

**אפיון מולקולארי של השונות הגנטית בעצי תמר שמקורם בזנים
שונים ובשיטות ריבוי שונות**

עבודת גמר

**מוגשת לפקולטה לחקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך למדעי החקלאות"**

מאת:

וצ'סלב גורביץ'

רחובות

דצמבר 2004

טבת תשס"ה

עבודה זו נעשתה בהדרכת:

ד"ר יובל כהן, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני

פרופסור אורי לביא, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני

תוכן עניינים

1.....	תוכן עניינים
3.....	רשימת טבלאות
3.....	רשימת איורים
4.....	1. תקציר
6.....	2. מבוא
6.....	2.1. עץ התמר
7.....	2.2. ריבוי התמר
8.....	2.3. מופעים חריגים של שתילי תמר מתרבית רקמה
10.....	2.4. 'Mantled' - מופע חריג של שתילי תרבית רקמה של דקל שמן
11.....	2.5. מתילציה של DNA בצמחים
11.....	2.6. שיטות לאפיון שונות גנטית בתמר
11.....	2.6.1. איזוזימים
12.....	2.6.2. סמני DNA
14.....	2.7. עקרונות שיטת ה-AFLP
14.....	2.8. מטרות העבודה
15.....	3. חומרים ושיטות
15.....	3.1. החומר הצמחי
17.....	3.2. הפקת DNA גנומי
18.....	3.3. הפקת Total RNA
19.....	3.4. טיפול ב-DNase I
19.....	3.5. יצירת cDNA
19.....	3.5.1. סינתזת הגדיל הראשון של cDNA
19.....	3.5.2. סינתזת הגדיל השני של cDNA
20.....	3.6. AFLP
20.....	3.6.1. ריאקצית רסטריקציה-ליגציה
20.....	3.6.2. Preselective Amplification
21.....	3.6.3. ריאקציית סימון קצה של תחלים
21.....	3.6.4. Selective Amplification
22.....	3.7. cDNA AFLP
22.....	3.8. Methylation Sensitive AFLP
25.....	3.9. אנליזה גנטית
26.....	4. תוצאות

4.1	הערכת השונות הגנטית ברמת הרצף בעצי תמר מהזנים 'ברהי' ו'מג'הול' ממקורות
26	ריבוי שונים.....
26	4.1.1 הפקת DNA גנומי.....
26	4.1.2 אנליזת AFLP לבחינת השונות הגנטית בין עצי 'ברהי' ו'מג'הול'.....
32	4.2 הערכת השונות הגנטית בעצי זכר ממקורות ריבוי שונים.....
35	4.3 שונות גנטית בין רקמות באותו עץ.....
36	4.4 אפיון דגם המתילציה ב-DNA של עצים שונים.....
44	4.5 אפיון דגם ביטוי גנים בפרחים של עצי 'ברהי' מפנוטיפים שונים.....
45	5. דיון.....
45	5.1 הערכת שונות גנטית.....
	5.1.1 אומדן השונות הגנטית ברמת הרצף בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול' ובין עצי זכר
45	משבטים שונים.....
46	5.1.2 שונות גנטית בין עצים מאותו זן שרובו מחוטרים.....
48	5.1.3 שונות גנטית בין עצים שרובו בתרביות רקמה.....
50	5.1.4 שונות גנטית ברמת עץ בודד.....
50	5.2 הערכת שונות אפיגנטית הנובעת משינויים בדגמי המתילציה.....
50	5.2.1 משמעות האנליזות EM, EH, ו-(EM-EH).....
51	5.2.2 שונות גנטית ואפיגנטית בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול'.....
51	5.2.3 שונות גנטית ואפיגנטית בין פרטים ממקורות ריבוי ופנוטיפים שונים.....
54	5.3 הערכת שונות בדגם ביטוי הגנים.....
54	5.4 כיוונים עתידיים וחשיבות חקלאית של המחקר.....
56	6. רשימת ספרות.....
A	7. תקציר באנגלית.....

רשימת טבלאות

- טבלה מס' 1: עצים ששימשו לבחינת השונות הגנטית ברצף, השונות בדגמי המתילציה ושונות בדגמי ה-cDNA. 15.....
- טבלה מס' 2: תחלים ואדפטורים ששימשו בריאקציות ה-AFLP וה-cDNA AFLP. 22.....
- טבלה מס' 3: השפעת מצבי מתילציה על פעילות אנזימי הרסטרקציה MspI / HpaI. 23.....
- טבלה מס' 4: תחלים ואדפטורים ששימשו לריאקציית ה-Methylation Sensitive AFLP. 24
- טבלה מס' 5: אפיון דגם הפסים של עצי 'ברהי' ו'מג'הול על בסיס אנליזת ה-AFLP. 28.....
- טבלה מס' 6: ערכי FST של עצי 'ברהי' ו'מג'הול. 29.....
- טבלה מס' 7: סיכום דגם הפסים באנליזת ה-AFLP של עצי זכר. 33.....
- טבלה מס' 8: סיכום דגם הפסים של Methylation Sensitive AFLP של עצי 'ברהי' ו'מג'הול. 38.....
- טבלה מס' 9: ערכי FST באנליזות EM ו-EH של עצי 'ברהי' ו'מג'הול. 38.....
- טבלה מס' 10: ערכי FST באנליזת (EM-EH) של עצי 'ברהי' ו'מג'הול. 39.....
- טבלה מס' 11: אתרים ממותלים של עצי 'ברהי' ו'מג'הול. 43.....

רשימת איורים

- איור 1: דוגמאות של DNA גנומי שהופק מעצי תמר. 26.....
- איור 2: דגם פסים מאפיון באנליזת AFLP של עצי 'ברהי' ו'מג'הול. 27.....
- איור 3: המרחקים הגנטיים בין עצי 'ברהי' ו'מג'הול על פי דגם פסי ה-AFLP. 30.....
- איור 4: אנליזת 'קיבוץ' (Clustering) של עצי 'ברהי' ו'מג'הול על פי דגם פסי ה-AFLP. 31.....
- איור 5: דגם פסי AFLP (צירוף D) של עצי זכר שמקורם ממטעים שונים ומשיטות ריבוי שונות. 32.....
- איור 6: עץ פילוגנטי של 33 עצי זכר על פי אנליזת ה-AFLP. 34.....
- איור 7: עצים בעלי וואריגציה. 35.....
- איור 8: קטע מדגם פסים של AFLP (סט O) של שני עצי מג'הול צעירים (A, B) בעלי וואריגציה. 36.....
- איור 9: דגם פסי Methylation Sensitive AFLP של עצי 'ברהי' ועצי 'מג'הול. 37.....
- איור 10: עצים פילוגנטיים של עצי 'ברהי' ועצי 'מג'הול באנליזות EM, EH ו-(EM-EH). 40.....
- איור 11: אנליזת "קיבוץ" (Clustering) של דגם ה-Methylation Sensitive AFLP של עצי 'ברהי' ו'מג'הול. 41.....
- איור 12: דגם פסי AFLP של cDNA ו-DNA גנומי של עצי 'ברהי'. 44.....

1. תקציר

התמר הינו גידול עיקרי באזורים המדבריים של מזרח התיכון וצפון אפריקה. בארצות רבות באזורים אלו התמר הנו גורם חשוב מאוד בכלכלה. ריבוי מסורתי של עץ התמר נעשה על ידי חוטרים. הצורך בהרחבת מטעי התמרים בעולם הביא לפיתוח טכניקות לריבוי התמר בתרבית רקמה. לרוב, העצים שרובו בתרביות רקמה נראים נורמלים ואחידים, ואולם במקרים מסוימים מתגלים ביניהם פרטים בעלי פנוטיפים חריגים. בין עצים חריגים אלה התגלו מספר פנוטיפים טיפוסיים, המופיעים במאות אלפי עצים בארץ ובמספרים גדולים עוד יותר בעולם. עצים בעלי פנוטיפים חריגים אלה מהווים בעיה קשה לחקלאים משום שאינם מצדיקים את ההשקעה הכרוכה בגידול.

בעבודה הנוכחית נעשה שימוש בשיטת ה-AFLP במטרה לאפיין שונות בשני זני תמר נפוצים: 'ברהי' ו'מג'הול', כמו גם בעצי זכר שונים, שרובו באמצעות חוטרים או בתרביות רקמה ומייצגים פנוטיפים נורמליים וחריגים. סמני AFLP שימשו אותנו לצורך הערכת שונות גנטית ברמת הרצף, אפיון דגמי מתילציה וכן לאפיון של שונות ברמת הביטוי של גנים שונים. נמצא שלשני הזנים דגמי AFLP ייחודיים המבדילים בצורה ברורה ביניהם. בזן 'ברהי' רוב העצים שמקורם מחוטרים ומתרביות רקמה מאופיינים בדגמי פסים דומים מאוד המצביעים על שונות גנטית נמוכה ברמת הרצף. בזן 'מג'הול', לעומת זאת, נמצא שעצים שמקורם מחוטרים מאופיינים בשונות גנטית נמוכה יחסית (הדומה ברמתה לזאת שנמצאה ב'ברהי'), בעוד שבין העצים שרובו באמצעות תרביות רקמה נמצאה רמה גבוהה יחסית של שונות גנטית ברמת הרצף. כמה עצים בעלי פנוטיפים חריגים אופיינו בדגם פסים חריג. שונות גנטית ברמת הרצף נמצאה גם בין רקמות שונות של עצי 'מג'הול' שמקורם בתרבית רקמה והם בעלי ואריגציות בעליהם. בדומה לרמת השונות בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול', נמצא מספר גדול יחסית של פסי AFLP פולימורפיים בין העצים הזכריים השונים שמקורם מזרעיים. בדגמי המתילציה של ה-DNA נמצאו פסים מאפיינים רבים לכל אחד מהזנים 'ברהי' ו'מג'הול'. בעצי 'ברהי' שמקורם מחוטרים ומתרביות רקמה, כמו גם בעצי 'מג'הול' שרובו באמצעות חוטרים, נמצאה רמה נמוכה יחסית של שונות בדגמי המתילציה, בעוד שבעצי 'מג'הול' שמקורם מתרביות, נמצאה רמה גבוהה יחסית של פולימורפיזם. בנוסף, מצאנו, מספר פסים בעלי אסוציאציה לפנוטיפים חריגים שמאפיינים עצים שרובו בתרביות רקמה בשני הזנים ופסים בעלי אסוציאציה לשיטת הריבוי ב'מג'הול'. בדיקה מעמיקה יותר דרושה בכדי לקבוע אם פסים אלה מייצגים אתרים בהם דגם המתילציה ייחודי לפנוטיפ ולאו לשיטת ריבוי.

נעשה אפיון של דגם ביטוי הגנים בפרחי 'ברהי' מעצים נורמלים ומעצים בעלי חנטה לקויה וריבוי שחלות, אך התוצאות המוצגות הן ראשוניות והמערכת ועדיין דורשת כיוול סופי.

התוצאות שהתקבלו מצביעות על אפשרות שבמהלך הריבוי של תמר באמצעות תרבויות רקמה, נצברים שינויים גנטיים (ברמת הרצף) ו/או אפיגנטיים (בדגם המתילציה). שינויים אלה, הנגרמים ככל הנראה ע"י תנאיי תרבית רקמה מסוימים, יכולים להיות הגורם ליצירת עצים בעלי פנוטיפים חריגים. הבנת המגוון ליצירת עצים אלה דרושה לייעול של תנאיי תרבית רקמה כדי למנוע יצירה והפצה של עצים חריגים במטעים. בנוסף, ניתן לנצל שיטות מולקולאריות שונות לזיהוי מוקדם של עצים בעלי פנוטיפים חריגים בשלבי התרבית או ההקשחה, טרם שתילתם במטע. זיהוי כזה יכול למנוע אובדן רב שנובע מגידול עצים אשר חריגותם מתגלה רק לאחר מספר שנים במטע.

2. מבוא

2.1. עץ התמר

עץ התמר (*Phoenix dactylifera*) הינו חד פסיגי ודו ביתי ושייך למשפחת הדקליים (*Areaceae Coryphoideae*). גנום התמר הינו דיפלואידי ומכיל 36 כרומוזומים (Barrow, 1998). לתמר גזע יחיד, בלתי מסתעף, שגובהו עשוי להגיע עד למעלה מעשרים וחמישה מטרים. סיבי הגזע הם צרורות של צינורות הובלה. בראש הגזע אמיר או "כתר" של עלים גדולים, מנוצים המכונים "כפות תמרים". אורך העלים הוא עד שלושה מטרים ומשך חייהם בין שנתיים לארבע שנים. בתקופת האביב מתפתחות בין העלים תפרחות. התפרחות מכילות כמה עשרות סנסנים שעליהם נמצאים הפרחים. בעצי הזכר מתפתחת תפרחת אבקנית ובעצי הנקבה מתפתחת תפרחת עליינית. לפרח הנקבי יש שלוש שחלות. לאחר ההאבקה, שחלה אחת מתפתחת לפרי ואילו שתי השחלות הנוספות מתנוונות (סטולר, 1977). מהתפרחות הנקביות המופרות מתפתחים אשכולות הפרי. משקלו של אשכול בודד יכול להגיע עד לכעשרים ק"ג.

העדות הראשונה על המצאות התמר בארץ נמצאה בחפירות יריחו, כ-1,600 שנה לפני סה"נ (ברנשטיין, 2004; סטולר, 1977). התמר הינו אחד משבעת המינים, שבהם התברכה הארץ. בתקופת המקרא היה התמר נפוץ בכל עמק הירדן, מגינוסר לצוער שבדרום ים המלח ועד ים סוף. כמו כן גדל התמר לאורך מישור החוף, ממפרץ עכו עד עזה. במלחמות היהודים עם הרומאים נגרם נזק רב לחורשות התמרים שבבקעת הירדן ובעין גדי ובתום ימי הביניים הייתה בקעת הירדן כמעט ריקה מתמרים (ברנשטיין, 2004; סטולר, 1977). במחצית השנייה של המאה ה-19 יובאו לאזור עזה תמרים מהדלתה של מצרים. המפנה הממשי חל עם התיישבות יהודים בבקעת כנרת. באביב 1935 יצא בן-ציון ישראלי לבגדד, ובסיועה של הקהילה היהודית רכש ידע רב בגידול התמר והביא משך שש שנים חוטרים של מספר זנים מקומיים מפרס, עיראק ומצרים. בשנות החמישים יזם ישראלי מבצע להבאת עשרות אלפי חוטרי תמרים מעיראק, שהיוו את הבסיס העיקרי למטעי התמרים בערבה (אבידוב, 1959). מ-1972, משך 11 שנים, הובאו ארצה מדי שנה 2500-3000 חוטרי תמרים מקליפורניה (ברנשטיין, 2004).

כיום, מטעי התמר נפוצים מדרום הכנרת, לאורך בקעת הירדן והערבה, ועד אילת. בשנים האחרונות, עקב ההצלחה הכלכלית, מטעי התמר מתרחבים בקצב של כ-10% בשנה. במטעים המסחריים בארץ קיימים כ-10 זנים של תמרים (ברנשטיין, 2004). הזנים הנפוצים ביותר המשמשים ליצוא הם 'מג'הול', 'דקל נור' 'חיאני' ו-'ברהי'. עבודה זאת מתמקדת בזנים 'ברהי' ומג'הול' וכמו כן בעצי זכר שונים.

מוצאו של הזן 'ברהי' משאת-אל-ערב שבדרום עיראק ומקור השם לפי Popenoe הוא 'barh' - 'רוחות קיץ' המנשבות במפרץ. עצים מזן זה הוכנסו לארץ לראשונה ב-1934. עצים

רבים של 'ברה' הובאו לארץ בשנות החמישים. הפרי של 'ברה' יכול להימכר במצב בוסר מאחר שכמות הטנין בציפתו נמוכה. לעץ ה'ברה' נוף צפוף, בסיסי העלים רחבים, ידת האשכול ארוכה מאוד, הסנסנים קצרים והאשכול רחב. לפרי צורת ביצה, רחב יותר בכתף ובעל מרקם עדין ודבשי. (ברנשטיין, 2004).

מוצאו של הזן 'מג'הול' ממרוקו. משמעות השם 'מג'הול' היא בלתי ידוע או לא מזהה, ובעבר שימש כשם כללי לתמרים שאינם מזהים עם זן ידוע (זרעיים). עד הגעתו לארצות הברית בשנת 1927 על ידי סווינגל (Swingle 1945), ה'מג'הול' גדל רק בנווה המדבר הגדול Tafilalet שבמרוקו. לישראל הובאו חוטרי 'מג'הול' הראשונים ב-1949 מקליפורניה. הזן עורר עניין רב, ובתחילת שנות ה-70 הובא משלוח חוטרים שני מקליפורניה של אלפים רבים של חוטרים שניטעו בעמקי הדרום. בעבר היו הפירות של הזן 'מג'הול' מיועדים ליבוש והכילו ריכוז גבוה ביותר של סוכר (סטולר, 1977). בשנים האחרונות משווקים פירות אלה כפרי עסיסי, המכיל אחוזים גבוהים יותר של מים. שינוי זה הביא לעליה גבוהה בביקוש לזן, והפיכתו לזן מוביל באירופה הפודה מחירים גבוהים בשווקים (ברנשטיין, 2004).

בניגוד לעצים נקביים אין למעשה טיפוח של עצי זכר. מוצאם של רוב עצי הזכר הוא מזרעיים. זאת הסיבה לכך שבניגוד לאחידות שבמטעיי עצי נקבה השייכים לאותו זן ומרובים בשיטות ווגטטיביות, נצפית שונות פנוטיפית רבה בין עצי זכר שונים. אחת התכונות החשובות בהן שונות זאת יכולה להתבטא היא חיוניות האבקה, שכן יש לה השפעה על היבול. (ברנשטיין, 2004).

2.2. ריבוי התמר

התמר, כמו רוב עצי הפרי, מרובה בשיטות וגטטיביות, שכן ריבוי מיני מביא לעצים בעלי שונות גנטית ופנוטיפית רבה והפירות המתקבלים שונים מפירות ההורים. לכן לא מקובל ריבוי תמרים מזרעיים אלה למטרות נוי.

באופן מסורתי התמר מרובה באמצעות חוטרים. החוטרים צומחים בחלקו התחתון של עץ במהלך שנות חייו הראשונות. חוטרים אלו הינם חוטרי קרקע, או חוטרי אוויר שנעטפים ("מאורגזים") בשק המכיל כבול או נסורת לחה, ומשרישים לתוך המצע שבשק. החוטרים המושרשים נכרתים מעץ האם ונשתלים במטע. בשיטת ריבוי זאת נוצרים שתילים איכותיים, אך יש לה חסרונות כדלקמן:

- עץ אחד מצמיח רק חוטרים בודדים, בתלות בזן (20-1), ורק חלק מהם משתרשים.
- פעמים רבות שעור קליטת החוטרים בקרקע הוא נמוך.
- הסרת החוטרים פוגעת בעץ.
- חוטרים עשויים לשאת גורמי מחלות ומזיקים, ולכן הפצתם מוגבלת ולעיתים אסורה.
- הטיפול בחוטרים והשינוע שלהם יקרים.

- זריעים, הנובטים בסמוך לגזע האם, עלולים להילקח בטעות כחוטרי קרקע.
- החוטרים שונים בגודלם ובקצב גדילתם, ולכן העצים בחלקות חוטרים אינם אחידים.

בשנים האחרונות, פותחו שיטות לריבוי עצי תמר בתרבית רקמה כחלופה לריבוי בחוטרים וזאת בשל היתרונות הבאים:

- ניתן לייצר כמות רבה של שתילים בו זמנית.
- צמחי תרבית נקיים מגורמי מחלות ומזיקים.
- הקליטה בשדה כמעט מלאה.
- שתילים שמוצאם מתרבית רקמה מצטיינים באחידות רבה בגודל ובקצב הצימוח.

בשיטות תרבית רקמה, נלקחת רקמת תאים מלב עץ האם. הרקמה גדלה על מצע מזון בנוכחות הורמונים צמחיים ויוצרת מספר רב של צמחונים (כ-500 ויותר) שיגדלו לשתילים. לפני הנטיעה השתילים עוברים הקשחה (Zaid, 1999). קיימות שתי שיטות עיקריות לריבוי תמר בתרבית רקמה: אמבריוגנזה ואורגנוגנזה.

אמבריוגנזה: המקור הצמחי (ה-explant) הוא פקע אמירי או פקעים חיקיים של חוטר. השימוש בחוטרים מונע את חיסול עץ האם (ישראלי, 2004). האקספלט עובר חיטוי ובגידול על מצע מזון מתאים מביא ליצירת קלוס (רקמה אמורפית, בלתי ממוינת). כעבור כשנה בתרבית, הופך הקלוס לפריך וגרגרי - קלוס אמבריוגני. הקלוס האמבריוגני מועבר למצע ללא חומרי צמיחה ובנוכחות אור. בתנאים אלה מתמיינים עוברים סומטיים המתפתחים לצמחונים שמושרשים ומוקשחים (ישראלי, 2004).

אורגנוגנזה: המקור הצמחי הוא רקמה המכילה מריסטמות בדומה למקור המשמש לריבוי באמבריוגנזה. בשיטה זו אין יצירת קלוס, אלא התפתחות ישירה של צמחונים. בתנאים מתאימים הרקמה משגשגת ונוצרות עליה בליטות בצבע ירקרק, דמויות עלים זעירים. קבוצות של תאי אפידרמיס על פני בליטות אלה מתפתחות למריסטמות, ויוצרות פקעים. הפקעים גדלים לנצרון זעיר עם עלים וקודקוד צמיחה וזה מתפתח לצמח צעיר (ישראלי, 2004).

2.3. מופעים חריגים של שתילי תמר מתרבית רקמה

הריבוי בתרבית הינו ריבוי וגטטיבי. לכן, העצים שמקורם בשבט (clone) אחד צפויים להיות זהים לעץ האם וזהים ביניהם (true to type). אולם, מספר רב של עצים שמקורם מתרביות ממקורות מסוימים נראים שונים (off-type) ויוצרים אי אחידות, למרות שנוצרו מאותו מקור. תופעה זו נקראת שונות סומקלונלית - somaclonal variation (Kaeppeler et al., 2000; Larkin and Scowcroft 1982). שונות סומקלונלית יכולה להיגרם כתוצאה משינויים גנטיים (ברמת ה-DNA) או אפיגנטיים (ללא שינוי ברצף הבסיסים של ה-DNA). הפנוטיפים הבאים נפוצים בעצי תמר שרובו בתרבית רקמה (Zaid, 2003):

- עצים בעלי חנטה לקויה

ג'רבי (Djerby, 2000) מתאר חנטה לקויה בעצים רבים מהזנים 'ברהי' ו'חלאס', שמקורם בתרבות רקמה. כיום מצוים בארץ, כ-1500 עצים מהזן 'ברהי' (50% מעצי ה'ברהי' שמקורם מתרבות רקמה) וכמה מאות עצי הזן 'חלאס' שמוגדרים כבעלי בעיות חנטה. הבעיה מקיפה אלפים רבים של עצים בעולם. בערב הסעודית, קיימים כ-100,000 עצים כאלה (Djerby, 2000). הפירות בעצים אלה שונים מפירות של עצים נורמלים. במקרים רבים (עד 100%), לא נצפה הניוון הנורמלי של שתיים משלוש השחלות, וכולן מתפתחות לפרי פרתנוקרפי משולש. ידוע שפרחים באשכולות לא מופרים בעצים נורמליים, יכולים להתפתח לפרי פרתנוקרפי משולש שהעדר האבקה יעילה, ואולם בעדויות הנ"ל הואבקה העצים כשורה. בנוסף, בחלק מעצים אלה נמצא ריבוי של איברים דמויי שחלות (4-6 שחלות בחנט המתפתח, במקום שלוש שחלות הנוצרות בפרח נורמלי או בפרי פרתנוקרפי משולש). ה"שחלות הנוספות" ממוקמות בדור חיצוני לשלושת השחלות הפרתנוקרפיות (Cohen et al., 2004; Djerby, 2000). בהסתכלות מיקרוסקופית נמצא שבפרחים מרובי שחלות בעיקר, וגם בחלק מהפרחים בעצים עם בעיות חנטה, קיימים עיוותים במבנה השחלות והצלוקות, שככל הנראה מפריעים לנביטת נחשוני גרגרי האבקה להפריט הביצית (Cohen et al., 2004). פירות פרתנוקרפיים המתפתחים מפרחים אלה הינן חסרי ערך כלכלי (Cohen et al., 2004; McCubbin 2000; Zaid 1999). בעצים אלה יש שיפור של החנטה עם הזמן. בהשוואה של עצים מגילאים שונים שמוצאם באותה מעבדה עולה כי שעור החנטה בעצים בני 4-5 שנים נע בין 0-20%, בעצים בני 6-7 שנים - כ-70% ובעצים רבים שגילם מעל 10 שנים החנטה מלאה (Cohen et al., 2004). במעקב רב שנתי אחר עצים בודדים נצפה שיפור בחנטה תוך כדי התבגרותם (Cohen et al., 2004).

- עיכוב צימוח וננסות

במטעי 'מג'הול' שמקורם מריבוי באמבריוגנזה נמצאו עצים בעלי מופע ננסי אופייני, בעלי עלים קצרים עם הוצים (עלעלים) ארוכים ורחבים. נוף הצמח נראה מעוגל ומכונס (ברנשטיין, 2004). עצים אלה אינם מתפתחים כצפוי ונשארים קטנים מאוד. הם לא פורחים גם בשלב בו עצים נורמלים חונטים אשכולות ראשונים. בשנה האחרונה נצפו בחלק קטן מעצים אלה תפרחות ראשונות, ובהן, כפי שתואר בפנוטיפ חוסר החנטה בעצי הזן 'ברהי', נמצאו חנטים מרובי שחלות (כהן, תוצאות שלא פורסמו). ההערכה היא שבארץ קיימים כ-10,000 עצי 'מג'הול' המאופיינים בעיכוב צמיחה.

- ואריגאציות (סקטורים בעלי צבע שונה בעלים)

בזן 'מג'הול' בעיקר, אך גם בזנים אחרים מופיעים לעיתים בין שתילי התרבות, צמחים בעלי עלים מגוונים, עם פסי אורך צהבהבים מעוטי או חסרי כלורופיל. מרביתם נפסלים על ידי השתלן (McCubbin et al., 2000). טיפוסים חריגים כאלה ידועים בצמחים רבים והם

ביטוי למצב כימרלי. לא ברור עדיין אם צמחים אלה יכולים להניב פרי נורמלי. לפי McCubbin, קצב גדילתם איטי ביחס לצמחים הרגילים.

- עצים המייצרים רק חוטרים ולא תפרחות
עצים אלה מצמיחים חוטרים בגובה רב על גבי גזעם במקום בו עץ נורמלי מצמיח תפרחות.

- עצים עם עלים בעלי הוצים (עלעלים) רחבים במיוחד ומבנה עלה חריג
(McCubbin et al., 2000; Zaid, 1999)

- עצים בעלי מופע הדומה לפגיעה של הפטרייה טלביופסיס (*Theaviopsis paradoxa*)

לא ברור עדיין האם אלו סמפטומים פיסולוגיים או שהינם נובעים מרגישות יתר של השתילים הצעירים לפגיעת הפתוגן.

תדירות גבוהה של הפנוטיפים הנ"ל הביאה בשנים האחרונות לעקירה של מספר רב של עצים במטעי הארץ, ונשקלת האפשרות לעקור עצים נוספים שאינם מצדיקים את ההשקעה. בנוסף, מתעורר ספק באשר לכדאיות הריבוי באמצעות תרביות רקמה, למרות יתרונותיה הרבים של שיטה זו. לפתרון בעיה זו חשיבות רבה להמשך הפיתוח של ענף התמר בעולם, ומחקרים רבים מנסים לאפיין את הטיפוסים החריגים ולמצוא שיטות לזיהויים המוקדם (Kunert et al., 2003; Zaid and Al-Kaabi, 2003).

2.4 'Mantled' - מופע חריג של שתילי תרבית רקמה של דקל שמן

תופעה דומה לבעיות החנטה וריבוי השחלות בעצי התמר מהזן 'בריה' התגלתה גם בעצי דקל שמן (*Elaeis guineensis* Jacq.) שנוצרו בתרבית רקמה (Corley et al., 1986). כ-5% מעצי דקל השמן שנוצרו באמבריוגנזה הם בעלי פנוטיפ ייחודי - 'Mantled', המתאפיין בשיעורי חנטה נמוכים מאוד ובריבוי שחלות. ברוב העצים התופעה מתמתנת במהלך ההתבגרות, ולאחר מספר שנים במטע העצים הופכים לנורמליים (Rival et al., 1998b). באפיון מולקולארי של עצי 'Mantled' לא נמצאו שינויים ברצף ה-DNA באסוציאציה לפנוטיפ זה (Rival et al., 1998a). לעומת זאת, נמצאה אסוציאציה בין פנוטיפ זה ודגם המתילציה של ה-DNA. שינויים אלה נגרמים כנראה כתוצאה מריבוי בתרבית רקמה ולפחות במידה מסוימת, תלויים בתנאי התרבית (Jaligot et al., 2002; Jaligot et al., 2002; Euwens et al., 2002; Matthes et al., 2001; et al., 2000). נמצא שבאופן כללי ה-DNA של עצי 'Mantled' ממותל פחות ב-0.5-2.5% בהשוואה לעצים הנורמליים (Jaligot et al., 2000). בנוסף, נמצא דגם מתילציה ייחודי לעצי 'Mantled' (Jaligot et al., 2004). תוצאות אלה מצביעות על כך שפנוטיפ 'Mantled' נובע ככל הנראה משונות אפיגנטית (שברמת המתילציה של

ה-DNA ולא ברצפו). בהתבסס על הדמיון של פנוטיפ של חנטה לקויה וריבוי השחלות בתמר מהזן 'ברהי' למתואר בעצי דקל השמן החריגים, ניתן להניח שתופעה זו בתמר, ואולי גם תופעות נפוצות אחרות המתגלות בעצים שרובו בתרבויות רקמה, נובעות גם כן משונות אפיגנטית בדגם המתילציה באתרים (Loci) מסויימים.

2.5. מתילציה של DNA בצמחים

מתילציה של DNA נובעת מהוספה של קבוצת מתיל (CH_3) לציטוזין והפיכתו ל-5-methylcytosine. בגנום הצמחי למעלה מ-20% מהציטוזינים ממותלים (Gruenbaum *et al.*, 1981). בצמחים, כמו גם באורגניזמים אחרים, המתילציה של ציטוזין מתרחשת לאחר שכפול ה-DNA באמצעות האנזים cytosine-DNA methyltransferase ובשיתוף עם אנזימים אחרים (Finnegan *et al.*, 1998; Richards 1997). באוקריוטים, המתילציה עשויה למנוע קישור של חלבונים רגולאטורים ל-DNA, כמו כן מתילציה של פרומוטר או אזור מקודד של גן יכולה לפגוע בשעתוק (Jost *et al.*, 1993). מתילציה של DNA מעורבת בתזמון של שכפול ה-DNA, ובבניה של כרומטין (Jost *et al.*, 1993). מקובל להניח ששיעור המתילציה בגנום, הנו כלי לבקרת הביטוי של גנים רבים. המנגנון האחראי למיתול בשעור שונה של אזורים שונים ב-DNA אינו ידוע די צורכו. בנוסף לבקרת הביטוי, למתילציה יש תפקיד בהגנת התא מפני DNA זר (Finnegan *et al.*, 1998). שינויים בדגם המתילציה מהווים את אחד המנגנונים ליצירת שונות סומקלונלית אפיגנטית (Jost *et al.*, 1993; Kaeppler *et al.*, 2000).

2.6. שיטות לאפיון שונות גנטית בתמר

בעשרות השנים האחרונות פותחו שיטות מולקולריות שונות לבחינת שונות גנטית בין פרטים. השיטות כוללות איזוזימים וסמני DNA. בהמשך מתוארות השיטות העיקריות והממצאים המרכזיים שנמצאו בשיטות אלה לגבי עצי תמר.

2.6.1 איזוזימים

איזוזימים הינם חלבונים בעלי פעילות אנזימתית דומה הנבדלים במבנה המולקולארי. ניתן להבדיל בין איזוזימים שונים על גבי ג'ל עמילן בהרצה בשדה חשמלי. לאחר ההפרדה, האיזוזימים מזוהים על פי פעילותם האנזימתית, בריאקציות המתבצעת בתוך הג'ל. איזוזימים נפוצים ששימשו למחקר בתמר כוללים: Esterases (EST), Endopeptidases, (ENP) Alcohol dehydrogenases (ADH), Peroxidases (PER). בשיטות אלו השונות הגנטית מתבטאת בהבדלי ביטוי, מבנה ופעילות של איזוזימים שונים. על אף היותה פשוטה

זולה, השיטה מוגבלת בביטוי של משפחות איזוזימים נפוצים ומאופיינת ברמת פולימורפיזם נמוכה ובמספר סמנים מוגבל ביותר.

בעבודות המוזכרות מטה נעשה שימוש באיזוזימים בתמר. בהשוואה בין זנים (Torres and Tisserat 1980) לא נמצאו הבדלים בין הזנים 'ברהי', 'מג'הול', 'דרי', 'דקל נור' ו'חדראווי'. אומנם היכולת של איזוזימים להבדיל בין זנים הוכחה במחקרים אחרים. ביניהם סריקת הזנים בעלי עמידות למחלת הביוד (Bayoud) (Baaziz and Saadi, 1988; Baaziz, 1989; Bendiab *et al.*, 1993) ואפיון צמחונים מאמבריוגנזה ומאורגנוגנזה (Baaziz *et al.*, 1994). Bendiab וחבריו (1998) הצליחו להבדיל בין 28 זני תמר שנבדלו במאפיינים מורפולוגיים באמצעות איזוזימים. מאידך לא נמצאו הבדלים בדגם הפסים של איזוזימים בין עצים נורמליים לעצי off-type שנוצרו בתרבית רקמה (Salman *et al.*, 1988), אם כי Saker וחבריו (2000), מצאו הבדלים בעוצמת הפעילות של איזוזימים השונים בין שתילי off-type לשתילים נורמליים מזן 'זגלול' שמקורם בתרבית רקמה.

2.6.2 סמני DNA

סמני DNA הינם אתרים בגנום הניתנים לזיהוי בשיטות מולקולאריות. סמנים אלה מספקים מידע גנטי רב לגבי הפרט הנבדק. שימוש בסמני DNA מסייע בזיהוי אישי, זיהוי משפחתי, אומדן שונות גנטית בין ובתוך קוים, איתור גנים הנמצאים בתאחיזה, העברת גנים בין קוים במעט דורות (Introgression), חיזוי און מכלוא (heterosis) והגדלת הסיכוי לקבלתו, זיהוי מחלות תורשתיות. באמצעות הסמנים ניתן לקבל טביעות אצבעות של פרטים בצורת דגם פסים שמאפשר להעריך את השונות הגנטית בין פרטים או אוכלוסיות על סמך פולימורפיזם. סמני ה-DNA אינם תלויים בתנאי סביבה והם מצויים בכל הרקמות. קיימים מספר סוגי סמני DNA והעיקריים שבהם ששימשו לאפיון שונות גנטית בתמר מפורטים להלן:

- Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP (Botstein *et al.*, 1980) השיטה מזהה הבדלים גנטיים על בסיס של נוכחות או העדר של אתר חיתוך של אנזים רסטריקציה באתר מסוים בגנום. לאחר הפרדת המקטעים החתוכים בג'ל, והיברידיזציה לגלאי מסומן, נראים המקטעים המכילים רצף הומולוגי לגלאי כפסים. ההבדלים בדגם הפסים בין הפרטים הנבדקים מצביעים על השונות הגנטית ביניהם.

סמני RFLP יושמו בתמרים לאפיון הבדלים בין זנים. נמצא פולימורפיזם ברור בין חמישה זנים של תמר: 'ברהי', 'דקל נור', 'מג'הול', 'חלאס' ו'חדראווי' (Corniquel *et al.*, 1994).

- Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD (Williams *et al.*, 1989) השיטה מזהה הבדלים הגנטיים על סמך נוכחות או העדר אתרים הומולוגיים לתחלים (primers) בעלי רצפים אקראיים המאפשרים קבלת תוצר PCR באתר מסוים. בשיטה זאת ה-DNA המופק מהפרטים הנבדקים עובר הגברה (אמפליפיקציה) בריאקציה PCR עם

תחלים קצרים אקראיים. המקטעים שעוברים הגברה הם אלו שתחומים ברצפים הומולוגיים לתחלים בטווח המרחקים האפשרי להגברה ב-PCR. התוצרים השונים נבדלים באורכם לפי קצב תנועתם בג'ל.

באמצעות RAPD נמצאו הבדלים בין הזנים 'ברהי', 'דקל נור' ו'מג'הול' (Corniquel et al., 1994). Mokhtar וחבריו (2000) מצאו הבדלים בין שמונה זני תמר מטוניס ו-Al-Khalifah וחבריו (2003) הצליחו לזהות הבדלים בין 13 זנים מערב הסעודית. בעבודה אחרת נמצא פולימורפיזם בין כל אחד מתוך 43 זנים שונים של תמר (Sedra et al., 1998) כמו כן, נמצאה שונות סומקלונאלית בכ-4% מתוך 70 עצים מזן 'זגלול' שמקורו בתרבות ריקמה (Saker et al., 2000).

- Representational Difference Analysis - RDA (Lisitsyn et al., 1993)

השיטה מזהה הבדלים גנטיים על סמך התאמה של מקטעי DNA שמקורם בפרטים הנבדקים. בשיטה זאת ה-DNA שמופק מהפרטים נחתך ע"י אנזימי רסטריקציה, נעשה חיבור של אדפטורים לקצוות והגברה של המקטעים ב-PCR. המקטעים שמקורם מפרט אחד משמשים כ-Tester, ואילו המקטעים שמקורם מפרט אחר משמשים כ-Driver. נעשית היברידיזציה בין Tester ל-Driver בעודף גדול של Driver. השיטה מאפשרת לזהות מקטעים ייחודיים של ה-Tester.

Vorster וחבריו (2002) מצאו הבדלים בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול' בשיטת RDA.

- Simple Sequence Repeat - SSR (Gupta et al., 1994)

השיטה מזהה הבדלים בין פרטים לפי מספר החזרות של רצף קצר מסוים בגנום שלהם. שמוגבר ב-PCR באמצעות תחלים ייחודיים לשוליים של הרצף החוזר. Zehdi וחבריו (2004) הצליחו לאפיין 12 זנים של תמר בשיטה זאת.

- Amplification Fragment Length Polymorphis - AFLP (Vos et al., 1995)

השיטה משלבת מאפיינים של RFLP ו-RAPD ומבוססת על זיהוי קיום או העדר של אתרי חיתוך. הזיהוי נעשה לאחר הגברת המקטעים החתוכים ב-PCR באמצעות שימוש באדפטורים ותחלים מתאימים. השיטה מאפשרת אפיון יעיל של מספר רב יחסית של אתרים.

באנליזה של 21 זני תמר מקליפורניה בשיטת AFLP נמצא פולימורפיזם ברור בין כל הזנים (Cao et al., 2002). Diaz וחבריה (2003) מצאו הבדלים בין שלושה זנים של תמר ו-El-Assar וחבריו (2004) איפיינו מרחקים גנטיים בין 47 עצים של תמר השייכים ל-21 זנים שונים ולעוד תשעה קיום לא ידועים. במחקר אחר נתגלתה שונות גנטית בטכנולוגיה של AFLP בין ובתוך הזנים 'מג'הול' ו'דקל נור' שרובו מחוטרם (Devanand et al., 2003). נמצא גם פולימורפיזם בין הזנים 'חלאס' ו'מג'הול' (Lacaze et al., 2000).

בעבודה הנוכחית נעשה שימוש בשיטת ה-AFLP. סמנים אלו שימשו לצורך הערכת שונות גנטית, אפיון דגמי מתילציה ואפיון של רמת הביטוי של גנים שונים בפרחי תמר מפנוטיפים שונים (באמצעות cDNA AFLP).

2.7. עקרונות שיטת ה-AFLP

שיטת ה-AFLP (Vos *et al.*, 1995) מאפשרת זיהוי נוכחות או העדר של אתר רסטריקציה באתר מסוים בגנום. בשלב הראשון נחתך ה-DNA בשני אנזימי רסטריקציה שונים, לקצוות החתוכים מוספים שני אדפטורים שונים המותאמים לאתרי החיתוך של אנזימי הרסטריקציה. תוצרי החיתוך עוברים הגברה בריאקצית PCR בעזרת תחלים הומולוגים לאדפטורים. לאחר מכן נעשית ריאקצית הגברה נוספת ע"י שימוש בתחלים סלקטיביים מסומנים. תחלים אלו ארוכים במספר נוקליאוטידים מאלו ששימשו בהגברה הראשונה, ובכך מופחת מספר התוצרים בכדי לאפשר אנליזה נוחה. תוצרי ההגברה מופרדים בג'ל אקריל-אמיד שעובר יבוש וחשיפה.

בנוסף לזיהוי הבדלים גנטיים, מאפשרת שיטת ה-AFLP לזהות הבדלים בדגמי המתילציה של DNA. לצורך זה כל פרט נבדק עובר שתי ריאקציות רסטריקציה-ליגציה, כאשר בכל אחת מוחלף אחד מאנזימי החיתוך באחד משני אנזימים בעלי רגישות שונה למתילציה של אתר החיתוך משותף (Mingliang *et al.*, 2000). דגם פסים המתקבל מאפשר זיהוי של:

- הבדלים גנטיים ברמת הרצף בין פרטים שונים
- הבדלים בדגם המתילציה בין פרטים שונים
- אתרים ממותלים בפרט בודד

בשיטת ה-AFLP ניתן גם לאפיין דגם ביטוי של גנים שונים בתנאים שונים. לשם כך מפיקים RNA שליח (mRNA) מהרקמה הנבחנת ויוצרים cDNA שמטופל כמתואר לעיל (Bachem *et al.*, 1998). דגם הפסים המתקבל מייצג את תבנית הביטוי הגנטי ברקמה.

2.8. מטרות העבודה

מטרת העבודה היא לאפיין את השונות הגנטית בעצי תמר במספר רבדים:

1. הערכת השונות הגנטית ברמת הרצף בין עצי תמר מזנים שונים, מזוויגים שונים ומשיטות ריבוי שונות.
2. הערכת השונות הגנטית ברמת הרצף בעצי תמר בעלי פנוטיפים חריגים.
3. השוואת דגמי המתילציה ב-DNA בין עצים חריגים ונורמליים בזנים שונים.
4. הערכת הבדלים בדגם ביטוי הגנים בין עצים בעלי פנוטיפים שונים.

3. חומרים ושיטות

3.1. החומר הצמחי

החומר הצמחי כלל עלים, פרחים ושורשים מעשרות עצי ושתילי תמר ממטעים, מזנים ומזוויגים שונים, ממקורות ריבוי שונים ובעלי פנוטיפים שונים. העלעלים (הוצים) של עלים צעירים הועברו למעבדה, נשטפו במים, נחתכו לגזרים קטנים והוקפאו ב-80 °C. התפרחות של עצי הנקבה הוסרו במצב של טרום-פתיחה והועברו בקירור למעבדה, בה הפרחים הופרדו מהסנסנים והוקפאו ב-80 °C. שורשים צעירים של עצים בעלי וואריגציות הוצאו ע"י חפירה, נשטפו במים והוקפאו ב-80 °C. רשימת העצים שנבחנו בעבודה זו מופיעה בטבלה מס' 1.

טבלה מס' 1: עצים ששימשו לבחינת השונות הגנטית ברצף, השונות בדגמי המתילציה ושונות בדגמי ה-cDNA.

מס"ד gAFLP	מס"ד mAFLP	מס"ד cAFLP	זן	מקור ריבוי	מטע	שנת נטיעה	תאור נוסף של הפנוטיפ או המקור
1	1		'ברה'	OS	יבניאל	2002	נורמלי
2	2		'ברה'	OS	יבניאל	2002	נורמלי
3			'ברה'	OS	יבניאל	2002	נורמלי
4-5			'ברה'	OS	בית זרע	1992	נורמלי
6-7			'ברה'	OS	יטבתה	1992	נורמלי
		1	'ברה'	OS	יטבתה	1992	נורמלי
8	3		'ברה'	OS	יטבתה	1992	נורמלי
9-10			'ברה'	OS	יטבתה	1992	נורמלי
	4		'ברה'	OS	יטבתה	1992	נורמלי
	5	2	'ברה'	OS	יטבתה	1992	נורמלי
		3	'ברה'	OS	יטבתה	1992	נורמלי
		4	'ברה'	OS	יטבתה	1998	נורמלי
	6		'ברה'	OS	יטבתה	1998	נורמלי
11	9		'ברה'	TC (1)	יטבתה	1999	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
12-13			'ברה'	TC (1)	יטבתה	1999	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
		7-8	'ברה'	TC (1)	יטבתה	1999	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
14			'ברה'	TC (1)	בית זרע	1994	נורמלי
15			'ברה'	TC (1)	בית זרע	1994	שעור נמוך של חנטה
16		5	'ברה'	TC (1)	יטבתה	1993	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
17			'ברה'	TC (1)	יטבתה	1993	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
	10-15		'ברה'	TC (1)	יטבתה	1998	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
18			'ברה'	TC (2)	יטבתה	1999	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
19			'ברה'	TC (2)	יטבתה	1999	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
	7-8		'ברה'	TC (2)	יטבתה	1999	נורמלי
20-21			'ברה'	TC (2)	בית זרע	1999	נורמלי
22-23			'ברה'	TC (3)	בית זרע	2000	נורמלי
60			'ברה'	TC (3)	בית זרע	2000	עלעלים גדולים ורחבים במיוחד
24-27			'ברה'	TC (4)	יבניאל	1999	שעור נמוך של חנטה וריבוי שחלות
28			'ברה'	TC (4)	יבניאל	1999	נורמלי
29-31			'מג'הול'	OS	יבניאל	2002	נורמלי
32			'מג'הול'	OS של גולן	שער	1999	עלעלים צפופים עם קצוות צהובים
33-34			'מג'הול'	OS	שער גולן	1996	נורמלי

מס"ד gAFLP	מס"ד mAFLP	מס"ד cAFLP	זן	מקור ריבוי	מטע	שנת נטיעה	תאור נוסף של הפנוטיפ או המקור
35			'מג'הול'	OS	יטבתה	בוגר	נורמלי
36	16		'מג'הול'	OS	יטבתה	בוגר	נורמלי
37			'מג'הול'	OS	יטבתה	בוגר	נורמלי
38	17		'מג'הול'	OS	יטבתה	בוגר	נורמלי
39-42			'מג'הול'	TC (5)	יטבתה	1999	נורמלי
44			'מג'הול'	TC (2)	יבניאל	2001	סימני הפטריה טלביופסיס
45-46	21-22		'מג'הול'	TC (2)	יבניאל	2001	נורמלי
47			'מג'הול'	TC (2)	שער גולן	1996	בעל חוטרים במקום תפרחות
48			'מג'הול'	TC (2)	שער גולן	1996	עלעלים צפופים עם קצוות צהובים
49			'מג'הול'	TC (2)	יטבתה	2001	נורמלי
50-51			'מג'הול'	TC (2)	יטבתה	2002	נורמלי
	18-20		'מג'הול'	TC (2)	יטבתה	2000	נורמלי
52-54	26-28		'מג'הול'	TC (6)	יבניאל	2001	עיכוב צימוח
	23-25		'מג'הול'	TC (6)	יטבתה	2001	עיכוב צימוח
55			'מג'הול'	TC (7)	חוות עדן	1982	נורמלי
57			'מג'הול'	TC (7)	חוות עדן	1982	שעור נמוך של חנטה, הבשלה מאוחרת
59			'מג'הול'	TC (2)	חממת צביאלי	שתיל צעיר	ואריגציה (עלים בעלי סקטורים צהובים)
1A (שורש)			'מג'הול'	TC (2)	חממת צביאלי	שתיל צעיר	ואריגציה (עלים בעלי סקטורים צהובים)
2A (עלה ירוק)			'מג'הול'	TC (2)	חממת צביאלי	שתיל צעיר	ואריגציה (עלים בעלי סקטורים צהובים)
3A (עלה צהוב)			'מג'הול'	TC (2)	חממת צביאלי	שתיל צעיר	ואריגציה (עלים בעלי סקטורים צהובים)
4B (שורש)			'מג'הול'	TC (2)	חממת צביאלי	שתיל צעיר	ואריגציה (עלים בעלי סקטורים צהובים)
5B (עלה ירוק)			'מג'הול'	TC (2)	חממת צביאלי	שתיל צעיר	ואריגציה (עלים בעלי סקטורים צהובים)
6B (עלה צהוב)			'מג'הול'	TC (2)	חממת צביאלי	שתיל צעיר	ואריגציה (עלים בעלי סקטורים צהובים)
M1-M10			זכר	OS	יטבתה	1988	פרטים שנבחרו באקראי ממקור לא ידוע
M11-M12			זכר	TC (2)	קטורה	2000	TC Clone 1
M13-M14			זכר	TC (2)	קטורה	2000	TC Clone 2
M15-M16			זכר	TC (2)	בית זרע	2000	TC Clone 2
M17-M18			זכר	TC (2)	בית זרע	2000	TC Clone 3
M19-M23			זכר	OS	בית זרע		פרטים שנבחרו באקראי ממקור לא ידוע
M24-M25			זכר	OS	בית זרע		OS Clone 4
M26-M27			זכר	OS	בית זרע		OS Clone 5
M28-M29			זכר	OS	בית זרע		OS Clone 6
M30-M31			זכר	OS	בית זרע		OS Clone 7
M32-M33			זכר	OS	בית זרע		OS Clone 8

מס"ד - מספר סידורי.

gAFLP - אנליזה של שונות גנטית ברמת הרצף.

mAFLP - אנליזה של שונות בדגמי המתילציה.

cAFLP - אנליזה של שונות בדגמי cDNA

OS - ריבוי מחוטרים.

TC - ריבוי בתרבית רקמה (המספרים בסוגריים מציינים את החברות השונות של תרביות הרקמה).

*עצים בעלי מאפיינים זהים או חוזרים באנליזות שונות מופעים בשורות משותפות.

3.2 הפקת DNA גנומי

בופר מיצוי:

3% w/v CTAB (Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide)

1% v/v β -mercaptoethanol

1.4 M NaCl

20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)

100 mM Tris pH 8.0

DNA גנומי הופק מעלי תמר לפי השיטה של Aitchitt וחבריו (1993) בשינויים כדלקמן: כשלושה גרם של רקמה (עלים או שורשים צעירים), נכתשו בחנקן נוזלי בנוכחות שלושה גרם של חול שנשטף בחומצה. החומר הכתוש הורחף ב-15 מ"ל בופר מיצוי והודגר משך 30 דקות ב-65 °C תוך ערבוב. המיצוי הראשון נעשה ע"י הוספת 15 מ"ל פנול (pH 7.8)/כלורופורם ביחס של 1:1 (הכלורופורם הכיל איזואמיל-אלכוהול ביחס של 1:24) וסירכוז משך 7 דקות ב-8,000g. הפזה המימית הופרדה ועברה מיצוי נוסף ע"י הוספת נפח אחד של כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24) וסירכוז באותם תנאים. לפאזה העליונה הוסף נפח אחד של איזופרופנול ונעשה סירכוז משך 20 דקות ב-16,500g. המשקע נשטף ב-20 מ"ל אתנול 70% וסורכז משך 10 דקות ב-16,500g. המשקע יובש, הורחף ב-3 מ"ל מים מזוקקים וטופל במשך 30 דקות ב-37 °C ב-RNase A (סיגמה) (בריכוז סופי של 10 μ g/ml). חומצות הגרעין הושקעו ב-2.5 נפחים של אתנול (100%) לאחר הוספת Na-Acetate לריכוז סופי של 0.1M וסירכוז משך 10 דקות ב-16,500g. המשקע נשטף ב-20 מ"ל אתנול 70% וסורכז משך 10 דקות ב-16,500g. המשקע יובש והורחף ב-400 μ מים מזוקקים. ריכוז ואיכות של ה-DNA הוערכו באמצעות הפרדה על ג'ל אגרוז 0.7% והשוואה עם כמות ידועה של סמן גודל (λ DNA/EcoRI+HindIII). רמת ניקיון ה-DNA הוערכה ע"י יחס בליעת האור באורכי גל של 260 ו-280 ננומטר בספקטרופוטומטר.

3.3 הפקת Total RNA

הרכב התמיסות ששימשו בהפקה:

(1) בופר מיצוי:

0.1 M Tris-Cl pH 8.0
0.025 M EDTA pH 8.0
2 M NaCl
2% w/v CTAB
2% w/v Polyvinylpyrrolidone (PVP) (k3)
0.2% v/v β -mercaptoethanol

(2) SSTE:

0.5% w/v SDS
1 M NaCl
0.01 M Tris-Cl pH 8.0
0.001 M EDTA pH 8.0

הפקת Total RNA נעשתה בשיטת CTAB (Chang *et al.*, 1993) בשינויים כדלקמן: כ- 3 גרם של רקמה (פרחים), נכתשו בחנקן נוזלי. החומר הכתוש הורחף ב-20 מ"ל בופר מיצוי והודגר משך 10 דקות ב- 65°C תוך ערבוב. המיצוי נעשה פעמים בנפח אחד של כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24), הדוגמאות עורבבו משך 5 דקות וסורכזו 7 דקות ב-8,000g. לפאזה העליונה הוסף 1/3 נפח 10M LiCl, המבחנות עורבבו היטב והודגרו למשך הלילה ב- 4°C . הדוגמאות סורכזו משך 25 דקות ב-7,500g ב- 4°C . למשקע הוספו 1 מ"ל SSTE ו-1 מ"ל כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24), הדוגמאות הורחפו, הועברו למבחנות 2 מ"ל וסורכזו 5 דקות ב-10,500g. הפזה המימית מוצתה ב-כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24) שנית. ה-RNA שוקע ע"י חלוקת הפזה המימית לשתי מבחנות 2 מ"ל שבכל אחת: $400\ \mu\text{l}$ פזה מימית, $133\ \mu\text{l}$ של 10 M Amonium acetate, $1,330\ \mu\text{l}$ אתנול (100%). המבחנות עורבבו היטב והודגרו במשך הלילה ב- 20°C . הדוגמאות סורכזו 15 דקות ב-18,000g. המשקע נשטף ב-1 מ"ל אתנול 70%, סורכז 5 דקות ב-18,000g, יובש והורחף ב- $30\ \mu\text{l}$ מים שעברו טיפול ב-DEPC (diethylpyrocarbonate). התרחיף (שתי המבחנות של אותה דוגמא) אוחד. ריכוז ואיכות ה-RNA הוערכו באמצעות הפרדה על ג'ל אגרוז 1.2%.

3.4 טיפול ב-DNase I

הטיפול ב-DNase I נעשה כדלקמן:

ל-10 µg של Total RNA הוסף:

4 µl 10 x DNase Buffer

0.5 µl RNase inhibitor (40 U/ µl) (Fermentas, Irvine, USA)

0.5 µl RNase free DNase (1 U/ µl) (Promega, Madison, WI, USA)

נפח הריאקציה הושלם ל-40 µl ע"י מים שעברו טיפול ב-DEPC. הדוגמאות הודגרו במשך חצי שעה ב-37 °C ולאחר מכן מוצו בפנול/כלורופורם (1:1), שוקעו באיזופרפנול ונמהלו ב-12 µl מים שעברו טיפול ב-DEPC.

3.5 יצירת cDNA

הגדילים של cDNA יוצרו בשני שלבים:

3.5.1 סינתזת הגדיל הראשון של cDNA

הגדיל הראשון של cDNA סונתז לפי פרוטוקול SuperScript II (GIBCO-BRL) לפי הוראות היצרן. בשיטה זאת נוצר גדיל של DNA על תבנית של RNA המכיל רצף poly A (חזרות של אדנין) שבדרך כלל מאפיין את RNA שליח (mRNA). הסינתזה נעשית באמצעות תחל (primer) poly dT המזהה את הרצף poly A והאנזים Reverse Transcriptase.

3.5.2 סינתזת הגדיל השני של cDNA

אל מבחנת הריאקציה של הגדיל הראשון (20 µl) הוסף:

15 µl 10 x RNase H buffer

3.5 µl DNA polymerase I (10 U/ µl) (New England Biolab, Beverly, USA)

1.5 µl RNase H (5 U/ µl) (New England Biolab, Beverly, USA)

1 µl dNTPs (25 mM)

109 µl H₂O

הדוגמאות הודגרו שעתיים ב-16 °C, מוצו בפנול-כלורופורם ונמהלו ב-40 µl מים.

AFLP 3.6

דגם הפסים של AFLP (Vos *et al.*, 1995) נוצר לפי Kashkush וחובריו (2001). השלבים השונים מפורטים להלן:

3.6.1 ריאקצית רסטריקציה-ליגציה

DNA גנומי (0.5 μ g), נחתך באנזימי רסטריקציה ב-37 °C במשך 3 שעות ועבר ליגציה לאדפטורים יחודיים. ריאקצית הרסטריקציה-ליגציה הכילה:

- 3 U *MseI* (New England Biolab, Beverly, USA)
- 10 U *EcoRI* (New England Biolab, Beverly, USA)
- 120 U T4-DNA Ligase (New England Biolab, Beverly, USA)
- 5 pmole *EcoRI* adaptor, 50 pmole *MseI* adaptor (2' טבלה מס')
- 1 μ l NaCl (0.5M)
- 5 μ g BSA
- 1 x DNA ligase buffer

נפח הריאקציה היה 10 μ l. בסיום הריאקציה התוצרים נמהלו 1:10 במים מזוקקים פעמיים.

3.6.2 Preselective Amplification

השתמשנו בתחלים הומולוגיים לרצפי האדפטורים (ראה טבלה מס' 2). ריאקצית ה-PCR הכילה:

- 4 μ l DNA (3.6.1 מסעיף (התוצר המהול מסעיף 3.6.1))
- 10 pmole *EcoRI* primer
- 10 pmole *MseI* primer
- 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA)
- 2 μ l 10 \times *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, Madison, WI, USA)
- 2 μ l 25 mM MgCl₂
- 0.8 μ l 2.5 mM dNTPs

נפח הריאקציה היה 20 μ l. תנאי ה-PCR היו: 20 מחזורים של: 30 שניות ב-94 °C, 60 שניות ב-56 °C ו-60 שניות ב-72 °C לאחר ההגברה, תוצרי ה-PCR נמהלו 1:20 במים מזוקקים פעמיים.

3.6.3 ריאקציית סימון קצה של תחלים

(בכל הניסויים התחל המסומן היה *EcoRI*)

ריאקציית הסימון הכילה:

180 pmole *EcoRI* primer

100 μ Ci (10 mCi/ml; 1000-3000 Ci/mmol) γ -³³P ATP (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)

20 U T4 polynucleotide kinase (New England Biolab, Beverly, USA)

10 μ l 5 \times polynucleotide kinase buffer

נפח ריאקציית הסימון היה 50 μ l. הדוגמאות הודגרו במשך שעה ב-37 °C ולאחר מכן חוממו ל-70 °C ל-10 דקות.

Selective Amplification 3.6.4

נעשה שימוש בתחלים ארוכים ב-2 נוקליאוטידים מהתחלים של ה-Preselective amplification (ראה טבלה מס' 2). תכולת הריאקציה:

4 μ l DNA (3.6.2 מסעיף)

3.6 pmole *EcoRI* selective primer

10 pmole *MseI* selective primer

1 U *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA)

2 μ l 10 \times *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, Madison, WI, USA)

2 μ l 25 mM MgCl₂

0.8 μ l 2.5 mM dNTPs

נפח הריאקציה היה 20 μ l. תנאי ה-PCR היו: מחזור אחד של 2 דקות ב-94 °C, 30 שניות ב-65 °C ו-2 דקות ב-72 °C. בעשרת המחזורים הבאים טמפרטורת ה-annealing ירדה במעלה אחת בכל מחזור. 25 מחזורים הבאים היו: 30 שניות ב-94 °C, 30 שניות ב-56 °C, ו-2 דקות ב-72 °C. תוצרי ה-PCR עורבבו עם 20 μ l של בופר הטענה.
בופר הטענה:

98% Formamide

10 mM EDTA

1 mg/ml Bromophenol blue

1 mg/ml Xylene cyanol

לאחר דנטורציה של 2 דקות ב-94 °C, התוצרים הופרדו על גל ריצוף סטנדרטי של 5% פוליאקרילאמיד (באורך 43 ס"מ) במשך שעתיים ב-55 וואט.
הרכב הג'ל:

20:1 acrylamide : bis acrylamide (BioRad, Hercules California, USA)

7.5 M urea (BioRad, Hercules California, USA)

1XTBE buffer (Promega, Madison, WI, USA)

הג'ל יובש ונחשף ל-X-ray פילם למשך כ-72 שעות ב-80 °C, או נחשף לפלטת Phosphoimager למשך לילה אחד.

טבלה מס' 2: תחלים ואדפטורים ששימשו בריאקציות ה-AFLP וה-cDNA AFLP

אתר <i>EcoRI</i>	אתר <i>MseI</i>	תיאור
5'CTCGTAGACTGCGTACC3' 5'AATTGGTACGCACTCTAC3'	5'TACTCAGGACTCAT3' 5'GACGATGAGTCCTGAG3'	אדפטורים לליגציה
5'GACTGCGTACCAATTCA3'	5'GATGAGTCCTGAGTAAC3'	תחלים לשלב ה- Preselective Amplification
5'GACTGCGTACCAATTCAC3'	5'GATGAGTCCTGAGTAACAT3'	תחלים לשלב ה- Selective Amplification
5'GACTGCGTACCAATTCAG3'	5'GATGAGTCCTGAGTAACAG3'	
5'GACTGCGTACCAATTCACA3'	5'GATGAGTCCTGAGTAACAA3'	
5'GACTGCGTACCAATTCACC3'	5'GATGAGTCCTGAGTAACTA3'	
5'GACTGCGTACCAATTCAGG3'	5'GATGAGTCCTGAGTAACTT3'	
5'GACTGCGTACCAATTCAC3'	5'GATGAGTCCTGAGTAACAC3'	

cDNA AFLP 3.7

(Bachem *et al.*, 1998).

השיטה זהה לשיטת ה-AFLP (סעיף 3.6) אלא שהתבנית הנבחנת היא cDNA. ריאקציית הרסטריקציה-ליגציה היתה בנפח של 50 µl (במקום 10 µl) המותאם לריכוזים נמוכים יותר של cDNA. שאר מרכיבי הריאקציות זהים למתואר בסעיף 3.6.

Methylation Sensitive AFLP 3.8

(Matthes *et al.*, 2001)

השיטה מיועדת לאפיון דגמי מתילציה ודומה לשיטת ה-AFLP (סעיף 3.6). השינויים הם כדלקמן: בשלב החיתוך והליגציה מוחלף האנזים *MseI* באחד משני האנזימים *HpaII* או *MspI*. אנזימים אלה מזהים את אותו אתר חיתוך (CCGG), אך שונים ברגישותם למתילציה

של הציטוזינים באתר (ראה טבלה מס' 3): במצב של מתילציה מלאה (בשני הגדילים) בציטוזין חיצוני באתר - שני האנזימים לא חותכים, כאשר ציטוזין פנימי ממותל רק - *MspI* חותך. במצב של המי-מתילציה (מתילציה רק באחד הגדילים) בציטוזין החיצוני באתר החיתוך - רק *HpaII* יכול לחתוך (Jaligot *et al.*, 2004; Madlung *et al.*, 2002; Mingliang *et al.*, 2000).

טבלה מס' 3: השפעת מצבי מתילציה על פעילות אנזימי הרסטריקציה *MspI* / *HpaII*

פעילות אנזימתית		מצב מתילציה באתר החיתוך	
<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>		
+	+	C C G G G G C C	העדר מתילציה
-	-	^m C C G G G G C C ^m	מתילציה של ציטוזין חיצוני בשני הגדילים
+	-	C ^m C G G G G C ^m C	מתילציה של ציטוזין פנימי בשני הגדילים
-	+	^m C C G G G G C C	המי-מתילציה (רק בגדיל אחד) של ציטוזין חיצוני

+ אנזים פעיל
 - אנזים אינו פעיל

DNA מכל הפרטים שימש לשתי ריאקציות חיתוך וליגציה נפרדות: האחת עם *EcoRI* ו-*HpaII* והשנייה עם *EcoRI* ו-*MspI*. לאתר של *HpaII* ו-*MspI* שימש אדפטור מתאים (ראה טבלה מס' 4). ריאקציית החיתוך-ליגציה נמשכה 5 שעות ב-37 °C והכילה:

0.5 µg Genomic DNA

10U *HpaII* או 20U *MspI* (New England Biolab, Beverly, USA)

20 U *EcoRI* (New England Biolab, Beverly, USA)

120U T4-DNA Ligase (New England Biolab, Beverly, USA)

5 pmole *EcoRI* adaptor (4 מס' 4) (ראה טבלה מס' 4)

50 pmole *MspI* / *HpaII* adaptor (4 מס' 4) (ראה טבלה מס' 4)

2 µl NaCl (0.5M)

10 µg BSA

2x DNA ligase buffer

נפח הריאקציה היה $20 \mu\text{l}$. $5 \mu\text{l}$ הוטענו על ג'ל אגרוז % 1.2 לבדיקת החיתוך, והיתרה נמהלה ב- $60 \mu\text{l}$ מים מזוקקים פעמיים. שאר שלבי ה-AFLP היו זהים למתואר בסעיף 3.6 להוציא שימוש בתחלים של *MspI / HpaII* (במקום תחלים של *MseI*) (באותם ריכוזים) (ראה טבלה מס' 4).

טבלה מס' 4: תחלים ואדפטורים ששימשו לריאקציית ה-Methylation Sensitive AFLP

אתר <i>EcoRI</i>	אתר <i>MspI / HpaII</i>	תיאור	
5'CTCGTAGACTGCGTACC3' 5'AATTGGTACGCAGTCTAC3'	5'GACGATGAGTCCTGAT3' 5'CGATCAGGACTCAT3'	אדפטורים לליגציה	
5'GACTGCGTACCAATTCA3'	5'GATGAGTCCTGATCGG3'	תחלים לשלב ה- Preselective Amplification	
5'GACTGCGTACCAATTCACA3'	5'GATGAGTCCTGATCGGTGCG3'	I	תחלים לשלב ה- Selective Amplification
5'GACTGCGTACCAATTCAC3'	5'GATGAGTCCTGATCGGTGCG3'	II	
5'GACTGCGTACCAATTCAGG3'	5'GATGAGTCCTGATCGGGCG3'	III	
5'GACTGCGTACCAATTCAGG3'	5'GATGAGTCCTGATCGGTGCG3'	IV	
5'GACTGCGTACCAATTCACG3'	5'GATGAGTCCTGATCGGTGCG3'	V	
5'GACTGCGTACCAATTCACC3'	5'GATGAGTCCTGATCGGGCG3'	VI	
5'GACTGCGTACCAATTCAGC3'	5'GATGAGTCCTGATCGGTGCG3'	VII	

דגם הפסים של אנליזת ה-Methylation Sensitive AFLP (איור 9), תורגם למטריצה בינארית (כמתואר בסעיף 3.9). נתונים אלה נבחנו בשלוש אנליזות שונות: EM, EH ו-EM-EH). האנליזות EM ו-EH המבוססות על דגמי פסים שנוצרו באמצעות השימוש באנזימי חיתוך *EcoRI+MspI* ו-*EcoRI+HpaII* (לפי הסדר) מאפשרות לבחון בשני סוגים של פולימורפיזם; הראשון - מקורו בשונות גנטית בין הפרטים והשני - מקורו בשונות בדגם המתלציה ביניהם. אנליזת (EM-EH) מבוססת על הפרשים בין פסי EM ופסי EH לכל דוגמא בכל אתר. כאשר ההפרש ישנו באתר מסוים של דוגמה כל שהיא, משמעותו היא שאתר זה ממותל בציטוזין פנימי בשני הגדילים או המי-ממותל (ראה טבלה מס' 3). כך מתקבל דגם חדש המצביע על אתרים כאלה. בעזרת אנליזת (EM-EH) ניתן לאמוד את השונות בדגמי המתלציה בין הפרטים, ולעריך (באופן מוגבל) את רמתה הכללית.

3.9 אנליזה גנטית

דגם הפסים של AFLP תורגם למטריצה בינארית (1 מציין נוכחות של פס, ו-0 היעדר של פס בפרט מסוים באתר נתון). אנליזה של שונות מולקולארית (Analysis of Molecular Variance (AMOVA) נעשתה ע"י שימוש בתוכנת ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). האנליזה כללה בדיקת שונות גנטית בין ובתוך אוכלוסיות.

השונות הגנטית בין האוכלוסיות נמדדה ע"י ערכי FST (Fixation index) המבטא את החלק היחסי של שונות בין אוכלוסיות מתוך כלל השונות.

השונות הגנטית בתוך האוכלוסיות נמדדה כאחוז פסים פולימורפיים בכל הפרטים השייכים לאותה אוכלוסייה, וכמו כן ע"י הערך AGD (Average Gene Diversity) המתאר את ממוצע הפסים הפולימורפיים בין כל זוג פרטים באוכלוסייה.

הערכת מרחקים גנטיים בין פרטים נעשתה באמצעות תוכנת PHYLTOOLS (Buntjer, 2001). המרחק הגנטי בין כל זוג פרטים הוערך ע"י החסרת ערך Nei (Nei and Li, 1979) מ-1. ערך Nei מבטא את השיעור היחסי של פסים מונומורפיים מתוך כלל הפסים (ערך מקסימאלי של-1 מתקבל כאשר כל הפסים הם מונומורפיים).

עצים פילוגנטיים המתארים את המרחקים הגנטיים בין הפרטים השונים נבנו בשיטת UPGMA (Rohlf, 2000) בעזרת התוכנה NEIGHBOR (Felsenstein, 1999) והוצגו בעזרת התוכנה TREEVIEW (Page, 2000).

תוכנת PHYLTOOLS מאפשרת בחינת המובהקות של המרחקים הגנטיים על ידי יצירת Bootstrap, כלומר ע"י החלפת חלק מהנתונים בנתונים שמקורם בהכפלת הנתונים קיימים באופן אקראי. נבחנו 100 מטריצות שונות שבכל אחת מהן הוחלפו 35% מהנתונים המקוריים. ערכי Bootstrap המופיעים בנקודות ההתפצלות בעצים מציינים את מידת המובהקות הסטטיסטית של ההתפצלות. משמעותם - אחוז המטריצות בהם אותה התפצלות נשמרה. רק ערכים מובהקים (הגבוהים מ-70) מוצגים בעצים הפילוגנטיים.

קבוצות (Clustering) של פרטים לקבוצות על פי מאפיינים גנוטיפיים נעשתה באמצעות תוכנת STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). האלגוריתם של STRUCTURE מרכיב מספר מבוקש של קבוצות על בסיס הגנוטיפים של הפרטים השונים וללא כל מידע נוסף. התוכנה מחשבת את מידת השייכות של כל פרט לכל קבוצה.

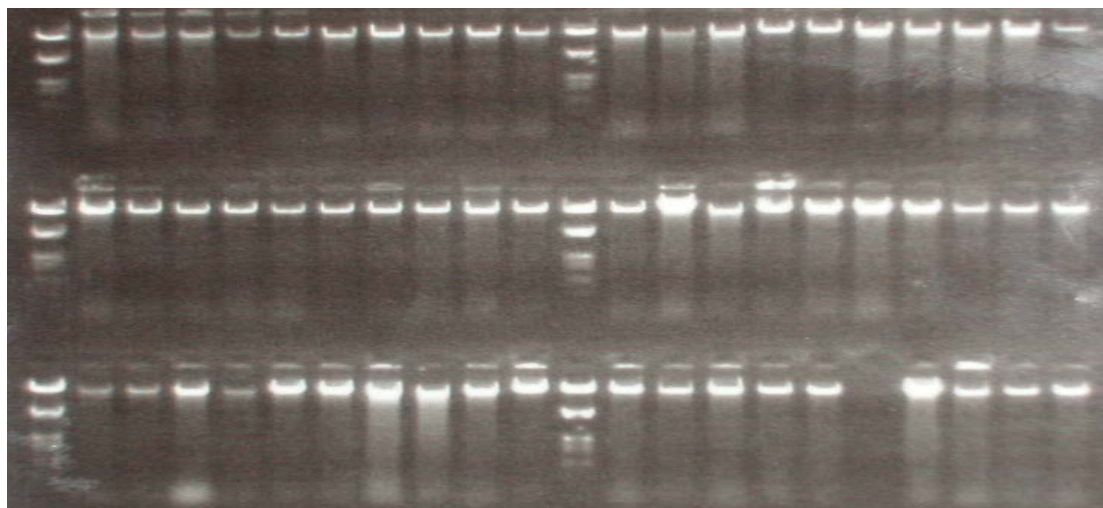
4. תוצאות

4.1 הערכת השונות הגנטית ברמת הרצף בעצי תמר מהזנים 'ברהי' ו'מג'הול' ממקורות ריבוי שונים

4.1.1 הפקת DNA גנומי

הפקת DNA מעלי תמר התבססה על שיטת ה-CTAB (Aitchit *et al.*, 1993). (ראה סעיף 3.2). הדוגמאות היו בעלות יחס בליעת האור באורכי גל של 260 ו-280 ננומטר בטווח בין 1.7 ל-2 ובעלות ריכוז ה-DNA בטווח בין 50-150 ng/μl. במידת הצורך הדוגמאות רוכזו ב-'SpeedVac' או נמהלו לריכוז המתאים. ג'ל מייצג של DNA גנומי מוצג באיור 1.

איור 1: דוגמאות של DNA גנומי שהופק מעצי תמר

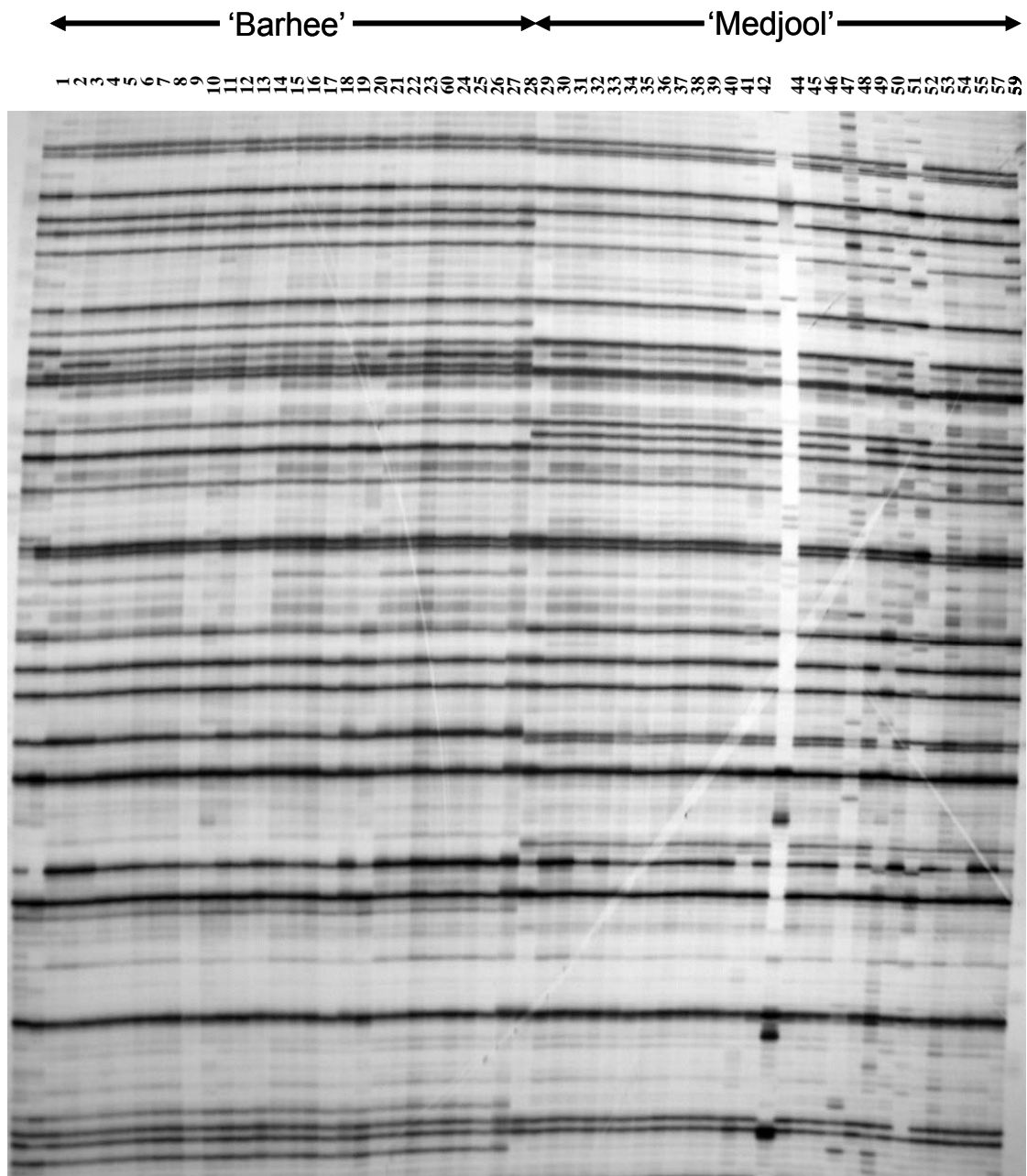


ראה תיאור החומר הצמחי ופרוט שיטת ההפקה והבדיקה בחומרים ושיטות (סעיף 3.2).

4.1.2 אנליזת AFLP לבחינת השונות הגנטית בין עצי 'ברהי' ו'מג'הול'

עשרים ותשעה עצי 'ברהי' ו-28 עצי 'מג'הול' שנבדלים בגילם, במיקום נטיעתם, במקור ריבויים ובמופעים הפנוטיפים שלהם (ראה טבלה מס' 1) נבחנו באמצעות AFLP. דגם פסים התקבל בעזרת שימוש בחמישה צירופים של תחלים סלקטיביים (A, B, C, D ו-O) (ראה טבלה מס' 2). דגם הפסים שנוצר ע"י צירוף D מוצג באיור 2.

איור 2: דגם פסים מאפיין באנליזת AFLP של עצי 'ברהי' ו'מג'הול'



דגם AFLP-ה התקבל בשימוש בתחלים מצירוף D. המספרים הסידוריים של הפרטים השונים מפורטים בטבלה מס' 1.

נסרקו 317 פסים ברורים של AFLP שתורגמו למטריצה בינארית (1 - לנוכחות הפס ו- 0 להעדרו באתר מסוים). המטריצה מאפשרת הערכה של שונות גנטית ויצירה של עצים פילוגנטיים (Dendrograms), בעזרת שימוש בתוכנות כמפורט בפרק השיטות (ראה סעיף 3.9). מספר הפסים הפולימורפיים ואחוז הפסים הפולימורפיים מוצגים בטבלה מס' 5.

טבלה מס' 5: אפיון דגם הפסים של עצי 'ברהי' ו'מג'הול על בסיס אנליזת ה-AFLP.

זן	מקור ריבוי	מספר העצים שנבדקו	מספר פסים פולימורפיים	אחוז הפסים הפולימורפיים	ערכי AGD
'ברהי'	OS	10 (8)	50 (2)	15.77 (0.63)	11.88 (0.78)
'ברהי'	TC (1)	7	2	0.63	0.57
'ברהי'	TC (2)	4	1	0.31	0.50
'ברהי'	TC (3)	3	0	0	0.00
'ברהי'	TC (4)	5	0	0	0.00
'ברהי' כללי		29 (27)	50 (4)	15.77 (1.26)	4.69 (0.79)
'מג'הול'	OS	10	3	0.94	0.75
'מג'הול'	TC (5)	4	15	4.73	7.83
'מג'הול'	TC (2)	9 (8)	68 (27)	21.45 (8.52)	18.66 (9.32)
'מג'הול'	TC (6)	3	11	3.47	7.33
'מג'הול'	TC (7)	2	3	0.94	3.00
'מג'הול' כללי		28 (27)	84 (43)	26.49 (13.56)	9.21 (5.97)

הערכים השונים בטבלה מהווים סיכום התוצאות שהתקבלו ע"י שימוש בחמישה צירופים של תחלים סלקטיביים (A, B, C, D ו-O). הדוגמאות חולקו לקבוצות לפי הזן ומקור הריבוי (ראה טבלה מס' 1). * אנליזה ללא הפרטים החריגים (דוגמאות מס' 1, 2 בזן 'ברהי', ו-47 בזן 'מג'הול'). ערכים אלה מופעים בסוגריים.

ניתוח AMOVA (Analysis of Molecular Variance) בוצע לדוגמאות 'ברהי' ו'מג'הול'. הדוגמאות חולקו לקבוצות לפי הזן, שיטת הריבוי (חוטרים או תרביות רקמה) ולפי מעבדת היצור שבה יוצרו שתילי התרביות. השונות בתוך הקבוצות נמדדה ביחידות AGD (Average Gene Diversity) ומפורטת בטבלה מס' 5. השונות בין הקבוצות חושבה ביחידות FST ומוצגת בטבלה מס' 6. רוב השונות הגנטית שנמצאה היתה בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול'. ראה ערך FST בין שני הזנים (FST = 0.9) (טבלה מס' 6). ערכי AGD בתוך הזן 'ברהי' והזן 'מג'הול' היו 4.69 ו-9.21 בהתאמה (טבלה מס' 5).

חמישים פסים (15.8%) היו פולימורפיים בתוך (within) דוגמאות 'ברהי'. יש להדגיש שרוב הפסים הפולימורפיים היו בשני עצי חוטרים צעירים מאוד (דוגמאות מס' 1 ו-2). רק שני פסים פולימורפיים נמצאו בכל שאר עצי 'ברהי': שני פסים פולימורפיים היו ב'ברהי' ממקור תרבית רקמה (1) TC ופס פולימורפי אחד בעצים ממקור (2) TC (טבלה מס' 5).

טבלה מס' 6: ערכי FST של עצי 'ברהי' ו'מג'הול

'מג'הול'							'ברהי'								
כללי	TC	TC	TC	TC	TC	OS	כללי	TC	TC	TC	TC	OS*	OS		
	(7)	(6)	(2)*	(2)	(5)			(4)	(3)	(2)	(1)				
													0.00	OS	י.ט.ז.
												0.00	OS*		
											0.00	0.13	0.00	TC (1)	
										0.00	-0.16	0.11	-0.08	TC (2)	
									0.00	0.76	0.69	0.30	-0.11	TC (3)	
								0.00	0.00	0.83	0.74	0.39	-0.01	TC (4)	
						0.00								כללי	
						0.00		0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.92	OS	י.ט.ז.
					0.00	0.24		0.95	0.94	0.94	0.96	0.96	0.86	TC (5)	
				0.00	-0.03	0.09		0.85	0.82	0.83	0.86		0.82	TC (2)	
			0.00		0.01	0.13		0.92	0.90	0.91	0.93	0.93		TC (2)*	
		0.00	-0.01	-0.06	0.02	0.38		0.97	0.95	0.96	0.97	0.97	0.86	TC (6)	
	0.00	0.30	0.09	-0.04	0.38	0.84		0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	0.86	TC (7)	
0.00							0.90 (0.95)*							כללי	

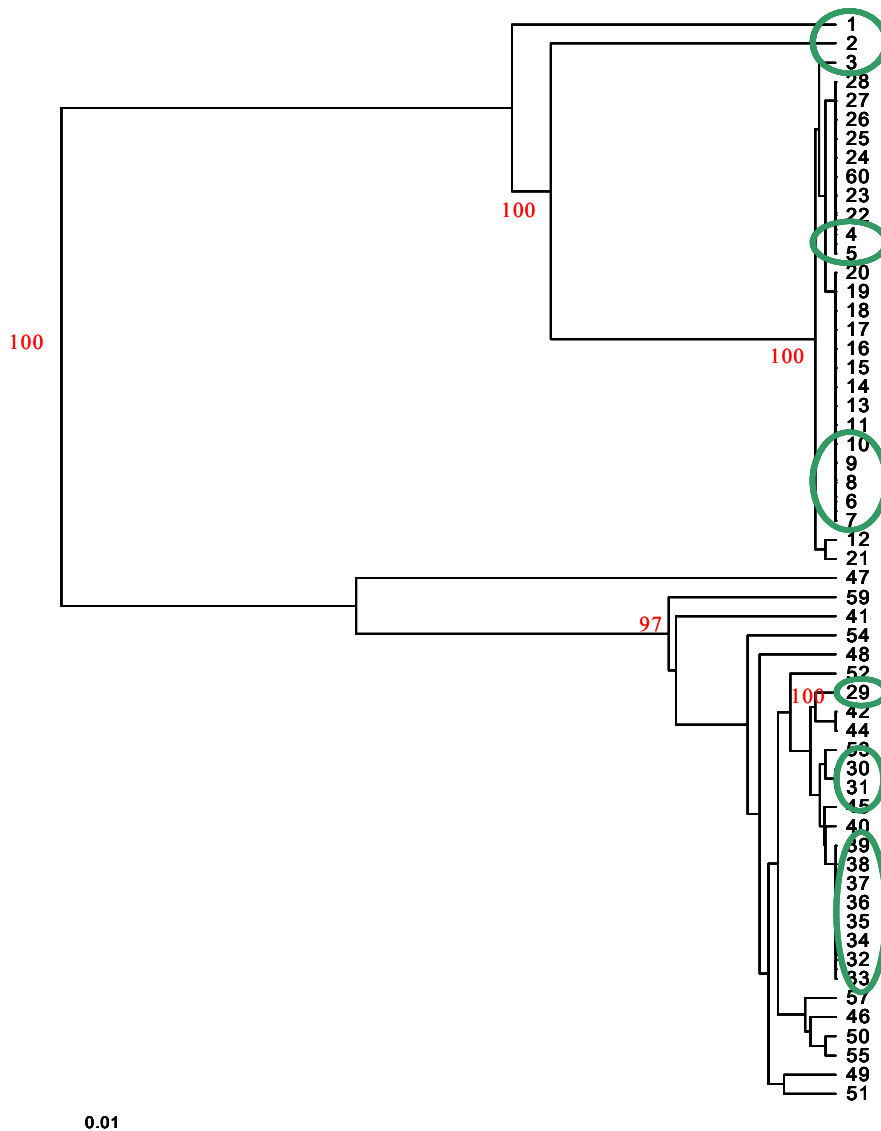
הדוגמאות חולקו לקבוצות לפי הזן ומקור הריבוי (ראה טבלה מס' 1). הערכים התקבלו בניתוח AMOVA בעזרת תוכנת ARLEQUIN. * אנליזה ללא הפרטים החריגים (דוגמאות מס' 1, 2 בזן 'ברהי', ו-47 בזן 'מג'הול').

שמונים וארבע פסים (26.5%), היו פולימורפיים בתוך כלל עצי 'מג'הול'. לעץ מס' 47 היה גם דגם פסים וגם פנוטיפ חריגים. העץ מייצר חוטרים בגובה רב על גבי הגזע במקום שבו היו צריכות להיווצר תפרחות. בנוסף, צורת העלעלים שלו שונה מזאת של העצים הרגילים. מספר נמוך יחסית (3) של פסים פולימורפיים נמצאו בתוך חוטרים של 'מג'הול'. לעומת זאת, מידה גבוהה של פולימורפיזם התגלתה בין עצי 'מג'הול' שמקורם בתרבות רקמה. עצים ממקור (2) TC אופיינו ברמת הפולימורפיזם המירבית (68 פסים פולימורפיים, AGD=18.6) (טבלה מס' 5).

מכיוון ששלושה עצים התגלו כחריגים מאוד (מספרי 1 ו-2 ב'ברהי' ו-47 ב'מג'הול'), ניתוח AMOVA נעשה בנוסף גם ללא אותם עצים חריגים (טבלאות מס' 5-6). כצפוי באנליזה זאת השונות הגנטית בתוך קבוצות ובתוך הזנים הייתה נמוכה יותר (טבלה מס' 5). כמו כן, ערכי FST בין הקבוצות ללא הפרטים החריגים לשאר הקבוצות היו גבוהים יותר (טבלה מס' 6). הקשרים הגנטיים בין העצים חושבו ביחידות מרחק גנטי של Nei ושימשו לבניה של עצים פילוגנטיים (איור 3). המרחק הגנטי בין הזנים היה גדול ביחס למרחקים בין עצים השייכים

לאותו זן. המרחקים הגנטיים בין עצי 'מג'הול' היו גבוהים לעומת המרחקים בין עצי 'ברהי'. בתוך עצי 'ברהי' (מלבד שני הפרטים החריגים: עצים מס' 1 ו-2), לא נמצא כמעט הבדל במרחקים גנטיים שבין העצים מחוטרים לעומת המרחקים שבין העצים מתרבויות. בניגוד לכך, בתוך עצי 'מג'הול' המרחקים הגנטיים הגדולים נמצאו בין עצים שמקורם מתרבויות. המרחקים הגנטיים בין חוטרי 'מג'הול' היו דומים למרחקים הגנטיים בין עצי 'ברהי'. בעץ הפילוגנטי (איור 3), החלוקה לענפים הייתה ייחודית רק לזנים. לא נצפתה חלוקה יחודית למקור הריבוי או לפנוטיפ מסוים.

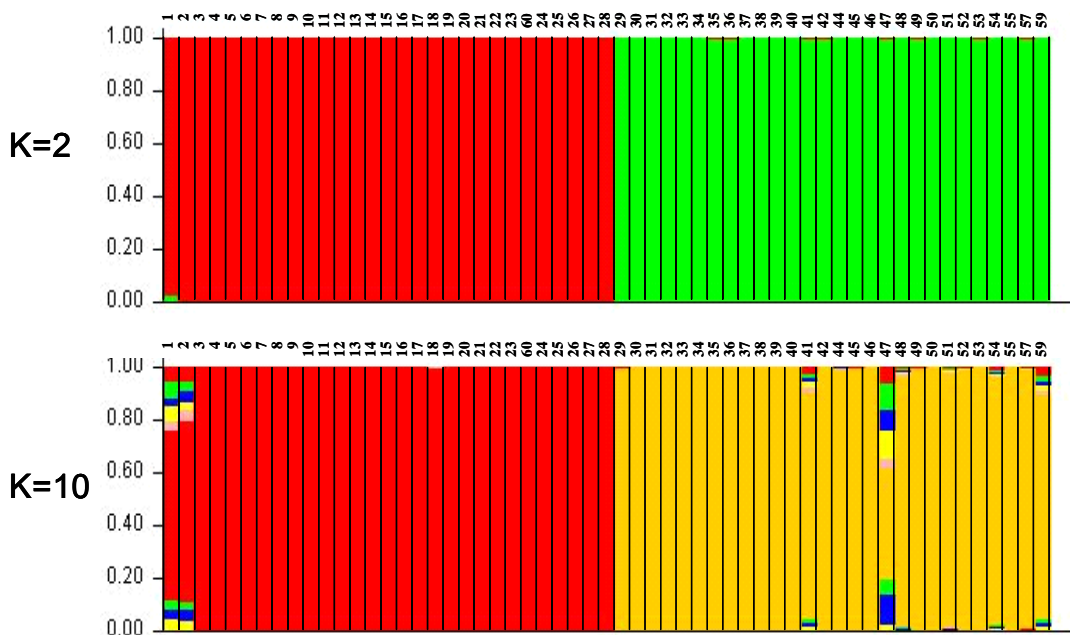
איור 3: המרחקים הגנטיים בין עצי 'ברהי' ו 'מג'הול' על פי דגם פסי ה-AFLP



אומדן המרחקים הגנטיים בין עצי 'ברהי' ו-28 עצי 'מג'הול'. העץ נבנה בשיטת UPGMA ומבוסס על מרחקים גנטיים המחושבים ביחידות Nei. ערכי Bootstrap הגבוהים מ-70 שחושבו בעזרת התוכנה PHYLTOOLS מוצגים במקומות הפיצול. המספרים הסיפוריים של הפרטים השונים מפורטים בטבלה מס' 1. דוגמאות שמקורן בחוטרים תחומות בירוק.

אנליזת 'קיבוץ' (Clustering) נעשתה בעזרת תוכנת STRUCTURE. נבחנה חלוקה ל-10-2 קבוצות (clusters) בהתאמה למספר הזנים, לדרך הריבוי ולמקורות השונים. האנליזה נעשתה בחמש חזרות. ב"קיבוץ" לכל מספר של קבוצות (2-10 קבוצות), כל העצים חולקו על ידי התוכנה רק לשתי קבוצות יחודיות בהתאם לזן (קבוצה אחת הכילה את כל עצי הזן 'ברהי' והאחרת את כל עצי הזן 'מג'הול'). במילים אחרות, לא היה 'קיבוץ' של עצים בהתאם לפנוטיפ, לשיטת הריבוי או למקור הריבוי (איור 4). גם הפרטים החריגים ביותר נשארו ב'קבוצת' הזן שלהם. יחד עם זאת, עצים חריגים אלה נמצאו שייכים במידה מסוימת גם למספר קבוצות נוספות בהתאם לרמת הפולימורפיזם שלהם ולדרגת החלוקה שנקבעה בתוכנה.

איור 4: אנליזת 'קיבוץ' (Clustering) של עצי 'ברהי' ו'מג'הול' על פי דגם פסי ה-AFLP

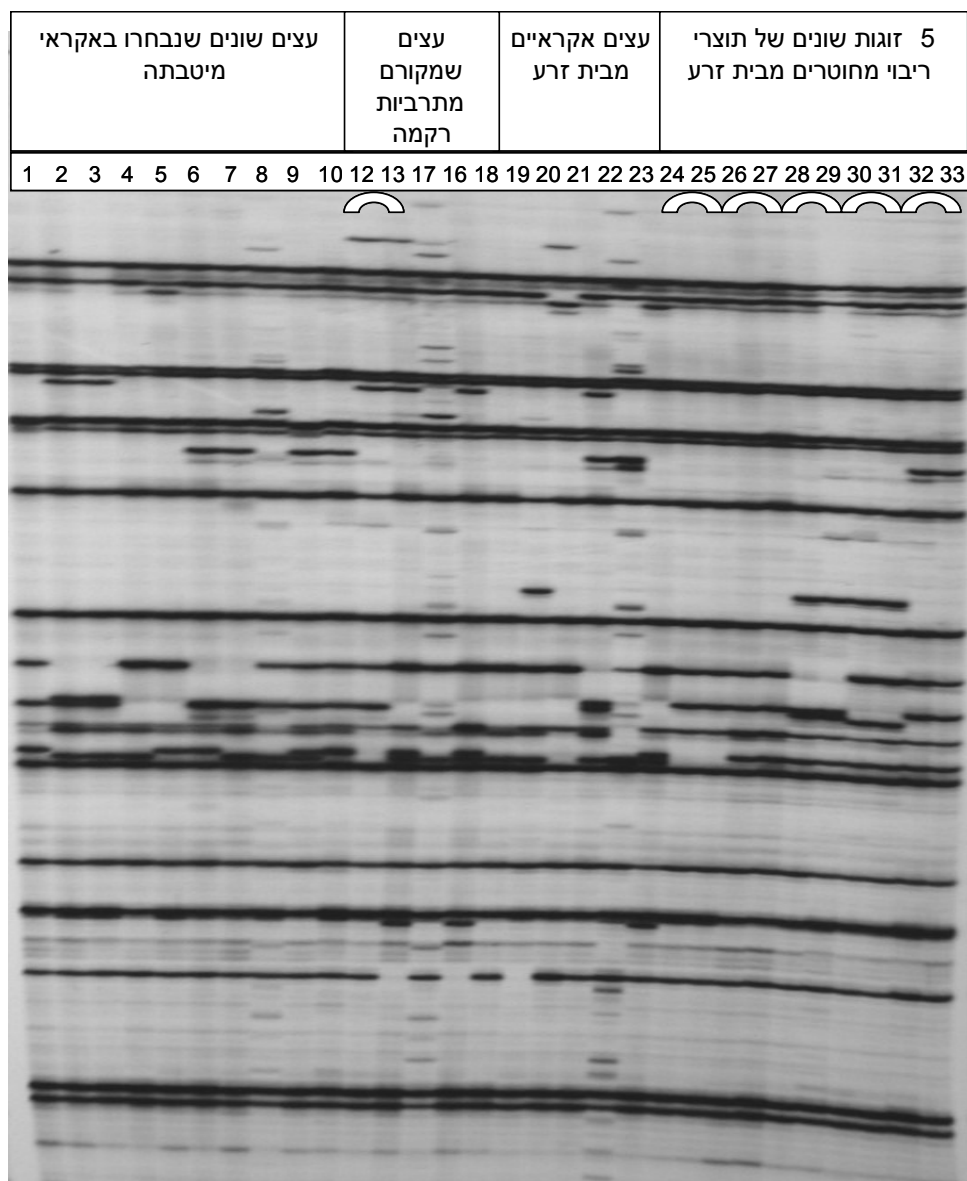


האנליזה נעשתה בתוכנת STRUCTURE. מוצג ניתוח של K=2 (עליון) ו-K=10 (תחתון) ($K = \text{מספר הקבוצות}$). העמודות מייצגות את הפרטים והצבעים מייצגים את הקבוצות השונות. מידת השייכות של כל פרט לקבוצה כלשהי מתבטאת בגובה היחסי של צבע הקבוצה בעמודה המציינת את הפרט. המספרים הסידוריים של הפרטים השונים מפורטים בטבלה מס' 1.

4.2 הערכת השונות הגנטית בעצי זכר ממקורות ריבוי שונים

נעשתה בחינה של השונות הגנטית ב-33 עצי זכר הכוללים ארבעה זוגות של עצים משלושה שבטים (clones) שונים של תרבית רקמה, חמישה זוגות של חוטרים "אחים" שונים (לכל זוג עצים יש "עץ אב" משותף אחר) ועוד 15 עצים מחוטרים שנבחרו באקראי ולא ידועים קשרים ביניהם (ראה טבלה מס' 1). התקבלו 354 פסי AFLP ברורים בששה צירופים שונים של תחלים סלקטיביים (A, B, C, D, E ו-O) (ראה טבלה מס' 2). דגם הפסים שנוצר ע"י צירוף D מוצג באיור 5. נמצאו 261 (73.7%) פסים פולימורפיים וערך ה-AGD בין כל הזכרים היה 51.97 (ראה טבלה מס' 7).

איור 5: דגם פסי AFLP (צירוף D) של עצי זכר שמקורם ממטעים שונים ומשיטות ריבוי שונות



* מספרי הפרטים מפורטים בטבלה מס' 1.
 ** זוגות עצים השייכים לאותו שבט מקושרים בקשתות (↔).
 *** לא כל העצים שנבדקו בעבודה מוצגים בתמונה זו.

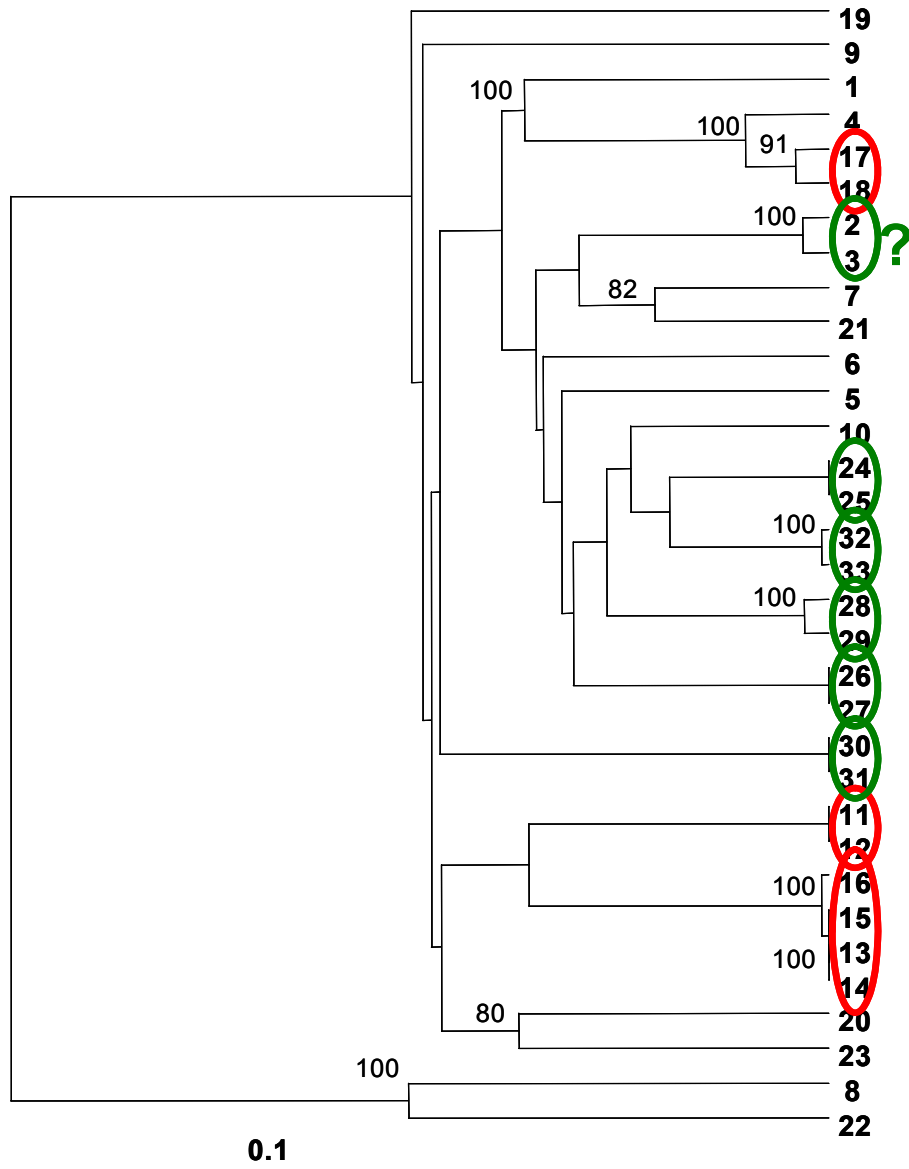
טבלה מס' 7: סיכום דגם הפסים באנליזת ה-AFLP של עצי זכר

מקור	מס"ד (לפי טבלה מס' 1)	מספר עצים נבדקים	מספר פסים פולימורפיים	אחוז פסים פולימורפיים	ערכי AGD
TC clone 1	M11-M12	2	0	0	0
TC clone 2	M13-M16	4	1	0.28	0.50
TC clone 3	M17-M18	2	4	1.13	4.00
OS clone 4	M24-M25	2	0	0	0
OS clone 5	M26-M27	2	0	0	0
OS clone 6	M28-M29	2	3	0.85	3.00
OS clone 7	M30-M31	2	0	0	0
OS clone 8	M32-M33	2	1	0.28	1.00
סה"כ הזכרים (כולל הפרטים ממקורות לא ידועים)					
		33	261	73.72	51.97

כל הפסים התקבלו ע"י שימוש בששה צירופים של תחלים סלקטיביים (A, B, C, D, E ו-O) שיצרו סה"כ 354 פסים. הדוגמאות חולקו לקבוצות לפי מקור הריבוי והשבטים מהם רובו העצים.

ראוי להדגיש שנמצאה שונות בתוך זוגות שמקורם מאותו שבט (חוטרים או תרבית רקמה). נמצאו פסים פולימורפיים בשניים מתוך ארבעה הזוגות שמקורם בתרביות רקמה, ובשניים מתוך חמשת זוגות החוטרים. אולם רמת הפולימורפיזם היתה נמוכה מאוד (0-1.13% פסים פולימורפיים וטווח ערכי AGD של 0-4) (ראה טבלה מס' 7). עץ פילוגנטי של כל עצי הזכר המבוסס על מרחקים גנטיים (לפי Nei) מוצג באיור 6.

איור 6: עץ פילוגנטי של 33 עצי זכר על פי אנליזת ה-AFLP



העץ נבנה בשיטת UPGMA ומבוסס על מרחקים גנטיים המחושבים ביחידות Nei. מוצגים ערכי Bootstrap הגבוהים מ-70 שחושבו בעזרת התוכנה PHYLTOOLS. המספרים הסידוריים מפורטים בטבלה מס' 1. עצים שמוצאם משבטים זכריים משותפים תחומים בקווים (ירוק לעצים מחוטרים ואדום - מתרבית). ? - מציין עצים שרובו מחוטרים ולפי הדמיון שביניהם יתכן שמקורם מאותו עץ זכר.

4.3 שונות גנטית בין רקמות באותו עץ

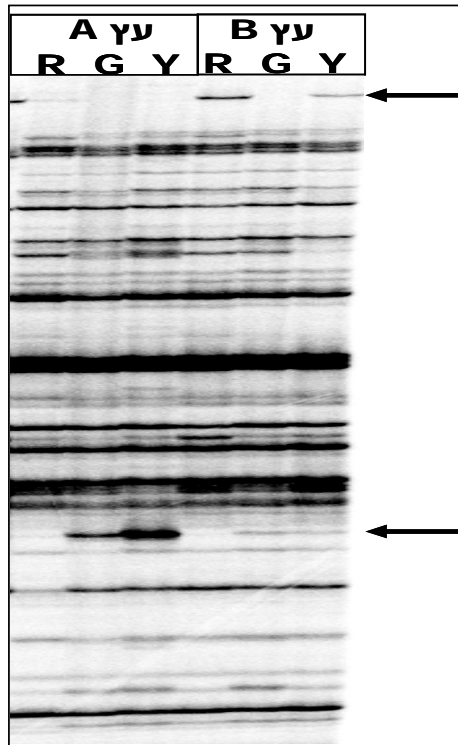
השונות הגנטית בין רקמות שונות באותו עץ אופיינה בשיטת AFLP. לאנליזה זו נבחרו עצים בעלי ואריגציה (המכילים סקטורים ירוקים וסקטורים צהובים בעלים). סקטורים אלה היו לעיתים קטנים יחסית ופעמים אחרות הכילו מחצית עלים או אף עלים שלמים (איור 7). נלקחו שתי דוגמאות עלים (מסקטור ירוק - נורמלי, ומסקטור צהוב - עם ואריגציה) ודוגמת שורש משני עצים צעירים שונים מזן 'מג'הול' שרובו בתרבית רקמה (ממקור (2) TC). נסרקו 160 פסי AFLP שהתקבלו בעזרת שימוש בחמישה צירופים של תחלים סלקטיביים (D, C, B, A, O) (טבלה מס' 2). נמצאה שונות גנטית בין סקטורים ירוקים וצהובים בעלים. כמו כן נמצאו פסים פולימורפיים בין דוגמאות העלים לבין דוגמת השורש של אותו עץ (איור 8). שלושה (1.9%) וחמישה (3.1%) מתוך 160 פסים, היו פולימורפיים בעצים A ו-B בהתאמה.

איור 7: עצים בעלי וואריגציה



א: בעלה אחד חלק מהעללים צהובים וחלק ירוקים. ב: בעלעל אחד יש סקטור צהוב וסקטור ירוק.

איור 8: קטע מדגם פסים של AFLP (סט O) של שני עצי מג'הול צעירים (A, B) בעלי ואריגציה

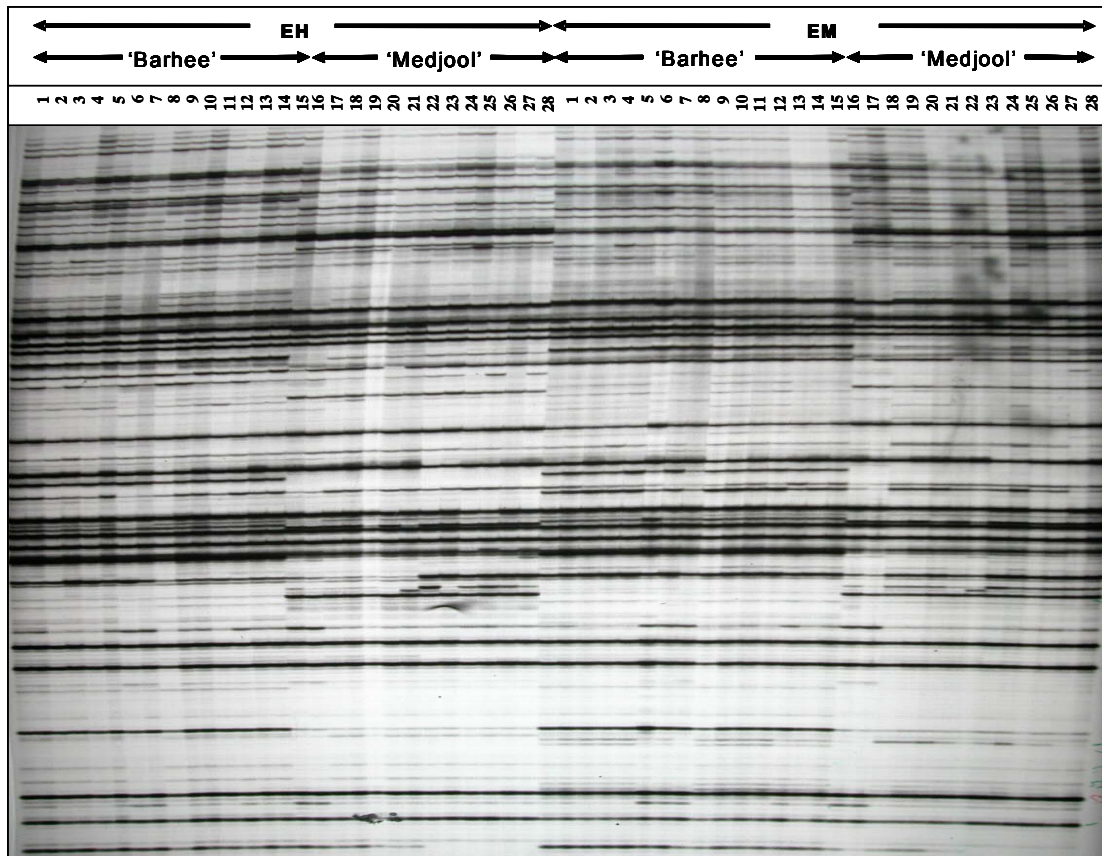


העצים חבו בתרבית רקמה. R - שורש, Y - סקטור צהוב בעלה, G - סקטור ירוק (נורמלי) של עלה. החצים מצביעים על פולימורפיזם בין רקמות באתו עץ.

4.4. אפיון דגם המתילציה ב-DNA של עצים שונים

אפיון דגמי המתילציה ב-DNA נעשה בשיטת Methylation Sensitive AFLP (סעיף 3.8). דוגמאות DNA הופקו מעלים של 15 עצים מהזן 'ברה' אשר כללו עצים נורמליים שמקורם בחוטרים או בתרבית רקמה ועצים מתרבית רקמה המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות, ו-13 עצים מהזן 'מג'הול' שכללו עצים נורמליים מחוטרים ומתרבית ועצים מעוכבי צימוח מתרבית רקמה (ראה טבלה מס' 1). לכל דוגמא נעשו שתי ריאקציות חיתוך-ליגציה נפרדות, אחת באמצעות האנזימים *EcoRI* ו-*HpaII* והשניה באמצעות *EcoRI* ו-*MspI*. דגם הפסים התקבל באמצעות שבעה צירופים של תחלים סלקטיביים (I, II, III, IV, V, VI ו-VII) (ראה טבלה מס' 4). דגם הפסים שנוצר ע"י צירוף II מוצג באיור 9.

איור 9: דגם פסי Methylation Sensitive AFLP של עצי 'ברהי' ועצי 'מג'הול'



נבחנו 15 עצי 'ברהי' ו-13 עצי 'מג'הול'. הדגם התקבל באמצעות צירוף 11 של תחלים סלקטיביים. המספרים הסיידוריים של הפרטים השונים מפורטים בטבלה מס' 1. (EH - חיתוך ב-*EcoRI* ו-*HpaII*, EM - חיתוך ב-*EcoRI* ו-*MspI*).

דגם הפסים של אנליזת ה-Methylation Sensitive AFLP, תורגם למטריצה בינארית. נתונים אלה נבחנו בשלוש אנליזות שונות: EM, EH, ו-(EM-EH). אנליזות EM ו-EH מבוססות על דגמי פסים שנוצרו באמצעות השימוש באנזימי חיתוך *EcoRI*+*MspI* ו-*EcoRI*+*HpaII* בהתאמה ואנליזת (EM-EH) מבוססת על הפרשים בין פסי EM ופסי EH לכל דוגמא בכל אתר (ראה סעיף 3.8). סך כל הפסים באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH) היה 359, 331 ו-58 בהתאמה.

נעשה ניתוח AMOVA לדגמי עצי 'ברהי' ו'מג'הול' לפי הזן, מקור הריבוי והפנוטיפ. בכל אנליזה נעשתה הערכה למספר הפסים הפולימורפיים, אחוז הפסים הפולימורפיים, השונות בתוך הקבוצות ביחידות AGD (ראה טבלה מס' 8) והשונות בין הקבוצות ביחידות FST (ראה טבלאות מס' 9-10).

טבלה מס' 8: סיכום דגם הפסים של Methylation Sensitive AFLP של עצי 'ברהי' ו'מג'הול'

ערכי AGD			אחוז פסים פולימורפיים			מספר פסים פולימורפיים			מספר העצים שנבדקו	פנוטיפ	מקור ריבוי	זן
EM-EH	EH	EM	EM-EH	EH	EM	EM-EH	EH	EM				
0.33	0.86	1.73	1.72	0.60	1.11	1	2	4	6	חנטה טובה	OS	'ברהי'
0	1	1	0.00	0.30	0.28	0	1	1	2	חנטה טובה	TC (2)	'ברהי'
0	0	0.57	0.00	0.00	0.28	0	0	1	7	חנטה לקויה וריבוי שחלות	TC (1)	'ברהי'
1.4	1.79	2.66	5.17	1.51	1.95	3	5	7	15			כללי 'ברהי'
1	2	3	1.72	0.60	0.84	1	2	3	2	נורמלי	OS	'מג'הול'
0.4	0.8	1	1.72	0.60	0.56	1	2	2	5	נורמלי	TC (2)	'מג'הול'
8.13	5	10.73	32.76	3.63	6.96	19	12	25	6	עיכוב צימוח	TC (6)	'מג'הול'
10.1	7.46	14.56	60.34	7.25	13.1	35	24	47	13			כללי 'מג'הול'

EM - אנליזה של דגם הפסים המתקבל אחרי חיתוך ב-EcoRI ו-MspI
 EH - אנליזה של דגם הפסים המתקבל אחרי חיתוך ב-EcoRI ו-HpaII
 (EM-EH) - אנליזה של דגם הפרשים בין פסי EM ו-EH
 כל הפסים התקבלו ע"י שימוש בשבעה צירופים של תחלים סלקטיביים (I-VII). הדוגמאות מאופיינות לפי מקור הריבוי והפנוטיפ (ראה טבלה מס' 1).

טבלה מס' 9: ערכי FST באנליזות EM ו-EH של עצי 'ברהי' ו'מג'הול'

'מג'הול'				'ברהי'					
Total	TC (6)	TC (2)	OS	Total	TC (1)	TC (2)	OS		
	0.97	0.99	0.98		0.84	0.46	0	OS	י.ה.ט.ז.
	0.95	0.99	0.98		0.96	0	0.51	TC (2)	
	0.97	0.99	0.99		0	0.87	0.64	TC (1)	
0.95				0				Total	
	0.69	0.87	0		0.99	0.98	0.98	OS	י.ה.ט.ז.
	0.62	0	0.94		0.99	0.99	0.98	TC (2)	
	0	0.47	0.69		0.95	0.91	0.94	TC (6)	
0				0.91				Total	

הערכים התקבלו ניתוח AMOVA בעזרת תוכנת ARLEQUIN (מתחת לאלכסון - הערכים של אנליזת EM, מעל האלכסון - הערכים של אנליזת EH). הדוגמאות מאופיינות לפי מקור הריבוי והפנוטיפ (ראה טבלה מס' 1).

טבלה מס' 10: ערכי FST באנליזת (EM-EH) של עצי 'ברהי' ו'מג'הול'

'מג'הול'				'ברהי'					
Total	TC (6)	TC (2)	OS	Total	TC (1)	TC (2)	OS		
	0.86	0.99	0.99		0.93	0.68	0	OS	יטטז
	0.77	0.99	0.98		1	0		TC (2)	
	0.86	0.99	0.99		0			TC (1)	
0.81				0				Total	
	0.69	0.97	0					OS	ילוטאז
	0.34	0						TC (2)	
	0							TC (6)	
0								Total	

הערכים התקבלו ניתוח AMOVA בעזרת תוכנת ARLEQUIN. הדוגמאות מאופיינות לפי מקור הריבוי והפנוטיפ (ראה טבלה מס' 1).

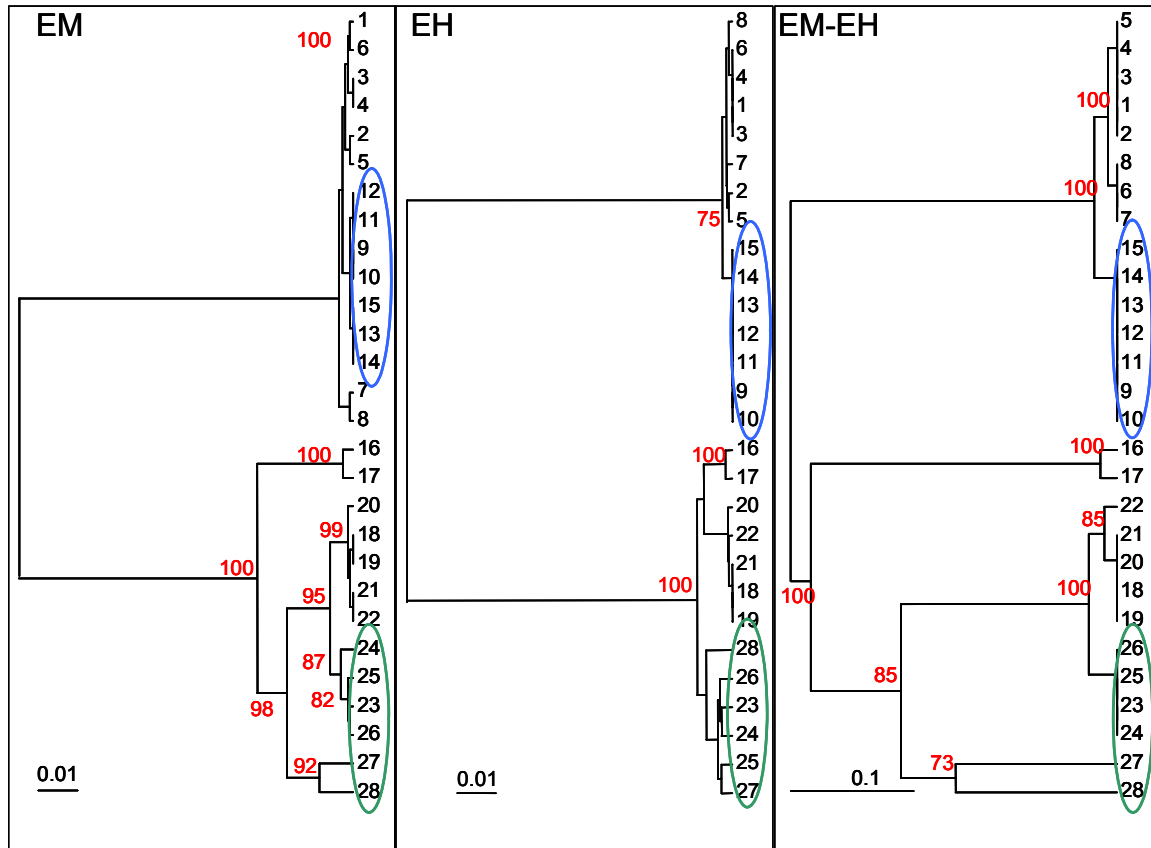
בתוך עצי 'ברהי' נמצא שעור נמוך יחסית של פסים פולימורפיים באנליזות EM, EH, ו- (EM-EH) (1.95%, 1.51% ו-5.17% בהתאמה). רוב הפסים הפולימורפיים נמצאו בחוטרים (1.11%, 0.6% ו-1.72% של פסים פולימורפיים בשלושת האנליזות הנ"ל). בתוך שאר עצי 'ברהי', אחוז הפסים הפולימורפיים בכל האנליזות היה לכל היותר מחצית מזה שנמצא בחוטרים. ערכי ה-AGD שנמצאו בחוטרים באנליזה EH היו: 0.86; 1; 0 בקבוצות OS; TC (2) ו-TC (1) בהתאמה. בשאר האנליזות, ערכי ה-AGD הגבוהים ביותר נמצאו בחוטרים.

בתוך עצי 'מג'הול' נמצא אחוז גבוה יחסית של פסים פולימורפיים באנליזות EM, EH, ו- (EM-EH) (13.1%, 7.25% ו-60.34% בהתאמה). רוב הפסים הפולימורפיים נמצאו בעצים מעוכבי הצימוח (6.96%, 3.63% ו-32.76% בשלושת האנליזות בהתאמה). בתוך קבוצות OS ו-TC (2) של 'מג'הול' נמצא אחוז נמוך יחסית של פסים פולימורפיים (לכל היתר 1.7%). ערכי FST בין כל עצי הזן 'ברהי' לכל עצי הזן 'מג'הול' היו 0.91, 0.95 ו-0.81 באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH), בהתאמה. כאשר ב'ברהי' - ערכי ה-FST הגבוהים ביותר היו בין קבוצת (1) TC לשאר הקבוצות של הזן בכל האנליזות, וב'מג'הול' ערכי ה-FST הגבוהים ביותר היו בין קבוצת OS לשאר הקבוצות של הזן בכל האנליזות (ראה טבלאות 9-10).

העצים הפילוגנטיים של 15 דוגמאות 'ברהי' ו-13 דוגמאות 'מג'הול' באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH) מוצגים באיור 10. בכל האנליזות המרחק בין הזנים היה גדול מאוד ביחס למרחקים בין העצים השייכים לאותו זן. כמו כן ההבדלים בתוך (within) עצי 'מג'הול' היו גדולים ביחס להבדלים בתוך (within) עצי 'ברהי'. ההבדל בולט במיוחד באנליזות EM ו-(EM-EH). בזן 'ברהי' ישנה הפרדה בין העצים הנורמלים לעצים המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות, אך הפרדה זו אינה מובהקת באנליזת EM (Bootstrap נמוך מ-70). בזן 'מג'הול' בכל האנליזות הייתה הפרדה בין העצים שמקורם מחוטרים (מס' 16, 17) לבין העצים שמקורם מתרביות, אך הפרדה זאת לא הייתה מובהקת באנליזת EH (Bootstrap

נמוך מ-70). ההפרדה בין העצים הנורמלים לעצים מעוכבי צימוח הייתה מובהקת (Bootstrap=100) רק באנליזה EH. בשאר האנליזות, לא נראית ההפרדה ברורה של פנוטיפים אלו.

איור 10: עצים פילוגנטיים של עצי 'ברהי' ועצי 'מג'הול' באנליזות EM, EH, ו-(EM-EH)



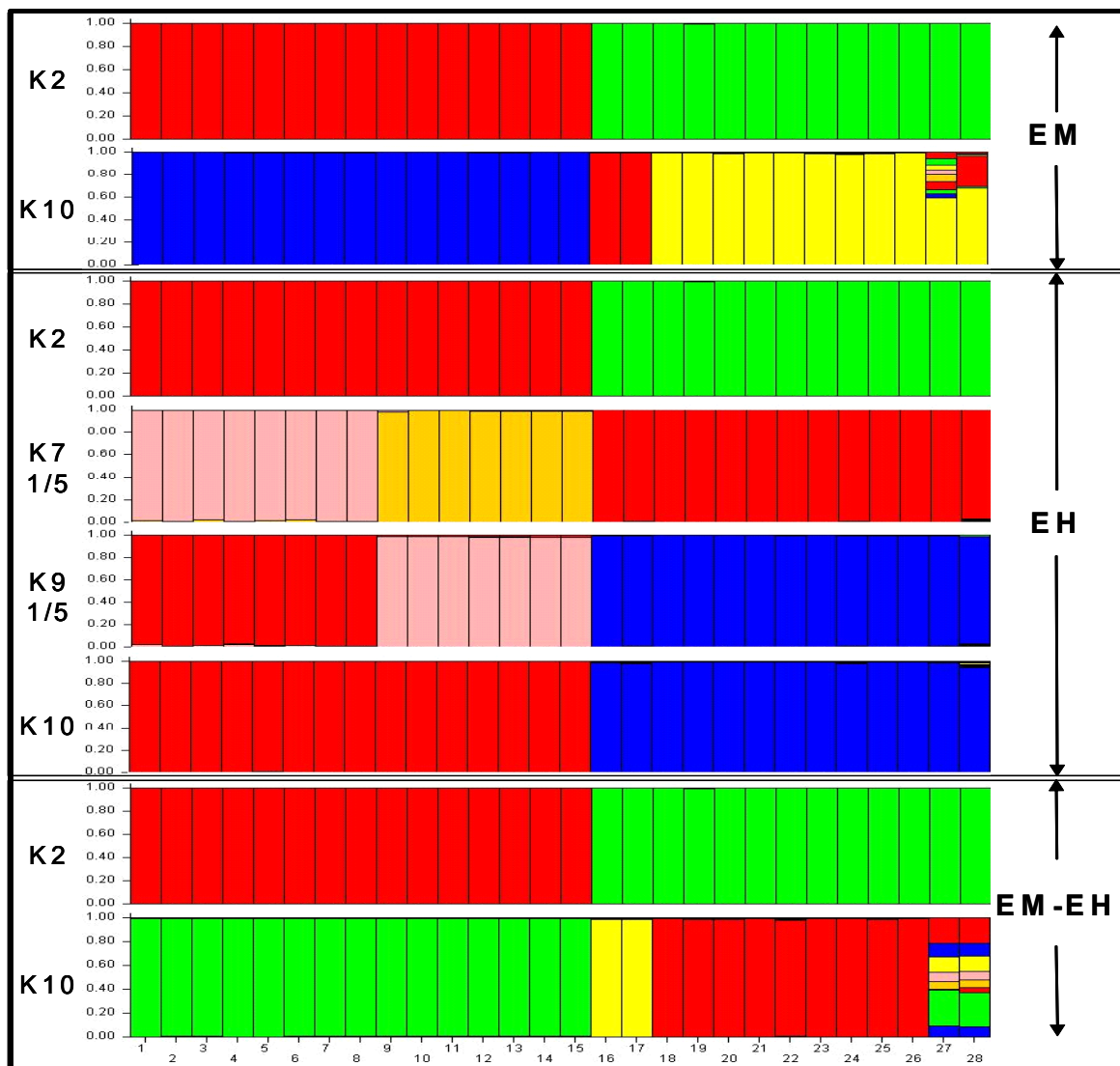
העצים נבנו בשיטת UPGMA ומבוססים על מרחקים גנטיים המחושבים ביחידות Nei. מוצגים ערכי Bootstrap (באדום) הגדולים מ-70 שחושבו בעזרת התוכנה PHYLTOOLS. המספרים הסידוריים של הפרטים השונים מפורטים בטבלה מס' 1. עצי 'ברהי' המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות תחומים בכחול, עצי 'מג'הול' המאופיינים בעיכוב צימוח תחומים בירוק.
 EM - אנליזה של דגם הפסים המתקבל אחרי חיתוך ב-EcoRI ו-MspI
 EH - אנליזה של דגם הפסים המתקבל אחרי חיתוך ב-EcoRI ו-HpaI
 (EM-EH) - אנליזה של דגם הפרשים בין פסי EM ו-EH

אנליזת 'הקיבוץ' (Clustering) של 15 עצי 'ברהי' ו-13 עצי 'מג'הול' באנליזות EM, EH ו-(EM-EH) נעשתה בעזרת תוכנת STRUCTURE ומוצגת באיור 11. מספר הקבוצות (clusters) נקבע להיות בין 2 עד 10. כל חלוקה נעשתה בחמש חזרות. בכל האנליזות, בקיבוץ לשתי קבוצות, כל העצים חולקו באופן נכון לקבוצות ייחודיות בהתאם לזן. באנליזה EH, עצי 'ברהי' ו'מג'הול' התקבצו בדרך כלל לפי הזן בחלוקות לכל מספר של קבוצות. ראוי לציין שבשני מקרים, K=7 ו-K=9, באחת מחמש החזרות עצי הזן 'ברהי'

התקבצו בהתאם לפנוטיפ (עצים מחוטרים ומתרבית רקמה (TC 2) בעלי חנטה נורמלית לעומת עצים מתרבית רקמה (TC 1) המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות (איור 11)).

באנליזות EM ו-(EM-EH) בחלוקה ליותר משתי קבוצות ($K > 2$), החוטרים של 'מג'הול' (מס' 16, 17) התכנסו לקבוצה נפרדת. עצים בעלי שונות גבוהה ממקור תרבית רקמה TC (1) מעוכבי צימוח (עצים מס' 27, 28), נמצאו אומנם שייכים בעיקר לקבוצת עצי הזן 'מג'הול' אך, במידה מסוימת, גם למספר קבוצות נוספות (בהתאם לרמת הפולימורפיזם ולמספר הקבוצות באנליזה). בשונה מכך, העצים מהזן 'ברהי' התקבצו לקבוצת הזן בלבד.

איור 11: אנליזת "קיבוץ" (Clustering) של דגם ה-Methylation Sensitive AFLP של עצי 'ברהי' ו'מג'הול'



תוצאות של אנליזות EM, EH ו-(EM-EH) (מלמעלה למטה). האנליזה בוצעה בעזרת תוכנת STRUCTURE. מוצג ה'קיבוץ' למספר שונה של קבוצות (K - מצוין את מספר הקבוצות). העמודות מייצגות את הפרטים והצבעים מייצגים את הקבוצות. מידת השייכות של כל פרט לקבוצה מתבטא בגובה היחסי של צבע הקבוצה בעמודה של הפרט. (באנליזה EH ב-K=7 וב-K=9 ה'קיבוצים' המוצגים התקבלו רק באחת מתוך חמש חזרות).

אנליזה (EM-EH) מאפשרת זיהוי של אתרים ממותלים והמי-ממותלים בגנום שמזוהים באופן יחודי על ידי האנזימים *MspI/HpaII*. מצב של המי-מתילציה הגורם להעלמות של פס בדגם EM הינו נדיר יחסית (בדקל שמן - רק 4.1% מאתרי *MspI/HpaII* המי-ממותלים (Jaligot *et al.*, 2004)). כמו כן הופעת פס נוסף בדגם EH (שמקורו בחיבור שני פרגמנטים דרך אתר שלא נחתך ע"י *HpaII*), גם הוא נדיר. החלטנו להתייחס לדגם EM כמייצג את סך כל האתרים שנסרקו. טבלה מס' 11 מציגה את מספר הפסים (סך כל האתרים) שהתקבלו באנליזת EM, מספר ואחוז האתרים הממותלים מסך כל האתרים. האחוז הממוצע של אתרים ממותלים ב'ברהי' וב'מג'הול' הוא 12.18% ו-8.37% בהתאמה. בעצי 'ברהי' בעלי פנוטיפ נורמלי, האחוז הממוצע של אתרים ממותלים גדול ב-0.9% מזה של העצים המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות (12.58% ו-11.72% בהתאמה). האחוז הממוצע של אתרים ממותלים בעצים נורמליים ועצים מעוכבי צימוח היה 8.59% ו-8.11% בהתאמה.

טבלה מס' 11: אתרים ממותלים של עצי 'ברהי' ו'מג'הול'

זן	פנוטיפ	מס"ד	סך כל פסי EM	אתרים ממותלים	אחוז אתרים ממותלים	אחוז ממוצע של אתרים ממותלים
'ברהי'	נורמלי	1	285	35	12.28	12.18
		2	285	36	12.63	
		3	284	36	12.68	
		4	284	36	12.68	
		5	286	36	12.59	
		6	286	36	12.59	
		7	286	36	12.59	
		8	285	36	12.63	
	חנטה לקויה וריבוי שחלות	9	286	34	11.89	11.72
		10	286	34	11.89	
		11	286	34	11.89	
		12	286	34	11.89	
		13	287	33	11.50	
		14	287	33	11.50	
		15	287	33	11.50	
'מג'הול'	נורמלי	16	280	21	7.50	8.37
		17	279	20	7.17	
		18	290	27	9.31	
		19	290	27	9.31	
		20	289	27	9.34	
		21	291	26	8.34	
		22	291	25	8.59	
	מעוכבי צימוח	23	291	24	8.25	8.11
		24	291	25	8.59	
		25	291	23	7.90	
		26	290	26	8.96	
		27	298	25	8.39	
		28	290	19	6.55	

מס"ד - מספר סידורי

האתרים הממותלים בכל דוגמא חושבו כסכום הפרטים בערך מוחלט של פסי EM ופסי EH בכל אתר. אחוז הפסים הממותלים חושב ביחס למספר אתרים באנליזת EM.

אנליזה (EM-EH) שנעשתה רק על פסי EM מונומורפיים (בתוך כל הפרטים הנבדקים באותו זן) של דוגמאות 'ברהי' או 'מג'הול' מאפשרת זיהוי של הבדלים בדגם המתילציה שלא מופיעים על רקע הבדלים ברצף באותו אתר. באנליזה זו ניתן לאתר מקטעי DNA בעלי אסוציאציה לפנוטיפ שקשורה לדגם המתילציה של ה-DNA ולא לרצפו.

בעצי 'ברהי' נמצאו כ-25 אתרים ממותלים (מתילציה של אתר לפחות בעץ אחד) מתוך 283 אתרים מונומורפיים של דגם ה-EM. מתוך 25 אתרים ממותלים, ב-24 לא נמצאו הבדלים בין 15 עצי 'ברהי', ואילו באתר אחד כל העצים בעלי פנוטיפ נורמלי (מחוטרים

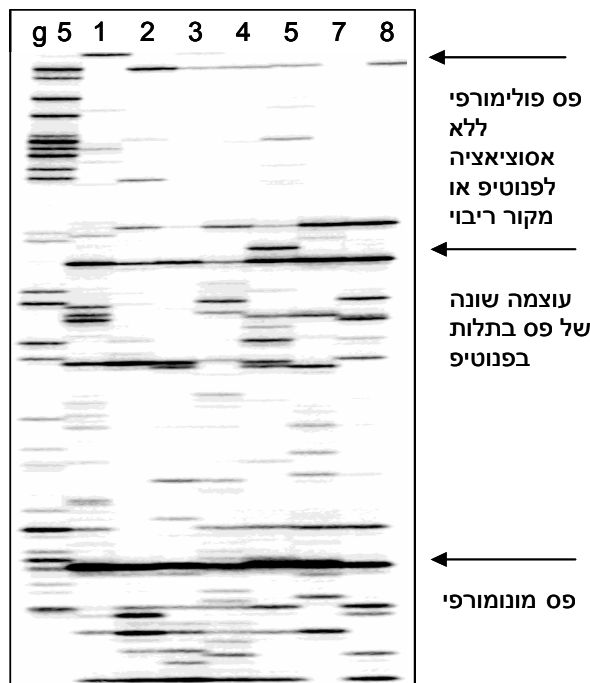
ומתרבית רקמה TC (2)) היו ממותלים, וכל העצים המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות (מתרבית רקמה (1) TC) לא היו ממותלים.

בעצי 'מג'הול' נמצאו סה"כ תשעה אתרים ממותלים מתוך 268 אתרים מונומורפיים של דגם ה-EM. מתוך תשעה אתרים ממותלים, בחמישה לא נמצאו הבדלים בין 13 עצי 'מג'הול'. באתר אחד כל העצים הנורמלים (מחוטרים ומתרבית רקמה (2) TC) היו ממותלים, וכל העצים בעלי צימוח מעוכב (מתרבית רקמה (6) TC) לא היו ממותלים. אתר אחד היה ממותל רק בעצים מחוטרים ובשני האתרים הנותרים, ההבדלים במתילציה לא היו קשורים לפנוטיפ או למקור ריבוי.

4.5 אפיון דגם ביטוי גנים בפרחים של עצי 'ברהי' מפנוטיפים שונים

ההבדלים בדגם ביטוי הגנים בפרחים נבחנו באמצעות שיטת cDNA AFLP. אופיינו שבעה עצי 'ברהי': ארבעה עצים נורמליים מחוטרים (1-4) ושלושה עצים המאופיינים בבעיות חנטה וריבוי שחלות שמקורם בתרבית רקמה (5; 7; 8) (ראה טבלה מס' 1). קטע מדגם הפסים שהתקבל באמצעות צירוף A (ראה טבלה מס' 2) מוצג באיור 12. נמצאו פסים מונומורפיים, פסים ייחודיים לפי עוצמתם לפנוטיפ (או לשיטת ריבוי) ופסים פולימורפיים ללא אסוציאציה לפנוטיפ או מקור ריבוי (ראה איור 12).

איור 12: דגם פסי AFLP של cDNA ו-DNA גנומי של עצי 'ברהי'



הדגם נוצר באמצעות צירוף A של תחלים סלקטיביים. המספרים מפורטים בטבלה מס' 1. g5 - ביקורת של DNA גנומי של עץ מס' 5. החצים מצביעים על פסים המייצגים דגמי התפלגות שונה בין הפנוטיפים והעצים השונים.

5. דיון

בעבודה הנוכחית נעשה שימוש בשיטת AFLP לצורך אומדן של שונות גנטית ברמת הרצף, שונות בדגם המתילציה של DNA ושונות בדגם הביטוי של גנים בעצי תמר שרובו באמצעות חוטרים או באמצעות תרביות רקמה. השונות הגנטית ברמת הרצף נבדקה במספר רמות: בין זנים שונים או עצי זכר שונים, בין עצים בעלי פנוטיפים שונים מאותו זן ממקורות ריבוי שונים, ובין רקמות שונות של אותו עץ. השונות בדגם המתילציה נבדקה בעזרת Methylation Sensitive AFLP. הבדיקה נעשתה לעצי 'ברהי' ו'מג'הול' וכללה עצים נורמליים שמקורם מחוטרים ומתרביות רקמה ועצים בעלי פנוטיפים החריגים הנפוצים ביותר שמקורם בתרביות רקמה: עיכוב צימוח ב'מג'הול', וחנטה לקויה וריבוי שחלות ב'ברהי'. פנוטיפים חריגים אלו קיימים בקרב אלפי שתילים בארץ ובמספרים גדולים הרבה יותר בעולם (Cohen *et al.*, 2004), ויכולים לשמש כמודל לתהליכי יצירת השונות בתרבית הרקמה. הבדלים בדגם ביטוי גנים נבדקו באמצעות אנליזת cDNA AFLP שיושמה רק בהקף ראשוני במספר עצים מהזן 'ברהי' בעלי פנוטיפ נורמלי שרובו מחוטרים ועצים בעלי חנטה לקויה וריבוי שחלות אשר רובו בתרבית רקמה.

באמצעות סמני AFLP ניתן לזהות פולימורפיזם באתרים רבים. יחד עם זאת, ראוי לציין שהעדר פולימורפיזם אינו מצביע על זהות גנטית. בשיטות השונות לבחינת השונות הגנטית, ובכלל זה ב-AFLP, לא נבדק כל הגנום אלא רק "חלון" מצומצם ממנו. ככל שייבדק חלק גדול יותר בגנום, אומדן השונות הגנטית יהיה מדויק יותר (עד לריצוף מלא של הדוגמאות הנבדקות). בנוסף, ראוי להדגיש כי בשימוש ב-AFLP, כמו בכל השיטות האחרות המבוססות על PCR, קיימת אפשרות של הגברה לא ייחודית של קטעי DNA שמקורם בזיהומים שונים. על כן, חשוב לבצע חזרות ובקורות מתאימות, ולהתייחס לתוצאות המתקבלות בזהירות המתאימה.

באופן כללי, השימוש בשיטת AFLP בצמחים יכול לסייע בהערכת שונות גנטית בין או בתוך אוכלוסיות שונות, באומדן יחסים פילוגנטיים בין פרטים או אוכלוסיות. בנוסף ניתן לנצל את השיטה בתוכניות טיפוח שונות על ידי בחירת הורים בעלי פוטנציאל גבוה לאון מכלוא או לביצוע סלקציה על בסיס האפיון הגנוטיפי (Saunders *et al.*, 2001).

5.1 הערכת שונות גנטית

5.1.1 אומדן השונות הגנטית ברמת הרצף בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול' ובין עצי זכר משבטים שונים

באנליזה של השונות הגנטית בעצי תמר מהזנים 'ברהי' ו'מג'הול' נמצאה רמה גבוהה של פולימורפיזם (58.7% של פסים פולימורפיים, $AGD=41.7$). רוב השונות שנמצאה נבעה מהשונות שבין שני הזנים ($FST=0.9$). תוצאות אלו נתמכות בעבודות אחרות, המצביעות על

המרחק הגנטי הגדול בין שני זנים אלו (Cao and Chao, 2002; Sedra *et al.*, 1998). בעבודות הנ"ל כל זן היה מיוצג על ידי עץ בודד. למרות הריבוי הוגסטיבי של תמרים קימת שונות גנטית בין עצים השייכים לאותו זן (Corniquel and Mercier, 1994; Devanand and Chao, 2003; Gurevich *et al.*, 2004). יתכן ששונות גנטית בין העצים שנבדקו אינה מייצגת באופן מובהק את השונות האמיתית בין הזנים. חוסר מובהקות זה מתבטא באי התאמה של המרחקים הגנטיים בין זנים שנבדקו בשתי העבודות ויתכן שנובע גם ממספר נמוך ולא מייצג של סמנים (56 סמני RAPD בעבודה של Sedra וחבריו (1998)).

יתכן שהשונות הגנטית הגבוהה בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול' נובעת מהמרחק הגיאוגרפי בין אזורי מוצאם ('ברהי' הינו זן עיראקי, ומקורו של הזן 'מג'הול' במרוקו). אם כי, השערה זאת אינה נתמכת בתוצאות של עבודות אחרות, אשר מראות כי המרחקים הגנטיים בין זנים מאותו מוצא גיאוגרפי אינם נמוכים ביחס למרחקים בין זנים ממוצאים גיאוגרפיים מרוחקים שנבדקו, אינם מייצגים בצורה מובהקת את השונות הגנטית בין זנים ממקורות גיאוגרפיים משותפים או מרוחקים. אפשרות אחרת היא שרמת הבידוד הגיאוגרפי בין נאות המדבר השונות בארצות המוצא - דומה לרמת הבידוד בין איזורים גיאוגרפיים רחוקים. מכיוון שכל זן זוהה וצמח בנאת מדבר מבודדת, גם זנים מנאות מדבר בארצות קרובות התפתחו למעשה בבידוד זה מזה, ולכן הפכו שונים גנטית זה מזה.

רמה גבוהה של שונות גנטית ברמת הרצף נמצאה גם בין עצי זכר משבטים שונים (73.7% של פסים פולימורפיים, AGD=52.0). רמה זו של שונות גנטית דומה לזאת שנמצאה בין זני נקבה שונים (Sedra *et al.*, 2000; Mokhtar *et al.*, 2003; Al-Khalifah *et al.*, 1998). מקורם של רוב העצים הזכריים, כמו גם מקורם של הזנים השונים, מזרעים ולכן לכל פרט יש גנוטיפ שונה. זאת הסיבה לכך שחלקות הזכרים מתאפיינות בשונות פנוטיפית רבה בין הפרטים השונים.

ניתן לנצל את השונות הגנטית שבין הזנים ובין עצי זכר שונים בתוכניות טיפוח לשיפור היבול ואיכות הפרי. יש לציין שבתמר אופיינו מספר פנוטיפים של זכרים המצטיינים בהשפעתם החיובית על תכונות הפרי (Nixon, 1934). התופעה של השפעת המטען הגנטי של זכר על תכונות הפרי נקראת מטקסניה (Denney, 1992). בעתיד יתכן שניתן יהיה להיעזר בסמני DNA לבחירה וריבוי של עצי זכר מצטיינים.

5.1.2 שונות גנטית בין עצים מאותו זן שרובו מחוטרים

שונות גנטית נמוכה יחסית נמצאה בין עצים מאותו זן (או שבט זכרי) שרובו באמצעות חוטרים. זהו ממצא לא צפוי שכן העצים רובו וגסטיבית באמצעות חוטרים, שיטה שנחשבת אמינה בשימור הגנוטיפ והתכונות של הזן. אולם, שונות גנטית בין עצים שרובו באמצעות חוטרים השייכים לאותו זן נמצאה גם בעבודות קודמות: בתוך הזנים 'מג'הול', 'דקל נור'

ו'ברהי' בשיטות של RAPD ו-RFLP (Corniquel and Mercier, 1994), ובתוך הזנים 'דקל נור' ו'מג'הול' בשיטת AFLP (Devanand and Chao, 2003). יש לזכור שעצים אלה רובם באופן גנטיבי במשך אלפי שנים בנאות מדבר מבודדות ובמהלכן, יתכן שנצברו מוטציות. לחילופין, שונות גנטית יכולה לנבוע מעצים שמקורם מזריעים שנבטו קרוב לגזע עץ האם שזוהו בטעות כחוטרי קרקע (תופעה נפוצה בריבוי באמצעות חוטרים) או בעצים בעלי פנוטיפים דומים ששויכו בטעות לאותו הזן.

באנליזה של חוטרי 'ברהי' נמצאה רמה נמוכה מאוד של פולימורפיזם. שתי דוגמאות (מס'ד 1 ו-2 טבלה מס' 1) היו בעלי דגמי פסים שונים מדגמי יתר העצים שנבחנו, ואופינו ברמת פולימורפיזם גבוהה יחסית (15.77% של פסים פולימורפיים, $AGD=11.88$) בתוך חוטרי 'ברהי' הכוללים עצים אלה). בניית השונות הגנטית ללא העצים החריגים האלה נמצא שרק 0.63% ($AGD=0.78$) מהפסים היו פולימורפים. ההערכה הפנוטיפית של עצים חריגים אלה מוגבלת בשל גילם הצעיר. מכיוון שלדוגמאות מס' 1 ו-2 יש הרבה פסים האופייניים לזן 'ברהי' ובין שני עצים אלה קיימת שונות רבה יחסית, בעוד ששאר החוטרים של 'ברהי' מראים דמיון כללי רב, קיימת אפשרות ששני עצים אלו אינם חוטרים, אלא זריעים של 'ברהי' שנבטו קרוב לגזע עץ האם ונשתלו בטעות כחוטרי קרקע. לחילופין יש להניח היווצרות מוטציות רבות במהלך היצירה וההתפתחות של חוטרים אלה. איננו יכולים גם לשלול באופן מוחלט קיומה של טעות באנליזה, על אף שהבדיקה נעשתה במספר חזרות.

בעצי 'מג'הול' שמקורם בחוטרים נמצאה שונות גנטית נמוכה מאוד (0.94% של פסים פולימורפיים, $AGD=0.75$). תוצאה זאת שונה מהרמה הגבוהה של פולימורפיזם בין חוטרי 'מג'הול' שנמצאה בארה"ב (39% פסים פולימורפיים ב'מג'הול' לעומת 3% בלבד ב'דקל נור') (Devanand and Chao, 2003). מקורו של הזן 'מג'הול' בארה"ב בתשעה חוטרים שנלקחו מעץ אחד והובאו ממרוקו ב-1927 (Swingle, 1945). מקור כל חוטרי עצי הזן 'מג'הול' בארץ הינו מאלפי חוטרים שהובאו לארץ מאמריקה (ברנשטין, 2004). לכן ההבדל בין תוצאות שני המחקרים בולט עוד יותר. Devanand וחבריו סבורים שקיימים מספר קווים גנטיים של 'מג'הול' במרוקו. לדעתנו, זה לא מסביר בצורה מספקת את השונות הגנטית הרבה שנמצאה בזן זה בקליפורניה, שכן אם הסבר זה נכון, אזי היו קיימים בארה"ב לכל היותר תשעה קווים גנטיים של 'מג'הול'. יתכן שבין העצים שנבדקו על ידי Devanand וחבריו היו עצים דומים פנוטיפית למג'הול, מזנים קרובים, או זריעים, אך שונים ממנו מבחינה גנטית. כנראה שבחומר שהובא ארצה, היתה הקפדה יתרה על מקור החוטרים, ולכן נמצאה בארץ שונות גנטית נמוכה בין עצי הזן 'מג'הול'. לחילופין, יש להניח שלזן 'מג'הול' רגישות לתנאי סביבה מסוימים שהיו בקליפורניה לאחר שנות השבעים, ואשר לא היו בארץ. שינויים אלה התבטאו בצבירה מהירה של שונות גנטית (למשל על ידי הפעלת מערכת טרנספוזונים). אפשרות שלישית להסברת ההבדלים בין התוצאות שלנו לתוצאות של Devanand וחבריו יכול להיות טמונה בשימוש בתחלים סלקטיביים שונים בשתי העבודות. בנוסף, הגדלת מספר העצים

במדגם (10 עצים בעבודה שלנו לעמת 23 עצים אצל Devanand), עשוי להגדיל את מספר הפסים הפולימורפיים מבלי לשנות את השונות הכללית במדגם (ממוצע הפסים הפולימורפיים בין כל זוג פרטים באוכלוסייה - ערך AGD). דבר זה אינו מסביר את ההבדל הגדול בין תוצאות שתי העבודות, אך מצביע על מוגבלות בהשוואת השונות בתוך אוכלוסיות בעזרת אחוז פסים פולימורפיים ולא בעזרת ערך AGD שלצערנו לא חושב בעבודה של Devanand ובהעדר נתונים אין לנו אפשרות לבצע חישוב זה. אין ספק שאנליזה של מדגמים רחבים יותר המייצגים בצורה טובה יותר את השונות בתוך הזן 'מג'הול' שרובה מחוטרים ואשר תתבסס על ערכי AGD, תאפשר השוואת תוצאות אמינה יותר. יתכן גם שהשוואה כזאת תצביע על דמיון בין הממצאים.

יתכן ששונות גנטית בין עצים מחוטרים ממקור משותף נובעת כתוצאה מהיווצרות מוטציות במהלך ריבוי וגטטיבי והצטברותן מדור לדור. השערה זאת נתמכת בפולימורפיזם שנמצא בין עצי חוטרים שמקורם באותו עץ אב (טבלה מס' 7, זוגות M32-M33 ו-M28-M29). תופעה זו מצביעה על מוטציות שמתרחשות במהלך דור אחד של ריבוי וגטטיבי. ברור שאם תוך דור אחד מתקבלת רמת שונות של עד 0.85% של פסים פולימורפיים, במשך אלפי שנים השונות יכולה להצטבר למימדים נרחבים. למיטב ידיעתנו, לא נבחנה עד כה השונות הגנטית הנוצרת במהלך דור אחד של עצי תמר.

ראוי לציין זוג עצי זכר שרובו בחוטרים (M2-M3). למרות שאין בידינו מידע לגבי המקור המשותף של זוג זה, הדמיון הגנטי הרב שנמצא ביניהם (הדומה ברמתו לזה שנמצא בין זוגות הידועים כאחים) תומך באפשרות שהם 'בנים' של אותו עץ "אב". מקרה זה משמש כדוגמה לזיהוי של קרבה בין פרטים בשיטת AFLP – נושא שיכול להיות חשוב בפרקטיקה החקלאית.

5.1.3 שונות גנטית בין עצים שרובו בתרבויות רקמה

נבחנו עצים שרובו באמצעות תרבויות רקמה בשבע מעבדות מסחריות בארצות שונות. בנוסף, נבחנו מספר עצים בעלי פנוטיפים חריגים נפוצים. נמצא עץ אחד מזן 'מג'הול' בעל דגם פסים ופנוטיפ חריגים מאוד (מס"ד 47). עץ זה מייצר חוטרים בגובה רב על גבי הגזע במקום שבו היו צריכות להיווצר תפרחות. בנוסף, צורת ההוצים (העלעלים) שלו שונה מזאת של העצים הרגילים בני אותו זן. בין יתר העצים, לא נמצא פולימורפיזם גנטי האופייני לאופן הריבוי (חוטרים או תרבויות רקמה). הדוגמאות השונות לא התכנסו לקבוצות (בעצים הפילוגנטיים ובתוכנת STRUCTURE) בהתאם למקור הריבוי או בהתאם לפנוטיפ הייחודי. סביר להניח שקיימים אתרים מסוימים ששינויים גנטיים בהם קשורים לפנוטיפים הייחודיים ואיתורם כרוך בסקירה רחבה יותר. לחילופין ישנה אפשרות שלפנוטיפים אלה אופי אפיגנטי (ראה סעיף 5.2).

רמה נמוכה יחסית של פולימורפיזם נמצאה בין עצי 'ברהי' שרובו בתרבויות רקמה (מתוך 317 פסים, שניים היו פולימורפיים בין פרטים של זן 'ברהי' ממקור (1) TC ופס פולימורפי אחד היה בין עצים שמקורם (2) TC). לעומת זאת, בין עצי 'מג'הול' שרובו בתרבויות רקמה נמצאה רמת פולימורפיזם גבוהה יותר (עד 68 פסים פולימורפיים) ביחס לזו שנמצאה ב'ברהי' (מחוטרים או תרבויות) או בדוגמאות של 'מג'הול' מחוטרים. רוב העצים בעלי פולימורפיזם גבוה יוצרו במעבדה אחת - (2) TC (8.5% של פסים פולימורפיים, AGD=9.32 בעצים בעלי פנוטיפ נורמלי), אך גם בעצי 'מג'הול' משאר המעבדות המסחריות נמצאה רמת פולימורפיזם גבוהה יחסית לעצי החוטרים או לעצי הזן 'ברהי' (מחוטרים או מתרבויות רקמה). אנו מעריכים (ראה גם הסעיף הבא), שהמוטציות שגרמו לשונות סומקלונלית זאת, התרחשו תוך כדי תהליך הריבוי במעבדה. Saker וחבריו (2000), שגם בעבודתם נמצאה שונות גנטית בין שתילי תמר מתרבות רקמה, מצביעים על השפעת גיל התרבות והתנאים בה על יצירת השונות. המנגנון ליצירת שונות סומקלונלית לא ברור מספיק. ידוע על מוטציות נקודתיות, חסרים כרומוזומאליים, טרנסלוקציות ושינויים בפלואידיות שקשורים לשונות סומקלונלית (D' Amato, 1991; Evans and Sharp, 1986; Kaeppler *et al.*, 2000). מוטציות יכולות להתרחש בעקבות הפעלת מנגנונים שונים כתוצאה מחשיפת הרקמה לתנאי "עקה" בתרבות. ידוע, למשל, שבתנאים אלה עשויות להיות מופעלות מערכות של טרנספוזונים ורטרוטרנספוזונים (Kaeppler *et al.*, 2000). רמת השונות הסומקלונלית מושפעת מסוג התרבות וגילה, שימוש בחומרים מוטגנים ולחצי סלקציה המופעלים על הרקמה כגון רמת המלחים והרביצידיים (Skirvin, 1978). קיימים דיווחים על שונות גנטית הנוצרת כתוצאה מריבוי בתרבויות רקמה גם בגידולים רבים אחרים, ביניהם בננה (Hwang and Ko, 1986; Sahijram *et al.*, 2003) ועגבניה (Soniya *et al.*, 2001). השונות הסומקלונלית מופיעה גם בתרבויות ממקור אנימלי (Skirvin *et al.*, 1994). התוצאות שלנו, כמו גם רמת הפולימורפיזם הגבוהה בין עצי 'מג'הול' שרובו בחוטרים בארה"ב (Devanand and Chao, 2003) מצביעות על אפשרות של רגישות מיוחדת בזן 'מג'הול' (שמתבטאת בשינויים גנטיים) לתנאי סביבה (כמו אולי תנאי "עקה" במטע) או אולי למרכיבים מסוימים במצע התרבות. השערה זאת נתמכת בקיום של שונות גנטית בין רקמות שונות של אותו עץ שרובה באמצעות תרבות רקמה (ראה סעיף הבא). הבדלים ברגישות לתנאי תרבות בין זנים נצפו גם במערכות נוספות. למשל Hwang וחברו (1986) דיווחו על רמה ממוצעת של שונות סומקלונלית של 3% בזני בננה שונים, כאשר רמתה בזן 'Cavendish' היתה מעל 20%. במקרה שלנו, לא ידוע אם שתילי 'ברהי' ו'מג'הול' מרובים באותם תנאי תרבות רקמה ולכן המסקנה לגבי רגישות שונה של הזנים לתנאי תרבות צריכה להתקבל בזהירות ראויה. יחד עם זאת נראה שלזן 'מג'הול' התאמה פחותה לתנאים בהם הוא מרובה ויתכן שניתן לפתור זאת על ידי שינויים מתאימים בפרוטוקולים של תרבות רקמה.

5.1.4 שונות גנטית ברמת עץ בודד

בחינת השונות הגנטית ברמת העץ הבודד, איפשרה הבנה מעמיקה יותר של תהליכי היצירה של מוטציות בתמר. בחרנו לאנליזה זאת עצי 'מג'הול' שרובו באמצעות תרבויות רקמה, בעלי ואריגציות נראות. נבחנו הבדלים בין רקמות עלה מעטות (או חסרות) כלורופיל (צהובות), רקמות נורמליות (ירוקות) ודוגמאות שורש. נמצא פולימורפיזם בדגם הפסים בין הרקמות הצהובות (חסרות הכלורופיל), לרקמות הירוקות (נורמליות) ובין רקמות העלים לשורשים בשני העצים. בנוסף, נמצאו פסים פולימורפיים המבדילים בין שני העצים ברקמות הצהובות והירוקות. ואריגציה יכולה להופיע כתוצאה ממוטציות שונות בגנים הפוטוסינתטיים או בגנים המבקרים את התארגנות הכלורופלסטים (Seth et al., 1999). תוצאות אלו מצביעות על כך שבעצים אלה, כנראה, לא התרחש אירוע בודד של מוטציה המתבטא בוואריגציה, אלא חלו, במהלך הגידול בתרבית, מספר מוטציות. מוטציות אלה מתגלות באיברי הצמח השונים, בהתאם לעיתוי התרחשותם. לחילופין, בשלב מסוים בתרבית חלו מוטציות רבות, ונוצר עובר כימרי למספר מוטציות. באיברים השונים מתבטאות מוטציות אלה באקראי בהתאם לרקמה הראשונית ממנה הם נוצרו.

5.2 הערכת שונות אפיגנטית הנובעת משינויים בדגמי המתילציה

5.2.1 משמעות האנליזות EM, EH ו-(EM-EH)

דגם הפסים שהתקבל ב-Methylation Sensitive AFLP נבחן בשלוש אנליזות שונות: EM, EH ו-(EM-EH). אנליזות EM ו-EH מבוססות על דגמי פסים שנוצרו באמצעות השימוש באנזימי חיתוך *EcoRI+MspI* ו-*EcoRI+HpaII* בהתאמה ואנליזת (EM-EH) מבוססת על הפרשים בין פסי EM ופסי EH לכל דוגמא בכל אתר (ראה סעיף 3.8). באנליזות EM ו-EH, השונות בין הפרטים יכולה לנבוע מהבדלים ברצף הבסיסים או מהבדלים בדגם המתילציה. הפרדת שני מקורות השונות הנ"ל והערכת השונות בדגמי המתילציה מתאפשרת באנליזת (EM-EH), בה כתוצאה מהשוואת פסי EM ופסי EH בכל פרט מתקבל דגם חדש המצביע על האתרים הממותלים או ההמי-ממותלים (טבלה מס' 3). חשוב לציין שאומנם ההבדלים באתר מסוים בין פרטים באנליזת (EM-EH) מצביעים על שונות בדגמי המתילציה, אולם אותה שונות יכולה לנבוע גם כתוצאה מהבדלים גנטיים אחרים באותו האתר (למשל נוכחות של אתר ממותל בפרט אחד והיעדר כללי של אתר בפרט אחר). דבר זה מקשה באיתור אסוציאציה בין דגם המתילציה לפנוטיפ מסוים, ויש לבצע את האנליזה רק על אתרים מונומורפיים מבחינת הרצף.

5.2.2 שונות גנטית ואפיגנטית בין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול'

בניתוחים השונים (EM, EH ו-EM-EH) נמצאה רמה גבוהה של פולימורפיזם הן לפי ערכי FST (טבלאות מס' 9-10), הן בעצים הפילוגנטיים (איור 10) והן בשימוש בתוכנת STRUCTURE (איור 11). רוב השונות שנמצאה נבעה מהשונות שבין הזנים 'ברהי' ו'מג'הול'. שיעור מתילציה נמוך יחסית נמצא בעצי 'מג'הול' בהשוואה לעצי 'ברהי' (טבלה מס' 11). תוצאות אלה מצביעות על הבדלים בדפוסי המתילציה בין שני הזנים. שונות בדגמי מתילציה בין זנים נצפתה גם במערכות אחרות. למשל, בצמחי ארבידופסיס דגמי המתילציה היו שמורים מאוד בתוך זנים ואקוטיפים אך שונים מאוד ביניהם (Cervera *et al.*, 2002). בדקל שמן, שבו מקורם של השבטים השונים של עצים הוא מריבוי מיני, דגמי המתילציה היו שונים בין שבטים שונים ושמורים יחסית בתוך השבטים (Jaligot *et al.*, 2004; Jaligot *et al.*, 2001; Mathes *et al.*, 2001; Jaligot *et al.*, 2000; *al.*, 2002). ידוע על שינויים בדגמי המתילציה המתרחשים בזמן הריבוי והתפתחות הרקמות של העץ (Finnegan *et al.*, 1998). יחד עם זאת, ברמת הזן, שימור דגם המתילציה ברקמה מסוימת במהלך הריבוי מדור לדור, מצביע על כך שקיים מידע לפיו מתילציה נעשית באופן ייחודי לרקמה ולשלב ההתפתחותי. המנגנון האחראי לכך אינו ברור די צורכו (Richards, 1997). ידוע שביונקים חלה ירידה חדה במתילציה בזמן ההפריה, ותוך כדי התפתחות העובר יש עליה בשיעור המתילציה באופן ייחודי לרקמות המתפתחות (Richards, 1997). ככל הנראה המידע להתאמת דגם המתילציה לרקמה ולשלב התפתחותי טמון ברקע הגנטי ובביטוי הגנים הייחודיים (Jaligot *et al.*, 2004).

5.2.3 שונות גנטית ואפיגנטית בין פרטים ממקורות ריבוי ופנוטיפים שונים

הפנוטיפים שאופיינו בניסוי זה הנם חנטה לקויה וריבוי שחלות ב'ברהי' ועיכוב צימוח ב'מג'הול'. פנוטיפים אלו מתגלים בעצים שרובו בתרביות רקמה (בארץ קיימים אלפי שתילים). השונות בתוך עצי 'ברהי' ו'מג'הול' בהתאם למקור הריבוי ולפנוטיפ בכל זן נמדדה כאחוז האתרים הפולימורפים וערכי AGD (ראה טבלה מס' 8). בין כל עצי הזן 'ברהי' נמצאה שונות נמוכה יחסית, ללא הבדלים משמעותיים ברמת השונות בין הקבוצות. בתוך קבוצות עצי הזן 'מג'הול' בעלי פנוטיפ נורמלי (הן מחוטרים והן מתרביות רקמה), רמת שונות הייתה נמוכה ודומה לזאת שנמצאה בעצי 'ברהי'. לעומת זאת, בתוך קבוצת עצי 'מג'הול' שמקורם מתרבית רקמה המאופיינים בעיכוב צימוח, נמצאה שונות גבוהה יחסית בכל האנליזות. ממצא זה נתמך גם בניתוח של עצים פילוגנטיים (איור 10). על סמך תוצאות אנליזת (EM-EH) (AGD=8.13) ניתן לקבוע שבין העצים מעוכבי הצימוח בזן 'מג'הול', יש שונות רבה בדגם המתילציה בהשוואה לעצים אחרים משני הזנים. יש לציין שלא ניתן להעריך במדויק את השונות הגנטית ברמת הרצף, כיוון שבכל האנליזות נמצא גם מרכיב של שונות בדגם המתילציה. סביר להניח (על סמך שונות גנטית גבוהה שנמצאה בין עצי 'מג'הול')

מתרבויות רקמה (סעיף 4.1.2), שהשונות הגבוהה שהתקבלה באנליזות EM (AGD=10.73) ו-EH (AGD=5) בעצי 'מג'הול' מעוכבי צימוח, מכילה מרכיב ניכר של שונות גנטית ברמת הרצף. אולם, תוצאות אלה מצביעות גם על האפשרות שבמהלך הריבוי של הזן 'מג'הול' בתרבויות רקמה, מצטברת שונות בדגם המתילציה (בנוסף לשונות ברצף הבסיסים). באופן עקרוני ניתן לראות התאמה מסוימת בין שיעור רמת השונות הגנטית ברמת הרצף והשונות בדגם המתילציה. בשתי הרמות נמצאה שונות גבוהה בין עצי 'מג'הול' שרובו בתרבויות רקמה בהשוואה לעצים שרובו מחוטרים ולעצי 'ברהי' משתי שיטות הריבוי. לקשר בין שונות ברצף לשונות במתילציה שנמצא בעצי 'מג'הול' מתרבויות רקמה ישנם מספר הסברים: האפשרות הראשונה היא שמוטציות ברצפים מסוימים (כגון אלה המבקרים מערכות של מתילטרנספראזות שונות), גורמים לשיבושים במתילציה של DNA ולכן לשונות בדגמיה. האפשרות השנייה היא ששינוי במתילציה יכול לגרום להפעלת מערכות האחראיות לשינויים גנטיים. Kaepler וחבריו (2000) מציעים שירידה כללית במתילציה מעלה את רמת הפעילות של מערכות טרנספוזונים. הצעה זו מתקשרת לממצא שלנו לפיו יש ירידה כללית במתילציה בעצי off-type מתרבות רקמה (ראה הפסקה הבאה). יתכן שתנאי תרבות רקמה משנים באופן ישיר הן את דגם המתילציה של ה-DNA והן את רצף הבסיסים ואלה משפיעים אחד על השני ועל הפנוטיפ.

קיומו של דגם מתילציה המאפיין פנוטיפים ושיטות ריבוי (חוטרים לעומת תרבויות רקמה) נבחן במספר ניתוחים: סקירת מטריצה בינארית, בנית עצים פילוגנטיים ואנליזה בתוכנת STRUCTURE. בסקירת מטריצה בינארית של אנליזת (EM-EH), נמצא כי בתוך כל זן העצים בעלי הפנוטיפ הנורמלי, ממותלים יותר מהעצים החריגים (ראה טבלה מס' 11). עצי 'ברהי' המאופיינים בחנטה לקויה וריבוי שחלות, נמצאו ממותלים פחות מהעצים הנורמליים בכ-0.86%. ירידה בשיעור המתילציה נצפתה גם במערכות דומות נוספות. בדקל שמן בעל הפנוטיפ 'Mantled' שמקורו בתרבות רקמה נמצאה ירידה של 0.5-2.5% בשיעור המתילציה ביחס לעצים הנורמליים על פי בדיקה ב-HPLC (Jaligot et al., 2000). יש לציין את הדמיון בין תופעת החנטה הלקויה וריבוי השחלות ב'ברהי' שמקורו בתרבויות רקמה לפנוטיפ 'Mantled' בדקל שמן, שגם הוא נוצר בתרבות רקמה, ונחקר באופן נרחב. בשני המקרים לא נמצאה שונות ברצף ה-DNA באסוציאציה לתופעה (Gurevich et al., 2004; Rival et al., 1998a), כמו כן בשני המקרים חל שיפור בחנטת העצים והיתה העלמות של השחלות הנוספות במהלך השנים תוך התבגרות העץ (Cohen et al., 2004; Rival et al., 1998b). ממצאים אלו תומכים באפשרות שהפנוטיפ החריג ב'ברהי' קשור לשינויים בדגם המתילציה של ה-DNA.

תופעה נוספת של ירידה בשיעור המתילציה שקשורה לפנוטיפ זוהתה בארבידופסיס. נמצא ששינויים בגן "Superman" (Sup) המביאים לפנוטיפ של ריבוי אבקנים ושחלות קשורים לרמת המתילציה של ה-DNA. נמצא שבצמחים טרנסגניים בהם יש ירידה ברמת

המתילציה הכללית עולה דווקא רמת המתילציה הספציפית לגן Sup ועליה זו מביאה לתופעה של יצירת איברים נוספים דמויי אבקנים או שחלות (Jacobsen and Meyerowitz, 1997). בהתבסס על מקרה זה, הירידה במתילציה בעצים בעלי פנוטיפים חריגים שנמצאה בעבודה זאת, יכולה להיות קשורה לעליה במתילציה בגנים ייחודיים שמביאה לפנוטיפים המתוארים. ניתן להסביר זאת בכך, שמתילטרנספראזות האחראיות למתילציה ייחודית של אותם גנים, מופעלות כאשר ישנה ירידה כללית במתילציה של הגנום. עם זאת, יש לציין שבעבודה שלנו המבוססת על AFLP, נבחנה המתילציה רק בחלק קטן מהאתרים (המתאימים לחלון מסויים של אתרי *MspI/HpaII*) ואיננו יודעים אם היא מייצגת את כלל המתילציה בגנום של הפרטים הנבדקים. לכן, לצורך הסקת מסקנות ברורות דרושה אנליזה רחבה הרבה יותר.

בעצים הפילוגנטיים של 'ברהי' קימת הסתעפות ייחודית לפי הפנוטיפ (עצים נורמלים לעומת עצים בעלי חנטה לקויה וריבוי שחלות) שנתמכת באופן מוגבל מאוד בניתוח STRUCTURE (באנליזת EH בלבד, רק במספר חזרות בודד - איור 11). יתכן שהסתעפות זאת מייצגת סמנים ייחודיים לפנוטיפ הקשורים לדגם המתילציה (על סמך אנליזת (EM-EH)) ו/או לרצף ה-DNA (על סמך אנליזות EM ו-EH), אולם קביעה זו דורשת בדיקה מעמיקה יותר הכרוכה בהגדלה משמעותית של מספר העצים ושל מספר האתרים הנסרקים. בהמשך העבודה ניתן יהיה לרצף את הפסים הייחודיים לפנוטיפ, ולהשוותם למאגרי המידע הגנטיים (שימוש בתוכנת BLAST), לצורך איתור גנים היוצרים או מבקרים את הפנוטיפ הנתון.

בעצים הפילוגנטיים של 'מג'הול' נמצאה הסתעפות ייחודית לשיטת הריבוי (חוטרים לעומת תרביות רקמה) שנתמכת בניתוח STRUCTURE באנליזות EM ו-(EM-EH). הסתעפות ייחודית לפנוטיפ (נורמלי לעומת מעוכבי צימוח) נצפתה רק בעץ פילוגנטי המבוסס על אנליזת EH. בניתוח על בסיס תוכנת STRUCTURE לא היה אימות להסתעפות זאת. כאמור לעיל, גם ב'מג'הול' יתכן שיש קשר בין הפנוטיפ או שיטת הריבוי לדגם המתילציה ויתכן גם לרצף ה-DNA.

בסקירת אתרים בדגם (EM-EH) אשר נמצאו להיות מונומורפיים מבחינת הרצף (לפי דגם EM), גם ב'ברהי' וגם ב'מג'הול' נמצא אתר אחד המצוי באסוציאציה לפנוטיפים הנבחנים. במג'הול נמצא גם אתר אחד באסוציאציה לשיטת ריבוי (חוטרים לעומת תרביות רקמה). אתרים אלה מבדילים באופן ייחודי בין עצים המייצגים פנוטיפים או שיטות ריבוי שונים. הבדל זה נובע משונות במתילציה ולא משונות ברצף. פסים המבדילים בין העצים הנורמליים לעצי 'Mantled' נמצאו גם בדקל שמן בשיטת Methylation Sensitive AFLP (Jaligot et al., 2004). יתכן שדגם המתילציה באתרים אלה משפיע על הפנוטיפ (לגבי שני הזנים) או מושפע על ידי שיטת הריבוי (במקרה של 'מג'הול') ואולם רק לאחר הרחבת המדגם הנבדק ניתן יהיה להעריך את משמעות ממצא זה. תוצאה זו, ביחד עם הירידה הכללית שהתקבלה

ברמות המתילציה בעצים החריגים מחזקת את האפשרות להימצאות קשר בין דגם מתילציה לפנוטיפים ייחודיים בתמר.

סיכום הממצאים מצביע על האפשרות שבתהליך הריבוי בתרבית רקמה נוצרים תנאים מסוימים שגורמים לשינויים בדגם המתילציה של ה-DNA (ובחלק מהמקרים כנראה גם ברצף הבסיסים עצמו). שינויים אלה יכולים להשפיע על תכונות שונות ולבקר את הפנוטיפים שהזכרו לעיל. בדקל השמן נמצא שהבדלים קטנים בתנאי תרבית רקמה יכולים להשפיע על תדירות ועוצמת התופעות החריגות (Eeuwens *et al.*, 2002). גם בבננה נמצא קשר בין הרכב מצע התרבית לרמת שונות סומקלונלית (Trujilo and Garcia, 1996). הבדלים כאלה קיימים קרוב לוודאי בפרוטוקולים של יצירת עצי התרבית במעבדות הייצור השונות, ואלו יכולים להיות הסיבה ליצירת העצים החריגים במסות גדולות גם בתמר.

5.3 הערכת שונות בדגם ביטוי הגנים

אנליזת ביטוי גנים מהווה כלי נוסף לבחינת ההבדלים הגנטיים והאפיגנטיים ומאפשרת התמקדות בגנים ייחודיים. גישה זאת עשויה לתרום להבנת המנגנון באמצעותו נוצרים הפנוטיפים החריגים. אפיון דגם ביטוי הגנים בפרחים של תמר נעשה באמצעות שיטת cDNA AFLP. השיטה נמצאת בשלבים של כיוול ויושמה במדגם מצומצם של דוגמאות 'ברה' אשר מייצגות ארבעה עצים נורמליים מחוטרים ושלושה עצים המאופיינים בחנטה לקויה וריבוי שחלות שמקורם בתרבית רקמה. נמצאו פסים מונומורפיים, פסים בעלי עוצמה ייחודית לפנוטיפ (או לשיטת ריבוי) ופסים פולימורפיים ללא אסוציאציה לפנוטיפ או למקור הריבוי (איור 12). להבדלים בביטוי יכולים להיות מספר גורמים, ביניהם: הבדלים גנטיים, הבדלים אפיגנטיים הקשורים לדגם המתילציה או הבדלים הנובעים משלב התפתחותי או מתנאי סביבה שונים. בעתיד, יש צורך להגיע לכיוול המערכת, לאימות התוצאות ולאפיון דגם הביטוי של הגנים השונים.

5.4 כיוונים עתידיים וחשיבות חקלאית של המחקר

נטיעות שתילי תמר מתרבית רקמה הינן חדשות יחסית בארץ ובעולם, אך חיוניות להמשך התפתחות ענף התמר. בנוסף ליתרון של הריבוי המסיבי של תמר, מציעות שיטות הריבוי בתרבית רקמה מגוון אפשרויות לעתיד. ביניהן פיתוח זנים חדשים המאופיינים, בתכונות פרי, יבול, חיוניות האבקה (בזכרים) או עמידות למחלות נפוצות (כמו מחלת הביוד (Bayoud) המכה את ענף התמרים בצפון אפריקה). יחד עם זאת, היווצרות עצי off-type בתרביות רקמה מהווה מכשול לשיטה ומעוררת ספק באשר לכדאיות השימוש בה (Kunert *et al.*, 2003; Zaid *et al.*, 2003). העבודה הנוכחית מסיעת להבנת המנגנון של יצירת עצי off-type ומצביעה על האפשרות ששינויים ברצף ה-DNA ובדגם המתילציה הנגרמים ע"י

תנאי תרבית רקמה מסוימים הם האחראים להיווצרות הפנוטיפים החריגים. בהמשך ניתן יהיה לאתר אזורים ייחודיים בגנום שהשינויים בהם מביאים לקבלת פנוטיפ מסוים. לשם כך דרושה אנליזה של מדגם רחב יותר, ריצוף מקטעים בעלי אסוציאציה לפנוטיפ וניתוח שלהם בתוכנת BLAST. בנוסף, דרוש מחקר גם ברמת תרבית רקמה כדי לאפיין את השפעתם של תנאים מסוימים בתרבית על היווצרות השונות הסומקלונלית. הרחבת הידע בנושא תסייע להתאמה טובה יותר של תנאי התרבית במטרה למנוע יצירת עצים פגומים. אנליזה מולקולארית יכולה לשמש כלי יעיל ללימוד הנושא ולזיהוי מוקדם של צמחי ה-off-type. זיהוי מוקדם יכול למנוע שתילת עצים במטע בהם הפנוטיפ מתגלה רק לאחר מספר שנות גידול ובכך למנוע אובדן השקעות רבות.

6. רשימת ספרות

- ישראלי, י. (2004). התמר. פרק 9: ריבוי תמרים בתרבית רקמה. הוצאת הדיקלאים בע"מ ומועצת הפירות.
- אבידוב, י. (1959). עלילות עירק. הוצאת עם עובד.
- ברנשטיין, צ. (2004). התמר. הוצאת הדיקלאים בע"מ ומועצת הפירות.
- סטולר, ש. (1977). גידול התמר בארץ ישראל. הוצאת הקיבוץ המאוחד.
- Aitchitt, M., Ainsworth, C. C. and Thangavelu, M. (1993). A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 317-319.
- Al-Khalifa, N. S. and Askari, E. (2003). Molecular phylogeny of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia by DNA fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1266-1270.
- Baaziz, M. and Saadi, M. (1988). Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. *Canadian Journal of Botany* **66**, 89-93.
- Baaziz, M. (1989). The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New Phytologist* **111**, 403-411.
- Baaziz, M., Aissam, F., Brakez, Z., Bendiab, K., El Hadrami, I. and Cheikh, R. (1994). Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. *Euphytica* **76**, 159-168.
- Bachem, C. W. B., Oomen, R. J. F. J. and Visser, R. G. F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**, 157-173.
- Barrow, S. C. (1998). A monograph of *Phoenix* L. (*Palmae: Coryphoideae*). *Kew Bulletin* **53**, 513-575.
- Bendiab, K., Baaziz, M. and Majourhat, K. (1998). Preliminary date palm cultivar composition of Moroccan palm groves as revealed by leaf isoenzyme phenotypes. *Biochemical Systematics and Ecology* **26**, 71-82.
- Bendiab, K., Baaziz, M., Brakez, Z. and Sedra, M. H. (1993). Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny. *Euphytica* **65**, 23-32.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnic, M. and Davis, R. W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.

- Buntjer, J. B. (2001). PHYLTOOLS Phylogenetic Computer Tools. Ver. 1.3. Wageningen University, The Netherlands, <<http://www.spg.wau.nl/pv/pub/pt/>>.
- Cao, B. R. and Chao, C.-C. T. (2002). Identification of date cultivars in California using AFLP markers. *HortScience* **37**, 966-968.
- Cervera, M.T., Ruiz-Garcia, L. and Martinez-Zapater, J. M. (2002). Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics* **268**, 543-552.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113-116.
- Cohen, Y., Korchinsky, R. and Tripler, E. (2004). Flower abnormalities cause abnormal fruit setting in tissue culture propagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Horticultural Sciences & Biotechnology* **79**, 1007-1013.
- Corley, R. H. V., Lee, C. H., Law, I. M. and Wong, C. Y. (1986). Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter* **62**, 233-240.
- Corniquel, B. and Mercier, L. (1994). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Science* **101**, 163-172.
- D' Amato, F. (1991). Nuclear changes in cultured plant cells. *Caryologia* **44**, 217-224.
- Denney, J. O. (1992). Xenia includes metaxenia. *HortScience* **27**, 722-728.
- Devanand, P. S. and Chao, C. T. (2003). Genetic Variation within 'Medjool' and 'Deglet Nur' date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in California detected by fluorescent-AFLP markers. *Journal of Horticultural Sciences & Biotechnology* **78**, 405-409.
- Diaz, S., Pire, C., Ferrer, J. and Bonete, M. J. (2003) Identification of *Phoenix Dactylifera* L. varieties based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers. *Cellular & Molecular Biology Letters* **8**, 891-899.
- Djerbi, M. (2000). Abnormal fruiting of the date palm derived from tissue culture. The date palm international symposium, Windhoek, Namibia.
- Eeuwens, C. J., Lord, S., Donough, C. R., Rao, V., Vallejo, G. and Nelson, S. (2002). Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of 'mantled' flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**, 301-23.
- El-Assar, A. M., Krueger, R. R., Devanand, P. S. and Chao, C-C. T. (2004). Genetic analysis of Egyptian date (*Phoenix dactylifera* L.) accessions using AFLP markers. *Genetic Resource and Crop Evolution*, In Press.

- Evans, D. A. and Sharp, W. R. (1986). Applications of somaclonal variation. *BioTechnology* **4**, 528-532.
- Felsenstein, J. (1999). Phylip, Phylogeny Inference Package. Ver. 3.5c. University of Washington, <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>.
- Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J. and Dennis, E. S. (1998). DNA Methylation in plants. *Plant Molecular Biology* **49**, 223-247.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H. and Razin, A. (1981). Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* **292**, 860-862.
- Gupta, M., Chyi, Y-S., Romeo-Severson, J. and Owen, J. L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **89**, 998-1006.
- Gurevich, V., Lavi, U. and Cohen, Y. (2004). Genetic variation in date palms propagated from offshoots and tissue culture. *Journal of American Society for horticultural sciences*. In Press.
- Hwang, S. C. and Co, W. H. (1986). Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to *Fusarium* wilt , p. 151-156. In: G. J. Persley and E. A. DeLanghe (eds.). *Banana and plantain breeding strategies*.
- Jacobsen, S. E. and Meyerowitz, E. M. (1997). Hypermethylated SUPERMAN epigenetics alleles in *Arabidopsis*. *Science* **277**, 1100-1103.
- Jaligot, E., Rival, A., Beule, T., Dussert, S. and Verdeil, J. L. (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* **19**, 684-690.
- Jaligot, E., Beule, T. and Rival, A. (2002). Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 1263-1269.
- Jaligot, E., Beule, T., Baurens, F. S., Billotte, N. and Rival, A. (2004). Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the 'mantled' variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* **47**, 224-228.
- Jost, J. P. and Saluz, H. P. (1993). *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Basel: Springer Verlag.
- Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F. and Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* **43**, 179-188.
- Kashkush, K., Fang, J., Tomer, E., Hillel, J. and Lavi, U. (2001). Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). *Euphytica* **122**, 129-136.

- Kunert, K. J., Baaziz, M. and Cullis, C. A. (2003). Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: a literature review. *Emirates Journal of Agricultural Sciences* **15**, 1-16.
- Lacaze, P. and Brackpool, A. (2000). Molecular fingerprinting of date palm cultivars using AFLP. Date Palm International Symposium. Windhoek, Namibia. 22-25 February 2000.
- Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **60**, 197-214.
- Lisitsyn, N. and Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**, 946-51.
- Madlung, A., Masuelli, R. W., Watson, B., Reynolds, S. H., Davison, J. and Comai, L. (2002). Remodeling of DNA Methylation and Phenotypic and Transcriptional Changes in Synthetic Arabidopsis Allotetraploids. *Plant Physiology* **129**, 733-746.
- Matthes, M., Singh, R., Cheah, S. C. and Karp, A. (2001). Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 971-979.
- McCubbin, M. J., Van Staden, J. and Zaid, A. (2000). A Southern African survey conducted for off-types on date palms produced using somatic embryogenesis. *Proceeding of the Date Palm International Symposium*, Windhoek, Namibia.
- Mingliang, X., Xiangqian, L. and Korban, S. S. (2000). AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**, 361-368.
- Mokhtar, T., Abdelmajid, R. and Mohamed, M. (2000). Phylogenetic relationships in Tunisian date-palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. *Agronomie* **20**, 665-671.
- Nei, M. and Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**, 5269-5273.
- Nixon, R. W. (1934). Metaxania in Dates. *Proceedings of American Society for Horticultural Sciences* **32**, 221-226.
- Page, R.D.M. (2000). TREEVIEW, Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Ver. University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK. <<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>>.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). Interference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

- Richards, E. J. (1997). DNA Methylation and plant development. Trends in Genetics **13**, 319-323.
- Rival, A., Bertrant, L., Beule, T., Combes, M. S., Trouslot, P. and Lashermes, P. (1998a). Suitability of RAPD analysis for detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Breed **117**, 73-76.
- Rival, A., Tregear, J., Verdeil, J-L., Richaud, F., Beule, T., Hartman, C., Rode, A. and Duval, U. (1998b). Molecular search for mRNA and genomic markers of the oil palm 'mantled' somaclonal variation. Acta Horticulturae **461**, 165-171.
- Rohlf, F. J. (2000). NTSYSpc, numerical taxonomy and multivariate analysis system, user guide. Setauket, New York, USA, Exeter Software.
- Sahijram, L., Soneji, J. R. and Bollamma, K.T. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*MUSA* SPP.). In Vitro Cellular and Development Biology – Plant **39**, 551-556.
- Saker, M. M., Bekheet, S. A., Taha, H. S., Fahmy, A. S. and Moursy, H. A. (2000). Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. Biologia Plantarum **43**, 347-351.
- Salman, R. M., Al Jibouri, A. A. M., Al Quadhy, W. K. and Omar, M. S. (1988). Isozyme and chromosomal analyses of tissue culture derived date palms. Date Palm Journal **6**, 401-411.
- Saunders, J. A., Mischke, S. and Hemeida, A. A. (2001). The use of AFLP techniques for DNA fingerprinting in plants. <<http://www.beckman.com/Literature/BioResearch/A-1910A.pdf>>.
- Schneider, S. and Roessli, D. (2000). ARLEQUIN version 2.000. A software for populations genetic data analysis. <<http://anthro.unige.ch/arlequin>>.
- Sedra, M. H., Lashermes, P., Trouslot, P., Combes, M. C. and Hamon, S. (1998). Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. Euphytica **103**, 75-82.
- Seth, J. D., Kurepa, J. and Vierstra, R. D. (1999). The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. Plant Biology **96**, 6541-6546.
- Skirvin, R. M. (1978). Natural and induced variation in tissue culture. Euphytica **27**, 241-266.
- Skirvin, R. M., McPheeters, K. D. and Norton, M. (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience **29**, 1232-1237.

- Soniya, E. V., Banerjee, N. S. and Das, M. R. (2001). Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Current Science* **80**, 1213-1215.
- Swingle, W. T. (1945). Introduction of the Medjool date from Africa into the United States. *Date Growers' Institute* **22**, 15-16.
- Torres, A. M. and Tisserat, B. (1980). Leaf isozymes as genetic markers in date palms. *American Journal of Botany* **67**, 162-167.
- Trujillo, I. and Garcia, E. (1996). Strategies for obtaining somaclonal variants resistant to yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*). *Infomusa* **5**, 12-13.
- Vorster, B. J., Kunert, K. J. and Cullis, C. A. (2002). Use of representational difference analysis for characterization of sequence between date palm varieties. *Plant Cell Reports* **21**, 271-275.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M. A. F., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingeni, S. V. (1989). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6532-6535.
- Zaid, A. (1999). Date palm cultivation. ISSN 0259-2517 FAO Plant production and protection paper, **156**. FAO. Rome.
- Zaid, A. and Al Kaabi, H. (2003). Plant-off types in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates Journal of Agricultural Sciences* **15**, 17-35.
- Zehdi, S., Sakka, H., Rhouma, A., Ould Mohamed Salem, A., Marrakchi, M. and Trifi, M. (2004). Analysis of Tunisian date palm germplasm using simple sequence repeat primers. *African Journal of Biotechnology* **3**, 215-219.

7. תקציר באנגלית

Abstract

Date palm is a major tree crop in arid regions of the Middle East and North Africa, having an important impact on the economy of many countries in these regions. Date palms are traditionally propagated through offshoots. The development of propagation methods through tissue culture resulted in massive expansion of date palm plantations. While most trees generated from tissue culture are normal and true-to-type, several typical abnormal phenotypes have been detected. The present study applies Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis to characterize the variation of two elite date cultivars, 'Barhee' and 'Medjool', as well as male clones, propagated from offshoots and through tissue culture, representing normal and common abnormal phenotypes. The variation was analyzed on a few levels: genetic variation at the sequence level, variation in patterns of DNA methylation and variation in patterns of gene expression.

Analysis of genetic variation at the sequence level shows that the two cultivars have very distinct AFLP band patterns. Most offshoots, as well as the tissue culture propagated plants, have very similar band patterns, demonstrating a low level of genetic variation. However, a significant level of genetic variation was detected among 'Medjool' plants generated from tissue culture. Several phenotypically abnormal trees were characterized by unique and different AFLP band patterns. The male clones are characterized by a high level of polymorphic bands. Genetic variation was also detected among various tissues of single variegated off-type 'Medjool' trees propagated from tissue culture.

Analysis of DNA methylation also shows specific band patterns for 'Barhee' and 'Medjool' cultivars. A relatively low level of polymorphism was found among 'Barhee' trees originated from both offshoots and tissue culture, as well as among 'Medjool' trees originated from offshoots. But a relatively high level of polymorphism was found among 'Medjool' trees generated from tissue culture. In addition, we have found several polymorphic bands associated with common phenotypes of tissue culture originated trees in both cultivars and other polymorphic bands associated with the propagation

method in 'Medjool'. Additional tests are required in order to identify if these bands represent methylation pattern specific for the common phenotypes and/or for the method of propagation.

Pattern of gene expression in flowers of normal and off-type 'Barhee' trees was analyzed. The results are still preliminary and additional calibration of this experimental system is required.

Results of this study suggest that during propagation of date palm in tissue culture, genetic (at the sequence level) and/or epigenetic (in DNA methylation patterns) changes occur. It seems that these changes are affected by the conditions of the tissue culture and are responsible for the abnormal phenotypes. Understanding of the mechanism by which abnormal trees are generated is required for improvement of tissue culture conditions. Elimination of the abnormal phenotypes or their early detection is highly beneficial for the date palm industry.

**Molecular Characterization of Genetic Variation in
Date Palms Originated from Various Cultivars and
Propagation Methods**

M.Sc. Thesis

**Submitted of the Faculty of Agricultural, Food and Environmental
Quality Sciences of the Hebrew University of Jerusalem**

By

Vyacheslav Gurevich

Rehovot, Israel

December 2004