

דו"ח שנתי (ב') למחקר מספר 20-10-0090

אפיון מנגנונים גנטיים לעמידות כנגד קישון רולפסי באגוזי-אדמה

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

חוקר ראשי:

רן חובב - מינהל המחקר החקלאי, ראשון לציון; גנטיקה והשבחה של אגוזי-אדמה.

חוקרים שותפים:

מרי דפני ילין - מו"פ צפון; פתולוגיה של צמחים.

מואפק אבדאח - מינהל המחקר החקלאי; מרכז מחקר נווה יער; בחינת נדיפים באגוזי-אדמה.

תוכן עניינים

מבוא	2
מטרות ומשימות	2
תיאור הניסויים שבוצעו	2-5
תוצאות	5-14
דיון ומסקנות	14-15
רשימת ציטוטים	15

מבוא

פטריה הקרקע קשיון רולפסי (*Sclerotium rolfii*) הגורמת למחלת העובש הלבן מהווה את אחד הגורמים העיקריים המצרים את התפתחות ענף אגוזי-האדמה (אגוא"ד) בצפון הארץ ומרכזה. הפטרייה מאופיינת בתפסיר לבן התוקף את השורש והתרמילים ומביא לריקבון וקמילת הצמח. רב-פונדקיות, ספרופיטיות, אילוח באמצעות כלים חקלאיים, וקשיי הדברה בקרקעות כבדות - כל אלו הביאו לידי כך שפטרייה זו מהווה איום על המשך גידול אגוא"ד בשטחים רבים.

אחד הפתרונות הוא פיתוח של זנים עמידים. ואכן בארה"ב פותחו מספר זנים בעלי עמידות שדה לקשיון. בישראל לא היה ידוע בעבר על מקורות לעמידות, עד שלאחרונה זיהינו כי הזן 'חנוך' וזן נגזר שלו (B65), שאינם אידיאלים לגידול על אדמות כבדות, עשויים להיות מקור טוב לעמידות. תהליך הטיפול כשלעצמו הוא מאתגר מכיוון שככל הידוע לנו אין בספרות שום ידע על המנגנונים הגנטיים, הביולוגיים או הכימיים שמבדילים בין זנים עמידים ורגישים לקשיון.

מטרות המחקר ומשימות

מטרת המחקר לטווח הארוך היא פיתוח זנים של אגוא"ד בעלי עמידות לרולפסי ומותאמים לגידול באזורים צפוניים. לשם ייעול תהליך ההשכלה יש ללמוד את מנגנוני העמידות ולפתח כלים גנטיים חדשים כעזר לטיפול.

מטרות ספציפיות:

(1) בחינת אופן התורשה של תכונת העמידות לרולפסי והמתאם שלה עם תכונות אחרות ע"י שימוש בשני רקעים גנטיים שונים של עמידות ("חנוך", "NC3033").

(2) לימוד המנגנונים הביולוגיים והכימיים המבקרים את רמת העמידות.

(3) מיפוי גנטי של תכונת העמידות ככלי עזר לסלקציה מושכלת של צאצאים עמידים, לבנית תשתית מדעית לגילוי עתידי של גנים בעלי חשיבות לעמידות.

משימות ספציפיות לשנה ב':

1. עריכת מבחני עמידות ל RILs של זן עמיד X זן רגיש בהדבקה מכוונת – שנה ב'.

2. קביעת אופן ההורשה, התורשתיות ומתאמים גנטיים של תכונת העמידות.

3. מיפוי תכונת העמידות ע"י שימוש ב- SNP array.

4. קביעת הבדל בפרופיל הנדיפים בשני זנים עמיד ורגיש.

5. התמרה גנטית של תבדיד פטריה אלם בגן ל- GFP.

6. פיתוח החומר הגנטי לניסויים בשנה ג'.

תיאור הניסויים שבוצעו

משימות 1-3

חומר צמחי. מבחני השדה נערכו ברצף של שנתיים (2017-18) בחוות גד"ש בגליל עליון, שבעמק החולה. בעונת 2017 נבחנו במבחן שדה 99 קווי רקומבינציה (RILs) (ראה דיווח שנה א). בעונת 2018 הורחב הניסוי ל- RILs-243. כביקורת נבחנו זני ההורים, חנוך והררי, הזן איתן (B65, מוטנט שיחי של חנוך, סביל למחלת העובש בלבן), והזן אורית (B77, רגיש למחלה). בשנת 2018 נוספו שמונה קווי ביקורת, Tifrunner, NC3033, Florida-07, N08082oIJCT, C76-16, OLin, SSD6, SPT 06-06 המשמשים בארה"ב כהורים לאוכלוסיות קווי RIL מכוונים (structured) עם גנוטיפ ידוע (Holbrook et al., 2013). חלקם נצפו בעבר עם פוטנציאל של עמידות לעובש לבן, למשל, NC3033 (קו עם מחדר "אקזוטי" ממין הבר) ו-N08082oIJCT (קו נגזרת אולאית גבוהה של הזן הסביל ביילי). ראוי לציין כי בשנה זו לא התחלנו מיפוי גנטי של אוכלוסיית RIL שניה (NC3033 X Tifrunner) וזאת משום שעדיין חסר לנו מידע בסיסי על רמת העמידות האמתית של שני זנים אלה בתנאי ישראל. זו נבדקה כאמור בעונת 2018.

מבנה הניסוי ומדידות. חלקת ניסוי נזרעה בתאריך ה- 22/04/2018. כל ההכנות והטיפולים של חלקת הגידול היו בהתאם לסטנדרטים המסחריים של גידול אגוא"ד באזור עמק החולה. הקווים נזרעו על גבי ערוגות ברוחב ואורך 1.92X180 מ' במבנה של שלושה בלוקים באקראי. אורך "חלקה", (בלוק X קו) כ- 5 מ'. עומד חלקה 5 צמחים למטר בממוצע. בכל חלקה נבחרו 4 מרכזי האילוח (צמח מודבק וסביבתו), וסומנו ברצף ממוצע של 5 צמחים למטר.

האילוח בוצע לאחר סגירת הנוף, סביבת היום ה-100 מזריעה. הדבקת הצמח הראשי במרכז האילוח התבצעה בסמוך לצוואר השורש על ידי טמינת דסקיות תפטיר PDA בקוטר של 1 ס"מ ובעובי של 1.5 ס"מ. בשנת 2018, למען שיפור אחוזי ההדבקה בחלקות, בנוסף לטמינת דסקיות נערמו בסמוך לצוואר השורש גרגירי חיטה מעוקרים ומאולחים בתבדיד Rol3, ולאחר שבוע בוצעה בדיקת נגיעות והדבקה בפעם השנייה. התהליך בוצע בשעות הבוקר המוקדמות בטרם זריחה למניעת התייבשות הפטרייה ומיד לאחריו בוצעה השקיה אשר חזרה לאורך שלושת הימים שלאחר ההדבקה. סה"כ בניסוי כולו 3,144 מרכזי אילוח. ביום ה-30, 50, 70 מיום האילוח (שהם 136, 156 ו-176 יום מזריעה) התבצעו מדידות בשטח בסריקת מרכזי האילוח. במטרה לשפר את איסוף ועיבוד הנתונים, שונה סולם מדדי המחלה לבחינת הבדלים מ"חיוניות הצמחים" (שנה א) לסולם "דרגת המחלה" (כפי שמופיע ב-Shokes et al. 1996). מדדים שנאספו לאורך העונה:

(I) דרגת המחלה לפי הסולם הבא: (1) נוכחות רולפסי ללא פגיעת תפטיר בצמח (2) פגיעת תפטיר על גבעול בלבד (3) עד 25% מהצמח פגוע (בנוסף לגבעול נראית פגיעה בקצוות הענפים הצדדים) (4) 25%-50% מהצמח פגוע (גם הציר המרכזי נראה פגוע ומתייבש מהקצה העליון), (5) יותר מ- 50% מהצמח פגוע (יותר ממחצית הצמח ללא עלווה ירוקה).

(II) מספר הצמחים הפגועים בכל מרכז אילוח (0-5). צמח נחשב מת בדרגת מחלה הגבוהה מ-4.

(III) אסיף ידני של התרמילים ושקילת היבול בחלקות המאולחות ובחלקות הביקורת. איסוף הנתונים התבצע באופן ממוחשב ע"י טאבלטים שהותאמו לעבודה בשדה ובקישוריות למחשבים במעבדה.

(iv) מדדי אינדקס צמחי (GRVI), הצילום RGB נעשה ברחפן Phantom 4, צילום טרמי - Inspire1, בתוכנה לבנית מוזאיקה - Pix4D, מיפוי ועיבוד נתונים בתוכנת - GIS ARCVIEW 10.5.

מדדים נוספים שחושבו: (1) עוצמת מחלה - שהוא מכפלת מספר הצמחים המתים X דרגת המחלה שנצפתה במרכז האילוח. (2) אובדן היבול, מהווה אחוז ההפרש בין היבול בחלקות המאולחות והביקורת במוצע לצמח.

בשל השוני בסולם המדידה בין השנים ב-2017 "חיוניות הצמח" ו-2018 "דרגת מחלה", נורמלו המדדים של 2017 ל-2018 לפי סולמות ההמרה הבאים: (i) מ-"חיוניות הצמח" (3) ללא נוכחות פטריה, (3) עם נוכחות פטריה, (2), (1), (0), ל-"דרגת מחלה" (1) (2) (3) (4) (5) בהתאמה. (ii) מספר הצמחים המתים נורמל עבור כל מרכזי האילוח ל 0-5 צמחים מתים במרכז אילוח. בפועל, מרכזי האילוח מנו בין 3-7 צמחים ברצף עקב חוסר אחידות בעומד החלקות בשל פעילות בעלי חיים בשטח. לכן הנתונים נורמלו סטטיסטית ברמת מרכז האילוח.

עריכת genotyping ואנליזת מיפוי. מיפוי התכונות השונות נעשה באמצעות שבב של חברת אפומטריקס המכיל 58,233 SNP clusters של אגוא"ד, כפי שתואר בדוח שנה א'. 266 הקווים עברו genotyping ואנליזת מיפוי תוך שימוש ב-SNP array של חברת אפומטריקס. אנליזת genotyping נערכה על ידי יישום דנ"א שהופק מעלים צעירים מכל אחד מ-266 ה RILs על גבי השבב. מתוכם נבחרו לאחר סינון רק כ-2882 SNPs פולימורפיים בין קווי ההורים שהתפצלו באוכלוסייה בקירוב אפשרי ליחס 1:1 ועד 40-60%. תחילה נבחנו המתאמים הגנטיים בין הסמנים והתכונות על גבי הגנום (מיפוי פיזי) באמצעות תוכנת TASSEL (Bradbury et al., 2007). לאחר הגדרת intersect join בין הפנוטיפ והגנוטיפ ואנליזת GLM נבדקה רמת איכות הנתונים על ידי גרף QQ Plot המתאר על בסיס מודל מוכר את רמת הקשר בין פנוטיפ לגנוטיפ (קו המודל מייצג מצב של 0 קשר בין גנוטיפ ופנוטיפ). קישור מובהק לאזורים כרומוזומליים נבחן באמצעות גרף Manhattan plot. סמנים מובהקים לתאחיזה לתכונות זוהו ע"י בחינה של מובהקות סטטיסטית. ערכי $\log(P)$ – חושבו כפונקציה של השינוי ב SNP בין כל הצאצאים. אנליזת QTL נערכה עבור כל אחת מהתכונות הפנוטיפיות, וכנגד כל אחד מ-20 הכרומוזומים המסומנים של אגוא"ד (A, 11-20 B 1-10). כהמשך נבחנו ה-QTL גם באמצעות בניה ושימוש במפה גנטית לפי קבוצות תאחיזה (נבנתה בתוכנת JionMap 4.1) כפי שדווח בעבר (Patil et al. 2018). העיבוד התבצע בתוכנת MapQTL 6 (kyazma, Netherlands) לזיהוי אתרים כרומוזומליים יותר מדויקים, בהתאם לסף המינימלי $LOD < 3$, ו-1000 permutations test.

משימה 4

מבחן ביולוגי לבחינת הבדלים בדרגות המחלה בין גילאים פנולוגיים של הצמח. כ-250 שתילי "אורית" (זן רגיש) גודלו במצע מנותק בחממה במכון וולקני, ובחלוקה ל-5 קבוצות גיל: 25, 40, 54, 63 ו-80 יום מזריעה. ביום תחילת הניסוי 5/8/18, הועברו כולם לחממת האילוח תחת משטר השקייה של 4 דקות, 3 פעמים לאורך שעות האור, לשמירת אחוזי לחות גבוהים כתנאים מיטביים לפעילות פטריית קשיון רולפסי. כל הצמחים אולחו באותו היום, ו-6 צמחי ביקורת נשמרו מכל קבוצת גיל. ביום ה-4 וה-7 לאחר האילוח התבצעו מדידות. מדד המחלה נקבע על פי סולם: (1) צמח בריא עם תפטיר פטרייה סביבו (2) פגיעות תפטיר על גבעול בלבד (3) עד 25% מהצמח פגוע (4) 25%-50% מהצמח פגוע, (5) יותר מ-50% מהצמח פגוע. ביום ה-7 לאחר

האילוח נצפה הבדל מובהק בין קבוצות הגיל השונות, במספר הצמחים החולים מול הבריאים. ביום זה נאספו דגימות צוואר השורש לבחינת ביטוי גנים ומטאבוליטים. סה"כ נאספו 50 דגימות של צוואר השורש שאוחסנו מיד בהקפאה. חמש דגימות מכול קבוצת גיל לאחר אילוח בדרגת מחלה 2, וחמישה מביקורת ללא אילוח. במהלך השבוע שלאחר מכן, RNA הופק מכול הדגימות על פי פרוטוקול Borate.

משימה 5

התמרה גנטית של תבדיד פטריה *Sclerotium rolfii* אליהם בגן ל-GFP.

באדיבות Regine Kahmann התקבלו שני פלסמידים pOTEF-SG ו-pHSP70-SG, כאשר pOTEF-SG נבנה על בסיס הפלסמיד pTop 10 ו-pHSP70-SG נבנה על בסיס pSP72. שניהם מכילים את הגן SGFP-TYG ועמידות להיגרומיצין. *E. coli* שימש כמארח להגברת שני הפלסמידים. לשם יצירת עקומת גידול לפטריה, רולפסי גודלה בחמישה ריכוזי היגרומיצין, 100, 125, 150, 175, 200 מ"ג/מ"ל על מנת לקבוע את הריכוז המקסימלי בו הפטריה תגדל. לאחר מכן ריכוז זה יישמש לסלקציה של תבדידי הפטריה המכילים את העמידות להיגרומיצין שמקורה בפלסמיד. ה-*E. coli* שמכיל את הפלסמיד הופק באמצעות הקיט Presto Mini Plasmid Kit ע"פ פרוטוקול מצורף. התוצר שהתקבל נשלח לריצוף בכדי לאשרר את הרצף שלו, עם התחלים T7 ו-SP6.

משימה 6

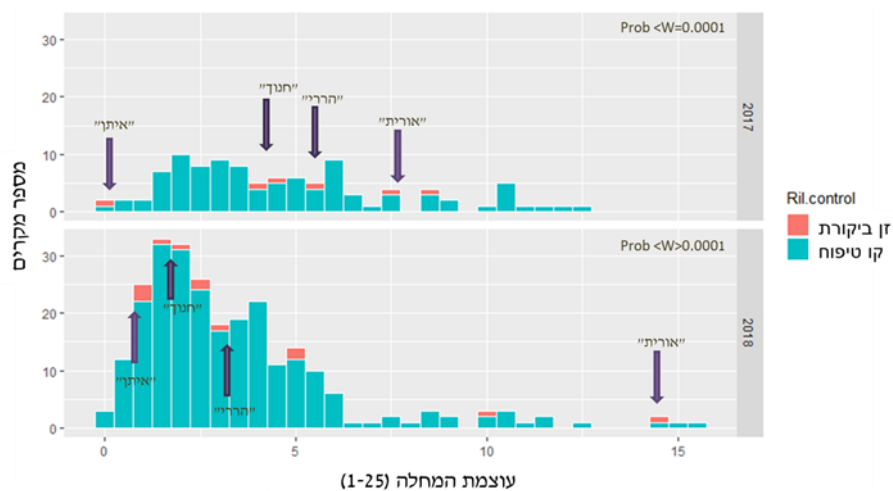
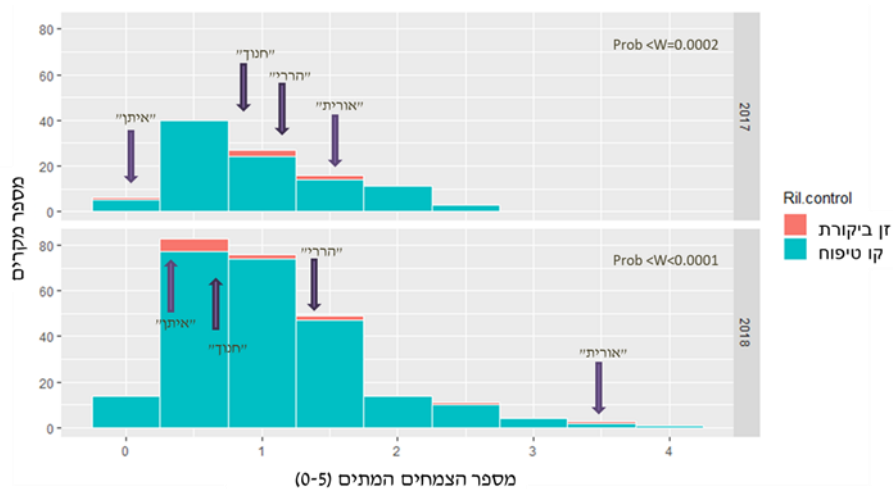
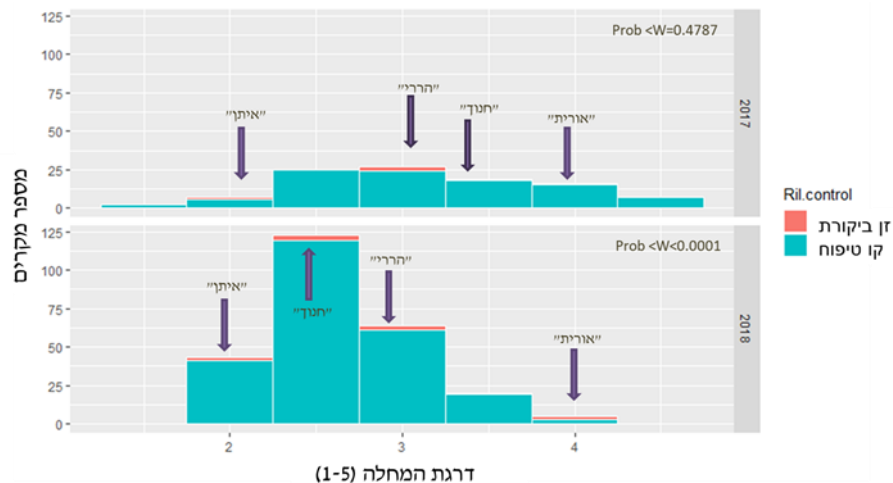
הכנת חומר ביולוגי לניתוח בשנה ג. בעונת 2017 נעשתה הכלאה בין הזנים חנוך N08082olJCT X (זן אולאית גבוהה נגזרת של 'ביילי'). בעונת 2018 גודלו כ- 10 צמחי F1 בחלקת טיפוח שלנו בקיבוץ נירים. נאספו זרעי F2 על בסיס צמח F1.

תוצאות

1. מבחני עמידות ל RILs של "חנוך" (עמיד) X "הררי" (רגיש) בהדבקה מכוונת בשדה.

התכונה "רמת הרגישות לרולפסי" המוצגת בפרק זה מבטאת שלושה מדדים שנאספו לאורך עונות מבחני השדה 2017-18: (I) **דרגת המחלה** למרכז אילוח (סקאלה של 1-5), (II) **מספר הצמחים המתים** למרכז האילוח (סקאלה של 0-5), (III) **עוצמת המחלה** (מכפלת דרגת המחלה ומספר הצמחים המתים) (סקאלה של 0-25) למרכז אילוח.

התפלגות שלושת המדדים הנ"ל בעונת 2018 והשוואתם לעונת 2018 מובאים באיור 1. על פי מבחן Shapiro-Wilk W Test התפלגות האוכלוסייה סטתה באופן מובהק מנורמלית בכל הפרמטרים שנבדקו פרט למדד דרגת המחלה של עונת 2017. עם זאת, ההתפלגות רציפה והסטייה מנורמליות מקורה ככל הנראה בסרגל המדד על פיו לא תתכן תוצאה קטנה מ-0.



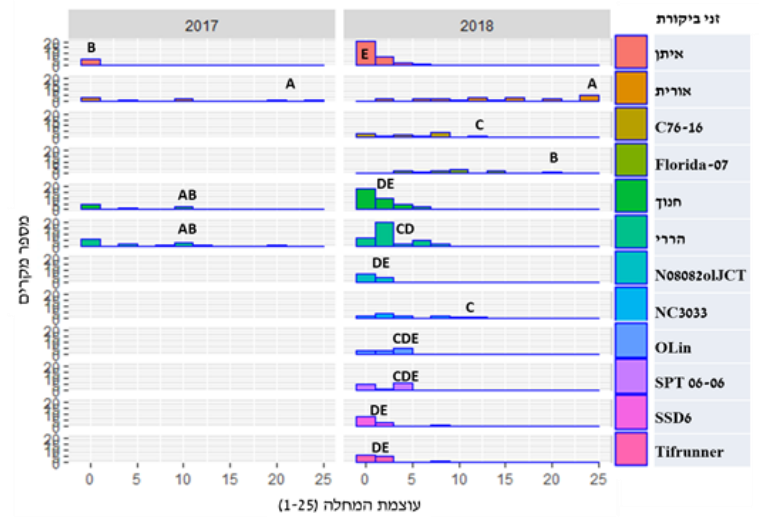
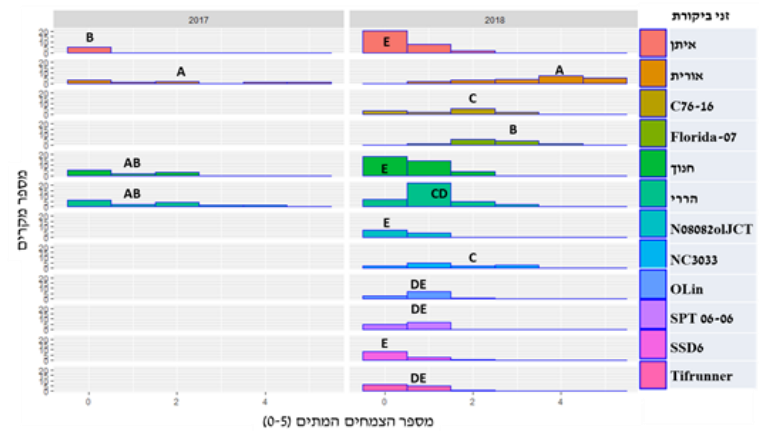
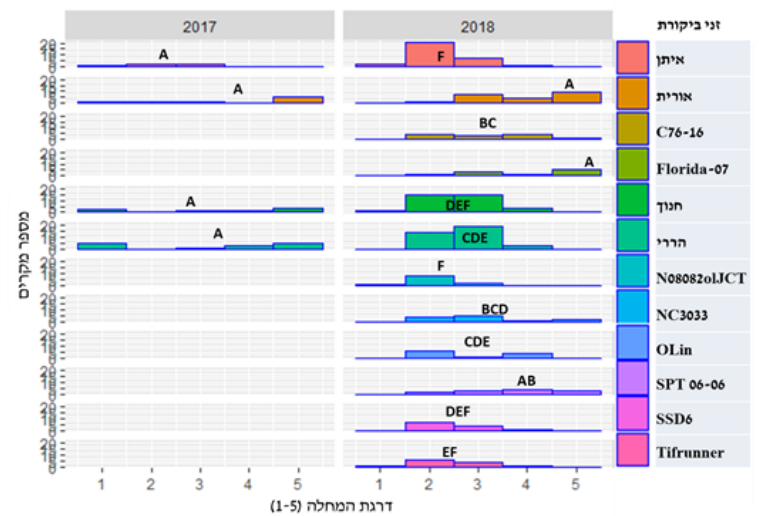
איור 1. התפלגות שלושת מדדי הרגישות לרולפטי בשנים 2017-18 באוכלוסיית RIL חנוך X הררי. קווי ההורים חנוך והררי, וקווי הביקורת איתן (עמיד) ואורית (רגיש) מודגשים בחץ סגול. בצבע הכתום מופיע מיקומם של קווי הביקורת הנוספים ("בינלאומיים"), זאת על מנת להראות את התפלגותם ביחס לאוכלוסייה.

כצפוי, מיקומם היחסי (בבחינת רבעונים) של זן הביקורת "איתן" וההורים "חנוך" "הררי" באוכלוסייה ביחס לרגישות לרולפסי נמצא בהתאמה לניסויים קודמים. לעומת זאת במדד מספר המתים ועוצמת המחלה הזן "אורית" (הרגיש ביותר בזני הביקורת הישראליים) התקבלו תוצאות לא צפויות. בעוד שבעונת 2017 נמצאו התוצאות ברבעון העליון של האוכלוסייה כאשר כ 15% מקווי האוכלוסייה נמצאו רגישים ממנו, בעונת 2018 נמצא הזן "אורית" מאוד רגיש ומחוץ לרווח הסמך באוכלוסייה ורק כאחוז בודד נמצא רגיש ממנו (ציון תקן 1.26, 2017: 3.45, 2018). מבחן שונות הראה הבדל מובהק בין קווי ה RIL באוכלוסייה המתפצלת בכל שלושת מדדי המחלה ובשתי העונות (טבלה 1), אם כי הבדלים אלו היו יותר משמעותיים בעונת 2018.

טבלה 1. ניתוח שונות (ANOVA) להשפעת קווי ה- RIL על שלושת מדדי הרגישות לרולפסי באוכלוסיית חנוך X הררי בשתי עונות (2017-2018). HH – שונות שמקורה בהבדל בין קווים.

תכונה	שנה	מקור השונות	דרגות חופש	סכום ריבועי	ממוצע ריבועי	F Ratio	Prob > F
דרגת מחלה (1-5)	2017	HH	102	433.40	4.25	1.78	<.0001
		Error	852	2037.04	2.39		
דרגת מחלה (1-5)	2018	HH	254	574.55	2.26	3.82	<.0001
		Error	2792	1653.37	0.59		
מספר מתים (0-5)	2017	HH	102	321.62	3.15	1.72	<.0001
		Error	852	1560.11	1.83		
מספר מתים (0-5)	2018	HH	254	1507.29	5.93	6.96	<.0001
		Error	2792	2379.15	0.85		
עוצמת מחלה (0-25 \ דרגה*מתים)	2017	HH	102	7864.60	77.10	1.73	<.0001
		Error	852	37935.72	44.53		
עוצמת מחלה (0-25 \ דרגה*מתים)	2018	HH	254	23826.10	93.80	7.92	<.0001
		Error	2792	33075.34	11.85		

מבחן תחום (LSD test-T) להשוואה בין קווי הביקורת מובא באיור 2. נמצאו הבדלים מובהקים בין שני זני הביקורת איתן ואורית בכל מדדי הרגישות ובשתי העונות, כאשר אורית היה רגיש ביותר בעוד איתן היה בקבוצת בעלי עמידות למחלה. במדד מספר המתים לשנת 2017 לא נמצא הבדל מובהק בין ההורים (חנוך והררי) לבין זני הביקורת (אורית ואיתן), שלא כמו בין קווי הביקורת עצמם. בעונת 2018 נמצא הבדל מובהק כאשר חנוך משויך לקבוצת הזנים העמידים הכוללת את איתן, N08082olJCT, SSD6. הררי משתייך לקבוצת הרגישים הכוללת את: SPT 06-06, Tifrunner ו-OLin. קו הביקורת NC3033 המוכר כעמיד יחסית בארה"ב נמצא בתנאי הניסוי הנוכחי רגיש יותר מהררי יחד עם הקווים C76-16, Florida-07. אורית נמצא רגיש במיוחד מכול זני הביקורת כמו גם ההורים.



איור 2. התפלגות קווי הביקורת/הורים לשלושת מדדי המחלה ומבחן תחום לממוצע שלהם (LSD testT) בחלוקה לעונות-2017 ו-2018. קווים בעלי אות שונה הם נבדלים ברמת מובהקות של 0.05.

אומדני התורשתיות וחישובי רכיבי שונות גנטיים וסביבתיים מוצגים בטבלה 2. אומדני התורשתיות בשתי העונות היו בינוניים עד נמוכים. לדוגמא, בעונת 2017 אומדן התורשתיות היה 7.69% בלבד ($P=0.004$) במדד דרגת המחלה, ואילו בעונת 2018 עלה לרמה בינונית של 35.80% ($P<0.0001$) בפרמטר עוצמת המחלה. מקדמי השונות הגנטי, סביבתי ופנוטיפי (ממוצע) לשנת 2017 היו 30%, 109% ו-113% בהתאמה, לעומת הממוצע לשנת 2018 48%, 70% ו-85% בהתאמה.

טבלה 2. אומדני תורשתיות וחישובם לפי רכיבים גנטיים (Vg), סביבתיים (Ve) ופנוטיפיים (Vp) לשלושת מדדי הנגיעות בחלוקה לשתי עונות 2017-18.

Wald p-Value	תורשתיות %	PCV %	ECV %	GCV %	Vp (פנוטיפ)	Ve (סביבתי)	Vg (גנוטיפ)	
0.0021	7.69	50.95	48.95	14.13	2.587	2.388	0.199	דרגת מחלה 17
0.0037	7.20	142.88	137.64	38.34	1.974	1.832	0.142	מספר מתים 17
0.0035	7.29	147.30	141.83	39.78	48.046	44.542	3.504	עוצמת מחלה 17
<.0001	18.99	31.78	28.61	13.85	0.731	0.592	0.139	דרגת מחלה 18
<.0001	32.74	102.00	83.65	58.36	1.267	0.852	0.415	מספר מתים 18
<.0001	35.80	123.06	98.60	73.63	18.446	11.842	6.604	עוצמת מחלה 18

מתאמים גנטיים חושבו בין שלושת מדדי הרגישות למחלה לבין מספר תכונות בעלות חשיבות חקלאית ושיווקית (טבלה 3). תכונות אגרונומיות שנבחנו: רמת שמן בגרעין (%), רמת חלבון בגרעין (%), רמת סוכר בגרעין (%), בכירות (%), אינדקס יבול (%), ורגישות לברזל במופע הצהבה (GRVI Yellow).

טבלה 3. מתאמים גנטיים בין שלושת המדדים של הערכת חומרת המחלה לבין תכונות אגרונומיות באגוא"ד. ערכים שליליים מצביעים על קורלציה שלילית. (*) מייצג רמת מובהקות >0.05 , (**) מייצג רמת מובהקות >0.01 , (***) מייצג רמת מובהקות >0.001 .

שמן %	חלבון %	בכירות %	אינדקס יבול	
0.0685	-0.01	0.0997	-0.0407	דרגת מחלה 2017
0.185	-0.0976	0.2479*	0.0413	מספר מתים 2017
0.1911	-0.0923	0.2495*	0.0356	עוצמת מחלה 2017
0.1434*	(-0.1465*)	0.2681***	0.3154***	דרגת מחלה 2018
0.1252	(-0.1356*)	0.2836***	0.3606***	מספר מתים 2018
0.1369*	(-0.1608*)	0.2675***	0.3549***	עוצמת מחלה 2018

נמצא מתאם חיובי מובהק בין שלושת מדדי הרגישות למחלה לרמת הבכירות ואינדקס היבול בעונת 2018. גם ב- 2017 נמצא מתאם לבכירות אך הוא היה רק בין שתיים מתכונות הרגישות (מספר מתים ועוצמת המחלה) ועם מובהקות נמוכה יותר ($P>0.05$). כמו כן נמצא מתאם מובהק לתכונת תכולת חלבון/שמן בגרעין ($P>0.05$) בעונת 2018. לא נמצא מתאם מובהק בין שלושת מדדי הרגישות למחלה לבין לרמת הסוכר (%) ולרמת ההצהבה (GRVI Yellow), ולכן הם אינם מופיעים בטבלה.

בנוסף לתכונות כמותיות, נבחן גם הקשר שבין רמת החיוניות לתכונות קטגוריות כגון צורת הצימוח, רמת החספוס של התרמיל, צורת התרמיל וחוזק התרמיל. בדומה לעונת 2017 גם בעונת 2018 נמצאה השפעה מובהקת של צורת הצימוח על כל שלושת מדדי הרגישות למחלה (**טבלה 4א**), כלומר קווים משתרעים היו יותר רגישים למחלה מאשר קווים שיחיים. אולם בעונת 2018 הייתה השפעה זו מובהקת יותר ($F \text{ ratio}=21-27$). מבחינת רמת החספוס (**טבלה 4ב**), נמצאה השפעה מובהקת על שלושת מדדי הרגישות למחלה בשתי העונות, כלומר תרמילים בעלי קליפה חלקה היו רגישים יותר למחלה. גם כאן בעונת 2018 הייתה ההשפעה בעלת מובהקות גבוהה יותר ($F \text{ ratio}=7-8.2$). לא נמצאה השפעה מובהקת לצורת התרמיל וחוזק התרמיל על אף אחד משלושת מדדי הרגישות למחלה ולכן הם לא מובאים בטבלאות.

טבלה 4. ניתוח שונות לבחינת השפעת (א) צורת הצימוח (שיחי מול משתרע) ו- (ב) רמת החספוס של התרמיל (חלק לעומת מחוספס) על תכונות הקשורות לעמידות כנגד קשיון. (*) מייצג רמת מובהקות $0.05 >$ (**) מייצג רמת מובהקות $0.01 >$ (***) מייצג רמת מובהקות $0.001 >$.

א.

רמה	ממוצע עוצמת מחלה 2017	ממוצע מספר מתים 2017	ממוצע דרגת מחלה 2017	ממוצע עוצמת מחלה 2018	ממוצע מספר מתים 2018	ממוצע דרגת מחלה 2018
שיחי	3.07508	0.703226	3.30047	2.59586	0.90778	2.56508
משתרע	3.32508	0.952058	4.5264	5.28352	1.54031	2.98146
F Ratio	2.8373	6.4857	6.5796	23.3733	21.2347	27.4343
Prob > F	0.0956	0.0126*	0.012*	<.0001***	<.0001***	<.0001***

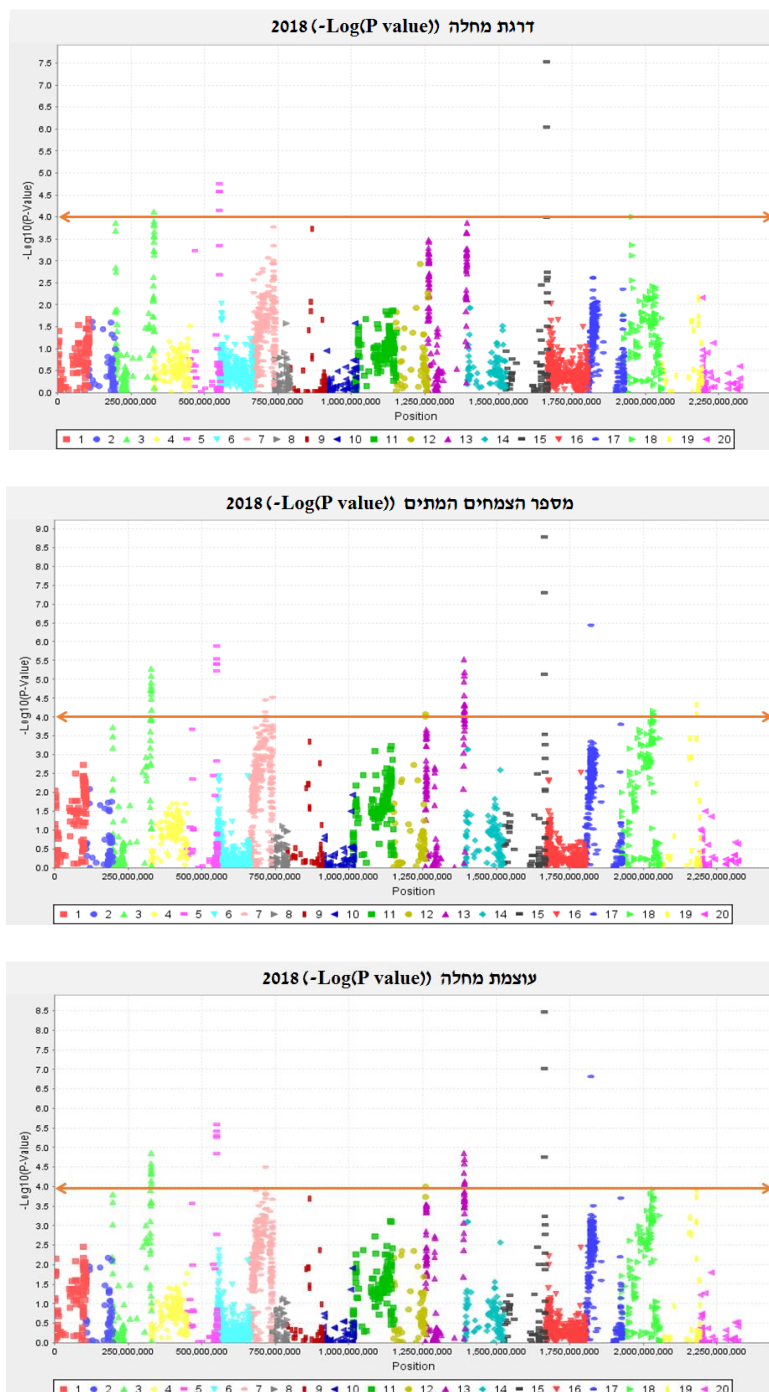
ב.

רמה	ממוצע דרגת מחלה 2017	ממוצע מספר מתים 2017	ממוצע עוצמת מחלה 2017	ממוצע דרגת מחלה 2018	ממוצע מספר מתים 2018	ממוצע עוצמת מחלה 2018
מחוספס	3.13234	0.74019	3.48136	2.64788	1.01807	3.06915
חלק	3.2946	1.01677	4.83547	2.92923	1.51176	5.05365
F Ratio	0.7333	5.025	5.0382	7.3195	8.1682	8.2507
Prob > F	0.3943	*0.0276	*0.0274	**0.0083	**0.0054	**0.0052

2. מיפוי תכונות העמידות ע"י שימוש ב-SNP array.

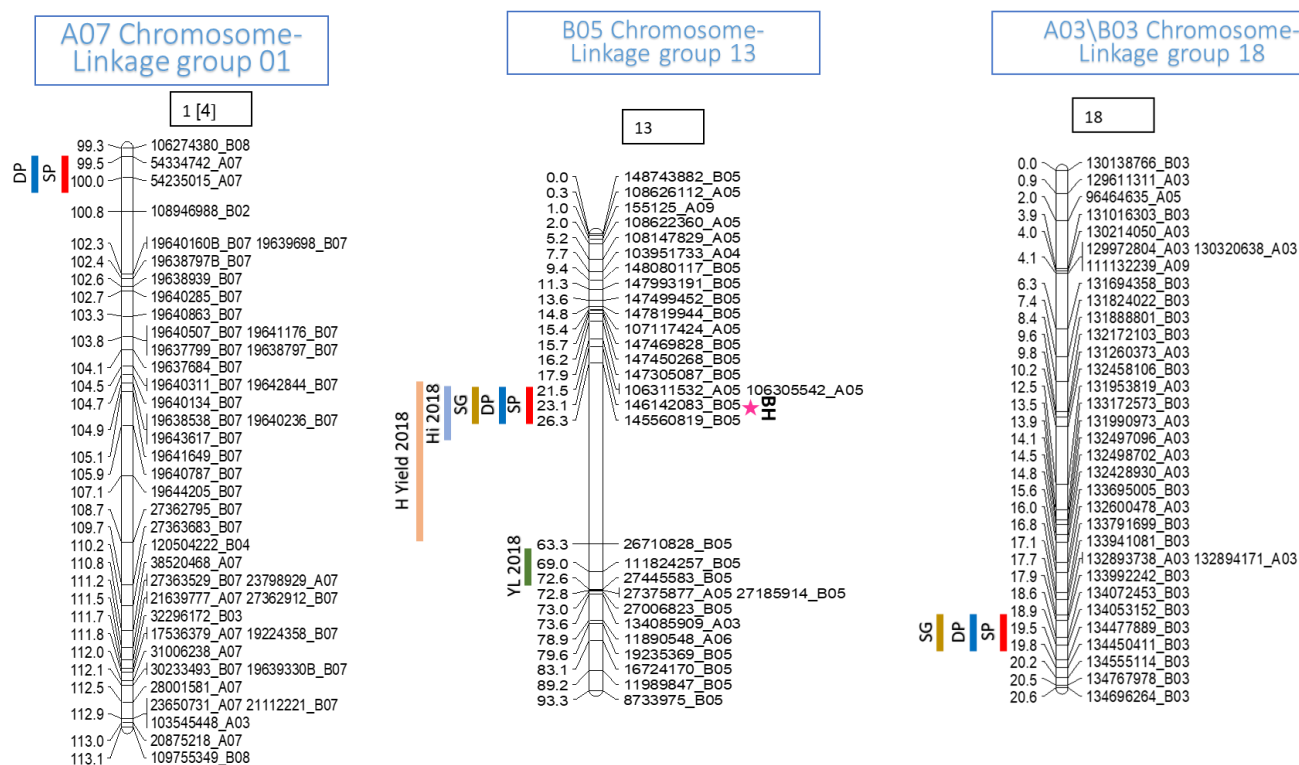
כאמור, מיפוי תכונות מדדי המחלה נעשה בשתי שיטות - מיפוי פיזי על הגנום ומיפוי על גבי מפה גנטית. זאת משום שקיימת בעיה מובנית בהגדרת ה array לגבי המיקום המדויק של כל SNP (אם על גנום A או B). תחילה, נעשה ניתוח QQ באמצעות תכנת TASSEL בכדי להציג את איכות הקשר בין הגנוטיפ והפנוטיפ לתכונות הרגישות לרולפסי (ראה פרק שיטות). תוצאות הניתוח הראו הבדל ברור בין שתי העונות. בעוד שבעונת 2017 הקו הליניארי של האסוציאציה בשלושת מדדי הרגישות היה קרוב לזה המצופה שמעיד על 0 קשר בין גנוטיפ ופנוטיפ, בעונת 2018 נראה קשר מובהק בין גנוטיפ ופנוטיפ במספר המתים ועוצמת המחלה ($-\text{Log}_{10}(P)=9$) (SP) ודרגת מחלה ($-\text{Log}_{10}(P)=7.5$) (SG). תוצאות המיפוי הפיזי של עונת 2018 עבור שלושת מדדי המחלה על בסיס הרצף הגנומי מובאים באיור 5. המיפוי מוצג באמצעות ההתאמה בין ערכי $-\text{Log}_{10}(P)$ לשינוי ב SNPs בין כל הצאצאים ועבור כל אחת מהתכונות הפנוטיפיות, וכנגד כל אחד מ- 20 הכרומוזומים המסומנים של אגוא"ד (Manhattan plot).

נמצאו מספר אתרים (QTLs) בעלי קשר מובהק למדדי הרגישות למחלה. בעיקר, מדד מספר המתים עם ערך $\text{Log}_{10}(P)$ מקסימלי 9 על כרומוזום 15 (וכרומוזום 5 המקביל שלו בגנום A), וכרומוזום 13 (וכרומוזום 3 המקביל שלו בגנום A) כ-QTL שני, וכרומוזום 7 (וכרומוזום 17 המקביל שלו בגנום B) כ-QTL שלישי.



איור 5: Manhattan plot לבחינת התאמה בין ערכי $\text{Log}_{10}(P)$ לשינוי ב-2882 SNPs לכל שלושת מדדי הרגישות לרולפסי (עונת 2018). הקו הכתום מסמן את ערך הסף 4 של $-\text{Log}_{10}(P)$.

בנוסף לאיתור הלוקוסים בגנום הפיזי, נערך גם מיפוי גנטי באמצעות בניית מפת תאחיזה. באנליזה זו זוהו מספר QTLs מובהקים המסבירים 7.5-14.5% מהשונות הכללית באוכלוסייה (איור 6, טבלה 5). המיפוי הגנטי גם הביא להבחנה ספציפית יותר של תת-הגנום שבו מצוי כל QTL. זאת משום בעיה מובנית בתכנון השבב של חברת אפימטריקס שלא יודע באופן מוחלט להבדיל בין גנום A וגנום B של אגוא"ד הפוליפלואידי. ניתוח באמצעות קבוצות תאחיזה (מיפוי גנטי) הוריד את מספר האתרים העיקריים לשלושה (כרומוזומים A3, A7, ו-B5). ה-QTL המובהק מכולם ממוקם על הלוקוס לתכונת צורת הצימוח (כרומוזום B5) שמקורו דווקא בהורה הרגיש (הררי) והוא מסביר כ- 15% מהשונות הכללית. באתר זה ישנה גם בקרה על תכונות נוספות כגון רמת היבול ואינדקס היבול. שני ה-QTL האחרים מקורם בהורה העמיד (חנוך).



איור 6: מיפוי גנטי של מדדי העמידות למחלה ותכונות נוספות. SG = דרגת מחלה, DP = מספר מתים, SG = עוצמת מחלה. שאר התכונות: BH – צורת הצימוח, YL = יבול, HI = אינדקס יבול.

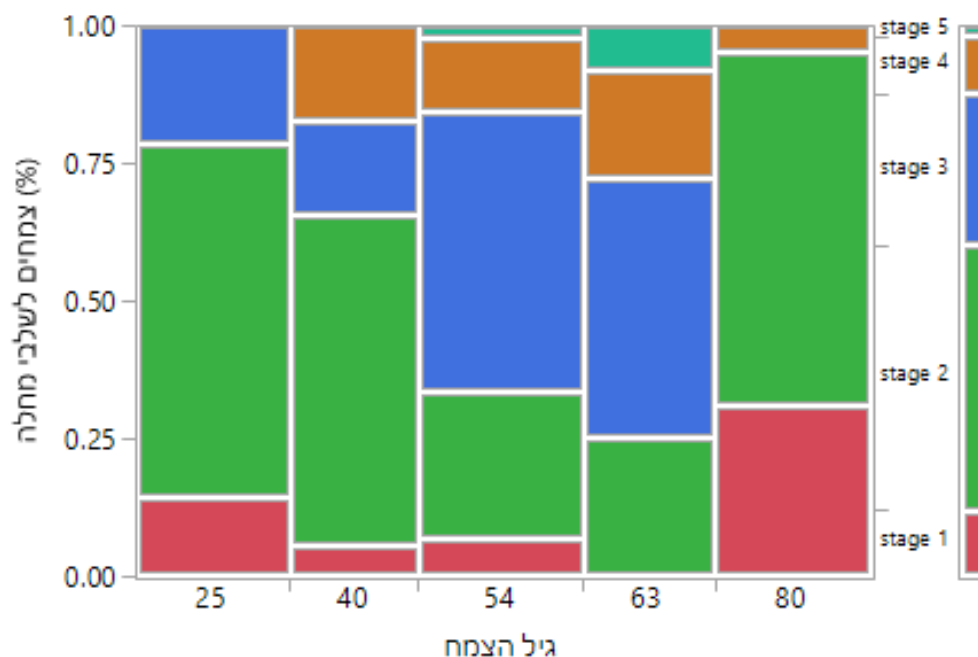
טבלה 5: רשימת QTLs מובהקים ($LOD > 3$) עבור שלושת מדדי המחלה.

תכונה	כרומוזום	מיקום (cM)	התחלה Snp	LOD	שונות פנוטיפ (מוסברת %)	אפקט אדיטיבי
עוצמת מחלה	A07/B07	100.0	54235015_A07	3.04	7.5	-0.73
מספר צמחים מתים	A07/B07	100.0	54334742_A07	3.07	7.6	-0.19
עוצמת מחלה	B05/A05	23.1	106311532_A05	5.18	12.5	0.94

0.26	14.5	6.09	106311532_A05	23.1	B05/A05	מספר צמחים מתים
0.12	9.4	3.85	106311532_A05	23.1	B05/A05	דרגת מחלה
-0.75	8	3.24	133992242_B03	19.5	B03/A03	עוצמת מחלה
-0.19	8.2	3.31	132893738_A03	17.9	B03/A03	מספר צמחים מתים
-0.11	7.8	3.15	134053152_B03	19.5	B03/A03	דרגת מחלה

3. מבחן ביולוגי לבחינת השפעת הגיל הפנולוגי של הצמח על דרגת המחלה

מטרת הניסוי הייתה לבחון השפעת גיל הצמח על רמת ההדבקות במחלה. בהמשך גם לזהות ביטוי גנים ומטאבוליטים ספציפיים שקשורים לגיל הפנולוגי ועשויים להשפיע על רמת ההדבקה. לשם כך השתמשנו בזן הרגיש "אורית". האילוח נעשה באופן מלאכותי על מצע מנותק. נבדקו 5 קבוצות גיל: 25, 40, 54, 63 ו-80 יום מזריעה. תוצאות הניסוי מובאות באיור 7. נמצא הבדל מובהק בהתפלגות קטגוריות המחלה בין הגילאים השונים ($\text{Prob} > \text{ChiSq} < 0.001$) מה שדוחה את השערת האפס כי התפלגות עוצמת המחלה היא זהה ללא קשר לגיל הצמח. באופן כללי ניתן לראות כי צמחים צעירים הם באופן מובהק עמידים יותר למחלה מאשר צמחים מבוגרים. זה נכון עד גיל של 63 יום מזריעה, כאשר לאחר מכן ישנה שוב ירידה ברמת ההדבקה של הצמחים. ביום זה נספו דגימות צוואר השורש לבחינת ביטוי גנים ומטאבוליטים. סה"כ נאספו 50 דגימות של צוואר השורש שאוחסנו מיד בהקפאה. חמש דגימות מכול קבוצת גיל לאחר אילוח בדרגת מחלה 2, וחמישה מביקורת ללא אילוח. במהלך השבוע שלאחר מכן, RNA הופק על פי פרוטוקול Borate להפקת RNA מכול קבוצות הגיל.



איור 7: מבחן קטגורי (Chi-Square) לבחינת ההבדל בין חמש קבוצות גיל שונות ביחס לרמת המחלה. רמות המחלה (stage) הן: (1) צמח בריא עם תפטיר פטרייה סביבו (2) פגיעות תפטיר על גבעול בלבד (3) עד 25% מהצמח פגוע (4) 25%-50% מהצמח פגוע, (5) יותר מ- 50% מהצמח פגוע.

דיון ומסקנות

בשנה ב' של המחקר נערך ניסוי שדה של הדבקה מכוונת של קשיון בהיקפים שלא דווחו בעבר באגוא"ד (מעל 3000 מרכזי אילוח). הורחב היקף ההדבקה ל 243 קווים ויעילות ההדבקה הייתה גבוהה מאוד. מספר גורמים תרמו לשיפור הניכר, ביניהם הדבקה בגיל המתאים (מועד סגירת הנוף), הדבקה כפולה (עם תבדיל באגר + גרגירי חיטה נגועים), הדבקה בשעות הבוקר המוקדמות בלחות גבוהה, השקיה מיידית לאחר ההדבקה, וחזרה על ההדבקה לאחר כשבוע (על צמחים שלא נדבקו בסיבוב הראשון). בנוסף, בשנה זו המשכנו לפתח את שיטת המדידה של רמת המחלה על ידי פיתוח שלושה מדדים משלימים. שיפור יעילות ההדבקה ופיתוח מדדי מחלה תרמו להקטנה משמעותית של השונות הניסויית בשדה ולהגדלת התורשתיות של כל שלושת המדדים. עדיין, קיימת שונות ניסויית גבוהה בשדה, בדומה למה לנצפה בעבודות קודמות בקשיון באגוא"ד (Bera et al., 2016; Gorbet et al., 2004), מה שמצריך הסתכלות נוספת (סביבה ב') והגדלת משמעותית של גודל החלקות ומספר החזרות בשדה. בנוסף, יש לציין כי ראינו הבדל מובהק בין שלושת מדדי המחלה. במדד "רמת המחלה" ההבדל בין הקווים היה פחות מובהק מאשר מדד "מספר המתים", מה שמראה כי אכן מדובר פה בעמידות שדה כללית שפחות קשורה ברמת העמידות המיידית אלא בהאטה של קצב התקדמות המחלה בשדה. בנוסף ראינו שיש השפעה לגיל הפיזיולוגי של הצמח, כאשר צמחים בכירים הם יותר רגישים.

הגדלת הניסוי ושיפור יעילות ה-phenotyping תרמו למציאה של QTL נוספים לאלו שנמצאו בעונת 2017. ראוי לציין כי מאז תחילת המחקר פורסמה עוד עבודה של מיפוי המחלה באגוא"ד (Dodia et al., 2016). המחקר הוא עוסק באגוא"ד מזן הודי שהוא טיפוס בוטנים אחר (ספרדי). גם בו נמצאו גם מספר QTL לעמידות, אולם רמת המובהקות שלהם ורמת ההסבר של % מהשונות הפנוטיפית היו באופן מובהק נמוך מאשר נמצא בניסוי שלנו. מתוך שלושת ה-QTL נמצא אחד (כרומוזום A7) משותף לשני המחקרים. תוצאה זו מראה כי מקור העמידות שלנו (שילוב של הזן חנוך עם צורת צימוח שיחית של הררי) הוא חדשני ועשוי לתרום מעבר לידע הקיים.

בניסויי ההדבקה בתנאים מבוקרים (בחממה), שמטרתו לימוד המנגנונים הביולוגיים והכימיים המבקרים את רמת העמידות, נמצאה השפעה מעניינת של גיל הצמח על רמת ההדבקה. צמחים צעירים הינם יותר עמידים להדבקה באופן מובהק. תוצאה זו היא דומה לניסוי דומה שדווח בהדבקות של אגוא"ד מטיפוס אחר (Bekriwala et al., 2016) והיא עשויה לפתוח צוהר להבנת תהליכי עמידות הקשורים לגיל הצמח.

תכניות להמשך:

1. בחינת אפקט ה-QTL על רקע גנטי של זן רגיש מאוד (אורית). התחלנו בשנה ב' מערכת של הכלאות מחזירות בין שני קווים עמידים מהאוכלוסייה ה-RIL (HH251 ו HH242) על הרקע של אורית.
2. ניסויי שדה בהיקפים גדולים על קרקע מאולחת באופן טבעי. כעשרה קווים מהאוכלוסייה נבחנו כעת בשטח גדול בעמק החולה.
3. מבצע מבחן חוזר בחוות גד"ש של כל אוכלוסייה ה-RIL בהדבקה מכוונת כדי לאתר השפעות גנוטיפ X סביבה.
4. המשך פיתוח אוכלוסייה RIL חדשה: בין הזנים חנוך N08082oIJCT X (זן אולאית גבוהה נגזרת של 'ביילי').
5. נדיפים: כאמור נאסף חומר צמחי מניסוי הגילאים והוא ישמש לבחינת ביטוי גנים וניסוי נדיפים/מטבוליטיים.
6. התמרה גנטית של פטריה: בניסוי זה נמשיך לפענח את רצפי הפלסמידים שקיבלנו, נבחן את התאמת ה-codon usage בגנים המצויים בפלסמיד ל-*S. rolfsii*, ניצור פרוטוקול להפקת פרוטופלסטים מקורי הפטריה. ונמשיך לפתח פרוטוקול טרנספורמציה.

רשימת ציטוטים

Bekriwala TH, Kedar N, Chaudhary DA (2016) Effect of age on susceptibility of groundnut plants to *Sclerotium rolfsii* Sacc. caused stem rot disease. *J Plant Pathol Microbiol*, 7:12

Bera SK, Kamdar JH, Kasundra SV (2016) A novel QTL governing resistance to stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* in peanut. *Australasian Plant Pathol*. 45: 637.

Bradbury PJ (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **23**, 2633–2635.

Dodia MD, Binal J, Sunil SG, Polavakkalipalayam P, Gyan PM, Dayama N et al. (2018). Genotyping-by-sequencing based genetic mapping reveals large number of epistatic interactions for stem rot resistance in groundnut. *Theoretical and Applied Genetics*, 1-16.

Gorbet DW, Kucharek TA, Shokes FM, Brenneman TB (2004) Field evaluations of peanut germplasm for resistance to stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Peanut Sci.* 31:91–95.

Holbrook CC, Isleib TG, Ozias-Akins P, Chu Y, Knapp SJ, Tillman B, Guo B, Gill R, Burow, MD (2013) Development and phenotyping of recombinant inbred line (RIL) populations for peanut (*Arachis hypogaea*). *Peanut Science* 40:89–94.

Patil A, Popovsky S, Levy Y, Chu Y, Clevenger J, Ozias-Akins P, Hovav, R. (2018) Genetic insight and mapping of the pod constriction trait in Virginia-Type peanut. *BMC Genetics*.8:50-57.

Shokes, FM, Różalski K, Gorbet, DW, Brenneman T, Berger DA (1996). Techniques for inoculation of peanut with *sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field. *Peanut Sci.* 23:124-128.