

תקציר הדו"ח:

במהלך המחקר נמצאו קוים אשר היו בעלי עמידות יחסית גבוהה לאספרגילוס פלווס ולפוזריום מונילופורמה, פטריות היוצרות אפלטוקסין ופיומוניזין בהתאמה. הזנים המבטיחים נבדקו בנויי שדה מקיפים ונתקבלה מובהקות סטטיסטית לגבי אחדים מהם. קוים אלה ישמשו חומר בסיסי לתכנית טיפוח שמטרתה פיתוח זנים עמידים לפטריות. בשנה ג' התחלנו בבצוע מחקרים אפידמיולוגיים לזהוי מוקדם של הפטריה פוזריום בשדות תירס. זאת במטרה לפתח אמצעים לאיתור שדות נגועים בהם פוטנציאל הנזק גבוה במיוחד. בנוסף, ניסינו לבדוק יעילות תכשיר (וירול) במניעת המחלה. שני כווני מהקר אלה נתגלו כמבטיחים. ניתן לבסס מדדים מוקדמים לאיתור שדות נגועים והוכח כי שיעור הנגיעות בשדות מרוססים היה נמוך יותר. אולם תוצאות נסויים אלה הן הקדמיות ויש לחזור עליהם שנים נוספות במטרה לבסס הממצאים ולפתח מודל חזוי מדויק כמו גם פרוטוקול רסוס בחומר.

איתור זני תירס מתוק מטיפוח מקומי העמידים ליצירת אפלטוקסינים כמקורות
עמידות לקבלת תוצרת איכותית נקיה מאפלטוקסינים

פסטר נחמן¹, מנשרוב מזל¹, אנטולי טרוסטנצקי¹,
אברי בר-צור², אילה מאיר² ורפי סלומון³

¹המחלקה לאיסוס תבואה ומזון, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן
²נוה-יער, מרכז מחקר צפון, מינהל המחקר החקלאי
³המחלקה לוידולוגיה, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן

תקציר

זהו תוצרת חקלאית בכלל וגרעיני תירס מתוק בפרט ברעלני פטריות (מיקוטוקסינים) מהווה כיום בעיה כלל עולמית. פגיעתם של הרעלנים חמורה בבני אדם ובע"ח ובעיקר גבוהה רעילותם של אפלטוקסינים וטוקסינים הנוצרים ע"י מיני פוזריום (טריכוטצנים, פיומוניזינים, זארלנון ועוד). מאחר והרעלנים יציבים בתהליכי עבוד המזון, מתבצע כיום בכל רחבי תבל חיפוש מואץ אחר זנים עמידים. מטרת המחקר היא לאתר זנים כאלה מתוך המאגר הגנטי הקיים בארץ. בשנת המחקר החולפת התמקדנו באיתור תבדידים של *Aspergillus flavus* ו/או *A. parasiticus* ואיתור תבדידים של *Fusarium moniliforme*.

זאת מתוך קלחי תירס מתוק שנאספו בארץ. נמצא כי תבדידים של *A. flavus* ו-

A. parasiticus אשר בודדו מהקלחים אכן יצרו אפלטוקסינים ותבדיד של

F. moniliforme יצר פיומוניזין B₁.

בהמשך שימשו תבדידים אלו לנסויי חממה ושדה שבצענו, ובהם הדבקנו מלאכותית קלחי תירס בנבגי הפטריות. הניסויים נערכו בחממה ובשדה מסחרי בנוה-יער ובשדה תירס בחוות עדן. הדבקת הקלחים נעשתה בשתי שיטות: הזרקת סוספנסיות נבגים לקלחים וריסוס המשי בכמות מדודה מסוספנסיה זו. בתום שבוע ושבועיים מיום ההדבקה נאספו הקלחים. נקבעה רמת הזהום בפוזריום ובאספרגילוס (לפי גודל הכתם ומיקומו), ורמת הזהום בטוקסינים. נמצא כי שיטת ההדבקה באמצעות דקירת הקלח והזרקת נבגים היתה יעילה משיטת רסוס המשי. בכל הקלחים אשר הודבקו בשיטה הראשונה אכן נראו כתמים נקרוטיים לאורך האשבולים בעוד שמספר הקלחים אשר נדבקו לאחר ריסוס משי היה זעיר.

ההדבקות נצפו לאחר הדבקה ב- *A. parasiticus* כמו גם לאחר הדבקה

ב- F. moniliforme. הזן Jubilee (ג'ובילי) הראה רגישות גבוהה יחסית לפוזריום בהשוואה לזנים הנוספים שנבדקו: 856, incredible ו- 733A. זאת גם בנסויי החממה וגם בנסויי השדה. תוצאות העבודה מלמדות עוד כי שיטות ההדבקה בה השתמשנו היו אכן יעילות לשם הדבקת הקלחים ולפיכך השחקשנו בהן (אם כי ברכוזי נבגים שונים) גם בנסויי-שדה.

בניסויים אלה בחנו קוים חנים הנמצאים באוסף המחלקה בנווה יער. תוצאות הניסויים מלמדות כי קיימת התפלגות בעמידותם של הגנוטיפים השונים לעמידות לפחיריום. שלושה מהם, IL 773 A, SugLoaf E45, ו- Viva E1 (Asg) הראו עמידות גבוהה יחסית לשאר הגנוטיפים ולפחכך אנו ממליצים לבחור בהם לשם התחלת תכנית טיפוח אשר תניב זנים מסחריים עמידים לפחיריום. במטרה לנסות ולהבין את האפידמיולוגיה של המחלה בשדה בחנו במהלך המחקר מדדים מוקדמים להופעת הפטריה. מחקר זה החל בשנה האחרונה של העבודה ובשלב הראשון דגמנו שדות במועדים שונים על מנת ללמוד על בניית האינקוולום. טרם גובשו ממצאים מאחר ובשנה זו לא נרשמה נגיעות בפטריה ובכוונתנו איפא' להתחיל במחקר אפידמיולוגי מסודר לשם חיזוי שדות נגיעים. במהלך השנה אף בצענו ניסוי הקדמי בו טופלו שדות בתכשיר וירול לשם מניעת פחיריום. הנתונים הראשוניים אשר נתקבלו מעידים כי התכשיר אכן הוריד שיעור נגיעות אולם יש בדעתנו לחזור ולאשש ממצאים אלה בנסויים מבוקרים גם בשנים הבאות זאת במטרה להציע למגדלים תכשיר אשר יהיה יעיל במניעת המחלה או הפחתת שיעורה בשדות ברחבי הארץ.

מבוא

בעית המיקוטוקסינים בתירס הפכה כיום לכלל עולמית ובארצ"ב מאיימת בעיה זו על ציבור מגדלי התירס כמו על כל התעשייה העניפה הנשענת על גידול זה (מכוני תערובות, מגדלי בעלי חיים, יצואני גרעינים וכו'). הרעלנים המסוכנים והנפוצים ביותר בתירס הם אפלטוקסינים ומיקוטוקסינים כגון פיומוניזין ו- DON הנוצרים ע"י מיני פוזריום. גידול התירס המתוק בארץ הולך וכובש פלח נרחב בחקלאות. שטחי הגידול משתרעים על פני כ- 55,000 דונמים והיבול: 100,000 - 80 טון. כמות גדולה מתירס זה מיועדת לייצוא. עד היום נמנעו בארץ מלטפל בבעית המיקוטוקסינים בתירס אך כיום - הוצבו דרישות מחמירות על-ידי ארצות היעד, וגובר החשש מפני דחיית משלוחים אשר ימצאו מזוהמים. החשש מפני זיהום התירס במיקוטוקסינים מחד והחמרת הדרישות לאחרונה, מאידך, מחייבים התחלת ביצוע עבודה יסודית, הן לקביעת היקף הבעיה ובעיקר לבירור תכונות לעמידות אפשרית הנמצאת בזן הקיים (ג'ובילי) ואלה העומדים לפני שחרור לחקלאים. כמו כן יש להרחיב ולכלול זנים הקיימים במאגר הנמצא בנווה-יער. הזנים אשר ימצאו כעמידים או רגישים פחות לזיהום במיקוטוקסינים יהוו בסיס להמשך עבודת טיפוח של זנים מסחריים.

קבלת תוצרת נקיה ממיקוטוקסינים, בעיקר אפלטוקסינים ופיומוניזינים, תהווה יתרון עצום למגדלים ותתרום כלכלית להכנסתם, לביסוס הענף ולהגדלת הייצוא של תירס מתוק מישראל לשווקי העולם.

בידוד תבדידים טוקסיגניים:

קלחי תירס נאספו משדה מסחרי בנווה-יער והובאו למעבדה. הגרעינים הוצאו מהקלחים ולאחר חיטוי חיצוני - טולטלה דוגמת גרעינים (5 גר') ב- 45 סמ"ק תמיסת אגר (0.1%). מהולים יורדים מתמיסת המיהול שוטחו על מצע PDA בצלחות פטרי והצלחות הודגרו ב- 28°C. בדרך זו בודדו מגרעינים בין היתר 3 פטריות אשר הוגדרו ע"י ה- CBS כ: *F. moniliforme* ו- *A. parasiticus*, *A. flavus*.

קביעת כושר יצירת מיקוטוקסינים ע"י תבדידי המבחן:

תבדידי *Aspergillus* מקב' *A. flavus* ידועים כבעלי כושר ליצור אפלטוקסינים בעוד אשר תבדיד של *F. moniliforme* ידועים כמקור עיקרי ליצירת פיומוניזינים. לפיכך היה ענין לבדוק כושר יצירת מיקוטוקסינים אלה ע"י התבדידים שבודדנו מגרעיני התירס. סוספנסיות נבגים ($10^5/\text{ml}$) הוכנו מכל פטריה בנפרד, ואלה שמשו לאילוח גרעיני תירס (מעוקרים בקרינת גמא) בשתי רמות של לחות (moisture content): 17% ו- 22%. הגרעינים הודגרו ב- 28°C ובדיקת הטוקסינים (כ"א בנפרד בהתאם למין הפטריה) בוצעה בתום 7 ו- 14 ימי הדגרה. רמת האפלטוקסינים נקבעה תוך שימוש בשיטה המתוארת ב- AOAC (1) ובעזרת קיטים אימונולוגיים תוצרת חברת Neogen Corporation, Lansing, MI, USA בעוד אשר תכולת פיומוניזין B_1 נקבעה תוך שימוש בשיטה המתוארת בספרות (2,3) לאחר מודיפיקציות כמתואר בנספח מס' 1. בנוסף גם בעזרת קיטים אימונולוגיים (גם הם מתוצרת Neogen) (1).

כתבדידים "רפרנטיים" שמשו תבדידי *A. parasiticus* ו- *F. moniliforme* אשר נתקבלו מאוסף ה- Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Ill., USA והמוגדרים כיוצרי אפלטוקסינים ופיומוניזין B_1 בהתאמה.

הדבקת קלחי תירס בשדה

הנסויים בוצעו בשדה מסחרי בחוות עדן, בחממה ובשדה מסחרי בנווה-יער. הוכנו תרחיפי נבגים מהפטריות *A. parasiticus* ו- *F. moniliforme* ($10^6/\text{ml}$) בתוך תמיסת Tween. לצורך הדבקת הקלחים השתמשנו בשתי שיטות (תמונה מס' 1):
 א. 5 סמ"ק של סוספנסיות נבגים הוזרקו לאורך הקלח במקומות שונים.
 ב. 5 סמ"ק של סוספנסיות נבגים רוססו (בעזרת מרסס ידני) על פני המשי (בעת הטפול היו הקלחים במצב של עד שבוע מיום שליפת המשי).
 קבוצת טפול אחת הודבקה פעם אחת וקבוצה שניה הודבקה פעמיים בהפרש של 7 ימים. קלחים להם הוזרקה תמיסת Tween, כאלה אשר רוססו במים מעוקרים וכאלה אשר לא טופלו כלל שמשו כבקורת.
 לאחר האילוח כוסו הקלחים בשקיות נייר על מנת למנוע נזקי חרקים ואילוח קלחים אשר לא הודבקו.

איסוף הקלחים

בתום 7 ימים ו- 14 ימי מתום הריסוס, נאספו הקלחים והובאו למעבדה. הגלומות הוסרו והקלחים סווגו לקבוצות על פי גודל הכתם הנקרוטי ומיקומו (בראש הקלה, באמצע או בתחתית) (תמונה מס' 2).

גנוטיפים שונים מאוסף נווה-יער נזרעו בחלקות של שדה מסחרי. החלקות נזרעו באקראי. לאחר הדבקת הצמחים הם כוסו בשקיות למניעת חדירת מזיקים. בתום 14 ימים ממועד ההדבקה - נקטפו הקלחים, קולפו ובוצעה הערכת נגיעות בסקלה של 0 (ללא נגיעות) עד 4 (כתם נגיעות שקוטרו עולה על 3 ס"מ). נתוח תוצאות נעשה תוך שמוש בתכנית SAS (ע"י ד"ר אברהם גניזי, המחלקה לסטטיסטיקה, מרכז וולקני).

תוצאות ודיון

לושרם של התבדילים אשר בודדו מגרעיני תירס מתוק בארץ ליצור אפלטוקסינים או פיומוניזין B_1 מוצג בטבלה מס' 1. הנתונים מלמדים כי תבדידי ה- *Aspergillus* יצרו אפלטוקסינים הן על מצע סינטטי והן על גרעיני תירס בעוד אשר תבדיד של *F. moniliforme* מבידוד מקומי יצר פיומוניזין B_1 רק על גרעיני התירס. בבצוע הנסויים השתמשנו גם בתבדידי פטריות אשר נתקבלו מאוסף ה- NRRL ושמשו כבקורת. ניתן לראות כי תבדילים אלה אשר הוגדרו ע"י NRRL כ"טוקסיגניים" אכן יצרו אפלטוקסינים ופיומוניזין B_1 אם כי בסדרי גודל שונים מאלו אשר נוצרו ע"י התבדילים המקומיים. תוצאות העבודה לימדו איפא כי התבדילים המקומיים הינם טוקסיגניים ולכן השתמשנו בהם להמשך נסויי השדה.

בנסויים אשר ערכנו בחוות עדן היה שיעור זהום הקלחים בפחזרים ובאספרגילוס נמך ולא איפשר ניתוח התוצאות. לכן אנו מתיחסים לתוצאות אשר נתקבלו מנסוי שדה אשר נערך בנווה-יער ובו בוצעו השנה הדבקה בפחזרים. בטבלה מס' 2 מוצגים נתוני נגיעות אשר נצפו לאחר הדבקה בפחזרים בתירס אשר נקטף - 14 ימים מיום ההדבקה. ניתן לראות כי בכל מקרה בו הוזרקה סוספנסית נבגים לקלחים נתקבלה נגיעות מירבית וכל הקלחים ה"מוזרקים" הוגדרו כנגועים. במרביתם הוגדרה נגיעות ברורה - דהיינו כתם נקרוטי בקוטר של כ- 5 ס"מ בהשוואה לנגיעות "נקודתית" בה קוטר הכתם היה כ- 1 ס"מ בלבד. בטבלה מס' 3 מוצג סיכום הנגיעות אשר נצפה בקלחים בתום שבוע ושבועיים של הדגרה בשדה. הנתונים מלמדים בברור כי גם בקלחי הבקורת נצפתה נגיעות בפחזרים זאת בשלשה זנים: Jubille, 856 ו- incredible בעוד שבזן 733A הידוע כזן עמיד לפחזרים לא נצפתה נגיעות בקלחי הבקורת. לעומת זאת נתקבלה הדבקה מיטבית לאחר הזרקה של סוספנסית נבגים לתוך הקלחים. בכל הזנים היה שיעור הנגיעות בפחזרים 100% לאחר שבועיים מיום ההזרקה, בעוד אשר בשיטת הריסוס נתקבלה נגיעות מירבית רק בזן Jubilee. חשוב לציין כי בזן זה, היה שיעור נגיעות גבוה גם בקלחי הבקורת כאשר באסיף המאוחר נתגלו כל הקלחים מזן זה נגועים במחלה. לא נתגלו טוקסינים בקלחים גם באלה בהם הוגדרה הנגיעות כברורה.

תוצאות העבודה מלמדות כי 2 שיטות ההדבקה היו יעילות לשם אילוח הקלחים. שעור המחלה הגבוה אשר נצפה בשיטת ההזרקה מלמד כי יתכן ורכוז הנבגים בסוספנסיה ($10^6/\text{ml}$) היה גבוה ובנסויים המתוכננים לשנה זו - יעשה שמוש בסוספנסיות בהן רכוז הנבגים יהיה נמוך. זן ה-Jubilee נתגלה כרגיש ביותר לפוזריום. מאחר ועבודת השדה השנה היתה הקדמית - ומטרתה בעיקר לבחון את שיטת ההדבקה האופטימלית - לא ניתן לקבוע בוודאות כי התוצאות לגבי נגיעות ה-Jubilee אכן מוחלטות. תוצאות אלה מוגדרו כאינדיקטיביות בלבד ובנסויי השדה אשר נערכו במהלך נכללו חלקות גדולות יותר והדבקה של מס' קלחים רב לשם בצוע מבחנים סטטיסטיים ברמת מובהקות גבוהה.

נסויי שדה

סוספנסיות הנבגים אשר הוכנו כוילו להיות בצפיפות של $10^4/\text{ml}$ אולם בפועל הובהר כי נתקבלו במועדי ההכנה השונים צפיפויות שונות ולכן אלה מצוינות בכל אחד מהאיורים בהם מובאות תוצאות ההדבקה.

מאחר וההזרקה בוצעה בשלשה מקומות לאורך הקלח - היה עניין לבדוק האם יש הבדלים בנגיעות הקלחים בין מקומות ההזרקה השונים. ההשוואה בוצעה בשני זנים ג'ובילי ו-781 IL. מתוצאות המובאות באיורים מס' 1 ו-2 ניתן לראות כי לא היה הבדל בין רמת הנגיעות (Disease severity = DS) במיקום השונה ע"פ הקלח ברם רמת הנגיעות היתה גבוהה יותר כאשר רכוז הנבגים היה 1.9×10^5 . תוצאות אלה מוצגות לגבי הזן ג'ובילי. בזן 781 IL נתקבלו ממצאים דומים (איורים 3 ו-4) אולם נראה בברור כי בקו זה היתה בכל מקרה רמה נמוכה יותר של DS בהשוואה לזו שנתקבלה בג'ובילי.

איור מס' 5 מציג את תוצאות הנסויים בהם נבחנו גנוטיפים שונים לעמידות בפני פוזריום. התוצאות מלמדות כי ישנם זנים בעלי עמידות יחסית גבוהה לפוזריום (Viva EI (Asg) SugLoaf E 4 Sun, IL 773A) בהשוואה לשאר הזנים שנבחנו. בשלשת הזנים המצוינים לעיל היתה חומרת המחלה (DS) נמוכה באופן מובהק מהאחרים כאשר רק בזן אחד Viva EI (Asg) היה אמנם מס' הקלחים הנגועים גבוה יחסית לשניים האחרים אך חומרת המחלה בהם היתה נמוכה ביותר. ניתן איפא לסכם ולומר כי במהלך המחקר פותחו בוצעו נסויים בהם איתרנו בצורה ברורה 3 זנים בעלי עמידות יחסית גבוהה (טבלה 4).

אפידמיולוגיה של מחלת הפחריים בתירס וניסויים ראשוניים להזברתה.

מבוא:

פטריות מהסוג פוזריום תוקפות תירס וגורמות נזק קשה בין היתר בקלחים. בנוסף לנזק הישיר, ידועים מינים רבים יוצרי מיקוטוקסינים (פיומוניזין, טריכוטצנים ועוד). עם התגברות המודעות לנזק הקשה הנגרם לבריאות האדם ובע"ח ע"י מיקוטוקסינים, ישנה כיום החמרה בדרישות לגבי נקיון קלחים מפוזריום ובמדינות רבות מתבצעות בדיקות לנוכחות מיקוטוקסינים בקלחים.

בשנים האחרונות אנו עדים להתפרצויות חמורות של מחלת הפוזריום בשדות רבים ברחבי המדינה. אין כיום נתונים על הקף הבעיה ובעיקר לא על הגורמים להתפרצותה. כך, ישנן שנים בהן המחלה חמורה במיוחד וקלחים רבים נמצאים נגועים וישנן שנים בהן כמעט ולא מוצאים נגיעות בקלחים.

ישנן מספר שאלות לברור בכל הקשור לפוזריום: הסיבות להתפרצות. אזורים מועדים לתקיפה לעומת אזורים בהם שכיחות המחלה נמוכה יחסית או בכלל אינה. אפידמיולוגיה. דרכי מניעה או הדברה. בשנה אחרונה ניסינו לבדוק מדדים מוקדמים להופעת המחלה וטיפול מונע בחומר מקובל בשימוש כנגד וירוסים.

א. מדדים מוקדמים להופעת הפוזריום (בשיתוף עם מר מנחם גרוסמן):

נבחר שדה בחולתא באזור בו היתה התפרצות קשה של המחלה בשנת 1996. השדה נדגם בתאריכים שונים לאורך תקופת הגידול וקלחים הובאו למעבדה לשם זהוי פוזריום. שיטת העבודה: כל קלח נחתך בשלשה אזורים: קדקד, מרכז ובסיס לגלילים בעובי של כ 3 ס"מ. זאת במטרה לבדוק באם יש שונות באזורי הקלח השונים, ממצא העשוי לעזור בהבנת דרכי החדירה (כך למשל, אילוח רב יותר בקדקד מצביע על חדירה דרך המשי). הגרעינים מכל גליל הוסרו, סטרילית, בעזרת סקלפל, נשטפו ומי השטיפה שוטחו על פני מצע מזון. הצלחות הודגרו לפני ספירת מושבות הפוזריום אשר הופיעו.

תוצאות:

שדה חולתא-שלשה מועדי דגימה

	26.8	3.9	9.9
מספר קלחים	19	21	21
נגועים	3	1	1

ניסוי לשכת הדרכה לכיש:

בוצעו שני ניסוסים: ראשון - משי לבן, שני - משי חום.

תוצאות (נגיעות בפוזריום בקלחים בעת קטיף סופי):

נגיעות נקי סה"כ אחוז נגיעות

טיפול	13	18	31	41
-------	----	----	----	----

בקורת	19	12	31	61
-------	----	----	----	----

באף אחד מהקלחים לא היתה פגיעה בהפריה.

תוצאות הניסויים מלמדות (חרף מספר הקלחים הקטן) כי החומר היה יעל בעיכוב פוזריום.

יש לציין כי זהו ניסוי ראשון מסוגו בו נמדדת יעילות של חומר בתנאי שדה והתוצאות

המבטיחות מעודדות המשך מחקר מבוסס יותר בשנה הבאה.

ספרות:

1. Anon (1995). Official Methods of Analysis of Internation, 16th Edition, Arlington, VA, USA.
2. Jackson, M.A. and Bennett, G.A. (1990). Production of fumonisin B₁ NRRL 13616 in submerged culture. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2296-2298.
3. Nelson, P.E., Desjardins, A.E. Plattner, R.D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by Fusarium species: Biology, chemistry, and significance. Annu. Rev. Phytopathol. 31, 233-252.

פרוטוקול למצוי זהוי פיומוניזין

Extraction and cleanup for fumonisin B₁ analysis.

A: from Synthetic media: For fumonisin B₁ (FB₁) determination in liquid culture, the contents of each flask was filtered through Whatman No. 1 filter paper and the solvent was partitioned twice with 50 ml ethyl acetate in a separatory funnel. The ethyl acetate fractions were discarded. The water fraction was evaporated to dryness in a rotavapor. The residue was dissolved in 7 ml acetonitrile-water (1:6). A C₁₈ cleanup column was preconditioned with 5 ml of methanol followed by 5 ml of methanol followed by 5 ml of water. Then a 7-ml sample was applied to the column. The column was washed with 2 ml H₂O and 2 ml acetonitrile-water (2:8). Then FB₁ was eluted with 2 ml of acetonitrile-water (7:3) and the column eluant was evaporated to dryness under a stream of N₂ on a water bath. The residue was dissolved in 500 µl acetonitrile-5% aqueous KCl (1:1).

B: From corn: Corn with a culture of *F. moniliforme* was ground in a blender and 20 g was placed in flasks with 40 ml acetonitrile-water (1:1) which were then placed in a wrist-action shaker for 30 min. The flask content was filtered through Whatman No. 1 filter paper. 2 ml of filtered extract was added to 5 ml H₂O and was applied to cleanup as described earlier. The sample residue was dissolved in 2 ml of acetonitrile-5% aqueous KCl (1:1).

Thin layer chromatography. 10 µl of samples was spotted on a TLC plate along with 10 µl of FB₁ standard (10 and 50 ppm) dissolved in acetonitrile-5% aqueous KCl (1:1). The TLC plate was developed in n-butanol:acetic acid:water (3:1:1), air-dried, sprayed with 0.5% p-anisaldehyde in methanol:acetic acid:sulfuric acid (85:10:5) and heated at 105°C for 5 min. FB₁ was observed as a dark spot at R_f 0.53.

טבלה מס' 1 - יצירת אפלטוקסינים ע"י תבדילים של Aspergillus flavus ו- A. parasiticus ופיומוניזין B₁ ע"י תבדיל של Fusarium moniliforme אשר בודדו מגרעיני תירס מתוק. כושר יצירת המיקוטוקסינים של התבדילים הושווה לזה של תבדילי בקורת אשר נתקבלו מאוסף ה-NRRL.

	Fungi from sweet corn				Reference strains (NRRL)			
Mycotoxins ¹	<u>A. flavus</u>	<u>A. parasi-</u>	<u>F. moni-</u>	<u>A. parasi-</u>	<u>F. moniliforme</u>			
		<u>ticus</u>	<u>liforme</u>	<u>ticus</u>	5682	13616		
	SM ²	corn ³	SM	corn	SM	corn	SM	corn
Aflatoxins								
B ₁	2.5	15.6	6.3	6.3	-	-	2.5	15.6
B ₂	ND	0.9	ND	0.9	-	-	ND	0.9
G ₁	6.3	31.3	2.5	31.3	-	-	ND	78.1
G ₂	ND	2.3	ND	4.7	-	-	ND	4.7
Total	8.8	50.1	8.8	43.2			2.5	99.3
Fumonisin								
B ₁	-	-	-	-	ND	1000	-	ND

¹ - mycotoxin production on corn (mg/kg) or SM (μg/kg);

² - SM - synthetic media;

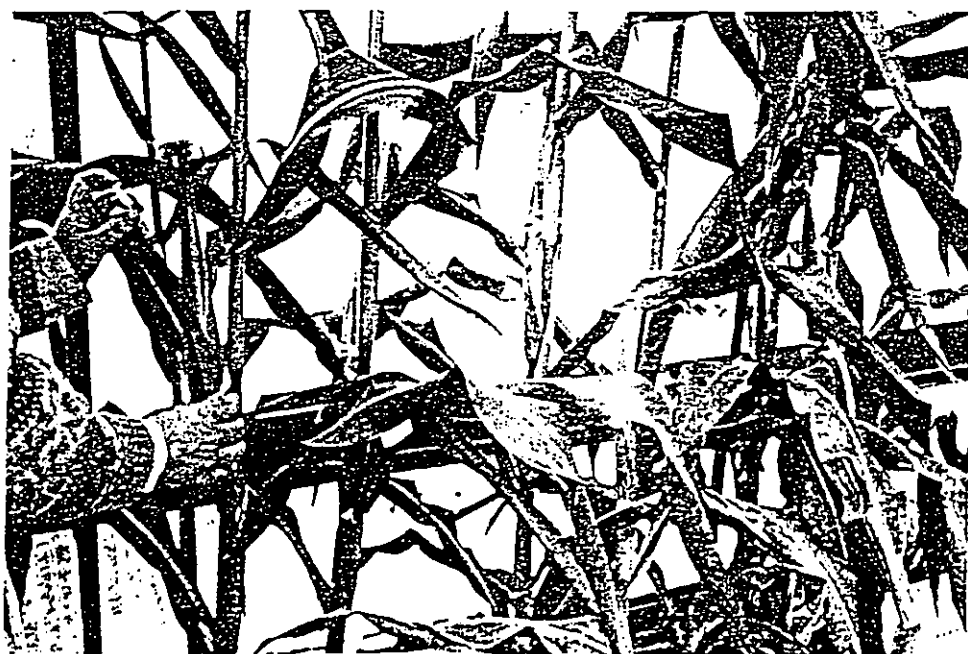
³ - moisture content of corn for AF analyses was 18.7%,

moisture content of corn for FB₁ analyses was 47.5%.

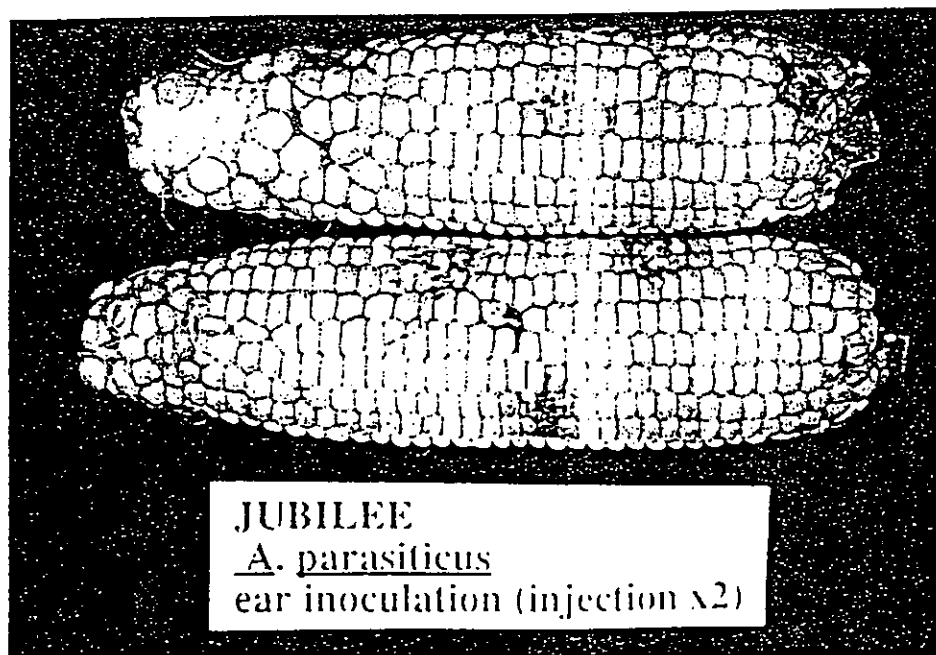
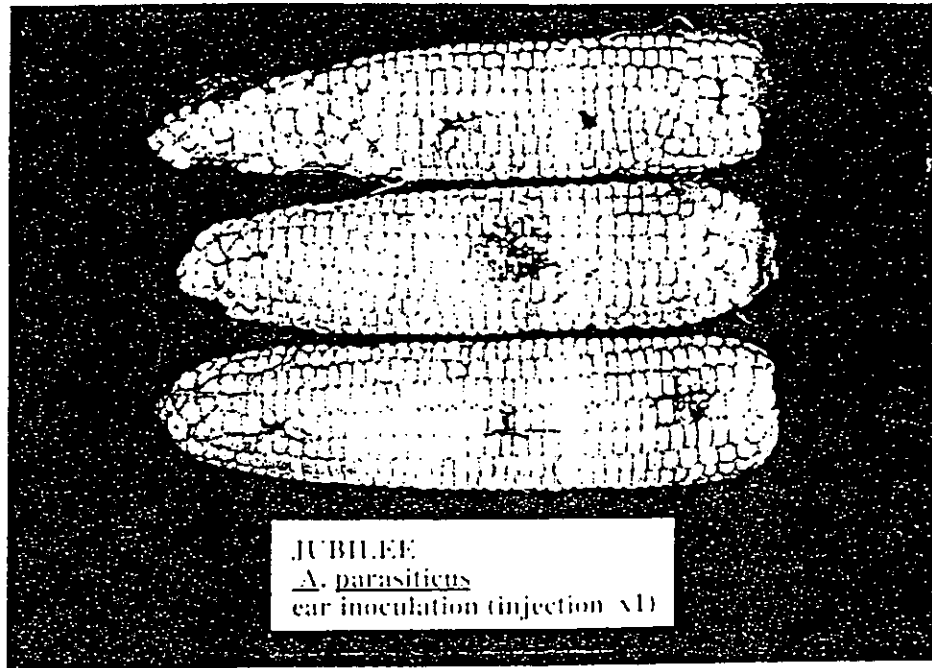
The data obtained show that A. flavus, A. parasiticus and F.

טבלה מס' 3 - רכוז נתוני נגיעות קלחים בארבעה זני המבחן לאחר שבוע ושבועיים מתום ההדבקה בפוזריום.

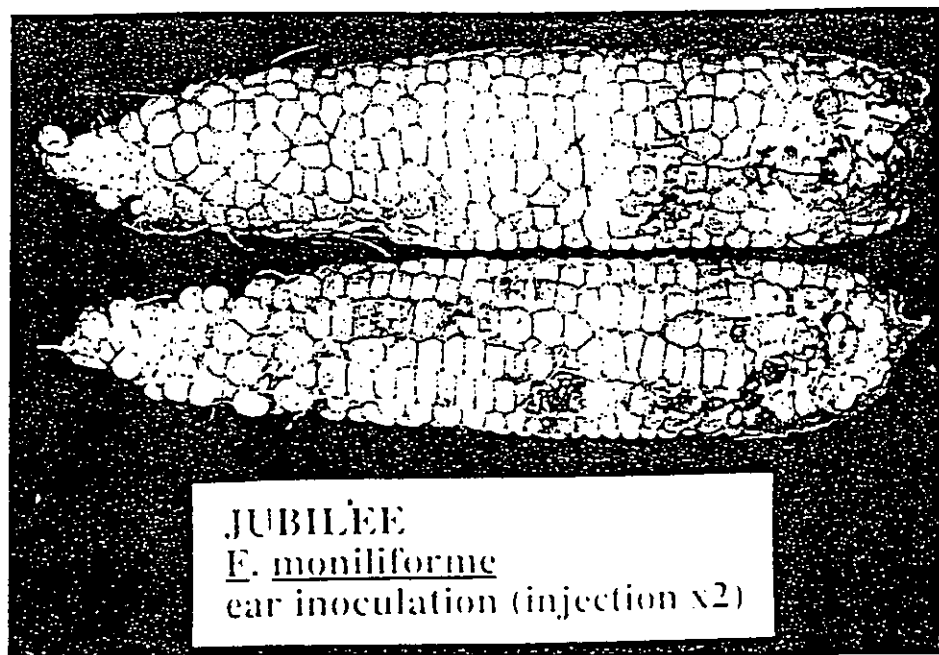
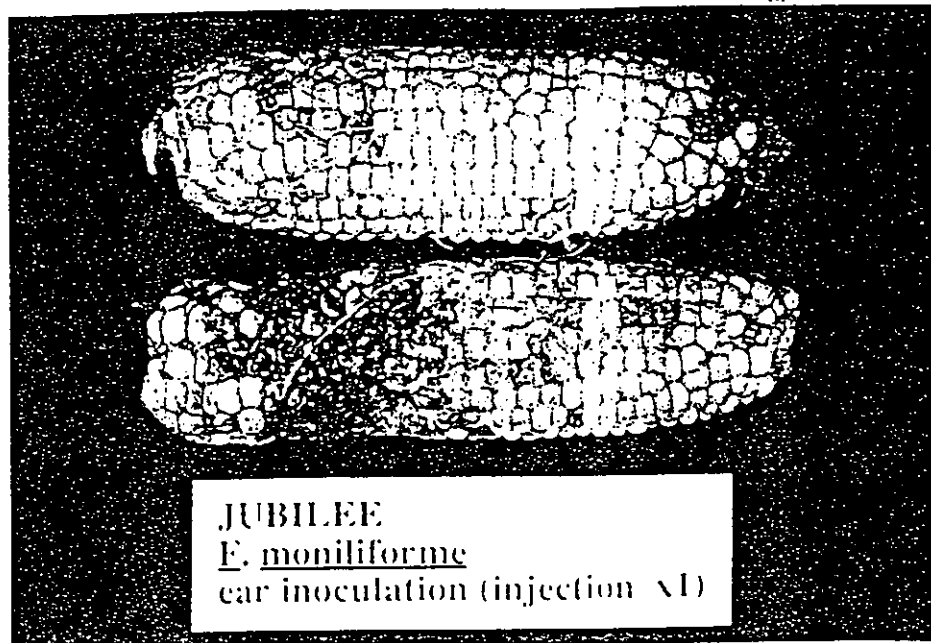
זן		במורת						טיפול			
		ללא טיפול		חזקה		ריסוס משי		חזקה		ריסוס משי	
		שבוע	שבועיים	שבוע	שבועיים	שבוע	שבועיים	שבוע	שבועיים	שבוע	שבועיים
856	נגוע	2	8	3	2	0	2	3	14	2	4
	סה"כ	9	15	14	7	2	14	3	14	9	14
JUBILEE	נגוע	6	12		5	7	3	6	14	9	6
	סה"כ	12	12		7	12	9	7	14	10	9
INCREDIBLE	נגוע	1	4	0	1	0		4	1	3	1
	סה"כ	8	6	9	3	9		4	1	3	1
733A	נגוע	0	0	0	4	0	4	6	5	1	2
	סה"כ	8	7	4	10	5	10	6	5	3	4



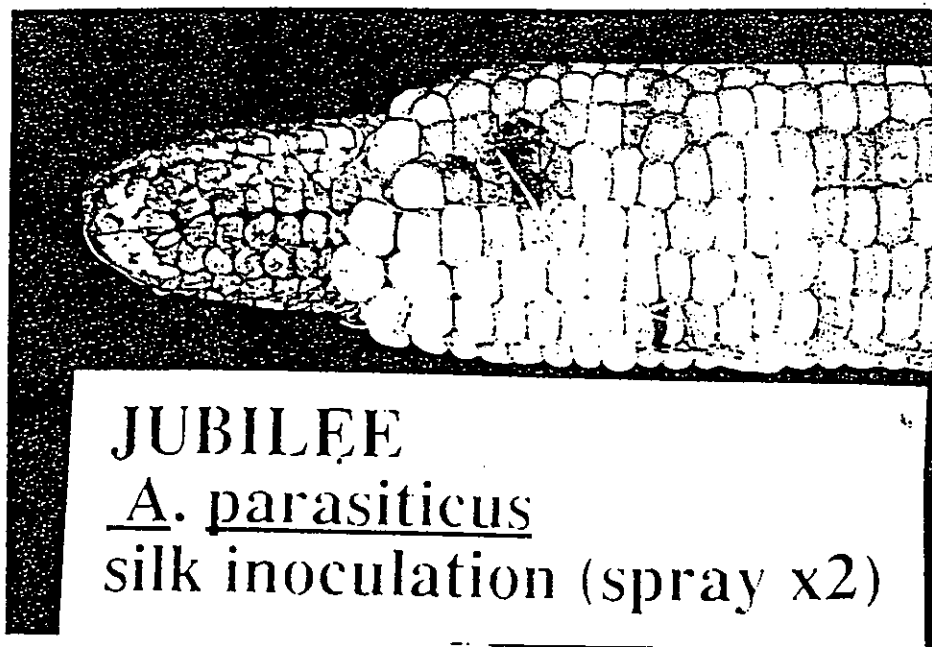
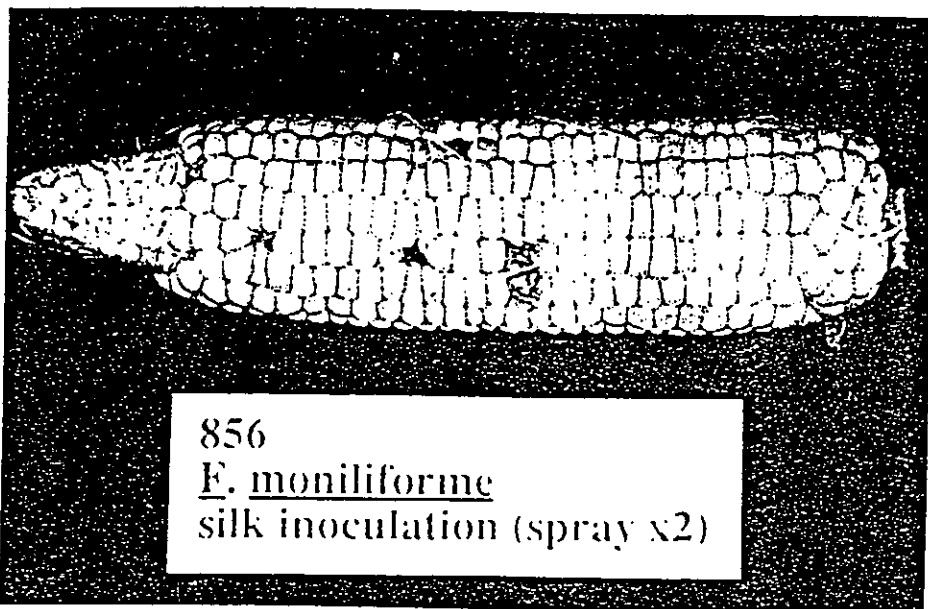
תמונה מס' 2: נגיעות קלחי תירס מתוק לאחר הדבקה בפטריות
Fusarium moniliforme \ Aspergillus parasiticus



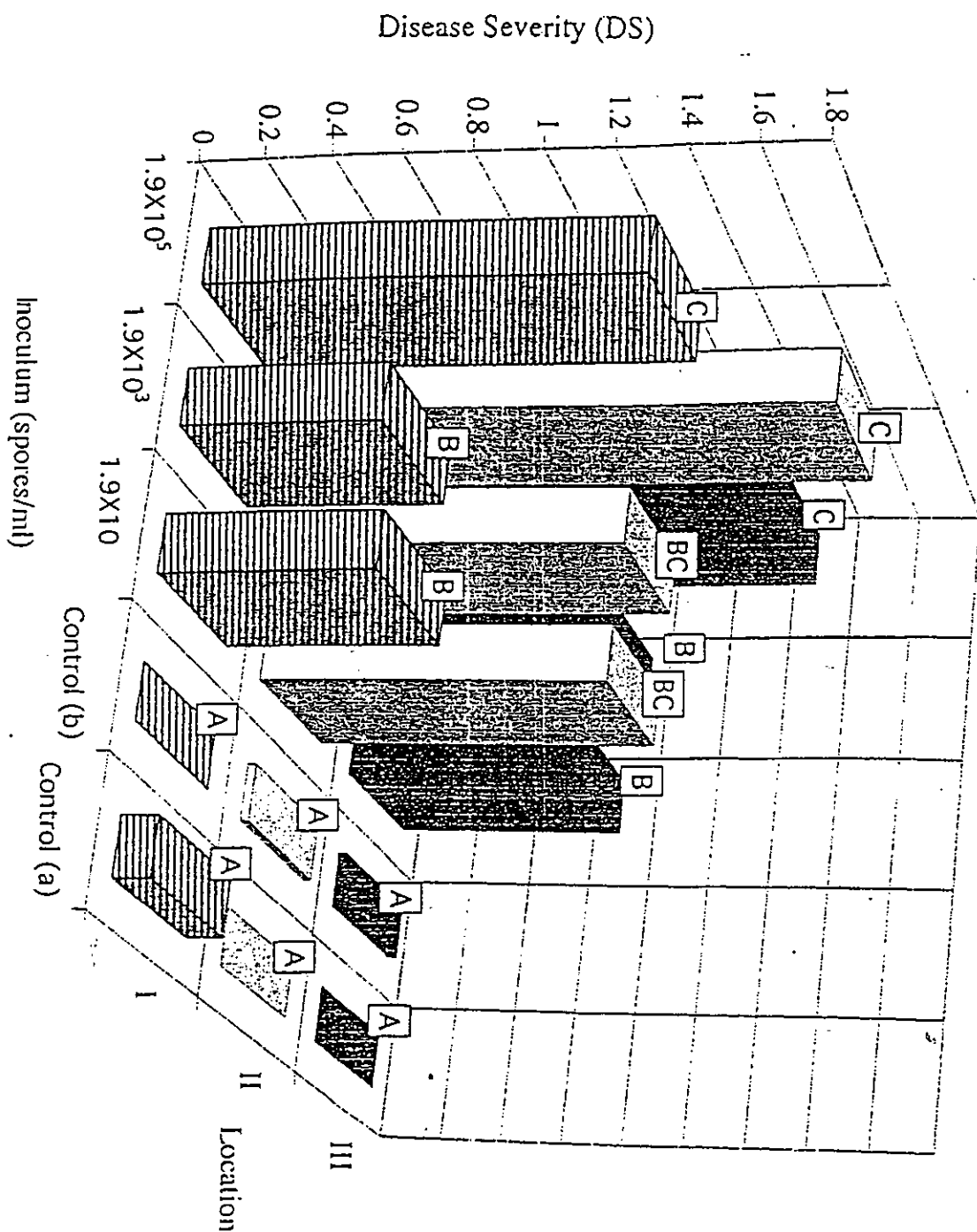
תמונה מספר 2: נגיעות קלחי תירס מתוק לאחר הדבקה בפטריות
Fusarium moniliforme ו Aspergillus parasiticus



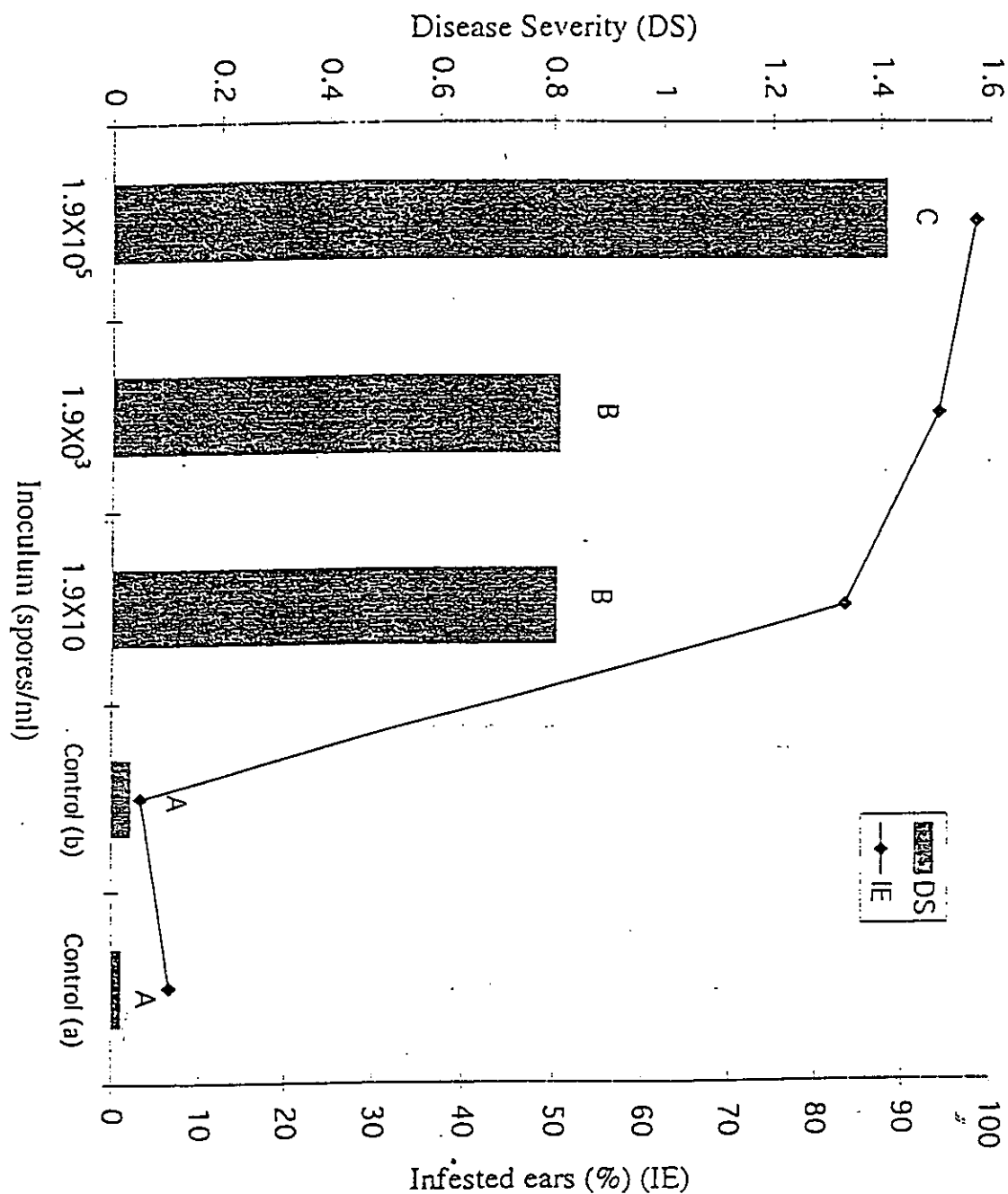
תמונה מספר 2: נגיעות קלחי תירס מתוק לאחר הדבקה בפטריות
Fusarium moniliforme ו Aspergillus parasiticus ...

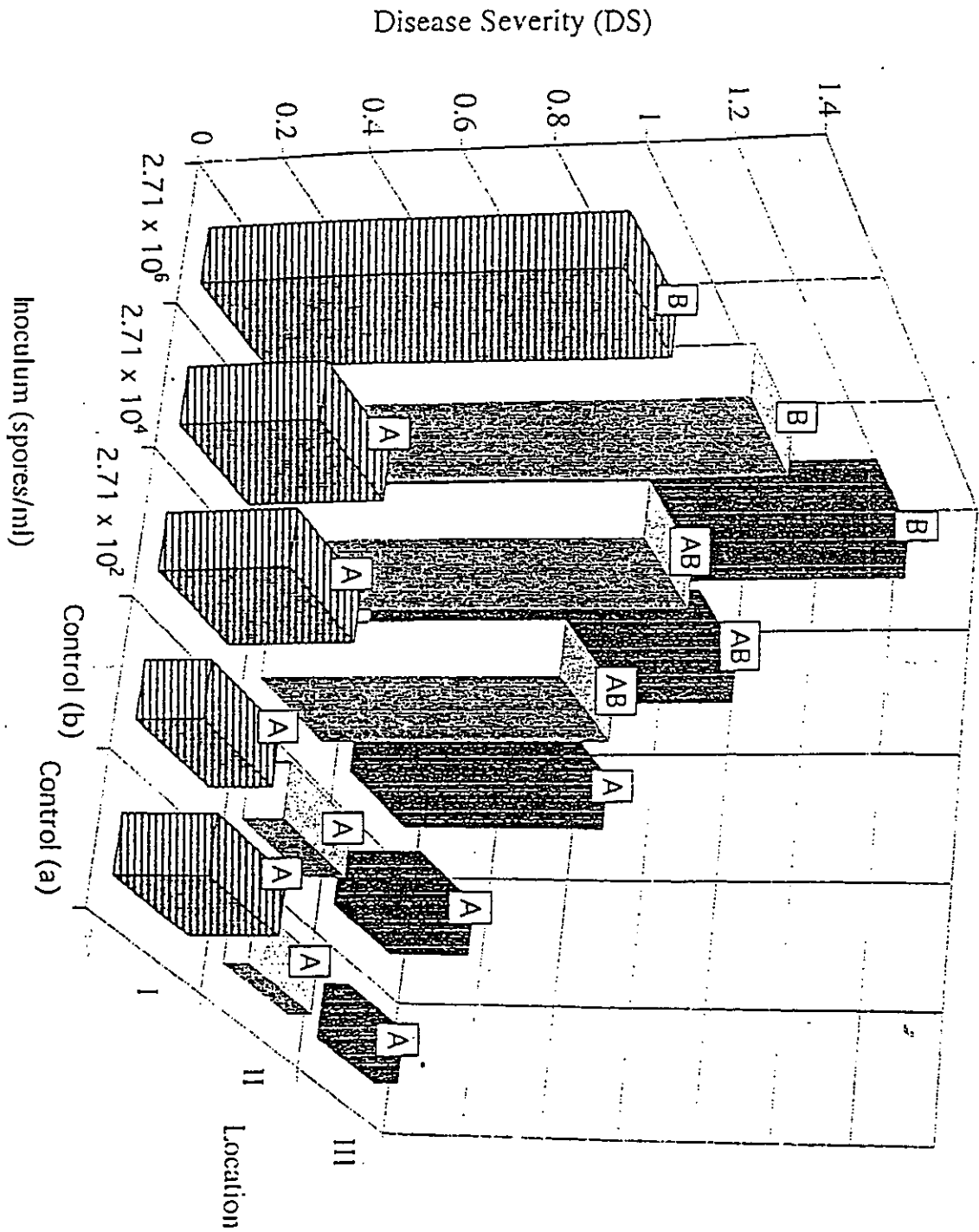


איור 1: נגיעות קליות תירס בפחוריות בון ג'ובילי לאחר הדרכת שדה בשיטת ההזרקה לקליחים. ההזרקה בוצעה בשלושה מקומות לאורך הקלח (קדקד, אמצע ובסיס) וניתוח התוצאות בוצע בהשוואת הנגיעות בין מקומות ההזרקה השונים.



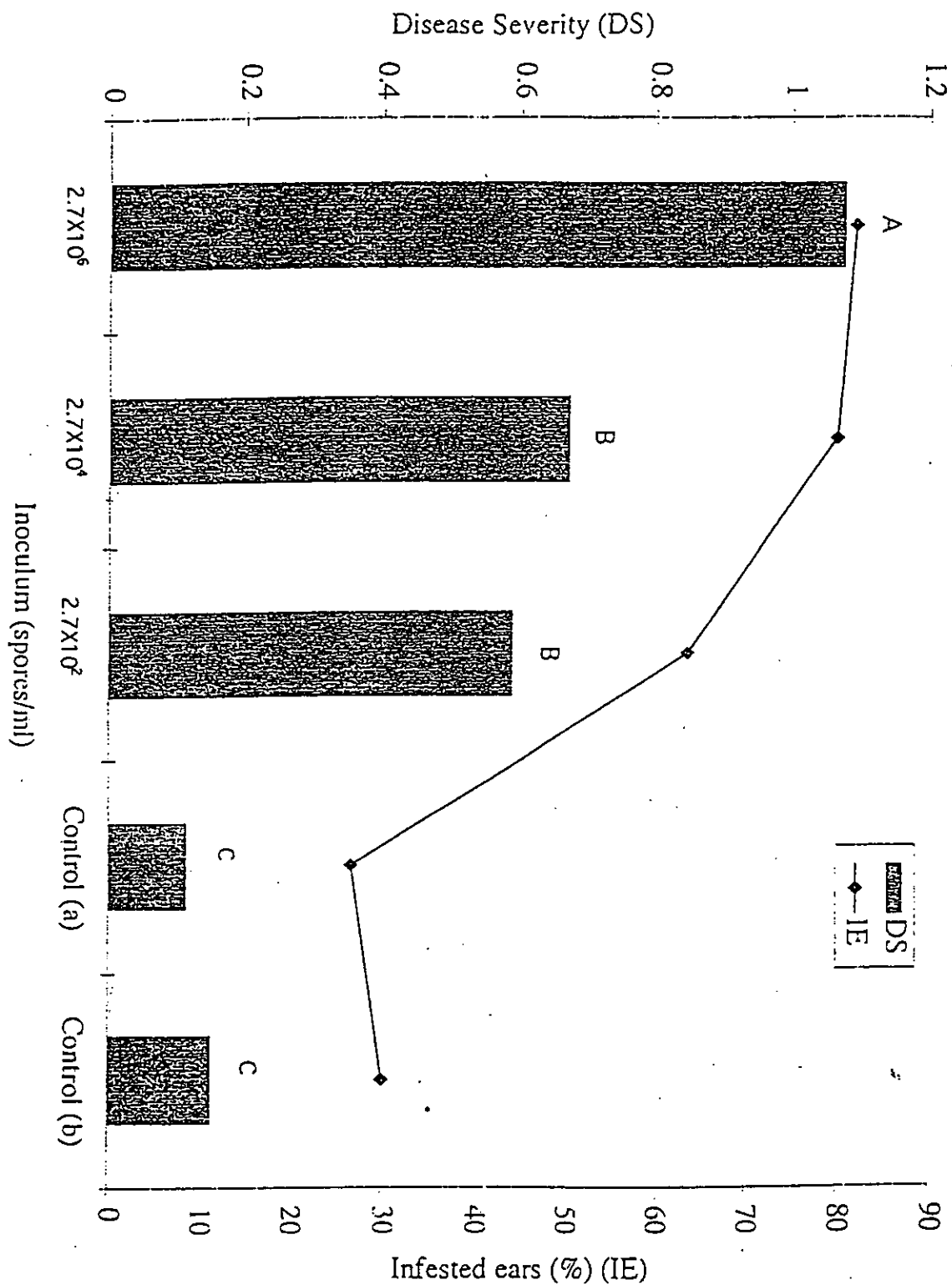
איור 2: גיטות קלחי תירס בפוריות בון גיובילי לאחר הזדקק שדה בשיטת ההזדקק לקלחים.
ההזדקק בצעה בשלשה מקומות לאורך הקלח (קדקד, אמצע ובסיס) ויחדיו התוצאות בוצע
בהשוואת הנגיטות ללא התחשבות במיקום ההזדקק.



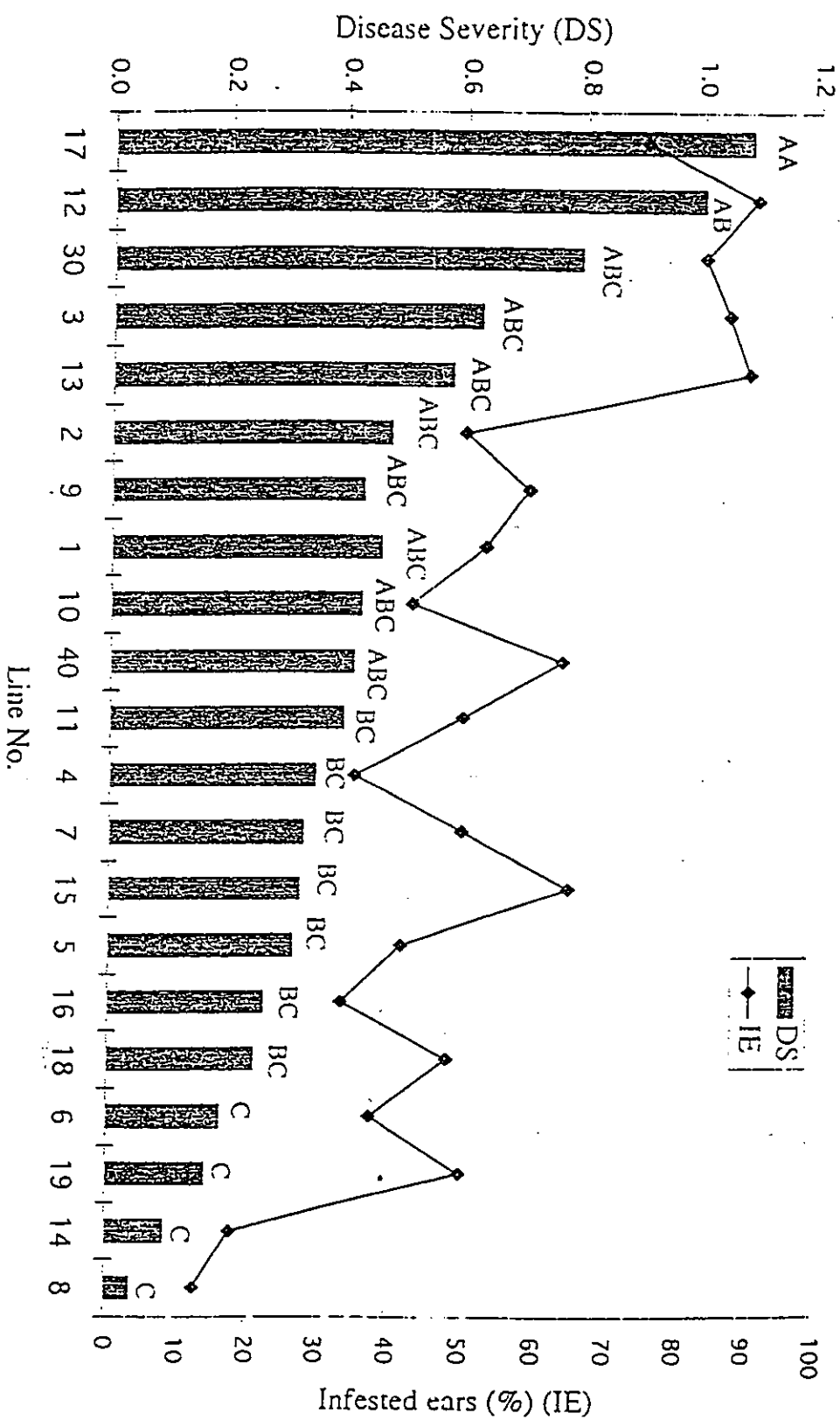


אין 3: נגישות קלינית תיירט בפחיריות בין **IL781** לאחר הזנקה שדה בשיטת ההזנקה לקליטים. ההזנקה בוצעה בשלושה מקומות לאורך הקליח (קדקד, אמצע ובסיס) וניתוח התוצאות בוצע בהשוואת הנגישות בין מקומות ההזנקה השונים.

איור 4: נגיפת קלחי תירס בפחדים בן **IL781** לאחר הזנקה שדה בשיטת ההזדקקה לקלחים. ההזדקקה בוצעה בשלושה מקומות לאורך הקלח (קדקד, אמצע ובסיס) וניתוח התוצאות בוצע בהשוואת הנגיפת ללא התחשבות במיקום ההזדקקה.



אזור 5: מבחני זניס לעמידות לפחידים לאחר הדבקות שדה (שדה מסחרי בננה יעד). שומות
 חונים מופיעים בטבלה מספר 1 בהתאם למספר השורה.



טבלה 4: ניתוח שונות של עמידות זנים בהתאם לרמת פטריית הפחיריום אשר אולחה (רמת הנבגים בסוספנסיה) (הדבקות שדה בשיטת ההזרקה לקלחים).

Corn Hybrid	Line No.	Inoculum (spores/ml)				
		19	85	271	500	670
Viking E2B1	17				A	
J95	12					A
J	30	A				
79Y E4 (AC)	3					A
SnowBell E1B (Asg)	13		A			
2684 E1 (Rog)	2					A
IL781A	9				AB	
2419 E2 (Rog)	1					A
IL796B	10				AB	
IL781	40			A		
J106A	11					A
A619 se E2	4				AB	
IL772A	7				AB	
Sweet Elite 129 (IFS)	15			A		
Classic R32B (Asg)	5					A
Tuxedo E2 (Sto)	16		B			
Champ E1A (Asg)	18		B			
Divinity E2 (LSC)	6		B			
Viva E1 (Asg)	19				B	
SugLoaf E4 Sun	14		B			
IL 773A	8		B			

1. מטרת המחקר לתקופת הד"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה:
איתור זנים העמידים לפוזריום ופיתוח אמצעים להדברת הפטריה (שנים ב' ו- ג'). בנוסף, מציאת מדדים מוקדמים להופעת הפטריה במטרה לאתר שדות חשודים ולמנוע קטיף של יבול מזוהם. בדיקת יעילותו של תכשיר וירול בהורדת שיעור הנגיעות.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הד"ח:
נלקחו מדגמים של קלחים משדות ונבדקו במעבדה לנוכחות איכותית של פוזריום. בוצעו שני ניסויים בהם רוססו שדות בוירול ובוצעה הערכת נגיעות קלחים.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:
מדדים מוקדמים: ניתן לעקוב אחר התפתחות פוזריום באמצעות דגימות מיצגות משדות בארץ. טיפול מונע: נתונים שנצברו מעידים כי ניתן להפחית שיעור המחלה בעזרת וירול.
4. הבעיות שנוותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן:
העבודה אשר בוצעה בשנה ג' היא ראשונית אולם הממציאים מבטיחים ומעודדים המשך המחקר בשני הכוונים: אפידמיולוגיה ומניעת המחלה.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הד"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך:
הרצאה ראשונה על ממצאי העבודה בשנה ג' כבר הוגשה לפני מגדלי תירס ביום עיון אשר נערך בת"א.