

דוח מסכם לתוכנית מחקר-12-804-203

מציאת סמן מולקלרי לעמידות למחלת החלפת בקליפים תוך שלוב של שיטות גנומיות ופיטופתולוגיות  
**Discovery of molecular markers for alternaria resistance in citrus by combining genomics  
and phytopathology approaches**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

עמיר שרמן היחידה לגנומיקה, מנהל המחקר החקלאי

רון אופיר היחידה לגנומיקה, מנהל המחקר החקלאי

ניר כרמי המחלקה להשבחת מטעים, מנהל המחקר החקלאי

דוד עזרא המחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי

Amir Sherman, Genomic unit, ARO, Volcani Center, POB6, Bet Dagan.

Email: [asherman@agri.gov.il](mailto:asherman@agri.gov.il)

Ron Ophir, Genomic unit, ARO, Volcani Center, POB6, Bet Dagan.

Email: [Ophir@agri.gov.il](mailto:Ophir@agri.gov.il)

Nir Carmi, Horticulture, ARO, Volcani Center, POB6, Bet Dagan

Email: [nircarmi@volcani.agri.gov.il](mailto:nircarmi@volcani.agri.gov.il)

David Ezra, Plant pathology and weed, ARO, Volcani Center, POB6, Bet Dagan.

Email: [dezra@volcani.agri.gov.il](mailto:dezra@volcani.agri.gov.il)

יוני 2013

תמוז תשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר

## תקציר

**הצגת הבעיה:** מחלת החלפת (*Alternaria brown spot*) מהווה בעיה חמורה בתחום הקליפים. הפטרייה תוקפת את העלים והפירות של זנים רגישים. הפגיעה בזנים רגישים היא משמעותית ביותר. מניעת המחלה נעשית כיום על ידי ריסוסים כימיים. העמידות למחלת החלפת מקורה בגן בודד במשפחת הקליפים. לזיהוי העמידות-רגישות קיים מבחן פיטופתולוגי ברמת העלה הדורש השקעה רבה ולכן אינו מיושם. המטרה בעבודה זו היא זיהוי סמנים אחוזים לעמידות האלטרנריה בקליפים על ידי שילוב של גישות פיטופתולוגיות גנומיות וביואינפורמטיות על מנת ליישם סמן זה בתוכנית ההשבחה.

**מטרות:** 1. איפיון התכונה ברמה הפיטופתולוגית. 2. מציאת השונות הקשורה לעמידות לאלטרנריה. 3. יישום של סמן העמידות בתוכנית ההשבחה.

**שיטות עבודה:** מבחן פיטופתולוגי לזיהוי צמחים עמידים רגישים לאלטרנריה. ריצוף של דנ"א גנומי מהורי אוכלוסיית המיפוי, בטכנולוגיית Illumina Hi-Seq, ועיבודו לשונות גנטית. העיבוד נעשה בעזרת מיפוי לשלד של גנום התפוז של כל אחד מההורים. בהמשך לצורך אסוציאציה של התכונה עם סמן רוצפו צבר של 40 צמחים מדור F1 המראים עמידות לאלטרנריה וצבר נוסף 60 צמחים למציאת סמנים האחוזים לתכונה. פתוח שבב SNP להדרים ובדיקת הצברים השונים בעזרתועל מנת למצוא סמנים האחוזים לתכונה.

**תוצאות:** בעזרת המבחן הפיתופתולוגי אופיין אוסף ההדרים ואוכלוסיה מתפצלת לתכונה. רוצף הגנום של שני סוגי עצי קליפים: אורה המראה עמידות לאלטרנריה ומורקוט מראה רגישות לאלטרנריה. הגנומים מופו לשלד הגנום של התפוז על מנת למצוא את השונות (SNP). בוצעה השואה בריצוף גנומי של צברים עמידים ורגישים תוצרי הכלאה ובוצע ניתוח ביואנפורמטי שזהה שאין איזור אחד בגנום שאחוז לתכונה. למרות זאת נבדקו סמנים מכל האיזורים שנראו כחשודים אך לא נמצאה תאחיזה לתכונה. לפיכך בחרנו להשתמש בגישה של bulk segregation analysis על SNP chip. גם בגישה התגלו מעט מאד סמנים שיתכן ואחוזים חלש מאד לתכונה.

## מבוא

בהדרים, גורמים תתי מינים שונים של *Alternaria alternata* למחלות הכתמים השחורים והכתמים החומים על זני הדרים שונים. מחלת הכתמים החומים או כתמי החלפת בהדרים התגלתה בישראל בתחילת שנות השמונים של המאה שעברה (1). ומאז היא מהווה בעיה חמורה בתחום הקליפיים המשפיעה על זני טאנגריין, אשכולית והיברידים שלהם (*tangerines, grapefruit (C.paradisi Macf.)*). המחלה *Alternaria brown spot* נגרמת על ידי תת גזע ספציפי (*A. alternata pathotype tangerine*) של אלטרנריה שזוהה כמפריש את הטוקסין ACT. מנגנון הפעולה המדויק של הרעלן עדיין לא זוהה. הפטרייה תוקפת את העלים והפירות של זנים רגישים. פרי שנפגע בשלבי ההתפתחות הראשונים שלו עלול לנשור. הפגיעה בפרי בשלבים מאוחרים יותר מתבטאת בהופעת נקודות שחורות-חומות על הפרי, נקודות אלה פוגעות באיכות הפרי באופן המונע את ייצואו ומורידה את מחירו. הפגיעה בזנים רגישים היא משמעותית ביותר. מניעת המחלה נעשית כיום על ידי ריסוסים כימיים מספר פעמים רב בשנה. ידוע שחלק מזני הקליפיים מגלים עמידות לאלטרנריה ואינם נדבקים כלל (2). המנגנון המוצע הוא גן יחיד לעמידות הקיים בחלק מזני הקליפיים כאשר העמידות היא רצסיבית (3).

שלד הגנום של הקלמנטינה יצא ע"י International Citrus Genome Consortium ומופקד בפרויקט הגנומי של הצמחים ה-phytozome של Joint Genome institute (JGI) (4). הגנום של הקלמנטינה שגודלו מוערך כ-296 Mb שלד גנום התפוז נבנה על ידי קבוצה אחרת והוא בגודל של כ-328 Mb (5). בניית שלד הוא תהליך בו מסדרים את רצפי הקונצנזוס הנוצרים באיסוף הראשוני של הקריאות (הקונטיגים) אחד ביחס לשני לכדי מבנה גדול יותר (6). התהליך הזה דורש מידע חישובי, כמו ריצוף דו-צדדי (paired-end), סמנים ממפות גנטיות או ריצופים אחרים כגון ריצוף של bacterial artificial chromosomes (BAC). תוצאת הריצוף בנפח גבוהה היא קריאות של רצפים קצרים (כ-100 בסיסים) ואנו קוראים להם כאן קריאות. את הקריאות מחברים אחד לשני בתהליך האיסוף (אסמבלי) ליצירת רצף קונצנזוס ארוך יותר הנקרא קונטיג. לאחר שמסדרים את כל הקונטיגים ל-scaffold או בשמו הנוסף סופר-קונטיג, לא תמיד ישנה חפיפה והמשכיות של קונטיג אחד את משניהו נוצר. לעיתים יודעים שקונטיג מסוים נמצא במרחק של X בסיסים מהשני אבל לא יודעים מה קיים ביניהם. כתוצאה מכך נוצר scaffold עם gap (רווח) את הרווח הזה ממלאים ב-N המציין בסיס כלשהו. אחת הדרכים לגלות SNPs (התמרות נוקליאוטידים נקודתיות) היא להשתמש בריצוף-חוזר (re-sequencing) של הצמח. הטכנולוגיות החדשות מאפשרות הסתכלות כלל-גנומית על ההתמרות. ככלל בטכנולוגיות החדשות כמו Illumina אם חוזרים על ריצוף של נוקליאוטיד לפחות עשרה פעמים בגנום זה מספיק כדי לוודא את זהות האלל. כך שצריך כיסוי של לפחות עשרים ריצופים חוזרים לכל נוקליאוטיד כדי לוודא שאכן בנוקליאוטיד ההתמרה היא ודאית (7). את הריצוף החוזר ממפים ללגנום ה-reference בעזרת תוכנות מיפוי, כמו למשל bowtie או Mosaik. תוכנות אלו מייצרות אינדקסים עבור הגנום וממקמות את ביעילות ובמהירות את הקריאות של הריצוף החוזר. בחלק מהמקרים הקריאה ממופת ליותר ממקום אחד בגנום ואז יש להחליט אם משתמשים בה או מתעלמים ממנה. במקרה של התמרות אנו מעוניינים להמנע מהבדלים בין רצפים חוזרים

ולכן משתמשים בקריאות שמופו באופן ייחודי לאחד מהמקומות בגנום. שימוש באמצעים אלו יכול לזהות סמנים האחוזים לתכונות בהתאם לחומר שעובר ריצוף בנפח גבוה. גישה נוספת שניתן להשתמש בה לזיהוי תכונות היא שמוש בשבבי דנא . היתרון של השבבים הוא בכך שיש עליהם אינפורמציה מוגדרת והם מסכמים את הסיגנל כולו. בריצוף ישיר הרבה פעמים הכיסוי לא אחיד בגלל בעיות של כיסוי הנובעות בעיקר מכך שלא כל החומר מיוצג בצורה אחידה ויכולת הכיסוי עדיין מגבלת. שבבי דנא לחלק גדול מהגידולים חקלאים עדיין לא פותחו. בעבודות קודמות פותחו על ידינו שבבי דנא למספר אורגניזמים ביניהם מלון(9).

### לאור זאת מטרות המחקר היו:

1. איפיון התכונה ברמה הפיטופתולוגית .
2. מציאת השונות הקשורה לעמידות לאלטרנריה.
3. יישום של סמן העמידות בתוכנית ההשבחה.

### פירוט עיקרי הניסויים:

#### 1. איפיון התכונה ברמה הפיטופתולוגית

**איסוף חומר ביולוגי** - אוכלוסיית המיפוי שבה אנו משתמשים היא דור F1 תוצר ההכלאה מורקוט X אורה . (מורקוט רגיש לאלטרנריה הטרזיגוט לתכונה; אורה עמיד הומוזיגוט רצסיבי). במסגרת הפרויקט נאספו זני ההורים, מספר רב של קליפים אחרים, אוכלוסיית המיפוי (כ-100 פרטים) ונבחנו במבחן פיטופתולוגי של הדבקה על עלים צעירים מנותקים. הפטרייה המדביקה והמבחן הראשוני העמד לרשות הפרויקט על ידי דר דוד עזרא . הניסיונות נערכו במספר חזרות ( 5 עלים לבדיקה) עם עלים צעירים שניתן להשיגם בדרך כלל רק במרץ אפריל או בספטמבר . הזמן שנדרש לביצוע בהיקף בינוני של הבדיקות הוכיח לנו שוב למה מבחן זה אינו מיושם בתוכנית הטיפוח. כפי שהיה צפוי היחסים של צמחי ה-F1 היו קרוב ליחס 1: 1 (41 עמידים 59 רגישים) כמצופה מהכלאה בין הטרזיגוט (רגיש) להומוזיגוט רצסיבי עמיד. בנוסף נמשך אפיון זנים מאוסף ההדרים שקיים סך הכל נבחנו 29 זנים (טבלה1). בהתאם לנתונים אלו הוכנו 4 מאגרים של דנא של רגישים עמידים מ F1 ורגישים ועמידים מאוסף הזנים.

זן	עמידות	זן	עמידות	זן	עמידות	זן	עמידות
אבנה	עמיד	טרוייר	עמיד	ניבה	רגיש	רגיש	רגיש
אור	עמיד	ינוב	רגיש	נקטר	עמיד	עמיד	עמיד
אורה	עמיד	יעל	עמיד	עידית	רגיש	רגיש	רגיש
איממורה	?	לי	רגיש	פונקן	רגיש	רגיש	רגיש
אלנדייל	עמיד	מורקוט	רגיש	פורצון	רגיש	רגיש	רגיש
הדס	עמיד	מיכל	רגיש	פזית	עמיד	עמיד	עמיד
וילקינג	עמיד	מינאולה	רגיש	פרציילד	רגיש	רגיש	רגיש

טמפל	עמיד	מירב	רגיש	קינג	עמיד
טרדיבו	עמיד	נורית	עמיד	קינ	עמיד
				ראשון	עמיד
				שני	רגיש

### **טבלה 1: סיכום בדיקות עמידות לאלטרנריה שבוצעו במסגרת הפרויקט**

בדיקות עמידות לאלטרנריה בוצעו לסדרת זנים מחלקות האוסף של ההדרים הנמצאות במכון וולקני ואו בחוות צריפין. הבדיקות בוצעו על עלים צעירים בזמן לבלוב (מספר עלים אולחו לכל זן). זנים שנמצאו כעמידים נבדקו שוב על מנת לוודאות שאכן מדובר בזנים עמידים. בכל ניסיון השתמשנו בביקורת חיובית- זן רגיש ובקורת שלילית – זן עמיד והדבקה ללא גורם המחלה.

#### **2. מציאת שונות הקשורה לעמידות לאלטרנריה**

**2.1 ריצוף בנפח גבוה** - רנא הוכן משני ההורים מורקוט ואורה מאוסף של מספר רקמות (עלים פריחה ופירות בשלבים שונים). הרנ"א עורבב לדגימה אחת מתוך ניסיון לצמצם את השונות הפנימית – של מספר הטרנסקריפטים לגן. נעשה ניסיון לבצע ריצוף בעזרת טכנולוגיית ABI Solid במרכז הגנומי של האוניברסיטה העברית גבעת רם. הדגימה הוכנה במרכז מרנא שסופק על ידינו על בסיס קיטים של חברת ABI ל Ribosomal depletion. ניתוח ביואינפורמטי העלה שרוב החומר שהתקבל אינו מיצג את טרנסקריפטום ההדרים ולכן החלטנו לבצע ריצוף גנומי שישווה לגנום הקלמנטינה והתפוז המפורסמים.

#### **2.2 ריצוף בנפח גבוה דנא גנומי.**

לאור פרסום גנום התפוז שנמצא על ידינו כבעל איכות טובה יותר מאשר גנום הקלמנטינה החלטנו להשתמש בגנום זה כרצף ייחוס (reference) לעבודה הגנומית שאנו מבצעים. נשלחו לריצוף גנומי דנא שני ההורים אורה ומורקוט, שני צברים של דנא גנומי של צמחי ה-1F העמידים ושני צברים דנא גנומי תוצרי ההכלאה רגישים. הריצוף בוצע על מכונת 2000HISEQ ו-2500HISEQ במרכזים שונים (אוניברסיטת אילינוי ומכון וייצמן). רוב הדוגמאות הורצו בערוץ בודד לדוגמא (הצברים של הצמחים הרגישים הורצו על 2/3 ערוץ כל אחת). הצפי של כמות הריצוף מכל ערוץ הוא בסדר גודל 20Gb (ערוץ 1 מכסה את גנום ההדרים X 50). בטבלה מספר 2 מסוכמות התוצאות הראשוניות של הריצוף. הרצנו תוכנית שממפה את הקריאות של הפרגמנטים בגודל 100bp לגנום של התפוז (*Citrus sinensis*). 45-55% מהקריאות מופו למקום אחד בלבד (uniquely) בשלד הגנום. קריאות ריצוף הגנום של ההורים כיסו אחוזים גבוהים מגנום ההדרים (uniquely) משלד הגנום המפורסם בחציון של 34-50X. וממוצע של 80-101X עבור כל נוקלאוטיד. מכאן ניתן להסיק שרוב הגנום מכוסה היטב על ידי ההורים.

דנא	reads	*כיסוי באחוזים
מורקוט	196 מיליון	88%
אורה	151 מיליון	87%
F1 עמידים	483 מיליון	89%
F1 רגישים	300 מיליון	84%

**טבלה 2. כיסוי הריצוף בהשוואה לעומת הREF שהוא C. sinensis (תפוז).** גודל הרצף המופקד של התפוז הוא 328Gb. הכיסוי המשתף בחפיפה בין הדוגמאות השונות כ-82 אחוז.

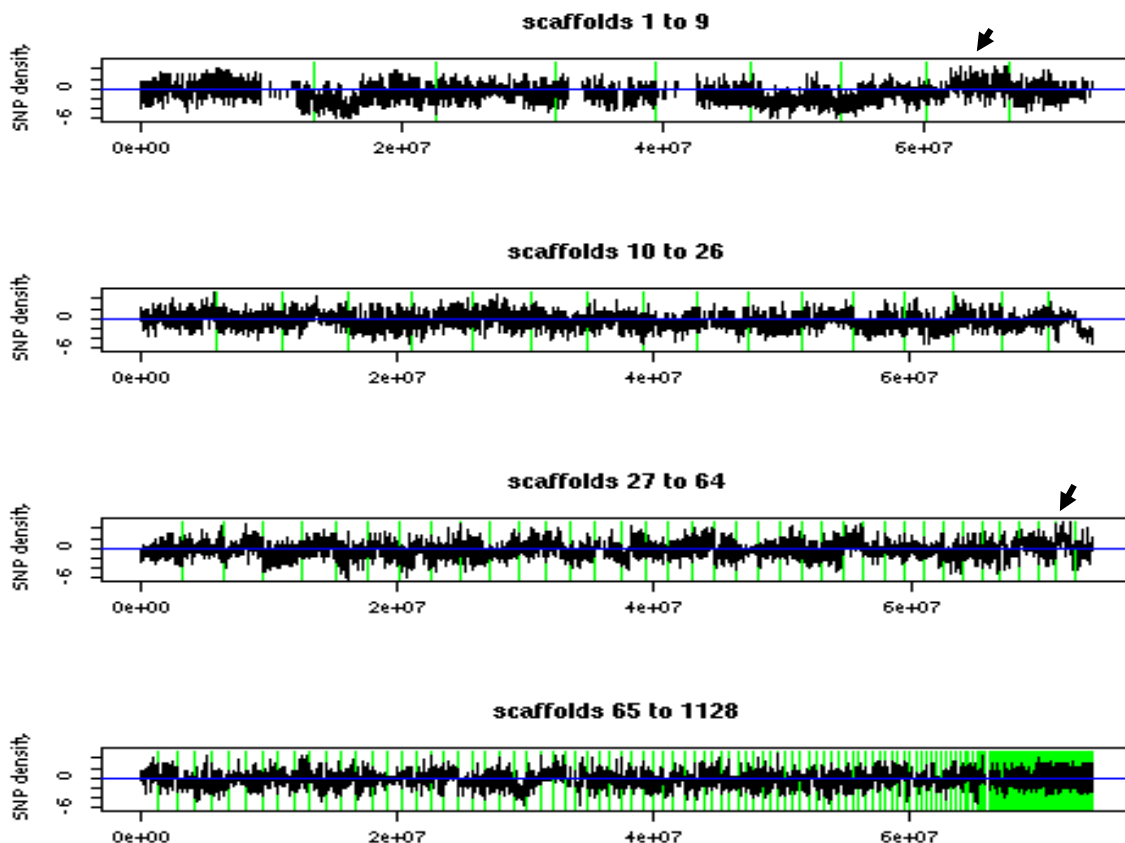
**2.3 קביעת הגנוטיפ** - ראשית מופו הקריאות של כל גנום: אורה, מורקוט והגנום של הצאצאים שלהם מדור F1. כפי שמתואר למעלה. לקביעת הגנוטיפ קדמה הקביעה מהי התמרה אמינה מכלל השנויים ברצף. אנו התייחסנו אך ורק להתמרות בי-אלליות. לשם כך קבענו במבחן סטטיסטי האם פרופורצית הכיסוי של האלל בעל הכיסוי הנמוך ביותר היא משמעותית נמוכה משני האללים האחרים. אם כן, אנו מתייחסים לשני האללים הגבוהים כאללים של ההתמרה והשלישי הוא טעות חיבור הקריאות (אסמבלי) ואם לא הרי שההתמרה הזו לא עונה להגדרת התמרה בי-אללית. קביעת הגנוטיפ התבססה על פי מספר הפעמים שהוא רוצף. בגנום בו קיים אלל אחד בלבד אנו דורשים כיסוי של ריצוף 4 פעמים ומעלה עם sequence quality (phred scale) גבוה 25- הגנום מוגדר הומוזיגוט לאלל. בהתמרה שבה נמצאו שני אללים אנו מצפים שהכיסוי שלהם יהיה בפרופורציה דומה, כיוון שאין להניח שיש העדפה לרצף אלל אחד על פני השני. לפיכך על מנת לקבוע הטרוזיגוט בוצע מבחן סטטיסטי בהנחת האפס שכמות הריצוף של כל אחד מהאללים צריכה להיות זהה. התמרות שלא יצאו משמעותיות סטטיסטית הגנוטיפ שלהם באותו גנום הוגדר כהטרוזיגוט. טבלה 3 מראה את השכיחות של ה SNP בחלק מצירופי הגנוטיפ השונים. מתוך כלל האפשרויות של הגנוטיפים מוצגות בטבלה ארבעת האפשרויות הנוצרות מהמידע על גנום ההורים. טבלה 3 מסכמת את ההבדלים בין ההורים לפי הנחת העבודה

Ora			
Hetero	Homo		
217640	75955	Homo	Murcott
149747	198771	Hetero	

**טבלה 3. שונות בין ההורים. SNP שנמצאו בין ההורים ועל סמך הפרמטרים שתוארו מבחינת כיסוי ריצופי.**

- כדי למצוא סמנים האחוזים לתכונה אנו מחפשים סמנים שמתנהגים כמו התכונה. אורה הוא עמיד לאלטרנריה ועמידות היא רציסבית לפיכך האללים של התכונה בו הם הומוזיגוטים. לעומתו ההורה מורקוט הוא רגיש לאלטרנריה והכלאות הראו שגנוטיפ של התכונה הוא הטרוזיגוט. את הריצוף לצאצאים מדור F1 עשינו אך ורק לצאצאים העמידים לאלטרנריה כלומר שהגנוטיפ שלהם הוא הומוזיגוט (הנחת העבודה היא שאללים הקרובים לתכונה יתנהגו כתכונה עצמה). כמות ההתמרות שהגנוטיפ שלהם הוא הומוזיגוט-באורה, הטרוזיגוט במורקוט והומוזיגוט לאלל אורה ב F1 היא 53,074.

**שימוש ברצף לזהוי תאחיזה-** הדרך שבה בחרנו לזהות סמנים הקשורים לתכונה היא על סמך הפיזור הפיזי שלהם וזאת על סמך ההנחה שבאזור האחוז לתכונה בצורה הדוקה הרקומביציה תלך ותפחת. כדי להתמקד בסמנים האחוזים לתכונה אנו מריצים חלון גולש בגודל 35kbp ומסתכלים על סך כל הסמנים שהם הומוזיגוט-באורה, הטרוזיגוט במורקוט והומוזיגוט לאלל אורה ב F1 לסמנים שהם הומוזיגוט-באורה, הטרוזיגוט במורקוט והטרוזיגוט F1 או הומוזיגוט של האלל השונה מאורה ב F1. היחס סכום הסמנים שהם הומוזיגוט-באורה, הטרוזיגוט במורקוט והומוזיגוט לאלל אורה ב F1 (סיגנל) לסמנים ברקע שהם הומוזיגוט-באורה, הטרוזיגוט במורקוט והטרוזיגוט F1 או הומוזיגוט של האלל השונה מאורה ב F1 (קו שחור ; סקלה לוגריתמית). הקווים הירוקים האנכיים הם תחומי ה scaffolds השונים. יחס הגבוה מ-1 מיצג שכיחות גבוהה יותר של סמנים הצפויים להיות אחוזים. אנו מחפשים רצף של יחס סמנים הגדול מ-1 לאורך טווח מסוים מתוך ההנחה שזור מסויים יהיה בתאחיזה ולא סמן בודד.



**איור 1. תאחיזה לתכונה.** עבור חלון של 35Kbp חושב היחס סכום הסמנים שהם הומוזיגוט-באורה, הטרוזיגוט במורקוט והומוזיגוט לאלל אורה ב F1 (סינגל) לסמנים ברקע שהם הומוזיגוט-באורה, הטרוזיגוט במורקוט והטרוזיגוט F1 או הומוזיגוט של האלל השונה מאורה ב F1 (קו שחור ; סקלה לוגריתמית). הקווים הירוקים הם תחומי ה scaffolds השונים. יחס הגבוה מ-1 מיצג שכוחות גבוהה יותר של סמנים הצפויים להיות אחוזים. אזורים גדולים רציפים המראים יחס כזה מצוינים בחץ. ציר ה X מרחק בbp. ציר ה Y יחס סמנים(ראה הסבר למעלה).

מתוך מספר אזורים שזוהו כחשודים בתאחיזה לתכונה תוכנו 48 זוגות פרימרים למבחני SNP. המבחנים נבדקו על צאצאי ה F1 וזנים עמידים ורגישים במכשיר ה Fluidigm EP1 (מכשיר לבדיקת מבחני SNP בנפח גבוה). הסמנים נמצאו לא אחוזים וברובם הראו סגרגציה שאינה מנדלית (הרחבה בדיון).

**שמוש בשבבי SNP לזהוי תאחיזה-** לאור התוצאות הבלתי מספקות תוך שימוש בריצוף גנומי החלטנו לבצע ניסיון נוסף תוך שימוש בטכנולוגיה נוספת שבבי דנא שבה יש לנו ניסיון רב משימוש במספר מערכות חקלאיות לזהוי תכונות. לצורך כך תוכנן שבב המכיל 45 אלף SNP המבדילים בין ההורים ובוצעו היבריזציות של דנא מצברים של דור F1 בין הצברים העמידים לרגישים (תמונה 2). גם כאן ניתן לראות

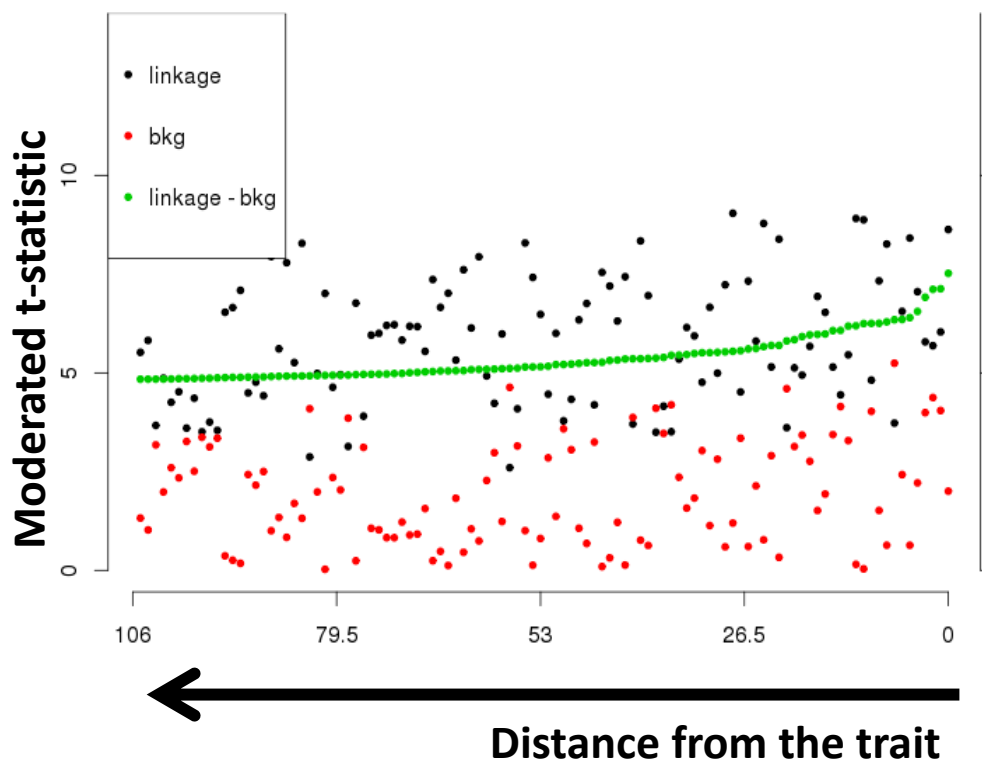


שאינן סמנים הבולטים באופן ברור (הקו הירוק שמייצג את עליית פערי הסיגנל של סמנים מהעמיד לעומת הרגיש). אם היו סמנים אחוזים היינו מצפים לקו ירוק שעולה ככל שמתקרבים לתכונה. כדי לוודא שאכן התוצאה שלילית נבדקו מספר סמנים שהראו תאחיזה חלקית בעזרת נתוני הריצוף הקודמים. גם כאן לא נראו תוצאות חיוביות.

### 3. דיון

בעבודה זו שולבה תשתית גנטית עם מבחנים פיטופתולוגים ונסיונות גנומים על מנת לזהות סמן לעמידות לאלטרנריה בקליפיים. כדי לנסות ולהבין את התוצאה השלילית שקבלנו-חוסר תאחיזה של הסמנים שזוהו לתכונה של עמידות לאלטרנריה ננסה לפרט בנושא של כל אחד ממרכיבי המערכת. המודל הגנטי הוצע על ידי מספר קבוצות ואושש על ידינו בבדיקה גם של האוכלוסיה וגם של האוסף. האוכלוסיה הגנטית מורכבת מתוצרי הכלאה של הזנים מורקוט ואורה. יחסי העמידים רגישים באוכלוסיה קרובים למצופה (1:1) על סמך הריצוף של ההורים ניתן לבדוק האם אכן ההכלאה היא תקינה בבדיקה מעמיקה של הריצוף נתגלתה זהות טובה לאורה ובעיות של קטעים שחלקם אינם מתאימים למורקוט. הסבר לתופעה זו יכול להיות זהום כלשהו (תופעה מוכרת) בהכלאה אך אינו מהווה בעיה מרכזית. בעיה נוספת שעולה ומהווה בעיה יותר מרכזית היא סגרגציה לא מנדלית של סמנים שיכולה למסך על התאחיזה שאנו מחפשים. מעבודה מולקלרית שהתפרסמה באחרונה (8) נמצא שבהכלאות של שני טיפוסי הדריס שיעור הסגרגציה הלא מנדלית הוא בהיקף של כ-30 אחוז.

המבחנים הפיטופתולוגים עצמם אינם מהוים בעיה- התוצאות שלהן נקיות וחוזרות על עצמן בצורה סדורה. המערך הגנומי שבו השתמשנו מורכב משני חלקים עיקריים: ריצוף גנומי בצורה רנדומלית (shotgun) ושימוש בשבבי דנא. בשיטה הרנדומלית יתכן שהאזור שבו נמצאת התכונה כלל אינו מכוסה על ידי הריצוף-כמו שניתן לראות אנו מכסים בסביבות 85-90 אחוז מהגנום המופקד (שגם הוא עצמו אינו מלא). קיימת אפשרות שאזור שלם אינו מרוצף ולכן אנו לא מוצאים את הסמנים שאחוזים לתכונת העמידות. אפשרות זו יכולה להסביר גם את התוצאה בשבבי הדנא שבהם השונות הקיימת על השבבים מקורה משונות שזהותה על ידינו בריצוף. טכנולוגיה של שימוש בשבבים לזהוי סמנים אחוזים בוצעה על ידינו במגוון אורגניזמים בהצלחה רבה וזהו הכשלון הראשון שלנו בשימוש בגישה זו – ההסברים העיקריים שאנו חושבים עליהם קשורים לכיסוי הרצף וסגרגציה שאינה מנדלית. ההסברים שספקנו הינן השערות בלבד ויש קושי להוכיח אותן. לאור התוצאות שהתקבלו אנחנו מנסים לבחון האם ניתן למצוא סמן בעזרת האוסף הגנטי שברשותנו. ניסיונות אלו הם מעבר לתוכנית מחקר זו.



**תמונה 2.** היברידיזציה תחרותית תוך שימוש בשבבי SNP למיפוי עמידות לאלטרנריה בהדרים. ניתוח תוצאות ההיברידיזציות. בשחור פער הסיגנל בין הממצע של הפולים של צמחים שעמידים לאלטרנריה לבין אלו שאינם. באדום ממצע הסיגנל של הפולים בעלי אותו פנוטיפ. בירוק הפחתה של הסיגנל האדום מהשחור – נותן את הסיגנל הירוק- ככל שקרוב יותר לתכונה הסיגנל הירוק מתחזק

## טופס סיכום שאלות מנחות

### **מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה(כפי שהגדרו בהצעת המחקר)**

1. . איפיון התכונה ברמה הפיטופתולוגית .
2. . מציאת השונות הקשורה לעמידות לאלטרנריה.
3. . ישום של סמן העמידות בתוכנית ההשבחה.

### **עיקרי הניסויים והתוצאות.**

בעזרת המבחן הפיתופתולוגי אופיין אוסף ההדרים ואוכלוסיה מתפצלת לתכונה. רוצף הגנום של שני סוגי עצי קליפים : אורה המראה עמידות לאלטרנריה ומורקוט מראה רגישות לאלטרנריה. הגנומים מופו לשלד הגנום של התפוז על מנת למצוא את השונות (SNP). בוצעה השואה בריצוף גנומי של צברים עמידים ורגישים תוצרי הכלאה ובוצע ניתוח ביואנפורמטי שזהה שאין איזור אחד בגנום שאחוז לתכונה. למרות זאת נבדקו סמנים מכל האיזורים שנראו כחשודים אך לא נמצאה תאחיזה לתכונה. לפיכך בחרנו להשתמש בגישה של bulk segregation analysis על SNP chip. גם בגישה התגלו מעט מאד סמנים שיתכן ואחוזים חלש מאד לתכונה.

### **מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו . האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח**

מטרות המחקר לא הושגו. למרות מאמץ רב ושימוש במספר טכנולוגיות שונות לא זוהה על ידינו סמן שאחוז לתכונה של עמידות לאלטרנריה בקליפים. הסיבות לכשלון אינן ברורות אם כי הועלו על ידינו מספר סברות בדיון המדעי. כפתרון לבעיה זו אנו מציעים להשתמש באוסף הגנטי ולבצע סריקה גנטית שם – למרות שסריקה באוסף אינה קלה והרעש בה הוא גבוה. תהליך זה החל על ידינו ויבוצע במסגרת זמן שהיא מעבר לתוכנית זו.

**פרסום הדוח : אני ממליץ לפרסם את הדוח**

1. Solel, Z. 1991. Alternaria brown spot on Minneola tangelos in Israel. Plant Pathol. 40:145-147.
2. Kohmoto. K, Akimitsu. K, Otani, H. 1991. Correlation of Resistance and Susceptibility of Citrus to *Alternaria alternata* with Sensitivity to Host-Specific Toxins. Phytopathology 81: 719-722.
3. Dalkilic, Z., L.W. Timmer ve F.G. Gmitter, Jr. 2005. Linkage of an Alternaria disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130:191-195.
4. Aleza P, Juárez J, Hernández M, Pina JA, Ollitrault P, Navarro L., 2009. Recovery and characterization of a Citrus clementina Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole Citrus genome sequence. BMC Plant Biology 9:110
5. Xu Q et al., 2013. The draft genome of sweet orange ( Citrus sinensis). Nat Genet 45: 59-66
6. Gritsenko GA, Jurgen FN, Marcel J, Reinders T, and De Ridder D., 2012. GRASS: a generic algorithm for scaffolding next-generation sequencing assemblies. Bioinformatics; 28(11): 1429-1437.
7. Nielsen, R., J. S. Paul, et al., 2011. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data." Nature reviews. Genetics 12(6): 443-451
8. Ollitrault P, Terol J, Garcia-Lor A, Bérard A, Chauveau A, Froelicher Y, Belzile C, Morillon R, Navarro L, Brunel D, Talon M., 2012. SNP mining in C. clementina BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. BMC Genomics 10;13:13.
9. Sherman A, Eshed R, Harel-Beja R, Tzuri G, Portnoy V, Cohen S, Rubinstein M, Schaffer AA, Burger J, Katzir N and Ophir R(2012) Combining bulk segregation analysis and microarrays for mapping of the pH trait in melon. Theor Appl Genet DOI 10.1007/s00122-012-