השראת מוטציות בצמח רוסקוס באמצעות קרינת גאמא

יערית קוטשר[1], ניר הזנשנפורג[2], אורית עמיר-שגב[1], קובי קוטשר[2]

ליאן מרצ'וק-אובנת[1], דליה אבנור[1] ומשה ראובני[1]

[1] המחלקה לצמחי נוי וביוטכנולוגיה בחקלאות, מכון וולקני

[2] המרכז למחקר גרעיני - שורק

מבוא

רוסקוס היפופילום (Ruscus Hypoglossum) הוא שיח ירוק עד רב-שנתי ממשפחת ה-Asparagaceae Juss (Chase et al., 2009). לרוסקוס ענפונים דמויי עלים (פילוקלדים) גלדניים ומבריקים, והצמח מגיע לגובה של חצי מטר עד מטר. העלים האמיתיים של הצמח הם קטנים וגלדניים ואינם פוטוסינטתיים. הם מצויים במרכז הפילוקלדים ונראים כקוץ רך, שם גם נמצא הפרח. הפרח קטן מאוד וצבעו לבן. חנטת הפרי נדירה בצמח זה, והפירות הם גרגרים אדומים המכילים זרעים. הצמח מפתח קני שורש מעובים.

ריבוי הצמחים נעשה על ידי חלוקת קנה השורש למספר גושים, הנושאים ענפים ושורש מעובה. הצמח גדל בתנאי צל, במגוון קרקעות או מצעי גידול, ורגיש לעודפי מים, לקרקע גירית, לקרינה גבוהה ולטמפרטורות קיצוניות. מוצא הרוסקוס בדרום-מערב אירופה, וכיום ניתן למצוא זנים שונים בבר ממערב אירופה עד אירן. בישראל זן הבר נקרא עצבונית החורש או עצבונית קטנת עלים. צמח הרוסקוס, שהובא לישראל כצמח גן על ידי הטמפלרים, התאקלם היטב בארץ והוא נפוץ מאוד בגינות ובגנים ציבוריים באזורים מוצלים.

אחת התכונות הבולטות של ענף הרוסקוס היא יכולת הישרדותו לאחר הקטיף גם בתנאים קשים. הענף הקטוף מחזיק מעמד מספר שבועות באגרטל ושומר על מראה רענן, טרי וירוק. בתחילת שנות השישים החלו בניסיונות שיווק של ענפי רוסקוס שנקטפו מגינות. בתחילת שנות ה-70 עלה הביקוש לענפים ירוקים כמילוי לזרי פרחים בשווקים באירופה, ולכן נשתלו החלקות המסחריות הראשונות בארץ. בשנת 1979 הגיע היקף הגידול לכ-250 דונם. מגמת העלייה בגידול נמשכה והתפרשה על פני כ-2000 דונם בשנות ה-2000. נכון לשנת 2014, מספר ענפי הרוסקוס המיוצאים נשאר יציב, והיצוא נאמד ב-126 מיליון ענפי רוסקוס (Weizmann et al., 2014).
תנאי הצללה אופטימליים לגידול ענפי רוסקוס לשיווק הם תחת הצללה כבדה (50%-60% של רשת שחורה). נמצא כי הצללה כבדה משפרת את איכות הפיגמנטציה של העלים ומעלה את קצב ההתארכות שלהם, כך שהמוצר המתקבל איכותי יותר (Stamps ,1997).

ניסיונות שנעשו במהלך השנים לגדל רוסקוס באופן מסחרי במקומות אחרים בעולם, נכשלו ברובם, ועד כה לא קמו מתחרים מסחריים לרוסקוס הישראלי. חלק מהסיבות ליתרונה המשמעותי של

ישראל בגידול רוסקוס ולהצלחת הגידול הן: א. הרוסקוס זקוק למנוחת קיץ, ולכן ישנה חשיבות לעונת קיץ יבשה; ב. הרוסקוס רגיש מאוד למחלות פטרייתיות ובקטריאליות בתנאי לחות גבוהה (Tamari, 2017; Elad, 2014); ג. להתפתחות מרבית של הצמחים יש צורך בטמפרטורות גידול מתונות, כיוון שטמפרטורות נמוכות פוגעות באיכות הגידול, וטמפרטורות גבוהות מונעות פריצות של ענפים חדשים. מסיבות אלה, הקיץ היבש והחורף המתון, ישראל מהווה מקום גידול אופטימלי לרוסקוס.

למרות שהרוסקוס הוא גידול רווחי, הגיוון בו דל. במחקר זה אנו מציגים לראשונה יצירת שינויים גנטיים ברוסקוס בטכניקות של הקרנה, כדי לבדוק אפשרות ליצור קווים בעליי פנוטיפ חדש וייחודי.

שיטות וחומרים

חומר צמחי

צמחי הרוסקוס במחקר זה נלקחו מחלקה לגידול מסחרי (דורון חביב מכפר ויתקין). הצמחים נעקרו מהשורש ונלקחו למעבדה. מקנה השורש ומהפילוקלדים של צמחים אלו חולצו ניצנים. ניצנים, פרחים ומקטעי פילוקלדים שימשו כרקמה צמחית בפיתוח פרוטוקול לריבוי רוסקוס מתרבית רקמה.

הכנסה לתרבית

במסגרת המחקר, פותח פרוטוקול ריבוי לתרבית רקמה של רוסקוס ואופטימיזציה של הרכב המצע, בהסתמך על ניסיוננו המוקדם מצמחים אחרים.

השלב הראשון בהכנסה לתרבית רקמה הוא חיטוי הרקמה. חיטוי המקטעים הוא שלב קריטי, הכולל את הפעולות שלהלן:

1. הרקמה הצמחית נשטפת בסבון ובמים כחיטוי ראשוני.
2. שטיפה במים זורמים במשך שלוש שעות.
3. ערבול בפונגיציד Merphane 0.2% כשעה.
4. ערבול באתנול 70% עשר דקות בערך.
5. ערבול באקונומיקה 2% חומר פעיל + Tween 20 במשך כחצי שעה.
6. שלוש שטיפות במים מזוקקים סטריליים.

מצע ותנאי התרבית

המקטעים הצמחיים הסטריליים הונחו על צלחות פטרי המכילות מצע. המצע מורכב מ- MS (Murashige and Skoog, 1962) בתוספת 88.2 mM סוכרוז ו-0.8% אגר. למצע זה הוספו ההורמונים הצמחיים NAA (Naphthalene Acetic Acid) ו- BA (6-BenzylAdenine) בריכוזים שונים.

הרקמה הצמחית הועברה למצע ריבוי והתארכות מדי 4-6 שבועות. כל 5-9 גושי רקמת רוסקוס הועברו לחומוסיות שקופות (Polypropylene), המכילות מצע טרי. בכל ההעברה למצע טרי חולצו

ונספרו הצמחונים החדשים שהנצו מגושי הרקמה. אנליזה סטטיסטית בוצעה בתוכנת SAS JMP (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

כל טיפול כלל שלוש חזרות, וכל ניסוי בוצע פעמיים.

התרביות נשמרו בחדר גידול בטמפרטורה של 25 מ״צ במשך 16 שעות תאורה ביום.

השרשה והקשחה

גושי רקמת הרוסקוס שהוסרו הועברו לחומוסיות שונות, המכילות מצע השרשה מסוג MS (Murashige and Skoog, 1962), בתוספת 58.8 mM סוכרוז ו-0.8% אגר. למצע זה הוספו ההורמונים הצמחיים: IAA (Indole-3-Acetic Acid), NAA, IBA (3-Indole Butyric Acid), בריכוזים שונים.
ההקשחה בוצעה באשלים המכילים מצע גידול וטוף, חול ים או פרלייט. הצמחונים נשמרו בחדר גידול בלחות גבוהה ובטמפרטורה של 25 מ״צ למשך שבועיים לפחות, לפני שהועברו לחממה.

הקרנה של הרקמה הצמחית

הרקמה הצמחית, שאותה בחרנו להקרין, הייתה מריסטמות בשלב חלוקות התאים. כיומיים לפני ההקרנה הופרדו הניצנים מחלקי קנה השורש והושמו על צלחת המכילה מצע ריבוי. הצלחות נחשפו לקרינת גמא במנות של 5 Gray (Gy), 10, 15, 20, 40, 80 ממקור של Co60 במרכז למחקר גרעיני שורק (ממ״ג). כל מנת קרינה שימשה להקרנה של שלוש צלחות המכילות כ- 15 מריסטמות.

כל שלישיית צלחות פטרי הוקרנו במקביל בזמן שווה ובמרחקים שונים ממקור הקרינה. מכיוון שמנת הקרינה תלויה בריבוע המרחק, שלטנו בה על ידי שליטה במיקום הצלחות ביחס למקור הקרינה.

מיד לאחר ההקרנה הועברו הניצנים המוקרנים לצלחות מצע חדשות, ובוצע מעקב אחר קצב התפתחותן לאורך הזמן.

תוצאות

ריבוי בתרבית

בשלב הראשון פיתחנו מחדש תרבית רקמה של רוסקוס ובוצעה אופטימיזציה של הרכב המצע, בהסתמך על ניסיון מוקדם שלנו בצמחים אחרים. החומר הצמחי שממנו פותחה התרבית הוא קנה השורש. בצמחי רוסקוס הגדלים בקרקע, מתפתח צמח לרוב רק ממריסטמה אחת מתוך המספר הרב של המריסטמות הרדומות על קנה השורש. המריסטמות הרדומות מהוות את המקור לריבוי מריסטמות אדוונטיביות בתרבית.

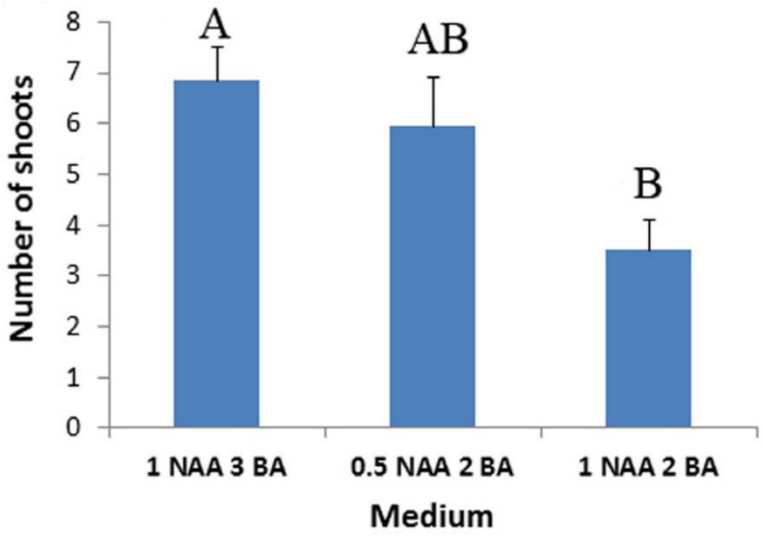
המקטעים השטופים הונחו על מצע MS המכיל אוקסין וציטוקינין. במקרה זה, בניסוי ראשוני שערכנו נמצא שהאוקסין הטוב ביותר הוא NAA, והציטוקינין האופטימלי הוא BA.

לאחר ניפוי החומר הנגוע הועברו המריסטמות למצע טרי. לאחר שבוצעו כמה העברות מדי 4-5 שבועות, ניתן היה לראות התחלה של ריבוי מריסטמטי. כעבור מספר שבועות נוספים התפתחו

נצרונים אחדים מכל מקטע של קנה שורש. כפי שניתן לראות בתמונה 1, נוצרו 3-6 נצרונים מכל מריסטמה ראשונית.

תמונה 1: יצירת נצרונים ממריסטמות ראשוניות של רוסקוס

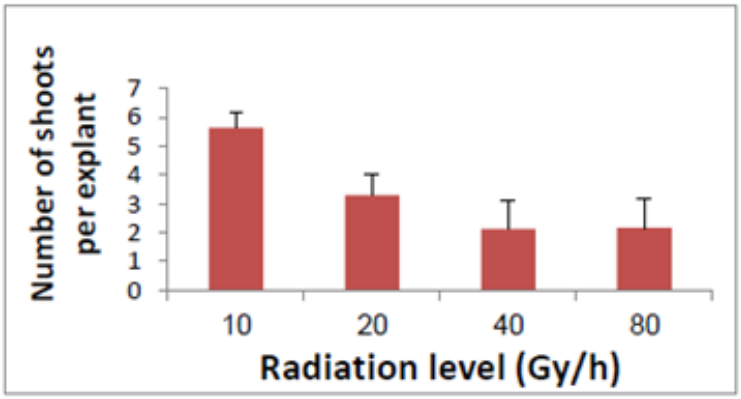
המצע האופטימלי לריבוי היה בשלב הראשוני 1 מ״ג/ליטר NAA ו- 3 מ״ג/ליטר BA, כפי שמתואר באיור 1.



איור 1: אופטימיזציה של הרכב פיטוהורמונים במצע לצורך קבלת מספר מרבי של נצרונים. הניסוי בוצע בחמש חזרות; אנליזה סטטיסטית של שונות המדגם נעשתה באמצעות תוכנת JMP

ריבוי רוסקוס לאחר הקרנה

מקטעי קנה השורש של הרוסקוס הוקרנו תחילה בארבע מנות שונות של קרינת גמא, כדי לבדוק את יעילות הקרינה בשינוי תכונות הרקמה. שישה שבועות לאחר מכן, המקטעים המוקרנים, שהראו קצוות של עלים, הועברו לצנצנות, ולאחר חודשיים נספרו הצמחונים שגדלו בצנצנות. באיור 2 מוצגת השפעת ההקרנה על גדילת הייחורים כעבור שלושה וחצי חודשים מההקרנה. נספרו רק מריסטמות אשר גדלו או פיתחו נצרונים חדשים, ונספרו רק הנצרונים החדשים שגדלו כולל המריסטמה המקורית שהוקרנה.

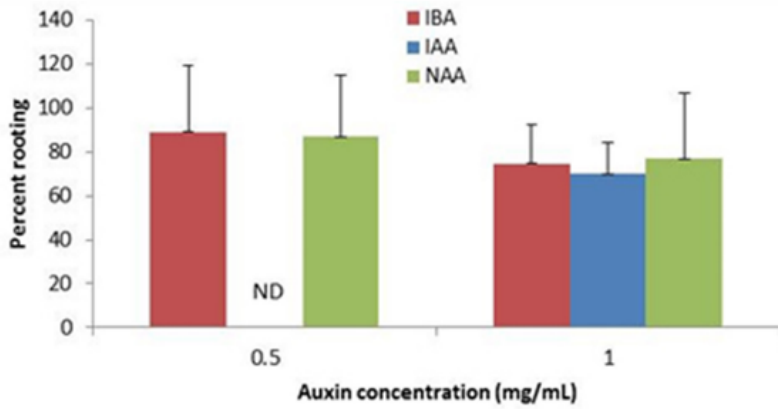


איור 2: מספר הצמחונים ליחידת מריסטמה ראשונית כפונקציה של קצב הקרינה לאחר שלושה וחצי חודשים מיום ההקרנה

השתרשות צמחונים מרוסקוס

במשך שנה פיתחנו פרוטוקול השרשה והקשחה של צמחים מתרבית על פי תוצאות בחינה של שימוש באוקסינים שונים (NAA, ABA, IAA) בריכוזים שונים. כאשר הנצרונים הגיעו לאורך של 3-4 ס״מ לפחות, הם הועברו למצע השתרשות. בדיקת השתרשות כעבור שלושה חודשים מרגע הנחת הצמחונים על מצע ההשתרשות.

לא מצאנו הבדלים משמעותיים ביעילות ההשתרשות בין האוקסינים השונים, וכולם תרמו להשתרשות באחוזים גבוהים (מעל 70%). באיור 3 מוצגים אחוזי ההשתרשות של צמחוני הרוסקוס, תוך שימוש באוקסינים שונים. 9-10 צמחונים הושמו בצנצנות המכילות מצע MS 0.5 בשלוש חזרות. אחוז הצמחונים המושרשים נמדד לאחר 3 חודשים במצעים השונים.



איור 3: אחוז השתרשות של צמחוני רוסקוס על אוקסינים שונים; לא נעשה ניסוי של ND עם IAA בריכוז זה

השתרשות הרוסקוס לאחר ההקרנה

כחצי שנה לאחר ההקרנה (כ-4 העברות על מצע ריבוי) הועברו צמחונים בגודל של 4 ס״מ לפחות למצע השתרשות (MS+IBA). חודש עד חודשיים לאחר העברתם למצע נספרו הצמחונים שהשרישו ומספר השורשים שהנצו בכל צמחון. כל הצמחונים שהוקרנו במנה של 80 Gy לא השרישו כלל. מספר השורשים בצמחים המוקרנים בהקרנות השונות היה בהתאם למוצג בטבלה 1.

טבלה 1: מספר השתרשות צמחוני רוסקוס שמונה חודשים לאחר ההקרנה [אותיות לטיניות מסמנות קבוצה שונה סטטיסטית]

רמת קרינה	מספר שורשים לצימחון	מספר צמחונים
0	$^{A}9.0\pm0.8$	32
5	$^{C}5.5\pm0.2$	174
10	$^{C}6.4\pm0.2$	393
15	$^{BC}6.9\pm0.4$	95
20	$^{AB}8.0\pm0.4$	68
40	$^{BC}6.8\pm0.4$	74
80	$^{D}0\pm0$	45

השפעת ההקרנה על צורת העלווה של רוסקוס

לאחר גידול של הצמחים המוקרנים בבית רשת הם הועברו למגדל בכפר ויתקין ונשתלו בחלקה מסחרית להמשך גידולם ולביצוע הערכה. חלק מהצמחים העידו על שינוי פנוטיפי, כמו פילוקלדים צרים או שלושה פילוקלדים היוצאים מאותו פרק (תמונה 2). אחוז הצמחים בעלי השינוי הפנוטיפי הגדול ביותר היה בקרב הצמחים שקיבלו מנת קרינה של 10-20 Gy.

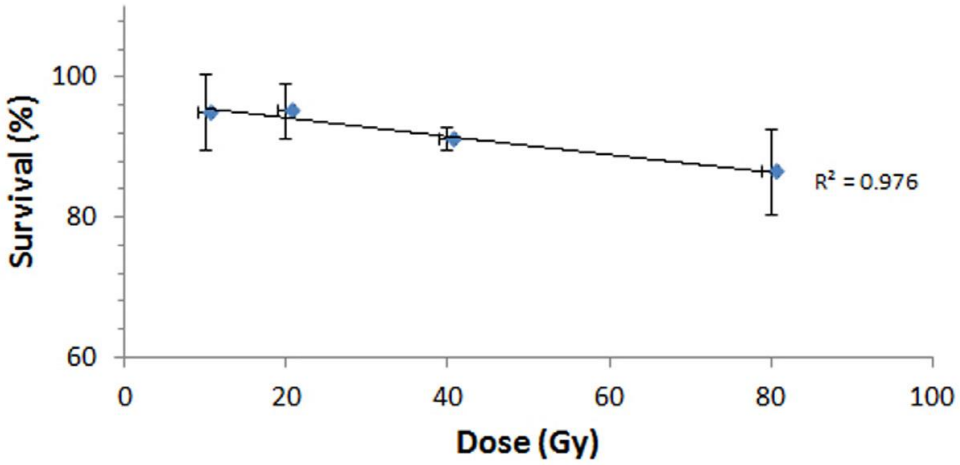
תמונה 2: צמחי רוסקוס באדמה לאחר רגנרציה: A – צמחי ביקורת; C+B – צמחים עם פילוקלדים מאורכים; D+E - צמחים עם שלושה פילוקלדים היוצאים מאותו פרק;

דיון

פרוטוקול הריבוי שפיתחנו מהיר, פשוט ומיטבי, משום שהרקמה מתרבה במהירות של 6-8 גבעולים בהעברה אחת, ללא ירידה ביצירת גבעולים לאחר שלוש שנים (36 ההעברות לערך) וללא ירידה בחיות הרקמה או נקרוזיס (מות הרקמה).

הגבעולים השרישו על מצע של 0.5 MS עם 0.5 mg/L ועל מצע של Auxin 1 mg/L (IBA, IAA or NNA) ללא הבדלים (איור 3 לעיל). כל הגבעולים המושרשים שרדו הקשחה במצעים שונים, למעט בחול ים. תוצאות אלו נמצאו דומות לתוצאות של Jha and Sen (1985), אשר דיווחו על שרידות רוסקוס של 80% במצעים שונים. מכאן עולה כי הרוסקוס הוא צמח עמיד וחסין, המצליח להסתגל ולשגשג במגוון מצעים וטיפולי קרינה.

מנות גבוהות של קרינת גמא לא היו קטלניות עבור הצמח (איור 4), אך הן ההפחיתו מכושר החלוקה שלו (איור 2 לעיל) ומכושר ההשרשה שלו (טבלה 1).



איור 4: אחוז הרקמה החיה שישה שבועות לאחר ההקרנה

לפיכך, הסקנו כי ההשרשה רגישה יותר לקרינה מאשר הריבוי. לרוסקוס יש פיזיולוגיה ייחודית, מאחר שבאגרטל עם מים שומרים ענפי הרוסקוס על מראה טרי במשך שבועות אחדים. לאור כושר השרידות הגבוה שלו, הרוסקוס הוא מועמד טוב להשראת מוטציות באמצעות קרינת גמא. השתמשנו בקרינת הגמא מאחר בהיותה יעילה בהשראת מוטציות על רקמה וגטטיבית. קיבלנו כמה מוטציות פנוטיפיות (תמונה 2 לעיל) - תשע מוטציות פנוטיפיות מתוך אלף צמחים, ולכן יש להמשיך ולסרוק צמחים נוספים. במהלך השנים הבאות נוכל לבחון אם המוטציות שהתקבלו הן אכן יציבות.

מסקנות

במאמר זה הוצג פרוטוקול לריבוי רוסקוס והקרנת המריסטמות שלו בקרינת גמא באמצעות תרבית רקמה ליצירת שינוי פנוטיפי. ריבוי מהיר בתרבית רקמה מתאים ליצירת מוטגנזה, והשינויים הפנוטיפיים שנוצרו בעקבות השראת הקרינה מוצגים במאמר זה.

מקורות

CHASE, M.W.; REVEAL, J.L.; FAY, M.F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, n.2, p.132– 136, 2009. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2009.00999

WEIZMANN, S.; HAZAN, A.; SHPIGEL, E.; BARKAI, N. Report to the Chief Scientist of the Ministry of Agriculture in Israel (In Hebrew). 2014. Available at: https://www.moag.gov.il/shaham/professionalinformation/documents/keren_mehkarim_shaham/risusi_alvaa_ruscus_lemniaat_ clooza.pdf. Accessed May 11th 2020.

STAMPS, R.H. **Florida/Holland/Israeli *Ruscus* production and use**. Apopka: Extension, Institute of Food and Agriculstural Sciences, 2001.

TAMARI, Y. **Growth instruction for *Ruscus***. Flower Growers Bulletin, 2017.

ELAD, Y. 2014. **Plant diseases in Israel – *Ruscus***. Available at: https://phytopathology.org.il/wp-content/uploads/2017/11/Ruscus.pdf. Accessed May 11th 2020.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

JHA, S.; SEN, S. *In vitro* regeneration of *Ruscus hypophyilum* L. plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.5, p.79-87, 1985. DOI: https://doi.org/10.1007/BF00033573.