

דו"ח לתוכנית מחקר 857-0508-05

משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר לקרן המדען הראשי

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
857 - 0508 - 08	פיתוח גידול שושן צחור (<i>Lilium candidum</i>): ייצור פרחים וריבוי פרחים וריבוי בצלים- בשיטה semi-autotrophic וטבילה לסרוגין

ג. כללי				
מוסד מחקר של החוקר הראשי				
אוניברסיטת בן גוריון				
סוג הדו"ח			תאריכים	
סופי			תקופת המחקר	
			עבודה מוגשת הדו"ח	
			סיים	התחלה
			שנה חודש	שנה חודש
			11 06	08 07

ב. צוות החוקרים		
חוקר ראשי	שם משפחה	שם פרטי
	זכאי	מישל
חוקרים משניים		
1	עבד	גרה
2		
3		
4		
5		
6		
7		

ד. מקורות מימון עבור מיעוד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
המדען הראשי	113	90

ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים
הצגת הבעיה: השושן הצחור הינו בעל פוטנציאל שיווקי גדול כגידול חדש לייצוא. ניתן לכוון את פריחתו אך מחלות ויראליות, חוסר אחידות ונדירות בצלים מהווים בעיה ולכן מטרת המחקר היא ייצור יעיל של בצלים בתרבויות רקמה. מטרת המחקר המרכזית הינה השלמת פתוח גידול השושן הצחור כפרח קטוף וכבצל והחדרתו כמוצר חדש וייחודי לסל היצוא מישראל. המחקר הנוכחי יתמקד בעיקר בייצור יעיל וחדשני של בצלים. מטרת ספציפיות כוללות: (1) פיתוח מערכת לגידול semi-autotrophic מבוסס על שיטת טבילה לסירוגין. (2) בחינת ההתפתחות והפריחה של בצלים שיתקבלו בתרבות רקמה והכוונת הפריחה לייצור גבעולי פריחה איכותיים בכל עת; (3) ייצור צמחים חופשיים מווירוס; (4) בחינת תכונות הגידול והפריחה של חומר צמחי מהבר ועמידותו למחלות ויראליות. שיטות עבודה: ייצור מצעים מוצקים ונוזליים על בסיס MS, שימוש ב-explants ובתנאי גידול שונים, התקנת מתקני RITA, חשיפת תרבויות וצמחונים לטמפרטורות שונות, חתכים היסטולוגיים לבדיקות מריסטמטיות. תוצאות עיקריות: הריבוי המיטבי התקבל מגלדים בחושך, חיתוך הגלד גרם להגדלת הריבוי; קצב הגידול ב-RITA יותר מהיר מאשר בתרבות מוצקה אבל מסי' הבצלצולים הנוצרים/explants יותר נמוך; הקשחת הצמחונים יעילה בכ-70%; חשיפת התרבות או הבצלצול לאחר השתילה ל-15°C תרמה לחיוניות הבצלצולים, מזרזת את התפתחות הצמחון ואת מעבר הפאזה של המריסטמה; מסקנות עיקריות: ריבוי השושן הצחור בתרבות רקמה אפשרי וחיוני לקיום והספקת חומר צמחי נקי; חשיפה ל-15 מ"צ תורמת ליעילות הריבוי.

1. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	תאריך (שנה) (חודש) (יום)
-----------	-------------	---------------------	----------------------	--------------------------

פיתוח גידול שושן צחור (*Lilium candidum*): ייצור פרחים וריבוי פרחים וריבוי בצלים-

בשיטה semi-autotrophic וטבילה לסרוגין

מוגשת ע"י: מישל זכאי¹, עבד גרה²

¹המחלקה למדעי החיים, אוניברסיטת בן-גוריון בנגב, באר-שבע;

²מחלקה לוירולוגיה, הקריה למחקר החקלאי, מכון וולקני, בית-דגן

Michele Zaccai, Life Sciences Dept., Campus Bergmann, Ben Gurion University of the Negev, Beer Sheva, 84105; mzaccai@bgu.ac.il.

Abed Gera, Institute of Plant Protection, Agricultural Research Organization, The Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250, Abedgera@agri.gov.il.

מספר הפרויקט: 857-0508-08

יוני 2011

אייר תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא

חתימת החוקר _____

רשימת פרסומים: -

Zaccai, M., A. Ram, and I. Mazor, *Lilium candidum: flowering characterization of wild Israeli ecotypes*. Israeli Journal of Plant Science, 2009. 57(4): p. 297-302.

תקציר

הצגת הבעיה: השושן הצחור הינו בעל פוטנציאל שיווקי גדול כגידול חדש לייצוא. ניתן לכוון את פריחתו אך מחלות ויראליות, חוסר אחידות ונדירות בצלים מהווים בעיה ולכן מטרת המחקר היא ייצור יעיל של בצלים בתרבויות רקמה. מטרת המחקר המרכזית הינה השלמת פתוח גידול השושן הצחור כפרח קטוף וכבצל והחדרתו כמוצר חדש וייחודי לסל היצוא מישראל. המחקר הנוכחי יתמקד בעיקר בייצור יעיל וחדשני של בצלים. מטרת ספציפיות כוללות: (1) פיתוח מערכת לגידול semi-autotrophic מבוסס על שיטת טבילה לסירוגין. (2) בחינת ההתפתחות והפריחה של בצלים שיתקבלו בתרבות רקמה והכוונת הפריחה לייצור גבעולי פריחה איכותיים בכל עת; (3) ייצור צמחים חופשיים מוורוס; (4) בחינת תכונות הגידול והפריחה של חומר צמחי מהבר ועמידותו למחלות ויראליות.

שיטות עבודה: ייצור מצעים מוצקים ונוזליים על בסיס MS, שימוש ב-explants ובתנאי גידול שונים,

התקנת מתקני RITA, חשיפת תרבויות וצמחונים לטמפרטורות שונות, חתכים היסטולוגיים לבדיקות מריסטמטיות. **תוצאות עיקריות:** הריבוי המיטבי התקבל מגלדים בחושך, חיתוך הגלד גרם להגדלת הריבוי; קצב הגידול ב-RITA יותר מהיר מאשר בתרבות מוצקה אבל מס' הבצלצולים הנוצרים/explants יותר נמוך; הקשחת הצמחונים יעילה בכ-70%; חשיפת התרבות או הבצלצול לאחר השתילה ל-15°C תרמה לחיוניות הבצלצולים, מזרזת את התפתחות הצמחון ואת מעבר הפאזה של המריסטמה; **מסקנות עיקריות:** ריבוי השושן הצחור בתרבות רקמה אפשרי וחיוני לקיום והספקת חומר צמחי נקי; חשיפה ל-15 מ"צ תורמת ליעילות הריבוי.

מבוא

הצלחת תעשיית הפרחים מבוססת במידה רבה על היצע של מוצרים חדשים. השושן הצחור (*Lilium*)

(candidum, Liliacea) הינו דוגמה לגידול בעל פוטנציאל שיווקי גדול לייצוא, עקב משמעותו הסמלית לעם היהודי, ולעולם הנוצרי. ממחקר שבוצע במעבדתנו לפיתוח גידול שושן צחור כגידול חדש, אשר התמקד בבקרה על מנגנון הפריחה והכוונתה, עולה שניתן לכוון את פריחתו של השושן הצחור למועדים הרצויים ולכן יש מקום להמשיך את פיתוח הגידול. יחד עם זה, נותרו מספר בעיות - (1) נגיעות במחלות ויראליות; (2) חוסר אחידות בחומר הצמחי; (3) נדירות בצלי השושן הצחור ומחירים הגבוה; (4) פיתוח מוצר נוסף בגידול השושן הצחור: הבצלים עצמם - המעידות על הצורך לייצר בצלים נקיים ואחידים בכמויות גדולות.

הכיוון העיקרי המצריך מחקר בשלב זה הינו נושא ריבוי החומר הצמחי וייצור יעיל וזול של בצלי שושן צחור נקיים ממחלות, תוך שימוש בתרבויות רקמה ובטכנולוגיה המבוססת על הטבילה לסירוגין במתקן "RITA®" (*Réceptacle à Immersion Temporaire Automatique*). שיטה זו קלה להתקנה ולשימוש ונראתה מתאימה לעבודה הנוכחית לאור התוצאות המעודדות שהתקבלו בשימוש בה, בריבוי שושן ובצלים פורחים אחרים [1, 2]. במהלך ההתפתחות מבצלצול לבצל בוגר, כפי שנחקר בשושן הפסחא, עוברת המריסטמה הקודקודית שני תהליכים עיקריים המבוקרים באופן בלתי תלוי [3] ומתרחשים בד"כ בהפרש גדול של זמן: (1) המעבר משלב יובנלי (*juvenile*) - ייצור מספר עלים בלבד ללא גבעול - לשלב וגטיבי בוגר, מאופיין בהתרוממות של קודקוד הצמיחה ויצירת עלים מרובים ו-(2) מעבר משלב וגטיבי לשלב רפרודוקטיבי, או התמיינות לפרח [4]. לשלב ההתפתחותי ולגודל הבצלצול השפעה משמעותית על קצב הגדילה: קצב הגדילה מתגבר בבצלים בוגרים יותר או גדולים יותר לעומת בצלים יובנליים או קטנים [5]. לכן, האצת ההתרחשות של המעברים ההתפתחותיים מהווה יתרון בתהליך הייצור של הבצל הבוגר. תרדמה הינה תופעה נפוצה בבצלי שושן שגדלו בתרבות [6-9]. טמפרטורה מהווה את הגורם העיקרי המשפיע על התרדמה. חשיפה לטמפרטורה נמוכה, הדרושה לפירוק העמילן גורמת

לשבירת תרדמה ולבצבון (sprouting) הבצל, אך הטמפרטורה הדרושה לשם כך ומשך החשיפה לקור תלויים בגנוטיפ [8]. מערכת גידול *in vitro*, המאפשרת בקרה מדויקת של תנאי הסביבה, הינה מערכת אידיאלית לחקר התפתחות של הבצל והשפעת החשיפה לקור. למיטב ידיעתנו, אין דיווח על תרדמה של בצלצולי שושן צחור שהתפתחו בתרבית. כמו כן, הבצלים שקיבלו בתרבית במעבדתנו המשיכו להתפתח ללא מתן קור. סביר להניח שחשיפה לקור תזרז את התפתחות הבצל, בדומה למתרחש במיני שושן אחרים. בנוסף לשבירת התרדמה ולזירוז המעבר לשלב הוגטיבי של בצלצולים [4], החשיפה לטמפרטורה נמוכה של בצלים בוגרים גורמת להקדמת שלב המעבר לפריחה ומועד הפריחה, תוך תהליך הורנליזציה, המוכר היטב במיני שושן [10-17] וכן בשושן הצחור. ידוע שחשיפת הבצלים *in vitro* לטמפרטורות נמוכות מזרזת את התפתחותם לאחר השתילה, אך ההשפעה הישירה של הטמפרטורה על הקדמת הפריחה אינה ברורה.

מטרות המחקר

מטרת המחקר המרכזית הינה השלמת פתוח גידול השושן הצחור כפרח קטוף ובבצל והחדרתו כמוצר חדש וייחודי לסל היצוא מישראל. המחקר הנוכחי יתמקד בעיקר בייצור יעיל וחדשני של בצלים. מטרות ספציפיות כוללות: (1) פיתוח מערכת לגידול semi-autotrophic מבוסס על שיטת טבילה לסירוגין. (2) בחינת ההתפתחות והפריחה של בצלים שיתקבלו בתרבית רקמה והכוונת הפריחה לייצור גבעולי פריחה איכותיים בכל עת; (3) ייצור צמחים חופשיים מוירוס; (4) בחינת תכונות הגידול והפריחה של חומר צמחי מהבר ועמידותו למחלות ויראליות.

התוצאות העיקריות של המחקר

העבודה בתרבית בוצעה ברובה על חומר צמחי שמקורו בטיפוס מאוכלוסיית בר באזור הכרמל, בעל תפוח עשירה במיוחד וגבעול ארוך. טיפוס זה נבדק ונמצא נקי מוירוסים. בשנה הראשונה של המחקר הוקדשו רוב המאמצים לייעול מערכת הריבוי בתרבית, תוך בחינת השפעה של גורמים שונים, הכוללים רקמות מוצא (explants), הרכב המצע ותנאי אור בתרביות מוצקות. השימוש בתרביות המוצקות מאפשר בחינה בו-זמנית של גורמים רבים בחזרות לעומת מס' מתקני ה-RITA המוגבל יותר.

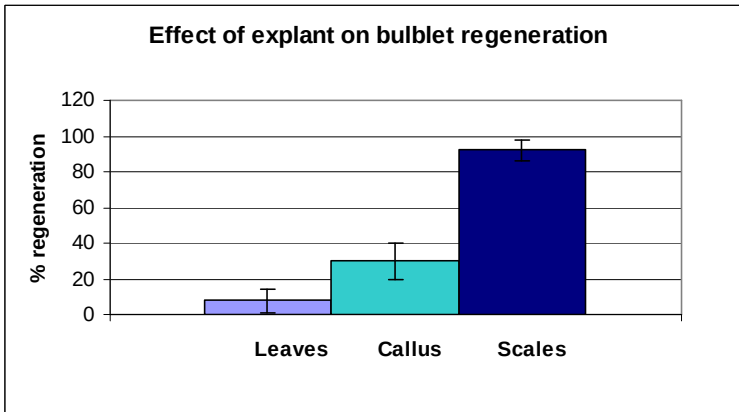
1. תרביות על מצע מוצק

שיטות עיקריות

הרכב המצע: המצעים הוכנו על בסיס מלחי MS (Murashige & Skoog, 1962) בתוספת 6% סוכרוז, ו-0.8% אגר (Duchefa). להרכב בסיסי זה הוספו הורמונים או חומרים שונים כדיקלמן: 2 מ"ג/ל NAA ו-0.1 מ"ג/ל; BA (R3), 1 מ"ג/ל NAA ו-0.1 מ"ג/ל BA (R5); 0.5 מ"ג/ל IBA ו-0.5 מ"ג/ל BA (R6); 0.1 מ"ג/ל NAA ו-0.8 מ"ג/ל BA (S1). במטרה לבדוק השפעת סוכרים והורמונים שונים, נעשה שימוש במצע- R5 בתוספת GA3 (2 או 3 ח"מ), או ancymidol (2 ח"מ) או פרוקטוז, גלוקוז, סורביטול או מניטול בריכוזים שונים. *Explants*: נעשה שימוש ב-4 סוגי רקמות מוצא: בצלצול, גלד, קאלוס ועלים. **תנאי גידול.** כל התרביות גודלו בחדר גידול ב-25 מ"צ בתנאי יום ארוך (16 שעות אור/8 שעות חושך) או בחושך. טיפול 15°C: התרביות הוכנסו לאינקובאטור בטמפ' של 15°C בחושך למשך 4 שבועות.

הקשחה (acclimation). בצלצולים בגודל שתילה וצמחונים (בצלצולים בעלי עלים מפותחים) מועברים

מהתרבית למגשי "חישתיל" בתערובת עציצים מעוקרת, כאשר כל שתיל מכוסה במיכל זכוכית למשך שבועיים. המגשים שוהים בחדר הגידול מס' שבועות ולאחר מכן השתילים המושרשים מועברים לעציצים גדולים יותר בחממה.



איור 1 – השפעת ה-explant על כושר רגנרציה בחושך. כושר הרגנרציה מבטא את % ה-explants שיצרו בצלצולים. כל תוצאה מבוססת על לפחות 20 explants ב-7 חזרות.

תוצאות

1.1. השפעת ה-explant והרכב המצע על כושר הרגנרציה של בצלצולים

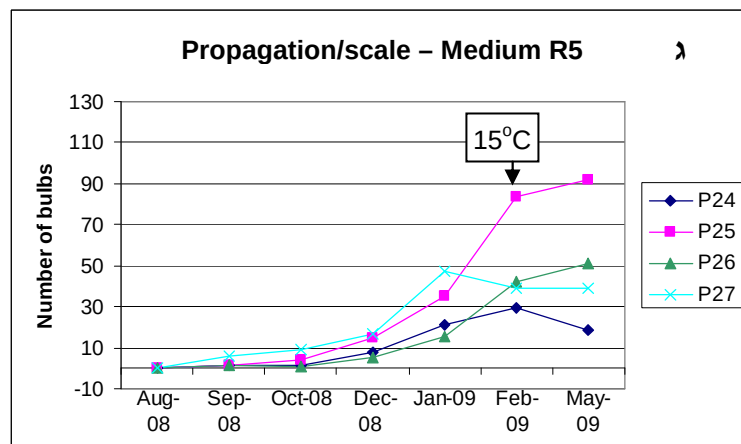
תוצאות ראשוניות שהתקבלו לפני תחילת המחקר הראו שהרגנרציה הייתה טובה יותר באופן בולט כאשר התרביות גודלו בחושך מאשר באור. יחד עם זה, נמצא שהצמחונים זקוקים לתקופה של מס' שבועות באור טרם העברתם לשתילה באדמה לקליטה מוצלחת יותר.

נבדקה השפעת ה-explant - גלדים ולבבות בצלצולים סטריליים (scales) שפורקו מצלצולים שגדלו בתרבית, קאלוסים (callus) ומקטעי עלים (leaves) - על כושר הרגנרציה בחושך. כושר הרגנרציה הוערך ע"י % ה-explants שבהם נצפתה רגנרציה של בצלצולים (איור 1).

ניתן להבחין באופן חד-משמעי שרגנרציה מגלדים הייתה הטובה ביותר מבין ה-explants (איור 1), ולכן גלדים מהווים את ה-explant העיקרי להמשך המחקר.

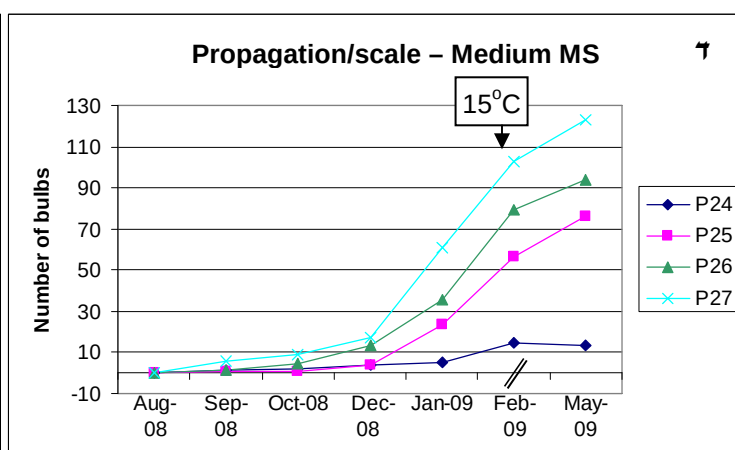
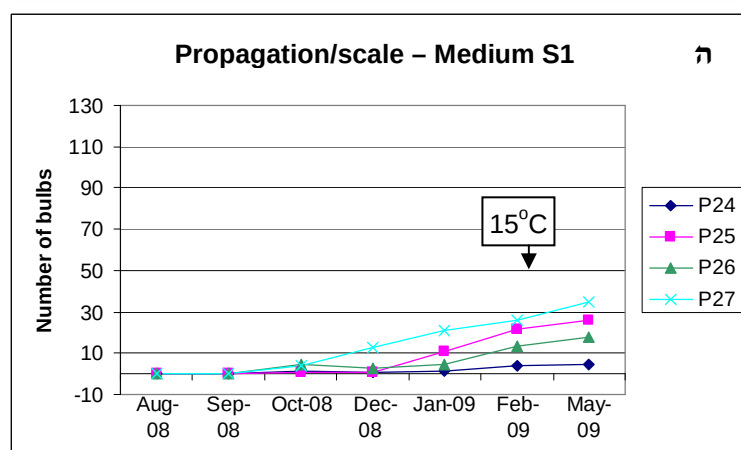
1.2. השפעת חיתוך הגלד על ייצור בצלצולים

מאחר שנקבע כי גלדים הינם ה-explants היעילים ביותר לריבוי בצלצולים בתרבית, בוצע ניסוי נוסף שבחן את השפעת חיתוך הגלד על הריבוי לאורך זמן. כחומר התחלתי, נלקחו (1) גלדים שלמים, (2) החלק עליון והחלק התחתון של גלדים חצויים לשניים לרוחב, (3) גלדים חתוכים ל-12 חתיכות קטנות (איור 2א). המבחנות הועברו לטמפרטורה של 15°C למשך 4 שבועות במהלך הגידול. נבדק מספר הבצלצולים שהתקבלו במהלך מספר חודשים כתוצאה מרגנרציה והגיעו למשקל של לפחות 100 מ"ג, שנקבע כגודל "שתילה" (איור 2ב). התוצאות כוילו למס' בצלצולים שהתקבלו לגלד אחד. בכל המקרים, נראה שחיתוך הגלד גרם להגברת ריבוי הבצלצולים (איור 2ג-ה). הרגנרציה הטובה ביותר התקבלה כאשר הגלד נחתך ל-12 חתיכות במצע MS ללא הורמונים (איור 2ד). לעומת זאת, מצע S1 גרם לריבוי המועט ביותר עבור כל ה-explants (איור 2ה).



א

סימון	Explant
P24	גלד שלם
P25	חצי גלד, חלק עליון
P26	חצי גלד, חלק תחתון
P27	גלד חתוך ל-12 חלקים

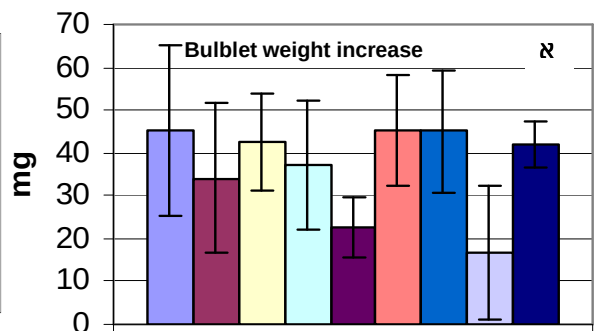
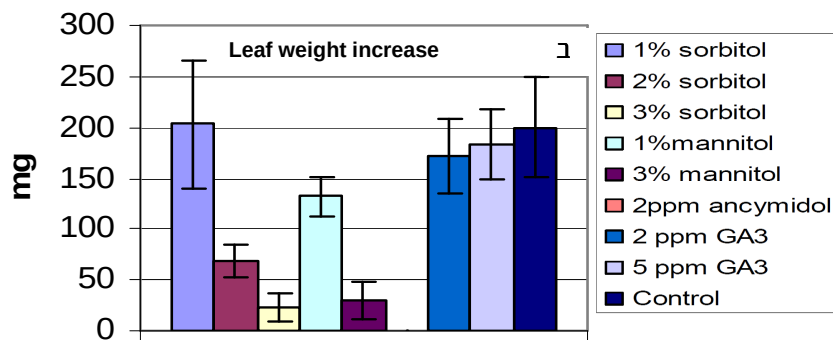


איור 2. השפעת הרכב המצע וה-explant על וקצב הגידול ומס' בצלצולים בגודל שתילה/ גלד. א. הרכב המצע סוג ה-explant; ב. בצלצולים בגודל שתילה (במשקל של 100 מ"ג); ג-ה. קצב גידול ומס' בצלצולים שהתפתחו פר גלד במצעים השונים (הרכב המצע מפורט בפרק שיטות). בפברואר, הוכנסו המבחנות לאינקובטור ב-15°C בחושך למשך 4 שבועות ולאחר מכן הוחזרו ל-25°C באור.

1.3. השפעת סוכרים שונים, ג'יברלין ומעכב ג'יברלין במצע הגידול על התפתחות הבצלים

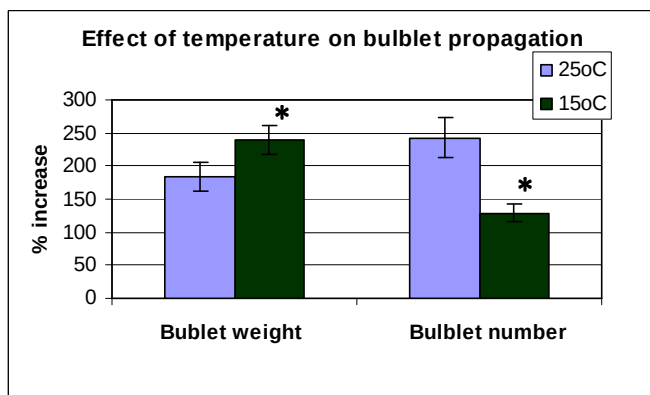
נבחנה השפעתם של סוכרים שונים (מניטול וסורביטול לעומת סוכרוז) בריכוזים שונים על התפתחות הבצלצול והעלים במשך חודשיים (חודש ראשון ב-15 מ"צ ושני ב-25 מ"צ). הניסוי בוצע על טיפוס שושן "C". שימוש במניטול או סורביטול לא השפיע על התפתחות הבצלצול (איור 3א) ובאופן כללי גרם לתוספת משקל מועטה יותר לעומת סוכרוז (איור 3ב).

עלתה ההשערה שתוספת ancymidol תגרום לגדילה מוגברת של הבצל על חשבון העלים. אומנם ה-ancymidol עיכב לחלוטין התפתחות העלים (איור 3ב), אך לא התקבלה תוספת משקל של הבצלצול לעומת הביקורת. מצד שני, תוספת GA לא הניבה גדילה מוגברת של העלים אך גרמה עיכוב בגדילת הבצלצול בריכוז של 5 ח"מ (איור 3א).



איור 3. השפעת סוכרים שונים, GA3 או ancymidol על גדילת בצלולים (א) ועלים (ב) במשך חודשיים.

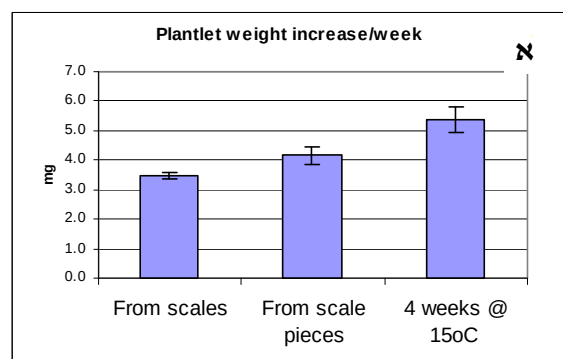
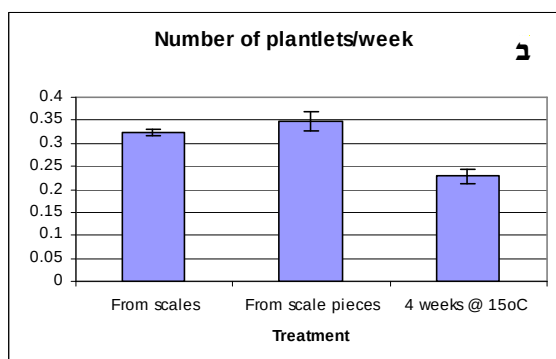
1.4. השפעת טמפרטורה נמוכה (15°C) על התפתחות הבצלולים



איור 4. השפעת חשיפת התרבית ל-15°C על ריבוי בצלולים. הריבוי התבצע מגלדים שלמים על מצע R5 למשך 15 שבועות טמפרטורה קבועה של 25°C (25°C) או ב-25°C ל-7 שבועות, 15°C ל-4 שבועות ושוב 25°C ל-5 שבועות (15°C). * : הבדל מובהק ($p < 0.05$) בין הטיפולים.

חשיפת בצלולים לאחר הרגנרציה לטמפרטורה נמוכה נעשית באופן רוטיני במיני שושן אחרים על מנת לעודד את המשך גידולם ולזרז את תהליך הבלבוב לאחר השתילה [6-9]. נבדקה ההשפעה של חשיפת התרביות לטמפרטורה של 15°C למשך 4 שבועות על התפתחות וריבוי הבצלולים שהתפתחו מגלדים שלמים. שהייה ב-15°C במשך 4 שבועות גרמה לעליה מובהקת בגדילה, אך בירידה במס' הבצלולים (איור 4).

חשיפת בצלולים ל-15°C מ"צ בתחילת הגידול גרמה להעלאה בקצב גדילת הצמחונים, אשר הייתה ניכרת גם לאחר מספר חודשים (איור 5א), אך גרמה לצמצום מס' הצמחונים המתפתחים מ-explant (איור 5ב). יש יתרון בשימוש במקטעי גלדים גם לגבי קצב גידול וגם לגבי התרבות הצמחונים, לעומת שימוש בגלדים שלמים (איור 5א, 5ב).



איור 5. השפעת explant וטמפרטורה על קצב גדילה (א) וקצב ריבוי (ב) לאורך 6 חודשים בתרבית מוצקה.

2. תרבויות נוזליות ב שיטת הטבילה לסרוגין (RITA)

שיטות עיקריות



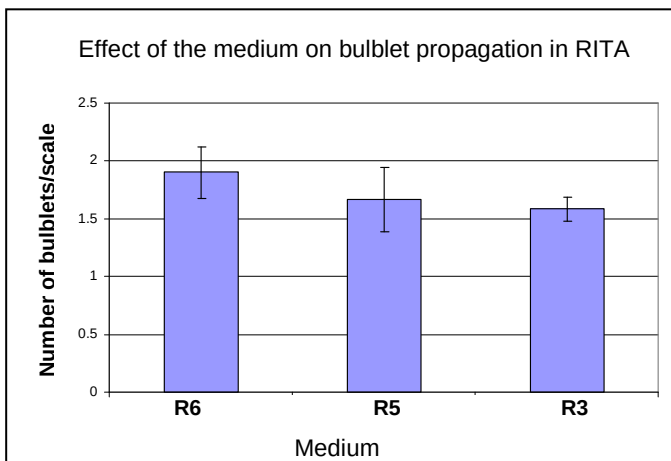
איור 6. מתקן RITA (שמול). החומר הצמחי נמצא על רשת באמצע המתקן (ימין). בר : 5 ס"מ.

הותקנו מיכלי RITA (איור 6) לפי הוראות היצרן (VITROPIC) בחדר הגידול. משאבת אקוואריום פשוטה מחוברת לכל מתקן לצורך לחץ האוויר ודחיפת הנוזל כלפי מעלה. אם לא צוין אחרת, הרקמות הצמחיות הוצפו במצע הגידול 15 דקות בהפרשים של 12 שעות. מצעי המזון הוכנו כפי שתואר לגבי התרבויות המוצקות, אך ללא תוספת אגר. מתקני ה-RITA

הוחזקו בחושך לתקופת הריבוי (לרוב 3 חודשים) ולאחר מכן הוצבו באור למשך 4 שבועות לצורך הקשחה. רמת הזיהום הייתה יותר גבוהה במתקני RITA מאשר בתרבויות המוצקות, כצפוי משימוש בתרבית נוזלית. לרוב הצלחנו להתגבר על בעיות הזיהום, אך הן גרמו לעיכוב מסוים במהלך העבודה.

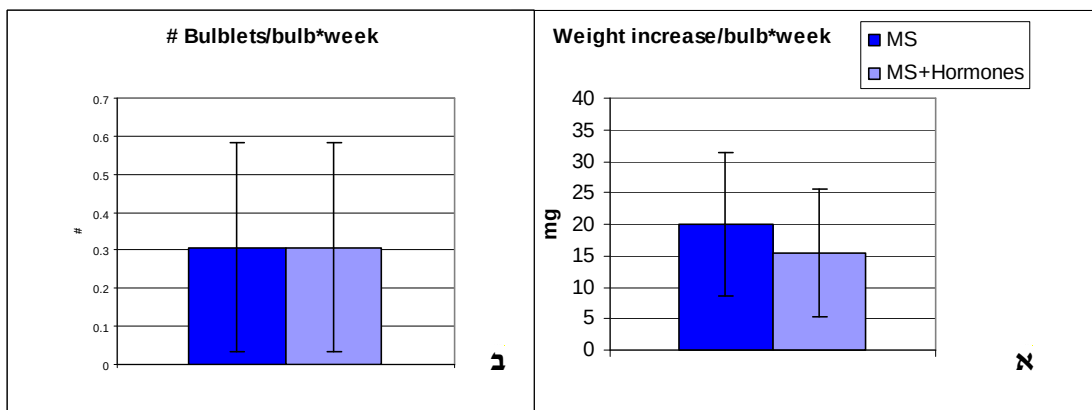
תוצאות

2.1 השפעת הרכב המצע על ריבוי בצלצולים ב-RITA



להרכב המצע (ריכוזים שונים של הורמונים) לא הייתה השפעה משמעותית על ריבוי בצלצולים מגלדים (איור 7). נבדקה גם השפעת תוספת הורמונים למצע (MS) ללא הורמונים ו-R5, "MS+hormones" על קצב ייצור בצלצולים וגדילתם (איור 8).

איור 7. השפעת הרכב המצע על ריבוי בצלצולים/גלד ב-RITA בחושך למשך 12 שבועות. הרכב המצעים מפורט בפרק שיטות. הניסוי כלל לפחות 20 חזרות לכל טיפול.

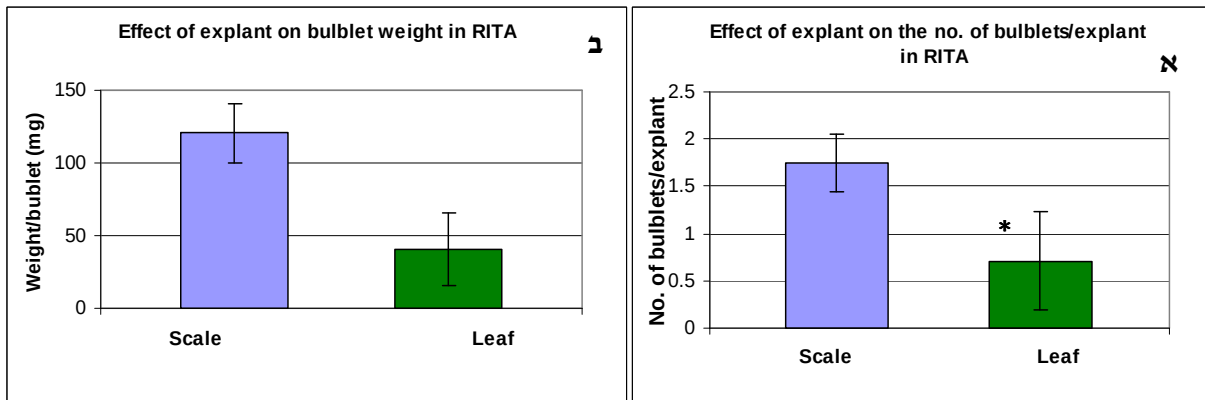


איור 8. השפעת סוג המצע על קצב גדילה (א, תוספת גדילה לבצלול לשבוע) וריבוי (ב, מס' בצלצולים לגלד התחלתי לשבוע) ב-RITA, טיפוס "S".

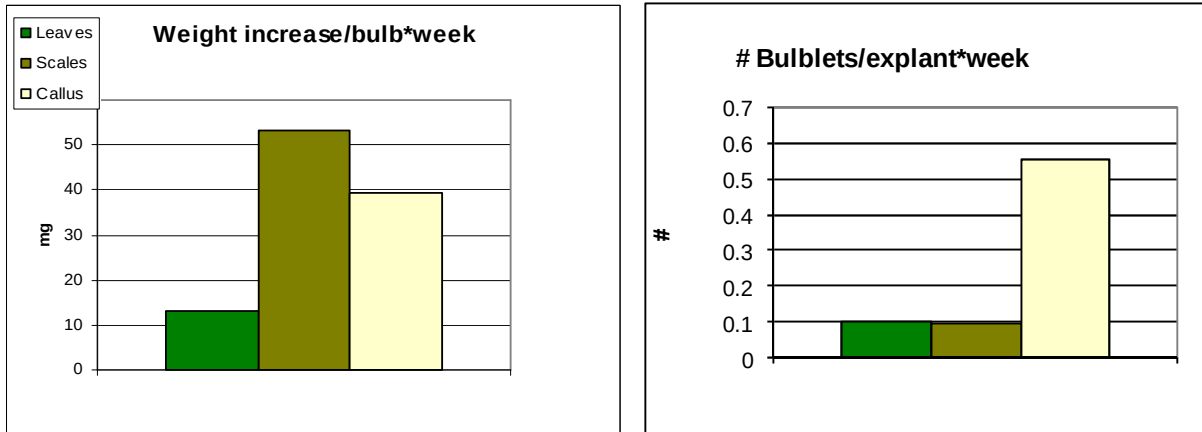
2.2. השפעת ה-explant והרכב המצע על כושר הרגנרציה של בצלצולים

נבדקה השפעת ה-explant, גלד או מקטעי עלים על ריבוי בצלצולים ב-RITA במצע R5 למשך 12 שבועות בשני טיפוסים שונים, S ו-C4 (איורים 9 ו-10). בטיפוס S, הריבוי מגלדים היה יעיל יותר לעומת העלים (איור 9), גם מבחינת מס' הבצלצולים/explant וגם מבחינת משקל הבצלצולים (איור 9).

בטיפוס C4, קצב גדילת הבצלצולים היה מירבי כאשר מקורם היו גלדים (איור 10), אך קצב ייצור בצלצולים הגדול ביותר התקבל מקאלוסים (איור 10). אך בטיפוס שושן זה, יעילות ייצור בצלצולים מעלים הייתה זהה לזו של גלדים (איור 10), לעומת הטיפוס S, בו יעילותם של העלים הייתה נמוכה בהרבה מזו של הגלדים (איור 9).



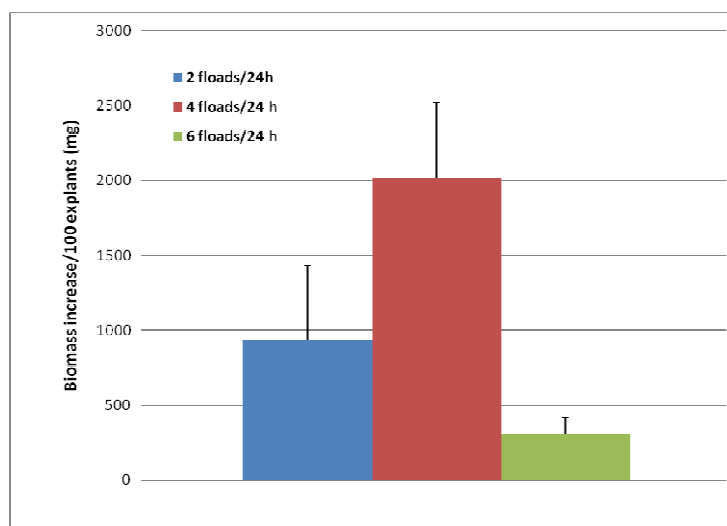
איור 9. השפעת ה-explant (גלד (scale) ומקטעי עלים (leaf)) על מס' הבצלצולים/explant (A) ועל משקל הבצלצולים/explant (B) לאחר 12 גידול במצע R5 בחושך, בטיפוס S. * : הבדל מובהק ($p < 0.05$) בין ה-explants.



איור 10. השפעת ה-explant (גלד (scale) ומקטעי עלים (leaf)) על מס' הבצלצולים/explant (A) ועל משקל הבצלצולים/explant (B) לאחר 12 גידול במצע R5 בחושך, בטיפוס C4.

2.3. השפעת תדירות השטיפה של מצע הגידול על גדילת הבצלצולים ב-RITA

בניסוי זה, בוצעה שטיפה של מצע גידול בתדירות של 2, 4 ו-6 פעמים ליממה. נעשה שימוש במצע MS ללא הורמונים ובגלדים כ-explants. כל שטיפה נמשכה 15 דקות. קצב גידול הבצלצולים הגבוה ביותר נמצא כאשר בוצעו 4 שטיפות (איור 11). יחד עם זה, מסיבה לא ברורה, קצב הגידול של הבצלצולים בניסוי זה היה נמוך במיוחד ולכן, יש לחזור על הניסוי על מנת לאמת את התוצאות.



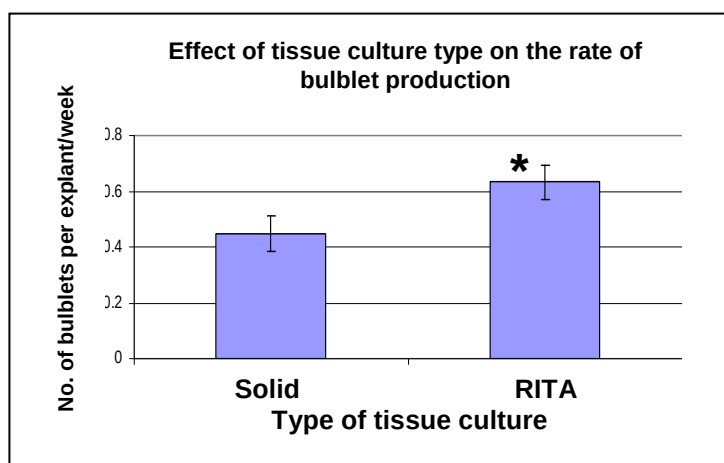
איור 11. השפעת מס' השטיפות ביממה על גדילת הבצלולים ב-RITA בטיפוס C4 במשך 12 שבועות.

2.4. השוואה בין תרבית מוצקה לתרבית ב-RITA

ככלל, התקבלו פחות בצלולים/explant ב-RITA בהשוואה בתרביות המוצקות בתקופה של 12 שבועות:

בין 1 ל-2 ב-RITA, לעומת 3-4 בתרבית מוצקה (תוצאות לא מובאות). לעומת זאת, קצב ייצור בצלולים ב-

RITA היה גבוה באופן מובהק מקצב הגידול במצע מוצק (איור 12).



איור 12. השפעת סוג התרבית על קצב התפתחות בצלולים מטיפוס S. הבצלולים התפתחו מגלדים על מצע R5 בחושך למשך 12 שבועות. הניסוי כלל לפחות 20 חזרות לכל טיפול. הבדל מובהק ($p < 0.05$) בין סוגי המצע.

3. הקשחת הבצלולים וצמחונים מהתרביות

בעיות של הקשחה גרמו לתמותה של בצלולים וצמחונים רבים במעבר מהתרבית לשתילה במיוחד לאחר גידול ב-RITA. למרות שלא נראתה זגוגיות (vitrification) בבצלולים אלו, כנראה שהתנאים במיכלי RITA והמצע הנוזלי פגעו בהתפתחות התקינה של הבצלולים.

לכן, נבחנו אמצעים שונים לשיפור הישרדות הבצלולים והתקבלו המסקנות הבאות: משקל מינימאלי של הבצלול או הצמחון לשתילה הוא 100 מ"ג; במקרים מסוימים, יש להסיר את העלים לפני השתילה על מנת לאפשר גדילה יותר טובה של הבצלול; לנוכחות שורשים, אין השפעה על חיוניות הבצלול/צמחון; יש לכסות את הבצלולים/צמחונים בניילון נצמד לאחר השתילה כשבוע; יש להעביר את הבצלולים/צמחונים מחדר הגידול לחממה (תחת רשת צל) כחודש לאחר הוצאה מן התרבית. חשיפת מיכלי ה-RITA לאור במשך 2-3 שבועות טרם השתילה תורמת לשיפור ההקשחה. תוך יישום כל המסקנות הנ"ל, אחוזי התמותה בשלב השתילה ירדו ל-30% בלבד.

4. התפתחות ומעבר שלב בבצלצולי שושן לאחר גידול *in vitro*

שיטות עיקריות

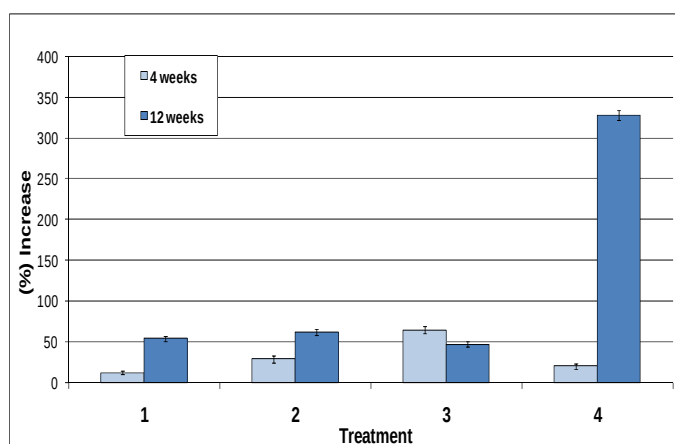
בצלצולים (טיפוס C4) שגדלו בתרבית מוצקה נשתלו במצע עציצים, עברו ההקשחה, והועברו למשטרי טמפרטורה שונים (טבלה 1) בחדרי גידול, בתנאי פוטופריודה של 16 שעות אור, 8 שעות חושך. תוספת במשקל הצמחונים במהלך הגידול חושבה באופן הבא: $100 \times (\text{משקל לאחר 4 או 12 שבועות} - \text{משקל התחלתי}) / \text{משקל התחלתי}$. בניסויים הקשורים להשפעת הטמפרטורה, המשקל ההתחלתי של הבצלצול היה כ-200 מ"ג. לאחר חשיפת הצמחונים למשטרי טמפרטורה שונים, הצמחים נשתלו לעציצים בקוטר 23 ס"מ והועברו לחממה מבוקרת להמשך הגידול למשך שנה. היקף הבצל נמדד באזור הרחב ביותר של הבצל. בניסוי הבודק את השפעת גודל הבצלצול על התפתחות הצמחון לאחר השתילה, בצלצולים במשקל ממוצע של 106.8 מ"ג ($SE=2.78$) נחשבו בצלצולים קטנים, ובצלצולים במשקל ממוצע של 221 מ"ג ($SE=2.93$) נחשבו בצלצולים גדולים.

מעבר שלב במריסטמה נבדק בעזרת חתכים היסטולוגיים. בצלצולים עברו תהליך ייבוש באתנול, קיבוע ב-FAA (50% אתנול, 5% חומצה אצטית, 5% פורמלדהיד) והעברה ל-100% TBA (tert-Butanol). הבצלצולים הועברו לפארפלט וחתכים בוצעו ע"י מיקרוטום. החתכים נצבעו ב-Toluidin blue או ב-Aceto-carmin. ונבדקו במיקרוסקופ Nikon SMZ1000 מצויד במצלמה Nikon DXM1200F.

תוצאות

טבלה 1. רצף טיפולי טמפרטורה לאחר שתילת בצלצולים

טיפול	שבוע 0	שבוע 4	שבוע 8	שבוע 12
1	25 מ"צ	25 מ"צ	25 מ"צ	25 מ"צ
2	25 מ"צ	4 מ"צ	25 מ"צ	25 מ"צ
3	25 מ"צ	15 מ"צ	25 מ"צ	25 מ"צ
4	25 מ"צ	15 מ"צ	15 מ"צ	15 מ"צ



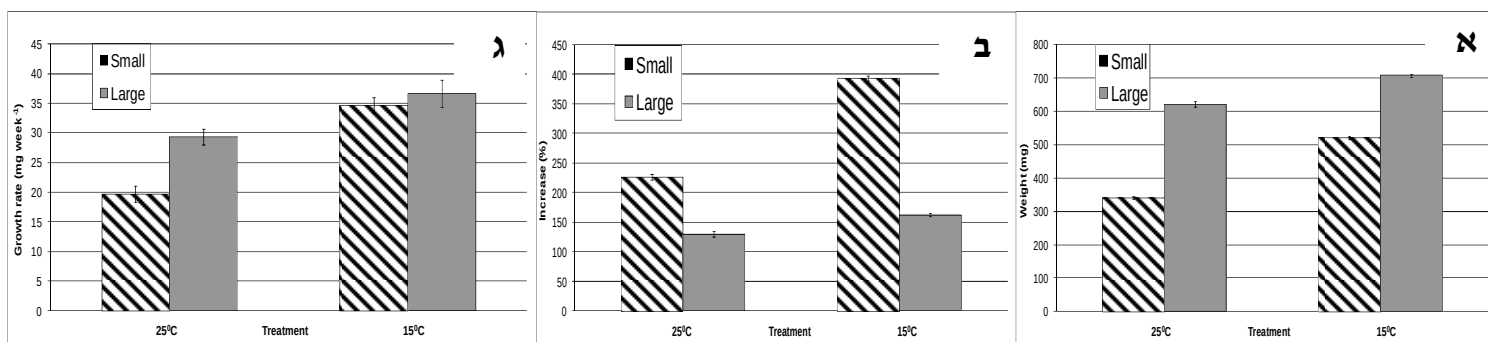
איור 13. השפעת רצף טמפרטורות - לפי הטיפולים המפורטים בטבלה 1 - על תוספת משקל הצמחונים 4 ו-12 שבועות לאחר השתילה (בצע כחול בהיר וכחול כהה, בהתאמה).

השפעת הטמפרטורה על התפתחות הצמחונים שמקורם מתרביות הרקמה לאחר השתילה נבדקה בטיפוס C4 לפי הטיפולים המתוארים בטבלה 1. ארבעה שבועות לאחר השתילה, תוספת המשקל בכל הטיפולים הייתה בין 10 עד כ-50%, כאשר התוספת המרבית נרשמה בטיפול 3, והקטנה ביותר, בטיפול 1 (חשיפה רציפה ל-25 מ"צ). לעומת זאת, לאחר 12 שבועות, נרשמה תוספת של כ-300% בטיפול 4 (חשיפה רציפה ל-15 מ"צ), לעומת תוספת של כ-50% בכל הטיפולים האחרים. מגמה זו הייתה ניכרת גם בהמשך הגידול: לאחר 16 שבועות, בצלצולים שנחשפו לטמפ' של 15 מ"צ (טיפול 4) היו יותר גדולים ויותר מפותחים מכל הבצלצולים האחרים בניסוי (איור 14). צבעם השתנה, והם אף הצמיחו בצלצול חדש בנוסף לגלדים. לעומת זאת, הבצלצולים הקטנים ביותר התקבלו בטיפול מס' 1 (טמפ' רציפה של 25 מ"צ).

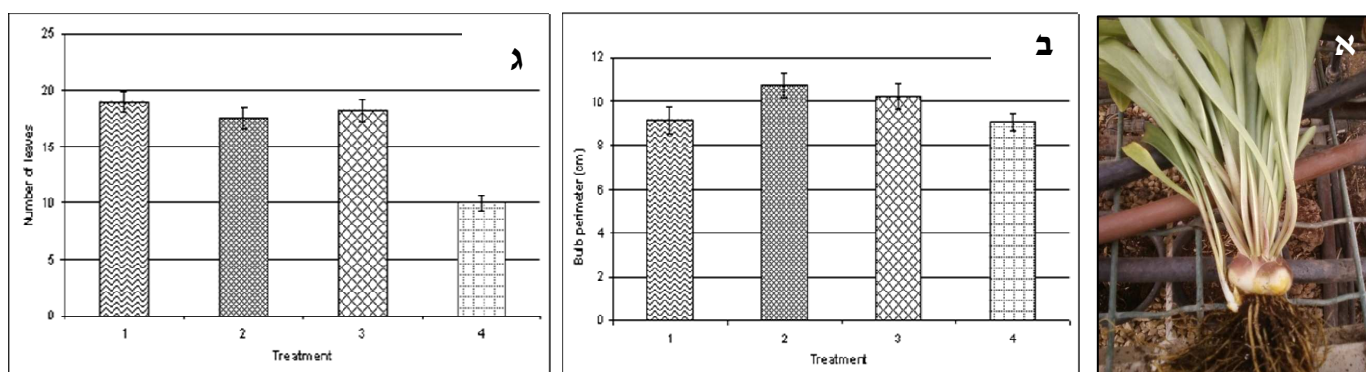


איור 14. השפעת רצף טמפרטורות על מראה בצלולים 16 שבועות לאחר השתילה. הטיפולים מפורטים בטבלה 1. (בר = 1 ס"מ)

נבדקה השפעת גודל הבצלול בשילוב עם טמפרטורת הגידול על התפתחות הצמחונים לאחר השתילה. בניסוי זה, נבחרו בצלים במשקל התחלתי שונה (קטנים וגדולים) ונחשפו לטמפרטורה של 15 או 25 מ"צ באופן רציף במשך 12 שבועות. נמצא שצמחים אשר התפתחו מבצלולים גדולים היו גדולים יותר מצמחים שהתפתחו מבצלולים קטנים (איור 15 א), אך קצב הגידול של בצלים קטנים היה גבוה יותר מזה של הבצלולים הגדולים, בני אותם משטרי הטמפרטורה (איור 15 ב). קצב הגידול לעומת זאת, היה תלוי בטמפרטורה, וגבוה יותר ב-15 מ"צ (איור 15 ג), כאשר בצלולים גדולים הראו קצב גידול גבוה יותר מהצלולים הקטנים ב-25 מ"צ.



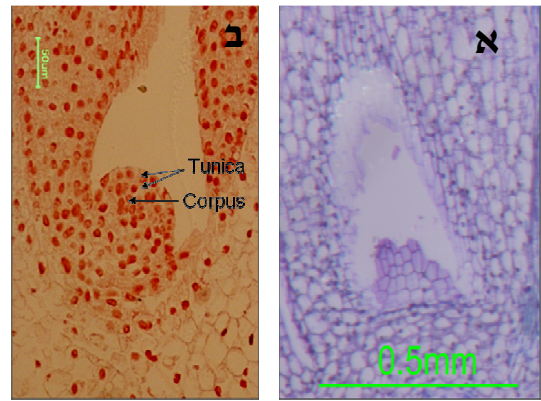
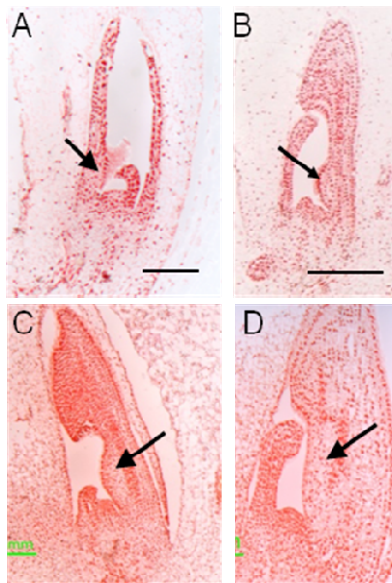
איור 15. השפעת משקל הבצלול (משקל התחלתי של 106.8 או 261.7 מ"ג – small ו-large, בהתאמה - בעת השתילה על התפתחות הצמחון לאחר 12 שבועות. א. משקל הצמחון, ב. אחוז תוספת גדילה, ג. קצב גדילה.



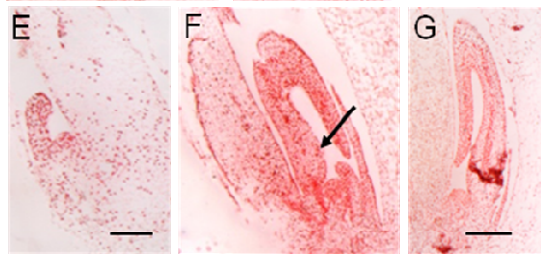
איור 16. השפעת רצף טמפרטורות (לפי הטיפולים המתוארים בטבלה 1) על התפתחות הצמחים שנה לאחר השתילה. א. מראה צמח מטיפולי מס' 1, ב. הקף הבצל, ג. מס' העלים/צמח.

השפעת טיפולי הטמפרטורה על התפתחות הצמחים לאחר הוצאתם מן התרבות נמדדה גם בבצלים בוגרים יותר (איור 16).

למרות העלייה שנצפתה במשקל הבצלולים שגדלו ב 15 מ"צ 12 שבועות מהשתילה (איור 13), לאחר שנה, בצלים אלו היו קטנים יותר ופיתחו פחות עלי שושנת מאשר בצלים שנחשפו לטיפולים אחרים (איור 16 ב, ג).



איור 17. התפתחות המריסטמה בבצלולים (חתכי אורך).
א: טיפול 1 (25 מ"צ), בשתילה; ב: טיפול 4, (15 מ"צ), 4 שבועות לאחר השתילה. לפירוט הטיפולים, ראו טבלה 1. שכבות טוניקה וקורפוס נראים ב-"ב" אך לא ב-"א".



איור 18. השפעת גודל הבצלול על התפתחות המריסטמה (חתכי אורך).
קודקודי צמיחה של בצלולים קטנים (A) וגדולים (B) לאחר 4 שבועות ב-15 מ"צ; בצלולים קטנים (C) וגדולים (D) לאחר 8 שבועות ב-15 מ"צ; בצלולים קטנים (E) וגדולים (F) לאחר 12 שבועות ב-15 מ"צ; בצלול גדול לאחר 12 שבועות ב-25 מ"צ. חצים ב-A-D מצביעים על עובי בסיס הפרי מורדיה והחץ ב-F מצביע על הפרי מורדיה. בר: 0.5 מ"מ.

השפעת הטמפרטורה של 15 מ"צ וגודל התחלתי של הבצלול על ארגון ומעבר שלב המריסטמה נחקרה בעזרת סידרה של חתכי אורך בבצלולים במשך התפתחותם. בשתילה, המריסטמה הכילה רק מספר קטן של תאים לא מאורגנים לשכבות (איור 17א). לעומת זאת, לאחר חשיפה של 4 שבועות ל-15 מ"צ, השכבות האופייניות של המריסטמה, הטוניקה והקורפוס נראו ברור (איור 17ב).

נערכה השוואה בין בצלולים קטנים וגדולים שגדלו באותה טמפרטורה של 15 מ"צ. מספר הפרימורדיות שימש כמדד להערכת מידת ההתפתחות של המריסטמה. חתכים היסטולוגיים של מריסטמות הראו כי לאחר 4 - 8 שבועות חשיפה ב-15 מ"צ, ייצור הפרימורדיות היה דומה בבצלולים קטנים וגדולים (איור 5A,D). התעבות נצפתה בבסיס הפרימורדיה לאחר 4 שבועות, (איור 5A,B חיצים), אשר הייתה עוד יותר בולטת לאחר 8 שבועות (איור 5A,C חיצים). עם זאת, לאחר 12 שבועות, בצלולים גדולים פיתחו פרימורדיות יותר קטנות מבצלולים קטנים (איור 5F חץ). שיעור גבוה יותר של פרימורדיה התפתח בבצלולים גדולים לעומת בצלולים קטנים.

הדבר עולה בקנה אחד עם שיעור צמיחה גבוה יותר של הבצלולים הגדולים בבצלולים שגדלו ב-25 מ"צ במשך 12 שבועות פיתחו פרימורדיום אחד בלבד (איור 5G) לעומת 3 בבצלים שגדלו ב-15 מ"צ למשך אותה תקופה (איור 5F).

בדיקת נוכחות וירוסים בחומר הצמחי שהתקבל מהתרביות

מכיוון שקשה מאוד לזהות ולאפיין וירוסים בחומר צמחי הגדל בתרבית רקמה ומאחר שבדיקות בשלב התרבית אינן אמינות דיו, הוחלט לבצע בדיקות מפורטות כאשר תעמוד לשרותינו כמות מספקת של צמחים מבוססים בחממה. נערכו בדיקות תקופתיות לוירוסים החשובים והנפוצים ביותר בשושן: Lily LSV (Lily symptomless virus), וירוס הנימור של השושן (Lily mottle virus) LMoV, ווירוס המוזאיקה של המלפפון, (Cucumber mosaic virus) CMV (במעבדתו של פרופ' עבד גרע. לרוב, הצמחים נמצאו נקיים מוירוסים אלו.

אפיון טיפוזי הבר

מועד הפריחה, כמות הפרחים לתפוח ואורך הגבעול בפריחה נמדדו באוסף טיפוזי הבר הגדלים בחממה, שנתיים ברציפות. נמצאה השונות בין הטיפוזים, אשר כללה כנראה מרכיבים גנטיים עבור חלק מהפרמטרים. תוצאות האפיון פורסמו [18]. לצערנו, לא ניתן היה לבדוק נוכחות/עמידות לוירוסים באוסף הטיפוזים מכיוון שבשנה השלישית של המחקר (בה תוכננה בדיקה זו), הצמחים היו נגועים מאוד במחלות קרקע. מתבצע עתה ריבוי מחודש של האוסף.

מסקנות והשלכות

1. ריבוי בתרביות מוצקות

- ה-explant היעיל ביותר היה הגלד

- חיתוך הגלד גרם לשיפור בריבוי ובקצב גדילה של צמחונים לעומת גלד שלם

- שימוש בסוכרים שונים ב-GA3 ובמעכב GA, ancymidol לא תרמו לגדילה ולריבוי בצלולים בתרבית מוצקה, ובמקרים מסוימים אף גרמו לפגיעה לעומת הביקורת (MS).

- מצע MS ללא הורמונים גרם לריבוי מרבי של בצלולים, לעומת מצע בתוספת אוקסין וציטוקינין

2. גידול ב-RITA

- קאלוסים הינם ה-explant היעיל ביותר מבחינת ריבוי ב-RITA. נראה שנוצרים קאלוסים בעלי כושר רגנרטיבי טוב, אשר מסוגלים לפתח מספר רב של בצלולים. עד כה קאלוסים התקבלו באופן ספוראדי מתרביות עלים בדיכ, אבל עדיין לא מצאנו פרוטוקול לייצור קאלוסים מכוון. יעילות הריבוי של הגלדים הייתה גבוהה יותר מזו של העלים, כפי שנמצא גם בניסויים קודמים.

- הוספת הורמונים (הרכב מצע R5) למצע MS אינה משפיעה על קצב גידול וריבוי הבצלולים.

- גידול ב-RITA גרם לקצב גידול מוגבר מאוד של הבצלולים לעומת התרביות המוצקות, אך קצב הריבוי נמצא קטן או שווה לזה של התרביות המוצקות. המשך ייעול מערכת ה-RITA עשויה לשפר גם את קצב הריבוי. לגנוטיפים שונים יש כושר ריבוי שונה.

3. הקשחת הבצלים

- חשיפת מתקני ה-RITA לאור טרם שתילה גרמה להקשחה ופתרה את בעיית תמותת הצמחונים בשתילה. החשיפה לאור כנראה גרמה לשינויים במבנה העלים, אשר הובילו לעמידות ולירידה בלחות בזמן השתילה.

4. השפעת חשיפת התרביות ל-15 מ"צ על התפתחותם

- חשיפה של 4 שבועות ב-15 מ"צ תרמה לגדילת הצמחונים. יתרון זה ניכר גם לאחר זמן ממושך. יתכן ושהות בטמפרטורה זו שוברת מצב של תרדמה או מנוחה של הבצלולים הגדלים ב-25 מ"צ. טמפ' של 15 מ"צ גורמת לגדילה מרבית של בצלולים לאחר השתילה (ראו בהמשך). עקב כך, פרוטוקול ריבוי וגידול צמחונים מתרביות רקמה צריך לכלול חשיפת בצלולים לטמפ' של 15 מ"צ.

- זירוז בגדילת הבצלולים בשלבים הראשונים לאחר השתילה לא התבטא בגודל הבצל לאחר שנה בחממה.

5. השפעת הטמפרטורה על התפתחות הבצלולים לאחר השתילה

- נראה באופן חד משמעי שחשיפה רציפה של הבצלולים לטמפרטורה של 15 מ"צ גרמה להתפתחות מזוהת שלהם לעומת טיפולים אחרים שכללו חשיפה של 4 שבועות (מתוך 12 שבועות) ל-15 מ"צ או ל-4 מ"צ. כאמור מקודם, יתכן שטמפ' של 15 מ"צ גורמת לשבירת תרדמה או מנוחה של הבצלולים מהתרבית.

- חשיפת הבצלצולים ל-15 מ"צ מזרזת את מעבר הפאזה של המריסטמה.

6. אוסף טיפוזי הבר מהווה מאגר גנטי חשוב

7. חשיבות הריבוי בתרבית

- מאחר שקיימת סכנה של איבוד חומר צמחי בשושן צחור בגלל מחלות שונות, יש חשיבות רבה לריבוי בתרבית רקמה ולחידוש מתמיד של הסטוק ממקור נקי.

3. סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.	
מטרת המחקר המרכזית הינה השלמת פתוח גידול השושן הצחור כפרח קטוף וכבצל והחדרתו כמוצר חדש וייחודי לסל היצוא מישראל. המחקר הנוכחי יתמקד בעיקר בייצור יעיל וחדשני של בצלים. מטרת ספציפיות כוללות: (1) פיתוח מערכת לגידול semi-autotrophic מבוסס על שיטת טבילה לסירוגין. (2) בחינת ההתפתחות והפריחה של בצלים שיתקבלו בתרבית רקמה והכוונת הפריחה לייצור גבעולי פריחה איכותיים בכל עת; (3) ייצור צמחים חופשיים מוורוס; (4) בחינת תכונות הגידול והפריחה של חומר צמחי מהבר ועמידותו למחלות ויראליות.	
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.	
1. בחינת השפעה של מס' גורמים על הרגנרציה והריבוי של בצלצולים בתרבית מוצקה 2. בחינת השפעה של מס' גורמים על הרגנרציה והריבוי של בצלצולים בתרבית מוצקה ב-RITA 3. בחינת השפעת חשיפה ל-15 מ"צ על רבוי, התפתחות הבצלצולים ומצב המריטם 4. בחינת הקשחת הצמחונים מתרבית 5. אפיון טיפוסי שושן צחור מאוכלוסיות בר בישראל	
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.	
1. <u>ריבוי בתרביות מוצקות</u> : ה-explant היעיל ביותר היה הגלד. חיתוך הגלד גרם לשיפור בריבוי ובקצב גדילה של צמחונים לעומת גלד שלם. שימוש בסוכרים שונים ב-GA3 ובמעכב GA, ancyimidol לא תרמו לגדילה ולריבוי בצלצולים בתרביות מוצקה, ובמקרים מסוימים אף גרמו לפגיעה לעומת הביקורת (MS). מצע MS ללא הורמונים גרם לריבוי מרבי של בצלצולים, לעומת מצע בתוספת אוקסין וציטוקינין. 2. <u>גידול ב-RITA</u> : קאלוסים הינם ה-explant היעיל ביותר מבחינת ריבוי ב-RITA. הוספת הורמונים למצע MS אינה משפיעה על קצב גידול וריבוי הבצלצולים, גידול ב-RITA גרם לקצב גידול מוגבר מאוד של הבצלצולים לעומת התרביות המוצקות, אך קצב הריבוי נמצא קטן או שווה לזה של התרביות המוצקות, המשך ייעול מערכת ה-RITA עשויה לשפר גם את קצב הריבוי. לגנוטיפים שונים יש כושר ריבוי שונה. 3. <u>הקשחת הבצללים</u> : חשיפת מתקני ה-RITA לאור טרם שתילה גרמה להקשחה ופתרה את בעיית תמותת הצמחונים בשתילה. החשיפה לאור כנראה גרמה לשינויים במבנה העלים, אשר הובילו לעמידות לירידה בלחות בזמן השתילה. 4. <u>השפעת חשיפת התרביות ל-15 מ"צ על התפתחותם</u> : חשיפה של 4 שבועות ב-15 מ"צ תרמה לגדילת הצמחונים. יתרון זה ניכר גם לאחר זמן ממושך. יתכן ושהות בטמפרטורה זו שוברת מצב של תרדמה או מנוחה של הבצלצולים הגדלים ב-25 מ"צ. טמפ' של 15 מ"צ גורמת לגדילה מרבית של בצלצולים לאחר השתילה (ראו בהמשך). עקב כך, פרוטוקול ריבוי וגידול צמחונים מתרביות רקמה צריך לכלול חשיפת בצלצולים לטמפ' של 15 מ"צ. זירוז בגדילת הבצלצולים בשלבים הראשונים לאחר השתילה לא התבטאו בגודל הבצל לאחר שנה בחממה. 5. <u>השפעת הטמפרטורה על התפתחות הבצלצולים לאחר השתילה</u> : חשיפה רציפה של הבצלצולים לטמפרטורה של 15 מ"צ גרמה להתפתחות מזוהזת שלהם לעומת טיפולים אחרים שכללו חשיפה של 4 שבועות (מתוך 12 שבועות) ל-15 מ"צ או ל-4 מ"צ. חשיפת הבצלצולים ל-15 מ"צ מזוהזת את מעבר הפאזה של המריסטמה. 6. <u>אוסף טיפוסי הבר מהווה מאגר גנטי חשוב</u> 7. <u>חשיבות הריבוי בתרבית</u> : מאחר שקיימת סכנה של איבוד חומר צמחי בשושן צחור בגלל מחלות שונות, יש חשיבות רבה לריבוי בתרבית רקמה ולחידוש מתמיד של הסטוק ממקור נקי.	
הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר.	
בדיקת וירוסים בטיפוסי הבר השונים לא יצא לפועל בגלל מחלות הצמחים	
האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - <u>יש לפרט</u> : פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.	
Zaccai M., Ram A. and Mazor I., (2009). <i>Lilium candidum</i> : flowering characterization of wild Israeli ecotypes. Israeli J. of Plant Science, 57(4): 297-302.	
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)	
☐ רק בספריות	☐
☐ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)	☐
☐ חסוי – לא לפרסם	☐

1. Pelkonen, V.-P., *Biotechnological approaches in lily (Lilium) production*, in Faculty of Science, Department of Biology,. 2005, Oulu: Oulu. p. 65.
2. Sage, D.O., *Propagation and protection of flower bulbs: current approaches and future prospects, with special reference to Narcissus*. Acta Horticulturae, 2005. **673**: p. 323-334.
3. Poethig, R.S., *Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants*. Science, 1990. **250**(4983): p. 923-930.
4. Langens-Gerrits, M., G.J. De Klerk, and A. Croes, *Phase change in lily bulblets regenerated in vitro*. Physiologia Plantarum, 2003a. **119**(4): p. 590-597.
5. Langens-Gerrits, M., G.J. de Klerk, and A. Croes, *How to produce lily bulblets in vitro that perform optimally after planting*. Acta Hort. (ISHS), 2000. **530** :p. 289-296.
6. Ishimori, T., Y. Niimi, and D.S. Han, *Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of Lilium x formolongi 'White Aga' cultured in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2007 :(3)88 .p. 313-318.
7. Langens-Gerrits, M.M., et al., *Effect of low temperature on dormancy breaking and growth after planting in lily bulblets regenerated in vitro*. Plant Growth Regulation, 2003c. **40**(3): p. 267-275.
8. Langens-Gerrits, M.M., et al., *Development of dormancy in different lily genotypes regenerated in vitro*. Plant Growth Regulation, 2001. **34**(2): p. 215-222.
9. Shin, K.S., D. Chakrabarty, and K.Y. Paek, *Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulblets regenerated in vitro*. Scientia Horticulturae, 2002. **96**(1-4): p. 195-204.
10. Dole, J.M. and H.F. Wilkins, *Interaction of bulb vernalization and shoot photoperiod on "Nellie White" Esater lily*. HortScience, 1994. **29**(3): p. 143-145.
11. Dole, J.M. and H.F. Wilkins, *Lilium, Easter. Floriculture. Principles and Species.*, in Floriculture. Principles and Species., I. Prentice-Hall, Editor. 1999. p. 417-427.
12. Holcomb E.J. and B. R., *Photoperiod, chilling and light quality during daylight extension affect growth and flowering of tissue-culture Easter lily plants*. HortScience, 2001. **36**(1): p. 53-55.
13. Miller, W.B., *Lilium longiflorum*,, in *The Physiology of Flower Bulbs*, D.H.a.L. Nard, Editor. 1993, Elsevier: Amsterdam, London, New York, Tokyo. p. 391-422.
14. Roh, S.M. and H.F. Wilkins, *Temperature and photoperiod effect on flower numbers in Lilium longiflorum Thunb.* .J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1977b. **102**(3): p. 235-242.
15. Roh, S.M. and H.F. Willkins, *The effects of bulb vernalization and shoot photoperiod treatments on growth and flowering in Lilium longiflorum Thunb. Cv. Nellie White*. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1977a. **102**: p. 229-235.
16. Roh, S.M. and H.F. Willkins, *Comparison of continuous and alternating bulb temperature treatments on growth and flowering in Lililum longiflorum Thunb.* . J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1977c. **102**(3): p. 242-247.
17. Streck, N.A. and M. Schuh, *Simulating the vernalization response of the "Snow Queen" lily (Lilium longiflorum Thunb.)* Scientia Agricola, 2005 **6** 2p. 117-121
18. Zaccai, M., A. Ram, and I. Mazor, *Lilium candidum: flowering characterization of wild Israeli ecotypes*. Israeli Journal of Plant Science, 2009. **57**(4): p. 297-302.