

השוואה בין 'אטינגר' ל'עירית' כמפרים ל'האס' – ניסויי מעבדה
חלק שני של דו"ח 2014-2011

דורון שניידר – מו"פ צפון
פאולו שטהל, רפי שטרן, מרטין גולדווי – מכללת תל-חי
חן שוחט, סיגל כורם, דני ברקוביץ – מי"גל, קרית-שמונה
הדר כהן, ירון וייסמרק – מו"פ גליל מערבי
סעיד סעיד- מטע ראש 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 בשוקי 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 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% 20mM Ethylenediaminetetra Acetic Acid, Hexadecyltrimethylammonium Bromide [CTAB], 1.4M NaCl, [EDTA] pH 8, 1% Polyvinylpyrrolidone [PVP] MW=40000, 1% ו-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 מהגנים 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). תנאי תגובת PCR מפורטים בטבלה 2.

טבלה 1: התחלים לתגובת PCR

תחל Reverse (3'>5')	תחל Forward (5'>3')	SNP-ה-הדנ"א בקטע	שם הפריימרים
RB (1482-1502 ²) tctctgttatctggaccaccc	FD (1308-1327 ²) GGCCAAGATGTCATACATGG	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) cttgccttgcatcaagggaagg	F (355-377 ⁴) TTCAATTCTGATATGGGTGCA CC	SNP429, SNP462, SNP472	ChS490
R (458-481 ³) gcactcaatccaaagtctgtaacc	F (307-327 ³) ACAAGGTTGCCAAGGGCAAG C	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: תגובת ה-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 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 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

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 Cell450 (טבלה 1) לאיפיון SNP1447+SNP1371 מהגן ל-Cellulase.

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: CC, CT ו-TT, 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 הומוזיגוטים, 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	GACTCGAATGGATTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAAACCCGGCCAAGATGT	1318	
Etinger	GACTCGAATGGATTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAAACCCGGCCAAGATGT	1318	
Iriet	GACTCGAATGGATTATTATCAGGTTGACTACATATTAGGTCAGAAACCCGGCCAAGATGT	1318	

		SNP1371	
Hass	CATACATGGTAGGATTCCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGTCCTCAC	1378	
Etinger	CATACATGGTAGGATTCCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGTCCTCAC	1378	
Iriet	CATACATGGTAGGATTCCGGAGAGAGGTATCCACAGCATGTCCATCACAGAGGTCCTCAC	1378	

Hass	TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATCCATACCCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT	1438	
Etinger	TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATCCATACCCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT	1438	
Iriet	TTCCATCTGTACAGGTGCACCCTAATCCATACCCCTGCAATGCTGGATTTCAGTACCTGT	1438	

		SNP1447	
Hass	ATTCTAGCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA	1498	
Etinger	ATTCTAGCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA	1498	
Iriet	ATTCTAGCCACCCAACCCAAATATCCTAGTGGGTGCCATATTGGGTGGTCCAGATAACA	1498	

Hass	GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC	1538	
Etinger	GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC	1538	
Iriet	GAGACAGTTTCTCAGATGACCGGAACAATTATCAGCAGTC	1538	

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.

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


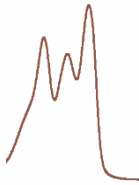
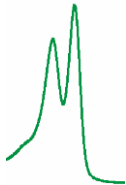
2. איפיון ה-SNP מהגן ל-Cellulase בצאצאי H ממטע עם הזנים המפריים E ו-I

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; או 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 כרומוטוגרמות שונות עבור קטע הגן המכיל את שני ה-SNP 1371 ו-SNP 1447 (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 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. מהכרומוטוגרמות שהתקבלו ניתן לקבוע בוודאות ש-28% או 31% מהצאצאים התקבלו מהפריה זרה עם E, 49% או 53% נוספים התקבלו מהפריה זרה עם E או I ו-23% או 16% מהפירות התקבלו מהפריה עצמית או הפריה זרה עם I, בהתאמה (טבלה 3ג). על בסיס התוצאות ובהנחה ששכיחות כל אלל באוכלוסיית גרגרי האבקה דומה ניתן להניח שהתפלגות ההורות בצאצאי H במטע 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 לזוה 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 ממוטע עם המפרים E ו-I לבין הכרומוטוגרמות המתקבלות ב-DHPLC עבור כל אחת מהאפשרויות

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

טבלה 3. ג: האפשרויות לצירופי האללים של קטע הגן ל-Cellulase המכיל את SNP1371 ו-SNP1447 בצאצאי H מ-2011-12 ממוטע רה"ן עם המפרים E ו-I.

תוצאות אנליזת צאצאי H		האבא בצאצאי H			SNP1371	SNP1447	מקור האלל	צאצאי H אפשריים
2012-13	2011-12	I	E	H				
36 (16%)	51(23%)	√	-	√	C	C	אמא (H)	צאצא 1
					C	C	אבא	
67 (31%)	64 (28%)	-	√	-	C	C	אמא (H)	צאצא 2
					T	T	אבא	
117 (53%)	110 (49%)	√	√	-	C	C	אמא (H)	צאצא 3
					C	T	אבא	
220	225							סה"כ צאצאים

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) הידועים ברצף שונה בין זני אבוקדו (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 ו-I. כתוצאה מכך מספר השילובים בצאצאי H גדול, גם אם מתייחסים רק לשני הסניפים 94 ו-118 (5 סוגי צאצאים). דבר זה מסרבל את האנליזה של זהות ההורה המפרה (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 60	TGGGTCCACTTTGGGCATGGCCTAAAATAATCTCCTGGGATGGGCATTATTACCCTTGGG
Ettinger 60	TGGGTCCACTTTGGGCATGGCCTAAAATAATCTCCTGGGATGGGCATTATTACCCTTGGG
Iriet 60	TGGGTCCACTTTGGGCATGGCCTAAAATAATCTCCTGGGATGGGCATTATTACCCTTGGG

Hass 120	ATACAATAGAAGCTTAAGAAAAGGATGCAGTAAAGGCCATCCTTCACATGGTCGGAAGT
Ettinger 120	ATACAATAGAAGCTTAAGAAAAGGATGCAGTAAAGGCCATCCTTCACATGGTCGGAAGT
Iriet 120	ATACAATAGAAGCTTAAGAAAAGGATGCAGTAAAGGCCATCCTTCACATGGTCGGAAGT

Hass 180	AGGATCTTTTGACATTGAGACATTGTGGGGCATCAAGGCGTGATGACCGGGATCCATACG
Ettinger 180	AGGATCTTTTGACATTGAGACATTGTGGGGCATCAAGGCGTGATGACCGGGATCCATACG
Iriet 180	AGGATCTTTTGACATTGAGACATTGTGGGGCATCAAGGCGTGATGACCGGGATCCATACG

	SNP971
Hass 240	ATGAATAGTGTAGACCATGAAATGGGTTTCATTTTGCAGTATAGATTCTTGTTTCCTTTGA
Ettinger 240	ATGAATAGTGTAGACCATGAAATGGGTTTCATTTTGCAGTAYAGATTCTTGTTTCCTTTGA
Iriet 240	ATGAATAGTGTAGACCATGAAATGGGTTTCATTTTGCAGTAYAGATTCTTGTTTCCTTTGA

Hass	ATCAAGCATTCATAAACTATTTATCTGCATCGACTGACAGGTGGGCTTCTCTA 294
Ettinger	ATCAAGCATTCATAAACTATTTATCTGCATCGACTGACAGGTGGGCTTCTCTA 294
Iriet	ATCAAGCATTCATAAACTATTTATCTGCATCGACTGACAGGTGGGCTTCTCTA 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 ל Cellulase המכיל את SNP971 בזנים ההוריים H, E ו-I (טבלה עליונה) והאפשרויות לצירופי האללים של קטע גן זה בצאצאי H ממטע עם המפריס 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 60 AGTATGTAATCAATCAGATGGTGGTTAAGAAAAACAGTCATCAAATTAAGTTTTATCAA
 Ettinger 60 AGTATGTAATCAATCAGATGGTGGTTAAGAAAAACAGWCATCAAATTAAGTTTTATCAA
 Iriet 60 AGTATGTAATCAATCAGATGGTGGTTAAGAAAAACAGWCATCAAATTAAGTTTTATCAA

SNP118

Hass 120 CYGTCCATTTTGTGGAAAGCCTCCAGATGAAGGGTCTGTATTGCTTCATTAGATTGAA
 Ettinger 120 CCGTCCATTTTGTGGAAAGCCTCCAGATGAAGGGTCTGTATTGCTTCATTAGATTGAA
 Iriet 120 CCGTCCATTTTGTGGAAAGCCTCCAGATGAAGGGTCTGTATTGCTTCATTAGATTGAA

Hass 180 TTGAATTAAGCAAATGGATGGATGTAAATTCATTTAATGTTAGGTCCTACTTCTTGTTCAG
 Ettinger 180 TTGAATTAAGCAAATGGATGGATGTAAATTCATTTAATGTTAGGTCCTACTTCTTGTTCAG
 Iriet 180 TTGAATTAAGCAAATGGATGGATGTAAATTCATTTAATGTTAGGTCCTACTTCTTGTTCAG

SNP246 SNP251

Hass 240 AAGACAGTTRGTTTCTAGTCTGCTGAGGAAATGCTCCACCAAATTTGTATTTGTACACCC
 Ettinger 240 AAGACAGTTMGTTSSTAGTCTGCTGAGGAAATGCTCCACCAAATTTGTATTTGTACACCC
 Iriet 240 AAGACAGTTAGTTTSTAGTCTGCTGAGGAAATGCTCCACCAAATTTGTATTTGTACACCC

```
Hass      AAAAAACCTGTTTCATTTATTTACTCTGTGA 269
Ettinger  AAAAAACCTGTTTCATTTATTTACTCTGTGA 269
Iriet     AAAAAACCTGTTTCATTTATTTACTCTGTGA 269
          *****
```

תמונה 5: השוואת הרצף של קטע הגן ל 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 ChS1 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	אמהי (H) אבהי	צאצא 1
-	-	√	T	T	אמהי (H) אבהי	צאצא 2
√	√	√	T	C	אמהי (H) אבהי	צאצא 3
√	√	-	T	T	אמהי (H) אבהי	צאצא 4
√	√	-	T	C	אמהי (H) אבהי	צאצא 5

SNP429

Hass AGAGAAAAGACCCATAATCACCAAATTAAGGCTAACATAACAGTTGGGGCTGGCAACAGG 60
 Ettinger AGAGAAAAGACCCATAATCACCAAATTAAGGCTAACATAACAGTTGGGGCTGGCAACAGG
 60
 Iriet AGAGAAAAGACCCATAATCACCAAATTAAGGCTAACATAACAGTTGGGCTGGCAACAGG
 60

SNP462 SNP472

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-SNP472. מקרא האותיות: C/T=Y, A/G=R, C/G=S.

טבלה 6: תכולת האללים בקטע הגן לChS 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 המפרים E ו-I (טבלה תחתונה).

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

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

SNP345

Hass ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGCTCAAAGAGGATGTTGCATGGAAATATTTCCAGCAGCTGG 60
 Ettinger ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGCTCAAAGAGGATGTTGCAYGGAAATATTTCCAGCAGCTGG 60
 Iriet ACAAGGTTGCCAAGGGCAAGCTCAAAGAGGATGTTGCAYGGAAATATTTCCAGCAGCTGG 60

Hass TTAGTGCTGTGGATTTTGGCCACAGCAGGGGTGTTTATCATCGTGATTTAAAACCTGAAA 120
 Ettinger TTAGTGCTGTGGATTTTGGCCACAGCAGGGGTGTTTATCATCGTGATTTAAAACCTGAAA 120
 Iriet TTAGTGCTGTGGATTTTGGCCACAGCAGGGGTGTTTATCATCGTGATTTAAAACCTGAAA 120

Hass ACCTACTGGTGGATGAGAATGAGAACTTAAAGGTTACAGACTTTGGATTGAGTGC 175
 Ettinger ACCTACTGGTGGATGAGAATGAGAACTTAAAGGTTACAGACTTTGGATTGAGTGC 175
 Iriet ACCTACTGGTGGATGAGAATGAGAACTTAAAGGTTACAGACTTTGGATTGAGTGC 175

תמונה 7: השוואת הרצף של קטע הגן לSTK 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 ממוטע 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 ממוטע רה"ן עם המפריים E ו-I מכל אחת מהעונות 2011-12 ו-2012-13. ממוטע רה"ן 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 ההפריה 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 בפירות H.

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