

יצירה ופיתוח מאגר גנטי חדש לגידולי פרחים מובילים עם תכונות משופרות לייצור בישראל ואזורים חמים אחרים
Development and breeding of new products for the flower industry, with an advantage to the Israeli grower

256-0957-16

דוח מסכם

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

Michal Shamir vhshamir@agri.gov.il	מכון וולקני, תקן	מיכל אורן שמיר
Rina Kamenetsky vhkamen@agri.gov.il	מכון וולקני, תקן	רינה קמנצקי
Iris Yedidia irisy@agri.gov.il	מכון וולקני, תקן	איריס ידידיה
Tzahi Arazi tarazi@agri.gov.il	מכון וולקני, תקן	צחי ארזי
Efraim Lewinsohn twefraim@agri.gov.il	מכון וולקני, תקן	אפרים לוינסון
Michele Zaccai mzaccai@exchange.bgu.ac.il	אונ. בן-גוריון, תקן	מישל זכאי
David Weiss weiss@agri.huji.ac.il	אונ. עברית, תקן	דודו וייס
Menashe Cohen menashec@migal.org.il	מו"פ צפון	מנשה כהן
Maayan Kitron maayank@arava.co.il	מו"פ ערבה תיכונה	מעייין קיטרון
Ran Stav ranstav@agri.gov.il	מכון וולקני, תקן	רן סתיו
Rina Ovadia Rinat@agri.gov.il	מכון וולקני, תקן	רינת עובדיה
Pini Snir psnir@shaham.moag.gov.il	שה"מ, תקן	פיני שניר
Shosh Weizman shoshw@shaham.moag.gov.il	שה"מ, תקן	שוש ויצמן
Ziva Gilad ziva.mop@gmail.com	מו"פ בקעת הירדן	זיוה גלעד
Yair Nishri yain@shaham.moag.gov.il	שה"מ, תקן	יאיר נשרי

תקציר

הצגת הבעיה וחשיבותה: ענף הפרחים בישראל רעב למוצרים חדשים המתאימים לגידול בתנאים מקומיים. אמנם ניכרת האטה מסוימת בהתפתחות הענף בשנים האחרונות, אך ישראל עדין חזקה בייצור וייצוא של פרחים וצמחי נוי. מיזם זה מציע אסטרטגיה משולבת לטיפול ופיתוח שלושה גידולים מרכזיים בענף הפרחים בישראל כפלטפורמה לטיפול זנים חדשים בגישות מודרניות. הגידולים הנבחרים, לזיאנתוס, שושן וקאלה הם בין עשרת הגידולים הרווחים ביותר בתעשיית הפרחים העולמית. **המטרות** הספציפיות לשנה זו: (1) בליזיאנתוס, המשך ייעול השיטה של טרנספורמציה על ידי טבילת התפרחת, המשך ייצור צמחים טרנסגניים עם הגן *AroG ו-BEAT והתחלת אפיון מטבולומי ופנוטיפי של הפרחים. (2) בשושן א. המשך יצירה ופיתוח מאגר גנטי חדש לגידולי פרחים מובילים עם תכונות משופרות לייצור בישראל ואזורים חמים אחרים. ב. המשך פיתוח סמנים גנטיים לתכונת פריחה ללא דרישות קור. (3) בקאלה 1. שתילה בהיקף נרחב במכון וולקני ובמו"פ לכיש של צמחי קאלה אתיופית ופלמנגו שמקורם מזרעים שהוקרנו בשנת 2016 ומעקב אחרי פנוטיפים. 2. בניית פרופיל ויראלי בעזרת אנליזת טרנסקריפטום והמשך פיתוח פרוטוקול איתור וירוסים בקאלה, סריקת לתפוצת וירוסים בשדות ובדיקה לאחר הנבטה מזרעים. **שיטות וחומרים ותוצאות:** (1) בליזיאנתוס, פותחה שיטת טרנספורמציה יעילה ומהירה הרבה יותר מהשיטה המקובלת, על ידי טבילת הפרח בתמיסת האגרובקטריום. ישנם כ-25 צמחים טרנסגניים המבטאים ביתר את הגנים *AroG ו-BEAT ובאפיון ראשוני של מדגם קטן של פרחים נמצאה הצטברות של בנוואיד ריחני פנילאטנול בצמחים הטרנסגניים. (2) בשושן, בוצעה תכנית הכלאות בין הורים בעלי מצג פעמון כלפי מעלה לבין הזן 'אוסנת' והפרט LPI46, ובסלקציות בוררו 33 קווים בעלי אסתטיקה רצויה שפרחו במשך שנתיים רצופות בנובמבר – דצמבר. בבחינת מדדי פריחה של צמחי נרשם שינוי בביטוי במספר גנים בתנאי הגידול השונים ונבחרו גנים מבטיחים שעשויים להיות מעורבים בתהליך הפריחה. (3) בקאלה, החומר המוקרן נשתל במו"פ לכיש, שם מתבצע מעקב פנוטיפי אחר כ-2500 מוטנטים מרביתם מזרעים. מבין הצמחים סמצויים כ-20 צמחים המציגים פריחה מוקדמת (ספטמבר-נובמבר). חלקם בעלי פנוטיפ ייחודי בעלים ובפרחים, וכן פרחים בעלי ריח. האפיון הפנוטיפים ימשך בשנה הקרובה. בנוסף פותח פרוטוקול ראשוני לאיתור וירוסים בצמחי ק. אתיופיקה ונבדק על צמחים שגודלו מזרעים.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח: 1. סימה קגן 2. יעקוב בן יעקוב 3. צחי ארזי

הצהרת החוקר הראשי הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים. ניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

Yair Nishri

חתימת החוקר

מבוא

ענף הפרחים בישראל רעב למוצרים חדשים מתאימים לגידול בתנאים מקומיים בשיטות יעילות וידידותיות לסביבה. במאמץ לפתח מוצרים חדשים ולהרחיב את מגוון הגידולים המבוססים והמוצלחים בשוקים הבינלאומיים, אנו מציעים לשלב יכולות וטכנולוגיות של מספר קבוצות מחקר, בתמיכה של שרות ההדרכה, ליצירת מוצרים עם יתרון מובהק למגדל הישראלי. המיזם מתמקד בשלושה גידולים מרכזיים בארץ ובעולם: ליזיאנתוס, שושן פסחא וקאלה לבנה, בהם יש לנו בסיס איתן לפיתוח. העבודה המשולבת תהווה בסיס תשתיתי לפיתוח של גידולים נוספים בעתיד.

ליזיאנתוס: ליזיאנתוס הוא בין עשרת פרחי הקטיף המובילים במכירות בבורסות ההולנדיות. למרות הטיפול הנרחב בעולם ובישראל של פרחי ליזיאנתוס, אחת התכונות החסרות בפרחים אלו היא ארומה. שתי עבודות קודמות שלנו מרמזות על כך שניתן יהיה לייצר צמחי ליזיאנתוס בעלי ארומה נעימה באמצעים של הנדסה גנטית, וצמחים אלו יהיו בסיס להמשך טיפוח של קווי ליזיאנתוס ריחניים נוספים: א. העבודה עם פרחי פטוניה. בעבודה זו הגברנו באופן משמעותי את יצירת חומצות האמינו הארומטיות ובעיקר פנילאלנין, על ידי הגברת השטף במסלול השיקימט החדרנו בצמחי פטוניה מוטנט של הגן הראשון במסלול השיקימט, שאינו רגיש לעיכוב על ידי תוצרי המסלול, *AroG. ביטוי ביתר של *AroG בצמחי פטוניה, גרם ליצירה מוגברת של חומרים נדיפים ממשפחת הבנזואידים וריח נעים וחזק מהפרחים ביחס לפרחי ביקורת (Oliva et al., 2015). ב. עבודה עם פרחי ליזיאנתוס. החדרנו לצמחי ליזיאנתוס במערכת טרנספורמציה יעילה שפותחה על ידנו (Zaccai and Edri, 2002), את הגן BEAT ממקור *Clarkia breweri*, ליצירת החומר הנדיף בעל הריח הנעים הדומה לריח יסמין וגרדניה (Aranovich et al 2007). הצמחים הטרנסגניים לא היו ריחניים, אבל כשהוטבלו בסובסטרט של הגן BEAT, בנוזל אלכוהול, הם ייצרו את המטבוליט הנדיף הריחני בנוזל אצטט. הגברת יצירת בנוזל אלכוהול על ידי החדרת הגן *AroG ויצירת בנוזל אצטט מבנוזל אלכוהול על ידי החדרת הגן BEAT עשויים ליצור פרחי ליזיאנתוס ריחניים.

מטרות המחקר בליזיאנתוס לשנה זו: המשך ייעול השיטה של טרנספורמציה על ידי טבילת התפרחת, המשך ייצור צמחים טרנסגניים עם הגן *AroG ו-BEAT והתחלת אפיון מטבולומי ופנוטיפי של הפרחים.

שושן: צמחי שושן הינם צמחי בצל בעלי חשיבות כלכלית גדולה מאוד כפרחי קטיף, צמחי עציץ, וכצמחי גינון. שושן לונגיפלורום (*Lilium longiflorum*) גדל בארץ בהיקף של כ- 500 דונם וממנו משווקים פרחים ליצוא, בעיקר לבורסות הפרחים בהולנד, לעסקאות באנגליה וכן לשוק המקומי. בסוג *Lilium* קיימת שונות ניכרת בין המינים באשר למבנה הצמח, צורת הפרח, צבעי הפרח, ריח ומורפולוגיה של הבצלים. ממיני הבר טופחו אלפי זנים תרבותיים עם מגוון רחב ביותר של דרישות פיזיולוגיות, צבעים, עונות גידול וכיו"ב. מתחילת שנות השמונים התרכז טיפוח של שושן הפסחא בהולנד בפיתוח זנים שיתאימו פיזיולוגית ליצר בצלים ולפרוח בתנאי האקלים הקר (van Tuyl et al., 2012). כתוצאה מכך, לכל זני שושן הפסחא המסחריים דרישת הקור לצורך פריחה הינה אובליגטורית. לכן, הכוונת הפריחה למועדים הרצויים מחוץ לעונה תמיד תצריך מתן טיפול קור לבצלים לפני השתילה. טיפולי קור אלה יקרים ומלווים בסכנת מחלות. בנוסף, שתילה לאחר האחסון בקרקע חמה (כמקובל בישראל) גורמת לתופעה של "דה-וורנליזציה", הגורמת לעיכוב בפריחה וירידה באיכות הפריחה.

מנגנוני פריחה ותרדמה של שושן נחקרו רבות, אך רק לזנים דורשי קור (Miller, 1993; Okubo and Sochacki, 2012), Kamenetsky et al., 2012). מנות קור ויום ארוך מהווים סיגנלים למעבר המריסטמה משלב ווגטטיבי לשלב רפרודוקטיבי. מחקרים אחרונים מציעים שהוויסות הגנטי של המעבר לפריחה בשושן מושפע על-ידי מספר גורמים חיצוניים ופנימיים. אולם, כל מסלולי האינדוקציה לפריחה מובילים בסופו של דבר לביטוי של קבוצה קטנה יחסית של גנים שפועלים למעבר להתפתחות רפרודוקטיבית. חלק מהגנים אלו ידועים בשושן (Kamenetsky et al., 2012; Liu et al., 2009). היכולת לפריחה ללא השראת קור נשמרה במרכז תפוצת אוכלוסיות בר של *L. longiflorum* בשרשרת האיים מדרום יפן ועד טאיוואן (Ryukyu Archipelago). באזור זה נמצאה שונות גנטית בין אוכלוסיות הבר המתבטאת

במשך הזמן הדרוש מנביטת הזרע לפריחה ובדרישות טמפרטורה לתרדמה ופריחה (Hiramatsu et al., 2001; Mojtahedi et al., 2013).

קבוצת המחקר שלנו הצליחה לקבל ב-2012 זרעים שמקורם בשתי אוכלוסיות בר מאיים בדרום הארכיפלג. בשנת 2012 השתחררו בהולנד זני שושן לונגיפלורום חדשים בעלי מצג פעמון כלפי מעלה. הזנים החדשים לחלוטין הללו – 'Illusive', 'Global Beauty', 'Global Village' – הינם בעלי דרישות קור גבוהות בדומה לדרישות הזן 'White Heaven'. הזנים הללו, יחד עם פרט נבחר מאוכלוסית הבר בעל דרישות קור נמוכות וכן עם זן השושן 'Osnat' המתאים לגדול בתנאי ישראל משמשים כהורים בתוכנית הטיפוח. מטרת הטיפוח היא לקבל טיפוסים ייחודיים בעלי אסתטיקה "הולנדית" ופיזיולוגיה "ישראלית". הגישה המדעית מתבססת על פיתוח סמנים גנטיים לתכונת הפריחה על בירור, ריצוף ובדיקת הביטוי של "candidate genes" העשויים להיות מעורבים בבקרת הפריחה בשושן. בהסתמך על מידע ביואינפורמטי מתוך אנאליזת RNA-seq של מריסטומות מבצלי שושן שבוצעה במעבדתנו (Villacorta Martin et al., 2015), נבחרו מספר גנים השייכים למסלולי הפריחה השונים במיני צמחים אחרים. מעורבותם של גנים אלה בתהליך הפריחה נבדקה ע"י בחינת ביטויים ברקמות שונות בצמחי שושן מהזן השושן 'White Heaven' (WH), אשר גודלו בתנאי ורנליזציה ואורך יום שונים. מניסויים שבוצעו במסגרת מחקר אחר, נמצא שגודל הבצל משפיע מאוד על מסלול הפריחה בזן WH. פריחה התקבלה מבצלים קטנים שלא נחשפו לקור אך גדלו בתנאי יום ארוך (Lazare and Zaccari, 2016), בניגוד לבצלים הגדולים, אשר אינם פורחים ללא קור. תוצאות של ניסויים הכוללים בצלים משני גדלים נכללו בדו"ח זה במטרה להרחיב את הבסיס הפיזיולוגי למציאת קורלציות בין הפריחה לבין ביטוי של גנים נבחרים.

מטרות המחקר לשנה זו הן: א. המשך יצירה ופיתוח מאגר גנטי חדש לגידולי פרחים מובילים עם תכונות משופרות לייצור בישראל ואזורים חמים אחרים. ב. המשך פיתוח סמנים גנטיים לתכונת הפריחה ללא דרישות קור.

קאלה: קידום פיתוח זנים של קאלה לבנה, מתבצע באמצעות פיתוח חומר ריבוי מזרעים ובמקביל ביצוע מוטגנזה באמצעות קרינה מייננת בפקעיות צעירות לאחר הנצה ובזרעים. הזרעים המשמשים במחקר הנם מ-3 מקורות שונים, זרעים מדרום אפריקה בעלי שיזרה צהובה; זרעים מד"א בעלי שיזרה אדומה; וזרעים שנאספו בישראל משטח פתוח בנגב שנועד לייצור פקעות. החומר עובר אפיון פנוטיפי לצורך לימוד האחידות ויאופיין גנטית בהמשך. החומר הוקרן בקור האטומי בשורק ומגודל לאחר הקרנה בחממה ובתרבות. מסתמן כי מנת הקרינה שניתנה בזרעים הייתה נמוכה מידי, בעוד שבחומר הוגטטיבי יש לרדת ברמת הקרינה. בנוסף מרוכז מאמץ לפיתוח פרוטוקול ריבוי בתרבות שאינו קיים כרגע בקאלה אתיופית, במטרה לאפשר ריבוי מהיר של פנוטיפים מבטיחים לאחר ההקרנה. מטרת המחקר הינה לפתח מוצרים חדשים של קאלה לבנה: זנים מקדימי פריחה בעלי מופע ייחודי, וכן ייצור חומר ריבוי מזרעים כמותג חדש "נקי מוירוס". המיזם מתוכנן ל-3 שנים. מטרת העל של המחקר הינה לפתח מוצרים חדשים של קאלה לבנה: זנים מקדימי פריחה, פרחים בעלי מופע ייחודי, וכן ייצור חומר ריבוי מזרעים כמותג חדש "נקי מוירוס".

מטרות המחקר לשנה זו הן: 1. שתילה בהיקף נרחב במכון וולקני ובמו"פ לכיש של צמחי קאלה אתיופית ופלמנגו שמקורם מזרעים שהוקרנו בשנת 2016 ומעקב אחרי פנוטיפים. 2. בניית פרופיל ויראלי בעזרת אנליזת טרנסקריפטום והמשך פיתוח פרוטוקול איתור וירוסים בקאלה, סריקת לתפוצת וירוסים בשדות ובדיקה לאחר הנבטה מזרעים.

מטרות המחקר

המטרה הכללית של מרכז המצוינות היא הכנסת מוצרים חדשים בגידולים מבוססים ומובילים בענף הפרחים, ע"י פיתוח זנים ייחודיים הניתנים למסחר ולהגנה בשווקים הבינלאומיים, המקנים יתרון ברור למגדל הישראלי. המטרות הספציפיות הן:

(1) יצירת קווי ליזיאנתוס טרנסגניים יציבים בעלי ריח נעים בדומה לפרחי גרדניה ויסמין, שיהוו מקור להמשך טיפוח והחדרת תכונה זו לקווים מסחריים נוספים.

- (2) טיפוח זני שושן פסחא ללא דרישות קור או עם דרישות קור מופחתות, בעלי תכונות אסתטיות מצטיינות, לייצור חומר ריבוי ופרח קטוף באזורים עם אקלים חם.
- (3) פיתוח מוצרים חדשים של קאלה לבנה: זנים מקדמי פריחה בעלי מופע פרח ייחודי, וייצור חומר ריבוי מזרעים כמותג חדש "נקי מוירוס".

עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

ליזיאנתוס:

טרנספורמציה של תרביות רקמה: הניסויים התמקדו בביצוע טרנספורמציות בדרך של תרביות רקמה לייצור צמחים טרנסגניים הנושאים את הגן *AroG** או את הגנים *AroG** ו-*BEAT*. מהלך המחקר כלל הרבה ניסויים ליעול מערכת רגנרציה/ בליזיאנתוס בזנים/קו טיפוח הרלוונטים. מקור החומר הצמחי היה מזרעים או צמחונים קטנים של ליזיאנתוס מהזנים (EP) Excalibur Pink, (EW) Excalibur White, (RP) Royal Purple, ומקו הטיפו X-2541. פלסמידים בינאריים הנושאים את הגן *AroG** ("AroG16") או את הגנים *AroG** ו-*BEAT* ביחד על אותו פלסמיד, שהתקבלו מהמעבדה של מיכל שמיר. הפלסימידים הוחדרו לאגרובקטריום EHA 105. מערכת רגנרציה/טרנספורמציה של ליזיאנתוס בוצעה בהסתמך על הפרוטוקול שפורסם ע"י המעבדה להחדרת הגן *BEAT* לליזיאנתוס (Aranovich et al., 2007). על מנת ליעל את המערכת, בוצעו שינויים בפרוטוקול כפי שכתוב בהמשך. וידוא לטרנספורמציה נעשתה ע"י בדיקת נוכחות וביטוי של הגן *nptII* (עמידות לקנמיצין), הנמצא על הפלסמיד המוחדר (Aranovich et al., 2007).

רגנרציה של צמחונים מקטעי עלים. התקבלו צמחוני EP בתרבית רקמה מהמעבדה של מיכל שמיר, וזרעים של X2541 מהמעבדה של דני זמיר. בוצע ריבוי של הצמחונים בתרבית ע"מ ליצור חומר צמחי סטרילי לטרנספורמציה. בניסויים הראשונים, נבדק כושר הרגנרציה של EP ו-X2541 תוך הנחת קטעי עלים על מצע הרגנרציה (MS + הורמונים) ללא גורם סלקציה. כושר הרגנרציה של EP היה יותר גבוה מזה של X2145, אך לפי הניסיון שהצטבר במעבדה, כושר הרגנרציה אינו מיטבי בשני גנוטיפים אלה. לכן בוצעו שינויים בהרכב המצעים על מנת לשפרו. בנוסף, הוחלט בהמשך העבודה להשתמש גם בזנים הבאים: (EW) Excalibur White ו-(RP) Royal Purple.

טרנספורמציות עם הגן *AroG:** בוצעו מספר רב של טרנספורמציות עם הגן *AroG** (כ 100 אירועים שונים, הכוללים כ"א 10-20 קטעי עלים) תוך שינויים בהרכב המצעים ושלבנים השונים של תהליך הטרנספורמציה כמפורט למטה:

1. הרכבי המצעים, בעיקר שינויים בריכוזי ההורמונים IAA ו-BA וניסיון שימוש ב-zeatin. נמצא שריכוזים נמוכים יותר של IAA ו-BA היו הכי יעילים ו-zeatin לא גרם לשינוי.

2. אנטיביוטיקות לסילוק אגרובקטריום לאחר הטרנספורמציה: נמצא שקרבניצילין היה הכי יעיל.

3. תנאי הטרנספורמציה: הפעלת וואקום לפרקי זמן שונים במהלך ההדבקה עם אגרובקטריום. נמצא שעליה הדרגתית של חוזק הוואקום לדקה, ולאחר מכן הדגרה נוספת של קטעי העלים לחמש דקות עם האגרובקטריום, היו התנאים היעילים ביותר. הדגרה לחצי שעה ושעה עם אגרובקטריום, בטמפ' של 28 מ"צ גרמה לעיכול הרקמה. הדבקת קטעי העלים עם ריכוז גבוה יותר של חיידקים לא שיפר את יעילות הטרנספורמציה.

טבלה 1. תוצאות הטרנספורמציות עם *AroG**

זן/קו	מס' אירועי טרנספורמציות	מס' צמחונים שהתקבלו על מצע הסלקציה*	מס' צמחונים חיוביים בבדיקת PCR	יעילות טרנספורמציה (צמחים חיוביים בבדיקת PCR קטעי עלים שעברו טרנספורמציה) (%)
X2541	35	1	1	0.2
EP	7	1	1	0.9
EW	12	8	6	3.3
RP	2	12	8	26.7

4. זמני אינקובציה שונים של הרקמה עם אגרובקטריום לאחר הטנספורמציה: נמצא שהזמן המיטבי היה 4 ימים בחדר גידול (25 מ"צ) ולאחר מכן העברה של הרקמה למצע סלקציה.

5. "טיפולי קור": אחרי טנספורמציה, הצלחות שהו במקרר במשך 2-3 ימים על מנת לשפר את כושר הרגנרציה על מצע רגנרציה לפני המעבר למצע סלקציה.

מטבלה 1 ניתן להתרשם מההבדלים בכושר הרגנרציה ומשיעור הצלחת הטנספורמציה בזנים/קווים השונים, כאשר היעילות של הזן RP הרבה יותר גבוהה מזו של כל האחרים. לאחר הטנספורמציות המתוארות בטבלה 1, לצערנו, זיהומים בחדר הגידול גרמו למוות של צמחים יקרים לפני העברתם לחממה. בנוסף, חלק מהצמחונים לא שרדו את תהליך ההקשחה בין הגידול בתרבית רקמה להעברה לחממה.



איור 1. צמחים טרנסגניים מזן RP עם הגן *AroG* בשלב וגטטיבי (A) ובפריחה (B).

ארבעה צמחים מזן RP שהראו תוצאות חיוביות ב-PCR התפתחו בחממה (איור 1) אך צמחים אלה היו עקרים ולא הניבו זרעים. במהלך הרגנרציה של הצמחים הטנסגניים, נשמרו מספר צמחונים בתרבית (קלונים של הצמחים שהועברו בחממה), אשר יושרו ויועברו בחממה להמשך גידול. צמח מזן RP הראה עלי כותרת לבנים (איור 2) במקום הצבע הוורוד המאפיין את הזן. הסיבה לכך אינה ידועה. יתכן שתופעה זו נובעת משונות בתוך הזן. לא הורגש ריח בצמחים הטנסגניים.

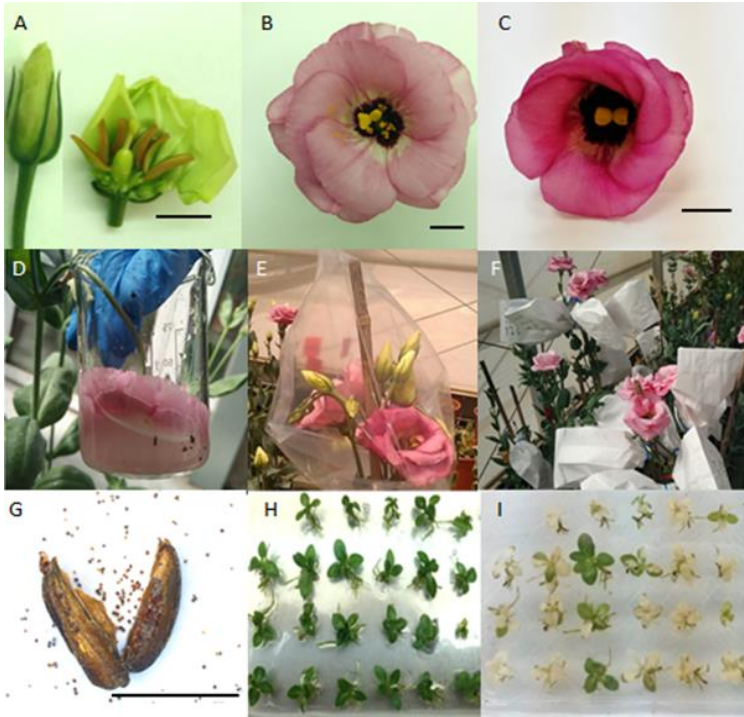
טרנספורמציות עם הפלסמיד הנושא את שני הגנים, *AroG** ו *BEAT*. לאחרונה, בוצעו טנספורמציה של הזנים RP ו Tzilli עם הפלסמיד הנושא את שני הגנים, *AroG** ו *BEAT*. פלסמיד זה פותח במעבדה של מיכל אורן-שמיר בעזרת Gibson Assembly Cloning Kit בפלסמיד pART27. עד כה התקבלו 12 נצרים מהזן RP ו 14 נצרים מהזן Tzilli במצע סלקטיבי אחרי הטנספורמציה. הנצרים עדיין קטנים מידי כדי לאפשר בדיקת PCR לוודא של הטנספורמציה. בדיקות אלו יבוצעו בעתיד. הנצרים החיוביים יושרו והצמחונים שיתקבלו יוקשחו ויגודלו בחממה (מעבר לתקופת המחקר).

לסיכום, הטנספורמציה בדרך של תרביות רקמה בליזיאנטוס דורשת הרבה זמן, בין כ-10 עד 16 חודשים מזריעת זרע בתרבית עד לפריחה (איור 4) ועוד כ 4 חודשים מהפריחה לקבלת זרעים. יחד עם זה, ניתן לקבל יעילות סבירה בזנים מסוימים (טבלה 1). בעבודה זו, נוצרו מספר צמחים טרנסגניים עם הגן *AroG**, אך לא נמצא בהם פנוטיפ ריחני. הסיבה לעקרות הצמחים הטנסגניים אינה ברורה אך יתכן שהיא קשורה לביטוי יתר של הגן *AroG**. צמחים נוספים הנושאים את הגן *AroG** וצמחים שעברו טנספורמציה עם שני הגנים, *AroG** ו *BEAT* יגודלו עד הפריחה (וקבלת הזרעים אם הם יתפתחו) לאחר תקופת המחקר.

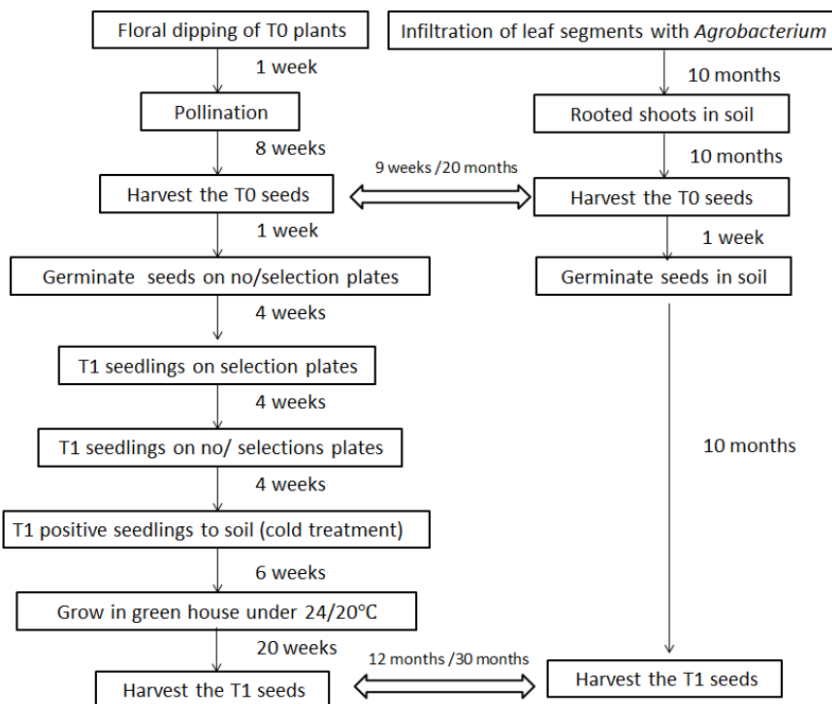
שיפור וקיצור התהליך של טנספורמציה על ידי טבילת התפרחת:

במשך שנות המחקר פיתחנו שיטה לטרנספורמציה יעילה של צמחי ליזיאנטוס על ידי טבילת הפרח בתמיסת האגרובקטריום, בדומה לשיטת הטנספורמציה המקובלת בארבידופסיס. עד היום ישנם מעט מאוד צמחים בהם שיטה

זו הצליחה. הזנים שנבחרו לעבודה הם: Excalibur pink - זן מסחרי ושני זני הורים X-2541 X-1042 מתוכנית טיפוח לזיאינתוס של דני זמיר מהפקולטה לחקלאות. במשך המחקר פתרנו בעיות ושיפרנו את התהליך. לדוגמה בשנה השלישית הצלחנו לשפר את אחד השלבים שהיו צוואר בקבוק בתהליך כולו וזה מעבר הצמחים הטרינסגניים מתרבית לחממה. השיפור נעשה על ידי קיצור שלב השהייה בפרלייט מחודשיים לשבועיים שהוריד באופן ניכר את מספר הצמחים שהתנוונו בשלב זה ושיפר את הקלטות הצחים במצע הקוקוס-טוף. על ידי שיפור השיטה קצרנו את תהליך הטרינספורמציה והעלינו את יבול הצמחים הטרינסגניים (איור 2). למעשה שיטת טבילת הפרח מקצרת את התהליך עד לקבלת זרעים של דור T1 בכ-18 חודשים בהשוואה לשיטה שהייתה מקובלת עד עתה על ידי טרינספורמציה של קאלוס בתרבית (איור 3).



איור 2. סדרת התמונות ימין מציגות את התהליכים בשיטת הטרינספורמציה של פרחי לזיאינתוס על ידי טבילת הפרח: A שלב מוקדם של הפרח לפני פתיחתו. הטרינספורמציה נעשית על ידי פתיחת הניצן, B שלב מתקדם יותר של הפרח שבו נעשית הטרינספורמציה, C הורדת האבקנים לפני טבילת הפרח בתמיסת האגרובקטריום, D. טבילה בתמיסת האגרו, E עטיפת הפרח בניילון לשמירת לחות, F עטיפת הפרחים בנייר לאחר האבקה, G הזרעים הרבים בכול פרי, גידול הנבטים תחילה ללא גורם סלקציה, I העברה למצע סלקטיבי. הסרגלים + 1 ס"מ. בתמונות משמאל ניתן לראות את העברת הצמחים הטרינסגניים מתרבית לקרקע (J, K) ופריחתם (L) בחממה.



איור 3. הסכימה מתארת את השלבים השונים וזמן המשכם של שתי שיטות הטרינספורמציה, מתרבית או על ידי טבילת הפרח. טרינספורמציה מתרבית ועד לקבלת זרעים של T1 לוקחת כ-30 חודשים, בזמן שעל ידי טבילת הפרח 12 חודשים.

נבחנו שני שלבי התפתחות של הפרח לטבילה בתמיסת האגרובקטריום, ובשני השלבים התקבלו צמחים טרנסגניים (טבלה 2, איור 2 A,B). עובדה מעניינת ומפתיעה היא שהשחלה של הפרחים בשני שלבים אלו סגורה לחלוטין, על פי תמונות ממיקרוסקופ סורק (לא מוצגות) ולמרות זאת רמת הטרנספורמציה דומה לזו של ארבידופסיס, בה השחלה פתוחה בזמן הטיפול.

טבלה 2. יעילות טרנספורמציה על ידי טבילת פרח בשני השלבים, השלב הצעיר (איור 1A) והשלב הבוגר (איור 1B).

Flower stage	Number of plants	No. of T1 Seedlings sensitive to selection	No. of T1 Seedlings resistant to selection	Positive	Transformation % efficiency
young flower	773	748	25	8	1.1
mature flower	867	799	68	18	2.3

מצב הצמחים הטרנסגניים משיטת טבילת הפרח:

שני הגנים שהוכנסו לצמחי ליזיאנתוס על ידי טבילת הפרח הם *AroG** ו-*BEAT*. המצאות החלבון *AroG** בצמחים נבחנה על ידי נוגדנים ספציפיים לחלבון זה, שמקורו בחיידקים, והמצאות הגן *BEAT* מקלרקה נעשתה בעבר על ידי זיהוי הגן לעמידות לקנמיצין, ובשנת המחקר השלישית זיהינו רצף ייחודי לפלסמיד ה-*BEAT* מקלרקה שלא קיים בצמחי ליזיאנתוס ואפשר זיהוי יותר בטוח ומדויק (פרטים בדוח הביניים לפני שנה).

טבלה 3 מסכמת את רשימת הצמחים הטרנסגניים הקיימים בסוף השנה הרביעית למחקר ואת יעילות הטרנספורמציה לכל טרנספורמציה. מכיוון שהטרנספורמציה הכפולה עם שני הגנים *AroG** ו-*BEAT* נעשתה עם שני פלסמידים נפרדים, היעילות נבחנה לכל פלסמיד לחוד ולכן הצמחים עם טרנספורמציה כפולה לא רשומים בטבלה, למרות שהם קיימים בחממה. לצערנו זני ההורים X-2541 ו-X-1042 גדלים בקושי רב בחממה ולא נראה שנגיע איתם לפריחה. ניתן לראות שאחוז הטרנספורמציה בצמחים של Excalibur Pink נע בערך בין 1 ל-3%, שהיא תדירות דומה לזו של ארבידופסיס. **באיור 4** ניתן לראות תמונות של מספר צמחים טרנסגניים בחממה. למעשה כל הפרחים הטרנסגניים הפורחים עכשיו ואלו שבדרך יהיו צאצאים של הזן המסחרי Excalibur Pink שהוא היברידי. על מנת לדעת למה לצפות מבחינת הצאצאים, הנבטנו מספר זרעים של צמחי wt ובדקנו את הפנוטיפים המתקבלים. **איור 5** מראה שלושה פנוטיפים, פרח ורוד מלא או בעל דור עלי כותרת אחד, ופרח לבן מלא, ואנחנו מצפים לקבל מספר קטן יותר של הפנוטיפ הרביעי של פרחים לבנים בעלי דור פרחים אחד. מהאנליזה המצומצמת שיש בידינו כרגע, נראה שהורי ההיברידי XP היו בעלי צבעים ורוד ולבן ובעלי פרח מלא או בעל דור אחד של עלי כותרת. שתי תכונות אלו התחלקו בין הצאצאים. כרגע יש לנו בחממה מספר מועט של צמחים טרנסגניים פורחים ומספר רב יותר לקראת פריחה ואנחנו מצפים לראות ביניהם חלוקה בין הפנוטיפים השונים ולבחון את האם נוצרים בכס חומרי ריח ואלו. בשלב זה, מכיוון שרק מספר קטן של צמחים הגיעו לפריחה, יש לנו תוצאות ראשוניות של אנליזת GC-MS לבחינת חומרי ריח נדיפים מעלי הכותרת של הפרחים הטרנסגניים. נעשתה אנליזת נדיפים מקלון אחד מכל אחד בלבד של צמחי ביקורת, צמחים עם *AroG** וצמחים עם *AroG** ו-*BEAT* (**איור 6**).

טבלה 3. רשימת הצמחים הטרנסגניים מהזן Excalibur Pink ושני זני ההורים X-2541 ו-X-1042. בטבלה מצוינים הפלסמידים בהם הושבטו הגנים, מספר הצמחים ההתחלתי, מספר הצמחונים העמידים לקנמיצין, מספר הצמחים שהיו חיוביים או לחלבון *AroG** או לגן *BEAT*. ויעילות הטרנספורמציה.

Cultival	Plasmid	Number of plants	No. of T1 Seedlings sensitive to selection	No. of T1 Seedlings resistant to selection	Positive	Transformation % efficiency
Excalibur pink	PBI101-35S::BEAT	205	195	10	3	1.5
Excalibur pink	PBI101-35S::BEAT	354	321	33	12	3.7
Excalibur pink	PART27	144	134	10	1	0.7
Excalibur pink	PART27-AroG*	568	553	15	5	0.9
Excalibur pink	PART27-AroG*	513	478	35	6	1.3
X-2541(FA) X-1042(M)	PART27-AroG*	91	78	13	1	1.3
X-1042(M) X-2541(M)	PART27-AroG*	437	433	4	1	0.2



איור 4. צמחים טרנסגניים ממקור של צמחי Excalibur Pink פורחים בחממה.

איור 5. הפנוטיפים השונים מהכלאה עצמית של צמחי Excalibur Pink ומספרם מתוך 26 צמחים. אנחנו מצפים לקבל מספר קטן של פרחים לבנים בעלי דור עלי כותרת אחד.



12



7

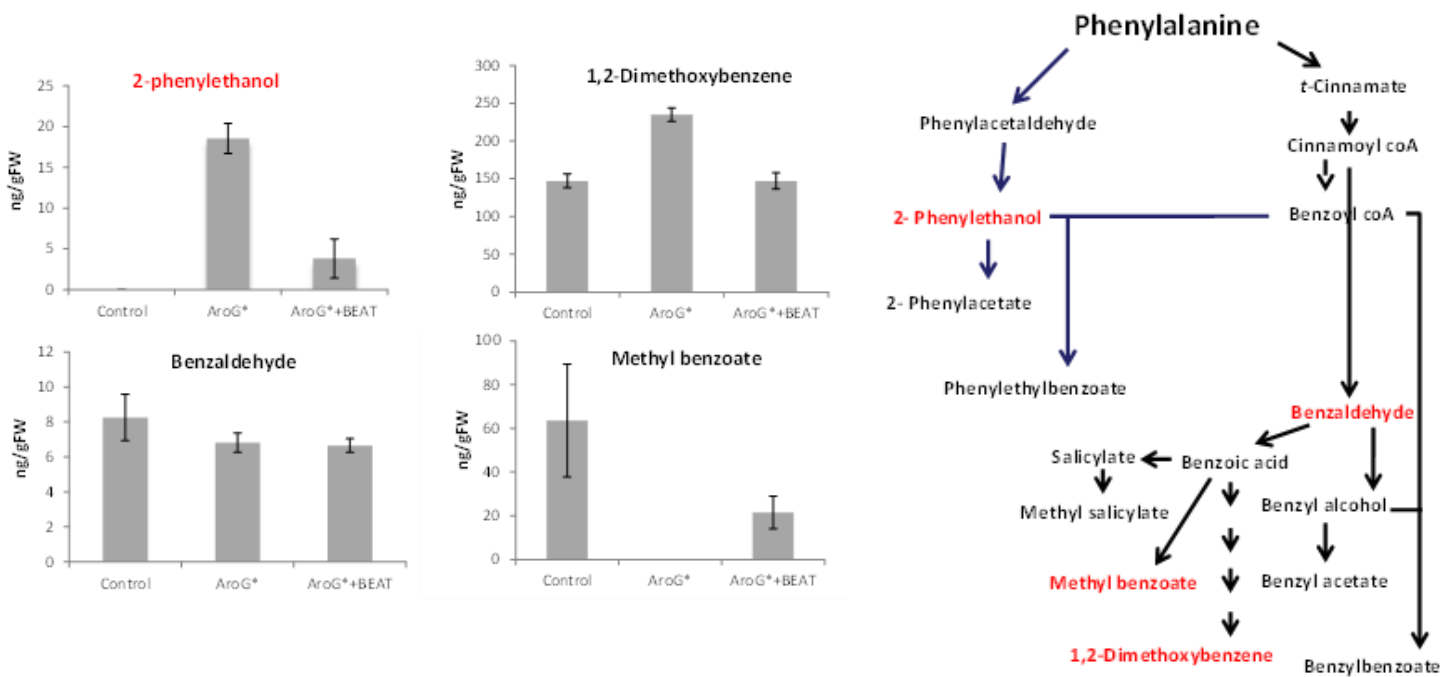


7

White
One layer

NY

מאנליזות הנדיפים של הצמחים הטרנסגניים וצמחי הביקורת, נמצאו ארבעה חומרים שריכוזם השתנה שנובעים מפנילאלנין, Phenylethanol, Dimethoxybenzene, Benzaldehyde, ו-Methyl benzoate (איור 6). יש לזכור שמדובר רק בקלון אחד מכל צמח (החזרות הן מצמחים שונים של אותו הקלון) ולכן אלו תוצאות מאוד ראשוניות. מבין ארבעת הנדיפים החומר האחד בו ניתן לראות שישנה עליה ניכרת בצמחים הטרנסגניים ביחד לצמחי הביקורת, בו החומר לא נמצא, הוא Phenylethanol. תוצאה זו מעודדת ומרמזת על כך שאכן הצמחים הטרנסגניים יצרים בעודף חומרי ריח. שלושת החומרים האחרים שנמצאו הצטברו באופן ניכר בצמחי הביקורת ולכן אינם הוכחה לשינוי בין צמחי הביקורת לטרנסגניים. לא ראינו הגברה של תוצר הגן BEAT, Benzyl acetate, ואנו מקווים למצוא אותו בהמשך האנליזות של התוצרים הטרנסגניים שיפרחו במשך החודשיים הקרובים. לסיכום, הופעת החומר Phenylethanol בצמחים הטרנסגניים מעודדים ומרמזים על כך שיתכן וצאצאים נוספים של הצמחים הטרנסגניים גם יגבירו בנוואידיים ואולי גם יהיו ריחניים.



איור 6. חומרים נדיפים ממשפחת הבנוואידים שהצטברו בצמחי ליזיאנטוס Excalibur Pink ומקום המצאותם במסלולי הביוסינטזה. האנליזה נעשתה לקלון אחד בלבד מכול טיפול, צמחי ביקורת, צמחים המבטאים ביתר את הגן *AroG** וצמחים המבטאים ביתר את הגנים *AroG** ו-*BEAT*. הקווים האנכיים מבטאים שגיאות תקן של 4 חזרות.

שושן:

תוכנית ההכלאות: בנובמבר 2013 ובמאי–יוני 2014 בוצעו שני מחזורי הכלאה בין שלושה זנים שטופחו בהולנד למופע פעמון כלפי מעלה ('Global Beauty', 'Illusive', 'Global Village') לבין הזן הישראלי 'Osnat', וכן פרט של שושן לונגיפלורום שהובא במסגרת יבוא חומר צמחי מאוכלוסיית בר מאיים באוקיינוס השקט מדרום ליפן. כינוי הפרט הוא LPI46. כ-4000 זרעים תוצרי 9 קבוצות הכלאה נזרעו לאחר ביצוע ההכלאות ואיסוף הזרעים וגדלו בתחנת הנסיונות באבני איתן בקיץ 2015. הבצלים נאספו במהלך חודש ספטמבר 2015 בהתאם למועד ההבשלה והועברו לקרוור ב-2°C. חומר הריבוי מכל מועדי הוצאת הבצלים נשתל בשבוע הראשון של נובמבר 2015, על מנת להתחיל לסנכרן את מועדי הגידול בתכנית הטיפוח למועדי הגידול של השושן המסחרי בארץ. הבצלים נשתלו במצע קוקוס בבית צמיחה בתחנת הנסיונות באבני איתן. משטר ההשקיה והדישון וכן הטיפול במזיקים ומחלות התבצע בהתאם לפרוטוקול גידול מסחרי של שושן.

הפריחה החלה במרץ 2016 ובוצעה סלקציה בהתאם לפרמטרים של מטרות התכנית שכללו התיחסות למספר הפעמונים לגבעול, גודל הפעמון, זווית הפעמון ביחס לציר הגבעול, אורך עלווה, רוחב עלווה, צפיפות עלווה. הסלקציה נמשכה עד לחודש מאי 2016. לא סומנו פרטים שפרחו לאחר מועד זה. ב-28.7.2016 הוצאו הבצלים שסומנו להמשך מעקב לאחר הסלקציה שבוצעה במרץ-מאי 2016. בסה"כ סומנו והוצאו להמשך מעקב 154 פרטים תוצרי 7 קבוצות הכלאה. בצלים אלו הועברו לקרוור קצר של 38 יום ב-2°C כגורם סלקציה. הבצלים נשתלו במצע קוקוס באבני איתן ב-4.9.2016. משטר ההשקיה והדישון וכן הטיפול במזיקים ומחלות התבצע בהתאם לפרוטוקול גידול מסחרי של שושן. הפרטים הראשונים פרחו בסוף נובמבר 2016. החל מתחילת הפריחה ועד למחצית ינואר 2017 סומנו 33 פרטים מצטיינים מחמש קבוצות הכלאה ע"פ הפרמטרים של מספר הפעמונים לגבעול, גודל הפעמון, זווית הפעמון ביחס לציר הגבעול, מבנה התפרחת, אורך עלווה, רוחב עלווה, צפיפות עלווה. במחצית יולי 2017 נאסף כל חומר הריבוי של הקווים המצטיינים, מוין לגודל, הועבר לקרוור ב-4°C למשך 49 יום ונשתל ב-30.8.2017 במצע קוקוס בבית צמיחה בתחנת אבני איתן. נערך מעקב על מועד ואיכות הפריחה.

ממחזור ההכלאה הראשון נאספו שני הלקטים מהצרוף בו שימש הזן 'Global Beauty' כהורה נקבי והפרט LPI46 כהורה זכרי. ההלקטים נאספו במחצית ינואר 2014, כ- 65 יום לאחר ביצוע ההכלאה. מהזרעים שהופקו מההלקטים נשתלו 78 צמחים מהם פרחו ארבעה פרטים מינואר עד מרץ 2015. ממחזור ההכלאה השני נאספו 23 הלקטים מ- 11 צרופי הכלאות (טבלה 4). ההלקטים נאספו במהלך אוגוסט 2014, 70 - 80 יום מביצוע ההכלאות. ההלקטים נזרעו במגשי זריעה בינואר 2015 והוצבו להנבטה במבנה מכוסה בפוליאאתילן. ניכרה שונות גבוהה, בין 0 ל- 100 אחוז בשיעור הצלחת ההכלאות. שיעור הצלחה גבוה בביצוע ההכלאה, כלומר הפקת הלקט, איננו ערובה לאחוז נביטה גבוה. במספר צרופים היתה הצלחה מושלמת בביצוע ההכלאה, אך כנראה חיוניות הזרעים היתה נמוכה והתבטאה בשיעור נביטה נמוך (טבלה 4).
 התקבלו קרוב ל- 4000 זרעים שנשתלו בחממה להמשך המעקב וביצוע סלקציות בשנת המחקר השניה.

הורה נקבי	הורה זכרי	מס. הכלאות שבוצעו	מס. הלקטים	שיעור הכלאות מוצלח (אחוז)	אחוז נביטה ממוצע	מס. נבטים ממוצע להלקט	מס. נבטים
'Osnat'	LPI46	1	1	100	3.96	19	19
'Osnat'	'Global Beauty'	5	1	20	0.00	0	0
'Osnat'	'Illusive'	3	2	67	33.33	120	240
LPI46	'Global Beauty'	1	1	100	42.78	821	821
'Global Beauty'	'Osnat'	4	4	100	67.70	406	1625
'Global Beauty'	LPI46	6	6	100	53.38	171	1025
'Illusive'	'Osnat'	3	3	100	1.25	2	6
'Illusive'	LPI46	3	3	100	0.37	3	8
'Global Village'	'Osnat'	4	2	50		63	126
'Global Village'	LPI46	4	1	25		8	8
'Osnat'	'Global Village'	3	0	0	0.00		0
סה"כ		37	23	62		169	3878

טבלה 4. מספר הכלאות שבוצעו במחזור ההכלאות השני, (25 במאי - 3 ביוני 2014), מס. ההלקטים שהתקבל (אוגוסט 2014), מספר הנבטים ואחוז הנביטה, (מרץ 2015).

שתילת סתיו 2015 פרוחה באביב 2016 ובוצעה סלקציה חריפה. מתוך כ- 4000 פרטים שנשתלו נבחרו 154 פרטים. גורם הסלקציה הראשון היה זווית הפעמונים ביחס לגבעול. כל פרט שלא היה בעל מצג פעמונים כלפי מעלה נפסל. מאחר ומטרת התכנית היא לטפח צמחים בעלי מצג פעמון כלפי מעלה הפורחים בנובמבר-דצמבר הועברו הבצלים של הפרטים המצטיינים לקרוך קצר של 38 יום ששימש כגורם סלקציה. מטרה נוספת לקרוך הקצר הינה סנכרון האוכלוסיה של תכנית הטיפוח למחזור הגידול החקלאי של השושן בארץ ועל כן השתילה התבצעה בשבוע הראשון של ספטמבר 2016. נבחרו 33 פרטים מ- 5 קבוצות הכלאה שפרחו מסוף נובמבר 2016 עד למחצית ינואר 2017. פרטים אלו עונים על שני המאפיינים העיקריים של התכנית שהם מצג פעמון כלפי מעלה ופריחה בנובמבר-דצמבר. משתילת 30 באוגוסט 2017 הגיעו 6 קווים לשלב פריחה של קטיפה מסחרי עד למועד כתיבת הדוח במחצית נובמבר 2017. כל הקווים שהקדימו לפרוח שייכים לקבוצת ההכלאה בה ההורה הנקבי הוא טיפוס הבר LPI46 וההורה הזכרי הוא הזן 'Global Beauty'. (איור 7)



איור 7. קו טיפוח בעל מצג פעמון כלפי מעלה. מועד פריחה: 1; 4.11.2017

לתוצרי תכנית ההכלאות המדווחת בזה יש הפרטנציאל לגוון את זני השושן הגדלים בישראל. קווים אלו הינם בעלי מצג פעמון כלפי מעלה ודרישת קור נמוכה. בנוסף התקבל בתכנית המדווחת בזה אישוש נוסף לתכונת טיפוס הבר LPI46 לשמש כמקדים פריחה בתכניות טיפוח.

תגובת זני ההורים לקרור מופחת: בצלי השושן 'White Heaven' בגודל 12-14 (גדולים) ובגודל 5-8 (קטנים) נחשפו ל – 0,3,5,7,9,11 שבועות ב – 4°C לפני השתילה ונשתלו בנובמבר 2014 בחממה מבוקרת אקלים (טמפ' קבועה של כ- 25°C) בחדרים שונים בהם יושמו תנאי יום קצר (8/16, חושך/אור) או ארוך (16/8, חושך/אור). נדגמו מריסטמות מהבצלים ביום השתילה, אחרי טיפול הקור (PP), ולאחר השתילה מגבעולים בגובה 15 ס"מ (VEG), (איור B). עלים נדגמו באותו שלב. בודד RNA ונוצר cDNA מכל הדוגמאות ב3 חזרות ביולוגיות. ביטוי הגנים נבחן בתהליך של Single Cell PCR Fluidigm, במעבדה במכון ויצמן.

בצלים של זני הורים המשתתפים בתכנית ההכלאות -'Illusive', 'Global Vilage', 'Global Beauty' וכן מהזן 'White Heaven' כזן יחוס, אוחסנו ב – 4°C במשך 3 שבועות בלבד על מנת לחשוף הבדלים בין הקווים בתנאי ורנליזציה לא רוויה. לאחר החשיפה לקור, הבצלים נשתלו בתחילת נובמבר 2016 בחממה מבוקרת טמפרטורה (25°C) במוצע במשך כל היממה) בתנאי יום טבעי. נדגמו עלים באינטרוולים למעקב התפתחות ולהפקת RNA לבדיקת ביטוי גנים.

2017. פתוח סמנים מולקולריים הקשורים לפריחה בשושן

הגישה המדעית מתבססת על פיתוח סמנים גנטיים לתכונת הפריחה תוך בדיקת פרופיל הביטוי של "candidate genes" העשויים להיות מעורבים בבקרת הפריחה בשושן. האנאליזות בוצעו בצמחים שגדלו בתנאים שונים המשפיעים של מועד הפריחה (שונות סביבתית) ובמגוון זנים וקווי טיפוח (שונות גנטית). בהסתמך על מידע ביואינפורמטי מתוך אנאליזת RNA-seq של מריסטמות מבצלי שושן שבוצעה במעבדתנו (Villacorta Martin et al., 2015), נבחרו מספר גנים השייכים למסלולי הפריחה השונים במיני צמחים אחרים. *חומר צמחי*: זנים - 'Global Beauty', 'Global Vilage', 'Illusive' וקווי טיפוח מתכנית ההכלאות. הבצלים חולקו לפי גודלם (גדול-מעל גודל 8) ובגודל 5-8 (קטנים).

תנאי גידול וטיפולים: טיפולי קור לפני השתילה התבצעו תוך הטמנת בצלים בוורמיקוליט לח ואחסונם ב 4°C למשכי זמן שונים. הצמחים גודלו בחממה מבוקרת (25°C) במוצע במשך כל היממה) בתנאי יום טבעי יום ארוך (8/16 שעות אור/חושך) או יום קצר (16/8 שעות אור/חושך).

בדיקות מולקולאריות: רקמות צמחיות (מריסטמות או עלים) נדגמו בזמנים שונים לפי הניסויים, הוכנסו לחנקן נוזלי ואוחסנו ב -80°C עד להפקת ה RNA ויצירת cDNA, לפי פרוטוקולים בשימוש שוטף במעבדה. ביטוי הגנים נבדק ב- Real time PCR במכשיר באוניברסיטת בן גוריון או בתהליך של high throughput qPCR (Fluidigm), ביחידת שירות במכון ויצמן. תוצאות האנליזה נותחו בעזרת התוכנה MEV.

פיזיולוגיה של הפריחה

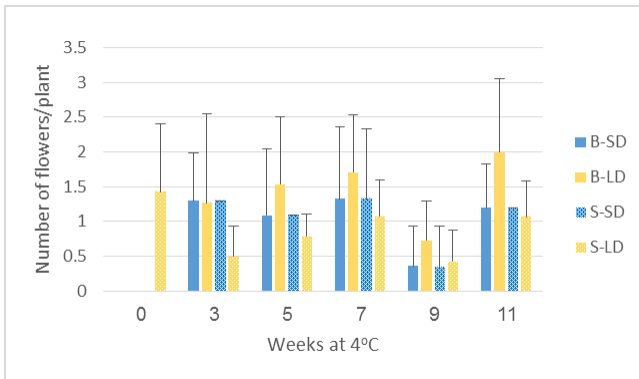
הצמחים גודלו בתנאי ורנליזציה ואורך יום שונים. מניסויים שבוצעו במסגרת מחקר אחר, נמצא שגודל הבצל משפיע מאוד על מסלול הפריחה בזן WH. פריחה התקבלה מבצלים קטנים שלא נחשפו לקור אך גדלו בתנאי יום ארוך (Lazare and Zaccai, 2016), בניגוד לבצלים הגדולים, אשר אינם פורחים ללא קור.

כצפוי, חשיפת הבצל לקור לפני השתילה גרמה להקדמת הפריחה באופן כמותי בכל הבצלים (**טבלה 5**). תנאי יום ארוך גרמו אף הם להקדמת הפריחה. כאמור, בצלים קטנים שלא נחשפו לקור פרחו ביום ארוך. באופן כללי, מספר הפרחים/צמח הושפעו מחשיפת הבצל לקור אך השונות לפרמטר זה הייתה גבוהה ולא התקבלו הבדלים מובהקים לרוב (**איור 8**). ניסוי זה, בו נוצרו מצבים בהם צמחים ממשו את הפריחה ומצבים של היעדר פריחה הווה בסיס לבחינת ביטויים של גנים נבחרים על מנת להעריך את התאמתם כסמנים.

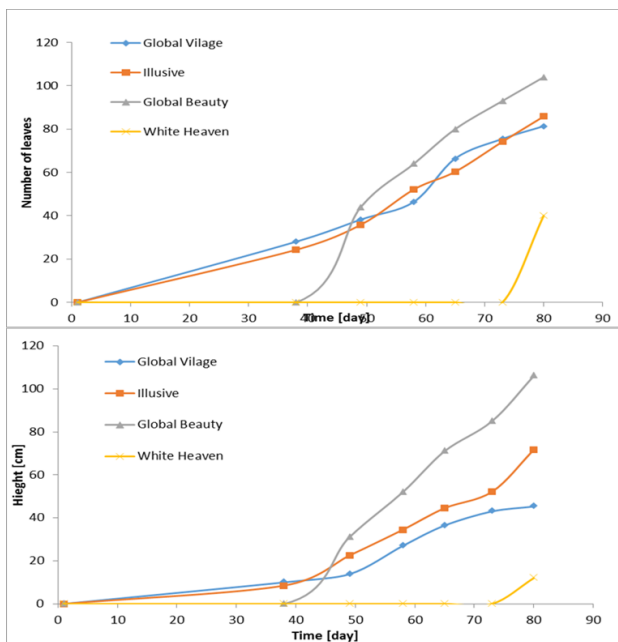
נמצאו הבדלים בתגובת זני ההורים לקרור קצר של שלושה שבועות בשני המדדים שנבדקו – מספר העלים וקצב הגידול (איור 9). מיד עם ההעברה לחממה הזנים 'Global Village' ו- 'Illusive' התעוררו והחלו לפתח עלים ולהתארך. ההתעוררות והצימוח החלו לאחר 38 יום בזן 'Global Beauty' ולאחר 73 יום בזן 'White Heaven'.

טבלה 5. השפעת ורנליזציה, גודל בצל ואורך יום על מס' השבועות משתילה להופעת ניצני פריחה בשושן הפסחא, זן SD .WH : יום קצר . LD : יום ארוך . N/A : אין פריחה, הצמחים נשארו במצב וגטטיבי והזדקנו. אותיות שונות מסמנות הבדל מובהק ($p < 0.05$). פרטים על הטיפולים מפורטים בפרק "מהלך הניסויים". $N=15$.

Photoperiod	Bulb size	Bulb exposure at 4°C (weeks) before planting					
		0	3	5	7	9	11
SD	Large	N/A	15.14 ⁱ	12.14 ^{gh}	10.70 ^{fg}	10.11 ^{def}	8.80 ^{cd}
	Small	N/A	15.20 ⁱ	11.00 ^{fg}	11.33 ^{cdef}	9.67 ^{cdef}	8.33 ^{bc}
LD	Large	N/A	12.75 ^h	9.85 ^{def}	9.42 ^{cdef}	8.10 ^{bc}	7.12 ^{ab}
	Small	12.00 ^{gh}	12.60 ^{gh}	10.30 ^{ef}	9.00 ^{cde}	8.00 ^{abc}	6.45 ^a

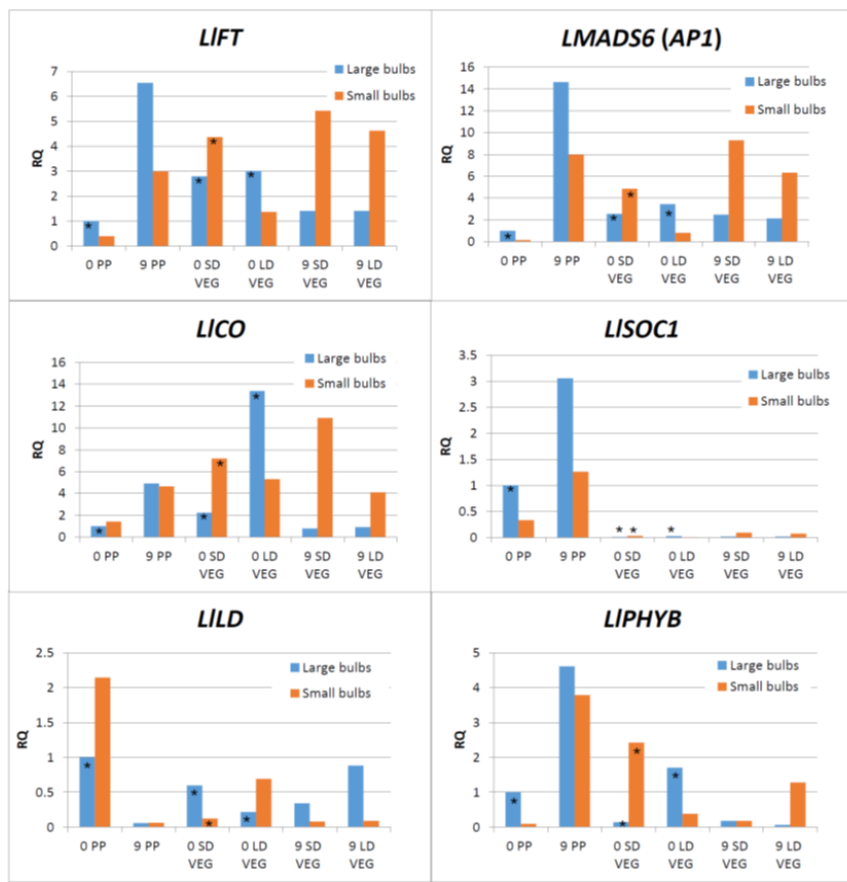


איור 8. השפעת ורנליזציה, גודל בצל ואורך יום על מס' פרחים לצמח. B : בצל קטן, S : בצל קטן, SD : יום קצר, LD : יום ארוך.



איור 9. מספר עלים (גרף עליון) וגובה (גרף תחתון) של זני ההורים במהלך הגידול בחממה לאחר חשיפת הבצלים לקרור בטמפרטורה של 4°C למשך שלושה שבועות.

בתחילת המחקר, נבחרו מס' גנים הידועים כמשחקים תפקיד חשוב במסלולי הפריחה של מיני צמחים שונים. ביטויים של הגנים הנבחרים נמדדו במריסטמות ועלים של בצלי וצמחי שושן. תוצאות ראשוניות הראו שרמת הביטוי בעלים הייתה נמוכה מאוד ולכן מוצגות תוצאות ממריסטמות בצלים בשתילה ומצמחים בשלב הוגטטיבי, לאחר התארכות הגבעול לגובה 15 ס"מ. שלושת הגנים השייכים לקבוצת האינטגרטורים של מסלולי הפריחה, *LIFT*, *LISOC1* ו *LMADS7 (AP1)* הראו עליה משמעותית בביטוי עקב החשיפה לקור לפני השתילה (איור 10). אותה מגמה נבחנו עבור הגן *LIPHYB*, וב *LICO* השייכים למסלול הפוטופריודה בארבידופסיס. לעומת זאת, ביטוי *LILD* (גם שייך למסלול הפוטופריודה בארבידופסיס) ירד עקב חשיפה לקור. בבצלים הגדולים, ביטוי *LICO* עלה מאוד במריסטמה בתנאי יום ארוך לעומת היום הקצר. אולם, לא נראתה מגמה ברורה של קורלציה בין ביטוי הגנים שנבחנו לבין מצב של מימוש פריחה או העדר פריחה. מידע על ביטוי גנים נוספים צפוי להתקבל בקרוב. בחינת ביטוי גנים אלה ואחרים בגנוטיפים שונים יוסיף מידע על התאמתם כסמנים.



איור 10. ביטוי גנים נבחרים במריסטמות שושן הפסחא, זן WH לפני ואחרי השתילה בצמחים שגדלו בתנאי גידול שונים. PP: לפני השתילה. VEG: אחרי השתילה. 0, 9: שבועות חשיפת הבצל לקור לפני השתילה. SD: יום קצר, LD: יום ארוך. *: לא התרחשה פריחה.

בהמשך המחקר, בוצעה אנליזה יותר רחבה, הכוללת כ-70 גנים שונים שנבחרו מהטרנסקריפטום על בסיס ביטויים במהלך החשיפה לקור של הבצלים ו/או השתייכותם למנגנון הפריחה במינים שונים. ביטויים של אותם גנים נבדקו במריסטמות של בצלים וצמחים שושן מזן WH אשר עברו סדרה של טיפולים שהשפיעו על פריחתם (טבלה 6). המריסטמות נדגמו לאחר הטיפולים שבוצעו בבצלים (בשתילה) ובצמחים במצב וגטטיבי לאחר השתילה. פרופיל הביטוי של הגנים במריסטמות שושן לפני ואחרי השתילה בטיפולים השונים נותח במטרה לזהות גנים המראים קשר בין ביטויים לבין מועד הפריחה.

Bulbs temperature treatment (weeks@Temperature (°C))	Bulb circumference (cm)	Day length SD=short day LD=long day	Days from planting to flowering
5@25+2@32	14	SD	No flowering
5@4+2@25	14	SD	70
5@4+2@32	14	SD	84
9@25 (Non-cooled)	14	LD	No flowering
9@25 (Non-cooled)	14	SD	No flowering
9@25 (Non-cooled)	10	LD	99
9@25 (Non-cooled)	10	SD	No flowering
9@4	14	LD	49
9@4	14	SD	65
9@4	10	LD	54
9@4	10	SD	65

טבלה 6. השפעת טיפולי טמפרטורה בבצלים לפני השתילה על מועד פריחה של צמחי שושן מזן WH. בטיפול 5@25+2@32, הבצלים שהו 5 שבועות ב-25°C ולאחר מכן שבועיים ב-32°C, בטיפול 5@4+2@25, הבצלים שהו 5 שבועות ב-4°C ולאחר מכן שבועיים ב-25°C, בטיפול 5@4+2@32, הבצלים שהו 5 שבועות ב-4°C ולאחר מכן שבועיים ב-32°C. בטיפול non-cooled, הבצלים שהו המריסטמות נדגמו ישירות לאחר הטיפול, בשתילה.

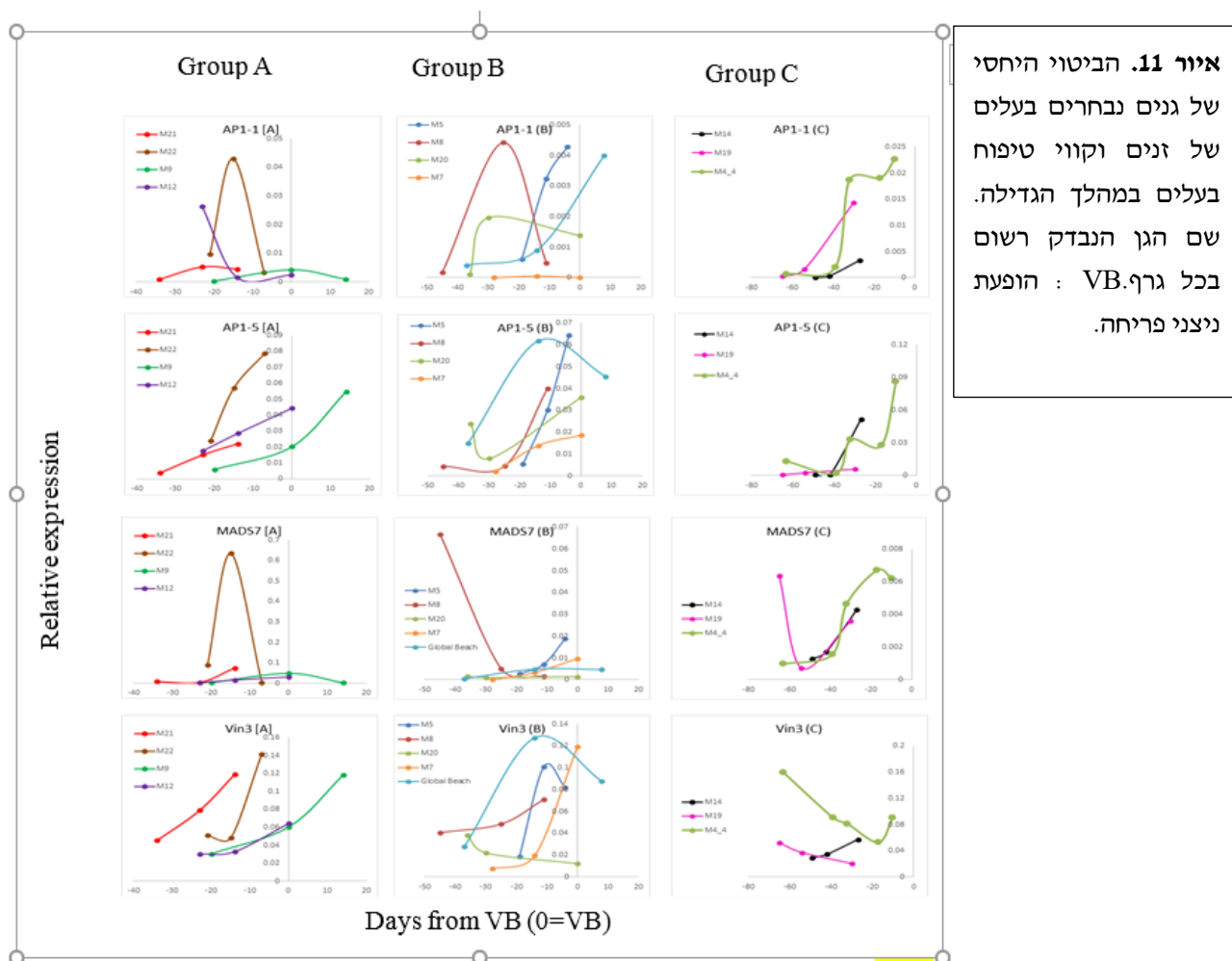
פיזיולוגיה של הפריחה ובחינת ביטויי גנים נבחרים בזנים וקווי טיפוח

נבחנו זנים וקווים מתוך מאגר השונות הגנטית של השושן הנשמר במו"פ צפון וכן קווים מתכנית הטיפוח הנוכחית. אחד מביטויי השונות במאגר הוא מועד הפריחה. זנים וקווי טיפוח מהווים מאגר גנטי בעל שונות לגבי מועד הפריחה. כל הבצלים אוחסנו ב-4°C במשך 3 שבועות בלבד על מנת לחשוף הבדלים בין הקווים בתנאי ורנליזציה לא רוויה. לאחר החשיפה לקור, הבצלים נשתלו בחממה מבוקרת בתנאי יום טבעי. נצפתה שונות עבור כל המדדים שנבדקו והצמחים חולקו ל 3 קבוצות לפי הזמן מהשתילה להופעת ניצני הפריחה (**טבלה 7**).

Group	Name	Days from planting to VB	Height at VB (cm)	Number of leaves at VB	Number of flowers/plant
A	M9 (141011-8)	57	50	69	1
A	M12 (141011-20)	72	92	82	1
A	M21 (14101-16)	72	135	139	6
A	M22 (141011-19)	79	76	85	1
B	M5 (140112-30)	83	84	91	2
B	M8 (141011-6)	83	82	113	3
B	M2 (Global Beach)	86	127	114	4
B	M7 (141011-5)	86	91	89	2
B	M11 (141011-14)	86	52	45	1
B	M20 (141110-15)	94	43	59	1
C	M19 (141101-47)	101	123	158	5
C	M4 (Illusive)	105	137		5
C	M3 (Global Village)	113	100	154	5
C	M14 (141011-24)	122	78	79	1
C	M16 (141101-10)	147	123	132	1

טבלה 7. נתונים פיזיולוגיים של זנים וקווי טיפוח שגדלו בחממה מבוקרת בתנאי יום טבעי. הזנים והקווים חלקו ל 3 קבוצות ע"פ הזמן מהשתילה להופעת ניצני הפריחה (VB): A (ורוד, עד 80 יום), B (ירוק, בין 80 ל 100 יום) ו C (כחול, יותר מ 100 יום)

לאחר שתילה הקווים והזנים בחממה, נדגמו עלים באינטרוולים למעקב התפתחות ולהפקת RNA לבדיקת ביטוי גנים נבחרים (מתוך האנליזה הני"ל) החשודים כמעודדי פריחה (flowering enhancers) (**איור 11**). באופן כללי, נרשמה עליה בביטוי של הגנים במהלך ההתפתחות, לקראת הופעת ניצני הפריחה (שלב ה VB) דבר המחזק את ההשערה כי גנים אלה אכן מעודדי פריחה, במיוחד עבור הגן AP1-5. לא נראו הבדלים משמעותיים בפרופיל ביטוי הגנים בין הקבוצות השונות חוץ מהגן MADS7, שהראה עליה בביטוי לקראת VB מלבד בקבוצה C והגן VIN3, שירד בקבוצה C לקראת VB ועלה לקראת VB בקבוצות האחרות. לצערנו בשלב זה, לא היו מספיק בצלים מכל קו/זן ולכן לא יכולנו לבצע ניתוחים סטטיסטיים. המידע הפיזיולוגי והמולקולארי עדיין פרלימינארי, אך מהווה אינדיקציה להמשך.



איור 11. הביטוי היחסי של גנים נבחרים בעלים של זנים וקווי טיפוח בעלים במהלך הגדילה. שם הגן הנבדק רשום בכל גרף. VB: הופעת ניצני פריחה.

קאלה

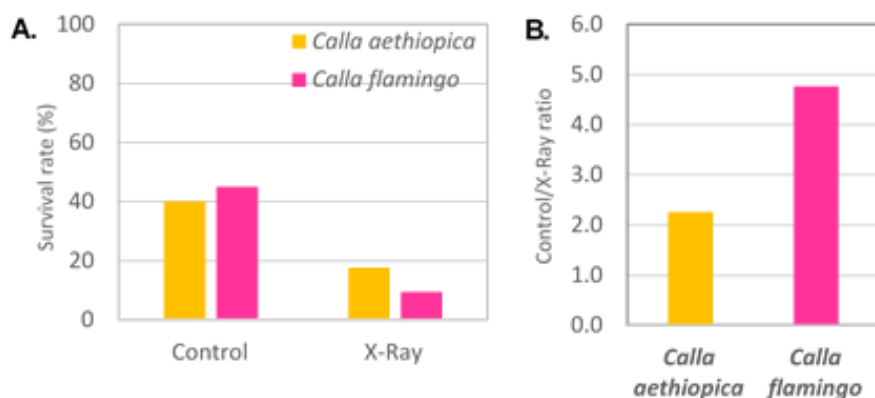
רקע: בשנת המחקר הרביעית, טופחו הצמחים שמוצאם מזרעים אשר טופלו בקרני X בשנה הקודמת (2016) במנת קרינה של 10kRad במכון ויצמן. הצמחים שגדלו מהזרעים הם: קאלה אתיופית ומוצאם מחברת "Seeds and all", דרום אפריקה; קאלה פלמנגו שיובא מהולנד ונמסרו כזרעים למכון וולקני ע"י משק "גפני" בכפר הס לנמל, Port Elizabeth, דרום אפריקה; קאלה פלמנגו שיובא מהולנד ונמסרו כזרעים למכון וולקני ע"י משק "גפני" בכפר הס לנמל, דרום אפריקה. כל החומר המוקרן מהקרנות שבוצעו בשנים הקודמות ל-2016 נשתל במו"פ לכיש לצורך מעקב מסודר אחרי מופע הפריחה והעברה של טיפוסים מעניינים לריבוי שיתבצע במו"פ בקעת הירדן. החומר נשתל בשטח של חצי דונם וכולל כ-2500 צמחים מתוכם 2000 פקעות מוקרנות מרביתן מזרעים. אחת מהמטרות המרכזיות שהוגדרו למחקר הינה מציאת דרך להפחית את רמות הוירוס בגידול ולייצר חומר נקי לשימוש עתידי. הוספנו מספר סוגי וירוסים לבדיקות תכנון פריימרים לוירוסים ספציפיים על פי רצפים שקיימים בספרות ואנו ממשיכים לבדוק את התאמתם ואת פרופיל הוירוסים הקיים בקאלה אתיופית המקומית. מטרת העל של המחקר הינה לפתח מוצרים חדשים של קאלה לבנה: זנים מקדימי פריחה, פרחים בעלי מופע ייחודי, וכן ייצור חומר ריבוי מזרעים כמותג חדש "נקי מוירוס". **מטרות המחקר לתקופת הדו"ח:** 1. שתילה בהיקף נרחב במכון וולקני ובמו"פ לכיש של צמחי קאלה אתיופית ופלמנגו שמקורם מזרעים שהוקרנו בשנת 2016 ומעקב אחרי פנוטיפים. 2. בניית פרופיל ויראלי בעזרת אנליזת טרנסקריפטום והמשך פיתוח פרוטוקול איתור וירוסים בקאלה, סריקת לתפוצת וירוסים בשדות ובדיקה לאחר הנבטה מזרעים.

מהלך העבודה:

חומר ריבוי: לאחר סקירת מקורות זרעים שונים בשנה הראשונה, הוחלט על יבוא זרעים של ק. אתיופית מחברת "Seeds and all", Port Elizabeth, דרום אפריקה, שנתנו אחוזי נביטה גבוהים והציגו אחידות גבוהה. נערכו שלושה מחזורי הקרנה בשנתיים עוקבות של הניסוי, מאלו ששרדו את המוטגנזה כ- 2000 פרטים נמצאים בגידול במו"פ לכיש ועוד 440 פרטים במכון וולקני. בין הצמחים שהתפתחו לאחר המוטגנזה נמשכה התמותה של שתילים בגלל ההקרנה. כ- 150 פרטים משמשים כביקורת לניסוי בשני האתרים.

תהליך ההקרנה: הזרעים הוקרנו במערכת X RAD 320 של חברת North Branford, CT, USA, Precision X-Ray בעזרת קרן הומוגנית העוברת בתוך גליל קרינה מוגן ובקרה ממחשבת על התהליך כולל חלון צפייה במהלך ההקרנה. ע"ס תוצאות הכיול שהתבצעו בשנת המחקר הראשונה והשנייה, ניתנה רמת קרינה של 10kRad, רמה המאפשרת הישרדות של כ- 20% מהזרעים.

כעבור שנה מהזריעה בדקנו שוב את רמת השרידות של הצמחים הבוגרים שמקורם משתי ההקרנות האחרונות שבוצעו במהלך שנת המחקר השלישית (2016) ומצאנו כי רמת השרידות במוטנטים של הקאלה האתיופית עומדת על 17.7% לעומת 40% בביקורת ופלמינגו רמת השרידות של המוטנטים עמדה על 9.5% לעומת 45% בביקורת (איור 12A). לכן ניתן לומר כי בקאלה האתיופית השרידות לאחר ההקרנה עמדה על 50% בעוד בפלמינגו על 20% (איור 1B). רמת השרידות הגבוהה יותר בקאלה האתיופית נבעה מנביטה מאוחרת של זרעים במהלך השנה. גם בפעם זו, ניתנו מנות קרינה גבוהות יחסית במטרה לקבל מוטגנזה אפקטיבית. רמת נביטה של 17% התאימה בקירוב לערכי LD50.



איור 12 – הצגת רמת השרידות של צמחי קאלה אתיופית ופלמינגו שמקורם מזרעים מוקרנים כשנה לאחר מתן מנת הקרנה. A – אחוז שרידות של הצמחים המוקרנים (X-ray) בהשוואה לצמחי הביקורת (Control) מתוך כלל הצמחים שנזרעו מכל סוג. B – יחס בין שרידות צמחי הביקורת למוקרנים בקאלה אתיופית לצד פלמינגו כשנה לאחר ההקרנה.

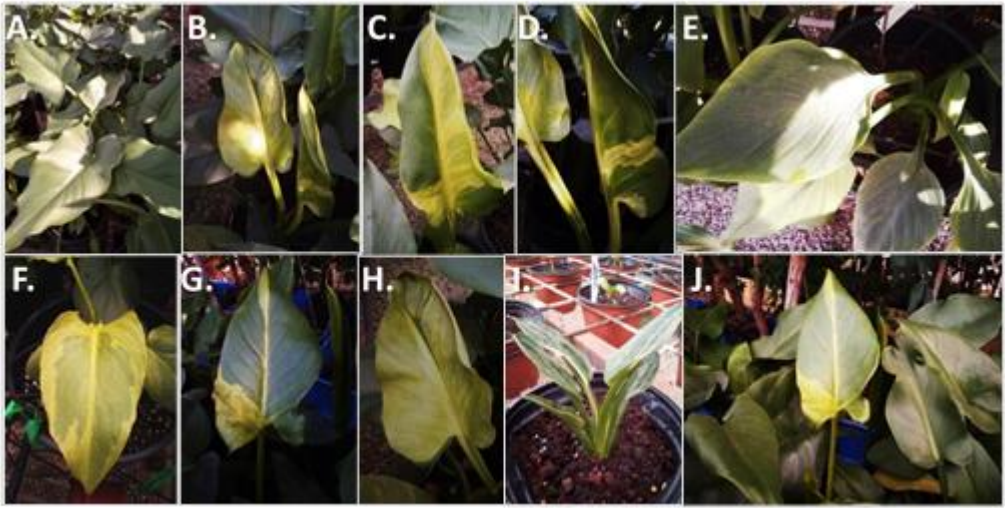
מורפולוגיה

צמחי הקאלה שגודלו במכון וולקני הועברו בשלבים לעציצים בנפח 10 ליטר מצע. במהלך הגידול אותרו מספר מופעים מורפולוגיים חריגים כמוצג באיור 2 עבור הפלמינגו ובאיורים 3-4 עבור קאלה אתיופית. בפלמינגו אותר מוטנט בעל עלה עם ברק גבוה שיתכן ושכבת הקוטיקולה שלו השתנתה (איור 13A), וכן מופעי פריחה מגוונים (איור 13B-K).



איור 13 - הצגת מופעים מורפולוגיים שונים בעלים ופרחים של צמחי קאלה פלמינגו מוקרנים שפרחו בתקופה אוקטובר-דצמבר 2017. (צמחי הביקורת לא מיוצגים מכיוון שלא נמצאו פרחים בתקופה זו. A - עלה של צמח מוטנט בעל ברק גבוה

בקאלה האתיופית אובחנו שינויי צבע בהירים או פסים בחלקים על פני העלים (**איורים 14B-J**) וכן שינוי צורת העלה למעוגל יותר (**איור 14E** וכן **15**). בפרחי הקאלה האתיופית נראו ואריאציות במידות הפרח, בצורתו וכן בגוון ירקרק כמוצג באיור 6.



איור 14 - שינויים מורפולוגיים בעלי קאלה אתיופית מוטנטים (**B-J**) בהשוואה לביקורת (**A**).



איור 15 - מופע עלים עגול בק. אתיופיקה.

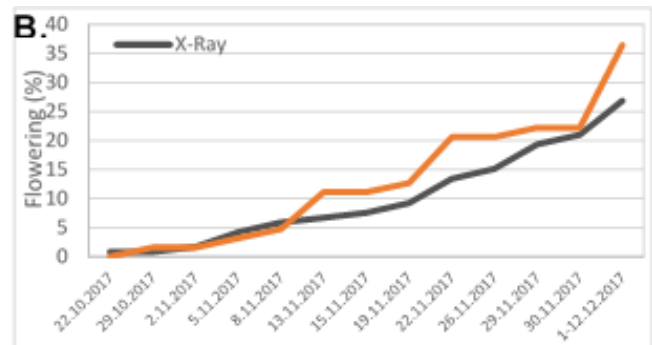
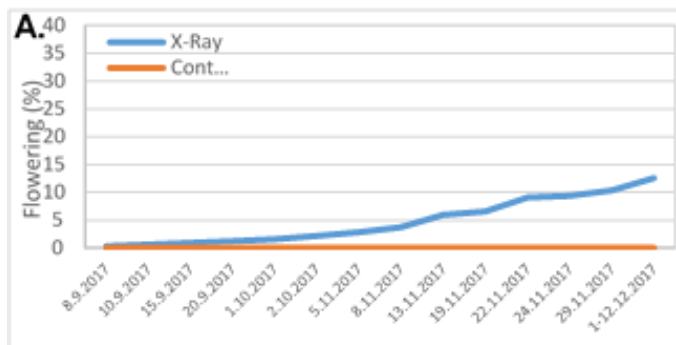


איור 16 – הצגת מופעים מורפולוגיים שונים בפריחת צמחי קאלה אתיופית מוקרנים שפרחו בתקופה ספטמבר-דצמבר 2017. (צמחי הביקורת לא מיוצגים מכיוון שלא נמצאו פורחים בתקופה זו)

מועד פריחה

צמחי הקאלה החלו לפרוח בתחילת הסתיו, כאשר האתיופית החלה לפרוח בערך כשנה לאחר הזריעה, והפלמינגו כתשעה חודשים לאחר הזריעה כמוצג ב**איור 17**. בקאלה האתיופית נצפתה פריחה ב-12.5% מהפרטים המוקרנים בלבד (**איור 18A**) ובפלמינגו ברמה גבוהה יותר, אך פחות ביחס לקבוצת הביקורת שלה (**איור 18B**). פרחי ק. אתיופיקה המקדימים היו בעלי ריח!

עפ"י בדיקה אישית עם גדעון לוריא הקדמת מועד הפריחה בקאלה אתיופית לתקופה שבין ספטמבר לנובמבר מהווה יתרון משמעותי למגדל הישראלי בתחרות בשוקי אירופה. פרטים ששומרים על תכונה של הקדמת מועד הפריחה ניתן יהיה לרשום כון ישראלי (נכון להיום אין כזה).



איור 17 – תיאור יחסי מצטבר של כמות הצמחים הפורחים מתוך כלל הצמחים מאותו הטיפול, בהם צמחים מוטנטים (X-ray) בהשוואה לביקורת (Control) במהלך ספטמבר-דצמבר 2017 בקאלה אתיופית (A) ובקאלה פלמינגו (B).

העמדת מערכת לבדיקת וירוסים בקאלה אתיופית: הסוג קאלה *Zantedeschia* שייך למשפחת הלופיים Araceae הכוללת מספר גידולי פקעת רב-שנתיים המשמשים לנוי ולמאכל. דרך הריבוי העיקרית בגידולים אלה הינה באמצעות ריבוי וגטטיבי של הפקעות או קני השורש. גישה זו אחראית במידה רבה לצבירה של וירוסים בחומר הגנטי המועברים בצמח במהלך החלוקה הגטטיבית ועם הזמן מחלישים אותו וגורמים לדפורמציות בעלים ובפרחים. מחלות וירוס בקאלה, מגבילות את הייצור, מפחיתות את היבול ופוגעות באיכותו.

מרבית הוירוסים בקאלה הנם מקבוצת הפוטיווירוס כאשר החשובים שבהם הם: *Dasheen mosaic virus* (DsMV), *Zantedeschia mild mosaic virus* (ZaMMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV) ו-*Konjak mosaic virus* (KoMV). מרבית הפוטיווירוסים תוקפים את צמחי הקאלה במשולב ויתכנו מספר מינים בצמח אחד. בנוסף לכך וירוסים אלה אינם ספציפיים ויכולים להופיע בפונדקאים נוספים. אחת המטרות בפרויקט הינה פיתוח מערכת לזיהוי וירוסים בקאלה אתיופית ושימוש בכלים ללימוד הנגיעות בחומר המיוצר מזרעים, ועובר הקרנה. סריקות לוירוסים בוצעו על בסיס מאמר (Hu et al., 2010) שהציג אוכלוסיית וירוסים בקאלה מטאיוואן. בוצעו אנאליזות PCR על cDNA מקאלות שהציגו סימפטומים ומכאלה שנראו נקיות. כביקורת שימשו צמחי טבק נגועים בוירוס ממעבדתו של עבד גרא. כוילה מערכת לבדיקת וירוסים שהוצגה בדו"ח קודם והראתה כי המעבר דרך זרעים מפחית את מרבית הוירוסים. המחקר במעבדה בכיוון זה ממשיך בגישה של NGS לאיתור כל הוירוסים בק. אתיופיקה בישראל. יש צורך בריצוף עמוק של אוכלוסיית הוירוסים בקאלות ועל בסיס הנתונים שיתקבלו לבנות מערכת דיסקציה של הוירוסים הישראליים המקומיים. לשם כך, סיווגנו את אוכלוסיות צמחי הקאלה האתיופית עפ"י סימפטומים ויראליים. לאחר בדיקת המופעים חלקנו אותם לשלושה מופעים שיתכן ונגרמים ע"י וירוסים שונים או שילוב הדבקה ממספר וירוסים, כאשר המופע המשותף לכולם היה הקטנת גודל העלה ביחס לצמח שלא מראה סימפטומים כמפורט באיור 18.



איור 18 - עלים של צמחי קאלה לבנה הנגועים בוירוסים לפי חלוקה לקבוצות על-פי מופע מורפולוגי. A - מופע תקין (V0). B - עלה מעוות, צר, מאורך ושוליים גליים, לעתים עם פסים כלורטיים עדינים, פטוטרות קצרה (V1). C - עלה רחב עם פסים כלורטיים במיקום העורקים, עם שוליים גליים ועיוותים בשטח העלה (V2). D - צמח מעוכב גידול, עלים מעוותים וצרים ומעט קטנים, לרוב ללא שינויי צבע מובהק. עלים מצמחי קאלה, כחצי שנה

מכל קבוצה המראה מופע דומה נלקחה כמות עלים (pool) וממנו הופק Total RNA ונשלח לריצוף במעבדתו של פרופסור סטפן גרין מאוניברסיטת שיקגו. בעזרת אנליזת הטרנסקריפטום שתתקבל נוכל ללמוד בצורה מהימנה את אוכלוסיית הוירוסים הישראלית בקאלה אתיופית ומהמופעים השונים לקבל פרופיל ויראלי לגבי גורמי המחלה.

דיון

בסוף השנה הרביעית (עם שלוש שנות מימון) הגענו בכל שלושת הפרויקטים להישגים מבטיחים ולמעשה ישנה תכנית להמשך המחקר והעבודה בשלושתם.

ליזיאנטוס:

במשך תקופת המחקר, עבדנו במקביל בשתי שיטות טרנספורמציה של ליזיאנטוס ובשניהם הגענו לפרחים פורחים טרנסגניים. בשיטה דרך תרביות נתקלנו בהרבה בעניות טכניות של זיהומים ולכן מספר הצמחים הטרנסגניים מוגבל מאוד ולצערנו לא הורגש בהם ריח. בשיטת הטרנספורמציה שפותחה לראשונה במסגרת מחקר זה, על ידי טבילת הפרח בתמיסת האגרובקטריום, הצלחנו להגיע למספר מכובד של צמחים טרנסגניים, עם הגן *AroG** לבד וכן צמחים עם שני הגנים *AroG** ו-*BEAT*. הראנו ששיטת טרנספורמציה זו יעילה באותה מידה כמו בצמחי ארבידופסיס, אך בניגוד לארבידופסיס, האגרובקטריום חודר כנראה לשחלת הפרח וגורם ליצירת זרעים טרנסגניים גם לאחר פתיחת הפרח ולאחר שהשחלה למעשה סגורה. אנחנו משערים שהאגרובקטריום חודר לשחלה דרך עמוד העלי, ומקווים להוכיח זאת בשבועות הקרובים, לקראת פרסום מאמר על שיטת הטרנספורמציה הזו בליזיאנטוס.

השיטה לטרנספורמציה על ידי טבילת הפרח, שפותחה במסגרת מחקר זה, היוותה בסיס להגשת הצעת מחקר נוספת למדען, שממומנת כבר כמעט שנה, שבה אנחנו מציעים לערוך גנומית את הצמחים ולגרום לשינויים בצבע בצמחים בהם אין DNA זר ולמעשה אינם נחשבים טרנסגניים.

מכיוון שהצמחים איתם הצלחנו בטרנספורמציות היו צמחי ה- *Excalibur Pink*, שהם היברידיים, בחנו את הצפי לגבי הצאצאים של צמחים אלו, על מנת לדעת למה לצפות בדור הצמחים הטרנסגניים. מצאנו שלושה, כנראה מתוך ארבעה, פנוטיפים שונים במבנה הפרח ובצבעו. אפיון פנוטיפי ומטבולומי של הצמחים הטרנסגניים עשויה לתרום מידע האם יש קשר בין מידת הגברת יצירת החומרים הנדיפים צורת הפרחוצבעו.

בשלב ראשוני זיהינו הצטברות של ארבעה מטבוליטים ריחניים, ומתוכם אחד, *Phenylethanol*, עלה באופן ניכר בצמחים טרנסגניים ולא בצמחי הביקורת. תוצאה זו מעודדת ומציעה שיתכן שבאנליזה רחבה של כל הטרנסגניים הגדלים כעת בחממה, יתכן שיהיו צמחים עם הצטברות גבוהה יותר ובעלי ריח פרחוני. אנחנו מתכננים להמשיך עם הפרויקט הזה עד לפריחה ואפיון מטבולומי מלא של הפרחים והעלווה שלהם, ומקווים לפרסם את הממצאים במאמר במשך השנה הקרובה.

שושן:

תכנית הכלאות: מטרת התכנית הינה לטפח שושן בעל דרישות קור נמוכות, שיתאים לגידול בארצות חמות ושיהיה בעל אסתטיקה רצויה כלומר בעל מצג פעמון כלפי מעלה. טיפוח השושן בתכנית זו מתבסס על שיטות "קלאסיות" של הכלאות מכוונות. מאחר ולא היו בידינו סמנים גנטיים, שיפור הסיכוי להשגת מטרות התכנית טמון בבחירה נכונה של ההורים שהשתתפו בהכלאות. החל מתחילת המילניום הנוכחי מופיעים דיווחים המתעדים את אוכלוסית הבר של שושן לונגיפלורום בשרשרת האיים מדרום יפן ועד טאיוואן (Ryukyu Archipelago). (Mojtahedi et al., 2001; Hiramatsu et al., 2013). אחד ההורים בהכלאות היה פרט שבודד מתוך כ- 600 זריעים מאוכלוסית הבר של השושן. פרט זה, שסומן כ- LPI46, הגיע מאוכלוסיה הנמצאת בקצה הדרומי של הארכיפלג, והוא כנראה בעל דרישות קור נמוכות. אחד מגורמי הסלקציה בתכנית היה משך קרור קצר לפני השתילה. עם סיום התכנית הנוכחית אנו מחזיקים ב- 33 קווים בעלי אסתטיקה טובה שפרחו לאחר קרור קצר. ב- 75% מקווים אלו (25 קווים) אחד ההורים הינו הפרט LPI46, שנבחר מתוך אוכלוסיית הבר. מימצא זה מאשש את הדיווחים בספרות המציינים שכלל שאוכלוסית הבר הינה דרומית יותר משך הזמן מזריעה לפריחה, גורם המשקף דרישת קור נמוכה, הינו קצר יותר. לפרט זה תכונות חיוביות נוספות כגון מספר פרחים גבוה לצמח והוא יוכל לשמש כהורה בתכניות טיפוח בעתיד.

תידרש שנה נוספת של בדיקות של הקווים המצטיינים. הבדיקה הנוספת תבצע בהקף של עשרות פרטים מכל קו ובסיומה יוחלט האם ניתן להתחיל ברישום של זן שהתקבל מתכנית ההכלאות המדווחת בזה. ההחלטה תתקבל בשנת 2018, כארבע שנים לאחר ביצוע ההכלאות.

פיזיולוגיה של הפריחה ומרקרים מולקולריים: על מנת לחפש סמנים מולקולריים הקשורים לפריחה בשושן, נקטנו בשתי גישות: (1) יצרית שונות במועד הפריחה תוך שימוש בשינוי בתנאי גידול בזן WH (שונות סביבתית) ו-(2) שימוש בקווי טיפוח וזנים ונחשפו לקור לתקפה קצרה (שונות גנטית). השונות הסביבתית והגנטית היוותה בסיס לבדיקת ביטוי גנים העשויים להיות מרקרים לפריחה. מניסויים פיזיולוגיים, הבחנו שלרוב, ביטוי של אותם גנים במריסטמות היה שונה לפני ואחרי השתילה. למשל, ביטוי של גנים מסויימים עלה מאוד כתוצאה לחשיפת הבצל לקור ועקב כך היו יכולים להיחשב כמעודדי פריחה, אך ביטויים לא השתנה בתנאים אינדוקטיביים לאחר הפריחה. במילים אחרות, לא מצענו מעודד או מעכב פריחה אוניברסאלי לכל שלבי התפתחות השושן. מסקנה זו הייתה חשובה להבנת הבקרה המולקולרית של הפריחה בצמח זה וגם לבחירת גנים רלוונטיים לדביקה בקווי הטיפוח. פרופיל הביטוי של רוב הגנים שנבדקו לקראת הפריחה בעלים לא היה שונה בקווי טיפוח וזנים. הגן *API-5* כנראה מעורב לשלב המעבר לפריחה ולכן וביטוי העולה לקראת פריחה יכול לשמש כמרקר. למעשה, מסתמן שההבדל במועד הפריחה של הגנוטיפים השונים נובע מאורך השלב הווגטטיבי שלהם ושתהליך המעבר לפריחה מבוקר באופן דומה. אנחנו מתכננים להמשיך לחקור את השפעת הגנים מקבוצת *API* על תהליך הפריחה והתפתחות הפרחים בשושן.

קאלה:

המשך המחקר:

1. על בסיס תוצאות אנליזת הטרנסקריפטום של שלושת קבוצות המופעים הויראליים יפותח כלי מדוייק לאפיון וירוסים בכל חומר הריבוי, כולל זרעים, צמחים לאחר מוטגנזה וחומר ריבוי מוטנטי מפקעים.
 2. פנוטיפים מעניינים שכבר סומנו יועברו לריבוי במו"פ בקעת הירדן.
 3. צמחים מוקרנים (עונה שלישית) גדלים במו"פ לכיש וצמחים לאחר הקרנה במנהל המחקר. המשך מעקב אחר פנוטיפים יתבצע בשני האתרים. ללא מימון נוסף לא ניתן יהיה לבצע את העבודה במשק מודל ולכן אנו מתקדמים בעבודה מול המו"פ ובמערכות העומדות לרשותנו.
- סכום: נמצאו מעל עשרים צמחים שהיצגו הקדמת פריחה משמעותית ביחס לביקורת. ניתן להמשיך להתקדם עמם לפיתוח זן. יש צורך בהמשך תצפית רב שנתית, כיון שמעבר לפנוטיפ הפרח יש חשיבות גם לגודל הפקעות ולתנאי הגידול. בעונה הקרובה נמשיך לאפיין פנוטיפים מוקרנים שהתפתחו מזרעים בתנאי גידול אחידים, חלקם יישלח לריבוי במו"פ בקעת הירדן לצורך המשך הפיתוח. עבודת אפיון הוירוסים ובדיקה לנוכחותם בחומר הריבוי שפותח מזרעים נמשכת ומצביעה על תהליך הגידול מזרעים כדרך טובה להפחתה של וירוסים בחומר הריבוי.

רשימת ספרות

- Aranovich D.**, Lewinsohn E. and Zaccai M. (2007) Post-harvest enhancement of aroma in transgenic lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) using the *Clarkia breweri* benzyl alcohol acetyltransferase (BEAT) gene. *Post. Biol. Tech.* 43, 255-260.
- Hu WC**, Huang CH, Lee SC, Wu CI, Chang YC, 2010. Detection of four calla potyviruses by multiplex RT-PCR using nad5 mRNA as an internal control. *European Journal of Plant Pathology* 126, 43-52.
- Hu WC**, Lin WF, Huang WZ, Huang CH, Chang YC, 2007. The production and application of the antiserum against *Zantedeschia* mosaic virus recombinant coat protein. *Plant Pathol. Bull.* 16, 31-40.
- Huang WZ**, Chung FC, Chen YL, Huang CH, Chang YC, 2005. Development and comparison of three detection methods for calla lily-infecting Dasheen mosaic virus. *Plant Pathol. Bull.* 14, 239-50.
- Kamenetsky R.**, Zaccai M. and M.A. Flaishman. 2012. Florogenesis In: Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production. Kamenetsky R. and Okubo H. (Eds.) CRC, Taylor and Francis Group, Florida, pp. 197-233

- Lee SC**, Chang YC, 2006. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA. *Plant Pathol. Bull.* 15, 187-96.
- Oliva M.**, Ovadia R., Perl A., Bar E., Lewinsohn E., Galili G. and Oren-Shamir M. (2015). Enhanced formation of aromatic amino acids increases fragrance without affecting flower longevity or pigmentation in *Petunia* x hybrid. *Plant Biotech J.* 13, 125-136.
- Van Tuyl J.M.**, Arens P. and A. Marasek-Ciołakowska. 2012. Breeding and Genetics of Ornamental Geophytes. In: *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production*. Kamenetsky R. and Okubo H. (Eds.) CRC, Taylor and Francis Group, Florida, pp. 131-158
- Zaccai M.**, and Edri N. (2002) Floral transition in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) *Scien. Hort.* 95, 333-340
- .
- Lazare S.** and M. Zaccai, 2016. Flowering pathway is regulated by bulb size in *Lilium longiflorum* (Easter lily). *Plant Biology*, In Press.
- Villacorta Martin, C., F.** Nunez de Caceres Gonzalez, J. de Haan, K. Huijben, P. Passarinho, M. Lugassi-Ben Hamo and M. Zaccai, 2015. Whole transcriptome profiling of the vernalization process in *Lilium longiflorum* bulbs. *BMC Genomics* 16:550 DOI 10.1186/s12864-015-1675-1