

**השוואה בין זנים מפרים ל'האס' וקביעה של יכולת ההפריה העצמית ב'ג'ס' באמצעות
פיתוח שיטה לזיהוי גנטי של ההורות בצאצאים
דו"ח 2013-14**

דורון שניידר – מו"פ צפון
יעל לב, רפי שטרן ומרטין גולדווי – מכללת תל-חי
עמיר שרמן, רון אופיר וורד יריחימוביץ – מחלקה למטעים מכון וולקני
הדר כהן – מו"פ גליל מערבי
תומר לוי – מטע געתון

עמוד	תוכן עניינים
1	הקדמה.....
1	חומרים ושיטות.....
	תוצאות ודיון
4	1.א. אפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'האס' (H).....
6	1.ב. קביעת המפרה בצאצאי 'האס' (H) ממטע געתון בעזרת SNP.....
7	2.א. אפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'ג'ס' (GE).....
9	2.ב. קביעת סוג ההפריה בצאצאי ג'ס (GE) בעזרת SNP.....
10	סיכום ביניים של ההתקדמות בשני חלקי המחקר.....

הקדמה

דו"ח זה מסכם את ההתקדמות שהושגה במהלך שנת 2014 בפיתוח שיטה גנטית לזיהוי ההורות בצאצאי אבוקדו. השיטה הגנטית לזיהוי ההורות בצאצאים בה אנו משתמשים מבוססת על SNP (Single-nucleotide polymorphism) ספציפיים לכל זן, וזיהויים באופן מהיר ופשוט במכשיר DHPLC. מטרת המחקר הן: 1. השוואה ביעילות של ארבעה זנים מפרים שונים ליהאסי (H) ו-2. לימוד התלות של הזן ג'ם (GE) בהפריה זרה.

הזן H הוא זן האבוקדו המרכזי במטעי ישראל. הפירות שלו מבוקשים בשוקי העולם, אך היבול עומד על כ-1.5 טון/דונם בממוצע עם סירוגיות גבוהה. בישראל משמש האטינגר (ET) (טיפוס פריחה B) כזן מפרה בלעדי ל-H (טיפוס פריחה A), ויש צורך במציאת זנים מפרים מצטיינים נוספים. במסגרת המחקר תבחן איכות הזנים: זוטאנו (ZU), אדרנול (ED) ו-BL667 (BL) (טיפוסי פריחה B) כמפרים ל-H, בהשוואה ל-ET. יעילות הזן המפרה תקבע לפי שיעור צאצאי H, שיתקבלו כתוצאה מהפריה עם גרגרי אבקה שלו. הזן GE הינו זן פטנטי מקליפורניה בעל פירות "דמויי האסי". לפירות GE דמיון לפירות ה-H מבחינת צורת הפרי וקליפה מחוספסת המשחירה בהבשלה. יחד עם זאת, פירות GE גדולים בהשוואה ל-H והם מבשילים בינואר, בעוד שפירות H מבשילים כבר בנובמבר. ל-GE מספר יתרונות ע"פ ה-H: א. פוריות גבוהה יותר (כ-2 ט"ד' ויותר במטע קונבנציונלי) וסירוגיות נמוכה יותר; ב. צימוח מתון ומבנה עץ קומפקטי המאפשרים נטיעה של העצים בצפיפות גדולה (3 x 5 מ²), אשר בה ניתן להגיע ליבולים גבוהים מ-2 ט"ד'; ו-ג. עמידות גדולה יותר לתנאי קרה. פרחי GE, בדומה לפרחי H, הם מטיפוס פריחה A, אך אין בספרות מידע לגבי יכולת ההפריה העצמית שלהם והתלות בהפריה זרה לקבלת יבול גבוה. במסגרת המחקר תבחן תכונה זו של ה-GE במטע בו נטועים עצים מהזן המפרה ET (טיפוס פריחה B) ועצים מהזן לביא (LA) (טיפוס פריחה A). החפיפה בין פרחי GE במופע נקבי לבין פרחי LA במופע זכרי אמורה להיות קצרה בגלל ששני הזנים מטיפוס פריחה A, ולכן צפוי שהפריה בין שני זנים אלו לא תהיה שכיחה. אף על פי כן, צאצאי GE שהופרו ע"י אבקת LA עשויים להתפתח. לכן יש צורך לפתח שיטה שתזהה בנוסף לצאצאי GE עצמיים וכאלו שהופרו ע"י ET, גם אותם.

חומרים ושיטות

1. נתוני המטעים

1.1. מטע 'האסי' (געתון) המטע נמצא בסמוך לקיבוץ געתון בגליל המערבי, הוא ניטע בקיץ 2012, מרווחי נטיעה 4X5. הזן העיקרי במטע הוא H ולסירוגין נטועים בו כל עץ שלישי בשורה שלישית המפרים: ET, ZU, ED ו-BL (תמונה 1).

מהשורות במטע געתון בינואר 2014 נשמרו ב-4°C עד מרץ, הזרעים הוצאו מהפירות, נשטפו במים, נשתלו במשטחי הנבטה במצע טוף (חבי מרום גולן) והונבטו בחממה. דני"א הופק מעלים שהתפתחו מהצמחונים. כל העלים מהזנים ההוריים ומהזרעים המונבטים נשמרו ב-70°C עד לשימוש.

3. הפקת דני"א

דני"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% 20mM Ethylenediaminetetra Acetic Acid, Hexadecyltrimethylammonium Bromide [CTAB], 1.4M NaCl, [EDTA] pH 8, 1% Polyvinylpyrrolidone [PVP] MW=40000, 1% Mercaptoethanol. התערובת הודגרה 15 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. הדני"א נשמר ב-20°C עד לשימוש.

4. תגובת PCR

תגובת PCR עם תחלים אוניברסלים, המגבירים קטעים בהם עשויים להיות SNP, נערכה לשם הגברת קטעי דני"א השונים 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). רצף התחלים ותנאי תגובת PCR מפורטים [בטבלאות 1 ו-2](#).

טבלה 1: התחלים לתגובת PCR

תחל Reverse (3'>5')	תחל Forward (5'>3')	שם ה-SNP	התחלים
Cell450-RB (1308-1327 ²) TCTCTGTTATCTGGACCACCC	Cell450-FD (1482-1502 ²) GGCCAAGATGTCATACATGG	SNP1371, NP1447 ¹	Cell450
R (1022-1043 ³) AGAGAAGCCCACCTGTCTAGTCG	F (751-771 ²) TGGGTCCACTTTGGGCATGGC	SNP971	Cell950
R (458-481 ³) GCACTCAATCCAAAGTCTGTAACC	F (307-327 ³) ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGC	SNP345	STK400
SNP31 R CGGGAGCACATACACAAATTGTATTC	SNP31 F TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTA	SNP31A, SNP31B	SNP31 ⁴
SNP09 R CCCCTCCGCCTATAGGTAGTTTAA	SNP09 F GCGAAAGAATCATCGTATGCC	SNP09	SNP09 ⁴

¹ המספר מתאר את מיקום ה-SNP ברצף הבסיסים בגן מהזן H

² מיקום התחל ברצף הבסיסים בגן ל-Cellulase מהזן H (Acc. No. EU335600)

³ מיקום התחל ברצף הבסיסים בגן ל-STK מהזן H (Acc. No. EU335745)

⁴ פריימרים שהתקבלו ממרכז הגנומי במכון וולקני המגבירים רצף ובו SNP (עמיר שרמן ורון אופיר, תוצאות לא מפורסמות)

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

5. איפיון SNP ע"י ריצוף ובמכשיר DHPLC

תוצרי PCR מדני"א של הזנים ההוריים הורצו במכשיר ה-DHPLC לזיהוי הבדלים בדגמי הכרומוטוגרמות ולאחר מכן הם נשלחו לריצוף, כדי לזהות בהם SNP. איפיון ראשוני של חלק מה-SNP נערך בצאצאי GE.

תוצאות ודיון

1.א. איפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'האס' (H)

בזנים ההוריים ממטע H בגעתון (H, ET, ZU, ED ו-BL) רוצף קטע מהגן ל-Cellulase (Cell) ובו SNP1371 ו-SNP1447 (תמונה 3). רק בזנים H ו-ET רוצפו בינתיים קטע נוסף מהגן ל-Cellulase ובו SNP971 וקטע מהגן ל-Serine Threonine Kinase (STK) ובו SNP345 (תוצאות לא מובאות). תחלים מאבוקדו המגבירים קטעי דני"א בהם מצויים SNP התקבלו מהמרכז הגנומי בבית דגן: SNP31, SNP09 (עמיר שרמן ורון אופיר, תוצאות לא מפורסמות). תגובת PCR עם התחלים הללו נערכה על דני"א מהזנים ההוריים שהוזכרו, והקטעים המוגברים רוצפו (תמונה 4). תכולת ה-SNP בזנים ההוריים השונים בכל קטעי הדני"א שנבדקו, כמו גם הכרומוטוגרמה שהתקבלה עבורם ב-DHPLC, מופיעים בטבלה 3. צירופי האללים האפשריים בצאצאי H ממטע געתון מופיעים בטבלה 4.

```

HASS      GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGATATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
ETTINGER  GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGATATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
ZUTANO     GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGATATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
EDRANOL    GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGATATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
BL667      GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGATATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
*****
SNP1371
HASS      AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
ETTINGER  AGGYTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
ZUTANO     AGGYTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
EDRANOL    AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
BL667      AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
*****
SNP1447
HASS      TCAGTACCTGTATTCTAGCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
ETTINGER  TCAGTACCTGTATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
ZUTANO     TCAGTACCTGTATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
EDRANOL    TCAGTACCTGTATTCTAGCYCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
BL667      TCAGTACCTGTATTCTAGCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
*****

HASS      TCCAGATAACAGAGA 195
ETTINGER  TCCAGATAACAGAGA 195
ZUTANO     TCCAGATAACAGAGA 195
EDRANOL    TCCAGATAACAGAGA 195
BL667      TCCAGATAACAGAGA 195
*****
    
```

תמונה 3: השוואת הרצף של קטע הגן ל Cellulase מהזנים ההוריים H, ET, ZU, ED ו-BL המכיל את SNP1371, SNP1447 (מסומנים ברקע צהוב). מקרא האותיות: C/T=Y

SNP09:

```
HASS GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
ETTINGER GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
ZUTANO GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
EDRANOL GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
BL667 GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
*****
```

SNP09A

```
HASS GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
ETTINGER GTATCCACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
ZUTANO GTATCCACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
EDRANOL GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
BL667 GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
*****
```

SNP31:

```
HASS TGTCGGGGTAACTAGTAACATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTAATAA 60
ETTINGER TGTCGGGGTAACTAGTAACATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTAATAA 60
ZUTANO TGTCGGGGTAACTAGTAACATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTAATAA 60
EDRADOL TGTCGGGGTAACTAGTAACATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTAATAA 60
BL667 TGTCGGGGTAACTAGTAACATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTAATAA 60
*****
```

SNP31A

SNP31B

```
HASS TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
ETTINGER TTAATTGCGTATCATACAATAAACGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
ZUTANO TTAATTGCGTATCATACAATAAACGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
EDRANOL TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
BL667 TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
*****
```

תמונה 4: קטעי דנ"א שהוגברו בתגובת PCR עם התחלים SNP09 (למעלה) ו-SNP31 (למטה) מהזנים ההוריים H, ET, ZU, ED ו-BL המכילים את SNP09A, SNP31A ו-SNP31B (מסומנים ברקע צהוב).

טבלה 3: תכולת ה-SNP בזנים ההוריים השונים במטע H עם הזנים ET, ZU, ED ו-BL, בכל קטעי הדנ"א שנבדקו והכרוםטוגרמות שהתקבלו עבורם ב-DHPLC.

cell950			stk400			cell450			SNP09			SNP31		
כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים	זן	כרומטוגרמה	שני האללים ¹	זן
	TT TT	H		T T	H		CC CC	H		T T	H		GT GT	H
	TT TC	ET		C T	ET		CT TT	ET		C C	ET		AC AC	ET
	TT TC	ZU		C T	ZU		CT TT	ZU		C C	ZU		AC AC	ZU
	TT TC	ED		T T	ED		CC CT	ED		T T	ED		GT GT	ED
	TT TT	BL		C T	BL		CC CC	BL		T T	BL		GT GT	BL

¹האותיות מסמלות את הבסיסים באתרי ה-SNP ברצף שהוגבר בתגובת PCR עם התחלים המתאימים. מיקום ה-SNP ברצף הדנ"א מפורט בטבלה 1 ברקע צהוב ה-SNP הצפויים לפי דמיון לכרומטוגרמות משאר הזנים. SNP אלו טרם רוצפו.

1.1. קביעת המפרה בצאצאי 'האס' (H) ממטע געתון בעזרת SNP

בכל הצאצאים של הזן H נמצא תמיד אלל אחד של H (אימה) שמקורו בביצית, כאשר המקור של האלל השני יהיה מגרגר האבקה של הזן המפרה. בטבלה 4 ניתן לראות את האפשרויות של שילובי האללים בצאצאי H עצמיים ובכאלו שיתקבלו לאחר הפריה זרה בנוכחות הזנים המפרים: ED, ZU, ET ו-BL. מהטבלה עולה ש-SNP09 ו-SNP31 הם SNP אינפורמטיביים, כיוון שניתן באמצעותם לזהות בוודאות את כל צאצאי ה-H שהתקבלו מהפריה עם גרגרי אבקה מהזנים ET ו-ZU (צאצאים מסוג 2). באמצעות SNP1371 ו-SNP1447 מהגן ל-Cellulase ניתן יהיה לדעת מהי הכמות של מחצית מצאצאי H שיופרו ע"י ED (החסרת מספר צאצאים מסוג 2 במספר הצאצאים מסוג 3). כדי לאפיין את מקור האבקה שהפרתה את כל הסוגים של צאצאי H ממטע געתון יש צורך למצוא SNP נוספים שיבדילו בין צאצאי H עצמיים לצאצאי H שהופרו ע"י ED ו-BL, ו-SNP שיבדילו בין צאצאי H שהופרו ע"י ET ו-ZU. העצים במטע זה ניטעו בקיץ 2012. רק במהלך 2016 תערך אנליזה גנטית של פירות H ראשונים ממטע זה, שיבשילו בסתיו 2015.

טבלה 4: תכולת SNP בצאצאי H האפשריים ממטע בו נטועים הזנים המפריים ET, ZU, ED, BL.

האבא בצאצאי H					שם ה-SNP		מקור האלל	סוג הצאצא
BL	ED	ZU	ET	H	SNP31A	SNP31B	:SNP31	
√	√			√	G	T	אמא (H)	צאצא 1
					G	T	אבא	
		√	√		G	T	אמא (H)	צאצא 2
					A	C	אבא	
BL	ED	ZU	ET	H	SNP09A		:SNP09	
√	√			√	T		אמא (H)	צאצא 1
					T		אבא	
		√	√		T		אמא (H)	צאצא 2
					C		אבא	
BL	ED	ZU	ET	H	SNP1371	SNP1447	:Cellulase	
√	√			√	C	C	אמא (H)	צאצא 1
					C	C	אבא	
	√	√	√		C	C	אמא (H)	צאצא 2
					C	T	אבא	
		√	√		C	C	אמא (H)	צאצא 3
					T	T	אבא	

2.א. אפיון SNP בזנים ההוריים ממטע 'ג'ים' (GE)

בזנים ההוריים ממטע GE בגעתון (ET, GE, LA) רוצף קטע מהגן ל-Cellulase ובו SNP1371 ו-Serine (תמונה 5). רק ב-ET רוצפו קטע נוסף מהגן ל-Cellulase ובו SNP971 וקטע מהגן ל-Serine Threonine Kinase (STK) ובו SNP345 (תוצאות לא מובאות). תחלים מאבוקדו המגבירים קטעי דני"א בהם מצויים SNP התקבלו מהמרכז הגנומי בבית דגן: SNP31, SNP09 (עמיר שרמן ורון אופיר, תוצאות לא מפורסמות). תגובת PCR עם התחלים הללו נערכה על דני"א מהזנים ההוריים שהוזכרו, והקטעים המוגברים רוצפו (תמונה 6). תכולת ה-SNP בזנים ההוריים השונים בכל קטעי הדני"א שנבדקו, כמו גם הכרומטוגרמה שהתקבלה עבורם ב-DHPLC, מופיעים בטבלה 5. צירופי האללים האפשריים בצאצאי GE ממטע געתון מופיעים בטבלה 6.


```

GEM          GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
ETTINGER    GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
LAVI        GGCCAAGATGTCATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAG 60
*****
SNP1371
GEM          AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
ETTINGER    AGGYTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
LAVI        AGGCTCCTCACTTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCCATACCCTGCAATGCTGGATT 120
***
SNP1447
GEM          TCAGTACCTGTATTCTAGCYCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
ETTINGER    TCAGTACCTGTATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
LAVI        TCAGTACCTGTATTCTAGCYCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGG 180
*****

GEM          TCCAGATAACAGAGA 195
ETTINGER    TCCAGATAACAGAGA 195
LAVI        TCCAGATAACAGAGA 195
*****

```

תמונה 5: השוואת הרצף של קטע הגן Cellulase מהזנים ההוריים H, ET, ו-LA המכיל את SNP1371, SNP1447 (מסומנים ברקע צהוב). מקרא האותיות: C/T=Y

SNP09:

```

GEM          GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
ETTINGER    GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
LAVI        GCGAAAGAATCATCGTATGCCCCGGAAGATAGATTATTACGAGCCATACTTGGCATTTCAG 60
*****
SNP09A
GEM          GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
ETTINGER    GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
LAVI        GTATCTACCGCAAAGGAAACTTGTCTAAAACCTACCTATAGGCGGAAGGGG 110
*****

```

SNP31:

```

GEM          TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTTAAA 60
ETTINGER    TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTTAAA 60
LAVI        TGTCGGGGTAACTAGTAACTATACTATATTAATTAATTAATTAATAACTATATTAATTTAAA 60
*****
SNP31A      SNP31B
GEM          TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
ETTINGER    TTAATTGCGTATCATACAATAAACGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
LAVI        TTAATTGCGTATCGTACAATAAATGAATACAATTTGTGTATGTGCTCCCG 110
*****

```

תמונה 6: קטעי דנ"א שהוגברו בתגובת PCR עם התחלים SNP09 (למעלה) ו-SNP31 (למטה) מהזנים ההוריים H, ET, ו-LA המכילים את SNP09A, SNP31A, ו-SNP31B (מסומנים ברקע צהוב).

טבלה 5: תכולת ה-SNP בזנים ההוריים השונים במטע GE עם הזנים ET ו-LA בכל קטעי הדנ"א השונים שנבדקו והכרומוטוגרמות שהתקבלו עבורם ב-DHPLC.

cell950			stk400			cell450			SNP09			SNP31		
כרומוטוגרמה	שני האלים	זן	כרומוטוגרמה	שני האלים	זן	כרומוטוגרמה	שני האלים	זן	כרומוטוגרמה	שני האלים	זן	כרומוטוגרמה	שני האלים	זן
	TT TC	GE		C T	GE		CC CT	GE		T T	GE		GT GT	GE
	TT TC	ET		C T	ET		CT TT	ET		C C	ET		AC AC	ET
	TT TC	LA		C T	LA		CC CT	LA		T T	LA		GT GT	LA

2.2. קביעת סוג ההפריה בצאצאי GE בעזרת SNP

בכל הצאצאים של הזן GE נמצא תמיד אלל אחד של GE (אימה) שמקורו בביצית, כאשר המקור של האלל השני יהיה מגרגר האבקה של הזן המפרה. **בטבלה 6** ניתן לראות את אפשרויות שילובי האללים בצאצאי GE עצמיים ובכאלו שיתקבלו לאחר הפריה זרה עם אבקת ET או LA. מהטבלה עולה ש-SNP09 ו-SNP31 הם SNP אינפורמטיביים, כיוון שניתן באמצעותם לזהות בוודאות את כל צאצאי ה-GE שהופרו ע"י ET (צאצאים מסוג 2). באמצעות SNP1371 ו-SNP1447 מהגן ל-Cellulase ניתן יהיה לאפיין רבע מצאצאי GE העצמיים (צאצא מסוג 1). כדי להגדיל את דרגת הוודאות של ההורות בצאצאי GE יש צורך למצוא SNP נוספים שיבדילו בין צאצאי GE עצמיים לצאצאי GE שהופרו ע"י LA. בשנה האחרונה (עונת 2013-14) הופק דנ"א מעלים של כ-300 זרעי GE ממטע געתון. במהלך השנה הקרובה בכוונתנו לקבוע את ההורות בצאצאים האלו, כדי לקבוע האם ה-GE זקוק להפריה זרה, וכן לאסוף צאצאים נוספים מעונת 2014-15. בשלב זה נבדקה תכולת SNP09 ב-15 מתוך 300 צאצאי GE הנייל וכולם נמצאו הומוזיגוטים לאלל T (סוג צאצא 1 **בטבלה 6**). מתוצאות ראשוניות אלה עולה שצאצאי GE לא התקבלו מהפריה זרה באמצעות גרגרי אבקה מהזן ET ושלזן GE יכולת הפריה עצמית. כדי לבסס מסקנות אלה יש לבדוק את תכולת האלל במדגם רחב יותר של צאצאי GE וכן לשלול את האפשרות שצאצאי ה-GE התקבלו מהפריה זרה של גרגרי אבקה מפרחי הזן LA.

טבלה 6: תכולת SNP בצאצאי GE האפשריים ממוטע בו נטועים הזנים ET ו-LA.

האבא בצאצאי GE			שם האלל		מקור האלל	סוג הצאצא
LA	ET	GE	SNP31A	SNP31B	:SNP31	
√		√	G	T	אמא (GE)	צאצא 1
			G	T	אבא	
	√		G	T	אמא (GE)	צאצא 2
			A	C	אבא	
LA	ET	GE	SNP09A		:SNP09	
√		√	T		אמא (GE)	צאצא 1
			T		אבא	
	√		T		אמא (GE)	צאצא 2
			C		אבא	
LA	ET	GE	SNP1371	SNP1447	:Cellulase	
√		√	C	C	אמא (GE)	צאצא 1
			C	C	אבא	
	√		C	T	אמא (GE)	צאצא 2
			T	T	אבא	
	√		C	C	אמא (GE)	צאצא 3
			T	T	אבא	
√	√	√	C	T	אמא (GE)	צאצא 4
			C	T	אבא	
√	√	√	C	C	אמא (GE)	צאצא 5 ¹
			C	T	אבא	

¹שיעור הצאצאים מסוג זה צפוי להיות כפול בהשוואה לשאר הצאצאים.

סיכום ביניים של ההתקדמות בשני חלקי המחקר

1. בחלק הראשון של המחקר נערכת השוואה בין הזנים זוטאנו, אדרנול, BL667 ואטינגר כמפריים ל'האסי'. יעילות הזן המפרה תקבע לפי אחוז צאצאי ה'האסי' שיתקבל במטע כתוצאה מהפריה עם גרגרי אבקה שלו (אחוז גבוה מעיד על יעילות גבוהה של הזן המפרה). זיהוי הזן המפרה בצאצאים יעשה באמצעות שיטה גנטית, שהתחלנו לפתח במהלך 2014 ונמשיך בכך גם ב-2015.
2. בחלק השני של המחקר נקבעת יכולת ההפריה העצמית בזן 'גים'. לצורך כך מפותחת שיטה גנטית לזיהוי ההורות בצאצאים. תוצאות ראשוניות מ-2014 מצביעות על יכולת הפריה עצמית בזן זה. ב-2015 נבסס תוצאות אלה מאנליזה של ההורות במספר רב של צאצאי 'גים' ומניסויי שדה, בהם עצי 'גים' יכוסו במהלך הפריחה ברשת בנוכחות דבורי דבש וללא זן מפרה.