

דוח מסכם לתכנית מחקר מספר 20-02-0099 (132-1960-20)

שנת מחקר 3 מתוך 3 שנים

זיהוי, אפיון וכימות פטריות עובש ומיקוטוקסינים בפרחי קנאביס רפואי מסחרי ובחינת הפחתת מחלה בשיטות לא כימיות

Detection, quantification and characterization of molds and mycotoxins from commercial floral medical cannabis, and evaluation of disease reduction by non-chemical means

מוגש לקרן המדען הראשי שבמשרד החקלאות ע"י

סטנלי פרימן, מח' לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי

אדוארד סיונוב, מח' לחקר אחסון ואיכות תוצרת חקלאית ומזון, מנהל המחקר החקלאי

מרסל מימון, מח' לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי

Stanley Freeman, Dept. of Plant Pathology and Weed Research, ARO,

Rishon LeZion, 7505101. E-mail: freeman@volcani.agri.gov.il

Edward Sionov, Dept. of Food Science, ARO, Rishon LeZion, 7505101. E-

mail: edwardsio@volcani.agri.gov.il

תקציר

1. הצגת הבעיה: בשנים האחרונות בארץ ובעולם נעשה שימוש בצמח הקנאביס ובחומרים המופקים ממנו לטיפול בבני אדם הסובלים ממגוון בעיות רפואיות קשות. בחוות הגידול המאושרות בארץ היקף הנזקים ממחלות פטריות הפוגעות בתפוחות הקנאביס הרפואי (ק.ר) יכולות להגיע עד 70%. חלק מהפטריות שאופיינו הן מיקוטוקסיגניות (יצרני רעלנים) שמהוות סיכון גבוה לבריאות האדם ובעלי חיים. מטרת המחקר העיקרית היא לפתח אסטרטגיות משולבות לניטור וצמצום זיהומים הנגרמים ע"י פטריות עובש ורעלנים בפרחי ק.ר.

2. שיטות העבודה: נדגמו צמחי ק.ר סימפטומטיים מחוות גידול החשודים כנגועים במחלות פטרייתיות. חומר צמחי חוטא ונזרע על מצעי מזון שונים לזיהוי הפטריות בשיטות מורפולוגיות ומולקולריות. מפרחים נגועים ביצענו ספירות עובשים ושמרים ובחנו האם הספירות עוברות את סף הגילוי של 2,000 (CFU) לגר' תפוחת הנקבע ע"י היק"ר (יחידה לקנאביס רפואי) של משרד הבריאות. נבחנו טיפולים בקרינות גמא ובטא, פלזמה קרה וחיטוי בקיטור (שיטת חיטוי שלא הוזכרה בכתיבת ההצעה ונוספה תוך כדי המחקר) להפחתת רמת הנגיעות בתפוחות הקטופות בשיטת המיהולים בצלחות פטרי. מיקוטוקסינים מתפוחות קנאביס ופטריות התוקפות ק.ר. זוהו באמצעות HPLC המצויד בגלאי PDA וגלאי פלואורסנטי.

3. תוצאות עיקריות לתקופת המחקר: בקנאביס נגוע זוהו פטריות קרקע ונוף של סוגי אלטרנריה, בוטריטיס, אספרגילוס, ופוזריום, הגורמים למחלות עובש בתפוחות קנאביס ומייצרות מיקוטוקסינים. כמו-כן, זוהתה ואופיינה פטריית הקימחון ממספר חוות. ריכוז הפתוגנים מרוב החוות שנבדקו היו מעל לרמות הסף המקסימלית המותרת על ידי היק"ר. קרינת גמא ובטא בעוצמה של 10.3 KGy הפחיתה

רמות נגיעות של מיקרואורגניזמים מזהמים בתפרחות אל מתחת לספי הגילוי. טיפול בפלזמה קרה הפחיתה את הנגיעות בארבעה סדרי גודל. כמו-כן, טיפולי קיטור ב 70 מ"צ בחשיפות קצרות בין 10 עד 20 שניות קטלו מיקרואורגניזמים מזהמים בתפרחות מסחריות ומאולחות באופן מלאכותי. לא נצפתה פגיעה מובהקת בחומרם הפעילים. מבחני *in vitro* באמצעות מי חמצן או טיפול משולב ע"י מי חמצן עם פלזמה קרה הפחיתה משמעותית את תכולת מיקוטוקסינים במצע סינטטי. המשכנו באופטימיזציה של שיטות מיצוי של מיקוטוקסינים מתפרחות ק.ר. ומשמן של ק.ר. כמו-כן, שיפרנו סף מגבלת זיהוי ומגבלת כימות של מיקוטוקסינים באמצעות שימוש בקולונות אימונו-אפיניות. לאחר אופטימיזציה של שיטת המיצוי של מיקוטוקסינים מתפרחות ק.ר., תנאי הרצה במכשיר ה-HPLC, זיהוי וכיול הסטנדרטים, יש באפשרותנו לזהות ולכמת ארבעה תת-סוגים של אפלאטוקסינים (AFG1, AFB1, AFB2, AFG2) ואוכראטוקסין A (OTA) המיוצרים בעיקר ע"י מיני *Aspergillus*, פומוניזינים B1 ו-B2 המיוצרים ע"י מיני *Fusarium*, טריכוטצינים (HT-2) מ-*Trichothecium* - ו-סיטרינין (CTN) מ-*Penicillium*. כמו-כן, זוהו שלושה מיקוטוקסינים ממיני *Alternaria*.

4. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: מבחני קור עבור כל אחד מהפתוגנים הושלמו עבור הפתוגנים שבדודו. בחינת הטיפול בקרינות גמא ובטא, פלזמה קרה וחיטוי בקיטור הפחיתה את רמת הנגיעות בתפרחות הקטופות מתחת לסף המקסימלי המותר על ידי היק"ר. טיפול בקיטור היה יעיל ביותר בקטילת אורגניזמים בתפרחות קטופות (יצור עצמי וגם מסחרי) ולא פגע משמעותי ביצור החומרים הפעילים המיוצרים. פותחו ויושמו שיטות לזיהוי וכימות מיקוטוקסינים של פטריות שונות (כולל אלטרנריה) הלא מוכרים ולא נכללים בחוזר משנה למנכ"ל משרד הבריאות, 2017.

תוכן עניינים:

1.....	תקציר
2.....	מבוא
4.....	מטרות המחקר
4.....	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות מחקר
16.....	דיון
18.....	ביבליוגרפיה
20.....	נספחים

מבוא

בשנים האחרונות בעולם וגם בארץ נעשה שימוש בצמח הקנאביס ובחומרים המופקים ממנו לטיפול במגוון בעיות רפואיות בהם הצמח מסייע לחולים, כגון חולי סרטן, פרקינסון ומחלות נזירופטיות אחרות, להתמודד עם כאבים קשים (Amar, 2006). בחוות הגידול המאושרות בארץ מתבצע גידול אינטנסיבי של צמח הקנאביס כגידול של מונוקולטורה ובכך הצמחים נחשפים למגוון מחלות פטרייתיות, נגיפיות וחיידקיות התוקפות וגורמות לנזקים משמעותיים לצמח הקנאביס (McPartland).

et al, 2017) קיים נוהל גידול בתנאים נאותים של קנאביס רפואי (ק.ר.) הכוללת הנחיות, דרישות איכות ואמות מידה נדרשות IMC-G.A.P המונחה ע"י היחידה לקנאביס רפואי (היק"ר) של משרד הבריאות, אך אין פרוט באיזה "עובשים ושמרים" מדובר. זיהוי שגוי באבחון מחלות הצמח עשוי להוביל ליישום מוטעה של חומרי הדברה ועשוי להוביל למוצר מזיק לחולים ובכך מסכן בגרימת נזקים נוספים עבור חלק מהחולים המצויים במצב בריאותי ירוד עם מערכת חיסון מוחלשת.

חלק מהפטיות שאופיינו הן מיקוטוקסיגניות שמהוות סיכון גבוה לבריאות האדם ובעלי החיים עקב יכולתן לייצר מיקוטוקסינים (רעלני פטריות), (ICMSF, 1996). חשיפה ממושכת למיקוטוקסינים יכולה לגרום אפילו למוות (UNEP, 2016). פטריות מיקוטוקסיגניות שמייצרות מיקוטוקסינים משתייכות בעיקר לסוגים *Aspergillus*, *Penicillium* ו-*Fusarium* שאלה הסוגים שחלקם בודדו מחומר מסחרי בעבודה הקדמית שלנו. אפלאטוקסינים (Aflatoxins) מיוצרים על ידי מיני פטריית *Aspergillus*; אפלאטוקסין B1 רעלן הפוגע בכבד וידוע כמסרטן לבעלי חיים ובני אדם (CAST, 2003; Bennett and Klich, 2003). אוכראטוקסינים (Ochratoxins) מיוצרים על ידי מיני *Penicillium* ו-*Aspergillus* (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007), כמו-כן, טריכוטצאנים (Trichothecenes) מיוצרים ע"י מיני פטריות *Fusarium*, ו-*Tricothecium* שגם כן בודדו מחומר ק.ר. מסחרי לאחרונה במעבדתנו; שני מיקוטוקסינים חשובים DON (deoxynivalenol) ו-T-2 טוקסין עלולים לגרום לשלשולים והקאות, חולשה, תת לחץ דם ומוות בחשיפה לרמות גבוהות (Osweiler, 2014). כמו-כן, פומוניזין B1 חשוד כמעורב באפידמיולוגיה של סרטן הוושט (Wang et al., 2000; Chelule et al., 2001).

עפ"י היק"ר, מתבצעות בדיקות של אפלאטוקסינים ואוכראטוקסין A בלבד, ואת הרמות המקסימליות המותרות בק.ר. נקבעו לגבי אפלאטוקסין B1 ולכלל אפלאטוקסינים. אין כיום דרישות לניטור ומעקב לטריכוטצאנים (DON ו-T-2), פומוניזנים וזיראלינון המיוצרים ע"י מיני *Fusarium* ו-*Tricothecium*. רעלנים המיוצרים ע"י מיני *Alternaria* נפוצים מאד בפרחי קנאביס הגדלים בארץ (פרימן, דווח אישי). לא חלה חובה על מגדלי ק.ר. לבדוק ולוודא את רמות רעלנים אלה שרובם מסרטנים וגורמים נזק בריאותי בלתי הפיך לבני אדם. לכן, ניטור, אפיון והגדרת רעלני פטריות מסוכנים (ולא רק אפלאטוקסינים ואוכראטוקסין A) בק.ר. מאוד חיוניים כדי למנוע התפרצויות של הרעלה ע"י מיקוטוקסינים אלה וכדי לשמור על סטנדרטים גבוהים של בטיחות ואיכות המוצר בישראל.

נבחנו מספר שיטות ניקיון של פרחים נגועים בגישות לא כימיות וידידותיות לסביבה:

1. פלסמה קרה לחיטוי קוטלת פטריות (<http://novaplasma.com>) – כשגז מתפרק לחלקים האטומיים וכך יוצר רדיקלים ריאקטיביים מאוד מבחינה כימית (OH, NO ועוד). לאחרונה, השתמשו בשיטה זו באמצעות H₂O₂ להדברת *Aspergillus* sp. בק.ר. (Ruchlemer et al., 2015).
2. נבחנו סוגי הקרנות בטא (לא מייננת) וגמא (מייננת) שבשימוש נרחב ע"י חב' שור-ואן מהמרכז למחקר גרעיני בנחל סורק שהראו יעילות גבוהה בקטילת מיקרואורגניזמים בעלי תבלינים ובקנאביס רפואי (Jeong et al., 2015; McPartland et al., 2017).

3. כמו-כן, נבחנה שיטת הקיטור (מכשיר הנבנה ע"י חברת עשת אילון בשותפות של רפי רגב מהמכון להנדסה חקלאית, מנהל המחקר החקלאי) לקטילה של מזהמים של תפרחות קנאביס לאחר הקטיף.

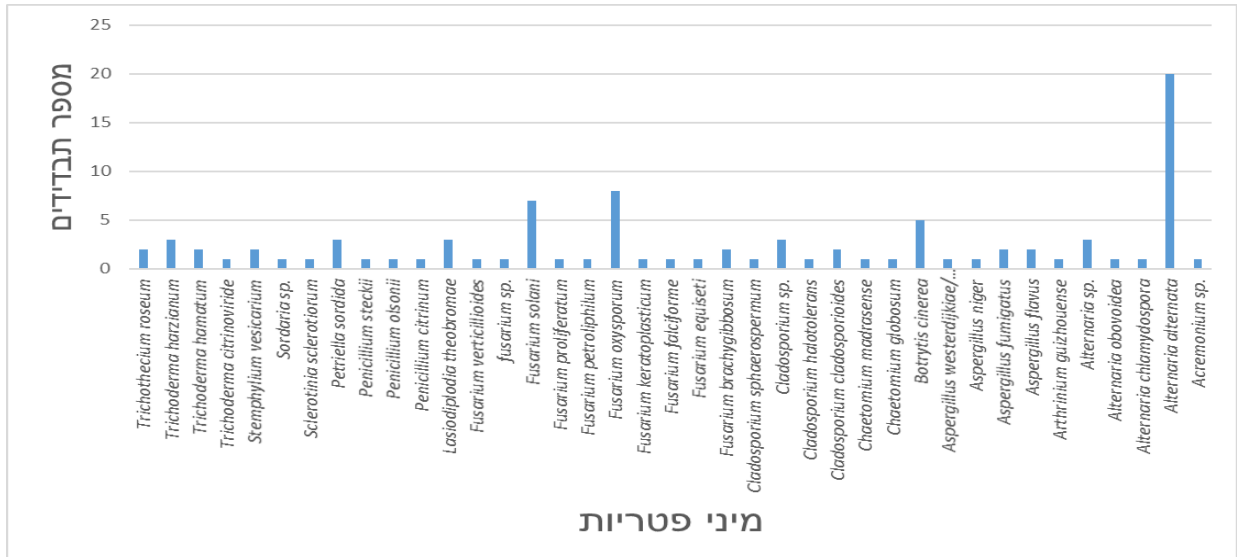
מטרות המחקר

לפתח אסטרטגיות משולבות לניטור וצמצום זיהומים הנגרמים ע"י פטריות עובש ורעלנים בפרחי קנאביס רפואי. מטרות המשנה:

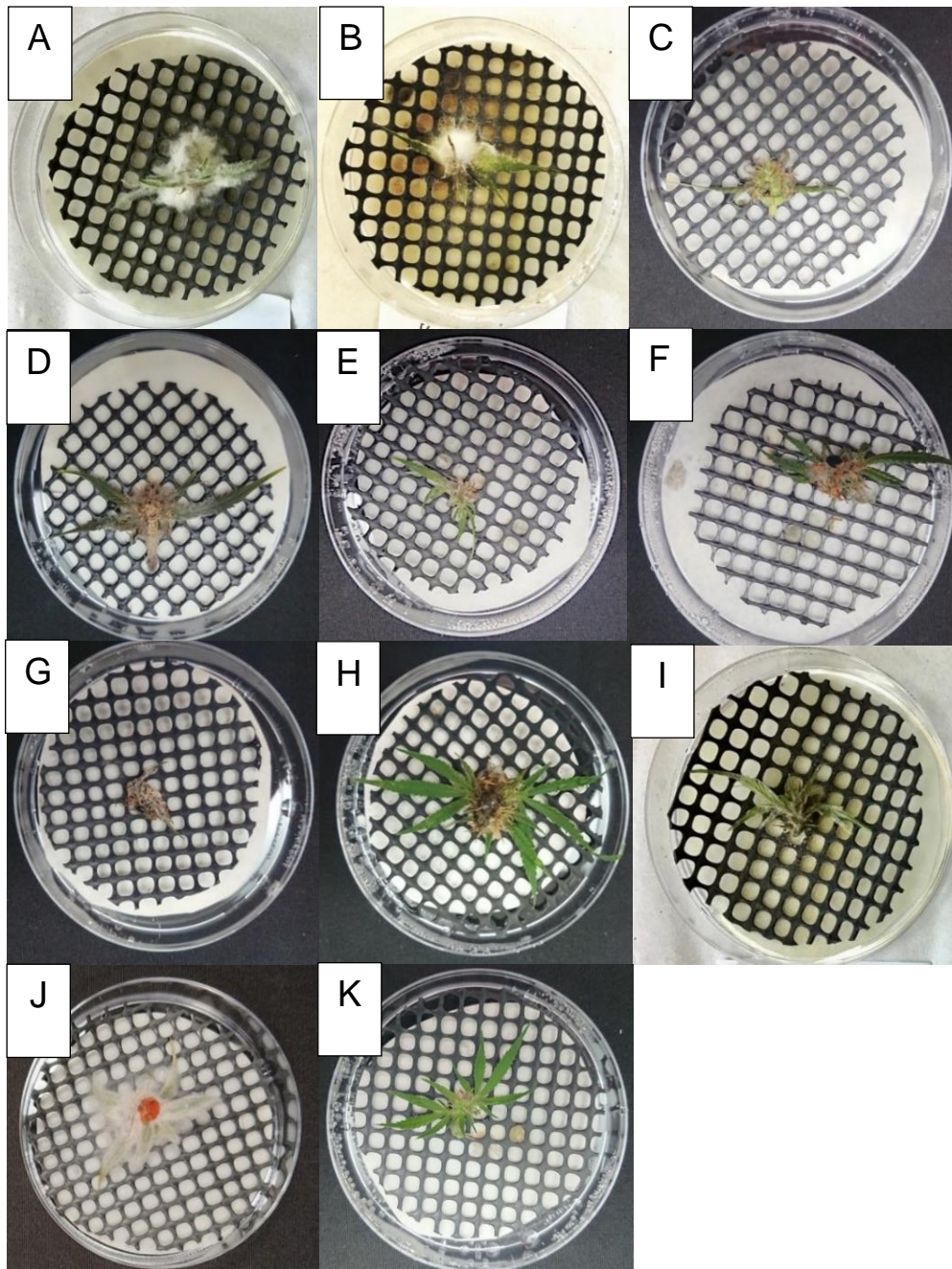
1. דיגום קנאביס רפואי (ק.ר.) מחוות שונות לקביעת רמת הניקיון של החומר התרופתי
2. כימות רמות ה"עובשים ושמרים" בתוצרת הק.ר.
3. זיהוי ואפיון של גורמי המחלה הספציפיים בתוצרת הק.ר. המסופק למטופל
4. ניטור, מעקב וקביעת רמות המיקוטוקסינים מאורגניזמים פטרייתיים המבודדים מפרחים נגועים
5. בחינת שיטות ניקיון של פרחים והפחתה של נגיעות בפרחים בשיטות לא כימיות וידידותיות לסביבה

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות מחקר

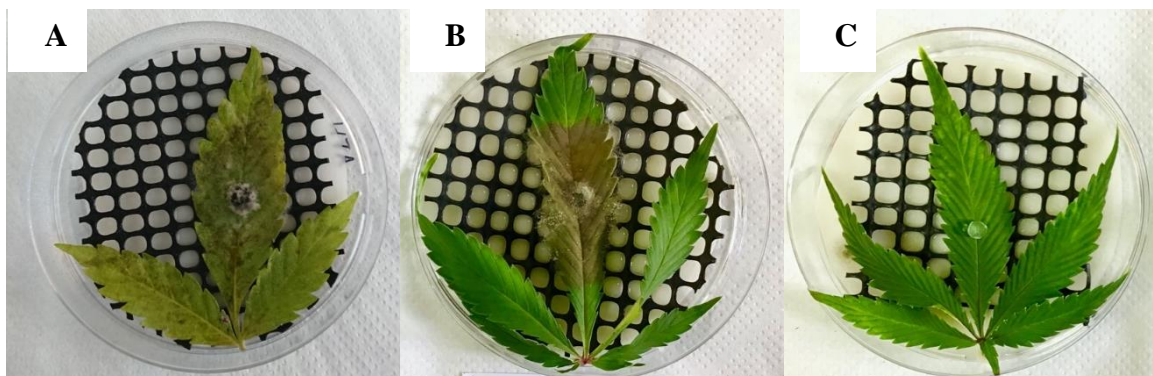
1. דיגום קנאביס רפואי (ק.ר.) מחוות שונות לקביעת רמת הניקיון של החומר התרופתי
 2. כימות רמות ה"עובשים ושמרים" בתוצרת הק.ר.
 3. זיהוי ואפיון של גורמי המחלה הספציפיים בתוצרת הק.ר. המסופק למטופל
- בסיוורים שנעשו במספר חוות גידול בארץ החל מ-2016 ועד 2021, התקבלו צמחי קנאביס החשודים כנגועים במחלות. כמו-כן, נדגמו צמחים לאחר שיווק מהחוות לפני חלוקה למטופלים. חומר צמחי החשוד כנגוע במחלות חוטא ונזרע על מצעי מזון שונים לזיהוי פטריות שונות. מפרחים נגועים בוצעו ספירות של יחידות ריבוי (CFU) לגר' תפרחת, כשלפי הנחיות היק"ר הספירה הכללית של 20,000 (CFU) וספירה ספציפית של עד 2,000 (CFU) עובשים ושמרים לגר' תפרחת הם הגבול העליון שמעבר לערכים אלה החומר אינו ראוי לשימוש ושיווק. לאחר הבידוד מהפרחים וחלקי צמח שונים בוצע זיהוי מורפולוגי ומולקולרי ע"י הפקת DNA, הגברה של גנים שונים, וריצוף והשוואה למאגרי המידע לקבלת אימות לרצף הפטרייה. כמו-כן, בוצעו מבחני קוך, על מנת לאמת כי הפטרייה שבודדה אחראית לגרימת המחלה בצמחי המקור (טבלאות 4 ו-5, נספח). מחומר הצמחי שהציג תסמיני מחלה שונים ונדגם מחוות גידול ברחבי הארץ בודדו מספר פטריות בעלות פוטנציאל פתוגני (איור 1). הושלמו מבחני קוך בעלים מנותקים וצמחים שלמים בעלי תפרחות עבור פטריות שהופיעו מספר רב של פעמים (איור 2; טבלה 2) וכמו-כן עבור פטריות בעלות חשיבות בתחום גידול הקנאביס, כגון *Alternaria alternata* ו-*Botrytis cinerea* (איור 3) ו-*Fusarium oxysporum*] (איור 4; וטבלאות 4 ו-5 (נספח)). לאחרונה, מחלת הקימחון, הנגרמת ע"י הפטרייה *Golovinomyces cichoracearum*, התגלתה בפעם הראשונה בארץ בשנת 2019. הושלם מבחן קוך בצמחים שלמים. הפטרייה ממשיכה להתפשט וגורמת להפסדי יבול ניכרים המתבטא בריקבון התפרחות, אך אינה מייצרת רעלנים (איור 5; Maymon et al. 2020).



איור 1. מיני הפטריות השונים שזוהו באמצעות הגברת מקטעי ITS 4-5 ו ITS 1-4. עבור חלק מן התבדידים הזיהוי לרמת המין לא היה וודאי מספיק ולכן מופיע רק שם הסוג. ניתן לראות שמיני הפטרייה שהופיעו פעמים רבות ביותר הם: *Alternaria alternata*, ו- *Botrytis cinerea*, ו- *Fusarium oxysporum*.



איור 2. השלמת מבחן קור עם פטריות שבודדו מצמחים נגועים באופן טבעי.
 A- *Alternaria alternata*, B- *Botrytis cinerea*, C- *Aspergillus flavus*, D- *Aspergillus westerdijkiae*, E- *Cladosporium tenuissimum*, F- *Cladosporium* spp., G- *Penicillium*, H- *Penicillium steckii*, I- *Trichothecium roseum*, J- *Fusarium equiseti*, ו-אביקורת.

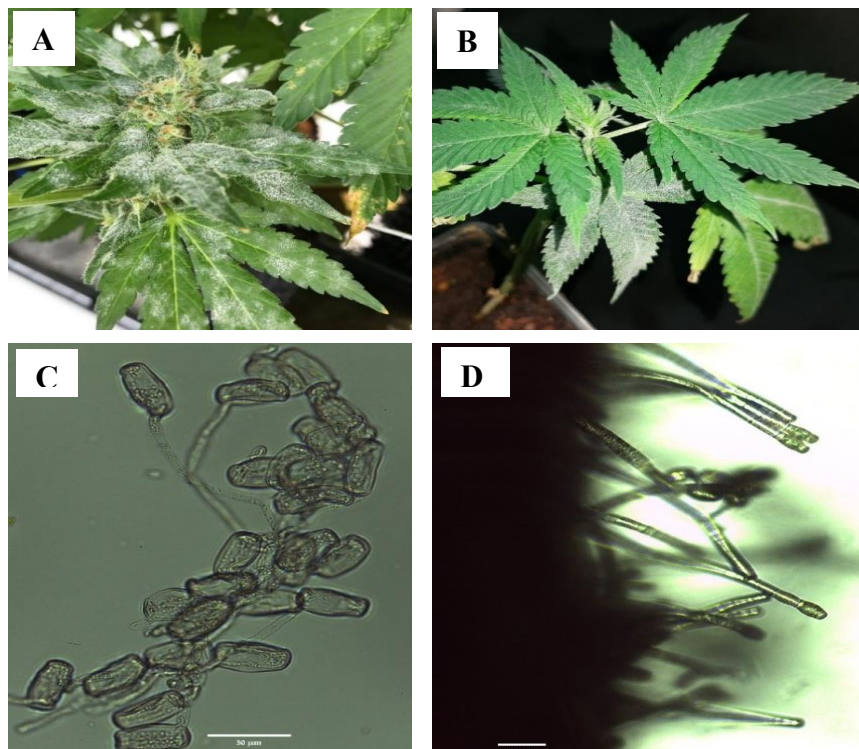


איור 3. מבחן קור בעלים מנותקים של ק.ר. עם דסקית אגר של *Alternaria alternata* (A) ו-*Botrytis cinerea* (B) ו-אביקורת מים. (C)

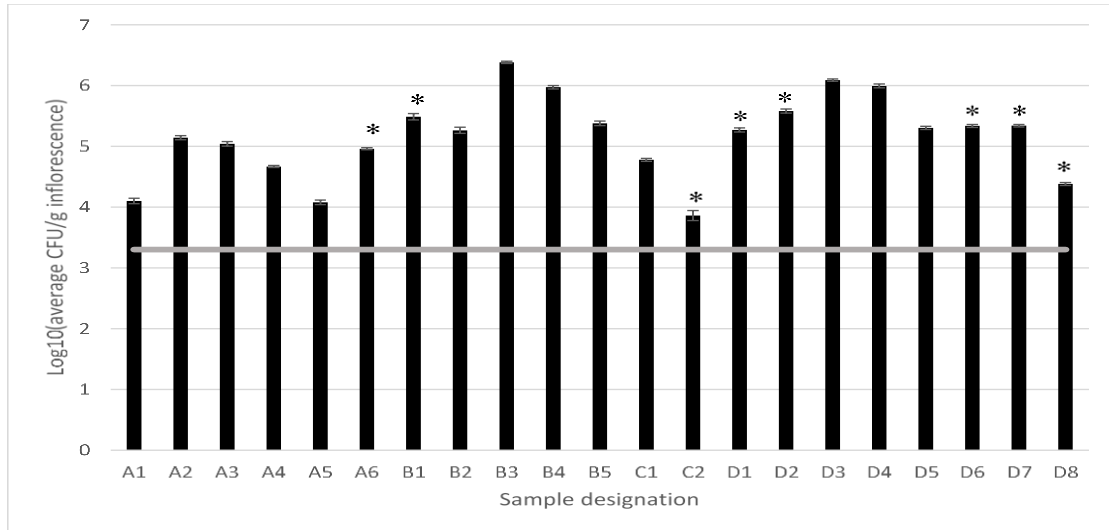


איור 4. אילוח שתילי ק.ר. עם תבדידים שזוהו ואופיינו כ-*Fusarium oxysporum* f.sp. *cannabis*.

בהערכת רמות ה-CFU בגר' תפרחות מארבע חוות מסחריות שונות בארץ, נמצא שכל התפרחות לא עמדו בתקנים המוגדרים על ידי היק"ר ואף חרגו מן הסף המותר במידה ניכרת (איור 6). בבדיקות אלה עלה כי ברוב המקרים מושבות פטרייתיות שבודדו מתפרחות שייכות לפטריות מסוגים אלטרנריה, בוטריטיס, פוזריום, אספרגילוס ופנציליום (איור 1 ו-2).



איור 5. קימחון בקנאביס הנגרם ע"י הפטרייה *Golovinomyces cichoracearum*. A. עלים ותפרחות נגועות באופן טבעי. B. צמח מודבק לאחר אילוח מלאכותי ע"י קימחון. תמונות מיקרוסקופיות של נבגים C ונושאי נבגים D.



איור 6. רמות CFU ביחידות של לוג 10 של CFU לגרי תפרחת, כפי שנמדדו מארבע חוות גידול קנאביס מסחריות ברחבי ישראל (A, B, C, D). כל אות מייצגת חווה, והמספרים מייצגים את מספר הדגימות מאותה החווה. דגימות D1 ו D2 מייצגות תפרחות מיובשות. הכוכביות מייצגות תפרחות שהיו אסימפטוטיות, כל שאר הדגימות הראו רמות שונות של תסמיני מחלה. העמודים השחורים מייצגים את שגיאת התקן הממוצע של 3 חזרות עבור כל דגימה; הקו האפור מייצג את רמת ה CFU לגרי תפרחת המקסימלית המותרת על ידי היק"ר (2,000 CFU/g inflorescence).

4. ניטור, מעקב וקביעת רמות המיקוטוקסינים מאורגניזמים פטרייתיים המבודדים מפרחים

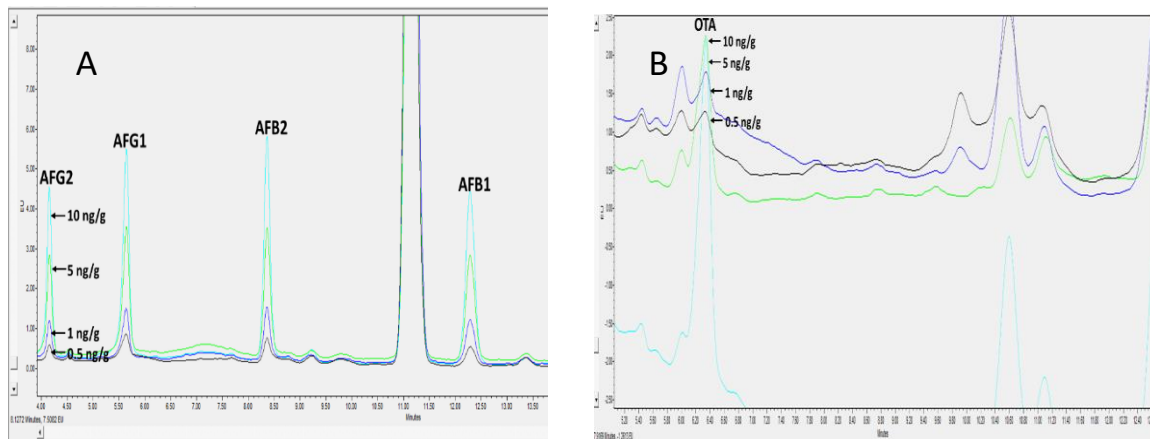
נגועים

זיהוי וכימות של מיקוטוקסינים באמצעות ה-HPLC. זיהוי וכימות מיקוטוקסינים בדגימות של תפרחות קנאביס רפואי בוצעו באמצעות HPLC המצויד בגלאי PDA וגלאי פלואורסנטי. לצורך הפקת הטוקסינים, תפרחות יובשו ונטחנו באמצעות מטחנה עד קבלת אבקה. הפקת מיקוטוקסינים התבצעה באמצעות קולונות מיצוי מיוחדות (AflaTest WB, OchrTest and FumoniTest extraction columns) על פי פרוטוקול של היצרן (VICAM, USA). זיהוי וכימות של מיקוטוקסינים נעשו על ידי הזרקת 20µL של מיצוי לתוך מערכת HPLC (Waters ACQUITY^{Arc}, USA) תוך שימוש בקולונה בקולונה Kinetex 2.6 µm XB-C₁₈ (Phenomenex, USA) (100 x 2.1 mm) הרכב יחסי של פזה נידת לזיהוי אפלאטוקסינים: water: methanol: acetonitrile (70:15:15 v/v); וליהוי אוקראטוקסין A ופומוניזינים B1 ו-B2 - acetonitrile:water:acetic acid (99:99:2, v/v/v). נקודת השיא-הפיק של הרעלנים AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ נמדדו באמצעות גלאי פלורסנטי (עירור ב-365nm ופליטה ב-455nm); ונקודת השיא-הפיק של מיקוטוקסינים OTA, Fumonisin B₁ ו-Fumonisin B₂ נמדדו גם באמצעות גלאי פלורסנטי (עירור ב-330nm ופליטה ב-450nm). כימות של ריכוזי הטוקסינים נעשה על ידי השוואת עקומות כיול של מיקוטוקסינים סטנדרטים לכל הניסויים.

בדיקת יכולת של פטריות עובש לייצר מיקוטוקסינים. מאה מיקרוליטרים של תרחיף פטרייתי בריכוז של 10⁶ ספורות פר מ"ל נזרעו בצלחות פטרי המכילות מצע סינטטי (YES yeast)

extract sucrose). הצלחות הודגרו ב-28°C למשך 5 ימים. על מנת לכמת את ריכוזי מיקוטוקסינים המיוצרים ע"י פטריות עובש, חמש דיסקי אגר בקוטר של 1 ס"מ נוספו ל-1.7 מ"ל של מתנול ונמחצו עד לקבלת תמיסה הומוגנית. מיקוטוקסינים מוצו על ידי טלטול של התמיסה למשך 30 דקות במהירות של 150 סל"ד ולאחר סרוז למשך 10 דקות במהירות של 15,000 סל"ד. הנוזל העליון (שמכיל טוקסינים) סונן דרך מסנן 0.22 PTFE מיקרון ונשמר במקפיא -20°C לפני בדיקה אנליטית באמצעות HPLC. בדיקת כמותית של מיקוטוקסינים נעשתה על ידי הזרקה של 20µL של מיצוי לתוך מערכת HPLC שפרטיה הוזכרו לעיל. הרכב יחסי של פזה ניידת: Acetonitrile:Water:Acetic acid (99:99:2, v/v/v).

גילוי, זיהוי וכימות מיקוטוקסינים בתפרחות ק.ר. באמצעות HPLC. לאחר אופטימיזציה של שיטת המיצוי של מיקוטוקסינים מתפרחות ק.ר., תנאי הרצה במכשיר ה-HPLC, זיהוי וכיול הסטנדרטים, יש באפשרותנו לזהות ולכמת ארבעה תת-סוגים של אפלאטוקסינים (AFG1, AFB2, AFB1, AFG2) ואוכראטוקסין A (OTA) המיוצר בעיקר ע"י מיני *Aspergillus* ומספר מיני *Penicillium*. אלה הטוקסינים העיקריים הנמצאים בפרחי קנאביס ורק לגביהם קיימת רגולציה (ראו חוזר משנה למנכ"ל משרד הבריאות, 2017). זיהום מלאכותי של תפרחות קנאביס בריכוזים שונים של תמיסות סטנדרטיות של אפלאטוקסינים ואוכראטוקסין A הראו פיקים ברורים של הפרדה בין תת סוגים וריכוזים שונים של הרעלנים (איור 7), מה שמאפשר זיהוי וכימות מדויקים של הרעלנים אלה.



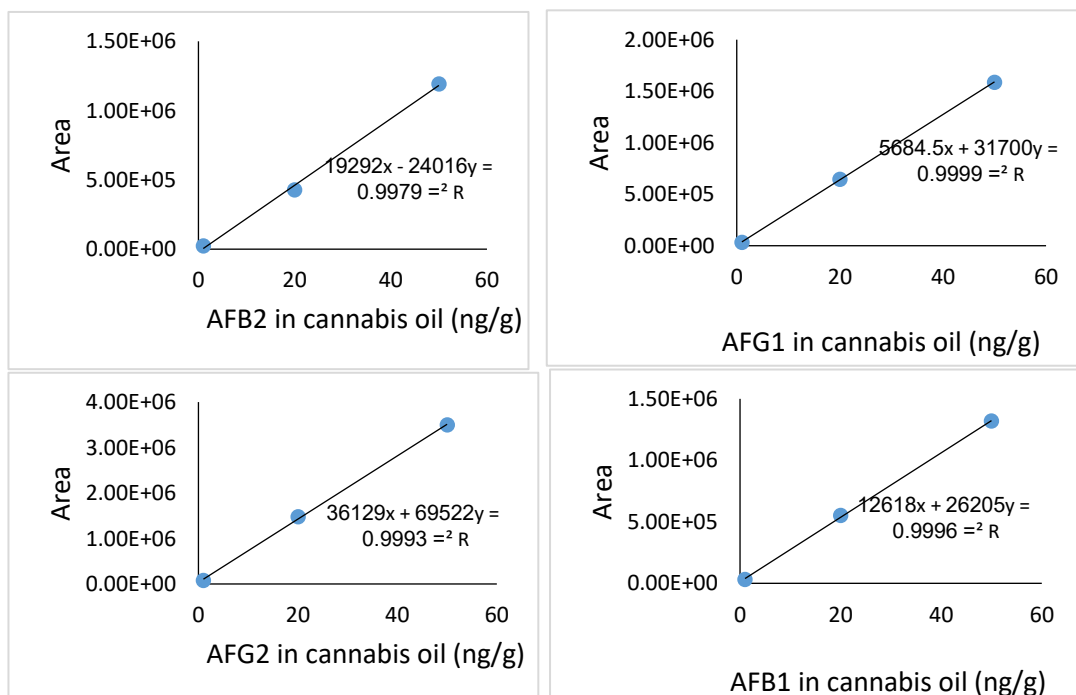
איור 7. היסטוגרמה של ריכוזים שונים (0.5, 1, 5, 10 µg/g) של 4 תת סוגים של אפלאטוקסינים – AFG2, AFG1, AFB2, AFB1 ו- אוכראטוקסין A (A) ו- OTA (B) שנמדדו וזוהו בפרחי ק.ר. באמצעות HPLC

כמו-כן, נעשתה אנליזה של מיקוטוקסינים שעלולים להיווצר ע"י פטריות עובש שבדודו מתפרחות ק.ר. מיקוטוקסינים הופקו ממצעי גידול פטרייתיים ונבדקו באמצעות ה-HPLC. טבלה מס' 2 מציגה שעד כה, 12 תבדידי פטריית עובש *Alternaria alternata* הראו יכולת לייצר רעלנים מסוגים alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene. כמו-כן, פטריות עובש *Trichothecium roseum* ו- *Penicillium citrinum* הפרישו ריכוזים יחסית גבוהים של מיקוטוקסינים HT2 ו-citrinin, בהתאמה (טבלה מס' 2, נספח). לא דווח על רמות

מיקוטוקסינים בתפרחות או בשמן מכיוון שלמעבדה הגיעו דוגמאות צמחים או דוגמאות שמנים המאולחים בפטריות שלא מייצרות רעלנים (כגון *Botrytis*). באנליזת HPLC לא נמצאו מיקוטוקסינים בדוגמאות אלה. כמו-כן, מיקוטוקסינים שמקורם מאלטרנריה לא נמצאו בדוגמאות של פרחים שהגיעו לבדיקה.

גילוי, זיהוי וכימות מיקוטוקסינים בשמן ק.ר. באמצעות HPLC

לאחר אופטימיזציה של שיטת המיצוע של מיקוטוקסינים מתפרחות ק.ר., יש באפשרותנו לזהות ולכמת ארבעה תת-סוגים של אפלאטוקסינים (AFB2, AFB1, AFG1, AFG2) בשמן של קנביס רפואי. כמוזכר בהצעת המחקר ובדו"ח הקודם אלה הטוקסינים העיקריים הנמצאים בפרחי קנאביס ולגביהם קיימת רגולציה (ראו חוזר משנה למנכ"ל משרד הבריאות, 2017). לאחר מיצוע שמן מפרחי ק.ר. (שהתבצע על בסיס מתנול) ביצענו זיהום מלאכותי של שמן ע"י תמיסות סטנדרטיות של אפלאטוקסינים בריכוזים שונים. הפקת מיקוטוקסינים התבצעה באמצעות קולונות מיצוע מיוחדות (AflaTest WB extraction columns) על פי פרוטוקול של היצרן (VICAM, USA). זיהוי וכימות של מיקוטוקסינים נעשו על ידי הזרקת 20 µL של מיצוע לתוך מערכת HPLC (Waters ACQUITY Arc, USA) תוך שימוש בקולונה Kinetex 2.6 (100 x 2.1 mm) (Phenomenex, USA) µm XB-C18. הרכב יחסי של פזה ניידת לזיהוי אפלאטוקסינים: water: methanol: acetonitrile (70:15:15v/v). נקודת השיא-הפיק של הרעלנים AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 נמדדו באמצעות גלאי פלורסנטי (עירור ב-365nm ופליטה ב-455nm). כימות של ריכוזי הטוקסינים נעשה על ידי השוואת עקומות כיוול של מיקוטוקסינים סטנדרטים לכל הניסויים. עקומות הכיוול שחשבו על ידי ניתוח רגרסיה לינארית המבוסס על שלוש נקודות כיוול בטווח של 1-50 ננוגרם/גר', נחשבו לינאריות בטווח הנחקר, עם מקדם מתאם ממוצע השווה ל-0.99 (איור 8), מה שמאפשר זיהוי וכימות מדויקים של הרעלנים אלה בשמן ק.ר.



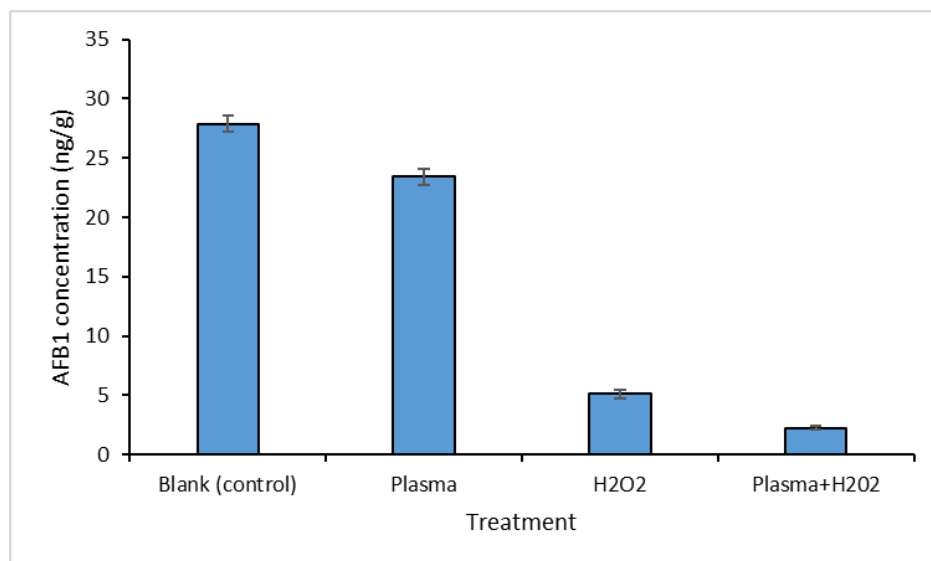
איור 8. עקומות הכיול של ריכוזים שונים של אפלאטוקסינים G1, B1, G2, B2 בשמן ק.ר.

סף הגילוי (LOD – limit of detection) של מיקוטוקסינים חושב כריכוז הנמוך ביותר שהתגלה ע"י גלאי HPLC מדגימות מהולות של הסטנדרטים. סף הכימות (- limit of quantification (LOQ) הוגדר כגדול פי שלושה מערכי ה-LOD. תוצאות עבור LOD ו-LOQ מסוכמות בטבלה בנספח 3. מבחני הנצולת (recovery experiments) בוצעו באמצעות דגימות של שמן ק.ר. עם ריכוזים ידועים של מיקוטוקסינים סטנדרטיים. ממוצע הנצולת של אפלאטוקסינים בשמן ק.ר. נע בין 75%-ל-92% (בטווח המקובל) עם טווח סטיית התקן היחסית (RSD) של 2.65-4.64% בתוך רמות הסטנדרטים של מיקוטוקסינים של 1-50 ng/g (טבלה 3, נספח).

השפעת שיטות לא כימיות וידידותיות לסביבה, כגון פלזמה קרה ו/או מי חמצן (H₂O₂), על

תכולת מיקוטוקסינים במצע סינטטי

בנוסף לבחינת שיטות ניקיון של פרחים נגועים בשיטות לא כימיות וידידותיות לסביבה (ראו תיאור למטה), נבחנו השפעות של פלזמה קרה ומי חמצן בנפרד ובשילוב של שניהם על יציבות של אפלאטוקסין B1 (AFB1) במצע סינטטי. התוצאות מראות (איור 9) שטיפול באמצעות פלזמה קרה הפחית באופן מתון את ריכוז של AFB1 במצע סינטטי ל-23.4 ng/g לעומת 28 ng/g במצע הלא מטופל (ביקורת). טיפול ע"י מי חמצן הפחית באופן דרסטי את ריכוז המיקוטוקסין לרמה של 5 ng/g, וטיפול משולב ע"י פלזמה קרה עם מי חמצן הפחית עוד יותר את תכולת ה-AFB1 לריכוז של 2.2 ng/g. תוצאות אלה מצביעות על יעילות רבה של מי חמצן וטיפול משולב של פלזמה קרה יחד עם מי חמצן בפירוק של מיקוטוקסין AFB1 in vitro; לכן, בשלב הבא נבדוק השפעת טיפולים לא כימיים וידידותיים לסביבה על פירוק מיקוטוקסינים בפרחי ק.ר. ובנגזרת של קנאביס רפואי, כגון שמן של ק.ר.

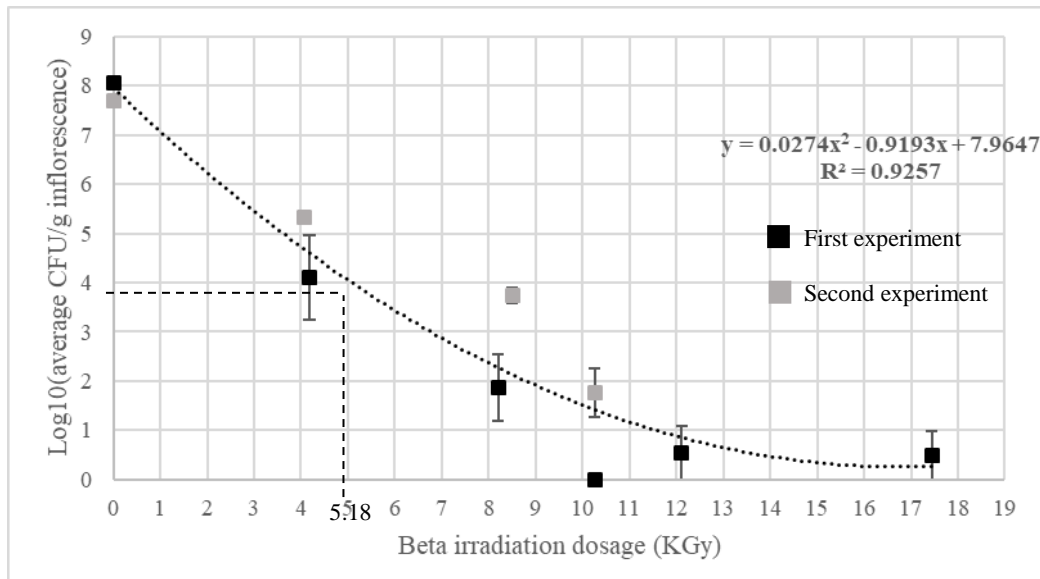


איור 9. השפעת in vitro של טיפולים לא כימיים (פלזמה קרה, מי חמצן ושילוב של שניהם) על יציבות של אפלאטוקסין B1

5. בחינת שיטות ניקיון של פרחים והפחתה של נגיעות בפרחים בשיטות לא כימיות וידידותיות

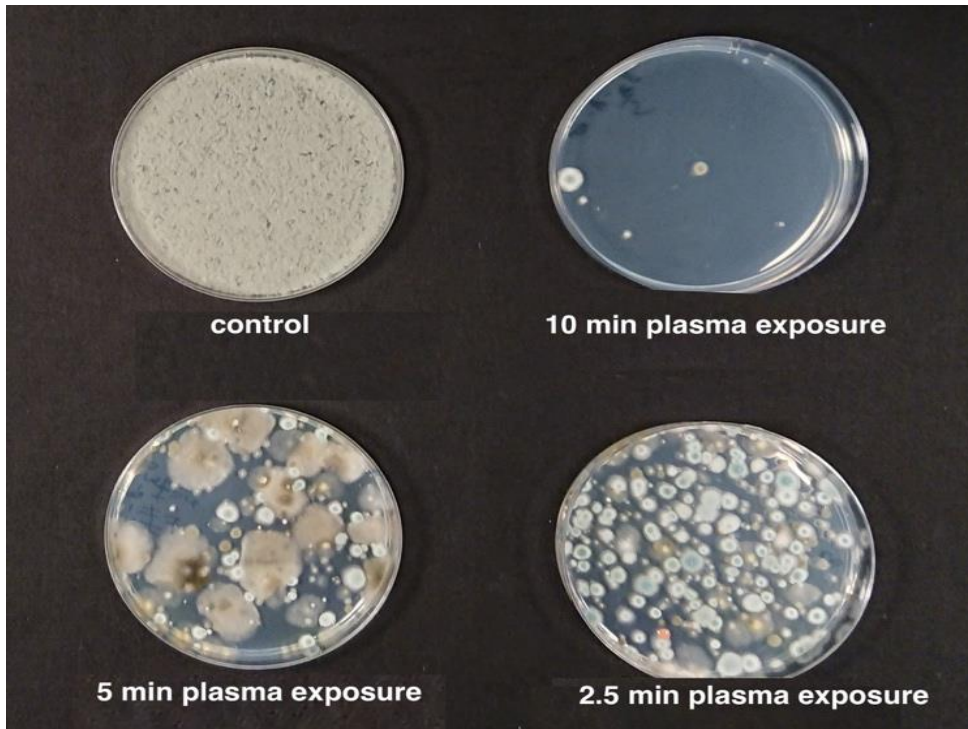
לסביבה

נבחנו שלוש שיטות לא כימיות וידידותיות לסביבה לניקיון של פרחים נגועים לאחר הקטיפה: א. הקרנות בטא (לא מייננת) וגמא (מייננת) שבשימוש נרחב ע"י חב' שור-ואן מהמרכז למחקר גרעיני בנחל סורק נבחן, וניסויים הראו יעילות גבוהה בקטילת מיקרואורגניזמים בעלי תבלינים ובקנאביס רפואי (Jeong et al., 2015; McPartland et al., 2017). בעבודתנו, קרינת גמא הפחיתה בערכי Log, סדר גודל של פי 4.5-6.0 את ה-CFUs מ- 8.05 ± 0.12 ו- 7.7 ± 0.11 ל- 1.88 ± 0.96 ו- 3.02 ± 0.11 , בשני ניסויים עוקבים, בהתאמה (Jerushalmi et al. 2020b). קרינת גמא לא נהוגה לטיפול בתפרחות קנאביס לאור נזק פוטנציאלי שאלול להיגרם לחומרים הפעילים בחשיפה. לכן, קרינת בטא, מורשת ע"י היק"ר לשימוש בחיטוי כשעוצמה קבועה של כ- 12 KGy נהוגה לחיטוי תפרחות נגועות. בהמשך, נבחרו ערכים של בין 4 עד כ- 18 KGy, בעלי תחומים מתחת ומעל העוצמה הנהוגה לחיטוי באופן מסחרי. מהניסויים שהועמדו, עוצמה ממוצעת של 10.3 KGy הפחיתה רמות נגיעות אל מתחת לספי הגילוי בשני ניסויים שונים (איור 10).

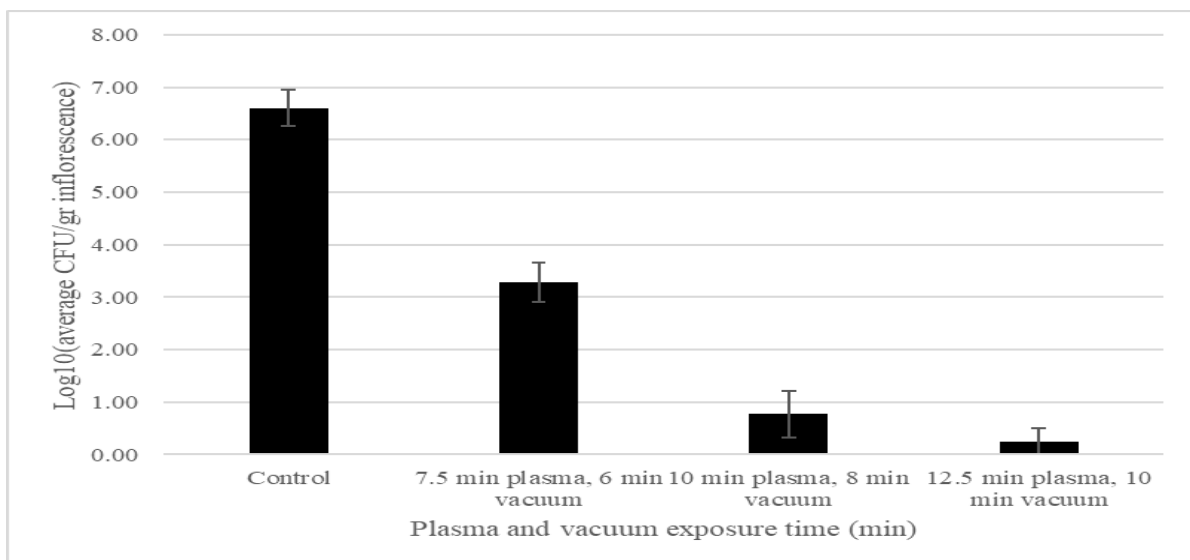


איור 10. CFU levels, [$\log_{10}(\text{CFU/g inflorescence})$] of artificially inoculated *Botrytis cinerea* MC inflorescences, exposed to different e-beam irradiation dosages in two experiments. Bars represent SE of the mean of 9 replicates per sample. A value of 5.18 KGy was calculated, according to the polynomial formula (dotted line) to reduce CFUs by 50% (ED_{50}), represented by the dashed line.

ב. פלזמה קרה לחיטוי, קוטלת נבגי פטריות (<http://novaplasma.com>) שבה גז מתפרק לחלקים האטומיים וכך יוצר רדיקלים ריאקטיביים מאד מבחינה כימית (OH, NO ועוד). לאחרונה, השתמשו בשיטה זו באמצעות H₂O₂ להדברת *Aspergillus* spp. בק.ר. (Ruchlemer et al., 2015). חשיפות הזמן ועוצמת נבחרו באופן ניסיוני לאחר פיתוח



איור 11. Fungal CFUs from artificially inoculated *Botrytis cinerea* inflorescences after cold plasma (2.5, 5, 10 min exposure and untreated control) treatments.



איור 12. CFU levels, log₁₀(CFU/g inflorescence), of uninoculated MC inflorescences exposed to different cold plasma and vacuum time treatments. Bars represent SE of the mean of 9 replicates per sample.

פרוטוקולים של חברת נובופלאזמה. בניסויים שלנו עם תפרחות מאולחות באופן מלאכותי (מגידול צמחים במתקן וולקני) ונגיעות טבעיות (מגידול צמחים בחווה מסחרית), טיפולי פלזמה הקרה הפחיתו את הנגיעות בארבעה סדרי גודל (איור 11 ו- איור 12; Jerushalmi et al. 2020b).

טבלה 1. יחידות ריבוי (CFU) בתפרחות ק.ר. לאחר טיפולי חיטוי בקיטור

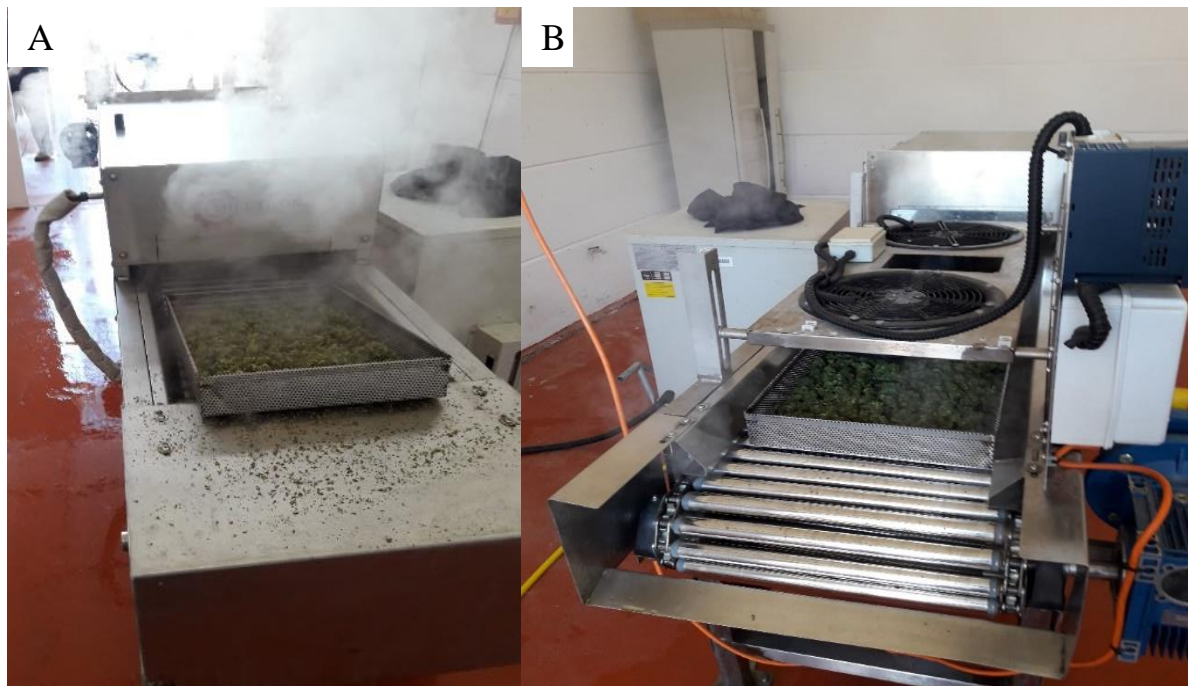
Treatment ^a	Noncommercial inflorescences		Commercial inflorescences		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Control	4.40 ± 0.01 ^b	3.05 ± 0.06	4.16 ± 0.08	5.58 ± 0.02	3.23 ± 0.05
10 s	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
15 s	0.31 ± 0.31	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
20 s	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

^a CFU survival values for noncommercial and commercial inflorescences exposed to 10, 15 and 20 sec steam treatments in the different experiments

^b Values are presented as log₁₀ (CFU/g inflorescence) ± standard error

ג. חיטוי בקיטור

בבחנה שיטת חיטוי בקיטור (מכשיר הנבנה ע"י חברת עשת אילון בשותפות של רפי רגב ודר' זאב שמילוביץ מהמכון להנדסה חקלאית, מינהל המחקר החקלאי) לקטילה של מזהמים של תפרחות קנאביס לאחר הקטיף (איור 13).

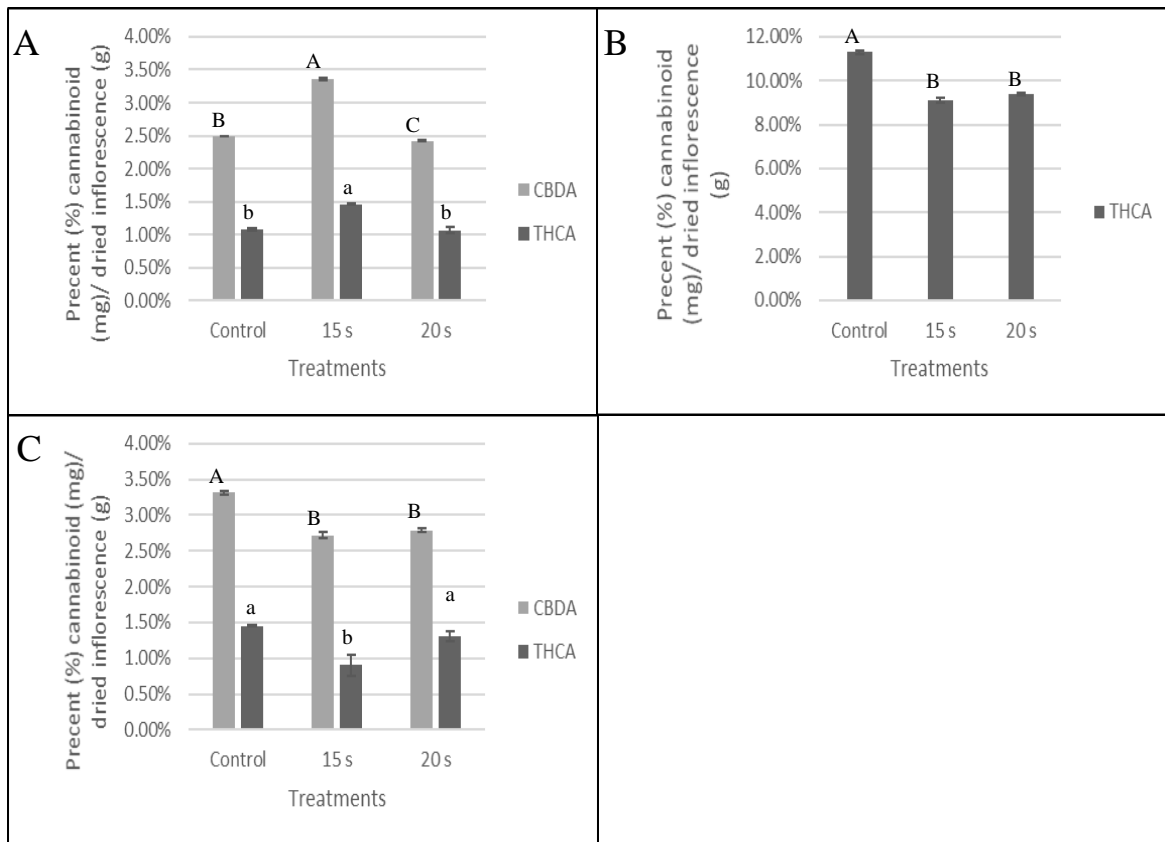


איור 13. מכשיר חיטוי בקיטור, שפותח במכון להנדסה חקלאית במכון וולקני, כפי שמוצג בשני הקצוות. מגש עם תפרחות של ק.ר. נע לתוך מנהרת הקיטור (A) ויוצא מצדו השני ומתייבש באמצעות שני מאורים (B).

זמני חשיפה של 10, 15 ו- 20 שניות בטמפ' של 70 מ"צ היו יעילות ביותר לקטילת האורגניזמים בתפרחות מאולחות באופן מלאכותי וגם טבעי וכמויות יחידות ריבוי מיקרוביאליות

לא זוהו אפילו מתחת לסף הגילוי (טבלה 1). השפעות הטיפולים על מראה ומשקל התפרחות לא נבדקו.

השפעת טיפולי הקיטור בכל זמני החשיפה על רמות הטרפנים הייתה מזערית שגרמה לעלייה של טרפנואידים וטרפנים מסוימים בטיפולי הקיטור לעומת ביקורת לא מטופלת (Jerushalmi et al. 2021). כמו-כן, רמות וכמויות קנבינואידים מסוימים פחתו כשזמני החשיפה התארכו, אך ברוב הניסויים השינויים לא היו מובהקים. באלו שהייתה הפחתה מובהקת ב CBDA ו-THCA (איור 14) הערכים היו בגבול המותר לפי ה- (USP - United States Pharmacopeia).



איור 14. אחוזי קנבינואידים מתפרחות מסחריות שחושבו באופן יחסי לכמויות יבשות לתפרחת בשלושה ניסויים שונים (A,B,C). בכל ניסוי התפרחות נחשפו בקיטור לטמפ' של 70 מ"צ למשך 15 ו- 20 שניות. ערכי הקנבינואידים בין הטיפולים שמופיעים עם אות שונה מובהקים ($\alpha = 0.05$).

דין

הגידול ושימוש בקנאביס רפואי (ק.ר) התרחב בשנים האחרונות בהובלת היחידה לקנאביס רפואי (יק"ר) של משרד הבריאות. קיימים מספר אתגרים שהיק"ר מתמודד איתם במסגרת ה-IMC-GAP כגון דרישות איכות ואמות מידה הנדרשות ממגדלי הק.ר בארץ. עם זאת, חייבים להתייחס למספר הנושאים כגון: (i) מחסור ידע על מחלות צמחים התוקפות ק.ר; (ii) חוסר שיטות בקרה והדברה של מחלות אלה; (iii) התמודדות עם מגבלות מחמירות וחשש מחשיפה לחומרי ההדברה של האנשים המטפלים בצמח; (iv) הסדרת נושאים כלליים של האיכות של הק.ר המתייחס לכמות "עובשים ושמרים" /גר' תפוחת וזיהומים של רעלנים המיוצרים ע"י מיקרואורגניזמים אלה. בפרויקט שהסתיים לא מכבר בנושא "פיתוח ממשק הגנת הצומח לגידול קנאביס מסחרי למטרות רפואיות", וממומן ע"י המדען הראשי של משרד החקלאות, דווח בהרחבה על פגעים שונים בק.ר. וההתמודדות איתם.

חלק מהפתוגנים המאופיינים בעבודה זו, כגון *Botrytis*, *Alternaria* (איור 1-3), *Fusarium* (איור 4) גורמים למחלות קשות בגידול ק.ר. (Jerushalmi et al. 2020a; 2022). כמו-כן, אופיינה מחלת הקימחון הנגרמת ע"י הפטרייה *Golovinomyces cichoracearum* בפעם הראשונה בארץ שממשיכה להתפשט וגורמת להפסדי יבול ניכרים (איור 5; Maymon et al. 2020). נמשיך לבחון התפתחות המחלה באביב 2022 מאחר ובתנאי החורף המחלה נעלמה. נעקוב אחר הגידולים הסמוכים, כגון חסה, שדווח כפונדקאי לקימחון *G. cichoracearum* הגדלה בקרבה לחוות גידול של ק.ר. על מנת למנוע מקור ההדבקה.

הבעיה הקשה ביותר בגידול המסחרי של ק.ר היא התמודדות עם פטריות עובש בתפרחות הגורמות לזיהומים בפרחים ובסופו של דבר עשויות לסכן את החולים המשתמשים בק.ר. נמצא כי רמות היחידות הריבוי (CFU) גר"/תפרחת בכל החוות שנדגמו חורגות בסדרי גודל של פי 4.5 עד 6.0 מעל המותר לפי ההנחיות של הי.ק.ר, ולכן נדרשים טיפולים להפחתת רמות ה"זיהום" של הק.ר המשווקים לחולים (Jerushalmi et al 2020b). נמצא כי במרבית המקרים יחידות הריבוי בספירות הללו השתייכו בעיקר למיני אלטרנריה, פוזריום, אספרגילוס ופניציליום העלולות לייצר מיקוטוקסינים מזיקים לבני אדם, במיוחד מטופלים בעלי מערכת חיסון מוחלשת (טבלה 2). חשיפה מוגברת לפטריות מסוג אספרגילוס אף עלולה להוביל לפיתוח מחלות כרוניות כגון אספרגילוזיס חודרני בריאות (Gargani et al., 2011). כמו-כן, חלק מהפטריות הפוגעות בתפרחות מייצרות מיקוטוקסינים; רעלנים אלה עלולים לפגוע במטופלים הצורכים ק.ר, הן בעישון והן בטיפות שמן. מיקוטוקסינים מאוד יציבים ושורדים כל הליך מיצוי. מכיוון שהנושא חדש יחסית, לא ידוע האם הרעלנים שורדים את השריפה במהלך עישון (ככל הנראה שלא). בנוסף, ישנם הרבה אנשים שלא מסוגלים לעשן ומקבלים את הקנאביס בטיפות שמן. נוכחות של הרעלנים בשמן קנאביס מהווה גורם סיכון לבריאות של האנשים המשתמשים בקנאביס.

במהלך שנה שנייה של המחקר בחנו השפעות *in vitro* של טיפולים לא כימיים, כגון פלזמה קרה ומי חמצן, על פטריות מיקוטוקסיניות ומיקוטוקסינים. פלזמה קרה ומי חמצן, ובמיוחד שילוב של שני טיפולים אלה, הפחיתו באופן משמעותי את רמת אפלאטוקסין B1 ובמצע סינטטי (איור 9). השפעת פלזמה קרה דווחה כיעילה מאוד על בקרת פטריות פתוגניות ומיקוטוקסינים בשורה של תוצרת

חקלאית, כגון דגניים, תבלינים, בשר יבש ודגים (Misra et al., 2019; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12398>). במהלך שנה שלישית של המחקר אנחנו המשכנו לבחון השפעת טיפולים ידידותיים אלה על תפרחות ק.ר. הנגועות בפטריות מיקוטוקסיגניות ומיקוטוקסינים. אחת ממטרות המחקר הייתה לפתח שיטות לזיהוי וכימות מיקוטוקסינים בקנביס רפואי. כעת יש באפשרותנו לבצע בדיקות לזהות ולכמת מיקוטוקסינים בקנביס רפואי. בחנו את היעילות של טיפולים שונים על הפחתת רמת הנגיעות (CFU) בתפרחות ק.ר. שיטת ניקיון התוצרת בטיפול בהקרנת ביטא מיושם באופן מסחרי ומלא, ומורשה ע"י הי.ק.ר. שיטת פלאזמה קרה ניסיוני ובפיתוח. כמו-כן, שיטת הקיטור גם ניסיוני ומחכה לאישור הי.ק.ר. ליישומו לפי הרגולציה הקיימת. תוצאות מחקר זה מספקות כלים לי.ק.ר. לקבלת החלטות בנידון. קרינת גמא לא נהוגה לטיפול חיטוי בתפרחות קנביס לאור נזק פוטנציאלי שעלול להיגרם לחומרים הפעילים עקב טמפרטורות חשיפה בסביבת 35 מ"צ. לעומת זה, השיטה נהוגה לחיטוי תבלינים ומיני ירקות הראתה יעילות בחיטוי מזהמים בתפרחות ק.ר. לכן, קרינת בטא, המורשת ע"י היק"ר לשימוש בחיטוי בעוצמה קבועה של כ- 12 K Gy נהוגה לחיטוי תפרחות נגועות. במבחני חשיפה שלנו של תפרחות נגועות, נבחרו ערכים של בין 4 עד כ- 18 K Gy. טיפול בעוצמה של 10.3 K Gy הפחית רמות נגיעות ע"י פטריית *Botrytis cinerea* אל מתחת לספי הגילוי (איור 10), המוכיח את יעילות הטיפול, אך לא בהכרח שתפחית באותו סדר גודל פטריות אחרות.

טיפול בפלאזמה קרה היה יעיל להפחתת מזהמים בתפרחות של ק.ר. חשיפות הזמן ועוצמות נבחרו באופן ניסיוני לאחר פיתוח פרוטוקולים של חברת נובופלאזמה. זמני חשיפה ועוצמה שנוסו הפחיתו את הנגיעות בארבעה סדרי גודל (איורים 11 ו- 12) (Jerushalmi et al. 2020b).

במהלך העבודה לעת עתה, כל שיטות החיטוי הראו פוטנציאל רב בחיטוי תפרחות קנביס מזהמים; ישנו צורך בבחינת השפעת הטיפולים על הרכב החומרים הפעילים בק.ר. שיטת החיטוי בקיטור הראתה פוטנציאל מבטיח כאמצעי להבטחת ניקיון התוצרת המסופקת לחולה מבלי לפגוע באופן משמעותי באיכות החומרים הפעילים, דהיינו, קנבינואידים, טרפנים וטרפנואידים (Jerushalmi et al. 2022).

במסגרת תכנית מחקר זו, נבחנו שיטות חיטוי ידידותיות לסביבה, על איכות התוצרת המסופקת לחקלאי. בעתיד, תבחן השפעת שיטות החיטוי באמצעות קרינה ופלאזמה קרה על איכות וכמות של המיקוטוקסינים וחומרים הפעילים בתפרחות הנגועים לאחר אילוח מלאכותי וטבעי (מחוות מסחריות) המשוקים לחולים.

רשימה של פרסומים מדעיים שנבעו מהמחקר עצמו

פרימן ס', ירושלמי ש' ומימון מ' (2021) מחלות פטרייתיות בקנביס. בספר תובנות חדשות במחלות צמחים, בעריכת אלעד י', דומברובסקי א', מנוליס-ששון ש' ועזרא ד', הוצאת המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים. <https://volcaniarchive.agri.gov.il/skn/tu/e53255>

- Jerushalmi S, Maymon M, Dombrovsky A, Freeman S, 2020a. Fungal pathogens affecting the production and quality of medical cannabis in Israel. *Plants* 9, 882. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/7/882>.
- Jerushalmi S, Maymon M, Dombrovsky A, Freeman S, 2020b. Effects of cold plasma, gamma and e-beam irradiations on reduction of fungal colony forming unit levels in medical cannabis inflorescences. *Journal of Cannabis Research* 2, 1-12.
- Maymon M, Jerushalmi S, Freeman S, 2020. First report of *Golovinomyces cichoracearum sensu lato* on *Cannabis sativa* in Israel. *New Disease Reports* 42, 11.
- Jerushalmi, S., Maymon, M., Dombrovsky, A., Regev, R., Schmilovitch, Z., Namdar, D., Shalev, N., Koltai, H., and Freeman, S. 2021. Effects of steam sterilization on reduction of fungal colony forming unit levels, cannabinoids and terpene levels in medical cannabis inflorescences. *Scientific Reports* 11:13973.
- Jerushalmi, S., Maymon, M., O'Donnell, K., and Freeman, S. 2022. Members of the *Fusarium oxysporum* complex causing wilt symptoms in medical cannabis in Israel, Italy and North America comprise a polyphyletic assemblage. *Plant Disease* (in press). <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-22-0155-RE>.

הפצה של הידע במסגרת הרצאות וימי עיון

- 2019 הרצאה של שחר ירושלמי (סטודנט לתואר שלישי) בנושא של מחלות פיטריטיות במסגרת קבלת פרס שוחרי המדע של וולקני.
- 8.2019 הרצאה של סטנלי פרימן על מחלות פטריטיות בקנאביס במסגרת קורס הגנה"צ של שה"מ.
- 12.2019 הרצאה של שחר ירושלמי (סטודנט לתואר שלישי) במסגרת יום הסטודנט המכון להגנה"צ. 30.5.21 דווח למנכ"ל ושר החקלאות על פעילות מחקרי במחלות בקנאביס.
- 27.7.21 הרצאה של הסטודנט שחר ירושלמי: חיטוי תפרחות קנאביס בשיטות לא כימיות וללא שארתיות במסגרת הכנס השנתי של העמותה הישראלית למחלות צמחים ה41.
- 6.10.21 הרצאה מוזמנת סטנלי פרימן, במסגרת כנס מדעי החקלאות 2021. אפיון זיהוי מחלות פטריטיות בקנאביס רפואי וחיטוי תפרחות לאחר הקטיף בשיטות לא כימיות.
- 18.1.22 הרצאה במסגרת קורס בפקולטה לחקלאות על נושא קנאביס. אפיון זיהוי מחלות פטריטיות בקנאביס רפואי וחיטוי תפרחות לאחר הקטיף בשיטות לא כימיות.

ביבליוגרפיה

- Amar, M.B. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 1-25.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. (2003). *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497–516.
- CAST report. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems (Richard JL and Payne GA, eds). Council for Agricultural Science and Technology Task Force report No. 139, Ames, Iowa, USA.

- Chelule PK, Gqaleni N, Dutton MF, Chuturgoon AA. (2001). Exposure of rural and urban populations in KwaZulu Natal, South Africa, to Fumonisin B1 in maize. *Environ. Health Persp.* 109: 253-256.
- ICMSF. (1996). Toxigenic fungi: *Aspergillus*, p. 347-381. In T.A. Roberts, A.C. Baird-Parker, R.B. Tompkin (ed.), *Microorganisms in foods 5: microbiological specifications of food pathogens*. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Blackie Academic and Professional. An Imprint of Chapman & Hall. London, UK.
- Jerushalmi S, Maymon M, Dombrovsky A, Freeman S, 2020a. Fungal pathogens affecting the production and quality of medical cannabis in Israel. *Plants* 9, 882. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/7/882>.
- Jerushalmi S, Maymon M, Dombrovsky A, Freeman S, 2020b. Effects of cold plasma, gamma and e-beam irradiations on reduction of fungal colony forming unit levels in medical cannabis inflorescences. *Journal of Cannabis Research* 2, 1-12.
- Jerushalmi, S., Maymon, M., Dombrovsky, A., Regev, R., Schmilovitch, Z., Namdar, D., Shalev, N., Koltai, H., and Freeman, S. 2021. Effects of steam sterilization on reduction of fungal colony forming unit levels, cannabinoids and terpene levels in medical cannabis inflorescences. *Scientific Reports* 11:13973.
- Jerushalmi, S., Maymon, M., O'Donnell, K., and Freeman, S. 2022. Members of the *Fusarium oxysporum* complex causing wilt symptoms in medical cannabis in Israel, Italy and North America comprise a polyphyletic assemblage. *Plant Disease* (in press). <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-22-0155-RE>.
- Maymon M, Jerushalmi S, Freeman S, 2020. First report of *Golovinomyces cichoracearum sensu lato* on *Cannabis sativa* in Israel. *New Disease Reports* 42, 11
- Jeong RD, Shin EJ, Chu EH, Park HJ. (2015). Effects of ionizing radiation on postharvest fungal pathogens. *Plant Pathol J.* 31(2):176–80.
- McPartland, J.M., Clarke, R.C., and Watson, D.C. (2017). *Hemp diseases and pests*. CABI. Publ. pp. 251
- Misra, N.N., Yadav, B., Roopesh, M.S., and Cheorun, J. (2019). Cold Plasma for effective fungal and mycotoxin control in foods: mechanisms, inactivation effects, and applications. 18: 106-120.
- Oswiler GD. (2014). Trichothecene Toxicosis. *The Merck Veterinary Manual*.
- Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 61-99.
- Ruchlemer, R., Amit-Kohn, M., Raveh, D., and Lumir, H. 2015. Inhaled medical cannabis and the immunocompromised patient. *Support Care Cancer* 23:819-822.
- UNEP (2016). *UNEP Frontiers 2016 Report: Emerging Issues of Environmental Concern*. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- Wang H, Wei H, Ma J, Luo X. (2000). The fumonisin B1 content in corn from North China, a high-risk area of esophageal cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19:139-141.

נספחים

טבלה 2. כימות של הרעלנים (באמצעות HPLC) המיוצרים ע"י פטריות עובש שבודדו מתפרחות ק.ר.

Sample no.	Fungal species	Concentration of mycotoxins (µg/g)												
		AFB1	ALT	AOH	AME	CTN	DON	FB1	FB2	GLIO	OTA	T2	HT2	ZEA
1	<i>Aspergillus flavus</i>	n.d. ^a	- ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-
3	<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-
4	<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-
5	<i>Fusarium equiseti</i>	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.
6	<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.
7	<i>F. clavum</i>	-	-	-	--	-	n.d.	26.86±1.65	n.d.	--	-	-	-	n.d.
8	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-	0.022±0.106	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>Trichothecium roseum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	7.832±0.09	-
10	<i>Alternaria alternata</i>	-	0.036±0.004	0.032±0.009	0.022±0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>A. alternata</i>	-	0.026±0.001	0.027±0.01	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>A. alternata</i>	-	0.248±0.011	5.122±0.353	3.150±0.286	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>A. alternata</i>	-	8.572±2.528	3.405±0.454	8.114±0.383	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>A. alternata</i>	-	1.055±0.056	4.503±1.217	1.864±0.122	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>A. alternata</i>	-	2.612±0.070	15.433±0.203	14.504±0.512	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>A. alternata</i>	-	1.401±0.158	0.592±0.056	1.920±0.026	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>A. alternata</i>	-	0.744±0.059	15.945±1.010	22.680±2.742	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>A. alternata</i>	-	0.205±0.000	0.155±0.042	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>A. alternata</i>	-	0.263±0.030	5.871±0.017	1.542±0.052	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	<i>A. alternata</i>	-	0.063±0.001	7.255±0.828	2.295±0.691	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>A. alternata</i>	-	0.667±0.068	19.628±1.693	12.136±1.252	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AFB1- Aflatoxin B1, ALT- Altenuene; AOH- Alternariol; AME- Alternariol monomethyl ether; CTN- Citrinin; DON- Deoxynivalenol; FB1-Fumonisin B1; FB2- Fumonisin B2; GLIO- Gliotoxin; OTA- Ochratoxin A; T2 & HT-2- trichothecenes; ZEA- Zearalenone

^a – not detected; ^b – not relevant

טבלה 3. נתוני סף גילוי, סף כימות, ליניאריות, ניצולת ודיוק שיטת HPLC לזיהוי טוקסינים בשמן ק.ר.

Analyte	Spiked levels in cannabis oil (ng/g)	Linearity (R ²)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery (%)	RSD (%)	Accuracy (%)
AFB1	1	0.9996	0.3	0.9	75.76	3.89	97.56
	20				89.96	2.72	99.49
	50				91.92	1.80	97.12
AFB2	1	0.9979	0.3	0.9	77.08	4.50	98.65
	20				90.04	3.44	93.88
	50				88.43	4.46	100.95
AFG1	1	0.9999	0.3	0.9	75.15	4.64	98.44
	20				85.09	3.96	97.04
	50				89.34	3.31	96.68
AFG2	1	0.9993	0.3	0.9	80.85	2.37	95.33
	20				84.68	2.82	96.51
	50				88.44	2.65	95.08

AFB1- Aflatoxin B1; AFB2- Aflatoxin B1; AFG1- Aflatoxin G1; AFG2- Aflatoxin-G2

טבלה 4. סיכום מבחני קוך לפטריות שנבחנו בעבודה.

Species	Koch Assay *	
	Intact plant	Detached tissue
<i>Acremonium sp.</i>		
<i>Alternaria alternata</i>	+	+
<i>Alternaria chlamydospora</i>		
<i>Alternaria obovoidea</i>		
<i>Alternaria sp.</i>		
<i>Arthrinium guizhouense</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>		+
<i>Aspergillus fumigatus</i>		-
<i>Aspergillus niger</i>		-
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>		+
<i>Botrytis cinerea</i>	+	
<i>Chaetomium globosum</i>		
<i>Chaetomium madrasense</i>		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		+
<i>Cladosporium halotolerans</i>		
<i>Cladosporium sp.</i>		+
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		
<i>Cladosporium tenuissimum</i>		+
<i>Fusarium brachygibbosum</i>		
<i>Fusarium equiseti</i>		+
<i>Fusarium falciforme</i>		
<i>Fusarium keratoplasticum</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	
<i>Fusarium solani</i>	+	
<i>Fusarium sp.</i>		
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>		
<i>Penicillium citrinum</i>		+
<i>Penicillium olsonii</i>		
<i>Penicillium steckii</i>		+
<i>Petriella sordida</i>		
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		
<i>Sordaria sp.</i>		
<i>Stemphylium vesicarium</i>		
<i>Trichoderma citrinoviride</i>		
<i>Trichoderma hamatum</i>		
<i>Trichoderma harzianum</i>		

* Koch postulate assays of intact plants and detached tissues; + signifies a positive response (symptom appearance) while – signifies a negative response, lack of symptom

טבלה 5. תבדידי הפטריות שנאספו ומידע בהתאם.

Sample number	Sequenced by ITS 4-5 primers	Sequenced by EF1-728F-986R primers	NCBI Result	Infected plant tissue	Sampling date
1A	+		<i>Fusarium solani</i>	Stem	25.8.2016
2A	+		<i>Fusarium solani</i>	Stem	25.8.2016
3A	+	+	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	Stem	25.8.2016
4A	+	+	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	Stem	25.8.2016
5A	+	+	<i>Fusarium solani</i>	Stem	25.8.2016
6A	+	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	Stem	25.8.2016
7A	+	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	Stem	25.8.2016
10A	+	+	<i>Fusarium sp.</i>	Inflorescence	27.9.2016
16A	+		<i>Trichothecium roseum</i>	Stem	6.10.2017
17A	+		<i>Trichothecium roseum</i>	Inflorescence	6.10.2017
19A	+		<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Root	6.10.2017
20A	+		<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Stem	6.10.2017
21A	+		<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Root	6.10.2017
22A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Root	16.11.2017
23A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	16.11.2017
24A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	16.11.2017
25A	+		<i>Penicillium citrinum</i>	Inflorescence	16.11.2017
26A	+		<i>Cladosporium sp.</i>	Inflorescence	16.11.2017
27A	+		<i>Alternaria obovoidea</i>	Inflorescence	26.2.2017

28A	+		<i>Alternaria chlamyospora</i>	Inflorescence	26.2.2017
29B	+		<i>Chaetomium globosum</i>	Leaves	7.11.2017
29C	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	7.11.2017
30A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	7.11.2017
31A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	7.11.2017
31B	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	7.11.2017
32A	+		<i>Cladosporium sp.</i>	Inflorescence	7.11.2017
33A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	7.11.2017
33B	+		<i>Penicillium steckii</i>	Inflorescence	7.11.2017
34B	+		<i>Aspergillus flavus</i>	Leaves	7.11.2017
35A	+		<i>Cladosporium halotolerans</i>	Leaves	7.11.2017
35B	+		<i>Acremonium sp.</i>	Leaves	7.11.2017
36A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	7.11.2017
36B	+		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Leaves	7.11.2017
37Ass2	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	7.11.2017
38B	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	23.11.2017
39A	+		<i>Sordaria sp.</i>	Leaves	23.11.2017
39B	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	23.11.2017
42A	+		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Leaves	23.11.2017
43A	+		<i>Alternaria sp.</i>	Leaves	23.11.2017
44A	+		<i>Trichoderma harzianum</i>	Stem	23.11.2017
45A	+		<i>Trichoderma hamatum</i>	Root	23.11.2017
45Aparp	+		<i>Trichoderma hamatum</i>	Root	23.11.2017
46A	+		<i>Cladosporium sp.</i>	Root	23.11.2017

47A	+		<i>Alternaria sp.</i>	Leaves	23.11.2017
48A	+		<i>Trichoderma harzianum</i>	Root	23.11.2017
49A	+		<i>Aspergillus flavus</i>	Inflorescence	23.11.2017
49B	+		<i>Trichoderma harzianum</i>	Inflorescence	23.11.2017
53A	+		<i>Aspergillus niger</i>	Inflorescence	15.1.2018
54A	+		<i>Botrytis cinerea</i>	Inflorescence	22.4.2018
55A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	22.4.2018
56A	+		<i>Botrytis cinerea</i>	Inflorescence	22.4.2018
57A	+		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Inflorescence	22.4.2018
59A	+		<i>Stemphylium vesicarium</i>	Root	10.5.2018
59B	+		<i>Alternaria alternata</i>	Root	10.5.2018
59C	+		<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Root	10.5.2018
61A	+		<i>Alternaria sp.</i>	Inflorescence	10.5.2018
62A	+	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	Inflorescence	10.5.2018
63A	+		<i>Botrytis cinerea</i>	Inflorescence	10.5.2018
63B	+		<i>Stemphylium vesicarium</i>	Inflorescence	10.5.2018
64A	+		<i>Fusarium oxysporum</i>	Inflorescence	10.5.2018
64B	+	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	Inflorescence	10.5.2018
65A	+		<i>Botrytis cinerea</i>	Inflorescence	10.5.2018
68-1A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	31.5.2018
68A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	6.6.2018
69-2A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	6.6.2018
70A	+	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	Stem	6.6.2018

71B	+		<i>Aspergillus westerdijkiae/ochraceus</i>	Inflorescence	6.6.2018
73B	+		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Inflorescence	6.6.2018
75A	+	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	Inflorescence	6.6.2018
77A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	6.6.2018
84A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	3.6.2018
85A	+	+	<i>Fusarium solani</i>	Stem	9.7.2018
86B	+	+	<i>Fusarium sp.</i>	Stem	9.7.2018
99A	+		<i>Fusarium proliferatum</i>	Stem	9.8.2018
106A	+		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Inflorescence	4.9.2018
106B	+	+	<i>Fusarium equiseti</i>	Inflorescence	4.9.2018
107C	+		<i>Alternaria alternata</i>	Inflorescence	4.9.2018
108B	+	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	Inflorescence	4.9.2018
109A-1	+		<i>Fusarium solani</i>	Stem	4.9.2018
109A-2	+		<i>Fusarium solani</i>	Stem	4.9.2018
109A-3	+		<i>Fusarium solani</i>	Stem	4.9.2018
109A-4	+		<i>Fusarium falciforme</i>	Stem	4.9.2018
110A	+		<i>Penicillium olsonii</i>	Inflorescence	4.9.2018
111A	+		<i>Botrytis cinerea</i>	Inflorescence	4.9.2018
112A	+		<i>Fusarium brachygibbosum</i>	Inflorescence	4.9.2018
114A	+		<i>Fusarium brachygibbosum</i>	Inflorescence	4.9.2018
116A	+		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Inflorescence	23.12.2018
117A	+		<i>Alternaria alternata</i>	Leaves	23.12.2018
118A	+		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Leaves	23.12.2018

119B	+		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Leaves	23.12.2018
119D	+		<i>Chaetomium madrasense</i>	Leaves	23.12.2018
119E	+		<i>Petriella sordida</i>	Leaves	23.12.2018
120A	+		<i>Petriella sordida</i>	Leaves	23.12.2018
120B	+		<i>Petriella sordida</i>	Leaves	23.12.2018
121A	+		<i>Arthrinium guizhouense</i>	Inflorescence	3.3.2019
122A	+		<i>Petriella sordida</i>	Inflorescence	3.3.2019