

# בת קאלה אתיופית "תוצרת הארץ": ריבוי וניקוי מוירוסים של מוטנטים מצטיינים לצורך רישום

זנים

## *Zantedeschia aethiopica* "made in Israel" virus cleaning and micropropagation outstanding protocols for mutants

דיווח מחקר לתכנית המחקר – קוד מדען 20-01-0193

256-1052-19

שנות המחקר: שנה שלישית

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

### שמות השותפים למחקר:

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
| פייסילוגיה של קאלה מנגנוני עמידות מוטנגנזה, זרעים, הכלאות בקאלה, ניקוי מוירוס ליווי, איסוף דוגמאות, משק מודל, חיתוכים תרבות רקמה, ריבוי, ניקוי מוירוס | <a href="mailto:iris@volcani.agri.gov.il">mailto:iris@volcani.agri.gov.il</a><br>noamr@volcani.agri.gov.il<br>shoshw@shaham.moag.gov.il<br>bocobza@volcani.agri.gov.il | מכון וולקני, תקן<br>מכון וולקני<br>שה"מ, תקן<br>מכון וולקני, תקן | <b>איריס ידידיה</b><br>נעם רזניק<br>שוש ויצמן<br>שמאל בוקובזא |
|---|--|--|---|

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים הכתובים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם בגדר המלצות גידול לחקלאים.

איריס יציל

חתימת החוקר:

### תקציר הדו"ח

**הבעיה:** בת קאלה אתיופית הינה צמח מתאים מבחינה אקלימית ומבחינת חלון השינוק לאירופה, המציג פוטנציאל כלכלי בלתי ממומש עבור המגדל הישראלי. בעזרת זנים חדשים ומיתוג, פוטנציאל זה יוכל להתממש. המגוון הגנטי העולמי הקיים עבור ק. אתיופיקה מוגבל מאוד. הפרויקט הנוכחי התבסס על ביצוע מוטנגנזה באמצעות קרינת X בזרעים (מהורים קבועים) מדרום אפריקה. הזרעים השורדים לאחר ההקרנה התפתחו לצמחי אם ועברו חלוקה וגטטיבית, אפיון פנוטיפי ותהליך לפיתוח ריבוי בתרבית, במהלך 3 עונות עוקבות.

**היפותזת עבודה:** פיתוח זן חדש של ק. אתיופיקה, מותאם למועדי הפריחה והאקלים בישראל צפוי לפדות מחירים גבוהים יותר מחומר הריבוי הקיים בארץ ואינו משווק תחת זן רשום. השלכות יישומיות: זן רשום עשוי לייצר ערך כלכלי מוסף למגדלים.

**מטרת המחקר:** פיתוח קו (אחד או יותר) של ק. אתיופיקה בעל מופע ייחודי, יבול גבוה, מקדים פריחה ועמיד. **שיטות:** מעקב פנוטיפי אחר טיפוסים נבחרים (מחלוקת פקעות) נערך במשך 3 שנים. במהלכו הצמחים עברו סינון על סמך פרמטרים שונים. לימוד פרופיל וירום התבצע באמצעות NGS, בצמחים סימפטומטיים. פרוטוקול בתרבית רקמה נבחן מאקסופלנטים שונים ובחשיפה לשילובי הורמונים שונים.

**סיכום:** תוצאות המעקב הפנוטיפי אחר הקווים הנבחרים הובילו לבחירה של 3 קווים מתאימים לבדיקה בתנאי המגדל. וירום ק. ישראלית אופייני לראשונה זוהו 3 וירוסים כולל וירואיד אחד. לאחר האפיון נבחנה בהצלחה האפשרות לנקות את חומר הריבוי מוירוסים באמצעות העברה חוזרת של מריסטמות בתרבית. פותח פרוטוקול ריבוי בתרבית שהוביל לקבלת קאלוס, אך הקאלוס שהתקבל לא אפשר רגנרציה של צמחונים. סיכום מבחני עמידות לפקטובקטריום בקווים הנבחרים הצביע על מספר קווים עמידים יותר לפתוגן. שלושה קווים נבחרו להמשך בדיקה אצל מגדל קאלות מסחרי ולשם כך הקווים יעברו פיצול של חומר הריבוי כמקובל אצל המגדלים, המאפשר מקדם ריבוי של 1:15.

**הצגת הבעיה:** המינים בקבוצה *Zantedeschia* (בת קאלה) ממשפחת ה-Araceae פורחים בעונת החורף-אביב ובעלי קנה שורש כאיבר אגירה רב שנתי. הסוג כולל גם מינים צבעוניים מקבוצת Aestivae אשר אינם כלולים בתוכנית המחקר הנוכחית. כלל המינים בסוג הינם עשבוניים, רב-שנתיים דיפלואידים, בעלי 32 כרומוזומים [1, 2]. מרביתם עוברים הכלאה עצמית (self-fertile), תכונה חשובה לחקלאות המשמרת אחידות גנטית, אך גם מסבירה חלקית העדר מגוון גנטי במינים הלבנים [3]. חומר הריבוי של ק. אתיופיקה בישראל מקורו במספר פקעות בודדות אשר הגיעו מדרום אפריקה לפני קום המדינה, וכן יבוא מצומצם של פקעות ממקור הולנדי, אשר התערבבו עם החומר הראשוני המצוי בידי המגדלים (תקשורת אישית גדעון לוריא). המגוון הגנטי של ק. אתיופיקה בעולם כולל מספר מצומצם של זנים רשומים בעלי תכונות אופייניות: פרח בגוון לבן ירוק ('Green Goddess'), פרח ורדרד ('Flamingo'), צורת משפך ננסית ('Childsiana'), או ('Colombe de la Paix') בעל פרח רחב ופתוח. זנים אלה ייצרו נישת שיווק ייחודית והם משווקים גם היום. בעבודה זו בחרנו במוטגנזה כאסטרטגיה להרחבת המגוון הגנטי בגידול זה, לצורך קבלת זנים חדשים ומותאמים לתנאי הגידול בישראל. קרינה מייננת ידועה כבסיס למספר הרב ביותר של זני צמחים רשומים (כ-3000 זנים רשומים במגוון צמחי יבול) [4]. ק. אתיופיקה שימשה במחקר הנוכחי ליישום גישה דומה [5]. זרעי ק. אתיופיקה יובאו לישראל מחברת "Seeds and All", Port Elizabeth, South Africa ממקור דרום אפריקאי. הזרעים נוצרו בהכלאת צמחי אם קבועים בחברה. לאחר בדיקת אחוזי נביטה בצלחות פטרי ובעיצים, הזרעים הוקרנו במערכת X RAD 320 של חברת Precision X-Ray, North Branford, CT, USA. המערכת נועדה להקרנה מבוקרת של דוגמאות ביולוגיות וממוקמת במכון ויצמן. רמות קרינה מדויקות מושגות באמצעות קרן הומוגנית העוברת בתוך גליל מוגן ובקרה ממוחשבת מאפשרת דיוק מקסימלי בכיול מנות הקרינה. תוצאות הכיול הראו כי הקרנה ברמה של- 10kRad למשך 20 דקות אפשרה הישרדות של 20-50% מהזרעים בהשוואה לביקורת בלתי מוקרנת. רמה זאת נבחרה על ידינו להמשך הניסויים. טיפול בקרינה מייננת עשוי לגרום לשבירת הכרומוזום, טרנסלוקציה שלו, הכפלה, הרחקת מקטעים ושינויים נקודתיים ברצף הבסיסים. מוטגנזה בזרעים עשויה להוביל לעיתים ליצירת כימרות, אותן ניתן לפתח באמצעות מחזורים נוספים (M1, M2) ע"י רבייה מינית בהכלאה עצמית. סלקציה לצמחים המתקבלים (מוטנטים משוערים) מתבצעת לאחר הנבטה עם פריחה. ייצוב מוטציה מבוקשת, ידרוש לעיתים הכלאות עצמיות וסלקציה לפנוטיפ הרצוי [4-6]. הכלאה עצמית עשויה לאפשר המשך פיתוח מזרעים. קאלה לבנה וצבעונית מהוות מרכיב משמעותי בסל גידולי הפרחים הנמכרים בעולם, המסחר מתבסס על זני פטנט של ק. אתיופיקה ועל זני היברידי צבעוניים אשר תופסים ביחד את המקום ה-15 ברשימת הפרחים הנמכרים ביותר בבורסת הפרחים ההולנדית. הזנים הצבעוניים רגישים לפתוגנים ולמחלת הריקבון הרך בפרט [7-10]. ק. אתיופיקה נחשבת לסבילה יותר לחיידקי ריקבון רך, אך גם היא נפגעת מאוד מן הפתוגן ומציגה הבדלים בין זנים בשדה ובמעבדה. בנוסף, ק. אתיופיקה מתאימה לתנאי האקלים בישראל (נטולת דרישות קור) וניתן לגדלה בטווח רחב של תנאים (שטח פתוח, חממה, קרקע, מצע מנותק וכו'). אי התאם גנטי מונע הכלאה בינה לבין הזנים הצבעוניים [2, 11, 12]. למרות שבעבר נמצא במבחנים סרולוגיים כי ק. אתיופיקה בישראל נגועה ב-Dusheen mosaic virus, מעולם לא בוצע אפיון וירוסים מלא בק. ישראלית ולא נעשה כל ניסיון לפיתוח פרוטוקול ניקוי בתרבית. מיתוג

של חומר הריבוי המיוצר בישראל כנקי מווירוס עשוי לתרום לכלכליות הגידול [13, 14]. בספרות העולמית מצויים דיווחים מועטים לגבי הצלחת פרוטוקול יצור קאלוס בתרבית רקמה בק. אתיופיקה (בניגוד למינים הצבעוניים), ואין בנמצא פרוטוקול הכולל רגנרציה, בגלל קשיים בקבלת קאלוס קומפקטי המאפשר אמבריוגנזה. פיתוח פרוטוקול ניקוי מוירוס וריבוי עבור המוטנטים המשוערים עשוי להוות פריצת דרך [15]. ביצוע ריצוף עמוק בעבודה הנוכחית אפשר לראשונה קבל את תמונת הווירוסים בשטחי הגידול ומתוכם לאפיין את הקיים בקווים המוטנטים עם וללא ריבוי מזרעים. בהתאם לכך פותח פרוטוקול המאפשר זיהוי בו זמני של הווירוסים העיקריים בק. אתיופיקה בישראל. בכך העבודה פותחת את הדרך לפיתוח זן אחיד, נקי ובעל תכונות משופרות עבור המגדל הישראלי.

## 1. עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

לאורך שנות המחקר נערך מעקב פנוטיפי אחר כ- 20 קווים נבחרים מתוך מאות פרטים שנבטו ועברו סלקציה לאחר ההקרנה בקרינת X. מסיבות טכניות נאלצנו במהלך שנת המחקר השנייה להחליף מספר פרטים שנפגעו. למרות האמור לעיל, על סמך התצפיות, 5 קווים הציגו מאפיינים דומים לאורך כל שנות המחקר ונבדלו באופן מובהק מצמחי הביקורת הבלתי מוקרנים, ומצמחי ק. ישראלית. הקווים נבחרו על בסיס התכונות הבאות: א. הקדמת מועד פריחה. ב. מספר פרחים גבוה לפקעת. ג. גודל הפרח. ד. מופע סימטרי ומשפך סגור. ה. עמידות יחסית לחיידקי ריקבון רך (*Pectobacterium brasiliense*).

1.1. **שנת המחקר הראשונה 2018-19:** בשנה זו נערך מעקב אחר 21 קווים, לאחר חיתוך של הפקעות ל- 10 יחידות אחידות בגודלן ושתילה בתאריך 30.8.2018 נערך מעקב פנוטיפי אחר התפתחות ופריחה, צמחי ק. אתיופיקה שלא עברו הקרנה וצמחי ק. ישראלית ממגדל מקומי שמשו כביקורת. בתום שנה זאת הוחלפו 5 קווים, כולם כאלה שלא הציגו פנוטיפ מרשים והוחלפו בעקבות התקפת דורבנים בשטח הגידול.

**שנת המחקר השנייה:** בתאריך 31.10.2019 נשתלו פקעות מושרשות של 21 קווים, 18 מוטנטים CaX (נבחרו מתוך אלפים בעונה הראשונה לאחר ההקרנה), 3 קווים בלתי מוקרנים Ca והזן המוכר בתור "קאלה ישראלית" ZAI שמשו כצמחי ביקורת. הקווים הנבחרים נשתלו בעציצים בנפח 10 ליטר, עם תערובת מצע גידול רם 8 (טוף מרום גולן). חלקת הניסוי כללה 10 פקעות אחידות מכל אחד מהקווים. פקעת האם נשתלה בנפרד יחד עם יחידות ריבוי נוספות (מאגר חומר ריבוי) שלא היו אחידות בגודלן או בשלב ההתפתחות הפיסיולוגי. הפקעות בניסוי מוספרו מ- 1-10 בעוד שהפקעת המקורית סומנה ב-0. תהליך זהה בוצע על קווי הביקורת.

שנת המחקר השלישית: בתאריך 30.8.2020 נשתלו פקעות לאחר חלוקה של אותם קווים כמו בשנת המחקר הקודמת.

1.2. **ביקורת:** שלושה קווים לא מוקרנים שמקורם מאותם זרעים (Ca) ועוד קו של קאלה אתיופית ישראלית (ZAI), ארבעת קווי הביקורת נחתכו ל-10 יחידות דומות.

### 1.3 תיאור הקווים והפרטים במעקב במהלך עונה 2019-2021

- 220 צמחים (יחידות ריבוי) נחתכו הושרשו והוכנסו למעקב 18 קווים מוקרנים + 4 קווים לא מוקרנים בקורת, טבלה 1).
- מכל אחד מהצמחים בניסוי הוכנו גם צמחי עתודה שלא שמשו במעקב.
- הניסוי הועמד ב- 31.10.2019 בבית רשת (30%) והפקעות הונבטו בצורה זהה.
- מעקב אחר גדילה והתפתחות בוצע על בסיס שבועי ואיסוף נתוני פריחה כל שבועיים עד 21.4.20. תקופת סגר קרוונה ראשון שיבשה את מהלך הבדיקות לקראת סוף עונת הגידול הקווים מוצגים בטבלה 1.
- מאפייני פריחה שנבדקו בהתאם למתואר בסעיף 2.1.

#### 1.3.1 קווים במעקב הפנוטיפי

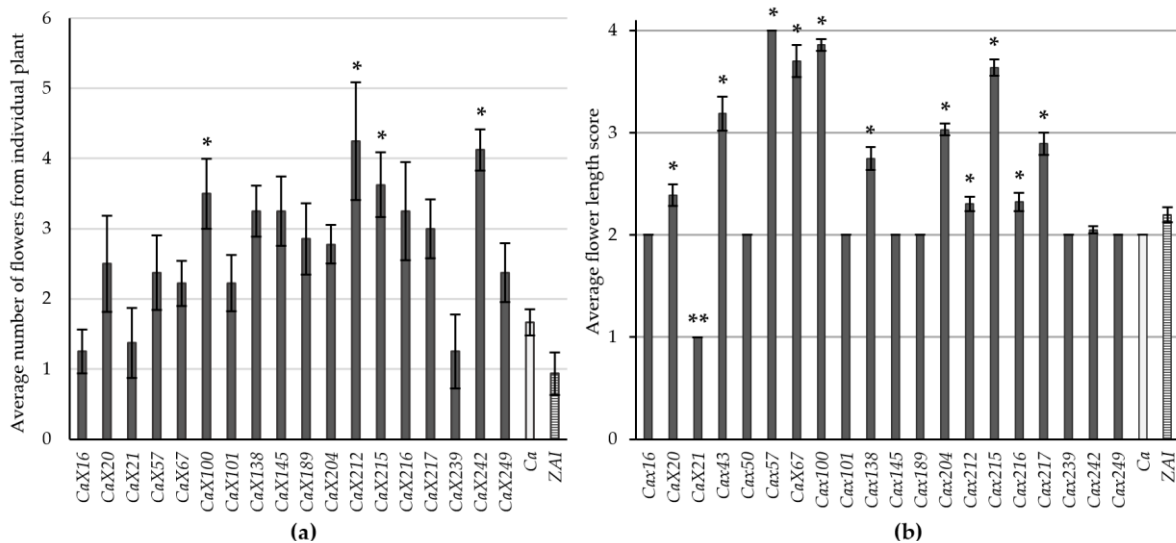
| #  | שם      | כמות | תכונה                                 | הערות                                    |
|----|---------|------|---------------------------------------|--|
| 1  | Ca20    | 10   | בקורת סימטריה מושלמת + פרח גדול + ריח | מופע מיוחד - בקורת לא מוקרן              |
| 2  | Ca 24   | 10   | בקורת                                 | לא מוקרן                                 |
| 3  | Ca31    | 10   | בקורת - גביע בהיר, זיר מושלם          | בקורת לא מוקרן                           |
| 4  | ZAI46   | 10   | בקורת                                 | בקורת ישראלית                            |
| 5  | CaX 16  |      | סימטריה מושלמת                        |  |
| 6  | CaX 50  | 10   | ריח חזק מאד                           | מופע מיוחד                               |
| 7  | Cax57   | 10   | סימטריה מושלמת                        |  |
| 8  | Cax67   | 10   | פרח גדול                              |  |
| 9  | CaX 97  | 10   | פרח בינוני פתוח                       |  |
| 10 | Cax100  | 10   | פרח ענק                               | מופע מיוחד - גדליה                       |
| 11 | Cax138  | 10   | פרח גדול עם כתמים ירוקים              | מופע מיוחד                               |
| 12 | CaX 160 | 10   | ריח חזק זיר כהה                       |  |
| 13 | CaX172  | 10   | סימטריה מושלמת                        |  |
| 14 | CaX 199 | 10   | עלווה ננסית                           |  |
| 15 | Cax204  | 10   | פרח עם גוון ירקרק                     | מופע מיוחד-מזכיר את <i>Green goddess</i> |
| 16 | Cax212  | 10   | הקדמת פריחה                           |  |
| 17 | Cax215  | 10   | הקדמת פריחה                           |  |
| 18 | Cax216  | 10   | הקדמת פריחה                           |  |
| 19 | Cax217  | 10   | סימטריה מושלמת + פרח גדול + זיר כהה   |  |
| 20 | Cax239  | 10   | סימטריה מושלמת + מרובה גבעולים        |  |
| 21 | Cax242  | 10   | זיר כהה                               | מופע מיוחד                               |
| 22 | CaX 304 | 10   | עלווה ננסית                           |  |

טבלה 1. צמחי קאלות בניסוי המעקב מעונות 2019-2021. מודגשים באפור צמחי בקורת. מודגשים בירוק צמחים שסומנו כבעלי הפוטנציאל הגבוה ביותר. מסומנים בכתום צמחים בעלי עלווה מובחנת ושונה.

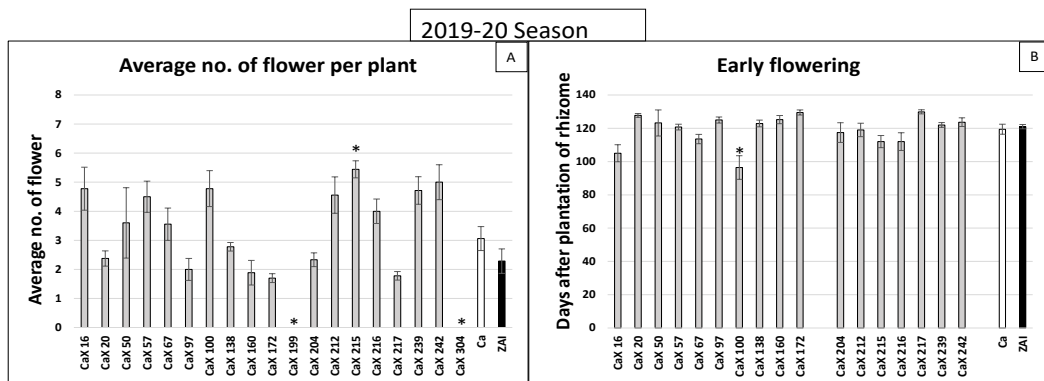
#### 1.4 תוצאות מעקב פריחה קאלה אתיופית מוקרנת

מעקב פריחה: בשנת הניסוי השנייה נאלצנו להחליף 5 קווים בקבוצת הניסוי שסבלה מדילול בעקבות מתקפת דרבנים. למזלנו מרבית הקווים שנבחרו כמצטיינים בעונה הראשונה המשיכו לבדיקה גם בעונה השנייה והשלישית. סיכום הנתונים עבור קבוצת הניסוי בעונה הראשונה ובעונות העוקבות מוצגים באיורים 1-3, תיעוד מצולם מוצג באיור 3.

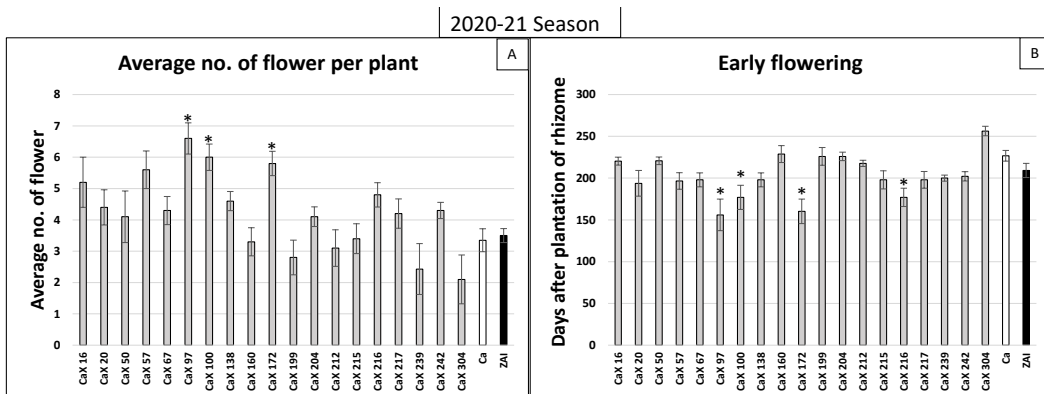
1.4.1. מועד פריחה עונת הפריחה החלה בסוף נובמבר 2019 עם הופעת הפרחים הראשונים ונמשכה עד אמצע אפריל 2020, כאשר סיום מועד הפריחה נקבע במידה רבה על סמך אילוצי הגעה למעבדה בעקבות הסגר ונאלצנו לסיים את העונה מעט מוקדם מהצפוי. ניתוח באמצעות מבחן מבחן ANOVA הכולל אנליזת Tukey-Kramer מוצג בנספח 3 לדו"ח.



איור 1. עונת גידול ראשונה. (a) יבול פרחים (b) גודל פרח מקווי קאלה אתיופיקה מוטנטים, בהשוואה לקווי ביקורת בעונת הגידול (2018–2019). מספר פרחים ממוצע לצמח מכל אחק מהקווים, מוצג בעמודות עם שגיאת תקן. (b) דירוג אורך הפרח של הקווים הנבחרים לקבוצות אורך, עפ"י הערכים הבאים: קבוצה 1- קטן (<5 ס"מ), קבוצה 2- בינוני (6-10 ס"מ), קבוצה 3- גדול (11-14 ס"מ), קבוצה 4- גדול מאוד (>14 ס"מ). הקווים המוטנטים מסומנים ב-CaX וקווי הביקורת ב-Ca. הזן הישראלי המקומי מסומן ב-ZAI. ערכים הנבדלים משמעותית מהביקורת מסומנים בכוכבית בודדת ( $p \leq 0.001$ ), שתי כוכביות מסמלות גודל קטן משמעותית ( $p \leq 0.001$ ).

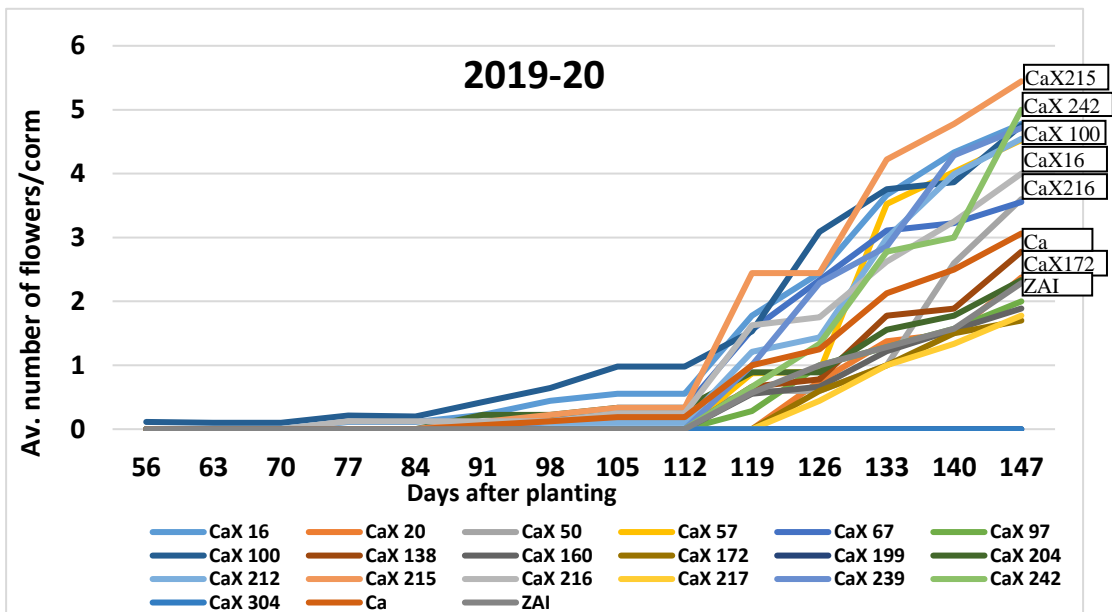


איור 2. אפיון פנוטיפי של קווים נבחרים של קאלה אתיופיקה לאחר חשיפה לקרינת X בעונת הגידול 2019-2020. Ca ו-ZAI משמשים כביקורת, הקווים שעברו הקרנה מסומנים ב-CaX. העמודות מציגות מספר ממוצע של 10 חזרות זהות  $\pm$  שגיאת תקן. הצמחים גדלים בעציצים נפרדים בתנאים טבעיים בבית רשת. חזרות המסומנות בכוכבית שונות מהביקורת Ca במידה מובהקת (student's t-test at  $P \leq 0.05$ ) שני קווים לא פרחו בעונה זו.

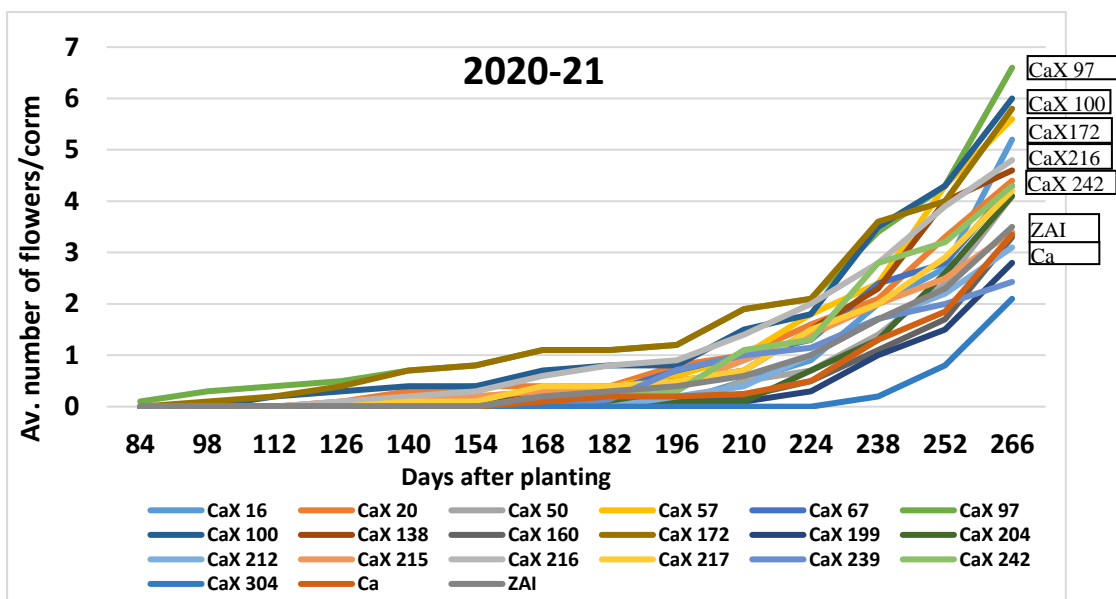


איור 3. אפיון פנוטיפי של קווים נבחרים של קאלה אתיופיקה לאחר חשיפה לקרינת X בעונת הגידול 2020-2021. Ca ו-ZAI משמשים כביקורת, הקווים שעברו הקרנה מסומנים ב-CaX. העמודות מציגות מספר ממוצע של 10 חזרות זהות  $\pm$  שגיאת תקן. הצמחים גדלים בעציצים נפרדים בתנאים טבעיים בבית רשת. חזרות המסומנות בכוכבית שונות מהביקורת Ca במידה מובהקת (student's t-test at  $P \leq 0.05$ ).

המעקב אפשר אפיון של הקווים המקדימים, ומשתנה חשוב זה לא נפגע. אולם, הכמות הכוללת של הפרחים לעונה לא הגיעה למיצוי. נתון זה התאזן בעונה שלאחר מכן שהגיעה לסיימה. הקווים CaX16, CaX97, CaX100, CaX172, CaX216 הציגו הקדמת פריחה והופעת פרח ראשון 60-80 יום משתילה בבית רשת ללא חימום. תופעה זו חזרה על עצמה בכל שנות התצפית. קווי הביקורת: הקו ZAI קאלה ישראלית וכן 3 קווי הביקורת הבלתי מוקרנים Ca פרחו רק 120 יום מתחילת הניסוי. גם תופעה זו חזרה על עצמה לאורך כל עונות המעקב. חלק מצמחי הניסוי הראו התנהגות פריחה דומה לקווי הביקורת, מספר קווים מוקרנים הראו תבנית דומה אך עם כמות פרחים כוללת גבוהה יותר מהביקורת (איור 2,3).



איור 4. כמות פרחים מצטברת ממוצע לפקעת במהלך העונה 2019-20, בקווים שונים של קאלה אתיופיקה לאחר הקרנה (CaX). בקורת משמשים צמחים ללא הקרנה (Ca) והזן ZAI.



איור 5. כמות פרחים מצטברת, ממוצע לפקעת במהלך העונה 2020-2021, בקווים שונים של קאלה אתיופיקה לאחר הקרנה (CaX). בקורת משמשים צמחים ללא הקרנה (Ca) והזן ZAI.

הקדמת פריחה הנה ללא ספק אחת התכונות החשובות ביותר עבור המגדלים וזן שיציג שיפור משמעותי בתכונה זו עשוי לייצר ערך כלכלי. כל הצמחים שהציגו פריחה מוקדמת היו מקבוצת הצמחים שעברו הקרנה ועל פי התוצאות עד כה התכונה נשמרת מעונה לעונה. זנים שאותרו כמקדימי פריחה הציגו הקדמת פריחה בתנאי סביבה משתנים ולמרות ההבדלים בחומר הריבוי ובמועדי השתילה בין העונות. הקו CaX 100 בלט לאורך כל עונות הגידול והצטיין בהקדמת פריחה. קו CaX 97 הקדים פריחה רק בעונת הגידול השנייה. לאחר שקלול של מספר תכונות, קו 100 וקו CaX97 נבחרו ע"י מגדלי קאלה להמשך בדיקה במשק מודל, בשנת המחקר הבאה.

#### 1.4.2 כמות פרחים:

כמות הפרחים מכל צמח מכל קו בביקורת ובניסוי תועדה לאורך כל תקופת הפריחה מרגע ההנצה ועד הנבילה של כל פרח. הנתונים אפשרו לחשב את כמות הפרחים הממוצעת לצמח בודד (יחידת ריבוי) מכל קו, אשר כלל 10 חזרות (פרטים) זהים מבחינה גנטית. באופן כללי צמחי הביקורת הציגו כמות פרחים ממוצעת Ca-ZAI או 2 ו-3, כאשר חלק מהמוטנטים המוקרנים מייצרים יותר פרחים ליחידת ריבוי וחלקם פחות, התפלגות צפויה מראש, היות והמוטגנזה אקראית. בערך כמחצית מהקווים שהתקבלו לאחר ההקרנה הציגו כמות פרחים גבוהה מקבוצת הביקורת, רק מיעוטם במידה מובהקת. יתכן כי חוסר ההדירות בתוצאות נובע מתנאי סביבה משתנים, הבדלים במנות הקור בתחילת החורף מהווים גורם משמעותי בהתעוררות לפריחה והחודשים החמים בסתיו משפיעים לרעה על מיצוי היבול. קיים שהציגו יבול גבוה בשנים עוקבות הינם CaX100, CaX 215, CaX 242.

ממוצע כמות הפרחים הכולל של קבוצת הביקורת לצמח בודד עמד על 2 פרחים לפקעת. הזנים המוקרנים המצטיינים עמדו על ממוצע של 4 פרחים או יותר בשתי עונות הגידול הראשונות ויותר מ 6 פרחים בעונת הגידול האחרונה. בעונת הקורונה סיום העונה המוקדם מנע הערכה מלאה של נתון זה. חשוב לקחת בחשבון הבדלים קטנים בגודל יחידת הריבוי בין העונות השונות ומשתנים נוספים כמו מזג האוויר. בעונה הראשונה חומר הריבוי פוצל מפקעת גדולה יחסית. בעונת הביניים חומר הריבוי היה קטן ואחיד מאוד בזמן השתילה פקעות בגודל 8-10. בעונה האחרונה נשתלו פקעות אחידות וגדולות יותר בגודל 10-12, שהופקו מחומר הריבוי של העונה הקודמת. הבדלים במספר הפרחים לפקעת בודדת נגזרים בין היתר מכמות העיניים לפקעת, נתון שלא ניתן לקבוע מראש, ומהשפעת גורמי סביבה, כאשר הגידול מתבצע במערכת בלתי מבוקרת. מספר פרחים לפקעת הינה תכונה העשויה לנבוע בין היתר מהבדלים גנטיים במידת השלטון הקודקודי של המריסטמה המרכזית ויתכן שקיים שונים נבדלים ביניהם בתכונה זאת. בכל מקרה, קיים מסוימים הציגו מספר פרחים גבוה יותר במידה מובהקת במספר עונות עוקבות ולמרות הבדלים בגודל הפקעת. ניתן להניח כי קיים אלה בעלי פוטנציאל יבול גבוה יותר מאחרים.

1.5 משתנים מורפולוגיים: לאורך עונות הפריחה בוצע מעקב אחר גודל הפרחים (גודל המתחל, אורך עמוד פריחה איור 4.) מכל צמח בכל קו שנבדק כאשר נקודת הייחוס נקבעה לפי אורך הפרח מבסיסו ועד לקצה המחודד בזמן הפתיחה ללא עמוד הפריחה. פרח קטן היה קצר מ- 5 ס"מ, בינוני 10-5 ס"מ וגדול 10-14 ס"מ. מופעים חריגים צוינו כענקים ובד"כ האורך שלהם היה גדול מ- 14 ס"מ. סכין פלסטיק חד-פעמי,

באורך של 18 ס"מ, שימש כקנה מידה ונקודת ייחוס, בתמונות של הפרחים (איור 6) ניתן לזהות ולהשוות בין הקווים את מאפייני הגודל על פי אובייקט הייחוס.

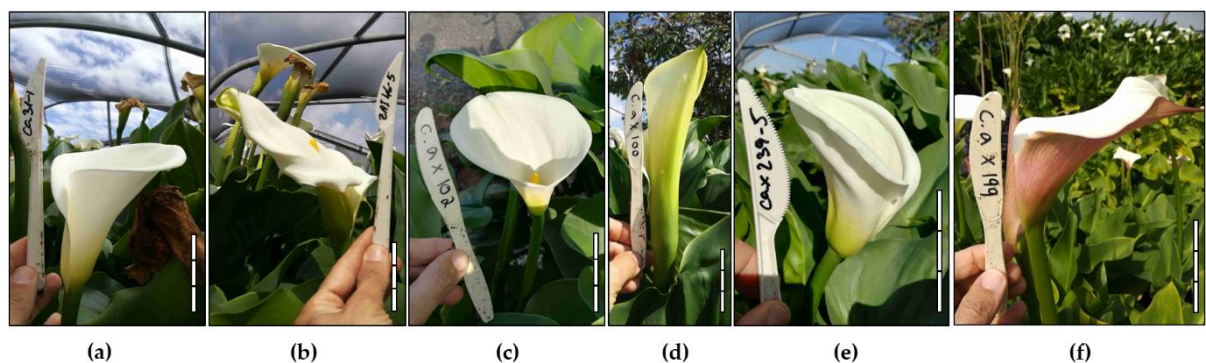
בניגוד לעונת הגידול הראשונה בה נצפה הבדל משמעותי באורך עלה המתחל בין קאלה שעברה הקרנה לצמחי ביקורת משתי הקבוצות, בשנות המחקר הבאות לא ניכר הבדל גדול באורך המתחל. בכל מקרה תמונה ריאלית תתקבל רק בבחינת המופע בתנאי המגדלים. הקווים CaX100/ CaX138/ CaX215 הציגו מופעי פרח מרשימים ועקביים לאורך העונות. בדיקת המובהקות שערכנו לא סיפקה תוצאה עבור גודל פרח או אורך מתחל (לא מוצג). קו CaX100 הציג פרח גדול מתחילת העונה ועד סופה בקרב כל החזרות. גודל הפרח ותכונות נוספות כמו גודל האבקנים שנבדקו, הציע כי ייתכן שהקו טטרהפלואידי. קו נוסף שהציג גודל פרח מרשים הינו קו CaX199, קו זה מצטיין גם בגוון ורוד ייחודי בעלה המתחל החיצוני (איור 6) ולכן גם הוא זכה להתעניינות בקרב מגדלים ויבחן במשק מודל בעונה הבאה. גודל הפרח תלוי במידה רבה גם בפרוטוקול הדישון והגידול ולכן חשוב לראות את הצמח גם בתנאי גידול מסחריים. בשיווק לשוק מקומי, גודל הפרח מהווה יתרון, אך בשיווק ליצוא הפרחים הגדולים מיקרים את עלות התובלה ולא תמיד יש בהם יתרון.

#### 1.6 ריח

קאלה אתיופית לבנה הינה חסרת ריח או בעלת ריח חלש לא מובחן שאינו מהווה מדד לזן. איתור קווים המפיצים ריח, במיוחד ריח טוב היווה אתגר נוסף במחקר. קווי הביקורת של קאלה אתיופית ישראלית, ZAI, נטולי ריח ואילו קווי הביקורת Ca (הלא מוקרנים) בעלי ריח עדין וחלש. הריח מתחיל להופיע אחרי שהפרח נפתח בצורה מלאה. מתוך קווי הניסוי, חמישה קווים לא הפיצו ריח, היתר הפיצו ריח בעוצמה משתנה, בלטו במיוחד הקווים Cax100/CaX16/CaX50/CaX138/CaX212.

#### 1.7 מופע ייחודי

מופע ייחודי הוגדר כמופע שונה משמעותית מהזן הישראלי וכזה שצפוי לו יתרון יחסי בשווקים מול קאלה אתיופית לבנה. נתוני המופעים הייחודיים נאספו מקווי הניסוי, הנוכחית, מספר קווים הראו מופעים ייחודיים ויפים ביניהם: קו CaX239 בעל פרחים עם סימטריה גביע מושלמת עם שוליים מעוגלים; קו CaX215 המציג קו ירוק בצדו החיצוני של הפרח; קו CaX199 המציג גוון ורוד בצדו החיצוני של המתחל; קו CaX100, עם פרח גדול, חלק ומושלם (איור 6).



איור 6. צילומי גביע הפרח של חלק מהקווים המשתתפים בניסוי. ביקורות a, b; פרח קטן מאוד ועגול, c; מוטציות מורפולוגיות שונות כולל צבע המתחל, d, e, f.



פירוט רחב של מופעים שהתקבלו כתוצאה מההקרנה ניתן גם בנספח 1 (2) המצורף לדו"ח זה. לאחר חשיפת הקווים למגדלים, ניכר כי כל מופע חריג מושך מאוד את העין וצפוי לדעתם להיות בעל ערך מסחרי. מופע חריג מגביר את הסיכויים לרשום את הקו כזן רשום, או לתת לו סימול מסחרי שעשוי לתת לו ערך מוסף מידי בבורסת הפרחים. צמחים שאינם משווקים תחת סימול מסחרי ביניהם קאלה אתיופיקה ישראלית, נמכרים מראש בסקאלת מחירים נמוכה יותר.

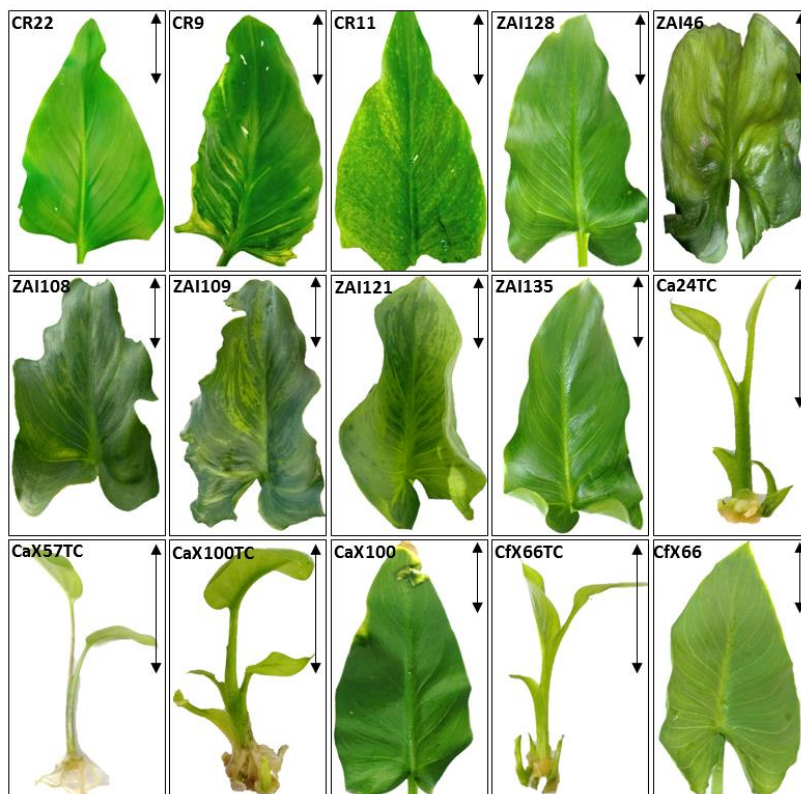
## 2.0 פיענוח וירום הקאלה הישראלית

RNA מצמחים המציגים סימפטומים הופק ונשלח לריצוף בארה"ב באוני' אילינוי שיקגו במעבדה של סטפן גרין. נתוני הריצוף עובדו ע"י דר' נעה סלע וזוהו מספר וירוסים המהווים חלק מוירום הקאלה. למרות הבדלים בסימפטומים שנשלחו לריצוף לא נמצא הבדל בהרכב הוירוסים בדוגמאות וכולן הכילו אותם וירוסים.

הוירוסים שנמצאו: *Dahlia mosaic virus* (11,735 bp in length) belongs to *Caulimovirus* – a DNA circular virus, *Dasheen mosaic virus/Zantedeschia mosaic virus/Konjac mosaic virus*, *Viroid* (372bp in length) וירואיד זה כרגע מוגבל בפרסום. נתוני הוירום נבדקו בבדיקות סימפלקס ומולטיפלקס PCR. המקטעים עברו ריצוף ואושרו ביחס לוירוסים ידועים במאגרי המידע. נמצא קשר בין התסמינים לנוכחות וירוסים ספציפיים, אולם נצפתה גם נוכחות שני וירוסים באותה רקמה. תוצאות העבודה

הביואינפורמטית והוירוסים שנמצאו מפורטות באיורים 7,8 וטבלה 2.

### 2.1 בדיקות לזיהוי וירוסים:

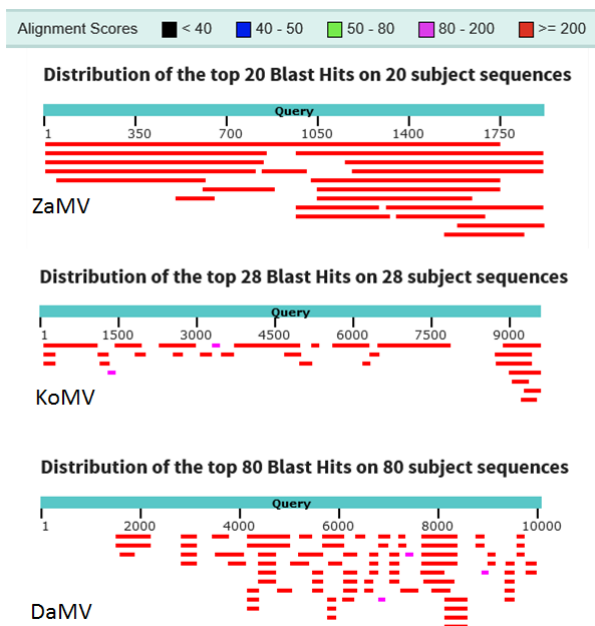


איור 7. אוסף דוגמאות עלים ששימשו לבדיקות נוכחות וירוסים ברקמה עלי קאלה אתיופית, חלקם מציגים סימפטומים אופייניים לנגיעות וירוסים בקאלה וחלקם נטולי סימפטומים ושימשו כביקורת. ZAI מייצג קאלה ישראלית, CaX מייצג קווים לאחר הקרנה בקרינת X, CR מייצג קאלה צבעונית, CFX מייצג ק. אתיופיקה מהזן פלמינגו. בנוסף נבחנו מספר צמחים שגודלו בתרבית לאחר מספר העברות מריסטמות לבחון תהליך אפשרי לניקוי מוירוס (TC). הסקאלה על גבי התמונה מציגה אורך של 5 ס"מ.

התוצאות שהתקבלו בעבודה הביואינפורמטית ורצפי פריימרים שפורסמו בספרות אפשרו לפתח שיטה המאפשרת בבדיקת PCR בודדת, לבחון נוכחות כלל ווירוסים בדוגמה. אותו הוירוסים שעלו מאנאליזת הוירום, בעזרת פריימרים שתוכננו במעבדה (רשימת הפריימרים מצורפת בנספח).

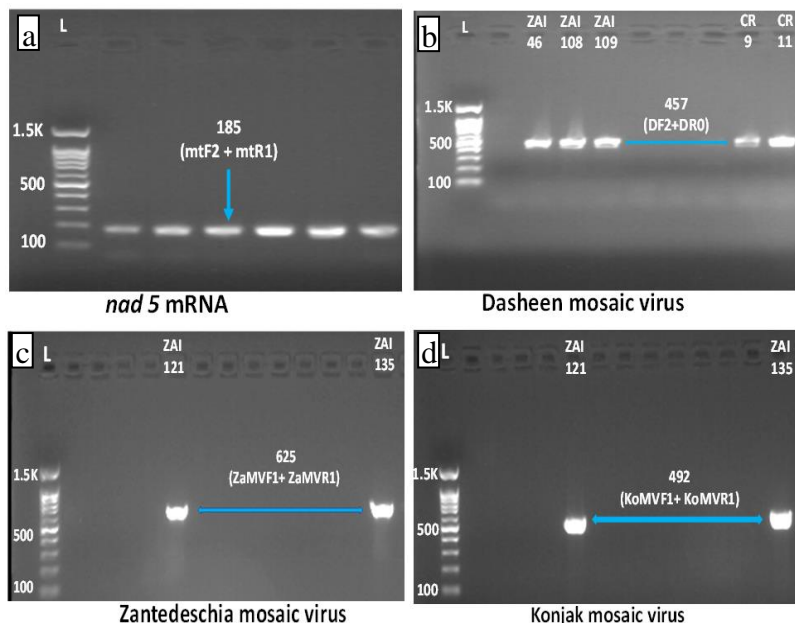
| analysis | Hit ID   | Number of contigs in |    |    |    |    |
|----------|----------|----------------------|----|----|----|----|
|          |          | V0                   | V1 | V2 | V3 | V4 |
| DaMV     | AF048981 | -                    | 2  | 2  | -  | -  |
|          | AJ298033 | 19                   | 5  | 2  | 5  | 14 |
|          | AJ298034 | -                    | -  | 2  | -  | -  |
|          | JX083210 | -                    | 3  | 2  | 5  | 14 |
|          | KT026108 | -                    | 5  | 5  | -  | -  |
| MG602227 | -        | 5                    | 7  | 5  | -  |    |
| MG602229 | 21       | 31                   | 34 | 4  | -  |    |
| MG602230 | -        | 3                    | 5  | -  | -  |    |
| MG602231 | -        | 1                    | 5  | -  | 15 |    |
| MG602232 | 20       | 3                    | 2  | -  | 17 |    |
| MG602233 | 23       | 3                    | 4  | -  | -  |    |
| KY242359 | -        | -                    | 4  | -  | 13 |    |
| KP729477 | -        | -                    | 1  | -  | -  |    |
| total    | 73       | 61                   | 75 | 19 | 73 |    |
| ZaMV     | AF470620 | 66                   | 2  | 2  | 5  | 5  |
|          | total    | 66                   | 2  | 2  | 5  | 5  |
| KoMV     | AB219545 | 18                   | -  | 1  | 4  | 7  |
|          | total    | 18                   | 0  | 1  | 4  | 7  |
| Viroid   | FJ751927 | 1                    | 1  | 1  | 1  | 1  |
|          | total    | 1                    | 1  | 1  | 1  | 1  |

| analysis | Total number of contigs in |    |    |    |    |
|----------|----------------------------|----|----|----|----|
|          | V0                         | V1 | V2 | V3 | V4 |
| DaMV     | 73                         | 61 | 75 | 19 | 73 |
| ZaMV     | 66                         | 2  | 2  | 5  | 5  |
| KoMV     | 18                         | 0  | 1  | 4  | 7  |
| Viroid   | 1                          | 1  | 1  | 1  | 1  |



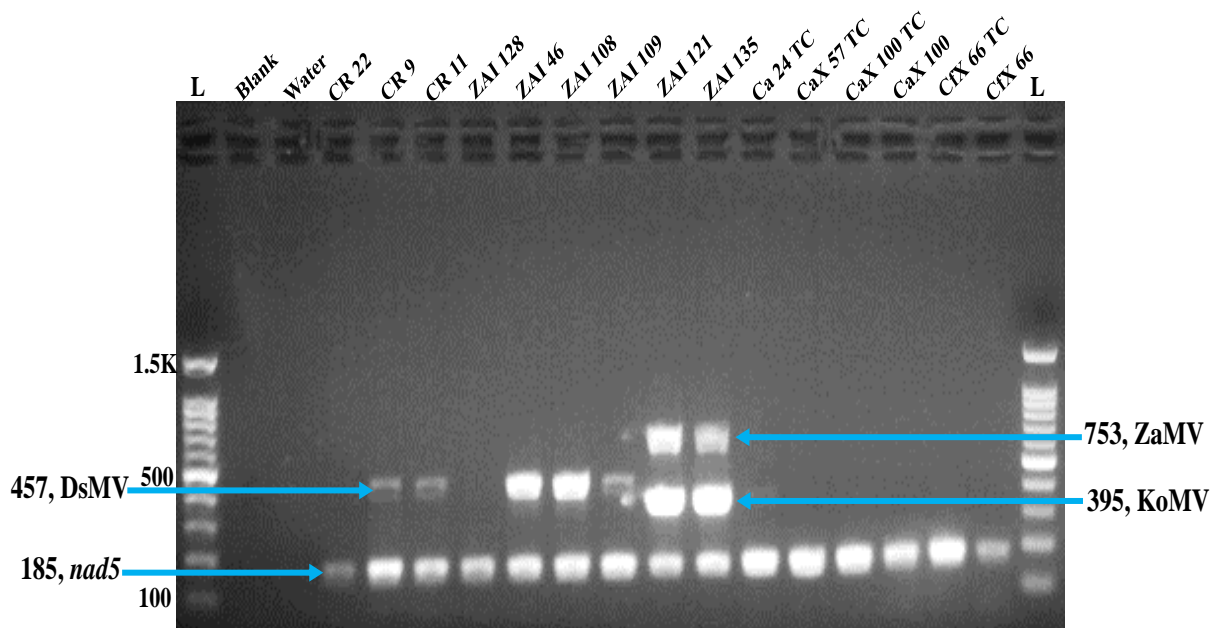
איור 8. הרכבת מקטעי הוירוסים שהתגלו לרצפים ידועים.

טבלה 2. תוצאות פיענוח הוירום: פירוט וירוסים שהתגלו ומספר קונטיגים מכל אחד מהוירוסים שהתגלו.



איור 9. תמונות ג'לים אגרוז - תוצאות Simplex PCR לרצפי וירוסים עם פריימרים ייחודיים לכל אחד מהוירוסים שעלו באנאליזת הוירום. (a) ביקורת חיובית לגן הצמחי המיטוכונדריאלי *nad5* (185bp), עם סט פריימרים mtF2+mtR1; (b) הגברת מקטע *DsMV* (457bp) עם פריימרים DRO+2DF, על צמחי קאלה אתיופיקה מהקווים ZAI 46, ZAI 109, ZAI 108, ZAI 9, CR 11, CR 9; (c) שני קווי ZAI עם פריימרים ל-*ZaMV* (625 bp) (ZaMVf1+ZaMVR1); (d) שני קווים ZAI - ZAI 121, ZAI 135, עם פריימרים ל-*KoMV* (492 bp) (KoMVf1+KoMVR1). ריכוז אגרוז 1.5% בבופר TAE 0.5%.

התוצאות מראות כי ניתן לאתר את הוירוסים כל אחד בנפרד בריאקציית PCR בעזרת פריימרים ידועים שעברו התאמה קלה בהתאם לרצפים שהתקבלו במאנאליזת הוירום. כדי להפוך את האנאליזה לנוחה יותר ולנסות לאתר את הוירוסים גם בחומר מתרבית רקמה במטרה לנקות את חומר הריבוי מוירוסים, נבחנה ריאקציית מולטיפלקס עם מספר רצפים הנבדקים בו זמנית.



איור 10. תמונת ג'ל אגרוז המציגה תוצאות multiplex PCR של וירוסים בדוגמאות קווים שונים של צמחי קאלה. התערובת כללה פריימרים ספציפיים להגברה של 3 וירוסים פוטנציאליים וגן ביקורת פנימית מיטוכונדריאלי *nad5*. ריכוז אגרוז 1.5% בבופר TAE 0.5%.

ניתן לראות כי ראקציית המולטיפלקס מאפשרת זיהוי בו זמנית של מספר וירוסים. מסתמן כי צמחים שהיו נגועים ב-DsMV לא היו נגועים בוירוסים אחרים, אולם צמחים שהיו נגועים ב-ZaMV הראו גם נגיעות ב-KoMV. ניתן לראות כי חלק מהקווים המוטנטים שהשתתפו בניסוי היו נקיים מוירוס, וכל הצמחים שעברו ניקוי דרך תרבית רקמה היו נקיים. נתון מעודד במטרה להצליח לייצר חומר צמחי נקי מוירוס.

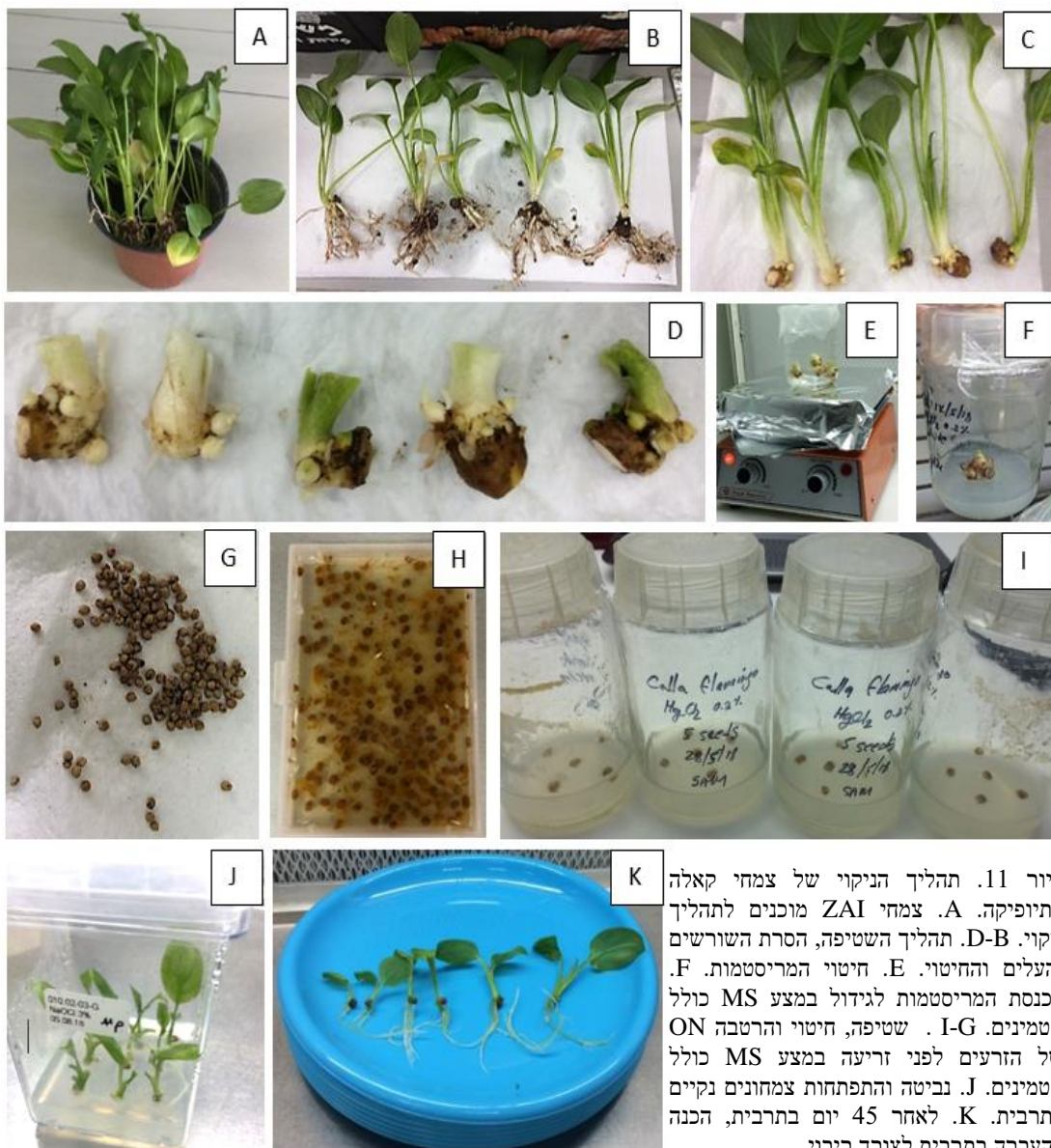
#### אנאליזת רצפים:

המקטעים שהתקבלו בריאקציות ה-PCR עברו ניקוי ונשלחו לריצוף במכון וויצמן. עבור כל אחד מהמקטעים נקבע רצף קונצנזוס והשווה למאגר NCBI. נמצאה רמת דמיון של מעל 95% לחלבון המעטפת של DsMV במקטעים שרוצפו מ-CR 9 ומ-ZAI 46. התוצרים שבודדו מ-ZAI 135 ומ-ZAI 121 הציגו רמת דמיון של מעל 96% לרצף ZaMV במאגר. התוצרים מ-ZAI 135 ו-ZAI 121 עם פריימרים ל-KoMV הציגו רמה של יותר מ-98% דמיון ל-KoMV מק. אתיופיקה ו-93% דמיון לאתו וירוס מקונג'אק, אך גם לרצפים של וירוסים נוספים מצמחים שונים לגמרי כמו *Tamarillo leaf malformation virus* ו-*Pokeweed mosaic virus isolate PkMV*. פיענוח וירוס הקאלה הישראלית אינו בהכרח בעל חשיבות חקלאית אך יש לו חשיבות מדעית להבנת הפתוגנים הקיימים בצמחי נוי ועשויים להשפיע גם על צמחי תועלת אחרים. לניקוי מוירוס במיוחד בגידולי גיאופיטים יש ערך שיווקי ומיתוגי. מדינות רבות מעדיפות חומר ריבוי נקי מוירוס. נכון לכתובת ההצעה לא ידוע על השפעת הוירוסים על יבול בגידול מסחרי, או על מופע הפרחים. הניקוי יאפשר לבחון השפעה כזאת בעתיד.

**3.0 פיתוח פרוטוקול בתרבית רקמה:** פיתוח פרוטוקול ריבוי בתרבית, חשוב עבור כל גידול וגטטיבי ככלי לייצור המוני של חומר ריבוי איכותי ונקי. ק. אתיופיקה בניגוד להיברידיים בקבוצת הקאלה הצבעונית, הנה

גידול שקשה לייצר ממנו קאלוס, וקשה ואולי בלתי אפשרי להכניסו לתהליך רגנרציה. בספרות קיימים דיווחים בודדים להצלחה בגידול זה, מרביתם אינם מציגים ייצור קאלוס, וכאשר קיים קאלוס לא מוצג תהליך רגנרציה [16]. לאחר תהליך של האבקה עצמית מכוונת ע"י העברת אבקה בין צמחים מאותו קו, הצלחנו בשנים קודמות לקבל זרעים ממספר קוים. כדי להתגבר על זיהומים הנפוצים מאוד ברקמה הווגטיבית התחלנו את התהליך מזרעים.

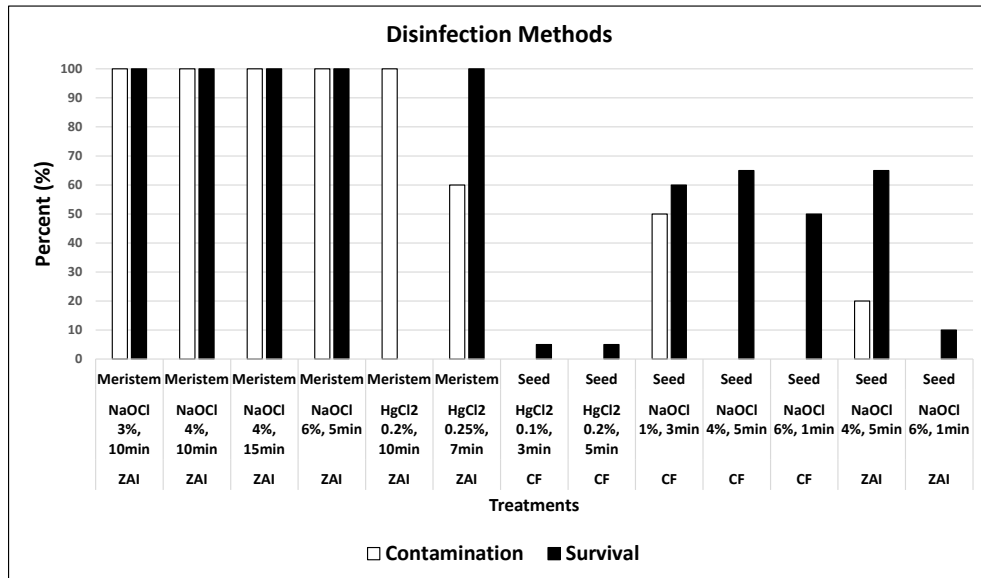
3.1 פיתוח תהליך חיטוי להכנסת חומר צמחי של ק. אתיופיקה לתרבית: כדי לבסס תרבית יש צורך לפתח פרוטוקול ניקוי לחומר הצמחי שיאפשר מניעת זיהומים תוך צמצום פגיעה ברקמה הצמחית. איור 11, מתאר תהליך ניקוי וריבוי מזרעים ומרקמה מריסטמטית.



איור 11. תהליך הניקוי של צמחי קאלה אתיופיקה. A. צמחי ZAI מוכנים לתהליך ניקוי. D-B. תהליך השטיפה, הסרת השורשים והעלים והחיטוי. E. חיטוי המריסטמות. F. הכנסת המריסטמות לגידול במצע MS כולל ON ושטיפה, חיטוי והרטבה של הזרעים לפני זריעה במצע MS כולל ויטמינים. I-G. חיטוי והרטבה של הזרעים לפני זריעה במצע MS כולל ויטמינים. J. נביטה והתפתחות צמחונים נקיים בתרבית. K. לאחר 45 יום בתרבית, הכנה להעברה בתרבית לצורך ריבוי.

פרוטוקול החיטוי כלל חשיפה למשכי זמן שונים ולריכוזים שונים של נתרן היפוכלורי (היפוכלורית) או כספית כלורית.

התוצאות (איור 12) הראו כי הטיפול המועדף בזרעים היה 4% היפוכלורייט למשך 5 ד', הטיפול הציג את רמת הזיהום הנמוכה ביותר ואפשר הישרדות של מעל 60% בזרעים. הטיפולים בתרבית מריסטמית שהופקה מפקעיות, היו יעילים פחות בניקוי זיהומים אולם שיעור הישרדות היה גבוה וניתן היה בעזרת 0.25% כספית כלורית למשך 7 דקות להשיג מספיק חומר צמחי נקי להמשך העבודה.



איור 12. תהליכי החיטוי שבוצעו ברקמות שונות של ק. אתיופיקה והשפעתם על מידת ההשרדות ועל התפתחות זיהומים בתרבית (%). בכל טיפול נבחנו 40 זרעים או 40 מריסטמות.

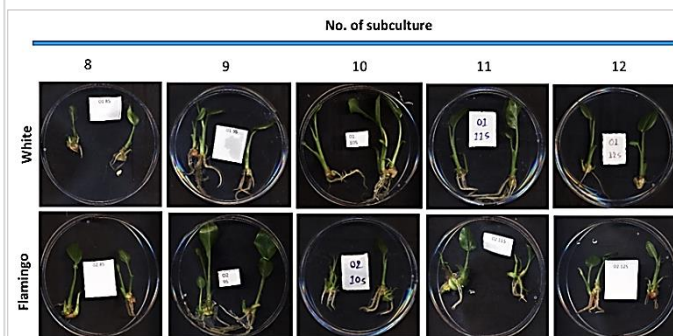
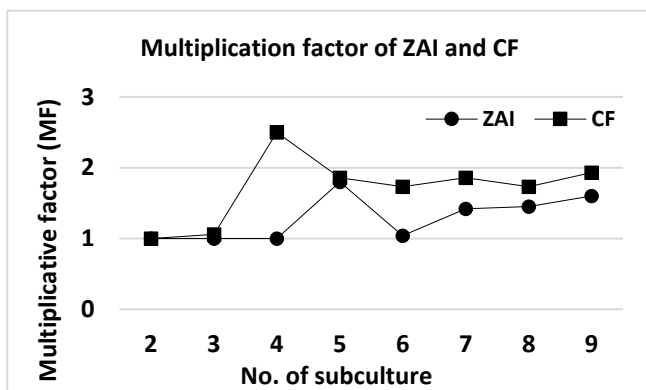
### 3.2 קביעת פקטור ריבוי לקווים שונים: פקטור החלוקה/ריבוי הראשוני לקווים שהוכנסו לתרבית נקבע

על סמך מספר הצמחים שהתקבלו בכל העברה ביחס למספר הצמחים שהיו בהעברה קודמת. כל העברה בוצעה במרווח של חודש. במהלך 12 העברות נמצא כי פקטור החלוקה של שני קווי ק. אתיופיקה שנבחנו ק. לבנה ופלמינגו בעלת גוון ורדרד היה זהה, עם יתרון קל לזן פלמינגו.

*Multiplication factor (MF)*

$$= \frac{\text{Total number of shoots transferred to new media}}{\text{Total number of plants in previous media}}$$

המצע המועדף לבחינת פקטור הריבוי היה מצע MS (4.4 g/L) עם ויטמינים, אגר (0.8%), סוכרוז (3%), NAA (0.2 mg/L), BAP (2 mg/L).



**איור 13.** פקטור החלוקה של ק. אתיופיקה לאחר הכנסה לתרבית נבדקה ק. לבנה לעומת הזן הורדרד פלמינגו ע"ג מצע המעודד התפתחות נצר. בפאנל הימני תמונות מקדמי החלוקה של הזנים בהתאם למספר ההעברות.

**3.3 שיפור מצע הגידול במטרה להגביר את מקדם החלוקה:** נבדקו 5 קווים שונים של ק. אתיופיקה. חמשת הקווים גודלו בארבעה מצעים שונים המפורטים בטבלה 3. איור 13 מציג את ההבדל במקדמי החלוקה בין ק. אתיופיקה לבנה וק. אתיופיקה ורדרדה מהזן פלמינגו ע"ג אותו מצע. בצילום מוצג פקטור החלוקה של זנים שונים של ק. אתיופיקה מקווי הניסוי וק. אתיופיקה מהזן פלמינגו על גבי המצעים השונים. מקדם חלוקה נחשב מספר הצמחים בתרבית חדשה לעומת התרבית הקודמת. כל העברה בוצעה במרווח של חודש מהקודמת.

| Experimental media for subculture |               |           |         |       |         |            |
|-----------------------------------|---------------|-----------|---------|-------|---------|------------|
| Media                             | MS + vitamins | Sugar (%) | AdS     | 6-BAP | IBA     | Plant agar |
| 1                                 | 4.4g/l        | 3%        | -       | -     | -       | 0.8%       |
| 2                                 | 4.4g/l        | 3%        | 100mg/l | -     | -       | 0.8%       |
| 3                                 | 4.4g/l        | 3%        | 100mg/l | 2mg/l | 0.5mg/l | 0.8%       |
| 4                                 | 4.4g/l        | 3%        | 100mg/l | 4mg/l | 1mg/l   | 0.8%       |

| Lines Selected for experiment |
|-------------------------------|
| CaX 100-2                     |
| CaX 57-3                      |
| CfX 66                        |
| Cf 12                         |
| Ca 24-7                       |

**טבלה 3.** ארבעה מצעי גידול וחמישה זני קאלה נבדקו להשפעתם על מקדם החלוקה של הצמחים.

השפעה חיובית על מקדם החלוקה/ריבוי נמצאה למדיום M4, M3 עם יתרון קל למדיום M4 (איורים 14-16). מצע M3 הראה השפעה רק על חלק מהקווים, מצע M4 לעומתו נתן תוצאה חיובית על כל הזנים. מצע המכיל AdS אדנין סולפאט בריכוז של 100mg/L כמו גם אוקסין וציטוקינין נמצא המוצלח ביותר להגברת מקדם הריבוי בכל הקווים הנבדקים. AdS ידוע כמגביר יצירת נצר ומונע התפתחות נקרוזות בתהליכי רגנרציה. בבחינת מקדמי החלוקה על 4 המצעים השונים, נמצא כי המצעים 1 ו-2 לא נתנו שום יתרון בריבוי. ניכר כי המצע שהכיל את הריכוז הגבוה ביותר של שני ההורמונים BAP ו- IBA נתן את התוצאות הטובות ביותר. מכאן שלצורך ריבוי מיטבי נדרש גם אוקסין (IBA) הקשור בד"כ לשיפור ההשרשה וגם ציטוקינין (BAP) המעורב בתהליכים התפתחותיים רבים בצמחים ובחלוקת תאים. הריכוז

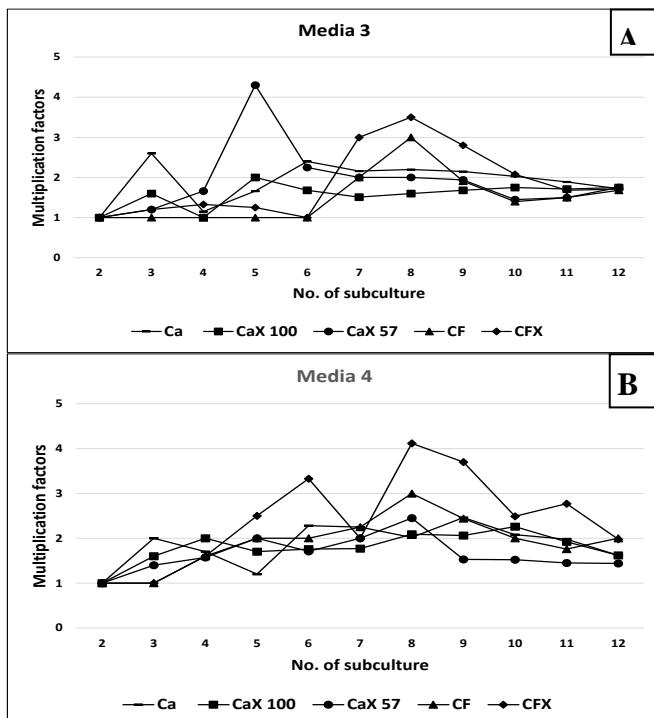
הגבוה ביותר של שניהם במצע 4 היה בעל ההשפעה הרבה ביותר על מקדם הריבוי בכל הקווים שנבחנו. דוגמא לפעילות הזאת נתונה באיור 15.

מקדם הריבוי במהלך ההעברות אינו קבוע ומציג לעיתים קרובות תנודה גלית. ניכר כי בהעברה ה- 8 הוא מגיע לפיק של שני סוגי המצעים ואחר כך חלה ירידה. בספרות מייחסים את הירידה להצטברות של

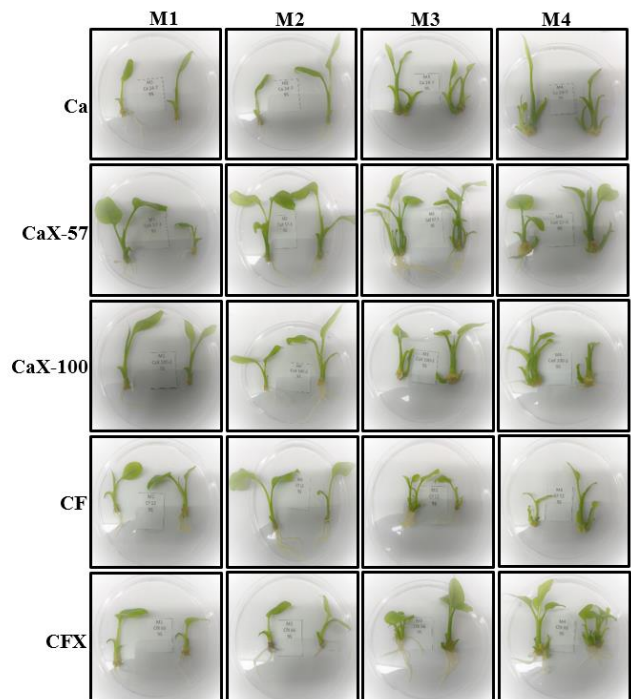
## Media

| Subculture | M1      |           |          |       |        | M2      |           |          |       |        | M3      |           |          |       |        | M4      |           |          |       |        |
|------------|---------|-----------|----------|-------|--------|---------|-----------|----------|-------|--------|---------|-----------|----------|-------|--------|---------|-----------|----------|-------|--------|
|            | Ca 24-7 | CaX 100-2 | CaX 57-3 | CF 12 | CFX 66 | Ca 24-7 | CaX 100-2 | CaX 57-3 | CF 12 | CFX 66 | Ca 24-7 | CaX 100-2 | CaX 57-3 | CF 12 | CFX 66 | Ca 24-7 | CaX 100-2 | CaX 57-3 | CF 12 | CFX 66 |
| 3          | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 2.66    | 1.66      | 1.16     | 1     | 1.2    | 2       | 1.66      | 1.33     | 1     | 1      |
| 4          | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1.125   | 1         | 1.66     | 1     | 1.25   | 1.66    | 2         | 1.5      | 1.5   | 1.5    |
| 5          | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1.66    | 2         | 4.33     | 1     | 1.2    | 1.2     | 1.7       | 2        | 2     | 2.5    |
| 6          | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 2.4     | 1.7       | 2.2      | 1     | 1      | 2.28    | 1.76      | 1.71     | 2     | 3.33   |
| 7          | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 2.16    | 1.5       | 2        | 2     | 3      | 2.25    | 1.77      | 2        | 2.25  | 2      |
| 8          | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 2.21    | 1.61      | 2        | 3     | 3.5    | 2.02    | 2.09      | 2.45     | 3     | 4.12   |
| 9          | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 1       | 1         | 1        | 1     | 1      | 2.15    | 1.68      | 1.45     | 1.4   | 2.8    | 2.46    | 2.06      | 1.53     | 2.44  | 3.7    |
| 10         | 1       | 1         |          |       |        | 1       | 1         |          |       |        | 1.89    | 1.75      |          |       |        | 2.08    | 1.9       |          |       |        |

איור 14. תוצאות גידול קווים שונים של ק. אתיופיקה במצעי גידול שונים ומידת השפעתם על מקדם הריבוי.

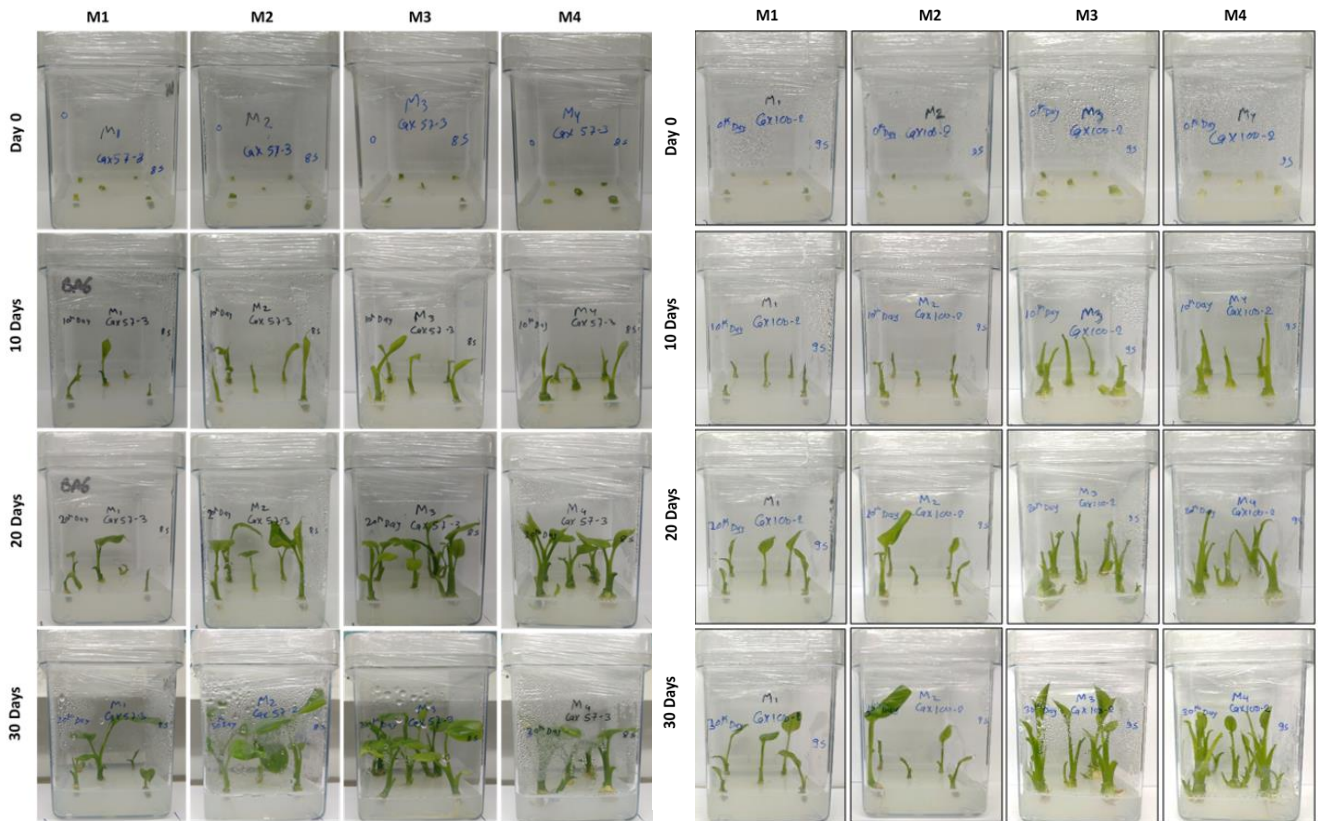


איור 15. מקדם הריבוי של קווי הניסוי על גבי המצעים 3 למעלה ו-4 למטה, כפונקציה של מספר ההעברות. הקווים CaX57 ו-CaX100 הינם קווים לאחר מוטגנזה. הקו Ca הינו קו ביקורת והקווים CF ו-CFX הינם מהזן פלמינגו של קאלה אתיופיקה.



איור 16. הבדלים מורפולוגיים בהתפתחות קווים שונים של קאלה אתיופיקה על המצעים 1M, 2M, 3M, 4M. הקווים CaX57 ו-CaX100 הינם קווים לאחר מוטגנזה. הקו Ca הינו קו ביקורת והקווים CF ו-CFX הינם מהזן פלמינגו של ק. אתיופיקה. הצילום לאחר 30 יום מהעברה.

האיורים הבאים (איור 17, 18) מציגים את ההתפתחות של שני קווים מוטנטים הקו CaX57 והקו CaX100 שהוא קו מצטיין, לאחר העברה מריסטמטית למצעי הריבוי השונים. ניתן לראות את שיגשוג הצמחונים לאחר 30 יום על המצעים M3 ו-M4. כיון שהשיטה מתבססת על חלקות מריסטמטיות ולא על יצירת קאלוס ורגרציה, תהליך הריבוי מוגבל ואינו גבוה יותר מחלוקות מקובלות בגידול, המתבצעות ע"י חיתוך הפקעות ליחידות ריבוי והשרשתן במצע גידול. יתרון גדול לגישה הנוכחית מתקבל בתהליך ניקוי חומר הריבוי מוירוס, המתקבל במהלך ההעברה המריסטמטית.



**איור 17. השינויים המורפולוגיים של קו CaX100 בתרבית לאחר 8 העברות. הצילום נערך בזמן 0, 10, 20, 30, ימים לאחר ההעברה בארבעה מצעים שונים.**

**איור 18. השינויים המורפולוגיים של קו CaX 57 בתרבית לאחר 8 העברות. הצילום נערך בזמן 0, 10, 20, 30, ימים לאחר ההעברה בארבעה מצעים שונים.**



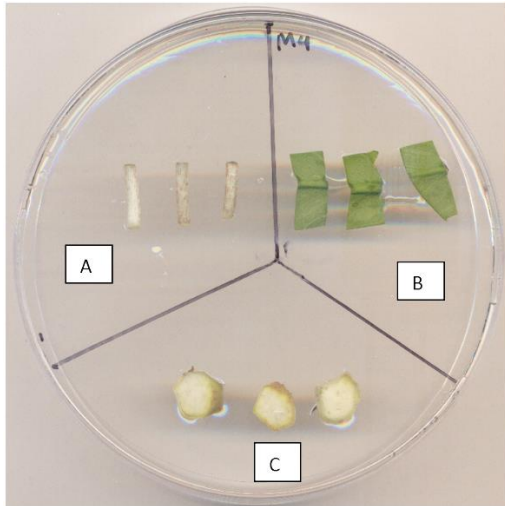
### 3.4. השפעת הרכב המצע על יצירת קאלוס בקווים של ק. אתיופיקה:

נבחנה השפעת מצעי גידול שונים על יצירת קאלוס. ייצור קאלוס והצלחה בתהליך רגנרציה מקאלוס, עשויים להוות פריצת דרך בפתוח ק. אתיופיקה נקייה בתרבית. ייצור קאלוס בק. אתיופיקה (בניגוד לק. צבעונית) הוא תהליך קשה. דה-דיפרנציאציה ורגנרציה בחלק מהצמחים קשים מאוד לביצוע והסיבות לכך לא תמיד ידועות. הידע בספרות בנוגע לק. אתיופיקה מוגבל מאוד, כנראה בגלל הקושי לקבל פרוטוקול יעיל. דיווחים קיימים בספרות מציגים יצירת קאלוס אך לא רגנרציה. במהלך שנות המחקר עד כה, לא הצלחנו לפתח קאלוס יעיל בתרבית. פפוטורות הסתמנו כמקור ראשוני יעיל ליצירת קאלוס, תוצאה שהתקבלה לראשונה. התוצאות המבטיחות ביותר התקבלו על קאלוס אשר נוצר מפקעות, אך ניתן להפיק קאלוס גם מפטוטורות עלים. סוגי המצעים בהם השתמשנו מפורטים בטבלה 4.

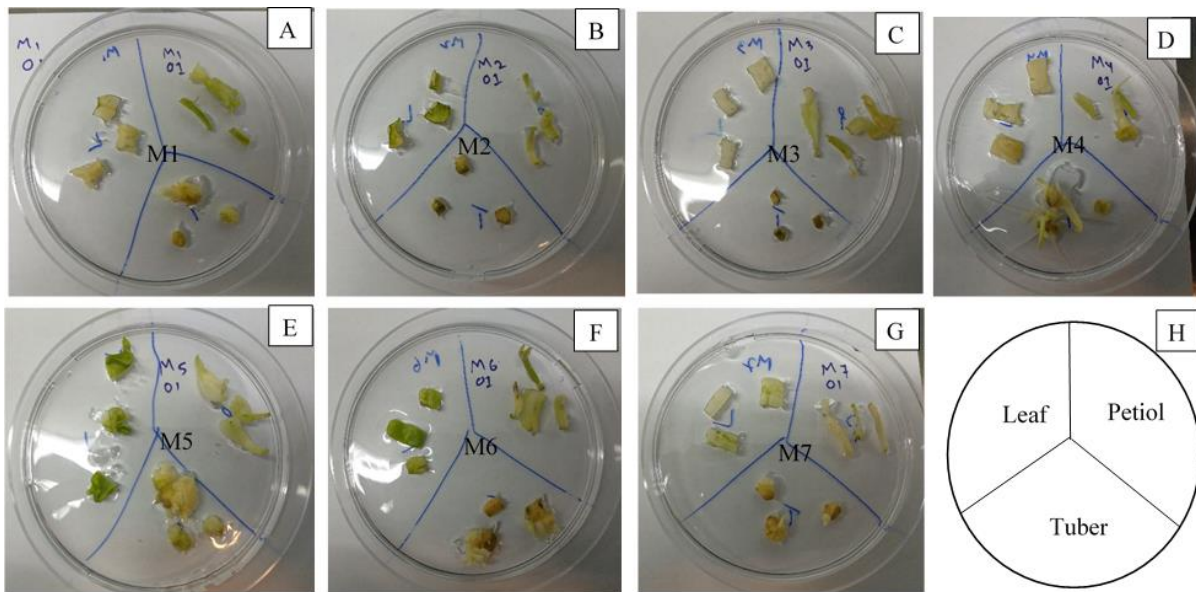
האקספלנטים שנבחנו הינם: עלים, פטוטורות, ופקעות (איור 19). חלקי הצמח נלקחו מצמחים שכבר הוכנסו לתרבית, כדי להימנע מזיהומים נוספים. האקספלנטים נשמרו בתנאי יום קצר (8 ש' אור/16 ש' חשיכה) או בחושך מוחלט. יצירת קאלוס נצפתה רק בחלקי צמחים ששהו בחשיכה מוחלטת. הקאלוס הראשוני התקבל לאחר חודש בתנאי המצע האינדוקטיבי. המצעים היחידים שהובילו ליצירת קאלוס מתוך 15 צירופים שנבחנו כללו 2,4D ו-BAP או BA (6-Benzylaminopurine, benzyl adenine, ) ציטוקינין סינתטי מצעים 8 ו-9 המפורטים בטבלה 4.

| Media | MS + vitamins | Sugar (%) | 6-BAP    | Zeatin | Kinetin | TDZ     | 2,4-D  | NAA    | IAA    | Gerlite  |
|-------|---------------|-----------|----------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|----------|
| 1     | 4.4g/l        | 3%        |          |        |         | 0.5mg/l |        |        |        | 2.5 gm/l |
| 2     | 4.4g/l        | 3%        |          |        |         | 1.5mg/l |        |        | 2mg/l  | 2.5 gm/l |
| 3     | 4.4g/l        | 3%        |          |        |         | 2mg/l   |        |        |        | 2.5 gm/l |
| 4     | 4.4g/l        | 3%        |          |        |         | 5mg/L   |        |        |        | 2.5 gm/l |
| 5     | 4.4g/l        | 3%        | 5 mg/l   |        |         |         |        |        | 1 mg/l | 2.5 gm/l |
| 6     | 4.4g/l        | 3%        |          | 5 mg/l |         |         |        |        |        | 2.5 gm/l |
| 7     | 4.4g/l        | 3%        |          |        |         |         | 1 mg/l |        |        | 2.5 gm/l |
| 8     | 4.4g/l        | 3%        | 3 mg/l   |        |         |         | 1 mg/l |        |        | 2.5 gm/l |
| 9     | 4.4g/l        | 3%        | 0.5 mg/l |        |         |         | 1 mg/l |        |        | 2.5 gm/l |
| 10    | 4.4g/l        | 3%        | 3 mg/l   |        |         |         |        |        | 1 mg/l | 2.5 gm/l |
| 11    | 4.4g/l        | 3%        | 2 mg/l   |        |         |         |        |        | 1 mg/l | 2.5 gm/l |
| 12    | 4.4g/l        | 3%        | 1 mg/l   |        |         |         |        |        | 1 mg/l | 2.5 gm/l |
| 13    | 4.4g/l        | 3%        |          |        | 1 mg/l  |         |        |        | 2 mg/l | 2.5 gm/l |
| 14    | 4.4g/l        | 3%        |          |        | 2 mg/l  |         |        |        | 2mg/l  | 2.5 gm/l |
| 15    | 4.4g/l        | 3%        | 2 mg/l   |        |         |         |        | 2 mg/l |        | 2.5 gm/l |
| 15    | 4.4g/l        | 3%        | 0.5 mg/l |        |         |         |        | 2mg/l  |        | 2.5 gm/l |

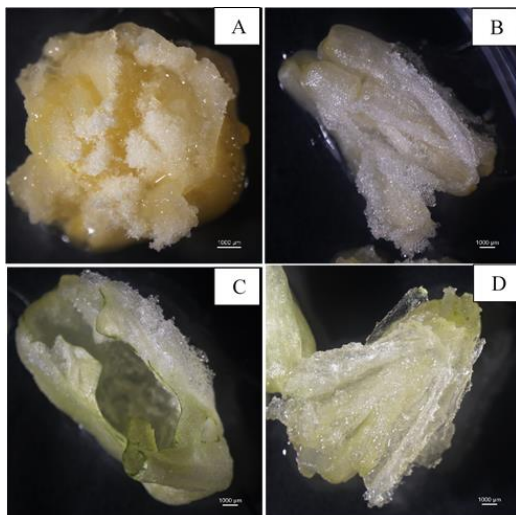
טבלה 4. המצעים השונים שנבדקו לצורך יצירת קאלוס באקספלנטים של ק. אתיופיקה.



איור 19. אקספלנטים של קאלה אתיופיקה אשר שימשו ליצירת קאלוס על inducing media (CIM) 4.4 g/l MS with vitamins, 3% sugar, 5mg/l Thidiazuron (TDZ) and 0.25% gelrite. A. פטוטרות, B. עלים, C. פקעות.



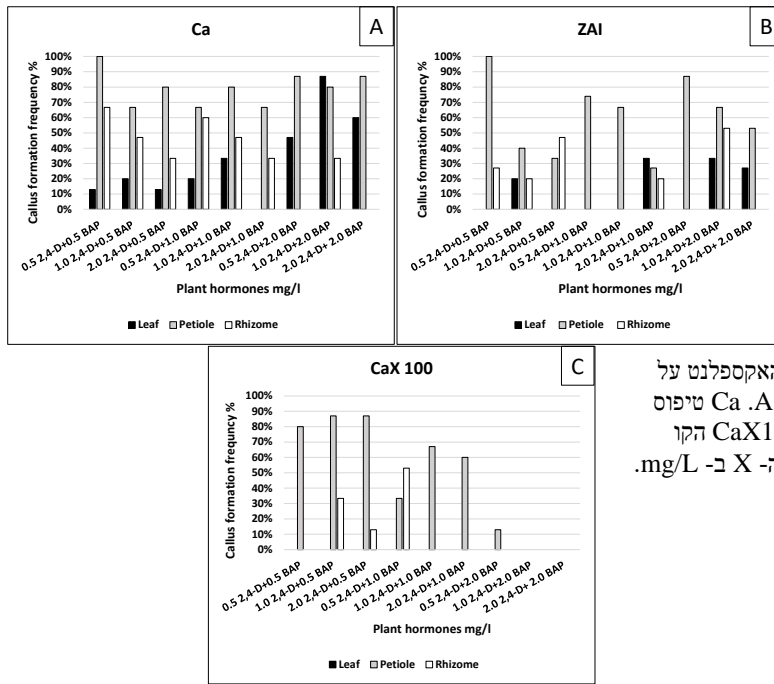
איור 20. סידור אקספלנטים מ-ק. אתיופיקה עם כיוון השעון: פטוטרות, פקעת, עלים, בצלחות פטרי המכילות צירופים שונים של מצעים משרי דה-דיפרנציאציה- לצורך קבלת קאלוס בצמחים.



לאחר כחודש במצעים השונים (איור 21) בחשיכה, התחילו להופיע מקבצי תאים המסתמנים כקאלוס בעיקר ע"ג חלקי פקעת. כדי להצליח לקבל קאלוס קומפקטי ואולי רגנרטיבי, נבחנו 9 צירופים שונים של מצעים אשר נגזרו ממצע 8 ו-9.

איור 21. התחלת יצירת קאלוס על פני הרקמה הצמחית. A. פקעת ק. אתיופיקה ע"ג מצע M9. B. פטוטרת עלה ע"ג מצע M8. C. עלה על מצע M8. D. פטוטרת ק. אתיופיקה מהזן פלמינגו על מצע M8.

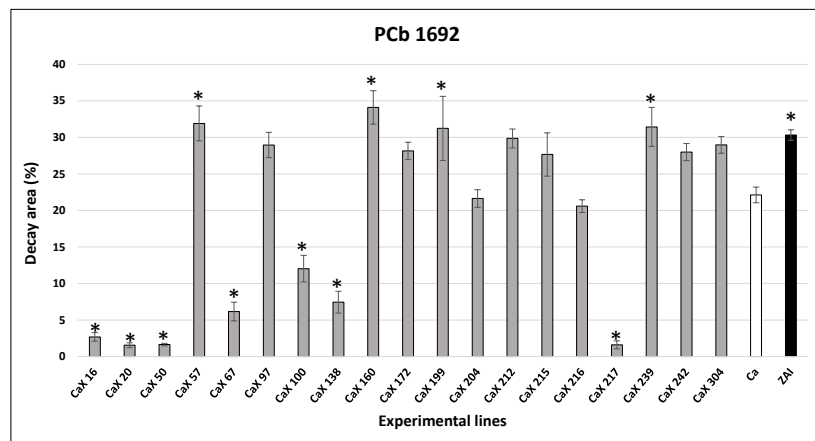
התוצאות מובאות להלן באיור 22.



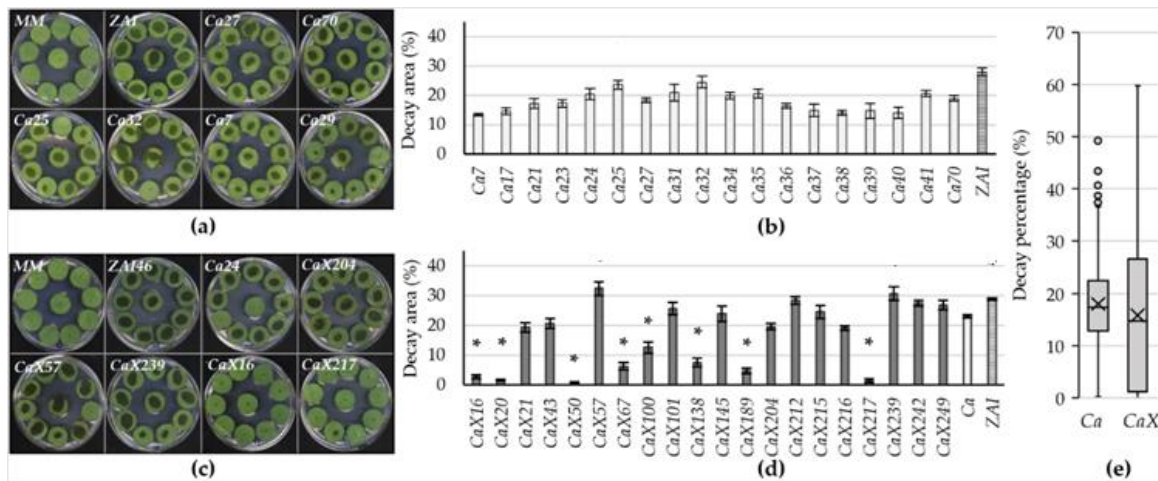
איור 22. השפעת הורמונים שונים וסוג האקספלנט על תדירות יצירת קאלוס מקאלה אתיופיקה. A. Ca טיפוס הבר שלא עבר הקרנה. B. ZAI. C. CaX100. המוקרן. ריכוזי ההורמונים נתונים בציר ה-X ב-mg/L.

ניתן לראות כי הפטוטרות נתנו את התוצאה הטובה ביותר ביצירת קאלוס במרבית ריכוזי ההורמונים שנבחנו. הקאלוסים לא היו באיכות וצפיפות המאפשרת קבלת רגנרציה ולמרות המאמץ, לא התקבל קאלוס המאפשר התקדמות לקבלת צמחונים באף אחד מהשילובים.

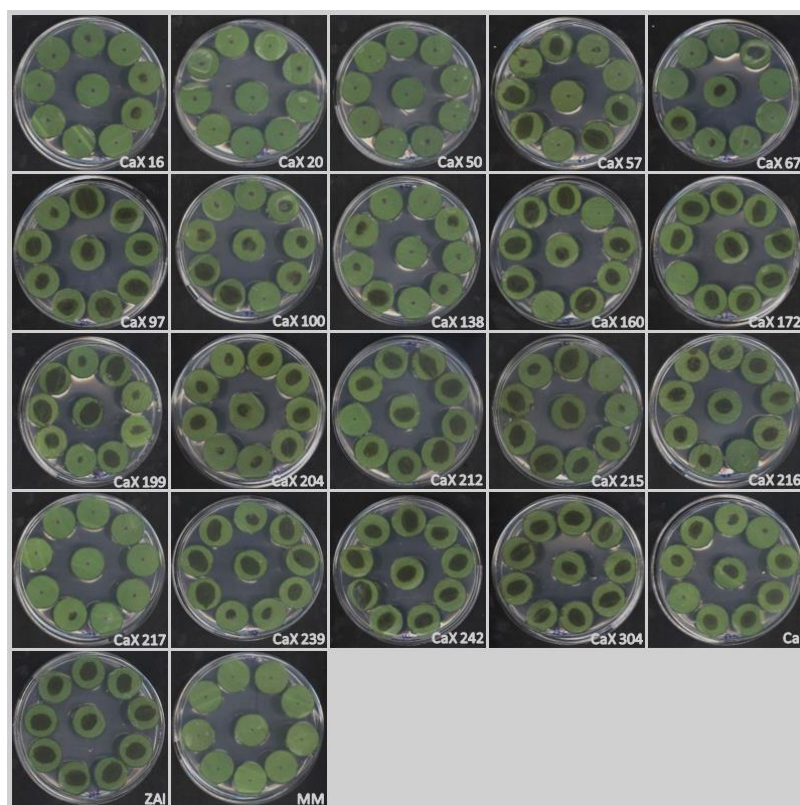
4.0 מבחני עמידות למחלת הריקבון הרך: מבחני עמידות נערכו בדסקיות עלים בהתאם לפרוטוקול מקובל במעבדה [9]. התוצאות הראו הבדל מובהק ברמת העמידות עבור מספר קווים עמם אנו ממשיכים באפיון למרות שחלקם לאו דווקא הצטיינו בכמות הפרחים. תוצאות העמידות להדבקה בריקבון רך הינן מעודדת, ומצטרפות למשתנים האחרים המאפיינים את הקווים הנבחרים. למרות התוצאות המעודדות במבחן צלחות יש לבחון את הקווים לעמידות גם בצמחים שלמים כדי להיווכח האם תכונה זאת מאפיינת גם את הצמח השלם. הבדלים משמעותיים בין מינים של ק. אתיופיקה ברמת העמידות למחלת הריקבון הרך אופיינו על ידינו בעבר, אך לא בין קווים שמקורם בחומר גנטי דומה, שעבר טיפולי הקרנה ומציג פנוטיפים המעידים על הבדלים משמעותיים בין הקווים.



איור 23. התפתחות סימפטומים (שטח נקרוזה באחוזים) ע"ג דיסקיות עלי קאלה שנלקחו מהקווים השונים. כל טיפול כולל 40 דסקיות, 10 חזרות שנלקחו מ-4 צמחים שונים והודבקו בהידק - 10µL, *Pectobacterium brasiliense* 1\*10<sup>7</sup> CFU/ml. Ca העמודות מייצגות את שטח ההדבקה באחוזים 17 שעות לאחר הדבקה, וסטיית תקן, עמודות המסומנות בכוכבית נבדלות מביקורת Ca בלתי מוקרנת, ברמת מובהקות  $p \leq 0.05$ . ההשוואה נערכה בעזרת מבחן Student's t-test.



**איור 24.** אנאליזת התפתחות סימפטומים (שטח נקרזה באחוזים מכלל שטח הדיסקית) ע"ג דיסקיות עלי קאלה ביקורת (Ca) ומוטנטים נבחרים (CaX), שנלקחו מהקווים השונים. כל טיפול כולל 40 דסקיות, 10 חזרות שנלקחו מ-4 צמחים שונים והודבקו בחיידק ע"י תרחיף  $10\mu\text{L}$  *Pectobacterium brasiliense* (Pcb1692)  $1 \times 10^8$  CFU/ml. התמונות נלקחו 20 שעות לאחר ההדבקה השטח חושב באמצעות תכנת Threshold\_Colour plugin, imageJ software (NIH, MD, USA). בצילום MM מינימל מדיום ללא חיידקים. a. תמונות מייצגות של צמחי ביקורת מהקו Ca. אחוזי שטח רקמה נגועה מכלל שטח הדיסקית, בין קווי Ca. c. תמונות מייצגות של שטח רקמה נגועה בצמחים שעברו מוטגנזה בקרינת X. אחוזי הריקמה הנגועה בקווי CaX. בהשוואה לצמחי הביקורת. E. השוואה בפיזור הנתונים בין הקווים המוקרנים לקווי הביקורת מבחינת אחוזי ההדבקה. עמודות המסומנות בכוכבית מציגות פחות שטח רקמה נגוע (עמידות גבוהה יותר) במידה מובהקת בהשוואה לביקורת במבחן Student's t-test ( $p \leq 0.001$ ).



**איור 25.** התפתחות סימפטומים (שטח נקרזה באחוזים מכלל שטח הדיסקית) ע"ג דיסקיות עלי קאלה שנלקחו מהקווים השונים. כל טיפול כולל 40 דסקיות, 10 חזרות שנלקחו מ-4 צמחים שונים והודבקו בחיידק ע"י תרחיף  $10\mu\text{L}$  *Pectobacterium brasiliense*  $1 \times 10^8$  CFU/ml. התמונות נלקחו 20 שעות לאחר ההדבקה השטח חושב באמצעות תכנת Threshold\_Colour plugin, imageJ software (NIH, MD, USA).

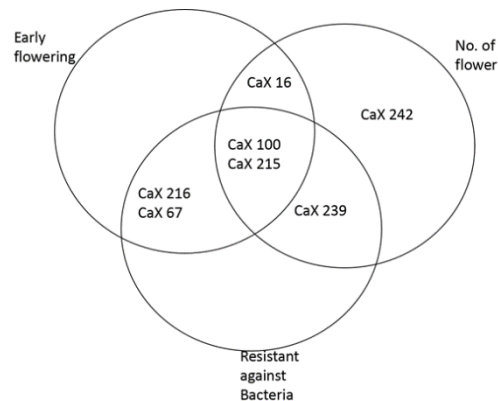
**5.0 סיכום ומסקנות:** כדי לסכם ולבחור קווים המציגים תכונות מבוקשות שיכולות להוות פוטנציאל לזן ישראלי, התוצאות נותחו באמצעות דיאגרמת Venn. התכונות החשובות ביותר מבחינתנו היו הקדמת פריחה, מספר פרחים לפקעת ועמידות לפקטובקטריום. רצינו לראות האם זן אחד או יותר מבטאים את כל התכונות או חלק מהן. בעבודה כזאת לאחר היכרות, תצפית ומעקב אחרי הפרחים שנמשך כ- 5 שנים, 3 מתוכן במסגרת המחקר, אנו מזהים תכונות עקביות שחוזרות על עצמן במספר קווים. התוצאות אלה מוצגות באיור 26. הביצועים המסכמים של כל אחד מחמישה קווים נבחרים מסוכמים (טבלה 5 A-C).

| A Rank | Lines   | Average number of flowers/plant | B Rank | Lines   | Average first flower (days) | C Rank | Lines   | Area of Decay (%) |
|--------|---------|---------------------------------|--------|---------|-----------------------------|--------|---------|-------------------|
| 1      | CaX 239 | 6.3                             | 1      | CaX 100 | 95.9                        | 1      | CaX 215 | 7.21              |
| 2      | CaX 215 | 5.4                             | 2      | CaX 16  | 103.6                       | 2      | CaX 67  | 8.17              |
| 3      | CaX 100 | 5.3                             | 3      | CaX 216 | 109.67                      | 3      | CaX 216 | 8.89              |
| 4      | CaX 242 | 5.2                             | 4      | CaX 215 | 111.3                       | 4      | CaX 100 | 10.93             |
| 5      | CaX 16  | 4.9                             | 5      | CaX 67  | 112.7                       | 5      | CaX 239 | 13.50             |

טבלה 5. חמשת הקווים המובילים בשלושה משתנים: A. מספר פרחים ממוצע לצמח; B. מספר ימים ממוצע לפריחה; C. עמידות לחיידק *Pectobacterium brasilesne* כפי שמוצגת ע"י התפתחות שטח נקרטי בדיסקיות עלים.

ניתן לקבוע כי כמות הפרחים שהתקבלה מהקווים לאחר ההקרנה עולה על זו של צמחי הביקורת ומעידה עד כה, על הצלחת הגישה במטרה להגביר את היבול. עוד מסתמן כי הקדמת פריחה, משתנה בעל חשיבות מסחרית גבוה במיוחד למגדל הישראלי הושגה ע"י תהליך המוטגנזה. הקדמה נצפתה רק בקווים המוקרנים ולא באף אחד מצמחי הביקורת. יותר מכך, מדריכים המלווים את הגידול רואים בהקדמת פריחה לחודשים דצמבר ינואר בשטח פתוח ללא תוספת חימום, פוטנציאל מסחרי. חשוב לזכור בהקשר זה כי חלון ההזדמנויות של מגדלי ישראל בק. אתיפיקה הינו בחודשים נובמבר-אפריל והשינוי במועד פריחה הינו משתנה קריטי. משתנה הריח שהופיע כמדד נוסף לא הוצג כמטרה וספק אם יש לו משמעות מסחרית. השנה העברנו פקעות מכל אחד מהקווים המובילים (הועברו 6 קווים) לצורך ריבוי ובדיקה בתנאי המגדלים. פיתוח השיטה לבדיקת הוירוסים מאפשרת המשך פעילות בכיוון זה. תוצאות הוירוס מסוכמות כעת למאמר. הקווים המובילים בשלושה פרמטרים, פריחה מוקדמת, מספר פרחים לצמח ועמידות להדבקה בחיידקי פקטובקטריום הגורמים להתפתחות מחלת הריקבון הרך מוצגים באיור 26.

איור 26. דיאגרמת Venn המציגה את הקווים המצטיינים בשלושה פרמטרים, מספר פרחים לפקעת, מועד פריחה ועמידות לפקטובקטריום ואת הקווים המציגים שילובים שונים ביניהם.



מסקנות על פי פרקים:

**אפיון פנוטיפי:** החלק הראשון והעיקרי של העבודה עסק באפיון פנוטיפי של קווים מצמחים שהתפתחו מזרעים מוקרנים בקרינת X. החלק המוצג כולל שלוש שנות מחקר ואינו מציג את עבודה הפרלימינרית שנערכה על מאות קווים אשר רק 20 הנבחרים בהם כלולים במחקר. אלה הציגו מראש תכונות חיוביות בסריקה הראשונית שערכנו. המטרה העיקרית בפרויקט הייתה לספק למגדלים קו אחד או יותר אותם ניתן לרשום בסימון מסחרי כמותג קאלה ישראלית. מטרה זו הושגה במלואה במהלך המחקר ובעונה הנוכחית 3 קווים פוטנציאליים בעלי פנוטיפ הקשור לגודל פרח, גוון פרח והקדמת פריחה ויבול יועברו למגדל מסחרי לבחינה במשק מודל בעונת הסתיו 2022.

**פיענוח וירום הקאלה הישראלית:** פיענוח וירום ק. ישראלית היווה מבחינתנו מטרה בעלת ערך מדעי. בשנים האחרונות, עם התפתחות טכנולוגיות NGS ניתן לקבל יותר נתונים לגבי מעבר וירוסים ופתוגנים אחרים בין צמחים. צמחי נוי פחות נחקרים בהיבט זה, בגלל חשיבותם הנמוכה בייצור מזון וערך כלכלי נמוך. אולם, למרות האמור לעיל, צמחי נוי בעלי יכולת להעביר וירוסים ופתוגנים אחרים בשיעור גבוה יותר מגידולים אחרים. מודל הסחר העולמי בגידולי נוי כולל שינוע בהיקפים גדולים לאזורים רבים, כולל בשיווק ישיר לצרכנים. צמחי נוי מצויים במידה רבה "מתחת לראדר" של רשויות הגנת הצומח. הממצאים הנובעים מעבודה זו מצביעים על וירוס נפוץ בגידולי קאלה בעולם (דשין), אך גם על וירוס מצמח הקונג'אק המצוי בקאלה הישראלית. בנוסף גילינו וירואיד שטרם דווח בקאלה ועשוי להיות משמעותי בגידולי מטעים. איתור הוירוסים ופרוטוקול הניקוי שפתחנו בעלי חשיבות לחקלאות, גם אם לא רואים את היישום המיידי.

**פיתוח פרוטוקול ריבוי קאלה בתרבית:** פיתוח פרוטוקול תרבית רקמה לא הושג במלואו. מראש ידענו שאנחנו ניגשים למשימה קשה עד בלתי אפשרית. הגורמים הגנטיים המונעים מקאלה אתיופיקה לעבור תהליך התמיינות לצמחונים אינם ידועים. בספרות אין דיווחים לגבי הצלחת פרוטוקול התמיינות בקאלה אתיופיקה. תהליך דה-דיפרנציאציה הושג בעבר במספר מאמרים וגם אצלנו הצלחנו לקבל קאלוסים וריבוי, אך לא התמיינות. קווי קאלה היברידיים המהווים הכלאה בין מינים אחרים של קאלה, עוברים התמיינות לצמחונים ללא קושי. למרות האמור כאן, הצלחנו במשימה נוספת שעמדה לנגד עינינו והיא ניקוי החומר הגנטי מוירוסים. הצמחים שהכנסנו לתרבית ועברו ריבוי באמצעות העברת מריסטמות וחלוקות, נוקו בהצלחה מכל הוירוסים שנמצאו. פרוטוקול הניקוי ניתן ליישום, אך דורש בהמשך ריבוי בשיטה המקובלת אצל המגדלים המתבססת על חלוקה או חיתוך של הפקעות, מה שמסכן את החומר באילוח מחדש. מקרה ריבוי נקי נשמר על ידינו לאורך 3 שנות המחקר בתנאים מונעי הדבקה (חדר גידול ורשת 50 מש) ונותר נקי לחלוטין מוירוסים. תוצאה זו מצביעה על הפוטנציאל של שימור צמחי אם נקיים לצורך ייצור חומר נקי.

**התוצאות שהושגו בעבודה זו יאפשרו בקרוב לתת סימול מסחרי לזן חדש של קאלה ישראלית.**

1. Funnell, K.A., *Zantedeschia*, in *The physiology of flower bulbs*, A. De Hertogh and M. Le Nard, Editors. 1993, Elsevier Science Publisher: Amsterdam. p. 683-704.
2. Snijder, R.C., F. Santiago Brown, and J.M. van Tuyl, *The Role of Plastome-Genome Incompatibility and Biparental Plastid Inheritance in Interspecific Hybridization in the Genus Zantedeschia (Araceae)* Floricul. Ornamen. Biotechnol., 2007. **1**: p. 150-157.
3. Ghimire, B.K., et al., *Karyotype and nucleic acid content in Zantedeschia aethiopica Spr .and Zantedeschia elliottiana Engl.* Afri J Biotechnol, 2012. **11**(53): p. 11604-11609.
4. Jain, S.M., *Mutagenesis in crop improvement under the climate change.* Romanian Biotechnological Letters, 2010. **15**(2): p. 88-106.
5. Aros, D., et al., *Gamma irradiation on Alstroemeria aurea G. in vitro rhizomes: an approach to the appropriate dosage for breeding purposes.* Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias, 2012. **44**(1): p. 191-197.
6. Jain, S.M., *Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA.* Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2005. **82**(1): p. 113-123.
7. Blom, T.J. and W. Brown, *Preplant Copper-based Compounds Reduce Erwinia Soft Rot on Calla Lilies.* HortTechnology 1999. **9**(1): p. 56-59.
8. Gracia-Garza, J.A., et al., *Increased incidence of Erwinia soft-rot on calla lilies in the presence of phosphorous.* European Journal of Plant Pathology, 2004. **110**(3): p. 293-298.
9. Snijder, R.C., P. Lindhout, and J.M. van Tuyl, *Genetic control of resistance to soft rot caused by Erwinia carotovora subsp carotovora in Zantedeschia spp. (Araceae), section Aestivae.* Euphytica, 2004. **136**(3): p. 319-325.
10. Wright, P.J., *A soft rot of calla (Zantedeschia spp.) caused by Erwinia carotovora subspecies carotovora.* New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1998. **26**(4): p. 331-334.
11. Yao, J.L., D. Cohen, and R.E. Rowland, *Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of Zantedeschia (Araceae).* Theoretical and Applied Genetics, 1994. **88**(2): p. 255-60.
- 12.. Yao, J.L., D. Cohen, and R.E. Rowland, *Interspecific Albino and Variegated Hybrids in the Genus Zantedeschia.* Plant Science, 1995. **109**(2): p. 199-206.
13. Hu, W.C., et al., *Detection of four calla potyviruses by multiplex RT-PCR using nad5 mRNA as an internal control.* European Journal of Plant Pathology, 2010. **126**(1): p. 43-52.
14. Luvisi, A., et al., *Occurrence of viruses in Calla and Peruvian lily in Tuscan nurseries and evidence of new viral records in Italy.* Adv. Hort. Sci., 2016. **30**(1): p. 53-56.
15. RuizSifre, G., E. RosaMarquez, and C.E. FloresOrtega, *Zantedeschia aethiopica propagation by tissue culture.* Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, 1996. **80**(3): p. 193-194.
16. Onytienè, V., Masienè, R., Burbulis,N., Blinstrubienè, A. Factors affecting Zantedeschia Spreng. dedifferentiation in vitro. BIOLOGIJA, 2017. 63(4): p. 334-340.

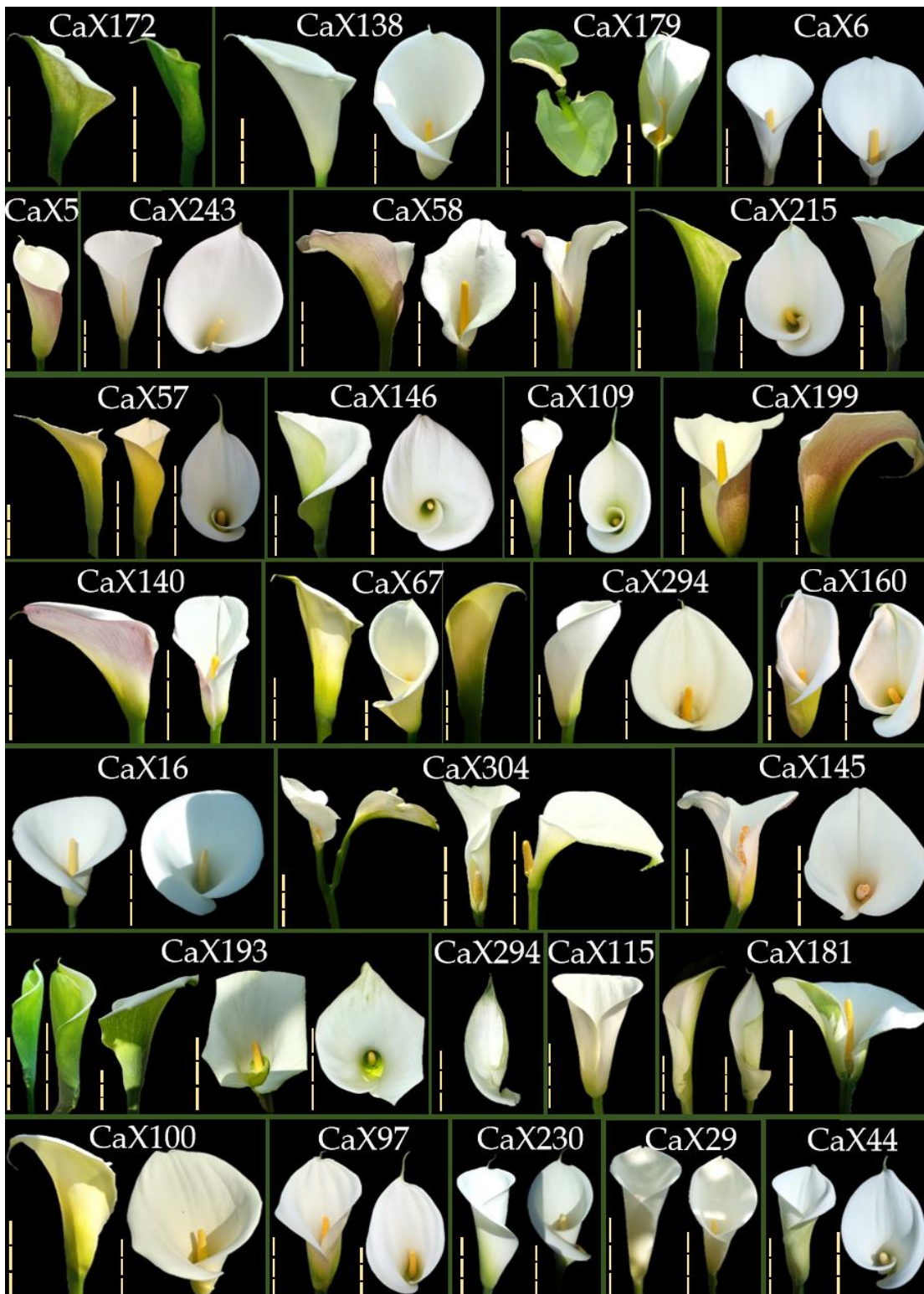
נספחים:

נספח 1. מופעים שונים של פרחי קאלה שהתקבלו בתגובה להקרנה בקרינת X.

נספח 2: רשימת פריימרים שהוזמנו לאיתור ווירוסים.

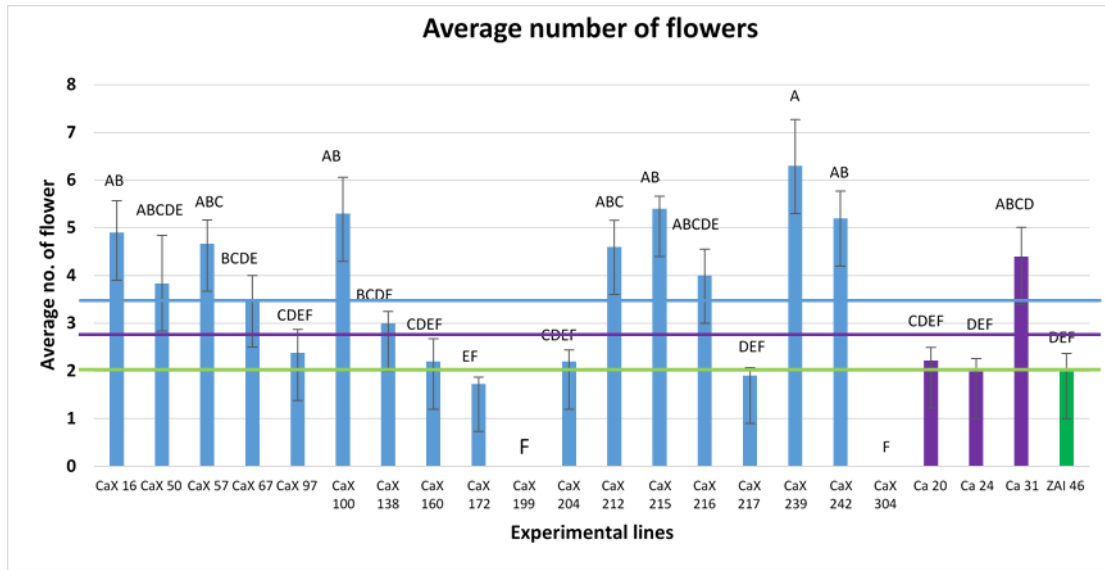
נספח 3: מבחן ANOVA בתוספת אנאליזת פוסט הוק - Tukey Kramer לכמות הפרחים.

נספח 1.





| S.N. | Virus   | Primers to order | Primer               | Direction | Sequenced (5'-3')               | Amplification number                  | Notes   | Reference  |
|------|---|------------------|----------------------|-----------|---------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| 1    | Zantedeschia Mosaic Virus (ZaMV, Potyvirus)   | ✓                |                      | F         | GCACGGCAGATAAACACGAC            | 1531 (GenBank Accession No. EU544542) | Primers designed to amplify the 3' untranslated region (3'UTR), coat protein (CP), and partial nuclear inclusion b protein (Nib) genes. | Wei, T., Pearson, M. N., Cohen, D., Tang, J. Z., & Clover, G. R. G. (2008). First Report of Zantedeschia mosaic virus infecting a Zantedeschia sp. in New Zealand. <i>Plant Disease</i> , 92(8), 1253.   |
|      |   | ✓                |                      | R         | GTGGGCAACCTTCAACTGTG            |                                       |   |  |
| 2    |   | ✓                | Degenerative BL3637  | F         | CCTTTAACAGTDS6AAACAT            | 0.8 kb                                | For amplification of the conserved region of L genes of potyviruses   | Chen, C. C., Chen, T. C., Lin, Y. H., Yeh, S. D., & Hsu, H. T. (2005). A chlorotic spot disease on calla lilies ( <i>Zantedeschia</i> spp.) is caused by a potyvirus serologically but distantly related to Watermelon silver mottle virus. <i>Plant Disease</i> , 89(5), 440-445. |
|      |   | ✓                | Degenerative BL4435c | R         | CATDGRCAAGARTRTARACAGA          |                                       |   |  |
|      |   | ✓                | WN2645K              |           | GGGTACCCTTCCAAAAGAGTCTGGGCTT    |                                       |   |  |
|      |   | ✓                | WN34694KS            |           | GGCATGCATGCTAAGGTTAAGGAGCTCACA  |                                       | For amplification of WSMoV N gene   |  |
|      | Calla lily Chlorotic Spot Virus (Tospovirus)  | ✓                | L3922                | R         | CCAAGGACTCMAACTCTCTCTCG         |                                       |   | Chen, T. C., U. J. T., Lin, Y. P., Yeh, Y. C., Kang, Y. C., Huang, L. H., & Yeh, S. D. (2012). Genomic characterization of Calla lily chlorotic spot virus and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. <i>Plant pathology</i> , 61(1), 183-194.            |
|      |   | ✓                | L4499                | F         | GCCAGACACAGTACGGATCA            |                                       |   |  |
| 3    | Lisianthus Necrosis virus (Tombusviridae)     | ✓                |                      | F         | ATGGAAATCGTTAGG                 | 1.1 kb                                | LNV coat protein gene produced a cDNA of approximately 1.1 kb.  | Chen, Y. K., Jan, F. J., Chen, C. C., & Hsu, H. T. (2006). A new natural host of Lisianthus necrosis virus in  |
|      |   | ✓                |                      | R         | CTATAGCAATGTTGC                 |                                       |   |  |
|      |   | ✓                | ZUNCP1               | F         | GTCTTGCAAGCAGACGATCAG           |                                       |   | Huang, C. H., Hu, W. C., Yang, T. C., & Chang, Y. C. (2007). Zantedeschia mild mosaic virus, a new   |
|      |   | ✓                | ZUNCP2               | F         | AATAAACAAGTTGATGCTGGT           |                                       |   | widespread virus in calla lily, detected by ELISA,   |
|      |   | ✓                | ZUNCP1               | R         | GCTAGGGCCCTGCAAGGCTGAGATCCCGAGT |                                       |   | dot-blot hybridization and IC-RT-PCR. <i>Plant</i>   |
|      | Zantedeschia Mild Mosaic Virus (ZaMMV) (Poty) | ✓                | ZUN1a                | F         | CTCACATATGATGAGGATGAGGG         |                                       |   | <i>pathology</i> , 56(1), 183-189.   |
|      |   | ✓                | ZUN1a                | R         | CAGATCTTTGGCTTGGGTT             |                                       |   |  |
|      |   | ✓                | ZUN1b                | R         | GTCTTCAAGATTAGAGC               | 792 bp                                |   |  |
|      |   | ✓                | ZUNF2                | F         | GATCTCGACCTGGCTCATC             |                                       |   |  |
|      |   | ✓                | TuR0                 |           | TGTCCTTGGATCTATCAATGTT          |                                       |   |  |
|      | Tulip Mosaic Virus (TuMV) (Poty)              | ✓                | TuCP1                |           | GCAGGTGAGAGCTTGAATGCAGG         | 1077 bp                               |   | Hu, W. C., Huang, C. H., Lee, S. C., Wu, C. I., & Chang, Y. C. (2010). Detection of four calla   |
|      |   | ✓                | DR0                  |           | ITGAACACGTCGACGAAAGCATC         |                                       |   | potyviruses by multiplex RT-PCR using nad5 mRNA  |
|      | Dasheen Mosaic Virus (DsMV) (Poty)            | ✓                | DF2                  |           | GACTCTATGAGGTCOAATTC            | 457 bp                                |   | as an internal control. <i>European Journal of plant</i>   |
|      |   | ✓                | ZR0                  |           | CTCTATTTAAAGACATGACTCG          |                                       |   | <i>pathology</i> , 126(1), 43.   |
|      |   | ✓                | ZF3                  |           | CCGCCCTGCAAGGCGCAAC             | 260 bp                                |   |  |
|      | Konjac Mosaic Virus (KoMV) (Poty)             | ✓                | mtR1                 |           | ATCTCAGTCACCAACATTGGCAT         |                                       |   |  |
|      |   | ✓                | mtF2                 |           | GCCTTCTG66GCTCTCTGTTGATA        | 185 bp                                |   |  |
| 8    | nad5 mRNA                                     | ✓                |                      |           |                                 |                                       |   |  |



איור 3. הצגה גרפית של ממוצע כמות הפרחים בקווי קאלה אתיופיקה לאחר הקרנה. מוצג ממוצע מספר הפרחים לכל קבוצה הכוללת 10 עציצים. העמודות מייצגות ממוצע מס' פרחים  $\pm$  שגיאת תקן. עמודות נבדלות בסימול האותיות, מייצגות הבדל מובהק סטטיסטית ( $P < 0.05$ ) אשר נקבע במבחן ANOVA הכולל אנליזת Tukey-Kramer לאחר קבלת מובהקות. קווי הרוחב מציגים את הערך הממוצע הכולל של מספר הפרחים בכל אחת מהקטגוריות, סגול-Ca, ירוק-ZAI, כחול-CaX.