השוואה בין זנים מפרים ל'האס' וקביעה של יכולת ההפריה העצמית ב'ג'ם' באמצעות פיתוח שיטה לזיהוי גנטי של ההורות בצאצאים

דו"ח 14-2013

דורון שניידר– מו"פ צפון

יעל לב, רפי שטרן ומרטין גולדווי – מכללת תל-חי

עמיר שרמן, רון אופיר וורד יריחימוביץ – מחלקה למטעים מכון וולקני

הדר כהן – מו"פ גליל מערבי

תומר לוי – מטע געתון

תוכן עניינים עמוד

הקדמה..... 1

חומרים ושיטות..... 1

תוצאות ודיון

1.א. אפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'האס' (H)..... 4

1.ב. קביעת המפרה בצאצאי 'האס' (H) ממטע געתון בעזרת SNP..... 6

2.א. אפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'ג'ם' (GE)..... 7

2.ב. קביעת סוג ההפריה בצאצאי ג'ם (GE) בעזרת SNP..... 9

סיכום ביניים של ההתקדמות בשני חלקי המחקר..... 10

הקדמה

דו״ח זה מסכם את ההתקדמות שהושגה במהלך שנת 2014 בפיתוח שיטה גנטית לזיהוי ההורות בצאצאי אבוקדו. השיטה הגנטית לזיהוי ההורות בצאצאים בה אנו משתמשים מבוססת על SNP (Single-nucleotide polymorphism) ספציפיים לכל זן, וזיהויים באופן מהיר ופשוט במכשיר DHPLC. מטרות המחקר הן: 1. השוואה ביעילות של ארבעה זנים מפרים שונים ל׳האס׳ (H) ו-2. לימוד התלות של הזן ג׳ם (GE) בהפריה זרה.

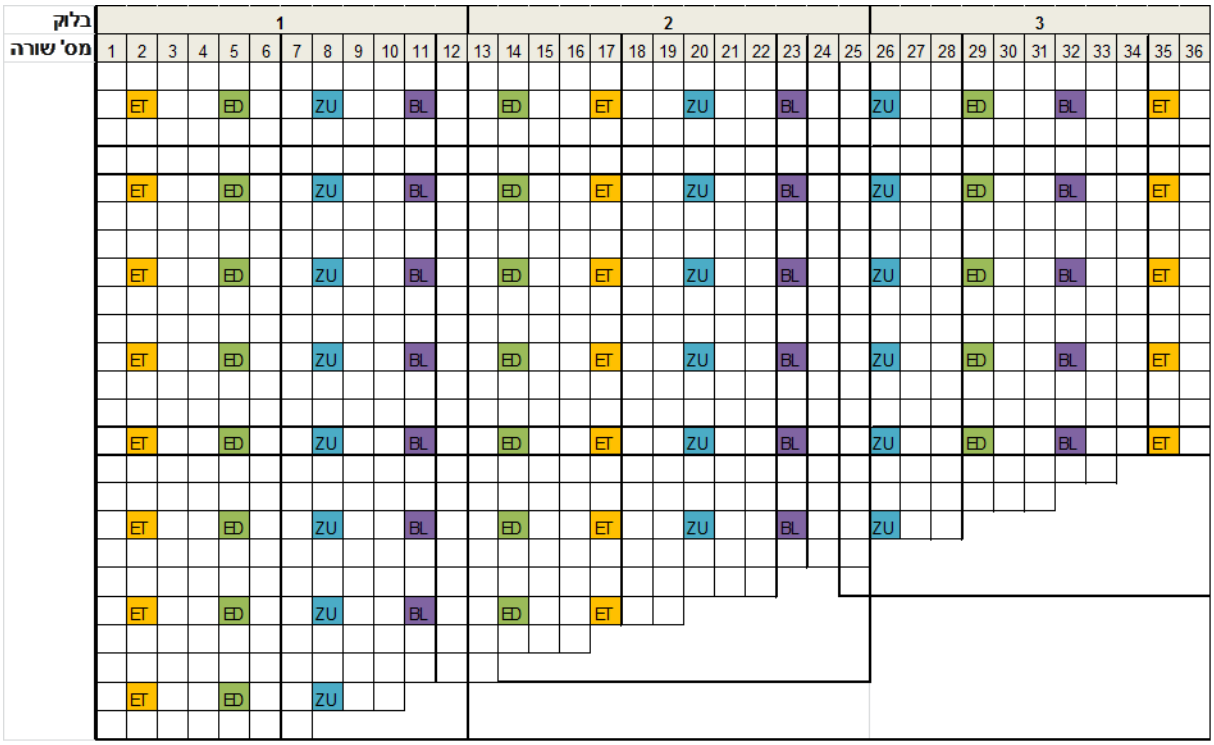
הזן H הוא זן האבוקדו המרכזי במטעי ישראל. הפירות שלו מבוקשים בשווקי העולם, אך היבול עומד על כ-1.5 טון/דונם בממוצע עם סירוגיות גבוהה. בישראל משמש האטינגר (ET) (טיפוס פריחה B) כזן מפרה בלעדי ל-H (טיפוס פריחה A), ויש צורך במציאת זנים מפרים מצטיינים נוספים. במסגרת המחקר תבחן איכות הזנים: זוטאנו (ZU), אדרנול (ED) ו-BL667 (BL) (טיפוסי פריחה B) כמפרים ל-H, בהשוואה ל-ET. יעילות הזן המפרה תקבע לפי שיעור צאצאי H, שיתקבלו כתוצאה מהפריה עם גרגרי אבקה שלו.

הזן GE הינו זן פטנטי מקליפורניה בעל פירות ״דמויי האס״. לפירות GE דמיון לפירות ה-H מבחינת צורת הפרי וקליפה מחוספסת המשחירה בהבשלה. יחד עם זאת, פירות GE גדולים בהשוואה ל-H והם מבשילים בינואר, בעוד שפירות H מבשילים כבר בנובמבר. ל-GE מספר יתרונות ע״פ ה-H: א. פוריות גבוהה יותר (כ-2 ט׳/ד׳ ויותר במטע קונבנציונלי) וסירוגיות נמוכה יותר; ב. צימוח מתון ומבנה עץ קומפקטי המאפשרים נטיעה של העצים בצפיפות גדולה (3 x5 מ^2), אשר בה ניתן להגיע ליבולים גבוהים מ-2 ט׳/ד׳; ו-ג. עמידות גדולה יותר לתנאי קרה. פרחי GE, בדומה לפרחי H, הם מטיפוס פריחה A, אך אין בספרות מידע לגבי יכולת ההפריה העצמית שלהם והתלות בהפריה זרה לקבלת יבול גבוה. במסגרת המחקר תבחן תכונה זו של ה-GE במטע בו נטועים עצים מהזן המפרה ET (טיפוס פריחה B) ועצים מהזן לביא (LA) (טיפוס פריחה A). החפיפה בין פרחי GE במופע נקבי לבין פרחי LA במופע זכרי אמורה להיות קצרה בגלל ששני הזנים מטיפוס פריחה A, ולכן צפוי שהפריה בין שני זנים אלו לא תהיה שכיחה. אף על פי כן, צאצאי GE שהופרו ע״י אבקת LA עשויים להתפתח. לכן יש צורך לפתח שיטה שתזהה בנוסף לצאצאי GE עצמיים וכאלו שהופרו ע״י ET, גם אותם.

חומרים ושיטות

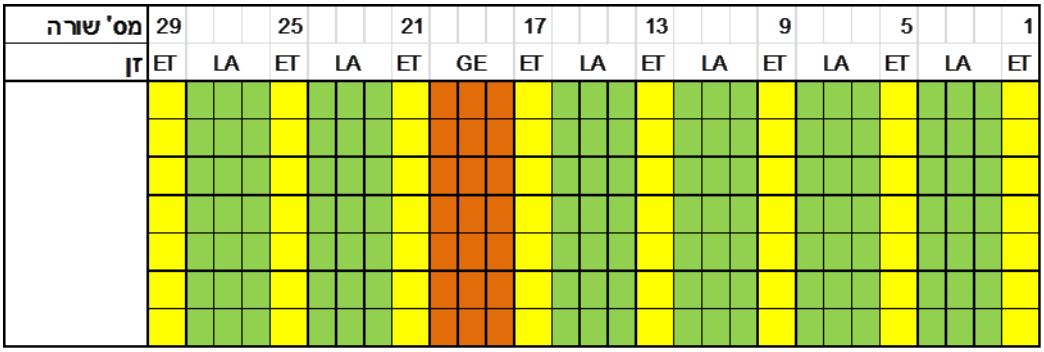
1. <u>נתוני המטעים</u>

1.1. <u>מטע ׳האס׳ (געתון)</u> המטע נמצא בסמוך לקיבוץ געתון בגליל המערבי, הוא ניטע בקיץ 2012, מרווחי נטיעה 4X5. הזן העיקרי במטע הוא H ולסירוגין נטועים בו כל עץ שלישי בשורה שלישית המפרים: ET, ZU, ED ו- BL (תמונה 1).



תמונה 1. סכמת מטע H עם המפרים ET, ZU, ED ו- BL. במטע שלושה בלוקים שבכל אחד מהם חזרה של שורה אחת עם כל אחד מהזנים המפרים. עצי H מתוארים על-ידי משבצות לבנות, עצי ETבמשבצות צהובות, עצי ZU במשבצות כחולות, עצי ED במשבצות ירוקות ועצי BL במשבצות סגולות.

1.2. <u>מטע יג'ים' (GE, געתון)</u>: המטע נמצא בסמוך לקיבוץ געתון בגליל המערבי. הזן העיקרי במטע הוא LA ונטועה בו שורת ET לסירוגין כל שלוש שורות LA. במרכז המטע נטועות שלוש שורות מהזן GE (תמונה 2). עצי GE הורכבו בהרכבת סנדוויץ על H ב-2008. שתילי H המקוריים ניטעו ב-2003, מרווחי הנטיעה בכל המטע הם 2.5 x 2.5 מ^2, 160 עצים/ד'.



תמונה 2. סכמת מטע GE עם הזנים ET ו-LA. במטע בלוק אחד של שלוש שורות GE (משבצות בכתום) שמשני צדדיו שורת ET (משבצות צהובות). בשאר המטע 6 בלוקים של 3 שורות LA (משבצות בירוק) וביניהם שורת ET.

2. <u>חומר צמחי</u>

להפקת דנ"א שימשו עלים מהזנים ההוריים מעצים ממטעי געתון: H, ET, ZU, ED ו-BL ממטע H ו-GE, ET ו-LA ממטע GE. כ-300 פירות GE, כ- 100 מכל שורה, שנאספו באקראי משני צידי כל אחת

מהשורות במטע געתון בינואר 2014 נשמרו ב-4°C עד מרץ, הזרעים הוצאו מהפירות, נשטפו במים, נשתלו במשטחי הנבטה במצע טוף (חב' מרום גולן) והונבטו בחממה. דנ"א הופק מעלים שהתפתחו מהצמחונים. כל העלים מהזנים ההוריים ומהזרעים המונבטים נשמרו ב- 70°C- עד לשימוש.

3. <u>הפקת דנ"א</u>

דנ"א גנומי הופק לפי Doyle and Doyle (1987). 100-200mg עלים נכתשו במכתש ועלי בנוכחות חנקן נוזלי. האבקה הכתושה הורחפה ב- 700µl בופר הפקה המכיל: 100mM Tris pH 8, 2% Hexadecyltrimethylammonium Bromide [CTAB], 20mM Ethylenediaminetetra Acetic Acid [EDTA] pH 8, 1.4M NaCl, 1% Polyvinylpyrolidone [PVP] MW=40000 ו- 1% 2- Mercaptoethanol. התערובת הודגרה 15 דקות ב- 65°C, תוך כדי ערבוב מפעם לפעם. לאחר קירור לטמפרטורת החדר, נערכו שני מיצויים עם Chloroform:Octanol (24:1). ה-DNA הושקע בעזרת Ethanol והומס במים. הדנ"א נשמר ב-20°C- עד לשימוש.

4. <u>תגובת PCR</u>

תגובת PCR עם תחלים אוניברסלים, המגבירים קטעים בהם עשויים להיות SNP , נערכה לשם הגברת קטעי דנ"א השונים במכשיר Minicycler (MJ Research, Waltman, MA USA). התערובת לתגובת ה-PCR הכילה בנפח 50µl את המרכיבים הבאים: 20ng DNA (1µl), FastStart Taq PCR buffer X1, 200µM מכל אחד מה-dNTP, 30pmol מכל תחל ו- 1 unit FastStart Taq DNA Polymerase (Roche diagnostics, Almere, The Netherlands). רצף התחלים ותנאי תגובת PCR מפורטים בטבלאות 1 ו-2.

טבלה 1: התחלים לתגובת PCR

התחלים	שם ה-SNP	תחל Forward (5'>3')	תחל Reverse (3'>5')
Cell450	SNP1371, NP1447[1]	Cell450-FD (1482-1502[2]) GGCCAAGATGTCATACATGG	Cell450-RB (1308-1327[2]) TCTCTGTTATCTGGACCACCC
Cell950	SNP971	F (751-771[2]) TGGGTCCACTTTGGGCATGGC	R (1022-1043[2]) AGAGAAGCCCACCTGTCAGTCG
STK400	SNP345	F (307-327[3]) ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGC	R (458-481[3]) GCACTCAATCCAAAGTCTGTAACC
SNP31[4]	SNP31A, SNP31B	SNP31 F TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTA	SNP31 R CGGGAGCACATACACAAATTGTATTC
SNP09[4]	SNP09	SNP09 F GCGAAAGAATCATCGTATGCCC	SNP09 R CCCCTTCCGCCTATAGGTAGTTTTA

[1] המספר מתאר את מיקום ה-SNP ברצף הבסיסים בגן מהזן H

[2] מיקום התחל ברצף הבסיסים בגן ל-Cellulase מהזן H (Acc. No. EU335600)

[3] מיקום התחל ברצף הבסיסים בגן לSTK מהזן H (Acc. No. EU335745)

[4] פריימרים שהתקבלו ממרכז הגנומי במכון וולקני המגבירים רצף ובו SNP (עמיר שרמן ורון אופיר, תוצאות לא מפורסמות)

טבלה 2: תגובת ה-PCR

טמפ' (°C)	זמן (דקות)	מספר סיבובים
95	5	1
95	0.5	5
58	0.5	
72	0.5	
95	0.5	35
55	0.5	
72	0.5	
72	5	1

5. <u>איפיון SNP ע"י ריצוף ובמכשיר DHPLC</u>

תוצרי PCR מדנ"א של הזנים ההוריים הורצו במכשיר הDHPLC לזיהוי הבדלים בדגמי הכרומטוגרמות ולאחר מכן הם נשלחו לריצוף, כדי לזהות בהם SNP. איפיון ראשוני של חלק מה- SNP נערך בצאצאי GE.

תוצאות ודיון

1.א. איפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'האס' (H)

בזנים ההוריים ממטע H בגעתון (H, ET, ZU, ED ו- BL) רוצף קטע מהגן ל-Cellulase (Cell) ובו SNP1371 ו-SNP1447 (תמונה 3). רק בזנים H ו-ET רוצפו בינתיים קטע נוסף מהגן ל-Cellulase ובו SNP971 וקטע מהגן ל- Serine Threonine Kinase (STK) ובו SNP345 (תוצאות לא מובאות). תחלים מאבוקדו המגבירים קטעי דנ"א בהם מצויים SNP התקבלו מהמרכז הגנומי בבית דגן: SNP31, SNP09 (עמיר שרמן ורון אופיר, תוצאות לא מפורסמות). תגובת PCR עם התחלים הללו נערכה על דנ"א מהזנים ההוריים שהוזכרו, והקטעים המוגברים רוצפו (תמונה 4). תכולת ה- SNP בזנים ההוריים השונים בכל קטעי הדנ"א שנבדקו, כמו גם הכרומטוגרמה שהתקבלה עבורם ב-DHPLC, מופיעים בטבלה 3. צירופי האללים האפשריים בצאצאי H ממטע געתון מופיעים בטבלה 4.

```
HASS        GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
ETTINGER    GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
ZUTANO      GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
EDRANOL     GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
BL667       GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
            ************************************************************
            SNP1371
HASS        AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
ETTINGER    AGGYTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
ZUTANO      AGGYTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
EDRANOL     AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
BL667       AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
            *** ********************************************************
                                SNP1447
HASS        TCAGTACCTGTATTCTAGCCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
ETTINGER    TCAGTACCTGTATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
ZUTANO      TCAGTACCTGTATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
EDRANOL     TCAGTACCTGTATTCTAGCYCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
BL667       TCAGTACCTGTATTCTAGCCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
            ******************* ****************************************

HASS        TCCAGATAACAGAGA 195
ETTINGER    TCCAGATAACAGAGA 195
ZUTANO      TCCAGATAACAGAGA 195
EDRANOL     TCCAGATAACAGAGA 195
BL667       TCCAGATAACAGAGA 195
            ***************
```

תמונה 3: השוואת הרצף של קטע הגן לCellulase מהזנים ההוריים H, ET, ZU, ED ו-BL המכיל את SNP1371, SNP1447 (מסומנים ברקע צהוב). מקרא האותיות: C/T=Y

SNP09:

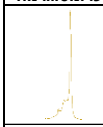
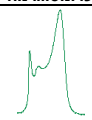
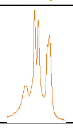
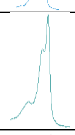
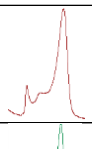
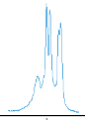
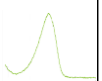
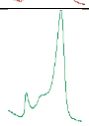
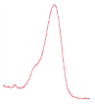
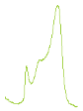
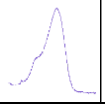
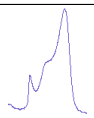
```
HASS        GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
ETTINGER    GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
ZUTANO      GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
EDRANOL     GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
BL667       GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
            ************************************************************
              SNP09A
HASS        GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
ETTINGER    GTATCCACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
ZUTANO      GTATCCACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
EDRANOL     GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
BL667       GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
            ***** ********************************************
```

SNP31:

```
HASS        TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
ETTINGER    TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
ZUTANO      TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
EDRADOL     TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
BL667       TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
            ************************************************************
                      SNP31A     SNP31B
HASS        TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
ETTINGER    TTAATTGCGTATCATACAATAAACGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
ZUTANO      TTAATTGCGTATCATACAATAAACGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
EDRANOL     TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
BL667       TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
            ************* ********* **************************
```

תמונה 4. קטעי דנ"א שהוגברו בתגובת PCR עם התחלים SNP09 (למעלה) ו-SNP31 (למטה) מהזנים ההוריים H, ET, ZU, ED ו-BL המכילים את SNP09A, SNP31A ו-SNP31B (מסומנים ברקע צהוב).

טבלה 3: תכולת ה- SNP בזנים ההוריים השונים במטע H עם הזנים ET, ZU, ED ו-BL, בכל קטעי הדנ"א שנבדקו והכרומטוגרמות שהתקבלו עבורם ב-DHPLC.

cell950			stk400			cell450			SNP09			SNP31		
כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים [1]	זן
	TT TT	H		T T	H		CC CC	H		T T	H		GT GT	H
	TT TC	ET		C T	ET		CT TT	ET		C C	ET		AC AC	ET
	TT TC	ZU		C T	ZU		CT TT	ZU		C C	ZU		AC AC	ZU
	TT TC	ED		T T	ED		CC CT	ED		T T	ED		GT GT	ED
	TT TT	BL		C T	BL		CC CC	BL		T T	BL		GT GT	BL

[1]האותיות מסמלות את הבסיסים באתרי ה-SNP ברצף שהוגבר בתגובת PCR עם התחלים המתאימים. מיקום ה-SNP ברצף הדנ"א מפורט בטבלה 1

ברקע צהוב ה- SNP הצפויים לפי דמיון לכרומטוגרמות משאר הזנים. SNP אלו טרם רוצפו.

1.ב. קביעת המפרה בצאצאי 'האס' (H) ממטע געתון בעזרת SNP

בכל הצאצאים של הזן H נמצא תמיד אלל אחד של H (אימהי) שמקורו בביצית, כאשר המקור של האלל השני יהיה מגרגר האבקה של הזן המפרה. בטבלה 4 ניתן לראות את האפשרויות של שילובי האללים בצאצאי H עצמיים ובכאלו שיתקבלו לאחר הפריה זרה בנוכחות הזנים המפרים : ET , ZU, ED ו-BL. מהטבלה עולה ש- SNP31 ו-SNP09 הם SNP אינפורמטיביים, כיוון שניתן באמצעותם לזהות בוודאות את כל צאצאי ה- H שהתקבלו מהפריה עם גרגרי אבקה מהזנים ET ו- ZU (צאצאים מסוג 2). באמצעות SNP1371 ו-SNP1447 מהגן ל-Cellulase ניתן יהיה לדעת מהי הכמות של מחצית מצאצאי H שיופרו ע"י ED (החסרת מספר צאצאים מסוג 2 במספר הצאצאים מסוג 3). כדי לאפיין את מקור האבקה שהפרתה את כל הסוגים של צאצאי H ממטע געתון יש צורך למצוא SNP נוספים שיבדילו בין צאצאי H עצמיים לצאצאי H שהופרו ע"י ED ו-BL, ו- SNP שיבדילו בין צאצאי H שהופרו ע"י ET ו-ZU. העצים במטע זה ניטעו בקיץ 2012. רק במהלך 2016 תערך אנליזה גנטית של פירות H ראשונים ממטע זה, שיבשילו בסתיו 2015.

טבלה 4: תכולת SNP בצאצאי H האפשריים ממטע בו נטועים הזנים המפרים ET, ZU, ED BL.

סוג הצאצא	מקור האלל	שם ה-SNP		האבא בצאצאי H				
SNP31:		SNP31B	SNP31A	H	ET	ZU	ED	BL
צאצא 1	אמא (H)	T	G	√			√	√
	אבא	T	G					
צאצא 2	אמא (H)	T	G		√	√		
	אבא	C	A					
SNP09:		SNP09A		H	ET	ZU	ED	BL
צאצא 1	אמא (H)	T		√			√	√
	אבא	T						
צאצא 2	אמא (H)	T			√	√		
	אבא	C						
Cellulase:		SNP1447	SNP1371	H	ET	ZU	ED	BL
צאצא 1	אמא (H)	C	C	√			√	√
	אבא	C	C					
צאצא 2	אמא (H)	C	C		√	√	√	
	אבא	T	C					
צאצא 3	אמא (H)	C	C		√	√		
	אבא	T	T					

2.א. אפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'ג'ם' (GE)

בזנים ההוריים ממטע GE בגעתון (GE, ET ו-LA) רוצף קטע מהגן ל-Cellulase ובו SNP1371 ו-SNP1447 (תמונה 5). רק ב-ET רוצפו קטע נוסף מהגן ל-Cellulase ובו SNP971 וקטע מהגן ל- Serine Threonine Kinase (STK) ובו SNP345 (תוצאות לא מובאות). תחלים מאבוקדו המגבירים קטעי דנ"א בהם מצויים SNP התקבלו מהמרכז הגנומי בבית דגן: SNP31, SNP09 (עמיר שרמן ורון אופיר, תוצאות לא מפורסמות). תגובת PCR עם התחלים הללו נערכה על דנ"א מהזנים ההוריים שהוזכרו, והקטעים המוגברים רוצפו (תמונה 6). תכולת ה-SNP בזנים ההוריים השונים בכל קטעי הדנ"א שנבדקו, כמו גם הכרומטוגרמה שהתקבלה עבורם ב-DHPLC, מופיעים בטבלה 5. צירופי האללים האפשריים בצאצאי GE ממטע געתון מופיעים בטבלה 6.

```
GEM       GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
ETTINGER  GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
LAVI      GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
          ************************************************************
          SNP1371
GEM       AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
ETTINGER  AGGYTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
LAVI      AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
          *** ********************************************************
                            SNP1447
GEM       TCAGTACCTGTATTCTAGCYCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
ETTINGER  TCAGTACCTGTATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
LAVI      TCAGTACCTGTATTCTAGCYCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180

          ******************* ****************************************

GEM       TCCAGATAACAGAGA 195
ETTINGER  TCCAGATAACAGAGA 195
LAVI      TCCAGATAACAGAGA 195
          ***************
```

תמונה 5: השוואת הרצף של קטע הגן לCellulase מהזנים ההוריים H, ET, ו-LA המכיל את SNP1371, SNP1447 (מסומנים ברקע צהוב). מקרא האותיות: C/T=Y

SNP09:

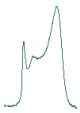
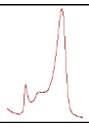
```
GEM       GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
ETTINGER  GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
LAVI      GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTCAG 60
          ************************************************************
            SNP09A
GEM       GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
ETTINGER  GTATCCACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
LAVI      GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
          ***** ******************************************
```

SNP31:

```
GEM       TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
ETTINGER  TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
LAVI      TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAAAACTATATTAATTAAA 60
          ************************************************************
                     SNP31A    SNP31B
GEM       TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
ETTINGER  TTAATTGCGTATCATACAATAAACGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
LAVI      TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
          ************* ********* *************************
```

תמונה 6. קטעי דנ"א שהוגברו בתגובת PCR עם התחלים SNP09 (למעלה) ו-SNP31 (למטה) מהזנים ההוריים H, ET ו-LA המכילים את SNP09A, SNP31A ו-SNP31B (מסומנים ברקע צהוב).

טבלה 5: תכולת ה- SNP בזנים ההוריים השונים במטע GE עם הזנים ET ו-LA בכל קטעי הדנ"א השונים שנבדקו והכרומטוגרמות שהתקבלו עבורם ב-DHPLC.

cell950			stk400			cell450			SNP09			SNP31		
כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים[1]	זן
	TT TC	GE		C T	GE		CC CT	GE		T T	GE		GT GT	GE
	TT TC	ET		C T	ET		CT TT	ET		C C	ET		AC AC	ET
	TT TC	LA		C T	LA		CC CT	LA		T T	LA		GT GT	LA

2.ב. קביעת סוג ההפריה בצאצאי GE בעזרת SNP

בכל הצאצאים של הזן GE נמצא תמיד אלל אחד של GE (אימהי) שמקורו בביצית, כאשר המקור של האלל השני יהיה מגרגר האבקה של הזן המפרה. בטבלה 6 ניתן לראות את אפשרויות שילובי האללים בצאצאי GE עצמיים ובכאלו שיתקבלו לאחר הפריה זרה עם אבקת ET או LA. מהטבלה עולה ש-SNP31 ו-SNP09 הם SNP אינפורמטיביים, כיוון שניתן באמצעותם לזהות בוודאות את כל צאצאי ה-GE שהופרו ע"י ET (צאצאים מסוג 2). באמצעות SNP1371 ו-SNP1447 מהגן ל-Cellulase ניתן יהיה לאפיין רבע מצאצאי GE העצמיים (צאצא מסוג 1). כדי להגדיל את דרגת הוודאות של ההורות בצאצאי GE יש צורך למצוא SNP נוספים שיבדילו בין צאצאי GE עצמיים לצאצאי GE שהופרו ע"י LA.

בשנה האחרונה (עונת 2013-14) הופק דנ"א מעלים של כ-300 זרעי GE ממטע געתון. במהלך השנה הקרובה בכוונתנו לקבוע את ההורות בצאצאים האלו, כדי לקבוע האם ה- GE זקוק להפריה זרה, וכן לאסוף צאצאים נוספים מעונת 2014-15. בשלב זה נבדקה תכולת SNP09 ב-15 מתוך 300 צאצאי GE הנ"ל וכולם נמצאו הומוזיגוטים לאלל T (סוג צאצא 1 בטבלה 6). מתוצאות ראשוניות אלה עולה שצאצאי GE לא התקבלו מהפריה זרה באמצעות גרגרי אבקה מהזן ET ושלזן GE יכולת הפריה עצמית. כדי לבסס מסקנות אלה יש לבדוק את תכולת האלל במדגם רחב יותר של צאצאי GE וכן לשלול את האפשרות שצאצאי ה- GE התקבלו מהפריה זרה של גרגרי אבקה מפרחי הזן LA.

טבלה 6: תכולת SNP בצאצאי GE האפשריים ממטע בו נטועים הזנים ET ו-LA.

סוג הצאצא	מקור האלל	שם האלל		האבא בצאצאי GE		
SNP31:		SNP31B	SNP31A	GE	ET	LA
צאצא 1	אמא (GE)	T	G	√		√
	אבא	T	G			
צאצא 2	אמא (GE)	T	G		√	
	אבא	C	A			
SNP09:		SNP09A		GE	ET	LA
צאצא 1	אמא (GE)	T		√		√
	אבא	T				
צאצא 2	אמא (GE)	T			√	
	אבא	C				
Cellulase:		SNP1447	SNP1371	GE	ET	LA
צאצא 1	אמא (GE)	C	C	√		√
	אבא	C	C			
צאצא 2	אמא (GE)	T	C		√	
	אבא	T	T			
צאצא 3	אמא (GE)	C	C		√	
	אבא	T	T			
צאצא 4	אמא (GE)	T	C	√	√	√
	אבא	T	C			
צאצא 5[1]	אמא (GE)	C	C	√	√	√
	אבא	T	C			

[1] שיעור הצאצאים מסוג זה צפוי להיות כפול בהשוואה לשאר הצאצאים.

סיכום ביניים של ההתקדמות בשני חלקי המחקר

1. בחלק הראשון של המחקר נערכת השוואה בין הזנים זוטאנו, אדרנול, BL667 ואטינגר כמפרים ל'האס'. יעילות הזן המפרה תקבע לפי אחוז צאצאי ה'האס' שיתקבל במטע כתוצאה מהפריה עם גרגרי אבקה שלו (אחוז גבוה מעיד על יעילות גבוהה של הזן המפרה). זיהוי הזן המפרה בצאצאים יעשה באמצעות שיטה גנטית, שהתחלנו לפתח במהלך 2014 ונמשיך בכך גם ב-2015.
2. בחלק השני של המחקר נקבעת יכולת ההפריה העצמית בזן 'ג'ס'. לצורך כך מפותחת שיטה גנטית לזיהוי ההורות בצאצאים. תוצאות ראשוניות מ-2014 מצביעות על יכולת הפריה עצמית בזן זה. ב-2015 נבסס תוצאות אלה מאנליזה של ההורות במספר רב של צאצאי 'ג'ס' ומניסויי שדה, בהם עצי 'ג'ס' יכוסו במהלך הפריחה ברשת בנוכחות דבורי דבש וללא זן מפרה.