

ניתוח גנטי של תכונות עמידות לגרב יבללת ומאפייני תרמיל נוספים באגוזי-אדמה

Genetic analysis of pod wart resistance and additional pod related traits in peanut

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

רן חובב – גנטיקה והשבחה של אגוזי-אדמה, מינהל המחקר החקלאי

Ran Hovav, Department of Agronomy and Natural Resources, Institute of Plant Sciences, Volcani Center, Bet Dagan, 50250. E.mail: ranh@agri.gov.il

תקציר:

1. **הצגת הבעיה:** מחלת גרב היבללת (להלן "גרב") היא אחד הגורמים המצרים את התפתחות ענף אגוזי-האדמה (אגא"ד) לייצוא בקליפה. נכון להיום אין טיפול יעיל לנגע זה המתרבה בקרקעות הנגב המערבי ומהווה איום על הענף.
2. **מטרות המחקר:** הבנת המנגנון הגנטי המבקר את תכונות העמידות לגרב והקשר הגנטי שלה לתכונות תרמיל אחרות באגא"ד. מטרה נוספת היא איתור אזורים גנומיים שאחוזים לעמידות ולמאפייני תרמיל אחרים.
3. **שיטות העבודה:** המחקר מתבסס על מידע שנאסף לאורך שני עונות גידול בתנאי שדה משתי אוכלוסיות גנטיות מתפצלות, תוצרי ההכלאה בין הזן חנוך לבין שני קווים בעלי סבילות גבוהה לגרב. רמת הנגיעות הממוצעת נבדקה על ידי שיעור התרמילים הנגועים. בנוסף נאמדו תכונות אחרות בעלות חשיבות חקלאית ושיווקית. אומדני תורשתיות ומתאמים גנטיים חושבו על מנת לחזות את יעילות הסלקציות לעמידות ובכדי לעצב אסטרטגיית טיפוח. בדור F_2 התבצעה דגימת DNA לצורך האנליזה הגנוטיפית. תהליך הזיהוי והאפליקציה של סמני SNP באוכלוסיות המתפצלות נערך באמצעות טכנולוגיית GBS.
4. **תוצאות:** נמצאה שונות פנוטיפית גבוהה מאוד במבנה הצמחים והתרמילים. רמת הנגיעות בגרב התפלגה באופן אחיד אך נצפתה הטיה של ההתפלגות לערכים הנמוכים של רמת נגיעות. נמצאה דומיננטיות חזקה מאוד של תכונות שליליות שמקורן מההורים התורמים כגון צבע הטסטה, רמת החספוס, רמת המילוי ומשקל זרע. התורשתיות של רמת הנגיעות נמצאה בערכים בינוניים. נמצא מתאם חיובי בין רמת הנגיעות לבין משקל ואורך התרמיל. כמו כן נמצאו מתאמים מובהקים בין התכונות השונות, דבר שיש לקחת בחשבון בסלקציות. לגבי מיפוי התכונות, לאחר הריצוף, המיון והסינון התקבלו 5,659 סמני SNP בגנום A, ו-3,156 בגנום B. המיפוי העלה סמני SNP מובהקים עבור תכונות צבע הטסטה (שמבוקרת על ידי גן בודד) ומספר הזרעים בתרמיל, עם ערכי R^2 של 0.41 ו-0.28 בהתאמה. לתכונות העמידות לגרב נמצא סמן בכרומוזום 7 אך בעל השפעה יחסית נמוכה ($R^2=0.18$).

5. מסקנות: ברמה הטיפוחית, יש לפעול בכמה אלטרנטיבות: 1. מכיוון שהתכונות השליליות של ההורים התורמים הן מאוד דומיננטיות, יש לעשות הכלאה מחזירה אחת ומיד לאחריה "לפתוח" את האוכלוסיות המתפצלות לטיפוח. 2. לגדל אוכלוסיות גדולות בכדי למצוא שילובים נדירים של התכונות. 3. מכיוון שהתורשתיות היא בינונית-נמוכה, מומלץ לדחות את הסלקציות לגרב לדורות יותר מתקדמים בטיפוח. ברמת הסמנים מומלץ: 1. להגדיל את הכיסוי על ידי הורדת מספר הצאצאים בריצוף בודד. 2. ביצוע של GBS על דורות מתקדמים (RILs) שהן אוכלוסיות יותר יציבות והומוזיגוטיות. 3. לשקול אימוץ שיטות מיפוי נוספות כגון Bulk Segregant Analysis, סמנים פולימורפיים ו - SNP Array.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר:



תאריך: 21.2.2016

תוכן עניינים:

3	1. מבוא
3	2. מטרות המחקר
4-6	3. שיטות וחומרים
6-17	4. פירוט עיקרי הניסויים
18-20	5. דיון
21	6. ספרות מצוטטת

1. מבוא

אחת המחלות המצרות את התפתחות ענף אגוזי-האדמה (אגא"ד) הינה נגע הגרב או היבללת. הגרב הינה מחלה חדשה יחסית, אשר תוארה לראשונה בישראל בשנת 1988 [1]. היא מאופיינת על ידי יבלות כהות ומכוערות המופיעות על גבי התרמילים הפוסלות אותם לשיווק. ההנחה הבסיסית היא כי מקורו של הגרב הוא בחיידקי סטרפטומיצטים (*Streptomyces*) הנישאים ומוחדרים לשדות על גבי פקעות תפוחי-אדמה (תפו"א) המשמשות כחומר ריבוי [1]. סטרפטומיצט זה שורד בקרקע למשך תקופה ארוכה (כ- 15 שנים) ועלול להתפרץ בצורה חמורה ובלתי צפויה בשדות שלפני כן לא נצפה בהם אף סימפטום. ישנם מספר טיפולים קיימים המרסנים את מחלת הגרב באגא"ד בתנאי שדה. גרינשטיין [2] הראה כי חשיפת תרמילים ללהבת butane/air ב 740 מעלות צלזיוס לפני הזריעה מפחיתה את כמות הגרב בקרקע. עיקור קרקע עם פורמלדהיד הוא טיפול מסחרי הנמצא בשימוש רחב, למרות שהוא יקר ולעתים לא יעיל בשל פירוק מואץ של החומר על ידי מיקרואורגניזמים בקרקע. לאחרונה, גופטה וחובריו [3] הראו כי השקיה עודפת במהלך העונה יכולה להפחית את השכיחות של המחלה ב -33%. שיטות בקרה אחרות כוללות מחזור זרעים, שימוש בזבל אורגני, ועיקור פקעות תפו"א.

עמידות גנטית לגרב עשויה להיות פתרון בר-קיימא נוסף. בתפו"א למשל, פותחה עמידות גנטית לגרב על ידי בידוד תאים סומטים עם thaxtomin A [4], בנוסף לעמידות שדה שנתגלתה בזנים מסוימים [5] [6]. אולם, כל זני אגא"ד בישראל רגישים מאוד לגרב, ובניגוד לתפו"א עדיין לא דווח על עמידות שדה למחלה. בעבודה קודמת נבדק אוסף עולמי של אגא"ד ונמצאו קוים בעלי פוטנציאל טיפוחי בעלי סבילות גבוהה לגרב (קו IGC111, וקו IGC53) שמקורם בפרו (*A. hypogaea* spp. *fastigiata* var. *peruviana* and *A. hypogaea* spp. *hypogaea* var. *hirsuta*). אלו הם טיפוסים "עתיקים" (landraces) אשר נתוני התרמיל שלהם, כגון מבנה תרמיל ייחודי, קליפה גסה, צבע תרמיל כהה ויבול נמוך שונים מאוד מהזנים המקובלים, ולכן אינם עומדים בדרישות הקשיחות של השוק בקליפה. ולכן, על אף הפוטנציאל הגלום במקור גנטי זה, טיפוח זנים עמידים או סבילים למחלה באמצעות קווים אלה הינו פתרון ארוך ומאתגר המצריך כלים גנטיים מתקדמים.

2. מטרות המחקר

מטרת המחקר העיקרית היא הבנת הבסיס הגנטי של תכונת העמידות לגרב ושל מספר תכונות נוספות באגא"ד בעלות חשיבות חקלאית.

מטרות משנה:

1. זיהוי וניתוח הקשר הגנטי שבין תכונת העמידות לגרב לבין מאפייני תרמיל אחרים בעלי חשיבות כלכלית וטיפוחית וזאת על מנת לחזות את יעילות הסלקציה לעמידות.
2. פיתוח סמני SNP באמצעות שיטות GBS ו Next Generation Sequencing.
3. זיהוי מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת העמידות לגרב ומאפייני תרמיל אחרים כעזר לסלקציה וכתשתית מדעית לגילוי עתידי של גנים בעלי חשיבות להתפתחות הקליפה ועמידות למחלה.

3. שיטות וחומרים

חומר צמחי ומערכי הניסוי. המחקר מתבסס על מידע שנאסף לאורך שתי עונות גידול בתנאי שדה מסחרי משתי אוכלוסיות גנטיות מתפצלות, תוצרי ההכלאה בין הזן חנוך לבין שני קווים בעלי עמידות שדה לגרב. בשנה הראשונה, שנת 2013, נזרעו שלוש חלקות ניסוי על קרקעות בעלות היסטוריה של נגיעות בגרב, מכיוון שלא ניתן לחזות את רמת הנגיעות בקרקע. החלקות מהוות חזרות ביולוגיות:

א. ניר עוז 14 מע' (נזרעה ב- 8.4.13).

ב. מגן מזרח א'. (נזרעה ב- 12.4.13).

ג. ש.כ.ן 1412 (נזרעה ב- 13.4.13).

שלושת החלקות בגודל של כ- 1 דונם כל אחת. בכל חלקה נזרעו כ- 800 פרטי F_2 תוצרי ההכלאה בין הזן חנוך לבין שני הקווים בעלי עמידות שדה לגרב. בנוסף נזרעו בשדה ההורים חנוך, ICG111 (להלן 111), IGC53 (להלן 53) ומכלואי ה- F_1 כביקורות ולצורך חישוב אומדני תורשתיות. הצמחים נזרעו בשתי שורות על ערוגה וברוח של 40 ס"מ בין צמחים בשורה. בסוף העונה נבחרה החלקה בה היה אחוז הנגיעות הגבוה ביותר, ועליה נערכו הניתוחים הפנוטיפים והגנוטיפים. היא גם היוותה את המקור לדור F_3 . במהלך העונה נערכה סריקה פנוטיפית ראשונית של האוכלוסיות המתפצלות למאפיינים ווגטטיביים כגון צורת צימוח (זקוף, שיחי או משתרע) צורת עלה (רגיל או מעוגל), ותבנית פריחה (רציף או מתחלף).

בשנה השנייה (קיץ 2014) גודל דור משפחות ה- F_3 . נבחרו באקראי 188 צמחי F_2 ומכל צמח נלקחו עשרה זרעים שהיו משפחה. המשפחות גודלו בשתי חזרות ובשני בלוקים, על מנת לנטרל כמה שאפשר את השפעת הסביבה. בסך כל גודלו 2×188 משפחות F_3 מכל אחת משתי האוכלוסיות (חנוך 53×111). בכל חלקה לצד משפחות ה- F_3 גודלו גם ההורים כביקורת. בסך הכל כ- 400 משפחות F_3 תוצרי ההכלאה נזרעו ידנית ב- 15.4.14 בחלקה ייעודית במו"פ דרום עם היסטוריה של נגיעות גבוהה בגרב. החלקה נאספה באוקטובר 2014.

בדיקות ומדידות. בסוף עונת הגידול הראשונה נאספו כל התרמילים מכל צמח לשקית נפרדת ונערכו בדיקות פנוטיפיות של מספר תכונות על כל צמח בנפרד. רמת הנגיעות הממוצעת נבדקה על ידי שיעור התרמילים הנגועים וחומריתה חושבה על פי סולם נגיעות, כדלקמן: אחוז התרמילים נקיים (A), אחוז התרמילים הנגועים ברמה מספר 1 (B) – הופעה של יבלת אחת אשר אינה פוסלת את התרמיל לייצוא) ואחוז התרמילים הנגועים ברמה 2-3 (C) – פוסלת את התרמיל לייצוא). מהם חושבה רמת הנגיעות הכללית (%) על פי הנוסחה הבאה: $(A+B+C) / (B \times 1 + C \times 2)$, בכדי לתת משקל יתר לתרמילים הפסולים לייצוא. מלבד זאת נמדדו תכונות "רפרודוקטיביות" בעלות חשיבות חקלאית כגון, משקל תרמילים ברוטו לצמח (ג'), משקל תרמילים נטו לצמח (ג''), שיעור תרמילים נקיים, אורך תרמיל ממוצע (ס"מ), מספר גרעינים ממוצע בתרמיל, אחוז ראש מצומק, משקל גרעין ממוצע (ג'), שיעור הגרעין (יחס בין משקל הזרע לבין משקל התרמיל), צבע הטסטה (1- לבן, 2- חום, 3- ורוד, 4- אדום, 5- סגול, 6- סגול כהה) [7], רמת החספוס של התרמיל (1 – מאוד חלק, 2 – חלק, 3 – מחוספס, 4 – מאוד מחוספס), ורמת השינוף (1-4). בסוף עונת הגידול השנייה נאספו כל התרמילים מכל משפחה לשקית נפרדת. אותן תכונות שנמדדו בדור F_2 נבדקו גם בדור F_3 .

ניתוחים סטטיסטיים. אומדן התורשתיות במובן הרחב (h^2_b) חושבה באמצעות מרכיבי השונות של ההורים, של צמחי F1 ו-F2. מתאמים גנטיים בין רמת הנגיעות לגרב ובין התכונות האחרות חושבו באמצעות פונקציה Fit Y by X של תוכנת JMP (SAS, Carry, NC, USA), על מנת לחזות את יעילות הסלקציות לעמידות לגרב ובכדי לעצב אסטרטגיית טיפוח [8]. בשנה השניה אומדני תורשתיות במובן היותר צר ($h^2_{n/b}$) התקבלו מהיחס בין 2 הדורות העוקבים המתפצלים גנטית, משונות משותפת בין צמחי F2 וממוצעי צאצאיהם ב F3, מהגרסיה של ממוצעי הצאצאים על ערכי הוריהם באמצעות פונקציה Fit Y by X של תוכנת JMP.

הפקות דנ"א. בדור F2 התבצעה דגימת DNA לצורך האנליזה הגנוטיפית. מכל צמח נלקחה דגימת עלה בשלבי הגידול הראשונים (0.5 גרם רקמה לאחר שישים יום מזריעה) והם נשמרו בהקפאה עמוקה. הפקת DNA נעשתה על ידי שימוש בקיט של חברת SIGMA Aldrich Life Science. בדיקת ריכוז סופי של ה DNA שהתקבל נעשתה במכשיר NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) ובמכשיר Qubit (Life Technologies).

פיתוח פרוטוקול GBS לאגוזי אדמה ויישומו בתכנית המחקר. תהליך הזיהוי והאפליקציה של סמני SNP באוכלוסיות המתפצלות נערך באמצעות טכנולוגיית GBS-genotyping by sequencing לפי פרוטוקול שפותח במקור עבור חיטה [9] עם התאמות ספציפיות למערכת של המחקר הנוכחי. בשיטת GBS מפשטים את גודל ומורכבות הגנום על ידי חיתוך ה DNA הגנומי של ההורים ושל הצאצאים באמצעות אנזים או שני אנזימי חיתוך שונים, ועל ידי כך מקבלים מקבץ מקטעים המהווים ייצוג של הגנום על פני מספר רב של פרטים. בעבודה זו נערכה בדיקה ראשונית של היתכנות GBS באג"ד. לשם כך נדגמו באקראי 94 צמחי F2 מתוך אוכלוסיית המיפוי. מתוך כל צמח נדגם DNA כפי שתואר לעיל. בנוסף, DNA הופק משני ההורים כביקורת. הספריות נבנו פעמיים 1. באופן עצמאי במעבדה. 2. שירות GBS של אוניברסיטת קורנל.

1. בבניית הספריות בפעם הראשונה נעשה שימוש בשני אנזימי חיתוך [10], אחד cutter 6, *PstI* (CTGCAG) חותך אתר נדיר ואנזים שני שהינו 4 cutter, *MspI* (CCGG) חותך אתר שכיח. החיתוך מייצר מקטעים משני סוגים: 1) מקטעים שיש להם אתר חיתוך שכיח בקצה אחד ואתר חיתוך נדיר בקצה השני (*MspI*-*PstI*). 2) מקטעים שיש להם אתר חיתוך שכיח בשני הקצוות (*MspI*-*MspI*). בכל אדפטור קדמי המתחבר לאתר החיתוך היותר נדיר שולב ברקוד ייחודי על מנת שנוכל לזהותו לאחר מכן בשלב הריצוף.

2. באמצעות שירות של אוניברסיטת קורנל: DNA שהתקבל בהפקה השנייה נשלח לריצוף במעבדה ב Genomic Diversity facility, ב Institute of Biotechnology, באוניברסיטת קורנל המתמחה בטכנולוגיית ה GBS ואשר בידיהם ניסיון עם צמחים פוליפלואידים. בפעם הזו הוחלט לבצע GBS רק עם אנזים חיתוך אחד, *ApeKI*, שהינו 5 cutter, על מנת לקבל מקטעים יותר ארוכים מחד, וכיסוי גדול יותר לכל מקטע.

זיהוי הסמנים בהורים (חנוך ו 53) ופיתוחם נעשה באמצעות pipeline ביואינפורמטי שפותח אצלנו במעבדה תוך כדי תמיכה של היחידה לביואינפורמטיקה של מינהל המחקר (בראשות דר'

עדי פייגנבוים). הקריאות נעשו על ידי שימוש בגנום של אגא"ד (peanutbase.com) באמצעות תכנת Bowtie2 עם חמש דרגות חופש של mismatches. סמני SNPs אלו נבדקו על ידי הצאצאים שבהם יש לפחות כיסוי של עשרים קריאות בכדי להבטיח את הזיהוי הנכון של גנוטיפ הסמן בכל צאצא. בזמן ההשוואה לפרטים התכנה מחליטה אם הצמח הומוזיגוט או הטרוזיגוט באתר הנבדק: סימון של 0/0 מצביע על הומוזיגוט וזהה לגנום הייחוס (reference genome), 0/1 או 1/0 מצביע על הטרוזיגוט, 1/1 מצביע על הומוזיגוט השונה מגנום הייחוס.

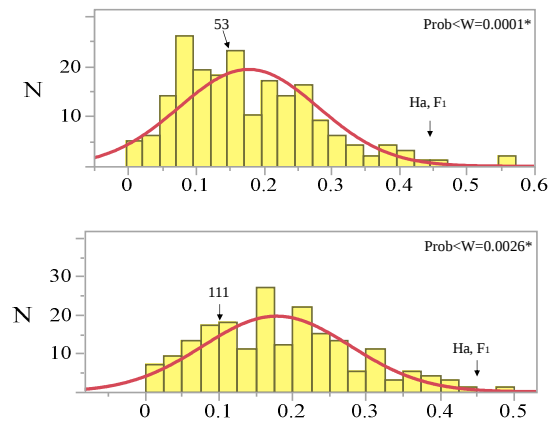
ניתוח QTLs. על קובץ ה VCF הורצה פונקציית ה GLM- General Linear Model, המבצעת ניתוח של association mapping, המאפשר לבדוק קשר הסתברותי בין סמן כלשהו לפנוטיפ. הרצת פונקציית ה GLM מפיקה שני דוחות, האחד טבלת מובהקות של כל סמן ותכונה פנוטיפית (מבחן f) והשני טבלת אומדן ההשפעה של האללים השונים, כלומר התרומה האללית לפנוטיפ מסוים. כאשר מדובר בתכונות כמותיות האוכלוסייה מחולקת לקבוצות על פי האללים ונבחן האם יש הבדל משמעותי בין מופע האללים בקבוצות הפרטים השונות על ידי חישוב ה P -value. מטבלת אומדני האללים הוכנה Manhattan Plot, המציגה את כל הסמנים על פי מיקומם הגנטי (כרומוזום), כאשר כל נקודה הוא סמן. ציר ה- X הינו המיקום הגנטי (קואורדינטות גנומיות) וציר ה- Y הינו ה LOD Score.

4. פירוט עיקרי הניסויים

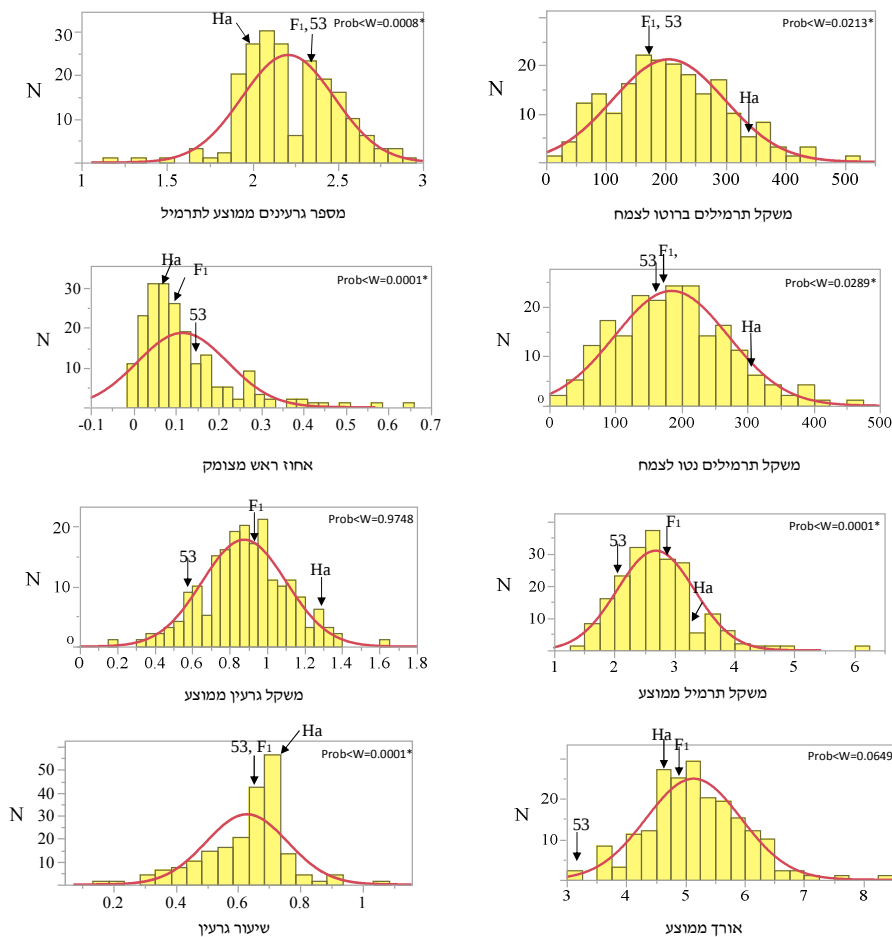
דור ה- F_2 :

התפלגות תכונות בדור F_2 . השונות שקיימת באגא"ד תרבותיים ביחס לעמידות כנגד מחלת הגרב ותכונות נוספות אופיינה ב 204 פרטי דור F_2 מאוכלוסייה 5 (חנוך $\times 53$) ו 197 צמחים מאוכלוסייה 6 (חנוך $\times 111$) בתנאי שדה. כצפוי נמצאה שונות פנוטיפית גבוהה מאוד במבנה הצמחים והתרמילים בדור F_2 . רמת הנגיעות בגרב התפלגה באופן אחיד יחסית עם עקומה נורמלית, עם מינימום של 0% ומקסימום 50% נגיעות (**איור 1**). נצפתה הטיה של ההתפלגות לערכים הנמוכים של נגיעות ושל תכונות נוספות. ממוצע ההורים היה 45% ו- 11% עבור חנוך והטיפוסים העמידים, בהתאמה. רמת הנגיעות הממוצעת של מכלואי ה- F_1 הייתה דומה לזו של ההורה חנוך.

מלבד הנגיעות בגרב נמדדו תכונות נוספות בעלות חשיבות חקלאית כגון משקל תרמילים ברוטו לצמח, משקל תרמילים נטו לצמח, משקל תרמיל ממוצע, אורך תרמיל ממוצע, מספר גרעינים ממוצע בתרמיל, אחוז ראש מצומק, משקל גרעין ממוצע, ושיעור הגרעין. התפלגות תכונות היבול האחרות שנבדקו בדור F_2 באוכלוסייה חנוך $\times 53$ מובאות ב**איור 2**.



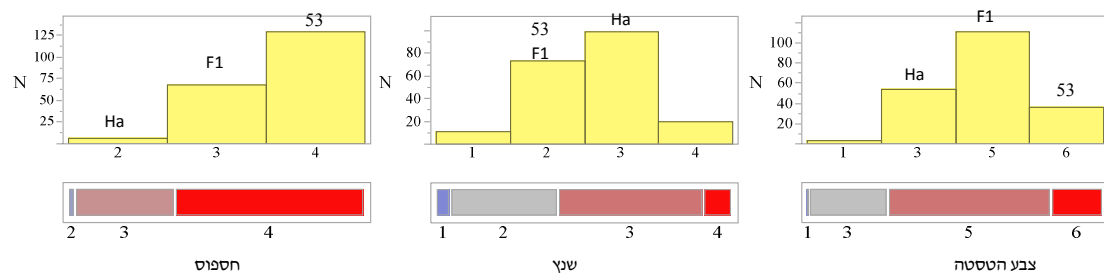
איור 1. התפלגות שיעור הנגיעות בגרב באוכלוסיית F_2 מתפצלת. N = מספר הפרטים. ממוצעי ההורים וצמחי ה- F_1 מסומנים בחצים. למעלה: אוכלוסייה $53 \times$ חנוך. למטה: אוכלוסייה $111 \times$ חנוך. $\text{Prob}(W)$ = מבחן שפירו-וויילק להתפלגות נורמלית.



איור 2. התפלגות של תכונות תרמיל וגרעין שונות באוכלוסיית F_2 חנוך $53 \times$. N = מספר הפרטים. ממוצעי ההורים וצמחי ה- F_1 מסומנים באותיות. Ha = חנוך. $\text{Prob}(W)$ = מבחן שפירו-וויילק להתפלגות נורמלית. אוכלוסיית חנוך $111 \times$ הראתה דגם התפלגות דומה ולא מופיעה כאן.

נמצא כי רוב התכונות מתפלגות בצורה נורמלית מלבד תכונת מספר הגרעינים הממוצע בתרמיל. עוד נמצא עבור תכונת שיעור הגרעין באוכלוסיות אלה יש סטייה חזקה מאוד לכיוון מטה יחסית לממוצעים של ההורים, כך שבחלק גדול מהפרטים (עד כדי רבע) יש שיעור "גרעין" פחות מ-0.5, שנחשב לערך נמוך ביותר עבור שוק אגא"ד המסחרי.

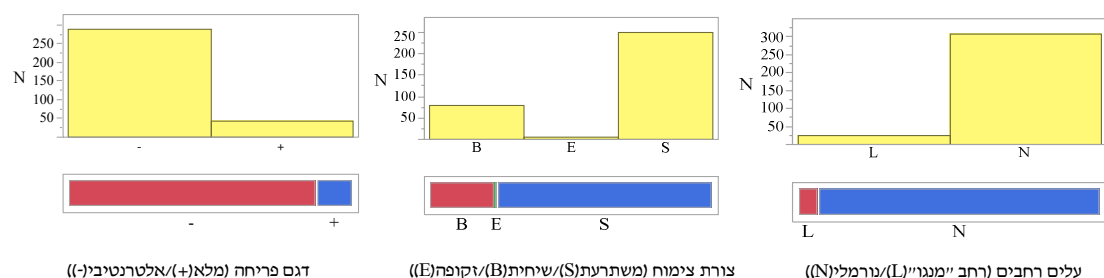
מלבד תכונות אלו נבדקו גם מספר תכונות איכותיות של צבע הטסטה (קליפת הגרעין), מידת החספוס והשינוף (איור 3).



איור 3. התפלגות תכונות תרמיל בדידות באוכלוסיית F_2 חנוך $53 \times N$. מספר הפרטים. צבע הטסטה: 1- לבן, 2- חום, 3- ורוד, 4- אדום, 5- סגול, 6- סגול כהה. רמת החספוס: 1- מאוד חלק, 2- חלק, 3- מחוספס, 4- מאוד מחוספס. רמת השינוף: היא היקף "מותן" התרמיל (ציונים 1-4). מיקום ההורים וצמחי ה- F_1 מסומנים באותיות. אוכלוסיית חנוך $111 \times$ הראתה דגם התפלגות דומה ואיננה מופיעה כאן.

צבע הטסטה הינה תכונה חשובה בשיווק אגא"ד. הצבע הסגול (רמה 5 ו-6) המאפיין את הקווים 111 ו-53 איננו רצוי בשוק. מבחן כי-בריבוע למבחן של יחס 3:1 של ורוד:סגול בהתאמה נותן מובהקות של 0.257, מה שמרמז על בקרה מונוגנית. דומיננטיות חזקה של ההורים ה"אקזוטיים" נמצאה גם ברמת החספוס של התרמיל. מעט מאוד פרטים הם בעלי תרמיל חלק כמו של חנוך. רמת שנף עמוק יחסי (רמה 3) היא תכונה אופיינית לתרמילים של הזן חנוך. ניתן לראות שרמת שנף זו מופיעה באופן תדיר באוכלוסייה ולכן איננה אמורה להוות בעיה בטיפול.

כמו כן תועדו גם מאפיינים ווגטיביים של צורת הצימוח (שיחית (B), משתרעת (S), זקופה (E)) ושל דגם פריחה (מלא (+), אלטרנטיבי (-)). בנוסף סומנו פרטים "מוטנטים" בעלי פנוטיפ ייחודי של עלים מאוד רחבים (כוננו על ידינו "מנגו") אשר לא מופיעים בהורים. התפלגות של מאפיינים ווגטיביים אלה מובאת באיור 4. נמצא כי צורת הצימוח באוכלוסייה מתפצלת ביחס של 3:16 שיחיים: משתרעים. דגם הפריחה התפצל ביחס של 2:1 ל- אלטרנטיבי/מלא. צורת העלים "מנגו" נמצאה בשכיחות של 1:16.



איור 4. התפלגות תכונות צמח בדידות באוכלוסיית F_2 חנוך $53 \times N$ ($N = 325$). א. צורת הצימוח. ב. דגם פריחה. ג. מוטנט עלים רחבים ("מנגו").

אומדני תורשתיות במובן ברחב. אומדן התורשתיות במובן הרחב של רמת הנגיעות בגרב ושל תכונות כמותיות נוספות חושב באמצעות היחס שבין השונות של ההורים, $F1$ והאוכלוסייה המתפצלת (**טבלה 1**). התורשתיות של רמת הנגיעות נמצאה בערכים בינוניים של 0.51 ו- 0.48 לאוכלוסיות חנוך $53 \times$ ו- חנוך $111 \times$, בהתאמה. בתכונת אחוז ראש מצומק התקבל ערך שלילי באוכלוסייה 5, המורה על תורשתיות אפסית. ייתכן וההבדלים בין הערכים של שתי האוכלוסיות נובעים משגיאה ניסויית.

טבלה 1. ערכי תורשתיות במובן הרחב עבור מספר תכונות. בכל אוכלוסייה התקבלו ערכים שונים בהתאם להורים ולתנאי הסביבה.

תכונה	אוכלוסייה 5 חנוך $53 \times$	אוכלוסייה 6 חנוך $111 \times$
משקל תרמילים ברוטו לצמח	0.38	0.14
משקל תרמילים נטו לצמח	0.37	0.39
אחוז נגיעות גרב	0.5	0.48
משקל תרמיל ממוצע	0.64	0.31
אורך תרמיל ממוצע	0.91	0.46
מספר גרעינים ממוצע לתרמיל	0.51	0.72
אחוז ראש מצומק	-8.25	0.37
משקל זרע ממוצע	0.9	0.71
שיעור גרעין	0.95	0.5

מתאמים גנטיים. מתאמים גנטיים חושבו בין רמת הנגיעות בגרב ובין התכונות האחרות, על מנת לחזות קשיים בסלקציות לעמידות לגרב (**טבלה 2**). נמצא מתאם חיובי ומובהק (0.37 ו- 0.18 לאוכלוסיות 5 ו- 6, בהתאמה) בין רמת הנגיעות ומשקל התרמיל, וגם מתאם חיובי ומובהק (0.22 ו- 0.15 לאוכלוסיות 5 ו- 6, בהתאמה) בין רמת הנגיעות ואורך התרמיל.

טבלה 2. מתאם בין רמת הנגיעות בגרב לבין תכונות תרמיל שונות.

אוכלוסייה 5 (חנוך $53 \times$)		אוכלוסייה 6 (חנוך $111 \times$)		תכונה
מתאם	מובהקות מ-0	מתאם	מובהקות מ-0	
0.08	0.22	0.11	0.09	משקל תרמילים ברוטו לצמח
0.06	0.37	0.12	0.07	משקל תרמילים נטו לצמח
0.37	<0.0001	0.18	0.08	משקל תרמיל ממוצע
0.22	0.001	0.15	0.03	אורך תרמיל ממוצע
0.13	0.08	0.05	0.42	מספר גרעינים ממוצע לתרמיל
-0.01	0.87	0.04	0.05	אחוז ראש מצומק
0.09	0.19	0.05	0.51	משקל זרע ממוצע
-0.09	0.14	-0.12	0.07	שיעור גרעין

בנוסף חושבו מתאמים גנוטיפים בין תכונות התרמיל השונות. מטרת הניתוח היא לזהות תכונות אשר קשורות אחת לשנייה וצריכות להילקח בחשבון בטיפוח. ניתוח המתאם נעשה באמצעות

רגרסיה ליניארית והסיכום שלו מובא בטבלה 3. נמצאו מתאמים מובהקים בין התכונות השונות. חלק מהמתאמים צפויים, כגון המתאם החיובי והמובהק בין משקל זרע לבין משקל תרמיל, או בין משקל תרמיל ואורך תרמיל. נמצא מתאם שלילי ומובהק בין אורך ממוצע של תרמיל לשיעור הגרעין (באוכלוסייה 5 -0.47, ובאוכלוסייה 6 -0.27), כאשר תרמיל מאורך היא תכונה רצויה בטיפוח. בשתי האוכלוסיות ניתן לראות שככל שהתקבל תרמיל ארוך יותר שיעור הגרעין קטן, תוצאה שאינה רצויה. חשוב לציין כי בכל אוכלוסייה יתקבלו קורלציות קצת שונות בהתאם להורים ולתנאי הסביבה. בשתי אוכלוסיות אלו הופיע פנוטיפ מפתיע ורצסיבי של צמחים בעלי תרמילים ענקיים אך ריקים, של 1:16, שוודאי משפיע על הקורלציה בין שיעור גרעין ואורך תרמיל.

טבלה 3. מתאמים בין תכונות תרמיל שונות בשתי האוכלוסיות. הנתונים מוצגים רק עבור אוכלוסייה 5 (חונך $53 \times$).

* = קורלציה מובדלת ברמת מובהקות של $p < 0.05$

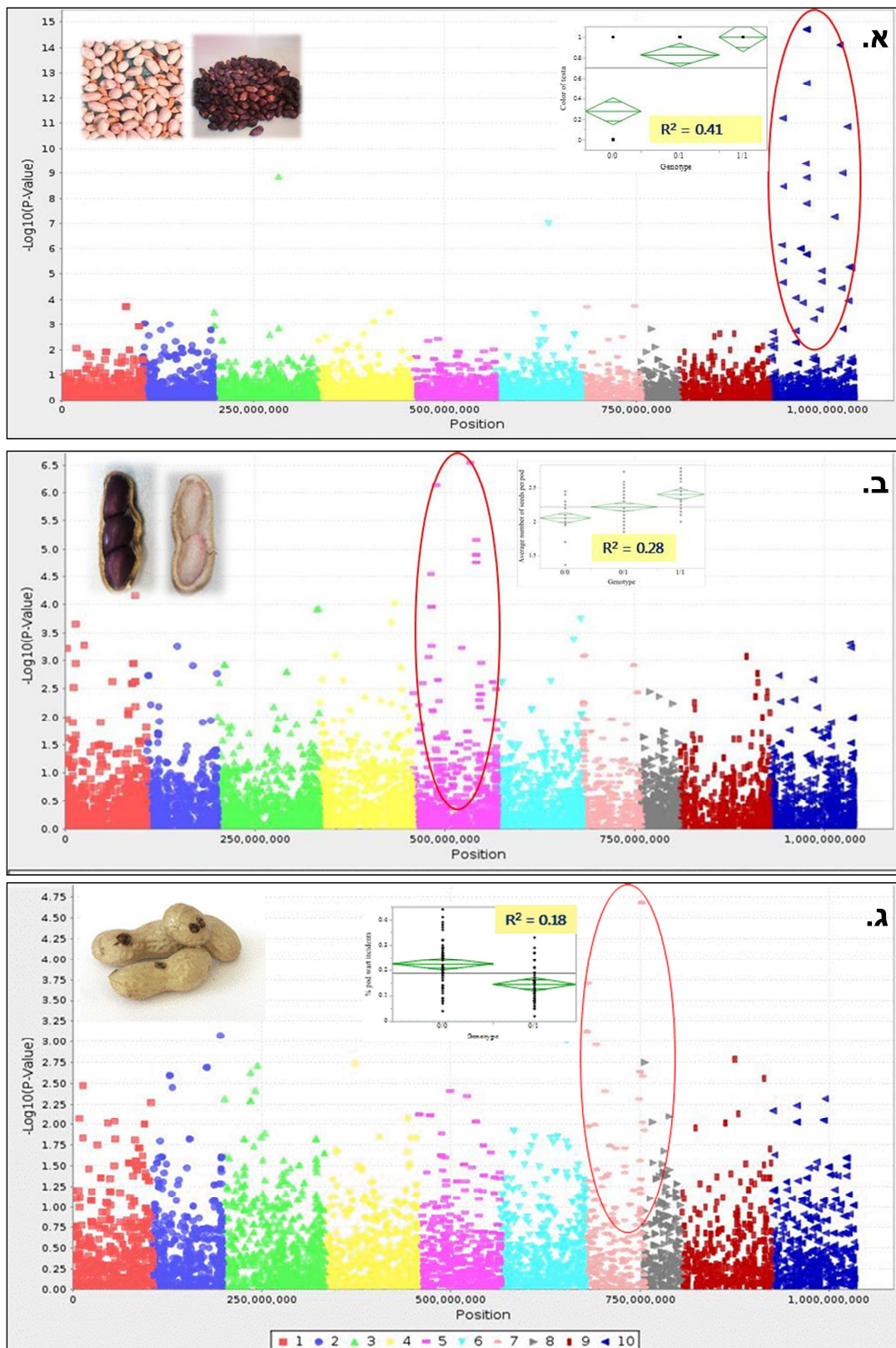
** = קורלציה מובדלת ברמת מובהקות של $p < 0.01$

תכונות	משקל כללי	משקל נטו	אחוז נגיעות	משקל תרמיל ממוצע	אורך ממוצע	מס' גרעינים ממוצע לתרמיל	אחוז ראש מצומק	משקל ממוצע לזרע	שיעור גרעין
משקל תרמילים ברוטו לצמח	1								
משקל תרמילים נטו לצמח	0.97**	1							
אחוז נגיעות	0.09	0.07	1						
משקל תרמיל ממוצע	0.09	0.1	0.37*	1					
אורך תרמיל ממוצע	0.16*	0.12	0.22**	0.38**	1				
מס' גרעינים ממוצע לתרמיל	0.14*	0.14*	0.12	0.18**	0.23**	1			
אחוז ראש מצומק	0.01	0.01	-0.06	-0.09	0.06	-0.13	1		
משקל זרע ממוצע	0.11	0.13	0.09	0.63**	-0.05	0.01	-0.13	1	
שיעור גרעין	-0.07	-0.03	-0.1	0.05	-0.47**	0.21**	-0.20**	0.55**	1

מיפוי תכונות באמצעות GBS. הניתוח לאיתור SNPs ומיפוי תכונות נעשה בעזרת תכנת TASSEL ובעזרת Script מיון וסינון שפותח על ידי המחלקה לביואינפורמטיקה של מינהל המחקר. לאחר בניית הספריות וריצופן בשנית, קיבלנו ~124,000 סמני SNP בתוכנת TASSEL. לאחר סינון קפדני באמצעות פרמטרים שונים להפרדה בין SNPs הומהולוגיים ו SNPs אמיתיים אותרו 5,659 סמני SNP בגנום A, ו 3,156 בגנום B. פונקציית ה-GLM, המבצעת ניתוח של association mapping הורצה על קובץ ה-vcf. הרצת פונקציית ה-GLM מפיקה שני דוחות, האחד טבלת מובהקות של כל סמן ותכונה פנוטיפית (מבחן f) והשני טבלת אمدן ההשפעה של האללים השונים, כלומר התרומה האללית לפנוטיפ מסוים. מטבלת אומדני האללים נבנו תרשימי Manhattan Plot, המציגים את כל הסמנים על פי מיקומם הגנטי (כרומוזום), כאשר כל נקודה הוא סמן (איור 5). ציר ה-X הינו המיקום הגנטי (קואורדינטות גנומיות) וציר ה-Y הינו ה LOD Score.

המיפוי העלה סמני SNP מובהקים עבור תכונת צבע הטסטה (איור 5א), שכאמור לעיל הראתה יחס של 3:1 בדור F_2 ובניסויים נוספים, עובדה המצביעה על כך שייתכן ומבוקרת על ידי גן יחיד. לכן, התכונה יכולה לשמש כביקורת עבור איכות הסמנים בניסוי לתכונות הכמותיות. אנליזה מבוססת-שונות של כל פרט F_2 ביחס לגנוטיפ של ההורה התקבל מרכיב R^2 - גבוה בתכונת צבע הטסטה (0.41). משמע, יש התאמה גבוהה בין הגנוטיפ לפנוטיפ, אחוז גבוה מתוך השונות מוסבר על ידי locus הזה. ואכן, הסמנים בעלי המובהקות הגבוהה נמצאים במרחק של כ 6-8 cM מהגן. בתכונות אחרות התקבלה תמונה פחות ברורה, אך בכל זאת נותנת אינדיקציה לכוון כלשהו. למשל בתכונת מספר גרעינים ממוצע לתרמיל נמצאו כמה סמנים בעלי מובהקות גבוהה בכרומוזום 5, כאשר הסמן בעל המובהקות הגבוהה ביותר קיבל ציון R^2 של 0.28. למיטב ידיעתנו זו פעם ראשונה שמדווחים סמנים לתכונה חשובה זו באגא"ד.

בתכונת העמידות לגרב, נמצא בכרומוזום 7 בגנום *A. duranensis* יש שני סמנים עם ציון LOD מספק, אך התקבל R^2 של 0.18, משמע הסמן יכול להסביר כחמישית מכלל השונות באוכלוסייה. אמנם, עדיין עלו כמה בעיות: ראשית, הסמנים אמורים להופיע בטור אחד ישר, אך הם "מפוזרים" על פני הכרומוזום, דבר המהווה בעיה לקבוע את מהימנותם, שכן הסמנים צריכים להופיע בקרבה אחד לשני. דבר זה יכול להיות מוסבר על ידי כך שגנום אגא"ד עדיין ראשוני, וכי הוא גנום מורכב גם ברמה הדיפלואידית. ראוי לציין שבדיקה מעמיקה של הסמנים המובהקים הראתה פרמטרים חזקים (מספר קריאות גבוה, מופע מספק של האללים השונים בקרב האוכלוסייה).

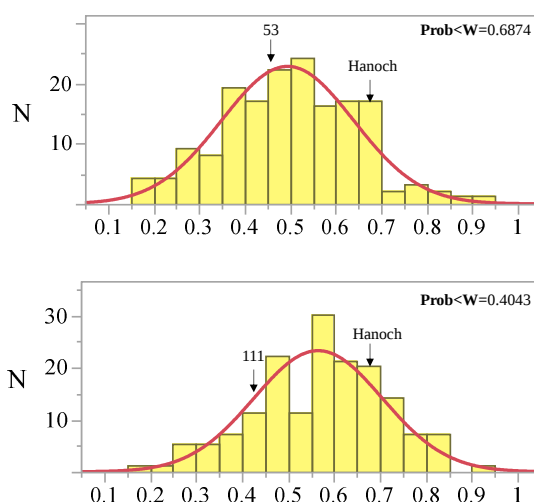


איור 5. Manhattan Plot של תכונות צבע הטסטה (א), מספר זרעים לתרמיל (ב), ורמת הנגיעות בגרב (ג). המיפוי נעשה על גנום *A. duranesis*. מרכיב ה- R^2 (Rsquare) של כל ניתוח שונות אומד את הפרופורציה של השונות הפנוטיפית המוסברת על ידי הסמן והלוקוס הקרובים ביותר.

דור ה- F_3 :

מטרת הניסוי בעונה השנייה הייתה להמשיך ולאפיין את רמת הנגיעות בגרב ותכונות נוספות במבנה של משפחות. נבחרו באקראי 188 צמחי F_2 מכל אוכלוסייה ומכל צמח נלקחו עשרה צאצאים שהיו משפחה. בסך כל גודלו 2×188 משפחות F_3 מכל אחת משתי האוכלוסיות (אוכלוסייה 5- חנוך $53 \times$ ואוכלוסייה 6- חנוך $111 \times$). בכל חלקה לצד משפחות ה- F_3 גודלו גם ההורים כביקורת.

התפלגות תכונות בדור F_3 . התפלגות ממוצעי המשפחות בדור F_3 בתכונת שיעור הנגיעות בגרב מופיעה באיור 6.

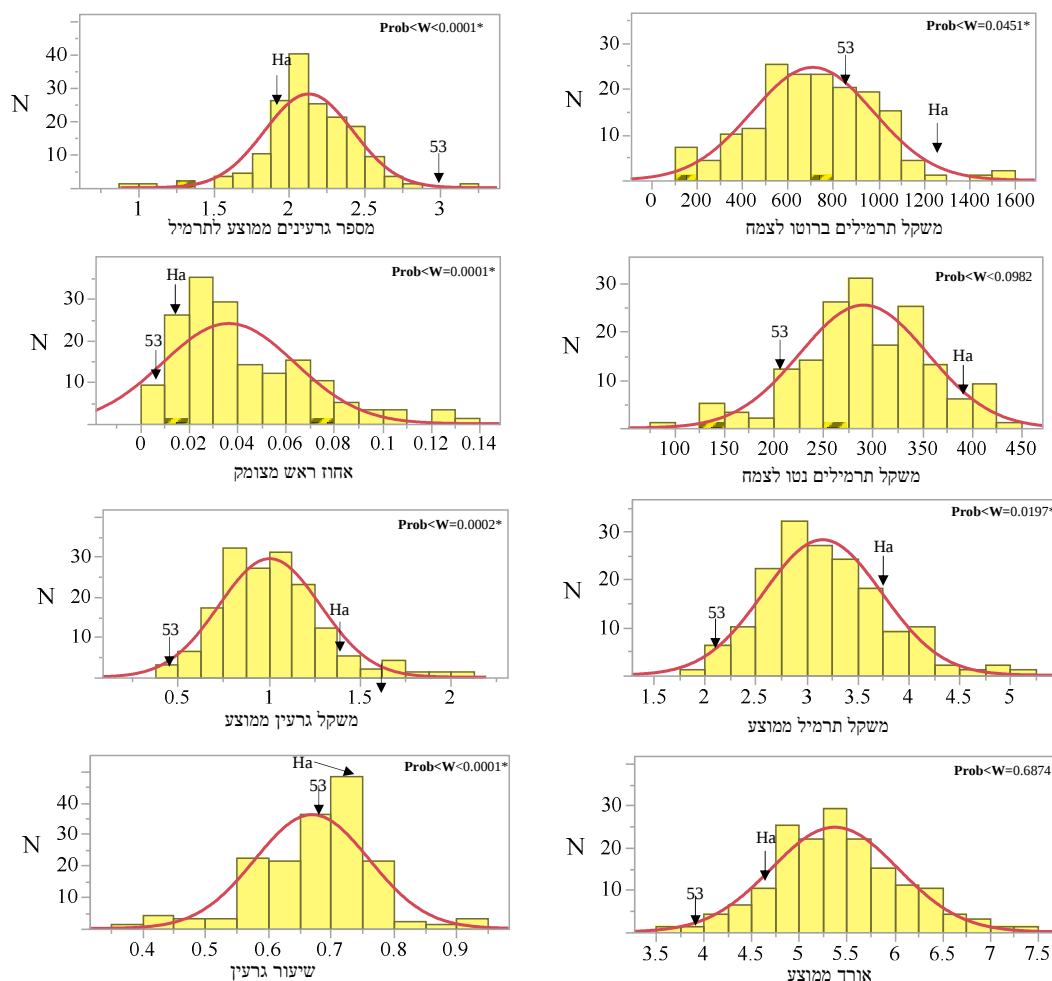


איור 6 התפלגות ממוצעי שיעור הנגיעות בגרב במשפחות F_3 מתפצלות. N = מספר הפרטים. ממוצעי ההורים מסומנים. למעלה: אוכלוסייה $53 \times$ חנוך. למטה: אוכלוסייה $111 \times$ חנוך. $Prob(W)$ = מבחן שפירו-וויילק להתפלגות נורמלית.

רמת הנגיעות בגרב התפלגה באופן אחיד יחסית עם התפלגות נורמלית, עם מינימום של 0% ומקסימום 90% נגיעות (איור 3.12). למעשה בדור זה, שבו נמדדו ממוצעי משפחות, התפלגות התכונה היתה נורמלית גם מבחינה סטטיסטית (איור 6). ממוצע ההורים היה 67% ו-46% ו-43% עבור חנוך, קו 53 וקו 111, בהתאמה. יש לציין כי ערכי ההורים היו גבוהים מהרגיל, במיוחד ההורים בעלי הסבילות למחלה אשר הראו רמות גבוהות מהצפוי. עדיין הייתה מובהקות גבוהה מאוד בהבדל שבין ההורים הסבילים ובין הזן חנוך. גם בדור זה נצפתה סטייה לרמות נמוכות. חלק מהמשפחות הראו רמות נגיעות קרובות ל-0, דבר המרמז על שונות ניסויית והשפעות סביבה גבוהות.

מלבד הנגיעות בגרב נמדדו תכונות נוספות בעלות חשיבות חקלאית כגון משקל תרמילים ברוטו לצמח, משקל תרמילים נטו לצמח, משקל תרמיל ממוצע, אורך תרמיל ממוצע, מספר גרעינים ממוצע בתרמיל, אחוז ראש מצומק, משקל גרעין ממוצע, ושיעור הגרעין. התפלגות תכונות היבול האחרות שנבדקו בדור F_3 באוכלוסייה חנוך $53 \times$ מובאות באיור 7. התפלגויות תכונות משקל

התרמיל ברוטו, משקל תרמילים נטו לצמח, משקל תרמיל ממוצע, משקל גרעין ממוצע, ואורך תרמיל ממוצע בדור F_3 היו דומות לאלו של דור F_2 . תכונת מספר גרעינים ממוצע התפלגה באופן שונה בדור F_3 מאשר בדור F_2 ונראית יותר רציפה. גם בדור F_3 נצפתה התופעה של ערכים מאוד נמוכים בתכונת שיעור הגרעין.



איור 3.8 התפלגות של תכונות תרמיל וגרעין שונות באוכלוסיית F_3 חנוך $\times 53$. N = מספר הפרטים. ממוצעי ההורים מסומנים באותיות. H_a = חנוך. $Prob(W)$ = מבחן שפירו-ווילק להתפלגות נורמלית.

תכונות בדידות לא נבדקו בדור זה מכיוון שקשה לקבוע את הפנוטיפ במשפחה שלמה. אף על פי כן, ניתן לציין כי גם בדור F_3 נמצאה השפעה של ההורים ה"אקזוטיים", למשל ברמת החספוס של התרמיל, שבה מעט מאוד משפחות היו בעלות תרמיל חלק כמו של חנוך. כמו כן נמצאו הרבה פרטים עם תרמילים גדולים וריקים (המאפיינים את תכונת העלים הרחבים או ה"מגו"), תכונה אשר המשיכה להתפצל בתוך המשפחות בדור זה.

אומדני תורשתיות במובן היותר צר בדור F_3 . אומדן התורשתיות במובן היותר צר של רמת הנגיעות בגרב ושל תכונות נוספות חושבה באמצעות השונות המשותפת בין צמחי F_2 וממוצעי צאצאיהם ב F_3 . תוצאות האנליזה מובאות בטבלה 4.

טבלה 4. טבלת ערכי תורשתיות במובן היותר צר עבור מבחר תכונות.

שונות משותפת בין צמחי F_2 וממוצעי צאצאיהם ב F_3		
תכונה	אוכלוסייה 5 חנוך $53 \times$	אוכלוסייה 6 חנוך $111 \times$
משקל תרמילים ברוטו לצמח	0.45	0.3-
משקל נטו	0.11	0.11
אחוז נגיעות	0.32	0.34
משקל תרמיל ממוצע	0.34	0.53
אורך תרמיל ממוצע	0.5	0.6
מספר גרעינים ממוצע לתרמיל	0.59	0.4
אחוז ראש מצומק	0.05	0.11
משקל זרע ממוצע	0.31	0.64
שיעור גרעין	0.45	0.52

התוצאות, כצפוי, מציגות ערכים נמוכים יותר מאשר התורשתיות במובן הרחב, שכן האפקט הדומיננטי (d) פחות נוכח, ויותר אפשר לבדוד את האפקט האדטיבי (a). בדור F_2 באוכלוסייה 5 ובאוכלוסייה 6 קיבלנו רמת נגיעות של 0.50 ו-0.48 בהתאמה, ואילו בדור F_3 קיבלנו 0.32 ו-0.34. חשוב לציין כי בכל אוכלוסייה יתקבלו ערכי תורשתיות קצת שונים בהתאם להורים ולתנאי הסביבה.

מתאמים גנטיים בדור F_3 . מתאמים גנטיים חושבו בין רמת הנגיעות בגרב ובין התכונות האחרות על מנת לחזות קשיים בסלקציות לעמידות לגרב. תוצאות הניתוח מובאות בטבלה 5.

טבלה 5. מתאמים בין רמת הנגיעות בגרב לבין תכונות תרמיל שונות.

אוכלוסייה 5 (חנוך $53 \times$)		אוכלוסייה 6 (חנוך $111 \times$)		תכונה
מתאם	מובהקות מ-0	מתאם	מובהקות מ-0	
0.01	0.88	0.25	0.0012	משקל תרמילים ברוטו לצמח
0.20	0.0041	0.37	<.0001	משקל תרמילים נטו לצמח
0.43	<.0001	0.40	<.0001	משקל תרמיל ממוצע
0.15	0.03	0.03	0.73	אורך תרמיל ממוצע
-0.09	0.24	0.13	0.09	מספר גרעינים ממוצע לתרמיל
0.09	0.24	-0.16	0.04	אחוז ראש מצומק
0.04	0.60	0.24	0.002	משקל גרעין ממוצע
-0.07	0.34	0.04	0.58	שיעור הגרעין

ניתן לראות מתאם מובהק בין תכונות העמידות לבין משקל התרמיל (באוכלוסייה 5 0.43, ובאוכלוסייה 6 0.4), אך בשונה מדור F_2 , אין מתאם מובהק בין רמת הנגיעות לבין האורך הממוצע של התרמיל.

בשלב הבא ערכנו ניתוח של מתאמים גנוטיפים בין תכונות התרמיל השונות. מטרת הניתוח היא לזהות תכונות אשר מושפעות אחת מהשנייה, ובעיקר תכונות אשר קשורות בקשר ישיר או עקיף לתכונות העמידות לגרב. ניתוח המתאם נעשה באמצעות רגרסיה ליניארית והסיכום שלו מובא בטבלה 6. בדור F_3 גם נמצאו מתאמים מובהקים בין התכונות השונות. חלק מהמתאמים צפויים, כגון המתאם החיובי והמובהק בין משקל זרע לבין משקל תרמיל, או בין משקל לתרמיל ואורך תרמיל. בדור F_3 שוב נמצא מתאם שלילי ומובהק (באוכלוסייה 5 -0.39, ובאוכלוסייה 6 -0.34) בין אורך תרמיל ממוצע לשיעור הגרעין, ומתאם חיובי ומובהק בין אחוז ראש מצומק לבין אורך תרמיל ממוצע (באוכלוסייה 5 0.37, ובאוכלוסייה 6 0.41) כאשר תרמיל ארוך היא תכונה רצויה בטיפוח. בשתי האוכלוסיות ניתן לראות שככל שהתקבל תרמיל ארוך יותר שיעור הגרעין קטן ואף חסר גרעין אחד בתרמיל, תוצאה שאינה רצויה. חשוב לציין כי בכל אוכלוסייה יתקבלו קורלציות קצת שונות בהתאם להורים ולתנאי הסביבה. גם בדור F_3 שני אוכלוסיות אלו הופיע פנוטיפ רצסיבי של צמחים בעלי תרמילים גדולים אך ריקים, של 1:16, שוודאי משפיעות על הקורלציה בין שיעור גרעין ואורך התרמיל.

טבלה 6. מתאמים בין תכונות תרמיל שונות בשתי האוכלוסיות. הנתונים מוצגים רק עבור אוכלוסייה 5 (חונך $53 \times$).

* = קורלציה מובדלת ברמת מובהקות של $p < 0.05$

** = קורלציה מובדלת ברמת מובהקות של $p < 0.01$

תכונות	משקל כללי	משקל נטו	אחוז נגיעות	משקל תרמיל ממוצע	אורך ממוצע	מספר גרעינים ממוצע לתרמיל	אחוז ראש מצומק	משקל ממוצע לזרע	שיעור גרעין
משקל תרמילים ברוטו לצמח	1								
משקל תרמילים נטו לצמח	0.46**	1							
אחוז נגיעות	0.01	0.20*	1						
משקל תרמיל ממוצע	0.03	0.62**	0.43**	1					
אורך תרמיל ממוצע	0.11	0.31**	0.15*	0.28**	1				
מספר גרעינים ממוצע לתרמיל	0.21**	0.15*	-0.09	-0.1	0.14*	1			
אחוז ראש מצומק	-0.05	0.1	0.09	0.08	0.37**	0.06	1		
משקל זרע ממוצע	0.08	0.11	0.04	0.08	0.03	-0.25**	0.03	1	
שיעור גרעין	0.13*	0.16*	-0.07	0.05	-0.39**	0.09	-0.38**	0.07	1

מיפוי סמנים בדור F_3 . נערך ניתוח נוסף של איתור סמנים על תכונות כמותיות בדור F_3 , תוך כדי שימוש ב Genotyping שנעשה בדור F_2 . המטרה היתה לבצע phenotyping על משפחות ולא על פרטים בודדים (כמו בדור F_2) מה שעשוי לתת תוצאות יותר מהימנות. ביצענו ניתוח בעזרת תכנת TASSEL. אולם, בדור F_3 בשל השונות הגדולה בין ובתוך שני אוכלוסיות הניסוי, ובשל שגיאת

ניסוי לא זוהו סמנים ברורים עבור התכונות השונות, ולכן לא מצורפים כאן תרשימי Manhattan plot.

דיון מסקנות

בעבודה זו התמקדנו בהבנת הבסיס הגנטי של תכונות העמידות לגרב ושל מאפייני תרמיל נוספים. כמו כן אמדנו את הקשר הגנטי שבין תכונות העמידות לגרב לבין מאפייני תרמיל אחרים על מנת לחזות את יעילות הסלקציה לעמידות. בנוסף נעשה ניסיון של פיתוח של סמני SNP באמצעות שיטות GBS וניסיון לזהות מקטעים גנומיים האחוזים לתכונות העמידות לגרב ומאפייני תרמיל אחרים כעזר לסלקציה וכתשתית מדעית לגילוי עתידי של גנים בעלי חשיבות להתפתחות הקליפה ועמידות למחלה.

תוצאות התפלגות רמת הנגיעות בגרב באוכלוסיות השונות מרמזות על תכונה הנשלטת על ידי מספר גנים אולם עם רמת תוספתיות נמוכה. זאת מכיוון שפרטי ה- F_1 היו דומים להורה הרגיש. לכן, ככל הנראה הטיפוסים בעלי הסבילות הגבוהה הם בעלי גנוטיפ רצסיבי במספר גנים. ההטיה של ההתפלגות לערכים הנמוכים, במיוחד בדור F_2 , של נגיעות ושל תכונות נוספות יכולה להקשות על מיפוי אוכלוסייה זו.

בנוסף לתכונות העמידות נמצאה גם סטייה חזקה בתכונות נוספות, כגון שיעור הגרעין (מילוי התרמיל), שבה יש סטייה חזקה לערכים נמוכים, כאשר ההורים מרוכזים באמצע ההתפלגות והאוכלוסייה פזורה בצורה חדה מידי לכיוון מטה. סיבה אפשרית לכך היא שבהכלאות בין קוים עתיקים (landraces) וזנים מתורבתים יש אחוז גבוה של abortion, חוסר הפריה בשל מחסומים גנטיים. ככלל, השונות הגדולה שנמצאה באוכלוסיות F_2 ו F_3 מקורה בהכלאה היחסית מרוחקת בין שני ההורים. תכונות נוספות שנמצאו עם סטייה לכיוון ההורים התורמים הן משקל הזרע ומשקל התרמיל. פרמטרים אלה מצריכים עבודה עם אוכלוסיות גדולות בכדי למצוא שילוב גנטי מתאים להורה חנוך ובעל עמידות לגרב.

מספר תכונות "בדידות" גם כן נבדקו באוכלוסייה בכדי לראות את ההשפעה שלהן על יעילות הטיפוח. אחת מהן היא צבע הטסטה, שתוצאת מבחן כי-בריבוע למבחן של יחס 3:1 הראה ש היא מבוקרת על ידי גן בודד. ולכן, 75% מכל חומר גנטי מתפצל עשוי להיות בעל צבע טסטה כהה. מכיוון צבע טסטה כהה אינו מקובל בתעשיית אגא"ד בקליפה, יש להתחשב בתכונה זו. מצד שני הבקרה המונוגנית של התכונה גורמת לכך שהסלקציה כנגד התכונה היא קלה באופן יחסי. דומיננטיות חזקה של הורי-הבר נמצאה גם ברמת החספוס של התרמיל שכנראה מושפעת על ידי מספר גנים רצסיביים. מכיוון שיש בתעשיית הבוטנים בקליפה עדיפות גבוהה לתרמילים חלקים ובהירים, הדבר מקשה על סלקציות לחומר עם עמידות לגרב בנוסף לתכונה זו. צורת הצימוח באוכלוסייה מתפצלת ביחס של 3:16 שיחיים:משתרעים, דבר המרמז על שני גנים עם יחסי אפיסטזיס. דגם הפריחה התפצל ביחס של 2:1 ל- אלטרנטיבי/מלא, מה שמרמז אולי על אלל לטאלי שמסתובב באוכלוסייה זו. צורת העלים הרחבים "מנגו" נמצאת בשכיחות של 1:16 מה שמראה על שני גנים רצסיביים כפולים. לתכונות אלה אין חשיבות ישירה בטיפוח לעמידות ליבלת, אולם הן יכולות להיות קשורות בצורה עקיפה לתכונות העמידות או תכונות תרמיל אחרות.

נתון מעניין נוסף שנמצא בעבודה זו, היא התפלגות תכונת מספר הגרעינים הממוצע בתרמיל. גם תכונה זו נחשבת "קשיחה" בתעשיית אגא"ד בקליפה, כאשר קיימת דרישה לתרמילים עם שני גרעינים בלבד. אף על פי כן, לא ידוע על עבודות שחקרו את התורשה של תכונה זו. בעבודה הנוכחית נמצא בדור F_2 כי התכונה התפלגה בצורה לא נורמלית, וכי היא מושפעת ככל הנראה על ידי מספר קטן מאוד של גנים, אולי אפילו 1 או 2. מעבר לכך, נצמא סמן מולקולארי מובהק לתכונה על כרומוזום A5, וזאת לראשונה באגא"ד. עדיין, רק 25% מהפרטים באוכלוסייה היו בעלי מספר ממוצע של 2 זרעים בתרמיל, מה ששוב גורם לכך שיש לקחת אוכלוסיות גדולות מאוד להמשך סלקציות.

רמת התורשתיות של התכונות נאמדה על ידי ניסויים רב-שנתיים על מנת לחזות את יעילות הסלקציה לעמידות לגרב ולתכונות הנוספות. התורשתיות מתארת את חלקה היחסי של השונות הגנטית בשונות הפנוטיפית. בדור F_2 נמצא שתכונת רמת הנגיעות בגרב היא בעלת תורשתיות בינונית. הדבר מראה כי רמת העמידות היא בעלת רכיב גדול של השפעת סביבה. רמה כזו של תורשתיות מרמזת על כך שניתן לעשות סלקציה לקווים עמידים כבר בדורות הראשונים, ושסלקציות לעמידות לגרב עשויות להיות יעילות יחסית. כמו כן ישנה גם אפשרות מעשית לזיהוי QTLs, מה שמבטיח כיוון חיובי של שיפור רמת הנגיעות בתכונות טיפוח עתידיות. אומדני התורשתיות במובן היותר צר בדור F_3 , יותר נמוכים מאשר אומדני התורשתיות במובן הרחב בדור F_2 . ההבדל באומדן יכול לנבוע מכך שהחלק הדומיננטי מופחת, ולכן התורשתיות יותר מדויקת בתחזית שלה בדור F_3 . זה מחזק את הטענה לעיל שתכונת העמידות היא בעלת רכיב דומיננטי חזק.

מתאמים גנטיים בין תכונות תרמיל שונות לבין עמידות לגרב נערכו על מנת למצוא תכונות שיכולות להשפיע על יעילות סלקציה מקבילה. לא נמצא מתאם מובהק בין רמת הנגיעות בגרב לבין משקל תרמילים ברוטו, משקל תרמילים נטו, מספר גרעינים ממוצע בתרמיל, משקל גרעין ממוצע ושיעור הגרעין, ולכן תכונות אלו לא מהוות בעיה בטיפוח לכיוון עמידות לגרב. בחינת המתאמים בין תכונות הראתה מתאם חיובי ומובהק בין רמת הנגיעות ומשקל התרמיל בשני הדורות, וגם מתאם חיובי ומובהק בין רמת הנגיעות ואורך התרמיל בדור F_2 , ולכן ייתכן ששתי תכונות אלה אחוזות גנטית לרמת העמידות או משפיעות עליה בצורה פליאוטרופית. מתאמים מובהקים נמצאו גם בין תכונות אחרות. חלק מהמתאמים צפויים, כגון המתאם החיובי והמובהק בין משקל זרע לבין משקל תרמיל, או בין משקל תרמיל ואורך תרמיל. אך נמצא גם מתאם שלילי ומובהק בין אורך ממוצע של תרמיל לשיעור הגרעין הן בדור F_2 ובדור F_3 . בשתי האוכלוסיות ניתן לראות שככל שהתקבל תרמיל ארוך יותר שיעור הגרעין קטן, תוצאה שאינה רצויה. בדור F_2 בשתי האוכלוסיות הופיע פנוטיפ רצסיבי של צמחים בעלי תרמילים גדולים אך ריקים ביחס של 1:16, שוודאי משפיעות על הקורלציה בין שיעור גרעין ואורך תרמיל.

הגנוטיפים 111 ו-53 הינם קווים בעלי מבנה תרמיל ייחודי של קליפה גסה. הם שייכים לתתי המינים *hirsuta* ו-*peruviana* בהתאמה. אלו הם טיפוסים "עתיקים" (*landraces*) אשר נתוני התרמיל שלהם אינם מתאימים לשיווק מסחרי של אגא"ד בקליפה. בתצפיות קודמות העלתה

השערה כי עצם רמת החספוס של הקליפה של שני קווים אלו מקנה להם עמידות. ההשערה היתה כי ישנה אינטראקציה כימית בין חיידקי הסטרפטומיצטים (*Streptomyces*) התוקפים את הקליפה, לבין מבנה הקליפה. ההשערה נדחתה לאחר המחקר הנוכחי שכן לא נמצאה קורלציה בין רמת העמידות לבין רמת החספוס של הקליפה. לעומת זאת, בעבר נמצאה קורלציה שלילית ומובהקת בין הופעת מחלת הגרב לבין הופעת מחלות ונגעים אחרים כגון מחלת הפוזריום. גילוי זה מוביל להשערה שיבלות הגרב נוצרות כתגובת רגישות יתר מקומית (hypersensitive mechanism). נמצא כי על תרמילים נגועים במחלה ועל תרמילים שאינם נגועים במחלה קיימת אותה כמות של חיידקים (דרור מינץ, מחקר לא מפורסם) אך הם נבדלים בתגובתם למחלה. כמו כן נמצא ש-thaxtomin A, גורם מחלה הקשור ל common scab מביא למוות תאי מקומי שנגרם על ידי תגובת רגישות יתר (hypersensitive response). על פי ממצא זה השערנו החדשה היא שצמחים רגישים למחלת הגרב יפתחו יבלת כתגובת רגישות יתר מקומית למחלה המקנה עמידות כלשהי מפני מחלות אחרות. ההשערה מחוזקת על ידי העובדה שבהרבה מקרים בעבודה זו נמצאו תרמילים "עמידים" אשר למעשה מופיעה בהם התחלה של הדבקה אך ללא התקדמות לכיוון של השחרה, מה שמראה כי עמידות יכולה להיות דווקא קשורה ל hyposensitivity. אום, השערה זו דורשת מחקר in vitro ו in vivo עתידי בנושא.

כמסקנה, יש לפעול בכמה אסטרטגיות חלופיות להמשך הטיפול עמידות לגרב:

1. לגדל אוכלוסיות גדולות מאוד בכדי למצוא שילובים נדירים של התכונות.
2. מכיוון שהתכונות השליליות של ההורים התורמים את המקור לעמידות הן מאוד דומיננטיות, יש לעשות הכלאה מחזירה אחת (למרות שהתכונה לעמידות היא פוליגנית) ומיד לאחריה "לפתוח" את האוכלוסיות המתפצלות לטיפול.
3. מכיוון שהתורשתיות במובן היותר צר היא למעשה נמוכה, כדאי לדחות את הסלקציות לגרב לדורות יותר מתקדמים לקווים יותר יציבים והומוזיגוטים ובחלקות גדולות, ואילו בדורות הראשונים רק להתרכז בסלקציות לתכונות אחרות.

מיפוי סמנים. היותו של אגא"ד אלוטטרפלואיד ובעל גנום גדול מקשה על מציאת SNPs מכיוון שבריצוף גנום טטרפלואיד מתקבלים ארבעה בסיסים במקום שניים [11, 12]. יתר על כן בגנום האגא"ד יש אחוז גבוה של חלקים החוזרים על עצמם. מיני אגא"ד הכי שונים התפצלו רק לפני כמה אלפי שנים [13] ולכן בין תתי מינים שונים קיימת שונות גנטית נמוכה יחסית. פולימורפיזם אמיתי בסמני SNP הוא מאוד נדיר קשה להבחין בין SNP הומולוגי בין שני תת הגנומים באותו תת מין לבין varietal SNP בין תתי מינים שונים, כך שהסיכוי למצוא SNP אמיתי הוא פי 1000 קטן מאשר למצוא SNP כוזב. בשל מאפיינים אלו זוהי משימה קשה לפתח סמני SNP עבור אגא"ד.

ולכן רק עבור שלוש תכונות התקבלו סמנים בעלי מובהקות גבוהה המצביעים על קשר בין הגנוטיפים השונים לתכונה. ראוי לציין כי קיים קשר חזק בין רמת התורשתיות לבין היכולת זיהוי מקטעים גנומים האחוזים לתכונות השונות (זיהוי QTLs), ובשביל איתור QTL צריך רמת

תורשתיות מספיק גבוהה. ייתכן כי התורשתיות הבינונית עד נמוכה שנמצאה הקשתה על איתור ה QTLs.

ניתן לפעול בכמה אסטרטגיות לאיתור יותר יעיל ומהימן של סמנים :

1. ביצוע Bulk Segregant Analysis כדי לקבל כיסוי גדול יותר של המקטעים.
2. ריצוף 48 צמחים ולא 96 צמחים, כדי להגדיל את הכיסוי לכל מקטע.
3. ביצוע GBS על דורות מתקדמים (RILs-Recombinant Inbred Lines) שהן אוכלוסיות יותר יציבות והומוזיגוטיות ולא על דור F_2 , בו חצי מהפרטים הטרוזיגוטים.
4. שימוש בשיטת סמנים פולימורפיים, כגון סמני SSR.
5. שימוש ב SNP Array מתוכנן מראש. ב GBS היתה התייחסות רק ל 1/40 של הגנום, ייתכן שצריך למפות את כלל הגנום, ומתוכו להתמקד על אזורים בהם יש סמני SNP. ואכן, לאחרונה פיתחנו ביחד עם מעבדה שותפה בארה"ב SNP שררשט המבוסס, בין היתר גם על חנוך, 53 ו- 111.

- .1 Kritzman G, Shani-Cahani A, Kirshner B, Riven Y, Bar Z, Katan J, and Grinstein A (1996) *Pod wart disease of peanuts*. *Phytoparasitica* 24: 293-304.
- .2 Grinstein A, Kritzman G, Riven Y, PeretzAlon I, and Bar Z (1997) *Chemical and physical disinfection of peanut pods for improved seed quality*. *Crop Protection* 16: 353-357.
- .3 Gupta K, Buchshtab O, and Hovav R (2014) *The Effects of Irrigation Level and Genotype on Pod-Filling Related Traits in Peanut (Arachis hypogaea)*. 2014 7.
- .4 Wilson CR, Tegg RS, Wilson AJ, Luckman GA, Eyles A, Yuan ZQ, . . . Conner AJ (2010) *Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection*. *Phytopathology* 100: 460-467.
- .5 Sedlakova V, Dejmalova J, Dolezal P, Hausvater E, Sedlak P, and Bastova P (2013) *Characterization of forty-four potato varieties for resistance to common scab, black scurf and silver scurf*. *Crop Protection* 48: 82-87.
- .6 Lerat S, Simoa-Beaunoir A, and Beaulieu C (2009) *Genetic and physiological determinants of Streptomyces scabies pathogenicity*. *Molecular plant pathology* 10: 579-585.
- .7 Pittman RN, *United States Peanut Descriptors*, 1995, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- .8 Gautami B, Ravi K, Lakshmi N, Hoisington D, and Varshney R (2009) *Novel set of groundnut SSRs for genetic diversity and interspecific transferability*. *Int J Integr Biol* 7: 100-106.
- .9 Poland J, Brown P, Sorrells M, and Jannink J (2012) *Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach*. *Plos One* 7.
- .10 Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinhofs A, and Kilian A (2004) *Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9915-20.
- .11 Bertoli DJ, Ozias-Akins P, Chu Y, Dantas KM, Santos SP, Gouvea E, . . . Moretzsohn MC (2014) *The use of SNP markers for linkage mapping in diploid and tetraploid peanuts*. *G3 (Bethesda)* 4: 89-96.
- .12 Akhunov E, Nicolet C, and Dvorak J (2009) *Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 507-517.
- .13 Nielen S, Vidigal BS, Leal-Bertioli SC, Ratnaparkhe M, Paterson AH, Garsmeur O, . . . Bertoli DJ (2012) *Matita, a new retroelement from peanut: characterization and evolutionary context in the light of the Arachis A-B genome divergence*. *Mol Genet Genomics* 287: 21-38.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתכנית העבודה

1. זיהוי וניתוח הקשר הגנטי שבין תכונת העמידות לגרב לבין מאפייני תרמיל אחרים בעלי חשיבות כלכלית וטיפוחית וזאת על מנת לחזות את יעילות הסלקציה לעמידות.
2. פיתוח סמני SNP באמצעות שיטות GBS ו-Next Generation Sequencing.
3. זיהוי מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת העמידות לגרב ומאפייני תרמיל אחרים כעזר לסלקציה וכתשתית מדעית לגילוי עתידי של גנים בעלי חשיבות להתפתחות הקליפה ועמידות למחלה.

עיקרי התוצאות

נמצאה שונות פנוטיפית גבוהה מאוד במבנה הצמחים והתרמילים. רמת הנגיעות בגרב התפלגה באופן אחיד אך נצפתה הטיה של ההתפלגות לערכים הנמוכים של רמת נגיעות. נמצאה דומיננטיות חזקה מאוד של תכונות שליליות שמקורן מההורים התורמים כגון צבע הטסטה, רמת החספוס, רמת המילוי ומשקל זרע. התורשתיות של רמת הנגיעות נמצאה בערכים בינוניים. נמצא מתאם חיובי בין רמת הנגיעות לבין משקל ואורך התרמיל. כמו כן נמצאו מתאמים מובהקים בין התכונות השונות, דבר שיש לקחת בחשבון בסלקציות. לכן ברמה הטיפוחית, יש לפעול בכמה אלטרנטיבות: 1. לגדל אוכלוסיות ענקיות בכדי למצוא שילובים נדירים של התכונות. 2. מכיוון שהתכונות השליליות של ההורים התורמים הן מאוד דומיננטיות, יש לעשות הכלאה מחזירה אחת ומיד לאחריה "לפתוח" את האוכלוסיות המתפצלות לטיפוח. 3. מכיוון שהתורשתיות היא בינונית-נמוכה, מומלץ לדחות את הסלקציות לגרב לדורות יותר מתקדמים בטיפוח.

לגבי מיפוי התכונות, לאחר הריצוף, המיון והסינון התקבלו 5,659 סמני SNP בגנום A, ו-3,156 בגנום B. המיפוי העלה סמני SNP מובהקים עבור תכונות צבע הטסטה (שמבוקרת על ידי גן בודד) ומספר הזרעים בתרמיל, עם ערכי R^2 של 0.41 ו-0.28 בהתאמה. לתכונת העמידות לגרב נמצא סמן בכרומוזום 7 אך בעל השפעה יחסית נמוכה ($R^2=0.18$).

בעיות שונות לפתרון

עדיין לא הצלחנו ליישם את טכנולוגיית ה-GBS במלואה על אוכלוסיית F_2-F_3 . ברמת הסמנים מומלץ: 1. להגדיל את הכיסוי על ידי הורדת מספר הצאצאים בריצוף. 2. ביצוע של GBS על דורות מתקדמים (RILs) שהן אוכלוסיות יותר יציבות והומוזיגוטיות. 3. אימוץ שיטות מיפוי נוספות כגון Bulk Segregant Analysis, סמנים פולימורפיים ו-SNP Array.

לסיכום: שימוש בסמני SNP באגא"ד אפשרי, אך מציאת מספר גדול של סמנים הינה מאתגרת. שיטת GBS פותחה יחסית לאחרונה, והיא עובדת היטב בצמחים פוליפואידים, בתנאי שבין ההורים קיים מרחק גנטי מספיק גדול. בניסוי הנוכחי היו כמה סיבות שהשיטה לא היתה מתאימה: הגנום חדש ועוד בבניה וייתכן שחלק מה SNPs לא התמפו למקום הנכון, הגנום גדול מידי, השונות הגנטית באגא"ד לא מספיק גדולה, וניתוח על אוכלוסייה מתפצלת שחצי מפרטיה היו הטרוזיגוטים מקשה על זיהוי SNPs אמתיים בצמחים פוליפואידים. בנוסף, אין יכולת לקבל

תורשתיות גבוהה כאשר יש סטיה גדולה מההורים. משני חלקי המחקר ניתן לראות כי יש צורך בגידול דורות המשך על מנת לקבל תוצאות יותר טובות, הן מבחינת הסלקציה לטיפוח וגם מבחינת מיפוי סמנים.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב

מאמר בנושא גנטיקה של עמידות לגרבהגרם שמבוסס על תוצאות המחקר נשלח לעיתון crop science.

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח:

- ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)

האם בכוונתך להגיש תכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא הוחלט