

הגנטיקה של מילוי התרמיל בתנאי מים מופחתים באגוזי אדמה

The genetics of pod filling under water limiting conditions 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:** מילוי התרמיל באגוזי-אדמה מושפע מאוד ממחסור במים לאורך ובסוף עונת הגידול. לתכונת מילוי התרמיל באגוזי-אדמה יש גם מרכיב גנטי הבא לידי ביטוי בכך שגנוטיפים שונים הינם בעלי כושר מילוי תרמיל שונה. על אף חשיבותה הרבה של תכונת מילוי התרמיל בתנאי מים מופחתים והידיעה שקיימים גורמים גנטיים המשפיעים עליה, לא נערך עדיין מחקר מסודר שמתאר את הקשר שבין הגנוטיפ ורמת ההשקיה על רמת מילוי התרמיל.
2. **מטרות המחקר:** 1. לבחון את השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על מילוי תרמילים באגוזי-אדמה. 2. לבחון את תכונת מילוי התרמיל באוכלוסיות גנטיות מתפצלות. 3. לפתח סמני SNP ולזהות מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת מילוי התרמיל באגוזי-אדמה. 4. לאתר מנגנונים ביולוגיים שעשויים להשפיע על מילוי התרמיל באגוזי אדמה בכלל, ועל ההבדל בין זנים בפרט.
3. **שיטות העבודה:** ארבעה גנוטיפים הכוללים זנים קיימים וקווי טיפוח חדשים נבחנו במבנה דו-גורמי עם ארבעה טיפולי השקיה על חלקה ייעודית במו"פ דרום. מכל חלקה חושבו פרמטרים רבים ביניהם רמת המילוי (שיעור הגרעין). בהמשך המחקר, נבחנו שתי אוכלוסיות מתפצלות מדור F_2 בתנאי שדה לרמת המילוי ותכונות נוספות. מכל אוכלוסייה נבדקו כ- 250 צמחים. DNA נאסף מכל הצמחים. פיתוח וזיהוי הסמנים נעשה באמצעות טכנולוגיות GBS (genotyping by sequencing) במעבדה ובשירות חיצוני של אוניברסיטת קורנל. הפנוטיפ של התכונה למילוי תרמיל נבדק על בסיס ממוצעי משפחות בדור F_3 . נערכו ניסויי RNAseq להשוואת ביטוי הגנים בגרעינים ותרמילים של שני קווים קיצוניים.
4. **תוצאות:** נמצא כי רמת ההשקיה משפיעה באופן מובהק על תכונות שיעור הגרעין, אחוז ראש מצומק, משקל התרמילים ברוטו, משקל 100 תרמילים נטו ומשקל 100 זרעים. לא נמצאה ה"ג מובהקת גנוטיפ X סביבה על רכיבי תרמיל, אך עדיין גנוטיפים ספציפיים הראו ירידה במילוי התרמיל עם המעבר ל- 80% השקיה. תכונת רמת מילוי התרמיל נמצאה מתפצלת מאוד בדור ה- F_2 של ההכלאה בין הזן "חנוד" ושני הורים "אקזוטיים" בעלי פוטנציאל מילוי נמוך. יתר על כן, נמצאו מספר רב של פרטים outliers אשר בהם שיעור הגרעין היה נמוך במיוחד. אף-על-פי כן,

רמת התורשתיות של התכונה הייתה גבוהה יחסית. נמצאו מתאמים גנטיים מובהקים בין תכונת שיעור הגרעין לבין משקל הזרע, אורך התרמיל ורמת "ראש מצומק", אך לא בין שיעור הגרעין לבין משקל תרמיל כללי ורמת נגיעות בגרב. ניסוי ראשוני של פיתוח סמני GBS הראה כי קיימים כמה אזורים בגנום בעלי השפעה על התכונה, בעיקר QTL אחד בכרומוזום A05. אולם מערכת ה-GBS נמצאה לא כל כך יעילה במערכת שלנו, עם מספר סמנים קטן ולא ספציפי לתת-גנום. ולכן אנו עוברים כעת לשימוש בציפ של affymetrix שפותח בשיתוף עם מעבדה בארה"ב. בניסוי RNA השוואתי נמצא כי בגנוטיפ עם רמת מילוי טובה, יש ייצוג גבוה יותר של ביטוי גנים בגרעינים הקשורים לתהליכי נשימה, ייצור סוכרים ומטבוליזם של שמן. לעומת זאת, בגנוטיפ עם המילוי הטוב פחות יש ייצוג גבוה יותר של ביטוי גנים בקליפת התרמיל הקשורים להבשלה מוקדמת של דופן ראשונית ומשנית, מה שהיה בהתאמה עם עליה מוקדמת בשיעור צלולוז בקליפה.

5. מסקנות: א. מצב המים בקרקע משפיע על התפתחות הזרע באופן ישיר ולא רק מהכיוון של העברת מוטמעים מצמח האם. ב. השפעה זו באה לידי ביטוי בעיקר ברמות השקיה נמוכות יותר מ-80%, כאשר בהרבה מקרים לא היו הבדלים מובהקים בין רמות 80%, 100% ו-120%, מה שאומר כי בחלק מהמקרים ניתן בהחלט להוריד מעט את רמת ההשקיה ללא פגיעה ברכיבי מילוי התרמיל. ג. בהשבחה, סלקציות עבור תכונת המילוי של התרמיל עשויים להיות יעילים כבר בדורות ראשונים של הכלאות, אך יש צורך באוכלוסיות טיפוח גדולות לשם בניית התכונות. ד. שימוש בסמני DNA מסוג GBS נמצא יעיל ברמה נמוכה באגוזי אדמה תרבותיים. יש לעבור לשיטות מיפוי אחרות. ה. שיפור בתהליכי ייצור מוטמעים ואנרגיה בגרעין, ועיכוב תהליכי הבשלת דופן התרמיל עשויים להביא לעלייה בפוטנציאל מילוי התרמיל באגוזי-אדמה.

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
4	2. מטרות המחקר
5	3. שיטות וחומרים
9	4. פירוט עיקרי הניסויים
25	5. מסקנות
27	6. ספרות מצוטטת

1. מבוא

אחד האתגרים העיקריים העומדים בפני ענף אגוזי-האדמה (אגא"ד) בישראל הוא המחסור במים להשקיה. ואכן, עקב עליות חדות במחירי המים והקטנת המכסות לחקלאים ישנה ירידה חדה ברווחיות של גידול הבוטנים בישראל ופגיעה בכדאיותו. בעונת 2012, למשל, הייתה ירידה חדה של כ- 30% בגידול אגא"ד באזור הנגב המערבי עקב צמצום במכסות המים לחקלאים. מיותר לציין כי מדובר בגידול קיצי בתנאים של השקיה מלאה, ולכן גורם המים מהווה את התשומה העיקרית של המגדלים, וכל חיסכון בקו"ב מים מוזיל את עלויות הייצור ומעלה את הרווח לחקלאי.

רמת המילוי של התרמיל היא אולי התכונה הראשונה שנפגעת ממצב של השקיה לא מיטבית. מילוי התרמיל הוא שלב התפתחותי חשוב המשפיע על רמת היבול בקטניות רבות [1, 2]. בסויה, למשל, הוצע כי גם פעילות הזרע (מבלע) וגם פעילות צמח האם (מקור) משתנים על ידי מחסור במים, וזאת על מנת לשמר את השטף של מוטמעים לעוברים המתפתחים [3]. שני אלו נפגעים בצורה חריפה בתנאים של מחסורי מים לפרקי זמן ממושכים [3]. באגא"ד, חיסרון במים הוא אפילו משמעותי יותר מאשר בקטניות אחרות שכן בגידול זה התרמילים מתפתחים מתחת לפני האדמה ולכן מושפעים באופן ישיר ממצב המים במדיום הקרקע שמסביב. בתחילת התפתחות התרמיל, השחלון (גנופור) מכיל מבנים דמויי יונקות שורשים המתפקדים כשורש לכל דבר בקליטה של מים ומומסים מהקרקע לטובת צמח האם [4]. מאוחר יותר התרמיל שמתפתח אינו מתפקד כשורש, אך מים ומומסים אחדים כגון סידן עדיין נספגים על ידי הקליפה החיצונית והם חיוניים להתפתחות התקינה של הזרע, בייחוד מאחר שההובלה התת-קרקעית של צינורות השיפה אל הזרעים היא מוגבלת יחסית בהשוואה לקטניות אחרות [5]. מחקרים הראו כי פעילות המים (water activity) של קליפת התרמיל עשויה לבקר את מאזן המים של הזרע המתפתח בעיקר בשלבי הגידול הסופיים, ובכך גם את מילוי התרמיל [6]. כתוצאה מכך, מילוי התרמיל רגיש במיוחד לרמות רטיבות נמוכות ומהווה צוואר בקבוק בפיתוח אסטרטגיות לחיסכון במים.

ולראייה, אף-על-פי שהשקיה בטפטוף מהווה הצלחה גדולה מאוד בגידולים אחרים, היא מעולם לא מוסחרה בגידול אגא"ד עקב אי רטיבות מספקת בסביבת התרמילים המתפתחים.

ליכולת המילוי של התרמיל באגא"ד בתנאים שונים יש גם מרכיב גנטי חזק. ידועים למשל הבדלים בין זנים שונים כגון "חנוך" ו"הררי" ביחס לכושר מילוי התרמיל. הזן הררי סובל מבעיות של אי-מילוי נאות של תרמילים כאשר גדל על קרקעות חוליות, במיוחד בתנאי השקיה לא מיטביים, מה שמתבטא בשיעור גרעין נמוך ביחס למשקל התרמיל ("שיעור הגרעין"). לעומתו הזן חנוך הוא סביל יותר למילוי תרמיל בתנאי השקיה לא מיטבית, אך מאידך, סובל מבעיה אחרת של "ראש מצומק" (dead end).

בנוסף, ניסוי מקדים שמטרתו לאפיין את השונות הגנטית של תכונת מילוי התרמיל באגא"ד סרקנו את התכונה באוסף נרחב של כ-130 זנים וקווים "עתיקים" (landraces) [7] המייצגים את כלל השונות הפנוטיפית של המין *Arachis hypogaea*. תוצאות שנלקחו ממספר שנים, קרקעות שונות, ויישומי השקיה שונים הצביעו על שונות גבוהה בשיעור הגרעין בין הקווים השונים באוסף. מסתבר כי בממוצע רב שנתי שיעור הגקעין באוסף נע בין 57.1 (קו PI338338) ו-74.9 (קו Georgia Green). אחד המאפיינים העיקריים שנצפה הוא רגישות גבוהה לתנאי השקיה לא אופטימאליים במספר קווים (כגון PI338338). שונות זו מעלה שוב את ההיפותזה כי רכיבים גנטיים מעורבים בתכונת מילוי התרמיל באגא"ד והקשר שלה למצב המים בקרקע. תצפיות דומות דווחו גם במקומות אחרים בעולם [8], אך בישראל עיקר הידע נובע מתצפיות בחלקות מסחריות, ולא נעשה בעבר ניסוי מסודר שבוחן את מילוי התרמיל בזנים וקווי טיפוח שונים וברמות השקיה שונות.

2. מטרת המחקר

מטרת המחקר העיקרית היא לימוד המנגנון הגנטי המבקר את תכונת מילוי התרמיל באגא"ד והקשר שלה לתנאי השקיה שונים, ושימוש בידע זה כבסיס מדעי לטיפוח מושכל של אגא"ד סבילים יותר לתנאי השקיה מופחתים.

מטרות משנה:

1. בחינת השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על מילוי תרמילים באגא"ד, ועל תכונות נוספות בעלות חשיבות חקלאית ושיווקית.
2. בחינת הגנטיקה של מילוי תרמילים ברקע של מבנה משפחתי (דור F_2), והקשר לתכונות נוספות בעלות חשיבות חקלאית ושיווקית.
3. פיתוח סמני SNP וזיהוי מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת מילוי התרמיל באגא"ד.
4. איתור מנגנונים ביולוגיים שעשויים להשפיע על מילוי התרמיל באגא"ד בכלל, ובפרט על ההבדל בתכונה זו בין זנים שונים בפרט.

3. שיטות וחומרים

3.1 השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על מילוי תרמילים באגא"ד

מבנה הניסוי הוא דו-גורמי עם בלוקים באקראי, כאשר גורם אחד הוא גורם הגנוטיפ והשני הוא גורם ההשקיה.

נבחנו ארבעה גנוטיפים של אגא"ד:

חנוך – זן משתרע, אפיל, רגיש לתכונה של dead end.

הררי - זן שיחי, בכיר למחצה, רגיש לתכונת שיעור הזרע בהשקיה לא מיטבית.

53 – קו "עתיק" (landrace) מטיפוס (PI338338) אשר נמצא במספר תצפיות רגיש ביותר למילוי תרמיל ומובא כאן כביקורת.

B18 – קו טיפוח חדש של מכון וולקני, בעל צורת צימוח שיחית ומבנה תרמיל long shape, בבדיקה ראשונית נמצא בעל שיעור נמוך של dead end ביחס לחנוך, אך גם בעל שיעור נמוך של שיעור גרעין.

ארבעת טיפולי ההשקיה הם:

1. החזרת 100% מצריכת המים מתחילת פריחה ועד סיומה (110-35 ימים לאחר זריעה).

2. החזרת 120% מצריכת המים בתקופה הנ"ל.

3. החזרת 80% מצריכת המים בתקופה הנ"ל.

4. החזרת 60% מצריכת המים בתקופה הנ"ל.

החזרה של 100% בוצעה על בסיס נתוני ליזימטר שהוצב בטיפול זה.

הניסוי נערך בחלקת גידולי שדה במו"פ דרום. חלקה של 24 ערוגות (רוחב ערוגה: 1.93 ס"מ) * 200 מטר הותאמה לביצוע הניסוי: הוצבה מערכת השקיה של ממטירונים במרווחים של 4 ערוגות בין קווי השקיה, 6 מטר ע"ג קו ההשקיה. בוצעה הצבת טיפולים של בלוקים באקראי, 4 טיפולים, 4 חזרות: גודל חלקה – 12 ערוגות * 24 מטר. (3 קווי השקיה * 4 ממטירונים לכל קו, סה"כ 12 ממטירונים). לכל טיפול הפעלה נפרדת. הוצבו שני ליזימטרים קבועים, בשני טיפולים שונים.

נתוני גידול. גידול קודם – חיטה. עיבוד יסוד – משתת מערג. לאחר עיבוד זה בוצע תיחוח. דישון יסוד לא בוצע מכיוון שבבדיקות קרקע נמצאו ערכים מתאימים לגידול אגוזי אדמה. מועד זריעה – 15/4, מועד נייעור – 7/10, סה"כ 175 ימי גידול.

זריעה. שתי שורות בערוגה, 2.5 זרעים למטר שורה. במהלך הזריעה הוזרקו ברזל ובקטריות ריזוביום לחרוץ הזריעה. הליזימטרים נזרעו ידנית בעומד תואם, 2 זרעים בכל נקודה, בוצע דילול לאחר נביטה. במהלך הגידול ניתנו בחלקה טיפולי דישון, מחלות ומזיקים כמקובל באזור. בסיום הגידול בוצעה עקירה ע"י עקרון מוטות מרובעים, ולאחר מכן בוצע דייש ידני. בדיקות. מכל חלקה בבלוק נבדקו הפרמטרים הבאים:

יבול תרמילים כללי נמדד ממקטע של 6 מטר מכל חלקה. משקל תרמילים ברוטו נבדק על 250 תרמילים אקראיים. כמו כן נבדק אחוז תרמילים לא מפותחים, אחוז סינגלים, ואחוז נגיעות בגרב. מתוך 250 התרמילים ברוטו נבחרו 100 תרמילים "אמיתיים" ולפיהם נקבעו שיעור הגרעין (יחס גרעין לכלל התרמיל), אחוז ראש מצומק (מספרי), משקל 100 תרמילים ומשקל 100 זרעים. אחוז שמן נקבע על 5 גרם זרעים באמצעות מיצוי בסולקסלט. צבע הקליפה נבדק על עשרה

תרמילים בשלים, אשר יובשו בתנור 65 מ"צ למשך 48 שעות ונקראו במכשיר קולורמטר מסוג color-guide 45/0 20 mm.

3.2 בחינת הגנטיקה של מילוי תרמילים ברקע של מבנה משפחתי והקשר לתכונות נוספות
המחקר מתבסס על מידע שנאסף משתי אוכלוסיות גנטיות מתפצלות ובתנאי שדה מסחרי (גד"ש ניר יצחק). אלו אוכלוסיות F_2 תוצרי הכלאה בין הזן חנוך ובין שני קווים בעלי פוטנציאל מילוי תרמיל נמוך ביותר מטיפוסי *hirsuta* ו-*peruviana* (להלן 111 ו 53 בהתאמה). מכל אוכלוסייה נזרעו כ- 250 צמחי F_2 באופן ידני בעומד של 2.5 צמחים/מטר שורה. הטיפולים בשדה היו דומים לאלו של פרק 3.1. בנוסף לאוכלוסייה המתפצלת גודלו בכל חלקה ההורים ודור F_1 כביקורת ולשם חישובי תורשתיות במובן הרחב.

במהלך העונה נערכה סריקה פנוטיפית ראשונית של האוכלוסיות המתפצלות למאפיינים ווגטיביים כגון צורת הצימוח, אופן הפריחה וצורת העלים. בסוף עונת הגידול נאספו כל התרמילים מכל צמח לשקית נפרדת ונמדדה תכונת "שיעור הגרעין" ותכונות אחרות בעלות חשיבות חקלאית כגון משקל תרמילים לצמח, מספר תרמילים לצמח, מידת השינוף של התרמיל, מידת החספוס של התרמיל, אורך התרמיל הממוצע, מספר זרעים ממוצע לתרמיל, אחוז dead end, צבע הזרע, משקל זרע ממוצע, ומידת הנגיעות בגרב. חושבו גם אומדני התורשתיות במובן הרחב ומתאמים גנטיים בין שיעור הגרעין ובין התכונות האחרות על מנת לחזות את יעילות הסלקציות לשיעור גרעין גבוה ובכדי לעצב אסטרטגיית טיפוח. המתאמים והתורשתיות חושבו בעזרת תכנת JMP (SAS, Cary, NC).

3.3 פיתוח סמני SNP ואיתור מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת שיעור הגרעין.

הפקות דנ"א. בדור F_2 התבצעה דגימת DNA לצורך האנליזה הגנוטיפית. מכל צמח נלקחה דגימת עלה בשלבי הגידול הראשוניים (0.5 גרם רקמה לאחר שישים יום מזריעה) והם נשמרו בהקפאה עמוקה. הפקת ה 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 לאגא"ד 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 באגא"ד. לשם כך נדגמו באקראי 94 צמחי F_2 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 6 cutter, *PstI* (CTGCAG) אתר נדיר ואנזים שני שהינו 4 cutter, *MspI* (CCGG) החותך 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 (חונך 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.

3.4 איתור מנגנונים ביולוגיים שעשויים להשפיע על מילוי התרמיל באגא"ד

חומר צמחי. שני הגנוטיפים חנוך והקו 53 נבחרו על מנת ללמוד את מהלך ביטוי הגנים בהתפתחות גרעינים ותרמילים. צמחים משני הגנוטיפים גודלו בתנאי שדה כחלק מניסיון ההשקיה שתואר לעיל (סעיף 3.1). צמחים מכל החלקות (2 גנוטיפים X 3 בלוקים) נעקרו ב- 110 ימים לאחר הזריעה, ותרמילים נאספו מארבעה שלבי התפתחות שונים, לפי מדד שתואר בעבר באגא"ד [11], כדלקמן: R4 – תרמילים עם שחלה זעירה, R5 – תרמילים עם זרע מתפתח, R6 – תרמילים עם זרע גדול אך לא בשל, R7 – זרע בשל. התרמילים הופרדו מהזרעים הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב-80 מ"צ.

בדיקת אחוז ופרופיל השמן. נלקחו 5 ג' זרעים מכל אחד מארבעת שלבי ההתפתחות. הזרעים נטחנו במכשיר (Abencor, Mc2 Ingenieria Y Sistemas, Seville, Spain), ויובשו למשך 24 שעות. אחוז השמן הכללי נבדק באמצעות מיצוי סוקסלט עם מיצוי בהקסן. מכל דוגמא, 0.06 גרם של שמן נמהל ב 0.3 מ"ל של chloromethane ו- 2 מ"ל sodium methoxide. הוספו חמישה מ"ל חומצה אצטית ו 2 מ"ל תמיסת סטנדרט פנימי ((C17-methylheptadecanoate). לאחר סירכוז, נלקחה הפאזה העליונה וסוננה דרך PTFE פילטר (0.45 μ m). האקסטרקציה יובשה ב- 37 מ"צ עם זרם גז N_2 . אנליזת GC בוצעה במכשיר Agilent 6890 GC-FID המצויד בקולונת SPTM- ('Supelco') 2560.

הפקת RNA והכנת ספריות ביטוי לריצוף. 400 מ"ג נלקחו מכל רקמה טחונה (זרעים או תרמילים בהתפתחות). RNA מוצה באמצעות שיטת ה-Hot Borate כפי שדיווחנו בעבר [12]. כלל ה RNA שימש להכנת ספריות RNA-seq עם שלוש חזרות ביולוגיות על ידי שימוש בקיט TruSeq RNA (Illumina) לפי הוראות היצרן. איכות הספריות נבדקה באמצעות DNA Screen Tape D1000 של מכשיר ה-Agilent Technologies TapeStation 2200. ספריות ה RNA-Seq רוצפו במכשיר Illumina HiSeqTM 2000 בטכניון.

ניתוח נתוני RNA-Seq. קריאות רצף ראשוניות עברו תהליך סינון ראשוני ע"י שימוש ב-FASTX Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html, version 0.0.13) כימות הטראנסקריפטים (מספר הקריאות לכל גן) מה RNA-Seq נעשה ע"י תכנת bowtie2 [13] וכנגד ה-4X tetraploid peanut transcript assembly reference (<http://www.peanutbase.org/>). אנליזת מובהקות ביטוי גנים נעשתה באמצעות תכנת R R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) עם חבילת DESeq2 [14]. אותרו הבדלים מובהקים בביטוי גנים בין שלבי התפתחות שונים בכל גנוטיפ ובין שלבי התפתחות דומים בין שני הגנוטיפים. התפלגות ערכי ה- p עברה בקרה של false בערך של $\alpha = 0.05$. הרשימה המאוחדת של הגנים המבוטאים בצורה מובהקת שימשה להפקת ערכי RPKM, מהם חושבו ה-hierarchical clustering וה-heatmap באמצעות טרנספורמציה \log_2 . מבחני GO enrichment בוצעו על ידי הכלי Blas2GO [14]. על מנת למצוא תהליכים ביולוגיים ומולקולריים מובהקים, נערך מבחן Fisher ($Qvalue < 0.05$).

ניתוח מסלולי צבירת שמן. רצפי גנים הקשורים לצבירת שמן בזרעים זוהו ע"י הומולוגיה לגנים מבסיס נתונים (4X tetraploid) באמצעות אנליזת tblastx. הגנים קובצו למשפחות שונות לפי התפקיד הביוכימי, כגון ביוסנתזה של גליצרוליפידים, lipid transfer proteins, סינתזה של חומצות שומן, הארכת ח' שומן ואגירת שמן בתא. הביטוי של גנים ממשפחות אלו נורמל לערכי RPKM עבור כל רקמה (זרע או קליפה), שלבי התפתחות וגנוטיפים. בסך הכול, נבדקו 584 גנים ממסלול השמן, אשר נותחו יחדיו באמצעות אנליזת-רשת WGCNA [15].

כימות מטאבוליטים עיקריים בקליפת התרמיל. בחינה כללית של רכיבי קליפת התרמיל נעשתה עבור אותן דוגמות התרמיל שעברו אנליזת RNASeq (שני גנוטיפים, שלושה שלבי גידול, שלוש חזרות). האנליזה כללה את הרכיבים הבאים: חומר יבש, יוני מימן בתמיסה (SM 4500 H-B), ריכוז זרחה במים (מבוססת על תגובת צבע, בה נוצר קומפלקס של זרחן ומוליבדן), ריכוז אשלגן (באמצעות פוטומטר להבה), נוכחות יסודות באמצעות מכשיר בליעה אטומית (ברזל, אבץ, מנגן, נחושת, ניקל, קדמיום, עופרת, כרום, קובלט, מגנזיום, קלציום), (ADF, NDF, ANCOME) Technology), חלבון (Nessler's reagent).

4. פירוט עיקרי הניסויים

4.1 השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על מילוי תרמילים ותכונות נוספות באגא"ד

א. השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על תכונות מילוי תרמיל (שיעור הגרעין וראש מצומק).

נערך מבחן שונות במטרה לבדוק את השפעת הגנוטיפ (חנוך, הררי, 53, B18) ורמת ההשקיה (60,80,100,120%), והשפעת הגומלין ביניהם (ה"ג) על תכונות שקשורות במילוי התרמיל. תוצאות המבחן מובאות בטבלה 1.

טבלה 1: מבחן שונות (ANOVA) לקביעת השפעת ארבעה גנוטיפים, ארבע רמות השקיה והאפקט המשולב שלהם על שתי תכונות מילוי תרמיל באגא"ד. ר"מ = ריבוע הממוצע. ד"ח = דרגות חופש. גורמים מובהקים מודגשים.

תכונה	מקור שונות	ר"מ	ד"ח	ערך F	Prob>F
שיעור הגרעין	בלוק (אקראי)	28	3	4.05	0.0124
	השקיה	160	3	23.25	< 0.0001
	גנוטיפ	311	3	45.07	< 0.0001
ראש מצומק	השקיה X גנוטיפ	21	9	1.03	0.4310
	בלוק (אקראי)	109	3	3.04	0.03870
	השקיה	120	3	3.32	0.02823
	גנוטיפ	954	3	26.41	< 0.0001
	השקיה X גנוטיפ	164	9	1.51	0.1730

נמצאה השפעה מובהקת של הגנוטיפים ורמות השקיה על שיעור הגרעין ואחוז ראש מצומק. כמו כן נמצאה השפעה של הבלוק על שתי תכונות אלה, דבר שמעיד על חשיבות המבנה הניסוני. לא נמצאה ה"ג מובהקת של גנוטיפ X רמת השקיה על שתי התכונות. ולכן, מבחני תחום של ההבדלים בין הגנוטיפים השונים נערכו ללא קשר לרמת ההשקיה, ולחילופין מבחני תחום של ההבדלים בין רמות ההשקיה השונות נערכו ללא קשר לגנוטיפים. תוצאות מבחנים אלו מובאות בטבלה 2.

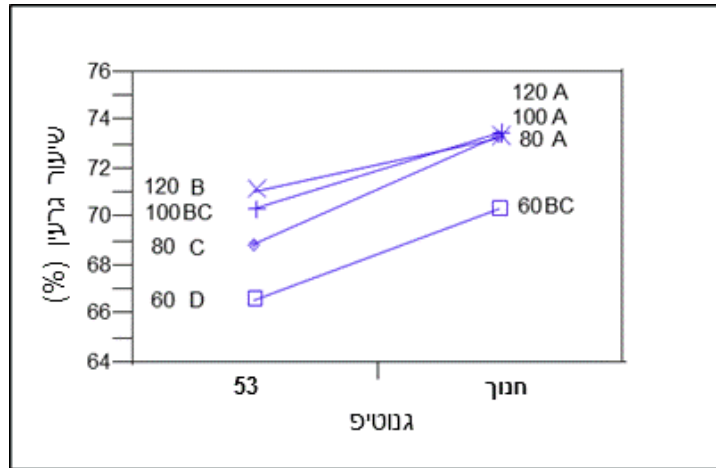
טבלה 2: מבחן תחום להבדלים בין גנוטיפים שונים ובין רמות השקיה שונות בתכונות שיעור הגרעין וראש מצומק. קבוצות שאינן בעלות אות משותפת הן מובהקות סטטיסטית ($p < 0.05$).

ראש מצומק (%)			שיעור הגרעין (%)		
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ
A	15.86 ± 0.86	חנוך	A	74.61 ± 0.39	הררי
B	13.22 ± 0.86	B18	B	72.64 ± 0.38	חנוך
C	9.55 ± 0.86	53	C	69.44 ± 0.38	B18
D	5.36 ± 0.90	הררי	C	69.24 ± 0.38	53
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	השקיה	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	השקיה
A	13.16 ± 0.86	60	A	72.68 ± 0.37	120
AB	11.12 ± 0.90	80	A	72.57 ± 0.39	100
B	10.13 ± 0.86	100	A	71.90 ± 0.37	80
B	9.56 ± 0.86	120	B	69.77 ± 0.37	60

ניתן לראות שמבין הגנוטיפים שנבדקו הזן הררי הראה את רמת שיעור הגרעין הגבוהה ביותר (74.6%) וגם את כמות הראש המצומק הנמוכה ביותר (5.36%) וזאת ללא קשר ברמת ההשקיה. רמת המילוי שנמצאה בניסוי עבור הררי היא גבוהה יותר מזו שבדרך כלל מוצאים לזן זה בתנאי קרקע דומים (כ- 71%). לעומת זאת הזן הררי ידוע ברמות הנמוכות של ראש מצומק, דבר שבא לידי ביטוי גם בניסוי זה. הגנוטיפים B18 ו- 53 הראו רמות נמוכות של שיעור גרעין (69.2% ו- 69.4% בהתאמה) כמצופה. הזן חנוך היה בעל רמות ראש מצומק הגבוהות ביותר (15.9%).

מבחינת ההבדלים בין רמות ההשקיה, לא נמצא הבדל מובהק בין שלושת הטיפולים 120%, 100% ו- 80% מבחינת השפעתם הן על שיעור הגרעין והן על שיעור ראש מצומק. לעומת זאת, נמצאה ירידה חדה של לפחות שני אחוזים במילוי התרמיל ברמת השקיה של 60% לעומת רמות ההשקיה האחרות. רמה של 60% השקיה הביאה גם לשיעור הגבוה ביותר של ראש מצומק (13.16%), שהייתה מובהקת סטטיסטית מרמות ההשקיה של 100% ו- 120% אך לא מובהקת מהרמה של 80% השקיה.

למרות שהשפעת גומלין גנוטיפ X השקיה לא נמצאה מובהקת סטטיסטית ביחס לשיעור הגרעין בכלל הניסוי, נמצאו מספר הבדלים מובהקים בין הגנוטיפים ספציפיים לתגובה של טיפול רמות השקיה נמוכות. למשל הגנוטיפים 53 ו- B18 נמצאו יותר רגישים לרמות השקיה נמוכות מאשר הזנים חנוך והררי. דוגמא להבדל כזה ניתן לראות באיור 1, המתאר את שיעור הגרעין של קו 53 בכל רמות ההשקיה בהשוואה לזן חנוך. ניתן לראות באיור שבזן חנוך אין הבדלים מובהקים בשיעור הגרעין בין 120%, 100% ו- 80% השקיה, ואילו רק ב- 60% השקיה יש ירידה מובהקת. לעומת זאת בקו 53 האפקט של ירידה בכמות ההשקיה הוא חזק יותר ומובהק כבר בירידה מ- 120% ל- 100% השקיה, ובמעבר מ- 80% ל- 60% השקיה הוא כבר מאוד משמעותי. תוצאה זו מראה שתכונת שיעור הגרעין מושפעת מרמות ההשקיה בשני הגנוטיפים אך קו 53 הוא יותר רגיש למעבר לרמות השקיה נמוכות.



איור 1: ההבדלים בין הזן חנוך לבין קו 53 ביחס למילוי התרמיל ברמות השקיה שונות. קבוצות שאינן בעלות אות משותפת הן מובהקות סטטיסטית ($p < 0.05$).

ב. השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על תכונות תרמיל ויבול אחרות.

רמת המובהקות של השפעת הגנוטיפ, ההשקיה וה"ג גנוטיפ X השקיה נבדקה גם על תכונות יבול תרמיל אחרות כגון יבול תרמילים לחלקה, משקל תרמילים ברוטו, אחוז סינגלים, משקל תרמיל ממוצע, ורמת הנגיעות בגרב. פירוט של מקורות השונות ורמות המובהקות של התכונות השונות מובאים בטבלה 3.

טבלה 3: מבחן שונות (ANOVA) לקביעת השפעת ארבעה גנוטיפים, ארבע רמות השקיה והאפקט המשולב שלהם על מספר תכונות של יבול תרמילים באגוזי אדמה. ר"מ = ריבוע הממוצע. ד"ח = דרגות חופש. גורמים מובהקים מודגשים.

תכונה	מקור שונות	ר"מ	ד"ח	ערך F	Prob>F
יבול תרמילים לחלקה	בלוק (אקראי)	22	3	4.64	0.0065
	השקיה	6	3	1.33	0.2742
	גנוטיפ	68	3	14.10	< 0.0001
משקל תרמילים ברוטו	השקיה X גנוטיפ	4	9	0.32	0.9627
	בלוק (אקראי)	15436	3	1.86	0.1496
	השקיה	23499	3	2.83	0.0487
	גנוטיפ	122944	3	148.28	< 0.0001
אחוז תרמילים לא מפותחים	השקיה X גנוטיפ	47544	9	1.91	0.0745
	בלוק (אקראי)	176	3	2.70	0.0566
	השקיה	470	3	7.20	0.0004
	גנוטיפ	184	3	2.82	0.0493
סינגלים	השקיה X גנוטיפ	279	9	1.42	0.2060
	בלוק (אקראי)	18	3	0.59	0.6237
	השקיה	13	3	0.42	0.7334
	גנוטיפ	43	3	1.37	0.2635
משקל 100 תרמילים	השקיה X גנוטיפ	84	9	0.88	0.5435
	בלוק (אקראי)	258	3	0.47	0.3849
	השקיה	1766	3	3.26	0.032
	גנוטיפ	270507	3	500.27	< 0.0001
	השקיה X גנוטיפ	3335	9	2.05	0.07

0.0799	2.42	3	159	בלוק (אקראי)	משקל 100 זרעים
0.0341	3.18	3	209	השקיה	
< 0.0001	1179.04	3	77627	גנוטיפ	
0.6053	0.81	9	161	השקיה X גנוטיפ	נגיעות גרב
< 0.0001	7.28	3	2187	בלוק (אקראי)	
0.0002	8.19	3	2462	השקיה	
< 0.0001	17.35	3	5213	גנוטיפ	
0.3565	1.14	9	1032	השקיה X גנוטיפ	אחוז שמן
0.174	1.7336	3	243.826	בלוק (אקראי)	
0.4343	0.9298	3	130.778	השקיה	
0.0145	3.9181	3	551.057	גנוטיפ	
0.7731	0.6205	9	261813	השקיה X גנוטיפ	

באופן מפתיע, לא נמצאה השפעה מובהקת של רמת השקיה על יבול התרמילים לחלקה. זאת בניגוד להשפעה שהייתה על מרכיבי מילוי התרמיל (טבלה 1). חוסר השפעה מובהקת של רמת ההשקיה נמצאה גם עבור תכונות אחוז הסינגלים ואחוז השמן בזרעים. לעומת זאת, כן נצפתה השפעה מובהקת לרמת ההשקיה על משקל התרמילים ברוטו, אחוז תרמילים לא מפותחים, משקל 100 תרמילים, משקל 100 זרעים ורמת נגיעות בגרב. נמצאה השפעה מובהקת של הגנוטיפ בכל התכונות שנמדדו מלבד אחוז הסינגלים. לא נמצאה ה"ג מובהקת של גנוטיפ X רמת השקיה על כל תכונות היבול שנבדקו. ולכן, מבחני תחום של ההבדלים בין רמות ההשקיה השונות נערכו ללא קשר לגנוטיפ, ולחילופין מבחני תחום של ההבדלים בין הגנוטיפים השונים נערכו ללא קשר לרמת ההשקיה. תוצאות מבחנים אלו מובאות ב**טבלאות 4 ו-5**, בהתאמה.

טבלה 4: מבחן תחום להבדלים בין רמות השקיה שונות בתכונות יבול תרמילים שנמצאו מובהקות במבחן השונות. קבוצות שאינן בעלות אות משותפת הן מובהקות סטטיסטית ($p < 0.05$).

תרמילים לא מפותחים (%)			משקל תרמילים ברוטו (ג')		
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	השקיה	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	השקיה
A	11.98 ± 1.17	60	A	741.13 ± 13.14	100
A	10.27 ± 1.21	80	A	734.63 ± 13.14	120
B	6.13 ± 1.17	100	AB	724.06 ± 13.14	80
B	5.53 ± 1.17	120	B	691.31 ± 13.14	60
משקל 100 זרעים (ג')			משקל 100 תרמילים (ג')		
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	השקיה	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	השקיה
A	124.18 ± 1.15	80	A	344.80 ± 3.93	80
A	124.06 ± 1.15	100	AB	337.43 ± 3.63	120
AB	121.06 ± 1.15	120	AB	335.95 ± 3.63	100
B	119.56 ± 1.15	60	B	328.53 ± 3.50	60
נגיעות גרב (%)					
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	השקיה			
A	35.52 ± 2.47	60			
A	33.30 ± 2.47	80			
B	24.77 ± 2.47	100			
B	20.22 ± 2.47	120			

טבלה 5: מבחן תחום להבדלים בין גנוטיפים בתכונות יבול תרמילים שנמצאו מובהקות במבחן השוונות. קבוצות שאינן בעלות אות משותפת הן מובהקות סטטיסטית ($p < 0.05$).

משקל תרמילים ברוטו (ג')			משקל תרמילים לחלקה (ק"ג)		
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ
A	835.63 ± 13.14	B18	A	7.16 ± 0.31	הררי
A	806.13 ± 13.14	הררי	B	6.17 ± 0.31	חנוך
B	762.38 ± 13.14	חנוך	B	5.67 ± 0.31	B18
C	487.00 ± 13.14	53	C	4.29 ± 0.31	53
משקל 100 תרמילים (ג')			תרמילים לא מפותחים (%)		
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ
A	394.87 ± 5.79	B18	A	10.02 ± 1.21	חנוך
B	367.84 ± 6.28	חנוך	A	9.93 ± 1.16	B18
B	365.09 ± 6.28	הררי	AB	8.15 ± 1.16	הררי
C	216.50 ± 6.28	53	B	5.80 ± 1.16	53
נגיעות גרב (%)			משקל 100 זרעים (ג')		
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ
A	36.37 ± 2.47	הררי	A	149.1 ± 0.90	B18
A	34.67 ± 2.47	חנוך	B	143.6 ± 0.90	הררי
A	31.40 ± 2.47	B18	C	140.6 ± 0.90	חנוך
B	11.37 ± 2.47	53	D	56.1 ± 0.90	53
			כמות שמן (%)		
קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ	קבוצה	ממוצע + שגיאת תקן	גנוטיפ
A	47.04 ± 1.71	53	A	47.04 ± 1.71	53
AB	44.11 ± 1.78	חנוך	AB	44.11 ± 1.78	חנוך
B	40.48 ± 1.71	הררי	B	40.48 ± 1.71	הררי
B	39.72 ± 1.71	B18	B	39.72 ± 1.71	B18

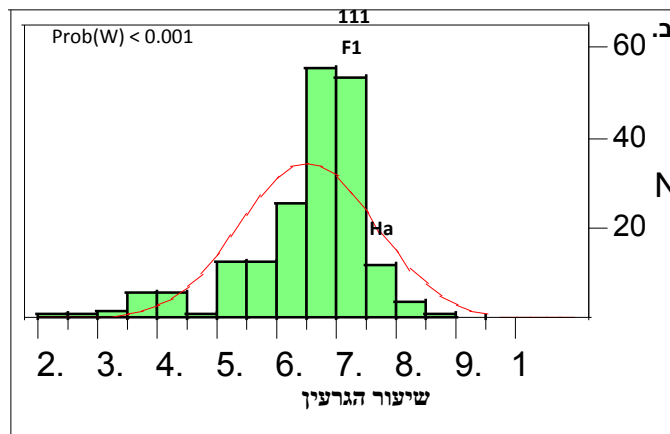
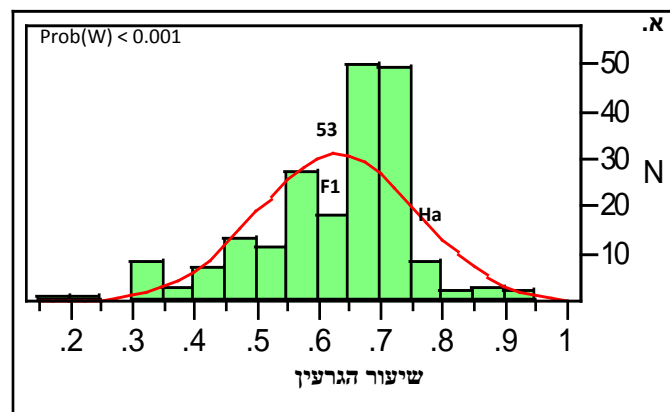
בכל התכונות שנבדקו לא נמצא הבדל מובהק בין רמות השקיה של 100% ו-120%. בחלק מהתכונות כגון משקל תרמילים ברוטו, משקל 100 תרמילים, ומשקל 100 זרעים הערכים שנצפו עבור 100% השקיה היו אפילו גבוהים יותר מאשר הערכים ב-120%, אם כי לא בצורה מובהקת. לעומת זאת, במעבר להשקיה ברמות יותר נמוכות, בעיקר ברמת השקיה של 60%, נצפו שינויים מובהקים בתכונות היבול. למשל, אחוז התרמילים הלא מפותחים עלה באופן מובהק ברמות ההשקיה הנמוכות (60% ו-80%) בהשוואה לרמת ההשקיה הרגילה (100%) והגבוהה (120%) מסביבות 6% ל-11% בהתאמה. באופן מעניין, תכונת הנגיעות בגרב מושפעת מרמת ההשקיה, כאשר רמות השקיה נמוכות (60% ו-80% מביאות לעליה של כ-40% בנגיעות.

בטבלה 5 מוצגים מבחני ההבדלים בין הגנוטיפים ביחס לתכונות יבול תרמילים. הזן הררי נמצא בעל יבול התרמילים לחלקה הגבוה ביותר (7.16 ק"ג לחלקה) מבין הגנוטיפים ללא קשר לרמת ההשקיה. כצפוי, קו B18 שטופח למשקל תרמיל גבוה היה בעל משקל תרמיל ברוטו, משקל 100 תרמילים ומשקל 100 זרעים הגבוהים ביותר בניסוי, וזאת אף על פי שהוא הראה ערכים נמוכים בתכונות שקשורות למילוי התרמיל (טבלה 2). קו 53 שמהווה מקור חשוב לעמידות כנגד מחלת הגרב, היה כצפוי בעל אחוזי הנגיעות הנמוכים ביותר (כ-11%). הוא גם היה בעל ריכוזי השמן הנמוכים ביותר. גם בשאר התכונות הוא היה נחות מאוד ביחס לגנוטיפים האחרים.

4.2 בחינת הגנטיקה של מילוי תרמילים ברקע של מבנה משפחתי והקשר לתכונות נוספות

א. ניתוח גנטי של אוכלוסיות F_2 .

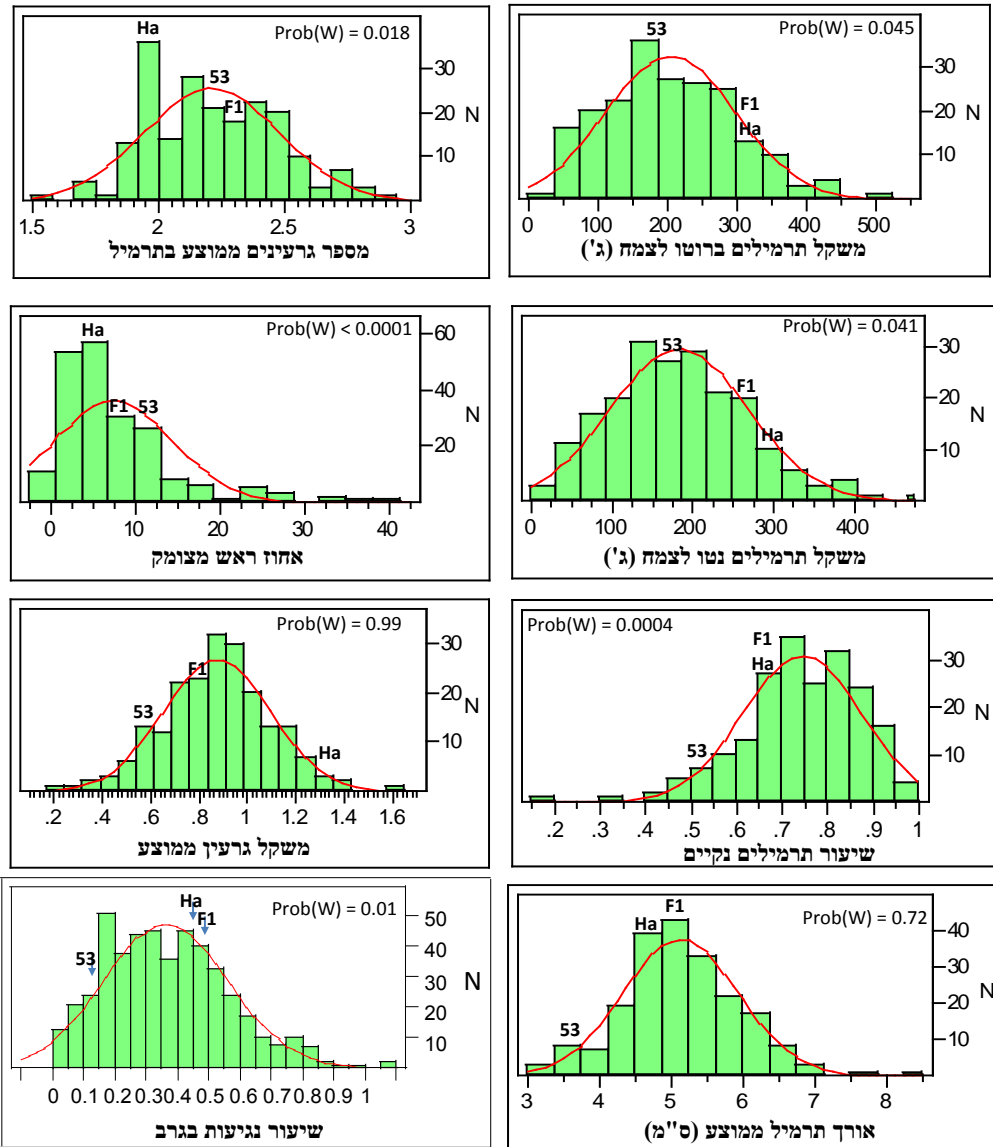
בניסוי השדה נבחנו שתי אוכלוסיות F_2 שמקורן בהכלאה בין הזן "חנוך" לבין טיפוס *hirsuta* ו-*peruviana* (בעלי פוטנציאל נמוך של מילוי תרמיל). כצפוי נמצאה שונות פנוטיפית גבוהה מאוד במבנה הצמחים והתרמילים. תכונת שיעור הגרעין התפלגה באופן אחיד בשתי האוכלוסיות (איור 2). אולם בשתי האוכלוסיות נצפתה סטייה גדולה מאוד לכיוון ערכים נמוכים של שיעור גרעין. למשל באוכלוסייה חנוך $111 \times$ ממוצע ההורים היו 0.73 ו-0.7 בהתאמה. גם דור F_1 היה דומה להורה 111. אולם בצאצאים יש סטייה גדולה מאוד לכיוון מספרים נמוכים בהרבה, כאשר שיעור הגרעין נע בין 0.2-0.9. תוצאות אלו מרמזות על תכונה הנשלטת על ידי מספר גנים.



איור 2: התפלגות שיעור הגרעין 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. $Prob(W) =$ מבחן שפירו-ווילק להתפלגות נורמלית.

אומדן התורשתיות במובן הרחב של רמת הנגיעות בגרב חושבה באמצעות היחס שבין השונות של ההורים ההומוזיגוטים והאוכלוסייה המתפצלת ונמצאה בערכים גבוהים מאוד של 0.9 ו-0.78 לאוכלוסיות חנוך $53 \times$ ו- $111 \times$, בהתאמה. הדבר מראה כי תכונת שיעור הגרעין היא בעלת רכיב גנטי גדול והשפעת סביבה נמוכה. אם זאת יש לקחת בחשבון שערכים גבוהים אלה נובעים גם מכך שערכי השונות בין פרטי F_2 שהיו גבוהים במיוחד, מה שמעלה את אומדן התורשתיות.

בכל מקרה, נתון זה מעיד כי יש סיכוי גבוה להצלחה בסלקציות לקווים בעלי פוטנציאל מילוי טוב כבר בדורות הטיפוח הראשונים, וגם אפשרות מעשית לזיהוי QTLs לתכונה זו. התפלגות תכונות היבול האחרות שנבדקו בדור F_2 מובאות באיור 3.



איור 3: 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. אוכלוסיית חנוך $111 \times$ הראתה דגם התפלגות דומה ואיננה מופיעה כאן. $Prob(W)$ = מבחן שפירו-ווילק להתפלגות נורמלית.

נמצא כי רוב התכונות מתפלגות בצורה נורמלית מלבד תכונת מספר הגרעינים הממוצע בתרמיל אשר הראה סטייה חזקה לכיוון מספר נמוך של גרעינים לתרמיל, וכנראה מבוקר על ידי מספר גנים קטן יחסית.

מתאמים גנטיים חושבו בין תכונת שיעור הגרעין ובין התכונות האחרות על מנת לחזות את יעילות הסלקציות לתרמיל מלא ביחד עם תכונות אגרונומיות אחרות. תוצאות הניתוח מובאות בטבלה 6. לא נמצא מתאם מובהק בין שיעור הגרעין לבין משקל תרמילים לצמח, רמת הנגיעות בגרב,

ומשקל תרמיל ממוצע. ולכן תכונות אלו לא מהוות בעיה בטיפוח לכיוון תרמיל מלא. אולם, נמצא מתאם שלילי ומובהק ביותר בין שיעור הגרעין ואורך תרמיל ממוצע ושיעור ראש מצומק (באוכלוסייה 53) ומתאם חיובי ומובהק עם מספר גרעינים לתרמיל. לכן ייתכן שתכונות אלה אחוזות גנטית לרמת העמידות או משפיעות עליה בצורה פליאוטרופית. כמו כן, נמצא מתאם חיובי ומובהק בין שיעור הגרעין ומשקל הגרעין, מה שמראה ששיעור הגרעין הנמוך הוא בגלל גרעין יותר קטן ולא, למשל, משקל קליפה יותר גבוה.

טבלה 6: מתאמים גנטיים רמות המובהקות בין תכונת שיעור הגרעין ובין תכונות אחרות בשתי אוכלוסיות F₂ מתפצלות. מתאמים מובהקים מאפס (רמה 0.05) מודגשים.

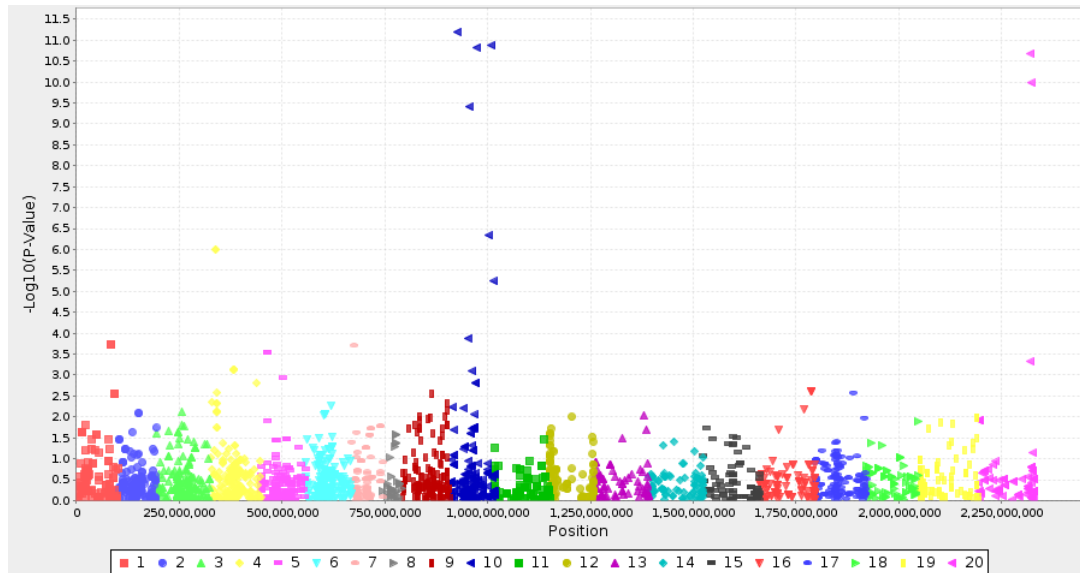
חנוך x 111		חנוך x 53		תכונה
מובהקות מ-0	מתאם	מובהקות מ-0	מתאם	
0.19	0.09	0.33	-0.07	משקל תרמילים ברוטו לצמח
0.24	0.08	0.70	-0.03	משקל תרמילים נטו לצמח
0.07	-0.13	0.16	-0.10	אחוז נגיעות בגרב
0.03	-0.16	0.47	-0.03	משקל תרמיל ממוצע
0.0001	-0.27	0.0001	-0.48	אורך תרמיל ממוצע
0.04	0.15	0.0027	-0.21	מספר גרעינים ממוצע בתרמיל
0.14	-0.11	0.0041	-0.20	אחוז ראש מצומק
0.0001	0.28	0.0001	0.55	משקל גרעין ממוצע

4.3 פיתוח סמני SNP ואיתור מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת שיעור הגרעין.

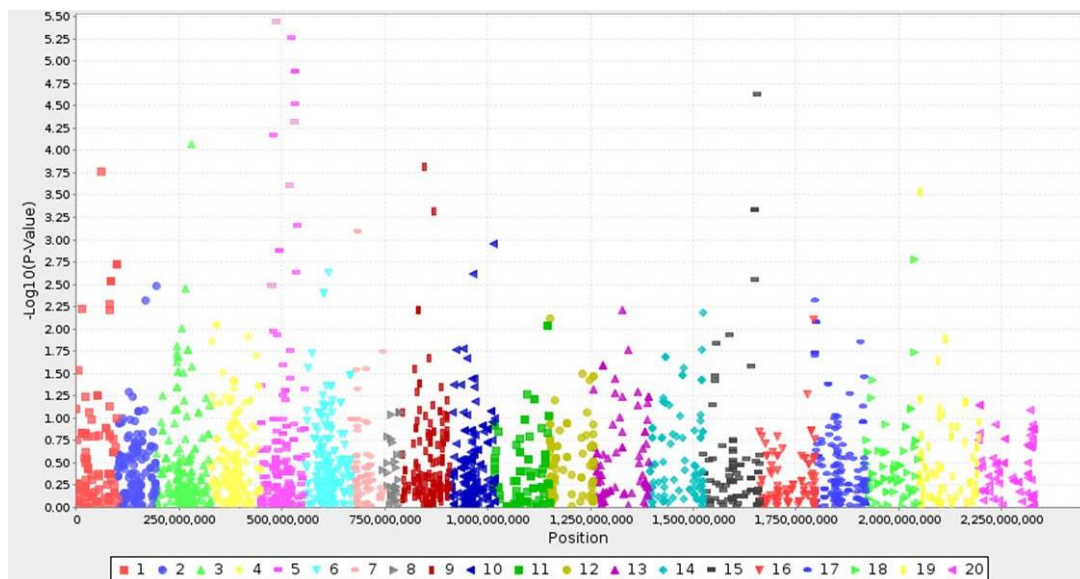
הניתוח לאיתור SNPs ומיפוי תכונות נעשה בעזרת תכנת TASSEL ובעזרת Script מיון וסינון שפותח על ידי המחלקה לביואינפורמטיקה של מינהל המחקר. לאחר בניית הספריות וריצופן בשנית, קיבלנו ~124,000 סמני SNP בין הורים חנוך וקו 53. לאחר סינון נוסף באמצעות פרמטרים שונים להפרדה בין SNPs הומהולוגיים ו SNPs אמתיים אותרו 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 אומדן 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), שהראתה יחס של 3:1 בדור F₂ ובניסויים נוספים (עובדה המצביעה על כך שיתכן ומבוקרת על ידי גן יחיד). לכן, התכונה יכולה לשמש כביקורת עבור איכות הסמנים בניסוי לתכונות הכמותיות. אנליזה מבוססת-שוונות של כל פרט F₂ ביחס לגנוטיפ של ההורה התקבל מרכיב - R² גבוה בתכונת צבע הטסטה (0.41). משמע, יש התאמה גבוהה בין הגנוטיפ לפנוטיפ, אחוז גבוה מתוך השוונות מוסבר על ידי locus הזה. ואכן, הסמנים בעלי המובהקות הגבוהה נמצאים במרחק של כ-6-8 cM מהגן. אולם כפי

א.



ב.



איור 4: Manhattan Plot של תכונות צבע הטסטה (א), ושיעור הגרעין (ב). המיפוי נעשה על קובץ

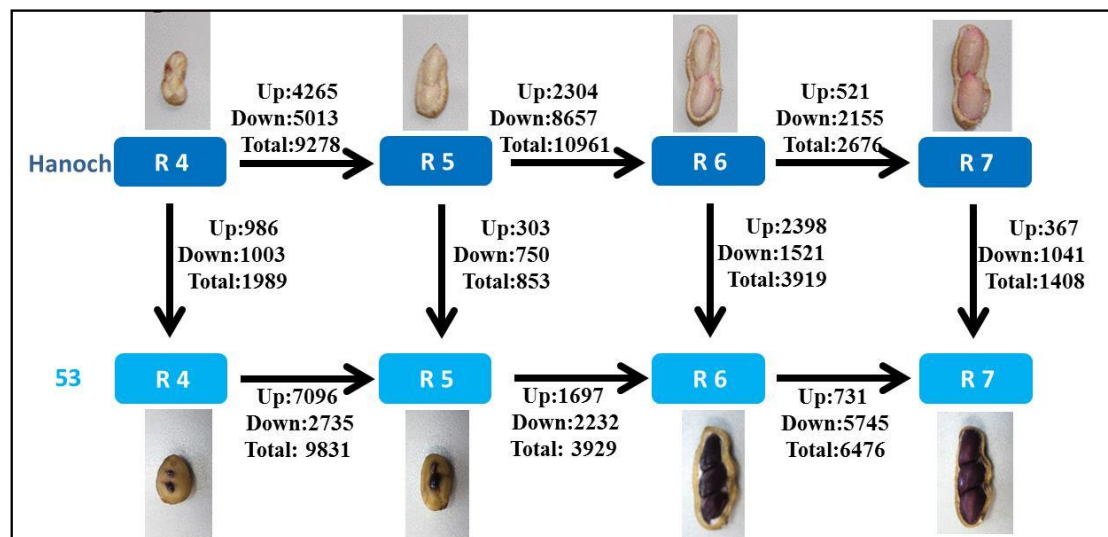
משותף של שני הגנומים הדיפלואידים של אגא"ד *(A. duranensis)* A ו- *(A. ipaensis)* B.

שניתן לראות באיור, מספר הסמנים היה נמוך מאוד ביחס לכמות ה-SNP הכללית שנמצאה באנליזה. כמו כן, נמצאו בניתוח סמנים מובהקים על כרומוזום B10 המקביל, מה שמרמז על חוסר בספציפיות של האנליזה לגנום מסוים (מכיוון שתכונה זו מבוקרת על ידי גן בודד).

בתכונת שיעור הגרעין, נמצאו בכרומוזומים 5A ו-5B כמה סמנים עם מובהקות גבוהה, כאשר ערך R^2 לסמן המובהק ביותר היה של 0.28, משמע שהסמן יכול להסביר כרבע מכלל השונות של תכונה זו באוכלוסייה. אמנם, עדיין עלו אותן הבעיות כמו בתכונת "צבע הטסטה", של פיזור על פני הכרומוזום ולא בנקודה מסוימת, וחוסר ספציפיות לגבי תת גנום מסוים. דבר המהווה בעיה לקבוע את מהימנותם, שכן הסמנים בעלי המובהקות הגבוהה 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), כך שכלל הנראה מדובר ב-SNPs אמתיים.

4.4 איתור מנגנונים ביולוגיים שעשויים להשפיע על מילוי התרמיל באגא"ד

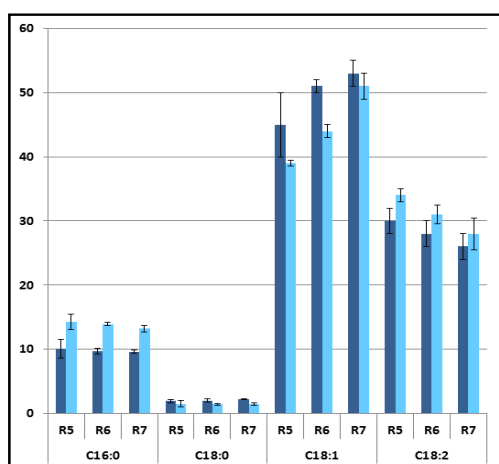
על מנת לאתר מנגנונים שעשויים להשפיע על מילוי תרמיל באגא"ד נערכה השוואה של ביטוי גנים באמצעות אנליזת RNASeq. ספריות ביטוי הוכנו לכל אחד מהגנוטיפים חנוך ו-53, בשתי רקמות (זרעים וקליפת התרמיל), במספר שלבי התפתחות ובשלוש חזרות ביולוגיות. אחרי סינון ראשוני נמצאו בממוצע 13.6 מיליון קריאות עבור ספרייה, ואלו עברו התאמה (alignment) עם בסיס נתוני ביטוי גנים של אגא"ד (peanutbase.org) שכולל 120,364 טראנסקריפטים מגנומים A ו-B. מבחינת ביטוי גנים בגרעין, נמצא כי תהליך מילוי הזרע הינו מאוד דינמי ומהיר, הכולל שיוניים רבים בביטוי גנים, וזאת בשני הגנוטיפים (איור 5). אולם, בזן חנוך המעבר החד ביותר בביטוי גנים היה בשלבי התפתחות הזרע האמצעיים, כאשר 40% מכלל הגנים המובהקים השתנו במעבר בין השלבים R4-R5. לעומת זאת, הקו 53 מספר הגנים שהשתנו באופן מובהק היה בשלבים הקיצוניים, R4-R5 ו-R6.



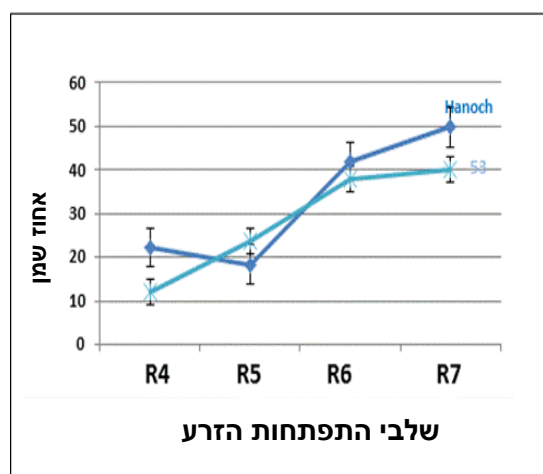
איור 5: הבדלים בביטוי גנים בשלבי התפתחות שונים של זרעי אגא"ד. מצוינים מספרי הגנים בעלי מובהקות בביטוי בין כל שני שלבי התפתחות שונים באותו גנוטיפ, ובין שני הגנוטיפים באותו שלב התפתחות. המספרים שליד החצים מייצגים את מספרי הגנים שעלו, ירדו והמספר הכללי בכל השוואה.

אנליזה פונקציונלית של ביטוי גנים נערכה על מנת להגדיר תהליכים ביולוגיים ופעילות אשר מועשרים בשלבי ההתפתחות השונים. נמצא כי בשני הגנוטיפים המעבר משלב R5 לשלב R6, המאופיין בשינוי דרסטי בהתפתחות הזרע וצבירת השמן, היה מלווה בעליה חדה של גנים הקשורים לפעילות מאגר הנוטריאנטים (nutrient reservoir activity) כגון חלבוני תשמורת, ביוסינתזה של שמן, יצירת גופיפי שמן, תגובה לנוכחות ABA, רגולציה חיובית שך פקטורי שעתוק, והשתקת RNA. שינוי זה בא בהתאמה לממצאים שלנו, המראים שינויים בכמות שמן ופרופיל חומצות שומן בין שלבי ההתפתחות האלו בשני הגנוטיפים (איור 6).

ב.

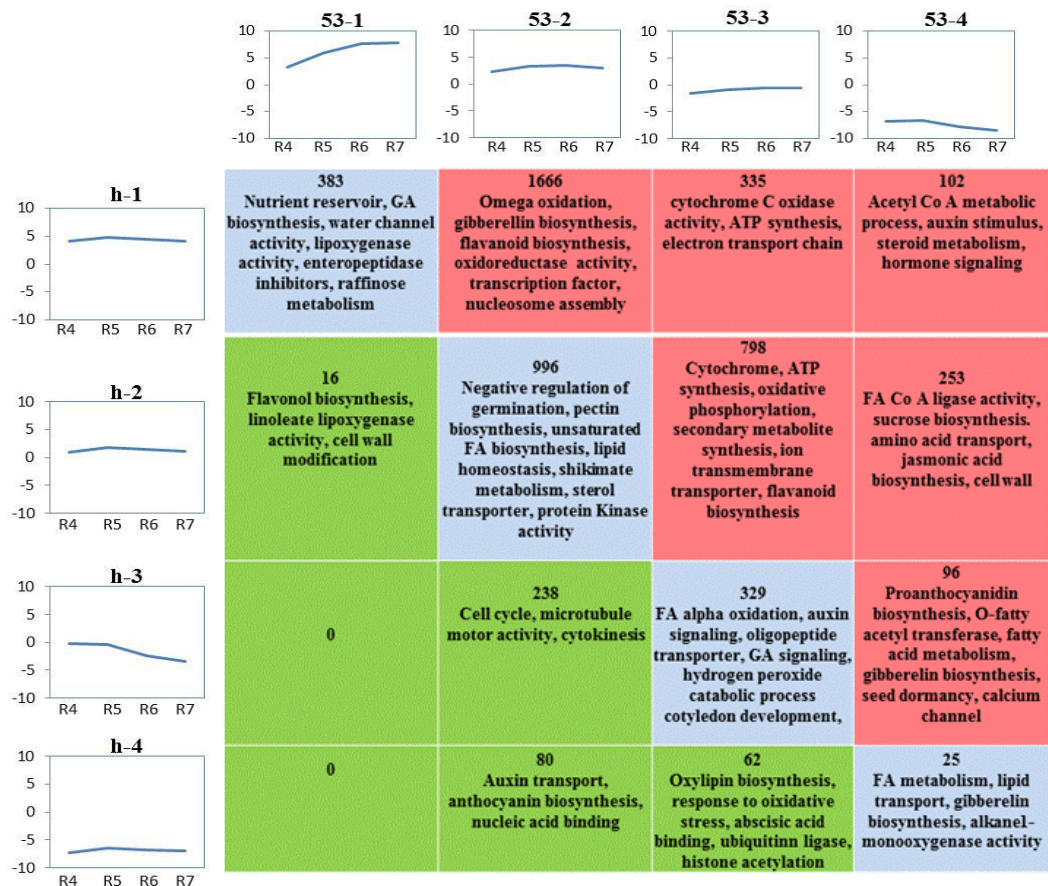


א.



איור 6: תהליך צבירת שמן (א) ופרופיל שמן (ב) בזרעי אגא"ד בהתפתחות. כחול = הזן חנוך. תכלת = הקו 53.

בנוסף להשתנות בביטוי גנים בין שלבי ההתפתחות, נערכה גם אנליזה ביטוי השוואתית בין שני הגנוטיפים בכל שלב התפתחותי. באופן כללי, 5,379 גנים שונים היו בעלי ביטוי מבדיל בין שני הגנוטיפים לכל שלבי התפתחות הזרע (איור 5). שלב ההתפתחות R6 היה בעל ההבדל הגדול ביותר בביטוי גנים בין שני הגנוטיפים, עם 3,919 גנים בעלי ביטוי שונה. כל 5,379 הגנים אשר הראו הבדל בביטוי עברו אנליזה של hierarchical clustering, אשר הביאה ליצירת ארבע צברי ביטוי (clusters). לאחר מכן, יצרנו מטריצת שינוי (transition matrix) על מנת ללמוד את המעבר בשינוי הביטוי של הגנים בין שני הגנוטיפים (איור 7). מטרת האנליזה היא לאתר שינויים ברשת ביטוי הגנים במהלך התפתחות הזרע.

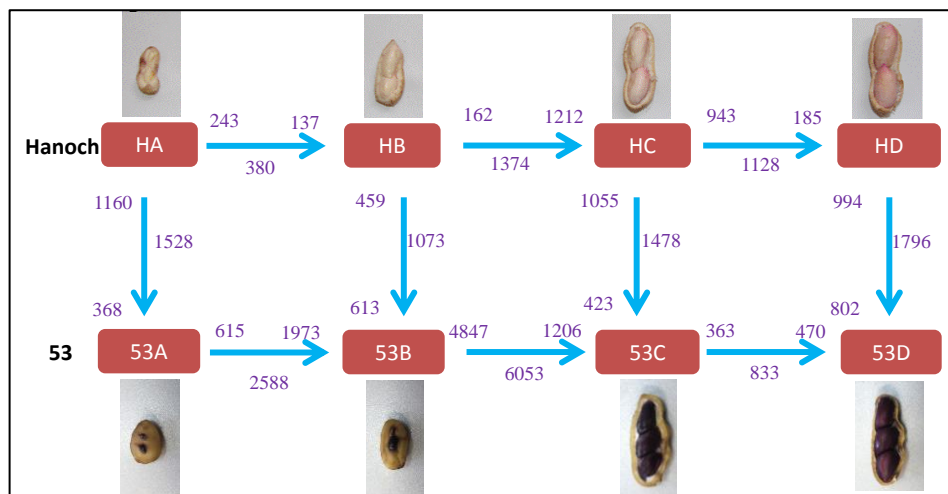


איור 7: מטריצת השתנות השוואתית בין הזן חנוך (h) והקו 53 ביחס לפרופיל ביטוי גנים בהתפתחות הזרע. אנליזת clustering התבצעה בשני הגנוטיפים (הגרפים בצידי המטריצה). בתוך התאים במטריצה מופיעים מספר הגנים המשותפים לשני ה-clusters בצדדים, ורשימת התהליכים הביולוגיים המועשרים. באדום מסומנים ריבועים אשר בהם היה ביטוי גנים גבוה יותר בחנוך, בירוק מסומנים ריבועים אשר בהם היה ביטוי גבוה ב-53, ובכחול מסומנים ריבועים בעלי ביטוי דומה בהתפתחות.

באנליזת המטריצה נמצאו מספר הבדלים מעניינים בין הזן חנוך לקו 53 אשר עשויים להסביר את ההבדל ביניהם בפרוטנציאל מילוי התרמיל. ראשית, שילובי המטריצה המתארים מקרים שבהם הזן חנוך היה בעל ביטוי גבוה יותר (תאים אדומים באיור 7), הכילו מספר גבוה יותר של גנים מאשר תאים במטריצה אשר מתארים מיקרים שבהם הקו 53 היה בעל ביטוי גבוה יותר (תאים אדומים באיור 7) (3250 מול 396, בהתאמה). בנוסף, תהליכים ביולוגיים הקשורים ביצירה של מטאבוליטים ראשוניים ואנרגיה (כגון cytochrome C oxidase activity, סינתזת ATP, ושרשרת העברת אלקטרונים) היו מיוצגים ביתר בתאים אשר בהם הזן חנוך היה באופן מובהק בעל ביטוי גבוה מ-53 (לדוגמה באיור 7 תאים h-2/53-3 ו-h-1/53-3). זה היה מלווה בייצוג יתר של תהליכים ביולוגיים בקשורים לביוסנתזה של מטאבוליטים ראשוניים כמו Acetyl Co A (h-1/53-4), מטאבוליזם של חומצות שומן (h-2/53-4 ו-h-3/53-4), ומטאבוליזם של סוכרוז (h-2/53-4). בנוסף, גנים רבים הקשורים לתהליכי התפתחות הזרע והבטחת יצירת מוטמעים מספקת

לנביטה עתידית, כגון סינתזה של חלבוני תשמורת (nutrient reservoir), היו מבוטאים ברמות גבוהות בשני הגנוטיפים (שילוב h-1/53-1). אך נראה כי הם מבוטאים ברמות יותר גבוהות בזן חנוך בשלבי התפתחות הראשונים של הזרע (R4). באופן מעניין, רמה גבוהה יותר של ביטוי גנים הקשורים למטבוליזם של סוכרים נמצאה בזן חנוך לעומת קו 53, אשר נמצאה בהתאמה עם יחס סוכר גבוה יותר של סוכרוז בזרעים הבשלים, כפי שנמדד באמצעות אנליזת HPLC (91.1% לעומת 85.3% מתוך כלל הסוכרים, בהתאמה; Prob > F = 0.0035).

מתוך הכרח לבחון תבניות ביטוי של תהליכי סינתזת ליפידים בזרע אגא"ד, נבנתה מתוך הטראנסקריפטום רשימה של 584 גנים הקשורים ליצירת שמן, כגון ביוסנתזת של פירובט, ביוסנתזת של חומצות שומן, פקטורי שעתוק הקשורים לצבירת שמן, ולוקליזציה ודגרדציה של שמן. על מנת לחקור את הדינמיקה של ביטוי גנים הקשורים לצבירת שמן, ערכנו למסד הנתונים של 584 הגנים אנליזת ביטוי משותף או WGCNA (weighted gene co-expression network analysis). באנליזת הביטוי המשותף נמצאו כמה שינויים מובהקים בתבנית הביטוי של גנים הקשורים ליצירת שמן. למשל, מספר מובהק יותר של גנים הקשורים להארכת חומצות שומן (FA elongation) ויצירה פלסטידית של חומצות שומן מפירובט נמצא בעלייה בביטוי בזן חנוך בהתפתחות הזרע, לעומת ירידה שלהם בקו 53. בנוסף גנים אחרים אשר הראו עליית ביטוי בשני הגנוטיפים במהלך התפתחות הזרע, אך הראו עלייה בזן חנוך בשלבי התפתחות מוקדמים יותר. בדומה להתפתחות הזרע, נערכה גם אנליזה להתפתחות קליפת התרמיל בשני הגנוטיפים חנוך ו 53. מבחינת ביטוי גנים, נמצא כי תהליך התפתחות הקליפה בזן חנוך מאופיין בעליה מתונה של ביטוי גנים בין השלבים R4-R5 ו R5-R6 (איור 8). לעומת זאת, בקו 53 היתה עלייה חדה מאוד בביטוי גנים בקליפה בשלבי התפתחות אלה.



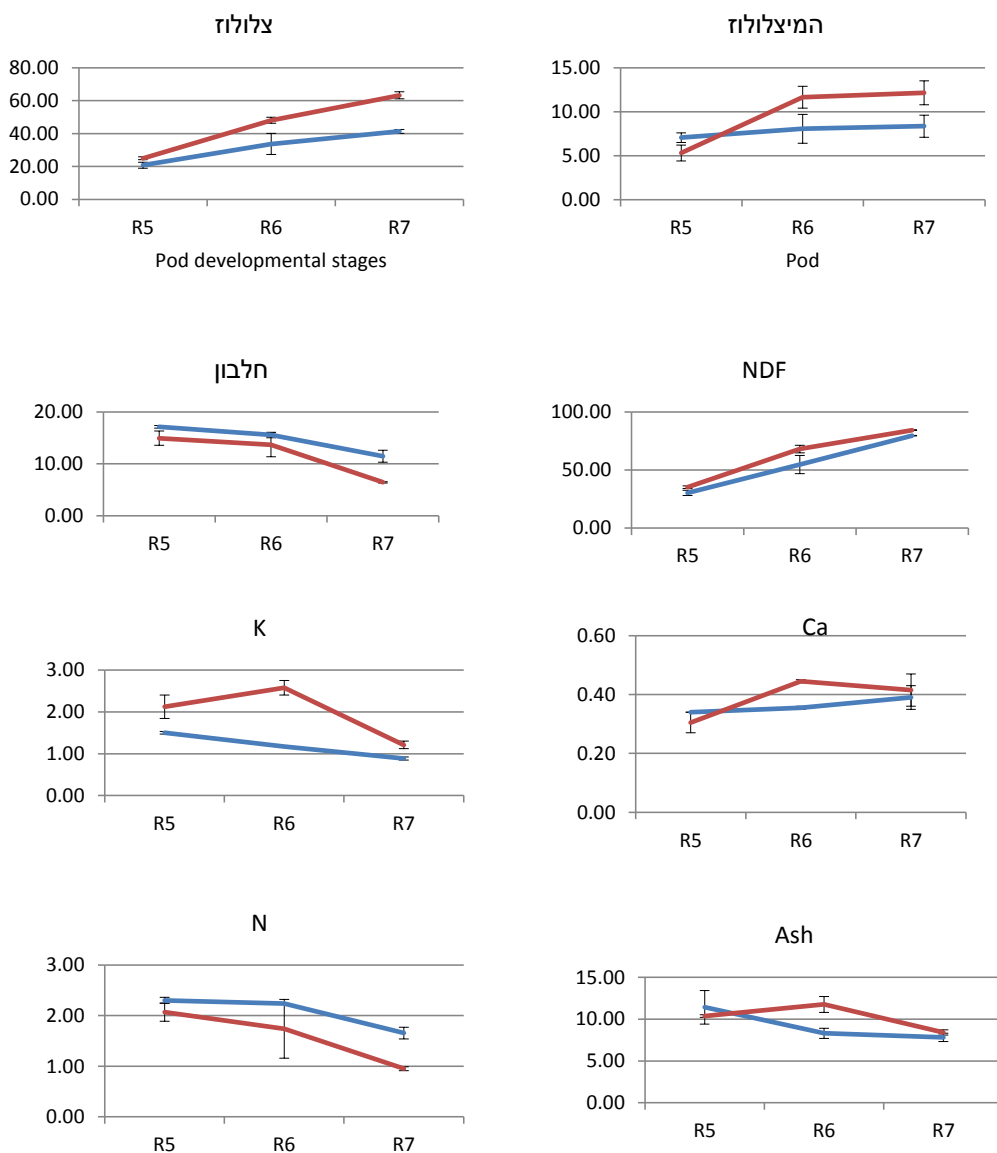
איור 8 : הבדלים בביטוי גנים בשלבי התפתחות שונים של קליפות אגא"ד. מצוינים מספרי הגנים בעלי מובהקות בביטוי בין כל שני שלבי התפתחות שונים באותו גנוטיפ, ובין שני הגנוטיפים באותו שלב התפתחות. המספרים שליד החצים מייצגים את מספרי הגנים שעלו, ירדו והמספר הכללי בכל השוואה.

גם בהתפתחות הקליפה נערכה אנליזת מטריצה, וגם בה נמצאו מספר הבדלים מעניינים בין הזן חנוך לקו 53 (מטריצה אינה מובאת כאן). אחד השינויים המובהקים ביותר בתבנית הביטוי של גנים היתה קשורה בתהליכי סינתזה של צלולוז. דוגמה של הבדלים בביטוי של מספר גנים בסינתזת צלולוז מובאים באיור 9. בקו 53 נמצא ביטוי מוקדם יותר של מספר העתקים של גנים ממשפחת הצלולוז סינתאז, כגון CESA4, CESA7, ו CESA8, אשר התבטאו באופן מובהק יותר כבר בשלב R5 (הגנים המסומנים בצהוב באיור 9).

			R4	R5	R6	R7
CESA1	Aipa37981_comp0_c0	H	-0.13026	0.192825	1.164464	-1.19981
CESA1	Aipa37981_comp0_c0	53	0.474047	3.254544	0.881795	-1.33764
CESA2	Adur3969_comp0_c0	H	4.512438	4.885851	3.206721	2.040074
CESA2	Adur3969_comp0_c0	53	3.890576	5.493978	3.34246	2.448813
CESA3	Adur7810_comp1_c0	H	5.304049	4.947121	4.198573	4.161485
CESA3	Adur7810_comp1_c0	53	4.79032	4.646835	4.223809	4.512501
CESA3	Aipa3853_comp0_c1	H	-4.14136	-3.63188	-3.51457	-4.99616
CESA3	Aipa3853_comp0_c1	53	-4.56206	-4.15843	-4.20202	-6.12448
CESA3	Aipa38830_comp1_c0	H	5.152319	4.985318	4.452595	4.29207
CESA3	Aipa46704_comp0_c0	53	4.519773	4.016169	3.927549	4.303683
CESA4	Adur44472_comp0_c0	H	-3.73057	-2.03308	5.322181	3.008511
CESA4	Adur44472_comp0_c0	53	-3.53394	5.977356	5.08249	3.110864
CESA4	Adur44473_comp1_c0	H	1.929665	2.098397	8.364531	5.896094
CESA4	Adur44473_comp1_c0	53	1.445197	7.729881	7.58046	6.437916
CESA4	Adur45031_comp0_c1	H	-2.26073	-2.36339	2.616005	1.161135
CESA4	Adur45031_comp0_c1	53	-1.99616	2.865391	3.211687	1.666151
CESA4	Adur45032_comp0_c0	H	-0.57347	-0.45865	5.384361	3.280709
CESA4	Adur45032_comp0_c0	53	-1.20202	5.085028	5.482698	4.520171
CESA4	Aipa13418_comp0_c0	H	-0.84253	-0.72499	5.962167	3.747817
CESA4	Aipa13418_comp0_c0	53	-0.90059	6.032696	5.619354	3.773961
CESA4	Aipa13419_comp0_c0	H	1.178662	1.870398	8.065446	5.587095
CESA4	Aipa13419_comp0_c0	53	0.80488	7.251088	7.183788	6.113832
CESA4	Aipa13419_comp1_c0	H	-1.13395	0.143176	7.134257	4.802762
CESA4	Aipa13419_comp1_c0	53	-0.8988	6.995341	6.698339	5.114492
CESA4	Aipa27210_comp0_c0	H	-9.96578	-9.96578	-9.96578	-9.96578
CESA4	Aipa27210_comp0_c0	53	-9.96578	-9.96578	-9.96578	-9.96578
CESA4	Aipa43665_comp1_c0	H	-2.30045	-4.74339	3.118609	1.401812
CESA4	Aipa43665_comp1_c0	53	-3.1888	3.159952	3.388557	1.918386
CESA4	Aipa43665_comp2_c0	H	-1.66048	-1.36092	4.955336	2.951463
CESA4	Aipa43665_comp2_c0	53	-1.82794	5.359978	5.104421	3.990168
CESA4	Aipa48638_comp0_c0	H	-4.23786	-3.69277	-3.39593	-3.98089
CESA4	Aipa48638_comp0_c0	53	-6.09132	-3.08722	-2.89254	-3.28865
CESA5	Adur33343_comp2_c0	H	-5.2109	-3.57347	-4.38082	-4.48466
CESA5	Adur33343_comp2_c0	53	-6.02718	-4.16704	-4.68038	-9.96578
CESA5	Aipa52425_comp0_c0	H	2.352099	2.901945	0.822934	-1.03899
CESA5	Aipa52425_comp0_c0	53	2.236748	3.667589	0.898918	-0.14827
CESA6	Aipa3853_comp0_c0	H	-3.4112	-2.44222	-2.32193	-2.03899
CESA6	Aipa42275_comp1_c0	53	1.194087	3.212362	0.6107	-1.30876
CESA7	Adur11603_comp2_c0	H	-9.96578	-9.96578	-5.01159	-5.05889
CESA7	Adur11603_comp2_c0	53	-9.96578	-9.96578	-9.96578	-5.32193
CESA7	Adur44265_comp0_c0	H	-0.9388	-0.64461	7.577395	5.757708
CESA7	Adur44265_comp0_c0	53	-0.9342	7.159902	7.335399	6.065106
CESA7	Adur44473_comp0_c0	H	-0.70997	0.354264	7.335368	5.037397
CESA7	Adur44473_comp0_c0	53	-0.51595	7.086879	6.997262	5.340669
CESA7	Adur44474_comp0_c0	H	-2.35845	-2.29808	5.230933	2.835048
CESA7	Adur44474_comp0_c0	53	-1.03406	5.708233	4.932675	3.023019
CESA7	Adur45031_comp0_c0	H	-3.4112	-2.64686	3.808745	2.010541
CESA7	Adur45031_comp0_c0	53	-3.63188	3.694769	4.274187	2.798051
CESA7	Aipa27211_comp1_c0	H	-9.96578	-9.96578	-9.96578	-9.96578
CESA7	Aipa27211_comp1_c0	53	-5.17571	-9.96578	-4.65593	-9.96578
CESA7	Aipa49534_comp0_c0	H	-0.83564	-0.60165	7.383868	5.516593
CESA7	Aipa49534_comp0_c0	53	-0.88808	7.07207	7.097748	5.811702
CESA8	Adur10709_comp0_c0	H	-0.77431	-1.22882	6.610058	4.515027
CESA8	Adur10709_comp0_c0	53	-0.29572	6.788181	6.682438	5.084107
CESA8	Adur10709_comp1_c0	H	0.47785	0.642162	7.649174	5.478411
CESA8	Adur10709_comp1_c0	53	-0.10263	7.523917	7.57265	6.222161
CESA8	Adur10712_comp0_c0	H	-1.99616	-2.78588	4.731482	2.739848
CESA8	Adur10712_comp0_c0	53	-2.16058	4.912426	4.804673	3.0268
CESA8	Adur42014_comp0_c0	H	-4.06693	-5.59655	-0.74904	-2.90329
CESA8	Adur42014_comp0_c0	53	-6.26534	-3.26073	-3.6681	-3.65593
CESA9	Adur11603_comp0_c0	H	0.744735	-2.52008	1.309176	0.495013
CESA9	Adur11603_comp0_c0	53	-0.20645	-0.45074	0.621056	0.563321

איור 9: אנליזת ביטוי של גנים ממשפחת צלולוז סינטאז בהתפתחות קליפת תרמילי אגא"ד. ביטוי בעודף מאופיין בצבע אדום. בצהוב מסומנים גנים שבהם היה הבדל מובהק בין חנוך ו-53 בשלב R5.

בחינה כללית של רכיבי קליפת התרמיל נעשתה עבור אותן דוגמות התרמיל שעברו אנליזה RNASeq (שני גנוטיפים, שלושה שלבי גידול, שלוש חזרות). האנליזה כללה את הרכיבים הבאים: חומר יבש, יוני מימן וזרחה בתמיסה, ריכוז אשלגן, נוכחות יסודות, ADF, NDF וחלבון. דוגמא לכימות של מספר רכיבים בקליפה מובאים באיור 10. נמצא הבדל מובהק בכמות צלולוז והמיצלולוז בקו 53 לעומת חנוך במהלך ההתפתחות. כמו כן, היתה עלייה בכמות אשלגן, סידן ואפר בקו 53 לעומת חנוך. בחנוך היתה כמות יותר גדולה של חנקן בשלבי ההתפתחות האחרונים.



איור 10: סקירה של מספר רכיבי קליפה בהתפתחות תרמילי אגא"ד. כחול = חנוך. אדום = קו

.53

5. דיון ומסקנות

5.1 השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על מילוי תרמילים ותכונות נוספות באגא"ד

בפרק זה של המחקר בדקנו את השפעת הגנוטיפ, רמת ההשקיה וה"ג ביניהם על רכיבי יבול שונים של אגוזי-אדמה, תוך כדי התמקדות בתכונות שקשורות לתרמילים לשיווק בקליפה. נמצא כי רמת ההשקיה משפיעה באופן מובהק על רמת המילוי של התרמילים, הן מבחינת שיעור הגרעין והן מבחינת אחוז ראש מצומק. ולכן, יתכן כי מצב המים בקרקע משפיע על התפתחות הזרע באופן ישיר ולא רק מהכיוון של העברת מוטמעים מצמח האם. הדבר בא לידי חיזוק בעובדה שרמת ההשקיה משפיעה באופן מובהק על משקל התרמילים ברוטו, משקל 100 תרמילים נטו ובמיוחד על משקל 100 זרעים. השפעה זו באה לידי ביטוי בעיקר ברמות השקיה נמוכות יותר מ-80%, כאשר בהרבה מקרים לא היו הבדלים מובהקים בין רמות 80%, 100% ו-120% מבחינת השפעה על תכונות מילוי התרמיל ותכונות היבול הנוספות. הדבר מראה כי בחלק מהמקרים ניתן בהחלט להוריד מעט את רמת ההשקיה ללא פגיעה ברכיבי מילוי התרמיל.

רמת ההשקיה נמוכה משפיעה באופן דומה על כל הגנוטיפים שנבדקו, ללא קשר ברמת מילוי התרמיל ההתחלתית של הגנוטיפים בהשקיה המיטבית. דבר זה בא לידי ביטוי בעובדה שלא הייתה ה"ג מובהקת גנוטיפ X סביבה. אולם, למרות שה"ג גנוטיפ X השקיה לא הייתה מובהקת סטטיסטית, עדיין גנוטיפים 53 ו- B18 מראים ירידה משמעותית במילוי התרמיל עם המעבר ל-80% השקיה. דבר זה מאשש תצפיות קודמות שלנו כי קווים אלה רגישים למחסור מים ביחס למילוי התרמיל שלהם.

באופן מעניין, רמת ההשקיה לא השפיעה על יבול התרמילים הכללי לחלקה, דבר שמרמז כי הצמח מפצה את העדר המים ביצירה של יותר תרמילים. אולם, תכונה זו לא נבדקה על ידינו בניסוי זה והיא צריכה להיבדק באופן ספציפי בניסויים נוספים. נתון מעניין נוסף הוא שבחלק מהתכונות, כגון משקל תרמילים ברוטו ומשקל 100 זרעים, השקיה בעודף לא רק שאינה מועילה אלא אפילו מזיקה. מעבר לכך במספר מקרים, כגון משקל 100 זרעים ומשקל 100 תרמילים והתפלגות גודל התרמיל, רמה של 80% השקיה נתנה תוצאה טובה יותר מאשר רמה של 100%. דבר זה מרמז על כך שיייתכן והליזימטרים שהוצבו בניסוי לא חזו בצורה מדויקת את איבוד המים בשדה ולמעשה השקיה של 100% נתנה עודף מסוים של מים שדווקא הזיק למאפייני יבול התרמילים האלה. גורם נוסף יכול להיות נעוץ באופן האפליקציה של המים. בניסוי זה ניתנו מים לכל אחד מהטיפולים בכל 48 שעות. יתכן כי תכונות תרמיל מושפעות גם מטווח ההפסקות שבין ההשקיה, ולכן 80% מים במתקבלים כל יומיים לא יתנו את אותו אפקט אילו, למשל, היו ניתנים פעם בשבעה או עשרה ימים. ולכן, יש לבדוק גם גורם של האינטרוולים בין ההשקיות גם בניסויים נוספים.

העובדה שחלקת הניסוי נמצאה בעבר מאולחת בגורם מחלת הגרב נתנה לנו אפשרות לבדוק את השפעת ההשקיה על רמת הנגיעות במחלה בגנוטיפים השונים. כצפוי, נמצא כי קו 53 הוא בעל רמת הנגיעות הנמוכה ביותר בגרב. זהו קו שבמשך כמה שנים מקבל ציוני נגיעות במבחנים שונים ומהווה מקור לעמידות גנטית. תוצאה חשובה אחרת היא כי רמות השקיה גבוהות מביאות לירידה גבוהה ברמת הנגיעות בכל הגנוטיפים, כולל אלו שנמצאו מאוד רגישים. ולכן המלצה נוספת שלנו היא להשקות בעודף קרקעות שבהן צפוי להיות אילוח טבעי גבוה במחלה.

5.2 בחינת הגנטיקה של מילוי תרמילים ברקע של מבנה משפחתי והקשר לתכונות נוספות

בחלק זה של העבודה ערכנו ניסוי שדה במבנה משפחתי של אוכלוסיית דור F_2 . נמצא כי תכונת מילוי התרמיל מבוקרת על ידי מספר גנים ובעלת השפעה סביבה. אולם, נמצאה גם סטייה חזקה מאוד לכיוון הערכים הנמוכים, שהיא מעבר למצופה בהתפלגות נורמלית. ייתכן שהדבר נובע ממחסומי הפרייה גנטיים שבין ההורים שמביא לאחוזים נמוכים של הפרייה והיווצרות של זרעים מצומקים.

אומדני תורשתיות נמצאו גבוהים ומכך ניתן לחזות כי סלקציות עבור תכונת המילוי של התרמיל עשויים להיות יעילים כבר בדורות ראשונים של הכלאות לטיפוח. מאידך יתכן קושי מסוים בטיפוח זנים עם תרמיל מלא אך גם מאורך ובעל שני זרעים לתרמיל (תכונות רצויות בתעשייה) מכיוון שהם נמצאים במתאם הפוך לתכונה.

5.3 פיתוח סמני SNP ואיתור מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת שיעור הגרעין.

היות צמח אגא"ד אלוטטרפלואיד ובעל גנום גדול מקשה על מציאת SNPs מכיוון שבריצוף גנום טרפלואידי 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 אמתי 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 אמתי הוא פי 1000 קטן מאשר למצוא SNP כוזב. בשל מאפיינים אלו זוהי משימה קשה לפתח סמני SNP עבור אגא"ד.

ולכן רק התקבלו באופן יחסי מספר נמוך של סמנים בעלי מובהקות גבוהה המצביעים על קשר בין הגנוטיפים השונים לתכונת רמת המילוי ("שיעור הגרעין"). 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 הטרזיגוטים.
4. שימוש בשיטות סמני SNP אחרות כגון SNP Array מתוכנן מראש. ב GBS היתה התייחסות רק ל 1/40 של הגנום, ייתכן שצריך לרצף את כלל הגנום, ומתוכו להתמקד על אזורים בהם יש סמני SNP.

ואכן, לאחרונה פיתחנו ביחד עם מעבדה שותפה בארה"ב אשר מבוסס על השוני בין 22 גנומים של גנוטיפים שונים, ביניהם הגנוטיפים חנוך ו-53 (אשר ריצוף גנום מלא שלהם בוצע במהלך השנה האחרונה למחקר). בימים אלה אנו עורכים אנליזה ראשונית של השבב על אוכלוסייה הומוזיגוטית מתקדמת (RIL) אשר מבוססת על אותה אוכלוסיית F_2 (חנוך X 53) המתוארת בדו"ח זה.

5.4 איתור מנגנונים ביולוגיים שעשויים להשפיע על מילוי התרמיל באגא"ד

בניסוי RNA השוואתי נמצא כי בגנוטיפ עם רמת מילוי טובה (חנוך), יש ייצוג גבוה יותר של ביטוי גנים בגרעינים הקשורים לתהליכי נשימה, ייצור סוכרים ומטבוליזם של שמן. לעומת זאת, בגנוטיפ עם המילוי הטוב פחות (53) יש ייצוג גבוה יותר של ביטוי גנים בקליפת התרמיל הקשורים להבשלה מוקדמת של דופן ראשונית ומשנית, מה שהיה בהתאמה עם עליה מוקדמת בשיעור צלולוז בקליפה.

ההבדל שנמצא בתבנית ביטוי הגנים בהתפתחות זרעי אגא"ד בין הגנוטיפים חנוך ו- 53 עשוי להסביר את ההבדל ביניהם הן בפוטנציאל מילוי התרמיל, והן בכמות השמן, אשר שניהם יותר גבוהים בזן חנוך. בנוסף, סינתזה מוגברת של חלבוני תשמורת בשלבים הראשוניים של התפתחות הזרע, עשויים לשמש כמאגר רחב יותר עבור תהליכי המילוי של הזרע והתרמיל, במיוחד בתנאים לא מיטביים. בניגוד לחלבונים ושומנים, להבדלים בכמות הסוכרוז בזרע ישנה השפעה קטנה על מילוי התרמיל, מכיוון שהם נמצאים בריכוז נמוך בתא (כ- 4% מסך החומר היבש), אך הם עשויים להצביע על יכולת כללית יותר טובה של קליטת מוטמעים בזרע התפתח, וגם מעידים על איכות גרעין יותר טובה.

ההבדלים בכמות רכיבי צלולוז והמיצלולוז, אשלגן, סידן ואפר עשויים להסביר הבשלה מוקדמת של קליפת התרמיל בקו 53. הבשלה מוקדמת של הקליפה עלולה לגרום לירידה ביכולת המעבר של מים דרך הקליפה אל הזרע המתפתח, מה שיכול להביא לפגיעה ביכולת המילוי של התרמיל.

כמובן, יש לקחת בחשבון כי שני הגנוטיפים שנבחרו הינם רחוקים גנטיים, וכי ייתכן שתוצאות אנליזת ביטוי גנים והמטאבוליטיים יכולים לנבוע מהבדל מיקרי, ולא דווקא קשורים בפוטנציאל המילוי. ולכן, בשלב זה של המחקר אנו מנסים לבחון גורמים אלה במבנה המשפחתי של אוכלוסיות מתפצלות.

6. ספרות מצוטטת

1. Kadhem FA, Sprecht JE, and Williams JH (1985) *Soybean irrigation serially timed during stages R1 to R6 II. Yield component responses*. Agron J 77: 299-304.
2. Momen NN, Carlson RE, Shaw RH, and Arjmand (1979) *Moisture stress effects on the yield components of two soybean cultivars*. Agron J 71 86-90.
3. Westgate ME and Grant DT (1989) *Effect of water deficits on seed development in soybean. I. Tissue water status*. Plant Physiol 91: 975-979.
4. Webb AJ and Hansen AP (1989) *Histological changes of peanut) Arachis hypogaea) gynophore and fruit surface during development, and their potential significance for nutrient uptake*. Ann Bot 64: 351-357.
5. Klesling TC, Hammons RO, and Walker ME (1982) *Peanut seed size and nutritional calcium requirement*. J Plant Nut. 1177-1185 :5
6. Dorner JW (2008) *Relationship between kernel moisture content and water activity in different maturity stages of peanut*. Peanut Sci 35 77-80.
7. Holbrook CC and Dong W (2005) *Development and evaluation of a mini core collection for the U.S. peanut germplasm collection*. Crop Sci 45: 1540-1544.
8. Isleib TG, Tillman BL, Pattee HE, Sanders TH, Hendrix KW, and Dean LO (2008) *Genotype-by-environment interactions for seed composition traits of breeding lines in the uniform peanut performance test*. Peanut Sci 35: 130-138

- .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, Kleinjohs 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 Boote KJ (1982) *Growth stages of peanut (Arachis hypogaea L.)*. Peanut Science 9: 35-39.
- .12 Brand Y, Shilman F, and Hovav R. *Characterization of duplicate genes involved in oil pathways of polyploid peanut (Arachis hypogaea)*. in *43th meeting of the American Peanut Research and Education Society*. 2011. San-Antonio, USA. .
- .13 Langmead B and Salzberg SL (2012) *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. Nature Methods 9: 357-U54.
- .14 Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, and Robles M (2005) *Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research*. Bioinformatics 21: 3674-3676.
- .15 Park C, Gale G, de Jong S, Ghazalpour A, Bennett B, Farber C, . . . Smith D (2011) *Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach*. BMC Systems Biology 543. :
- .16 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.
- .17 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.
- .18 Nielen S, Vidigal BS, Leal-Bertoli 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. לבחון את השפעת הגנוטיפ ורמת ההשקיה על מילוי תרמילים באגוזי-אדמה.
2. לבחון את תכונת מילוי התרמיל באוכלוסיות גנטיות מתפצלות.
3. לפתח סמני SNP ולזהות מקטעים גנומיים (QTLs) האחוזים לתכונת מילוי התרמיל באגוזי-אדמה.
4. לאתר מנגנונים ביולוגיים שעשויים להשפיע על מילוי התרמיל באגוזי אדמה בכלל, ועל ההבדל בין זנים בפרט.

עיקרי התוצאות

נמצא כי רמת ההשקיה משפיעה באופן מובהק על תכונות שיעור הגרעין, אחוז ראש מצומק, משקל התרמילים ברוטו, משקל 100 תרמילים נטו ומשקל 100 זרעים. לא נמצאה הי"ג מובהקת

גנוטיפ X סביבה על רכיבי תרמיל, אך עדיין גנוטיפים ספציפיים הראו ירידה במילוי התרמיל עם המעבר ל- 80% השקיה. מצב המים בקרקע משפיע על התפתחות הזרע באופן ישיר ולא רק מהכיוון של העברת מוטמעים מצמח האם. השפעה זו באה לידי ביטוי בעיקר ברמות השקיה נמוכות יותר מ- 80%, כאשר בהרבה מקרים לא היו הבדלים מובהקים בין רמות 80%, 100% ו- 120%, מה שאומר כי בחלק מהמקרים ניתן בהחלט להוריד מעט את רמת ההשקיה ללא פגיעה ברכיבי מילוי התרמיל.

תכונת רמת מילוי התרמיל נמצאה מתפצלת מאוד בדור ה- F_2 של ההכלאה בין הזן "חנוך" ושני הורים "אקזוטיים" בעלי פוטנציאל מילוי נמוך. יתר על כן, נמצאו מספר רב של פרטים outliners אשר בהם שיעור הגרעין היה נמוך במיוחד. אף-על-פי כן, רמת התורשתיות של התכונה הייתה גבוהה יחסית. נמצאו מתאמים גנטיים מובהקים בין תכונת שיעור הגרעין לבין משקל הזרע, אורך התרמיל ורמת "ראש מצומק", אך לא בין שיעור הגרעין לבין משקל תרמיל כללי ורמת נגיעות בגרב. בהשעחה, סלקציות עבור תכונת המילוי של התרמיל עשויים להיות יעילים כבר בדורות ראשונים של הכלאות, אך יש צורך באוכלוסיות טיפוח גדולות לשם בניית התכונות.

ניסוי ראשוני של פיתוח סמני GBS הראה כי קיימים כמה אזורים בגנום בעלי השפעה על התכונה, בעיקר QTL אחד בכרומוזום A05. אולם מערכת ה- GBS נמצאה לא כל כך יעילה במערכת שלנו, עם מספר סמנים קטן ולא ספציפי לתת-גנום. ולכן אנו עוברים כעת לשימוש בציפ של affymetrics שפותח בשיתוף עם מעבדה בארה"ב.

בניסוי RNA השוואתי נמצא כי בגנוטיפ עם רמת מילוי טובה, יש ייצוג גבוה יותר של ביטוי גנים בגרעינים הקשורים לתהליכי נשימה, ייצור סוכרים ומטבוליזם של שמן. לעומת זאת, בגנוטיפ עם המילוי הטוב פחות יש ייצוג גבוה יותר של ביטוי גנים בקליפת התרמיל הקשורים להבשלה מוקדמת של דופן ראשונית ומשנית, מה שהיה בהתאמה עם עליה מוקדמת בשיעור צלולוז בקליפה. שיפור בתהליכי ייצור מוטמעים ואנרגיה בגרעין, ועיכוב תהליכי הבשלת דופן התרמיל עשויים להביא לעלייה בפוטנציאל מילוי התרמיל באגוזי-אדמה.

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 אמיתיים בצמחים פוליפואידים.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב

במהלך המחקר התפרסמו שני המאמרים הנ"ל:

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

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

בנוסף, בימים אלו מוגש מאמר בנושא התפתחות הקליפה לעיתון Transcriptomics

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרם את הדו"ח:

- ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)

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