

תוכן עיניינים

2	תקציר מדעי של תוכנית המחקר
3	מבוא ותיאור הבעיה
7	מטרת תוכנית המחקר
8	תיאור מקיף של הפעלת המחקר
11	תרשים זרימה
12	תקציב המחקר
12	רשימת ספרות
15	רשימת פרסומים של החוקר(ים) הרלוונטיים לנושא הנחקר.

איתור מוטציות לפרתנוקרפיה דומיננטית בעגבניה

תכנית מס' 261078010

רבקה ברג- טיפולי מוטגנאזה סריקת אוכלוסיות, ריכוז המחקר rivkab@volcani.agri.gov.il

יחיעם זליץ - סריקת אוכלוסיות ובחינת צאצאים

אילן פארך - הכנת אוכלוסיות מיפוי

שרה שבתאי - הכנת אוכלוסיות לסריקה בשדה ואנליזות

ילנה בורובסקי- אנליזות מולקולריות

סעדיה נהון- טיפול בניסויי שדה

תקציר מדעי של תוכנית המחקר

פרתנוקרפיה מהווה פיתרון מועדף ליצירת פירות בעגבניה בתנאי סביבה הפוגמים ביצור אבקה ובהפרייה. הבעיה היא שהמקורות הגנטיים הקיימים לוקים במגבלות המונעות את שילובם בזני עילית של עגבניות, בעיקר מכיוון שהם נשלטים ע"י מערכות גנים רצסיביים שביטויים מושפע מתנאי הסביבה והרקע הגנטי. הפתרון המועדף הוא איתור גנים צמחיים דומיננטיים העשויים להשרות חנטה פרתנוקרפית אלא שכיום לא מוכרים מוטנטים כאלו. בעגבניה מעוניינים במוטציות שישירו פרתנוקרפיה פקולטטיבית כך שיתאפשר ריבוי של הזנים מזרעים, אולם זיהוי וודאי של מוטציות כאלו קשה משום שהוא מחייב סלקציה בתנאים שמונעים באופן מוחלט חנטת פירות נושאי זרעים. מטרת תוכנית המחקר המוצעת להשרות מוטציות בקו עגבניה הטרוזיגוטי לגן גרעיני לעקרות זכרית באמצעות הקרנת האבקה, ולערוך סלקציה של קוים פרתנוקרפיים מבין הצמחים העקרים זכרית. הגישה המוצעת בתכנית זו, שהיא גרסה מתוקנת של תכנית קודמת, מתבססת על הקרנת אבקה ולא על הקרנת זרעים, מה שמעלה באופן משמעותי את הסיכוי לגלות מוטציות כאלו. במחקרים קודמים מצאו שמוטגנאזה באמצעות הקרנה ברמות נמוכות של קרינת גאמה שגורמת לחסרים קצרים בד.נ.א יכולה להוביל ליצירת מוטציות דומיננטיות. כדי להשרות מוטציות כאלו, תוקרן בקרינת גאמה אבקה (=גמטות זכריות) שתאסף מצמחי עגבניה הטרוזיגוטים לגן לעקרות זכרית (*MS26/ms26*), שבהם האלל לעקרות (*ms26*) מלווה בסמן מורפולוגי סמוך (במרחק של- *CM3* בלבד) לחוסר אנטוציאנין (*aw*). האבקה המוקרנת תשמש להפריית צמחים עקריים זכריים (*ms26aw/ms26aw*) מאותו מקור גנטי, והזרעים שיתקבלו יזרעו במגשי חישתיל. על-פי צבע תת-הפסיג יזוהו בקלות הצמחים העקרים הזכריים (בשיעור צפוי של 50%) כבר כשתילים צעירים, ורק צמחים אלו יועברו לגידול בשדה. כל צמח עקר זכרי שמקורו בהפריה בגרגר אבקה מוקרן נושא מוטציה דומיננטית לפרתנוקרפיה, צפוי להניב פירות פרתנוקרפיים על כל ענפי הפריחה שלו כך שהזיהוי שלו בשדה יהיה קל וברור. (זאת להבדיל ממצב של מוטציה כימראלית כתוצאה מהקרנת זרעים כאשר רק חלק קטן מענפי הפריחה צפוי לגלות את הפנוטיפ המבוקש). כדי לרבות מינית את אותם הצמחים שיבטאו את המוטציה, הם יופרו באבקה של ההורה הפורה של אותו קו, ותורשתיות התכונה לפרתנוקרפיה תיבחן בדור הבא. לכשתמצא מוטציה כזו תתחיל תוכנית המיועדת למיפוי באמצעות יצירת אוכלוסיית מיפוי. פשטות ומהימנות הסריקה המוצעת תאפשר לסרוק אוכלוסיות מאד גדולות (כ- 30,000 שתילים בשנתיים) כך, שקיים סיכוי סביר לזהות מוטציה דומיננטית לפרתנוקרפיה פקולטטיבית תוך שנתיים-שלוש.

בעיית ההנבה בעגבניה בתנאי-סביבה מונעי הפריה: מהלך התפתחות של פרי העגבניה מתרחש בשלושה שלבים (17): בשלב הראשון שנמשך עד ליומיים לפני אנטזיס, פקע הפריחה על כל מרכיביו, כולל השחלה, מתפתחים באופן סינכרוני. יומיים לפני אנטזיס התפתחות השחלה נעצרת (ovary arrest) בעוד יתר חלקי הפרח ממשיכים בגדילה מהירה עד לפתיחת הפרח. אם מתרחשת האבקה והפריה מוצלחת, השחלה המופריית (=הפרי) נכנסת לשלב הגדילה השני שנמשך 7-10 ימים ומבוצע בעיקר באמצעות חלוקות תאים. המשך הגדילה (השלב שלישי) מתבצע בעיקר באמצעות הגדלת נפח התאים המלווה באנדו-רה-דופליקציה של ה-DNA אך ללא חלוקת תאים (22). כלומר אות שמתקבל ע"י ההפריה (ושמהותו עדין לא ידועה) הכרחי לכניסת השחלה לשלב הגדילה השני ובלעדיו הפרח יונשר תוך מספר ימים.

בעגבניה, בדומה למינים רבים אחרים, אחד הגורמים העיקריים המגבילים את עונת ההנבה הינו הרגישות הגבוהה של תהליכי המיקרוספורוגנזה, ההאבקה וההפריה לתנאי טמפ' החורגים מתחום צר יחסית (13, 35, 41). ולכן עונת הגידול מחוץ לבתי צמיחה ממוזגים מוגבלת. מעבר לכך גם בעונות גידול מיטביות, גל חולף של טמפ' חריגות (לדוגמא, חמסין בעונת האביב ובראשית הקיץ) עלול להוביל לאובדני יכול משמעותיים בעגבניה, בעיקר בזנים מסיימים. שני הפתרונות ההורטיקולטריים לבעיה זו הם: א) גידול בבתי צמיחה ממוזגים, מה שמייקר את הגידול ומחייב ניעור הפרחים ו/או שימוש בדבורי בומבוס להבטחת הפריה. ב) טיפולים הורמונאליים באנלוגים סינטטים של אוקסין או במעכבי תנועה של אוקסין, מה שדורש עבודת-ידיים מרובה, ומוביל הרבה פעמים להתפתחות פרי חלול באיכות ירודה, ובנוסף, הטיפולים אינם יעילים בטמפ' גבוהות (1). גנים טבעיים לפרתנוקרפיה פקולטיבית (כזו שמאפשרת יצירת זרעים כאשר מתרחשת הפריה) עשויים להוות פתרון מועדף לבעיות חנטה הנובעות מרגישות האבקה לטמפרטורות חריגות (18). הבעיה היא ששני המקורות הגנטיים הטובים ביותר הקיימים בעגבניה, האחד *pat-2*, המבוקר על ידי גן רצסיבי ראשי *pat-2* וגן רצסיבי מישני *mp* (47), והשני *pat-3/pat4* המבוקר ע"י 2 - 3 גנים רצסיביים (46), לוקים במגבלות המונעות את שילובם בזני עילית של עגבניות. הסרוגם העיקרי בכך שהגנים רצסיביים, מה שמחייב לשלב את האללים של כל אחד מהגנים לפרתנוקרפיה לשני קווי ההורים בכל תוכנית טפוח של זני מכלוא, ובכך מסרבל את תהליך ההשבחה. יתרה מזאת, שתי המערכות נשלטות ע"י מערכות גנים בעלי חודרנות וביטוי חלקיים המושפעים מתנאי הסביבה והרקע הגנטי מה שמפחית עוד יותר את האטרקטיביות שלהם כמקורות לפרתנוקרפיה בתוכניות השבחה. בעגבניה קיימים שני מקורות טרנסגניים לפרתנוקרפיה: האחד זה שנבנה על-ידנו (9, 43), והשני שנבנה על-ידי קבוצת מחקר איטלקית (38). שניהם אמנם דומיננטיים וניתנים לזיהוי מולקולרי מידי, אולם שניהם מבוססים על גנים חיידקיים, ולעת-עתה קיימת בציבור הסתייגות מצמחים מהונדסים בכלל, ובמיוחד מכאלו המבוססים על גנים שמקורם מאורגניזמים לא-צמחיים.

ומכאן שהפתרון המועדף הוא איתור **גנים צמחיים דומיננטיים** המשרים חנטה פרתנוקרפית, אלא שכיום לא מוכרים מוטנטים כאלו. ניתן להשרות מוטציות ע"י טיפולים מוטאגניים שונים (8). בעוד שמוטגנים כימיים משרים בעיקר

מוטציות נקודתיות שהן ברוב המקרים רצסיביות (24, 30), מוטציות דומיננטיות מתקבלות בעיקר כתוצאה מחסרים קטנים יחסית של ד.נ.א (40, 52). מוטציות דומיננטיות עשויות לנבוע מחסר קטן באזורי הבקרה (פרומוטרים או אינטרונים) של גנים שמובילים לשינוי בדגם הביטוי של הגנים הללו, שינוי שעשוי להתבטא כמוטציה דומיננטית, למשל, כאשר החסר מוביל לאובדן אתרי קשירה של חלבונים הפועלים כבקרים שליליים של ביטוי הגן (לדוגמא: 4, 16, 5). גם חסר באזור המקדד עשוי להוביל ליצירת חלבון קטוע או כימראלי חדש בעל פעילות דומיננטית. במספר מקרים נמצא שאופי הפעילות הדומיננטי של החלבון הכימראלי נובע מאיבוד המקטע האחראי לשינוי בקישור החלבון עם חלבונים ו/או ד.נ.א בתגובה לסיגנאל חיצוני או פנימי. במקרים אחרים מצאו שהאופי הדומיננטי נובע מהתקשרות בלתי הפיכה בין החלבון הקטוע לבין חלבון אחר, קישור שמונע התקשרות של החלבון האחר עם חלבון תקין. במקרים כאלו החלבון הקטוע או הכימראלי הופך להיות מאקטב או מדכא קבוע (=דומיננטי) של התגובה לסיגנאל (לדוגמא: 2, 34, 37, 25).

הדוגמאות המוכרות ביותר של מוטציות חסר דומיננטיות הן של המוטנטים האחראיים ל"מהפכה הירוקה" בהם הנינוס נובע מחוסר תגובה לג'יברלין. בחלק מהמוטנטים הללו התרחש חסר שמוביל ליצירת חלבון DELLA קטוע המתנהג כמוטציה דומיננטית בשל איבוד המקטע האחראי להריסת החלבון בנוכחות ריכוז ג'יברלין גבוה, הריסה החיונית להפעלת התגובה לג'יברלין (לדוגמא: 12, 21). בעיקרון, הפעלה בשחלות בלתי מופרות של גן חיוני לחנטה ואשר באופן רגיל מופעל רק בעקבות הפריה, עשויה להניב מוטנט פרתנוקרפי דומיננטי. מכיוון שהבסיס המולקולרי של הפעלת התפתחות השחלה לפני בעקבות הפריה עדין לא פוענח במלואו, קשה להצביע מראש באלו גנים מוטציות דומיננטיות עשויות להוביל לפנוטיפ פרתנוקרפי. אבל ניתן לחשוב על אפשרויות שונות: לדוגמא, דווח בספרות שהשתקת הגן הבקרתי AUX/IAA9 בעגבניה הובילה לשינויים פנוטיפיים שונים בדומה לחשיפה לאוקסין, כולל יצירת פירות פרתנוקרפיים (50). ולאחרונה הראו שהשתקה זו הובילה לשחרור מוקדם ולדיכוי מוקדם עוד לפני אנטזיס של הרבה גנים שבאופן רגיל ביטויים משתנה בעיקבות הפריה (51). עדין לא ברור מה מכל השינויים הללו חיוני ומספיק להשראת חנטה פרתנוקרפית, אולם חסר באזור הבקרה של גן כזה כן שלא יהיה נתון לבקרה ע"י AUX/IAA9 עשוי להוביל להתפתחות פרי ללא תלות בהפריה. אפשרות נוספת: העובדה ששני המוטנטים הטבעיים לפרתנוקרפיה בעגבניה גורמים לעליה בכמות הג'יברלינים הפעילים או בפרקורסורים המיידיים שלהם בשלב אנטזיס (14,15), רומזת שמוטציות באזורי בקרה של גנים המקדדים לאנזימים המעורבים בביוסינטזה של ג'יברלינים פעילים (GA_1 , GA_3 , GA_4 , GA_7) בשחלה כן שלא יהיו נתונים עוד לבקרה שלילית על-ידי תוצריהם או ע"י בקרים אחרים (33), עשויות להניב את הפנוטיפ הרצוי, בדומה להשפעה של השתקה טרנסגנית של גן המקדד לחלבון DELLA (29). וסביר להניח שמוטציות בגנים אחרים עשויות אף הן להוביל לפנוטיפ המבוקש.

שיקולים בבחירת החומר הביולוגי, המוטאגן, ומשטר המוטגנאזה: בעגבניה, שמרובה מזרעים, המוטציות הרצויות מבחינה הורטיקולטורית הן אלו שיובילו לפרתנוקרפיה **פקולטטיבית** דומיננטית, כך שניתן יהיה לקבל זרעים כשתתרחש הפריה. זיהוי פנוטיפי של מוטציות כאלו מאד קשה מכיוון שהוא דורש לערוך את הסלקציה בתנאים שימנעו הפריה באופן

מוחלט. מכול הטיפולים המקובלים כולל: סירוס הפרחים, גידול בתנאי סביבה שמונעים יצירת אבקה חיונית, טיפול בכימיקאליים שקוטלים אבקה, רק סלקציה על רקע של עקרות זכרית מאפשרת לערוך את הסריקה של אוכלוסיות מאד גדולות במינימום עבודת הכנה ובמירב הסבירות לזהות את הצמחים המוטנטים לפרתנוקרפיה דומיננטית. בעגבניה כל המקורות הקיימים לעקרות זכרית מבוססים על אללים רצסיביים של גנים גרעיניים. טיפול מוטגני באוכלוסיה מתפצלת לגן גרעיני רצסיבי לעקרות זכרית שנמצא בתאחיזה הדוקה לסמן מורפולוגי שניתן לזהויו כבר בשתילים שהונבטו במגשי הזריעה, יאפשר למיין ולהעביר לגידול בשדה לשם סריקה רק צמחים עקריים זכריים. צמחים כאלו לא אמורים לשאת פרי אלא אם כן הם נושאים מוטציה דומיננטית לחנטה פרתנוקרפית. במכון וולקני זוהה והוכנס לשימוש ("ע"י ד"ר דבורה לפושנר תיבל"א ופרופ' רפי פרנקל ז"ל) גן לעקרות זכרית *ms26* שנמצא בתאחיזה הדוקה (במרחק של 3CM) לאלל הרצסיבי של הגן ליצור אנטוציאנין (*aw*). במצב הומוזיגוטי לאלל הרצסיבי בשני הגנים (*aw/aw; ms26/ms26*) ההיפוקוטייל של הנבט (שיתפתח לצמח עקר זכרי) הוא ירוק, בעוד שבמצב ההטרוזיגוטי לאללים הדומיננטים (*AW/aw; MS26/ms26*), ההיפוקוטייל של הנבט סגול והצמח יתפתח להיות פורה זכרי, ושתיל כזה לא יועבר לגידול בשדה. בגלל התאחיזה ההדוקה בין האלל לעקרות זכרית *ms26* לבין האלל לחוסר אנטוציאנין *aw*, רק כ- 1.5% מהצמחים בעלי ההיפוקוטייל הירוק עשויים להיות פוריים זכרית בגלל ארוע רקומבינציה בין שני הגנים (ארוע שיוביל לקבלת גמטה מטיפוס *aw; MS26*).

מוטגנאזה למטרות השבחה של מיני גידולים המרובים באמצעות זרעים (דהיינו ברביה מינית) יכולה להעשות ע"י מתן הטיפול המוטגני לזרעים או לאבקה. היתרון של מוטגנאזה של זרעים הוא הקלות היחסית של ביצוע הטיפול, אבל החסרון העיקרי של מוטגנאזה בזרעים ככלי להעשרת השונות הגנטית הוא בכך שרק חלק קטן מהמשפחות בכלל יכולו מוטציות, זאת משום שטיפול בזרעים משרה מוטציות רק במספר תאים מוגבל מכלל הזרע, כלומר המוטציות הן כימראליות, ורק במקרים בהם הכימרה כוללת תאים מהם יתפתחו בהמשך גמטות קיים בכלל סיכוי שהמוטציה תורש לדור הבא. ומכאן שיש לסרוק מספר גדול מאד של משפחות (עם מספר מספיק של צמחים בכל משפחה) בדור *M2*, בתקוה לאתר את הפנוטיפ המבוקש. אפשרות אחרת היא מוטגנאזה של גרגרי אבקה בשלים. במקרה זה אין שלב כימראלי של המוטציה, שכן כל מוטציה שתחול בגרעין האבקה הגנרטיבי שמפרה את הביצית תורש באופן מיני לדור הבא. זאת אומרת שהסיכוי של פרט ו/או משפחה באוכלוסיית מוטגנאזה שמוצאה מצמחים שמקורם בהפריה באבקה שנחשפה לטיפול במוטגן ישאו מוטציה גדול בהרבה מאשר באוכלוסיה שמוצאה מטיפול מוטגני בזרעים (8). כאשר מחפשים מוטציות דומיננטיות, בדומה לאלו שאנו מעוניינים למצוא במחקר הנוכחי, למוטגנאזה של האבקה יתרון נוסף: הפריה של צמחים רצסיביים באבקה מאותו גנוטיפ שנחשפה לטיפול מוטגני תאפשר לחשוף באופן מידי את המוטציה בדור הראשון (*M1*), שכן צמח שיתפתח מזרע שמוצאו מהפריה בגרגר אבקה שהתרחשה בו המוטציה הדומיננטית, יבטא אותה באופן ברור בפנוטיפ של כלל הצמח, מה שמכונה גם "screen for pseudo-dominance" (53).

כאמור, הטיפול המוטגני היעיל ביותר לקבלת חסרים קטנים הוא הקרנה ברמות נמוכות יחסית של קרני גאמה, זאת מכיון שפגיעה של קרן גאמה ברקמה חייה יוצרת מסלול של מספר יוניזציות קרובות אחת לשנייה, וכל אחד מאירועי היוניזציה יכול לגרום לשבר בד.נ.א. כך שפגיעת קרן בודדת יוצרת צבר שברים דו-גדיליים בד.נ.א שאיחויים יכול להביא לחסר קטן באזור צבר השברים. לעומת זאת הקרנה ברמות גבוהות של קרינת גאמה או ב- fast neutron מגדילה מאד את הסיכוי לפגיעה של שתי קרניים באתרים כרומוזומאליים שונים, ותהליכי האיחוי של, ובין השברים השונים עשויים להוביל לאברציות כרומוזומאליות גדולות כולל חסרים גדולים, טראנסלוקציות ואינברסיות. כלומר, הקרנה במנות נמוכות שתוביל לפגיעה בודדת בגרעין התא תגרום בעיקר ליצירת מוטציות מסוג חסרים קטנים, והקרנה במנות גבוהות תשרה בנוסף לכך גם אברציות כרומוזומאליות חמורות (40).

שאלה שנידונה בעבודות שונות שנועדו ליצור אוכלוסיות צמחים מוטנטיים היא בחירת רמת המוטגנאזה (8, 23). אין לכך תשובה מוסכמת וחד-משמעית. שתי הבעיות העיקריות בטיפולים מוטגניים חריפים הן: א) ההשפעה הטוקסית הכללית הגבוהה, שמובילה לירידה בחיוניות הרקמה המטופלת (זרעים או אבקה) שאמורה להיות רקמת המוצא לדור הבא, ועל כן בעקיפין מפחיתה את הסיכוי לחשוף מוטציות חדשות. ב) היוצרות חסרים מאד גדולים שמובילים לפנוטיפים לטאליים (49). חלק מהעבודות מהשנים האחרונות שעסקו במוטגנאזה של זרעים ממליצות על מינון/טיפול שמוביל לפגיעה מינימאלית בחיוניות הזרעים המטופלים, מה שמעיד שכמות המוטציות שהושרו לגנום (=זרע) מוגבלת, ועל-כן קטן הסיכוי שמדובר במוטציות המייצגות חסרים גדולים שעלולים לפגוע בחיוניות ובפוריות הצמחים המוטנטיים (8, 26). בעבודת מוטגנאזה שנעשתה לאחרונה באורז נבחר טיפול בקרינת גאמה במנה של 250 Gy (1Gy=100rad) שגרם לפגיעה של 3% בלבד בחיוניות הזרעים. ואפילו מטיפול מתון זה נתקבלו בכל צמח בממוצע כ- 100 מוטציות באזורים מקודדים לגנים (100 מוטציות לטרנסקריפטום) (52). שיקולים דומים מתקיימים גם לגבי מוטגנאזה באבקה. במספר עבודות הראו שקיים יחס הפוך בין מנת הקרינה לה נחשפה האבקה לבין מספר הזרעים שחנטו בפירות שהתפתחו מהפריה באבקה המוקרנת. בארבידופסיס דווח שמנה נמוכה של קרינת גאמה (50Gy ומטה) לא פגעה בשיעור חנטת הזרעים ביחס לאבקה לא מוקרנת, אך במנות גבוהות יותר שיעור חנטת הזרעים וכן שיעור הנביטה של הזרעים שנוצרו פחתו ביחס ישר למנת הקרינה. ובמוטנטים שהתקבלו מההקרנה ברמה גבוהה נמצאו חסרים מאד גדולים (1-1000kb ומעלה), מה שמסביר את הירידה בפוריות הזרעים שהתפתחו על גבי הצמחים שהתפתחו מהפריה באבקה המוקרנת, והרבה מהמוטציות כלל לא הורשו לדור הבא בגלל השפעתן הלטאלית (32, 48, 49, 53). מוטגנטזה בעגבניה באמצעות הקרנה של אבקה בקרינת גאמה דווחה במספר פירסומים (6, 10, 45, 19, 27), וגם כאן דווח שכל מנה מעל 50Gy פגעה בשיעור חנטת הזרעים ובשיעור הנביטה של הזרעים שמוצאם בהפריה באבקה מוקרנת. ויתכן שאבקת העגבניה רגישה להקרנה יותר מזו של ארבידופסיס שכן ניצפתה ירידה של 20-30% בנביטת זרעים שמוצאם מאבקה מוקרנת ב- 50Gy (53). בעבודות הללו דווח ששיעור המוטנטים באוכלוסיה עלה ככל שעלתה רמת הקרינה, אלא שהרוב המכריע של המוטנטים נבעו מחסרים מאד גדולים, שהובילו לירידה בפוריות ולעיתים ללטאליות מוחלטת. על סמך ממצאי דיווחים

אלו, מוטגנאזה של אבקה המיועדת להעשרה בחסרים קטנים - כאלו שעשויים להוביל למוטציות דומיננטיות - צריכה להיעשות ע"י הקרנה בקרינת גאמה במינונים נמוכים, שמובילים לפגיעה מינימאלית בשיעורי חנטת הזרעים שמוצאם בהפריה באבקה מוקרנת.

הסיכוי להשרות מוטנט לפרתנוקרפיה דומיננטית בתוך אוכלוסיית מוטגנאזה שמקורה באבקה מוקרנת כלל אינו מבוטל. הערכה זו מבוססת על מספר דיווחים קודמים בספרות. א) באוכלוסיית מוטגנאזה באמצעות טיפול ב-EMS שגרם 15% פגיעה בחיוניות זרעי עגבניה מקו M82, מתוך 6000 משפחות שנסרקו עפ"י 15 קטגוריות שונות נמצאו 2552 מוטנטים, וחמישה מהם הוגדרו כדומיננטים בהתאמה עם העובדה שמוטגן זה משרה בעיקר מוטציות נקודתיות שהן בד"כ רצסיביות (30). ב) בעבודה שנועדה להעריך באמצעות אנליזת Tilling את שיעור המוטציות שהושרו ע"י הקרנת זרעי אורז בקרינת גאמה, נבחן שיעור המוטציות ב- 25 אזורים מוגדרים של גנום האורז (אורך האזורים הממוצע נע בין 1-1.5kb) . בתוך 2130 המשפחות שנבחנו נמצאו 6 מוטציות מתוכן שתיים כתוצאה מחסרים זעירים (2 & 4 bp) אחת באזור אינטרון והאחרות באזורי אקסונים של גנים מקדדים (42). ג) בעבודת מוטגנאזה שנעשתה באורז (52) נבחר טיפול בקרינת גאמה במנה של 50Gy שגרם לפגיעה של 3% בלבד בחיוניות הזרעים. מטיפול זה נתקבלו בכל צמח בממוצע כ- 100 מוטציות באזורים מקודדים לגנים (100 מוטציות לטרנסקריפטום). בהנחה שגנום העגבניה כולל כ- 30,000 גנים (3, 44), אוכלוסייה של 30,000 צמחים צריכה להציג בממוצע כ- 100 מוטציות לכל גן. אפילו בהנחה מחמירה שיציגו רק 50 מוטציות לכל גן, כולל גן המטרה (דהינו כל גן שמוטציה בו תוביל לפרתנוקרפיה דומיננטית) הסיכוי שמוטציה כזו תרחש כתוצאה מהקרנה אינו מבוטל כלל, וסריקת המוטציה על רקע של עקרות זכרית מעלה מאד את הסיכוי שמוטנט כזה אכן יחשף פנוטיפית בשדה. זאת משום שעל רקע של עקרות זכרית ימצא צמח מוטנטי הנושא פירות (חסרי זרעים) על כל ענפיו, בעוד כל יתר הצמחים אינם נושאי פירות

מטרת תוכנית המחקר:

1. להשרות מוטציות חסר קטנות באמצעות הקרנת אבקה של קו עגבניה המכיל גן גרעיני לעקרות זכרית, ולערוך סלקציה של צמחים פרתנוקרפיים מבין הצמחים העקרים זכרית.
2. לאפיין גנטית ולמפות מוטציות דומיננטיות לפרתנוקרפיה פקולטיבית

השיבות וייחודו של המחקר:

פרתנוקרפיה פקולטיבית בעגבניה היא ללא ספק הפיתרון המועדף לבעיות חנטה בתנאי סביבה מגבילי הפריה, מפני שהיא מאפשרת שליטה טובה יותר בתהליך החנטה תוך הפחתה של עלויות היצור (צמצום הוצאות מיזוג בתי צמחיה, חסכון בעבודה והימנעות משימוש באוקסינים סינטטיים) והארכה של תקופת ההנבה. העדר זרעים, דווח גם כמאריך את חיי המדף של הפרי, ומעלה את שיעור המוצקים המסיסים בפרי. החידוש והיתרון בגישה המוצעת הוא שבניגוד למקורות הרצסיביים הקיימים היום, פרתנוקרפיה דומיננטית תחייב לשלב את התכונה רק באחד משני ההורים של קווי מכלוא. יחודו של המחקר בגישה החדשה המוצעת להשראה ולזיהוי מוטציה דומיננטית לפרתנוקרפיה פקולטיבית, שהיא

בהגדרה תכונה שקשה מאד לזהות בפנוטיפ באופן מהימן. ביצוע הסריקה של האוכלוסיה שטופלה במוטאגן על רקע של עקרות זכרית גנית יפשט את המערך הניסויי, יאפשר לסרוק במהימנות אוכלוסיות מאד גדולות ועל-כן ישפר מאד את הסיכוי למצוא את המוטציה המבוקשת. בעתיד, זיהוי מולקולרי של המוטציה עצמה, יקל על שילובה בתכניות טיפוח וכן על ההשראה והסלקציה של מוטציות בגנים דומים בגידולים אחרים שיכולים להינות מהתכונה של חנטה שאינה מותניית בהפריה.

התוכנית המוצעת נושאת רווח משני כפול: ראשית, זיהוי קל ומידי של מוטציות דומיננטיות לתכונות נוספות אחרות בעלות חשיבות חקלאית, בעיקר כאלו המשפיעות על ארכיטקטורת הצמח, מוטציות שניתן יהיה לרבות ע"י הפריית הצמח העקר נושא המוטציה המבוקשת באבקה של הורה פורה. רווח משני חשוב נוסף עשוי להיות יצירת אוכלוסיית מוטגנאזה חדשה בעגבניה באמצעי המיועד להעשרה בחסרים קטנים. אוכלוסיה שתהווה השלמה ותוספת לאוכלוסיות שיוצרו בעגבניה המועשרות במוטציות נקודתיות בעקבות טיפול ב- EMS או בחסרים גדולים יחסית בעקבות הקרנה ב- fast neutron (<http://zamid.sgn.cornell.edu/mutants/>) ; 30 . בהתאם למשאבים הכספיים שיעמדו לרשותנו, נשקול גידול בנפרד של הצאצאים הפוריים זכרית ושאנים מתאימים לסלקציה לפרתנוקרפיה דומיננטית, ומכל צמח פורה יאספו הזרעים בנפרד ליצירת אוכלוסיית מוטגנאזה (M2) חדשה.

תיאור מקיף של הפעלת המחקר

תאור החומר ביולוגי: לאחרונה הועמדו לרשותנו ע"י ד"ר דבורה לפושנר זרעים של קו עגבניה מסיים הנושא את האלל לעקרות זכרית *ms26* בתאחיזה הדוקה (3CM) לסמן לחוסר אנטוציאנין *aw* (*aw/aw; ms26/ms26*). הזרעים שקיבלנו מוצאם מהכלאה: *Aw/aw; MS26/ms26 X aw/aw; ms26/ms26*.

כך ש 50% מהצאצאים הם עקרים זכריים ובעלי תת-פסיג ירוק, ו-50% מהצמחים הם הטרוזיגוטיים לגן לעקרות ולגן לחוסר אנטוציאנין. אבקה שתאסף מהצמחים ההטרוזיגוטיים תוקרן בקרינת גאמה, ותשמש להאבקת הצמחים העקרים הזכריים (בעלי תת-פסיג ירוק) של אותו קו. (ראה תרשים זרימה מצורף). כיום כבר נאספת ומיובשת אבקה מצמחים כאלו כדי לערוך את ניסויי הכיול כמתואר בהמשך. במידה וימצא שהאבקה של קו זה רגישה במיוחד לאפקטים הטוקסיים של ההקרנה (הבדלים בין גנוטיפים דווחו בספרות (39)), נשקול שימוש במקורות אחרים לעקרות זכרית כאוכלוסיית המוצא למוטגנאזה.

כיול הטיפול המוטאגני (שנה א'): לאור הדיווחים בספרות אודות השראת חסרים גדולים ואברציות כרומוזומאליות אחרות ע"י טיפולי הקרנה של אבקת עגבניה במנות של 50Gy ומעלה (1Gy=100rad). אנו נכיל את המערכת לטיפול שכמעט ואינו פוגע בחיוניות האבקה. המדד לפגיעה מינימאלית יהיה בדומה למתואר בספרות, דהיינו, טיפול שכמעט ולא יפגע בשיעור חנטת הזרעים ובשיעור הנביטה שלהם בהשוואה לזרעים שיתקבלו מהפריה באבקה לא מוקרנת. בניסויים הראשונים נבחן טיפולים בטווח שבין 5-75Gy. כמנה הגבוהה ביותר נבחרה הקרנה של 75Gy משום ש-50Gy הוא הטיפול הנמוך ביותר שדווח בספרות שעסקה בהקרנת אבקה של עגבניה, וב-100Gy דווחו כבר נזקים ברורים לחיוניות

הזרעים. לקראת ההקרנה אבקה תאסף מפרחים פתוחים, תיובש בואקום, ותישמר בטמפ של 20°C - עד לחשיפה לקרינה. היבוש בואקום שמיועד לשמור על חיוניות האבקה לאורך זמן (עד שנתיים (20)), יפחית גם את הנזקים הכלליים של הקרינה כתוצאה מפעילות חמצן וניגזרותיו (23). עפ"י המומלץ בספרות האבקה המוקרנת תשמש להאבקת פרחים של הצמחים העקרים עוד באותו היום. שירותי הקרנה בקרינת גאמה ניתנים במכון וייצמן ברחובות, ובכור בנחל שורק. למעשה התחלנו כבר בתהליך של איסוף ויבוש אבקה לקראת ניסויי הכיול. כנקודת התחלה לניסוי המוטגנאזה נבחר רמת הקרנה שתוביל לפחיתה של לא יותר מ-10% בשיעור הנביטה של זרעים שמוצאם מהפריה באבקה מוקרנת לעומת הפריה באבקת ביקורת לא מוקרנת.

סריקת אוכלוסיות (שנה א'): לאחר שיכול טיפול ההקרנה, אבקה שנאספה, יובשה והוקפאה תוקרן, ותשמש להאבקת פרחים של הגנטיפ העקר הזכרי והזרעים יאספו מהפירות. משיאספו כ-15,000 זרעים יערך סבב הסריקה הראשון למוטנטים לפרתנוקרפיה. בהנחה מחמירה של 30 זרעים בלבד לפרי, מדובר בכ-480 פירות, כמות שיכולה להתקבל מהאבקת כ-70 צמחים, כשבכל אחד יואבקו כ-10-8 פרחים. הזרעים יונבטו במגשי "חשתיל" וצפוי ש-50% מהם יהיו בעלי תת-פסיג ירוק ורק צמחים אלו יועתקו לגידול בשדה למטרת זיהוי מוטנטים לפרתנוקרפיים. העברה לשדה בנפרד, של נבטים בעלי תת-פסיג סגול, לצורך יצירת משפחות של מוטגנאזה בהקרנה שיוכלו לשמש בהמשך כמקור חדש לאיתור מוטציות, תישקל בהתאם למגבלות התקציביות.

השתילים בעלי תת-הפסיג הירוק (כ-7500 מתוך 15,000) שיועברו לשדה, יסרקו מספר פעמים לאורך תקופת הפריחה וההנבה. צמחים שיופיעו עליהם פירות במספר קומות ובענפי פריחה שונים, הם מועמדים כנושאי מוטציה דומיננטית לפרתנוקרפיה. לגבי כל צמח כזה נאמת שהוא אכן עקר זכרי, שכן 1.5% מהצאצאים חסרי אנטוציאנין יהיו תוצרי שיחלוף שינתק בין האלל לחוסר צבע לבין האלל לעקרות זכרית, ובנוסף תמיד קיים החשש לטעות אנוש בזיהוי הצמחים aw/aw במגשי השתילה. צמחים מועמדים כמוטנטים לפרתנוקרפיה ישמשו כאמהות בשני מכלואים שונים לשתי מטרות כמפורט להלן (ראה תרשים זרימה מצורף):

א. מיכלואים לקביעת תורשתיות הפנוטיפ ולקביעת אופי (או "חוזק") הפרתנוקרפיה (שנה ב' וג'): לשם כך, פרחים של המוטנט יופרו באבקה של צמחי הגנוטיפ $AW/aw; MS26/ms26$. מכיוון שהסיכוי שהמוטציה הדומיננטית לפרתנוקרפיה תמצא בתאחיזה מאד הדוקה לגן לעקרות זכרית מאד קטן, שתי התכונות (עקרות זכרית ופרתנוקרפיה) יופרדו בצאצאי ההכלאה. תורשתיות של גן יחיד דומיננטי לפרתנוקרפיה פקולטטיבית תתבטא בכך שמתוך הצאצאים העקרים זכרית, 50% ישאו פירות שיהיו פרתנוקרפיים ו-50% האחרים לא ישאו פירות כלל. שיעור הצאצאים נושאי פירות עם זרעים מתוך כלל הצמחים הפוריים זכרית יושפע מ"חוזק" הפרתנוקרפיה, כלומר בהתאם למידת הנטיה לפרתנוקרפיה אובליגטורית (על הרצף שבין פקולטטיבי לאובליגטורי). במידה והמוטציה קרובה באופיה לאובליגטורית, צפוי ש-50% מהצאצאים הפוריים זכרית ישאו פירות עם מעט זרעים או אפילו פירות חסרי זרעים לחלוטין. לעומת זאת, אם המוטציה בעלת אופי פקולטטיבי, צפוי שכל הפירות או לפחות רובם ישאו זרעים. במקרה כזה נבחן בדרך נוספת

האם 50% מהפוריים זכרית נושאים גן דומיננטי לפרתנוקרפיה פקולטיבית. זאת, ע"י טיפול מקומי של פרחים מסומנים בחומרים קוטלי אבקה (11, 28), ונבדוק אם מתפתחים מהם פירות חסרי זרעים. ניתן לבחון זאת גם ע"י הכנת יחורים שיועברו לגידול בתנאים שפוגעים ביצור אבקה, או ע"י סרוס פיזי של הפרחים, אלא שכאן עלולה להיות הפלה של הפרח בגלל תגובת פציעה שמובילה לעליה מקומית ביצור אתילן. השוואת גודל הפירות הפרתנוקרפיים לגודלם של פירות נושאי זרעים באותם צמחים ובצמחי ביקורת פוריים, אף היא תצביע עד כמה המוטציה "חזקה" במובן שהיא מאפשרת התפתחות פרי בגודל דומה לזה של פרי נושא זרעים. כפי שמצויין בתרשים הזרימה, רק מוטציה דומיננטית שתגרום לפרתנוקרפיה אובליגטורית, שאינה מאפשרת יצירת זרעים גם כאשר מאביקים את הפרחים, לא ניתן יהיה לרבות מינית. אולם מוטציה כזו ממילא חסרת ערך חקלאי, אלא אם כן שוקלים ריבוי מייחורים, מה שכיום לא מקובל בעגבניות.

ב. מיפוי מוטציות לפרתנוקרפיה דומיננטית (שנה ב' וג'): במידה ויזוהו מספר מוטנטים יערך מבחן אלליות בין המוטנטים השונים על ידי הכלאות ומבחני צאצאים. על מנת למפות את המוטציות על פני גנום העגבניה, הצמחים המוטנטים העקרים הזכריים (*aw/aw;ms26/ms26;PART/part*) שיראו פנוטיפ פרתנוקרפי ברור (ראה הסבר בתרשים הזרימה) יוכלאו עם שושלת LA1589 ממין הבר *Solanum pimpinellifolium*. צמחי F_2 יגודלו בתנאים המאפשרים חנטה פרתנוקרפית (חנטה בעונת החורף בערבה הדרומית, ראה בתרשים הזרימה), ויסווגו לפרתנוקרפים ונורמליים. זיהוי סמנים מולקולריים בתאחיזה לגן לפרתנוקרפיה יעשה בשיטת bulked segregant analysis (31) ע"י יצירת באלקים (bulks) נפרדים של DNA מצמחים נורמליים ומצמחים מוטנטים וסריקה לאיתור פולימורפיזם בסמנים בין שני הבאלקים. הסמנים שיסרקו יבחרו על בסיס מפות קיימות של עגבניה ונתוני פולימורפיזם ידועים בהכלאה הבין מינית שבניסוי זה (<http://www.sgn.cornell.edu>) באופן שהם יכסו את כל הגנום. בשלב ראשון יבחרו סמני PCR במירווחים של 20 CM האחד מהשני, כ 6 סמנים לכרומוזום. לאחר איתור פולימורפיזם בין הבאלקים הסמנים יבדקו בנפרד בכל אחד מצמחי אוכלוסית ה- F_2 . מאחר ויעשה שימוש בסמנים שמיקומם בגנום ידוע, ניתן יהיה לבדוק סמנים נוספים מהאזור הכרומוזומלי המכיל את הגן לפרתנוקרפיה על מנת לזהות תאחיזה הדוקה לגן. סמנים אלו יהיו את הבסיס התשתיתי לשילוב הגן בתכניות טיפוח, ובעתיד לבידוד הגן (לא במסגרת תוכנית המחקר הנוכחית). במידה ויתפרסם הרצף השלם של גנום העגבניה בסמוך למועד מיפוי מוטציה מעניינת ניתן יהיה להשוות את הרצף של המוטנט והביקורת באזור מיפוי המוטציה. לאחרונה פורסמו טכנולוגיות לאיתור ולמיפוי חסרים קטנים שעשויים להיות הבסיס למוטנטים שמקורם בהקרנה. זאת באמצעות אנליזת oligonucleotide microarrays השוואתית (7, 36). זיהוי המוטנטים בטכנולוגיות אלו ואימות זהות המוטציות החשודות באמצעים טרנסגניים ידרשו למעלה משלוש השנים המוקצות למחקר.

תוכנית העבודה לשנים ב' וג': אנו מתכננים לסרוק במהלך המחקר כ-30,000 צמחים. עפ"י מגוון הפנוטיפים שיתקבלו בשדה לקראת סוף השנה הראשונה- תחילת השנה השניה, יוחלט האם בשנה השניה והשלישית תיסרק אוכלוסיה שתיחשף לאותו טיפול מוטגאני או שתיבחן אוכלוסיה שתטופל ברמת קרינה שונה. בעיקרון בשנים אלו נמשיך לסרוק

צמחים נוספים מאוכלוסיית המוטגנאזה, למציאת מוטנטים מועמדים נוספים לפרתנוקרפיה. המוטנטים הללו יוכלאו כמתואר למעלה לקביעת אופי ותורשתיות התכונה ולשם מיפוייה.

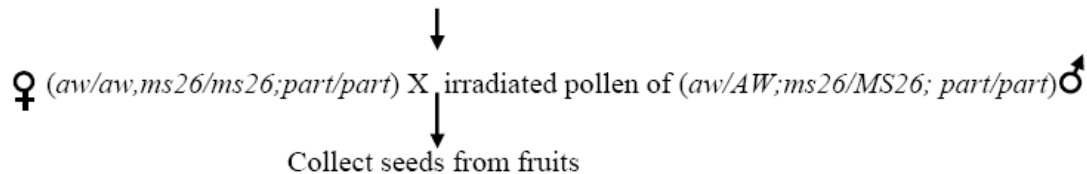
תרשים זרימה של מהלך השראה זיהוי ואפיון מוטציה דומיננטית לפרתנוקרפיה פקולטיבית

Definition of genes, alleles, and genotypes used in the flowchart below:

PART= hypothetical dominant mutation for facultative parthenocarpy (WT allele is *part*)
aw (anthocyanin without)= close marker for male sterility *ms26*
 Maintainer line consists of:
 50% plants *aw/AW;ms26/MS26;part/part* (used to collect pollen for radiation, paternal line)
 50% plants *aw/aw; ms26/ms26; part/part* (used as maternal parent)

Generate mutagenized M1 population:

Gamma-irradiated pollen grains collected from the *aw/AW;ms26/MS26;part/part* plants
 Irradiated pollen is used to pollinate *aw/aw; ms26/ms26* plants



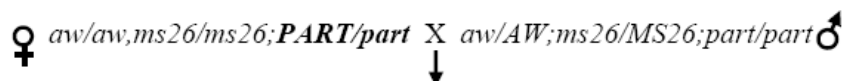
Germinate seeds in flats: screen for seedlings with green hypocotyls (*aw/aw; ms26/ms26*) and transfer to field

Expected genotypes/phenotypes in the field:

{ 1.5% *aw/aw,ms26/MS26;part/part* : male fertile, seeded fruits (discard)
 48.5% *aw/aw,ms26/ms26;part/part* : male sterile, no fruits,

Unless mutated: *aw/aw,ms26/ms26;PART/part* : A plant with parthenocarpic fruits

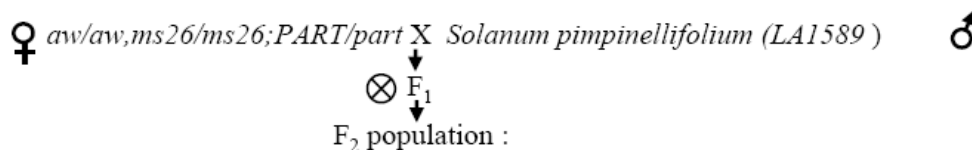
→ To determine heritability and nature of parthenocarpy (obligate or facultative)**:



25% progenies: *aw/aw ; ms26/ms26; PART/part* : male sterile parthenocarpic fruit
 25% progenies: *aw/aw; ms26/ms26; part/part* : male sterile, no fruits
 25% progenies: *AW/aw ; MS26/ms26; part/part* : male fertile, seeded fruits fruit
 25% progenies: *AW/aw ; MS26/ms26; PART/part* : male fertile, most fruits: parthenocarpic or with very few seeds (if tending towards obligate) or mostly seeded (if highly facultative)

** In case of very strong obligate parthenocarpy no progenies are expected following the pollination

→ For mutation mapping:



Grow in the winter in the Arava (under pollination restrictive conditions) to identify facultative parthenocarpic progenies, perform bulked segregant analysis

תקציב המחקר: 40,000 ש"ח יוקצו לכח אדם, 30,000 להוצאות גידול השדה למטרות סריקה, 17,000 ש"ח טיפולי הקרנה, ציוד אזיל, אחזקת חממה להכנת המיכלואים, 3,000 ש"ח הוצאות נסיעה, התוכנית קבלה מימון של 50,000 (לשנה אחת) בשנת 2009 מקרן ראש המינהל, לביצוע הניסויים ההקדמיים לכיול המערכת.

שבתון/גמלאות- לא מתוכננת יציאה לשבתון בתקופת המחקר.

רשימת ספרות

1. Abad M, Monteiro AA (1989) The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: A review. *Sci Hort* 38: 167-192.
2. Barker CL, Baillie BK, Hammond-Kosack KE, Jones JD, Jones DA (2006) Dominant-negative interference with defense signalling by truncation mutations of the tomato Cf-9 disease resistance gene. *Plant J.* 46:385-399.
3. Barone A, Di Matteo A, Carputo D, Frusciante L. High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency. *Curr Genomics.* 2009 10(1):1-9.
4. Barry CS, Giovannoni JJ (2006) Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci* 103: 7923-7928.
5. Beales J, et al (2007) A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 115:721-733
6. Brock RD, Franklin IR (1966), The effect of desiccation, storage and radiation intensity on mutation rate in tomato pollen. *Radiat Bot* 6:171-179.
7. Bruce M, Hess A, Bai J, Mauleon R, Diaz MG, Sugiyama N, Bordeos A, Wang GL, Leung H, Leach JE (2009) Detection of genomic deletions in rice using oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics.* 10:129.
8. Brunner H (1995) Radiation induced mutations for plant selection. *Appl Radiat. Isot.* Vol. 46(6/7): 589-594.
9. Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R (2003) Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rolB gene in the ovary. *Planta* 217: 726-735.
10. Contant RB, Devreux, M, Ecochard RM (1971) Radiogenetic effects of gamma-and fast neutron irradiation on different ontogenetic stages of the tomato. *Radiat Bot* 11:119-136 .
11. Cross JW, Ladyman JAR (1991) Chemical-agents that inhibit pollen development-tools for research. *Sex Plant Reprod* 4: 235-243
12. Dill A, Jung HS, Sun TP. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):14162-7
13. El Ahmadi AB, Stevens MA (1979) Reproductive responses of heat-tolerant tomatoes to high temperatures. *J Amer Soc Hort Sci* 104:686-691.
14. Fos M, Nuez F, García-Martínez JL (2000) The *pat-2* gene, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* 122:471-479.
15. Fos M, Proano K, Nuez F, Garcia-Martinez JL (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol Plant* 111:545-550.

16. Fu D, Szucs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM, Fu D, Szucs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM, Dubcovsky J. (2005) Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics* 273(1):54-65.
17. Gillaspay G, Ben-David H, Gruissem W (1993). Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell*. 5:1439-1451
18. Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005) Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol (Stuttg)*. 7: 131-139.
19. Grant WF, Owensb WT (2002) Lycopersicon assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens. *Mutation Res* 511:207–237. Review.
20. Hanna WW, Towill LE. (1995) Long-term pollen storage. *Plant Breeding Reviews* 13:179–207.
21. Itoh H, Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Kamiya N, Hasegawa Y, Ashikari M, Matsuoka M. (. 2005) Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J*. 44(4):669-679.
22. Joubes J, Chevalier C (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol Biol* 43: 735-45.
23. Kodym A, Afza R (2003) Physical and chemical mutagenesis. In: *Methods in Molecular Biology. Plant functional genomics*, Vol 236 (Ed. E.Grotewold) Humana Press pp.189-203.
24. Koornneef M, Dellaert L, van der Veen J (1982) EMS and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Res* 93: 109–123.
25. Li N, Mattoo AK (1994) Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key protein in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive, monomeric enzyme. *J Biol Chem* 269: 6908-6917.
26. Li X, Zhang Y (2002) Reverse genetics by fast neutron mutagenesis in higher plants. (Review). *Funct Integr Genomics* 2: 254–258.
27. Liharska TB, Hontelez J, van Kammen A, Zabel P, Koornneef M (1997) Molecular mapping around the centromere of tomato chromosome 6 using irradiation-induced deletions. *Theor Appl Genet* 95:969-974.
28. Loussaert D (2004) Trihalogenated methylsulfonamides as specific male gametocides. *Sex Plant Reprod* 16: 299-307
29. Marti C, Orzaez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A. (2007) Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant* 52(5):865-876
30. Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D (2004) *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J* 38: 861-872.
31. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 9828-9832.
32. Naito K, Kusaba M, Shikazono N, Takano T, Tanaka A, Tanisaka T, Nishimura M. (2005) Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with gamma-rays and carbon ions. *Genetics*. 169(2):881-889.
33. Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*. 14 Suppl:S61-80.

34. Parnis A, Cohen O, Gutfinger T, Hareven D, Zamir D, Lifschitz E (1997) The dominant developmental mutants of tomato, Mouse-ear and Curl, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a Knotted gene. *Plant Cell*. 9: 2143-2158.
35. Picken AJF (1984) A review of pollination and fruit set in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Hort Sci* 59:1– 13.
36. Rios G, Naranjo MA, Iglesias DJ, Ruiz-Rivero O, Geraud M, Usach A, Talon M.(2008) Characterization of hemizygous deletions in citrus using array-comparative genomic hybridization and microsynteny comparisons with the poplar genome. *BMC Genomics*. 9:381.
37. Rong YS, Golic KG (1998) Dominant defects in *Drosophila* eye pigmentation resulting from a euchromatin-heterochromatin fusion gene. *Genetics*. 150:1551-1566.
38. Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A (1997) Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotechnol* 15: 1398-1401.
39. Sanamyan MF (2003) Evaluation of the effect of pollen irradiation on karyotype variability in M1 cotton plants. *Genetika* 39: 947-955.
40. Sasaki MS. (2009) Advances in the biophysical and molecular bases of radiation cytogenetics. *Int J Radiat Biol*. 85(1):26-47. Review
41. Sato S, Kamiyama M, Iwata T, Makita N, Furukawa H, Ikeda H (2006a) Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Ann Bot (Lond)* 97: 731-738.
42. Sato Y, Shirasawa K, Takahashi Y, Nishimura M, Nishio T (2006b) Mutant selection from progeny of gamma-ray-irradiated rice by DNA heteroduplex cleavage using *Brassica* petiole extract. *Breeding Sci* 56: 179–183
43. Shabtai S, Salts Y, Kaluzky G, Barg R (2007) Improved yielding and reduced puffiness under extreme temperatures induced by fruit-specific expression of rolB in processing tomatoes. *Theor Appl Genet*. 114:1203-1209.
44. Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley S (2002) Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*. 14: 1441-1456.
45. Van Wordragen MF, et al (1994) Genetic and molecular organization of the short arm and pericentromeric region of tomato chromosome 6. *Euphytica* 79:169-174.
46. Vardy E, Lapushner D, Genizi D, Hewitt J (1989a) Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime: I. Line RP75/59. *Euphytica* 41:1-8.
47. Vardy E, Lapushner D, Genizi D, Hewitt J (1989b) Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime: II. Cultivar "Severianin". *Euphytica* 41: 9-15.
48. Vizir IY, Anderson ML, Wilson ZA, Mulligan BJ. (1994) Isolation of deficiencies in the *Arabidopsis* genome by gamma-irradiation of pollen. *Genetics* 137(4):1111-1119.
49. Vizir IY, Mulligan BJ (1999) Genetics of gamma-irradiation-induced mutations in *Arabidopsis thaliana*: large chromosomal deletions can be rescued through the fertilization of diploid eggs. *J Hered*. 90: 412-417.
50. Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell*. 17: 2676-2692.

51. Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latché A, Pech JC, Fernie AR, Bouzayen M. (2009) Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *Plant Cell*. 21(5):1428-1452
52. Wu JL, Wu C, Lei C, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba MR, Ramos-Pamplona M, Mauleon R, Portugal A, Ulat VJ, Bruskiewich R, Wang G, Leach J, Khush G, Leung H (2005) Chemical- and irradiation-induced mutants of *indica* rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol* 59: 85-97.
53. Yang C-Y; Mulligan BJ, . Wilson ZA.(2004) Molecular genetic analysis of pollen irradiation mutagenesis in *Arabidopsis*. *New Phytol*. 164: 279-288.
54. Zamir D (1983) Pollen irradiation in tomato – minor effects on enzymic gene transfer. *Theor Appl Genet* 66(2): 147-151

רשימת פרסומים של החוקר(ים) הרלוונטיים לנושא הנחקר.

זלץ י, שבתאי ש, זהבי א, ברג ר (2004), עגבניות לתעשייה לכל עת. יבול שיא, גיליון מס' 1, עמ' 32.

רבקה ברג, שרה שבתאי, גלינה קלוצקי, יחיעם זלץ (2007), שיפור ההנבה של עגבניות תעשייה בתנאי טמפרטורה קיצוניים באמצעות הנדסה גנטית. גן שדה ומשק. גיליון מס' 5, עמ' 16-18.

Barg, R., Meir, E., Lapushner, D., Frankel, R. and Salts, Y. (1990) Differential regulation of fruit specific 62 kDa protein in developing parthenocarpic (*pat-2/pat-2*) and seeded tomato fruits. *Physiol. Plant*. 80(3): 417-424.

Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R (2003) Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta* 217: 726-735.

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 9828-9832.

Shabtai S, Salts Y, Kaluzky G, Barg R (2007) Improved yielding and reduced puffiness under extreme temperatures induced by fruit-specific expression of *rolB* in processing tomatoes. *Theor Appl Genet*. 114:1203-1209.