التشخيص المظهري والجزيئي لبعض الفطريات المسببة لمرض لفحة السنابل على الشعير في محافظتي صلاح الدين ونينوى

سعدالله حسن علي
sasdhasn2@gmail.com
العامة لتجارة الحبوب/ فرع صلاح الدين

قيس كاظم زوين**
qzewain@gmail.com
كلية الزراعة ـجامعة تكريت

كركز محمد ثلج***
KrKzoh@yahoo.com
كلية الزراعة ـجامعة تكريت

- تاريخ استلام البحث 10\5\2022 وقبوله 2\6\2022 .
- البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

الخلاصة

أظهرت نتائج المسح الحقلي وأذ تقصي عن مرض اللفحة الرأسية للسنابل على الشعير لمناطق زراعة الشعير في محافظتي صلاح الدين ونينوى انتشار المرض بنسب متباينة أذ بلغ عدد الحقول المصابة بالمرض(الفحص العيني) ١٧ حقل من اصل ٢١ حقلاً شملت بعملية المسح وبلغت نسبة الاصابة بالمرض في الحقول بين ٣.٢ – ٤.٧ % وبمتوسط 2.9 % وبشدة اصابة تراوحت بين ٠.٣ - ٠.٩ % وبمتوسط ٠.٧ % . اظهرت البيانات المتعلقة بنسب العزل من سنابل ونباتات الشعير تفوق تكرار ظهور اجناس فطر *Fusarium spp* مقارنةً بعزلات الفطريات الأخرى اذ بلغت اعلى نسبة لتكرار ظهور النوع *F. graminearum* ٢٠%من النبات البالغة و٣٥% من السنابل تلاه النوع *F. culmorum* وبنسبة قاربت ١٥% من النباتات و ٢٠% من السنابل ، ثم تبعها النوع *F. poae* بنسبة ١٥% من النباتات و ١٠% من السنابل ، كما ظهرت أجناس أخرى مع الفطر *Fusarium spp* في الظهور وكانت اعلى نسبة ظهور الفطر *Alternaria spp* وبنسبة ٢٥% على النباتات البالغة و ٢٠% على السنابل ثم تبعة الفطر *Aspergillus spp* بنسبة الظهور ٥% على النباتات البالغة و١٠% على السنابل ، والفطر *Helminthosporum spp* بنسبة ٥% على النباتات البالغة بينما على السنابل ظهر بنسبة ١٠% . بعد تنقية المستعمرات لاحظنا وجود مستعمرات لونها أبيض بشكل عام مع وجود لون وردي والذي تغير مع تقدم عمر المستعمرة إلى اللون البني مكونة وسادة فطرية محدودة التكوين عند تنميتها على وسط أوراق القرنفل Carnation Leaf Agar (CLA). كما ان مقلوب الطبق كان بلون برتقالي شاحب .كذلك ظهرت تحت المجهر أبواغ كونيدية كبيرة Macroconidia مقوسة نحيفة الشكل من جانبها الظهري والأبواغ نحيفه لها جدران سميكة أطوالها متوسطة ومنحنية أو مستقيمة في جانبها البطني وخليتها القاعدية متميزة والقمية مستدقة تقريباً ويتراوح عدد الحواجز في الابواغ الكبيرة بين ٣ الى ٧ حواجز. الأبواغ الكلاميدية للفطر مختلفة في تكوينها وغالباً ما تكون الأبواغ البطيئة التكوين أكثرها شيوعاً تلك التي تتكون على الابواغ الكونيدية الكبيرة، كما تكونت في الغزل الفطري فرادا بابعاد بين ١٠ـ١٢ مايكروميتر. كما تم مشاهدة مستعمرات ذات `لون احمر يميل الى البني والأبواغ الكونيدية الكبيرة Macrocondia قوية وقصيرة نوعاً ما ومحاطة بجدران سميكة جانبها الظهري منحني نسبياً والجانب البطني مستقيم تقريباً لها ٣-٤ حواجز أعدادها غزيرة وذلك عندما أصبح عمر مستعمرة الفطر سبعة ايام على الوسط الذي فيه أوراق قُرنفل. حوامل الكونيديا ذات شكل متفرع على غزل الفطر تتجمع وتكون شكل الوسادة الفطرية Sporodochium. الشكل بيضوي ويميل الى الكروي هو ماتتميز به أبواغ الكلاميديا والتي تتكون بين خلايا غزل الفطر أو على الطرفين ملمسها أملس الى خشن والأبعاد تتراوح من ٩-١٣ ميكروميتر وكانت بشكل منفرد أو تتجمع فتعطي شكل السلاسل. تم تأكيد التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية التي تسببت بالأصابة بلفحة السنابل في حقول الشعير هما النوعين *F.graminearum* و *F. culmorum* وباستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ، (PCR) من خلال الأستعمال لزوج بادئات المتخصصة للكشف عن الجينات في منطقة فاصل النسخ الداخلي ITS Internal transcribed spacer (ITS) الذي استعمل فيه البادئ الأمامي (ITS1 F: 5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′) والبادئ العكسي ITS4 R: 5′) (TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′). واظهرت النتائج من تحليل الهجرة الكهربائية باستعمال الاكاروز ٢ % في ظهور حزمة بحجم ٥٤٤ زوج قاعدي وهو الحجم الذي تم توقعه الذي تظهر عنده بادئات المتخصصة للكشف. ولأن البادئان يقعان داخل التكوين الجيني لكل من الفطر *F.graminearum* والفطر *F. culmorum* ، فانه يتأكد بشكل نهائي أن عزلتي الفطر التي تم تشخيصهما بالتشخيص المظهري على الاوساط الزرعية تعود الى الفطرين المذكورين آنفاً.

الكلمات المفتاحية: لفحة السنابل ، *F.graminearum* ، *F. culmorum*

Phenotypic and molecular diagnosis of some fungi that cause spikes blight on barley in Salah al-Din and Nineveh governorates

(1) Saad Allah Hassan Ali * (2) Qais Kazem Zwain ** (3)Karkaz Muhammad Snow ***

sasdhasn2@gmail.com qzewain@gmail.com KrKzoh@yahoo.com

(1) The General Company for Grain Trade / Salah El-Din Branch.

(2) College of Agriculture - University Tikrit.

(3) College of Agriculture - University Tikrit.

- **Date of research received 10/5/2022 and accepted 2/6/2022.**
- **Part of PhD dissertation for the first author.**

Abstract

The results of the field survey showed that when the head blight disease was investigated on barley for the barley cultivation areas in the governorates of Salah al-Din and Nineveh, the disease spread in varying proportions, the number of fields affected by the disease (examination appearance) 17 fields out of 21 fields included in the survey process, and the infection rate in the fields ranged between 3.2 - 4.7 %, with an average of 2.9 %, and a severity of infection ranging between 0.3 - 0.9 %, and an average of 0.7%. The data related to the percentages of isolates from ears and barley plants showed a higher frequency of appearance of spp *Fusarium* species compared to isolates of other fungi. The highest frequency of appearance of *F. graminearum* reached 20% of the adult plant and 35% of the ears were followed by *F. culmorum* with a rate of approximately 15% of the plants And 20% of the spikes, followed by the type *F. poae* with 15% of the plants and 10% of the spikes, and other genera appeared with the fungul *Fusarium* spp in the emergence and the highest percentage of the appearance of the fungus *Alternaria* spp and by 25% on the adult plants and 20% on the spikes Then the fungus *Aspergillus* spp followed with a percentage of 5% on adult plants and 10% on spikes, and *Helminthosporum* spp with 5% on adult plants, while it appeared on spikes by 10%. After purification of the colonies, we noticed the presence of colonies of white color in general with a pink color, which changed with the age of the colony to brown, forming a fungal pillow with limited formation when growing on the middle of the Carnation Leaf Agar (CLA) leaves. The inverted plate was pale orange in color. Also, Macroconidia spores appeared under the microscope, curved and thin on its dorsal side, and the spores were thin, with thick walls, of medium lengths, and curved or straight on their ventral side, their basal cell distinct and the apical almost tapering. The number of septa in large spores ranged between 3 to 7 septa. Chlamydial spores of fungi are different in their composition, and the slow-forming spores are often the most common ones that form on large conidia, as they were formed in the mycelium single with dimensions between 10-12 micrometers. Colonies of `red color tend to brown and Macrocondia strong and somewhat short and surrounded by thick walls, the dorsal side is relatively curved, and the ventral side is almost straight. clove. Conidia runners are branched on mycelium of mushrooms that assemble and form the pillow-shaped Sporodochium. The shape is oval and tends to be spherical. It is characterized by Chlamydia spores, which are formed between the cells of the mycelium of the fungus or on both ends. Its texture is soft to rough, and the dimensions range from 9-13 micrometers, and they are singly or aggregated, giving the form of chains. Molecular diagnosis

of the fungal isolates that caused head blight in barley fields, *F. graminearum* and *F. culmorum*, was confirmed using polymerase chain reaction (PCR) technology by using a pair of specialized primers to detect genes in the internal transcribed spacer (ITS) ITS in which the forward initiator (ITS1 F: 5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) and the reverse initiator (ITS4 R: 5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) were used. The results of electro-migration analysis using 2% agarose showed that a band of size 544 base pairs appeared, which is the size that was expected at which the specialized primers appear for detection. Because the initiators are located within the genetic makeup of F.graminearum and F. culmorum. It is finally confirmed that the two isolates of mushrooms that were diagnosed by phenotypic diagnosis on culture media belong to the two fungi mentioned above.

Key words: head blight, F.graminearum, F. culmorum.

المقدمة

يعد الشعير *Hordeum vulgare* التابع للعائلة النجيلية Poaceae من أقدم محاصيل الحبوب التي عرفها الانسان (اليونس واخرون ، ١٩٨٧) محصول الشعير يزرع في المناطق التي تكون فيها الامطار محدودة وذلك بسبب تحمل هذا النبات قلة سقوط الامطار وظروف الجفاف (العامري ، ٢٠١٠).ويعاني العراق من شحة في إنتاجة مما يتسبب في عدم تلبية الاحتياجات الاستهلاكية للبلد مع وجود حاجة متزايدة لأستهلاك هذا المنتج (Blattne ، ٢٠١٨). إن احد أهم اسباب إنخفاض إنتاجية محصول الشعير في العراق يعود الى انتشار العديد من الآفات الزراعية لاسيما الإصابات الفطرية بمراحل نموه كافة ومن هذه الأمراض تعفن البذور وموت البادرات قبل البزوغ وبعدها وتعفنات الجذور (Lamichhane وآخرون ، ٢٠١٧). كما تتعرض سنابل الشعير الى مرض لفحة السنابل ولايقتصر تأثير هذه الفطريات في تسببها بخسائر مباشرة وغير مباشرة وتشمل خفض نسبة الانبات والحاصل وكذلك رداءة نوعية المحصول بل قدرتها على إنتاج المركبات السامة للانسان والحيوان والتي تقع ضمن الخسائر غير المباشرة والتي تدعى بالسموم الفطرية Mycotoxins والتي تتسبب بالعديد من الإخفاقات الصحية وأشهرها مرض السرطان ومن اشهر السموم الفطرية السم deoxynivalenol (DON) ((McMullen وآخرون ، ٢٠١٢). وكذلك السم Zeralenon (ZEN) ، إن هذان السمين يتواجدان في قش المحاصيل فضلا عن وجودهما في الحبوب (Liu و Applegate ، ٢٠٢٠). يعد الفهم الأفضل للتفاعلات الفطرية والنباتية وعوامل الإمراضية شرطًا أساسيًا لتطوير استراتيجيات جديدة لمكافحة المرض. اذ ان التطورات الحديثة في التسلسل والتقنيات الجينومية جعلت من الممكن مراقبة تغيرات التعبير الجيني على مستوى الجينوم الكامل ، والتي أثرت على جميع جوانب العلوم البيولوجية (Xu وآخرون ، 2006). في علم أمراض النبات ، يعد التحديد المبكر للعامل المسبب للمرض أمرًا بالغ الأهمية للتعرف على العامل الممرض ، وتنفيذ اللوائح التي تتضمن التحكم والحجر الصحي (Atkins و Clark ، 2004). أشار Stakheev وآخرون (٢٠١١) إلى أن تقنيات التشخيص الميكروبيولوجي الروتيني ، بما في ذلك عزل مسببات الأمراض والدراسات المورفولوجية ، كانت تستغرق وقتًا طويلاً وتتطلب جهدًا كبيرًا ؛ علاوة على ذلك ، اعتمدت نتائجهم على خبرة الموظف العالية ؛ وبالتالي ، هناك بعض تقنيات التشخيص الجزيئي المحددة والحساسة التي تم استخدامها للكشف عن مسببات الأمراض الفطرية بدقة ، مثل تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) والمقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (ELISA). على الرغم من أن كلتا الطريقتين قد وفرتا نتائج سريعة وموثوقة ، إلا أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل مرغوبة لأنها أكثر حساسية وتحديدًا (Chakraborty وآخرون ، ٢٠٠٦ . De Villiers ، ٢٠٠٩). وهدفت الدراسة الى تشخيص الفطريات المعزولة من عملية المسح الحقلي مظهريا وجزيئيا

المواد وطرائق العمل

المسح الحقلي:

تم أجراء المسح الحقلي لمرض لفحة السنابل على الشعير في بعض مناطق محافظة صلاح الدين (الشرقاط والعلم وسامراء وبيجي) ومحافظة نينوى (القيارة وحمام العليل والحمدانية) خلال الأشهر نيسان وآيار من عام ٢٠٢٠ إختيرت عدة حقول في كل منطقة ، وتم حصر النباتات المصابة اثناء السير داخل الحقل على شكل قطرين متعامدين ورمي المربع الخشبي (مساحته١/٢م٢) بمعدل خمسة رميات لكل قطر في كل حقل ومتوسط ٨٥ نبات لكل حقل، وحساب النسبة المئوية للإصابة باستخدام المعادلة الاتية:

%للإصابة = عدد النباتات المصابة في المربع الخشبي/ العدد الكلي للنباتات في المربع الخشبي ×١٠٠

ومن الاعراض المرضية الظاهرة النباتات المصابة ،هي الإصفرار وموت الأوراق السفلية على المجموع الخضري والسنابل البيضاء الطباشيرية او ذات اللون البني الفاتح ، ومن الحبوب النامية ذات الشكل المنكمش او خشنة السطح لونها رمادي ناعم ، ومن السويقة أيضًا أسفل السنبلة ذات اللون البني أو الأرجواني.

وتم تقييم شدة الاصابة للنباتات المصابة باستخدام معادلة (Michenny ،١٩٢٣) :

شدة الاصابة=عدد السنابل من الفئة(١)×تكرارها+....+عدد السنابل من الفئة(٥) ×تكرارها/ العدد الكلي للسنابل المختبرة×أعلى فئة

بعد تصنيفها إلى ستة فئات أستناداً الى مقياس (Jones ، ٢٠٠٠) كتعديل لقياس(Chelkowski،١٩٨٩) .

الفئات	الاعراض على السنابل
٠	السنابل سليمة
١	سنيبلة واحدة مصابة
٢	٢ الى ٣ سنيبلات مصابة
٣	٤ الى ٥ سنيبلات مصابة
٤	٦ الى ٨ سنيبلات مصابة
٥	٩ الى ١٤ سنيبلات مصابة
٦	١٥ أو أكثر سنيبلات مصابة

عزل وتشخيص الفطريات :

تمت زيارة عدة حقول في المناطق المذكورة سابقا عند مرحلة تكامل النمو الخضري للنباتات وقبل التزهير وبعد التزهير وتكون السنابل وتكاملها ، وقلعت النباتات التي لوحظت عليها أعراض الإصابة المتمثلة بالإصفرار والتقرح على منطقة التاج والساق وتلون عقد السلاميات باللون البني وتهدل الاوراق السفلى على مجموعها الخضري وأستخدمت طريقة Waalwijk وآخرون (٢٠٠٣) باخذ ٥٠ سنبلة من الحقول المختارة بطريقة عشوائية وأزالة السفا عنها وتم غسلها بماء جار في إناء زجاجي وعقمت سطحياً بغمرها في محلول ١%هايبوكلوريت الصوديوم NaOcl لمدة دقيقتين جففت بين ورقتي ترشيح ثم نقل كل جزء بعد تقطيعه الى طبق بتري قطر٩سم وجرت الزراعة داخل غرفة الزرع المعقمة على وسط البطاطا والدكستروز الصلب Potato dextrose agar الجاهز المصنع من شركة Himedia بأذابة ٣٩.٥ غم في لتر ماء مقطر والوسط Carnation Leaf-Piece CLA Agar الخاص بتعريف أنواع Fusarium المتمثلة مكوناته بـ ٢% اكار وأوراق القرنفل المجففة في ٧٠ سليليزية لمدة ٣ ساعات ، وضعت ٥ قطع من اوراق القرنفل في كل طبق (٢٠٠٦) Summerell و Leslie و اضيف الى الوسطين المضاد الحيوي Chloromophenicol كلورمفينكول بمعدل ١٠٠ ملغم / ١لتر ، لوثت الأطباق بالفطريات المنقاة بأخذ أجزاء صغيرة من نهاية الغزل الفطري بتقنية Hyphal tip وحسبت نسبة عزلها حسب المعادلة :

% للفطر المعزول = عدد مستعمرات النوع الفطري / العدد الكلي للمستعمرات × ١٠٠

بعد ذلك تم تحضين الأطباق في حاضنة نوع بايندر Binder على درجة حرارة ٢٥ م (± ٢) وعرضت للإضاءة كل ١٢ ساعة بالتبادل مع الظلام. وبعد نمو المستعمرات الفطرية نقيت وتم تعريف الفطريات مجهريا كما تم قياس أبعاد الأبواغ

بأنواعها والحوامل البوغية بأستخدام المجهر Motic والبرنامج motic image plus 2.0ml الخاص بقياس أبعاد الأبواغ. وعرفت لمرتبة الجنس إعتماداً على المفتاح التصنيفي المعد من Barnnet و Hunter (٢٠٠٦) و Leslie وSummerell(٢٠٠٦)، وبالاعتماد على الصفات المزرعية لمستعمرات الفطريات والمواصفات المظهرية للغزل والتراكيب الثمرية والأبواغ وأبعادها.

التشخيص الجزيئي للدنا لبعض الفطريات المعزولة

١ .عزل الدنا DNA Isolation :

قمنا باستخدام العزلتين التي تم تشخيصهما مظهريا وهما النوعان *F. graminearum* و*F. culmorum* والتي تم عزلها من جذور وتيجان وسنابل نباتات القمح والشعير المصابة في عدة مناطق من محافظة صلاح الدين ومحافظة نينوى وبعد تنمية هاتين العزلتين على الوسط الزرعي Potato Dextrose Agar PDA على درجة حرارة ٢٥±٢°م لمدة سبعة ايام حسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة ZYMO RESEARCH **(أمريكا)**. بعدها تم تنقية تلك الفطريات باستخدام طريقة البوغ المفرد لكل فطر لأستخلاص الحامض النووي لكل منها على حدة كالأتي:

١-تم إضافة ٢٠٠ ملغم من الغزل الفطري إلى ZR BashingBead أنبوب التحليل Lysis tub وأضفنا اليه ٧٥٠ ميكرولتر من محلول التحلل Lysis solution .

٢-تم تثبيت العينات بجهاز الرجاج المزود بحامل مجموعة الأنابيب وتم أجراء العملية بأقصى سرعة لمدة ٥ دقائق .

٣-أجراء الطرد المركزي بجهاز الطرد المركزي الدقيق لأنابيب التحلل ZR BashingBead مع سرعة ١٠٠٠٠ / دورة لمدة دقيقة واحدة .

٤- تم نقل ٤٠٠ ميكرولتر من المادة الطافية لراشح العينة إلى الفلاتر Zymo-Spin (ذو لون برتقالي) المثبتة فوق أنبوب التجميع Collection tube ثم اجراء طرد مركزي على سرعة ٧٠٠٠ دورة لمدة دقيقة .

٥- اضافة ١٢٠٠ ميكروليتر من محلول ربط الحمض النووي الفطري DNA Binding Buffer إلى المرشح في أنبوب التجميع في الخطوة ٤ وثم اهمال كل فلاتر العينات وتبقى فقط أنابيب التجميع .

٦- نقل ٨٠٠ ميكرولتر من الخليط في الخطوة ٥ إلى فلاتر جديدة (ذات لون أبيض) تسمى Zymo-Spin IIC Column المثبتة في أنابيب تجميع جديدة واجراء طرد مركزي على سرعة ١٠٠٠٠ دورة لمدة دقيقة واحدة .

٧- تم اهمال كل محتويات أنابيب التجميع واعادة الفلاتر الى أنابيب التجميع وتكرار الخطوة ٦ ثم اهمال أنابيب التجميع .

٨- اضافة ٢٠٠ ميكرولتر من محلول الغسيل المسبق للحامض النووي DNA pre-wash Buffer إلى الفلاتر في أنابيب تجميع جديدة واجراء الطرد المركزي عند ١٠٠٠٠ دورة لمدة دقيقة واحدة.

٩- تم اضافة ٥٠٠ ميكرولتر من محلول غسيل الحامض النووي الفطري DNA wash Buffer الى الفلاتر في أنابيب التجميع ثم اجراء الطرد المركزي على سرعة ١٠٠٠٠ دورة لمدة دقيقة واحدة .

١٠- اهمال أنابيب التجميع بالكامل ونبقي على الفلاتر البيضاء حيث تنقل إلى أنبوب الطرد المركزي الدقيق المسمى بندروف (١.٥) ثم اضافة ٥٠ ميكرولتر (٣٥ ميكرولتر كحد أدنى) من محلول شطف الحمض النووي DNA Elution Buffer مباشرة إلى الفلاتر ثم اجراء الطرد المركزي على سرعة ١٠٠٠٠ / دورة لمدة ٣٠ ثانية فقط لأستخراج الحمض النووي ، تهمل الفلاتر ويؤخذ الراسب المتمثل بالحمض النووي DNA النقي .

٢. تقدير تركيز ونقاوة الدنا المستخلص:

تم تقدير تركيز DNA في العينات بعد تخفيفها الى ١٠٠ مرة باستعمال محلول TBE وقد استعمل جهاز NanoDrop للتعرف على تركيز DNA في العينات وتحديد نقاوتها.

٣ .تقدير الحجم الجزيئي للدنا DNA:

قدرت الأحجام الجزيئية للدنا إعتمادا" على إجراء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز، باستخدام دليل حجمي يمثل قطع من الدنا حجمها الجزيئي معلوم متمثلة بالدلائل الحجمية Markers. ان المسافات التي قطعتها هذه الجزيئات في الهلام تناسبت عكسياً مع أحجامها الجزيئية ، وقد أستعمل الدليل Sizer DNA Markers (intron)، إذ أعطى هذا الدليل في هلام الآكاروز حزم ذات أوزان جزيئية معروفة

المحاليل المستخدمة في عملية الترحيل:

١. محلول TBE بقوة X10 الذي تضمن التالي:
٨٩ مولار Tris-base ، ٠.٨٩ مولار Boric acid ، ٠.٠٢ مولار EDTApH 8 . لتحضير ١٠٠ مل من محلول TBE X١٠ تم اخذ ١٠.٨ غم من Tris-base مع ٥.٥ غم من حامض البوريك واذيبت في ٨٠ مل ماء مقطر ثم اضيف ٥مل من محلول Na_2EDTA بتركيز ٢٠.٤ مولار وضبط الاس الهيدروجيني pHعند درجة ٧.٨ ثم اكمل الحجم الى ١٠٠مل بالماء المقطر. بعدها عقم بالاوتوكليف.وعند استخدامه تم تخفيفه الى عشر مرات باستخدام الماء المقطر للحصول علىTBE X1.
٢. اكاروز نقي.
٣ـ الصبغة الحمراء السليمة.

طريقة تحضير هلام الاكاروز وعملية الترحيل الكهربائي DNA :

تحضير هلام الاكاروز: تم اعداد الاكاروز وفقًا لما ذكره Sambrook وآخرون،(١٩٨٩)، الذي كان بتركيز ١.٥ ٪ من خلال إذابة ١.٥ غرام من الاكاروز في ١٠٠ مل من محلول TBE المحضر مسبقًا. سخن الاكاروز لدرجة الغليان ثم ترك ليبرد عند حرارة ٤٥-٥٠ °م . سكب الجل بعدها في حوض التحميل لتحضير لوح الجل الذي ثبت في طرفه المشط لعمل ثقوب الخاصة بحمل العينات.ُسكب الجل برفق حتى لا تتكون فقاعات هواء وترك ٣٠ دقيقة ليبرد ثم ازيل المشط بلطف من الاكاروز الصلب. ثبتت بعدها الصفيحة على حاملها في الوحدة الأفقية ممثلة بالخزان الذي تم ملؤه بمحلولTBE X1 كي يتم تغطية سطح الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي.

تحضير العينة:

تم خلط ٢ ميكرولتر من محلول التحميل المجهز من شركة (Intron / كوريا) مع ٥ ميكرولتر من الحمض النووي النقي لغرض الترحيل كهربائيًا ، وبعد عملية الخلط ، تمت عملية التحميل في فتحات الهلام. وتم تشغيل الجهاز بتيار كهربائي قوة ٧ فولت / سم^{٢} لمدة ١ ساعة لحين وصول الصبغة إلى الجهة الثانية من الجل. وقد ضبطت الأقطاب ليكون إتجاه الترحيل للعينات نحو القطب الموجب مع مراعاة ايقاف الترحيل عند وصول الترحيل للعينات الى قبل نهاية الهلام.
تم اختبار الجل بأستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي ٣٣٦ نانومتر، بعد وضع الجل في حوض يحتوي على ٣ ميكرولتر من محلول صبغة الحمض النووي الحمراء السليمة و ٥٠٠ مل من الماء المقطر.

البادئات المستخدمة في التفاعل

حفظت البادئات بالتجميد، وتم إذابتها في ddH_2O الحر لإعطاء تركيز نهائي قدره ١٠٠ بيكومول/ميكرولتر كمحلول مخزون والاحتفاظ بالمخزون عند حرارة ٢٠- ° م لتحضير تركيز ١٠ بيكومول/ميكرولتر كعامل تمهيدي معلق. سحب ١٠ ميكرولتر من محلول المخزون واضيف الى ٩٠ ميكرولتر من الماء المنزوع الايونات ddH2O للوصول إلى الحجم النهائي ١٠٠ ميكرولتر. تم الأختبار اعتمادا الى تعليمات الشركة الكندية المصنعة (IDT).

١. البادئ النوعي للجين ITS

الكشف عن جينات ITS باستخدام تقنية PCR: تم إجراء الكشف عن الجين المتخصص ITS باستخدام بادئات للتضخيم. تم تضخيم جزء من ITS باستخدام البادئ الأمامي (ITS1 F: 5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′) والبادئ العكسي (ITS4 R: 5 ′ TCCTCCGCTTATTGATGC-3 3) (مجموعة بادئات مجهزة من شركة تقنيات DNA المتكاملة IDT الكندية). تم إجراء تضخيم PCR بحجم إجمالي قدره ٢٥ ميكرولتر يحتوي على ١.٥ ميكرولتر من الحمض النووي، و٥ ميكرولترTaq PCR PreMix (Intron ، كوريا)، ١ ميكرولتر من كل بادئ ثم تمت إضافة الماء المقطر إلى

الأنبوب للوصول الى الحجم الكلي من ٢٥ مايكرولتر. اجري التدوير الحراري تحت ظروف اشار اليها Vesna وآخرون (٢٠٠٢) وعلى النحو التالي: المسخ عند ٩٤ درجة مئوية لمدة ٣ دقائق، تلاها ٣٥ دورة عند ٩٤ درجة مئوية لمدة ٤٥ ثانية، ثم مرحلة الالتحام عند ٥٢ درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة وبعدها مرحلة الاستطالة الاولى عند ٧٢ درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة ثم الاستطالة النهائية عند ٧٢ درجة مئوية لمدة ٧ دقائق باستخدام Cycler الحراري (Gene Amp، PCR system 9700؛ Applied Biosystem). تم فصل منتجات PCR على هلام الاكاروز الكهربائي بتركيز ١.٥% بوجود الدليل الحجمي 1000 bp حيث حمل المزيج في حفر هلام الآكاروز ثم رحلت العينات بجهاز الترحيل الكهربائي لمدة ١.٥–٢ ساعة صبغت بالصبغة الحمراء (Intron Korea) وتم تصويرها باستعمال كاميرا دقيقة بعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية.

جدول (١) مكونات تفاعل التضخيم

ت	مكونات التفاعل	حجم المادة المضافة(µl)
١	D.W	١٦.٥
٢	Primer F	١
٣	Primer R	١
٤	Taq PCR PreMix	٥
٥	DNA	1.5

تم خلط ٣ ميكرولتر من المخزون المؤقت لتحميل المعالج (Intron / كوريا) مع ٥ ميكرولتر من الحمض النووي المفترض ليكون مرتحلاً كهربائيًا (صبغة التحميل) ، وبعد عملية الخلط ، تتم عملية التحميل في فتحات الهلام. تم تعريض تيار كهربائي بقوة ٧ فولت \ سي ٢ لمدة ١-٢ ساعة حتى تصل الصبغة إلى الجانب الآخر من الجل. تم اختبار الجل بواسطة مصدر للأشعة فوق البنفسجية مع ٣٣٦ نانومتر بعد وضع الجل في حمام مائي الذي يحتوي على ٣ ميكرولتر من محلول تلطيخ حمض نووي آمن أحمر و ٥٠٠ مل من الماء المقطر.

النتائج والمناقشة :

١- المسح الحقلي :

بينت نتائج المسح الحقلي والتقصي عن مرض اللفحة الرأسية للسنابل على الشعير لمناطق زراعة الشعير في محافظتي صلاح الدين ونينوى انتشار المرض بنسب متباينة وحسب الجدول (٢) اذ بلغ عدد الحقول المصابة بالمرض(الفحص العيني) ١٧ حقل من اصل ٢١ حقلاً شملت بعملية المسح اذ بلغت نسبة الاصابة بالمرض في هذه الحقول بين ٣.٢ – ٤.٧ % وبمتوسط ٢.٨ % وبشدة اصابة تراوحت بين ٠.٣- 0.9 % وبمتوسط 0.6 % حيث سجلت اعلى نسبة اصابة بالمرض في قضاء سامراء بمعدل ٤.٧ % بينما اقل نسبة اصابة سجلت في قضاء الشرقاط والحمدانية والقياره بمعدل٢.٣%. ويعود ارتفاع نسبة الاصابة وشدتها في بعض المناطق الى توفر الظروف البيئية الملائمة لنمو المسبب المرضي وانتشاره مثل درجة الحرارة والرطوبة. إن استخدام طرق الري الحديثة بالرش في سامراء والعلم وبيجي والحمدانية ادى الى ارتفاع مستوى الرطوبة اثناء فترات ارتفاع درجات الحرارة في شهر نيسان والتي تعد ظروفاً ملائمة لنمو الممرض والتي تكون فيها السنابل في مراحل التزهير والطور اللبني التي تعد مرحلة حساسة للاصابة بالمرض وهذا يتفق مع(Gilbert وHarber ،٢٠١٣.-Martinez Espinoza وآخرون ، ٢٠١٤).هناك عدة عوامل أخرى مثل الري المتكرر ، واتباع نظام زراعة الشعير بعد الذرة ، واعتماد عدم الحراثة أو الحراثة السطحية ، والزراعة من الأصناف المعرضة للإصابة ، وما إلى ذلك من ظروف تزيد أيضًا من فرصة انتشار المرض (Teli واخرون ، ٢٠١٦ .Palazzini وآخرون ، 2018)

جدول (٢) نسبة وشدة الاصابة بمرض لفحة السنابل للحقول التي تم اجراء الدراسة المسحية عليها

المحافظة	القضاء	نسبةالاصابة المئوية	شدة الاصابة المئوية
صلاح لدين	الشرقاط	٣.٢	0.5
	بيجي	3.5	0.9
	سامراء	4.7	0.9
	العلم	3.5	0.7
نينوى	قيارة	2.3	0.3
	الحمدانية	2.3	0.5
	حمام العليل	3.5	0.9
المتوسطات		2.9	0.6

العزل Isolation :

اظهرت البيانات المبينة في الجدول (٣) والمتعلقة بنسب العزل من سنابل ونباتات الشعير تفوق تكرار ظهور أنواع فطر*Fusarium SSP* مقارنةً بعزلات الفطريات الأخرى اذ بلغت اعلى نسبة لتكرار ظهور النوع *F. graminearum* ٢٠%من النبات البالغة و٣٥% من السنابل تلاه النوع *F. culmorum* وبنسبة قاربت ١٥% من النباتات و ٢٠% من السنابل ثم تبعها النوع *F. poae* بنسبة ١٥% من النباتات و ١٠% من السنابل ، كما ظهرت أجناس أخرى مع الفطر*spp Fusarium* في الظهور وكانت اعلى نسبة ظهور الفطر*Alternaria spp* وبنسبة ٢٥% على النباتات البالغة و ٢٠% على السنابل ثم تبعة الفطر*Aspergillus spp* بنسبة الظهور ٥% على النباتات البالغة و١٠% على السنابل ، والفطر *Helminthosporum spp* بنسبة ٥% على النباتات البالغة بينما على السنابل ظهر بنسبة ١٠% ويعود سبب انخفاض نسبة ظهور الفطرين *Aspergillus spp* و*Penicillium spp* لكونهما يعدان من الفطريات المشهورة مخزنياً ومحدودية أمراضيتهما للنباتات في الحقل(Thalji, و Al Momany ، ٢٠١٥).كما يلاحظ زيادة عزل الفطر *F. graminearum* و *F. culmorum* ثم *F. poae* مقارنة مع الأنواع الأخرى للفطر Fusarium أثناء العزل من نباتات وسنابل القمح (الشعبي وآخرون ، ٢٠١٨.القيسي وآخرون ، ٢٠٢١).

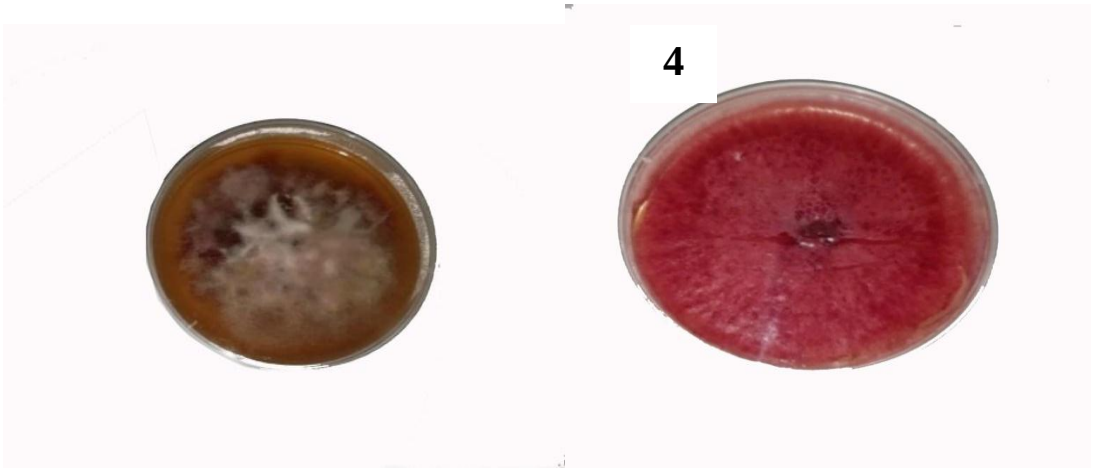
جدول (٣) النسبة المئوية للفطريات المعزولة من نباتات الشعير والسنابل

العزلات	العزل من النباتات	العزل من السنابل
Alternaria spp.	٢٥%	٢٠%
Aspergillus spp.	٥%	١٠%
F. graminearum	٢٠%	٣٥%
F. culmorum	١٥%	٢٠%
F. poae	١٥%	١٠%
Helminthosporum spp	٥%	%١٠
Penicillium spp	%٥	%٥

التشخيص المظهري :

بعد تنقية المستعمرات لاحظنا وجود مستعمرات لونها أبيض بشكل عام مع وجود لون وردي والذي تغير مع تقدم عمر المستعمرة إلى اللون البني مكونة وسادة فطرية محدودة التكوين عند تنميتها على وسط أوراق القرنفل Carnation Leaf (CLA) Agar. كما ان مقلوب الطبق كان بلون برتقالي شاحب. وقد نمت المستعمرات الفطرية بسرعة على الوسط PDA وكانت ألوانها عديدة تتمثل بالأبيض أو البرتقالي شاحب أو الأصفر أو البني محمر.كذلك ظهرت تحت المجهر أبواغ كونيدية كبيرة Macroconidia مقوسة الشكل من جانبها الظهري والأبواغ نحيفة لها جدران سميكة أطوالها متوسط ومنحنية أو مستقيمة في جانبها البطني وخليتها القاعدية متميزة والقمية مستدقة تقريباً ويتراوح عدد الحواجز في الابواغ الكبيرة بين ٣ الى ٧ حواجز. اما ابعاد الأبواغ فقد تباينت تبعاً لعدد الحواجز اذ كانت تلك التي تمتلك ثلاثة حواجز عند ٣.٧×٣٢.٥-٣٧ مايكروميتر والتي تمتلك من ٥ الى ٧ حواجز أبعادها عند ٤٨-٥٣×٣.٧-٥ ميكروميتر. ايضاً لوحظ ان الفطر (المجهول) لايكون ابواغاً كونيدية صغيرة Microconidia . الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores للفطر مختلفة في تكوينها وغالباً ما تكون الأبواغ البطيئة التكوين أكثرها شيوعاً تلك التي تتكون على الابواغ الكونيدية الكبيرة، كما تكونت في الغزل الفطري فرادا بابعاد بين ١٠ـ١٢ مايكروميتر. المواصفات المشار اليها في اعلاه تنطبق على مواصفات نوع الفطر *F. graminearum* وقد اتفقت النتائج هذه مع ما ذكره Nelson و آخرون(١٩٨٣) و Leslie وSummerell (٢٠٠٦). كما توافقت النتائج مع ما أشار اليه كل من (الكبيسي ،٢٠١٣ .الطائي وطه ،٢٠١٨ . القيسي وآخرون ،٢٠٢١) في امكانية عزل الفطر من نباتات القمح والشعير المصابة في مناطق مختلفة من العراق.

كما تم مشاهدة مستعمرات ذات `لون احمر يميل الى البني والأبواغ الكونيدية الكبيرة Macrocondia قوية وقصيرة نوعاً ما ومحاطة بجدران سميكة جانبها الظهري منحني نسبياً والجانب البطني مستقيم تقريباً لها ٣-٤ حواجز أعدادها غزيرة وذلك عندما أصبح عمر مستعمرة الفطر سبعة ايام على الوسط الذي فيه أوراق قُرنفل. حوامل الكونيديا ذات شكل متفرع على غزل الفطر تتجمع وتكون شكل الوسادة الفطرية Sporodochium لها ابعاد تراوح مابين ٤-٧ × ٣٥-٥٠ مايكروميتر. الشكل بيضوي ويميل الى الكروي هو ماتتمييز به أبواغ الكلاميديا والتي تتكون بين خلايا غزل الفطر أو على الطرفين ملمسها أملس الى خشن والأبعاد تتراوح من ٩-١٣ ميكروميتر وكانت بشكل منفرد أو تتجمع فتعطي شكل السلاسل، ولا تحتوي على الأبواغ الكونيدية الصغيرة Microconidia . صفات المستعمرات الفطرية المبينة آنفاً ترجع لنوع فطر *F. culmorum* وإن هذا الوصف يتوافق مع نتائج ذكرها Nelson و آخرون (١٩٨٣) و Leslie و Summerell (٢٠٠٦) و (Desjardins ، 2006) و(Munkvold ، ٢٠١٧) و(Minati ، ٢٠١٩).

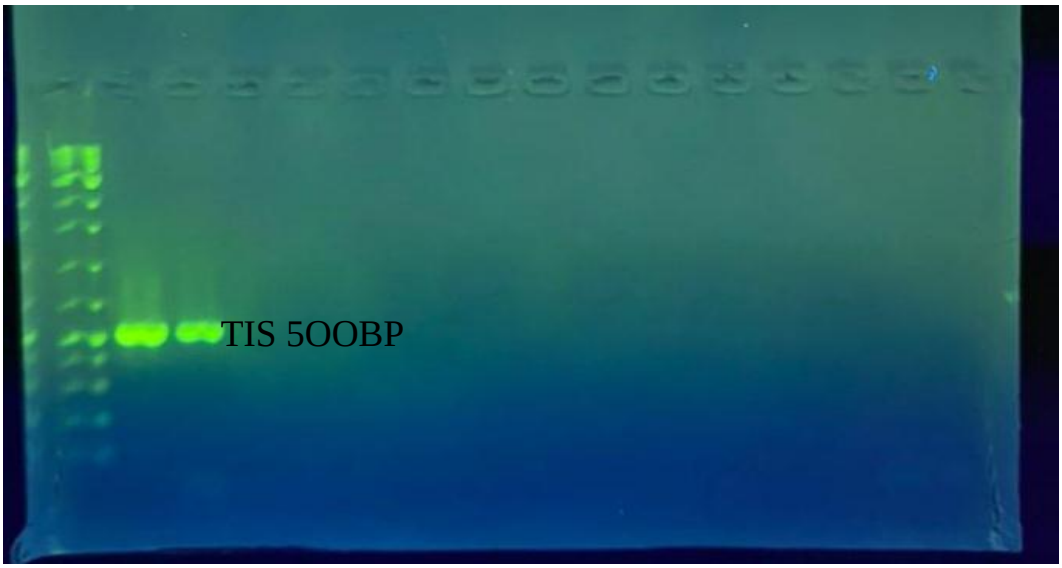


الصورة (١)الفطريات المعزولة ١- مستعمرة فطر *F. graminearum* على PDA ٢- ابواغ كبيرة Macroconidia للفطر *F. culmorum* ٣-الابواغ الكلاميدية لفطر *F. culmorum* عمر ٢٠ يوما ٤- فطر *F. graminearum* نامي على PDA ٥-ابواغ كبيرة Macroconidia للفطر *F. graminearum* ٦- حوامل كونيدية Conidiophores والابواغ الكلاميدية Chlamydospores . قوة التكبير على المجهر x٤٠٠

تأكيد تشخيص الفطريات جزيئياً :

أوضحت النتائج التي تم الحصول عليها من التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية التي تسببت بالأصابة بلفحة السنابل في حقول الشعير هما النوعين *F.graminearum* و *F. culmorum* وباستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ، Polymerase Chain Reaction (PCR) من خلال استخدام زوج بادئات المتخصصة للكشف عن الجينات في منطقة فاصل النسخ الداخلي ITS Internal transcribed spacer (ITS) الذي استعمل فيه البادئ الأمامي (ITS1 F: 5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′) والبادئ العكسي (ITS4 R: 5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′). واظهرت النتائج من تحليل الهجرة الكهربائية باستعمال الاكاروز ٢ % في ظهور حزمة بحجم ٥٤٤ زوج قاعدي وهو الحجم الذي تم توقعه الذي تظهر عنده بادئات المتخصصة للكشف. ولأن البادئان يقعان داخل التكوين الجيني لكل من الفطر *F.graminearum* والفطر *F. culmorum* فانه يتأكد بشكل نهائي أن عزلتي الفطر التي تم تشخيصهما بالتشخيص المظهري على الاوساط الزرعية تعود الى الفطرين المذكورين آنفاً. إن هذه النتيجة التي تم الوصول اليها تتفق مع (Nielsen وآخرون ، ٢٠١١ . Bekalu وآخرون ، ٢٠٢٠) الذين أكدوا أن التشخيص لعزلات الفطرين*F.graminearum* و *F. culmorum* يمكن أن يتم استعمال بادئات تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل.

M 1 2



١- تمثل عزلة الفطر *F.graminearum*

٢-تمثل عزلة الفطر *F . culmorum*

صورة (2) ناتج تقانة البلمرة المتسلسل على حجم ٥٠٠ زوج قاعدة وترحيل كهربائي ٢% لمدة ١:٣٠ ساعة

ولكي يتم تحديد هوية عزلتي الفطرين *F.graminearum* و *F . culmorum* فقد تم تضخيم الجينات المتخصصة Specific primers عند منطقة الفاصل الداخلي ITS وهي من النوع rRNA وباستعمال بادئات ITS1 و ITS4. وتم بعد تشخيص العزلات جزيئياً وتأكدت مطابقتها مع نسخ تركيبة جزيئية لهذه الانواع وهي مخزونة في بنك الجينات التابع الى الموقع العالمي للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI). وتبين من خلال مقاطعة المحتوى الجيني لتلك العزلات انها ذات مطابقة بنسبة ٩٩٪ مع العزلات العالمية **MN452715.1** و **KY272845.1** في حالة العزلات من الفطر *Fusarium graminearum* كما بينت المطابقة التشخيصية الجزيئية في حالة العزلات من نوع الفطر *Fusarium culmorum* دقة تشخيصية عند ٩٩% مع العزلة العالمية MT032704.1ـ وان غطاء الاستعلام للتسلسل كان عند ٩٩٪ وان قيمة الخطأ هي عند ٠.٠. وان النتائج التي تم الحصول عليها قد اظهرت توافقا بنسبة ٩٩٪ .

جدول (٤) قيم التوافق الجزيئي بين عزلات الاصابة من فطريات *F.graminearum* و *F. culmorum* مع العزلات العالمية.

Gene: 16S ribosomal RNA gene						
No.	**Type of substitution**	**Location**	**Nucleotide**	**Sequence ID with compare**	**Source**	**Identities**
1	**Transition, Transvertion**	**378**	**N(A,C,G,T)\C**	**ID: MN452715.1**	*Fusarium graminearum*	**99%**
2	**Transition**	**352**	**T\C**	**ID: MT032704.1**	*Fusarium culmorum*	**99%**

المصادر

- **الشعبي، صالح، صفية المصري، عدنان نحالوي، لينا المطرود وتيسير أبو الفضل.(٢٠١٨).**تقصي انتشار مرض لفحة فيوزاريوم سنابل القمح ومسبباته في سهل الغاب في سورية، والتباين في قدرا تها االمراضية في سهل الغاب في سورية .مجلة وقاية النبات العربية، 98- 113. :36
- **الطائي ، علي كريم و زه رده شت عبد الوهاب طه.(٢٠١٨).** أول تشخيص للفطر Fusarium poae المسبب لتعفن جذور الحنطة في شمال العراق ، مجلة علوم الرافدين، المجلد ٢٧ ،العدد ٥ ، ص ١٦٢-١٦٨ .
- **العامري، مثنى عبد الباسط علي** (٢٠١٠)، تقويم الأداء وتقدير المعالم الوراثية وأدلة الانتخاب لمدخلات جديدة من الشعير(*Hordeum vulgare*)، رسالة ماجستير، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل .
- **القيسي، عبير رؤوف محمود، عبدالله عبد الكريم حسن، وليد محمد صالح وفاتن حسن يحيى. (٢٠٢١).**تقويم كفاءة بعض مؤشرات المقاومة الجزيئية لأصناف من القمح في مقاومة مرض لفحة السنابل المتسبب عن الفطر *Fusarium graminearum* في محافظة صالح الدين، العراق. مجلة وقاية النبات العربية (39)2 : 96-108.
- **الكبيسي، علي صادق محمد (٢٠١٣)** . تشخيص مسببات تعفن جذور الشعير في منطقتي تلعفر والحمدانية ومكافحتها . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل ، العراق .
- **اليونس،** عبدالحميد احمد (١٩٩٣) . إنتاج وتحسين المحاصيل الحقلية ، الجزء الأول . مطبعة الكتب للطباعة والنشر ، بغداد ،العراق، ٤٦٩ صفحة .

- **De Villiers, C. I. P. (2009).** A comparison of screening techniques for Fusarium head blight of wheat in South Africa (Doctoral dissertation, University of the Free State).
- **Bekalu, Z. E., Krogh Madsen, C., Dionisio, G., Bæksted Holme, I., Jørgensen, L. N., S Fomsgaard, I., and Brinch-Pedersen, H. (2020).** Overexpression of nepenthesin HvNEP-1 in barley endosperm reduces Fusarium head blight and mycotoxin accumulation. Agronomy, 10(2), 203.
- **Atkins, S. D., and Clark, I. M. (2004**). Fungal molecular diagnostics: a mini review. J Appl Genet, 45(1), 3-15.
- **Barnet, H. L. and B.B. Hunter (2006).** Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. 241pp.
- **Blattner, F. R. (2018**). Taxonomy of the genus Hordeum and barley (Hordeum vulgare). In The Barley Genome (pp. 11-23). Springer, Cham**.**
- **Chakraborty, S., Liu, C. J., Mitter, V., Scott, J. B., Akinsanmi, O. A., Ali, S., ... and Simpfendorfer, S. (2006**). Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and Fusarium head blight management. Australasian Plant Pathology, 35(6), 643-655.
- **Chelkowski, J. (1989**). Formation of mycotoxins produced by Fusaria in heads of wheat, triticale and rye. Pages 63-84 in: Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy, and Pathogenicity. J. Chelkowski, ed. Elsevier Press, Amsterdam
- **Gilbert, J., and Haber, S. (2013).** Overview of some recent research developments in Fusarium head blight of wheat. Canadian Journal of Plant Pathology, 35(2), 149-174.
- **Jones, R. K. (2000).** Assessments of Fusarium head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. Plant Disease, 84(9), 1021-1030.

- **kheev, A. A., Ryazantsev, D. Y., Gagkaeva, T. Y., and Zavriev, S. K. (2011).** PCR detection of Fusarium fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. Food Control, 22(3-4), 462-468.
- **Lamichhane, J. R., Dürr, C., Schwanck, A. A., Robin, M. H., Sarthou, J. P., Cellier, V., ... & Aubertot, J. N. (2017**). Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *37*(2), 1-25.
- **Leslie, J. F., and Summerell, B. A. (2006).** The Fusarium Laboratory Manual Blackwell. John F. Leslie and Brett A. Summerell., Ed, 1-388.
- **Liu, J., and Applegate, T. (2020).** Zearalenone (ZEN) in livestock and poultry: dose, toxicokinetics, toxicity and estrogenicity. *Toxins*, *12*(6), 377.
- **Martinez-Espinoza, A., Ethredge, R., Youmans, V., John, B., and Buck, J. (2014).** Identification and Control of Fusarium Head Blight (Scab) of Wheat in Georgia.
- **McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., and Van Sanford, D. (2012**). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. Plant Disease, 96(12), 1712-1728.
- **Michenny,H.H.(1923)** Influence of Soil temperature and moisture on infection of wheat seeding by Helminthosporium sativum. Journal Agriculture Research.26:195-217.
- **Minati ،Mohammed Hussein(٢٠١٩). .** Isolation, Identification, Pathogenicity and Toxicity of some Fungi associated with Head Blight and Crown Rot Diseases on Wheat in Basrah. Doctor of Philosophy (PhD). University of Basrah
- **Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O. (1983).** Fusarium species: an illustrated manual for identification.
- **Nielsen, L. K., Jensen, J. D., Nielsen, G. C., Jensen, J. E., Spliid, N. H., Thomsen, I. K., ... and Jørgensen, L. N. (2011).** Fusarium head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. Phytopathology, 101(8), 960-969.
- **Palazzini, J. M., Torres, A. M., and Chulze, S. N. (2018).** Tolerance of triazole-based fungicides by biocontrol agents used to control Fusarium head blight in wheat in Argentina. Letters in applied microbiology, 66(5), 434-438.
- **Teli, B., Chattopadhyay, A., Meena, S. C., Gangwar, G. P., and Pandey, S. K. (2016).** Present status of Fusarium head blight of wheat and barley in India. Diseases of wheat and their management, 79-92.
- **Thalji, T., and Al Momany, A. (2015**). Effect of Fungi on viability farmers wheat seeds stored for planting in Jordan. Jordan Journal of Agriculture Sciences, accepted.
- **Waalwijk, C., Kastelein, P., de Vries, I., Kerényi, Z., van der Lee, T., Hesselink, T., and Kema, G. (2003).** Major changes in Fusarium spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, *109*(7), 743-754.
- **Xu, J. R., Peng, Y. L., Dickman, M. B., & Sharon, A. (2006).** The dawn of fungal pathogen genomics. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *44*, 337-366.