

השוואה בין 'אטינגר' ל'עירית' כמפרים ל'האס' – ניסויי מעבדה

חלק שני של דו"ח 2014-2011

דורון שניידר – מו"פצפון

פאולו שטהל, רפי שטרן, מרטין גולדווי – מכללת תל-חי

חן שוחט, סיגל כורם, דני ברקוביץ – מיי"גל, קרית-שמונה

הדר כהן, ירון וייסמרק – מו"פ גליל מערבי

סעיד סעיד – מטעראש הנקרה

תוכן עניינים

1	הקדמה
1	חומרים ושיטות ניסויי מעבדה
	תוצאות ניסויי מעבדה
3	1. אפיון SNP מהגן ל-Cellulase בזנים ההוריים 'האס', 'אטינגר' ו'עירית'.
4	2. אפיון ה-SNP מהגן ל-Cellulase בצאצאי 'האס' ממתע עם הזנים המפרים 'אטינגר' ו'עירית'.
5	3. אפיון SNP מגנים נוספים בזנים ההוריים 'האס', 'אטינגר' ו'עירית'.
10	דיון ומסקנות.
11	ספרות.

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 בדיקות במהלך הפריחה לאיפיון הפריחה, ההאבקה וההפריה בעצים משלושת הזנים וכן נערכים קטיפים מבוקרים של עצי H משורות הסמוכות לכל אחד מהזנים המפרים. דו"ח זה מסכם את תוצאות ניסויי המעבדה שנערכו במסגרת המחקר

חומרים ושיטות ניסויי מעבדה

1. חומר צמחי

להפקת דני"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 דני"א

דני"אגנומיהופקלפי Doyle and Doyle (1987). 100-200mg עלים נכתשו במכתשועלבינוכחותחנקןנוזלי. האבקה הכתושה הורחפה ב-700µl בופרה הפקה המכיל: 100mM Tris pH 8, 2% Hexadecyltrimethylammonium Bromide, 1% [CTAB], 1.4M NaCl, 20mM EthylenediaminetetraAcetic Acid [EDTA] pH 8, 1% Polyvinylpyrrolidone [PVP] MW=40000 ו-2-Mercaptoethanol 1%. 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 והומסבמים. הדני"א נשמר ב-20°C עד לשימוש.

3. תגובת PCR

תגובת PCR עם תחלים אוניברסלים (טבלה 1) נערכה לשם הגברת קטעי דני"א מהגנים השונים במכשיר Minicycler (MJ Research, Waltman, MA USA). התערובת לתגובתה-PCR הכילה בנפח 50µl את המרכיבים הבאים: 20ng DNA (1µl), FastStartTaqPCR buffer X1, 1 unit FastStartTaq DNA Polymerase (Roche מכל תחל ו-30pmol, dNTP, 200µM מכל אחד מה-1, diagnostics, Almere, The Netherlands). תנאי תגובת PCR מפורטים בטבלה 2.

טבלה 1: התחלים לתגובת PCR

תחל Reverse (3'>5')	תחל Forward (5'>3')	SNP-ה הדניא בקטע	שם הפריימרים
RB (1482-1502 ²) tctctgttatctggaccacc	FD (1308-1327 ²) GGCCAAGATGTCATAC ATGG	SNP1371, SNP1447 ¹	Cell450
R (1022-1043 ²) agagaagcccacctgtcagtcg	F (751-771 ²) TGGGTCCACTTTGGGCATGGC	SNP971	Cell950
R (302-324 ⁴) cacagagtaaataaatgaacagg	F (57-80 ⁴) AGTATGTAATCAATCAG ATGGTGG	SNP94, SNP118, SNP246, SNP251	ChS250
R (526-547 ⁴) cttgccctgcatcaagggaagg	F (355-377 ⁴) TTCAATTCTGATATGGGTGCA CC	SNP429, SNP462, SNP472	ChS490
R (458-481 ³) gcactcaatccaaagtctgtaacc	F (307-327 ³) ACAAGGTTGCCAAGGGC AAGC	SNP345	STK400

¹ 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 מיקום התחל ברצף הבסיסים בגן ל-ChS מהזן H (Acc. No. EU335626)

טבלה 2: תגובתה-PCR

מספר סיבובים	זמן (דקות)	טמפי (°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

4. איפיון SNP במכשיר dHPLC:

תוצרי PCR מדניא של הזנים ההוריים H, I ו-E רוצפו, כדי לזהות בהם SNP. תוצרי PCR מדניא של הצאצאים הורצו במכשיר dHPLC. צאצאים להם כרומוטוגרמות בעלות פרופיל שונה נשלחו לריצוף, כדי לאפשר זיהוי תכולת ה-SNP לפי סוג הכרומוטוגרמה עבור כל שאר הצאצאים.

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

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 הדניא כני"ל (סעיף 2) ותגובת PCR עם זוגהתחלים Cell450 (טבלה 1) לאיפיון SNP1447+SNP1371 מהגן ל-Cellulase.

תוצאות ניסויי מעבדה

1. אפיון SNP מהגן ל-Cellulase בזנים ההוריים E, H ו-I

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

לפי הפירוט בטבלה 3 א' ניתן לראות שבזנים E ו-I קיימים עבור גן זה שני אללים שונים בגלל נוכחות SNP הטרוזיגוטיים. לעומת זאת בזן H שני ה-SNP הומוזיגוטיים, ולכן בקטע הגן ל-Cellulase 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	GACTCGAATGGATTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAACC
Etinger	GACTCGAATGGATTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAAYCCGGCCAAGATGT
Iriet	GACTCGAATGGATTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAAYCCGGCCAAGATGT

SNP1371	
Hass	CATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGCTCCTCAC
Etinger	CATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGCTCCTCAC
Iriet	CATACATGGTAGGATTCGGAGAGAGGTTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGCTCCTCAC

Hass	TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT
Etinger	TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT
Iriet	TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATTCATACCCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT

SNP1447	
Hass	ATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA
Etinger	ATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA
Iriet	ATTCTAGCTCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA

Hass	GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC
Etinger	GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC
Iriet	GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC

תמונה 3: השוואת הרצף של קטע הגן ל-Cellulase מהזנים 'האס', 'אטינגר' ו'עירית' המכיל את SNP1305, SNP1371 ו-SNP1447 (מסומנים ברקע אפור). Y=C/T.

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


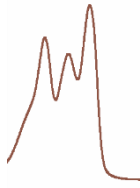
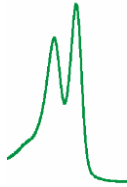
הזן ההורה	שם האלל	פירוט ה-SNP	
		SNP1371	SNP1447
¹ H	CC	C	C
	CC	C	C
E	TT	T	T
	CT	C	T
I	CC	C	C
	CT	C	T

2. איפיון ה-SNP מהגן ל-Cellulase בצאצאי H ממטע עם הזנים המפריים 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; ג. אלל TT, עבור צאצאים שהופרו מאבקת E. לפיכך נצפה לקבל שלושה סוגי צאצאים בהגברת קטע הגן המכיל את ה-SNP (טבלה 3ב').

במכשיר dHPLC ניתן לזהות כרומטוגרמות שונות עבור קטע הגן המכיל את שני ה-SNP1371 ו-SNP1447 (התחלים להגברת קטע זה בתגובת PCR מפורטים בטבלה 3א), לפיהן ניתן לזהות את תכולת האללים בכל אחד מצאצאי H ממטע רה"ן המכיל את הזנים המפריים E ו-I (טבלה 3ב'). תגובות ה-PCR הני"ל נערכו על 225 ו-220 צאצאי H מהמטע הני"ל מעונת 2011-12 ומעונת 2012-13, בהתאמה. התוצרים הורצו במכשיר ה-dHPLC. מהכרומטוגרמות שהתקבלו ניתן לקבוע בוודאות ש-28% או 31% מהצאצאים התקבלו מהפריה זרה עם E, 49% או 53% נוספים התקבלו מהפריה זרה עם I או E, ו-23% או 16% מהפירות התקבלו מהפריה עצמית או מהפריה זרה עם I, בהתאמה (טבלה 3ג'). על בסיס התוצאות ובהנחה ששכיחות כל אלל באוכלוסיית גרגרי האבקה דומה ניתן להניח שהתפלגות ההורות בצאצאי H ממטע רה"ן בעונות 2011-12 ו-2012-13 היתה: 56% או 62% תוצרי הפריה עם אבקת E, כ-42% או 44% תוצרי הפריה עם אבקת I ושיעור אפסי של תוצרי הפריה עצמית. בכוונתנו למצוא SNP נוספים לאבחנה בין צאצאי H עצמי לצאצא שהופרה ע"י אבקת I ובין צאצאי H שהופרה ע"י אבקת E לכזה שהופרה ע"י אבקת I, כדי לדעת באופן וודאי מהו שיעור הצאצאים מכל סוג.

טבלה 3. ב: השוואה בין צירופי האללים של קטע הגן ל-Cellulase המכיל את SNP1371 ו-SNP1447 בצאצאי H ממטע עם המפרים E ו-I לבין הכרומטוגרמות המתקבלות ב-DHPLC עבור כל אחת מהאפשרויות

צאצאי H אפשריים	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 3. ג: האפשרויות לצירופי האללים של קטע הגן ל-Cellulase המכיל את SNP1371 ו-SNP1447 בצאצאי H מ-2011-2012 ממטע רה"ן עם המפרים E ו-I.

צאצאי H האפשריים	מקור האלל	SNP1447	SNP1371	האבא בצאצאי H			תוצאות אנליזת צאצאי H	
				I	E	H	2011-12	2012-13
צאצא 1	אמהי (H) אבהי	C	C	√	-	√	51(23%)	36 (16%)
		C	C	-	√	-	64 (28%)	67 (31%)
צאצא 2	אמהי (H) אבהי	T	T	√	√	-	110 (49%)	117 (53%)
		T	C	-	-	-	225	220

3. איפיון SNP מגנים נוספים

להגדלת דרגת הוודאות של זהות ההורה שהפרה את צאצאי H יש למצוא SNP ספציפיים נוספים לכל זן הורה.

בסעיף זה מובאים קטעים נוספים מרצף מהגנים: Cellulase, chalcone synthase (ChS) ו-Serine-threonine kinase (STK) (Chen et al., 2008). קטעי הגנים רוצפו מכל אחד מהזנים ההוריים: H, E ו-I. השוואות בין הרצפים שהתקבלו, מיקום ה-SNP הספציפיים לכל זן, פרוט

האללים האפשריים לכל זן ואפשרויות השילובים בצאצאי H מהמטע מובאים בתמונות ובטבלאות 4, 5,

6 ו-7:

1. ה-SNP: 94, 118, 246 ו-251 מהגן ל-ChS אינם אינפורמטיביים בגלל שקיימים יותר משני אללים בזנים E-I. כתוצאה מכך מספר השילובים בצאצאי H גדול, גם אם מתייחסים רק לשני הסניפים 94 ו-118 (5 סוגי צאצאים). דבר זה מסרב את האנליזה של זהות ההורה המפירה (תמונה 5 וטבלה 5).
2. בעזרת ארבעת ה-SNP: 462 ו-472 מהגן ל-ChS (תמונה 4 וטבלה 4), 971 מהגן ל-Cellulase (תמונה 6 וטבלה 6) ו-345 מהגן ל-STK (תמונה 7 וטבלה 7) ניתן יהיה להגדיל דרגת וודאות לזיהוי צאצאי H שהתקבלו לאחר הפריה עצמית. לא ניתן בעזרת SNP אלו להפריד בין צאצאי H שהופרו ע"י אבקת E או I, כי האללים של זנים הוריים אלו זהים.

Hass	TGGGTCCACTTTGGGCATGGCCTAAAATAATCTCCTGGGATGGGCATTATTACCCTTGGG	60
Ettinger	TGGGTCCACTTTGGGCATGGCCTAAAATAATCTCCTGGGATGGGCATTATTACCCTTGGG	60
Iriet	TGGGTCCACTTTGGGCATGGCCTAAAATAATCTCCTGGGATGGGCATTATTACCCTTGGG	60

Hass	ATACAATAGAAGCTTAAGAAAAGGATGCAGTAAAGGCCATCCTTCACATGGTCGGGAAGT	120
Ettinger	ATACAATAGAAGCTTAAGAAAAGGATGCAGTAAAGGCCATCCTTCACATGGTCGGGAAGT	120
Iriet	ATACAATAGAAGCTTAAGAAAAGGATGCAGTAAAGGCCATCCTTCACATGGTCGGGAAGT	120

Hass	AGGATCTTTTGACATTGAGACATTGTGGGGCATCAAGGCGTGATGACCGGGATCCATACG	180
Ettinger	AGGATCTTTTGACATTGAGACATTGTGGGGCATCAAGGCGTGATGACCGGGATCCATACG	180
Iriet	AGGATCTTTTGACATTGAGACATTGTGGGGCATCAAGGCGTGATGACCGGGATCCATACG	180

SNP971		
Hass	ATGAATAGTGTAGACCATGAAATGGGTTTCATTTTGCAGTATAGATTCTTGTTCCTTTGA	240
Ettinger	ATGAATAGTGTAGACCATGAAATGGGTTTCATTTTGCAGTAYAGATTCTTGTTCCTTTGA	240
Iriet	ATGAATAGTGTAGACCATGAAATGGGTTTCATTTTGCAGTAYAGATTCTTGTTCCTTTGA	240

Hass	ATCAAGCATTCCATAAACTATTTATCTGCATCGACTGACAGGTGGGCTTCTCTA	294
Ettinger	ATCAAGCATTCCATAAACTATTTATCTGCATCGACTGACAGGTGGGCTTCTCTA	294
Iriet	ATCAAGCATTCCATAAACTATTTATCTGCATCGACTGACAGGTGGGCTTCTCTA	293

תמונה 4: השוואת הרצף של קטע הגן ל-Cellulase מהזנים H, E ו-I המכיל את SNP971 (מסומן

ברקע אפור). מקרא האותיות C/T=Y

טבלה 4: תכולת האללים בקטע הגן Cellulase המכיל את SNP971 בזנים ההוריים H, E ו-I (טבלה עליונה) והאפשרויות לצירופי האללים של קטע גן זה בצאצאי H ממשע עם המפריים E ו-I (טבלה תחתונה).

פירוט אללי SNP971		הזן ההורה
T	אלל 1	H
T	אלל 2	
T	אלל 1	E
C	אלל 2	
T	אלל 1	I
C	אלל 2	

האבא בצאצאי H			SNP971	מקור האלל	צאצאי H האפשריים
I	E	H			
√	√	√	T	אמהי (H)	צאצא 1
			T	אבהי	
√	√	-	T	אמהי (H)	צאצא 2
			C	אבהי	

SNP94

Hass AGTATGTAATCAATCAGATGGTGGTTAAGAAAAACAGTCATCAAATTAAGTTTTATCAA 60
 Ettinger AGTATGTAATCAATCAGATGGTGGTTAAGAAAAACAGTCATCAAATTAAGTTTTATCAA 60
 Iriet AGTATGTAATCAATCAGATGGTGGTTAAGAAAAACAGTCATCAAATTAAGTTTTATCAA 60

SNP118

Hass CYGTCCATTTGTTTGAAAGCCTCCAGATGAAGGGTCTGTATTGCTTCATTAGATTGAA 120
 Ettinger CCGTCCATTTGTTTGAAAGCCTCCAGATGAAGGGTCTGTATTGCTTCATTAGATTGAA 120
 Iriet CCGTCCATTTGTTTGAAAGCCTCCAGATGAAGGGTCTGTATTGCTTCATTAGATTGAA 120
 * *****

Hass TTGAATTAAGCAAATGGATGGATGTAATTCATTTAATGTTAGGTCCTACTTCTTGTGTCAG 180
 Ettinger TTGAATTAAGCAAATGGATGGATGTAATTCATTTAATGTTAGGTCCTACTTCTTGTGTCAG 180
 Iriet TTGAATTAAGCAAATGGATGGATGTAATTCATTTAATGTTAGGTCCTACTTCTTGTGTCAG 180

SNP246SNP251

Hass AAGACAGTTRGTTTCTAGTCTGCTGAGGAAATGCTCCACCAAATTTGTATTTGTACACCC 240
 Ettinger AAGACAGTTMGTTTCTAGTCTGCTGAGGAAATGCTCCACCAAATTTGTATTTGTACACCC 240
 Iriet AAGACAGTTAGTTTCTAGTCTGCTGAGGAAATGCTCCACCAAATTTGTATTTGTACACCC 240

Hass AAAAACCTGTTTCATTTATTTACTCTGTGA 269
 Ettinger AAAAACCTGTTTCATTTATTTACTCTGTGA 269
 Iriet AAAAACCTGTTTCATTTATTTACTCTGTGA 269

תמונה 5: השוואת הרצף של קטע הגן ChS מהזנים H, E ו-I המכיל את SNP94, SNP118, SNP246 ו-SNP251 (מסומנים ברקע אפור). מקרא האותיות: C/A=M, C/T=Y, A/G=R, C/G=S T/A=W

טבלה 5: תכולת האללים בקטע הגן לChS המכיל את SNP94, SNP118, SNP246 ו-SNP251 בזנים ההוריים H, E ו-I (טבלה עליונה) והאפשרויות לצירופי האללים של קטע גן זה בצאצאי H ממטע עם המפרים E ו-I (טבלה תחתונה).

פירוט האללים עם ה-SNP				הזן ההורה
SNP94	SNP118	SNP246	SNP251	
T	T	G	C	אלל 1
T	C	A	C	אלל 2
A	C	C	C	אלל 1
T	C	C	C	אלל 2
A	C	A	G	אלל 3
A	C	A	G	אלל 1
T	C	A	C*	אלל 2
T	C	A	G	אלל 3
A	C	A	C*	אלל 4

*רק פלסמיד אחד ממושבה אחת

האבא בצאצאי H			SNP94	SNP118	מקור האלל	צאצאי H האפשריים
I	E	H				
√	√	√	T	T	(H) אמהי	צאצא 1
			T	C	אבהי	
-	-	√	T	T	(H) אמהי	צאצא 2
			T	T	אבהי	
√	√	√	T	C	(H) אמהי	צאצא 3
			T	C	אבהי	
√	√	-	T	T	(H) אמהי	צאצא 4
			A	C	אבהי	
√	√	-	T	C	(H) אמהי	צאצא 5
			A	C	אבהי	

SNP429

Hass AGAGAAAAGACCCATAATCACCAAATTAAGGCTAACATAACAGTTGGGGCTGGCAACAGG 60
 Ettinger AGAGAAAAGACCCATAATCACCAAATTAAGGCTAACATAACAGTTGGGGCTGGCAACAGG 60
 Iriet AGAGAAAAGACCCATAATCACCAAATTAAGGCTAACATAACAGTTGGGGCTGGCAACAGG 60

SNP462SNP472

Hass TGAGAAGTCCATGATCAAGAAGAGATACATGTACCTGACAGAAGACATATTGAAAGAGAA 120
 Ettinger TGAGAAGTCCATGATCAAGAARAGATACATGYACCTGACAGAAGACATATTGAAAGAGAA 120
 Iriet TGAGAAGTCCATGATCAAGAARAGATACATGYACCTGACAGAAGACATATTGAAAGAGAA 120

Hass TCCAAATGTTTGTGCCTACATGGCTCCTTCCCTTGATGCAAGGCAAGACATGGTGGTGGT 180
 Ettinger TCCAAATGTTTGTGCCTACATGGCTCCTTCCCTTGATGCAAGGCAAGACATGGTGGTGGT 180
 Iriet TCCAAATGTTTGTGCCTACATGGCTCCTTCCCTTGATGCAAGGCAAGACATGGTGGTGGT 180

Hass TGAAGTCCCAAAGTTGGGCAAGGAAGCTGCAGCCAAGGCTATCAAGGAATGGGGCCAGCC 240
 Ettinger TGAAGTCCCAAAGTTGGGCAAGGAAGCTGCAGCCAAGGCTATCAAGGAATGGGGCCAGCC 240
 Iriet TGAAGTCCCAAAGTTGGGCAAGGAAGCTGCAGCCAAGGCTATCAAGGAATGGGGCCAGCC 240

Hass CAAGTCCAAGATCACCCACC 260
 Ettinger CAAGTCCAAGATCACCCACC 260
 Iriet CAAGTCCAAGATCACCCACC 260

תמונה 6: השוואת הרצף של קטע הגן לChS מהזנים H, E ו-I המכיל את SNP429, SNP462 ו-I

SNP472 (מסומנים ברקע אפור). מקרא האותיות: C/T=Y, A/G=R, C/G=S.

טבלה 6: תכולת האללים בקטע הגן ל ChS המכיל את SNP429, SNP462 ו-SNP472 בזנים ההוריים H, E ו-I (טבלה עליונה) והאפשרויות לצירופי האללים של קטע גן זה בצאצאי H ממטע עם המפריים E ו-I (טבלה תחתונה).

הזן ההורה	פירוט האללים עם ה-SNP		
	SNP429	SNP462	SNP472
H	C	G	T
	G	G	T
E	C	G	T
	C	A	C
I	C	A	C
	G	G	T

צאצאי H האפשריים	מקור האלל	SNP472	SNP462	האבא בצאצאי H		
				I	E	H
צאצא 1	(H) אמהי אבהי	T	G	√	√	√
		T	G			
צאצא 2	(H) אמהי אבהי	T	G	√	√	-
		C	A			

SNP345

```

Hass      ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGCTCAAAGAGGATGTTGCATGGAAATATTTCCAGCAGCTGG 60
Ettinger  ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGCTCAAAGAGGATGTTGCAYGGAAATATTTCCAGCAGCTGG 60
Iriet     ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGCTCAAAGAGGATGTTGCAYGGAAATATTTCCAGCAGCTGG 60
*****

Hass      TTAGTGCTGTGGATTTTTGCCACAGCAGGGGTGTTTATCATCGTGATTTAAAACCTGAAA 120
Ettinger  TTAGTGCTGTGGATTTTTGCCACAGCAGGGGTGTTTATCATCGTGATTTAAAACCTGAAA 120
Iriet     TTAGTGCTGTGGATTTTTGCCACAGCAGGGGTGTTTATCATCGTGATTTAAAACCTGAAA 120
*****

Hass      ACCTACTGGTGGATGAGAATGAGAACTTAAAGGTTACAGACTTTGGATTGAGTGC 175
Ettinger  ACCTACTGGTGGATGAGAATGAGAACTTAAAGGTTACAGACTTTGGATTGAGTGC 175
Iriet     ACCTACTGGTGGATGAGAATGAGAACTTAAAGGTTACAGACTTTGGATTGAGTGC 175
*****
    
```

תמונה 7: השוואת הרצף של קטע הגן ל STK מהזנים H, E ו-I המכיל את SNP345 (מסומן ברקע אפור). מקרא האותיות: C/T=Y.

טבלה 7: תכולת האללים בקטע הגן ל-STK המכיל את SNP345 בזנים ההוריים H, E ו-I (טבלה עליונה) והאפשרויות לצירופי האללים של קטע גן זה בצאצאי H ממטע עם המפריים E ו-I (טבלה תחתונה).

פירוט אללי SNP345		הזן ההורה
T	אלל 1	H
T	אלל 2	
T	אלל 1	E
C	אלל 2	
T	אלל 1	I
C	אלל 2	

האבא בצאצאי H			SNP345	מקור האלל	צאצאי H האפשריים
I	E	H			
√	√	√	T	אמהי (H)	צאצא 1
			T	אבהי	
√	√	-	T	אמהי (H)	צאצא 2
			C	אבהי	

דיון ומסקנות:

א. פותחה שיטה פשוטה לזיהוי ההורה המפרה בצאצאי H באמצעות SNP במכשיר DHPLC.
 ב. בעזרת SNP שנמצאו מהגן ל-Cellulase אופיינו מעל 200 צאצאי H ממטע רה"עם המפריים E ו-I. I מכיל אחת מהעונות 2011-12 ו-2012-13. ממטע רה"עם המפריים E ו-I. תוצאות האנליזה הגנטית של ההורות בצאצאים מצביעות על-כך שכ-60% מצאצאי H במטע הופרו ע"י אבקת E, והשאר הופרו ע"י אבקת I. שיעור אפסי מהצאצאים התקבל כתוצאה מהפריה עצמית. 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.

ג. נמצאו SNP נוספים מהגנים ל-Cellulase, ChS ו-STK בעזרתם ניתן יהיה להעלות דגרת וודאות בזיהוי צאצאי H עצמיים. לא ניתן יהיה להפריד באמצעותם בין צאצאי H שהופרו עם אבקה מפרחי E או I, ויש להמשיך לחפש SNP כאלו.

לסיכום: התוצאות מניסויי השדה והמעבדה מצביעות על כך ששני הזנים, E ו-I, מתאימים כמפריים ל-H מבחינת סוג הפריחה ותקופת הפריחה, עם יתרון קל מבחינת שיעורי הפריה בצאצאי H ל-E. יתרון זה לא בא לידי ביטוי ביבול בעצי H הסמוכים ל-E. ייתכן ובמרחקי נטיעה גדולים יותר בין הזנים המפריים היתרון של ה-E כמפרה על-פני I היה בא לידי ביטוי גם בפוריות H.

Chen, H., Morrel, P.L., Ashwoth, V.E.T.M., De la Cruz, M. and Clegg, M.T.
2008. Nuclotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado
(*Persea americana* Mill.). J. Hered., 99 :382–389