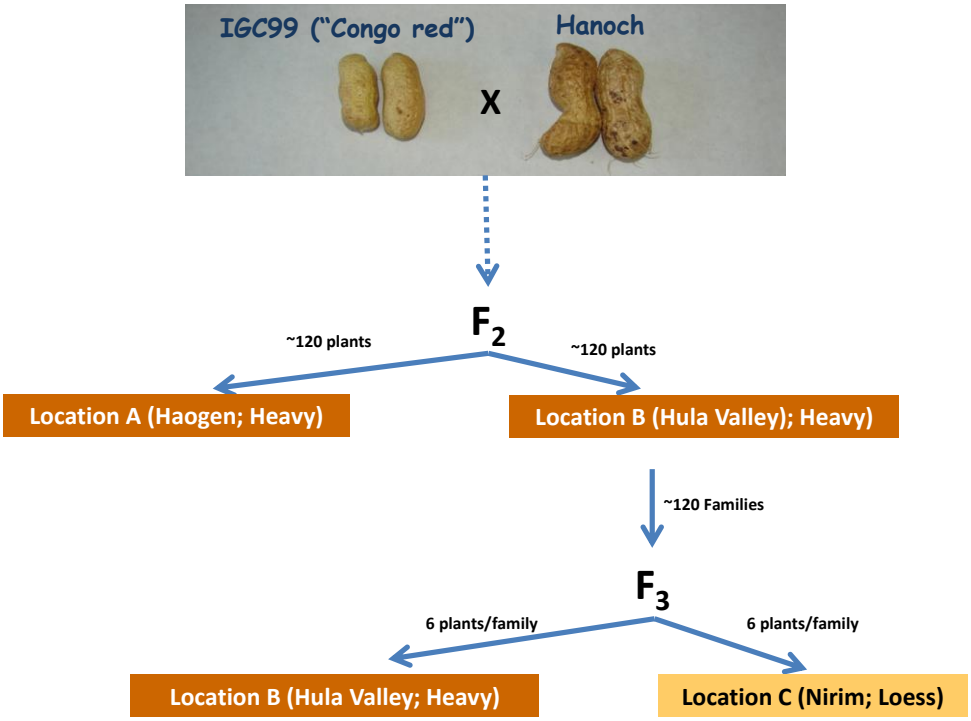
חומר צמחי ותנאי הניסוי

בשביל האנליזה הגנטית, שתי אוכלוסיות F2 מתפצלות גודלו במהלך 2016, בחלקות בעלות קרקע כהה – עמק החולה (E; 62% clay, 1.5% organic material, pH 7.533°09′36″N 35°35′48″), והעוגן (E; 55% clay, 1.7% organic material, pH 7.332°21′44″N 34°55′27″). אוכלוסיות אלו נבנו מההכלאה בין הזן 'חנוך', שהוא זן מטיפוס וירג'יניה עם תרמיל מרושת, לבין אחד מטיפוסי הוולנסיה לעיל בעלי התרמיל החלק (ICG99) אשר נבחר בשל היכולת שלו לשמור על גוון תרמיל בהיר בקרקע כבדה (Hovav et al., 2012). מספר מאפייני תרמיל של שני ההורים מוצגות בטבלה 1. מבנה הניסויים של כל הפרויקט מוצגים באיור 1. מספר תמונות של ניסוי דור ה-F2 בעמק החולה (קיץ 2016) מוצגות באיור 2.

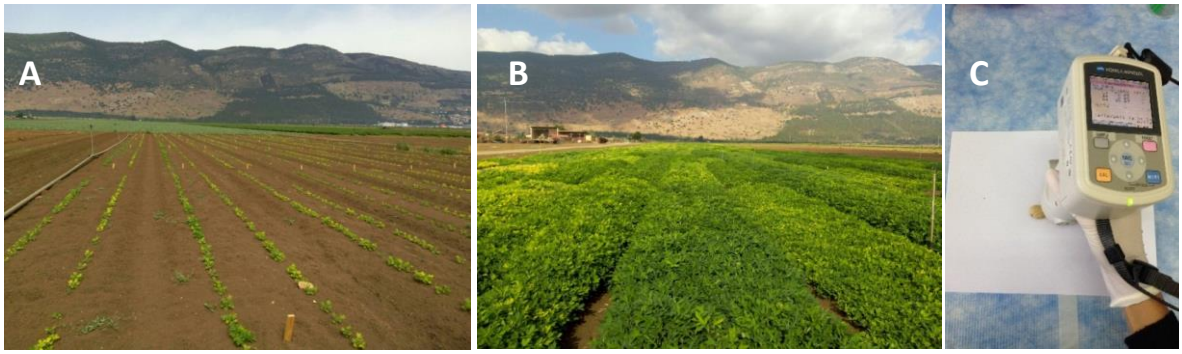
<u>טבלה 1</u>: תכונות אגרונומיות ומאפייני תרמיל של שני קווי ההורים אשר שימשו לאנליזה הגנטית (עמק החולה, 2016).

Parent	**Hanoch**	**IGC99**
Botanical type	*A. hypogaea* ssp. *hypogaea*	*A. hypogaea* ssp. *fastigiata*
Branching habit	Spreading	Erect
N of seeds/pod	2-3	3-4
Pod reticulation	Semi-reticulated	Extra smooth
Pod color	Dark yellow	golden
L*	59	64
Pod length/width ratio	3.25	2.25

Pod mean yield	600 Kg/D	400 Kg/D
% Giant pods (5-7 pod/ounce)	101%	60%
100 pods weight (g)	305	180
Seed ratio	73%	70%



איור 1: סכמה של מבנה הניסויים בפרויקט.



איור 2: ניסוי עמק החולה, אשר מומן על ידי יק"א ישראל, בקיץ 2016. A. צמחים ב 20 יום מזריעה. B. צמחים ב- 120 יום מזריעה. C. מכשיר קולורימטר נייד CM700D (Minolta, Japan). אשר רכישתו מומנה על ידי יק"א.

החלקות נזרעו על שתי שורות בערוגה, 75 סמ' רווח בין השורות. בכל שורה, הזרעים נזרעו במרווח של 40 סמ'. החלקה נזרעה במקביל לשטח מסחרי של אגוא"ד בתנאי השקיה מלאה. קווי ההורים ופרטי F1 נזרעו גם כן בניסוי כביקורת ולחישוב אומדני תורשתיות.

אחת מאוכלוסיות ה- F2 (עמק החולה), שהכילה 120 פרטים, פותחה להמשך יצירת דור F3 על ידי איסוף זרעים על בסיס צמח בודד. משפחות F3 נזרעו ב- 2017 גם כן בשני אתרים, אבל הפעם אתר אחד הוא עמק החולה, ואילו השני הוא באדמת לס בנירים, נגב מערבי (″34°23′42 N 31°20′10 E; 13% clay, 57% sand, 30% silt, 0.5% organic material) (איור 1). המטרה הייתה לבדוק את רמת יציבות הגוון הבהיר גם באדמה "חצי כבדה". בכל אתר גודלו 6-10 צמחים מכל משפחה. שני הניסויים בדור F3 נערכו בתוך שטחים מסחריים (זן חנוך) ולפי הפרקטיקה באזור. הצמחים נעקרו בכל ניסוי בזמן האמצעי של ההבשלה של ההורים. למשל בדור F2 בעמק החולה, ההורה IGC99 הגיע ל- 90% הבשלה ב- 135 יום מזריעה, וגידול ההורה חנוך הוערך על ידי החקלאי ל- 155 יום מזריעה. לכן צמחי הניסוי נעקרו ב- 145 יום מזריעה. התרמילים נאספו על בסיס צמח בודד (בדור F2) או על בסיס משפחה (דור F3), יובשו ואחסנו בטמפרטורת החדר עד למדידות.

קביעת ערכי הגוון של התרמילים

שנים-עשר תרמילים בשלים ונקיים ממחלות נבחרו באקראי מכל דוגמה וערכי הגוון שלהם נקבעו. לפני המדידות, התרמילים יובשו בתנור 65 °C למשך חמישה ימים להבטיח חומר יבש. הגוון נמדד באמצעות מכשיר קולורימטר נייד CM700D (Minolta, Japan) אשר נרכש בעזרת תקציב יק"א (איור 2C). ערכי הגוון חושבו באמצעות שיטת Hunter המשתמשת במונחי L*a*b* למידול תלת כיווני של ערכי הצבע. שלושת הקואורדינטות הבסיסיות בשיטה הן רמת הבהירות (L*, כאשר שווה 0 זה גוון שחור וכאשר שווה 100 זה לבן), רמת האדום/ירוק (a*, כאשר ערכים שליליים מתאימים לרמת גוון ירוק וערכים חיוביים לרמת האדום), ומיקום לרמת הצהוב/כחול (b* - כאשר ערכים שליליים מתאימים לרמת גוון כחול וערכים חיוביים לרמת צהוב). ערך הגוון בכל פרמטר מבוטא על ידי הממוצע של שלוש קריאות באזור שונה של התרמיל.

תכונות איכות תרמיל ויבול נוספות נאספו גם כן. משקל תרמילים ברוטו לצמח נמדד על בסיס צמח בודד בדור F2 ובאמצעות ממוצע המשפחה בדור F3 (משקל התרמילים למשפחה מחולק במספר הצמחים). באותו אופן נמדד משקל התרמילים נטו (לא כולל תרמילים לא בשלים, חולים או ריקים). מדידות נוספות כללו משקל תרמיל ממוצע (על ידי דגימת 100 תרמילים), משקל זרע ממוצע, גוון קליפת הזרע (=1 pink, 2=light purple, 3=dark purple), מספר זרעים לתרמיל, שיעור הגרעין (משקל זרעים / משקל תרמילים), ויחס אורך/רוחב של התרמיל. רמת החספוס נקבעה על ידי ה- USA peanut descriptor (Pittman, 1995) כאשר 1 = חלק (כמו IGC99) ו- 2 = מחוספס (כמו חנוך).

ניתוחים סטטיסטיים

מתאמים בין ערכי L*, a*, b* של גוון התרמיל ובינם לבין תכונות אחרות חושבו באמצעות שיטת ה- best linear predictors (BLUPs). מרכיבי השונות ותורשתיות עבור משתני הגוון חושבו באמצעות שיטת REML (residual maximum likelihood) על ידי תוכנת JMP 5.1.0 (SAS, Cary, NC).

אנליזת Bulk segregant לזיהוי סמן לתכונת רמת החספוס

אנליזת Bulk segregant (BSA) נערכה על פרטים מדור F2. 57 פרטים עם תרמיל חלק ו 49 פרטים עם תרמיל מחוספס נדגמו. בכל קבוצה פנוטיפית (חלק/מחוספס), כל התרמילים נאספו לצבר (bulk) להפקת RNA. עבודה הייתה ברמת RNA ולא DNA גנומי כדי להקל על זיהוי SNPs בגנום המורכב והפוליפלואידי של אגוא"ד. דוגמאות נלקחו מכל צבר (5 גרם) ושימשו להפקת ה RNA בשיטת hot-borate, כפי שתואר בעבר (Brand and Hovav, 2010). ה RNA הכללי שהופק שימש להכנת שתי ספריות RNA-Seq על ידי קיט TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina) לפי הוראות היצרן כפי שתואר (Gupta et al., 2016). איכות הספריות נבדקה באמצעות DNA Screen Tape D1000 ומכשיר Tapestation 2200 (Agilent). ספריות ה- RNAseq עברו ריצוף מקביל על ידי שימוש במכשיר Illumina HiSeqTM2000 בשירות של מכון וויצמן.

ניתוח הנתונים של ה BSA נעשה באמצעות השיטה שדווחה על ידינו בעבר (Kayam et al., 2017). באופן כללי רצפים עברו סינון ראשוני ע"י שימוש בתכנת FASTX Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.htm) ואח"כ מיפוי הקריאות כנגד רצף הגנום של אגוא"ד (Bertioli et al., 2016; Dash et al., 2016) על ידי שימוש בתכנת Bowtie2 aligner (Langmead and Salzberg, 2012). תכנת GATK (The genome Analysis Toolkit) שימשה לזיהוי SNPs (McKenna et al., 2010; DePristo et al., 2011). פולימורפיזם בין הקווים הובדל מפולימורפיזם בין תתי הגנום על פי שיטת ה- BFR (bulk frequency ratio), כפי שתואר בעבר (Trick et al., 2012).

אנליזה כימית של קליפת תרמיל אגוא"ד

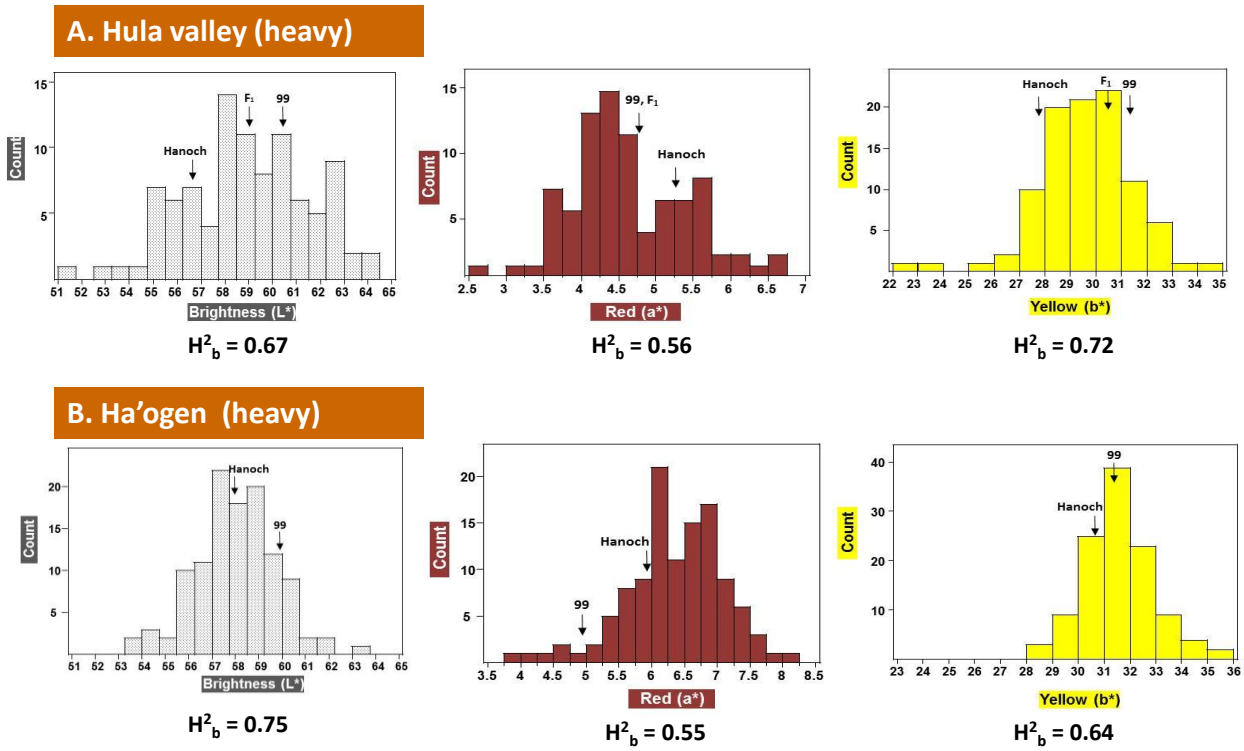
תרמילים נאספו משני קווי ההורים (חנוך ו- IGC99), בזמן ההתפתחות שלהם בתוך אוכלוסיות F2 בעמק החולה. חמישה צמחים נאספו באקראי מכל קו X חזרה ונעקרו ב- 100 ימים מזריעה. בשלב התפתחותי זה ניתן למצוא על השיח תרמילים בכל שלבי ההתפתחות. התרמילים מוינו לשלושה שלבי התפתחות בשיטה שתוארה בעבר (Gupta et al., 2016). השלבים הם: R5 – תרמיל בגודל 50% מגודל מרבי, R6 – תרמיל בגודל 90% לא בשל, R7 – תרמיל בשל. מכל שלב הופרדו הקליפות מהזרעים ונשלחו לאנליזה כימית במעבדה לשירותי שדה, נווה יער. האנליזות כללו: קריאת ריכוז זרחן במים (P) בקומפלקס עם molybdenum, אשלגן (K) וסידן (Ca) במים עם פוטומטר להבה, ADF, NDF, סיבים גסים, צלולוז והמיצלולוז נמדדו בשיטת ANCOME (https://www.ankom.com/analytical-methods-support/fiber-analyzer-a200). רמת האפר

נקבעה לאחר אינקובציה ב- $550\ C^0$ ל 8 שעות. רמת אמוניה נקבעה באמצעות תמיסה של potassium iodide, mercuric chloride ו- potassium hydroxide.

תוצאות ודיון

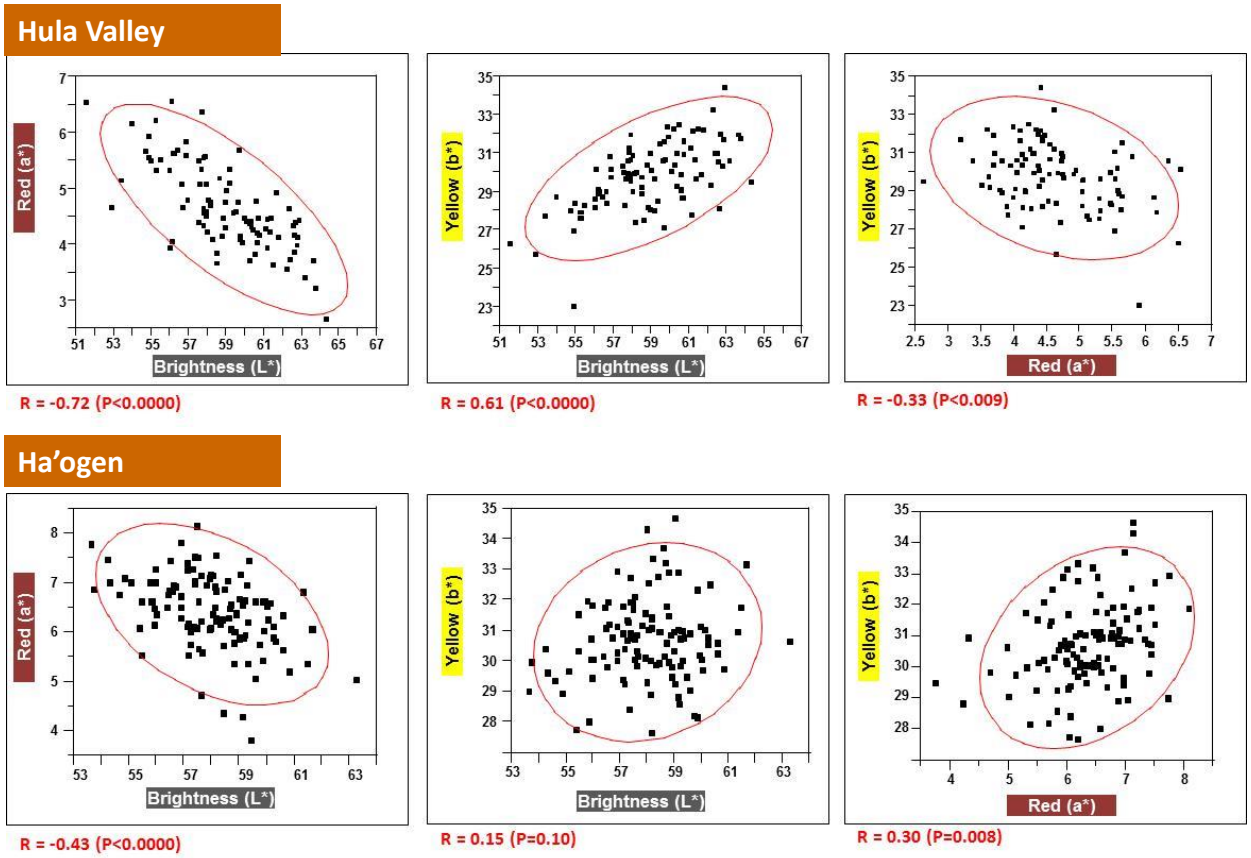
אנליזה של רכיבי גוון התרמיל בשתי קרקעות כהות

איור 3 מציג את התפלגות רכיבי גוון התרמיל (L*, a*, b*) בשתי אוכלוסיות F2 של ההכלאה חנוך X IGC99. כל אוכלוסייה גדלה בחלקה אחרת באזור אחר עם קרקע כהה (עמק החולה, העוגן). כפי שנראה באיור, כל שלושת המשתנים התפלגו באופן נורמאלי, עם מעט סטייה במשתנה a* בעמק החולה שהיה בעל צורה בימודלית. כצפוי, קו IGC99 היה בעל ערכי L* גבוהים יותר ובעל ערכי a* נמוכים יותר מאשר הזן חנוך בשני האתרים. כמו כן, קו IGC99 היה בעל ערכי b* גבוהים מאשר חנוך, אבל הבדל זה היה מובהק רק באתר החולה. באופן כללי התפלגות הערכים של שלושת רכיבי הגוון הייתה רחבה יותר באתר החולה מאשר העוגן. תוצאות אלה מצביעות שכל שלושת התכונות מבוקרות על ידי מספר גנים (פוליגניות) עם השפעת סביבה די חזקה. אומדני תורשתיות במובן הרחב היו בינוניות עד גבוהות (איור 3), במיוחד עבור ערכי ה- L* וה- b*. תוצאות התורשתיות הגבוהה יחסית נובעות מכך שרכיב השונות באוכלוסיית ה- F2 הייתה גבוהה באופן מובהק מזו של ההורים/F1. תוצאה זו מצביעה על סיכוי גבוה יחסית להצלחת סלקציות גנטיות לזנים חדשים עם ערכי בהירות גבוהים.



איור 3: התפלגות משתני גוון התרמיל באוכלוסיית F2 (חנוך IGC99 X) שגדלה בשני אתרים. אפור = L*, אדום = a*, צהוב = b*. H^2_b = תורשתיות במובן הרחב. ערכי ההורים מצוינים בחץ.

מתאמים בין שלושת משתני הגוון חושבו במטרה ולבחון האם יש קשר ביניהם (איור 4). נראה כי בשתי אוכלוסיות ה- F2 (היינו האתרים החולה והעוגן), נמצא מתאם שלילי מובהק בין רמת הבהירות (L*) ורמת הרכיב האדום (a*). כמו כן נמצא מתאם חיובי בין רמת הבהירות (L*) לבין רמת הרכיב הצהוב (b*), אבל הוא היה מובהק סטטיסטית רק בניסוי החולה. המתאם בין הרכיב האדום והצהוב היה סותר בין שני הניסויים, שלילי בהחולה וחיובי בהעוגן. התוצאה מראה כי הקשר החזק ביותר הוא בין רמת הבהירות והרכיב האדום בתרמיל. תוצאות דומות נמצאו בניסוי קודם שלנו שכלל אוסף של קווים בלתי תלויים (Hovav et al., 2012), וזו הפעם הראשונה שאנו מראים זאת במבנה משפחתי. התוצאה מצביעה על כך שרמת הבהירות של התרמיל מושפעת באופן ישיר מקליטה של רכיבי קרקע אדומים, והגנוטיפים נבדלים ברמת הקליטה הזו.



איור 4: מתאמים בין רכיבי גוון התרמיל בשתי אוכלוסיות F2.

בנוסף, חושבו גם מתאמים בין שלושת רכיבי הגוון ובין תכונות אחרות בעלות חשיבות שיווקית (טבלה 2). מטרת הניתוח היא לאתר אפקטים פוטנציאלים בין התכונות, גנטיים או פליאוטרופים, ולחזות סיכוי לקו-סלקציה בטיפוח זנים חדשים. לא נמצא מתאם מובהק בין רכיבי הגוון (בהירות, אדום וצהוב), לבין

רוב התכונות שנבדקו ($p(r) < 0.01$) , מלבד תכונות שיעור הגרעין (seed ratio) שהייתה בעלת מתאם מובהק לרמת הבהירות והרכיב האדום. מתאם מובהק אבל נמוך נמצא גם בין משקל התרמיל הממוצע עם הערך הצהוב, אך זה היה רק בניסוי העוגן.

<u>טבלה 2</u>: מתאמים בין שלושת רכיבי הגוון לבין מסר תכונות בעלות חשיבות חקלאית באוכלוסיית F2 שגדלה בשני אתרים. * - מתאם מובהק מ- 0 (ברמת $p>0.01$). אתרים: A - החולה B- העוגן.

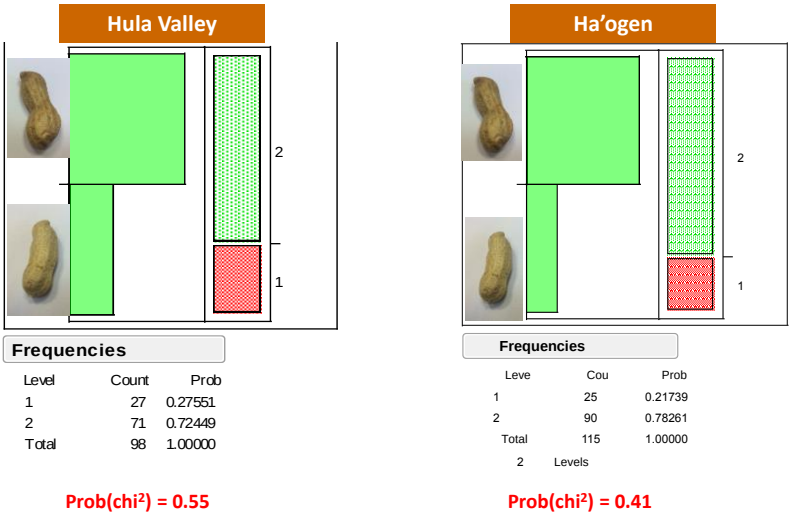
תכונה	**בהירות (L*)**		**אדום (a*)**		**צהוב (b*)**	
אתר	A	B	A	B	A	B
Pod Yield/P	0.09	0.14	-0.24	-0.14	0.07	-0.02
Pod Mean Weight	0.04	0.12	-0.04	0.16	0.15	0.26*
Seed Mean Weight	0.17	0.20	-0.15	0.15	0.16	0.17
N Pods/P	0.24	0.08	-0.20	-0.19	0.13	-0.10
Seed Ratio	0.35*	0.29*	-0.49*	-0.29*	0.19	0.04

אנליזה גנטית של תכונת רמת החספוס והקשר שלה לרכיבי הגוון בקליפה

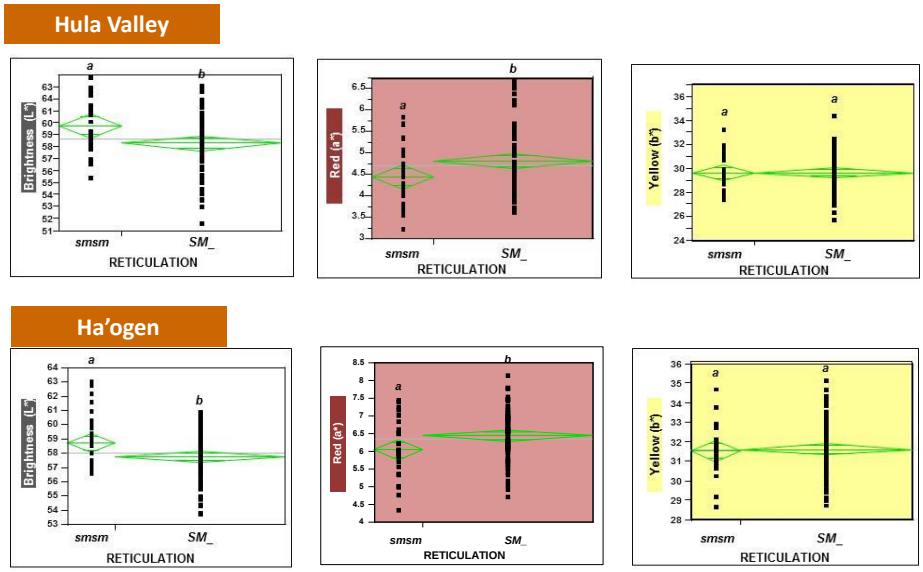
אחת ההיפותזות של המחקר הייתה שלרמת החספוס יש קשר הדוק עם רכיבי גוון התרמיל. במיוחד, קליפת התרמיל החלקה מאוד של קו IGC99 (וקווי וולנסיה אחרים) מבקרת את גוון התרמיל בקרקעות כבדות. על מנת לבחון השערה זו, בדקנו בתחילה את התפלגות תכונת רמת החספוס בדור F2 (איור 5). בשתי האוכלוסיות נמצא כי רמת החספוס מתפלגת ביחס של 3:1 עבור חלקים לעומת מחוספסים. התפלגות זו אופיינית לבקרה של גן בודד או עיקרי ברקע גנטי זה. אנו כינינו גן זה (*Sm*) *Smoothie* , משום שהאלל הרצסיבי שלו מקנה את קליפת התרמיל החלקה.

הקשר שבין Sm לבין רכיבי גוון התרמיל נבדק בשתי אוכלוסיות הניסוי. נמצאו הבדלים מובהקים בשתי האוכלוסיות בין פרטים חלקים (*smsm*) ומחוספסים (*Sm_*) ביחס לרמת הבהירות והרכיב האדום (איור 6). כצפוי, קבוצת ה- *smsm* הייתה בעלת ערכי בהירות יותר גבוהים וערכי אדום יותר נמוכים. לא היה הבדל בין הקבוצות ביחס לרכיב הגוון הצהוב. חשוב להדגיש כי ההבדל בין הקבוצות ב- L* ו a* הוא מובהק סטטיסטית אך לא מושלם. כפי שניתן לראות באיור 6, עדיין פרטים רבים בעלי גנוטיפ *smsm* היו עם תרמיל פחות בהיר מאשר ממוצע קבוצת ה- *Sm*, מה שמעיד על גורמים גנטיים או סביבתיים אחרים

שמשפיעים על גוון התרמיל. עדיין, בממוצע, פרטים בעלי גנוטיפ *smsm* היו בעלי רמת בהירות (L*) גבוהה ב- 2.8 ורמת גוון אדום (a*) נמוכה ב- 1.5 מאשר פרטים *SM_*. ולכן, אנו מניחים כי הגן העיקרי לרמת החספוס של התרמיל משפיע על רמת הבהירות על ידי הקטנה של ספיגת רכיבים אדומים מהקרקע.

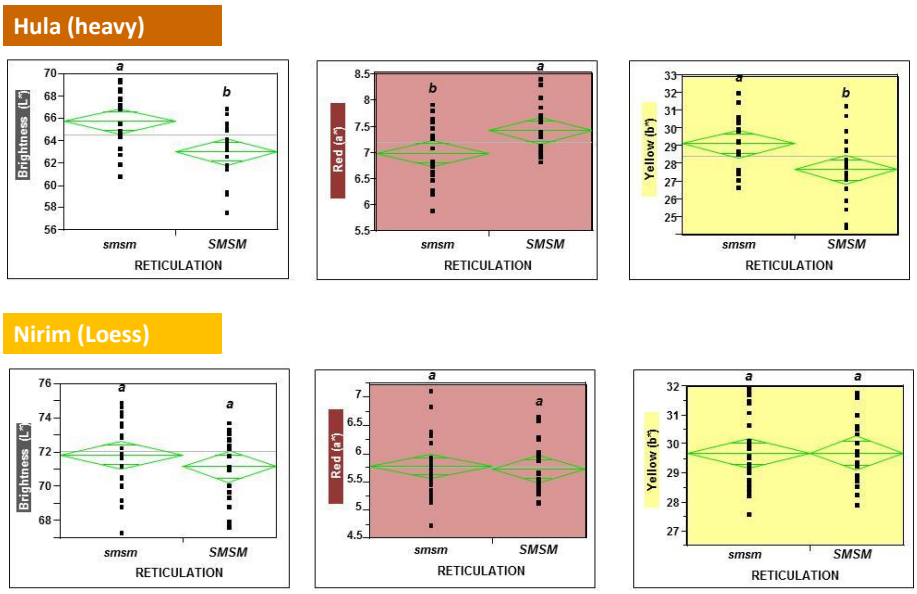


<u>איור 5</u>: התפלגות תכונת רמת החספוס בשתי אוכלוסיות F2. 1 = חלק, 2 = מחוספס.



<u>איור 6</u>: האפקט של מופע הגן Sm על רכיבי הגוון בשתי אוכלוסיות F2. *Sm_* = תרמיל מחוספס, *smsm* = תרמיל חלק.

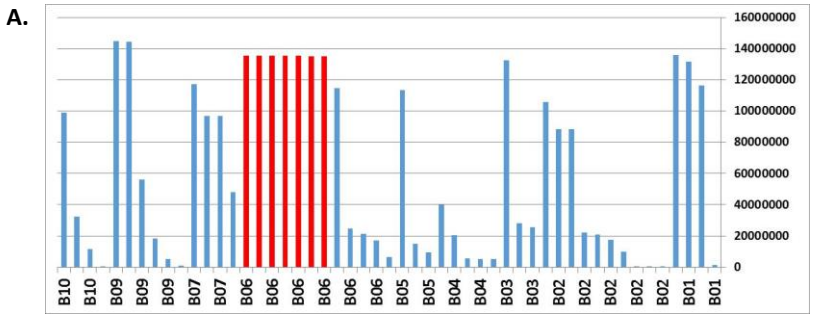
המשכנו לחקור את האפקט של הפנוטיפ של הגן *Sm* על רכיבי הגוון בדור הבא (F3). כפי שניתן לראות באיור 7, התוצאות באופן כללי חזרו גם בדור F3 על משפחות שגדלו בעמק החולה, אך לא בנירים באדמה "חצי כבדה (לס). תוצאות אלה מדגימות שוב שקליטה של חלקיקים ספציפיים מהקרקע משחקת תפקיד אינטראקטיבי על גוון התרמיל הסופי.



<u>איור 7</u>: האפקט של מופע הגן *Sm* על רכיבי גוון התרמיל בשתי אוכלוסיות F3. . *Sm_* = תרמיל מחוספס, *smsm* = תרמיל חלק.

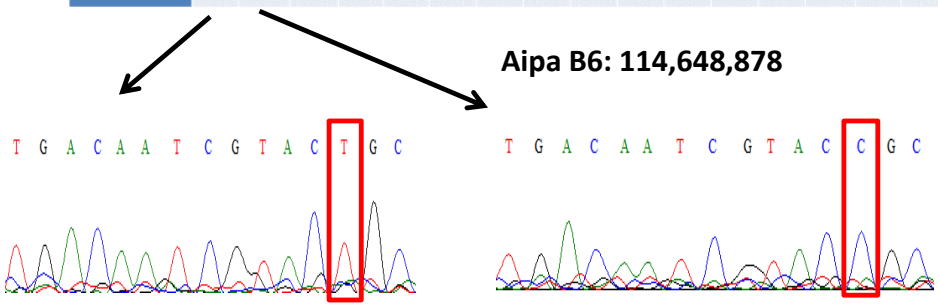
מיפוי גנטי של הגן *Sm* על הגנום הפוליפלואידי של אגוא"ד

גישת Bulk Segregant Analysis (BSA) שימשה על מנת למפות את *Sm* על גנום אגוא"ד. כפי שמוצג באיור 8. *Sm* מופה לקבוצת תאחיזה B6, במרחק של כ- 10 cM מ SNP Aipa B6: 114,648,878 (~114M) . כפי שיתואר בהמשך, לסמן שנמצא יהיה כלי חשוב לעזר בטיפוח תרמילים חלקים במיוחד ובהירים.



B.

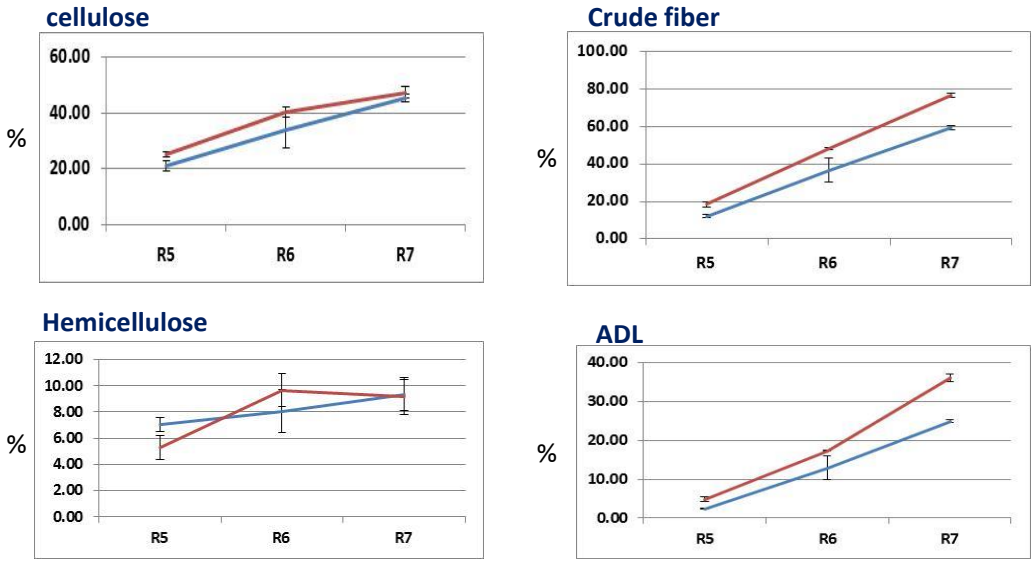
	H	99	1	3	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Phenotype	SM	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
H99-101	T	C	C	C	C	T	C	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C



איור 8: מיפוי תכונת רמת החספוס (*Sm*) על גנום אגוא"ד. A. אנליזת BSA עבור 50 ה- SNPs המסוננים בין ההורים חנוך ו IGC99 , המצביעה על hot spot לתאחיזה על כרומוזום B6 (עמודות בצבע אדום). B. המשך האנליזה של אחד ה- SNPs על כרומוזום B6 (Aipa B6: 114,648,878), עם מספר פרטים חלקים (*sm*) באוכלוסיית ה- F2. הגנוטיפ של כל פרט נקבע על ידי ריצוף DNA בשיטת Sanger.

אנליזה כימית של קליפות תרמילי אגוא"ד

נערכה אנליזה כימית של קליפות אגוא"ד על ידי דגימת תרמילים בשלושה שלבי התפתחות (R5, R6, R7) בשני ההורים, חנוך ו IGC99 . לא נמצא הבדל מובהק בין קליפות התרמילים של שני ההורים בשיעור ה- K, Ca, Ash והאמוניה (תוצאות אינן מובאות). כמו כן לא נמצא הבדל מובהק בין ההורים בכמות הצלולוז וההמיצלולוז (איור 9). אולם, נמצא הבדל מובהק בכמות הסיבים הכללית וכמות הליגנין (ADL), כאשר קליפות תרמיל של הזן החלק (IGC99) היו בעלות 20% יותר ליגנין. ליגנין הוא חומר הידרופובי שהוא crosslinked בתוף הפברילות של הצלולוז, ותפקידו למלא חורים בשכבות הקליפה. לכן, אנו משערים כי כמות הלגנין עשויות להשפיע הן על רמת החלקלקות של התרמיל והן על רמת הבהירות שלו בקרקע.



איור 9: רמות של ארבע רכיבים כימיים בקליפות תרמילי בוטנים בהתפתחות. כחול = חנוך, אדום = IGC99.

סיכום ותכניות להמשך

במחקר הנוכחי אנו המשכנו בלימוד הגנטיקה של גנוטיפים של אגוא"ד בעלי תרמיל בהיר, גם כאשר גדלים על אדמות כהות. האנליזה הגנטית התבצעה על דורות F2 ו- F3 שמקורם בהכלאה בין גנוטיפ

בהיר וזן וירג'יניה "רגיל". שתי אוכלוסיות F2 גדלו בשני אתרים על קרקע כהה. מצאנו כי תכונת גוון התרמיל, ובעיקר רמת הבהירות שלו, היא תכונה המושפעת ממספר גנים (פוליגנית) עם אומדני תורשתיות בינוניים. כמו כן, נמצא כי באדמות כהות, הפנוטיפ של רמת החספוס, אשר מבוקר על ידי גן עיקרי, עשוי להסביר כ- 50% של השונות בין שני קווי ההורים בתכונת הבהירות (L*) וכ- 40% בתכונת הרכיב האדום (a*). אולם, השפעה זו לא הייתה קיימת כאשר התרמילים התפתחו על קרקע "חצי כבדה" (לס), מה שמרמז כי קליטה של חלקיקים מהקרקע היא בעלת השפעה אינטראקטיבית על הפנוטיפ הסופי. כמובן שיש השפעה גם לגורמים נוספים כגון רמת מילוי התרמיל, רמת הבכירות ורמת ההשקיה המשפיעים על גוון התרמיל הסופי, וגם אלו צריכים להילקח בחשבון.

בשלב זה, תכונת ה- *Sm* מוחדרת לתוך זני עלית ישראלים (כגון הזנים אורית ואולאית-חנוך). זה נעשה באמצעות מערכת הכלאות מחזירות הנעזרת בסמני DNA. ולכן, הממצא של תורשה פשוטה לרמת החספוס והקשר שלה על גוון התרמיל, יהיה השפעה גדולה בטיפוח זנים עם גוון תרמיל בהיר באדמות כהות.

Cited Literature

Bertioli, D.J., S.B. Cannon, L. Froenicke, G.D. Huang, A.D. Farmer, E.K.S. Cannon, X. Liu, D.Y. Gao, J. Clevenger, S. Dash, L.H. Ren, M.C. Moretzsohn, K. et al. 2016. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. Nature Genetics 48:438-444. DOI: 10.1038/ng.3517.

Branch, W.D., D.E. Williams, and E.J. Williams. 1997. Inheritance of black-pod color in peanut. Journal of Heredity 88:156-158.

Brand, Y., and R. Hovav. 2010. Identification of suitable internal control genes for quantitative Real-Time PCR expression analyses in peanut (*Arachis hypogaea*) Peanut Science 37:12-19.

Dash, S., E.K.S. Cannon, S.R. Kalberer, A.D. Farmer, and S.B. Cannon. 2016. PeanutBase and other bioinformatic resources for peanut. in: S. H. T. and R. F. Wilson (Eds.), Peanuts Genetics, Processing, and Utilization AOCS Press. pp. 241-252.

Ginzberg, I., and O. Buchshtab.2009. Characterizing of grwing factors that influence the tint of peanut pods (Hebrew). Israeli peanut production and marketing board, Israel. pp. 1-11.

Ginzberg, I., A. Tubi, O. Buchshtab, S. Wininger, B. Ben-Dor, E. Fogelman, and Y. Kapulnik. 2010. Soil type and wetness affect tint of peanut (*Arachis hypogaea* L.) pod shell. Peanut Science 37:144-150.

Gupta, K., O. Buchshtab, and R. Hovav. 2014 The effects of irrigation level and genotype on pod-filling related traits in peanut (*Arachis hypogaea*). Journal of Agricultural Science 7(1).

Gupta, K., I. Hedvat, A. Faigenboim-Doron, J. Clevenger, P. Ozias-Akins, and H. Hovav. 2016. Transcriptome profiling of peanut developing seed with a focus on duplicate oil related pathways. Plant Science 1-17.

Holbrook, C.C., and W. Dong. 2005. Development and evaluation of a mini-core collection for the U.S. peanut germplasm collection. Crop Science 45:1540–1544.

Hovav, R., H. Badani, I. Ginzberg, Y. Brand, I. Chedvat, and S. Galili. 2012. Evaluation of a peanut collection for shell color traits under different soil types. Plant Breeding 131:148-154.

Isleib, T.G., H.E. Pattee, and P.W. Rice. 1997. A Laboratory colorimeter method to measure pod brightness in peanuts. Peanut Science 24 81-84.

Kayam, G., Y. Brand, A. Doron-faigenboim, A. Patil, I. Hedvat, and R. Hovav. 2017 Fine-mapping the branching habit trait in cultivated peanut by combining Bulked Segregant Analysis and high-throughput sequencing. Frontiers in Plant Science 8:467. DOI: doi:10.3389/fpls.2017.00467.

Langmead, B., and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods 9:357-U54. DOI: Doi 10.1038/Nmeth.1923.

Pittman, R.N. 1995. United States Peanut Descriptors. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS 132.

Trick, M., N.M. Adamski, S.G. Mugford, C.C. Jiang, M. Febrer, and C. Uauy. 2012. Combining SNP discovery from next-generation sequencing data with bulked segregant analysis (BSA) to fine-map genes in polyploid wheat. Bmc Plant Biollogy 12. DOI: Artn 14. Doi 10.1186/1471-2229-12-14.

Yen, G.C., P.D. Duh, and C.L. Tsai. 1993. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. Journal Agricultural Food Chemisty 41:67-70. DOI: DOI 10.1021/jf00025a015.