

תוכן עניינים

פרק	עמוד
תקציר מדעי	1
דף פותח	3
מבוא ומטרות המחקר	4
פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר	5
דיון ומסקנות	16
ספרות מצוטטת ורשימת פרסומים	19

תקציר מדעי

הצגת הבעיה: מועד ההבשלה (או רמת הבכירות) היא תכונה בעלת חשיבות מכרעת לאדפטציה ויבול באגוזי-אדמה (אגוז"ד), ומהווה אחד מיעדי ההשבחה. אולם, מורכבותה של התכונה והעובדה שאגוז"ד מבשילים מתחת לפני הקרקע גורמים לקושי במדידה ולסלקציה לא יעילה, ומהווים אתגר טיפוחי. לימוד הרכיבים הגנטיים המבקרים את רמת הבכירות ופיתוח של סמני DNA לזיהוי מוקדם של טיפוסים בכירים יהוו יתרון בטיפוח. מטרות המחקר: 1. זיהוי לוקוסים שנמצאים בתאחיזה עם תכונת רמת הבכירות במספר אוכלוסיות מיפוי. 2. חיזוק ההיפותזה של הקשר בין רמת הבכירות, אינדקס הקציר ותכונות אחרות. 3. מיפוי ברזולוציה גבוהה של תכונות מודול ספציפיות הקשורות לרמת הבכירות. 4. זיהוי גנים המבקרים את רמת הבכירות באגוז"ד.

שיטות עבודה: חמש אוכלוסיות RIL (NT, PH, CC, RR, HH) שמקורן מטיפוסי שיווק של אגוז"ד עם הבדלים ברמת בכירות שימשו לניתוח הגנטי. האוכל נבדקו ב 1-3 סביבות, תלוי באוכלוסייה. מכל קו בכל אוכלוסייה ובכל "סביבה" נזרעו שלוש חזרות בבלוקים באקראי. רמת הבכירות נמדדה באמצעות שיטת הגירוד וקביעת ערך אינדקס ההבשלה (MI). נאספו גם נתונים עבור תכונות "מודול" שעשויות להרכיב את תכונת ה-MI, כגון אינדקס הקציר, צורת הצימוח, דגם הפריחה, אורך הפרק, וקצב הפריחה. מתאמים והשפעות גומלין בין תכונות נמדדו. מיפוי גנטי התבצע באמצעות Axiom SNP array ספציפי לאגוז"ד ותכונות JionMap ו MapQTL 6. מפה גנטית אינטגרטיבית נבנתה על בסיס חמשת המיפויים האוכלוסייתיים. שיטת genome targeting שימשה על מנת לזהות גנים מועמדים עבור שתי תכונות מודול, צורת הצימוח ודגם הפריחה.

תוצאות עיקריות: נמצא הבדל מובהק בין קווי ה-RIL בניסויים ביחס ל MI. אומדני התורשתיות היו בינוניים-פלוי (0.38-0.63), דבר המרמז על תרומה פחות או יותר שווה של הגנוטיפ וסביבה. בסך הכול נמצאו 17 QTLs המשפיעים על MI. מתוכם, שמונה היו יציבים בכל הסביבות. רמות המובהקות של הלוקוסים (LOD) נעו בין 4.03-6.7, ומקדמי ההסבר (PVE%) נעו בין 5.3-17.3. מתאמים מובהקים נמצאו בין MI לתכונות אינדקס ההבשלה לאינדקס הקציר (באוכ' HH, CC), לצורת הצימוח (באוכ' HH, CC), משקל התרמיל (באוכ' NT, PH, CC), דגם הפריחה (באוכ' PH, CC) וקצב הפריחה (באוכ' PH). סה"כ נמצאו 26 QTLs לתכונות המודול. QTLs משותפים נמצאו עבור MI עם אינדקס הקציר (כרומוזומים B6, B2), דגם הפריחה/רמת

העינוף/קצב הפריחה (כרומוזום B2), צורת הצימוח (כרומוזום B5), ומשקל התרמיל (כרומוזומים A02 ו-A07). נמצא גן מועמד לתכונת צורת הצימוח באמצעות מיפוי מדויק אשר צמצם את המקטע לגודל של 14.7 kb בכר' B5 המכיל שני גנים. בריצוף של שני גנים אלה נמצא SNP בגן *MADS* המביא להחלפת הבסיס מ A ל- C ולשינוי ב- Alternative splicing. גן מועמד נמצא גם לתכונת דגם הפריחה שהוא הומולוג של הגן *TFL1*. נמצאה מוטציית חסר בתוך גן זה בהורה עם הפריחה הרציפה. סריקה של אוסף עולמי הראתה על linkage disequilibrium מובהק לאתר זה.

מסקנות והמלצות: לרקע הגנטי יש השפעה מכרעת בבחירה של סמנים גנטיים לטיפוח זנים בכירים. בבחירת סמנים לטיפוח לבכירות יש להתרכז בסמנים שהיו יציבים במספר סביבות/שנים. למשקל התרמיל יכולה השפעה על רמת הבכירות (תלוי ברקע הגנטי), ולכן יש להתחשב בזה בהשבחה לזנים בכירים. יש לוודא השפעת QTLs ספציפיים באמצעות בידודם על אותו רקע גנטי באמצעות יצירת קווים כמעט איזוגנים באמצעות הכלאות מחזירות. שילוב של מספר QTLs עשוי להיות הכרחי על מנת להשיג רמת בכירות גבוהה על רקע הזן חנוך באמצעות שימוש בסמנים גנטיים. יש להמשיך וללמוד את הגנים *MADS* ו- *TFL1* בשימוש של טרנספורמציה באגוא"ד לשם הוכחה סופית על מעורבותם בצורת הצימוח ודגם הפריחה, בהתאמה.

דו"ח סופי לתכנית מחקר מספר 20-01-0142

ניתוח גנטי-מולקולארי של רמת הבכירות באגוזי-אדמה

Molecular-Genetic Analysis of the Maturity Trait in Peanut

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

רן חובב, חוקר ראשי – המחלקה לחקר גידולי שדה וירקות, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, ראשון לציון.

יעל לוי, מנהלת מעבדה מולקולרית - המחלקה לחקר גידולי שדה וירקות, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, ראשון לציון.

Ran Hovav, Field Crops & Vegetables, ARO, PO Box 6, 50250, Rishon-LeZion.

E-mail: ranh@agri.gov.il

Yael Levy, Field Crops & Vegetables, ARO, Rishon-LeZion. E-mail: yaelc@agri.gov.il

מבוא ומטרות המחקר

מועד ההבשלה (או רמת הבכירות) הוא אחד התכונות האופייניות והחשובות באגוזי-אדמה (אגוא"ד). תכונה זו היא בעלת שונות גנטית גבוהה בין זנים שונים (בין 90-180 יום מזריעה), והיא בעלת חשיבות מכרעת לאדפטציה וליבול. בישראל, תקופת הגידול של אגוא"ד מוגבלת לזמן שבין תחילת האביב ובין גשמי הסתיו. ולכן, באזורים הצפוניים התפתחו זנים בכירים ובדרום אפילים. בשנים האחרונות, עקב הצורך בחיסכון במים והתחמקות מגשמי סתיו ומחלות, נוצר צורך לפתח טיפוס אגוא"ד בכירים בכל רחבי הארץ. אולם, האופי היחסית מורכב של התכונה, רמת תורשתיות נמוכה [1,2] השפעת גומלין עם הסביבה [3,4], והעובדה שאגוא"ד מבשילים בהסתר מתחת לקרקע, מביאים לכך שהקביעה המוחלטת של רמת הבכירות בדורות טיפוח ראשונים, כמו גם יעילות הסלקציה לכיוון גנוטיפים בכירים, מהווים אתגר גדול. בנוסף, השיטה הטכנית למדידת רמת ההבשלה, שיטת "גירוד התרמיל" [5], היא מייגעת וסובייקטיבית. שיטה אלטרנטיבית של סלקציה בלתי-ישירה ע"י שימוש בסמנים עשויה לתרום ליעילות תהליך ההשבחה.

למרות חשיבותה הרבה של תכונת רמת הבכירות לא קיים מידע רב לגבי הבקרה הגנטית או המולקולרית שלה. זאת במיוחד לאור העובדה שגורמים גנטיים הידועים ממערכות של קטניות אחרות, כגון תגובת פריחה לאורך יום ודגם הפריחה [6], אינם רלוונטיים באגוא"ד המאופיינים כולם בניטרליות לאורך יום ודגם פריחה בלתי-מסיים מובהק [7-8]. כך, שבעוד תהליך איתור סמנים לתכונות כמותיות אחרות התפתח מאוד לאחרונה באגוא"ד, קיים מידע מועט ביותר על איתור סמנים למועד ההבשלה. רובם של המחקרים היו באמצעות מפות גנטיות לא רוויות, וה QTLs שנמצאו בהם הם בדרך כלל עם השפעה קטנה על התכונה [9-11]. בעבודת המחקר הנוכחית, שמנו למטרה ללמוד את הרכיבים הגנטיים אשר מבקרים את רמת הבכירות תוך כדי שימוש בכלים המולקולריים החדשים והמעודכנים ביותר באגוא"ד. היעד הסופי של המחקר הוא פיתוח של סמני DNA לזיהוי מוקדם של גנוטיפים בכירים. ההיפותזה המנחה אותנו היא כי ניתן לפרק את הפנוטיפ הכללי של רמת הבכירות לתכונות "מודול" (modules) קלות יותר להגדרה (כגון צורת צימוח, קצב פריחה, אינדקס הקציר וכו'), וללמוד אותם באמצעות רקע גנטי מתאים.

מטרות המחקר (כפי שהופיעו בהצעת המחקר)

מטרת המחקר העיקרית היא לימוד הגורמים הגנטיים והמולקולריים שמבקרים את רמת הבכירות באגוא"ד. מטרת ספציפיות:

1. זיהוי לוקוסים שנמצאים בתאחיזה עם תכונת רמת הבכירות במספר אוכלוסיות מיפוי.
2. חיזוק ההיפותזה של הקשר בין רמת הבכירות, אינדקס הקציר ותכונות אחרות.
3. מיפוי ברזולוציה גבוהה של תכונות מודול ספציפיות הקשורות לרמת הבכירות.
4. זיהוי גנים המבקרים את רמת הבכירות באמצעות שילוב של genome targeting עם גנים מועמדים.

פירוט המשימות והניסויים שבוצעו

משימה 1: זיהוי לוקוסים שנמצאים בתאחיזה עם תכונת רמת הבכירות במספר אוכלוסיות מיפוי.

שיטות וחומרים:

אוכלוסיות הניסוי: **טבלה 1** מסכמת את חמשת אוכלוסיות ה RIL ששימשו לניתוח הגנטי. כל אוכלוסייה היא שונה במעט ומטרתה לבחון את תכונת מועד ההבשלה ברקע גנטי שונה. האוכלוסיות נעות בתווך של טיפוס שיווק של אגוא"ד ושל הבדלים ברמת הבכירות. תכונות ה"מודול" הן ספציפיות לכל אוכלוסייה לפי ההורים ששימשו להרכבתה (טבלה 1).

טבלה 1. אוכלוסיות המיפוי והאנליזה הגנטית של רמת הבכירות ותכונות "מודול". תכונות ה"מודול" הן כדלקמן: MA = פריחה על הציר המרכזי, FR = קצב הפריחה, IL = אורך הפרק, BR = רמת העינוף, FG = יחס גנופורים/פרחים, BH = צורת הצימוח של ענפים צדדיים, HI = יחס תרמילים/עלווה (אינדקס הקציר), PS = משקל תרמיל ממוצע.

מס' SNPs במפה	מספר "סביבות" (שנים)	תכונות "מודול" ייחודיות שנבדקו באוכל הרלוונטית	הורי ההכלאה (טיפוס שיווק) ההורה הבכיר מופיע בצד שמאל של ההכלאה	גודל אוכל	כינוי אוכל
2552	2	BH, HI	חנך (וירג'ניה) X הררי (וירג'ניה)	252	HH
3625	3	MA, BR, HI, PS, BH, IL*	חנך (וירג'ניה) X קונגו (ולנסיה)	309	CC
1425	2	BH, PS,	(runner) GK7-OL X הררי (וירג'ניה)	273	RR
2597	1	PS, FR, FG**	NC3033 X (runner) Tifrunner (אקזוטי)	256	NT
3902	2	MA, FR, BH, HI, PS	חנך (וירג'ניה) X IGC53 (peruviana)	277	PH

IL* – אורך הפרק היה אמור להיבדק באוכל HH, אך בניסוי ראשוני על ההורים לא נמצא הבדל באורך הפרק, אלא רק באוכל CC.
FG** – יחס גנופורים/פרחים היה אמור להיבדק באוכל CC, NT, PH, אך בניסוי ראשוני על ההורים לא נמצא הבדל ביחס גנופורים/פרחים, אלא רק באוכל NT.

מכל קו בכל אוכלוסייה ובכל "סביבה" (שנים) נזרעו שלוש חזרות בבלוקים באקראי. בכל חזרה נזרעו 20 צמחים מכל קו ב"חלקות" באורך של 4 מטר בעומד של 5 צמחים/מ"ר, שתי שורות לערוגה. בנוסף נזרעו קווי ההורים כביקורות. מדידות: רמת הבכירות נמדדה ע"י עקירה ידנית של 2-3 צמחים מכל חלקה במועד ממוצע של שני ההורים. בכל מדידה נאסף כ-1 ק"ג של תרמילים ועליהם התבצעה בדיקת הבשלה באמצעות שיטת הגירוד, שבה האקסוקארפ מוסר באמצעות סילון מים, ומיונם על בסיס גוון המזוקארפ. "רמת ההבשלה" נקבעה באמצעות הערך "**אינדקס ההבשלה**" (MI) ע"י ציון 2 לתרמיל שחור, ציון 1 לחום, וציון 0 לבהיר. זאת ע"מ לתת יותר השפעה לתרמילים עם מזוקארפ שחור (הבשלה מלאה) לעומת תרמילים עם צבע חום (הבשלה חלקית).

מיפוי גנטי: אפיון גנוטיפי התבצע באמצעות Axiom SNP array ספציפי לאגוא"ד המכיל כ- 50,000 SNPs [12] ושירות של חברת Affymetrix. דנ"א נדגם מההורים וכל אחד מקווי ה- RIL (בכל אוכלוסייה) באמצעות איסוף של עלים צעירים מצבר של 12 צמחים והפקה באמצעות קיט של סיגמה. סמנים ספציפיים לזנים (varietal specific SNPs) נמצאו ע"י שימוש בתכנת SWEEP שפותחה במעבדה שותפה בארה"ב. מספר הסמנים הסופי לכל אוכלוסייה נקבע לאחר דגימת הצאצאים וסינון של SNPs שאינם מתפצלים באוכלוסייה ביחס 1:1 (במבחן כי-בריבוע). לאחר סינון זה נשארו מספרי הסמנים לכל אוכלוסיית RIL המופיעים בטבלה 1. מיפוי גנטי נערך על בסיס מפת תאחיזה שהוכנה בתוכנת JionMap 4.1 (Netherlands, kyazma) כפי שתואר על ידינו בעבר [13]. העיבוד התבצע בתוכנת MapQTL 6 (Netherlands, kyazma), בהתאם לסף המינימלי $LOD < 4$ ו-1000 permutations test.

תוצאות:

נתונים סטטיסטיים לתכונת רמת ההבשלה: מספר פרמטרים הקשורים לאינדקס ההבשלה עבור חמש

אוקלוסיות הניסוי מובאים בטבלה 2.

טבלה 2. נתונים סטטיסטיים לגבי אינדקס ההבשלה עבור חמש אוקלוסיות RIL לפי מספר הסביבות שנבדקה כל אוקלוסייה.

אוקלוסייה	סביבה	טווח	ממוצע \pm סטיית תקן	תורשתיות	ממוצע הורה בכיר/ממוצע הורה אפיל (מובהקות)
HH	1	13.3-70.9	39.2 \pm 10.1	0.38	72.1/44.8 (<0.001)
	2	24.8-80.2	55.6 \pm 11.2	0.46	54.0/30.9 (<0.001)
RR	1	26.4-80.6	55.8 \pm 9.3	0.43	67.3/51.3 (<0.001)
	2	25.2-80.2	56.1 \pm 10.9	0.48	72.6/58.2 (0.004)
CC	1	25.8-96.6	61.2 \pm 14.1	0.51	87.3.3/51.2 (<0.001)
	2	4.1-89.1	55.2 \pm 18.5	0.61	80.7/46.3 (<0.001)
	3	2.3-87.9	45 \pm 16.2	0.57	73.6/55.5 (<0.001)
PH	1	38.1-85.4	67.6 \pm 12.3	0.63	72.2/43.3 (<0.001)
	2	27.3-72.5	54.6 \pm 9.7	0.58	68.3/41.5 (<0.001)
NT	1	29.1-93.6	63.5 \pm 11.4	0.61	84.2/42.1 (<0.001)

ערכי ההבשלה של ההורים בכל אוקלוסייה היו בהתאם לצפי עם שינויים קלים בין האוקלוסיות. בכל אחת מהאוקלוסיות, ההורים נמצאו שונים באופן מובהק אחד מהשני באינדקס ההבשלה. ניתן לציין את ההורים הבכירים "קונגו" (מאוקלוסיית CC) ו NC3033 (מאוקלוסיית NT), שהראו אחוזי הבשלה גבוהים במיוחד (83.3% ו 84.2 בהתאמה) מה שצפוי לזנים מטיפוס *fastigiata*. כמו כן, השינויים שנצפו בין האוקלוסיות השונות בנתוני הורה 'חנוך' (ההורה האפיל באוקלוסיות HH, CC ו-PH) נבעו מכך שהאוקלוסיות האלו לא נאמדו באותו המועד מסיבות לוגיסטיות. ניתוח ANONA להבדל בין ממוצעי הקווים היה מובהק ביותר בכל חמשת האוקלוסיות, כלומר נמצא הבדל מובהק בין קווי ה- RIL בניסויים ביחס לרמת ההבשלה. רמת התורשתיות נמדדה באמצעות רכיבי השונות בין ובתוך משפחות ונמצאה בינונית-פלוס (0.38-0.63), דבר המרמז על תרומה פחות או יותר שווה של השפעת הגנוטיפ ושל השונות הניסויית/סביבתית.

מיפוי תכונת אינדקס ההבשלה: בטבלה 3 מסוכמים הלוקוסים (QTLs) שנמצאו עבור תכונת רמת הבכירות בכל אחת מהאוקלוסיות בארבעת השנים של הניסוי. כמו כן מצורפות מספר הסביבות שבהן נמצא ה QTL מובהק מתוך כלל הסביבות שאותה אוקלוסייה נבדקה, רמת ה LOD, מקדם ההסבר (PVE%), והמיקום הכרומוזומלי של כל QTL.

טבלה 3. סיכום רשימת QTL מובהקים עבור תכונת רמת ההבשלה מארבע אוקלוסיות RIL מארבע עונות גידול שונות. QTLs משותפים (בלפחות שתי אוקלוסיות) מודגשים בצבע זהה.

מקדם הסבר ** (PVE%)	** LOD	מיקום QTL בכרומוזום (מיליוני בסיסים)	מספר סביבות*	כרומוזום	שם QTL	אוקלוסיית מיפוי
9.9 - 11.9	5.3 - 6.4	117.6 - 125.6	2/2	A04	qMIHHA04	HH
9.8	5.28	11.3 - 16.6	1/2	B06	qMIHHA06	HH
9.3 - 9.9	5 - 5.3	2.8 - 5.7	2/2	B03	qMIHHA03	HH
10.2	5.5	156.5 - 158.9	1/2	B05	qMIHHA05	HH
6.2 - 9.3	5.9 - 4.0	11.8 - 5.3	3/3	A02	qMICCA02	CC
8.5 - 10	5.4 - 6.6	0.2 - 1.8	3/3	A07	qMICCA07	CC
7.8 - 8.8	4.9 - 5.7	5.2 - 2.1	3/3	A10	qMICCA10	CC
5.3	4.1	22.6-23.1	1/3	B03	qMICCB03	CC
8.7 - 11.5	5.1 - 7.4	118.2 - 120.5	2/3	B02	qMICCB02	CC
8.1 - 11.6	4.4 - 6.4	118.6 - 126.6	2/2	A04	qMIRRA04	RR

7.3 - 8.0	4.5-4.0	48.4 - 51.4	2/2	A08	qMIRRA08	RR
9	4.9	105.8 - 105.9	1/2	B02	qMIRRB02	RR
6.8	4.0	56.4 - 57.0	1/2	B04	qMIRRB04	RR
15.4	5.5	98.0 - 100.3	1/1	A02/B02	qMINTA02	NT
17.3	5.2	122.2-128.1	1/2	A08	qMIPHA08	PH
10.7	4.8	117.9 - 124.5	1/2	B02	qMIPHB02	PH
8.7 - 11.4	5.4 - 6.7	145.1-137.4	2/2	A02	qMIPHB02	PH

* מתייחס למספר הסביבות שהלוקוס זוהה כמובהק מתוך מספר הסביבות שאוכלוסייה כולה נבדקה.

** במקרה של יותר מסביבה אחת מובא הטווח של ערכי ה LOD וה- PVE% בכל הסביבות.

בסך הכול נמצאו 17 QTLs המשפיעים על תכונת אינדקס ההבשלה (MI). מתוכם, שמונה היו יציבים בכל הסביבות שנבדקו באותה אוכלוסייה, ועוד אחד שהיה יציב בשתיים מתוך שלוש הסביבות שנבדקו. רמות המובהקות של הלוקוסים (LOD) נעו בין 4.03-6.7, ומקדמי ההסבר (PVE%), המסבירים את האחוז ההשפעה של ה QTL מסך השונות של ה MI בניסוי, נעו בין 5.3-17.3. נתונים אלה מראים השפעות נמוכות עד בינוניות של הלוקוסים על ה-MI, ולא נמצא לוקוס אחד שניתן לאפיין אותו כ"עיקרי". שני זוגות של QTLs נמצאו זהים בשתי אוכלוסיות שונות - זוג אחד על כרומוזום A04 (לאוכלוסיות RR ו HH), והשני על כרומוזום B02 (לאוכלוסיות PH ו CC).

משימה 2: חיזוק ההיפותזה של הקשר בין רמת ההבשלה, אינדקס הקציר ותכונות אחרות.

שיטות וחומרים:

בחינת פנוטיפית של תכונות מודול נעשה בכל אוכלוסייה, בהתאם לשאלה האם תכונה זו מתפצלת בין ההורים ובין הקווים באוכלוסייה (טבלה 1), כדלקמן:

אינדקס הקציר (HI): אינדקס הקציר נבחן בשדה עבור אוכל' HH, CC ו-PH. אינדקס הקציר נבחן בסיום הגידול. הניסוי נעקר והצמחים הונחו להתייבש במשך מספר ימים. כל חלקה נשקלה לקבלת משקל ברוטו (תרמילים + עלווה), ולאחר מכן עברה דיש והתרמילים בלבד נשקלו, מהם נלקחו אינדקס הקציר (משקל תרמילים מחולק במשקל ברוטו).

צורת הצימוח (BH): נקבעה באוכלוסיות HH, RR, CC ו NT בצורה איכותית (משתרעת/שיחית/זקופה). דגם הפריחה (MA): נקבע באוכל' CC ו PH בצורה איכותית על ידי אבחון נוכחות פרחים על הענף המרכזי (main axis), נוכחות פרחים מעידה על פריחה רציפה והעדר פרחים מעיד על פריחה סירוגית. אורך הפרק (IL): אורך הפרק נמדד תחילה רק על חמשת ההורים, באמצעות מדידה של הפרק השלישי (N+3) של גבעולים צדדיים בצמחים בני 40 יום. הצמחים גודלו בתנאי חממה בעציץ בגודל 10 ליטר מתחת לרשת 70% צל. מכל קו גודלו חמישה צמחים. בעקבות בדיקה זו נמצא כי אורך הפרק הוא מובהק רק בהורה "קונגו" ולכן הוא נבדק רק באוכלוסייה CC ברמת השדה. אורך הפרק נמדד כמוצע של 4 ענפים צדדיים של 4 הצמחים הקיצוניים בכל חלקה.

רמת העינוף (BR): נקבעה באוכל' CC בצורה איכותית. בתחילה "רמת העינוף" נקבעה על ידי ספירת תחיליות של ענפים צדדיים בצמחים בגיל 60 יום בתנאי שדה. אולם מכיוון שראינו רק שני סוגי פנוטיפ (ההבדל בין ארבעה ענפים צדדיים לבין "יותר" ענפים צדדיים) הבדיקה הפכה לאיכותית.

קצב הפריחה (FR): נוטר באוכל' NT ו PH ע"י ספירה יומית של מספר הפרחים על 10 צמחים. בתחילה הוא נבדק על ההורים NC3033, Tifrunner, חנוך ו IGC53 בתנאי חממה בבדיקה יומית (איור 7 בדו"ח של שנה ב'). לאחר מכן, הוא נבחן בשדה בכל האוכלוסייה פעם בשבוע מיום 30 למשך ארבעה שבועות ע"י ספירת הפרחים על ארבעה צמחים אקראיים בכל חלקה. הקצב חושב על ידי מקדם המתאם של מספר הפרחים לעומת ימים.

יחס גנופורים/פרחים (FG): נמדד תחילה על הורי אוכלוסיית RR, NT ו- PH, על ידי יישום תגיות על כל הפרחים בתפרחת (על כ- 5 תפרחות לצמח) וספירת הגנופורים שיצאו מתפרחת זו. לאחר שנמצאו הבדלים מובהקים רק בהורי אוכל' NT, תכונה זו נבדקה רק באוכל' זו בתנאי שדה פעם אחת בעונה על ידי סימון תפרחות על ארבעה צמחים אקראיים בכל חלקה וספירת הגנופורים שיצאו בפועל לאחר כ- 60 יום.

משקל תרמיל ממוצע (PS): נמדד באוכל' RR, CC, NT ו CC, ע"י שקילת 100 תרמילים בשלים. חישובים סטטיסטיים: מתאמים בין תכונות נערכו על ערכי הממוצע הכללי של כל תכונה בכל אוכלוסייה. מתאמים חושבו באמצעות פקודת Y by X ב JMP. מתאמים בין שתי תכונות כמותיות חושבו באמצעות מקדם הרגרסיה, מתאמים בין תכונה איכותית וכמותית נערכו באמצעות מבחן F. מבחנים בין שתי תכונות איכותיות נבחנו באמצעות מבחן בי-בריבוע. רמת מובהקות מ- 0 חושבה לכל מבחן.

תוצאות

טבלה 4 מסכמת את הקשר שבין רמת ההבשלה לבין תכונות המודול, ובין תכונות המודול עצמן בכל אחת מחמשת אוכלוסיות הניסוי.

טבלה 4. קשר בין תכונות בחמשת אוכלוסיות הניסוי. בשביל לפשט את הניתוח, הטבלה מציגה את המתאמים בין ממוצעים של כל החזרות וכל הסביבות לאותה תכונה. הטבלה מרכזת נתונים עבור שלושה סוגי מבחנים. בין שתי תכונות כמותיות = מקדם המתאם (מובהקות מ- 0). בין תכונה איכותית ותכונה כמותית = מובהקות ערך F של השפעת התכונה האיכותית על התכונה הכמותית. בין שתי תכונות איכותיות = מובהקות של ערך כי-בריבוע (מהשערת האפס שאין הבדל). רקע לבן = אין מובהקות, רקע צהוב = מובהקות ברמה של $P < 0.05$, רקע אדום = מובהקות ברמה של $P < 0.01$. MA = פריחה על הציר המרכזי, FR = קצב הפריחה, IL = אורך הפרק, BR = רמת העינוף, FG = יחס גנופורים/פרחים, BH = צורת הצימוח של ענפים צדדיים, HI = יחס תרמילים/עלווה (אינדקס קציר), PS = משקל תרמיל ממוצע.

אוכלוסייה HH	MI	BH	HI
MI			
BH	<0.0001		
HI	0.48	0.042	

אוכלוסייה RR	MI	BH	PS
MI			
BH	0.08		
PS	0.12	0.45	

אוכלוסייה CC	MI	BH	PS	MA	BR	HI	IL
MI							
BH	0.03						
PS	-0.22	0.45					
MA	0.04	0.75	0.22				
BR	0.04	0.72	0.21	<0.001			
HI	0.33	0.09	0.12	0.02	0.02		
IL	0.27	0.02	0.36	0.12	0.11	-0.08	

אוכלוסייה PH	MI	BH	PS	MA	FR	HI
MI						

BH	0.22					
PS	-0.11	0.21				
MA	<0.001	0.84	0.27			
FR	0.67	0.55	-0.08	<0.001		
HI	0.44	0.07	0.14	0.02	0.54	

אוקלוסייה NT	MI	PS	FR	FG
MI				
PS	-0.37			
FR	0.07	-0.07		
FG	0.12	-0.15	0.03	

באוקלוסייה HH נמצא מתאם מובהק מאוד בין אינדקס ההבשלה לאינדקס הקציר. נמצאה השפעה מובהקת מאוד של צורת הצימוח על אינדקס ההבשלה והשפעה מובהקת לצורת הצימוח על אינדקס הקציר. באוקלוסייה RR לא נמצאה השפעה מובהקת של צורת הצימוח על אינדקס ההבשלה, אם כי היא היתה על גבול המובהקות הסטטיסטית. לא נמצא מתאם בין רמת ההבשלה ומשקל התרמיל. לא נמצאה השפעה של צורת הצימוח על משקל התרמיל.

באוקלוסייה CC נמצא מתאם שלילי לא גבוה (-0.22) אבל מובהק מאפס בין משקל התרמיל ואינדקס ההבשלה. נמצאה השפעה מובהקת של דגם הפריחה ורמת העינוף על אינדקס ההבשלה. נמצא מתאם חיובי לא גבוה אבל מובהק מאפס בין אינדקס הקציר ואינדקס ההבשלה. כמו כן, נמצאה באוקלוסייה זו השפעה מובהקת של צורת הצימוח על אינדקס ההבשלה. בין תכונות המודול ניתן לציין קשר הדוק ביותר ומובהק סטטיסטית בין דגם הפריחה ורמת העינוף. נמצאה השפעה מובהקת של צורת הצימוח על אורך הפרק. נמצאה השפעה מובהקת של דגם הפריחה ורמת העינוף על אינדקס הקציר.

באוקלוסייה PH נמצא מתאם שלילי נמוך (-0.11) אבל מובהק מאפס בין משקל התרמיל ואינדקס ההבשלה. נמצאה השפעה מובהקת של דגם הפריחה על אינדקס הפריחה. נמצא מתאם חיובי וגבוה (0.67) בין קצב הפריחה לבין אינדקס ההבשלה. לא נמצאה באוקלוסייה זו השפעה מובהקת של צורת הצימוח על אינדקס ההבשלה. בין תכונות המודול ניתן לציין השפעה מובהקת של דגם הפריחה על קצב הפריחה, כאשר פריחה רציפה היתה בעלת קצב פריחה גבוה מאשר פריחה אלטרנטיבית. לדגם הפריחה היתה גם השפעה מובהקת על אינדקס הקציר. נמצא גם מתאם גבוה ומובהק בין קצב הפריחה ואינדקס הקציר.

באוקלוסייה NT נמצא מתאם שלילי בינוני (-0.37) ומובהק מאפס בין משקל התרמיל ואינדקס ההבשלה. נמצא מתאם חיובי נמוך (0.12) בין אינדקס ההבשלה ויחס גנופורים פרחים. לא נמצא מתאם מובהק בין אינדקס ההבשלה לקצב הפריחה. בין תכונות המודול ניתן לציין מתאם שלילי נמוך (-0.15) אך מובהק מאפס בין משקל התרמיל ויחס גנופורים פרחים.

משימה 3: מיפוי ברזולוציה גבוהה של תכונות מודול ספציפיות הקשורות לרמת הבכירות.

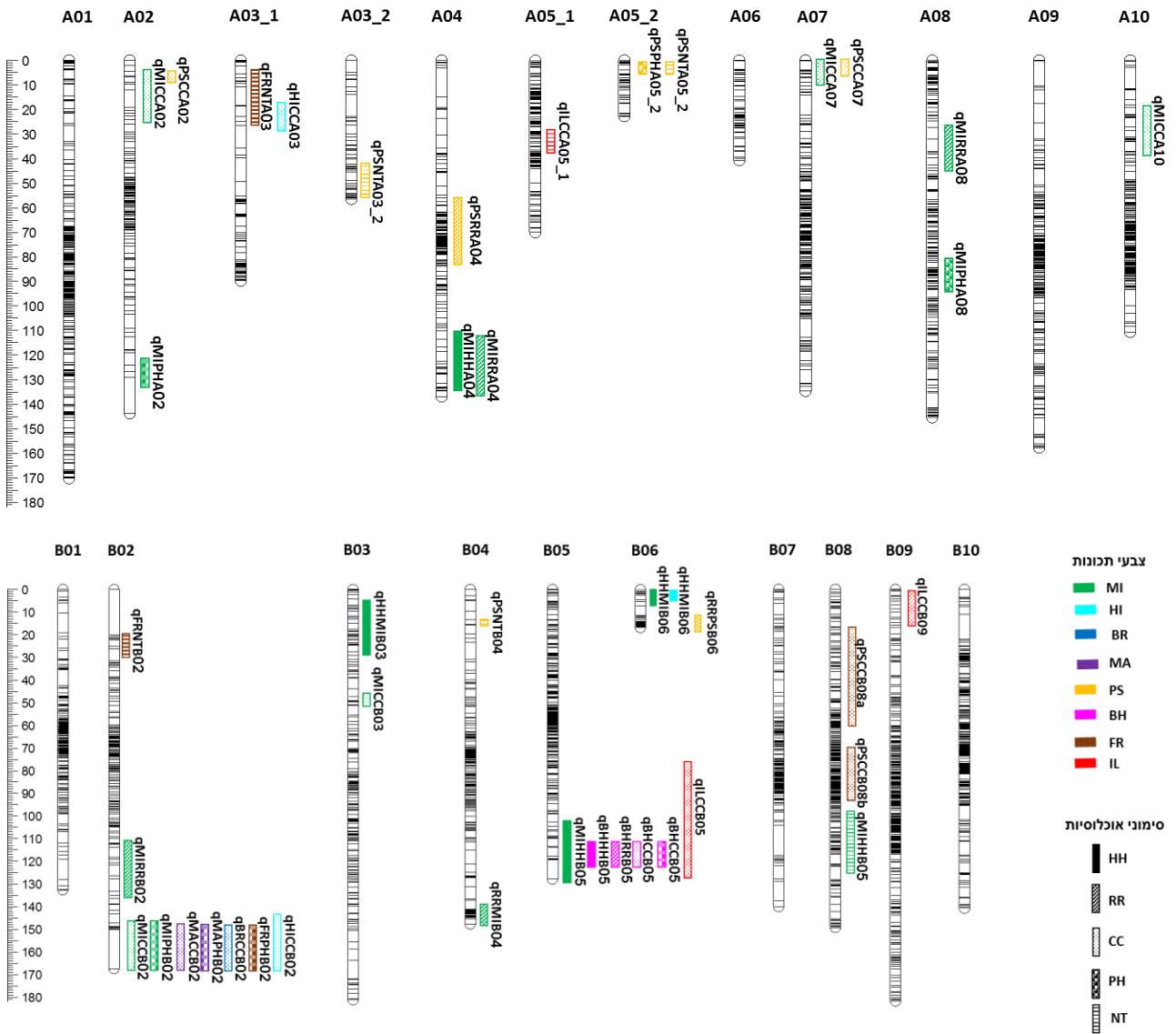
שיטות וחומרים:

מפה גנטית אינטגרטיבית נבנתה על בסיס חמש המפות הגנטיות באמצעות התכנית Combine Groups for Map Integration Module של תוכנת JoinMap ולפי השיטה שתוארה בעבר על ידי Shirasawa [14]. סה"כ

המפה המאוחדת הכילה 4886 סמנים. מיפוי ה-QTL התבצע בתוכנת MapQTL 6 (kyazma, Netherlands), בהתאם לסף המינימלי $4 < LOD$ ו-1000 permutations test.

תוצאות:

איור 1 מציג את המיפוי הגנטי של כל התכונות הנמדדות בניסוי.



איור 1. מפה גנטית מאוחדת לאוכלוסיות HH, CC, RR, PH ו-NT (22 קבוצות תאחיזה) עם 4886 סמנים. MI = אינדקס ההבשלה, MA = פריחה על הציר המרכזי, FR = קצב הפריחה, IL = אורך הפרק, BR = רמת העינוף, FG = יחס גופורים/פרחים, BH = צורת הצימוח של ענפים צדדיים, HI = יחס תרמילים/עלווה (אינדקס יבול), PS = משקל תרמיל ממוצע.

סה"כ נמצאו 26 QTLs לתכונות המודול (בנוסף ל-17 שנמצאו עבור אינדקס ההבשלה).

נמצא QTL משותף לתכונת אינדקס ההבשלה ואינדקס הקציר באוכל' HH על כרומוזום B6.

בלוקוס לאינדקס ההבשלה שהיה משותף לאוכלוסיות CC ו-PH בקצה התחתון של כרומוזום B2 מופו גם לוקוסים מובהקים המבקרים את הפריחה על הציר המרכזי (באוכל' CC ו-באוכל' PH), לרמת העינוף (CC),

לקצב הפריחה (PH) ולאנדקס הקציר (CC). כאמור, נמצאה השפעה מובהקת של דגם הפריחה על כל התכונות הנ"ל באוכלוסיות אלה (טבלה 3). באופן מעניין, תכונת דגם הפריחה באוכל' CC ו-NT התפצלה באופן ברור ליחס של 1:1 (מובהקות של כי בריבוע 0.73 ו-0.47 בהתאמה). עקב כך, ההערכה היא כי תכונת דגם פריחה רציפה מבוקרת על ידי אלל רצסיבי של גן אחד. הנחה זו התחזקה מאוד בתוצאות המיפוי של דגם הפריחה, אשר מופתה באופן חד משמעי לאזור ספציפי אחד בכרומוזום B02 עם מובהקות גבוהה ביותר (-) $(\log_{10}(p\text{-value}) = 58; \text{LOD} = 57.02)$.

לוקוס מעניין נוסף נמצא בכרומוזום B05, אשר היה מובהק לאנדקס ההבשלה באוכל' HH. נמצא כי לוקוס זה גם מובהק לתכונת צורת הצימוח באוכל' HH, RR ו-CC. למרות שהלוקוס הזה לא נמצא מובהק לאנדקס ההבשלה באוכל' RR ו-CC, עדיין הייתה השפעה מובהקת של צורת הצימוח על אנדקס ההבשלה ב-CC וקרובה למובהקות סטטיסטית ב-RR (טבלה 3). לוקוס זה גם נמצא מובהק לתכונת אורך הפרק באוכל' CC. תכונת צורת הצימוח גם כן מבוקרת על ידי לוקוס אחד עיקרי, אשר הסביר $\text{PVE}\% 0.68\text{-}0.91$ מסך השונות הגנטית.

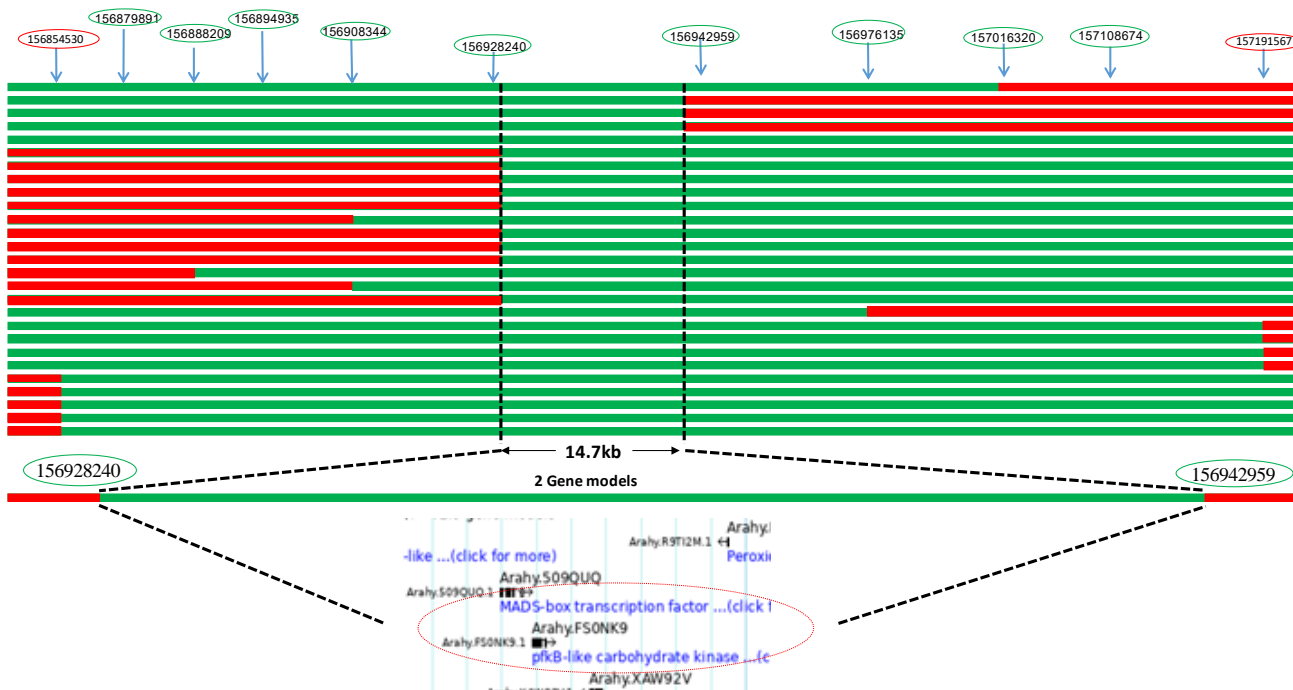
מיפוי משותף לאנדקס ההבשלה נמצא גם למשקל התרמיל על כרומוזומים A02 ו-A07 (אוכל' CC). נראה כי למשקל התרמיל יש השפעה מסוימת ברקע הספציפי הזה.

משימה 4: זיהוי גנים המבקרים את רמת הבכירות באמצעות שילוב של genome targeting עם גנים מועמדים.

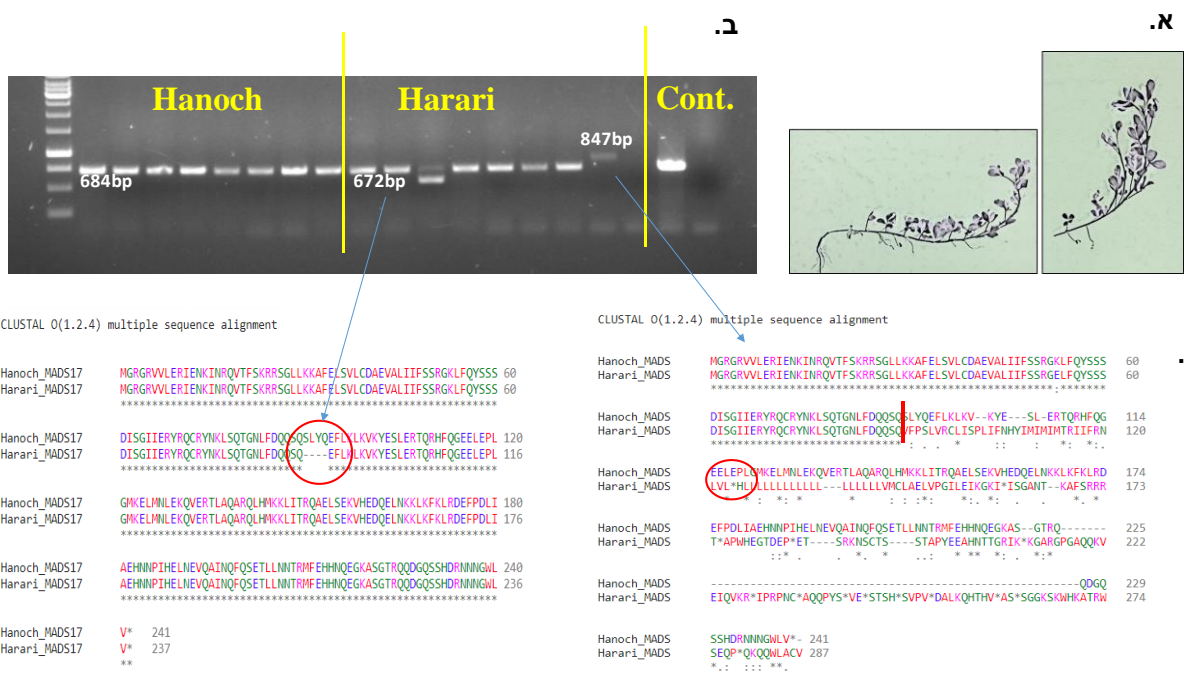
עקב השפעת תכונות צורת הצימוח ודגם הפריחה על רמת הבכירות, החלטנו להתמקד בניסיון לזהות גנים מועמדים המבקרים שתי תכונות מודול אלה.

בידוד הגן לצורת הצימוח (BH): בידוד הגן לצורת הצימוח מבוסס על המשך עבודה שנעשתה על אוכל' HH (חנך X הררי). בעבודה קודמת [15] דיווחנו שבאוכל' HH תכונת צורת הצימוח מבוקרת על ידי גן אחד, אשר כונה *Bunch1*. באמצעות המיפוי שמתואר לעיל, נמצא כי *Bunch1* ממוקם בתוך מקטע גנומי של כ-640Kb בכרומוזום B05. גישת Map-based cloning שימשה על מנת להמשיך ולהקטין מקטע גנומי זה. כ-2000 צמחים מתפצלים ל BH גודלו בשדה והופעלו עליהם שני סמני KASP™ שממוקמים בקצוות המקטע. כ-30 פרטים רקומביננטים נמצאו אינפורמטיביים לסמנים, תוך כדי צמצום ראשוני של המחדר ל-350kb. לאחר מכן נערך תהליך צמצום גודל המקטע על ידי איתור 11 סמני SNPs במרווחים שווים לאורך המחדר, ובחינתם על כל אחד מהרקומביננטים (איור 2). כתוצאה מתהליך זה צומצם המקטע לגודל של 14.7 kb בלבד המכיל שני גנים – *pfkB-like carbohydrate kinase* (להלן *pfkB*) ו-*MADS-Box transcription factor like* (להלן *MADS*) (להלן *MADS*). ניתוח ביטוי של שני גנים אלה באמצעות "אטלס הביטוי" של אגוזי-אדמה (PeanutBase.org), הראה כי בעוד ה-*pfkB* מתבטא ברוב רקמות הצמח, *MADS* מתבטא באופן ייחודי בקצוות ולאורך הענפים הצדדיים (האיבר בו רואים הבדל בין צמחים שיחיים ומשתרעים). מעבר לכך, נערך ריצוף מלא של שני גנים אלה בשני ההורים שתורמים את התכונה, חנך והררי, ונמצא בגן *MADS*, SNP אחד שנמצא בין גבול האקסון השלישי והאינטרון הרביעי של הגן. החלפת הבסיס (A ל-C) גורמת לשינויים רבים ב-Alternative splicing (איור 3). אחד השינויים מביא ל-Stop codon של ביטוי הגן, ואחר מביא לחסר של ארבעה חומצות אמינו

בתוך אתר הקישור של חלבון זה לחלבונים אחרים. ולכן, המסקנה הייתה כי ה- *MADS* הוא ככל הנראה הגן המבקר את צורת הצימוח.

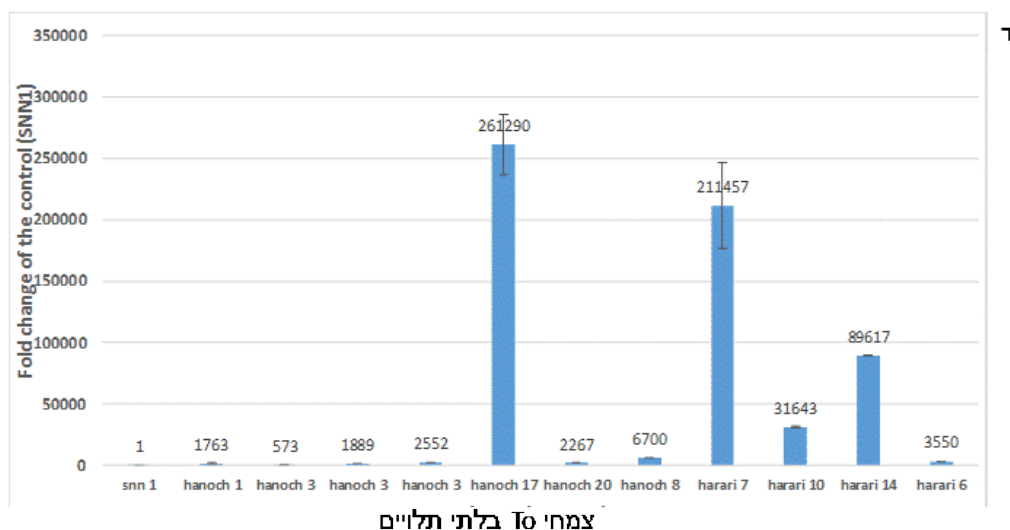
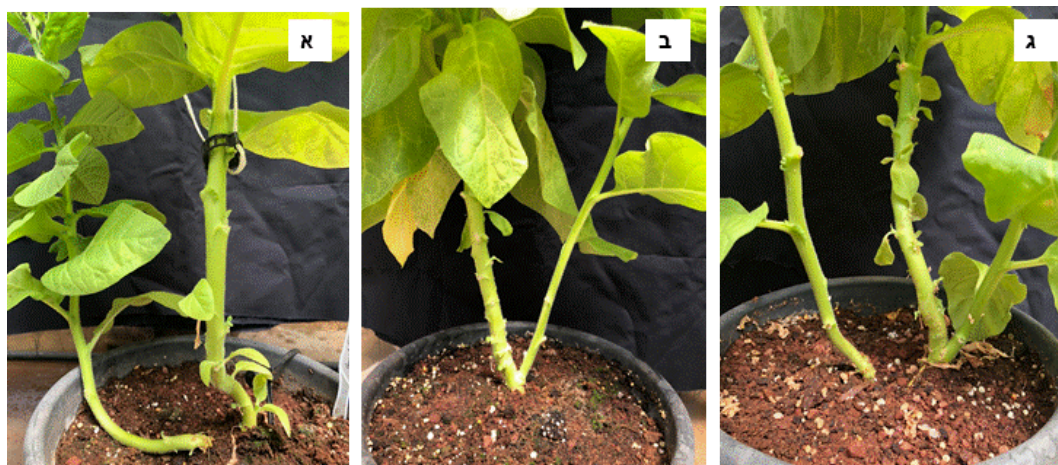


איור 2: תהליך בידוד הגן לצורת הצימוח באמצעות מיקום מפה. סריקה של כ- 30 רקומביננטים על מקטע של 350kb שבתוכו נמצא הגן. אזור ירוק מסמן מיקום שבו הייתה התאמה בין הגנוטיפ של הסמן והפנוטיפ של צורת הצימוח (שיחי או משטרע). אזור אדום מסמן מיקום שבו הייתה אי-התאמה.



איור 4: מוטציה בגן *MADS* גורמת לשינוי בתהליכי "עריכה אלטרנטיבית" (alternative splicing) בזן הררי. א. cDNA הופק מגבעולים צדדיים של ההורים הררי (שיחי) וחנוך (משטרע). ב. PCR נערך באמצעות פריימרים התוחמים את כל רצף ה-cDNA של הגן *MADS*. ג. ריצוף של מקטעי ה-PCR מראה על מגוון תוצרים חלקיים בהורה הררי שנובעים מ- alternative splicing כולל שינוי שמביא ל- Stop codon של ביטוי הגן (מימין) ואחר שמביא לחסר של ארבעה חומצות אמינו בתוך אתר הקישור של חלבון זה לחלבונים אחרים (משמאל).

בכדי לנסות ולהוכיח את מעורבותו של *MADS* בתכונת צורת הצימוח יש להחדיר אותו בניסוי טרנספורמציה. מכיוון שטרנספורמציה בבוטנים היא מאוד לא יעילה וארוכה (כשנתיים) החלטנו שבמסגרת התכנית הנוכחית ננסה לבטא ביתר את הגן *MADS* בטבק. טרנסקריפט מלא של הגן בוטה ביתר בטבק תחת בקרה של פרומטור 35S. שתי ורסיות של הגן בוטאו: הרצף ה"מקורי" (wild-type) (35S:Hanoch), וה"מוטנט" שלא עבר עריכת splice (35S:Harari) כביקורת. צמחי טבק מטיפוס SNN "טבעיים" ללא כל התמרה שימשו גם כן כביקורת שלילית. מתוך 24 טרנספורמנטים T₀ בלתי תלויים (9-15:35S:Hanoch, 35S:Harari), ושלושה צמחי wild-type, רק צמח אחד מטיפוס 35S:Hanoch הראה צורת צימוח שדומה למשתרעת בקומה הראשונה של הענפים הצדדיים של צמח הטבק (איור 4א). כל שאר הצמחים הראו פנוטיפ חזק של צורת צימוח זקופה בענפים הצדדיים (איור 4ב,ג). באופן מעניין, אנליזת ביטוי RT-PCR כמותי של מספר צמחי 35S:Hanoch, 35S:Harari וביקורת SSN3 הראתה ביטוי גבוה מאוד ומובהק בצמח עם הענפים הצדדיים ועוד מספר צמחי 35S:Harari זקופים (מוטנטים) (איור 4ד).

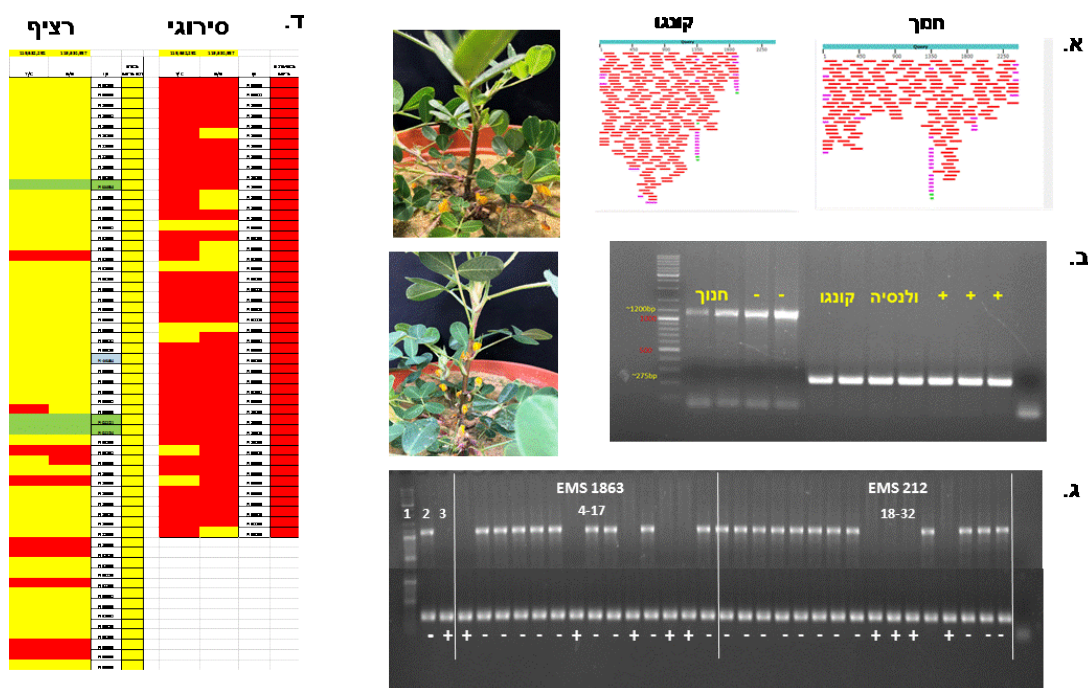


איור 4. ביטוי ביתר של הגן *AhMADS-box* בטבק. א. צמח טבק מותמר ב 35S:Hanoch (Hanoch 17) שמראה פנוטיפ דמוי משתרע בגבעולים הצדדיים הראשונים שלו. ב. דוגמא לצמח טבק המותמר ב 35S:Harari עם ענפים צדדיים זקופים. ג. צמח טבק SNN "טבעי" ללא מחדר עם צורת צימוח זקופה. ד. אנליזת Real-time לביטוי (ביחס לביטוי ב SNN) של הגן *AhMADS-box* במספר טרנספורמנטים בלתי-תלויים.

בידוד הגן לתכונת דגם הפריחה (MA): בידוד הגן MA נעשה על בסיס אוק' CC. על ידי שימוש במערכת הסמנים של אוכלוסייה זו, הגן לדגם הפריחה מופה למחדר של 1.7 מיליון בסיסים בין סמנים S12_119984822 ו-S12_118543259, המכיל כ-140 גנים. בהסתכלות על רשימת הגנים, נמצא, במרכז המחדר, הגן *TFL-1-like* (*Terminal Flowering 1*) שידוע ממערכות צמחיות אחרות כמשפיע על דגם פריחה וארכיטקטורה של הצמח.

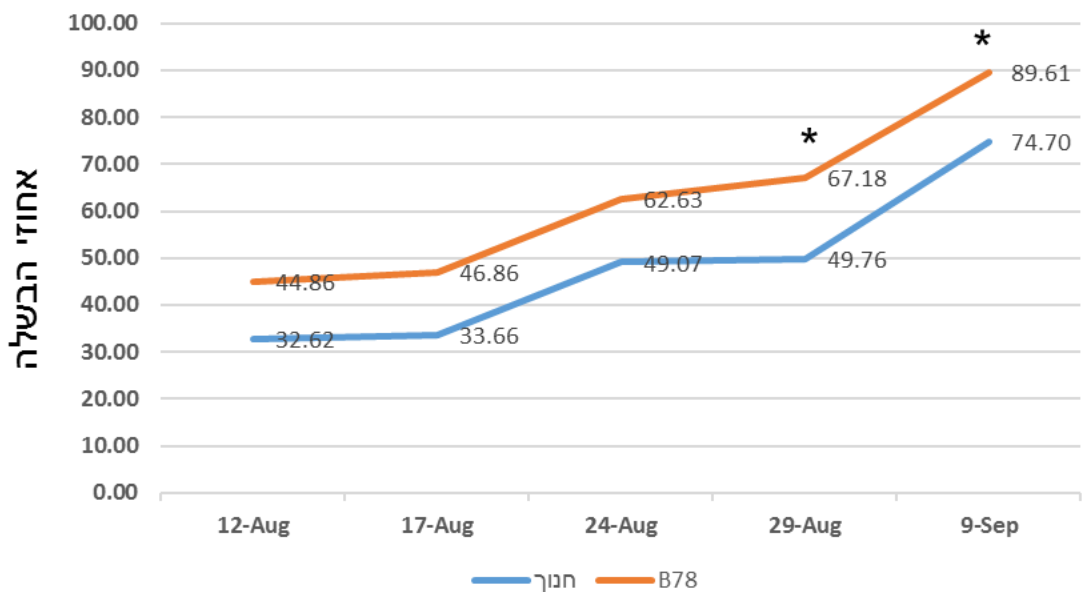
סריקה של רצף הגן המקודד ל *TFL-1* בהורי אוק' CC חנוך וקונגו מתוארת באיור 5א. הרצף לגן זוהה באמצעות ריצוף מחדש (re-sequencing) שנעשה לשני הורים אלה. על בסיס אנליזה זו נמצא חסר של כ-900 בסיסים בקו קונגו (איור 5ב), המכיל חלק מהרצף המקודד לחלבון ה-*TFL-1*, בדיוק באמצע המוטיב של ה-Phosphatidylethanolamine-binding. מיפוי מחדש של תכונת דגם הפריחה, הפעם עם מוטציית החסר של הגן *TFL-1*, שיפרה באופן ניכר את מובהקות המיפוי, עם $LOD = 153$ ועם מקדם הסבר של 0.958. בנוסף, סרקנו את נוכחות מוטציית החסר בשתי משפחות של מוטנטים EMS (M2). נמצא כי מוטציית החסר התפצלה באופן מלא עם תכונת דגם הפריחה (איור 5ג), מה שמחזק את ההשערה כי *TFL-1* הוא המבקר את דגם הפריחה.

בשלב הבא, בדקנו האם המיפוי שנמצא לתכונת דגם הפריחה הוא ייחודי לרקע הגנטי של אוכלוסיות RR ו PH, או בעל אפקט נרחב במין *Arachis hypogaea*. לשם כך נסרקו שני הסמנים הקרובים ביותר לדגם הפריחה באוסף עולמי של כ-100 קווים המייצגים את השונות הגנטית הקיימת של אגוא"ד [6]. האנליזה הראתה על linkage disequilibrium מובהק מאוד לאתר זה ($p(F) = 2.45E-11$) (איור 5ד). היינו, ברוב המקרים הגנוטיפ של הסמן היה תואם לפנוטיפ של התכונה (באיור 5ג - צהוב = רציפה, אדום = סירוגית). תוצאה זו מחזקת את ההשערה שהאתר הכרומוזומלי המבקר את דגם הפריחה באוכלוסייה CC הוא בעל משמעות אבולוציונית רחבה לתכונה זו באגוא"ד.



איור 5. אנליזה מולקולרית של תכונת דגם הפריחה. א. re-sequencing לגן *TFL1-like* עבור חנוך וקונגו. המיפוי נעשה כנגד הרצף של הגן *TFL1-like* מהגנום הידוע של הזן Tifrunner. ניתן לראות את החסר הקיים בסוף הגן בקונגו לעומת חנוך. ב. תוצר PCR שתוכן על בסיס החסר. ניתן לראות הבדל בין הורים וקווי RIL נוספים עם פריחה רציפה (+) ועם פריחה סירונית (-). ג. התפלגות המוטציה של *TFL* בשתי משפחות מוטנטים. ד. מבחן אסוציאציה בין הגנוטיפ של שני סמנים לגן *TFL1-like* לבין דגם הפריחה בכ- 100 קווים המייצגים את השונות העולמית באגוא"ד. מימין קווים עם פריחה סירונית ומשמאל עם רציפה. צבע בסמן ובקו מסוים שאיננו מתאים לצבע הקבוצה מייצג מצב שבו הגנוטיפ של הסמן לא מתאים לפנוטיפ של התכונה. ניתן לראות כי ברוב הקווים יש התאמה בין הסמן לתכונה.

בהמשך, נערך ניסוי בתנאי שדה לבחינת ההשערה כי מוטנט EMS פגוע בגן *TFL1-like* הוא בכיר מחנוך באופן מובהק. ניסוי השדה נערך בחלקה מסחרית "קרני" בגד"ש חלוצה. תאריך זריעה: 6.4.21. זנים: חנוך, B78 ("מוטנט"). תבנית הניסוי: בלוקים באקראי עם חמש חזרות. בכל חזרה X זן נזרעו חלקות של 8 מטר ערוגה בעומד מסחרי (שלוש שורות עם 5 צמחים למטר). מבחן הבשלה נערך בחמישה תאריכים: 12.8, 17.8, 24.8, 29.8 ו-9.9. ערך הבשלה לפי שיטת גירוד תרמילים. עקומות התקדמות הבשלת הזנים חנוך ו B78 לאורך עונת הגידול מובאים באיור 6.



איור 6. רמת ההבשלה (אחוזים) של הזן חנוך ו B78 בחמישה תאריכים. קרני, חלוצה 2021. כוכבית מציינת הבדל מובהק סטטיסטית בין שני הזנים ($p \leq 0.05$).

נמצא הבדל ברמת ההבשלה בין שני הזנים כבר במועד הראשון, אם כי ההבדל לא היה מובהק סטטיסטית. הבדל זה נשמר לאורך כל תקופת הגידול, ואף בשני מועדי הבדיקה האחרונים הוא היה מובהק סטטיסטית. בתאריך האחרון (כשלושה ימים לפני העקירה) ההבדל עמד על כ- 15% הבשלה. למעשה, הזן B78 כבר היה מוכן לעקירה ב- 29 לאוגוסט, כעשרה ימים לפני מה שהיה בפועל בחלקה המסחרית. יש לציין שההבדל הזה איננו מסביר באופן מלא את ההבדלים בין טיפוס וירג'יניה וטיפוסים *fastigiata* ברמת ההבשלה (40-30 יום).

דין ומסקנות

מועד ההבשלה (או רמת הבכירות) הוא אחד התכונות האופייניות והחשובות ביותר באגוא"ד. תיאור של זן רשום יתחיל כמעט תמיד עם הגדרת רמת הבכירות שלו (כגון "בכיר", "בכיר למחצה" או "אפיל"). וזאת לא בכדי - תכונה זו היא בעלת חשיבות מכרעת לאדפטציה וליבול. אולם, על אף חשיבותה הרבה, יש מעט מאוד דיווחים על עבודות באגוא"ד שמנסות לתאר את הרכיבים הגנטיים או המולקולריים שמבקרים תכונה זו. זאת בניגוד לקטניות אחרות, שבהן הבקרה על מועד ההבשלה נחקרה רבות ונמצאה קשורה בגנים המבקרים תגובה לאורך היום או את המעבר משיח בעל דגם פריחה בלתי-מסיים למסיים [17].

ישנם ארבעה גורמים עיקריים העלולים להקשות בזיהוי גורמים גנטיים-מולקולריים הקשורים לרמת הבכירות באגוא"ד: 1. ניטור לקוי של תכונת רמת ההבשלה עקב הקושי היחסי של בחינה שלה בהיקפים גדולים. 2. התמקדות בלעדית בערכי הבשלות כנתון היחיד, תוך התעלמות מתכונות נוספות המשפיעות באופן ישיר או עקיף על רמת הבכירות. 3. שימוש ברקע גנטי בודד לאנליזה ובאוקלוסייה קיצונית מדיי מבחינת מועד ההבשלה. 4. העדר שונות גנטית, מה שמביא לשימוש במספר נמוך מדיי של סמנים ויצירת מפות לא רוויות.

בעבודה זו הצענו להתמודד עם אתגרים אלה באמצעות. 1. נערך פנוטיפינג של תכונת רמת ההבשלה בהיקף נרחב ביותר. בסך נערכו כ- 8300 דגימות של אינדקס הבשלה במשך ארבע השנים של הפרויקט. מדובר בפרויקט לוגיסטי גדול, הכולל איסוף בשדה באמצעות עשרות פועלים, ובדיקת הבשלה עם שתי עמדות מדידה עם מכונות לחץ מים לקילוף קליפה חיצונית, מיון וספירה, שעבדו בכל שנה במשך חודשים. למיטב ידיעתנו מאמץ בהיקף כזה לא דווח בעבר באגוא"ד. 2. "מודולציה" של תכונת רמת הבכירות באגוא"ד: ההיפותזה המנחה הייתה כי בנוסף למדידה הישירה של רמת הבשלות במועד מסוים, ניתן גם לפצלה על ידי התייחסות לתכונות חלקיות או תכונות מודול, אשר הן קלות יותר למדידה ויכולות להיאמד תוך שימוש באוקלוסייה גנטית מתאימה. 3. שימוש בסט מגוון של חמש אוקלוסיות מיפוי עם רקע גנטי שונה. 4. שימוש בשבב DNA של אגוא"ד שתוכנן ופותח באמצעות שימוש בנתוני רצף גנומי של רוב ההורים של אוקלוסיות ה- RIL שבפרויקט.

המיפוי הגנטי הביא למספר לא גדול של אזורים המבקרים את אינדקס ההבשלה MI (17 בסך הכול). כמו כן, ברוב האוקלוסיות הם אינם מסבירים בצורה מלאה את השונות הפנוטיפית (מקדמי ההסבר נעו בין 3.3-5.3). אולם, אם ניקח בחשבון את העובדה שרמת התורשתיות הייתה בינונית (0.43-0.63), אזי אחוז ההסבר בפועל הוא יותר גבוה. אגב, אומדני תורשתיות דומים נמצאו בעבודות גנטיות אחרות באגוא"ד [1,2], מה שמראה כי הפנוטיפ של אינדקס ההבשלה מורכב כמחציתו מהשפעות סביבה (או שגיאה ניסויית) וחצי מבקרה גנטית. כמו כן, ראוי לציין שעל אף רמת התורשתיות הבינונית, שמונה מתוך ה QTLs בניסוי חזרו בסביבות שונות. הדבר מראה על יציבות ה- QTLs הנ"ל והפוטנציאל לשלב אותם בתכניות טיפוח.

באופן עקרוני, רוב ה QTLs שבניסוי היו ספציפיים לאוקלוסיות שבהן הם אותרו. כלומר, לרקע הגנטי יש השפעה גדולה על הבקרה הגנטית. שני זוגות של QTLs, אולם, נמצאו זהים בשתי אוקלוסיות שונות. זוג אחד על כרומוזום A04 (לאוקלוסיות HH ו RR), והשני על כרומוזום B02 (לאוקלוסיות CC ו PH). ראוי לציין שבשני הזוגות של אוקלוסיות אלה ההורה הבכיר הוא זהה (הררי ב HH ו- RR) או מאוד קרוב (ולנסיה ו periviana

ב CC ו PH, בהתאמה). מתוך כל הלוקוסים לרמת הבשלה שנמצאו בניסוי זה, רק אחד (qMICCA10) נמצא בקרבת לוקוס שדווח בעבר כמובהק עבור רמת הבכירות [11], אם כי המיקום המדויק של אותו QTL לא ברור בגלל מפה לא רוויה שהחוקרים השתמשו בה למיפוי. דבר זה מדגיש שוב את חשיבות הרקע הגנטי באיתור סמנים לטיפוח, ובחירה נכונה של הסמנים לפי רקע גנטי זה.

בשתי האוכלוסיות שבהן נבדק אינדקס הקציר (CC ו HH) נמצא מתאם חיובי מובהק בינו לבין אינדקס ההבשלה. אומנם המתאמים היו בינוניים (0.33 ו 0.48, בהתאמה), אך עדיין, אינדקס הקציר באופן כללי עשוי להסביר כשליש עד חצי מסך השונות של אינדקס ההבשלה. יחס גבוה של יבול תרמילים לעלווה (אינדקס הקציר) מרמז על יחס מבלע/מקור גבוה בצמח. דבר זה בהחלט עשוי להוות גורם לקצב הבשלה גבוה, בעיקר בטיפוסי וירג'יניה (כמו חנוך והררי) שהם ארוכי תקופת-גידול במהותם. ולכן, לא היה מפתיע לגלות כי באוכלוסייה HH שלושה מתוך אבעת ה-QTLs לאינדקס הקציר מופו לאותו מיקום של ה-QTLs לרמת ההבשלה. ההנחה היא שלאינדקס הקציר יש השפעה חשובה בקביעת רמת הבכירות של אגוזי-אדמה. באוכלוסייה HH אינדקס הקציר עצמו נובע מיבול תרמילים גבוה (נתוני יבול מובאים בדוחות השנתיים). מכאן, שטיפוח לבכירות גבוהה יותר ברקע הגנטי הזה יכולה להיות ללא צורך בהתפשרות על יבול תרמילים. ולכן, סמני DNA שמכילים אזורי בקרה לשניהם רצויים בתכניות טיפוח נעזרות בסמנים.

בניגוד לאוכלוסייה HH, באוכלוסיית CC אינדקס ההבשלה נובע ככל הנראה מדגם הפריחה. דגם פריחה רציף מביא ליותר פרחים ופחות ענפים במוצע לצמח. ולכן, בהחלט ייתכן כי שימוש ברקע גנטי זה עלול להביא לירידה ביבול. לצערנו בניסוי ההבשלה עם B78 המוטנט (איור 6), הייתה בעיית נביטה של הזרעים (עקב אכסון ממושך של אוכלוסייה המוטנטים), ולכן לא ניתן היה לבדוק יבולים. ולכן, יש צורך להמשיך ולבחון את דגם הפריחה הרציפה בתנאי שדה מסחריים ולמשך כמה עונות על מנת לוודא האם לא קיימת פגיעה ביבול התרמילים.

צורת הצימוח משפיעה על רמת ההבשלה, אבל לא באותה צורה בכל הרקעים הגנטיים שבהם היא נבדקה. למשל, ב-HH ההורה האפיל והמשתרע (חנוך) הוא זה שתרם את הבכירות (אפקט אדטיבי שלילי), ואילו באוכלוסייה RR ההורה הבכיר והשיחי (הררי) הוא זה שתרם את הבכירות (אפקט אדטיבי חיובי). זה אומר שטיפוח לקו יותר בכיר על רקע הזן חנוך (בעל תרמיל גדול) עשוי דווקא להגיע מצמחים משתרעים. מאידך, באוכלוסיות טיפוח שבהן הזן האפיל הוא GK7-OL יש לכוון יותר לצמחים שיחיים. כמו כן, יש לציין שהשפעה היא לא יציבה. באוכלוסיית HH בשנת 2019 היא הייתה יותר חזקה מאשר ב-2018, וכתוצאה מכך גם נמצא QTL אחד המבקר את שתיהן רק ב-2019. לצורת הצימוח הייתה גם השפעה על רמת הבכירות באוכלוסייה CC, אם כי השפעה זו לא היתה מספיק מובהקת לקביעת QTL ל MI בלוקוס זה. ההשפעה היא אדטיבית חיובית, כלומר, לוקוס של צורת צימוח שיחית או זקופה מעודדת הבשלה על רקע של CC.

בידוד הגן לצורת הצימוח מהווה דוגמה לאיתור תכונת "מודול" פשוטה שעשויה לבקר בצורה עקיפה את רמת הבכירות באגוזי אדמה. גילוי השפעת הגן MADS על צורת הצימוח מהווה תגלית עם אימפקט גבוה מאוד, מכיוון שלא דווח בעבר על השפעה של גן זה על זווית צימוח של ענפים צדדיים בצמחים בכלל. אחת השאלות היא מניין הגיעה תכונת צורת הצימוח השיחית (האלל הרצסיבי) לתוך החומר הגנטי הישראלי? סקירה

היסטורית של הזנים בישראל מראה כי מקורו של הזן השיחי 'הררי' הוא מהכלאה שנערכה הזן המשתרע 'חנוך' לבין זן השיחי 'הילה'. מקורו של 'הילה' הוא בהכלאה אחרת שנערכה בתחילת שנות השמונים בין הזן 'שולמית' השיחי 'שולמית' לבין קו משתרע (113). הזן שולמית נוצר על ידי סלקציות בדור F2 של הכלאה בין זן משתרע מטיפוס runner (פלוראנר) ובין זן בעל צורת צימוח "זקופה" מטיפוס ספרדי. כלומר, המקור לתכונה זו הוא מהטיפוס הספרדי. הדבר מסביר מדוע אותו לוקוס בדיוק נמצא בעבודה הנוכחית עבור צורת הצימוח באוכלוסיית CC (שמקורה בזן "קונגו" מטיפוס ספרדי), כמו גם בדיווחים אחרים שבהם שימשו הכלאות דומות עם טיפוסים ספרדיים [11, 18], ונמצא QTL עם השפעה חלקית בדיוק באותו האתר כמו הגן לצורת הצימוח בעבודה זו.

באוכלוסיות PH ו CC, נמצאה השפעה מובהקת של דגם הפריחה על רמת ההבשלה. דגם פריחה רציף אופייני לזנים בכירים מטיפוס *fastigiata*. זאת לעומת זנים מטיפוס *hypogaea* שבהם הפריחה אלטרנטיבית. אותו הדבר לגבי רמת העינוף. איתור גן מועמד שמבקר תכונה זו מהווה אבן-דרך חשובה בפרויקט הנוכחי, מכיוון שככל הנראה דגם הפריחה משפיעה על דרך קצב הפריחה ואינדקס הקציר (שניהם מופו לאותו לוקוס עם דגם הפריחה). חשוב להדגיש, שלמרות חשיבותה של תכונת דגם הפריחה באגוא"ד, באופן מפתיע אין מידע בספרות שמתאר את הבקרה הגנטית שלה. בעבודה זו למעשה הפעם הראשונה שמדווח כי היא מבוקרת על ידי גן יחיד. ככל הנראה הרקע הגנטי הייחודי של הזן חנוך (שקיים ברקע הגנטי שלו גם מעט *fastigiata*) הוא שהביא לתגלית. אכן, ניתוח ראשוני הראה כי לחנוך בגנום A2 ההומולוגי יש מוטציית חסר (תוצאות לא מובאות). ההומולוג הקרוב ביותר לגן *TFL1* מאגוא"ד הוא בסויה, שבה הוא נמצא הגורם המרכזי שמבקר את זני הסויה המסיימים [19], מה שמחזק את ההשערה שהוא המבקר את דגם הפריחה באגוא"ד. התאחיזה ההדוקה בין הסמנים לתכונה באוסף העולמי מעידה כי לסלקציה בלוקוס זה הייתה חשיבות בהתפתחות ההיסטורית של טיפוס *fastigiata* בכירים מטיפוס *hypogaea*, ועשויה להוות אחד הגורמים החשובים באבולוציה של אגוא"ד בתנאי תרבות. אנו רואים בממצא זה בעל פוטנציאל עם אימפקט מדעי גבוה, וממשיכים בשלב זה בהוכחת הבקרה של הגן *TFL1* על דגם הפריחה באמצעות ניסויי טרנספורמציה באגוא"ד.

מסקנות והמלצות:

1. לרקע הגנטי יש השפעה מכרעת בבחירה של סמנים גנטיים לטיפוח זנים בכירים.
2. בבחירת סמנים לטיפוח זנים בכירים יש להתרכז בסמנים שהיו יציבים במספר סביבות/שנים.
3. למשקל התרמיל יכולה השפעה על רמת הבכירות (תלוי ברקע הגנטי), ולכן יש להתחשב בזה בהשבחה לזנים בכירים.
4. יש להמשיך וללמוד את הגנים *MADS* ו-*TFL1* בשימוש של ניסויי טרנספורמציה באגוא"ד לשם הוכחה סופית על מעורבותם בצורת הצימוח ודגם הפריחה, בהתאמה.
5. יש לוודא השפעת QTLs ספציפיים באמצעות בידודם על אותו רקע גנטי באמצעות יצירת קווים כמעט איזוגנים באמצעות הכלאות מחזירות.

6. שילוב של מספר QTLs עשוי להיות הכרחי על מנת להשיג רמת בכירות גבוהה על רקע הזן חנוך באמצעות שימוש בסמנים גנטיים.

ספרות מצוטטת

1. Ali N, Wynne JC (1994) Heritability estimates and correlation studies of early maturity and other agronomic traits in two crosses of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). Pak J Bot, 26: 75-82.
2. Chiow HY, Wynne JC (1983) Heritabilities and genetic correlations for yield and quality traits of advanced generations in a cross of peanut. Peanut Sci 10: 13-17.
3. Pattee HE, Singleton JA, Sanders TH (1974) Composition changes of peanut fruit parts during maturation. Peanut Sci 1: 57-62.
4. Rowland DL, Sorensen RB, Butts CL, Faircloth WH (2006) Determination of maturity and degree day indices and their success in predicting peanut maturity. Peanut Sci 33: 125-136.
5. Williams EJ, Sanders DJ (1981) A non-destructive method for determining peanut pod maturity. Peanut Sci 8: 134-141.
6. Weller JL, Ortega R (2015) Genetic control of flowering time in legumes. Front Plant Sci, 6.
7. Bagnall DJ, King RW (1991) Response of peanut (*Arachis hypogaea*) to temperature, photoperiod and irradiance 2. Effect on peg and pod development. *Field Crop Res* 26: 279-293.
8. Reddy PR (1988) Physiology (ed. Reddy, P.R.) Groundnut, 77-119 (Indian Council of Agricultural Research).
9. Selvaraj MG *et al.* (2009) Identification of QTLs for pod and kernel traits in cultivated peanut by bulked segregant analysis. *Electron J Biotechnol* 12: 3-4.
10. Chirinos FV, Isleib TG, Milla-Lewis SR (2011) Breeding for early maturity in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using traditional methods and marker assisted selection (MAS). PhD thesis, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
11. Fonceka, D. *et al.* (2012) Fostered and left behind alleles in peanut: interspecific QTL mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. *BMC Plant Biol* 12: 26.
12. Pandey MK, Agarwal G, Kale SM, Clevenger J, Nayak SN, Sriswathi M, Varshney RK (2017). Development and evaluation of a high density genotyping 'Axiom_Arachis' array with 58 K SNPs for accelerating genetics and breeding in groundnut. *Sci Rep* 7: 40577.
13. Patil AS, Popovsky S, Levy Y, Chu Y, Clevenger J, Ozias-Akins P, Hovav R. (2018). Genetic insight and mapping of the pod constriction trait in virginia-type peanut. *BMC Genet* 19: 9.

14. Shirasawa K, Bertoli DJ, Varshney RK, Moretzsohn MC, Leal-Bertoli SC, Thudi M, Pandey MK, Rami JF, Foncéka D, Gowda MV, Qin H, Guo B, Hong Y, Liang X, Hirakawa H, Tabata S, Isobe S (2013). Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes. *DNA Res* 20: 173-84.
15. Kayam G, Brand Y, Doron-faigenboim A, Patil A, Hedvat I, Hovav R (2017) Fine-mapping the branching habit trait in cultivated peanut by combining Bulk Segregant Analysis and high-throughput sequencing. *Front Plant Sci* 8: 467.
16. Fraiman-Meir D, Hedvat I, Shem-Tov Y, Hovav, R (2017) Identification and characterization of new genetic source for pod wart resistance in peanut (*Arachis hypogaea*). *Crop Sci* 57: 617–625.
17. Benlloch R, Berbel A, Ali L, Gohari G, Millan T, Madueno F (2015) Genetic control of inflorescence architecture in legumes. *Front Plant Sci* 6.
18. Li L, Yang X, Cui S, Meng X, Mu G, Hou M, He M, Zhang H, Liu L, Chen Y (2019) Construction of high-density genetic map and mapping quantitative trait loci for growth habit-related traits of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Front Plant Sci* 10.
19. Liu B, Watanabe S, Uchiyama T, Kong F, Kanazawa A, Xia Z, et al. (2010) The soybean stem growth habit gene *Dt1* Is an ortholog of *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1. *Plant Physiol* 153: 198-210.

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

- Kunta S, Agmon S, Hedvat I, Levy Y, Chu Y, Ozias-Akins P, Hovav R (2021) Identification of consistent QTL for time to maturation in Virginia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology* 21:186.
- Kunta S, Chu Y, Levy Y, Harel A, Abbo S, Ozias-Akins P, Hovav R (2022) Identification of a major locus for flowering pattern sheds light on plant architecture diversification in cultivated peanut. *Theor Appl Genet* (In press).
- Kunta S, Parimi P, Levy Y, Kottakota C, Hedvat I, Hovav R (2022) A first insight into the genetics of maturity trait in Virginia X Runner types peanut background. *Crop Sci* (in review).