

זיהוי ואפיון גנטי-מולקולארי ופיזיולוגי של גן עיקרי האחראי

להופעת מיקרו-סדקים ואיבוד מים בפרי העגבנייה

מאת: רן חובב

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה

הוגש לסנט האוניברסיטה העברית בשנת הלימודים 2005-2006

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

1. דר' ארתור שפר, המכון לגידולי שדה וגן, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.

2. פרופ' יוסי ריוב, המכון למדעי הצמח, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה,

רחובות.

תודות

ברצוני להודות לכל חברי במעבדה אשר עזרו לי והיו לצידי במשך התקופה הארוכה של עבודה זו. במיוחד הנני רוצה להודות לד"ר ארי שפר על התמיכה, הסבלנות והשעות הארוכות אשר השקיע על מנת לעזור לי. כמו כן, הנני מודה לכל החוקרים, העובדים והסטודנטים של המכון לגידולי שדה וגנטיקה, מנהל המחקר החקלאי, בבית דגן, על העזרה והתמיכה לאורך הדרך.

כמו כן הנני אסיר תודה למשפחתי, ובעיקר לאישתי עינת, אשר עזרו לי להוציא את העבודה הזו מין הכוח אל הפועל.

תוכן העניינים

1-2	א. תקציר.....
3-4	1. הקדמה וחשיבות העבודה.....
5-23	2. סקירה ספרותית.....
24-25	3. מטרת העבודה.....
26-43	4. שיטות וחומרים.....
44-92	5. תוצאות.....
44-52	5.1. אפיון פנוטיפי של תופעת חדירות פרי העגבנייה למים.....
53-59	5.2. אפיון התורשה של תופעת חדירות הקליפה ומיפוייה.....
60-69	5.3. אפיון השפעתו של הגן <i>Cwp</i> באוכלוסיות מתפצלות.....
70-89	5.4. בידוד הגן למיקרו-סדקים ואפיונו.....
90-92	5.5. אפיון אבולוציוני של הגן <i>Cwp</i>
93-104	6. דיון ומסקנות.....
105-113	7. רשימת הספרות.....
114-116	8. Abstract.....

רשימת איורים:

מספר איור	עמוד	כותרת
1	6	עץ פילוגנטי המשווה בין עשרה מיני עגבנייה
2	7	המבנה האנטומי של פרי העגבנייה
3	8	סכימה המתארת את מבנה תאי האפידרמיס המכילים קוטיקולה
4	11	תמונות TEM המדגימות שלבים בהתפתחות הקוטיקולה
5	12	סכימה המתארת את תהליך התהוות הקוטיקולה
6	27	תהליך הטיפוח ויצירת האוכלוסיות השונות של עגבניית הצימוק
7	31	מהערכת ה-LVDT לבדיקת שינויים בקצב גדילת הפרי
8	45	השוואה בין פירות של שני קווי עגבנייה השונים בקצב איבוד מים מהפרי
9	48	השפעה של הוספה או אי הוספה של אנטי-טראספיראנט על עגבניית צימוק
10	48	בדיקת שלמותה של הקליפה על ידי הוספת <i>tuilidine-blue</i>
11	49	תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק של הקוטיקולה של פרי עגבנייה בשלה
12	50	תמונות SEM של מקטעי פרי עגבנייה בשלבי התפתחות שונים
13	52	המתאם הפנוטיפי שבין צפיפות המ"ס לבין איבוד המשקל הממוצע
14	54	התפלגות הפנוטיפ של מידת הייבוש בפרי העגבנייה
15	56	מפת סמני ה-DNA הצפופה של העגבנייה
16	57	מיפוי ראשוני של הגן <i>Cwp</i>
17	58	מיפוי הגן <i>Cwp</i> ברמת רזולוצייה גבוהה ביותר
18	61	התפלגות הגנוטיפים של הגן <i>Cwp</i> ביחס לקצב איבוד המשקל
19	62	הקשר שבין הגנוטיפ של הגן <i>Cwp</i> לבין מספר תכונות חקלאיות
20	64	הקשר שבין הגנוטיפ של הגן <i>Cwp</i> לבין תכונת ה"פיוצים" בפרי
21	65	ההבדלים בין הגנוטיפים של הגן <i>Cwp</i> ביחס למשקל ממוצע של קליפות פרי נקיות מתאים
22	69	בדיקת LVDT לבחינת פרטים בעלי מ" ופרטים חסרי מ"ס
23	72	בידוד הגן <i>Cwp</i> באמצעות <i>map-based gene cloning</i>
24	74	שלושת ה-ORFs שעלו באמצעות הניתוח הביו-אינפורמטי
25	76	הבדלים ברמת הביטוי של הגנים המועמדים <i>Dbp</i> ו- <i>Put</i> בפירות מתפתחים
26	78	הבדלים ברמת הביטוי של הגן <i>Put</i> בין הגנוטיפים השונים של הגן <i>Cwp</i>
27	78	הבדלים ברמת הביטוי של הגן <i>Put</i> בין הקו M82 לבין שני קווי אינטרוגרסיה
28	79	רצף החלבון של הגן <i>Put</i>
29	81	צמחי עגבנייה טראנסגנים המבטאים את הגן <i>Put</i>
30	82	השווה בין פרטים טראנסגניים מאוכלוסיית T ₁ מתפצלת
31	83	השפעת מספר העותקים של הטרנסגן <i>Put</i> על רמת הסדקים וקצב ההתרגשות
32	85	ביטוי הגן <i>Cwp1</i> בפרי ובצמח
33	86	אנליזת Southern של הגן <i>Cwp1</i>
34	87	השוואת רצף חומצות האמינו בין הגנים <i>Cwp1</i> ו- <i>Cwp2</i>
35	88	עץ הומולוגי המתאר את הקרבה שבין הגנים <i>Cwp1</i> ו- <i>Cwp2</i> בעגבנייה ובמינים נוספים
36	91	הבדלים ברמת הביטוי של הגן <i>Cwp1</i> במיני בר ובמיני תרבות
37	92	השוואת רצף הפרומוטור של הגן <i>Cwp1</i>
38	100	צילומים מיקרוסקופיים הממחישים את הקרבה הפיזית שבין האורגנולות

רשימת טבלאות:

מספר טבלה	עמוד	כותרת
1	46	השוואה המשקל הטרי והיבש ומספר תכונות נוספות, בין פרי עגבנייה בשלב אדום בשל לבין פרי עגבנייה מצטמק
2	54	אופן ההתפלגות של תכונת ההתייבשות בשתי אוכלוסיות F ₂ שונות
3	66	האחוז היחסי של מרכיבי הקוטין בקליפת הפרי בגנוטיפים Cwp^{EE} ו- Cwp^{HH} של הגן Cwp
4	67	האחוז היחסי של מרכיבי השעוות בקליפת הפרי בגנוטיפים Cwp^{EE} ו- Cwp^{HH} של הגן Cwp

פירוט קיצורים

עברית:

מ"ס – מיקרו-סדקים.

אנגלית:

B – Breaker (שלב התפתחותי של פרי)

BAC- Bacterial Artificial Chromosome

CAP – Cleaved Amplified Polymorphism.

Cwp - Cuticular Water Permeability

Dbp – DNA Binding Protein

ER - Epidermal Reticulation

G – Green (שלב התפתחותי של פרי)

GC-MS – Gas Chromatography Mass Spectrophotometer

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

LTP - Lipid Transfer Proteins

LVDT - Linear Variable Displacement Transducers

MG – Mature Green (שלב התפתחותי של פרי)

NIL - Near Isogenic Lines

Ov - Ovule

Put - Putative Protein

QTL – Quantitative Trait Locus

R – Red (שלב התפתחותי של פרי)

SEM - Scanning Electron Microscope

SP – Self Pruning

TEM – Transmitting Electron Microscope

TGRC – Tomato Genetic Resource Center

TSS – Total Soluble Solids

VLFA - Very Long-chained Fatty Acid

Zinc – Ring Finger Domain protein

תקציר

התנאי המרכזי להתפתחותה של החקלאות המודרנית היה טמון בשינוי גנטי של תכונות אשר אפשרו את הפיכתם של צמחי הבר לגידולים חקלאיים. רוב המחקר העוסק בשאלת השינוי הגנטי-מולקולארי שבין הגידול החקלאי המודרני ומין הבר שממנו הוא בא, הוא בעיקר בגידולי התבואות. לעומת זאת, בגידולי הפרי ידוע פחות על השינויים האבולוציוניים המולקולאריים שהיוו את הבסיס ליצירת מיני התרבות. אחת התופעות הייחודיות לפירות בשרניים היא התכונה של שמירת תכולת המים שבתוכם. פרי העגבנייה (*Solanum lycopersicon*) למשל, מכיל עד כ- 95% מים הנשמרים לאורך כל הבשלתו של הפרי, ואף לאורך זמן לאחר הקטיף בתנאי אחסון. היכולת לשמור את תכולת המים בפרי הנובעת מהמבנה הייחודי של הקליפה, היא תכונה חשובה בגידולי העגבנייה התרבותית.

בעבודה הנוכחית, אנו מציגים את התופעה של איבוד מים דרך מיקרו-סדקים (מ"ס) בקוטיקולה של פרי העגבנייה. תכונה זו גורמת לאיבוד מים מהיר של הפרי השלם, גם כאשר הוא עדיין מחובר לצמח האם. תכונה זו התגלתה כחלק ממערכת טיפוח הנעזרת בהכלאות עם מין הבר *Solanum habrochaites*.

מטרות העבודה היו: א. לאפיין את תכונת התייבשות הפרי מבחינה פנוטיפית וגנטית. ב. לבודד את המרכיב הגנטי האחראי להורשתה, לבדוק את השפעתו על תכונות חקלאיות, ואף לנסות ולאפיין אותו מבחינה אבולוציונית.

על מנת לבדוק האם התייבשות הפרי בקווים המצטמקים היא דרך הקליפה, הפרי שעדיין גדל על השיח טופל באנטי-טרנספירנט. האנטי-טראספיראנט עצר את ייבוש הפרי, דבר שמוכיח כי הפרי מתייבש עקב איבוד מים. בחינות של מרכיבי פרי וביומסה הראו בבירור כי אך ורק מים יוצאים דרך קליפת הפרי. בדיקות SEM (Scanning Electron Microscope) הראו, שעל גבי הקליפה של הפירות המתייבשים נוצרו מ"ס רבים. לעומת זאת, בפרטים שאינם מתייבשים שכבת הקוטיקולה היא שלמה. מבחן מקיף הראה קורלציה מובהקת בין מידת המ"ס לבין קצב הייבוש, דבר המורה על קשר ברור בין שתי התופעות. בדיקות נוספות הראו כי שכבת הקוטיקולה של פירות מקווים בעלי מ"ס עבה יותר מאשר של פירות חסרי מ"ס. מבחן מטאבולומי (GC-MS) כללי שנערך על קליפות פרי נקיות, הראה שאין הבדל בין הקווים מבחינת כל אחד מהמרכיבים הכימיים של הקוטיקולה.

בבדיקת התפלגות תכונת המ"ס וייבוש הפרי של פרטים משתי אוכלוסיות F_2 בלתי תלויות, נמצא כי היא ביחס מובהק של שלושה בעלי התכונה לכל אחד ללא התכונה. אופן התפלגות זה אופייני למערכת תורשה של גן יחיד דומיננטי. הגן כונה *Cwp* (Cuticular Water Permeability). תוך שימוש במפה הגנטית הרוויה של העגבנייה,

מופה הגן *Cwp* לחלק הטלומרי של כרומוזום 4. על מנת להקטין את התחום שבו נמצא הגן, נבדקה אוכלוסיית פרטים גדולה (כ- 200 צמחים). בעקבות אנליזה זו נמצאו שני סמנים (TG464 ו-TG163) אשר המרחק ביניהם הנו 1.5cM בלבד, והתכונה נמצאת ביניהם. מבין האסטרטגיות לבידוד הגן *Cwp* בחרנו להמשיך באסטרטגיה של Map Based Positional Gene Cloning. לשם כך, יצרנו אוכלוסיית F₂ של כ- 7000 גמטות, עליה בדקנו את שני הסמנים הנ"ל. במקביל, ייצרנו מערכת של סמנים נוספים תוך שימוש ב-Bacterial Artificial Chromosome (BAC). על ידי מערכת זו נמצא BAC בודד, שהגן *Cwp* נמצא בתוכו. הכנת תת-ספרייה מאותו ה-BAC הביאה למציאתו של מקטע בגודל 15kbp המכיל את הגן. ריצוף מקטע זה ועריכת אנליזות BLAST הראו כי הוא מכיל שלושה גנים, שניים מהם, "Zinc" ו-"Dbp" מקודדים פקטורי שיעתוק, ואילו השלישי מקודד חלבון בעל פעילות לא ידועה (*Put*) (Putative Protein).

מבחני ביטוי של הגנים באוכלוסיות מתפצלות הראו כי רק הגן *Put* מתבטא בפרי הצעיר ובצורה דיפרנציאלית, דהינו, רק בפרטים בעלי מ"ס. הבדלים בביטוי נמצאו גם באוכלוסיות בעלות רקע גנטי אחר מאשר מין הבר *S. habrochaites*. לדוגמא, הגן *Put* התבטא בפירות של קווי אינטרוגרסייה, שמקורם ממין הבר *S. pennellii* אך לא בקו התרבותי. על מנת להוכיח שהגן *Put* הוא הגורם לתופעת המ"ס ולייבוש הפרי, החזרנו את הרצף שלו לקו של עגבנייה תרבותית תחת הבקרה של הפרומוטור 35S. ניתוח של צמחי T₀ הראה כי מספר פרטים היו בעלי מ"ס בדרגה בינונית (אך מובהקת מהביקורת), ואף הראו סימני התייבשות של הפרי באחסון בטמפרטורת החדר. ניתוח אוכלוסיות T₁ מתפצלות הראו קשר ברור ומובהק בין מספר העותקים של הטראנסגן ורמת הביטוי של תכונת איבוד המים דרך המ"ס. תוצאות אלה מוכיחות שהגן *Put* זהה לגן *Cwp*, ולכן הוא כונה כ-*Cwp*.

אנליזת Southern גנומית הראתה כי *Cwp* הוא חלק ממשפחה של לפחות שני גנים. הגן השני כונה *Cwp2* והוא בודד באמצעות ספרייה גנומית של העגבנייה. הגן *Cwp2* מופה לאזור בחלק הטלומרי של כרומוזום 2 (IL2.1), למקום שגם דווח בעבר כ-QTL להופעת מ"ס, אם כי השפעתו קטנה.

בדיקת הביטוי של הגן *Cwp* בסדרה של מיני בר ומיני תרבות, הראתה כי הוא מתבטא בפירות של מיני הבר אך לא בזני התרבות ובמין התרבותי למחצה (*Solanu cerasiforme*). אנליזות אלה ואחרות, עשויות לשפוך אור על התהליכים האבולוציוניים מולקולאריים שעבר הגן *Cwp*, ואף לתת רמז למסלול התרבות שעבר גידול העגבנייה, מעשב בר לצמח בעל פרי עגבנייה העסיסית המוכרת לנו כיום.

1. הקדמה וחשיבות העבודה

אחת ממטרות המחקר והפיתוח בישראל הנה לייצר מיני גידולים חדשניים, אשר יהיו ייחודיים מבחינת ההתאמה לאקלים בישראל, הערך התזונתי המוסף, הטעם או האקוזוטיות. ייצור זנים חדשים המכילים בתוכם מטען גנטי ייחודי הוא ללא ספק אחד הנכסים הרוחניים והחומריים החשובים בארץ דלת משאבים, מים וכוח עבודה זול. דוגמא למוצר מסוג זה, המתפתח בצורה מהירה, הן בעולם והן בישראל, הינו ענף העגבניות המיובשות בשמש (sun-dried tomatoes). שימוש במוצר זה כתבלין הולך וגדל, והוא חביב מאוד על אנשי משק הבית והמסעדנים כאחד. למרות הגידול בשימוש במוצר זה, הפוטנציאל המסחרי שלו, ענף העגבניות המיובשות בישראל עדיין בחיתוליו, ורוב חומר הגלם מגיע מחו"ל (בעיקר מטורקיה).

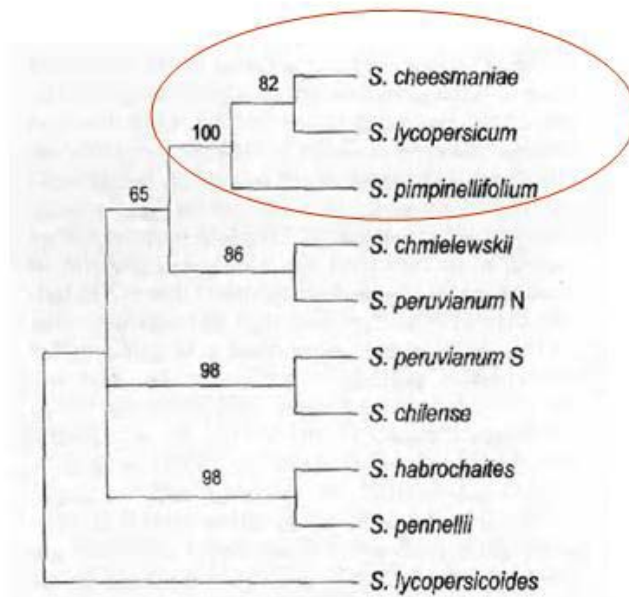
בניגוד למוצרי פירות מיובשים אחרים (כגון צימוקים), ייצור חומר הגלם לתעשיית העגבניות המיובשות כולל חיתוך העגבניות לפני ייבושן (בשמש או בתנור). הצורך בחיתוך הפרי נגרם עקב המבנה הייחודי שיש לקליפת פרי העגבנייה. קליפת הפרי מכוסה בציפוי דק הקרוי קוטיקולה. ככל שאר הקליפות של צמחי היבשה העילאיים, הקוטיקולה הינה רקמה המורכבת מחומרים ליפידיים הידרופוביים, בעלי תפקיד חשוב של מניעת אידוי מים מהצמח. אולם, הקוטיקולה של פרי העגבנייה הנה בעלת כמה מאפיינים ייחודיים הגורמים לה להיות בלתי חדירה למים באופן כמעט מוחלט. בתהליך המקובל הפרי נחצה לשניים, מונח על גבי משטח, ואליו מוספים חומרים שונים העוזרים למנוע פגיעה וריקבון בפרי, ואף מאיצים את תהליך הייבוש. תהליך זה גורם לפגיעה קשה הן באיכותו והן בטעמו של המוצר הסופי.

בעבודה הנוכחית, אנו מציגים תופעה ייחודית של איבוד מים דרך מיקרו-סדקים בקוטיקולה של פרי העגבנייה (fruit cuticle micro-fissures). תכונה זו גורמת לאיבוד מהיר של מים דרך הפרי השלם, כל זאת כשהפרי מבשיל על השיח, או אחרי הקטיף בטמפרטורת החדר, תוך כדי שמירה על איכויות הפרי ברמת גבוהה. קצב הייבוש של הפרי מהיר עד כדי כך, שהפרי מאבד מים גם כשהוא מחובר לשיח האם, תוך כדי יצירה של מה שניתן לכנות כ- "עגבניית צימוק". תכונה זו התגלתה במסגרת עבודות שבוצעו במכון וולקני, בית דגן, וכחלק ממערכת טיפוח לשיפור איכות פרי העגבנייה, הנעזרת בהכלאות עם מין הבר *Solanum habrochaites* Knapp & D.M Spooner (או בשמו הקודם *Lycopersicon hirsutum*). השימושים הפוטנציאליים במוצר מסוג זה הם רבים ומגוונים ועשויים להתפתח מעבר

ליצירת תבלין איכותי. לדוגמא, החדרת התכונה לעגבניות לתעשיית הקטשופ והרטבים, תוך כדי יצירת עגבניות המתייבשות בשדה, עשויה להוזיל בצורה משמעותית את עלויות השינוע והייבוש של התוצרת החקלאית.

חקר הבקרה הגנטית של תופעת התייבשות פרי העגבנייה עקב הופעת מיקרו-סדקים בקליפה, כפי שמתואר בעבודה זו, עשוי לשפר את היכולת להחזיר את התכונה לזני עגבניות שונים בתוכניות טיפוח, ואף למיני פירות מתייבשים אחרים. מעבר לחשיבות הכלכלית שיש לעבודה הנוכחית ביצירת מוצר חדשני, המחקר המוצע עשוי לתת בעתיד מענה לשאלות הקשורות בתופעות נוספות בעלות משמעות חקלאית, כגון הנזקים הכבדים הנגרמים עקב סדקים ופיצוצים בפרי העגבנייה. מסקנות העבודה עשויות אף לפתוח צוהר למחקר מתקדם העוסק בתופעת הסדקים בקליפת הפירות של גידולים נוספים כגון פלפל (שבו למניעת איבוד המים דרך סדקים בקליפה ישנה חשיבות עליונה בשימור הפרי בתנאי אחסון), תפוח-עץ, דובדבן, אפרסמון, ענבים וגידולים נוספים בעלי פרי ענבה.

אך מעבר לכל אלו, לעבודה הנוכחית ישנה גם חשיבות בסיסית, הקשורה לביולוגיה של התא הצמחי. בשנים האחרונות, חלה עלייה ניכרת בתחום המחקר החדשני העוסק באופן שבו מתפתחת הקוטיקולה החיצונית של איברי הצמח, ואף זוהו מספר גנים חשובים המבקרים את תהליך. למרות זאת, התמונה עדיין רחוקה מלהיות שלמה, והבנתה של היווצרות שכבת הקליפה, עדיין רחוקה מפתרון. בידוד הגן המבקר את תופעת המיקרו-סדקים בקליפת הפרי, המתואר בעבודה זו, עשוי לשפוך אור על התהליכים הביולוגיים הקשורים בהתפתחות הקוטיקולה של הצמחים בכלל, ושל פרי העגבנייה, בפרט. בנוסף, לעבודה זו יש גם אספקט אבולוציוני מעניין. ההבדל ברמת הביטוי של הגן הנ"ל בין מיני הבר ומיני התרבות של העגבנייה, כפי שנצפה בעבודה, עשוי אף לתת הסברים לתהליכים אבולוציוניים הקשורים בהפיכתה של העגבנייה מצמח בר לגידול חקלאי בעל פרי עסיסי, השומר את תכולת המים שבתוכו לאורך זמן.

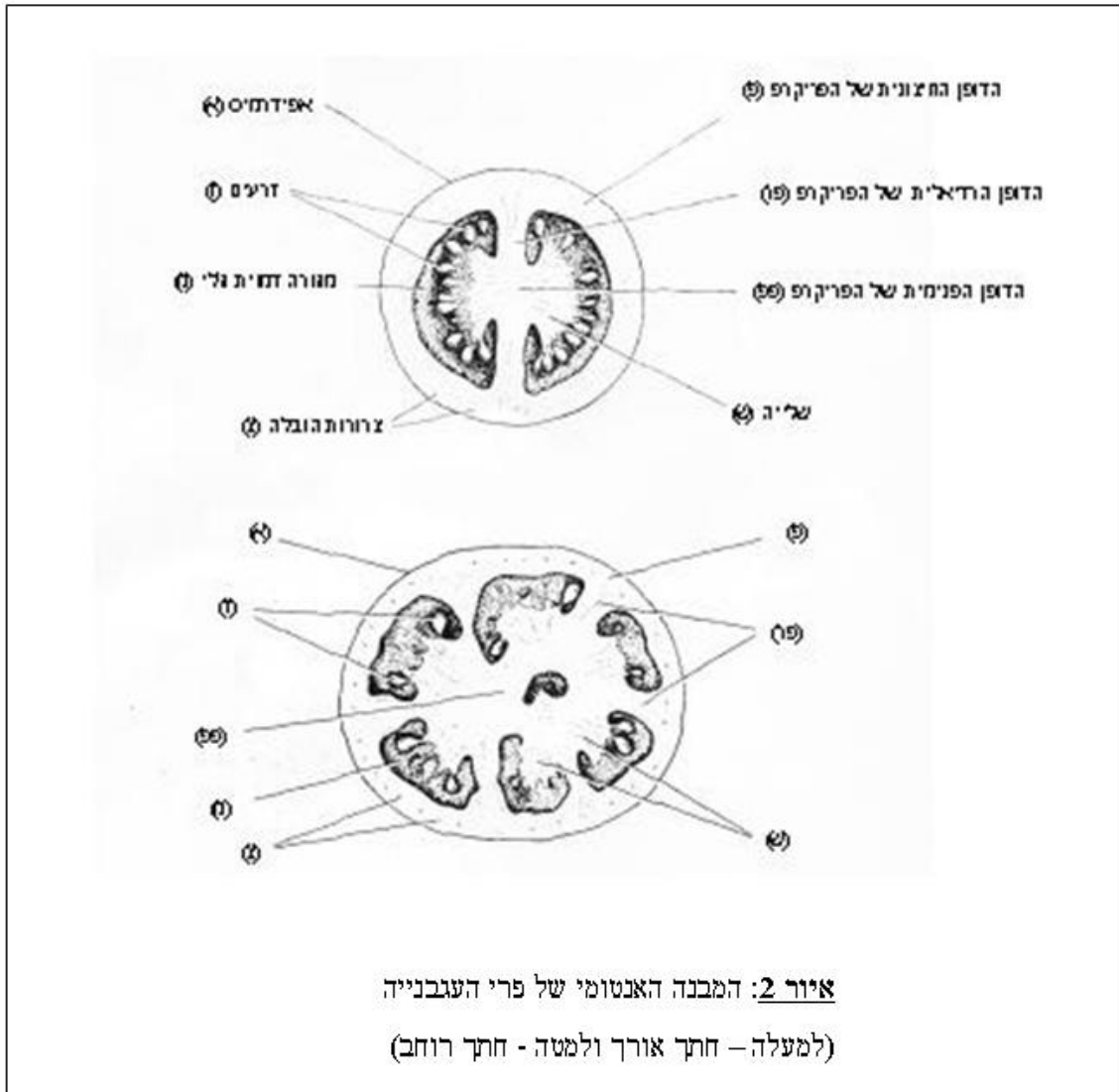


איור 1:

עץ פילוגנטי המשווה בין עשרה מיני עגבנייה. העץ הו סיכום נתונים של 2275 תכונות שונות (ביניהן מורפולוגיות ומולקולאריות) (מתוך Spooner et al., 2005). באדום מסומנים מיני עגבנייה בעלי פרי אדום.

2.2 האנטומיה של פרי העגבנייה

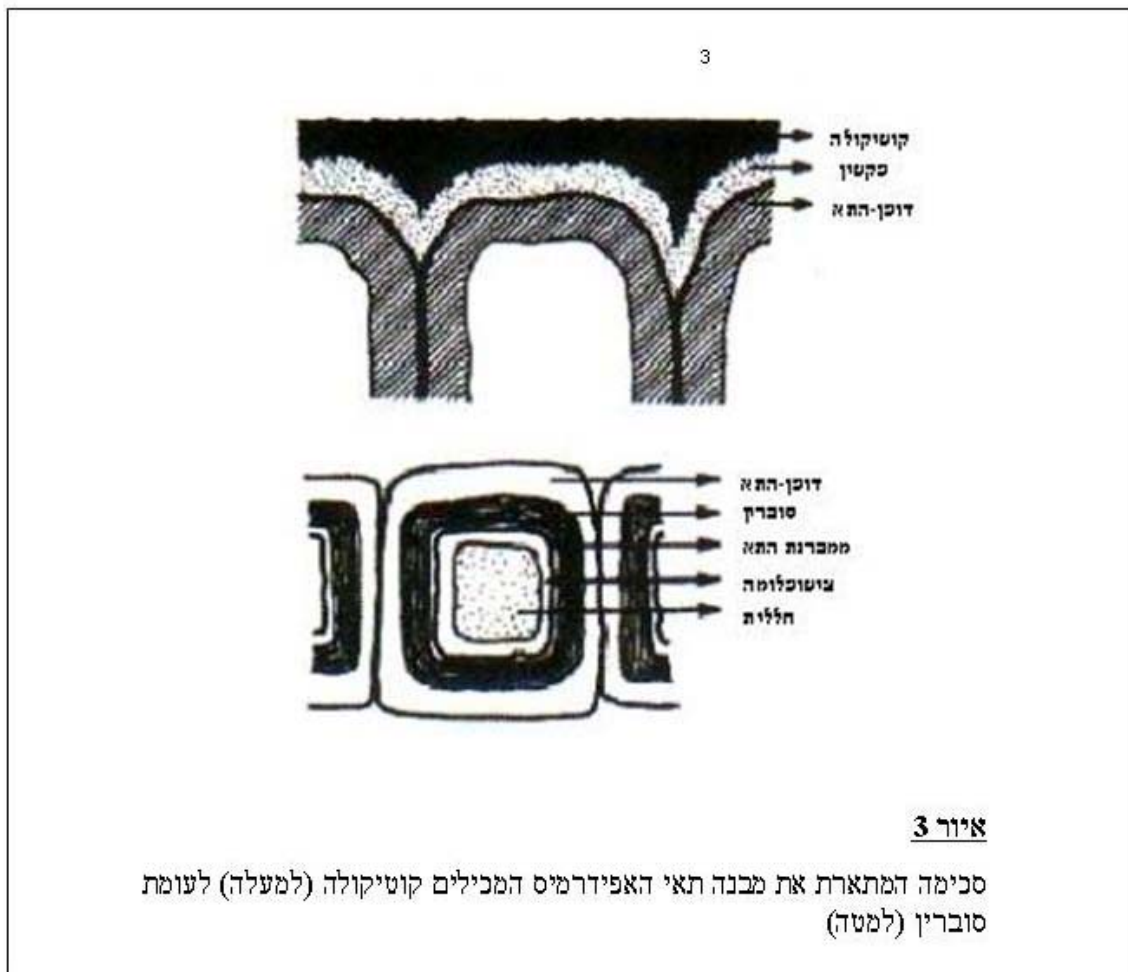
פרי העגבנייה (*S. lycopersicon* Miller) הוא מסוג "ענבה" (berry), המורכב מציפה (pulp) ומחלק בשרני (flesh) (Ho and Hewitt, 1986). הציפה מכילה את השלייה (placenta) ורקמה ממודרת המכילה את הזרעים. החלק הבשרני מכונה פריקרב (pericarp). הפריקרב מתפתח מדפנות השחלה, והוא מכיל את קליפת הפרי (exocarp), רקמה פרנכימטית (parenchymatous mesocarp), אשר בה נמצאים צינורות ההובלה של הפרי, ושכבה פנימית של תאים (endocarp) המייצגת את הגבול בין הפריקרב לבין השלייה (איור 2). בפריקרב מבחינים מספר דפנות: דופן חיצוני (outer wall) המקיף את הפרי, דופן רדיאלי (radial wall) המפריד בין מגורה אחת לשנייה, ודופן פנימי, המהווה את מרכז הפרי. תאי הפריקרב בפרי הבשל הם יחסית גדולים ומעוגלים (100 - 500 מיקרון).



קליפת הפרי (exocarp) מכילה את שכבת תאי האפידרמיס החיצונית, ומתחתיה רקמה של עד 4 שכבות של תאים היפודרמאליים (hypodermal cells). התאים ההיפודרמאליים הנם תאים מעוגלים בעלי דופן מעובה (collenchyma-like thickening). האפידרמיס שמעליהם הוא חד-תאי, ותאיו יותר מלבניים ומאורכים (Esau, 1965).

2.3 שכבת הקוטיקולה בצמחים

את שכבת תאי האפידרמיס של הפרי מכסה שכבה של קוטיקולה. עובי שכבה זו הוא 4 - 10 מיקרון, והיא המבדילה בין תאי הצמח והסביבה החיצונית. השכבה מכסה את האפידרמיס מבחוץ, אך גם חודרת במרווח שבין דפנות התאים, ולעיתים מגיעה אף לתאים ההיפודרמליים (איור 3). מלבד התפקיד החיוני ביותר שיש לקוטיקולה במניעת איבוד מים, יש לה גם תפקיד בהגנה מפני התקפת פתוגנים וחרקים, מפני קרינת UV, נזקי קרה ועוד (Barnes and Cardoso-Vilhena, 1996; Eigenbrode, 1996; Mendgen, 1996; Sieber et al., 2000). בנוסף לכך, שכבת הקוטיקולה משתתפת בתהליכי ההתפתחות הנורמאליים בצמח, כגון מניעת איחוי איברים, והשתתפות באינטראקציה שבין גרגירי האבקה והצלקת בזמן ההפריה. לשכבת הקוטיקולה יש גם תפקיד חשוב בהשפעה על התקשורת הבין-תאית בצמח, וזאת על ידי הגברת או הפחתת יכולת המעבר של מולקולות המשרות אותות בתא (Pruitt et al., 2000; Sieber et al., 2000).



2.4 מבנה הקוטיקולה בכלל ובעגבנייה בפרט

השוואה בין מיני צמחים שונים, בין איברים שונים באותו צמח, ואפילו בין שלבים שונים של אותו איבר, מראה כי קיים שוני רב במבנה ובארגון של שכבת הקוטיקולה (Kolattukudy, 1980). אף על פי כן, הקוטיקולה של כל מיני הצמחים ובכל האיברים בנויה משני מרכיבים עיקריים. הראשון הוא הקוטין (cutin), המורכב מפוליאסטרים של חומצות שומן המכונות – cutin acids. כל חומצות השומן המרכיבות את הקוטין הן בעלות 16 או 18 פחמנים (C16/C18). חומצות שומן אלו הן בד"כ רוויות, אם כי ניתן למצוא בקוטין חומצות שומן C18 שהן בלתי רוויות (Kolattukudy, 2001; Nawrath, 2002). לכל חומצות השומן יש שייר הידרוקסילי (hydroxyl residue), הנמצא בדרך כלל בעמדת ה- ω (החיצונית) של המולקולה. הקשר האסטרי הוא בין ההידרוקסיל הנ"ל לבין הקבוצה הקרבוקסילית (הנמצאת בעמדה α) של החומצה השכנה. בחלק מהחומצות המרכיבות את הקוטין, קיימים הידרוקסיל אחד או יותר בעמדות הפנימיות של המולקולה, וקשר אסטרי שלהם יוצר הסתעפות בפוליאסטר (Baker and Holloway, 1970). מלבד ה- cutin acids, לפוליאסטר קשורים גם מרכיבים פנוליים, כגון Coumaric acid, Chalconaringenin ולעיתים גם רב-סוכרים (Riley and Kolattukudy, 1975; Baker et al., 1982).

המרכיב השני בקוטיקולה הוא השעווה. כהגדרה, כל מרכיב של קוטיקולה המתמוסס בממס אורגאני (כלורופורם, אתנול וכדומה) מכונה שעווה. זה כולל פחמימנים ארוכים מאוד (C20-C30), חומצות שומן בודדות, חומצות שומן ארוכות במיוחד (Very Long Fatty Acid - VLFA), פנולים חופשיים ועוד (Matthew and Ashworth, 1999). מבחינה מבנית, השעוות מחולקות לשתי קבוצות. האחת היא קבוצת השעוות התוך-קוטיקולאריות שבתוכן קבועה שרשרת הקוטין, והשנייה היא קבוצת השעוות החוץ-קוטיקולאריות, שהיא שכבת השעווה העוטפת את הקוטיקולה, ואת האיבר כולו (Jeffree, 1996).

כל המרכיבים הנ"ל, וגם מרכיבים אחרים, קיימים גם בקוטיקולה של פרי העגבנייה (Shishiyama et al., 1970; Baker et al., 1982). במהלך התפתחות הפרי חלים שינויים רבים גם בכמות וגם במרכיבי שכבת הקוטיקולה של פרי העגבנייה (Baker et al., 1982). משקל הקוטיקולה, לדוגמא, עולה מ-60 ל-1231 מיקרוגרם/סמ"ר בזמן שהקוטר של הפרי עולה מ-12 ל-72 מ"מ (פרי של 100 ג'). במקביל, גם משקלי המרכיבים השונים של הקוטיקולה עולים במהלך גדילת הפרי. מרכיב הקוטין למשל, עולה מ-31 ל-929 מיקרוגרם/סמ"ר, ומרכיב השעווה התוך-קוטיקולארית

עולה מ- 4 ל- 35 מיקרוגרם/סמ"ר. לעומתם, מרכיב השעווה החוץ-קוטיקולארית עולה מ- 4 ל- 23 מיקרוגרם/ס"מ רבלב. כך, שבעגבנייה הבשלה רוב השעווה היא שעווה תוך-קוטיקולארית.

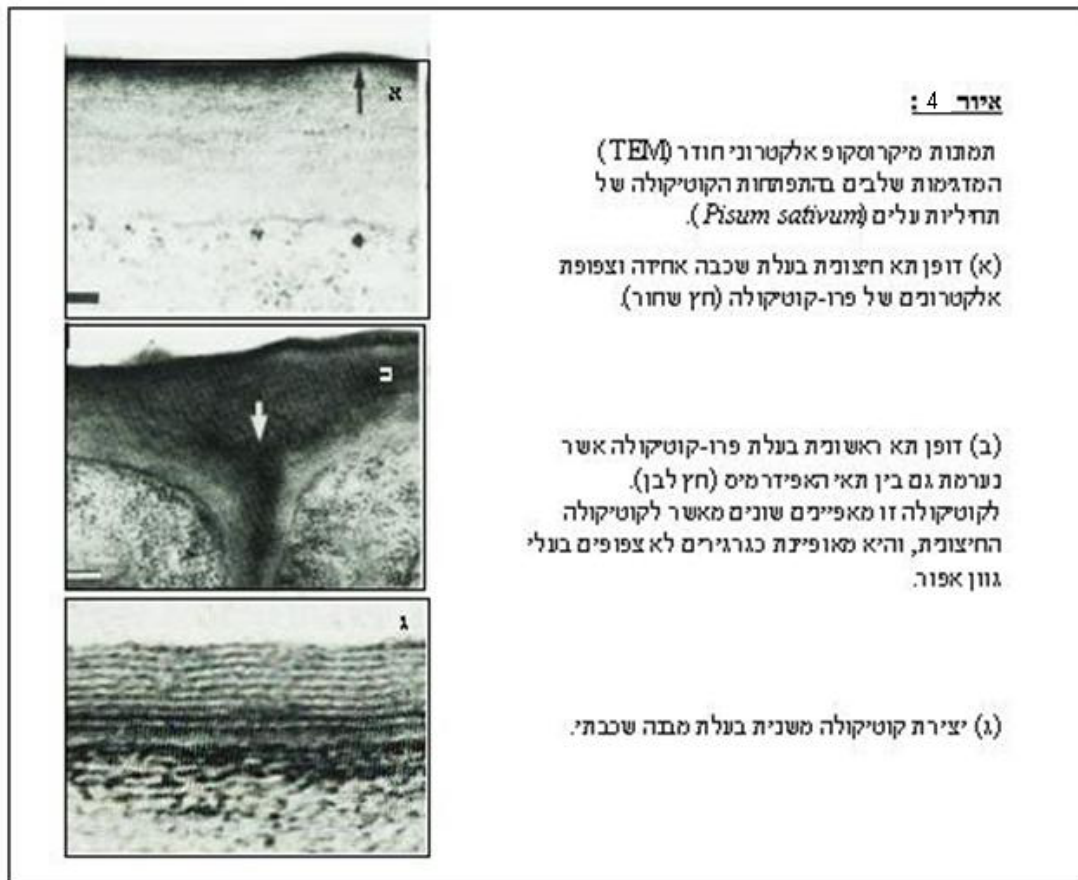
היחסים של מרכיבי הקוטיקולה (כגון הקוטין והפנולים) משתנים אף הם במידה רבה במהלך התפתחות פרי העגבנייה. דוגמא של מרכיב כזה, היא חומצת-השומן 10,16-dihydroxyhexadecanoic, המהווה מרכיב עיקרי מחומצות-השומן המרכיבות את פולימר הקוטין. אותה חומצת-שומן מהווה כ- 50% מסך חומצות-השומן בשכבת הקוטין של פרי בתחילת התפתחותו. עם התפתחות הפרי עולה בהדרגה רמת ה- 10,16-dihydroxyhexadecanoic ומגיעה ל- 75% בפרי האדום בשל. גם יחסי המרכיבים של שכבת השעווה משתנים עם התפתחות הפרי. לדוגמא, שכבת השעווה החוץ-קוטיקולארית בשלב הירוק בוגר (mature green) מורכבת בעיקר מהידרו-קרבונים (94%). תוך כדי הבשלת הפרי, לא משתנה כמות ההידרו-קרבונים אך רמתם של מרכיבים אחרים עולה, כך שבשלב האדום-בשל (red ripe) אותה השעווה מורכבת בעיקר מטריטרפנים ופלונואידיים (70%).

2.5 התהוותה של שכבת הקוטיקולה בצמחים

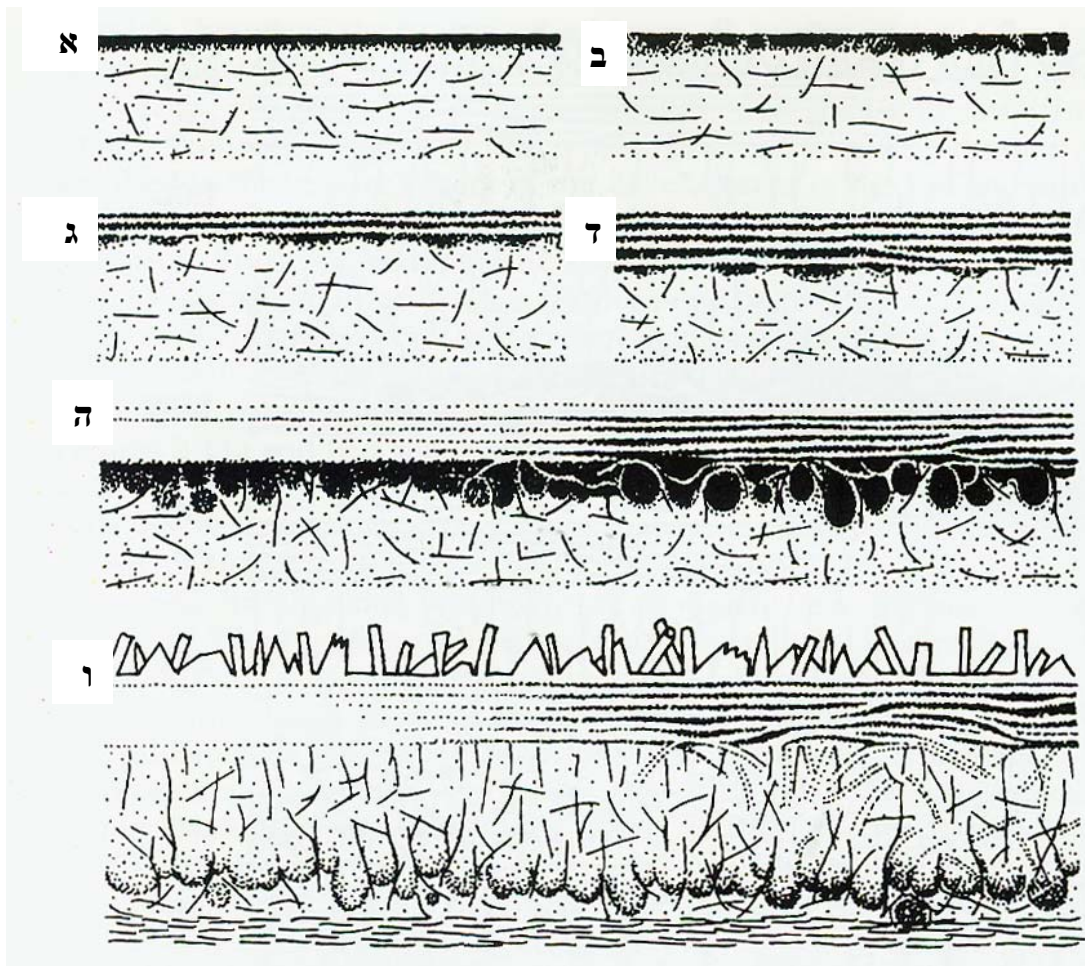
שכבת הקוטיקולה מתחילה להיווצר כבר בשלב מאוד צעיר של התפתחות העלה או הפרי (Jarvis and Wardrop, ושניוני), השלב הראשוני בהתפתחות מוגדר כ"קוטיקולה ראשונית" (primary cuticle), אם כי ההבחנה בין קוטיקולה "ראשונית" ו"שניונית" כשלב מוגדר בהתפתחות הקוטיקולה היא פחות ברורה מאשר בהתפתחות דופן התא. קוטיקולה הראשונית מוגדרת כשכבה דקה, אך בלתי חדירה (impermeable osmiophilic) ובלתי חודרנית למים (water repellent), הנוצרת מתאי האפידרמיס מיד עם התחלת התחלקותם המהירה בקדקוד הצמיחה. באנליזה של מיקרוסקופ אלקטרוני חודר (TEM) נראית שכבה זו, שהנה צפופה וחסרת צורה (אמורפית), כפס שחור כה בעובי של כ- 0.2 מיקרון (איור 4א).

במספר מיני צמחים, נוצרת מתחת לשכבת הקוטיקולה הראשונית שכבה נוספת הקרויה פרו-קוטיקולה (Procuticle). זוהי שכבת משנה, שעובייה כעובי שכבת הקוטיקולה הראשונית והיא מופיעה בצילומי TEM כשכבה מגורגרת אפורה. עם התפתחות האיבר, שכבה זו הופכת ליותר ויותר עבה, עד אשר באיבר הבוגר היא מופיעה כשכבה עבה המצויה הן מעל תאי האפידרמיס והן ברווח שביניהם (איור 4ב).

בחלק מהמקרים, כמו בפרי העגבנייה, ניתן להבחין כי בשלבים היותר מאוחרים של התפתחות האיבר, מתהווה מעל שכבת הקוטיקולה הראשונית שכבה נוספת של קוטיקולה. בשכבה זו נערמים מרבצי הקוטין בצורה של שכבות בעלות גוון כהה ובהיר לסירוגין (איור 4ג). זוהי שכבת הקוטיקולה המשנית, ולעיתים היא מכונה בלועזית – lamellate cuticular proper. שכבות הקוטין בקוטיקולה המשנית עשויות להיות מסודרות בצורה ישרה (שכבה על גבי שכבה), אלכסונית, ואף חסרות ארגון מסודר.



סכימה המסכמת את תהליך התפתחות שכבת הקוטיקולה בצמחים, משלב ההתפתחות הראשונית של הדופן ועד לעצירתה הסופית של גדילת התא, מופיעה באיור 5 (מתוך Jeffree, 1996). ניתן לראות בסכימה כי בשלב הראשון נוצרת פרו-קוטיקולה חסרת צורה מובהקת (א), ההופכת עם הזמן (בחלק מהמקרים) לקוטיקולה רב-שכבתית (ב ו-ג). בשלב זה שכבה העשויה מפקטין "קושרת" את שכבת הקוטיקולה לשטח הפנים של דופן התא. בשלב הבא (ה), שכבת



איור 5:

סכימה המתארת את תהליך התהוות הקוטיקולה (מתוך Jeffree, 1996). (א) פרו-קוטיקולה אחידה ובעלת צפיפות אלקטרונית גבוהה. (ב) פרו-קוטיקולה במצב מעבר. (ג) הפרו-קוטיקולה עוברת למצב של שכבתיות. (ד) היווצרות נוספת של שכבות בקוטיקולה. (ה) מצב מעבר מקוטיקולה ראשונית לקוטיקולה שלמה. ניתן לראות גופיפים ליפידים כדוריים הנוצרים בתחתית הקוטיקולה השכבתית, אשר לעיתים מאבדת את צורתה המושלמת. מעל הקוטיקולה מתחילה להיווצר שכבת שעווה ראשונית. (ו) בתא נוצר הדופן השניוני. הדופן הראשוני משתלב לתוך שכבת הקוטיקולה. גבישי שעווה מופיעים מעל הקוטיקולה.

הקוטיקולה מתעבה באמצעות גופיפים ליפידים כדוריים, שמקורם בשכבת דופן התא שמתחת (בתחילת הגידול מהדופן הראשונית ובהמשך מהדופן המשנית). בשלב הגידול הסופי של התא, עם יצירת הדופן המשני, מתהווה מעל גבי שכבת הקוטיקולה שכבה של שעווה (המורכבת מליפידים מסיסים). שכבה זו נוצרת על ידי נדידה של השעווה התוך קוטיקולרית על שטח הפנים תוך כדי יצירת גבישי שעווה.

2.6 התהליכים המבקרים את התפתחותה והתהוותה של שכבת הקוטיקולה

מולקולות המפתח ליצירת הקוטיין והשעווה בשכבת הקוטיקולה הן חומצות השומן, פלמיתית (16:0), סטיארית (18:0) ואולאית (18:1). חומצות אלה נוצרות בתהליך הידוע של יצירת חומצות השומן בתא (בשלב ראשון בציטופלזמה ולאחר מכן בפלסטידות), תוך כדי שהן קשורות לקומפלקס החלבוני – Acyl Carrier Protein (ACP). לאחר היווצרותן, חלק ממולקולות המפתח הנ"ל עובר תהליך של קיטוע והתנתקות מה- ACP על ידי אנזימים מיוחדים בשם thioesterases, ומועבר אל ה- endoplasmic reticulum כקומפלקס הקרוי fatty acyl-CoA. משלב זה, אותו "מאגר" של fatty acyl-CoA מתפצל למספר מסלולים מטבוליים שונים הכוללים, בין היתר, את תהליך יצירת הממברנות בתא, יצירת חומרי התשמורת בזרעים, וכמובן, את תהליך יצירת שכבת הקוטיקולה. ואכן, חשיבותה של צומת דרכים זו הוכחה על ידי Schnurr et al. (2004), שהראו כי פעילות תקינה של האנזים Acyl-CoA synthetase הינה הכרחית להתפתחותה של קוטיקולה נורמאלית בצמחי ארבידופסים.

במקרה של ייצור השעווה (cuticular waxes), מולקולת המפתח היא, ברוב המקרים החומצה הסטיארית (18:0) הקשורה ל- acyl-CoA. מולקולה זו עוברת סדרה של הוספות של שני פחמנים (באמצעות קומפלקס חלבוני הקשור לממברנה וקרוי multienzyme acyl elongase system), ליצירת חומצות שומן ארוכות במיוחד (VLCFA). אורכן של מולקולות אלה עשוי להגיע ל- 24-34 פחמנים, והן עשויות לעבור הידרוליזה ליצירת חומצות שומן חופשיות. לחילופין, הן עשויות לעבור שינויים נוספים, כגון חיזור ויצירת אלדהידים (aldehydes), אלקנים (alkanes), אלכוהולים משניים (secondary alcohols) וקטונים (ketones).

מוטציות הקשורות בשינויים מבניים או בשינוע לקוי של שעוות אל החלק החיצוני של התא הצמחי, הן קלות יחסית לזיהוי. ואכן, בארבידובסיס זוהתה סדרה שלמה של מוטנטים אשר כונו בשם הקיצור cer (eceriferum) – אשר משמעותו בלועזית היא "מחוסר שעווה" (Koornneef et al., 1989; McNevin et al., 1993; Rashotte et al.,)

(2004). מוטנטים בעלי שינויים חזותיים בשעוות העלים נצפו גם במיני צמחים אחרים, כגון סורגום (*Sorghum*) (*bicolor*), תירס (*Zea mays*), ברוקולי (*Brassica oleracea*) ואפון הגינה (*Pisum sativum*) (Jenks et al., 1996). שימוש במוטציות הנ"ל הביא לבידודם ואפיונם של גנים רבים הקשורים לביו-סינתזה של שעוות בצמחים. לדוגמא, הגן *Cer1* בודד ואופייני כ- aldehyde decarboxylase (Aarts et al., 1995). במוטנט זה, חלה מצד אחד עלייה משמעותית בכמות היחסית של האלדהידים (aldehydes) בשעווה (ביחס לצמח הלא מוטנטי), ומצד שני ירידה בכמויות האלקאנים (alkanes) והאלכוהולים המשניים (secondary alcohols). הגן *Cer2* בודד אף הוא, אך פעילותו הביולוגית המדויקת עדיין לא ברורה (Negruk et al., 1996; Xia et al., 1996; Kunst and Samuels, 2003). השעווה במוטציית *cer2* מכילה כמויות גדולות מהרגיל של קבוצות C26 ו-C28 של כוהלים ראשוניים ואסטרם. גם פעילותו הביולוגית מולקולרית של הגן *Cer3* עדיין לא ברורה בצורה מלאה, וניתוחים של מאגרי מידע ממוחשבים הראו כי הוא עשוי לקודד ל- E3 ubiquitin ligase (Kunst and Samuels, 2003).

מספר גנים נוספים, הממלאים תפקיד בתהליך ההתארכות (elongation) של חומצות השומן בשעווה, בודדו. ביניהם, ההומולוג של *FATTY ACID ELONGATION1* (James et al., 1995) *3-KETOACYL-CoA SYNTHASE* (Todd et al., 1999) *FIDDLEHEAD (FDH)* (Yephremov et al., 1999; Pruitt et al., 2000) ו- *CUT1/CER6* (Millar et al., 1999; Fiebig et al., 2000). מבין הגנים הנ"ל ניתן לציין כי הגן *Cer6* נחשב כגן המקודד לאנזים המפתח בתהליך העיבוי של השעווה, וזאת עקב הביטוי החזק שלו בכל חלקי הצמח, ובכל שלבי הגידול (Hooker et al., 2002). תגלית נוספת חשובה, בעיקר בהבנת הדרך שבה מועברים מרכיבי השעווה אל מחוץ לתא, היא בידודו של הגן האחראי למוטציה *cer5* (Pighin et al., 2004). גבעוליהם של צמחי ארבידופסיס בעלי מוטציה זו הם בעלי שכבת שעווה דקה מהרגיל. הגן שבודד זוהה כ- ABC transporter, והוא מצוי בממברנת הפלסמה של תאי האפידרמיס, ונמצא כי הינו חשוב ביותר למעבר של השעווה אל שכבת הקוטיקולה.

בניגוד לתהליך יצירת השעוות, שמקורן מהחומצה הסטיארת (18:0), יחידות המבנה הבסיסי של הקוטיין, נוצרות דווקא מחומצות השומן פלמיתית (16:0) ואולאית (18:1) (Kolattukudy, 1981). גם חומצות אלה נמצאות בתא כקומפלקס עם Acyl CoA, והן עוברות תהליכי "הבשלה" כגון הידרוקסילציה (hydroxylation) ואפוקסידציה (epoxidation), המקוטלזים על ידי סדרה של אנזימים ממשפחת ה- Cytochrome P450. דוגמא לגן ממשפחת ה- Cytochrome P450 שנמצא כמשפיע על תהליך יצירת הקוטיין הוא הגן *LACERATE* בארבידופסיס (Wellesen et al., 2001). גן זה שייך לתת הקבוצה CYP86 של ה- Cytochrome P450. שימוש בחלבון רקומביננטי של גן

זה הראה כי הוא מסוגל לקטל את הריאקציה של הוספת הידרוקסיל לקצה ה- ω (החיצונית) של חומצת שומן. צמחי ארבידופסיס מוטנטים הפגועים בגן זה מראים תופעות התפתחותיות לא רגילות כגון איברים מאוחרים.

ה-"הבשלה" של יחידות הקוטין עשויה גם לכלול תהליכים אנוימתיים נוספים, כגון ליפוקסיגנזיה (lipoxygenases) ופראוקסיגנאזיה (peroxygenases) (Blee and Schuber, 1993). לאחרונה אף נמצא, כי לאנזים פראוקסיגנאז ישנה חשיבות רבה בתהליך יצירתה של שכבת קוטיקולה תקינה (Lequeu et al., 2003). עיכוב ספציפי של אנזים זה בעלי תירס הביא לירידה משמעותית בכמות האפוקסיד הקוטיקולרי בתא, וכתוצאה מכך לירידה חדה בעובי שכבת הקוטיקולה, דבר שגרם הן לחזירות יותר גבוהה שלה והן לרגישות יתר להתקפת פטריות. לאחר תהליך "ההבשלה" של יחידות הקוטין, הן עוברת תהליך של פילמור (הנעשה באמצעות האנזים Acyl-CoA:cutin transferase) ליצירת הפוליאסטר המורכב של שכבת הקוטין (Reina and Heredia, 2001).

לאחרונה פורסמו מספר דיווחים אשר מספקים תובנות חדשות לגבי המטבוליזם של קוטין בצמחים. Chen et al. (2003), דיווחו על בידודו של הגן *Wax2*, והראו כי הוא הכרחי לביוסינתזה התקינה הן של הקוטין והן של השעווה בצמח. הצמחים המוטנטים מסוג *wax2* הם בעלי שכבת קוטיקולה בעלת משקל נמוך, מצד אחד, אך מצד שני נראות עבות יותר ובלתי מאורגנות. החלבון WAX2 הראה דמיון של 32% לחלבון CER1, והוא מכיל גם אזורים נוספים בעלי הומולוגיה לחלבונים sterol desaturases ו-short chain dehydrogenases/reductases. העובדה כי הוא כנראה ממלא תפקיד הן ביצירת קוטין והן ביצירת שעווה מעידה על כך שהוא מכוון לנקודת הקשר שבין שני המרכיבים, ככל הנראה בתחילת המסלול של יצירתם או במערכת השינוע שלהם אל מחוץ לתא. גן חשוב אחר שבודד הוא גן ממשפחת ה-LACS (Long-chain acyl-CoA synthetases), אשר ממלא תפקיד במטבוליזם של חומצות שומן והשינוע הבין-תאי שלהן (Schnurr et al., 2004). תפקידו ההיפותטי של גן זה (הקרוי *Lac2*), הוא בשיפועה של מולקולת הביניים – 16-hydroxypalmitate (שהיא אחת מתוצרי הביניים בביוסינתזה של קוטין), והוא מתבטא בעיקר ברקמות צעירות ובתאי האפידרמיס. מלבד העובדה ששכבת הקוטיקולה של מוטנטים הפגועים בגן זה הנה דקה יותר מאשר בקו הארבידופסיס הרגיל, המוטנט של גן זה מראה גם תופעות פליאוטרופיות נוספות, כגון הקטנת גודל העלים, ירידה בגובה הצמח וירידה בפוריות הזרעים ובשיעורי הנביטה. מוטנט אחר של ארבידופסיס המראה תופעות של אי תקינות בקוטיקולה הוא ה-*abnormal leaf shape1*, המראה תופעות של עלים קטנים בעוברים וברקמות יובינליות של הצמח (Tanaka et al., 2001). הגן הפגוע במוטנט זה מקודד לאנזים הפעיל בפירוק חלבונים בשם subtilisin-like Ser protease.

נקודת מבט נוספת, השופכת אור נוסף על הבקרה של תהליך יצירת הקוטין והשעווה ברמת השעתוק, היא עבודתם של אהרוני וחובריו (Aharoni et al., 2004). בעבודה זו השתמשו המחברים במערכת של השריית פעילות-יתר של גנים בצמח הארביזופסיס, וייצרו סדרה של צמחים הפגועים בשכבת הקוטיקולה. אחד המוטנטים בסדרה זו הראה פנוטיפ של עלה מבריק וירקרק. מוטנט זה הקרוי *shine*, הנו בעל שכבת שעווה גדולה מהרגיל. בידוד הגן הגורם לתכונה הראה שמדובר בפקטור שעתוק ממשפחת ה-AP2/EREBP. מסתבר שגן זה מפעיל גנים הקשורים בסנתזה של מולקולות הקוטין והשעווה, ולכן עשוי להיות גן מפתח בבקרה על היצירה של מולקולות אלה.

בנקודה זו של סקירת הספרות, אנו רואים לנכון לציין, כי למרות החשיבות הביולוגית הרבה שיש לשכבת הקוטיקולה, ולמרות ההצלחות היחסיות בבידוד גנים שונים המשפיעים על הבקרה והסנתזה של קוטיקולה בצמחים, עדיין רב הנסתר על הגלוי, והתמונה השלמה של תהליך יצירת הקוטיקולה בצמחים בכלל, ובפרי העגבנייה, בפרט, רחוקה מלהיות מושלמת. אכן, אחת ממטרות המחקר בעבודה זו היא להוסיף ידע על תהליך זה, שלפי דעתנו, עדיין לא קיבל את הדגש הראוי לו.

2.7 מעבר מולקולות מים דרך הקוטיקולה

עבודות רבות חקרו את הגורמים המשפיעים על המעבר של מולקולות מים דרך שכבת הקוטיקולה. הגורמים עשויים להיות סביבתיים, כגון טמפרטורה, לחות ותנועת אוויר (Martin and Stott, 1957; Moreshet, 1970), או גורמים פנימיים כגון, עובי הקוטיקולה, המורפולוגיה של שטח הפנים (נוכחות פיוניות או שערות), גודל החרירים בקוטיקולה ועוד (SchÖnherr, 1976a; SchÖnherr and Schmidt, 1979; Lownds et al., 1993; Riederer and Schreiber, 2001). בנוסף, נמצא שבמצב של קוטיקולה חסרת פיוניות, ולא פגועה מבחינה מכאנית, השעוות התוך-קוטיקולאריות הן בעלות החשיבות הרבה ביותר כמחסום מפני איבוד הנוזלים (SchÖnherr, 1976b). ולראייה, טבילה של פרי דובדבן (*sweet cherry*) בתמיסת כלורופורם למשך מספר שניות אינה גורמת לאיבוד מים מהפרי. לעומת זאת, טבילה ארוכה יותר, אשר גורמת להמסה של השעווה התוך-קוטיקולרית גורמת לאיבוד מים מהיר, וזאת למרות שהקוטין לא נפגע כלל (Knoche et al., 2000).

לשכבת הקוטיקולה של פרי העגבנייה יש כמה מאפיינים מבניים עיקריים המייחדים אותה כשכבה מאוד לא חדירה למעבר של מולקולות של מים. הראשון הוא, מבנה למינארי, כלומר שכבות הקוטין מסודרות במקביל לדופן תאי האפידרמיס (במינים אחרים רבים שכבת הקוטיקולה בפרי אינה מסודרת אלא נראית כמערבולת) (Wilson and

(Sterling, 1975). המאפיין השני של השכבה, הוא העובדה שאין בה פיוניות, נקבים או תעלות מכל סוג שהוא. מאפיין אחר הנו, ששכבת הקוטיקולה בפרי מכילה בעיקר שעוות תוך-קוטיקולריות, המורכבת ממרכיבים פנוליים המהווים מחסום למעבר מים (Vogg et al., 2004). גם העובי הגדול יחסית של השכבה הקוטיקולארית גורם לכך שחדירות הקליפה של פרי העגבנייה למים נמוכה מאוד (Bargel and Neinhuis, 2004).

2.8 מעבר מים דרך סדקים בקוטיקולה של פרי העגבנייה

מעבר מים, שלא דרך הפיוניות, יכול להתרחש גם כתוצאה מסדקים בקוטיקולה (Maguire et al., 1999). סדקים אלה, אשר נגרמים עקב פגיעה מכאנית בקליפת הפרי, מופיעים ברוב סוגי הצמחים בעלי פרי ענבה. בפרי עגבנייה, קיימים שלשה סוגים עיקריים של סדקים (Bakker, 1988): 1. סדקים רחביים (coarse cracking) 2. סדקים אורכיים, המכונים בעגה המקצועית – "פיצוצים" (splitting) 3. מיקרו-סדקים קטנים בקוטיקולה (cuticle cracks,) ("russeting or "rain check").

המחקר העוסק בשתי התופעות הראשונות (סדקים רחביים ואורכיים) הוא נרחב ביותר. תכונות אלו נחשבות בדרך כלל כשליליות, והגורמים להיווצרותן מגוונים ויכולים להיות הן סביבתיים והן פנימיים. הגורמים הסביבתיים כוללים השקיה בלתי סדירה (בעיקר מעבר מיובש מוחלט להרטבה מוגזמת הגורם להעלאת לחץ הטורגור באופן חד), תנאי טמפרטורה גבוהה וקרינה חזקה, משרעת טמפרטורה גבוהה בין יום ולילה והרטבה חיצונית של הפרי הגורמת לדיפוזיה של מים לתוך הפרי ולהתפוצצותו (Peet and Willits, 1995; Moreshet et al., 1999). המרכיבים הפנימיים התורמים להופעת "פיצוצים" יכולים להיות עובי ומבנה הקוטיקולה, קצב גידול מהיר של הפרי ומערכת הובלת מים לא מספיק מפותחת (Conter et al., 1969; Voisey et al., 1970; Glenn and Poovaiah, 1989; Peet, 1992). הופעת סדקים רחביים ואורכיים על גבי הפרי פוסלת אותו מיידית לשיווק, הן מטעמים אסתטיים והן בשל כושר השתמרותו הנמוך (ה"פיצוץ" גורם לחשיפת תוך הפרי לגורמי מחלה ומזיקים, דבר הגורם לריקבון).

תופעת המיקרו-סדקים (cuticle cracks) בפירות של גידולים שונים היא תופעה שונה משתי הקודמות. בניגוד לתופעות הסדקים הרחביים והאורכיים, שאורכם עשוי להגיע למספר סנטימטרים ועומקם למספר מילימטרים, המיקרו-סדקים (להלן מ"ס) הנם בקיעים שטחיים המוגבלים לשטח הקוטיקולה בלבד, ולכן אינם גורמים בדרך כלל לריקבון בפרי. אף על פי כן, תופעה זו עדין נחשבת לשלילית בשל שתי סיבות עיקריות. הסיבה הראשונה היא הפגיעה האסתטית בפרי (בעיקר במקרים בהם נוצרת על גבי המ"ס שכבת שעם אופיינית), דבר הפוגם בצורה חריפה בשיווק

(Tukey, 1959). הסיבה השנייה היא, שכאשר לא נוצרת שכבת שעם (suberin) על גבי הסדק, מתרחשת תופעה של איבוד מים דרך הסדקים. איבוד מים זה פוגע במרקם הפרי ומשנה את טעמו, וגורם למעשה לירידה משמעותית באורך חיי המדף שלו (Hayman, 1987; Maguire et al., 1999).

תופעת המ"ס הנה תופעה נפוצה יחסית בגידולי עגבניות חממה, כאשר מידת הפירות הפגועים עשויה לנוע בין 10% ל- 95% מסך התוצרת (Bakker, 1988; Demers et al., 2001). בדיווחים שונים מרחבי העולם עולה, כי במהלך הגידול השנתי ההופעה של המ"ס היא בעיקר בעונת הקיץ ופחות באביב ובסתיו (Demers et al., 2000; Khosla et al., 2000). אולם בישראל, שבה תנאי מזג האוויר חמים יחסית ועונות הגידול הן שונות, הופעת המ"ס מתרחשת בעיקר בסוף החורף/תחילת הקיץ. משני הנתונים הנ"ל ניתן לראות את ההשפעה שיש לתנאי הסביבה החיצוניים על מהלך ההתפתחות של המ"ס.

תופעת המ"ס מהווה בעיה לא רק בפרי העגבנייה, אלא גם בגידולים נוספים כגון פלפל מתוק (Aloni et al., 1999; Moreshet et al., 1999; Aloni et al., 1998), תפוח עץ (Faust and Shear, 1972), אפרסק (Borys and Bustamante-Oranegui, 1990), ענבים (Considine, 1982), אפרסמון (Iwanami et al., 2002) ודובדבן (Andersen and Richardson, 1982; belmans and Keulemeans, 1996).

2.9 תהליך היווצרותם של מ"ס בפרי העגבנייה והגורמים המשפיעים עליו

הספרות המקצועית העוסקת בגורמים המשפיעים על היווצרות המ"ס בעגבנייה היא מועטה יחסית, ורוב החומר המדעי העוסק בנושא מגיע בעיקר מהמחקר על שני סוגי הסדקים הגדולים בעגבנייה (האורכיים והרוחביים שתוארו לעיל) ומהמחקר של מ"ס בפלפל מתוק. ההבחנה הראשונית בהיווצרותם של מ"ס בפרי העגבנייה מתרחשת, בדרך כלל, בשלבי הגידול הסופיים של התפתחות הפרי, בין 42-49 יום לאחר החנטה (Bakker, 1988; Ehret et al., 1993). Emmos and Scott (1997) תיארו את תהליך התפתחות המ"ס באחוזים, כאשר, פרי בשלב ירוק צעיר מכיל בדרך כלל רק 10% מסך הסדקים הסופיים. לעומתו פרי בשלב ירוק בוגר מכיל כבר כ- 61% מסך המ"ס, בשלב ה- "שבירה" (Breaker) – 88%, ובתחילת שלב האדום בשל – 98%. מידת החומרה של הופעת המ"ס נמצאת בדרך כלל ביחס ישר למשך הגידול. ככל שהזמן בין התחלת הופעת המ"ס לבין הקטיף ארוך יותר, כך עוצמתם של המ"ס יותר גדולה (Bakker, 1988; Ehret et al., 1993; Demers et al., 2001).

הגורמים המשפיעים על היווצרות של מיקרו-סדקים בקליפת פרי העגבנייה אינם ברורים במלואם (סיכום של התופעה והגורמים ניתן למצוא ב- Dorais et al., 2004), והם כוללים שלושה היבטים עיקריים: א. תכונות הפרי. ב. תנאי האקלים ואגרוטכניקת הגידול. ג. היבטים גנטיים המשפיעים על מידת העמידות/רגישות לתופעה.

2.9.1 תכונות הפרי המשפיעות על הופעת מ"ס

2.9.1.1 המבנה האנטומי של הפרי

הסתכלות על שטח פני העגבנייה בעלת מ"ס מראה, כי בחלק מהמקרים הסדקים מתחילים להיווצר בעיקר באזור החיבור שבין תאי האפידרמיס (Emmons and Scott, 1998). תוך כדי תהליך התפתחות הקוטיקולה, מתמלא אזור זה בשכבת קוטיקולה בין-תאית אופיינית. בניגוד לקוטיקולה שעל פני התאים, המסודרת בצורה למינארית, הקוטיקולה באזור זה הינה בעלת סידור אמורפי. חוסר הסדר מראה על העדר מרכיבי קוטיקולה מסוימים, ולכן היא עשויה להיקרע יותר בקלות עם הפעלת לחץ הטורגור.

גם לעובי שכבת תאי האפידרמיס והקוטיקולה יש השפעה על הופעת המ"ס בקליפת הפרי. שכבה עבה, מצד אחד, עשויה להיות חזקה יותר מבחינה מכאנית. אולם, מצד שני, שכבה עבה היא פחות אלסטית ולא עומדת בלחץ שמפעיל הפרי הגדל. ואכן, בחלק מהמקרים דווח כי שכבה דקה יותר גורמת למ"ס (Emmons and Scott, 1998), ובמקרים אחרים, דווקא שכבה עבה יותר הייתה במתאם חיובי לרמת המ"ס (Ehret et al., 1993).

נוכחות מ"ס בקוטיקולה עשוי להיגרם גם עקב שינויים ביחס אורך/רוחב של תאי האפידרמיס הנמצאים מתחת לשכבת הקוטיקולה. פירות עגבנייה העמידים בפני היווצרות סדוקים דווחו כבעלי תאי אפידרמיס פחות מאורכים (Conter et al., 1969; Emmons and Scott, 1998). מסיבות פיזיקאליות, ככל שהתא מעוגל יותר, הוא מפעיל במהלך התפתחותו לחץ שווה על הדופן ועל הקוטיקולה, ומוריד על ידי כך את הסיכוי להיווצרות הסדק.

2.9.1.2 הקצב היומי והעונתי של גדילת הפרי

את מהלך הגדילה של פרי ניתן לסווג לשניים. האחד הוא מהלך הגדילה לאורך התפתחות הפרי, והשני הוא קצב הגדילה במהלך היממה עצמה (יום ולילה). את מהלך הגדילה לאורך התפתחות הפרי מהשחלה המופרית ועד לפרי הבשל ניתן לחלק לשלושה שלבים (Dorais, 2004): שלב ראשון (0-21 יום), שבו מתקיימת בעיקר חלוקת תאים

וקצב הגדילה הנו איטי יחסית (בסופו מגיע הפרי לכ- 10% מגודלו הסופי). שלב שני (21-35 ימים), המאופיין בגדילה מואצת עקב התארכות והתרחבות התאים, ושלב סופי של הבשלת הפרי, שבו שוב ישנה ירידה בקצב הגדילה. במהלך היממה, הפרי גדל בעיקר מהבוקר ועד הצהריים. לאחר מכן ישנה ירידה בקצב הגדילה. בשעות הלילה גדילת הפרי היא הנמוכה ביותר (Pearce et al., 1993; Guichard et al., 2001).

תחילת הופעת המ"ס מתרחשת, ברוב המקרים, רק לאחר השיא בקצב גדילת הפרי. ואכן, נמצא כי קצב גדילת הפרי בזמן תחילת הופעת הסדקים, אינו קשור להופעתם (Bakker, 1988; Ehret et al., 1993). ראוי לציין, כי לא נעשתה עבודה על השפעת גדילת הפרי בשלבי הגידול הסופיים על הופעת מ"ס בקליפת הפרי.

לשינויים היומיים בקצב גדילת הפרי עשויה להיות השפעה על הופעת המ"ס, וזאת בדרך כלל עקב מצב המים בצמח וטמפרטורת הסביבה (Pearce et al., 1993; Guichard et al., 2001). Yao וחבוריו (2000) הראו כי לשינויים היומיים בגדילת הפרי הייתה השפעה על הופעת סדקים בפלפל. אולם, לפי מיטב ידיעתנו, אין עדיין מידע מקביל בפרי העגבנייה.

2.9.1.3 גודל וצורת הפרי

מודל פיזיקאלי של התפלגות הלחצים המקומיים על קליפת פירות עקב לחץ טורגור הראה כי בפרי שצורתו אליפטית, הלחץ על כל חלקי הפרי הוא שווה (Considine and Brown, 1981). כל סטייה מצורה זו גורמת ללחץ מקומי נוסף. כך, פירות בעלי קדקוד שטוח, מהווים סטייה מהמבנה האליפטי, ולכן נוטים יותר להיסדקות. מסקנה זו מנוגדת לממצא אחר, שמראה כי דווקא פירות בעלי פרי אליפטי-מאורך נטו ליצור יותר סדקים מאשר פירות שטוחים (Emmons and Scott, 1998). כנראה, שלצורת הפרי ישנה השפעה חלקית בלבד, שעדיין איננה ברורה.

קיימים דיווחים המראים, שרמת הופעת המ"ס נמצאת ביחס ישר לגודל הפרי (Koske et al., 1980; Emmons and Scott, 1997). ככל שהפרי גדול יותר, יחס המעטפת/נפח שלו קטנה, דבר שמגדיל את הלחץ על שכבת הקוטיקולה ואת הסיכוי להיווצרות המ"ס.

2.9.1.4 מאזן המים בתוך הפרי

תנועת המים בצמחים היא, באופן עקרוני, מהאזורים שבהם פוטנציאל המים גבוה לאזורים בהם הוא נמוך. גדילת הפרי נמצאת במתאם גבוה לקצב תנועת המים לתוכו, שהיא כשלעצמה תלויה בשינויים בפוטנציאל המים בגבעול (Johnson et al., 1992; Leonardi et al., 2000; Guichard et al., 2001). בפרי העגבנייה, 85%-95% מהמים מועברים באמצעות השיפה, ביחד עם המוטמעים (Ho et al., 1987; Bertin et al., 2000). הצטמקות הפרי,

המתרחשת כתוצאה מהיציאה של מים אל מחוץ לו, עשויה לקרות לאחר המעבר מהלילה ליום עקב התחלה מיידית של תהליך הטרנספירציה. הצטמקות עשויה להתרחש גם בשעות הצהריים שבהן אידוי מים מהצמח הוא הרב ביותר. איבוד מים זה מלווה בפיצוי מידי ע"י הצמח בהחדרת מים לפרי. דבר זה גורם ליצירת לחץ על האפידרמיס, ועלול כשלעצמו לגרום להופעת סדקים. כתוצאה מכך, שעות הבוקר המוקדמות ושעות אחר הצהריים המאוחרות הן השעות הקריטיות להופעת המ"ס. בפלפל נמצא כי תנודתיות יומיות של הצטמקות והתרחבות הפרי, גרמה להופעה חמורה של מ"ס בפרי (Aloni et al., 1999; Moreshet et al., 1999).

2.9.1.5 הספקת מוטמעים לתוך הפרי

מספר מחקרים הראו קשר בין תנועת מוטמעים מואצת לפרי ובין הופעת המ"ס. למשל, מספר פירות נמוך לצמח הגביר את הופעת המ"ס, עקב עלייה ברמת המוטמעים בתוך הפרי (Bakker, 1988; Demers et al., 2001). פרי המועמס במוטמעים הנו בעל פוטנציאל אוסמוטי גבוה, ולכן מים זורמים אליו במהירות, דבר שעלול להגביר את הופעת המ"ס (Guichard et al., 2001).

2.9.2 תנאי אקלים ואגרוטכניקה

2.9.2.1 עוצמת אור

התפתחות של מ"ס בעגבניות הגדלות באזורים בעלי אקלים ממוזג, מואצת עם הגדלת כמות האור והקרינה הכללית בעונות האביב והקיץ (Frazier and Bowers, 1947; Demers et al., 2000). אולם בניגוד לפלפל (Moreshet et al., 1999) ותפוח עץ (Faust and Shear, 1972), לא נמצא בעגבנייה קשר ישיר בין עוצמת ההארה לבין הופעה מסיבית של מ"ס.

2.9.2.2 טמפרטורה

החרפה בהופעתם של מ"ס בפרי העגבנייה בתנאי קרינה גבוהים, עשויה להיות קשורה בשינויי הטמפרטורה בפרי עקב הקרינה הישירה. ואכן, לטמפרטורה גבוהה עשויה להיות השפעה על היווצרות מ"ס (Corry and Tan, 1990). אף הציעו, כי הגדלת הטמפרטורה בפרי עשויה לגרום להתפשטות הגזים בתוכו, ולגרימת לחץ נוסף על דפנות הפרי. אולם, לחץ זה הוא כנראה חלש מאוד, ואינו מסוגל לגרום להופעת סדקים (Almeida and Huber, 2001).

2.9.2.3 לחות יחסית

המ"ס בפרי נוטים יותר להופיע לאחר גשם או הרטבה של הפרי (Young and, 1947). בנוסף, ניסוי שנערך בתפוחי עץ הראה, שפירות המתפתחים על העץ, מפתחים סדקים רבים על גבי הפרי כאשר הם עטופים בשקיות פולי-אתילן (Tukey, 1959). ניסוי זה ממחיש את ההשפעה שיש ללחות סביב הפרי על היווצרות המ"ס. מעבר לכך, הלחות היחסית יכולה להשפיע על הופעת המ"ס באמצעות השפעתה על הטרנספירציה.

2.9.2.4 גיזום נוף

גידול מודרני של עגבניות מלווה בגיזום ודילול תמידי של ענפים צדדיים, וזאת על מנת להרחיב את משך הניבה ולשמור על אוויר של הצמח. מ"ס בפרי נוטים להופיע לאחר גיזום הנוף והשאת הפרי על השיח (Ehret et al., 1993). תופעה זו נגרמת, כנראה, עקב מעבר חד של מים לתוך הפרי, או עקב קרינה ישירה הגורמת להתחממות הפרי.

2.9.2.5 השקיה

לכמות ההשקיה ולתדירותה ישנה השפעה רבה על הופעת מ"ס וגם על הופעת סדקים אורכיים ורוחביים (Abbott et al., 2000; Chretien et al., 2000; Peet and Willits, 1995; Peet, 1992; Abbott et al., 1986; et al., 1985). הגדלת כמות המים בכל השקיה גורמת לעלייה בפוטנציאל המים בסביבת השורשים, דבר שגורם, לכניסה מוגברת שלהם לצמח ולהופעת מ"ס (Peet and Willits, 1995). לעומת זאת פיזור אותה כמות מים על מספר השקיות רב יותר, הביאה לעצירה של התפתחות סדקים (Abbott et al., 1986). בנוסף, הגדלה פתאומית של המים במצע, הביאה להקטנה של האלסטיות של הקוטיקולה בפרי ולהופעתם של "פיצוצים" בקליפת הפרי (Kamimura et al., 1972).

2.9.3 היבטים גנטיים המשפיעים על הרגישות לתופעה

גורם נוסף העשוי להשפיע על הופעת המ"ס הנו הרקע הגנטי של הצמח. הבדלים במידת הרגישות להופעת מ"ס בין זני עגבנייה בעלי רקע גנטי שונה נצפו בצורה ברורה כבר בעבר (Conter et al., 1969; Voisey et al., 1970; Hankinson and Rao, 1979; Davies and Hobson, 1981; Abbott et al., 1986; Den Outer and Veendaal, 1987; Emmons and Scott, 1998). על-פי (Dorais et al., 2004) גנים רבים עשויים להיות מעורבים בתהליך התפתחות המ"ס, ואלה עשויים להיות רק חלק מהגנים המשפיעים על כל סוגי הסדקים בפרי, דבר המקשה על עריכת סלקציות לזנים עמידים לתכונה.

לתופעת המ"ס בפרי העגבנייה קיים מרכיב גנטי מובהק, הבא לידי ביטוי במערכות של הכלאות עם מיני הבר. Fulton וחבריו (2000) מתארים את התכונה כ"רישות שכבת האפידרמיס" (ER) (Epidermal Reticulation), ואף מצאו ארבעה QTLs המשפיעים על התכונה, אשר מקורם בהכלאות עם מין הבר *S. neorickii* (או בשמו הקודם *L. parviflorum*). תכונת ה-ER נחשבה לשלילית, וזאת משום שעל גבי הסדקים נוצרת שכבת שעם אופיינית הגורמת לפסילת הפרי לשיווק. עיקר חשיבותה הטיפוחית של התכונה היא בקרבתה הגנומית לתכונות אחרות בעלות חשיבות חקלאית. תופעות המ"ס וה-ER מופיעות גם במערכת הכלאות עם מיני הבר *S. habrochaites* ו-*S. pennellii* (Monforte et al., 2001). דיווח מאוחר מראה כי לתופעת ה-ER בפרי העגבנייה קיימים כשבעה QTLs, שמקורם ממיני בר שונים של העגבנייה (Frery et al., 2004).

ראוי לציין, כי אין מידע ביולוגי מוצק המאפיין את תופעת המ"ס מבחינת הבקרה הגנטית שלה, והקשר בינה לבין איבוד מים דרך הקוטיקולה. במסגרת עבודות קודמות שבוצעו במכון ולקני, וכחלק ממערכת טיפוח לשיפור איכות פרי העגבנייה (הנעזרת בהכלאות עם מין הבר *S. habrochaites*), זוהו פרטים מסוימים מתוך אוכלוסייה מתפצלת, אשר הראו סימנים של התייבשות או "הצטמקות" הפרי השלם. בדיקות ראשוניות הראו, שאיבוד המים הוא דרך הקוטיקולה של הפרי. פרט זה הוכלא בהכלאה עצמית (self-cross) ליצירת דור F₄. פרט בעל התכונה מדור F₄ הוכלא בהכלאה חוזרת (back-cross) עם ההורה התרבותי, ומהכלאה זו נוצרה אוכלוסיית BC₁F₂ המתפצלת לתכונת "הצטמקות" הפרי לאחר ההבשלה. הפרטים בעלי תכונת ה-"הצטמקות" באוכלוסייה זו איבדו מים בקצב מהיר, הן כאשר הפירות היו עדיין על צמח האם, והן לאחר הקטיפה כעת איחסונם בטמפרטורת החדר. אוכלוסייה זו היוותה את חומר המקור, וממנה פותחו קווים "כמעט" איזוגניים (Near Isogenic Lines) מתקדמים.

בחינה מיקרוסקופית של הפרי הבשל הראתה כי הפרטים המצטמקים מכילים מ"ס רבים, הפזורים לאורך כל שטח פני הפרי. הנחת העבודה הייתה שבהעדר השתעמות, המ"ס הם הגורמים לאיבוד המים המהיר. איבוד המים הוא מהיר מאוד, עד כדי כך שבתנאים נוחים יחסית נוצר מוצר חדש לגמרי, המכונה על ידינו "צימוקי עגבניות". כך שלמעשה, אנו מתייחסים לאורך כל העבודה לתופעת המ"ס כתופעה חיובית (בניגוד למתואר לעיל).

האופי הגנטי הברור של התכונה להסתדקות קליפת הפרי, והציבות בהופעתה בדורות שונים ובתנאים שונים (high inheritance and penetrance), מקלים על לימוד הבקרה הגנטית שלה. מחקר זה עשוי להוביל להבנה של תפקוד הגנים הקובעים את היווצרות ומבנה הקוטיקולה של הפרי, תחום שטרם נחקר ביסודיות. לימוד הגורם האחראי לתופעה עשוי גם לשפוך אור על הגורמים המביאים לתופעות ההיסדקות האחרות, המהוות מפגע חקלאי חמור.

3. מטרת העבודה

מטרת העבודה היתה לבודד את המרכיב הגנטי האחראי להורשת תופעת המ"ס בפרי העגבנייה. השלב הראשון של העבודה כלל ייצוב קווים כמעט איזוגנים (Near Isogenic Lines) המכילים מקטע גנומי ממין הבר *S. habrochaites*, הנבדלים בתכונת מעבר מים דרך הקוטיקולה של הפרי. חומר גנטי זה היה הבסיס למחקר, שכלל את מטרות המשנה הבאות:

3.1 אפיון פנוטיפי של תופעת חדירות פרי העגבנייה למים

- א. אפיון תכונת איבוד המים בפרי העגבנייה.
- ב. בחינת השאלה האם איבוד המים הוא דרך הקליפה בכלל, ודרך סדקים בקליפה בפרט.
- ג. חקר מבני (Structural composition) של המיקרו-סדקים באמצעות SEM (Scanning Electron Microscope).
- ד. בחינת המתאם הפנוטיפי שבין הופעת המ"ס בקליפה ובין קצב איבוד המים של הפרי.

3.2 אפיון התורשה של תופעת חדירות הקליפה, ומיפוייה על גבי המפה הגנומית

- א. בחינת התורשה של תופעת המ"ס בקליפה ואפיונה כגן עיקרי יחיד (*Cwp*).
- ב. מיפוי גנטי-מולקולארי כללי של הגן *Cwp*.
- ג. מיפוי הגן *Cwp* ברמת רזולוציה גבוהה.

3.3 אפיון השפעתו של הגן *Cwp* באוכלוסיות מתפצלות

- א. בחינת השפעת *Cwp* על קצב הייבוש של הפרי.
- ב. בדיקת השפעתו של *Cwp* על תכונות חקלאיות חשובות כגון גודל הפרי, כלל המסיסים המוצקים (TSS) וכמות סוכרים בפרי.
- ג. בחינת הקשר שבין הגנוטיפ של הגן *Cwp* לבין "פיצוצים" בפרי.
- ד. בדיקת השפעת הגן *Cwp* על משקל הקוטיקולה ומרכיביה.

ה. בחינת השפעת *Cwp* על קצב גדילת הפרי בשלבי ההתפתחות הסופיים של הפרי (באמצעות טכנולוגיית LVDT).

3.4 בידוד הגן למיקרו-סדקים באמצעות Positional Cloning ואפיונו

- א. בידוד גנים המועמדים להוות את הגן *Cwp* באמצעות Positional Cloning.
- ב. ניתוח ביו-אינפורמטי של הגנים המועמדים מתוך ה- Positional cloning.
- ג. אנליזות ביטוי של הגנים המועמדים, תוך כדי זיהוי הגן בעל הפוטנציאל הגדול ביותר להיות הגן *Cwp*.
- ד. הוכחת בידודו של הגן *Cwp* באמצעות ניסויי התמרה (טראנספורמציה) לשני זני תרבות של העגבנייה.
- ה. בחינה מקיפה של התפלגות תכונת איבוד המים דרך מ"ס בקליפת הפרי של פרטים מותמרים מדור T_1 .
- ו. בחינת השאלה האם הגן *Cwp* מתבטא אך ורק בקליפת הפרי של העגבנייה.
- ז. מציאת גנים הומולוגים של הגן *Cwp* בגנום העגבנייה, מיפויים ואפיון תפקידם הביולוגי ביחס לגן *Cwp*.
- ח. בניית מודל המנסה להסביר את תפקידו המולקולארי של הגן *Cwp*.

3.5 להתחקות באמצעות הגן *Cwp* אחר האבולוציה של שימור המים בפרי העגבנייה במעבר מהבר

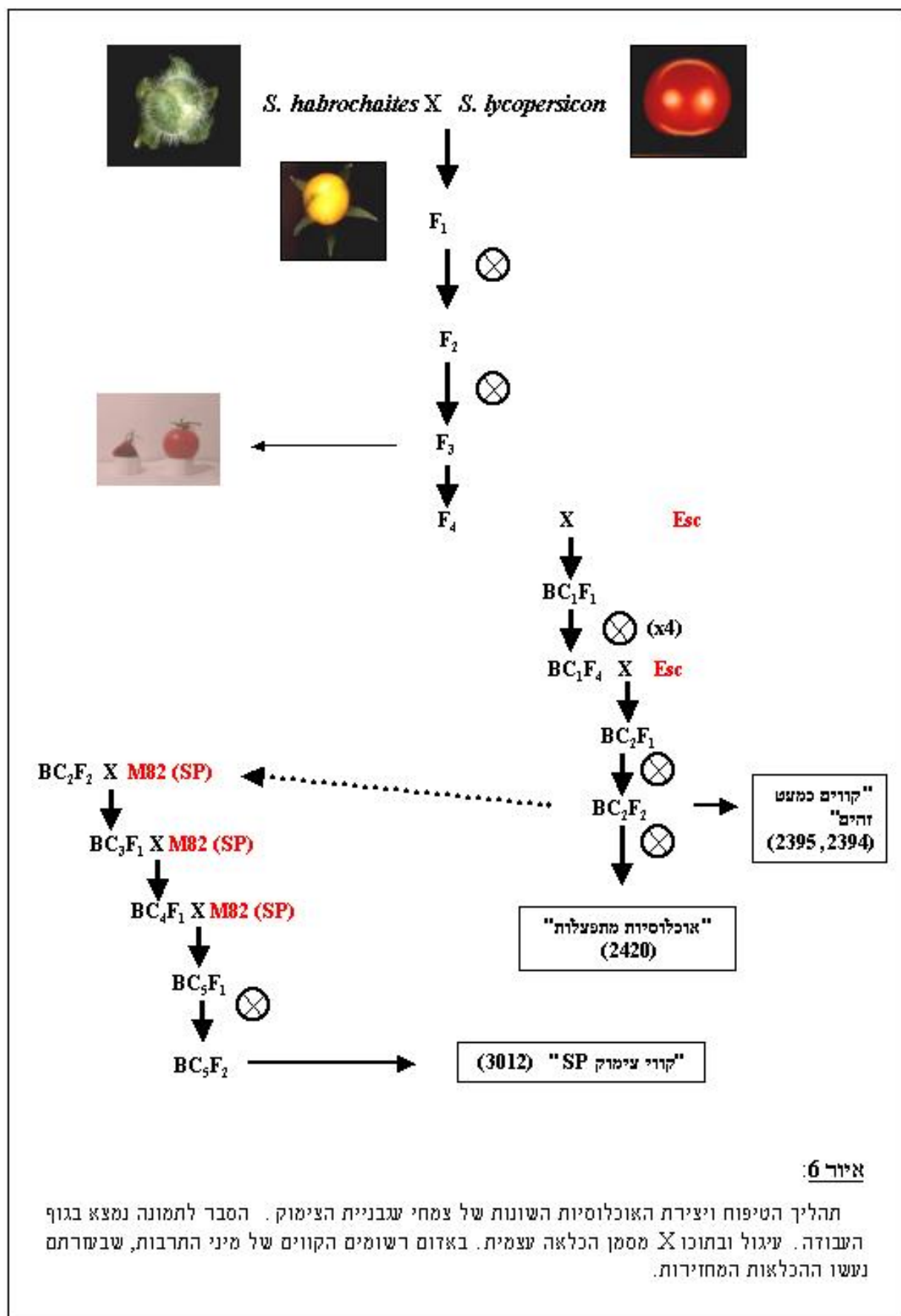
לתרבות.

- א. ניתוחי הבדלי הביטוי של הגן *Cwp* בין מיני בר וזני תרבות שונים של העגבנייה.
- ב. השוואת רצף הפרומוטור של הגן *Cwp* בין מיני העגבנייה הנ"ל, במטרה לזהות אזור ספציפי בפרומוטור שאחראי על בקרת ביטוי.

4. שיטות וחומרים

4.1 החומר הצמחי ובניית אוכלוסיות הניסוי

מקורן של רוב האוכלוסיות ששימשו לניסויים בעבודה הנוכחית, הנו בהכלאה הראשונית בין זן העגבנייה התרבותית (*S. lycopersicon*) מסוג "צרי", בעל צורת גידול בלתי-מסיימת, ובין אחד ממיני הבר של העגבנייה (*S. habrochaites*), שמקורו בפרו (accession no. LA1777). על בסיס הכלאה זו, נבנתה סדרה של קווים כמעט איזוגנים (Near Isogenic Lines) מתקדמים, כמתואר להלן (איור 6). פרט של קו עגבנייה תרבותית (E) הוכלא עם מין הבר (H) ליצירת צמח F_1 היברידי. צמח זה, בעל פרי צהוב אופייני, עבר הכלאה עצמית ליצירת אוכלוסיית F_2 מתפצלת. המרחק הגנטי הרחוק יחסית שבין שני ההורים, הביא לכך שמתוך מאות צמחים שגדלו, רק 25 צמחים הניבו פירות בעלי זרעים. כחלק ממערכת טיפוח (שמטרתה שיפור איכות פרי העגבנייה), נבחרו להמשך הסלקציות שלושה צמחי F_2 , שהכילו כמויות סוכרים גבוהות בפרי. צמחים אלה עברו שלב נוסף של הכלאה עצמית ליצירת שלושה אוכלוסיות F_3 (10 צמחים לכל אוכלוסייה). פירותיהם של הפרטים באוכלוסיות אלה הושארו במכוון על גבי השיח לזמן רב לאחר ההבשלה, וזאת על מנת לזהות פרטים אשר מאבדים מים מהפרי בקצב מהיר. ואכן, מתוך אוכלוסייה זו נבחר פרט אחד ($F_3-203-10$), אשר במקום להתרכך ולהרקב, הראה סימנים של התייבשות או "הצטמקות" של הפרי השלם (ראה איור 5). פרט זה עבר הכלאה עצמית (self-cross) ליצירת דור F_4 . פרט בעל התכונה מדור F_4 הוכלא בהכלאה חוזרת (back-cross) עם ההורה התרבותי (E), ומהכלאה זו נוצרה אוכלוסיית BC_1F_2 המתפצלת לתכונה הפרטים בעלי תכונת ה"הצטמקות" באוכלוסייה זו איבדו מים בקצב מהיר, כאשר הפירות היו עדיין על צמח האם או לאחר הקטיף כשאוחסנו בטמפרטורת החדר. צמחים נבחרים אלה עברו סדרה נוספת של שתי הכלאות עצמיות, שלוותה בסלקציות לתכונה, ליצירת אוכלוסיית BC_1F_4 . פרטים מתייבשים מאוכלוסיית BC_1F_4 , עברו הכלאה מחזירה נוספת עם מין התרבות ליצירת צמחי BC_2F_1 . מצמחים אלה נבנו שתי אוכלוסיות BC_2F_2 (2394 ו-2395) המתפצלות לתכונה. פרטים קיצוניים מאוכלוסיות אלה היוו את הבסיס לחלק מהאנליזות בעבודה, וכוננו על ידינו – "קווים כמעט זהים" (ראה להלן), כאשר קווים הומוזיגוטים מצטמקים כונו HH ואילו קווים לא מצטמקים כונו EE.



בנוסף, פרטים הטרוזיגוטים מאוכלוסייה זו (HE), עברו סדרה נוספת של הכלאות עצמיות ליצירת אוכלוסיות BC₂F₃. אלו הן האוכלוסיות הגדולות, שכונו על ידינו "האוכלוסיות המתפצלות" (ראה להלן), ועליהן נערכו אנליזות נוספות (כגון יצירת אוכלוסיית הענק לאנליזת ה-map based gene cloning).

בנוסף לשתי אלה, נבנתה גם סדרה נוספת של קווים כמעט איזוגנים (3012), מהכלאה של פרט HH מצטמק (מאוכלוסיית 2394) עם זן תרבותי של עגבנייה לתעשייה (M82), בעל צורת גידול מסיימת (Self Pruning (SP)), אשר לוותה בשלושה סיבובים נוספים של הכלאות מחזירות לקו התעשייה.

אוכלוסיות נוספות המתוארות בעבודה, שמקורן ממיני בר אחרים של העגבנייה היו:

(1) קווי אינטרוגרסיה, שמקורם מהכלאה בין זן העגבנייה לתעשייה M82 עם מין הבר (*Eshed S. pennellii*) (Eshed and Zamir, 1995), אשר התקבלו ממעבדתו של דני זמיר, האוניברסיטה העברית בירושלים.

(2) קווי אינטרוגרסיה, שמקורם מהכלאה בין זן של עגבנייה תרבותית (VF36 עם מין הבר *S. lycopersicoides*) (Chetelat and Meglic, 2000), אשר התקבלו ממרכז ה-TGRC, דיוויס, קליפורניה.

(3) לצד האוכלוסיות השונות וקווי ההורים, גודלו כביקורות גם מיני בר נוספים של עגבנייה, אשר נתקבלו מה-Tomato Genetic Resource Center (TGRC), דיוויס, קליפורניה:

S. cheesmaniae (LA0166)

S. pimpinellifolium (LA0114)

S. chmielewskii (LA1028)

S. cerasiforme (עשרה קווים שונים המייצגים אוספים שונים)

S. pennellii (LA0716)

הצמחים גודלו במצעים מנותקים (דליים 1-15) בתנאי חממה כמקובל, וכפי שמפורט בעבודה קודמת (Miron and Schaffer, 1991). המשקל הממוצע וקצב ההתייבשות של הפירות נקבעו (כל-עוד לא מצוין אחרת בגוף העבודה) על ידי איסוף של חמישה פירות בשלב האדום בוגר, והנחתם על גבי משטח של רשת בטמפרטורת החדר (תנאים חצי-מבוקרים – 15-25 מ"צ). הפירות נשקלו כל 2-5 ימים (בהתאם לניסוי). המשקל היבש של הפירות נקבע לאחר חצייתם וייבושם למשך 7 ימים בטמפרטורה של 60 מ"צ.

4.2 בדיקת סוכרים בפרי

לבדיקת סוכרים מסיסים, נלקחה דגימה של כ- 0.5 גרם רקמת פריקרב מהפרי הטרי. הסוכרים מוצו באתנול 80%. נעשו שלושה מיצויים ב- 70 מ"צ, ולאחר מכן הדוגמאות נודפו עד ליובש (Miron and Schaffer, 1991). המשקע שהתקבל הומס במיליליטר אחד של מים מזוקקים פעמיים, והתמיסה שהתקבלה סוננה דרך פילטר 0.45 מיקרון. האנליזה של הסוכרים נעשתה ב- HPLC, בקולונת Fast Carbohydrate של Bio-Rad, כאשר כממס שימשו מים מזוקקים פעמיים, לפי הוראות היצרן. גלוקוז ופרוקטוז זוהו לפי זמן יציאתם מהקולונה. כמות הסוכר חושבה בהתאם לסטנדרטים שהוזרקו במקביל.

4.3 בדיקת נוכחות מיקרו-סדקים וניתוח אולטרא- מבני

בדיקת נוכחותם של מ"ס בקליפת הפרי נעשתה על ידי בינוקולר שולחני (הגדלה עד פי 70), או באמצעות זכוכית מגדלת (הגדלה עד פי 20). צילומים של מ"ס נעשו על ידי חיבור של מצלמה דיגיטלית (Nikon 1050) לבינוקולר השולחני. מידת הסידוק נקבעה על ידי גודל הסדקים וצפיפותם. לכל פרי ניתן ציון מ- 1 ועד 5, המהווה אומדן למידת הסידוק, כאשר ציון 1 משמעותו שלא ניתן להבחין בסדקים כלל, ו- 5, משמעותו מ"ס בצפיפות גבוהה ביותר העוטפת את כל שטח פני הפרי. דוגמא לאומדנים של מידת המ"ס, בעלי ציון 1, 3 ו- 5, כפי שנקבעו על-ידי הסתכלות בבינוקולר, ניתן לראות באיור 26 (פרק התוצאות – עמוד 78).

המבנה האולטרא-מבני (ultra-structural) של המ"ס נבחן באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק - Scanning Electron Microscope (SEM). לאנליזה ה- SEM, נלקחו חלקי פירות בגודל של 5 מ"מ לערך. הפירות נלקחו מקווים בעלי מ"ס ומקווים נטולי מ"ס. הרקמה קובעה בתמיסת 4% glutaraldehyde למשך 48 שעות. לאחר מכן, הדגימות עברו תהליך של פוסט-פיקסציה בתמיסת 1% osmium tetroxide (Yasuzumy and Sugihara, 1964). בשלב הבא הדגימות הוטבלו בתמיסות בעלות ריכוז הולך ועולה של אצטון ויובשו מיד לאחר מכן. הדגימות נבדקו באמצעות המיקרוסקופ הסורק (Joel T 330A, Tokyo, Japan), במכון למדעי הקרקע, מנהל המחקר החקלאי, וביחידה למיקרוסקופיה, האוניברסיטה העברית בירושלים.

4.4 הפקת קוטיקולה נקייה מתאים

תמיסת ההפקה (PCS) (200ml):

0.2gr pectinase (Sigma # P2611)

0.4gr cellulase (Sigma #C8546)

1.64gr sodium acetate

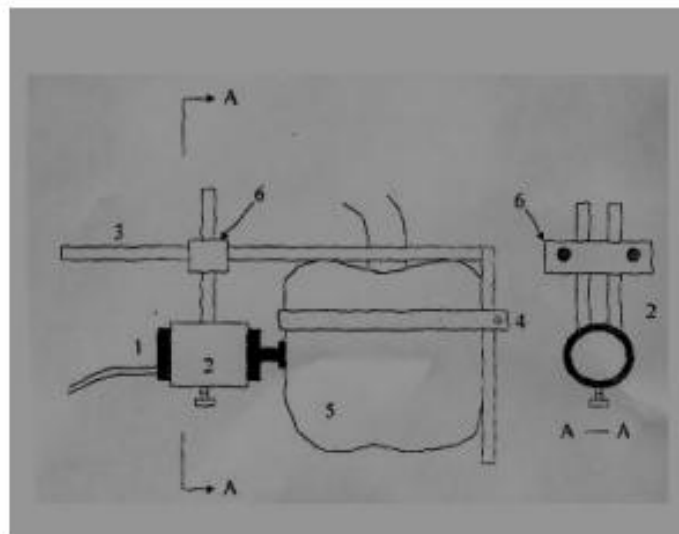
התמיסה הובאה לpH 3.8 על ידי חומצה אצטית.

1. מכל טיפול הועברו דיסקיות של קליפת פרי בקוטר של 5 מילימטר למבחנות של 50 מ"ל, שאליהן הוספו 30 מ"ל של תמיסת הפקה PCS
2. אינקובציה ב-37 מ"צ בטלטול במשך יומיים.
3. שטיפת הדיסקיות במי ברז על גבי מסננת.
4. אינקובציה ב-37 מ"צ למשך הלילה בבופר PCS- בתוך מבחנה שקולה.
5. שטיפה במי ברז.
6. ייבוש הקליפות בתנור ב-60 מ"צ בתוך מבחנות שקולות למשך יומיים.
7. שקילת חומר יבש.

חומר זה הווה גם את הבסיס לאנליזת ה-GC-MS של מרכיבי הקוטין, השעוות והפנולים של קליפת הפרי. הבדיקה נעשתה במעבדתו של ריינהרד גטר (גרמניה).

4.5 מדידת קצב גדילת הפרי באמצעות LVDT

בדיקת קצב גדילת הפרי נעשתה באמצעות מערכת ה-LVDT (Linear Variable Displacement Transducers). עיקרון הפעולה של המערכת מתואר בצורה מפורטת בעבודתם של Yao וחובריו (2000), אשר בדקו את השפעת גדילת הפרי היומית על הופעת סדקים בפלפל, ועיקריה הן כדלהלן (איור 7). חיישן חשמלי, המתרגם את שינויי המרחק למתח חשמלי, מודבק על גבי הפרי המתפתח. גדילת הפרי גורמת ללחץ על הסנסור, המביא לשינוי במתח החשמלי. שינוי זה מתורגם באמצעות נוסחה פשוטה לשינוי בקוטר הפרי (במיקרונים). על מנת לקבע את המערכת ולמנוע תזוזות לא רצויות, מולבשת מסגרת מתכת (המורכבת משני מוטות) על גבי הכתפיים של הפרי הנבדק באמצעות גומיה (איור 2). הנתונים נלקחו משישה פירות בעלי גנוטיפ Cwp^{HH} ושישה פירות בעלי גנוטיפ Cwp^{EE} . הפירות נלקחו מצמחים שונים. המדידה נעשתה בכל רבע שעה במשך 20 יום. הבדיקה החלה כאשר הפרי היה בשלב הירוק בוגר והסתיימה בשלב האדום בשל.



6

אזר 7:

מערכת ה-LVDT לבדיקת שינויים בקצב גדילת הפרי (מתוך Yao et al., 2000)

4.6 אנליזה של חומצות גרעין (DNA)

4.6.1 מיצוי DNA בשיטת Eduards

בופר Eduards:

200mM Tris HCL
250mM NaCl
25mM EDTA
0.5% SDS

- (1) טחינת כ- 50 מ"ג רקמה והוספת 400 מיקרוליטר של הבופר.
- (2) vortex למשך 5 שניות.
- (3) צנטריפוגציה במהירות של 13000 סל"ד במשך 5 דקות.
- (4) הוצאה של 300 מיקרוליטר נוזל עליון מהמבחנה והעברתם למבחנה חדשה.
- (5) הוספת 300 מיקרוליטר של isopropanol ערבוב ידני ואינקובציה בטמפרטורת החדר למשך 2 דקות.
- (6) צנטריפוגציה במהירות של 13000 סל"ד למשך 8 דקות.

- (7) שפיכת הנוזל העליון וייבוש.
- (8) הוספת 500 מיקרוליטר של 70% אתנול.
- (9) צנטריפוגציה במהירות 13000 סל"ד למשך 5 דקות וייבוש בואקום.
- (10) הוספת 200 מיקרוליטר של מים (dd).

4.6.2 פיתוח סמני CAPs

סמני PCR מסוג CAPs (Cleaved Amplified Polymorphism) פותחו על בסיס סמני RFLP הקיימים במפה הגנטית של העגבנייה (Tanksley et al., 1992), או על ידי כל רצף DNA ידוע אחר (cDNA או גנומי). במקרה הראשון, נבחרו שבעה לוקוסים אשר בעבר נמצא כי קיים קשר שלהם לתכונת הסדקים בפרי. פלסמידים מסוג BlueScript (Stratagene #3547) המכילים מקטעי DNA המייצגים את סמני ה-RFLP הנבחרים, התקבלו מה-Tomato Genome Center במכון וויצמן. מקטעי פלסמידים אלה רוצפו באופן חלקי על ידי שימוש ברצפי ה-T7 וה-T3. על בסיס רצפים אלה, תוכנו פריימרים ספציפיים על ידי שימוש בתוכנת ה-Primer Express Program (Perkin Elmer Biosystems) Version 1.0. פריימרים אלה שימשו לריאקציית PCR, שמטרתה חיפוש פולימורפיזם בין ההורים *Solanum lycopersicon* ו-*Solanum habrochaites* ובין הצאצאים של ההכלאה ביניהם.

ראוי לציין, כי בעבודה הנוכחית ייצרנו עשרות סמני CAPs, שמקורם ברצפי DNA ידועים (מסמני RFLP, גנים מועמדים, קצוות של BACs וכדומה). להלן מודגם הייצור של שני סמני CAPs שנוצרו על בסיס סמני ה-RFLP TG163 ו-TG464. הפריימרים לסמנים היו:

TG163 F: 5'-TGCAATCCCGAACATGAAGAC-3'

TG163 R: 5'-CCTTCTGGTCGCATCTGTGTCT-3'

TG464 F: 5'-TCAGGGTGAGGGGTAATAATTGAG-3'

TG464 R: 5'-GCTTAAACTCAAGTCTCCTCGCA-3'

תהליך ההגברה: ריאקציה ההגברה נערכה במכשיר PCR (Mastercycle Gradient, Eppendorf, Germany)

באמצעות שימוש ב-DNA Taq Polymerase (SuperNova Taq Polymerase, JMR Products, Kent, UK).

הנפח הכולל של הריאקציה היה 25 מיקרוליטר אשר הכיל:

10 x reaction buffer
0.125 mM for each deoxynucleotide
0.5 µg primer
50-100 ng genomic DNA

תנאי ההגברה וההיברידיזציה עברו אופטימיזציה לכל זוג של פריימרים בנפרד. על מנת לזהות את אנזימים ההגבלה

שייתן את הפולימורפיזם הרצוי בין האללים Cwp^{HH} ו- Cwp^{EE} , נערכה ריאקציה בנפח כולל של 10 מיקרוליטר שכללה:

3.5 µl PCR product
1 µl 10 x restriction buffer
1-3 Units restriction enzyme

תוצרי החיתוך נבדקו על 1% ג'ל אגרוז.

DraI ו-*HinF1* נמצאו כמתאימים לסמנים TG163 ו-TG464, בהתאמה, והם נבחנו על אוכלוסיות המתפצלות

לתכונה. שיטה דומה בוצעה לגבי כל שאר סמני ה-CAPs.

4.6.3 סימון רדיואקטיבי וסריקת ממברנות BAC

מקורם של כל ה-BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) המתוארים בעבודה, הוא מ-Clemson

University Genomic Institute, USA, והשימוש נעשה על ידי Tomato Heinz 1706 BAC Library Filters

(LE_HBa). הממברנות המייצגות את ספריות ה-BAC נסרקו על-מנת לזהות clone ספציפי באמצעות גלאי

רדיואקטיבי.

ה-DNA סומן באמצעות Random Priming, על ידי NEBlot™ Kit (New England BioLabs inc.)

(#N1500S), לפי הוראות היצרן. ל-DNA 25ng נעשתה דנטורציה על ידי הרתחה ל-10 דקות. הוספו 0.5mM מכל

אחד מהנוקלאוטידים dATP, dGTP, dTTP ו- $[\alpha^{32}P]dCTP$ 50µCi ו-2U אנזימים Klenow בבופר

הקסונוקלאוטיד.

תמיסת הריאקציה הועברה אינקובציה ב- 37 מ"צ למשך חצי שעה. הגלאים המסומנים רדיואקטיבית, עברו ניקוי בקולונה, Mini Quick Spin Column תוצרת Roche, לסילוק הנוקלאוטידים והפריימרים החופשיים (לפי הוראות היצרן).

פרה-היברידיזציה: חסימת האתרים הפנויים על גבי הממברנה נעשתה על-ידי השרייתה, תוך כדי טלטול, למשך 5 שעות בתמיסת היברידיזציה ללא גלאי בטמפרטורה של 65 מ"צ.
תמיסת ההיברידיזציה:

6 x SSPE
(0.1% PVP, 0.1% Ficoll, 0.1% BSA) 5 x Denhart solution
25% formamide
150µg/ml Salmon sperm DNA
0.5% SDS

ההיברידיזציה נעשתה במשך 16 שעות בנוכחות הגלאי המסומן. גלאי dsDNA, הורתח למשך 10 דקות והוסף לתמיסת ההיברידיזציה.

שטיפות הממברנה וחשיפה: בוצעו שלוש שטיפות ברמות החמרה עולות:

1. 0.1% SDS + 2 x SSC בטלטול בטמפרטורת החדר.

2. 0.1% SDS + 1 x SSC בטלטול ב- 65 מ"צ למשך 20 דקות.

3. 0.1% SDS + 0.5 x SSC בטלטול ב- 65 מ"צ למשך 20 דקות.

רמת ההחמרה בשטיפות שונתה בהתאם לרמת ההומולוגיה של הסמן. לאחר הייבוש בטמפרטורת החדר, נחשפה

הממברנה לפילם X-ray 667 של Kodak, או לחילופין באמצעות מכשיר phosphoimager (FLA-5000; FujiFilm).

4.6.4 הפקת BACS והכנת תת-ספרייה של BAC

הפקת הפלסמידים של ה-BAC המתאים נעשתה מחיידקי ה-*E. coli* הנושאים אותו באמצעות ה-Maxi

Plasmid Purification Kit ([®]12263 QIAGEN), לפי הוראות היצרן.

ה-BAC Hba_37B8 עבר תהליך של יצירת תת-ספרייה, על ידי חיתוכו במספר אנזימי הגבלה והחדרת

המקטעים לתוך הוקטור BlueScript II ks+ (Stratagene). לאחר מכן, הוחדרו הפלסמידים לתוך תאי HD5 של *E.*

coli באמצעות אלקטרופורציה.

4.6.5 הליכה על פני הכרומוזום

לשם הפרוצדורה של ה"הליכה על פני הכרומוזום", קצוות של BACs רוצפו (באמצעות הפריימרים Sp6 ו-T7), ועל בסיס הרצף פותח תוצר PCR ספציפי. תוצר ה-PCR החדש שהופק, סומן בסימון רדיואקטיבי והיווה גלאי לסריקה נוספת של ספריית ה-BACs, על-מנת לגלות מושבות חדשות.

4.6.6 אנליזת Southern

הפקת DNA:

ה-DNA הופק מכל צמח בנפרד, מעלים צעירים.

הפקת DNA 0.5mg מעלים, בוצעה לפי הפרוטוקול שתואר ע"י Doyle וחובריו (1990).

הכנת הממברנות

10 µg של DNA גנומי מכל צמח נחתכו באנזמי ההגבלה *NdeI*, *HindIII*, *HincII*, *DraI*, *EcoRI* ו-*NdeI*. ה-DNA החתוך הורץ על-גבי ג'ל אגרוז 1% במשך כ-16 שעות במתח של 30V. לאחר ההרצה צולם הג'ל לקביעת איכות החיתוך, וה-DNA הועבר לקיבוע על-גבי ממברנה Genescreen plus. ההעברה נעשתה לפי פרוטוקול היצרן (PerkinElmer Life Sciences):

1. טלטול הג'ל ב-0.25M HCl במשך 15 דקות.

2. שטיפת הג'ל במים.

3. טלטול הג'ל ב-0.4M NaOH במשך 15 דקות.

4. העברה קאפילארית של ה-DNA מהג'ל לממברנה על-גבי גשר הטבול ב-0.4M NaOH במשך כ-12 שעות.

5. קיבוע ה-DNA על גבי הממברנה בטמפרטורה של 65°C במשך שעתיים.

הכנת גלאי ה-DNA:

הגלאי הנו קלון של רצף cDNA של הגן *Cwp*

הסמן שובט בתוך פלסמידים הנמצאים בחיידקי *E. coli*. השימוש בסמן נעשה על-ידי הגברתם בריאקציה PCR,

בעזרת הפריימר M13. הסימון של תוצר ה-PCR, ההיברידיזציה והשטיפות נעשו כפי שתואר לעיל ("סימון

רדיואקטיבי של ממברנת ה-BAC").

4.7 בדיקת ביטוי (mRNA)

4.7.1 מיצוי RNA כללי מצמתים

מיצוי ה-RNA נעשה לפי Komor וחובריו (1981) עם מספר שינויים. כל התמיסות והכלים ששימשו למיצוי ה-RNA עברו עיקור באוטוקלב.

1. 3 גרם רקמת פריקרפ (או קליפת פרי) שהוקפאה בחנקן נוזלי מיידית עם הקטיף, נכתשה במכתש ועלי עם חנקן נוזלי.

2. האבקה שהתקבלה הורחפה בשלושה מיליליטר לגרם רקמה בופר כתישה שהכיל: 50mM Tris HCL (pH 7.5), 50mM EDTA, 5mM LiCl ו-0.5% SDS, ונפח שווה של פנול רווי

3. התרחיף טולטל במהירות של 250 סיבובים לדקה בטמפרטורת החדר למשך שלושים דקות, וסורכו 12,000g ל-10 דקות.

4. הפאזה העליונה נאספה, והוסף לה נפח שווה של כלורופורם : איזואמיל אלכוהול (1:24).

5. התרחיף טולטל למשך 20 דקות וסורכו כנ"ל. הפאזה המימית נאספה והועברה לתמיסת LiCl 2M (100 מיקרוליטר) למשך הלילה ב-4 מ"צ.

6. התרחיף סורכו ב-12,000g למשך 15 דקות.

7. התרחיף שהתקבל נשטף פעמיים ב-LiCl 2M ופעמיים ב-70% אתנול קר, יובש בואקום והורחף במים מזוקקים פעמיים.

4.7.2 ניקוי ה-RNA משאריות DNA:

1. סירכוז ב-7,500g למשך 7 דקות ב 4 מ"צ.

2. הוצאת הנוזל החוצה והוספת הראגנטים הבאים:

3µl Buffer DNase
Ribonuclease Inhibitor 1µl (Promega, U.S.A) (Rnasin)
24µl H₂O+ Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)
2µl DNase (Promega, U.S.A)

3. אינקובציה של 60 דקות בטמפ' של 37 מ"צ.

4. הפסקת הריאקציה ע"י הכנסת 5M EDTA (Ethylene Diamine TetraAcetate) ואינקובציה של 15

דקות ב- 65 מ"צ.

בדיקת ניקיון דגימת ה RNA מ- DNA נעשתה ע"י הרצה ב- PCR עם פריימרים לגן המקודד ל- Actin.

4.7.3 יצירת ה-cDNA

1. לתוך מבחנת אפנדורף הוכנסו:

Total RNA (5-20 µg)
Random hexamer 0.2µg (סיגמה)
Oligo(dT)₁₈ 0.5µg (סיגמה)
DEPC H₂O

2. אינקובציה ב- 70 מ"צ למשך 5 דקות

3. הוספת החומרים הבאים:

4µl 5x reaction buffer
2µl 10mM dNTPs
20U Rnasin
DEPC H₂O

4. אינקובציה ב- 25 מ"צ למשך 5 דקות.

5. הוספה 100U של האנזים Reverse Transcriptase (RevertAidTMM-MuLV של חברת Fermentas).

6. אינקובציה ב- 25 מ"צ למשך 10 דקות

7. אינקובציה ב- 42 מ"צ למשך 60 דקות.

8. הפסקת הריאקציה על ידי אינקובציה ב- 70 מ"צ למשך 10 דקות.

4.7.4 אנליזת RT-PCR לקביעת רמת הביטוי של הגנים

פריימרים ל- RT-PCR:

פריימרים ספציפים ליצירת מקטע קצר (לאנליזת - on-line quantitative PCR) תוכננו באמצעות התוכנה

Primer Express Program, version 1.0 (Perkin Elmer Biosystems). הפריימרים תוכננו לשלושת הגנים

שעלו באנליזת ה- Positional Cloning כדלהלן:

- 1) *Zinc* gene, forward, 5'-AATAATGCGAATCGAATCACTA-3' and reverse, 5'-AAGGCTAAATCTCCTCCTTTCT-3' (amplicon 140 bp).

2) *Dbp* gene, forward, 5'-TGGATAAGCGGACGACTCTATTG-3' and reverse, 5'-CTGTTGTTTGGGAAGTGGCTTCT-3' (Amplicom 180 bp).

3) *Put* gene, forward, 5'-CTCTCCTTGGCCCAAGGCTCAA-3' and reverse, 5'-CAGCTTTAGTGGTATCTCTCATCA-3' (amplicon 130bp).

בנוסף, הגן לאקטין (*actin*) שימש כגן ה-reference:

4) *Actin* gene (Gene bank accession No. BF096262), forward, 5'-CACCATTGGGTCTGAGCGAT-3' and reverse, 5'-GGGCGACAACCTTGATCTTC-3' (amplicon 251bp).

ריאקציית ה-PCR הכמותית נעשתה במכשיר GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PerkinElmer Biosystems), כאשר ה-cDNA משמש כתבנית. כחומר הדיטקציה שימש ה-SYBR Green Master Mix, המכיל AmpliTaq Gold, לפי הוראות היצרן (Eurogentic, בלגיה).

נפח הריאקציה (25 מיקרוליטר) כלל את המרכיבים הבאים: דגימת cDNA, פריימרים בריכוז של 10 pmol (Reverse and Foreword), 2.5µl 10X Reaction Buffer, 50mM MgCl₂ בנפח של 1.5µl, 5Mm dNTP, mix בנפח של 1µl, 0.125µl enzyme. וכן הצבע SYBR GreenTM בנפח של 0.75µl.

מכשיר ה-thermocycler תוכנת ל-40 מעגלים לכל ריאקציה, כאשר בתחילה היה שלב דנטורציה ראשוני של 10 דקות ב-95 מ"צ. כל מעגל כלל שלב דנטורציה של 30 שניות ב-95 מ"צ, שלב צימוד הפריימרים (annealing) של 30 שניות, בטמפ' של 61 מ"צ, ושלב הארכה (elongation) של 30 שניות ב-72 מ"צ. איסוף הנתונים נערך ב-77 מ"צ למשך שלושים שניות. אנליזה ראשונית של עקומת ה-dissociation לתוצר ה-PCR הראתה כי תוצר זה הנו אמיתי (התוצר נשאר מעל 77 מ"צ). עקומת כיוול לוגריתמית, שכללה כמויות ידועות עולות של cDNA, הורצה עבור כל אחד מזוגות הפריימרים הנ"ל, כולל הפריימרים לגן *Actin* לנירמול. כל תוצרי ה-real time PCR נבדקו על גבי אגרוז ג'ל (2%), ונשלחו לריצוף על מנת לאמת את התוצאות.

4.8 ניסויי טראנספורמציה

4.8.1 פרוצדורת השיבוט

הרצף המלא של הגן *Cwp* חולץ מתוך ה- cDNA של פרי עגבנייה צעיר (10 ימים לאחר חנטה), מפרט בעל

הגנוטיפ Cwp^{HH} , וזאת באמצעות הפריימרים הבאים:

Cwp forward, 5'-GTAGTACTATATAAACCATGTGAG-3'

Cwp reverse, 5'-CATATGTTGACATATCTAATG-3'

הרצף המלא (930 בסיסים) שובט לתוך pGEM-T easy vector (Promega), ע"י שימוש בפרוצדורת ה- T-A

cloning. לאחר מכן הוא שובט בשנית לוקטור BlueScript II ks+ (Stratagene), על ידי שימוש באנזים ההגבלה

EcorI (NEB #R0101). הגן *Cwp* שובט בשלישית לקטע שבין אתרי ה- cauliflower 35S promoter וה- n-

terminator, של הוקטור הבינארי pBIN PLUS (Ghosh et al., 2002), תוך שימוש באנזימי ההגבלה *XhoI*

(NEB #R0146) ו- *XbaI* (NEB #R0145). הוקטורים המהונדסים הוחדרו לתוך תאי *E. coli* (strain

DH5alpha, Stratagene) ולאחר מכן לתאי אגרובקטריום קומפוטנטים (*Agrobacterium electro-* EHA105

competent cells).

4.8.2 מצעי מזון

מצעי מזון עוקרו באוטוקלאב בטמפרטורה של 121 מ"צ למשך 20 דקות. מצעים מוצקים קוררו לטמפרטורה של

56-60 מ"צ ובהמשך הוספו האנטיביוטיקות ו/או ההורמונים המתאימים שעברו סטריליזציה על ידי סינון דרך פילטר

של 0.2 μ בתנאים סטריליים, והמצע נמזג לצלחות פטרי או לצנצנות לפי הצורך.

4.8.2.1 מצעי מזון לגידול חיידקי *A. tumefaciens*

LB (Luria –Bertani) medium

	(g / l)
Bacto –trytone	10
Yeast extract	5

NaCl	10
Bacto agar (למצע מוצק)	15
pH 7.5	

4.8.2.2 מצע לזיהוי חיידקי *A. tumefaciens* :

1. Lactose agar

	(g / l)
Lactose	10
Bacto-yeast extract	1
Bacto agar	15

2. Benedict's reagent

תמיסה א'	
sodium citrate	17.3 g
Na ₂ CO ₃	100g
ddH ₂ O	850 ml

תמיסה ב'	
CuSO ₄ •5H ₂ O	17.4g
ddH ₂ O	100 ml

מיד לפני המזיגה על גבי הצלחות תמיסה א' הוספה לתמיסה ב' תוך כדי ערבוב.

4.8.2.3 מצעי גידול צמחים - לעגבניה

1/2 MSO = DO : מצע הנבטת זרעים :

	(g / l)
MS + vitamins	2.3
Sucrose	15.0
Agar	8.0
pH 5.8 (Made with 1 M KOH)	

למצע MSO נוזלי לא מוסיפים אגר

מצעי התמינות (רגנרציה) - D1 ומצע התארכות - D2 :

	(g / l)
MS salts	4.3
Glucose	30.0
Agar	8.0
pH 5.8 (Made with 1M KOH)	

למצע D1 הוספו 1 mg /1 Zeatin, 300mg/1 Carbenecylin ו-100 mg/1 Kanamycin

למצע D2 הוספו 0.1 mg /1 Zeatin, 300mg/1 Carbenecylin ו-100 mg/1 Kanamycin

מצע השרשה MSR :

	(g / 1)
MS Salts	4.3
Sucrose	15
Agar	8.0
pH	5.8 (Made with 1M KOH)

לאחר עיקור וקירור המצע ל-56-60°C, הוספה תמיסה סטרילית של ההורמון IBA בריכוז 2.0 mg/l.

הכנת *A. tumefaciens* להדבקה

תרחיף חיידקי *A. tumefaciens* שגודל ממושבה בודדת נשמר בתמיסה שהכילה 20% גליצרול בטמפרטורה של 70 – מ"צ. 100µl תרבית החיידקים הוספו ל- 25 מ"ל של מצע LB למשך 24 שעות בטמפרטורה של 28 מ"צ. לאחר 24 שעות בתרבית נמהלה ביחס של 1:1000 עם מצע LB והודגרה במטלטלת עד קבלת ריכוז חיידקים של 0.3-0.6 O.D שנקרא בספקטרופוטומטר באורך גל של 600 nm. בתחומי O.D אלו החיידקים מצויים בשלב גידול לוגריתמי הדרוש להדבקת הרקמה הצמחית. תרחיף החיידקים סורכו בצנטריפוגה במהירות של 3000 rpm במשך 10 דקות. המשקע הורחף עם מצע MSO נוזלי לריכוז של 0.3-0.6 O.D.

4.8.3 התמרה והתמיינות של צמחי עגבנייה

התמרת פסיגי עגבנייה בעזרת חיידקי *A. tumefaciens*.

מהלך העבודה: (McCormick, 1991):

א. זרעי עגבניה מהקווים MP-1 (Barg et al., 1997), ו-MicroTom (Meissner et al., 1997) עוקרו בטלטול במשך 20 דקות בתמיסת NaOCl מימית שהכילה 3% כלור פעיל בתוספת טיפת דטרגנט תוך כדי טלטול במטלטלת סיבובית במהירות של 10 סל"ד.

ב. הזרעים המעוקרים הועברו דרך שלושה כלים שהכילו מים מזוקקים פעמיים. הזרעים הושרו כ- 10 דקות בכל כלי במטרה לשטוף את תמיסת ה-NaOCl.

ג. הזרעים השטופים נזרעו במצע MSO 1\2 (כ- 100 זרעים) לקבלת פסיגים.

ד. פסיגים של נבטי עגבניה בני 9-12 יום נחתכו.

ה. בין 150-200 פסיגים הונחו בצלחת פטרי שהכילה מצע DO, כך שהחלק העליון של העלים פנה לעבר המצע. הפסיגים הודגרו בחדר גידול לצמחים בטמפרטורה 25 מ"צ למשך 48 שעות.

ו. תרבית החיידקים המהולה נמזגה לתוך הצלחת שהכילה את הפסיגים (10 ml לצלחת). כעבור כ- 90 דקות הדגרה תרבית החיידקים נשאבה, והצלחת שבתוכה הפסיגים המודבקים בחיידקים, הושארה להדגרה למשך 72 שעות בחושך בטמפרטורה של 25 מ"צ.

התמיינות של פסיגי עגבנייה:

א. יומיים לאחר ביצוע ההתמרה הפסיגים הועברו למצע D1. הפסיגים הועברו למצע חדש כל 10 ימים, כדי לחדש את הטיפול האנטיביוטי בחיידקי האגרובקטריום ולספק מצע טרי להתמיינות צמחונים מותמרים.

ב. נצרון שהתפתח עד לשלב של לפחות שני עלים וקודקוד צמיחה ברור, נותק מן הפסיג והועבר למצע D2 להתארכות.

ג. עם התפתחות הנצרון לצמחון בעל 4-5 עלים ובגובה של 2-3 ס"מ, הצמחון הועבר למצע השרשה (MSR).

ד. צמחון שפיתח שורשים באורך של כ- 2 ס"מ, נותק מהמצע והועבר לתערובת הנבטה שהכילה 70% כבול דק ו- 30% רמקוליט מספר 2 לתקופת הקשחה של 10-15 יום, בחדר גידול בטמפרטורה של 25 מ"צ ובמשטר תאורה של 16 שעות אור, 8 שעות חושך.

ה. כשהצמחון הגיע לגובה של כ- 7 ס"מ הוא נשתל בעציץ (5L) להמשך גידול בחממה.

4.9 ניתוח הנתונים

כל הניתוחים הסטטיסטים בעבודה הנוכחית נעשו באמצעות השימוש בחבילת התוכנה הסטטיסטית JMP (Sall)
(SAS Institute, Cary, N.C.) (and Lehman, 1996). אפקט הטיפולים בניסויים השונים נבחן באמצעות ניתוח
שונות, על ידי שימוש במודל הליניארי הכללי (GLM). ערכי הרגרסיה חושבו לגבי כל פרי בודד, כאשר מידת השיפוע
של הערך מקו הרגרסיה חושב באמצעות ניתוח השונות.

5. תוצאות

5.1 אפיון פנוטיפי של תופעת הדירות פרי העגבנייה למים

5.1.1 אפיון תכונת איבוד המים בפרי העגבנייה

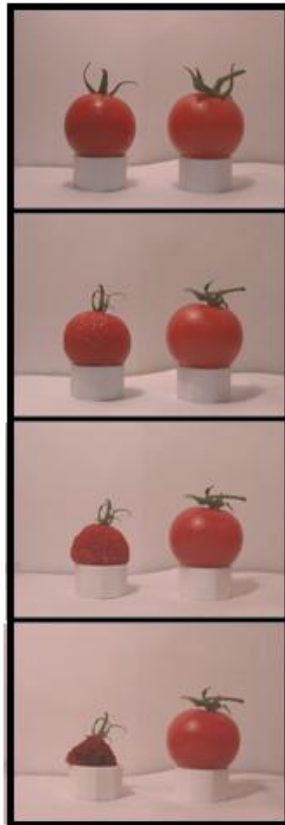
השלב הראשון של העבודה כלל ייצוב קווים "כמעט" איזוגניים (Near Isogenic Lines) הנבדלים בקטע גנומי ממין הבר *S. habrochaites*, המקנה את תכונת התייבשות לפרי הבשל, כאשר הוא נמצא עדיין על צמח האם, או לחילופין כאשר הוא נקטף ומונח בטמפרטורת החדר. התייבשות הפרי הייתה מהירה ביותר, תוך כדי יצירת מה שניתן לכנות "עגבניית צימוק". באיור 8 מוצגות מספר תמונות הממחישות את תהליך התייבשות הפרי הקטוף של פרט מהקו המצטמק, לעומת פרי מקו עגבניית צ'רי רגילה. עד לתחילת הניסוי (זמן 0), לא ניתן היה להבדיל בשוני בין קו העגבנייה הרגיל לזה של עגבניית הצימוק. לעומת זאת, מיד לאחר התחלת האחסון (שבמקרה זה נעשה בטמפרטורה של 37 מ"צ), קו עגבניית הצימוק איבד ממשקלו בצורה מהירה. לאחר 14 יום הוא איבד כמעט את כל תכולת המים שלו, תוך כדי יצירת עגבנייה מיובשת. לעומת זאת, קו הצ'רי הרגיל כמעט ולא איבד מים ולמעשה נשאר שלם.

באיור 8 מתואר ניסוי נוסף, הממחיש את תהליך איבוד המשקל של פירות מקווי עגבנייה המאבדים מים (להלן - HH) בהשוואה לקווים כמעט איזוגניים להם, שאינם מאבדים מים (להלן - EE). מכל פרט נקטפו 5 פירות בשלב אדום בשל. הפירות נשקלו מיד עם הקטיף, ואוחסנו בטמפרטורת החדר (15-25 מ"צ). משקל הפרי הממוצע נמדד כל חמישה ימים. קצב איבוד המשקל של הפירות מהקו HH היה מהיר יותר בצורה מובהקת מאשר של פרטים מהקו EE ($P_{[b1-b2]}$ (0.0001 < . אופן איבוד המשקל היה לוגריתמי (ערכי t^2 למודל לוגריתמי הם >0.99 לשני הגרפים). כך שלמעשה פרי של קו האינטרוגרסיה (HH) איבד באופן קבוע כמחצית ממשקלו כל שמונה ימים. לעומתו, הפירות של פרטים בעלי הגנוטיפ הלא מתייבש (EE), איבדו לאורך כל תקופת הניסוי רק כ- 10% ממשקלם ההתחלתי. יש לציין כי בתחילת הניסוי משקלם של הפירות בקו HH היה נמוך יותר מאשר פירות מקו EE. הדבר נבע מהעובדה, שהפירות של שני הקווים נקטפו בשלב אדום בשל, אשר בו הפירות בעלי הגנוטיפ HH כבר איבדו מים ומשקל, וזאת כשהם עדיין מחוברים לצמח האם. קצב איבוד המים של שני הקווים היה מהיר יותר בתנאים של טמפרטורות גבוהות ולחות יחסית נמוכה, אך עדיין ההבדל בקצב איבוד המשקל בין שני הגנוטיפים נשאר קבוע (תוצאות שאינן מובאות).

איור 8 :

א.

א. השוואה בין פירות של שני קווי עגבנייה, השונים בקצב איבוד מים מהפרי. הפירות נקטפו במצב של פרי בשל, והונחו מיד בטמפרטורה של 37 מ"צ למשך כשבועיים. בכל תמונה, בצד ימין – פרי רגיל. בצד שמאל – פרי בעל חדירות גדולה למים.



0 ימים

4 ימים

10 ימים

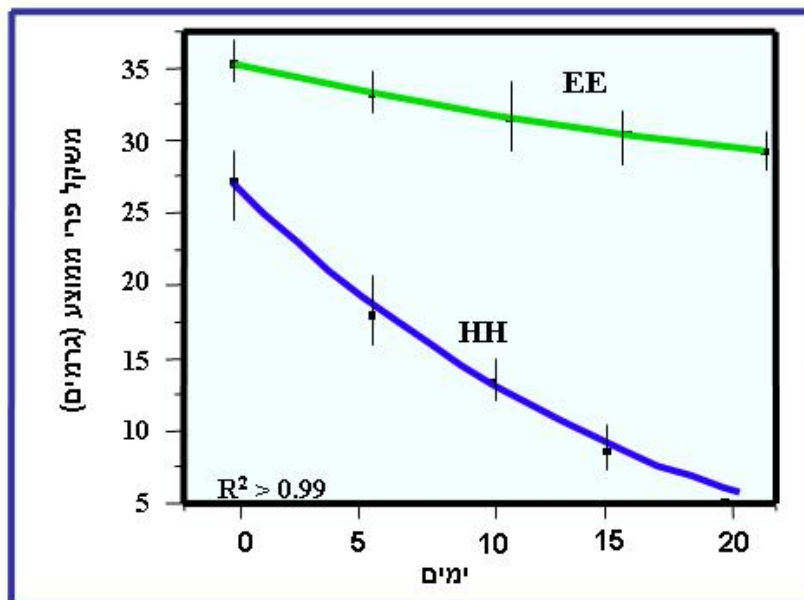
14 ימים

ב. השוואה של קצב איבוד משקל הפרי הממוצע בין שתי קבוצות פרטים מאוכלוסייה של קווים כמעט איזוגנית הנבדלים בקצב אידוי המים מהפרי. מכל אוכלוסייה נבחרו 10 צמחים. מכל צמח נקטפו 5 פירות אדומים. הפירות הונחו בטמפרטורת החדר (15-25 מ"צ). משקלם נבדק כל חמישה ימים.

HH – פרטים מקו מצטמק.

EE – פרטים מקו כמעט זהה גנטי ולא מצטמק.

ב.



נבחנה השאלה, האם תהליך איבוד המשקל הוא תוצאה של איבוד מים בלבד, או שמדובר גם באיבוד של ביומסה. על מנת לענות על שאלה זו, נערך ניסוי אשר כלל בדיקות של משקל טרי, משקל יבש, ורמת הסוכרים בפרי, לפני תהליך ההתייבשות ולאחריו. לניסוי שומשו שמונה פירות של צמחים מקו מתייבש (HH), שנקטפו בשלב התפתחותי של אדום בשל. בנוסף, שמונה פירות אחרים הנמצאים באותו שלב התפתחותי, הושארו על צמח האם למשך 14 יום נוספים. במשך תקופה זו הפירות המחוברים לשיח איבדו חלק ממשקלם והתייבשו. לאחר תקופה זו גם פירות אלו נקטפו ונערכו עליהם אותה הבדיקות המתוארות לעיל. תוצאות הבדיקה מובאות בטבלה 1.

טבלה 1:

השוואה המשקל הטרי והיבש ומספר תכונות נוספות, בין פרי עגבנייה אדום בשל לבין פרי עגבנייה מצטמק. הפירות נלקחו מקו הטיפוח של עגבניות הצימוק (בעל הפנוטיפ HH), וחולקו באופן אקראי, לשתי קבוצות. קבוצה אחת נבדקה מיד, ואילו השנייה נשארה להתייבש על צמח האם למשך 14 יום, ורק לאחר מכן נקטפה ונבדקה. אותיות שונות מציינות הבדל מובהק בין טיפולים ($\alpha \leq 0.05$).

תכונה	שלב אדום בשל	עגבניית צימוק (לאחר 14 יום)
משקל טרי (גרם\פרי)	16.63 a	12.2 b
אחוז משקל יבש	12.53 a	17.89 b
כלל סוכרים מומסים (brix)	11.51 a	14.57 b
כלל הסוכרים (מ"ג\גרם משקל טרי)	66.4 a	86.4 b
כמות המים (גרם\פרי)	14.55 a	10.02 b
משקל יבש (גרם\פרי)	2.08 a	2.18 a
סוכרים (גרם\פרי)	1.10 a	1.05 a

על פי הטבלה נתן לראות בבירור כי איבוד המשקל הטרי במהלך התייבשות הפרי, היה כתוצאה של איבוד המים בלבד, ולא תוצאה של ירידה במשקל יבש. במקביל, התוספת שנצפתה באחוז המשקל היבש, כלל הסוכרים המסיסים (Brix) ותכולת הסוכר הייתה רק על בסיס יחידת משקל פרי (גרם משקל), ולא על בסיס המשקל הכללי של הפרי, שבו אין שינוי בכמות המרכיבים. דבר זה מראה על כך ששינוי המשקל הוא כתוצאה מאיבוד מים בלבד.

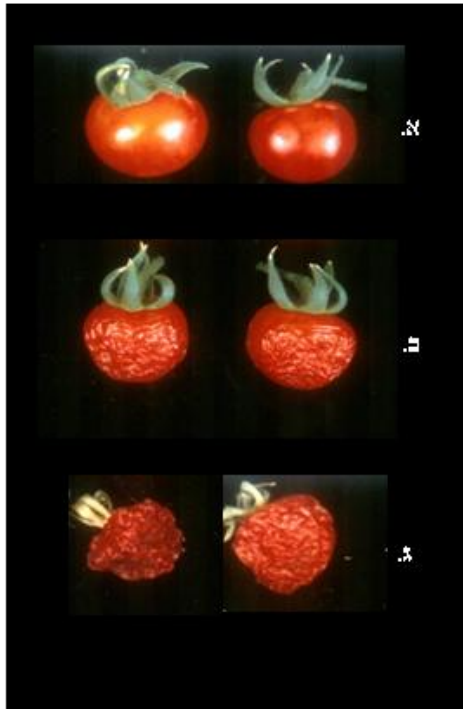
5.1.2 איבוד המים הוא עקב הופעה של מיקרו-סדקים בקליפה

התייבשות הפרי בעגבניית הצימוק נובעת, כתוצאה מאיבוד של מים דרך הקליפה. דבר זה הוכח על ידי ניסוי פשוט, שבו נעשתה מריחה של 1% אנטי-טרנספירנט (מונע-איוד) על גבי הפרי הבשל של צמח מהקו HH, וזאת כאשר הוא עדיין מחובר לצמח האם (איור 9). נמצא כי לאחר שבועיים, האנטי-טרנספירנט הקטין משמעותית את התייבשות הפרי בצורה יעילה (איור 9א), בהשוואה לפרי הביקורת שהתייבש (9ב). ממצא זה מצביע על כך, שתהליך ההצטמקות של הפרי נובע מאיבוד של מים דרך הקליפה, ולא מתנועה של מים מהפרי חזרה לצמח האם. מעבר לכך, קצב הייבוש של פירות מנותקים (9ג) היה גבוה יותר, בהשוואה לפירות המחוברים לצמח (ללא נוכחות של אנטי-טרנספירנט), דבר המראה כי צמח האם מפצה על אובדן המים בפרי באמצעות תנועה של מים מהצמח לתוך הפרי.

על מנת לבדוק האם קליפת פרי העגבנייה המצטמק פגועה מבחינה מכאנית, נערכה על פירות של קווים מצטמקים (HH) ופירות רגילים (EE) בדיקה של שלמות הקליפה. בדיקה זו מבוססת על עבודתם של Tankara וחבריו (2000), בה נעשה שימוש בצבע toluidine-blue הצובע את דופן התא באופן ספציפי (אך אינו צובע קוטיקולה). זאת על מנת לזהות מוטאנטים של צמח הארבידופסיס הפגועים בקליפת העלים. הרעיון של שימוש בחומר צובע דופן הוא בכך, שאם הקוטיקולה אינה שלמה החומר יגיע לדופן ויצבע אותו בצבע כחול-סגול אופייני. באיור 10 ניתן לראות שקליפתו של הפרי בעל הפנוטיפ HH הייתה חדירה, אפילו עוד בשלב הירוק בוגר (שבו עדיין לא מבחינים בהצטמקות הפרי). לעומת זאת, הפרי בעל הפנוטיפ EE כמעט ולא נצבע על ידי ה-toluidine-blue.

סדרה של תמונות שנעשו במיקרוסקופ אלקטרוני סורק (SEM) של קליפת פרי עגבנייה אדום-בשל מקו מתייבש (HH) ומקו כמעט זהה לו מבחינה גנטית אך לא מתייבש (EE), מוצגת באיור 11. תמונות של שטח הפנים ותמונות של חתך רוחב בפרי מראות כי הפרי הבשל של הקו HH מאופיין בנוכחותם של מ"ס רבים בקליפת הפרי. העובי של מ"ס אלה לא עלה, בדרך כלל על 20 מיקרון, ולכן הם אינם חודרים לתוך רקמת תאי האפידרמיס, אלא מוגבלים לרוחב הקוטיקולה בלבד (איור 11ד).

כפי שניתן לראות באיור 11ה, הסדק נוטה בד"כ להתפתח במרווח שבין תאי האפידרמיס, ורק לעיתים נדירות הוא חוצה את התאים עצמם. עוד ניתן לראות באיור, כי מין הבר (*S. habrochaites*), שהנו בעל מבנה ייחודי מאוד של שטח פני הפרי, אינו מראה שום סימן של מ"ס (איור 11ו).



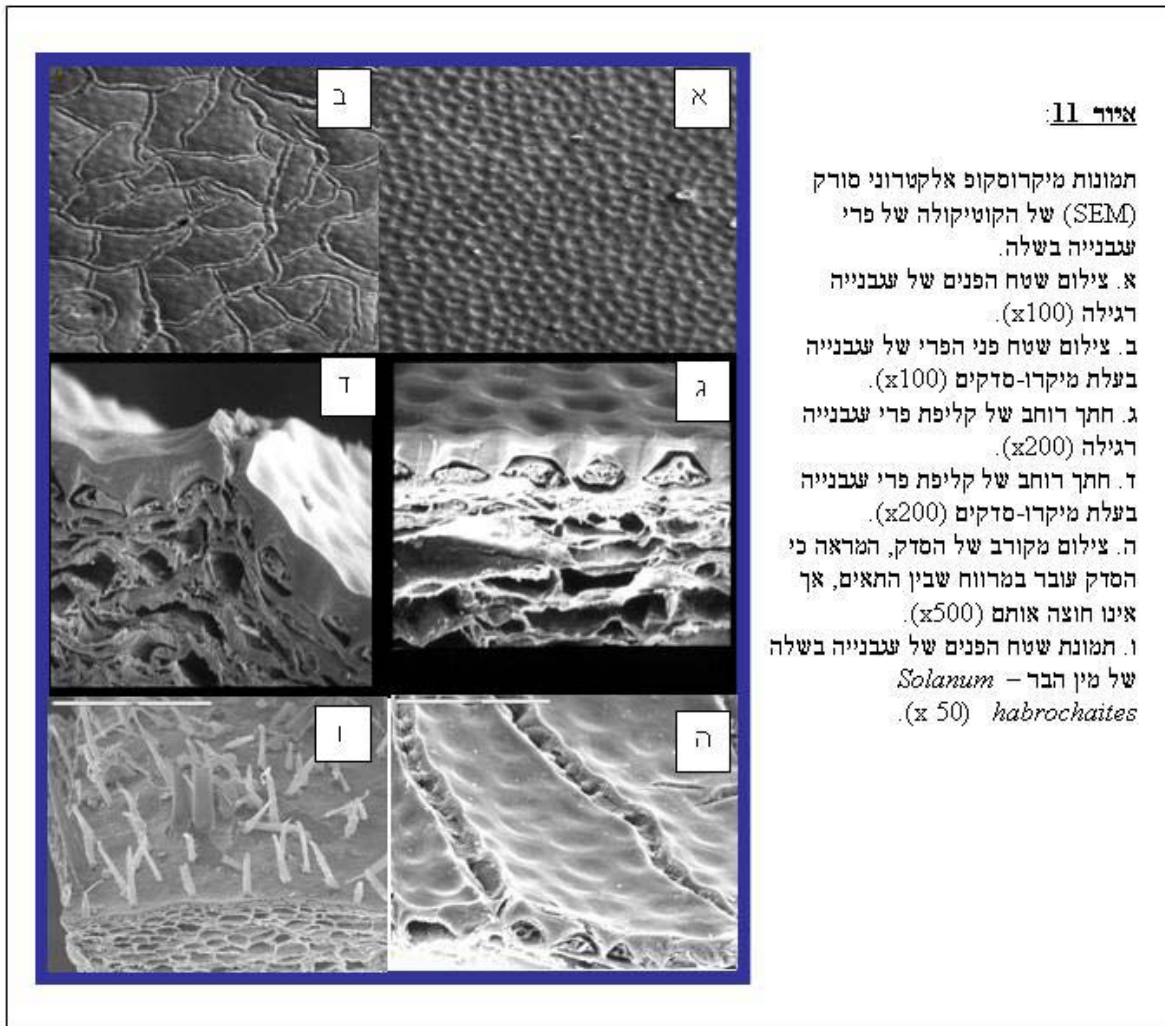
איור 9:

השפעה של הוספה (א) או אי-הוספה (ב,ג) של 1% אנטי-טראנספיראנט על פרי עגבניית צימוק, כאשר הפרי מחובר לשיח האם (א,ב) או מנותק ממנו (ג). התמונות נלקחו לאחר 14 יום של התייבשות.



איור 10:

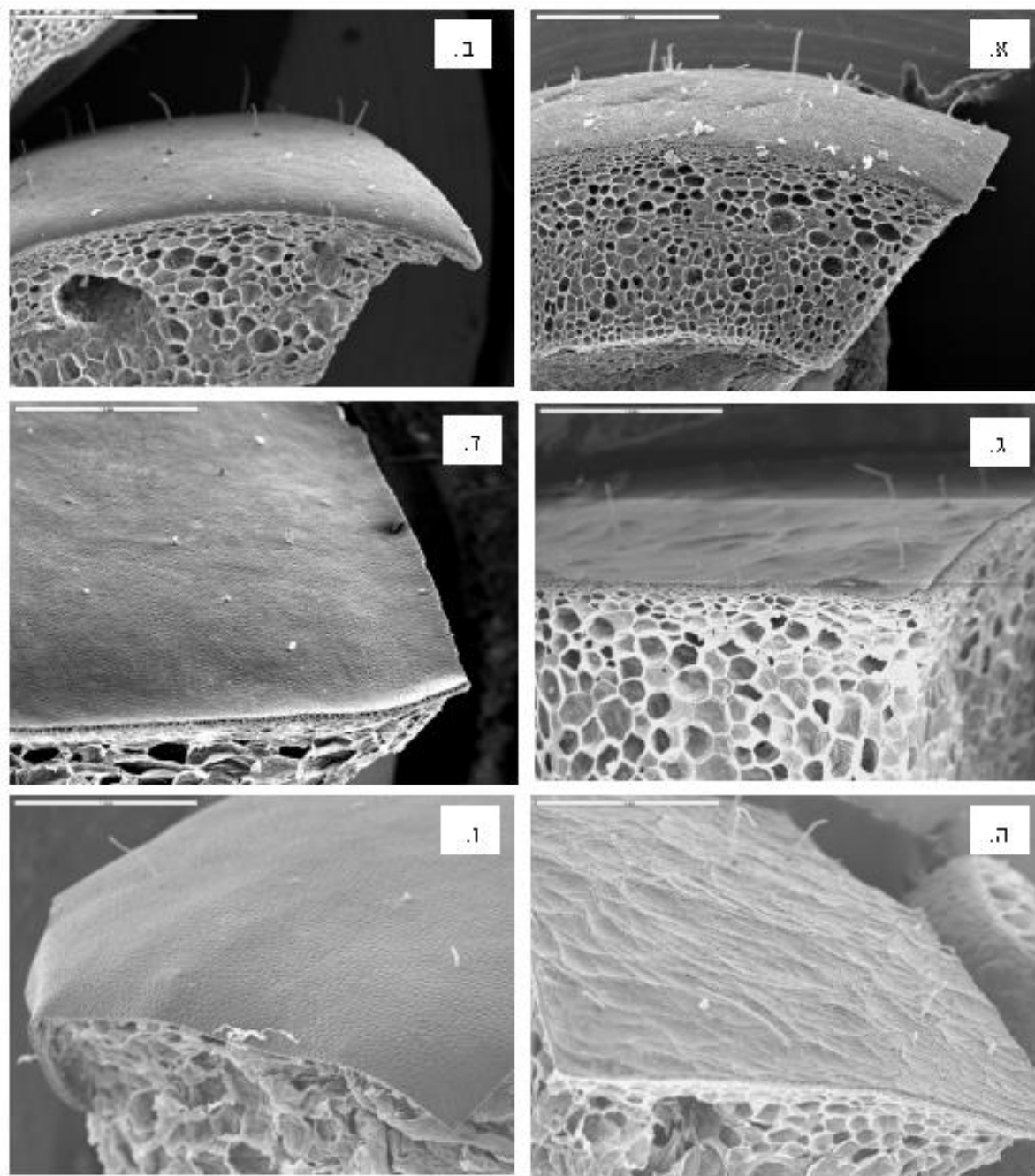
בדיקת שלמותה של הקליפה, על ידי הוספת toulidine-blue על קליפת פרי ירוק בוגר של עגבנייה רגילה לעומת עגבניית צימוק. הפירות נקטפו והוטבלו חלקית בתמיסת toulidine blue (5%) למשך שעותיים. לאחר מכן נשטפו במים מזוקקים ויובשו.



איור 11:

תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק (SEM) של הקוטיקולה של פרי עגבנייה בשלה.
 א. צילום שטח הפנים של עגבנייה רגילה (x100).
 ב. צילום שטח פני הפרי של עגבנייה בעלת מיקרו-סדקים (x100).
 ג. חתך רוחב של קליפת פרי עגבנייה רגילה (x200).
 ד. חתך רוחב של קליפת פרי עגבנייה בעלת מיקרו-סדקים (x200).
 ה. צילום מקורב של הסדק, המראה כי הסדק עובר במרווח שבין התאים, אך אינו חוצה אותם (x500).
 ו. תמונת שטח הפנים של עגבנייה בשלה של מין הבר – *Solanum habrochaites* (x 50).

סדרה נוספת של תמונות SEM של שטח פני העגבנייה, המתיחסת לשלבים שונים בהתפתחות הפרי (משלב ירוק צעיר ועד שלב אדום בשל) בקו מתייבש ובעל מיקרו-סדקים (HH), ובקו רגיל נטול מיקרו-סדקים (EE), מתוארת באיור 12. ניתן לראות, כי מבחינה התפתחותית, המ"ס נוטים להופיע בקליפת הפרי הנמצא בין שלב הירוק צעיר ובין שלב הירוק בוגר.



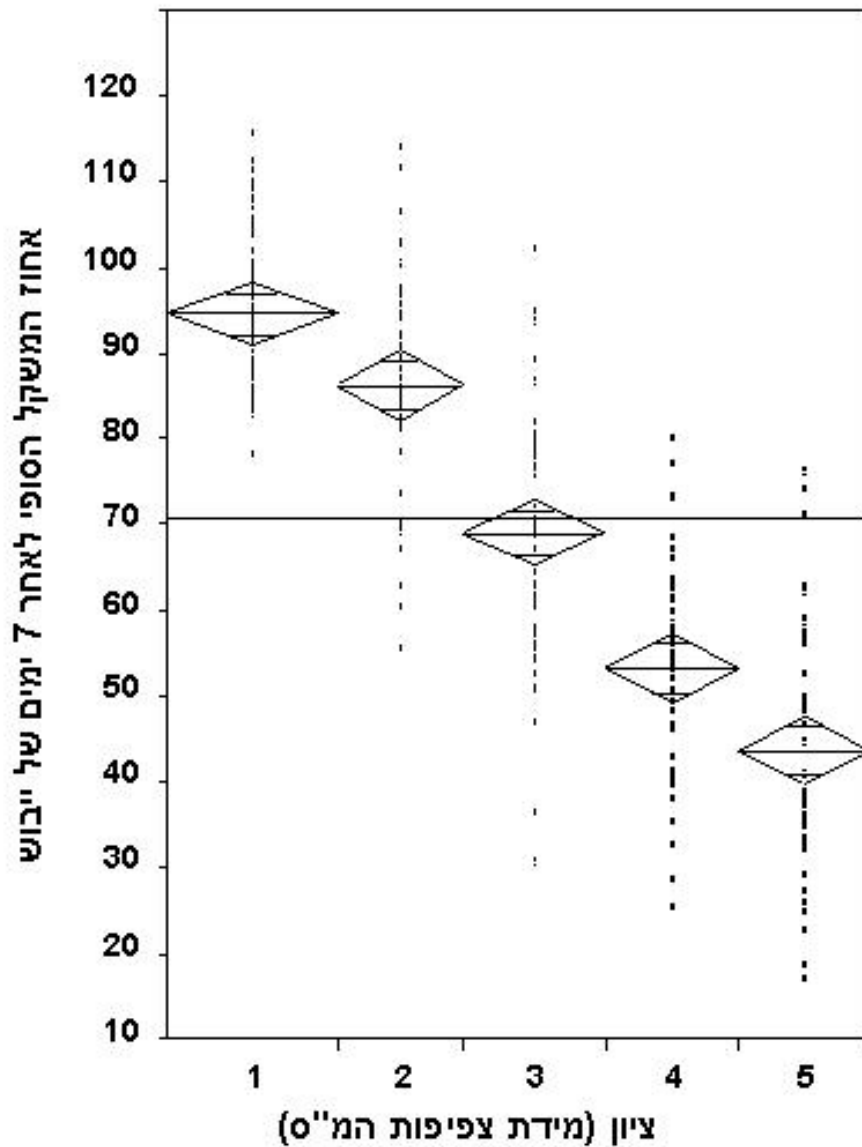
איור 12:

תמונות SEM של מקטעי פרי עגבנייה בשלבי התפתחות שונים: א, ב - פרי בשלב ירוק צעיר (15 יום מחנטה), ג, ד - שלב ירוק בוגר. ה, ו - שלב אדום בשל. האיור מציג את ההשוואה בין פרטים בעלי פנטיפ HH (א, ג, ה) לבין פרטים בעלי פנטיפ EE (ב, ד, ו)

5.1.3 המתאם הפנוטיפי שבין תכונת המ"ס לבין תכונת התייבשות הפרי

שאלה שהתבקשה לאור הנתונים הנ"ל היא האם קיים קשר ברור בין תופעת המ"ס בקליפת הפרי לבין היכולת של הפרי לאבד מים בצורה מהירה. לשם כך ערכנו ניסוי שהכיל את רוב אוכלוסיות הניסוי בעונת הגידול של חורף 2003, ומטרתו היתה לבדוק האם קיים מתאם פנוטיפי בין שתי התכונות (איור 13). בניסוי זה, שנערך על כ- 200 פרטים המתפצלים הן לתכונת הופעת המ"ס, הן לקצב הייבוש של הפרי, נאספו מכל פרט כשלושה עד חמישה פירות. לפירות אלו ניתן ציון לגבי חומרת וצפיפות המ"ס על פי סקלה שבין 1 ל-5. פרי שהיה נטול סדקים קיבל את הציון – 1. לעומת זאת, פרי שהכיל מ"ס רבים וצפופים, העוטפים את כל שטח הפנים של הפרי, קיבל את הציון 5. ניתן לציין בנקודה זו, כי עם התפתחות המחקר, למדנו לזהות את הופעת המ"ס באמצעים הפשוטים ביותר, כגון שימוש בבינוקולר שולחני, ואף על ידי שימוש בזכוכית מגדלת רגילה. כך, שהיה בידינו כלי פשוט לבדוק בזמן קצר את נוכחותם, ומידת צפיפותם של המ"ס במספר רב מאוד של דגימות פרי. במקביל, הפירות הונחו על גבי שולחן-מרושת, ומשקלם נמדד לאחר שבעה ימים.

כפי שניתן לראות באיור 13, המתאם הפנוטיפי בין מידת חומרת הופעתם של המיקרו-סדקים, לבין אחוז איבוד המשקל (כתוצאה מאידוי מים) היה גבוה מאוד. פרטים עם ציון גבוה של מ"ס (קבוצות 4 ו-5) איבדו מים בקצב מהיר יותר ומובהק סטטיסטית, מאשר פרטים בעלי ציון נמוך של מ"ס (קבוצות 1 ו-2). מתאם גבוה זה, שבין הופעת מ"ס, לבין קצב ייבוש הפרי, מחזק את הקשר שבין שתי התופעות. על כן אנו מניחים כי תכונת ההתייבשות נובעת מאיבוד מים דרך הקליפה, בנוכחות מ"ס שמתפתחים בקוטיקולה בין שלב ירוק צעיר לירוק בוגר.



אזר 13:

המתאם הפנוטיפי שבין צפיפות המ"ס לבין איבוד המשקל הממוצע של הפרי לאחר שבעה ימים בטמפרטורת החדר (15-25 מ"צ). כל נקודה בגרף הנה ממוצע של שלושה עד חמישה פירות של פרט כל שהוא מאוכלוסייה המתפצלת לשתי התכונות (סך-הכל כ- 200 פרטים). לפני הייבוש, ניתן לכל פרט את הציון הממוצע למידת צפיפות המ"ס (בין 1 לפרי נטול סדקים, ו-5 למ"ס מאוד צפופים). הגרף מראה את הממוצע (הקו האופקי במרכז כל מעוין), 95% של גבולות הסמך (הקצה האנכי של כל מעוין), ומידת הפיזור (הנקודות השחורות) של הפרטים השונים בכל קבוצת זירוג של מ"ס. הבדל הנו מובהק בין קבוצות-זירוג כאשר בסיס משולש בקצה המעוין אינו חופף עם בסיס משולש של קבוצה אחרת.

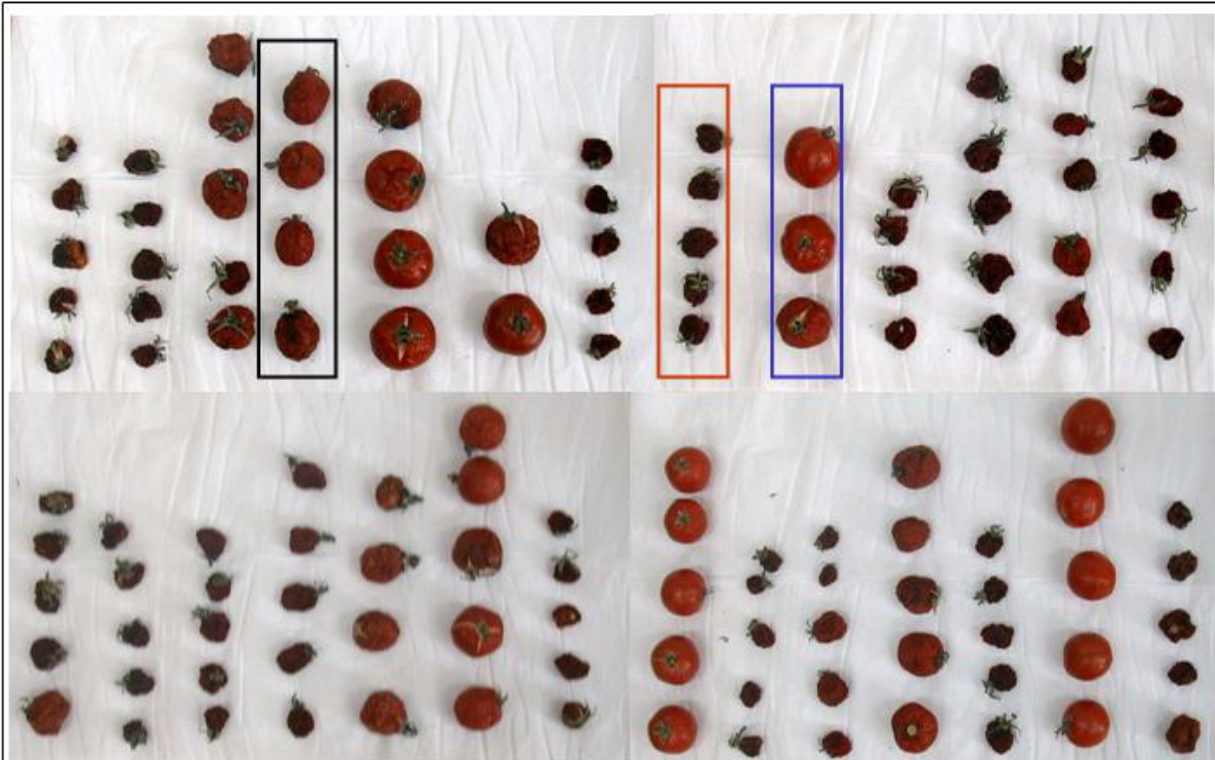
5.2 אפיון התורשה של תופעת חדירות הקליפה, ומיפוייה על גבי המפה הגנומית

5.2.1 התורשה של תופעת אידוי המים דרך מ"ס בקליפת הפרי

בחנית אופן ההורשה של תכונת איבוד המים בפרי בעגבנייה דרך מ"ס בקליפת הפרי נערכה באמצעות שתי אוכלוסיות F_2 המתפצלות לתכונה (2393 ו-2394). מקור האוכלוסיות היה בהכלאה בין שני קווים של עגבניית צ'רי רגילה, לבין קו אינטרוגרסיה מתקדם, המכיל את התכונה (קו 1718). לפחות שלושה פירות בשלים נקטפו מכל פרט באוכלוסייה. הפירות הושארו על גבי שולחנות רשת בטמפרטורת החדר למשך כשבועיים, עד אשר היה ניתן להבחין בבירור בפירות המתייבשים. באיור 14 מתוארת הבחינה של חלק קטן יחסית מהפרטים, והיא מהווה דוגמה הממחישה את אופן ההתפצלות הפנוטיפית של הפרטים השונים באוכלוסייה. ניתן להבחין באיור, כי בתוך קבוצת הפירות המתייבשים ישנם הבדלים במידת ההתייבשות, כאשר ישנם פרטים המתייבשים כליל, וישנם פרטים המתייבשים למחצה, בנוסף לפרטים שמאבדים מעט מים.

טבלה 2 מתארת את תוצאות הבדיקה המלאה, שנערכה על כל הפרטים משתי אוכלוסיות ה- F_2 . בשתי האוכלוסיות, התפלגות הפנוטיפים לתכונת ההתייבשות היתה 3:1 ללא-מתייבשים : מתייבשים בהתאמה. אופן ההתפלגות הנ"ל הנו אופייני לאופן ההורשה של גן יחיד עם יחסי אללים של דומיננטי-רצסיבי, כאשר האלל הדומיננטי הנו מהקו המתייבש (הפרטים המתייבשים חלקית נכללים בתוך המתייבשים). לפיכך, אנו הסקנו כי התכונה של איבוד מים מהיר בפרי העגבנייה מבוקרת על ידי גן בודד (או לחילופין גן עיקרי), אשר כינינו אותו בשם - *Cwp* (*Cuticular Water Permeability*).

בחנית אופן ההורשה של הופעת המ"ס נבדקה אף היא באותן אוכלוסיות. לפני ייבוש, כל אחד מהפירות עבר בחינה של הופעה וצפיפות המ"ס על גבי קליפת הפרי. נמצא מתאם מובהק בין הציון שקיבל כל פרי לבין מידת הייבוש של אותו פרי. למשל, כל הפירות הלא מתייבשים קיבלו את הציון 0 או 1. לעומתם, כל שאר הפירות (שלושה-רבעים מהסה"כ) קיבלו ציון שבין 3 ל-5. מכאן ניתן להסיק כי גם תכונת הופעת המ"ס (שכפי האמור לעיל, קשורה בקשר נסיבתי לתכונת הייבוש), מתפצלת ביחס של 3:1 האופייני לגן בודד.



איור 14:

התפלגות הפנוטיפ של מידת הייבוש בפרי העגבנייה. האיור הנו דוגמא לאופן הבדיקה של אוכלוסיית F_2 המתפצלת לתכונת התייבשות הפרי. כל טור של פירות מייצג פרט בודד מכלל האוכלוסייה. הפירות נקטפו במצב של פרי אדום בשל (לפני שהראו סימני התייבשות). הפירות הונחו על שולחן מרושת למשך כשבועיים. בתמונה ניתן לראות: קו שלא התייבש כלל (מוקף בריבוע כחול), פרט שהתייבש לגמרי (ריבוע אדום) ופרט שהתייבש חלקית (ריבוע שחור).

טבלה 2:

אופן ההתפלגות של תכונת התייבשות הפרי, בשתי אוכלוסיות F_2 שונות. בשתי האוכלוסיות ההורה המקנה את התכונה זהה (קו צימוק). ההורה השני, לעומת זאת שונה בשתי האוכלוסיות (שני זני צ'רי תרבותי שונים). מימין, אוכלוסיית 2393. משמאל, אוכלוסיית 2394. N – הפרי לא מראה סימני התייבשות. Y – הפרי מתייבש. n – מספר הפרטים. מבחן הכי-בריבוע הוא ליחס התפצלות של 3:1.

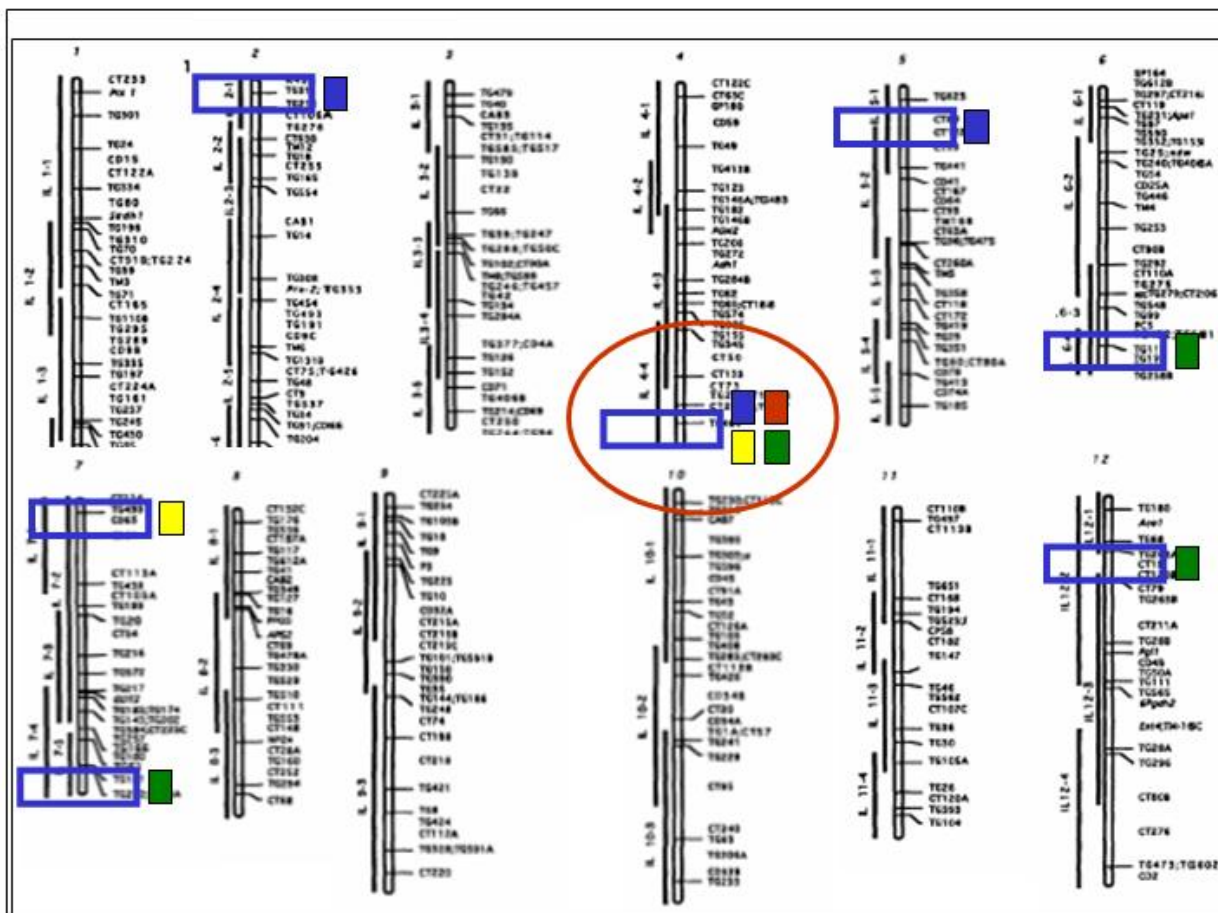
פנוטיפ	n	Probability	פנוטיפ	n	Probability
N	16	0.272	N	15	0.234
Y	39	0.709	Y	49	0.765
Total	55	1.000	Total	64	1.000
X^2 value: 0.029			X^2 value: 0.424		
Prob of X^2 : 0.864			Prob of X^2 : 0.546		

5.2.2 מיפוי גנטי-מולקולארי של הגן *Cwp*

במטרה ללמוד את אופן ההורשה של תכונת ההתייבשות של הפרי דרך מ"ס בקליפה, ועל מנת לאפשר את המיפוי העדין שלה, התחלנו בשלב הראשון למקם את התכונה על גבי המפה הגנטית של העגבנייה, ואף לקבוע את גודל האינטרוגרסיה של מין הבר בתוך אחד הקווים ששימש כמקור לאוכלוסיות המתפצלות (קו 1719). על מנת לזהות את המיקום של הגן, נעזרנו במידע מוקדם על שבעה לוקוסים פוטינציאלים בגנום של העגבנייה, שדווחו בעבר כעשויים להשפיע על הופעת אפידרמיס מרושת (Er) (Fulton et al., 2000; Frary et al., 2004). סיכום של שבעת הלוקוסים (המכונים QTLs), המיקום שלהם על גבי מפת התאחיזה של העגבנייה והמקור הגנטי של האוכלוסיות בהן התכונה נצפתה, מוצגים באיור 15.

מערכת של סמני CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism), המבדילה בין שני ההורים *S. lycopersicon* (E) ו-*S. habrochaites* (H) נבנתה. הסמנים נבנו על בסיס סמני TG קיימים (Tanksley et al., 1992), הנמצאים בקרבה לכל אחד משבעת ה-QTLs. דוגמא לסמן מסוג CAPS מתוארת באיור 16א. נמצא כי האינטרוגרסיה של קו הטיפוח 1719 (שמקורה ממין הבר *S. habrochaites*), היא מהחלק המרוחק של זרוע 4-4 (איור 16ב). באזור זה מצוי QTL חשוב לתכונת האפידרמיס המרושת (Er4.1). גודל המחדר בקו הטיפוח 1719 נקבע על ידינו כאזור הכרומוזומלי שבין הסמן TG464 ועד הסמן CT173 (הקו המנוקד באיור 16ב), שהם כ-10 cM לערך. הגן *Cwp* נמצא בוודאות בתוך מקטע זה.

במטרה לבחון את השפעתם של מחדרים נוספים מאזורים אחרים בגנום, הנמצאים בתאחיזה עם QTLs לאפידרמיס מרושת, נבדקו שאר ה-QTLs (המתוארים באיור 15) למידת התאחיזה שלהם לתכונת הופעת המ"ס. התוצאות הראו כי לא הייתה השפעה של אזורים מועמדים אחרים בגנום, ובהם הגנוטיפ של קו הצימוק דומה למעשה לזה של ההורה התרבתי (תוצאות אינן מובאות).



איור 15:

מתוך שבעת הלוקוסים צוין במיוחד לוקוס אחד (בעיגול האדום), הנמצא בזרוע הארוכה של כרומוזום ארבע (מכונה Er4.1), שהוא גם בעל ההשפעה הגדולה ביותר על התכונה, וגם דווח כמופיע במערכות ההכלאה עם כל מיני דבר. השפעתו של לוקוס זה (במין *S. habrochaites*) ושל נוספים (במין *Solanum pennellii*) מוצגים בטבלה הבאה (מתוך Frary et al., 2004):

QTL	%PV
Er4.1	67
Er2.1	8
Er5.1	8

מפת סמני ה-DNA הצפופה של העגבנייה, המחולקת לפי קווי האינטרוגרסיה של מין הבר *S. pennellii* (Eshed and Zamir, 1995). על גבי המפה מתוארים שבעה QTLs (Quantitative Trait Loci) של הופעת סדקים בקליפה (מלבנים כחולים). הריבועים המלאים מציינים את המקור הגנטי שממנו נצפתה התכונה כאשר:

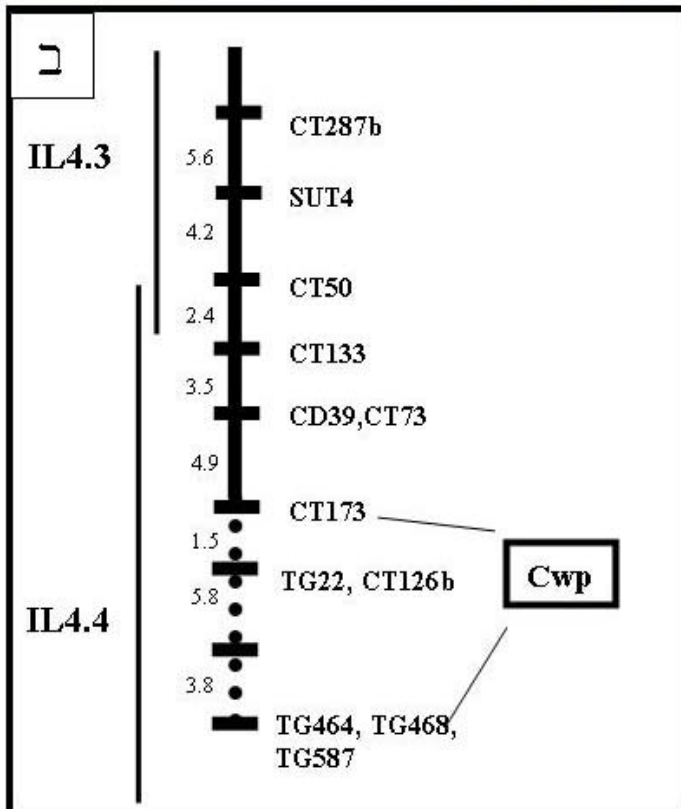
- *S. pennellii*
- *S. habrochaites*
- *S. neoriokii*
- *S. peruvianum*



איור 16:

מיפוי ראשוני של הגן *Cwp*.

א. דוגמא למערכת סמני CAPS שתוכננה והופעלה. בדוגמא זו מוצג הסמן TG464. בשני הטורים הראשונים מימין אלו ההורים: *habrochaites* - h ; 1 - TG464. האוכלוסייה המתפצלת היא 2394.

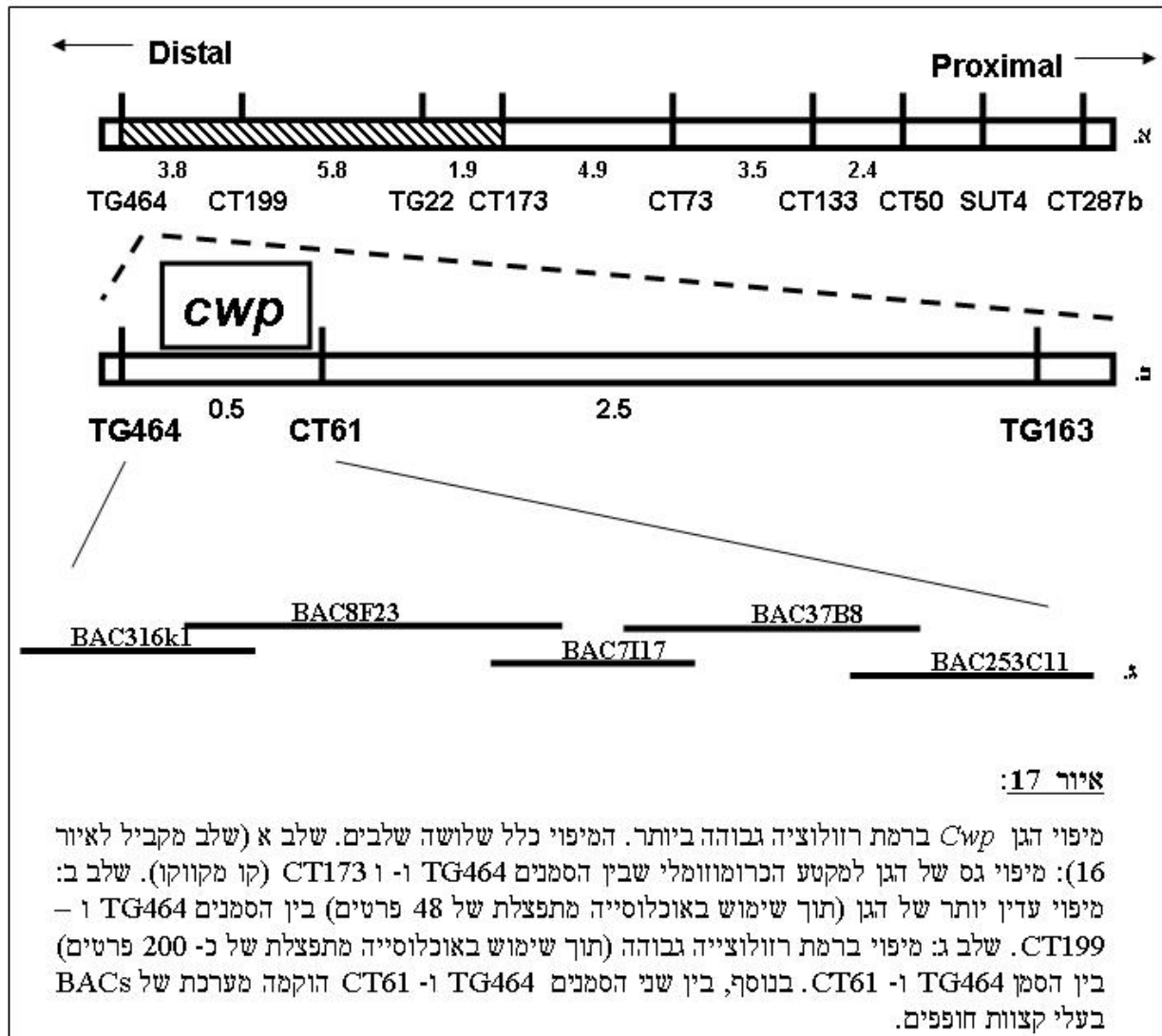


ב. הגן *Cwp* מופה לחלק הטלומרי של הזרוע הארוכה בכרומוזום 4 (IL 4.4) בין הסמנים TG464 ו-CT173. החלק המנוקד הוא גודל המחדר של מין הבר (*S. habrochaites*) בקו הטיפוח 1719.

5.2.3 מיפוי הגן *Cwp* ברזולוציה גבוהה

במטרה ליצור סמן מולקולארי קרוב יותר לגן *Cwp*, וזאת למטרות מחקר וטיפוח, החלטנו להגדיל את הרזולוציה של האזור הכרומוזומלי שהגן *Cwp* מצוי בתוכו. לשם כך, הפעלנו בשלב הראשון סדרה של סמני CAPS פולימורפים המתאימים לאזור שבין TG464 ו-CT173 על שני ההורים ועל 48 פרטים מאוכלוסיית F₂ מתפצלת.

הגן *Cwp* נמצא בתאחיזה לסמן CT199, במרחק של 3cM לערך (2 ארועי רקומבינציה מתוך 96 גמטות) (איור 17א). הסמן CT199 דווח כבר בעבר כסמן הנמצא בתאחיזה ל – QTL עיקרי של תכונת האפידרמיס המרושת (Er) בעגבנייה, האחראי להסבר של 40-85% מכלל השונות הפנוטיפית של הופעת סדקים בכמה אוכלוסיות של הכלאות עם מיני הבר (Frery et al. 2004).



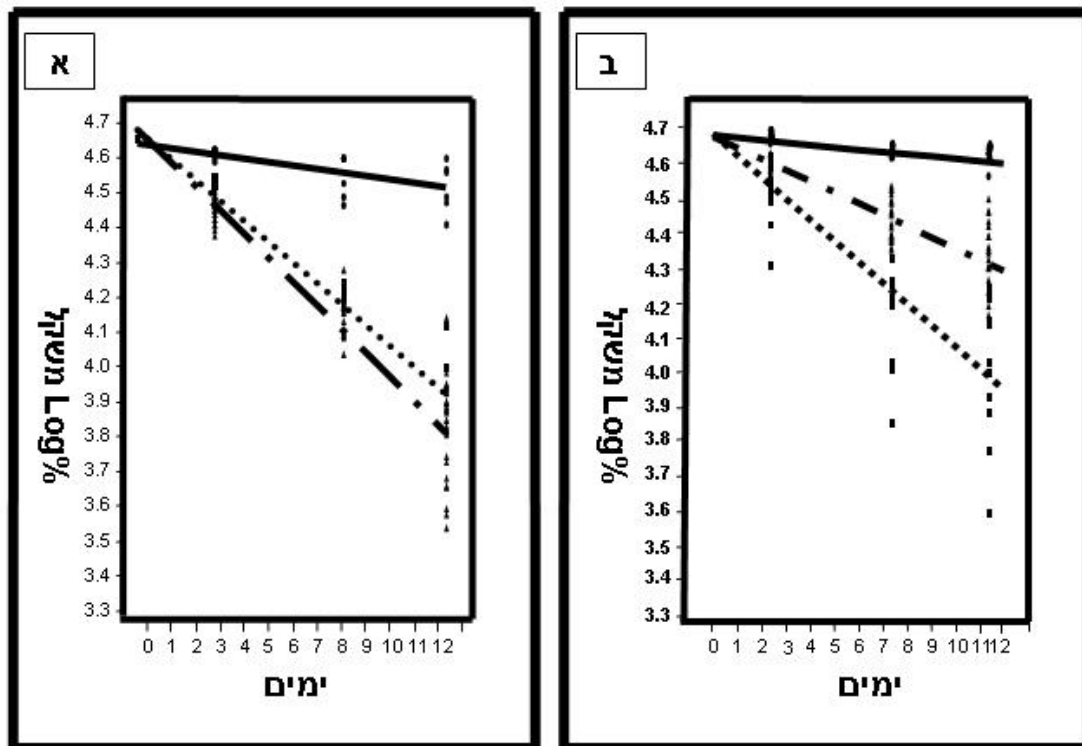
על מנת למפות את הגן ברמת רזולוציה גבוהה עוד יותר, תוכננה סדרה נוספת של סמני CAPS, המהווים חלק ממצבור (cluster) של סמנים הממוקמים במקטע כרומוזומלי זה. מערכת סמנים זו נבדקה על אוכלוסיית F₂ גדולה יותר (כ- 200 פרטים). הגן *Cwp* נמצא בתוך המצבור הנ"ל בין הסמנים TG464 ו-CT61, כאשר המרחק בין שני הסמנים הוא כ- 0.5 cM בלבד (איור 17ב). בין שני הסמנים הנ"ל נבנתה סדרה של חמישה BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) בעלי קצוות חופפים (contigs) (איור 17ג). מערכת זאת נבנתה על ידי זיהוי ה-BACs המתאימים מתוך ספרייה גנומית של עגבנייה, וסידורם בתהליך המכונה – "הליכה על גבי הכרומוזום". בקצרה, תהליך זה בוצע על ידי ריצוף קצותיו של BAC מסוים, שימוש ברצף זה על מנת ליצור גלאי (probe), ואיתו לסרוק את ספריית ה-BACs פעם נוספת ולעלות BAC חופף. חמשת ה-BACs שעלו יצרו גשר בין הסמנים TG464 ו-CT61. בהעדר רצף גנומי ידוע של העגבנייה, מהווה מערכת זו תשתית טובה, הן למציאת סמנים מולקולאריים בעלי קרבה גדולה מאוד לגן *Cwp*, והן כגשר בין המפה הגנטית והפיזית של מקטע זה. זהו גם השלב הראשון בתהליך בידוד של הגן באמצעות map based gene cloning (ראה פרק – "בידוד וזיהוי הגן *Cwp*" בהמשך).

5.3 אפיון השפעתו של הגן *Cwp* באוכלוסיות מתפצלות

המיפוי המדויק של הגן *Cwp* ואפיונם של סמני DNA רבים שבא בעקבותיו, נתנו לנו את האפשרות לזהות פרטים הטרוזיגוטים לתכונה, ואף לבדוק את השפעתם של הגנוטיפים השונים באוכלוסיות המתפצלות לתכונת התייבשות הפרי. בנוסף ניתן היה לבחון את השפעת הגנוטיפ על תכונות נוספות.

5.3.1 השפעת הגנוטיפים השונים של הגן *Cwp* על קצב הייבוש של הפרי

תוצאות רבות שהתקבלו מאוכלוסיות F_2 מתפצלות הראו זיקה מלאה בין הגנוטיפ של הגן *Cwp* לבין הפנוטיפ של התייבשות הפרי. מין הבר *S. habrochaites* הוא זה המקנה את האלל (Cwp^{HH}), הגורם להופעת המ"ס ולהתייבשות הפרי. יחסי האללים של הגן *Cwp* הנם יחסים של דומיננטיות מלאה או חסרי דומיננטיות, דבר התלוי ברקע הגנטי שאליו הוחדרה התכונה. לדוגמא, באוכלוסיית F_2 מתפצלת אחת (2394), הפרטים בעלי הגנוטיפ ההטרוזיגוטי Cwp^{HH} והפרטים בעלי הגנוטיפ ההומוזיגוט Cwp^{HE} התייבשו בקצב זהה (איור 18א). לעומת זאת, באוכלוסיית F_2 בעלת רקע גנטי שונה (2395), הפרטים ההטרוזיגוטים התייבשו בקצב שהוא בין ההומוזיגוט הדומיננטי (Cwp^{HH}) המתייבש ובין ההומוזיגוט הרצסיבי (Cwp^{EE}) הלא מתייבש (איור 18ב). ניסויים נוספים, שכללו אוכלוסיות F_2 נוספות, הראו כי אופן ההורשה של היווצרות המ"ס והתייבשות הפרי אינו תלוי בצורת הצימוח, והתכונה מתפצלת בהתאם לגנוטיפ של הפרט, גם בפרטים בעלי צורת צימוח מסיימת, וגם באלו בעלי בצורת צימוח בלתי-מסיימת (תוצאות שאינן מובאות).



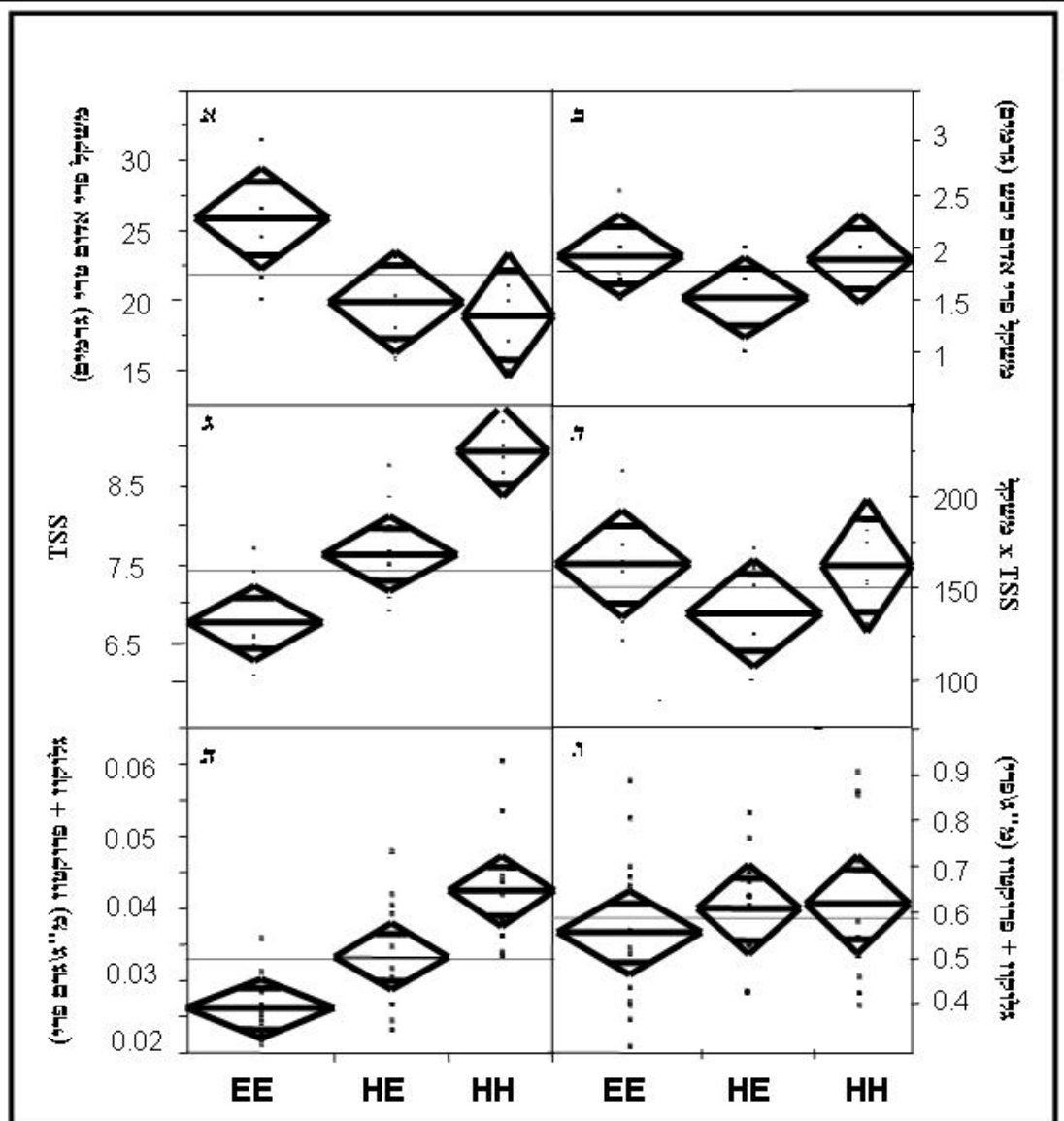
איור 18:

התפלגות הגנוטיפים של הגן CWP ביחס לקצב איבוד המשקל (עקב איבוד מים) בשתי אוכלוסיות F_2 מתפצלות. שלושה פירות בשלים נקטפו מכל פרט והונחו להתייבש בטמפרטורת החדר. משקל הפרי הממוצע נבדק לאחר 3, 8 ו-12 יום. הגרף מתאר את אחוז ה- \log של איבוד המשקל (הטרנספורמציה היא על מנת לקבל קו ליניארי). א: אוכלוסיית 2394. ב: אוכלוסיית 2395. הגנוטיפים נקבעו על ידי סמן מולקולארי קרוב (TG464), כאשר:

— Cwp^E/Cwp^E
 - - - Cwp^H/Cwp^E
 Cwp^H/Cwp^H

5.3.2 השפעת הגן Cwp על תכונות חקלאיות חשובות

השוואה בין פירות של צמחים בעלי גנוטיפים שונים מאוכלוסיות מתפצלות נוספות, מחזקת את העובדה כי השפעתו של האלל Cwp^H מוגבלת אך ורק לאיבוד מים מהפרי. למעשה, לא נצפו השפעות של האלל Cwp^H על המשקל היבש ליחידת פרי (איור 19). אמנם, תכולת הסוכרים המסיסים (גלוקוז + פרוקטוז) וכלל המומסים המוצקים המחושבים על בסיס משקל טרי עלתה עם הוספת האלל הדומיננטי, אולם על בסיס של כלל משקל הפרי, לא היה הבדל מובהק במשקל היבש של הפרי או בכמות הסוכרים המסיסים. לכן, הזיקה, לכאורה, שבין תכונת ההתייבשות של הפרי לבין העלייה במרכיבי המשקל היבש (על בסיס יחידת משקל), אינה נובעת מתאחיזה גנטית בין תכונות נפרדות, אלא היא, ככל הנראה, תופעה פליאוטרופית משנית הנובעת מאיבוד המים וריכוז של מרכיבי הביומסה בפרי. נוכחותו של האלל Cwp^H קשורה גם לירידה במשקל הטרי של הפרי ובגודלו, וזאת עוד לפני שניתן להבחין בהצטמקותו של הפרי הבשל.



איור 19:

הקשר שבין הגנוטיפ של הגן *Cwp* לבין מספר תכונות חקלאיות, המבוסס על אוכלוסיית F_2 מתפצלת (2394). הגנוטיפים השונים של הגן *Cwp* נקבעו באמצעות סמן מולקולארי קרוב (TG464).

א. משקל טרי של פרי אדום (לפני ההבחנה בתהליך ההצטמקות). ב. משקל יבש של פרי אדום. ג. כלל המוצקים המומסים (TSS). ד. TSS יחסי המיוצג על ידי הכפלה של ערכי ה-TSS בסעיף ג במשקל הפרי. ה. תכולת הסוכרים המסיסים (גלוקוז + פרוקטוז) לגרם פרי. ו. כלל תכולת הסוכרים המסיסים (גלוקוז + פרוקטוז) ליחידת פרי שלם. כל איור מראה את הממוצע (הקו האופקי במרכז כל מעוין), 95% של גבולות הסמך (הקצה האנכי של כל מעוין), ומידת הפיזור (הנקודות השחורות) של הפרטים השונים בכל קבוצת גנוטיפ של הגן *Cwp*. ההבדל בין גנוטיפים הנו מובהק כאשר בסיס משולש בקצה המעוין אינו חופף עם בסיס משולש של קבוצה אחרת.

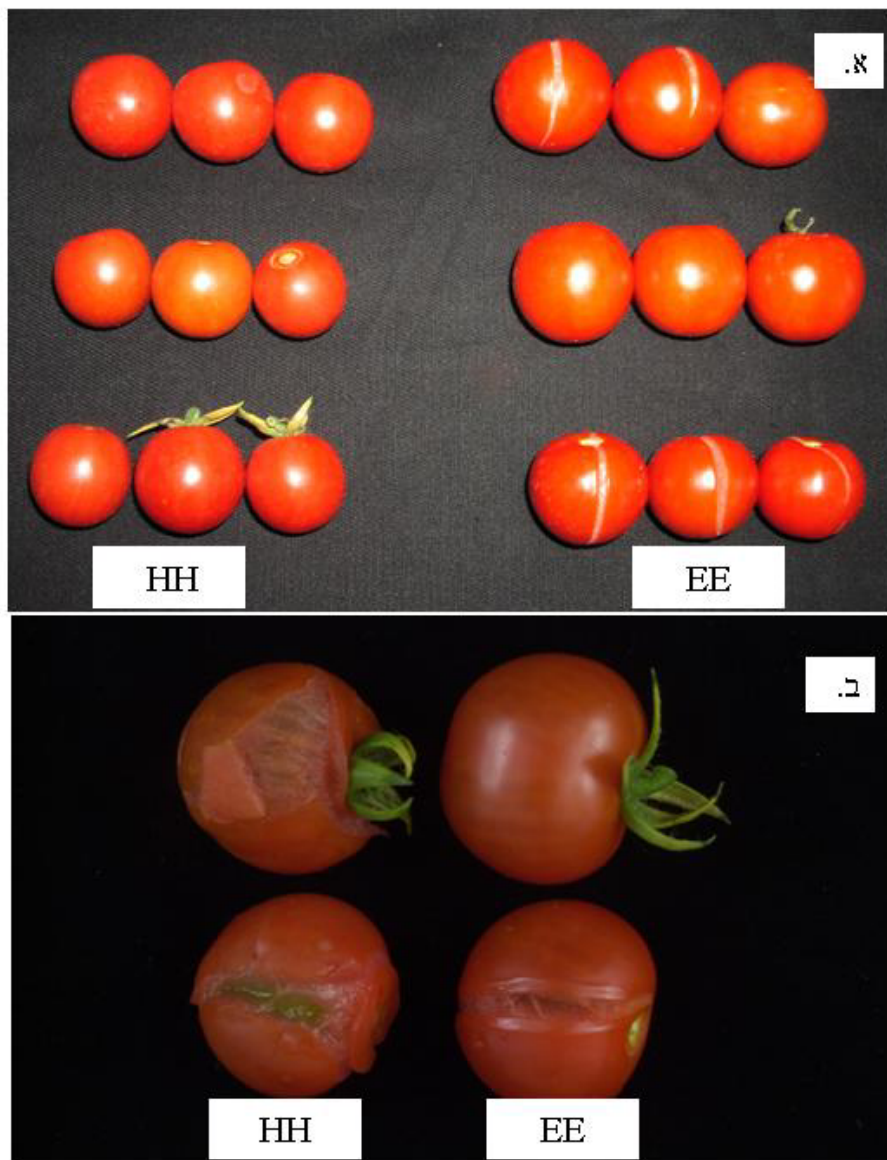
(איור 19ד). ממצא זה מראה על יכולת הפרי לאייד מים כבר בשלב שלפני השלב ההתפתחותי של פרי אדום בשל, למרות שאיבוד מים זה הוא חלקי ואינו מביא למופע של "עגבנייה מיובשת".

5.3.3 הקשר בין הגנוטיפ של הגן Cwp לבין "פיצוצים" בפרי

מלבד תופעת המ"ס בקליפה קיימת בעגבניות גם תופעה נוספת בעלת חשיבות כלכלית והיא תופעת הפיצוצים האורכיים בפרי. פיצוצים אלה הנגרמים עקב השקיה מופרזת או הרטבה חיצונית של הפרי, גורמים לריקבונות המביאים לפגיעה קשה באיכותו, ולפסילה מיידית שלו לשיווק. גידול פרטים מאוכלוסיית F_2 המתפצלת לגנוטיפ של הגן Cwp הראה תופעה מעניינת. דווקא הפרטים שהיו בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} היו עמידים יותר לתופעת הפיצוצים מאשר פרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{EE} (נטולי המ"ס) (איור 20א). תופעה זו התחזקה בעת גידול העגבניות בעונת הקיץ בטמפרטורות גבוהות. ניתן לציין, כי לא נמצא קשר בין הגנוטיפ של הגן Cwp לבין פיצוצים רוחביים בפרי. לעומת זאת, הרטבה חיצונית של פירות על ידי הטבלתם במים מזוקקים למשך כשלוש שעות הראתה, כי דווקא הפירות בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} היו יותר רגישים להתפוצצות הקליפה (איור 20ב). מכאן, שהמ"ס מהווים מצד אחד גורם המשחרר לחץ טורגור מהפרי החוצה. אולם מצד שני הם גורמים לפרי להיות רגיש יותר לפיצוצים, שמופיעים עקב הרטבה חיצונית של הפרי, מכיוון שהם מאפשרים למים להיכנס לפרי ולגרום ללחץ טורגור על הקליפה הבלתי שלמה.

5.3.4 השפעת הגנוטיפ של הגן CWP על משקל הקוטיקולה ועל מרכיביה

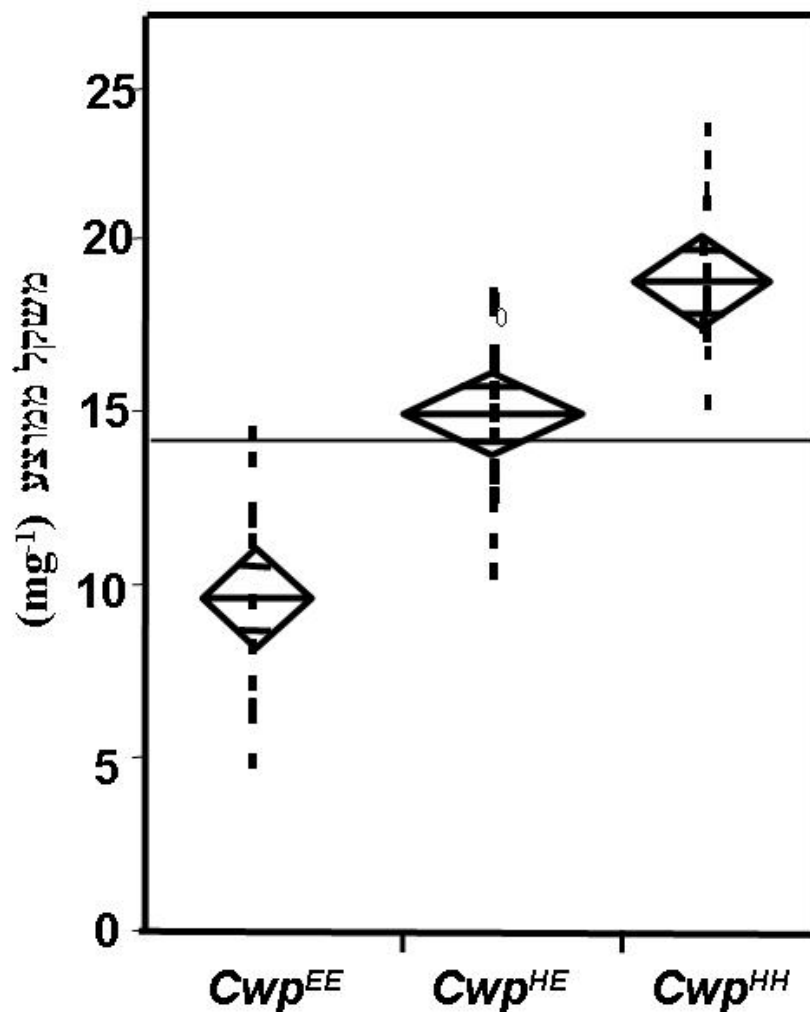
הופעתם של מ"ס בקליפה עשויה להתרחש עקב ירידה בכושר ההתנגדות שיש לשכבת הקוטיקולה כנגד הלחץ שנוצר עם התרחבותו של הפרי (Conter et al., 1969; Emmons and Scott, 1998). כושר התנגדות זה, עשוי לנבוע מגורמים שונים כגון עובי הקוטיקולה או המרכיבים הכימיים שלה. הסתכלות יותר מעמיקה בתמונות ה-SEM המתוארות באיורים 11 ו-12 מגלה, כי תבנית תאי האפידרמיס שעל גבי קליפתו של הפרי בעל הסדקים, פחות ברורה מאשר תבנית התאים בקו נטול הסדקים. הדבר מרמז כי עובייה של שכבת הקוטיקולה שמעל התאים גדול בפרטים בעלי המ"ס. איור 21 מתאר את ההבדל בין הגנוטיפים השונים (שנקבעו על פי סמן DNA מולקולארי) ביחס למשקל של קוטיקולה שהופרדה מתאים (אחרי ניקוי באמצעות האנזימים צלולז ופקטינז). פרטים שהיו בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} היו בעלי קוטיקולה עבה יותר מאשר פרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{EE} , ואילו



איור 20:

הקשר שבין הגנוטיפ של הגן Cwp לבין תופעת ה"פיצוצים" בפרי. א. פירות בשלים מגנוטיפ Cwp^{HH} (HH) לעומת פירות מגנוטיפ Cwp^{EE} (EE). ב. בדיקת התפוצצות קליפת הפרי עקב טבילה הפרי במים מזוקקים למשך כ- 3 שעות.

פרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HE} היו בעלי שכבת קוטיקולה בעובי בינוני. לפי תוצאה זו ניתן להסיק כי קיים קשר ישר והדוק בין עובי שכבת הקוטיקולה של הפרי לבין הופעתם של המ"ס בה.



איור 21:

ההבדלים בין הגנוטיפים של הגן Cwp ביחס למשקל הממוצע של קליפות פרי נקיות מתאים. מכל פרט (אוכלוסיית 2394) נלקחו פירות אדומים. דסקיות בקוטר של 1.5 ס"מ נדגמו מכל קליפה באמצעות מחורר. הדסקיות עברו תהליך של ניקוי אנזימתי (באמצעות פקטינאזות וצולואזות), ייבוש ושקילה. הערך על ציר ה-Y מייצג את משקל הדסקית הממוצע לכל גנוטיפ (כ- 20 דסקיות בסה"כ).

על מנת לבדוק אם קיים הבדל בין פרטים בעלי מ"ס לבין פרטים נטולי מ"ס ביחס למרכיבים הכימיים של הקוטיקולה, קליפות פרי שנוקו מתאים על ידי הפעלת צלולאזות ופקטינזות, נשלחו לאנליזת GC-MS במעבדתו של Wurtzburg, R. Jetter, גרמניה. נלקחו דוגמאות הן מפרי ירוק בוגר והן מפרי אדום בשל. תוצאות האנליזה מובאות בטבלאות 3 ו-4. באופן כללי לא נמצאו הבדלים מובהקים מבחינת חומצות השומן, המרכיבים הפנוליים והשעוות בין הפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} ובין הפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{EE} . חוסר המובהקות נכון הן לגבי פירות אדומים והן לגבי פירות ירוקים. בתוך כל קבוצת גנוטיפ, נמצאו הבדלים בין פירות ירוקים ופירות אדומים, כמצופה לפי השינויים החלים במהלך התפתחות הפרי (Baker *et al.*, 1982). תוצאות הבחינה של מרכיבי הקוטיקולה מראים, כי לא השוני במרכיבי הקוטיקולה אחראי להופעת המ"ס.

טבלה 3: האחוז היחסי של מרכיבי הקוטין בקליפת הפרי בגנוטיפים Cwp^{HH} ו- Cwp^{EE} של הגן Cwp . קליפות פרי נוקו משאריות תאים והועברו אנליזה באמצעות GC-MS. האנליזה נערכה על פירות בשלב ירוק בוגר ואדום בשל.

מרכיב הקוטין	HH אדום	EE אדום	HH ירוק	EE ירוק
cinnamate	2.1a	2.0a	3.1b	3.9b
hexadecanoic Acid	0.3a	0.4a	0.5a	0.9a
omega-hydroxy hexadecanoic acid	3.9a	4.2a	5.1a	3.5a
10,16/9,16/8,16-dihydroxy hexadecanoic acid	87.6a	88.5a	81.6b	82.3b
10,18/11,18- dihydroxy octadecanoic acid	1.5a	2.1a	1.8a	1.6a
18 hydroxy 9,10 epoxy octadecanoic acid	1.2a	1.0a	2.4a	2.0a
סטנדרט פנימי	1.4a	1.8a	5.4b	5.8b

טבלה 4: האחוז היחסי של מרכיבי השעוות בקליפת הפרי בגנוטיפים Cwp^{HH} ו- Cwp^{EE} של הגן Cwp . קליפות פרי נוקו

משאריות תאים והועברו אנליזה באמצעות GC-MS. השעוות מוצו מתוך הקוטיקולה באמצעות ממס אורגני. האנליזה

נערכה על פירות בשלב ירוק בוגר ואדום בשל.

מרכיב הקוטיין	HH אדום	EE אדום	HH ירוק	EE ירוק
total alkanes	24.4a	25.5a	31.4a	27.5a
total isoalkanes	1.4a	1.3a	1.3a	1.4a
total alcohols	3.1a	3.0a	3.5a	2.9a
total fatty acids	5.3a	4.9a	1.0b	1.0b
total aldehydes	0.8a	0.6a	0.0b	0.0b
total 2OH-acids	0.4a	0.4a	0.0b	0.0b
total esters	4.3a	4.7a	6.1a	4.2a
d-Amyrin	10.4a	10.7a	15.6b	18.6b
b-Amyrin	7.14a	6.92a	4.85a	6.07a
a-Amyrin	6.7a	6.7a	9.6b	11.4b
total other triterpenoids	3.2a	3.2a	5.9a	6.3a
total triterpenoid esters	2.22a	1.96a	7.07b	6.49b
Naringenin	1.3a	1.6a	0.0a	0.0a
Chalconaringenin	0.3a	0.4a	0.0a	0.0a
total steroids	0.5a	0.5a	1.6a	2.0a
unknown	27.3a	26.9a	12.4b	11.4b

5.3.5 השפעת הגנוטיפ של הגן Cwp על קצב גדילת הפרי בשלבי ההתפתחות הסופיים של הפרי

אחת ממטרות העבודה היתה לבדוק האם הופעת המ"ס נובעת מגדילה מואצת של הפרי בשלבים שלפני הבשלת הפרי. טכנולוגיית LVDT (Linear Variable Differential Transformers), המוזדנת בצורה רציפה את גדילת הפרי (Yao et al., 2000), יושמה על מנת לעקוב אחר שינויים קטנים בקצב גדילת הפרי (איור 22). האוכלוסייה שנבדקה הכילה פרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{EE} ופרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} . הפרטים נלקחו מאוכלוסיית 2394 המתפצלת לתכונה, כאשר הגנוטיפים ההומוזיגוטים שבה נקבעו באמצעות סמן קרוב (TG464). מדידת השינויים בגודל החלה בשלב של פרי ירוק בוגר (כ- 30 יום מחנטה) ונמשכה כ- 21 יום. בתחילת הניסוי לא היה הבדל במשקל הפרי הממוצע בין הגנוטיפים השונים ($P(F) = 0.652$).

תקופת הניסוי נחלקה לשלוש תקופות המציינות שלושה שלבי התפתחות:

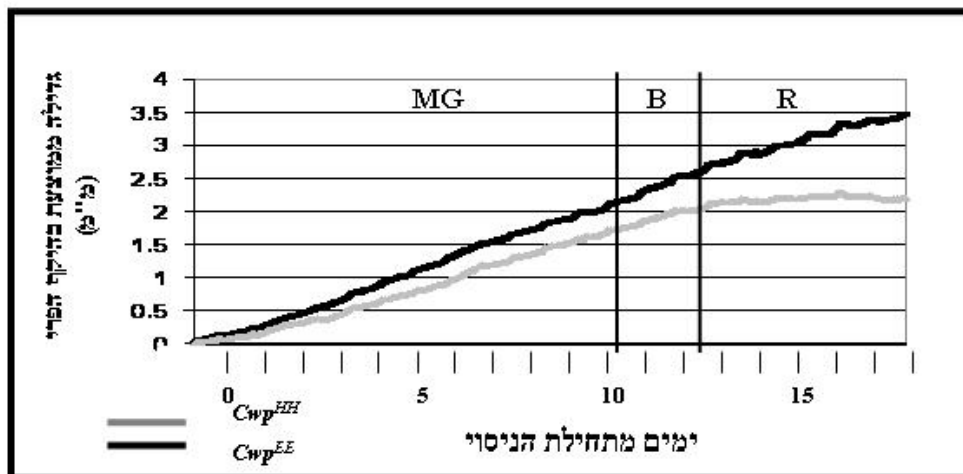
א. ירוק בוגר (MG). ב. שלב ה"שבירה" (breaker, B). ג. אדום בשל (R) (איור 22).

בשלב א' (MG), שבו עדיין לא הצלחנו להבחין במ"ס, לא היה הבדל בקצב הגדילה היחסי של הפירות בין פרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{EE} ובין הפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} . אולם, כבר בשלב זה בפרטים העתידים להיות בעלי מ"ס (Cwp^{HH}) היתה התחלה של ירידה בקצב הגדילה.

שלב ב' (B), הנו השלב שבו ניתן היה להבחין לראשונה בהופעת מ"ס בגנוטיפ Cwp^{HH} . בשלב זה, היה הבדל בין הגנוטיפים, כאשר הפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{EE} שמרו על קצב גדילה קבוע, ואילו בפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} קצב הגדילה ירד. בסוף שלב ב', קצב הגדילה של הפרטים בעלי מ"ס היה אפסי.

בשלב ג' (R), השלב שבו הפרי נמצא במצב בשל, קצב הגדילה של פירות בפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} היה שלילי. זהו תחילתו של מאזן שלילי של הצטברות מים בפרי והתחלת התייבשות הפרי. יש לציין, שהפירות Cwp^{HH} שצוינו קודם לכן באיור 8 (עמוד 45), כבעלי משקל נמוך יותר מפירות Cwp^{EE} , נלקחו משלב זה, דבר המסביר את ההבדלים שנצפו במשקל ההתחלתי של הפירות באותו האיור.

ממצאים אלו ניתן להסיק, שהסתדקות הפרי אינה נגרמת עקב גדילה מהירה יותר של הפרי. תוספת הגדילה בפירות נטולי המ"ס מקורה בלחץ טורגור המופעל על דפנות התאים, דבר שגורם להרפיית הדופן ולגדילת התא עקב הצטברות מים. בפירות בעלי מ"ס, לחץ הטורגור נמוך יותר עקב אידוי מים מהפרי, ולכן אין תוספת גדילה.



איור 15:

בדיקת LVDT לבחינת ההבדלים בין פרטים בעלי מ"ס לבין פרטים נטולי מ"ס ביחס לשינוי היקף הפרי במהלך התפתחותו. בניסוי נבדקו פירות מ-6 צמחים שונים בעלי מ"ס ו-6 נטולי מ"ס. הפרטים היו חלק מאוכלוסייה המתפצלת לתכונת המ"ס (2394). בשלב ההתחלתי של הניסוי לא היה הבדל מובהק בגודל הפרי הממוצע בין הגנוטיפים. הגנוטיפ של הפרטים זוהה באמצעות סמן PCR אחוז לתכונה (TG464). MG – פרי בשלב הירוק הבוגר; B – פרי בשלב השבירה (Breaker); R – פרי בשלב האדום בשל C_{wp}^{HH} – פרט

הומוזיגוט בעל מ"ס. C_{wp}^{EE} – פרט הומוזיגוט נטול מ"ס.

5.4 בידוד הגן למיקרו-סדוקים באמצעות Positional Cloning ואפיונו

במשך המחקר ננקטו מספר אסטרטגיות על מנת לבודד את הגן *Cwp*. בבסיס כל אחת מהאסטרטגיות הנ"ל היה העיקרון שקיים שוני גדול יחסית ברצף ה-DNA בין ההורה התרבותי (*S. lycopersicon*) ובין מין הבר (*S. habrochaites*). הבדל זה נתן לנו את האפשרות לייצר סמן מולקולארי מכל רצף נתון של גן מועמד (candidate gene), או רצף גנומי אחר. לאחר מכן, ניתן היה למפות את הסמן ולראות האם הוא נמצא בקרבה לתכונת המ"ס (co-localization). האסטרטגיות השונות, שנוסו במקביל היו:

א. בידוד של cDNA בעזרת ספריות הפחתה מפירות בעלי מ"ס ומפירות נטולי מ"ס: כלל ה-RNA (Total RNA

RNA) הופק מפירות חסרי ובעלי מ"ס בשלב ה-"שבירה". RNA זה עבר אנליזה ע"ג שבבי DNA (DNA microarray) שבאוניברסיטת קורנל, למציאת הבדלים ברמת ביטוי הגנים. במקביל יצרנו מדוגמאות ה-RNA ספריית הפחתה של cDNA. משתי פרוצדורות אלה עלו כמה עשרות של גנים מועמדים.

ב. בחירת גנים מועמדים הקשורים בביוסינתיזה של מרכיבי קוטיקולה מתוך מאגרי המידע במחשב. תהליך יצירת הקוטיקולה הנו מורכב ביותר, ולמעשה אינו ברור לחלוטין. למרות שפרוצדורה זו נראתה פחות מעשית, השתמשנו בידע מוקדם על גנים המבקרים את תהליך יצירת הקליפות בצמחים (ראה פרק סקירת ספרות), על מנת לבדוק חלק מהגנים הנ"ל כמועמדים.

ג. השוואת תוצרים חלבוניים שהופקו מקליפת הפרי: תוצרי-חלבונים הופקו מקליפות פרי שנוקו משאריות תאים בדרך אנזימתית והופרדו על גבי ג'ל פולי-אקרילאמיד באמצעות 2D electrophoresis. מספר חלבונים שעלו מתוך הקליפה הנקייה רוצפו באמצעות אנליזת GC-MS ונבדקו כגנים מועמדים.

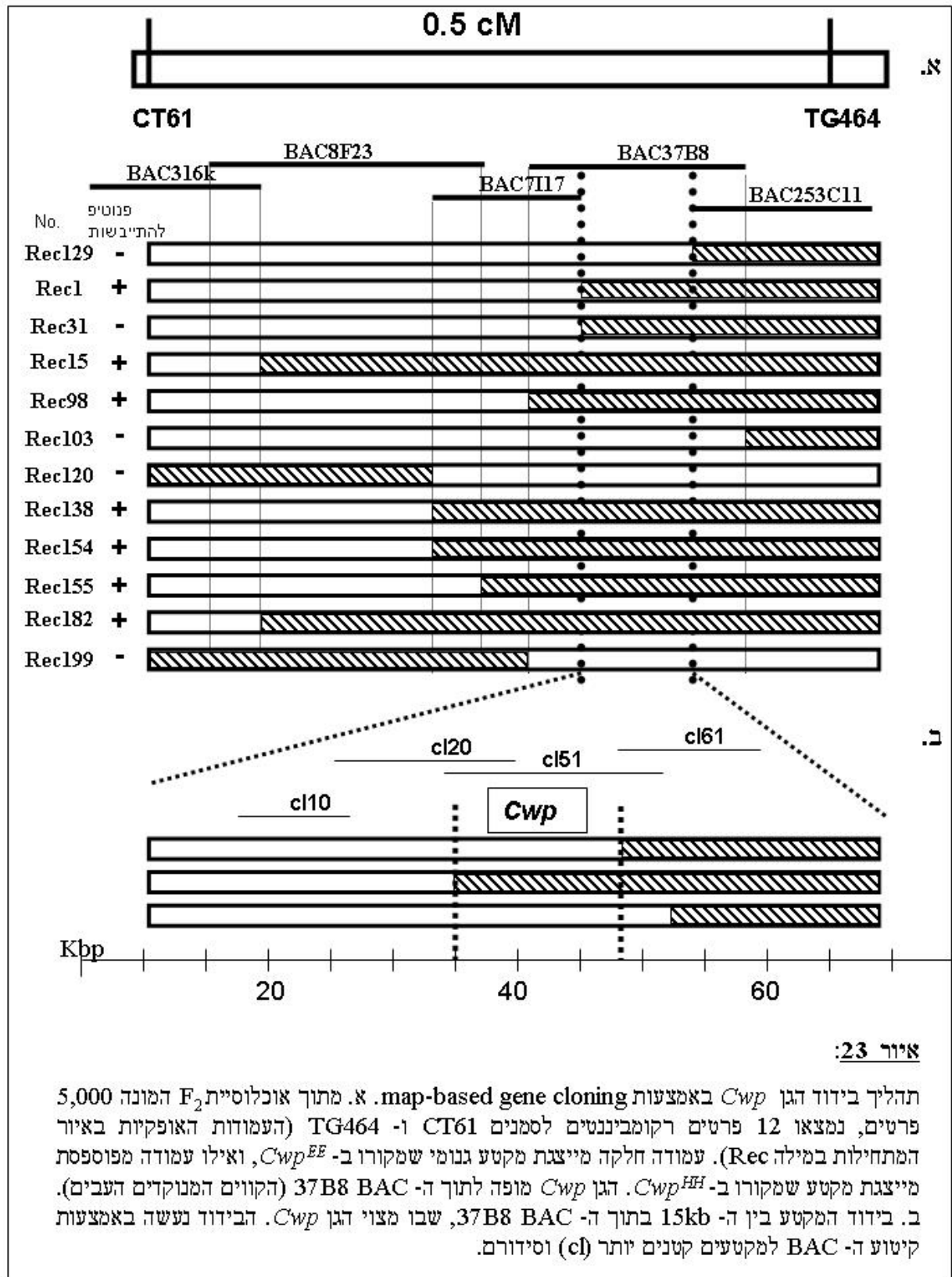
ד. בידוד הגן באמצעות המיקום הפיזי על פני המפה הגנטית (Map Based Positional Gene Cloning). (ראה בהמשך).

מבין האסטרטגיות השונות לבידוד הגן האחראי להופעת המ"ס בפרי, בחרנו להמשיך באסטרטגיה של Map Based Positional Gene Cloning. זאת לאחר שנמצא כי מתוך עשרות גנים מועמדים שעלו באסטרטגיות האחרות, אף גן לא מופה לאזור האחראי להופעת מ"ס. לפיכך, התוצאות של אסטרטגיות א-ג אינן מתוארות בעבודה זו.

5.4.1 בידוד הגן *Cwp* באמצעות Positional Cloning

עיקרון הפעולה בתהליך הבידוד מכונה Chromosome walking (Tanksley et al., 1995). שיטה זו מתבססת מצד אחד על יצירת סמנים נוספים יותר קרובים לתכונה, ומצד שני על התקרבות לגן על-ידי אירועי שחלוף נדירים באוכלוסיות מתפצלות בגודל מתאים (Durrett et al., 2002). השלב הראשון של יצירת סמנים נוספים תואר לעיל בפרק "מיפוי הגן *Cwp* ברמת רזולוציה גבוהה" (עמודים 57-59), שבו תוארה בנייתה של מערכת הכוללת חמישה BACs חופפים בין הסמנים TG464 ו-CT163.

במטרה לבודד מקטע גנומי קטן ביותר המכיל את הגן *Cwp*, אוכלוסייה גדולה של 5,000 צמחוני F_2 (כ-10,000 גמטות שונות), עברה אנליזה עם שני סמני ה- CAPs TG464 ו-CT163. מתוך אלפי הצמחונים שנבדקו נמצאו שנים-עשר צמחים רקומביננטים, שבהם היה הבדל בגנוטיפ של שני הסמנים הנ"ל (איור 23). המרחק הגנטי בין שני הסמנים לפי חישוב זה הוא 0.34cM, ולא 0.5cM כפי שחושב קודם לכן על פי אוכלוסיית F_2 הקטנה בהרבה (איור 17). הקטנת גודל המקטע שבתוכו מצוי הגן *Cwp* נעשתה באמצעות בדיקת הגנוטיפ של כל אחד מקצוות ה-BACs על כל אחד משנים עשר הרקומביננטים והשוואה שלו לפנוטיפ של התכונה (איור 23-א). מכל אחד משנים עשר הרקומביננטים גודלו עשרה צאצאים על ידי הכלאה עצמית, ובהם נבדקה תכונת איבוד המים דרך המ"ס. מתוך שנים עשר אירועי הרקומבינציה שנבדקו בתחילה, שלושה מוקמו בין שני הקצוות של BAC 37B8 (באיור 23-א האזור התחום על ידי שני קווים מנוקדים). מכאן, הגן *Cwp* נמצא בוודאות בתוך ה-BAC 37B8. על מנת להמשיך ולבדוק את אירועי הרקומבינציה, ה-BAC 37B8 פורק למקטעים קטנים יותר, אשר סודרו בצורה חופפת (איור 23-ב). זוהה מקטע של 15,000 בסיסים (15 kb) אשר הגן *Cwp* מצוי בוודאות בתוכו (איור 23-ב) (מיפוי וקטוע נוסף ברמות רזולוצייה יותר גבוהות אינם מובאים באיור).



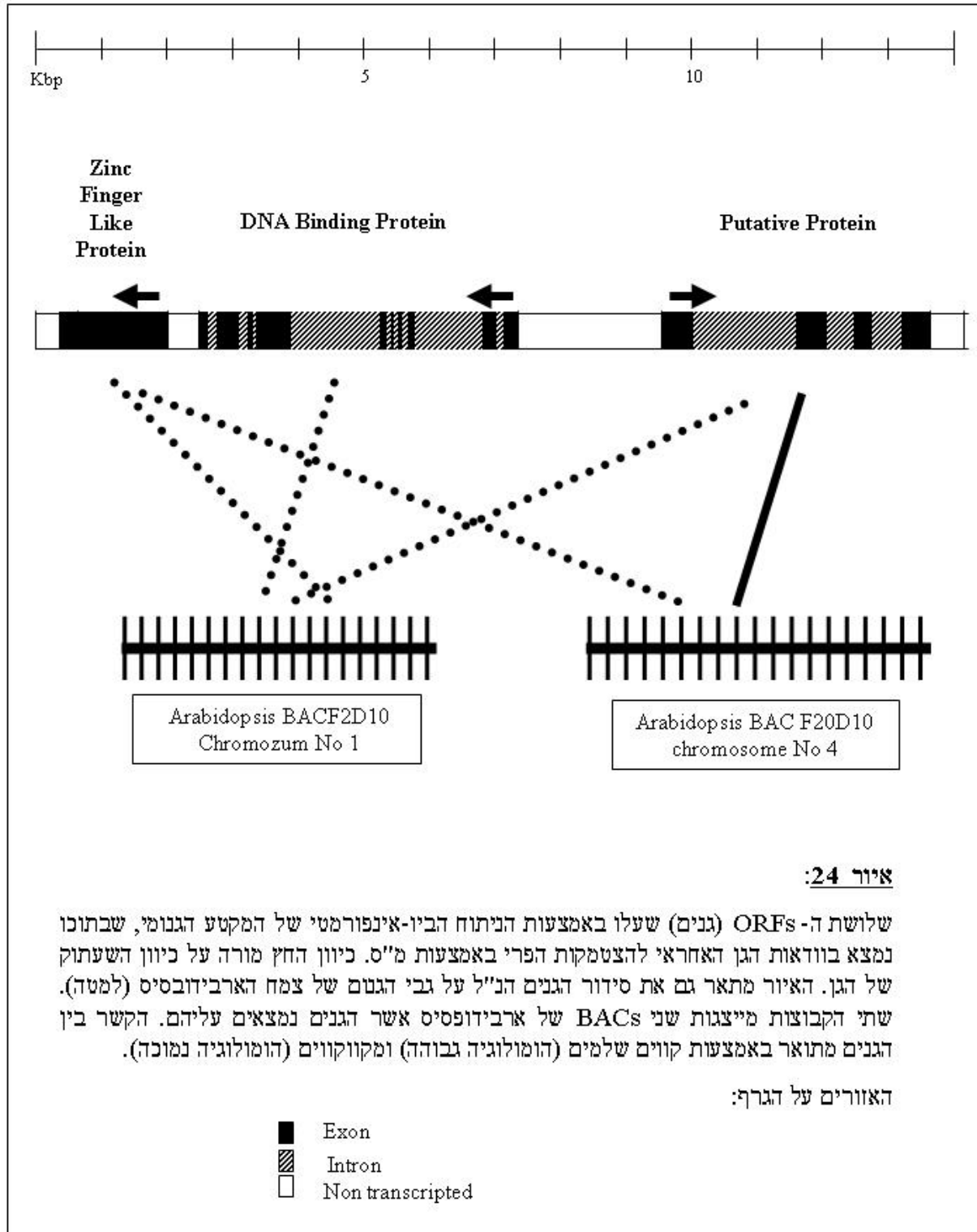
5.4.2 ניתוח ביו-אינפורמטי של הגנים המועמדים מתוך ה- positional cloning

המקטע הנ"ל (15Kb) נחלק ל-תת-מקטעים נוספים, הוחדר לוקטור (Stratagene) Bluescript, רוצף ועבר תהליך של assembling באמצעות תוכנת SEQUENCHER (Gene Codes Corporation). ניתוח ביו-אינפורמטי של הרצף הגנומי של מקטע זה (שנערך באמצעות התוכנה BLAST) הצביע על שלוש מסגרות קריאה (ORFs) שונות, שהן למעשה שלושה גנים מועמדים לתכונת התייבשות הפרי דרך מ"ס (איור 24). שלושת הגנים הנ"ל מופיעים גם בגנום של ארבידופסיס בקרבה יחסית גבוהה אחד לשני (שלושה מהם על BAC בודד בכרומוזום מספר 1 של ארבידופסיס, ושניים על BAC בודד בכרומוזום 4), דבר המורה על רמת ה-synteny הקיימת בין שני המינים.

הגן הראשון הראה דמיון לחלבון של ארבידופסיס בעל פעילות לא ידועה (NP_189369.1) (זהות – 44%, הומולוגיה – 61%). לחלבון זה ישנם שני domains. האחד הנו RING-finger domain, שהוא סוג מיוחד של Zn-finger (40-60 חומצות אמינו המחוברות לאטום אחד של אבץ), והוא אחראי כנראה לקישור של חלבון-חלבון בתא (Borden, 1998). domain זה זוהה בעבר כחלק מסדרה שלמה של חלבונים בעלי טווח פעילויות רחב, כגון שכפול ויראלי, מערכת העברת אותות והתפתחות התא. ה- domain השני בתוך חלבון זה, שנקרא DUF23, הנו בעל פעילות בלתי ידועה. הוא מהווה חלק ממשפחה של domains בעלת אורך של 300 ח' אמינו, שנמצאה בחלבונים של דרוזופילה ו- *C. elegans*. לשם הפשטות כינינו גן זה בשם "Zinc". ראוי לציין, כי הרצף שלנו (שבתוך המקטע בן 15kb), הוא רק חלק מהגן השלם (ואף לא החלק שמכיל את ה- "Ring Finger" domain).

הגן השני הראה דמיון לחלבון הקושר DNA ומכיל bromodomain (ארבידופסיס | NP_974153.1) (זהות – 37%, הומולוגיה – 56%). חלבון זה הנו חלק ממשפחה של חלבונים קושרי DNA הקשורים בתהליכי אצטילציה של חלבונים אחרים, DNA וכרומטין, וברגולציה של היסטון אצטיל-טראנספראזות (Dhalluin et al., 2000). גן זה כונה על ידינו "Dbp" (DNA Binding Protein).

הגן השלישי מקודד לחלבון בעל דמיון ל-"חלבון היפוטטי" (putative protein) מצמח הארבידופסיס (NP_568038.1) (זהות – 48%, הומולוגיה – 67%). הוא מכיל בתוכו domain בעל תפקיד בלתי ידוע (DUF833). הוא חלק ממשפחה של domains, המצויה באאוקריוטים, פרוקריוטים ואף בוירוסים. כאמור, לחלבון זה פעילות לא ידועה.



איור 24:

שלושת ה-ORFs (גנים) שעלו באמצעות הניתוח הביו-אינפורמטי של המקטע הגנומי, שבתוכו נמצא בוודאות הגן האחראי להצטמקות הפרי באמצעות מ"ס. כיוון החץ מורה על כיוון השעתוק של הגן. האיור מתאר גם את סידור הגנים הנ"ל על גבי הגטם של צמח הארבידופסיס (למטה). שתי הקבוצות מייצגות שני BACs של ארבידופסיס אשר הגנים נמצאים עליהם. הקשר בין הגנים מתואר באמצעות קווים שלמים (הומולוגיה גבוהה) ומקווקווים (הומולוגיה נמוכה).

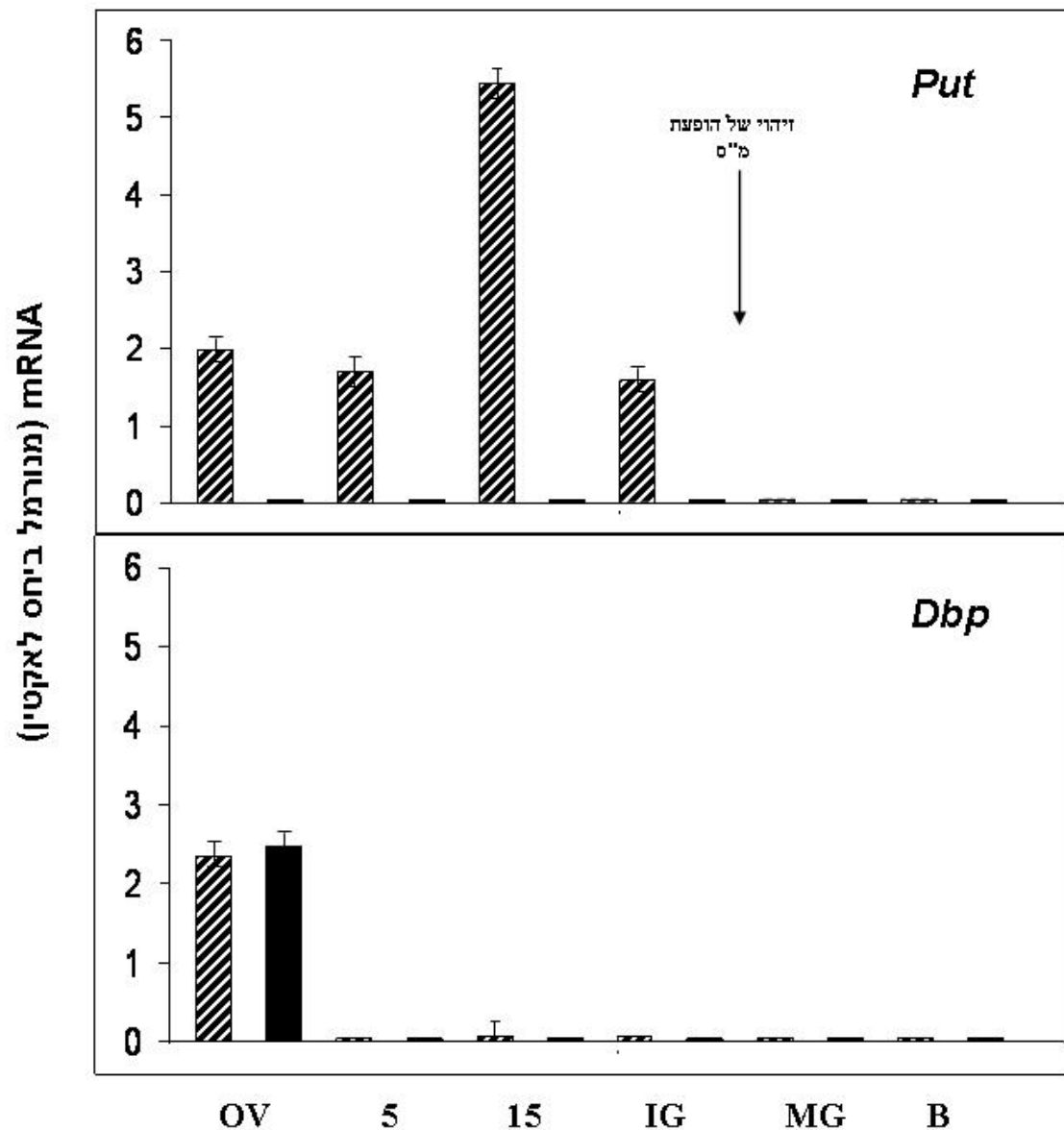
האזורים על הגרף:

- Exon
- ▨ Intron
- Non transcribed

אחד מהחלבונים במשפחה זו נמצא מתבטא בתחילת תהליך האמבריוגנזה בעכברים (Halford et al., 1993). גן זה כונה על ידינו "Put" (קיצור ל- putative protein). פרוצדורה של חיזוי מיקומו של חלבון זה בתא נעשתה באמצעות תוכנת הניתוח TargetP (Technical University of Denmark; Version 1.01). התחזית הראתה כי הגן Put עשוי להיות, ברמת סבירות גבוהה, חלק ממערכת הממברנות התוך-תאיות. כפי שוודאי ניתן להבחין, אף אחד משלושת הגנים המתוארים לעיל, לא הראה שום דמיון או הומולוגיה לגנים הידועים כמשתתפים בתהליך הביסנינתזה של קוטיקולה או חומצות שומן. הדבר לא מפתיע, לאור העובדה שידוע מעט מאוד על תהליך זה. מעבר לכך, לשלושת הגנים הנ"ל קיימים גם קווי מוטנטים בארבידופסיס (tagged mutation line). בדיקה פנוטיפית של קווים אלו הראתה כי לאף אחד מהם לא היה איזשהו מופע בלתי רגיל (תוצאות אינן מובאות).

5.4.3 אנליזות ביטוי של שלושת הגנים המועמדים

בהעדר מידע מוקדם על שלושת הגנים והרצון להחליט מי מהם קשור להופעה של מ"ס בקליפה, מדדנו את רמת הביטוי שלהם בפרטים בעלי האלל Cwp^{HH} ובפרטים בעלי האלל Cwp^{EE} (איור 25). RNA הופק משחלות ומפירות בשלבי הגידול הנ"ל: חנטה, 5 ימים מחנטה, 15 ימים מחנטה, פרי ירוק צעיר, פרי ירוק בשל ופרי בשלב ה"שבירה" (breaker). הפירות נקטפו מפרטים של אוכלוסיית F_2 מתפצלת, הוזה לזו שעליה נערכה פרוצדורת ה- positional cloning (2394). רמת הביטוי של כל אחד משלושת הגנים נבדקה על ידי RT-PCR. הגן *Zinc* לא התבטא באף שלב התפתחותי בשני הגנוטיפים, דבר המראה כי הוא אינו קשור לתופעת המ"ס (לכן התוצאות לגביו אינן מובאות). הגן *Dbp* התבטא אך ורק בשחלות ובצורה שווה בשני הגנוטיפים (איור 25, למטה), דבר המורה על כך שהביטוי של הגן הזה אינו קשור כנראה לתופעת המ"ס ואיבוד המים בפרי. לעומת זאת, הגן *Put* התבטא לאורך כל השלבים הצעירים של התפתחות הפרי (עד למועד שבו הופיעו הסדקים לראשונה) (איור 25, למעלה). מעבר לכך, ביטוי הגן *Put* היה דיפרנציאלי לחלוטין – הוא התבטא אך ורק בפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} , שמקורם ממין הבר *S. habrochaites*, ולא התבטא בפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{EE} . רמת הביטוי הגבוהה ביותר של הגן *Put* הייתה בפירות צעירים מאוד, בשלב של 15 יום מחנטה. ראוי לציין, כי אותה התבנית של הבדלי ביטוי בגן *Put* נשתמרה באוכלוסיות מתפצלות אחרות ובעונות גידול שונות.

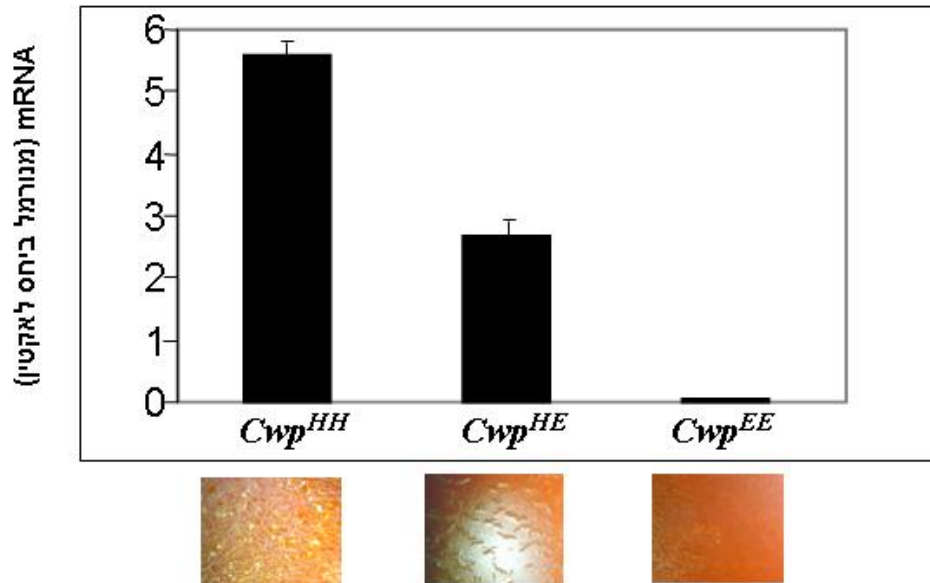


איור 25:

הבדלים ברמת הביטוי של הגנים המועמדים *Put* ו-*Dbp* בפירות מתפתחים. הפירות נלקחו מפרטים בעלי מ"ס ומצטמקים (Cwp^{HH}) (העמודות המקווקות) ומפרטים נטולי מ"ס ולא מצטמקים (Cwp^{EE}) (העמודות השחורות). הפרטים שייכים לאוכלוסיית F_2 המתפצלת לתכונה (2394). רמת הביטוי נבדקה על ידי RT-PCR. כל עמודה מייצגת ממוצע של שלושה צמחים ושל שלוש חזרות טכניות בכל צמח. שלבי הבדיקה: Ov – שחלה, 5 – חמישה ימים מחנטה, 15 – חמישה עשר יום מחנטה, IG – ירוק צעיר, G – ירוק בשל, B – "שבירת צבע". זיהוי ראשוני של מ"ס על גבי הקליפה היה בניסוי זה בשלב שבין ירוק צעיר לירוק בוגר (חץ).

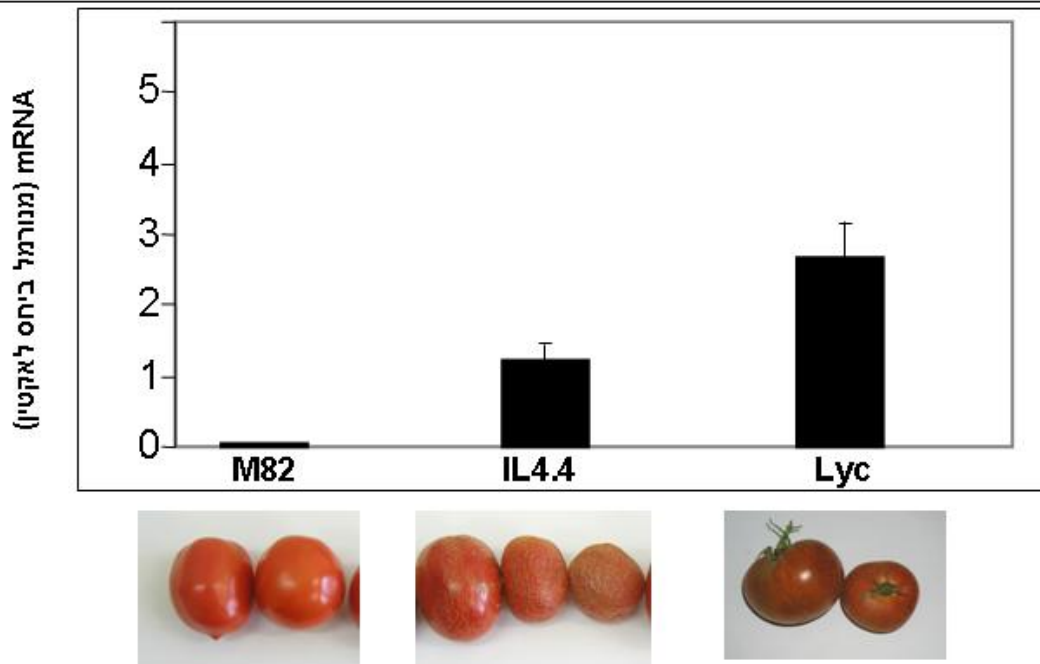
על מנת לחזק את התוצאות לגבי ההבדלים ברמות הביטוי של הגן *Put* בגנוטיפים השונים של הגן *Cwp*, ערכנו אנליזת ביטוי נוספת. באנליזה זו השתמשנו בפרטים של אוכלוסיית F_2 מתפצלת (3012), שמקורה בהכלאה בין קו צימוק רגיל לבין קו העגבניות לתעשייה (M82). קו זה מתאפיין בצורת צימוח בלתי-מסיימת ובפירות גדולים יחסית (כ-50 גרם). במקרה זה בדקנו את רמת הביטוי של הגן *Put* בכל שלושת הגנוטיפים של הגן Cwp^{HH} , Cwp^{HE} (כ-50 גרם). Cwp^{EE} , Cwp^{HE} . הבדיקה נעשתה על פירות שנקטפו בשלב של 5-15 יום מחנטה (שזהו השיא ברמת הביטוי בהתפתחות – ראה בגרף הקודם). כפי שניתן לראות באיור 26, תבנית הביטוי של הגן *Put* בגנוטיפים השונים הייתה מנדלית קלאסית. הפרטים ההומוזיגוטים (Cwp^{HH}) הראו את רמת הביטוי הגבוהה ביותר של הגן *put*, הפרטים ההטרוזיגוטים (Cwp^{HE}) היו בעלי רמת ביטוי של בערך מחצית מהפרטים בעלי הגנוטיפ Cwp^{HH} , ואילו הפרטים ההומוזיגוטים הרצסיביים (Cwp^{EE}) לא הראו שום ביטוי. כמו כן, רמת הביטוי של הגן *Put* באוכלוסייה זו הייתה בהתאמה מלאה לפנוטיפ של כמות המ"ס בקליפה, כאשר הפרטים בעלי רמת הביטוי הגבוהה של הגן *Put* היו בעלי שכבת מ"ס צפופה (ציון 5), הפרטים בעלי רמת הביטוי הבינונית היו בעלי שכבת מ"ס בינונית (ציון 3) והפרטים ללא ביטוי היו נטולי מ"ס (איור 26 למטה).

במטרה להמשיך ולחזק את ההשערה כי הגן *Put* הוא המבקר את הופעת המ"ס בקליפת הפרי, בחנו את ביטוי של הגן בקווים כמעט איזוגונים נוספים (איור 27). הראשון היה קו אינטרוגרסיה (introgression line 4.4), שמקורו בהכלאה בין-מינית שבין מין בר אחר של עגבנייה – *S. pennellii* (Eshed and Zamir 1995) לבין קו התעשייה M82. הקו השני הנו קו אינטרוגרסיה (Lyc 4.4) שמקורו בהכלאה הבין-מינית שבין מין הבר המרוחק יותר *S. lycopersicoides* (Chetelat and Meglic, 2000) ובין קו העגבנייה התרבותית VF36. הגן *Put* התבטא בשני קווי האינטרוגרסיה הנ"ל אך לא במין התרבותי (איור 27). רמת הביטוי הייתה בהתאמה מלאה לפנוטיפ של הופעת המ"ס בקליפת הפרי, כאשר שני קווי האינטרוגרסיה (שמקורם ממיני בר שונים), היו בעלי מ"ס, ואילו קו התרבות היה נטול מ"ס (איור 27 למטה).



איור 26:

ההבדלים ברמת הביטוי של הגן *put* בין הגנוטיפים השונים של הגן *Cwp*. הפרטים שייכים לאוכלוסיית F_2 המתפצלת לתכונה (3012). רמת הביטוי נבדקה על ידי RT-PCR. כל עמודה מייצגת ממוצע של שלושה צמחים ושל שלוש חזרות טכניות בכל צמח. למטה: צילומי בינוקולר המתארים את רמת הסדקים על פני שטח קליפת הפרי.



איור 27:

הבדלים ברמת הביטוי של הגן *Put* בין הקו M82, לבין שני קווי אינטרוגרסייה: IL4.4 – מקורו בהכלאה עם מין הבר *S. Pennellii*. Lyc 4.4 – מקורו בהכלאה עם מין דבר *S. lycopersicoides*. רמת הביטוי נבדקה על ידי RT-PCR. כל עמודה מייצגת ממוצע של שלושה צמחים ושל שלוש חזרות טכניות בכל צמח. למטה: צילומים המתארים את רמת הסדקים על פני שטח קליפת הפרי.

5.4.4 השוואה בין רצף הגן *Put* בקו בעל מ"ס לעומת קו נטול מ"ס

חוסר הביטוי של הגן *Put* בקווי עגבנייה תרבותית, כפי שנצפה בעבודה הנוכחית, בא גם לידי ביטוי כאשר סורקים את בסיסי המידע של ה-EST של העגבנייה ברשת האינטרנט (<http://www.tigr.org>). אף-על-פי שבסיס הנתונים של רצפי הביטוי בעגבנייה הוא נרחב ביותר (כ-300,000 בזמן כתיבת עבודה זו), רצף הגן *Put* אינו מופיע בו כלל. דבר זה מסביר את העובדה כי ניסיונותינו "לחלץ" את הגן מ- cDNA של פרי העגבנייה לא צלחו. לעומת זאת, הרצף של הגן *Put* חולץ בקלות יחסית מ- cDNA של קו עגבנייה מצטמקת (בעלת הגנוטיפ Cwp^{HH}), המייצג את הרצף של מין הבר *S. habrochaites*.

על מנת לחקור האם ההבדלים במופע של התכונה בגנוטיפים Cwp^{HH} ו- Cwp^{EE} הם כתוצאה מהבדלים ברצף ה- cDNA והחלבון של הגן *Put*, נערכה השוואה של רצף ה- cDNA ושל רצף החלבון האוטומטי שמתורגם ממנו בין שני הגנוטיפים (להלן Put^{HH} ו- Put^{EE}). כאמור לעיל, בשל העובדה כי רצף ה- cDNA של הגנוטיפ Put^{EE} אינו ידוע, השוואה נערכה בין רצף ה- cDNA של הגנוטיפ Put^{HH} לבין הרצף הגנומי (מתוך ה- BAC) של הגנוטיפ Put^{EE} (איור 28). כפי שניתן לראות באיור, ההבדלים ברצף החלבון בין שני הגנוטיפים הנם קטנים ביותר, ולמעשה אינם מסוגלים להסביר את השונות הפנוטיפית שבין שני הקווים. תוצאה דומה נצפתה גם בשני הגנים המועמדים האחרים (הרצפים אינם מובאים). תוצאה זו מחזקת את העובדה, שההבדלים במופע של המ"ס הנם תוצאה מבקרה שונה של ביטוי הגן ולא משינוי ברצף החלבון.

put - hab	MCIVVFIWEADSRYSLVLLLNDRDEYHNRPTKEVHWNHEDGEIVGGKDEVGGGTWLA	55
Put - esc	MCIVVFIWEADSRYSLVLLLNDRDEYHNRPTKEVHWNHEDGEIVGGKDEVGGGTWLA	55
Consensus	mcivvfiweadsrys lvlllnrdeyhnrptkevhwedgeivggkdevgggtwla	
put - hab	SSTNGKLAFLTNVLELHTLPHVKTRGDLPLRFLQSNKSPMEFAKELVNEGNEYNG	110
Put - esc	SSTNGKLAFLTNVLELHTLPHVKTRGDLPLRFLQSNKSPMEFAKGLVNEGNEYNG	110
Consensus	sstngklafldtnvlelhtlphvktrgdplrlflqsnkspmfaklvnegneyng	
put - hab	FNLILADIE^hTKKMVYVTRNRPKGEPIITIQEVQPGIHVLSNAKLDSPWPKAQRILKLN	165
Put - esc	FNLILADIE^sSKKMVYVTRNRPKGEPIITIQEVQPGIHVLSNAKLDSPWPKAQRILKLN	165
Consensus	fnliladie kkmvyvtnrpkgepit iqevqpgihvlsnakldspwpkaqrllkn	
put - hab	FKKMLDVYEVN^hEKICVKDMIEKIMRDTTKADKSKLPCICSTDWELELSSIFVEV	220
Put - esc	FKKMLDVYEVN^sEKICVKDMIEKIMRDTTKADKSKLPCICSTDWELELSSIFVEV	220
Consensus	fkkmldvyevn ekicvkdmiekimrdttkadksklpcicstdwelelssifvev	
put - hab	DTALGCGYTRSTTALTIEVGGEVSFYELYL^hNNM^hKEQIVNYRIEKLQMQ	270
Put - esc	DTALGCGYTRSTTALTIEVGGEVSFYELYL^skNNM^sKEQIVNYRIEKLQMQ	270
Consensus	dtalgcgytrsttaltievgevsfyelyl nnmwkeqivnyrieklqmq	

איור 28:

רצף החלבון של הגן *PUT*, שנקבע על פי תרגומו של רצף ה- cDNA ורצף ה- DNA הגנומי של הקווים *PUT-hir* ו- *PUT-esc*, בהתאמה. ההבדלים ברצף מסומנים בצהוב.

5.4.5 ניסויי התמרה של הגן PUT

על מנת להוכיח באופן סופי את מעורבותו של הגן *Put* ביצירת התכונה של עגבנייה מתייבשת באמצעות מ"ס בקליפת הפרי, נערכה סדרה של ניסויי התמרה. רצף ה-cDNA השלם של הגן *Put* שובט מתוך RNA של פרי עגבנייה מצטמקת (גנוטיפ Put^{HH}) והוחדר לתוך פלסמיד ביטוי (pBINPLUS) תחת הבקרה של הפרומוטור 35S. סדרה של צמחי T_0 טראנסגנים בלתי תלויים נוצרה על בסיס צמחי MP (25 צמחים) וצמחי מיקרו-טום (20 צמחים). צמחי MP טרנסגניים מדור T_0 הראו מידה משתנה של מ"ס בקליפה, כאשר ארבעה צמחים (MP1-2, MP1-7,) MP1-16, MP1-22 הראו את הכמות הרבה ביותר ביחס לביקורת (איור 29-א). הפירות של אותם צמחים התייבשו גם בקצב מהיר יותר בהשוואה לקו ה-MP הרגיל, כאשר הונחו במשך שבוע בטמפרטורת החדר (15-25 מ"צ) (איור 29-ב). באוכלוסיית הטרנסגנים שמקורה בקו ה-MicroTom, שני צמחים (Mic103 ו-Mic122) הראו כמות רבה של מ"ס ואיבוד מים בקליפה בהשוואה לביקורת. אולם הם היו חסרי זרעים ולכן לא המשכנו את האנליזה עליהם. ראוי לציין כי אף-על-פי שהגן *Put* הוחדר תחת הבקרה של פרומוטור קונסטיטויבי, לא נמצאה השפעה כל שהיא של הגן על איברים אחרים של הצמח באף אחת מהאוכלוסיות השונות שנבדקו.

5.4.6 ניתוחי הצמחים הטרנסגנים בדור T_1

על מנת לחזק את תוצאות ניסוי הטרנספורמציה בדור T_0 , נערכה אנליזה נוספת של אוכלוסיות טרנסגנים מתפצלות בדור T_1 . לשם כך נבחרו שני צמחי T_0 בלתי-תלויים (MP1 ו-MP4), אשר היו בעלי העתק אחד של הטרנסגן. מכל אוכלוסיית T_1 גודלו כ-16 צמחים. כל אחד מהפרטים נבדק לתכונות של נוכחות מ"ס על קליפת הפרי ומידת איבוד המשקל של הפרי. במקביל, נקבעו גם מספר העותקים של כל טרנסגן (0, 1 או 2) על ידי מבחן צאצאים. בחינת הצאצאים בדור T_1 חיזקה בצורה מוחלטת את התוצאות שנתקבלו בדור T_0 . הצמחים שהיו בעלי שני עותקים של הטרנסגן (המיזיגוטים) הראו גם כמות רבה יותר של מ"ס ואף התייבשו בצורה יותר מהירה, מאשר הפרטים ללא עותקים (איור 30). מעבר לכך, אופן הביטוי של שתי התכונות (מ"ס וההתייבשות) הראו אפקט של מנה (dosage effect), כאשר הפרטים בעלי עותק אחד הראו את התכונות במידה חלקית (איור 31). הופעתה של תכונת איבוד המים דרך מ"ס בקליפת הפרי של הצמחים הטרנסגנים, מוכיחה מעבר לכל ספק כי הגן *Put* הוא הגורם לתופעה. כמו כן היא מראה על הקשר הישיר שבין הגן *Put* והגן *Cwp*. על כן אנו מסיקים כי שניהם הנם אותו הגן. על-כן, מכאן ואילך נכנה את הגן *Put* כ-*Cwp*. הערה: מסיבות שיוסברו בהמשך, נכנה מנקודה זו והילך את הגן *Cwp* כ-*Cwp1*.

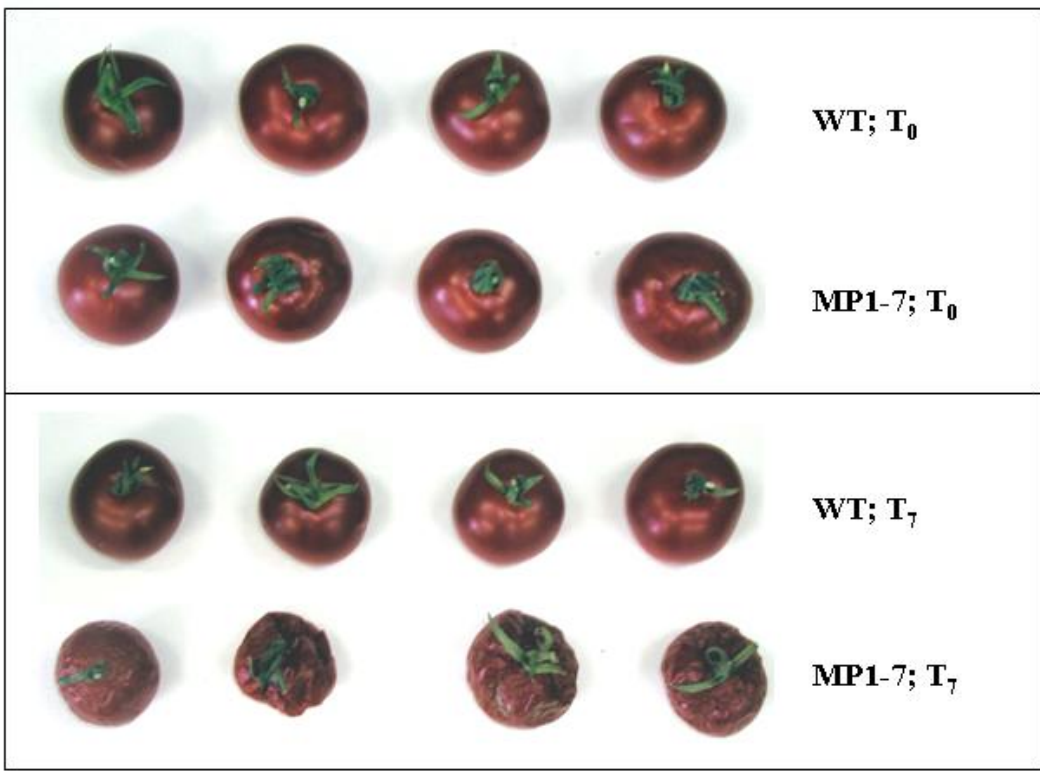


איור 29:

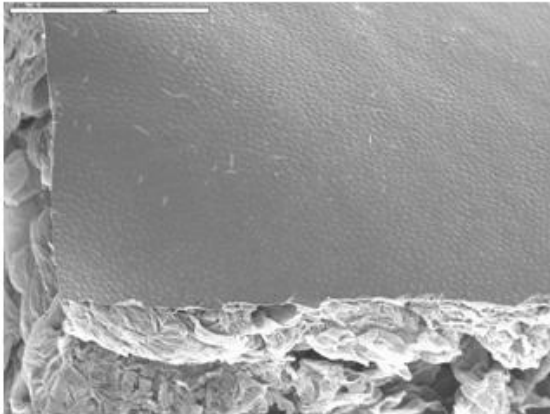
צמחי עגבנייה טרנסגנית המבטאים את רצף הגן *Put* של המין *S. habrochaites* תחת בקרה של פרומוטור 35S.

א. צילום בינוקולר של שטח פני עגבניית MP רגילה נטולת מ"ס (למעלה) לעומת שטח פני עגבנייה טרנסגנית (למטה) בעלת מ"ס.

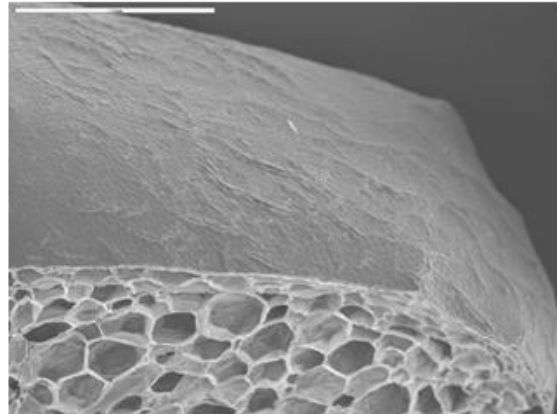
ב. השוואת קצב ההתייבשות של פירות מעגבניית MP רגילה (WT), ומקו של עגבנייה טרנסגנית (MP1-7). התמונות הן מזמן ההתחלה (T_0), ולאחר שבעה ימים (T_7) של ייבוש בטמפרטורת החדר (15-25 מ"צ).



0 עותקים



2 עותקים



א.



0

עותקים



T₀



0

עותקים



T₇



2

עותקים



T₀



2

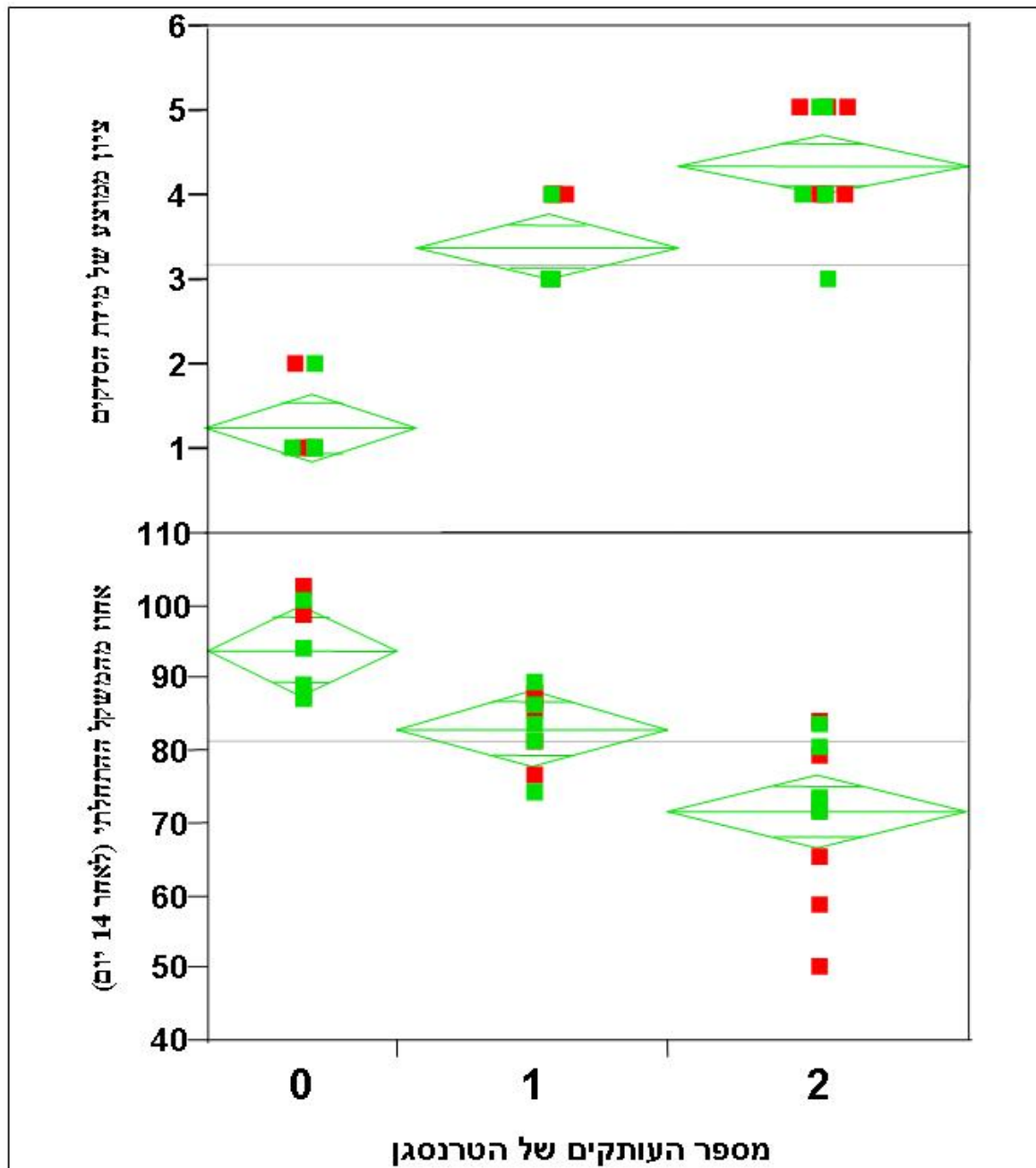
עותקים



T₇

איור 30:

השוואה בין פרטים טרנסגנים מאוכלוסיית T₁ מתפצלת. א. תמונת מיקרוסקופ אלקטרוני סורק הממחישה את ההבדל בכמות הסדקים שבין פרט עם שני עותקים של הטרנסגן *Put*, לבין פרט ללא עותקים כלל. ב. ההבדל בין פרטים בעלי שני העותקים של הטרנסגן לבין פרטים ללא עותקים ביחס לאיבוד המים בפרי. הפירות נקטפו בשלב של אדום בשל והונחו בטמפרטורת החדר. התמונות נלקחו מכל פרט בהתחלת הניסוי (T₀) ולאחר שבעה ימים (T₇).



איור 31:

השפעת מספר העותקים של הטרנסגן *Put* על כמות הסדקים שעל גבי קליפת הפרי ועל מידת ההתייבשות של הפרי (מבוטאת כאחוז מהמשקל ההתחלתי לאחר 14 ימים של ייבוש).

נקטפו חמישה פירות של פרטים משתי אוכלוסיות טרנסגנים מתפצלות (T) בלתי-תלויות. לכל פרי ניתן ציון לגבי מידת הסדקים שעל הקליפה (ציון 1 לפרי ללא סדקים כלל ועד לציון 5 לפרי בעל מ"ס בצפיפות גבוהה מאוד). הפירות נשקלו לאחר מכן, הונחו בטמפרטורת החדר למשך 14 יום ונשקלו שוב. הצבעים בגרף מסמנים את שתי האוכלוסיות השונות.

5.4.7 הגן *Cwp1* מתבטא בצורה ספציפית בקליפת הפרי

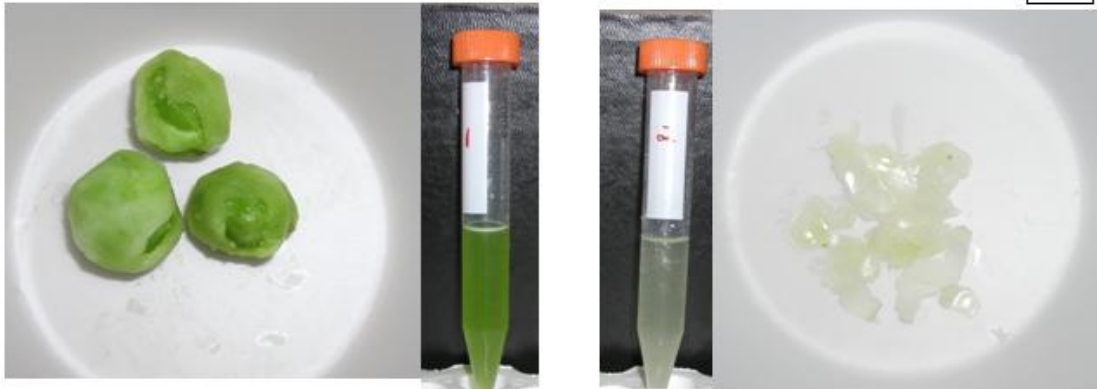
על מנת לבדוק האם הגן *Cwp1* מתבטא בצורה ספציפית בקליפת הפרי, ערכנו את הניסוי הבא. פירות בשלב הגידול המתאים (5-15 ימים מחנטה) נקטפו מפרט בעל הגנוטיפ *Put^{HH}*. מפירות אלו הסרנו את קליפת הפרי בצורה עדינה, כך שהפרי הופרד לשני חלקים – הקליפה ושאר חלקי הפרי (איור 32). מכל חלק הופק RNA, וממנו סונתז cDNA. רמת הביטוי של הגן *Cwp1* נבדקה בכל אחד מחלקי הפרי. כביקורת שימשו פרי שלם בעל גנוטיפ *Put^{HH}* ופרי שלם בעל גנוטיפ *Put^{EE}*. נמצא שהגן *Cwp1* מתבטא בקליפת הפרי בלבד (איור 32). בנוסף, לא נמצא ביטוי של הגן *Cwp1* בחלקים אחרים של הצמח, כגון גבעולים ועלים (איור 32). יש צורך בניסויים נוספים שיכללו את בדיקת הביטוי של הגן באנליזת in-situ, על מנת לזהות את האתר המדויק בקליפת הפרי שבו מתבטא הגן, אולם אנליזות מעין אלה הן מעבר לגבולות העבודה הנוכחית, כפי שנקבעו במטרות המחקר.

5.4.8 הגן *Cwp1* הנו חלק ממשפחה של גנים

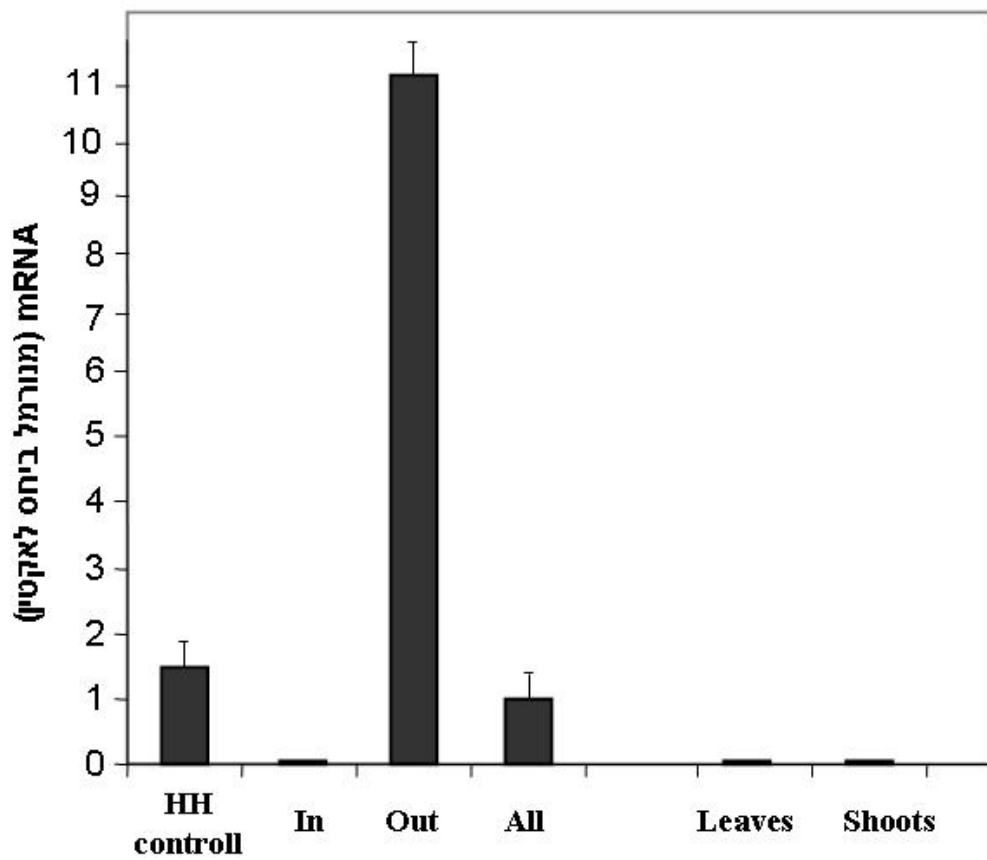
כאמור לעיל, הגן *Cwp1* הנו חלק ממשפחה של חלבונים בעלי תפקיד לא ידוע, המכילים domain מסוים שמופיע כמעט בכל האורגניזמים בטבע (אאוקריוטים, פרוקריוטים ואף וירוסים) (Halford et al., 1993). בצמח הארבידופסיס ישנם שלושה הומולוגים של הגן הנ"ל, המופיעים בשני כרומוזומים שונים. על מנת לזהות הומולוגים של הגן *Cwp1* בעגבנייה ערכנו אנליזת Southern. באנליזה זו השתמשנו ברצף ה-cDNA של הגן *Cwp1* כגלאי של העתקים נוספים שלו בגנום (איור 33). על פי נוכחותו של לפחות פס נוסף בכל אחד מהחיתוכים ניתן להסיק כי הגן *Cwp1* הנו חלק ממשפחה של גנים, המכילה לפחות שני גנים.

בידוד ההומולוג של הגן *Cwp1*: על בסיס היכולת של רצף הגן *Cwp1* לזהות אזורים הומולוגיים לו באמצעות היברידיזציה, בודדנו עותק נוסף של הגן. תהליך הבידוד כלל שימוש ברצף הגן כגלאי בכדי לסרוק ספריית BACs של עגבנייה. מה-BAC שעלה בסריקה זו הכנו תת-ספרייה, אשר אותה סרקנו שוב עם אותו הגלאי. השבט שעלה הכיל את הרצף של העותק הנוסף של הגן *Cwp1*. גן נוסף זה כונה *Cwp2*. מתוך הרצף הגנומי של הגן *Cwp2*, ערכנו אנליזת תרגום אוטומטית (robot translation) לרצף החלבון שלו. השוואה בין רצפי החלבונים *Cwp1* ו-*Cwp2* מובאת באיור 34. ניתן לראות באיור כי רמת הדמיון בין שני החלבונים היא של 47%. למרות זאת, השוני בין החלבונים הנו גדול יחסית, דבר המרמז על תפקיד שונה.

א.



ב.

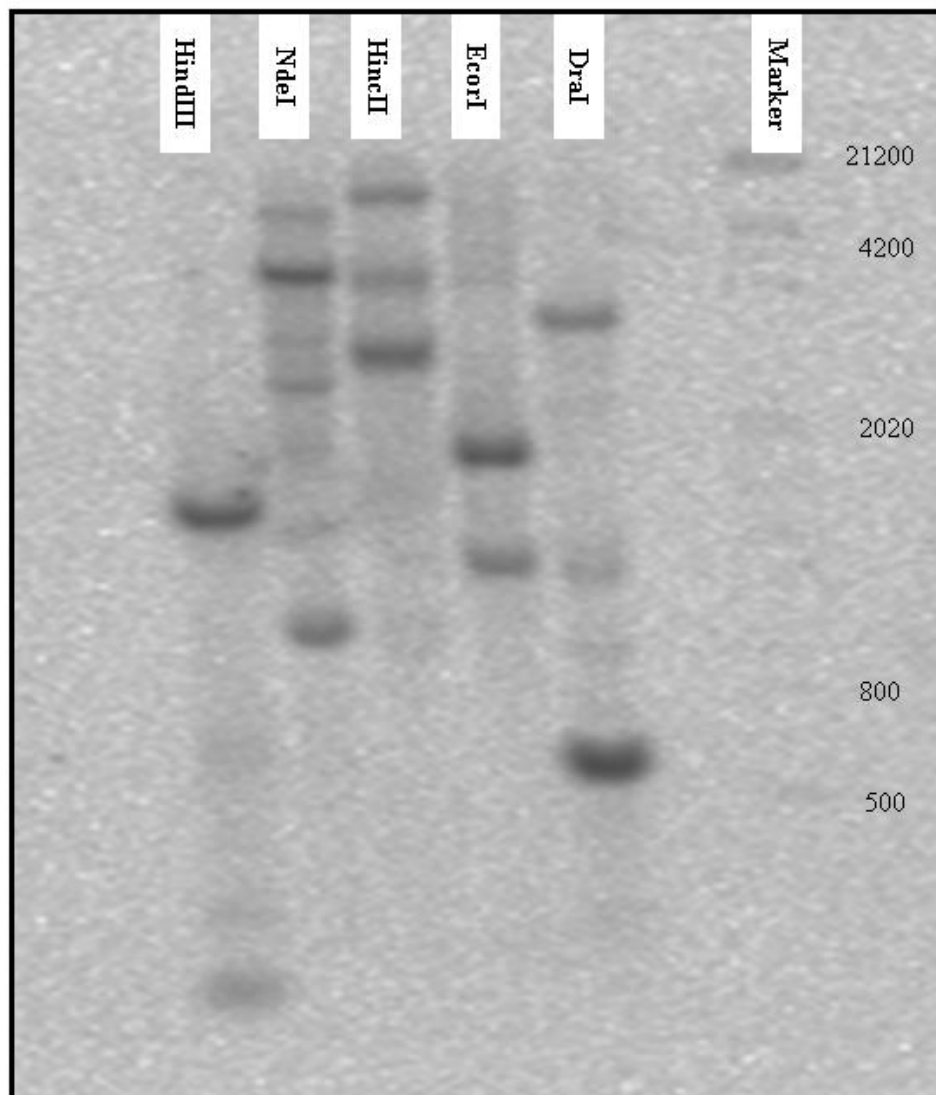


איור 32:

ביטוי הגן *Cwp1* בפרי ובצמח.

א. תמונות המתארות את הרקמות שנבדקו. בצד ימין – קליפת פרי נקייה (Out), ובצד שמאל – תוך הפרי (In). במבחטת – אותן הרקמות בתוך בופר המיצי של ה-RNA.

ב. רמת הביטוי של הגן *Cwp1* נבדקה באמצעות RT-PCR על פרי שלם (HH control, All), תוך הפרי בלבד (In), קליפת הפרי בלבד (Out), עלים (Leaves) וגבעול (Shoot).



איור 33:

אנליזת Southern של רצף הגן *Cwpl*. DNA כללי הופק מעלים של קו עגבנייה, תרבותית (139). ה-DNA עבר קיטוע מלא באמצעות חמישה אנוימי הגבלה, הורץ וקובע על ממברנת *nitro-celulose*. כלל ה-DNA עבר היברידיזציה עם גלאי רדיואקטיבי שהוכן על תבניתו של רצף הגן *Cwpl*. בכל טור ניתן להבחין בסימון אחד חזק, ולפחות בעוד סימון אחד חלש יותר.

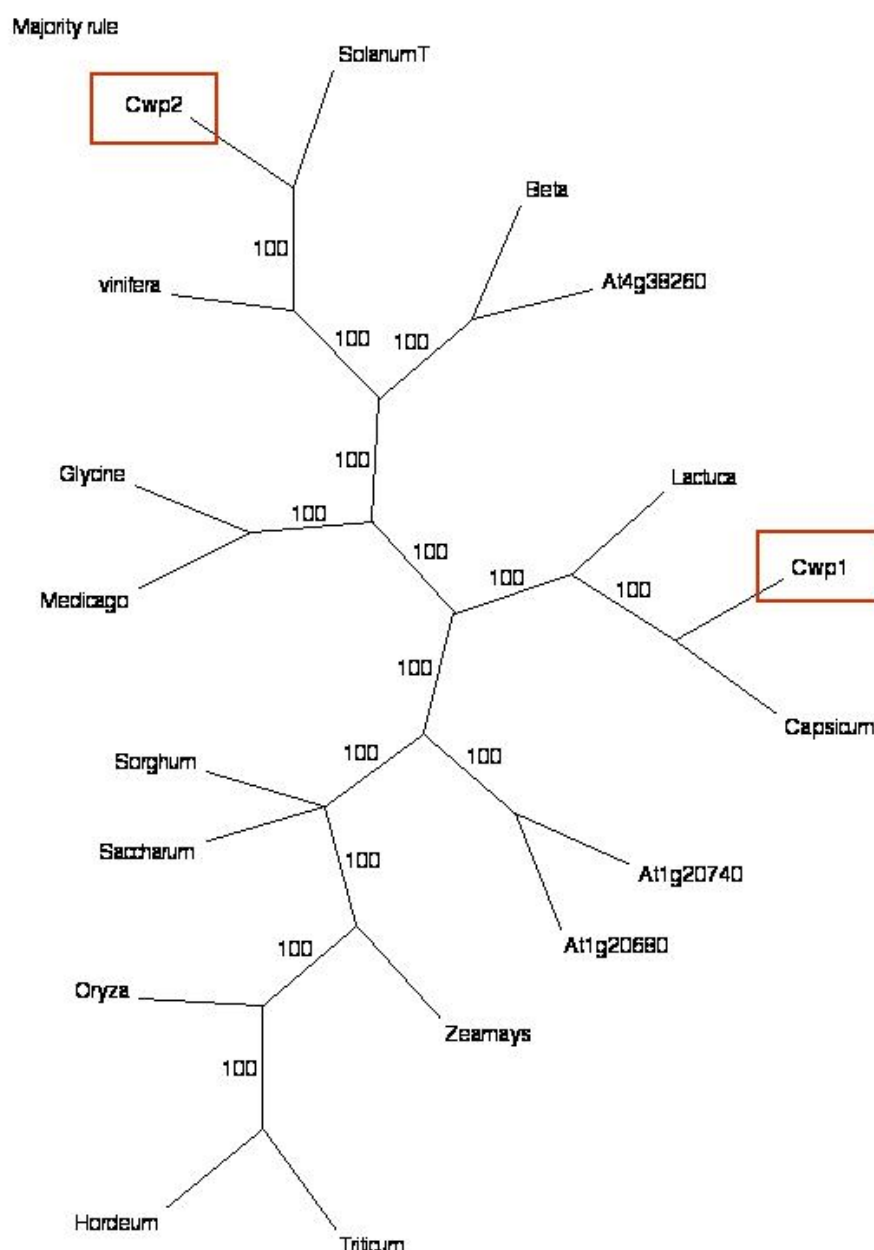
pp1	NCIWFIVLEADSRYSLVLLLNDRDEYHNRP TKEVHVMEDGEI VGGKDEVGGGTWLASSTNG	60
pp2	MSIFVFIWKAHPLHPFLFLNDRDEYHNRP TKPLSVMEDTDI LGGRDEVAGGTWLACTRIG	60
Consensus i vfiw a l lnrdeyhnrptk wwed i gg dev ggtwla g		
pp1	KLAFLTNMLELHTLPHVKT RGDPLRFLDSNKSPMEFAKELVNEGNEYNGFNLI LADI ET	120
pp2	RLAFLTNMLEI NSNSHTRS RGDPLRFLKSMKSPRDFSECLLI EAGEYNGFNLI VTDLCS	120
Consensus l a f l t n v e h r g d p l r f l s k s p f l e e y n g f n l i d		
pp1	KKMYYVTNRPKGEPI TI CEVCPGI HVLSNAKLDSPMPKACRL KLNFKKMLDWEVNDKLI	180
pp2	MINLYITNRPKHTGMSVTEVSPGI HVLSNASLNSPMPKSCRLECSFKQLLDEYGES.EI	178
Consensus m y t n r p k e v p g i h v l s n a l s p m p k q r l f k l d y e i		
pp1	CVKDMIEKLMRDTTKADKSKLPCV CSTDMLELSSIFVEVDTALGCGYTRSTTALTI EVG	240
pp2	PIGHAAERI MRDVAQED.SNPPGI I SPECEYCLSSLFVDTEMCMGRFCPRSTSSLAVKKS	237
Consensus e m r d d s p i s e l s s f v g r s t l		
pp1	GEVSFYELYLENMMEKEGI VNYRI EKLCMQ	270
pp2	CDATFYERFLRRF.....	250
Consensus f y e l		

איור 34:

השוואת רצף חומצות האמינו של הגן *Cwp1* (רצף עליון), כנגד רצף הגן ו-*Cwp2* (רצף תחתון). צבע שחור מסמן התאמה מלאה. צבע כחול מסמן התאמה חלקית (חומצות אמינו קרובות).

בניגוד לגן *Cwp1*, שלא נמצא לו רצף זהה בספריות ה-EST ברשת האינטרנט (<http://www.tigr.org>), הגן *Cwp2* מופיע בספריות אלה (AW621927). לפי מסדי נתונים אלה, הגן *Cwp2* מתבטא בכל חלקי הצמח בעגבנייה. הפיכת הרצף של הגן *Cwp2* לסמן מולקולארי (המבדיל בין ההורה *S. esculentum* וההורה *S. habrochaites*) ומיפוי על גבי המפה הגנטית נתן תוצאה מעניינת. הגן *Cwp2* התמפה לאזור בגנום, שהוא קצה הזרוע הקצרה של כרומוזום מס' 2 (IL2.1). מסתבר, כי אזור זה אופייני אף הוא בעבר, כאזור המשפיע על הופעת "אפידרמיס מרושת" (reticulated epidermis), אם כי השפעתו הכללית על הופעת התכונה היא קטנה יחסית (8% לעומת כ-45% של הגן *Cwp1*), והוא משפיע רק ברקע הגנטי של מין הבר *S. pennellii* (ראה איור 15 בפרק זה).

באיור 35 מתואר עץ פילוגנטי, המתאר את הקרבה בין הגנים *Cwp1* ו-*Cwp2* בעגבנייה, בארבידופסיס ובמספר מיני צמחים נוספים. ראוי לציין, כי הבסיס להשוואה הוא רצפי החלבונים אשר מקורם ברצפי ה-EST של המינים.



איור 35

עץ הומולוגי המתאר את הקרבה הגנטית שבין הגנים *Cwp1* - *Cwp2* בעגבנייה ובאורגניזמים נוספים. שני הגנים בעגבנייה מסומנים בריבוע אדום. האנליזה נערכה על רצפי החלבון של הגנים (מתורגם מה-EST), אשר נלקחו מבסיס נתונים ברשת האיטרנט (TIGR). העץ המתואר הנו קונצנזום של שלושה עצים פילוגנטיים "חסרי שורשים" (un-rooted), אשר נוצרו בעזרת האלוגוריתם Parsimoni של תוכנת PAUP. כל עץ נבנה על ידי שימוש ב-10 חזרות של בחירת רצפים אקראיים.

המינים הנוספים באיור:

Capsicum – *Capsicum annuum*; *Zeamays* – *Zea mays*; *Sorghum* – *Sorghum bicolor*; *Saccharum* – *Saccharum officinarum*; *Oryza* – *Oryza sativa*; *Hordeum* – *Hordeum vulgare*; *Triticum* – *Triticum aestivum*; *SolanumT* - *Solanum tuberosum*; *vinitera* – *Vitis vinifera*; *Beta* – *Beta vulgaris*; *Medicago* - *Medicago truncatula*; *Glycine* – *Glycine max*; *Lactuca* – *Lactuca sativa*; At4g38260, At1g20740, At1g20680 – *Arabidopsis thaliana*.

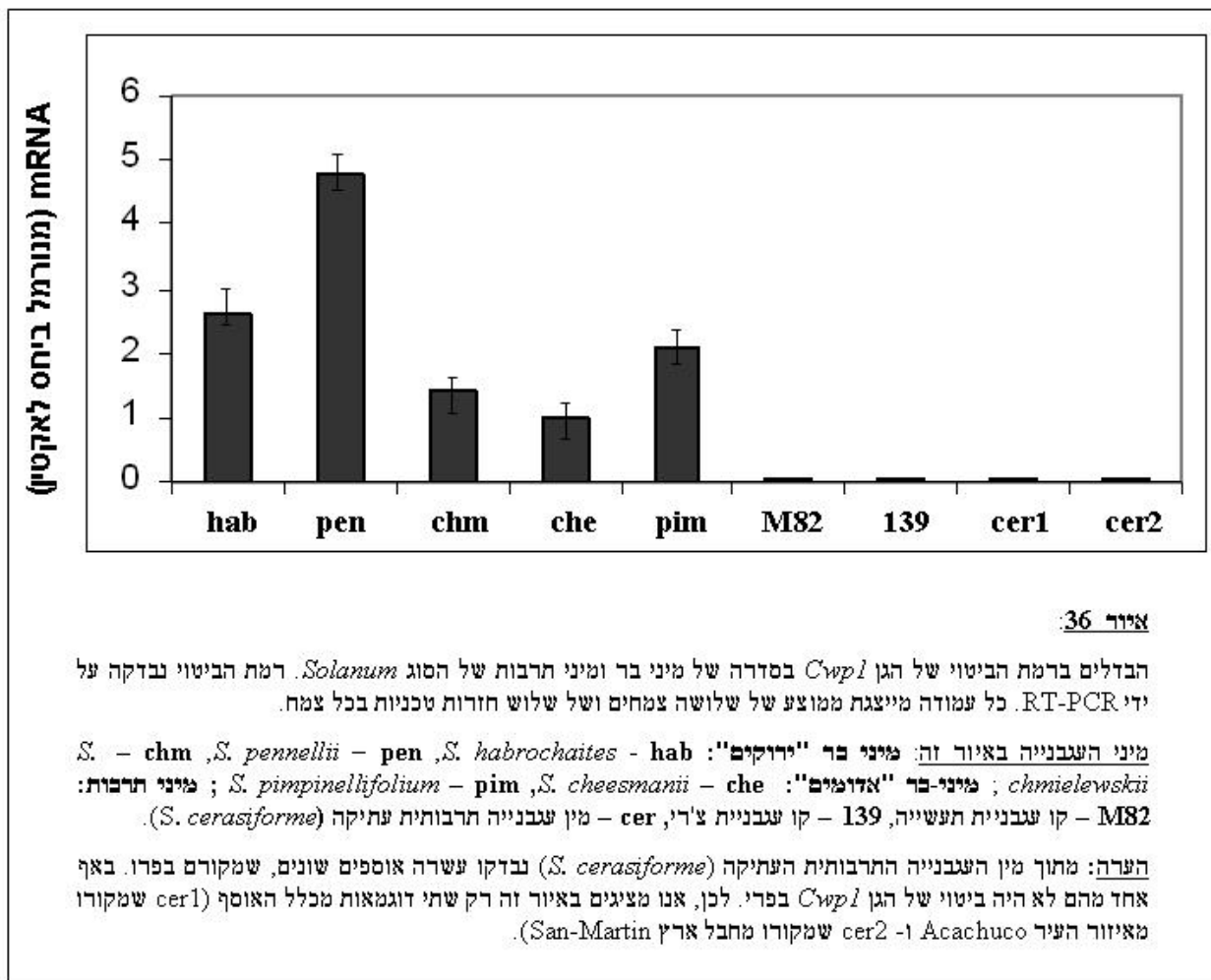
נראה כי הגנים *Cwp1* ו-*Cwp2* שייכים לשתי קבוצות שונות. הגן *Cwp1* בעגבנייה קרוב יותר לגן *Cwp* בפלפל (*Capsicum annuum*) (כ-90% הומולוגיה) והגן קרוב יותר לקבוצת החד-פסיגיים מאשר הגן *Cwp2* בעגבנייה (כ-60% הומולוגיה). על כן, נראה כי שני גנים אלו התפצלו מגן אחד, עוד לפני היווצרות הסוג *Solanum*. עוד ניתן להבחין באיור 35, כי חלה ירידה משמעותית ברמת ההומולוגיה של רצף ה-*cDNA* של הגן *Cwp* במעבר מעגבניית הבר (*Cwp1*) והפלפל (שביניהם קיימת 90% הומולוגיה) לקבוצה הקרובה ביותר, שהיא הדגניים (60% הומולוגיה). ירידה משמעותית נוספת ברמת ההומולוגיה היא בין כל הקבוצה הנ"ל (עגבניה, פלפל ודגניים) ובין שאר הקבוצות (פחות מ-50% הומולוגיה).

5.5 אפיון אבולוציוני של הגן *Cwp* על ידי שימוש במיני-הבר של העגבנייה

אחת ממטרות המחקר היתה לנסות ולהתחקות, באמצעות הגן *Cwp1*, אחר השינויים שעבר גידול העגבנייה במהלך האבולוציה שלו ביחס ליכולתו לשמור את תכולת המים בפרי. ואכן, אחת התכונות החשובות בפרי העגבנייה התרבותית היא עסיסיותו של הפרי, המאופיין בתכולת מים גבוהה ביותר (כ-90%). נראה כי מאפיין קיצוני זה של אי-האפשרות לאידוי מים מהפרי, עשוי היה להתרחש בעקבות תהליכי סלקציה ייחודיות במעבר מהבר לתרבות.

5.5.1 ניתוחי ביטוי של הגן *Cwp* במיני עגבנייה שונים

על מנת לבדוק את התהליך האבולוציוני שעבר ביטוי הגן *Cwp1* מעגבניית הבר *S. habrochaites*, שבה הוא פעיל, לעגבנייה התרבותית *S. lycopersicon*, שבה הוא משותק, נבדקה רמת הביטוי שלו בסדרה של פירות ממיני בר ומיני תרבות של הסוג *Solanum*. נלקחו פירות משלושה מיני בר מתת-הסוג *Eriopersicon* (בעלי פירות ירוקים) ומשני מיני-בר מתת-הסוג *Eulycopersicon* (בעלי פירות אדומים), וכן מסדרה של זני תרבות (*S. lycopersicon*) אשר הם למעשה חלק מה- *Eulycopersicon*). האנליזה נעשתה באמצעות RT-PCR, ותוצאותיה מובאות באיור 36. הגן *Cwp1* התבטא ברמות ביטוי שונות בכל מיני הבר של הסוג *Solanum* שנבדקו (גם ה-*Eriopersicon* הירוקים וגם ה- *Eulycopersicon* האדומים). לעומת זאת, הוא לא התבטא באף אחד מזני התרבות של העגבנייה, הכולל גם עשרה אוספים שונים של המין התרבותי העתיק – *S. cerasiforme*.
ראוי לציין בעניין זה, כי למרות שהגן *Cwp1* התבטא בכל מיני הבר של העגבנייה, לא ניתן היה להבחין בתופעת המ"ס בפרי או בהצטמקות הפרי על השיח באף אחד מהמינים האלה (הן ה"אדומים" והן ה"ירוקים"). למעשה, כל תופעות המ"ס והתייבשות הפרי שנצפו עד כה, הן של קווי אינטרוגרסיה הכוללים מקטע ממין הבר על הרקע הגנטי של מין התרבות.



5.5.2 השוואת רצף הפרומוטור של הגן *CWP* בין מיני הענבייה

במטרה לזהות אזור ספציפי בפרומוטור של הגן *Cwp1* העשוי לבקר את ביטוי, נבדק הרצף הגנומי של כ-1200 בסיסים ב"מעלה הזרם" שלפני תחילת הגן. ההשוואה של רצף הפרומוטור בין שני מיני בר "ירוקים", שני מיני בר "אדומים" ושני מיני תרבות מוצגת באיור 37. הסתכלות באיור מגלה כי למרות שהגן *Cwp1* מתבטא בכל מיני הבר, הן ה"אדומים" והן ה"ירוקים", השונות בין שתי הקבוצות האלה ברצף הפרומוטור היא מעבר לנורמאלי, שהוא SNP אחד לכל 30 בסיסים לערך) (העיוגולים הכחולים באיור 37). לעומת זאת, ההבדלים בין מיני הבר ה"אדומים", בהם יש ביטוי של הגן *Cwp1*, לבין מיני התרבות, שבהם אין ביטוי של הגן הם מינוריים (העיוגולים האדומים באיור 37). למעשה, קיימים רק שני מקומות במקטע זה, שבהם קיים הבדל העשוי להסביר את ההבדל בביטוי הגן בין מיני התרבות והבר. ראוי לציין, כי לא אותרו שינויים באלמנטי-ציס באיזור הפרומוטור העשויים להשפיע על הביטוי של הגן.

en	000GT0CT ATTCTT ACAAT ACTCAAGT AATTT AACGT AGTGGTCAAAT TTGAT AAATTA	495
nr	000GT0CT ATTCTT ACAAT ACTCAAGT AATTT AACGT AGTGGTCAAAT TTGAT AAATTA	497
Pin	000GT0CT ATTCTT ACAAT ACTCAAGT AATTT AACGT AGTGGTCAAAT TTGAT AAATTA	497
Ches	000GT0CT ATTCTT ACAAT ACTCAAGT AATTT AACGT AGTGGTCAAAT TTGAT AAATTA	497
Hir	000GT0CT ATTCTT ACAAT ACTCAAGT AATTT AACGT AGTGGTCAAAT TTGAT AAATTA	495
dsm	000GT0CT ATTCTT ACAAT ACTCAAGT AATTT AACGT AGTGGTCAAAT TTGAT AAATTA	495
en	ATTAT ATACT AATTTTTTCAGTCTT ATT TT ATGTGGT ATATTT AATT CGACAT GAAATTTA	506
nr	ATTAT ATACT AATTTTTTCAGTCTT ATT TT ATGTGGT ATATTT AATT CGACAT GAAATTTA	507
Pin	ATTAT ATACT AATTTTTTCAGTCTT ATT TT ATGTGGT ATATTT AATT CGACAT GAAATTTA	507
Ches	ATTAT ATACT AATTTTTTCAGTCTT ATT TT ATGTGGT ATATTT AATT CGACAT GAAATTTA	507
Hir	ATTAT ATACT AATTTTTTCAGTCTT ATT TT ATGTGGT ATATTT AATT CGACAT GAAATTTA	506
dsm	ATTAT ATACT AATTTTTTCAGTCTT ATT TT ATGTGGT ATATTT AATT CGACAT GAAATTTA	506
en	AAAAAT AAAGCGTTGAAA TTT ATC ABAAT ACATTTTT AAAAAA TCGA TT CAATTTT	595
nr	AAAAAT AAAGCGTTGAAA TTT ATC ABAAT ACATTTTT AAAAAA TCGA TT CAATTTT	597
Pin	AAAAAT AAAGCGTTGAAA TTT ATC ABAAT ACATTTTT AAAAAA TCGA TT CAATTTT	597
Ches	AAAAAT AAAGCGTTGAAA TTT ATC ABAAT ACATTTTT AAAAAA TCGA TT CAATTTT	596
Hir	AAAAAT AAAGCGTTGAAA TTT ATC ABAAT ACATTTTT AAAAAA TCGA TT CAATTTT	594
dsm	AAAAAT AAAGCGTTGAAA TTT ATC ABAAT ACATTTTT AAAAAA TCGA TT CAATTTT	594
en	TTCTCT CT CAT AAAT GT ATT AGC T AAT T T AAAAT T AAAT AGAAT AACCAATGAT	695
nr	TTCTCT CT CAT AAAT GT ATT AGC T AAT T T AAAAT T AAAT AGAAT AACCAATGAT	697
Pin	TTCTCT CT CAT AAAT GT ATT AGC T AAT T T AAAAT T AAAT AGAAT AACCAATGAT	697
Ches	TTCTCT CT CAT AAAT GT ATT AGC T AAT T T AAAAT T AAAT AGAAT AACCAATGAT	695
Hir	TTCTCT CT CAT AAAT GT ATT AGC T AAT T T AAAAT T AAAT AGAAT AACCAATGAT	694
dsm	TTCTCT CT CAT AAAT GT ATT AGC T AAT T T AAAAT T AAAT AGAAT AACCAATGAT	694
en	AAAAAT AAAT T T AAT TTT AAA TTT T ACCAT AT A ABAAT GTGACATCTTTTTT	705
nr	AAAAAT AAAT T T AAT TTT AAA TTT T ACCAT AT A ABAAT GTGACATCTTTTTT	705
Pin	AAAAAT AAAT T T AAT TTT AAA TTT T ACCAT AT A ABAAT GTGACATCTTTTTT	705
Ches	AAAAAT AAAT T T AAT TTT AAA TTT T ACCAT AT A ABAAT GTGACATCTTTTTT	705
Hir	AAAAAT AAAT T T AAT TTT AAA TTT T ACCAT AT A ABAAT GTGACATCTTTTTT	704
dsm	AAAAAT AAAT T T AAT TTT AAA TTT T ACCAT AT A ABAAT GTGACATCTTTTTT	704
en	ACTGACT AAAAAAT AGAAAAAT AATGT CAT AT AT AT AAAAT AAAAAA TCAAAAT	764
nr	ACTGACT AAAAAAT AGAAAAAT AATGT CAT AT AT AT AAAAT AAAAAA TCAAAAT	766
Pin	ACTGACT AAAAAAT AGAAAAAT AATGT CAT AT AT AT AAAAT AAAAAA TCAAAAT	766
Ches	ACTGACT AAAAAAT AGAAAAAT AATGT CAT AT AT AT AAAAT AAAAAA TCAAAAT	766
Hir	ACTGACT AAAAAAT AGAAAAAT AATGT CAT AT AT AT AAAAT AAAAAA TCAAAAT	774
dsm	ACTGACT AAAAAAT AGAAAAAT AATGT CAT AT AT AT AAAAT AAAAAA TCAAAAT	774
en	AATTT AAA T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	808
nr	AATTT AAA T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	805
Pin	AATTT AAA T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	806
Ches	AATTT AAA T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	805
Hir	AATTT AAA T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	809
dsm	AATTT AAA T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	809
en	AT AT AAT AAAAT ACT AATTT ACAATTTTT AAAAT AAT ATGACT AAAAACT	898
nr	AT AT AAT AAAAT ACT AATTT ACAATTTTT AAAAT AAT ATGACT AAAAACT	899
Pin	AT AT AAT AAAAT ACT AATTT ACAATTTTT AAAAT AAT ATGACT AAAAACT	898
Ches	AT AT AAT AAAAT ACT AATTT ACAATTTTT AAAAT AAT ATGACT AAAAACT	898
Hir	AT AT AAT AAAAT ACT AATTT ACAATTTTT AAAAT AAT ATGACT AAAAACT	877
dsm	AT AT AAT AAAAT ACT AATTT ACAATTTTT AAAAT AAT ATGACT AAAAACT	877
en	AAAAAACA T T T T ACOOOG TCAOCT AAT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	998
nr	AAAAAACA T T T T ACOOOG TCAOCT AAT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	999
Pin	AAAAAACA T T T T ACOOOG TCAOCT AAT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	981
Ches	AAAAAACA T T T T ACOOOG TCAOCT AAT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	981
Hir	AAAAAACA T T T T ACOOOG TCAOCT AAT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	995
dsm	AAAAAACA T T T T ACOOOG TCAOCT AAT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	985
en	CAT A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1098
nr	CAT A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1099
Pin	CAT A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1098
Ches	CAT A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1098
Hir	CAT A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1098
dsm	CAT A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	985
en	AT TAAAAGT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1141
nr	AT TAAAAGT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1140
Pin	AT TAAAAGT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1142
Ches	AT TAAAAGT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1141
Hir	AT TAAAAGT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1149
dsm	AT TAAAAGT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1149

השוואת רצף הפרומוטור של הגן *Cwpl* בשני מיני תרבות (*S. lycopersicon*) - *esc* ; (*S. cerasiforme* - *cerche*) שני מיני-בר "אדומים" - *pim* ; *S. cheesmanii* - ושני מיני-בר "ירוקים" (*S. pimpinellifolium* - *S. - hir*) ושני מיני-בר "ירוקים" (*S. - chm* ; *habrochaetes* (*chmielewski*)).

ההשוואה היא עד כ- 1200 בסיסים ב"המעלה הזרם". העיגולים הכחולים מסמנים את ההבדלים בין מיני הבר ה-"ירוקים" ובין מיני הבר ה-"אדומים". העיגולים האדומים מסמנים הבדלים בין מיני הבר ה-"אדומים" ובין מיני התרבות. סוף הרצף (למטה) הוא תחילתו של ה- ORF (הגן).

6. דיון ומסקנות

6.1 אפיון תכונת ההתייבשות של פרי העגבנייה

פירותיהם של זני העגבנייה התרבותית מאופיינים בקליפה ייחודית, שהנה בלתי-חדירה למעבר של מולקולות מים דרכה. הדבר נובע בעיקר מהמבנה הכימי של מרכיבי הקוטיקולה, הקוטין והשעווה, ומהעובדה שהקוטיקולה אינה מכילה בתוכה פיוניות, תעלות או חרירים מכל סוג שהוא (Baker et al., 1982; Bargel and Neinhuis, 2004; Vogg et al., 2004). בעבודה הנוכחית חקרנו את התכונה הגנטית של יכולת הפרי לאדות מים דרך קליפת הפרי. החדירות הגבוהה של הקוטיקולה נובעת בעקבות היווצרותם של מ"ס. היווצרות הסדקים, המבוקרת מבחינה גנטית, מביאה לאפשרות לאבד מים מהפרי השלם בצורה טבעית, וללא צורך במניפולציות כימיות או פיזיקאליות.

קצב הייבוש של הפרי של קווי העגבנייה המתייבשים הנו לוגריתמי, כך שהפרי יכול לאבד כמחצית ממשקלו בכל מספר ימים, בתלות בטמפרטורה החיצונית, בלחות היחסית ובגודל ההתחלתי של הפרי. לדוגמא, בקווים בעלי מ"ס שפירותיהם מסוג "צ'רי" (30 גרם), בטמפרטורת החדר הפרי מאבד מחצית ממשקלו בכל 8 ימים, ולאחר תקופה של כמה שבועות הוא מגיע עד ל- 10-15% ממשקלו הראשוני. זאת לעומת קוים חסרי מ"ס, שבהם הפרי בדרך-כלל אינו מאבד יותר מ- 10% ממשקלו. במקרה של פירות גדולים יותר, כגון הפרי של קו התעשייה M82 (כ-100 גרם), והקו המשמש להתמרה - MP1 (כ-80 גרם), קצב איבוד המשקל הנו איטי יותר, ולמעשה הפירות אינם מאבדים בדרך כלל מעל ל- 50% ממשקלם ההתחלתי גם לאחר תקופת ייבוש ארוכה יחסית. הדבר נובע, ככל הנראה, מהסיבה שמאגרי המים שבתוך הפרי הגדול מספיקים על מנת להביא את איבוד המים למצב של שיווי-משקל, אשר בו (כל עוד לא היה שינוי בתנאי הסביבה) כוח הדיפוזיה של אדי המים שווה לכוח התאחיזה שלהם בפרי. אופן איבוד משקל לוגריתמי זה, הנו מאוד אופייני לאיבוד של מים בפירות, והוא דווח כבר בעבר בבדיקות של קצב הייבוש בענבים (Martin and Stott, 1957). ואכן, צורת הייבוש של הפרי והטעם המרוכז והאופייני של התוצר הסופי הביאו לידי כך שכינינו קווים אלו בשם "צימוקי עגבניות" (raisin tomatoes).

6.2 הייבוש של "עגבניות הצימוק" נובע עקב הופעת מ"ס בקליפת הפרי

איבוד המים מתרחש, כאמור, עקב הופעתם של מ"ס בקליפת הפרי. תופעה זו של היווצרות המ"ס הנה שכיחה למדי בגידול של עגבניות חממה. אולם, כמות הסדקים בפירות היא בדרך כלל לא גדולה מספיק על מנת לגרום לפנוטיפ האופייני של "עגבניית הצימוק", וחומרתה של התופעה היא בעיקר בפגיעה באסתטיות של הפרי. בנוסף, הסיבות לתופעה בקווי העגבנייה התרבותית אינן חד משמעיות, ונראה כי היא מושפעת ממספר רב של גורמים פנימיים וחיצוניים (Dorais, 2004). בעבודה זו הצלחנו לייצב את התופעה, זאת על ידי שימוש בהכלאה עם מין הבר של העגבנייה (*S. habrochaites*). קווי העגבנייה שנוצרו מאופיינים בצפיפות גבוהה מאוד של מ"ס, אשר הופעתם יציבה בתנאי סביבה שונים, בעונות גידול שונות וברקעים גנטיים שונים.

אנליזות SEM הראו כי המ"ס בפירותיהם של קווי העגבנייה המתייבשים מתחילים להתפתח בשלבים שלפני הבשלת הפרי, בדרך כלל בשלב שבין ירוק צעיר לירוק בוגר. כמותם וצפיפותם של המ"ס עולה עם התקדמות התפתחותו והבשלתו של הפרי, כך שבפרי הבשל מספרם מגיע לשיא. הקשר הפנוטיפי הברור שנצפה בין כמות הסדקים ובין קצב איבוד המים מהפרי, והעובדה שהסדקים מתחילים להיווצר לפני התחלת התייבשות הפרי, מצביעה בבירור על העובדה כי מדובר כאן במקרה של סיבה ותוצאה. לכן, אנו התייחסנו לאורך כל העבודה לשתי התכונות הנ"ל כנשלטות על ידי גורם אחד. תופעה מעניינת, הראויה לציון, היא כי לעונת הגידול ישנה השפעה מסוימת על חומרת התופעה, כאשר בעונת הקיץ הסדקים מתחילים להופיע בשלבים היותר מאוחרים של התפתחות הפרי, בסוף שלב הירוק בשל ולעיתים אף בשלב "שבירת הצבע" (breaker). ההבדל בחומרת התופעה בין עונות הגידול נובע כנראה מהשפעתה של הטמפרטורה על התפתחות הסדקים בדרך ישירה או עקיפה (דרך פגיעה בהתפתחותו התקינה של הפרי כולו).

מניתוח של תמונות ה-SEM ניתן לראות שתי תופעות מעניינות. האחת היא שהסדק מתחיל להיווצר במרווח שבין תאי האפידרמיס (על גבי ה"גבעה" של מרבצי קוטיקולה) ובדרך כלל לא בחלק הקעור שמעל תאי האפידרמיס. תופעה זו נצפתה בעבר ע"י Emmons and Scott (1998), אשר בחנו קווי עגבנייה מסחריים עמידים ורגישים להופעת המ"ס. תוך כדי תהליך התפתחות הקוטיקולה מתמלא איזור התפר שבין תאי האפידרמיס בשכבת קוטיקולה אופיינית. בניגוד לקוטיקולה שמעל התאים (שהיא מסודרת בצורה למינארית), הקוטיקולה באזור זה היא בעלת סידור אמורפי. Emmons and Scott (1998) משערים, כי חוסר הסדר מראה על העדר של מרכיבי קוטיקולה מסוימים, ולכן היא

עלולה להיקרע ביתר קלות עם הפעלת לחץ הטורגור. באנליזת GC-MS שנערכו בעבודה זו, לא נמצאה הוכחה לכך שקיים שוני במרכיבי הקוטיקולה העשוי להסביר את תופעת המ"ס בקליפה. לכן הנחתנו היא, כי השוני במרכיבי הקוטיקולה אינו משפיע על תופעת המ"ס.

התופעה השנייה הנה ההבדל בין הקווים בעלי מ"ס והקווים נטולי מ"ס, ביחס לעובי שכבות הקוטין שמעל התאים. בתמונות ה-SEM (איורים 11 ו-12) ניתן לראות כי בקווים בעלי מ"ס נעלמה "חתימת הטוואי" של תאי האפידרמיס שמתחת לקוטיקולה, דבר המצביע על שכבת קוטיקולה עבה מהרגיל. התוצאות לגבי משקלי הקוטיקולה הנקיה בגנוטיפים השונים של הגן *CwpI* תומכות גם הן בחשיבות של עובי שכבת הקוטיקולה. עבודות קודמות אשר חקרו את הקשר שבין תופעת מ"ס בקליפת פרי העגבנייה ובין העובי של שכבת הקוטיקולה הראו תוצאות מנוגדות. בעוד שבמספר מחקרים הקורלציה שבין עובי הקוטיקולה ותופעת מ"ס הייתה שלילית ומובהקת (Gill and Nandpuri, 1970; Emmons and Scott, 1998), הרי שמחקרים אחרים הראו כי שכבת קוטיקולה עבה יותר מפחיתה את רמת האלסטיות של התאים ומובילה לעלייה בכמות הסדקים (Voisey et al., 1970; Den Outer and van Veenendaal, 1987; Guichard et al., 2001). אכן, מכיוון שבפרי העגבנייה אין שלב של התעבות משנית של דופן התא, שכבת האפידרמיס צריכה להיות חזקה מספיק על מנת להתנגד להופעתם של פיצוצים בפרי, אך גם חייבת להיות אלסטית מספיק על-מנת לאפשר את התרחבות הפרי.

הבדיקות השונות לבחינת השפעת הגן *CwpI* באוכלוסיות מתפצלות הראתה בבירור כי הוא אינו קשור בגדילה מואצת של הפרי בשלבי הגידול הסופיים. מחקרים קודמים אשר בדקו את השפעת קצב גדילת הפרי בשלבי הגידול הראשוניים הראו כי גם לו אין השפעה על הווצרות מ"ס (Bakker, 1988; Ehret et al., 1993). לכן אנו מסיקים כי הגן *CwpI* אינו משפיע על גדילת פרי מואצת. בנוסף הגן *CwpI* אינו משפיע על הביומסה הכללית ועל תוספת סוכרים, והשפעתו על ריכוזי המרכיבים האלה נובעת מהשפעתו על אידוי המים בלבד.

6.3 בידוד הגן *Cwp* והשפעת הגנוטיפ שלו באוכלוסיות מתפצלות

תופעת התייבשות הפרי עקב הופעת מ"ס בקליפה מבוקרת על ידי גן עיקרי יחיד, אשר בודד על ידינו תוך שימוש בגישה של forward genetics (הגעה מהפנוטיפ אל הרצף), ושימוש באנליזה של positional cloning. גן זה כונה בשם – *Cwp* (cuticular water permeability), ולמיטב ידיעתנו, זהו הגן הראשון שבודד אי-פעם בצמחים בכלל, ובעגבנייה בפרט, אשר מתבטא בצורה ספציפית רק באפידרמיס של הפרי, ומשפיע על אופן יצירתה של הקליפה. האלל של הגן שגורם להופעת התכונה הנו דומיננטי מוחלט, או לחילופין חסר-דומיננטיות, דבר התלוי ברקע הגנטי שאליה הוחדרה התכונה. מקורו של האלל הדומיננטי הוא במין הבר (*S. habrochaites*), והוא הגורם להופעתה של תכונת המ"ס ברקע של מין התרבות (E). יחסי האללים של הגן *Cwp1* עשויים להשתנות גם בתנאים נוספים. לדוגמא, ביטוי של האלל הוא דומיננטי לגמרי בטמפרטורת נמוכות. לעומת זאת, תנאים של טמפרטורה גבוהה גורמת לעיתים לאלל להיות חסר-דומיננטיות, וכך פרטים הטרוזיגוטים (Cwp^{HE}) מראים פנוטיפ של מ"ס שהוא בין ההומוזיגוט הדומיננטי (Cwp^{HH}) והרצסיבי (Cwp^{EE}).

חיזוק לאפקט המנה (dosage effect) שעשוי לאפיין את אופן התבטאות הגן, בא לידי ביטוי בניסוי הטרנספורמציה עם הגן *Cwp1*. צמחים טראנסגנים מדור T1 (של הזן MP1), המכילים שני עותקים של הגן המותמר, נבדלו באופן מובהק מצמחים בעלי עותק אחד בלבד, הן בכמות הסדקים שעל גבי הפרי, והן במידת קצב ההתייבשות של הפרי. כמות הסדקים וקצב הייבוש של צמחים ללא העתק של הגן היו, כצפוי, הנמוכים ביותר. תוצאה זו מראה בבירור את הקשר שבין מספר האללים, רמת הביטוי והופעת הפנוטיפ בקו העגבנייה ובתנאי הסביבה הספציפיים של ניסויי ההתמרה.

כאמור, גם לרקע הגנטי של הפרי ישנה השפעה על יחסי האללים. פרי גדול, למשל, גורם לעיתים ליחסי אללים קו-דומיננטיים (ראה ביטוי הגן – איור 26). מעבר לכך, תופעת המ"ס מופיעה לעיתים בזני העגבנייה הרגילים (בעלי גנוטיפ Cwp^{EE}). כל אלו מראים כי תכונת המ"ס היא בעלת אופי כמותי, ולמעשה הגן *Cwp1* הנו גן עיקרי המשפיע על תכונה זו, אולם התכונה נתונה להשפעתם של גנים נוספים, כמו גם של תנאי הסביבה. בידודו של הגן *Cwp2*, כפי שתואר בעבודה, והעובדה כי הוא התמפה לאזור שדווח בעבר כמשפיע על הופעת סדקים בקליפה, פותחים צוהר

למחקר חדש אשר עשוי לתת תשובות לגבי הקשר שבין ה-QTLs השונים של תכונת ההתייכשות עקב מ"ס לבין משפחת הגנים של הגן *Cwp1*, ואף לגבי ההשפעה של תנאי הסביבה המבקרים את התופעה.

הגנים *Cwp1* ו-*Cwp2* משוייכים למשפחה אחת. זאת למרות כי רמת הדמיון בין שני הגנים היא של 47% בלבד. ראשית, רמת הומוולוגיה זו היא יחסית גבוהה בהשוואה לרמת ההומוולוגיה לחלבונים אחרים בגנום. שנית, רמה זו מספיק גבוהה על מנת שרצף הגן *Cwp1*, יעבור היברידיזציה באנליזת Southern עם הגן *Cwp2* (איור 33). בכל מקרה, סביר להניח כי שני הגנים התפצלו במהלך האבולוציה, עוד לפני הווצרות הסוג *Solanum* (איור 35).

העובדה כי הגן *Cwp1* מתבטא בעיקר בשלבי ההתפתחות הראשוניים של הפרי, הרבה לפני הופעת התכונה, אינה מפתיעה. ניתוח ביטוי של הגנים המשפיעים על הצורה והגודל של פרי העגבנייה, הראה, למשל, כי הם עשויים להתבטא בשלבים המוקדמים ביותר של התפתחות הפרי, ואפילו בשלבים הראשוניים של התפתחות הפרח (Tanksley, 2004). לדוגמאת הגנים *Fasciated* ו-*Locule-number* המשפיעים על מספר המגורות בפרי, מתבטאים כבר בשחלת הפרח (Lippman and Tanksley, 2001; van der Knaap et al., 2002). מחקרים התפתחותיים של קווים כמעט איזוגנים הראו, כי השינוי בצורת הפרי המביאה ליצירת "פרי מרובע" (הלוקוס fs8.1), מתחילים אף הם בשלב מאוד מוקדם בהתפתחות הפרח/השחלה (Ku et al., 2000). הגן *Fw2.2*, המהווה גן עיקרי המבקר את גודל הפרי בעגבנייה (Frery et al., 2000), מתבטא בעיקר בשלבי הגידול הראשוניים של התחלקות התאים בפרי. דוגמא אחרת היא הגן *Lin5* של האינברטאז האפלופסטי שמתבטא בעיקר בשלבים הראשוניים של התפתחות הפרי, אך הפנוטיפ של התכונה מופיע בזמן הבשלת הפרי בלבד (Fridman et al., 2000; Fridman et al., 2004). דוגמאות אלה, בצירוף העובדה כי שכבת הקוטיקולה מתחילה להתפתח בשלבים מאוד מוקדמים של התפתחות האיבר (Jeffrey, 1996), מסבירים את הפער שבין זמן הביטוי של הגן ומועד הופעת התכונה.

6.4 התוצר החלבוני של הגן *Cwp1* הנו חלק ממערכת החלבונים בממברנות התוך-תאיות

הגן *Cwp1* מקודד לחלבון היפותטי, אשר תפקידו הביולוגי לא היה ידוע עד תחילת עבודה זו. עובדה זו אינה מפתיעה אם מתחשבים בכך שתפקידם הביולוגי של חלק גדול מהגנים בצמחים אינו ידוע. סריקה של מאגרי המידע הממוחשבים מראה כי, בצמח הארבידובסיס למשל, אשר כל הגנום שלו רוצף לא מזמן, סך-כל הגנים שתפקידם

הביולוגי עדיין אינו ידוע מהווה כ- 30% מכלל הגנים (נכון לגבי זמן כתיבת העבודה) (<http://www.arabidopsis.org>). ניסויים שערכנו במעבדתנו, הכוללים ריצוף אקראי של ה-37B8 BAC, הראו כי המצב בעגבנייה הוא דומה. תוצאה זו ממחישה את החשיבות של השימוש בטכנולוגיית השיבוט באמצעות המיקום על גבי המפה הגנטית (positional cloning). יתרונה של השיטה הזו לעומת שיטות הבידוד האחרות, באה גם לידי ביטוי אם מביאים בחשבון כי הגן הנ"ל אינו מתבטא במיני העגבנייה התרבותיים מחד, ומאידך ביטויו אינו גבוה והוא מוגבל בעיקר לשלבי ההתפתחות הראשונים של הפרי.

הגן *Cwp1* מקודד, כאמור, לחלבון היפוטתי (NP_568038.1), אשר מכיל בתוכו domain בעל תפקיד בלתי ידוע (DUF833). הוא חלק ממשפחה של domains, המצויה באאוקריוטים, פרוקריוטים ואפילו וירוסים. כאמור לחלבון זה פעילות ספציפית לא ידועה. אחד מהחלבונים במשפחה זו מתבטא בתחילת תהליך האמבריוגנזה בעכברים (Halford et al., 1993). עובדת היותו של הגן *Cwp1* חלק ממשפחה של גנים אשר מתבטאת באורגניזמים כל כך רחוקים מלמדת כי למשפחה זו ישנה חשיבות מעבר להשפעה על היווצרות הקליפה של פרי העגבנייה, ופעילותה הבסיסית משותפת לכל האורגניזמים.

תחזית לגבי מיקומו התאי של החלבון CWP נעשתה באמצעות תוכנת הניתוח (TargetP Technical University of Denmark; Version 1.01). התחזית הראתה כי החלבון עשוי להיות, ברמת סבירות גבוהה, חלק ממערכת הממברנות התוך-תאיות. היות והשפעתו של החלבון CWP היא כנראה בשינוי הכמות או בתהליך ההפרשה של מרכיבי הקוטיקולה אל מחוץ לתא, יכול בהחלט להיות כי יש לגן הזה ישנה חשיבות בהעברה של מולקולות שומניות בתוך התא או מחוץ לו. ראוי לציין כי על-אף העובדה שבקרב הקהילה המדעית קיימת הסכמה כללית לגבי חשיבותה של הקוטיקולה לגבי תהליכים פיזיולוגיים ואקולוגיים של הצמח, עדיין ידוע מעט מאוד כיצד המרכיבים ההידרופוביים של הקוטיקולה נוצרים ומופרשים החוצה מתאי האפידרמיס. המולקולות המרכיבות את שכבת השעווה, לדוגמא, הן חומצות שומן ארוכות במיוחד (VLEA), אשר בגלל אורכן, הן מאוד הידרופוביות ואינן יוצאות בקלות מהפאזה השומנית בתא (Zhang et al., 1996). לעומת זאת, תא אפידרמיס טיפוסי מכיל סדרה שלמה של חללים הידרופיליים אשר מופרדים בממברנות דו-שכבתיות.

כיצד, אם כן, מועברות חומצות השומן ממקום היווצרותן אל מחוץ לדופן התא?

על מנת לנסות ולענות על שאלה זו, נתאר תחילה את המבנה של תאי האפידרמיס (Kunst and Samuels, 2003). תא אפידרמיס המתמחה בהפרשה של חומצות שומן מתאפיין, בדרך-כלל, בדופן עבה ובחללית גדולה מאוד

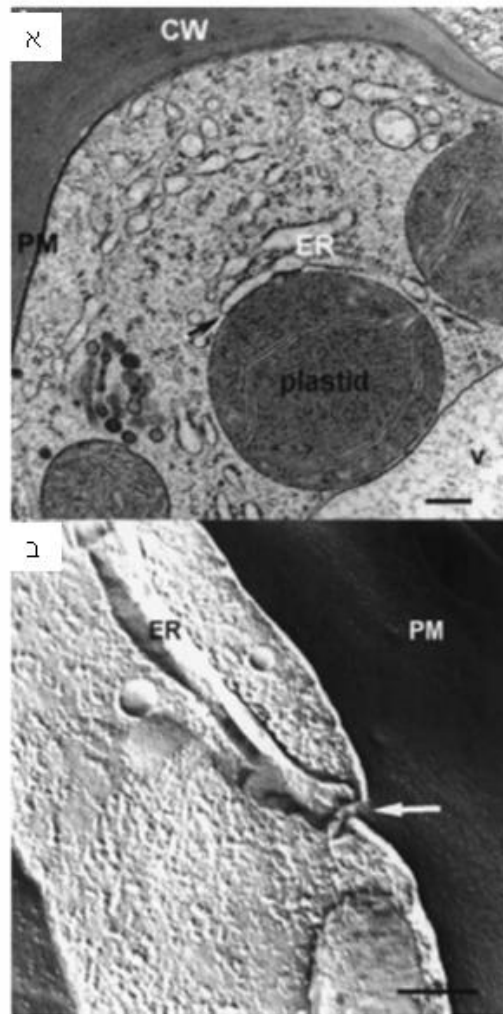
המהווה מעל 95% מנפח התא. הציטופלסמה של תאים אלה הנה שכבה דקה ביותר והיא מכילה גרעין קטן מאוד, פלסטידות, מערכת של ER (endoplasmic reticulum), גופיפי גולג'י וממברנת התא (ראה איור 38א). לכל אחד מהאורגנולות האלה יש תפקיד בביוסינתזה ובשינוע של חומצות השומן.

התהליך הראשוני של הביוסינתזה של החומצה הפלמיטית, הסטיארית והאולאית (שהן אבני הבניין ליצירת השעווה והקוטין) נעשה בכלורופלסטידות באמצעות מערכת ה-ACP (Ohlrogge et al., 1979). משם עוברים חומרים אלה אל ה-ER באמצעות מערכת שאינה ידועה עדיין. ככל הנראה, מעבר זה מתאפשר עקב המבנה הייחודי של תאי האפידרמיס, שבהם ישנה קרבה פיזית גדולה מאוד בין שני האברונים הנ"ל (Douce and Joyard, 1979) (איור 38א). במערכת ה-ER מתרחשים כל תהליכי ההתארכות של מולקולות השעווה ותהליכי ההבשלה של מולקולות הקוטין (Kunst and Samuels, 2003). תוצאות הניתוח של מרכיבי הקוטיקולה באמצעות ה-GC-MS, שהוצגו בעבודה זו, הראו כי לא היה הבדל בין הגנוטיפים של הגן *CwpI* במרכיבי הקוטין והשעווה, ועל כן אנו מניחים כי מעורבותו של הגן *CwpI* היא, ככל הנראה, רק לאחר השלבים האלה.

השלב הבא בנדידת המולקולות הוא המעבר מה-ER אל ממברנת התא. נכון לעכשיו, תהליך זה אינו ידוע, ולא ברור עדיין כיצד מולקולות כגון ה-VLFA משונעות מה-ER אל ממברנת התא. קיימות שתי היפותזות עיקריות המנסות להסביר את התהליך (Kunst and Samuels, 2003):

א. מרכיבי הקוטיקולה נעים בצורה ישירה מה-ER אל ממברנת התא. ניסויים מיקרוסקופיים, הכוללים הקפאה מהירה של תאי צמחים, הראו כי ה-ER וממברנת התא נמצאים בקרבה גדולה אחד לשני (Stahelin and Chapman, 1987) (איור 38ב). תנועה זו עשויה להתרחש גם בתוך גופיפי ממברנלים דו-שכבתיים או בתוך כיסים הידרופוביים של חלבונים קושרי ליפידים (lipid transfer proteins) (Chye et al., 1999).

ב. העברה מסודרת דרך המערכת התוך-ממברנלית הכוללת ER - גולג'י - ממברנת התא. ישנם מספר דיווחים המראים כי העברת מולקולות שומניות נעשית באמצעות מערכת של שלפוחיות שמקורן בגופיפי הגולג'י (Moreau et al., 1998).



איור 38: (מתוך Kunst and Samuels, 2003):

צילומים מיקרוסקופיים הממחישים את הקרבה הפיזית שבין האורגנלות בתאי האפידרמיס (גבעול של ארבידופסיס).

א. הקרבה שבין ה-ER והפלסטידה (plastid) (חץ שחור).

ב. הקרבה שבין ה-ER לממברת התא (PM).

עוד באיור: V – חללית. CW – דופן התא.

עם הגעתן של חומצות-השומן אל ממברנת התא הן מועברות אל מחוץ לתא. מעבר זה דורש אנרגיה והוא נעשה על

ידי מערכת של טרנספורטרים המכונים – ABC transporters. זוהי מערכת שידועה כמפרישה חומרים הידרופוביים

ביונקים ובשמרים, ואף זוהתה לאחרונה בצמחים (Pighin et al., 2004).

מרכיבי השעווה והקוטין ההידרופוביים חייבים לעבוד דרך דופן התא על מנת להגיע אל שכבת הקוטיקולה. חלבונים מעבירי ליפידים (LTP) (lipid transfer proteins) הוצעו כמתווכים המולקולריים בשלב זה (Sterk et al., 1996; Xia et al., 1991). חלבוני ה-LTP הם חלבונים קטנים יחסית (9 kD), בעלי רצף של 9 חומצות אמינו מסוג ציסטאין, היוצרות כיס הידרופובי בתוך החלבון (Gomar et al., 1998; Tassin-Moindrot et al., 2000). כיס הידרופובי זה מאפשר להם "לאחוז" בחומצות שומן בצורה לא ספציפית ולשנע אותם אל תוך הדופן. חוסר הדמיון שבין רצף החלבון של הגן *Cwp1* לבין ה-LTPs, והעובדה כי חלבוני ה-LTP אינם חלק ממערכת הממברנות התוך ממברנליות, מראים כי הגן *Cwp1* אינו קשור, ככל הנראה, לשלב הזה של התפתחות הקליפה. ללא ספק, דרושים עוד ניסויים נוספים, הכוללים הסתכלות מיקרוסקופית על אופן הביטוי של הגן *Cwp1* (immuno-, in-situ hybridization) על מנת לנסות ולקבוע בצורה ברורה את תפקידו המולקולארי של הגן *Cwp1*, ואת מעורבתו ההיפותטית במערכת המתוארת לעיל.

6.5 האבולוציה של שימור המים בפרי העגבנייה במעבר מהבר לתרבות

התנאי המרכזי להתפתחות ההיסטורית של החקלאות המודרנית היה טמון בשינוי של תכונות אשר אפשרו את הפיכתם של צמחי הבר לגידולים חקלאיים בקנה מידה גדול. רוב המחקר בן-ימינו, העוסק בשאלה של השוני הגנטי-מולקולארי שבין הגידול החקלאי המודרני ומין הבר שממנו הוא בא, נעשה בעיקר בגידולי התבואות. אכן, בשנים האחרונות זוהו מספר גנים, בעיקר בתירס ובחיטה (Doebly et al., 1997; Liljegren et al., 2000; Gallavotti et al., 2004; Yan et al., 2004; Wang et al., 2005), אשר שינוי מולקולרי בהם מסביר את התפתחותן של תכונות מורפולוגיות וחקלאיות במעבר מהבר לתרבות. לעומת זאת, בגידולי הפרי, המהווים בעיקר תוספת תזונתית לגידולי התבואה הבסיסיים, ידוע פחות על השינויים האבולוציוניים המולקולאריים שהיוו את הבסיס ליצירת מיני התרבות.

אחת התופעות הייחודיות לפירות בשרניים, היא התכונה של שמירת תכולת המים שבתוכם. פרי העגבנייה, למשל, מכיל עד כ- 95% מים, הנשמרים לאורך כל הבשלתו של הפרי, ואף לאורך זמן לאחר הקטיף בתנאי אחסון. היכולת לשמור את תכולת המים בפרי, הנובעת מהמבנה הייחודי של הקליפה, היא תכונה חשובה בגידולי העגבנייה העסיסית הנפוצה בימינו. בתנאי הבר, לעומת זאת, לא נראה כי ישנו יתרון מסוים ליכולת לשמור את תכולת המים בפרי לאורך

זמן כה רב. השאלה הנשאלת היא, מהם השינויים הגנטיים-מולקולאריים שעבר צמח העגבנייה, שגרמו להופעתו של פרי העגבנייה התרבותית הייחודי?

צמח העגבנייה (*S. lycopersicum* L.) תורבת על ידי הילידים באמריקה, ככל הנראה במכסיקו. עם הגעתם של האירופאים לאמריקה במאה ה-15, היו פירותיו של צמח העגבנייה כבר בגודל ובמבנה הידועים לנו כיום (Jenkins, 1948; Rick, 1995). מכיוון שתרבות העגבנייה חל בתקופה הפרה-היסטורית, אין אנו יודעים את המסלול האבולוציוני המדויק שעבר גידול זה, מעגבניית הבר בעלת הפירות הקטנים, הירוקים והבלתי-אכילים, אל העגבנייה הידועה לנו כיום. עדויות היסטוריות וגיאוגרפיות שונות מראות כי מקורו של אב-הטיפוס של העגבנייה התרבותית מוגבל לאזור של פרו-אקוודור (Rick and Holle, 1990). מין זה עבר לכיוון צפון עם הילידים כגידול "תרבותי למחצה", בתקופה הקודמת לגילוי אמריקה, ואינו תורבת, עד אשר הגיע למכסיקו (Jenkins, 1948). קשה לקבוע את האזור הראשוני שבו חל התרבות וזאת משום שבניגוד למיני הבר האחרים, השונות הגנטית שבין האוספים העתיקים של תת-המינים של עגבניית התרבות היא נמוכה מאוד (Villard et al., 1998).

בידודו של הגן *Cwp1* והעובדה כי קיימים הבדלים בביטוי בין מיני-הבר ומיני-התרבות, עשויים בהחלט להוות דוגמא לגן שעבר שינוי גנטי על מנת להתאים יותר לגידול בתנאי התרבות. מעבר לכך, ניתוח וסריקה של רמת הביטוי של גן זה באוספים שונים של מיני בר ומיני תרבות וניתוח השוני ברצף ה-DNA שלהם, עשויים לשפוך אור על תהליך התרבות של העגבנייה. חוסר הביטוי של הגן *Cwp1* במין התרבותי העתיק *S. cerasiforme*, כפי שנצפה בעבודה זו, מעיד כי ככל הנראה הסלקציה כנגד הביטוי שלו הייתה בתקופה שלפני הופעתו האבולוציונית של מין זה. לעומתו, מיני הבר האדומים האחרים (כמו גם הירוקים), שנבדקו בעבודה, מבטאים את הגן *Cwp1*. במינים אלה, קיימת שונות יחסית גדולה בין האוספים השונים שלהם בבר (Villard et al., 1998). על כן, בדיקת הביטוי בתוך האוספים של מיני הבר *S. pimpinellifolium* ו-*S. cheesmaniae* (הקרובים ביותר אל מין העגבנייה התרבותית) עשויה להיות חשובה על מנת להתחקות אחר שאלות אלו.

ישנן עוד שתי נקודות נוספות הראויות לציון ביחס לביטוי של הגן *Cwp1* במיני הבר של העגבנייה. הראשונה היא, שלמרות שהגן *Cwp1* מתבטא במיני הבר, הם אינם מראים מ"ס בכמות רבה וגם אינם מתייבשים בקצב מהיר. הסיבה לכך, ככל הנראה, היא כי המבנה האנטומי של קליפת הפרי של מיני הבר או הגודל שלהם. זוהי למעשה דוגמא קלאסית של מה שקרוי בגנטיקה תופעה של אפיסטזיס בין תכונות. הנקודה השנייה היא, שלא נמצאו בעבודה זו ההבדלים ברמת הרצף של ה-DNA שעשויים להסביר בצורה טובה את ההבדלים ברמת הביטוי של הגן *Cwp1* בין מיני העגבנייה

השונים (למעט שני SNPs באזור הפרומטור). על מנת לנסות ולמצוא את האזור המבקר את הגן הזה, צריך לבדוק את רצפי ה-DNA שמעבר לתחום שנבדק בעבודה זו (מעבר ל-1200 bp ב-"מעלה הזרם" של הגן, או לחילופין בצד ה-3' של הגן). מעבר לכך, הבדלי הביטוי בין המינים השונים יכולים להיות מסיבות שלא קשורות בהבדל ברצף הפרומטור של הגן, אלא הם עשויים להיות עקב תופעות אחרות, כמו השתקת גנים על ידי מתילציה של DNA, מיקרו RNAs, רטרו-טראנספוזומים דומיננטים, ותופעות אפי-גנטיות נוספות (Liu and Wendel, 2003). על מנת להוכיח את השפעתם של הבדלים ברצף ה-DNA יש צורך לעשות עבודה נוספת הכוללת ניסויי התמרה של הפרומטורים של מיני העגבנייה השונים ביחד עם גנים מדווחים מתאימים. אנליזות אלה ואחרות עשויות לשפוך אור על התהליכים האבולוציוניים-מולקולאריים שעבר הגן *Cwp1*, ואף לתת רמז למסלול הפרה-היסטורי והגיאוגרפי המדויק שעבר צמח העגבנייה מעשב בר לצמח בעל פרי עסיסי המוכר לנו כיום.

6.6 מטרות עתידיות

להלן מוצעות מטרות עתידיות, אשר מטרתן לנסות ולאפיין את תפקידו הביולוגי והמולקולרי של החלבון CWP, ואת התפתחותה האבולוציונית של משפחת החלבונים CWP בעגבנייה ובמינים אחרים:

1. ביטוי החלבון במערכת in-vitro וגיבושו, על מנת לאפיין את המבנה התלת-מימדי שלו.
2. הפעלת מערכת של 1H/2H על מנת למצוא קשר בין CWP לבין חלבונים נוספים, או בינו לבין רצפי DNA ספציפיים.
3. שימוש ב-Micro-array על מנת לזהות קשר בין הביטוי של הגן *Cwp1* לבין הביטוי של גנים אחרים בגנום.
4. פרוצדורת in-situ או immuno localization של הגן/חלבון על מנת לקבוע בוודאות את מיקומו התאי.
5. יצירת קווים טראנסגנים המבטאים את הגן GFP תחת הפרומוטור של הגן *Cwp1*.
6. המשך ההשוואה של הפרומוטור של הגן *Cwp1* באוספים של מיני בר נוספים, זאת על מנת לזהות את הגורם המדויק להשתקתו של הגן במהלך האבולוציה של העגבנייה.
7. ניתוחי ביטוי הגן *Cwp2* בפרי העגבנייה.
8. בחינת לוקוסים נוספים המשפיעים על יצירת מ"ס בפרי העגבנייה.
9. בדיקת ביטוי הגנים *Cwp1* ו-*Cwp2* במיני צמחים שונים כגון פלפל, ענבים ועוד.

- Aarts MGM, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A** (1995) Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* **7**: 2115-2127
- Abbott JD, Peet MM, Willits DH, Gough RE** (1985) Water management of greenhouse tomatoes. *Hortscience* **20**: 688-690
- Abbott JD, Peet MM, Willits DH, Sanders DC, Gough RE** (1986) Effects of irrigation frequency and scheduling on fruit production and radial fruit cracking in greenhouse tomatoes in soil beds and in a soil-less medium in bags. *Sci. Hort.* **28**: 209-217
- Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, Pereira A** (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2463-2480
- Almeida DPF, Huber DJ** (2001) Transient increase in locular pressure and occlusion of endocarpic apertures in ripening tomato fruit. *J. Plant Physiol.* **158**: 199-203
- Aloni B, Karni L, Moreshet S, Yao C, Stanghellini C** (1999) Cuticular cracking in bell pepper fruit: II. Effects of fruit water relations and fruit expansion. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **74**: 1-5
- Aloni B, Karni L, Rylski I, Cohen Y, Lee Y, Fuchs M, Moreshet S, Yao C** (1998) Cuticular cracking in pepper fruit. I. Effects of night temperature and humidity. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **73**: 743-749
- Andersen PC, Richardson DG** (1982) A rapid method to estimate fruit water status with special reference to rain cracking of sweet cherries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **107**: 441-444
- Baker EA, Bukovac MJ, Hunt GM** (1982) Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. *In* DF Cutler, KLA Cutler, CE Price, eds, *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, UK. pp 33-44
- Baker EA, Holloway PJ** (1970) The constituent acids of angiosperm cutins. *Phytochemistry* **9**: 1557-1562
- Bakker JC** (1988) Russeting (cuticle cracking) in glasshouse tomatoes in relation to fruit-growth. *J. Hort. Sci.* **63**: 459-463
- Barg R, Pilowsky M, Shabtai S, Carni N, Alejandro D, Szechtman BD, Salts Y** (1997) The TYLCV-tolerance tomato line MP-1 is characterized by superior transformation competence. *J. Exp. Bot.* **48**: 1919-1923
- Bargel H, Neinhuis C** (2004) Altered tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit cuticle biomechanics of a pleiotropic non ripening mutant. *J. Plant Growth Regul.* **23**: 61-75
- Barnes J, Cardoso-Vilhena J** (1996) Interaction between electromagnetic radiation and the plant cuticle. *In* G Kerstiens, ed, *Plant Cuticle: An Integrated Function Approach*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK, pp 157-174
- Belmans K, Keulemans J** (1996) A study of some fruit skin characteristics in relation to susceptibility of cherry fruit to cracking. *Acta. Hort.* **410**: 547-550

- Bertin N, Guichard S, Leonardi C, Longuenesse JJ, Langlois D, Navez B** (2000) Seasonal evolution of the quality of fresh glasshouse tomatoes under Mediterranean conditions, as affected by air vapour pressure deficit and plant fruit load. *Ann. Bot.* **85**: 741-750
- Blee E, Schuber F** (1993) Biosynthesis of cutin monomers - involvement of a lipoxygenase peroxygenase pathway. *Plant J.* **4**: 113-123
- Borden KLB** (1998) RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem. Cell Biol.* **76**: 351-358
- Borys MW, Bustamante-Oranegui F** (1990) Syndrome of pear russetting and splitting. *Acta. Hort.* **274**: 79-91
- Chen XB, Goodwin SM, Boroff VL, Liu XL, Jenks MA** (2003) Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* **15**: 1170-1185
- Chetelat RT, Meglic V** (2000) Molecular mapping of chromosome segments introgressed from *Solanum lycopersicoides* into cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theor. Appl. Genet.* **100**: 232-241
- Chretien S, Gosselin A, Dorais M** (2000) High electrical conductivity and radiation-based water management improve fruit quality of greenhouse tomatoes grown in rockwool. *HortScience* **35**: 627-631
- Chye ML, Huang BQ, Zee SY** (1999) Isolation of a gene encoding Arabidopsis membrane-associated acyl-CoA binding protein and immunolocalization of its gene product. *Plant J.* **18**: 205-214
- Considine J** (1982) Physical aspects of fruit growth: cuticular fracture and fracture patterns in relation to fruit structure in *Vitis vinifera*. *J. Hort. Sci.* **57**: 79-91
- Considine J, Brown K** (1981) Physical aspects of fruit growth. *Plant Physiol.* **68**: 371-376
- Conter SD, Burns EE, Leeper PW** (1969) Pericarp anatomy of crack-resistant and susceptible tomato fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **94**: 136-137
- Corey KA, Tan ZY** (1990) Induction of changes in internal gas-pressure of bulky plant organs by temperature-gradients. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **115**: 308-312
- Davies JN** (1966) Occurrence of sucros in the fruit of some species of *Lycopersicon*. *Nature* **209**: 640-641
- Davies JN, Hobson GE** (1981) The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **15**: 205-280
- Demers DA, Dorais M, Papadopoulos AP** (2001) Yield and cuticle cracking of greenhouse tomato (*lycopersicon esculentum* Mill.) as influenced by leaf to fruit ratio and relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **42**: 23-28
- Demers DA, Hoa M, Dorais M, Papadopoulos AP** (2000) Effects of EC and macro-nutrient/NaCl levels of the nutrient solution on cuticle cracking of greenhouse tomato fruits. *In* Greenhouse Vegetable Research Team Ann. Rep. Greenhouse and Processing Crop Research Center, Harrow, ON, Canada. pp 28-31
- Den Outer RW, van Veenendaal WHL** (1987) Anatomical investigation of tomatoes with swelling cracks. *Groeten Fruit* **42**: 40-42
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM** (2000) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491-496
- Doebley J, Stec A, Hubbard L** (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485-488

- Dorais M** (2004) Greenhouse tomato fruit cuticle cracking. *Hort. Rev.* **30**: 163-185
- Douce R, Joyard J** (1979) Structure and function of the plastid envelope. *Adv. Bot. Res.* **7**: 1-116
- Doyle JJ, Doyle JL, Brown AHD** (1990) Chloroplast DNA phylogenetic affinities of newly described species in glycine (Leguminosae, Phaseoleae). *Syst. Bot.* **15**: 466-471
- Durrett RT, Chen KY, Tanksley SD** (2002) A simple formula useful for positional cloning. *Genetics* **160**: 353-355
- Ehret DL, Helmer T, Hall JW** (1993) Cuticle cracking in tomato fruit. *J. Hort. Sci.* **68**: 195-201
- Eigenbrode SD** (1996) Plant surface waxes and insect behaviour. In G Kerstiens, ed, *Plant Cuticle: An Integrated Function Approach*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. pp 201-222
- Emmons CLW, Scott JW** (1997) Environmental and physiological effects on cuticle cracking in tomato. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **122**: 797-801
- Emmons CLW, Scott JW** (1998) Diallel analysis of resistance to cuticle cracking in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **123**: 67-72
- Emmons CLW, Scott JW** (1998) Ultrastructural and anatomical factors associated with resistance to cuticle cracking in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. *Int. J. Plant Sci.* **159**: 14-22
- Esau K** (1965) *Plant anatomy*. John Wiley and sons, Inc., New York.
- Eshed Y, Zamir D** (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **141**: 1147-1162
- Faust M, Shear CB** (1972) Cuticle cracking of apples, an interpretive review. *HortScience* **7**: 233-235
- Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL, Chau S, Fischer RL, Preuss D** (2000) Alterations in CER6, a gene identical to CUT1, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* **12**: 2001-2008
- Frary A, Fulton TM, Zamir D, Tanksley SD** (2004) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 485-496
- Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Liu JP, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD** (2000) fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85-88
- Frazier WA, Bowers JL** (1947) A final report on studies of tomato fruit craking in Maryland. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **49**
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D** (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**: 1786-1789
- Fridman E, Pleban T, Zamir D** (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4718-4723

- Fulton TM, Grandillo S, Beck-Bunn T, Fridman E, Frampton A, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley SD** (2000) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 1025-1042
- Gallavotti A, Zhao Q, Kyojuka J, Meeley RB, Ritter M, Doebley JF, Pe ME, Schmidt RJ** (2004) The role of *barren stalk1* in the architecture of maize. *Nature* **432**: 630-635
- Ghosh SB, Nagi LHS, Ganapathi TR, Khurana SMP, Bapat VA** (2002) Cloning and sequencing of potato virus Y coat protein gene from an Indian isolate and development of transgenic tobacco for PVY resistance. *Curr. Sci.* **82**: 855-859
- Gill PS, Nandpuri KS** (1970) Comparative resistance to fruit cracking in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ind. J. Agri. Sci.* **40**: 89-98
- Glenn GM, Poovaiah BW** (1989) Cuticular properties and postharvest calcium applications influence cracking in sweet cherries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **14**: 1787-1788
- Gomar J, Sodano P, Sy D, Shin DH, Lee JY, Suh SW, Marion D, Vovelle F, Ptak M** (1998) Comparison of solution and crystal structures of maize nonspecific lipid transfer protein: A model for a potential in vivo lipid carrier protein. *Proteins-Structure Function And Bioinformatics* **31**: 160-171
- Grumet R, Fobes JF, Herner RC** (1981) Ripening behavior of wild tomato species. *Plant Physiol.* **68**: 1428-1432
- Guichard S, Bertin N, Leonardi C, Gary C** (2001) Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie* **21**: 385-392
- Halford S, Wilson DI, Daw SC, Roberts C, Wadey R, Kamath S, Wickremasinghe A, Burn J, Goodship J, Mattei MG** (1993) Isolation of a gene expressed during early embryogenesis from the region of 22q11 commonly deleted in DiGeorge syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1577-1582
- Hankinson B, Rao VNM** (1979) Histological and physical behavior of tomato skins susceptible to cracking. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **104**: 577-581
- Hayman G** (1987) The hair-like cracking of last season. *Grower* **107**: 3-5
- Ho L, Hewitt J** (1986) Fruit development. *In* Atherton JG, R J, eds, *The Tomato Crop*. Chapman and Hall, London, UK 14-47
- Ho LC, Grange RI, Picken AJ** (1987) An analysis of the accumulation of water and dry-matter in tomato fruit. *Plant Cell Environ.* **10**: 157-162
- Hooker TS, Millar AA, Kunst L** (2002) Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**: 1568-1580
- Iwanami H, Yamada M, Sato A** (2002) A great increase of soluble solids concentration by shallow concentric skin cracks in Japanese persimmon. *Sci. Hort.* **94**: 251-256
- James DW, Lim E, Keller J, Plooy I, Ralston E, Dooner HK** (1995) Directed tagging of the Arabidopsis *fatty-acid elongation-1 (Fae1)* gene with the maize transposon activator. *Plant Cell* **7**: 309-319
- Jarvis LR, Wardrop AB** (1974) The development of the cuticle in *Phormium tendax*. *Planta* **119**: 101-112
- Jeffree CE** (1996) Structure and ontogeny of plant cuticle. *In* G Kerstiens, ed, *Plant Cuticle: An Integrated Function Approach*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. pp 33-75

- Jenkins JA** (1948) The origin of the cultivated tomato. *Econ. Bot.* **2**: 379-392
- Jenks MA, Rashotte AM, Tuttle HA, Feldmann KA** (1996) Mutants in *Arabidopsis thaliana* altered in epicuticular wax and leaf morphology. *Plant Physiol.* **110**: 377-385
- Johnson RW, Dixon MA, Lee DR** (1992) Water relations of the tomato during fruit-growth. *Plant Cell Environ.* **15**: 947-953
- Kamimura M, Yoshikawa H, Ito K** (1972) Studies on fruit cracking in tomato. *Bul. Hort. Res. Stat. Ministry Agr. For. Ser. C (Morioka)* **7**
- Khosla S, Papadopoulos AP, Breault C, Demers DA, Dorais M** (2000) The influence of multi-stemming and liquid CO₂ supplementation on greenhouse fruit quality, including fruit cracking. *In Greenhouse Vegetable Research Team Annu. Rep. Agriculture and Agri-Food Canada, Greenhouse and Processing Crops Research Centre, Harrow, ON, Canada.* pp 98-102
- Knoche M, Peschel S, Hinz M, Bukovac MJ** (2000) Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: characterizing conductance of the cuticular membrane using pericarp segments. *Planta* **212**: 127-135
- Kolattukudy PE** (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* **208**: 990-999
- Kolattukudy PE** (1981) Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 539-567
- Kolattukudy PE** (2001) Polyesters in higher plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**: 1-49
- Komor E, Thom M, Maretzki A** (1981) The mechanism of sugar uptake by sugarcane suspension cells. *Planta* **153**: 181-192
- Koornneef M, Hanhart CJ, Thiel F** (1989) A genetic and phenotypic description of *eceriferum* (*Cer*) mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.* **80**: 118-122
- Koske TJ, Pallas JE, Jones JB** (1980) Influence of ground bed heating and cultivar on tomato fruit cracking. *HortScience* **15**: 760-762
- Ku HM, Grandillo S, Tanksley SD** (2000) fs8.1, a major QTL, sets the pattern of tomato carpel shape well before anthesis. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 873-878
- Kunst L, Samuels AL** (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* **42**: 51-80
- Leonardi C, Guichard S, Bertin N** (2000) High vapour pressure deficit influences growth, transpiration and quality of tomato fruits. *Sci. Hort.* **84**: 285-296
- Lequeu J, Fauconnier ML, Chammai A, Bronner R, Blee E** (2003) Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. *Plant J.* **36**: 155-164
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed HY, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF** (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**: 766-770
- Lippman Z, Tanksley SD** (2001) Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *Lyesculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics* **158**: 413-422

- Liu B, Wendel JF** (2003) Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**: 365-379
- Lownds NK, Banaras M, Bosland PW** (1993) Relationships between postharvest water-loss and physical-properties of pepper fruit (*Capsicum Annuum* L). *HortScience* **28**: 1182-1184
- Maguire KM, Lang A, Banks NH, Hall A, Hopcroft D, Bennett R** (1999) Relationship between water vapour permeance of apples and micro-cracking of the cuticle. *Postharvest Biol. Technol.* **17**: 89-96
- Martin RJL, Stott GL** (1957) The physical factors involved in the drying of sultana grapes. *Aust. J. Agr. Res.* **8**: 444-459
- Matthew AJ, Ashworth EN** (1999) Plant epicuticular waxes: function, production and genetics. *Hort. Rev.* **32**: 1-68
- McCormick S** (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. In *Plant Tissue Culture Manual*, Vol B6. Kluwer Academic Publishers, pp 1-9
- McNevin JP, Woodward W, Hannoufa A, Feldmann KA, Lemieux B** (1993) Isolation and characterization of *eceriferum* (*Cer*) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome* **36**: 610-618
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A** (1997) A new model system for tomato genetics. *Plant J.* **12**: 1465-1472
- Mendgen K** (1996) Fungal attachment and penetration. In K G, ed, *Plant Cuticle: An Integrated Function Approach*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. pp 175-188
- Millar AA, Clemens S, Zachgo S, Giblin EM, Taylor DC, Kunst L** (1999) CUT1, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* **11**: 825-838
- Miron D, Schaffer AA** (1991) Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb and Bonpl. *Plant Physiol.* **95**: 623-627
- Monforte AJ, Friedman E, Zamir D, Tanksley SD** (2001) Comparison of a set of allelic QTL-NILs for chromosome 4 of tomato: Deductions about natural variation and implications for germplasm utilization. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 572-590
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C** (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Prog. Lipid. Res.* **37**: 371-391
- Moreshet S** (1970) Effect of environmental factors on cuticular transpiration resistance. *Plant Physiol.* **46**: 815-818
- Moreshet S, Yao C, Aloni B, Karni L, Fuchs M, Stanghellini C** (1999) Environmental factors affecting the cracking of greenhouse-grown bell pepper fruit. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **74**: 6-12
- Nawrath C** (2002) The biopolymers cutin and suberin. In C R Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp doi/10.1199/tab.0021
- Negruk V, Yang P, Subramanian M, McNevin JP, Lemieux B** (1996) Molecular cloning and characterization of the *CER2* gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **9**: 137-145
- Ohlrogge JB, Kuhn DN, Stumpf PK** (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1194-1198

- Pearce BD, Grange RI, Hardwick K** (1993) The growth of young tomato fruit.1. Effects of temperature and irradiance on fruit grown in controlled environments. *J. Hort. Sci.* **68**: 1-11
- Peet MM** (1992) Fruit cracking in tomato. *HortTechnol.* **2**: 216-223
- Peet MM, Willits DH** (1995) Role of excess water in tomato fruit cracking. *HortScience* **30**: 65-68
- Pighin JA, Zheng HQ, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL** (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702-704
- Pruitt RE, Vielle-Calzada JP, Ploense SE, Grossniklaus U, Lolle SJ** (2000) *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 1311-1316
- Rashotte AM, Jenks MA, Ross AS, Feldmann KA** (2004) Novel *eceriferum* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **219**: 5-13
- Reina JJ, Heredia A** (2001) Plant cutin biosynthesis: the involvement of a new acyltransferase. *Trends Plant Sci.* **6**: 296-305
- Rick CM** (1995) Tomato *Lycopersicon esculentum* (*Solanaceae*). In J Smart, S N.W., eds, *Evolution of Crop Plants*. Longman Scientific & Technical, London. pp 452-457
- Rick CM, Holle M** (1990) Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: Genetic variation and its evolutionary significance. *Econ. Bot.* **44**: 69-78
- Riederer M, J; S** (1988) Development of plant cuticle fine structure and cutin composition of *Clivia miniata* Reg. leaves. *Planta* **174**: 127-138
- Riederer M, Schreiber L** (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* **52**: 2023-2032
- Riley GR, Kolattukudy PE** (1975) Evidence for covalently attached p-coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiol.* **56**: 44-51
- Sall J, Lehman A** (1996) *JMP Start Statistics*. Wadsworth Publishing Company, Belmont
- Schnurr J, Shockey J, Browse J** (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 629-642
- Schönherr J** (1976a) Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in cutin matrix. *Planta* **128**: 113-126
- Schönherr J** (1976b) Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* **131**: 159-164
- Schönherr J, Schmidt HW** (1979) Water permeability of plant cuticle. *Planta* **144**: 391-400
- Shishiyama J, Araki F, Shigeyasu A** (1970) Studies on cutin-esterase I. Preparations of cutin and its fatty acid component from tomato fruit peel. *Plant Cell Physiol.* **11**: 323-334
- Sieber P, Schorderet M, Ryser U, Buchala A, Kolattukudy P, Metraux JP, Nawrath C** (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell* **12**: 721-737

- Spooner DM, Peralta IE, Knapp S** (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. *Taxon* **54**: 43-61
- Stachelin LA, Chapman RL** (1987) Secretion and membrane recycling in plant cells: Novel intermediary structures visualized in ultra rapidly frozen sycamore and carrot suspension-culture cells. *Planta* **171**: 43-57
- Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Van Kammen A, De Vries SC** (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**: 907-921
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, Machida Y** (2001) A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* **128**: 4681-4689
- Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y** (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**: 139-146
- Tanksley SD** (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* **16**: 181-189
- Tanksley SD, Ganai MW, Martin GB** (1995) Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* **11**: 63-68
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, et al.** (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**: 1141-1160
- Tassin-Moindrot S, Caille A, Douliez JP, Marion D, Vovelle F** (2000) The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein - Solution structure of a complex with prostaglandin B-2. *Eur. J. Biochem* **267**: 1117-1124
- Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski JG** (1999) KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **17**: 119-130
- Tukey LD** (1959) Observations on the russetting of apples grown in plastic bags. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **74**: 30-39
- van der Knaap E, Lippman ZB, Tanksley SD** (2002) Extremely elongated tomato fruit controlled by four quantitative trait loci with epistatic interactions. *Theor. Appl. Genet.* **104**: 241-247
- Villand J, Skroch PW, Lai T, Hanson P, Kuo CG, Nienhuis J** (1998) Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Sci.* **38**: 1339-1347
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA, Riederer M** (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. *J. Exp. Bot.* **55**: 1401-1410
- Voisey PW, Lyhall LH, Kloek M**, (1970) Tomato skin strength – its measurement and relation to cracking. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **95**: 485-488
- Wang H, Nussbaum-Wagler T, Li BL, Zhao Q, Vigouroux Y, Faller M, Bomblies K, Lukens L, Doebley JF** (2005) The origin of the naked grains of maize. *Nature* **436**: 714-719

- Wellesen K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A** (2001) Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid omega -hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9694-9699
- Wilson LA, Sterling C** (1975) Studies on the cuticle of tomato fruit I. Fine structure of the cuticle. *Z. Pflanzenphysiol* **77**: 359-371
- Xia YJ, Nicolau BJ, Schnable PS** (1996) Cloning and characterization of *CER2*, an Arabidopsis gene that affects cuticular wax accumulation. *Plant Cell* **8**: 1291-1304
- Yan LL, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J** (2004) The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* **303**: 1640-1644
- Yao CR, Moreshet S, Aloni B, Karni L** (2000) Effects of climatic factors and water stress on the diurnal fluctuation in diameter of bell pepper fruit. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **75**: 6-11
- Yasuzumy G, Sugihara G** (1964) The fine structure of nuclei fixed by a double fixation procedure. *Exp. Cell Res.* **33**: 578-580
- Yephremov A, Wisman E, Huijser P, Huijser C, Wellesen K, Saedler H** (1999) Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of Arabidopsis reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell* **11**: 2187-2201
- Young PA**, (1947) Cuticle cracks in tomato fruits. *Phytopathology* **37**: 143-145
- Zhang FL, Kamp F, Hamilton JA** (1996) Dissociation of long and very long chain fatty acids from phospholipid bilayers. *Biochemistry* **35**: 16055-16060

Abstract

One of the most intriguing phenomena unique to fleshy fruit is their ability to maintain a high water content. This task of retaining up to ninety five percent water even after harvest from the mother plant, as in tomato fruit (*Solanum lycopersicon*), is accomplished by a fruit cuticle highly impermeable to water diffusion, and the presence of this barrier to water loss is one of the factors that contributed to the widespread cultivation of the juicy tomato. While the molecular evolution allowing domestication of the staple grains has been studied, little is known about the molecular evolution of fleshy fruits which are generally supplementary to the staple diet.

In this work we report on the characterization and molecular genetic analysis of a trait of mature tomato fruit dehydration. This phenotype was developed in the lab based on an introgression from the wild species *Solanum habrochaites*. Initial experiments showed that fruit weight lost is only due to water dehydration and SEM analyses showed that the loss of water occurs due to the presence of micro-fissures on the fruit cuticle of the dehydrating lines.

Analysis of segregating F₂ population showed that a major gene is responsible for the trait, which we term *CWP* (cuticular water permeability). The allelic relation between *CWP* genotype are dominant or partially dominant depends on the genetic background and also environmental conditions. The *Cwp* gene was localized to the telomeric portion of chromosome 4 nearly to the ER4.1 QTL (Quantitative Trait Locus) that had been previously described as affecting epidermis reticulation and the outer cuticular layer "cantalup-like" netting phenotypes.

We used the map based cloning approach to clone *CWP* gene. Based on first round of population screening of 300 individuals we had limited the position of *CWP* gene to a 0.5 cM chromosomal segment. In addition we identified a 5 BAC contig which included the *CWP* gene. The second round of population screening included over 7000 gametes that were tested for recombination analysis. *CWP* gene was finally delimited the to a 15 kb portion of BAC 37B8. Sequencing and annotation of this segment revealed 3 ORFs, a Zn Ring finger like protein, which is an unexpressed pseudogene, a DNA binding protein and a putative protein of no known function.

In order to identify which of this gene is the *CWP* gene we did an expression analysis of the genes in the developing fruit of the two genotypes. The *DBP*, which is present in the tomato EST

database, is equally expressed in the ovary of both genotypes, suggesting that it is not the *CWP* gene. However, the putative protein gene (*PUT*) is differentially expressed and is expressed only in the ovary and young fruit of the dehydrating genotype as well as the introgression lines carrying other wild species allele but was not expressed in the cultivated genotypes or in the non-dehydrating fruit carrying the *S. lycopersicon* allele. In accord with this result the put protein is not reported in the EST database and is similarly not found on the tomato micro-array. Analysis of segregating populations determined that the *PUT* gene expression is related to the allelic dosage, and subsequently also to the phenotype of fissures. This indicates that the *S. habrochaites* derived allele for *CWP* is transcriptionally active while the *S. lycopersicon* allele is silent. In addition, *PUT* gene is specifically expressed in the fruit skin but not in the fruit pericarp and other plant portions as well.

In order to confirm that the *PUT* is causal to *CWP* transgenic tomatoes expressing the *PUT* cDNA under the 35S constitutive promoter were developed. The fruit skin phenotype had been shown already in the initial transformed plants (T₀). The final proof comes from the segregating T₁ population when the transgene copy number was in correlation with the microfissure as well as the dehydration phenotypes.

Southern analysis procedures showed that *CWP* gene is part of a small gene family in tomato and there is at least another member. Using the *CWP* gene as a probe on the tomato BACs we cloned a second gene which is 45% homologous to the *CWP*. This second gene was termed as *CWP2* and is present in the EST database for tomato. The two tomato *CWP* genes represent two subfamilies. The *CWPI* is closely related to an EST from pepper where it is expressed in the fruit, and also to a family of monocot ESTs for unknown proteins. The second family is homologous to a potato EST and to a number of dicot ESTs. Interestingly, *CWP2* maps to the portion of chromosome 2 which harbors an additional QTL for reticulated epidermis, but with a much smaller contribution to the trait.

Since the *CWPI* gene is silenced in the cultivated tomato we were interested in determining the evolutionary event that characterizes the impervious cultivated tomato fruit skin. Expression analysis of *CWP* gene in fruit of cultivated and wild tomato species showed that *CWP* gene was expressed in its peel tissue of all wild species, including the red fruited species *S. cheesmanii* and *S. pimpinellifolium* but not in the cultivated tomatoes including the small fruited wild *S. lycopersicon* var *cerasiforme*. We are presently continuing our survey of expression in accessions of the red fruited wild species in order to identify the evolutionary event of *CWP* silencing. The availability of a number of species differing in the silencing of expression of a gene is a powerful

tool to identify the molecular evolutionary event that led to silencing. Promoter sequencing of these different species so far has raised 2 SNPs that distinguish between the *S. lycopersicon* and *L. esc* var *cerasiforme*, and all the other wild species. Farther analyses are required to determind the exact sequence alteration that coused the *CWP* silencing that allowed for the development of one of the most water retentive fruit known, which was to human advantage.

**Revealing, molecular-genetic and physiological
characterization of a major gene determining
micro fissures appearance and water loss in
tomato fruit**

**Thesis submitted for the degree of “Doctor of Philosophy”
By
Ran Hovav**

**Submitted to the Senate of the Hebrew University
August 2006**

This work was carried out under the supervision of

Dr. Arthur Schaffer, Department of Genetics and Vegetable Crops, Volcani Center, Bet-Dagan

And

Prof. Joseph Riov, Institute of Plant Sciences, Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot

Table of contents:

Abstract	
1. introduction	3
2. literature review	5
3. Objectives	24
4. Material and methods	26
5. Results	44
6. Discussion	93
7. References	105
8. Abstract (English)	114