

דוח מדעי לתוכנית מחקר בנושא:

## אפיון מולקולארי של עצי תמר חריגים שמקורם בתרביות רקמה

מאת: יובל כהן, מאור שוחט, סקאר מאקש, דפנה צוק, רעיה קורצ'נסקי ואורי לביא (המכון למדעי הצמח, מכון וולקני)

### מבוא ותאור הבעיה:

ריבוי מסורתי של עץ התמר נעשה על ידי חוטרים. הצורך בהרחבת מטעי התמרים בעולם הביא לפיתוח טכניקות לריבוי התמר בתרבית רקמה. כיום נטועים בארץ כ-35,000 עצי תרבית רקמה, המהווים את מרבית העצים הצעירים וכ-10% מכלל העצים הנטועים. אולם, על אף שהריבוי הינו וגטיבי והעצים צפויים להיות זהים לעץ האם וזהים ביניהם (true to type). מספר רב של עצים שמקורם מתרבית רקמה נראים חריגים באופנים שונים (off-types). החריגים כוללים עצים ננסיים, עצים בעלי חנטה לקויה ועיוותים במבנה הפרח (כהן וחוב' 2003), בעלי שונות בצורת העלים, ובעלי עלים מגוונים (עם סקטורים צהובים – לבנים בעלים) ועצים הרגישים במיוחד לכוויה שחורה. רק חלק מעצים אלה מזוהים בשלב מוקדם יחסית ונפסלים לפני או בסמוך לנטיעתם. שני פנוטיפים בולטים ונפוצים מאוד התגלו בשנים האחרונות בין עצים צעירים בני מספר שנים, שמקורם משתילי תרבית רקמה: (1) כ-2000 עצי 'ברהי' ו'חלאס' שמתקשים בחנטה ופרחיהם אינם נורמאליים ולעיתים נוצרים בהם שחלות פרתנוקרפיות מוספות. (2) כ-10,000 עצי 'מג'הול' מעוכבי צימוח נטועים בארץ. למרות שעצים נורמאליים בגיל דומה כבר פורחים ומניבים, העצים מעוכבי הצימוח אינם פורחים, או פורחים אך אינם מניבים פרי (פעמים רבות מתגלים גם בהם פירות פרתנוקרפיים מרובי שחלות). תופעות חריגות אלה אופייניות לשתילי מעבדות תרבית רקמה מסוימות. אולם, תופעות של עצים חריגים (וביניהם תופעות של ננסות או של חנטה לקויה וריבוי שחלות) קיימות במידה מסוימת (כ-5-10% מהשתילים) גם בעצים מתרביות רקמה שיוצרו במעבדות אחרות. מחקר זה מתרכז באפיון מולקולארי של שתילי תרבית הרקמה החריגים מטיפוסים נפוצים אלה.

תהליכי הצימוח הווגטיבי מבוקרים בין היתר על ידי ההורמונים הצמחיים ג'יברלינים וברסינוסטרואידים. הורמונים אלה משפיעים על תהליכים רבים בצמח, הכוללים נביטה, התארכות גבעולים ועלים, והתפתחות הפרח והפרי. במיוחד חשובה פעילותם התוך-תאית של הג'יברלינים בעידוד חלוקות והתארכות התאים. בשנים האחרונות זוהו בצמחי מודל, בעצים וגם בצמחים חד-פסיגים, מוטנטים ננסיים רבים הפגועים בסינתזת הג'יברלינים, ברצפטורים שלהם או בתגובה של הצמח להורמון. תופעת הננסות הינה נפוצה גם במיני צמחים אחרים שמקורם בתרבית רקמה, כמו למשל בבננות.

ב-15 השנים האחרונות נמצאו עשרות גנים המבקרים את תהליכי יצירת הפרח. צמחים הפגועים בגנים אלו אינם פורחים כלל, או שמבנה פרחיהם פגוע. בחלק מהמוטנטים, משתנה זהותם של חלק מדורי הפריחה (תופעה המכונה Homeotic Transformation). בין אלה נמצאו גם מוטנטים בהם נוצרים אברים מוספים דמויי שחלות במקומם של אבקנים.

### מטרת המחקר

מטרת המחקר היא לאפיין את תופעת חוסר החנטה והשינויים במבנה הפרח ואת עיכוב הצימוח והננסות לצורך הבנת תהליכי יצירת עצי התמר החריגים בתרביות רקמה, וכן לאתר את המנגנונים הפיסיולוגיים

## תוצאות

### שיבוט "גנים מועמדים" הקשורים לפנוטיפים החריגים הנפוצים

בשנים הקודמות התמקדנו בבחינה מורפולוגית ופיסולוגית של העצים השונים ובאנליזה גנטית כללית, הדוגמת את הגנום ומחפשת הבדלים בין עצים נורמאליים ועצים חריגים. גישה אחרת לאפיון הפנוטיפים היא זיהוי שינויים בגנים ספציפיים העשויים להיות קשורים לתהליך מסוים, המאפיין את הפנוטיפ. התחלנו בזיהוי ובידוד של גנים בעצי תמר שמוטציות או שינויים בהתבטאותם יכולים להביא לפנוטיפים הנפוצים המתקבלים בעצי התרבית החריגים. התרכזנו בסדרה של גנים הקשורים למסלולי הביסוינתזה, או החישה של ההורמונים ג'יברלינים וברסינוסטרואידים, שמוטציות בהם (במינים אחרים) מביאה ליצירת צמחים ננסיים. במקביל בחנו גנים מתמרים הקשורים למסלול התהוות הפרח, שמוטציות בהם בצמחי מודל (כמו ארבידופסיס) או במיני דגנים חד פסיגיים (אורז, חיטה ותיירס), הביאו לירידה בחנטת הפירות ולהתפתחות שחלות מוספות בהתאמה לפנוטיפ חוסר החנטה בעצי תמר מתרבית רקמה.

על ידי השוואה של גנים הומולוגיים ממינים אחרים (בעיקר דגניים שונים), אופיינו אזורים שמורים בגנים אלה, ששימשו ליצירת תחלים (פריימרים - רצפי DNA קצרים). בעזרת תחלים אלה הצלחנו "לדוג" מקטעים חלקיים של הגנים הומולוגיים מתוך DNA גנומי של תמר, בשיטה של PCR. רצפים נוספים מ-RNA מרקמות עלים צעירים או פרחים מתפרחות סגורות בודדו בשיטה של RT-PCR. עד עתה הצלחנו לשבט מקטעים מאחד-עשר גנים הקשורים לתהליכי התהוות הפרח (טבלה 1), ומארבעה-עשר גנים הקשורים לביסוינתזה של הג'יברלינים והברסינוסטרואידים או למסלולים אחרים המביאים לננסות (טבלה 2) או ממשיכים לננסות ולשבט גנים נוספים הקשורים למסלולים חשובים אלה בתמרים.

הגנים שבודדו נבחנו בשלושה כיוונים שונים בעצים הנורמאליים והחריגים: הגנים לננסות נבחנו בעצי 'מג'הול' ננסיים ונורמאליים. הגנים הקשורים למבנה הפרח נבחנו בעצי 'ברהי' בעלי בעיות חנטה וריבוי שחלות לעומת עצים פוריים):

א. איתור הבדלים ברצף הבסיסים של מקטעי ה-DNA: מקטעי DNA מהגנים רוצפו מעצי תמר נורמאליים וחריגים. ההבדלים המועטים שהתקבלו ברצף הבסיסים לא היו בהתאמה לפנוטיפים החריגים.

ב. אפיון הבדלים בדפוסי המתילציה בגנים אלה: בקרת גנים נעשית פעמים רבות על ידי שינויים בדפוסי המתילציה של גנים. אולם, בחינה ראשונית של דפוסי המתילציה במקטעי הגנים שבידדנו לא הצביעה על הבדלים בין העצים הנורמאליים והעצים החריגים. עם זאת ראוי לציין שמצאנו הבדל בדגמי המתילציה בין גנומים של עצים נורמאליים לחריגים אם כי מעוט הנתונים לא מאפשר להצביע על אסוציאציה בין דגם המתילציה לפנוטיפ.

ג. איתור הבדלים ברמות הביטוי של הגנים: הבדלים ברמות הביטוי של הגנים הקשורים לתהליכי יצירת הפרח נבחנו בפרחים של עצים נורמאליים וחריגים, בשיטה של Quantitative RT-PCR. תוצאות ראשוניות מצביעות על הבדלים ברמות הביטוי של חלק מהגנים המועמדים, אולם נדרש מחקר נוסף על מנת להוכיח את הקשר בין ההבדלים בביטוי הגנטי והפנוטיפים. אנליזה דומה של בחינת רמות

## מסקנות

המחקר הנוכחי מתמקד באפיון מולקולארי של פנוטיפ הננסות ופנוטיפ חוסר החנטה וריבוי השחלות המופיעים בין שתילי התמר מתרבית הרקמה בארץ. בעבודה זו התמקדנו בזיהוי גנים מועמדים הקשורים לננסות ולבקרה על התפתחות הפרח. התוצאות שמוצגות בדוח זה הינן ראשוניות, ונדרש מחקר נוסף לאפיון מעמיק יותר של הגנים המועמדים בעצים החריגים והנורמאליים.

השימוש בעצי תרבית הרקמה הינו חיוני להמשך התפתחות ענף התמר בארץ ובעולם. איומים אסטרטגיים על ענף התמר בעולם, כמו התפשטות חדקונית הדקל האדומה מחד, ומחלת ה'באיוד' מאידך, מחייבים את המשך הפיתוח של טכניקות הריבוי של תמרים בתרבית הרקמה. אי לכך, מניעת יצירתם של עצים חריגים וזיהויים המוקדם הינם הכרחיים להמשך נטיעות מסיבי של שתילי תרבית ריקמה. הפנוטיפים הנבדקים במחקר זה יכולים לשמש כמודל להבנת תהליכי יצירת השונות הפנוטיפית בין שתילי תרביות הרקמה. מידע זה הינו חשוב כדי למנוע הישנות יצירתם של אלפי שתילים חריגים או כדי לאפשר את זיהויים המוקדם לפני שתילתם במטעים. המידע המולקולארי אותו השגנו עד עתה לא זיהה עדיין הבדלים ספציפיים בין העצים החריגים והנורמאליים. אנו מקווים שגישה זו תאפשר בעתיד זיהוי החריגים בשלב מוקדם בהתפתחותם. בנוסף, המידע המולקולארי הנצבר על מסלולים פיסולוגיים חשובים בתמרים (צמיחה ווגטיבית והתפתחות הפרח) תורם להבנת תהליכים אלה בעצי התמר.

טבלה 1: גנים מתמר הקשורים לבקרת מבנה הפרח שבודדו ואופיינו במחקר זה

הומולוגיה לגנים האורתולוגים	גנים אורתולוגים	אורך מקטע מרוצף (bps)		תפקיד	שם הגן
		cDNA מפרח	DNA גנומי		
85% (280 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> Rlk-OPsc receptor-like	448	480	מוטציה בגן גורמת להצטברות תאים שלא התמיינו במריסטמת הפרח ובנצרים. המריסטמה המוגדלת יוצרת עודף של איברים בפרח.	PdCLAVATA (CLV)
80% (289 bps)	<i>Glycine max</i> receptor-like protein kinase 1 (RLK1)				
92% (546 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> SQUA1	500	-	הומולוגי לגן AP1 מארבידופסיס. בעל אזור שמור המכונה MADS domain. מפעיל את הגנים ממודל ABCDE בעיקר את הגנים מסוג B	PdSQUAMOSA 1 (SQUA1)
82% (198 bps)	<i>Oryza sativa</i> MADS-box protein FDRMADS3				
92% (455 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> DEF1	455	747	הומולוגי לגן AP3 מארבידופסיס. בעל אזור שמור המכונה MADS domain. מוטציה בגן גורמת להפיכת עלי הכותרת לעלי גביע והאבקנים הופכים לעלי שחלות. גן מסוג B	PdSUPERWOM AN1 (PdSPW1)
82% (139 bps)	<i>Oryza sativa</i> MADS-box protein SPW1				
89% (286 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> MADS box (GLO1)	260	790	הומולוגי לגן PI מארבידופסיס. בעל אזור שמור המכונה MADS domain. מוטציה בגן גורמת להפיכת עלי הכותרת לעלי גביע והאבקנים הופכים לעלי שחלות. גן מסוג B	PdMADS4
87% (201 bps)	<i>Musa acuminata</i> putative MADS box protein (MADS1)				
93% (582 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> AG2	633	200	בעל אזור שמור המכונה MADS domain. מוטציה בגן גורמת להפיכת אבקנים לעלי כותרת. גן מסוג C	PdAGAMOUS (PdAG)
79% (436 bps)	<i>Lilium longiflorum</i> AGAMOUS-like protein (LFMADS1)				

הומולוגיה לגנים האורתולוגים	גנים אורתולוגים	אורך מקטע מרוצף		תפקיד	שם הגן
		cDNA מפרח	DNA גנומי		
96% (646 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> AGL2-3 oil palm	665	230	בעל אזור שמור המכונה MADS domain. מהווה תוספת E למודל ה ABC. מוטציות sep1, sep2, sep3 (נקראו בעבר AGL4, AGL2 AGL9) גורמות ליצירת פרח הבנוי כולו מעלי גביע. מפעיל גנים מסוג C, B	PdAGAMOUS-LIKE2-3 (PdAGL2-3)
86% (455 bps)	<i>Musa acuminata</i> putative MADS box protein (MADS3)				
92% (414 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> MADS box AGL2-5	744	472	בעל אזור שמור המכונה MADS domain. מהווה תוספת E למודל ה ABC. מוטציות sep1, sep2, sep3 (נקראו בעבר AGL4, AGL2 AGL9) גורמת ליצירת פרח הבנוי כולו מעלי גביע. מפעיל גנים מסוג C, B	PdAGAMOUS-LIKE2-4 (PdAGL2-4)
86% (672 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> MADS box AGL2-4				
90% (85 bps)	<i>Brassica juncea</i> transcription factor CRC	280	640	בעל אזור שמור המכונה YABBY domain. הגן אחראי לבניית העורק הראשי בעלה ובקרת התפתחות השחלה. מוטציה בגן גורמת לאבקים מרובים. הומולוגי לגן CRABS CLAW (CRC) מארבידופסיס.	PdDROOPING LEAF (PdDL)
87% (78 bps)	<i>Oryza sativa</i> Drooping Leaf (DL)				
88% (116 bps)	<i>Triticum aestivum</i> YABBY protein (YAB1)	485	-	בעל אזור שמור המכונה YABBY domain. מוטציה בגן גורמת למספר לא תקין של איברי פרח. הגן אחראי לבקרת גודל הפרח.	PdABNORMAL FLORAL ORGANS (PdAFO1)
84% (107 bps)	<i>Arabidopsis thaliana</i> AFO (Abnormal Floral Organs)				
84% (131 bps)	<i>Oryza sativa</i> FIL2	472	190	בעל אזור שמור המכונה YABBY domain. מוטציה בגן גורמת למספר לא תקין של איברי פרח. הגן אחראי לבקרת גודל הפרח.	PdABNORMAL FLORAL ORGANS (PdAFO2)
83% (143 bps)	<i>Arabidopsis thaliana</i> YABBY2				
90% (173 bps)	<i>Elaeis guineensis</i> defensin EGAD1	190	359	הומולוגי לגן הגן PPT מפטוניה ולגנים מסוג Defensin שמטרתם להגן על הצמח. תוצרי הגן מצטברים בצמחי תרבות ריקמה, נמצא באסוציאציה לפנוטיפ Mantled בדקל השמן.	PdDefensin1
90% (60 bps)	<i>Helianthus annuus</i> defensin SD2				

טבלה 2: גנים מתמר הקשורים לבקרת צמיחה ולננסות שבודדו ואופיינו במחקר זה

אחוז הומולוגיה	אורך האזור השמור (bps)	גנים אורתולוגים במינים אחרים	אורך מקטע מרוצף (bps)			שם הגן
			cDNA מפרח	cDNA מעלה	DNA גנומי	
<b>גנים במסלול הביוסינתזה והבקרה של ג'יברלינים</b>						
85	197	<i>Zea mays</i> DWARF8 gene	410	410	1620	GAI (Gibberellic acid-insensitive )
84	213	<i>Oryza sativa</i> SLR1 gene for DELLA protein				
90	41	<i>Prunus persica</i> ent-kaurene oxidase	-	-	395	KO (Kaurene oxidase)
90	40	<i>Cucurbita maxima</i> ent-kaurene oxidase				
72	264	<i>Hordeum vulgare</i> ent-kaurenoic acid oxidase	284	284	550*	KAO (Kaurenoic acid Hydroxylase)
83	65	<i>Arabidopsis thaliana</i> ENT-Kaurenoicacid hydroxylase				
84	252	<i>Triticum aestivum</i> gibberellin 20-oxidase	406	-	981	GA-20-OX (Gibberellin-20-oxidase)
83	274	<i>Zoysia japonica</i> gibberellin 20 oxidase				
80	175	<i>Oryza sativa</i> OsGA2ox3 -gibberellin 2-oxidase	-	-	194	GA-2-OX (Gibberellin 2-oxidase)
88	44	<i>Hordeum vulgare</i> GA 2-oxidase 5				
82	64	<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i> GA3ox1	285	285	552**	GA-3-OX (Gibberellin 3-oxidase)
86	46	<i>Cucumis sativus</i> GA 3bete-hydroxylase				
<b>גנים במסלול הביוסינתזה והבקרה של ברינסטרואידים</b>						
80	308	<i>Zea mays</i> DWF1	582	582	582	DWF1 (Brassionsteroid biosynthetic protein DWARF1-DIMINUTO)
83	200	<i>Gossypium hirsutum</i> DWARF1				
78	332	<i>Lycopersicon esculentum</i> DWARF1 (DWF1)				
82	480	<i>Gossypium hirsutum</i> sterol delta-7 reductase DWF5	567	567	910	DWF5 (sterol delta-7 reductase)
79	364	<i>A. thaliana</i> sterol delta7 reductase (DWARF5)				

אחוז הומולוגיה	אורך האזור השמור (bps)	גנים אורתולוגים במינים אחרים	אורך מקטע מרוצף (bps)			שם הגן
			cDNA מפרח	cDNA מעלה	DNA גנומי	
88 81	148 109	<i>Nicotiana tabacum</i> sterol-C5(6)-desaturase	349	349	-	DWF 7 (sterol-C5- desaturase)
85 85	121 128	<i>Gossypium hirsutum</i> sterol-C5-desaturase DWF7				
85	247	<i>Zea mays</i> S-adenosyl-L-methionine:delta 24-sterol methyltransferase	311	311	~1900	SMT (Sterol Methyltransferase)
80	311	<i>Oryza sativa</i> cycloartenol-C24-methyltransferase				
81	413	<i>Hordeum vulgare</i> BRI1 gene	-	457	524	BRI 1 (Brassinosteroid insensitive 1)
78	385	<i>Lycopersicon esculentum</i> BRI1 protein (CURL3)				
<b>גנים אחרים הקשורים לננסות</b>						
64	25	<i>Rumex palustris</i> expansin 17 precursor	-	-	184	EXP ( $\alpha$ -Expansin)*
60	25	<i>Musa acuminata</i> expansin-like (Exp3) gene				
85	134	<i>Eucalyptus globulus</i> putative xyloglucan endotransglycosylase		410	410	XET (xyloglucan endo- transglycosylase)
81	176	<i>Asparagus officinalis</i> xyloglucan endotransglycosylase XET2				
61	71	<i>Vitis vinifera</i> brassinosteroid-6-oxidase (BR6OX1)	-	-	1005	BR6OX (brassinosteroid-6- oxidase)*
66	71	<i>Lycopersicon esculentum</i> 6-deoxocastasterone oxidase (Dwarf)				