פיתוח שיטה לזיהוי הזן המפרה בפירות 'האס'

דו"ח 13-2011

דורון שניידר, הדר כהן – מו"פ צפון
פול שטאל, רפי שטרן, חן שוחט, סיגל כורם, דני ברקוביץ, מרטין גולדווי – מי"גל, קרית-שמונה
ירון וייסמרק- מטע רכס הסולם

תוכן עניינים

הקדמה..... 1
חומרים ושיטות
א. ניסויים במטע..... 1
ב. ניסויי מעבדה..... 2
תוצאות
א. ניסויים במטע
1. פנולוגיה של הפריחה..... 4
2. פנולוגיה של הפרח..... 4
3. נביטת גרגרי אבקה בצלקת 'האס' לאחר האבקה טבעית ולאחר האבקה ידנית... 5
4. אופי הפעילות וההתנהגות של הדבורים..... 6
5. פוריות 'האס'..... 7
ב. ניסויי מעבדה
1. אפיון SNP בזנים ההוריים H, E ו-I..... 8
2. איפיון ה-SNP בצאצאי H ממטע עם הזנים המפרים E ו-I..... 9
מסקנות והמלצות להמשך המחקר..... 11
ספרות..... 12

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 היתה לפתח שיטה להבחנה גנטית בין הזנים 'האס' (H), 'אטינגר' (E) ו'עירית' (I), המבוססת על SNP (Single-nucleotide polymorphism). השיטה תאפשר לזהות את ההורות בצאצאי H ממטע בו נטועים הזנים הללו לסירוגין. זהו שלב ראשון במחקר שמטרתו למצוא מפרים מצטיינים ל-H, בנוסף ל-E. במקביל נערכו מספר בדיקות במהלך הפריחה לאיפיון ההאבקה בעצים משלושת הזנים וכן נערכים קטיפים מבוקרים של עצי H משורות הסמוכות לכל אחד מהזנים המפרים.

חומרים ושיטות

א. ניסויים במטע

1. נתוני המטע: המטע נמצא בסמוך לקיבוץ רה"ן. המטע ניטע בקיץ 2005, מרווחי נטיעה 6 x4 על כנה דגניה 117. הזן העיקרי במטע הוא H, ונטועות בו לסירוגין (כל שלוש שורות H) שורות E ו- I (תמונה 1). במבנה המטע שלושה בלוקים, בכל אחד מהם שלושה סוגים של שורות H: שורת H סמוכה ל-E, שורת H סמוכה ל-I ושורת H אמצעית.

Row No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Cultivar	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I
	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I
	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I
	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I
	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I
	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I
	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I	H	H	H	E	I

תמונה 1. סכמת מטע H עם המפרים I ו- E ברה"ן

2. פנולוגיה: התחלה וסוף הפריחה נקבעו במטע רה"ן בעצים משלושת הזנים, H, E ו-I. בארבעה ימים נערך מעקב יומי אחרי מופע הפרחים בזנים הללו: 27/3, 2/4, 14/4 ו-14/4. טמפ המקסימום והמינימום היומיות במהלך הפריחה נמדדו בעזרת מכשירי הובו, שהוצבו במטע.

3. נביטת גרגרי אבקה בצלקת: נביטת גרגרי אבקה בצלקות פרחי H נבדקה לאחר האבקה טבעית ולאחר האבקה ידנית בעודף אבקה. לצורך הבדיקה העליים הועברו לתמיסת קיבוע (Histochoice), ומספר גרגרי האבקה שנבטו (בתנאים טבעיים או לאחר האבקה ידנית) בכל צלקת נקבע תחת מיקרוסקופ אור, לאחר ריכוך בתמיסה בסיסית.

- נביטת גרגרי אבקה לאחר האבקה טבעית נקבעה בצלקות מפרחי H שהתפתחו בשורה הסמוכה לשורת E, בשורה הסמוכה לשורת I וכאלו שהתפתחו בשורת H אמצעית. לבדיקה נלקחו צלקות מפרחים טריים מיד לאחר השלב הנקבי – בבוקר שלאחר הפתיחה הראשונה שלהם. הבדיקה נערכה בחמישה מועדים שונים במהלך הפריחה: 24/3, 27/3, 2/4, 9/4, 11/4 ו-14/4/13. בכל מועד נדגמו צלקות מכ-50 פרחים מכל טיפול.

- נביטת גרגרי אבקה לאחר האבקה ידנית נקבעה בצלקות פרחי H אשר כוסו ברשת חרקים לפני פתיחת הפרחים. במהלך המופע הנקבי (פתיחה ראשונה) עברו הפרחים עיקור זכרי (הסרת אבקנים) והואבקו ידנית בעודף אבקה מפרחי E, I או H. צלקות מפרחי H מעוקרים שכוסו ברשת ולא הואבקו כלל שמשו כביקורת. העליים מפרחים אלה הוסרו בשלב הפתיחה הזכרי (פתיחה שנייה). ניסוי ההאבקה הידנית נערך בשלושה מועדים שונים במהלך הפריחה: 11/4, 12/4 ו-14/4/13. ההאבקה הידנית התבצעה ע"י חיכוך הפרח מהזן המאביק בפרח H המואבק. בכל מועד הואבקו צלקות מכ-10 פרחים מכל טיפול.

4. אופי הפעילות וההתנהגות של הדבורים: מספר דבורי דבש לעץ בדקה נקבע ב-10 עצים מכל אחד משלושת הזנים במטע: H, E ו-I. עצים מאותו זן היו אחידים מבחינת גודל עץ, שלב פריחה ועוצמת פריחה. מעקב אחרי כ-20 דבורים שביקרו בפרחים מכל זן נערך כדי לקבוע את אופי פעילות הדבורים (איסוף צוף או איסוף אבקה) בפרחים. בפרחי הזן H נערך מעקב אחרי פחות דבורים, בשל מיעוט ביקורי הדבורים בפרחים. מהנתונים שהתקבלו חושב שיעור הדבורים אוספות הצוף או אוספות האבקה הממוצע לכל זן. כל הבדיקות נערכו בשלושה מועדים במהלך הפריחה: 2/4, 11/4 ו-14/4/13, אחת לשעתיים בין השעות 8-18.

5. מעקב פוריות עצי H: מעקב על היבול הכללי במטע רה"ן (תמונה 1) החל בעונת 2009-10, שנת הניבה המלאה הראשונה. בעונות 2009-10, 2010-11 ו-2011-12 היבול הכללי מכל אחת משורות H במטע נשקל. בעונת 2012-13 נבחרו מכל אחת משורות H במטע 8 עצים מייצגים. כל אחד מהעצים נקטף ונשקל ומספר הפירות ממנו נקבע. עבור כל שנה היבול הממוצע לכל אחד מסוגי השורות התקבל מנתוני שלושת הבלוקים שבמטע.

ב. ניסויי מעבדה

1. חומר צמחי

להפקת דנ"א שימשו עלים מהזנים ההוריים: H, E ו-I ממטעי עין-שמר וחניתה, ועלים מצאצאי H ממטע ראש-הנקרה שהונבטו. 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 (טבלה 1) 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). תנאי תגובת PCR מפורטים בטבלה 2.

טבלה 1: התחלים לתגובת PCR

ה-SNP בקטע הדנ״א המוגבר	תחל Forward (5'>3')	תחל Reverse (5'>3')
SNP1371[1] SNP1447	Cell450-FD (1482-1502[2]) GGCCAAGATGTCATACATGG	Cell450-RB (1308-1327[2]) TCTCTGTTATCTGGACCACCC

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

[2] מיקום התחל ברצף הבסיסים בגן לצלולז מהזן H (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 הזנים ההוריים H, I ו-E רוצפו, כדי לזהות בהם SNP. תוצרי PCR מדנ״א של הצאצאים הורצו במכשיר dHPLC. צאצאים להם כרומטוגרמות בעלות פרופיל שונה נשלחו לריצוף, כדי לאפשר זיהוי תכולת ה-SNP לפי סוג הכרומטוגרמה עבור כל שאר הצאצאים.

5. זיהוי מקור האבקה שהפרתה צאצאי H ממטע עם המפרים I ו-E

פירות H נאספו בעונות 2011-12 ו-2012-13 ממטע רה״ן, בו נטועות לסירוגין גם שורות I ו-E (תמונה 1). הזרעים נוקו, נשטפו במים ונזרעו במשטח פלסטי עם ורמיקוליט. לאחר הזריעה הזרעים הושקו בתמיסה מימית המכילה חומר נגד פיטריות (׳Bavistin 50DF׳, אגן). הזרעים הונבטו ב״חממית״ ולאחר כשלושה חודשים (יוני-יולי) העלים הוקפאו ב-70°C- עד לשימוש. הפקת הדנ״א כנ״ל (סעיף 2) ותגובת PCR עם זוג התחלים מטבלה 1 לאיפיון SNP1447+SNP1371 מהגן לצלולז.

תוצאות

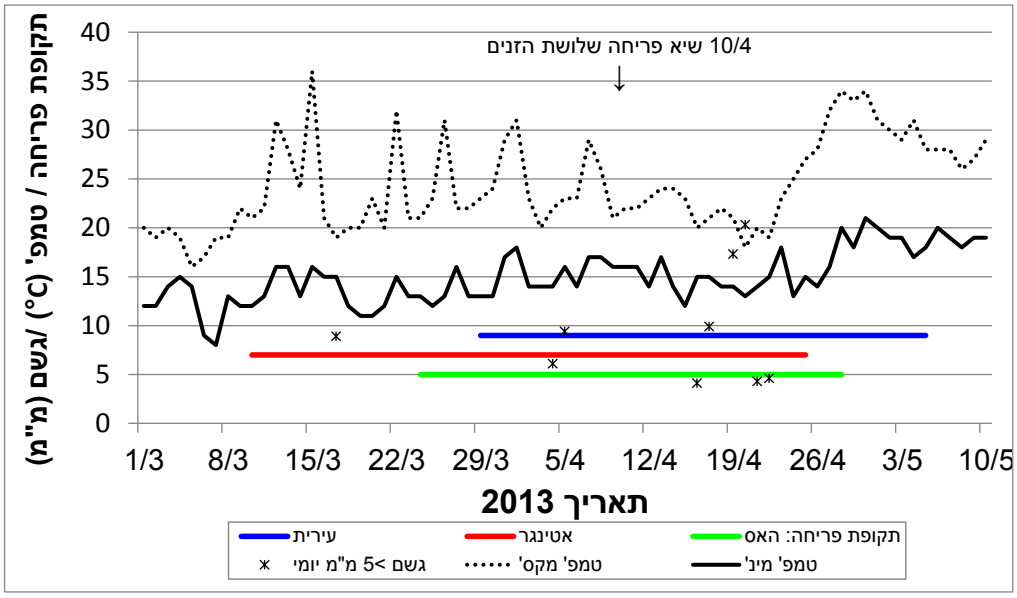
א. ניסויים במטע

1. פנולוגיה של הפריחה

בעונת הפריחה באביב 2013 הפריחה בעצי E היתה בעוצמה מאוד גבוהה. הפריחה בעצי H היתה בינונית-חלשה ואילו הפריחה בעצי I היתה חלשה מאוד. מזג האוויר בעונת הפריחה הזו התאפיין בתנודות גדולות בטמפ' המקסימום היומיות (20-35°C), כאשר טמפ' המינימום היומיות היו יחסית קבועות (±15°C). הפריחה בעצי H החלה ב-24/3/13 והסתיימה ב-28/4/13 (32 יום), שיא הפריחה היה ב-10/4/13 (איור 1). במהלך הפריחה היו 8 ימי גשם בהם ירדו מעל 5 מ"מ. ימי הגשם התרכזו בעיקר לאחר תקופה שלאחר שיא הפריחה (10/4/13), בשבועיים שבין 9-23/4/13. בתקופה זו טמפ' המקסימום היומיות היו נמוכות יחסית, 18-24°C (איור 1).

במעקב אחרי התפתחות הפריחה בזנים H, E ו- I במטע רה"ן באביב 2013 מצאנו שפריחת ה- E הקדימה בשבועיים-שלושה שבועות את הפריחה בעצי H ו-I. יחד עם זאת לשני הזנים המפרים, E ו- I היתה חפיפה טובה עם פריחת עצי ה- H (איור 1): פריחת הזן המפרה E התחילה לפני פריחת H והסתיימה מעט לפני סיום הפריחה ב-H, מנגד פריחת הזן המפרה I התחילה מעט אחרי התחלת הפריחה בעצי H והסתיימה מעט לאחר שעצי H סיימו לפרוח. למרות ההבדלים בעונת הפריחה שיא הפריחה בשלושת הזנים היה בסביבות 10/4/13. יש לציין שבין הזנים היו הבדלים ניכרים בעוצמת הפריחה: עצמת הפריחה בעצי E היתה הגבוהה ביותר מבין שלושת הזנים ועוצמת הפריחה בעצי I היתה הנמוכה ביותר.

איור 1. תקופת הפריחה של הזנים H, E ו- I, טמפרטורות המינימום והמקסימום היומיות וכמות הגשם היומית. מטע רה"ן 2013

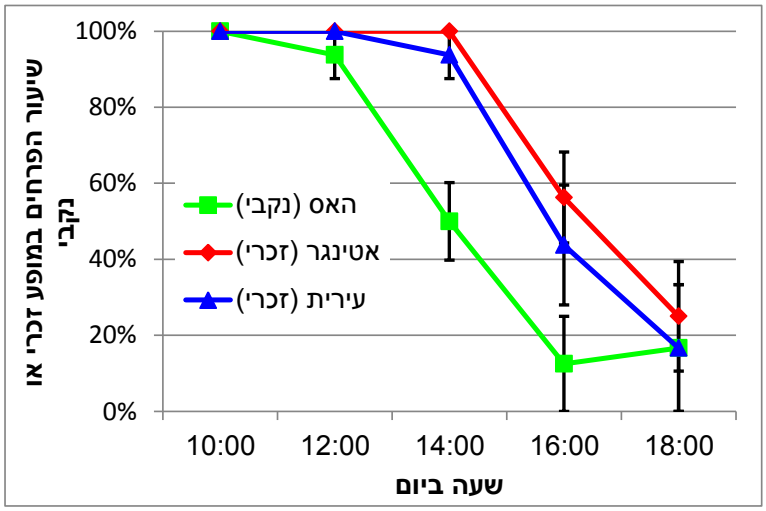


2. פנולוגיה של הפרח

הפרחים מכל הזנים נפתחו ברובם רק בשעה 10:00 בבוקר, אבל כבר ב-8 היו מספיק פרחים פתוחים לבדיקה. לזן H פרחים מסוג A (מופע נקבי בבוקר וזכרי אחה"צ) ואילו לזנים E ו- I פרחים מסוג B

(מופע זכרי בבוקר ונקבי אחה"צ). ניתן לראות באיור 2 שנמצא מתאם טוב בין מופע הפרחים הנקבי של הזן המופרה H למופע הפריחה הזכרי של פרחי הזנים המפרים, E ו-I, במהלך היום.

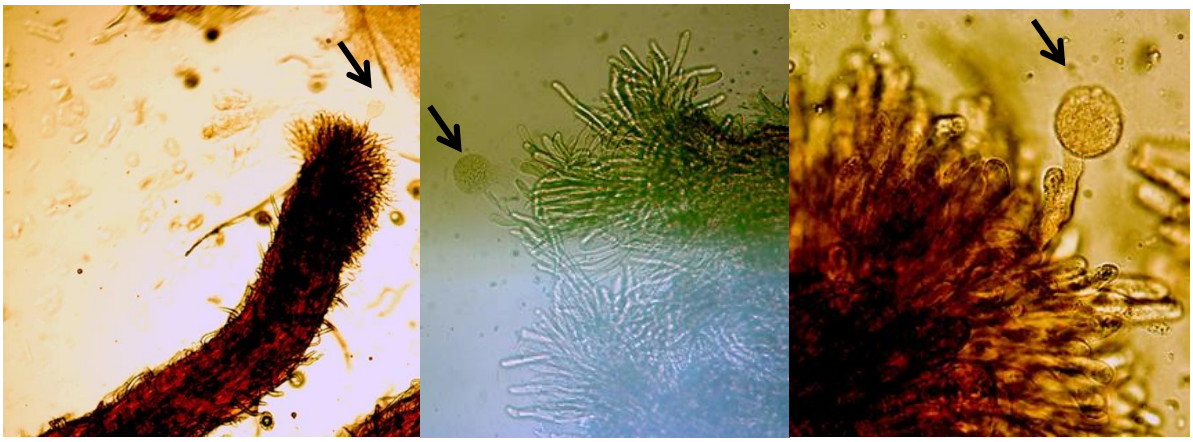
איור 2: שיעור פרחי H במופע נקבי לעומת שיעור פרחי E ו-I במופע זכרי. רה"ן 2013



3. נביטת גרגרי אבקה בצלקת 'האס' לאחר האבקה טבעית ולאחר האבקה ידנית

נביטת גרגרי אבקה בצלקות H נקבעה תחת מיקרוסקופ אור (תמונה 2). מתוצאות האבקה טבעית במטע (עם המפרים I ו-E) עולה שב-10% מצלקות H נבטו גרגרי אבקה (נבדקו כ-594 צלקות, ב-61 מהם נבטו גרגרי אבקה). זהו שיעור גבוה בהשוואה להערכה המקובלת, לפיה פחות מ-1% מהפרחים מתפתח לפרי. יחד עם זאת, לא יותר מ-4 גרגרי אבקה נבטו בצלקת אחת, כאשר ב-90% מהצלקות נבטו רק 1-2 גרגרי אבקה. נוכח כמות גרגרי האבקה הקטנה על כל צלקת ניתן להניח שלא כל צלקות ה-H המואבקות אכן מופרות ו/או חונטות.

ניסוי האבקה ידנית בעודף אבקה נערך כדי להשוות בין איכות האבקה מהזנים המפרים H, E ו-I להאבקת פרחי H. מבין סה"כ כ-90 צלקות H שהואבקו ידנית בניסוי זה רק בשתיים מהן נבטו 1-2 גרגרי אבקה. זהו אחוז קטן בהשוואה לשיעור הצלקות בהן נבטו גרגרי אבקה לאחר האבקה טבעית במטע (כ-10%, כנ"ל), ולא ניתן להסיק ממנו מסקנות.



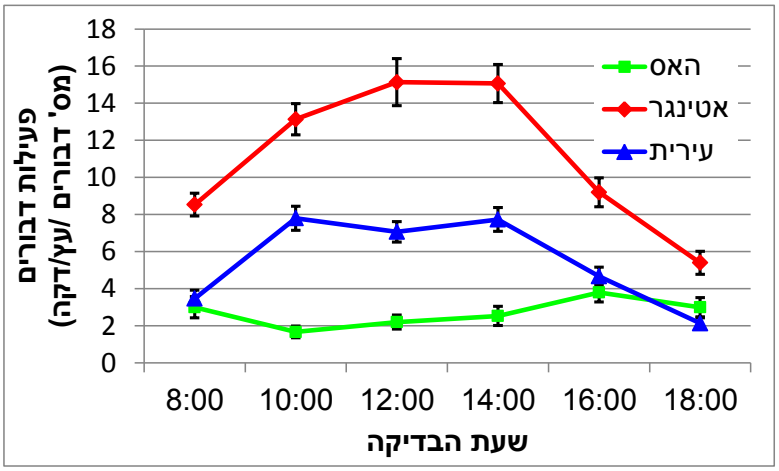
תמונה 2. נביטה של גרגר אבקה בצלקת פרח H תחת מיקרוסקופ אור בהגדלות שונות

4. אופי הפעילות וההתנהגות של הדבורים

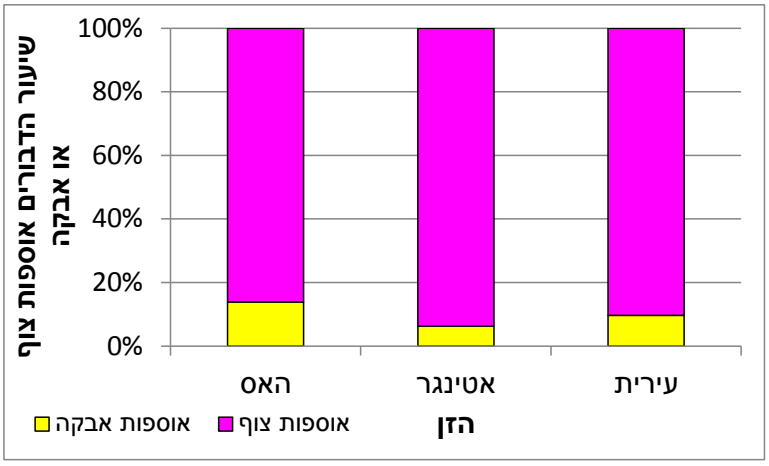
פעילות הדבורים בעצים והתנהגותם בפרחים נבחנה במהלך הפריחה בשלושת הזנים. יש לציין שעוצמת הפריחה לא היתה אחידה: עוצמת הפריחה בעצי E היתה הגבוהה ביותר ואילו הפריחה בעצי I היתה בעוצמה הנמוכה ביותר. בהתאם לכך מספר הדבורים שנצפו בעצי E היה הגבוה ביותר מבין שלושת הזנים (איור 3). מצד שני מספר הדבורים שנצפו בעצי H היה הנמוך מבין שלושת הזנים, למרות שעוצמת הפריחה בעצים אלה היתה גבוהה בהשוואה לפריחה בעצי I. בעונה הקרובה נשווה בין אטרקטיביות פרחי E ו- I לדבורי הדבש, כאשר הפריחה בעצים משני הזנים דומה. באיור 3 ניתן לראות שמספר הדבורים לעץ בזנים E ו- I היה גבוה ביותר בין השעות 10-14, שעות בהן הרוב המוחלט של הפרחים במופע זכרי (איור 2). למרות שבשעה 8:00 מעט פרחים היו פתוחים היו בעצים דבורי דבש שביקרו בפרחים הפתוחים ו/או ניסו להגיע לצוף בפרחים סגורים ("גונבות צוף"). במשך כל שעות היום מספר הדבורים בעצי H היה קבוע, עם עליה מכ-2 ל-4 דבורים לעץ לדקה בשעה 16:00.

תוצאות המעקב אחרי התנהגות הדבורים הראו כי הרוב המוחלט של דבורי הדבש בפרחי H, E ו-I אוספות צוף מהפרחים (איור 4, ±90%).

איור 3: מספר דבורי דבש לדקה בעצי הזנים H, E ו- I במהלך היום במטע רה"ן אביב 2013



איור 4: שיעור דבורי דבש אוספות אבקה ואוספות צוף בפרחי הזנים H, E ו- I במהלך הפריחה במטע רה"ן אביב 2013



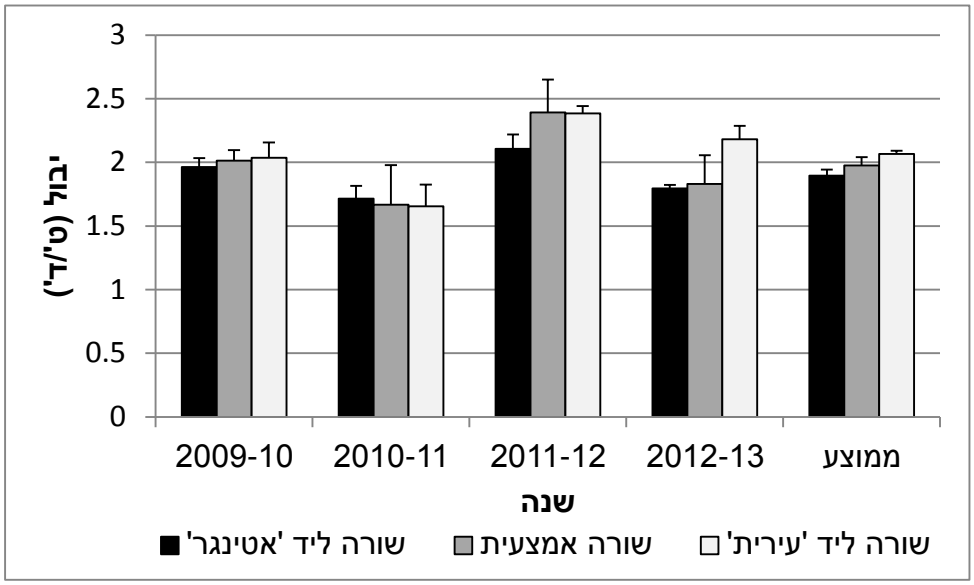
5. פוריות 'האס'

פוריות עצי H, כתלות במרחק משורת הזן המפרה E או I נקבעה במהלך 4 עונות רצופות (איור 5). היבול הממוצע בעונות אלה היה גבוה ועמד על כ-2 ט'/ד'. בכל שנות הבדיקה לא נמצא הבדל מובהק ברמת היבול בין שלושת סוגי השורות: שורת H סמוכה ל-E, שורת H סמוכה ל- I ושורת H אמצעית, למרות יתרון קל לשורת H הסמוכה לשורת I מבחינת היבול הממוצע ב-4 העונות שנבדקו.

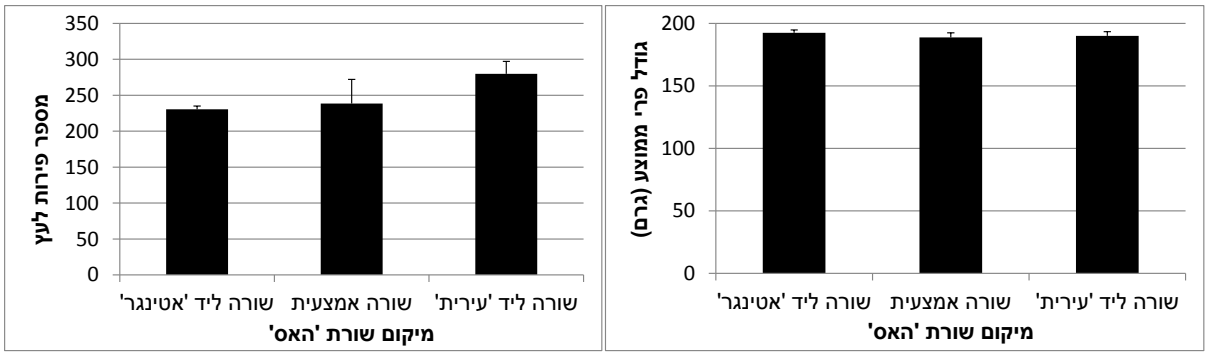
בעונת 2012-13 נערך קטיף מבוקר לכל עץ בנפרד, ממנו עולה שהיבול הגבוה בשורת H הסמוכה לשורת I נבע מהתפתחות יותר פירות לעץ, ולא מהתפתחות פירות גדולים יותר (איור 6).

בבדיקה פרטנית של פירות אקראיים ממטע זה בעונת 2011-12 ובעונת 2012-13 נמצא קשר לינארי ישר בין משקל הפרי הכולל למשקל הזרע. יחד עם זאת כאשר משקל הזרע קטן מתקבל יחס גבוה בין משקל פרי הכולל למשקל הזרע (איור 7).

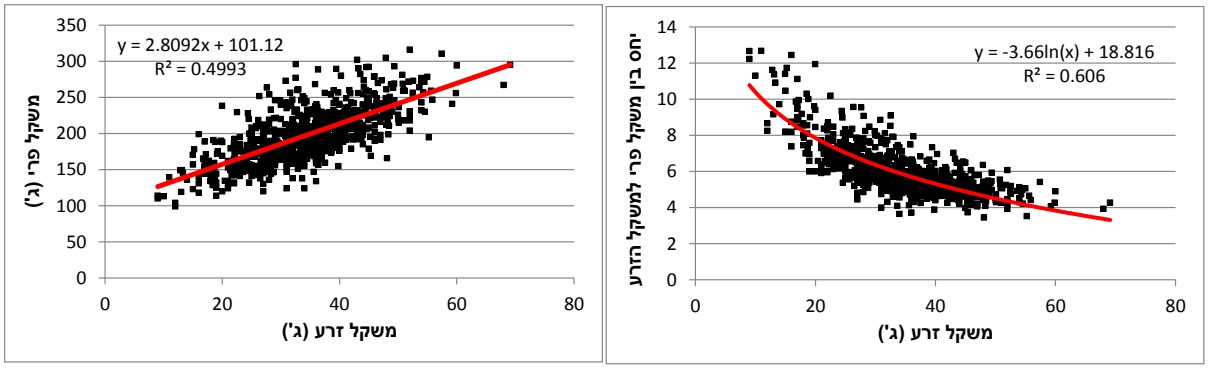
איור 5: יבול 'האס' במטע רה"ן בעונות 2009-10 עד 2012-13. אין הבדל סטטיסטי ביבול בין השורות השונות.



איור 6: מספר פירות לעץ (משמאל) וגודל פרי ממוצע (מימין) במטע רה"ן עונת 2012-13. אין הבדל סטטיסטי בין הטיפולים.



איור 7: הקשר בין משקל הפרי למשקל הזרע (משמאל) והקשר בין היחס שבין משקל הפרי למשקל הזרע לבין משקל הזרע (מימין)



ב. ניסויי מעבדה

1. אפיון SNP בזנים ההוריים H, E ו-I

בזנים ההוריים H, E ו-I נמצאו שלושה SNP בגן לצלולז: SNP1305, SNP1371 ו-SNP1447 ושני האללים השונים מכל אחד מהזנים הדיפלואידיים הללו רוצפו (תמונה 3). ה-SNP נקראו לפי מיקומם (מספר הבסיס) בגן לצלולז מהזן H. בטבלה 3 מפורטת תכולת ה-SNP באללים השונים, מצוינים רק הSNP האינפורמטיביים SNP1371 ו-SNP1447. בשלושת הזנים: H, E ו-I, נמצאו 3 אללים שונים בקטע הגן המכיל את שני ה-SNP הללו. האללים נקראו: **CC**, **CT** ו-**TT**, בהתאם לבסיס המצוי בכל אחד מאתרי ה-SNP.

לפי הפירוט בטבלה 3 ניתן לראות שבזנים E ו-I קיימים עבור גן זה שני אללים שונים בגלל נוכחות SNP הטרוזיגוטיים. לעומת זאת בזן H שני ה-SNP הומוזיגוטים, ולכן בקטע הגן לצלולז שהוגבר שני האללים זהים. אחד האללים מהזן I זהה לשני האללים מהזן H (אלל **CC**) והזנים E ו-I חולקים אלל אחד משותף (**CT**). לכן נוכחותם של האללים הללו בצאצא H תעיד על הפריה עם אבקה מאחד מהזנים הללו בדרגת וודאות של 50%. רק לזן E אלל אחד השונה משאר האללים המצויים בשלושת הזנים (**TT**), ולכן נוכחותו בצאצא H תעיד בדרגת וודאות של 100% על הפריה עם אבקה מהזן הזה.

```
                                                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
                ****************************************
```

תמונה 3: 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.

טבלה 3: תכולת האללים בקטע הגן לצלולז המכיל את SNP1371 ו-SNP1447 בזנים ההוריים H, E ו-I.

הזן ההורה	שם האלל	פירוט ה-SNP	
		SNP1447	SNP1371
^{1}H	CC	C	C
	CC	C	C
E	TT	T	T
	CT	T	C
I	CC	C	C
	CT	T	C

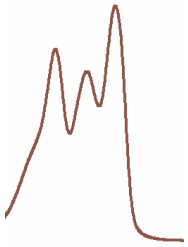
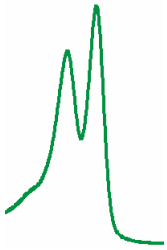
2. איפיון ה-SNP בצאצאי H ממטע עם הזנים המפרים E ו-I

בכל צאצאי הזן H נצפה למצוא אלל אמהי שמקורו בביציות. בגלל שבזן זה שני האללים המכילים את ה-SNP זהים, יהיה זה תמיד אלל **CC**. במטע בו נטועים גם הזנים E ו-I קיימות שלוש אפשרויות לתכולת האלל השני בצאצאי H: א. אלל **CC**, עבור צאצאים שהופרו מאבקה עצמית (H) או מאבקת I; ב. אלל **CT**, עבור צאצאים שהתקבלו מהפריה עם גרגר אבקה מהזנים E או I; או ג. אלל **TT**, עבור צאצאים שהופרו מאבקת E. לפיכך נצפה לקבל שלושה סוגי צאצאים בהגברת קטע הגן המכיל את ה-SNP (טבלה 4).

במכשיר dHPLC ניתן לזהות כרומטוגרמות שונות עבור קטע הגן המכיל את שני ה-SNP SNP1371 ו-SNP1447 (התחלים להגברת קטע זה בתגובת PCR מפורטים בטבלה 1), לפיהן ניתן לזהות את תכולת האללים בכל אחד מצאצאי H ממטע רה"ן המכיל את הזנים המפרים E ו-I (טבלה 4).

תגובות ה-PCR הנ"ל נערכו על 226 צאצאי H מהמטע הנ"ל מעונת 12-2011, והתוצרים הורצו במכשיר ה-dHPLC. מהכרומטוגרמות שהתקבלו ניתן לקבוע בוודאות ש- כי 28% מהצאצאים (64 צאצאים) התקבלו מהפריה זרה עם E, 49% נוספים (111 צאצאים) התקבלו מהפריה זרה עם E או I ו-23% מהפירות (51 צאצאים) התקבלו מהפריה עצמית או הפריה זרה עם I (טבלה 5). בהנחה ששכיחות כל אלל באוכלוסיית גרגרי האבקה דומה ניתן להניח שכ-56% (=28%x2) מצאצאי H במטע הם תוצרי הפריה עם אבקת E, כ-42% (=(49%-28%)x2) מצאצאי H הם תוצרי הפריה עם אבקת I וכ-2% מהצאצאים התקבלו מהפריה עצמית. יחד עם זאת יש למצוא SNP נוספים לאבחנה בין צאצא H עצמי לצאצא שהופרה ע"י אבקת I כדי לדעת באופן וודאי מהו שיעור הצאצאים מכל סוג.

טבלה 4: השוואה בין צירופי האללים של קטע הגן לצלולז המכיל את SNP1371 ו-SNP1447 בצאצאי H ממטע עם המפרים E ו-I לבין הכרומטוגרמות המתקבלות ב-DHPLC עבור כל אחת מהאפשרויות

צאצאי אפשריים	H	מקור האלל	SNP1447	SNP1371	סוג כרומטוגרמה מ-DHPLC
צאצא 1		אמא (H)	C	C	
		אבא	C	C	
צאצא 2		אמא (H)	C	C	
		אבא	T	T	
צאצא 3		אמא (H)	C	C	
		אבא	T	C	

טבלה 5: האפשרויות לצירופי האללים של קטע הגן לצלולז המכיל את SNP1371 ו-SNP1447 בצאצאי H מ-2011-12 ממטע רה"ן עם המפרים E ו-I.

צאצאי H האפשריים	מקור האלל	SNP1447	SNP1371	ההורה H	האבהי בצאצאי		תוצאות אנליזת צאצאי H 2011-12 (%)
				H	E	I	
צאצא 1	אמהי (H)	C	C	√	-	√	51(22%)
	אבהי	C	C				
צאצא 2	אמהי (H)	C	C	-	√	-	64 (28%)
	אבהי	T	T				
צאצא 3	אמהי (H)	C	C	-	√	√	111 (49%)
	אבהי	T	C				

מסקנות והמלצות להמשך המחקר:

א. בעונת הפריחה 2013 מצאנו שהזנים E ו-I הינם זנים מפרים מתאימים ל- H מבחינת החפיפה בתקופת הפריחה ומתאם בין מופע הפרחים הנקבי של H למופע הפריחה הזכרי של פרחי הזנים המפרים במהלך היום. כמו כן מצאנו שהרוב המוחלט של דבורי הדבש באות לפרחי הזנים H, E ו-I כדי לאסוף צוף (כ-90%) ולא כדי לאסוף אבקה. מהממצאים עולה שאטרקטיביות פרחי הזנים E ו-I גבוהה בהשוואה לפרחי H. ישנה עדות לכך שככל הנראה כמות הצוף בפרחי ה-E גבוהה בהשוואה לפרחי H (אהד אפק, ידע אישי). עובדה זו יכולה להסביר את האטרקטיביות הגדולה של פרחי E לביקורי הדבורים בהשוואה לפרחי ה-H. בנוסף פורסם שצוף פרחי אבוקדו מהזן E איננו אטרקטיבי לדבורי דבש בגלל ריכוז מינרלים גבוה (Afik et al., 2006). ייתכן ובצוף פרחי H ריכוז המינרלים גבוה אף יותר בהשוואה לפרחי E ו-I, ומסיבה זו האטרקטיביות של הפרחים מזן זה נמוכה כל כך.

ב. בעונת 2012-13 מצאנו שב-10% מצלקות H, ממטע עם המפרים E ו-I, נבטו גרגרי אבקה. זהו שיעור גבוה בהשוואה להערכה המקובלת לפיה פחות מ-1% מהפרחים מתפתח לפרי. יחד עם זאת, נוכח מספר גרגרי האבקה המצומצם על כל צלקת (1-4 גרגרי אבקה) ניתן להניח שלא כל הצלקות המואבקות אכן מופרות ו/או חונטות.

ג. ניסוי האבקה ידנית בעודף אבקה נערך כדי להשוות בין איכות האבקה מהזנים המפרים H, E ו-I להאבקת פרחי H. ככל הנראה גודל המדגם בניסוי היה קטן מידי, ולכן לא ניתן להסיק מהתוצאות מסקנות. בעונה הבאה נגדיל את מספר הצלקות המואבקות בכל טיפול כדי להימנע מבעיה זו.

ד. המרחק משורת הזן המפרה, E או I, לא השפיע על הפוריות של עצי H במבנה המטע ברה"ן בארבע השנים האחרונות 2009-2013.

ה. פותחה שיטה פשוטה לזיהוי ההורה המפרה בצאצאי H באמצעות SNP במכשיר DHPLC. בעזרת SNP שנמצאו עד כה אופיינו מעל 200 צאצאי H מעונת 2011-12 ממטע רה"ן עם המפרים E ו-I. מהתוצאות ניתן להניח שכמחצית מהצאצאים הופרו בהפריה זרה ע"י E (56%) ושאר הצאצאים

(42%) הופרו בהפריה זרה ע״י אבקה מפרחי I. אנו מניחים כי בעונת 2011-12 במטע התפתח שיעור נמוך מאוד (2%) של צאצאי H עצמיים. תוצאה זו נתמכת בתוצאה אחרת שקבלנו בשיטה זו, לפיה אחוז פירות H העצמיים במטע שילר, בו נטועים עצי אטינגר (כל שורה שלישית, עץ שלישי), היה אפסי.

ו. יש לחפש SNP נוספים על-מנת שניתן יהיה לזהות בוודאות את ההורה האבהי שהפרה את צאצאי H ממטע עם המפרים E ו-I. לשם כך יש למצוא SNP באמצעותו נוכל להבדיל בין צאצא H עצמי וכזה שהופרה ע״י אבקת I ו- SNP באמצעותו נוכל להבדיל בין צאצא H שהופרה ע״י אבקת E או כזה שהופרה ע״י אבקת I.

לסיכום: התוצאות עד כה מצביעות על כך שלשני הזנים, E ו- I, יעילות דומה כמפרים ל-H, עם יתרון קל ל-E. איפיון וודאי של מקור האבקה שהפרתה את צאצאי H משתי עונות שונות יאפשר לבסס את הממצאים.

ספרות

Afik, O., Dag, A., Kerem, Z. and Shafir, S. 2006. Analyses of Avocado (*Persea americana*) Nectar Properties and their Perception by Honey bees *(Apis mellifera*). Chem. Ecol. 32: 1949–1963.