פיתוח שיטה לזיהוי הזן המפרה בפירות 'האס'

דו"ח 2011

דורון שניידר, הדר כהן – מ"וף צפון
סיגל כורם, חן שוחט, רונה קרוסינקר, יובל סער, דני ברקוביץ, מרטין גולדווי – מי"גל, קרית-שמונה
ורד יריחימוביץ – מכון וולקני
ירון וייסמרק - מטע ראש הנקרה

הקדמה

הזן 'האס' הוא זן האבוקדו המרכזי במטעי הארץ. הפירות שלו מבוקשים בשווקי העולם, אך היבול עומד על כ-1.5 טון/דונם בממוצע עם סרוגיות גבוהה. בישראל משמש ה'אטינגר' כזן מפרה בלעדי ל'האס'. מטרת המחקר לפתח שיטה להבחנה גנטית בין הזנים האס, אטינגר ועירית, המבוססת על SNP (Single-nucleotide polymorphism). השיטה תאפשר לזהות את ההורות בצאצאי 'האס' ממטע בו נטועים הזנים הללו לסירוגין. זהו שלב ראשון במחקר שמטרתו למצוא מפרים מצטיינים ל'האס', בנוסף ל'אטינגר'.

חומרים ושיטות

1. חומר צמחי

להפקת דנ"א שימשו עלים מהזנים ההוריים: האס, אטינגר ועירית ממטעי עין-שמר וחניתה, ועלים מצאצאי 'האס' 2010 ממטע ראש-הנקרה. העלים נשמרו ב- 70°C- עד לשימוש.

2. הפקת דנ"א

דנ"א גנומי הופק לפי Doyle and Doyle (1987). 100-200mg עלים נכתשו במכתש ועלי בנוכחות חנקן נוזלי. האבקה הכתושה הורחפה ב- 700µl בופר הפקה המכיל: 100mM Tris pH 8, 2% Hexadecyltrimethylammonium Bromide [CTAB], 20mM Ethylenediaminetetra Acetic Acid [EDTA] pH 8, 1.4M NaCl, 1% Polyvinylpyrolidone [PVP] MW=40000 ו- 1% 2-Mercaptoethanol. התערובת הודגרה 30 דקות ב- 65°C, תוך כדי ערבוב מפעם לפעם. לאחר קירור לטמפרטורת החדר, נערכו שני מיצויים עם Chloroform:Octanol (24:1). ה-DNA הושקע בעזרת Ethanol והומס במים. הדנ"א נשמר ב-20°C- עד לשימוש.

3. תגובת PCR

תגובת PCR עם תחלים אוניברסלים נערכה לשם הגברת קטעי דנ"א מהגן לצלולז במכשיר Minicycler (MJ Research, Waltman, MA USA). התערובת לתגובת ה-PCR הכילה בנפח 50µl את המרכיבים הבאים: 20ng DNA (1µl), FastStart Taq PCR buffer X1, 200µM מכל אחד מה-dNTP, 30pmol מכל תחל ו- 1 unit FastStart Taq DNA Polymerase (Roche diagnostics, Almere, The Netherlands). התחלים ותנאי תגובת PCR מפורטים בטבלאות 1 ו-2.

טבלה 1: התחלים לתגובת PCR

מס' תגובה	ה-SNP בקטע הדנ"א המוגבר	תחל Forward (5'>3')	תחל Reverse (5'>3')
1	SNP1305[1] SNP1371 SNP1447	Cell-F (1259-1288) GACTCGAATGGATTTATTATCAGG	Cell-R (1518-1538[2]) GACTGCTGATAATTGTTCCGG
2	SNP1371 SNP1447	Cell-F-B (1329-1349) AGGATTCGGAGAGAGGTATCC	Cell-R (1518-1538) GACTGCTGATAATTGTTCCGG
3	SNP1305	Cell-F-A (1123-1146) TTCCGGAGGACATGCTTCATGTGG	Cell-R-A (1330-1350) TGGATACCTCTCTCCGAATCC

[1] מיקום ה-SNP ברצף הבסיסים בגן לצלולז מהזן האס (Acc. No. EU335600)

[2] מיקום התחל ברצף הבסיסים בגן לצלולז מהזן האס (Acc. No. EU335600)

טבלה 2: תגובת ה-PCR

טמפ' (°C)	זמן (דקות)	מספר סיבובים
95	5	1
95	0.5	5
58	0.5	
72	0.5	
95	0.5	35
55	0.5	
72	0.5	
72	5	1

4. איפיון SNP במכשיר dHPLC:

תוצרי PCR מדנ"א של ההורים רוצפו, כדי לזהות בהם SNP. תוצרי PCR מדנ"א של הצאצאים הורצו במכשיר dHPLC. תוצרים להם כרומטוגרמות שונות נשלחו לריצוף. זיהוי תכולת ה-SNP בשאר הצאצאים נעשה לפי סוג הכרומטוגרמה שהתקבלה עבור כל אחד מהם.

5. זיהוי מקור האבקה שהפרתה צאצאי 'האס' ממטע עם המפרים 'עירית' ו-'אטינגר'

ארבעים ושבעה פירות 'האס', שנותרו לאחר הקטיף במטע, נאספו במהלך פברואר 2011. הזרעים נוקו, נשטפו במים, נזרעו במשטח פלסטי עם ורמיקוליט ולאחר מכן הושקו בתמיסה מימית המכילה חומר נגד פיטריות ('Bavistin 50DF', חב' אגן). הזרעים הונבטו ב"חממית" ולאחר כשלושה חודשים (יוני-יולי) נקטפו עלים, שהוקפאו ב-70°C- עד לשימוש. הדנ"א הופק כנ"ל (סעיף 2) ו- PCR נערך עם זוגות התחלים הבאים:

1) Cell450-F-A ו- Cell450-R-A ו-2) Cell450-F-B ו-Cell450R, לאיפיון SNP1305 ו-SNP1447+SNP1371, בהתאמה (טבלה 1, תגובות 2 ו-3).

תוצאות

<u>אפיון SNP בזנים ההוריים האס, אטינגר ועירית</u>

מהשוואת הרצף, ששובט מהגן לצלולז, בין הזנים ההוריים האס אטינגר ועירית נמצאו שלושה SNP: SNP1305, SNP1371 ו-SNP1447. מספר ה- SNP נקבע לפי מספר הבסיס בגן לצלולז מהזן האס.

הזנים ההוריים הם דיפלואידים, ולכן מבוטאים בכל אחד מהם שני מופעים (אללים) מכל גן. תכולת ה-SNP בכל אחד משני האללים מהזנים האלו מפורטת בטבלה 3. בשלושת הזנים שנבדקו נמצאו שלושה אללים שונים עבור ה-SNP שהוזכרו. האללים נקראו: **CCC**, **TCT** ו-**CTT**, בהתאם לנוקליאוטידים המצויים בכל אחד מה-SNP שאותרו.

בטבלה 3 ניתן לראות שבזן האס שלושת ה-SNP הומוזיגוטים, ולכן בקטע הגן לצלולז שהוגבר שני האללים זהים (**CCC**). לעומת זאת בזנים אטינגר ועירית קיימים עבור קטע גן זה שני אללים שונים, בגלל נוכחות SNP הטרוזיגוטיים: **TCT** ו-**CTT** ב'אטינגר' ו- **CCC** ו-**TCT** ב'עירית' (טבלה 3).

<u>איפיון את מקור האבקה האפשרי שהפרה צאצאי ה'האס' ממטע עם המפרים 'אטינגר' ו'עירית'</u>

בכל אחד מצאצאי 'האס' מבוטאים שני אללים, אחד שמקורו מהזן האימהי (הביצית) והשני שמקורו בזן האבהי (גרגר האבקה). האלל האימהי היחיד האפשרי בצאצאי 'האס' הוא **CCC**, בגלל הזהות בין שני האללים. לעומת זאת לאלל האבהי בצאצאי 'האס' ממטע בו נטועים גם הזנים אטינגר ועירית שלוש אפשרויות: **CCC**, מהפריה עם גרגר אבקה מהזן האס או עירית, **TCT** מהפריה עם גרגר אבקה מהזן אטינגר או עירית או **CTT**, מהפריה עם גרגר אבקה מהזן אטינגר (טבלה 4). לכן צרופי ה-SNP הללו מאפשרים לאפיין את מקור האבקה האפשרי שהפרה את צאצאי ה'האס'.

<u>אנליזת ה-SNP בצאצאי 'האס' ממטע עם המפרים 'אטינגר' ו'עירית'</u>

מתוך ניסיוננו, מכשיר dHPLC מאפשר להבדיל בין הטרוזיגוטיות להומוזיגוטיות על בסיס SNP אחד או שניים (יותר משני SNP אינם יוצרים היסטוגרמות אופייניות לכל אלל). לכן הגברנו ב- PCR שני קטעי דנ"א, האחד מכיל את SNP1305 והשני את מכיל את SNP1371 ו-SNP1447 (התחלים לתגובות אלה מפורטים בטבלה 1). התקבלו היסטוגרמות אופיניות לכל סוג אלל, לפיהן ניתן לזהות את תכולת האללים בצאצאי 'האס' ממטע המכיל את הזנים המפרים אטינגר ועירית (טבלה 4).

אנליזת dHPLC לקטע המכיל את שלושת ה-SNP שאותרו נערכה ל-47 צאצאי 'האס' מהמטע שהוזכר. מהתוצאות ניתן לקבוע כי 43% מהצאצאים (20 פירות) הם תוצרי הפריה זרה עם גרגר אבקה מהזן אטינגר, 40% מהצאצאים (19 פירות) הם תוצרי הפריה זרה עם גרגר אבקה מהזן אטינגר או עירית ו-17% מהצאצאים (8 פירות) תוצרי הפריה עצמית או הפריה זרה עם גרגר אבקה מהזן עירית (טבלה 4). מכאן שאחוז צאצאי 'האס' שהופרו ע"י אבקה מהזן אטינגר גבוה בהשוואה לצאצאים שהופרו ע"י אבקה מהזן עירית, ושיעור ההפריה העצמית בצאצאי 'האס' נמוך ואינו עולה על 17% מהצאצאים במטע.

מסקנות והמלצות להמשך המחקר:

1) פותחה שיטה פשוטה לזיהוי ההורה המפרה בצאצאי H באמצעות SNP במכשיר dHPLC.

2) יש לחפש SNP נוספים על-מנת להגדיל את דרגת הוודאות של הזיהוי.

3) הרחבת השיטה לזני אבוקדו נוספים.

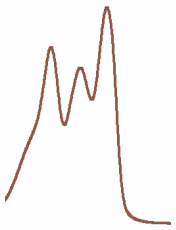
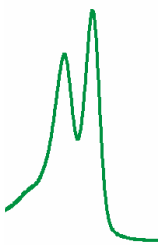
איור 1: השוואת הרצף של קטע הגן לצלולז מהזנים 'האס', 'אטינגר' ו'עירית' המכיל את SNP1305, SNP1371 ו-SNP1447 (מסומנים ברקע אפור). האות Y מסמנת אתר בו באחד האללים קיים הבסיס C ובאלל השני מצוי הבסיס T.

```
                                                   SNP1305
Hass            GACTCGAATGGATTTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAACCCGGCCAAGATGT 1318
Etinger         GACTCGAATGGATTTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAAYCCGGCCAAGATGT 1318
Irit            GACTCGAATGGATTTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAAYCCGGCCAAGATGT 1318
                ********************************************* *************
                                                         SNP1371
Hass            CATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGCTCCTCAC 1378
Etinger         CATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGYTCCTCAC 1378
Irit            CATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGCTCCTCAC 1378
                ***************************************************** *******

Hass            TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT 1438
Etinger         TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT 1438
Irit            TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT 1438
                ************************************************************
                     SNP1447
Hass            ATTCTAGCCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA 1498
Etinger         ATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA 1498
Irit            ATTCTAGCYCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA 1498
                ******** ***************************************************

Hass            GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC 1538
Etinger         GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC 1538
Irit            GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC 1538
                ****************************************
```

טבלה 3: תכולת האללים בקטע הגן לצלולז המכיל את SNP1305, SNP1371 ו-SNP1447 בזנים ההוריים האס, אטינגר ועירית

הזן ההורה	שם האלל	פירוט ה-SNP		
		SNP1447	SNP1371	SNP1305
האס	CCC	C	C	C
	CCC	C	C	C
אטינגר	CTT	T	T	C
	TCT	T	C	T
עירית	CCC	C	C	C
	TCT	T	C	T

טבלה 4: שלושת האפשרויות לצירופי האללים של קטע הגן לצלולז המכיל את SNP1305, SNP1371 ו-SNP1447 בצאצאי 'האס' ממטע עם המפרים 'אטינגר' ו'עירית', ההורה האבהי האפשרי וסוג הכרומטוגרמות המתקבלות ב-dHPLC עבור כל אחת מהאפשרויות ותוצאות האנליזה של ה-SNP ב-47 צאצאי 'האס' מהמטע.

צאצאי 'האס' אפשריים	מקור האלל בצאצא 'האס'	SNP1447	SNP1371	SNP1305	ההורה האבהי אפשרי לצאצאי 'האס'	סוג כרומטוגרמה מ-dHPLC SNP1371+SNP1447	סוג כרומטוגרמה מ-dHPLC SNP1305	מס' צאצאי 'האס' מכל סוג
צאצא 1	אמא ('האס')	C	C	C	'האס' או 'עירית'			8 (17%)
	אבא	C	C	C				
צאצא 2	אמא ('האס')	C	C	C	'אטינגר'			20 (43%)
	אבא	T	T	C				
צאצא 3	אמא ('האס')	C	C	C	'אטינגר' או 'עירית'			19 (40%)
	אבא	T	C	T				